

文章编号 1006-8147(2022)03-0253-07

论著

## 髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠的构建及应用

纪辰燕,李星晨,陈桂冬,于津浦

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤分子诊断中心,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津恶性肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤免疫与生物治疗重点实验室,天津 300060)

**摘要** 目的:通过 Cre-loxP 基因敲除系统特异性敲除髓系 SOCS3 基因,构建早期髓系来源抑制细胞(eMDSCs)高浸润荷瘤鼠模型。方法:通过将 SOCS3<sup>fl</sup>小鼠与 Lyz2-Cre 小鼠杂交繁育,获得髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠,PCR 法鉴定小鼠基因型,Western 印迹验证基因敲除效果,流式细胞术检测髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠骨髓中 eMDSCs 比例及其对 T 细胞的抑制作用,并在该小鼠基础上分别构建乳腺癌、肺癌和黑色素瘤 3 种 eMDSCs 高浸润荷瘤鼠模型,流式细胞术检测肿瘤组织中 eMDSCs 浸润情况。结果:PCR 鉴定和 Western 印迹检测证实髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠构建成功,流式细胞术结果表明髓系 SOCS3 基因敲除小鼠骨髓中 eMDSCs 比例显著升高( $t=17.94, P<0.001$ ),且该群 eMDSCs 抑制 T 细胞增殖( $t=14.21, P<0.001$ )、促进 T 细胞凋亡( $t=13.53, P<0.001$ )。在黑色素瘤、乳腺癌、肺癌 3 种髓系特异性 SOCS3 基因敲除荷瘤鼠的肿瘤组织中 eMDSCs 数量显著增加( $t=24.14、24.56、14.93$ ,均  $P<0.001$ )。结论:通过髓系特异性 SOCS3 敲除可成功构建 eMDSCs 高浸润荷瘤鼠模型。

**关键词** Cre-loxP 系统;SOCS3 基因;组织特异性;小鼠;eMDSCs

中图分类号 R332

文献标志码 A

### Construction and application of myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice

Ji Chen-yan, Li Xing-chen, Chen Gui-dong, Yu Jin-pu

(Cancer Molecular Diagnostics Core, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center of Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Immunology and Biotherapy, Tianjin 300060, China)

**Abstract Objective:** To construct mouse models of cancer with high infiltration of eMDSCs through myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice based on the Cre-loxP system. **Methods:** SOCS3<sup>fl</sup> mice were crossed with Lyz2-Cre mice to generate myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice. The genotypes of the offspring were identified by PCR, and the knockout effect was verified by Western blotting. The proportion of eMDSCs in the bone marrow of myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice and their inhibitory effect on T cells were detected by flow cytometry. Based on the myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice, three kinds of tumor-bearing mouse models including breast cancer, lung cancer, and melanoma with high infiltration of eMDSCs were constructed, and the infiltration of eMDSCs in tumors was detected by flow cytometry. **Results:** PCR results and Western blotting analysis confirmed that myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice were successfully constructed. Flow cytometry results demonstrated that the proportion of eMDSCs in the bone marrow of myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice was significantly increased ( $t=17.94, P<0.001$ ), and the eMDSCs significantly inhibited T cell proliferation ( $t=14.21, P<0.001$ ) and promoted T cell apoptosis ( $t=13.53, P<0.001$ ). The number of eMDSCs was significantly increased in tumor tissue of three types of myeloid-specific SOCS3 gene knockout tumor-bearing mice with melanoma, breast cancer, and lung cancer ( $t=24.14, 24.56, 14.93$ , all  $P<0.001$ ). **Conclusion:** Mouse models of cancer with high infiltration of eMDSCs are successfully constructed by specifically knocking out the SOCS3 gene of mouse myeloid cells.

**Key words** Cre-loxP system; SOCS3 gene; tissue specificity; mouse; eMDSCs

髓系来源抑制细胞(MDSCs)是由不同分化阶段的髓系细胞构成的一群异质性细胞<sup>[1]</sup>。MDSCs 可以通过抑制抗肿瘤免疫反应,促进肿瘤的免疫逃逸<sup>[2]</sup>。同时,MDSCs 可以通过分泌血管内皮生长因子(VEGF)等生长因子,促进肿瘤局部血管生成<sup>[3]</sup>;或

通过促进肿瘤细胞发生上皮间充质转化(EMT),升高肿瘤干细胞(CSCs)的比例等途径,直接促进肿瘤的生长和转移<sup>[4-5]</sup>。根据表型差异,MDSCs 可分为单核 MDSCs(M-MDSCs)、多形核 MDSCs(PMN-MDSCs)和早期 MDSCs(eMDSCs)。eMDSCs 是一种新发现的亚群,具有不成熟表型 Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup>,可分化为 M-MDSCs<sup>[6]</sup>。eMDSCs 已被证实存在于肾细胞癌、头颈部癌、黑色素瘤和卵巢癌中,但其免

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81872143)

作者简介 纪辰燕(1994-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤学;通信作者:于津浦, E-mail: jyu@tmu.edu.cn。

疫抑制功能尚未被证实,目前缺乏针对肿瘤 eMDSCs 研究的荷瘤鼠模型<sup>[7-8]</sup>。前期研究中,笔者在构建的 4T1 乳腺癌小鼠模型中发现一群表型特征为 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>MHCII<sup>-</sup>的 eMDSCs。与经典 MDSCs 相比,这群 eMDSCs 具有更强的免疫抑制功能,且能转变成经典 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>MDSCs。且笔者研究发现,SOCS3 基因表达降低能影响髓系祖细胞的分化,促进 eMDSCs 的产生<sup>[9-10]</sup>。基于上述机制,笔者利用 Cre-loxP 系统构建髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠,并对其接种乳腺癌 E0771 细胞、肺癌 Lewis 细胞、黑色素瘤 B16 细胞,构建 3 种 eMDSCs 高浸润的荷瘤鼠模型,为研究 eMDSCs 促进肿瘤的分子机制和探索针对 eMDSCs 的靶向药物提供了重要的实验平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 7 只 SPF 级 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 杂合子小鼠(4 雄 3 雌),6~8 周龄,18~22 g,1 只 SPF 级雄性 Lyz2-Cre 鼠,7 周龄,20 g,均购于广州赛业生物技术有限公司[SCXK(苏)2020-0006],两种小鼠遗传背景皆为 C57BL/6J。SPF 级野生型 C57BL/6J 小鼠雌、雄各 3 只,6~8 周龄,18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[(SYXK(京)2019-0010)]。所有引进小鼠饲养于天津医科大学肿瘤医院实验动物中心[(SYXK(津)2017-0005)],按照 SPF 级标准饲养,室温(23±3)℃,12 h 光照/黑暗循环,自由取食、饮水,动物实验经天津医科大学肿瘤医院动物实验伦理委员会批准(AE-2021013),并按照《实验动物护理与指南》进行。

1.1.2 细胞系 本研究中使用的小鼠乳腺癌 E0771 细胞株购自中国医学科学院,小鼠肺腺癌 LLC (Lewis lung cancer) 细胞株购自广州赛库生物技术有限公司,小鼠黑色素瘤 B16(B16 melanoma)细胞株购自 ATCC,皆用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养。

1.1.3 实验材料 快速 DNA 提取扩增套装(天根生化科技有限公司),DNATriol(Invitrogen 有限公司),RT Response Kit,SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa),CD11b Micro Beads,Anti-Gr-1 antibodies,Anti-Biotin MicroBeads(美天旎生物有限公司),红细胞裂解液(碧云天),GAPDH 抗体、SOCS3 抗体(CST),羊抗鼠 IgG 单克隆抗体、羊抗兔 IgG 单克隆抗体(中杉金桥),Percp-anti-CD45 抗体、PE-anti-Gr-1 抗体、PE-anti-F4/80 抗体、FITC-anti-CD11b 抗体、FITC BrdU Flow Kit,Apoptosis Detection Kit(BD 有限公司),

APC anti-CD3 抗体(Biolegend 公司),Dynabeads® mouse T-Activator CD3/CD8 (Gibco,美国),T Cell Isolation Kit (MiltenyiBiotec,美国);荧光定量 PCR 仪(AB7500,Applied Biosystems,中国),普通 PCR 仪(BIO-RAD,美国),化学发光凝胶成像分析仪(BIO-RAD,美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠的构建 通过生物信息学分析验证小鼠基因组中 SOCS3 基因的 DNA 序列,并根据该序列构建敲除载体和基因打靶策略。酶切线性化载体,通过电穿孔法将上述线性化载体转入胚胎干细胞(ES 细胞),并通过药物进行抗药性筛选。通过 PCR 鉴定同源重组 ES 细胞克隆,并通过 Southern 印迹分析进行确认。通过显微注射将同源重组 ES 细胞移植到囊胚中,后将囊胚移植入代孕母鼠的子宫内获得子代嵌合体小鼠,将其与 flp 工具鼠交配,获得去除抗药基因的 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠。

1.2.2 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠的鉴定 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠基因型鉴定方法如下。区域一上游引物 F1(5'-GAAGATCC CTGATTCCTCCGTCATACTC-3')和下游引物 R1(5'-ATGGGGAGAGACACAAGAGCCCTA-3')用于首次 PCR 筛选,来自重组等位基因的 240 bp 片段代表阳性小鼠。区域二上游引物 F2(5'-CTGGGAAAACAGC CATCTATTCATCC-3')和下游引物 R2(5'-GTTGTTG CGTCTGCCCCAAACT-3')用于 PCR 再次确认,从阳性小鼠中扩增出来自重组等位基因的 324 bp 片段。

1.2.3 髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠的繁育 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠自交,PCR 鉴定 F2 代小鼠,筛选出 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠。将 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠与 Lyz2-Cre 工具鼠杂交获得 F3 代 SOCS3<sup>fl/fl</sup>-LysM-Cre<sup>+/+</sup> 小鼠。F3 代小鼠进行自交,获取髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠(SOCS3<sup>fl/fl</sup>-LysM-Cre<sup>+/+</sup> 小鼠,SOCS3<sup>ko</sup> 鼠)。

### 1.2.4 髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠的鉴定

1.2.4.1 DNA 提取 取鼠尾至无酶 EP 管,将其打碎处理为细胞悬液,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清后加入 200 μL 裂解缓冲液,震荡至彻底悬浮。加入 20 μL 蛋白酶 K,混匀,56℃ 1 h,后 95℃ 5 min 灭活蛋白酶 K,12 000 r/min 离心 5 min,取上清至新的无酶 EP 管,4℃ 冰箱放置备用。

1.2.4.2 PCR 扩增 PCR 体系为 20 μL,内含模板 DNA 1 μL,2×PCR Reagent 10 μL,正反向引物各 0.5 μL,DEPC 水 8 μL。使用 PCR 扩增仪循环扩增,反应条件:预变性 94℃,3 min;变性 94℃,30 s;退火 55℃,30 s,重复 40 个循环;延伸 72℃ 6 min。

1.2.4.3 琼脂糖电泳 取 PCR 扩增后产物 8 μL 进

行琼脂糖凝胶电泳,检测产物大小。

**1.2.4.4 SOCS3<sup>KO</sup> 鼠基因组鉴定** 首先对 F4 代小鼠进行 SOCS3<sup>flp</sup> 小鼠鉴定,然后取上述 SOCS3<sup>flp</sup> 小鼠进行 Cre 的鉴定,即 LysM-Cre<sup>+/+</sup>小鼠鉴定,最后取 SOCS3<sup>flp</sup>LysM-Cre<sup>+/+</sup>小鼠的髓系细胞进行 SOCS3 基因敲除鉴定。SOCS3<sup>flp</sup> 小鼠基因组鉴定结果判断:上游引物 F2 和下游引物 R2 用于鉴定 SOCS3<sup>flp</sup> 小鼠。PCR 结果判定:(1)只有一个条带,大小为 324 bp,为 SOCS3<sup>flp</sup> 小鼠。(2)只有一个条带,大小为 186 bp,为野生型小鼠。(3)两个条带,分别为 324、186 bp,为 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠。Cre 基因的鉴定:取 F4 代 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠进行 Cre 基因的鉴定,PCR 结果判定:只有一个条带,大小为 204 bp,为 LysM-Cre<sup>+/+</sup>小鼠。Cre 基因鉴定的上游引物序列为 5'-GAACGCACT-GATTTTCGACCA-3',下游引物序列为 5'-GCTAACCAGCGTTTTCTGTTTC-3'。最后取 SOCS3<sup>KO</sup> 鼠的髓系细胞进行鉴定,PCR 结果判定:(1)只有一个条带,大小为 324 bp,Cre 基因表达不成功。(2)只有一个条带:520 bp,SOCS3<sup>KO</sup> 鼠。髓系细胞 SOCS3 基因鉴定的引物为上游引物 F3、上游引物 F2 和下游引物 R2,F3 序列为 5'-ACTTCACGGCTGCCAACATCTG-3'。

**1.2.5 Western 印迹** 使用含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液分离总蛋白。蛋白质提取物通过 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离,并湿转至 PVDF 膜,用 5%脱脂牛奶封闭 1 h,并在 SOCS3 抗体稀释液中 4℃孵育过夜。然后在室温下加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠或兔二抗,室温孵育 1 h,用 Chemiluminescent HRP Substrate 显影液显影,利用 Image J 软件定量分析 SOCS3 蛋白的相对表达量(内参为 GAPDH)。

**1.2.6 流式细胞术** 取小鼠骨髓,用 70 μm 滤网过滤后裂解红细胞,再次用 70 μm 滤网过滤,PBS 清洗并按 5×10<sup>5</sup> 个/100 μL 重悬,流式管加 100 μL 骨髓细胞悬液备用。肿瘤组织充分研磨后进行过滤,PBS 清洗后按 5×10<sup>5</sup> 个/100 μL 重悬,流式管加 100 μL 肿瘤细胞单细胞悬液备用。在每管中分别加入 Percp-anti-CD45 抗体、FITC-anti-CD11b 抗体、PE-anti-Gr-1 抗体、PE-anti-MHC II 抗体、PE-anti-F4/80 抗体各 2.5 μL,震荡均匀后室温孵育 20 min,PBS 清洗,流式细胞仪检测。

**1.2.7 Annexin V 检测 T 细胞凋亡** 将 T 细胞与 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>的骨髓细胞、SOCS3<sup>KO</sup> 鼠 eMDSCs、肿瘤原位 eMDSCs 按照 1:3 比例共培养,培养过程中加 CD3/CD8 抗体刺激 T 细胞活化。72 h 后收集 T 细胞,PBS 清洗,结合缓冲液按 2×10<sup>5</sup> 个细胞/100 μL

重悬,取 100 μL 悬液于流式管中备用。加入 2.5 μL APC-anti-CD3 抗体,室温避光孵育 20 min,PBS 清洗后用 100 μL 结合缓冲液重悬,加入 5 μL Annexin V 和 5 μL 7-AAD,室温避光孵育 15 min,使用流式细胞仪检测。

**1.2.8 Brdu 检测 T 细胞增殖** 将 T 细胞与 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>-</sup>髓系细胞、SOCS3<sup>KO</sup> 鼠骨髓中的 eMDSCs、肿瘤原位 eMDSCs 按照 1:3 比例共培养,培养过程中加 CD3/CD8 抗体刺激 T 细胞活化。72 h 后收集 T 细胞,PBS 清洗,结合缓冲液按 2×10<sup>5</sup> 个细胞/100 μL 重悬,取 100 μL 悬液于流式管中备用。加入 2.5 μL APC-anti-CD3 抗体,室温孵育 20 min,PBS 清洗。加入 100 μL Cytofix/Cytoperm Buffer,4℃避光孵育 20 min,Perm/wash buffer 清洗。加入 Cytofix/Cytoperm Buffer Plus 100 μL,4℃避光孵育 10 min 后,Perm/wash buffer 清洗。加入 100 μL Cytofix/Cytoperm Buffer,4℃避光孵育 5 min,Perm/wash buffer 清洗。加入 Dnase,37℃水浴孵育 1 h,Perm/wash buffer 清洗。加入稀释的 Brdu 抗体 50 μL,室温避光孵育 20 min,Perm/wash buffer 清洗,重悬细胞后上机检测。

**1.2.9 动物实验** 将处于对数生长期的 E0771 细胞按照 2×10<sup>6</sup>/(120 μL·只),皮下接种野生型 C57BL/6J 小鼠(WT 鼠)和 SOCS3 敲除小鼠(雌性,6~8 周龄,18~22 g)第 4 乳腺脂肪垫上,将 LLC 按 1×10<sup>6</sup>/(120 μL·只)、B16 按照 5×10<sup>5</sup>/(120 μL·只),皮下接种野生型小鼠和 SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠(雌性,6~8 周龄,18~22 g)腹股沟,每 3 d 观察肿瘤的生长状况,测量肿瘤长短径,连续进行 3 周,计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。公式:体积=ab<sup>2</sup>/2(a 为长径,b 为短径)。

**1.3 统计学处理** 正态分布的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。所有数据均用 SPSS23.0 和 GraphPad Prism 8 软件处理,多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠的构建** SOCS3<sup>flp</sup>小鼠构建方式如图 1 所示。将上述小鼠与 flp 工具鼠交配,获得去除抗药基因的 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠 7 只。

**2.2 PCR 鉴定 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠结果** 二步法鉴定 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠,通过 PCR 对区域一进行鉴定,取上述鉴定结果为阳性的小鼠,对其区域二再次鉴定,最终获得 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠。如图 2 所示,F1 代 SOCS3<sup>flp</sup>小鼠区域一的扩增产物为 240 bp 和 166 bp 两条 DNA 片段,区域二的扩增产物为 324 bp 和 186 bp 两条



DNA 片段,与预期结果一致,而 WT 小鼠区域一的扩增产物为一条 166 bp 的 DNA 片段,区域二的扩增产物为一条 186 bp 的 DNA 片段。

**2.3 髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠的繁育** 髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠的繁育方式如图 3 所示。将 SOCS3<sup>fl</sup> 小鼠自交,取获得的子代小鼠进行 PCR 鉴定,筛选出 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠。将 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠与 Lys2-Cre 工具鼠杂交获得 F3 代 SOCS3<sup>fl</sup>-LysM-Cre<sup>+/+</sup> 小鼠。将 F3 代小鼠进行自交获取髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠(SOCS3<sup>fl/fl</sup>LysM-Cre<sup>+/+</sup>小鼠,SOCS3<sup>KO</sup> 鼠)。

**2.4 SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠的鉴定结果** SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠为携带 Cre 基因的 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠,其基因型为 SOCS3<sup>fl/fl</sup> LysM-Cre<sup>+/+</sup>。取 F4 代小鼠鼠尾进行 PCR 鉴定,其中 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠扩增产物为一条 324 bp 的 DNA 片段,对上述 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠的 Cre 基因进行进一步鉴定,扩增产物为一条 204 bp DNA 片段的小鼠即为 SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠,见图 4A、4B。SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠的 SOCS3 基因在髓系细胞中被特异性敲除,其基因型如图 4C 所示。通过 PCR 对 F4 代 SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠的髓系细胞

进行了鉴定,与预期一致,扩增产物出现一条 520 bp 的 DNA 片段,见图 4D。结果显示,与 Cre 工具鼠相比,SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠髓系细胞中 SOCS3 蛋白表达显著降低,而肠组织、皮肤和肝脏中 SOCS3 蛋白表达无显著变化,见图 4E。

**2.5 髓系 SOCS3 基因的敲除促进 eMDSCs 的生成和免疫抑制活性** 如图 5A 所示,在敲除 SOCS3 基因后,小鼠骨髓中表型为 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>MHCII<sup>-</sup> 的 eMDSCs 比例显著升高[(10.54±0.50)% vs. (40.5±2.85)%,  $t=17.94$ ,  $P<0.001$ ]。与 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>细胞相比,肿瘤原位 eMDSCs(t-eMDSCs)可显著抑制 T 细胞增殖 [(18.80±0.76)% vs. (9.54±0.67)%,  $t=15.95$ ,  $P<0.001$ ],促进 T 细胞凋亡[(8.33±0.75)% vs. (18.69±0.61)%,  $t=18.48$ ,  $P<0.001$ ]。SOCS3<sup>KO</sup> 小鼠骨髓中分选的 eMDSCs 免疫抑制活性与肿瘤原位 eMDSCs 相似,也可显著抑制 T 细胞增殖[(18.80±0.76)% vs. (9.95±0.77)%,  $t=14.21$ ,  $P<0.001$ ],促进 T 细胞凋亡 [(8.33±0.75)% vs. (16.9±0.79)%,  $t=13.53$ ,  $P<0.001$ ],见图 5B、5C。

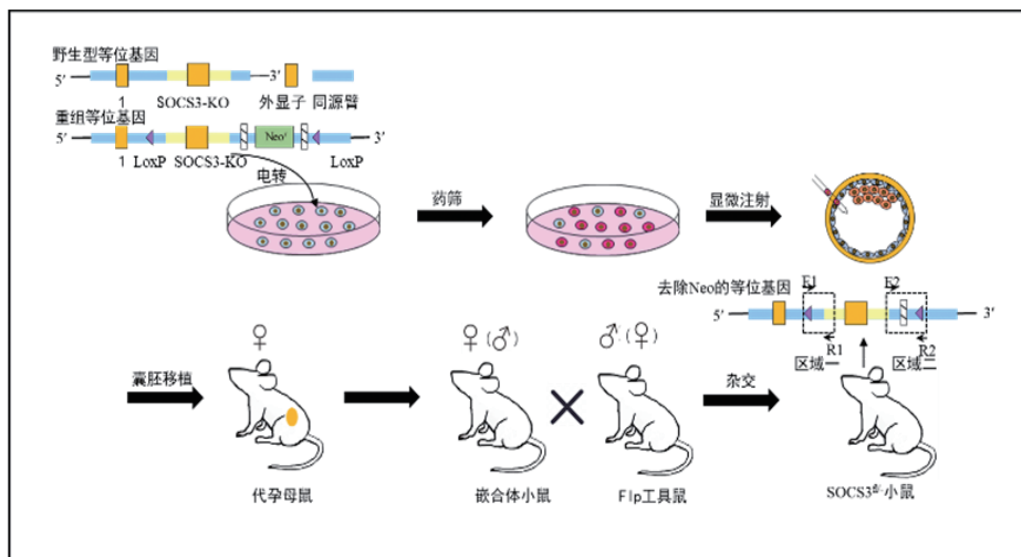
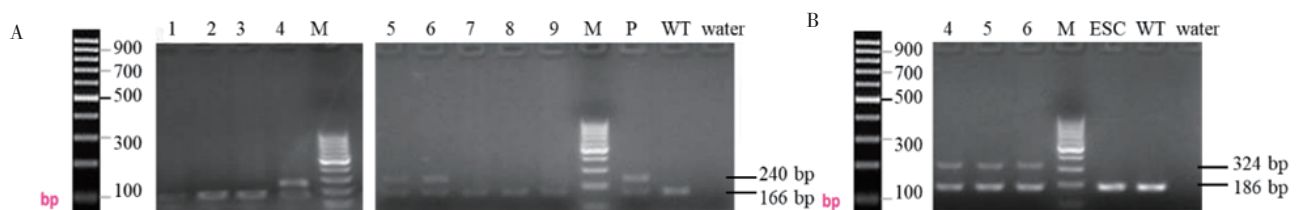


图1 SOCS3<sup>fl</sup>小鼠构建方式及鉴定位点

Fig 1 Construction methods and identification sites of SOCS3<sup>fl</sup> mice



注:A:F1代小鼠区域一鉴定结果(4、5、6:SOCS3<sup>fl</sup>小鼠;1、2、3、7、8、9:野生型小鼠);B:F1代小鼠区域二鉴定结果(4、5、6:SOCS3<sup>fl</sup>小鼠);M:DNA marker;P:阳性对照;WT:野生型小鼠;water:阴性对照;ESC:胚胎干细胞

图2 SOCS3<sup>fl</sup>小鼠 DNA PCR 鉴定

Fig 2 Results of genotype identification in SOCS3<sup>fl</sup> mice by PCR

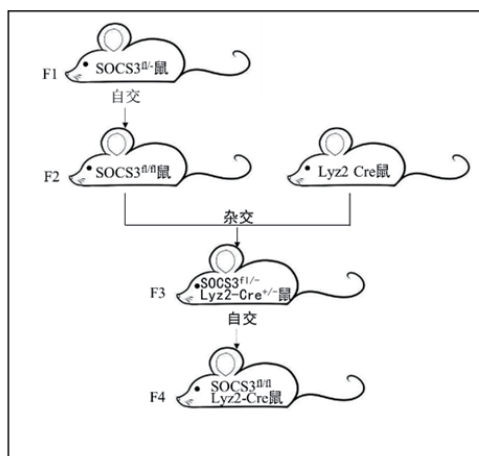
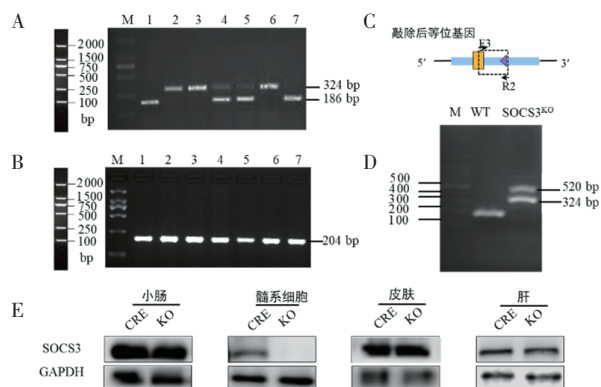


图3 髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠的构建

Fig 3 Construction of myeloid-specific SOCS3 gene knockout mice

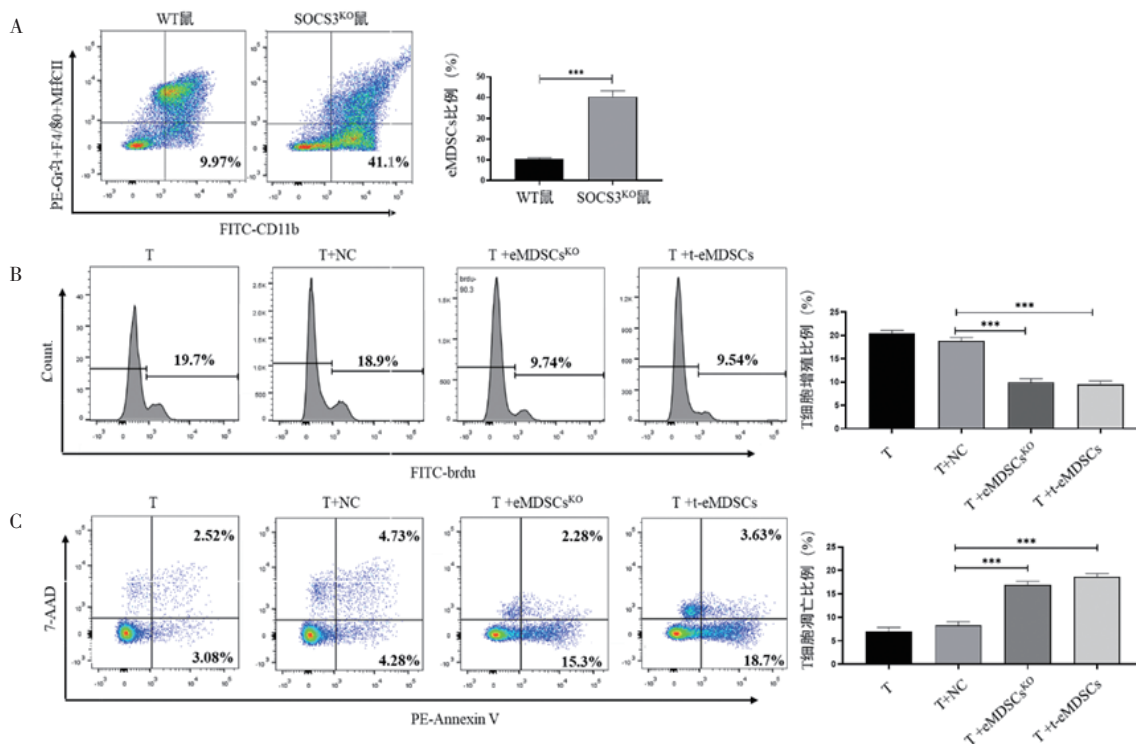
2.6 髓系 SOCS3 基因的敲除促进肿瘤生长和 eMDSCs 的浸润 为构建 eMDSCs 高浸润的荷瘤鼠模型,分别将 B16、E0771 与 LLC 细胞接种到 WT 小鼠和 SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠皮下。结果显示,SOCS3<sup>ko</sup> 组的黑色素瘤[(931.40±145.50)mm<sup>3</sup> vs. (293.60±96.16)mm<sup>3</sup>,  $t=6.90, P<0.001$ ]、乳腺癌[(377.9±36.12)mm<sup>3</sup> vs. (139.60±20.42)mm<sup>3</sup>,  $t=12.84, P<0.001$ ]、肺癌[(512.40±82.58)mm<sup>3</sup> vs. (240.20±28.14)mm<sup>3</sup>,  $t=6.98, P<0.001$ ]体积显著高于 WT 组,见图 6A、6B、6C。且流式结果表明,与 WT



注:A:F4 代小鼠 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 基因的 PCR 鉴定结果(2,3,6:SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠;4,5 为 SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠;1,7:野生型小鼠);B:F4 代 SOCS3<sup>fl/fl</sup> 小鼠 Cre 基因的 PCR 鉴定结果;C:SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠髓系细胞的鉴定位点;D:SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠髓系细胞 DNA PCR 鉴定结果;E:SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠不同组织中 SOCS3 蛋白的表达变化;M:DNA marker;WT: 野生型小鼠;SOCS3<sup>ko</sup>:髓系特异性 SOCS3 基因敲除鼠

图4 SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠鉴定Fig 4 Identification of SOCS3<sup>ko</sup> mice

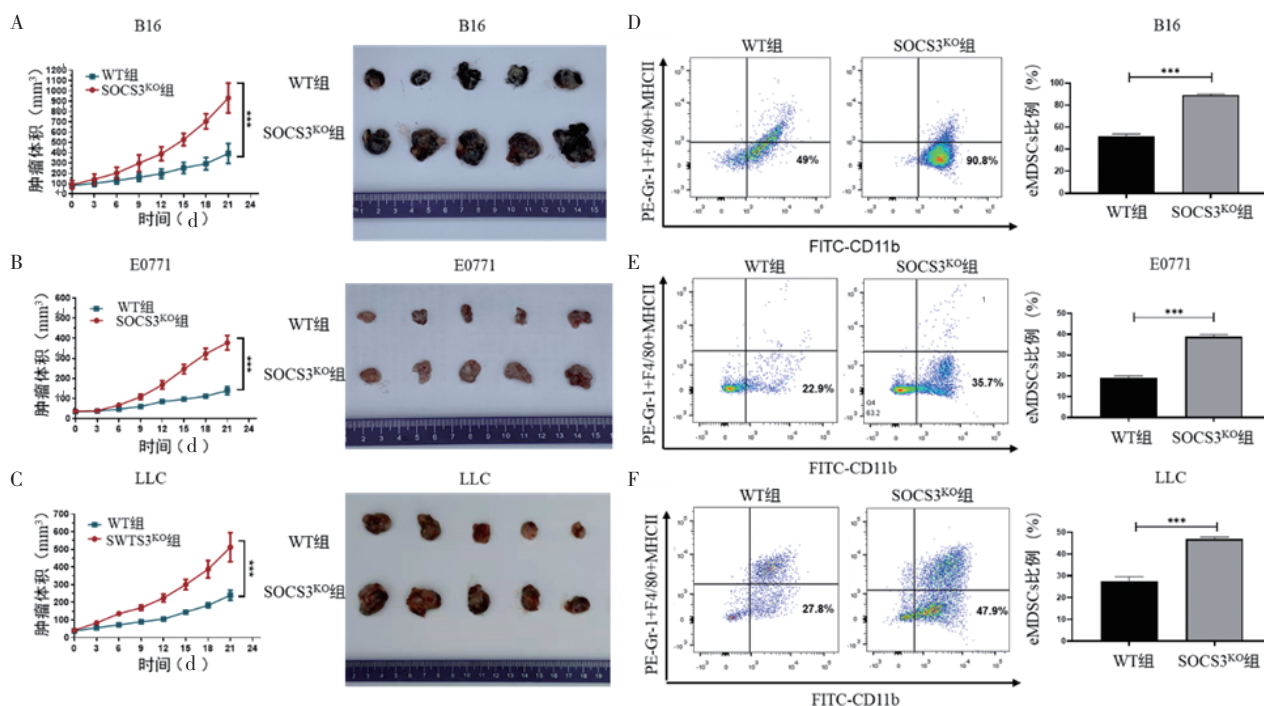
组相比,SOCS3<sup>ko</sup> 组黑色素瘤[(51.40±2.40)% vs. (88.80±1.20)%,  $t=24.14, P<0.001$ ]、乳腺癌[(19.10±0.90)% vs. (38.8±1.06)%,  $t=24.56, P<0.001$ ]、肺癌[(27.55±2.03)% vs. (46.90±0.95)%,  $t=14.93, P<0.001$ ]中的 eMDSCs 比例显著升高,见图 6D、6E、6F。



注:A:SOCS3 基因敲除对小鼠骨髓中 eMDSCs 生成的影响;B:SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠骨髓中 eMDSCs 对 T 细胞增殖的影响;C:SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠骨髓中 eMDSCs 对 T 细胞凋亡的影响;T:T 细胞;T+NC:T 细胞与 CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>细胞共孵育;T+eMDSCs:T 细胞与 SOCS3<sup>ko</sup> 小鼠骨髓中 eMDSCs 共孵育;T+t-eMDSCs:T 细胞与肿瘤原位 eMDSCs 共孵育;\*\*\* $P<0.001$

图5 特异性 SOCS3 基因敲除对 eMDSCs 的生成和免疫抑制功能的影响

Fig 5 Effects of specific SOCS3 gene knockout on the production and immunosuppressive function of eMDSCs



注:A、B、C:髓系 SOCS3 基因敲除对黑色素瘤、乳腺癌、肺癌体积的影响;D、E、F:髓系 SOCS3 基因敲除对黑色素瘤、乳腺癌、肺癌中 eMDSCs 浸润的影响;WT 组:野生型小鼠组;SOCS3<sup>KO</sup> 组:髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠组;\*\*\* $P < 0.001$

图6 髓系 SOCS3 基因敲除对肿瘤生长和 eMDSCs 浸润的影响

Fig 6 Effect of SOCS3 gene knock-out on tumor growth and infiltration of eMDSCs

### 3 讨论

具有促肿瘤作用的 MDSCs 最早发现于荷瘤鼠, 后在肿瘤患者体内陆续被发现<sup>[11]</sup>。同时 Lang 等<sup>[12]</sup>分析实体瘤患者外周血中 MDSCs 的比例与患者总生存率的关系时发现, MDSCs 比例的增高降低了患者的总生存率, 至此 MDSCs 成为肿瘤研究的又一焦点。研究证实肿瘤组织中的 MDSCs 促进了肺癌和结肠癌的远处转移<sup>[13-14]</sup>。临床试验, 证实针对 MDSCs 的靶向治疗能抑制肿瘤生长, 延长患者的生存期<sup>[15]</sup>, 且抑制 MDSCs 可以提高免疫检查点抑制剂的疗效<sup>[16-17]</sup>。总之, MDSCs 在肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用。

MDSCs 由髓系祖细胞分化发育而来。正常情况下, 髓系祖细胞可分化成为单核细胞、中性粒细胞、巨噬细胞, 而在肿瘤患者体内, 髓系祖细胞受到肿瘤细胞分泌的可溶性因子的调控, 出现分化障碍, 成为具有免疫抑制能力的 MDSCs<sup>[18]</sup>。目前研究 MDSCs 时对其的获取主要包括 3 个途径, 一是直接从荷瘤小鼠的脾脏或肿瘤组织中分离 MDSCs, 二是通过白细胞介素-6 (IL-6)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等细胞因子诱导髓系细胞增殖分化成 MDSCs, 三是直接建立 MDSCs 干细胞系。上述方法各有其局限性, 利用流式分选或磁珠分选从荷瘤鼠脾或肿瘤组织获得的 MDSCs 虽然得到纯化, 但数量很少; 而肿瘤细胞在体外培养或体内接种过程

中会出现优势生长, 干扰实验结果; 体外诱导法存在 MDSCs 分化效率低的问题<sup>[19-20]</sup>。因此, MDSCs 相关研究受到现有方法的限制。

本研究发现 MDSCs 的亚群 eMDSCs 的生成受肿瘤源性 IL-6 影响。正常生理状况下, IL-6 引起一过性 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK/STAT3) 通路激活, 但肿瘤源性 IL-6 可诱导髓系细胞中 SOCS3 的缺失, 导致 JAK/STAT3 通路持续激活, 从而促进了 eMDSCs 的生成和扩增<sup>[9-10]</sup>。本研究利用 Cre-loxP 系统成功构建了髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠, 对其进行基因型鉴定和蛋白水平上的敲除效果验证, 确认 SOCS3 基因在髓系细胞中特异性敲除。流式细胞学技术比较髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠与野生型小鼠骨髓中 eMDSCs 数量的结果显示, 前者 eMDSCs 数量显著升高, 可达到髓系细胞的 40%, 且该群 eMDSCs 具有与肿瘤原位 eMDSCs 相似的免疫抑制功能, 无肿瘤细胞污染, 使得直接从小鼠骨髓中分离 eMDSCs 的新获取方法成为可能。同时, 本研究将乳腺癌细胞 E0771、肺癌细胞 LLC、黑色素瘤细胞 B16 接种到髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠皮下, 通过流式细胞学技术比较髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠与野生型小鼠所形成的 3 种不同瘤子中 eMDSCs 比例, 结果显示前者显著高于后者, 证实 3 种 eMDSCs 高浸润的荷瘤鼠模型构建成功。

综上所述,本研究以特异性敲除小鼠髓系细胞中 SOCS3 基因的方式,模拟肿瘤源性 IL-6 对髓系细胞的调控作用,促进骨髓中的 eMDSCs 的生成和扩增,为 MDSCs 的获取提供了新的有效方法,为 eMDSCs 相关实验研究提供了稳定的细胞来源。且本研究在髓系特异性 SOCS3 基因敲除小鼠的基础上首次构建了 3 种 eMDSCs 高浸润的荷瘤鼠模型,可以模拟临床上高 eMDSCs 的肿瘤患者,为体内探索 eMDSCs 的促肿瘤机制,寻找新型靶向药物提供了有力的动物模型。

#### 参考文献:

- [1] BRONTE V, BRANDAU S, CHEN S H, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12150.
- [2] YANG Y, LI C, LIU T, et al. Myeloid-derived suppressor cells in tumors: from mechanisms to antigen specificity and microenvironmental regulation[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1371.
- [3] BRUNO A, MORTARA L, BACI D, et al. Myeloid derived suppressor cells interactions with natural killer cells and pro-angiogenic activities: roles in tumor progression[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 771.
- [4] UGEL S, DE SANCTIS F, MANDRUZZATO S, et al. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(9): 3365–3376.
- [5] YUE D, LIU S, ZHANG T, et al. NEDD9 promotes cancer stemness by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCL8 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Biol Med*, 2021, 18(3): 705–720.
- [6] JIANG M, ZHANG W, ZHANG R, et al. Cancer exosome-derived miR-9 and miR-181a promote the development of early-stage MDSCs via interfering with SOCS3 and PIAS3 respectively in breast cancer[J]. *Oncogene*, 2020, 39(24): 4681–4694.
- [7] UHEL F, AZZAOU I, LE GALLOU S, et al. Early-stage myeloid-derived suppressor cell count: basophil exclusion matters[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2019, 144(4): 1125–1127.
- [8] HOLTZHAUSEN A, HARRIS W, UBIL E, et al. TAM family receptor kinase inhibition reverses mdsc-mediated suppression and augments anti-pd-1 therapy in melanoma [J]. *Cancer Immunol Res*, 2019, 7(10): 1672–1686.
- [9] JIANG M, CHEN J, ZHANG W, et al. Interleukin-6 trans-signaling pathway promotes immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells via suppression of suppressor of cytokine signaling 3 in breast cancer[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1840.
- [10] ZHANG W, JIANG M, CHEN J, et al. SOCS3 Suppression promoted the recruitment of cd11b(+)gr-1(-)f4/80(-)mhcii(-) early-stage myeloid-derived suppressor cells and accelerated interleukin-6-related tumor invasion via affecting myeloid differentiation in breast cancer[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1699.
- [11] TALMADGE J E, GABRILOVICH D I. History of myeloid-derived suppressor cells[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10): 739–752.
- [12] LANG S, BRUDEREK K, KASPAR C, et al. Clinical relevance and suppressive capacity of human myeloid-derived suppressor cell subsets[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(19): 4834–4844.
- [13] LIN S, ZHANG X, HUANG G, et al. Myeloid-derived suppressor cells promote lung cancer metastasis by CCL11 to activate ERK and AKT signaling and induce epithelial-mesenchymal transition in tumor cells[J]. *Oncogene*, 2021, 40(8): 1476–1489.
- [14] SUN H L, ZHOU X, XUE Y F, et al. Increased frequency and clinical significance of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(25): 3303–3309.
- [15] FLEMING V, HU X, WEBER R, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells to bypass tumor-induced immunosuppression [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 398.
- [16] LOEUILLARD E, YANG J, BUCKARMA E, et al. Targeting tumor-associated macrophages and granulocytic myeloid-derived suppressor cells augments PD-1 blockade in cholangiocarcinoma[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5380–5396.
- [17] LAW A M K, VALDES-MORA F, GALLEGÓ-ORTEGA D. Myeloid-derived suppressor cells as a therapeutic target for cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 561.
- [18] GROTH C, HU X, WEBER R, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression[J]. *Br J Cancer*, 2019, 120(1): 16–25.
- [19] CONDAMINE T, GABRILOVICH D I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(1): 19–25.
- [20] WEBER R, RIESTER Z, HÜSER L, et al. IL-6 regulates CCR5 expression and immunosuppressive capacity of MDSC in murine melanoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2020, 8(2): e000949.

(2021-10-13 收稿)