

# IL34 转基因小鼠的建立和表型分析

杨青, 全雄志, 廉虹, 张旭, 马春梅, 张连峰

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,  
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

**【摘要】** 目的 建立白介素 34 转基因小鼠, 研究该基因在小鼠中表达对小鼠免疫系统的作用。方法 把人的 IL34 基因插入 CMV 启动子下, 构建转基因表达载体, 通过显微注射法建立 IL34 转基因 C57BL/6J 小鼠。PCR 鉴定 IL34 转基因小鼠的基因型, Western blotting 检测 IL34 蛋白的表达水平, 组织化学染色观察 IL34 转基因小鼠重要器官的病理改变。结果 建立了 2 个品系的 IL34 转基因小鼠。转入的人 IL34 基因在脾脏中的表达水平高于内源性 IL34。组织学分析显示 IL34 转基因小鼠各重要器官如脑、心、肝、肾、肠等的形态结构均正常, 但脾脏的生发中心比较活跃, 白髓的范围比野生型小鼠大。结论 成功建立了 IL34 转基因小鼠, IL34 基因的过度表达对免疫系统作用需要进一步探讨。

**【关键词】** 白介素 34; 转基因小鼠; 巨噬细胞

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0064-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.014

## The Establishment of Interleukin 34 Transgenic Mice

YANG Qing, QUAN Xiong-zhi, LIAN Hong, ZHANG Xu, MA Chun-mei, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Human Disease Animal Models Level-3 Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

**【Abstract】 Objective** To generate the interleukin 34 (IL34) transgenic mice and investigate its functions on mouse's immune system. **Method** The transgenic plasmid was constructed by inserting the human IL34 gene in the downstream of CMV promoter. The transgenic mice were produced by microinjection method and the genotype was detected by PCR. The expression level of the protein was determined with Western blotting. The pathologic changes of important organs were observed by histochemical stain. **Result** Two lines of transgenic C57BL/6J mouse of IL34 gene were established. The expression levels of the IL34 gene was higher than the endogenous IL34 in the spleen tissue. Histology analysis demonstrated the important organs of the IL34 transgenic mice such as brain, heart, liver, kidney, intestine et al were normal except spleen. Compare with the wild type mice, the germinal center of spleen was more activity, the area of white pulp were larger. **Conclusion** The IL34 transgenic mice were established successfully. Over-expression of IL34 in the immune system needs further investigating.

**【Key words】** Interleukin 34; Transgenic mice; Macrophage

白介素最早发现在白细胞中表达作为细胞间信号传递,可以由多种细胞产生,不但参与调节免疫应答还广泛参与调节机体的生理病理过程。迄

今发现并命名的白介素家族的成员共有 37 种,它们存在于多种组织中,具有广泛的生物学活性。白介素 34 (Interleukin34, IL34) 是 2008 年 Haishan Lin 等

[基金项目] 卫生部项目, 实验动物和人类疾病动物模型资源扩展 (200802036) 和十一五新药专项支持 (2009ZX09501-026)。

发现的细胞因子<sup>[1]</sup>,它可以与在单核细胞表面的表达的集落刺激因子受体(colony stimulating factor 1 receptor, CSF1R)结合,促进骨髓中巨噬细胞集落的形成。IL34 在脾中有高表达,提示该基因对免疫系统有一定的作用,但其作用机制尚不清楚。本研究通过转基因技术,将人 IL34 基因转入 C57BL/6J 小鼠,建立了人 IL34 转基因小鼠,为进一步研究 IL34 的作用建立了模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 IL34 表达载体的构建及转基因

从 Origene 公司购买人 IL34 质粒,以 EcoR I 和 Not I 酶切质粒,胶回收 IL34 基因片段,然后将该片段插入到从 Origene 公司购买的 pCMV-MIR 载体中 CMV 启动子的下游,构建 IL34 转基因载体。提取并酶切鉴定质粒正确后,用 Tth111I 将其线性化, SephadexG50 柱纯化 DNA 片段,获得 CMV 启动的 IL34 基因的转基因片段,注射前将转基因片段的浓度调整至 5 ng/μL,用显微注射法<sup>[2]</sup>将线性化的转基因表达载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中(小鼠购自康蓝公司[SCXK(京)2004001]),用 ICR 小鼠作假孕受体(本实验室饲养),制备转基因小鼠(TE2000-U 显微注射仪)。实验中涉及动物的操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准,批准号为 GC-08-2036。

### 1.2 PCR 鉴定 IL34 转基因动物的基因型

转基因小鼠在出生 9~14 d 用剪趾法标记,收集剪下的组织,用碱裂解法提取基因组 DNA<sup>[3]</sup>,用 PCR 检测 IL34 转基因小鼠,PCR 引物为(上海英潍捷基贸易有限公司,中国),PCR 试剂购自宝生物工程(中国)有限公司,中国。PCR 上游引物为 5'-GTCAATGGGTGGAGTATTTACG,下游引物为 5'-GCTTATATAGACCTCCCACCGT。反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,30 个循环。IL34 片段为 386 bp。

### 1.3 Western blotting 鉴定 IL34 基因在蛋白水平的表达

选用 1 月龄的转基因阳性和同窝阴性小鼠,颈椎脱臼法牺牲小鼠,迅速取出脾组织置匀浆器中,加入 1 mL 的 RIPA 蛋白裂解液,将组织匀浆破碎后静置 30 min,然后 4℃,1300 rpm 离心 30 min,取上清液即为脾组织总蛋白。BCA 法测定浓度,取等量

蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,随后将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 30 min。用 TBST 以 1:1000 浓度稀释绵羊抗人 IL34 单抗,将一抗与膜封入杂交袋中,4℃ 过夜。弃去一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。用 TBST 以 1:20000 浓度稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗绵羊 IgG,同时加入 β-actin 抗体于杂交盒中,放入膜,室温摇床孵育 1 h。弃去二抗,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。将膜至于化学发光剂中,曝光、显影及定影。

### 1.4 IL34 转基因小鼠的病理学检测

选用 2 月龄 IL34 转基因小鼠和同窝阴性小鼠,颈椎脱臼法牺牲小鼠,取心、肝、脾、肺、肾、脑及小肠等重要器官然后用 10% 福尔马林溶液中固定 48 h,进行取材、脱水、包埋、切片、HE 染色及光镜下观察(Nikon 显微镜,日本)。

## 2 结果

### 2.1 IL34 表达载体的构建和转基因小鼠基因型的鉴定

从 Origenen 购买的人 IL34 质粒(GenBank No. NM\_152456)。将该基因酶切回收后插入从 Origene 公司购买的 pCMV-MIR 载体中 CMV 启动子的下游,构建 IL34 转基因表达载体(图 1)。

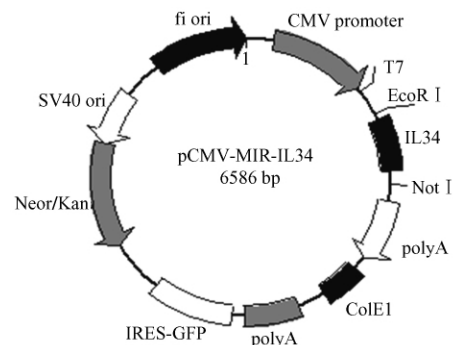


图 1 IL34 转基因表达载体

Fig. 1 IL34 transgenic construct

用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,转入到假孕受体 ICR 小鼠中,小鼠出生后 9 d 提取基因组 DNA,用 PCR 扩增 IL34 目的基因 386 bp 的片段来鉴定 IL34 转基因小鼠(图 2),共得到 5 只首建鼠,均可传代,留下两个表型明显的保种。

### 2.2 Western blotting 检测 IL34 基因在蛋白水平的表达

分别提取出生 1 月龄的转基因小鼠和同窝阴性

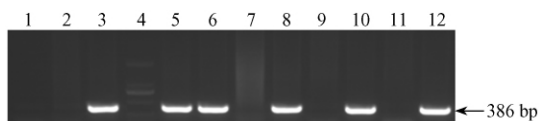


图 2 PCR 鉴定 IL34 转基因动物的凝胶电泳分析

1、空白对照;2、阴性对照;3、阳性对照;  
4、DNA 分子量标记 DL2000;5、6、8、10、12  
F1 代转基因小鼠;7、9、11 F1 代阴性小鼠

**Fig. 2** Genotyping of the transgenic mice with PCR  
Lane 1 was blank control; Lane 2 was negative control;  
Lane 3 was positive control; Lane 4 was DNA molecular  
weight marker(DL2000); Lane 5, 6, 8, 10 and 12 were  
the positive transgenic mice; Lane 7, 9 and 11 were  
negative controls

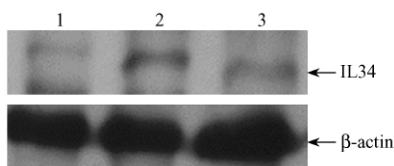


图 3 人 IL34 蛋白在 IL34 转基因小鼠脾组织中的表达  
1 号野生型小鼠;2、3 号阳性小鼠;用  $\beta$ -actin 作为内对照

**Fig. 3** The column figure of different lesions in different  
age groups Expression of human IL34 in the transgenic  
spleen The Lane 1 was the wild type spleen. The lane  
2 and 3 were samples from the transgenic spleen of  
founder 13 and founder 24. The same NC membrane  
was normalized with  $\beta$ -actin

小鼠的脾组织总蛋白,用人 IL34 单克隆抗体进行  
Western blotting 分析,结果显示有 2 个 Founder 的  
F1 代有人 IL34 高表达,分别为 13 和 24 首建鼠。  
IL34 蛋白分子量大小为  $27 \times 10^3$ 。

### 2.3 病理学检测

将 2 月龄 IL34 转基因小鼠和同窝阴性小鼠的  
重要器官进行病理解剖,HE 染色高倍镜下可观察到  
IL34 转基因小鼠的脾脏中白髓比较活跃,白髓范  
围比对照鼠大(彩插 4 图 4),其他组织没有明显  
变化。

### 3 讨论

白介素最早发现其主要作用是激活和调节免  
疫细胞,参与免疫调节过程。但随着研究的不断深  
入,发现白介素还广泛地参与调节机体的生理病理  
过程。白介素的重要作用越来越受到研究者的  
关注,迄今为止人们发现并命名了 37 种白介素细胞  
因子<sup>[4]</sup>。IL34 是 2008 年 Haishan Lin 等<sup>[1]</sup>发现的又

一白介素家族成员,它可以与 CD14<sup>+</sup> 单核细胞特  
异性结合,促进单核细胞的增殖和分化。通过功能筛  
选还证明了 IL34 是 CSF1R 的配体,和 CSF1R 另  
一个配体巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage-colony  
stimulating factor, M-CSF1) 的功能相似,IL34 也能刺  
激骨髓中单核母细胞向巨噬细胞分化<sup>[5]</sup>。M-CSF  
在炎症反应的细胞因子调节网络中起着非常重要  
的作用,在各种炎性和自身免疫性疾病如风湿性关  
节炎<sup>[6]</sup>、肾炎<sup>[7,8]</sup>、肺炎<sup>[9]</sup>、动脉粥样硬化<sup>[10]</sup>、骨巨  
细胞瘤<sup>[11]</sup> 等重大疾病中都起到了重要的作用。  
IL34 是近两年才发现的细胞因子,生物活性与 M-  
CSF 相似<sup>[12]</sup>,但促巨噬细胞分化的能力低于 M-  
CSF,且其功能以及对各种疾病的调节作用还未明  
确。最近两年对 IL34 的研究都是集中在体外研究  
或者使用重组 IL34 进行体内研究<sup>[13]</sup>,而且其使用  
量远远超过了机体内的生理浓度,维持时间短等特  
点,因此我们建立了 IL34 转基因小鼠,为研究内源  
性 IL34 对机体的作用提供了很好的模型。

在本研究中,首建鼠 F13 和 F24 的后代小鼠,  
PCR 结果显示了外源基因能稳定地按孟德尔规则  
传递到后代。Western blot 结果显示 IL34 基因的表  
达量在 F13 和 F24 转基因小鼠的脾组织中与野生型  
小鼠的相比显著增高,表明成功建立了 IL34 转基因  
小鼠。通过病理学检测发现,IL34 转基因小鼠的脾  
脏的白髓区域比较活跃,白髓范围比野生型小鼠  
的大。说明免疫细胞增生活跃,提示 IL34 对免疫系统  
有一定的作用,但其机制尚未清楚。因此,IL34 小  
鼠的建立,为进一步对内源性 IL34 的生物学功能及  
对机体免疫系统的调节作用机制提供很好的实验  
依据。

### 参考文献:

- [1] Lin H, Lee E, Hestir K, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome[J]. Science 2008, 320: 807-811.
- [2] Gordan J, Ruddle F. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei[J]. Science, 1981, 214(4526): 1244-1246.
- [3] Chishti M, Yang D, Janus C, et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein695 [J]. J BiolChem, 2001, 276(24): 21562-21570.
- [4] Nold M, Nold-Petry C, Zepp J, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity[J]. Nat Immunol. 2010, 11(11): 1014-22.

(上转第 59 页)

## 参考文献:

- [ 1 ] Lu X , Nguyen TA , Moon SH , et al. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways[J]. *Cancer Metastasis Rev* 2008 , 27 ( 2 ):123 - 135.
- [ 2 ] Choi J , Nannenga B , Demidov ON , et al. Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene ( Wip1 ) exhibit defects in reproductive organs , immune function , and cell cycle control [J]. *Mol Cell Biol* 2002 , 22(4) :1094 - 1105.
- [ 3 ] Yu E , Ahn YS , Jang SJ , et al. Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers[J]. *Breast Cancer Res Treat* 2007 , 101(3) :269 - 278.
- [ 4 ] Harrison M , Li J , Degenhardt Y , et al. Wip1-deficient mice are resistant to common cancer genes[J]. *Trends Mol Med* 2004 , 10 ( 8 ):359 - 361.
- [ 5 ] Demidov ON , Timofeev O , Lwin HN , et al. Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine [J]. *Cell Stem Cell* 2007 , 1 ( 2 ):180 - 190.
- [ 6 ] Schito ML , Demidov ON , Saito S , et al. Wip1 phosphatase-deficient mice exhibit defective T cell maturation due to sustained p53 activation [J]. *J Immunol* 2006 , 176(8) :4818 - 4825.
- [ 7 ] Zhu YH , Zhang CW , Lu L , et al. Wip1 regulates the generation of new neural cells in the adult olfactory bulb through p53-dependent cell cycle control[J]. *Stem Cells* 2009 , 27(6) :1433 - 1442.
- [ 8 ] Le Guezennec X , Bulavin DV , et al. WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging[J]. *Trends Biochem Sci* 2010 , 35 ( 2 ):109 - 114.
- [ 9 ] Cha H , Lowe JM , Li H , et al. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response [J]. *Cancer Res* 2010 , 70(10) :4112 - 4122.
- [ 10 ] Moon SH , Nguyen TA , Darlington Y , et al. Dephosphorylation of gammaH2AX by WIP1: An important homeostatic regulatory event in DNA repair and cell cycle control[J]. *Cell Cycle* 2010 , 9(11) .
- [ 11 ] Ju Z , Jiang H , Jaworski M , et al. Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment[J]. *Nat Med* 2007 , 13(6) :742 - 747.

(修回日期)2011-02-14

## (下接第 66 页)

- [ 5 ] Marc Baud H , Romain R , C'eline C et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis[J]. *J Pathol* 2010 , 221: 77 - 86
- [ 6 ] Bischof R , Zafiroopoulos D , Hamilton J , et al. Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage ( GM )-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation [J]. *Clin. Exp. Immunol.* 2000 , 119: 361 - 367.
- [ 7 ] Lenda D , Kikawada E , Stanley E , et al. Reduced macrophage recruitment , proliferation , and activation in colony-stimulating factor-1-deficient mice results in decreased tubular apoptosis during renal inflammation[J]. *J Immunol.* 2003 , 170: 3254 - 3262 .
- [ 8 ] Le Meur , Y. et al. Macrophage accumulation at a site of renal inflammation is dependent on the M-CSF/c-Fms pathway[J]. *J. Leukocyte Biol.* 2002 , 72: 530 - 537 .
- [ 9 ] Baran C. et al. Important roles for macrophage colony-stimulating factor , CC chemokine ligand 2 , and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis[J]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007 , 176: 78 - 89.
- [ 10 ] Isabelle B , Seraya M , Hervé D , et al. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implication in atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis.* 2011 , 214(2) : 316 - 24.
- [ 11 ] Niida S , Kaku M , Amano H , et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption[J]. *J Exp Med* 1999 ; 190: 293 - 298.
- [ 12 ] Suwen W , Sayan N , Violeta C , et al. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells[J]. *J Leukoc Biol.* 2010 , 88(3) : 495 - 505.
- [ 13 ] Eda H , Zhang J , Keith RH , et al. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood[J]. *Cytokine.* 2010 , 52(3) : 215 - 20.

(修回日期)2011-02-28

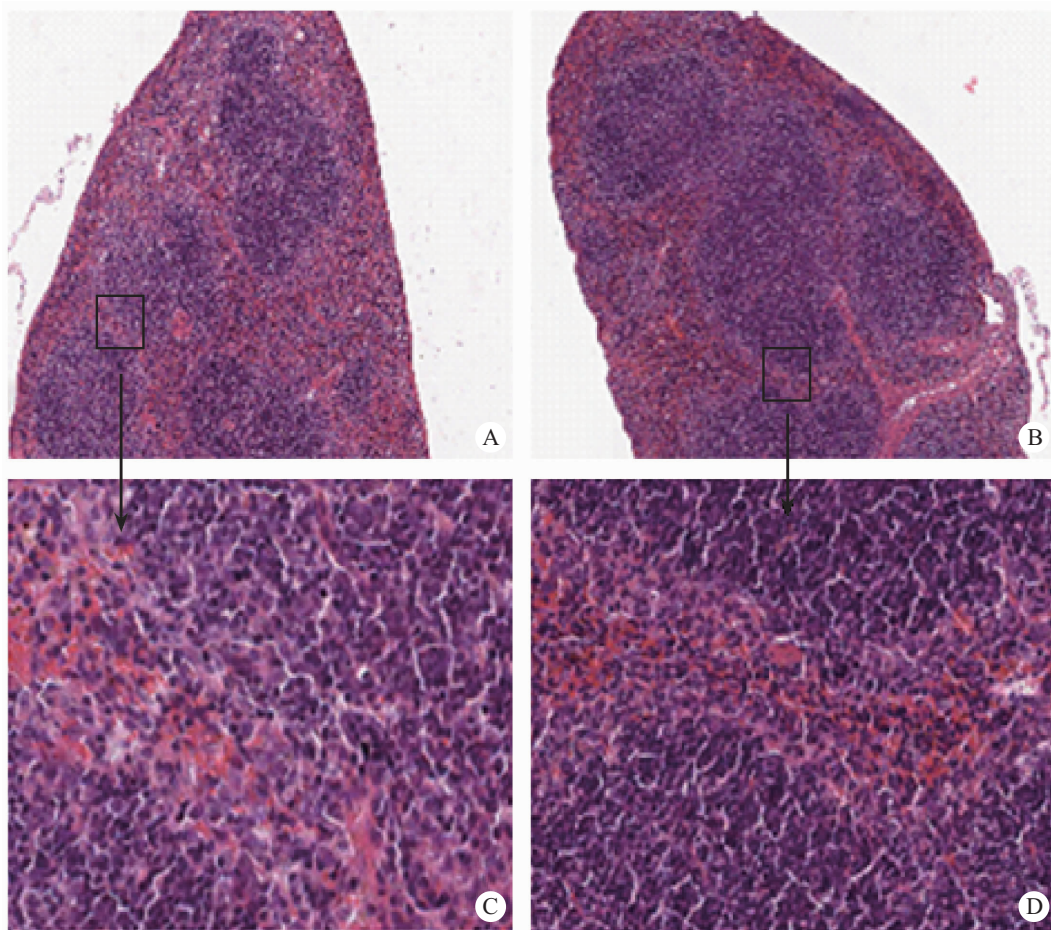


图 4 IL34 转基因小鼠的组织学分析

Fig. 4 Histology analysis of IL34 transgenic mice

A. 野生型小鼠脾组织的 HE 染色

B. 野生型小鼠脾组织的 HE 染色

C. 转基因阳性小鼠脾组织的 HE 染色

D. 转基因阳性小鼠脾组织的 HE 染色

A. The spleen from the wild type mouse

B. The spleen from the wild type mouse

C. The spleen from the transgenic mouse

D. The spleen from the transgenic mouse