

秦琪,李娟,杨柳,等. 巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠的构建及功能分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(4): 428-436.

Qin Q, Li J, Yang L, et al. Construction and functional analysis of macrophage-conditional *Cd226* gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(4): 428-436.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.04.002

巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠的构建及功能分析

秦琪^{1,2}, 李娟², 杨柳^{1,2}, 方亮², 陈丽华^{2*}

(1. 西北大学生命科学学院, 西安 710069; 2. 空军军医大学基础医学院免疫学教研室, 西安 710032)

【摘要】 目的 构建并鉴定巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠, 为研究 CD226 分子调节巨噬细胞表型和功能影响疾病发生发展提供动物模型。**方法** 通过 *Cd226*^{flax/+} 雌雄小鼠自交, 得到基因型 *Cd226*^{flax/flax} 小鼠。*Cd226*^{flax/flax} 与 *Lyz2-Cre*⁺ 小鼠杂交, 获得 *Cd226*^{flax/+} *Lyz2-Cre*⁺ 小鼠, 再将其与 *Cd226*^{flax/flax} 小鼠杂交, 最终获得 *Cd226*^{flax/flax} *Lyz2-Cre*⁺ 小鼠, 即巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠。采用 PCR 和琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型; 采用流式细胞术、qRT-PCR 和 Western Blot 验证小鼠巨噬细胞 CD226 敲除效果; 采用 Transwell 实验检测 CD226 对小鼠巨噬细胞迁移能力的影响。**结果** 从基因和蛋白水平证实巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠构建成功。Transwell 实验结果显示, 与对照组相比, 巨噬细胞条件性敲除 CD226 分子显著抑制腹腔巨噬细胞的迁移。**结论** 成功构建巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠, 为后续深入研究 CD226 调控巨噬细胞功能在免疫性疾病发病中的作用和机制提供更加精准的实验动物模型。

【关键词】 CD226; 条件性敲除; 基因型鉴定; 巨噬细胞; 迁移

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 04-0428-09

Construction and functional analysis of macrophage-conditional *Cd226* gene knockout mice

QIN Qi^{1,2}, LI Juan², YANG Liu^{1,2}, FANG Liang², CHEN Lihua^{2*}

(1. Faculty of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China. 2. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an 710032)

Corresponding author: CHEN Lihua. E-mail: chenlh@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To construct and identify macrophage-conditional *Cd226* gene knockout mice, and to provide an animal model for studying the effect of CD226 on the occurrence and development of diseases by regulating the phenotype and function of macrophages. **Methods** *Cd226*^{flax/+} mice were self-crossed by male and female to obtain *Cd226*^{flax/flax} mice. *Cd226*^{flax/flax} were hybridized with *Lyz2-Cre*⁺ mice to obtain *Cd226*^{flax/+} *Lyz2-Cre*⁺ mice, and then crossed with *Cd226*^{flax/flax} mice to obtain macrophage-conditional *Cd226* knockout mice (*Cd226*^{flax/flax} *Lyz2-Cre*⁺). The phenotypes of the mice were identified by PCR and agarose gel electrophoresis. To verify that CD226 had been conditionally knockdown in macrophages, qRT-PCR, flow cytometry and Western Blot were used to evaluate CD226 expression. Transwell was used to detect the effect of CD226 on the migration of macrophages. **Results** The successful establishment of macrophage-conditional *Cd226* gene knockout mice was confirmed at gene and protein levels. Compared with *Cd226*^{flax/flax} mice, the migration ability of peritoneal macrophages was significantly inhibited in *Cd226*^{flax/flax} *Lyz2-Cre*⁺ mice. **Conclusions** Macrophage-conditional *Cd226* gene knockout mice

【基金项目】 国家自然科学基金 (82071848)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82071848).

【作者简介】 秦琪 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 巨噬细胞与溃疡性结肠炎。Email: 1622394017@qq.com

【通信作者】 陈丽华 (1971—), 女, 博士生导师, 博士, 教授, 研究方向: 细胞与分子免疫学。Email: chenlh@fmmu.edu.cn

were successfully established, which can provide a more accurate animal model for studying the role and mechanism of CD226 regulation of macrophage in the pathogenesis of immune diseases.

【**Keywords**】 CD226; conditional knockout; genotype identification; macrophage; migration

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

CD226(又称 DNAM-1)为免疫球蛋白超家族成员之一,在多种免疫细胞上组成性表达,如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞及单核/巨噬细胞等^[1-4]。作为重要的共刺激分子和黏附分子,CD226 可介导 CTL/NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤、血小板与血管内皮细胞之间的黏附及单核细胞的迁移^[5-7]。课题组前期研究发现,全身敲除 CD226 分子可通过促进 Treg 细胞的增殖延缓小鼠自身免疫性脑脊髓膜炎发病^[8];可调节巨噬细胞向 M2 型极化促进心肌梗死后愈合^[9];可抑制外周血炎性单核细胞向腹腔的迁移从而减缓小鼠溃疡性结肠炎的发生发展^[10]。但以上研究均基于全身性 *Cd226* 基因敲除小鼠,不能排除其他细胞中 CD226 缺失对疾病模型的影响。

Cre/LoxP 系统是由 Sternberg 等^[11]于 1981 年提出,包含 Cre 重组酶和 loxP 位点两部分。Cre 重组酶是一种酪氨酸位点特异性重组酶,由大肠杆菌噬菌体 P1 的 Cre 基因编码,能够特异性识别 loxP 位点,并介导两个 loxP 位点的 DNA 序列特异性缺失^[12]。LoxP 位点长 34 bp,包括两个 13 bp 的反向重复序列和一个 8 bp 的间隔区域。其中,反向重复序列是 Cre 重组酶的特异识别位点,而间隔区域决定了 loxP 位点的方向^[13]。利用 Cre/LoxP 重组酶系统,可以实现组织特异性基因敲除,已广泛应用于条件性基因敲除小鼠的构建^[14]。

小鼠溶菌酶基因 *Ly2* 编码溶菌酶 M (lysozyme M),其在小鼠的单核细胞、巨噬细胞和粒细胞等髓系细胞中表达^[15]。本研究利用 Cre/LoxP 重组酶系统,将 Cre 重组酶插入到小鼠 *Ly2* 基因起始密码子处,通过表型分析成功构建出巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠,并检测了巨噬细胞条件性敲除 CD226 分子后对巨噬细胞迁移的影响,为进一步研究 CD226 调控巨噬细胞功能在免疫性疾病中发挥的作用和机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级 C57BL/6J 背景 *Cd226^{fllox/+}* 小鼠共 3 只,一雄两雌,*Ly2-Cre⁺* 小鼠共 3 只,一雄两雌,体重

20 ~ 25 g,购自赛业生物有限公司【SCXK(苏)2018-0003】。实验动物饲养于空军军医大学实验动物中心【SYXK(陕)2019-001】,环境温度 23 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 60%,昼夜各半循环照明,自由饮水饮食。分别选取 6 ~ 8 周、体重 20 g 左右健康雌雄小鼠进行交配、育种。所有操作均符合空军军医大学实验动物伦理学要求(IACUC-20220299)。

1.1.2 主要试剂与仪器

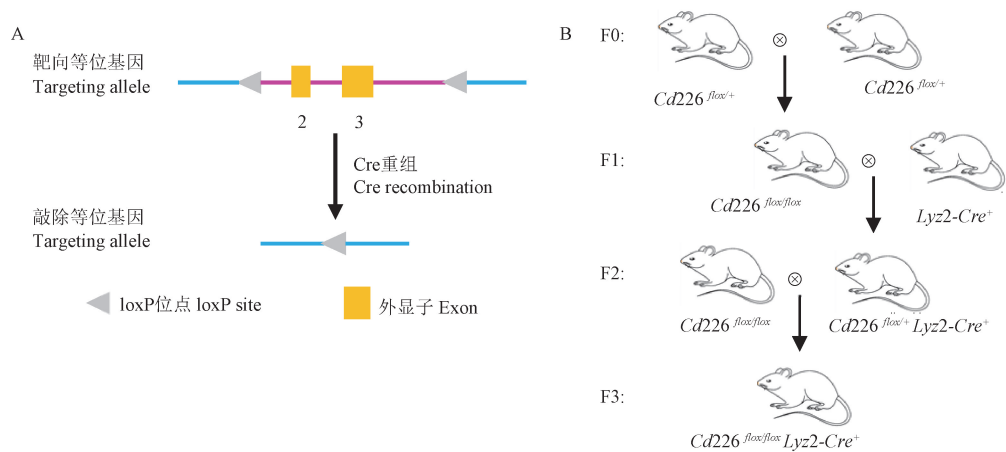
小鼠组织直接 PCR 试剂盒(上海翌圣生物科技有限公司)、2000 DNA Marker(上海翌圣生物科技有限公司)、50 bp DNA Ladder(北京天根科技生化有限公司)、Goldview 核酸染料(上海翌圣生物科技有限公司)、1 × TBE(上海生工生物工程公司)、琼脂糖(深圳市达科为生物工程有限公司)、TRIzol(西安米鼠生物科技有限公司)、RNA 反转录试剂盒(上海翌圣生物科技有限公司)、RIPA buffer(Thermo)、Transwell 小室(美国 Corning 公司)、Rabbit polyclonal antibody to CD226 (Abmart)、GAPDH Polyclonal antibody (proteintech)、流式抗体:PE anti-mouse CD11b、FITC anti-mouse F4/80、Pacific blue anti-mouse Ly6G、PE-Cy7 anti-mouse Ly6C、APC anti-mouse CD226(美国 Biolegend 公司)。

凝胶电泳仪(上海天能生物有限公司,中国)、凝胶成像系统(上海天能生物有限公司,中国)、自动凝胶成像仪(Bio-Rad)、流式细胞仪(艾森生物有限公司,中国)、倒置荧光显微镜(Olympus,日本)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的构建与繁殖

应用 Cre/LoxP 技术构建巨噬细胞条件性基因敲除小鼠(图 1A)。将 *Cd226^{fllox/+}* 雌雄小鼠自交,获得子代基因型为 *Cd226^{fllox/fllox}* 的小鼠,*Cd226^{fllox/fllox}* 小鼠与 *Ly2-Cre⁺* 小鼠杂交获得基因型为 *Cd226^{fllox/+} Ly2-Cre⁺* 小鼠。后将 *Cd226^{fllox/+} Ly2-Cre⁺* 与 *Cd226^{fllox/fllox}* 进行杂交,得到的后代基因型可能是:*Cd226^{fllox/+}*、*Cd226^{fllox/+} Ly2-Cre⁺*、*Cd226^{fllox/fllox}*、*Cd226^{fllox/fllox} Ly2-Cre⁺*。其中基因型 *Cd226^{fllox/fllox} Ly2-Cre⁺* 小鼠为巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠,即 CKO 小鼠,*Cd226^{fllox/fllox} Ly2-Cre⁻* 作为对照组小鼠,后续称为 *Cd226^{fl/fl}* 小鼠(图 1B)。



注:A:巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠构建策略;B:巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠繁殖策略。

图 1 巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠构建与繁殖

Note. A. Construction strategy of macrophage conditional *Cd226* gene knockout mice. B. Reproductive strategies of macrophage conditional *Cd226* gene knockout mice.

Figure 1 Establishment and reproductive strategies of macrophage conditional *Cd226* gene knockout mice

1.2.2 小鼠基因型鉴定

待新生小鼠 3 ~ 4 周龄,剪取 3 mm 左右鼠尾组织,根据小鼠组织直接 PCR 试剂盒提取 DNA。PCR 扩增体系为 20 μ L,反应条件为:预变性 94 $^{\circ}$ C, 5 min;变性 94 $^{\circ}$ C, 10 s;退火 60 $^{\circ}$ C, 20 s,重复上述循环 35 次;延伸 72 $^{\circ}$ C, 30 s,终延伸 72 $^{\circ}$ C, 5 min。使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,在凝胶成像仪中分析结果并拍照。引物序列由北京擎科生物有限公司合成。引物序列见表 1。

1.2.3 腹腔巨噬细胞的提取

脱颈处死小鼠,无菌条件下剪开小鼠皮肤暴露腹膜,吸取预冷 PBS 轻轻搅动肠管,收集腹腔灌洗液,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,使用 DMEM 完全培养基重悬细胞;一部分细胞悬液用于流式检测,另一部分接种至六孔板,贴壁培养 6 h 后,收集细胞用于后续实验。

1.2.4 骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophage, BMDM) 的提取与培养

无菌条件下分离小鼠股骨和胫骨,迅速使用 PBS 冲洗骨髓细胞,70 μ m 滤网过滤后,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,将细胞重悬在含 20 ng/mL M-CSF 的 DMEM 完全培养基中,随后接种至 10 cm

培养皿,3 d 后换液,继续使用含 20 ng/mL M-CSF 的 DMEM 完全培养基培养 3 d。

1.2.5 细胞迁移实验

采用 Transwell 小室进行实验:使用无血清 DMEM 培养基重悬小鼠腹腔巨噬细胞,密度调整为 1.5×10^5 /mL,吸取 100 μ L 细胞悬液加入 Transwell 上室,吸取 700 μ L DMEM 完全培养基加入下室。于 37 $^{\circ}$ C 迁移 12 h 后,甲醇固定 20 min,结晶紫染色 20 min,显微镜下观察细胞迁移情况,并进行拍照计数。

1.2.6 流式细胞术

将制备好的单细胞悬液使用 100 μ L 流式洗液重悬,加入抗体 PE anti-mouse CD11b、PE-Cy7 anti-mouse Ly6C、Pacific Blue anti-mouse Ly6G、FITC anti-mouse F4/80、APC anti-mouse CD226 及相应的同型对照抗体各 1.5 μ L,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,加入流式洗液,涡旋,1200 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 200 μ L 流式洗液重悬细胞,随后上机检测。

1.2.7 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

TRIzol 提取小鼠 BMDM 及腹腔巨噬细胞 RNA,取 2 μ g RNA 逆转录为 cDNA, qRT-PCR 检测 *Cd226* mRNA 的表达水平。反应体系:2 $\times$ SYBR Master

表 1 小鼠基因型鉴定引物序列

Table 1 Primer sequences for mouse genotyping

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
<i>Flox</i>	AATAAGCATTTGTTACTGGCTAACCC	AACTGAATGGACCTCCAACCTACA
<i>Cre</i>	CCCAGAAATGCCAGATTACG	CTTGGGCTGCCAGAATTCTCTC

Mix 10 μL , Forward Primer 0.4 μL , Reverse Primer 0.4 μL , cDNA 2 μg , ddH₂O 补足至 20 μL 。反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 1 个循环;变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s, 40

个循环;退火/延伸 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 40 个循环。引物序列由北京擎科生物有限公司合成。引物序列见表 2。

表 2 逆转录 PCR 引物序列

Table 2 Reverse transcription PCR primer sequences

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
18s	ATCCCTGAGAAGTTCCAGCA	CCTCTTGGTGAGGTGGATGT
Cd226	GAGGCAAACTCCCAGTGCTA	CAGGAGGTTGGACTTGTATGC

1. 2. 8 Western Blot

使用 RIPA 裂解液提取巨噬细胞蛋白,BCA 法进行蛋白定量,每孔按照 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完成后以 400 mA 恒流、快转的方式进行转膜;将条带放入 5%脱脂牛奶中,摇床上室温封闭 1 h;分别在对应的目的条带中加入抗 GAPDH 多克隆抗体(1 : 10 000)和抗 CD226 多克隆抗体(1 : 1000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;随后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1 : 1000),室温摇床孵育 1 h;孵育完成过 TBST 清洗 3 次,每次 10 min;避光条件下配制 ECL 化学发光液,最后于凝胶成像系统中进行曝光并拍照。

1. 3 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 8 软件进行数据分析,两组间比较使用非配对 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

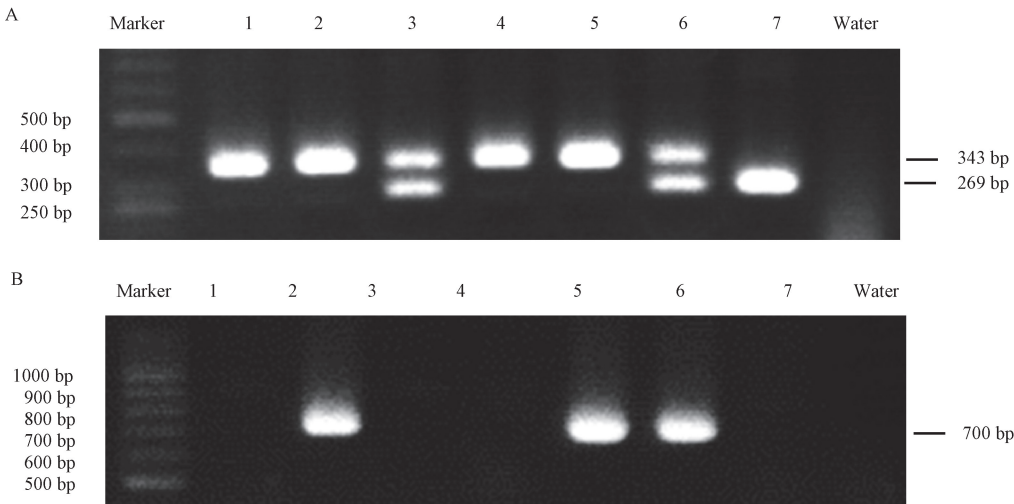
2 结果

2. 1 基因敲除小鼠基因型鉴定

提取鼠尾组织基因组 DNA,PCR 扩增后进行凝胶电泳,基因型鉴定结果见图 2。图 2A 为 *flox* 基因型鉴定结果,条带包括 343 bp 和 269 bp 大小基因片段为 *Cd226^{flox/+}* 杂合子小鼠,仅扩增出 343 bp 大小为 *Cd226^{flox/flox}* 纯合子小鼠,条带大小 269 bp 为野生型小鼠。*Cre* 基因型鉴定结果如图 2B,扩增出 700 bp 条带大小即为 *Lyz2-Cre⁺* 小鼠。结合两者鉴定结果可知,2、5 为 *Cd226^{flox/flox} Lyz2-Cre⁺* 小鼠,即 CKO 小鼠,1、4 为 *Cd226^{flox/flox}* 小鼠,作为对照组小鼠,3 为 *Cd226^{flox/+}* 小鼠,6 为 *Cd226^{flox/+} Lyz2-Cre⁺* 小鼠,7 为野生型小鼠。

2. 2 髓系特异性 *Cd226* 基因敲除小鼠验证

小鼠外周血单核细胞可分为炎性单核细胞



注:A: *Flox* 基因型鉴定结果,其中 1、2、4、5 为 *Cd226^{flox/flox}* 纯合子小鼠,3、6 为 *Cd226^{flox/+}* 杂合子小鼠,7 为野生型小鼠;B: *Cre* 基因型鉴定结果,其中 2、5、6 为 *Lyz2-Cre⁺* 小鼠,1、3、4、7 为 *Lyz2-Cre⁻* 小鼠。

图 2 小鼠基因型 PCR 鉴定

Note. A. Identification results of *Flox* genotypes, in which 1, 2, 4 and 5 were *Cd226^{flox/flox}* homozygous mice, 3 and 6 were *Cd226^{flox/+}* heterozygous mice, and 7 was wild type mice. B. Identification results of *Cre* genotypes, 2, 5, 6 were *Lyz2-Cre⁺* mice, and 1, 3, 4 and 7 were *Lyz2-Cre⁻* mice.

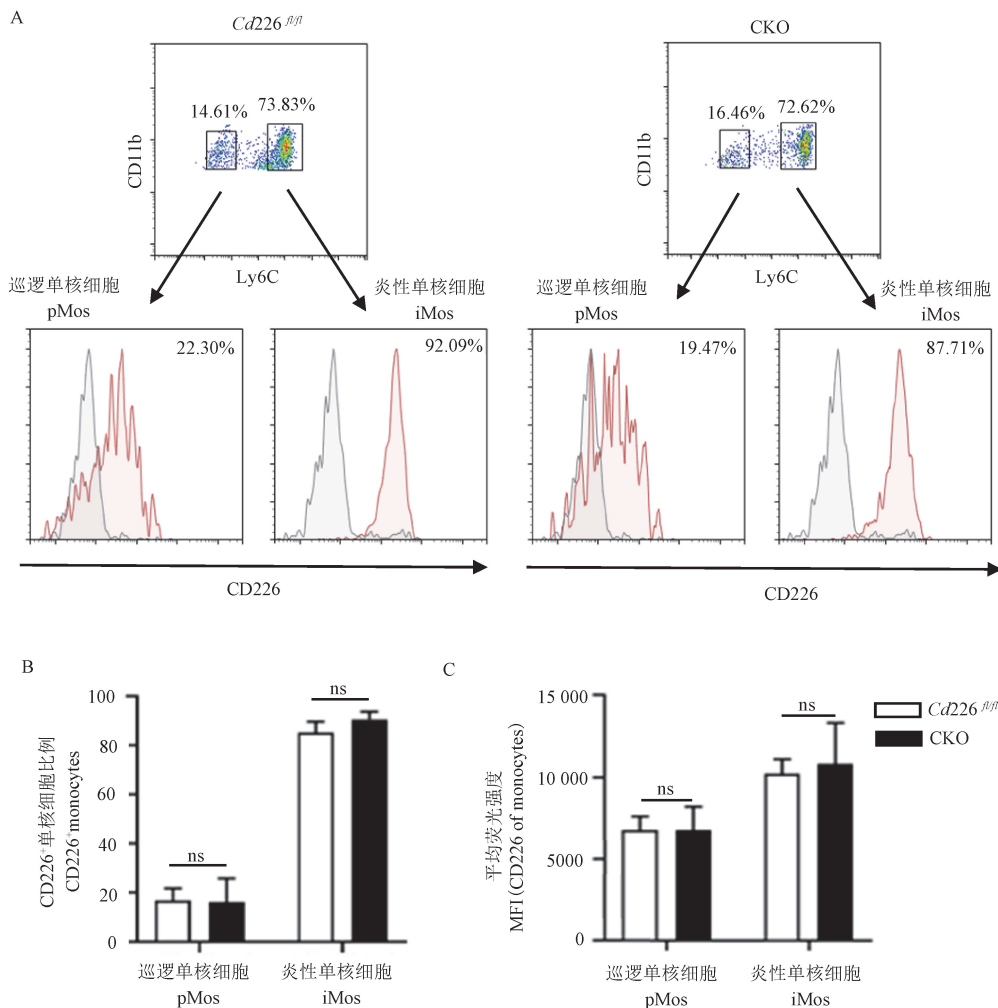
Figure 2 Genotype identification of mouse by PCR

(inflammatory monocytes, iMos) 和巡逻单核细胞 (patrolling monocytes, pMos) (图 3A), 流式细胞术检测 $Cd226^{fl/fl}$ 小鼠和 CKO 小鼠外周血单核细胞中 CD226 表达水平, 结果显示, $Cd226^{fl/fl}$ 小鼠和 CKO 小鼠 CD226⁺ pMos 及 iMos 细胞比例和平均荧光强度均无显著性差异 (图 3B 和 3C)。

提取小鼠骨髓细胞, 经过 20 ng/mL M-CSF 诱导 7 d 后, 流式细胞术检测 BMDM 的纯度, 如图 4A 所示, CD11b⁺F4/80⁺ 细胞纯度达到 93.99%, 表明小鼠 BMDM 诱导成功。为进一步验证 CKO 小鼠 BMDM 中 CD226 敲除效果, 分别使用流式细胞术、Western Blot 和 qRT-PCR 从蛋白和基因水平进行验证, 结果显示: 与对照组相比, CKO 组小鼠 BMDM 中 CD226⁺

巨噬细胞所占比例 (图 4B) 及平均荧光强度 (图 4C) 显著下降, $Cd226$ mRNA 表达水平明显减少 (图 4D), Western Blot 检测结果显示 CKO 小鼠 BMDM 中 CD226 的蛋白表达水平显著下降 (图 4E)。

提取 $Cd226^{fl/fl}$ 小鼠和 CKO 小鼠腹腔巨噬细胞, 贴壁培养 6 h 后, 如图 5A 所示, 流式细胞术检测腹腔巨噬细胞纯度达 93.57%, 可进行后续实验。进一步通过流式细胞术比较两组小鼠 CD11b⁺F4/80⁺ 巨噬细胞中 CD226 的表达水平, 结果显示: 与对照组相比, CKO 组小鼠腹腔 CD226⁺ 巨噬细胞所占比例及平均荧光强度 (MFI) 显著下降 (图 5B)。通过 qRT-PCR 和 Western Blot 检测不同基因型小鼠 $Cd226$ mRNA 以及蛋白表达水平, 结果表明, 与对照

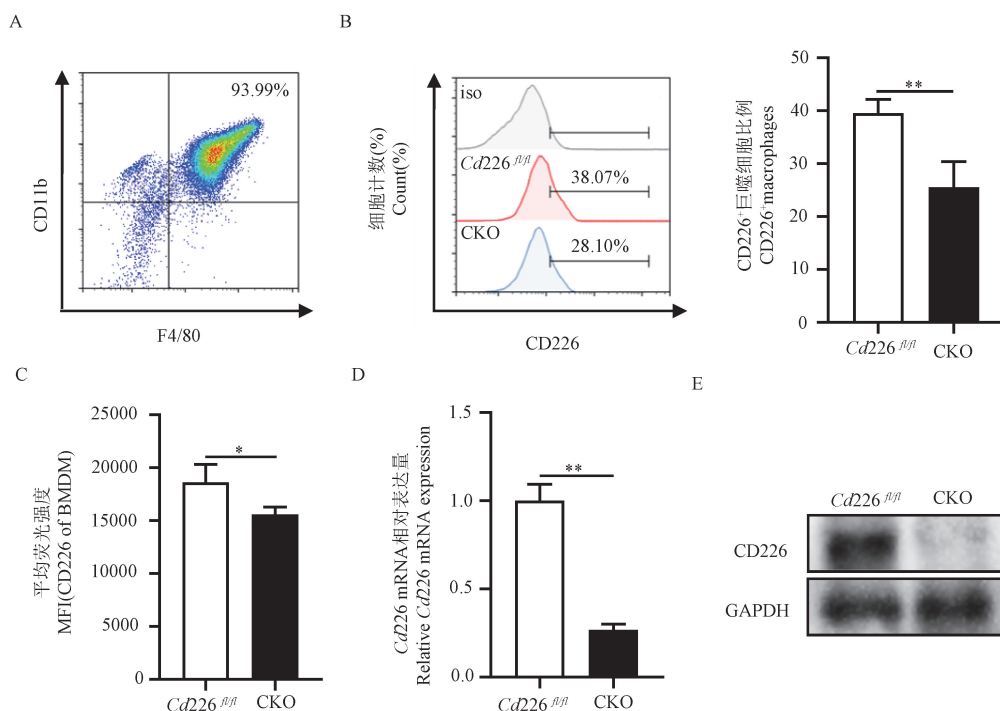


注: A: 流式细胞术检测 $Cd226^{fl/fl}$ 和 CKO 小鼠 pMos 和 iMos 比例; B、C: 分别为流式细胞术检测 $Cd226^{fl/fl}$ 和 CKO 小鼠外周血中 CD226⁺ 单核细胞表达水平及 CD226 MFI 值。

图 3 外周血单核细胞 $Cd226$ 基因敲除效果鉴定

Note. A. The proportion of pMos and iMos in $Cd226^{fl/fl}$ and CKO mice was detected by flow cytometry. B, C. The expression of CD226⁺ monocytes and mean fluorescence intensity in peripheral blood of $Cd226^{fl/fl}$ and CKO mice were detected by flow cytometry.

Figure 3 Identification of the efficiency of gene $Cd226$ knockout in peripheral blood monocytes



注:A:流式细胞术检测 BMDM 的纯度;B、C:流式细胞术检测 *Cd226^{fl/fl}* 和 CKO 小鼠 BMDM 中 CD226 的表达水平 (B) 以及 CD226 MFI 值 (C);D:qRT-PCR 检测 *Cd226^{fl/fl}* 和 CKO 小鼠 BMDM 中 *Cd226* mRNA 表达水平;E:Western Blot 检测两组小鼠 BMDM 中 CD226 蛋白表达水平;与 *Cd226^{fl/fl}* 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 BMDM 中 *Cd226* 基因敲除效果鉴定

Note. A. The purity of BMDM by flow cytometry. B, C. The expression of CD226 (B) and mean fluorescence intensity (C) in BMDM of *Cd226^{fl/fl}* and CKO mice were detected by flow cytometry. D. qRT-PCR was used to detect *Cd226* mRNA expression in BMDM of *Cd226^{fl/fl}* and CKO mice. E. Western Blot was used to detect the expression of CD226 protein in BMDM. Compared with *Cd226^{fl/fl}* group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Identification of the efficiency of gene *Cd226* knockout in bone marrow-derived macrophages

组相比,CKO 组腹腔巨噬细胞 *Cd226* mRNA (图 5C) 和蛋白 (图 5D) 表达水平显著减少。

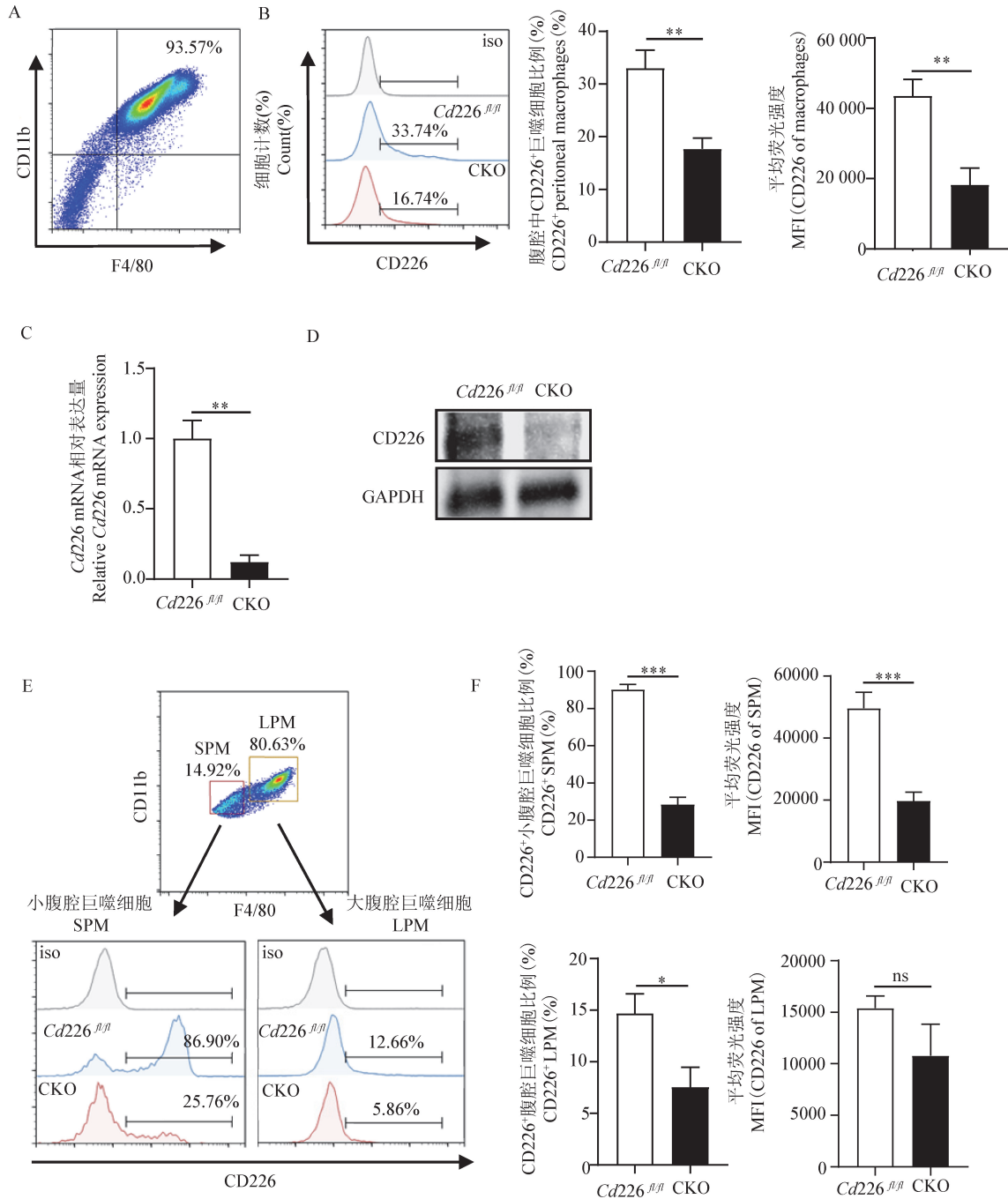
腹腔巨噬细胞根据细胞大小分为大腹腔巨噬细胞 ($CD11b^{hi} F4/80^{hi}$, large peritoneal macrophage, LPM) 和小腹腔巨噬细胞 ($CD11b^{+} F4/80^{low}$, small peritoneal macrophage, SPM) 两个亚群, LPM 为组织驻留巨噬细胞, 而 SPM 由血液中的单核细胞进行补充^[16-17]。流式检测结果发现, 在对照组小鼠中, CD226 高表达于 SPM, 而在 LPM 中表达较低 (图 5E), 巨噬细胞条件性敲除 CD226 后, CD226⁺ SPM 比例及平均荧光强度明显下降, CD226⁺ LPM 细胞比例显著降低, 但 LPM 中 CD226 平均荧光强度无显著性差异 (图 5F)。

2.3 敲除 CD226 对巨噬细胞迁移的影响

Transwell 迁移实验结果显示, 与对照组相比, CKO 组小鼠腹腔巨噬细胞平均每个视野向下室迁移细胞数明显减少 (见图 6), 表明巨噬细胞条件性敲除 CD226 可减弱巨噬细胞的迁移能力。

3 讨论

目前基因敲除小鼠是研究某个基因功能的重要研究工具, Aonuma 等^[18]首先在全身性 *miR-150* 基因敲除小鼠发现 *miR-150* 的缺失对心脏有保护作用, 进一步构建心肌细胞条件性 *miR-150* 基因敲除小鼠, 确定了心肌细胞中 *miR-150* 发挥心脏保护功能的具体机制。葡萄糖调节蛋白 94 (GRP94) 是内质网应激信号传导中一个关键分子, 研究发现 GRP94 分子的全身性基因敲除小鼠具有胚胎致死的可能^[19]。CD226 作为免疫细胞上的共刺激受体, 研究表明在炎症条件下, CD226 通过与 TIGIT 竞争性结合 CD155 下调 Treg 的抑制功能, 加重移植植物抗宿主病^[1]; T 细胞和 NK 细胞上 CD226 与配体 CD155 和 CD112 的相互作用, 在肿瘤免疫监测中起重要作用^[20]; 急性髓系白血病 CD226 的表达水平与患者生存率呈正相关^[21]。课题组既往研究发现, CD226 的全身性敲除可通过调节巨噬细胞的功能

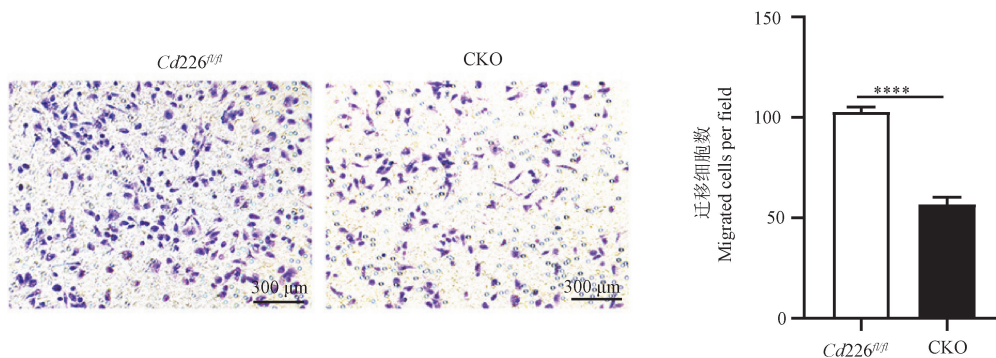


注:A:流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞的纯度;B:流式细胞术验证 *Cd226^{fl/fl}* 和 CKO 小鼠腹腔巨噬细胞 CD226 表达水平;C:qRT-PCR 比较 *Cd226^{fl/fl}* 和 CKO 小鼠腹腔巨噬细胞中 *Cd226* mRNA 表达水平;与 *Cd226^{fl/fl}* 组相比, ** $P < 0.01$;D:Western Blot 检测两组小鼠腹腔巨噬细胞中 CD226 的蛋白表达水平;E:流式细胞术检测 SPM 和 LPM 的圈门示意图;F:流式细胞术检测 *Cd226^{fl/fl}* 和 CKO SPM 和 LPM 中 CD226 表达水平;与 *Cd226^{fl/fl}* 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 腹腔巨噬细胞 *Cd226* 基因敲除效率鉴定

Note. A. The purity of peritoneal macrophages by flow cytometry. B. CD226 expression in peritoneal macrophages of *Cd226^{fl/fl}* and CKO mice was verified by flow cytometry. C. qRT-PCR verification of *Cd226* mRNA expression in peritoneal macrophages of *Cd226^{fl/fl}* and CKO mice. Compared with *Cd226^{fl/fl}* group, ** $P < 0.01$. D. Western Blot was used to detect the expression of CD226 protein in peritoneal macrophages. E. Schematic diagram of the loop gate for flow cytometric detection of SPM and LPM. F. CD226 expression in SPM and LPM of *Cd226^{fl/fl}* and CKO was used to detect by flow cytometry. Compared with *Cd226^{fl/fl}* group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Identification of the efficiency of gene *Cd226* knockout in peritoneal macrophages



注:Transwell 法比较 *Cd226^{fl/fl}* 和 CKO 小鼠腹腔巨噬细胞迁移能力;与 *Cd226^{fl/fl}* 组相比, **** $P < 0.0001$ 。

图 6 CD226 对小鼠巨噬细胞迁移功能的影响

Note. The migration ability of peritoneal macrophages in *Cd226^{fl/fl}* and CKO mice was detected by Transwell assay. Compared with *Cd226^{fl/fl}* group, **** $P < 0.0001$.

Figure 6 Effect of CD226 in mouse peritoneal macrophages on its migration capability

缓解溃疡性结肠炎和心肌梗死^[9-10]。为进一步探讨巨噬细胞中 CD226 分子影响疾病发生发展的作用和机制,本研究通过 *Cd226^{fllox/fllox}* 小鼠与 *Lyz2-Cre⁺* 小鼠杂交获得了巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠,并从基因和蛋白水平进行了验证,结果表明 CKO 小鼠腹腔巨噬细胞和 BMDM 中 CD226 的表达水平显著下降,但在外周血 pMos 和 iMos 中表达水平与对照组无显著性差异。

Lysozyme-M (Lyz2) 表达在各种髓系细胞中,如单核细胞、巨噬细胞和粒细胞^[15],但有研究表明 *Lyz2* 基因在单核细胞中的表达水平较低, Abram 等^[22]使用 ROSA-EYFP 报告小鼠与不同的髓系 Cre 小鼠杂交,通过检测不同细胞中 YFP⁺细胞数来比较髓系细胞的敲除效率和特异性,发现 *LysM-Cre* 小鼠脾和外周血中性粒细胞、腹腔巨噬细胞 YFP⁺细胞表达水平约 80%,但在外周血单核细胞及脾巨噬细胞中 YFP⁺细胞仅表达 40% 左右;另一项研究指出, M-溶菌酶基因的表达与细胞成熟相关,在髓样干细胞向成熟巨噬细胞分化过程中, *LysM* 的活性逐渐增强^[23]。本研究通过 Transwell 实验发现,与对照组小鼠相比, CKO 小鼠腹腔巨噬细胞迁移能力明显减弱,说明 CD226 是影响巨噬细胞迁移的重要分子。由于单核细胞上 CD226 可与内皮细胞 CD155 结合促进单核细胞跨血管内皮迁移至组织^[5],推测髓系敲除 CD226 分子后影响了外周血单核细胞向成熟单核细胞的转变。虽然 *Cd226^{fllox/fllox}* 小鼠与 *Lyz2-Cre⁺* 小鼠杂交获得的 *Cd226^{fllox/fllox} Lyz2-Cre⁺* 小鼠在外周血单核细胞中 CD226 敲除效率不明显,但 *LysM-Cre* 小鼠仍然是研究巨噬细胞有效的工具鼠。

综上所述,本研究成功构建巨噬细胞条件性 *Cd226* 基因敲除小鼠,在基因和蛋白水平对敲除效果进行了验证,为研究 CD226 功能提供了可靠的动物模型,也为进一步研究 CD226 调控巨噬细胞功能在免疫性疾病中发挥的作用和机制提供了有效的研究工具。

参 考 文 献 (References)

- [1] Sato K, Yamashita-Kanemaru Y, Abe F, et al. DNAM-1 regulates Foxp3 expression in regulatory T cells by interfering with TIGIT under inflammatory conditions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(21): e2021309118.
- [2] Okumura G, Iguchi-Manaka A, Murata R, et al. Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated antitumor activity of natural killer cells [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(4): 1.
- [3] Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, Hara A, et al. Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329(3): 996-1000.
- [4] Nagayama-Hasegawa Y, Honda SI, Shibuya A, et al. Expression and function of DNAM-1 on human B-lineage cells [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2020, 98(4): 368-374.
- [5] Reymond N, Imbert AM, Devilard E, et al. DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(10): 1331-1341.
- [6] Huang Z, Qi G, Miller JS, et al. CD226: an emerging role in immunologic diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 564.
- [7] Sayitoglu EC, Georgoudaki AM, Chrobok M, et al. Boosting natural killer cell-mediated targeting of sarcoma through DNAM-1 and NKG2D [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 40.
- [8] Wang N, Liang S, Jin J, et al. CD226 attenuates treg suppressive capacity via CTLA-4 and TIGIT during EAE [J]. *Immunol Res*, 2019, 67(6): 486-496.
- [9] Li J, Song Y, Jin JY, et al. CD226 deletion improves post-

- infarction healing via modulating macrophage polarization in mice [J]. *Theranostics*, 2020, 10(5): 2422–2435.
- [10] Li J, Zhao F, Qin Q, et al. The effect of CD226 on the balance between inflammatory monocytes and small peritoneal macrophages in mouse ulcerative colitis [J]. *Immunol Invest*, 2022, 51(6): 1833–1842.
- [11] Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites [J]. *J Mol Biol*, 1981, 150(4): 467–486.
- [12] Oh-McGinnis R, Jones MJ, Lefebvre L. Applications of the site-specific recombinase Cre to the study of genomic imprinting [J]. *Brief Funct Genomics*, 2010, 9(4): 281–293.
- [13] Noiman T, Kahana C. A simple combined use of CRISPR-Cas9 and cre-LoxP technologies for generating conditional gene knockouts in mammalian cells [J]. *CRISPR J*, 2018, 1: 278–285.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(6): 2568–2573.
- [17] Cassado AD, D'Império Lima MR, Bortoluci KR. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 225.
- [18] Aonuma T, Moukette B, Kawaguchi S, et al. Cardiomyocyte microRNA-150 confers cardiac protection and directly represses proapoptotic small proline-rich protein 1A [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(18): e150405.
- [19] Mao C, Wang M, Luo B, et al. Targeted mutation of the mouse Grp94 gene disrupts development and perturbs endoplasmic reticulum stress signaling [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10852.
- [20] Du X, de Almeida P, Manieri N, et al. CD226 regulates natural killer cell antitumor responses via phosphorylation-mediated inactivation of transcription factor FOXO1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(50): E11731–E11740.
- [21] Chashchina A, Märklin M, Hinterleitner C, et al. DNAM-1/CD226 is functionally expressed on acute myeloid leukemia (AML) cells and is associated with favorable prognosis [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 18012.
- [22] 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.
- [23] Möllers B, Klages S, Wedel A, et al. The mouse M-lysozyme gene domain: identification of myeloid and differentiation specific DNaseI hypersensitive sites and of a 3'-cis acting regulatory element [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20(8): 1917–1924.

[收稿日期] 2022-09-10