

ApoE 基因敲除对小鼠 B、T 淋巴细胞的影响

石桂英, 张海涛, 张连峰, 白琳

(中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 了解 Apo E 基因敲除对淋巴细胞的影响。**方法** 用不同抗体标记 Apo E 基因敲除及同窝野生对照小鼠的外周血、脾脏、骨髓等细胞, 应用流式细胞仪进行分析, 比较两组之间的差异。**结果** 对检测结果进行统计分析发现, 与野生型小鼠相比, Apo E 基因敲除小鼠的外周血、脾脏淋巴细胞、短期造血干细胞均有改变, 骨髓前体 B 淋巴细胞、胸腺 T 淋巴细胞、长期造血干细胞等没有显著变化。**结论** Apo E 基因敲除后, 小鼠外周血及脾脏 B 淋巴细胞减少, 骨髓短期造血干细胞增加, 但 B 及 T 淋巴细胞发育, 以及骨髓长期造血干细胞、淋系共同祖细胞都没有显著变化。

【关键词】 Apo E 基因敲除小鼠; 流式细胞术; 骨髓造血干细胞

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 05-0005-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.005.002

The influence of B、T lymphocytes decreased in Apo E gene knockout mice

SHI Gui-ying, ZHANG Hai-tao, ZHANG Lian-feng, BAI Lin

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the influence of Apo E gene knockout on the lymphocytes. **Methods** Cells from the peripheral blood, spleen and bone marrow of Apo E knockout and wildtype mice were stained with kinds of antibodies, and analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with wildtype mice, significant differences were found in B and T lymphocytes in the peripheral blood and spleen, but there was no significant difference in pre B cells, T lymphocytes in the thymus and long term hematopoietic stem cell in the Apo E knockout mice. **Conclusion** Numbers of B lymphocytes decreased in the peripheral blood and spleen, but there was no significant difference in B, T lymphocytes development, and numbers of long term hematopoietic stem cell in Apo E gene knockout mice.

【Key words】 Apo E gene knockout mice; Flow cytometry; Hematopoietic stem cell

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, Apo E) 是一种多态性蛋白, 参与脂蛋白的转化与代谢过程, 其基因可以调节多种生物学功能^[1]。Apo E 基因敲除后, 小鼠的 B 淋巴细胞及 T 淋巴细胞发生改变^[2], Apo E 在造血干祖细胞中表达丰富, Apo E 基因敲除小

鼠喂饲高脂、高胆固醇饲料后, 造血干祖细胞显著增多^[3], 这说明在高脂、高胆固醇可以诱导 Apo E 基因敲除小鼠造血干祖细胞增殖。那么在没有高脂、高胆固醇诱因下, Apo E 基因对小鼠造血干祖细胞有没有影响呢?

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81200256); 协和青年基金资助项目 (3332013040)。

【作者简介】 石桂英, 女, 主管技师, 研究方向: 干细胞与衰老。

【通讯作者】 白琳, bailin49@163.com。

造血干细胞是所有成熟血细胞维持的重要因素。在生理状态下,造血干细胞面临多种命运选择:自我更新、分化、凋亡、静息或迁移,这些选择之间的平衡决定了造血干细胞的功能^[4]。不同命运的选择是由内在(细胞周期、凋亡等相关基因)和外在(微环境)的调控机制共同决定的^[5]。但是造血干细胞维持自我更新和选择分化的具体机制还不清楚。

那么 Apo E 对造血系统有怎样的作用,是否会影响骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的发育分化呢?为了解 Apo E 基因敲除是否会影响 HSC,我们应用 Apo E 基因敲除小鼠及同窝野生对照小鼠进行了相关分析。

1 材料和方法

1.1 动物与设备

Apo E 基因敲除小鼠来自北京协和医学院比较医学中心,遗传背景为 C57B6/L,对照小鼠为同窝野生型小鼠,动物生产及使用许可证号:SCXK(京)2009-0007;SYXK(京)2011-0022。动物饲养在 SPF 动物房,喂饲 SPF 级小鼠维持饮料。

主要实验设备为美国 BD 公司 Aria 流式细胞仪。

1.2 PCR 方法鉴定 Apo E 基因敲除小鼠基因型

用 10 日龄小鼠尾尖提取基因组 DNA,普通 PCR 鉴定基因型。反应条件:94℃ 预变性 3 min;94℃ 30 s,68℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。基因敲除小鼠的 PCR 鉴定引物:OIMR0180:5'-GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG 3', OIMR 0181:5'-TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C 3', OIMR 0182:5'-GCC GCC CCG ACT GCA TCT 3', PCR 产物长度,野生型为 155 bp, Apo E 敲除为 245 bp,杂合子同时有上述 2 条片段。引物由上海英骏生物工程技术有限公司合成,PCR 试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 流式分析

小鼠 2 月龄时脱颈椎处死,取外周血、胸腺、脾脏、后肢骨,置于冰上预冷的染色缓冲液(含 1% BSA 的 PBS)中。胸腺、脾脏用磨砂玻片研磨成细胞悬液;后肢骨用 5 mL 注射器将骨髓细胞冲出,并吹打成细胞悬液。将细胞悬液用 50 μ m 尼龙滤膜过滤后收集到 15 mL 离心管中,用 PBS 定容至 10 mL,混匀后,取 10 μ L 细胞悬液,稀释 10 倍后计数细胞

数。细胞悬液离心,1000 r/min,10 min,将细胞浓度调整为 1×10^8 个细胞/mL。分别取 10^6 细胞标记荧光抗体(BD 公司)。

骨髓造血干细胞的分析中用如下抗体进行标记:CD34-FITC、Flt3-PE、CD16/32-Percep-cy5.5、Sca1-PE-Cy7、cKit-APC、Ter-119-Biotin、Gr-1-Biotin、Mac-1-Biotin、B220-Biotin、IL-7R-Biotin、CD4-Biotin、CD8-Biotin、Biotin-APC-Cy7。骨髓造血干细胞(HSC)表面标记为:lin-c-kit⁺sca1⁺,长期造血干细胞(LT-HSC)表面标记为:Lin-c-Kit⁺Sca1⁺CD34⁻Flt3⁻,短期造血干细胞(ST-HSC)表面标记为:Lin-c-Kit⁺Sca1⁺CD34⁺Flt3⁻,髓系祖细胞(MP)表面标记为:Lin-c-Kit⁺Sca1⁻,共同髓系祖细胞(CMP)表面标记为:Lin-c-Kit⁺Sca1⁻CD34⁺CD16/32^{low},粒单系祖细胞(GMP)表面标记为:Lin-c-Kit⁺Sca1⁻CD34⁺CD16/32^{high},巨核单系祖细胞(MEP)表面标记为:Lin-c-Kit⁺Sca1⁻CD34⁻CD16/32^{low},淋系共同祖细胞(CLP)的表面标记为:Lin-c-kitlow Sca1^{low}CD34⁺IL-7R⁺。IgD-FITC、CD43-PE、B220-PE-Cy7、IgM-APC,标记不同发育阶段的 B 淋巴细胞。脾脏及外周血细胞标记抗体:CD4-FITC、CD8-Percep-cy5.5、B220-PE-Cy7、CD11b-APC-Cy7。上述抗体加入细胞悬液,冰上避光,30 min;加 1 mL 染色缓冲液,离心,2600 r/min,5 min,弃上清,加 200 μ L 染色缓冲液重悬细胞,用 50 μ m 尼龙滤膜过滤,冰上避光备用。

1.4 统计分析方法

数据分析采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析,各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间资料分析采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

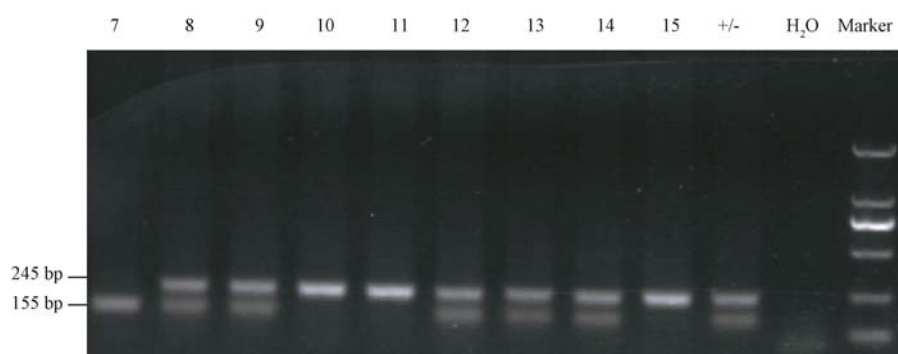
2 结果

2.1 PCR 鉴定结果

剪取 10 日龄小鼠脚趾,采用饱和氯化钠法提取小鼠基因组 DNA,进行 PCR,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,野生型产物长度为 155 bp, Apo E 缺失产物长度 245 bp。基因型鉴定结果(图 1)。

2.2 Apo E 基因敲除小鼠外周血 B 细胞、T 细胞减少

我们取 Apo E 基因敲除小鼠及同窝野生对照小鼠的外周血进行分析,发现 Apo E 基因敲除小鼠外周血中 B220⁺细胞($P < 0.05$)及 T 淋巴细胞($P < 0.01$)显著减少,而 CD11b⁺细胞则没有显著变化($P > 0.05$)。

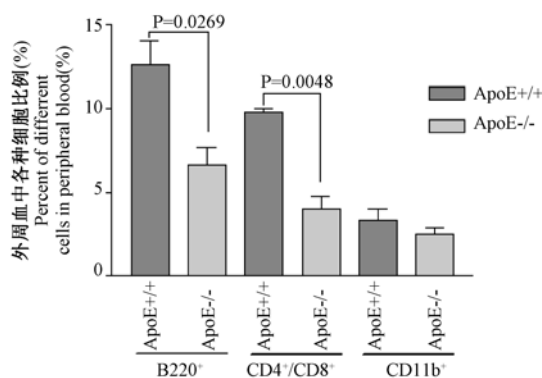


注:Marker 为 2000 bp DNA Marker,7-15 为小鼠编号,+/- 为杂合对照,H₂O 为阴性对照。

图 1 Apo E 基因敲除小鼠鉴定结果

Note: Marker: 2000 bp DNA marker; 7-15: No. of different mice; +/-: heterozygous control; H₂O: negative control.

Fig.1 Genotyping of Apo E knockout mice



注:Apo E +/+ : 同窝野生对照小鼠,
Apo E -/- : Apo E 基因敲除小鼠。

图 2 Apo E 基因敲除影响外周血 B220⁺ 细胞及 T 淋巴细胞

Note: Apo E +/+ : wildtype control mice;
Apo E -/- : Apo E gene knockout mice.

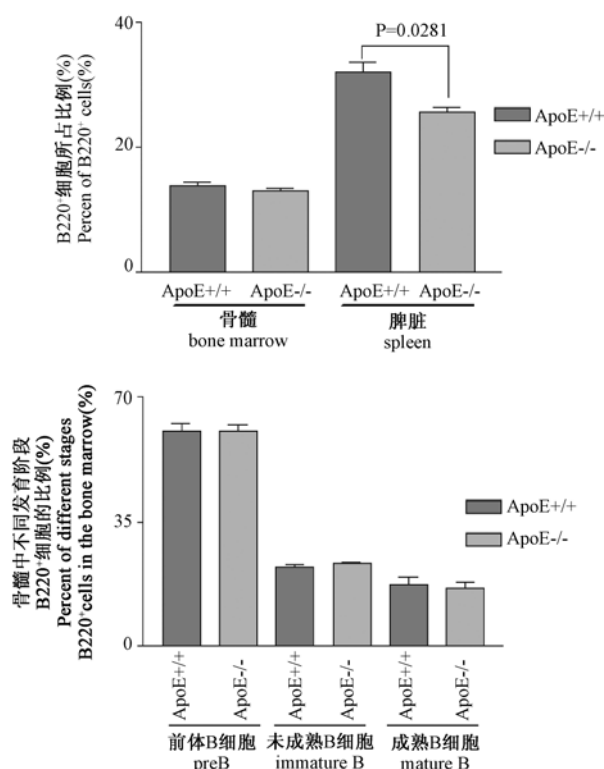
Fig.2 Apo E gene knockout influences the B220⁺ cells and T lymphocytes of peripheral blood

2.3 Apo E 基因敲除对小鼠骨髓及脾脏中 B220⁺ 细胞的影响

Apo E 基因敲除小鼠外周血中 B220⁺ 细胞减少,本研究对骨髓及脾脏的细胞进行了分析,同时对骨髓中前体 B 细胞的发育也进行了分析。结果发现,Apo E 基因敲除小鼠脾脏 B220⁺ 细胞减少 ($P < 0.05$),但是骨髓中 B220⁺ 细胞无显著改变 ($P > 0.05$)。同时,骨髓中前体 B 细胞的发育也没有显著变化 ($P > 0.05$)。

2.4 Apo E 基因敲除小鼠 T 细胞变化

Apo E 基因敲除小鼠外周血 T 淋巴细胞减少,为了解骨髓及脾脏 T 淋巴细胞的变化,本研究分析了骨髓、脾脏中 CD4⁺、CD8⁺ 细胞。结果发现,脾脏



注:A:骨髓及脾脏中 B220⁺ 细胞比例;B:

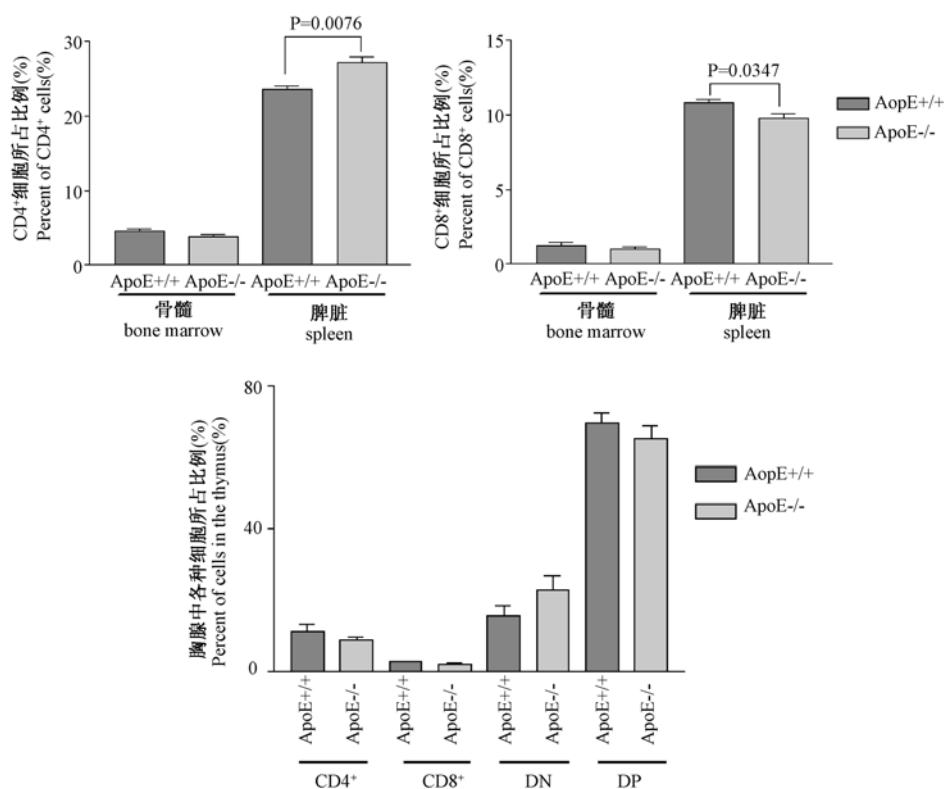
骨髓前体 B 细胞、未成熟 B 细胞及成熟 B 细胞的比例。

图 3 Apo E 基因敲除对骨髓及脾脏 B220⁺ 细胞的影响

Note: A: percent of B220⁺ cells in the bone marrow and spleen;
B: percent of pre B, immature B, mature B cells in the bone marrow.

Fig.3 Influence of Apo E knockout on the B220⁺ cells in bone marrow and spleen

中 CD4⁺ 细胞比例增多 ($P < 0.01$),而 CD8⁺ 细胞比例降低 ($P < 0.05$);骨髓中则未发现显著变化 ($P > 0.05$ 图 4A)。为进一步了解 Apo E 基因敲除对小鼠 T 淋巴细胞发育的影响,我们分析了胸腺 T 淋巴



注:A:骨髓及脾脏 CD4⁺、CD8⁺ 细胞的比例;B:胸腺中各阶段 T 细胞的比例;DN:CD4、CD8 双阴性细胞,DP:CD4、CD8 双阳性细胞。

图 4 Apo E 基因敲除对 T 淋巴细胞的影响

Note: A: percent of CD4⁺、CD8⁺ cells in the bone marrow and spleen; B: percent of different stages T lymphocytes in the thymus;

DN: CD4, CD8 double negative cells, DP: CD4, CD8 double positive cells.

Fig. 4 Influence of Apo E knockout on T lymphocytes

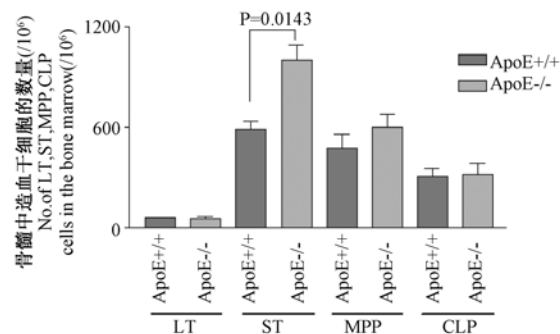
细胞,结果显示,各阶段 T 淋巴细胞的比例没有显著变化($P > 0.05$)图 4B)。这说明,Apo E 基因敲除对 T 淋巴细胞发育没有显著影响。

2.5 Apo E 基因敲除对骨髓造血干细胞的影响

为了解 Apo E 基因敲除对小鼠骨髓造血干细胞的影响,本研究分析了 Apo E 基因敲除小鼠及同窝野生对照小鼠骨髓造血干细胞的数量,发现 Apo E 基因敲除小鼠短期造血干细胞 (ST-HSC) 数量显著增加($P < 0.05$),长期造血干细胞 (LT-HSC)、多潜能造血祖细胞 (MPP) 及淋系共同祖细胞 (CLP) 则没有显著变化($P > 0.05$)。造血干细胞的功能是否改变,则需进行骨髓移植实验来深入研究。

3 讨论

已有研究表明,Apo E 基因参与免疫调节作用,Apo E 基因敲除小鼠的体液免疫及细胞免疫均发生改变^[6]。Apo E 基因敲除小鼠在 3 月龄时已出现脂肪条纹,即动脉粥样硬化早期的损伤性表现^[1]。本研究中采用 2 月龄小鼠作为研究对象喂饲正常小鼠



注:LT:长期造血干细胞,ST:短期造血干细胞, MPP:多潜能造血祖细胞,CLP:淋系共同祖细胞。

图 5 Apo E 基因敲除对骨髓造血干细胞的影响

Note: LT: long term HSC, ST: short term HSC, MPP: multi-potential progenitors, CLP: common lymphoid progenitor.

Fig. 5 Influence of Apo E knockout on the hematopoietic stem cell (HSC)

维持饲料,避免了 Apo E 基因敲除所致疾病对研究目标的影响。本研究发现,Apo E 基因敲除后小鼠造血系统 B220⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞在外周组织中发生变化,骨髓短期造血干细胞显著增加($P <$

0.05),但是骨髓长期造血干细胞及胸腺 T 细胞则没有显著变化($P > 0.05$)。这说明 Apo E 基因可能通过免疫调节作用影响 B220⁺、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞。Apo E 基因对骨髓造血干细胞的自我更新及分化功能是否有影响,尚需应用竞争性骨髓移植、体外克隆形成实验等进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Reue KL, Quon DH, O'Donnell KA, *et al.* Cloning and regulation of messenger RNA for mouse apolipoprotein E. *The Journal of biological chemistry* [J]. 1984, 259 (4): 2100 - 2107.
- [2] Ali K, Middleton M, Pure E, *et al.* Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circulation research* [J]. 2005, 97(9): 922 - 927.

- [3] Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, *et al.* ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *The Journal of clinical investigation* [J]. 2011, 121: 4138 - 4149.
- [4] Kobayashi M, Srour EF. Regulation of murine hematopoietic stem cell quiescence by Dmtf1. *Blood* [J]. 2011, 118: 6562 - 6571.
- [5] Pietras EM, Warr MR, Passegue E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology* [J]. 2011, 195: 709 - 720.
- [6] Laskowitz DT, Lee DM, Schmechel D, *et al.* Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of lipid research* [J]. 2000, 41: 613 - 620.

[修回日期] 2014-03-31

(下接第 25 页)

组的前足是用来控制方向的,而后足是用来驱动肢体前行的,分工比较明确。而模型组动物除左后足之外的三足的推进指数均远高于 50%,可能说明动物支配四足的神经功能不够健全,或者是有损伤,使得三足均驱动肢体前行。经过相关性分析,第一次穿台时间与双侧前足的制动指数是呈负相关的($r = -0.433, -0.374$),且与左前足相关性显著($P < 0.05$),这个可能是与临床上 AD 患者摔倒的概率增加有关。

由于本次实验的样本量较小,想完全从动物身上探索步态的确切改变,还需加大样本量,做进一步的研究。

参考文献:

- [1] Tinetti M E, Speechley M, Ginter S F. Risk factors for falls among elderly persons living in the community[J]. *New England journal of medicine*, 1988, 319(26): 1701 - 1707.
- [2] Li S D, Shi Z, Zhang H, *et al.* Assessing gait impairment after permanent middle cerebral artery occlusion in rats using an automated computer-aided control system[J]. *Behavioural brain research*, 2013(250): 174 - 191
- [3] VISSER H. Gait and balance in senile dementia of Alzheimer's type[J]. *Age and ageing*, 1983, 12(4): 296 - 301.
- [4] Alexander N B, Mollo J M, Giordani B, *et al.* Maintenance of balance, gait patterns, and obstacle clearance in Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 1995, 45(5): 908 - 914.

- [5] Garcia-Alloza M, Robbins E M, Zhang-Nunes S X, *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease[J]. *Neurobiology of disease*, 2006, 24(3): 516 - 524.
- [6] Tang X C, Han Y F. Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb[J]. *CNS Drug Reviews*, 1999, 5(3): 281 - 300.
- [7] Ved H S, Koenig M L, Dave J R, *et al.* Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate[J]. *Neuroreport*, 1997, 8(4): 963 - 967.
- [8] Xiao X Q, Zhang H Y, Tang X C. Huperzine A attenuates amyloid β -peptide fragment 25 - 35 - induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase - 3 activation[J]. *Journal of neuroscience research*, 2002, 67(1): 30 - 36.
- [9] Visser H. Gait and balance in senile dementia of Alzheimer's type [J]. *Age and ageing*, 1983, 12(4): 296 - 301.
- [10] Hausdorff J M, Rios D A, Edelberg H K. Gait variability and fall risk in community-living older adults: a 1 - year prospective study [J]. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 2001, 82(8): 1050 - 1056.
- [11] Holtzer R, Verghese J, Xue X, *et al.* Cognitive processes related to gait velocity: results from the Einstein Aging Study [J]. *Neuropsychology*, 2006, 20(2): 215.

[修回日期] 2014-03-03