

闫华箏, 高建雄, 张楠, 等. 一种 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠品系体内 GFP<sup>+</sup> 细胞的表达特征和对白喉毒素的反应特征 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1524-1531.

YAN H Z, GAO J X, ZHANG N, et al. Expression of GFP<sup>+</sup> cells and their response to diphtheria toxin in a *Lyz2* IRES DTREGFP mice strain *in vivo* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(12): 1524-1531.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.12.003

# 一种 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠品系体内 GFP<sup>+</sup> 细胞的表达特征和对白喉毒素的反应特征

闫华箏<sup>1,2</sup>, 高建雄<sup>1,2</sup>, 张楠<sup>1,2</sup>, 卞明明<sup>1,2</sup>, 许瑶妹<sup>1,2</sup>,  
张霖<sup>1,2</sup>, 周诗雨<sup>1,2</sup>, 方壹万<sup>1,2</sup>, 吕合作<sup>1,2\*</sup>

(1. 蚌埠医科大学第一附属医院检验科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医科大学慢性疾病免疫学基础与临床安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233030)

**【摘要】 目的** 观察 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠体内绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 阳性髓系细胞 (主要为单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞) 的表达特征和对白喉毒素 (diphtheria toxin receptor, DT) 反应规律。**方法** 随机选取 6 ~ 8 周龄 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠和相同遗传背景的 C57BL/6J 小鼠, 进行腹腔注射 DT (25 ng/g), 连续 3 d。分别取骨髓、外周血和脾, 做成单细胞悬液, 以 GFP 和 CD11b 为标志, 采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测给药前后不同时间点这些组织中 GFP 阳性细胞 (GFP<sup>+</sup>) 占总髓系细胞 (CD11b<sup>+</sup>) 比例的变化规律。**结果** 外周血 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞在 DT 注射前占 CD11b<sup>+</sup> 细胞的 (24.62 ± 5.655)%, 注射后逐渐减少, 第 3 天达到最低 (7.982 ± 2.729)%; 脾和骨髓中其比例在 DT 注射前分别为 (13.73 ± 2.994)% 和 (65.23 ± 4.261)%, 在注射后第 1 天减少最明显, 分别为 (3.468 ± 0.5862)% 和 (50.98 ± 7.957)%, 之后逐渐恢复。**结论** DT 可以有效地减少 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠体内单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的比例, 且不同的组织的变化规律有所不同。

**【关键词】** 转基因鼠; 白喉毒素; 白喉毒素受体; 耗竭实验

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 12-1524-08

## Expression of GFP<sup>+</sup> cells and their response to diphtheria toxin in a *Lyz2* IRES DTREGFP mice strain *in vivo*

YAN Huazheng<sup>1,2</sup>, GAO Jianxiong<sup>1,2</sup>, ZHANG Nan<sup>1,2</sup>, BIAN Mingming<sup>1,2</sup>,  
XU Yaomei<sup>1,2</sup>, ZHANG Lin<sup>1,2</sup>, ZHOU Shiyu<sup>1,2</sup>, FANG Yiwan<sup>1,2</sup>, LYU Hezuo<sup>1,2\*</sup>

(1. Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China;  
2. Anhui Key Laboratory of Basic and Clinical Immunology of Chronic Diseases, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China)

Corresponding author: LYU Hezuo. E-mail: lhz233003@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the expression characteristics of green fluorescent protein (GFP)-positive myeloid cells (mainly monocytes, macrophages, and neutrophils) and their pattern of response to diphtheria toxin (DT) in *Lyz2* internal ribosome entry site (IRES) DT receptor/enhanced GFP (DTREGFP) mice. **Methods** Transgenic *Lyz2* IRES DTREGFP mice (6 ~ 8 weeks old) and C57BL/6J mice with the same genetic background were selected randomly

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (82072416), 蚌埠医科大学第一附属医院高水平科技创新团队资助项目 (BYFFY2022TD001)。  
Funded by the National Natural Science Foundation of China (82072416), the High-Level Scientific and Technological Innovation Team Fund of the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University (BYFFY2022TD001).

**【作者简介】** 闫华箏, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经免疫。Email: 3248633078@qq.com

**【通信作者】** 吕合作, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 神经免疫。Email: lhz233003@163.com

and injected intraperitoneally with DT (25 ng/g) for 3 consecutive days. Bone marrow, peripheral blood, and spleen cells were separated and made into single-cell suspensions with GFP and CD11b as markers. Changes in the proportion of GFP<sup>+</sup> cells to total myeloid cells (CD11b<sup>+</sup>) was detected in these tissues at different time points before and after drug administration, using flow cytometry. **Results** Peripheral blood CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells accounted for (24.62 ± 5.655) % of CD11b<sup>+</sup> cells before DT injection, and this proportion gradually decreased after injection and reached a minimum of (7.982 ± 2.729) % on the third day. The proportions in spleen and bone marrow were (13.73 ± 2.994) % and (65.23 ± 4.261) % before DT injection, respectively, decreased most significantly on the first day after injection to (3.468 ± 0.5862) % and (50.98 ± 7.957) %, respectively, and then gradually recovered. **Conclusions** DT effectively reduced the proportions of monocytes, macrophages, and neutrophils in *Lyz2* IRES DTREGFP mice, but the pattern of change varied among tissues.

**[Keywords]** transgenic mouse; diphtheria toxin; diphtheria toxin receptor; depletion assay  
**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

髓系细胞主要包括粒细胞、单核细胞、树突状细胞、肥大细胞等,是人体先天免疫系统的主要组成成分,在不同的自身免疫性疾病的发病机制中发挥着关键的作用<sup>[1]</sup>。在炎症、肿瘤等病理条件下,多种髓系细胞可靶向炎症微环境。例如,在心血管疾病中,髓系细胞会分泌一些相关蛋白,参与调解炎症反应、纤维化、血管内皮障碍等病理过程,在其中起到举足轻重的作用<sup>[2-3]</sup>。在肿瘤中,癌细胞还会与髓系细胞相互作用,导致肿瘤的转移,影响 M1 型巨噬细胞的极化<sup>[4]</sup>。由于髓系细胞在免疫微环境中扮演着重要的角色,因此了解髓系细胞在先天免疫系统中发挥的具体作用及可能的相关机制是十分必要的。

随着基因编码技术的日益成熟,转基因小鼠在科研生物领域应用已经十分广泛。利用 CRISPR/Cas9 技术,可以获得基因定点插入 IRES DTREGFP 的小鼠,作为研究某类细胞或者基因比较成熟的工具<sup>[5]</sup>。通过将灵长类白喉毒素受体(diphtheria toxin receptor, DTR)引入特定小鼠细胞中,可以使此类细胞群对白喉毒素(diphtheria toxin, DT)敏感,并在 DT 注射时诱导这些细胞死亡,从而达到细胞的特异性耗竭<sup>[6]</sup>。该转基因鼠就是通过基因编辑让目的细胞表达 DTR,然后通过 DT 实现细胞的选择性剔除<sup>[7]</sup>。

在本实验中选择一种 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠。其中,由 *Lyz2* 基因编码的溶菌酶是一种蛋白质类防御因子,是动物自身的重要免疫因子<sup>[8]</sup>。能广泛地表达于单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞,因此长期以来被用作小鼠髓系细胞的特异性标志物<sup>[9]</sup>。也因此,本实验后续提到的髓系细胞特指单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞。该小鼠通过将 *Dtr* 基因与增强型绿色荧光蛋白(enhanced

green fluorescent protein, EGFP) 基因结合成为 DTREGFP 基因,通过同源重组的方式将 DTREGFP 插入到小鼠的 *Lyz2* 基因位点。插入 DTREGFP 基因的小鼠,能在髓系细胞上特异性地表达 DTR 和绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP),在连续 3 d 腹腔注射 DT 后<sup>[10]</sup>,便能与 DT 结合,特异性地减少髓系细胞,通过检测 GFP 阳性(GFP<sup>+</sup>)细胞的变化情况,便能够观察 DT 对目的细胞的影响。本实验旨在通过流式细胞术观察 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠体内 GFP<sup>+</sup> 髓系细胞的表达特征和对 DT 的反应规律,以进一步探索髓系细胞在先天免疫系统中发挥的关键作用及相关机制,为以后的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

自上海南方模式生物科技有限公司购入 6 ~ 8 周龄 SPF 级 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠【SCXK(沪)2017-0010】,遗传背景是 C57BL/6J 小鼠。小鼠饲养于蚌埠医科大学实验动物中心【SYXK(皖)2023-009】。保持室温在 22 ~ 26 ℃,湿度在 45 ~ 65 %,保证食物及水源充足,在正常昼夜环境下饲养,体重达到 20 g 后随机选取 28 只基因鼠,雌雄各半进行分组。野生型(wild type, WT)小鼠为基因鉴定之后筛选出的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,共 8 只,雌雄各半,6 ~ 8 周龄,体重 20 g,来源及饲养环境同 *Lyz2* IRES DTREGFP 转基因小鼠。实验期间所有操作均经过蚌埠医科大学伦理委员会审批(2020-050)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DT(lits labs, 15047A1); Rat anti-CD11b antibody

(Invitrogen, 130-113-238); 通用组织温和酶解试剂盒 (瑞沃德, DHGT-5004); 红细胞裂解液 (ThermoFisher, 00-4300-54); DMEM 培养基 (Gibco, 612302); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (ExCell Bio, FSP500); PBS 缓冲液 (Biosharp, BL302A); 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) (Biosharp, BL539A); 10 × TBE 溶液 (biosharp, BL540A); DNA 提取试剂盒 (Vazyme, PD101-01); SuperRed/GelRed (BIOMIKY, MK002A)。

高速离心机 (Eppendorf, 德国); 单细胞悬液制备仪 (瑞沃德, 中国); 流式细胞仪 (Cytex Biosciences, 美国); Power Pac Basic 基础电泳仪 (Bio-rad, 美国); Milli-QSynthesisA-10 纯水仪 (Millipore, 美国); 凝胶成像仪 (Bio-rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及基因型鉴定

以 C57BL/6J 为阴性对照组 (blank group), 以 Lyz2 IRES DTREGFP 基因鼠为实验组 (sham group)。实验组按照 25 ng/g 的剂量腹腔注射 DT, 连续 3 d, 每天一次。

小鼠 DNA 的提取: 取 3 周龄小鼠脚趾组织于 1.5 mL Ep 管中, 加入 200 μL 裂解液 (1 × mouse tissue lysis buffer 200 μL + proteinase K 4 μL), 使组织完全浸入裂解液中, 55 °C 水浴 20 min, 95 °C 金属浴 5 min, 灭活 proteinase K 后, 12 000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 取上清。上清液即为所提取的 DNA。

以所提 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 反应体系: 2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)<sup>a</sup> 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 16 μL, DNA 模板 5 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL。PCR 扩增条件: 95 °C, 5 min, 预变性, 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 重复 35 个循环, 72 °C 7 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 所得结果在凝胶成像系统中拍照分析。引物由上海生工生物公司合成, 引物序列如表 1。

表 1 小鼠基因型鉴定 PCR 引物设计方案及产物长度

Table 1 PCR primer design scheme and product length for mouse genotyping

| 工具鼠<br>Omnipotent    | 引物<br>Primer | 引物序列 (5'→3')<br>Primer sequence (5'→3') | 产物长度/bp<br>Product length/bp |                                            |                                            |
|----------------------|--------------|-----------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                      |              |                                         | 野生型<br>C57BL/6J              | 杂合子<br>Lyz2 IRES<br>DTREGFP <sup>+/−</sup> | 纯合子<br>Lyz2 IRES<br>DTREGFP <sup>+/+</sup> |
|                      |              |                                         |                              |                                            |                                            |
| Lyz2 IRES<br>DTREGFP | P1           | F:GAGCACACTGTCAAAACCGAGAT               | 326                          | 326                                        | -                                          |
|                      | P2           | R:TCCTGGCTGAAGAACTGACCTAC               |                              |                                            |                                            |
|                      | P3           | F:TTCCTCAAGGACGACGGCAACTA               | -                            | 512                                        | 512                                        |
|                      | P4           | R:GAGGGGAAATCGAGGGAATGTGAC              |                              |                                            |                                            |

1.2.2 外周血制备及处理

实验开始前配制好所需试剂: SB 缓冲液 (胎牛血清与 1 × PBS 的比例为 1:19); 1 × 红细胞裂解液 (10 × RBC 裂解缓冲液与超纯水的比例为 1:9)。

用小鼠固定器固定小鼠, 用 75% 乙醇擦拭小鼠尾巴, 剪掉小鼠尾部约 1 cm 进行取血, 将采集的血液置于 EDTAK 抗凝管中, 以防血液凝结。取 50 μL 血液, 置于流式管内, 然后加入 1 mL 红细胞裂解液, 抽吸混匀, 静置 3 min。待液体透亮后放入超低温离心机中 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min。加入 SB 缓冲液, 抽吸混匀后再次 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 此过程重复 2 次, 洗去红细胞裂解液。每管中加入 50 μL 的 SB 缓冲液重悬细胞沉淀后, 加入 CD11b 抗体, 冰上避光孵育 30 min 后, 离心, 弃上清。最后加入 2% 的 PFA 固定, 置于 4 °C 避光保存, 等待上机检测。

1.2.3 骨髓细胞制备及处理

处死小鼠后, 用酒精棉球将后肢擦拭干净, 从股骨头接合处将后肢剪下。将毛发及皮肤清理干净, 然后将胫骨和股骨中的肌肉和结缔组织去除, 浸入 SB 缓冲液中清洗干净。切断股骨和胫骨的两端, 用注射器将骨髓冲洗出来, 可冲洗多次。

用 70 μm 的尼龙网过滤细胞悬液至离心管中, 进行 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 弃上清。加入红细胞裂解液, 吹打混匀, 静置 5 min, 之后再次 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min。加入 SB 缓冲液, 重悬后进行 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 洗去红细胞裂解液。加入 CD11b 抗体, 冰上避光孵育 30 min。之后每管加入 SB 缓冲液, 1000 r/min, 4 °C, 离心 5 min。洗去未结合的抗体。经 70 μm 尼龙网再次过滤于流式管中。最后每管内加入 2% 的 PFA 固定, 置于 4 °C 避光保存, 等待上机检测。

1.2.4 肝、肺和脾单细胞悬液的制备及处理

用 5% 的戊巴比妥钠, 按照 50 mg/kg 的剂量腹

腔注射小鼠,待小鼠完全麻醉后,固定于手术台上。剪掉胸腹部皮肤,经心脏灌注。灌注结束之后,剪下小鼠的肝、脾和肺。按照试剂盒的要求称取相应重量的组织。将小鼠组织剪碎,按照说明书加入对应体积的预混试剂,一并放入组织处理管中。将组织处理管置于单细胞悬液制备仪 DSC-400 的管套中,选择对应程序。

程序结束后,取 70  $\mu\text{m}$  尼龙网对制备好的单细胞悬液进行过滤,置于离心管中,1200 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min,弃上清。加入红细胞裂解液,静置 5 min 后,加入 DMEM 终止消化,1500 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$  再次离心 5 min。加入 SB 缓冲液后进行离心,将红细胞裂解液洗去。加入 CD11b 抗体,冰上避光孵育 30 min。加入 SB 缓冲液 1000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$ ,离心 5 min,经 70  $\mu\text{m}$  尼龙网再次过滤于 BD Falcon 流式管中。最后每管内加入 200  $\mu\text{L}$  的 2% 的 PFA 固定,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  避光保存,等待上机检测。

1.3 统计学分析

运用 GraphPad Prism 9.0 进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用两独立样本  $t$  检验,计量资料以平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的基因鉴定结果

*Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠是在 *Lyz2* 基因终止密码子之后定点敲入 IRES DTREGFP 表达框的基因重组小鼠。通过 PCR 检测 *Lyz2* IRES DTREGFP 小鼠的基因型,含有 DTREGFP 基因的实验组小鼠在 326 bp 和 512 bp 的位置有条带,阴性对照组仅在 326 bp 处有条带,在 512 bp 处无条带,如图 1。

2.2 小鼠肺、肝、脾、骨髓和外周血中 GFP<sup>+</sup>细胞所占比例

取小鼠肝、肺、脾、骨髓和外周血进行流式检测,观察 GFP 阳性细胞所占比例。如图 2 结果所示,小鼠肝、肺、脾、骨髓和外周血中均能表达 GFP 阳性细胞,其比例分别为 (3.887  $\pm$  1.457)%、(8.223  $\pm$  6.069)%、(21.03  $\pm$  12.28)%、(62.87  $\pm$  16.88)和 (40.47  $\pm$  5.835)%,其中肺和肝中 GFP 阳性细胞所占比例最少,而外周血、骨髓和脾中所占比例较多。所以本实验后续仅针对外周血、骨髓和脾进行流式检测,进一步观察 DT 对 GFP 阳性细胞的影响。

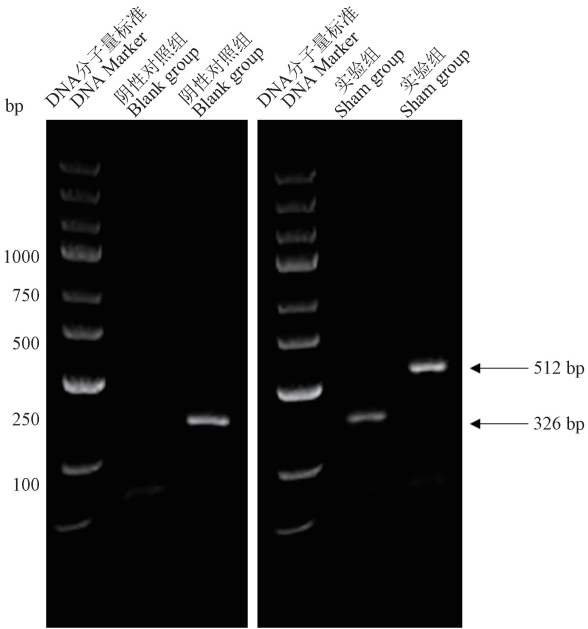


图 1 小鼠基因型 PCR 鉴定  
Figure 1 Genetic identification of mice by PCR

2.3 小鼠注射 DT 后不同时间点脾中 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞的变化规律

流式细胞术检测实验组注射 DT 后 1、3 和 5 d 的脾组织中 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞的变化规律。CD11b 为单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞的标志物,因此本文将 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>定义为单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞的标志。如图 3 所示,实验组与阴性对照组相比,脾中 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞的所占比为 (13.73  $\pm$  2.994)%。并且在实验组注射 DT 后,脾中的 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞所占比例明显减少到 (10.27  $\pm$  1.246)% ( $P < 0.01$ )。在注射 DT 后 1 d, GFP<sup>+</sup> 细胞被迅速减少达到 (3.468  $\pm$  0.5862)%,证明 DT 能成功减少 70% 左右的 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞,但之后细胞会逐渐开始恢复。由此结果表明,DT 能成功减少脾中 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>的细胞,并且与注射 DT 前相比,在注射后 1 d 具有显著性差异( $P < 0.01$ )。

2.4 小鼠注射 DT 后不同时间点外周血中 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞的变化规律

如图 4 所示,实验组与阴性对照组相比,外周血中能成功表达 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞。并且在注射 DT 后,外周血中的 CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞所占比例明显减少 (14.64  $\pm$  1.986)%。在注射完 DT 后,CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞开始减少 (14.27  $\pm$  4.541)%,并且持续到注射后 3 d。在注射后 3 d 时,CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞所



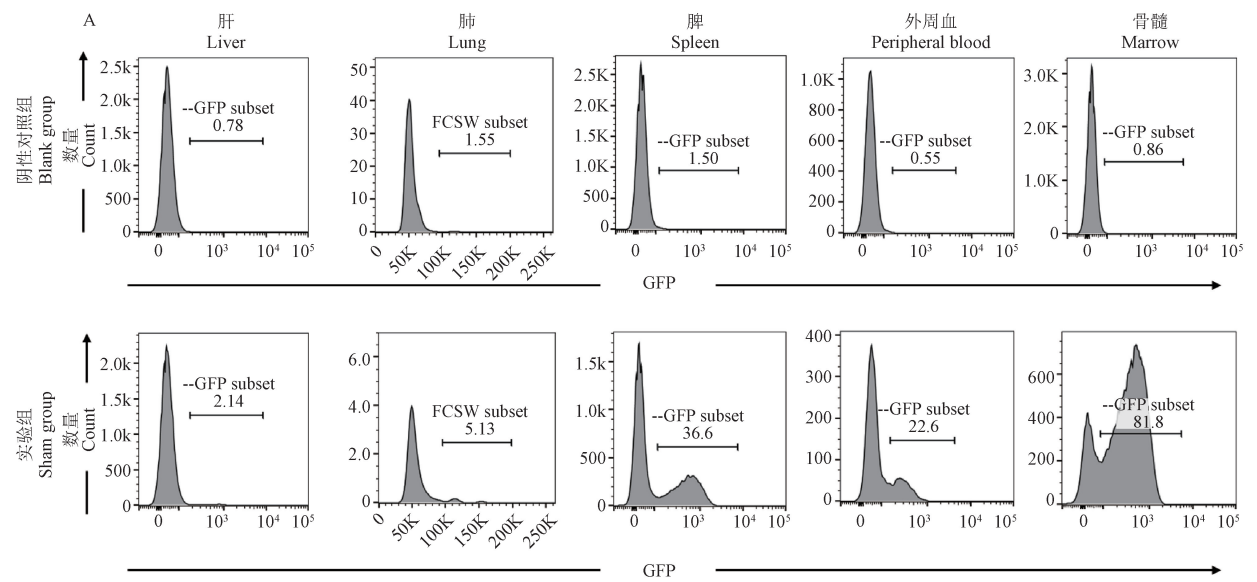
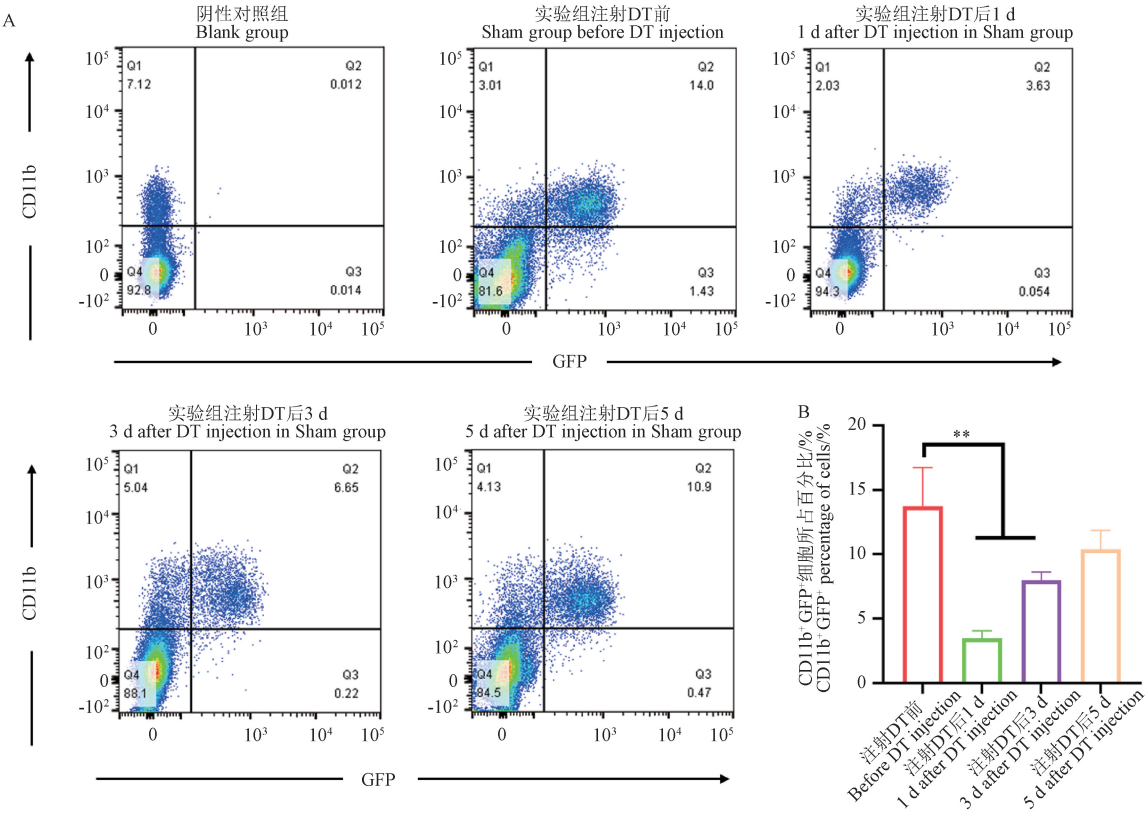


图 2 肝、肺、脾、外周血和骨髓中 GFP 阳性细胞所占比例( $n = 3$ )

Figure 2 Proportion of GFP<sup>+</sup> cells in liver, lung, spleen, peripheral blood and marrow( $n = 3$ )



注:A:流式检测阴性对照组与实验组在未注射 DT 与注射 DT 后脾中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞的代表性图片;B:实验组注射 DT 后不同时间点 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 统计图;与注射 DT 前相比, \*\*  $P < 0.01$ 。(下图同)

图 3 脾中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞随时间变化的规律( $n = 6$ )

Note. A. Representative images of CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells in the spleen of blank group and sham group before and after DT injection by flow assay. B. Statistics of CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> at different time points after DT injection in sham group. Compared with before DT injection, \*\*  $P < 0.01$ . (The same in the following figures)

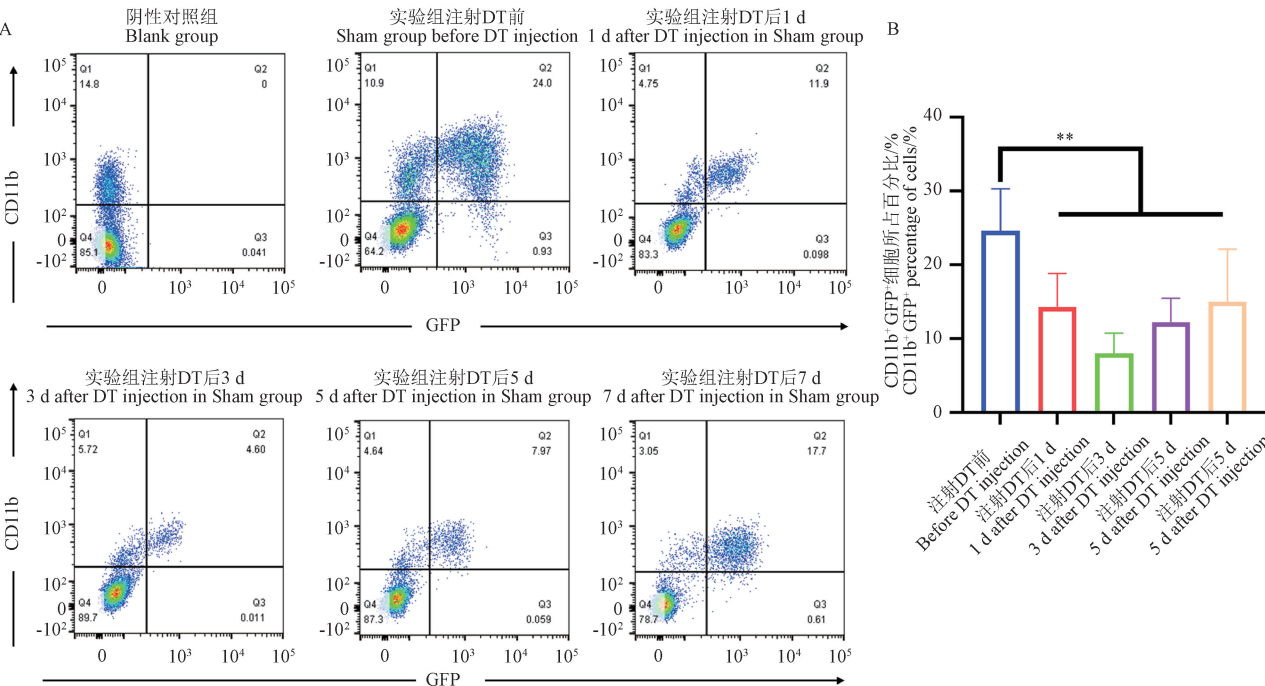
Figure 3 Pattern of CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells in the spleen over time( $n = 6$ )

占比例达到最低 ( $7.982 \pm 2.729$ )%, 与注射 DT 前有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 证明 DT 能成功减少外周血中 60% ~ 70% 的 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞, 之后细胞会逐渐开始恢复。由此结果表明, DT 能成功减少外周血中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 的细胞, 并且在注射后 3 d 时达到最低值。

2.5 小鼠注射 DT 后不同时间点骨髓中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞的变化规律

如图 5 所示, 实验组与阴性对照组相比, 骨髓中

能成功表达 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞; 脾中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞的比例为 ( $65.23 \pm 4.261$ )%。并且在注射 DT 后, 骨髓细胞中的 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞所占比例明显减少 ( $14.25 \pm 3.685$ )%。在注射后 1 d 时, CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞被迅速减少, 最少可达到 ( $50.98 \pm 7.957$ )%, 且 DT 能成功减少 20% 左右的 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞, 在此之后细胞会逐渐开始恢复。由此结果表明, DT 能成功减少骨髓中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 的细胞, 并且在注射后 1 d 时达到最低值。



注: A: 流式检测阴性对照组与实验组在未注射 DT 与注射 DT 后外周血中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞的代表图片; B: 实验组注射 DT 后不同时间点 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 统计图。

图 4 外周血中 CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> 细胞随时间变化的规律 ( $n = 6$ )

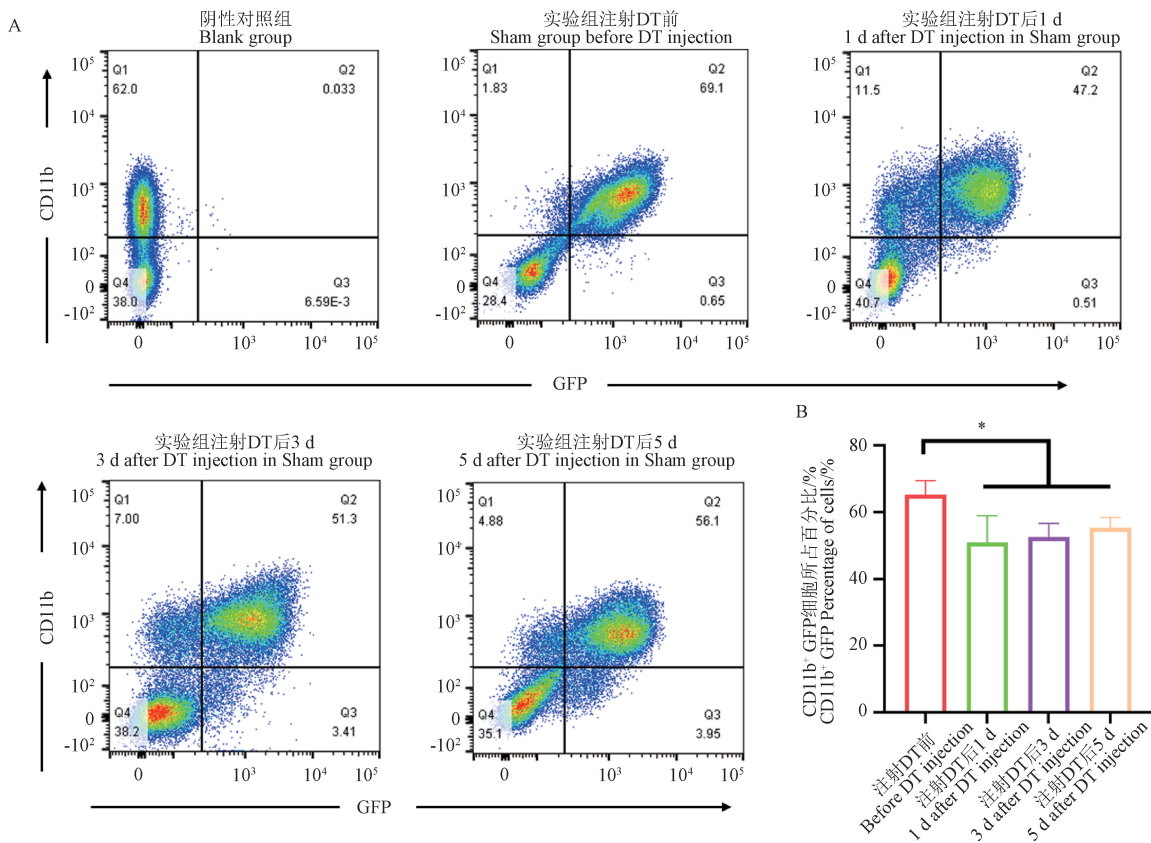
Note. A. Representative pictures of CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells in peripheral blood of blank group and sham group without and after DT injection by flow assay. B. Statistics of CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> at different time points after DT injection in sham group.

Figure 4 Patterns of CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> cells in peripheral blood over time ( $n = 6$ )

3 讨论

先天免疫系统包括一系列的细胞及其相关机制, 是抵御入侵病原体的第一道防线<sup>[11]</sup>。在各种免疫系统疾病中, 髓系细胞发挥着重要作用。其中, 中性粒细胞在循环的白细胞中占主要比例, 也是先天免疫中最主要的细胞成分, 同时也是最先到达感染部位或受伤组织的细胞<sup>[12]</sup>。中性粒细胞的颗粒中含有多种毒素, 可以杀死或抑制细菌、真菌的生长, 通过其独特的效应功能 (如吞噬作用和细胞外陷阱) 来对抗病原体, 执行各种效应机制来介导先

天免疫<sup>[13-14]</sup>。巨噬细胞作为最有效率的吞噬细胞, 可以吞噬很大数量的微生物或其他细胞, 细菌物质分子与巨噬细胞表面受体的结合会触发巨噬细胞对细菌的包裹作用和杀伤作用<sup>[15-16]</sup>。此外, 免疫细胞的存活和功能还会受到氧化还原的控制, 并且取决于活性氧/活性氮 (reactive oxygen species/reactive nitrogen species, ROS/RNS) 的细胞内和细胞外水平<sup>[17]</sup>。因此, 免疫代谢还与氧化还原反应密不可分。在病理状态下, 髓系细胞还会分泌一些相关蛋白和细胞因子, 在急性炎症的发生、发展和消退中



注:A:流式检测阴性对照组与实验组在未注射DT与注射DT后骨髓中CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞的代表图片;B:实验组注射DT后不同时间点CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>统计图;与注射DT前相比,\**P* < 0.05。

图5 骨髓中CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞随时间变化的规律(*n* = 6)

Note. A. Representative pictures of CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells in bone marrow of blank group and sham group without and after DT injection by flow assay. B. Statistics of CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> at different time points after DT injection in sham group. Compared with before DT injection, \**P* < 0.05.

Figure 5 Pattern of CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> cells in bone marrow over time(*n* = 6)

至关重要<sup>[18]</sup>。例如,肿瘤浸润性髓系细胞,主要包括巨噬细胞、骨髓来源的抑制性细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSCs)和中性粒细胞,通过分泌多种促血管生成因子来调节肿瘤血管的生成<sup>[19]</sup>。不仅如此,髓系细胞还在多种疾病中发挥了关键性的作用。例如,在急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)中,中性粒细胞弹性蛋白酶和M2巨噬细胞的比例会增加<sup>[20]</sup>。在组织愈合过程中,有来自NaV1.8的感觉神经元通过髓系细胞促进组织愈合<sup>[21]</sup>。尽管已知巨噬细胞和中性粒细胞在组织受伤或感染时会最先发生反应,但它们对某些疾病确切的发病机制仍然难以确定<sup>[22]</sup>。因此,想要明确的获得髓系细胞在各种病理条件下发挥的具体功能,还需要对髓系细胞进行更为精确的研究。因此,本研究选择了一种新的DTR转基因小鼠品系Lyz2 IRES DTREGFP。

白喉毒素是一种由白喉杆菌释放的蛋白质,肝

素结合性表皮生长因子(heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)充当DTR,但小鼠HB-EGF前体不能有效地与DT结合。因此,小鼠细胞对DT诱导的细胞死亡表现不明显。通过将灵长类DTR引入特定小鼠细胞中,可以使此类细胞群对DT敏感,并在DT注射时诱导这些细胞死亡,从而达到细胞的特异性耗竭<sup>[23]</sup>。该小鼠就是通过将DTR与EGFP结合后通过同源重组的方式将DTREGFP插入到小鼠的Lyz2基因位点。插入DTREGFP基因的小鼠,在髓系细胞上就能特异性的表达带有绿色荧光的DTR,在注射DT后,便能与DT结合,达到髓系细胞的特异性耗竭。

本实验结果表明,在小鼠肝、肺、脾、外周血和骨髓中存在GFP<sup>+</sup>细胞,并且CD11b也能成功检测到在GFP阳性细胞上表达。Lyz2 IRES DTREGFP小鼠经过DT连续3 d的腹腔注射,CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>细胞明显减少,并且在脾和骨髓细胞中,CD11b<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>

细胞在注射后 1 d 时就开始减少,随后开始恢复。在外周血中,CD11b<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup>细胞在注射后 3 d 时比例达到最少,之后也开始逐渐恢复,或许与 DT 的应用时间、骨髓每天能产生大量的髓系细胞以及没有完全耗竭髓系细胞有密切关系。因此,髓系细胞的连续减少需要持续低剂量的注射 DT 来维持,该结果也与之前的一些耗竭实验的结果相似<sup>[24-25]</sup>。综上所述,白喉毒素对 *Ly2z* IRES DTREGFP 小鼠体内单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞具有一定耗竭作用,且不同的部位作用的最佳时间不同。这为之后研究髓系细胞在多个层面的功能及机制提供了良好的工具,以及对耗竭条件方面的研究提供参考依据。

参 考 文 献(References)

[ 1 ] WANG H, LIU S, ZHAN J, et al. Shaping the immune-suppressive microenvironment on tumor-associated myeloid cells through tumor-derived exosomes [J]. *Int J Cancer*, 2024, 154 (12): 2031–2042.

[ 2 ] XUE P, CHANG Z, CHEN H, et al. Macrophage membrane (MMs) camouflaged near-infrared (NIR) responsive bone defect area targeting nanocarrier delivery system (BTNDS) for rapid repair: promoting osteogenesis via phototherapy and modulating immunity [J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 87.

[ 3 ] OESTERLE A, BOWMAN M A. S100A12 and the S100/calgranulins: emerging biomarkers for atherosclerosis and possibly therapeutic targets [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(12): 2496–2507.

[ 4 ] FAN X, YAN Z, LIN Y, et al. Mechanism exploration of zoledronic acid combined with PD-1 in the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2024, 73(4): 62.

[ 5 ] CHEN M, WU G, LU Y, et al. A p21-ATD mouse model for monitoring and eliminating senescent cells and its application in liver regeneration post injury [J]. *Mol Ther*, 2024, 32(9): 2992–3011.

[ 6 ] GILLIS C M, REBER L L. PMNDTR mice: a new model to study neutrophils *in vivo* [J]. *Med Sci*, 2018, 34(4): 339–343.

[ 7 ] BUCH T, HEPPNER F L, TERTILT C, et al. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration [J]. *Nature methods*, 2005, 2(6): 419–426.

[ 8 ] SINHA P, CHI H H, KIM H R, et al. Mouse lysozyme-M knockout mice reveal how the self-determinant hierarchy shapes the T cell repertoire against this circulating self antigen in wild-type mice [J]. *J Immunol*, 2004, 173(3): 1763–1771.

[ 9 ] LU N, WANG L, CAO H, et al. Activation of the epidermal growth factor receptor in macrophages regulates cytokine production and experimental colitis [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (3): 1013–1023.

[10] TIAN X, WANG Y, LU Y, et al. Conditional depletion of macrophages ameliorates cholestatic liver injury and fibrosis via lncRNA-H19 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 646.

[11] SADEGHI M, DIVANGAHI M. Discovering adaptive features of innate immune memory [J]. *Immunol Rev*, 2024, 323(1): 186–196.

[12] LIU Q, WU Y, CHEN G, et al. Umbilical cord blood-derived neutrophils possess higher viability than peripheral blood derived neutrophils [J]. *Am J Cancer Res*, 2024, 14(3): 1190–1203.

[13] LIEW P X, KUBES P. The neutrophil’s role during health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(2): 1223–1248.

[14] JIA M, FU H, JIANG X, et al. DEL-1, as an anti-neutrophil transepithelial migration molecule, inhibits airway neutrophilic inflammation in asthma [J]. *Allergy*, 2024, 79(5): 1180–1194.

[15] SÉVOZ-COUCHE C, LIAO W, FOO H Y C, et al. Direct vagus nerve stimulation: a new tool to control allergic airway inflammation through α7 nicotinic acetylcholine receptor [J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(13): 1916–1934.

[16] WU K, YUAN Y, YU H, et al. The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates GVHD by inducing M1 macrophage polarization in mice [J]. *Blood*, 2020, 136(4): 501–515.

[17] SIES H, JONES D P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(7): 363–383.

[18] ENDO-UMEDA K, NAKASHIMA H, KOMINE-AIZAWA S, et al. Liver X receptors regulate hepatic F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Kupffer cells/macrophages and innate immune responses in mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9281.

[19] WEIS S M, CHERESH D A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1359–1370.

[20] SONG P, YAKUFUJIANG Y, ZHOU J, et al. Identification of important genes related to aniois in acute myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(8): e18264.

[21] LU Y Z, NAYER B, SINGH S K, et al. CGRP sensory neurons promote tissue healing via neutrophils and macrophages [J]. *Nature*, 2024, 628(8008): 604–611.

[22] SOLDANO S, SMITH V, MONTAGNA P, et al. Nintedanib downregulates the profibrotic M2 phenotype in cultured monocyte-derived macrophages obtained from systemic sclerosis patients affected by interstitial lung disease [J]. *Arthritis Res Ther*, 2024, 26(1): 74.

[23] IWAMOTO R, HIGASHIYAMA S, MITAMURA T, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity [J]. *EMBO J*, 1994, 13(10): 2322–2330.

[24] PARK I, GODDARD M E, COLE J E, et al. C-type lectin receptor CLEC4A2 promotes tissue adaptation of macrophages and protects against atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 215.

[25] CHUNG J Y, KRAPP N, WU L, et al. Interleukin-1 receptor 1 deletion in focal and diffuse experimental traumatic brain injury in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(2): 370–379.