

## 免疫缺陷小鼠和人源化小鼠模型的发展及其在血液学研究中的应用

郑亚伟 郝莎 胡林萍 程涛

### Development of immunodeficient mice/humanized mouse models and their applications in hematology research

Zheng Yawei, Hao Sha, Hu Linping, Cheng Tao

Corresponding author: Cheng Tao, State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China. Email: chengtao@ihcams.ac.cn

随着生命科学的发展,动物模型在科学研究中发挥着越来越重要的作用。由于缺乏理想的实验动物,一些模拟人类生理及病理状态的体内实验研究始终受到一定程度的限制。造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的研究在再生医学研究中占据重要地位,造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)是目前应用最广泛的再生医学治疗手段。对HSC的研究需要进行体内移植实验检测其生物学行为。相对于体外实验,免疫缺陷小鼠移植模型能够更准确地反映原始造血细胞在体内造血微环境中的再生能力。人源化小鼠是移植了人类组织细胞或通过转基因的方法使其表达人源基因的免疫缺陷小鼠,也被称作小鼠-人嵌合体,是目前用来研究人类细胞或组织的一个独特的动物模型,在血液学领域的研究中发挥了重要作用。本文主要对免疫缺陷鼠和人源化小鼠模型的发展、建立及其在血液学研究中的应用进行综述。

#### 一、免疫缺陷小鼠的演化

人造血细胞移植给免疫缺陷小鼠的实验已开展了近30年,期间免疫缺陷小鼠的品系不断得到改良。

1. SCID小鼠和Rag<sup>-/-</sup>小鼠:1983年Bosma等<sup>[1]</sup>在CB17近交系小鼠中发现位于16号染色体上的Prkdc基因存在隐性突变,导致小鼠出现重度联合免疫缺陷综合征(severe combined immunodeficiency disease, SCID)。Prkdc基因编码的蛋白是DNA依赖的蛋白激酶(DNA-PK)的催化亚基,与Ku蛋白(含有能与DNA结合的末端)一起组成DNA-PK。DNA-PK为DNA重组酶的活化所必需,在双链DNA损伤修复和T、B细胞的T细胞抗原受体(TCR)、B细胞抗原受体

(BCR)基因V、D、J基因重排时发挥重要功能<sup>[2]</sup>。活化态DNA重组酶的缺失使TCR、BCR基因重排不能正常进行,原始T、B细胞不能进一步分化为功能性的T、B细胞,从而导致细胞和体液双重免疫缺陷。研究发现,虽然人的外周血<sup>[3]</sup>、胎肝造血组织<sup>[4]</sup>、HSC<sup>[5]</sup>都能够植入这种免疫缺陷小鼠中,但成功率非常低,而且植入的人源细胞并不能分化成有功能的人免疫细胞。因Prkdc基因突变的SCID小鼠仍残存有NK细胞、补体及髓系细胞的正常免疫,部分周龄较大的SCID小鼠可能发生免疫渗漏,产生B细胞和T细胞。同时SCID小鼠的放射修复缺陷使其对电离辐射的敏感性较野生型小鼠高2倍以上<sup>[6]</sup>。重组激活基因(Rag)缺陷小鼠的出现,克服了SCID小鼠的一些不足。Rag基因包括Rag1和Rag2。Rag1和Rag2位点定向突变阻止了成熟T和B细胞在小鼠体内的生成,且不会造成免疫渗漏和辐射敏感。但Rag<sup>-/-</sup>小鼠保留了较高水平的NK细胞,在一定程度上也限制了人HSC细胞的植入<sup>[7-8]</sup>。

2. 非肥胖糖尿病/免疫缺陷(NOD-scid)小鼠:1995年,Shultz等<sup>[9]</sup>将SCID小鼠与非肥胖糖尿病小鼠(non-obese diabetic, NOD/Lt)品系回交得到了NOD-scid小鼠。NOD-scid小鼠缺乏T细胞和B细胞功能,同时又拥有NOD小鼠具备的多种固有免疫缺陷(包括NK细胞及补体活性低下),从而支持了更高水平的人外周血细胞的植入<sup>[10]</sup>。此外,Shultz等<sup>[9]</sup>研究发现,SCID小鼠免疫渗漏高达90%,而NOD-scid小鼠则低于10%。NOD-scid小鼠一度成为造血细胞研究中应用最广、也最为重要的转基因移植模型。但NOD-scid小鼠也存在一些缺陷,如对放射更敏感(400 cGy的 $\gamma$ 射线可导致造血缺陷和死亡)<sup>[9]</sup>,且NOD-scid小鼠易发生胸腺瘤,平均寿命只有8个月,使其应用受到限制。

3. NSG/NOG/BRG小鼠:白细胞介素2受体 $\gamma$ 链(IL-2R $\gamma$ )也被称为通用细胞因子受体 $\gamma$ 链(common cytokine-receptor  $\gamma$ -chain,  $\gamma_c$ ),是形成高亲和力受体的重要组成部分,IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15和IL-21的信号传导都需要IL-2R $\gamma$ 组成的受体介导<sup>[11]</sup>。IL-2R $\gamma$ 的缺失可导致T、B细胞发生严重缺陷,并且完全阻滞NK细胞的发育<sup>[12-14]</sup>。2002至2005年,4个实验室分别繁育出IL-2R $\gamma$ 缺陷小鼠,为人源化小鼠研究带来了重大贡献<sup>[15-18]</sup>。其中3个应用最广泛的小鼠品系为:NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ(NSG)小鼠<sup>[17]</sup>、NOD.ShiCg-Prkdc<sup>scid</sup>IL2rg<sup>tm1Sug</sup>(NOG)小鼠<sup>[15]</sup>以及C.CgRag2<sup>tm1Fwa</sup>IL2rg<sup>tm1Sug</sup>或C.CgRag1<sup>tm1Mom</sup>IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>(BRG)小鼠<sup>[16,19]</sup>。IL-2R $\gamma$ 突变的免疫缺陷小鼠能接受人HSC和外周血的移植,且移植效率远远高于之前的免疫缺陷小鼠。IL-2R $\gamma$ 突变并不完

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.11.018

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)(2013CB966902、2015CB964400);国家自然科学基金创新群体(81421002);国家自然科学基金(81300374)

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院;实验血液学国家重点实验室

通信作者:程涛,Email:chengtao@ihcams.ac.cn

全相同, NOD背景的两种小鼠中, NOG小鼠表现为IL-2R $\gamma$ 胞内结构域缺失, 其IL-2R $\gamma$ 可以表达并结合细胞因子但失去了信号转导功能, 使得NOG小鼠表现为T、B细胞缺失和NK细胞无活性; NSG小鼠则表现为IL-2R $\gamma$ 完全缺失, 其IL-2R $\gamma$ 不表达且无法结合细胞因子, 导致该小鼠完全丧失T、B细胞和NK细胞。NSG小鼠及NOG小鼠均显示高水平的人HSC植入, 而NSG小鼠骨髓中的人HSC植入水平更高<sup>[20]</sup>。BRG小鼠是在BALB/c基因背景的小鼠中诱导Rag1<sup>-/-</sup>或Rag2<sup>-/-</sup>突变, 并且IL-2R $\gamma$ 胞内结构域缺失, 表现为T、B细胞缺失和NK细胞无活性。不同品系的免疫缺陷小鼠对人HSC移植的植入效率产生不同的结果, 其中NSG小鼠的HSC植入率高于BRG小鼠<sup>[19]</sup>。其原因主要在于NOD背景小鼠的SIRP $\alpha$  (signal regulatory protein alpha) 表现出胞外结构域的多态性, 可以结合人源CD47, 抑制了巨噬细胞对人源细胞的吞噬作用<sup>[21]</sup>。巨噬细胞表面的SIRP $\alpha$ 结合靶细胞表面的CD47, 会向吞噬细胞传递“别吃我”的信号, 使靶细胞免于被吞噬清除<sup>[22]</sup>。

4. NSGW小鼠: 以Kit基因突变小鼠为移植受体可以在受体非照射的情况下支持供体小鼠来源HSC<sup>[23]</sup>。Kit (c-Kit) 基因表达干细胞因子(stem cell factor, SCF)的受体, 为正常造血所必需, c-Kit无义突变小鼠的表型类似于再生障碍性贫血<sup>[24]</sup>, 自身HSC功能受损, 为野生型供体的造血细胞提供了竞争优势, 使HSC可以在低剂量照射或非照射的条件下获得植入。2014年, Cosgun等<sup>[25]</sup>通过将突变的Kit等位基因导入BALB/c或NOD背景的免疫缺陷小鼠品系, 构建了BRG Kit<sup>Wv/Wv</sup> (BRGWv)、NSG Kit<sup>Wv/Wv</sup> (NSGWv)、NSG Kit<sup>Wv/+</sup> (NSGWv+) 以及NSG Kit<sup>W41/W41</sup> (NSGW41) 小鼠。除了NSGWv小鼠的短暂寿命限制了其应用, 其余3种小鼠经过人源HSC移植实验显示, 包含Kit基因突变的未照射免疫缺陷小鼠可以获得高植入水平的多系造血重建, 其人源HSC植入比例可达到经照射处理的无Kit基因突变同品系免疫缺陷小鼠的植入水平, 其二次移植的受体小鼠也获得了移植重

建。并且不同于BRG和NSG小鼠, Kit基因突变的成年免疫缺陷小鼠显示出了与新生小鼠同样的植入效率。由于NOD背景的小鼠比BRG背景的小鼠拥有更高的人源细胞嵌合率, 且NSGW41小鼠不需要象NSGWv/+小鼠进行基因型鉴定, 因此更适于实验操作<sup>[26]</sup>。

免疫缺陷鼠的发展历程见表1。

## 二、人源化小鼠模型

人源化小鼠是指将人的造血细胞或组织移植给免疫缺陷小鼠从而建立人鼠嵌合体。利用人源化小鼠模型, 可以对人造血系统的生物学行为和功能进行分析, 模拟人体造血系统的生理条件, 减少样品获取过程对健康供者或患者的侵入性损伤。几种代表性的的人源化小鼠模型简介如下:

1. hu-PBL-SCID (human peripheral blood lymphocyte, SCID) 模型: Mosier等<sup>[3]</sup>通过尾静脉或腹腔注射的方法将成熟的人外周血淋巴细胞植入SCID小鼠体内, 以研究成熟免疫细胞的功能。该方法易于操作, 可以检测到人的T细胞和B细胞的植入, 但B细胞植入效率很低且很难检测到髓系细胞的植入。该模型植入的T细胞均为活化的成熟T细胞, 难以产生初始免疫反应。宿主的抗原提呈细胞(APC)不表达人白细胞抗原(HLA)分子, 无法与植入的T细胞相互作用。

2. SCID-hu (SCID-human) 模型: McCune等<sup>[4]</sup>通过将人胚胎的肝脏和胸腺细胞移植到SCID小鼠的肾被膜下, 成功促进了人的T细胞和B细胞在小鼠体内的分化成熟。小鼠的外周血可以检测到人CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>细胞及人IgG的一过性升高。由于人T细胞在同源的人胸腺上皮发育成熟, 故拥有HLA限制性。然而除了T细胞, 其余造血细胞在小鼠体内的重建水平很低。

3. hu-SRC-SCID (human scid repopulating cell SCID) 模型: hu-SRC-SCID模型是将胎肝、脐血、骨髓或外周血G-CSF动员来源的HSC移植给新生或成年的免疫缺陷小鼠, 使得小鼠体内获得人造血细胞的多系重建, 以此研究完整的人造血系统及天然免疫系统。该方法的局限性在于人T细胞在

表1 免疫缺陷鼠发展历程

品系	年份	适应性免疫	固有免疫	特点
SCID	1983 <sup>[1]</sup>	T、B细胞缺失	正常	人源细胞植入效率低; 免疫渗漏; 对辐射敏感
Rag1 <sup>-/-</sup> 或Rag2 <sup>-/-</sup>	1992 <sup>[7-8]</sup>	T、B细胞缺失	正常	人源细胞植入效率低; 无免疫渗漏及辐射敏感
NOD-scid	1995 <sup>[9]</sup>	T、B细胞缺失	NK细胞活性降低, 巨噬细胞功能减低	人源细胞植入效率较高; 对辐射敏感; 自发胸腺瘤, 生存期短
NOG	2002 <sup>[15]</sup>	T、B细胞缺失	NK细胞无活性, 巨噬细胞功能减低	人源细胞植入效率很高, 造血多系重建; 对辐射敏感; 生存期长
BRG	2004 <sup>[16,19]</sup>	T、B细胞缺失	NK细胞无活性	人源细胞植入效率高, 略低于NOG/NSG, 造血多系重建; 对辐射不敏感
NSG	2005 <sup>[17]</sup>	T、B细胞缺失	NK细胞缺失, 巨噬细胞功能减低	人源细胞植入效率很高, 造血多系重建; 对辐射敏感; 生存期长
NSGW	2014 <sup>[25]</sup>	T、B细胞缺失	NK细胞缺失, 巨噬细胞功能减低	人源细胞植入效率很高, 造血多系重建; 移植前无需照射处理

注: SCID: 重度联合免疫缺陷综合征; NOD: 非肥胖糖尿病

小鼠的胸腺内发育成熟,小鼠的主要组织相容性复合体(MHC)称为H2复合体,因此T细胞是小鼠H2限制性,缺乏人HLA限制性<sup>[27]</sup>。并且尽管可在小鼠骨髓中检测到人源分叶核白细胞、红细胞和巨核细胞,但外周血循环中的细胞量非常有限。

4. hu-BLT-SCID(human bone-liver-thymus SCID)模型:将人胎肝来源的CD34<sup>+</sup>细胞联合相同供体的胎肝和胸腺组织植入NOD-scid或NSG受体小鼠,建立的模型称之为hu-BLT-SCID模型<sup>[28-29]</sup>。移植的人源组织在受体小鼠体内建立了完整的人造血微环境,提高了人造血细胞的多系重建水平,尤其建立了有功能的完整的人免疫系统,包含T、B以及树突细胞,并产生高水平的人IgM和IgG抗体。由于T细胞发育需要经过人胸腺的选择,BLT小鼠包含多种多样的HLA限制T细胞,可以建立有效的适应性免疫反应<sup>[30]</sup>。因此BLT小鼠多用于适应性免疫反应的研究,如HIV感染<sup>[31]</sup>。BLT小鼠模型的使用受限于人胚胎组织的获取,并且由于胸腺的阳性选择只是针对人源T细胞,有小鼠MHC亲和力的T细胞无法被消除,因此hu-BLT-SCID小鼠比其他人源化小鼠模型更易于发生GVHD。

5. hu-Tg mice(human transgenic mice)模型:hu-Tg小鼠模型指的是通过转基因手段使人源基因在免疫缺陷小鼠体内表达(如人造血细胞所需的生长因子),以此促进人源细胞的植入,或以此研究人源基因的功能。大多数急性髓系白血病(AML)患者的细胞在植入受体小鼠后很难获得重建。为了提高移植效率,研究者在NOD-scid背景的小鼠中转基因表达了人细胞因子SCF、GM-CSF和IL-3(NOD/LtSz-scid-SGM3,NSS小鼠),促进了正常人髓系细胞的扩增,并提高了AML细胞的植入水平<sup>[32-33]</sup>。此后不断有研究报道了在不同品系免疫缺陷小鼠的基础上建立的hu-Tg模型,其中最近研究是NSGS小鼠及MISTRG小鼠模型。NSGS小鼠(NOD/LtSz-scid IL2RG-SGM3小鼠)是通过将NSG小鼠与NSS小鼠回交而得到的<sup>[34]</sup>。由于有特定的因子表达,NSGS小鼠为

髓系恶性肿瘤细胞提供了更优化的植入和扩增条件,大大提高了患者来源细胞的植入效率<sup>[34-35]</sup>。部分在NSG小鼠中难以植入的AML细胞,在NSGS小鼠的外周血、脾脏和骨髓中都检测到了显著增加的重建比例;MDS细胞的植入效率也显著增加,并且植入的细胞保留了发育异常的细胞形态特征<sup>[35]</sup>。2011年,通过在BRG小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell,ESC)中转入人源SIRPα编码基因,研究者构建了hSIRPα<sup>tg</sup>Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>(SRG)小鼠<sup>[36]</sup>。表达人源SIRPα的小鼠巨噬细胞对表达人CD47的造血细胞的吞噬作用大大减低,SRG小鼠中的人HSC植入水平提高,接近于NSG小鼠体内植入水平。2014年,研究者将编码人M-CSF、IL-3、GM-CSF和TPO的基因利用同源重组技术敲入BRG小鼠,构建了MITRG(hM-CSF,hIL-3/hGM-CSF,hTPO+Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>)小鼠;在MITRG小鼠中再表达人源SIRPα分子,又得到了MISTRG(hM-CSF,hIL-3,hGM-CSF,hTPO+Rag2<sup>-/-</sup>IL2rg<sup>-/-</sup>+hSIRPα)小鼠<sup>[37]</sup>。MITRG小鼠和MISTRG小鼠具有更完整的人固有免疫系统,促进了人单核、巨噬和NK细胞的发育成熟,对小鼠进行肿瘤组织移植后可以检测到巨噬细胞对肿瘤的浸润,这一现象与患者的病理检测结果非常相似<sup>[37]</sup>,提示该模型有助于对肿瘤进行体内实验研究。

人源化小鼠的发展历程见表2。

三、人源化小鼠在血液学研究中的应用

1. 人HSC生物学特性研究:转基因移植的模型为研究人HSC的免疫表型做出了重要贡献。通过免疫缺陷小鼠移植实验发现CD34<sup>+</sup>的细胞富集了人的HSC<sup>[38]</sup>,并且CD34<sup>+</sup>的细胞已广泛应用在临床的HSCT中<sup>[39]</sup>。随后更精细区分HSC的免疫表型被逐步发现,Notta等<sup>[40]</sup>将Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD49f<sup>+</sup>Rho<sup>low</sup>的细胞定义为长周期造血干细胞(LT-HSC),单细胞水平移植即可进行多系造血重建。

不同来源的人HSC的移植转化效率等生物学特性有所差异。人脐带血来源的CD34<sup>+</sup>细胞在NOD-scid小鼠中的植入率高于其他来源的细胞<sup>[41]</sup>。再比如造血干祖细胞的归巢

表2 人源化小鼠发展历程

模型	年份	建立方法	优点	缺点
hu-PBL-SCID	1988 <sup>[3]</sup>	将人外周血淋巴细胞植入SCID小鼠	主要植入CD3 <sup>+</sup> T细胞,可研究成熟T细胞功能;可用作转基因GVHD模型	仅限于成熟T细胞的研究,B细胞和髓系细胞植入率很低
SCID-hu	1988 <sup>[4]</sup>	将人胚胎肝脏和胸腺组织共同植入SCID小鼠肾被膜下	胸腺细胞可正常发育成熟,人T细胞拥有HLA限制性	除T细胞以外的其他造血细胞重建率低;需要获取人胚胎组织
hu-SRC-SCID	1992 <sup>[5]</sup>	将人造血干细胞植入免疫缺陷小鼠	可研究人完整造血系统及固有免疫系统	人T细胞无法在小鼠胸腺环境内获得HLA限制性,限制了有关适应性免疫的研究
hu-BLT-SCID	2006 <sup>[28-31]</sup>	将人造血干细胞联合同源胎肝和胸腺植入新生免疫缺陷小鼠	可研究人完整造血系统(包含固有免疫和适应性免疫系统)	比其他模型更易发生GVHD;模型建立方法复杂,需要获得胚胎组织并进行手术操作
hu-Tg Mice	2003 <sup>[32-37]</sup>	用转基因技术在免疫缺陷小鼠体内表达人源基因产物	表达特异人源细胞因子,促进人源细胞植入;作为研究人源基因功能的体内实验模型	细胞因子表达量过高会导致HSC的过度动员和耗竭;模型建立需要基因操作,方法复杂

注:SCID:重度联合免疫缺陷综合征;GVHD:移植物抗宿主病;HSC:造血干细胞

能力,不少学者对不同来源的人造血干细胞的体外迁移能力进行了广泛的研究,但由于各个实验室采用的方法和模型不同,得到的结果也截然不同<sup>[42-43]</sup>。利用荧光染料CFSE检测归巢于NOD-scid小鼠骨髓及脾脏中不同来源人CD34<sup>+</sup>细胞的数量及归巢效率,发现脐血CD34<sup>+</sup>细胞骨髓归巢效率低于外周血动员和骨髓CD34<sup>+</sup>细胞<sup>[43]</sup>。

2. 在HSCT领域的应用:目前,HSCT在临床上被广泛用于血液病和急性辐射损伤等患者的治疗,但由于骨髓和脐血中的HSC数量有限,不能满足需求,因此,科学家们开展体外扩增HSC的研究,并且联合移植实验检测HSC的功能,希望来克服这一困难。其中小分子化合物由于性质稳定和给药方便,利用其促进HSC体外扩增具有很好的应用前景。有研究表明体外培养HSC时加入前列腺素E2(PGE2)可通过激活WNT信号通路及上调CXCR4和Survivin,促进HSC的归巢、存活和增殖,并且移植实验证实了长期重建细胞(LTRC)和SCID重建细胞(scid repopulating cell, SRC)的增加<sup>[44-46]</sup>。Boitano等<sup>[47]</sup>证实嘌呤衍生物StemRegenin(SR1)可有效扩增CD34<sup>+</sup>细胞,并且将体外扩增的CD34<sup>+</sup>细胞移植给NSG小鼠后SRC增加了17倍。另有研究发现嘧啶咪唑(Pyrimidoindole)衍生物UM171可以在体外有效扩增人LT-HSC<sup>[48]</sup>。此外,调控表观遗传的小分子化合物也被证实可促进人HSC的体外扩增。有报道显示DNA甲基化抑制剂地西他滨(decitabine)和组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDACi)曲古抑菌素A(trichostatin A)<sup>[49]</sup>、丙戊酸(VPA)<sup>[50]</sup>可以促进人HSC的体外扩增并提高HSC的体内移植重建水平。

除了促进HSC的体外扩增,对移植受体微环境的优化也促进了HSC的造血重建。通过给予照射后的NOD-scid或NSG受体小鼠N-乙酰半胱氨酸(NAC),使小鼠体内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平降低,可以有效提高人HSC的移植重建水平<sup>[51]</sup>。

3. 白血病干细胞的研究:1991年,Bonnet等<sup>[52]</sup>将人白血病细胞植入受过照射的NOD-scid小鼠体内,发现CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞能够启动小鼠白血病的发生,而CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>的白血病细胞并不能引发小鼠白血病,首次鉴定了免疫表型特异性的白血病细胞群体,从而提出了白血病干细胞(leukemia stem cell, LSC)的概念。然而AML的LSC在不同的疾病亚型中表型不同。另外有研究在CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>的细胞亚群中也发现了LSC<sup>[53-55]</sup>,NPM1突变的AML细胞在CD34<sup>+</sup>的细胞亚群中存在LSC<sup>[56]</sup>。除了LSC,最近有研究证实白血病前体HSC的存在,包含DNMT3a突变的HSC相较于正常HSC显现出更强的多系重建能力,但并不表现为白血病特征的髓系优势重建<sup>[57]</sup>。移植模型对LSC和白血病前体HSC的检测为白血病的生物学特性研究提供了有效的手段,并为指导临床用药及预测疾病转归提供了有效的实验方法。

4. 针对LSC的免疫治疗研究:清除LSC是白血病治愈的关键因素。目前许多研究显示常规化疗手段难以完全清除LSC,可能导致白血病的复发。使用单克隆抗体的免疫治疗手段由于其靶向抗原的特异性及低毒副作用,在LSC的靶

向治疗中发挥了重要作用。随着技术的不断改良,人源化小鼠模型拥有了更完整的人免疫系统以及更高的原代肿瘤细胞植入率,这为研究针对肿瘤的免疫治疗提供了重要的体内实验模型。最早报道的靶向LSC的单克隆抗体是抗CD44的H90。H90诱导NOD-scid小鼠体内LSC分化,抑制白血病细胞向骨髓的归巢<sup>[58]</sup>。CD123是CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>的AML-LSC特有的标志分子,CD123的特异性中和抗体7G3靶向AML的LSC,减少CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞的数量,并抑制LSC的归巢能力,延长了NOD-scid小鼠的寿命<sup>[59]</sup>。2009年Majeti等<sup>[60]</sup>在植入高表达CD47的AML细胞的NSG小鼠模型中发现,特异阻断CD47的抗体可有效诱导宿主小鼠巨噬细胞对AML细胞的吞噬作用,使AML细胞得到有效清除;随后的研究中抗CD47的单克隆抗体对急性淋巴细胞白血病(ALL)的治疗作用也得到证实<sup>[61]</sup>。近年来有报道显示,嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)修饰T细胞(CAR-T细胞)可有效识别及杀伤肿瘤细胞并克服了MHC限制性,为癌症的免疫治疗提供了新的希望<sup>[62]</sup>。靶向CD44v6的CAR-T细胞可有效清除NSG小鼠模型中的AML细胞及多发性骨髓瘤细胞而不影响正常HSC,但可导致可逆性的单核细胞缺失<sup>[63]</sup>。靶向CD123的CAR-T细胞被证实可有效清除NSG小鼠体内的AML细胞,但同时正常的髓系细胞有清除作用<sup>[64]</sup>,表明其在应用于临床之前还需进一步改良。

#### 四、结语

免疫缺陷鼠及人源化小鼠作为实验动物模型具有许多优点,能进行体内实验检测人HSC的发育、分化和造血重建;也能用来评价一些药物或细胞因子对造血系统的影响。然而,这些小鼠模型也存在生存期短、辐射敏感、价格昂贵等一些缺点。随着技术的不断进步,免疫缺陷鼠及人源化小鼠模型将会继续发展、完善,为临床治疗血液疾病提供更多的实验依据。

#### 参考文献

- [1] Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse [J]. *Nature*, 1983, 301(5900): 527-530.
- [2] Watanabe F, Shinohara K, Teraoka H, et al. Involvement of DNA-dependent protein kinase in down-regulation of cell cycle progression [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(4):432-440.
- [3] Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, et al. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency [J]. *Nature*, 1988, 335(6187):256-259.
- [4] McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H, et al. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function [J]. *Science*, 1988, 241(4873):1632-1639.
- [5] Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, et al. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice [J]. *Science*, 1992, 255(5048):1137-1141.
- [6] Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, et al. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect

- [J]. *Science*, 1995, 267(5201):1178-1183.
- [7] Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, et al. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes [J]. *Cell*, 1992, 68(5):869-877.
- [8] Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V (D) J rearrangement [J]. *Cell*, 1992, 68(5):855-867.
- [9] Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice [J]. *J Immunol*, 1995, 154(1):180-191.
- [10] Hesselton RM, Greiner DL, Mordes JP, et al. High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice [J]. *J Infect Dis*, 1995, 172(4):974-982.
- [11] Sugamura K, Asao H, Kondo M, et al. The interleukin-2 receptor  $\gamma$  chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID [J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14:179-205.
- [12] Cao X, Shores EW, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor  $\gamma$  chain [J]. *Immunity*, 1995, 2(3):223-238.
- [13] DiSanto JP, Müller W, Guy-Grand D, et al. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(2):377-381.
- [14] Ohbo K, Suda T, Hashiyama M, et al. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain [J]. *Blood*, 1996, 87(3):956-967.
- [15] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. *Blood*, 2002, 100(9):3175-3182.
- [16] Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice [J]. *Science*, 2004, 304(5667):104-107.
- [17] Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells [J]. *J Immunol*, 2005, 174(10):6477-6489.
- [18] Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor  $\gamma$  chainnull mice [J]. *Blood*, 2005, 106(5):1565-1573.
- [19] Brehm MA, Cuthbert A, Yang C, et al. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2R $\gamma$  null mutation [J]. *Clin Immunol*, 2010, 135(1):84-98.
- [20] McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, et al. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains [J]. *Blood*, 2010, 116(2):193-200.
- [21] Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(12):1313-1323.
- [22] Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells [J]. *Science*, 2000, 288(5473):2051-2054.
- [23] Waskow C, Madan V, Bartels S, et al. Hematopoietic stem cell transplantation without irradiation [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(4):267-269.
- [24] Geissler EN, McFarland EC, Russell ES. Analysis of pleiotropism at the dominant white-spotting (W) locus of the house mouse: a description of ten new W alleles [J]. *Genetics*, 1981, 97(2):337-361.
- [25] Cosgun KN, Rahmig S, Mende N, et al. Kit Regulates HSC Engraftment across the Human-Mouse Species Barrier [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2):227-238.
- [26] McIntosh BE, Brown ME, Duffin BM, et al. Nonirradiated NOD, B6.SCID IL2R $\gamma$ -/- Kit (W41/W41) (NBSGW) mice support multilineage engraftment of human hematopoietic cells [J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(2):171-180.
- [27] Watanabe Y, Takahashi T, Okajima A, et al. The analysis of the functions of human B and T cells in humanized NOD/shi-scid/ $\gamma$ null (NOG) mice (hu-HSC NOG mice) [J]. *Int Immunol*, 2009, 21(7):843-858.
- [28] Lan P, Tomomura N, Shimizu A, et al. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation [J]. *Blood*, 2006, 108(2):487-492.
- [29] Denton PW, Garcia JV. Novel humanized murine models for HIV research [J]. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2009, 6(1):13-19.
- [30] Tomomura N, Habiro K, Shimizu A, et al. Antigen-specific human T-cell responses and T cell - dependent production of human antibodies in a humanized mouse model [J]. *Blood*, 2008, 111(8):4293-4296.
- [31] Denton PW, Garcia JV. Humanized mouse models of HIV infection [J]. *AIDS Rev*, 2011, 13(3):135-148.
- [32] Feuring-Buske M, Gerhard B, Cashman J, et al. Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in beta 2-microglobulin-deficient NOD/SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors [J]. *Leukemia*, 2003, 17(4):760-763.
- [33] Nicolini FE, Cashman JD, Hogge DE, et al. NOD/SCID mice engineered to express human IL-3, GM-CSF and Steel factor constitutively mobilize engrafted human progenitors and compromise human stem cell regeneration [J]. *Leukemia*, 2004, 18(2):341-347.
- [34] Wunderlich M, Chou FS, Link KA, et al. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3 [J]. *Leukemia*, 2010, 24(10):1785-1788.
- [35] Medyouf H, Mossner M, Jann JC, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(6):824-837.

- [36] Strowig T, Rongvaux A, Rathinam C, et al. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2<sup>-/-</sup>gamma(c)<sup>-/-</sup> mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(32):13218-13223.
- [37] Rongvaux A, Willinger T, Martinek J, et al. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(4):364-372.
- [38] Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility [J]. Blood, 1996, 87(1):1-13.
- [39] Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research [J]. Blood, 2008, 112(13):4793-4807.
- [40] Notta F, Doulatov S, Laurenti E, et al. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment [J]. Science, 2011, 333(6039):218-221.
- [41] Yong K, Fahey A, Reeve L, et al. Cord blood progenitor cells have greater transendothelial migratory activity and increased responses to SDF-1 and MIP-3beta compared with mobilized adult progenitor cells [J]. Br J Haematol, 1999, 107(2):441-449.
- [42] Voermans C, Gerritsen WR, von dem Borne AE, et al. Increased migration of cord blood-derived CD34<sup>+</sup> cells, as compared to bone marrow and mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells across uncoated or fibronectin-coated filters [J]. Exp Hematol, 1999, 27(12):1806-1814.
- [43] Zheng Y, Watanabe N, Nagamura-Inoue T, et al. Ex vivo manipulation of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their transmigratory potential [J]. Exp Hematol, 2003, 31(12):1237-1246.
- [44] Goessling W, North TE, Loewer S, et al. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration [J]. Cell, 2009, 136(6):1136-1147.
- [45] Hoggatt J, Singh P, Sampath J, et al. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation [J]. Blood, 2009, 113(22):5444-5455.
- [46] Goessling W, Allen RS, Guan X, et al. Prostaglandin E2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models [J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4):445-458.
- [47] Boitano AE, Wang J, Romeo R, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells [J]. Science, 2010, 329(5997):1345-1348.
- [48] Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, et al. Pyrimidindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal [J]. Science, 2014, 345(6203):1509-1512.
- [49] Milhem M, Mahmud N, Lavelle D, et al. Modification of hematopoietic stem cell fate by 5aza 2'deoxyctidine and trichostatin A [J]. Blood, 2004, 103(11):4102-4110.
- [50] Bug G, Gül H, Schwarz K, et al. Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells [J]. Cancer Res, 2005, 65(7):2537-2541.
- [51] Hu L, Cheng H, Gao Y, et al. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine increases engraftment of human hematopoietic stem cells in immune-deficient mice [J]. Blood, 2014, 124(20):e45-e48.
- [52] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell [J]. Nat Med, 1997, 3(7):730-737.
- [53] Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia [J]. Nat Med, 2011, 17(9):1086-1093.
- [54] Taussig DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells [J]. Blood, 2008, 112(3):568-575.
- [55] Sarry JE, Murphy K, Perry R, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ c-deficient mice [J]. J Clin Invest, 2011, 121(1):384-395.
- [56] Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34<sup>-</sup> fraction [J]. Blood, 2010, 115(10):1976-1984.
- [57] Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia [J]. Nature, 2014, 506(7488):328-333.
- [58] Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells [J]. Nat Med, 2006, 12(10):1167-1174.
- [59] Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(1):31-42.
- [60] Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells [J]. Cell, 2009, 138(2):286-299.
- [61] Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia [J]. Cancer Res, 2011, 71(4):1374-1384.
- [62] 鹿萍, 郝莎, 袁卫平, 等. 嵌合抗原受体—癌症免疫治疗的新希望 [J]. 中华医学杂志, 2015, 95(4):311-314.
- [63] Casucci M, Nicolis di Robilant B, Falcone L, et al. CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma [J]. Blood, 2013, 122(20):3461-3472.
- [64] Gill S, Tasian SK, Ruella M, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. Blood, 2014, 123(15):2343-2354.

(收稿日期:2015-05-11)

(本文编辑:徐茂强)