

## 五指山小型猪近交系异种移植产业化研发进展

冯书堂 戴一凡 章金刚 潘志强

**【摘要】** 为了早日实现五指山小型猪(WZSP)近交系异种移植产业化目标,努力推进近交繁育获得近交系,同时开展克服异种移植免疫排斥和猪内源性逆转录病毒(PERV)传染生物安全性两大难题的研发内容。本文从WZSP近交系双基因敲除克隆猪繁育成功、猪-猴异种角膜内皮移植取得突破性进展、WZSP近交系PERV无传染性群体建立、WZSP近交系是理想的动物模型和异种移植供体等方面,介绍WZSP近交系异种移植产业化的研发进展。

**【关键词】** 五指山小型猪;近交系猪;异种移植;免疫排斥反应; $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶基因敲除( $\alpha$ GTKO);猪内源性逆转录病毒(PERV);非 $\alpha$ -1,3-半乳糖(Gal)抗原;CRISPR/Cas9基因编辑技术

**【中图分类号】** R617, S828 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445(2018)06-0014-05

器官移植是治疗终末期器官衰竭的唯一有效途径。在当前供体器官严重匮乏的大环境下,异种移植是解决供体短缺的重要途径,其中猪器官异种移植技术开辟了人类的希望之路。大量的研究表明,天然抗体、补体系统、内皮细胞三大免疫障碍,是异种移植亟需解决首要的难题。 $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶基因敲除( $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene knockout,  $\alpha$ GTKO)猪基本克服了超急性排斥反应<sup>[1-2]</sup>,但还存在非 $\alpha$ -1,3-半乳糖( $\alpha$ -1,3-galactose, Gal)抗原,移植后引起急性血管性排斥反应。由于供、受体主要组织相容性复合体不匹配,易发生补体激活和凝血反应,异种器官长期存活还面临着慢性排斥反应等<sup>[3]</sup>。敲除非Gal抗原,如NeuGc、 $\beta$ GalNT2,可大大降低抗体介导的排斥反应(antibody-mediated rejection, AMR)的发生率<sup>[4]</sup>。

经多年探索,目前初步可以解决阻碍异种移植发展的关键问题——免疫排斥反应和传染生物安全性问题[猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)]这两大难题。2015年,美国艾默里大学报道了将 $\alpha$ GTKO+CD55人源化基因修饰猪的肾脏移植到猴的最长存活时间,已长达300 d<sup>[5]</sup>;2016年,美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)报道,将 $\alpha$ GTKO+CD46+TBM人源化基因修饰猪的异位心脏移植到

狒狒体内,可存活945 d<sup>[6]</sup>;2009年,美国匹兹堡大学报道,将CD46人源化基因修饰猪的胰岛移植到食蟹猴体内,可存活396 d<sup>[7]</sup>;2016年,美国哈佛大学报道,将 $\alpha$ GTKO+巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)阴性人源化基因修饰猪的肝脏移植到狒狒体内,可存活25 d<sup>[8]</sup>;美国马里兰大学报道,将 $\alpha$ GTKO+CD46人源化基因修饰猪的肺脏移植到狒狒体内,可存活7 d<sup>[9]</sup>。2015年, Yang等<sup>[10]</sup>报道采用CRISPR/Cas9基因编辑技术一次性去除PERV相关基因,可解决交叉感染这一阻碍异种移植发展的关键难题。尤其利用CRISPR/Cas9基因编辑技术同时敲除3个关键的猪糖分子基因,3基因敲除猪的细胞与人的抗体反应显著降低<sup>[3]</sup>。2015年底,《Science》杂志上发表了美国哈佛医学院George Church研究组的最新成果<sup>[11]</sup>,证实通过CRISPR/Cas9基因编辑技术可以一次性失活猪细胞中的62个PERV相关基因,表明利用CRISPR/Cas9可解决阻碍异种移植发展的免疫排斥和病毒交叉感染两大难题。根据国际最新研究成果,本课题组围绕上述两大难题开展了相关产业化研发,现总结如下。

### 1 五指山近交系双基因敲除克隆猪繁育成功

五指山小型猪(Wuzhishan miniature pig, WZSP)近

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2018.06.014

基金项目:国家重点研发计划重点专项(2017YFC11037000、2017YFD0501606)

作者单位:100007 北京盖兰德生物科技有限公司(冯书堂);南京医科大学(戴一凡);军事科学院军事医学研究院卫生勤务与血液研究所(章金刚);北京同仁医院(潘志强)

通讯作者:冯书堂,男,1945年生,1975年至2015年于中国农业科学院北京畜牧兽医研究所从事畜牧科学研究,研究员,博士生导师,2016年至今于北京市盖兰德科技公司任名誉董事长、首席科学家,主要从事动物繁育技术和实验用小型猪近交系培育与产业化研发, Email: fst508@sina.com

交系被视为异种移植研究的优良材料<sup>[12-15]</sup>。为了克服免疫排斥反应，我们与南京医科大学戴一凡课题组合作，利用 CRISPR/Cas9 技术结合 SCNT 构建了 *GGTA1/β4GalNT2* 双基因敲除猪，其中一窝五月龄 *GGTA1/β4GalNT2* 双基因敲除的近交系猪生长、发育良好，已步入发情期，实施配种、扩繁（图 1），为异种移植研究应用奠定种猪基础群。今后拟在 *GGTA1/β4GalNT2* 双基因敲除克隆猪的 Rosa 26 位点敲入人的 *hCD46/hCD55/LEA29YINS/hTBM* 等不同组合人源化基因，培育 4、5 个基因修饰系列人源化基因修饰猪，为医用生物辅料和异种移植产品研发奠定基础。

## 2 猪-猴异种角膜内皮移植取得突破性进展

### 2.1 WZSP 近交系角膜具有与人类近似的优势

经比对研究证实，与其他品种猪比较，WZSP 近交系角膜的厚度、曲光度及大小更接近于人类，是人类异种角膜内皮移植理想的供体材料。成年人的角膜厚度在 450~550 μm，WZSP 近交系 F<sub>22</sub> 代 22 日龄猪的角膜厚度为 (595 ± 13) μm，F<sub>15</sub> 代 23 日龄猪的角膜厚度为 (670 ± 24) μm，F<sub>23</sub> 代 300 日龄猪的角膜厚度则为 (686 ± 6) μm，90 日龄贵州小型猪的角膜厚度为 (760 ± 26) μm，普通成年家猪的角膜厚度更达 900 μm 左右。自 2000 年起，北京同仁医院眼科专家开始从事 WZSP 近交系-恒河猴穿透性角膜移植研究，通过不断改进移植方法与措施，结合术后结膜下注射复方倍他米松注射液等，不断取得新进展，其猪角膜移植片存活时间由 15 d 增至 3 个月、6 个月，2007 年 WZSP 近交系-恒河猴穿透性角膜移植，已可存活 280 d<sup>[16-17]</sup>。2011 年 WZSP 近交系-恒河猴板层角膜移植成功，



图 1 *GGTA1/β4GalNT2* 双基因敲除猪的生长发育情况  
Figure 1 Growth and development of *GGTA1/β4GalNT2* double gene knockout pigs

植片存活 3 个月以上（图 2）。

### 2.2 猪-猴异种角膜内皮组织片移植的研究进展

2016 年至 2017 年本课题组专业技术人员按照国际异种移植协会（International Xenotransplantation Association, IXA）规定的技术方法，完成 13 只猪-猴角膜内皮组织片移植手术，其中最长存活时间已达 500 余日<sup>[18]</sup>，该移植存活时间是国际猪-猴角膜内皮组织片移植存活最长时间，达到 IXA 规定的《异种角膜进入临床试验的条件》要求，即完成 10 只猪-猴角膜内皮组织片移植试验，其中连续有 6 只获得成功，存活 3 个月以上，可进行临床试验研究。目前笔者尚未见其他猪-猴异种角膜内皮组织片移植成功的研究报道。2017 年 9 月 20~23 日，本课题组参加在美国巴尔的摩市召开的第 14 届全球异种器官移植大会，并进行了大会交流，本课题组的技术较全层猪角膜移植具有免疫排斥反应小、术后恢复快等诸多优势。猪角膜内皮组织植片较薄（120~150 μm），携带异种抗原较少，且完全处于前房免疫偏离状态的保护中，因此免疫排斥反应的发生率较全层猪角膜大大降低，并且能够在仅局部使用肾上腺皮质激素（激素）的条件下维持组织植片长期存活（>6 个月），该技术更接近人体捐献角膜移植临床应用的实际条件，引起与会同行专家的关注。

### 2.3 异种角膜内皮组织片有着广阔的开发利用前景

角膜盲患者中约有 40% 适合角膜内皮组织片移植治疗，适应证包括白内障术后角膜内皮失代偿即大泡性角膜病变，先天性角膜内皮营养不良，外伤性角膜内皮损伤，单纯疱疹病毒型角膜内皮炎，急性青光眼反复发作导致的角膜内皮失代偿等。据资料报道，由于捐献供体较多，美国每年行角膜内皮组织片移植手术为 22 000 例。而我国每年此类患者均在 8 万例以上，由于异种角膜内皮组织片移植产品短缺，每年移植量不足 10%，所以研发一种替代产品用于角膜内皮组织片移植治疗角膜盲患者恢复光明尤为重要。

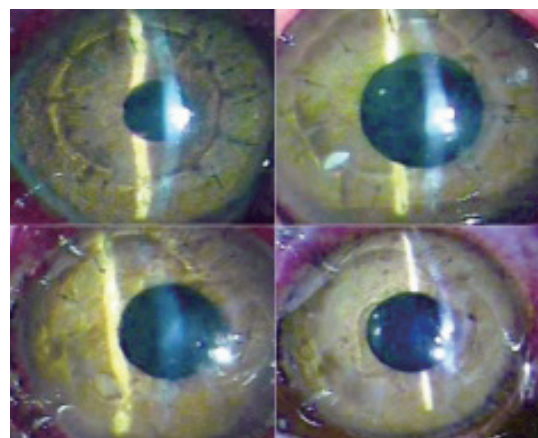


图 2 WZSP 近交系-恒河猴板层角膜移植成功  
Figure 2 Lamellar corneal transplantation of WZSP inbred line-Rhesus Monkey

与传统全层角膜移植相比,角膜内皮组织片移植具有术后视力恢复快、视觉质量更好、角膜感觉神经保存完好、无缝线相关并发症(炎症、新生血管、高度散光、异物感)和排斥反应发生率更低等优势。猪异种角膜内皮组织片产品的出现,如 WZSP 近交系异种移植角膜内皮组织片产品可使 40% 的角膜盲患者恢复光明,是一项惠及千万大众的利好事业,具有广阔的开发前景。

目前,我们正在研发的“一种后弹力层角膜内皮移植术用移植片及其液泡分离制备法”,已授权发明专利号(ZL.201610885932.8);另一种“一种后弹力层角膜内皮移植术用移植片及其机械制备法”,已申请发明专利(申请号 201610885272.3),为角膜内皮细胞移植提供了技术支撑。

### 3 五指山近交系 PERV 无传染性群体建立

#### 3.1 PERV 病毒的变异

国内外大量的研究已证实,PERV 编码有 *gag*、*pol*、*env* 3 个结构基因。国外研究还发现,不同猪种的基因组中均存在 60~150 copies 的前病毒,其中根据 PERV 的 *env* 基因组成差异,又可将 PERV 分为 A、B、C 3 种亚型。PERV-A/C 亚型重组病毒的感染性较 PERV-A 亚型和 PERV-B 亚型增强近 500 倍,表明 PERV-C 亚型的存在并参与重组可能增加了 PERV 传播的风险性等<sup>[19-20]</sup>。

#### 3.2 我国小型猪品种 PERV 的检测与筛查

我国军事科学院章金刚教授团队,联合国内 10 家单位从事培育研究,提供的 7 个品种、17 个种群、共计 348 只小型猪样品(表 1)<sup>[21]</sup>。研究证实,我国猪群普遍存在 PERV 感染,其中 PERV-A 亚型为 74.43%,PERV-B 亚型为 95.40%,PERV-C 亚型为 30.46%,且 81.61% 的猪存在 2 种以上亚型病毒混合感染<sup>[21]</sup>。WZSP 近交系基因组中存在 PERV-A、PERV-B 两种亚型,未检测到 PERV-C 亚型的存在与表达,四川大学华西医学中心的研究结果也证实了这一特性<sup>[3,20]</sup>。这就降低了具有较强感染能力的 PERV-A/C 亚型重组的可能性,并发现有该近交系 PERV 基因拷贝数少、且无传染性猪个体现象存在。这就为从该近交系群体内筛选 PERV 无传染性猪群体提供了可能。

#### 3.3 近交系无 PERV 传染性新品系的选育及确证

自 2016 年 9 月至 2017 年 12 月,参考美国食品与药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)规定的技术方法<sup>[21]</sup>,我们进行了选育 WZSP 近交系 PERV 无传染性新品系的研究,即采用细胞共培养、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)及反转录酶活性检测等实验方法,通过初步筛选和确证实验两步技术路线进行筛选(图 3),从而筛选获得无 PERV 传染性的 WZSP 近交系个体。

本课题组与军事科学院、南京医科大学、深圳市第二人民医院、美国 Cooper 教授等多方合作,在基因组水平对近交系无 PERV 传染性新品系进行验证。现已初步发现,

PERV 无传染性个体中的 PERV 前病毒基因序列中的终止子(TAA、TGA、TAG)及其终止位置,表明该个体属于 PERV 基因缺陷型 WZSP。同时,在与军事科学院合作研究中,共同申请发明专利 2 项,即“选育 WZSP 近交系无 PERV 传染性新品系的方法”(申请号 201710127536.3)和“一种鉴定和选育 PERV-pol 基因缺陷型 WZSP 近交系新品系的方法”(申请号 201710418223.3)。目前,第 1 批筛选出的 5 只 PERV 无传染性种猪,已分圈饲养、配种、陆续产仔、扩群。将为开发利用提供理想供体材料奠定基础。

## 4 五指山近交系是理想的动物模型和异种移植供体

### 4.1 WZSP 近交系是理想的动物模型

由于 WZSP 近交系耐近交、遗传稳定,且生理解剖、生长发育、器官大小、营养代谢等近似人类,以及有耐受性强、无 PERV 传染性等种质特性,是理想的动物模型。目前,北京、天津、四川、辽宁等地的研究机构先后采用上千只 WZSP 近交系实验用猪,成功用于疾病模型、药物鉴定、转基因食品安全、异种移植、生物辅料等诸多方面<sup>[22-25]</sup>。近期四川一课题组通过手术实验验证其耐受性,将 3D 打印血管移植到腹主动脉,发现 WZSP 近交系具有比其它猪更能耐受手术、术后愈合快等优势,已将 130 余只 WZSP 近交系猪用于 3D 打印血管临床前大动物验证试验,获得理想结果报批 FDA 临床试验。关于此特性,北京朝阳医院急诊科在猪心脏休克恢复研究中,也得到证实,即心脏停搏 8 min 仍可复跳,而其他品种实验猪心脏停搏 5 min 则无法复跳(资料尚未发表);北京友谊医院实施的猪肝脏同种异体移植以及中国农业科学院北京畜牧兽医研究所实施的回-直吻合术等,均证明 WZSP 近交系具有较强的耐受性。

### 4.2 WZSP 近交系、人源化多基因修饰、PERV 阴性猪具有三大优势

大量的研究业已证实,人源化多基因修饰猪(*GGTA1/*

表 1 中国小型猪体内 PERV 的检测与筛查结果<sup>[21]</sup>

Table 1 Detection and screening result of PERV in miniature pigs in China

品系	产地	n	PERV 亚型感染(只)		
			A	B	C
版纳小型猪	云南省	16	8	15	5
贵州小型猪	贵州省	36	18	32	9
剑河香猪	贵州省	20	11	19	15
巴马小型猪	广西省	101	87	98	21
巴马香猪	广西省	12	12	12	9
巴马香猪	上海	28	6	27	19
巴马香猪	重庆	20	16	20	17
贵州小型猪	重庆	22	18	20	9
农大小型猪	北京	26	18	26	2
五指山小型猪	北京	67	65	63	0

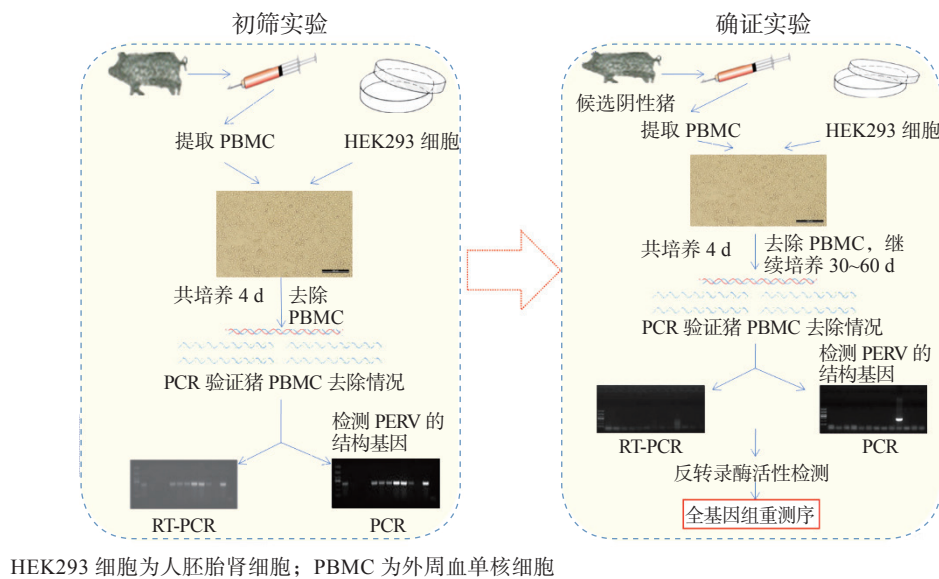


图 3 初步筛选与确证实验的技术路线

Figure 3 Technical route of preliminary screening and confirming experiment

$\beta_4\text{GalNT2+hCD55}$ 、 $\text{CD46}$ 、 $\text{LEA29YINS}$ 、 $\text{EPCR}$ 、 $\text{TBM}$ 、 $\text{hASGR1}$ 等), 可解决异种移植免疫排斥反应<sup>[1-4]</sup>。无 PERV 传染性近交系新品系, 可避免异种移植人畜共患病毒风险, 无疑是医用敷料、人工肝等产品研发供体素材。近交系基因高度纯合、遗传稳定, 便于医用产品标准化、商品化、规模化生产, 其近交繁育使其无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 生产、成本低、效益高<sup>[22-25]</sup>。WZSP 近交系、人源化多基因修饰、PERV 阴性猪具有的三大特点, 我们可得出如下推断: 近交系 + 人源化双基因敲除及多基因敲除 + 无 PERV 传染性 = 理想的异种组织或器官移植临床应用材料。

#### 4.3 WZSP 近交系已列入国家多项异种移植研发课题

WZSP 近交系的种质特异性, 已得到大多数同行专家和领导的认可, 因此, 30 年来先后得到国家科技部、农业部、国家自然科学基金委等单位的资助, 参加国家多项异种移植相关研发课题, 如 2017 年“生物医用材料研发与组织器官修复替代”重点研发专项课题——基因修饰的巴马小型猪和近交系五指山小型猪器官供体 (2017YFC11037000); 2017 年“畜禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”重点专项课题——畜禽疫病防控专用实验动物开发之疫病易感性小型猪筛选 (2017YFD0501600); 3 项国家高技术研究发展计划 (863)——基于近交系五指山猪的脱细胞组织基质材料的研发 (SQ2014X04D01216)、实验用小型猪重大疾病模型研发及其专门化品系培育 (2012AA020603)、异种器官移植的前期研究; 国家自然科学基金重大项目——异种器官移植基础性研究; 国家自然科学基金重点项目——五指山猪近交系建系研究等。

## 5 小结

WZSP 近交系研发成果在《科技日报》、中央电视台

等媒体多次报道, 尤其是 2017 年 1 月 2 日中央电视台《焦点访谈》中, WZSP 近交系成果转让成功引领我国科技创新报道, 产生了较大的社会影响。WZSP 近交系创新资源研发过程, 使我们体会到路漫漫、希望在! 30 年前以 2 只猪为系祖开始近交繁殖, 截止至投稿日已培育近交系猪群存栏 500 余只, 我们的培育基地经国家畜禽遗传资源委员会审定核准为国家级首批、唯一的一个国家异地保种遗传资源场 (No: C1101001), 为异种器官移植的科学研究奠定良好的实验基础。

#### 参考文献:

- [1] DAI Y, VAUGHT TD, BOONE J, et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(3): 251-255.
- [2] LAI L, KOLBER-SIMONDS D, PARK KW, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. Science, 2002, 295(5557): 1089-1092.
- [3] DUQUESNOY RJ, 李幼平. 移植免疫生物学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 617-618.
- [4] ESTRADA JL, MARTENS G, LI P, et al. Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/ $\beta$ 4GalNT2 genes[J]. Xenotransplantation, 2015, 22(3): 194-202. DOI: 10.1111/xen.12161.
- [5] HIGGINBOTHAM L, MATHEWS D, BREEDEN CA, et al. Pre-transplant antibody screening and anti-CD154 costimulation blockade promote long-term xenograft survival in a pig-to-primate kidney transplant model[J]. Xenotransplantation, 2015, 22(3): 221-230. DOI: 10.1111/xen.12166.
- [6] MOHIUDDIN MM, SINGH AK, CORCORAN PC, et al. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11138. DOI: 10.1038/ncomms11138.
- [7] VAN DER WINDT DJ, BOTTINO R, CASU A, et al. Long-term

- controlled normoglycemia in diabetic non-human primates after transplantation with hCD46 transgenic porcine islets[J]. *Am J Transplant*, 2009, 9(12): 2716-2726. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2009.02850.x.
- [8] SHAH JA, NAVARRO-ALVAREZ N, DEFAZIO M, et al. A bridge to somewhere: 25-day survival after pig-to-baboon liver xenotransplantation[J]. *Ann Surg*, 2016, 263(6): 1069-1071. DOI: 10.1097/SLA.0000000000001659.
- [9] LAIRD C, BURDORF L, PIERSON RN 3RD. Lung xenotransplantation: a review[J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2016, 21(3): 272-278. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000311.
- [10] YANG L, GÜELL M, NIU D, et al. Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)[J]. *Science*, 2015, 350(6264): 1101-1104. DOI: 10.1126/science.aad1191.
- [11] NIU D, WEI HJ, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307. DOI: 10.1126/science.aan4187.
- [12] FANG X, MOU Y, HUANG Z, et al. The sequence and analysis of a Chinese pig genome[J]. *Gigascience*, 2012, 1(1): 16. DOI: 10.1186/2047-217X-1-16.
- [13] MU YL, LIU L, FENG ST, et al. Identification of the miniature pig inbred line by skin allograft[J]. *J Integr Agricul*, 2015, 14(7): 1376-1382. DOI: 10.1016/S2095-3119(14)60976-X.
- [14] FENG ST, ZHANG XL, WANG TP. The progress on cultivation and identification of the first Wuzhishan inbred mini-pig in China[J]. *Agri Res Tech: Open Access J*, 2017, 12(4): 555858. DOI: 10.19080/ARTOAJ.2017.12.555858.
- [15] 冯书堂, 高倩, 刘岚. 哺乳动物近交系资源创新百年[J]. *遗传*, 2016, 38(3): 181-195. DOI: 10.16288/j.ycz.15-430.
- FENG ST, GAO Q, LIU L. Resources of mammalian inbred lines have been innovating for 100 years[J]. *Hereditas*, 2016, 38(3): 181-195. DOI: 10.16288/j.ycz.15-430.
- [16] ZHIQIANG P, CUN S, YING J, et al. WZS-pig is a potential donor alternative in corneal xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2007, 14(6): 603-611.
- [17] LI A, PAN Z, JIE Y, et al. Comparison of immunogenicity and porcine-to-rhesus lamellar corneal xenografts survival between fresh preserved and dehydrated porcine corneas[J]. *Xenotransplantation*, 2011, 18(1): 46-55. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2011.00626.x.
- [18] LIU Y, ZHANG Y, LIANG Q, et al. Porcine endothelial grafts could survive for a long term without using systemic immunosuppressors: an investigation of feasibility and efficacy of xeno-Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty from WZS-pig to rhesus monkey[J]. *Xenotransplantation*, 2018: e12433. DOI: 10.1111/xen.12433.
- [19] PATIENCE C, TAKEUCHI Y, WEISS RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs[J]. *Nat Med*, 1997, 3(3): 282-286.
- [20] 冯书堂, 马玉媛, 夏颖. 中国小型猪内源性反转录病毒研究进展与对策[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(4): 1244-1248. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2017.04.043.
- FENG ST, MA YY, XIA Y. Research progress and countermeasures of porcine endogenous retrovirus in Chinese miniature[J]. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2017, 44(4): 1244-1248. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2017.04.043.
- [21] WU J, MA Y, LV M, et al. Large-scale survey of porcine endogenous retrovirus in Chinese miniature pigs[J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2008, 31(4): 367-371.
- [22] ALBL B, HAESNER S, BRAUN-REICHHART C, et al. Tissue sampling guides for porcine biomedical models[J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(3): 414-420. DOI: 10.1177/0192623316631023.
- [23] 冯书堂, 李奎, 刘岚, 等. 小型猪近交系新品种的培育与开发利用[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(2): 274-280. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2015.02.016.
- FENG ST, LI K, LIU L, et al. Cultivation and application of miniature pig (*sus scrofa*) inbred[J]. *J Agricult Biotechnol*, 2015, 23(2): 274-280. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2015.02.016.
- [24] ZHAO Y, XIANG L, LIU Y, et al. Atherosclerosis induced by a high-cholesterol and high-fat diet in the inbred strain of the Wuzhishan miniature pig[J]. *Anim Biotechnol*, 2018, 29(2): 110-118. DOI: 10.1080/10495398.2017.1322974.
- [25] 冯书堂. 中国实验用小型猪[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.

(收稿日期: 2018-08-16)  
(本文编辑: 邬加佳 吴秋玲)