DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170245

·论 著·

CDHR2 基因条件性敲除小鼠模型的构建及鉴定

夏梓元[1]，蒋华波[1]，王 洋[2]，黄美金[3]，陆 斌[1*]

1. 第二军医大学药学院生化药学教研室，上海 200433
2. 第二军医大学长海医院病理科，上海 200433
3. 解放军成都军区昆明总医院肿瘤科，昆明 650010

［摘要］ **目的**：构建 CDHR2 基因条件性敲除小鼠模型，为研究 CDHR2 基因的生物学功能提供条件。**方法**：构建 CDHR2 基因条件打靶载体，电转入小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)，用 G418 和 GANC 筛选阳性细胞克隆。胚胎注射阳性 ES 细胞入小鼠囊胚，获得嵌合体小鼠。嵌合体小鼠与 Cre 小鼠交配获得条件性敲除小鼠。分别通过 PCR 方法和免疫组织化学方法对 CDHR2 的敲除结果进行验证。**结果**：成功构建打靶载体，并获得 6 个正确同源重组的 ES 细胞阳性克隆。阳性 ES 细胞克隆注射入 C57BL/6J 小鼠的囊胚中，获得 5 只嵌合鼠。嵌合鼠再与 Flp 小鼠交配，获得 6 只阳性 F_1 代去 Neo 小鼠。去 Neo 小鼠与 Cre 小鼠杂交，获得 CDHR2 基因肠道特异性敲除小鼠。免疫组织化学检测表明，阳性小鼠肠道组织中的 CDHR2 基因被特异性敲除，而肾脏组织 CDHR2 基因的表达没有受到影响。**结论**：成功构建 CDHR2 基因肠道特异性敲除小鼠，为进一步研究 CDHR2 基因的作用奠定了基础。

［关键词］ CDHR2；基因敲除；Cre/loxP 系统

［中图分类号］ R-33 ［文献标志码］ A

Construction and identification of a CDHR2 gene conditional knockout mouse model

XIA Zi-yuan[1], JIANG Hua-bo[1], WANG Yang[2], HUANG Mei-jin[3], LU Bin[1*]

1. Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Oncology, Kunming General Hospital, PLA Chengdu Military Area Command, Kunming 650010, Yunnan, China

［**Abstract**］ **Objective**: To construct a CDHR2 conditional knockout mouse model, and to provide conditions for the study on biological function of CDHR2 gene. **Methods**: The conditional CDHR2 targeting vector was constructed and transfected into mouse embryonic stem (ES) cells by electroporation. The positive ES cells screened by G418 and GANC were microinjected into the blastocysts of C57BL/6J mice. The chimeric mice were obtained and then mated with Cre mice to obtain conditional CDHR2 knockout mice. The phenotype was analyzed by PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results**: The conditional CDHR2 targeting vector was successfully constructed, with six positive clones of ES cells being obtained. The positive clones of ES cells were microinjected into blastocysts of C57BL/6J mice with 5 chimeric mice being obtained. The chimeric mice were mated with Flp mice, and 6 positive F_1 generation mice without Neo gene were obtained. Finally, such mice were hybridized with Cre mice to obtain intestine-specific CDHR2 knockout mice. Immunohistochemistry assay showed that the CDHR2 gene in intestinal tracts of the positive mice was specifically knocked out. In contrast, the expression of CDHR2 in kidney tissue was not affected. **Conclusions**: The successful construction of intestine-specific CDHR2 knockout mice provides a basis for further functional study on CDHR2 gene.

［**Key Words**］ CDHR2; gene knockout; Cre/loxP system

原钙黏蛋白(protocadherin，PCDH)家族是属于钙黏蛋白超家族中的一员，可以根据其基因结构分为集簇型 PCDH 和非集簇型 PCDH 两类[1]。近年来，多种非集簇型 PCDH 在肿瘤中表达下调，并具有抑制肿瘤生长的作用。如乳腺癌[2]和淋巴瘤[3]中的 PCDH8，胶母细胞瘤中的 PCDH9[4]，胃癌[5]、

［收稿日期］ 2017-03-24 ［接受日期］ 2017-04-15

［基金项目］ 国家自然科学基金(81472283). Supported by National Natural Science Foundation of China(81472283).

［作者简介］ 夏梓元，硕士，住院医师. E-mail：1431449713@qq.com

*通信作者(Corresponding author). Tel：021-81871327，E-mail：binlu@smmu.edu.cn

结直肠癌[6]、胰腺癌[6]、鼻咽癌[7]、食管癌[7]、乳腺癌[8]、宫颈癌[9-10]、肺癌[11]、肝细胞癌[12]、睾丸癌[13]及血液系统肿瘤[14]中的PCDH10，食管鳞状细胞癌中的PCDH17[15]，小细胞肺癌中的PCDH20[16]等均被发现表达下调或缺失，表明该家族分子在肿瘤发生发展中具有重要的作用。

CDHR2又称PCDH24，属于PCDH家族中非集簇型PCDH的一类膜蛋白。其最初被发现在肝、肾和结直肠中表达，曾被命名为protocadherin LKC[17]。CDHR2的基因位于染色体5q35，由1 310个氨基酸组成，在蛋白结构上包括7个钙黏蛋白重复结构域、1个跨膜区和PDZ结合域。研究[18]发现，CDHR2在结直肠癌中呈低表达，而HCT116细胞过表达CDHR2则可促使细胞发生接触抑制现象；体内实验还发现，CDHR2可抑制HCT116细胞在裸鼠体内的成瘤。这些结果表明，CDHR2在结直肠癌中具有抑制肿瘤细胞生长的作用。为进一步阐明CDHR2的生物学功能，本研究通过制备$CDHR2^{flox/+}$小鼠，再与Cre小鼠进行交配，最后成功获得了CDHR2基因肠道特异性敲除小鼠。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

1.1.1 实验动物 C57BL/6和B6.Cg-Tg(Vil1-cre)1 000 Gum/J品系小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司，由第二军医大学实验动物中心(SPF级)饲养。

1.1.2 主要试剂 血液/组织/细胞基因组提取试剂盒购自北京天根生化有限公司；GeneRuler 1 kb DNA Ladder购自ThremoFisher公司；DL2000 Marker购自北京天根生化有限公司；Go*Taq*® G2 Green Master Mixes购自Promega公司；PrimeSTAR GXL DNA Polymerase购自大连宝生物工程公司；抗CDHR2兔多抗由本教研室制备；GTVision™ Ⅲ抗鼠、兔通用型免疫组化检测试剂盒购自基因科技(上海)股份有限公司。

1.2 CDHR2基因肠道特异性敲除小鼠的构建策略 根据小鼠CDHR2基因组序列(NC_000079.6)设计特异性敲除CDHR2第4和第5外显子的CDHR2条件性基因敲除打靶载体(图1)。在CDHR2基因的第4号外显子上游的内含子中插入loxP位点，在第5号外显子下游内含子序列中插入FRT-pGK-Neo-FRT-loxP元件。通过同源重组，将打靶载体序列插入小鼠ES细胞基因组中，在Flp重组下去除2个FRT位点之间的Neo抗性基因，最后将该小鼠模型与肠道特异性表达Cre酶的小鼠进行杂交，获得肠道特异性敲除CDHR2基因的小鼠。

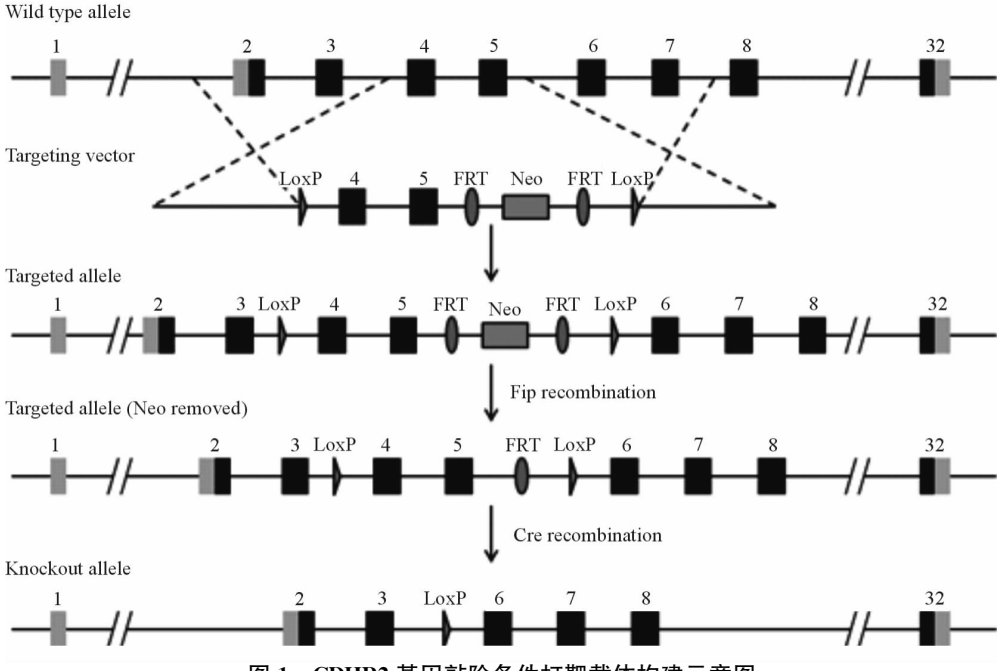


图1 CDHR2基因敲除条件打靶载体构建示意图

1.3 CDHR2基因肠道特异性敲除小鼠的构建方法 将构建成功的打靶载体，经线性化后，电穿孔转染C57BL/6J*129S3 ES细胞，以G418和GANC药物进行筛选；经长片段PCR鉴定，获得正确同源

重组的阳性克隆。阳性 ES 细胞克隆经扩增后，注射入 C57BL/6J 小鼠的囊胚中，获得嵌合鼠。嵌合小鼠通过与 Flp 小鼠交配，获得去除 Neo 基因的 flox 杂合子小鼠($CDHR2^{flox/+}$：Flp^{+})，后者再与野生型小鼠交配，获得分离掉 Flp 基因型的 flox 小鼠($CDHR2^{flox/+}$)。将获得的去 Neo 及 Flp 的 flox 阳性杂合子小鼠($CDHR2^{flox/+}$)与 Cre 小鼠 B6. Cg-Tg (Vil1-cre)1 000 Gum/J 交配，最终获得 flox 阳性且 Cre 阳性的小鼠($CDHR2^{flox/+}$：Cre^{+})。

1.4 小鼠基因型的 PCR 方法鉴定 通过 PCR 对同源重组阳性克隆进行筛选。对于 5′臂同源重组的鉴定使用 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase，反应条件：98℃ 2 min；98℃ 10 s，68℃ 3 min，35 个循环；68℃ 10 min。以 Flox 引物对(表 1)，阳性克隆出 4.2 kb 片段，阴性克隆出 8.9 kb 片段。

对于 Cre 酶的 PCR 鉴定，采用 Go*Taq* G2 Green Master Mix，反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 5 min。以 Cre 引物对(表 1)，阳性克隆出 309 bp 片段。

表 1 基因型鉴定引物序列

Genotype	Primer of sequence(5′→3′)	Primer type
Flox	AGCCACACCCCAAACAGAGCATC	Forward
	GCAAAAGCCAAGGGGTTAGAGACG	Reverse
Cre	ATTTGCCTGCATTACCGGTCG	Forward
	CAGCATTGCTGTCACTTGGTC	Reverse

1.5 CDHR2 基因肠道特异性敲除小鼠表型分析 通过提取 CDHR2 基因条件性敲除小鼠和野生型小鼠的结肠和肾脏组织，经甲醛溶液固定后，经石蜡包埋、切片、H-E 染色后进行形态学观察，免疫组织化学检测 CDHR2 的表达情况。

2 结 果

2.1 CDHR2 基因条件性敲除嵌合体小鼠的建立 通过构建 CDHR2 基因条件性敲除载体，并电转胚胎干细胞进行打靶，共获得抗性 ES 细胞克隆 125 个。抽提抗性 ES 细胞克隆的基因组 DNA 后，通过长片段 PCR 的方式对同源重组阳性克隆进行筛选，共获得 6 个正确同源重组的阳性 ES 细胞克隆(图 1)。取阳性 ES 细胞克隆，经扩增后，注射入 C57BL/6J 小鼠囊胚 33 个，通过胚胎移植，共获得 5 只嵌合体雄鼠。

2.2 F_1 代去 Neo 小鼠获得及基因型鉴定 取嵌合体雄鼠与 Flp 小鼠交配，繁育获得 F_1 代去 Neo 小鼠($CDHR2^{flox/+}$：Flp^{+})。经 PCR 筛选及测序确认，最终获得 6 只阳性杂合子小鼠(9、14、27、33、35、42 号，图 2)。

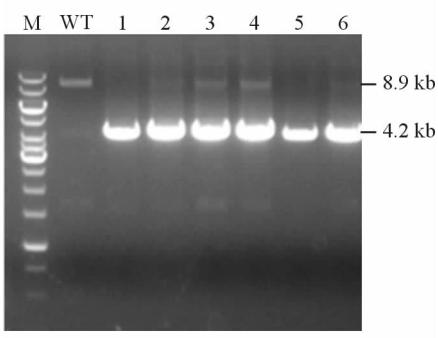


图 1 同源重组 ES 细胞基因型 PCR 鉴定结果

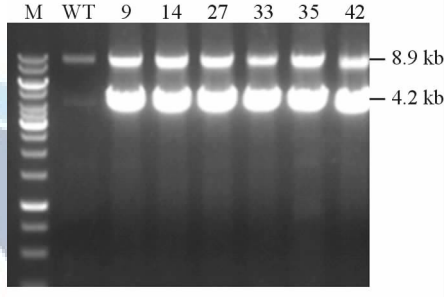


图 2 F_1 代去 Neo 小鼠基因型 PCR 鉴定结果

2.3 肠道组织特异性表达 Cre 酶小鼠的获得 取 F_1 代去 Neo 小鼠($CDHR2^{flox/+}$：Flp^{+})与 Vil1-Cre 小鼠交配，获得 flox 阳性且 Cre 阳性小鼠($CDHR2^{flox/+}$：Cre^{+})。$CDHR2^{flox/+}$：Cre^{+}小鼠交配后获得 flox 纯合且 Cre 阳性的小鼠($CDHR2^{flox/flox}$：Cre^{+})。结果表明，32、36、37 号小鼠 Cre 酶表达阳性(图 3)，提示其肠道组织中 CDHR2 可能被敲除。

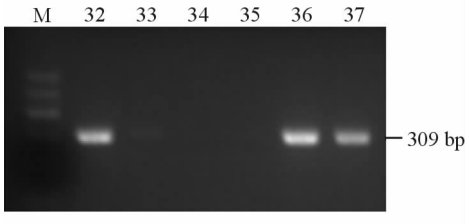


图 3 小鼠 Cre 酶表达情况的基因检测

2.4 CDHR2 基因肠道组织特异性敲除小鼠的组织标本鉴定 H-E 染色显示，CDHR2 基因肠道组织特异性敲除小鼠和野生小鼠的结肠和肾脏组织的形态学无明显改变。免疫组织化学检测显示，野生小鼠的结肠和肾脏组织均存在 CDHR2 的表达，尤其以结肠组织表达较为显著；而 CDHR2 基因肠

道组织特异性敲除小鼠结肠组织中 CDHR2 的表达呈阴性，肾脏组织中仍有 CDHR2 的表达，表明 CDHR2 基因在肠道组织中被特异性敲除，模型构建成功(图 4)。

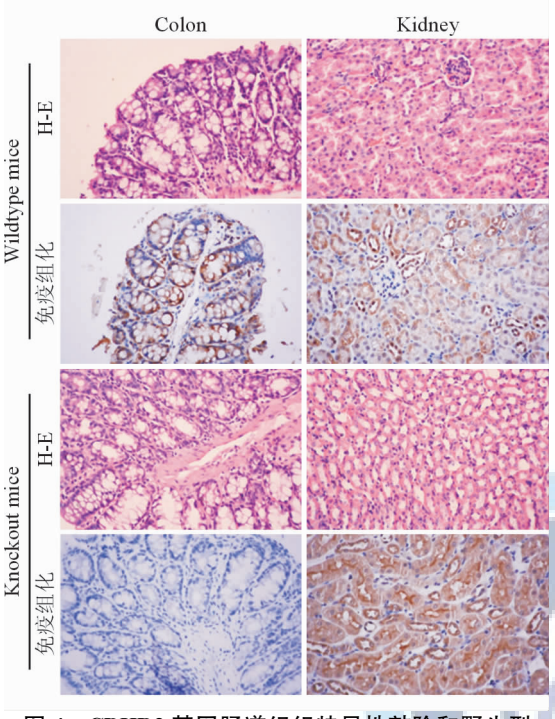


图 4　CDHR2 基因肠道组织特异性敲除和野生型小鼠结肠和肾脏组织形态及 CDHR2 的表达

Original magnification：×40

3　讨　论

基因敲除小鼠是动物水平上研究基因功能的利器。常规基因敲除小鼠是通过基因打靶技术，将需要敲除基因的几个重要的外显子或功能区域去除，使敲除小鼠全身所有的组织和细胞中均不表达该基因产物。但如果敲除该基因是胚胎致死性的，则难以获得成年小鼠以进行功能研究。而通过条件性基因敲除小鼠，首先把两个 loxP 位点放到目的基因的一个或几个重要外显子的两侧构建成嵌合小鼠，再与特定组织中表达 Cre 酶的小鼠进行杂交，可实现在特定组织或细胞中敲除基因，同时该基因在其他组织或细胞中的表达不受影响的目的。这样可避免胚胎致死性基因对小鼠生长发育的影响，从而能更好地研究相关基因在特定组织或细胞中的生理病理功能。

CDHR2 作为 PCDH 超家族的一员，在肿瘤的发生、发展中具有重要的作用。最初发现 CDHR2 在人的肝、肾和结直肠中表达，因而被命名为 protocadherin LKC[17]。CDHR2 的 C 末端可与 hMAST205 蛋白的 PDZ 区域相结合，发挥其接触抑制的作用[17]。另有研究[19]表明，Galectin-1 和 Galectin-3 能够与 CDHR2 的胞内段结合，使 β-catenin滞留于胞质，从而抑制 β-catenin 信号通路。我们预实验也发现，在多种肝癌细胞系和肝癌组织中，CDHR2 表达下调或缺失，且过表达 CDHR2 可显著抑制肝癌细胞的增殖和体内成瘤作用。

本研究通过设计小鼠 CDHR2 基因的打靶序列和构建打靶载体，电转入 ES 细胞，获得正确同源重组的阳性克隆。将阳性 ES 细胞注射入 C57BL/6J 小鼠的囊胚中，获得嵌合鼠。嵌合小鼠通过与 Flp 小鼠交配，获得去除 Neo 基因的 flox 杂合子小鼠。然后，该杂合子小鼠再与野生型小鼠交配，获得分离掉 Flp 基因型的 flox 小鼠。将获得的去 Neo 及 Flp 的 flox 阳性杂合子小鼠与 Cre 小鼠交配，最终获得 flox 阳性且 Cre 阳性的小鼠。H-E 染色和免疫组织化学检测显示，CDHR2 基因在敲除小鼠的肠道组织中表达缺失，而在肾脏组织中的表达不受影响，表明肠道特异性 CDHR2 基因敲除小鼠构建成功。该研究结果为进一步探究 CDHR2 在肠道肿瘤中的作用提供了重要条件。

参考文献

[1] MORISHITA H, YAGI T. Protocadherin family: diversity, structure, and function[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(5): 584-592.

[2] YU J S, KOUJAK S, NAGASE S, et al. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer[J]. Oncogene, 2008, 27(34): 4657-4665.

[3] LESHCHENKO V V, KUO P Y, SHAKNOVICH R, et al. Genomewide DNA methylation analysis reveals novel targets for drug development in mantle cell lymphoma[J]. Blood, 2010, 116(7): 1025-1034.

[4] DE TAYRAC M, ETCHEVERRY A, AUBRY M, et al. Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2009, 48(1): 55-68.

[5] YU J, CHENG Y Y, TAO Q, et al. Methylation of protocadherin 10, a novel tumor suppressor, is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. Gastroenterology, 2009, 136(2): 640-651, e641.

[6] YU B, YANG H, ZHANG C, et al. High-resolution melting analysis of PCDH10 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers[J]. Neoplasma, 2010, 57(3):

247-252.

[7] YING J, LI H, SENG T J, et al. Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation[J]. Oncogene, 2006, 25(7):1070-1080.

[8] MIYAMOTO K, FUKUTOMI T, AKASHI-TANAKA S, et al. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers[J]. Int J Cancer, 2005, 116(3):407-414.

[9] WANG K H, LIU H W, LIN S R, et al. Field methylation silencing of the protocadherin 10 gene in cervical carcinogenesis as a potential specific diagnostic test from cervical scrapings [J]. Cancer Sci, 2009, 100(11):2175-2180.

[10] NARAYAN G, SCOTTO L, NEELAKANTAN V, et al. Protocadherin PCDH10, involved in tumor progression, is a frequent and early target of promoter hypermethylation in cervical cancer[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2009, 48(11):983-992.

[11] HARADA H, MIYAMOTO K, YAMASHITA Y, et al. Prognostic signature of protocadherin 10 methylation in curatively resected pathological stage I non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Med, 2015, 4(10):1536-1546.

[12] FANG S, HUANG S F, CAO J, et al. Silencing of PCDH10 in hepatocellular carcinoma via de novo DNA methylation independent of HBV infection or HBX expression[J]. Clin Exp Med, 2013, 13(2):127-134.

[13] CHEUNG H H, LEE T L, DAVIS A J, et al. Genome-wide DNA methylation profiling reveals novel epigenetically regulated genes and non-coding RNAs in human testicular cancer[J]. Br J Cancer, 2010, 102(2):419-427.

[14] YING J, GAO Z, LI H, et al. Frequent epigenetic silencing of protocadherin 10 by methylation in multiple haematologic malignancies[J]. Br J Haematol, 2007, 136(6):829-832.

[15] HARUKI S, IMOTO I, KOZAKI K, et al. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(6):1027-1036.

[16] IMOTO I, IZUMI H, YOKOI S, et al. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers[J]. Cancer Res, 2006, 66(9):4617-4626.

[17] OKAZAKI N, TAKAHASHI N, KOJIMA S, et al. Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(7):1139-1148.

[18] OSE R, YANAGAWA T, IKEDA S, et al. PCDH24-induced contact inhibition involves downregulation of beta-catenin signaling[J]. Mol Oncol, 2009, 3(1):54-66.

[19] OSE R, OHARAA O, NAGASE T. Galectin-1 and galectin-3 mediate protocadherin-24-dependent membrane localization of β-catenin in colon cancer cell line HCT116[J]. Curr Chem Genomics, 2012, 6:18-26.

[本文编辑] 姬静芳