



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: B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因小鼠的构建及基因型鉴定  
作者: 葛锐麟, 张慧茹, 薛梓萌, 涂佳杰  
网络首发日期: 2026-05-12  
引用格式: 葛锐麟, 张慧茹, 薛梓萌, 涂佳杰. B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因小鼠的构建及基因型鉴定[J/OL]. 安徽医科大学学报.  
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260512.1308.004>



**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。

## B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因小鼠的构建及基因型鉴定

葛锐麟<sup>1</sup>, 张慧茹<sup>2</sup>, 薛梓萌<sup>2</sup>, 涂佳杰<sup>2</sup>

(安徽医科大学<sup>1</sup>第一临床医学院、<sup>2</sup>药学科学学院临床药理研究所, 合肥 230032)

基金项目：国家自然科学基金面上项目（编号：82373877）

作者简介：葛锐麟，男，本科生；

涂佳杰，男，教授，博士生导师，通信作者，E-mail: [tujiajie@ahmu.edu.cn](mailto:tujiajie@ahmu.edu.cn)

**摘要** **目的** 构建 B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因小鼠并分析其基因型，为疾病病理机制及药物靶点研究提供动物模型基础。**方法** 将 Mb1-cre 转基因小鼠与 *Spi1*<sup>flox/flox</sup> 小鼠进行杂交繁育，通过聚合酶链式反应（PCR）和琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型，筛选出基因型 Mb1-cre×*Spi1*<sup>flox/flox</sup> 的小鼠即为 B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因的纯合子小鼠。**结果** PCR 法鉴定结果显示，采用 flox 引物鉴定时仅扩增出 220 bp 条带，即基因型为 *Spi1*<sup>flox/flox</sup> 小鼠，采用 Mb1-Cre 引物鉴定时扩增出 383 bp 条带，即基因型为 Mb1-cre×*Spi1*<sup>flox/flox</sup> 小鼠；流式细胞术结果显示，与 *Spi1*<sup>flox/flox</sup> 小鼠相比，Mb1-cre×*Spi1*<sup>flox/flox</sup> 小鼠骨髓来源单个核细胞、外周血单个核细胞和脾脏来源的 B 细胞中 PU.1 表达水平显著降低，且 PU.1 在其他免疫细胞内（如 CD4<sup>+</sup>T 和巨噬细胞）正常表达。**结论** 该研究借助 Cre/LoxP 系统以及 CRISPR/Cas9 技术，成功构建出 B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因的小鼠，为深入探究 PU.1 在 B 细胞相关疾病里的具体作用提供了可靠的动物模型。

**关键词** *Spi1*；条件性敲除；B 细胞；CRISPR/Cas9 技术；Cre/LoxP 系统；PCR；流式细胞术

中图分类号 R 593.2

## Construction and genotyping of B cell conditional knockout *Spi1* mice

Ge Ruilin<sup>1</sup>, Zhang Huiru<sup>2</sup>, Xue Zimeng<sup>2</sup>, Tu Jiajie<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>First School of Clinical Medicine, <sup>2</sup>Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To construct B cell conditional knockout *Spi1* gene mice and analysis their genotypes to provide an animal model basis for disease pathogenesis and drug target research.

**Methods** Mb1-cre transgenic mice were crossbred with  $Spi1^{flox/flox}$  mice,. The genotypes of the offspring mice were identified using polymerase chain reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis. The mice with the genotype of Mb1-cre $\times$  $Spi1^{flox/flox}$  that were screened out will be the homozygous mice with B cell-specific conditional knockout of the *Spi1* gene. **Results** PCR identification results showed that when using flox primers for detection, only a 220 bp band was amplified, indicating a genotype of  $Spi1^{flox/flox}$  in the mice. When using Mb1-Cre primers for detection, a 383 bp band was amplified, indicating a genotype of Mb1-cre $\times$  $Spi1^{flox/flox}$  in the mice; Flow cytometry results showed that compared to  $Spi1^{flox/flox}$  mice, Mb1-cre $\times$  $Spi1^{flox/flox}$  mice exhibited significantly reduced PU.1 expression levels in bone marrow-derived mononuclear cells, peripheral blood mononuclear cells, and spleen-derived B cells. Moreover, PU.1 exhibited normal expression in other immune cells, such as CD4<sup>+</sup> T cells and macrophages. **Conclusion** By utilizing the Cre/LoxP system and CRISPR/Cas9 technology, this study successfully generates mice with B cell-specific conditional knockout of the *Spi1* gene, providing a reliable animal model for in-depth exploration of the specific role of PU.1 in B cell-related diseases.

**Key words** Spi1; conditional knockout; B cells; CRISPR/Cas9 technology; Cre/LoxP system; PCR; flow cytometry

**Fund program** National Natural Science Foundation of China (No. 82373877)

**Coersponding author** Tu Jiajie, E-mail: [tujiajie@ahmu.edu.cn](mailto:tujiajie@ahmu.edu.cn)

转录因子 PU.1 作为 E26 转化特异性家族的重要成员，由 *Spi1* 基因编码<sup>[1-2]</sup>。PU.1 蛋白由 272 个氨基酸构成，其 N 末端包含 1 个转录激活结构域，而 C 末端则含有 1 个 DNA 结合结构域<sup>[3]</sup>。PU.1 通过调控 B 淋巴细胞和骨髓细胞的增殖与分化，在造血系统中发挥着独特的转录调控功能<sup>[4]</sup>。先前对 PU.1 的研究主要集中在免疫细胞参与的癌症上<sup>[5]</sup>，最近的研究<sup>[6-8]</sup>表明 PU.1 可通过调节 B 淋巴细胞、巨噬细胞、CD4<sup>+</sup>T 等免疫细胞，来影响系统性红斑狼疮、类风湿关节炎（rheumatoid arthritis, RA）和实验性自身免疫性脑脊髓炎等疾病的进程。课题组近期研究<sup>[9-10]</sup>发现 PU.1 通过抑制巨噬细胞和成纤维样滑膜细胞中的 III 型受体酪氨酸激酶表达促进类风湿性关节炎的发展，此外 PU.1-IL-9 正反馈通路在 Th9 细胞中也能促进类风湿性关节炎发展。同时研究<sup>[11]</sup>亦证实，PU.1 在 B 细胞的发育及其相关疾病中扮演着关键角色，PU.1 对 B 细胞的调控潜力有望成为 RA 诊疗的潜在靶点。因此，该研究利用 CRISPR/Cas9 技术和 Cre/LoxP 系统，构建出 B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因（Mb1-cre × *Spi1*<sup>flox/flox</sup>）的小鼠，对其开展繁育和基因型鉴定，将为深入探究 PU.1 在 B 细胞相关疾病里的具体作用和潜在机制提供可靠的动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

*Spi1*<sup>flox/flox</sup> 小鼠，雌雄各 5 只，8 周龄，体质量（20 ± 2）g；Mb1-cre × *Spi1*<sup>flox/flox</sup> 小鼠，雌雄各 5 只，8 周龄，体质量（20 ± 2）g，所有小鼠的遗传背景均为 C57BL/6，均购自苏州赛业生物技术有限公司。小鼠饲养于安徽医科大学临床药理研究所 SPF 动物房，实验动物的饲养及操作严格遵循国标及安徽省实验动物饲养管理规范，实验动物伦理号为 PZ-2024-019，动物合格证编号为 44826100006。

### 1.2 主要材料

pH8.0 EDTA 溶液（货号：E1170，上海碧云天生物技术有限公司）；pH8.0 Tris-HCl 溶液（货号：G2003-1，北京索莱宝科技有限公司）；所用引物均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；2 × HotStrat Taq PCR Master Mix、100 bp Ladder DNA Marker、核酸染料、50 × TAE 电泳缓冲液（货号：MT205、MD111、EL108、EL102-01，北京博迈德基因技术有限公司）；PBS 缓冲液（货号：B310KJ，上海源培生物科技股份有限公司）；琼脂糖（货

号：1110GR100，广州赛国生物科技有限责任公司）；PU.1、CD19、F4/80、CD4 流式抗体（货号：681308、982418、123132、980802，美国 Biolegend 公司）；转录因子流式固定破膜缓冲液（货号：00-5523-00，美国 Invitrogen 公司）。

### 1.3 主要仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱（型号：HF100，上海力申科学仪器有限公司）；PCR 扩增仪（型号：T100，上海伯乐生命医学产品有限公司）；核酸定量仪（型号：DS-11，德国 Eppendorf 公司）；DYY-7C 型电泳仪（型号：DYY-7C，北京六一生物科技有限公司）；全自动数码凝胶图像分析系统（型号：Tanon-1600，上海天能科技有限公司）；艾本德离心机（型号：Centrifuge 5810，德国 Eppendorf 公司）；BD 流式分选细胞仪（型号：BD FACSCanto，美国 BD 公司）。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 Mb1-cre×Spi1<sup>fllox/fllox</sup> 基因小鼠的构建及繁育

小鼠 *Spi1* 基因共 5 个外显子，起始密码子 ATG 位于 Exon 1，终止密码子 TGA 位于 Exon 5，选择小鼠 *Spi1* 基因的 Exon 2 作为条件性敲除区域。利用 CRISPR/Cas9 系统设计并合成 sgRNA(gRNA-1:ATGGTTGTACTGAGCATACATGG,gRNA-2:CCAGCACCTTCGGAAGTGGAGG)，构建 Donor 同源重组载体，通过显微注射将 Cas 蛋白，sgRNA 和 Donor 注射到小鼠受精卵中，随后将受精卵移植到假孕母鼠输卵管以获得 F0 代小鼠。通过 PCR 和测序技术从 F0 代中筛选阳性小鼠，将得到的阳性 F0 小鼠与 C57BL/6JCy<sub>a</sub> 小鼠交配获得 Spi1<sup>fllox/fllox</sup> 小鼠，该小鼠与 Mb1-cre 转基因小鼠杂交，通过子代自交获得 Spi1 在 B 细胞条件性基因敲除（Mb1-cre×Spi1<sup>fllox/fllox</sup>）的小鼠，构建策略示意图见图 1。

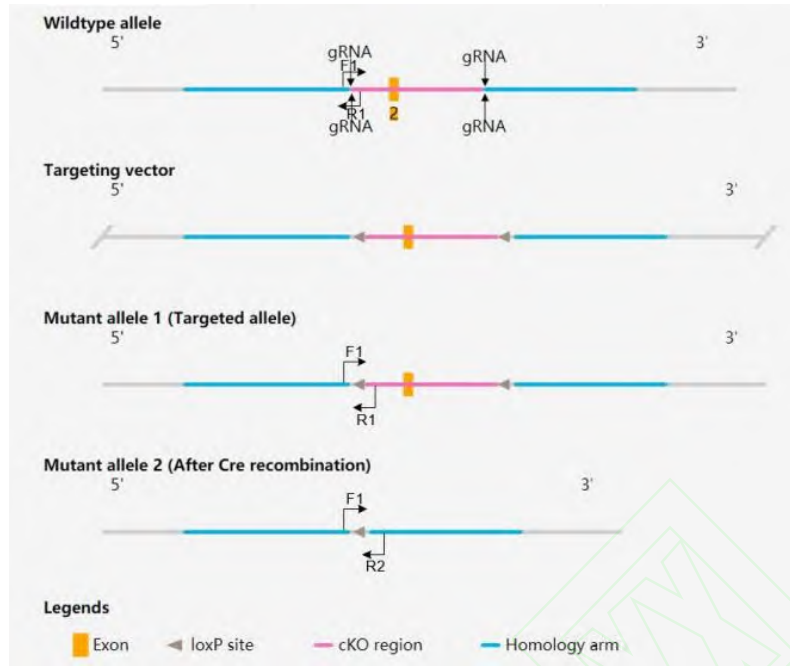


图 1 Mb1-cre×Spi1<sup>flox/flox</sup>小鼠构建策略示意图

Fig.1 Schematic diagram of the construction strategy of Mb1-cre×Spi1<sup>flox/flox</sup> mouse

#### 1.4.2 Mb1-cre×Spi1<sup>flox/flox</sup>小鼠基因鉴定

剪取 3~5 mm 鼠尾至 1.5 mL EP 管中,加 50  $\mu$ L 裂解液处理[25 mmol/L NaOH, 0.2 mmol/L EDTA (pH=8.0)], 置于 95  $^{\circ}$ C 电热恒温水箱中煮 30 min, 冷却后加入 50  $\mu$ L B 液[4 mmol/L Tris-Hcl 缓冲液 (pH=8.0)], 涡旋混合均匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 按照逆转录试剂盒要求进一步扩增 cDNA, Spi1<sup>flox/flox</sup> 和 Mb1-cre×Spi1<sup>flox/flox</sup> 小鼠基因鉴定引物序列详见表 1。PCR 扩增反应结束后, 进行琼脂糖凝胶电泳: 取 2.4 g 琼脂糖, 将其溶于 120 mL 1  $\times$  TAE 并倒入锥形瓶, 置于微波炉中, 加热至沸腾 3 次。待稍微冷却后, 添加 16  $\mu$ L 核酸染料, 摇匀后倒入模具。待凝胶凝固, 取 10  $\mu$ L PCR 扩增产物与 5  $\mu$ L DNA Marker 进行上样电泳。电泳条件: 120 V, 40 min, 结束后至 Tanon 1600 全自动凝胶图像分析系统, 进一步观察凝胶图像<sup>[12-13]</sup>。

表 1 PCR 扩增反应引物序列

Tab 1 Primer sequences for PCR amplification reactions

Gene name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
-----------	------------------	-----------

<i>flox</i>	F: GTGTGGACATGTGAGAGTGAGTCT R: TCTCTTATTATCCACTGCACCGTT	220
<i>Mb1-cre</i>	F: GAATAGGAACCTTCGGAATAGGAAC R: TATCTAGCAAGAAGACTACCTGGGAAC	383

### 1.4.3 小鼠免疫细胞分离

#### 1.4.3.1 分离小鼠骨髓来源单个核细胞 (bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)

采用颈椎脱臼法处死小鼠，将小鼠浸泡于 75%乙醇中 5 min，小心剥离小鼠腿部肌肉，取下股骨和胫骨，使用 0.9%氯化钠溶液将骨髓冲洗至 15 mL 离心管中，用 70  $\mu$ m 过滤筛网去除组织碎片，1 500 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入 1 mL 红细胞裂解液，避光静置 5 min，之后以 1 500 r/min 的转速离心 5 min，弃上清液即可获得 BM-MNCs<sup>[13]</sup>。

#### 1.4.3.2 分离小鼠外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)

左手抓取小鼠双耳及颈后部皮肤以此来固定住小鼠，右手使用剪刀剪去小鼠胡须后，轻压取血侧眼部皮肤，使眼球充血突起，用弯头镊夹快速摘取眼球，使血液从眼眶内垂直流入 1.5 mL 离心管中，当血液流尽后，采用脱臼法处死小鼠，把小鼠血样转移到 15 mL 离心管里，添加等量 PBS 混匀，再取 15 mL 离心管加入等量小鼠淋巴分离液，将稀释后的血样沿着离心管内壁缓缓加入，以 800 r/min 的速度离心 30 min，中间白膜层细胞即为 PBMC<sup>[13]</sup>。

#### 1.4.3.3 分离小鼠脾脏来源淋巴细胞

小鼠经颈椎脱臼处死后，放入稀释后的苯扎溴铵中浸泡 5 min，在无菌条件下取出脾脏，用冷的 PBS 清洗后，转移到培养皿里，添加适量的鼠淋巴细胞分离液进行研磨，研磨后的细胞悬液过滤至离心管内，在液面覆盖 1 mL 完全培养基，离心后吸取中间层淋巴细胞，经洗涤和离心，即可获得脾脏总淋巴细胞。

### 1.4.4 流式细胞术检测 Mb1-cre $\times$ Spi1<sup>flox/flox</sup> 小鼠体内 PU.1 的表达

将“1.4.3 项”中提取的 BM-MNCs、PBMC 和脾脏来源 T 淋巴细胞分别移至 1.5 mL 离心管中，分成 Spi1<sup>flox/flox</sup> 和 Mb1-cre $\times$ Spi1<sup>flox/flox</sup> 组，2 000 r/min 离心 5 min，两组细胞经固定破膜后，加入相应体积的 CD19、CD4、F4/80 和 PU.1 流式抗体，4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min

后, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用适量 PBS 重悬后, 利用纱网过滤转移至流式管中, 利用 BD 流式分选和十色流式细胞仪进行分析。

## 1.5 统计学处理

采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行数据分析及图表的制作, 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较使用独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Mb1-cre $\times$ Spi1<sup>flox/flox</sup> 小鼠基因型鉴定结果

B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因小鼠的基因型鉴定结果见图 2A、2B, 可见编号 1~8 号在 flox 扩增产物 220 bp 处有阳性条带, Cre 扩增产物在 383 bp 处没有条带, 为 Spi1<sup>flox/flox</sup> 基因型小鼠; 而编号 9~20 号在 flox 扩增产物 220 bp 处有阳性条带, Cre 扩增产物在 383 bp 处有阳性条带, 此结果表明在 220 bp 和 383 bp 两处均有阳性条带的为 B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因的小鼠。以上结果说明 B 细胞条件性敲除 *Spi1* 基因 (Mb1-cre $\times$ Spi1<sup>flox/flox</sup>) 小鼠构建成功。

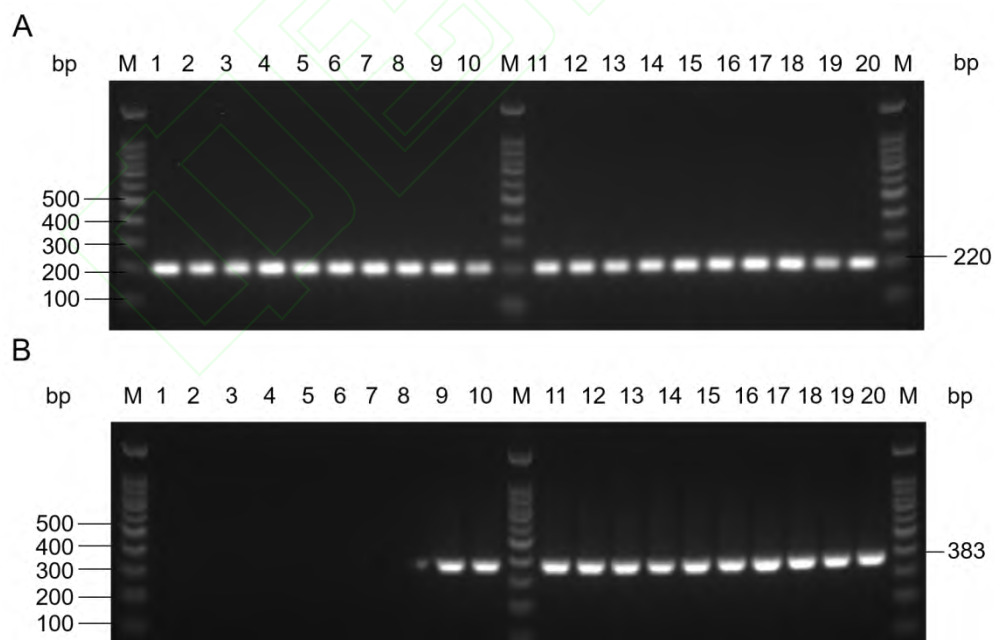


图 2 Mb1-cre $\times$ Spi1<sup>flox/flox</sup> 小鼠基因鉴定结果

Fig.2 Gene identification results of Mb1-cre $\times$ Spi1<sup>flox/flox</sup> mouse

注: A: Results of gel electrophoresis identification of mice expressing  $Spi1^{lox/lox}$  genotypes; B: Results of gel electrophoresis identification of mice expressing Mb1-cre genotypes; 1-20: mouse number; M: DNA Marker.

## 2.2 Mb1-cre $\times$ $Spi1^{lox/lox}$ 小鼠体内不同免疫细胞来源的 B 细胞中 PU.1 表达情况

为验证 PCR 鉴定结果, 本实验采用流式细胞术方法检测了  $Spi1^{lox/lox}$  和 Mb1-cre $\times$  $Spi1^{lox/lox}$  小鼠 BM-MNCs、PBMC 和脾脏来源的 B 细胞中 PU.1 的表达。结果显示,  $Spi1^{lox/lox}$  小鼠 B 细胞中正常表达 PU.1 蛋白, 而在 Mb1-cre $\times$  $Spi1^{lox/lox}$  小鼠多种来源的 B 细胞中几乎无 PU.1 的表达, 与 PCR 鉴定结果吻合 (图 3A、图 4A 和图 5A)。此外为了验证 PU.1 只在小鼠 B 细胞中特异性敲除, 而在其他免疫细胞如 CD4<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞中正常表达, 本研究使用了流式细胞术继续检测了  $Spi1^{lox/lox}$  和 Mb1-cre $\times$  $Spi1^{lox/lox}$  小鼠 BM-MNCs 来源的巨噬细胞中 PU.1 的表达以及 PBMC 和脾脏来源的 CD4<sup>+</sup>T 细胞中 PU.1 的表达, 结果表明  $Spi1^{lox/lox}$  和 Mb1-cre $\times$  $Spi1^{lox/lox}$  2 种小鼠体内 CD4<sup>+</sup>T 和巨噬细胞中 PU.1 的表达并无明显变化, 进一步证实了 PU.1 只在小鼠 B 细胞中特异性敲除 (图 3B、图 4B 和图 5B)。以上结果证明 Mb1-cre $\times$  $Spi1^{lox/lox}$  小鼠模型的构建成功, 为后续研究 PU.1 的相关作用机制提供了可靠的实验动物模型。

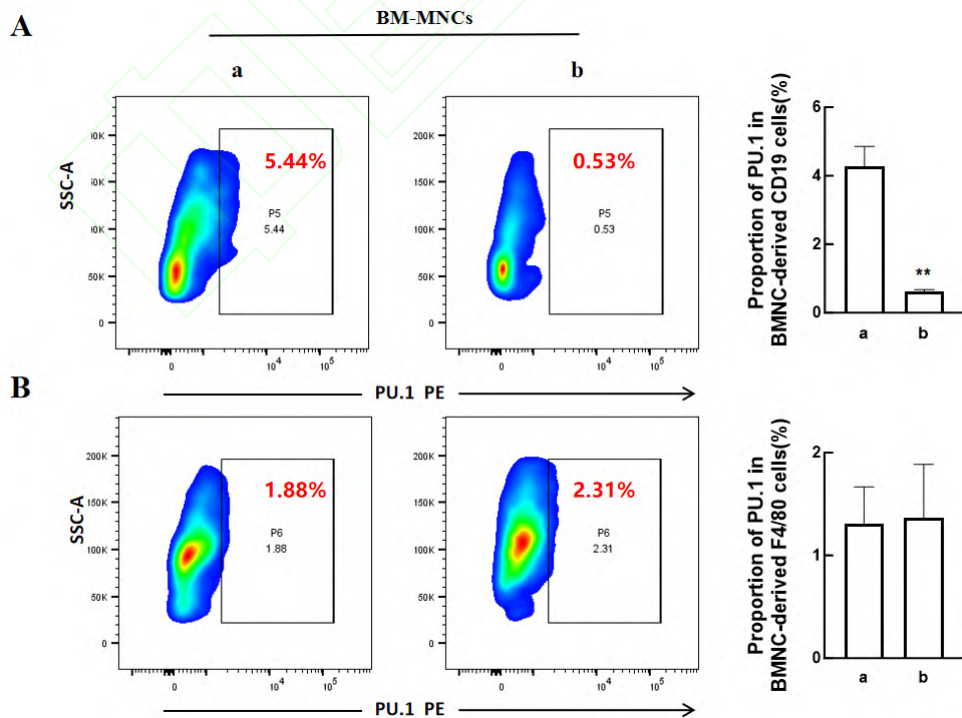


图 3  $Spi1^{flx/flx}$  和  $Mb1-cre \times Spi1^{flx/flx}$  小鼠 BM-MNCs 来源的 B 细胞和巨噬细胞中 PU.1 的表达水平

Fig. 3 Expression levels of PU.1 in BM-MNCs-derived B cells and macrophages from  $Spi1^{flx/flx}$  and  $Mb1-cre \times Spi1^{flx/flx}$  mice

注: A: PU.1 expression in BM-MNCs-derived B cells; B: PU.1 expression in BM-MNCs-derived macrophage cells; \*\* $P < 0.01$  vs  $Spi1^{flx/flx}$  mice; a:  $Spi1^{flx/flx}$  mice; b:  $Mb1-cre \times Spi1^{flx/flx}$  mice.

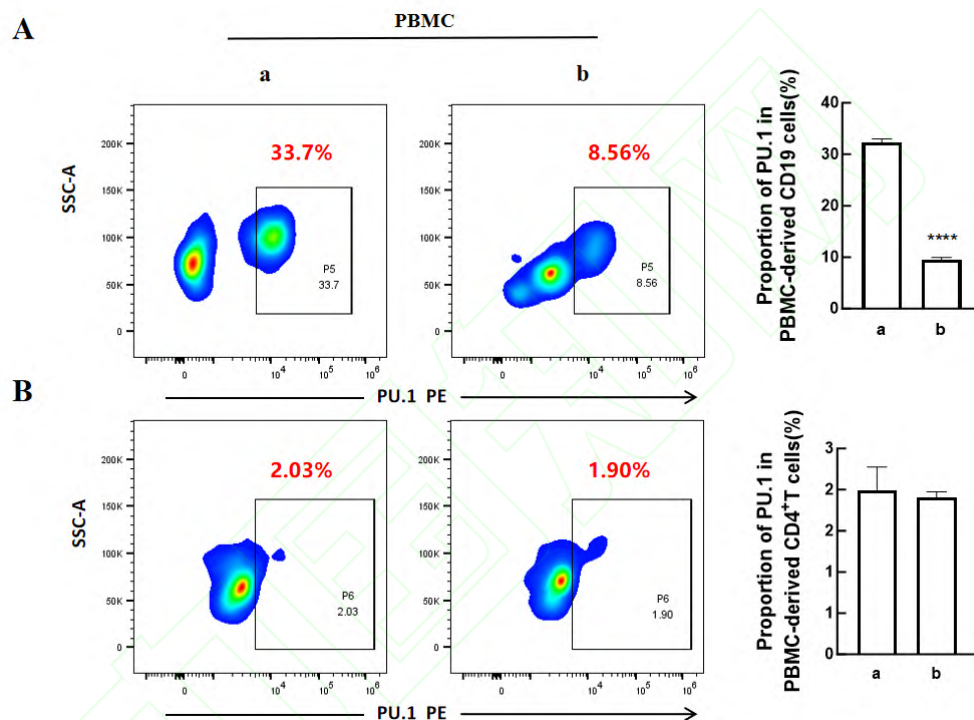


图 4  $Spi1^{flx/flx}$  和  $Mb1-cre \times Spi1^{flx/flx}$  小鼠 PBMC 来源的 B 细胞和  $CD4^+T$  细胞中 PU.1 的表达水平

Fig. 4 Expression levels of PU.1 in PBMC-derived B cells and  $CD4^+T$  cells from  $Spi1^{flx/flx}$  and  $Mb1-cre \times Spi1^{flx/flx}$  mice

注: A: PU.1 expression in PBMC-derived B cells; B: PU.1 expression in PBMC-derived  $CD4^+T$  cells; \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs  $Spi1^{flx/flx}$  mice; a:  $Spi1^{flx/flx}$  mice; b:  $Mb1-cre \times Spi1^{flx/flx}$  mice.

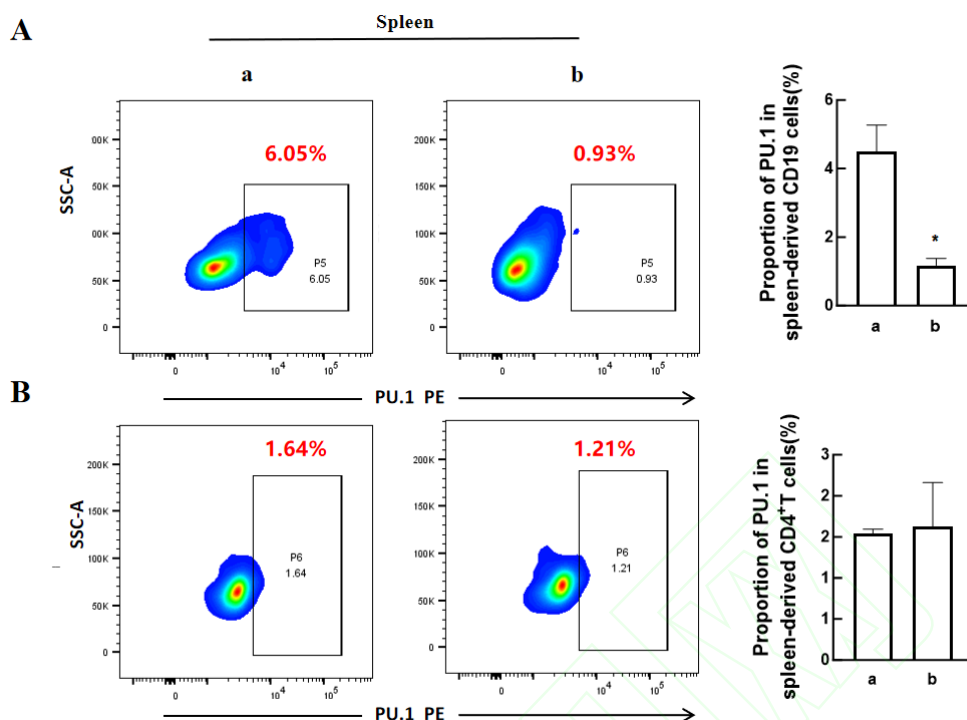


图 5  $Spi1^{flox/flox}$  和  $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  小鼠脾脏来源的 B 细胞和  $CD4^+T$  细胞中 PU.1 的表达水平

Fig. 5 Expression levels of PU.1 in spleen-derived B cells and  $CD4^+T$  cells from  $Spi1^{flox/flox}$  and  $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  mice

注：A: PU.1 expression in spleen-derived B cells; B: PU.1 expression in spleen-derived  $CD4^+T$  cells; \* $P < 0.05$  vs  $Spi1^{flox/flox}$  mice; a:  $Spi1^{flox/flox}$  mice; b:  $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  mice.

### 2.3 $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$ 小鼠体内 B 细胞分型变化情况

由于 PU.1 在 B 细胞早期发育中的关键作用，其敲除可能会导致初始 B 细胞生成受阻，为探索 B 细胞内敲除 PU.1 对 B 细胞自身发育有无影响，本实验采用流式细胞术方法检测了  $Spi1^{flox/flox}$  和  $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  小鼠脾脏与淋巴结来源的 B 细胞中，各 B 细胞亚型的数量变化情况。结果显示，与  $Spi1^{flox/flox}$  小鼠相比， $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  小鼠体内多种分型 B 细胞的占比均有不同程度变化，包括总 B 细胞 (total B cell) 和未成熟 B 细胞 (immature B cell) 数量在脾脏 (spleen) 及淋巴结 (lymph node) 中减少，而调节 B 细胞 (Breg) 在脾脏中增多等。见图 6。以上结果提示，B 细胞中特异性敲除 PU.1 可能会对 B 细胞的发育造成影响，进一步证实了 PU.1 在 B 细胞发育中的重要性。

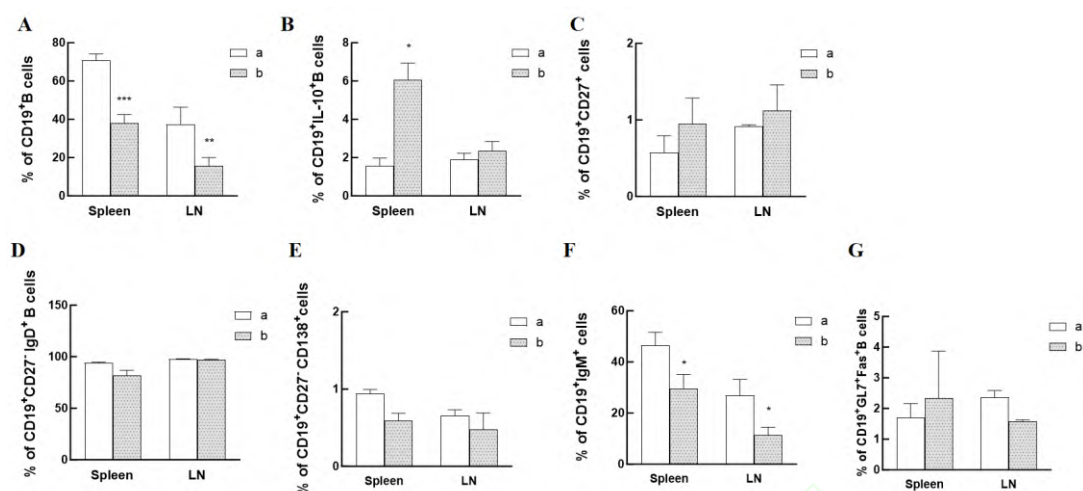


图 6  $Spi1^{flox/flox}$  和  $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  小鼠脾脏与淋巴结来源的 B 细胞中各 B 细胞亚型的数量变化情况

Fig. 6 The quantitative changes of various B cell subsets derived from the spleen and lymph nodes in  $Spi1^{flox/flox}$  mice and  $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  mice

注：A: Total B cells; B: Breg B cells; C: Memory B cells; D: Naive B cells; E: Plasma cells; F: Immature B cells; G: Germinal center B cells; a:  $Spi1^{flox/flox}$  mice; b:  $Mb1-cre \times Spi1^{flox/flox}$  mice;

\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs  $Spi1^{flox/flox}$  mice.

### 3 讨论

CRISPR/Cas9 作为当下热门的基因编辑工具之一，CRISPR 相关基因编辑技术已在动物模型构建等领域得到了广泛应用，借助该技术，能够实现对哺乳动物基因组的精准改变与修饰<sup>[14-15]</sup>。其作用机制如下：在单链向导 RNA 的精准引导下，Cas9 蛋白能够被特异性地定位到靠近宿主间隔序列的特定基因位点，并在该位点造成 DNA 双链的断裂。若此时存在外源的 DNA 模板，细胞便会启动同源定向修复机制，进而实现新的基因重组。相反，若无外源模板的参与，细胞则会通过非同源末端连接途径对断裂的 DNA 进行修复，这一过程往往会在靶位点引发 DNA 片段的缺失、插入或编码突变<sup>[16]</sup>。

PU.1 由原癌基因 *Spi1* 编码，作为 E26 转化特异性家族的转录因子，其异常表达在急性髓系白血病中得到了广泛研究<sup>[17]</sup>，此外，该基因对淋巴细胞和骨髓细胞系的发育至关重要，其表达水平直接影响造血干细胞的分化类型<sup>[1]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明，PU.1 参与多种自身免疫疾病的

发展过程，并在其中发挥不同作用，例如 PU.1 在 RA 的单核细胞、巨噬细胞和 Th9 细胞中起促炎因子的作用，与此相反的是 PU.1 在 RA -B 细胞和成纤维样滑膜细胞中作为一种抗炎转录因子。此外，PU.1 还可以通过调节中性粒细胞的炎性表观基因组来抑制中性粒细胞的激活<sup>[18]</sup>。鉴于 PU.1 在生理及病理状态时对多种免疫细胞具有重要调节作用，本研究推断 PU.1 或许在 RA 中发挥重要作用，课题组前期通过构建 PU.1 基因敲除小鼠来建立了 CAIA 模型，并首次证明 PU.1 在体内表现出促炎作用，更重要的是，PU.1 的小分子抑制剂可以显著抑制 CAIA 小鼠的关节炎症状<sup>[9]</sup>。这些结果表明，PU.1 可能在 RA 中充当促炎转录因子，并且是潜在的 RA 治疗靶点。

然而，目前尚无研究报道在体内特异性敲除 B 细胞中的 PU.1 对 RA 发展的影响。基于此，为深入探究 PU.1 在 RA 中 B 细胞的作用机制，本研究利用 CRISPR 基因编辑技术引入了 B 细胞特异性敲除 PU.1 基因的小鼠模型，并严格按照 SPF 级标准进行精心饲养与繁育。采用高效且可重复的琼脂糖凝胶电泳技术，对小鼠进行基因型鉴定，以确保实验的准确性，这不仅为深入解析 PU.1 在多种自身免疫疾病和癌症中的相关机制奠定了坚实的模型基础，也对整体研究进程具有重要推动作用。

PU.1 作为关键转录因子在共同淋巴祖细胞向祖 B 细胞分化中起分子开关作用，通过激活 Ebf1/Pax5 基因驱动 B 细胞谱系特异性基因表达<sup>[19]</sup>。在前 B 细胞阶段，PU.1 维持 pre-BCR 信号基因 (Iga/CD79a、Igb/CD79b) 表达，确保轻链重排及向未成熟 B 细胞的过渡。终末分化阶段，PU.1 通过表观遗传调控 Blimp-1 (Prdm1) /Xbp1 构建浆细胞转录网络，并协同调控内质网折叠酶(如 Pdia4)优化抗体分泌。此外，PU.1 通过修饰 BCR 信号组件(SYK/BLNK)染色质可及性调控活化阈值，并诱导 MHC II 共激活因子表达增强抗原呈递功能，衔接固有与适应性免疫。这些多层次的调控作用共同确立了 PU.1 在 B 细胞发育、分化及功能执行中的核心枢纽地位<sup>[20]</sup>。本研究使用的 Mb1-cre x Spi1<sup>fllox/fllox</sup> 模型中，Mb1 (Cd79a) 是 B 细胞前体及成熟 B 细胞中高表达的基因，其启动子驱动的 Cre 重组酶可高效删除 Spi1<sup>fllox/fllox</sup> 等位基因，敲除范围从祖 B 细胞阶段开始，覆盖整个 B 细胞发育过程 (Pre-B、Immature B、Mature B)，直至浆细胞和记忆 B 细胞<sup>[21]</sup>。通过该模型，可深入研究 PU.1 与 B 细胞的相互作用，为 B 细胞相关疾病 (如白血病、自身免疫疾病) 的精准治疗提供理论依据和新靶点。

此外，本实验结果表明，PU.1 敲除会影响总 B 细胞、非成熟 B 细胞及调节性 B 细胞的生成。调节性 B 细胞的主要功能是识别抗原后活化。这一发现进一步验证了 PU.1 在 B 细胞发育中的关键作用，不仅深化了对 B 细胞发育调控机制的理解，还为相关疾病研究提供了

新的思路。但本实验仅关注了 B 细胞数量的变化，未来研究可进一步从具体的细胞功能层面展开，例抗原呈递功能等。同时，深入探讨 PU.1 调控 B 细胞发育的具体分子机制，将有助于更全面地理解 B 细胞发育过程，为相关疾病的防治奠定更坚实的理论基础。

目前尚缺乏体内证据阐明 B 细胞特异性 PU.1 缺失对例如 RA 等自身免疫性疾病的病理进程的调控作用。基于此，本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 B 细胞条件性 PU.1 敲除小鼠模型，并严格按照无特定病原体标准进行标准化饲养与繁育。通过优化琼脂糖凝胶电泳技术体系，建立了高效、可重复的基因型鉴定方法，确保模型构建的准确性。该模型的建立不仅为深入探究 PU.1 在自身免疫疾病、肿瘤等重大疾病发生中的分子机制提供了关键技术平台，更为后续研究提供了可靠的动物模型支撑，对加速相关领域机制解析与转化应用具有重要推动价值。

## 参考文献

- [1] Turkistany S A, DeKoter R P. The transcription factor PU.1 is a critical regulator of cellular communication in the immune system[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2011, 59(6): 431-40. doi:10.1007/s00005-011-0147-9.
- [2] Li G, Hao W, Hu W. Transcription factor PU.1 and immune cell differentiation (Review)[J]. Int J Mol Med, 2020, 46(6): 1943-50. doi:10.3892/ijmm.2020.4763.
- [3] Klemsz M J, Maki R A. Activation of transcription by PU.1 requires both acidic and glutamine domains[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(1): 390-7. doi:10.1128/mcb.16.1.390.
- [4] DeKoter R P, Singh H. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1[J]. Science, 2000, 288(5470): 1439-41. doi:10.1126/science.288.5470.1439.
- [5] Burda P, Laslo P, Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis[J]. Leukemia, 2010, 24(7): 1249-57. doi:10.1038/leu.2010.104.
- [6] Xiang N, Fang X, Sun X G, et al. Expression profile of PU.1 in CD4<sup>+</sup>T cells from patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Med, 2021, 21(4): 621-32. doi:10.1007/s10238-021-00717-9.
- [7] Xie Z, Qu Y, Shen P, et al. PU.1 attenuates TNF- $\alpha$ -induced proliferation and cytokine release of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by regulating miR-155 activity[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 8349-56. doi:10.3892/mmr.2018.8920.
- [8] Fang Y, Chen W, Li Z, et al. The role of a key transcription factor PU.1 in autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1001201. doi:10.3389/fimmu.2022.1001201.
- [9] Tu J, Chen W, Fang Y, et al. PU.1 promotes development of rheumatoid arthritis *via* repressing FLT3 in macrophages and fibroblast-like synoviocytes[J]. Ann Rheum Dis, 2023, 82(2): 198-211. doi:10.1136/ard-2022-222708.
- [10] Tu J, Chen W, Huang W, et al. Positive feedback loop PU.1-IL9 in Th9 promotes rheumatoid arthritis development[J]. Ann Rheum Dis, 2024, 83(12): 1707-21. doi:10.1136/ard-2024-226067.

[11] Wang H, Jain S, Li P, et al. Transcription factors IRF8 and PU.1 are required for follicular B cell development and BCL6-driven germinal center responses[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(19): 9511-20. doi:10.1073/pnas.1901258116.

[12] 王卉卉, 朱向玲, 吴旭铭, 等. T 细胞条件性敲除 Spi1 基因小鼠的繁育及鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59 (4): 595-9. doi.org/10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.018.

Wang H H, Zhu X L, Wu X M, et al. Breeding and genotyping of T lymphocyte-conditional Spi1 knockout mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(4): 595-9. doi.org/10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.018.

[13] 张慧茹, 王安琪, 刘 崇, 等. CCR2 基因敲除小鼠的构建及基因型鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60 (7): 1167-72. doi.org/10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.016.

Zhang H R, Wang A Q, Liu C, et al. Breeding and genotype identification of CCR2 knockout mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2025, 60(7): 1167-72. doi.org/10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.016.

[14] Komor A C, Badran A H, Liu D R. CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 20-36. doi:10.1016/j.cell.2016.10.044.

[15] Li T, Yang Y, Qi H, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects[J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8: 36. doi:10.1038/s41392-023-01309-7.

[16] Mali P, Esvelt K M, Church G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology[J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-63. doi:10.1038/nmeth.2649.

[17] Ueno N, Nishimura N, Ueno S, et al. PU.1 acts as tumor suppressor for myeloma cells through direct transcriptional repression of IRF4[J]. *Oncogene*, 2017, 36(31): 4481-97. doi:10.1038/onc.2017.79.

[18] Fontana M F, Baccarella A, Pancholi N, et al. JUNB is a key transcriptional modulator of macrophage activation[J]. *J Immunol*, 2015, 194(1): 177-86. doi:10.4049/jimmunol.1401595.

[19] Northrup D L, Allman D. Transcriptional regulation of early B cell development[J]. *Immunol Res*, 2008, 42(1): 106-17. doi:10.1007/s12026-008-8043-z.

[20] Desai S, Bolick S C E, Maurin M, et al. PU.1 regulates positive regulatory domain I-binding factor 1/blimp-1 transcription in lymphoma cells[J]. *J Immunol*, 2009, 183(9): 5778-87. doi:10.4049/jimmunol.0901120.

[21] Sasaki Y, Derudder E, Hobeika E, et al. Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation[J]. *Immunity*, 2006, 24(6): 729-39. doi:10.1016/j.immuni.2006.04.005.

