

网络出版时间: 2023-06-19 10:48:55 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1411.011>

巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠模型的构建

薛茜¹, 李鉴洋², 高文茜¹, 张玉侠¹

摘要 目的 制备髓系(包括巨噬细胞和粒细胞)特异敲除哺乳动物不育系 20 样激酶 1(MST1) 基因小鼠, 为研究巨噬细胞 MST1 在临床相关疾病发生中的作用及机制提供动物模型。方法 利用 MST1 基因携带 loxP 位点的小鼠($Mst1^{lox/lox}$) 和髓系细胞特异表达 LysM-Cre 小鼠杂交构建巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠($Mst1^{lox/lox}$ LysM-Cre⁺, 即 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$); 通过聚合酶链式反应(PCR) 分别扩增 loxP 位点和 Cre 基因进行基因型鉴定; 通过定量 PCR 以及免疫荧光验证 MST1 在巨噬细胞中的敲除效率; 通过流式细胞术检测肝脏主要免疫细胞群。结果 $Mst1^{lox/lox}$ LysM-Cre⁺, 即 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 为巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠基因型; qPCR 和免疫荧光检测表明骨髓来源的巨噬细胞和腹腔巨噬细胞的 MST1 敲除效率达 70% 以上; 流式检测表明敲除巨噬细胞 MST1 基因对小鼠肝脏的主要免疫细胞群无明显影响。结论 成功构建巨噬细胞特异敲除 MST1 小鼠模型, 为进一步研究巨噬细胞 MST1 在临床相关疾病中的作用及机制奠

定了基础。

关键词 哺乳动物不育系 20 样激酶 1; Cre-loxP; 巨噬细胞; 基因敲除小鼠; Hippo 通路

中图分类号 R 392.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)10-1672-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.011

哺乳动物不育系 20 样激酶 1(mammalian sterile line 20-like kinase 1, MST1) 是 Hippo 通路的关键激酶, 在调控细胞增殖和分化过程中发挥着重要的作用^[1]。在经典 Hippo 通路中, MST1 可以和萨尔瓦多家族同源物 1(salvador homolog 1, SAV1) 相互作用, 磷酸化激活下游的大肿瘤抑制基因 1/2(large tumor suppressor 1/2, LATS1/2), 进而磷酸化 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP) 和有 PDZ 结合基序的转录辅激活物(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ), 二者磷酸化后与 14-3-3 蛋白结合滞留在胞质中, 无法发挥转录共激活功能, 从而抑制细胞增殖、促进细胞凋亡^[2-3]。

此外, 研究^[4-5]表明, MST1 在单核/巨噬细胞中高表达, 以 MST1 激酶为核心的非经典的 Hippo 通路对调控巨噬细胞参与的疾病免疫反应以及巨噬细胞表型和功能有着重要的影响。因此, 该研究利用 Cre-loxP 系统构建巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠

2023-05-22 接收

基金项目: 炎症免疫性疾病安徽省实验室开放基金项目(编号: IMM-DL202105); 安徽医科大学第一临床医学院临床医学“5+3”一体化早期接触科研项目(编号: 2021-ZQKY-59)

作者单位: 安徽医科大学¹ 基础医学院病理生理学教研室、² 第一临床医学院, 合肥 230032

作者简介: 薛茜, 女, 硕士研究生;

张玉侠, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhan-gyuxia@ahmu.edu.cn

diameter (LVEDD), left ventricular end systolic dimension (LVESD) and serum cTNI, CKMB, Mb and LDH significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of ROS, MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α and the mRNA and protein levels of SENP-1 and HIF-1 α in myocardial tissue also significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of LVEF, LVFS, serum GSH and SOD significantly decreased ($P < 0.05$), and the SUMOylates level of HIF-1 α protein in myocardial tissue also significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with CIH group, AAV-shSENP-1 group had less myocardial pathological damage, the levels of LVEDD, LVESD and serum cTNI, CKMB, Mb and LDH significantly decreased ($P < 0.05$), and the levels of ROS, MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α and the mRNA and protein levels of SENP-1 and HIF-1 α in myocardial tissue also significantly decreased ($P < 0.05$), the levels of LVEF, LVFS, serum GSH and SOD significantly increased ($P < 0.05$), and the SUMOylates level of HIF-1 α protein in myocardial tissue also significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of SENP-1 expression can alleviate CIH induced myocarditis and oxidative stress in rats, improve myocardial injury and cardiac dysfunction, and its mechanism may be related to the improvement of HIF-1 α SUMOylates level, thus inhibiting HIF-1 α expression.

Key words chronic intermittent hypoxia; small ubiquitin-like modifier-specific protease-1; myocardial injury; hypoxia inducible factor-1 α

模型($Mst1^{lox/lox}$ LysM-Cre⁺) ,为进一步研究巨噬细胞 MST1 在临床相关疾病中的作用和机制提供实验模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 胎牛血清、DMEM 培养基、0.25% 胰酶消化液(美国 GIBCO 公司);青霉素链霉素双抗(美国 Hyclone 公司);Anti-MST1(英国 Abcam 公司);抗小鼠的流式抗体 FITC F4/80 ,Per-cp / cy5.5 CD3 ,APC CD4 (美国 Biolegend 公司);山羊抗兔 IgG (H + L) 交叉吸附抗体(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);鼠尾裂解液(成都福际生物技术有限公司);逆转录试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);预混型 qPCR 试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);正置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.1.2 实验动物 髓系细胞表达 Cre 重组酶的小鼠 $Mst1^{+/+}$ LysM-Cre(♀) 和 MST1 第四外显子两侧含 loxP 位点的小鼠 $Mst1^{lox/lox}$ (♂) 由上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所王红艳教授提供;所有实验小鼠均在安徽医科大学动物实验中心 SPF 条件下饲养。

1.2 方法

1.2.1 小鼠配繁策略 首先利用 $Mst1^{+/+}$ LysM-Cre (♀) 小鼠与 $Mst1^{lox/lox}$ (♂) 小鼠交配,产生同时携带杂合 loxP 位点和 LysM-Cre 的杂合 F1 代小鼠 ($Mst1^{lox/+}$ LysM-Cre^{+/+}) 将这种基因型小鼠反复与 F0 代 $Mst1^{lox/lox}$ (♂) 小鼠回交,以获得同时携带 $Mst1$ loxP 位点和 LysM-Cre 的纯合小鼠 ($Mst1^{lox/lox}$ LysM-Cre^{+/+}) ,杂交策略见图 1。 $Mst1^{lox/lox}$ LysM-Cre⁺ (即 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$) 小鼠和 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠将分别被作为巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠和对照小鼠。

1.2.2 小鼠基因型鉴定 剪取鼠尾,按 50 : 1 比例加入鼠尾裂解液,60 ℃ 金属浴 25 min,95 ℃ 水浴 5 min,迅速置于冰上,12 000 r/min,离心 5 min,吸取上清液 -20 ℃ 保存。基因型鉴定引物见表 1。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,根据片段大小确定小鼠基因型。

1.2.3 小鼠骨髓、腹腔巨噬细胞的分离 6~8 周小鼠麻醉后,颈椎脱臼处死。分离小鼠后肢腿骨,注射器吸取 10% DMEM 高糖培养基反复冲洗骨髓腔,

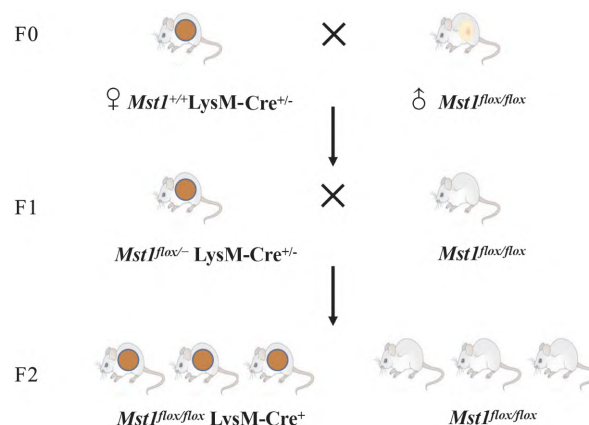


图1 小鼠配繁策略

表1 巨噬细胞 MST1 特异敲除小鼠的基因型鉴定引物

引物名称	引物序列(5'-3')
<i>Mst1</i>	F : GCTGATCCATGTCTCTACTCC R : GCTGCCATAATACTTGACTACG
<i>Mutant-Cre</i>	F : CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC R : CCCAGAAATGCCAGATTACG
<i>WT-Cre</i>	F : CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC R : TTACAGTCGGCCAGGCTGAC

将冲洗物 2 000 r/min,离心 5 min,弃上清液,用含 M-CSF(18 ng/ml) 的上述培养基重悬细胞沉淀,定期换液,培养 7 d 获得骨髓来源的巨噬细胞。相同方法处死小鼠,腹部正中纵切口切开皮肤,PBS(含 2% FBS) 反复灌洗腹腔,收集灌洗液 1 000 r/min,离心 8 min,弃上清液,DMEM(含 10% FBS) 重悬细胞,培养 2 d(12、24 h 换液) 获得腹腔巨噬细胞。

1.2.4 qPCR 检测巨噬细胞 MST1 的 mRNA 水平 纯化的巨噬细胞加 1 ml TRIzol 裂解 5 min 后,加入 0.2 ml 三氯甲烷抽提 RNA,加入 0.4 ml 异丙醇沉淀 RNA,4 ℃,12 000 r/min,离心 10 min,弃上清液,加入 1 ml 75% 乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次,加 0.02 ml 的 DEPC 水溶解 RNA,取 2 μl 检测 RNA 浓度。取 2 μg RNA,反转录得到 cDNA,作为模板进行 PCR 反应。反应条件为:95 ℃、30 s,1 个循环;95 ℃、5 min;60 ℃、30 s,40 个循环。*Mst1* 的引物序列为:上游 5'-AGGAATACAGTAATAGGGAC-3',下游 5'-AATATTGCCCTCATTGGATG-3';内参基因 β -actin 的引物序列为:上游 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3',下游 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。以 β -actin 为内参,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.2.5 腹腔巨噬细胞免疫荧光染色 纯化的腹腔巨噬细胞 4% 多聚甲醛固定 20 min,室温 10% 山羊

血清封闭 1 h, 加入 anti-MST1 (1 : 200) 4 °C 过夜。PBS 清洗 3 次, 加入 FITC anti-mouse F4/80 (1 : 200) 和二抗 (1 : 200), 山羊抗兔 IgG (H + L) 交叉吸附抗体 594, 室温、避光孵育 1.5 h。PBS 清洗 3 次, 避光进行 DAPI 染色, 完成后, 室温晾干, 封片, 拍照。

1.2.6 小鼠肝脏淋巴细胞的分离 麻醉后颈椎脱臼处死小鼠, 75% 乙醇溶液浸泡 5 min, 无菌取出肝脏, 置于细胞筛上, 剪碎后注射器活塞研磨, 收集肝组织于 50 ml 离心管, 冰上静置 10 ~ 15 min。上清液与沉淀之间出现明显界限, 吸取上清液, 4 °C, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 40% Percoll 重悬沉淀, 20 °C, 4 000 r/min 离心 10 min。用巴氏吸管吸除肝浆和 Percoll, 沉淀加适量红细胞裂解液, 置于冰上 8 min, 加等体积 PBS 终止裂解, 离心洗涤, 获得肝脏淋巴细胞。

1.2.7 肝脏淋巴细胞流式检测 每管加入肝脏淋巴细胞 1.0×10^6 个, 加 5 μ l 大鼠血清室温封闭 30 min。分别加入流式抗体各 1 μ l (T 细胞采用 CD3 和 CD4 抗体, B 细胞采用 CD19 抗体, 巨噬细胞采用 CD11b 和 F4/80 抗体), 4 °C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次, 弃上清液加入 200 μ l 固定液 (4% PFA) 重悬, BD 流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 实验结果采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠的基因型鉴定 鼠尾 DNA 通过 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳检测, 分别鉴定 loxP 位点和 Cre 的表达, 含 loxP 位点的小鼠, 可扩增出 600 bp 的片段, WT 小鼠扩增的片段为 450 bp。表达 Cre 重组酶 (Cre-MUT) 的小鼠, 可扩增出 700 bp 的片段, WT 小鼠, 可扩增出 350 bp 的片段。如图 2 所示, 1、2、5、6 号鼠为纯合 $Mst1^{lox/lox}$ LysM-Cre⁺ 小鼠 ($Mst1^{\Delta M/\Delta M}$), 而 3、4、7 号鼠为对照鼠 ($Mst1^{lox/lox}$)。C57 为野生型对照组, PC 为阳性对照组 (即已知基因型为 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 的小鼠)、NC 为阴性对照组 (未加入 DNA 模板)。由基因型鉴定结果 $Mst1^{lox/lox}$ LysM-Cre⁺ 小鼠 ($Mst1^{\Delta M/\Delta M}$) 应为巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠。

2.2 RT-qPCR 验证巨噬细胞敲除 MST1 的效果

RT-qPCR 检测 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠和 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠的腹腔巨噬细胞和骨髓巨噬细胞的 MST1 表达水平。

结果见图 3。

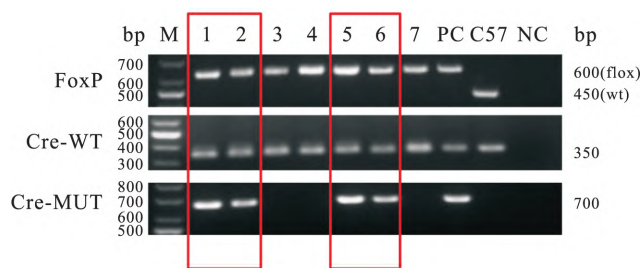


图 2 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠和 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠的基因型鉴定

1: 纯合 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠; 2: 纯合 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠; 3: 纯合 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠; 4: 纯合 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠; 5: 纯合 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠; 6: 纯合 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠; 7: 纯合 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠; M: Marker; C57 为野生型小鼠; PC: 阳性对照 (即已知基因型为 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 的小鼠); NC: 阴性对照 (未加入 DNA 模板)

与 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠比较, $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠的骨髓巨噬细胞中 MST1 的 mRNA 水平显著降低, 相对表达量下调了 60% ~ 70% ($t = 4.116$, $P = 0.0021$, 图 3A), 而腹腔巨噬细胞中未能检测到目标基因 mRNA 的表达 ($t = 8.055$, $P = 0.0001$, 图 3B), 证明巨噬细胞中 MST1 被成功敲除。

2.3 免疫荧光检测小鼠腹腔巨噬细胞中 MST1 的敲除效果 分离并纯化 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠和 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠腹腔巨噬细胞, 采用免疫荧光检测其 MST1 蛋白的表达水平, 结果如图 4 所示。 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠腹腔巨噬细胞中 MST1 的蛋白表达明显低于 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠 ($t = 11.93$, $P = 0.0003$)。以上结果提示成功构建 MST1 巨噬细胞特异性敲除小鼠模型。

2.4 巨噬细胞 MST1 敲除对小鼠肝脏的主要免疫细胞群的影响 分离 $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠和 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠的肝脏淋巴细胞, 分别标记 T 细胞 (CD3)、B 细胞 (CD19) 以及巨噬细胞 (CD11b, F4/80) 的表面标志性抗原, 流式检测肝脏中 T 细胞, B 细胞 (图 5A), CD4⁺ T 细胞, CD8⁺ T (即 CD3⁺ CD4⁻ T) (图 5B), Kupffer 细胞 (KC, CD11b^{low} F4/80^{high}) 和单核来源的巨噬细胞 (MoMs, CD11b^{high} F4/80^{low}) (图 5C) 的比例。结果表明, $Mst1^{lox/lox}$ 小鼠和 $Mst1^{\Delta M/\Delta M}$ 小鼠肝脏中主要淋巴细胞群的比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明巨噬细胞敲除 MST1 对于肝脏的主要的免疫细胞群无明显影响。

3 讨论

MST1 又称丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 4, 作为

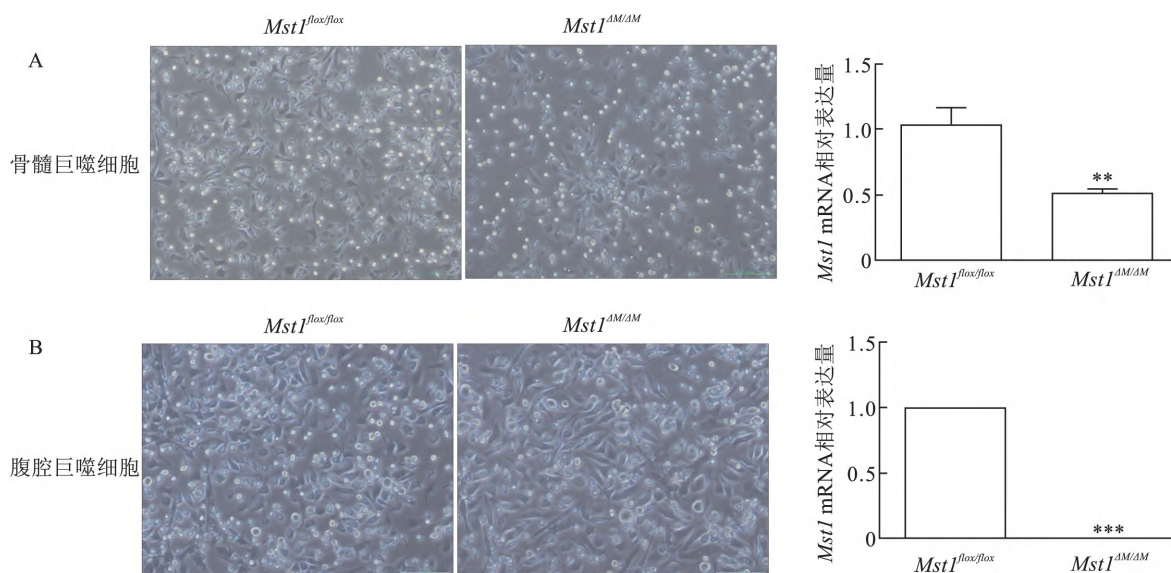


图3 qPCR 验证巨噬细胞中 MST1 的敲除效果 ×200

A: *Mst1^{flox/flox}* 小鼠和 *Mst1^{ΔM/ΔM}* 小鼠骨髓巨噬细胞中 MST1 的 mRNA 水平; B: *Mst1^{flox/flox}* 小鼠和 *Mst1^{ΔM/ΔM}* 小鼠腹腔巨噬细胞中 MST1 的 mRNA 水平; 与 *Mst1^{flox/flox}* 小鼠比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

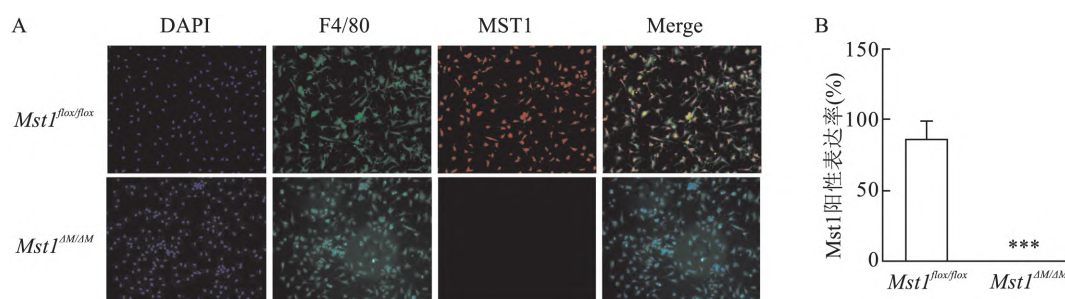


图4 巨噬细胞中 MST1 的敲除效果

A: *Mst1^{flox/flox}* 和 *Mst1^{ΔM/ΔM}* 小鼠的腹腔巨噬细胞荧光抗体 F4/80 和 MST1 免疫荧光 ×200; B: MST1 蛋白表达情况; 与 *Mst1^{flox/flox}* 小鼠比较: *** $P < 0.001$

Hippo 信号通路主要成分,参与调控细胞的发生、增殖、应激和凋亡等多种细胞生物学过程^[1]。有研究^[6]发现, MST1 与多种临床疾病的发生、发展密切相关,包括肿瘤、动脉粥样硬化、自身免疫性疾病等。

巨噬细胞在多种临床疾病的发生、发展及转归过程中发挥关键调节作用,其活化状态和功能受到多种因素的调控。丝苏氨酸蛋白激酶 MST1,在巨噬细胞中高表达,可通过多种途径被激活,参与巨噬细胞表型和功能的调节,例如巨噬细胞表面 Toll 样受体,可通过与髓样分化因子结合激活 MST1^[7];过氧化氢溶液中的活性氧也可以有效激活 MST1,进而通过 Nrf2 来维持巨噬细胞内的氧化还原稳态^[8]。MST1 可抑制巨噬细胞的炎症反应,促进巨噬细胞

的抗感染免疫。Maejima et al^[9]报道,巨噬细胞 MST1 可通过抑制自噬和促进凋亡加快动脉粥样硬化进展。研究^[10-12]发现, MST1 对慢性炎症诱导的肝纤维化和肝细胞癌的小鼠具有保护作用。因此深入探究 MST1 在机体内的作用,将有助于阐明包括肝纤维化、动脉粥样硬化等在内多种疾病的发生机制,进而有助于疾病的治疗;仅通过体外细胞和分子生物学实验研究 MST1 的功能,不足以反映生物体内的复杂环境及细胞间的相互作用,鉴于巨噬细胞在多类临床疾病中发挥关键调控作用,构建巨噬细胞特异性敲除 MST1 对于临床疾病的研究具有重要意义。

条件性基因敲除小鼠是一种新型动物模型,可

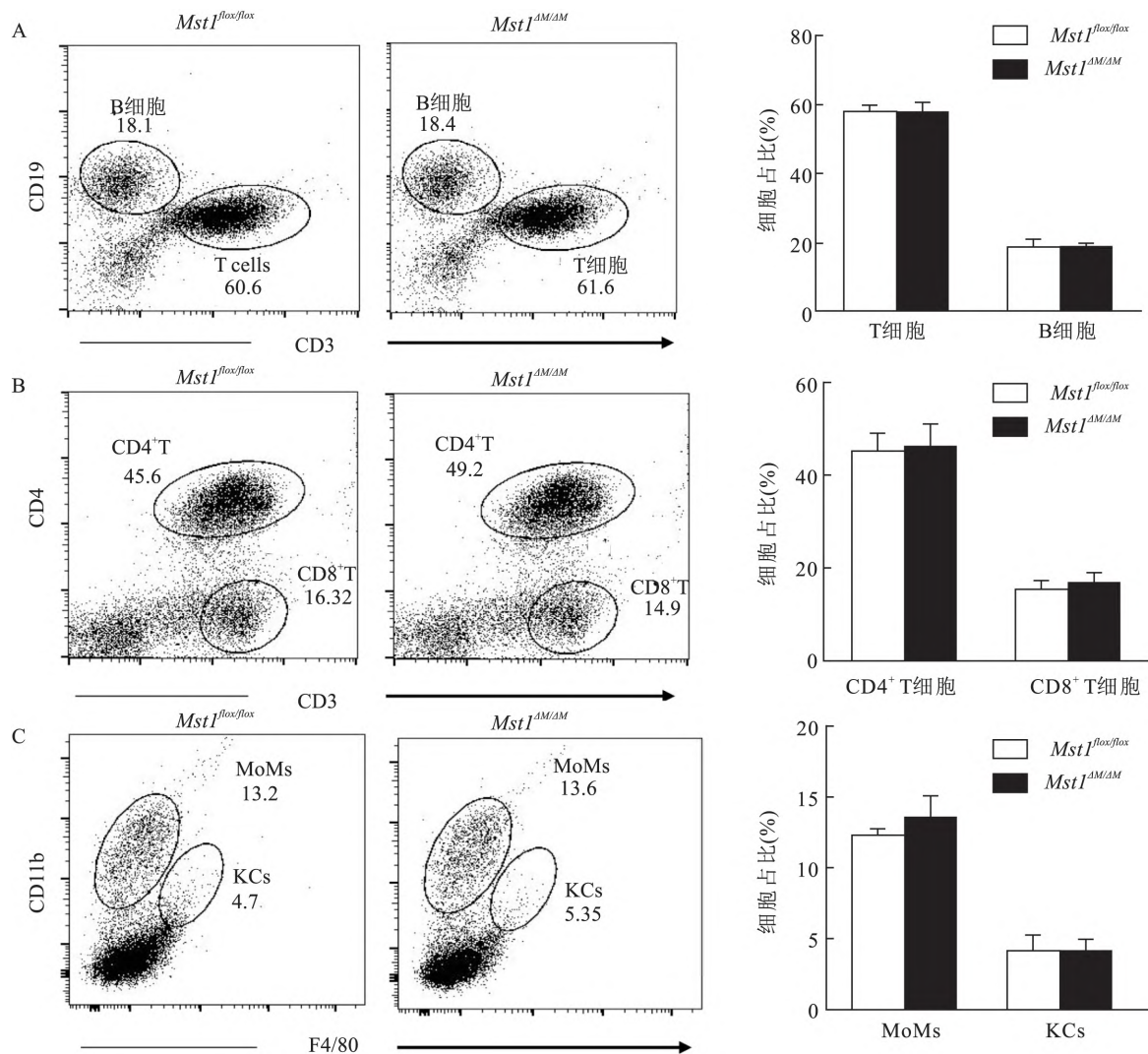


图5 流式细胞术检测 *Mst1^{flox/flox}* 小鼠和 *Mst1^{ΔM/ΔM}* 小鼠肝脏主要免疫细胞群

A: *Mst1^{flox/flox}* 小鼠和 *Mst1^{ΔM/ΔM}* 小鼠肝脏中 T、B 细胞的比例; B: *Mst1^{flox/flox}* 小鼠和 *Mst1^{ΔM/ΔM}* 小鼠肝脏中 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞比例; C: *Mst1^{flox/flox}* 小鼠和 *Mst1^{ΔM/ΔM}* 小鼠肝脏中单核来源的巨噬细胞 (MoMs) 和肝脏固有巨噬细胞 (Kupffer 细胞, KCs) 比例

以在特定的组织上精确地敲除目标基因,从而研究该基因在特定组织上的功能。这种技术在疾病研究中具有重要的应用价值,能够更好地理解疾病的发生机制和寻找治疗方法^[13]。

Cre-loxP 系统目前已被广泛应用于基因的条件性敲除,能够在生物体内实现组织特异性和发育时期特异性敲除指定基因^[14]。当 Cre 重组酶在含有 loxP 位点的靶基因的小鼠中表达时,loxP 位点之间的基因片段会被 Cre 重组酶切除,实现靶基因敲除^[15]。本研究利用选取髓系特异性 LysM 启动子调控 Cre 重组酶的表达,通过 LysM-Cre 小鼠与 *Mst1^{flox/flox}* 小鼠杂交,成功构建巨噬细胞特异性敲除 MST1 的小鼠模型,经验证敲除效果良好。

采用 qPCR 验证 MST1 的敲除效果时,分别提取小鼠的骨髓巨噬细胞和腹腔巨噬细胞进行验证。结果发现骨髓巨噬细胞内 MST1 的敲除效率稍大于 70%,而腹腔巨噬细胞的敲除效率为 100% (未在敲除鼠腹腔巨噬细胞内检测到 MST1)。这种敲除效率的差异可能是分离的骨髓巨噬细胞的纯度较低所致,若采用骨髓巨噬细胞进行相关实验需要进一步提高纯化程度。

免疫荧光检测 *Mst1^{flox/flox}* LysM-Cre⁺ 小鼠的腹腔巨噬细胞,表明细胞内 MST1 蛋白表达量明显下调,表明巨噬细胞特异性敲除 MST1 小鼠模型 (*Mst1^{flox/flox}* LysM-Cre⁺) 构建成功,为进一步研究巨噬细胞 MST1 敲除在相关疾病进展中的作用提供了

理想的动物模型。

参考文献

- [1] Wang Y, Jia A, Cao Y, et al. Hippo kinases MST1/2 regulate immune cell functions in cancer, infection, and autoimmune diseases [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2020, 30(5): 427–42.
- [2] Tang W, Li M, Yangzhong X, et al. Hippo signaling pathway and respiratory diseases [J]. *Cell Death Discov* 2022, 8(1): 213.
- [3] Kwon H, Kim J, Jho E H. Role of the Hippo pathway and mechanisms for controlling cellular localization of YAP/TAZ [J]. *FEBS J*, 2022, 289(19): 5798–818.
- [4] Wree A, Mc Geough M D, Inzaugarat M E, et al. NLRP3 inflammasome driven liver injury and fibrosis: Roles of IL-17 and TNF in mice [J]. *Hepatology*, 2018, 67(2): 736–49.
- [5] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Annu Rev Pathol* 2020, 15: 123–47.
- [6] Zhang Y. The emerging role of MST1 in immune suppression and its potential as a therapeutic target in immune-related diseases [J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(5): 747–55.
- [7] 赵桂芳, 董少忠, 宋杰. Hippo 信号通路在免疫反应中的相关研究进展 [J]. *国际免疫学杂志* 2022, 45(5): 524–9.
- [8] Wang P, Geng J, Gao J, et al. Macrophage achieves self-protection against oxidative stress-induced ageing through the Mst-Nrf2 axis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 755.
- [9] Maejima Y, Zablocki D, Nah J, et al. The role of the hippo pathway in autophagy in the heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 118(17): 3320–30.
- [10] Zhang Q, Zhou R, Xu P. The Hippo pathway in innate anti-microbial immunity and anti-tumor immunity [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1473.
- [11] Luo X, Zhang R, Lu M, et al. Hippo pathway counter-regulates innate immunity in hepatitis b virus infection [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 684424.
- [12] 余淑娟, 耿晶, 陈兰芬. Hippo 信号通路调控免疫细胞的功能 [J]. *遗传* 2017, 39(7): 650–8.
- [13] 乔思源, 江文刚, 汪思应. miR-100 基因敲除小鼠模型的构建及基因型鉴定 [J]. *安徽医科大学学报* 2021, 56(4): 510–3.
- [14] Liao Y. Conditional knockout mouse models: potential tools for understanding the molecular mechanisms underlying cardiovascular diseases [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(4): H682–93.
- [15] Song A J, Palmiter R D. Detecting and avoiding problems when using the cre-lox system [J]. *Trends Genet*, 2018, 34(5): 333–40.

Construction of macrophage-specific MST1 knockout mouse model

Xue Qian¹, Li Jianyang², Gao Wenqian¹, Zhang Yuxia¹

(¹Dept of Pathophysiology School of Basic Medicine,

²First Clinical Medical Institute Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To establish myeloid (including macrophage and granulocyte) specific knockout mice of mammalian sterile line 20-like kinase 1 (MST1) gene for further investigating the role and the mechanism of MST1 in macrophages in related clinical diseases. **Methods** *Mst1*^{fllox/fllox} LysM-Cre (referred to as *Mst1*^{ΔM/ΔM} hereafter) mice were generated by crossing *Mst1*^{fllox/fllox} with lysozyme (LysM-Cre) mice. The loxP site and Cre gene were amplified by PCR for genotyping. The knockdown efficiency of MST1 in macrophages was verified by quantitative PCR and immunofluorescence. The main immune cell populations in the livers were detected by flow cytometry. **Results** *Mst1*^{fllox/fllox} LysM-Cre (*Mst1*^{ΔM/ΔM}) was the genotype of macrophage specific knockout MST1 mice. The results of qPCR and immunofluorescence showed that the knock-out efficiency of MST1 was more than 70% in bone marrow-derived macrophages and peritoneal macrophages. Flow cytometry showed that macrophage knockout of MST1 had no significant effect on the main immune cell populations in the liver of mice. **Conclusion** Macrophage-specific knockout of MST1 mouse model is successfully established, which lays a foundation for further investigation on the role and mechanism of macrophage MST1 in clinical related disease.

Key words mammalian sterile line 20-like kinase 1; Cre-loxP; macrophage; gene knockout mice; Hippo pathway