

孟雪,王新洲,高水波,等. 巨噬细胞特异性敲除 KLF2 基因小鼠模型构建与鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(4): 444-450.

MENG X, WANG X Z, GAO S B, et al. Construction of macrophage-specific KLF2 gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(4): 444-450.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.04.004

巨噬细胞特异性敲除 KLF2 基因小鼠模型 构建与鉴定

孟雪¹,王新洲²,高水波²,吴鸿^{1,2*}

(1. 河南中医药大学第二临床医学院,郑州 450002;2. 河南省中医院中心实验室,郑州 450002)

【摘要】 目的 建立巨噬细胞特异性敲除 Kruppel 样因子 2 (kruppel-like factor 2, KLF2) 基因小鼠模型,探讨 KLF2 对巨噬细胞炎症反应的调控作用。方法 运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 $KLF2^{fllox/+}$ 小鼠。通过与 $Lyz2-Cre^{+/+}$ 小鼠繁育得到目的基因型小鼠,通过基因型鉴定、实时荧光定量-聚合酶链反应 (qRT-PCR)、Western Blot 从 DNA、RNA、蛋白水平验证 KLF2 敲除效率。分离培养小鼠骨髓源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs),检测脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的炎症相关因子 mRNA 变化。结果 建立了 $KLF2^{fllox/fllox}/Lyz2-Cre^{+}$ 基因型小鼠,即巨噬细胞特异性敲除 KLF2 基因。小鼠骨髓、BMDMs 的 KLF2 mRNA 及蛋白水平显著低于对照组小鼠,而心脏、肝、肾组织中 KLF2 mRNA 表达较对照组小鼠无显著变化。两组小鼠的体重、进食、进水、形态无显著性差异。在 LPS 作用下,缺失 KLF2 的 BMDMs 炎症相关基因 IL-6 mRNA 表达水平较对照组显著下降,而 IL-1、iNOS、CD86 mRNA 表达水平较对照组显著升高。结论 本研究成功构建了巨噬细胞特异性敲除 KLF2 小鼠模型,为进一步研究巨噬细胞 KLF2 对临床炎症相关疾病的调控作用及机制奠定基础。

【关键词】 Kruppel 样因子 2;特异性敲除小鼠;Cre/LoxP 系统;巨噬细胞;动脉粥样硬化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 04-0444-07

Construction of macrophage-specific KLF2 gene knockout mice

MENG Xue¹, WANG Xinzhou², GAO Shuibao², WU Hong^{1,2*}

(1. the Second Clinical Medical College of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;

2. Central Laboratory of Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

Corresponding author: WU Hong. E-mail: kevin5me@126.com

【Abstract】 **Objective** To establish a macrophage-specific KLF2 gene knockout mouse model, and explore the regulatory effect of KLF2 on the macrophage inflammatory response. **Methods** $KLF2^{fllox/+}$ mice were constructed using CRISPR/Cas9 gene editing technology. Target genotype mice were obtained by breeding with $Lyz2-Cre^{+/+}$ mice and screening genotypes through polymerase chain reaction, and KLF2 knockout efficiency was verified using genotyping, qRT-PCR, and Western Blot. Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were isolated and cultivated and mRNA levels of inflammation-related factors in lipopolysaccharide-induced BMDMs were detected. **Results** A $KLF2^{fllox/fllox}/Lyz2-Cre^{+}$ mouse model was established. KLF2 mRNA and protein levels in mouse bone marrow and BMDMs were significantly lower

【基金项目】 国家自然科学基金(81473453),河南省科技研发计划联合基金(222301420088),河南省高校重点科研项目(23A360013)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81473453), Henan Provincial Science and Technology Research and Development Plan Joint Foundation (222301420088), Key Scientific Research Projects of Universities in Henan Province (23A360013).

【作者简介】 孟雪,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病。Email:MXMXL6@163.com

【通信作者】 吴鸿,男,教授,博士生导师,研究方向:中医药防治心血管疾病。Email:kevin5me@126.com

in KLF2 knockout mice compared with the findings in control mice, while expression levels of KLF2 in the heart, liver, and kidney showed no significant changes compared with levels in the control group. There were no significant differences in body weight, diet, drinking water, and appearance between the two groups. The group receiving lipopolysaccharide stimulation showed significantly reduced interleukin (IL)-6 mRNA expression and significantly increased IL-1, iNOS, and CD86 mRNA expression in KLF2-deficient BMDMs compared with the control group. **Conclusions** We constructed a macrophage-specific KLF2 knockout mouse model, thus laying the foundation for further research on the regulatory effect and mechanism of macrophage KLF2 in clinical inflammatory-related diseases.

[Keywords] KLF2; specific knockout mice; Cre/LoxP system; macrophages; atherosclerosis

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

Kruppel 样因子 (kruppel-like factors, KLFs) 家族是锌指类 DNA 结合转录因子中的一族, 包含 18 名成员 (KLF1 ~ 18), 广泛表达于各种组织, 可调节多种生物学过程^[1-3]。KLF2 蛋白是该家族成员之一, 由 354 个氨基酸组成, 分子量约 37 kDa, 其锌指结构位于 C 端, 发挥 DNA 结合与核定位作用, 而 N 端负责调控靶基因的转录, 进而激活或抑制蛋白的表达^[4-5]。自 1995 年 ANDERSON 等^[6]发现 KLF2 以来, 其在循环系统中的抗炎、抗凝、调节血管生成、抗氧化、调控免疫细胞等的作用逐渐被了解。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种累及大、中动脉的慢性炎症性疾病^[7-8]。巨噬细胞是 AS 发生发展涉及的主要免疫细胞群, 参与了 AS 从早期泡沫细胞形成到晚期斑块破裂的整个病理过程, 作用至关重要^[9-10]。多项临床前研究显示巨噬细胞靶向纳米颗粒药物可促进炎症消退及增加斑块稳定性, 展现了其在治疗 AS 方面的巨大潜力^[11]。巨噬细胞对炎症反应的调节是双向的, 在不同的局部微环境下, 表现出促进或抑制炎症状态^[12-13]。转录因子 KLF2 具有抗 AS 斑块形成的作用。研究表明骨髓特异性 KLF2 敲除的 *LDLR*^{-/-} AS 小鼠在高脂饲料喂养后较 *LDLR*^{-/-} 小鼠斑块面积显著增加, 同时斑块中包裹了更多的中性粒细胞和巨噬细胞^[14]。提示, KLF2 抗 AS 斑块形成与调节巨噬细胞状态有关, 但如何调节尚不得而知。由于 KLF2 全基因敲除的小鼠易发生血管生成损伤, 导致胚胎性死亡, 为进一步揭示 KLF2 在 AS 中的潜在调控机制, 本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和 Cre/LoxP 重组系统构建了巨噬细胞特异性 KLF2 基因敲除小鼠模型, 在 DNA、mRNA 和蛋白水平上验证 KLF2 基因敲除效率, 诱导培养骨髓源巨噬细胞, 并初步分析敲除 KLF2 对巨噬细胞炎症表型的影响, 为深入研究巨噬细胞 KLF2 在 AS 及临床炎症相关疾病中的作用提供有效动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 只 SPF 级 C57BL/6N *KLF2*^{fllox/+} 小鼠, 其中雌性 2 只、雄性 1 只, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 由赛业生物科技有限公司采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建; 2 只 SPF 级 *Lyz2-Cre*^{+/+} 小鼠, 其中雌性 1 只、雄性 1 只, 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 20 g, 购自赛业生物科技有限公司【SCXK (苏) 2020-0006】。饲养环境: IVC 笼盒, 小鼠自由饮水、进食, 环境温度 20 ~ 26 °C, 湿度 40% ~ 70%, 每 12 h 明暗交替, 饲养于河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院) 实验动物中心【SYXK (豫) 2021-0018】。所有动物实验操作经河南省中医院 (河南中医药大学第二附属医院) 伦理委员会批准 (PZ-HNSZYY-2022-020)。

1.1.2 主要试剂与仪器

柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程公司); 100 ~ 3000 bp DNA 分子量标准 Marker (上海生工生物工程公司); 2 × Rapid Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科技公司); GoldView II 型核酸染色剂 (北京索莱宝科技公司); 琼脂糖粉 (香港柯菲特生物科技公司); DMEM 高糖培养基 (以色列 BI 公司); 胎牛血清 (以色列 BI 公司); 0.45 μm PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); RIPA 裂解液 (北京索莱宝科技公司); ECL 发光液 (北京索莱宝科技公司); 10 ~ 250 kDa 蛋白分子量标准 Marker (上海雅酶生物医药科技公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术公司); 抗 KLF2 抗体 (北京博奥森生物技术公司); 抗 β-Actin 抗体 (武汉三鹰生物公司); 酶标羊抗兔二抗 (武汉三鹰生物公司)。普通 PCR 仪 (伯乐, 美国); 实时荧光定量 PCR 系统 (赛默飞, 美国); 凝胶成像系统 (伯乐, 美国); 电泳仪 (伯乐, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 *KLF2*^{flox/+} 小鼠构建策略

采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将含有 loxP 位点的供体载体 *KLF2* 基因的 gRNA 和 Cas9 mRNA 共同注射到 C57BL/6N 小鼠受精卵中,经胚胎移植,获得阳性 F0 代小鼠,运用 PCR 和序列分析对 F0 代小鼠进行鉴定,并将其与野生型小鼠杂交,得到 F1 代(*KLF2*^{flox/+})杂合子小鼠,以获得更多阳性的 F2 代小鼠。

1.2.2 繁育路线

将引进的 *KLF2*^{flox/+} 小鼠进行雌雄自交,繁育产生的子代中筛选出子代基因型为 *KLF2*^{flox/flox} 的小鼠。将 *KLF2*^{flox/flox} 小鼠与 *Lyz2-Cre*^{+/+} 小鼠进行繁育,得到基因型为 *KLF2*^{flox/+}/*Lyz2-Cre*^{+/-} 小鼠。再将 *KLF2*^{flox/+}/*Lyz2-Cre*^{+/-} 小鼠进行雌雄自交,通过筛选最终获得子代基因型为 *KLF2*^{flox/flox}/*Lyz2-Cre*⁺ (K2MKO) 小鼠,该小鼠可表现出系细胞特异性 *KLF2* 基因敲除。基因型为 *KLF2*^{flox/flox}/*Lyz2-Cre*⁻ (*KLF2*^{flox/flox}, WT) 小鼠作为对照组。

1.2.3 小鼠基因型鉴定

剪取小鼠鼠尾约 2 mm,加入 200 μL 组织裂解液,震荡混匀,56 ℃ 金属浴裂解 3 h。加入 200 μL Buffer CL,充分混匀。加入 200 μL 无水乙醇,充分混匀。将溶液移入纯化吸附柱中,静置 2 min,室温 10 000 r/min 离心 1 min,弃废液。分步加入 500 μL CW1、CW2 溶液漂洗吸附柱,10 000 r/min 离心 30 s,弃废液。12 000 r/min,离心 2 min,去除残留溶液。室温开盖静置数分钟使乙醇充分挥发,避免残余乙醇影响后续实验。取出吸附柱,置于新的 1.5 mL Ep 管中,加入 100 μL 无酶水,静置 3 min,12 000 r/min,离心 2 min,收集 DNA 溶液。

1.2.4 PCR 反应体系

PCR 反应体系共 20 μL:2 × Taq PCR Master Mix 10 μL、正反向引物各 1 μL(10 μmol/L)、DNA 模板 1 ~ 2 μL,无酶水补齐至 20 μL。引物序列见表 1。PCR 扩增程序如下 flox:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 35 s,72 ℃ 35 s,35 个循环;72 ℃ 5 min;保持 10 ℃。Lyz2-Cre:94 ℃ 2 min;94 ℃ 20 s,65 ℃ 15 s(每个循环降 0.5 ℃),68 ℃ 10 s,10 个循环;94 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,28 个循环;72 ℃ 2 min;保持 10 ℃。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。电泳完成后凝胶成像系统拍照,根据扩增片段长度进行基因型鉴定。

表 1 小鼠基因型 PCR 鉴定引物

Table 1 PCR primers for mice genotype identification	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
Flox	F:CCACCACCGCCAGGCTTATATACCGC
	R:CACGGGTGGCGAAAGTGCAA
Lyz2-Cre	F:CCCAGAAATGCCAGATTACG
	R:CTTGGGCTGCCAGAATTTCCTC

1.2.5 小鼠骨髓源巨噬细胞的分离培养、鉴定及处理

选取 8 ~ 10 周龄 K2MKO 小鼠和 WT 小鼠,超净台内分离小鼠股骨及胫骨,先浸泡于冷的 75% 乙醇中,后置于冷的 PBS 中。镊子夹取股骨或胫骨,小心剪去骨头两端,使用 DMEM 高糖培养基将骨髓从骨髓腔中冲出,移液器轻轻打散,1000 r/min 离心 5 min 收集细胞,加入 1 mL 红细胞裂解液,手指轻弹离心管底,使细胞松散,冰上静置 10 min。加入 10 mL DMEM 高糖培养基重悬细胞,1000 r/min 离心 5 min 洗去红细胞裂解液。用含 DMEM 高糖培养基 + 30% L929 小鼠成纤维细胞上清 + 10% 胎牛血清的完全培养基重悬收集的细胞,计数后调整细胞密度,按照每毫升 5 × 10⁵ 个铺于 6 孔细胞培养板,每孔 2 mL,共培养 7 d,其中 3.5 d 换液。收集部分细胞,通过流式细胞术检测表面标志物 F4/80 对巨噬细胞进行鉴定。诱导成功的细胞分为 WT 组、K2MKO 组、WT + LPS 组、K2MKO + LPS 组。其中 WT + LPS 组、K2MKO + LPS 组使用 LPS(200 ng/mL)刺激 6 h,其余组不做处理。收集细胞用于后续 qRT-PCR 检测。

1.2.6 巨噬细胞 *KLF2* 蛋白表达水平检测

RIPA 裂解液提取小鼠 BMDMs 总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳 1 h,湿转法转膜 1.5 h,5% 脱脂奶室温封闭 2 h,4 ℃ 过夜孵育一抗 *KLF2*(1 : 1000)、β-actin(1 : 5000),次日用 TBST 洗膜,加入羊抗兔二抗(1 : 2000),37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗膜。将 PVDF 膜置于 ECL 发光液 2 min,蛋白免疫印迹成像系统拍照并分析。

1.2.7 qRT-PCR 检测小鼠各组织 *KLF2* mRNA 及 BMDMs 炎症相关基因 mRNA 表达

运用 RNA 提取试剂盒提取小鼠骨髓、心脏、肝、肾及 BMDMs 总 RNA。微量核酸测定仪检测各组总 RNA 纯度及浓度,将各组 RNA 样品逆转录为 cDNA。设计 qRT-PCR 引物,具体序列见表 2。配制 SYPR Green 荧光染料体系共 20 μL:2 × TB Green

Mix 10 μ L、正反向引物各 0.8 μ L (10 μ mol/L)、cDNA 模板 2 μ L,无酶水补齐至 20 μ L。运用实时荧光定量系统进行定量检测,正常组做参照,以 β -Actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对表达量。

表 2 qRT-PCR 检测引物
Table 2 qRT-PCR detection primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
KLF2	F: TAAAGGCGCATCTGCGTACA R: GTGTCGCTTCATGTGCAAGG
IL-6	F: ACGGCCTTCCTACTTCACA R: AGACAGGCTCTGTTGGGAGTGG
IL-1	F: ATGCCACCTTTTGACAGTGAT R: GTGCTGCTGCGAGATTGAA
iNOS	F: GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA R: GTGGACGGGTCGATGTCAC
CD86	F: ATGGACCCAGATGCACCAT R: ACTACCAGCTCACTCAGGCT
β -actin	F: AGAAGCTGTGCTATGTTGCTCTA R: AAGGCTGGAAAAGAGCCTCAG

1.3 统计学分析

运用 IBM SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计分析,实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)方式呈现。数据分析多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 $KLF2^{flox/flox}$ 小鼠获得及鉴定

基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 $KLF2^{flox/+}$ 小鼠,敲除 KLF2 基因(ENSMUSG00000 055148)转录本外显子 1 ~ 3 区域(exon1 ~ 3),构建策略见图 1A。 $KLF2^{flox/+}$ 基因型雄性、雌性小鼠自交得到的子代小鼠经鉴定后获得 $KLF2^{flox/flox}$ 基因型小鼠。使用 flox 引物的 PCR 鉴定结果见图 1B,扩增出 249 bp 单一条带为 $KLF2^{flox/flox}$ 基因型小鼠,扩

增出 215 bp 单一条带为 $KLF2^{+/+}$ 基因型小鼠,扩增出 249 bp 和 215 bp 双条带为 $KLF2^{flox/+}$,其中 $KLF2^{flox/flox}$ 基因型小鼠用于下一步繁育。

2.2 K2MKO 小鼠获得及鉴定

K2MKO 小鼠繁育路线如图 2A 所示。使用 flox 引物和 Lyz2-Cre 引物对最终得到的小鼠进行基因型鉴定,结果如图 2B 所示,若 flox 引物扩增出 249 bp 和 215 bp 双条带,Lyz2-Cre 引物未扩增出条带,小鼠基因型为 $KLF2^{flox/+}/Lyz2-Cre^{-}$;若 flox 引物扩增出 249 bp 和 215 bp 双条带,Lyz2-Cre 引物扩增出 700 bp 条带,小鼠基因型为 $KLF2^{flox/+}/Lyz2-Cre^{+}$;若 flox 引物扩增出 249 bp 单条带,Lyz2-Cre 引物未扩增出条带,小鼠基因型为 $KLF2^{+/+}/Lyz2-Cre^{-}$;若 flox 引物扩增出 249 bp 单条带,Lyz2-Cre 引物扩增出 700 bp 条带,小鼠基因型为 $KLF2^{flox/flox}/Lyz2-Cre^{+}$ 。

2.3 K2MKO 小鼠形态

经观察,K2MKO 小鼠生长发育良好,毛发柔顺有光泽,可正常繁育。8 周龄 K2MKO 小鼠与 WT 小鼠体重、进食量、进水量、形态无显著性差异(图 3)。

2.4 小鼠 KLF2 敲除效率验证

为了鉴定 K2MKO 小鼠 KLF2 敲除效率,使用 qRT-PCR 检测小鼠骨髓、心脏、肝、肾 KLF2 mRNA 表达水平;Western Blot 检测 BMDMs 中 KLF2 蛋白表达水平。结果显示,K2MKO 小鼠骨髓 KLF2 mRNA 表达水平较 WT 小鼠有显著降低(WT 组相对表达值为: 0.95 ± 0.04 ,K2MKO 相对表达值为: 0.08 ± 0.02);而心脏、肝、肾 KLF2 mRNA 表达水平较 WT 小鼠无显著性差异(图 4A),说明巨噬细胞特异性敲除 KLF2 小鼠模型构建成功。与 WT 小鼠 BMDMs 相比,KLF2-MKO 小鼠 BMDMs 中 KLF2 蛋白表达显著降低(图 4B),进一步说明小鼠模型构建成功。

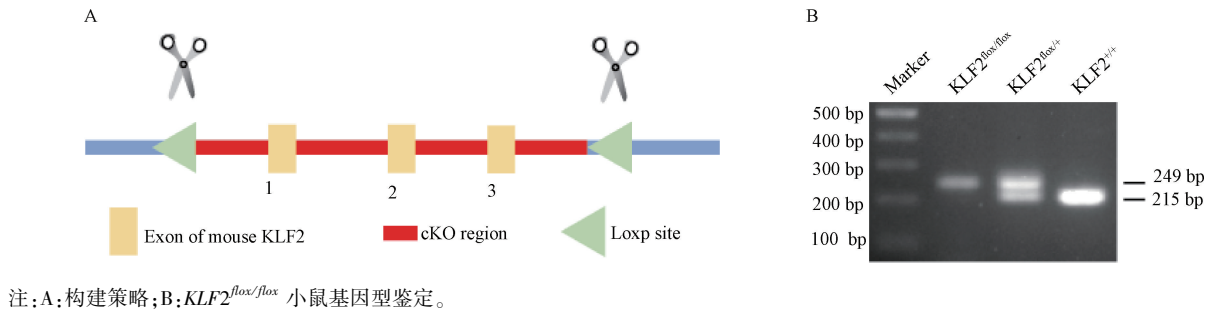


图 1 $KLF2^{flox/flox}$ 小鼠获得及基因型鉴定
Note. A. Construction strategy. B. Genetic identification of $KLF2^{flox/flox}$ mice.
Figure 1 Obtainment and genetic identification of $KLF2^{flox/flox}$ mice

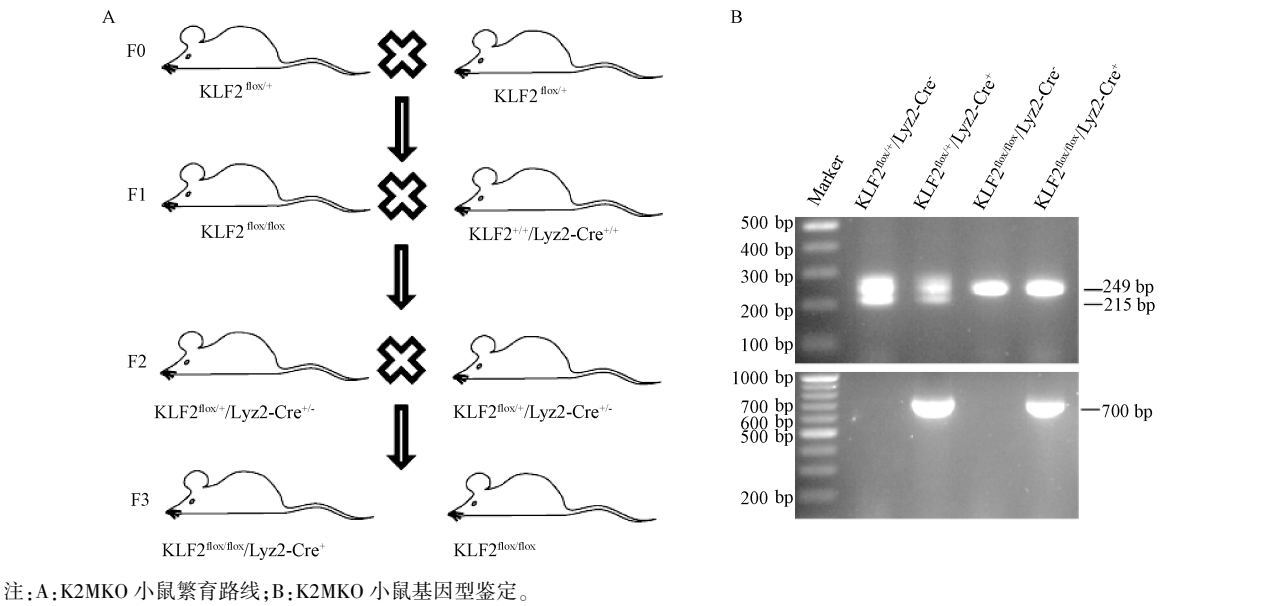


图 2 K2MKO 小鼠获得及基因型鉴定

Note. A. Reproductive route of K2MKO mice. B. Genetic identification of K2MKO mice.

Figure 2 Obtainment and genetic identification of K2MKO mice

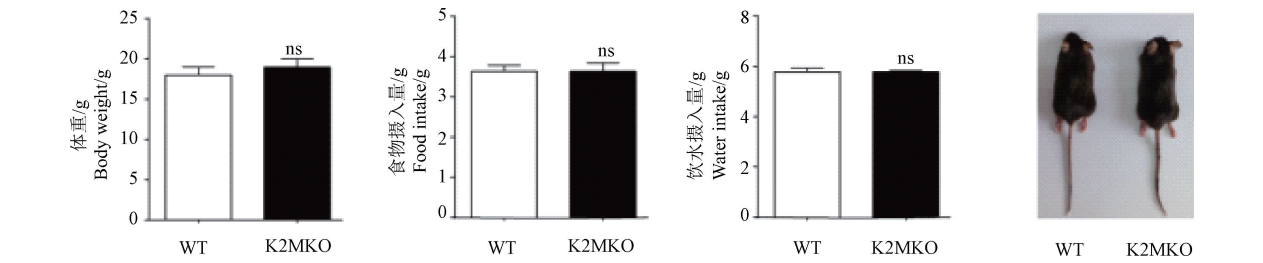
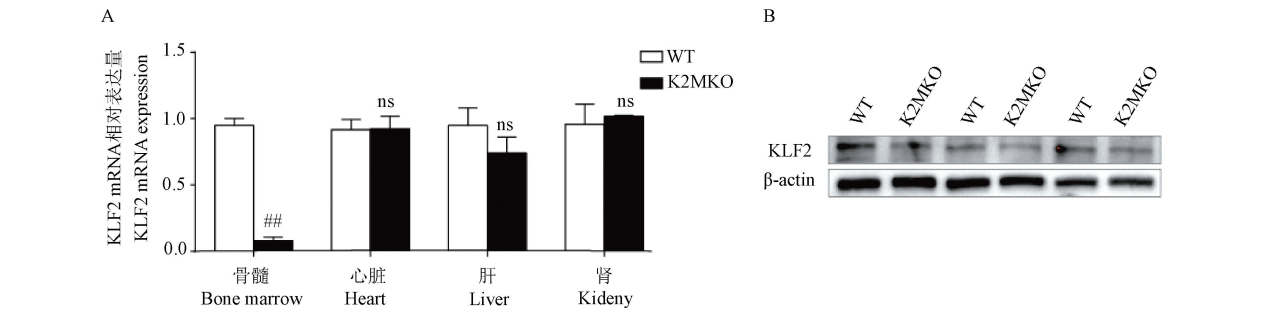


图 3 K2MKO 小鼠一般情况

Figure 3 General situation of K2MKO mice



注:与 WT 小鼠相比,## $P < 0.01$ 。

图 4 小鼠不同组织 KLF2 mRNA 表达水平

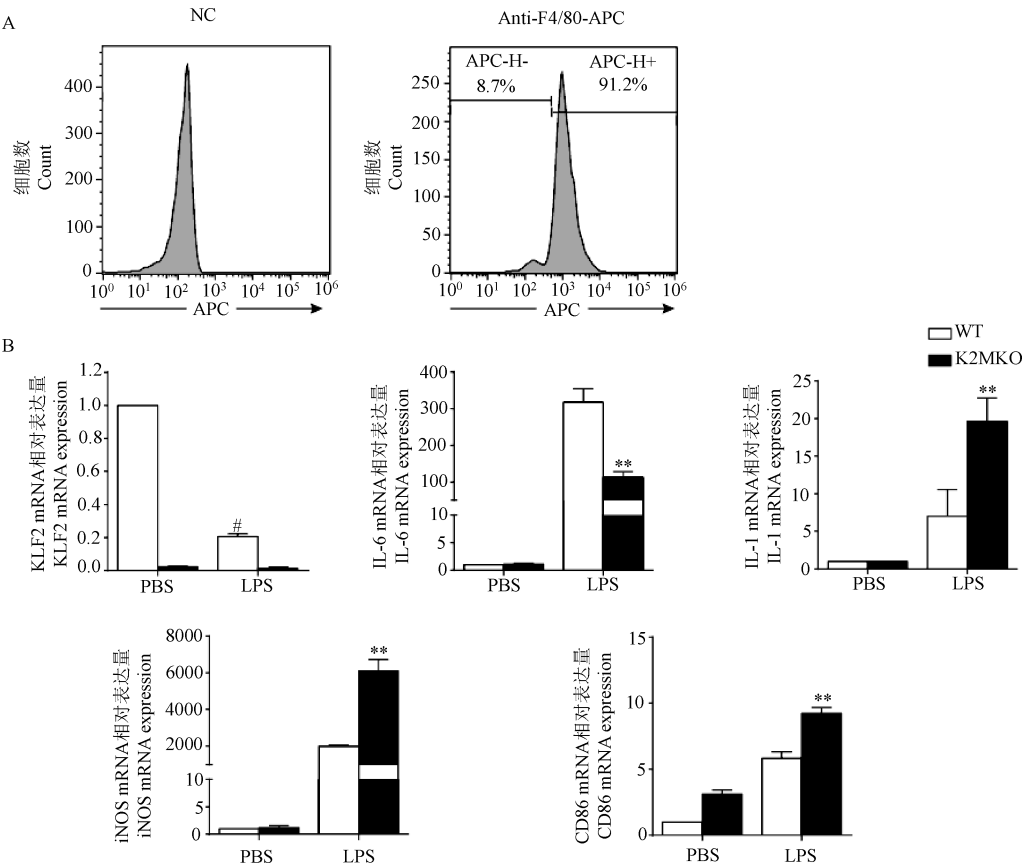
Note. Compared with WT mice, ## $P < 0.01$.

Figure 4 KLF2 mRNA expression levels in different tissues of mice

2.5 敲除 KLF2 对 LPS 诱导 BMDMs 炎症相关基因表达的影响

分离培养小鼠 BMDMs,流式细胞术检测巨噬细胞特异性标志物 F4/80(如图 5A),诱导成功的巨噬细胞比率 > 90%。LPS 刺激 KLF2-MKO 小鼠

BMDMs,qRT-PCR 检测炎症相关基因 mRNA 表达,结果显示,在 LPS 刺激下,WT 小鼠 BMDMs 的 KLF2 表达显著降低;敲除 KLF2 的 BMDMs 炎症相关因子仅 IL-6 显著降低,而 IL-1、iNOS、CD86 均显著升高,说明炎症反应加剧(图 5B)。



注:A;BMDMs 流式细胞术表面标志物鉴定;B:LPS 刺激下 BMDMs 炎症相关基因 mRNA 表达水平;与 WT 小鼠相比,[#]*P* < 0.05;与 WT + LPS 组小鼠比,^{**} *P* < 0.01。

图 5 BMDMs 炎症相关基因 mRNA 表达

Note. A. Identification of surface biomarkers in BMDMs by flow cytometry. B. mRNA expression levels of inflammation-related genes in BMDMs under LPS stimulation. Compared with WT mice, [#]*P* < 0.05. Compared with WT + LPS mice, ^{**} *P* < 0.01.

Figure 5 mRNA expression levels of inflammation-related genes in BMDMs

3 讨论

KLF2 是 KLFs 家族中研究最多的转录因子蛋白之一,主要集中在 KLF2 对血管内皮细胞功能的调节作用。KLF2 在血管内皮中的作用至关重要。KLF2 作为血管内皮功能稳态的“开关”分子,通过对下游多个靶基因的转录调控,实现粘附因子、血栓相关因子等功能蛋白生物学功能的动态平衡^[5,15]。近年来,KLF2 对免疫细胞炎症反应的调节逐渐成为研究热点之一。巨噬细胞作为免疫细胞重要的一类,在炎症相关疾病中扮演着重要角色。构建巨噬细胞特异性敲除 KLF2 小鼠模型,研究巨噬细胞中 KLF2 在病理条件下的变化及其对炎症的调节机制对开发靶向药物十分重要。

基因编辑技术加速了对基因功能的探究,尤其是 CRISPR/Cas9 技术已广泛应用于动物模型构建、医药工程等领域,具有低成本、高效率、易操作的特

点,能够有效修饰内源性基因,对不同物种进行特异性基因敲除、插入和替换^[16-17]。全基因敲除小鼠构建过程中经常出现胚胎死亡的情况,KLF2 亦是如此^[18]。Cre/LoxP 系统不仅可以改善小鼠胚胎致死的局限性,还为在特定细胞亚群中研究基因功能提供了可能^[19-20]。本研究成功构建了 KLF2-MKO 小鼠模型,并从 DNA、mRNA 和蛋白水平验证了其敲除效率,且其子代小鼠生长发育良好、毛发柔顺有光泽,生长速度、繁殖能力与对照组相比无显著性差异,存活率高,避免了全基因敲除带来的局限性。在以往的研究中^[14,21],Cre/LoxP 系统已被应用于髓系细胞特异性敲除 KLF2 小鼠的构建,同样有效地敲除了 KLF2,与本研究不同的是在构建 KLF2^{flox/flox}鼠时应用的是同源重组或 ES 打靶技术,而本研究则应用了 CRISPR/Cas9 技术。

KLF2 对炎症反应具有调控作用,通过抑制 NF-κB 炎症信号通路,减少炎症因子的产生。一方面,

KLF2 可以通过分子间交互作用直接抑制 NF-κB 通路活性^[22-23],另一方面 KLF2 还可以通过增加 NF-κB 通路的负调控因子如 IκBα、IκBε 的表达来抑制其活性。巨噬细胞的炎症状态具有多向性,存在着不同的极化状态,发挥促进或抑制炎症的作用。目前,KLF2 对巨噬细胞炎症状态的调控机制仍不完全清楚。本研究分离培养巨噬细胞特异性敲除 KLF2 小鼠 BMDMs,并使用 LPS 诱导细胞炎症模型,体外观察敲除 KLF2 对巨噬细胞炎症反应的影响。结果显示,敲除 KLF2 的 BMDMs 展现出更加显著的促炎状态,促炎因子 IL-1 和 M1 型巨噬细胞标志物表达升高,表明 KLF2 对巨噬细胞炎症反应有负调控作用。类似的,有研究报道髓系细胞特异性敲除 KLF2 的小鼠在高脂饲料喂养后出现代谢性炎症,同样说明髓系细胞中 KLF2 对炎症反应起抑制作用^[24]。

本研究成功构建了巨噬细胞特异性敲除 KLF2 小鼠,为揭示 KLF2 在巨噬细胞中的调控机制提供了有效的动物模型,并为进一步构建巨噬细胞特异性敲除 KLF2 的 AS 小鼠模型、研究 KLF2 在 AS 等炎症性疾病中的重要作用奠定基础。

参 考 文 献(References)

[1] OISHI Y, MANABE I. Krüppel-like factors in metabolic homeostasis and cardiometabolic disease [J]. Front Cardiovasc Med, 2018, 5: 69.

[2] TETREAULT M P, YANG Y, KATZ J P. Krüppel-like factors in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(10): 701-713.

[3] HSIEH P N, FAN L, SWEET D R, et al. The Krüppel-like factors and control of energy homeostasis [J]. Endocr Rev, 2019, 40(1): 137-152.

[4] DABRAVOLSKI S A, SUKHORUKOV V N, KALMYKOV V A, et al. The role of KLF2 in the regulation of atherosclerosis development and potential use of KLF2-targeted therapy [J]. Biomedicines, 2022, 10(2): 254.

[5] NOVODVORSKY P, CHICO T J. The role of the transcription factor KLF2 in vascular development and disease [J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014, 124: 155-188.

[6] ANDERSON K P, KERN C B, CRABLE S C, et al. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Krüppel-like factor: identification of a new multigene family [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(11): 5957-5965.

[7] KOBİYAMA K, LEY K. Atherosclerosis [J]. Circ Res, 2018, 123(10): 1118-1120.

[8] LIBBY P. The changing landscape of atherosclerosis [J]. Nature, 2021, 592(7855): 524-533.

[9] KOELWYN G J, CORR E M, ERBAY E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. Nat

Immunol, 2018, 19(6): 526-537.

[10] TABAS I, BORNFELDT K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 653-667.

[11] CHEN W, SCHILPEROORT M, CAO Y, et al. Macrophage-targeted nanomedicine for the diagnosis and treatment of atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(4): 228-249.

[12] YANG S, YUAN H Q, HAO Y M, et al. Macrophage polarization in atherosclerosis [J]. Clin Chim Acta, 2020, 501: 142-146.

[13] JINNOUCHI H, GUO L, SAKAMOTO A, et al. Diversity of macrophage phenotypes and responses in atherosclerosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(10): 1919-1932.

[14] LINGREL J B, PILCHER-ROBERTS R, BASFORD J E, et al. Myeloid-specific Krüppel-like factor 2 inactivation increases macrophage and neutrophil adhesion and promotes atherosclerosis [J]. Circ Res, 2012, 110(10): 1294-1302.

[15] ATKINS G B, JAIN M K. Role of Krüppel-like transcription factors in endothelial biology [J]. Circ Res, 2007, 100(12): 1686-1695.

[16] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, et al. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing [J]. Life Sci, 2019, 232: 116636.

[17] CHENG H, ZHANG F, DING Y. CRISPR/Cas9 delivery system engineering for genome editing in therapeutic applications [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(10): 1649.

[18] WANI M A, MEANS R T Jr, LINGREL J B. Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice [J]. Transgenic Res, 1998, 7(4): 229-238.

[19] KIM H, KIM M, IM S K, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes [J]. Lab Anim Res, 2018, 34(4): 147-159.

[20] KOS C H. Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models [J]. Nutr Rev, 2004, 62(6): 243-246.

[21] WEINREICH M A, TAKADA K, SKON C, et al. KLF2 transcription-factor deficiency in T cells results in unrestrained cytokine production and upregulation of bystander chemokine receptors [J]. Immunity, 2009, 31(1): 122-130.

[22] JHA P, DAS H. KLF2 in regulation of NF-κB-mediated immune cell function and inflammation [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2383.

[23] TURPAEV K T. Transcription factor KLF2 and its role in the regulation of inflammatory processes [J]. Biochemistry, 2020, 85(1): 54-67.

[24] SWEET D R, VASUDEVAN N T, FAN L, et al. Myeloid Krüppel-like factor 2 is a critical regulator of metabolic inflammation [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5872.