

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00341

骨形成蛋白 4 条件性 RNA 干扰小鼠的建立

李福兵, 杜晓兰, 余瑛, 赵玲, 何启芬, 陈林

第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军创伤中心, 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室, 重庆 400042

摘要: 为研究骨形成蛋白 4(Bone morphogenetic protein 4, BMP4)在骨骼发育中的作用, 我们以含有 LoxPneo 的 pBSK/U6 载体为骨架, 构建小鼠 BMP4 条件性 RNAi(conditional RNA interference), CRNA; 载体(BMP4^{CRNAi}), 经 *Kpn* I 和 *Afl* III 双酶切获取针对 *bmp4* 并含 *neo* 基因的干扰片段, 纯化后的目的片段显微注射入 0.5 d 的 FVB/NJ 小鼠受精卵, 并植入同期发情的假孕母鼠中, 获取 G₀ 代转基因小鼠; 利用 PCR 对 G₀ 代转基因小鼠基因型进行鉴定, PCR 阳性的小鼠与 FVB/NJ 小鼠交配, 最终获取稳定传代的 BMP4^{CRNAi} 小鼠。稳定传代的 BMP4^{CRNAi} 小鼠与成骨和软骨前体细胞表达 Cre 的转基因小鼠(Col2a1-Cre)交配, 获取 BMP4^{Col2a1-CRNAi} 小鼠。分离 BMP4^{Col2a1-CRNAi} 小鼠原代软骨细胞, 提取总 RNA, 利用半定量 RT-PCR 检测 RNA 干扰效率。小鼠基因型鉴定结果表明: 成功获得条件性 RNAi 转基因小鼠; BMP4 干扰效率检测结果表明: 在软骨细胞中 BMP4 的干扰效率为 81%。以上结果表明, 我们成功制备了 BMP4^{CRNAi} 小鼠和 BMP4^{Col2a1-CRNAi} 小鼠, BMP4^{CRNAi} 小鼠与不同 Cre 转基因小鼠交配, 可以研究 BMP4 在不同细胞、组织和器官的功能, BMP4^{Col2a1-CRNAi} 小鼠的获得为研究 BMP4 在软骨发育中的作用提供了合适的动物模型。

关键词: 骨形成蛋白 4; 条件性 RNA 干扰; 条件性敲低; 转基因

Generation of bone morphogenetic protein 4 conditional RNA interference mice

LI Fu-Bing, DU Xiao-Lan, YU Ying, ZHAO Ling, HE Qi-Fen, CHEN Lin

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: To explore bone morphogenetic protein 4 (BMP4) function in the developing bone, a BMP4 conditional RNA interference (CRNAi) vector was constructed based on the pBSK/U6 vector with a LoxPneo cassette. The transgene fragment targeting *bmp4* was obtained by *Kpn* and *Afl* double digestion and was purified before being microinjected into fertilized eggs from FVB/NJ mice. BMP4^{CRNAi} transgenic mice were genotyped by PCR. And the PCR positive mice were crossed with Col2a1-Cre transgenic mice, whose Cre recombinase was specifically expressed in osteo-chondro-progenitor cells. *Bmp4* mRNA expression in primary chondrocytes were examined by semi-quantitative RT-PCR to determine RNA interference efficiency. Results showed that BMP4^{CRNAi} mice and BMP4^{Col2a1-CRNAi} mice were produced successfully, and

收稿日期: 2007-10-17; 修回日期: 2007-12-24

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目(973 项目) (编号: 2005CB522604), 国家自然科学基金杰出青年基金(编号: 30425023), 国家自然科学基金重点项目(编号: 30530410)资助[Supported by the National Key Technology Research and Development Program (973 Program) (No. 2005CB522604), National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 30425023) and National Natural Science Foundation of China (No. 30530410)]

作者简介: 李福兵(1978-), 男, 重庆铜梁人, 博士研究生, 研究方向: FGFR1 在骨骼发育和骨折修复中的作用。Tel: 023-68757040;
E-mail: abbilson@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈林(1965-), 男, 重庆梁平人, 教授, 博士, 研究方向: FGFRs 在骨骼发育和骨折修复中的作用。Tel: 023-68757041;
E-mail: linchen70@163.com

bmp4 knockdown efficiency in primary chondrocytes of *BMP4^{Col2a1-CRNAi}* mice was 81%. This transgenic mouse line provides excellent model for studying the role of BMP4 in chondrocyte development, and *BMP4^{CRNAi}* mouse may be a good model for studying the role of BMP4 in different cells, tissues and organs through crossing with different Cre transgenic mice.

Keywords: bone morphogenetic protein 4; conditional RNAi; conditional knockdown; transgenic

BMP4 属于转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族中BMP家族的一员,在软骨膜和增生区软骨细胞中均表达,有研究表明BMP4在骨骼发育过程中发挥了重要的调控作用[1-3]。骨骼的成骨方式有两种:软骨内成骨和膜内成骨。软骨内成骨是长骨发育的主要形成方式,包含软骨形成和骨形成两个密切相关的过程。BMP4 敲除杂合子小鼠表型为轴前多趾, BMP4/7 双杂合子比单杂合子动物肋骨和指(趾)骨发生异常的几率高[4],提示 BMP4 是骨骼发育的重要分子。BMP4 经典基因敲除小鼠胚胎期死亡[5],获得BMP4 条件性敲除小鼠技术要求高、中靶率低、并且比较费时、费力,因此对于BMP4 在体内的作用研究受到很大的影响,目前对于BMP4 的研究大多是在体外细胞或者组织培养方面进行。条件性RNA干扰技术为在体(*in vivo*)研究BMP4 在特定器官、组织和细胞的功能提供了一个较好的研究手段,它可以有效的避免胚胎期致死,从遗传水平上解剖BMP4 的在特定细胞、组织和器官的生理功能。条件性RNA干扰技术是利用特定启动子(U6 和H1)和Cre/LoxP系统干扰基因在特定组织或者细胞中的表达,以达到研究基因功能的目的。在本研究中,我们构建了基于U6 和Cre/LoxP系统的BMP4 条件性RNAi真核表达载体,将两侧插入LoxP序列的*neo*基因置于U6 远端启动子和近端启动子之间, *neo*基因的存在使得U6 启动子不能启动针对BMP4 的siRNA, 仅在在有Cre重组酶表达的细胞或组织才能启动针对*bmp4*基因的干扰片段表达;通过显微注射方法获得BMP4 条件性RNAi转基因小鼠,利用细胞特异性表达Cre重组酶的Col2a1-Cre转基因小鼠与该小鼠交配,获取在成软骨前体细胞中敲低BMP4 的RNAi小鼠,从而为建立研究BMP4 在软骨中的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

pBSK/U6-*neo* 真核表达载体由美国国立卫生研

究院(NIH)邓初夏教授惠赠; DH5 α 感受态细菌由本室保存;质粒提取试剂盒购于 Omega 公司;限制性内切酶、其他工具酶和 RT-PCR 试剂盒均购于 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂盒购于 GENEMEGA 公司; DNA 琼脂糖凝胶纯化试剂盒购于 Qiagen 公司;凝胶成像系统及相关软件购于 Bio-Rad 公司;其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 实验动物

在成骨和软骨前体细胞中表达 Cre 的 Col2a1-Cre 转基因小鼠由军事医学科学院杨晓教授惠赠; SPF 级 FVB/NJ 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于第三军医大学大坪医院实验动物中心。所有动物实验操作均按第三军医大学实验动物管理委员会要求进行(执行标准 SYXK(军 2002032))。

1.3 靶序列的选择

干扰靶序列选小鼠 BMP4 mRNA 序列(GI:121949822)375 nt~395 nt[6],针对*bmp4*的靶点序列为: 5'-GGCTCCCAAGAATCATGGACT-3'。经NCBI网上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)行序列同源分析,确保抑制基因的特异性,然后根据pBSK/U6-*neo*载体和靶序列预测转录形成发夹状RNA(short heparin RNA, shRNA)(图1), shRNA茎环处设计为酶切位点,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。序列分别为, E1: 5'-GCTCCC-AAGAATCATGGA CTA-3'; E2: 5'-AGCTTAGTCC-ATGATTCTTGGGAGC-3'; F1: 5'-AGCTTAGTCC-

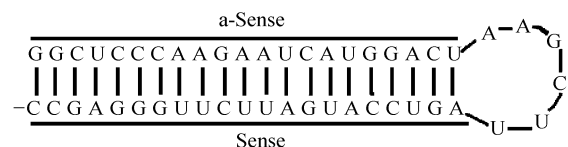


图1 预期转录形成针对 *BMP4* 的发夹状 RNA

Fig. 1 Prediction of form shRNA with a 6-bp stem loop targeting the *BMP4* gene

ATGAT TCTTGGGAGCCTTTTTG-3 ; F2: 5 AAT-TCAAAAAGGCTCCCAAGAATCATGGACTA-3 。预期转录形成 shRNA 示意图见图 1。

1.4 BMP4^{CRNAi} 载体构建和鉴定

将合成的成对寡核苷酸 E1、E2 和 F1、F2 分别用灭菌去离子水稀释至 10 ng/ μ L。各取 100 μ L, E1 和 E2 混匀为 E, F1 和 F2 混匀为 F 后, 分别 95 变性 5 min, 自然冷却复性, 形成双链。先将 E 片段插入线性化的 pBSK/U6-neo 质粒载体, 然后再插入 F 片段。用含 50 μ g/mL 氨苄西林的 LB 平板筛选阳性克隆, 用 PCR 鉴定载体是否构建成功, 构建成功的

载体进行测序(由上海英骏生物技术有限公司完成)确认, 整个过程如图 2 所示。

1.5 BMP4^{CRNAi} 转基因小鼠制备

大量扩增经鉴定构建成功的 BMP4^{CRNAi} 质粒, 然后经 *Afl* 和 *Kpn* 双酶切后获取大小约 2.7 Kb 目的基因片段, 对超数排卵获取的 0.5 d FVB/NJ 小鼠受精卵行显微注射, 然后移植到同期发情的假孕昆明白母鼠。G₀ 代转基因小鼠用 *neo* 基因的通用引物 TW12(5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG-ACGAGTTC-3')和 E2 进行 PCR 鉴定, 扩增片段约 600 bp。

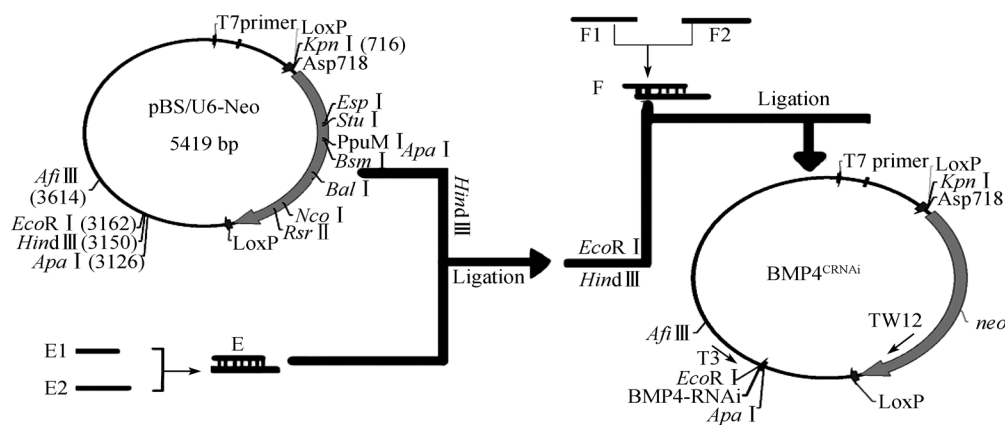


图 2 BMP4^{CRNAi} 载体构建示意图

Fig. 2 Construction of the BMP4^{CRNAi} vector

1.6 成骨和软骨前体细胞(Osteo-Chondro-progenitor cell)特异性干扰 BMP4 小鼠的制备

利用所获得的 G₀ 代 BMP4^{CRNAi} 转基因小鼠与 FVB/NJ 交配, 获取稳定传代的 BMP4^{CRNAi} 转基因小鼠, 然后与 Col2a1-Cre 转基因小鼠交配。后代用 PCR 方法进行基因型鉴定, 鉴定引物为 E2+TW12 和 Col2F1(在 Col2a1 启动子上)+Col2R1(在 Cre 上), Col2F1 序列为 5'-GAGGGTCCAGCCCGAGCTACTT-3', Col2R1 序列为 5'-GCATCGACCGGTAATGCAGGC-3'。经 PCR 鉴定两对引物均为阳性的小鼠为成骨和软骨前体细胞特异性干扰 BMP4 表达的小鼠 (BMP4^{Col2a1-RNAi})。

1.7 BMP4^{Col2a1-RNAi} 小鼠干扰效率鉴定

取新生小鼠, PCR 鉴定基因型, 同时分离软骨细胞, DMEM/F12(1:1)培养基(含青、链霉素和 10% FBS)中培养 2 代, 提取软骨细胞总 RNA。

RT-PCR 检测 BMP4 mRNA 的表达。BMP4 的上、下游引物分别为 5'-GAGGGATCTTTACCGGCTCC-3', 5'-GTTGAAGAGGAAACGAAAAGCAG-3'; 内参 β -actin, 序列分别为 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3' 和 5'-TTGTTACCAACTGGGACGACATGG-3'。扩增条件: 94 4 min; 94 40 s, 58 40 s, 72 1 min 30 个循环; 72 10 min, 4 保存。RT-PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳, 然后用凝胶成像系统软件对结果进行半定量分析。

2 结果

2.1 BMP4^{CRNAi} 载体构建

核酸片段 E1 和 E2 变性后复性形成的 DNA 片段 E 通过 *Apa* 和 *Hind* 酶切位点插入 pBS/U6-neo 载体, 挑取菌落 U6-E1 到 U6-E5, 用引物 E2 和 TW12 进行 PCR 筛选, 结果如图 3 所示, 阳性结果表示成功插入片段 E。将 F1 和 F2 变性后复性为 F,

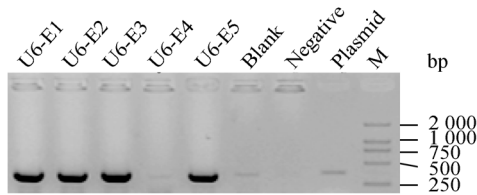


图 3 pBS/U6-E 载体 PCR 筛选结果
Fig. 3 PCR results of pBS/U6-E

将 F 插入阳性载体 U6-E, 分别用引物 E2+TW12 和 F1+T3 进行 PCR 筛选, 2 对引物均阳性的转化子为构建成功的载体。筛选结果如图 4 所示。双阳性

质粒 pBS/U6-EF-3 进行测序验证。测序结果如图 5 所示。

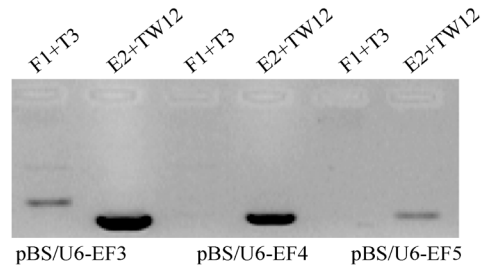


图 4 pBS/U6-EF 载体 PCR 筛选结果
Fig. 4 PCR results of vector pBS/U6-EF

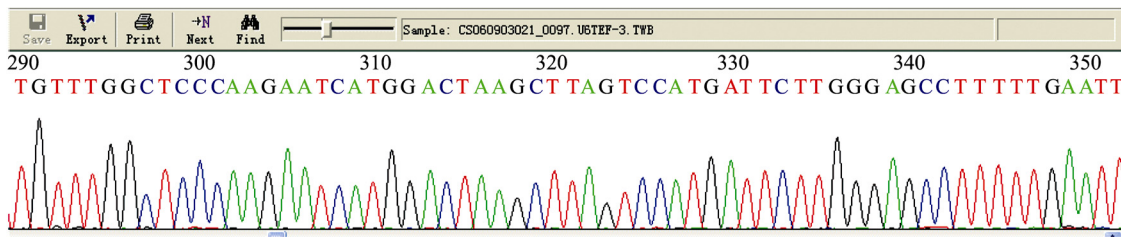


图 5 pBS/U6-EF-3 质粒测序结果
Fig. 5 Sequencing result of plasmid pBS/U6-EF-3

2.2 BMP4^{CRNAi} 转基因小鼠制备

构建成功的 BMP4 条件性干扰载体 pBS/U6-EF-3 用 *Kpn* 和 *Afl*III 双酶切后行琼脂糖凝胶电泳, 然后切取目的片段进行 DNA 纯化。纯化后的 DNA 片段对 FVB/NJ 超数排卵后获取的 0.5 d 的受精卵进行显微注射, 然后移植到同期发情的假孕母鼠。出生后的 G₀ 代小鼠如图 6 所示, 箭头所指为 G₀ 代阳性小鼠。13 只 G₀ 代小鼠中有 2 只鉴定为 PCR 阳性。G₀ 代转基因小鼠 PCR 鉴定见图 7。



图 6 G₀ 代转基因小鼠
箭头所指为 G₀ 代阳性小鼠。
Fig. 6 Transgenic BMP4^{CRNAi} mice
Arrowed is transgenic positive mice.

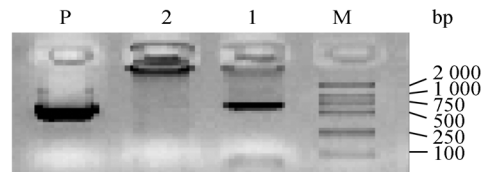


图 7 G₀ 代 PCR 鉴定结果
M: 标准 DNA 分子量; 1,2: 样本; P: 阳性对照。

Fig. 7 Genotyping of transgenic offspring
M: DL2000 marker; 1,2: Offspring; P: Positive control.

2.3 BMP4 成骨-软骨特异性 RNAi(BMP4^{col2a1-RNAi}) 小鼠制备

G₀ 代 BMP4^{CRNAi} 转基因小鼠与 FVB/NJ 小鼠连续交配 3 代, 获取相对稳定传代的转基因小鼠后再与 Col2a1-Cre 转基因小鼠交配, 通过 PCR 筛选获取 BMP4^{Col2a1-RNAi} 小鼠。PCR 鉴定结果如图 8 所示, Cre 和干扰片段检测均为阳性的小鼠为 BMP4^{Col2a1-RNAi} 小鼠。

2.4 BMP4^{col2a1-RNAi} 小鼠敲除效率鉴定

分离 BMP4^{Col2a1-RNAi} 小鼠原代软骨细胞, 提取总 RNA, 然后通过半定量 RT-PCR 检测 BMP4 在软骨细胞中的表达。结果如图 9 所示。BMP4 扩增片

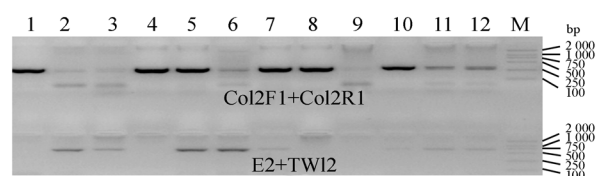


图8 $BMP4^{col2a1-RNAi}$ 小鼠 PCR 鉴定结果

1~12: 小鼠编号; M: 标准 DNA 分子量。

Fig. 8 genotyping of $BMP4^{col2a1-RNAi}$ mice

1-12: No. of offsprings; M: DL2000 marker.

段为 180 bp 左右, β -actin 为 760 bp 左右。通过 Bio-Rad 凝胶成像系统软件对光密度分析结果敲除效率为 81%。

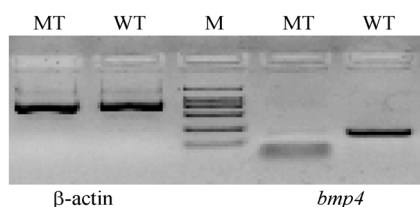


图9 $BMP4$ 在软骨中的干扰效率鉴定结果

MT: $BMP4^{col2a1-RNAi}$ 干扰小鼠; WT: 野生型小鼠; M: 标准 DNA 分子量。

Fig. 9 Interference efficiency of $BMP4$ in chondrocytes assessed by semi-quantitative RT-PCR

MT: $BMP4^{col2a1-RNAi}$ mice; WT: Wild type mice; M: DL2000 marker.

3 讨论

BMPs是骨骼发育过程中重要的调控分子^[7],可促进软骨形成和骨形成^[8-10], BMPs在骨折修复方面也有着重要的作用。因此BMPs的生理功能以及在骨折基因治疗方面越来越受到重视^[11,12]。BMPs相互之间的功能部分可以互相代偿,因此,大部分BMPs基因敲除小鼠的表型不明显,但是BMP2和BMP4敲除后均导致小鼠胚胎期死亡,从而限制了对其基因功能的研究。目前对BMP4的研究大部分停留在细胞或者体外组织培养水平^[13,14],然而体外的研究结果与体内的生理功能并不一定完全一致,因而BMP4在机体发育中的作用及分子机制还有待进一步研究。由于Bmp4基因经典敲除后导致胚胎期死亡,而条件性敲除小鼠的获得费时、费力并且技术条件要求高,为此,我们设计通过条件性RNAi技术制备bmp4条件性RNAi转基因小鼠,然后通过与不同的组织特异性Cre转基因小鼠交配,研究BMP4在不同发育阶段,不同组织中的作用和分子机制。2003年,

Gratsch等^[6]用尾静脉注射方法注射针对BMP4的siRNA片段,并检测到该片段的表达;2007年,Shuman等^[15]通过向孕鼠注射表达BMP4 shRNA片段的质粒研究BMP4在面部发育中的作用,但是注射的目的片段没有整合到生殖细胞基因组中,所以目的片段不能传代,此外,该方法组织特异性差,并可能引起核酸免疫排斥反应,因此该方法的应用受到一定限制。本实验通过制备BMP4条件性干扰转基因小鼠,同时借助于U6启动子和Cre/LoxP系统,从而可以有效的研究BMP4在软骨以及其他组织中的作用。

RNA干扰技术是近年来发展起来的一种研究基因功能、基因治疗等的新技术,应用十分广泛。同时利用转基因技术和Cre/LoxP系统的可调控性,制备条件性RNAi转基因小鼠可以巧妙的利用不同启动子驱动的Cre实现器官、组织或者细胞特异性敲低特定基因的功能。本实验利用pBSK/U6 neo载体,将针对BMP4的寡核苷酸序列设计成具有回文结构的模板链,能够转录出具有互补序列的单链RNA,自身折叠形成发夹样双链RNA。通过制备在体内持续表达针对bmp4的shRNA转基因小鼠可以有效的研究该基因的功能。与细胞特异性表达Cre的Col2a1-Cre转基因小鼠交配,获得的后代分离软骨细胞检测干扰效率为81%,由此我们认为该技术是可行的。条件性RNAi不需要基因敲除方法的复杂载体构建、基因打靶、ES细胞筛选等过程,因此该技术相对于经典的基因敲除或者条件性基因敲除具有省时、省力、节约资金的优点。但是该技术也存在一定缺陷, RNAi是在转录水平干扰目的基因表达,而不是像经典基因敲除可以彻底敲除目的基因,仅仅是敲低目的基因,因此该技术只能作为基因功能的初步研究结果。与经典基因敲除相比,条件性基因干扰和条件性基因敲除都必须制备组织特异性启动子驱动的Cre转基因小鼠,并且都需要较为复杂的小鼠交配方案,显得耗时;此外, RNAi存在脱靶和靶向的问题,为了避免脱靶和解决靶向性问题,可以通过体外细胞实验验证干扰效率和改变靶序列的设计来解决。总之, RNAi干扰技术为快速、初步研究基因功能提供了较好的工具。此外, RNAi技术的应用也逐渐引起人们的重视, Shukla等^[16]已经在小鼠上成功应用该技术治疗成纤维细胞生长因子2型受体(FGFR2)S252W点突变引起的脑门早闭,显示该技术在基础研究以及临床治疗上具有较好的应

用前景。

本实验所用pBSK/U6-neo载体在U6 启动子近端和远端之间插入LoxPneo序列, 这可以阻断U6 启动子的功能^[17,18], 酶切获得的DNA片段包含整个调控序列、neo基因以及干扰序列, 将该片段通过显微注射整合入小鼠基因组中, 获得BMP4^{CRNAi}小鼠。BMP4^{CRNAi}小鼠与不同组织特异性启动子驱动的Cre转基因小鼠交配, 去除LoxP位点之间的neo基因, 在特定的组织细胞内重新使U6 启动子发挥功能, 持续转录针对BMP4 的siRNA, 从而获得不同组织、细胞特异性干扰bmp4 基因的小鼠模型, 为进一步研究BMP4 的生理功能提供了除经典基因敲除和条件性基因敲除之外的新手段。本实验用BMP4^{CRNAi}小鼠与Col2a1-Cre转基因小鼠交配, 然后分离原代软骨细胞检测BMP4 干扰效率。检测结果表明: 成功建立BMP4 条件性RNAi小鼠模型——BMP4^{CRNAi}小鼠模型, 这为研究BMP4 在不同组织中的作用奠定了基础。81%干扰效率的BMP4^{Col2a1-RNAi}小鼠的获得为研究BMP4 在软骨细胞中的作用提供了较好的动物模型。

参考文献(References):

- [1] Li G, Peng H, Corsi K, Usas A, Olshanski A, Huard J. Differential effect of BMP4 on NIH/3T3 and C2C12 cells: implications for endochondral bone formation. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(9): 1611–1623. [\[DOI\]](#)
- [2] Hatakeyama Y, Tuan RS, Shum L. Distinct functions of BMP4 and GDF5 in the regulation of chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 2004, 91(6): 1204–1217. [\[DOI\]](#)
- [3] Shum L, Wang X, Kane AA, Nuckolls GH. BMP4 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy in the endochondral cranial base. *Int J Dev Biol*, 2003, 47(6): 423–431.
- [4] Katagiri T, Boorla S, Frendo JL, Hogan BL, Karsenty G. Skeletal abnormalities in doubly heterozygous Bmp4 and Bmp7 mice. *Dev Genet*, 1998, 22(4): 340–348. [\[DOI\]](#)
- [5] Dunn NR, Winnier GE, Hargett LK, Schrick JJ, Fogo AB, Hogan BL. Haploinsufficient phenotypes in Bmp4 heterozygous null mice and modification by mutations in Gli3 and Alx4. *Dev Biol*, 1997, 188(2): 235–247. [\[DOI\]](#)
- [6] Gratsch TE, De Boer LS, O'Shea KS. RNA inhibition of BMP-4 gene expression in postimplantation mouse embryos. *Genesis*, 2003, 37(1): 12–17. [\[DOI\]](#)
- [7] Yin J, Ma Y, Yin Q, Xu H, An N, Liu S, Fan X, Yang H. Involvement of over-expressed BMP4 in pentylentetrazol kindling-induced cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(1): 54–60. [\[DOI\]](#)
- [8] Okamoto M, Murai J, Yoshikawa H, Tsumaki N. Bone morphogenetic proteins in bone stimulate osteoclasts and osteoblasts during bone development. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(7): 1022–1033. [\[DOI\]](#)
- [9] Lin L, Fu X, Zhang X, Chen LX, Zhang JY, Yu CL, Ma KT, Zhou CY. Rat adipose-derived stromal cells expressing BMP4 induce ectopic bone formation *in vitro* and *in vivo*. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(12): 1608–1615. [\[DOI\]](#)
- [10] Wordinger RJ, Fleenor DL, Hellberg PE, Pang IH, Tovar TO, Zode GS, Fuller JA, Clark AF. Effects of TGF-beta2, BMP-4, and gremlin in the trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(3): 1191–1200. [\[DOI\]](#)
- [11] Zhao M, Zhao Z, Koh JT, Jin T, Franceschi RT. Combinatorial gene therapy for bone regeneration: cooperative interactions between adenovirus vectors expressing bone morphogenetic proteins 2, 4, and 7. *J Cell Biochem*, 2005, 95(1): 1–16. [\[DOI\]](#)
- [12] Rose T, Peng H, Usas A, Josten C, Fu FH, Huard J. Ex-vivo gene therapy with BMP-4 for critically sized defects and enhancement of fracture healing in an osteoporotic animal model. *Unfallchirurg*, 2005, 108(1): 25–34. [\[DOI\]](#)
- [13] Gouon-Evans V, Boussemart L, Gadue P, Nierhoff D, Koehler CI, Kubo A, Shafritz DA, Keller G. BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(11): 1402–1411. [\[DOI\]](#)
- [14] Perry JM, Harandi OF, Paulson RF. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood*, 2007, 109(10): 4494–4502. [\[DOI\]](#)
- [15] Shuman JB, Gong SG. RNA interference of Bmp-4 and midface development in postimplantation mouse embryos. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2007, 131(4): 447 e1–11. [\[DOI\]](#)
- [16] Shukla V, Coumoul X, Wang RH, Kim HS, Deng CX. RNA interference and inhibition of MEK-ERK signaling prevent abnormal skeletal phenotypes in a mouse model of craniosynostosis. *Nat Genet*, 2007, 39(9): 1145–1150. [\[DOI\]](#)
- [17] Coumoul X, Shukla V, Li C, Wang RH, Deng CX. Conditional knockdown of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(11): e102. [\[DOI\]](#)
- [18] Coumoul X, Li W, Wang RH, Deng C. Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(10): e85. [\[DOI\]](#)