

转基因家兔模型制作方法

刘恩岐 郑华东 赵四海 杨鹏辉

(西安交通大学医学院实验动物中心 西安 710061)

摘要:作为生物医学研究重要的实验动物模型,转基因家兔已经被广泛应用在人类心脑血管疾病、艾滋病以及癌症等生物医学研究领域,特别是利用转基因家兔模型在人类动脉粥样硬化实验研究中已经取得了令人瞩目的成绩。本文结合我们自己制作转基因家兔的经验、研究成果以及文献资料,详细介绍了利用原核显微注射法、直接将外源基因注入受精卵雄原核中的转基因家兔制作技术,回顾了利用转基因家兔模型在生物医学研究中取得的重要进展。

关键词:转基因;家兔;显微注射;动物模型;生物反应器

中图分类号:Q394.Q81 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2006)03-62-08

The Method for Creating Transgenic Rabbits

LIU En-Qi ZHENG Hua-Dong ZHAO Si-Hai YANG Peng-Hui

(Laboratory Animal Center, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Transgenic rabbits have been found to be excellent animal models for biomedical research. Rabbits expressing human genes have been used as models for cardiovascular disease, AIDS and cancer researches. Transgenic rabbits have provided new special insights into the mechanisms regulating the development of human atherosclerosis. The most commonly used method for creating transgenic rabbits is pronuclear microinjection. Here, we describe the protocol of creating transgenic rabbits currently used in our laboratory, and briefly review the present and future use of transgenic rabbits in biomedical research.

Key words: Transgenic; Rabbit; Microinjection; Animal model; Bioreactor

家兔(*Oryctolagus cuniculus*)属于兔形目(Lagomorpha)动物,和啮齿类实验动物(如小鼠和大鼠)相比,在系统发育上更接近人类^[1]。家兔的妊娠周期短、性成熟早、体形较大、容易实验操作,不存在严重的可以传染给人的疾病,是生物医学研究中常用的实验动物。家兔脂蛋白特征与人相似,脂蛋白代谢方面更适合于人类动脉粥样硬化的研究,是研究人类动脉粥样硬化核心模型之一^[2,3]。

转基因家兔(transgenic rabbits)是继转基因小鼠之后发展起来、体型相对较大的动物模型,已被广泛应用于脂质代谢、动脉粥样硬化、肥大型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)、抗病毒及癌症等研究领域。另外,转基因家兔也

适合用作生物反应器(bioreactor),通过其乳腺分泌重组蛋白,用于人类疾病的诊断和治疗^[3]。本文将重点介绍目前常用的转基因家兔制作方法,并简要介绍了利用转基因家兔模型在生物医学研究中所取得的进展。

1 转基因家兔的制作方法

制作转基因动物的方法包括:原核显微注

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目资助(利用转基因家兔模型研究 apoA-II 与动脉粥样硬化关系, No. C247);

第一作者介绍:刘恩岐,男,硕士,副教授,研究方向:实验动物学和实验病理学, E-mail: liuenqi@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期:2005-06-17,修回日期:2006-03-06

射法 (pronuclear microinjection) 胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 或者精子、卵母细胞介导的转基因方法、以及核移植 (nuclear transfer) 技术。原核显微注射法是目前制作转基因家兔最常用的方法, 制作过程如图 1 所示。家兔品系一般选用无特异病原体 (special pathogen free,

SPF 新西兰 (New Zealand) 家兔或日本大耳白 (Japanese White) 家兔。制作转基因家兔时, 将构建好的外源基因直接注射到受精卵的雄原核中, 然后将带有外源基因的受精卵移植到同品系假孕受体 (recipient) 雌兔的输卵管中, 获得新生转基因仔兔。

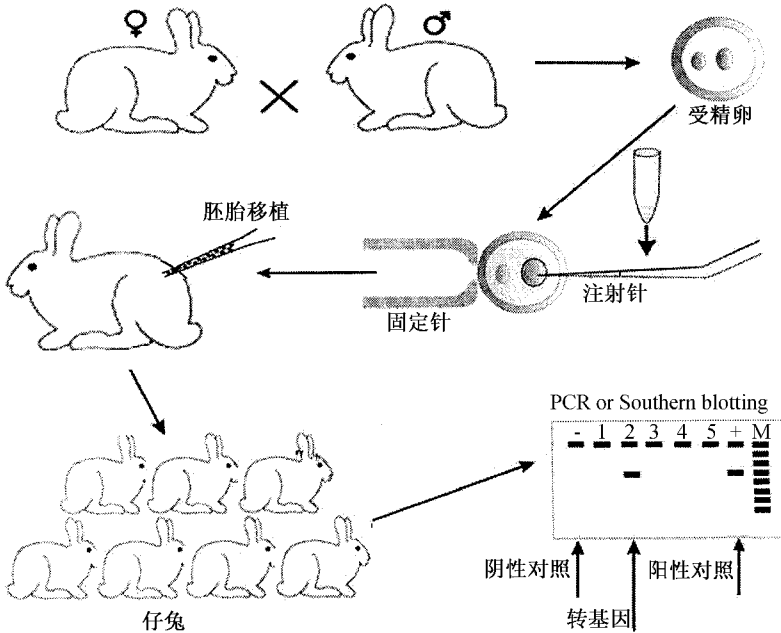


图 1 利用原核显微注射法制作转基因家兔示意图

给供体雌兔注射激素诱导超数排卵, 与雄兔交配后, 收集受精卵, 然后将外源基因注射到受精卵的雄原核中。注射后的胚胎再移植给假孕的受体家兔。用 PCR 或 Southern 杂交法检测仔兔基因组中是否整合外源基因。

1.1 超数排卵和同期发情 (superovulation and estrus synchronization) 注射孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 或促卵泡激素 (follicular stimulating hormone, FSH) 诱导供体 (donor) 雌兔超数排卵 (图 2)。使用 PMSG 时, 只需在交配前 3 d 肌肉注射一次 150 IU (图 2:A)。FSH 则需要每隔 12 h 皮下注射 0.5 IU 的 FSH, 共 6 次 (图 2:B)。第 4 d 让供体雌兔与 2~3 只雄兔交配, 以保证受精。交配后, 给雌兔肌肉注射人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, hCG) 100~150 IU, 诱发排卵。胚胎移植前一天, 给受体雌兔也注射 100 IU hCG, 使受体雌兔子宫、输卵管与接受移植的受精卵处于生理同期。

1.2 受精卵收集 (zygote collection) 交配 17~20 h 后, 处死供体雌兔, 打开腹腔, 取出输卵管 (留 1~1.5 cm 子宫与之相连)。用 M2 培养基 (94.7 mmol/L NaCl, 4.75 mmol/L KCl, 1.71 mmol/L CaCl₂, 1.19 mmol/L KH₂PO₄, 1.22 mmol/L MgSO₄, 3.92 mmol/L NaHCO₃, 5.55 mmol/L 葡萄糖, 23.29 mmol/L 乳酸钠, 0.45 mmol/L 丙酮酸钠, 21.0 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸, 0.4% 牛血清白蛋白, pH = 7.4) 冲取、收集受精卵。将形态正常受精卵收集在一起, 在 37°C、5% CO₂ 条件下用改良 M16 培养基 (94.7 mmol/L NaCl, 4.75 mmol/L KCl, 1.71 mmol/L CaCl₂, 1.19 mmol/L KH₂PO₄, 1.22 mmol/L MgSO₄, 24.5 mmol/L NaHCO₃, 5.55 mmol/L 葡萄糖, 23.29 mmol/L 乳

酸钠、0.45 mmol/L 丙酮酸钠、21.0 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸、0.05 mmol/L 乙二醇四乙酸钠、

0.4%牛血清白蛋白、20%胎牛血清、0.1%谷氨酸钠培养,直至用于显微注射。

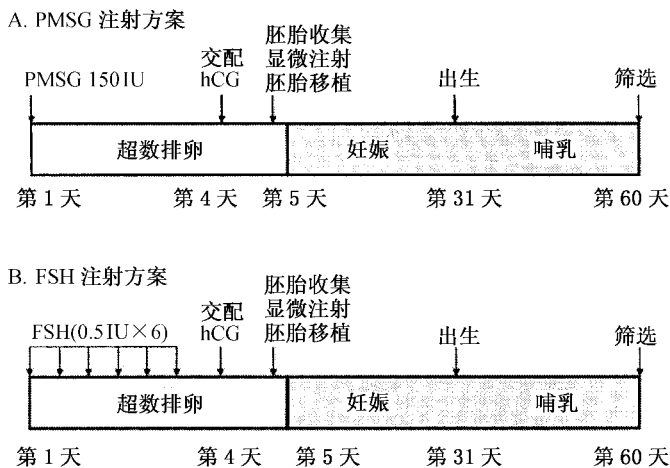


图 2 用 PMSG (A) 或 FSH (B) 诱导供体超数排卵程序及制作转基因家兔时间表

1.3 显微注射 将外源基因注射到家兔受精卵的过程,是在 200 倍放大倍数下、在带有机械壁的倒置微分干涉相差显微镜下进行(图 3:A, B)。用固定针(holding pipette)吸住受精卵,将吸入注射针(microinjection pipette)内的外源 DNA 溶液注入到雄原核(两个原核中较大的一

个)中。图 3C 是未注射外源基因的家兔受精卵照片,图 3D 是注射后受精卵的照片。注射成功的标志是注射后雄原核体积膨大,大约是原来的 1.5~2.0 倍。注射后的受精卵再移到改良 M16 中,37°C、5% CO₂ 条件下培养 2~3 h 后移植。

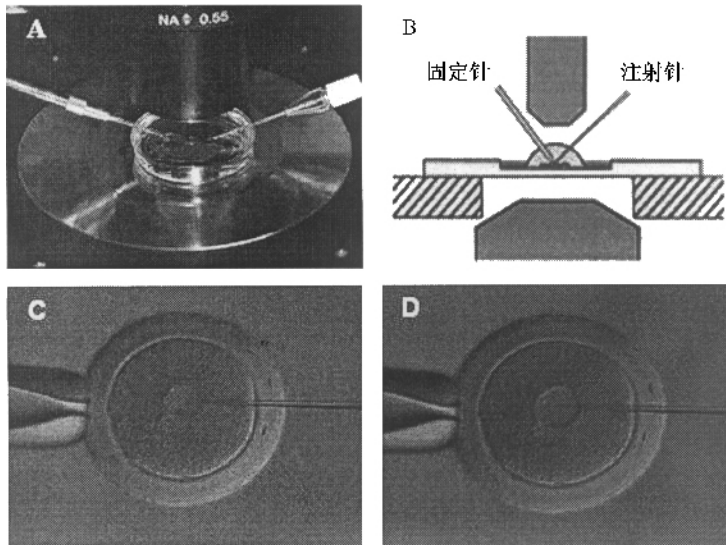


图 3 原核显微注射过程

A: 在倒置显微镜下进行外源基因原核显微注射; B: 原核显微注射示意图,用固定针(左)吸住受精卵、用注射针(右)将外源 DNA 溶液注入; C: 未注射外源基因的家兔受精卵照片,雄原核(上)比雌原核大; D: 注射后家兔受精卵的照片,雄原核体积比注射前膨大。

1.4 胚胎移植(embryo transfer) 麻醉怀孕受体家兔,仰位放置,无菌操作实施受精卵移植。

在下腹部切开皮肤、肌肉和腹膜,找出卵巢和输卵管。给每只家兔移植 30~40 枚注射过的受精卵(每侧输卵管 15~20 枚)。移植时,用 50 μ l 的微注射器连接一个细小的塑料管,将含有受精卵的 M2 培养基吸入细塑料管内(大约 5 μ l),通过输卵管口将细塑料管插入输卵管内,徐徐推动注射器柄将受精卵移入输卵管内。缝合腹膜、肌肉和皮肤。将术后的家兔移入到单独的饲养笼内。分娩前 2 d 移入繁殖笼内,准备好产箱。

1.5 转基因家兔的鉴定 仔兔出生 2~3 周后,取耳组织,提取基因组 DNA,溶解在 TE buffer 中。用 PCR 或 Southern 杂交检测仔兔基

因组中是否整合了外源基因,用 Northern 或 Western 杂交检测外源基因表达水平。如,我们在人类血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)转基因家兔的肝脏中检测到人类 VEGF 基因的 mRNA,图 4 是 Northern 杂交照片^[4],结果显示人类 VEGF 基因主要在家兔肝脏中表达。

携带外源基因的仔兔就是转基因 founder,让 founder 转基因家兔与同品系非转基因家兔交配,以确定该家兔携带的外源基因是否稳定遗传,繁殖产生大量的 F₁ 代,可用于基因表达的研究。

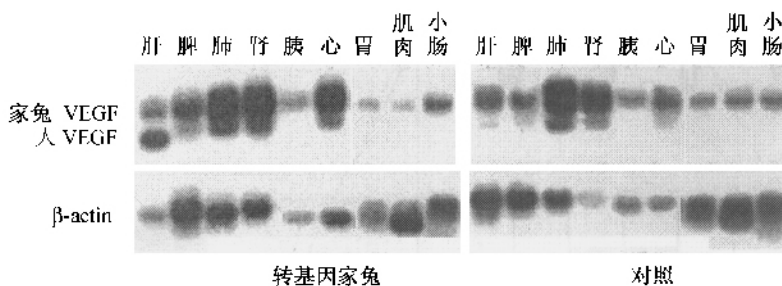


图 4 Northern 杂交检测转基因家兔各组织中人类 VEGF 基因 mRNA 转录水平

2 转基因家兔制作效率分析

通过显微注射技术将外源基因直接注射到家兔受精卵雄原核中制作转基因家兔的方法,与使用相同方法制作转基因小鼠的过程相似^[5],不同之处是,家兔受精卵的直径大约是小鼠的 2 倍,但原核的大小却差不多,家兔受精卵的透明带比较厚(图 3 :C、D)。另外,制作转基因家兔的成本也比制作转基因小鼠的成本高。

人们对影响制作转基因小鼠效率的因素已经进行了比较详细的研究^[6],但对于家兔来说,目前还缺乏系统研究,制作效率较低^[3]。主要原因是超数排卵后仍不能获得足够的受精卵,胚胎移植后妊娠率低,仔兔中的转基因效率(阳性仔兔数/受精卵移植数)低等^[3,7]。以制作表达人类载脂蛋白 A-II 基因(Apolipoprotein A-II, apoA-II)的转基因家兔为例,使用 FSH 诱发超数排卵,每只家兔得到受精卵 2~79 枚,平均

29 枚。大约 20% 的雌兔对 FSH 没有反应。从 49 只供体雌兔中获得 876 枚形态正常受精卵,通过显微注射方式注入了人类 apoA-II 基因,822 枚受精卵被移植给 28 只受体家兔,妊娠率是 57.1%(16/28)。产仔兔 59,存活 37 只。经 PCR 初筛、Southern 杂交证实,4 只仔兔携带人类 apoA-II 基因,存活 3 只^[8]。再如,我们制作人类 VEGF 转基因家兔时,将外源基因注射到 1 804 枚胚胎的原核中,产仔兔 137 只,但最终只得到 1 只用于研究的转基因家兔^[4]。

Murakami 等发现受体雌兔的年龄是影响转基因效率最重要的因素之一,6~17 月龄的受体雌兔转基因效率最高,大于 17 月龄或小于 6 月龄,转基因效率降低^[7]。胚胎移植率(仔兔数/胚胎移植数)也与年龄有关,家兔 12 月龄以前比较高,之后随着年龄的增加,移植率逐步下降。超过 3 岁后,胚胎移植率最低^[9]。家兔自然妊娠率大约 65%,胚胎移植率 43%^[9,10]。

文献报道转基因家兔基因整合率(转基因仔兔数/总仔兔数)为 7.2% ~ 13%^[10-12]。我们制作 VEGF 和 apoA-II 转基因家兔的基因整合率分别 4.4%、10.8%^[4,8]。最近,有人提出对家兔的雄原核和雌原核同时实行双注射(double microinjection)外源基因,可以提高基因整合率^[13]。Murakami 等发现,注射外源基因的结构对家兔基因整合率有重要影响,但与胚胎移植率没有关系^[7]。在小鼠中,外源基因的结构对基因整合率影响不大^[5,6]。

与小鼠相比,制作转基因家兔不但要消耗更多的时间(家兔妊娠期是小鼠的 1.5 倍)和资金,而且制作过程更加困难。显微注射技术本身、外源基因的纯度(家兔雄原核对 DNA 纯度很敏感)、外源基因结构及在基因组中的整合位点、外源基因不正常表达等影响制作转基因家兔的效率。其中,最重要的因素是注射的 DNA 浓度必须适当、纯度要高^[7]。

虽然利用显微注射方法制作转基因家兔效率不是很高,但仍然是目前最常采用的方法,其他制作方法仍在探索之中。家兔 ES 细胞系还没有真正建立起来,通过同源重组技术培育基因剔除(knock-out)或基因替换(knock-in)家兔模型的愿望就不可能实现。利用体细胞核移植技术,4 年前培育成功克隆家兔^[14],今后,核移植技术有可能用于生产转基因家兔。另外,通过精子介导的转基因家兔培育方法,也已经在我国和国外两个独立研究小组获得成功^[15,16]。最近,沈伟等采用一种“二甲基亚砷/精子介导的基因转移技术(DMSO-sperm mediated gene transfer)”,提高了家兔基因整合率^[17]。精子介导的转基因技术比显微注射法简单一些,但其有效性仍有待于进一步验证。

3 转基因家兔的应用

3.1 转基因家兔与转基因小鼠模型 毫无疑问,小鼠是生物医学研究中使用最广泛的实验动物模型,但家兔某些特殊的生物学特性也决定了它在医学研究中重要地位。如,家兔体内低密度脂蛋白(LDL)含量高,与人相似,而啮齿

类实验动物体内高密度脂蛋白(HDL)占优势;家兔的肝脏不能编码 apoB48 mRNA,像人的肝脏一样只能合成 apoB-100,而小鼠肝脏既能产生 apoB-100,又可以合成 apoB48。因此,小鼠的 apoB48 既存在于肝源性极低密度脂蛋白(VLDL)中,也存在于肠源性乳糜微粒之中,而人类的 apoB48 只存在于人的乳糜微粒之中。和人类一样,家兔血浆中富含胆固醇酯转移蛋白(CETP),在动脉粥样硬化发生、发展中起重要作用。高胆固醇饲料容易诱发家兔动脉粥样硬化,对于大多数小鼠品系则不能,因为小鼠缺乏 CETP^[2,3]。家兔的这些特性使之成为独特的模型用于研究血浆脂蛋白代谢与动脉粥样硬化的关系。

家兔和小鼠在脂蛋白代谢方面的不同还表现在,当相同的人类基因导入到它们的基因组之后,可能在家兔和小鼠身上呈现出不同的表型。如,人类卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)在家兔身上对饲料诱导的动脉粥样硬化有抑制作用,但在小鼠身上却没有反映出来^[2,3]。人类同一基因在不同种动物中反映出来表型的差异,可能会影响人们对实验结果的解释。但是,通过对来源不同种类的动物模型比较分析,将会不断提高我们对生物医学认识水平。

3.2 人类疾病转基因家兔模型 1985 年,Hammer 等在世界上首次制作成功转基因家兔,在家兔的血清中检测到了人的生长激素(growth hormone)^[10]。随后,Knight 等制作了携带 c-myc 原癌基因的转基因家兔^[18],Peng 等制作了携带 EJ-ras 基因和棉尾兔乳头瘤病毒(CRPV)DNA 的转基因家兔^[19]。1994 年,范江霖等培育成功表达人类肝脂酶(hepatic lipase,HL)的转基因家兔^[20],开始使用转基因家兔研究人类脂质、脂蛋白的代谢。

用“transgenic rabbits”或“transgenic and rabbits”主题词检索 PubMed 生物医学数据库,发现 2005 年 12 月 31 日以前 PubMed 收录的关于转基因家兔的论文中,50% 以上是利用转基因家兔模型研究人类心脑血管疾病的,包括动脉粥样硬化、血脂代谢异常、HCM、肥胖、糖尿病

等 30%左右是以开发转基因家兔生物反应器、生产重组蛋白为目的,其余是关于其他疾病模型和基础研究的论文。

动脉粥样硬化是人类心脑血管疾病最常见的病因,动脉粥样硬化引起的心脑血管疾病是目前威胁我国人民健康、导致死亡率最高的疾病^[21]。动脉粥样硬化的发生和发展与许多因素有关,其中脂蛋白代谢异常是主要危险因素之一,而转基因家兔模型开辟了研究人类脂质代谢异常新领域。到目前为止,人类 apo(a), apoA-II, apoB, apoE2, apoE3, HL, LCAT, 脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase), 15-脂质氧化酶(15-lipoxygenase), 基质金属蛋白酶 12(matrix metalloproteinase-12), VEGF 基因以及家兔的载脂蛋白 B mRNA 编码蛋白催化多肽 1(Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 1)基因等已经在家兔身上表达。此外,人类 apo(a), apoA-I, LCAT 和 LPL 基因已经被导入到 LDL 受体缺陷的 WHHL(watanabe heritable hyperlipidemic)家兔体内。双基因转基因家兔也已经培育成功。这些转基因家兔模型为研究人类动脉粥样硬化及其相关疾病的发生、发展提供了新的、独特的方法^[2~4, 8, 22]。

除了研究人类动脉粥样硬化以外,2个独立的研究小组利用转基因家兔模型研究心血管生理和 HCM^[23, 24]。其中一个研究小组培育了表达人类突变肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain)基因的转基因家兔模型,其表型与人类 HCM 患者的临床症状相似:心肌肥大、心肌细胞和心肌纤维紊乱、间质纤维化、未成年死亡。并用组织多普勒成像(Doppler imaging)技术研究了心肌的收缩和舒张以及降血脂药辛伐他汀(simvastatin)对 HCM 和间质纤维化的作用^[23, 25]。另一个研究小组利用转基因家兔表达了突变肌球蛋白轻链^[24],研究该肌球蛋白轻链与 HCM 的关系,结果发现该转基因家兔模型从出生到成年没有出现 HCM 症状,提示该基因突变不会导致 HCM^[26]。

家兔也被用来研究人类艾滋病(AIDS),家兔可以感染人类的艾滋病病毒(HIV-1),但由于

家兔和人类的 CD4 上 HIV gp20 蛋白的结合位点不同,自然感染过程十分缓慢。Dunn 等制作出表达人类 CD4 的转基因家兔,该转基因家兔模型的淋巴细胞很容易感染 HIV-1^[27],显示出该模型在开发预防和治疗抗艾滋病药物方面有较大的潜力。另外,表达人类原癌基因(oncogenes)的转基因家兔模型,也已经被广泛应用于研究人类肿瘤发生机理、寻找预防和治疗措施^[28~30]。

3.3 转基因家兔生物反应器 选择哪一种转基因动物作为生物反应器生产重组蛋白,取决于该重组蛋白市场需求量和生产成本。一般来说,如果一年生产数吨重组蛋白(如,白蛋白),应该选择转基因奶牛作为生物反应器,生产数百公斤,选择转基因山羊或绵羊,生产数公斤,可以选择转基因家兔。

和大型家畜相比较,家兔体型小、饲养成本低、制作转基因家兔周期短、见效快,也容易 SPF 化。另外,家兔乳汁中蛋白含量是绵羊乳汁的 2.5 倍、山羊的 4.8 倍。一只哺乳期的雌兔一天可分泌乳汁 170~220 g,一年可产 10 kg 的乳汁^[31]。家兔乳腺表达重组蛋白可以高达 20 g/L,建立一个中、小型家兔生产设施,一年可以生产出 50 kg 重组蛋白。所以,转基因家兔也是一种有效的生物反应器。

世界上很多实验室和医药公司正在开发转基因家兔生物反应器,用来生产单克隆抗体、激素、活性肽和药物蛋白,用于人类和动物疾病的诊断与治疗。到目前为止,人类抗胰蛋白酶(antitrypsin),白介素-2(interleukin-2),组织纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator),促红细胞生成素(erythropoietin),胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1),细胞外超氧化物歧化酶(extracellular superoxide dismutase),生长激素、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase),降钙素(calcitonin),神经生长因子(nerve growth factor- β),凝乳酶(chymosin),C1 抑制剂(C1 inhibitor),凝血因子 VⅢ(human clotting factor VⅢ)以及马绒毛膜促性腺激素(equine chorionic gonadotropin),牛 FSH 等已经在转基因家兔乳腺

中表达^[3, 32, 33], 其中有些药物经过提纯及药理、药效学研究之后, 已经进入临床试验中。

糖原贮积症 II 型(glycogen storage disorder type II)是由溶酶体 α -葡萄糖苷酶缺乏引起一种致命的遗传病。患有此病的患者由于缺乏 α -葡萄糖苷酶, 溶酶体糖原不能分解, 在肌肉组织中聚集, 严重影响肌肉组织功能、导致心脏肥大症, 危及生命。现行的治疗方案是给患者注射利用遗传工程改造的中国地鼠(Chinese hamster)卵巢细胞系生产的 α -葡萄糖苷酶制剂。1998 年, 荷兰 Bijvoet 等制作成功表达人类 α -葡萄糖苷酶的转基因家兔, 将从转基因家兔乳汁中提取的人类 α -葡萄糖苷酶注射给糖原贮积症 II 型小鼠, 小鼠糖原贮积症 II 型症状减轻或消失^[34]。随后, 患有糖原贮积症 II 型的患者使用转基因家兔提供的人类 α -葡萄糖苷酶治疗后, 肌肉功能恢复正常、心功能明显改善^[35~38]。目前, 位于荷兰的 Pharming Pharmaceutical 公司(<http://www.pharming.com>)正在将转基因家兔生产的人类 α -葡萄糖苷酶和人类 C1 抑制剂(治疗人类遗传性血管性水肿) 市场化, 其中人类 C1 抑制剂已经进入三期临床试验(Phase III clinical trials)。可以预见, 不久的将来患者有可能在药店上买到这两种转基因家兔生产的药物。

需要说明的是, 不是所有的转基因家兔都可以成为有效的生物反应器, 重组蛋白表达水平低或者表达的蛋白没有活性是目前开发转基因家兔生物反应器面临的主要困难。

4 结语

在生物医学研究中, 虽然家兔模型的应用远不如实验小鼠广泛, 但家兔独特的生物学特性, 决定了它在生物医学研究中有着啮齿类实验动物无法取代的重要地位。随着转基因家兔制作技术的丰富和完善, 以及家兔 ES 细胞系的建立, 培育出基因剔除家兔将成为可能, 利用小分子干涉 RNA(siRNA) 原理培育基因封闭(knock-down) 转基因家兔的愿望也会实现, 核移植技术也将广泛应用于转基因家兔的生产。新

的转基因家兔模型的不断培育成功, 将大大推动生物医学研究和认识水平。

参 考 文 献

- [1] Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, 1996, **379** (6 563) 333 ~ 335.
- [2] 刘恩岐, 范江霖. 转基因兔在动脉粥样硬化研究中的应用及其进展. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11**(4) 371 ~ 375.
- [3] Fan J, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol Ther*, 2003, **99**(3) 261 ~ 282.
- [4] Kitajima S, Liu E, Morimoto M, et al. Transgenic rabbits with increased VEGF expression develop hemangiomas in the liver: a new model for Kasabach-Merritt syndrome. *Lab Invest*, 2005, **85**(12): 1 517 ~ 1 527.
- [5] Hogan B, Beddington R, Costantini F. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Third edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 2003, 289 ~ 358.
- [6] Brinster R L, Chen H Y, Trumbauer M E, et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**(13): 4 438 ~ 4 442.
- [7] Murakami H, Fujimura T, Nomura K, et al. Factors influencing efficient production of transgenic rabbits. *Theriogenology*, 2002, **57**(9) 2 237 ~ 2 245.
- [8] Liu E, Kitajima S, Morimoto M. Create transgenic rabbits by microinjection human apoA-II gene into fertilized eggs. *J Xi'an Med Univ*, 2004, **15**(1) 67 ~ 70.
- [9] Maurer R R, Foote R H. Maternal aging and embryonic mortality in the rabbit. Repeated superovulation embryo culture and transfer. *J Reprod Fertil*, 1971, **25**(3) 329 ~ 341.
- [10] Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, **315**(6 021) 680 ~ 683.
- [11] Snyder B W, Vitale J, Milos P, et al. Developmental and tissue-specific expression of human CD4 in transgenic rabbits. *Mol Reprod Dev*, 1995, **40**(4) 419 ~ 428.
- [12] Duverger N, Viglietta C, Berthou L, et al. Transgenic rabbits expressing human apolipoprotein A-I in the liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16**(12): 1 424 ~ 1 429.
- [13] Chrenek P, Vasicek D, Makarevich A V, et al. Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos. *Transgenic Res*, 2005, **14**(4) 417 ~ 428.
- [14] Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat*

- Biotechnol* 2002 **20**(4) 366 ~ 369.
- [15] Wang H ,Lin A ,Zhang C ,et al . Expression of porcine growth hormone gene in transgenic rabbits as reported by green fluorescent protein. *Anim Biotechnol* 2001 **12**(2) :101 ~ 110.
- [16] Kuznetsov A V ,Kuznetsova I V ,Schit I Y . DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova *in vitro* and *in vivo* . *Mol Reprod Dev* 2000 **56**(Suppl.2) 292 ~ 297.
- [17] Shen W ,Li L ,Pan Q ,et al . Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol Reprod Dev* , 2006 [Epub ahead of print].
- [18] Knight K L ,Spieker-Polet H ,Kazdin D S ,et al . Transgenic rabbits with lymphocytic leukemia induced by the c-myc oncogene fused with the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1988 **85**(9) :3 130 ~ 3 134.
- [19] Peng X ,Olson R O ,Christian C B ,et al . Papillomas and carcinomas in transgenic rabbits carrying EJ-ras DNA and cottontail rabbit papillomavirus DNA. *J Virol* ,1993 **67**(3) : 1 698 ~ 1 701.
- [20] Fan J ,Wang J ,Bensadoun A ,et al . Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1994 **91**(18) 8 724 ~ 8 728.
- [21] He J ,Gu D ,Wu X ,et al . Major causes of death among men and women in China. *N Engl J Med* 2005 **353**(11) :1 124 ~ 1 134.
- [22] Liu E ,Kitajima S ,Higaki Y ,et al . High lipoprotein lipase activity increases insulin sensitivity in transgenic rabbits. *Metabolism* 2005 **54**(1) :132 ~ 138.
- [23] Marian A J ,Wu Y ,Lim D S ,et al . A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* ,1999 , **104**(12) :1 683 ~ 1 692.
- [24] James J ,Sanbe A ,Yager K ,et al . Genetic manipulation of the rabbit heart via transgenesis. *Circulation* ,2000 **101**(14) : 1 715 ~ 1 721.
- [25] Nagueh S F ,Kopelen H A ,Lim D S ,et al . Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities irrespective of cardiac hypertrophy in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2000 **102**(12) :1 346 ~ 1 350.
- [26] James J ,Zhang Y ,Wright K ,et al . Transgenic rabbits expressing mutant essential light chain do not develop hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* ,2002 **34**(7) 873 ~ 882.
- [27] Dunn C S ,Mehtali M ,Houdebine L M ,et al . Human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4-transgenic rabbits. *J Gen Virol* ,1995 **76**(Pt 6) :1 327 ~ 1 336.
- [28] Sethupathi P ,Spieker-Polet H ,Polet H ,et al . Lymphoid and non-lymphoid tumors in E kappamyc transgenic rabbits. *Leukemia* ,1994 **8**(12) 2 144 ~ 2 155.
- [29] Peng X ,Griffith J W ,Han R ,et al . Development of keratoacanthomas and squamous cell carcinomas in transgenic rabbits with targeted expression of EJras oncogene in epidermis. *Am J Pathol* ,1999 **155**(1) 315 ~ 324.
- [30] Peng X ,Griffith J W ,Lang C M . Reinitiated expression of EJras transgene in targeted epidermal cells of transgenic rabbits by cottontail rabbit papillomavirus infection. *Cancer Lett* , 2001 **171**(2) :193 ~ 200.
- [31] Duby R T ,Cunniff M B ,Belak J M ,et al . Effect of milking frequency on collection of milk from nursing New Zealand white rabbits. *Anim Biotechnol* ,1993 **4** 31 ~ 42.
- [32] Bosze Z ,Hiripi L ,Carnwath J W ,et al . The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Res* 2003 **12**(5) 541 ~ 553.
- [33] Dunn D A ,Pinkert C A ,Kooymann D L . Foundation Review : Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Discov Today* 2005 **10**(11) 757 ~ 767.
- [34] Bijvoet A G ,Van Hirtum H ,Kroos M A ,et al . Human acid alpha-glucosidase from rabbit milk has therapeutic effect in mice with glycogen storage disease type II. *Hum Mol Genet* , 1999 **8**(12) 2 145 ~ 2 153.
- [35] Van den Hout H ,Reuser A J ,Vulto A G ,et al . Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet* 2000 **356**(9 227) 397 ~ 398.
- [36] Van den Hout J M ,Reuser A J ,de Klerk J B ,et al . Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J Inherit Metab Dis* ,2001 **24**(2) 266 ~ 274.
- [37] Van den Hout J M ,Kamphoven J H ,Winkel L P ,et al . Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk. *Pediatrics* 2004 **113**(5) : e448 ~ 457.
- [38] Winkel L P ,Van den Hout J M ,Kamphoven J H ,et al . Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe 's disease : a three-year follow-up. *Ann Neurol* 2004 **55**(4) 495 ~ 502.