

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.21.001

文章编号: 1005-8982 (2019) 21-0001-06

基础研究·论著

## DDR2 血管内皮细胞条件性基因敲除小鼠的复制、鉴定及表型分析\*

王婷婷<sup>1</sup>, 卜歆<sup>2</sup>, 李金奎<sup>3</sup>, 王娜<sup>1</sup>, 邱意开<sup>1</sup>, 岳振生<sup>2</sup>, 苏金<sup>2</sup>, 张淑雅<sup>1</sup>

[1. 宁夏医科大学基础医学院 生育力保持教育部重点实验室(生物化学与分子生物学系), 宁夏 银川 750004; 2. 空军军医大学基础医学院 生物化学与分子生物教研室, 陕西 西安 710032; 3. 宁夏医科大学总医院 急诊科, 宁夏 银川 750004]

**摘要:** **目的** 应用 Cre/LoxP 系统复制盘状结构域受体 2 (DDR2) 在血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除小鼠模型  $DDR2^{iAEC}$  ( $DDR2^{lox/lox}$ ,  $Cdh5-Cre/ER^{T2}$ ), 并分析其在肝脏中的表型。**方法** 复制 DDR2 打靶载体, 通过电转入小鼠胚胎干细胞 (ES 细胞) 打靶, 通过聚合酶链反应 (PCR) + 脱氧核糖核酸 (DNA) 印迹法鉴定筛选阳性 ES 细胞, 将阳性的 ES 细胞注射到 C57BL/6N 小鼠囊胚, 移植入受体小鼠子宫以获得嵌合体小鼠。将得到的嵌合体小鼠与 C57BL/6N 小鼠回交得到 F0 杂合子, F0 代杂合小鼠自交筛选获得 F1 代  $DDR2^{lox/lox}$  小鼠, 该小鼠与  $Cdh5-Cre/ER^{T2}$  小鼠杂交, 通过子代自交获得  $DDR2$  在血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除 ( $DDR2^{lox/lox}$ ,  $Cdh5-Cre/ER^{T2}$ ) 小鼠。他莫昔芬诱导血管内皮细胞上  $DDR2$  基因敲除, 对小鼠进行表型分析。**结果** 获得  $DDR2$  血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除小鼠  $DDR2^{iAEC}$  ( $DDR2^{lox/lox}$ ,  $Cdh5-Cre/ER^{T2}$ ),  $DDR2^{iAEC}$  小鼠出生时符合孟德尔遗传定律, 发育良好, 他莫昔芬诱导敲除小鼠血管内皮细胞  $DDR2$  基因表达后, 小鼠出现自发性肝纤维化及黄体血管新生障碍等表型。**结论** 成功复制  $DDR2$  血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除小鼠模型。血管内皮细胞  $DDR2$  缺失能导致自发性肝纤维化。

**关键词:** 肝纤维化; 胶原盘状结构域受体 2; 血管内皮细胞; 基因敲除技术; Cre/LoxP

**中图分类号:** R394.3

**文献标识码:** A

## Generation, genotyping and phenotype analysis of DDR2 endothelial cell conditional knockout mice\*

Ting-ting Wang<sup>1</sup>, Xin Bu<sup>2</sup>, Jin-kui Li<sup>3</sup>, Na Wang<sup>1</sup>, Yi-kai Qiu<sup>1</sup>,  
Zhen-sheng Yue<sup>2</sup>, Jin Su<sup>2</sup>, Shu-ya Zhang<sup>1</sup>

[1. Department of Key Laboratory of Fertility Maintenance (Biochemistry and Molecular Biology), Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Air Force Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China; 3. Department of Emergency, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China]

**Abstract: Objective** To create a tamoxifen induced discoidin domain receptor 2 (DDR2) endothelial conditional knockout mouse line  $DDR2^{iAEC}$  ( $DDR2^{lox/lox}$ ;  $Cdh5-Cre/ER^{T2}$ ) by Cre-LoxP system and to analyzed the phenotype in liver. **Methods** DDR2 conditional knockout targeting vector was constructed and then transfected into mouse embryonic stem (MES) by electroporation. The successfully transferred MES cells were screened by PCR and Southern-blotting to identify positive cells. The positive targeted MES cells were microinjected into the

收稿日期: 2019-05-25

\* 基金项目: 教育部春晖计划项目 (No: Z2016053); 国家自然科学基金 (No: 31560290, 81702845)

[通信作者] 张淑雅, E-mail: zhangshuya1268@163.com

blastula of *C57 BL/6N* mice and chimeric mice were generated after transplanting the blastula into the host mice. After crossing breeding between the chimeric and *C57BL/6N* mice to get F0 heterozygote, which inbred and were screened,  $DDR2^{flx/flx}$  mice were generated.  $DDR2$  Endothelial cell conditional knockout mice ( $DDR2^{flx/flx}; Cdh5-Cre/ER^{T2}$ ) could be further gained by crossing breeding between *Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup>* transgenic and  $DDR2^{flx/flx}$  mice. The *DDR2* gene deletion on vascular endothelial cells was achieved by tamoxifen induction, and the phenotypes of mice were analyzed. **Results** We had acquired  $DDR2^{iAEC}$  ( $DDR2^{flx/flx}; Cdh5-Cre/ER^{T2}$ ) mice successfully. The deletion of *DDR2* gene expression on vascular endothelial cells was successfully induced by tamoxifen.  $DDR2^{iAEC}$  mice were comparable with Mendelian's law at birth and can grow up with normal development.  $DDR2^{iAEC}$  mice showed spontaneous liver fibrosis and luteal angiogenesis disorder compared to WT mice. **Conclusions** We have successfully generated a *DDR2* endothelial specific knockout mouse line and find endothelial *DDR2* deficiency in mice induced spontaneous liver fibrosis, which lay a foundation for later learning on the molecular function of *DDR2* in vascular endothelial cell.

**Keywords:** liver cirrhosis; discoidin domain receptor 2; endothelial cells; gene knockout techniques; *Cre/LoxP*

胶原的盘状结构域受体 2 (discoidin domain receptor 2, *DDR2*) 是一种位于细胞膜的酪氨酸蛋白激酶受体, 由胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域组成, 胞外盘状结构域被胶原识别并激活, 进而介导盘状结构域发生二聚化, 触发胞内催化结构域的酪氨酸残基发生自磷酸化<sup>[1]</sup>。磷酸化的酪氨酸激酶介导细胞外基质胶原向细胞内的信号传递<sup>[2]</sup>。*DDR2* 高表达于激活状态的血管内皮细胞 (例如, 心脏瓣膜内皮细胞发生内皮间充质转化的过程<sup>[3]</sup>, 肿瘤血管内皮细胞<sup>[4]</sup>)。前期研究发现, *DDR2* 自发全身性突变缺失小鼠肿瘤血管新生障碍, 能显著抑制肿瘤的生长与转移。另有文献<sup>[5]</sup>报道, *DDR2* 全身性敲除促进小鼠肝纤维化的发生、发展, 提示 *DDR2* 在生理和病理性血管新生中扮演十分重要的调控作用, 但对血管内皮细胞中 *DDR2* 对血管新生的调控机制尚不清楚。为深入研究血管内皮细胞中 *DDR2* 在血管新生中的作用及分子机制, 本研究设计基于同源重组理论, 利用胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES cell) (ES 细胞) 打靶及显微注射技术, 复制  $DDR2^{flx/flx}$  小鼠, 利用 *Cre/LoxP* 系统复制 *DDR2* 在血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除小鼠 ( $DDR2^{flx/flx}; Cdh5-Cre/ER^{T2}$ ), 可以选择性地在小鼠发育的不同时间诱导敲除血管内皮细胞中的 *DDR2*, 希望为深入研究 *DDR2* 在生理性及病理性血管新生中的作用提供帮助。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 *C57BL/6N* 小鼠购自南京大学南京生物医药研究院, *Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup>* 小鼠由空军军医大学

韩骅教授馈赠, 所有实验小鼠均按照无特定病原级动物饲养标准饲养。

1.1.2 试剂与仪器 基因组提取试剂盒 (北京天根生物有限公司), PCR 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), 琼脂糖 (上海碧云天生物技术公司), 他莫昔芬 (美国 Sigma 公司), 玉米油 (美国 Sigma 公司), 小鼠 CD146 免疫磁珠 (德国 Miltenyi 公司, 130-092-007), 小号磁力柱 (德国 Miltenyi 公司, 130-042-201), ECM 培养基 (美国 Scien Cell 公司, 1001), DMEM (美国 Hyclone 公司), IV 型胶原酶 (美国 Sigma 公司, C5138), 100  $\mu$ m 细胞筛网 (美国 BD 公司, 352360), *DDR2* 抗体 (美国 R&D 公司, MAB2538)。MACSTM 全自动组织处理器 (德国 Miltenyi 公司), 低温高速离心机 (美国 Eppendorf 公司), Olympus X71 倒置相差显微镜 (日本奥林巴斯公司), FC500 流式细胞仪 (美国 Beckman coulter 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 *DDR2* 条件性基因敲除 (conditional gene knockout, CKO) 策略 小鼠 *DDR2* 基因全长 116.64 kb, 包含 17 个外显子, 编码的蛋白质由 854 个氨基酸组成, 本策略 (见图 1) 是在第 2 个外显子的下游内含子区插入 FRT-Neo-FRT-LoxP 元件, 在第 3 个外显子的下游的内含子区插入另外一个 LoxP 位点, 利用 *Cre* 重组酶特异识别 34 bp 的部分回文的 LoxP 位点之间的序列, 发生特异性地重组或删除。导致第 3 个外显子区域的 1.1 kb 序列将被 *Cre/LoxP* 系统切除, 形成移码突变而阻止蛋白质的正常翻译。

1.2.2 *DDR2* CKO 打靶载体的构建 如图 2 所示, 含有靶基因的细菌人工染色体 (bacterial artificial

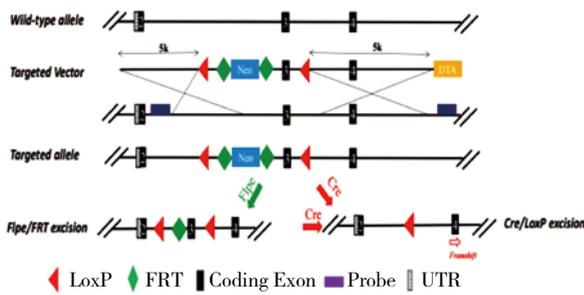


图 1 *DDR2* CKO 策略图

chromosome, BAC) 克隆购自 Invitrogen, 从 BAC 载体扩增 5'-同源臂、3'-同源臂和 *DDR2* 基因的靶向区域, 然后将这 3 个片段连接到具有第 1 个 LoxP 和 FRT-Neo-FRT 的第 2 个 LoxP 元件的载体中。在电穿孔进入 ES 细胞之前, 通过 PCR、酶消化和测序确认靶向载体。PGK/EM7-NeoR 盒作为 ES 细胞靶向步骤的阳性选择标记, 将 Flox 表达菌株与 floxed 小鼠杂交, 或在 ES 细胞阶段表达 Flpe 来除去。TK 是 ES 细胞靶向步骤的阴性选择标记, 随机插入靶基因的细胞将死于细胞毒性。

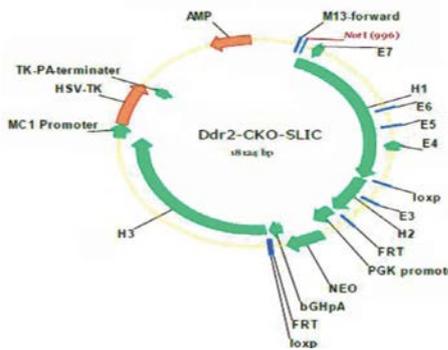


图 2 *DDR2* CKO 打靶载体结构

**1.2.3 ES 细胞克隆筛选及囊胚注射** 将线性化的打靶载体, 电转到 ES 细胞进行打靶, 通过长片段 PCR 及脱氧核苷酸 (DNA) 印迹法筛选出中靶克隆, 将其注射于囊胚, 并移植于受体小鼠子宫, 得到嵌合体小鼠 (嵌合率 >50%)。

**1.2.4 *DDR2*<sup>flx/flx</sup> 小鼠的复制** 根据毛色筛选嵌合率在 50% 及以上的雄性鼠, 将其与 Flper 小鼠配繁一代, 去除 Neo 抗性基因, 排除 Neo 基因对小鼠表型分析的干扰, 以获得 *DDR2*<sup>flx/flx</sup> 小鼠。

**1.2.5 *DDR2* 基因在血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除小鼠的获得** 筛选 *DDR2*<sup>flx/+</sup> 小鼠与 Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup> 小鼠杂交, 并通过子代自交获得 *DDR2* 在血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除的纯合子小鼠 *DDR2*<sup>iΔEC</sup> (*DDR2*<sup>flx/flx</sup> 小鼠, Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup>)。

**1.2.6 血管内皮细胞 *DDR2* 基因诱导敲除** 在小鼠 4 周龄时, 给予 *DDR2*<sup>iΔEC</sup> 小鼠与同窝野生对照组 (wild type, WT) 小鼠腹腔注射他莫昔芬, 剂量为 66 mg/kg, 连续给药 5 d。

**1.2.7 肝血窦内皮细胞的分离、鉴定及 *DDR2* 敲除效率分析** 在小鼠 8 周龄时, 用免疫磁珠法分离肝血窦内皮细胞, 用流式细胞术鉴定细胞纯度, 应用定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 及蛋白免疫印迹法检测血管内皮细胞 *DDR2* 的表达。

**1.2.8 肝脏病理切片 HE 染色、天狼星红染色及 Masson 三色染色** 在小鼠 3 月龄时, 解剖 *DDR2*<sup>iΔEC</sup> 小鼠的肝脏 (选取同窝 *DDR2*<sup>flx/flx</sup> 小鼠肝脏为对照, WT), 进行石蜡包埋, 切片, 通过 HE 染色、天狼星红染色、Masson 染色及免疫组织化学检测肝脏的病理变化。

1.3 统计学方法

采用 Image Pro plus 6.0 和 GraphPad Prism 6.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

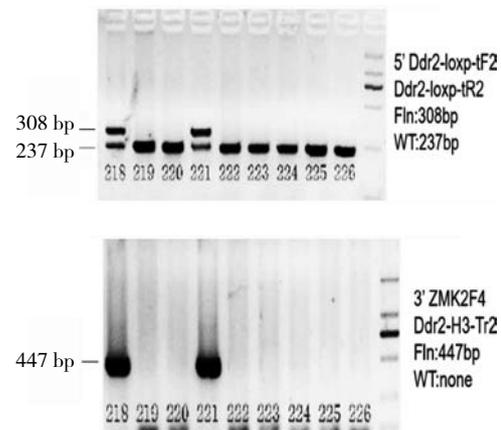
2 结果

2.1 *DDR2* CKO 打靶载体

所有质粒均经 PCR 鉴定, 终载体中 FRT 位点至第 2 个 LoxP 位点间片段均存在。电转后得到药物抗性 ES 细胞克隆 6 个, 分别经长片段 PCR 及 DNA blotting 鉴定, 最终筛选出 4 个阳性克隆。

2.2 嵌合体小鼠及 *DDR2* flox 小鼠

如图 3 所示, 显微注射后得到由基因敲除 ES 细



5'-Fln/WT=308 bp/237 bp, 3'-Fln/WT=447 bp/none, 对小鼠 (218-226) 进行基因型鉴定, 218、221 为杂合子小鼠。

图 3 *DDR2* CKO 小鼠基因鉴定结果

胞和供体胚胎细胞共同发育而来的嵌合小鼠。挑选嵌合率在 50% 及以上的成熟雄性嵌合体小鼠与 Flper 小鼠配繁一代后再与野生型 B6 小鼠进行交配, 得到的 F1 代小鼠, 经 PCR 鉴定基因型后获得杂合体 (基因型表示为: F1n/WT) 小鼠, 218 与 221 为杂合子小鼠, 用于 F0 代交配。

### 2.3 DDR2 血管内皮细胞可诱导性条件性基因敲除小鼠的繁育及鉴定结果

DDR2<sup>flx/flx</sup> 小鼠与 Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup> 小鼠杂交, 对后代自交后获得的小鼠进行基因型鉴定, 成功获得 DDR2 血管内皮细胞诱导性条件性基因敲除小鼠 DDR2<sup>iΔEC</sup> (DDR2<sup>flx/flx</sup>, Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup>)。见图 4。

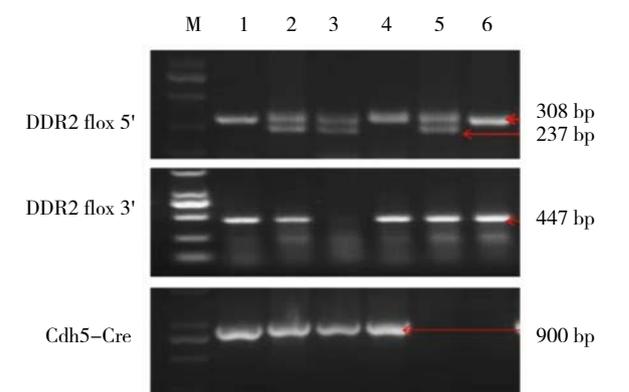
### 2.4 血管内皮细胞 DDR2 基因诱导敲除效率

用免疫磁珠法分离提取肝血窦内皮细胞, 纯度达到 88.4% (见图 5A)。与对照组 (WT) 比较, DDR2 在 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠血管内皮细胞 mRNA 表达下降 >95% (WT 组为 (1.032 ± 0.092), DDR2<sup>iΔEC</sup> 组为 (0.053 ± 0.025),  $t = 6.246, P = 0.002$ ) (见图 5B)。与 WT 组比较, DDR2 在 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠血管内皮细胞中的蛋白表达下降 >95% (DDR2/β-actin 的比值在 WT 组为 (0.568 ± 0.023), DDR2<sup>iΔEC</sup> 组为 (0.020 ± 0.010),  $t = 8.839, P = 0.001$ ) (见图 5C、D), 证明 DDR2<sup>flx/flx</sup> 和

Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup> 能够高效敲除血管内皮细胞上的 DDR2, DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠复制成功。

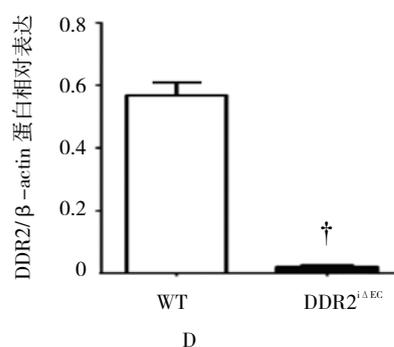
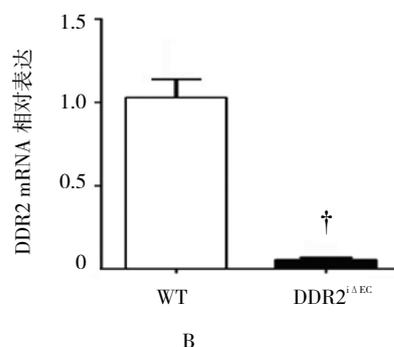
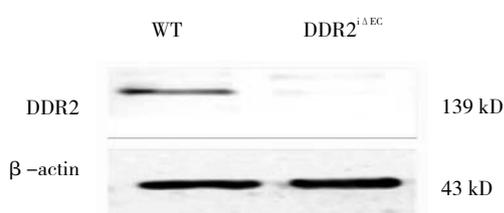
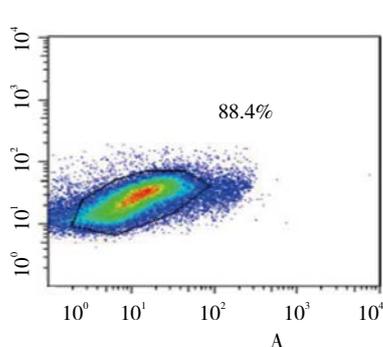
### 2.5 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠肝脏表型分析

3 月龄 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠肝脏呈现自发纤维化。肝脏病理切片 HE 染色 (见图 6A) 显示, DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠肝血窦结构排列异常, 大量炎症细胞浸润, 天狼星红染色 (图 6B、C) 阳性区域与 WT 组比较, DDR2<sup>iΔEC</sup> 组增加 (7.089 ± 0.9852) 倍 ( $t = 5.040, P = 0.003$ )。Masson 染色阳性区域显示, 与 WT 组比较, DDR2<sup>iΔEC</sup> 组增加 (5.499 ± 0.9804) 倍 ( $t = 6.480, P = 0.001$ ) (见图 6D、E)。上述



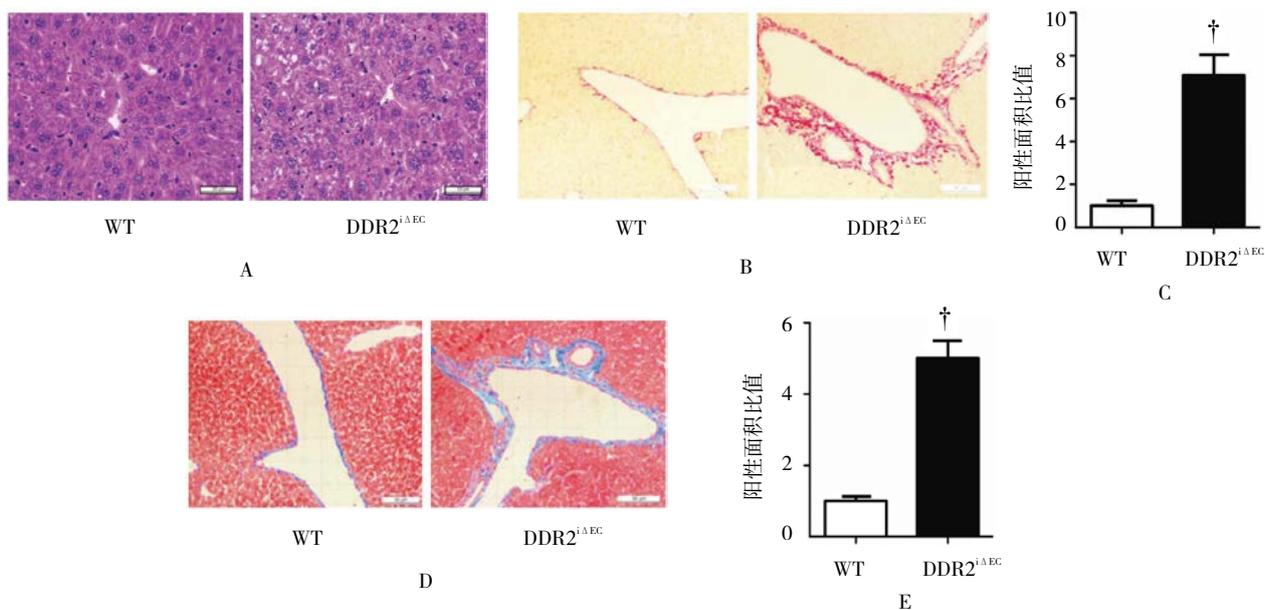
M: Marker; 1、4: DDR2<sup>iΔEC</sup> (DDR2<sup>flx/flx</sup>, Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup>); 2、3: DDR2<sup>flx/+</sup>, Cdh5-Cre/ER<sup>T2</sup>; 5: DDR2<sup>flx/+</sup>; 6: WT (DDR2<sup>flx/flx</sup>) 小鼠。

图 4 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠基因型的鉴定结果



A: 肝血窦内皮细胞的纯度。B: WT 及 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠肝血窦内皮细胞 DDR2 mRNA 的表达。C: WT 及 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠肝血窦内皮细胞 DDR2 蛋白的表达。D: WT 及 DDR2<sup>iΔEC</sup> 小鼠肝血窦内皮细胞 DDR2 蛋白相对表达量。† 与 WT 比较,  $P < 0.05$ 。

图 5 肝血窦内皮细胞纯度及 DDR2 表达



A: 小鼠肝脏组织切片 (HE, 标尺 50  $\mu\text{m}$ ); B: 小鼠肝脏切片 (天狼星红, 标尺 50  $\mu\text{m}$ ); C: 天狼星红染色阳性面积统计分析图; D: 小鼠肝脏切片 (Masson, 标尺 50  $\mu\text{m}$ ); E: Masson 染色阳性面积统计分析图。† 与 WT 比较,  $P < 0.05$ 。

图 6 *DDR2*<sup>iΔEC</sup> 小鼠呈现自发性肝纤维化

结果均表明 *DDR2*<sup>iΔEC</sup> 小鼠肝脏胶原纤维沉积增多, 尤其沉积在血管周围, 提示血管内皮细胞中 *DDR2* 缺失导致肝脏发生自发性纤维化病变。

### 3 讨论

作为细胞外基质胶原 (I、II、III 及 X 型) 的 *DDR2*, 属于膜表面受体型蛋白酪氨酸激酶<sup>[6]</sup>, 胶原识别并激活 *DDR2*, 参与细胞增殖、迁移及细胞外基质的重塑<sup>[7]</sup>。主要在骨骼<sup>[8-9]</sup>、心脏<sup>[10]</sup>、皮肤<sup>[11]</sup>、肾<sup>[12]</sup>、肺<sup>[13-14]</sup> 和卵巢<sup>[15]</sup> 中高表达。近年来, *DDR2* 在血管新生中的作用受到重视, 笔者的前期研究发现 *DDR2* 高表达于肿瘤血管内皮细胞, 肿瘤间质中 *DDR2* 缺失能抑制肿瘤血管新生, 抑制 *DDR2* 可抑制肺纤维化过程中 VEGF 的分泌而抑制病理性血管新生<sup>[16]</sup>, 提示 *DDR2* 在生理性及病理性血管新生中扮演中重要角色。但血管内皮细胞中 *DDR2* 的作用尚未见报道, 深入研究 *DDR2* 在血管内皮细胞中的作用具有重要意义。本研究用基因打靶技术复制 *DDR2*<sup>flx/flx</sup> 小鼠, 并将其与血管内皮细胞特异性 *Cre/ER*<sup>T2</sup> 小鼠 (*Cdh5 Cre/ER*<sup>T2</sup>) 进行交配, 得到 *DDR2*<sup>flx/flx</sup> 和 *Cdh5Cre/ER*<sup>T2</sup> 小鼠, 然后给予他莫昔芬诱导 *Cre* 酶的活性, 根据实验需要, 在特定时间特异性地敲除血管内皮细胞中 *DDR2*, 分离肝血窦内皮细胞, 通过 qPCR 及蛋白免疫印迹法检测 *DDR2* 敲除效率, 发现血管内皮细胞中 *DDR2* 的敲除效率高达 90% 以上, 证明成功复制血管内皮细胞

*DDR2* 诱导性条件性基因敲除小鼠, 为后续深入研究 *DDR2* 在血管内皮细胞中的作用机制奠定基础。在表型分析中发现, 血管内皮细胞 *DDR2* 条件性基因敲除后会诱发小鼠自发的肝纤维化, 笔者将在后续深入研究血管内皮细胞 *DDR2* 缺失导致肝纤维化的机制。

条件性基因敲除小鼠是将某个基因修饰定位于某些特定类型的细胞或小鼠发育的某一特定阶段的一种特殊的基因打靶技术<sup>[17]</sup>。目前条件性基因打靶主要使用来源于大肠杆菌 P1 噬菌体的 *Cre/LoxP* 系统。*Cre/LoxP* 系统主要由两部分组成, *Cre* 重组酶和 *Cre/LoxP* 位点。*Cre/LoxP* 诱导系统目前是最先进的工具之一, 不仅用于特定的细胞类型, 而且是在特定的时间敲除目的基因<sup>[18]</sup>。本研究引用血管内皮细胞的特异性 Marker 基因 *Cdh-5* (又称为 VE-Cadherin) 调控 *Cre* 的启动子<sup>[19]</sup>, 通过启动子驱动 *Cre* 重组酶的表达模式, 可以在血管内皮细胞中完成特异性基因敲除<sup>[20]</sup>。在可诱导性条件性敲除的这个系统中, *Cre* 蛋白质被融合到一种突变的雌激素受体 (ER) 中, 在未诱导的细胞中, *Cre-ER* 被隔离在细胞质中, 不能发挥作用<sup>[21]</sup>。但是在给予他莫昔芬 (是 ER 突变体的配体) 后, ER 和 *Cre* 转移到细胞核, *Cre* 酶识别 loxp 位点的目的基因 *DDR2*, 在 loxp 位点上将目的基因 *DDR2* 切除, 使 *DDR2* 在血管内皮细胞中不能转录和翻译, 从而在内皮细胞中特异性敲除 *DDR2*, 可诱导性敲除的优势在于可根据实验需要选择不同的

时间点进行诱导敲除。

在小鼠的表型分析中发现,  $DDR2^{flx/flx}$  和  $Cre/ER^{T2}$  小鼠在给予他莫昔芬诱导后出现自发性肝纤维化, 这是一个令人兴奋的现象, 提示血管内皮细胞中的  $DDR2$  在防御肝纤维化过程中扮演重要角色。文献报道  $DDR2$  全身敲除小鼠慢性四氯化碳导致的肝纤维化模型中,  $DDR2$  缺失导致肝纤维化加重<sup>[22]</sup>。要阐明血管内皮细胞中  $DDR2$  在肝纤维化中的作用机制需要  $DDR2$  内皮细胞条件性基因敲除小鼠, 本研究复制的  $DDR2^{flx/flx}$  和  $Cdh5-Cre/ER^{T2}$  小鼠将为后续深入研究奠定基础, 具有重要的意义。

#### 参 考 文 献:

- [1] ZHU C, TANG B, SU J, et al. Abnormal accumulation of collagen type I due to the loss of discoidin domain receptor 2 (DDR2) promotes testicular interstitial dysfunction[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e131947.
- [2] VOGEL W F, ABDULHUSSEIN R, FORD C E. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function[J]. Cell Signal, 2006, 18(8): 1108-1116.
- [3] ZHANG S, BU X, ZHAO H, et al. A host deficiency of discoidin domain receptor 2 (DDR2) inhibits both tumor angiogenesis and metastasis[J]. The Journal of Pathology, 2014, 232(4): 436-448.
- [4] GUPTA D, HULL M L, FRASER I, et al. Endometrial biomarkers for the non-invasive diagnosis of endometriosis[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 4: D12165.
- [5] OLASO E, ARTETA B, BENEDICTO A, et al. Loss of discoidin domain receptor 2 promotes hepatic fibrosis after chronic carbon tetrachloride through altered paracrine interactions between hepatic stellate cells and liver-associated macrophages[J]. The American Journal of Pathology, 2011, 179(6): 2894-2904.
- [6] KONITSIOTIS A D, RAYNAL N, BIHAN D, et al. Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor  $DDR2$  in collagen[J]. J Biol Chem, 2008, 283(11): 6861-6868.
- [7] MATSUMURA H, KANO K, de EVSIKOVA C M, et al. Transcriptome analysis reveals an unexpected role of a collagen tyrosine kinase receptor gene,  $DDR2$ , as a regulator of ovarian function[J]. Physiological Genomics, 2009, 39(2): 120-129.
- [8] SUUTRE S, KERNA I, LINTROP M, et al. Evaluation of correlation of articular cartilage staining for  $DDR2$  and proteoglycans with histological tissue damage and the results of radiographic assessment in patients with early stages of knee osteoarthritis[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015, 8(5): 5658.
- [9] HUANG T L, MU N, GU J T, 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.
- [10] VILLOUTREIX B O, MITEVA M A. Discoidin domains as emerging therapeutic targets[J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37(8): 641-659.
- [11] CARIO M.  $DDR1$  and  $DDR2$  in skin[J]. Cell Adh Migr, 2018, 12(4): 386-393.
- [12] RICHTERS A, NGUYEN H D, PHAN T, et al. Identification of type II and III  $DDR2$  inhibitors[J]. J Med Chem, 2014, 57(10): 4252-4262.
- [13] LEE M S, JUNG E A, AN S B, et al. Prevalence of mutations in discoidin domain-containing receptor tyrosine kinase 2 ( $DDR2$ ) in squamous cell lung cancers in Korean patients[J]. Cancer Res Treat, 2017, 49(4): 1065-1076.
- [14] RUIZ P A, JARAI G. Discoidin domain receptors regulate the migration of primary human lung fibroblasts through collagen matrices[J]. Fibrogenesis & Tissue Repair, 2012, 5(1): 3.
- [15] RODGERS R J, IRVING-RODGERS H F. The roles of the ovarian extracellular matrix in fertility[J]. Soc Reprod Fertil Suppl, 2010, 67: 217-230.
- [16] SCOTTON C J, CHAMBERS R C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: The myofibroblast in focus[J]. Chest, 2007, 132: 1311-1321.
- [17] GUAN Z B, WANG K Q, SHUI Y, et al. Establishment of a markerless multiple-gene deletion method based on  $Cre/loxP$  mutant system for *Bacillus pumilus*[J]. J Basic Microbiol, 2017, 57(12): 1065-1068.
- [18] KINEMAN R D, DEL R M, SARMENTO-CABRAL A. 40 years of IGF1: understanding the tissue-specific roles of IGF1/IGF1R in regulating metabolism using the  $Cre/loxP$  system[J]. J Mol Endocrinol, 2018, 61(1): T187-T198.
- [19] MONVOISIN A, ALVA J A, HOFMANN J J, et al. VE-cadherin- $CreERT2$  transgenic mouse: A model for inducible recombination in the endothelium[J]. Developmental Dynamics, 2006, 235(12): 3413-3422.
- [20] ALVA J A, ZOVEIN A C, MONVOISIN A, et al. VE-cadherin- $cre$ -recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells[J]. Developmental Dynamics, 2006, 235(3): 759-767.
- [21] LO S C, LI K C, CHANG Y H, et al. Enhanced critical-size calvarial bone healing by ASCs engineered with  $Cre/loxP$ -based hybrid baculovirus[J]. Biomaterials, 2017, 124: 1-11.
- [22] ZHANG X, YAN M, LIU L, et al. Expression of discoidin domain receptors ( $DDR2$ ) in alcoholic liver fibrosis in rats[J]. Archives of Medical Research, 2010, 41(8): 586-592.

(王荣兵 编辑)