

Csf1r^{Cre} 介导的黄色荧光素蛋白可有效标记 各组织定居巨噬细胞

李晓宇¹, 赵殿元^{2,3}, 张胜权¹, 杨靖^{1,2,3}, 唐丽^{1,2,3}¹ 安徽医科大学基础医学院生化教研室, 合肥 230032;² 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所, 北京 102206;³ 蛋白质组学国家重点实验室, 北京蛋白质组研究中心, 国家蛋白质科学中心, 北京 102206)

摘要 目的 构建 *Csf1r*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 报告基因小鼠, 检测 *Csf1r*^{Cre} 介导黄色荧光素蛋白(YFP) 标记单核细胞及不同组织定居巨噬细胞的效率。方法 *Rosa26*^{YFP} 突变小鼠具有一个 loxP 侧翼的 STOP 序列, 后跟插入 *Rosa26* 基因座的黄色荧光蛋白基因(YFP)。当与表达 *Csf1r*^{Cre} 重组酶的小鼠交配时, STOP 序列被删除, 并在双突变后代 *Csf1r*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 的表达组织中观察到 YFP 表达。将 *Csf1r*^{Cre} 小鼠与 *Rosa26*^{YFP} 小鼠交配, 通过 PCR 筛选出 *Csf1r*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 报告基因小鼠。分离成年 *Csf1r*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 小鼠的血液及骨髓单核细胞、肝脏巨噬细胞、肾脏巨噬细胞、肺泡巨噬细胞和脾脏巨噬细胞, 标记流式抗体, 通过流式细胞术分析 *Csf1r*^{Cre} 介导 YFP 标记组织巨噬细胞的效率。结果 *Csf1r*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 报告基因小鼠中肾脏、肝脏、脾脏、肺泡巨噬细胞表达 YFP 中位数为 93.25%、92.45%、91.10%、94.70%, 血液单核细胞表达 YFP 中位数为 98.20%, 骨髓单核细胞表达 YFP 中位数为 93.90%。结论 *Csf1r*^{Cre} 可以介导 YFP 对各组织定居巨噬细胞以及骨髓和血液单核细胞进行示踪。同时, *Csf1r*^{Cre} 可用作这些细胞的基因条件性敲除工具鼠。

关键词 *Csf1r*^{Cre} 重组酶; 报告基因小鼠; 流式细胞术; 组织定居巨噬细胞; 单核细胞; 细胞标记效率

中图分类号 R 392-33; R 329.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1567-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.001

几乎所有的组织器官中都存在巨噬细胞, 这些巨噬细胞被统称为组织定居巨噬细胞(tissue-resident macrophage, TRM)。TRM 不仅具有吞噬清除体内废物的作用, 还能产生生长因子与信号分子, 促进宿主对入侵微生物的处理, 同时对器官发育和体内平衡至关重要^[1]。同时, TRM 参与调控血管形成、脂肪生成、代谢及神经功能等生理过程^[1], 在多种病理生理条件下的正常免疫反应中不可或缺^[2]。TRM 主要源于造血干细胞和卵黄囊巨噬细胞, 胚胎发育时其前体抵达组织器官, 随器官发育分化为成熟 TRM^[3-4]。TRM 在发育和功能等方面仍需探究。基因敲除小鼠模型是研究 TRM 的发育机制与免疫功能的关键技术手段, *Rosa26*^{YFP} 突变小鼠含 loxP 侧翼的 STOP 序列及插入 *Rosa26* 基因座的黄色

荧光蛋白基因(YFP), 与表达 Cre 重组酶的小鼠交配后可删除 STOP 序列并表达 YFP。而 *Csf1r*^{Cre} 小鼠可用于单核及巨噬细胞的标记^[5]。因此, 该研究旨在通过构建 *Csf1r*^{Cre} *Rosa26*^{YFP} 双突变小鼠, 通过 YFP 表达显示 TRM 中 *Csf1r*^{Cre} 的表达以及 TRM 被 YFP 标记的诱导效率, 为进一步研究 TRM 的发育和功能提供理想的小鼠模型。

1 材料与方法

1.1 小鼠 *Rosa26*^{YFP} 和 *Csf1r*^{Cre} 转基因小鼠(均来自美国 Jackson 实验室), 2 只雌性 *Rosa26*^{YFP} 小鼠和 1 只雄性 *Csf1r*^{Cre} 小鼠用于繁殖, 雌性小鼠体质量分别为 19.2 g 和 18.6 g, 雄性小鼠体质量为 23.8 g, 均为 C57BL/6J 小鼠, SPF 级。该繁殖笼小鼠生出 12 只小鼠, 其中有 5 只雌性小鼠, 7 只雄性小鼠。全体小鼠均饲养于军事医学研究院生命组学研究所 SPF 级动物房。动物伦理批号为: IACUC-20220209-08MOL。

1.2 仪器与试剂 LSRFortessa SORP 流式细胞仪(型号: BD LSRFortessa SORP, 美国 BD 公司); Ap-

2025-06-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 32270941)

作者简介: 李晓宇, 女, 硕士研究生;

唐丽, 女, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: tangli731@163.com;

杨靖, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: yangjing@ncpsb.org.cn

plied Biosystems ProFlex PCR 热循环 PCR 仪(型号: ProFlex 96-Well PCR System, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 全自动数码凝胶成像仪(型号: Chemi-Doc™ Touch, 美国 Bio-Rad 公司)。PCR 引物(北京华大基因科技有限公司), 序列见表 1。2 × Es Taq Master-Mix(Dye) (北京康为世纪公司); Mouse Tail Direct PCR Kit(山东思科捷公司); Collagenase IV (美国 Sigma-aldrich 公司)、DNase I (美国 Sigma-aldrich 公司)、Optiprep™ (德国 Serumwerk Bernburg AG 公司)、RPMI-1640(北京中生奥邦公司)、1 × 红细胞裂解液(北京翱擎公司)。所用流式抗体信息如下: CD45-AF700(克隆号: 30-F1, 货号: 109822)、SiglecF-BV421(克隆号: E50-2440, 货号: 562681) 和 CD115-BV605(克隆号: CSF-1R, 货号: 135517) 购自美国 BD Bioscience 公司; Ly6C-BV421(克隆号: HK1.4, 货号: 48-5932-82)、F4/80-PE(克隆号: BM8, 货号: 12-4801-80)、Ly6C-pecy7(克隆号: HK1.4, 货号: 25-5932-80)、Ly6G-pecy7(克隆号: 1A8, 货号: 25-9668-82)、CD11c-PE(克隆号: M418, 货号: 12-0114-83) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; CD11b-APC(克隆号: M1/70, 货号: 101211)、CD64-BV421(克隆号: X54-5/7.1, 货号: 139309) 和 F4/80-BV711(克隆号: BM8, 货号: 123147) 购自美国 BioLegend 公司。

表 1 *Csf1r^{Cre}* 和 *Rosa26^{YFP}* 基因的鉴定引物序列

Tab.1 Identification primer sequences for *Csf1r^{Cre}* and *Rosa26^{YFP}* genes

Primer	Primer sequence (5'-3')
<i>Csf1r^{Cre}-1</i>	GCTGTTTCTGGCTTCTCCC
<i>Csf1r^{Cre}-2</i>	GACCCCTCATGTTCTGAAGTGTCT
<i>Csf1r^{Cre}-3</i>	GCAAAGGCTCGCTACAGACCT
<i>Rosa26^{YFP}-1</i>	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
<i>Rosa26^{YFP}-2</i>	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
<i>Rosa26^{YFP}-3</i>	GGAGCGGGAGAAATGGATATG

1.3 方法

1.3.1 小鼠繁育与基因型鉴定 2 只雌性 *Rosa26^{YFP}* 小鼠与 1 只雄性 *Csf1r^{Cre}* 小鼠杂交, 在子代出生 7~14 d 后按顺序取脚趾依次放入 EP 管中并编号; 用 Mouse Tail Direct PCR Kit 试剂盒裂解提取 DNA: 按照样本数配置相应量的 1 × 裂解液(单样本配方: 4 μL Proteinase K, 200 μL 1 × Mouse Tail Lysis Buffer), 混匀后使用, EP 管中分别加入 200 μL 1 × 裂解液, 振荡后 55 °C 水浴孵育 20 min, 95 °C 加热 5 min 灭活 Proteinase K, 注意小鼠脚趾要被裂解液全

部浸泡。涡旋振荡充分混匀裂解产物后, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液进行 PCR 反应; 配置 PCR 反应体系 12 μL: 2 × mix 6 μL, DNA 模板 2 μL, 引物(上游 + 下游) 1.5 μL, H₂O 2.5 μL; PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 50 s, 35 个循环; 72 °C 2 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用数字凝胶成像仪观察和记录。

1.3.2 *Csf1r^{Cre}* ROSA26^{YFP} 小鼠及 *Csf1r^{Cre}* 或 *ROSA26^{YFP}* 小鼠肝脏单细胞悬液的获取 每只小鼠腹腔注射 1.2% 的三溴乙醇 500 μL 麻醉小鼠, 75% 乙醇给表皮消毒, 将小鼠固定于解剖盘上, 打开腹腔, 将内脏拨开, 暴露小鼠肝门静脉, 留置针穿刺, 先用含有 0.25 mmol EGTA、5 mmol D-glucose、0.665 mmol 肝素钠的 I 灌液(灌注母液: 0.147 μmol NaCl、753.733 μmol NaH₂PO₄ · 7H₂O、438.226 μmol NaH₂PO₄ · 2H₂O、5.3 mmol KCl、9.1 mmol HEPES、4.2 mmol NaHCO₃, pH = 7.3), 以 3 440 μL/min 的流速灌注 3~5 min, 冲洗干净肝脏内的血液, 之后用含有 0.05% 的胶原酶 IV, 0.002% 的 DNase I 的 II 灌液以 2 550 μL/min 的流速灌注 3~5 min, 原位消化至肝脏呈破抹布状, 用手术剪剪下全肝, 放入加有 RPMI-1640 培养基的 100 mm 培养皿中, 眼科镊撕碎, 70 μm 细胞筛网过滤, 制成单细胞悬液。4 °C、483 r/min 离心 5 min 去除沉淀的肝实质细胞, 1 526 r/min、4 °C 离心 5 min 取沉淀细胞, 用 2.25 mL 的 RPMI-1640 培养基将沉淀细胞重悬起来。按照样本数配置所需的 optiprep 和 RPMI-1640 培养基的混合液, 两者比例为 2 : 1, 每个样本按照 3 mL 配置, 混匀后, 每个 15 mL 离心管内加入 2.75 mL 的混合液, 与重悬起来的单细胞悬液混合均匀, 用 RPMI-1640 培养基定容至 5 mL, 在其上层小心轻轻地加 3 mL RPMI-1640 培养基, 注意要使 RPMI-1640 培养基和细胞混合液有明显分层, 4 °C、2 264 r/min 离心 25 min, 升降速为 0, 吸取中间层细胞到新的 15 mL 离心管中, 加 RPMI-1640 培养基至 10~15 mL 清洗细胞, 4 °C、1 526 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞后用 1 mL 红细胞裂解液重悬细胞, 3 min 后加入 2 mL PBE 终止, 4 °C、1 526 r/min 离心 5 min, 适量 PBE 重悬细胞。

1.3.3 小鼠肾脏、肺脏和脾脏单细胞悬液的获取 取肾脏和肺脏, 放入加有灌注液 II 的 2 mL 离心管中, 用手术剪剪碎, 在 37 °C 的摇床内体外消化 45 min, 利用 70 μm 细胞筛网过滤, 制成单细胞悬液。将脾脏取出, 放入加有 RPMI-1640 培养基的培养皿

中,眼科镊将其撕碎后,利用 70 μm 细胞筛网过滤,制成单细胞悬液。将所得的肾脏单细胞悬液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、483 r/min 离心 5 min 去除沉淀的肾脏实质细胞,上清液与脾脏和肺脏单细胞悬液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 526 r/min 离心 5 min,沉淀细胞后用 1 mL 红细胞裂解液重悬细胞,在 3 min 后用 2 mL PBE 终止红裂,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 526 r/min 离心 5 min,加入适量 PBE 重悬细胞。

1.3.4 小鼠血液及骨髓单细胞悬液的获取 将小鼠用 CO_2 安乐死后,用 75% 乙醇给表皮消毒,将小鼠固定于解剖盘上,打开胸腔,将注射器针头扎至右心房,抽取小鼠心脏血,加入到含有 1.5 mg/mL 的 PBS 中,混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 526 r/min 离心 5 min,沉淀细胞后用 1 mL 红细胞裂解液重悬细胞,在室温孵育 3 min 后加入 2 mL PBE 终止裂解,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 526 r/min 离心 5 min,用适量 PBE 重悬细胞。分离出小鼠的胫骨和股骨,放入含有 75% 乙醇的细胞培养皿中。剔除胫骨和股骨周围其余组织,然后将胫骨和股骨放入含有 PBS 的细胞培养皿中清洗 2~3 次,随后放入含有 RPMI-1640 培养基的细胞培养皿中。用眼科剪剪开胫骨和股骨的骨两端,然后用 1 mL 注射器吸取完全培养基,将培养基从骨头的一端冲洗骨髓细胞到 50 mL 无菌离心管中,重复多次至骨头发白。70 μm 细胞筛网过滤得到单细胞悬液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 526 r/min 离心 5 min,沉淀细胞用 1 mL 红细胞裂解液重悬,3 min 后用 2 mL PBE 终止红裂,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 526 r/min 离心 5 min 取沉淀细胞,加入适量 PBE 重悬细胞。

1.3.5 流式抗体标记并利用流式细胞术检测不同 TRM 及单核细胞 取各组织单细胞悬液 100 μL ,加入 1 μL Fc Block,封闭 10 min。不同 TRM 以及单核细胞流式抗体的标记策略如下:肝脏巨噬细胞 CD45-AF700、Ly6C- $\text{pecy}7$ 、F4/80-BV711、CD64-BV421;脾脏巨噬细胞和肾脏巨噬细胞 CD45-AF700、Ly6C-BV421、CD11b- $\text{pecy}7$ 、F4/80-PE;肺泡巨噬细胞 CD11c-PE、CD45-AF700、SiglecF-BV421;血液及骨髓单核细胞 Ly6G- $\text{pecy}7$ 、CD11b-APC、CD115-BV605、Ly6C-BV421。配制抗体时,将全部样本所需的抗体配在一起,混匀后均分到每个样本中混匀,冰上避光孵育 20 min。若标记策略中需同时使用 2 种或更多 BV 通道的抗体时,每个样本用 10 μL 的 Brilliant Stain Buffer Plus 作为抗体稀释液,而当标记策略中的处于 BV 通道的荧光抗体少于 2 个时,将抗体配制于 20 μL 的 PBS 中。避光标记 20 min 后,PBE 洗涤 2 次,PBE 重悬细胞,在上机检测

前 10 min 加入 10 μL 的 7AAD。流式细胞检测 YFP 标记 TRM 和单核细胞的效率。

1.3.6 统计学处理 GraphPad Prism 软件进行统计学分析,以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,不满足正态分布的小样本量两样本均数的比较采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组与对照组小鼠的基因型鉴定结果 *Rosa26R^{YFP}* 小鼠与 *Csf1r^{Cre}* 小鼠杂交子代小鼠共有 12 只,在小鼠 7~14 d 时剪下脚趾,用试剂盒提取基因组 DNA,通过 PCR 扩增特定条带,琼脂糖凝胶电泳进行基因分型。已知 YFP 野生型 PCR 条带为 600 bp (YFP⁻),表达 YFP 的 PCR 条带为 320 bp (YFP⁺),*Csf1r^{Cre}* PCR 条带为 470 bp (Cre⁺),野生型 PCR 条带为 340 bp。用 *Csf1r^{Cre}* 引物进行 PCR,当只有位于 340 bp 的条带时,小鼠基因型为 wt,当有 340 bp 和 470 bp 的两个条带时,小鼠基因型为 *Csf1r^{Cre}*。用 *Rosa26R^{YFP}* 引物进行 PCR,当只有位于 600 bp 的条带时,小鼠基因型为 wt,当有 600 bp 和 320 bp 的两个条带时,小鼠基因型为 *Rosa26R^{YFP}*。*Csf1r^{Cre}* 及 *Rosa26R^{YFP}* 基因型鉴定结果见图 1A 和图 1B。根据琼脂糖凝胶电泳结果,编号为 2、3、6、10 的小鼠基因型为 *Csf1r^{Cre} Rosa26R^{YFP}*,将这些小鼠设置为实验组,而编号为 1、5、8 的小鼠基因型为 *Rosa26R^{YFP}*,编号为 4、7、12 的小鼠基因型为 *Csf1r^{Cre}*,将编号为 1、4、5、7、8、12 这些小鼠设置为对照组。编号为 9 和 11 的小鼠

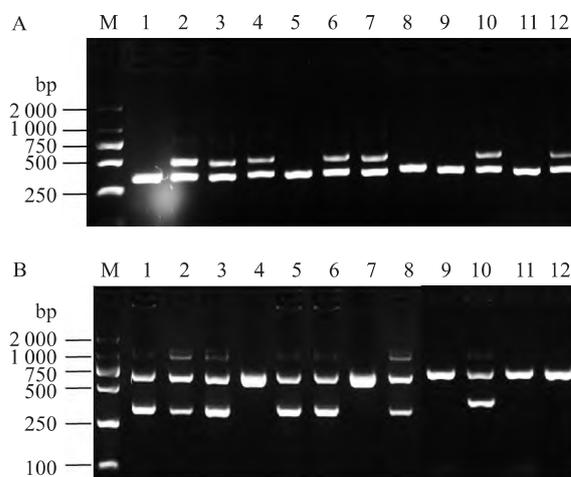


图1 *Csf1r^{Cre}* 小鼠与 *Rosa26^{YFP}* 小鼠交配的子代小鼠 *Csf1r^{Cre}* 基因 (A) 及 *Rosa26^{YFP}* 基因 (B) PCR 琼脂糖凝胶结果
Fig. 1 *Csf1r^{Cre}* gene (A) and *Rosa26^{YFP}* gene (B) PCR agarose gel results of the progeny mice of *Csf1r^{Cre}* mice mated with *Rosa26^{YFP}* mice

M: Marker; 1-12: Serial number of the experimental mouse.

基因型为纯野生型 wt, 弃去纯野生型小鼠。

2.2 肝脏、肾脏、脾脏、肺泡巨噬细胞和骨髓及血液单核细胞流式分析圈门策略 流式细胞分析仪检测所得的各组织定居巨噬细胞以及血液和骨髓单核细胞表达 YFP 的情况。第 1 步先根据 FSC-A 和 SSC-A 来圈出细胞群; 第 2 步, 根据 7AAD, 圈出 7AAD⁻ 的活细胞群, 去除 7AAD⁺ 的死细胞; 第 3 步根据 SSC-A 和 SSC-H 去除细胞粘连, 圈出单细胞。随后根据不同组织巨噬细胞及单核细胞特异性表达蛋

白, 圈出目的细胞群。圈出实验组小鼠 *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 与对照组 *Csf1r^{Cre}* 小鼠和 *Rosa26^{YFP}* 小鼠中各组织巨噬细胞及骨髓和血液单核细胞中 YFP 阳性细胞的比例, 并对其进行统计分析。具体圈门策略如下: 肝脏巨噬细胞为 CD45⁺ Ly6C⁻ F4/80⁺ CD64⁺ (图 2A); 脾脏及肾脏巨噬细胞为 CD45⁺ Ly6C⁻ CD11b^{low} F4/80⁺ (图 2B、2C); 肺泡巨噬细胞为 CD45⁺ CD11c⁺ SiglecF⁺ (图 2D); 骨髓及单核细胞为 Ly6C⁻ CD11b⁺ Ly6C⁺ CD115⁺ (图 2E、2F)。

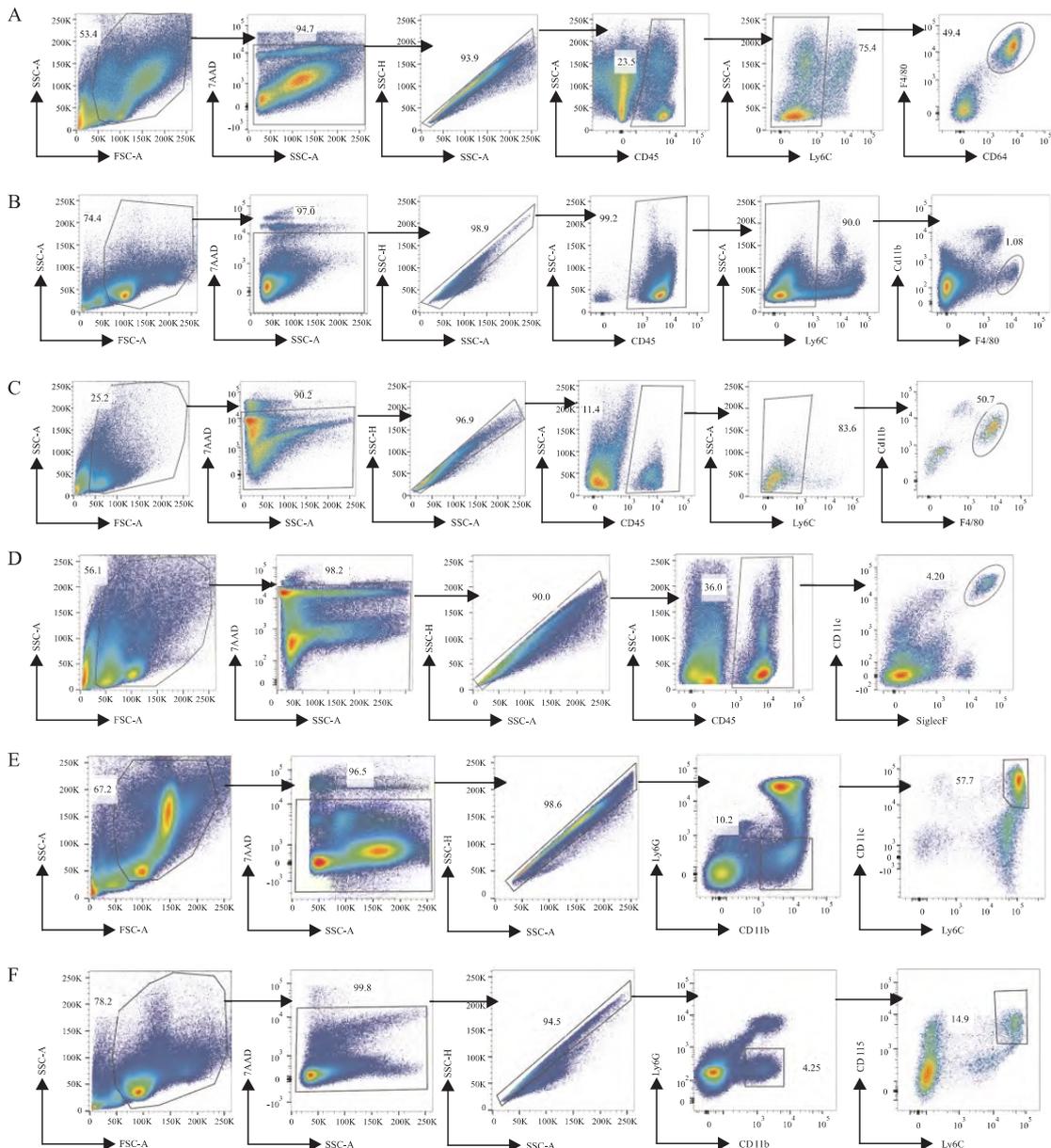


图 2 肝脏巨噬细胞、脾脏巨噬细胞、肾脏巨噬细胞、肺泡巨噬细胞、骨髓单核细胞及血液单核细胞流式分析圈门策略
Fig. 2 Gating strategies of flow cytometry for kupffer cells, spleen-resident macrophages, kidney-resident macrophages, alveolar macrophages, bone marrow monocytes and blood monocytes

A: Kupffer cells; B: Spleen-resident macrophages; C: Kidney-resident macrophages; D: Alveolar macrophages; E: Bone marrow monocytes; F: Blood monocytes.

2.3 YFP 标记肝脏、肾脏、脾脏、肺泡巨噬细胞和骨髓及血液单核细胞群的效率 各组结果的数据不满足正态分布,且样本量较小,进行独立样本 Mann Whitney *U* 检验。结果显示,对照组小鼠的肾脏、肝脏、脾脏、肺泡巨噬细胞及骨髓和血液单核细胞基本不表达 YFP,但在实验组 *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠中,肝脏巨噬细胞(kupffer cells, KCs) (图 3A)、脾脏巨

噬细胞(图 3B)、肾脏巨噬细胞(图 3C)和肺泡巨噬细胞(图 3D)中 YFP 的表达较高,分别为 92.45% (85.75%, 94.65%)、91.10% (88.95%, 94.50%)、93.25% (89.40%, 94.45%) 和 94.70% (92.80%, 95.45%) (对照组 *n* = 6, 实验组 *n* = 4, *Z* = -2.882, -2.882, -2.882, 均 *P* = 0.004)。在骨髓单核细胞(图 3E)与血液单核细胞(图 3F)中,实验

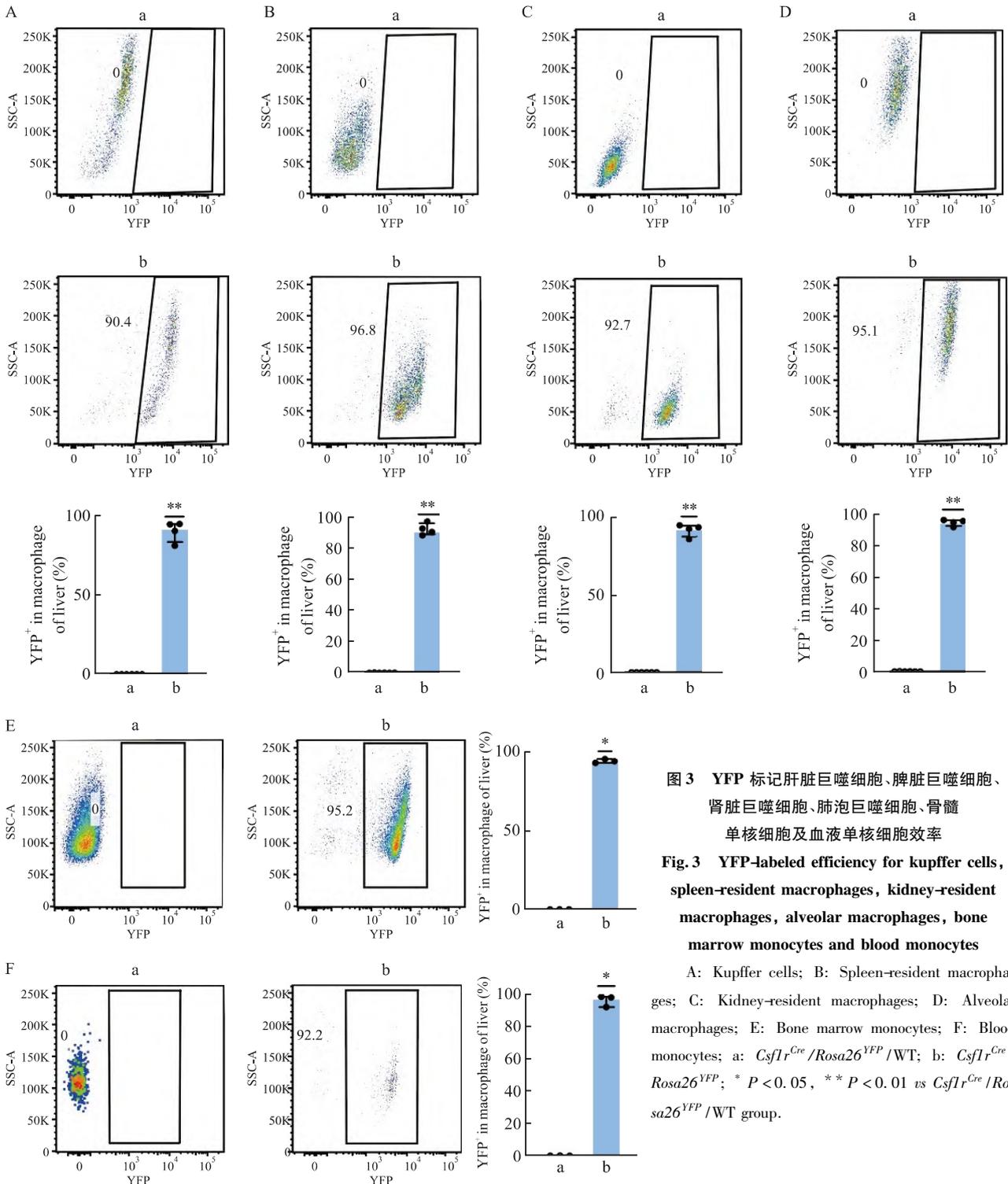


图 3 YFP 标记肝脏巨噬细胞、脾脏巨噬细胞、肾脏巨噬细胞、肺泡巨噬细胞、骨髓单核细胞及血液单核细胞效率
Fig.3 YFP-labeled efficiency for kupffer cells, spleen-resident macrophages, kidney-resident macrophages, alveolar macrophages, bone marrow monocytes and blood monocytes

A: Kupffer cells; B: Spleen-resident macrophages; C: Kidney-resident macrophages; D: Alveolar macrophages; E: Bone marrow monocytes; F: Blood monocytes; a: *Csf1r^{Cre} / Rosa26^{YFP} / WT*; b: *Csf1r^{Cre} / Rosa26^{YFP}*; * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs *Csf1r^{Cre} / Rosa26^{YFP} / WT* group.

组小鼠表达 YFP 分别为 93.90% (92.80%, 95.20%) 和 98.20% (92.20%, 98.60%) (对照组 $n = 3$, 实验组 $n = 3$, $Z = -2.087$ 、 -2.087 , 均 $P = 0.037$)。上述结果表明,利用 *Csf1r^{Cre}* 介导的 YFP 对肝脏、脾脏、肾脏、肺脏巨噬细胞和血液及骨髓单核细胞标记效率高。

3 讨论

TRM 是免疫细胞的异质性群体,可实现组织特异性和生态位特异性功能。TRM 可发挥专门的稳态功能,如可清除和回收哺乳动物组织中发生凋亡的细胞,可以预防组织损伤后的慢性炎症和自身免疫性疾病^[6]。Davies et al^[7] 的研究强调了造血细胞与自我更新胚胎来源群体的组织巨噬细胞起源的显著异质性。巨噬细胞是每个器官不可或缺的一部分^[8],如肝脏内的 Kupffer 细胞、脾脏巨噬细胞、肾脏巨噬细胞以及肺泡巨噬细胞。TRM 被赋予了一些组织特异的生理功能。TRM 整合来自各种环境传感器的信号,协调对特殊组织细胞的生长、重塑和稳态至关重要的适应性细胞反应^[9]。报告基因小鼠模型成为进一步研究 TRM 的调控机制的强有力的工具。

Cre/loxP 重组系统的转化研究侧重于通过修饰 Cre/DNA 相互作用来增强其特异性^[10]。该系统可以使特定的细胞类型或组织器官中的基因被特异性敲除,已普遍用于研究调控细胞发育与功能的机制。*Csf1r^{Cre}* 小鼠可用于单核及巨噬细胞的标记^[5]。本研究通过将 *Csf1r^{Cre}* 小鼠与 *Rosa26^{YFP}* 小鼠交配,成功构建了 *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 报告基因小鼠模型。实验结果表明,该模型在标记单核细胞及多种 TRM(如肝脏 Kupffer 细胞、脾脏巨噬细胞、肾脏巨噬细胞、肺泡巨噬细胞以及血液和骨髓单核细胞)中表现出高效且稳定的 YFP 表达,标记效率高达 90% 以上。这一结果证实了 *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠作为研究 TRM 发育、稳态维持及功能的强大工具的有效性。

与现有的其他巨噬细胞标记工具鼠(如 *Cx3cr1-Cre*、*LysM-Cre*、*CD11b-Cre* 和 *Vav1-Cre*) 相比, *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠在标记效率和特异性方面具有显著优势。例如, *Cx3cr1-Cre* 在肺泡巨噬细胞和脾脏巨噬细胞中的标记效率较低^[11-12],且存在年龄依赖性^[13]; *LysM-Cre* 的敲除效率不稳定^[14]; *CD11b-Cre* 的特异性较低,可同时标记多种免疫细胞^[12];而 *Vav1-Cre* 的敲除范围过于广泛,缺乏组织特异性^[15]。相比之下, *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠能够高效地

标记单核细胞和 TRM,为研究 TRM 在组织稳态和免疫反应中的作用提供了更可靠的模型。

集落刺激因子-1 受体(colony stimulating factor 1 receptor, CSF-1R) 作为 TRM 发育和维持的关键调节因子^[16-17],在巨噬细胞的功能调控中发挥核心作用。Bencheikh et al^[18] 的研究证明了 CSF-1R 在调节人单核细胞分化过程中基因表达的生理和动态作用。本研究进一步验证了 CSF-1R 信号在 TRM 稳态维持中的重要性,并揭示了 *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 小鼠在研究 CSF-1R 调控机制中的潜力。未来研究可利用该模型深入探讨 CSF-1R 信号在 TRM 发育、分化及功能调控中的具体机制,以及其在病理条件下的动态变化。

总之, *Csf1r^{Cre} Rosa26^{YFP}* 报告基因小鼠的成功构建为 TRM 的研究提供了强有力的工具。该模型不仅能够高效标记 TRM 和单核细胞,还为未来揭示巨噬细胞在组织稳态、免疫监视及疾病发生发展中的作用机制奠定了重要基础。未来研究可进一步优化该模型,并探索其在巨噬细胞相关疾病治疗中的潜在应用价值。

参考文献

- [1] Mass E, Nimmerjahn F, Kierdorf K, et al. Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(9): 563-79. doi: 10.1038/s41577-023-00848-y.
- [2] Pidwill G R, Gibson J F, Cole J, et al. The role of macrophages in *Staphylococcus aureus* infection [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 620339. doi: 10.3389/fimmu.2020.620339.
- [3] Mass E, Ballesteros I, Farlik M, et al. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis [J]. *Science*, 2016, 353(6304): aaf4238. doi: 10.1126/science.aaf4238.
- [4] Blériot C, Chakarov S, Ginhoux F. Determinants of resident tissue macrophage identity and function [J]. *Immunity*, 2020, 52(6): 957-70. doi: 10.1016/j.immuni.2020.05.014.
- [5] Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells [J]. *Science*, 2012, 336(6077): 86-90. doi: 10.1126/science.1219179.
- [6] Nagata S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36: 489-517. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010.
- [7] Davies L C, Jenkins S J, Allen J E, et al. Tissue-resident macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(10): 986-95. doi: 10.1038/ni.2705.
- [8] Jenkins S J, Allen J E. The expanding world of tissue-resident macrophages [J]. *Eur J Immunol*, 2021, 51(8): 1882-96. doi: 10.1002/eji.202048881.

- [9] Shang M, Cappellesso F, Amorim R, et al. Macrophage-derived glutamine boosts satellite cells and muscle regeneration [J]. *Nature*, 2020, 587(7835): 626–31. doi: 10.1038/s41586-020-2857-9.
- [10] Cox N, Crozet L, Holtman I R, et al. Diet-regulated production of PDGF α by macrophages controls energy storage [J]. *Science*, 2021, 373(6550): eabe9383. doi: 10.1126/science.abe9383.
- [11] Shi J, Hua L, Harmer D, et al. Cre driver mice targeting macrophages [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1784: 263–75. doi: 10.1007/978-1-4939-7837-3_24.
- [12] Abram C L, Roberge G L, Hu Y, et al. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using Rosa-EYFP reporter mice [J]. *J Immunol Methods*, 2014, 408: 89–100. doi: 10.1016/j.jim.2014.05.009.
- [13] Sahasrabudhe V, Ghosh H S. Cx3Cr1-Cre induction leads to microglial activation and IFN- γ signaling caused by DNA damage in early postnatal brain [J]. *Cell Rep*, 2022, 38(3): 110252. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110252.
- [14] Schneider C, Nobs S P, Kurrer M, et al. Induction of the nuclear receptor PPAR- γ by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(11): 1026–37. doi: 10.1038/ni.3005.
- [15] Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, et al. VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages [J]. *Genesis*, 2002, 34(4): 251–6. doi: 10.1002/gene.10161.
- [16] Hu B, Duan S, Wang Z, et al. Insights into the role of CSF1R in the central nervous system and neurological disorders [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 789834. doi: 10.3389/fnagi.2021.789834.
- [17] Chitu V, Richard Stanley E. Regulation of embryonic and postnatal development by the CSF-1 receptor [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 123: 229–75. doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.10.004.
- [18] Bencheikh L, Diop M K, Rivière J, et al. Dynamic gene regulation by nuclear colony-stimulating factor 1 receptor in human monocytes and macrophages [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1935. doi: 10.1038/s41467-019-09970-9.

Csf1r^{Cre}-mediated yellow fluorescent protein can effectively label tissue-resident macrophages in various tissues

Li Xiaoyu¹, Zhao Dianyuan^{2,3}, Zhang Shengquan¹, Yang Jing^{1,2,3}, Tang Li^{1,2,3}

(¹Dept of Biochemistry, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Institute of Lifeomics, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206; ³State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Science, Beijing 102206)

Abstract Objective To construct *Csf1r*^{Cre} Rosa26^{YFP} mice, and to detect the efficiency of *Csf1r*^{Cre}-mediated yellow fluorescent protein (YFP) labeling monocytes and tissue-resident macrophages in different tissues. **Methods** The Rosa26^{YFP} mutant mice had a loxP-flanked STOP sequence, followed by a yellow fluorescent protein gene (YFP) inserted into the Rosa26 locus. When crossed with mice expressing the *Csf1r*^{Cre} recombinase, the STOP sequence was deleted, and yellow fluorescent protein (YFP) expression was observed in the tissues of double-mutant offspring (*Csf1r*^{Cre} Rosa26^{YFP}). *Csf1r*^{Cre} mice were mated with Rosa26^{YFP} mice, and genotype of *Csf1r*^{Cre} Rosa26^{YFP} mice were identified by PCR. Blood and bone marrow monocytes, liver macrophages, kidney macrophages, alveolar macrophages and spleen macrophages of adult *Csf1r*^{Cre} Rosa26^{YFP} mice were isolated, labeled with flow cytometry antibodies, and the recombination efficiency of *Csf1r*^{Cre}-mediated YFP labeling tissue macrophages was analyzed by flow cytometry. **Results** In *Csf1r*^{Cre} Rosa26^{YFP} reporter mice, the median percentage of YFP+ was 93.25% in renal macrophages, 92.45% in liver macrophages, and 91.10% in spleen macrophages. The percentage of YFP+ was 94.70% in alveolar macrophages, 98.20% in blood monocytes, and 93.90% in bone marrow monocytes. **Conclusion** *Csf1r*^{Cre} can be used to trace tissue-resident macrophages as well as bone marrow and blood monocytes. At the same time, *Csf1r*^{Cre} can target these cells to prepare conditional gene knockout mice.

Key words *Csf1r*^{Cre} recombinase; reporter gene mice; flow cytometry; tissue-resident macrophage; monocytes; cell labeling efficiency

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 32270941)

Corresponding authors Tang Li, E-mail: tangli731@163.com; Yang Jing, E-mail: yangjing@ncpsb.org.cn