论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0280-04

成熟成骨细胞中敲除基因 *fgfr1* 小鼠的制备

李福兵,赵 玲,鲁秀敏,余 瑛,何启芬,陈锚锚,段亚琪,戚华兵,陈 林 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 制备在成熟成骨细胞中敲除基因 *fgfr1* 的特定细胞阶段性基因敲除小鼠。**方法** 从美国 NIH 引进 SPF 级 *fgfr1* 条件性基因敲除(*fgfr1*$^{flox/flox}$)小鼠,进行饲养、繁殖和 PCR 鉴定;*fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠与在成熟成骨细胞表达 Cre 重组酶的 OC-Cre 小鼠交配,获得在成熟成骨细胞中敲除一个基因拷贝的杂合子小鼠;杂合子小鼠之间交配,或者杂合子小鼠与 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠交配,可以获得在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr1* 基因的小鼠 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$。**结果** 成功制备在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr1* 的细胞特异性敲除小鼠。**结论** 成功引进 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠,应用合理的基因条件性敲除繁殖策略,获得在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr1* 的基因敲除小鼠。

关键词: *fgfr1*;条件性基因敲除;小鼠;骨骼发育

中图法分类号: R-332;R322.71;R394.2 **文献标识码:** A

Generation of differentiated osteoblast specific *fgfr1* knockout mice

LI Fu-bing, ZHAO Ling, LU Xiu-min, YU Ying, HE Qi-fen, CHEN Mao-mao, DUAN Ya-qi, QI Hua-bing, CHEN Lin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To obtain differentiated osteoblast-specific inactivation of *fgfr1* mice. **Methods** To obtain *fgfr1*$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$ mice, *fgfr1*$^{flox/flox}$ mice obtained from NIH were crossed with OC-Cre mice. To obtain *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$ mutant mice, *fgfr1*$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$ further crossed with themselves or *fgfr1*$^{flox/flox}$ mice. After *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$ crossed with *fgfr1*$^{flox/flox}$ mice, half of their offspring were mutant mice. **Results** Differentiated osteoblast-specific *fgfr1* knockout mice were obtained. **Conclusion** *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$ mice were obtained through proper crossing strategy, which provides a suitable platform for studying *fgfr1* function in bone development and fracture healing.

Key words: fibroblast growth factor receptor 1; conditional gene knockout; mice; bone development

成纤维细胞生长因子 1 型受体(fibroblast growth factor receptor 1, *fgfr1*)属于酪氨酸激酶受体家族,*fgfr1*信号通路在胚胎发育、骨骼发育、血管生成等多种生物信号通路中有着重要的生物学功能[1-3]。*fgfr1* 点突变主要引起两类人类骨骼遗传疾病:颅缝早闭和骨发育不良[3,4],*fgfr1* 完全敲除后将导致胚胎期死亡[5]。条件性基因敲除(conditional knockout)技术可以有效克服常规基因敲除导致的胚胎期死亡,为在体(*in vivo*)研究胚胎期致死以及其他重要基因在特定细胞、组织和器官中的作用提供了强有力的工具。由于 *fgfr1*是胚胎发育所必需的,常规全身敲除将导致胚胎期死亡,所以 *fgfr1* 条件性敲除小鼠为研究 *fgfr1* 在特定细胞、组织和器官中的功能提供了前提条件。目前研究结果提示:*fgfr1* 在骨骼发育以及骨折愈合中可能起到很重要的作用,但是其具体功能及分子机制还不完全清楚。本实验室引进 *fgfr1*$^{flox/flox}$基因条件性敲除小鼠[6],雌雄各 2 只,就 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠鉴定、繁殖、保种以及在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr1* 基因小鼠的制备进行探讨。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522604);国家自然科学基金杰出青年基金(30425023);国家自然科学基金重点项目(30530410)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Project, 2005CB522604), the National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (30425023) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30530410)

作者简介: 李福兵,男,重庆市铜梁县人,博士研究生,主要从事 *fgfr1* 信号通路在骨骼发育和骨折修复中的作用的研究。电话:(023)68757040,E-mail:abbilson@yahoo.com.cn

通信作者: 陈 林,电话:(023)68757041,E-mail:linchen70@163.com

收稿日期: 2007-09-14;**修回日期:** 2007-11-09

1　材料与方法

1.1　实验动物

*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠从美国国立卫生研究院(NIH)引进,雌雄各 2 只。OC-Cre 转基因小鼠[7]由军事医学科学院杨晓教授惠赠,雌雄各 2 只,该小鼠在成熟成骨细胞中表达 Cre 重组酶。SPF 级 C57BL/6J 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司[许可证编号:SCXK(沪)2003-0003],饲养于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。所有实验动物操作均经第三军医大学实验动物管理委员会许可[执行标准 SYXK(军 2002032)]。

1.2　*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠的饲养和保种

*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠的饲养按照 SPF 动物饲养标准执行,经隔离饲养观察未见异常后进入饲养区,严格按照 SPF 动物管理相关规定进行实验操作。*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠保种采用 *fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配保种。

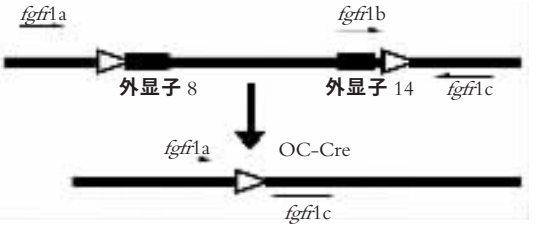
1.3　*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠鉴定及保种

1.3.1　小鼠基因组 DNA 的提取　　采取剪取脚趾编号方法,从前肢到后肢,从右至左依次编号。剪取的脚趾组织用于提取基因组 DNA。基因组 DNA 提取大致步骤如下:组织放入 1.5 ml EP 管中,加入 200 μl 裂解液(0.5% SDS, 0.1 mol/L NaCl,0.05 mol/L EDTA,0.01 mol/L Tris · HCl,pH 8.0,用前加 20 mg/ml 蛋白酶 K 2 μl),55 ℃消化过夜。加入 100 μl 6 mol/L NaCl,剧烈振荡(大于 200 次)后,冰浴 10 ~ 30 min,然后 14 000 r/min 离心 10 min,取上清,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,干燥后加入 TE 缓冲液 50 μl,56 ℃溶解 DNA 1 h,4 ℃保存,用于基因型鉴定。

1.3.2　*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠基因型鉴定及保种策略　　*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配后得到的后代理论上全为 *fgfr*1$^{flox/+}$杂合子小鼠,用于保种。*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠的基因型[6]中,8 ~ 14 号外显子两端含有 2 个 LoxP 序列,采用引物 *fgfr*1b 和 *fgfr*1c 进行小鼠的基因型鉴定(图 1)。2 条染色体都带有 2 个 LoxP 序列的纯合子小鼠,PCR 仅扩增得到 1 条 400 bp 左右的条带。1 条染色体带 2 个 LoxP 序列,同时另外 1 条染色体为野生型的杂合子小鼠 PCR 扩增出 400 bp 和 360 bp 2 条带。野生型小鼠 PCR 仅扩增出 1 条约 360 bp 的条带。引物 *fgfr*1b 和 *fgfr*1c 序列分别为:5′-CTGGTATCCTGTGCCTATC-3′和 5′-CAATCTGATCCCAAGACCAC-3′。PCR 反应体系参照天为时代公司的试剂说明书。PCR 条件:94 ℃ 4 min; 94 ℃ 40 s, 58 ℃ 1 min, 72 ℃ 30 s 32 个循环; 72 ℃ 10 min; 4 ℃保存。PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳。电泳完成后用 Bio-Rad 凝胶电泳成像仪照相。

1.4　成熟成骨细胞中敲除 *fgfr*1 纯合子小鼠的交配策略及鉴定方法

*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠与在特定细胞、组织或器官表达 Cre 重组酶的小鼠交配后,可以把表达 Cre 细胞的 *fgfr*1 基因的 8 ~ 14 号外显子区域敲除(图 1)。*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠与 OC-Cre 转基因小鼠交配,出生后代通过 PCR 筛选。鉴定 Cre 引物为 OCF1:5′-ATGTCTAGGCATGCATAGGGT-3′(位于 Osteocalcin 启动子)和 OCR1:5′-GCATCGACCGGTAATGCAGGC-3′(位于 Cre),鉴定 *fgfr*1引物为 *fgfr*1b 和 *fgfr*1c。经鉴定,PCR 结果示 Cre 阳性,并且 *fgfr*1 为杂合子(扩增出约 400 bp 和 360 bp 2 条带)的小鼠留用,记为 *fgfr*1$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$,同时用引物 fgfr1a 和 *fgfr*1c 进行重组鉴定;然后用 *fgfr*1$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠与 *fgfr*1$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠交配,通过 PCR 筛选获取 *fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠和 *fgfr*1$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠。通过 *fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠和 *fgfr*1$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠交配,可以获得 1∶1 的 *fgfr*1$^{flox/flox}$和 *fgfr*1$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠。见图 2。



△: LoxP 回文序列

图 1　*fgfr*1 条件性敲除小鼠单拷贝敲除示意图

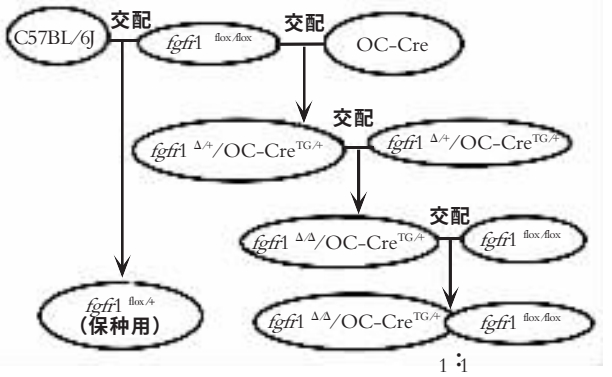
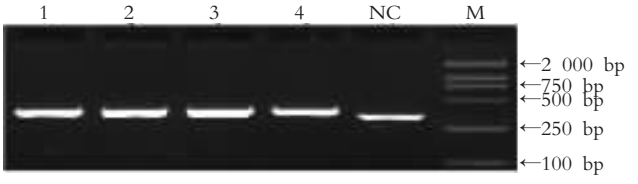


图 2　敲除小鼠骨骼中成熟成骨细胞 *fgfr*1 的小鼠交配示意图

2　结果

2.1　引进小鼠 PCR 鉴定结果

剪取引进小鼠尾组织提取基因组 DNA,通过 PCR 鉴定基因型。PCR 引物为 *fgfr*1b 和 *fgfr*1c, PCR 鉴定照片见图 3,显示扩增片段大小约为400 bp,阴性对照(negative control, NC)成立,4 只引进小鼠基因型全为 *fgfr*1$^{flox/flox}$。

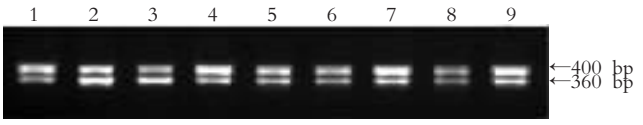


1 ~ 4:引进小鼠;NC:阴性对照;M:DNA 标准(DL 2000)

图 3　引进 *fgfr*1 条件性敲除小鼠 PCR 鉴定结果

2.2　引进小鼠的繁殖保种

引进 *fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配成功保种并获得 *fgfr*1 杂合子(*fgfr*1$^{flox/+}$)小鼠(图 4),后代的基因型符合孟德尔遗传定律。



1~9:后代样本

图4 *fgfr1* 杂合子条件性敲除小鼠 PCR 鉴定结果

2.3 成熟成骨细胞中敲除*fgfr1*基因小鼠的繁殖与鉴定

fgfr1$^{flox/flox}$小鼠与 OC-Cre 小鼠交配可以获得 *fgfr1*$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠，*fgfr1*$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠与 *fgfr1*$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠交配获取 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠。为研究 *fgfr1* 在成熟成骨细胞中的作用可以采用 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠与*fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠交配，获取的小鼠中有 50% 为敲除 *fgfr1* 的小鼠。以上 3 种交配方式所获得的小鼠基因型均符合孟德尔遗传定律。*fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠与*fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠交配获取的后代 PCR 鉴定结果见图 5。

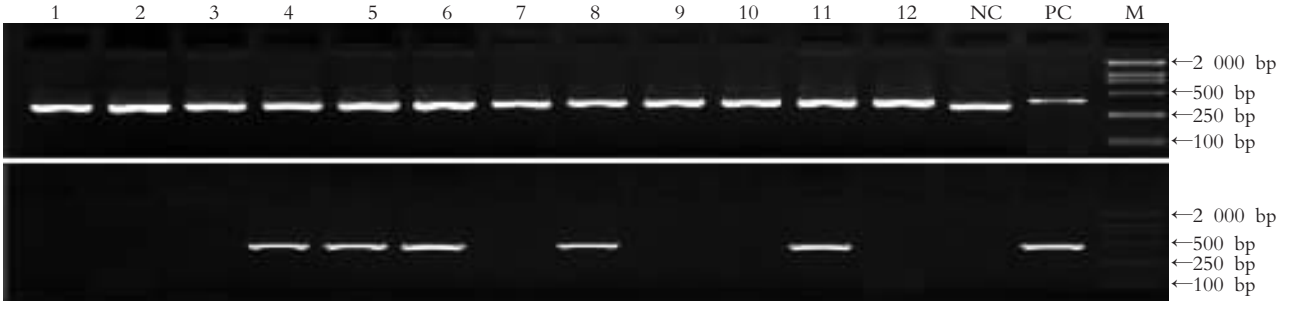
3 讨论

3.1 条件性基因敲除技术的优势

随着现代分子生物学的发展和应用，人们对基因功能有了更深入的探索，尤其是转基因和基因敲除技术的应用。但是部分基因是胚胎发育所必需的，这些基因敲除后可导致胚胎期死亡，因此基因全身敲除或者转基因技术无法解析这些基因的生理功能。基因条件性敲除技术是在体或离体(*in vitro*)研究特定基因在某一细胞、组织、器官以及在同一细胞不同阶段的生理功能的重要手段之一，是从遗传上解剖特定基因功能的非常有效可行的研究手段。该技术的应用可以弥补全基因敲除的不足，但是由于并非完全敲除该基因，敲除效率也不是 100%，所以也不能替代全基因敲除技术。*fgfr1* 全身敲除将导致小鼠胚胎期死亡[1]，因此全基因敲除技术没法解析该基因在机体的功能。已有的研究表明 *fgfr1* 在胚胎形成、细胞增生凋亡和骨骼发育等多种生理过程中都具有很重要的作用，但其分子机制还不清楚[8]。为了研究*fgfr1*基因在小鼠骨骼发育中对成熟成骨细胞的调节作用以及如何影响成年期骨骼稳态的维持，我们利用*fgfr1*$^{flox/flox}$(也表示为 *fgfr1*^{CKO}或者 *fgfr1*$^{co/co}$)条件性敲除小鼠与 OC-Cre 小鼠交配，成功获得在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr1* 基因的敲除小鼠，表示为 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$。*fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠只有在表达 Cre 的成熟成骨细胞中才能敲除基因 *fgfr1*，在没有 Cre 表达的细胞中该细胞的基因型仍然为 *fgfr1*$^{flox/flox}$，由此可以实现细胞特异性敲除 *fgfr1* 基因，并且可以有效避免 *fgfr1* 全敲除后导致的胚胎期死亡。此外，*fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠与其他组织特异性 Cre 小鼠交配，可以研究 *fgfr1* 在相应组织细胞中的功能，因此 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠和细胞或组织特异性 Cre 小鼠的获得是研究这类基因的前提。目前，利用 2 种或者 2 种以上的条件性基因敲除小鼠与特定组织表达 Cre 的转基因小鼠交配来研究基因之间的相互作用已成为功能基因组学研究基因功能的一种趋势。

3.2 基因条件性敲除小鼠交配策略的选择原则

条件性基因敲除小鼠的交配比较繁琐，不同交配方式获得组织细胞特异性基因敲除小鼠所需时间和所耗费的精力不同。为了快速获得足够数量的在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr1* 基因的敲除小鼠，我们利用 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配保种。采用 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠与 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠交配来获取在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr1* 的小鼠(图 2)。获得 *fgfr1*$^{\triangle/+}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠后，也可以采用杂合子小鼠之间进行交配获取杂合子敲除、纯合子敲除和野生型小鼠，这种交配方式的优点是可以获取杂合子敲除小鼠，从而可以检测杂合子敲除小鼠是否有表型。在杂合子小鼠没有表型的情况下，如果仅为了获得纯合子敲除小鼠 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$，则 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠与 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$交配可以更快获得在特定细胞中敲除 *fgfr1* 的小鼠和 *fgfr1*$^{flox/flox}$对照小鼠。但是，如果杂合子小鼠有表型，则最好用杂合子小鼠作为对照，可以研究杂合子小鼠的表型究竟是 Cre 引起还是该基因本身的生理功能，从而更加准确的证明该基因的功能以及基因剂量与基因功能的关系。此外，也可以先利用



1~12:后代样本；NC：阴性对照；PC：阳性对照；M：DNA 标准(DL 2000)

图5 *fgfr1*$^{\triangle/\triangle}$/OC-Cre$^{TG/+}$小鼠与 *fgfr1*$^{flox/flox}$小鼠的后代的 PCR 鉴定结果

全身表达 Cre 的 EⅡ-Cre 或者 CMV-Cre 转基因小鼠与 *fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠交配,先全身敲除 1 个拷贝,然后再与在特定细胞或者组织表达 Cre 的小鼠交配,获取在特定细胞或组织中敲除该基因的小鼠。不过此方法交配策略复杂,消耗时间长,利用此法获得全身敲除 1 个拷贝的基因可能引起相应的表型,这种小鼠也可以用于研究该基因是否存在基因剂量效应问题。值得注意的是用 EⅡ-Cre 小鼠与 *fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠交配敲除 1 个基因后,需要进一步用含 EⅡ-Cre 的杂合子小鼠与野生型小鼠交配,选取剔除 EⅡ-Cre 拷贝并含有敲除拷贝的基因敲除小鼠。

3.3　条件性基因敲除小鼠的优势

条件性基因敲除技术是从遗传水平上剖析基因功能,这为研究胚胎发育所必需的基因在胚胎期后的生理功能提供了强有力的工具[9,10]。目前,国外已成功建立多个基因的条件性基因敲除动物模型[11-13]以及不同的 Cre 转基因小鼠,这为研究特定基因在特定的细胞、组织、器官的作用[14],以及该基因在发育过程中不同时间的作用提供了很好的平台[15]。由于国内条件、信息以及硬件设施的限制,目前利用条件性基因敲除技术研究特定基因在发育和不同疾病中的作用的报道较少[16-18]。本实验室从美国引进*fgfr*1$^{flox/flox}$小鼠,成功保种繁殖,并已经获得在成熟成骨细胞中敲除 *fgfr*1 基因的小鼠,为研究 *fgfr*1 在成熟成骨细胞中的作用和在骨折修复的作用奠定了基础,并为研究成年期骨稳态的维持提供了平台。但是与经典基因敲除技术相比,条件性基因敲除技术也存在一些不足:①条件性基因敲除小鼠的获得、繁殖、保种和用于研究基因功能显得更为复杂、繁琐和耗时。②条件性基因敲除小鼠应用于基因功能研究还必须依靠组织或细胞特异性表达 Cre 的转基因小鼠的获得。由于转基因小鼠转入基因具有随机性,不同实验室获得的同一启动子驱动表达 Cre 的转基因小鼠的 Cre 活性可能存在差异,这为实验的重复性带来了一定的难度。尽管如此,条件性基因敲除技术仍然是一项功能强大的解析基因功能的工具,并且与经典基因敲除技术之间不能相互替代。

参考文献:

[1] Chen L, Deng C X. Roles of FGF signaling in skeletal development and human genetic diseases[J]. Front Biosci, 2005, 10: 1961-1976.

[2] Xu X, Weinstein M, Li C, *et al*. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) and their roles in limb development[J]. Cell Tissue Res, 1999, 296(1): 33-43.

[3] Marie P J, Coffin J D, Hurley M M. FGF and FGFR signaling in chondrodysplasias and craniosynostosis[J]. J Cell Biochem, 2005, 96(5): 888-896.

[4] Rice D P, Rice R, Thesleff I. Molecular mechanisms in calvarial bone and suture development, and their relation to craniosynostosis[J]. Eur J Orthod, 2003, 25(2): 139-148.

[5] Kindblom J M, Gevers E F, Skrtic S M, *et al*. Increased adipogenesis in bone marrow but decreased bone mineral density in mice devoid of thyroid hormone receptors[J]. Bone, 2005, 36(4): 607-616.

[6] Xu X, Qiao W, Li C, *et al*. Generation of Fgfr1 conditional knockout mice[J]. Genesis, 2002, 32(2): 85-86.

[7] Tan X, Weng T, Zhang J, *et al*. Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis[J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 13): 2162-2170.

[8] Li F B, Du X L, Chen L. Role of Fibroblast growth factor receptor 1 in the bone development and skeletal disease[J]. J Medi Coll PLA, 2007, 22(6): 376-384.

[9] Lin Y, Liu G, Wang F. Generation of an Fgf 9 conditional null allele [J]. Genesis, 2006, 44(3): 150-154.

[10] Razzaque M S, Soegiarto D W, Chang D, *et al*. Conditional deletion of Indian hedgehog from collagen type 2alpha1-expressing cells results in abnormal endochondral bone formation[J]. J Pathol, 2005, 207(4): 453-461.

[11] Li W, Qiao W, Chen L, *et al*. Squamous cell carcinoma and mammary abscess formation through squamous metaplasia in Smad4/Dpc4 conditional knockout mice[J]. Development, 2003, 130(24): 6143-6153.

[12] Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, *et al*. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts[J]. J Clin Invest, 2006, 116(12): 3150-3159.

[13] Jacob A L, Smith C, Partanen J, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 1 signaling in the osteo-chondrogenic cell lineage regulates sequential steps of osteoblast maturation[J]. Dev Biol, 2006, 296(2): 315-328.

[14] Belteki G, Haigh J, Kabacs N, *et al*. Conditional and inducible transgene expression in mice through the combinatorial use of Cre-mediated recombination and tetracycline induction[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(5): e51.

[15] Yu K, Xu J, Liu Z, *et al*. Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth[J]. Development, 2003, 130(13): 3063-3074.

[16] Liu X, Bruxvoort K J, Zylstra C R, *et al*. Lifelong accumulation of bone in mice lacking Pten in osteoblasts[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(7): 2259-2264.

[17] Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe B D, *et al*. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing[J]. Nat Genet, 2006, 38(12): 1424-1429.

[18] 赵　玲, 杜晓兰, 苏　楠, 等. HIF-1α 条件性基因敲除嵌合体小鼠的获得[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(14): 1361-1363.

(编辑　吴培红)