

几丁质酶结构域内含蛋白1(*Chid1*) 基因剔除小鼠的建立

奚 骏 吴友兵 孙 霞 任建科*

(上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 建立几丁质酶结构域内含蛋白1(chitinase domain containing 1, *Chid1*)基因剔除小鼠, 观察小鼠表型和发育差异。设计了合适的基因剔除策略, 成功构建了基因剔除打靶载体。以电穿孔方法将打靶载体导入ES细胞(embryonic stem cell), 用G418和Ganciclovir进行正负筛选, 挑选抗药的阳性克隆, 提取ES细胞基因组DNA, 用长臂PCR鉴定出阳性ES细胞。将阳性ES细胞复苏培养后注入小鼠囊胚, 获得嵌合体小鼠。嵌合体小鼠与C57BL/6J小鼠交配后获得Aguoti毛色的杂合子小鼠。在雌雄杂合子交配的后代中获得纯合子小鼠。从脑、脾脏、肝、肺的RNA水平鉴定来看, 基因剔除小鼠的*Chid1*基因未表达, 而杂合子、野生型小鼠有明显的该基因条带。经过初步的表型观察发现, *Chid1*基因剔除小鼠发育正常, 未出现胚胎致死, 交配繁殖能力无异常。几丁质酶结构域内含蛋白1(*Chid1*)基因剔除小鼠模型建立成功。*Chid1*基因对于小鼠发育、生殖方面无明显作用。

关键词 几丁质酶结构域内含蛋白1; 基因打靶; 基因剔除

Generation of Chitinase Domain Containing 1 (*Chid1*) Knockout Mice

Xi Jun, Wu Youbing, Sun Xia, Ren Jianke*

(Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract To generate chitinase domain containing 1 (*Chid1*) knockout mice, mice were observed in phenotype and development. We designed an appropriate strategy and constructed the targeting vector. After electroporation of targeting vector into ES cells, positive clones were grown and selected using G418 and Ganciclovir, then injected into mouse blastulas to obtain chimeric mice. By mating with C57BL/6J mice, we got heterozygous mice with Aguoti coat. Then we got homozygous KO mice from heterozygous mice mating. RT-PCR results showed that *Chid1* expressed in brain, spleen, liver and lung from heterozygous and wild-type mice, but not in homozygous mice. In general, *Chid1* knockout mice develop normally and all mice are alive after birth, there is no defect in fertility and development, *Chid1* knockout mice are successfully generated and can be a good animal model for investigate its biological function *in vivo*.

Key words chitinase domain containing 1; gene targeting; gene knockout

收稿日期: 2012-10-22 接受日期: 2012-12-04

上海市自然科学基金(批准号: 09ZR1422600)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-50793648-82008, E-mail: renjianke98@gmail.com

Received: October 22, 2012 Accepted: December 4, 2012

This work was supported by Natural Science Foundation of Shanghai (Grant No.09ZR1422600)

*Corresponding author. Tel: +86-21-50793648-82008, E-mail: renjianke98@gmail.com

网络出版时间: 2013-2-26 16:58 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130226.1658.003.html

几丁质酶结构域内含蛋白1(chitinase domain containing 1, *Chid1*)在人体中位于11号染色体短臂15区5带, 全长1 182 bp, 其编码蛋白共393个氨基酸, 是一个功能未知的分泌蛋白基因。该基因含有两个转录本, 是几丁质酶基因家族中的一员, 具有一个完整的Glyco_18结构域, 该结构域是一个相对保守的结构域。据文献报道, 该基因编码的蛋白能和巨噬

细胞的内吞/外排的受体结合,成为细胞进行内吞/外排作用的标志^[1-2]。几丁质酶是一类可以催化几丁质水解反应的酶,可以抑制含有几丁质的有机体的生长。最初在兰花球茎中被发现。1929年,由卡勒和霍夫曼从蜗牛的胃液(中肠腺分泌液)中发现了该类酶^[3]。后来,又陆续在人的唾液、猪的器官中发现了该酶^[4]。然而,最近的研究表明,在哺乳动物体内,也存在着一类酸性哺乳动物几丁质酶(acidic mammalian chitinase, AMCase)^[5],其与呼吸道过敏有关。有临床研究报告表明,在哮喘病患者体内,这类蛋白特异性增高,是几丁质酶基因家族中的一员。在小鼠基因组中,相对应的*Chid1*基因位于7号染色体上,转录本长1 354 bp,编码的蛋白质全长393个氨基酸,有13个外显子。其生物学功能没有详细报道,本文将首次针对*Chid1*基因构建*Chid1*基因剔除小鼠,利用小鼠这一模式动物,为研究该基因在生物体内的生物学功能及相关机制提供了很好的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠ES细胞株由本实验室保存,打靶载体PL2-neo由复旦大学黄芳博士赠送。129S1和C57BL/6J品系小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司,并在本实验室保种饲养。各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、各种DNA聚合酶、DNA分子量Marker等均

购自大连TaKaRa公司;质粒提取和凝胶回收试剂盒购自Qiagen公司和上海华舜生物技术公司;蛋白酶K购自Merk公司;RT-PCR试剂盒购自Promega公司。细胞培养相关试剂,包括DMEM培养基、PBS、谷氨酰胺、胎牛血清、G418、Gancyclovir、DMSO、青霉素、链霉素、胰蛋白酶等均为Gibco-BRL公司和Sigma公司产品;白血病抑制因子(LIF)购自Chemicon公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。电穿孔仪Gene Pulser II和电极杯为Bio-Rad公司产品。

1.2 方法

1.2.1 打靶载体构建 从NCBI数据库中获得小鼠几丁质酶结构域内含蛋白1(chitinase domain containing 1, *Chid1*)基因的序列,并根据基因组序列设计打靶载体方案。如图1所示, *Chid1*基因位于小鼠基因的7号染色体上,有13个外显子,起始密码子ATG在第二个外显子上,我们设计的打靶载体,剔除其第二个到第六个全部的外显子。引物序列: 50ko-L-5*Xba*: 5'-TCC TTC TAG ATC CTG TCT CAA ACA AAC GAA AAC CGA CTC-3'; 50ko-L-3*Xho*: 5'-CAT ACT CGAGAT ACA CGA AGG CAG ATG ATT AGC ACA GA-3'; 50ko-R-5*Sal*: 5'-GTG TGT CGA CTG TGT AGA GGA GGA AAT GAT GTA AC-3'; 50ko-R-3*Hind*: 5'-AGG GAA CTG AAG GGC CAA GCA CTG ACC-3'。

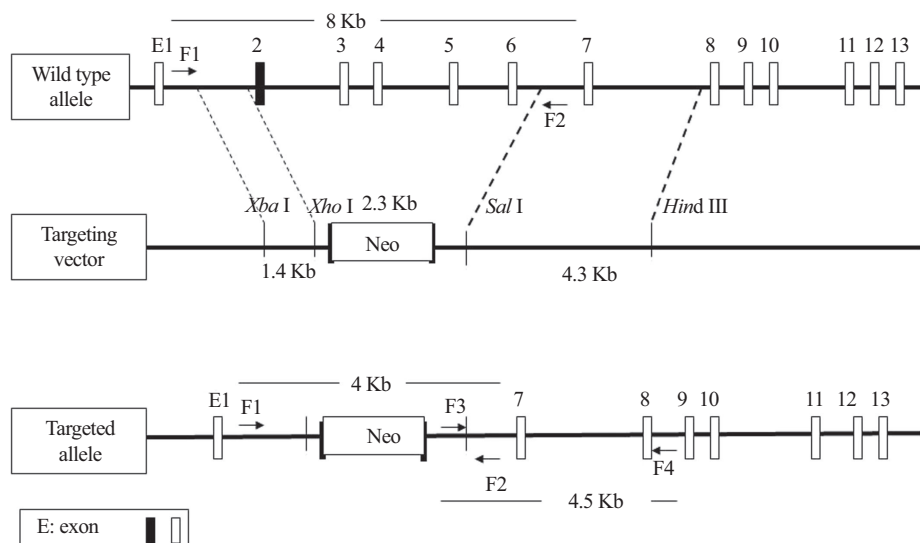


图1 打靶载体设计方案

Fig.1 Targeting vector design strategy

用带有限制性酶切位点的引物从ES细胞基因组中扩增出5'同源臂(L arm, 1.5 Kb)和3'同源臂(R arm, 4.3 Kb), 5'同源臂用*Xba* I和*Xho* I酶切, 3'同源臂用*Sal* I和*Hind* III酶切后, 分别连接到打靶载体PL2-neo上, 构建成针对*Chid1*基因的打靶载体, 并命名为*Chid1* KO vector, 如图2A所示。

1.2.2 ES细胞培养 复苏ES细胞, 用接种过滋养层细胞的培养皿培养。

1.2.3 ES细胞电穿孔转染打靶载体 将处于对数生长期的ES细胞消化后并计数, 细胞悬浮于无LIF的PBS中, 细胞密度达到 1.2×10^7 后加入线性化后的打靶载体质粒DNA, 混匀后转移至无菌的电穿孔杯中, 以电源240 V和电容500 μ F的参数进行电穿孔, 悬浮后重新培养。

1.2.4 正负药物筛选 ES细胞在电穿孔24 h后, 换在含有G418(400 mg/L) Ganciclovir(2 μ mol/L)药物的培养液中进行选择性培养, 每天更换培养液, 经一周选择性培养后, 抗性ES细胞长成肉眼可见的克隆时可进行挑选, 一个克隆分在两块48孔板中培养。

1.2.5 ES细胞基因组DNA的提取 将一块长满ES细胞的48孔板吸去培养液, 每孔加入500 μ L细胞裂解液(1 g/L蛋白酶K), 55 $^{\circ}$ C过夜消化后提取基因组DNA。另一块48孔板中的ES细胞进行冻存。

1.2.6 PCR鉴定阳性ES克隆 用PCR鉴定阳性ES细胞克隆, 发生正确同源重组的阳性克隆应该在引物F1(5'同源臂外侧)和引物F2(3'同源臂上)的作用下扩增出8 Kb和4 Kb两条条带(ES细胞中两个等位基因一般仅一个等位基因发生同源重组且概率极小), 而阴性克隆只能扩增出8 Kb的条带。得到的阳性克隆再用引物F3(打靶载体的tk-neo区)和引物F4(3'同源臂外侧)扩增验证, 重组的阳性克隆如果能扩增出一个4.5 Kb的片段, 证明其3'同源臂也正确重组。鉴定引物为: 5'-CAG GGA AGT GAC AGC AAA AGG AAA CAG GA-3'(F1: 50-ES8k-ELN-5); 5'-AAA AAG TCA AGC AAG AGG AGC CAG GTC ATA-3'(F2: 50-ES8k-ELN-3); 5'-GCT TGG CGG CGA ATG GGC TGA C-3'(F3: 50ko-NRE-5); 5'-AGG GAA CTG AAG GGC CAA GCA CTG ACC-3'(F4: 50ko-NRE-3)。将上面扩增出的4 Kb和4.5 Kb的片段分别克隆到T载体上测序验证正确。

1.2.7 ES细胞显微注射和囊胚移植 将阳性的ES细胞复苏并培养后, 用毛细管制备持卵管和注射针,

在显微注射仪上, 选取囊胚供体中发育正常的囊胚, 以持卵管负压吸附固定, 用注射针吸取阳性ES细胞, 通过手动或电动显微注射法将15-20个细胞注入囊胚腔内。将2.5 d的假孕母鼠麻醉, 70%乙醇消毒, 在背侧部剪一开口, 解剖显微镜下暴露输卵管和子宫, 在靠输卵管的子宫角上用注射针头刺一小孔, 将移卵管由此孔中插入, 将囊胚吹入子宫。缝合切口, 待小鼠苏醒后, 放回笼中, 约17 d后可产仔鼠, 可根据毛色判断嵌合度。

1.2.8 基因剔除小鼠育种 皮毛嵌合度大于50%的雄性嵌合体小鼠与C57BL/6J纯系小鼠交配, 子代中灰色小鼠来源于生殖系嵌合的ES细胞, 经鉴定为*Chid1*基因剔除杂合子的小鼠。所得的杂合子小鼠继续与129/S1纯系小鼠交配, 直至得到杂合子小鼠F4代(本研究中的小鼠毛色仍为灰色)杂合子小鼠与杂合子小鼠交配才能得到的纯合子小鼠和同窝的野生型小鼠。

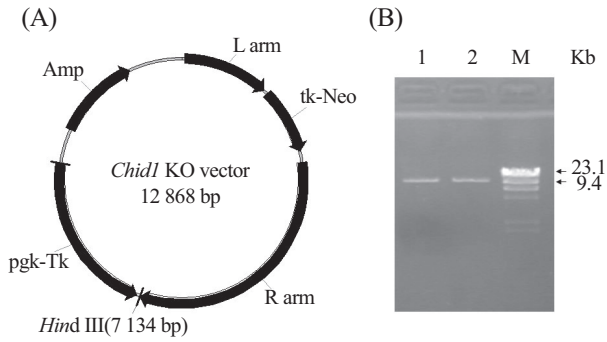
1.2.9 三引物PCR鉴定小鼠基因型 采用三引物PCR的方法来鉴定小鼠的基因型, 如果是纯合子, 只能被扩增出1.0 Kb的条带, 野生型只能被扩增出0.5 Kb的条带, 而杂合子这两条条带均能被扩增出。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C变性5 min后, 95 $^{\circ}$ C变性35 s, 60 $^{\circ}$ C退火32 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 进行35个循环后, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。引物序列: 50kojd-51: 5'-CTA GAT GGA TGG CTG CTT ATG GTC G-3'; 50kojd-31: 5'-CAA GCC CCT CCT ATG TTC TGA CTC-3'; Neo-RT299-3: 5'-TCG GCA GGA GCA AGG TGA GAT GAC AGG AG-3'。

1.2.10 RT-PCR及Real-time PCR 提取小鼠组织总RNA后, 用DNA酶处理后反转录成cDNA, 作为模板再进行RT-PCR及Real-time PCR分析, 检测*Chid1*基因的表达, *GADPH*和*Actin*为内参基因。本文所用RT-PCR的引物是扩增长的isoform1, 有13个外显子(短的isoform2有11个外显子, 缺少exon10-11)。引物序列如下: 50RT-52: 5'-GCC TGG CCC TAA TGC TCC CTT GTC-3'; 50RT-31: 5'-CTC CCG CCG CGA TTC TTC TTG TA-3'。

2 结果

2.1 质粒构建及打靶策略

打靶载体的设计方案如图2A所示, 预计通过同源重组剔除*Chid1*基因的外显子2-6, 其中外显子2包含起始密码子ATG, 如图1所示。



A: 构建完成的打靶载体; B: 打靶载体Hind III线性化后的电泳图。
A: targeting vector map; B: electropherogram of targeting vector linearized by Hind III.

图2 打靶载体图及线性化鉴定

Fig.2 Targeting vector map and linearization identification

2.2 阳性ES细胞的鉴定

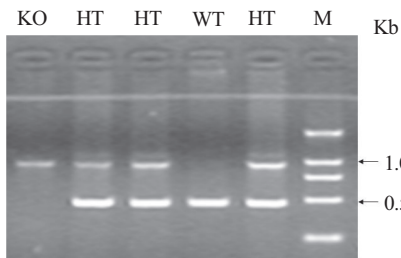
打靶载体用Hind III线性化(图2B)后电转ES细胞, 挑选经药物G418和Gan筛选过的克隆, 利用PCR初步鉴定正确重组的阳性克隆。如图2所示, 引物F1、F2用于鉴定5'同源臂的同源重组是否正确, 引物F3、F4用于鉴定3'同源臂的同源重组是否正确, PCR鉴定结果见图3。在75个能扩增出条带的ES克隆中, 阳性克隆为两个, 分别为13号和41号, 阳性的ES克隆扩增后用于囊胚腔注射制备嵌合体小鼠。

2.3 制备嵌合体小鼠

显微注射共获得嵌合率大于50%的雄性小鼠15只, 与C57BL/6J交配, 共获得ES细胞来源的灰鼠28只, 经鉴定, 其中13只为阳性的*Chid1*杂合子小鼠, 符合孟德尔遗传规律。

2.4 杂合子小鼠的获得和基因剔除小鼠的基因型鉴定

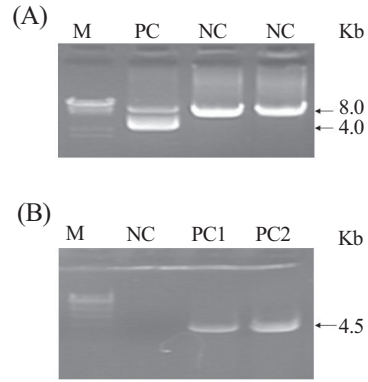
将*Chid1*杂合子小鼠与129/S1纯系小鼠交配, 直



KO: 敲除小鼠; WT: 野生型小鼠; HT: 杂合子小鼠; M: 分子量标准。
KO: knockout mice; WT: wild type mice; HT: heterizygous mice; M: marker.

图4 F4代小鼠基因型鉴定图

Fig.4 Genotyping results for pups from F4 mice mating



A: 阳性ES细胞5'同源臂鉴定图; B: 阳性ES细胞3'同源臂鉴定图。
A: confirmation of 5' recombination; B: confirmation of 3' recombination.

图3 阳性ES细胞的筛选及鉴定

Fig.3 Screening and identification of positive ES cells

至得到杂合子小鼠F4代, 再将杂合子小鼠与杂合子小鼠相互交配, 生出的小鼠剪尾巴提取基因组DNA用PCR进行基因鉴定, 结果表明新生小鼠中有纯合子。PCR鉴定结果见图4。

2.5 *Chid1*基因表达谱分析

利用野生型小鼠皮肤、大脑、小脑、丘脑、纹状体、海马、垂体、脊髓、心脏、肺、胸腺、气管、胃、脾、肝、肾、结肠、小肠、骨骼肌、白色脂肪、褐色脂肪、骨髓、睾丸、附睾的cDNA模板进行Real-time PCR扩增*Chid1*基因, 分析该基因在小鼠体内的表达谱。结果如图5所示, 该基因在大部分组织内均有表达, 以*Chid1*基因在皮肤的表达水平作为单位1, 可以看到该基因在生殖系统(如睾丸、附睾)和神经系统中(如大脑、小脑、丘脑、纹状体、海马、垂体、

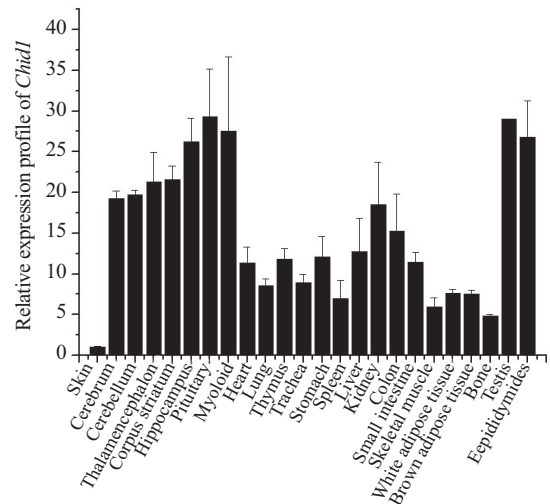


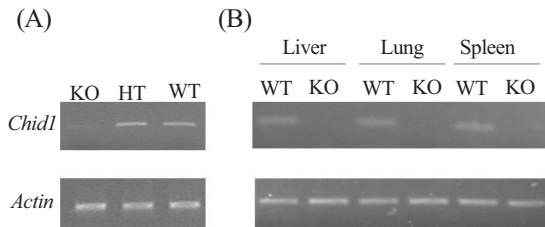
图5 *Chid1*基因表达谱分析

Fig.5 *Chid1* gene expression profile

脊髓)的表达水平相对较高。

2.6 RT-PCR分析证明*Chid1*基因被剔除

对小鼠组织中*Chid1*基因进行RT-PCR检测,如图6所示,在纯合子小鼠的脑中,检测不到*Chid1*基因的表达,杂合子和野生型的表达水平并没有明显的差异,我们进一步在小鼠的脾脏、肝脏和肺中检测*Chid1*基因的表达,纯合子小鼠均没有该基因的表达。



A: 小鼠脑组织的*Chid1* RNA表达检测图; B: 小鼠肝、肺、脾脏的*Chid1* RNA表达检测图。

A: *Chid1* RNA expression in brain; B: *Chid1* RNA expression in liver, lung and spleen.

图6 *Chid1*基因的RNA表达检测

Fig.6 *Chid1* RNA expression determination

2.7 基因剔除小鼠的初步表型观察

杂合子和纯合子小鼠和同窝的野生型小鼠相比,在体型和行为上没有明显的异常,体重和性别比例也没用明显的差异。

3 讨论

在本实验中,首先通过构建针对*Chid1*基因的打靶载体,通过电穿孔的方法转染至对数生长期的ES细胞内进行基因打靶,通过正负药物筛选,并通过长臂PCR鉴定同源重组后的ES克隆,随后进行囊胚注射,将阳性细胞植入假孕母鼠体内得到嵌合体小鼠,进一步交配繁殖得到杂合子小鼠,将杂合子小鼠与129/S1进行4代背景纯化后,杂合子小鼠相互交配得到纯合子小鼠。

*Chid1*的外显子2包含了该基因的起始密码子ATG,在构建打靶载体时,该密码子也在剔除的范围内,这样做的目的是为了尽量避免产生不完整的基因产物。通过对阳性ES细胞的鉴定来看,上游臂的PCR结果中阳性克隆出现了明显的8 Kb条带和4.5 Kb条带,对扩增出的条带进行克隆测序,证明5'同源臂发生了同源重组。将该基因组进行下游臂鉴定,能扩增出4.5 Kb的条带,测序证明3'同源臂也发生了同源重组。该阳性细胞为我们所预计的*Chid1*剔除-同源

重组ES细胞。在杂合子交配出生的后代中,经过基因型鉴定,得到纯合子KO小鼠。从KO小鼠脑、脾脏、肝以及肺中抽提出RNA并反转成cDNA,进行RT-PCR,结果显示,在检测的组织中,KO小鼠均未出现*Chid1*基因的表达。证明在RNA水平上,该基因已被剔除。至于蛋白层面上的鉴定,由于实验时没有制备得到合适的抗体,以及没有商业化的抗体提供,故未进行相关的实验。从DNA、RNA的鉴定结果来看,*Chid1*基因剔除小鼠建立成功。根据UCSC的microarray expression data的结果,*Chid1*基因的表达谱一致,在雌性小鼠的生殖系统、肝脏、肾脏和下丘脑的表达都比雄性小鼠高很多,这一现象非常有趣,暗示激素可以调节该基因的表达,我们将在这方面作进一步的研究。

*Chid1*基因剔除后,没有导致纯合子小鼠胚胎致死。*Chid1*基因剔除小鼠的嵌合体小鼠、杂合子、纯合子小鼠能正常交配繁殖,从出生到二月龄左右,杂合子和纯合子小鼠和同窝的野生型小鼠相比,外形上未观察到明显的差异。这些结果说明,*Chid1*基因对胚胎小鼠发育可能没有明显作用。

*Chid1*是一个功能未知的分泌蛋白基因,对于该基因的生物学功能研究报道尚少。该基因是几丁质酶基因家族中的一员,含有完整的相对保守的Glyco_18结构域,可能具有几丁质酶的一些特性。在哺乳动物体内,几丁质酶分为壳三糖苷酶、酸性哺乳动物几丁质酶以及一些类几丁质酶蛋白(YKL-39、YKL-40以及Oviductin)。据报道,酸性几丁质酶与哮喘有一定关系^[5-6],酸性哺乳动物几丁质酶和T细胞辅助细胞2(Th2)有关,Elias等^[5]认为该几丁质酶在和IL-13等蛋白结合后可以引起炎症反应。另外,有人认为AMCase对人支气管上皮细胞TGF- β -1、ICAM-1的表达可能有负性影响(孙培莉,南京医科大学博士研究生论文,2008年)。也有报道称该基因家族中的酸性几丁质酶(AMCase)蛋白在气源性致敏源(aeroallergen)哮喘中特异性升高^[2,6-7];几丁质酶YKL-40是肺损伤的炎症标志物^[8],在哮喘病患者的血清中,几丁质酶YKL-40含量比正常人显著增多,同时其含量也与哮喘的严重程度有关^[9-10],而*Chid1*基因在支气管哮喘病人中也存在高表达的现象。AMCase酶主要在非黏液分泌上皮细胞内表达,有报道发现,AMCase的表达与表皮生长因子(EGFR)呈正相关^[11],当阻断EGFR的激活后,AMCase的表达

下降, 表明AMCase与EGFR通路有关。在卵清蛋白(OVA)致敏的小鼠哮喘模型中^[12], 通过RNA干扰技术, 抑制AMCase的表达可显著改善小鼠的过敏症状。而*Chid1*基因也是几丁质酶基因家族中的一员, 这预示该基因的功能可能与哮喘有关, 我们将在这方面进行进一步的研究。此外, 从一些体外实验的结果来看^[13-14], IFN- γ 和TNF- α 等炎症细胞因子能诱导几丁质酶的表达, 表明几丁质酶和炎症的相关反应有关。另有文献报道, 该基因还可能具有免疫抵抗、抑制癌细胞生长的作用^[15]。在人的唾液、血清^[16]中发现的几丁质酶, 可以分解细菌的多糖细胞壁, 而降解细胞壁所产生的寡糖、壳聚糖等, 具有一定的抗菌抗肿瘤的效用^[15,17]。此外, 通过体外实验发现, 该基因的重组蛋白具有糖结合的特异性结构, 可以抑制LPS的内毒素作用^[18]。因此, 建立该基因剔除小鼠, 将为研究该基因的生物學功能和机制提供很好的动物模型, 对于该基因敲除的小鼠, 可以专门针对哮喘以及抗细菌、抗肿瘤等方面作进一步的研究。

参考文献 (References)

- 1 Funkhouser JD, Aronson NN. Chitinase family GH18: Evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol* 2007; 7(1): 96.
- 2 Kzhyshkowska J. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood* 2006; 107(8): 3221-8.
- 3 Oshima H, Miyazaki R, Ohe Y, Hayashi H, Kawamura K, Kikuyama S. Isolation and sequence of a novel amphibian pancreatic chitinase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2002; 132(2): 381-8.
- 4 Overdijk B, van Steijn GJ, Odds FC. Distribution of chitinase in guinea pig tissues and increases in levels of this enzyme after systemic infection with *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 1999; 145(1): 10.
- 5 Elias JA, Homer RJ, Hamid Q, Lee CG. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(3): 497-500.
- 6 Zhu Z, Zheng T, Homer RJ, Kim YK, Chen NY, Cohn L, *et al*. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science* 2004; 304(5677): 1678-82.
- 7 Ober C, Tan Z, Sun Y, Possick JD, Pan L, Nicolae R, *et al*. Effect of variation in CHI3L1 on serum YKL-40 level, risk of asthma, and lung function. *New Engl J Med* 2008; 358(16): 1682-91.
- 8 Hartl D, Lee CG, Da Silva CA, Chupp GL, Elias JA. Novel biomarkers in asthma: Chemokines and chitinase-like proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9(1): 60-6.
- 9 Kim HR, Jun CD, Lee KS, Cho JH, Jeong ET, Yang SH, *et al*. Levels of YKL-40 in pleural effusions and blood from patients with pulmonary or pleural disease. *Cytokine* 2012; 58(3): 336-43.
- 10 Tang H, Fang Z, Sun Y, Li B, Shi Z, Chen J, *et al*. YKL-40 in asthmatic patients, and its correlations with exacerbation, eosinophils and immunoglobulin E. *Eur Respir J* 2010; 35(4): 757-60.
- 11 Lee CG, Da Silva CA, Dela Cruz CS, Ahangari F, Ma B, Kang MJ, *et al*. Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* 2011; 73: 479-501.
- 12 Yang CJ, Liu YK, Liu CL, Shen CN, Kuo ML, Su CC, *et al*. Inhibition of acidic mammalian chitinase by RNA interference suppresses ovalbumin-sensitized allergic asthma. *Hum Gene Ther* 2009; 20(12): 1597-606.
- 13 Malaguarnera L, Musumeci M, Licata F, Di Rosa M, Messina A, Musumeci S. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages. *Immunol Lett* 2004; 94(1/2): 57-63.
- 14 Di Rosa M, Musumeci M, Scuto A, Musumeci S, Malaguarnera L. Effect of interferon-gamma, interleukin-10, lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha on chitotriosidase synthesis in human macrophages. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(5): 499-502.
- 15 刘东, 王欣荣, 万兵兵, 韩泽广. 人类新基因*CHID1*的克隆与功能初步研究. 华东理工大学学报(Liu Dong, Wang Xinrong, Wan Bingbing, Han Zeguang. Molecular cloning and preliminary functional study of human novel gene *CHID1*. *Journal of East China University of Science and Technology*) 2007; 33(5): 6.
- 16 Li S, Zhao ZA, Li M, Gu ZR, Bai C, Huang WD. Purification and characterization of a novel chitinase from *Bacillus brevis*. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2002; 34(6): 690-6.
- 17 陈少波, 吴根福. 几丁质酶研究进展. 科技通报(Chen Shaobo, Wu Genfu. Recent progress on chitinase. *Bulliten of Science and Technology*) 2004; 20(3): 5.
- 18 Meng G, Zhao Y, Bai X, Liu Y, Green TJ, Luo M, *et al*. Structure of human stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) reveals a saccharide-binding cleft with lower sugar-binding selectivity. *J Biol Chem* 2010; 285(51): 39898-904.