

万颖寒, 慈磊, 王珏, 等. 淋巴细胞活化基因-3 敲除 ($Lag-3^{-/-}$) 小鼠构建及初步表型分析[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 49-57.

Wan YH, Ci L, Wang J, et al. Construction and preliminary phenotypic analysis of $Lag-3^{-/-}$ mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 49-57.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.008

淋巴细胞活化基因-3 敲除 ($Lag-3^{-/-}$) 小鼠构建及初步表型分析

万颖寒^{1,2#}, 慈磊^{2,3#}, 王珏^{1,2}, 龚慧^{1,2}, 万志鹏^{3,4}, 奚骏³, 何敏珠³,
孙瑞林³, 费俭^{2,3,4}, 沈如凌^{1,2*}

(1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 模式生物技术联合实验室, 上海实验动物研究中心, 上海 201203/ 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; 3. 上海南方模式生物科技股份有限公司, 上海 201318; 4. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092)

【摘要】 目的 构建淋巴细胞活化基因-3 ($Lag-3$) 基因敲除小鼠, 初步分析 $Lag-3$ 基因敲除对小鼠表型影响, 为后续 $Lag-3$ 体内功能研究提供动物模型。方法 利用 CRISPR/Cas9 技术结合受精卵显微注射构建敲除小鼠, 通过分子鉴定筛选基因敲除阳性小鼠, 利用 RT-PCR 和流式检测方法进一步验证 $Lag-3$ 基因敲除小鼠体内 $Lag-3$ 基因敲除效果; 通过建立 ConA 诱导的肝损伤模型研究 $Lag-3$ 基因在体内的功能。结果 PCR 和产物测序结果显示, 获得了 exon 2 缺失的 $Lag-3$ 基因敲除小鼠; 该基因敲除纯合子小鼠 ($Lag-3^{-/-}$) 经刀豆蛋白 (ConA) 刺激后, 小鼠心脏、脾、肺、巨噬细胞和淋巴结中仅能检测到 $Lag-3$ mRNA 本底表达信号, 小鼠巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中仅能检测到非常低数量的 $Lag-3$ 阳性细胞。表型分析发现, $Lag-3$ 基因的缺失显著减少了 ConA 诱导的小鼠外周血、骨髓和脾 CD3⁺T 细胞的数量, 减轻了 ConA 诱发的急性肝损伤情况。结论 成功构建 $Lag-3$ 基因敲除小鼠模型, 肝损伤过程中的体内功能研究显示, $Lag-3$ 缺失可以显著缓解 ConA 引发的肝损伤的发生。

【关键词】 $Lag-3$; CRISPR/Cas9; 基因敲除; 刀豆蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0049-09

Construction and preliminary phenotypic analysis of $Lag-3^{-/-}$ mice

WAN Yinghan^{1,2#}, CI Lei^{2,3#}, WANG Jue^{1,2}, GONG Hui^{1,2}, WAN Zhipeng^{3,4}, XI Jun³, HE Minzhu³,
SUN Ruilin³, FEI Jian^{2,3,4}, SHEN Ruling^{1,2*}

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China. 2. Joint Lab for Technology of Model Organisms, Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China/School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092. 3. Shanghai Model Organisms Center, Shanghai 201318. 4. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092)

Corresponding author: SHEN Ruling. E-mail: shenruling@slarc.org.cn

【Abstract】 Objective To construct lymphocyte activation gene-3 ($Lag-3$)-knockout mice and analyze the influence of $Lag-3$ knockout on mouse phenotypes to provide an animal model for subsequent $Lag-3$ *in vivo* function

【作者简介】 万颖寒 (1984—), 女, 助理研究员。研究方向: 模式生物研究。Email: wanyinghan@slarc.org.cn;

慈磊 (1990—), 男, 助理研究员, 研究方向: 模式生物研究。Email: lei.ci@modelorg.com。

#共同第一作者

【通信作者】 沈如凌 (1981—), 女, 副研究员, 研究方向: 模式生物研究。Email: shenruling@slarc.org.cn

research. **Methods** Knockout mice were constructed via CRISPR/Cas9 technology combined with microinjection of fertilized eggs. The *Lag-3*-knockout mice were screened via molecular identification and further verified via RT-PCR and flow cytometry. *Lag-3* gene function *in vivo* was studied by establishing a ConA-induced liver injury model. **Results** PCR and product sequencing showed that exon 2-deleted *Lag-3*-knockout mice were obtained. The heart, spleen, lung and macrophages from ConA-induced homozygous mice were evaluated with only *Lag-3* mRNA background expression signals detected in phagocytes and lymph nodes and only very low numbers of *Lag-3*-positive cells detected in mouse macrophages, spleen cells and lymph nodes. Phenotypic analysis revealed that deleting the *Lag-3* gene significantly reduced the number of ConA-induced CD3⁺T cells in the peripheral blood, bone marrow and spleen as well as ConA-induced acute liver injury. **Conclusions** A *Lag-3*-knockout mouse model is successfully constructed. *In vivo* functional studies during liver injury show that *Lag-3* deficiency significantly alleviated ConA-induced liver damage.

[Keywords] *Lag-3*; CRISPR/Cas9; gene knockout; ConA

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

Lag-3 全称淋巴细胞激活基因-3, 又称为 CD223 和 Ly66, 是一种定位于膜上的糖蛋白, 属于免疫球蛋白(Ig)超家族成员, 含有四个 Ig 样结构域。*Lag-3* 在活化的 T 细胞、Treg 细胞、浆细胞样树突状细胞(pDC)、天然杀伤性细胞(NK)和 B 细胞上表达^[1-2]。T 细胞激活后, 白细胞介素 2(IL-2), IL-7 和 IL-12 会上调 *Lag-3* 的表达, *Lag-3* 以比 CD4 更高的亲和力与 MHC II 类分子结合, 对 CD3T 细胞受体(TCR)复合物信号传导起负调控作用, 进而抑制 T 细胞的过度活化和增殖, 调控体内的免疫平衡^[2-3]。*Lag-3* 也参与调节肿瘤微环境中的免疫应答, 其通过阻断 T 细胞抗肿瘤功能的恢复途径在肿瘤免疫逃避中发挥重要作用^[4], 因此在免疫治疗中是一个重要的免疫检查点分子, 受到广泛关注^[5-7]。

鉴于 *Lag-3* 基因在体内的重要功能, 早在 1996 年就建立了第一个 *Lag-3* 体内基因敲除小鼠模型, 利用该模型首先发现 *Lag-3* 基因缺失显著影响了 NK 细胞的活性^[8], 在后续的研究中发现, 在体内 *Lag-3* 不但调控活化 T 细胞的扩增^[9], 还调节浆细胞样树突状细胞稳态^[10]; 在自身免疫疾病研究方面, 近年来, 利用 *Lag-3* 条件敲除小鼠模型, 证明 *Lag-3* 可通过抑制 Treg 细胞的增殖, 促进自身免疫疾病的发生, 在 1 型糖尿病小鼠模型中敲除 *Lag-3* 可显著降低 1 型糖尿病的发生^[11]; 这些研究表明, *Lag-3* 在体内多种生理、病理过程中扮演了重要角色。

急性肝炎仍然是危害人类生命健康的一类重要疾病。刀豆蛋白 A(ConA)诱导的急性肝损伤模型, 通过活化 Th1 细胞, 刺激库普弗细胞和肝细胞释放 TNF- α , IFN- γ 等细胞因子, 招募淋巴细胞浸润, 造成急性肝损伤, 是研究人类肝脏自身免疫性肝炎和病毒性肝炎的常用模型。虽已有证据显示 *Lag-3*

在病毒感染, 肝炎等疾病过程中发挥作用, 但还未有报道对 *Lag-3* 在体内肝损伤过程中的功能进行研究。

为了便于研究 *Lag-3* 在急性肝损伤过程中的功能, 我们利用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *Lag-3* 基因敲除小鼠(*Lag-3*^{-/-}), 并在该模型上首次利用刀豆蛋白诱发急性肝损伤模型, 对 *Lag-3* 在急性肝损伤过程中的功能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Lag-3^{-/-} 小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司储存(储存编号: PR1-20180509) 20 只 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠, 4 周龄, 体重 10 ~ 12 g; 5 只 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 体重 18 ~ 20 g; 20 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 8 周龄, 体重 10 ~ 12 g; 12 只 SPF 级雌性 ICR 假孕小鼠, 8 周龄, 体重 28 ~ 30 g; 12 只 SPF 级雄性 ICR 结扎小鼠 8 周龄, 体重 28 ~ 30 g; 由上海南方模式生物科技股份有限公司繁育提供【SCXK(沪)2014-0002】。饲养于上海实验动物研究中心 SPF 级实验动物房【SYXK(沪)2014-0002】按照 SPF 级动物饲养要求进行饲养。所有操作均由上海南方模式生物科技股份有限公司实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批通过(审批号: IACUC 号 2017-0032)。

1.1.2 主要试剂

pX-T7-sgRNA 质粒、Cas9 表达载体由上海南方模式生物科技股份有限公司构建。质粒小量提试剂盒和琼脂糖胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司, MESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit 试剂盒购自 Ambion 公司; APC 标记大鼠抗小鼠 *Lag-3* 抗体购自

Biologend 公司;DH5 α 感受态细胞及各种限制性内切酶、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA 设计和表达载体构建

小鼠 *Lag-3* 基因定位于第 6 条染色体的 19F2-F3 区段 (Chromosome 19: 124,904,361-124,911,705, ENSMUSG00000032217.1), 全长 2001 bp, 有 8 个的外显子, 表达蛋白全长 521 aa。针对小鼠 *Lag-3* 基因结构, 通过在线 sgRNA 设计软件 (<http://crispr.mit.edu/>), 针对敲除区域 (exon 2) 在 intron 1 和 intron 2 中设计 sgRNA, 最终在两个 intron 中各选择 2 个 sgRNA 靶位点, sgRNA 序列信息分别为: sgRNA1: 5'-CATCATGCCTCCCTGTGAA-3'; sgRNA2: 5'-TGCCTCAGCTCCCTTCAAC-3'; sgRNA3: 5'-AC TACAGGATGCCGGTGTGT-3'; sgRNA4: 5'-GTGGA TTGCTCCCCACACAC-3'。根据 4 个 sgRNA 靶位点合成相应的 oligoDNA 用于 sgRNA 表达载体构建。

设计 4 对针对 *Lag3* 基因的 sgRNA 寡聚核苷酸链: 正义链 1: 5'-CACCGCATCATGCCTCCCTG TTGAA-3', 反义链 1: 5'-AAACTTTCAACAGGGAGG CATGATG-3'; 正义链 2: 5'-CACCGTGCCTC AGCCTCCCTTCAAC-3', 反义链 2: 5'-AAACT GTTGAAGGAGGCTGAGGCA-3'; 正义链 3: 5'-CACCG ACTACAGGATGCCGGTGTGT-3', 反义链 3: 5'-AAACTACACACCGGCATCTGTAGT-3'; 正义链 4: 5'-CACCGGTGGATTGCTCCCCACACAC -3', 反义链 4: 5'-AAACTGTGTGTGGGAGCAATCCAC-3'。

将 *Lag-3* sgRNA 寡核苷酸单链以逐步降温的方法退火成双链。BbsI 酶切 pX-T7-sgRNA 质粒使其线性化, 回收后与 4 个寡核苷酸双链分别进行连接、转化感受态大肠杆菌; 挑选抗性单克隆提取质粒 DNA, 进行测序鉴定, 鉴定正确的阳性克隆保存备用。

1.2.2 sgRNA 和 Cas9 表达载体的体外转录

sgRNA 的表达载体 pX-T7-sgRNA 经酶切线性化后, 按照 HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行体外合成; Cas9 表达载体经酶切线性化, 按照 mMESSEmMACHINE T7 Ultra Transcription Kit 试剂盒说明书进行体外转录。

1.2.3 阳性小鼠品系获得及鉴定

通过显微注射将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注射到 C57BL/6 小鼠受精卵胞质中, 注射后受精卵移植到

假孕雌鼠子宫中, 待出生后获得 F0 代小鼠, PCR 方法筛选阳性基因型的 F0 代小鼠。Lag-3 基因敲除 F1 代杂合子小鼠 (*Lag-3*^{-/+}) 由 F0 代阳性小鼠与 C57BL/6 野生型小鼠交配获得, 引物对 P1/P2 序列信息为: P1: 5'-GCTTCTGGGACTGCTTTGG-3'; P2: 5'-GGGTTGTCTAGGCGAGGG-3', PCR 产物测序鉴定。PCR 条件为: 94 °C 3 min; 35 个循环的 95 °C 30 s, 56 °C 15 s, 72 °C 2 min; 72 °C 5 min。F2 代 *Lag-3* 基因敲除纯合子小鼠 (*Lag-3*^{-/-}) 模型由 F1 代杂合子小鼠自交获得, 基因型鉴定策略同 F1 代小鼠。

1.2.4 逆转录实时定量 PCR (RT-PCR) 检测

将刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 通过尾静脉按 12 mg/kg 剂量注射到小鼠体内, 18 h 后取材。按照 TRIzol RNA 抽提试剂说明书, 分别从脾、腹腔巨噬细胞和淋巴结中分离抽提细胞总 RNA。使用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (Transgen) 将分别来自 *Lag-3*^{-/-} 和野生型小鼠的 RNA 样品逆转录成 cDNA; TransStart Top Green qPCR SuperMix (Transgen) 用于实时 PCR 扩增。反应条件如下: 95 °C 3 min; 40 个循环的 95 °C 30 s, 60 °C 15 s, 72 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s。Lag-3 特异性引物序列信息为: 上游序列: 5'-CCTGGATCCTAACTTTCTACGAAG-3', 下游序列: 5'-CGCTCAGCACCGTGTAG-3'。小鼠 β -actin 基因作为 *Lag-3* 基因表达水平的内参。 β -actin 引物序列信息为: 上游序列: 5'-ATTGCTG ACAGGATGCAGAA-3', 下游序列: 5'-GCTGATCC ACATCTGCTGGAA-3'。

1.2.5 流式细胞术 (FACS) 检测 Lag-3 表达

将 ConA 通过尾静脉按 12 mg/kg 剂量注射到小鼠体内, 18 h 后取材。异氟烷麻醉小鼠后, 取脾淋巴细胞、腹腔巨噬细胞和淋巴结, 过筛网后分别获得细胞悬液; 经去除红细胞和 PBS 洗涤后, ①用荧光抗体 APC anti-mouse Cd223 (Lag-3) 对细胞进行标记, 检测 Lag-3 表达; ②用荧光抗体 FITC anti-mouse CD3e 和 APC anti-mouse Cd223 (Lag-3) 对细胞进行双标, 检测 Lag-3 在 T 细胞上的表达, 标记后的细胞, 在冰上避光孵育 20 min, 将细胞重悬于 Stain Buffer 中 (含 1% FBS 的 PBS), Stain Buffer 洗涤两次后按常规方法上流式细胞仪 CytoFlex 检测, 每个样品检测收集 10 000 个细胞, 结果用 CellQuest 软件分析。

1.2.6 血生化检测

同窝生 *Lag-3*^{-/-} 小鼠和野生型小鼠经 ConA 注射处理(方法同 1.2.5),18 h 后小鼠经异氟烷麻醉进行眼球取血,未经刀豆蛋白注射的同窝 *Lag-3*^{-/-} 小鼠和野生型小鼠同样进行眼球取血,使用全自动生化分析仪(日立 7180 型)对血液生化指标进行检测。

1.2.7 组织和病理学检测

同窝生 *Lag-3*^{-/-} 小鼠和野生型小鼠经 ConA 注射处理(方法同 1.2.5)后进行各组织器官取材、称重,同窝生未经刀豆蛋白注射的 *Lag-3*^{-/-} 小鼠和野生型小鼠同时进行取材。组织拍照后,小鼠各组织器官经过 PBS 清洗后固定于 4% 多聚甲醛中,组织包埋切片后 H&E 染色拍照分析。

1.3 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 7.0 进行统计,数据表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$),One-Way ANOVA 方法分析数据, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

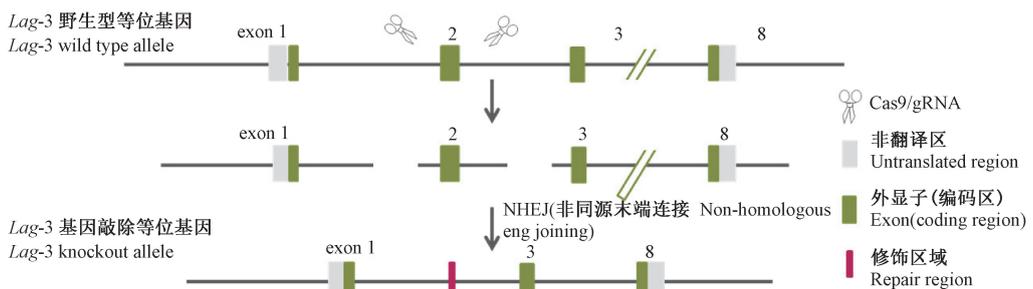
2.1 *Lag-3*^{-/-} 小鼠的制备

Lag-3^{-/-} 小鼠的构建策略如图 1 所示,Cas9/sgRNA 将 *Lag-3* 基因 exon 2 敲除,exon 2 区域的缺失将造成蛋白读码框移码,*Lag-3* 蛋白无法正确翻译,从而造成基因功能性缺失。将转录后的 *Lag-3* sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物通过显微注射方式注射到 C57BL/6 小鼠受精卵胞质中,180 枚经过显微注射的受精卵移植到 9 只 ICR 假孕鼠输卵管中,共

出生 36 只 F0 代小鼠(出生率为 20%),经 PCR 对 F0 代小鼠的基因型进行鉴定,凝胶电泳结果(图 2)显示 29 只小鼠中能检测到 Cas9/gRNA 作用后的变小条带(阳性率 80%),选择其中 2 只雄性小鼠(5 号和 23 号)分别与野生型 C57BL/6 雌鼠交配,PCR 鉴定加产物测序,确定 F1 代突变杂合子小鼠有 2 种基因类型:敲除类型 1 为缺失 421 个碱基对;敲除类型 2 为缺失 405 个并且替换 2 个碱基对。选择敲除类型 1 型的 F1 代 *Lag-3*^{+/-} 小鼠进行自交,获得 F2 代 *Lag-3*^{-/-} 小鼠用于后续实验,阳性小鼠鉴定结果如图 3 所示。

2.2 *Lag-3*^{-/-} 小鼠 mRNA 水平和蛋白水平验证

注射 ConA 刺激后采用 Real-time PCR 和流式细胞术(FACS)分别在 mRNA 和蛋白水平检测 *Lag-3* 基因敲除小鼠敲除效果。RT-PCR 结果如图 4A 所示:ConA 刺激后,*Lag-3* 敲除纯合子小鼠的心脏、脾、肺、肾、骨髓组织和腹腔巨噬细胞的 *Lag-3* mRNA 表达水平均显著低于野生型小鼠($P < 0.001$)。利用流式细胞术(FACS)检测小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴细胞的 *Lag-3* 蛋白表达情况,结果如图 4B-C 所示:*Lag-3*^{-/-} 小鼠的 *Lag-3* 信号水平非常低,腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴细胞中可检测到的 *Lag-3* 信号表达分别占父群的(0.7 ± 0.36)%,(0.66 ± 0.48)%和(0.28 ± 0.09)%;而相应的野生型小鼠的 *Lag-3* 信号水平分别占父群的(12.39 ± 2.63)%,(24.5 ± 3.56)%和(5.73 ± 0.6)%。该结果从 mRNA 和蛋白水平上证明已成功构建 *Lag-3*^{-/-} 小鼠。

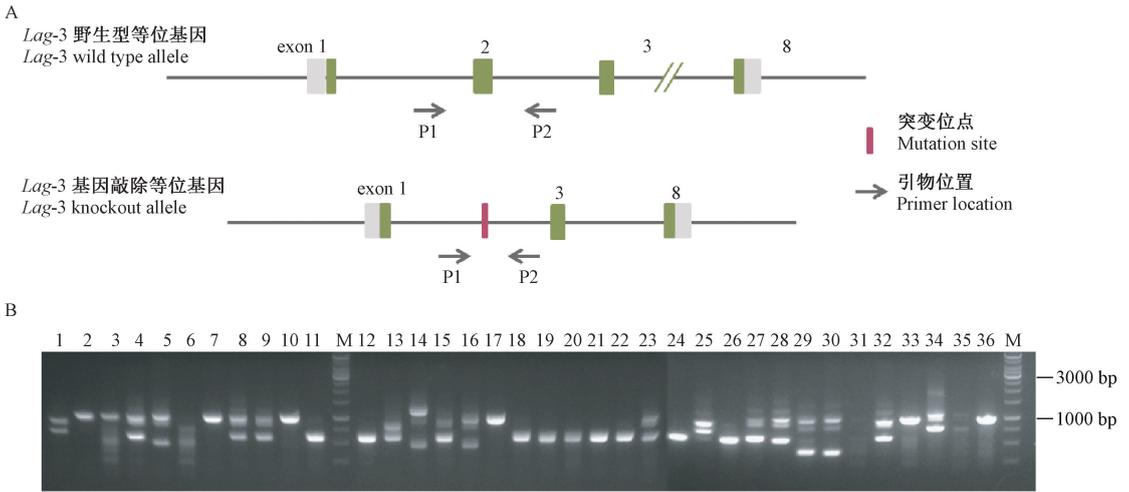


注:针对敲除区域(exon2),Cas9/sgRNA 识别并剪切目标靶序列,将 *Lag-3* 基因 exon 2 敲除。

图 1 *Lag-3*^{-/-} 小鼠构建策略

Note. For the knockout region (exon2), the Cas9/sgRNA complex knocks out the *Lag-3* gene exon 2 by recognizing and cleaving the target sequence.

Figure 1 *Lag-3*^{-/-} mice construction strategy

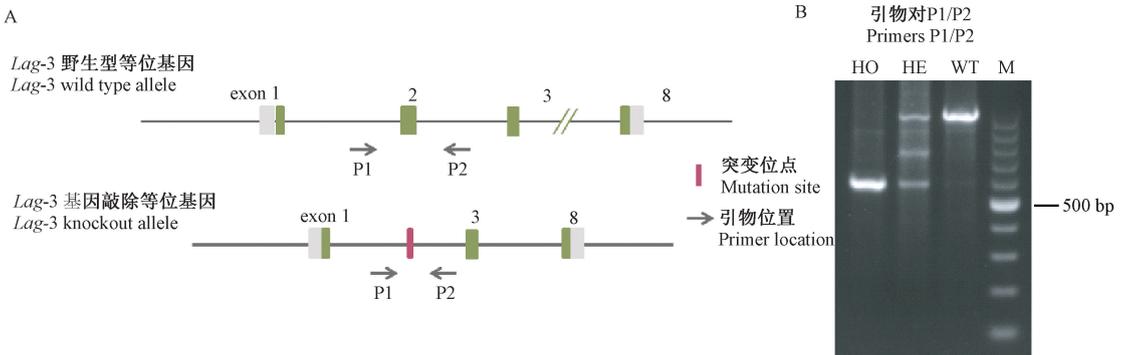


注:A;*Lag-3* 基因 F0 代小鼠敲除小鼠鉴定策略;B:F0 代小鼠基因型鉴定电泳结果。

图 2 F0 代小鼠基因型鉴定

Note. A, Identification strategy of *Lag-3* gene knockout mice in the F0 generation. B, Electrophoresis results of genotype identification in F0 generation mice.

Figure 2 Genotype identification of F0 generation mice



注:A;*Lag-3*^{-/-} 小鼠基因型鉴定策略;B;*Lag-3*^{-/-} 小鼠基因型鉴定电泳结果。野生型小鼠 PCR 产物为一条 990 bp 条带;*Lag-3*^{+/-} 小鼠 PCR 产物为 990 bp 和 569 bp 两条带;*Lag-3*^{-/-} 小鼠 PCR 产物为一条 569 bp 条带。WT-野生型小鼠, HE-*Lag-3*^{+/-} 小鼠, HO-*Lag-3*^{-/-} 小鼠。

图 3 F2 代小鼠基因型鉴定

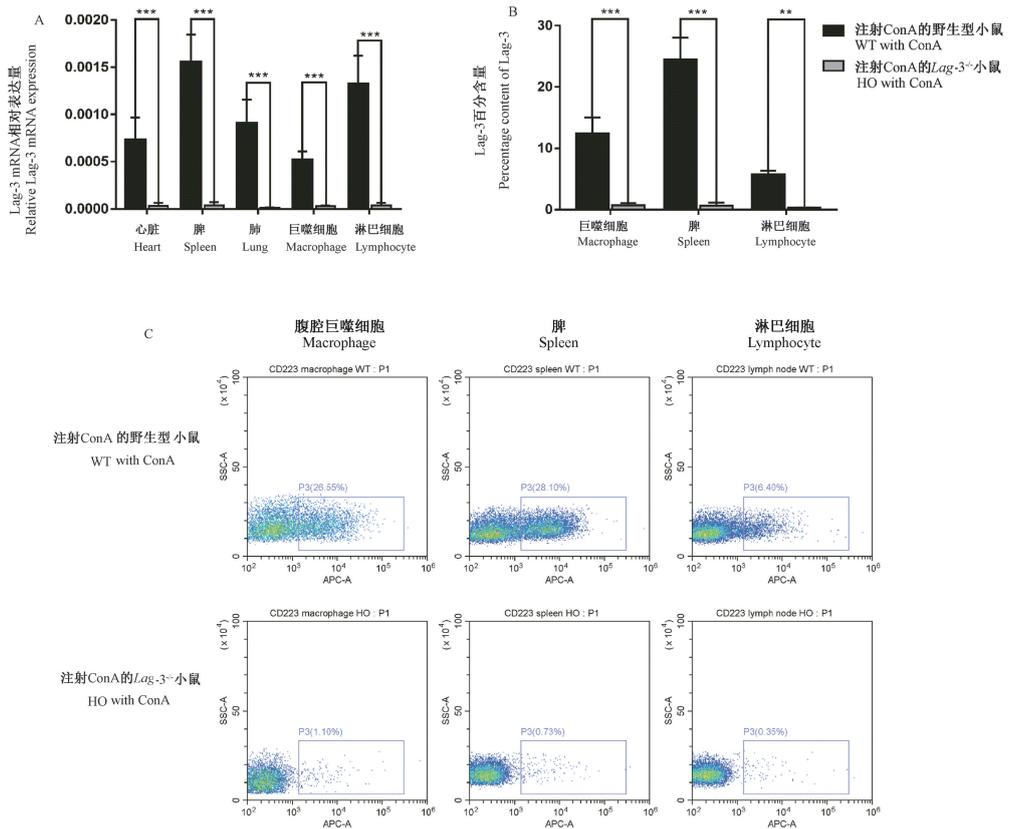
Note. A, Genotype identification strategy for *Lag-3*^{-/-} mice. B, Electrophoresis results of genotype identification in *Lag-3*^{-/-} mice. The wild-type mouse PCR product was a 990 bp band; the *Lag-3*^{+/-} mouse PCR product was two bands of 990 bp and 569 bp; and the *Lag-3*^{-/-} mouse PCR product was a 569 bp band. WT-wild type mice, HE-*Lag-3*^{+/-} mice, HO-*Lag-3*^{-/-} mice.

Figure 3 Genotype identification of F2 mice

2.3 ConA 刺激前后 *Lag-3*^{-/-} 小鼠 CD3⁺T 细胞比例变化

利用流式细胞术(FACS)对小鼠血液、骨髓细胞和脾细胞中的 CD3⁺T 细胞表达检测,结果如图 5 所示:未注射 ConA 的情况下,和野生型小鼠相比, *Lag-3*^{-/-} 小鼠的血液和脾细胞中 CD3⁺T 细胞比例无显著性差异,但骨髓中的 CD3⁺T 细胞比例显著性低

于野生型小鼠;ConA 刺激后,野生型小鼠血液中的 CD3⁺T 细胞显著性升高,骨髓和脾中的 CD3⁺T 细胞比例略有下降,但没有显著性差异;而在 *Lag-3*^{-/-} 小鼠中,ConA 刺激后,小鼠血液、骨髓细胞和脾细胞中的 CD3⁺T 细胞比例较刺激前均显著性降低。该结果说明 *Lag-3* 基因敲除显著降低了 ConA 刺激后小鼠 CD3⁺T 细胞量。



注:A: *Lag-3* 基因敲除野生型和纯合子小鼠组织 *Lag-3* mRNA 表达水平检测结果; B: 不同基因型小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中 *Lag-3* 百分含量柱状图。与注射 ConA 的野生型小鼠组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; C: 不同基因型小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中 *Lag-3* 表达情况散点示意图。APC 标记荧光抗体 anti-CD223 检测。

图 4 *Lag-3*^{-/-} 小鼠 mRNA 和蛋白相对表达水平检测 ($n = 3$)

Note. A, Detection of *Lag-3* mRNA expression levels in tissues of wild-type and *Lag-3* gene knockout homozygous mouse tissue. B, Bar chart of *Lag-3* percentage content in peritoneal macrophages, spleen cells and lymph nodes of mice with different genotypes. Compared to WT with ConA, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. C, Scatter plot of *Lag-3* positive cell in peritoneal macrophages, spleen cells and lymph nodes of mice with different genotypes. APC labeled fluorescent antibody anti-CD223.

Figure 4 Detection of relative mRNA and protein expression levels in *Lag-3*^{-/-} mice ($n = 3$)

2.4 *Lag-3* 基因敲除减轻 ConA 诱导引起的小鼠肝损伤

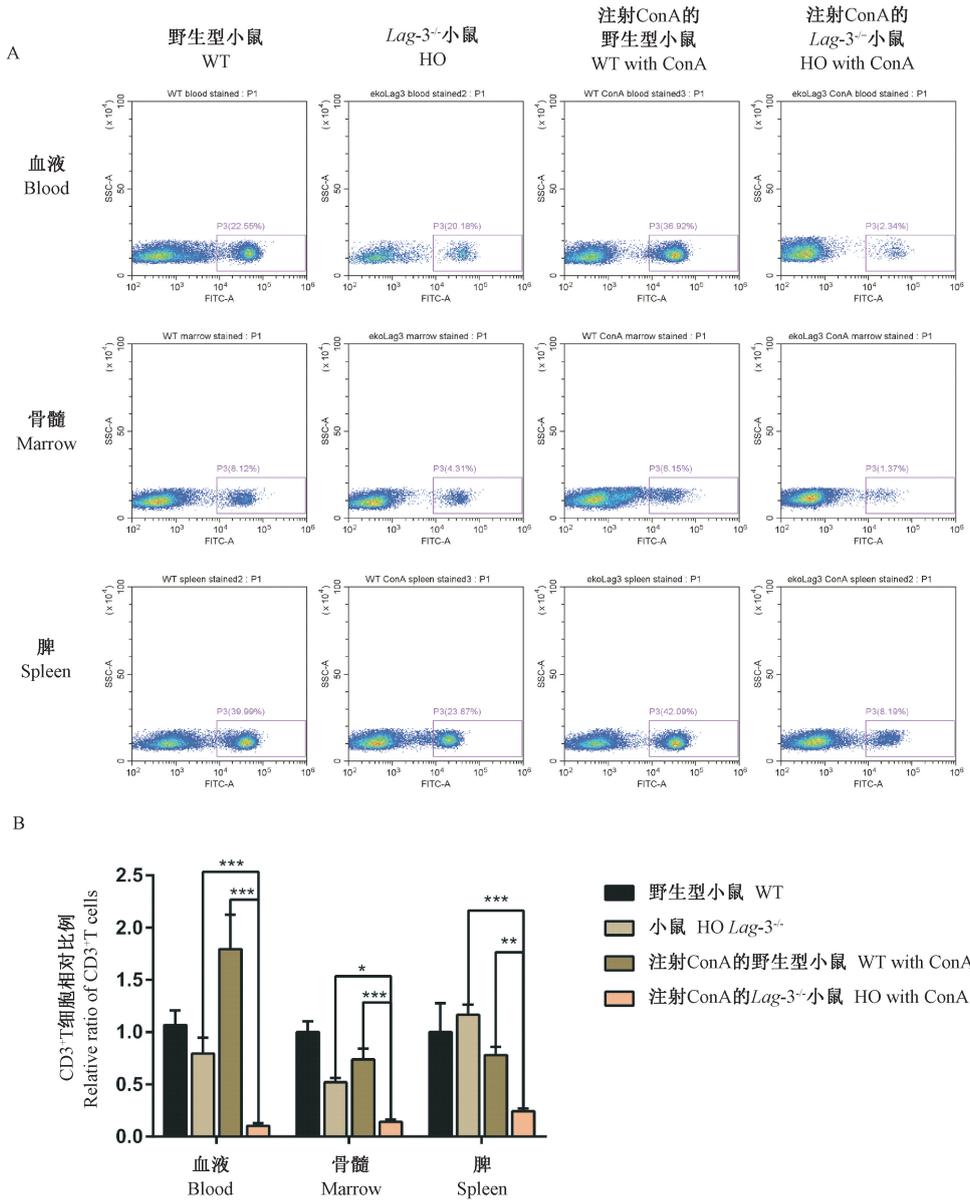
分别取 ConA 注射前后的野生型和 *Lag-3*^{-/-} 小鼠血清, 进行血生化指标检测, 如图 6A 所示: 诱导前两组小鼠的肝功能指标谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 水平无差异, 注射 ConA 后, 两组小鼠的肝功能指标 ALT 和 AST 均有大幅度增加, 但野生型小鼠的 ALT 和 AST 增幅比 *Lag-3*^{-/-} 小鼠更大, 两组小鼠之间有显著性差异; 分别取诱导前后的野生型和 *Lag-3*^{-/-} 小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾和胸腺组织进行称重和病理检测, 结果发现: 诱导前后各组小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾和胸腺按组织/体重比

析, 差异无显著性 (图 6C); 取组织拍照 (图 6B) 并进行 H&E 染色后病理学观察 (图 6D), 发现诱导后野生型小鼠的肝和脾组织充血更明显。该结果说明 *Lag-3* 基因敲除可以减轻 ConA 诱导的肝损伤。

3 讨论

在过去十年中, 旨在激活免疫系统以攻击癌细胞的疗法是对抗癌症的重要策略之一。

我们利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 通过受精卵直接注射 Cas9 mRNA 和 guideRNA, 构建了 C57BL/6 背景的 *Lag-3*^{-/-} 小鼠模型, 获得的 F0 代小鼠 80% 都可以检测到 CRISPR/Cas9 介导的基因编



注:A:野生型小鼠和 *Lag-3*^{-/-} 小鼠血液、脾细胞和骨髓细胞中 CD3⁺T 细胞比例散点示意图;FITC 标记荧光抗体 anti-CD3 检测;B:野生型小鼠和 *Lag-3*^{-/-} 小鼠血液、脾细胞和骨髓细胞中 CD3⁺T 细胞统计图;与注射 ConA *Lag-3*^{-/-} 组相比, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001。

图 5 流式细胞术检测 *Lag-3*^{-/-} 小鼠 ConA 刺激前后 CD3⁺T 细胞比例变化

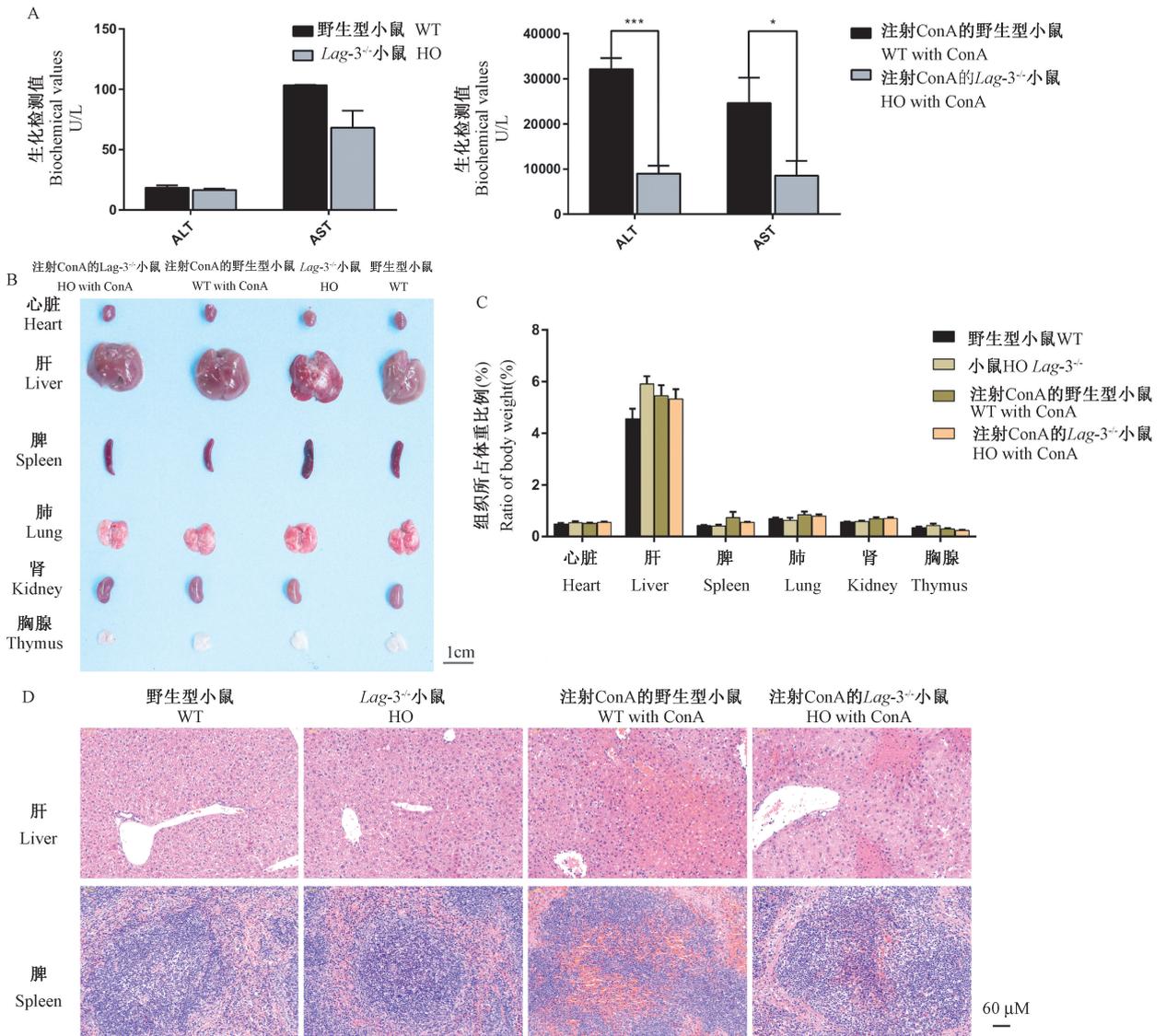
Note. A, Scatter plot of the ratio of CD3⁺T cells in blood, spleen cells and bone marrow cells in wild-type and *Lag-3*^{-/-} mice; FITC-labeled fluorescent antibody anti-CD3 assay. B, Statistical map of the ratio of CD3⁺T cells in blood, spleen cells and bone marrow cells of wild-type and *Lag-3*^{-/-} mice. Compared to WT with ConA, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

Figure 5 Changes in the ratio of CD3⁺T cells in *Lag-3*^{-/-} mice by flow cytometry before and after ConA stimulation

辑效果,证明我们的设计方案和采用的方法是一个高效快速获得 *Lag-3* 基因敲除小鼠的方法。

通过对小鼠心脏、脾、肺、巨噬细胞和淋巴结 *Lag-3* RNA 水平表达检测发现,基因敲除纯合子小鼠只能检测到本底信号,证明 RNA 水平实现了对 *Lag-3* 基因的敲除。在随后的蛋白水平验证发现,尽管 *Lag-3* 具有广泛的表达谱^[12],但根据我们在预

实验中采用流式检测的方法发现:正常情况下,小鼠的脾、腹腔巨噬细胞、骨髓和淋巴结的 *Lag-3* 表达水平很低(数据未显示),而刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 处理可以显著上调小鼠体内腹腔巨噬细胞、淋巴结和脾 *Lag-3* 的表达,这与以前的报道,活化的 T 细胞中 *Lag-3* 表达上调相一致。野生型小鼠和 *Lag-3*^{-/-} 小鼠的对比发现,与 ConA 处



注:A:野生型小鼠和 *Lag-3*^{-/-}小鼠经 ConA 给药诱导前后,小鼠的肝功能指标变化:ALT-谷丙转氨酶,AST-谷草转氨酶,每组 3 只小鼠。与 *Lag-3*^{-/-}组或注射 ConA *Lag-3*^{-/-}组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; B:ConA 诱导前后小鼠主要组织病理图 C:组织所占体重比;D:野生型小鼠和 *Lag-3*^{-/-}小鼠 ConA 诱导前后,小鼠脏和脾 H&E 染色图(比例尺 = 60 μm)。

图 6 ConA 诱导前后,野生型小鼠和 *Lag-3*^{-/-}小鼠病理检测

Note. A, Changes in liver function indexes of wild-type and *Lag-3*^{-/-} mice before and after injection with ConA. ALT-alanine aminotransferase, AST-aspartate aminotransferase, 3 mice per group (Compared to *Lag-3*^{-/-} or *Lag-3*^{-/-} with ConA, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$). B, Photograph of main tissues of mice before and after ConA injection. scale bar=1 cm, 3 mice per group. C, Measurement of tissue/body weight ratio of mice before and after ConA injection. D, HE staining of liver and spleen before and after ConA injection in wild type mice and *Lag-3*^{-/-} mice, scale bar=60 μm.

Figure 6 Pathological detection of wild-type mice and *Lag-3*^{-/-} mice before and after ConA induction

理前相比,野生型小鼠 *Lag-3* 表达明显上调,而 *Lag-3*^{-/-}小鼠心脏、脾和腹腔巨噬细胞中 *Lag-3* mRNA 处于本底水平,与野生型小鼠相比有显著区别,同样流式检测方法检测腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中 *Lag-3* 的表达情况,发现其蛋白表达也在本底水平。这些数据表明,我们已成功构建 *Lag-3* 基因敲除小鼠品系。

对 *Lag-3* 基因敲除小鼠的初步表型分析发现, *Lag-3*^{-/-}小鼠骨髓中的 CD3⁺T 细胞比例显著减少,而外周血和脾中的 CD3⁺T 细胞比例没有显著性变化;但我们用 T 细胞激活的刺激剂 ConA 处理小鼠后发现, *Lag-3*^{-/-}小鼠无论骨髓、外周血还是脾中的 CD3⁺T 细胞比例较野生型小鼠均有非常显著降低,尤其 *Lag-3*^{-/-}小鼠外周血 CD3⁺T 细胞比例只有野生

型的 1/15, 我们推断 Lag-3 的缺失影响了 T 细胞的增殖, 造成无法响应 ConA 的刺激。

ConA 作为一种 T 细胞激活剂, 在动物实验中, 经常用于诱导急性肝损伤, 模拟人类肝脏自身免疫性肝炎和病毒性肝炎。ConA 刺激初步表型分析结果显示, 基因敲除小鼠可能在肝损伤方面有相应的表型缺陷。另外, 根据 2018 年 Wang 等^[13] 新的研究结果, 与原来认为的 MHC-II 是 Lag-3 唯一的配体不同, 纤维蛋白原样蛋白 1 (FGL1) 而非 MHC-II 是 Lag-3 主要的功能配体。FGL1 是一个分泌蛋白, 正常情况下, 在体内主要在肝中表达, 表明 Lag-3 可能在肝生理病理过程中发挥重要功能。基于这两方面的证据, 我们用 ConA 诱导的急性肝损伤模型对野生型和 Lag-3^{-/-} 小鼠的响应情况进行了比较分析, 结果显示 Lag-3 基因敲除可以显著减轻 ConA 诱导的急性肝损伤。目前对 Lag-3 研究的热点, 主要集中在其作为一个重要的肿瘤免疫治疗靶点, 通过与 PD1 靶点的协同作用进行抗肿瘤研究^[5-6]。我们的研究结果显示, Lag-3 也可能是一个治疗急性肝损伤的靶点, 目前多家药企已经开发了相应的抗体药物, 并且进入临床, 这些药物后续也有可能用于自身免疫性或者病毒性急性肝损伤的治疗。

综上所述, 我们利用 CRISPR/Cas9 技术, 建立了 Lag-3 基因敲除小鼠品系, 在 RNA 和蛋白水平对该基因的敲除效果进行了验证, 并通过 ConA 诱发的肝损伤模型, 证明了 Lag-3 在急性肝损伤过程中发挥重要作用, 为 Lag-3 体内基因功能研究提供了新的模型, 为急性肝损伤的治疗提供了新的线索。

参 考 文 献 (References)

[1] Huard B, Gaulard P, Faure F, et al. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand [J]. Immunogenetics, 1994, 39 (3): 213-217.

[2] Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape [J]. Cancer Res, 2012, 72 (4): 917-927.

[3] Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, et al. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3) [J]. Eur J Immunol, 2002, 32 (8): 2255-2263.

[4] Sierro S, Romero P, Speiser DE. The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications [J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15 (1): 91-101.

[5] Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, et al. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target [J]. Immunol Rev, 2017, 276 (1): 80-96.

[6] Turnis ME, Andrews LP, Vignali DA. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy [J]. Eur J Immunol, 2015, 45 (7): 1892-1905.

[7] Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223) [J]. J Immunol, 2005, 174 (2): 688-695.

[8] Li J, Yang F, Wei F, et al. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment [J]. Oncotarget, 2017, 8 (39): 66656-66667.

[9] Zou J, Shankar N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF-κB signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine expression in response to E. faecalis infection [J]. PLoS One, 2015, 10 (8): e0136947.

[10] Workman CJ, Wang Y, El Kasmī KC, et al. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis [J]. J Immunol, 2009, 182 (4): 1885-1891.

[11] Zhang Q, Chikina M, Szymczak-Workman AL, et al. LAG3 limits regulatory T cell proliferation and function in autoimmune diabetes [J]. Sci Immunol, 2017, 2 (9): eaah4569.

[12] Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells [J]. Immunity, 2004, 21 (4): 503-513.

[13] Wang J, Sanmamed MF, Datar I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3 [J]. Cell, 2019, 176 (1-2): 334-347.

[收稿日期] 2019-07-22