

论著·基础研究

小胶质细胞 *Stat3* 基因条件性敲除小鼠的构建及鉴定

朱晓晨, 谢欣宜, 赵旭日, 徐丽娜, 何智妍, 周 薇

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔微生态与系统性疾病实验室, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200125

[摘要] **目的**·基于 Cre-Loxp 系统构建小胶质细胞 *Stat3* 基因条件性敲除小鼠并验证其敲除效率。**方法**·将 *Cx3cr1^{creERT2}* 与 *Stat3^{fl/fl}* 基因型小鼠多代交配繁育, 直到获得足够数量的 *Stat3^{fl/fl}*; *Cx3cr1^{creERT2}* 基因型小鼠, 即条件敲除小鼠 (conditional knockout, CKO); 同窝 *Stat3^{fl/fl}* 基因型小鼠, 即对照小鼠 (wild type, WT)。利用小鼠组织提取 DNA 后通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR), 结合特异性引物分别扩增的结果来判断小鼠基因型。在 CKO 及 WT 小鼠 6 周龄时通过腹腔注射他莫昔芬诱导小胶质细胞中 *Stat3* 基因的敲除; 2 周后, 随机选取 CKO 小鼠 ($n=4$) 及 WT 小鼠 ($n=4$), 利用磁珠分选法 (magnetic activated cell sorting, MACS) 分选出小胶质细胞后通过实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 技术从基因水平检测基因敲除效率; 通过脑组织切片免疫荧光染色标记小胶质细胞和 STAT3 蛋白观察小胶质细胞中 STAT3 的表达情况; 利用流式细胞术分别检测 STAT3 在小胶质细胞及脾巨噬细胞中的变化。通过尼氏染色检测神经元细胞的情况; 通过脑组织切片荧光染色标记小胶质细胞, 观察皮层和海马区域小胶质细胞的情况; 通过流式细胞术检测小胶质细胞表型。**结果**·成功繁育出 CKO 小鼠和 WT 小鼠。MACS 后脑细胞中小胶质细胞的占比从 10% 提升到 85%。RT-PCR 结果显示, 相对于 WT 小鼠, CKO 小鼠小胶质细胞中 *Stat3* 的 mRNA 相对表达量为 0.3317 ± 0.0414 , mRNA 水平下调 ($P=0.001$)。脑组织免疫荧光染色结果显示, CKO 小鼠小胶质细胞中 STAT3 蛋白的荧光强度较 WT 小鼠弱。脑组织流式细胞术显示: WT 小鼠小胶质细胞中 STAT3 的阳性细胞占比为 $(85.30 \pm 5.69)\%$; CKO 小鼠小胶质细胞中 STAT3 的阳性细胞占比为 $(39.70 \pm 3.88)\%$, STAT3 表达率下降 ($P=0.001$)。脾组织流式细胞术显示, CKO 小鼠与 WT 小鼠脾巨噬细胞中 STAT3 的阳性细胞占比的差异无统计学意义 ($P>0.05$)。尼氏染色显示, CKO 小鼠与 WT 小鼠神经元细胞无显著差异。脑组织切片荧光染色结果显示, CKO 小鼠与 WT 小鼠的小胶质细胞在形态上无明显差异。小胶质细胞流式细胞术显示 CKO 小鼠与 WT 小鼠小胶质细胞表型无显著差别。**结论**·成功构建小胶质细胞 *Stat3* 基因条件性敲除小鼠, 为后续相关研究提供动物模型。

[关键词] 小胶质细胞; 信号转导和转录激活因子 3 (STAT3); 他莫昔芬; 小鼠; Cre 重组酶

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.06.005 **[中图分类号]** R781 **[文献标志码]** A

Construction and characterization of mice with conditional knockout of *Stat3* gene in microglia

ZHU Xiaochen, XIE Xinyi, ZHAO Xuri, XU Lina, HE Zhiyan, ZHOU Wei

Laboratory of Oral Microbiota and Systemic Disease, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200125, China

[Abstract] **Objective**·To construct mice with conditional knockout of *Stat3* gene in microglia based on the Cre-Loxp system and validate their knockout efficiency. **Methods**·*Cx3cr1^{creERT2}* and *Stat3^{fl/fl}* genotypic mice were bred for conditional knockout mice (CKO) and Wild Type mice (WT). The mouse genotypes were determined by extracting DNA from mouse tissues through Polymerase Chain Reaction (PCR) combined with the amplification results of cre and flox primers. *Stat3* knockdown was induced by intraperitoneal injection of tamoxifen in the CKO and WT mice at 6 weeks of age. The CKO mice ($n=4$) and WT mice ($n=4$) were randomly selected for the detection. After two weeks of observation, microglia cells were sorted out by Magnetic Activated Cell Sorting (MACS). Real-time PCR (RT-PCR) was used to detect gene knockout efficiency at the gene level. The expression of STAT3 in microglia was observed by brain immunofluorescence staining. The expression rate of STAT3 in microglia was detected

[基金项目] 国家自然科学基金 (81971299, 82071112); 上海市“科技创新行动计划”自然科学基金项目 (22ZR1437500)。

[作者简介] 朱晓晨 (1998—), 女, 硕士生; 电子信箱: zhuxiaochen98@163.com。

[通信作者] 周 薇, 电子信箱: sweetzw@hotmail.com。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81971299, 82071112); Natural Science Foundation Project of Shanghai "Science and Technology Innovation Action Plan" (22ZR1437500).

[Corresponding Author] ZHOU Wei, E-mail:sweetzw@hotmail.com.



by flow cytometry. The expression rate of STAT3 in macrophages of the spleen was detected by flow cytometry. The condition of neuronal cells was examined by Nissl staining. The condition of the microglia in the cortex and hippocampus was observed by brain immunofluorescence staining. The phenotype of the microglia was detected by flow cytometry. **Results**·The CKO mice and WT mice were successfully bred. MACS boosted the proportion of microglia in brain cells from 10% to 85%. RT-PCR results showed that mRNA levels of *Stat3* were down-regulated in microglia of CKO mice, compared with the WT mice ($P=0.001$). The relative mRNA expression of *Stat3* in microglia of the CKO mice was 0.331 ± 0.041 . Immunofluorescence staining of brain tissues showed that the fluorescence intensity of STAT3 in microglia of the CKO mice was weaker than that of the WT mice. Flow cytometry of brain tissues showed that the STAT3-positive cells in microglia of the WT mice was $(85.30 \pm 5.69)\%$ and the CKO mice was $(39.70 \pm 3.88)\%$. STAT3 expression was decreased in microglia of the CKO mice ($P=0.001$). Flow cytometry of spleen tissues showed that there was no statistical difference in the percentage of STAT3-positive cells in splenic macrophages between the CKO and WT mice ($P>0.05$). Nissl staining showed that there were no significant differences between the neuronal cells of the CKO mice and WT mice. Immunofluorescence staining of brain tissues showed that there was no significant difference in the shape of microglia between the CKO mice and WT mice. Flow cytometry showed that the phenotype of microglia in the CKO mice was not remarkably different from that of the WT mice. **Conclusion**·We successfully construct the STAT3 gene conditional knockout mice from microglia, which provides the foundation for subsequent related studies.

Key words microglia; signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); tamoxifen; mice; Cre recombinase

在先天免疫细胞中，小胶质细胞是神经炎症的主要参与者^[1]。小胶质细胞是中枢神经系统中的巨噬细胞，占中枢神经系统细胞总数的10%，参与神经元的发生及可塑性过程，并在脑组织受到损害时充当第一道防线^[2]。小胶质细胞可以感知炎症、细菌病毒、毒素或受损细胞的存在，能够产生抗炎因子，清除细菌、病毒和受损细胞，维持神经中枢系统的正常运作，确保神经元行使正常功能^[3]。虽然轻度激活的小胶质细胞可以清除细胞碎片和受损的神经元，启动细胞的免疫功能，对大脑有保护作用，但当小胶质细胞在过度激活状态时，也会大量释放促炎和细胞毒性因子加剧脑内炎症的发生发展；同时伴随吞噬能力的下降，使整个大脑处于过度炎症状态，进一步加剧神经元的凋亡^[4-5]。因此维持小胶质细胞的正常生理功能以及进一步了解其作用原理是非常重要的。由于小鼠和人类之间遗传和病理生理学的相似性，可利用基因工程小鼠模型深入了解小胶质细胞在与神经炎症相关的疾病发展过程中作用的分子和细胞机制^[6]。

信号转导和转录激活因子3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是细胞质转录因子家族成员之一，是参与大脑炎症反应病理过程的重要分子，可介导多种细胞内信号通路，也参与神经再生分化、血管生成、维持能量平衡等多项生理活动^[7-8]。STAT3是炎症基因表达的重要调节因子，已被证明其在小胶质细胞对各种刺激的反应中起重要调节作用，并介导小胶质细胞对中枢神经系统损伤的促炎反应^[9]。目前，基于STAT3信号深入探讨小胶质细胞作用的研究较少。

Cre-*loxP*介导的重组系统作为一种强大的基因编辑工具，已广泛应用于基因研究中^[10]。Cre重组酶特异性识别*loxP*位点，并根据2个*loxP*位点相对位置的不同，可使其位点间的DNA序列倒位、丢失、易位^[11]。由于Cre-*loxP*系统的高效性和强特异性，如今已广泛用于基因方面的研究，诱导型Cre-*loxP*系统还可在时间和空间上对基因进行编辑。诱导型Cre-*loxP*系统是对Cre进行改造而成，只有当人工合成的激素分子与其结合时，Cre才能进入细胞核内介导基因重组。他莫昔芬诱导的Cre系统是目前应用最广泛的诱导型Cre^[12]。

目前在炎症中关于STAT3机制的研究大多采用体内抑制剂药物注射等方法，无法排除全身细胞的相互影响；而基因条件性敲除小鼠在理想情况下可在特定类型细胞中实现基因敲除，为生物学机制的深入研究提供更为准确可靠的证据。由于目前尚无相关小鼠模型，故为探究STAT3信号与小胶质细胞的作用，本研究拟构建小胶质细胞*Stat3*基因条件性敲除小鼠，为进一步深入研究提供动物模型。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

Stat3^{fl/fl}雄性小鼠购于美国杰克逊实验室，*Cx3cr1*^{creERT2}雌性小鼠由上海交通大学基础医学院虞志华教授惠赠，基因小鼠背景均为C57BL/6。所有实验用小鼠均饲养在上海交通大学医学院附属第九人民医院SPF级动物房中，12 h光暗交替，温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，允许其自由进食和饮水。

1.2 主要实验试剂

DEPC 处理水 [B501005-0100, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 中国]; MicroElute Total RNA kit (R6831-01, Omega Bio-Tek 公司; 美国); PerCP -Cy5.5 Anti CD11b 抗体 (550993, BD 公司; 美国); APC -Cy7 Anti CD45 抗体 (557659, BD 公司; 美国); APC Anti F4/80 抗体 (566787, BD 公司; 美国); APC Anti-CD86 抗体 (558703, BD 公司; 美国); PE-Cy7 Anti-CD206 抗体 (25-2061-82, BD 公司; 美国)。

1.3 小鼠的繁育

以 *Stat3^{fl/fl}* 与 *Cx3cr1^{creERT2}* 基因型的小鼠为 F0 代, 杂交获得 *Stat3^{fl/+}*; *Cx3cr1^{creERT2}* 为 F1 代。F1 代自交, 获得 *Stat3^{fl/fl}*; *Cx3cr1^{creERT2}* 为 F2 代。F2 代与 *Stat3^{fl/fl}* 交配, 最终同时获得数量相近的条件敲除小鼠 (conditional knockout, CKO)、对照小鼠 (wild type, WT) 仔鼠为 F3 代, 进行后续实验。

1.4 小鼠基因型鉴定

小鼠 3 周龄时利用剪脚趾标号, 将所剪脚趾置于 1.5 mL 的 EP 管中, 加入裂解液, 置于 55 °C 烘箱过夜, 第二天取出待其温度到室温后 16 200×g 离心 3 min, 吸出上清至新 1.5 mL 的 EP 管, 加入等量异丙醇, 颠倒混匀, 16 200×g 离心 3min, 弃上清, 加 2 倍体积 70% 乙醇, 涡旋后, 16 200×g 离心 3 min, 弃上清, ddH₂O 溶解后 4 °C 保存待用。采用 20 μL 扩增体系, 2×PCR Mix 10 μL, 上下游引物各 1 μL, 样品 2 μL, ddH₂O 补足到 20 μL。引物序列如表 1。配置好扩增体系后, 置于 PCR 反应仪中, 开启反应扩增程序, 结束后配置 2% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶成像仪成像后判定基因型。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence for PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Primer Type
<i>Cx3cr1</i>	AAGACTCACGTGGACCTGCT	Common forward
	CGGTTATTCAACTTGCACCA	Mutant reverse
	AGGATGTTGACTTCCGAGTTG	Wild type reverse
<i>Stat3</i>	TTGACCTGTGCTCCTACAAAA	Forward A
	CCCTAGATTAGGCCAGCACA	Reverse A

1.5 基因诱导敲除

1.5.1 他莫昔芬配置 称取他莫昔芬粉末加入玉米

油中, 配置成 20 mg/mL, 37 °C 避光摇晃至其充分溶解后, 置于 4 °C 保存备用。

1.5.2 体内给药 小鼠 6 周龄时腹腔注射他莫昔芬玉米油溶液, 每只小鼠注射剂量为 0.1 mL, 间隔 24 h 给药, 连续给药 5 d, 2 周后分别随机选取 4 只 WT 小鼠及 4 只 CKO 小鼠进行基因敲除效率的验证。

1.6 基因敲除效率验证

1.6.1 组织切片免疫荧光 小鼠冰上灌注后取脑置于 4% 多聚甲醛 (PFA), 4 °C 固定 48 h, 20% 和 30% 蔗糖梯度脱水, 冰冻切片包埋剂 (OCT) 包埋后制备冰冻切片, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后封闭, STAT3 和离子钙接头蛋白 (IBA1) 一抗共同 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗后, 37 °C 避光孵育辣根过氧化物酶标记的二抗 30 min, PBS 清洗后, 滴加含 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI) 的荧光防淬灭封片剂后封片, 荧光显微镜下拍照。

1.6.2 免疫磁珠分选法 (magnetic activated cell sorting, MACS) 提取小胶质细胞 脑组织灌注后取出剪碎, 消化后过 70 目筛网, 4 °C 离心后用 30% percoll 重悬沉淀, 去除最上层髓鞘及上层液体, PBS 清洗细胞沉淀, 用 100 μL 胎牛血清 (FBS) 重悬得脑组织单细胞悬液。显微镜下细胞计数, 每 10⁷ 个细胞重悬于 90 μL FBS, 加 10 μL CD11b 磁珠, 4 °C 避光孵育 15 min, PBS 清洗后过柱, 得到小胶质细胞。

1.6.3 实时定量 PCR 检测 取 CKO、WT 小鼠 MACS 后的细胞, 采用离心柱式提取 RNA。超微量核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度, Takara 反转录试剂盒反转录为 cDNA。采用 10 μL 反应体系, 加入 SYBR 5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH₂O 3 μL, 每个样品 3 个复孔, 点板后离心混匀, 放入罗氏荧光定量 PCR 仪开启程序, 结束后采用 GraphPad Prism 9.0 对结果进行分析。

1.6.4 流式细胞术检测 取他莫昔芬诱导后小鼠, 制备脑细胞悬液及脾细胞悬液, 100 μL PBS 重悬 10⁶ 个细胞于流式管中, 加入 PerCP Cy5.5-CD11b 和 APC Cy7-CD45 流式抗体标记小胶质细胞; 加入 APC Cy7-CD45 和 APC-F4/80 流式抗体标记脾巨噬细胞, 4 °C 避光孵育 30 min, PBS 清洗; 固定破膜后, 加入 PE-Stat3 流式抗体检测 STAT3 的表达, 4 °C 避光孵育 30 min, PBS 清洗, 流式细胞仪检测 STAT3 的表达。

1.7 脑内神经元和小胶质细胞检测

1.7.1 尼氏染色检测脑内神经元细胞 小鼠经生理盐水灌注后用4% PFA灌注, 取脑置于4% PFA中固定24 h, 石蜡包埋后切片, 脱蜡至95%乙醇, 入牢固蓝染色液, 室温过夜后95%乙醇洗去多余染色液, 蒸馏水冲洗, 入分化液分色15 s, 入70%乙醇分色30 s, 水洗, 95%乙醇、100%乙醇依次脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固后, 显微镜下拍照。

1.7.2 免疫荧光观察小胶质细胞 各组选取截面相近的大脑冰冻切片, PBS清洗后封闭, IBA1一抗共同4 °C孵育过夜, PBS清洗后, 37 °C避光孵育辣根过氧化物酶标记的二抗30 min, PBS清洗后, 滴加含DAPI的荧光淬灭封片剂后封片, 荧光显微镜下拍照。

1.7.3 流式细胞术检测小胶质细胞分型 利用CKO小鼠和WT小鼠制备脑细胞悬液, 100 μ L PBS重悬 10^6 个细胞于流式管中, 加入PerCP Cy5.5-CD11b和APC Cy7-CD45流式抗体标记小胶质细胞, 4 °C避光孵育30 min, PBS清洗, 固定破膜后, 加入APC-

CD86流式抗体检测M1型小胶质细胞, 加入PE Cy7-CD206流式抗体检测M2型小胶质细胞, 4 °C避光孵育30 min, PBS清洗, 流式细胞仪检测。

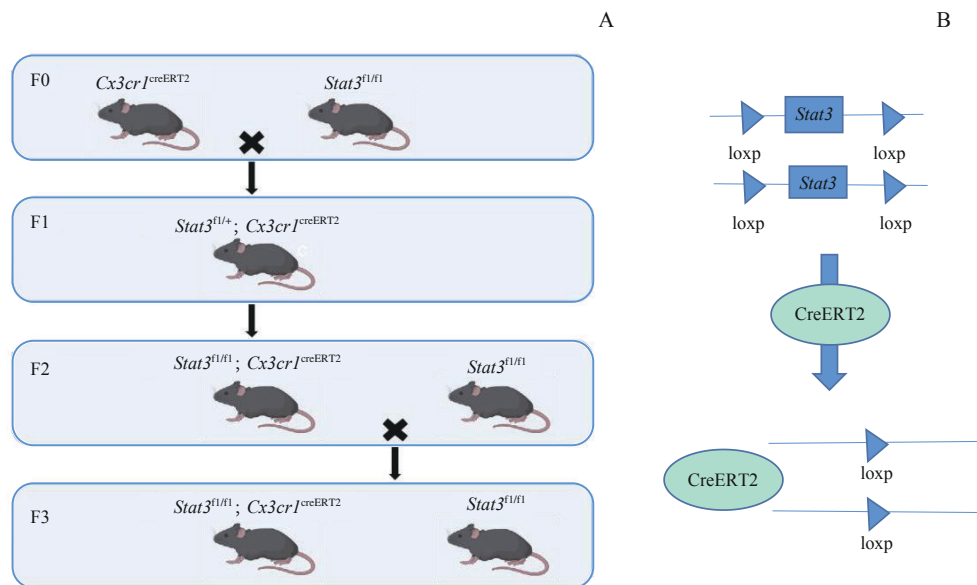
1.8 统计学分析

用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠模型的构建

CKO小鼠的繁育如图1所示。F0代 $Stat3^{fl/fl}$ 与 $Cx3cr1^{creERT2}$ 基因型的小鼠杂交, 成功获得基因型为 $Stat3^{fl/+}; Cx3cr1^{creERT2}$ 的F1代。F1自交, 成功获得足够数量基因型为 $Stat3^{fl/fl}; Cx3cr1^{creERT2}$ 的F2代。后继续与 $Stat3^{fl/fl}$ 交配, 最终可成功同时获得数量相近的 $Stat3^{fl/fl}; Cx3cr1^{creERT2}$ (CKO)、 $Stat3^{fl/fl}$ (WT) 实验鼠。



Note: A. Schematic diagram of mice breeding. B. Schematic diagram of *Stat3* gene knockdown.

图1 小鼠模型构建示意

Fig 1 Schematic diagram of the construction of mice

2.2 小鼠的基因型鉴定

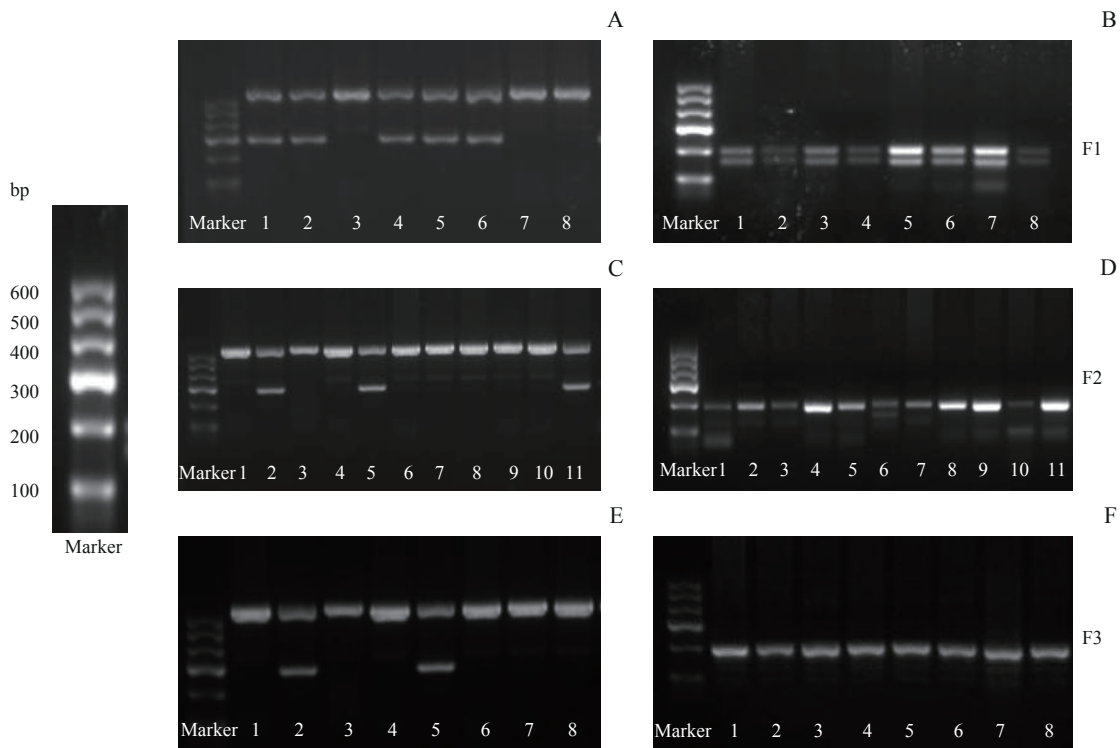
提取小鼠DNA进行基因型鉴定, 鉴定结果如下。特异性引物凝胶电泳后基因型对应条带大小如表2。结合图2A、B可知, 1、2、4、5、6基因型为 $Stat3^{fl/+}; Cx3cr1^{creERT2}$, 为F1代实验鼠; 结合图2C、D可知, 2、5、11基因型为 $Stat3^{fl/fl}; Cx3cr1^{creERT2}$, 为F2代实验鼠; 结合图2E、F可知, F3代2、5号为CKO

鼠, 1、3、4、6、7、8号为WT小鼠。

表2 基因型对应的特异性引物条带

Tab 2 Location of genotype-specific primer bands

Primer	Genotype	Location
<i>Cx3cr1</i>	WT	695 bp
	$Cx3cr1^{creERT2}$	300 bp; 695 bp
<i>Stat3</i>	$Stat3^{fl/+}$	146 bp; 187 bp
	$Stat3^{fl/fl}$	187 bp



Note: A/B. *Cx3cr1*^{creERT2} and *Stat3*^{fl/fl} genotype identification results of F1 generation mice, respectively. C/D. *Cx3cr1*^{creERT2} and *Stat3*^{fl/fl} genotype identification results of F2 generation mice, respectively. E/F. *Cx3cr1*^{creERT2} and *Stat3*^{fl/fl} genotype identification results of F3 generation mice, respectively.

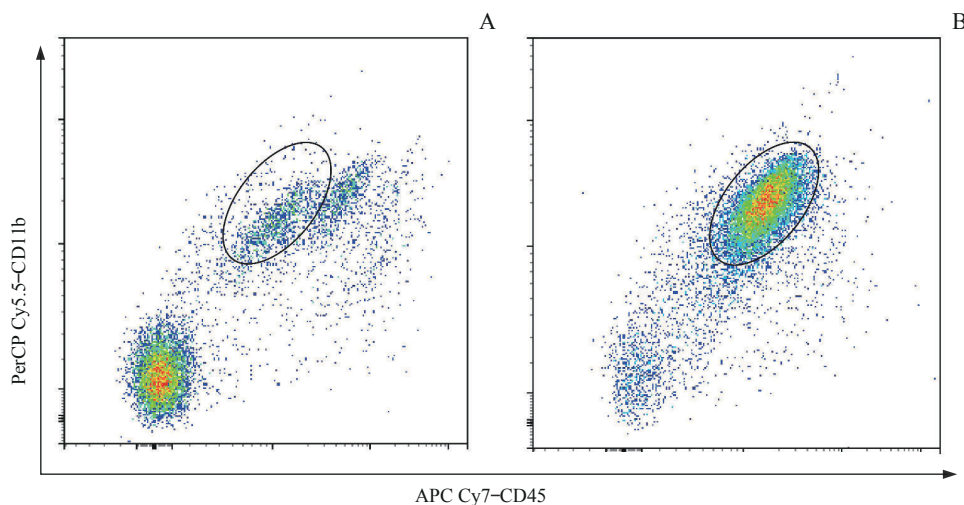
图2 小鼠基因型鉴定结果

Fig2 Genotype identification of mice

2.3 他莫昔芬诱导后小胶质细胞STAT3变化情况

2.3.1 CKO小鼠小胶质细胞 *Stat3* mRNA 表达变化 WT与CKO组小鼠腹腔注射他莫昔芬后,利用MACS提取小胶质细胞,利用流式细胞术检测提纯效果,通过CD45^{int}CD11b⁺标记小胶质细胞。结果如图3所示,MACS提纯前小胶质比例约为10%,提纯后小胶质细胞比例约为85%。通过RT-

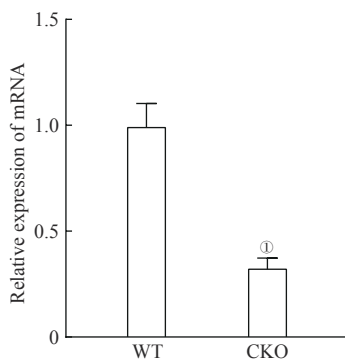
PCR检测 *Stat3* 基因 mRNA 表达情况,结果如图4所示,CKO小鼠小胶质细胞中的 *Stat3* mRNA 较WT小鼠的相对表达量为 0.3317 ± 0.0414 ,CKO小鼠小胶质细胞中的 *Stat3* mRNA 水平与WT小鼠相比差异有统计学意义 ($P=0.001$)。该结果说明在CKO小鼠在基因水平上可以实现小胶质细胞 *Stat3* 的敲除。



Note: A. Microglia proportion before MACS. B. Microglia proportion after MACS.

图3 流式细胞术检测MACS后小胶质细胞的纯度变化

Fig3 Detection of microglial purity changes after MACS by flow cytometry



Note: ^① $P=0.001$, compared with the WT mice.

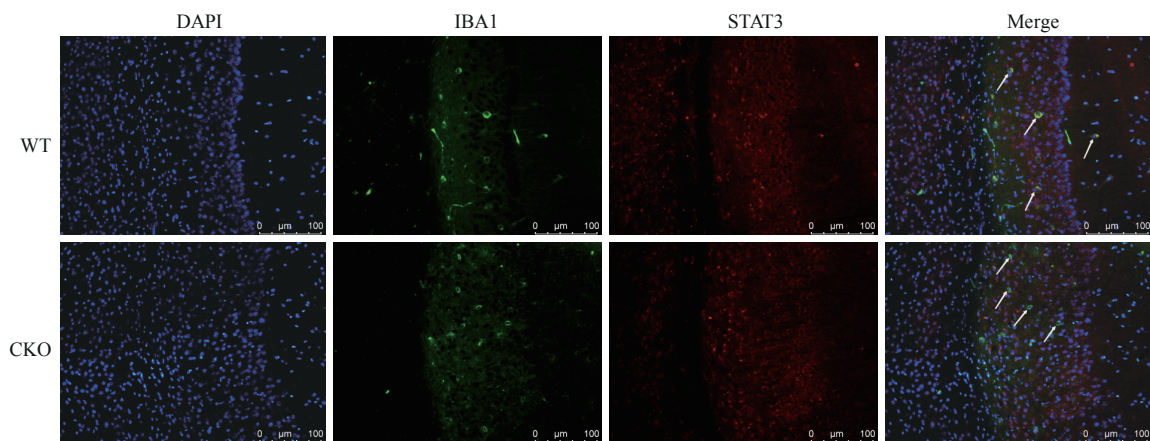
图4 小胶质细胞 *Stat3* mRNA 表达情况

Fig 4 *Stat3* mRNA expression in microglia

2.3.2 CKO小鼠小胶质细胞STAT3蛋白表达变化

WT与CKO组小鼠大脑切片免疫染色, 绿色荧光为

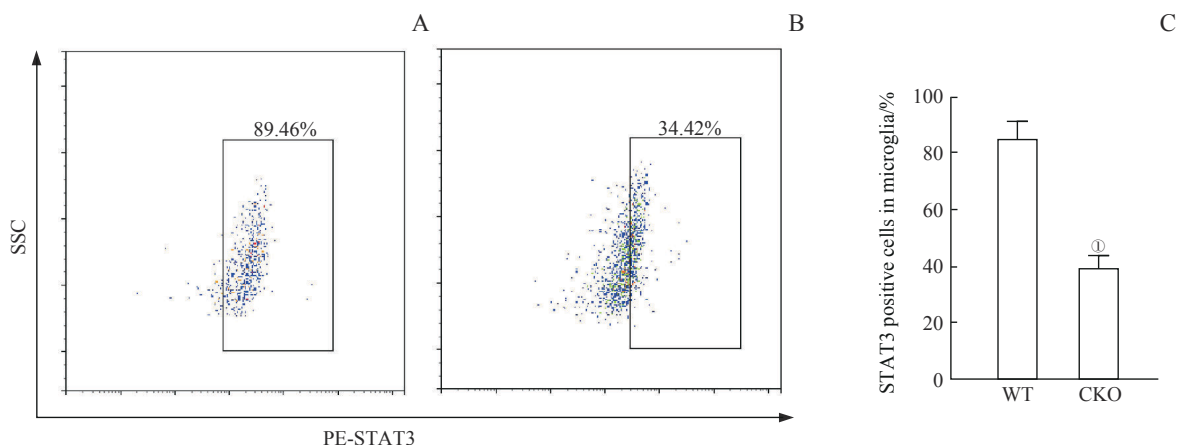
IBA1 标记的小胶质细胞, 红色荧光为标记的 STAT3, 蓝色荧光为 DAPI 标记的细胞核。结果显示, 如图 5, 与 WT 组相比 CKO 组的小胶质细胞 STAT3 荧光强度较弱, 说明 CKO 组小鼠小胶质细胞内 STAT3 蛋白表达减少。该结果表明小鼠腹腔注射他莫昔芬后, CKO 小鼠小胶质细胞中的 STAT3 表达降低, 可实现 STAT3 蛋白层面的敲除。通过流式细胞术对 CKO 和 WT 小鼠小胶质细胞中的胞内因子 STAT3 进行分析。结果显示如图 6, WT 组小胶质细胞中 STAT3 阳性细胞占比为 (85.30±5.69)%, CKO 组小胶质细胞中 STAT3 阳性细胞占比为 (39.70±3.88)%, 差异具有统计学意义 ($P=0.001$), 说明在 CKO 小鼠在蛋白水平上可以实现小胶质细胞 STAT3 的敲除。



Note: DAPI staining (blue) and STAT3 staining (red) in microglia represented by IBA1 (green). White arrows indicate microglia. Scale bar=100 μm .

图5 免疫荧光检测小胶质细胞内 STAT3 的表达变化

Fig5 Detection of changes in STAT3 expression in microglia by immunofluorescence



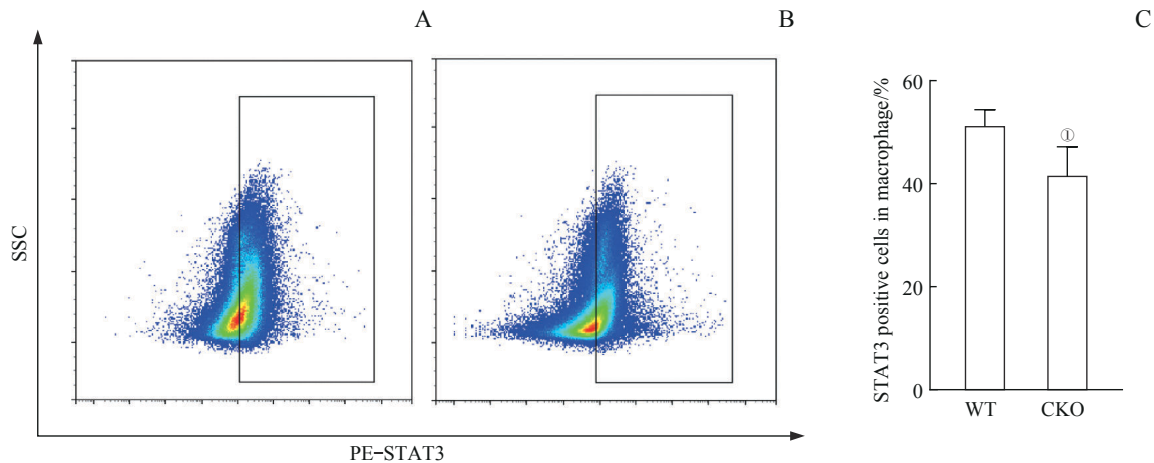
Note: A. Detection of STAT3-positive cells in microglia of the WT mice by flow cytometry. B. Detection of STAT3-positive cells in microglia of the CKO mice by flow cytometry. C. Statistics on the percentage of STAT3-positive cells in microglia. ^① $P=0.001$, compared with the WT mice.

图6 流式细胞术检测小鼠小胶质细胞中 STAT3 变化

Fig 6 Detection of STAT3 changes in mice microglia by flow cytometry

2.3.3 流式细胞术检测 CKO 小鼠脾巨噬细胞的变化 通过流式细胞术对 2 组小鼠脾巨噬细胞中的胞内因子 STAT3 进行分析, 如图 7, WT 组脾巨噬细胞中 STAT3 阳性细胞占比为 $(54.75 \pm 3.87)\%$, CKO 组的脾巨噬细胞中 STAT3 阳性细胞占比为 $(40.76 \pm$

$6.01)\%$, 2 组差异无统计学意义。上述结果提示, 相较小胶质细胞中 STAT3 的变化, 脾巨噬细胞 STAT3 的变化较不明显, 且 CKO 与 WT 小鼠比较无显著差异, 小鼠可用于 STAT3 机制的进一步研究。



Note: A. Detection of STAT3-positive cells in splenic macrophage of the WT mice by flow cytometry. B. Detection of STAT3-positive cells in splenic macrophage of the CKO mice by flow cytometry. C. Statistics on the percentage of STAT3-positive cells in splenic macrophage. ^① $P=0.098$, compared with the WT mice.

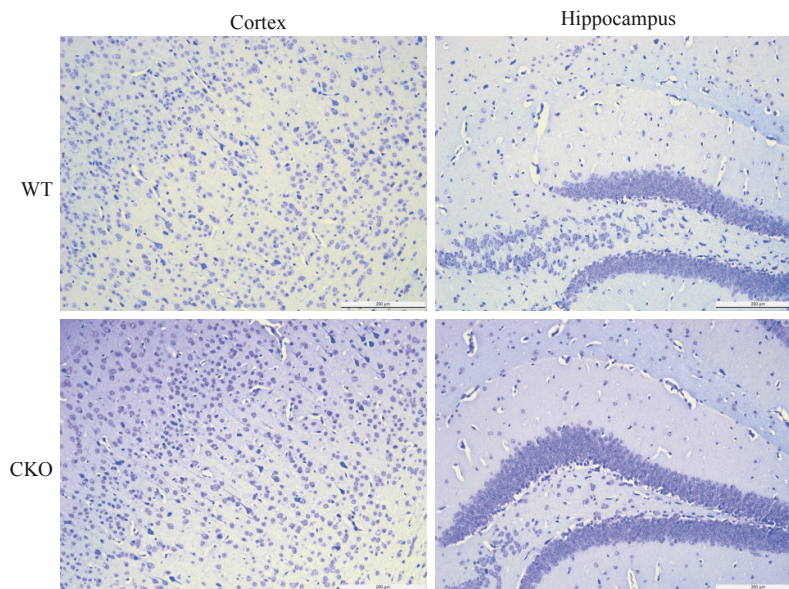
图 7 流式细胞术检测小鼠脾巨噬细胞中 STAT3 变化

Fig 7 Detection of STAT3 changes in mice splenic macrophage by flow cytometry

2.4 脑内神经元和小胶质细胞的情况

2.4.1 尼氏染色检测神经元的情况 观察小鼠皮层及海马区域神经元数目及形态变化, 结果如图 8,

CKO 组与 WT 组小鼠皮层和海马区域染色结果未见明显差异, 说明 CKO 小鼠的神经元未受到显著影响。



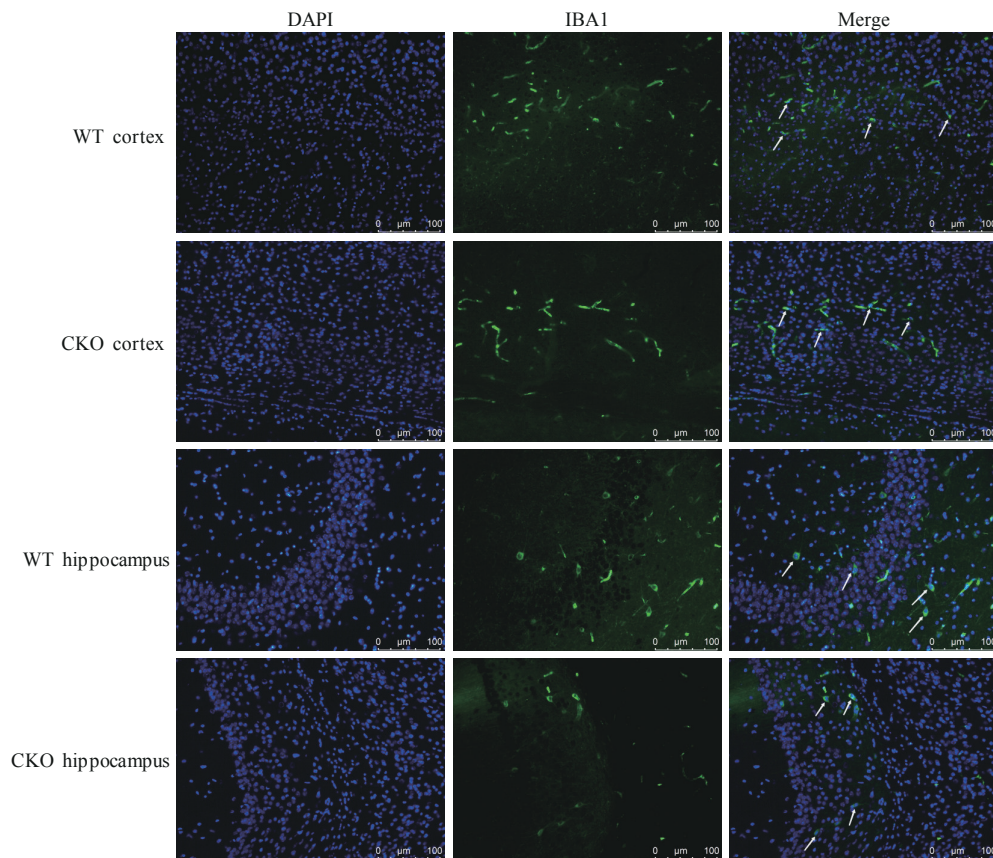
Note: Scale bar=200 μ m.

图 8 尼氏染色检测神经元的变化

Fig 8 Detection of the changes in neurons by Nissl staining

2.4.2 小胶质细胞的情况 WT与CKO组小鼠大脑切片免疫染色,绿色荧光为IBA1标记的小胶质细胞,蓝色荧光为DAPI标记的细胞核。结果显示,如图9,与WT组相比,CKO组的IBA1标记小胶质细胞在皮层和海马区域未见明显差异,形态无明显不同,说明CKO组小鼠小胶质细胞无明显改变。如图10所示,

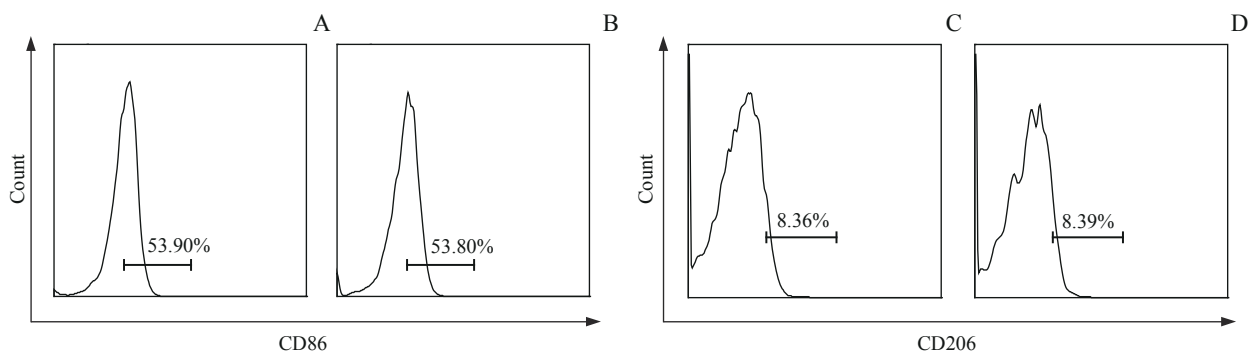
通过流式细胞术对CKO和WT小鼠小胶质细胞中的胞内因子CD86 (M1型)和CD206 (M2型)进行分析。如图11,CKO小鼠M1型/M2型小胶质细胞比例与WT小鼠相比,差异无统计学意义;说明CKO小鼠与WT小鼠小胶质细胞的表型无明显差别。



Note: DAPI staining (blue) and microglia represented by IBA1 (green). Scale bar=100 μm .

图9 免疫荧光检测小胶质细胞变化

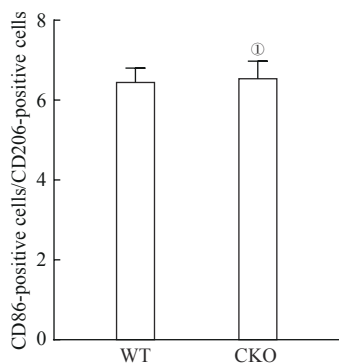
Fig 9 Detection of the changes of microglia by immunofluorescence



Note: A. Detection of the CD86-positive cells of microglia in the WT mice by flow cytometry. B. Detection of the CD86-positive cells of microglia in the CKO mice by flow cytometry. C. Detection of the CD206-positive cells of microglia in the WT mice by flow cytometry. D. Detection of the CD206-positive cells of microglia in the CKO mice by flow cytometry.

图10 流式细胞术检测小胶质细胞表型的变化

Fig 10 Detection of the type in mice microglia by flow cytometry



Note: ① $P=0.859$, compared with the WT mice.

图 11 M1 型小胶质细胞与 M2 型小胶质细胞比例的变化

Fig 11 Changes of M1 microglia/M2 microglia

3 讨论

STAT3 信号通路是疾病中普遍存在的信号级联。一方面, STAT3 在不同条件下参与不同细胞类型的各种信号通路。在发生阿尔茨海默病时, STAT3 信号通路被激活后可导致 β -分泌酶 (β -site APP cleaving enzyme 1, BACE1) 上调, 进而影响星形胶质细胞代谢并使 $A\beta$ 产生增加, 同时参与调节神经元毒性, 影响 AD 的病理过程^[13]。REICHENBACH 等^[14] 在阿尔茨海默病模型小鼠中特异性条件敲除星形胶质细胞中的 *Stat3* 基因后, 发现 $A\beta$ 水平降低, 促炎细胞因子激活减少, 小鼠学习记忆能力较对照组提升, 提示抑制 STAT3 可能通过影响 APP 代谢, 减轻神经炎症来纠正学习记忆能力的损害。在一些研究中, 也有证据表明 STAT3 激活会降低大脑的恢复能力, 阻断 STAT3 通路时可逆转该结果^[15]。另一方面, 神经炎症时, 小胶质细胞和星形胶质细胞被激活可以产生促炎细胞因子, 导致修复功能损伤, 并激活 STAT3 信号^[16-17]。有研究表明 *P. gingivalis*-LPS 造成的牙周炎症可激活 JAK2/STAT3 信号通路导致外周及中枢的炎症因子水平上调, 引起小胶质细胞的活化, 同时导致小鼠学习记忆能力下降, 且这些症状在应用 STAT3 抑制剂后有明显改善^[18]。上述研究提示, STAT3 信号介导的小胶质细胞活化可能在神经和牙周炎症的发生发展中起重要作用。

小胶质细胞 STAT3 信号激活在牙周炎促进认知损害中的作用机制尚不明确, 且目前尚无成熟的小胶质细胞 *Stat3* 基因条件性敲除的小鼠模型。本研究在构建小鼠模型后不仅验证了其敲除效率, 还利用流式细胞术分析了 CKO 小鼠与 WT 小鼠的小胶质细胞、

小胶质细胞 (中枢巨噬细胞) 和外周巨噬细胞的差异, 并同时分析了对神经元细胞及小胶质细胞本身的影响, 为进一步深入探讨小胶质 STAT3 信号激活的作用提供了基础。

在实验过程中选用 *Stat3*^{fl/fl} 小鼠, 与表达 Cre 重组酶的 *Cx3cr1*^{creERT2} 小鼠进行交配, 多代繁育后获得 CKO 小鼠, 并用他莫昔芬对 6 周龄小鼠进行 *Stat3* 基因的诱导敲除。为验证其敲除效率, 利用琼脂糖凝胶电泳的方法进行鼠尾基因型鉴定后, 提取 CKO 与 WT 小鼠的小胶质细胞从基因和蛋白水平分别证实了 *Stat3* 的敲除。由于 *Cx3cr1* 同时也在巨噬细胞中表达, 为证明小胶质细胞中 *Stat3* 的特异性敲除, 同时检测外周巨噬细胞中 STAT3 的表达情况, 故利用流式细胞术检测 CKO 与 WT 小鼠的脾巨噬细胞中 STAT3 的变化情况, 发现 CKO 小鼠脾巨噬细胞中也有一定程度上的敲除, 但无统计学差异, 证实了小胶质细胞 *Stat3* 基因的特异性敲除。为检测对小鼠神经元的影响, 利用尼氏染色观察比较神经元数目, 证明了小胶质细胞 *Stat3* 基因敲除后, 未对其神经元产生影响。为检测对小胶质细胞的影响, 利用免疫荧光观察到皮层和海马区域小胶质细胞形态无明显差别; 利用流式细胞术观察小胶质细胞极化情况, CKO 小鼠与 WT 小鼠未见明显差异。以上结果表明, 本研究成功建立了小胶质细胞 *Stat3* 基因敲除小鼠模型, 且小鼠小胶质细胞 *Stat3* 基因条件性敲除后, 未对小胶质细胞产生显著影响。

基于 Cre-loxP 系统的诱导型基因小鼠, 可在时间与空间上对 *Stat3* 基因进行敲除, 但诱导型基因敲除小鼠存在因繁育周期长、药物诱导影响因素多等导致目的基因切除不完全, Cre 可能会引起细胞异常增值并出现敲除基因脱靶等问题^[10-11,19]。由于小胶质细胞难以用病毒载体和电穿孔技术进行基因编辑, 利用 Cre-loxP 技术可较为方便地实现小胶质细胞中基因的敲除, 且研究通过多种实验方法证明了小胶质细胞 *Stat3* 基因被有效敲除。总体而言, 小胶质细胞 *Stat3* 基因条件性敲除小鼠的构建为后续机制的研究提供了较好的模型。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学动物伦理审查委员会批准 (审批号 SH9H-2019-A499-1)。所有实验过程均遵照《上海交通大学医学院实验动物相关规章制度》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by The Animal Ethics Review Committee of Shanghai Jiao Tong University (Approval Letter No. SH9H-2019-A499-1), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Rules and Regulations for Experimental Animals of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine*.

作者贡献/Authors' Contributions

朱晓晨、周薇参与了实验设计以及论文的写作和修改。朱晓晨、

谢欣宜、赵旭日、徐丽娜、何智妍负责实验操作。朱晓晨负责数据分析。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by ZHU Xiaochen and ZHOU Wei. The manuscript was drafted and revised by ZHU Xiaochen and ZHOU Wei. The experiments were performed by ZHU Xiaochen, XIE Xinyi, ZHAO Xuri, XU Lina and HE Zhiyan. The results were analyzed by ZHU Xiaochen. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-03-21
- Accepted: 2023-06-25
- Published online: 2023-06-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] PRINZ M, JUNG S, PRILLER J. Microglia biology: one century of evolving concepts[J]. *Cell*, 2019, 179(2): 292-311.
- [2] LI C Q, WANG Y, XING Y, et al. Regulation of microglia phagocytosis and potential involvement of exercise[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 953534.
- [3] HU S Y, LEE H, ZHAO H P, et al. Inflammation and severe cerebral venous thrombosis[J]. *Front Neurol*, 2022, 13: 873802.
- [4] YU F, WANG Y F, STETLER A R, et al. Phagocytic microglia and macrophages in brain injury and repair[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(9): 1279-1293.
- [5] KIM H, KIM M, IM S K, et al. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes[J]. *Lab Anim Res*, 2018, 34(4): 147-159.
- [6] HU Y S, HAN X, LIU X H. STAT3: a potential drug target for tumor and inflammation[J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(15): 1305-1317.
- [7] TOŠIĆ I, FRANK D A. STAT3 as a mediator of oncogenic cellular metabolism: pathogenic and therapeutic implications[J]. *Neoplasia*, 2021, 23(12): 1167-1178.
- [8] ZHENG Z V, CHEN J F, LYU H, et al. Novel role of STAT3 in microglia-dependent neuroinflammation after experimental subarachnoid haemorrhage[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2022, 7(1): 62-70.
- [9] LUO L, AMBROZKIEWICZ M C, BENSELER F, et al. Optimizing nervous system-specific gene targeting with cre driver lines: prevalence of germline recombination and influencing factors[J]. *Neuron*, 2020, 106(1): 37-65. e5.
- [10] NAVABPOUR S, KWAPIS J L, JAROME T J. A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2020, 108: 732-748.
- [11] SIMONETTI M, YILMAZER A, KRETSCHMER K. Genetic tools for analyzing Foxp3⁺ treg cells: fluorochrome-based transcriptional reporters and genetic fate-mapping[J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2559: 95-114.
- [12] ABUBAKAR M B, SANUSI K O, UGUSMAN A, et al. Alzheimer's disease: an update and insights into pathophysiology[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 742408.
- [13] SHEN Y N, ZHANG Y, DU J Y, et al. CXCR5 down-regulation alleviates cognitive dysfunction in a mouse model of sepsis-associated encephalopathy: potential role of microglial autophagy and the p38MAPK/NF-κB/STAT3 signaling pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 246.
- [14] REICHENBACH N, DELEKATE A, PLESCHER M, et al. Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model[J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(2): e9665.
- [15] MEHLA J, SINGH I, DIWAN D, et al. STAT3 inhibitor mitigates cerebral amyloid angiopathy and parenchymal amyloid plaques while improving cognitive functions and brain networks[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9(1): 193.
- [16] ZOU J, SHANG W L, YANG L, et al. Microglia activation in the mPFC mediates anxiety-like behaviors caused by *Staphylococcus aureus* strain USA300[J]. *Brain Behav*, 2022, 12(9): e2715.
- [17] HU Y, LI H X, ZHANG J, et al. Periodontitis induced by *P. gingivalis*-LPS is associated with neuroinflammation and learning and memory impairment in sprague-dawley rats[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 658.
- [18] SHCHOLOK T, EFTEKHARPOUR E. Cre-recombinase systems for induction of neuron-specific knockout models: a guide for biomedical researchers[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(2): 273-279.
- [19] JIA X N, GAO Z H, HU H L. Microglia in depression: current perspectives[J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(6): 911-925.

[本文编辑] 徐 敏