多样性远交
新一代小鼠模型

毒理学研究中使用基因相同的小鼠会使研究结果难以推断至人类。一种新的“多样性远交”小鼠模型可以更好地反映出人类的基因多样性，为安全性评估提供了有意思的新思路。©RoyScott

大多数用来检测化学品和药物毒性作用的小鼠都是实验室中长期通过基因近交获得的。但是越来越多毒理学家开始使用能够更准确地模拟人类基因多样性的新小鼠模型。据美国国家环境健康科学研究所的国家毒理学计划（National Toxicology Program，NTP）称，这样的一个模型——多样性（Diversity Outbred）小鼠模型——对苯（一种已知的人类白血病病因）的易感性大相径庭。结果显示该模型能够更好地确定化学物的细微影响，并进一步证明DO小鼠可用于毒理学研究和安全评估，研究的主要作者John E. French介绍到，他曾任NTP毒理遗传学专家，现任北卡罗来纳大学教堂山分校（University of North Carolina at Chapel Hill）药物基因组学和个体化治疗中心（Center for Pharmacogenomics and Individualized Therapy）副教授。

概念验证

因为毒性在一定程度上取决于化学物和基因如何交互作用，因此基因近交的小鼠——通过近亲繁殖获得——在设定的研究条件下对毒物的反应是相似的。这有一定的优点；举例而言，可以限制检测出化学品影响具有显著性差异时所需动物的数量。但这也存在缺点，近交小鼠表现出的品系特异性反应可能与不同基因的人类没有多大关联，NTP的毒理学家Kristine Witt说。

这对于研究来自不同亲缘的远交小鼠品系的毒理学家而言稀疏平常。这些品系的小鼠对于化学物和药物的反应差异更大，但由于“远交”，它们也会发生未知的变化。相对而言，DO模型一直在严格的随机繁殖条件下饲养，从而确保只有无亲缘关系的小鼠交配。因此，每一只DO小鼠的基因都不相同。而且，8只“初代小鼠”——所有DO后代小鼠都由原始的亲代品系繁殖获得——都经过完整的测序，“因此我们能够非常准确地重建任何一只DO小鼠的基因组，”缅因州酒吧港(Bar Harbor)杰克逊实验室（Jackson Laboratories）的Gary Churchill说。他还说，这种能力有助于开展基因组相关性研究，确定支配某一特定特征的基因或等位基因。

针对新的概念验证研究，NTP的研究人员及其合作方对2个独立队列中的各300只DO小鼠进行苯染毒。选择这种化学物是因为其体内代谢表征明确，且已知在小鼠体内和人体内类似。“根据相关代谢通路的多样性，找到明确的苯暴露基因相关性的可能性似乎很高，”共同作者Witt说到。

每组75只小鼠暴露于0、1、10或100 ppm苯，持续28天。然后研究人员观察外周血和骨髓样本中的微核（MN）。MN由染色体断片或整条染色体在细胞分裂期间未纳入子核而形成，已知其数量随苯暴露呈剂量依赖性增长。

暴露水平最高的小鼠外周血中MN数明显高于非暴露小鼠，但非暴露小鼠与低暴露小鼠相近。然而，骨髓中MN数在每个剂量水平都与非暴露对照小组不同。“我们无法采集暴露人群的骨髓，但这些结果表明血中的变化可能不能反映最敏感的个体中的骨髓毒性，”French说。

如同DO小鼠，人对苯的易感性也不同，有研究表明血中毒性的暴露水平低于联邦职业标准。尽管如此，重要的是基准浓度的数量级低于之前使用近交B6C3F1杂种小鼠的浓度，这个浓度NTP自1970年代起一直使用并至今仍广泛使用。基准浓度是指产生微小但可测反应的浓度——在这里，与非暴露动物相比，微核化最多增加10%。

4个月后研究人员重复这一试验，获得同样的结果。和以前一样，DO小鼠对苯的反应大相径庭，但队列的总体变化与第一个研究非常相似。

“数据集之间没有统计学差异，”Witt说。“所有染毒小鼠的基因都不一样，毛色不同，性格也不同——就像人类一样。但即便如此，我们的结果也是可复制的。要让毒理界相信DO小鼠可以成为有用的工具，这尤为重要。”如果这两个数据集截然不同，DO模型对于化学物检测就不可靠，她说。

通过对小鼠基因组进行连锁分析，研究人员能够找到抗苯毒性的基因——很可能是位于染色体10的2个磺基转移酶修饰和消除苯代谢物。Witt说，磺基转移酶可以通过阻止苯代谢物到达骨髓来进行修饰，骨髓是引起苯所致白血病的血液干细胞来源。人类有类似的磺基转移酶，其活性相似。她说，“这说明，DO小鼠毒理研究中的基因结果可以如何指引我们找到人体中相关基因进行进一步研究，并有助于阐明导致毒性和疾病的潜在作用机制。”

NTP实验室的代理主任Michael DeVito说，DO小鼠可以帮助毒理学家确保不会遗漏可能非常重要的人类终点。据他介绍，NTP正在进一步表征基线血清生化、脏器重量、生殖能力和其他指标存在差异的动物，希望这一模型可以最终纳入NTP的检测方案。“这些研究我们做得越多，越能理解常规的人群差异，”French说。

初代小鼠

DO小鼠产生于十年前一个名为Collaborative Cross（CC）的模型。CC模型的建立可以追溯到2002年。德克萨斯州农工大学（Texas A&M University）的基因学家和教授 David Threadgill说，当时的科学家越来越意识到毒理学中遗传背景可以决定表型。由于担心研究依赖所建立的近交品系可能会遗漏重要的人类终点，所以Threadgill和其他科学家肩负使命建立起了复杂性状协会（Complex Traits Consortium，CTC），他说，“要建立新的小鼠模型，从而可以包含人体中存在的遗传变异性。”

为了完成这一使命，CTC把来自实验室和野生*Mus musculus*（即家鼠）3个亚种的8个初始品系进行杂交繁殖。分析表明，这8个品系具有已知*M. musculus*中90%的遗传变异，这种变异随机分布在基因组中。使用“漏斗”设计对这8个品系进行杂交繁殖，逐渐减少两代之间的交配。最终，通过将有亲缘关系的小鼠交配进行获得近交品系，“每只小鼠都随机获得最早出现在初代小鼠身上的遗传变异，”Threadgill如此解释。

据Churchill称，近交CC品系的定义有2个标准：它们的基因组必须包含8个初代品系中6个品系的DNA，而且必须显示出98%的纯合性，也就是说从母代遗传获得的每个基因的拷贝都等同于从父代获得的基因拷贝。

DeVito说，为了最大化获得初代的基因多样性，科学家们使用尽可能多的CC系。2014年一篇年度论文中展示了这种方法，研究人员使用了47只CC系小鼠，发现它们对埃博拉病毒的反应完全不同，就和人类一样。传统近交小鼠模型不会出现像人类的埃博拉出血热症状，包括凝血迟缓、血管内血栓和潜在的休克致死。但据这篇受到广泛报道的论文称，一些CC系的确会出现这些症状，致死率取决于遗传背景——易感小鼠的炎症、细胞死亡和血管渗漏诱导基因的表达高出10～100倍。相对而言，抗性小鼠中限制血管渗漏（可能通过修复血管）的基因表达上调。因此，作者推测遗传因素可能在人类埃博拉病毒感染的存活率中起重要作用。

Churchill介绍，CTC最初的目标是最多繁殖1000只CC系小鼠。但这被证明是不可行的，因为太多的小鼠不断死亡。“我们遇到了繁殖的问题，”Churchill说。“大概5代后，90%的小鼠不再产仔。”从某种程度上说，这是一个可以遇见的阻碍，Churchill补充到，因为近交动物经常会

出现健康问题，生殖能力也会下降。

但部分CC系还是茁壮成长，现在研究小组对近200只重新组合的近交系小鼠进行比较，目前其中90只的结果已经公布；其余的CC系小鼠正在近交，结果也会公布出来，Threadgill说。这些小鼠将会完美地包含研究人员在某项研究中绘制基因图所需的基因多样性——举例而言，可以预测埃博拉患者结局的遗传特征。“但也要看运气，”Churchill说。“如果你仔细检查了所有CC系还一无所获，那就是碰到瓶颈了。”

建立DO模型

这个局限性刺激了科学家们在2009年建立DO模型。为了获得DO小鼠，科学家们让不同CC系小鼠随机交配。随机交配可以最小化遗传漂变的可能或人群中遗传变异的缺失，Threadgill解释到。所以，遗传多样性的划分越来越细致，而且据Threadgill称，相比遗传结构固定的CC系小鼠，这会得到更多的遗传分析方案。

当找到控制DO小鼠某一特征的基因时，研究人员就可以查找这些基因是否也存在于某一指定的CC系中。这一点十分重要，因为不可能再次获得基因相同的DO队列。由于某一给定队列中所有动物的基因都独一无二，所以研究人员无法得知某一组DO小鼠中的相关基因是否也会出现在另一组中。但如果那些相同的基因之后可以在一个CC系中发现，那么那一个品系就可以继续进行研究。Churchill表示，从这个意义上来说，DO和CC模型是互补的——研究人员可以在DO动物中寻找基因，再去研究他们在一组新的CC小鼠中发现的基因。

但DO小鼠还是给研究和检测带来了巨大的挑战。因为无法得知哪些动物带有相关的基因和等位基因变异体，所以研究人员必然要在尽可能多的动物中寻找。Threadgill表示，具体数量要看所涉及遗传通路的复杂性。“如果你找到一个只有3~4个基因控制某个特征的简单通路，那你就可以用更少的动物完成任务，”他说，“但对于被很多不同基因控制的高度变异的特征而言，并非如此。”

DeVito坦言，DO小鼠的样本量和统计功效要求是NTP尚未解决的问题。为了更好地理解其中的原理，DeVito及其同事在最近开展了一项探索性研究。他们给75只DO小鼠喂饲高脂饮食，然后与正常饮食的对照DO小鼠比较血清生化指标、组织学、脏器重量、体重以及其他终点。尚未公布的结果表明，除了精子数在对照和高脂组之间变化很大且原因不明以外，各组中小鼠的上述终点均没有差异。

“这不是极值，” DeVito说。“相反，这些动物的精子数逐渐增加，最小值和最大值相差70倍之多。”

DeVito指出，B6C3F1小鼠的精子数差异通常不会超过2倍。DO小鼠中精子数变化如此剧烈的情况说明存在研究难点，特别是对雄性生殖毒物的研究。科学家们不使用NTP指南推荐的在近交品系研究中每个染毒组设置10~20只动物，他们很可能需要使用上百只DO小鼠才能找出与未染毒对照小鼠不同的细微的生殖效应，DeVito说。

“传统研究设计不会在DO模型中使用与更常见的近交品系中相同的统计效力，” DeVito说。“我们需要更了解未染毒DO小鼠的终点变异性，这样才能为这个模型制定合理的研究设计。”

综上所述，DO和CC小鼠都很适合进行化学物安全评估，德克萨斯州农工大学兽医和生物医学院教授Weihsueh Chiu说。据他称，DO和CC小鼠有三大优点：1）通过让科学家找出抗性近交品系中不易发现的毒性效应来优化危害识别；2）通过建立人体遗传多样性模型来优化剂量反应评估；3）通过基因组相关性研究等方法识别控制毒物抗性或易感性的潜在通路来优化对机制的认识。

但Chui承认遗传变异性的优点也同时伴随着不足。DO和CC小鼠比其他实验室小鼠昂贵很多，Chui表示，其成本决定了统计的效力，这也证明了DeVito指出的研究设计问题。

“根本问题是：哪些情况下，危害识别、剂量反应或机制认识方面的优点值得付额外成本使用DO或CC小鼠？”Chui问。“现在，我们验证了它们有使用价值。我们处在一个发展和改良的阶段，我相信在这个过程中，我们能够明白如何才能更好地使用它们来帮助我们实现保护公众健康的最终目标。”

Charles W. Schmidt，硕士，来自缅因州波特兰市的一位获奖科普作家，为《探索杂志》（*Discover Magazine*）、《科学》（*Science*）和《自然医学》（*Nature Medicine*）撰稿。

译自*EHP* 123(3):A64–A67 (2015)

翻译：汪 源

本文参考文献请浏览英文原文

原文链接

http://dx.doi.org/10.1289/ehp.123-A64