

淋巴管内皮细胞表达 Cre^{ERT2} 重组酶基因敲入小鼠的制备与分析

权梦雪¹, 郑雅婷¹, 王博², 徐蓓蓓¹, 曹旭东¹, 何玉龙¹

(1. 苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏省高校血液学协同创新中心, 放射医学与辐射防护国家重点实验室, 剑桥-苏大基因组资源中心, 江苏苏州 215123;

2. 南京大学模式动物研究所, 南京 210061)

摘要: 目的: 除胚胎发育早期外, VEGFR3 主要在淋巴管内皮细胞中表达。为研究淋巴管生长调控与相关的功能机制, 本研究利用 Vegfr3 启动子制备在淋巴管表达可诱导 Cre 重组酶的小鼠品系。方法: 利用基因敲入方法在 Vegfr3 基因的终止密码子后插入 IRES-CreERT2, 制备 Vegfr3-IRES-CreERT2 转基因小鼠品系, 结合 Rosa26-mTmG 报告基因小鼠, 繁育 Vegfr3-IRES-CreERT2; Rosa26-mTmG 双转基因小鼠模型, 分析胚胎期和成年阶段小鼠 CreERT2 重组酶在不同组织的表达分布。结果: 研究发现在 Vegfr3 基因位点插入 IRES-CreERT2 的转基因小鼠其存活与生长发育正常。利用 Vegfr3-IRES-CreERT2; Rosa26-mTmG 小鼠进行的分析表明, 在胚胎期小鼠肺、皮肤、肠系膜和心脏等组织中, EGFP 报告基因主要在淋巴管表达, 散在的 EGFP 信号提示 CreERT2 重组酶在表达 VEGFR3 的部分血管内皮细胞与血液细胞中也有表达; 在成年小鼠耳部皮肤、气管和隔膜的淋巴管及其瓣膜中都高表达 EGFP, 进一步证实 CreERT2 重组酶在淋巴管表达的相对特异性。结论: 本研究成功制备可在淋巴管表达 CreERT2 重组酶的转基因小鼠品系, 为开展淋巴管相关研究提供了有效的工具。

关键词: 血管内皮细胞生长因子受体-3 (VEGFR3); 淋巴管; CreERT2 重组酶; 基因敲入; 诱导基因敲除

中图分类号: Q955

Generation and characterization of a knock-in mouse model with lymphatic expression of Cre^{ERT2} recombinase

Quan Mengxue¹, ZHENG Yating¹, WANG Bo², XU Beibei¹, CAO Xudong¹, HE Yulong¹

(1. Cyrus Tang Hematology Center, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Hematology, State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, CAM-SU Genomic Resource Center, Soochow University, Suzhou, 215123, Jiangsu;

2. Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing, 210061)

Abstract: Objective: VEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3) is mainly expressed in lymphatic endothelial cells except at early embryonic stages. To investigate mechanisms underlying lymphatic formation and function, we have generated a transgenic mouse line with the lymphatic expression of inducible Cre recombinase under the control of VEGFR3 promoter. Methods: In this study, the Vegfr3-IRES-CreERT2 transgenic mouse line was established using gene knock-in strategy with the IRES-CreERT2 inserted immediately after the stop codon of Vegfr3 gene. Vegfr3-IRES-CreERT2 mice were crossed with Rosa26-mTmG transgenic reporter mice to generate the Vegfr3-IRES-CreERT2;Rosa26-mTmG doubly transgenic mice. The expression of CreERT2 recombinase was analysed in various tissues at both embryonic and postnatal stages. Results: We found that Vegfr3-IRES-CreERT2 transgenic mice survived and grew normally. Expression analysis revealed that EGFP signals were mainly detected in lymphatic endothelial cells of lung, abdominal skin, mesentery and heart of Vegfr3-IRES-CreERT2;Rosa26-mTmG mice during embryonic development. There were some

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31970768, 81770489, 91739304); 科技部资助项目 (YFA0801100); 江苏省高校自然科学基金重点项目 (18KJA180012); 江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD) 的资助。

作者简介: 权梦雪 (1994-), 女, 硕士, 血管与淋巴管生物学

通信联系人: 何玉龙 (1967-), 男, 教授、博导, 血管与淋巴管生物学. E-mail: heyulong@suda.edu.cn

scattered EGFP signals, indicating that CreERT2 recombinase was also expressed in a small proportion of VEGFR3 positive blood vascular endothelial cells and hematopoietic cells. At postnatal stages, we found that high expression of EGFP could be detected mainly in lymphatic vessels as well as lymphatic valves of all the tissues examined, including ear skin, trachea and diaphragm, further validating the relative specificity of CreERT2 recombinase expression in lymphatic endothelial cells. Conclusion: We have successfully generated a transgenic mouse line (Vegfr3-IRES-CreERT2) with the expression of CreERT2 recombinase in lymphatic vessels, which provides a powerful tool for lymphatic related research.

Key words: Vascular endothelial growth factor receptor 3(VEGFR3); Lymphatic vessel; CreERT2 recombinase; Gene knock-in; Inducible gene knockout

0 引言

淋巴管系统不仅对胚胎发育和维持健康至关重要,还参与许多病理发展,如癌症、淋巴水肿等^[1],目前对淋巴管生成调控及其在相关疾病的病理机制仍了解较少,因此需要更有效的工具进行深入研究。目前靶向淋巴管系统的 Cre 重组酶转基因小鼠分为两类,一类是从妊娠开始就在淋巴管表达 Cre 重组酶的转基因鼠,有 *Lyve-1-EGFP-Cre* 和 *Podoplanin-Cre* 两种。*Lyve-1-EGFP-Cre* 转基因小鼠超过 90% 的淋巴管内皮细胞表达 *Lyve-1-Cre* 重组酶,但在其他细胞(包括巨噬细胞、肝和脾窦状血管内皮细胞等)也有表达^[2,3]。*Podoplanin-Cre* 转基因小鼠^[4]的 Cre 重组酶也在淋巴管内皮细胞表达,但其在淋巴结和次级淋巴组织的基质细胞中也有表达。另外,上述两种转基因小鼠也不能在胚胎期或出生后特定发育阶段开展基因敲除研究。另一类是能够在时间和空间上控制 Cre 重组酶 (Cre^{ERT2}) 在淋巴管表达的转基因鼠^[5]。值得指出的是,在本研究开始制备 *Vegfr3-Cre^{ERT2}* 转基因工具鼠时,应用淋巴管系统研究的可诱导的条件性敲除转基因工具鼠仅有 *Prox1-Cre^{ERT2}* 一种^[6]。PROX1 (Prospero-related homeobox 1) 是一种同源转录因子,除在淋巴管内皮细胞表达外,PROX1 在中枢神经系统、视网膜、心脏等组织中均有表达^[7]。由于其表达广泛,限制了利用 *Prox1-Cre^{ERT2}* 小鼠开展细胞特异性基因敲除研究。

受体酪氨酸激酶血管内皮生长因子受体 3 (Vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR3) 在淋巴管新生过程中发挥重要作用^[8,9]。在小鼠胚胎发育早期 VEGFR3 在血管内皮细胞表达,在胚胎发育的中后期其主要表达于淋巴管,在血管内皮细胞中的表达下降^[10,11]。另外有研究报道,VEGFR3 在新生血管^[12]以及窦状血管^[13]中表达,同时在单核细胞和巨噬细胞^[14]中也有表达,但仅限于这些细胞的少数亚群。因此, *Vegfr3* 是具有淋巴管相对特异性表达的基因之一,可利用其启动子制备在淋巴管表达 Cre 重组酶的小鼠品系。

为了不影响 VEGFR3 内源性表达,本研究采用基因敲入的方法,在 *Vegfr3* 终止密码子后插入内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 和 Cre^{ERT2} , IRES 元件允许上游内源性 *Vegfr3* 启动子驱动 Cre^{ERT2} 转录,且 Cre^{ERT2} 基因的插入不影响上游 *Vegfr3* 表达^[15,16],从而构建由 *Vegfr3* 启动子驱动的 Cre^{ERT2} 工具鼠(即 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}*)。利用纯合的 *Rosa26-mTmG* 基因报告小鼠与 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠交配获得 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 双转基因小鼠,利用他莫昔芬诱导 Cre^{ERT2} 的活性,结合免疫荧光分析方法,研究 Cre^{ERT2} 重组酶在胚胎期和成年阶段小鼠组织中的重组效率。

85

1 材料与方法

1.1 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 基因敲入小鼠制备

90

本文中所涉及的实验动物均在苏州大学 SPF 级动物房饲养, 并且动物实验均符合苏州大学实验动物管理规定。*Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠的制备由本课题组在南京大学模式动物研究所完成(国家遗传工程小鼠资源库), 其模型构建策略如图 1 所示: 利用同源重组的方法在 *Vegfr3* 第 30 个外显子 (Exon30) 的终止密码子 TAA 前插入 *His6* 序列、以及在其终止密码子后插入以下元件: 内部核糖体进入位点 (IRES)、*Cre^{ERT2}* 重组酶、*Frt* 位点和标记基因 *Neo* (新霉素磷酸转移酶)。靶向载体利用 Not I 内切酶线性化后, 通过电转胚胎干细胞 (Embryonic Stem Cells, ES 细胞), 并筛选出抗 G418 阳性的 ES 细胞, 将 ES 细胞进行显微囊胚注射, 囊胚植入假孕的母鼠子宫, 从而获得在生殖细胞带有目的基因的 F0 代嵌合体小鼠。*Rosa26-mTmG* 小鼠 (Stock No. 007676) 来自于美国杰克逊实验室^[17]。

95

1.2 基因型鉴定

100

本研究所涉及小鼠的基因型通过剪取小鼠脚趾或尾巴进行聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 确定。(1) *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 工具鼠鉴定引物序列为 *Cre500*: Forward: 5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGC-3'; Reverse: 5'-CAGGGTGTTATAAGCAATCCC-3', 出现 500bp 大小的条带代表 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠。(2) *Rosa26-mTmG* 工具鼠所用的引物为 WT (条带为 330bp) 和 mut (条带为 250bp)。WT: Forward: 5'-CACTGATCAAAACCCATAACTAC-3'; Reverse: 5'-GATGTGGAAACCACTGTGGC-3', 只有 330bp 大小的条带代表野生型。mut: Forward: 5'-CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT-3'; Reverse: 5'-TCAATGGGCGGGG GTCGTT-3', 出现一条 250bp 大小的条带或只有 250bp 大小的条带代表 *Rosa26-mTmG* 工具鼠。

105

1.3 诱导基因敲除和分析方案

110

诱导 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}*; *Rosa26-mTmG* 小鼠敲除策略分为胚胎和成年两个阶段: 胚胎期第一个分析时间点为胚胎发育早期即胚胎期 13.5 天 (Embryonic day 13.5, E13.5), 从 E11.5 至 E12.5 给孕鼠腹腔注射他莫昔芬 (Tamoxifen, Sigma Aldrich, 2 mg/天); 胚胎期第二个分析时间点为胚胎发育后期即 E18.5, 是从 E13.5-E15.5 连续腹腔给药。对于成年阶段, 诱导敲除方案是从小鼠出生后第 57 天 (Postnatal day 57, P57) 至 P63 连续一周腹腔注射他莫昔芬 (1 mg/天), 在 P77 时进行分析。

1.4 诱导基因敲除和分析方案

115

使用剪刀和镊子小心采集小鼠的左肺、腹部皮肤、肠系膜、心脏、耳朵、气管和隔膜。对于肺组织, 展平后置于 4% 多聚甲醛 (PFA) 溶液中在 4 °C 条件下固定过夜; 对于腹部皮肤, 脱毛后先在 10mM EDTA 溶液中, 4 °C 孵育过夜, 去除角质层, 使用 4% PFA 在 4 °C 条件下固定 2 小时; 对于耳皮肤, 脱毛后使用 4% PFA 在 4 °C 条件下固定过夜, 分离耳廓两侧皮肤, 小心去除中间软骨; 采集小鼠肠系膜和隔膜后, 固定在硅胶板上, 使用 4% PFA 溶液在 4 °C 条件下固定过夜; 对于心脏组织, 轻轻压平后置于 4% PFA 溶液中在 4 °C 条件下固定过夜; 分离得到气管后, 使用 4% PFA 在 4 °C 条件下固定 2 小时。

120

1.5 全组织免疫荧光染色

首先将固定好的组织用 1 x PBS 清洗表面残留的 4 % PFA，再加入含有 3 % (W/V) 脱脂奶粉的 0.3 % PBSTX 封闭液于 4 °C 冷库过夜；倒掉封闭液后加入一抗在 4 °C 冷库的水平摇床上孵育过夜；去掉一抗溶液后，使用 0.3 % PBSTX 溶液漂洗组织 4 次，每次 15 分钟；加入二抗后在 4 °C 冷库的水平摇床上孵育过夜；去掉二抗溶液后，使用 0.3 % PBSTX 溶液漂洗组织 8 次，每次 15 分钟；最后使用 50 % 甘油（溶解于 1 x PBS）封片。使用了以下抗体：Rat-anti-mouse PECAM-1 (BD553370)，Rabbit-anti-mouse LYVE-1 (Abcam, ab14917)，Goat-anti-human PROX1 (R&D, AF2727)，Cy5-donkey-anti-goat (Jackson Immuno Research)，Cy5-donkey-anti-rabbit (Jackson Immuno Research)，405-donkey-anti-rabbit (Jackson Immuno Research) 和 405-donkey-anti-rat (Jackson Immuno Research)。最后，用奥林巴斯激光共聚焦显微镜 FV1000 拍照。

2 结果与分析

2.1 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠模型的制备

本研究利用基因敲入技术制备在淋巴管表达的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠品系，如方法部分介绍，将获得的 F0 代嵌合体小鼠与表达 *FLP* 重组酶的转基因小鼠 (*FlpeR*) 交配，剔除两个 *Frt* 位点之间的标记基因 *Neo*^[18]。采用 PCR 技术扩增 *Cre^{ERT2}* 基因检测子代小鼠，如图 1B 所示，条带大小为 500bp 的样本是 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠。鉴定发现 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠与同窝野生型小鼠的出生比例是 1: 1，符合孟德尔遗传规律，即所有转基因鼠都能存活，而且转基因鼠的生长发育与同窝野生型小鼠相比也无明显差异（数据未展示）。

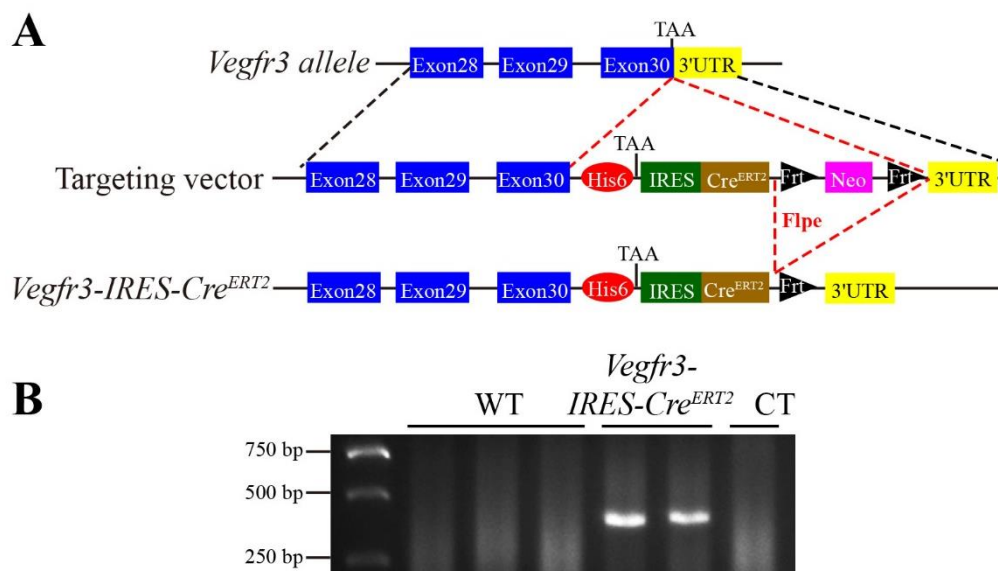


图 1 制备 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠的基因靶向策略示意图与基因型分析

Fig. 1 Schematic diagram of the targeting strategy used for the generation of *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* mouse line and the genotype analysis

A. 首先，在 *Vegfr3* 基因的 Exon30 的终止密码子 TAA 前插入标记基因 *His6*，然后在 TAA 后依次插入 *IRES*-

145 *Cre^{ERT2}*, 2 个 *Frt* 位点, 以及 *Neo* 筛选标记基因, 最后我们利用 *FLP-Frt* 重组系统工作原理, 将 2 个 *Frt* 位点之间的 *Neo* 用 *FLP* 重组酶介导切除。B. *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠基因组 PCR 鉴定结果。WT (Wild type mice): 同窝野生型小鼠, CT (control): 空白对照。

2.2 分析胚胎发育早期 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因小鼠 *Cre^{ERT2}* 重组酶的重组效率

150 *Rosa26* 基因位于小鼠 6 号染色体, 其小鼠的大多数组织甚至胚胎中均广泛表达^[17]。*Rosa26-mTmG* 小鼠是一种双荧光报告基因小鼠^[17], 由 2 个 34bp 的 *Loxp* 位点、终止密码子序列、以及编码红色荧光蛋白 (tdTomato) 和编码绿色荧光蛋白 (EGFP) 的序列组成, 其中 *Loxp* 位点在 *tdTomato* 和终止密码子序列的两侧 (图 2A)。*Rosa26-mTmG* 小鼠组织中表达红色荧光蛋白; 当与表达 *Cre* 重组酶的小鼠交配后, *Cre* 重组酶将切除两个 *Loxp* 位点之间的

155 tdTomato 和终止密码子序列, 于是启动绿色荧光蛋白的表达, 这一技术被广泛应用于分析 *Cre* 重组酶在小鼠组织中的表达分布情况^[17]。本研究将 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因小鼠与 *Rosa26-mTmG* 报告基因小鼠进行交配, 获得 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 双转基因小鼠 (图 2A)。

VEGFR3 最初在胚胎 8.5 天 (Embryonic day 8.5, E8.5) 小鼠的血管内皮细胞中表达,

160 但从 E10.5 至 E11.0 开始, VEGFR3 主要在淋巴管内皮细胞中表达, 在血管内皮细胞中表达降低^[19,20]。为了检测在淋巴管发育早期阶段, *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因小鼠中 *Cre^{ERT2}* 重组酶的重组效率, 我们从 E11.5 至 E12.5 连续 2 天对怀孕的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 母鼠腹腔注射他莫昔芬, 然后采集 E13.5 小鼠的肺组织用 PECAM1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1) 和 PROX1 进行全组织免疫荧光染色分析。PECAM1 是泛内皮细胞标

165 记物, 主要在血管内皮细胞和血液细胞 (如血小板、单核细胞等) 中表达^[21]。PROX1 是静脉内皮细胞分化为淋巴管内皮细胞的命运决定因子, 可作为淋巴管内皮细胞的标志物^[22]。实验结果显示, 肺部 PROX1 阳性的淋巴管内皮细胞与绝大部分的 EGFP 报告基因表达相重叠 (图 2B), 说明 *Vegfr3* 启动子驱动的 *Cre^{ERT2}* 主要在淋巴管内皮细胞上表达。另外, 在肺部也观察到散在的 EGFP 阳性 PROX1 阴性细胞, 这部分细胞可能是表达 VEGFR3 的血管内皮

170 细胞或血液细胞。

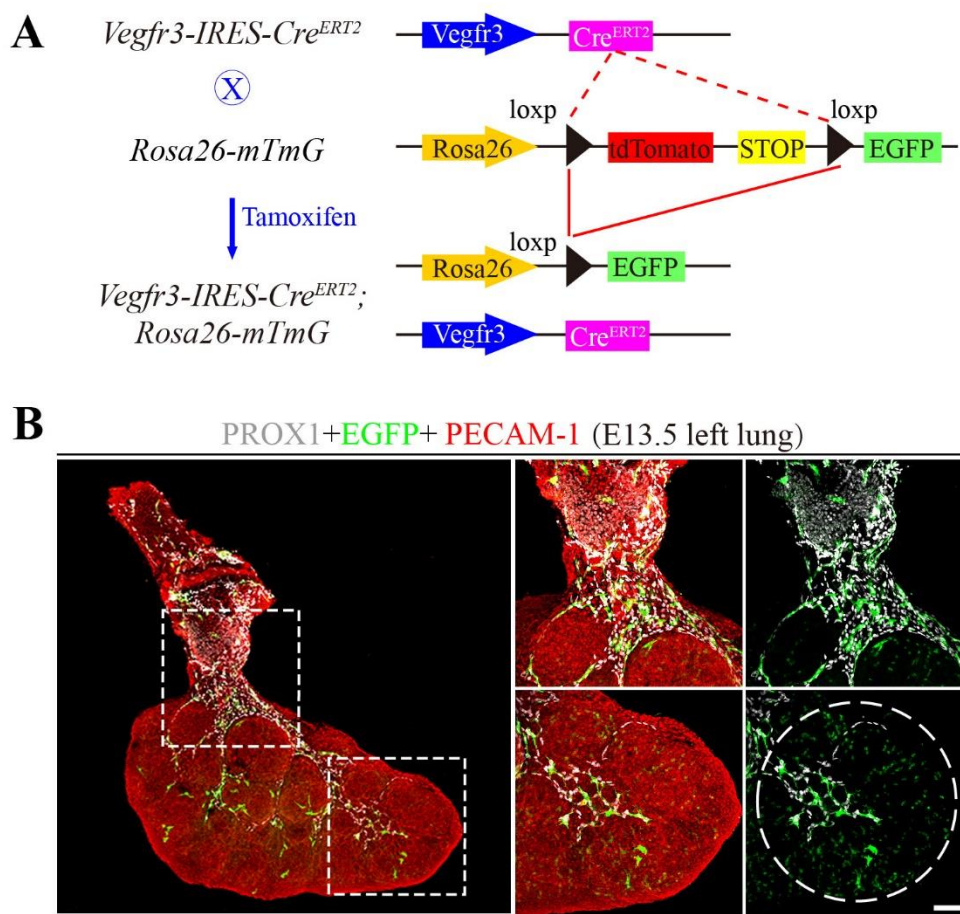


图 2. 在胚胎期 13.5 天利用 EGFP 报告基因分析 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠 *Cre^{ERT2}* 重组酶在肺部的表达情况

Fig. 2 Analysis of *Cre^{ERT2}* recombinate expression in *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* transgenic mice by EGFP reporter in lung at embryonic day 13.5 (E13.5)

A. *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠和 *Rosa26-mTmG* 报告基因小鼠交配策略的示意图。B. 小鼠 E13.5 的肺叶全景图。从 E11.5 至 E12.5 进行他莫昔芬腹腔内注射，然后对 E13.5 的肺组织用 PECAM1（红色）和 PROX1（白色）进行全组织免疫染色。由染色结果可知，在胚胎发育早期，PROX1 主要表达在淋巴管内皮细胞中，PROX1 阳性细胞与 EGFP 报告基因表达重叠；但也有少部分 EGFP 阳性细胞不表达 PROX1，这部分细胞可能是血管内皮细胞或血液细胞。白色虚线圈指示肺叶前端区域存在少部分 PROX1 阴性 EGFP 阳性细胞。标尺=100 μ m。

2.3 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 在胚胎发育后期的重组效率分析

在小鼠 E14.5 至新生期间，淋巴管发育是已形成的初级淋巴管网络进一步重塑发育为成熟的淋巴管网络系统的过程^[8]。为了探究 *Cre^{ERT2}* 重组酶在形成成熟的淋巴管网络系统期间的表达情况，我们从 E13.5 至 E15.5 连续 3 天对怀孕的母鼠进行腹腔内注射他莫昔芬，然后对 E18.5 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠的腹部皮肤、肠系膜和心脏表面淋巴管进行分析。全组织免疫荧光染色结果显示，*Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠皮肤中 PROX1 指示的淋巴管内皮细胞与 EGFP 报告基因表达几乎全部重叠（图 3），且少部分 EGFP

信号与血管内皮细胞标志物 PECAM1 重叠（图 3，箭头）；同时，我们观察到 PROX1 阳性淋巴管内皮细胞聚集的瓣膜与 EGFP 报告基因表达相重叠（图 3）。这些结果说明 EGFP 报告基因主要在小鼠皮肤淋巴管上表达于，散在的 EGFP 信号提示 Cre^{ERT2} 重组酶在部分血管内皮细胞或血液细胞中也有表达。

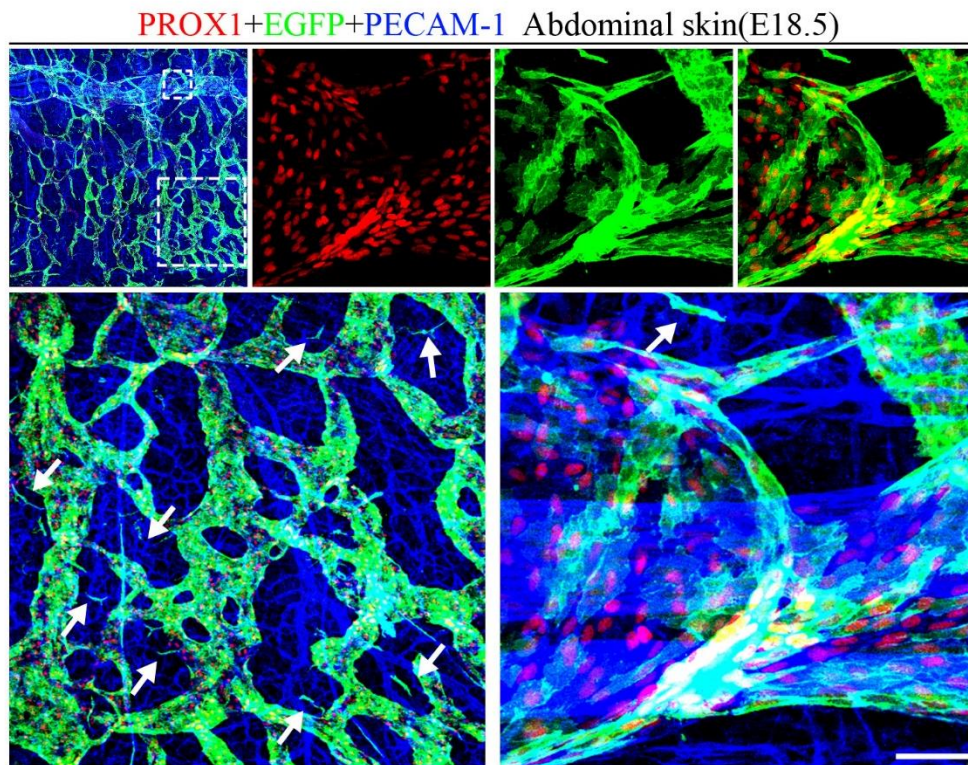


图 3 分析 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠 EGFP 报告基因在皮肤淋巴管的表达。

Fig. 3 Analysis of the EGFP reporter expression in skin lymphatic vessels of *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* mice

用 PECAM1（蓝色）和 PROX1（红色）对 E18.5 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26mTmG* 小鼠的腹部皮肤进行全组织免疫染色，结果显示，*Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠腹部皮肤 PROX1 指示的淋巴管和淋巴管瓣膜（淋巴管内皮细胞聚集处）与 EGFP 报告基因表达相重叠；箭头指向 EGFP 阳性 PROX1 阴性细胞，该细胞可能是毛细血管内皮细胞或血液细胞。标尺=50μm。

肠系膜淋巴管是由肠道内壁的毛细淋巴管进一步汇集形成的集合淋巴管，其与动脉和静脉并行^[23]。如图 4A 所示，肠系膜中 EGFP 信号与淋巴管内皮细胞完全重叠，且 EGFP 报告基因在集合淋巴管瓣膜的表达水平较高（图 4A，PROX1 阳性细胞聚集处）。

小鼠心脏淋巴管的形成始于胚胎期 E11.0-E12.0（即冠状血管发育之后的几天），在胚胎期 E15.0-E18.0，淋巴管内皮细胞从心脏基部向心尖迁移^[24]。出生后，淋巴管继续发生，并且淋巴管网络从心外膜下向心肌扩张^[24]。根据小鼠心脏淋巴管分布的特点，我们主要通过全组织染色分析心外膜下淋巴管丛（图 4B）。LYVE-1（Lymphatic vessel endothelial hyaluronan

receptor-1) 是淋巴管内皮细胞中最早表达的标记物之一, 可以有效地标记毛细淋巴管和前集合淋巴管。实验结果显示, 心外膜 EGFP 信号除了和 LYVE-1 阳性的淋巴管重叠外, 还有少部分和 PECAM1 阳性的毛细血管或血液细胞重叠 (图 4B 箭头)。上述结果表明, 胚胎期 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠的 EGFP 报告基因除了在淋巴管内皮细胞中表达, 还有少部分可能在血管内皮细胞或血液细胞中表达。

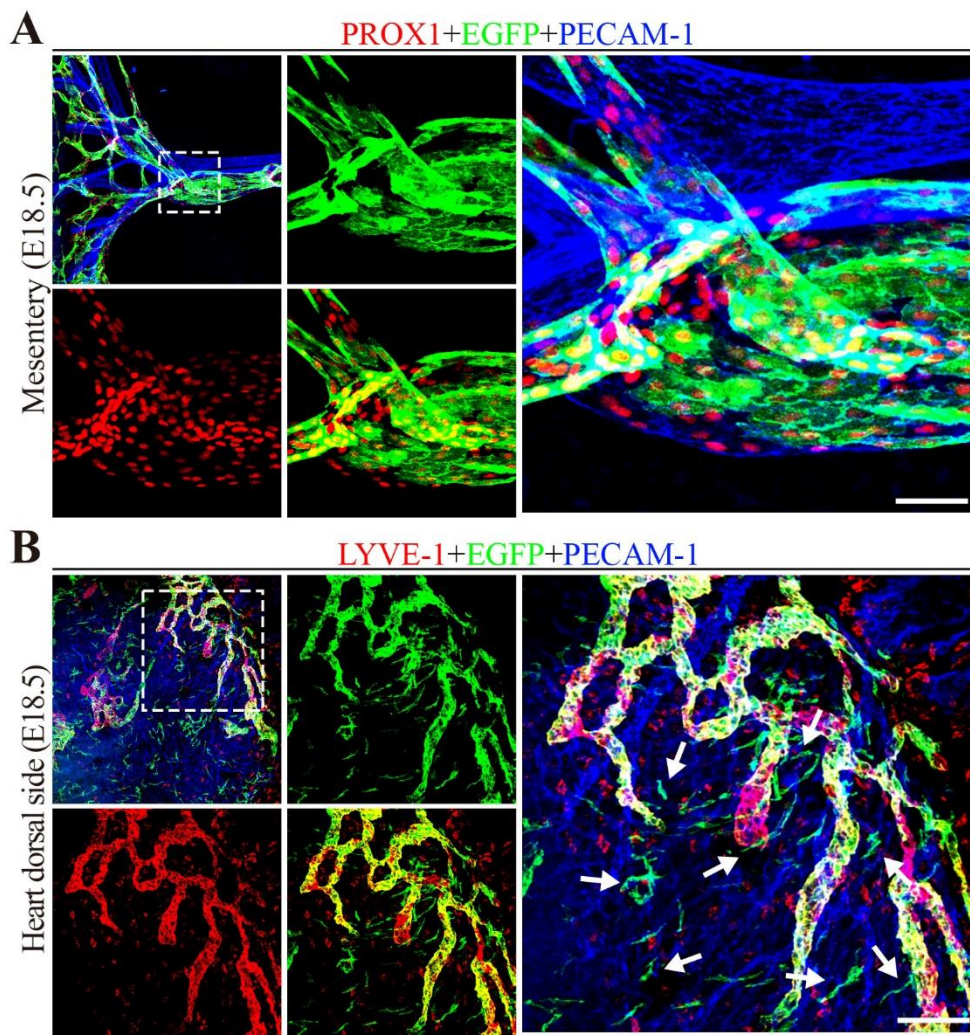


图 4. 分析 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因鼠 *Cre^{ERT2}* 重组酶内脏淋巴管组织中的重组效率 (E18.5)

Fig. 4 Analysis of the *Cre^{ERT2}* activity in lymphatic vessels of internal organs in *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* mice (E18.5)

A. 采集 E18.5 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2};Rosa26mTmG* 小鼠的肠系膜, 用 PECAM-1 (蓝色) 和 PROX1 (红色) 进行全组织免疫染色, 发现 PROX1 阳性细胞与 EGFP 报告基因表达相重叠。标尺=50 μ m。B. 用 PECAM-1 (蓝色) 和 LYVE-1 (红色) 的抗体对 E18.5 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2};Rosa26mTmG* 小鼠的心脏进行全组织免疫荧光染色。染色结果显示, LYVE-1 在胚胎期所有的淋巴管上均表达, LYVE-1 阳性细胞与 EGFP 报告基因表达重叠; 但发现散在的 EGFP 阳性细胞不表达 LYVE-1, 这部分细胞可能是毛细血管内皮细胞或血液细胞, 箭头指向毛细血管内皮细胞或血液细胞。标尺=100 μ m。

2.4 分析 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 在成年小鼠诱导的基因重组效率

由于很多疾病模型是用成年鼠来构建的，所以本研究继续分析了在成年阶段 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因工具鼠的 *Cre^{ERT2}* 重组酶的表达情况。耳部皮肤是成年鼠最广泛应用于淋巴管研究的组织模型，所以我们对出生后第 77 天 (Postnatal day 77, P77) 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠的耳腹侧皮肤进行全组织免疫染色，结果显示，LYVE-1 阳性的淋巴管与 EGFP 报告基因表达几乎完全重合，EGFP 报告基因在瓣膜处 (LYVE1 弱阳性) 高表达 (图 5)。

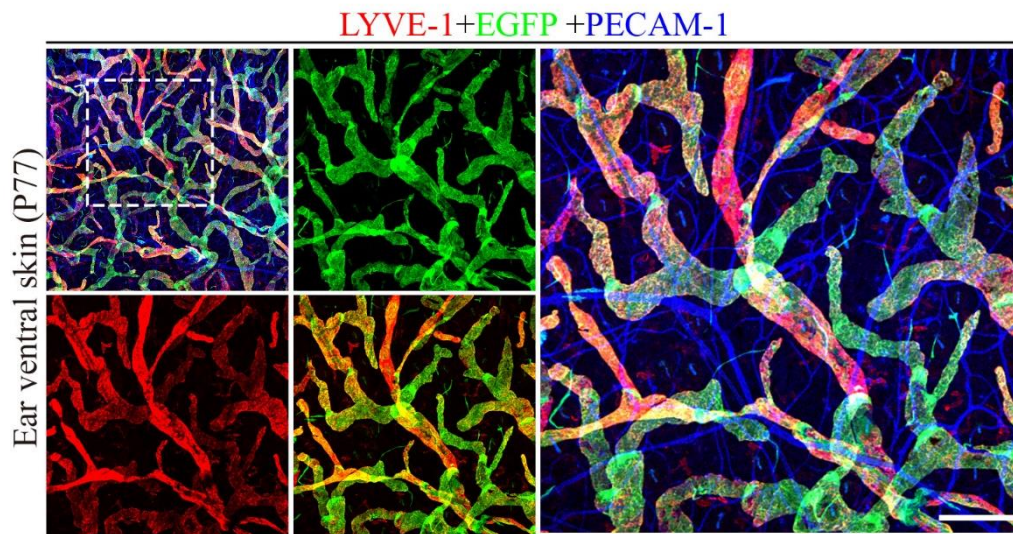


图 5. 分析 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠 EGFP 报告基因在成年阶段小鼠皮肤淋巴管的表达
Fig. 5 Analysis of the EGFP reporter expression in skin lymphatic vessels of *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* mice at adult stage

使用 PECAM-1 (蓝色) 和 LYVE-1 (红色) 对成年阶段 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26mTmG* 小鼠的耳腹侧皮肤进行全组织免疫荧光染色，耳腹侧皮肤主要为毛细淋巴管和前集合淋巴管，LYVE-1 在成年阶段的集合淋巴管表达量较低并较特异的在毛细淋巴管上表达。染色结果发现 EGFP 信号与 LYVE-1 阳性细胞重叠，EGFP 报告基因在瓣膜处 (LYVE1 弱阳性) 高表达。标尺=200 μ m。

气管是连接咽喉和肺的管道，小鼠气管包含 16-20 个透明软骨环^[25]。气管中的大多数小动脉、小静脉和淋巴管位于软骨环之间的粘膜区域，而毛细血管在软骨环上方形成梯状分布^[25]，利用气管中淋巴管和血管都很丰富，易于观察和比较的特点，我们对 P77 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠的气管进行全组织免疫荧光染色分析，结果显示，大部分 EGFP 报告基因在气管淋巴管上表达，散在的 EGFP 信号与 PECAM1 阳性 LYVE-1 阴性的细胞重合 (图 6A，箭头)。与此同时，我们也在隔膜中发现类似的散在 EGFP 信号 (图 6B，箭头)，但 EGFP 报告基因表达还是主要在隔膜淋巴管 (图 6B) 和淋巴管瓣膜 (图 6B，圆圈) 上。以上结果表明 *Cre^{ERT2}* 重组酶在成年阶段淋巴管中的重组效率很好，同时也在少部分 EGFP

报告基因在血管内皮细胞或血液细胞上有表达。

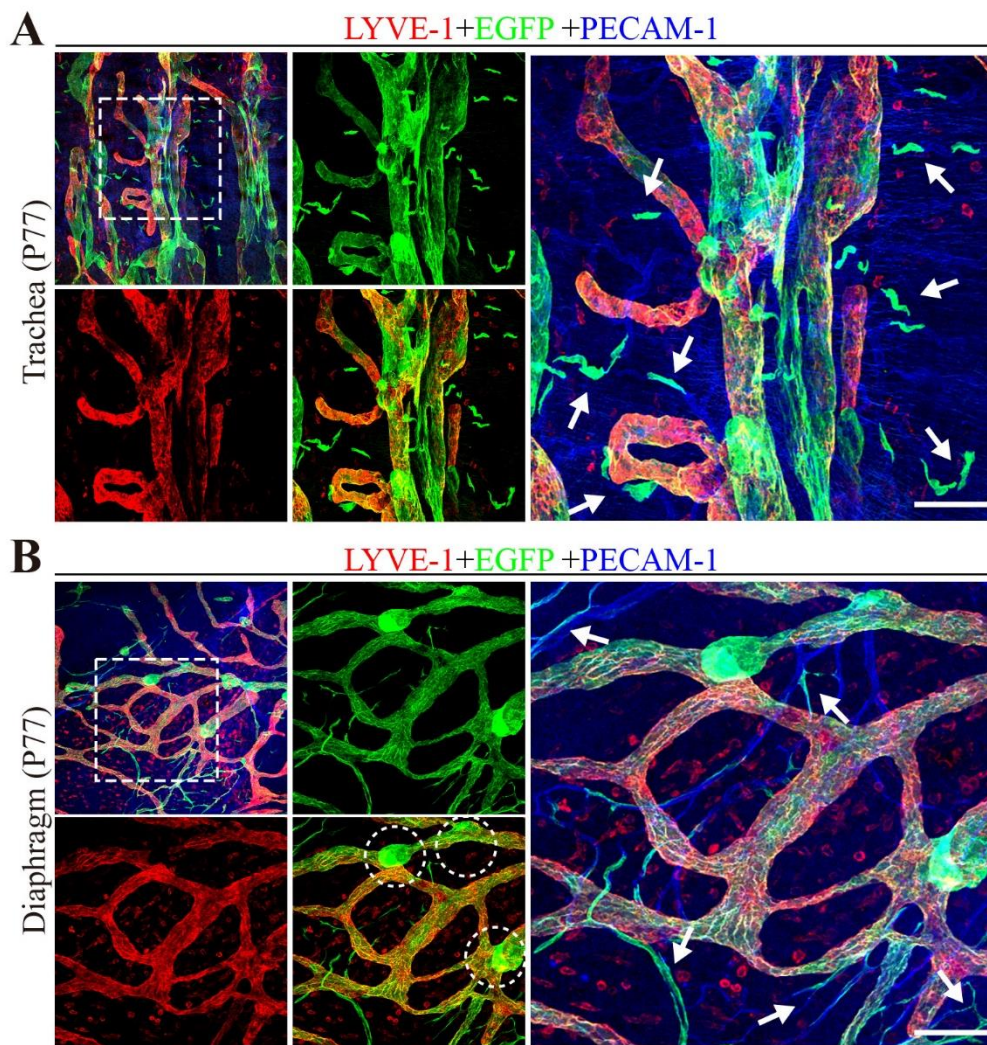


图 6 分析成年阶段 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因鼠 *Cre^{ERT2}* 重组酶在气管和隔膜组织中的重组效率。

Fig. 6 Analysis of the *Cre^{ERT2}* activity in lymphatic vessels of trachea and diaphragm in *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* adult mice

A. 采集 P77 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26mTmG* 小鼠的气管, 用 PECAM-1 (蓝色) 和 LYVE-1 (红色) 进行全组织免疫染色, 结果显示, LYVE-1 阳性细胞与 EGFP 报告基因表达相重叠, 箭头指向不表达 LYVE-1 的 EGFP 阳性细胞, 这部分细胞可能是血管内皮细胞或血液细胞。标尺=100 μm。B. 用 PECAM-1 (蓝色) 和 LYVE-1 (红色) 的抗体对 P77 的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26mTmG* 小鼠的隔膜进行全组织免疫荧光染色, 白色圆圈指示淋巴管瓣膜, 箭头指示血管内皮细胞或血液细胞。标尺=100 μm。

3 讨论

本研究通过基因敲入方法, 在 *Vegfr3* 的终止密码子后插入了 IRES 元件和 *Cre^{ERT2}* 重组酶编码序列, 构建了在淋巴管中表达 *Cre^{ERT2}* 重组酶的转基因小鼠。IRES 元件具有不依赖 5' 甲基化帽子结构而独立募集核糖体的功能^[15, 16], 可以启动下游 *Cre^{ERT2}* 基因表达, 且不影响

内源性 *Vegfr3* 表达。首先需要验证 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因小鼠的构建是否成功, 通过 PCR 鉴定小鼠基因型后, 我们观察到 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因小鼠后代符合孟德尔遗传规律, 而且转基因鼠的生长发育与野生型小鼠相比也无明显差异, 提示通过基因敲入的 *IRES-Cre^{ERT2}* 对内源性 VEGFR3 的表达可能没有明显影响。

在 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}; Rosa26-mTmG* 小鼠的胚胎期和成年阶段通过他莫昔芬诱导 *Cre^{ERT2}* 重组酶的活性, 结合绿色荧光蛋白 (EGFP) 的表达, 检测 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 工具鼠的重组效率。研究发现小鼠胚胎期和成年阶段 EGFP 报告基因主要在 PROX1 阳性或 LYVE1 阳性的淋巴管上表达。另外, EGFP 报告基因在 E18.5 小鼠的腹部皮肤和肠系膜淋巴管瓣膜, 以及成年阶段的皮肤和隔膜淋巴管瓣膜处高表达, 提示 VEGFR3 可能在淋巴管腔内瓣膜上高表达, 这与先前报道在小鼠 E17.5 至成年阶段, 淋巴管腔内瓣膜上 VEGFR3 的高表达相一致^[26, 27]。此外, 在胚胎期小鼠的腹部皮肤和心脏, 以及成年鼠的气管和隔膜中发现散在的 EGFP 信号与 PECAM1 阳性 PROX1 阴性 (或 LYVE-1 阴性) 的细胞重合, 提示 *Cre^{ERT2}* 重组酶在表达 VEGFR3 的部分血管内皮细胞或血液细胞中有表达。以上结果表明, 本研究制备的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 小鼠中 *Cre^{ERT2}* 重组酶主要在淋巴管上表达。

目前已报道靶向淋巴管系统的 Cre 工具鼠主要有 *Lyve-1-EGFP-Cre^[2, 3]*、*Podoplanin-Cre^[4]*、*Prox1-Cre^{ERT2[6]}* 和 *Vegfr3-Cre^{ERT2[28]}*。本研究开始制备 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因工具鼠时, 可诱导的 Cre 工具鼠仅有 *Prox1-Cre^{ERT2}*。VEGFR3 及其配体 VEGFC 是介导生理性和病理性淋巴管生成的主要信号, 可促进淋巴管内皮细胞的增殖^[29]、发芽、迁移和自身存活^[30]。另外有研究报道在小鼠胚胎期间 *Vegfr3* 是作为 *Prox1* 的一个直接靶点, 且 VEGF-C 介导的 VEGFR3 信号传导对于维持淋巴管内皮细胞祖细胞中 PROX1 表达也是必需的^[31]。以上研究提示我们 *Vegfr3* 可能是淋巴管发育和疾病过程中更具有特异性的淋巴管标志物, 所以本研究利用其启动子制备了在淋巴管表达 Cre 重组酶的小鼠品系。另外, 本研究是在 *Vegfr3* 基因终止密码子 TAA 后插入 *IRES-Cre^{ERT2}*, 而且利用 *His6* 标记所靶向的 *Vegfr3* 等位基因 (表达 VEGFR3-*His6*), 可用于分析插入的 *IRES-Cre^{ERT2}* 是否影响内源性 VEGFR3 的表达。

总之, 本研究成功构建了他莫昔芬可诱导的 *Vegfr3-IRES-Cre^{ERT2}* 转基因工具鼠, 并证明该工具鼠的 *Cre^{ERT2}* 重组酶在淋巴管中表达, 且在胚胎期和成年阶段均可有效发挥重组功能, 为进一步研究淋巴管生物学功能及其在疾病中的病理机制提供了有力的研究工具。

致谢

该研究获国家自然科学基金 (31970768, 81770489)、国家重点研发计划“发育编程及其代谢调节”专项 (YFA0801100)、放射医学与辐射防护国家重点实验室协作项目 (No. GZN1202002)、以及江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD) 的资助。

[参考文献] (References)

- [1] OLIVER G, KIPNIS J, RANDOLPH G J, et al. The Lymphatic Vasculature in the 21(st) Century: Novel Functional Roles in Homeostasis and Disease [J]. Cell, 2020, 182(2): 270-96.
- [2] PHAM T H M, BALUK P, XU Y, et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning [J]. Journal of Experimental Medicine, 2010, 207(1): 17-27.
- [3] TAKEDA A, HOSSAIN M S, RANTAKARI P, et al. Thymocytes in Lyve1-CRE/S1pr1(f/f) Mice Accumulate in the Thymus due to Cell-Intrinsic Loss of Sphingosine-1-Phosphate Receptor Expression [J]. Front Immunol, 2016, 7(1): 489.
- [4] ONDER L, SCANDELLA E, CHAI Q, et al. A novel bacterial artificial chromosome-transgenic podoplanin-cre mouse targets lymphoid organ stromal cells in vivo [J]. Front Immunol, 2011, 2(1): 50.
- [5] 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.

[6] SRINIVASAN R S, DILLARD M E, LAGUTIN O V, et al. Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(19): 2422-32.

[7] OLIVER, G, SOSA-PINEDA, B, GEISENDORF, S, et al. Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development [J]. *Mechanisms of Development*, 1993, 44(1): 3-16.

[8] HE Y, ZHU Y, LI B, et al. Progress and prospect of lymphangiogenesis research [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(10): 1030-40.

[9] ALITALO K. The lymphatic vasculature in disease [J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1371-80.

[10] A KAIPAINEN, J KORHONEN, T MUSTONEN, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(8): 3566-70.

[11] ZHANG L, ZHOU F, HAN W, et al. VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis [J]. *Cell Res*, 2010, 20(12): 1319-31.

[12] TAMMELA T, ZARKADA G, WALLGARD E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation [J]. *Nature*, 2008, 454(7204): 656-60.

[13] T A PARTANEN, J AROLA, A SAARISTO, et al. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues [J]. *FASEB J*, 2000, 14(13): 2087-96.

[14] SCHOPPMANN S F, BIRNER P, STÖCKL J, et al. Tumor-Associated Macrophages Express Lymphatic Endothelial Growth Factors and Are Related to Peritumoral Lymphangiogenesis [J]. *The American Journal of Pathology*, 2002, 161(3): 947-56.

[15] RODNINA MV, W. W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(3): 435-43.

[16] RENAUD-GABARDOS E. Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy [J]. *World Journal of Experimental Medicine*, 2015, 5(1):11-20.

[17] MUZUMDAR M D, TASIC B, MIYAMICHI K, et al. A global double-fluorescent Cre reporter mouse [J]. *Genesis*, 2007, 45(9): 593-605.

[18] CATHERINE S BRANDA, DYMECKI S M. Talking about a revolution: The Impact of Site-Specific Recombinases on Genetic Analyses in Mice [J]. *Dev Cell*, 2004, 6(1): 7-28.

[19] DUMONT, D J, LOTTA JUSSILA, JUSSI TAIPALE, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3 [J]. *Science*, 1998, 282(5390): 946-9.

[20] HAGERLING R, POLLMANN C, KREMER L, et al. Intravital two-photon microscopy of lymphatic vessel development and function using a transgenic Prox1 promoter-directed mOrange2 reporter mouse [J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(6): 1674-81.

[21] PRIVRATSKY J R, NEWMAN P J. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(3): 607-19.

[22] JOHNSON N C, DILLARD M E, BALUK P, et al. Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(23): 3282-91.

[23] BERNIER-LATMANI J, PETROVA T V. Intestinal lymphatic vasculature: structure, mechanisms and functions [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(9): 510-26.

[24] FLAHT-ZABOST A, GULA G, CISZEK B, et al. Cardiac mouse lymphatics: developmental and anatomical update [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2014, 297(6): 1115-30.

[25] BIELENBERG D R, D'AMORE P A. All Vessels Are Not Created Equal [J]. *The American Journal of Pathology*, 2013, 182(4): 1087-91.

[26] BAZIGOU E, XIE S, CHEN C, et al. Integrin- $\alpha 9$ Is Required for Fibronectin Matrix Assembly during Lymphatic Valve Morphogenesis [J]. *Developmental Cell*, 2009, 17(2): 175-86.

[27] NORRMEN C, IVANOV K I, CHENG J, et al. FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1 [J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(3): 439-57.

[28] MARTINEZ-CORRAL I, STANCZUK L, FRYE M, et al. Vegfr3-CreER (T2) mouse, a new genetic tool for targeting the lymphatic system [J]. *Angiogenesis*, 2016, 19(3): 433-45.

[29] BREITENEDER-GELEFF S, SOLEIMAN A, KOWALSKI H, et al. Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries [J]. *The American Journal of Pathology*, 1999, 154(2): 385-94.

[30] ASPELUND A, ROBCIUC M R, KARAMAN S, et al. Lymphatic System in Cardiovascular Medicine [J]. *Circ Res*, 2016, 118(3): 515-30.

[31] SRINIVASAN R S, ESCOBEDO N, YANG Y, et al. The Prox1-Vegfr3 feedback loop maintains the identity and the number of lymphatic endothelial cell progenitors [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(19): 2175-87.