

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20210488

· 论 著 ·

髓系特异性核因子 IB 条件性基因敲除小鼠的构建及其肠道炎症表现

胡漫秋, 周黎, 陈思源, 刘宏韬, 张浩, 何松, 周智航*

重庆医科大学附属第二医院消化内科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 通过构建核因子 IB (*NFIB*) 条件性基因敲除 (cKO) 小鼠, 探讨髓系细胞 *NFIB* 的表达与肠道炎症的关系。**方法** 利用人类蛋白质图谱数据库、基因型-组织表达数据库和 FANTOM5 数据库查找 *NFIB* 在炎症细胞中的表达情况。运用 CRISPR/Cas9 技术构建 *NFIB*-floxed 小鼠, 并与 *Ly2z*-Cre 转基因小鼠杂交, 将后代自交获得髓系特异性 *NFIB* cKO 小鼠 (*NFIB^{fl/fl}* *Ly2z*-Cre 小鼠)。经琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型后, 选取 C57BL/6N 品系的 *NFIB* cKO 小鼠 4 只为实验组, 非 cKO 小鼠 4 只为对照组。两组小鼠均使用 2.5% 葡聚糖硫酸钠盐以相同条件诱导, 构建慢性结肠炎模型, 从临床表现和组织病理学方面评估结肠炎严重程度。**结果** 经分析发现 *NFIB* 在髓系细胞来源的粒细胞、单核细胞中均有表达, 且在中性粒细胞中高表达。成功地利用 CRISPR/Cas9 技术和 Cre-loxP 系统构建了髓系特异性 *NFIB* cKO 小鼠。葡聚糖硫酸钠盐诱导的肠炎模型 *NFIB* cKO 小鼠在短时间内出现腹泻、肉眼血便、活动减少、体重减轻等情况。肠道大体观察显示 *NFIB* cKO 小鼠结肠较非 cKO 小鼠缩短 [(8.23 ± 0.35) cm vs (10.30 ± 0.36) cm, $P < 0.01$]。肠 H-E 染色显示 *NFIB* cKO 小鼠肠黏膜腺体结构改变和结缔组织增生伴广泛炎症细胞浸润, *NFIB* cKO 小鼠的组织学评分高于非 cKO 小鼠 [(4.25 ± 0.50) 分 vs (0.50 ± 0.58) 分, $P < 0.01$]。肠免疫组织化学染色结果显示, CD11b 阳性细胞在 *NFIB* cKO 小鼠较非 cKO 小鼠中募集更多。**结论** 本实验成功构建了髓系特异性 *NFIB* cKO 小鼠, 并发现髓系细胞中的 *NFIB* 能够减轻免疫细胞 (粒细胞或/和单核细胞) 浸润, 抑制肠道炎症。

[关键词] 条件性基因敲除; 核因子 IB; 肠道炎症; 髓系细胞; 动物模型

[引用本文] 胡漫秋, 周黎, 陈思源, 等. 髓系特异性核因子 IB 条件性基因敲除小鼠的构建及其肠道炎症表现 [J]. 海军军医大学学报, 2025, 46 (2): 215-222. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20210488.

Construction of myeloid specific nuclear factor IB conditional gene knockout mice and its intestinal inflammation manifestation

HU Manqiu, ZHOU Li, CHEN Siyuan, LIU Hongtao, ZHANG Hao, HE Song, ZHOU Zhihang*

Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between the expression of nuclear factor IB (*NFIB*) in myeloid cells and intestinal inflammation by constructing *NFIB* conditional gene knockout (cKO) mice. **Methods** Human Protein Atlas database, Genotype-Tissue Expression database, and FANTOM5 database were used to investigate the expression of *NFIB* in inflammatory cells. *NFIB*-floxed mice were constructed using CRISPR/Cas9 technology and hybridized with *Ly2z*-Cre transgenic mice. Myeloid specific *NFIB* cKO mice (*NFIB^{fl/fl}* *Ly2z*-Cre) were obtained by self-crossing the progeny. After the genotype identification of mice by agarose gel electrophoresis, 4 *NFIB* cKO mice of C57BL/6N strain were selected as experimental group, and 4 non-cKO mice were selected as control group. Both groups were induced with 2.5% dextran sulfate sodium salt (DSS) under the same condition to establish a chronic colitis model, and the severity of colitis was evaluated by clinical manifestations and histopathology. **Results** Analysis showed that *NFIB* was expressed in both myeloid granulocytes and monocytes, and the highest expression was found in neutrophils. *NFIB* cKO mice were successfully constructed using CRISPR/Cas9 technology and Cre-loxP system. DSS-induced enteritis *NFIB* cKO mice developed diarrhea, gross blood stools, reduced activity, and weight loss in a short time. The gross examination of the intestines showed that the colon of the *NFIB* cKO mice was significantly shorter than that of the non-cKO mice [(8.23 ± 0.35) cm vs (10.30 ± 0.36) cm, $P < 0.01$]. Intestinal H-E staining showed changes in mucosal glandular structure and connective tissue hyperplasia with extensive inflammatory cell infiltration in *NFIB* cKO mice. The histological score of *NFIB* cKO mice was significantly higher than that of non-cKO mice (4.25 ± 0.50 vs 0.50 ± 0.58 , $P < 0.01$). Intestinal immunohistochemical staining showed that more CD11b positive cells were recruited in *NFIB* cKO mice than non-cKO mice. **Conclusion** Myeloid specific *NFIB* cKO mice have been

[收稿日期] 2021-05-10 [接受日期] 2022-02-21

[基金项目] 国家自然科学基金 (81972285), 肿瘤免疫病理学教育部重点实验室开发课题 (2022jsz808). Supported by National Natural Science Foundation of China (81972285) and Development Project of Key Laboratory of Tumor Immunopathology of Ministry of Education (2022jsz808).

[作者简介] 胡漫秋, 硕士生. E-mail: 1148550944@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-63693332, E-mail: zhouzhihang@cqmu.edu.cn.

successfully constructed, and NFIB in myeloid cells can reduce infiltration of immune cells (granulocytes or/and monocytes) to inhibit intestinal inflammation.

[Key words] conditional gene knockout; nuclear factor IB; intestinal inflammation; myeloid cells; animal models

[Citation] HU M, ZHOU L, CHEN S, et al. Construction of myeloid specific nuclear factor IB conditional gene knockout mice and its intestinal inflammation manifestation[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 46(2): 215-222. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20210488.

核因子 I (nuclear factor I, *NFI*) 基因家族编码位点特异性转录因子, 对许多器官系统的发育至关重要^[1]。*NFI* 基因家族包含 4 个高度相关的基因: *NFIA*、*NFIB*、*NFIC* 及 *NFIX*, 其编码蛋白的结合位点位于各器官和组织中的大量基因启动子、增强子或沉默区^[2]。*NFIB* 在人体内参与大量的生物学过程, 调节细胞的分化和增殖^[3]。最近的研究结果表明, *NFIB* 在人类肿瘤的进展中发挥关键作用, 并已被确定为许多癌症的关键肿瘤抑制因子或癌基因^[4]。有报道 *NFIB* 与结直肠癌患者不良预后相关, 且可促进结直肠癌细胞的增殖与转移^[5]。炎症性肠病是一组由免疫反应失调引起的结肠和小肠炎症状态, 近年来从遗传、药理学和流行病学数据中发现炎症性肠病和结直肠癌之间存在着一定关系, 炎症性肠病是结肠癌发展的重要危险因素^[6]。先天和适应性免疫系统的激活及功能障碍是炎症性肠病患者肠道异常炎症反应的原因之一^[7]。在炎症性肠病中组织学表现是先天免疫细胞 (中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞和自然杀伤细胞) 以及适应性免疫细胞 (B 细胞和 T 细胞) 流入固有层^[8]。但是, *NFIB* 在肠道炎症发生、发展中的作用仍不清楚。

在体内研究抑制作用最有效的方法是敲除动物中的基因并观察其整体表型。近年来, Cre-loxP 重组酶系统在基因靶向研究中得到了广泛的应用^[9-10]。在靶基因序列的两端插入 loxP 获得杂合子 flox 小鼠, 与带有组织特异性启动子的 Cre 小鼠杂交后, 2 个 loxP 位点之间的序列被细胞切除和遗传, 能够得到条件性基因敲除 (conditional gene knockout, cKO) 小鼠。已有多种动物实验模型被用于研究炎症性肠病的病因和发病机制、开发药物等, 其中葡聚糖硫酸钠盐 (dextran sulfate sodium salt, DSS) 诱导的结肠炎模型应用最广。急性、慢性和复发的肠道炎症模型都可以通过改变 DSS 的浓度和给药频率来实现^[11]。本研究拟建立髓系特异性 *NFIB* 敲除小鼠, 并通过 DSS 诱导的肠炎模型观察敲除髓系细胞中的 *NFIB* 后免疫细胞和肠道

炎症的变化, 初步探讨髓系细胞中 *NFIB* 的抗炎作用, 为研究 *NFIB* 在肠道炎症中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 *NFIB* 在炎症细胞中的表达分析 从人类蛋白质图谱数据库、基因型-组织表达数据库和 FANTOM5 数据库中检索 *NFIB* 基因相关外周血细胞单个核细胞转录组数据并作为标准化表达 NX (每个样本中每个基因的转录表达值) 进行分析。

1.2 实验动物 实验小鼠品系为 C57BL/6N, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0011]; Lyz2-Cre 工具小鼠购自美国杰克逊实验室, 饲养于重庆医科大学实验动物中心 [动物使用许可证号: SYXK (渝) 2018-0003]。所有小鼠均按特定的 SPF 等级动物饲养标准饲养, 室内温度为 20~26 °C, 昼夜周期为 12 h/12 h。小鼠饲喂灭菌后的标准饮食, 自由获得食物和水。所有组织标本在小鼠安乐死后收集。动物实验方案经重庆医科大学动物保护和使用机构委员会批准 [科伦预审第 (2019) 133 号]。

1.3 *NFIB*-flox 小鼠的构建 在 *NFIB* 基因第 2 外显子下游的内含子序列中插入 1 个 loxP 位点, 并将 FRT-neo-FRT-loxP 元件插入到第 2 外显子上游内含子序列中, 得到 *NFIB*-flox 小鼠。

1.4 *NFIB* cKO 小鼠的构建 将 *NFIB*-flox 小鼠与 Lyz2-Cre 工具小鼠杂交, 进行种系传代和动物鉴定, 得到 flox 纯合子和 Cre 杂合子的髓系特异性 *NFIB* cKO 小鼠 (*NFIB*^{fl/fl}Lyz2-Cre 小鼠)。

1.5 PCR 鉴定、测序及 DNA 印迹分析 固定小鼠, 用消毒后的手术剪剪取鼠尾尖端约 1~2 mm 组织, 放入含有 100 μL 新鲜组织消化液 (鼠尾直接 PCR 试剂盒, 产品编号 B40013, 美国 Bimake 公司) 的离心管中, 55 °C 金属浴中消化 15 min。随后将样本置于 95 °C 金属浴中孵育 5 min 以灭活消化液中的蛋白酶, 12 400×g 离心 5 min, 取上清作为 PCR 模板进行扩增后得到 DNA 样本。用双蒸水配制 1% 琼脂糖溶液, 放入烧瓶中微波加热至

琼脂糖颗粒完全溶解, 待冷却至 45~50 °C, 加入稀释 10 000 倍的 GoldView 核酸染料 (DH392-5, 长沙鼎国生物技术有限公司) 7 μ L, 充分混匀, 注意避免气泡产生, 倒入制胶板中, 插入梳子, 待其自然冷却凝固后小心拔除梳子。然后向电泳槽中加入 1 $\times$ Tris- 乙酸盐 EDTA 缓冲液, 刚好没过凝胶约 1 mm, 用一次性枪头依次加样, 关上电泳槽盖, 接好电极插头, 给予 100 V 的电压, 其距离以阳极至阴极之间的测量值为准 (1~5 V/cm), 可见阳极和阴极由于电解作用产生的气泡, 当 DNA 样品或染料在凝胶中迁移了足够距离时关上电源、拔出电极插头, 打开电泳槽盖。使用曝光仪器 (ChampChemiTM 580, 中国森西赛智科技有限公司) 曝光凝胶。

基因组 DNA 从鼠尾中提取, 使用苯酚-氯仿法纯化。纯化后的 DNA 经限制性内切酶 *Afl*II 于 37° 缓冲液中消化过夜, 酶切反应通过 65 °C 加热 10 min 终止。酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 电压设置为 100 V, 当 DNA 样品或染料在凝胶中迁移了足够距离时关闭电源。电泳后, 凝胶经 0.5 mol/L NaOH 变性 15 min, 随后将 DNA 转移至尼龙膜, 转印后经紫外交联 (120 mJ/cm²) 固定。尼龙膜于 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 随后加入标记探针 (5' 端引物序列正向 5'-AGTGGGAGCTGAAAGCATGGCAT-3'、反向 5'-TTCCAACAAAGAAGCTGCCTCAGC-3', 3' 端引物序列正向 5'-AGAAGGGACTGGGAGAAAA-ACAGGAG-3'、反向 5'-CCATCCGTCTCTATCTC-GTCTTCCAT-3') 于 65 °C 孵育过夜。杂交后使用 0.1 $\times$ 柠檬酸钠盐缓冲液、0.1% SDS 洗液洗去未杂交的探针, 于曝光仪下显色。

1.6 DSS 诱导构建慢性结肠炎小鼠模型 选用 6~8 周、体重 > 18 g 的雌性髓系特异性 *NFIB* cKO 小鼠 (实验组) 及鉴定排除的非 cKO 小鼠 (对照组), 每组 4~6 只。实验第 1 天分别给实验组、对照组小鼠含 2.5% DSS (分子量为 36 000~50 000, 货号 02180139; 美国 MP 公司) 的饮用水和正常饮用水, 连续饮用 7 d, 分别在实验第 3、5 天给实验组更换含 2.5% DSS 的新鲜饮用水, 给对照组更换新鲜正常饮用水。第 8 天实验组更换为不含 DSS 的正常饮用水, 连续饮用 14 d。上述 DSS/ 正常饮用水方案重复循环 1 次。第 42 天采用颈椎脱臼法

处死小鼠。

1.7 结肠炎严重程度的评估 造模过程中持续观察小鼠体重、粪便等变化。DSS 诱导第 1 天随机选取实验组的 63 号小鼠 (*NFIB* cKO 小鼠) 和对照组的 51 号小鼠 (Cre 小鼠) 进行称重并记录, 随后每间隔 7 d 至少称重 1 次, 直到第 42 天处死小鼠, 根据体重变化百分比绘制曲线图。

处死小鼠后留取小鼠结肠标本。首先分离小肠与大肠, 再截取整个结肠 (从盲肠至肛门), 测量结肠长度; 然后将结肠组织常规石蜡包埋、连续切片后行 H-E 染色, 于光学显微镜下观察结肠组织学损伤并进行组织活动评分。通过幻灯片以盲评法进行组织学检查和评分。细胞浸润评分: (1) 固有层偶有炎症细胞, 计 0 分; (2) 固有层浸润增加, 主要在隐窝底部, 计 1 分; (3) 炎症浸润汇合到黏膜, 计 2 分; (4) 浸润跨壁延伸, 计 3 分。组织损伤评分: (1) 无黏膜损伤, 计 0 分; (2) 小面积隐窝丢失 ($\leq 49\%$), 计 1 分; (3) 大面积隐窝丢失至全部丢失 (50%~100%), 上皮完整, 计 2 分; (4) 隐窝全部丢失, 上皮丢失, 计 3 分。组织学总分为细胞浸润评分和组织损伤评分之和, 总分为 0~6 分。

1.8 免疫组织化学染色 将肠道石蜡切片脱蜡、复水后, 用 3% 过氧化氢溶液灭活过氧化氢酶 8 min, 柠檬酸钠抗原修复液微波加热 10 min, 共 3 次, PBS 清洗 3 次, 每次 3 min。10% 山羊血清室温封闭 10 min, 加入 CD11b 抗体 (Bioss bs-1014R) 4 °C 孵育过夜, 加入二抗 37 °C 孵育 15 min, PBS 清洗 3 次, 随后进行 DAB 和苏木精染色。最后脱水封片。

1.9 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析, 符合正态分布且方差齐的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结 果

2.1 *NFIB* 在髓系细胞中的表达 从人类蛋白质图谱数据库、基因型-组织表达数据库和 FANTOM5 数据库中获得 18 种血细胞类型和外周血总单个核细胞, 共 74 个样本的转录组数据, 并作为标准化表达 NX (每个样本中每个基因的转录表达值) 进行报告。结果发现 *NFIB* 在血细胞中呈差异性表达, 髓系细胞 (红细胞系、粒细胞系、单核细胞系、巨

核细胞系)以中性粒细胞和嗜碱性粒细胞的 NFIB 表达最为明显,其次为各类淋巴细胞(T细胞、浆细胞)、单核细胞。

2.2 成功构建 NFIB cKO 小鼠 首先构建 NFIB 基因敲除打靶载体,策略设计如图 1A,即含有 loxP 位点的向导 RNA (guide RNA, gRNA)。gRNA1 靶序列为 5'-ATGCCAC-ACAGTCCCGCTTTGG-3',

gRNA2 靶序列为 5'-TGTAACATGGGCCGGCATGC-GG-3'。在对最终载体进行测序验证后,将其与 Cas9 mRNA 共同注入小鼠受精卵中,产生靶向条件敲除小鼠 F0 (founder 6#)。对 F0 进行 PCR 鉴定及序列分析,确认 loxP 位点正确插入后将其与野生型小鼠杂交产生 F1 后代(41、42、43),培育计划如图 1B 所示。

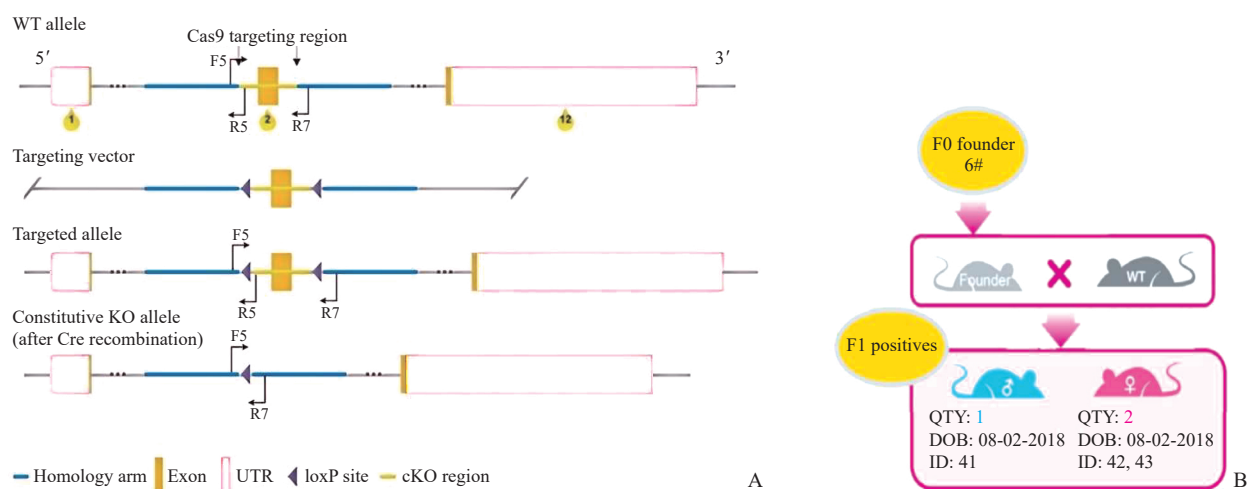


图 1 基因打靶策略设计和小鼠培育计划示意图

Fig 1 Schematic diagram of gene targeting strategy design and breeding plan of mice

A: NFIB cKO gene targeting strategy; B: NFIB-floxed chimeric mouse breeding program. F0 is the initial generation of targeted cKO mice, F1 (41, 42, 43) is the first generation of positive NFIB-floxed chimeric mice. KO: Knockout; UTR: Untranslated region; loxP: Locus of X-over in P1; cKO: Conditional gene knockout; WT: Wild-type; NFIB: Nuclear factor 1B.

对 F1 小鼠进行 PCR 鉴定,引物位点见图 2A,长片段 PCR 引物 1 序列为正向 5'-CAGTAACAGC-AAACCCAGGACAACAG-3'、反向 5'-AGTACTGTGGATTCGGACCACTCTGAC-3',引物 2 序列为正向 5'-CACGTAAACGGCCACAAGTTCGAG-3'、反向 5'-AAGGCATTCAGCAGCTAGACAAAGAGG-3',退火温度为 60 °C。41、42、43 均在 NFIB 条件等位基因位点(4.2 kb)出现阳性条带,而野生型小鼠和对照无条带(图 2B、2C),表明 F1 小鼠 NFIB 基因两端成功插入 loxP 位点。在 DNA 样品不是很纯或没有足够的 PCR 延长时间时,长片段 PCR 产物可能不会被扩增,可以行短片段 PCR 鉴定(引物 5 序列为正向 5'-TGTTTCAGTGTTG-GAATGTTGGACG-3'、反向 5'-GGTGGCACAGAA-ACACAAAGCATG-3',引物 6 序列为正向 5'-GAC-AGAGCATCACAGAGCAAACCAG-3'、反向 5'-AC-ACGGCTCATTAAACAACGGAAACC-3'),策略详见图 3A。

为了检测 34 bp 的 loxP 位点是否正确插入,使用单向引物(引物 3 序列为 5'-GATGAATGCA-TGCTGGAAGCTAATG-3',引物 4 序列为 5'-TCTG-ACAGAGGCCTAGATTTATGTTG-3'对 F1 小鼠的基因进行测序(图 2D),结果显示 loxP 位点正确插入。最后通过尾 DNA 样本的 DNA 印迹分析(策略设计见图 3B),证实了 3 只 F1 小鼠(41、42 和 43)的正确基因靶向性(图 3C、3D)。探针引物序列如下:5'探针正向引物序列为 5'-AGTGGAGCTGAAAGCATGGCAT-3',5'探针反向引物序列为 5'-TTCCAACAAAGAAGCTGCCTCAGC-3',3'探针正向引物序列为 5'-AGAAGGGACTGGGA-GAAAAACAGGAG-3',3'探针反向引物序列为 5'-CCATCCGTCTCTATCTCGTCTTCCAT-3'。

在成功构建 NFIB-flox 嵌合小鼠后,将其与 Lyz2-Cre 小鼠杂交,杂合重组小鼠,从而得到髓系特异性 NFIB cKO 小鼠,具体步骤如下:(1)杂交杂合子靶向小鼠,产生纯合子靶向小鼠(flox^{+/+}),

通过 PCR 鉴定 (引物信息见表 1); (2) 用组织特异性 Cre 删除小鼠繁殖纯合子靶向小鼠, 以产生针对目标等位基因的杂合子小鼠和针对 Cre 转基因的半合子/杂合子小鼠 ($Flox^{+/-}/Cre^{+/-}$), 通过 PCR 鉴定 (引物信息见表 1); (3) 将 $Flox^{+/-}$ 与 $Flox^{+/-}/Cre^{+/-}$ 小鼠杂交, 大约 25% 的后代将是

纯合的目标等位基因和半合/杂合的 Cre 转基因 ($Flox^{+/-}/Cre^{+/-}$)。可以用上述相同的方法筛选幼鼠。组织特异性基因缺失可以通过在 PCR 检测中添加 1 个额外的引物来证实 (引物信息见表 1), 结果证实成功地构建了 *NFIB* cKO 小鼠 (图 4)。

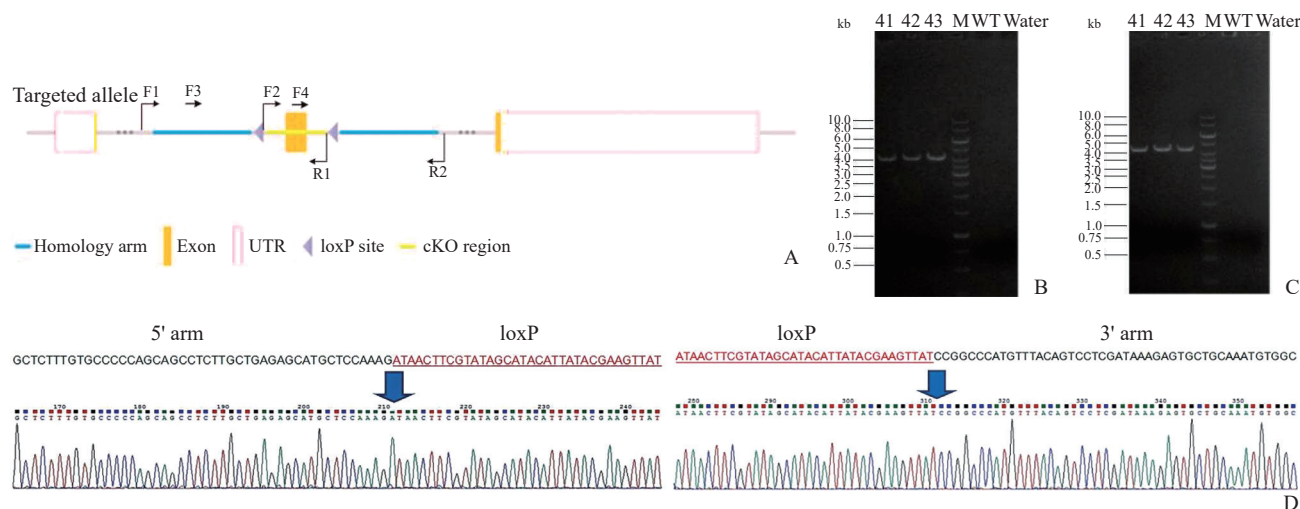


图 2 基因分型策略和 *NFIB*-flox 嵌合小鼠 PCR、测序鉴定结果

Fig 2 Genotyping strategy, PCR and sequencing identification results of *NFIB*-flox chimeric mice

A: Schematic diagram of genotyping strategy. B, C: PCR identification results for F1 mice (41, 42, 43) from the first-generation breeding showed positive results with both PCR primers 1 (B, 4.2 kb) and PCR primers 2 (C, 4.4 kb). D: Sequencing results. Taking mouse ID 41 as an example, 5' primers (F3) and 3' primers (F4) were used for sequencing. The detection results showed that the loxP site with 34 bp was inserted correctly, and the loxP site was displayed in red. *NFIB*: Nuclear factor 1B; PCR: Polymerase chain reaction; UTR: Untranslated region; loxP: Locus of X-over in P1; cKO: Conditional gene knockout; M: Marker; WT: Wild-type; Water: Water blank control, no DNA template was added.

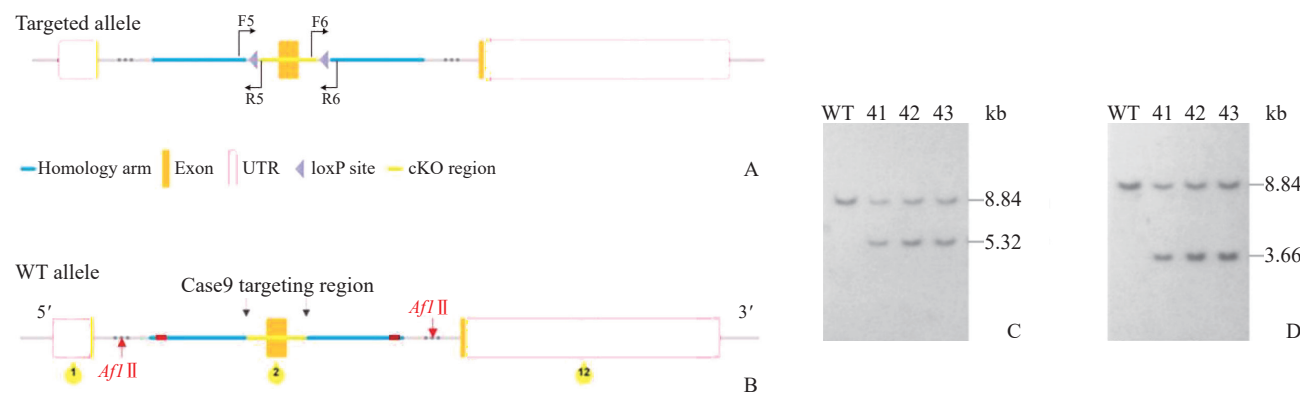


图 3 短片段 PCR、DNA 印迹策略设计和鉴定结果

Fig 3 Short-fragment PCR, DNA imprinting strategy design and identification results

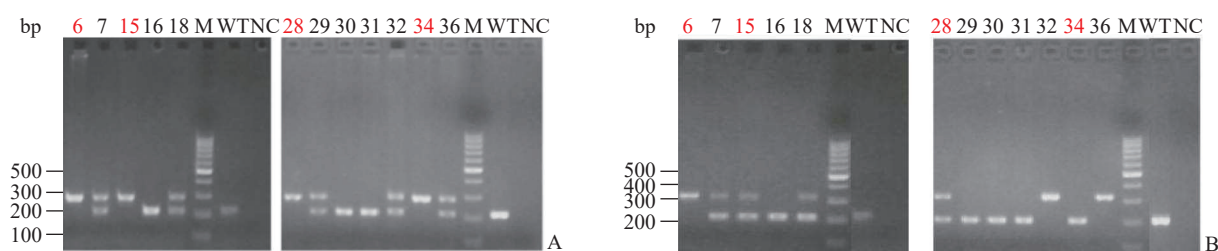
A: Schematic diagram of short fragment PCR strategy. B: Schematic diagram of DNA imprinting strategy, marked in red as probe. C, D: DNA imprint results, mice No. 41, 42 and 43 all showed positive results at the 5' probe (C) expected fragment (5.32 kb) and 3' probe (D) expected fragment (3.66 kb), while WT mice only showed positive results at the expected fragment (8.84 kb), confirming the correct gene targeting in 3 F1 animals. PCR: Polymerase chain reaction; UTR: Untranslated region; loxP: Locus of X-over in P1; cKO: Conditional gene knockout; WT: Wild-type; *Afl* II: *Afl* II restriction endonuclease.

表 1 组织特异性基因分型 PCR 引物及相应产物条带大小

Tab 1 Tissue specific genotyping PCR primers and corresponding product length

Primer	Sequence (5'-3')	Product length
Flox F	TGTTTCAGTGTGGAATGTTGGACG	flox/flox = 263 bp; flox/wt = 263/191 bp; wt/wt = 191 bp
Flox R	GGTGGCACAGAAACACAAAGCATG	
Cre F	CATATTGGCAGAACGAAAACGC	Cre amplicon=413 bp
Cre R	CCTGTTTCACTATCCAGGTTACGG	
cKO R	ATCCTGACATGCTGGTTTGAAGA	cKO=2 336 bp/263 bp; KO=322 bp

F: Forward primer; R: Reverse primer; flox: Flanked by loxP; wt: Wild-type; Cre: Cyclization recombination enzyme; cKO: Conditional gene knockout; KO: Knockout.

图 4 *NFIB* cKO 小鼠 PCR 鉴定结果Fig 4 PCR identification results of *NFIB* cKO mice

A: PCR results showed that the successfully constructed mice No. 6, 15, 28 and 34 contained homozygous of flox sequence (263 bp). B: PCR results showed that Cre (413 bp) was expressed in the successfully constructed mice, No. 6 mouse were Cre homozygous, and No. 15 and 28 mice were Cre heterozygous. *NFIB*: Nuclear factor IB; cKO: Conditional gene knockout; PCR: Polymerase chain reaction; M: Marker; WT: Wild-type; NC: Negative control; Cre: Cyclization recombination enzyme.

2.3 髓系细胞中敲除 *NFIB* 能够抑制 DSS 诱导的肠道炎症 将 *NFIB*-flox 小鼠与 *Lyz2*-Cre 小鼠杂交后, 后代自交。琼脂糖凝胶电泳结果(图 5)显示, 编号为 77、72、63 和 20 的小鼠为 *NFIB* cKO 小鼠,

基因型为 *NFIB*^{fl/fl}Cre, 纳入实验组; 编号为 80、24 的小鼠基因型为 *NFIB*^{fl/fl}, 编号为 74 和 51 的小鼠基因型为 Cre, 编号为 65 的小鼠基因型为野生型, 纳入对照组。

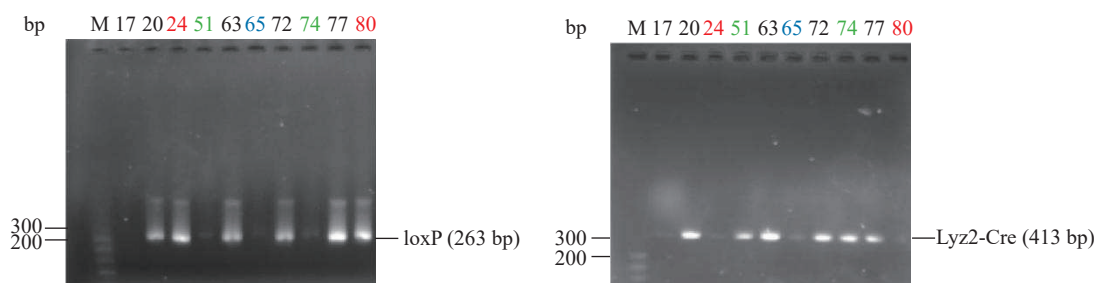


图 5 繁殖小鼠琼脂糖凝胶电泳鉴定结果

Fig 5 Identification of breeding mice

The results by gel electrophoresis showed that the genotypes of mice No. 77, 72, 63 and 20 were *NFIB*^{fl/fl}Cre (experimental group), mice No. 80 and 24 were *NFIB*^{fl/fl} (control group), mice No. 51 and 74 were Cre (control group), and mouse No. 65 were wild-type (control group). M: Marker.

使用 2.5% DSS 诱导慢性结肠炎, 第 8 天时实验组所有小鼠均出现肉眼血便、腹泻、活动减少, 造模期间小鼠体重减轻、采食差且精神萎靡。体重

变化曲线显示实验组 63 号 *NFIB* cKO 小鼠体重减轻程度较对照组 51 号小鼠明显(图 6)。

DSS 造模第 42 天, 小鼠处死后截取盲肠

至肛门段结肠测量长度, 实验组结肠 $[(8.23 \pm 0.35) \text{ cm}]$ 较对照组 $[(10.30 \pm 0.36) \text{ cm}]$ 短, 差异有统计学意义 ($t=7.11, P<0.01$)。实验组小鼠结肠的组织学评分 $[(4.25 \pm 0.50) \text{ 分}]$ 高于对照组小鼠 $[(0.50 \pm 0.58) \text{ 分}]$, 差异有统计学意义 ($t=9.82, P<0.01$)。

如图 7A、7B 所示, 对照组小鼠的结肠组织中均未见明显炎症细胞浸润和组织损伤。与对照组小鼠相比, 实验组小鼠的黏膜上皮细胞脱落, 黏膜增厚, 大量炎症细胞浸润, 肠绒毛和肠腺结构异常或缺失, 淋巴结肿大。免疫组织化学染色 (图 7C) 显示, CD11b 阳性细胞在实验组小鼠肠道募集数量多于对照组小鼠, 且广泛浸润至黏膜下层、黏膜下肌层及浆膜层。

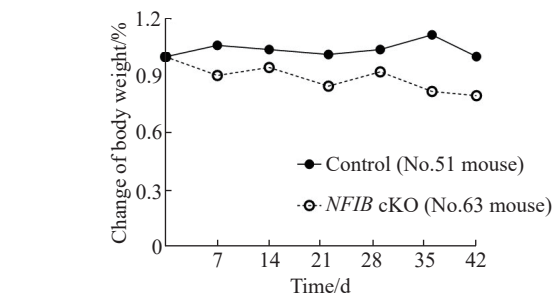
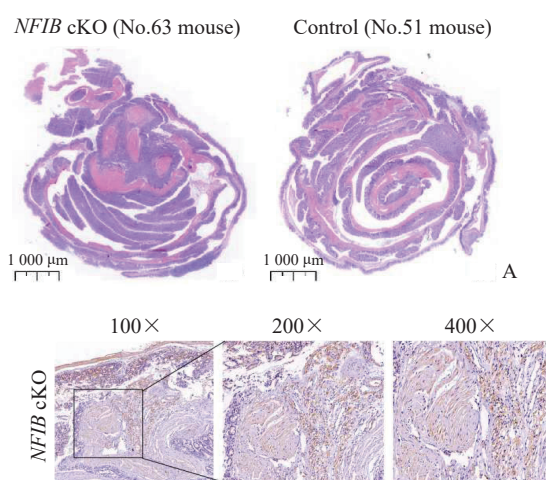


图 6 DSS 诱导的慢性结肠炎小鼠体重变化曲线

Fig 6 Weight change curve of mice with chronic colitis induced by DSS

Body weight data were recorded at an interval of 7 d, and 2 matched mice (No. 63 and 51) were randomly selected to obtain the body weight change curves at various time points by using the current body weight/original body weight. DSS: Dextran sulfate sodium salt; NFIB: Nuclear factor 1B; cKO: Conditional gene knockout.

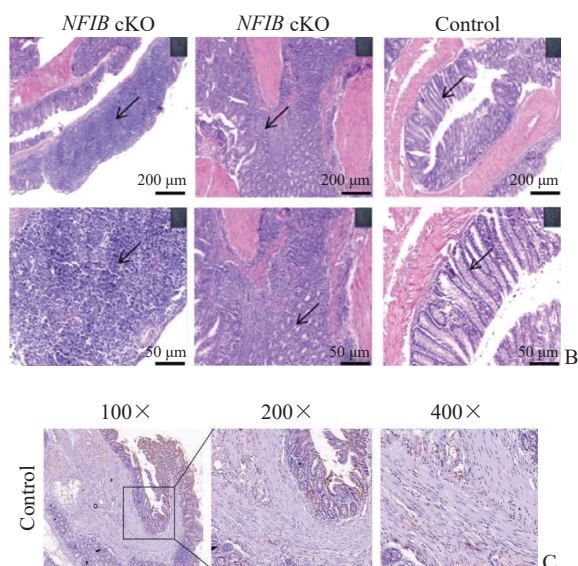


图 7 DSS 诱导的慢性肠炎小鼠结肠组织 H-E 和 IHC 染色结果

Fig 7 H-E and IHC staining results of DSS induced chronic enteritis mice

A: H-E staining of colon “Swiss roll”. B: H-E staining of colon tissue of cKO mice showed extensive infiltration of inflammatory cells in submucosa (arrows), and abnormal and residual glandular structures could be observed after magnification (arrows). Control mice had no significant histopathological changes (arrows). C: IHC staining for surface markers of mouse myeloid cells showed that CD11b positive cells were more significantly enriched in cKO mice than in control mice. DSS: Dextran sulfate sodium salt; H-E: Hematoxylin-eosin; IHC: Immunohistochemical; NFIB: Nuclear factor 1B; cKO: Conditional gene knockout.

3 讨论

NFIB 在小细胞肺癌、黑色素瘤、乳腺癌等恶性肿瘤中起促癌的作用^[12-15], 但在非小细胞肺癌、神经胶质瘤、骨肉瘤、皮肤鳞状细胞癌中则被认为是一种抑癌基因^[16-19]。研究表明 NFIB 也能促进结直肠癌转移, 说明 NFIB 在体内的作用具有组织特异性^[5]。本实验通过查找数据库发现在髓系细胞

中 NFIB 也有表达 (中性粒细胞为主), 而髓系细胞在炎症性肠病中发挥重要作用。基因编辑技术是研究基因作用的常用方法^[20]。CRISPR/Cas9 系统是目前基因编辑技术的焦点, 结合 Cre-loxP 技术后可以 cKO^[21-22]。2015 年 Tanaka 等^[23] 利用该技术成功构建了肠道特异性 *Cldn7* cKO 小鼠。为了研究髓系细胞中 NFIB 对肠道炎症的影响, 本实验采用该技术成功构建了髓系特异性 NFIB cKO 小鼠。

本研究观察了髓系细胞中敲除 *NFIB* 后肠道炎症的变化,发现髓系细胞中敲除 *NFIB* 后小鼠肠道长度缩短。H-E 染色结果显示,与对照小鼠相比, *NFIB* cKO 小鼠肠道炎症细胞浸润明显,以淋巴细胞及浆细胞为主(超过黏膜下层,可达固有肌层),也可见中性粒细胞;肠道黏膜增厚,黏膜上皮细胞损伤、细胞核崩解,杯状细胞缺失,异常隐窝灶(延伸、扭曲、分支、轴向改变、缺失等)增多,伴局部淋巴结肿大。为进一步探讨髓系敲除 *NFIB* 对结肠炎中免疫细胞浸润是否存在影响,本研究选用小鼠常见免疫细胞表面标志物 CD11b(泛粒细胞)作为检测分子,免疫组织化学染色结果显示 *NFIB* cKO 小鼠的肠道 CD11b 阳性细胞多于对照组。说明敲除 *NFIB* 后增加了免疫细胞在肠道中的浸润,这些现象均表明 *NFIB* 的丢失导致更加严重的结肠炎症表现。

本研究成功构建了髓系特异性 *NFIB* 敲除小鼠,并发现髓系细胞中的 *NFIB* 能够通过抑制免疫细胞浸润减轻结肠炎症,为进一步研究 *NFIB* 在肠道炎症及炎症相关肠癌中的作用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] NAGATA K, GUGGENHEIMER R A, HURWITZ J. Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80(20): 6177-6181. DOI: 10.1073/pnas.80.20.6177.
- [2] KRUSE U, SIPPEL A E. Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homo- and heterodimers[J]. *FEBS Lett*, 1994, 348(1): 46-50. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00585-0.
- [3] GTEx Consortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans[J]. *Science*, 2015, 348(6235): 648-660. DOI: 10.1126/science.1262110.
- [4] LI Y, SUN C, TAN Y, et al. Transcription levels and prognostic significance of the NFI family members in human cancers[J]. *PeerJ*, 2020, 8: e8816. DOI: 10.7717/peerj.8816.
- [5] LIU Z, CHEN J, YUAN W, et al. Nuclear factor I/B promotes colorectal cancer cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition and 5-fluorouracil resistance[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(1): 86-98. DOI: 10.1111/cas.13833.
- [6] TERZIĆ J, GRIVENNIKOV S, KARIN E, et al. Inflammation and colon cancer[J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(6): 2101-2114. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.01.058.
- [7] SARTOR R B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis[J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2006, 3(7): 390-407. DOI: 10.1038/ncpgasthep0528.
- [8] GEREMIA A, BIANCHERI P, ALLAN P, et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2014, 13(1): 3-10. DOI: 10.1016/j.autrev.2013.06.004.
- [9] TRINH K R, MORRISON S L. Site-specific and directional gene replacement mediated by Cre recombinase[J]. *J Immunol Methods*, 2000, 244(1/2): 185-193. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00250-7.
- [10] LE Y, SAUER B. Conditional gene knockout using Cre recombinase[J]. *Mol Biotechnol*, 2001, 17(3): 269-275. DOI: 10.1385/MB: 17: 3: 269.
- [11] BOIRIVANT M, FUSS I J, CHU A, et al. Oxazolone colitis: a murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(10): 1929-1939. DOI: 10.1084/jem.188.10.1929.
- [12] DENNY S K, YANG D, CHUANG C H, et al. Nfib promotes metastasis through a widespread increase in chromatin accessibility[J]. *Cell*, 2016, 166(2): 328-342. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.052.
- [13] DOOLEY A L, WINSLOW M M, CHIANG D Y, et al. Nuclear factor I/B is an oncogene in small cell lung cancer[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(14): 1470-1475. DOI: 10.1101/gad.2046711.
- [14] FANE M E, CHHABRA Y, HOLLINGSWORTH D E J, et al. NFIB mediates BRN2 driven melanoma cell migration and invasion through regulation of EZH2 and MITF[J]. *EBioMedicine*, 2017, 16: 63-75. DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.01.013.
- [15] HAN W, JUNG E M, CHO J, et al. DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(6): 490-499. DOI: 10.1002/gcc.20550.
- [16] BECKER-SANTOS D D, THU K L, ENGLISH J C, et al. Developmental transcription factor NFIB is a putative target of oncofetal miRNAs and is associated with tumour aggressiveness in lung adenocarcinoma[J]. *J Pathol*, 2016, 240(2): 161-172. DOI: 10.1002/path.4765.
- [17] STRINGER B W, BUNT J, DAY B W, et al. Nuclear factor one B (NFIB) encodes a subtype-specific tumour suppressor in glioblastoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29306-29320. DOI: 10.18632/oncotarget.8720.
- [18] MIRABELLO L, KOSTER R, MORIARITY B S, et al. A genome-wide scan identifies variants in NFIB associated with metastasis in patients with osteosarcoma[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(9): 920-931. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-15-0125.
- [19] ZHOU M, ZHOU L, ZHENG L, et al. MiR-365 promotes cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC) through targeting nuclear factor I/B (NFIB)[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100620. DOI: 10.1371/journal.pone.0100620.
- [20] METZGER D, CHAMBON P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse[J]. *Methods*, 2001, 24(1): 71-80. DOI: 10.1006/meth.2001.1159.
- [21] CHASSAING B, AITKEN J D, MALLESHPA M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice[J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15.25.1-15.25.15. DOI: 10.1002/0471142735.im1525s104.
- [22] GENUA M, RUTELLA S, CORREALE C, et al. The triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) in inflammatory bowel disease pathogenesis[J]. *J Transl Med*, 2014, 12: 293. DOI: 10.1186/s12967-014-0293-z.
- [23] TANAKA H, TAKECHI M, KIYONARI H, et al. Intestinal deletion of claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice[J]. *Gut*, 2015, 64(10): 1529-1538. DOI: 10.1136/gutjnl-2014-308419.