



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：诱导性皮肤CD4<sup>+</sup>T细胞缺失小鼠模型的构建、繁育和基因鉴定  
作者：邵娜，周旭洋，曹婷，邹颖  
收稿日期：2026-01-29  
网络首发日期：2026-03-26  
引用格式：邵娜，周旭洋，曹婷，邹颖. 诱导性皮肤CD4<sup>+</sup>T细胞缺失小鼠模型的构建、繁育和基因鉴定[J/OL]. 安徽医科大学学报.  
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260325.1640.002>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## 诱导性皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞缺失小鼠模型的构建、繁育和基因鉴定

邵娜<sup>1,2</sup>, 周旭洋<sup>2</sup>, 曹婷<sup>2</sup>, 邹颖<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学上海皮肤病临床学院, 上海 200443; <sup>2</sup>上海市皮肤病医院变态反应科/过敏性皮肤病诊疗中心, 上海 200443)

**摘要** **目的** 利用 Cre-loxP 与白喉毒素受体 (DTR) 系统, 构建并鉴定可诱导的皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞特异性缺失小鼠模型 CD4-iDTR, 并评价其清除效果与特异性。**方法**: 通过杂交繁育获得 CD4-iDTR 小鼠, 并利用 PCR 技术进行基因型鉴定。将 CD4-iDTR 小鼠分为未处理组 (对照组) 与白喉毒素 (DT) 诱导组。利用流式细胞术对比未处理组的 CD4-iDTR 小鼠与野生型 C57BL/6 小鼠基础状态下组织中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的分布; DT 组皮下注射 DT 诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞缺失, 评估给药后 24 h 及一周后皮肤组织与引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的清除效率; 同时检测皮肤中中性粒细胞、巨噬细胞、树突状细胞以及 CD11b<sup>+</sup> 免疫细胞的占比, 评价模型清除的特异性。**结果** PCR 鉴定证实成功获得基因型正确的 CD4-iDTR 小鼠。基础状态下, CD4-iDTR 小鼠皮肤及引流淋巴结中的 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例及数量与野生型小鼠差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。经 DT 诱导后, CD4-iDTR 小鼠皮肤组织中 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例及数量在 24 h、一周后下降 ( $P<0.05$ ); 而引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞未见明显波动。DT 处理前后皮肤中中性粒细胞、巨噬细胞及其他 CD11b<sup>+</sup> 髓系细胞的占比均无显著改变 ( $P>0.05$ )。**结论** 成功构建并繁育出 CD4-iDTR 小鼠模型, 实现了对皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞的高效、特异及可诱导性清除, 且对皮肤免疫微环境无明显干扰, 为皮肤免疫研究提供了理想的实验工具。**关键词** 皮肤; CD4<sup>+</sup> T 细胞; Cre-loxP 系统; DTR 系统; CD4-iDTR; CD4<sup>+</sup> T 细胞缺失

中图分类号 R 75

文献标志码 A

---

2026-01-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82473526)

作者简介: 邵娜, 女, 硕士研究生;

邹颖, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: zouyingsh@163.com

# Construction, breeding, and genotypic identification of an inducible mouse model with skin CD4<sup>+</sup> T cell deficiency

Shao Na<sup>1,2</sup>, Zhou Xuyang<sup>2</sup>, Cao Ting<sup>2</sup>, Zou Ying<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Clinical College of Dermatology, Anhui Medical University, Shanghai 200443; <sup>2</sup>Department of Allergy / Allergic Dermatoses Clinical Center, Shanghai Skin Disease Hospital, Shanghai 200443)

**Abstract Objective** To establish and characterize an inducible, CD4<sup>+</sup> T cell-specific ablation mouse model (CD4-iDTR) using the Cre-loxP and diphtheria toxin receptor (DTR) systems, and to evaluate its depletion efficacy and specificity.

**Methods** CD4-iDTR mice were generated through cross-breeding, with genotypes confirmed *via* PCR-based screening. Mice were categorized into an untreated (control) group and a diphtheria toxin (DT) induction group. Flow cytometry was employed to compare the baseline distribution of CD4<sup>+</sup> T cells between untreated CD4-iDTR and wild-type C57BL/6 mice. In the DT group, CD4<sup>+</sup> T cell ablation was induced by subcutaneous DT administration. The depletion efficiency in skin tissues and skin-draining lymph nodes (sdLNs) was quantified at 24 h and 1 week post-injection. Furthermore, the proportions of neutrophils, macrophages, dendritic cells, and other CD11b<sup>+</sup> immune cell subsets in the skin were monitored to assess the model specificity.

**Results** Genomic profiling confirmed the successful generation of the CD4-iDTR line. Under steady-state conditions, no significant differences were observed in the frequency or absolute number of CD4<sup>+</sup> T cells in the skin and sdLNs between CD4-iDTR and C57BL/6 mice ( $P > 0.05$ ). Following DT induction, the CD4<sup>+</sup> T cell population in the skin exhibited decline within 24 h and 1 week ( $P < 0.05$ ), whereas the CD4<sup>+</sup> T cell counts in sdLNs remained stable. The percentages of cutaneous neutrophils, macrophages, and other CD11b<sup>+</sup> myeloid populations were not significantly altered following DT treatment ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion** The CD4-iDTR mouse model is successfully established and bred, achieving efficient, specific, and inducible ablation of cutaneous CD4<sup>+</sup> T cells without significant interference with the skin immune microenvironment. This model serves as an ideal experimental tool for investigating skin-specific immunological mechanisms.

**Key words** skin; CD4<sup>+</sup> T cells; Cre-loxP system; DTR system; CD4-iDTR; CD4<sup>+</sup> T -cell ablation

**Fund program** National Natural Science Foundation of China (No. 82473526)

**Corresponding author** Zou Ying, E-mail: zouyingsh@163.com

皮肤作为人体质量要的免疫活性器官，其免疫稳态的维持离不开 CD4<sup>+</sup> T 细胞的核心调控作用<sup>[1-3]</sup>。初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞可响应局部信号，分化为功能各异的辅助性 T 细胞（T helper cell, Th）亚群，包括 Th1、Th2、Th17 以及调节性 T 细胞（regulatory T cell, Treg），并通过分泌独特的细胞因子谱，精密地指挥免疫监视、炎症反应及组织修复等关键进程<sup>[4]</sup>。当其功能发生紊乱，导致亚群比例失衡或效应异常时，便会破坏免疫平衡，这与特异性皮炎、银屑病等多种皮肤疾病的发生发展密切相关<sup>[5-8]</sup>。构建可在皮肤局部特异性缺失 CD4<sup>+</sup> T 细胞的小鼠模型，为研究该细胞在皮肤免疫稳态及疾病进程中的具体功能提供关键实验载体和技术平台。观察小鼠在 CD4<sup>+</sup> T 细胞缺失后，皮肤局部及全身免疫应答所发生的变化，从而直观揭示其免疫学效应。本研究旨在利用 Cre-loxP 和白喉毒素受体（diphtheria toxin receptor, DTR）系统构建 CD4-iDTR 小鼠，建立一种能够对皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞进行高效、特异及可诱导清除的动物模型，从而为深入探究 CD4<sup>+</sup> T 细胞在皮肤局部免疫微环境中的功能提供理想的实验工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** LoxP-STOP-DTR（以下简称 LSL-DTR）小鼠购自中国上海南模生物公司 [SCXK（沪）-2023-0005]，CD4-Cre 小鼠由同济大学银屑病研究所史玉玲课题组赠予。所有实验小鼠均饲养于同济大学沪北校区无特殊病原体（specific pathogen free, SPF）级动物房，合格证号为 SYXK（沪）2023-0044，饲养环境设置为 12 h 昼夜交替光照，室温维持在（23±3）℃，湿度 50%±10%，小鼠可自由摄食饮水。为获得 CD4-iDTR 小鼠，共选取 18 只 10 周龄亲代小鼠，包含 12 只 LSL-DTR 雌鼠与 6 只 CD4-Cre 雄鼠，小鼠体质量为（24±4）g。本研究所有实验操作流程均经同济大学沪北校区动物房伦理委员会审核批准（伦理号：TJ-HB-LAC-2025-150）。

**1.1.2 主要试剂** 胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）、青-链霉素溶液（货号：A5256901、15070063）购自美国 Gibco Life Sciences 公司；白喉毒素（货号：D381867）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；DNA 酶、IV 型胶原酶（货号：D4309、C4-28）均购自美国 Sigma-

Aldrich 公司。丙酮酸钠、RPMI-1640 培养基、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺酸 (HEPES) (货号: BP356、C11875500BT、BP310) 购自美国 ThermoFisher Scientific 公司。上海嘉远生物科技有限公司提供 DNA Ladder (货号: C06-09001); 生工生物工程(上海)股份有限公司合成了实验所用的所有引物, 并供应了琼脂糖以及 TAE 缓冲液、NaOH 滴定溶液 (货号: A501004、B548101、C601009); pH8.0 Tris-HCl 溶液和 pH8.0 乙二胺四乙酸 (EDTA) 溶液 (货号: T1150、E1170) 购自北京索莱宝科技有限公司。Taq 酶 (2×Premix)、PrimeScript RT Master Mix (货号: RR001Q、RR036Q) 均购自日本 Takara Bio 公司。Fc Blocker、BV421 anti-Mouse CD45、BV510 anti-Mouse CD45、AF700 anti-Mouse CD3、PerCP-Cy5.5 anti-Mouse CD4、BV421 Anti-Mouse CD4; FITC anti-Mouse CD8、AF488 anti-Mouse CD11b、APC anti-Mouse CD11c、PE anti-Mouse F4/80、AF700 anti-Mouse EpCAM (货号: 553141、109832、103137、100215、100539、100437、100707、101219、117310、101219、118216) 均购自美国 BioLegend 生物科技有限公司; APC-Cy7 anti-Mouse Ly6G (货号: 25-1276) 购自美国 Tonbo Biosciences 公司。细胞活性染料 Fixable Viability Stain 510 anti-Mouse (货号: 564406) 购自美国碧迪医疗器械有限公司。

**1.1.3 主要仪器和设备** 低温台式离心机、大离心机 (德国艾本德股份公司, 型号: 5430R、5810R); PCR 仪、电泳仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司, 型号: S1000™ Dual 48 well、1645070]; 流式细胞仪 (美国碧迪医疗器械有限公司, 型号: BD FACSMelody)。全自动多功能成像系统 (上海天能科技有限公司, 型号: Tanon Chemi Dog Ultra)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CD4-iDTR 模型的构建及繁育

为构建 CD4-iDTR 模型, 采用 Cre-loxP 系统和 DTR 系统, 以纯合 LSL-DTR (*LSL-DTR<sup>+/+</sup>*) 雌鼠与 CD4-Cre (*Cd4<sup>Cre</sup>*) 雄鼠作为亲代进行交配, 获得子一代 (F1) 小鼠。在 F1 代中筛选出同时携带 *Cd4<sup>Cre</sup>* 基因和 *LSL-DTR<sup>+/-</sup>* 转基因元件的个体 (*Cd4<sup>Cre</sup>/DTR<sup>+/-</sup>*), 再将其与 *LSL-DTR<sup>+/+</sup>* 小鼠进行回交, 子代小鼠中包含条件性基因清除 CD4-iDTR (*Cd4<sup>Cre</sup>/DTR<sup>+/+</sup>*) 子代, 及相应对照组 *LSL-DTR<sup>+/+</sup>*、*LSL-DTR<sup>+/-</sup>*。构建及繁育策略见图 1。

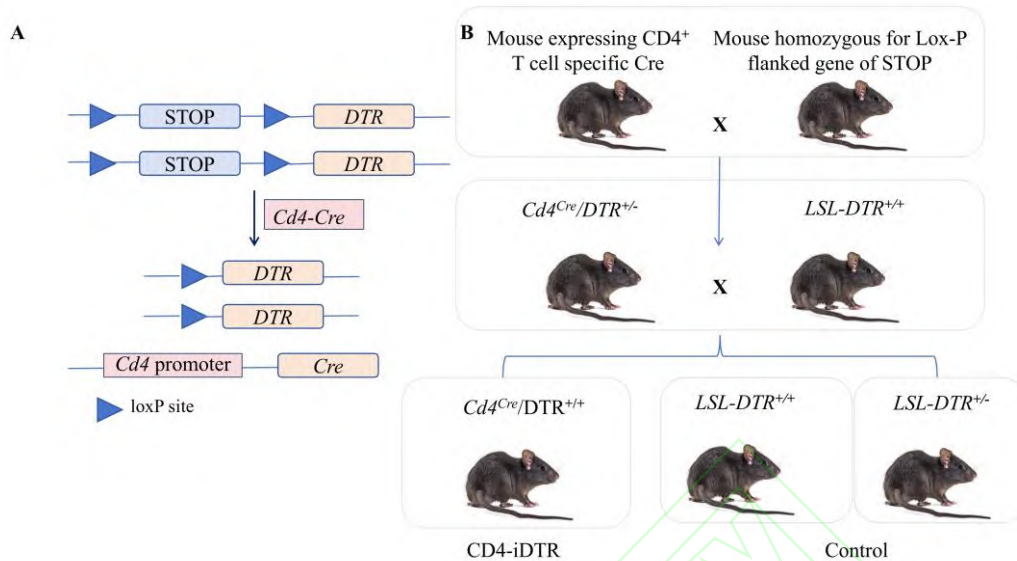


图 1 诱导性 CD4-iDTR 小鼠的构建 (A) 与繁育策略图 (B)

Fig. 1 Generation (A) and breeding strategy (B) of conditional CD4-iDTR mice

### 1.2.2 CD4-iDTR 小鼠基因型鉴定

剪取麻醉后的2~3周龄小鼠脚趾进行编号，并收集于离心管中。离心管中加入 100  $\mu$ L 鼠尾裂解液 A 液（250  $\mu$ L 5 mmol/L NaOH、20  $\mu$ L 10.5 M EDTA、49.73 mL ddH<sub>2</sub>O），95  $^{\circ}$ C 金属浴加热 1 h。加入 100  $\mu$ L 鼠尾裂解液 B 液（2 mL 1 mmol/L Tris-HCl、48 mL ddH<sub>2</sub>O），4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液作为 PCR 模板。引物序列见表1。PCR 反应体系：5  $\mu$ L 2 $\times$ Taq PCR Premix，引物各0.25  $\mu$ L，1  $\mu$ L DNA，加入 DNase/RNase-Free Water 补齐至10  $\mu$ L。*Cd4-Cre* PCR 反应程序为98  $^{\circ}$ C 2 min；35 $\times$ （98  $^{\circ}$ C 15 s，55  $^{\circ}$ C 30 s，68  $^{\circ}$ C 30 s），68  $^{\circ}$ C 5 min。*LSL* PCR 反应程序为 94  $^{\circ}$ C 3 min；35 $\times$ （94  $^{\circ}$ C 30 s，58  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 30 s），72  $^{\circ}$ C 5 min。

琼脂糖凝胶电泳：称取 0.6 g 琼脂糖粉末置于加入 30 mL TAE 缓冲液 250 mL 锥形瓶中，振荡混匀后，使用微波炉高火间歇加热沸腾三次至粉末完全溶解。随后向琼脂糖溶液中加入 3  $\mu$ L 核酸染料并振荡混匀。当琼脂糖溶液自然冷却至温度约为 60  $^{\circ}$ C时，将其缓慢倾注至制胶模具中。于室温条件下静置 20 min 使凝胶充分固化后，小心移去样品梳，将成型凝胶置于电泳槽中备用。加样时，在最左边的样品孔加入 5  $\mu$ L DNA ladder，其他孔依次加入 9  $\mu$ L 的 PCR 扩增产物。设置电压为 120 V，电泳 20 min 后，取出凝胶，通过凝胶成像系统获取图像并进行结果分析。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Primer name	Sequence (5' - 3')
<i>Cd4</i> -Cre	F: CATGTCCATCAGGTTCTTGC
<i>Cd4</i> -Cre	R: CCAGGGTCGGAGACAATAAC
LSL-Mutant	R: GCGAAGAGTTTGTCTCAACC
LSL-Common	F: AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
LSL-Wildtype	R: GGAGCGGGAGAAATGGATATG

### 1.2.3 皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞缺失模型的建立与诱导

选取 7 周龄雌性，CD4-iDTR 小鼠及其同龄野生型 C57BL/6 小鼠，体质量 (18±2) g，实验分组及诱导方案如下。缺失诱导组：6 只 CD4-iDTR 小鼠于上背部皮下注射 DT，给药剂量为 0.02 μg/只。未处理对照组：3 只 CD4-iDTR 小鼠，不作任何处理。野生型对照组：3 只 C57BL/6 小鼠分别注射等体积 PBS，分别于给药后 24 h 及一周后处死小鼠，采集背部皮肤组织及引流淋巴结进行后续检测。

### 1.2.4 小鼠细胞悬液制备

皮肤组织单细胞悬液制备，安乐死小鼠后，取上背部皮肤组织与腋窝淋巴结。皮肤组织经去除皮下脂肪并称重后，剪碎成匀浆状，加入消化酶混合液（成分为 27 mg IV 型胶原酶、100 μL 丙酮酸钠、100 μL DNA 酶、100 μL HEPES、100 μL 青-链霉素及 9.6 mL RPMI-1640 培养基），于 37 °C 消化 45 min，期间每 15 min 观察消化状态。消化结束后立即转移至冰上操作，加入 FBS 终止消化。组织悬液经细胞筛过滤，收集滤液至离心管，研磨筛网残留组织，并补充预冷 PBS 至总体积 20 mL。4 °C 500 r/min 离心 5 min。淋巴结组织于流式染色缓冲液中，后续研磨、离心与重悬步骤同皮肤组织处理方案。

### 1.2.5 流式细胞术分析

取“1.2.3 项”下提取的皮肤与淋巴结来源的单细胞悬液，加入 Fc blocker 于冰上孵育 10 min 阻断非特异性结合。随后加入细胞活性染料 Fixable Viability Stain 510 anti-Mouse，室温避光反应 15 min，4 °C、500 r/min 离心 5 min 弃上清液。① 皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞缺失效率检测：按 1 : 200 比例加入预混好的胞膜染色抗体，包括 BV421 anti-Mouse CD45、AF700

anti-Mouse CD3、PerCP-Cy5.5 anti-Mouse CD4；冰上孵育 40 min，加入流式染色缓冲液清洗，4 °C 500 r/min 离心 5 min 后弃上清液。使用流式染色缓冲液重悬细胞并过筛，加入 100  $\mu$ L 计数微球后上机检测。② 淋巴结 CD4<sup>+</sup> T 细胞缺失效率检测：按 1：200 比例加入预混好的胞膜染色抗体，包括 BV421 anti-Mouse CD45、AF700 anti-Mouse CD3、PerCP-Cy5.5 anti-Mouse CD4、FITC anti-Mouse CD8；孵育 40 min、洗涤及重悬步骤同上，上机进行流式检测。③ 模型特异性验证：为评估 DT 处理对非靶细胞的影响，按 1：200 比例加入预混好的胞膜染色抗体，包括 BV510 anti-Mouse CD45、APC-Cy7 anti-Mouse Ly6G、AF488 anti-Mouse CD11b、APC anti-Mouse CD11c、PE anti-Mouse F4/80、AF700 anti-Mouse EpCAM；孵育 40 min 及洗涤后重悬上机。

使用 FlowJo 10 软件分析检测结果。皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例与数量：首先圈定 CD45<sup>+</sup> 白细胞，分析其中 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞占 CD45<sup>+</sup> 细胞的百分比，并根据计数微球比值计算其绝对数量；皮肤引流淋巴结 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例：首先圈定 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞，计算 CD4<sup>+</sup> T 亚群在 CD3<sup>+</sup> T 细胞中的分布频率；模型特异性验证：在 CD45<sup>+</sup> 白细胞门内，定义中性粒细胞为 CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>，朗格汉斯细胞为 CD11b<sup>+</sup> EpCAM<sup>+</sup>，巨噬细胞为 CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>，树突状细胞为 CD45<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>，以及其他表达 CD11b<sup>+</sup> 的免疫细胞。通过对比 DT 处理前后各群细胞的比例变化，验证清除的特异性。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 10 软件进行统计分析和图表制作。计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示，两组之间比较采用独立样本 *t* 检验，3 组之间的比较使用单因素方差分析。事后多重比较采用 Tukey 检验。重复测量数据采用重复测量方差分析。当  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CD4-iDTR 转基因小鼠基因型鉴定结果

将基因型为  $Cd4^{Cre}/DTR^{+/-}$  与  $LSL-DTR^{+/+}$  的小鼠进行杂交，并对获得的子代小鼠进行基因型鉴定，部分结果见图 2，500 bp 阳性条带为  $Cd4^{Cre}$ ，340 bp 突变型条带为带  $LSL$ ，野生型条带为 650 bp，仅携带一条突变型条带为  $LSL-DTR$  纯合子小鼠 ( $LSL-DTR^{+/+}$ )，仅携带一条野生型条带为 WT 小鼠，同时携带一条突变型条带和野生型条带为  $LSL-DTR$  杂合小鼠 ( $LSL-DTR^{+/-}$ )。结果显示 2、3、4、5、6、7、11、14 为 CD4-iDTR ( $Cd4^{Cre}/DTR^{+/+}$ ) 小鼠，1、8、12、13 为  $LSL-DTR^{+/+}$  小鼠，9、10 号为  $LSL-DTR^{+/-}$  小鼠。

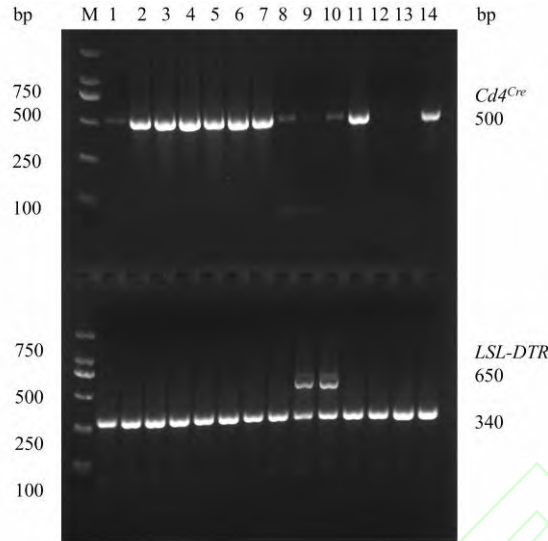


图 2 CD4-iDTR 小鼠基因型鉴定

Fig. 2 Genotypic of CD4-iDTR mice

M: DNA marker; 1-14: Mouse serial number.

## 2.2 CD4-iDTR 小鼠与 C57BL6 小鼠皮肤及皮肤引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例及数量

为评估 CD4-iDTR 小鼠模型在基础免疫状态下的特征,采用流式细胞术对 CD4-iDTR 和 C57BL/6 小鼠的皮肤组织及其引流淋巴结进行免疫细胞表型分析。计算皮肤组织单细胞悬液中 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞在 CD45<sup>+</sup> 白细胞群体中所占的相对比例与绝对数量;皮肤引流淋巴结内 CD4<sup>+</sup> T 细胞在 CD3<sup>+</sup> T 淋巴细胞中的分布频率。结果如图3所示,未经处理的 CD4-iDTR 小鼠与 C57BL6 小鼠相比较,CD4-iDTR 小鼠皮肤中 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 占 CD45<sup>+</sup> 的比例和数量与 C57BL6 小鼠无显著性差异,皮肤引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> 占 CD3<sup>+</sup> T 细胞的比例无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

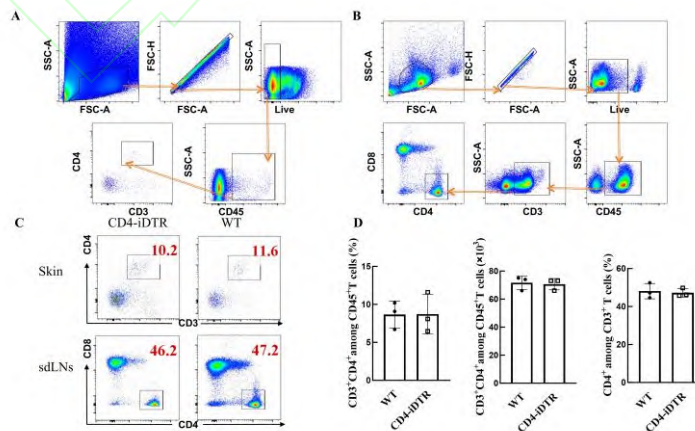


图 3 CD4-iDTR 小鼠与 C57BL6 小鼠皮肤/皮肤引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例及数量

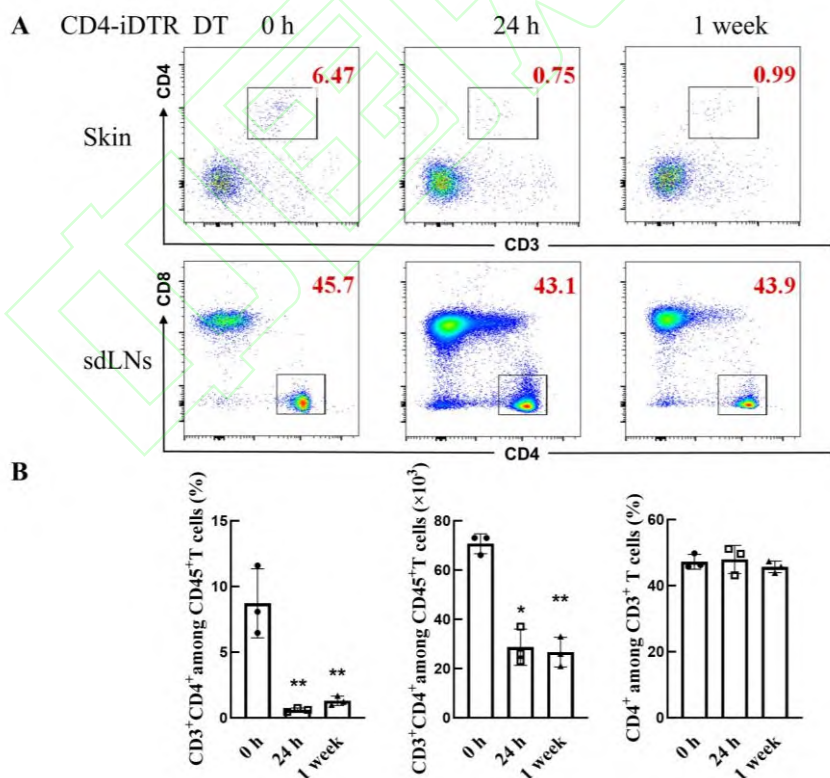
(n = 3)

**Fig. 3 The proportion and number of CD4<sup>+</sup> T cells in the skin/sdLN of CD4-iDTR mice compared with C57BL/6 mice (*n* = 3)**

A: Flow cytometry gating strategy for CD4<sup>+</sup> T cells in skin tissue; B: Flow cytometry gating strategy for CD4<sup>+</sup> T cells in sdLNs; C: Schematic diagram of CD4<sup>+</sup> T cells in the skin and sdLNs of different genotype mice; D: Statistical evaluation of CD4<sup>+</sup> T cell proportion and numerical abundance in the skin and sdLNs.

### 2.3 CD4-iDTR 小鼠皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞在白喉毒素注射24 h、一周后的清除效果分析

为评估 DT 诱导24 h、一周后对 CD4-iDTR 小鼠皮肤局部 CD4<sup>+</sup> T 细胞的清除效果，采用流式细胞术进行分析，以未处理的 CD4-iDTR 小鼠作为对照组，检测指标主要包括：皮肤组织中 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T 细胞在 CD45<sup>+</sup> 白细胞群体中所占的百分比及其绝对数量；皮肤引流淋巴结内 CD4<sup>+</sup> T 细胞占 CD3<sup>+</sup> T 细胞的相对比例。结果如图4B 所示，经 DT 处理24 h、一周后，小鼠皮肤组织中 CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> 占 CD45<sup>+</sup> 白细胞的比例和数量与未处理组相比均下降（*q*=10.20、9.32，均 *P*<0.05）。皮肤引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> 占 CD3<sup>+</sup> T 细胞的比例无显著性差异（*P*>0.05）。

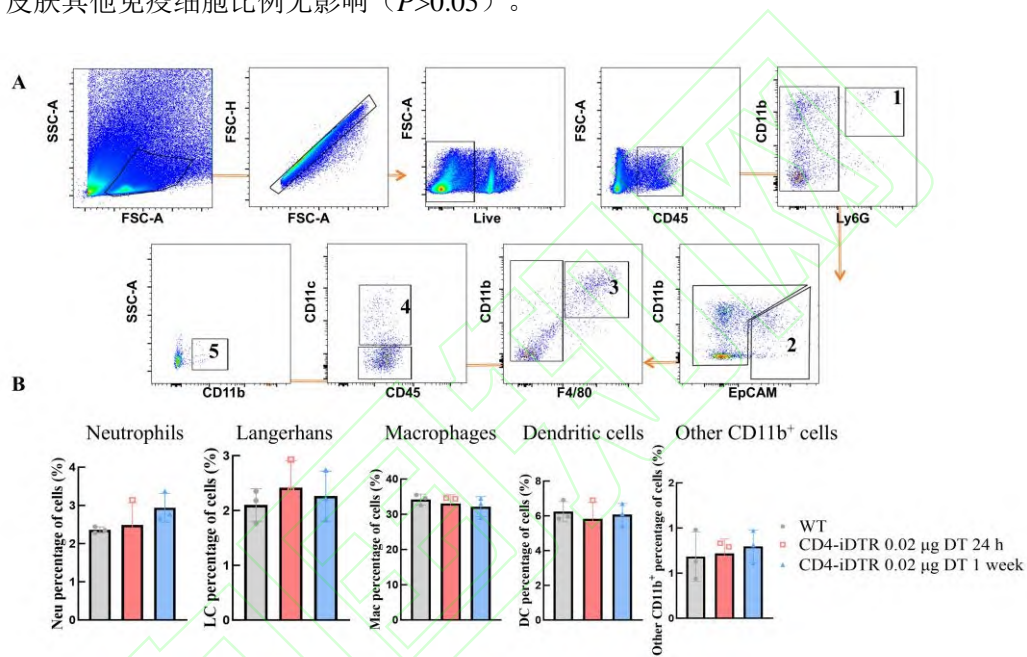


**图 4 流式细胞术分析 CD4-iDTR 小鼠注射白喉毒素 24 h、一周后皮肤/皮肤引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例及数量 (*n* = 3)**

**Fig.4** Flow cytometric analysis shows the proportion and number of CD4<sup>+</sup> T cells in the skin and skin-draining lymph nodes of CD4-iDTR mice at 24 h, 1 week DT injection  
(*n* = 3)

#### 2.4 白喉毒素对 CD4-iDTR 小鼠皮肤组织中中性粒细胞、朗格汉斯细胞、巨噬细胞、树突状细胞以及其他表达 CD11b<sup>+</sup> 的免疫细胞的影响

圈门逻辑如图 5A 所示，图 5B 结果可见 CD4-iDTR 小鼠皮下注射白喉毒素 24 h、一周后对皮肤其他免疫细胞比例无影响 ( $P>0.05$ )。



**图 5** 流式细胞术分析 CD4-iDTR 小鼠注射白喉毒素后皮肤组织中免疫细胞的细胞比例  
(*n* = 3)

**Fig.5** Flow cytometric analysis of immune cell proportions in the skin of CD4-iDTR mice after DT injection (*n* = 3)

A: Flow cytometric gating strategy for immune cells in mouse skin; B: Proportion of immune cells in skin tissue; 1: Neutrophils; 2: Langerhans; 3: Macrophages; 4: Dendritic cells; 5: other CD11b<sup>+</sup> cells.

### 3 讨论

本研究成功建立了一种基于 Cre-loxP 与 DTR 系统的皮肤局部特异性缺失 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 CD4-iDTR 小鼠模型，通过将 *Cd4* 启动子驱动的 *Cre* 重组酶与 loxP-stop-loxP-DTR 基因

系统整合，使 DTR 的表达严格限定于 CD4<sup>+</sup> T 细胞群体<sup>[9]</sup>。白喉毒素是由白喉棒状杆菌产生的外毒素，与 CD4<sup>+</sup>细胞群体上的 DTR 结合并通过 ADP-核糖基化，抑制蛋白质合成致 CD4<sup>+</sup>特异性凋亡<sup>[10-11]</sup>。流式细胞术结果表明，皮下注射白喉毒素 24 h 和一周后皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例及绝对数量降低，而对皮肤引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup> T 细胞未产生影响，证明诱导清除效应具有组织局限性和时间控制上的特异性与灵活性。同时小鼠皮肤组织中的其他免疫细胞比例无显著差异，进一步说明白喉毒素诱导的细胞清除效果具有高度靶向性，不影响皮肤组织局部微环境中其他免疫细胞的比例。

与特异性抗体清除或全身性基因敲除技术相比，利用 CD4-iDTR 小鼠结合 DT 建立的细胞清除系统，其核心优势在于实现了对 CD4<sup>+</sup> T 高效、特异且可诱导的局部清除。本模型在小鼠发育成熟后进行诱导性清除，有效规避了胚胎发育早期的免疫代偿以及长期的全身性免疫抑制<sup>[12-13]</sup>。同时，本研究证实通过皮下局部注射 DT，能够将 CD4<sup>+</sup> T 细胞的高效清除且精准限制在皮肤组织内（维持 24 h 至一周），而对皮肤引流淋巴结中的 CD4<sup>+</sup> T 细胞比例无明显波及。这种将清除作用精准局限于皮肤的特性，使得该模型成为探讨皮肤局部免疫机制的理想工具，尤其适用于解析特应性皮炎等慢性炎症复发过程中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的功能演变。

CD4<sup>+</sup> T 细胞在维持皮肤稳态及多种炎症性皮肤病中起着重要作用。当皮肤中 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例失衡或功能异常时，局部免疫平衡被打破，能够诱导多种疾病的发生。就银屑病而言，CD4<sup>+</sup> T 细胞向 Th17 亚群的过度分化会分泌大量 IL-17 等细胞因子刺激角质形成细胞异常增殖<sup>[14]</sup>。在特应性皮炎的疾病进程中，CD4<sup>+</sup> T 细胞的分化呈现动态变化：急性期以 Th2 型免疫反应为主，慢性期 Th1 型反应会逐渐增强，皮肤驻留记忆 T 细胞（TRM）在复发与慢性化过程中也发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。皮肤局部特异性缺失 CD4<sup>+</sup> T 细胞的 CD4-iDTR 小鼠模型是研究 CD4 基因在皮肤中作用的重要工具，可用于多种皮肤疾病模型（如特应性皮炎样、银屑病样模型）中 CD4<sup>+</sup> T 细胞在不同时期的具体功能和作用机制研究。

本研究成功构建一种新型小鼠模型，可实现对皮肤 CD4<sup>+</sup> T 细胞的诱导性敲除。具有精准调控局部免疫微环境、高度的可诱导性以及组织靶向性的优点，对皮肤基础免疫机制研究具有重要价值，提供一个可靠且有力的动物实验模型。

## 参考文献

- [1] Zareie P, Weiss E S, Kaplan D H, et al. Cutaneous T cell immunity[J]. Nat Immunol, 2025, 26(7): 1014-22. doi:10.1038/s41590-025-02145-3.

- [2] Kortekaas Krohn I, Aerts J L, Breckpot K, et al. T-cell subsets in the skin and their role in inflammatory skin disorders[J]. *Allergy*, 2022, 77(3): 827-42. doi:10.1111/all.15104.
- [3] Harbour J C, Abdelbary M, Schell J B, et al. T helper 1 effector memory CD4<sup>+</sup> T cells protect the skin from poxvirus infection[J]. *Cell Rep*, 2023, 42(5): 112407. doi:10.1016/j.celrep.2023.112407.
- [4] Lee G R. Molecular mechanisms of T helper cell differentiation and functional specialization[J]. *Immune Netw*, 2023, 23(1): e4. doi:10.4110/in.2023.23.e4.
- [5] Clowry J, Dempsey D J, Claxton T J, et al. Distinct T cell signatures are associated with *Staphylococcus aureus* skin infection in pediatric atopic dermatitis[J]. *JCI Insight*, 2024, 9(9): e178789. doi:10.1172/jci.insight.178789.
- [6] Aparicio-Soto M, Curato C, Riedel F, et al. *In vitro* monitoring of human T cell responses to skin sensitizing chemicals-a systematic review[J]. *Cells*, 2021, 11(1): 83. doi:10.3390/cells11010083.
- [7] Chen Y L, Ng J S W, Ottakandathil Babu R, et al. Group A *Streptococcus* induces CD1a-autoreactive T cells and promotes psoriatic inflammation[J]. *Sci Immunol*, 2023, 8(84): eadd9232. doi:10.1126/sciimmunol.add9232.
- [8] Shah P N, Romar G A, Manukyan A, et al. Systemic and skin-limited delayed-type drug hypersensitivity reactions associate with distinct resident and recruited T cell subsets[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(17): e178253. doi:10.1172/JCI178253.
- [9] Foster M P, Benedek M J, Billings T D, et al. Dynamics in cre-loxP site-specific recombination[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2024, 88: 102878. doi:10.1016/j.sbi.2024.102878.
- [10] 周园园, 刘 崇, 王安琪, 等. CSF1R<sup>+/-</sup>小鼠的构建和基因鉴定[J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60(5): 884-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.015.
- Zhou Y Y, Liu C, Wang A Q, et al. Construction and gene identification of CSF1R<sup>+/-</sup> mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2025, 60(5): 884-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.05.015.
- [11] 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): 147-59. doi:10.5625/lar.2018.34.4.147.

- [12] Buch T, Heppner F L, Tertilt C, et al. A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration[J]. *Nat Methods*, 2005, 2(6): 419-26. doi:10.1038/nmeth762.
- [13] Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(1): 57-63. doi:10.1084/jem.20061852.
- [14] Xin Y, Yang M, Zhao Z, et al. AIM2 deficiency in CD4<sup>+</sup> T cells promotes psoriasis-like inflammation by regulating Th17-Treg axis *via* AIM2-IKZF2 pathway[J]. *J Autoimmun*, 2025, 150: 103351. doi:10.1016/j.jaut.2024.103351.
- [15] Zheng C, Cao T, Ye C, et al. Neutrophil recruitment by CD4 tissue-resident memory T cells induces chronic recurrent inflammation in atopic dermatitis[J]. *Clin Immunol*, 2023, 256: 109805. doi:10.1016/j.clim.2023.109805.