

李喜,曾艳,陈昌蓉,等. 胸腺上皮细胞特异性敲除 *GSK-3 β* 基因小鼠模型的鉴定及免疫学特征观察 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(3): 279-286.

Li X, Zeng Y, Chen CR, et al. Characterization and immunological characteristics of *GSK-3 β* gene knockout thymic epithelial cells in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(3): 279-286.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.03.001

胸腺上皮细胞特异性敲除 *GSK-3 β* 基因小鼠模型的鉴定及免疫学特征观察

李喜¹, 曾艳¹, 陈昌蓉¹, 李论¹, 余祥¹, 周永芹¹, 王德成¹, 邓亚光^{2*}, 宋银宏^{1*}

(1. 三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 三峡大学感染与炎症损伤研究所, 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 三峡医学检验实验室(湖北)有限公司, 湖北 宜昌 443000)

【摘要】 目的 构建并鉴定胸腺上皮细胞(thymic epithelial cells, TECs)特异性敲除 *GSK-3 β* 基因小鼠模型, 评价其免疫学特征。**方法** 采用小鼠胚胎干细胞(ES 细胞, embryonic stem cells)打靶基因敲除技术, 得到 F0 代的 *GSK-3 $\beta^{lox/flox}$* (*GSK-3 $\beta^{f/f}$*) 小鼠; 再采用 Cre-LoxP 系统进行小鼠的繁殖; PCR 鉴定, 筛选出基因型为 *GSK-3 $\beta^{f/f}$ FoxN1-Cre^{+/+}* (*GSK-3 $\beta^{-/-}$*) 小鼠, 即为在 TECs 特异性敲除 *GSK-3 β* 基因的小鼠。观察基因敲除鼠的一般生物学特征、繁殖能力和子代存活率。应用 HE 染色、流式细胞术及免疫荧光技术, 比较基因敲除鼠和野生型小鼠免疫器官结构、胸腺、脾及外周血中免疫细胞比例及增殖能力差异。**结果** 成功构建 TECs 特异性敲除 *GSK-3 β* 基因小鼠模型。与野生型(wild type, WT)小鼠相比, *GSK-3 $\beta^{-/-}$* 小鼠一般生物学特征无明显差异, 子代存活率 > 90%; 衰老进程中 *GSK-3 $\beta^{-/-}$* 小鼠胸腺比 WT 小鼠体积大, 胸腺指数高, 胸腺细胞数量多; 脾中的初始 T 细胞及近期迁移细胞数量也显著多于 WT 小鼠。**结论** 成功构建了 TECs 特异性敲除 *GSK-3 β* 基因小鼠模型。为研究 *GSK-3 β* 基因在 TECs 的功能和作用机制提供了很好的研究模型。

【关键词】 胸腺上皮细胞; 特异性敲除; *GSK-3 β* ; 免疫学特征

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 03-0279-08

Characterization and immunological characteristics of *GSK-3 β* gene knockout thymic epithelial cells in mice

LI Xi¹, ZENG Yan¹, CHEN Changrong¹, LI Lun¹, YU Xiang¹, ZHOU Yongqin¹,
WANG Decheng¹, DENG Yaguang^{2*}, SONG Yinong^{1*}

(1. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, Three Gorges University, Institute of Infection and Inflammatory Injury, School of Basic Medicine, Three Gorges University, Yichang 443002, China.
2. China Three Gorges Medical Laboratory in Hubei Province, Yichang 443000)
Corresponding author: SONG Yinong. E-mail: syh728@126.com; DENG Yaguang. E-mail: yaguangdeng@126.com

【Abstract】 Objective To establish and characterize *GSK-3 β* knockout thymic epithelial cells in mice and evaluate their immunological characteristics. **Methods** The Cre-LoxP system was used for the F0 generation of *GSK-3 $\beta^{lox/flox}$* (*GSK-3 $\beta^{f/f}$*) mice with targeted gene knockout in embryonic stem cells. PCR was used to analyze *GSK-3 $\beta^{f/f}$ FoxN1-Cre^{+/+}* (*GSK-3 $\beta^{-/-}$*) mice with specific knockout of the *GSK-3 β* gene in thymus epithelial cells. The general biological characteristics, reproductive ability, and progeny survival rate of gene knockout mice were observed. HE staining, flow cytometry, and

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81671397, 82102206), 湖北省卫健委重点项目(WJ2019H528)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81671397, 82102206), Key Project of Health Commission of Hubei Province (WJ2019H528).

【作者简介】 李喜(1998—), 硕士, 研究方向: 免疫系统的发育与感染免疫, 肿瘤免疫。Email: 1114036361@qq.com
【通信作者】 宋银宏(1972—), 教授, 研究方向: 免疫系统的发育与感染免疫, 肿瘤免疫。Email: syh728@126.com;
邓亚光(1961—), 教授, 研究方向: 分子生物学与肿瘤生物学。Email: yaguangdeng@126.com。
* 共同通信作者

immunofluorescence were used to compare the immune organ structure, thymus, spleen, and proportion and proliferation of immune cells in peripheral blood between knockout and wildtype mice. **Results** Mice with specific knockout of the *GSK-3 β* gene in thymus epithelial cells were established successfully. Compared with wildtype mice, *GSK-3 β ^{-/-}* mice showed no significant difference in general biological characteristics, and the survival rate of offspring was >90%. In the aging process, the thymus of knockout mice was larger than that of wildtype mice with a higher thymus index and more thymic cells. The numbers of initial T cells and recently migrated cells in the spleen were significantly higher than those in wildtype mice. **Conclusions** Mice with specific knockout of the *GSK-3 β* gene in thymic epithelial cells was established successfully. These mice provide a good tool to study the function and mechanism of the *GSK-3 β* gene in thymus epithelial cells.

【**Keywords**】 thymic epithelial cells; specific knockout; *GSK-3 β* ; immunological characteristics

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

糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β) 是涉及多个细胞信号通路的丝/苏氨酸激酶, 其生物学功能复杂, 研究显示 GSK-3 β 在调控糖代谢、细胞炎症反应、神经及心脏功能和生殖功能中具有重要作用^[1-2]。其机制主要是通过磷酸化不同信号通路关键酶从而参与细胞新陈代谢、增殖、衰老及凋亡等生理活动的调控过程。目前已证实通过调节患者体内 GSK-3 β 的含量对糖尿病、感染、神经退行性疾病、免疫疾病、生殖类疾病及癌症有治疗作用, 但在胸腺发育过程的作用中未见报道^[3-8]。研究发现体外用 GSK-3 β 抑制剂 IM-12 处理 TECs, 可以显著促进 TECs 的增殖, 敲低 *GSK-3 β* 在衰老 TECs 细胞中的表达, 可以有效逆转 TECs 的衰老状态并促进其增殖。而 TECs 是胸腺中抚育未成熟 T 细胞发育分化的关键细胞, 胸腺的增龄性衰老也起始于 TECs 细胞的退化。据此可推测, 抑制或下调 GSK-3 β 可以延缓 TECs 的退化, 促进 TECs 增殖进而增强 T 细胞的发育分化及成熟, 或可成为延缓增龄性胸腺衰老, 促进衰老个体免疫功能的有效策略。而要明确这一效果并阐明相应机制, 需制作合适的动物模型。为了避免其他组织或细胞的 GSK-3 β 下调对实验造成影响, 需要在小鼠 TECs 内特异性敲除 *GSK-3 β* 。FoxN1 即特异性转录因子叉头框蛋白 N1 (Forkhead box protein N1, FoxN1), 是 Forkhead 转录因子家族成员之一, 主要表达于 TECs, 是 TECs 和 T 细胞发育的主要调节因子, 在胸腺发育过程中发挥调节 TECs 发育的重要作用^[9-10]。本研究采用小鼠 ES 细胞打靶基因敲除技术, 得到 *GSK-3 β ^{+/+}* 小鼠; 再采用 Cre-LoxP 系统进行小鼠的繁殖并筛选出 TECs 特异性敲除 *GSK-3 β* 基因 (*GSK-3 β ^{-/-}*) 小鼠。同时评价该基因敲除小鼠的一般生物学特征, 进一步从大体形态-组织学结构-细胞-功能分子不同维度全面评价 *GSK-3 β ^{-/-}* 小鼠的免疫学特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6N 品系的 *GSK-3 β ^{+/+}* 小鼠与 FoxN1-Cre^{+/+} 小鼠系三峡大学与赛业生物有限公司【SCXK(粤)2018-0032】合作共同制作并繁育, 每组小鼠雄鼠为 4 只, 雌鼠为 4 只, 6 周龄, 体重约 20 g。饲养环境: 小鼠于屏障环境饲养, 自由饮水, 环境温度 20 ~ 26℃, 湿度 40% ~ 70%, 光照/昼夜 12 h 交替, 饲养于三峡大学实验动物中心【SYXK(鄂)2017-0061】。所有操作均符合三峡大学实验动物伦理学要求(2022020C)。

1.1.2 主要试剂与仪器

基因组 DNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司); FACS Verse 流式细胞仪(美国 BD 公司); GELVIEW 核酸染料(武汉科瑞生物技术有限公司); DAPI 抗荧光淬灭封片剂(美国 VECTOR 实验室); O.C.T 冰冻切片包埋剂(美国 SAKURA 公司); DNA MARKER(天根生化科技有限公司); GSK-3 β 兔抗鼠单克隆抗体(美国 CST 公司); CK8 (keratin 8) 小鼠抗小鼠单克隆荧光抗体(美国 BD 公司); Alexa Fluor 488 荧光标记山羊抗兔 IgG (Thermo Fisher); Alexa Fluor 594 荧光标记山羊抗小鼠 IgG (Thermo Fisher)。免疫细胞表型鉴定试剂: CD3-APC、CD3e-APC、CD19-APC、CD11c-APC、TER-119-APC、CD16/32-APC、CD14-APC、NK1.1-APC、CD4-APC/cy7、CD8-BV510、CD44-BV421、CD25-FITC、C-kit (CD117)-PE、CD62L-APC、CD45RB-PE、UEA、CD45-APC/cy7、EpCAM-PerCP/cy5.5、CD80-BV510、MHC II-PE(美国 CST 公司)。

PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司); 凝胶电泳成像仪(上海欧翔科学仪器有限公司); 激光

共聚焦显微镜(日本 NIKON 公司);冰冻切片机(达科为)。目的基因 *LoxP*、*Cre* 上、下游引物由赛业生物有限公司设计, *LoxP* 基因:上游引物:5'-ACTTTGACTTGGGGCAACCTTAAT-3',下游引物:5'-AG AAGGGTGAATACCAGAAGACAA-3(插入 *LoxP* 扩增片段为 382 bp,未插入 *LoxP* 扩增片段为 250 bp)。 *Cre* 基因上游引物:5'-AACTGCTGGATTGGGAGT AAAACT-3',下游引物:5'-TGACAATCCTCAGGT CTCACG-3'(携带 *Cre* 扩增片段为 413 bp)(武汉英骏科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的饲养和繁殖

TECs 特异性敲除 *GSK-3β* 基因模型小鼠是敲除

GSK-3β 基因中第 2 号外显子,采用小鼠胚胎干细胞 (ES 细胞,embryonic stem cells)打靶基因敲除技术,得到 *GSK-3β* 基因带有 *LoxP* 位点的小鼠 ES 细胞,将此 ES 细胞注射到 C57BL/6 白化胚囊中,再植入 CD-1 假孕雌鼠子宫;将其中黑色雄鼠再与 C57BL/6 正常雌鼠交配繁殖,对后代进行基因分型,得到 F0 代的 *GSK-3β^{lox/lox}* 小鼠;将 *GSK-3β^{lox/lox}* 小鼠和 *FoxN1-Cre^{+/-}* 小鼠杂交后,得到其中基因型别为 *GSK-3β^{lox/+} FoxN1-Cre^{+/-}* 及 *GSK-3β^{lox/+} FoxN1-Cre^{-/-}* 的 F1 代小鼠;将两种不同基因型 F1 代小鼠交配,得到 F2 代小鼠;从 F2 代小鼠中筛选出基因型为 *GSK-3β^{lox/lox} FoxN1-Cre^{+/-}* 小鼠,此种小鼠即为在 TECs 中特异性敲除 *GSK-3β* 基因的小鼠(图 1 虚线方框内为模型小鼠)。

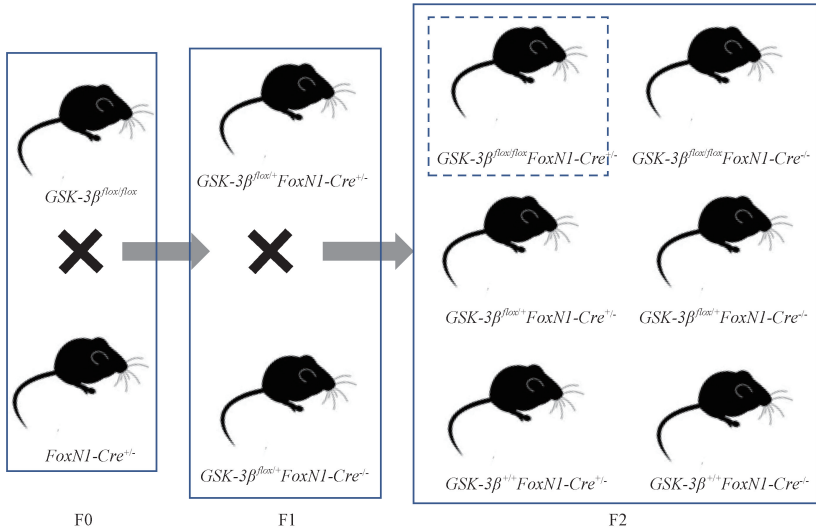


图 1 TECs 特异性敲除 *GSK-3β* 基因模型小鼠的繁殖路线

Figure 1 Reproductive route of *GSK-3β^{-/-}* mouse

1.2.2 PCR 技术鉴定小鼠基因型

小鼠 DNA 的提取:适量剪取出生 21 d 左右小鼠的鼠尾组织置于 1.5 mL 的 Eppendorf (EP) 管中,加入 1 × 裂解液 (Proteinase K 4 μL + 1 × Mouse Tissue Lysis Buffer 200 μL) 至所需裂解的组织中,涡旋震荡后将组织全部浸没在裂解液中;将 EP 管放入提前预热至 55℃ 的水浴锅中孵育 20 min;然后沸水浴中加热 5 min 灭活 Proteinase K;将裂解产物涡旋震荡充分后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清进行下一步实验。以所得 DNA 为模板进行 PCR 扩增,50 μL 反应体系如下:2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus) 25 μL、上游引物 (10 μmol/L) 2 μL、下游引物 (10 μmol/L) 2 μL、模板 DNA 5 μL、去离子水补足至 50 μL。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,

55℃ 30 s,72℃ 35 s,共 33 个循环;72℃ 5 min。使用 2% 琼脂糖凝胶与核酸染料对 PCR 扩增产物进行可视化,在凝胶成像仪中观察结果并拍照。

1.2.3 免疫荧光鉴定小鼠 TECs 中 *GSK-3β* 基因敲除效果

颈椎脱臼法处死小鼠后取胸腺组织置于 4% 多聚甲醛中 2 h 后,于饱和蔗糖溶液中脱水 72 h,4℃ 条件进行。冰冻切片机切片,恢复至室温 30 min。在载玻片上滴加 20 ~ 25 μL 的 5% BSA 的封闭液,覆盖整个组织切片,封闭 1 h。配制一抗:*GSK-3β* 兔抗小鼠单克隆抗体、CK8 小鼠抗小鼠单克隆荧光抗体,于玻片上加入稀释好的一抗,置于避光的湿盒内,4℃ 冰箱过夜。取出湿盒上的载玻片,用 1 × 的 PBS 缓冲液洗 3 次,每次 5 min。配制荧光染料

偶联的二抗稀释液:Alexa Fluor 488 荧光标记山羊抗兔 IgG、Alexa Fluor 594 荧光标记山羊抗小鼠 IgG 于玻片上加入稀释好的二抗,置于避光的湿盒内,避光孵育 1 h。载玻片上滴 Vector mount mediuua(含 DAPI)封片剂,并用 22 mm × 22 mm 盖玻片覆盖整个组织块,于激光共聚焦显微镜下观察。

1. 2. 4 免疫器官组织形态学观察

颈椎脱臼法处死小鼠后,取胸腺组织和脾组织拍照,并取小鼠的肝、肾于 4%多聚甲醛中固定,24 h 换固定液 1 次,固定 48 h,脱水、透明、石蜡包埋。HE 染色,光学显微镜下观察拍照。

1. 2. 5 流式细胞术检测胸腺、脾各淋巴细胞亚群及 TECs 数量变化

颈椎脱臼法处死小鼠,制备胸腺细胞单个细胞悬液,取细胞悬液计数,在 96 孔板中加入 3×10^6 个细胞,离心后弃上清,先用 CD16/32 封闭 Fc 受体,再用 20 μ L 荧光标记的抗体标记胸腺细胞,4℃避光孵育 45 min;重复洗涤 3 次,加入 200 μ L PBS 重悬细胞,用尼龙膜过滤细胞悬液至流式管中,避光放置,上流式细胞分析仪检测以下细胞:双阴性细胞(double negative cell, DN)的 4 个分化发育阶段(DN1、DN2、DN3、DN4)、CD4CD8 双阳性细胞

(double positive cell, DP)、CD4 单阳性细胞(single positive cell, SP)、CD8 SP 以及早期胸腺祖细胞(early thymic progenitor cells,ETPs)的比例。制备脾淋巴细胞悬液,用相应荧光抗体染色,洗涤同上,上流式细胞分析仪检测以下细胞:CD4 SP、CD8 SP、CD4⁺初始 T 细胞(CD4⁺Naive T cell)、CD8⁺初始 T 细胞(CD8⁺Naive T cell)、近期胸腺迁移细胞(recent thymic emigrates cells,RTE)。制备 TECs 细胞悬液,用相应荧光抗体染色上流式细胞分析仪检测以下细胞:皮质 TECs(cortical thymic epithelial cells, cTECs)髓质 TECs(medullary thymic epithelial cells, mTECs)胸腺上皮祖细胞(thymus epithelial progenitor cells,TEPCs)皮质胸腺上皮祖细胞(cortical thymus epithelial progenitor cells, cTEPCs)髓质胸腺上皮祖细胞(medullary thymus epithelial progenitor cells, cTEPCs),各细胞的表面分子如表 1 所示。

1. 3 统计学分析

本课题实验数据运用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,两组间比较用独立样本双侧 *t* 检验统计分析,多组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计。计量资料以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;*P* < 0.05 为差异具有显著性。

表 1 流式细胞术检测细胞及表面分子标志

细胞类型 Type of cell	表面分子标志 Surface molecular marker
双阴性细胞 1 型 DN1	* lin ⁻ CD25 ⁻ CD44 ⁺
双阴性细胞 2 型 DN2	* lin ⁻ CD25 ⁺ CD44 ⁺
双阴性细胞 3 型 DN3	* lin ⁻ CD25 ⁺ CD44 ⁻
双阴性细胞 4 型 DN4	* lin ⁻ CD25 ⁻ CD44 ⁻
CD4CD8 双阳性 CD4CD8DP	CD4 ⁺ CD8 ⁺
CD4 单阳性 CD4SP	CD4 ⁺ CD8 ⁻
CD8 单阳性 CD8SP	CD4 ⁻ CD8 ⁺
早期胸腺祖细胞 ETP	lin ⁻ CD127 ⁻ CD44 ⁺ CD25 ⁻ C-kit ⁺
胸腺上皮细胞 TEC	MHC II ⁺ CD45 ⁻ EpCAM ⁺
皮质胸腺上皮细胞 cTEC	MHC II ⁺ CD45 ⁻ EpCAM ⁺ Ly51 ⁺ UEA-1 ⁻
髓质胸腺上皮细胞 mTEC	MHC II ⁺ CD45 ⁻ EpCAM ⁺ Ly51 ⁻ UEA-1 ⁺
胸腺上皮祖细胞 TEPC	MHC II ^{low} CD45 ⁻ EpCAM ⁺
CD4 单阳性 T 细胞 CD4 ⁺ T cell	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻
CD8 单阳性 T 细胞 CD8 ⁺ T cell	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺
CD4 单阳性初始 T 细胞 CD4 ⁺ Naive T cell	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD62L ⁺ CD44 ^{lo}
CD8 单阳性初始 T 细胞 CD8 ⁺ Naive T cell	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD62L ⁺ CD44 ^{lo}
近期胸腺迁移 CD4 单阳性 T 细胞 CD4 ⁺ RTE	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD62L ⁺ CD44 ^{lo} CD45RB ^{lo}
近期胸腺迁移 CD8 单阳性 T 细胞 CD8 ⁺ RTE	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD62L ⁺ CD44 ^{lo} CD45RB ^{lo}

注: * Lin⁻;TCRβ、TCRγ/δ、CD3、CD4、CD8、CD11b、CD11c、F4/80、NK1. 1、CD19、B220、TER-119。
Note. * Lin⁻. TCRβ, TCRγ/δ, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, F4/80, NK1. 1, CD19, B220, TER-119.

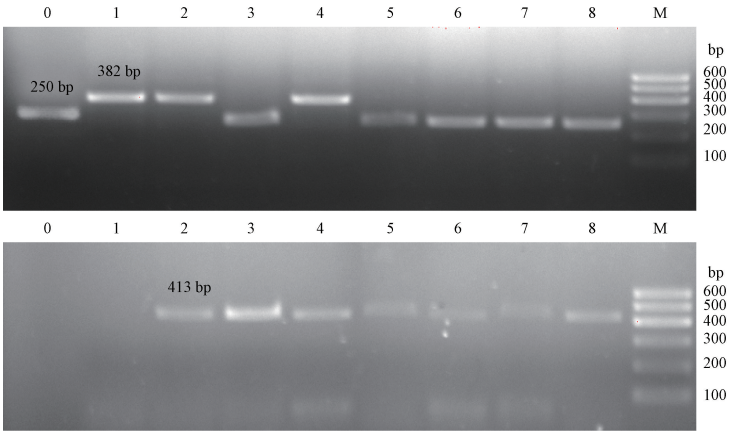
2 结果

2. 1 GSK-3β^{-/-}小鼠的基因鉴定

TECs 特异性敲除 GSK-3β 基因模型小鼠是敲除

GSK-3β 基因中第 2 号外显子,在两端加入 loxP 片段,PCR 鉴定小鼠的基因型,0 号小鼠为 WT 小鼠即阴性对照,其中 1、2、4 号小鼠在 382 bp 有扩增条带,则插入了 loxP 片段(图 2)。2 ~ 8 号小鼠均在

413 bp 有扩增条带,则 2 ~ 8 号小鼠均插入 Cre 酶 小鼠,2、4 号为 $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠,3、5 ~ 8 为 $GSK-3\beta^{+/+}$ $FoxN1-Cre^{+/-}$ $FoxN1-Cre^{+/-}$ ($GSK-3\beta^{+/+}$) 小鼠,2、4 号为模型小鼠。(图 2),综合可知 1 号为 $GSK-3\beta^{flox/flox}$ $FoxN1-Cre^{-/-}$

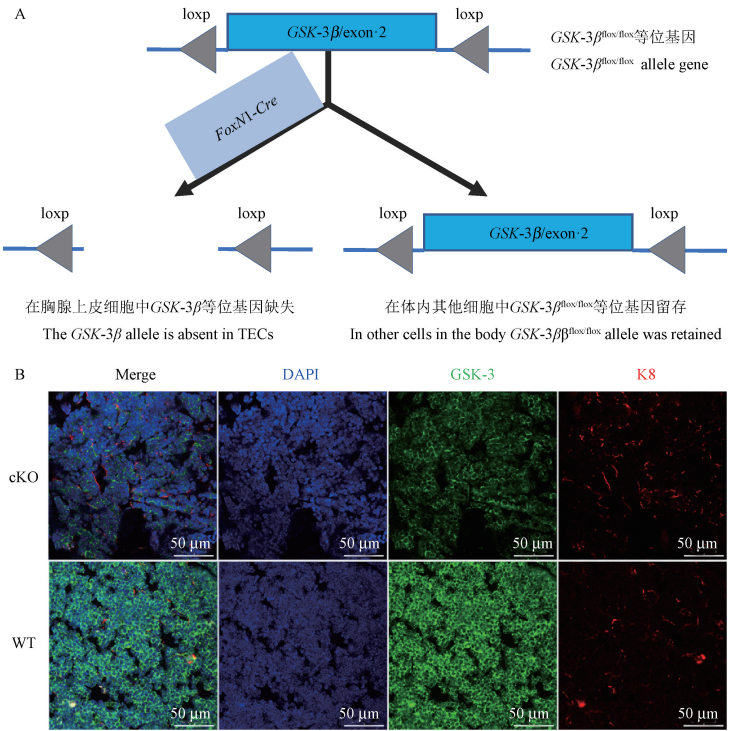


注:小鼠尾巴 DNA 经 PCR 扩增后电泳条带。
图 2 小鼠的基因鉴定
Note. Electrophoresis band of mouse tail DNA amplified by PCR.

Figure 2 Genetic identification of mice

2.2 $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠的构建和免疫荧光验证

因 FoxN1 主要表达在 TECs 上,利用 Cre-LoxP 系统可以构建出 TECs 特异性敲除 $GSK-3\beta$ 基因模型小鼠,而胸腺细胞仍然表达 $GSK-3\beta$ (图 3A),在 免疫荧光中观察到 $GSK-3\beta^{flox/flox}$ $FoxN1-Cre^{+/-}$ 小鼠较 野生型小鼠 K8 (主要表达在胸腺皮质中的 TECs) 表 达处 $GSK-3\beta$ 表达减少或缺失 (图 3B)。证明 $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠构建成功。



注:A;FoxN1-Cre 结合后出现的基因改变示意图;B; $GSK-3\beta^{-/-}$ (cKO) 小鼠和 WT 小鼠胸腺冰冻切片免疫荧光示意图。
图 3 $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠的构建和免疫荧光验证
Note. A. Schematic diagram of genetic changes after FoxN1-Cre binding. B. Schematic diagram of immunofluorescence in frozen sections of thymus from $GSK-3\beta^{-/-}$ (cKO) mice and WT mice.

Figure 3 Construction and immunofluorescence validation of $GSK-3\beta^{-/-}$ mice

2.3 器官组织形态学观察

以 12 月龄即衰老中同性别的 $GSK-3\beta^{-/-}$ 与同窝的 $GSK-3\beta^{+/+}$ 小鼠比较,大体观、体重无明显差别(图 4A),进一步发现其中 12 月龄雌性 $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠胸腺体积增大,胸腺指数增加(图 4B),两者肝肾 HE 染色未见明显差别(图 4C)。

2.4 TECs 特异性敲除 $GSK-3\beta$ 基因对小鼠胸腺和脾淋巴细胞各亚群以及 TECs 数量的影响

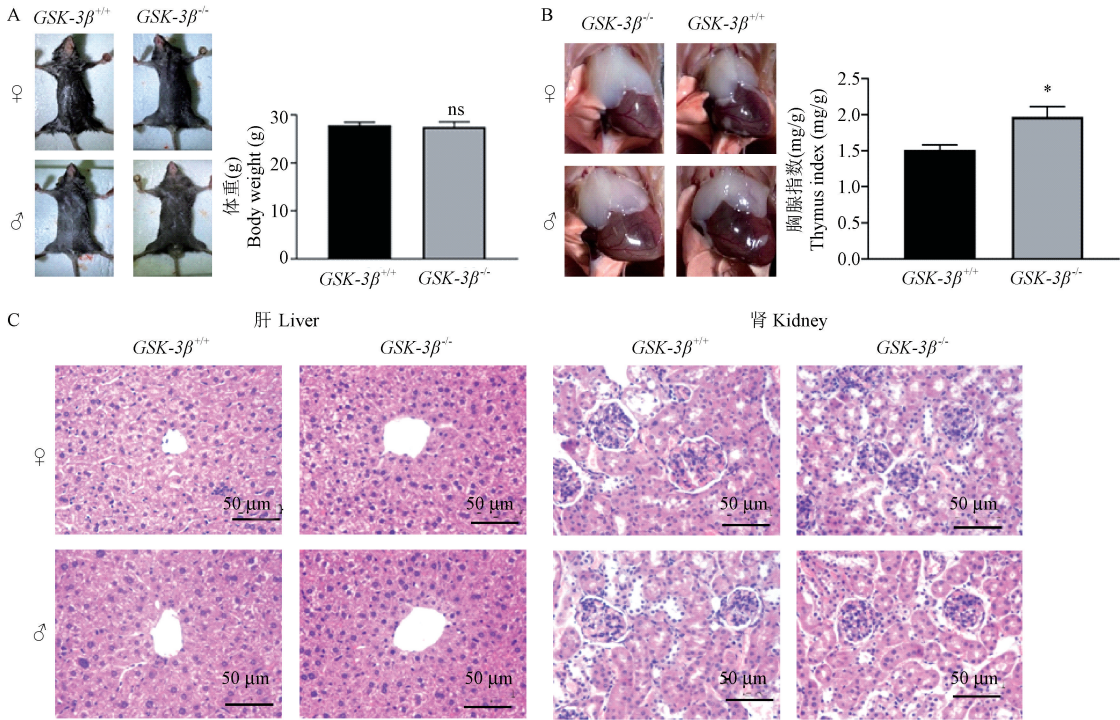
以 12 月龄同性别小鼠为代表, $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠与同窝的未敲除小鼠 $GSK-3\beta^{+/+}$ 相比, $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠胸腺的各淋巴细胞亚群数量明显增加(图 5A),脾 T 淋巴细胞各亚群数量呈上升趋势(图 5B),TECs 各亚群数量增加(图 5C)。说明 TECs 特异性敲除 $GSK-3\beta$ 基因衰老中小鼠的免疫功能增强。

3 讨论

有大量研究表明 $GSK-3\beta$ 参与了生物体内的多种生命活动,其中包括神经、生殖、内分泌、糖代谢。有研究者通过将 $GSK-3\beta$ 参与的信号通路的某一环

节通过药物进行阻断来得到相应的治疗效果,但 $GSK-3\beta$ 存在于多种生命活动,难以区分是哪一部分细胞的信号通路阻断带来的特定治疗效果,这时往往需要进行精准的细胞定位以及基因敲除。目前大多数研究利用小分子抑制剂或者全身敲除来探究敲除 $GSK-3\beta$ 对疾病的影响,本研究通过 Cre-LoxP 方法得到 TECs 特异性敲除的小鼠,评估其免疫学的相关特征,为研究胸腺上皮细胞中 $GSK-3\beta$ 敲除在延缓胸腺衰老中的作用及临床应用提供新的思路。实验结果表明基因敲除鼠可以正常生存,并利用 PCR 技术和免疫荧光进行验证,配对繁殖出足够数量的基因敲除鼠后,实验中发现衰老进程中基因敲除小鼠的胸腺衰老明显延缓。

文献表明:胸腺萎缩是免疫系统衰老的重要标志之一,随着年龄的增长会显示出胸腺增龄性的萎缩,脂肪组织填充增多,胸腺的皮髓质的交界不清,机体的成熟胸腺细胞产出减少,导致机体的免疫功能下降,造成老年性疾病的增加^[11],表现在机会性感染、自身免疫和肿瘤的发病率增高^[12]。现已知胸

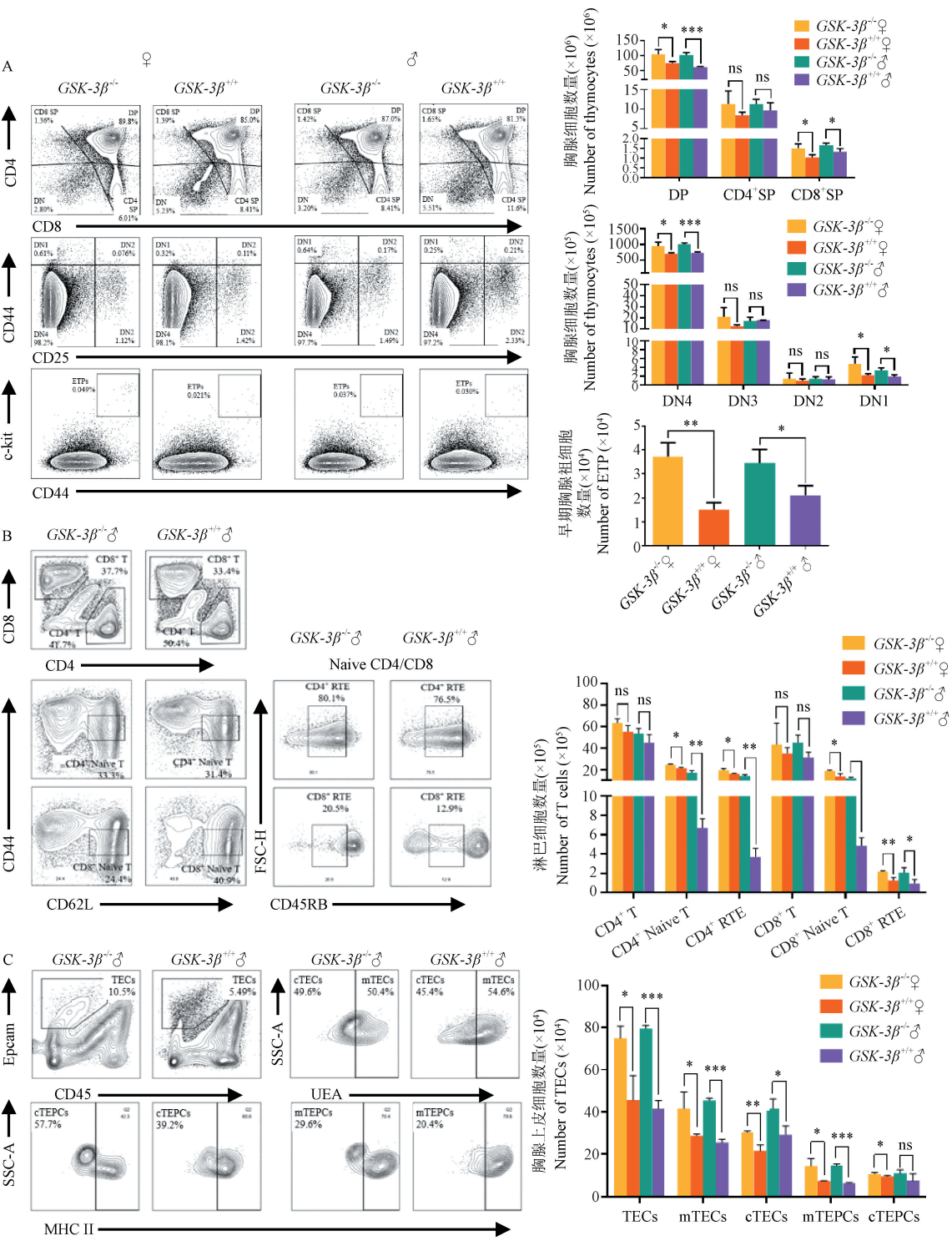


注:A: $GSK-3\beta^{-/-}$ 与同窝的未敲除小鼠 $GSK-3\beta^{+/+}$ 小鼠大体图片及雌性小鼠体重统计;B: 小鼠胸腺大体图片及 12 月龄雌性小鼠胸腺指数比较;C: 小鼠肝肾 HE 染色切片; $GSK-3\beta^{-/-}$ 小鼠与同窝的未敲除小鼠 $GSK-3\beta^{+/+}$ 小鼠 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 器官组织形态学观察

Note. A. Gross images of $GSK-3\beta^{+/+}$ $FoxN1^{Cre+/-}$ ($GSK-3\beta^{-/-}$) and littermate non-knockout mice ($GSK-3\beta^{+/+}$) and weight statistics of female mice. B. Gross images of mouse thymus and comparison of thymus index of 12 month old female mice. C. HE-stained sections of mouse liver and kidney. $GSK-3\beta^{+/+}$ $FoxN1^{Cre+/-}$ ($GSK-3\beta^{-/-}$) compared with littermate non-knockout mice ($GSK-3\beta^{+/+}$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Histological observation of organs



注: A: 流式细胞术检测 *GSK-3β^{-/-}* 与同窝的未敲除小鼠 *GSK-3β^{+/+}* 胸腺细胞淋巴细胞亚群; B: 流式细胞术检测脾淋巴细胞亚群; C: 流式细胞术检测 TECs 各亚群, *GSK-3β^{-/-}* 小鼠与同窝的未敲除小鼠 *GSK-3β^{+/+}* 小鼠相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 TECs 特异性敲除 *GSK-3β* 基因对小鼠胸腺和脾淋巴细胞各亚群以及 TECs 数量的影响

Note. A. Thymocyte lymphocyte subsets of *GSK-3β^{-/-}* and littermate non-knockout mice *GSK-3β^{+/+}* were determined by flow cytometry. B. Flow cytometry was used to detect the subsets of splenic lymphocytes. C. Flow cytometry was used to detect subsets of thymic epithelial cells. *GSK-3β^{-/-}* *FoxN1^{Cre+/+}* (*GSK-3β^{-/-}*) Compared with littermate non-knockout mice (*GSK-3β^{+/+}*), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Effect of specific knockout of *GSK-3β* gene on lymphocyte subsets in thymus and spleen and the number of thymic epithelial cells in mice

腺萎缩相关因素:FoxN1 减少、脂肪累积、氧化损伤累积、炎症因子增加等^[13-14]。FOXN1 是特异性转录因子叉头框蛋白 N1 (Forkhead box protein N1, FOXN1)是 Forkhead 转录因子家族成员之一,主要表达于皮肤及胸腺上皮细胞,含有 9 个外显子,约 1000 bp, 并且其为 Wnt 信号通路的下游靶点^[14], 从而可以参与调控胸腺细胞的数量和功能。而 TECs 特异性敲除 *GSK-3β* 基因的小鼠在敲低 *GSK-3β* 后就可以参与 Wnt 信号通路,合理推测这是其中 TECs 特异性敲除 *GSK-3β* 基因的小鼠延缓胸腺衰老的其中一条途径,其具体机制还有待进一步探究,在脂肪累积调控胸腺衰老方面,有研究者通过给予小鼠不同数量的食物来控制小鼠的能量摄入,发现能量摄入少的小鼠组的胸腺的脂肪化更轻,胸腺的结构更完整,可以产出数量更多的胸腺细胞,减缓或消除上述因素则可以延缓胸腺衰老;增加成熟的胸腺细胞产出;增强机体的免疫功能。这为延缓胸腺衰老提供了新的思路。

上述实验结果得出:TECs 特异性敲除 *GSK-3β* 基因的小鼠胸腺体积增大,胸腺细胞数量增多,胸腺衰老延缓,而是否存在与上述的胸腺的衰老因素的关联性及其中的具体机制还尚未阐明。因此建立 TECs 特异性敲除 *GSK-3β* 基因小鼠模型对其中机制进行深入探索,为探究延缓胸腺衰老的具体方法提供技术理论支持。

参 考 文 献(References)

[1] Potz BA, Scrimgeour LA, Sabe SA, et al. Glycogen synthase kinase 3β inhibition reduces mitochondrial oxidative stress in chronic myocardial ischemia [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2018, 155(6): 2492-2503.

[2] Zhang Y, Huang NQ, Yan F, et al. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: GSK-3β as a potential link [J]. Behav Brain Res, 2018, 339: 57-65.

[3] Dandekar MP, Valvassori SS, Dal-Pont GC, et al. Glycogen synthase kinase-3β as a putative therapeutic target for bipolar disorder [J]. Curr Drug Metab, 2018, 19(8): 663-673.

[4] de Simone A, Tumiatti V, Andrisano V, et al. Glycogen synthase kinase 3β: a new gold rush in anti-Alzheimer's disease multitarget drug discovery? [J]. J Med Chem, 2021, 64(1): 26-41.

[5] Romic S, Djordjevic A, Tepavcevic S, et al. Effects of a fructose-rich diet and chronic stress on insulin signaling and regulation of glycogen synthase kinase-3β and the sodium-potassium pump in the hearts of male rats [J]. Food Funct, 2020, 11(2): 1455-1466.

[6] Sahin I, Eturi A, de Souza A, et al. Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors as novel cancer treatments and modulators of antitumor immune responses [J]. Cancer Biol Ther, 2019, 20(8): 1047-1056.

[7] Lee S, Choi EJ, Cho EJ, et al. Inhibition of PI3K/Akt signaling suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma through the Snail/GSK-3/β-catenin pathway [J]. Clin Mol Hepatol, 2020, 26(4): 529-539.

[8] Pal D, Mukherjee S, Song IH, et al. GSK-3 inhibitors: a new class of drugs for Alzheimer's disease treatment [J]. Curr Drug Targets, 2021, 22(15): 1725-1737.

[9] Wei T, Zhang N, Guo Z, et al. Wnt4 signaling is associated with the decrease of proliferation and increase of apoptosis during age-related thymic involution [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 7568-7576.

[10] Žuklys S, Handel A, Zhanybekova S, et al. Foxn1 regulates key target genes essential for T cell development in postnatal thymic epithelial cells [J]. Nat Immunol, 2016, 17(10): 1206-1215.

[11] Thapa P, Farber DL. The role of the *Thymus* in the immune response [J]. Thorac Surg Clin, 2019, 29(2): 123-131.

[12] Majumdar S, Nandi D. Thymic atrophy: experimental studies and therapeutic interventions [J]. Scand J Immunol, 2018, 87(1): 4-14.

[13] Lee JH, Kim TJ, Kim JW, et al. The anti-apoptotic effect of ghrelin on restraint stress-induced *Thymus* atrophy in mice [J]. Immune Netw, 2016, 16(4): 242-248.

[14] Velardi E, Tsai JJ, Holland AM, et al. Sex steroid blockade enhances thymopoiesis by modulating Notch signaling [J]. J Exp Med, 2014, 211(12): 2341-2349.

[收稿日期] 2022-11-15