

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.19.006

S100a4-Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/fllox} 条件敲除小鼠的繁育及基因型鉴定*

王涛 康涛 雷琦 杨谦 曹冰清[△]

(陕西省人民医院神经内二科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:利用 Cre-LoxP 重组酶系统构建在成纤维细胞中 *Ddr2* 特异性敲除的纯合子小鼠并鉴定,为进一步研究 *Ddr2* 在肺纤维化中的作用提供基础。**方法:**将购买的 *Ddr2* loxp 小鼠和成纤维细胞特异表达的 S100a4-Cre 小鼠分别繁殖与鉴定,然后将两种小鼠杂交与鉴定,最终得到基因型为 Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/fllox} 的纯合子小鼠就是在成纤维细胞中 *Ddr2* 条件性敲除小鼠。**结果:**成功繁殖并用 PCR 技术准确鉴定了基因型为 Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/fllox} 的纯合子小鼠,Western blot 结果表明纯合子小鼠的肺成纤维细胞中 *Ddr2* 已缺失。**结论:**本研究利用 Cre-LoxP 系统成功构建了在成纤维细胞中 *Ddr2* 特异性敲除的纯合子小鼠,为进一步研究 *Ddr2* 在肺纤维化发展中的机制提供了研究平台。

关键词: Cre-LoxP 技术; *Ddr2*; 条件性敲除小鼠

中图分类号: R-33; Q75; R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)19-3628-05

Reproduction and Genotyping of the S100a4-Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/fllox} Conditional Knock-Out Mice*

WANG Tao, KANG Tao, LEI Qi, YANG Qian, CAO Bing-qing[△]

(The No.2 Department of Neurology, Shaanxi Province People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To generate and identify the fibroblast specific *Ddr2* knockout homozygous mice, for the research of the role of the *Ddr2* gene on the pulmonary fibrosis. **Methods:** First, The introduced *Ddr2* loxp mice and the S100a4-Cre mice which expressed fibroblast cell-specific had reproduced and genotyped respectively, then the two kinds of mice were crossed, finally the off-spring mice which genotyping Cre*Ddr2*^{fllox/fllox} were the homozygous mice. **Results:** Cre*Ddr2*^{fllox/fllox} mice were breed successfully and their genotype were identified accurately by PCR. **Conclusions:** We successfully generated fibroblast specific *Ddr2* gene knockout homozygous mice through Cre-LoxP technology, that can supply the tool for research the role of the *Ddr2* gene on pulmonary fibrosis.

Key words: Cre-LoxP System; *Ddr2*; Conditional Knockout Mice

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q75; R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)19-3628-05

前言

盘状结构域受体(discoidin domain receptor, DDR)家族属于受体型蛋白酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK),配体为胶原,包括 DDR1 和 DDR2。胶原与 DDRs 的结合可使其胞内区的酪氨酸残基发生磷酸化而活化,进而募集和活化下游的信号转导分子。DDR2 主要表达在成纤维型细胞或间充质来源的细胞^[1],主要被纤维型胶原(I、II 和 III 型)和 X 型胶原所活化,可调控细胞的增殖、分化和迁移等功能^[2,3]。在细胞水平,DDR2 最主要的功能是调控细胞的增殖、迁移和侵袭等过程^[4]。在整体动物水平,DDR2 基因缺失呈现出多种异常的表型,例如骨发育不全、不育及伤口不愈合^[5,6]。在病理条件下,降低 DDR2 的表达可抑制多种人类疾病的进展,例如关节炎、肿瘤血管新生和转移^[7,8]。

Cre-LoxP 重组酶系统是一种新型基因打靶技术,是条件性基因打靶、诱导性基因打靶、时空特异性基因打靶策略的核心

^[9,10]。其主要通过将某种细胞特异性表达重组酶的转基因小鼠和含 Loxp 位点的靶基因小鼠杂交,最终得到在该种特定类型的细胞中靶基因特异性敲除的小鼠,从而为靶基因在特异的组织或器官的功能研究提供较好的研究平台^[11]。为了进一步探讨 DDR2 在肺纤维化中的作用机制,我们购买了 *Ddr2* 条件性敲除小鼠和 S100a4-Cre 小鼠,利用 Cre/loxP 系统成功构建了在成纤维细胞中 *Ddr2* 特异性敲除的纯合子小鼠,并在体外验证了 *Ddr2* 在小鼠成纤维细胞中的缺失,为后续在动物水平研究 *Ddr2* 基因在肺纤维化发生发展中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

在成纤维细胞内特异性表达的 Cre 重组酶小鼠(以下简称 Cre 小鼠)购自于南京生物医药研究院;基因型为 *Ddr2*^{fllox/+} 的小鼠也购自于南京生物医药研究院;引物合成在上海生工生物工程股份有限公司完成;组织/细胞基因组提取试剂盒、PCR 试

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JM8029);陕西省社会发展科技攻关项目(2014K11-03-02-07)

作者简介:王涛(1978-),博士,主要研究方向:脱髓鞘脑病,基因工程, E-mail: wangt78@fmmu.edu.cn

[△] 通讯作者:曹冰清(1984-),硕士,主治医师,主要研究方向:帕金森病,阿尔茨海默病, E-mail: 569689538@qq.com, 电话: 13679275884

(收稿日期:2018-02-28 接受日期:2018-03-27)

剂和琼脂糖、I 型胶原酶、Ripa 强、蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 配胶试剂盒均购买于北京天根生化科技有限公司;进口胎牛血清和 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司;DDR2 抗体购自美国 R&D 公司;化学发光检测试剂盒购自 GE 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Ddr2*^{fllox} 小鼠的建立 *Ddr2*^{fllox/+} 的小鼠由南京生物医药研究院构建完成,小鼠引进后在 SPF 级动物房进行繁育和饲养。公母鼠合笼后生出的 F1 代小鼠有三种表型:纯合子(基因型为 *Ddr2*^{fllox/fllox})、杂合子(基因型为 *Ddr2*^{fllox/+})、野生型(基因型为 *Ddr2*^{+/+})。将 F1 代的纯合子小鼠继续公母鼠合笼,F2 代就会全部是纯合子小鼠。取鼠尾提基因组用常规 PCR 和电泳法进行 *Ddr2* 基因的 loxp 位点鉴定。

引物设计如下:基因组 5'loxp 位点上游引物:5'-GATCATCAGCGTAGCTTCTGAGTTG-3',下游引物:5'-GTAGGA-

CACTGGCAGTGAGTGATG-3';基因组 3'loxp 位点上游引物:5'-GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG-3',下游引物:5'-CGTAGACTATGGTGACTTCCGAGTG-3'。PCR 反应体系:总体系 20 μ L,2 $\times$ PCR Mix 10 μ L,上下游引物(10 μ M/L)各 0.5 μ L,模板 4 μ L,超纯水 5 μ L。PCR 扩增步骤为两步法,详见表 1。1% 琼脂糖凝胶,DL2000 作为 DNA 分子量 Marker,10 V/cm 进行电泳,全自动凝胶图像系统分析成像。若基因组 5'loxp 位点 PCR 扩增条带为 308 bp,3'loxp 位点 PCR 扩增条带为 447 bp,则为 *Ddr2*^{fllox/fllox} 纯合子小鼠。若基因组 5'loxp 位点 PCR 扩增条带为 308 bp 和 237 bp 两条带,3'loxp 位点 PCR 扩增条带为 447 bp,则为 *Ddr2*^{fllox/+} 杂合子小鼠。若基因组 5'loxp 位点 PCR 扩增条带为 237 bp,3'loxp 位点 PCR 没有扩增条带,则为 *Ddr2*^{+/+} 野生型小鼠。

表 1 PCR 反应条件

Table 1 The PCR reaction condition

Seg.	Temp	Time	Cycle
1	95℃	5 min	
2	95℃	30 s	
3	65℃	30 s	
4	72℃	30 s	2-4, 20
5	95℃	30 s	
6	55℃	30 s	
7	72℃	30 s	5-7, 20
8	72℃	3 min	
9	4℃	∞	

1.2.2 表达 Cre 重组酶小鼠的建立 成纤维细胞特异表达 Cre 重组酶的小鼠为杂合子,购买后养于 SPF 级动物房,与 C57 野生型小鼠进行杂交。得到的 F1 代小鼠提鼠尾基因组进行 PCR 鉴定。Cre 引物序列如下:上游引物:5'-TGCCACGACCAAGTGACAGCAATG-3',下游引物:5'-AGAGACGGAAATCATCGCTCG-3'。PCR 反应体系:总体系 20 μ L,2 $\times$ PCR Mix 10 μ L,上下游引物(10 μ M/L)各 0.5 μ L,模板 4 μ L,超纯水 5 μ L。PCR 反应条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,67℃ 30 s,72℃ 5 min,4℃ ∞ ,30 Cycle。经电泳鉴定,Cre 重组酶阳性的小鼠可见 350 bp 的扩增条带,野生鼠无扩增条带。

1.2.3 Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/fllox} 小鼠的建立 用成纤维细胞特异表达 Cre 重组酶的 C57 小鼠(基因型为 Cre^{+/+})和之前繁育得到的 *Ddr2*^{fllox} 纯合子小鼠(基因型为 *Ddr2*^{fllox/fllox})公母鼠合笼,对得到的 F1 代小鼠进行基因型鉴定,应用 PCR 和电泳法对 *Ddr2* loxp 位点和 Cre 重组酶进行鉴定,筛选得到基因型为 Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/+} 的杂合子小鼠。再将基因型为 Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/+} 的杂合子小鼠公母鼠合笼继续繁殖,得到 F2 代小鼠,经鉴定筛选得到的基因型为 Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/fllox} 的小鼠即为实验需要的 *Ddr2* 基因成纤维细胞特异性敲除小鼠。

1.2.4 Cre $\times$ *Ddr2*^{fllox/fllox} 小鼠肺成纤维细胞的原代培养与鉴定

肺原代成纤维细胞的培养:① 配制肺组织消化液,配方为:I 型胶原酶 100 μ L;0.25% 胰酶 200 μ L;双抗 2 μ L;DMEM 5 mL。② 4-6 周的小鼠处死后在超净台里打开胸腔,使心脏和肺暴露。③ 将肺组织取出放于装有 PBS 的小皿中,用眼科剪剪碎组织,用消化液重悬组织碎块后将此悬液放于 25 cm² 培养瓶中,37℃ 消化过夜。④ 用滴管使劲吹打悬液后 800 rpm 离心 5 min,弃去上清。⑤ 将细胞沉淀用含 20% 胎牛血清和双抗的 DMEM 培养液培养,隔两天传代一次。取第 4 代的原代细胞提取基因组,用 PCR 和电泳法鉴定 *Ddr2* 的缺失。用基因组 5'端 loxp 位点上游引物和 3'端 loxp 位点下游引物来鉴定,若 *Ddr2* 没有缺失,则无法扩增出条带,若 *Ddr2* 缺失,则可以扩增出 339 bp 的条带。

1.2.5 Western Blot 检测 *Ddr2* 的表达水平 用 Ripa 强将第 4 代的原代肺成纤维细胞裂解,再用蛋白定量试剂盒进行定量,Western Blot 法检测在肺成纤维细胞中 DDR2 蛋白表达情况。具体操作如下:首先根据定量结果进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后,100 V 2 h 恒压湿转蛋白,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,小鼠 DDR2 单克隆抗体 (1:1000) 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。二抗(1:10000)室温孵育 1 h,洗膜同上。GE 发光液检测膜上的荧光信号。

2 结果

2.1 DDR2 flox 小鼠的繁殖、生长及鉴定

将公司构建好的基因型为 $DDR2^{flox/+}$ 的公鼠与母鼠一起合笼,顺利繁育出 F1 代子鼠,子代小鼠基因型鉴定结果见图 1。如图所示,泳道 1 和 5,5'loxp 位点 PCR 扩增条带为 308 bp,

3'loxp 位点 PCR 扩增条带为 447 bp 的为 $Ddr2^{flox/flox}$ 纯合子小鼠。泳道 2、3、6,5'loxp 位点 PCR 扩增条带为 308 bp 和 237 bp 两条带,3'loxp 位点 PCR 扩增条带为 447 bp 的为 $Ddr2^{flox/+}$ 杂合子小鼠。泳道 4,5'loxp 位点 PCR 扩增条带为 237 bp,3'loxp 位点 PCR 没有扩增条带的为 $Ddr2^{+/+}$ 野生型小鼠。

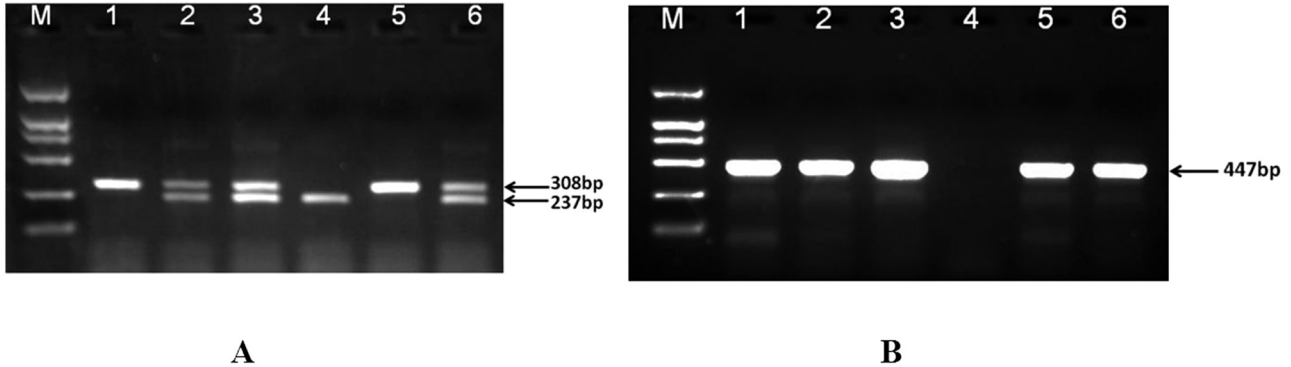


图 1 $Ddr2^{flox}$ 小鼠的基因型鉴定结果

Fig.1 The result of genotype identification of $Ddr2^{flox}$ mouse by PCR

注:A:M:DL2000 DNAMarker;1-6:6 只 F1 代小鼠基因组 5'loxp 位点鉴定结果;

B:M:DL2000 DNAMarker;1-6:6 只 F1 代小鼠基因组 3'loxp 位点鉴定结果

Note: A:M: DL2000 DNAMarker; 1-6: the PCR result of genome 5'loxp site of six F1 mice;

B:M: DL2000 DNAMarker; 1-6: the PCR result of genome 3'loxp site of six F1 mice

2.2 基因型为 $Cre \times Ddr2^{flox/flox}$ 小鼠的繁殖、生长及鉴定

用成纤维细胞特异表达 Cre 重组酶的 C57 小鼠(基因型为 $Cre^{+/+}$)和之前繁育得到的 $Ddr2^{flox}$ 纯合子小鼠(基因型为 $Ddr2^{flox/flox}$)公母鼠合笼,对得到的 F1 代小鼠进行基因型鉴定,筛选得到基因型为 $Cre \times Ddr2^{flox/+}$ 的杂合子小鼠。再将基因型为 $Cre \times Ddr2^{flox/+}$ 的杂合子小鼠公母鼠合笼继续繁殖,得到 F2 代

小鼠,经鉴定筛选得到的基因型为 $Cre \times Ddr2^{flox/flox}$ 的小鼠即为实验需要的 Cre 重组酶阳性的纯合子小鼠。鉴定结果见图 2。由图可见,F2 代小鼠 1、3 和 4 基因型为 $Cre \times Ddr2^{flox/flox}$,5'loxp 位点 PCR 扩增条带为 308 bp,3'loxp 位点 PCR 扩增条带为 447 bp,Cre 阳性的 PCR 扩增条带为 350 bp。其余 F2 代小鼠 2 和 5 基因型均为 $Cre \times Ddr2^{flox/+}$ 。

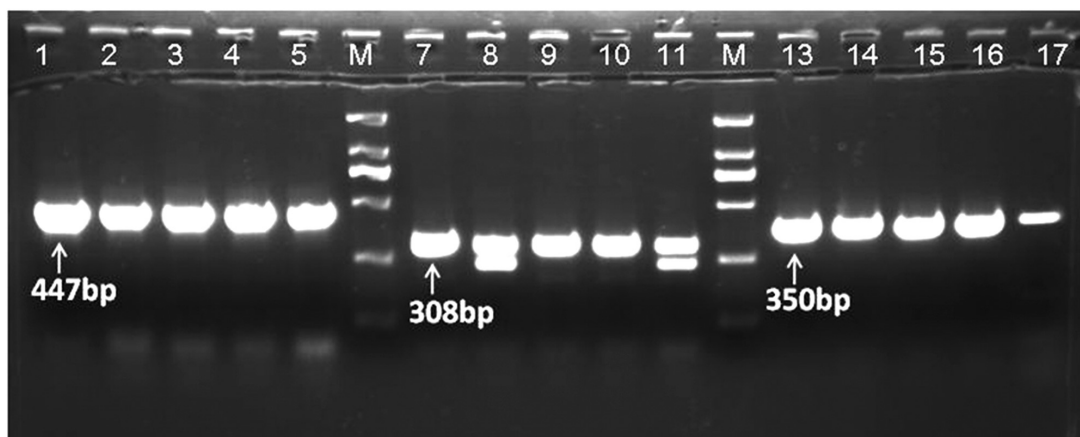


图 2 $Cre \times Ddr2^{flox/flox}$ 小鼠的基因型鉴定结果

Fig2. The result of genotype identification of $Cre \times Ddr2^{flox/flox}$ mouse by PCR

注: M:DL2000 DNAMarker;1-5:1-5 F2 代小鼠基因组 3'loxp 位点鉴定结果;

7-11:1-5 F2 代小鼠基因组 5'loxp 位点鉴定结果;13-17:1-5 F2 代小鼠 Cre 鉴定结果

Note: M: DL2000 DNAMarker; 1-5: the PCR result of genome 3'loxp site of 1-5 F2 mice;

7-11: the PCR result of genome 5'loxp site of 1-5 F2 mice; 13-17: the PCR result of 1-5 F2 mice Cre

2.3 $Cre \times Ddr2^{flox/flox}$ 小鼠肺成纤维细胞中 Ddr2 缺失情况的 PCR 验证

将 $Cre \times Ddr2^{flox/flox}$ 小鼠的肺成纤维细胞提取后经过四代原

代培养,提取细胞基因组,经过 PCR 鉴定表明 $Ddr2$ 基因已缺失,PCR 鉴定结果见图 3。如图所示,在肺成纤维细胞中,Cre 重组酶阳性,5' 端和 3' 端 loxp 位点均阳性,当 Cre 酶发挥作用,

Ddr2 缺失,用 5' 端 loxp 位点上游引物和 3' 端 loxp 位点下游引物可以扩增出 339 bp 的条带。若 *Ddr2* 没有缺失,就无法扩增出条带。

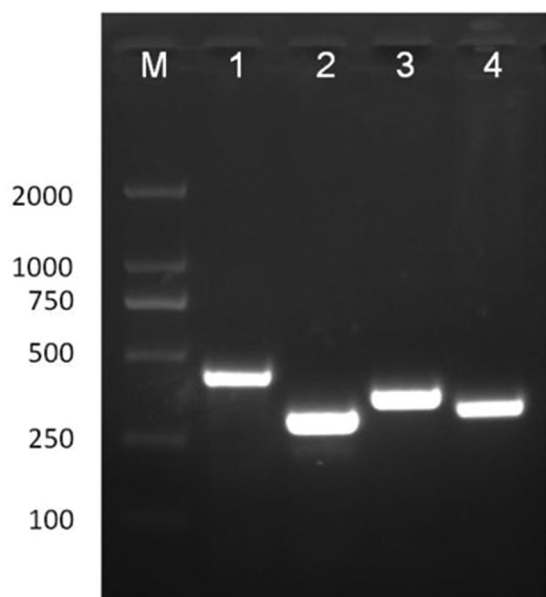


图3 Cre $\times$ *Ddr2*^{flox/flox} 小鼠肺成纤维细胞中 *Ddr2* 缺失的验证

Fig3. The identification of *Ddr2* in lung fibroblast of Cre $\times$ *Ddr2*^{flox/flox} mouse by PCR

注: M:DL2000 DNAMarker; 1:基因组 3'loxP 位点鉴定结果; 2:基因组 5'loxP 位点鉴定结果; 3:Cre 鉴定结果;

4:基因组 5'loxP 上游引物和 3'loxP 下游引物的 PCR 产物

Note: M: DL2000 DNAMarker; 1: the PCR result of genome 3'loxP site;
2: the PCR result of genome 5'loxP site;

3: the PCR result of Cre; 4: the PCR production of genome 5'loxP forward primer and genome 3'loxP reverse primer

2.4 Cre $\times$ *Ddr2*^{flox/flox} 小鼠肺成纤维细胞中 DDR2 蛋白水平的验证

Western Blot 结果表明在 Cre $\times$ *Ddr2*^{flox/flox} 小鼠肺成纤维细胞中的 DDR2 的表达水平比 Cre $\times$ *Ddr2*^{+/+} 的表达水平显著降低。

3 讨论

转基因、基因敲入/敲除动物技术已经成为现代生命科学基础研究和药物研发领域不可或缺的重要技术,该技术从上世纪七八十年代诞生以来,至今已有近四十年的历史,经典技术如 DNA 原核显微注射、胚胎干细胞显微注射技术一直以来经久不衰,在小鼠模型构建方面日趋完善,并且如同剪切酶和抗体等常规分子生物学试剂的制备技术一样。尽管如此,传统技术仍然存在一些难以克服的缺陷,如步骤繁琐、周期漫长、成功率低、费用高昂等^[12,13]。条件性基因敲除(conditional knockout)是将某个基因在特定类型的细胞或发育的某一特定阶段沉默的基因打靶方法,是在常规基因敲除的基础上,利用重组酶介导的位点特异性重组技术,在基因敲除的范围和时间上实现一种可控状态。因其可以在时间和空间上实现精确调控,所以迅速取代了传统的完全基因敲除技术,因其可以避免关键基因在完全性敲除(complete knockout)后的胚胎致死以及发育缺陷等问题^[14,15],成为在动物整体水平上进行基因及基因功能研究的主流技术。该技术采用基因结构或功能缺失的小鼠来研究相应基因及相关疾病,能降低甚至排除其他内源性基因的干扰,实验结果可信度高。条件性基因敲除主要是通过 Cre/LoxP 或者 FLP/FRT 重组系统来实现的^[16,17]。这两个系统都是真核细胞内位点特异性重组酶系统,已发展成为在体内、外进行遗传操作的有力工具。这两个系统的应用,可以使靶基因的表达或缺失发生在试验动物发育的某一阶段或某一特定的组织器官。此外,若与控制 Cre 或 Flp 表达的其他诱导系统相结合,还可以

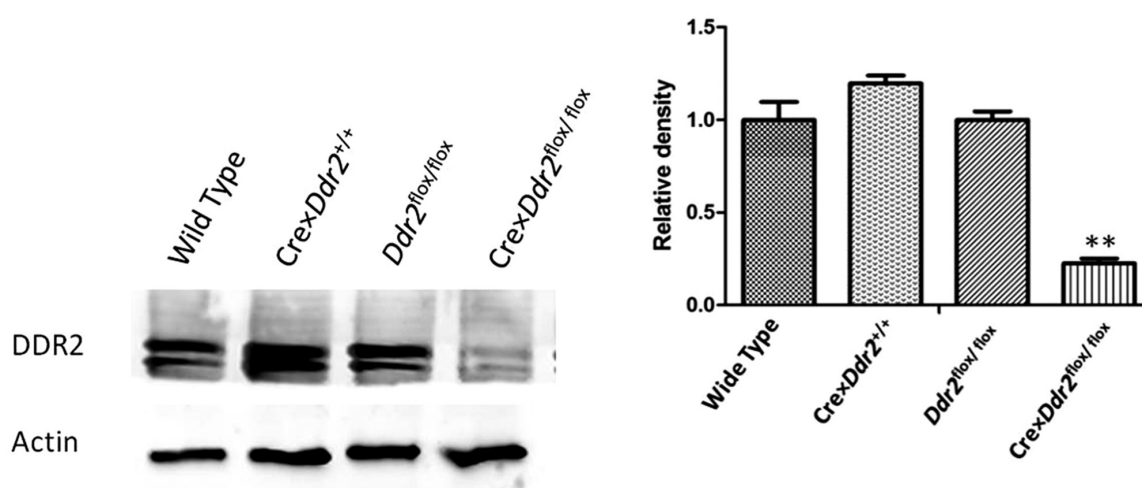


图4 Cre $\times$ *Ddr2*^{flox/flox} 小鼠肺成纤维细胞中 DDR2 缺失的验证(** $P<0.01$)

Fig.4 The identification of DDR2 in lung fibroblast of Cre $\times$ *Ddr2*^{flox/flox} mouse by Western Blot(** $P<0.01$)

对某一基因同时实现时空两方面的调控^[18]。条件性基因敲除小鼠的主要原理是通过基因打靶,把两个 LoxP 位点放到目的基因一个或几个重要的外显子的两边^[19]。该小鼠和表达 Cre 酶小鼠杂交之前,其目的基因表达完全正常。当和组织特异性表达 Cre 酶的小鼠进行杂交后,可以在特定的组织或细胞中敲除该

基因,而该基因在其他组织或细胞正常表达,此即条件性敲除小鼠。Cre-LoxP 系统是源于 P1 噬菌体的一个 DNA 重组体系^[20]。由 Cre 酶和相应的 LoxP 位点组成,它能导致重组发生在特定的 DNA 序列处(LoxP 位点)。该系统可以将外源基因定点整合到染色体上或将特定 DNA 片段删除。基于 Cre-LoxP 的基因

打靶要分两步来进行,首先要在胚胎干细胞的基因组中引入 LoxP 序列,这一步可以通过打靶载体的设计和对同源重组子的筛选来实现^[21]。下一步通过 Cre 介导的重组来实现靶基因的遗传修饰或改变^[22]。Cre 重组酶介导两个 LoxP 位点间的重组是一个动态、可逆的过程,可以分成三种情况:1、如果两个 LoxP 位点位于一条 DNA 链上,且方向相同,Cre 重组酶能有效切除两个 LoxP 位点间的序列;2、如果两个 LoxP 位点位于一条 DNA 链上,但方向相反,Cre 重组酶能导致两个 LoxP 位点间的序列倒位;3、如果两个 LoxP 位点分别位于两条不同的 DNA 链或染色体上,Cre 酶能介导两条 DNA 链的交换或染色体易位^[23]。条件性基因敲除鼠适用范围为:(1)该基因有胚胎致死性;(2)用于研究该基因在特定的组织或细胞中的生理病理功能^[24,25]。

盘状结构域受体 2(discoindin domain receptor 2, DDR2)属于一类特殊的受体型蛋白酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK),结构上含有胞外盘状结构区(discoindin region, DR)、一段较长的邻跨膜区、一段一次跨膜区和具有催化活性的胞浆内蛋白酪氨酸激酶区^[26]。DDR2 分子的 DR 形成了在空间结构上相邻的三个 loops,负责与其配体一纤维型胶原的结合从而介导 DDR2 的活化^[27]。2008 年 Jackson Laboratory^[28]发现了一种常染色体隐性遗传的自发突变小鼠(slic),在此小鼠中,DDR2 的绝大多数外显子(1-17)是缺失的。这种 DDR2 缺陷小鼠主要表现为生长障碍和性腺发育异常,生长障碍主要表现为侏儒症,颅面发育畸形(突出的眼球和短而扁的鼻子)。因为 DDR2 缺陷小鼠的性腺发育异常,纯合子小鼠无法生育,只能通过杂合与杂合交配的方式去繁育得到纯合子小鼠,繁育周期长,工作量大,耗时费力。虽然已有报道显示,DDR2 可调控肺成纤维细胞的迁移能力^[29],然而,并不清楚 DDR2 是否参与肺纤维化这一细胞外基质过度沉积导致的疾病。我们课题组前期利用 DDR2 自发突变小鼠、DDR2 腺病毒及 DDR2 小干扰 RNA 全面明确了 DDR2 是促进肺纤维化的关键分子。DDR2 对 TGF- β 1 和胶原这两条通路的作用均能促进 MFBs 的活化及血管重塑过程,最终导致纤维化的发生^[30]。

我们前期的工作的体外实验都是在原代肺成纤维细胞中进行的,证明了 DDR2 的活化与否与 TGF- β 1 诱导的 p38/AKT 的活化无关,DDR2 以非依赖的方式协同 TGF- β 1 诱导 p38 和 Akt 的活化。而体内实验更加具有说服力,可以在动物体内我们所关注的成纤维细胞中特异缺失 DDR2,通过动物肺纤维化模型的建立来研究 DDR2 在肺纤维化发生发展中的作用。于是我们利用 Cre-LoxP 这一重组酶系统,本课题组引进了 *Ddr2* 条件性敲除小鼠和 S100a4-Cre 小鼠,用 Cre-loxP 技术成功构建了在成纤维细胞中特异缺失 DDR2 的小鼠,基因型为 Cre $\times$ *Ddr2*^{lox/lox},并用 PCR 和 Western Blot 的技术验证了 Cre $\times$ *Ddr2*^{lox/lox} 小鼠中肺成纤维细胞中 DDR2 的缺失,从而实现了在动物体内的特定细胞对目标基因进行特异敲除的目的,为后续在动物水平进一步展开 DDR2 与肺纤维化的研究奠定了重要基础。

参考文献(References)

- [1] DeLeon-Pennell KY. May the fibrosis be with you: Is discoidin domain receptor 2 the receptor we have been looking for [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 91: 201-203
- [2] McDonald LT, Johnson SD, Russell DL, et al. Role of a novel immune modulating DDR2-expressing population in silica-induced pulmonary fibrosis[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0180724
- [3] Valiathan RR, Marco M, Leitinger B, et al. Discoidin domain receptor tyrosine kinases: new players in cancer progression[J]. Cancer Metastasis Rev, 2012, 31(1-2): 295-321
- [4] Huang TL, Mu N, Gu JT, et al. DDR2-CYR61-MMP1 Signaling Pathway Promotes Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis Through Regulating Migration and Invasion of Fibroblast-Like Synoviocytes [J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(2): 407-418
- [5] Olaso E, Lin HC, Wang LH, et al. Impaired dermal wound healing in discoidin domain receptor 2-deficient mice associated with defective extracellular matrix remodeling[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2011, 4(1): 5
- [6] Kano K, Marin de, Evsikova C, et al. A novel dwarfism with gonadal dysfunction due to loss-of-function allele of the collagen receptor gene, *Ddr2*, in the mouse[J]. MolEndocrinol, 2008, 22(8): 1866-1880
- [7] Zhang S, Bu X, Zhao H, et al. A host deficiency of discoidin domain receptor 2 (DDR2) inhibits both tumour angiogenesis and metastasis [J]. The Journal of pathology, 2014, 232(4): 436-448
- [8] Zhao W, Zhang C, Shi M, et al. The discoidin domain receptor 2/anexin A2/matrix metalloproteinase 13 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes[J]. Arthritis Rheum, 2014, 66(9): 2355-2367
- [9] Valny M, Honsa P, Kirdajova D, et al. Tamoxifen in the Mouse Brain: Implications for Fate-Mapping Studies Using the Tamoxifen-Inducible Cre-loxP System[J]. Front Cell Neurosci, 2016, 10: 243
- [10] Zomer A, Steenbeek SC, Maynard C, et al. Studying extracellular vesicle transfer by a Cre-loxP method [J]. Nat Protoc, 2016, 11(1): 87-101
- [11] Kawano F, Okazaki R, Yazawa M, et al. A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering [J]. Nat Chem Biol, 2016, 12(12): 1059-1064
- [12] Sengupta R, Mendenhall A, Sarkar N, et al. Viral Cre-LoxP tools aid genome engineering in mammalian cells[J]. J Biol Eng, 2017, 11: 45
- [13] Park TS, Kim SW, Lee JH. Efficient transgene expression system using a cumate-inducible promoter and Cre-loxP recombination in avian cells[J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2017, 30(6): 886-892
- [14] Sun X, Fu X, Li J, et al. Heterozygous deletion of *Atf1* by the Cre-loxP system in mice causes preweaning mortality [J]. Genesis, 2012, 50(11): 819-827
- [15] Reinert RB, Kantz J, Misfeldt AA, et al. Tamoxifen-Induced Cre-loxP Recombination Is Prolonged in Pancreatic Islets of Adult Mice[J]. Plos One, 2012, 7(3): e33529
- [16] Tan X, Liang F, Cai K, et al. Application of the FLP/FRT recombination system in cyanobacteria for construction of markerless mutants [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(14): 6373-6382
- [17] Hubbard EJ. FLP/FRT and Cre/lox recombination technology in *C. elegans*[J]. Methods, 2014, 68(3): 417-424
- [18] Ishikawa M, Hori K. A new simple method for introducing an unmarked mutation into a large gene of non-competent Gram-negative bacteria by FLP/FRT recombination[J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 86

- using MPCNL with the aid of a patented system[J]. BMC Urol, 2015, 15: 102
- [17] Lee JW, Park J, Lee SB, et al. Mini-percutaneous Nephrolithotomy vs Retrograde Intrarenal Surgery for Renal Stones Larger Than 10 mm: A Prospective Randomized Controlled Trial[J]. Urology, 2015, 86(5): 873-877
- [18] Karakoyunlu N, Goktug G, ?ener NC, et al. A comparison of standard PCNL and staged retrograde FURS in pelvis stones over 2 cm in diameter: a prospective randomized study [J]. Urolithiasis, 2015, 43(3): 283-287
- [19] Ahmad AA, Alhunaidi O, Aziz M, et al. Current trends in percutaneous nephrolithotomy: an internet-based survey [J]. Ther Adv Urol, 2017, 9: 219-226
- [20] Yang H, Yu X, Hu J, et al. Usage of Multilevel Paravertebral Block as the Main Anesthesia for Mini-Invasive PCNL: Retrospective Review of 45 Cases with Large Stones[J]. Urol Int, 2017, 99, 3: 326-330
- [21] Okeke Z, Smith AD, Labate G, et al. Prospective comparison of outcomes of percutaneous nephrolithotomy in elderly patients versus younger patients[J]. J Endourol, 2012, 26(8): 996-1001
- [22] Shah HN, Shah RH, Sodha HS. A randomized control trial evaluating efficacy of nephrostomy tract infiltration with bupivacaine after tubeless percutaneous nephrolithotomy [J]. J Endourol, 2012, 26 (5): 478-483
- [23] Bryniarski P, Paradysz A, Zyczkowski M. A randomized controlled study to analyze the safety and efficacy of percutaneous nephrolithotripsy and retrograde intrarenal surgery in the management of renal stones more than 2 cm in diameter [J]. J Endourol, 2012, 26 (1): 52-57
- [24] Etemadian M, Soleimani MJ, Haghighi R, et al. Does bleeding during percutaneous nephrolithotomy necessitate keeping the nephrostomy tube? A randomized controlled clinical trial [J]. Urol J, 2011, 8(1): 21-26
- [25] Wiesenthal JD, Ghiculete D, D'A Honey RJ, et al. A comparison of treatment modalities for renal calculi between 100 and 300 mm²: are shockwave lithotripsy, ureteroscopy, and percutaneous nephrolithotomy equivalent?[J]. J Endourol, 2011, 25(3): 481-485
- [26] Agarwal M, Agrawal MS, Jaiswal A, et al. Safety and efficacy of ultrasonography as an adjunct to fluoroscopy for renal access in percutaneous nephrolithotomy (PCNL)[J]. BJU Int, 2011, 108(8): 1346-1349

(上接第 3632 页)

- [19] Sun H, Chen H, Zang X, et al. Application of the Cre/loxP Site-Specific Recombination System for Gene Transformation in Aurantiocytriumlimacinum[J]. Molecules, 2015, 20(6): 10110-10121
- [20] Van Duyne GD. Cre Recombinase [J]. MicrobiolSpectr, 2015, 3(1): MDNA3-0014-2014
- [21] McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations [J]. CurrProtoc Mouse Biol, 2017, 7(1): 1-12
- [22] Nakamura Y, Hashimoto T, Ishii J, et al. Dual-color reporter switching system to discern dimer formations of G-protein-coupled receptors using Cre/loxP site-specific recombination in yeast[J]. Biotechnol Bioeng, 2016, 113(10): 2178-2190
- [23] Tsien JZ. Cre-Lox Neurogenetics: 20 Years of Versatile Applications in Brain Research and Counting[J]. Front Genet, 2016, 7: 19
- [24] Luo X, Yang Y, Ling W, et al. Pseudomonas putida KT2440 markerless gene deletion using a combination of λ Red recombineering and Cre/loxP site-specific recombination[J]. FEMS Microbiol Lett, 2016, 363(4)
- [25] Liu Z, Xie Y, Zhang X, et al. Efficient Construction of Large Genomic Deletion in Agrobacterium tumefaciens by Combination of Cre/loxP System and Triple Recombineering [J]. Curr Microbiol, 2016, 72(4): 465-472
- [26] Liang Z, Xie WJ, Zhao M, et al. DDR2 facilitates papillary thyroid carcinoma epithelial mesenchymal transition by activating ERK2/Snail1 pathway[J]. Oncol Lett, 2017, 14(6): 8114-8121
- [27] Kim D, You E, Jeong J, et al. DDR2 controls the epithelial-mesenchymal-transition-related gene expression via c-Myb acetylation upon matrix stiffening[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6847
- [28] Kano K, Marin de Evsikova C, Young J, et al. A Novel Dwarfism with Gonadal Dysfunction Due to Loss-of-Function Allele of the Collagen Receptor Gene, Ddr2, in the Mouse [J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(8): 1866-1880
- [29] Taza F, Chovanec M, Hahn N, et al. Long-Term Survival in a Patient with Metastatic DDR2-Positive Adrenal Cortical Carcinoma [J]. Clin Genitourin Cancer, 2017, 15(5): e893-e895
- [30] Hu Zhao, HuanBian, Xin Bu, et al. Targeting of Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) Prevents Myofibroblast Activation and Neovessel Formation During Pulmonary Fibrosis [J]. Molecular Therapy, 2016, 24(10): 1734-1744