

基于基因编辑技术研究特定基因对小鼠肠道微生物的影响

阮浩龙^{1,2}, 王宁^{1,2}, 于鸿浩^{1,2}, 岳鹏鹏^{1,2}

(桂林医学院 1. 智能医学与生物技术学院; 2. 医药生物技术与转化医学重点实验室, 广西 桂林 541199)

摘要: 基因编辑是一种能够精确修改基因组的技术, 它为基因功能研究提供了强大的工具。利用锌指核酸酶 (ZFNs)、转录激活类效应核酸酶 (TALENs)、规律成簇的间隔短回文重复序列 (CRISPR) 等技术, 研究人员可以操作目标基因, 实现在小鼠模型中敲除、插入或修改特定基因, 用以研究其对肠道微生物组成的影响, 探索肠道微生物与宿主相互作用的机制, 理解这些相互作用对宿主健康的影响。近期的研究发现, 小鼠基因编辑对其肠道微生物的影响有了重要进展。特定基因的敲除能够导致微生物组成的改变, 进而影响宿主的代谢、免疫和疾病风险。这些研究揭示了肠道微生物与宿主之间复杂的相互作用网络, 为理解肠道微生物学和宿主健康的关键因素提供了重要线索。未来, 进一步研究小鼠基因组编辑对肠道微生物的影响, 将有助于开发新的治疗策略和预防措施, 以维护宿主健康。

关键词: 基因编辑; 特定基因; 小鼠模型; 肠道微生物; 相互作用

中图分类号: Q78

Impact of targeted gene editing on the composition of intestinal microbiota in mice

RUAN Haolong^{1,2}, WANG Ning^{1,2}, YU Honghao^{1,2}, YUE Pengpeng^{1,2}

(1. College of Intelligent Medicine and Biotechnology; 2. Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology and Translational Medicine, Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541199, China)

Abstract: Gene editing is a precise technique for modifying the genome, providing a powerful tool for investigating gene function. Utilizing methods such as zinc finger nucleases (ZFNs), transcription-activator like effector nucleases (TALENs), and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR), researchers can manipulate target genes to knock out, insert, or modify specific genes in mouse models to study their impact on gut microbiome composition. This enables exploration of the mechanisms of gut microbiome/host interactions and understanding the impact of these interactions on host health. Recent studies have revealed significant advances in the effects of gene editing on the gut microbes of mice, where knocking out specific genes can lead to changes in microbial composition that affect host metabolism, immunity, and disease risk. These studies unveil a complex network of interactions between gut microbes and their hosts, providing important insights into key factors in gut microbiology and host health. In the future, further research into the effects of mouse genome editing on gut microbes will help develop new therapeutic strategies and preventive measures to maintain host health.

Keywords: gene editing; specific genes; mouse models; gut microbes; interactions

在小鼠 (以及广泛意义上的哺乳动物) 的健康过程中, 肠道微生物扮演着至关重要的角色。它们构成了对宿主消化、免疫系统和新陈代谢都有重要影响的庞大并且多样化的微生物群落。肠

道微生物与宿主形成密切的相互作用, 通过调节宿主的免疫反应, 合成维生素, 参与新陈代谢。宿主的饮食结构、抗生素的使用、免疫系统状态、精神状态、遗传因素以及药物的使用等因素都会

直接或间接地影响肠道微生物群落的组成和功能，宿主的饮食结构、抗生素的使用如饮食中摄取纤维素，可促进益生菌生长，而抗生素治疗则可能造成微生物群落不平衡^[1]。通过肠道微生物群落的调节，也会对宿主的免疫系统状态和精神状态造成影响。另外，宿主的遗传因素决定了影响微生物群落形成的个体对特定微生物的忍耐能力和亲和力。维持宿主的健康，这种微生物-宿主相互作用是必不可少的。另一方面，在现代生物学研究中，基因编辑技术起着举足轻重的作用。尤其是基因编辑技术 CRISPR-CAS9 的出现，使科学家们能够对基因进行精准编辑，从而对基因在生物体发育、生理及疾病中的功能及作用进行研究^[2-3]。

了解疾病模型和潜在的治疗方法，通过基因编辑技术研究小鼠肠道微生物至关重要。这项研究可以帮助研究者深入了解特定基因对肠道微生物的组成和功能的影响，在研究过程中，通过对肠道微生物特定的基因进行敲除、插入或修改，模拟人类疾病的基因变异，从而揭示出这些变异对微生物组成的影响机制以及相关疾病的发展^[4-7]。除此之外，这一研究对发现新的靶点和治疗策略都有很大的帮助。通过对特定基因与微生物成分相互作用的深入研究，为相关疾病的治疗提供新的思路和方法，从而找到调控通路和调控靶点的新途径。最关键的是，这一研究能够对个性化医疗起到推动作用。针对不同个体设计个性化治疗方案，提高治疗效果和预后，了解特定基因变异与微生物组成之间的相互作用。因此，在促进生物医学研究和临床治疗方面，基因组编辑技术在小鼠肠道微生物研究中的应用意义重大。

1 小鼠模型在肠道微生物研究中的作用

1.1 小鼠模型的优势和局限性

小鼠在结构和功能上与人类肠道微生物有相似之处^[8]，小鼠疾病模型更贴近人类生理和病理状态。此外，小鼠模型能够通过基因编辑技术实现遗传一致性，为研究肠道微生物与疾病之间的因果关系提供更加精确的实验条件，在实验室环境中严格控制小鼠的饮食、环境和遗传背景等因素，有利于排除干扰因素。独立研究某一基因对肠道微生物的组成和功能的影响，可以通过基因编辑技术来进行。另外，小鼠的繁殖周期短、生

长速度快、实验周期也比较短，这对于大规模的实验研究有一定的帮助^[9]。它们易于管理和操作，减少了研究成本和时间，为高通量的实验提供了可能性。

小鼠被广泛用于建立包括炎症性肠病、肥胖和糖尿病在内的多种疾病模型。建立这些疾病模型的方法，往往涉及到各种各样的技术，也涉及到各种各样的实验设计。例如，炎症性肠病模型可以模拟人类疾病的发生和发展过程，通过给予小鼠诱导剂（例如化学物质或细菌成分）来引发肠道炎症性反应。针对肥胖模型，可通过高脂饮食或基因改变等策略，模拟人类肥胖的特征，使小鼠体重增加，脂肪堆积。至于糖尿病模型，可诱导糖尿病相关的病理变化^[10-12]。通过给小鼠高糖饮食或使用特定基因敲除小鼠模拟胰岛素抵抗或胰岛素缺乏。使研究人员能对肠道微生物的不同疾病的研究进行广泛的覆盖。因此，小鼠模型为深入了解肠道微生物对宿主健康和疾病的影响提供了有力的支持，成为研究肠道微生物和疾病相互关系的重要工具。

1.2 小鼠模型的局限性

虽然在肠道微生物的研究中，小鼠疾病模型的作用举足轻重，但其局限性也是需要慎重考虑的。综合多种动物模型和临床资料^[13]，采用多种研究手段和方法，更全面地认识肠道微生物在疾病发展中的作用，才能更准确地评估肠道微生物与疾病之间的关系。在小鼠身上，某些微生物可能会发挥不同的作用，因此，需要进一步验证研究结果在人类中的适用性。另外，饲料成分、空气湿度、饲养温度、光照时间等都会对肠道微生物组成和功能造成影响^[14]，肠道微生物的稳态可能会受到这些环境因素的干扰，从而对研究结果的可靠性和可复制性产生影响。小鼠的遗传背景对其肠道微生物组成和疾病易感性有着重要的影响，不同的小鼠品系或基因种类的不同，导致研究结果的差异，因此小鼠的肠道微生物组成可能存在着不同的差异。此外，需要高通量测序技术进行微生物组学分析的小鼠疾病模型中的样本获取和分析也存在一定的技术挑战。最后，小鼠个体之间的微生物组成差异较大，可能影响研究结果的一致性和可靠性，因此需要考虑个体差异的影响，并采用相应的统计分析方法加以控制，才能在小鼠疾病模型的肠道微生物研究中开展^[15]。

2 基因编辑技术的概述

基因编辑技术可以实现对特定性状或功能的干预,是通过对生物的基因序列进行有针对性的修改。其中常用的编辑工具有基因编辑技术 CRISPR-CAS9、转录激活类效应核酸酶 (TALENs)、锌指核酸酶 (ZFNs) 等。CRISPR-CAS9 与 ZFNs 和 TALENs 技术相比,具有设计简单、操作便捷、成本低廉等显著优势^[16-17]。

CRISPR-Cas9 系统是一种革命性的基因编辑技术,其基本原理和组成包括 CRISPR 序列、Cas9 蛋白、RNA 引导、DNA 切割和编辑效果^[18-19]。CRISPR 序列是细菌和古细菌天然免疫系统的一部分,由重复序列和间隔序列组成,其中间隔序列保存了过去感染事件的遗传信息。Cas9 蛋白是 CRISPR-Cas9 系统中的核酸酶,其结合了两个重要的功能域,一个是识别目标 DNA 序列的结构域,另一个是切割 DNA 的核酸酶活性域。在核酸酶活性域内,由 RNA 引导使 Cas9 蛋白结合到目标 DNA 序列上,从而保证 Cas9 蛋白能够精确识别并结合到目标位点上。一旦 Cas9 蛋白结合到目标 DNA 序列上,它的核酸酶活性域就会在 DNA 链上进行切割并产生双链断裂,从而引起 DNA 修复机制的触发,如非同源末端连接或同源重组等。研究者可以利用不同的修复机制来实现多种基因编辑效果,这些修复机制能够进行插入、删除或精确替换目标位点的 DNA 序列,从而达到基因编辑的目的。通过这种方法,科研人员可以实现包括基因插入、删除在内的多种编辑方式,从而在基因上对特定序列进行精确编辑。总的来说,CRISPR-Cas9 系统是以 RNA 引导的方式将 Cas9 蛋白精确导向到目标 DNA 序列上来,并利用其核酸酶活性实现 DNA 的切割和编辑的重要工具,在生物学和医学研究中具有举足轻重的作用。

TALENs 是一种基因编辑技术,它利用转录激活因子效应子 (TALE) 的 DNA 定位特性和 FokI 核酸酶的切割功能,实现对目标 DNA 序列的精确识别和切割。这一技术的关键在于它可以定制 TALEN 蛋白的 DNA 结合域,使之能与基因组中的特定 DNA 序列结合。基本结构包括一个带有核定位信号的 N 端结构域,用于导向细胞核;一个中央结构域,由多个串联的 TALE 重复序列组成,每个重复序列能够识别特定的 DNA 碱基对,使得 TALENs 可以针对特定的 DNA 序列设计;以及一个含有 FokI 核酸酶的 C 端结构域,负责在识别位

点进行 DNA 双链切割。由于 FokI 需要成对工作,因此通常使用两个 TALEN 分子分别结合到目标 DNA 序列上,以便于 FokI 发挥作用。凭借高度的靶向性和可定制性,TALENs 在基因治疗和功能基因组学领域具有重要应用潜力,为实现精确的基因修复、敲除或敲入提供了一种强有力的工具。

ZFNs 是一种用于基因组编辑的工具,其原理基于人工设计的锌指蛋白结构与核酸识别和切割功能的结合。ZFNs 的基本组成包括锌指蛋白和核酸酶两个主要部分。首先,锌指蛋白是由多个锌指结构域组成的,每个锌指结构域通常由约 30 个氨基酸组成,其中包含一个锌离子结合位点,使其与 DNA 特定序列结合。这种序列特异性的结合使得 ZFNs 能够准确识别基因组中的目标序列。其次,核酸酶部分是负责切割 DNA 的活性部位,通常使用的是核酸酶 FokI,该酶在形成二聚体后才具有切割活性。在 ZFNs 中,两个锌指蛋白分别与目标 DNA 序列的两侧结合,而 FokI 核酸酶则在二聚体形成后结合到这两个锌指蛋白上,从而形成一个功能完整的酶复合物。一旦该复合物与目标 DNA 序列结合,核酸酶就会切割 DNA,引发细胞内的修复机制,如非同源末端连接 (NHEJ) 或同源重组 (HR)。通过这些修复机制,可以实现基因组中的点突变、插入或删除,从而实现基因组的精准编辑。ZFNs 的设计和应用为基因组编辑领域带来了革命性的变革,为研究人员提供了一种精准、高效的工具,用于探究基因功能、疾病治疗以及农业生物技术等方面的应用^[20]。

在小鼠模型中应用基因编辑技术通常包括以下几个步骤。首先,选择与特定生理过程、疾病或表型有关的基因,选择需要编辑的目标基因。然后,设计和构建能够对目标基因进行精确定位和切割的编辑工具。然后,一般通过微注射、基因转染或病毒载体等方式,将设计好的编辑工具引入小鼠胚胎或胚胎干细胞中。编辑工具结合目标基因序列,引导核酸酶对目标 DNA 进行切割,触发 DNA 修复的自然机制介入。在修复过程中,可以利用编辑工具携带的修改模板,造成插入、删除或修改目标基因的情况发生。最终,为了确认目标基因的编辑效果,对经过编辑的小鼠胚胎或细胞进行筛选鉴定。通过这些步骤,基因编辑技术可以在小鼠模型中实现对特定基因的精确编辑,为研究基因功能和疾病模型提供了一个重要的工具^[11,21]。

3 基因编辑对小鼠肠道微生物组成的影响

在选择合适的编辑工具、确定目标基因和设计编辑策略时,涉及到使用基因编辑技术改变小鼠肠道微生物组成的方法和策略。通过显微注射、基因转染等方式将编辑工具传递到小鼠模型中^[22-23],通过聚合酶链式反应(PCR)、测序等技术评估编辑效果,并对肠道微生物成分的变化进行微生物组学分析验证。随后,对微生物成分变化对宿主生理过程的影响及其潜在机理进行了功能验证和机制探究。实验控制严格,统计分析严密实验结果的可靠及科学的意义。这些策略和方法提供了重要的工具和平台来研究肠道微生物和宿主之间的相互作用,以及疾病的发生和发展。

现在已经知道的部分基因编辑对小鼠肠道微生物的影响。例如,通过调节宿主免疫系统对肠道微生物的反应,miR-146a 可能会引起微生物群落的改变。此外,miR-146a 敲除肠道内的丰富程度也可能直接影响某些微生物的生长和代谢活动。这些微生物的变化可能会进一步影响肠道环境,包括肠道黏膜屏障功能、短链脂肪酸的生成以及免疫调节物质的释放等,最终影响宿主的肠道健康,而这些微生物的变化会使宿主的肠道健康受到影响^[24-26],虽然导致 CKO 小鼠和 Flox 小鼠的微生物群落整体相似,但这些微小的差异在长期或特定的条件下都可能累积,最终导致宿主肠道健康状况受到明显的影响。因此,miR-146a 可能在调节肠道微生物群落方面扮演了重要角色,提供了一个重要线索,可以进一步探索宿主和肠道微生物之间的相互影响^[27]。

通过检测 Fut8 基因敲除(Fut8^{-/-})和野生型(Fut8^{+/+})小鼠的体重和 Fut8 酶活性,并采集粪便样本进行 PCR-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)分析,观察到 Fut8^{-/-}小鼠表现出生长缓慢的现象,并且完全丧失了 Fut8 酶活性。这一结果与野生型(Fut8^{+/+})小鼠相比显示出明显的差异。在对粪便样本进行 PCR-DGGE 分析时,发现 Fut8^{-/-}小鼠的肠道菌群结构与野生型小鼠存在显著的差异,特别是在拟杆菌门微生物方面。这表明 Fut8 基因敲除对小鼠的肠道菌群结构产生了显著影响。综合分析这些结果,Fut8 基因的敲除对小鼠的肠道菌群结构有显著的影响。这一发现为进一步理解 Fut8 基因在肠道微生态调节中的作用提供了重要线索^[28]。

研究人员正在对 ATG5 和 ATG7 这两种细胞自噬基因对肠道微生物的影响进行探索。通过对 ATG5 和 ATG7 的小鼠模型制作肠上皮特异性敲除,并进行宏基因组学二代测序,观察到敲除 ATG5 和 ATG7 基因后,小鼠自噬信号发生障碍,导致肠内潘氏畸形,免疫蛋白 MUC2 表达量升高。基因敲除小鼠的肠道微生物种类和分布与野生型小鼠有明显区别。这一发现表明,宿主细胞自噬机制反映了宿主基因的变化和肠道微生物之间的相互影响,它影响着肠道微生物的种类和分布。所以,细胞自噬基因的改变,可能使肠道微生物的组成发生变化,从而对肠道健康和免疫状态产生影响。这一研究成果为深入了解宿主和肠道微生物之间的相互作用提供了重要参考,也提供了一个全新的视角,可以探讨未来肠道微生物和细胞自噬机制之间的分子调控机制^[29]。

有研究员通过行为学测试、粪便菌群移植(FMT)、16S rDNA 基因测序等方法进行研究探讨 NLRP3 炎症小体基因敲除小鼠肠道菌群对抑郁样行为的影响及其机制。发现 NLRP3 KO 小鼠表现出较少的抑郁样行为,其肠道菌群结构显著改变。将 NLRP3 KO 小鼠的肠道菌群移植到野生型小鼠体内,可以改善慢性不可预知应激(CUS)诱导的抑郁样行为。最终得出结论,NLRP3 KO 小鼠肠道菌群通过调节星形胶质细胞功能,可能通过 circHIPK2 轴影响抑郁样行为^[30]。

相关研究的主要发现包括微生物组成的改变,以及微生物对宿主生理过程的影响等,其中主要发现了微生物对宿主生理过程的改变和影响。包括特定微生物菌群的增加或减少、微生物多样性的改变等,在基因编辑技术的干预下,小鼠的肠道微生物组成发生了明显的变化。这些微生物组成的变化与宿主的生理过程密切相关,包括免疫调节、营养代谢、肠道屏障功能等方面的变化^[31-34]。研究发现,由于小鼠免疫系统调节可能受到微生物成分改变的影响,从而引起机体免疫紊乱或炎症反应增多;同时,小鼠的营养吸收和代谢调节也可能受到微生物代谢物变化的影响,进而对其生理指标如体重、脂质代谢等产生影响。另外,小鼠肠道屏障功能的完整性可能会受到微生物成分变化的影响^[35-37],从而增加肠道疾病发生的概率。综合来看,基因编辑技术对宿主生理过程能产生明显影响的小鼠肠道微生物组成调控,为微生物与宿主相互作用的进一步研究提供了重要实验依据。

4 研究挑战与前景

基因编辑技术的发展为研究小鼠肠道微生物组成的影响开辟了新的研究途径,但也遇到了很多挑战;一是由于小鼠肠道微生物组成受很多因素的影响,如遗传环境饮食等诸多因素导致确定基因编辑对其直接影响具有很大难度;另外,由于样本的收集处理过程中存在很多外部因素能够对结果的准确性产生影响;再者由于基因编辑技术的使用涉及很多因素及其可能的交互作用而增加了数据解释工作的复杂程度;另外,基因编辑技术的使用还会带来很多伦理和法律方面的问题。包括实验动物福利伦理等方面可能会限制相关研究的进行。因此在小鼠肠道微生物的组成研究中运用基因编辑技术需要面对很多挑战。

尽管如此,基因编辑技术对研究小鼠肠道微生物组成有空前的机遇,随着技术的进步能够对微生物与宿主的相互作用有更深入的认识,对微生物与宿主之间的作用机理进行探讨,结合大数据生物信息学的方法,有望对基因编辑对微生物组成的影响进行综合分析和说明^[38-40],通过揭示微生物组的作用机制,在健康和疾病中发挥作用。另外,基因编辑技术的研究还为个性化医疗提供了新的思路和途径,如通过对肠道微生物组进行调节来治疗或预防相关疾病。随着技术的不断进步与方法不断改进,相信在这一领域会取得更多重要的研究成果,并对认识肠道微生物与人体健康之间的关系具有重要意义。

5 结论

基因编辑技术可以对小鼠肠道微生物组成的复杂性与多样性造成深远影响,而肠道微生物组成在个体间和环境因素下的差异,也为这项工作增加了难度。基因编辑技术的有效性、安全性、误差率、潜在的副作用以及对基因组的不可逆影响,都是研究中必须克服的重要挑战。然而,尽管面临诸多挑战,基因编辑技术在调控小鼠肠道微生物组成方面展现出了巨大的潜力。通过精准编辑微生物群体,在控制疾病传播、促进健康代谢和免疫调控方面为医学领域带来了新的可能性。这些研究成果不仅有助于更清晰地理解微生物在健康和疾病中的作用机制,还为疾病治疗和预防提供了创新的途径。

基因编辑技术在小鼠肠道微生物组成研究领

域大有可为。今后的研究工作应该着重提高基因编辑技术的精确性和安全性,对小鼠肠道微生物组成的调控机理进行深入的研究,并由此将研究成果应用于人类健康领域,为改善疾病治疗和促进人类健康有重要贡献,为医学领域的发展带来重大的影响和机遇。

参考文献

- [1] PONZIANI FR, ZOCCO MA, D'AVERSA F, et al. Eubiotic properties of rifaximin: disruption of the traditional concepts in gut microbiota modulation[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(25): 4491-4499.
- [2] HOU KJ, WU ZX, CHEN XY, et al. Microbiota in health and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 135.
- [3] GOMAA EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2020, 113(12): 2019-2040.
- [4] XIE KB, MINKENBERG B, YANG YN. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(11): 3570-3575.
- [5] SANDER JD, JOUNG JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 347-355.
- [6] MALI P, YANG LH, ESVELT KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [7] BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors[J]. *Science*, 2009, 326(5959): 1509-1512.
- [8] 高安, 徐玉静, 陆圣威, 等. 粪菌移植对慢加急性肝衰竭小鼠模型肠道菌群的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(6): 1379-1385.
- [9] 尹丹阳, 胡怡, 史仍飞. 动物衰老模型的研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(2): 156-162.
- [10] LI X, WATANABE K, KIMURA I. Gut microbiota dysbiosis drives and implies novel therapeutic strategies for diabetes mellitus and related metabolic diseases[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1882.
- [11] GRASSET E, PUEL A, CHARPENTIER J, et al. A specific gut microbiota dysbiosis of type 2 diabetic mice induces GLP-1 resistance through an enteric NO-dependent and gut-brain axis mechanism[J]. *Cell Metab*, 2017, 26(1): 278.
- [12] FÄNDRIS L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview[J]. *J Intern Med*, 2017, 281(4): 319-336.
- [13] 吕爱平. 病证结合动物模型研究: 从理论创新到技术挑战[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(1): 6-7.
- [14] 刘昌孝. 肠道菌群与健康、疾病和药物作用的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43(1): 1-14.
- [15] 肖瑶, 牛玥, 毛明慧, 等. 2型糖尿病与肠道核心菌群的相关性[J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(3): 358-369.
- [16] YANG H, WANG HY, SHIVALILA CS, et al. One-step

- generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1370-1379.
- [17] WAN HF, FENG CJ, TENG F, et al. One-step generation of p53 gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system[J]. *Cell Res*, 2015, 25(2): 258-261.
- [18] WYMAN C, KANAAR R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well[J]. *Annu Rev Genet*, 2006, 40: 363-383.
- [19] GAO CX. Genome engineering for crop improvement and future agriculture[J]. *Cell*, 2021, 184(6): 1621-1635.
- [20] JI HY, LU PP, LIU BC, et al. Zinc-finger nucleases induced by HIV-1 tat excise HIV-1 from the host genome in infected and latently infected cells[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 12: 67-74.
- [21] THOMAS KR, CAPECCHI MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51(3): 503-512.
- [22] FRIEDLAND AE, TZUR YB, ESVELT KM, et al. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(8): 741-743.
- [23] WANG HY, YANG H, SHIVALILA CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [24] FRANCESCHI C, VALENSIN S, LESCAI F, et al. Neuroinflammation and the genetics of Alzheimer's disease: the search for a pro-inflammatory phenotype[J]. *Aging*, 2001, 13(3): 163-170.
- [25] BHAUMIK D, SCOTT GK, SCHOKRPUR S, et al. MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8[J]. *Aging*, 2009, 1(4): 402-411.
- [26] YE EA, STEINLE JJ. MiR-146a attenuates inflammatory pathways mediated by TLR4/NF- κ B and TNF α to protect primary human retinal microvascular endothelial cells grown in high glucose[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 3958453.
- [27] 王辞岚, 李劲频, 傅金凤, 等. MiR-125a-5p 基因敲除 C57BL/6J 小鼠的构建[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(5): 838-842.
- [28] 李明, 白亚强, 何春阳, 等. 核心岩藻糖基转移酶 Fut8 基因敲除小鼠肠道菌群特征[J]. *中国微生物学杂志*, 2017, 29(4): 381-384, 389.
- [29] 赵文静. 肠上皮特异性敲除自噬基因 Atg5/Atg7 小鼠肠道微生物宏基因组测序分析[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
- [30] 程梦静. NLRP3 KO 小鼠肠道菌群对抑郁样行为的影响及其机制研究[D]. 南京: 东南大学, 2019.
- [31] 金磊, 王立志. 肠道微生物与宿主免疫关系研究进展[J]. *现代畜牧兽医*, 2018(9): 52-58.
- [32] 沙珊珊, 董世荣, 杨玉菊. 肠道菌群及代谢物调控宿主肠道免疫的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(8): 126-136.
- [33] CUMMINGS JH, ANTOINE JM, AZPIROZ F, et al. PASSCLAIM: gut health and immunity[J]. *Eur J Nutr*, 2004, 43 (Suppl 2): II118-II173.
- [34] TURNER JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(11): 799-809.
- [35] MA LY, NI YH, WANG Z, et al. Spermidine improves gut barrier integrity and gut microbiota function in diet-induced obese mice [J]. *Gut Microbes*, 2020, 12(1): 1-19.
- [36] SONG X, LIU L, PENG SW, et al. Resveratrol regulates intestinal barrier function in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice[J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102(3): 1205-1215.
- [37] WANG WJ, ZHAO JF, GUI WF, et al. Tauroursodeoxycholic acid inhibits intestinal inflammation and barrier disruption in mice with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(3): 469-484.
- [38] KRITTANAWONG C, SUN T, HERZOG E. Big data and genome editing technology: a new paradigm of cardiovascular genomics[J]. *Curr Cardiol Rev*, 2017, 13(4): 301-304.
- [39] LI Q, LU JS, YIN XD, et al. Base editing-mediated one-step inactivation of the Dnmt gene family reveals critical roles of DNA methylation during mouse gastrulation[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2922.
- [40] ZUO EW, SUN YD, WEI W, et al. GOTI, a method to identify genome-wide off-target effects of genome editing in mouse embryos [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(9): 3009-3029.

(方丽蓉 编辑)