



BD



The Jackson  
Laboratory

# 综合评价 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠模型 中人免疫系统的重建以开发新型 ONCO-HU™ 异种移植模型

Aaron Middlebrook,<sup>1</sup> Eileen Snowden,<sup>2</sup> Warren Porter,<sup>2</sup> Friedrich Hahn,<sup>2</sup> Mitchell Ferguson,<sup>2</sup> Brian Soper,<sup>3</sup> James Keck,<sup>3</sup> Joan Malcolm,<sup>3</sup> Shannon Dillmore,<sup>2</sup> Smita Ghanekar,<sup>1</sup> Rainer Blaesius<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>BD Biosciences, San Jose, CA; <sup>2</sup>BD Technologies, Raleigh-Durham, NC; <sup>3</sup>The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME

## 摘要

近期，免疫疗法在黑色素瘤治疗领域所取得的成功以及在其他癌症治疗领域中展现出的可观前景，都突显了免疫系统在癌症治疗中的重要性。事实上，有效的治疗方法设计和评估需要对免疫环境和构成肿瘤微环境的增殖肿瘤细胞之间的相互作用进行全面的了解。移植有 PDX 肿瘤细胞的人源化小鼠为研究人员提供了一种高度精密的工具，非常适合用于推动针对肿瘤免疫逃逸和提升细胞毒性反应的治疗策略的设计。

重度免疫缺陷小鼠，例如 NOD scid gamma (NSG™) 和表达人细胞因子 KITLG、CSF2 和 IL-3 (NSG™-SGM3) 的三重转基因 NSG™ 小鼠，是接受造血干细胞 (CD34+) 移植后用于移植人类肿瘤和建立人体免疫系统成分经过验证的宿主。NSG™-SGM3 中人细胞因子的表达能够支持髓系细胞和调节性 T 细胞的发育。

在这里，我们采用四个 14 色流式细胞仪分析组合方案对整个免疫系统进行全面而详细的分析。这四个分析组合方案旨在全面表征免疫系统的特定分支：1) T 细胞 2) NK 细胞/树突状细胞/B 细胞以及 3) 髓系细胞。在移植后的第 10、16、21 和 31 周，使用 4 个表型分析组合方案分别对 NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠的血液、脾脏和骨髓组织进行评估。研究结果表明，与 NSG™ 小鼠相比，三重转基因 NSG™-SGM3 小鼠表现出更完全的人源化免疫系统，在 T 细胞亚群的分布和髓系细胞的整体代表性方面都有特定的改善。

移植了同种异体人肿瘤的 NSG™ 小鼠为免疫肿瘤学提供了一个宝贵的临床前试验平台。



# 方法

## 小鼠

NSG™ 和 NSG™-SGM3 小鼠由 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) 移植人脐血来源的 CD34+ hSC 进行人源化处理，并运送至 BD Technologies (Raleigh-Durham, NC) 进行处理。

## 组织处理

对小鼠实施安乐死并收集脾脏、骨髓和外周血。将脾脏置于两块玻片之间并压碎。然后用 10-20 mL 的 PBS 液体冲洗载玻片，并将冲洗后的液体收集于 50 mL 的锥形管中。然后用 70 mm 细胞筛过滤，收集单细胞悬液。从股骨中分离骨髓，使用宽口移液器吸头和研磨方法将其捣碎。然后用 70 毫米的细胞筛进行过滤以获得单细胞悬液。终末期抽取 200-400 mL 外周血。在室温下用 4 mL ACK 缓冲液 (Gibco A10492-01) 处理外周血样本以及源自脾脏和骨髓的单细胞悬液 7 分钟，使红细胞全部裂解。然后用 45 mL DPBS (含 2% 胎牛血清) 将样本洗涤一次。吸出上清液，将沉淀物在人 FcR 封闭液中孵育，重悬于 PBS 中，然后转移至 BD Falcon™ 96 孔板，用于抗体混合物染色。您可以在 [jax.org/onco-hu](http://jax.org/onco-hu) 上了解有关该模型的更多信息。

## 流式细胞仪分析

将三种样本类型 (血液、脾脏和骨髓) 中的每一种细胞悬液均用右侧结果部分所述的 14 色分析组合方案进行 30 分钟染色。使用 BD Horizon™ Guided Panel Solution 对每个分析组合方案进行荧光染料选择；您可以在 [bdbiosciences.com/us/tools/s/gps](http://bdbiosciences.com/us/tools/s/gps) 上了解有关该工具的更多信息。用 50 mL 的 BD Horizon™ Brilliant 染色缓冲液 (BD Biosciences 目录号 659611) 对抗体混合物进行稀释。染色后，将细胞用 PBS 洗涤两次，并离心 (300g 下离心 7 分钟) 回收。在 BD Fortessa™ X-20 (BD Biosciences 目录号 658226R1) 上获取样本，使用 BD FACSDiva™ 软件进行数据分析。

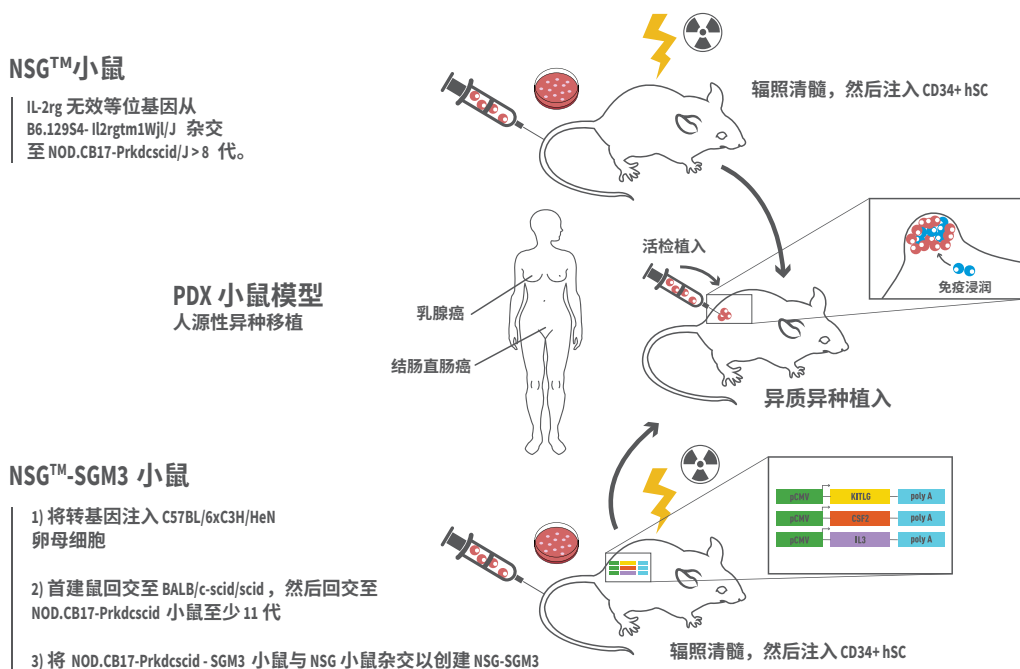


图 1: NSG 与 NSG-SGM3 小鼠对比

NSG™ 小鼠 (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ, 005557) 没有成熟的 B、T 和 NK 细胞。NSG™-SGM3 (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup> Tg (CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ, 013062) 为含有表达人类干细胞因子 (KITLG)、GM-CSF (CSF2) 和 IL-3 的转基因 NSG™ 小鼠。在 3-4 周龄时对受体小鼠进行辐照，并移植人脐血来源的 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞。在共移植人类肿瘤之前，已经对小鼠进行人多谱系移植和人免疫系统建立的验证。

# 结果

## T细胞分析组合方案

样本组织（骨髓、脾脏和外周血）用 14 色分析组合方案进行染色（试剂列表请参见下页表格）。该分析组合方案旨在分析 T 细胞亚群。下面的代表性流程图（移植后数周）说明了用于分析的门控策略。列举的细胞群采用箱线图表示（下一页，底部）。每个图上的绿色条带代表使用相同分析组合方案在正常健康成人供体 (n=6) 中测量的外周血中每个细胞亚群的范围。并未显示所有列举的细胞群。并未显示变化很小或与参考值（绿色条带）明确一致的细胞群。并未显示中间的 16-17周和 23 周时间点的数据。

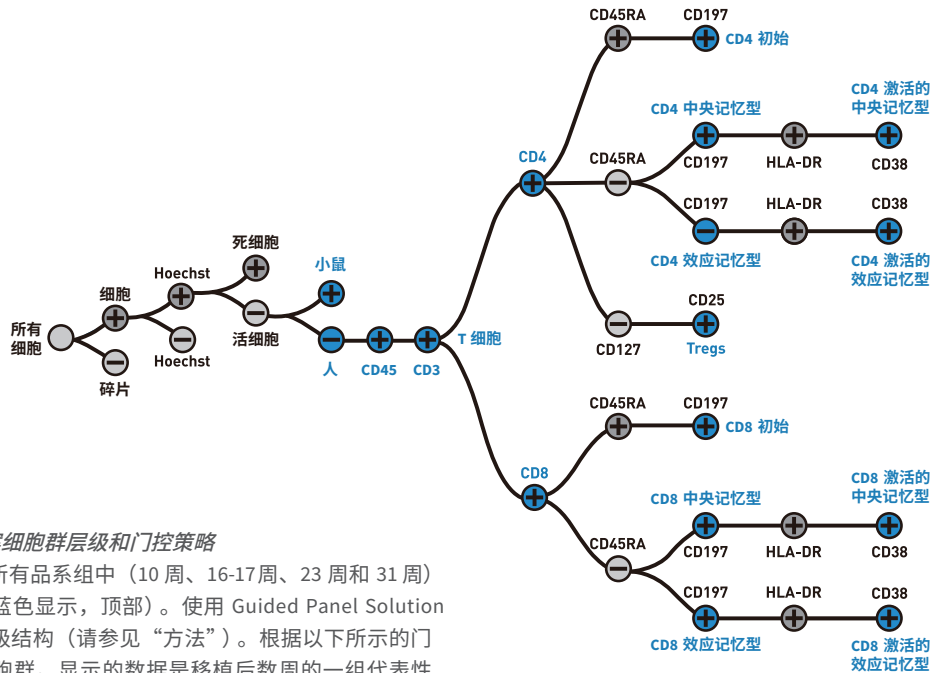
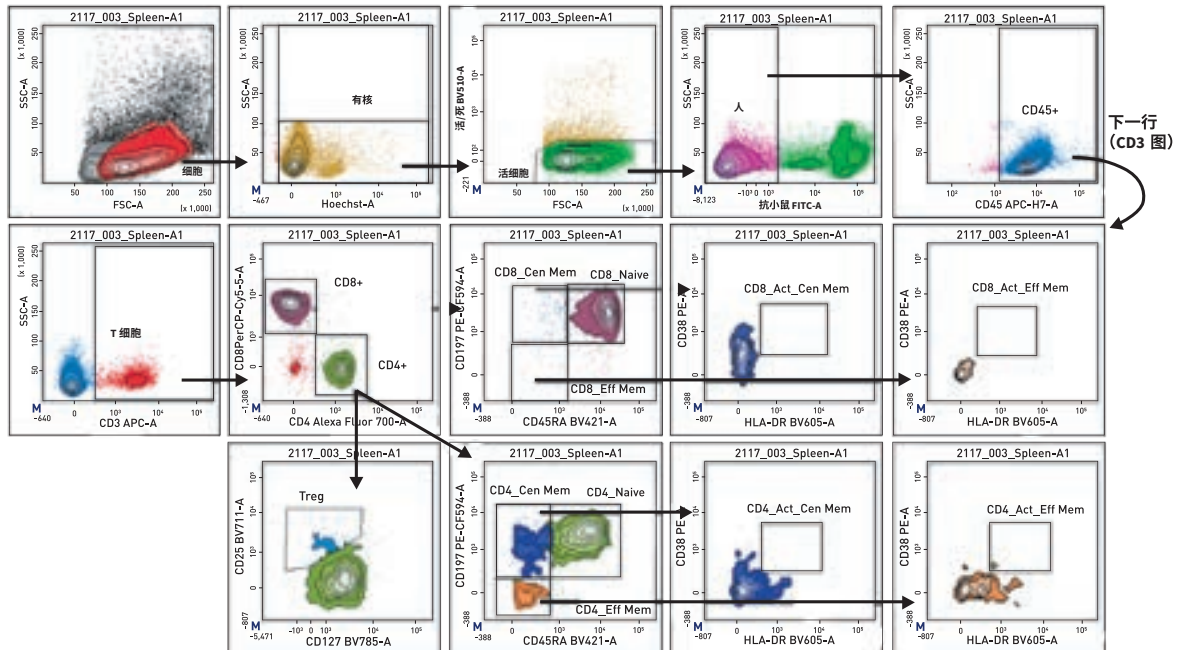


图 2:

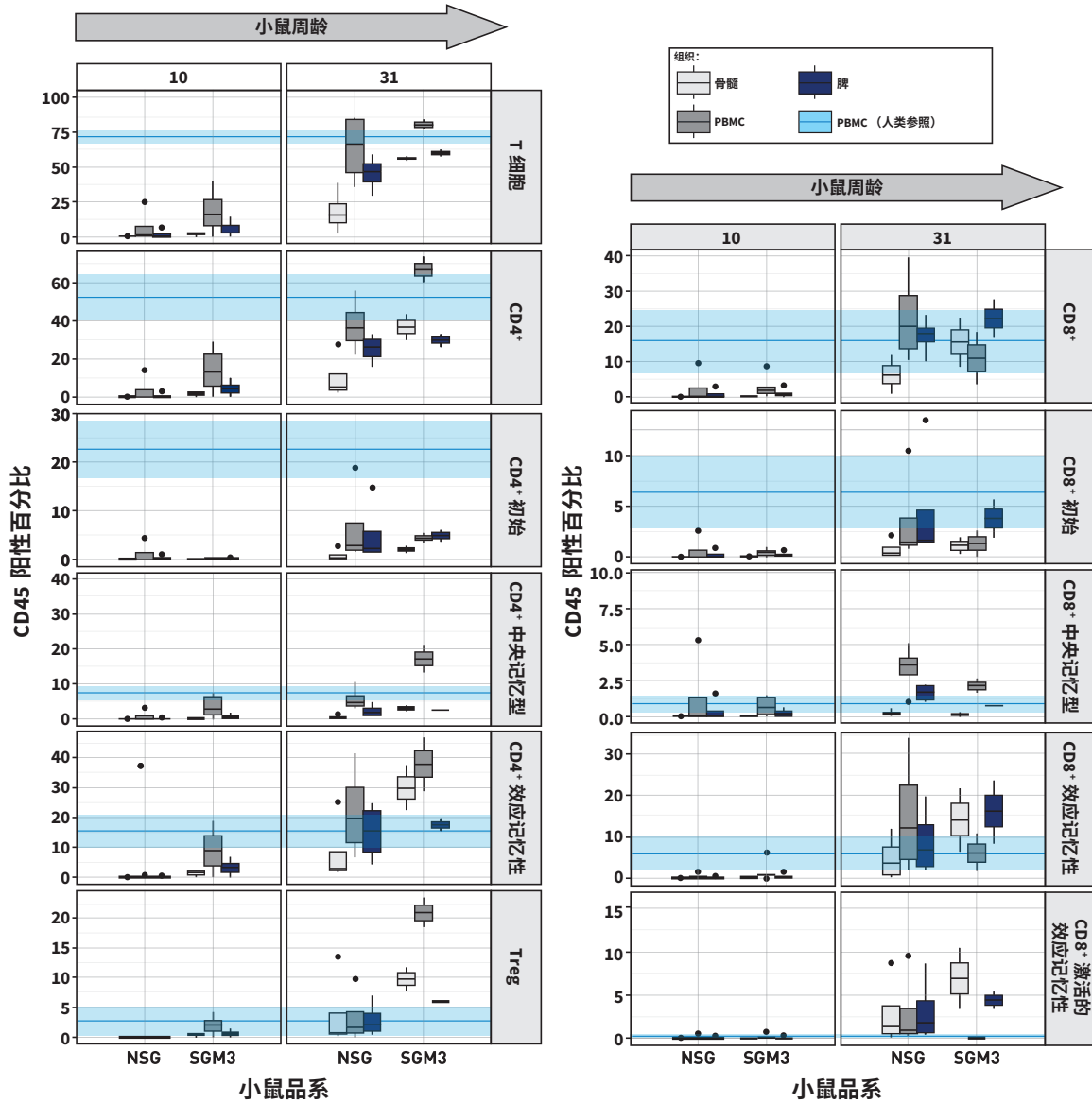
### T 细胞分析组合方案细胞群层级和门控策略

在所有组织类型和所有品系组中（10 周、16-17 周、23 周和 31 周）测量了细胞群（以蓝色显示，顶部）。使用 Guided Panel Solution Tool 生成细胞群层级结构（请参见“方法”）。根据以下所示的门控策略定义每个细胞群。显示的数据是移植后数周的一组代表性的图形。



T 细胞分析组合方案中使用的试剂。

激光	荧光	T 细胞	BD 目录号	*小鼠 DUMP 设门	
			(右侧)	抗体	BD 目录号
488	FITC PerCp-Cy <sup>TM</sup> 5.5	*小鼠 Dump 设门 CD8	560662	mCD45	553079
561	PE	CD38	555460	mH2Kd	553592
	PE-CF594	CD197	562381	mTer119	561032
	PE-Cy <sup>TM</sup> 7	CD28	560684	mCD31	558738
652	APC	CD3	555342	mCD41	561849
	APC-H7	CD45	560274	mCD71	553266
	AF 700	CD4	557922		
405	BV 421	CD45RA	562885		
	BV 510	FVS 活/死	564406		
	BV 605	HLA-DR	562845		
	BV 711	CD25	563159		
	BV 786	CD127	563324		
355	BUV 395	Hoechst 33342	561908		



# DC/NK 和 B 细胞分析组合方案

样本组织（骨髓、脾脏和外周血）用 14 色分析组合方案进行染色（试剂列表请参见下页表格）。该分析组合方案旨在分析 DC、NK 和 B 细胞亚群。下面的代表性流程图（移植后数周）说明了用于分析的门控策略。列举的细胞群采用箱线图表示（下一页，底部）。每个图上的绿色条带代表使用相同分析组合方案在正常健康成人供体 (n=6) 中测量的外周血中每个细胞亚群的范围。并未显示所有列举的细胞群。并未显示变化很小或与参考值（绿色条带）明确一致的细胞群。并未显示中间的 16-17 周和 23 周时间点的数据。

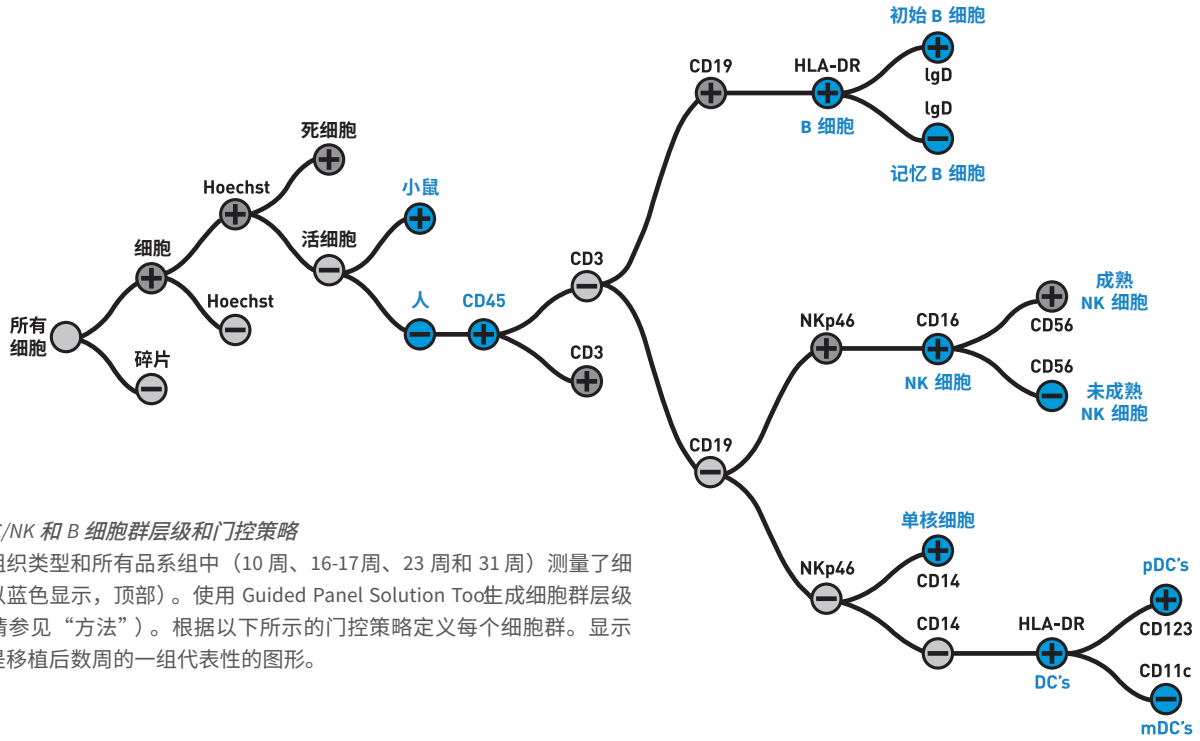
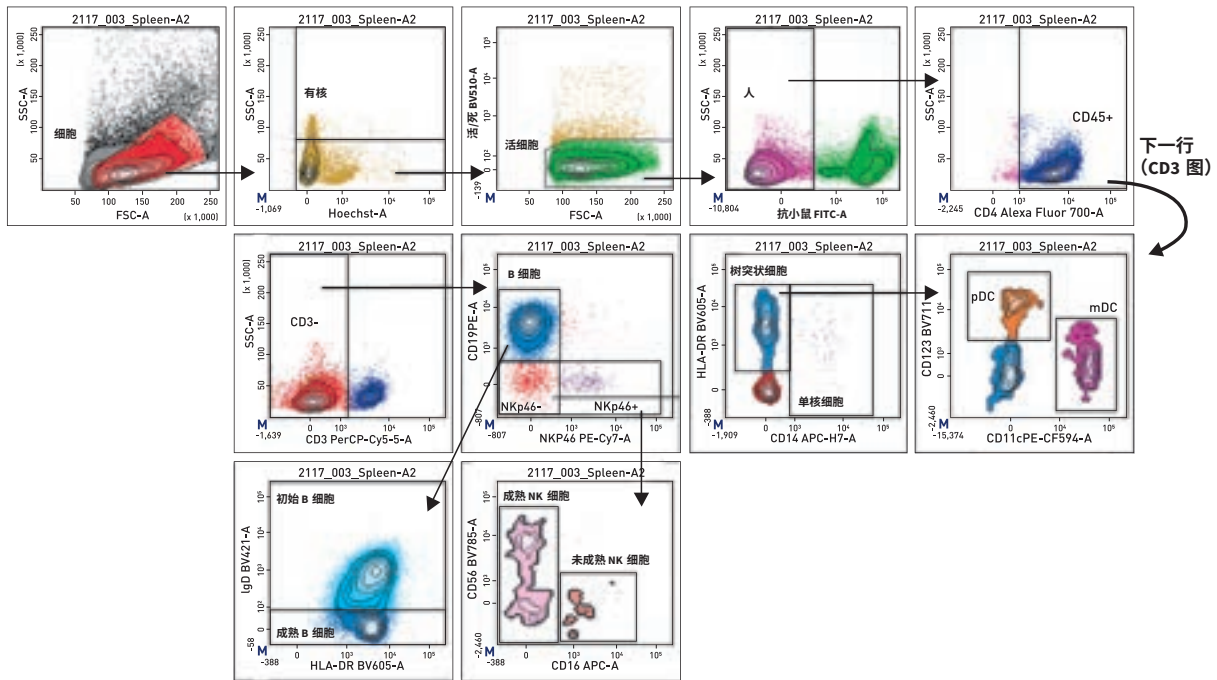


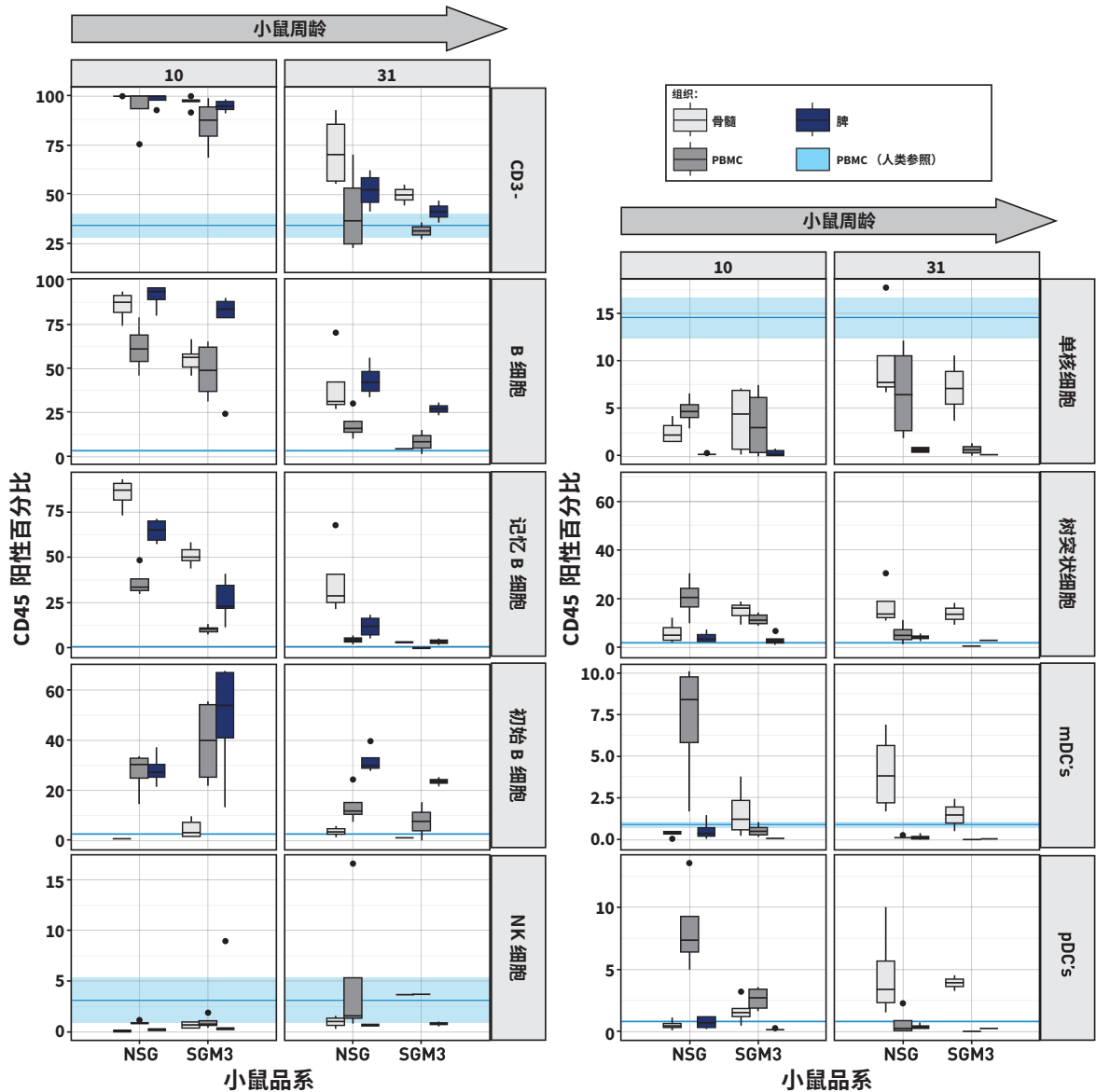
图 3: DC/NK 和 B 细胞群层级和门控策略

在所有组织类型和所有品系组中（10 周、16-17 周、23 周和 31 周）测量了细胞群（以蓝色显示，顶部）。使用 Guided Panel Solution Tool 生成细胞群层级结构（请参见“方法”）。根据以下所示的门控策略定义每个细胞群。显示的数据是移植后数周的一组代表性的图形。



DC/NK 和 B 细胞  
分析组合方案中  
使用的试剂。

激光	荧光	NK/B/DC 分析 组合方案	BD 目录号	*小鼠 DUMP 设门	
			(右侧)	抗体	BD 目录号
488	FITC PerCp-Cy™5.5	*小鼠 Dump 设门 CD3	560835	mCD45	553079
561	PE PE-CF594 PE-Cy™7	CD19 CD11c NKp46	555413 562393 562101	mH2Kd mTer119 mCD31	553592 561032 558738
652	APC APC-H7 AF 700	CD16 CD14 CD45	561304 560180 560566	mCD41 mCD71	561849 553266
405	BV 421 BV 510 BV 605 BV 711 BV 786	IgD FVS 活/死 HLA-DR CD123 CD56	562518 564406 562845 563161 564058		
355	BUV 395	Hoechst 33342	561908		



# 髓细胞分析组合方案

样本组织（骨髓、脾脏和外周血）用 14 色分析组合方案进行染色（试剂列表请参见下页表格）。该分析组合方案旨在分析髓细胞亚群。下面的代表性流程图(10 周龄 NSG™ 小鼠骨髓)说明了用于分析的门控策略。列举的细胞群采用箱线图表示（下一页，底部）。每个图上的绿色条带代表使用相同分析组合方案在正常健康成人供体 (n=6) 中测量的外周血中每个细胞亚群的范围。并未显示所有列举的细胞群。并未显示变化很小或与参考值（绿色条带）明确一致的细胞群。并未显示 16-17周和 23 周时间点。

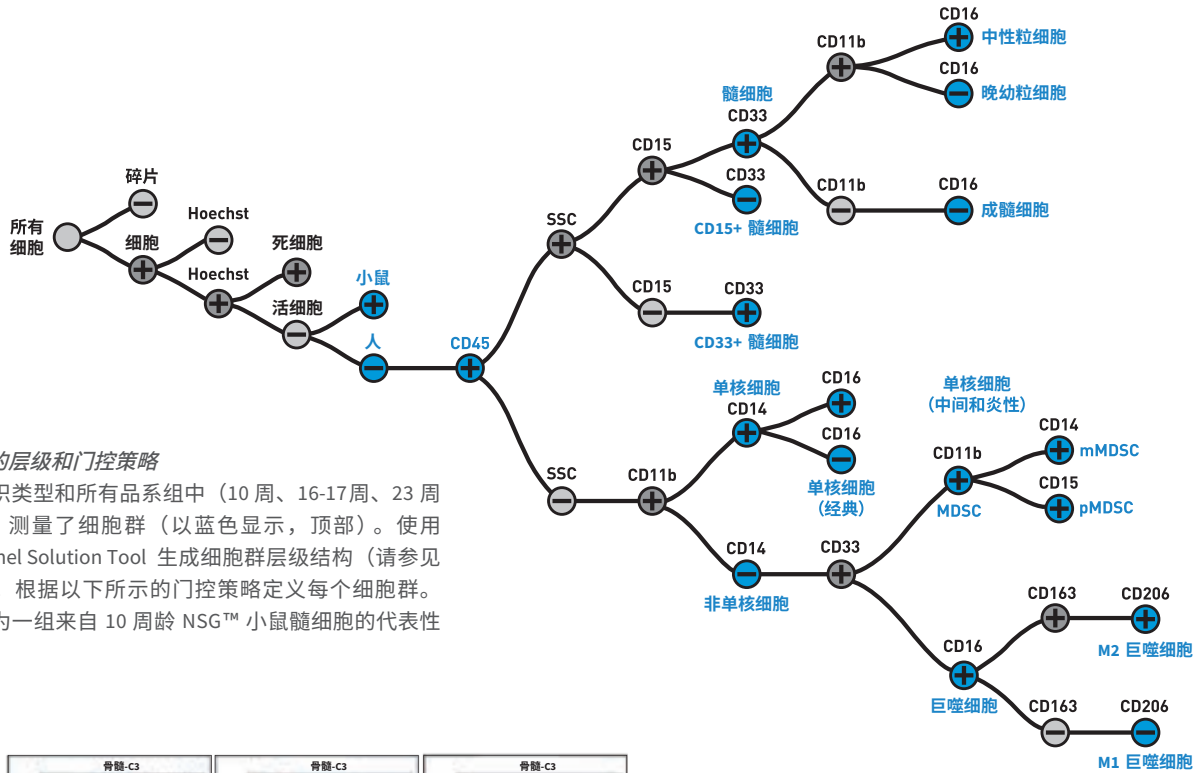
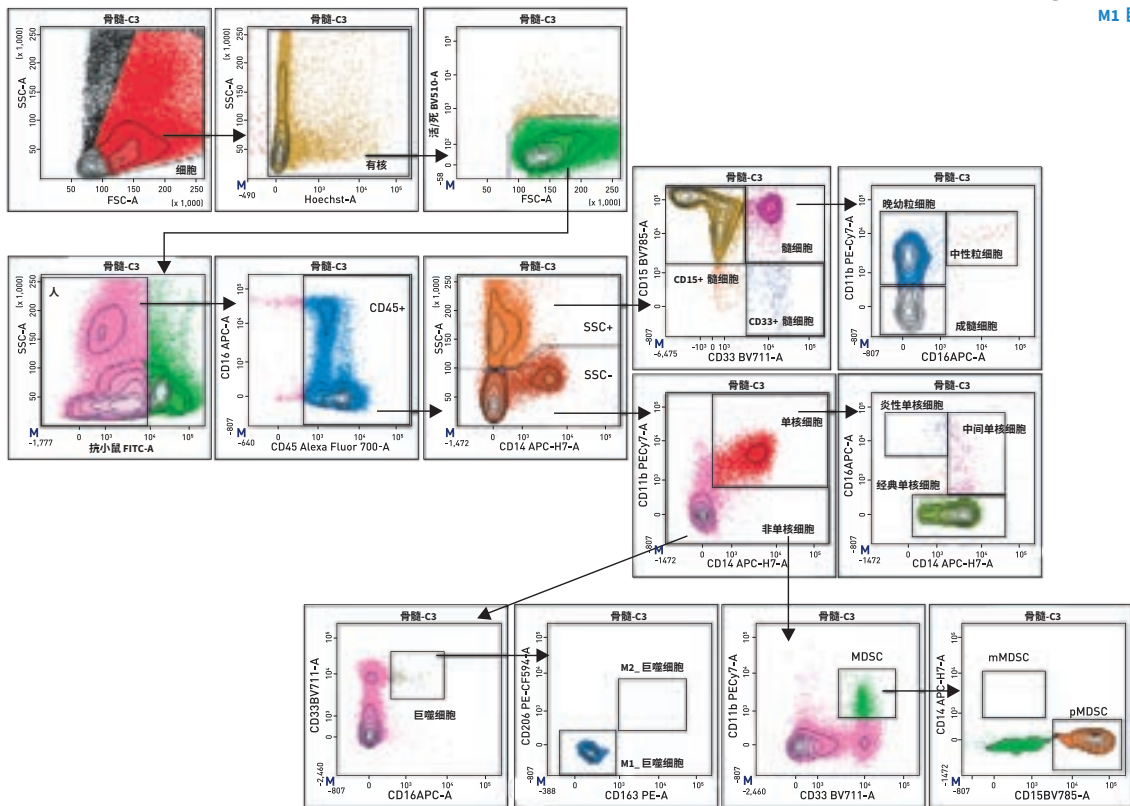


图 4: 髓细胞群的层级和门控策略

在所有组织类型和所有品系组中（10 周、16-17 周、23 周和 31 周）测量了细胞群（以蓝色显示，顶部）。使用 Guided Panel Solution Tool 生成细胞群层级结构（请参见“方法”）。根据以下所示的门控策略定义每个细胞群。所示数据为一组来自 10 周龄 NSG™ 小鼠髓细胞的代表性图形。

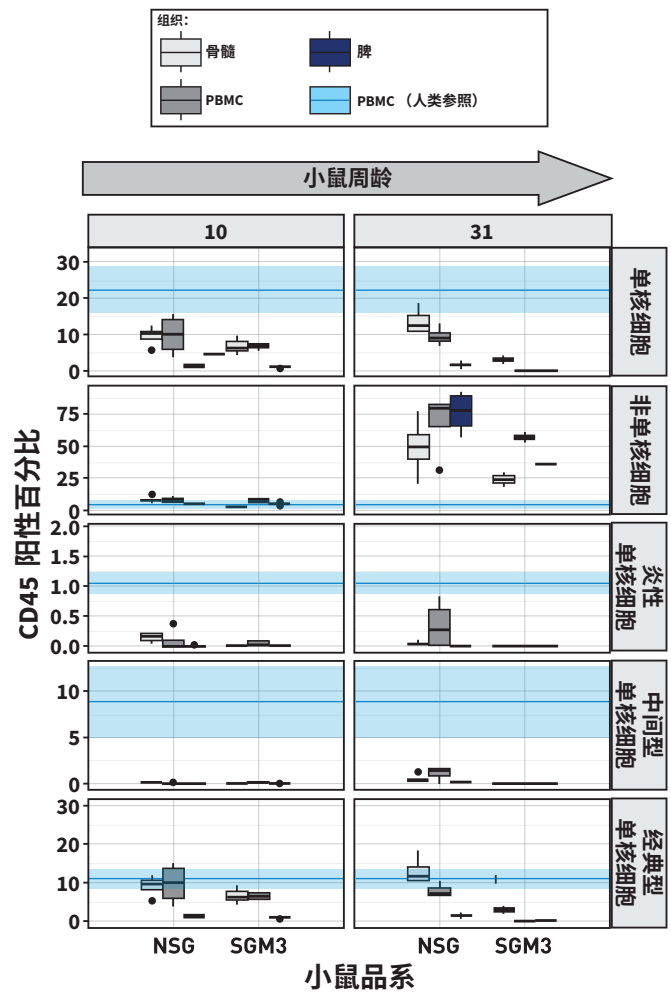
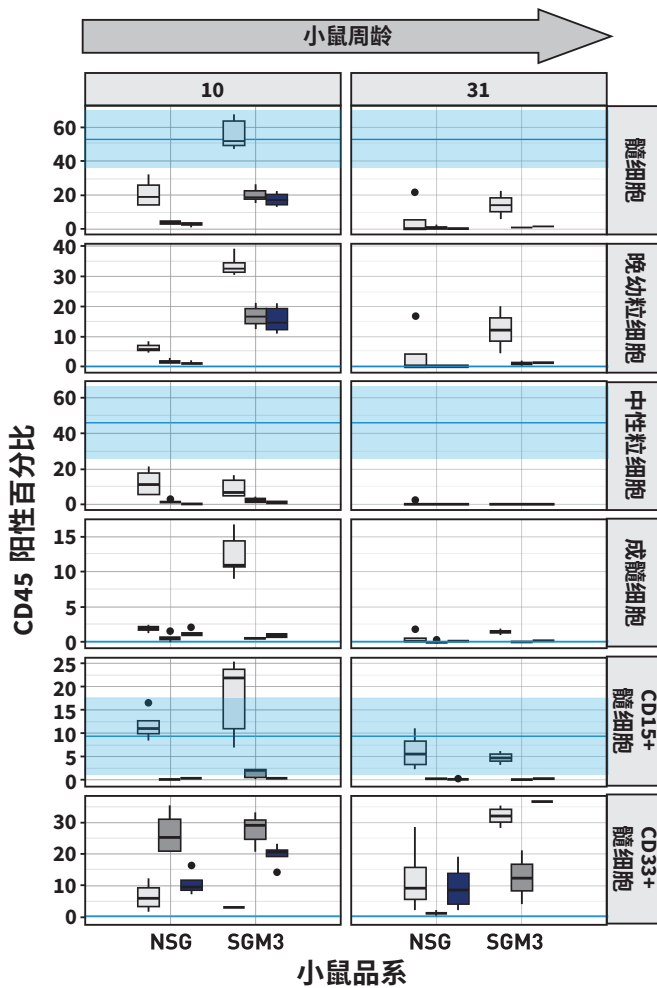




髓细胞分析  
组合方案中  
使用的试剂。

激光	荧光	髓细胞分析 组合方案	BD 目录号
488	FITC PerCp-Cy™5.5	*小鼠 Dump 设门	(右侧)
		CD195	560635
		CD163	560933
561	PE PE-CF594 PE-Cy™7	CD206	564063
		CD11b	557743
		CD16	561304
652	APC APC-H7 AF 700	CD14	560180
		CD45	560566
		CD192	564067
405	BV 421 BV 510 BV 605 BV 711 BV 786	FVS 活/死	564406
		HLA-DR	562845
		CD33	563171
		CD15	563383
355	BUV 395	Hoechst 33342	561908

*小鼠 DUMP 设门	
抗体	BD 目录号
mCD45	553079
mH2Kd	553592
mTer119	561032
mCD31	558738
mCD41	561849
mCD71	553266



## 结论

NSG™ 小鼠模型中三重人细胞因子 (SCF、GM-CSF 和 IL-3) 的表达表明，针对合适的异种移植模型的开发取得了显著的进展。BD 先进而灵活的流式细胞仪工具有助于对这些小鼠的免疫系统进行深入而全面的分析。通过测定包括 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和 DC 在内的大多数主要免疫亚群的频数，NSG™-SGM3 小鼠与 NSG™ 小鼠相比表现出更好的重建特性。NSG™-SGM3 小鼠表现出 Treg 频数增加 (NSG™ 小鼠中不明显)，记忆性 T 细胞池扩大，同时初始 T 细胞 (CD4+ 和 CD8+) 减少。重要的是，JAX® 体内药效服务的数据显示，与 NSG™ 小鼠相比，NSG™-SGM3 小鼠的髓细胞和淋巴细胞数量 (细胞/微升) 显著增加。与 NSG™ 小鼠相比，NSG™-SGM3 小鼠的免疫重建得到了全面改进，证实这一品系可以作为 PDX 肿瘤的潜在宿主，并可以提高研究人员研究肿瘤微环境中免疫细胞与癌细胞之间复杂相互作用的能力，有助于设计和开发用于癌症治疗的免疫学疗法。

1类激光产品。

仅供研究使用。不得用于诊断或治疗程序。

Cy™ 为 GE Healthcare 的商标。

Alexa Fluor® 为 Life Technologies Corporation 的注册商标。

NSG™ 和 NSG™-SGM3 为 Jackson Laboratory 的商标。

商标均是其各自所有者的财产。

BD Life Sciences, San Jose, CA, 95131, USA

[bdbiosciences.com](http://bdbiosciences.com)

© 2017 BD。BD、BD 徽标和所有其他商标均为 Becton, Dickinson and Company 的财产



## 杰克森实验室 The Jackson Laboratory

上海市浦东新区金科路 2889 弄 3 号长泰广场 C 座 629 室

### 技术支持

电话: 400-001-2626

邮件: [micetech@jax.org.cn](mailto:micetech@jax.org.cn)

网站: [www.jax.org/cn](http://www.jax.org/cn)

### 询价下单

电话: 400-693-5700

邮件: [orderquest@jax.org.cn](mailto:orderquest@jax.org.cn)

网站: [jax.ibiocart.com](http://jax.ibiocart.com)

