

刘天平,黎桂玲,刘科,等. *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(4): 35-40.

Liu TP, Li GL, Liu K, et al. Establishment of chimeric rabbits with *FOXN1* gene knockout [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(4): 35-40.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.04.005

FOXN1 基因敲除兔嵌合体的建立

刘天平^{1,2}, 黎桂玲², 刘科², 陈傍柱^{2*}, 王刚^{2*}, 顾为望^{1,2*}

(1.五邑大学药学与食品工程学院,广东省医学大动物模型重点实验室,广东 江门 529020;

2.广东省医学实验动物中心,南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院),广东 佛山 528248)

【摘要】目的 建立 F_0 代 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体,以探究普通饲养环境免疫缺陷兔活体保种的方法。方法 首先,利用 CRISPR/Cas9 技术,将构建好的 sgRNA 和 Cas9 蛋白注入兔二细胞期胚胎的一个细胞中,以获得 *FOXN1* 基因编辑嵌合体胚胎。然后,胚胎移植至代孕母兔。最后,通过 PCR 技术以及 Sanger 测序方法鉴定 F_0 代仔兔基因型,并观察其在普通饲养环境生长发育的情况。结果 PCR 结合 Sanger 测序结果表明 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体构建成功。经观察,嵌合体在普通环境下生长发育良好,无免疫缺陷表型。结论 本研究初步建立了在普通环境下可正常生长发育的 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体,为后续进一步繁育 *FOXN1* 免疫缺陷兔奠定了研究基础。

【关键词】*FOXN1*; 基因敲除兔; 免疫缺陷; 嵌合体

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856 (2024) 04-0035-06

Establishment of chimeric rabbits with *FOXN1* gene knockout

LIU Tianping^{1,2}, LI Guiling², LIU Ke², CHEN Bangzhu^{2*}, WANG Gang^{2*}, GU Weiwang^{1,2*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Large Animal Models for Biomedicine, School of Pharmacy and Food Engineering, Wuyi University, Jiangmen 529020, China. 2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Foshan 528248)

【Abstract】Objective To establish F_0 generation chimeric rabbits with *FOXN1* gene knockout and explore method for the in vivo conservation of immunodeficient rabbits in a conventional housing environment. Methods Initially, CRISPR/Cas9 technology was employed to inject constructed sgRNA and Cas9 protein into a single cell from rabbit two-cell stage embryos to obtain chimeric embryos with *FOXN1* gene editing. The embryos were subsequently transferred into surrogate does. Finally, the F_0 generation offsprings were genotyped using PCR and Sanger sequencing, and their growth and development in a conventional housing environment were observed. Results The PCR and Sanger sequencing result confirmed the successful establishment of chimeric rabbits with *FOXN1* gene knockout. On observation, the chimeras

【基金项目】国家自然科学基金(82101937);广东省科技计划项目(2019A030317012,2021B1212040016);广东省医学科研基金项目(B2024069)。

【作者简介】刘天平(1996—),男,硕士,研究方向:疾病模型制备与研究。E-mail:liutianping011@163.com

【通信作者】陈傍柱(1989—),男,博士,研究方向:疾病模型制备与研究。E-mail:chenbangzhu0619@qq.com

王刚(1966—),男,正高级兽医师,研究方向:实验动物品系培育。E-mail:wangzhy2005@21cn.com

顾为望(1956—),男,教授,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail:guww100@163.com

* 共同通信作者

exhibited normal growth and development in a conventional environment without any immunodeficient phenotypes.

Conclusions This study established a preliminary chimeric rabbit model with *FOXN1* gene knockout that grows and develops normally in standard laboratory environments. This lays the foundation for the further breeding of *FOXN1* immunodeficient rabbits in the future.

[Keywords] *FOXN1*; gene knockout rabbit; immune deficiency; chimera

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

先天性免疫缺陷动物是指由于先天基因突变导致免疫系统功能缺陷的动物模型。免疫缺陷动物在科学研究中有着重要的应用价值,被广泛用于肿瘤移植^[1]、人源化免疫重建^[2]、人源化肝制备^[3]、异种组织移植^[4]等。免疫缺陷相关的突变基因有 *RAG1*^[5]、*IL2RG*^[6]、*FOXN1*^[7]等。其中,最常用的裸小鼠和裸大鼠都是由于 *FOXN1* 基因纯合突变引起^[8]。*FOXN1* 基因是一种编码核转录因子的基因,在胚胎发育和免疫系统中有重要作用。*FOXN1* 基因的突变失活会导致胸腺发育不全和 T 细胞免疫缺陷,产生严重的免疫缺陷疾病。目前已有报道通过 *FOXN1* 基因敲除,可制备免疫缺陷裸兔^[9]。但免疫缺陷动物容易被感染病原体,在普通环境下难以长期存活,需要在无菌环境或者无特定病原体屏障设施 (specific pathogen free, SPF) 内饲养^[10]。事实上,除了啮齿类动物以外,至今其他免疫缺陷动物尚未能实现规模化生产。

通过 CRISPR/Cas9 技术制备基因编辑动物时, F_0 代容易形成嵌合体。已有研究表明,将构建好的 sgRNA 和 Cas9 蛋白或 Cas9 mRNA 注入二细胞期胚胎的一个细胞中,可以有效获得基因编辑嵌合体胚胎^[11]。利用该方法,可一步法制备嵌合体来实现纯合致死基因动物的保种繁育。此外,也有研究表明通过嵌合体猪可实现免疫缺陷猪的保种^[12]。为了今后能在 SPF 环境中高效培育 *FOXN1* 基因敲除免疫缺陷裸兔,本研究初步尝试了通过二细胞期胚胎注射法建立能在普通环境下正常生长发育的 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体,为免疫缺陷裸兔的培育提供了一定的研究基础和经验。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物采用普通级新西兰兔,雌性 8 只,3.0~4.0 kg,6~12 月龄;雄性 3 只,4.0~5.0 kg,6~12 月龄,购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2019-0035]。实验动物饲养于广东省医学实验动物中心普通级环境[SYXK(粤)2022-0002],室温

18~25℃,湿度 50%~60%,通风良好,12 h/12 h 光照黑暗交替,自由饮食。该动物实验和麻醉经广东省医学实验动物中心动物福利伦理审查批准(B202309-16),实验动物饲养和实验过程中遵循实验动物使用的 3R 原则,尽可能减轻实验过程中动物所受到的痛苦。

1.2 主要试剂与仪器

体外转录试剂盒 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit(E2050 S, NEB, 美国); Cas9 蛋白(Z03389, 金斯瑞生物科技股份有限公司, 美国); 2× Fast Pfus PCR Master Mix(G3305, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 孕马血清促性腺激素(PMSG)(22111102, 杭州动物药品厂); 人绒毛膜促性腺激素(HCG)(220912, 杭州动物药品厂); 促性腺素释放素(GnRH)(230217, 杭州动物药品厂); 青霉素钾、硫酸链霉素、牛血清白蛋白均来自 Sigma 公司。PCR 基因扩增仪(ETC811, 苏州东胜兴业科学仪器有限公司); 水平电泳仪(DYCP-31DN, Bio-Rad, 美国); 显微操作仪(DMi8, Leica, 德国); 拉针仪(MP-500, 深圳瑞沃德生命科技有限公司, 中国); 锻针仪(MF-900, NARISHIGE, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 sgRNA 设计

利用 sgRNA 设计网站 CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), 针对兔 *FOXN1* 基因位点(Gene ID:100346912), 在 2 号外显子上设计 1 个 sgRNA, sgRNA 靶点序列为 5'-GTACAAGCGGCATG TCCACG-3', PAM 位点为 AGG。

1.3.2 sgRNA 体外转录模板合成和纯化

合成寡链核苷酸片段, RB-FOXN1-crRNA1: 5'-AAGCTAATACGACTCACTATACTACAAGCGGCA TGTCCACGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3' 和 sgRNAT7 common: 5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCC ACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAA CTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'。通过 PCR 得到含 T7 启动子的 sgRNA 体外转录模板。模板大小在 120 bp 左右。PCR 反应体系为: H_2O 73.5 μL , 2×

Fast Pfus PCR Master Mix 75 μL , RB-FOXN1-crRNA1 (浓度 100 pmol/ μL) 0.75 μL , sgRNAT7 common (浓度 100 pmol/ μL) 0.75 μL 。反应条件为:预变性 98 $^{\circ}\text{C}$, 120 s;变性 98 $^{\circ}\text{C}$, 20 s;退火 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s;延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 15 s;终延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 300 s;扩增 35 个循环。合成的 sgRNA 体外转录模板采用苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, pH>7.8) 进行抽提后,再用乙醇醋酸钠沉淀纯化。最后用 20 μL 无酶水重悬,并测定 DNA 浓度。

1.3.3 sgRNA 的体外转录和纯化

采用 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit,按照说明书进行 sgRNA 体外转录。合成的 sgRNA 采用苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1, pH<5.0) 进行抽提后,再用乙醇醋酸钠沉淀纯化。最后用 60 μL 无酶水重悬并测定 RNA 浓度,分装成每管 5 μL ,置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.4 同期发情和超数排卵

兔子根据外阴颜色判断发情状态。挑选处于发情间期的母兔进行超数排卵,方法如下:(1)首先,对处于发情间期的供体母兔进行皮下注射 150 IU 的 PMSG。(2)然后,约 72 h 后将其与公兔放入同一笼中进行配种,并静脉注射 150 IU 的 HCG 促进排卵。与此同时,挑选处于发情期的代孕母兔肌肉注射 15 μg 的 GnRH。(3)配种后 22 h,供体母兔用盐酸塞拉嗪麻醉后 CO₂ 安乐死,取卵。

1.3.5 显微注射

配置 sgRNA (终浓度为 50 ng/ μL) 和 Cas9 蛋白 (终浓度为 50 ng/ μL) 显微注射混合液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后备用。显微注射时,将混合液注入兔二细胞期胚胎的一个细胞中,以获得 FOXN1 基因编辑嵌合体胚胎。显微注射完毕后,置于 5% CO₂, 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 条件培养 30 min。

1.3.6 胚胎移植

代孕母兔肌肉注射盐酸塞拉嗪后,用 4% 异氟烷呼吸诱导麻醉,用 2% 异氟烷维持呼吸麻醉。手术备皮,消毒,侧卧位。后侧腹部开 2~3 cm 切口,逐层切开皮肤、肌肉层和腹膜,暴露输卵管和卵巢。将胚胎装载至兔胚胎移植管中。移植管从输卵管的伞部开口插入至 2~3 cm,将胚胎推入至输卵管。最后逐层缝合伤口。双侧移植,8 枚胚胎/侧。

1.3.7 分娩与护理

术后 3 天预防感染。母兔孕期自由采食,自由饮水。母兔妊娠期 31 d。分娩前 1 周移至产笼待

产。仔兔由母兔正常哺乳。

1.3.8 基因型分析与鉴定

采集少量兔子的对应组织或体液,用 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后 PCR 扩增 FOXN1 基因靶点。PCR 引物为:FOXN1-F:5'-CTCTGTCCACCCAGAAG CAC-3'; FOXN1-R:5'-CAGAGGACCCAAGACAG CTG-3'。反应体系为:H₂O 19 μL , 2 $\times$ Fast Pfus PCR Master Mix 25 μL , FOXN1-F (浓度 10 pmol/ μL) 2 μL , FOXN1-R (浓度 10 pmol/ μL) 2 μL , 兔 DNA (浓度约 100 ng/ μL) 2 μL 。反应条件为:预变性 98 $^{\circ}\text{C}$, 120 s;变性 98 $^{\circ}\text{C}$, 20 s;退火 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s;延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 15 s;终延伸 72 $^{\circ}\text{C}$, 300 s;扩增 35 个循环。PCR 产物通过 Sanger 测序方法鉴定 F₀ 代仔兔基因型。

2 结果

2.1 仔兔出生情况

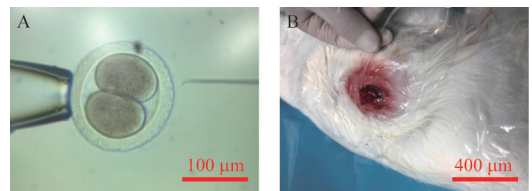
二细胞期胚胎显微注射后移植至 2 只代孕母兔 (图 1)。其中一只代孕母兔于移植后第 18 天时拔毛返情,未能产出仔兔。而另一只妊娠 31 d 后顺利产出 6 只仔兔,均健康存活。

2.2 基因型鉴定

针对新西兰兔设计了 FOXN1 基因靶点 (图 2A), PCR 产物 Sanger 测序结果发现:本实验成功获得了一只 FOXN1 基因敲除兔嵌合体 (图 2B), 其余均为野生型。经 tide 网站 (<https://tide.nki.nl/>) 定量评估基因编辑效果 (图 3)。

2.3 生长观察

目前, FOXN1 基因敲除兔嵌合体在普通环境下健康生长,除了胡子弯曲和毛发略微蓬松稀疏外,未见其他明显异常。记录了 FOXN1 基因敲除嵌合体兔和同龄野生型兔的生长曲线 (图 4), 二者无明显差异。

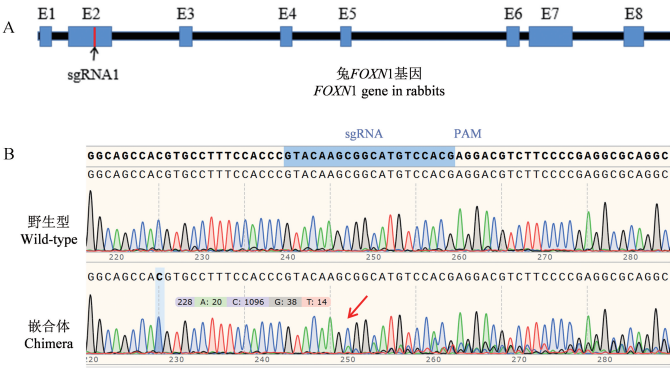


注:A:二细胞期胚胎显微注射,只注射其中一个细胞,生成嵌合体; B:兔胚胎移植手术。

图 1 建立 FOXN1 嵌合体胚胎

Note. A, Microinjection of two-cell stage embryos, injection into only one cell to generate chimeras. B, Rabbit embryo transplantation surgery.

Figure 1 Generation of FOXN1 chimeric embryos

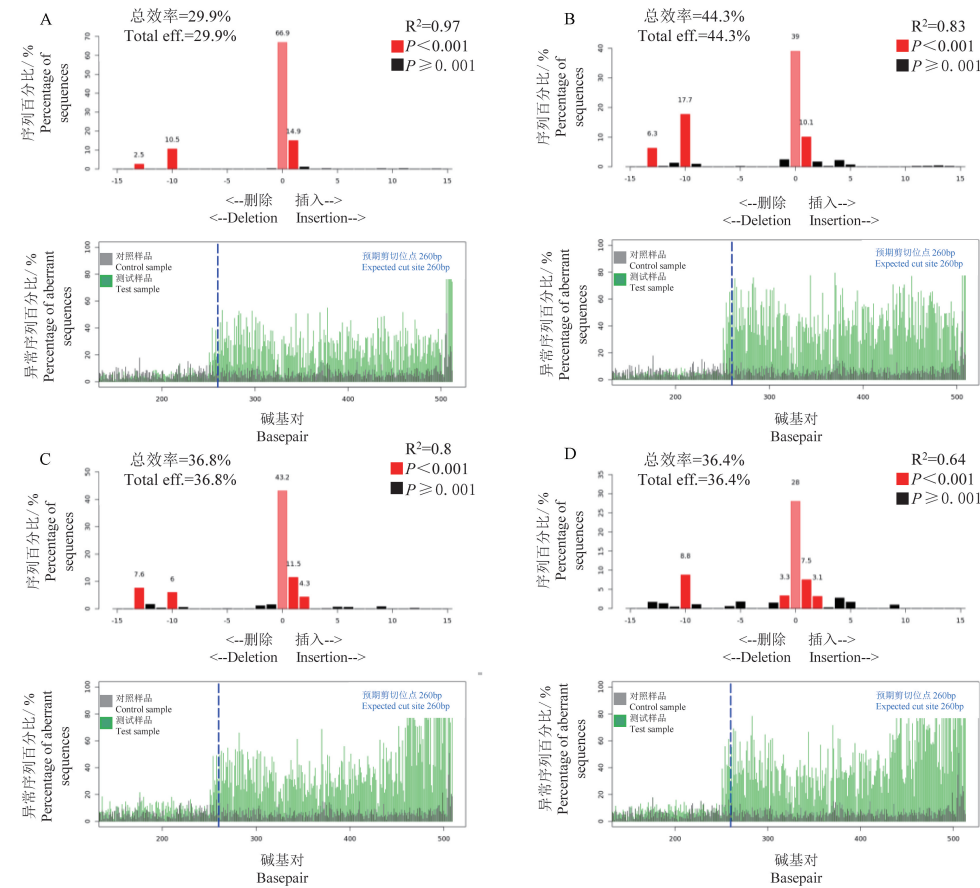


注:A:针对新西兰兔 *FOXN1* 基因的第二个外显子设计了 sgRNA;B:PCR 产物 Sanger 测序结果可见 sgRNA 靶点后有测序套峰(红色箭头所示),提示该仔兔为 *FOXN1* 嵌合体。

图 2 *FOXN1* 基因靶点和 F₀ 代 Sanger 测序结果比对图

Note. A, sgRNA targeting the second exon of the *FOXN1* gene in New Zealand rabbits was designed. B, Sanger sequencing results of the PCR product show sequencing peaks after the sgRNA target site (indicated by red arrows), indicating that this rabbit is a *FOXN1* chimera.

Figure 2 Alignment of the target site of *FOXN1* gene and Sanger sequencing results of the F₀ generation

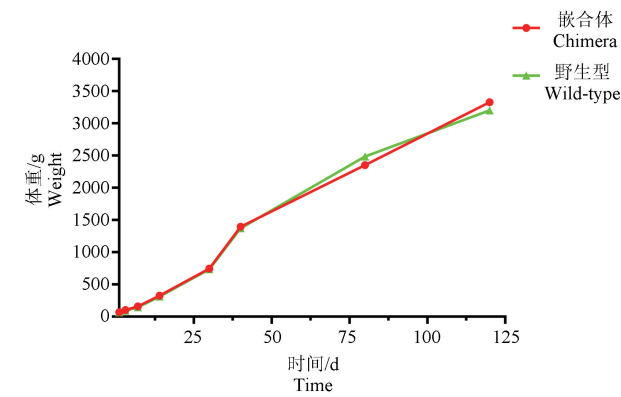


注:A:尾部组织 DNA(突变比例 29.9%);B:耳组织 DNA(突变比例 44.3%);C:血液 DNA(突变比例 36.8%);D:精子 DNA(突变比例 36.4%)。各小图的上部分为 *FOXN1* 靶点经编辑后发生碱基插入、删减等变异比例分析统计图;下部分为 *FOXN1*-sgRNA 靶点切割位点分析统计图,预测 DNA 的主要被切割位点。

图 3 定量评估基因编辑效果

Note. A, DNA from tail tissue (mutation rate 29.9%). B, DNA from ear tissue (mutation rate 44.3%). C, DNA from blood (mutation rate 36.8%). D, DNA from sperm (mutation rate 36.4%). In each figure, the upper part presents statistical analyses of the proportions of mutations such as base insertions and deletions observed after editing at the *FOXN1* target site; the lower part includes statistical analyses of the cutting site for the *FOXN1*-sgRNA target, predicting the primary DNA cleavage sites.

Figure 3 Quantitative evaluation of gene editing effectiveness



注:生长曲线显示 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体能在普通环境下健康生长。

图 4 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体与同龄野生型兔的生长曲线图

Note. Growth curve show that *FOXN1* gene knockout chimeric rabbit can grow healthily in a normal environment.

Figure 4 Growth curve graph of *FOXN1* gene knockout chimeric rabbit compared to wild-type rabbit of the same age

3 讨论

本研究作为培育 *FOXN1* 基因敲除兔种群的前期预实验,只移植了 2 只代孕母兔,仅获得了 1 只嵌合体,案例略显不足。兔性成熟时间较长,至少四月龄以上才能配种。目前该兔依然健康存活,已检测到其精子 DNA 也存在一定比例的 *FOXN1* 突变,理论上可通过进一步繁育获得 *FOXN1* 纯合突变的免疫缺陷裸兔。由于二细胞期胚胎的显微注射技术难度较大,容易造成胚胎中被注射的细胞后续发生死亡或停止生长发育,而胚胎中未经注射的细胞则继续发育成野生型个体^[12],因此可能导致最终出生的嵌合体数量比例较低。在本次研究中所获得的 6 只仔兔中仅有 1 只为嵌合体,其余均为野生型,获得嵌合体的比例并不高。因此,优化显微注射操作技术,减轻被注射细胞的损伤以避免其死亡,也许能提高每胎出生嵌合体兔的获得比例。

本研究利用二细胞胚胎注射法成功制备了 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体,并证实了 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体能在普通环境下健康生长。由于 *FOXN1* 基因敲除兔嵌合体能在普通环境下正常存活,理论上可采集普通级的 *FOXN1* 嵌合体种公兔的精子,然后对 SPF 级母兔大规模人工授精,短期内能获得很多 SFP 级的 *FOXN1* 杂合子种群。再通过 *FOXN1* 杂合子间交配,能大量获得 *FOXN1* 纯合敲除的免疫缺陷裸兔。*FOXN1* 基因敲除兔嵌合体的建立,可为后续繁育 *FOXN1* 免疫缺陷兔奠定良好基

础和提供技术优化。

参考文献:

[1] WANG W, LI Y, LIN K, et al. Progress in building clinically relevant patient-derived tumor xenograft models for cancer research [J]. *Animal Model Exp Med*, 2023, 6(5): 381-398.

[2] 周箴,徐云华,张菲菲,等. 人源化免疫肺癌小鼠模型的建立及其在程序性死亡受体 1 抑制剂疗效评估中的作用 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2020, 40(1): 37-43.

ZHOU Z, XU Y H, ZHANG F F, et al. Establishment of a lung cancer mouse model with humanized immunity and its role in efficacy evaluation of programmed death-1 inhibitors [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci*, 2020, 40(1): 37-43.

[3] 白家骊,毛青. 应用 CRISPR/Cas9 技术构建 Tet-on 调控表达 uPA 的人源化肝细胞嵌合小鼠 [J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(13): 1405-1412.

BAI J S, MAO Q. Construction of humanized chimeric mice with Tet-on regulating liver specific expression of uPA using CRISPR/Cas9 technology [J]. *J Army Med Univ*, 2023, 45(13): 1405-1412.

[4] 赵宁宁,张正,王彦博,等. 基于人源化免疫重建的患者来源肿瘤组织异种移植模型的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(6): 804-808.

ZHAO N N, ZHANG Z, WANG Y B, et al. Research progress on humanized patient-derived xenograft (Hu-PDX) models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(6): 804-808.

[5] 刘楚芬,吴勇,曹愿,等. hKDR^{+/+} 人源化及 Rag1^{-/-} 基因缺陷新型双靶点遗传修饰荷瘤小鼠模型的建立 [J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(2): 103-111.

LIU S S, WU Y, CAO Y, et al. Establishment of hKDR^{+/+} humanized and Rag1^{-/-} gene knockout double genetically modified mouse model [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(2): 103-111.

[6] 尹媛,曾文滔,周建丽,等. Prkdc 和 Il2rg 双敲除免疫缺陷小鼠的构建和初步应用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(8): 1107-1111.

YIN Y, ZENG W T, ZHOU J L, et al. Establishment and preliminary application of the immune-deficient mice models with Prkdc/Il2rg knockout [J]. *J Nanjing Med Univ Nat Sci*, 2022, 42(8): 1107-1111.

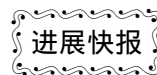
[7] 何啸,胡雨萌,宋银宏. 转录调节因子 FOXN1 异常表达引起相关疾病的研究进展 [J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(2): 264-267.

HE X, HU Y M, SONG Y H. Research progress on the diseases caused by abnormal expression of transcription regulator FOXN1 [J]. *Basic Clin Med*, 2019, 39(2): 264-267.

[8] ZHANG Z, BURNLEY P, CODER B, et al. Insights on FOXN1 biological significance and usages of the “nude” mouse in studies of T-lymphopoiesis [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(8): 1156-1167.

[9] SONG J, HOENERHOFF M, YANG D, et al. Development of

- the nude rabbit model [J]. Stem Cell Reports, 2021, 16(3): 656–665.
- [10] BOETTCHER A N, LOVING C L, CUNNICK J E, et al. Development of severe combined immunodeficient (SCID) pig models for translational cancer modeling; future insights on how humanized SCID pigs can improve preclinical cancer research [J]. Front Oncol, 2018, 8: 559.
- [11] WU Y, ZHANG J, PENG B, et al. Generating viable mice with heritable embryonically lethal mutations using the CRISPR-Cas9 system in two-cell embryos [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2883.
- [12] CHEN B, GU P, JIA J, et al. Optimization strategy for generating gene-edited Tibet minipigs by synchronized *Oestrus* and cytoplasmic microinjection [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(12): 2719–2732.
- [收稿日期]2023-11-15



构建临床癌症研究相关的人源肿瘤异种移植模型的进展

人源肿瘤异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型是从癌症患者手术切除肿瘤组织,随后移植到免疫缺陷小鼠体内,从而更好地保留了肿瘤的异质性。这是一种重要的转化医学研究方法,特别是在推动精准医学方面,这种方法已经崭露头角。本文从时间维度阐述了 PDX 模型在各个阶段的发展。作为 PDX 模型发展的第一阶段,人源肿瘤原位异种移植(patient-derived orthotopic xenograft, PDOX)模型将人源肿瘤组织植入小鼠体内,位置与患者的解剖位置相对应。PDOX 模型具有多个优势,包括高度保真地还原原始肿瘤、增强药物敏感性以及提高移植成功率。然而, PDOX 模型也存在严峻的挑战,需要先进的手术技术和精密的成像技术,限制了其应用。随后,人源化小鼠模型以及斑马鱼模型相继被开发应用。人源化小鼠模型具有类似肿瘤和免疫系统相互作用的人类免疫环境,是 PDX 模型研究的热点话题。斑马鱼异种移植模型(zebrafish patient-derived tumor xenograft, zPDX)和患者源性类器官(patient-derived organoids, PDO)模型作为研究癌症与药物开发的新模型, zPDX 模型将用于肿瘤移植到斑马鱼体内,成为新型个性化动物疾病模型,具有缩短患者等待时间的优势。PDO 模型提供了一种新的药物测试方法,可复制体内环境并保存重要的与患者相关的肿瘤信息。本综述突出了 PDX 模型每个新阶段的功能特征,并阐述了这一快速发展领域所面临的挑战以及未来的发展。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊(*Animal Models and Experimental Medicine*, 2023, 6(5): 381–398. <https://doi.org/10.1002/ame2.12349>)。