

· 实验研究 ·

Ngn2 基因转染对小鼠体外培养三维视杯结构视网膜神经元分化的调控作用

冷云霞 张蒙 吴敏 任国梁 高宗银

广州市第一人民医院眼科 华南理工大学附属第二医院眼科 510084

通信作者:高宗银, Email: Mb553@sina. com

【摘要】 目的 探讨 *Ngn2* 基因对小鼠体外培养三维视杯结构视网膜神经元分化的调控作用。 **方法** 采用小鼠诱导多能干细胞(iPSC)在特定条件下体外培养获取视泡结构(OV),OV培养过程中通过慢病毒介导 *Ngn2* 基因多次转染 OV,并在 OV 发育成熟后进行诱导,促进 OV 内细胞向视网膜神经细胞的特异性分化。以绿色荧光蛋白(*EGFP*)基因作为对照,免疫荧光法检测 OV 内视网膜神经细胞的分化情况,采用逆转录 PCR 和 Western blot 法定量检测 OV 内视网膜神经细胞特异性蛋白 Pax6、Islet1 和 Brn3b 基因和蛋白的表达情况。 **结果** 成功培养出小鼠 iPSC 来源的 OV。慢病毒介导下经 *Ngn2* 基因诱导的 OV 组织内部神经细胞的分化数量增加。逆转录 PCR 和 Western blot 法定量检测结果显示,*Ngn2* 转染组 OV 内视网膜神经细胞特异性蛋白 Pax6、Islet1 和 Brn3b 在基因及蛋白水平的相对表达量均明显高于 EGFP 转染组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。 **结论** *Ngn2* 基因转染可有效提高 OV 内视网膜神经细胞的分化数量,使体外培养的 OV 发育更为成熟,形成更为完善的视网膜细胞神经环路。

【关键词】 神经视网膜; *Ngn2* 基因; 视泡; 分化; 基因转染

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A030313761);广州市科技局基金项目(11C33150706)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.01.003

Regulation effects of *Ngn2* gene transfection on retinal neuron differentiation in three-dimensional optic vesicle of mice

Leng Yunxia, Zhang Meng, Wu Min, Ren Guoliang, Gao Zongyin

Department of Ophthalmology, Guangzhou First People's Hospital, School of Medicine, Southern University of Technology, Guangzhou 510084, China

Corresponding author: Gao Zongyin, Email: Mb553@sina. com

【Abstract】 Objective To investigate the regulation effects of *Ngn2* gene transfection on retinal neuron differentiation in three-dimensional optic vesicle (OV) of mice. **Methods** OV was cultured *in vitro* using mouse induced pluripotent stem cells (iPSC) under specific conditions. During OV culture, it was transfected multiple times by lentivirus-mediated *Ngn2* gene and then it was induced after maturation. The cells were specifically differentiated toward retinal nerve cells in OV. Using the green fluorescent protein (*EGFP*) gene as control, the differentiation of retinal nerve cells in OV was detected by immunohistochemistry. Reverse transcription PCR and Western blot were used to quantitatively detect the expressions of retinal neuron-specific proteins Pax6, Islet1 and Brn3b. **Results** The mouse iPS-derived OV was successfully cultured. The number of neural cells in the OV transfected with the *Ngn2* gene was increased by the lentiviral-mediated lentivirus. The expressions of PAX6, Islet1 and Brn3b in the *Ngn2* transfection group were significantly higher at the gene and protein levels than those in the control group, with significant differences between the two groups ($P < 0.05$). **Conclusions** The *Ngn2* gene can effectively increase the number of retinal neuron differentiation in OV and make *in vitro* cultured OV more mature and form a more perfect retinal cell neural circuit.

【Key words】 Neuroretina; *Ngn2* genes; Optic vesicle; differentiation; Gene transfection

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030313761); Science and Technology Program of Guangzhou (11C33150706)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.01.003

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)可在体外成功培育出具有三维形态的视泡结构(optic vesicle, OV),这种 OV 结构以一种自组装的方式形成,具有类似新生儿神经视网膜的全部分层结构,是进行视网膜各类神经细胞诱导再生研究的理想模型^[1-2]。此三维结构中自内向外包括 6 种类型的视网膜神经细胞和突触区域,与体内视网膜的外丛状层和内丛状层相对应^[3-5]。然而,此结构仍存在各类视网膜神经细胞产出率不稳定且功能细胞数量较少以及内部仍有大量的未分化的神经干细胞等问题^[6-7]。转基因研究证实,激活碱性螺子-环-螺族(basic helix-loop-helix, bHLH)转录因子 Ngn2 主要负责启动神经干细胞向多种功能性神经元方向分化^[8-11]。本研究利用小鼠 iPSC 建立体外三维 OV,通过慢病毒介导将 Ngn2 基因转染入 OV,诱导结构内的神经干细胞进一步分化,形成更为完善的视网膜神经细胞环路,为视网膜神经的再生提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 小鼠 iPSC、293T 细胞(中山大学中山眼科中心研究团队提供); mTeSR1 培养基、BD Metrigal(美国 ThermoFisher 公司); Polybrene(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM/F12、neurobasal、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、PBS、N2、NEAA、GlutaMax、B27(美国 Gibco/Invitrogen 公司); 脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)(美国 Preprotech 公司); 兔抗小鼠 Pax6 一抗(ab195045)、山羊抗小鼠 Brn3b 一抗(ab166945)、鼠抗小鼠 Islet1 一抗(ab86472)、兔抗小鼠 NF145 一抗(ab110995)(美国 Abcam 公司); 荧光二抗:山羊抗小鼠 IgG(6919-100)、山羊抗兔 IgG(6925-100)、小鼠抗山羊 IgG(6930-100)(美国 BioVision 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠体外三维 OV 的培养 将已成功建系的小鼠 iPSC 置于 BD metrigal 铺板的培养皿中用干细胞培养基进行培养,待 iPSC 呈片状伸展生长且融合达 85% 时开始计算时间节。培养第 1 天将贴壁生长的 iPSC 从培养皿底部刮起,使其成为 2 000~5 000 个细胞的团片,将其移至非黏附性培养皿中悬浮培养。培养第 3 天细胞团片逐渐形成独立干细胞团块,即胚体。培养第 6 天胚体稳定后置入体积分数 10% FBS 铺板的培养皿中进行

贴壁培养,同时更换为神经细胞诱导培养基(NIM = DMEM/F12+N2+NEAA+Anti-Anti),继续培养。

1.2.2 慢病毒包装 采用脂质体介导法转染 293T 细胞并制备慢病毒载体(DNA-脂质体转染复合物),将 3 种包装质粒基因 pLP-1、pLP-2、pLP-VSVG 及表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的 Ngn2 基因(Ngn2-EGFP)和仅表达绿色荧光的 EGFP 对照基因(图 1)转入 80% 融合的 293T 细胞培养皿中,培养皿直径 10 cm,加入 DNA 总量为 12 μg,质量比为 1:1:1:1,同时加入 24 μg PEI,转染 24 h 后更换 CD293-SFM 培养基,收集培养 48 h 的培养液,滤过后经高速离心机浓缩得到高滴度病毒载体。用少量病毒转染 293T 细胞,并进行 EGFP 免疫荧光鉴定,确定病毒载体滴度及有效性。



图 1 Ngn2 基因及 EGFP 基因示意图 慢病毒质粒包装的 Ngn2 基因同时搭载有 EGFP 基因片段,对照组仅有 EGFP 基因而不含功能基因 LV:慢病毒;EGFP:增强型绿色荧光蛋白

1.2.3 Ngn2 转染后对 OV 内细胞向视网膜神经细胞转化的诱导 OV 培养后 12、20、28 和 32 d 时,将浓缩的慢病毒加入培养皿中进行多次转染,确保 OV 内细胞到达较高的转染率。转染第 1 天根据所需培养液的数量计算所需要的病毒量,对病毒浓缩液进行稀释。移除原培养基后改用含有所需病毒液的培养基在体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。转染第 2 天更换正常新鲜培养基。培养第 32 天,即末次转染后,加入强力霉素启动目标基因的高效表达,诱导 OV 内的细胞向视网膜神经细胞转化。继续诱导至 38 d,收集细胞进行蛋白质检测。将 OV 固定包埋并制备冰冻切片,用于免疫组织化学检测。

1.2.4 免疫荧光法检测 Pax6、Islet1、Brn3b 和 NF145 表达 将 OV 组织置于质量分数 4% 多聚甲醛中 30 min,然后置入 OCT 冰冻切片包埋剂,在干冰表面冰冻包埋 OV 组织;冰冻切片切片厚度为 8~10 μm,室温下放置 30 min 以防脱片,-80 °C 保存。从冰箱取出切片于室温下放置 30 min;1 倍 PBS 洗 3 次,每次 5 min。用免疫组织化学笔画圈,以质量分数 2% 牛血清蛋白室温封闭 1 h。滴加相应一抗,室温孵育 1 h;1 倍 PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加相应二抗,室温下避光孵育 1 h;1 倍 PBS 洗 3 次,每次 5 min;DAPI 染色;1 倍 PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加防淬灭剂,封片。激光扫

描共焦显微镜下拍摄图像,检测视网膜神经细胞及视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)特异蛋白 Pax6、Islet1、Brn3b 和 NF145 在 OV 中的表达和定位。在 20 倍放大倍率下每个玻片观察 3 个视野,计算阻性细胞数均平均值。

1.2.5 逆转录 PCR 法检测 OV 组织中特异性抗体基因水平的表达 逆转录 PCR 检测转染后的 OV 组织,常规 Trizol 法抽提待测细胞内总 RNA 并逆转录为 cDNA,同时进行 PCR 扩增。Pax6 上游引物:5'-AGTGAATCAGCTCGGTGGTGTCTT-3',下游引物:5'-TGCAGAATTCGGGAAATGTCGCAC-3'; Islet-1 上游引物:5'-TATCAAGCTTCAATGGGAGACATGGGCGATCC-3',下游引物:5'-AAGTGGATCCTCATGCCTCTATAGGACTGGC-3'; Brn3b 上游引物:5'-AGCGCTCTCACTACCCCTTACACA-3',下游引物:5'-AAATGGTGCA TCGGTCATGCTTCC-3'; GAPDH 上游引物:5'-AACTCTGGTAAAGTGGATATTG-3',下游引物:5'-GGTGGAATCATATTGGAACA-3'。PCR 反应条件:95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环。以 GAPDH 为内参照,采用 Quantity Once 软件进行数据分析。基因相对表达量=目的基因表达量/GAPDH 表达量×100%。

1.2.6 Western blot 法测定 OV 结构中 Pax6、Islet1、Brn3b 和 NF145 蛋白表达 收集转染后的 OV 组织并转移到 EP 管中,加入裂解液 200 μl,冰上裂解 30 min;以 BCA 法测量蛋白浓度;常规 SDS-PAGE 胶电泳,用凝胶成像分析系统软件,扫描并记录吸光度值,

“Quantity Once”软件进行数据分析,以 β-actin 为内参。蛋白相对表达量=目的蛋白表达量/β-actin 表达量×100%。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件(ISBN:9787560960944, 中华科技出版社)进行统计分析。本研究研究指标中计量资料经 kolmogorov-Smirnov 检验呈正态分布,以 mean±SD 表示。Ngn2+ECCP 转染组和 ECCP 转染组 OV 组织中 Pax6、Brn3b 和 Islet1 阳性细胞计数差异比较采用独立样本 *t* 检验;2 个组 OV 结构中 Pax6、Brn3b 和 Islet1 在基因水平及蛋白水平相对表达量差异比较均采用独立样本 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光学显微镜下体外培养 OV 表现

iPSC 在 BD metrigal 铺板的培养皿中以单层细胞片状伸展的方式生长(图 2A),培养第 1 天形成细胞团片(图 2B),培养第 3 天细胞团片形成胚体(图 2C)。培养第 6 天胚体细胞数量进一步增加,结构更为紧密(图 2D)。培养第 8 天胚体贴壁后呈发散状快速生长,中央区形成典型的菊花样结构(图 2E)。培养第 16 天胚体出现突出于平面的初级 OV(图 2F)。培养第 24 天,将 OV 从基底部分离并置于非黏附性培养皿中悬浮培养(图 2G)。培养第 32 天 OV 逐渐发育成熟(图 2H)。

2.2 OV 细胞中 Pax6、Brn3b、Islet1 和 NF145 表达

与 EGFP 转染组比较,Ngn2 转染组 OV 中 Pax6、Brn3b、Islet1 和 NF145 阳性细胞数量增加。OV 结构

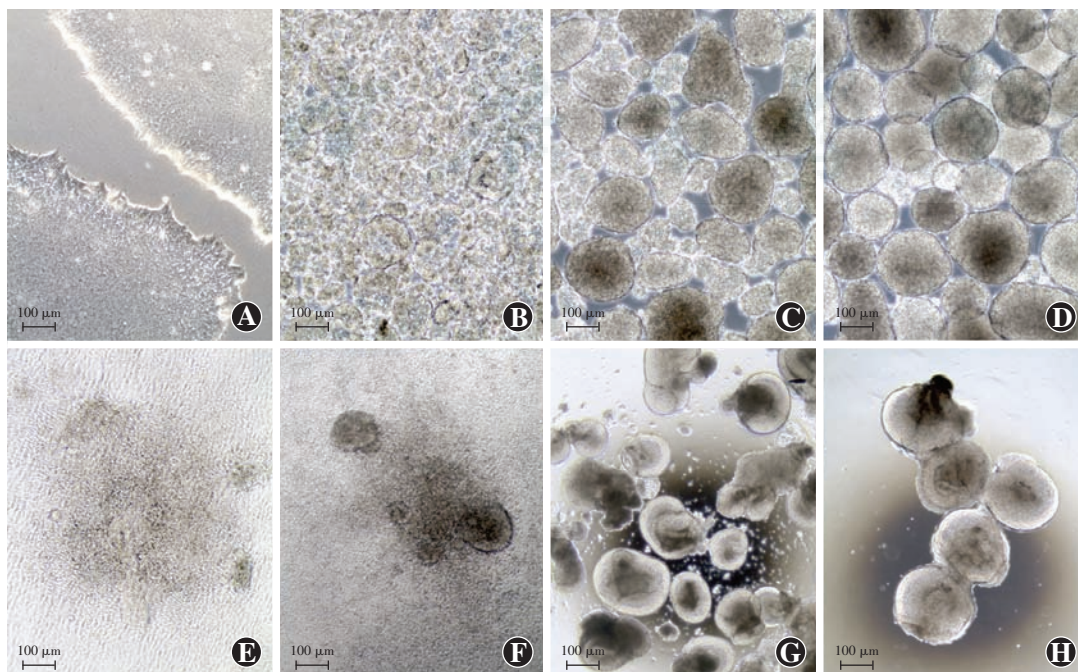


图 2 光学显微镜下体外培养的 OV 表现(标尺=100 μm) A:生长融合的 iPSC B:iPSC 细胞团片形成 C:第 3 天细胞碎片各自形成独立胚体 D:第 6 天胚体继续生长稳定 E:第 8 天胚体贴壁后快速生长,中央区形成典型的菊花样结构 F:第 16 天开始出现凸出于平面的 OV G:第 24 天 OV 单独分离后悬浮培养 H:第 32 天 OV 逐渐发育成熟

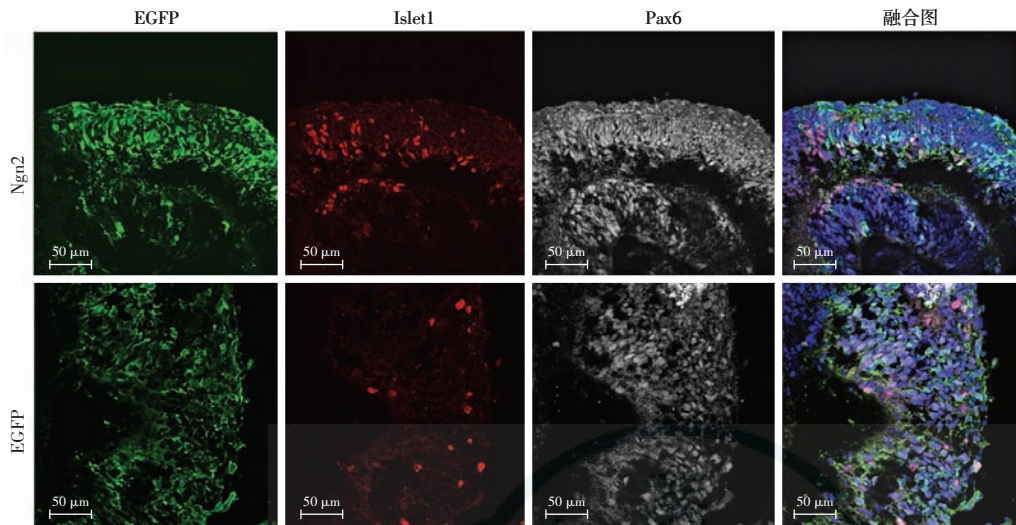


图 3 免疫荧光法检测 OV 细胞中 Islet1 和 Pax6 表达 (标尺=50 μm) Ngn2 转染组和 EGFP 转染组 OV 中 EGFP 表达均呈强阳性, Ngn2 转染组 Islet1 阳性细胞数量多于 EGFP 转染组, Ngn2 转染组 Pax6 阳性细胞数多于 EGFP 转染组。OV 结构由 5~7 层细胞构成, Pax6 阳性细胞广泛分布于 OV 的多层细胞结构, Islet1 阳性细胞则集中分布于 OV 内层 EGFP:增强型绿色荧光蛋白

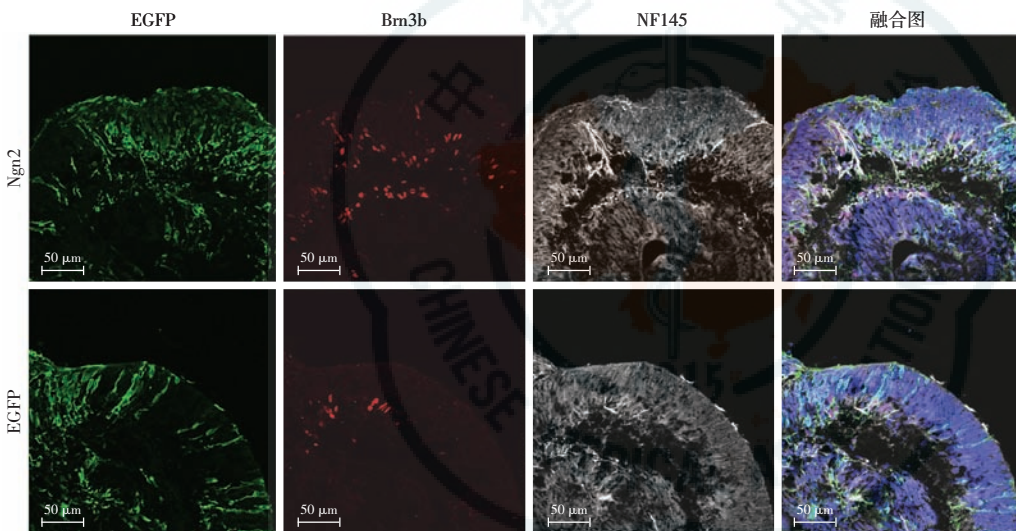


图 4 免疫荧光法鉴定 OV 中 Brn3b 和 NF145 的表达 (标尺=50 μm) Ngn2 转染组和 EGFP 转染组 OV 中 EGFP 表达均呈强阳性, Ngn2 转染组 Brn3b 阳性细胞数多于 EGFP 转染组, Ngn2 转染组 NF145 阳性细胞数多于 EGFP 转染组。OV 结构由 5~7 层细胞构成, NF145 阳性细胞广泛分布 OV 的多层细胞结构, Brn3b 阳性细胞则集中分布于 OV 内层 EGFP:增强型绿色荧光蛋白

具有 5~7 层细胞,各层细胞相互交叉,分层不明确,其中 Pax6 和 NF145 表达阳性神经细胞分布于由内至外的多层细胞结构中, RGCs 特异性蛋白 Brn3b 和 Islet1 表达阳性细胞则主要分布于 OV 结构内层 (图 3, 4)。

Ngn2 转染组 OV 中 Pax6、Brn3b 和 Islet1 阳性细胞数多于 EGFP 转染组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 1)。

表 1 OV 中各组特异性蛋白阳性表达细胞数比较 (mean±SD, /视野)

组别	样本量	Pax6	Brn3b	Islet1
Ngn2+EGFP 转染组	3	211.67±31.39	52.67±14.64	65.67±12.50
EGFP 转染组	3	106.00±17.52	12.33±6.11	34.00±7.55
<i>t</i> 值		13.196	8.191	11.082
<i>P</i> 值		0.006	0.015	0.008

注: Pax: 配对盒基因; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白 (独立样本 *t* 检验)

2.3 OV 结构中 Pax6、Brn3b 和 Islet1 mRNA 表达与 EGFP 转染组比较, Ngn2 转染组 Pax6、Brn3b 和

Islet1 mRNA 表达条带明显增强; EGFP 转染组 Pax6、Brn3b 和 Islet1 mRNA 相对表达量分别为 0.440 ± 0.019 、 0.264 ± 0.036 、 0.454 ± 0.022 , 低于 Ngn2 转染组的 0.742 ± 0.029 、 0.403 ± 0.029 和 0.683 ± 0.032 , 差异均有统计学意义 ($P=0.000$ 、 0.000 、 0.004) (图 5)。

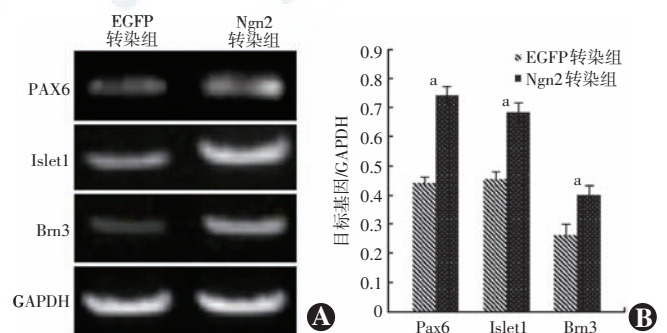


图 5 逆转录 PCR 检测 OV 结构中 Pax6、Brn3b 和 Islet1 mRNA 的表达 A: 逆转录 PCR 检测显示 Ngn2 转染组 Pax6、Brn3b 和 Islet1 mRNA 表达条带强于 EGFP 转染组 B: 2 个组 OV 中目标基因表达量化比较 与各自 EGFP 转染组比较, $a^P < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n=3$) Pax: 配对盒基因; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白

2.4 OV 结构中 Pax6、Brn3b 和 Islet1 蛋白表达

与 EGFP 对照组比较, Ngn2 转染组 Pax6、Brn3b 和 Islet1 蛋白表达条带明显增强。EGFP 转染组 Pax6、Brn3b 和 Islet1 蛋白相对表达量分别为 0.380 ± 0.023 、 0.164 ± 0.025 和 0.324 ± 0.017 , 明显低于 Ngn2 转染组的 0.542 ± 0.019 、 0.243 ± 0.023 和 0.383 ± 0.022 , 差异均有统计学意义 ($P=0.000, 0.013, 0.010$) (图 6)。

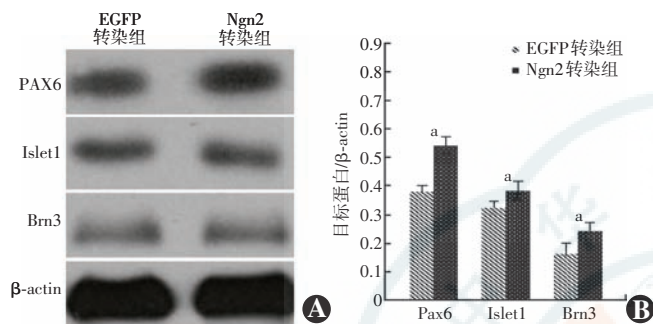


图 6 Western blot 定量检测 OV 中 Pax6、Brn3b 和 Islet1 蛋白表达

A: Western blot 法检测显示 Ngn2 转染组 Pax6、Brn3b 和 Islet1 蛋白表达条带强于 EGFP 转染组 B: 2 个组 OV 中目标蛋白比较量量化比较 与各自的 EGFP 转染组比较, $a^P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n=3$) Pax: 配对盒基因; EGFP: 增强型绿色荧光蛋白

3 讨论

青光眼、缺血性视神经病变等多种神经视网膜损伤性疾病都会导致不可逆性视功能损害。青光眼晚期视网膜神经纤维层明显变薄, 视网膜各级神经元, 尤其是 RGCs 的损伤率达 90% 以上, 且不可再生。目前多种青光眼防治方法仍无法完全有效地阻止 RGCs 的进行性损害。因此, 研究者尝试通过干细胞定向诱导分化等方法来探讨 RGCs 再生的替代治疗, 以达到重建视网膜神经网络, 修复患者视功能的目的。然而, 在动物体内或体外单体细胞的神经视网膜再生研究均存在很大缺陷, 不能完全模拟神经视网膜多层细胞相互支持发育的视网膜神经网络形态^[12-18]。2012 年日本研究人员发现, 适当的培养条件下可以诱导悬浮的胚胎干细胞团分化并自发形成具有复杂三维结构的组织形态。近年来, 多个报道利用类似方法在体外成功培育出具有三维杯状结构的 OV, 这种三维结构以一种自组装的方式生成, 具有类似新生儿神经视网膜的全层结构, 包括 6 种类型的视网膜神经细胞和突触区域, 与体内视网膜的外丛状层和内丛状层相对应, 是体外进行视网膜神经细胞诱导再生研究的理想模型^[3-7, 19]。但目前此类 OV 结构仍存在各类视网膜神经细胞产率不稳定且数量较少、OV 内部同时存在大量非神经细胞等问题, 需要进一步研究。以往的神经元再生

研究证实, 激活型 bHLH 转录因子 Ngn2 主要负责启动神经干细胞向多种功能性神经元方向分化, 能够大幅提高转染细胞向神经细胞分化的比例^[8-11]。

本研究中利用小鼠多能干细胞建立体外三维 OV 结构, 通过慢病毒介导将 Ngn2 基因转染入 OV, 结果显示转染后 Ngn2 基因呈过表达, 可有效上调 OV 组织内神经元特异性蛋白 Pax6 阳性细胞数量, 同时可部分上调 RGCs 特异性蛋白 Brn3b 和 Islet1 阳性细胞数量。这一结果提示 Ngn2 基因能够促进体外培养的 OV 细胞向神经元和 RGCs 分化。与以往的研究相比, 本研究的 OV 培养方法更为简单快速, 且培养出的 OV 具有更为明确的分层结构, 其中 Pax6 和 NF145 表达阳性的神经细胞分布于由内至外的多层细胞结构中, 而 RGCs 特异性蛋白 Brn3b 和 Islet1 表达阳性的细胞则主要分布于 OV 结构的内层, 这些特征与哺乳动物活体神经视网膜自内向外由 RGCs、水平细胞、双极细胞等多种多层细胞组成的结构相似, 可形成更为完善的体外视网膜神经细胞环路模型^[7, 19], 为青光眼等致盲眼病视网膜神经网络修复细胞替代治疗的体外研究提供了更为优质的模型。

视网膜祖细胞向视网膜神经细胞的定向分化调控机制非常复杂, 受细胞外或细胞基质内微环境因素和各种内在因子的共同调控^[12-14]。目前 Ngn2 在体外诱导干细胞向神经元分化的研究中取得了很大的突破, 但具体的分子调控机制尚未明确, 在诱导体内神经元功能性再生的研究中仍存在整合困难、转化率不稳定等关键性问题。

本研究中发现, 用 Ngn2 转染体外培养的 OV 细胞可明显上调其内部神经元及 RGCs 的表达数量, 用以模拟胚胎视网膜的发育过程, 为神经视网膜的再生研究提供了新的研究策略, 但其具体的作用机制及其对下游基因的调控影响尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture [J]. Nature, 2011, 472(7341): 51-56. DOI:10.1038/nature09941.
- [2] Eiraku M, Sasai Y. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues [J]. Nat Protoc, 2011, 7(1): 69-79. DOI:10.1038/nprot.2011.429.
- [3] Hosseini HS, Beebe DC, Taber LA. Mechanical effects of the surface ectoderm on optic vesicle morphogenesis in the chick embryo [J]. J Biomech, 2014, 47(16): 3837-3846. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2014.10.018.
- [4] Ohlemacher SK, Iglesias CL, Sridhar A, et al. Generation of highly enriched populations of optic vesicle-like retinal cells from human pluripotent stem cells [J]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2015, 32: 1-20. DOI:10.1002/9780470151808.sc01h08s32.
- [5] Phillips MJ, Wallace KA, Dickerson SJ, et al. Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form

- retinal laminae and develop synapses [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(4): 2007-2019. DOI: 10.1167/iovs.11-9313.
- [6] Capowski EE, Wright LS, Liang K, et al. Regulation of WNT signaling by VSX2 during optic vesicle patterning in human induced pluripotent stem cells [J]. Stem Cells, 2016, 34(11): 2625-2634. DOI: 10.1002/stem.2414.
- [7] Takata N, Eiraku M, Sakakura E. Data describing Rax positive optic-vesicle generation from mouse embryonic stem cells *in vitro* [J]. Data Brief, 2016, 8: 465-469. DOI: 10.1016/j.dib.2016.05.070.
- [8] Wan J, Goldman D. Opposing actions of Fg8a on Notch signaling distinguish two Müller glial cell populations that contribute to retina growth and regeneration [J]. Cell Rep, 2017, 19(4): 849-862. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.04.009.
- [9] Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, et al. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells [J]. Nat Protoc, 2009, 4(6): 811-824. DOI: 10.1038/nprot.2009.51.
- [10] Mesman S, Smidt MP. Tcf12 is involved in early cell-fate determination and subset specification of midbrain dopamine neurons [J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10: 353-357. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00353.
- [11] Rusanescu G, Mao J. Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodeling [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(2): 299-314. DOI: 10.1111/jcmm.12965.
- [12] Cepko CL. The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates [J]. Curr Opin Neurobiol, 1999, 9(1): 37-46.
- [13] Ooto S, Akagi T, Kageyama R, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(37): 13654-13659. DOI: 10.1073/pnas.0402129101.
- [14] Sigulinsky CL, German ML, Leung AM, et al. Genetic chimeras reveal the autonomy requirements for Vsx2 in embryonic retinal progenitor cells [J]. Neural Dev, 2015, 10: 12-18. DOI: 10.1186/s13064-015-0039-5.
- [15] Chen X, Wang S, Xu H, et al. Evidence for a retinal progenitor cell in the postnatal and adult mouse [J]. Stem Cell Res, 2017, 23: 20-32. DOI: 10.1016/j.scr.2017.06.010.
- [16] Rombaut C, Mertes H, Heindryckx B, et al. Human *in vitro* spermatogenesis from pluripotent stem cells: in need of a stepwise differentiation protocol? [J]. Mol Hum Reprod, 2018, 24(2): 47-54. DOI: 10.1093/molehr/gax065.
- [17] Deng F, Chen M, Liu Y, et al. Stage-specific differentiation of iPSCs toward retinal ganglion cell lineage [J]. Mol Vis, 2016, 22: 536-547.
- [18] London A, Itskovich E, Benhar I, et al. Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages [J]. J Exp Med, 2011, 208(1): 23-39. DOI: 10.1084/jem.20101202.
- [19] Capowski EE, Simonett JM, Clark EM, et al. Loss of MITF expression during human embryonic stem cell differentiation disrupts retinal pigment epithelium development and optic vesicle cell proliferation [J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(23): 6332-6344. DOI: 10.1093/hmg/ddu351.

(收稿日期: 2018-03-15 修回日期: 2018-11-02)

(本文编辑: 杜娟 尹卫靖)

读者·作者·编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述,本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下,患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息,包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开,除非这些信息对于本研究是必需的,如需在出版物上显示,应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息,但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部,不足以保护患者的隐私权),应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法,作者应该确保这些改变不影响研究的科学性,并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为实验对象的研究,作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题,作者应当做出客观说明并解释研究的合理性,提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究,作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件:(1)参与课题的选题和实验设计,参与实验资料的收集、分析和论证。(2)参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。(3)能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修,能够答辩并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者,应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位,于文末列出论文整理者的姓名,并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方,每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定,则视第一作者为通信作者。作者(包括通信作者)的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定,在编排过程中不宜变更或增减,尤其是通信作者和前三名作者,若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音,列于英文文题之下。

(本刊编辑部)