

文章编号 1006-8147(2018)01-0010-04

论 著

NKp46-Cre 介导的 YFP 报告基因系统标记小鼠 NK 细胞的特异性和效率检测

于明航¹, 李杨¹, 阎晗¹, 王瑾¹, 黄珊¹, 袁顺宗², 尹洁¹, 李泽兴¹, 王玺¹

(1.天津医科大学细胞生物学系,天津 300070;2.中国人民解放军 307 医院头颈肿瘤科,北京 100853)

摘要 目的:检测 NKp46-Cre 介导的黄色荧光蛋白(YFP)报告基因系统在小鼠体内自然杀伤细胞的效率以及特异性。方法:通过 ROSA26R-YFP 与 NKp46-Cre 小鼠杂交产生后代并且利用基因型鉴定的方法筛选出双阳性的基因型小鼠,流式细胞术检测小鼠体内免疫器官淋巴结、脾脏以及骨髓中的 YFP 的表达效率,然后用细胞表面抗体标记脾脏的淋巴细胞,分析淋巴细胞群体中 YFP 阳性细胞的百分比。结果:选取 ROSA26R-YFP 与 NKp46-Cre 小鼠杂交后代中基因型为 ROSA26R-YFP(+/+)Cre(+/-)的小鼠为实验组,ROSA26R-YFP(-/-)Cre(-/-)的小鼠为对照组;流式细胞术分析免疫器官(淋巴结、骨髓、脾脏)YFP 的阳性细胞的比例分别为 0.589%±1.02%、1.89%±1.28%、4.53%±1.54%,对照组 YFP 的阳性细胞的比例分别为 0.008%±0.003%、0.126%±0.08%、0.12%±0.004%;两种小鼠的非免疫器官(心脏)YFP 阳性的细胞为 0.009%±0.0002%、0.03%±0.012%;脾脏淋巴细胞系中各免疫细胞(NK 细胞、T 细胞、B 细胞)YFP 阳性百分比为 89.4%±1.08%、0.89%±0.56%、0.82%±0.82%。结论:NKp46-Cre 介导的 YFP 报告基因系统标记 NK 细胞具有明显的特异性。

关键词 免疫器官;自然杀伤细胞;转基因小鼠;荧光报告系统;Cre 重组酶

中图分类号 R392

文献标志码 A

Specificity and efficiency of NK cells labeled by NKp46-Cre induced YFP reporter system in mice

YU Ming-hang¹, LI Yang¹, YAN Han¹, WANG Jin¹, HUANG Shan¹, YUAN Shun-zong², YIN Jie¹, LI Ze-xing¹, WANG Xi¹

(1.Department of Cell Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Head and Neck Oncology, Chinese People's Liberation Army 307 Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract **Objective:** To detect the efficiency and specificity of YFP labeled NK cells by the NKp46-Cre mediated YFP reporting system in mice. **Methods:** Two-positive genotype mice were screened by ROSA26R-YFP and NKp46-Cre mice using genotype identification. Flow cytometry was used to detect the expression efficiency of YFP in the immune organs, spleen and bone marrow of mice, and then the lymphocytes of spleen were labeled by cell surface antibody, and the percentage of YFP positive cells in lymphocyte population was analyzed. **Results:** The mice with genotype ROSA26R-YFP(+/+)Cre(+/-) from ROSA26R-YFP and NKp46-Cre mice were selected as experimental group, the mice selected ROSA26R-YFP(-/-)Cre(-/-) were the control group and the proportions of the positive cells of the immune organs (lymph node, bone marrow, spleen) were 0.589%±1.02%, 1.89%±1.28%, 4.53%±1.54%, the proportion of YFP positive cells in control group were 0.008%±0.003%, 0.126%±0.08%, and 0.12%±0.004%; there were no distinct YFP positive cells 0.009%±0.0002%, 0.03%±0.012% in the non-immune organs (heart) of the two mice, and the YFP positive percentages of each immune cell(NK cell, T cell, B cell) in splenic lymphocyte system were 89.4%±1.08%, 0.89%±0.56%, and 0.82%±0.82%. **Conclusion:** YFP marked NK cells through NKp46-Cre induced YFP reporter system in mice may have high specificity and efficiency.

Key words immune organs; natural killer cells; transgenic mice; fluorescence reporting system; Cre recombinase

自然杀伤细胞(natural killer cells, NK cells)是机体进行免疫防疫的第一道防线,主要是抵抗细菌、真菌、病毒以及病原微生物的入侵^[1-3],同时 NK 细胞在抗肿瘤免疫方面也扮演着重要的角色^[4-6]。但是 NK 细胞在发育和功能等方面还有许多的未知机制。利用转基因小鼠研究 NK 的发育与功能是一个

非常有效的工具。NKp46-Cre 转基因小鼠是对表达 NKp46 受体的 NK 细胞进行特异性敲除的工具鼠^[7-8]。在本次研究中,主要是利用 ROSA26R-YFP 小鼠与 NKp46-Cre 小鼠杂交,通过对小鼠体内细胞 YFP 的表达验证 NKp46-Cre 的敲除效率以及是否具有特异性,目的是构建 YFP 基因报告系统,为进一步研究 NK 细胞的功能与发育做好基础。

1 材料与方法

1.1 材料 ROSA26R-YFP 转基因小鼠(哈佛医学院惠赠),NKp46-Cre 转基因小鼠(中国解放军 307

基金项目 国家重点基础研究发展计划基金资助(2014CB910100);

国家自然科学基金资助项目(31600705,31600693)

作者简介 于明航(1991-),男,硕士在读,研究方向:肿瘤免疫;通信

作者:王玺,E-mail:wangxi@tmu.edu.cn。

医院袁顺宗老师惠赠);鼠尾碱性裂解液(25 mmol/L NaOH;EDTA.Na₂ 0.2 mol/L),鼠尾酸性中和液(Tris-HCl 40 mmol/L,pH=5)Tag DNA 聚合酶(康成);普通 PCR 仪(ABI);流式细胞仪(BD);Percific Blue-CD3e (BD),APC-CD19(BD);PE-NKp46(BD);引物由北京奥科合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物

Tab 1 PCR primers

引物名称	引物序列
YFP A	GGAGCGGAGAAATGGATATG
YFP B	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
YFP C	AAGACCGCGAAGAGTTTGTC
Cre A	AATTGGTCTGGCATGCATAATC
Cre B	AGTAGGAAGGAAATATTCCCATGG
Cre C	CACACCGGCCTTATTCCAAG

1.2 实验方法

1.2.1 基因型鉴定 ROSA26R-YFP (+/-) 小鼠与 NKp46-Cre (+/-) 小鼠杂交,子代在出生 25 d 左右进行耳标编号,并剪鼠尾进行基因型鉴定。将鼠尾浸泡含有 75 μ L 的碱性裂解液的离心管中,将离心管置于 100 $^{\circ}$ C 金属水浴锅 30 min;冰上裂解 5 min;5 min 后向样品中加入 75 μ L 的酸性中和液并将鼠尾吹打均匀,Nanodrop 2000 测浓度;按照 Tag DNA 聚合酶试剂盒进行配制 PCR 体系;95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳进行,结束后在凝胶成像仪中记录结果。

1.2.2 流式细胞术检测各个组织器官 YFP 的表达 颈椎脱臼法处死 ROSA26R-YFP (+/+)NKp46-Cre (+/-) 和 ROSA26R-YFP (-/-)NKp46-Cre (-/-) 的小鼠,分别取两种小鼠的脾脏、骨髓、淋巴结和心脏,将组织在 1640 培养基中研磨,用细胞筛网过滤,制成单个悬浮细胞,通过细胞计数,选取 1 \times 10⁶ 个细胞进行流式上机,最后用 FlowJo 软件进行分析。

1.2.3 流式细胞术检测脾脏中各个免疫细胞的 YFP 的阳性效率 按 1.2.2 的方法提取脾脏的淋巴细胞;将 YFP 双阳性的带有 NKp46-Cre 的小鼠淋巴细胞每 1 \times 10⁶ 个细胞制成单个悬浮细胞于 3 个管,分别标记 CD3、CD19、NKp46;分别加入 1 μ L 抗体标记的 Percific Blue-CD3e,APC-CD19,PE-NKp46,并且每管都加入 1 μ L NKp46 的抗体,室温避光 30 min;300 g,5 min 离心收集细胞,最后用 300 μ L 的 PBS 重悬,另外需要一个含有 2 \times 10⁶ 个细胞 Negative 管,500 μ L PBS 重悬,最后将样品转入流式管,准备流式上机,最后用 FlowJo(7.6)软件进行分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间样品均数比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型鉴定 ROSA26R-YFP (+/-) 小鼠与 NKp46-Cre (+/-) 小鼠杂交后代共有 14 只小鼠,提取基因组 DNA 并进行基因型鉴定。已知 YFP 野生型的 PCR 条带为 600 bp(YFP⁻),而 YFP 阳性的 PCR 条带为 320 bp (YFP⁺),Cre 野生型的 PCR 条带为 454 bp(Cre⁻),而 YFP 阳性的 PCR 条带为 282 bp(Cre⁺),基因型结果鉴定见图 1、表 2。根据表格选择对照组和实验组。

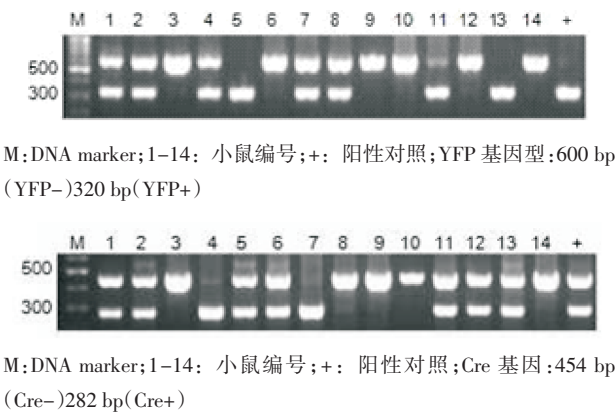


图 1 ROSA2R-YFP (+/-) 与 NKp46-Cre (+/-) 杂交小鼠后代基因型鉴定结果

Fig 1 The YFP genotyping results of the hybrid mice ROSA26R-YFP (+/-) and NKp46-Cre (+/-)

表 2 ROSA2R-YFP (+/-) 与 NKp46-Cre (+/-) 杂交小鼠后代基因型鉴定结果

Tab 2 The genotyping results of the hybrid mice ROSA26R-YFP (+/-) and NKp46-Cre (+/-)

标号	基因型	实验分组
1	YFP (+/-) Cre (+/-)	对照组
2	YFP (+/-) Cre (+/-)	
3	YFP (-/-) Cre (-/-)	
4	YFP (+/-) Cre (+/+)	
5	YFP (+/+) Cre (+/-)	实验组
6	YFP (-/-) Cre (+/-)	
7	YFP (+/-) Cre (+/+)	
8	YFP (+/-) Cre (-/-)	
9	YFP (-/-) Cre (-/-)	对照组
10	YFP (-/-) Cre (-/-)	
11	YFP (+/+) Cre (+/-)	实验组
12	YFP (-/-) Cre (+/-)	
13	YFP (+/+) Cre (+/-)	实验组
14	YFP (-/-) Cre (-/-)	

2.2 各个组织器官中 YFP 阳性的表达 流式细胞术检测根据基因型鉴定结果分成的实验组 ROSA26R-YFP (+/+)NKp46-Cre (+/-) 和对照组 ROSA26R-YFP(-/-)NKp46-Cre(-/-)小鼠的免疫器官(脾脏、淋巴结、骨髓)和非免疫器官(心脏)中细胞 YFP 阳性的表达,见图 2。双阳性小鼠淋巴结、骨髓、脾脏中 YFP 的阳性细胞数百分比分别为 $0.589\% \pm 1.02\%$ 、 $1.89\% \pm 1.28\%$ 、 $4.53\% \pm 1.54\%$;阴性

对照 YFP(-/-)Cre(-/-)小鼠相对应的器官 YFP 阳性百分比分别为 $0.008\% \pm 0.003\%$ 、 $0.126\% \pm 0.08\%$ 、 $0.12\% \pm 0.004\%$;与对照组相比均有统计学差异。两组小鼠的心脏细胞中基本没有 YFP 的表达,其中 YFP 的表达百分比分别为 $0.009\% \pm 0.0002\%$ 、 $0.03\% \pm 0.012\%$,两组之间没有明显统计学差异。NKp46-Cre 介导的 YFP 的表达在免疫器官中具有特异性。

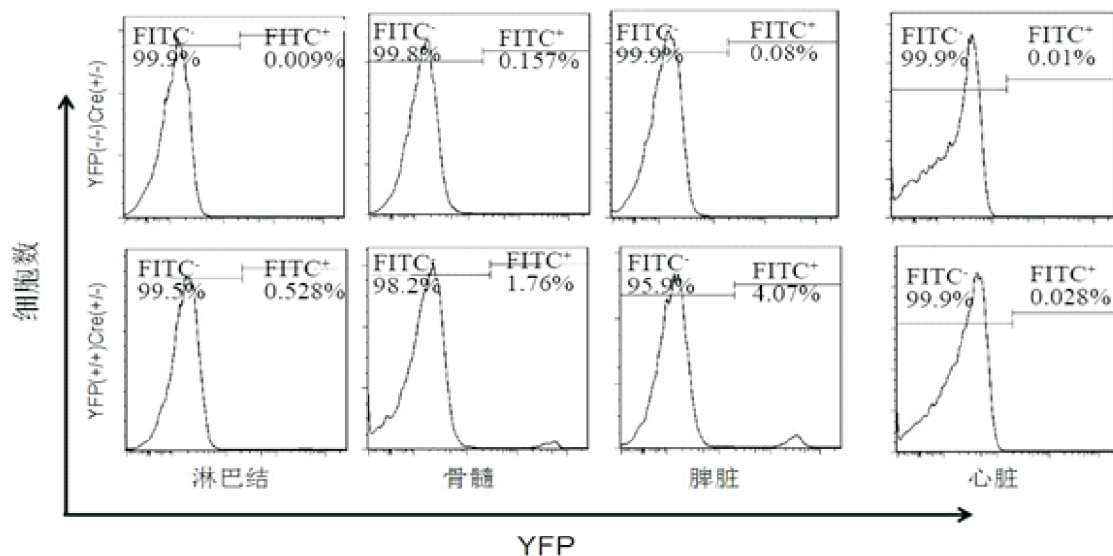


图 2 免疫器官(淋巴结、骨髓、脾脏)和非免疫器官(心脏)的 YFP 表达情况

Fig 2 The expression levels of YFP in immune organs and non-immune organs

2.3 脾脏淋巴细胞系中 YFP 阳性的表达效率 流式细胞术检测 ROSA26R-YFP(+/-)NKp46-Cre(+/-)小鼠脾脏中淋巴细胞系(T cells、B Cells、NK cells)的 YFP 标记阳性细胞的百分比。ROSA26R-YFP 阳性细胞标记 NK 细胞、T 细胞、B 细胞的百分比,分别

为 $89.4\% \pm 1.08\%$ 、 $0.89\% \pm 0.56\%$ 、 $0.82\% \pm 0.82\%$,在各种细胞中差异均有统计学意义,说明 NKp46-Cre 系统介导的 YFP 荧光报告系统可以准确代表小鼠体内的 NK 细胞(图 3)。

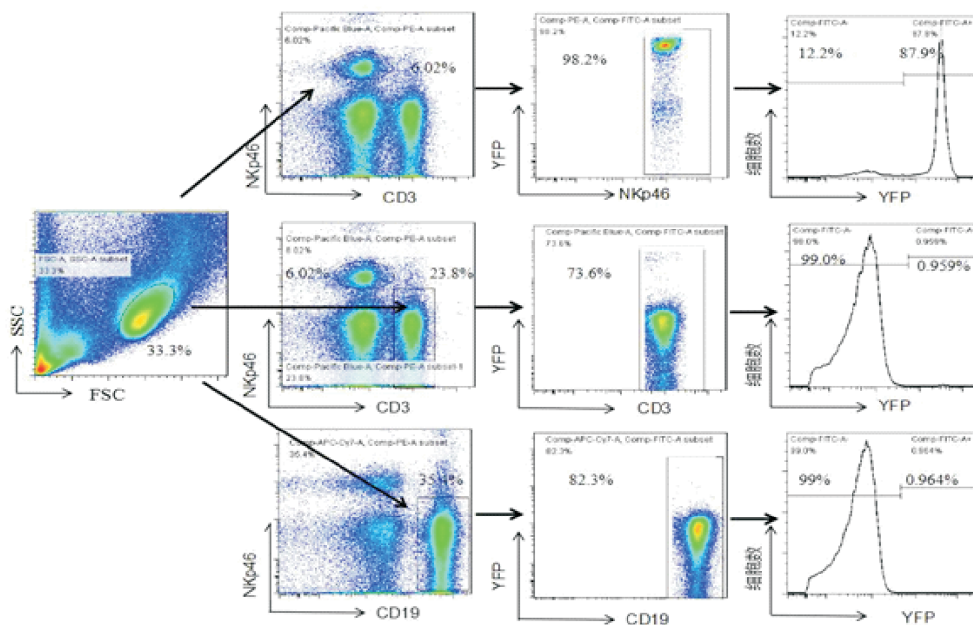


图 3 免疫器官脾脏淋巴细胞系中 YFP 的表达情况

Fig 3 The percentages of YFP in spleen lymphocyte lineage of immune organ

3 讨论

自然杀伤细胞是固有免疫系统中一类重要的免疫细胞,它主要分布于次级淋巴组织器官以及外周血中^[9-11],NK 细胞不像 T 细胞,它不需要预先致敏就能发挥杀伤作用或分泌细胞因子、趋化因子等能力^[12-14]。截止到目前为止,对 NK 细胞的发育分化以及功能方面的调控仍然存在很多的未知,而现在转基因小鼠的应用,对于 NK 细胞的进一步研究提供了非常有效的工具。

NKp46-Cre 转基因小鼠是一种专门介导表达 NKp46 受体的 NK 细胞的敲除小鼠^[7]。现阶段,Cre 重组酶介导的基因敲除检测主要集中在基因组的基因型鉴定,RT-PCR 以及 Western 等技术在 DNA、mRNA 和蛋白水平上进行验证,而这些实验对于做免疫功能实验较为困难,并且不利于活体实验的研究。因此,在本次实验中引入了 ROSA26R-YFP 荧光报告基因小鼠与 NKp46-Cre 小鼠杂交,借助 Cre 重组酶系统切除 ROSA26R-YFP 荧光报告基因前面的终止子从而表达 YFP 蛋白^[15],形成观察 NK 细胞的一种有效手段。

在本次实验中,我们得到了 ROSA26R-YFP(+/-) 或 ROSA26R-YFP(+/+) 的 NK 细胞,并且在各个免疫器官(脾脏、淋巴结、骨髓)中得到 YFP 的阳性表达,证实了 YFP 阳性 NK 细胞的阳性表达率在 80% 以上,而在 ROSA26R-YFP(+/+) 纯合的小鼠中的阳性率更高达 90% 左右。虽然 YFP 标记 NK 细胞并不是 100%,可能还是与 Cre 重组酶的敲除效率有关,但其结果证实 YFP 阳性细胞可代表 NK 细胞,为了以后进一步的研究我们会采取 ROSA26R-YFP(+/+) 纯合的小鼠进行实验。

综上所述,本次实验结果表明 YFP 基因报告系统可行,在以后的实验中选择 YFP 阳性的细胞进行实验,对 NK 细胞的发育进行实时监测,有利于分析 NK 细胞的分化和增殖,而对于功能方面利用 YFP 阳性细胞进行杀伤实验,也有着重要的作用,因此,这个系统的建立可以更加深入地探讨 NK 细

胞地发育和功能方面的问题,为免疫细胞的研究提供了方向。

参考文献:

- [1] Zhang C, Tian Z. NK cell subsets in autoimmune diseases[J]. J Autoimmun, 2017, 83:22
- [2] Post M, Cuapio A, Osl M, et al. The Transcription factor ZNF683/HOBIT regulates human NK-cell development[J]. Front Immunol, 2017, 8:535
- [3] Holmes M L, Huntington N D, Thong R P, et al. Peripheral natural killer cell maturation depends on the transcription factor Aiolos[J]. EMBO J, 2014, 33(22): 2721
- [4] Bollino D, Webb T J. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer and natural killer T cells for cancer immunotherapy[J]. Transl Res, 2017, 187:32
- [5] Sun J C, Lanier L L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells [J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(10):645
- [6] Lopez-Soto A, Gonzalez S, Smyth M J, et al. Control of metastasis by NK cells [J]. Cancer Cell, 2017, 32(2):135
- [7] Narni-Mancinelli E, Chaix J, Fenis A, et al. Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(45):18324
- [8] Deng Y, Kerdiles Y, Chu J, et al. Transcription factor Foxo1 is a negative regulator of natural killer cell maturation and function[J]. Immunity, 2015, 42(3):457
- [9] Male V, Brady H J. Transcriptional control of NK cell differentiation and function[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2014, 381:173
- [10] Moretta L, Montaldo E, Vacca P, et al. Human natural killer cells: origin, receptors, function, and clinical applications[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2014, 164(4):253
- [11] Paolini R, Bernardini G, Molfetta R, et al. NK cells and interferons[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(2):113
- [12] Levy E M, Roberti M P, Mordoh J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications[J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:676198
- [13] Hsu H T, Mace E M, Carisey A F, et al. NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander killing[J]. J Cell Biol, 2016, 215(6):875
- [14] Leavy O. Maturation and function of NK cells[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(3): 150
- [15] Guan C, Ye C, Yang X, et al. A review of current large-scale mouse knockout efforts[J]. Genesis, 2010, 48(2):73

(2017-08-05 收稿)

(上接第 9 页)

- ternative targeting route to the endoplasmic reticulum[J]. Nature, 2016, 540(7631):134
- [11] Jang J S, Wang X, Vedell P T, et al. Custom gene capture and Next-Generation sequencing to resolve discordant ALK status by FISH? and IHC in lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(11): 1891
 - [12] Wang N, Du X, Zang L, et al. Prognostic impact of Metadherin-SND1 interaction in colon cancer[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 10497

- [13] Cappellari M, Bielli P, Paronetto M P, et al. The transcriptional co-activator SND1 is a novel regulator of alternative splicing in prostate cancer cells[J]. Oncogene, 2014, 33(29):3794
- [14] Heinrich E M, Wagner J, Krüger M, et al. Regulation of miR-17-92a cluster processing by the microRNA binding protein SND1[J]. FEBS Lett, 2013, 587(15):2405
- [15] Fashe T, Saarikettu J, Isomäki P, et al. Expression analysis of Tudor-SN protein in mouse tissues[J]. Tissue Cell, 2013, 45(1):21

(2017-03-04 收稿)