

软骨细胞条件性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 功能增强型点突变小鼠的获得及其表型初步分析

雷子贤 戚华兵 苏楠 赵子瑜 陈锚锚 何启芬 赵玲 金旻 谢杨丽 李福兵
杜晓兰 陈林

中图分类号：R681.1 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2009)01-0009-07

摘要：目的 获得在软骨细胞中条件性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 增强型点突变小鼠并进行初步表型分析。方法 通过 PTEN 条件性基因敲除小鼠($Pten^{flox/flox}$ 小鼠)与软骨细胞特异表达 Cre 重组酶的小鼠(Col2 α Cre)交配 ,获得在软骨细胞中特异敲除 PTEN 基因小鼠(Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$);同时 ,利用 $Pten^{flox/flox}$ 小鼠与 FGFR3 增强型点突变小鼠($Fgfr3^{G369C/+}$ 小鼠 ,即 ACH 小鼠)交配 ,子代杂合子小鼠($Pten^{flox/+}$:ACH)之间再交配 ,获得 $Pten^{flox/flox}$:ACH 小鼠 ,通过 Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$ 和 $Pten^{flox/flox}$:ACH 交配即可获得在软骨细胞中特异性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 增强型点突变小鼠(Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$:ACH)。采用 PCR 对小鼠基因型进行鉴定 ,免疫荧光染色检测 PTEN 基因的敲除效率 ,通过 X 光平片摄影对小鼠的表型进行初步分析。结果 获得了在软骨细胞中敲除 PTEN 的 FGFR3 点突变小鼠 ,免疫荧光染色证实 Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$:ACH 小鼠软骨细胞中 PTEN 蛋白因为基因敲除而表达很低。初步的表型分析显示 :Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$:ACH 小鼠身长、尾长均较 $Pten^{flox/flox}$:ACH 小鼠长($P < 0.05$, $n = 5$)。Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$:ACH 小鼠表型 ,较 $Pten^{flox/flox}$:ACH 小鼠的侏儒表型有所缓解。结论 采用基于 Cre/LoxP 系统的条件性基因敲除策略 ,获得了在软骨细胞中敲除 PTEN 基因的 FGFR3 增强型突变小鼠 ,表型分析初步显示 ,软骨细胞特异性敲除 PTEN 基因可部分缓解由 FGFR3 增强型点突变所导致的小鼠侏儒表型。该小鼠的获得 ,为研究 PI3K/AKT 信号通路在 FGFR3 突变介导的软骨生长抑制中的作用提供了实验动物平台。

关键词：PTEN ; FGFR3 ; 软骨发育不全 ; 条件性基因敲除 ; 小鼠

Initial phenotype analysis on chondrocyte PTEN conditional knockout mice generation from FGFR3 gain of function mutant LEI Zixian , QI Huabing , SU Nan , et al . 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 the chondrocyte PTEN conditional knockout mice from FGFR3 gain of function mutants and initial phenotype analysis . **Methods** To produce the chondrocyte PTEN conditional knockout mice , the $Pten^{flox/flox}$ mice were crossed with Col2 α Cre mice expressing Cre recombinase in chondrocyte specifically ; to produce the $Pten^{flox/flox}$: ACH mice , $Pten^{flox/flox}$ mice were crossed with FGFR3 gain of function mutant mice ($Fgfr3^{G369C/+}$ mice) which presents a ACH genotype , the daughter heterozygote mice then cross with each other ; Finally , the chondrocyte PTEN conditional knockout mice with FGFR3 gain of function mutant (Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$:ACH) were obtained by crossing Col2 α Cre : $Pten^{flox/flox}$ and $Pten^{flox/flox}$:ACH . All the daughter mice were identified with PCR assay , PTEN knockout effect was detected with immunofluorescent staining , and phenotypes difference between genotypes were compared with X-ray plate film photography . **Results** Chondrocyte PTEN

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

作者单位：400042 重庆 , 第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心 , 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者：陈林 , Email : linchen70@163 . com

conditional knockout in FGFR3 gain of function mutant mice were obtained. It has been confirmed by immunofluorescent staining that there is few PTEN expression in the chondrocytes of Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH mice due to the gene conditional knockout. Preliminary phenotype analysis demonstrates that the mice possessing Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH genotype has longer body and tail length than Pten^{flox/flox} : ACH mice. Compared with Pten^{flox/flox} : ACH mice, the achondroplasia phenotype of Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH mice has been ameliorative.

Conclusion Based on Cre/LoxP recombination knockout strategy, Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH mice were obtained. Phenotype analysis revealed that PTEN gene conditional knockout strategy could meliorate the achondroplasia phenotype caused by FGFR3 gain of function mutations. The harvest of Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH mice provide us a experimental animal platform for studying the role of PI3K/AKT signaling cascade in chondrocyte growth inhibition mediated by FGFR3 mutation.

Key words : PTEN ; FGFR3 ; Achondroplasia ; Conditional knockout ; Mouse

成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 的功能增强型点突变可引起包括软骨发育不全 (achondroplasia, ACH) 在内的多种人类软骨发育障碍性侏儒。Chen 等^[1,2]利用基因敲入技术建立的模拟人 ACH 的 FGFR3 点突变小鼠模型 (Fgfr3^{G369C/+}小鼠, 即 ACH 小鼠) 表现为软骨细胞增殖与分化能力明显降低。目前研究 FGFR3 突变引起的软骨发育信号异常主要集中于转录因子 STAT1 和有丝分裂原活性蛋白激酶 (MAPK) 信号通路上, 对三磷酸肌醇/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 通路在骨骼发育中的改变研究相对较少。已有研究显示小鼠成-软骨前体细胞中 PTEN 敲除后可影响生长板软骨细胞的增殖与分化^[3], PTEN 即第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 是 PI3K/AKT 通路中一个重要的负性调控分子。为研究 PI3K/AKT 信号通路在 FGFR3 突变介导的软骨发育生长抑制中的作用, 避免完全敲除 PTEN 所引起的胚胎发育致死性, 我们采用条件性基因敲除策略建立了软骨特异性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 功能增强型点突变小鼠模型, 以观察 FGFR3 功能增强型点突变小鼠的侏儒表型有何改变, 为研究 PI3K/AKT 信号通路在 FGFR3 突变介导的软骨生长抑制中的作用提供了实验动物平台。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠鉴定中 PCR 所采用的 Taq 酶、dNTPs 购自日本 TaKaRa 公司, PCR 引物由本室自行设计并由美国 Invitrogen 公司合成, 兔抗鼠 PTEN 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。DNA Engine PCR 仪、Power PAC 300 电泳仪、Gel Doc 2000 凝胶成像仪系美国 Bio-Rad 公司产品, SP5 激光共聚焦显微镜系德

国 Leica 公司产品。

1.2 实验动物的引进、养殖

FGFR3 功能增强点突变小鼠 (Fgfr3^{G369C/+}小鼠, 即 ACH 小鼠) 为我室陈林教授在美国建立。Pten^{flox/flox} 小鼠从美国 Jackson 实验室引进。软骨细胞中特异表达 Cre 重组酶的转基因小鼠 (Col2aCre) 由军事医学科学院杨晓教授惠赠。SPF 级 C₅₇BL/6j 小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司 (许可证编号: SCXK(沪)2003-0003)。以上小鼠均在第三军医大学大坪医院实验动物中心饲养, 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)] 对实验动物进行操作。

1.3 软骨细胞特异性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 功能增强型点突变小鼠 (Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH 小鼠) 的获得

基于 Cre/LoxP 系统原理, Pten^{flox/flox} 小鼠与软骨细胞中特异表达 Cre 重组酶的转基因小鼠 (Col2aCre) 交配后, 可以把软骨细胞中特异表达 Cre 重组酶的子代细胞/组织中 PTEN 基因剔除, 为获得软骨细胞特异性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 功能增强型小鼠 (Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH 小鼠), 采用 PTEN 条件性基因敲除小鼠 (Pten^{flox/flox} 小鼠) 与软骨细胞特异表达 Cre 重组酶的小鼠 (Col2aCre) 交配, 子代回交 Pten^{flox/flox} 小鼠, 获得在软骨细胞中特异敲除 PTEN 基因小鼠 (Col2aCre : Pten^{flox/flox}) ; 同时, 利用 Pten^{flox/flox} 小鼠与 FGFR3 增强型点突变小鼠 (Fgfr3^{G369C/+}小鼠, 即 ACH 小鼠) 交配, 子代杂合子小鼠 (Pten^{flox/+} : ACH) 之间再交配, 获得 Pten^{flox/flox} : ACH 小鼠, 通过 Col2aCre : Pten^{flox/flox} 和 Pten^{flox/flox} : ACH 交配即可获得在软骨细胞中特异性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 增强型点突变小鼠 (Col2aCre : Pten^{flox/flox} : ACH), 即图 1 所示小鼠交配繁殖策略。

1.4 软骨细胞特异性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 增

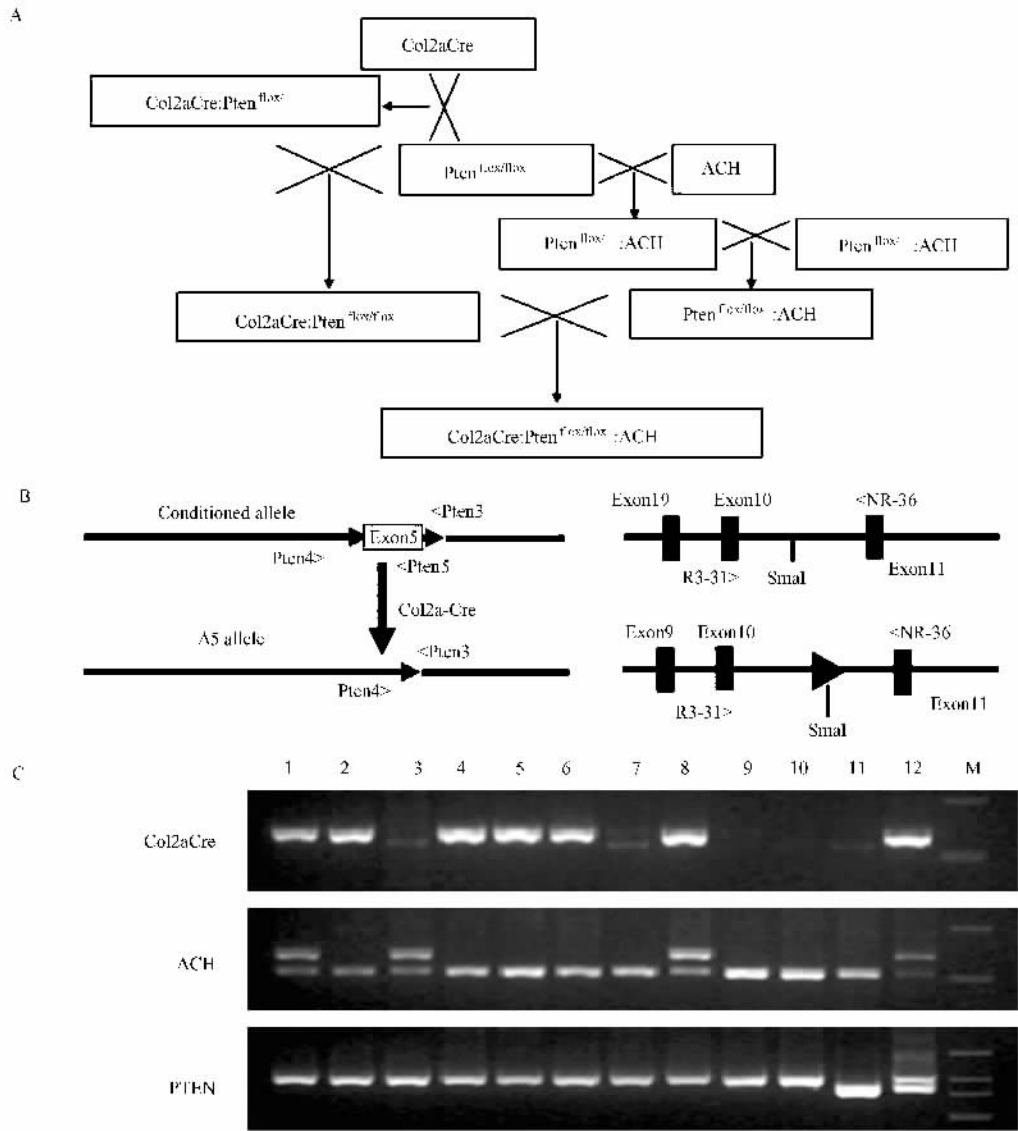


图 1 Col2aCre : Pten^{flox/flox} :ACH 基因型小鼠的繁殖策略及 PCR 鉴定

A. 获取软骨条件性敲除 PTEN 的 FGFR3 功能增强型点突变小鼠的交配策略 ;B. PCR 鉴定原理 ;C. 各基因型鉴定结果 : 1 号和 8 号小鼠基因型为 Col2aCre : Pten^{flox/flox} :ACH ;3 号小鼠基因型为 Pten^{flox/flox} :ACH ;2、4、5、6 号小鼠基因型为 Col2aCre : Pten^{flox/flox} ;7、9、10 号小鼠基因型为 Pten^{flox/flox} ;11 号为阴性对照 ;12 号为阳性对照 ;M 为 DL2000

强型点突变小鼠(Col2aCre : Pten^{flox/flox} :ACH 小鼠)的鉴定

1.4.1 实验小鼠基因组 DNA 的提取 :采用脚趾编号法对小鼠进行编号 ,剪取小鼠脚趾组织提取基因组 DNA。小鼠基因组 DNA 的提取简述如下 组织放入 1.5 ml EP 管中 ,加入 200 μ l 组织裂解液(0.5% SDS(m/v) ,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 μ l) 56℃ 消化过夜。加入 100 μ l 6 mol/L NaCl ,剧烈振荡(大于 200 次)后 ,冰浴 10 ~ 30 min ,然后 14 000 g 离心 15 min ,取上清 150 μ l ,加入 250 μ l 无水乙醇 ,

颠倒混匀 ,14 000 g 离心 10 min ;弃上清 ,干燥后加入 TE 缓冲液 50 μ l 56℃ 溶解 DNA 1 h 4℃ 保存。

1.4.2 PCR 鉴定 :Col2a-R1/Col2a-F1 鉴定 Col2aCre :产物大小为 300 bp ,基因型命名为 Col2aCre ,简记为 C ;PTEN4/PTEN5 鉴定 PTEN 基因中插入的 LoxP 序列 PTEN 基因若不存在 LoxP 序列 ,则得到一处约 900 bp 的条带 ,基因型命名为 Pten^{+/+} ,简记为 P^{+/+} ;双侧 PTEN 等位基因均有 LoxP 序列 ,则扩增得到 1000 bp 的条带 ,基因型为 Pten^{flox/flox} ,简记为 P^{flox/flox} ;单侧 PTEN 等位基因有 LoxP 序列 ,则得到大小约为 1000 和 900 bp 的 2 条带 ,基因型 Pten^{flox/+} ,简记为

$P^{6/+}$;ACH 小鼠在引入增强型突变位点的同时在 FGFR3 基因 10 号和 11 号外显子之间引入了一个大小为 60 bp 的 LoxP 序列 ;R3-31/NR3-36 则用于鉴定 FGFR3 基因 10 号和 11 号外显子之间是否存在该

LoxP 序列 野生型小鼠得到 260 bp 的条带 ,突变型小鼠则得到大小为 320 bp 的条带 ,得到大小为 260 和 320 bp 2 条带的小鼠基因型命名为 $Fgfr3^{G369C/+}$,即 ACH ,简记为 A。PCR 扩增鉴定原理如图 2 所示。

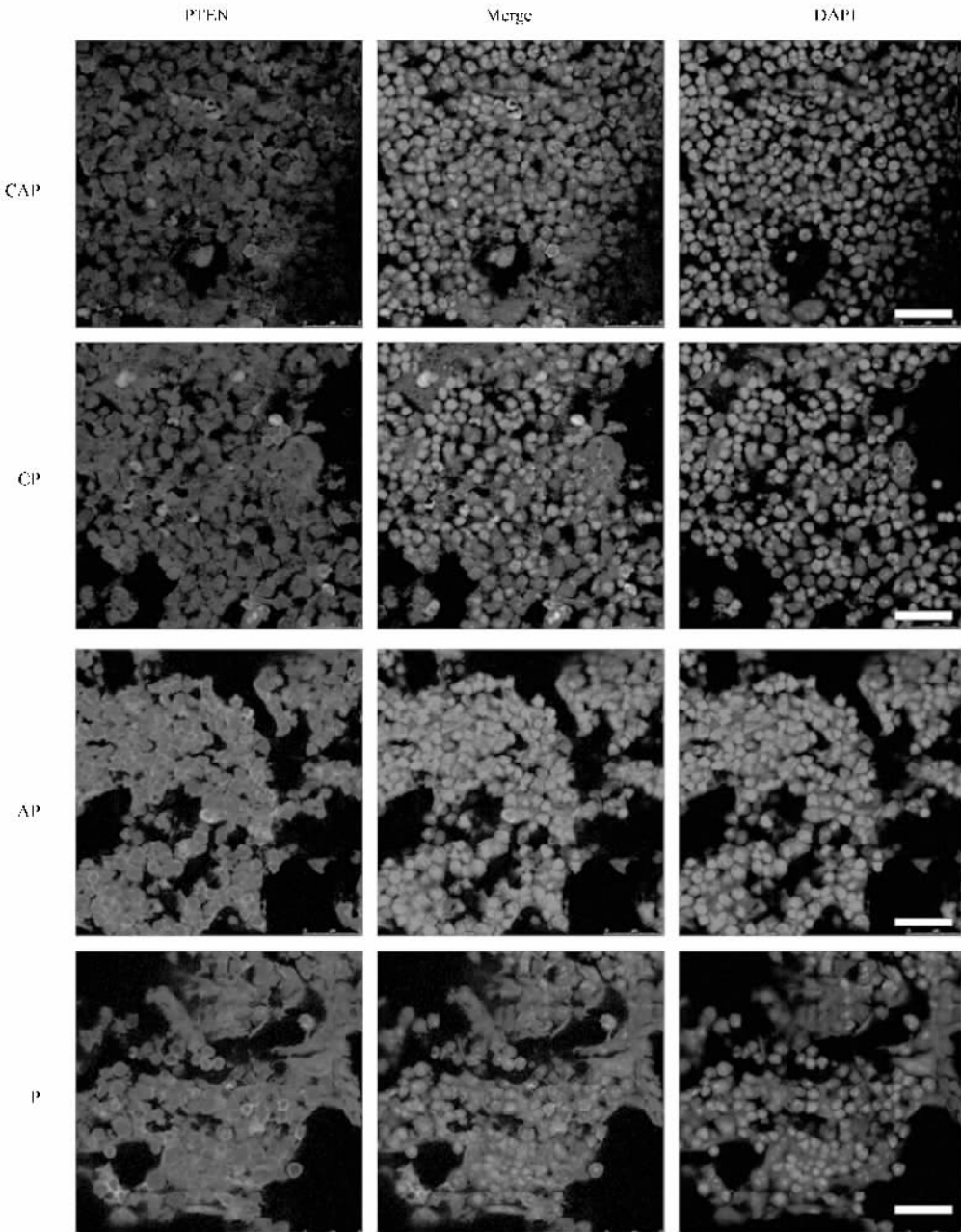


图 2 同窝各基因型小鼠 PTEN 免疫荧光染色结果
示 PTEN 在不同基因型小鼠软骨细胞中的表达差异 (Scale Bar = 50 μ m)

以上述提取的基因组 DNA 为模板 ,以 3 对不同的引物 PCR 鉴定基因型 :引物分别为 Col2a-F1 上游引物 :5'-GAGGGTCCAGCCCCGAGCTACTT-3' ,Col2a-R1 下游引物 :5'-GCATCGACCGGTAATGCAGGC-3' ;R3-31 上游引物 :5'-GCTCCCTGTCCTGCCTCGTG-3' ,NR-

36 下游引物 :5'-TGTA AAAAGGGGTGGGGTGGTAG-3' ; Pten3 下游引物 :5'-AATCTGTGCATGAAGGGAAC-3' , Pten4 上游引物 :5'-ACTCAAGGCAGGGATGAGC-3' , Pten5 下游引物 :5'-GTCATCTTCACTTAGCCATTGG-3'。

PCR 反应体系按照说明书配制, PCR 反应条件: 预变性 94°C 4 min, 1 个循环; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 34 个循环; 延伸 72°C 10 min; PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳后采用 Bio-Rad 凝胶成像系统成像、分析。

1.5 正位数字 X 光摄影

取经 PCR 鉴定为阳性的同窝 4 周龄各基因型小鼠即 CAP、CP、AP、P 各 5 只, 经 1% 的戊巴比妥钠麻醉后正位拍摄 X 光片, 曝光条件为 23 kV, 8 mA。采用 DICOMDIR 软件对 X 光片中各基因型小鼠的躯干长度、尾长、体长及第一尾椎 (S_1) 椎体长度进行测量。

1.6 免疫荧光染色

麻醉并处死经 PCR 鉴定为阳性的同窝 1 周龄各基因型小鼠各 5 只, 取胫骨上端股骨下端及膝关节, PBS 漂净血液及组织残渣, 4% 多聚甲醛预固定 12~16 h 后, 15% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙液室温下脱钙 3 周。组织经 OCT 复合物包埋后制备 6~8 μm 冷冻切片, 常规冷丙酮固定 20 min 后冻存储用。染色前, 对冷冻切片 PBS 漂洗切片 3 次, 采用非免疫羊血清 37°C 封闭切片 30 min。待封闭完成, 滴加兔抗鼠 PTEN 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 稀释比 1:200), 37°C 孵育 1 h 后转入 4°C 冰箱孵育过夜。次晨取出切片, 室温复温后, PBS 漂洗 3 次, 滴加 Cy5 标记的山羊抗兔 IgG (碧云天公司, 稀释比 1:500), 37°C 孵育 40 min; 细胞核采用 Hoechst 33258 染料 37°C 衬染 15 min。PBS 漂净染料, 抗淬灭封片剂封片后, 在波长为 350 和 640 nm 的激光下分别激发荧光, Leica SP5 激光共聚焦显微镜观察、照相。

1.7 统计学处理

所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析处理, 采用 t 检验对两样本均数间进行比较, 采用 ANOVA 对多样本均数进行单因素方差分析和多重比较。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳鉴定结果

根据 PCR 鉴定原理, 若 1 只小鼠同时具备的基因型为: C, $P^{flox/flox}$, A, 则为 Col2 α Cre : Pten $^{flox/flox}$: ACH 小鼠 (软骨细胞特异性敲除 PTEN 基因的 FGFR3 点突变功能增强型小鼠), 简记为 CAP; 若为 C 和 $P^{flox/flox}$, 则为 Col2 α Cre : Pten $^{flox/flox}$ 小鼠 (软骨细胞特异性敲除 PTEN 基因小鼠), 简记为 CP; 若为 $P^{flox/flox}$ 和 A, 而无 C, 则相当于 ACH 小鼠, 简记为 AP; 而仅有 $P^{flox/flox}$, 即为

Pten $^{flox/flox}$ 小鼠, 简记为 P。PCR 鉴定结果如图 2 所示: 1 号和 8 号小鼠基因型为 Col2 α Cre : Pten $^{flox/flox}$: ACH; 3 号小鼠基因型为 Pten $^{flox/flox}$: ACH; 2、4、5、6 号小鼠基因型为 Col2 α Cre : Pten $^{flox/flox}$; 7、9、10 号小鼠基因型为 Pten $^{flox/flox}$ 。

2.2 免疫荧光染色鉴定结果

对同窝 4 种不同基因型的实验小鼠关节软骨切片进行 PTEN 免疫荧光染色, 激光共聚焦显微术结果显示, 敲除 PTEN 基因的 CP 小鼠及 CAP 小鼠, 软骨组织中仅见少数散在分布的胞浆着棕黄色的阳性细胞; 对照组 P 小鼠及 AP 小鼠 (相当于 ACH 小鼠) PTEN 表达丰富, 切片中可见大量表达 PTEN 的软骨细胞, 细胞呈胞浆着色, 与衬染胞核的定位关系较好 (图 3)。PTEN 基因在 P 和 AP 小鼠表达丰富, 而在 CP 和 CAP 小鼠因为条件性敲除而表达很低, 说明在软骨细胞确实敲除了 PTEN 基因, 同时也说明条件性敲除的效率并不是 100%。

2.3 PTEN 敲除小鼠的初步表型分析

2.3.1 对同窝各基因型小鼠体重的称量观测发现: 同窝小鼠出生后 1 周内体重未见明显变化, 1 周后体重 AP 小鼠最轻, CAP 小鼠则重于 AP 小鼠, 如图 3 体重增长曲线所示。

2.3.2 对同窝各基因型小鼠的头部摄影和正位 X 光平片观测发现: AP 小鼠头颅圆钝, 相比较而言, CAP 小鼠头颅较 AP 小鼠尖, 但是较 P 小鼠则圆钝, 而 CP 小鼠的头颅在 4 者中最尖; 体型相比较则发现 AP 小鼠体型最小, CAP 小鼠体型介于 AP 小鼠和 P 小鼠之间, 而 CP 小鼠体型最大。PTEN 基因软骨条件性敲除后, 反映骨骼发育的几个长度指标确有较为显著的变化, 表现为 AP 小鼠与 CP 小鼠之间的尾长差异有显著性 ($P < 0.05$), 而 CAP 小鼠的尾长则介于两者之间; AP 小鼠与 CP 小鼠之间的体长差异有非常显著性 ($P < 0.01$), 而 CAP 小鼠的体长则介于两者之间, 与 CP 小鼠之间的体长差异也有显著性 ($P < 0.05$)。进一步比较同窝小鼠第 1 尾椎 (S_1) 发现, AP 小鼠和 CAP 小鼠与 CP 小鼠和 P 小鼠之间椎体长度差异均存在显著性 ($P < 0.01$) (图 3)。

3 讨论

成纤维细胞生长因子受体 (fibroblast growth factor receptors, FGFRs) 属于酪氨酸蛋白激酶 (PTK) 家族, 它们与其相应配体成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factors, FGFs) 结合, 在组织器官发育及损伤修复过程中发挥重要作用。FGFR3 是

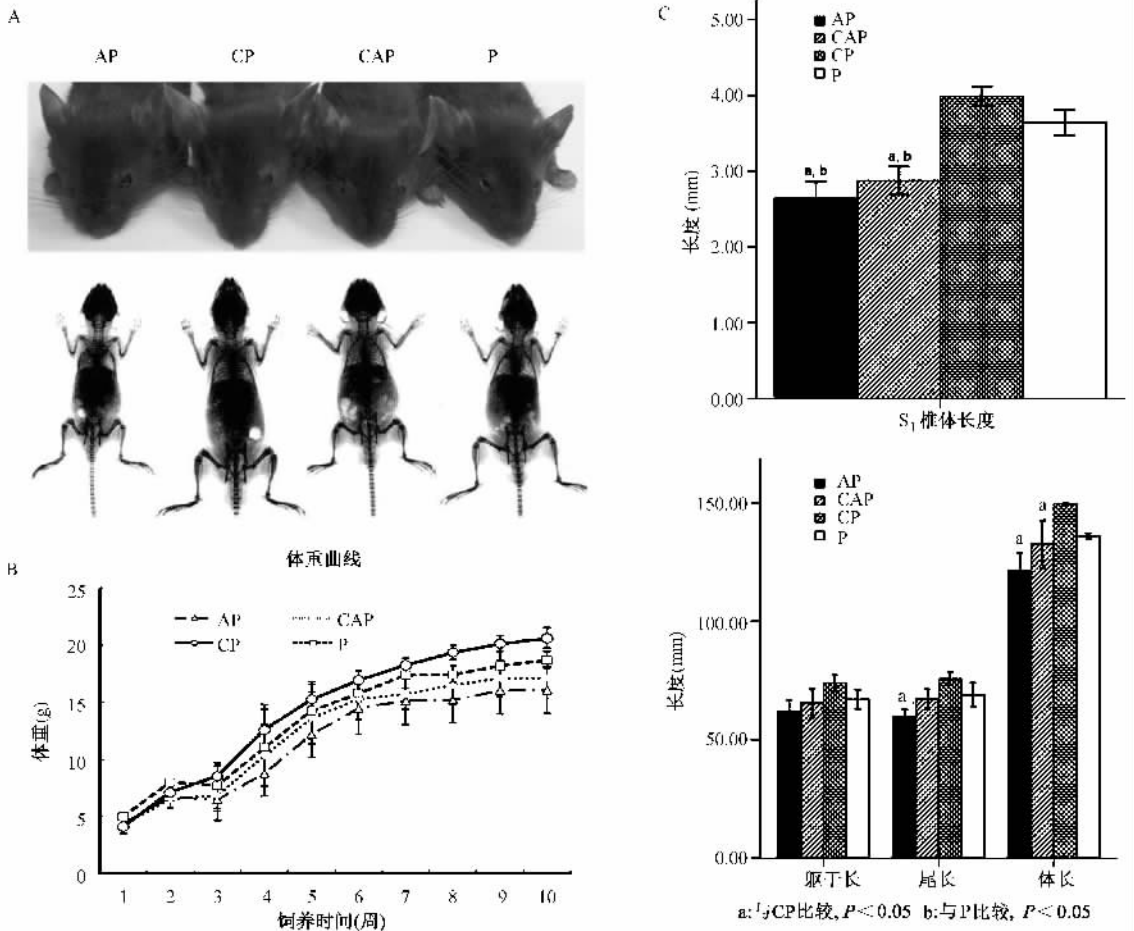


图 3 各基因型小鼠体格发育表型的比较

A. 上图示:同窝小鼠头颅发育比较;下图示:同窝小鼠大体体格比较;B. 同窝各基因型小鼠体重的比较;C. 上图示:同窝各基因型小鼠椎体长度的比较;下图示:同窝各基因型小鼠躯干长、尾长和体长的比较

FGFRs 家族成员之一,在人体中 FGFR3 的突变引起一系列骨骼发育缺陷性疾病,如软骨发育不全 (achondroplasia, ACH) 等。Chen 等^[1,2]利用基因敲入技术获得的 FGFR3 增强型点突变小鼠 (Fgfr3^{G369C/+} 小鼠,即 ACH 小鼠)主要表现为个体明显短小,头颅短圆,生长板软骨细胞增生与分化能力均降低。Deng 等^[4]发现 FGFR3 基因敲除小鼠,长骨过度生长、生长板增生软骨细胞带和肥大软骨细胞带变宽、软骨细胞增生活性增加,表明 FGFR3 负性调节长骨的软骨生成,主要影响软骨细胞的增生和分化。

研究显示,FGFR3 主要通过两条独立的通路参与了软骨细胞增殖和分化的调控。早期研究发现,STAT1 是 FGF 信号通路中的关键分子,在 FGF/FGFR3 所致的软骨发育不全中发挥了重要作用^[5]。在 FGFR3 激活突变的侏儒小鼠中,STAT1 蛋白活化,p21、p16、p18 等表达上调^[6]。STAT1 敲除后则可明显缓解由 FGF2 持续表达所致的侏儒表型^[7]。

Murakami 等^[7]发现,STAT1 敲除虽能恢复 FGFR3 功能增强性突变小鼠生长板软骨细胞的增生,但不能减弱 FGFR3 突变所致的侏儒症表型^[8]。这都提示,STAT1/p21 信号途径参与了 FGFR3 所致的软骨细胞增生抑制过程,但并不是影响其生物学效应发挥的唯一通路。Murakami 等^[7]将软骨细胞中持续表达活化 MEK1 的突变体小鼠与 FGFR3 基因敲除小鼠交配所产的子代小鼠,其骨骼过度生长的表型明显减弱。抑制 ERK/MAPK 通路活化,可明显缓解 FGFR3 所致的相关表型^[9]。这些研究结果均提示:MAPK 信号通路通过参与软骨细胞分化抑制从而调控软骨发育,FGFR3 信号可部分通过 MAPK 途径抑制软骨生长。

虽然上述 2 条信号通路影响了 FGFR3 介导的软骨增生分化抑制,但是在软骨发育中仍有其他信号通路发挥作用,近年来 PI3K/AKT 信号通路在软骨发育中所起的作用引起了越来越多的关注。PI3K

信号通路中最为重要的负性调控分子 PTEN,即使是低表达,在正常胚胎发育发生中也不可或缺。鼠胚胎干细胞 PTEN 功能丧失突变或敲除导致胚胎早期死亡^[10,11]。PTEN 所具备的这种敲除致死性限制了 PTEN 基因敲除小鼠成体的获得。条件性基因敲除技术的诞生不但避免了常规基因的敲除致死性,而且使得特异细胞/组织中基因的敲除成为可能。

基于条件性基因敲除技术, Ford-Hutchinson 等^[3]建立了成-软骨前体细胞特异性敲除 PTEN 小鼠 (Col2 α 1Cre :Pten^{fllox/fllox} 小鼠)。该突变小鼠初期骨松质的发育和软骨膜骨领的生成更显著,长骨生长板异常,表现为基质的过量产生和肥大分化的加速。敲除 Pten 的软骨细胞免疫染色显示出增强的 p-AKT/AKT 和 p-S6,反映 mTOR 和 PDK1 活性的增加,与 PI3K 信号增强相一致,表明上述变化确由 PTEN 敲除后活化的 PI3K/AKT 信号通路所致。

鉴于 FGFR3 在软骨发育不全中的关键地位, PI3K 通路在软骨细胞增生抑制中的重要作用以及 PTEN 对 PI3K 通路的负性调控,那么 FGFR3 是否是通过 PI3K 信号通路而影响了软骨发育呢?因此,我室建立了 Col2 α Cre :Pten^{fllox/fllox} :ACH (CAP) 小鼠,该小鼠同时具备软骨 PTEN 基因敲除和 FGFR3 功能增强型点突变两种基因型,并且显示出较 ACH 小鼠 (AP 小鼠)有所缓解的侏儒表型。CAP 小鼠头颅外形、体长发育、体重增长等表型介于对照 P 小鼠与 AP 小鼠之间。但是上述表型改变的机制是什么?是通过哪条信号通路发挥了作用? FGFR3 和 PTEN 是否存在相互作用?是直接作用还是间接作用?具体机制是什么?这一系列问题,基于这一小鼠模型,都将得到很好的研究和阐释。

【参 考 文 献】

[1] Chen L, Adar R, Yang X, et al. Gly369Gys mutation in mouse

causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. J Clin Invest, 1999, 104(11):1517-1525.

- [2] Chen L, Li C, Qiao W, et al. A Ser (365)→Cys mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in mouse downregulates Ihh/PTHrP signals severe achondroplasia. Hum Mol Gene, 2001, 10(5):457-465.
- [3] Ford-Hutchinson AF, Ali Z, Lines SE, et al. Inactivation of Pten in Osteo-Chondrogenitor Cells Leads to Epiphyseal Growth Plate Abnormalities and Skeletal Overgrowth. J Bone Miner Res, 2007, 22(8):1245-1259.
- [4] Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, et al. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. Cell, 1996, 84(6):911-921.
- [5] Li C, Chen L, Iwata T, et al. A Lys644Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and Ink4 cell cycle inhibitors. Hum Mol Genet, 1999, 8(1):35-44.
- [6] Sahni M, Raz R, Coffin JD, et al. STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. Development, 2001, 128(11):2119-2129.
- [7] Murakami S, Balmes G, McKinney S, et al. Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse. Genes Dev, 2004, 18(3):290-305.
- [8] Sahni M, Ambrosetti DC, Mansukhani A, et al. FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT21 pathway. Genes Dev, 1999, 13(11):1361-1366.
- [9] Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, et al. Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. Nat Med, 2004, 10(1):80-86.
- [10] Backman SA, Stambolic V, Suzuki A, et al. Deletion of Pten in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease. Nat Genet, 2001, 29(4):396-403.
- [11] Liu XM, Bruxvoort KJ, Zylstra CR, et al. Lifelong accumulation of bone in mice lacking Pten in osteoblasts. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(7):2259-2264.

(收稿日期:2008-11-26)