

· 基础研究 ·

Prkdc 和 Il2rg 双敲除免疫缺陷小鼠的构建和初步应用

尹媛¹, 曾文滔¹, 周建丽¹, 梅云¹, 王颖¹, 李建民^{1,2}, 赖娅娜^{1*}

¹南京医科大学医药实验动物中心, 江苏省医药动物实验基地, 江苏省动物实验中心, ²南京医科大学医学细胞生物学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 构建NOD背景免疫缺陷小鼠, 作为新的人源肿瘤异种移植(patient-derived xenograft, PDX)模型。方法: 利用CRISPR/Cas9技术获得NOD背景Prkdc和Il2rg双基因敲除小鼠, 通过正常繁育得到能够稳定遗传的纯合子后代(命名为NYG小鼠), 流式细胞术检测小鼠外周血免疫细胞比例, 移植接种新鲜肿瘤组织, 观察记录肿瘤生长状况及HE染色观察传代PDX肿瘤形态学特点。结果: NYG小鼠外周血小鼠无成熟的T细胞、B细胞和NK细胞表达, 对移植的患者肿瘤组织几乎没有排斥反应, 组织病理学表型及免疫系统未见明显异常。结论: 成功构建NYG小鼠免疫缺陷小鼠, 为肿瘤学基础理论及应用研究提供了新的PDX动物模型。

[关键词] CRISPR/Cas9; PDX模型; 肿瘤

[中图分类号] Q784

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)08-1107-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20220809

Establishment and preliminary application of the immune - deficient mice models with Prkdc/Il2rg knockout

YIN Yuan¹, ZENG Wentao¹, ZHOU Jianli¹, MEI Yun¹, WANG Ying¹, LI Jianmin^{1,2}, LAI Yana^{1*}

¹Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Jiangsu Animal Experimental Center of Medical & Pharmaceutical Research, Jiangsu Laboratory Animal center; ²Department of Cell Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to establish a patient-derived xenograft (PDX) model of NOD background immunodeficient mice for human cancer preclinical and biological research. **Methods:** NOD-Prkdc^{scid}Il2rg^{ml} mice were obtained by CRISPR/cas9 technology, and homozygous offspring with stable inheritance were obtained through normal breeding. The proportion of immune cells in peripheral blood of mice was monitored by flow cytometry. Fresh tumor tissues were transplanted and inoculated. The tumor growth status and the morphological characteristics of passaged PDX tumors were observed and recorded. **Results:** There was no expression of mature T, B and NK cells in peripheral blood of NYG mice. There was almost no rejection to human cells and tissues, and there was no obvious abnormality in histopathological phenotype and immune system. **Conclusion:** NYG mice and immunodeficient mice were successfully constructed, which provided a new PDX animal model for the basic theory and application of oncology.

[Key words] CRISPR/Cas9; patient derived xenografts model; tumor

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(00): 1107-1111]

肿瘤动物模型在模拟人类肿瘤发生、发展、转移等生物学特性以及肿瘤药物研发、靶点筛选、个性化治疗领域扮演着至关重要的角色。过去几十年, 以NCI-60为代表的细胞系移植动物模型广泛用

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BE2019730)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lai yana@njmu.edu.cn

于癌症生物学的研究。但既往的研究表明, 人类癌症细胞系在移植时会由于不明原因失去它们最初的肿瘤特征, 如遗传信息、生长侵袭特性的改变及肿瘤异质性的丢失^[1]。因此, 美国国家癌症研究所最终决定用患者来源的异种移植(PDX)替代NCI-60用于药物筛选^[2]。

PDX是通过将患者肿瘤样本直接移植到免疫功能低下或免疫受损的小鼠构建动物模型。PDX模型的一个显著优势是移植后的肿瘤在借助移植受体提供维持其在体内生长所需营养支持的情况下,保留了患者肿瘤包括肿瘤细胞的基因表达谱和异质性等关键特征^[3-4],从而在药效评价^[5]、生物标志物的筛选^[6]和预测患者对药物响应程度^[7]等研究中都具有很高的应用价值。为成功建立PDX模型,需要选择合适的免疫缺陷小鼠品系作为肿瘤组织移植的受体,裸鼠、SCID以及NOD/SCID等一系列免疫功能高度低下的小鼠被尝试用作人类肿瘤异种移植的标准受体。NOG/NSG小鼠是免疫功能最差的小鼠,对正常和恶性人体组织的移植效率最高^[8]。然而,受到技术壁垒和使用限制,NOG/NSG的售价相对较高(在日本用于学术用途的每只小鼠售价为100美元),而且用户不能自行繁育这些小鼠。本研究团队通过采用CRISPR/Cas9基因编辑技术,构建了NOD背景的Prkdc和Il2rg双敲除免疫缺陷小鼠,命名为NYG小鼠,为肿瘤研究和药物评估提供了良好的PDX模型。

1 材料和方法

1.1 材料

pX330 - U6 - Chimeric_BB - CBh - hSpCas9 质粒(Plasmid#42230)由美国Addgene公司提供。实验动物均在南京医科大学医药实验动物中心屏障中饲养繁殖,符合南京医科大学实验动物伦理管理规范

(伦理号:IACUC-2011031)。ICR小鼠受体、结扎鼠购自南京医科大学医药实验动物中心。NOD小鼠购自北京维通利华生物技术有限公司和南京大学模式生物研究所。

MESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit 试剂盒(AM1345, Ambion公司,美国), HiScribe™ T7 High yield RNA Synthesis Kit 试剂盒(E2040S)、各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶(M0202S)(NEB公司,美国),胶回收试剂盒(9762, TaKaRa公司,日本),小鼠组织DNA抽提试剂盒(PD101-01)及PCR相关试剂(P213-03)(南京诺唯赞),血清(Hyclone公司,美国),RPMI 1640培养基(Gibco公司,美国),DMSO(Sigma公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 CRISPR 敲入方案的设计

小鼠Prkdc(16 Chr, gene ID: 19090, NCBI Reference Sequence: NC_000082.7)和Il2rg(X Chr, GENE ID: 16186, NCBI Reference Sequence: NC_000086.8)基因组序列来自NCBI, CAS9设计软件来自CRISPOR.ORG, 采用<http://crispr.dbcls.jp>和<http://asia.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>进行脱靶分析,每个基因分别设计2个靶点(表1),设计的靶序列构建至PT7-CRISP载体(自构),经测序验证后,用HiScribe™ T7 High yield RNA Synthesis Kit 试剂盒体外合成sgRNA。PX330质粒(Addgene)扩增全长Cas9基因,用MESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit试剂盒转录Cas9 mRNA, -80℃保存待用。

表1 目标靶点信息

Table 1 Target information

靶点名称	靶点序列+PAM	T7体外转录重叠PCR引物序列
mPrkdc-sgRNA1/fw	CGAGCTGTTTCAGAAACACCA AGG	ATAATACGACTCACTATAGG <u>CGAGCTGTTTCAGAAACACCA</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAG
mPrkdc-sgRNA1/rev	ACTGGAGGAAGTGTGATTCA TGG	ATAATACGACTCACTATAGG <u>ACTGGAGGAAGTGTGATTCA</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAG
mIl2rg-SG1/rev	ACAGCCAGAAGTAATCTCTT TGG	ATAATACGACTCACTATAGG <u>ACAGCCAGAAGTAATCTCTT</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAG
mIl2rg-SG2/fw	GACATTTGTTGTCCAGCTCC AGG	ATAATACGACTCACTATAGG <u>GACATTTGTTGTCCAGCTCC</u> GTTTTAGAGCTAGAAATAG

下划线为识别的靶点序列。

1.2.2 显微注射与胚胎移植

将Prkdc及Il2rg sgRNA、Cas9 mRNA用无RNA酶水混合稀释至终浓度为20、50 ng/μL,将混合液用显微操作仪注射入NOD小鼠0.5 d受精卵雄原核中,注射完成后将受精卵吸入预热的M16液滴中,

清洗3遍,植入0.5 d的假孕ICR小鼠输卵管中。

1.2.3 F0代小鼠的基因型鉴定

受精卵移植的假孕母鼠单笼饲养20 d后,观察出生情况。小崽长至7 d,趾标法进行小鼠编号。剪下的脚趾以鼠尾组织标本试剂盒提取基因组DNA,

进行PCR鉴定。PCR条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火复性30 s,72℃延伸30 s,扩增35个循环,PCR产物直接送苏州金唯智生物科技有限公司测序,测序序列用GENESNAP软件分析靶序列,选择阳性小鼠传代建系。鉴定引物序列如下,mPrkdc-tF:5'-GCCTGGCTGAAAGTGTAT-3',mPrkdc-tR:5'-TTCAAGGCAGGTTAGGAC-3';mIl2rg-tF:5'-TGAGGACCCAATCAAGTG-3',mIl2rg-tR:5'-GGCTACTTCTTTCCCGATTA-3'。

1.2.4 流式分析B细胞、T细胞和NK细胞

取8周龄NYG小鼠和野生型BALB/C经尾静脉采集外周血细胞100 μL,直接免疫荧光抗体标记法染色,用流式细胞仪检测分别用CD3、CD19和NKp46表达情况,用比对T、B和NK细胞的组成。

1.2.5 NYG小鼠用于PDX模型的成瘤实验

收集临床新鲜剩余手术肿瘤组织,尽快移至动物房生物安全柜内,取部分肿瘤组织分别置于70% RPMI1640培养基、20%胎牛血清和10% DMSO组成的保存溶液中液氮冻存及福尔巴林溶液中待用;另取部分肿瘤组织用RPMI1640培养基清洗,2 h内去除坏死组织后,将肿瘤组织切成若干2 mm×2 mm×2 mm小块;NYG小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液,麻醉剂量为60 mg/kg,备皮消毒,开(6±2)mm切口,背部皮下移植接种,缝合后在屏障内饲养。饲养荷瘤小鼠2~3个月,每周观察小鼠皮下移植瘤的生长情况,

首次生长的肿瘤为F0代。待移植瘤长径增长至1~2 cm,麻醉脱臼处死小鼠,剥离肿瘤组织,液氮冷冻。皮下移植的肿瘤,每7 d测量1次肿瘤的长径(L)与短径(W),计算肿瘤体积,肿瘤体积计算公式为 $V=1/2 \times (L \times W^2)$,绘制肿瘤生长曲线,当肿瘤长径达到1 cm时传代或冻存。

1.2.6 组织病理分析

临床剩余肿瘤组织和PDX模型分离的肿瘤组织经中性福尔马林固定制备组织切片,用HE染色,比较患者肿瘤组织与PDX模型肿瘤组织异同。

2 结果

2.1 NYG纯合子小鼠的获得和基因型的PCR鉴定

将sgRNA、Cas9 mRNA原核注射至受精卵细胞质中,移植后20 d小鼠出生,共计生存39只。以苯酚/氯仿法抽提鼠尾DNA,以目标外显子上下游引物mPrkdc-tF/mPrkdc-tR及mIl2rg-tF/mIl2rg-tR鉴定F0代小鼠。琼脂糖凝胶电泳,野生型小鼠Prkdc及Il2rg扩增条带分别为376 bp及359 bp。F0代首建小鼠性成熟后与NOD野生型小鼠交配,获得F1代杂合子小鼠,再通过杂合子小鼠自交获得可稳定遗传的F2代Prkdc及Il2rg敲除NYG纯合子小鼠模型。具体的鉴定策略及电泳结果见图1,测序结果显示Prkdc缺失10个碱基,Il2rg缺失50个碱基。



A:NYG小鼠的鉴定策略;B:NYG小鼠PCR鉴定电泳结果,1、2为NYG样品,G为野生型B6小鼠基因组DNA,M为DL2000 marker。

图1 PCR鉴定NYG小鼠

Figure 1 PCR identification result of NYG mice

2.2 FCM检测NYG小鼠的外周血免疫细胞

与野生型BALB/C小鼠相比,NYG小鼠CD3、CD19和NKp46的相对应区域没有荧光,说明NYG小鼠外周血中表达CD3、CD19和NKp46的成熟T、B和NK细胞不存在,见图2。

2.3 人源化异种移植PDX模型原代肿瘤成瘤结果

NYG小鼠皮下种植原代肿瘤组织后,饮食、活动及生长均良好,体重未出现明显下降。肿瘤种植

2周后,测量移植手术组织的PDX肿瘤体积。部分PDX模型体积的变化趋势和小鼠移植后肿瘤的生长状态见图3。结果显示,手术2周后,肿瘤组织生长出现增快的趋势,NYG-PDX成瘤正常。

2.4 患者原发肿瘤和PDX肿瘤的组织学比较

用NYG小鼠构建的PDX模型肿瘤组织病理特征与手术患者的组织病理特征类似。HE染色结果显示,癌组织浸润性生长。4例患者原发肿瘤和PDX

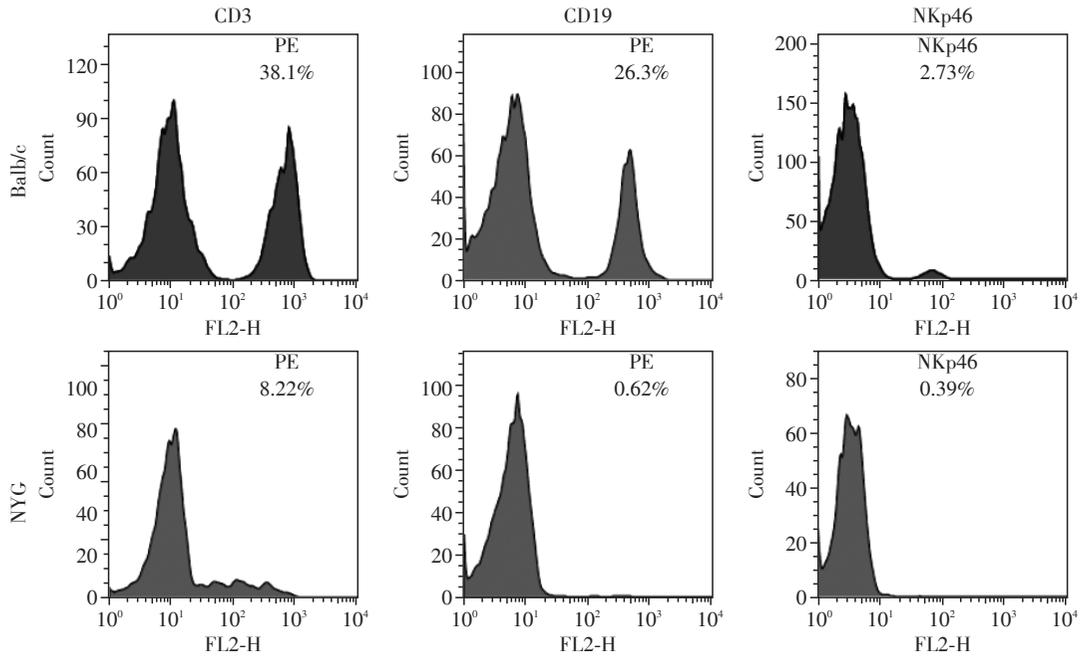
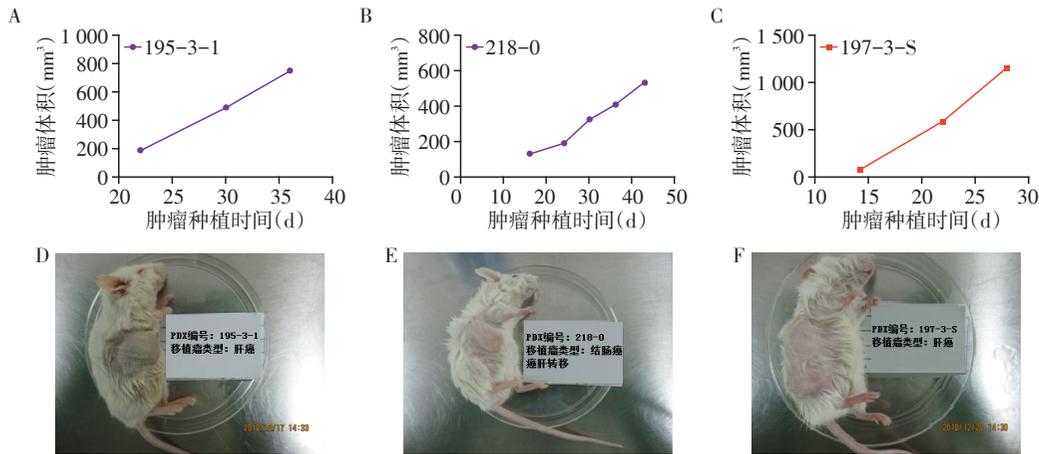


图2 NYG小鼠外周血CD3⁺CD19⁺NKp46⁺表达情况

Figure 2 CD3⁺CD19⁺NKp46⁺ expressed on peripheral blood cells of NYG mice



A~C:皮下种植原代肝癌/结肠癌肿瘤组织后的NYG小鼠体重增长趋势;D~F:NYG小鼠皮下种植原代肝癌/结肠癌肿瘤组织的生化优势。

图3 肝癌/结肠癌PDX模型的生长趋势和状态

Figure 3 HCC/Colon cancer PDX model growth characterization

肿瘤形态相似(图4),PDX肿瘤保留了原发肿瘤的形态学特点。

3 讨论

Il2rg是多种重要免疫因子的共同受体亚基,在免疫系统中发挥重要作用。敲除Il2rg将导致多种细胞因子受体传递信号受阻,NK缺陷和T、B淋巴细胞减少的表型^[2]。得益于CRISPR/Cas9的广泛应用和深入研究,这一系统现已被广泛应用到哺乳动物和人类细胞中^[9]。本研究中应用CRISPR/Cas9技术,成功构建了Prkdc^{scid}Il2rg^{null}免疫缺陷NYG小鼠。与国际公认的免疫缺陷程度最高、最适合人源细胞或

组织移植的PDX工具鼠(NSG、NOG、NCG、B-NDG^[2])一样,NYG鼠为NOD-Prkdc^{scid}Il2rg^{null}同系产品。测序结果显示,NYG小鼠Prkdc基因缺失10个碱基,Il2rg缺失50个碱基。外显子处碱基的缺失,导致这两个基因产生移码突变造成的功能改变。流式细胞检测的结果也再次证实了NYG免疫缺陷小鼠体内没有T细胞、成熟的B细胞和NK细胞的存在(图2)。

肿瘤异质性是影响治疗效果的一个重要决定因素。肿瘤治疗的最终目标是为每位患者提供量身定制的个性化治疗方案,并根据个体的特定生物学特性及其独特的肿瘤性质等要求,开发个性化的治疗方法以针对特定的肿瘤类型和进展状态。通

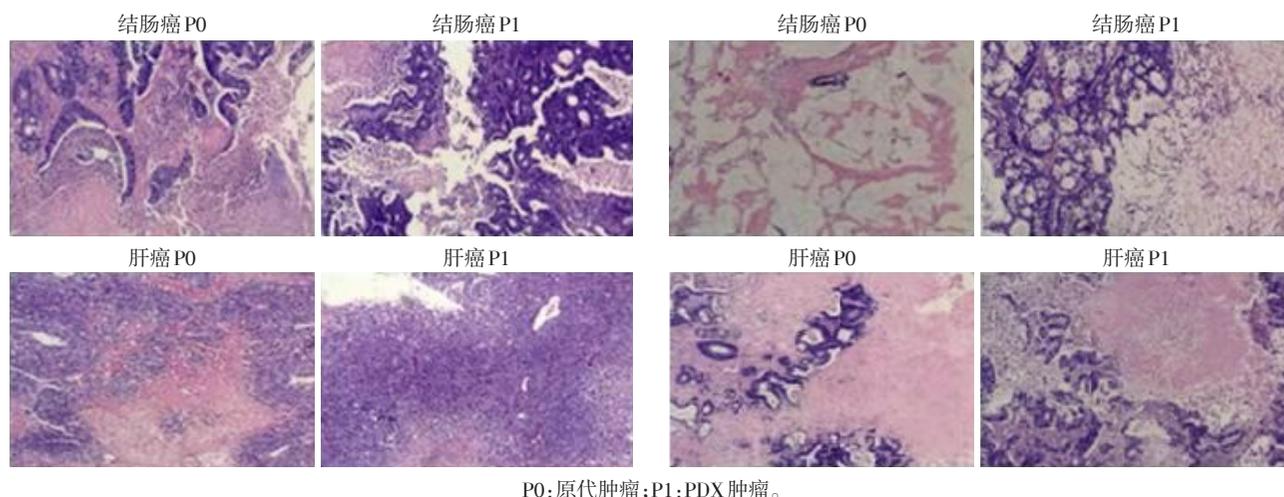


图4 4例原代肿瘤和PDX肿瘤HE染色比较($\times 100$)

Figure 4 Comparison of HE staining between primary tumor and PDX tumor of 4 patients($\times 100$)

过全面了解肿瘤亚型内部和之间的差异以及每个患者肿瘤内部的分子和细胞异质性,并将这些差异与临床行为联系起来,以便开展“个性化”的精准治疗。PDX模型作为发现和验证平台,相对于细胞系移植模型临床治疗反应预测性5%的准确度,使用PDX模型可将其提高至80%或更高^[10]。与传统的细胞系肿瘤模型相比,PDX将患者的新鲜肿瘤细胞或组织通过原位或者异位(多为皮下或肾包膜)等方式移植到免疫缺陷小鼠体内,能更为真实地再现原发肿瘤的生理、生化和肿瘤学等方面的特征,是目前最理想的研究患者个体化治疗的肿瘤模型^[12]。本研究采用手术获取的原代肝癌和结肠癌组织进行了PDX模型的初步构建,这两种常见肿瘤均在NYG小鼠异种移植获得成功。通过对组织切片的观察,移植肿瘤与患者肿瘤病理组织形态表现出高度的一致性,反映出NYG小鼠用于PDX模型开展临床前应用研究的潜力。受实验条件的限制,本研究中参与构建PDX模型的肿瘤类型有限,而药物筛选、疗效预测等相关领域的研究未能开展。但既有的免疫学、病理学检查及异种肿瘤移植实验结果已展示出NYG成为PDX模型的良好应用前景。

参考文献

- [1] KOJIMA Y, HAYAKAWA F, MORISHITA T, et al. Ym155 induces apoptosis through proteasome-dependent degradation of mcl-1 in primary effusion lymphoma[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 120: 242-251
- [2] OKADA S, VAETEEWOOTTACHARN K, KARIYA R. Application of highly immunocompromised mice for the establishment of patient-derived xenograft (PDX) models

[J]. *Cells*, 2019, 8(8): 889

- [3] CASSIDY J W, CALDAS C, BRUNA A. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(15): 2963-2968
- [4] WANG D, PHAM N A, TONG J, et al. Molecular heterogeneity of non-small cell lung carcinoma patient-derived xenografts closely reflect their primary tumors[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(3): 662-673
- [5] LEFLEY D, HOWARD F, ARSHAD F, et al. Development of clinically relevant in vivo metastasis models using human bone discs and breast cancer patient-derived xenografts[J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 130
- [6] NEOPHYTOU C M, PANAGI M, STYLIANOPOULOS T, et al. The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Cancers (Basel)*. 2021, 13(9): 2053
- [7] HIROSHIMA Y, MAAWY A, ZHANG Y, et al. Patient-derived mouse models of cancer need to be orthotopic in order to evaluate targeted anti-metastatic therapy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(44): 71696-71702
- [8] COLLINS A T, LANG S H. A systematic review of the validity of patient derived xenograft (PDX) models: the implications for translational research and personalised medicine[J]. *Peer J*, 2018; 6: e5981
- [9] 谭 磊,陈明月,沈 彬. 基因编辑研究进展与展望[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(11): 1689-1694
- [10] GOTO T. Patient-derived tumor xenograft models: toward the establishment of precision cancer medicine[J]. *J Pers Med*, 2020, 10(3): 64

[收稿日期] 2021-12-13

(本文编辑:唐 震)