

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0557-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250301

NOD-SIRPA 基因原位敲入 BALB/c 转基因小鼠的构建及鉴定

陶明阳, 李馨, 吕亚楠, 胡正

(吉林大学第一医院器官再造与移植教育部重点实验室, 吉林 长春 130062)

[摘要] **目的:** 基于成簇的规则间隔短回文重复序列 (CRISPR) /CRISPR 相关蛋白 (Cas) 9 技术构建 NOD-信号调节蛋白 α (*SIRPA*) 基因敲入的小鼠模型, 为构建更先进的人源化小鼠模型提供参考。**方法:** 基于 CRISPR/Cas9 技术, 将 NOD 背景 *SIRPA* 基因敲入至 BALB/c 小鼠受精卵中, 扩繁获得稳定基因型来源的纯合小鼠 (*SIRPA*-KI 鼠) 进行实验, 设计 PCR 引物, 核酸电泳鉴定小鼠基因型。按照小鼠品系分为 C57BL/6 组、BALB/c 组和 *SIRPA*-KI 组, 各组随机取 3 只周龄相近小鼠进行实验。诱导成熟的骨髓巨噬细胞与人 CD47-Fc 融合蛋白共孵育, Streptavidin PE/Cy7 染色, 流式细胞术检测 PE/Cy7 平均荧光强度 (MFI), 比较各组小鼠 *SIRPA* 基因结合人 CD47 Fc 的能力。每只鼠尾静脉注射 2×10^9 羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 标记的人红细胞, 体内吞噬实验检测各组小鼠巨噬细胞体内吞噬人红细胞情况。随机取 BALB/c 和 *SIRPA*-KI 小鼠各 1 只诱导成熟骨髓巨噬细胞, 体外吞噬实验检测各组小鼠巨噬细胞体内吞噬人红细胞情况。**结果:** 成功获得 BALB/c *SIRPA*^{NOD/NOD} 纯合小鼠。流式细胞术, 与 C57BL/6 组比较, BALB/c 组小鼠 MFI 明显升高 ($P < 0.01$); 与 C57BL/6 组和 BALB/c 组比较, *SIRPA*-KI 组小鼠 MFI 明显升高 ($P < 0.01$)。体内吞噬实验, C57BL/6 组小鼠巨噬细胞整体清除人红细胞速率最快; 巨噬细胞吞噬 6 h 时, 与 *SIRPA*-KI 组比较, C57BL/6 组人红细胞剩余百分率明显降低 ($P < 0.01$) 且接近 0%; 与 *SIRPA*-KI 组比较, BALB/c 组人红细胞剩余百分率明显降低 ($P < 0.05$)。体外吞噬实验, BALB/c 组小鼠巨噬细胞明显吞噬人红细胞, 且吞噬指数较高, 为 30.700%; 与 BALB/c 组比较, *SIRPA*-KI 组小鼠巨噬细胞吞噬指数明显降低 ($P < 0.01$)。**结论:** 通过 CRISPR/Cas9 技术向 BALB/c 品系敲入 NOD 背景 *SIRPA* 基因, 成功构建对人 CD47 亲和力增强和可明显抑制吞噬人红细胞且具有优越的人类细胞异种移植效率的小鼠模型。

[关键词] 信号调节蛋白 α ; BALB/c 小鼠; C57BL/6 小鼠; 基于成簇的规则间隔短回文重复序列/基于成簇的规则间隔短回文重复序列相关蛋白 9 技术

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A

Construction and identification of Balb/c transgenic mice with NOD-SIRPA gene knocked *in situ*

TAO Mingyang, LI Xin, LYU Yanan, HU Zheng

(Key Laboratory of Organ Reconstruction and Transplantation, Ministry of Education, First Hospital, Jilin University, Changchun 130062, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the construction of a NOD-signal regulatory protein α (*SIRPA*) gene

[收稿日期] 2024-07-10 **[录用日期]** 2024-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金重点专项 (82241224)

[作者简介] 陶明阳 (2000—), 女, 山东省潍坊市人, 在读硕士研究生, 主要从事人源化小鼠模型制备方面的研究。

[通信作者] 胡正, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: zhenghu0108@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

knock-in mouse model based on clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) 9 technology, and to provide the reference for the establishment of more advanced humanized mouse models. **Methods:** Based on CRISPR/Cas9 technology, the NOD-background *SIRPA* gene was knocked into the BALB/c mouse fertilized eggs, and homozygous mice with stable genotypes (*SIRPA*-KI mice) were obtained through expansion and breeding for experiments; PCR primers were designed, and mouse genotypes were identified by nucleic acid electrophoresis. The mice were divided into C57BL/6 group, BALB/c group, and *SIRPA*-KI group according to their strains, and 3 mice with similar ages were randomly selected from each group for experiments. Mature bone marrow-derived macrophages were co-incubated with human CD47-Fc fusion protein, stained with Streptavidin PE/Cy7, and the mean fluorescence intensity (MFI) of PE/Cy7 was detected by flow cytometry to compare the ability of *SIRPA* in the mice from various groups to bind human CD47 Fc. Each mouse was intravenously injected with 2×10^9 carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE)-labeled human red blood cells, and the phagocytosis of human red blood cells by macrophages in various groups was detected by *in vivo* phagocytosis assay. One BALB/c mouse and one *SIRPA*-KI mouse were randomly selected to induce mature bone marrow-derived macrophages, and the phagocytosis of human red blood cells by macrophages in various groups was detected by *in vitro* phagocytosis assay. **Results:** BALB/c *SIRPA*^{NOD/NOD} homozygous mice were successfully obtained. The flow cytometry results showed that compared with C57BL/6 group, the MFI of the mice in BALB/c group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with C57BL/6 group and BALB/c group, the MFI of the mice in *SIRPA*-KI group was significantly increased ($P < 0.01$). The *in vivo* phagocytosis assay results showed that the macrophages in C57BL/6 group exhibited the fastest overall clearance rate of human red blood cells; at 6 h of macrophage phagocytosis, compared with *SIRPA*-KI group, the residual percentage of the human red blood cells in C57BL/6 group was significantly decreased ($P < 0.01$) and was closed to 0%; compared with *SIRPA*-KI group, the residual percentage of the human red blood cells in BALB/c group was significantly decreased ($P < 0.05$). The *in vitro* phagocytosis assay results showed that the macrophages in BALB/c group significantly phagocytosed the human red blood cells, with a high phagocytic index of 30.7%; compared with BALB/c group, the phagocytic index of the macrophages in *SIRPA*-KI group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The study successfully constructs a mouse model with enhanced affinity for human CD47 and significantly inhibited phagocytosis of human red blood cells by knocking the NOD-background *SIRPA* gene into the BALB/c strain using CRISPR/Cas9 technology, providing a superior human cell xenotransplantation efficiency.

KEYWORDS Signal regulatory protein α ; BALB/c mice; C57BL/6 mice; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 9 technology

小鼠是造血干细胞 (hematopoietic stem cell, HSC) 鉴定和功能研究的重要工具^[1]。由于T和B淋巴细胞及自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞会介导强烈的异种造血免疫细胞排斥反应, 因此3种细胞缺陷的免疫缺陷小鼠品系才能够用于人类造血干细胞移植研究^[2]。其中, DNA激活催化多肽基因 (protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide gene, *Prkdc*) 的严重联合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 突变, 或重组激活基因1或2 (recombination activating

gene 1/2, *Rag1/Rag2*) 缺失, 均可导致T和B淋巴细胞缺失^[3-5]。白细胞介素 (interleukin, IL)-2受体共同 γ 链亚基 (IL-2 receptor, gamma chain, IL2rg) 遭到破坏, 会导致NK细胞完全缺失^[6]。目前常用的适于人造血干细胞移植和免疫重建的免疫缺陷品系有NOD scid gamma小鼠和NOD-SCID-IL-2^{-/-} (NSG、NOG和NCG等) 小鼠。然而这些小鼠存在补体C5缺陷, 无法用于补体介导免疫功能研究和评价治疗抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,

ADCC), 基因编辑困难限制品系拓展, 对麻醉敏感难以开展肝脏器官移植研究等问题^[7]。因此, 研发非NOD背景的T/B/NK缺陷小鼠具有重要意义。BALB/c品系小鼠具有明显优势, 如补体因子C5正常, 便于基因编辑可获得多种小鼠品系, 对麻醉耐受度高利于器官移植和免疫学研究, 繁殖性能好且繁殖寿命长等。

信号调节蛋白 α (signal regulatory protein alpha, SIRPA) 是一种抑制性受体, 在髓系细胞广泛表达, 其细胞外区含免疫球蛋白超家族 (immunoglobulin superfamily, IgSF) 结构域, 其中V结构域与广泛表达的配体CD47相互作用, 产生“别吞噬我”的吞噬抑制信号^[8-9]。TAKENAKA等^[10]发现: NOD品系小鼠因SIRPA NOD特异性多态性实现高效人类细胞植入。NCG小鼠也因SIRPA基因多态性导致巨噬细胞对人类细胞的吞噬活性降低^[11]。因此, 通过CD47与SIRPA相互作用使吞噬失活是构建高效异种移植系统的关键决定因素之一。BALB/c小鼠也具有独特的SIRPA基因多态性, 使BALB/c SIRPA IgV结构域能够适度结合人类CD47^[12]。但与NOD小鼠比较, BALB/c-Rag^{-/-}IL-2rg^{-/-}小鼠的人HSC植入率低, 脾脏中存在的人T和B淋巴细胞明显减少^[13]。现已有用NOD型SIRPA基因替换C57BL/6型SIRPA基因得到的BRGS小鼠, 但其采用的NOD-Idd13位点属于大基因座, 精准性和效率较低, 且BALB/c小鼠较C57/B6小鼠在免疫缺陷研究领域应用更为广泛^[14]。因此, 需要精准构建BALB/c背景表达NOD型SIRPA基因免疫缺陷小鼠, 从而优化免疫系统人源化小鼠模型。

成簇的规则间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) -CRISPR相关蛋白 (CRISPR associated proteins, Cas) 9介导的基因组修饰能够快速有效地编辑生物基因组, 是常用的基因工程工具^[15]。本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术使BALB/c小鼠获得NOD背景SIRPA基因的CD47高亲和能力, 增强其对入红细胞的抑制吞噬水平, 使得人体细胞和组织移植存活率明显提高, 从而构建优化的适用于人类细胞异种移植的小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 本实验室C57BL/6、BALB/c和SIRPA-KI小鼠采用常规动

物饲养方式喂养, 饲养于吉林大学人类疾病动物模型国家地方联合工程实验室实验动物中心, 实验动物生产许可证号: SCXK(吉)2019-0012, 按照《实验动物许可管理办法》《实验动物管理条例》的相关规定进行实验。CellTrace CFSE细胞增殖试剂盒购自美国赛默飞世尔科技有限公司, 重组小鼠巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 购自美国BioLegend公司, 重组小鼠干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 购自美国R&D公司, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 购自美国Sigma公司, 人源CD47蛋白购自上海拜力生物科技有限公司, 红细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司。干式恒温器(型号:MK-20)购自杭州奥盛仪器有限公司, PCR仪(型号: T100TMTThermal Cycler)和凝胶成像系统(型号: ChemiDocTM XRS+)购自美国Bio-Rad公司, 全光谱多色流式细胞仪(型号: BD FACSCantoTM II和BD FACSCelestaTM)购自美国BD公司。

1.2 小鼠模型构建 委托赛业生物公司将小鼠SIRPA基因的向导RNA (guide RNA, gRNA)、含有“NOD_ShiLtl品系的外显子2-内含子2-外显子3”盒式的供体载体与Cas9 mRNA共同注射至BALB/c小鼠受精卵中, 产生靶向条件敲入的子代。见图1和2。通过PCR法鉴定F0代动物, 使用SnapGen软件检查基因序列(图3), 将其与野生型 (wild type, WT) 小鼠杂交, 测试种系传代和产生具有稳定基因型F1代动物, 将得到F1代阳性小鼠与WT小鼠交配, 获得稳定基因型来源的F2代阳性小鼠, 在F2代阳性小鼠间进行合笼扩繁, 使用F3代小鼠进行实验。

1.3 鉴定小鼠基因型的PCR引物设计 WT等位基因长度为544 bp, 经基因编辑所得突变型 (mutation, Mut) 等位基因长度为460 bp。使用NCBI Primer-BLAST引物设计工具, 设计Mut等位基因正向引物4 (forward primer 4, F4) 和反向引物3 (reverse primer 3, R3), 即MU-F4/MU-R3; WT等位基因引物为WT-F4/WT-R6。

PCR引物序列为: WT/MU-F4, 5'-AGGGC-TTGGGCACTCTACTATG-3'; WT-R6, 5'-TAT-TTCTGTGTCAGGCTCTGATG-3'; MU-R3, 5'-ACGGATGGAAAAGTCCAAGTTAC-3'。引物结合位置见图4。

1.4 提取和扩增小鼠基因组 动物中心屏障内,

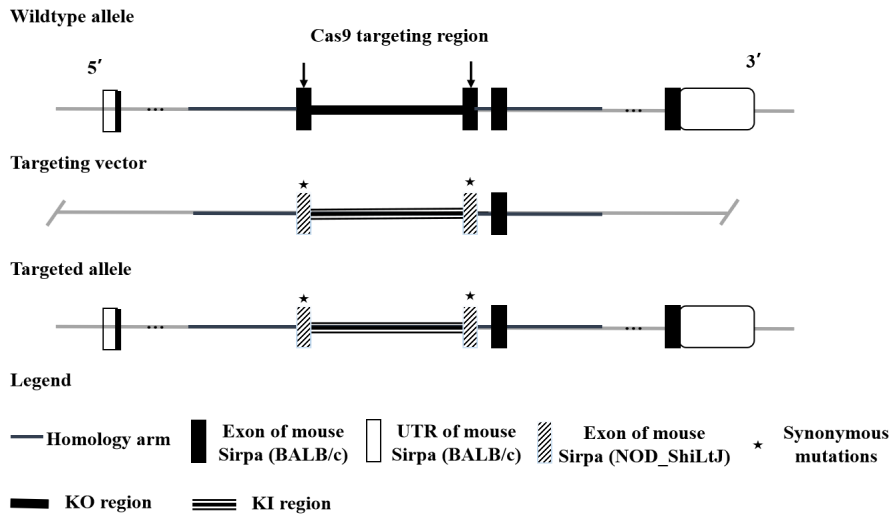


图1 基因编辑策略示意图

Fig. 1 Schematic diagram of gene editing strategy

gRNA1 (matching reverse strand of gene): 5'-ACTTCTGTCCCCGTGGCTCCTGG-3'
 gRNA2 (matching forward strand of gene): 5'-CTCCATGGATGTTAATTCTAAGG-3'
 gRNA3 (matching reverse strand of gene): 5'-CTTCTGTCCCCGTGGCTCCTGGG-3'
 gRNA4 (matching reverse strand of gene): 5'-GACCTTAGAATTAACATCCATGG-3'

图2 匹配SIRPA基因正反向链的gRNA序列

Fig. 2 gRNA sequences matching positive and negative strands of SIRPA gene

Knock-in
↓

5'-ATCCCTTAAGGTTAGTCATGGCTGCCATCTTTCTCCAGGAGCAACGAGGACAGAAGTG
AAGGTGATTCAGCCTGAGAACCTTTCGTGGGATTGCTAACCTGTCTAACTTCATCCGAG
 GTAGATGTCCTTGACTTCTAGCCCAAGTTCACAGCAGCCA-3'

图3 F0代动物基因序列

Fig. 3 F0 generation animal gene sequences

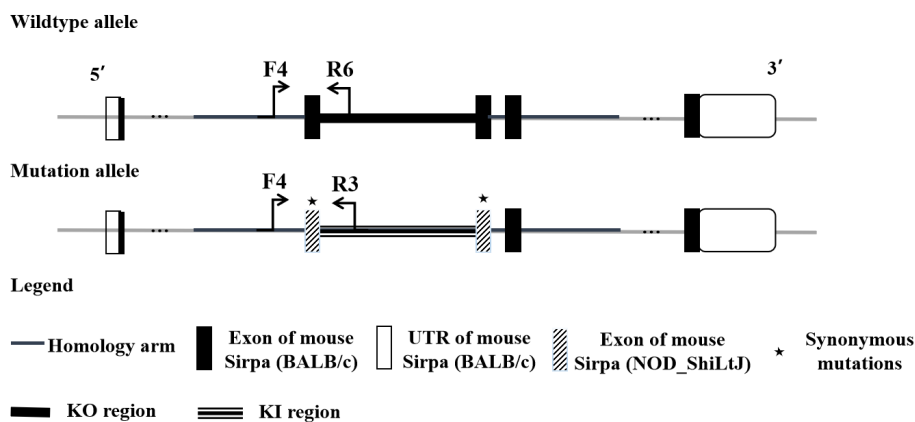


图4 PCR引物结合位置示意图

Fig. 4 Schematic diagram of PCR primer binding positions

使用耳标钳于每只待检测小鼠耳缘打耳号标记小鼠编号, 剪取尾尖约 3 mm, 加入 50 μL A 液 (将 0.039 9 g NaOH 和 0.023 4 g EDTA 溶于 40 mL 纯水中), 确保小鼠尾尖全部浸入液体中, 置于干式恒温器内, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min, 冷却后加入等体积 B 液 (0.252 2 g Tris-HCl 溶于 40 mL 纯水中) 获得小鼠基因提取物。

WT 和 Mut 等位基因 PCR 反应体系: 2 μL 5 \times PrimeSTAR Buffer, 0.8 μL dNTP Mixture, 0.5 μL WT-F 引物, 0.5 μL WT-R 引物, 0.2 μL PrimeSTAR GXL DNA Polymerase, 3.5 μL ddH₂O, 2.5 μL 小鼠基因组提取物。引物序列同“1.3”中。WT 等位基因反应温度及步骤 1: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、25 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 33 个循环。Mut 等位基因反应温度及步骤 2: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、35 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 35 个循环。

1.5 核酸电泳鉴定小鼠基因型 使用 TAE 缓冲液、琼脂糖和荧光核酸染色试剂 ($\times 10\ 000$) 配制成浓度为 1% 琼脂糖核酸凝胶。用移液枪吹吸混匀 9 μL PCR 产物与 1 μL 10 \times Loading Buffer, 总上样量为 10 μL , 加入凝胶的上样孔内, 并做 DNA Marker 孔参照。电泳仪设置 120 V、30 min, 结束后采用凝胶成像系统进行观察, 结合基因长度大小和 Marker 条带判断基因型。Mut 等位基因使用引物 MU-F4/MU-R3 进行 PCR 反应, 若出现条带则含有 Mut 基因; WT 等位基因使用引物 WT-F4/WT-R6 进行 PCR 反应, 若出现条带则含有 WT 等位基因, 反之则不含有。结合 2 组 PCR 反应扩增结果, 将可以确定动物的具体基因型为 WT/杂合型/纯合型。将 SIRPA W/W^{+/+} 记为 AA、将 SIRPA W/W^{+/-} 记为 Aa、将 SIRPA NOD/NOD^{+/+} 记为 aa。

1.6 小鼠骨髓巨噬细胞的提取、纯化和诱导分化

小鼠颈椎脱臼法处死, 完整分离双侧下肢骨, 75% 乙醇浸泡 2 min, 将骨髓用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 过 100 μm Cell Strainer 细胞过滤网冲至 15 mL 离心管中, 1 650 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃上清, 1 mL 裂红液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 9 mL PBS 缓冲液洗涤, 弃上清, 最终获取的骨髓细胞用含 15% 胎牛血清、1% 青-链霉素、1% L-G, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ M-CSF 的 DMEM 完全培养基重悬, 并每培养皿按 3×10^5 个细胞的密度

接种于 48 孔细胞培养板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养, 记为 1 d, 于培养 4 d 全量更换上述细胞培养液 1 次, 6 d 更换为含 15% 胎牛血清、1% 青-链霉素、1% L-G、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ IFN- γ 的 DMEM 完全培养基, 8 d 后可观察到巨噬细胞极化为 M1 型, 细胞呈长梭形, 伪足较为细长, 可进行后续实验。

1.7 流式细胞术检测各组小鼠 SIRPA 基因结合 CD47 能力 按照小鼠品系分为 C57BL/6 组、BALB/c 组和 SIRPA-KI 组。每组各 5 个孔, 1 个孔仅有骨髓巨噬细胞不加其他作为空白对照, 1 个孔仅加入 Streptavidin PE/Cy7 作为对照以排除非特异性染色影响。取 3 组小鼠已诱导的骨髓巨噬细胞, 弃培养基, PBS 缓冲液冲洗, 刮取细胞于流式管中, 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 弃上清留 100 μL , 加入 0.25 μg CD47 fusion, Biotin-labeled (Human) HiPTM Recombinant, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中共孵育 30 min。大量 PBS 缓冲液加入流式管 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 洗掉未结合的 CD47 融合蛋白, Streptavidin PE/Cy7 染色, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min, 采用流式细胞仪检测, FlowJo 软件分析 PE/Cy7 平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI), 以 MFI 值代表各组小鼠 SIRPA 基因结合 CD47 能力。

1.8 体内吞噬实验检测各组小鼠巨噬细胞体内吞噬人红细胞情况 人脐带血和小鼠血各取 200 μL 加入 5 mL PBS 缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清获得人脐血红细胞和 BALB/c 小鼠红细胞沉淀, 1 mL PBS 缓冲液重悬计数。按照 5 mL 体系, 各取 1×10^9 个红细胞加入 25 μL 羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE) 染色, 取 C57BL/6、BALB/c 和 SIRPA-KI 小鼠各 3 只, 每只小鼠尾静脉注射已标记 CFSE 的 2×10^9 个人脐带血红细胞, 另取 3 只 BALB/c 小鼠作为对照, 尾静脉注射已标记 CFSE 的 2×10^9 个 BALB/c 小鼠红细胞。以注射后 5 min 检测到的标记 CFSE 红细胞量为打入小鼠体内红细胞总量, 分别检测 1、2、4、6 和 18 h 标记 CFSE 红细胞剩余量, 以注射后 5 min 人红细胞剩余量作为小鼠体内人红细胞注入的总量, 计算人红细胞剩余百分率, 代表小鼠巨噬细胞体内吞噬情况。小鼠体内人红细胞剩余百分率 = 小鼠体内人红细胞剩余量 (个) / 小鼠体内人红细胞

注入总量(个)×100%。

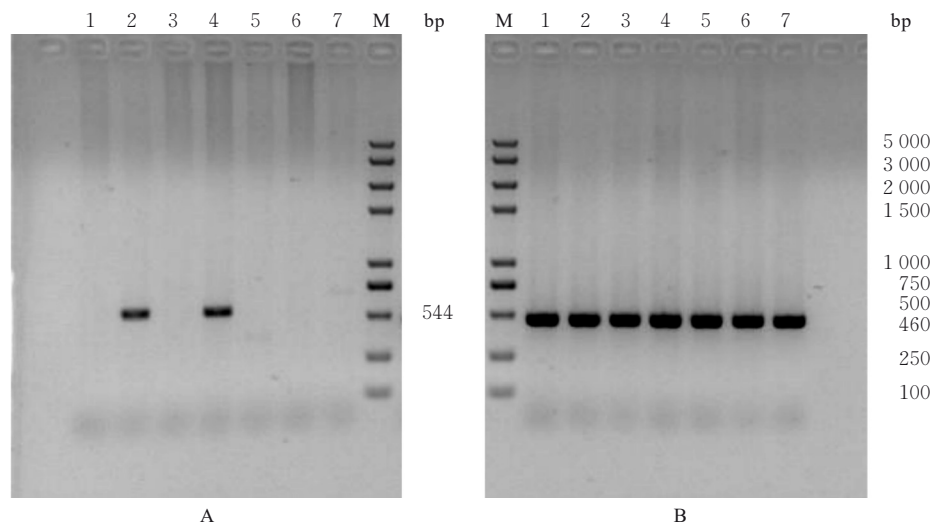
1.9 体外吞噬实验检测各组小鼠巨噬细胞体外吞噬人红细胞情况 操作步骤见“1.8”，获得人脐血红细胞，按照500 μL染色体系，取 1×10^8 人脐血红细胞加入20 μL CFSE染色15 min，使人红细胞被CFSE标记。实验分为BALB/c组和SIRPA-KI组。分别取BALB/c和SIRPA-KI小鼠已诱导的骨髓巨噬细胞各5个孔，弃48孔细胞培养板培养基，PBS缓冲液冲洗，每孔孵育 1×10^7 个CFSE标记的红细胞，37℃、2 h。孵育结束清洗并裂红，尽量除净红细胞，刮取细胞于流式管中，2 000 r·min⁻¹、4℃离心5 min，弃上清留100 μL，染Mouse F4/80 APC，4℃、30 min，采用流式细胞仪检测，FlowJo软件分析CFSE阳性率即为吞噬指数，代表

小鼠巨噬细胞体外吞噬人红细胞情况。

1.10 统计学分析 采用GraphPad prism 10统计软件进行统计学分析。各组小鼠巨噬细胞MFI、人红细胞剩余百分率和吞噬指数均符合正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定 WT等位基因小鼠基因条带和Mut等位基因小鼠基因条带见图5。小鼠1~4为雌性小鼠，5~7为雄性小鼠。基因型鉴定结果显示：小鼠2和4为Aa，其余均为aa。获得的纯合Mut小鼠即可继续扩大繁育并开展后续实验。



M: Marker; Lane 1-4: Female mice; Lane 5-7: Male mice.

图5 WT(A)和Mut(B)等位基因电泳图

Fig. 5 Electrophoregrams of WT(A) and Mut(B) allele genes

2.2 各组小鼠SIRPA基因结合人CD47能力 每组对照孔均无非特异性染色。与C57BL/6组比较，BALB/c组和SIRPA-KI组小鼠MFI明显升高($P < 0.01$)；与BALB/c组比较，SIRPA-KI组小鼠MFI明显升高($P < 0.01$)。提示C57BL/6组小鼠SIRPA基因对人CD47无结合亲和力，BALB/c特异性多态SIRPA基因与人CD47具有中等水平亲和力，SIRPA-KI小鼠SIRPA基因与人CD47蛋白表现出明显的亲和力，替换SIRPA基因后构建的SIRPA-KI小鼠结合人CD47能力明显提高。见图6和7。

2.3 各组小鼠巨噬细胞体内吞噬情况 C57BL/6组小鼠巨噬细胞整体清除人红细胞速率最快。巨噬细胞

吞噬6 h时，与SIRPA-KI组($16.00\% \pm 2.65\%$)比较，C57BL/6组小鼠体内人红细胞剩余百分率($2.67\% \pm 2.52\%$)明显降低($P < 0.01$)，且接近0%，人红细胞几乎全部被吞噬，提示C57BL/6小鼠巨噬细胞对人红细胞高度吞噬，其SIRPA基因与人CD47不亲和。巨噬细胞吞噬6 h时，与SIRPA-KI组比较，BALB/c组小鼠体内人红细胞剩余百分率($8.67\% \pm 3.22\%$)明显降低($P < 0.05$)；与C57BL/6组比较，BALB/c组小鼠体内人红细胞剩余百分率差异无统计学意义($P > 0.05$)，提示BALB/c小鼠巨噬细胞明显吞噬人红细胞，其SIRPA基因与人CD47亲和力较低。巨噬细胞吞噬6 h时，SIRPA-KI组小鼠体内人红细胞仍有剩余，

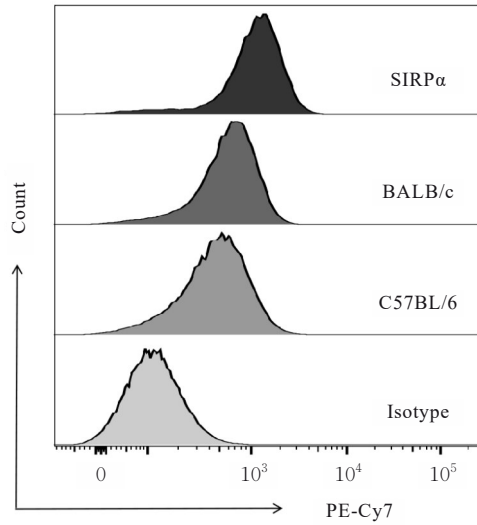
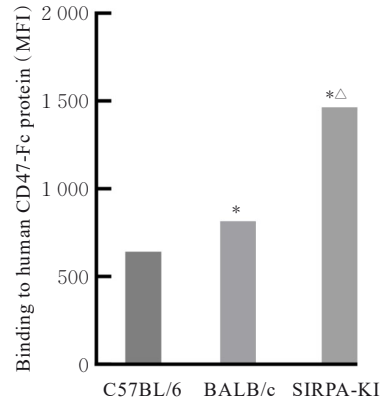


图6 各组小鼠 SIRPA 基因结合 CD47 亲和力

Fig. 6 Affinities of SIRPA gene binding with CD47 of mice in various groups



* $P < 0.01$ vs C57BL/6 group; $\Delta P < 0.001$ vs BALB/c group.

图7 各组小鼠 SIRPA 基因与人 CD47 结合 MFI

Fig. 7 MFI of SIRPA gene binding with human CD47 of mice in various groups

且与 C57BL/6 组和 BALB/c 组比较, SIRPA-KI 小

鼠 SIRPA 基因与人 CD47 亲和力最高, 证实敲入对人 CD47 高亲和力的 NOD 背景 SIRPA 基因能够延长人红细胞在小鼠体内存活时间。见图 8。

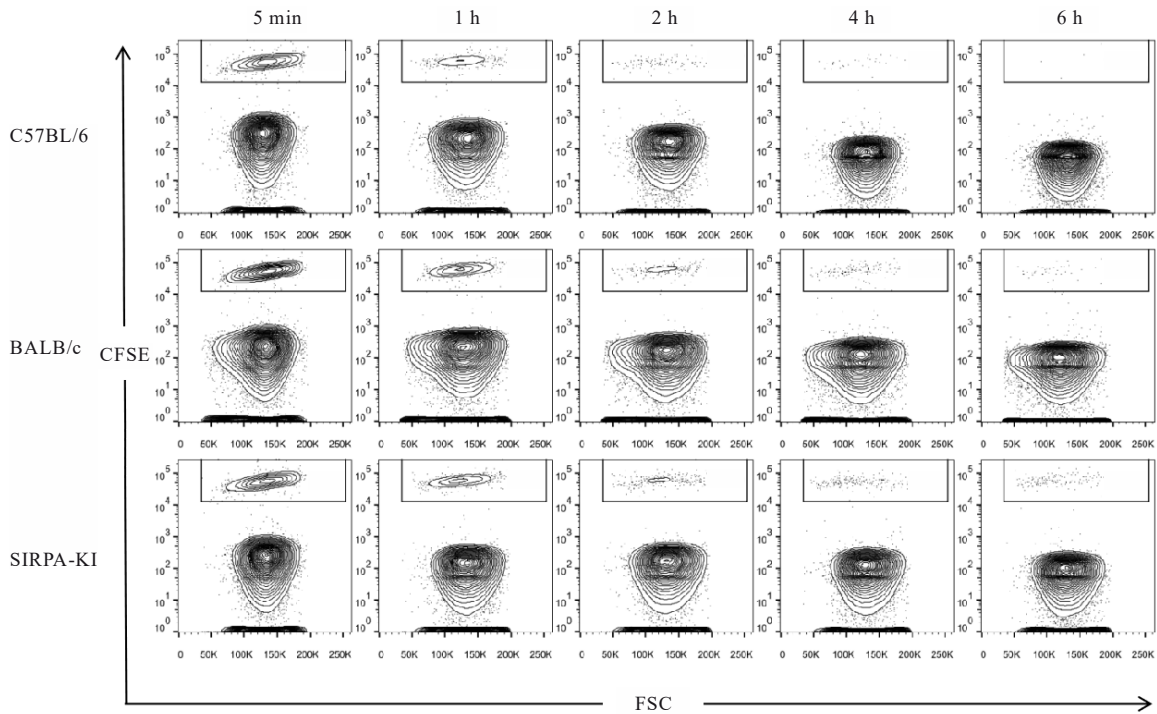
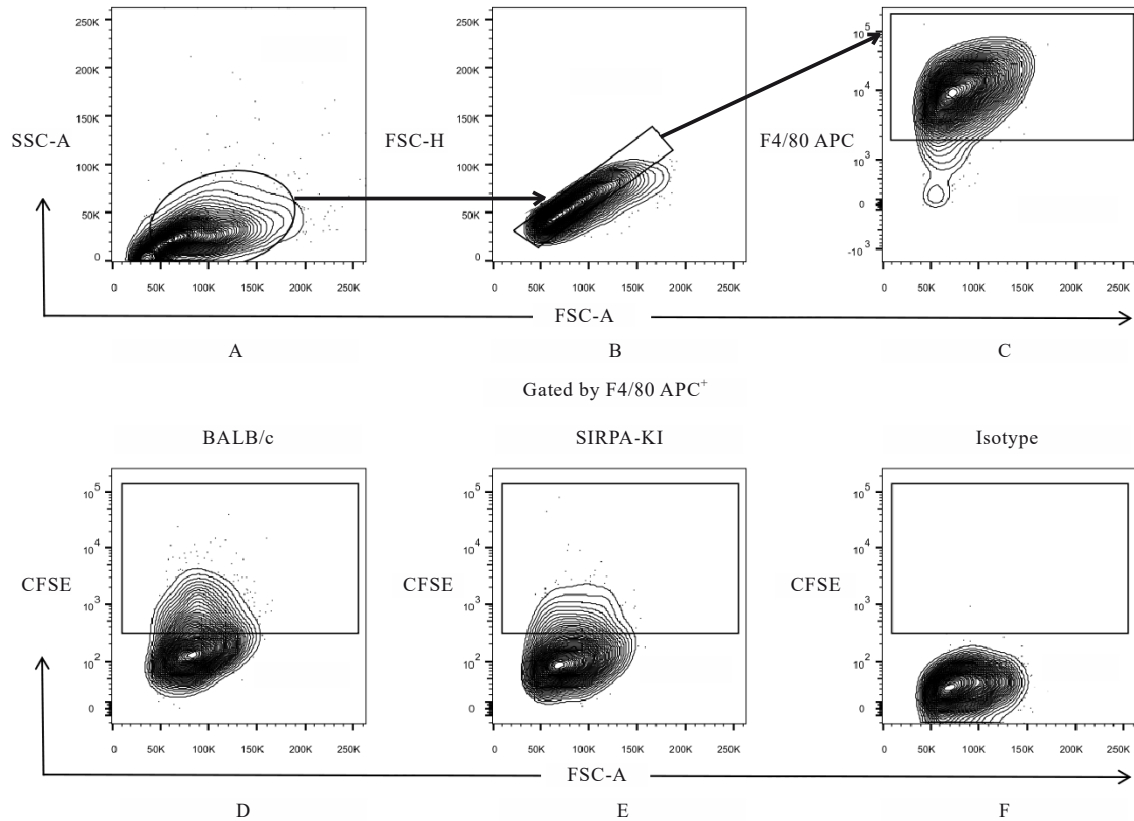


图8 注射不同时间各组小鼠体内人红细胞剩余百分率

Fig. 8 Remaining percentages of human red blood cells of mice in various groups after injected for different time

2.4 各组小鼠巨噬细胞体外吞噬情况 由 Mouse F4/80 APC 标记小鼠骨髓巨噬细胞, CFSE 标记人红细胞, BALB/c 组小鼠巨噬细胞明显吞噬人红细胞, 且吞噬指数 ($26.28\% \pm 3.28\%$) 较高, 与 BALB/c 组比较, SIRPA-KI 组小鼠巨噬细胞吞噬

指数 ($16.98\% \pm 0.74\%$) 明显降低 ($P < 0.01$), 提示构建的 SIRPA-KI 小鼠 SIRPA 基因与人 CD47 更亲和, 二者结合诱导的“别吞噬我”信号可以有效阻止小鼠巨噬细胞吞噬人红细胞。见图 9。



A:SSC-A vs FSC-H scatter plot; B:FSC-A vs FSC-H scatter plot (gating); C:FSC-A vs F4/80 APC contour plot; D:BALB/c FSC-A vs CFSE contour plot; E:SIRPA-KI CFSE vs FSC-A contour plot; F:Isotype FSC-A vs CFSE contour plot.

图9 各组小鼠巨噬细胞体外吞噬指数

Fig. 9 Indexes of engulfing of macrophages of mice in various groups *in vivo*

3 讨论

通过将人类造血淋巴细胞或组织植入免疫缺陷小鼠而创建的“人源化”小鼠模型是一项新兴技术,具有人类造血系统的人源化小鼠为评估人类对感染、炎症和癌症的免疫反应提供了一种有价值的小动物模型,在多个生物医学领域具有广泛吸引力^[16]。

研究^[17]表明:在人类细胞异种移植至免疫缺陷小鼠体内时,小鼠品系背景较为重要。NOD背景的免疫缺陷小鼠支持人造血细胞植入,BALB/c品系的小鼠也可以在体内支持人造血重建,但其作用较NOD品系更差^[18]。在免疫缺陷的NOD品系中有效的人类细胞植入是因NOD特异性SIRPA基因多态性^[14]。SIRPA基因的NOD特异性多态性允许NOD-SIRPA结合人CD47,CD47是在细胞中广泛表达的糖蛋白,SIRPA基因的胞质区具有免疫受体酪氨酸抑制基序,细胞表面CD47与巨噬细胞上SIRPA基因结合通过磷酸化SIRPA基因相关抑制基序来激发抑制信号,阻止其吞噬活性,阻止宿

主巨噬细胞吞噬人类移植物,从而抑制排斥反应^[19-20]。

BALB/c品系小鼠的异种移植能力也由SIRPA-CD47自我识别系统介导,BALB/c SIRPA基因能够以介于C57BL/6 SIRPA和NOD SIRPA中间水平与人CD47结合^[12, 21]。BALB/c来源的巨噬细胞在小鼠体外对人造血干细胞表现出适度的吞噬活性,与其结合活性一致。小鼠品系对异种移植的影响主要归因于品系特异性多态性SIRPA基因与人CD47的结合亲和力。因此,在建立高效的异种移植模型时,进一步修饰BALB/c小鼠SIRPA基因以增强与人CD47的结合力,对于最小化宿主巨噬细胞的抑制作用和提高移植存活率较为重要。

本研究成功采用CRISPR/Cas9技术在BALB/c品系小鼠敲入NOD特异性多态性SIRPA基因,期望能够优化促进异种植入,建立高效的异种移植模型。基因编辑小鼠鉴定基因型获得纯合敲入的小鼠后进行功能验证。通过人CD47 Fc融合蛋白与来自

C57BL/6、BALB/c 和 SIRPA-KI 小鼠表达 SIRPA 基因的巨噬细胞结合, 比较各品系小鼠 SIRPA 基因结合 CD47 蛋白能力。本研究结果显示: C57BL/6 小鼠 SIRPA 基因对人 CD47 的结合亲和力最低, BALB/c 特异性多态性 SIRPA 基因与人类 CD47 亲和力适中, 而 SIRPA-KI 鼠与人 CD47-Fc 蛋白表现出明显的结合亲和力, 且与其他品系小鼠比较存在明显差异, 与先前研究^[22]结果一致。提示敲入 NOD 背景 SIRPA 基因构建的 SIRPA^{NOD/NOD} 鼠结合人 CD47 蛋白能力具有明显提升效果。本研究结果显示: C57BL/6 小鼠巨噬细胞体内人红细胞清除速率最高, 在 6 h 时人红细胞几乎全部被吞噬, 此时 SIRPA-KI 组小鼠体内人红细胞还有剩余, 与 BALB/c 组比较具有明显差异, 提示该基因编辑后的小鼠构建较为成功, 抑制吞噬功能也具有良好效果, 体外实验也验证了这一结果; BALB/c 组小鼠体内巨噬细胞适度吞噬人造血干细胞, SIRPA-KI 组小鼠体内巨噬细胞吞噬指数较 BALB/c 组明显降低, 吞噬水平得到了明显抑制, 小鼠品系明显优化。因此, 本研究获得的 BLAB/c SIRPA^{NOD/NOD} 鼠, 其来自 NOD 的 SIRPA 基因与人 CD47 结合诱导的“别吞噬我”信号增强, 可以明显抑制小鼠巨噬细胞吞噬人红细胞, 为异种移植提供了一种更有效的小鼠模型。

综上所述, 本研究在小鼠 BALB/c 品系中敲入 NOD 背景 SIRPA 基因, 成功构建 BLAB/c SIRPA^{NOD/NOD} 小鼠, 提高了 BALB/c 品系小鼠对人 CD47 的亲和力, 明显抑制了巨噬细胞对人红细胞的吞噬能力。在此种类型小鼠的基础上可继续进行基因编辑, 有望进一步提高人类移植细胞或组织的存活率, 为构建人造造血干细胞移植小鼠模型提供了有效的研究工具。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

陶明阳参与研究设计、研究实施、数据采集和分析及论文撰写, 李馨参与实验数据收集, 吕亚楠参与数据整理和分析, 胡正参与研究设计和论文审阅。

[参考文献]

- [1] BREHM M A, SHULTZ L D, GREINER D L. Humanized mouse models to study human diseases [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010, 17(2): 120-125.
- [2] ITO R, TAKAHASHI T, KATANO I, et al. Current advances in humanized mouse models [J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(3): 208-214.
- [3] GREINER D L, HESSELTON R A, SHULTZ L D. SCID mouse models of human stem cell engraftment [J]. *Stem Cells*, 1998, 16(3): 166-177.
- [4] SHULTZ L D, BANUELOS S, LYONS B, et al. NOD/LtSz-Rag1nullPfpnull mice: a new model system with increased levels of human peripheral leukocyte and hematopoietic stem-cell engraftment [J]. *Transplantation*, 2003, 76(7): 1036-1042.
- [5] ROH Y J, GONG J E, KIM J E, et al. Comparison of immunophenotypes between Rag2 knockout mice derived from two different sources [J]. *Lab Anim Res*, 2023, 39(1): 2.
- [6] ITO M, HIRAMATSU H, KOBAYASHI K, et al. NOD/SCID/gamma (c) (null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells [J]. *Blood*, 2002, 100(9): 3175-3182.
- [7] BAXTER A G, COOKE A. Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice [J]. *Diabetes*, 1993, 42(11): 1574-1578.
- [8] LOGTENBERG M E W, SCHEEREN F A, SCHUMACHER T N. The CD47-SIRP α immune checkpoint [J]. *Immunity*, 2020, 52(5): 742-752.
- [9] MORRISSEY M A, KERN N, VALE R D. CD47 ligation repositions the inhibitory receptor SIRPA to suppress integrin activation and phagocytosis [J]. *Immunity*, 2020, 53(2): 290-302.
- [10] TAKENAKA K, PRASOLAVA T K, WANG J C Y, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(12): 1313-1323.
- [11] GUTIERREZ-BARBOSA H, MEDINA-MORENO S, PERDOMO-CELIS F, et al. A comparison of lymphoid and myeloid cells derived from human hematopoietic stem cells xenografted into NOD-derived mouse strains [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6): 1548.
- [12] IWAMOTO C, TAKENAKA K, URATA S, et al. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment [J]. *Exp Hematol*, 2014, 42(3): 163-171.e1.
- [13] BREHM M A, CUTHBERT A, YANG C X, et al. Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of

- mice bearing the IL2 rgamma (null) mutation [J]. *Clin Immunol*, 2010, 135(1): 84-98.
- [14] YAMAUCHI T, TAKENAKA K, URATA S, et al. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment[J]. *Blood*, 2013, 121(8): 1316-1325.
- [15] MA Y W, ZHANG L F, HUANG X X. Genome modification by CRISPR/Cas9[J]. *FEBS J*, 2014, 281(23): 5186-5193.
- [16] LOPEZ-LASTRA S, MASSE-RANSON G, FIQUET O, et al. A functional DC cross talk promotes human ILC homeostasis in humanized mice [J]. *Blood Adv*, 2017, 1(10): 601-614.
- [17] SHULTZ L D, SCHWEITZER P A, CHRISTIANSON S W, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice[J]. *J Immunol*, 1995, 154(1): 180-191.
- [18] 邹波, 杨娉婷. 嵌合抗原受体T细胞疗法在自身免疫性疾病中的应用[J]. *中国实用内科杂志*, 2024, 44(6): 466-471.
- [19] CHEN J, ZHONG M C, GUO H J, et al. SLAMF7 is critical for phagocytosis of haematopoietic tumour cells *via* Mac-1 integrin[J]. *Nature*, 2017, 544(7651): 493-497.
- [20] JIA X, YAN B J, TIAN X Q, et al. CD47/SIRP α pathway mediates cancer immune escape and immunotherapy[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(13): 3281-3287.
- [21] LEGRAND N, HUNTINGTON N D, NAGASAWA M, et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(32): 13224-13229.
- [22] JINNOUCHI F, YAMAUCHI T, YURINO A, et al. A human SIRPA knock-in xenograft mouse model to study human hematopoietic and cancer stem cells [J]. *Blood*, 2020, 135(19): 1661-1672.