

维生素D受体基因敲除小鼠品系的建立与鉴定

赵家荣, 刘欢, 张涛, 王令, 路宏朝*, 杜伟立

(陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000)

【摘要】 目的 探讨维生素D受体(VDR)基因敲除小鼠的最优繁育方式与鉴定方法,为进一步研究VDR功能及相关疾病提供动物模型。**方法** 针对课题组前期构建的VDR敲除小鼠,采用4种不同的交配方式产生子代小鼠,统计子代的表型和基因型,比较VDR基因敲除纯合子(VDR^{-/-})和杂合子(VDR^{+/-})小鼠的繁殖能力,同时在mRNA和蛋白水平分析VDR表达情况。**结果** VDR^{-/-}小鼠与VDR^{+/+}小鼠在表型上具有显著差异,主要表现在脱毛、体型小和活动能力下降等方面;4种繁育方式所产子代小鼠的基因型分布基本符合孟德尔遗传定律;VDR^{-/-}互交方式小鼠的生殖能力差,不能直接用于扩大VDR^{-/-}敲除鼠品系,而VDR^{+/-}互交方式可成功获得VDR^{-/-}小鼠,并且检测到VDR基因敲除性状能稳定遗传至子代小鼠,因此该方法是扩大品系的最佳途径。**结论** 本实验成功鉴定出子代小鼠基因型并建立VDR基因敲除小鼠品系,为后续VDR功能研究奠定基础。

【关键词】 维生素D受体;基因敲除;基因型鉴定;稳定遗传

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0766-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.015

Strain establishment and identification of vitamin D receptor gene knockout mice

ZHAO Jiarong, LIU Huan, ZHANG Tao, WANG Ling, LU Hongzhao*, DU Weili

(School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China)

Corresponding author: LU Hongzhao. E-mail: zl780823@sina.com

【Abstract】 Objective This study aimed to investigate method for the optimal breeding and identification of vitamin D receptor (VDR) knockout mice, which could provide animal models for further research on VDR function and related diseases. **Methods** Based on VDR knockout mice previously obtained in our lab, four different mating methods were used to generate offsprings, the phenotypes and genotypes of which were evaluated and the reproductive ability of VDR knockout homozygous (VDR^{-/-}) and heterozygous (VDR^{+/-}) mice were compared. And, VDR expression was analyzed at the mRNA and protein levels. **Results** Compared with VDR^{+/+} mice, VDR^{-/-} mice had a significantly different phenotype, mainly in terms of having less hair, small size, and decreased mobility. The genotype distributions of the offspring mice produced by the four breeding method were basically in accordance with Mendel's law of inheritance. VDR^{-/-} cross-over had poor reproductive ability and could not be directly used to expand VDR^{-/-} homozygous knockout mouse strains, while VDR^{+/-} cross-over could successfully obtain VDR^{-/-} mice. It was also determined that VDR knockout traits could be stably inherited by offspring mice, so VDR^{+/-} cross-over is the best way to expand the strains. **Conclusions** This experiment has successfully identified the genotypes of offspring mice and established VDR knockout mouse strains, laying the foundation for subsequent research on VDR function.

【Keywords】 Vitamin D receptor; gene knockout; genotype identification; stable inheritance

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

【基金项目】 陕西理工大学人才启动基金项目(SLGQD2017-10)。

Funded by Shaanxi University of Technology Talent Launch Fund Project(SLGQD2017-10).

【作者简介】 赵家荣(1995—),女,硕士研究生,研究方向为动物细胞工程。Email: zjrlyh0408@163.com

【通信作者】 路宏朝(1980—),女,博士,副教授,研究方向为动物生物技术。Email: zl780823@sina.com

维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)是一种核转录因子,属于类固醇激素/甲状腺激素受体超家族成员^[1],广泛存在于人体多种组织和细胞^[2-3]。1,25-二羟基维生素 D₃(1,25(OH)₂D₃)激素信号分子与 VDR 结合形成激素-受体复合物并作用于靶基因上的特定 DNA 序列,调节下游基因表达,同时影响相关代谢通路^[4-6]。VDR 的生理功能是调节人体内钙和矿物质平衡,参与皮肤、免疫系统、结肠、乳腺和前列腺等多种器官的生长发育过程^[7-10]。当 VDR 缺乏后,可能会导致心血管疾病、炎症、糖尿病和毛囊发育障碍等疾病的发生^[11-12]。由于生物体的复杂多样性,在不同物种、不同组织和机体发育的不同阶段,VDR 的生理功能目前仍存在较大争议,特别是在糖脂代谢过程、骨骼肌生长发育、生殖机能等方面,VDR 的功能并未完全揭示。因此,构建稳定遗传的 VDR 敲除鼠品系,将为后续其功能的解析提供良好的动物模型。

基于实验室前期构建的 F0 代 VDR 敲除鼠模型^[13],本实验将首先测定小鼠的繁殖性能,选择具有生殖能力的敲除鼠与野生鼠进行交配,建立能够将 VDR 敲除基因稳定遗传的杂合群体,进而对繁育小鼠的基因型和 VDR 表达水平进行鉴定分析,为揭示 VDR 的生物学功能提供实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

4 月龄 SPF 级 C57BL/6 J 小鼠 12 只,雌、雄各 6 只,体重 20~25 g,购于成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)2015-030】,实验室采用胚胎显微注射和 CRISPR/Cas9 技术构建成 VDR^{-/-}基因敲除鼠,饲养于陕西理工大学生物实验中心【SYXK(陕)2016-0012】。所有小鼠均饲养于 12/12 h 光照/黑暗条件下,自由采食和饮水,所有操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审查备案号:SLGQD2017-10-IACUC2017-0004)。

1.1.2 实验试剂

T7E1 核酸内切酶,总 RNA 提取试剂盒,SYBR Premix Ex Taq(大连宝生物工程有限公司,中国);Trizol(西安热默尔生物公司,中国);一抗(兔抗 VDR 单抗抗体),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,内参抗体(辣根过氧化物酶标记鼠 β-actin 抗体)(Cell Signaling Technology,美国);裂解液 RIPA

和 ECL 曝光液(武汉博士德生物工程有限公司,中国);DNA 纯化试剂盒、PVDF 膜(Fluxion Biosciences,美国);基因序列测序,Real-time qPCR 引物合成由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.1.3 实验仪器

实时荧光定量 PCR 仪(Step OnePlus™, Applied Biosystems,美国),数显恒温水浴锅(HH-2,常州润华电器有限公司,中国),PCR 扩增仪(PTC-200, MJResearch,美国),常温离心机(Centrifuge5424, Eppendorf,德国),低温离心机(Centrifuge5415R, Eppendorf,德国),立式压力蒸汽灭菌器(YXQ-Ls-75G,上海博讯实业有限公司,中国),电泳仪(DYY-6C,北京市六一仪器厂,中国),涡旋仪(VDP7EX-6,海门市其林贝尔仪器制造有限公司,中国),紫外可见光光度计(UV-4802,尤尼柯(上海)仪器有限公司,中国),凝胶成像系统(Gel Doc, BIO-RAD, 美国),蛋白曝光仪(GeneGnome, Syngene,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计

根据 Genbank 公布的小鼠 VDR 基因序列(CT010294.1),设计检测鼠 VDR 基因打靶位点引物及其定量引物(见表 1)。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences	
引物名称 Primer name	核酸序列 Nucleic acid sequence
qVDR-F	GCCGCATCACCAAAGGACAAC
qVDR-R	TAGGTCTTGTGTTGGGCATCG
VDRTPF	CGGTGGCTATGCTGAAGGTG
VDRTPR	GACACGGTGGGACTGAGAAG

注:qVDR-F 和 qVDR-R 为定量引物;VDRTPF 和 VDRTPR 为扩增打靶位点引物。
Note. qVDR-F and qVDR-R are quantitative primers; VDRTPF and VDRTPR are amplified target site primers.

1.2.2 VDR 敲除鼠品系构建

先将 F0 代雌、雄性 VDR 基因敲除纯合子(VDR^{-/-})小鼠互交,分析繁殖能力,后将 VDR^{-/-}小鼠与野生型(VDR^{+/+})小鼠互交,获得 F1 代;F1 代雌、雄性 VDR 基因敲除杂合子(VDR^{+/-})小鼠互交或 VDR^{+/-}小鼠与 VDR^{+/+}小鼠互交获得 F2 代;F2 代雌、雄性 VDR^{+/-}小鼠互交获得 F3 代。

1.2.3 VDR 敲除鼠鉴定

- (1)VDR 敲除鼠表型分析
- 每周定期观察小鼠体型以及被毛和皮肤形态的变化,详细记录。
- (2)VDR 敲除鼠基因型鉴定

剪取鼠尾组织样,蛋白酶 K 法提取小鼠基因组 DNA,PCR 扩增 CRISPR/Cas9 打靶基因片段,PCR 扩增体系为 50 μ L:5 μ LTaq 酶缓冲液,6 μ L Mg^{2+} ,5 μ L dNTP,上下游引物各 2 μ L,模板 1 μ L,Taq 酶 0.5 μ L,水 28.5 μ L;PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 34 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,12 $^{\circ}$ C 保存,扩增结束后,用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物,从而获得 VDR 敲除打靶基因片段。T7E1 核酸内切酶检测 VDR 基因是否敲除,同时将 VDR 敲除打靶基因片段测序,进一步确认 VDR 基因敲除类型。

1.2.4 VDR 敲除鼠不同组织中 VDR 表达水平分析

利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测敲除鼠多种组织中 VDR 基因转录表达水平。TRIZOL 法提取 VDR 敲除鼠肺、肾、皮肤、小肠、睾丸和胸腺等组织 RNA,经反转录试剂盒反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板,在转录水平检测 VDR 敲除鼠各个组织中 VDR 基因的表达情况。25 μ L qPCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq TM (2x) 12.5 μ L,上下游引物各 1 μ L,cDNA 模板 2 μ L,ddH₂O 8.5 μ L;qPCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,1 min;溶解曲线收集信号程序:95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,1 min;95 $^{\circ}$ C,15 s;共 40 个循环;采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 qPCR 结果。

取 VDR 敲除鼠肺、肾、皮肤、小肠和睾丸等组织各 50 mg 于研钵,加入液氮研磨后加入 150 μ L RIPA 裂解液。转移细胞裂解混合物至离心管,然后加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上样缓冲液,混匀后置于沸水浴 10 min,然后于 4 $^{\circ}$ C,10 000 r/min,冷冻离心 10 min。取上清液进行 12% SDS-PAGE 电泳,然后转至硝酸纤维素膜,洗脱后用封闭液封闭,加入一抗、洗脱、加二抗,ECL 曝光。

1.3 统计学方法

实验数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS17.0 统计学软件的 t 检验进行统计学分析,当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 F0 代 VDR 敲除鼠繁殖性能测定

实验室前期构建 F0 代 VDR 敲除鼠 12 只,均为双等位基因敲除,其中 8 只 VDR^{-/-} 小鼠等位基因

敲除片段大小与位置一致,4 只 VDR^{-/-} 小鼠等位基因敲除片段存在差异。采用 12 只雌、雄性 VDR^{-/-} 小鼠随机互交和 VDR^{-/-} 小鼠与 VDR^{+/+} 小鼠互交两种交配方式进行 VDR 敲除鼠的繁育,结果只有 VDR^{-/-}10#(♂) 和 VDR^{-/-}32#(♀) 可以产生子代,且 VDR^{-/-}10#(♂) 与 VDR^{-/-}32#(♀) 交配也可以产生 VDR^{-/-} 子代。VDR^{-/-}10#(♂) 和 VDR^{-/-}32#(♀) 交配产生的 VDR^{-/-} 小鼠及 VDR^{-/-}32#与 VDR^{+/+} 小鼠繁育的子代没有繁育能力,因此本实验的研究对象都是 VDR^{-/-}10#与 VDR^{+/+} 小鼠产生的后代,突变型 VDR 的保存与遗传都是以 VDR^{+/+} 杂合体形式进行,本研究中 VDR 敲除鼠品系的建立均是通过 VDR^{+/+} 与 VDR^{+/+} 和 VDR^{+/+} 与 VDR^{-/-} 两种交配方式进行。

2.2 VDR 基因敲除鼠鉴定

2.2.1 敲除鼠表型分析

本研究借助于前期获得 F0 代敲除鼠,建立了可稳定遗传的 VDR 敲除鼠品系,实验室保存的敲除鼠分别有 VDR^{+/+} 和 VDR^{-/-} 两种。通过观察,VDR^{+/+} 小鼠和 VDR^{+/+} 小鼠在表型、骨骼发育及活动能力上无显著差异,随着月龄增大也没有发生明显变化,而 VDR^{-/-} 小鼠和 VDR^{+/+} 小鼠具有显著差异,3 月龄时眼眶周围开始脱毛,并随着月龄增加,四肢及背部脱毛现象逐渐明显,直到 12 月龄时几乎完全脱毛,且骨骼发育缓慢,体型小,皮肤皱缩,活动能力降低(图 1)。

2.2.2 敲除鼠基因型鉴定

以 F2 代小鼠基因组 DNA 为模板,PCR 扩增靶点片段,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示:均能扩增长约 470 bp 的条带,与预期的 VDR 靶基因片段大小一致(图 2);纯化的 PCR 产物在 T7E1 核酸内切酶作用下检测 F2 代 VDR 敲除鼠,如图 3 所示,本实验从 F2 代小鼠中随机挑选 3 只小鼠进行检测分析,结果显示 3 号泳道样本为野生型小鼠,2 号和 4 号泳道的样本为 VDR^{+/+} 小鼠。T7E1 检测后再经测序确认,发现 2 号和 4 号样本的敲除类型一致,有 5 bp 的小片段删除,导致 VDR 发生无义突变,这一测序结果与 F0 代 VDR^{-/-}10#小鼠的一个等位基因的突变一致,说明本实验已经通过 F0 代 VDR^{-/-}10#小鼠繁育了 VDR^{+/+} 小鼠,为后续 VDR 敲除鼠品系奠定了基础。(见图 4)。

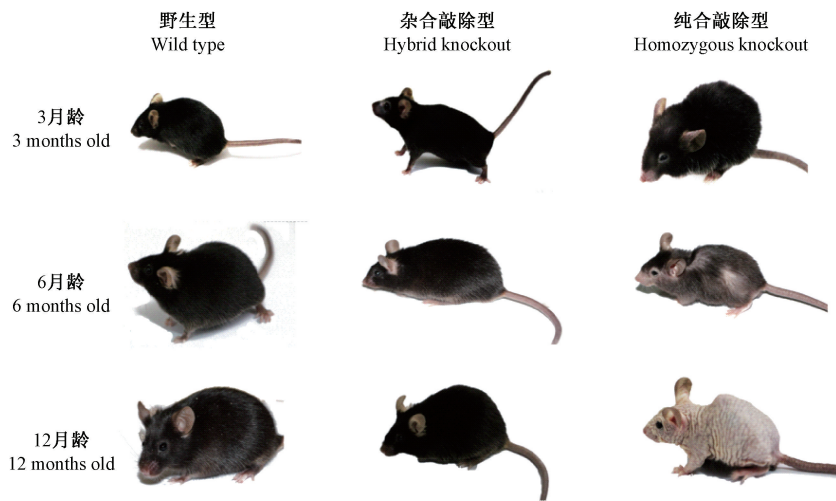
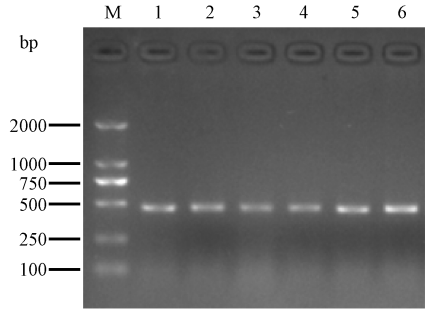


图 1 小鼠表型特征

Figure 1 Phenotypic characteristics of mice

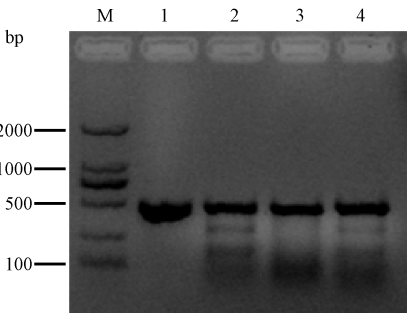


注:M. DNA 标准 Marker DL2000;1 - 6. 不同个体 VDR 靶点基因扩增产物。

图 2 VDR 靶点基因扩增

Note. M. DNA Standard Marker DL2000; 1 - 6. Amplified products of VDR target gene in different individuals.

Figure 2 Amplification of VDR target gene



注:M. DNA 标准 Marker DL2000;1. T7E1 未切 VDR 靶点基因; 2 - 4. T7E1 酶切不同个体 VDR 靶点基因。

图 3 T7E1 核酸内切酶鉴定 VDR 敲除鼠

Note. M. DNA Standard Marker DL2000; 1. T7E1 uncut VDR target gene; 2 - 4. T7E1 digests VDR target gene in different individuals.

Figure 3 T7E1 endonuclease to identify VDR knockout mice

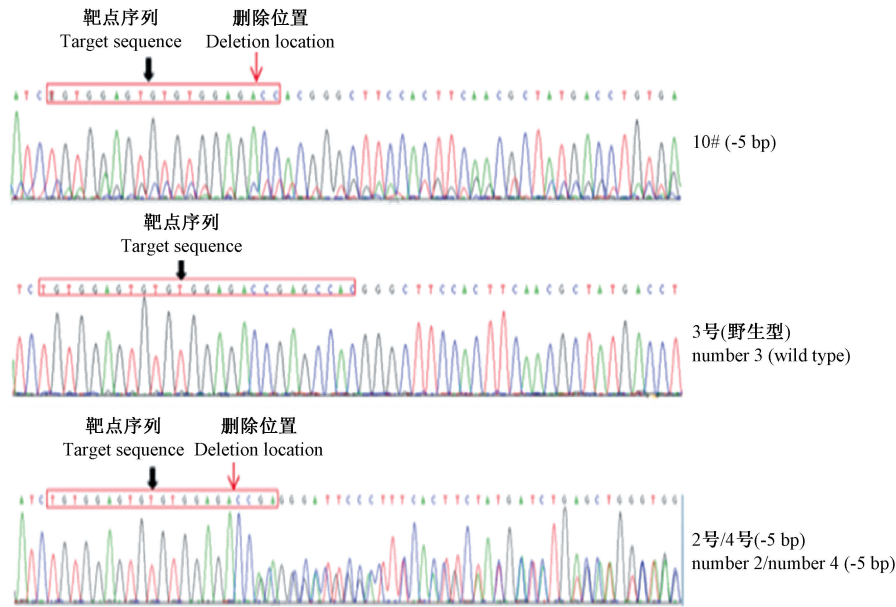


图 4 VDR 敲除鼠靶点测序图

Figure 4 Target sequencing chart of VDR knockout mice

2.2.3 VDR 基因敲除小鼠的繁育及鉴定情况

前期通过 F0 代 12 只 $VDR^{-/-}$ 敲除鼠繁育性能的检测分析,发现只有 $VDR^{-/-}$ 10#小鼠具有较好的、稳定的繁殖能力,因此本研究所有小鼠都是 $VDR^{-/-}$ 10#小鼠繁育的后代,每一代的繁殖性能和

基因型鉴定情况见表 2,这些数据表明不同繁育方式所产子代小鼠的基因型分布基本符合孟德尔遗传定律,在 VDR 敲除鼠品系构建过程中,本研究建立了详细、系统的遗传系谱图,其中部分遗传系谱图见图 5。

表 2 VDR 基因敲除小鼠不同繁育方式繁育结果

代数 Generations	配种方式 Method $\delta \times \text{♀}$	子鼠基因型/只 Genotype/ <i>n</i>			合计/只 Total/ <i>n</i>	纯合率/% Homozygosity rate/%
		+/+	+/-	-/-		
F1 代	-/- $\times$ -/-	0	0	6	6	100
	-/- $\times$ +/+	0	11	0	11	0
F2 代	+/- $\times$ +/+	19	15	0	34	0
	+/- $\times$ +/-	3	5	4	12	33
F3 代	+/- $\times$ +/-	10	19	9	38	24

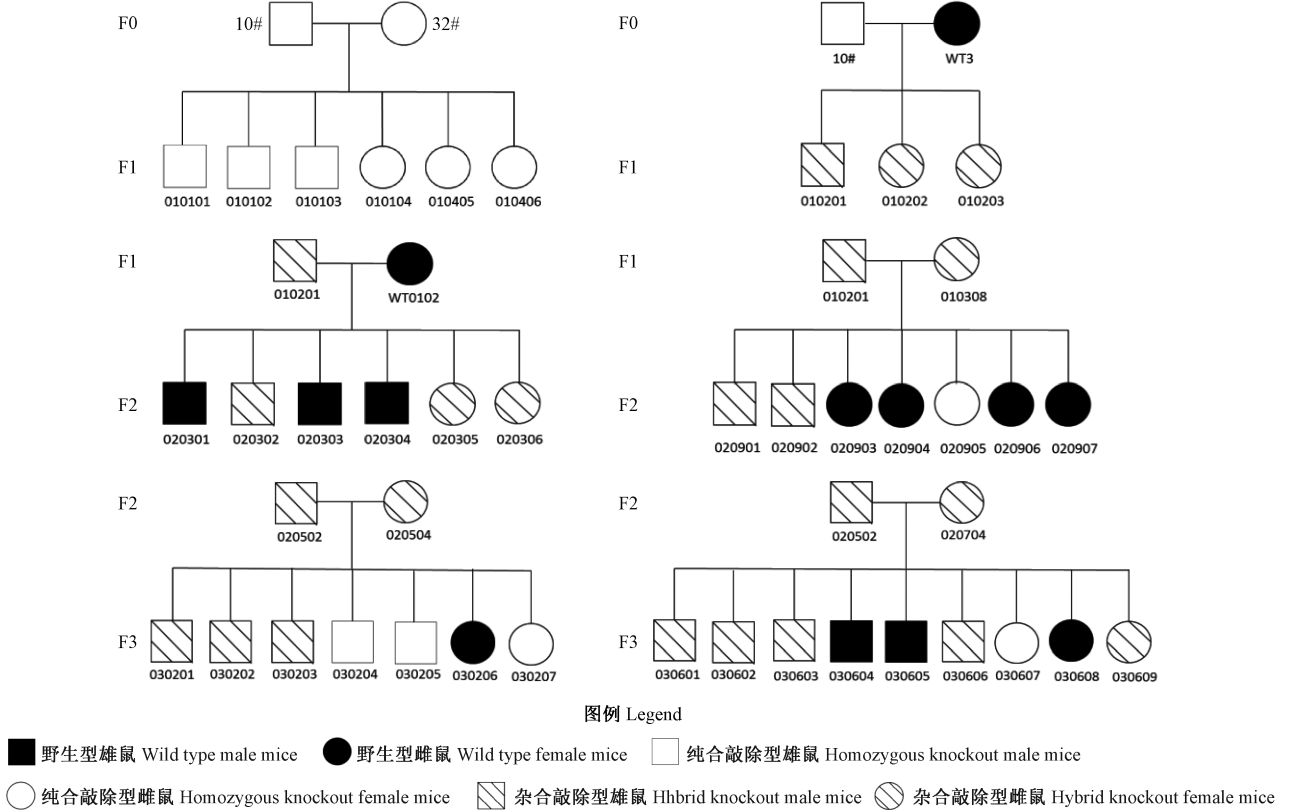


图 5 VDR 敲除鼠遗传系谱图

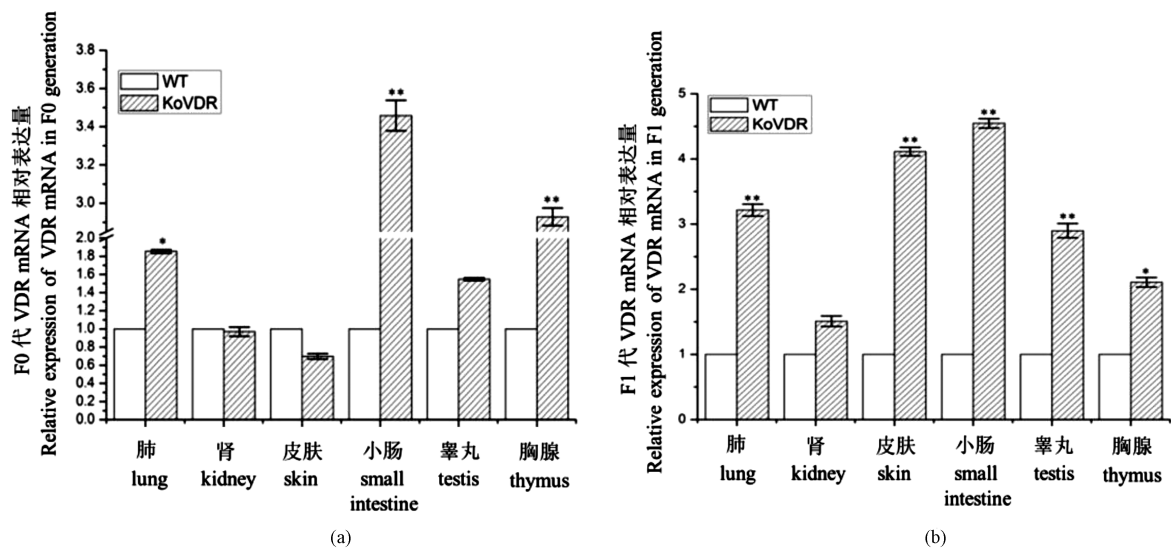
Figure 5 Genetic lineage of VDR knockout mice

2.3 敲除鼠不同组织中 VDR 基因表达水平分析

采用 qPCR 检测 F0 代和 F1 代 $VDR^{-/-}$ 小鼠的肺、肾、皮肤、小肠、睾丸和胸腺等组织中 VDR 的转录水平。结果显示,与 $VDR^{+/+}$ 小鼠相比,F0 代 $VDR^{-/-}$ 小鼠小肠和胸腺组织中 VDR 转录水平升高,且差异有极显著性($P < 0.01$),肺组织中呈显著升高($P < 0.05$),睾丸组织中也呈现升高趋势,但差异无显著性,肾和皮肤组织中 VDR 转录水平表达量呈降低趋势,且差异不显著,如图 6(a)所示。

F1 代 $VDR^{-/-}$ 小鼠各组织中 VDR 转录水平均呈升高趋势,其中肺、皮肤、小肠和睾丸组织中差异极显著($P < 0.01$),胸腺组织中差异有显著性($P < 0.05$),但肾组织中差异不显著,如图 6(b)所示。

Western blot 检测 F0 代 $VDR^{-/-}$ 小鼠和 $VDR^{+/+}$ 小鼠皮肤、小肠、肾、睾丸、肺等组织蛋白表达水平,如图 7 所示, $VDR^{+/+}$ 小鼠中各组织均有 VDR 表达,而 $VDR^{-/-}$ 小鼠中都未检测到 VDR 蛋白水平表达,说明 VDR 敲除成功。



注:(a) F0 代 VDR^{-/-} 小鼠与 VDR^{+/+} 小鼠不同组织 VDR 基因表达水平;(b) F1 代 VDR^{-/-} 小鼠与 VDR^{+/+} 小鼠不同组织 VDR 基因表达水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 F0 代、F1 代 VDR^{-/-} 小鼠与 VDR^{+/+} 小鼠不同组织中 VDR 转录水平分析

Note. (a) VDR gene expression levels in different tissues of F0 generation VDR^{-/-} mice and VDR^{+/+} mice. (b) VDR gene expression levels in different tissues of F1 generation VDR^{-/-} mice and VDR^{+/+} mice; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 6 Analysis of VDR transcriptome levels in different tissues of F0 and F1 generations VDR^{-/-} mice and VDR^{+/+} mice

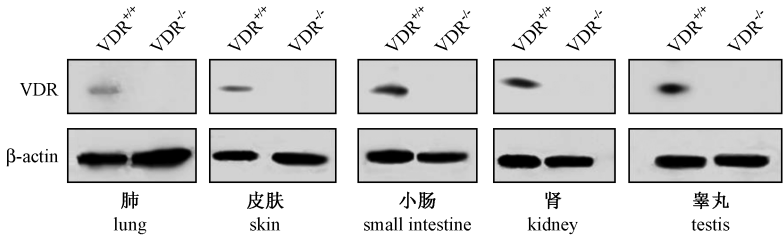


图 7 Western blot 检测 F0 代 VDR^{-/-} 小鼠与 VDR^{+/+} 小鼠不同组织中 VDR 蛋白表达

Figure 7 Western blot detected VDR protein expression in different tissues of F0 generation VDR^{-/-} mice and VDR^{+/+} mice

3 讨论

基因敲除是研究基因功能不可缺少的逻辑环节^[14],也是最直接的手段之一^[15],为疾病发生发展、药物筛选以及活体和整体水平的研究提供了有力手段^[16]。最近几年来,该领域技术发展迅速,基因敲除模型被广泛应用于生物学和医学研究领域。但是,敲除鼠品系建立又受敲除基因功能的限制,基因敲除小鼠的某些功能丧失,可能造成生长发育或生殖功能障碍^[17],因此不易获得纯合型后代。本研究发现 VDR^{-/-} 小鼠互交后,大多数小鼠无子代产生,仅有两只能够产生子代。由此推断,VDR 基因缺失后可能影响雌雄小鼠的生殖能力,但目前机制尚不清楚,有待后期验证。另外,采用 VDR^{+/-} 互

交方式,子代小鼠出现三种基因型:纯合型 (VDR^{-/-})、杂合型 (VDR^{+/-}) 和野生型 (VDR^{+/+}),其比例接近 1:2:1,VDR^{-/-} 可以用于后续功能研究,VDR^{+/-} 则可用来保种。

对于 VDR^{-/-} 小鼠,本研究通过 qPCR 技术检测各组织中 VDR 基因的转录水平,发现 F0 和 F1 代 VDR^{-/-} 小鼠 VDR 转录水平均有明显升高。同时,通过 Western blot 检测不同组织中 VDR 蛋白表达情况,在各组织中未检测到 VDR 表达,这一结果与本研究的预期结果一致。本研究的 VDR 敲除鼠品系是基于实验室前期通过 CRISPR/Cas9 技术构建的 F0 代 VDR 敲除鼠建立的,VDR 敲除的机理是在 VDR 基因外显子上 5 bp 的小片段删除,导致 VDR 基因无义突变,无法产生完整有功能的 VDR,因此

Western blot 检测不到蛋白表达,说明 VDR 敲除是成功的。由于 VDR 敲除仅仅是 5 bp 小片段删除,其转录机制没有受到影响,仅仅是 mRNA 翻译的提前终止,无法产生有功能的完整 VDR,由于 VDR 是一个广泛存在的转录因子,机体不同组织生理功能的发挥都需要 VDR,因此生物体就会通过自身调控机制进一步加强 VDR 基因转录水平,所以敲除鼠的 VDR 基因转录水平就会升高,这一结果符合生物体基因表达调控的基本原理。另外,由于不同组织对 VDR 的需求程度不同,不同组织之间会有差异,但具体调节机制还有待进一步的研究。基于前期的表型分析、测序分析、qPCR 和 Western blot 检测结果,本研究筛选出以 F0 代 VDR^{-/-} 10# 为父本进行 VDR 敲除鼠品系建立,VDR 基因上 5 bp 的片段删除导致了 VDR 发生无义突变,导致其功能的丧失,通过 VDR^{-/-} 与 VDR^{+/+},VDR^{+/-} 与 VDR^{+/-} 及 VDR^{+/-} 与 VDR^{+/+} 不同交配模式最终建立 VDR 敲除鼠品系,为后续 VDR 功能研究提供了良好的实验模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Heikkinen S, Väisänen S, Pehkonen P, et al. Nuclear hormone 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(21): 9181–9193.
- [2] Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(10): 3294–3298.
- [3] Ghazi AA, Zadeh-Vakili A, Zarif Yeganeh M, et al. Hereditary Vitamin D resistant rickets: clinical, laboratory, and genetic characteristics of 2 Iranian siblings[J]. *Int J Endocrinol*, 2017, 15(3): e12384.
- [4] 肖硕,文九芳. 基因敲除技术在维生素 D 受体研究中的应用进展[J]. *新医学*, 2016,47(06): 354–356.
Xiao S, Wen JF. Application progress in gene knock-out of vitamin D receptor[J]. *J New Med*, 2016, 47(06): 354–356.
- [5] Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF. Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D3 metabolically active in the intestine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971, 68(4): 803–804.
- [6] Tebben PJ, Singh RJ, Kumar R. Vitamin D-mediated hypercalcemia: mechanisms, diagnosis, and treatment [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(5): 521–547.
- [7] Gao L, Tao Y, Zhang L, et al. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and tuberculosis: updated systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2010, 14(1): 15–23.
- [8] Muhammad J, Chan ES, Brown TT, et al. Vitamin D supplementation does not affect metabolic changes seen with ART initiation[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2017, 4(4): ofx210.
- [9] Su H, Lou Y, Fu Y, et al. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism revealed by profiling of lysine succinylome of white adipose tissue[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14132.
- [10] 李爱梅,张伟,张浩,等. 维生素 D/维生素 D 受体、自噬与炎症相关疾病[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2017,42(08): 979–985.
Li AM, Zhang W, Zhang H, et al. Vitamin D/vitamin D receptor, autophagy and inflammation relevant diseases [J]. *J Central South Univ (Med Sci)*, 2017, 42(08): 979–985.
- [11] Yuan J, Guo X, Liu Z, et al. Vitamin D receptor activation influences the ERK pathway and protects against neurological deficits and neuronal death[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1): 364–372.
- [12] 王刚,张薛,李啸,等. 维生素 D 与甲状腺自身免疫性疾病[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(64): 12671–12672.
Wang G, Zhang X, Li X, et al. Vitamin D and thyroid autoimmune diseases[J]. *J Clin Med Lit*, 2017, 4(64): 12671–12672.
- [13] Zhang T, Yin Y, Liu H, et al. Generation of VDR knock-out mice via Zygote injection of CRISPR/Cas9 system [J]. *PLoS One*, 2016,11(9): e0163551.
- [14] 朱奎成,徐存拴,陈莹莹,等. *Hr* 基因敲除小鼠模型的构建和表型分析[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(8): 75–78.
Zhu KC, Xu CX, Chen YY, et al. Construction of a *Hr* mutant knockout mouse model and phenotypic analysis[J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(8): 75–78.
- [15] 王强,钱文溢,刘景丽,等. ER α 基因敲除小鼠的繁育及子代小鼠基因型的鉴定[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(2): 100–102.
Wang Q, Qian WY, Liu JL, et al. Breeding of ER α gene knockout mice and genotype identification of their filial generation [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2011, 19(2): 100–102.
- [16] 童佩,奚玲,杨洁,等. S100A1 基因敲除小鼠模型的构建与鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(5): 549–553.
Tong P, Xi L, Yang J, et al. Establishment and identification of S100A16 gene knockout mouse model [J]. *Acta Univ Med Nanjing(Nat Sci)*, 2017, 37(5): 549–553.
- [17] 周胜强,罗东,黄素芬,等. Caveolin-1 基因敲除小鼠子代基因型的鉴定及繁育方法[J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(3): 228–232.
Zhou SQ, Luo D, Huang SF, et al. Genotype identification and breeding method of caveolin-1 gene knockout mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2016, 24(3): 228–232.