

黄艺滢,张文龙,石桂英,等. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA4) 敲除和人源化小鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 307-315.

Huang YY, Zhang WL, Shi GY, et al. Establishment of CTLA4-knockout mice and CTLA4-humanized mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 307-315.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.03.005

细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA4) 敲除和人源化小鼠模型的建立

黄艺滢, 张文龙, 石桂英, 雷雪裴, 高苒*, 白琳*

(国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA4) 基因人源化小鼠模型, 为靶向 CTLA4 的肿瘤治疗性抗体研发和筛选提供有效的小鼠模型。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术, 建立 CTLA4 基因人源化和敲除小鼠模型, 利用 PCR、RT-PCR、Western Blot、免疫组织化学和流式细胞术的方法对其进行鉴定及分析。将小鼠黑色素瘤细胞株 (B16) 注射到 CTLA4 人源化小鼠皮下, 观察腹腔注射 CTLA4 单克隆抗体伊匹木 (ipilimumab) 的抗肿瘤效果。**结果** CTLA4 人源化小鼠可以稳定表达人源 CTLA4, 而不表达鼠源 CTLA4。CTLA4 人源化小鼠出生后 6 个月内正常存活, 组织病理学及免疫系统未见明显异常。同时在 CTLA4 人源化小鼠中, 伊匹木减缓肿瘤生长速度。CTLA4 基因敲除小鼠不表达 CTLA4 基因, 在出生后 3 ~ 5 周内由于自身免疫疾病死亡。**结论** 同时建立了 CTLA4 人源化和敲除小鼠。CTLA4 人源化小鼠可用于筛选与 CTLA4 基因相关的治疗性抗体或药物。

【关键词】 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4; 人源化; 基因敲除; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 03-0307-09

Establishment of CTLA4-knockout mice and CTLA4-humanized mice

HUANG Yiyong, ZHANG Wenlong, SHI Guiying, LEI Xuepei, GAO Ran*, BAI Lin*

(NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS&PUMC; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

Corresponding author: BAI Lin. E-mail: bailin49@163.com; GAO Ran. E-mail: gaoran26@hotmail.com

【Abstract】 Objective To establish a cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4) humanized mice model, and to provide an effective mouse model for CTLA4-targeted cancer therapeutic antibody research, development, and screening. **Methods** The animal models were established by CRISPR/Cas9 and then analyzed by polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), western blotting, hematoxylin-eosin (HE) staining and fluorescence-activated cell sorting. The mouse melanoma cell line (B16) was injected subcutaneously into CTLA4 humanized mice to observe the anti-tumor effects of intraperitoneal injection of the CTLA4 monoclonal antibody, ipilimumab. **Results** CTLA4-humanized mice could stably express human CTLA4 but not murine CTLA4. CTLA4-humanized mice survived normally within 6 months after birth, and there were no obvious abnormalities in histopathology and the immune system. In CTLA4-humanized mice, ipilimumab slowed tumor growth. CTLA4-knockout mice did not express CTLA4 and died of autoimmune diseases within 3 ~ 5 weeks after birth. **Conclusions** CTLA4-humanized and

【基金项目】 中央高校基本科研业务费专项资金 (3332020051), 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费 (2017-I2M-2-005)。

Funded by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (3332020051), CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (CIFMS) (2017-I2M-2-005).

【作者简介】 黄艺滢 (1991—), 女, 技师, 硕士, 研究方向: 细胞生物学。Email: huangyiyong91@163.com

【通信作者】 白琳 (1984—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 干细胞临床转化。Email: bailin49@163.com;

高苒 (1980—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 比较医学。Email: gaoran26@hotmail.com。

* 共同通信作者

CTLA4-knockout mice were established. CTLA4-humanized mice can be used as an animal model for therapeutic antibody- and CTLA4 gene-related drug experiments.

【Keywords】 CTLA4; humanization; gene knockout; mouse

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

细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4, CTLA4) 和 CD28 是表达在 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的同源受体,两者共享在抗原呈递细胞表面表达的一对配体,并且在 T 细胞活化中介导相反的功能。配体与 CD28 相互作用,介导 T 细胞与 T 细胞受体信号共刺激。而配体与 CTLA4 的相互作用可以介导 T 细胞功能的抑制^[1]。目前,癌症免疫疗法已成为治疗癌症的有效方法,CTLA4 是经过验证的免疫检查点的靶标之一^[2]。由于 CTLA4 功能的重要性,在许多临床前和临床研究中都对 anti-CTLA4 抗体^[3]及 CTLA4 阻滞剂^[4-10]进行了癌症治疗的测试。人类和小鼠的 CTLA4 只具有 75.16% 的同源性,目前批准用于临床的 anti-CTLA4 抗体可以与人源 CTLA4 结合,但不会与鼠源 CTLA4 交叉反应^[11]。因此,在利用小鼠进行药物有效性和安全性评价时,使用 CTLA4 人源化的小鼠是更好的选择。

采用 CRISPR/Cas9 的方法将人源 CTLA4 基因导入到小鼠的受精卵中,同时敲除小鼠内源 CTLA4 基因的表达。CTLA4 敲除小鼠在出生后 3 ~ 5 周内死亡,而 CTLA4 人源化小鼠表型正常。通过建立基因结构和调节方式与人类相似的模型,改善由于 CTLA4 在人与小鼠中的种属差异导致的在临床测试与动物实验结果的差异,从而使药物评价的结果更加客观。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J (雌性,3 ~ 4 周龄,7 ~ 12 g, 15 只;雄性,8 周龄,19 ~ 25 g,30 只)及 ICR 小鼠 (雌性,8 ~ 10 周龄,25 ~ 33 g,4 只),购买于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK (京) 2020-0004】并在本所 SPF 级动物屏障环境动物房【SYXK (京) 2019-0014】中长期饲养繁殖。饲养环境:温度 20 ~ 26℃,湿度 40% ~ 70%,光照周期明暗比 12 h:12 h。饲养期间小鼠自由进食饮水,垫料、鼠盒、水瓶、均经过高温高压灭菌处理。涉及动物操作程序和动物实验经本所动物使用与管理委员会

(IACUC) 批准,批准号为 BL18003。

1.1.2 主要试剂与仪器

载体构建:试剂盒 MEGAscript™ T7 Transcription Kit (Ambion, Am1354); 试剂盒 mMESAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit (Ambion, Am1345)。基因型鉴定:EasyPure® Genomic DNA Kit (Transgen, EE101-12); 鼠尾直接 PCR 试剂盒 (Bimake, B45012)。蛋白免疫印迹:RIPA 裂解液 (碧云天, P0013B); 一抗稀释液 (碧云天, P0256); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%) (雅酶, PG113) 一抗:CTLA4 (Abcam, ab134090), β -actin (Bioss, bs-0061R); 二抗:山羊抗兔 (中杉金桥, ZB-5301)。细胞培养:MEM 培养基 (Gibco, 12571063); RPMI 1640 培养基 (Gibco, 11875093); 胎牛血清 (Gibco, 10099141C) 青链霉素 (Gibco, 15140122), CD3 抗体 (Santa, sc-20047)。RT-PCR: TRIzol (Invitrogen, 15596018); 反转录试剂盒 (Thermo, K1682)。流式细胞术:红细胞裂解液 (BD, 555899); 抗体:CD4-FITC、B220-PE-Cy7、CD8-APC、CD11b-APC-Cy7、NK1.1-SB436、CD3-SB702 (Invitrogen)。

多样品研磨珠均质仪 (OMNI, Bead Ruptor 24 Elite), 电泳仪 (Bio-Rad), PCR 仪 (Hema), 细胞培养箱 (Thermo), 流式细胞仪 (BD FACSAria), 组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机 (德国 Leica)。

1.2 方法

1.2.1 载体构建

(1) sgRNA 表达载体构建:小鼠 CTLA4 基因位于第一号染色体的 1C2 区段 (ENSMUSG00000026011)。针对该基因,设计并合成一对向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA) 作用靶点 (上海英潍捷基), 分别为靶点 1: GGGTTCAAACACATCTCAAGG (寡核苷酸序列为:m-CTLA4-gRNA UP1: 5'-TAGGGGGTTCAAACACATCTCA-3' 和 m-CTLA4-gRNA DOWN1: 5'-AAACTGAGATGTGTTTGAACCC-3') 和靶点 2: GAGACTTCTGGAACATGGAGG (寡核苷酸序列为:m-CTLA4-gRNA UP2: 5'-TAGGGGAGACTTCTGGAACA TGG-3' 和 m-CTLA4-gRNA DOWN2: 5'-AAACCCATGTTCCAGAAGTCTC-3')。对克隆进行测序,测序结果

正确的用于后续实验。

将合成的 CTLA4 sgRNA 单链通过退火复性结合成小片段。用 Bsa I 酶切 pUC57-sgRNA 表达载体使其线性化,然后与 CTLA4 sgRNA 双链进行连接。构建完成的 sgRNA 载体利用试剂盒 MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit,通过体外转录为 sgRNA。

(2) CAS9 载体构建: pST1374-NLS-flag-linker-Cas9 载体利用试剂盒 mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA Transcription Kit 通过体外转录成为 Cas9-RNA。

1.2.2 显微注射

将转录后的 sgRNA 与 Cas9-RNA 混合,并将终浓度调整为每种 sgRNA 20 ng/μL 与 10 ng/μL。用显微注射法注射于 C57 小鼠受精卵中,用 ICR 雌鼠作为假孕受体,将注射后的受精卵移植到受体鼠输卵管壶腹部,等待小鼠出生。

1.2.3 基因型鉴定

小鼠出生后进行编号,并取尾尖进行鉴定。使用 Genomic DNA Kit 提取基因组 DNA,根据序列信息分别设计 2 对人源化及 1 对敲除检测引物(上海英潍捷基),2 对人源化检测引物分别为: M-CTLA4-UP-S: 5'-CTACCACTGAGCTACATCTATACCTCTGAG-3', M-CTLA4-UP-A: 5'-GCCACGTGCATTGCTTTG-3' (产物 1098 bp) 和 M-CTLA4-DOWM-S: 5'-GGAACCCAGATTTATGTAATTGATCC-3', M-CTLA4-DOWM-A: 5'-TTATTGGATAGTCAGCTGGTGTGC-3' 产物(1254 bp),可以分别检测转入人源 CTLA4 基因的上游和下游;1 对敲除引物为: M-CTLA4-KO-S: 5'-AGAAATTACTCTCCAAGACTCCACG-3' 和 M-CTLA4-KO-A: 5'-CCTTAAGTCCCAGCTGAGATCC-3',可以检测鼠源 CTLA4 基因。使用鼠尾直接 PCR 试剂盒进行 PCR,扩增程序为 95℃ 15 min; (95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 2 min) × 30 循环; 72℃ 10 min。加入 6 × 蛋白上样缓冲液后,用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳。使用敲除引物时,小鼠子代 PCR 产物中若含有 727 bp 的片段,则小鼠含有正常鼠源 CTLA4 基因,若含有 528 bp 的片段,则小鼠含有敲除后的 CTLA4 基因,若含有 1511 bp 的片段,则小鼠含人源化的 CTLA4 基因。敲除小鼠子代若只含有敲除后的 CTLA4 基因而无正常鼠源基因,则为纯合敲除小鼠。使用 2 对人源化检测引物时,人源化小鼠子代 PCR 产物中 CTLA4 人源基因上下游表达,且大小正

确,则小鼠含有该人源基因且插入位置正确,为杂合或纯合小鼠,若同时使用敲除引物检测未表达鼠源 CTLA4 基因,则为人源化纯合小鼠。

随后,选取包含突变的 PCR 产物进行 TA 克隆,并进行测序分析,确定 DNA 缺失片段信息。

1.2.4 CTLA4 敲除及人源化小鼠出生后体重及生存率观测

从出生后开始记录 CTLA4 人源化小鼠纯合 ($CTLA4^{h/h}$)、同窝野生型 ($CTLA4^{m/m}$)、敲除小鼠纯合 ($CTLA4^{-/-}$)、同窝野生型 ($CTLA4^{+/+}$) 的生存率及体重变化,其中 $CTLA4^{h/h}$ 、 $CTLA4^{m/m}$ 小鼠的生存率及体重从出生后 1 月记录至 6 月, $CTLA4^{-/-}$ 、 $CTLA4^{+/+}$ 小鼠生存率记录至第 6 周,体重从第 14 天记录至第 28 天。

1.2.5 Western Blot 检测 CTLA4 蛋白在脾和肺中的表达。

取后续繁育的雄性 CTLA4 人源化小鼠纯合 ($CTLA4^{h/h}$) (3 月龄) 及其同窝野生型 ($CTLA4^{m/m}$) 各 1 只,雄性敲除小鼠纯合 ($CTLA4^{-/-}$) (2 周龄) 及其同窝野生型 ($CTLA4^{+/+}$) 各 1 只。将脾及肺组织置于研磨管中加入 RIPA 裂解液,使用多样品研磨珠均质仪提取蛋白,使用 PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (12.5%) 制备胶,上样量为每孔 50 μg。一抗 CTLA4 (1:2500) 和 β-actin (1:2000) 使用一抗稀释液进行稀释,二抗山羊抗兔 (1:5000)。

1.2.6 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction, 逆转录 PCR) 检测 CTLA4 mRNA 在脾中的表达

取后续繁育的 CTLA4 人源化小鼠纯合及其同窝野生各 2 只,获取脾细胞后用 MEM 培养基加入 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素,在 37℃ 及 5% CO₂ 环境中培养,并用 CD3 抗体 (0.1 μg/mL) 刺激培养 4 d。培养后,用 TRIzol 分离总 RNA,并使用反转录试剂盒获得 cDNA。根据序列信息分别设计 1 对人源及 1 对小鼠源 CTLA4 mRNA 检测引物(上海英潍捷基),分别为 hCTLA4-F: 5'-CCCTGCACTCTCCTGTTTTTCT-3', hCTLA4-R: 5'-TTGATTTCCACTGGAGGTGCC-3' 和 mCTLA4-F: 5'-CCTTTTGTAGCCCTGCTCACT-3', mCTLA4-R: 5'-TTCCTCTGCTTTTCAT TAAAGGTAC-3'。使用针对人 CTLA4 的引物扩增片段为 273 个碱基对,而使用针对小鼠 CTLA4 的引物扩增片段为 278 个碱基对。

1.2.7 HE 染色检测淋巴细胞在组织中的分布

选用 4 周龄的 CTLA4 敲除小鼠和同窝野生型小鼠、3 月龄 CTLA4 人源化小鼠和同窝野生型小鼠, 福尔马林固定 24 h 以上, 取心脏及肝脱水、包埋、切片, 最后进行 HE 染色。

1.2.8 流式细胞术检测小鼠外周血中各类细胞的比例

后续繁育的 CTLA4^{h/h} 小鼠 (3 月龄) 4 只和 CTLA4^{m/m} 小鼠 (3 月龄) 5 只, 取外周血 50 μ L (EDTA 抗凝), 使用红细胞裂解液去除红细胞。每管血中加入 40 μ L PBS + CD4 (FITC)、B220 (PE-Cy7)、CD8 (APC)、CD11b (APC-Cy7)、NK1.1 (SB436)、CD3 (SB702) 小鼠单克隆抗体各 0.2 μ L。避光 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 洗 3 次, 1500 r/min 离心 5 min, 200 μ L PBS 重悬, 过滤后使用流式细胞仪分析染色细胞, FlowJo 软件计算细胞表面抗原阳性表达率。

1.2.9 肿瘤细胞细胞培养

鼠源黑色素瘤细胞系 B16 获赠于本所肿瘤课题组。其所需培养基为 RPMI 1640 + 10% FBS, 培养条件: 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。

1.2.10 肿瘤生长和分析

在 CTLA4^{h/h} (左腋下) 和 CTLA4^{m/m} 小鼠 (右腋下) 皮下注射 5×10^5 个 B16 黑色素瘤细胞, 并在细胞注射后第 3、5、7 天, 腹腔注射伊匹木单抗 (ipilimumab) 每只 100 μ g/100 μ L PBS。跟踪测量肿瘤体积, 计算公式为: $V = ab^2/2$, 其中 a 是长径, 而 b 是短径。在第 14 天处死小鼠, 取肿瘤组织称重。使用 GraphPad Prism 5.0 软件分析数据, 数据表示为平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 使用 *t* 检验。在整个研究中, $P < 0.05$ 差异具有显著性。

2 结果

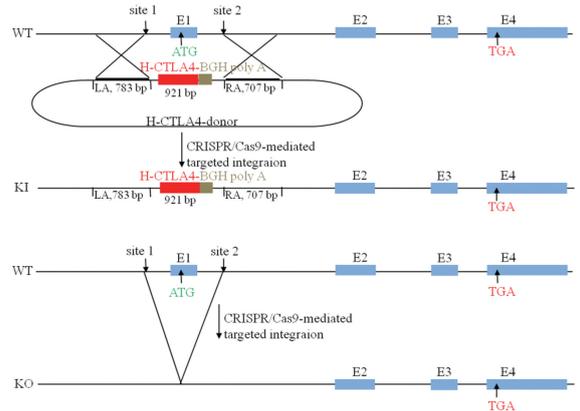
2.1 表达载体的构建

pUC57-sgRNA 表达载体经 Bsa I 酶切线性化, 合成的 CTLA4 sgRNA 双链的粘性末端与表达载体 Bsa I 酶切后的粘性末端相匹配, 两者连接, 成功构建 CTLA4 sgRNA 表达载体, 经测序验证序列正确。

2.2 CTLA4 敲除及人源化小鼠的构建

按照实验方案 (图 1), 将转录后的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合后通过显微注射技术注射到 C57 小鼠受精卵中, 移植到 ICR 假孕鼠子宫内, 共出生 23 只幼仔, 剪取 7 ~ 10 日龄小鼠的鼠尾组织, 提取 DNA 并进行 PCR (图 2a, c, d)。根据 PCR 结果, 选取分子量不同于野生型条带的 PCR 产物测序并与

野生型小鼠 CTLA4 基因序列比较。结果显示, 3#, 5#, 9#, 14#, 23# 小鼠发生基因敲入, 4#, 6#, 7#, 10#, 15# 小鼠发生基因敲除。将 F0 代敲除小鼠 7# (雄) 与 C57 小鼠进行杂交, 获得杂合子 CTLA4^{+/-}, 将 F0 代人源化小鼠 14# (雄) 与 C57 小鼠进行杂交, 获得杂合子 CTLA4^{h/m}, 将杂合子互交并将子代进行基因型鉴定, 得到纯合敲除小鼠 CTLA4^{-/-} (图 2b) 或纯合人源化小鼠 CTLA4^{h/h} (图 2e ~ g), 突变可稳定传代。



注: 在 sgRNA 和 Cas9 mRNA 的参与下, 小鼠 CTLA4 第一外显子被剪切; a: 使用人 CTLA4 的 CDS 区及 BGH Poly A 组成的 921 bp 阅读框, 成功替换了小鼠 CTLA4 第一外显子的编码区, 建立 CTLA4 人源化小鼠; b: 阅读框未能替换小鼠 CTLA4 第一外显子的编码区, 建立 CTLA4 敲除小鼠。

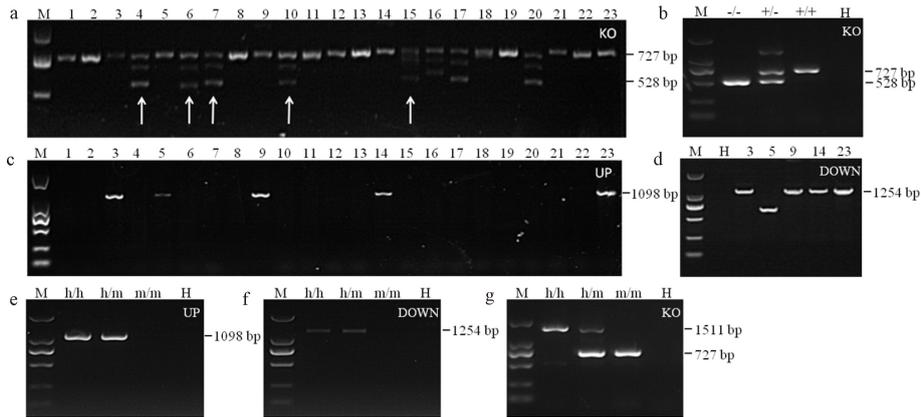
图 1 CTLA4 人源化及敲除小鼠建立方案

Note. With the participation of sgRNA and Cas9 mRNA, the first exon of mouse CTLA4 was cut. a. The 921 bp reading frame composed of the CDS region of human CTLA4 and BGH Poly A was used to replace the coding region of the first exon of mouse CTLA4 to establish a humanized CTLA4 mouse. b. The reading frame did not replace the coding region of the first exon of mouse CTLA4 and a CTLA4 knockout mouse was established.

Figure 1 Establishment of CTLA4 humanization and knockout mice

2.3 CTLA4 敲除及人源化小鼠生存率及体重变化

早有研究表明, CTLA4 基因敲除小鼠会在出生后 1 月内, 由于严重的自身免疫疾病死亡^[12]。统计了小鼠出生后的生存率及体重变化, CTLA4^{-/-} 小鼠在出生后 3 ~ 5 周内死亡 (图 3a), 而 CTLA4^{h/h} 小鼠在 6 月内生长正常, 未发生死亡 (图 3b)。CTLA4^{-/-} 小鼠在出生后 2 周时体重与同窝野生型小鼠 CTLA4^{+/+} 相似, 但在 3 ~ 4 周时体重明显低于 CTLA4^{+/+} 小鼠 (图 3c), 体型也更小 (图 3e), 而 CTLA4^{h/h} 小鼠在出生后 6 个月内体重与同窝 CTLA4^{m/m} 小鼠基本一致 (图 3d), 未见明显异常。

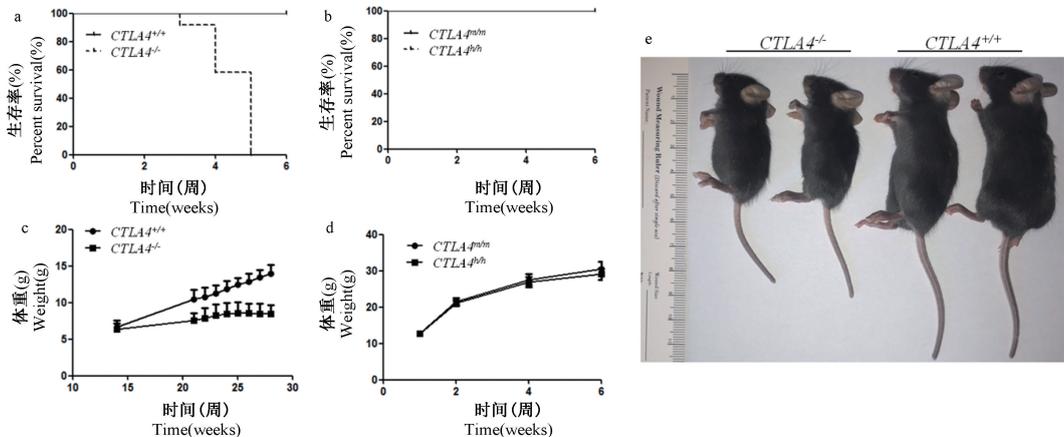


注: M: Marker (TaKaRa, DL2000); H: 水; 1 ~ 23 为通过显微注射技术出生的 F0 代小鼠编号 (a, c, d); -/-: CTLA4 基因敲除纯合子小鼠; +/-: CTLA4 基因敲除杂合子小鼠; +/+: 同窝野生型小鼠 (b); h/h: CTLA4 人源化纯合子小鼠; h/m: CTLA4 人源化杂合子小鼠; m/m: 同窝野生型小鼠 (e ~ g); 使用引物 M-CTLA4-KO 鉴定敲除小鼠 F0 代 (a)、其子代 (b) 基因型。使用引物 M-CTLA4-UP (c, e) 和 M-CTLA4-DOWM (d, f) 分别鉴定人源化小鼠 F0 代 (c, d) 及子代 (e, f) 人源基因插入位置, 使用引物 M-CTLA4-KO 鉴定人源化小鼠子代是否为纯合 (g)。

图 2 PCR 鉴定 F0 代及子代小鼠基因型

Note. M. Marker (TaKaRa, DL2000). H. H₂O. 1 ~ 23. F0 generation mice were generated by microinjection (a, c, d). -/-: CTLA4 homozygous mice. +/-: CTLA4 heterogeneous mice. +/+: Wild-type littermate mice (b). h/h. Humanized CTLA4 homozygous mouse. h/m. Humanized CTLA4 heterogeneous mouse. m/m. Wild-type littermate mice (e ~ g). The primer M-CTLA4-KO was used to identify the genotypes of knockout mice F0 generation (a) and its offspring (b). The primers M-CTLA4-UP (c, e) and M-CTLA4-DOWM (d, f) were used to identify the insertion position of the human gene in the F0 generation (c, d) and the offspring (e, f) of the CTLA4 humanized mice. The primer M-CTLA4-KO was used to identify the homozygous mouse (g).

Figure 2 Identify the genotype of the F0 generation and offspring mice by PCR



注: a: CTLA4^{-/-} 及 CTLA4^{+/+} 小鼠出生后 6 周内的生存率, CTLA4^{-/-} 小鼠在出生后 3 ~ 5 周内死亡 (n ≥ 9); b: CTLA4^{h/h} 及 CTLA4^{m/m} 小鼠出生后 6 月内的生存率 (n ≥ 7); c: CTLA4^{-/-} 及 CTLA4^{+/+} 小鼠出生 28 d 内的体重变化, CTLA4^{-/-} 小鼠在出生 14 d 后体重增长缓慢 (n ≥ 8); d: CTLA4^{h/h} 及 CTLA4^{m/m} 小鼠出生 6 月内的体重变化 (n ≥ 7); e: CTLA4^{-/-} 及 CTLA4^{+/+} 小鼠 4 周龄时体型对比。

图 3 CTLA4 基因敲除小鼠生存率及体重变化

Note. a. Survival rate of CTLA4^{-/-} and CTLA4^{+/+} mice within 6 weeks of birth. CTLA4^{-/-} mice died within 3 ~ 5 weeks after birth (n ≥ 9). B. Survival rate of CTLA4^{h/h} and CTLA4^{m/m} mice within 6 months of birth (n ≥ 7). c. Weight of CTLA4^{-/-} and CTLA4^{+/+} mice within 28 d of birth. CTLA4^{-/-} mice gain weight slowly after 14 d of birth (n ≥ 8). d. Weight of CTLA4^{h/h} and CTLA4^{m/m} mice within 6 months of birth (n ≥ 7). e. Comparison of CTLA4^{-/-} and CTLA4^{+/+} mice of 4 weeks old.

Figure 3 Changes of survival rate and weight of CTLA4 knockout mice

2.4 CTLA4 敲除及人源化小鼠组织中蛋白及 mRNA 表达

为了鉴定 CTLA4 敲除及人源化小鼠是否在蛋白水平发生 CTLA4 敲除或人源化转入,取 1 ~ 2 月龄小鼠脾、肺进行 Western Blot,分别使用种属反应性为小鼠和人的 CTLA4 抗体检测蛋白表达(图 4a)。结果显示,在 *CTLA4*^{-/-} 小鼠的脾和肺中,CTLA4 表达被敲除。

由于市售的种属反应性为人的 CTLA4 抗体无法区分人源与鼠源的蛋白,为了区分人源与小鼠源 CTLA4 表达,使用 RT-PCR 鉴定 *CTLA4*^{h/h} 小鼠脾细胞(CD3 抗体刺激 4 d)中 mRNA 表达(图 4b)。结果可见人特异性引物只能扩增 *CTLA4*^{h/h} 的 cDNA,而小鼠特异性引物也只能扩增 *CTLA4*^{m/m} 的 cDNA,可见 *CTLA4*^{h/h} 小鼠中只表达人源 CTLA4 的 mRNA。

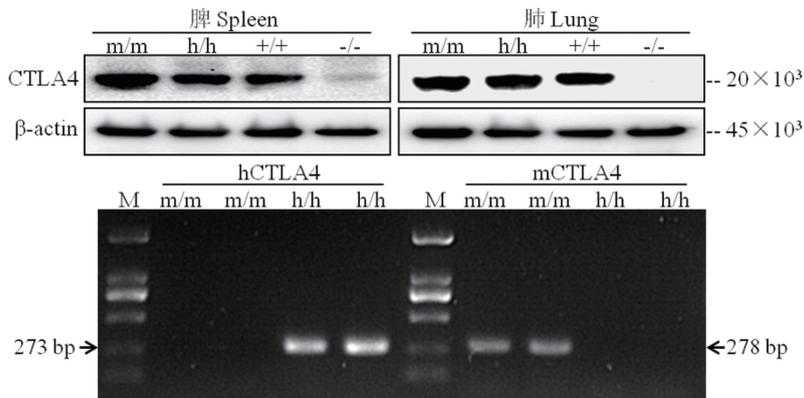
2.5 人源 CTLA4 基因可正常替代小鼠 CTLA4 基因

文献报道,*CTLA4*^{-/-} 小鼠会由于严重的自身免疫疾病,在出生后 3 ~ 4 周内死亡^[12],这与观察到的结果相似。HE 染色结果显示,相比于 *CTLA4*^{+/+} 小鼠(图 5a,e),*CTLA4*^{-/-} 小鼠表现出淋巴样细胞向非淋巴组织(如心脏、肝)的浸润(图 5b,f)。文献报道,CTLA4 敲除可导致动物患有严重胰腺炎和致命的心肌炎^[12-13]。但在 *CTLA4*^{m/m} 小鼠(图 5c,g)及 *CTLA4*^{h/h} 小鼠(图 5d,h)中,没有观察到淋巴细胞的

浸润,且全身病理检查未发现异常。结果表明,*CTLA4*^{h/h} 小鼠寿命正常,在 6 个月内没有观察到自身免疫性疾病发展的迹象。利用流式细胞术检测了 *CTLA4*^{m/m} 和 *CTLA4*^{h/h} 小鼠外周血中各类细胞的比例,发现其外周血中 B 细胞(B220⁺)、T 细胞(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)、粒细胞(CD11b⁺)和 NK 细胞(NK1.1⁺)的比例都没有明显差异(图 6)。结果说明人源化 CTLA4 基因后没有改变正常生理状态下小鼠免疫系统的组成。因此,在 *CTLA4*^{h/h} 小鼠中,人源 CTLA4 等位基因已功能性替代了小鼠 CTLA4 基因。

2.6 在 CTLA4 人源化小鼠中,CTLA4 单克隆抗体伊匹木减缓肿瘤生长速度

目前批准用于临床的抗 CTLA4 抗体可以与人源 CTLA4 结合,但不会与鼠源 CTLA4 交叉反应^[11]。为了检测建立的 *CTLA4*^{h/h} 小鼠是否可以用于临床药物筛选,对比了 CTLA4 单克隆抗体伊匹木^[3] 在 *CTLA4*^{h/h} 和 *CTLA4*^{m/m} 小鼠中抑制肿瘤生长的能力。用黑色素瘤细胞系 B16 分别移植入 *CTLA4*^{h/h} 和 *CTLA4*^{m/m} 小鼠皮下,在移植后第 3、5、7 天,伊匹木单抗以每只 100 μg 的剂量进行 3 次腹腔注射,观察肿瘤生长至 14 d。在 *CTLA4*^{h/h} 小鼠中,伊匹木单抗减缓肿瘤生长速度(图 7a,b),在第 14 天时,*CTLA4*^{h/h} 小鼠中肿瘤质量低于 *CTLA4*^{m/m} 小鼠(图 7c,d)。结果显示,伊匹木单抗可以在建立的 *CTLA4*^{h/h} 小鼠中发挥有效作用。

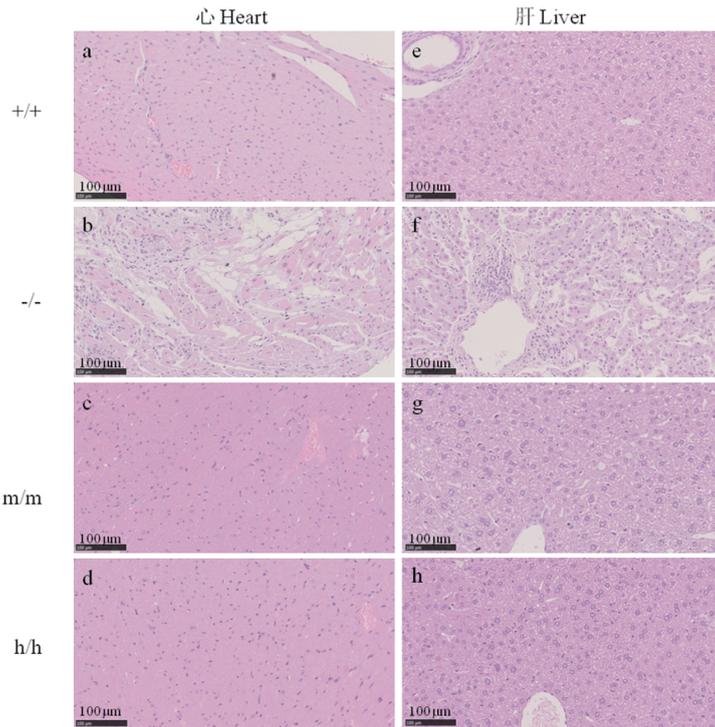


注:m/m;同窝野生型小鼠;h/h;CTLA4 人源化纯合子小鼠;+/+;同窝野生型小鼠;-/-;CTLA4 基因敲除纯合子小鼠;a:Western Blot 检测 CTLA4 蛋白在脾和肺中的表达;b:RT-PCR 检测 CTLA4 mRNA 在脾中的表达;hCTLA4:人特异性 CTLA4 引物;mCTLA4:小鼠特异性 CTLA4 引物。

图 4 CTLA4 在敲除小鼠及人源化小鼠中的蛋白及 mRNA 表达

Note. m/m. Wild type littermate mouse. h/h. Humanized CTLA4 homozygous mouse. +/+. Wild type littermate mouse. -/-. CTLA4 knockout homozygous mouse. a. CTLA4 protein expression of spleen and lung in mice detected by Western Blot. b. CTLA4 mRNA expression of spleen in mice detected by RT-PCR. hCTLA4. Human specific CTLA4 primer. mCTLA4. Mouse specific CTLA4 primer.

Figure 4 Expression of protein and mRNA in CTLA4 knockout and humanized mice

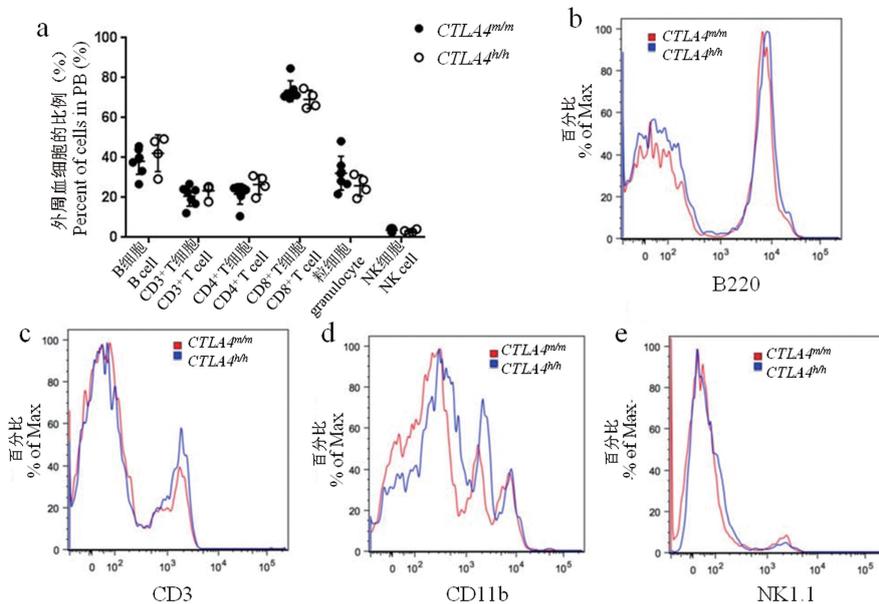


注:在 $CTLA4^{-/-}$ 小鼠中,淋巴细胞广泛浸润到非淋巴组织中(b, f),而在 $CTLA4^{+/+}$ (a, e), $CTLA4^{m/m}$ (c, g)及 $CTLA4^{h/h}$ (d, h)小鼠中无明显浸润。

图 5 组织中淋巴细胞浸润

Note. In $CTLA4^{-/-}$ mice, lymphocytes infiltrated extensively into non-lymphoid tissues (b, f), while in $CTLA4^{+/+}$ (a, e), $CTLA4^{m/m}$ (c, g) and $CTLA4^{h/h}$ (d, h) mice there was no significant infiltration.

Figure 5 Lymphocyte infiltration in tissues

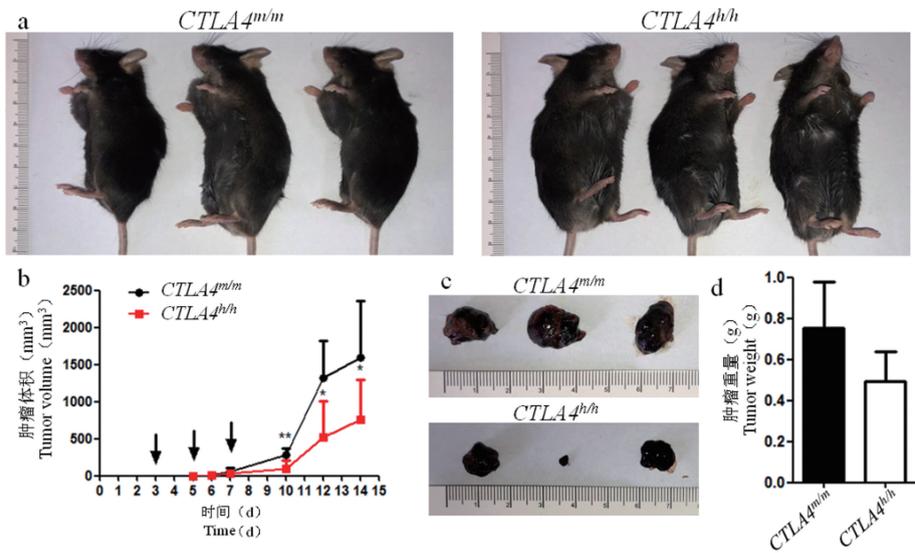


注:m/m;野生型小鼠($n=6$);h/h;CTLA4 人源化纯合子小鼠($n=4$)。a:流式细胞术统计不同免疫细胞在外周血中的比例。b ~ e:流式细胞术检测外周血中 B220(b), CD3(c), CD11b(d), NK1.1(e) 表达。

图 6 在 $CTLA4^{h/h}$ 小鼠外周血中不同免疫细胞的比例

Note. m/m. Wild type mouse ($n=6$). h/h. Humanized CTLA4 homozygous mouse ($n=4$). a. Proportion of different immune cells in peripheral blood by flow cytometry. b ~ e. The expression of B220 (b), CD3 (c), CD11b (d), NK1.1 (e) in peripheral blood by flow cytometry.

Figure 6 Proportion of different immune cells in peripheral blood of $CTLA4^{h/h}$ mice



注:向 $CTLA4^{h/h}$ (左腋下, $n=8$) 和 $CTLA4^{m/m}$ 小鼠 (右腋下, $n=6$) 皮下注射 5×10^5 B16 黑色素瘤细胞,并在第 3、5、7 天 (如箭头所示),腹腔注射伊匹木单抗每只 $100 \mu\text{g}$,观察并测量肿瘤直径至细胞移植后 14 d (a, b);在细胞移植后 14 d 时取出肿瘤称重 (c, d);与同时期 $CTLA4^{m/m}$ 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 在 $CTLA4^{h/h}$ 小鼠中,伊匹木抑制 B16 黑色素实体瘤恶性增殖

Note. 5×10^5 B16 melanoma cells were injected (s.c.) into $CTLA4^{h/h}$ ($n=8$) and $CTLA4^{m/m}$ ($n=6$) mice, and mice were treated (i.p.) with $100 \mu\text{g}$ ipilimumab per mouse on days 3, 5 and 7, as indicated by arrows. Measure the tumor diameter to 14 d after cell injected (a, b). Weigh the tumor on the 14th day after cell injected (c, d). Compared with $CTLA4^{m/m}$ group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 7 In $CTLA4^{h/h}$ mice, ipilimumab induced the malignant proliferation of B16 melanoma

3 讨论

如今,小鼠常被用于新药物研发和疾病机制研究。但由于物种差异,小鼠在药物的代谢和毒理学特征方面不一定与人类相同,导致药物在临床测试的效果和安全性与动物实验结果所预测不同的现象时有发生。为了减少物种差异,提高临床前实验的可靠性,通常使用人源化小鼠进行实验,人源化小鼠是指携带人类基因、细胞或组织的嵌合体小鼠。在本实验中,使用 CRISPR/Cas9 这一常用方法^[14]建立 CTLA4 基因敲除及人源化小鼠。

抗体疗法是备受关注的免疫疗法之一,治疗性抗体大致分为两类,第一类是抗体与癌细胞直接结合,通过免疫依赖性和/或非依赖性机制诱导癌细胞死亡^[15-18]。第二类是通过与免疫系统的细胞 (如 T 细胞) 结合并激活而引起肿瘤排斥反应^[19-20]。初始 T 细胞活化需要两个信号,即 T 细胞受体和 T 细胞共刺激途径^[21]。CTLA4 最初被发现为一种传递抑制信号,对于终止免疫反应非常重要^[12-13]。T 细胞活化受到 CTLA4 的负面调节,例如与 CD28 竞争与它们共同配体 B7.1 和 B7.2 的结合^[22]。尽管 CTLA4 调节免疫系统的确切机制仍存在争议,但

CTLA4 的抑制功能受到广泛认可^[23]。所有 CTLA4 敲除小鼠在淋巴结和脾均显示大量淋巴细胞增殖,随后白细胞对几乎所有组织进行自身免疫攻击,并导致小鼠过早死亡^[12-13,24]。在纯合 CTLA4 人源化小鼠中,一段时间内 (超过 6 个月) 没有观察到致命的自身免疫疾病,这证明在人源化小鼠中,人和小鼠的 CTLA4 具有相同的生物学功能。

在研究治疗性抗体的效果时,可以使用免疫系统人源化小鼠进行研究。如使用免疫缺陷小鼠进行人外周血重构,从而在小鼠中建立功能正常的人免疫系统^[25]。虽然这种模型可以用于筛选抗体的潜在抗癌作用,但在评估其它临床参数,如自身免疫性方面受到一定限制。此外免疫系统人源化小鼠容易产生移植物抗宿主病,或需要人细胞因子刺激使移植后的细胞存活增殖^[26]。相比之下,CTLA4 基因人源化小鼠的免疫应答是在自然环境中产生的。并且,CTLA4 基因人源化小鼠模型可以用于评估与潜在人类治疗性抗体相关的自身免疫副作用的能力^[3]。

因此,本研究建立的 CTLA4 人源化小鼠模型改善了 CTLA4 在人与小鼠中种属差异导致的实验结果差异,从而使药物评价的结果更加客观,为治疗

性抗体的验证提供了更有价值的实验动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy [J]. *Blood*, 2018, 131(1): 58-67.
- [2] Park J, Kwon M, Shin EC. Immune checkpoint inhibitors for cancer treatment [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(11): 1577-1587.
- [3] Lute KD, May KF Jr, Lu P, et al. Human CTLA4 knock-in mice unravel the quantitative link between tumor immunity and autoimmunity induced by anti-CTLA-4 antibodies [J]. *Blood*, 2005, 106(9): 3127-3133.
- [4] Ipilimumab [J]. *Drugs R D*, 2010, 10(2): 97-110.
- [5] Rotte A. Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 255.
- [6] Tremelimumab [J]. *Drugs R D*, 2010, 10(2): 123-132.
- [7] Antonia S, Goldberg SB, Balmanoukian A, et al. Safety and antitumor activity of durvalumab plus tremelimumab in non-small cell lung cancer: a multicentre, phase 1b study [J]. *Lancet Oncol*, 2016, 17(3): 299-308.
- [8] Bahig H, Aubin F, Stagg J, et al. Phase I/II trial of Durvalumab plus Tremelimumab and stereotactic body radiotherapy for metastatic head and neck carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 68.
- [9] Fumet JD, Isambert N, Hervieu A, et al. Phase Ib/II trial evaluating the safety, tolerability and immunological activity of durvalumab (MEDI4736) (anti-PD-L1) plus tremelimumab (anti-CTLA-4) combined with FOLFOX in patients with metastatic colorectal cancer [J]. *ESMO Open*, 2018, 3(4): e000375.
- [10] Lee JY, Kim JW, Lim MC, et al. A phase II study of neoadjuvant chemotherapy plus durvalumab and tremelimumab in advanced-stage ovarian cancer: a Korean Gynecologic Oncology Group Study (KGOG 3046), TRU-D [J]. *J Gynecol Oncol*, 2019, 30(6): e112.
- [11] He M, Chai Y, Qi J, et al. Remarkably similar CTLA-4 binding properties of therapeutic ipilimumab and tremelimumab antibodies [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 67129-67139.
- [12] Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4 [J]. *Science*, 1995, 270(5238): 985-988.
- [13] Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4 [J]. *Immunity*, 1995, 3(5): 541-547.
- [14] Erwood S, Gu B. Embryo-based large fragment knock-in in mammals: why, how and what's next [J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(2): 140.
- [15] Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treatment for the masses [J]. *Science*, 2004, 305(5681): 200-205.
- [16] Olszewski AJ, Grossbard ML. Empowering targeted therapy: lessons from rituximab [J]. *Sci STKE*, 2004, 2004(241): 30.
- [17] Slamon DJ, Leyland JB, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2 [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(11): 783-792.
- [18] Clynes RA, Towers TL, Presta LG, et al. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets [J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 443-446.
- [19] Chen L. Manipulation of T cell response to tumors by targeting on costimulatory pathway [J]. *Leukemia*, 1997, 3: 567-569.
- [20] Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade [J]. *Science*, 1996, 271(5256): 1734-1736.
- [21] Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(7): 544-556.
- [22] Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(2): 116-126.
- [23] Egen JG, Kuhns MS, Allison JP. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(7): 611-618.
- [24] Chambers CA, Sullivan TJ, Allison JP. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4⁺ T cells [J]. *Immunity*, 1997, 7(6): 885-895.
- [25] May KF Jr, Roychowdhury S, Bhatt D, et al. Anti-human CTLA-4 monoclonal antibody promotes T-cell expansion and immunity in a hu-PBL-SCID model: a new method for preclinical screening of costimulatory monoclonal antibodies [J]. *Blood*, 2005, 105(3): 1114-1120.
- [26] 李爽, 邹建玲, 鲁智豪, 等. 免疫系统人源化小鼠模型的建立、应用及挑战 [J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2017, 9(10): 15-20.
- Li S, Zou JL, Lu ZH, et al. The establishment, application and challenge of the humanized mice [J]. *Chin J Frontiers of Med Sci (Electronic Version)*, 2017, 9(10): 15-20.

[收稿日期] 2020-12-17