

巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠的构建

董伟波,陈悦兰,王 焱,程 梦,魏 伟,常 艳

摘要 目的 构建巨噬细胞特异性色氨酸 2,3-双加氧酶(TDO2)基因敲除小鼠,为研究 TDO2 调控巨噬细胞功能影响疾病发生发展提供动物模型。方法 基于 Cre-Loxp 系统构建巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除(TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺)小鼠。采用 PCR 和琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型;采用 Western blot 和免疫荧光验证小鼠巨噬细胞中 TDO2 敲除效果;通过苏木精-伊红(HE)染色,观察主要组织器官是否存在自发病变。结果 基因型鉴定结果表明,flox 扩增产物长度在 407 bp 或 408 bp 处仅有一条条带且 Cre 扩增产物长度在 543 bp 处有一条条带的小鼠即为 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 小鼠。Western blot 结果显示,与 TDO2^{flox/flox} 小鼠相比,TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDMs)中 TDO2 表达降低($P < 0.01$)。免疫荧光结果显示,与 TDO2^{flox/flox} 小鼠相比,TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 小鼠腹腔巨噬细胞和 BMDMs 中 TDO2 表达降低。HE 染色结果显示,与 TDO2^{flox/flox} 小鼠相比,TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 小鼠肝脏、脑、肾脏和脾脏组织内细胞形态无明显差异。结论 成功构建 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 小鼠,为后续深入研究 TDO2 调控巨噬细胞活化在疾病中的作用和机制提供更加精准的实验动物模型。

关键词 TDO2;特异性基因敲除;巨噬细胞;基因型鉴定;Cre-loxP

中图分类号 R 332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)06-0994-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.013

色氨酸 2,3-双加氧酶(tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO2)是犬尿氨酸代谢通路(kynurenine pathway, KP)的重要限速酶之一,其表达和酶活性可由

2024-04-16 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:2108085MH320);
省留学人员创新项目择优资助计划项目(编号:2022LCX019)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,安徽省抗炎免疫药物协同创新中心,安徽医科大学风湿关节炎研究中心,合肥 230032

作者简介:董伟波,女,硕士研究生;

常 艳,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

魏 伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

全身色氨酸(tryptophan, Trp)水平和糖皮质激素诱导^[1]。大量研究表明 TDO2 在癌症、神经系统疾病和自身免疫病的发生发展中发挥重要作用。巨噬细胞作为机体免疫系统中重要的免疫细胞之一,其促炎表型的 M1 巨噬细胞和抗炎表型的 M2 巨噬细胞在多种疾病中发挥重要作用。文献^[2]报道 TDO2 通过 AKT/GSK3 β /IL-8 信号通路控制 M2 巨噬细胞极化,促进食管鳞状细胞癌的进展。课题组前期研究显示 TDO2 在多种免疫细胞中表达,且与野生型小鼠相比,TDO2 全身性敲除小鼠(TDO2^{-/-})腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PMs)的 M1/M2 比值降低^[3]。因此,为进一步揭示 TDO2 调控巨噬细胞在疾病中的作用和潜在机制,该研究利用 Cre/LoxP 重组酶系统将 Cre 重组酶插入到小鼠 Lyz2 基因起始密码子处,通过表型分析成功构建出巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠,同时在基因组和蛋白水平对其进行鉴定,为后期研究 TDO2 调控巨噬细胞功能活化在疾病中的作用提供动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 TDO2^{flox/flox} 小鼠由课题组前期繁育获得^[4],雌性 2 只,体质量 20~25 g;髓系细胞表达 Cre 重组酶的小鼠(以下简称 Lyz2-iCre 小鼠)由安徽医科大学杨雪枝老师馈赠,雄性 1 只,体质量 20~25 g,购自江苏集萃药康生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2018-0008。基因小鼠背景均为 C57BL/6,饲养于安徽医科大学临床药理研究所 SPF 级动物房内,饲养室内的温度保持在 22~26 °C,相对湿度维持在 40%~70%。本实验动物饲养和繁育均符合安徽医科大学动物实验伦理委员会批准(编号:PZ-2022-007)。

1.1.2 试剂 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0、0.5 mol/L EDTA pH 8.0(上海碧云天生物技术有限公司),NaCl/SDS(北京索莱宝生物科技有限公司),蛋白酶 K(美国 Sigma 公司),2 \times Rapid Taq Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),Marker I DNA

标准分子量 Ladder(北京索莱宝科技有限公司), 50 × TAE(北京博迈德生物), Agarose(广州赛国生物科技), 1 × TE pH8.0(北京兰杰柯科技有限公司), 核酸染料(北京兰杰柯科技有限公司), RAPI 裂解液、5 × 上样缓冲液(北京索莱宝生物科技有限公司), TDO2 一抗、GAPDH 一抗(美国 proteintech 公司), 山羊抗小鼠 IgG/辣根酶标记(北京中山金桥)、山羊抗兔 IgG/辣根酶标记(上海 Abmart 公司), F4/80 一抗(杭州华安生物技术有限公司), 显影液(美国 Affinity 公司), M-CSF(美国 MCE 公司)。

1.1.3 仪器 超微量核酸蛋白检测仪(型号: DS-11)(美国丹诺尔公司), 台式梯度 PCR 仪 T100™ Thermal Cycler(型号: T100™)(美国 Bio-Rad 公司), 天能 Tanon EPS-300 琼脂糖凝胶电泳仪(型号: EPS-300)(上海天能科技公司), 全自动数码凝胶图像分析系统(型号: Tanon-1600)(上海天能科技公司), 通用型电泳仪(型号: DYY-6C)(北京六一生物科技有限公司), 激光共聚焦显微镜(型号: Leica sp8)(德国徕卡公司), 组织原位细胞扫描分析系统(型号: Panoramic MIDI II)(山东斯瑞缔医疗科技)。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞特异性敲除 TDO2 小鼠的构建

由于纯合 flox 小鼠的目的基因片段上下游均插入了同向的 LoxP 片段, 将其与 Lyz2-iCre 小鼠进行杂交后, LoxP 元件锚定的打靶区域即 flox 区域将会被删除, 使后续的外显子移码突变, 提前终止蛋白的翻译, 从而达到基因敲除的目的(图 1A)。具体配繁如下: 首先, 将 TDO2^{flox/flox} 小鼠与 Lyz2-iCre⁺ 基因型小鼠交配获得 TDO2^{flox/+} Lyz2-iCre⁺ 小鼠(F1 代), 再将 TDO2^{flox/+} Lyz2-iCre⁺ 小鼠与 TDO2^{flox/flox} 交配获得 F2 代, F2 代有 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺、TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁻、TDO2^{flox/+} Lyz2-iCre⁺、TDO2^{flox/+} Lyz2-iCre⁻ 4 种基因型(图 1B)。其中 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 为巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠, 将 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁻ 作为对照组小鼠(TDO2^{flox/flox})。

1.2.2 巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠的 PCR 鉴定

1.2.2.1 小鼠基因组 DNA 的提取 剪取鼠尾(1 周龄鼠尾约 2~5 mm), 加入 490 μl 鼠尾裂解液(1 mol/L Tris HCl pH = 8.0、0.5 mol/L EDTA、5 mol/L NaCl、20% SDS)和 10 μl 蛋白酶 K, 在 55 °C 下, 混匀消化 8~12 h 至无肉眼可见块状或絮状物, 采用乙

醇沉淀提取法进一步提取 DNA。12 000 r/min 离心 1 min, 取上清液 450 μl 移入新 EP 管中, 再加入 900 μl 无水乙醇, 12 000 r/min 离心 15 min。弃上清液, 加入 1 ml 75% 乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液, 打开 EP 管盖, 室温晾干 5~10 min。加入 30 μl DEPC 水置于 37 °C 溶解 DNA, 30 min 后用枪头吹打混匀, 4 °C 保存。

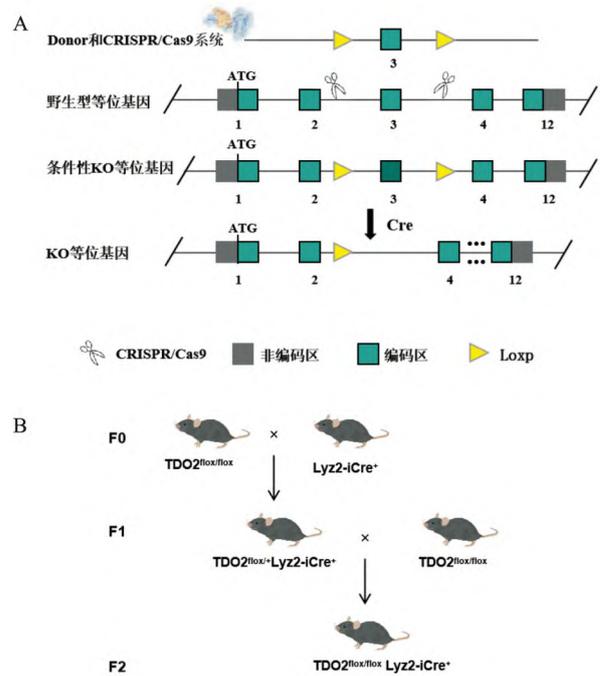


图 1 巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠构建与繁殖路线

A: 特异性 TDO2 敲除小鼠的构建策略; B: 小鼠繁殖路线

1.2.2.2 PCR 鉴定 PCR 反应总体系 25 μl; 分别加入 2 × Rapid Taq Master Mix 12.5 μl, ddH₂O 9.5 μl, 正反引物各 1 μl, 模板 cDNA 1 μl。PCR 扩增程序为: 95 °C、5 min, 98 °C、30 s, 65 °C、30 s, 72 °C、45 s, 20 个循环; 98 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、45 s, 20 个循环; 72 °C、5 min。基因鉴定策略见图 2; Flox 引物信息见表 1; Lyz2-iCre 引物信息见表 2。

1.2.2.3 凝胶电泳 称取 1.2 g Agarose 于锥形瓶中, 加入 60 ml TAE-buffer 放在微波炉中, 高火沸腾 3 次后拿出降温, 加入 10 μl 核酸染料, 摇匀倒入板子中, 插上梳子, 等待 30 min 后凝固。每孔点样 10 μl, marker 5 μl, 以 140V、400 mA 的条件电泳 30 min。结束电泳后, 拍照观察。

1.2.3 PMs 的提取 将小鼠麻醉后处死, 于超净台内用镊子拎起小鼠的腹部皮肤, 剪刀剪开小口; 用注射器抽取预冷的无菌 PBS, 在剪开的小口中轻轻打

表1 小鼠基因型鉴定 flox 引物序列

PCR 反应	引物名称	引物序列	产物大小(bp)
5'同源臂	JS04371-TDO2-5wt-tF1	F1:TGTGCCTATTCAAATCTGCTATG	WT:305
	JS04371-TDO2-5wt-tR1	R1:CGAACCATAATCACCTCCCAA	Targeted:407
3'同源臂	JS04371-TDO2-3wt-tF1	F1:ACTTGTTCATACCAATGAGAT	WT:305
	JS04371-TDO2-3wt-tR1	R1:AGCCTGTATCTCTGATAATCAAGAC	Targeted:408

表2 小鼠基因型鉴定 Lyz2-iCre 引物序列

PCR 反应	引物名称	引物序列	产物大小(bp)
5'同源臂	T003822-F1	F1:AGTGCTGAAGTCCATAGATCGG	WT:0
	T003822-R1	R1:CTGATTCTCCTCATCACCAGG	Targeted:543

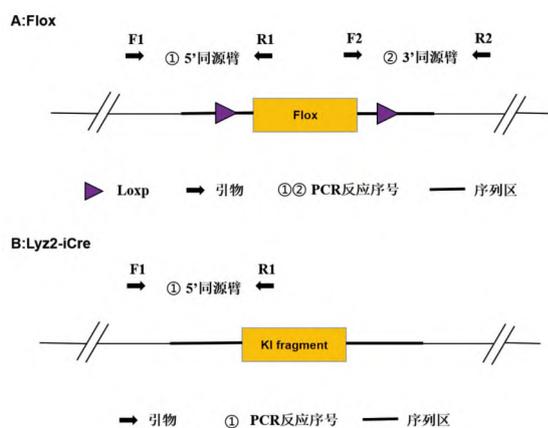


图2 小鼠鼠尾基因组 PCR 鉴定策略

入 PBS;轻揉小鼠腹部 2~3 min 后,静置 5 min,注射器吸取打入腹腔的液体至 15 ml 离心管中;1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入含 10% 血清的高糖 DMEM 培养基轻轻重悬,铺至 6 孔板,放入细胞培养箱中培养 4 h,收集贴壁细胞用于后续实验。

1.2.4 骨髓来源的巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 的分离与培养 将小鼠麻醉后处死,在超净台内分离小鼠股骨和胫骨,先放入 75% 乙醇溶液中浸泡 1 min,再换到无菌 PBS 中;在培养皿中加入 4 ml 高糖 DMEM,用剪刀剪断股骨和胫骨连接处,镊子夹取一根骨头,剪去两端,用 1 ml 注射器吸取适量培养基轻轻冲出骨髓细胞,至骨头变白;将冲出的细胞轻轻重悬,过纱网转移至新的 15 ml 无菌离心管中,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液;用 10% 高糖 DMEM 培养基适量体积重悬后铺板,当天计为第 0 天。在第 1、3 和 5 天先将原来培养基吸出,用 PBS 轻轻洗涤细胞,再加上含 M-CSF (10 ng/ml) 的 10% 高糖 DMEM 培养基;培养至第 7 天,即为 BMDMs,用于后续实验。

1.2.5 Western blot 使用裂解液 (RIPA : PMSF :

PI = 98 : 1 : 1) 提取 BMDMs 蛋白,将收集的蛋白与 5 × 上样缓冲液按比例混合,沸水浴 8 min, -20 °C 储存。先通过电泳将蛋白分离后,再 220 mA 转膜 1 h 获得蛋白条带;将条带放入 5% 脱脂牛奶 (1 g 脱脂奶粉 + 20 ml TPBS) 中,摇床上低速室温封闭 2 h;分别在对应位置的条带中敷上 GAPDH 一抗 (1 : 10 000) 和 TDO2 一抗 (1 : 400), 4 °C 孵育 18 h 以上;第二天 TPBS 清洗 3 次,在牛奶中加入山羊抗兔 IgG (1 : 5 000) 和山羊抗小鼠 IgG (1 : 10 000),摇床上室温孵育 2 h;孵育完成后 TPBS 清洗 3 次,PBS 清洗 1 次,每次 7 min;避光条件下进行曝光并拍照。

1.2.6 细胞爬片免疫荧光 加入 500 μl 4% 多聚甲醛固定 15 min,吸弃多聚甲醛;加入 0.5% 的 Triton 通透 10 min;加入 5% BSA 封闭 1 h;加入 80 μl 配制好的抗体 (TDO2 : F4/80 : 一抗稀释液 = 1 : 2 : 200) 于 4 °C 冰箱过夜;第二天洗去一抗,加入 80 μl 配制好的荧光二抗 (羊抗大鼠 488 : 羊抗兔 594 : 二抗稀释液 = 1 : 1 : 98) 室温避光孵育 1 h;加入 80 μl DAPI 溶液室温避光染 5 min;最后封片,激光共聚焦显微镜拍片。

1.2.7 组织苏木精 - 伊红 (HE) 染色 选取 10 周龄同窝雄性 TDO2^{flox/flox} 和 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 小鼠肝脏、脑、肾脏、脾脏组织固定,包埋脱蜡、HE 染色、脱水透明、封片拍照。

1.3 统计学处理 所有实验数据采用 Graphpad prism 8.3.0 进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠的基因型鉴定结果

2.1.1 Flox 基因鉴定结果 若以 JS04371-Tdo2-5wt-tF1 和 JS04371-Tdo2-5wt-tR1 为引物,PCR 反应显示 305 bp 条带和 407 bp 条带的为 TDO2^{flox/+} 小

鼠;PCR反应显示305 bp条带的为同窝WT小鼠;PCR反应显示407 bp条带的为TDO2^{flox/flox}小鼠;若以JS04371-Tdo2-3wt-tF1和JS04371-Tdo2-3wt-tR1为引物,PCR反应显示305 bp条带和408 bp条带的为TDO2^{flox/+}小鼠;PCR反应显示305 bp条带的为WT小鼠;PCR反应显示408 bp条带的为TDO2^{flox/flox}小鼠。Flox基因型鉴定结果见图3A,其中1和4为TDO2^{flox/+}小鼠,2和3为TDO2^{flox/flox}小鼠。

2.1.2 Lyz2-iCre 基因鉴定结果 根据凝胶电泳结果显示,PCR反应扩增出543 bp条带大小为Lyz2-iCre⁺小鼠。Lyz2-iCre基因型鉴定结果见图3B,其中1和2为Lyz2-iCre⁻小鼠,3和4为Lyz2-iCre⁺小鼠。结合两者鉴定结果可知,1为TDO2^{flox/+}Lyz2-iCre⁻小鼠,2为TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁻小鼠,3为TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠,4为TDO2^{flox/+}Lyz2-iCre⁺小鼠。

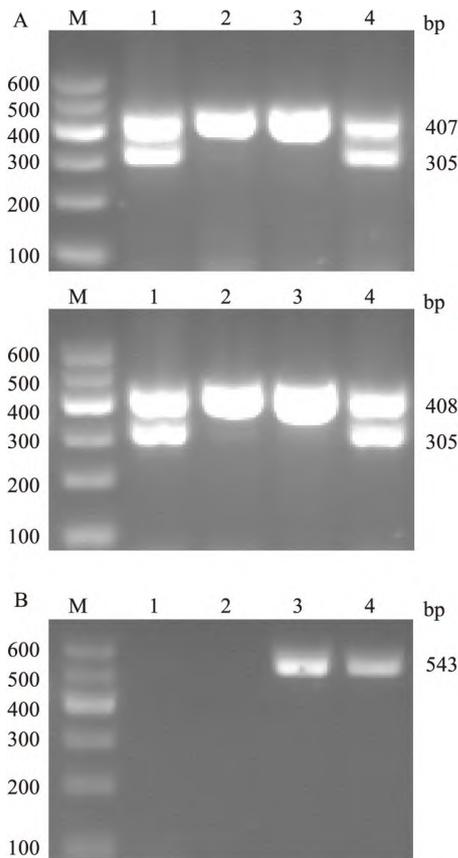


图3 小鼠基因型鉴定结果

A: Flox基因型鉴定结果;B: Lyz2-iCre基因型鉴定结果;1: TDO2^{flox/+}Lyz2-iCre⁻小鼠;2: TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁻小鼠;3: TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠;4: TDO2^{flox/+}Lyz2-iCre⁺小鼠

2.2 TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺的生长和繁育情况

TDO2^{flox/+}Lyz2-iCre⁺与TDO2^{flox/flox}杂交,每胎产5只左右幼鼠,成活率>90%,TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠约占四分之一,子代TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠能正常出生。经观察与分析,与TDO2^{flox/flox}小鼠相比,TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠的生长发育正常,毛色、外观无明显差异。见图4。

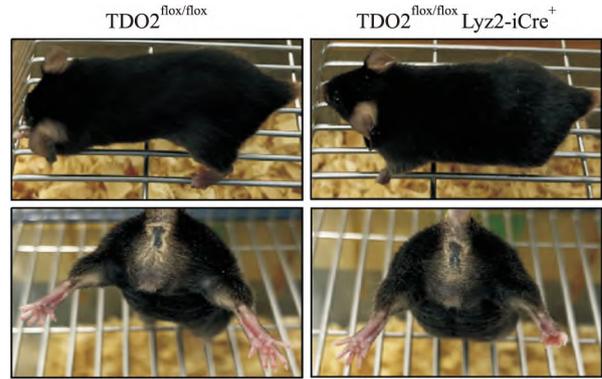


图4 TDO2^{flox/flox}小鼠和TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠照片

2.3 Western blot 检测 TDO2^{flox/flox}和 TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠 BMDMs 中 TDO2 敲除效果

Western blot 检测 TDO2^{flox/flox}和 TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠 BMDMs 中 TDO2 蛋白表达,结果显示,与TDO2^{flox/flox}小鼠相比,TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠 BMDMs TDO2 表达降低(P = 0.004 3, t = 5.817)。见图5。

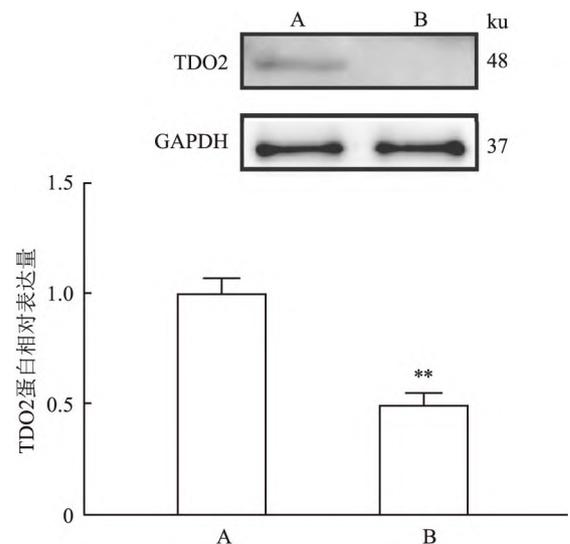


图5 TDO2^{flox/flox}和 TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠 BMDMs 中 TDO2 表达

A: TDO2^{flox/flox}小鼠;B: TDO2^{flox/flox}Lyz2-iCre⁺小鼠;与TDO2^{flox/flox}比较; ** P < 0.01

2.4 免疫荧光检测 TDO2^{flx/flx} 和 TDO2^{flx/flx} Lyz2-iCre⁺ 小鼠 PMs 和 BMDMs 中 TDO2 的敲除效果 免疫荧光观察小鼠的 PMs 和 BMDMs 中 TDO2 蛋白的表达,结果表明,与 TDO2^{flx/flx} 小鼠相比,TDO2^{flx/flx} Lyz2-iCre⁺ 小鼠 PMs (图 6A) 和 BMDMs(图 6B)中 TDO2 表达降低。

2.5 HE 染色观察 TDO2^{flx/flx} 小鼠和 TDO2^{flx/flx} Lyz2-iCre⁺ 小鼠肝脏、脑、肾脏和脾脏组织器官生长发育情况 为了观察各组织细胞内部的形态结构,解剖 10 周龄 TDO2^{flx/flx} Lyz2-iCre⁺ 小鼠及同窝对照

TDO2^{flx/flx} 小鼠,取主要组织器官进行 HE 染色。结果显示,与 TDO2^{flx/flx} 相比,TDO2^{flx/flx} Lyz2-iCre⁺ 小鼠肝脏中肝细胞形态结构均完整且大小正常,肝索呈放射状排列,周围未发现炎症细胞浸润;脑组织中海马区域排列整齐,核仁清晰;肾脏中肾小管无变性,排列有序,管腔形态大小正常,肾小球等结构均正常;脾脏结构正常,红白髓边界清晰,生发中心清晰可见。结果显示巨噬细胞 TDO2 敲除并未影响小鼠各组织器官的发育。见图 7。

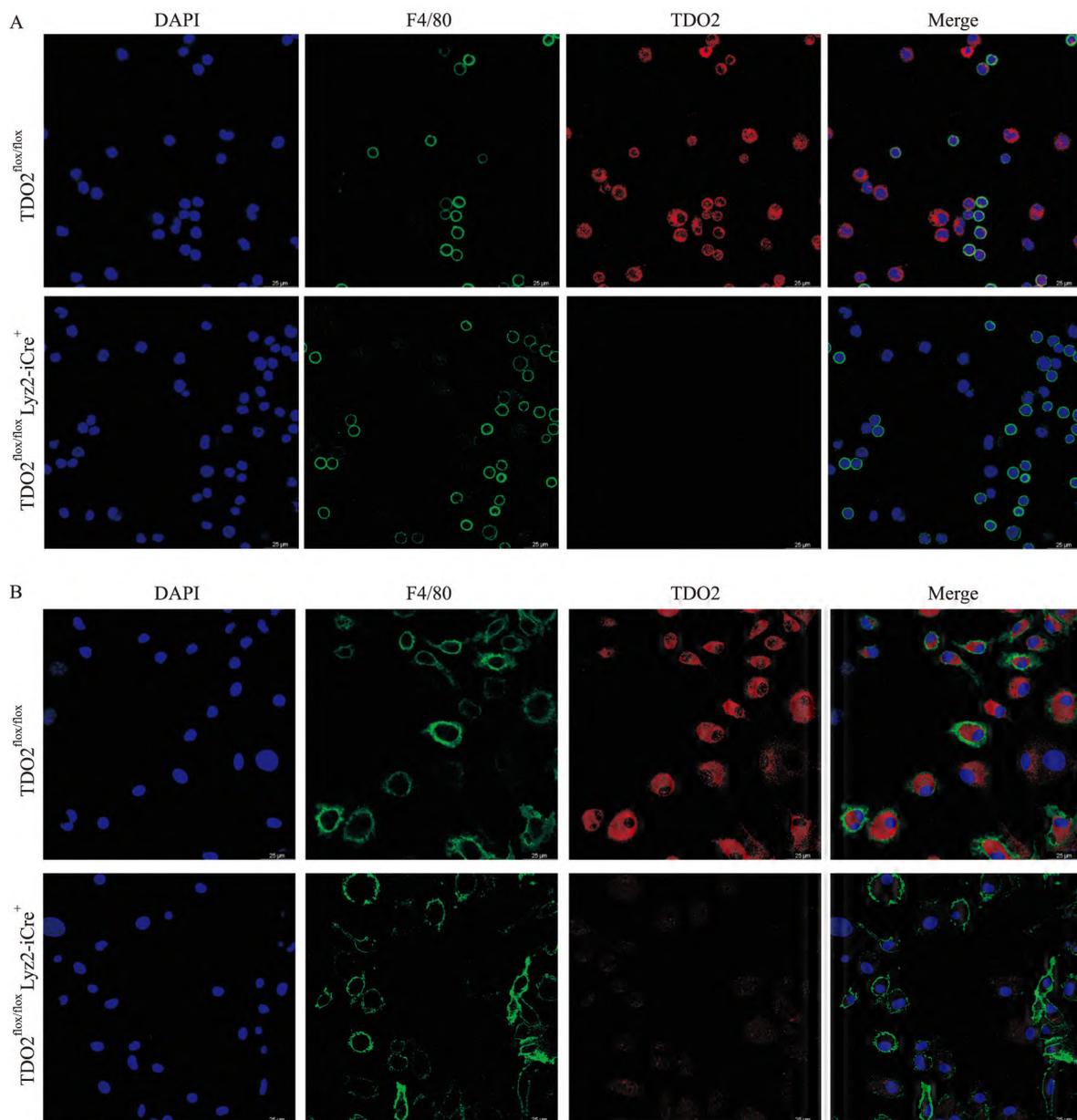
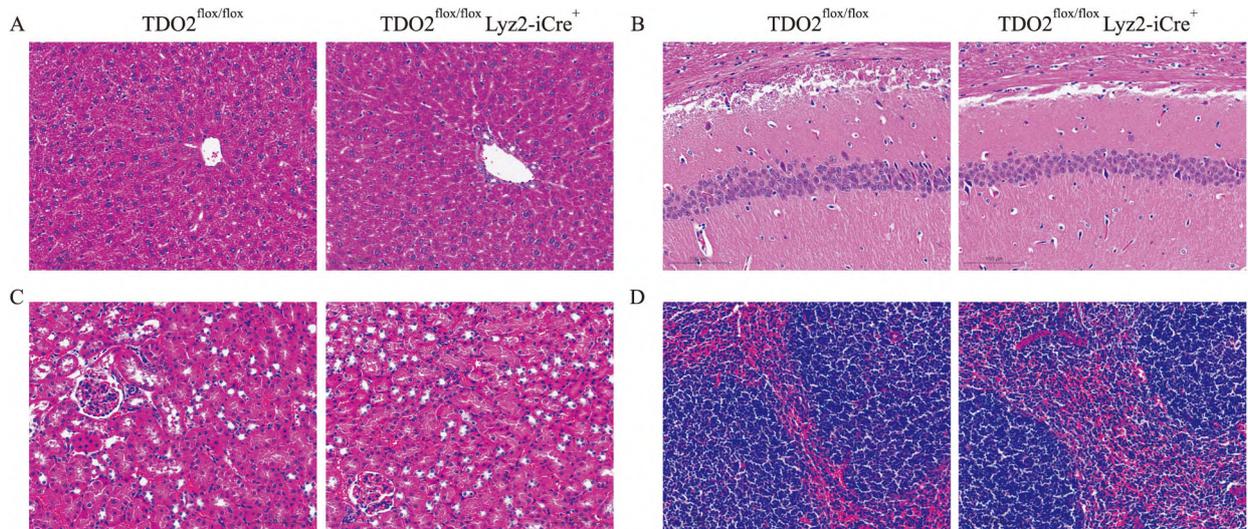


图 6 TDO2^{flx/flx} 和 TDO2^{flx/flx} Lyz2-iCre⁺ 小鼠 PMs 和 BMDMs 中 TDO2 表达 ×63
A:PMs 中 TDO2 的表达;B:BMDMs 中 TDO2 的表达

图7 TDO2^{flox/flox}小鼠和 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺小鼠各组织 HE ×40

A: 肝脏组织; B: 脑组织; C: 肾脏组织; D: 脾脏组织

3 讨论

TDO 是一种含血红素的同型四聚体胞质酶,由基因 TDO2 编码,介导 KP 的第一步和限速步骤,可以将底物 Trp 代谢为犬尿氨酸 (kynurenine, Kyn)^[5]。目前对 TDO2 的研究逐渐增多,并发现 TDO2 在多种疾病中发挥关键作用^[6-7]。文献^[8]报道, TDO2 介导产生的 Kyn 通过芳香烃受体与肿瘤细胞免疫逃逸密切相关。海马 TDO2 增加会促进行为缺陷,而 TDO2 药理学抑制可防止 APP-PS1 小鼠的认知能力下降,提示抑制 TDO2 为衰老相关疾病提供新的治疗策略^[9]。在自身免疫病中, TDO2 缺失能保护实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠脊髓中的神经元丢失^[10]。巨噬细胞在多种疾病中都发挥着重要的作用。课题组在研究类风湿关节炎的病理机制中,利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 RAW 264.7 细胞 TDO2 基因,发现敲除 TDO2 基因的 RAW 264.7 细胞极化、吞噬和分泌能力均减弱,提示 TDO2 可能参与调控巨噬细胞的功能活化^[11],但具体机制尚不明确。尽管课题组已经繁育出 TDO2^{-/-}小鼠,但无法特异性研究 TDO2 在各类细胞中的作用。因此,巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠的构建是必不可少的。构建巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠,深入研究 TDO2 调控巨噬细胞的作用,以及在疾病状态下参与的分子机制具有重要意义。

基于 CRISPR/Cas9 基因敲除技术及 Cre-loxp 系统建立稳定的特异性基因敲除实验动物模型已成为研究基因生物学功能的重要手段^[12]。将具有 LoxP

序列的目的基因突变小鼠和带有 Cre 酶基因的转基因 Cre 小鼠进行杂交,构建出在特定细胞中敲除目的基因的小鼠。相较于全身性基因敲除, Cre-loxp 系统构建特异性基因敲除的优点在于可以实现在特定的组织或细胞中敲除目的基因,且敲除效率可到 99%,适用范围广等。Lyz2 基因编码溶菌酶 2,主要在髓系细胞中表达,包括单核/巨噬细胞、粒细胞、树突状细胞等, Lyz2-iCre 小鼠是髓系细胞内特异性表达 Cre 的工具鼠,当与含有 loxP 位点的小鼠杂交时,子代可在骨髓细胞谱系中产生由 Cre 重组酶介导 loxP 位点间的序列重组。由于 Lyz2 是在髓系细胞中特异表达的酶,因此在被用于巨噬细胞基因功能的研究中需排除树突状细胞及粒细胞等髓系细胞可能存在的影响。与 Lyz2-CreERT 小鼠相比, Lyz2-iCre 小鼠有驱动密码子经过优化和不需要他莫昔芬诱导等优点^[13]。本研究首先通过 TDO2^{flox/flox}小鼠与 Lyz2-iCre⁺小鼠杂交获得 TDO2^{flox/+} Lyz2-iCre⁺小鼠,再将其与 TDO2^{flox/flox}小鼠杂交,最终获得 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺小鼠,然后用 Western blot 和免疫荧光验证 TDO2 在巨噬细胞中被敲除成功,且在繁育过程中观察到 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺小鼠相较于 TDO2^{flox/flox}小鼠生长速度和体质量无明显差异。HE 染色结果显示 TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺和 TDO2^{flox/flox}小鼠肝脏、脑、肾脏和脾脏组织器官细胞内部的形态结构均无明显差异。

综上所述,本研究成功构建巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠,为进一步研究 TDO2 调控巨噬细胞活化在炎症免疫性相关性疾病中发挥的作用和

机制提供了有效的研究工具。

参考文献

- [1] Cheong J E, Sun L. Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR pathway for cancer immunotherapy -challenges and opportunities[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(3): 307 - 25.
- [2] Zhao Y, Sun J, Li Y, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase controls M2 macrophages polarization to promote esophageal squamous cell carcinoma progression *via* AKT/GSK3 β /IL-8 signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(9): 2835 - 49.
- [3] Li S, Li S, Zhao Y, et al. A comprehensive analysis of TDO2 expression in immune cells and characterization of immune cell phenotype in TDO2 knockout mice [J]. *Transgenic Res*, 2021, 30(6): 781 - 97.
- [4] 许 媛, 魏 伟, 常 艳. 小鼠 TDO2 基因条件性敲除打靶载体的构建[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(7): 1082 - 6.
- [5] Lee R, Li J, Li J, et al. Synthetic essentiality of tryptophan 2,3-dioxygenase 2 in APC-mutated colorectal cancer [J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(7): 1702 - 17.
- [6] Ye Z, Yue L, Shi J, et al. Role of IDO and TDO in cancers and related diseases and the therapeutic implications [J]. *J Cancer*, 2019, 10(12): 2771 - 82.
- [7] Hu S, Lu H, Xie W, et al. TDO2 + myofibroblasts mediate immune suppression in malignant transformation of squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(19): e157649.
- [8] Zhong C, Peng L, Tao B, et al. TDO2 and tryptophan metabolites promote kynurenine/AhR signals to facilitate glioma progression and immunosuppression [J]. *Am J Cancer Res*, 2022, 12(6): 2558 - 75.
- [9] Bano S, Sharif H, Sajid F, et al. Liver tryptophan 2,3-dioxygenase: a determinant of anxiety-like behaviour-studies with chronic nicotine administration in rats [J]. *Behav Pharmacol*, 2023, 34(6): 307 - 17.
- [10] Lanz T V, Williams S K, Stojic A, et al. Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) deficiency is associated with subclinical neuroprotection in a mouse model of multiple sclerosis [J]. *Sci Rep*, 2017, 24(7): 41271.
- [11] 李素素. TDO2 介导巨噬细胞极化在 CIA 小鼠中的作用和机制 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2021.
- [12] Hunker A C, Soden M E, Krayushkina D, et al. Conditional single vector CRISPR/SaCas9 viruses for efficient mutagenesis in the adult mouse nervous system [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(12): 4303 - 16. e6.
- [13] 魏 琦, 朱学敏, 刘潇一, 等. 诱导型巨噬细胞特异性敲除 GRK2 基因小鼠模型的构建及应用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(4): 534 - 40.

Construction of macrophage-specific TDO2 knockout mice

Dong Weibo, Chen Yuelan, Wang Yi, Cheng Meng, Wei Wei, Chang Yan

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Center of Rheumatoid Arthritis of Anhui Medical University, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032*)

Abstract Objective To provide an animal model for studying the effect of TDO2 on the function of macrophages on the occurrence and development of diseases by constructing macrophage-specific tryptophan, 2, 3-dioxygenase (TDO2) gene knockout mice. **Methods** TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ mice were constructed based on Cre/LoxP system. The genotypes of mice were identified by PCR amplification and agarose gel electrophoresis. Western blot and immunofluorescence were used to verify the effect of TDO2 knockdown in mouse macrophages. The spontaneous lesions in major tissues and organ were observed by HE stainings. **Results** The results of genotype identification showed that the mice with only one band at 407 bp or 408 bp for the flox amplification product and one band at 543 bp for the Cre amplification product were TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ mice. Western blot results showed that TDO2 expression in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) of TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ mice decreased compared with TDO2^{flox/flox} mice ($P < 0.01$). Immunofluorescence results showed that TDO2 expression in peritoneal macrophages and BMDMs of TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ mice decreased compared with TDO2^{flox/flox} mice. HE staining showed no significant differences in cell morphology in the liver, brain, kidney and spleen tissues of TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ mice compared to TDO2^{flox/flox} mice. **Conclusion** TDO2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ mice is successfully constructed, providing a more precise experimental animal model for subsequent in-depth study of the role and mechanism of TDO2-regulated macrophage activation in disease.

Key words TDO2; specific gene knockout; macrophage; genotype identification; Cre-loxP