



复杂性状遗传 CC 小鼠的特点及实际应用中的提示

李欣悦, 向志光*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 实验动物为生命科学研究提供支持, 特别是小鼠, 因其遗传、免疫等信息积累丰富而应用广泛。后基因组时代, 为了研究人类以及动物的基因组信息, 人们建立了多种转基因、基因敲除小鼠模型以研究某一单基因功能; 然而人类大部分疾病并非单基因疾病, 除受外界环境影响, 一般受多遗传因素控制。生命科学领域的多基因相关的复杂性状研究向实验动物提出了新的要求。因此科学家提出了建立协同杂交小鼠(CC 小鼠)资源的计划。本文将对 CC 小鼠出现的背景、特点及应用中需要考虑的问题做一概述。

【关键词】 重组杂交系小鼠, 多基因复杂性状, CC 小鼠;

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)09-0001-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 09. 001

The character of Collaborative Cross mice and tips for its application

Li Xin-yue, Xiang Zhi-guang*

(Institute of Laboratory Animals, CAMS/PUMC, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Laboratory animals support the life science research. Based on their clear genetic, immune background, mice have been widely used. In the Post-genomics era, a great deal of genetic engineering mouse models, including those transgenic mice and gene targeted mice had been developed to study some a specific gene. However, most human diseases are not controlled by a single gene; besides the environmental factors, multiple genetic factors can influence the development of human diseases. The complex multi-gene traits research in life science put forward new challenges to the laboratory animals. To meet this challenge, scientists have proposed to develop a new mouse resource called the Collaborative Cross (CC) mice. This paper will review the background and character of CC mice, and gives some suggestions for its application.

【Key words】 Recombinant inbred strain mouse; Complex multi-gene traits; Collaborative Cross mice

1 CC 小鼠出现的背景

1.1 人类疾病复杂遗传性状的研究向实验动物提出了新的要求

针对人类疾病的研究是生命科学研究的主题之一。利用实验动物特别是小鼠进行人类疾病的实验研究, 较之针对人类自身的临床研究有几个特别的优势: 实验过程可控性, 研究全程的可干预性,

费用较低, 且研究的稳定性和可重复性好。人类的疾病受到遗传因素和外界环境等多因素影响。人类的某些疾病是受单一的显性基因控制的, 当这些显性基因出现状况时, 人类就会出现某些特征性的疾病状态, 例如红绿色盲^[1]、血友病^[2]、白化病^[3]等。利用实验动物可以实现对这类疾病的研究, 比如在小鼠的目的基因上引入点突变来模拟人类遗传疾病模型疾病的研究^[4]。针对此类需求人们开

[作者简介] 李欣悦(1992-), 女, 硕士研究生, 专业: 免疫学。

[通讯作者] 向志光, 男, E-mail: xiangzg@cnilas.org。

发了转基因技术^[5]、基因打靶技术^[6],实现了对于小鼠基因组的精心操作。最近几年新兴的 CRISPR/Cas9 技术更是把基因操作推向的极致^[7]。

然而更多的人类疾病是受多基因调控的,同时也受外界环境因素影响。研究这类疾病目前在人类使用 GWAS 的分析方法^[8],即通过对疾病易感人群与正常人群的基因组信息,特别是具有单核苷酸多态性的位点(SNP)进行聚类分析,查找该类疾病的易感基因^[9]。针对复杂遗传性状的研究,实验动物又该作何支持呢?

1.2 后基因组时代遗传信息解读的困惑

在基因组信息的解读过程中,小鼠基因组信息的解读与人类基因组的分析几乎是同步的,两个物种始终被做比较分析^[10]。然而人类基因组在测序解析之初就考虑到了人群遗传背景的多样性^[11],而小鼠作为一种模式生物,被分析的基因组来自一个近交品系 C57BL/6J,最初人与小鼠基因组比较发现的一些结果也均是与此单一品系的比较。但是后来人们通过对其他品系小鼠基因组分析发现,某些人类的基因组信息在 C57 BL/6J 小鼠不存在,但是在一些其它品系基因组中却可以找到同源物^[12]。因此,对于人和小鼠基因组信息的解读需要增加小鼠的遗传多样性信息。

目前,人们对于小鼠基因组的注释,多针对 C57BL/6J 这一个品系,Hao Xiong 等^[13]在呼吸道感染实验中发现不同品系动物的基因表达谱存在差异,而且其他品系的动物有大量未经注释的基因,比对分析并不存在于基于 C57BL/6J 这一个品系的转录组,而是与人类的某些转录本相关联。不同品系动物的转录本存在变位剪切的形式差异。在基因组上少量碱基的变异甚至落在了外显子与内含子的边界,导致同一基因组序列在不同品系动物的转录本不同。

目前,人们对于基因组的认识远远没有结束。除了大量的蛋白编码基因,他们可以通过一些关联研究对其可能的功能进行了注释;仍有大量的非蛋白编码基因,其基因功能的解读存在困难,Laurence Josset 等^[14]利用不同小鼠品系进行了呼吸道感染实验,比较肺组织感染前后 lncRNA 的表达变化,通过不同品系动物对病原感染的反应性不同,且其 lncRNA 位点与邻近编码基因的关联分析,试图对一些与炎症反应相关的 lncRNA 做出功能注释。所以对 CC 鼠品系的基因表型分析应用更有利于对人类遗传信息的解读,为人类疾病发生发展机制研究提供信息。

1.3 重组近交系是遗传作图分析的有力工具

近交系与封闭群是实验动物中常用的两个概

念。在育种方式上这两种动物完全不同:近交系动物的原则是使动物的遗传背景尽可能一致,因此采用了兄妹杂交策略;而封闭群动物的要求却是动物在一个群体内避免近交,使动物在一个群体内不同动物之间保持基因的多态性,但整个群体的遗传信息相当稳定。遗传物质单一稳定的近交系动物是生命科学研究的首选,它可以保障实验的稳定性,以及可重复性。而封闭群动物在一定程度上可以体现不同动物的群体性差异。在进行遗传作图分析上,很明显,近交系动物更为适合。但是为了实现基因性状与遗传物资的关联分析,科学家建立了一些重组近交系动物。

小鼠的重组近交系^[15]可由 2 个不同的近交系动物进行兄妹杂交,其后代达到纯合近交状态,这些动物品系便成为重组近交系。和人类的遗传多样性不同,不同品系的实验小鼠其遗传变异性在每种动物上均处于一种稳定状态,而且大多进行了较为完善的遗传分析。更为主要的是小鼠的遗传多样性在不同品系以分离状态特征分布。科学家可以利用 RI 动物进行了一些数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)分析^[16],例如荷兰与日本的科学家应用 BALB/C 小鼠与 DBA 小鼠的重组近交系(BXD)进行了造血干细胞转录调控以及肝脏脂肪代谢遗传调控网络的研究。不同的 RI 体系其遗传结构差别较大,最初 BXD 共有 26 个子代近交系,而 LXS 重组近交系子代品系的数量达到 77 个^[17]。

然而,普通重组近交系动物在进行基因功能分析,特别是复杂性状分析时表现出一些不足:由于普通的重组近交系动物其遗传物质仅仅来源于 2 个近交品系,其遗传物种的丰富性不足,及表现为此类重组近交系遗传多样性的限制性。并且由于多种近交系动物其有相近的亲缘关系,在各自的基因组中存在着一些具有同源遗传关系的区域(identical by descent, IBD),这些区域在重组杂交的过程中并不存在遗传多样性位点,因此不能很好的实现遗传作图的目的。在应用 2 个亲本来源的重组近交系进行数量性状位点分析时, QTL 的跨度平均在 30 Mbp,而这样一个跨度包含有数百个可能的候选基因。

通过标记辅助近交的方法培育 CC 系小鼠,可以获得含有丰富基因多态性且保持每 100 ~ 200 bp 内有分离多态性^[18]。这一水平的遗传多样性将足以驱动任何性状的表型多样性。这种多亲本的遗传参考群可提供比以前遗传参考群体更多的等位基因多样性和更好的基因型随机化与基因重组,从

而提高遗传图谱的绘制和表型相关分析的效率、精度、准确性^[19]。

2 CC 小鼠计划

如果将更多的近交品系引入重组杂交计划又会如何呢?科学家在本世纪初就进行了此类设想,提出了建立协同杂交小鼠的资源计划^[20]。CC 小鼠具体的杂交计划在本期的其他文章中将会具体介绍。这里我们分析一下 CC 小鼠的遗传多样性。为了获得具有更多遗传多样性的重组近交系动物,应该使用多种不同遗传背景的近交系动物作为亲本,然而 CC 杂交的复杂过程又不可能引入过多的亲本。小鼠有 3 个亚种(*Mus musculus domesticus*, *M. m. musculus*, and *M. m. castaneus*),科学家对常见的小鼠品系进行了序列分析,结果发现大部分品系具有更为相近的祖先,而不是均匀的来自这 3 个亚种^[21]。对现有的小鼠近交品系进行进化关系的分析,科学家选出了 8 个近交品系,其中也包括 3 个野生动物品系,他们的遗传物质的多样性可以基本覆盖小鼠整个物种,他们的亲缘关系相对较远,可以保证 CC 品系遗传位点的分散性^[22]。

3 具有遗传多样性的 CC 小鼠可否模拟人类遗传的多样性呢?

CC 小鼠可否用于导致人类复杂性状疾病的遗传性分析?动物模型深度表型分析是人类疾病基础和转化研究的一个有力工具。这里要提到比较医学的概念。小鼠由于与人类处于不同的生态位,进化分离较早,因此遗传物质差异较大,而且对于环境因素的应答也会有差异。因此在进行比较医学研究时,首先要明确这种差异。但是像使用之前的普通近交系动物一样,由实验小鼠得到的研究数据在一定程度上可以引导人类医学的研究。使用具有遗传多样性的 CC 小鼠进行研究得到的数据,可以为人类复杂性状疾病的研究提供支持。

4 CC 小鼠的应用

CC 小鼠可以进行复杂性状研究。这么多的新的近交品系出现,这些资源不仅可以用于复杂数量性状位点的确认。得到的不同品系的 CC 小鼠,其自身的特点有很大差异,表现为不同疾病的易感性差异。例如 CC011/Unc 这个 CC 近交品系,表现为自发结肠炎,是一个非常好的新的动物模型^[23]。此外,具有遗传多样性的 CC 鼠在疾病发生发展中能够体现临床表征的个体差异性,有助于人类疾病发生机制的研究。Jessica B. Graham 等^[24]对西尼罗河

病毒易感性分析文中介绍有关 WNV 感染的先天免疫和适应性免疫反应的已在 C57BL/6J 小鼠近交系研究,但该模型缺乏敏感性差异,其免疫和抗 WNV 感染与人类临床数据有差异,从而限制了该模型的实用性,他们认为选择具有广泛遗传多样性的 CCdRIX 品系作为模型更有效,能够体现疾病状态与先天免疫和适应性免疫的反应差异。因此,CC 小鼠的繁育与发展将会为各类人类疾病的研究提供一些适用的动物模型。

5 使用 CC 小鼠进行科学研究的思考

CC 小鼠的实验设计与一般的动物实验还是有差别的,首先是动物分组与动物的数量。近交系动物的遗传稳定性好,但是为了排除实验其他环节可能存在的误差,每个分组的动物的数量一般也在 3 只以上。而假定需要研究性别差异对实验的影响,雌雄各半,每种 CC 近交系需要使用 6 只以上的动物。现有的 CC 小鼠子代品系数量约有 200 种。是否每个实验都需要将所有的 CC 品系都试用一轮呢?如此的实验设计,将会是一个相对大的工程。

CC 小鼠不同品系之间存在生理机能、免疫功能等方面的差异,这些差异在进行实验研究时是否应该考虑进来呢?例如实验动物的用药剂量换算一般选择体表面积直接换算法,而动物的体表面积通常应用由体重推算体表面积的 Meeh-Rubner 公式,即: $A(\text{体表面积}, \text{m}^2) = K \times W(\text{体重}, \text{g})^{2/3} / 10000$,式中 K 为一常数,随动物种类而异,小鼠的 K 值为 9.1^[25]。在 Jian-Hua Mao 等^[26]研究中比较分析了 16 个 CC 鼠系 10 周龄的体重差异,不同品系的雄鼠平均体重分布在 17.5 ~ 33.8 g 之间,不同品系雌鼠的平均体重分布在 13.1 ~ 27.9 g 之间,其中 CC019 系小鼠平均体重最小,CC040 小鼠的平均体重最大。那么由于不同品系同龄动物体重存在差异,在计算用药量时不同品系的动物用药量会因体重的差异而不同。郑茂恩等^[27]对 SPF 级 KM、ICR、BALB/C、C57BL/6J 每个品系雌雄鼠各 80 只在 3 ~ 12 周龄进行体重测量,发现不同品系小鼠的生长速率不同。那么针对幼龄动物进行药物试验时,是否也应该考虑幼龄小鼠的体重因素呢?因为在实验中动物的给药剂量是基于体重计算的,动物实验中给药量的差异也是一个变量因素,此变量可能会对实验结果产生干扰。因此,在应用不同品系,体重存在差异的 CC 小鼠进行实验时,是否应该考虑在对结果分析时附加体重参数?

应用于科学研究的实验动物必须排除一些微生物,包括人兽共患病原、动物的疫病和一些严重干扰

研究的病原体。排除一些特殊病原体的动物叫做 SPF 动物。有一些条件致病菌对于免疫机能正常的动物没有致病性,因此他们在某些动物种群并未列为 SPF 排除的病原,例如绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌。国内外实验小鼠质量检测中经常发现 β 链球菌、产酸克雷伯氏菌、肺炎克雷伯杆菌等条件致病菌。

然而不同品系的 CC 小鼠免疫机能存在差异,某些在免疫功能健全的小鼠上的条件致病菌在某些 CC 品系可能就是严重致病微生物。例如绿脓杆菌在自然界广泛分布,主要通过接触和空气传播,属于不易排除的病原微生物。而不同品系的 CC 鼠在感染绿脓杆菌后,动物的存活时间及存活率不同,其中 IL256、IL521、IL2689、IL3438 品系小鼠感染后平均存活时间最长;IL711、IL1061、IL188、IL2126、IL1912 品系小鼠感染后的平均存活时间最短^[28]。因此对于 CC 小鼠的,SPF 排除病原的范畴可能也要进行更多的考虑。

参考文献:

- [1] Franceschetti A. Daltonism: its relation to other sex-linked hereditary abnormalities and its importance as gene marker [J]. *Triangulo Rev Sandoz Cienc Med*, 1962, 5: 273–287.
- [2] Wise RJ, Ewenstein BM, Gorlin J, *et al.* Autosomal recessive transmission of hemophilia A due to a von Willebrand factor mutation [J]. *Hum Genet*, 1993, 91(4): 367–372.
- [3] O'donnell FE Jr, King RA, Green WR, *et al.* Autosomal recessively inherited ocular albinism. A new form of ocular albinism affecting females as severely as males [J]. *Arch Ophthalmol*, 1978, 96(9): 1621–1625.
- [4] Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, *et al.* The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation [J]. *Science*, 1989, 244(4912): 1578–1580.
- [5] Allemand I, Angulo JF. Transgenic and knock-out models for studying DNA repair [J]. *Biochimie*, 1995, 77(10): 826–832.
- [6] Melton DW. Gene targeting in the mouse [J]. *BioEssays*, 1994, 16(9): 633–638.
- [7] Fujihara Y, Ikawa M. CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 319–336.
- [8] Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, *et al.* Five years of GWAS discovery [J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90(1): 7–24.
- [9] Minster RL, Sanders JL, Singh J, *et al.* Genome-Wide Association Study and Linkage Analysis of the Healthy Aging Index [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2015, 70(8): 1003–1008.
- [10] Pennacchio LA. Insights from human/mouse genome comparisons [J]. *Mamm Genome*, 2003, 14(7): 429–436.
- [11] Lu D, Xu S. Principal component analysis reveals the 1000 Genomes Project does not sufficiently cover the human genetic diversity in Asia [J]. *Front Genet*, 2013, 4: 127.
- [12] Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome [J]. *Nature*, 2002, 420(6915): 520–562.
- [13] Xiong H, Morrison J, Ferris MT, *et al.* Genomic profiling of collaborative cross founder mice infected with respiratory viruses reveals novel transcripts and infection-related strain-specific gene and isoform expression [J]. *G3 (Bethesda, Md)*, 2014, 4(8): 1429–1444.
- [14] Josset L, Tchitchek N, Gralinski LE, *et al.* Annotation of long non-coding RNAs expressed in collaborative cross founder mice in response to respiratory virus infection reveals a new class of interferon-stimulated transcripts [J]. *RNA Biol*, 2014, 11(7): 875–890.
- [15] Bailey DW. Recombinant-inbred strains. An aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes [J]. *Transplantation*, 1971, 11(3): 325–327.
- [16] Zou F, Gelfond JA, Airey DC, *et al.* Quantitative trait locus analysis using recombinant inbred intercrosses: theoretical and empirical considerations [J]. *Genetics*, 2005, 170(3): 1299–1311.
- [17] Williams RW, Bennett B, Lu L, *et al.* Genetic structure of the LXS panel of recombinant inbred mouse strains: a powerful resource for complex trait analysis [J]. *Mamm Genome*, 2004, 15(8): 637–647.
- [18] Churchill GA, Airey DC, Allayee H, *et al.* The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(11): 1133–1137.
- [19] Bogue MA, Churchill GA, Chesler EJ. Collaborative Cross and Diversity Outbred data resources in the Mouse Phenome Database [J]. *Mamm Genome*, 2015, 26(9–10): 511–520.
- [20] Vogel G. Genetics. Scientists dream of 1001 complex mice [J]. *Science*, 2003, 301(5632): 456–457.
- [21] Frazer KA, Eskin E, Kang HM, *et al.* A sequence-based variation map of 8.27 million SNPs in inbred mouse strains [J]. *Nature*, 2007, 448(7157): 1050–1053.
- [22] Yang H, Wang JR, Didion JP, *et al.* Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(7): 648–655.
- [23] Rogala AR, Morgan AP, Christensen AM, *et al.* The Collaborative Cross as a resource for modeling human disease: CC011/Unc, a new mouse model for spontaneous colitis [J]. *Mamm Genome*, 2014, 25(3–4): 95–108.
- [24] Graham JB, Thomas S, Swarts J, *et al.* Genetic diversity in the collaborative cross model recapitulates human West Nile virus disease outcomes [J]. *mBio*, 2015, 6(3): e00493–00415.
- [25] 赵伟, 孙国志. 不同种实验动物间用药量换算 [J]. *畜牧兽医科技信息*, 2010, 5: 52–53.
- [26] Mao JH, Langley SA, Huang Y, *et al.* Identification of genetic factors that modify motor performance and body weight using Collaborative Cross mice [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16247.
- [27] 郑茂恩, 李丽, 吴书兰, 等. 6 种 SPF 级大小鼠生长曲线的 Bertalanffy 模型分析 [J]. *实验动物科学*, 2015, 32(4): 10–13.
- [28] Lore NI, Iraqi FA, Bragonzi A. Host genetic diversity influences the severity of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the Collaborative Cross mice [J]. *BMC Genet*, 2015, 16: 106.

[修回日期]2016-06-07