

李端,刘亚坤,段冰霞,等. 少突胶质细胞条件性敲除 FGF9 基因小鼠模型的建立、鉴定及初步表型 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(4): 455-460.

Li D, Liu YK, Duan BX, et al. Establishment, identification and preliminary phenotyping of an oligodendrocyte-specific fibroblast growth factor 9 conditional knockout mouse [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(4): 455-460.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.04.005

少突胶质细胞条件性敲除 FGF9 基因小鼠模型的建立、鉴定及初步表型

李端¹,刘亚坤¹,段冰霞²,杜娟²,郭默然^{1*}

(1. 河北医科大学第二医院,石家庄 050000; 2. 河北森朗生物科技有限公司,石家庄 050000)

【摘要】 目的 建立少突胶质细胞特异性敲除成纤维生长因子 9(FGF9)小鼠模型,进一步研究 FGF9 在神经发育中的作用。**方法** 将 Olig1-Cre 转基因小鼠与 FGF9 转基因小鼠(FGF9^{fllox/fllox})杂交,选取雌性 FGF9^{fllox/wt}/Olig1-Cre⁺与雄性 FGF9^{fllox/fllox}合笼交配,F3 代获得少突胶质细胞特异性敲除 FGF9 基因小鼠(FGF9^{fllox/fllox}/Olig1-Cre⁺)。为了证实条件性基因敲除的特异性及有效性,提取鼠尾组织基因组 DNA,通过 PCR 技术鉴定其基因型,利用蛋白电泳以及激光共聚焦验证 FGF9 蛋白的表达,并对其表型进行观察。**结果** 从基因水平和蛋白水平证实了成功构建了 FGF9^{fllox/fllox}/Olig1-Cre⁺小鼠。初步表型分析显示,敲除组小鼠可活可育,生存期与对照组相同,但发育缓慢体重显著减轻。**结论** 成功获得少突胶质细胞中特异性敲除 FGF9 基因小鼠,FGF9 基因条件性敲除后引起小鼠发育缓慢。

【关键词】 FGF9 基因;少突胶质细胞;Cre/Loxp;表型分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 04-0455-06

Establishment, identification and preliminary phenotyping of an oligodendrocyte-specific fibroblast growth factor 9 conditional knockout mouse

LI Duan¹, LIU Yakun¹, DUAN Bingxia², DU Juan², GUO Moran^{1*}

(1. the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China. 2. Hebei Senlang Biological Technology Co., Ltd., Shijiazhuang 050000)

Corresponding author: GUO Moran. E-mail: guowanpiaopeng0823@163.com

【Abstract】 Objective To further study the role of fibroblast growth factor 9 (FGF9) in neurodevelopment by establishing a mouse model of conditional FGF9 knockout in oligodendrocytes. **Methods** Olig1-Cre transgenic mice were crossed with FGF9 transgenic mice (FGF9^{fllox/fllox}). Then, female FGF9^{fllox/wt}/Olig1-Cre⁺ mice were mated with male FGF9^{fllox/fllox} mice to obtain oligodendrocyte-specific FGF9 knockout mice (FGF9^{fllox/fllox}/Olig1-Cre⁺) in the F3 generation. To confirm that FGF9 had been conditionally inactivated in the oligodendrocytes alone, genotyping using PCR, western blotting, and laser confocal were used to evaluate the expression of FGF9 mRNA and protein. An initial characterization of the phenotype of the conditional knockout (CKO) mice was then made. **Results** We confirmed that the expression of the

[基金项目] 国家自然科学基金(81901290),河北省自然科学基金(H2020206390),河北省医学科学研究课题(20200880)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China Grants(81901290), Natural Science Foundation of Hebei Province(H2020206390), Hebei Medical Science Research Project Project(20200880)。

[作者简介] 李端(1990—),女,医师,硕士研究生,研究方向:神经病学研究。Email:lijiatou333@163.com

[通信作者] 郭默然(1986—),男,助理研究员,博士,研究方向:神经病学研究。Email:guowanpiaopeng0823@163.com

FGF9 mRNA and protein were appropriate in the FGF9^{flx/flx}/Olig1-Cre⁺ mice. Preliminary phenotypic analysis showed that FGF9 CKO mice survived for the same period of time as control mice and were fertile but developed slowly. **Conclusions** We have successfully established mice with a CKO of FGF9 in oligodendrocytes, which causes growth retardation.

【Keywords】 fibroblast growth factor 9; oligodendrocyte; Cre/Loxp; phenotypic analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是一个多基因家族,在促进胚胎发育、组织修复、神经保护、肿瘤发生与转移等多种生理或病理过程中发挥作用^[1]。FGFs 共有 23 个成员,分子量在 $17 \times 10^3 \sim 34 \times 10^3$ 之间,都具有 120 个氨基酸构成的保守核心^[2]。根据序列同源性和系统发育上的差异,将这些家族分为包括旁分泌(FGF 1-10、16-18、20、22)、内分泌(FGF 15/19、21、23)和胞分泌(FGF 11-14)3 种类型^[3]。

FGF9 作为其家族成员之一,广泛存在于在中枢神经系统及外周神经系统中,对神经元和神经胶质细胞有保护、促生长和修复损伤等作用^[4]。少突胶质细胞作为神经系统的重要部分,在保护神经元、协助信号传递中发挥重要作用,FGF9 也被证实可以调节少突胶质细胞中髓鞘相关蛋白的表达^[5-6]。但是少突胶质细胞敲除 FGF9 是否对小鼠有明显影响还未见相关报道。

条件性基因敲除动物模型,是研究基因在模型特定细胞或组织生理功能的有效方法。其中基于 Cre/Loxp 系统的条件性基因敲除小鼠因其良好的实验效果得到了许多研究者的青睐^[7]。为此,本实验利用 Cre/loxP 系统构建少突胶质细胞(Olig1)特异性敲除 FGF9 基因的小鼠模型,初步观察其表型,为进一步探讨 FGF9 基因在神经系统发育中的作用及机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

FGF9^{flx/flx} 纯合子转基因小鼠由本课题组委托百奥赛图基因生物技术有限公司【SCXK(京)2020-0007】制备。Olig1-Cre 转基因小鼠(B6; 129S4-Olig1^{tm1(cre)Rth/J})购自 Jackson 实验室(Stock No: 011105)。本实验中共用 FGF9^{flx/flx}/Olig1-Cre⁺ 以及同窝对照雄性小鼠各 16 只用于实验,8 周龄 SPF 级小鼠,体重约为 25 g。3 对用于 Western Blot 检测,3 对用于免疫化学染色,其余 10 对用于体重及生存

期统计。小鼠于河北医科大学第二医院 SPF 级动物饲养间饲养【SYXK(冀)2016-003】。室内温度控制在 20 ~ 25℃,湿度控制在 40% ~ 70%。小鼠笼盒每周进行 1 次消毒处理,垫料、饲料、饮水经过高温高压灭菌处理。繁殖采用雌雄比 3 : 1 同笼方式进行,每胎平均 6 ~ 10 只小鼠,小鼠出生 20 ~ 30 d 后进行分笼,一直到 8 周性成熟,整个过程中密切观察小鼠的生长和繁殖情况。所有操作均符合河北医科大学第二医院实验伦理要求(审批号:2020-R155)。

1.1.2 主要试剂与仪器

dNTP, rTag 酶(大连宝生物公司),PCR 引物由上海生工合成。GoTaq[®] Master Mixes 购自 Promega (M7123)。总蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司(P1250))。FGF9 抗体(Abcam 公司(EPR19937)), Olig1 抗体(Millipore 公司(MAB5540)), 二抗(Rockland ImmunoResearch)。其他生化试剂购自 Sigma。PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司),DYY-12 电泳仪(北京六一仪器厂),全自动凝胶成像系统(英国 Syngene 公司),石蜡切片机(德国 Leica 公司),Odyssey 双色红外荧光成像系统(美国 LI-COR 公司),转棒仪(意大利 Ugo Basile 公司)。

1.2 方法

1.2.1 转基因小鼠的鉴定

Olig1-Cre 转基因小鼠与 C57BL/6 野生型小鼠进行杂交繁殖。FGF9^{flx/flx} 转基因小鼠为纯合子小鼠,雌雄均取纯合子进行繁殖。碱性裂解法提取转基因小鼠尾尖组织的 DNA,设计合成鉴定基因的引物,引物序列见表 1。PCR 反应体系(20 μL): 2 × PCR Master Mix 10 μL,正向、反向引物各 0.5 μL, DNA 模板 2 μL,去离子水 7 μL。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个循环;72℃ 7 min。取 PCR 反应终产物 8 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,电压 100 V,时间 30 min,全自动凝胶图像系统分析成像并保存。

表 1 FGF9 及 Olig1-Cre 基因鉴定所需 PCR 引物

Table 1 PCR primers for FGF9 and Olig1 gene genotyping

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
FGF9	CTGCAGCGTTCTGCGATACTAGCTT	GCTACGTCAGAAATTTACGGATCCTGAC
Olig1-Cre	AATCGCGAACATCTTCAGGT	CGCCCCAGATGTACTATGC

1.2.2 少突胶质细胞特异性敲除 FGF9 基因小鼠的繁殖与鉴定

取雌性 FGF9^{flox/flox} 小鼠与雄性 Olig1-Cre⁺ 转基因小鼠进行杂交繁殖,根据孟德尔遗传规律,其子代基因型分别为:FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁺; FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁻,比例各占 1/2。取雌性 FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁺ 小鼠与雄性 FGF9^{flox/flox} 小鼠进行交配,其子代为四种基因型: FGF9^{flox/flox}/Olig1-Cre⁺; FGF9^{flox/flox}/Olig1-Cre⁻; FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁺; FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁻。其中 FGF9^{flox/flox}/Olig1-Cre⁺ 全敲小鼠比例为 1/4。按照 1.2.1 鉴定方法进行 FGF9 和 Olig-Cre 的鉴定。FGF9^{flox/flox}/Olig1-Cre⁺ 小鼠作为敲除组,同窝其余 3 种基因型小鼠表型无明显差异,作为对照组。

1.2.3 Western Blot

从处死的小鼠中收集新鲜大脑皮层组织并转移至试管中。使用总蛋白质提取试剂盒提取蛋白质,通过 SDS-PAGE 胶分离,然后转移到 PVDF 膜上。将膜与一抗在 4℃ 孵育 12 h,洗涤 3 次,持续 15 min,然后与二抗在 37℃ 孵育 1 h。在 Odyssey 红外成像系统 (LI-COR, NE) 上进行扫描分析以及定量。

1.2.4 免疫荧光

处死小鼠并用 4% 多聚甲醛灌注,取出小鼠大脑置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h。梯度乙醇脱水后,石蜡包埋切片,烤片脱蜡后用于免疫荧光染色。免疫荧光如文献所述进行了部分修改^[8]。大脑切片在 4℃ 下用一抗孵育过夜,然后在室温下用二抗和 Hoechst 染色孵育 1 h。共聚焦荧光显微镜 (Olympus FV1000) 观察图像及分析。

1.2.5 抓力、转棒测试、体质量及生存期比较

选取同窝非条件敲除小鼠作为对照组,对照组和敲除组各 3 只小鼠,进行抓力、转棒测试,并进行足迹分析。同时统计对照组和敲除组各 10 只小鼠,测量 8 周龄的体重进行比较,之后比较对照组和敲除组的生存期。本项由 2016 年 10 月开始,到 2020 年 1 月观察小鼠生存期结束为止。

1.3 统计学分析

数据的统计处理采用 GraphPad Prism5 软件分

析,Western Blot 结果用 Image-Pro plus 5.1 分析。体重测量数据比较采用 Student's *t* 检验,生存期比较用 Log-rank 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF9 条件性敲除模型的建立及验证

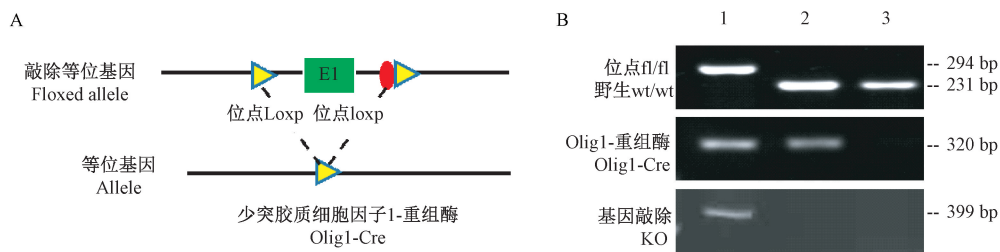
FGF9^{flox/flox} 基因小鼠是在 FGF9 第一个外显子两端插入了 Loxp 位点,比野生型多 60 bp,与表达 Cre 的转基因小鼠交配,从而获得 Cre 重组酶切除 FGF9 的条件敲除小鼠(图 1A)。对雄性 FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁺ 小鼠与雌性 FGF9^{flox/flox} 小鼠杂交后代进行基因鉴定,结果如图 1B 所示,2 号泳道内检测的结果为 Olig1-Cre 阳性小鼠,3 号泳道检测结果为野生型小鼠。1 号泳道内检测的结果为 FGF9^{flox/flox} Olig1-Cre⁺ 小鼠,即少突胶质细胞特异性敲除 FGF9 基因的小鼠模型,基因敲除 (knockout, KO) 也经过验证被敲除。其余 3 种基因型小鼠无明显差异,可作为对照小鼠。

取对照组和敲除组小鼠进行蛋白表达检测以及免疫荧光观察,每组 3 只小鼠。Western Blot 分析结果显示,与对照小鼠相比,FGF9 条件性敲除小鼠大脑皮层中 FGF9 表达显著降低,降低了约 60% 的表达 (Mean 0.356 SD 0.052 vs 0.143 SD 0.025, *P* = 0.0419) (图 2A)。对基因小鼠进行 FGF9 和 Olig1 双重免疫染色,敲除组小鼠大脑皮层中 FGF9 阳性细胞少于对照组小鼠,并且大部分 Olig1 阳性神经元不表达 FGF9 (图 2B),部分呈现更细长的反应形态 (箭头所指)。这些结果显示在蛋白水平上也证明模型建立成功。

2.2 FGF9 条件性敲除小鼠表型分析

2.2.1 遗传性状

使用雄性 FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁺ 小鼠与雌性 FGF9^{flox/flox} 小鼠交配生产后,累计统计了 82 只出生小鼠,其中雄性 43 只,雌性 39 只,雌雄比为 110.3%。其中 FGF9^{flox/flox}/Olig1-Cre⁺ 基因型小鼠 19 只; FGF9^{flox/flox}/Olig1-Cre⁻ 基因型小鼠 21 只; FGF9^{flox/wt}/Olig1-Cre⁺ 基因型小鼠 20 只;

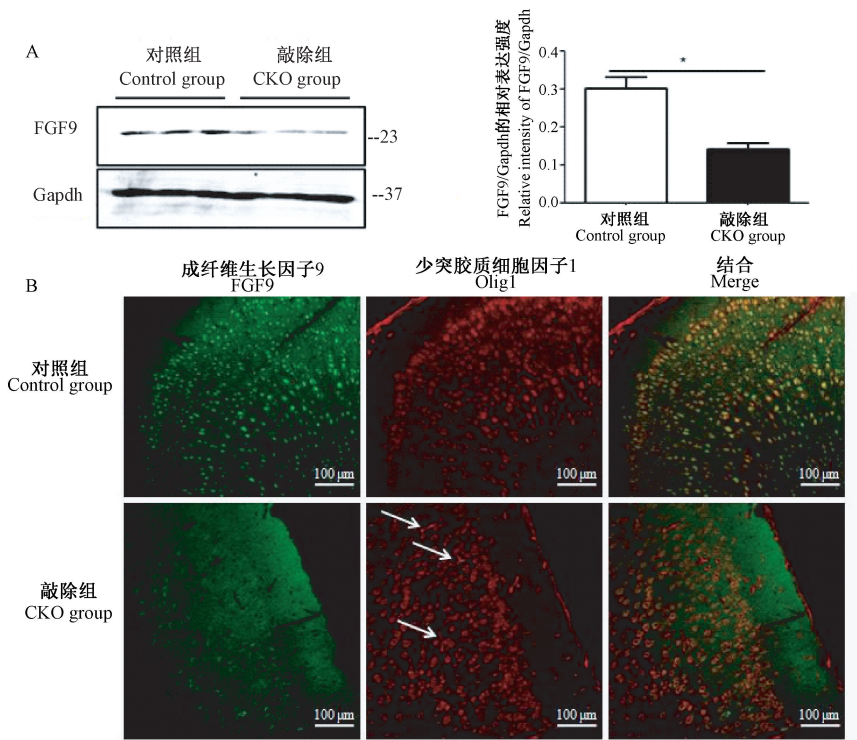


注:A; Cre/Loxp 敲除原理示意图;B;小鼠鼠尾组织 DNA 经 PCR 扩增后电泳条带。

图 1 PCR 检测 FGF9 CKO 小鼠基因组 DNA

Note. A. Schematic diagram of Cre/Loxp knockout principle. B. Electrophoresis band of PCR amplification of mouse tail tissue DNA.

Figure 1 PCR analysis of genomic DNA in FGF9 conditional knockout mice



注:A; Western Blot 验证对照组和敲除组小鼠大脑皮层中 FGF9 的蛋白水平变化,与对照组相比, * $P < 0.05$;B;对照组和敲除组小鼠皮层 FGF9 和 Olig1 的免疫荧光。

图 2 蛋白电泳和共聚焦观察结果验证 FGF9 CKO 小鼠大脑皮层 FGF9 的表达

Note. A. The expression of FGF9 protein levels in the cortex of the control and FGF9 CKO group. Compared with the control group, * $P < 0.05$. B. Immunostaining for FGF9 and Olig1 in the cortex of the control and FGF9 CKO group.

Figure 2 Western Blot and confocal results verify the expression of FGF9 in the cortex of FGF9 CKO mice

FGF9^{fllox/wt}/Olig1-Cre⁻基因型小鼠 23 只,分离比例符合基本孟德尔遗传定律,这说明少突胶质细胞条件性敲除 FGF9 对小鼠的胚胎发育无明显影响。

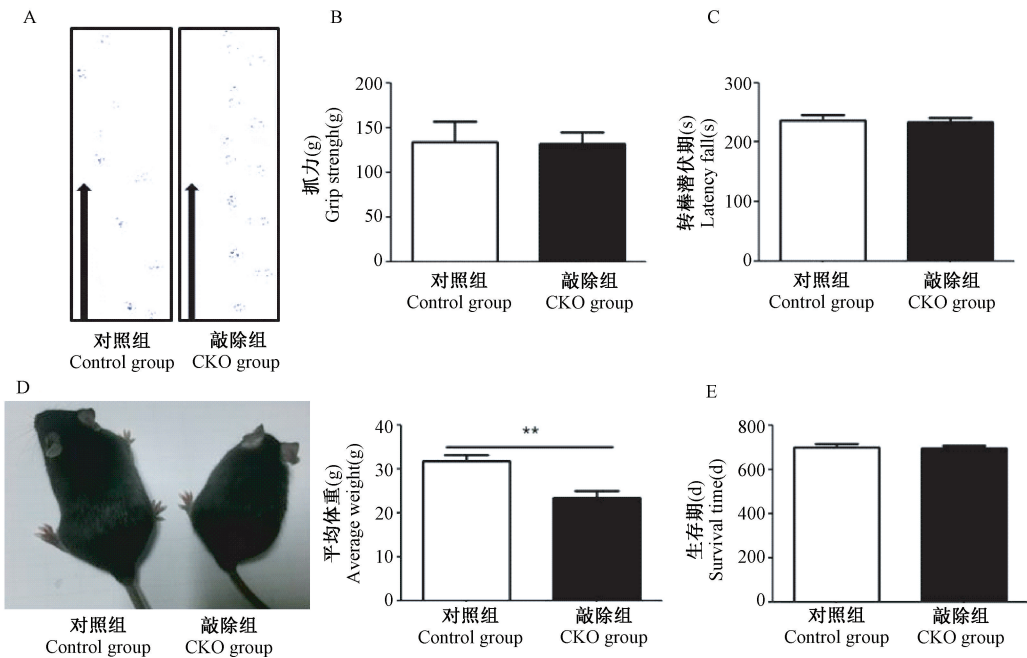
2.2.2 生长发育和生存期

分为对照组和敲除组两组,每组雌雄各 5 只小鼠(8 周性成熟),比较两组小鼠的行动情况,并未发

现敲除小鼠出现少突胶质细胞异常可能引起的多发性硬化的表型,例如后肢无力、瘫痪或者平衡失调等,抓力、转棒测试以及足迹分析均未见敲除小鼠与对照组有任何异常(图 3A ~ 3C)。有趣的是,统计了 10 对对照组和敲除组小鼠体重,结果显示条件性敲除 FGF9 基因小鼠生长明显慢于对照组。FGF9 敲除组平均体重比对照组减轻了 26.1%

(23.45 SD 4.86 vs 31.75 SD 4.43, $P = 0.004$) (图 3D), 差异具有显著性差异 ($P < 0.01$)。比较两组

生存期发现, 敲除组与对照组生存期没有差异, 均达到两年左右 (图 3E)。



注: A: 敲除组与对照组小鼠足迹分析, 前爪红色墨水标记, 后爪蓝色墨水标记; B: 敲除组与对照组小鼠抓力测试; C: 敲除组与对照组小鼠转棒测试; D: 与对照组相比, $*** P < 0.0001$; E: FGF9 敲除组小鼠的生存期与对照组小鼠没有差异。

图 3 FGF9 敲除组与对照组表型、体重及生存期比较

Note. A. Footprint analysis of CKO group and control group. The front paws were labeled with red ink, and the rear paws with blue ink. B. Grip strength test of CKO group and control group. C. Rotating rod test of CKO group and control group. D. Compared with the control group, $*** P < 0.0001$. E. The FGF9 CKO mice did not display overt abnormalities in survival.

Figure 3 Phenotype observation of the control and FGF9 CKO group

3 讨论

成纤维生长因子家族作为重要的细胞间信号分子, 参与了血管形成、胚胎发育、骨骼发育、损伤修复、细胞凋亡、肿瘤生长、性腺分化等多种生理或病理过程^[9-10]。FGF9 是中枢神经系统广泛表达的因子之一, 并起胶质细胞激活因子的作用, 以促进中枢神经系统中神经元的存活和胶质细胞的分化^[11-12]。但是相对于其他家族成员, FGF9 在中枢神经系统中研究较少, 相关机制并不清楚。

FGF9(-/-) 全敲小鼠由于肺发育不全出生时即死亡^[13]。为了更好的研究 FGF9 在中枢神经系统中的功能和作用机制, 本研究利用 Cre/Loxp 系统构建了少突胶质细胞条件性敲除 FGF9 基因小鼠。基因型鉴定是基因敲除小鼠繁育保种的重要环节^[14], 对构建成功小鼠提取 DNA 进行基因型鉴定 loxp 位点和 Olig1-Cre, 同时蛋白电泳验证大脑皮层 FGF9 蛋白的表达水平, 共聚焦激光显微镜观察皮层

中 FGF9 和 Olig1 蛋白的分布, 多种方法都证实了少突胶质细胞条件性敲除 FGF9 基因小鼠构建成功。

少突胶质细胞是中枢神经系统髓鞘形成细胞, Olig1 和 Olig2 在少突胶质细胞的发育、分化和髓鞘形成过程中发挥重要的作用。Olig1 主要参与少突胶质细胞的成熟分化和髓鞘形成的终末期, 而且部分功能可以被 Olig2 的功能所补偿。而 Olig2 主要少突胶质前体细胞的早期定向分化中在发挥作用。在构建的少突胶质细胞条件性敲除 FGF9 基因小鼠中, 也没有观察到后肢无力、瘫痪或者平衡失调等多发性硬化等表型。

初步表型分析显示, 敲除组小鼠胚胎发育无明显影响, 出生数量符合孟德尔遗传定律。生存期也没有明显变化, 但是生长速度慢于同窝对照小鼠, 8 周龄时体重显著低于对照组。这与之前的研究 GABAergic 神经元敲除 FGF9 小鼠有相似的结果, FGF9^{fllox/fllox} VGAT-Cre + 小鼠也显示出生长迟缓^[5]。有研究报道神经系统发育过程中端脑腹侧的祖细

胞(表达 Olig1)可以产生 GABA 能神经元和少突胶质细胞^[15]。条件性敲除 FGF9 基因与发育迟缓的关系,是否与 GABA 能神经元相关,以及是否还影响其他方面(如骨骼发育等),需要进一步研究。

综上所述,本研究成功构建了少突胶质细胞(Olig1)特异性敲除 FGF9 基因的小鼠模型,胚胎发育正常,生存期正常,但发育缓慢。这些表型提示,FGF9 基因在少突胶质细胞中表达或许对调控小鼠发育有积极作用。在以后的研究中,将进一步分析其具体的作用机制。

参 考 文 献(References)

- [1] Hui Q, Jin Z, Li XK, et al. FGF family: from drug development to clinical application [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1875.
- [2] Itoh N. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: Their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(10): 1819-1825.
- [3] Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease [J]. *J Biochem*, 2011, 149(2): 121-130.
- [4] Deng B, Lv W, Duan W, et al. FGF9 modulates Schwann cell myelination in developing nerves and induces a pro-inflammatory environment during injury [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(10): 8643-8658.
- [5] Guo M, Chen H, Duan W, et al. FGF9 knockout in GABAergic neurons induces apoptosis and inflammation via the Fas/caspase-3 pathway in the cerebellum of mice [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 154: 91-101.
- [6] Cohen RI, Chandross KJ. Fibroblast growth factor-9 modulates the expression of myelin related proteins and multiple fibroblast growth factor receptors in developing oligodendrocytes [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(3): 273-287.
- [7] 黄小荣, 黄衍恒, 叶霖, 等. 巨噬细胞条件性 Atg 5 基因敲除小鼠的构建及鉴定 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(6): 770-775.
- Huang XR, Huang YH, Ye L, et al. Construction and

identification of macrophage-conditional Atg5-knockout mice [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(6): 770-775.

- [8] Lin H, Hu H, Duan W, et al. Intramuscular delivery of scAAV9-hIGF1 prolongs survival in the hSOD1 (G93A) ALS mouse model via upregulation of D-amino acid oxidase [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(1): 682-695.
- [9] 易善勇, 杨晶, 官丽莉, 等. 成纤维细胞生长因子 9 (FGF9) 的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(7): 94-101.
- Yi SY, Yang J, Guan LL, et al. Research progresses on the fibroblast growth factor 9 [J]. *Chin Biotechnol*, 2015, 35(7): 94-101.
- [10] Wang S, Li Y, Jiang C, et al. Fibroblast growth factor 9 subfamily and the heart [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(2): 605-613.
- [11] Reuss B, von Bohlen und Halbach O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system [J]. *Cell Tissue Res*, 2003, 313(2): 139-157.
- [12] Yusuf IO, Cheng PH, Chen HM, et al. Fibroblast Growth Factor 9 suppresses striatal cell death dominantly through ERK signaling in Huntington's disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(2): 605-617.
- [13] Colvin JS, White AC, Pratt SJ, et al. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme [J]. *Development*, 2001, 128(11): 2095-2106.
- [14] 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.
- [15] Petryniak MA, Potter GB, Rowitch DH, et al. Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain [J]. *Neuron*, 2007, 55(3): 417-433.

[收稿日期] 2020-12-31