

黄小荣,黄衍恒,叶霖,等. 巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠的构建及鉴定[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 770-775.
Huang XR, Huang YH, Ye L, et al. Construction and identification of macrophage-conditional *Atg5*-knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 770-775.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.013

巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠的构建及鉴定

黄小荣[#],黄衍恒[#],叶霖[#],杨陈,汤济鑫,安宁,刘建兴,刘华锋^{*}

(广东医科大学附属医院肾病研究所,湛江市慢性肾脏病防控重点实验室,湛江 524001)

【摘要】 目的 构建并鉴定巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠,为研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供动物模型。方法 将引进 LysM-Cre 小鼠与 *Atg5^{fllox/+}* 小鼠进行杂交,*Atg5^{fllox/+}* 小鼠自交,分别获得基因型为 *Atg5^{fllox/+} Cre^{+/-}* 和 *Atg5^{fllox/fllox} Cre^{-/-}* 的子代小鼠;将上述两种基因型的子代小鼠杂交,得到巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠 (*Atg5^{fllox/fllox} Cre^{+/-}*, *Atg5^{-/-}*) 和对照小鼠 (*Atg5^{fllox/fllox} Cre^{-/-}*, *Atg5^{+/+}*)。提取小鼠鼠尾组织基因组 DNA,经 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳后,在 DNA 水平判断小鼠基因型;提取小鼠骨髓来源巨噬细胞 RNA 和蛋白,利用基因测序和 Western blot 技术检验 *Atg5* 基因的敲除效果。结果 成功建立巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠模型,该小鼠存活并且可育。在基因及蛋白水平上,巨噬细胞 *Atg5* 基因敲除成功;且与 *Atg5^{+/+}* 小鼠相比,*Atg5^{-/-}* 小鼠自噬基础水平低下(p62 明显增多,LC3 II 明显减少),对于自噬激活剂雷帕霉素刺激不能恢复到正常基础水平。结论 利用 Cre/loxP 系统,本研究成功构建并鉴定出条件性巨噬细胞 *Atg5* 基因敲除小鼠,为在动物水平研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供研究平台。

【关键词】 巨噬细胞; *Atg5* 基因; 基因敲除; 自噬; 基因型鉴定

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0770-06

Construction and identification of macrophage-conditional *Atg5*-knockout mice

HUANG Xiaorong[#], HUANG Yanheng[#], YE Lin[#], YANG Chen, TANG Jixin, AN Ning, LIU Jianxing, LIU Huafeng^{*}

(Institute of Nephrology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, and Key Laboratory of Prevention and Management of Chronic Kidney Disease of Zhanjiang City, Zhanjiang 524001, China)

Corresponding author: LIU Huafeng. E-mail: hf-liu@263.net

【Abstract】 Objective To construct and identify macrophage-conditional *Atg5*-knockout mice to provide an animal model for studying the role of macrophage autophagy in the pathogenesis of renal diseases. **Methods** LysM-Cre mice were hybridized with *Atg5^{fllox/+}* mice, and *Atg5^{fllox/+}* mice were self-crossbred to obtain progeny mice with *Atg5^{fllox/+} Cre^{+/-}* and *Atg5^{fllox/fllox} Cre^{-/-}*. The progeny mice of the above two genotypes were then hybridized to obtain macrophage-conditional *Atg5* gene-knockout mice (*Atg5^{fllox/fllox} Cre^{+/-}*, *Atg5^{-/-}*) and control mice (*Atg5^{fllox/fllox} Cre^{-/-}*, *Atg5^{+/+}*). The phenotypes of the mice were determined via electrophoresis of DNA that had been extracted from mouse tail tissue and amplified via PCR. Mouse bone marrow-derived macrophage RNA and protein were extracted, and *Atg5* gene expression was tested via sequencing and

【基金项目】 国家自然科学基金(81470959, 81670654, 81700627);广东省科技创新战略专项资金(2018A030313231);湛江市科技发展专项资金竞争性分配项目(2018A01034, 2018A01040)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81470959, 81670654, 81700627), Science and Technology Innovation Strategy Special Fund of Guangdong Province (2018A030313231), Science and Technology Development Special Fund Competitive Distribution Project of Zhanjiang City (2018A01034, 2018A01040).

【作者简介】 黄小荣(1993—),女,硕士研究生,研究方向:肾小管间质纤维化。Email: 1028781793@qq.com;

黄衍恒(1993—),男,硕士研究生,研究方向:肾小管间质纤维化。Email: 396852647@qq.com;

叶霖(1990—),女,博士研究生,研究方向:肾小管间质纤维化。Email: 471775761@qq.com。

[#]共同第一作者

【通信作者】 刘华锋,博士,教授,从事肾小管-间质损伤及防治研究。Email: hf-liu@263.net

Western blotting. **Results** A macrophage-conditional *Atg5*-knockout mouse model was established; these mice survived and were fertile. The macrophage *Atg5* gene was successfully knocked out at both the gene and protein levels. The basic macrophage autophagy level in the *Atg5*^{-/-} mice was much lower than that in the *Atg5*^{+/+} mice (p62 was significantly increased, and LC3II was significantly reduced) and could not be restored to the basic level without deleting *Atg5* after stimulation with the autophagy activator rapamycin. **Conclusions** Macrophage-conditional *Atg5* - knockout mice are successfully constructed and identified via the Cre/loxP system, providing a research platform for studying the role of macrophage autophagy in renal disease pathogenesis at the animal level.

【Keywords】 macrophage; *Atg5* gene; gene knockout; autophagy; genotype identification

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

巨噬细胞属于单核吞噬细胞家族成员, 既在固有免疫中起重要作用, 也可通过招募其他免疫细胞如淋巴细胞产生适应性免疫反应, 进而在机体免疫反应、组织损伤和修复中起关键作用^[1]。根据表型和功能不同, 巨噬细胞可分为不同的亚类, 一般可分为经典活化型 M1 促炎巨噬细胞 (M1) 和替代活化型 M2 抗炎巨噬细胞 (M2)。M1 可大量分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-23、活性氧簇 (ROS) 等促炎细胞因子; 而 M2 则可分泌 IL-4、IL-13、IL-10、TGF- β 1 等炎症抑制因子, 及成纤维细胞生长因子及血小板衍生因子等促纤维化因子^[2-3]。几乎所有类型的急性肾损伤和进行性慢性肾脏病都可在肾小球及肾间质中检测到巨噬细胞浸润^[4], 且根据肾脏微环境变化, 巨噬细胞可在促炎表型和抗炎促纤维化表型之间进行转化^[5], 从而在肾小管-间质损伤、修复和纤维化各阶段中发挥着不同作用^[4, 6-8], 显著影响肾小管-间质损伤的最终转归。

近年来, 自噬通路在肾小管-间质损伤进程中的作用越来越受关注; 而目前对自噬的研究主要集中在 TECs 上^[9-10], 免疫细胞自噬在肾脏疾病的作用研究尚涉及甚少。现研究认为, 自噬可影响免疫细胞的增殖、凋亡、迁徙、分化、活化以及炎症因子分泌^[11]。有研究表明在眼色素层炎^[12]、高脂饮食诱导肥胖小鼠^[13]、半乳糖胺联合 LPS 诱导的急性肝损伤^[14]等诸多炎症模型中, 特异性阻断巨噬细胞自噬通路, 可引起巨噬细胞炎症体降解受阻而分泌大量炎症因子 IL-1 阻和 IL-18, 加剧疾病相关器官的炎症反应及损伤严重程度^[12]。因此巨噬细胞自噬很可能参与调节机体炎症免疫反应, 影响疾病进展。然而在肾脏疾病发生发展过程中, 自噬如何调节巨噬细胞功能, 进而影响肾脏疾病进展尚未知晓。

ATG5 是自噬通路中的关键蛋白, 对于自噬泡形成及降解是必不可少的^[15]。ATG12-ATG/ATG16 复合物通过参与 LC3-PE 偶联途径或直接与膜结合两种方式形成自噬体膜^[16]; 并且 ATG5 可通

过与自噬体膜上的 TECRP 结合, 促进自噬体与溶酶体融合^[17-18], 形成自噬溶酶体, 最终降解其所包裹的内容物。敲低或敲除 ATG5 可导致自噬下调或完全抑制, 表明 ATG5 在自噬通路中起关键作用^[19]。因此, 巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠模型的构建, 为在动物水平上研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发生发展中的作用是可行且非常必要的。在本实验中我们将探讨最佳繁殖方案、繁育小鼠基因型鉴定及 *Atg5* 敲除效果分析, 为研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 月龄 SPF 级 C57BL/6J-*Atg5*^{em2(flox)/SMOC} 小鼠共 6 只, 雌雄各 3 只; LysM-Cre JAX stock No. 004781 小鼠共 4 只, 雌雄各 2 只, 体重 20 ~ 25 g, 购于上海南方模式生物科技股份有限公司【SCXK (沪) 2017-0010】, 饲养于广东医科大学实验动物中心【SYXK (粤) 2015-0147】。所有小鼠饲养于 12 h/12 h 光照/黑暗条件下, 自由采食和饮水, 所有操作均符合实验动物伦理学要求 (GDY1801016)。

1.1.2 试剂与仪器

Premix Tag 2.0 plus (TaKaRa, 日本); BIOWEST AGAROSE, Gel red 核酸凝胶染料 (联硕科技有限公司, 中国); TAE 缓冲液 (广州锐科生物有限公司, 中国); 雷帕霉素 (Sigma, 美国), 氯喹 (Sigma, 美国), anti-LC3 II antibody (Sigma, 美国); anti-SQSTM1/p62 antibody (MBL, 日本); anti-*Atg5* antibody, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (Abcam, 英国); anti-GAPDH antibody (上海碧云天生物技术有限公司, 中国)。

凝胶电泳仪 (Bio-Rad, 美国); Azure biosystems c500 双激光近红外成像分析仪 (Azure biosystems, 美国); ProFlexTM 3 x 32-well PCR System (Applied

Biosystems, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠尾部组织基因组 DNA 的提取、扩增及鉴定

(1) DNA 提取:采用碱裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA。待新生小鼠达 3~4 周龄打耳标后,剪取小鼠鼠尾约 3 mm,置于 1.5 mL EP 管中;加入 50 mmol/L NaOH 溶液 90 μ L,置恒温水浴锅中 95 $^{\circ}$ C 加热 30 min。待 EP 管冷却后,加入 1 mol/L Tris 溶液 (pH 8.0) 10 μ L 充分震荡混匀,以 12 000 r/min 离心 2 min。取上清置于新 1.5 mL EP 管中,-20 $^{\circ}$ C 保存。

(2) PCR 扩增:*Flox* 基因的上游引物:5'-TTCAGTGTACCCTGTGTATTGG-3',下游引物:5'-GGGAAACAGTTGTGTTCTTTGT-3'和 *Cre* 基因的上游引物:5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3',下游引物:5'-CCCAGAAATGCCAGATTACG-3',5'-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC-3';反应体系 25 μ L;扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

(3) PCR 产物鉴定:PCR 产物使用 1.5% (质量浓度) 琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像分析系统观察分析条带位置。琼脂糖凝胶上的 PCR 条带出现与 *Flox* 基因、*Cre* 基因 PCR 产物大小一致的条带为阳性结果,否则为阴性结果。

1.2.2 巨噬细胞 *Atg5* 基因敲除效果验证

将已进行基因型鉴定的小鼠,进行敲除效果鉴定。待小鼠 8 周龄后,取 *Atg5*^{+/+} 小鼠及 *Atg5*^{-/-} 小鼠骨髓细胞,使用 M-CSF 刺激 7 d,诱导为成熟巨噬细胞,提取其 RNA 及蛋白质。将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 后,进行 PCR 扩增,上游引物序列:5'-TTCAGTGTACCCTGTG TATTGG-3',下游引物序列:5'-GGGAAACAGTTGTGTTCTTTGT-3',然后将 PCR 产物送天一辉远生物科技有限公司进行测序。

用 RIPA 裂解液提取巨噬细胞蛋白,BCA 法测定蛋白含量;按每孔 30 μ g 总蛋白上样,行 SDS-PAGE 电泳,电泳完成后将蛋白转移至 0.22 μ m PVDF 膜上;20 mL 含 5%BSA 封闭液室温封闭 1 h;分别加入 1 \times PBST 稀释的抗 ATG5 多克隆抗体 (1:1000)、抗 LC3 多克隆抗体 (1:1000)、抗 P62 多克隆抗体 (1:1000) 和抗 GAPDH 单克隆抗体 (1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;20 mL 1 \times PBST 缓冲液中洗膜 3 次,每次 5 min;加入 1 \times PBST 缓冲液稀释的二抗辣根酶标

记山羊抗兔 IgG (1:1000),置摇床室温孵育 1 h;20 mL 1 \times PBST 缓冲液中洗膜 3 次,每次 5 min;在 Azure biosystems c500 双激光近红外成像分析仪曝光成像。通过检测自噬相关蛋白 (如 LC3 II、p62 等),观察雷帕霉素 (Rapamycin, 10 μ mol/L) 及氯喹 (Chloroquine, 10 μ mol/L) 刺激 24 h 后,是否能够激活/抑制 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬,进一步确定 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬功能缺陷。

2 结果

2.1 小鼠的繁殖情况

为挑选出最佳繁殖方案,我们在得到 F2 代小鼠后,采用了 2 种配种方式进行繁殖 (图 1);结果为若按 F2a 得到实验小鼠 (*Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{+/-} 或 *Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{-/-}) 共 5 只,占 50% (5/10),若按 F2b 得到实验小鼠 (*Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{+/-} 或 *Atg5*^{flox/flox} *Cre*^{-/-}) 共 3 只,占 25% (3/12);以上两种繁育方案的分离比例均符合基本孟德尔遗传定律,表明巨噬细胞条件性敲除 *Atg5* 基因后对小鼠繁殖能力无明显影响,且 F2 代采用 F2a 繁殖方式,获得巨噬细胞条件性敲除 *Atg5* 基因小鼠及对照小鼠的效率更高。

2.2 小鼠基因型鉴定结果

将鼠尾组织基因组 DNA 进行扩增后电泳,结果见图 2。其中小鼠 *Flox* 基因型鉴定结果见图 2A,其中 1 为 *Flox/Flox* 纯合小鼠 (469 bp),2、3 和 5 为 *Flox/-* 杂合子 (469 bp 和 411 bp),4 为野生型 (411 bp)。*Cre* 基因型鉴定结果见图 2B,其中 1、2、4、5 为 *Cre*^{+/-} (700 bp 和 350 bp),3 和 6 为 *Cre*^{-/-} (350 bp)。

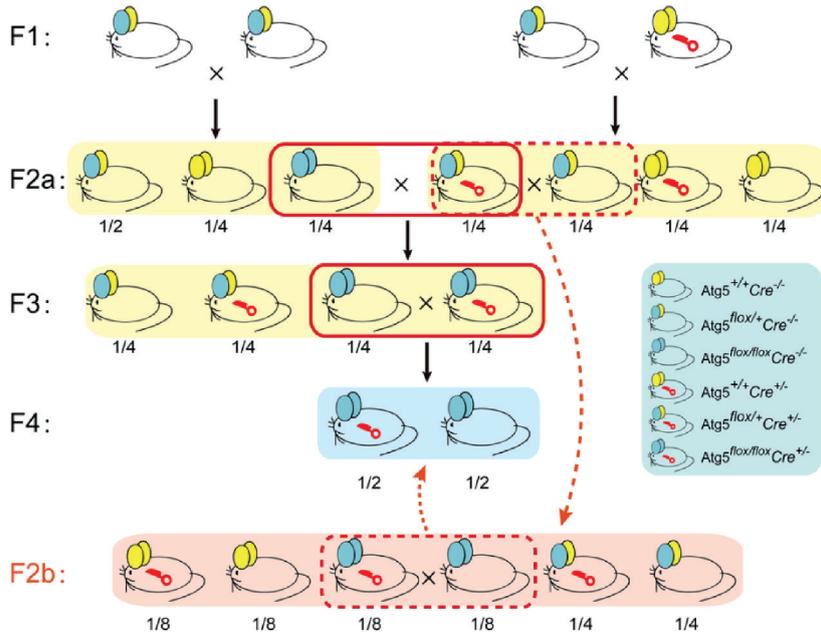
2.3 *Atg5* 基因敲除效果鉴定

分别提取 *Atg5*^{-/-} 小鼠和 *Atg5*^{+/+} 小鼠骨髓细胞,诱导成巨噬细胞;

(1) 基因水平敲除效果鉴定:提取该骨髓来源的巨噬细胞 RNA,逆转录为 cDNA 后,使用特异性引物进行 PCR 扩增,将 PCR 产物进行测序,结果显示 *Atg5*^{-/-} 小鼠编码区 Exon3 (约 128 bp) 被敲除 (图 3A-D)。

(2) 蛋白水平敲除效果鉴定:提取两组小鼠骨髓来源巨噬细胞蛋白进行 Western blotting 检测,结果显示:与 *Atg5*^{+/+} 小鼠相比,*Atg5*^{-/-} 小鼠 ATG5 蛋白表达水平明显减少 (图 3E);且 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞内 p62 明显增多,而 LC3II 明显减少 (图 3F),提示 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞内自噬水平低下。

(3) 功能水平敲除效果鉴定:使用雷帕霉素

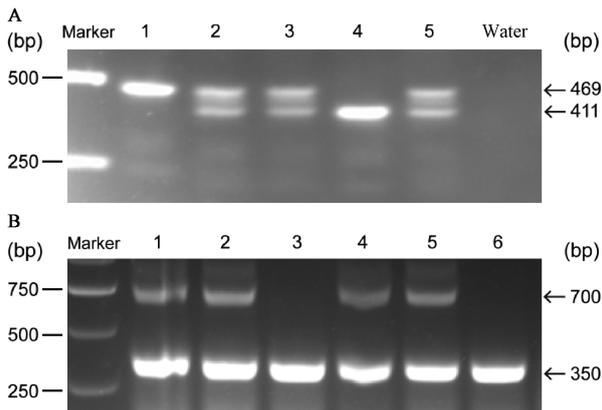


注：“→”为 F2a 繁殖方式，“--->”为 F2b 繁殖方式。

图 1 小鼠繁殖方案

Note. “→” is the propagation mode of F2a and “--->” is the propagation mode of F2b.

Figure 1 Mice breeding program



注:A 为小鼠 Flox 基因型鉴定结果,其中 1 为 Flox/Flox 纯合小鼠,2,3 和 5 为 Flox/- 杂合子,4 为野生型。B 为 Cre 基因型鉴定结果,其中 1,2,4,5 为 Cre^{+/-},3 和 6 为 Cre^{-/-}。

图 2 部分小鼠基因型 PCR 鉴定

Note: A shows the identification results of Flox genotype in mice, in which 1 is Flox/Flox homozygous mouse, 2, 3 and 5 are Flox/- heterozygotes, and 4 is wild type. B shows the identification result of Cre genotype in mice, in which 1, 2, 4, 5 were Cre^{+/-}, and 3 and 6 were Cre^{-/-}.

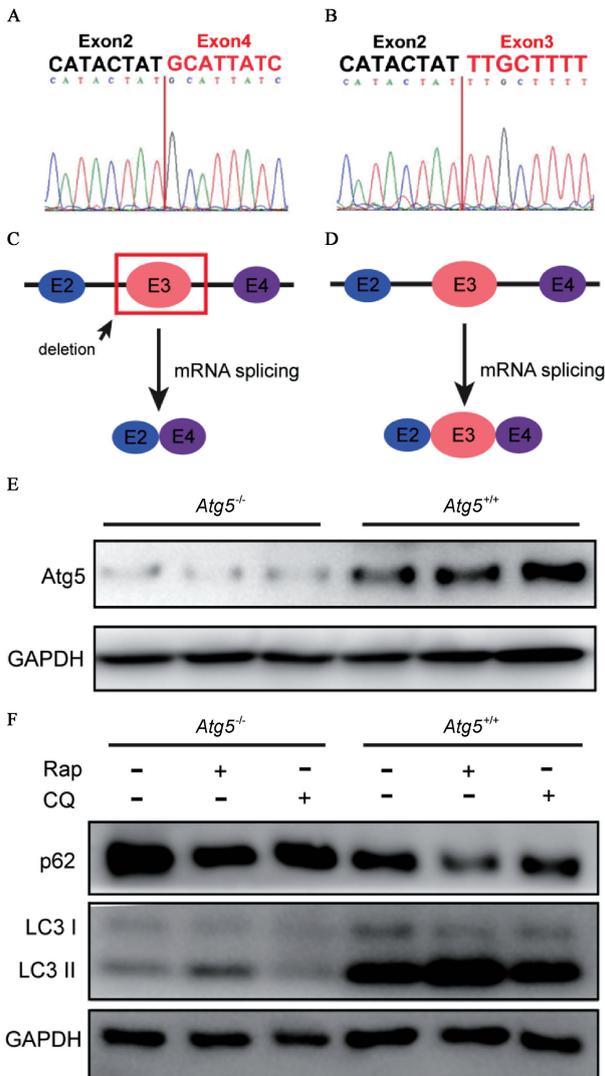
Figure 2 Results of genotype identification of some mice by PCR

(Rap) 诱导自噬后, *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬不能恢复到正常基础水平,提示 *Atg5*^{-/-} 小鼠巨噬细胞自噬缺陷; 综上,巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠构建成功。

3 讨论

基因敲除技术是利用一定的生物技术手段,使特定的目的基因缺失或者失活,从而排除其他因素对实验结果的干扰,使实验结果变得更可靠和直观。基因敲除包括全身性基因敲除及条件性基因敲除两种方法,其中全身性基因敲除是指在小鼠所有组织细胞中,将靶基因敲除掉,从而使靶基因的表达缺失。本文所提及的基因条件性敲除是利用 Cre-Loxp 重组系统,将 Cre 基因插入特定的启动子序列后面,即可人为地控制 Cre 基因在某些细胞谱系或者在机体发育的特定时间段亦或在外源性药物诱导下表达,表达的 CRE 蛋白识别特定的 DNA 序列(如 Loxp 位点),并进行 Loxp 位点之间的靶基因剪切,从而实现目的基因在特定细胞类型中功能性缺失^[20]。本研究中,我们选用了条件性 *Atg5* 基因敲除方案,一方面是出于实验目的考虑,另一方面也是为了避免全身性敲除 *Atg5* 基因导致小鼠胚胎期死亡或出生期死亡的劣势^[21],我们引入的 LysM-Cre 小鼠是将 Cre cDNA 靶向插入其内源性 M 溶菌酶基因座,从而使 CRE 重组酶特异性表达在包括巨噬细胞在内的髓样细胞中。

由于巨噬细胞具有高度异质性,而且其基因表达谱和单核细胞、粒细胞及树突状细胞之间有很大



注:A、B 分别为 $Atg5^{-/-}$ (实验组小鼠) 和 $Atg5^{+/+}$ (对照组小鼠) 骨髓来源巨噬细胞 $Atg5$ mRNA 逆转录为 cDNA 的测序结果。C、D 为两组小鼠 $Atg5$ mRNA 改变示意图。E 为两组小鼠骨髓来源巨噬细胞 ATG5 蛋白表达情况。F 为使用雷帕霉素 (Rap) 和氯喹 (CQ) 调控自噬后, 两组小鼠骨髓来源巨噬细胞对该调控的反应情况。

图 3 $Atg5$ 基因敲除效果鉴定

Note. A and B are the sequencing results of $Atg5^{-/-}$ (experimental group) and $Atg5^{+/+}$ (control group), respectively. C and D show the changes of $Atg5$ mRNA in mice of the two groups. E shows the expression of ATG5 protein in mouse bone marrow derived macrophages in the two groups. F shows the response of bone marrow derived macrophages of mice in the two groups to the regulation of autophagy by rapamycin (Rap) and chloroquine (CQ).

Figure 3 Identification of the efficiency of gene $Atg5$ knockout

的重叠^[22];因此,一个完全针对巨噬细胞的转基因 Cre 小鼠在本质上是并不存在的。目前靶向巨噬细胞的 Cre 小鼠主要是基于单核细胞/巨噬细胞标志物,如 $LysM$ 、 $CSF1R$ 、 $CD11b$ 和 $CX3CR1$ 等。其中 $Csf1r$ -

Cre 小鼠可用于研究巨噬细胞发育的命运图谱分析,虽然该转基因小鼠巨噬细胞基因敲除效率较高,但特异性很低,因 $Csf1r$ - Cre 可表达于所有白细胞^[23]。 $CD11b$ - Cre 小鼠对巨噬细胞基因敲除效率较低,而且 $CD11b$ - Cre 不仅表达在单核细胞和巨噬细胞,在中性粒细胞和树突状细胞也具有一定的活性。 $Cx3cr1$ - Cre 小鼠主要针对单核/巨噬细胞和树突细胞,对中性粒细胞的影响较小,但其在脾巨噬细胞以及外周血单核细胞基因的敲除效率相对较低^[24]。虽然 $LysM$ 也在大多数粒细胞和少数 $CD11c$ + 树突状细胞中表达,但 $LysM$ - Cre 小鼠对成熟巨噬细胞基因的敲除效率非常高^[20]。因此,即使 $LysM$ - Cre 小鼠对组织常驻巨噬细胞基因的敲除效率不高^[24],但其仍是研究巨噬细胞最常用的工具鼠。

为了研究自噬生物学功能,目前几种自噬相关基因缺失小鼠已被报道构建成功,包括 $Atg5^{-/-}$ 、 $Atg7^{-/-}$ 和 $Beclin 1^{-/-}$ 小鼠^[21, 25-26];其中 $BECLIN 1$ 通过与 $VPS34$ 结合,调控吞噬泡的形成及成熟;而 $ATG5$ 是自噬通路上游蛋白,启动自噬体形成,并与 $ATG12$ 和 $ATG16$ 结合,促进 $LC3$ 与 PE 结合,使 $LC3$ 沉积在自噬体膜上; $ATG7$ 是 $ATG12$ 与 $ATG5$ 结合所必需的一种类似 $E1$ 的酶^[19]。因此,敲除 $Atg5$ 、 $Atg7$ 或者 $Beclin 1$ 都可以达到自噬抑制的作用。然而 $Beclin 1$ 在细胞凋亡途径起到重要的作用,而且 $Beclin 1^{-/-}$ 突变小鼠发生自发性肿瘤的几率较高^[26],所以 $Beclin 1$ 并不是研究自噬的特异基因。虽然有研究表明 $Atg5$ 或 $Atg7$ 缺失小鼠的细胞仍然可以形成自噬体/自噬溶酶体,并在受到一定应激时可进行自噬介导的蛋白降解^[27],但由于 $ATG5$ 不仅参与自噬泡形成,而且通过与 $TECRP$ 结合,促进自噬体与溶酶体的融合^[19],所以 $Atg5^{-/-}$ 小鼠仍是目前用于研究自噬相关功能最常用的小鼠。

基因敲除小鼠的靶基因敲除后可能影响小鼠生殖功能^[28],我们实验结果表明巨噬细胞条件性敲除 $Atg5$ 后并不影响小鼠的生殖能力;在本实验中,我们探讨总结了最佳繁育方案,该繁育方案可在较短时间、较高概率获得实验所需基因型小鼠,为后续研究巨噬细胞自噬在肾脏疾病发病机制中的作用提供小鼠数量保障。

基因型鉴定是进行基因敲除小鼠繁育保种的重要环节^[29]。本研究采用碱裂解法提取鼠尾组织基因组 DNA,参照上海南方模式生物科技股份有限公司提供的引物序列,通过普通的 PCR 扩增凝胶电泳成功鉴定巨噬细胞条件性 $Atg5$ 基因敲除小鼠的基因型;与用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA 相

比,两种方法的检测结果一致,但碱裂解法耗时更短、费用更低(结果未展示),说明该方法可以作为检测巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠的基因型的一种快速可靠方法。

综上,本研究成功建立了巨噬细胞条件性 *Atg5* 基因敲除小鼠模型且能正常繁殖。该小鼠模型为研究巨噬细胞自噬(*Atg5*)在肾脏疾病发病机制中的作用机制提供了可靠的体内实验模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(4): 259-270.
- [2] Meng XM, Tang PM, Li J, et al. Macrophage phenotype in kidney injury and repair [J]. Kidney Dis (Basel), 2015, 1(2): 138-146.
- [3] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20.
- [4] Kinsey GR. Macrophage dynamics in AKI to CKD progression [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(2): 209-211.
- [5] Mills CD. M1 and M2 macrophages: Oracles of health and disease [J]. Crit Rev Immunol, 2012, 32(6): 463-488.
- [6] Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury [J]. Pediatr Nephrol, 2015, 30(2): 199-209.
- [7] Guiteras R, Flaquer M, Cruzado JM. Macrophage in chronic kidney disease [J]. Clin Kidney J, 2016, 9(6): 765-771.
- [8] Cao Q, Harris DC, Wang Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis [J]. Physiology (Bethesda), 2015, 30(3): 183-194.
- [9] Livingston MJ, Ding HF, Huang S, et al. Persistent activation of autophagy in kidney tubular cells promotes renal interstitial fibrosis during unilateral ureteral obstruction [J]. Autophagy, 2016, 12(6): 976-998.
- [10] Cheng H, Fan X, Lawson WE, et al. Telomerase deficiency delays renal recovery in mice after ischemia-reperfusion injury by impairing autophagy [J]. Kidney Int, 2015, 88(1): 85-94.
- [11] Chen P, Cescon M, Bonaldo P. Autophagy-mediated regulation of macrophages and its applications for cancer [J]. Autophagy, 2014, 10(2): 192-200.
- [12] Santeford A, Wiley LA, Park S, et al. Impaired autophagy in macrophages promotes inflammatory eye disease [J]. Autophagy, 2016, 12(10): 1876-1885.
- [13] Liu K, Zhao E, Ilyas G, et al. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization [J]. Autophagy, 2015, 11(2): 271-284.
- [14] Ilyas G, Zhao E, Liu K, et al. Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 β [J]. J Hepatol, 2016, 64(1): 118-127.
- [15] Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(24): 4721-4757.
- [16] Chen D, Zhong Q. A tethering coherent protein in autophagosome maturation [J]. Autophagy, 2012, 8(6): 985-986.
- [17] Chen D, Fan W, Lu Y, et al. A mammalian autophagosome maturation mechanism mediated by TECPR1 and the Atg12-Atg5 conjugate [J]. Mol Cell, 2012, 45(5): 629-641.
- [18] Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes [J]. Cell, 2012, 151(6): 1256-1269.
- [19] Ye X, Zhou XJ, Zhang H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2334.
- [20] Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, et al. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice [J]. Transgenic Res, 1999, 8(4): 265-277.
- [21] Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period [J]. Nature, 2004, 432(7020): 1032-1036.
- [22] Lever JM, Yang Z, Boddu R, et al. Parabiosis reveals leukocyte dynamics in the kidney [J]. Lab Invest, 2018, 98(3): 391-402.
- [23] McCubbrey AL, Allison KC, Lee-Sherick AB, et al. Promoter specificity and efficacy in conditional and inducible transgenic targeting of lung macrophages [J]. Front Immunol, 2017, 8: 1618.
- [24] Abram CL, Roberge GL, Hu Y, et al. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice [J]. J Immunol Methods, 2014, 408: 89-100.
- [25] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice [J]. J Cell Biol, 2005, 169(3): 425-434.
- [26] Yue Z, Jin S, Yang C, et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(25): 15077-15082.
- [27] Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy [J]. Nature, 2009, 461(7264): 654-658.
- [28] 赵家荣, 刘欢, 张涛, 等. 维生素 D 受体基因敲除小鼠品系的建立与鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 766-772.
- [29] 周胜强, 罗东, 黄素芬, 等. Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 228-232.
- Zhao JR, Liu H, Zhang T, et al. Strain establishment and identification of vitamin D receptor gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(6): 766-772.
- Zhou SQ, Luo D, Huang SF, et al. Genotype identification and breeding method of caveolin-1 gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(3): 228-232.