

Cre/LoxP 系统在眼部动物模型中的研究进展

娄翔峰 综述 罗雪 沈吟 审校

武汉大学人民医院眼科中心, 武汉 430060

通信作者: 沈吟, Email: yinshen@whu.edu.cn

【摘要】 Cre/LoxP 系统在新型基因打靶中应用广泛, 可对特定组织和器官中的基因进行改造, 将特定的基因片段删除, 以研究特定基因对生长发育的影响。Cre/LoxP 系统是条件性、诱导性和时空特异性基因打靶策略的技术核心。研究 Cre/LoxP 系统的工作机制有助于获得视网膜不同细胞类型的 Cre 转基因小鼠模型, 如视网膜双极细胞及神经节细胞上特异性表达的 Cre 工具鼠, 可为特定组织单基因的缺失在生长和发育过程中的影响提供实验基础。本文着重对 Cre/LoxP 系统及眼部特异性 Cre 重组酶模型鼠进行阐述。

【关键词】 小鼠/Cre 转基因; 小鼠模型; 视网膜

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81470628、81270998); 湖北省卫健委青年人才项目 (WJ2015Q014); 武汉市科技局晨光计划项目 (2016070204010153)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.015

Research progress of Cre/LoxP system in the eyes of animal model

Lou Xiangfeng, Luo Xue, Shen Yin

Eye Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Shen Yin, Email: yinshen@whu.edu.cn

【Abstract】 Cre/LoxP system has been widely used as new type of gene targeting, which can transform genes in specific tissues and organs, remove specific gene fragments, and help to study the effects of specific genes on growth and development. Cre/LoxP system is the core technology of conditional gene targeting, which induces gene targeting, and spatiotemporal specific gene targeting. The resource about the mechanism of the Cre/LoxP system is helpful to obtain the Cre transgenic mouse model on different cell types of the retina. The Cre transgenic mice with specific expression in retinal bipolar cells and ganglion cells can provide the experimental basis for the absence of specific tissue single genes during growth and development. This review focused on the Cre/LoxP system and specific Cre recombinase mouse model in eyes.

【Key words】 Mice, Cre transgenic; Disease model, mice; Retina

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81470628, 81270998); Hubei Provincial Health Commission Excellent Scientist Project (WJ2015Q014); Youth Science Plan for Light of the Morning Sun of Wuhan City (2016070204010153)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.09.015

基因敲除技术克服了随机整合的盲目性和偶然性, 是一种理想的修饰、改造生物遗传物质的方法。目前, 基因敲除主要应用于牛、羊和鼠等哺乳动物模型的建立。基因敲除是一种建立在基因同源重组技术基础以及胚胎干细胞技术基础上的新型分子生物学技术, 通过同源重组将外源基因定点整合入靶细胞基因组上某一确定的位点, 以定点修饰改造染色体上某一基因^[1-4]。随着基因敲除技术的发展, 除了同源重组外, 新的原理和技术也逐渐被应用, 简单的完全敲除已不能满足需求。目前, 基因敲除可以实现条件性敲除, 其中来源于噬菌体 P1 的 Cre/LoxP 系统应用广泛^[5]。Cre/LoxP 系统通过控制模型动物基因敲除的发育阶段和组织类型, 可以实现针对目标基因在动

物不同发育时期的功能的全面研究^[6-8]。随着基因敲除技术在眼科学中的应用, 越来越多基因敲除模型小鼠的建立及应用为视觉功能的研究提供了实验基础。本文就该系统的工作机制及目前应用于眼科研究的 Cre 工具鼠进行综述。

1 Cre/LoxP 系统

Cre/LoxP 系统由 Cre 重组酶及识别序列 Loxp 位点组成。通过在靶序列引入标记基因和两侧的 Loxp 位点, 以 Cre 酶介导位点特异性重组。Cre 是噬菌体 P1 基因组编码的整合素家族重组酶, 其相对分子质量为 38 000, 可作用于超螺旋环形、松弛型、线型等各种类型的底物^[9], 无需辅助因子即可识别并催化

带有 Loxp 特异性识别位点的目的基因序列并进行重组。Cre 可介导 3 种重组事件:(1)同向位点的序列缺失;(2)插入序列;(3)2 个反向位点之间序列颠倒。该重组过程是可逆的,且与重组酶的表达水平相关。

2 视网膜特异性 Cre 重组酶小鼠模型

Cre/LoxP 系统的基因重组技术已广泛应用于各种组织,如针对 CD133⁺ 卵巢癌干细胞的基因靶向治疗^[10]。Cre/LoxP 系统的基因重组技术在视网膜不同类型的细胞研究中具有举足轻重的作用,通过找出细胞特异性表达的启动子,构建相关的 Cre 工具鼠,从而建立实验动物疾病模型,进一步探究目的基因在眼部组织的生长发育过程中的影响。

2.1 视网膜色素上皮特异性表达的 Cre 工具鼠

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞在眼部发育和视觉功能中起重要的作用,具有分泌生长因子、抗氧化、参与视循环代谢、维持血-视网膜屏障和吞噬视细胞脱落的外节盘膜等重要生理功能。RPE 细胞为视网膜感光细胞的正常发育及功能所必需,若 RPE 细胞出现结构或功能异常则会导致视网膜感光细胞功能受损和视网膜退化等疾病。目前构建成功的 Cre 工具鼠有 BEST1-Cre、TRP1-Cre、VMD2-Cre 和 DCT-Cre 等。

2.1.1 BEST1-Cre Bestrophin-1 是一种完整的膜蛋白,由 BEST1 基因编码,位于 RPE 基底膜。Bestrophin-1 蛋白参与形成 Ca²⁺ 激活的 Cl⁻ 通道、参与调节电压依赖性 Ca²⁺ 通道,同时 Bestrophin-1 在眼部发育中起重要作用。BEST1 启动子在 RPE 细胞中特异性表达。Iacovelli 等^[11] 2011 年成功构建该基因鼠,在 C57BL/6 小鼠基础上加入 BEST1 启动子。该工具鼠中 50% ~ 90% 的 RPE 细胞可检测到 Cre 的表达,该模型可应用于年龄相关的黄斑退行性病变的研究。Yao 等^[12] 通过 BEST1-Cre 小鼠与 *Tb1ec1* 基因两侧带 Loxp 位点的小鼠杂交所得后代来研究自噬水平与年龄相关的黄斑退行性病变的关系。

2.1.2 TRP1-Cre TRP1-Cre 工具鼠中含有 *Tyrp1* 启动子,该启动子是 RPE 细胞上主要驱动基因。Mori 等^[13] 成功构建 TRP1-Cre 小鼠,并用其探究了维甲酸在眼球发育过程中的作用。Mori 等^[14] 为了在小鼠 RPE 中构建时间调控的体细胞特异位点突变模型,成功构建了 TRP1 启动子调控下的 TRP1-Cre-ER(T2)工具鼠,该工具鼠可以表达他莫昔芬依赖的 Cre ER(T2)重组酶。

2.1.3 VMD2-Cre 目前,无法在 RPE 细胞中人为控制 Cre 重组酶的活化,RPE 上特异性表达基因的研究无法在发育过程及成熟阶段展开,特别是某些基因的缺失可导致胚胎期小鼠死亡。Le 等^[15] 提出使用强力霉素时间调控 Cre 激活和失活的工具鼠。该工具鼠携带人 VMD2 启动子(优先在 RPE 表达^[16])、四环素反应元件(tetracycline-responsive element, TRE)及反向四环素反式激活因子(reverse tetracycline-dependent transactivator, rtTA)。在强力霉素诱导下,rtTA 通过 TRE 激活 Cre 转录。该工具鼠的构建方法不仅使进行性或退行性病变的研究更加便捷,而且为构建可调控的其他类型细胞的特异性 Cre 工具鼠提

供坚实的科学依据。

2.2 视网膜 Müller 细胞上特异性表达的 Cre 工具鼠

视网膜 Müller 细胞是视网膜内主要的神经胶质细胞,贯穿整个视网膜,包绕和联系视网膜上的各类神经细胞,从而与视网膜神经细胞发生多种功能的交互作用。Müller 细胞不仅起到支持和营养神经元的作用,还起到维持细胞外离子的稳定及参与谷氨酸盐循环,突触传递等作用。随着对 Müller 细胞研究的深入,发现在视网膜的各种疾病中伴有 Müller 细胞的神经胶质增生反应。Le 等^[15] 在构建 RPE 上特异性表达的工具鼠时,发现其在视网膜 Müller 细胞特异性表达 Cre,为条件性基因敲除研究特定目的基因的功能提供了实验基础,如采用该工具鼠与 VEGF/loxP 转基因小鼠杂交后代来研究视网膜 Müller 细胞来源的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在生理和病理状态下的作用^[17-18]。Roesch 等^[19] 于 2008 年首次发现在视网膜 Müller 细胞上特异性表达的 *Pdgfra*-Cre 启动子。构建该工具鼠可以研究特定基因缺陷在视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)中的作用。

2.3 视网膜感光细胞上特异性表达的 Cre 工具鼠

视网膜感光细胞可以分为视锥细胞和视杆细胞。这两种细胞结构和分布的差异使得其对光刺激产生不同的反应,研究这 2 种细胞的功能对于了解并治疗相关疾病具有重要作用。目前已构建成功的 Cre 转基因小鼠有 *Crx*-Cre、*RHO*-Cre 和 *HRGP*-Cre 等。

2.3.1 Crx-Cre *Crx* 是 *otx*-like 的同源基因,大量表达在视网膜感光细胞和松果体细胞上^[20-21]。*Crx* 是各种感光细胞特异性基因的调节器。人类 *Crx* 基因的突变与已知的 3 种感光细胞疾病有关^[22-25]。基因靶向研究表明,存在一个影响感光细胞命运的关键分子^[26]。Nishida 等^[27] 报道了一种 *Otx2* 条件性基因敲除的工具鼠。*Otx2* 是 *Otx* 家族的一员,在 *Crx* 启动子的作用下 *Otx2* 基因将沉默^[28],该工具鼠表现出感光细胞完全丢失,无长突细胞明显增加及松果体细胞的缺乏,此外 *Otx2* 基因可直接调节 *Crx* 的上游^[27]。

2.3.2 RHO-Cre 视紫红质是一种结合蛋白,由视黄醛和视蛋白结合而成,该蛋白在视觉形成过程中起着不可缺少的作用。研究表明,*RHO* 基因的突变是 RP 常见病因^[29]。Li 等^[30] 成功构建了在视杆细胞中特异性表达的 *RHO*-Cre 工具鼠。Popova 等^[31] 使用 *RHO*-Cre 工具鼠来研究赖氨酸甲基化酶 1 在小鼠视杆细胞发育和成熟过程中的作用。

2.3.3 HRGP-Cre Le 等^[32] 成功构建带有红绿色素启动子的 *HRGP*-Cre 转基因小鼠,且通过电生理及免疫组织化学等方法证明成年 *HRGP*-Cre 工具鼠视锥细胞的功能和分布不受 Cre 表达的影响。

2.4 双极细胞上特异性表达的 Cre 工具鼠

双极细胞属于二级神经元,其在视觉形成过程中接收光感受器的信号输入,信号整合后传递至无长突细胞和神经节细胞。随着眼科学的飞速发展,研究者对许多眼部疾病有了更深入的认识,如导致外层视网膜细胞凋亡的疾病包括 RP、年龄相关性黄斑病变(age-related macular degeneration, AMD)和长期视

网膜黄斑水肿等,其共同特点是光感受器死亡,但其下游的神经细胞多数还保留^[33-34]。因此,迫切需求构建双极细胞上特异性表达 Cre 工具鼠。

2.4.1 PCP2-Cre Lewis 等^[35]成功构建 PCP2-Cre 工具鼠。PCP2 是针对 ON 型双极细胞的启动子,可在 ON 型双极细胞定向表达 Cre。Lu 等^[36]报道了 PCP2-Cre、5-HTR2a-Cre 和 Chx10-Cre 3 种转基因工具鼠在双极细胞上 Cre 介导的重组效率及转基因的表达模式。

2.4.2 BAC-Pcp2-IRES-Cre 将 Cre cDNA 插入到 2.88 kb 的 Pcp2DNA 片段来构建 Cre 转基因小鼠,工具鼠浦肯野细胞中存在 Cre 的表达,同时在靶组织以外的区域也可观察到 Cre 重组酶活性。Zhang 等^[37]通过 Red 同源重组系统将 Cre cDNA 插入到带有完整的 *Pcp2* 基因的 173 kb 的 BAC 中构造 BAC/Cre 转基因小鼠,该工具鼠在浦肯野细胞及视网膜双极细胞上均表达 Cre。Zhang 等^[38]成功构建在视杆双极细胞上特异性表达 Cre 的 BAC-Pcp2-IRES-Cre 转基因小鼠,该工具鼠将是研究视网膜视杆双极细胞上特异性基因失活效果的有效工具。

2.5 视网膜神经节细胞上特异性表达的 Cre 工具鼠

视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)位于视网膜终段。研究发现,RGCs 进行性死亡是许多视网膜和视神经疾病的终末表现。因此,通过构建 RGCs 上特异性表达的 Cre 小鼠可更好地研究该病对 RGCs 的影响,从而寻找治疗措施。目前,成功构建的 Cre 工具鼠有 c-kit (151) Cre、Grik4-Cre、PCP2-Cre 及 Thy1-Cre 等。

2.5.1 c-kit(151) Cre Eriksson 等^[39]成功构建了 c-kit (151) Cre 工具鼠。c-kit (151) Cre 转基因鼠 Cre 重组酶表达受 c-kit 启动子的调控,Cre 主要表达在海马的 CA1、CA2 和 CA3 区、齿状回前区及 RGCs 层。Kimura 等^[40]借助 c-kit-Cret (TrkBc-kit KO)小鼠研究丙戊酸通过刺激神经元 TrkB 受体信号来阻止 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 诱导的 RGCs 凋亡。

2.5.2 Grik4-Cre Akashi 等^[41]成功构建了 Grik4-Cre 工具鼠。该工具鼠 Cre 主要表达在海马 CA3 区锥体细胞,同时 Cre 还在 RGCs 中表达。Martersteck 等^[42]报道 Grik4-Cre 转基因鼠 Cre 不仅仅表达在单一类型的细胞中,而是分布在多种不同类型的具有内在膜特性和树突功能的 RGCs 中,可以结合遗传标记和内在膜性能对 Cre 表达 RGCs 进行识别。

2.5.3 PCP2-Cre Ivanova 等^[43]在 RGCs 层某些细胞中发现 Cre 的表达,但这些细胞具体亚型并不明确。Ivanova 等^[44]研究发现,PCP2-Cre 鼠系中 Cre 仅在特定 RGCs 亚型表达;该研究指出结合内在膜特性的基因标记能够提供更可靠的 RGCs 亚型鉴定方法,该方法在研究其他细胞类型也有重要参考价值。

2.5.4 Thy1-Cre Thy1-Cre 鼠系在大脑皮质、小脑、脊髓、背根神经节和视网膜等中枢神经系统和外周神经系统的某些区域均表达 Cre。Thy1 基因编码一种主要在 RGCs 表达的相对分子质量为 25 000 的细胞表面糖蛋白,是研究 RGCs 基因表达的一种有利的标记工具^[45-46]。Campsall 等^[47]报道了 Thy1-Cre 转基因小鼠的基因表达情况及 Cre 重组酶活性的特征。Zhang

等^[48]利用 Thy1-CFP-DBA/2J 小鼠构建了青光眼模型,并研究了黑视蛋白在 RGCs 上表达的损失情况及行为学分析。另外,Cre 在 Thy1-Cre 工具鼠无长突细胞中表达,而无长突细胞是视网膜的抑制性中间神经元,故该工具鼠可用于研究神经回路的功能。

3 晶状体上特异性表达 Cre 的工具鼠

晶状体是人眼屈光系统的核心,其视觉调节过程由睫状肌、悬韧带和晶状体共同实现。研究晶状体上特异性表达 Cre 工具鼠可以为基因治疗提供实验基础。Jiang 等^[49]建立 1 个新的、有针对性的基于晶状体内皮细胞 (lens endothelial cells, LECs) 特异性启动子 LEP503 调控的单纯疱疹病毒胸苷激酶 / 丙环鸟苷 (herpes simplex virus thymidine kinase / ganciclovir, HSV-tk / GCV) 自杀基因系统,通过抑制 LECs 增生从而避免白内障术后出现后囊膜混浊。该系统由 Cre/LoxP 介导的增强型特异性表达载体组合 (含调控载体 Lenti-LEP503-HSVtk-Cre 和靶载体 Lenti-HPGK-Loxp-EGFP-pA-Loxp-HSVtk) 组成。

4 小结

综上所述,Cre/LoxP 系统具有位点特异、时期特异、组织特异和高效重组的特性,已发展为体内外进行遗传操作的新工具。该方法的应用必将对精确分析基因的功能及其与表型之间的关系,建立人类疾病的动物模型产生深远的影响。此外,Cre/LoxP 系统在光遗传学中的应用也受到越来越多的关注,其原理是将 ChR2、eBR、NaHR3.0、Arch 或 OptoXR 等特异光感基因导入目标神经元进行特殊离子通道表达,采用相应波长或频率的光刺激视蛋白,兴奋或抑制神经元,进而控制特定神经环路的活动,最终起到调控生理活动的目的。如何寻找组织特异性启动子以降低 Cre 在非靶组织的表达、联合其他基因工程技术克服单一酶无法解决的问题及优化实验操作是目前所必需考虑和解决的问题。随着眼科学及基因工程技术的发展,Cre/LoxP 系统将在治疗视网膜退行性疾病等过程中起到重要作用。

参考文献

- [1] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination [J]. Science, 1989, 244 (4910): 1288-1292.
- [2] Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting [J]. Trends Genet, 1989, 5 (3): 70-76.
- [3] Flenr M, Bühler M. Single-step generation of conditional knockout mouse embryonic stem cells [J]. Cell Rep, 2015, 12 (4): 709-716. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.06.051.
- [4] Andersson-Rolf A, Mustata RC, Merenda A, et al. One-step generation of conditional and reversible gene knockouts [J]. Nat Methods, 2017, 14 (3): 287-289. DOI: 10.1038/nmeth.4156.
- [5] Tsien JZ, Chen DF, Gerber D, et al. Subregion-and cell type-restricted gene knockout in mouse brain [J]. Cell, 1996, 87 (7): 1317-1326.
- [6] Nishihama R, Ishida S, Urawa H, et al. Conditional gene expression/deletion systems for marchantia polymorpha using its own heat-shock promoter and Cre/loxP-mediated site-specific recombination [J]. Plant Cell Physiol, 2016, 57 (2): 271-280. DOI: 10.1093/pcp/pcv102.
- [7] Al-Soudy AS, Nakanishi T, Mizuno S, et al. Germline recombination in a novel Cre transgenic line, Prl3b1-Cre mouse [J]. Genesis, 2016,

- 54(7) : 389–397. DOI:10.1002/dvg.22944.
- [8] Yao M, Lu X, Lei Y, et al. Conditional inducible triple-transgenic mouse model for rapid real-time detection of HCV NS3/4A protease activity [J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(3) : e0150894 [2017-09-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943641>. DOI: 10.1371/journal.pone.0150894.
- [9] 朱焕章, 史景泉. Cre/LoxP 系统在转基因小鼠上的应用策略[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(3) : 235–238. Zhu HZ, Shi JQ. Strategies and applications of the Cre/LoxP System in transgenic mice[J]. *Progress Bio Bio*, 2000, 27(3) : 235–238.
- [10] Long Q, Yang R, Lu W, et al. Adenovirus-mediated truncated Bid overexpression induced by the Cre/LoxP system promotes the cell apoptosis of CD133⁺ ovarian cancer stem cells[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1) : 155–162. DOI:10.3892/or.2016.5263.
- [11] Iacovelli J, Zhao C, Wolkow N, et al. Generation of Cre transgenic mice with postnatal RPE-specific ocular expression [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3) : 1378–1383. DOI:10.1167/iovs.10-6347.
- [12] Yao J, Jia L, Khan N, et al. Deletion of autophagy inducer RB1CC1 results in degeneration of the retinal pigment epithelium [J]. *Autophagy*, 2015, 11(6) : 939–953. DOI: 10.1080/15548627.2015.1041699.
- [13] Mori M, Metzger D, Garnier JM, et al. Site-specific somatic mutagenesis in the retinal pigment epithelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(5) : 1384–1388.
- [14] Mori M, Gargowitsch L, Bornert JM, et al. Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in mouse eye pigment epithelium [J]. *Genesis*, 2012, 50(11) : 828–832. DOI:10.1002/dvg.22044.
- [15] Le YZ, Zheng W, Rao PC, et al. Inducible expression of cre recombinase in the retinal pigmented epithelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(3) : 1248–1253. DOI:10.1167/iovs.07-1105.
- [16] Marquardt A, Stöhr H, Passmore LA, et al. Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease) [J]. *Hum Mol Genet*, 1998, 7(9) : 1517–1525.
- [17] Ueki Y, Ash JD, Zhu M, et al. Expression of Cre recombinase in retinal Müller cells [J]. *Vision Res*, 2009, 49(6) : 615–621. DOI:10.1016/j.visres.2009.01.012.
- [18] 夏蔚, 夏静, 张晓峰, 等. FK506 对高糖培养视网膜 Müller 细胞血管内皮生长因子表达的抑制作用 [J]. *中华实验眼科杂志*. 2014, 32(11) : 998–1003. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.11.008. Xia W, Xia J, Zhang XF, et al. Inhibition of FK506 on the expression of vascular endothelial growth factor in retinal Müller cells cultured by high concentration glucose [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(11) : 998–1003. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.11.008.
- [19] Roesch K, Jadhav AP, Trimarchi JM, et al. The transcriptome of retinal Müller glial cells [J]. *J Comp Neurol*, 2008, 509(2) : 225–238. DOI: 10.1002/cne.21730.
- [20] Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation [J]. *Cell*, 1997, 91(4) : 531–541.
- [21] Chen S, Wang QL, Nie Z, et al. Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes [J]. *Neuron*, 1997, 19(5) : 1017–1030.
- [22] Freund CL, Gregory-Evans CY, Furukawa T, et al. Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor [J]. *Cell*, 1997, 91(4) : 543–553.
- [23] Swain PK, Chen S, Wang QL, et al. Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration [J]. *Neuron*, 1997, 19(6) : 1329–1336.
- [24] Sohocki MM, Sullivan LS, Mintz-Hittner HA, et al. A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene [J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(5) : 1307–1315. DOI:10.1086/302101.
- [25] Freund CL, Wang QL, Chen S, et al. De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis [J]. *Nat Genet*, 1998, 18(4) : 311–312. DOI:10.1038/ng0498-311.
- [26] Furukawa T, Morrow EM, Li T, et al. Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice [J]. *Nat Genet*, 1999, 23(4) : 466–470. DOI:10.1038/70591.
- [27] Nishida A, Furukawa A, Koike C, et al. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development [J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(12) : 1255–1263. DOI:10.1038/nn1155.
- [28] Furukawa A, Koike C, Lippincott P, et al. The mouse Crx 5'-upstream transgene sequence directs cell-specific and developmentally regulated expression in retinal photoreceptor cells [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(5) : 1640–1647.
- [29] Dryja TP, McEvoy JA, McGee TL, et al. Novel rhodopsin mutations Gly114Val and Gln184Pro in dominant retinitis pigmentosa [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(10) : 3124–3127.
- [30] Li S, Chen D, Sauv e Y, et al. Rhodopsin-iCre transgenic mouse line for Cre-mediated rod-specific gene targeting [J]. *Genesis*, 2005, 41(2) : 73–80. DOI:10.1002/gene.20097.
- [31] Popova E, Pinzon-Guzman C, Salzberg A, et al. The role of Lysine demethylase 1 in mouse rod photoreceptor development and maturation [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(7) : 438.
- [32] Le YZ, Ash JD, Al-Ubaidi MR, et al. Targeted expression of Cre recombinase to cone photoreceptors in transgenic mice [J]. *Mol Vis*, 2004, 10 : 1011–1018.
- [33] Chen YY, Liu SL, Hu DP, et al. N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice [J]. *Exp Eye Res*, 2014, 121 : 102–113. DOI:10.1016/j.exer.2013.12.019.
- [34] Margalit E, Maia M, Weiland JD, et al. Retinal prosthesis for the blind [J]. *Survey Ophthalmol*, 2002, 47(4) : 335–356.
- [35] Lewis PM, Gril li-Linde A, Smeyne R, et al. Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum [J]. *Dev Biol*, 2004, 270(2) : 393–410. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.03.007.
- [36] Lu Q, Ivanova E, Ganjawala TH, et al. Cre-mediated recombination efficiency and transgene expression patterns of three retinal bipolar cell-expressing Cre transgenic mouse lines [J]. *Mol Vis*, 2013, 19 : 1310–1320.
- [37] Zhang XM, Ng AH, Tanner JA, et al. Highly restricted expression of Cre recombinase in cerebellar Purkinje cells [J]. *Genesis*, 2004, 40(1) : 45–51. DOI:10.1002/gene.20062.
- [38] Zhang XM, Chen BY, Ng AH, et al. Transgenic mice expressing Cre recombinase specifically in retinal rod bipolar neurons [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(10) : 3515–3520. DOI:10.1167/iovs.04-1201.
- [39] Eriksson B, Bergqvist I, Eriksson M, et al. Functional expression of Cre recombinase in sub-regions of mouse CNS and retina [J]. *FEBS Lett*, 2000, 479(3) : 106–110.
- [40] Kimura A, Namekata K, Guo X, et al. Valproic acid prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death via stimulation of neuronal TrkB receptor signaling [J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(3) : 756–764. DOI:10.1016/j.ajpath.2014.11.005.
- [41] Akashi K, Kakizaki T, Kamiya H, et al. NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(35) : 10869–10882. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5531-08.2009.
- [42] Martersteck EM, Hirokawa KE, Evarts M, et al. Diverse central projection patterns of retinal ganglion cells [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(8) : 2058–2072. DOI:10.1016/j.celrep.2017.01.075.
- [43] Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH. Characterization of transgenic mouse lines expressing Cre recombinase in the retina [J]. *Neuroscience*, 2010, 165(1) : 233–243. DOI:10.1016/j.neuroscience.2009.10.021.
- [44] Ivanova E, Lee P, Pan ZH. Characterization of multiple bistratified retinal ganglion cells in a purkinje cell protein 2-Cre transgenic mouse

- line[J]. J Comp Neurol. 2013. 521(9): 2165-2180. DOI:10.1002/cne.23279.
- [45] Barnstable CJ, Dräger UC. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina[J]. Neuroscience, 1984, 11(4): 847-855.
- [46] Perry VH, Morris RJ, Raisman G. Is Thy-1 expressed only by ganglion cells and their axons in the retina and optic nerve? [J]. J Neurocytol, 1984, 13(5): 809-824.
- [47] Campsall KD, Mazerolle CJ, De Repentigny Y, et al. Characterization of transgene expression and Cre recombinase activity in a panel of Thy-1 promoter-Cre transgenic mice[J]. Dev Dyn, 2002, 224(2): 135-143. DOI:10.1002/dvdy.10092.
- [48] Zhang Q, Vuong H, Huang X, et al. Melanopsin-expressing retinal ganglion cell loss and behavioral analysis in the Thy1-CFP-DBA/2J mouse model of glaucoma. [J]. Sci Chin Life Sci, 2013, 56(8): 720-725.
- [49] Jiang YX, Lu Y, Liu TJ, et al. Using HSV-TK/GCV suicide gene therapy to inhibit lens epithelial cell proliferation for treatment of posterior capsular opacification[J]. Mol Vis, 2011, 17: 291-299.

(收稿日期:2017-10-21 修回日期:2019-04-12)

(本文编辑:杜娟)

消 息

第四届“灵光杯”糖尿病视网膜病变典型病例征集活动

在中国,糖尿病患者已达 1.14 亿,糖尿病患者中糖尿病视网膜病变发病率高达 24.7%~37.5%,糖尿病视网膜病变是目前全球范围内工作年龄人群致盲的主要原因。2016 年国家卫生和计划生育委员会制定并发布《“十三五”全国眼健康规划(2016-2020)》中提出了对糖尿病视网膜病变进行早期诊断与治疗的倡议,对糖尿病视网膜病变给予了高度关注。

复方樟柳碱是中国自主研发的治疗缺血性眼病药物,其主要作用机制是调节微血管自律运动,增强视网膜血管的供血和供氧能力,减轻患者眼底水肿情况,进而改善患眼的视功能。依帕司他片作为醛糖还原酶抑制剂,可抑制多元醇通路活性,从而减缓 DR 的进展。为顺应国家卫生健康委员会的要求,积极参与糖尿病视网膜病变的防治,帮助一批乐于分享、善于表达、富有创新精神的青年医师的相关工作,《中华实验眼科杂志》与北京紫竹医药经营有限公司联合举办第四届“灵光杯”糖尿病视网膜病变诊疗典型病例征集活动。诚邀广大眼科医师踊跃投稿参赛。

1 征稿范围和要求

- 1.1 参与对象 全国眼科医生。
- 1.2 病例内容范围 (1)复方樟柳碱治疗糖尿病视网膜病变。(2)复方樟柳碱联合醛糖还原酶抑制剂紫竹万安依帕司他治疗糖尿病视网膜病变。
- 1.3 稿件要求 (1)参赛病例均未在国内外医学期刊上发表;(2)病例资料完整,包括疾病描述、临床图片、诊断、治疗、讨论;(3)完整病例稿件为 PPT 文件。

2 比赛方式及流程

- 2.1 全国初选 200 例。
- 2.2 初赛 眼科专业人员评议并评分,选取 30 人。
- 2.3 复赛 线上比赛,眼科医生线上评选,选取 15 人。
- 2.4 总决赛 全国范围内线上比赛,总成绩=眼科专家评分(80%)+网上投票(20%),根据总成绩高低排名。

3 报名投稿及奖励方式

- 3.1 投稿途径 将病例邮件发送至 zzbzlj@yibaiservice.cn,并写清联系人、医院、联系方式,邮件主题名:复方樟柳碱(联合紫竹万安)治疗糖尿病视网膜病变典型病例征集。
- 3.2 征稿时间 2019 年 7 月 1 日至 2019 年 11 月 30 日。
- 3.3 奖项设置 一等奖 2 名、二等奖 5 名、三等奖 8 名。

(北京紫竹医药经营有限公司)

读者·作者·编者

本刊对稿件的学术要求

文稿须有较高的学术价值,具有创新性、科学性、导向性和实用性。文稿要求资料翔实、实事求是、立论新颖、方法学正确、论据充分、图表恰当、结果客观、结论可靠、论述严谨、符合逻辑、层次清晰、数据准确、语句通顺。

(本刊编辑部)