

## · 实验研究 ·

# 示踪病毒工具在小鼠视觉环路各级神经元功能和形态研究中的应用

沈科炯 沈吟

武汉大学人民医院眼科中心 430060

通信作者:沈吟, Email: yinshen@whu.edu.cn

**【摘要】 目的** 利用病毒工具研究视网膜到脑的神经环路中神经细胞的形态结构及细胞之间的联系方式,并根据其示踪方向性和跨细胞突触性质,探索其用于研究视觉环路中细胞形态和连接分布情况。 **方法** 应用随机数字表法将 6~8 周龄实验小鼠随机分组,每组 4 只。野生型 C57BL/J 小鼠用于荧光金、腺相关病毒(AAV)、伪狂犬病毒(PRV)和 1 型单纯疱疹病毒 129 株(H129)示踪实验;转基因鼠 *GAD2-Cre* 小鼠用于 AAV 的示踪实验;转基因鼠 *Thy1-Cre* 小鼠用于狂犬病毒(RV)跨单突触示踪实验。病毒方向选择性示踪:(1)逆向示踪 在小鼠双侧上丘注射逆向神经示踪剂荧光金、AAV、PRV 或 RV,在特定时间点处死小鼠并取视网膜铺片,观察投射到脑的视网膜细胞形态分布和数量;(2)顺向示踪 在小鼠玻璃体腔注射 H129 等顺向示踪剂,在相应时间点取小鼠的大脑切片,观察视网膜投射到脑的细胞形态分布和数量。 **结果** 逆向标记中,荧光金标记到的视网膜神经节细胞比 AAV 标记到的数量更多,但 AAV 标记的神经节细胞有更多细胞突起的精细结构,荧光金仅能标记细胞的胞体。玻璃体腔注射 H129 和视觉投射脑区定位注射 PRV 能跨多突触后显示环路中串联起来的细胞分级投射。跨单突触示踪病毒,RVG 缺失的重组 RV 在结合辅助病毒后,可有效逆向跨 1 个突触,标记下一级的细胞。 **结论** AAV 病毒通过其携带的荧光蛋白可研究细胞精细的形态学特征。H129、PRV 和 RV 可用于研究视觉环路中神经连接。结合 Cre/loxP、Caspase-3、DTA、Gcamp 等基因元件技术,病毒工具能精确调控表达特定类型细胞的功能,同时进行非常细致的视觉功能和形态研究。

**【关键词】** 示踪; 荧光金; 病毒工具; 视觉环路**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2017YFE0103400)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20191021-00457

## Application of virus tracing tools in the study of function and morphology of neurons in the visual circuit

Shen Kejiang, Shen Yin

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

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

**【Abstract】 Objective** To utilize four viral tracer tools with different properties, to visualize cell morphology and connectome in visual pathways and explore and summarize the applications of different viral tracer tools in visual circuit, basing on the technology of neural circuitry tracing with viral vectors. **Methods** For cell tracing, C57BL/J mice were injected by fluorogold, adeno-associated virus (AAV), pseudorabies virus (PRV) or herpes simplex virus 1 strain 129 (H129). *GAD2-Cre* mice were injected by AAV. *Thy1-Cre* mice were injected by rabies virus (RV). Four mice were contained in every group. Retrograde tracing: mice were injected with fluorogold, AAV, PRV or RV in SC regions. After a certain period, their retinas were isolated, expanded into flat-mounted on slides to observe the morphology and distribution of labelled retinal cells. Anterograde tracing: mice were injected with H129 in vitreous cavities. After a certain period, their brains were isolated to observe the morphology and distribution of labelled brain cells. **Results** The number of cells labelled by fluorogold was larger than that labelled by AAV. The morphology of cells labelled by AAV possessed more details than that by fluorogold. H129 and PRV injection could display numerous cells with synaptic connections in the visual circuit. Recombined RV could mono-transsynaptically spread and label cells with the support of helper virus. **Conclusions** AAV is more helpful in studying cell morphology. HSV-1, PRV

and RV can be used to study cell connectomes. Cooperated with Cre/loxP system, Caspase-3, DTA, Gcamp or other neuroscience tools, viral tracer tools can be used to regulate the function of cells that belong to a specific cell type.

[Key words] Trace; Fluorogold; Viral tools; Visual circuit

Fund program: National Key R&D Program of China (2017YFE0103400)

DOI:10. 3760/cma. j. cn115989-20191021-00457

视网膜神经元之间突触连接是视网膜功能研究的基础,了解视网膜神经环路的突触联系对理解视觉环路功能机制、揭示视觉功能疾病病因以及寻找疾病的新治疗方法具有重要意义。神经示踪法可特异性地标记神经元<sup>[1-2]</sup>,是解析视觉神经环路连接的重要工具。示踪剂,包括无机荧光分子(如荧光金)和细菌毒素(如霍乱毒素),可应用于探索视网膜和脑的功能连接<sup>[3-4]</sup>,但因其容易淬灭且无法完整呈现细胞形态,从而限制了其应用。近年来新发展的示踪病毒工具可克服此类缺点,并能有效地示踪神经网络突触连接。目前常用的示踪病毒工具包括腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、1型单纯性疱疹病毒 129 株(herpes simplex virus strain 129, H129)、伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)以及狂犬病病毒(rabies virus, RV)。AAV 是 4.7 kb 的单链 DNA 小病毒,体积小、无包膜、无致病性,是已在临床中应用的病毒基因转移载体之一<sup>[5-6]</sup>;其也广泛应用于科学研究和尝试性眼部临床基因治疗<sup>[7-9]</sup>。H129 和 PRV 基因组体量大,约 150 kb,属单纯疱疹病毒,而 RV 属弹状病毒。H129、PRV 和 RV 均可跨突触在细胞间传递,拥有应用于眼科视觉环路研究的潜力<sup>[10-12]</sup>。本研究运用 AAV、H129、PRV 和 RV 来研究视觉环路中细胞的联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, *Thy1-cre* 小鼠(006143-FVB/N-Tg(Thy1-cre)1Vln/J)和 *Gad2-cre* 小鼠(028867-B6J. Cg-Gad2tm2(cre)Zjh/MwarJ)由美国 Jackson 实验室提供,并于武汉大学人民医院动物中心[许可证号:SYXK(鄂)2015-0027]饲养。实验动物的饲养及实验操作均遵守武汉大学动物管理委员会关于动物实验的相关规定。

1.1.2 主要试剂及仪器 鸡抗小鼠绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)多克隆抗体(ab13970)、兔抗小鼠 DsRed 多克隆抗体(ab62341)(英国 Abcam 公司);Alexa Fluor 488 标记的驴抗鸡多克隆 IgG 二抗

(703545155)、Alexa Fluor 594 标记的驴抗兔多克隆 IgG 二抗(711585152)(美国 Jackson 免疫研究实验室);质量分数 4% 荧光金生理盐水溶液(52-9400, 发射波长为 340~380 nm, 激发波长为 400 nm)(美国 Fluorochrome 公司);AAV2/2-EF1 $\alpha$ -EYFP(6.46 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml)、AAV2-EF1 $\alpha$ -DIO-EYFP-EYFP(5.79 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml)、AAV2-FLP-DIO(7.33 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml)、AAV2-Ef1 $\alpha$ -fDIO-EYFP(5.35 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml)、逆向跨多突触病毒 PRV-UBC-GFP(2.9 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml)、辅助病毒 AAV2-DIO-EGFP-TVA(6.24 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml)、辅助病毒 AAV2-DIO-RVG(6.24 $\times$ 10<sup>12</sup> vg/ml)、逆向跨单突触病毒 RV-EnvA- $\Delta$ G-DsRed(2 $\times$ 10<sup>8</sup> IFU)、顺向跨多突触病毒 H129-G4(2 $\times$ 10<sup>9</sup> pfu/ml)(武汉枢密脑科学技术公司)。68526 型脑立体定位注射仪、77020 型病毒注射显微镜、68030 型小鼠适配器(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);BX53 型荧光显微镜、FV1000 型共焦显微镜(日本 Olympus 公司);CM1950 冰冻切片仪(德国 Leica 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 C57BL/J 小鼠视网膜神经节细胞逆向标记 取 C57BL/J 小鼠按照随机数字表法分为荧光金组和 AAV 组,每组 4 只。腹腔内注射质量分数 5% 水合氯醛麻醉小鼠(0.01 ml/g)后,将小鼠放置于脑立体定位仪并固定头部。小鼠角膜涂红霉素眼膏,备皮消毒,剪开头皮暴露小鼠颅骨并调平颅顶平面,确定到上丘位置(AP=-4.0 mm, ML= $\pm$ 0.5 mm, DV=-1.7 mm)。在光学体视显微镜下用高速牙科钻钻颅孔,注意勿伤及硬脑膜,于荧光金组和 AAV 组小鼠上丘定位点分别注射荧光金(300 nl/侧)和示踪病毒工具 AAV2/2-EF1 $\alpha$ -EYFP(500 nl/侧)。注射完毕后留置注射针 10 min,缓慢移去注射针,缝合头皮,红霉素眼膏处理后置于复温毯复苏。

参照文献[1]的方法,荧光金组小鼠于注射后 3 d 用颈椎脱臼法处死,用镊子快速摘出双侧眼球,手术显微镜下眼科剪移去晶状体及玻璃体,质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min;转移至 PBS 中,去除巩膜,分离出完整的视网膜。将视网膜剪成四叶草状并铺平至载玻片上,滴加适量封片剂进行封片。参照文献[13]的方法,AAV 组小鼠于注射后 3~4 周颈椎脱臼法处死,摘

取眼球并分离出完整视网膜铺于 24 孔板;体积分数 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) PBST 溶液常温封闭 2 h, 加入含 5% BSA 的 PBST 溶液稀释的 GFP 一抗 (1:1 000), 4 °C 冰箱孵育过夜; PBST 缓慢摇动漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入含 5% BSA 的 PBST 溶液稀释的 Alexa Fluor 488 二抗 (1:500), 室温避光孵育 2 h, PBST 避光摇动漂洗 3 次, 每次 10 min; DAPI 室温染色 20 min, PBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 在手术显微镜下将视网膜剪成四叶草状, 加入抗荧光淬灭剂进行封片。荧光显微镜下观察各组视网膜铺片, 并分区计数视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 密度: 以视盘为中心, 将视网膜分为 4 个象限, 每个象限从距视盘 1/6、1/2、5/6 半径处划分为 3 个区域, 即后极部、中央部及周边部; 荧光显微镜 400 倍视野下, 每个象限的分区内各任意选取 3 个视野点, 按顺序进行拍照并对荧光标记的 RGCs 进行计数。

**1.2.2 GAD2-Cre 小鼠 GABA 能 RGC 逆向及双向标记** 取 GAD2-Cre 实验小鼠按照随机数字表法分为 DIO 组和 fDIO 组, 每组 4 只。按照 1.2.1 方法麻醉并固定小鼠, 在 DIO 组和 fDIO 组小鼠双侧上丘分别注射 AAV2-Ef1 $\alpha$ -DIO-EYFP-EYFP (500 nl/侧) 和 AAV2-Ef1 $\alpha$ -DIO-FLP-WPRE-pA (500 nl/侧)。同时 fDIO 组小鼠用利多卡因滴眼液点眼行局部麻醉, 固定小鼠, 撑开小鼠眼睑, 充分暴露眼球, 用微量注射器由角巩膜缘斜向下避开晶状体进针入玻璃体腔, 双眼各缓慢注射 1.5  $\mu$ l 逆行标记的病毒 AAV2-Ef1 $\alpha$ -fDIO-EYFP-WPRE-pA, 留置注射器 30 s 至注射完全; 涂抹红霉素眼膏, 并置于复温毯上等待复苏。

注射后 4 周, 颈椎脱臼法处死 2 个组小鼠并分离完整视网膜; 用 GFP 一抗和 Alexa Fluor 488 二抗按照 1.2.1 方法进行荧光染色并全视网膜计数荧光标记的 RGCs。

**1.2.3 C57BL/6J 小鼠视觉环路顺向及逆向跨多突触标记** 取 C57BL/6J 实验小鼠按照随机数字表法分为 H129 组 (8 只) 和 PRV 组 (4 只)。参照文献 [14-15] 描述的方法, H129 组小鼠玻璃体腔注射 H129-G4 (1.5  $\mu$ l/侧), 小鼠玻璃体腔注射方法同 1.2.2; 注射后 3、4 d 各取 4 只小鼠, 腹腔内注射 5% 水合氯醛麻醉小鼠 (0.015 ml/g), 固定于操作台, 剪开胸腔, 暴露心脏, 用 PBS (0.01 mol/L, pH = 7.2 ~ 7.4) 心脏灌注 15 min, 后用含 4% 多聚甲醛的 0.01 mol/L PBS 心脏灌注 10 min; 剥开颅骨分离鼠脑浸泡于 4% 多聚甲醛固定 10~48 h, 依次用 10%、20% 和 30% 蔗糖梯度脱水 2 h, 于冰冻切片进行切片, 切片厚 50~70  $\mu$ m; 同时剥取

眼球分离视网膜并铺片; 用 GFP 一抗和 Alexa Fluor 488 二抗染色后封片, 荧光染色方法同 1.2.1, 荧光显微镜下观察鼠脑中多个视觉相关核团被顺向标记的结果。

PRV 组小鼠双侧上丘注射 PRV-UBC-GFP (500 nl/侧), 于注射后 4 d 处死小鼠, 分离视网膜行冰冻切片并用 GFP 一抗和 Alexa Fluor 488 二抗染色分析, 荧光染色方法同 1.2.1, 于荧光显微镜下观察标记结果。

**1.2.4 RGC 突触前细胞的标记** 选取 4 只 Thy1-Cre 小鼠, 在其双侧上丘浅层注射体积比 1:1 混合的 AAV2-DIO-EGFP-TVA 和 AAV2-DIO-RVG (500 nl/侧), 注射后 4 周, 在同一注射位点注射重组 RV (RV-EnvA- $\Delta$ G-DsRed, 500 nl/侧), 小鼠上丘注射方法同 1.2.1。继续饲养 11 d 后处死小鼠, 按照 1.2.3 方法取双眼视网膜和鼠脑组织进行冰冻切片并进行免疫荧光染色。视网膜冰冻切片荧光染色方法同 1.2.1。脑组织冰冻切片染色采用含 5% BSA 的 PBST 溶液常温封闭 2 h, 加入含 5% BSA 的 PBST 溶液稀释的 GFP 一抗 (1:1 000) 和 DsRed 一抗 (1:500), 于 4 °C 冰箱孵育 3 d; PBST 缓慢摇动漂洗 3 次, 每次 10 min; 用含 5% BSA 的 PBST 溶液稀释的 Alexa Fluor 488 二抗 (1:500) 和 Alexa Fluor 594 二抗 (1:500) 室温避光孵育 5 h; PBST 室温避光漂洗 3 次, 每次 10 min; DAPI 室温染色 20 min, PBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 用抗荧光淬灭封片剂封片; 并于荧光显微镜下观察细胞标记结果。

**1.2.5 视网膜薄片膜片钳的 RGC 单细胞记录** 取 1.2.4 部分分离的完整视网膜, RGC 面向下倒扣在 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜上, 用手动切片器将视网膜组织切成 14  $\mu$ m 厚的薄片, 然后平行转移到记录槽中。拉制尖端口径为 1~2  $\mu$ m 的膜片钳记录电极, 灌入电极内液; 在电动微操仪的控制下, 采用微电极气脉冲式局部加药系统的方式, 在高压氮气的驱动下施加细胞受体激动剂到细胞表面; 用 Axon 200A 的放大器记录指定钳制电位下的电流变化。灌流液为 37 °C 的 Ringer 液。正置荧光显微镜下将记录电极靠近内核层表达 GFP 和 DsRed 的细胞, 形成高阻封接后, 通过加压系统给电极内部一个负压, 进行快电容补偿, 施加瞬时强脉冲打破电极尖端的膜片, 放大器设置到全细胞模式行膜片钳记录, 记录细胞对所施加药物的反应电流。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布, 以 mean $\pm$ SD 表示, 组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用均衡分组

单因素干预多水平研究设计, 荧光金组与 AAV 组小鼠视网膜不同部位 RGCs 密度的差异比较采用两因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验; DIO 组与 fDIO 组 RGCs 密度差异比较采用独立样本 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AAV 组与荧光金组逆向标记的 RGC 分布比较

为了分析不同的逆向标记方法所能标记到 RGC 神经元的分布, 我们分别对后极部、中央部和周边部标记的视网膜神经元计数。免疫荧光染色结果显示, 荧光金组小鼠视网膜后极部、中央部和周边部被标记的 RGCs 数量分别为  $(3\,254.30 \pm 260.77)$ 、 $(3\,352.56 \pm 215.76)$  和  $(2\,023.37 \pm 285.96)$  个/ $\text{mm}^2$ ; AAV 组小鼠视网膜后极部、中央部和周边部 EYFP 荧光表达的 RGCs 数量分别为  $(466.79 \pm 95.1)$ 、 $(960.71 \pm 134.04)$  和  $(1\,604.51 \pm 302.42)$  个/ $\text{mm}^2$ , 各组不同部位荧光标记 RGCs 数量总体比较, 差异有统计学意义 ( $F_{\text{部位}} = 0.541$ ,  $P = 0.590$ ;  $F_{\text{分组}} = 40.898$ ,  $P < 0.001$ ); 荧光金组后极部和中央部荧光标记 RGCs 细胞数多于 AAV 组, 差异有统计学意义 ( $t = -10.042$ 、 $-9.416$ , 均  $P < 0.01$ )。与荧光金组比较, AAV 组标记细胞荧光信号更强, 树突和轴突边界更清晰 (图 1)。

### 2.2 DIO 组和 fDIO 组标记 $\gamma$ -氨基丁酸 RGCs 形态及数量的变化

DIO 组和 fDIO 组 *GAD2-Cre* 小鼠视网膜铺片上可见荧光标记的  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 能 RGCs 胞体、树突及轴突纤维。DIO 组和 fDIO 组全视网膜荧光标记的 RGCs 数量分别为  $(115.02 \pm 7.29)$  个/ $\text{mm}^2$  和  $(91.84 \pm 4.84)$  个/ $\text{mm}^2$ , fDIO 组荧光标记 RGCs 数量明显少于 DIO 组, 差异有统计学意义 ( $t = 5.30$ ,  $P < 0.01$ ) (图 2)。

### 2.3 H129 组与 PRV 组标记视网膜到脑的视觉环路比较

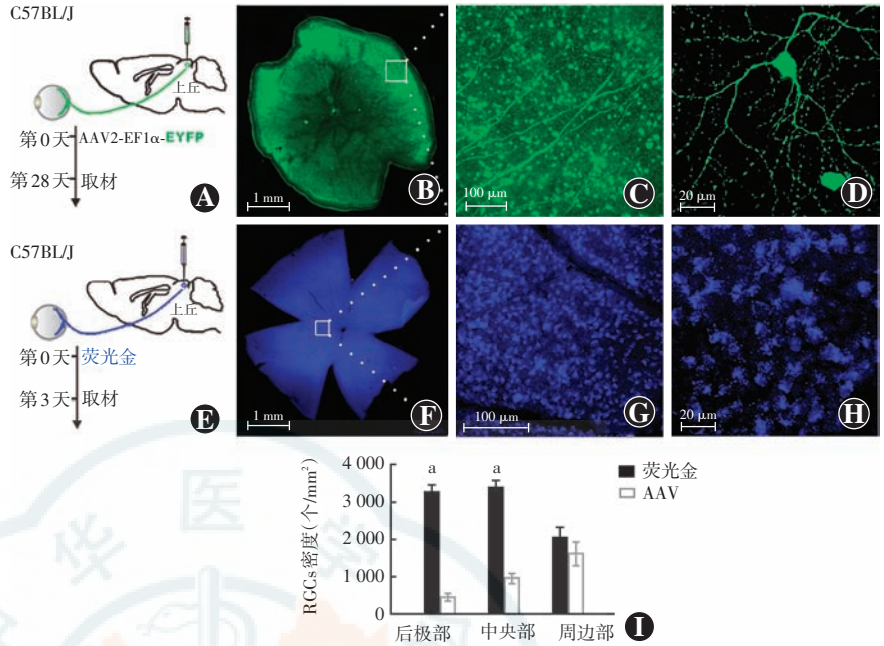
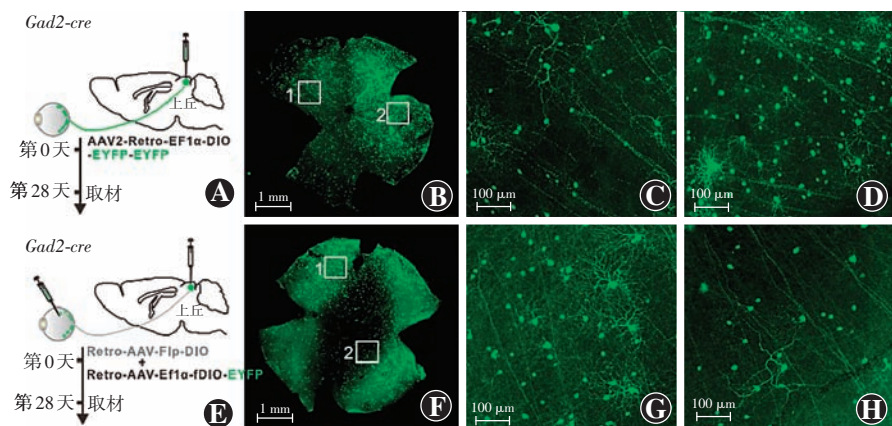


图 1 荧光金和 AAV 逆向标记 C57BL/J 小鼠视网膜不同区域 RGCs 的密度和形态 A: C57BL/J 小鼠上丘脑区注射 AAV2/2-EF1 $\alpha$ -EYFP 示意图 B: AAV 组小鼠视网膜铺片全景图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 1 mm,  $\times 40$ ) C: B 图的局部放大图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) D: AAV 组荧光标记的 RGCs 细胞胞体和树突形态图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 20  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1\,000$ ) E: C57BL/J 小鼠上丘脑区注射荧光金示意图 F: 荧光金组小鼠视网膜铺片全景图 (FG, 标尺 = 1 mm,  $\times 40$ ) G: F 图的局部放大图 (FG, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) H: 荧光金组荧光标记的细胞 (FG, 标尺 = 20  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1\,000$ ) I: 荧光金组与 AAV 组小鼠视网膜各区域荧光标记的 RGCs 量化比较  $F_{\text{部位}} = 0.541$ ,  $P = 0.590$ ;  $F_{\text{分组}} = 40.898$ ,  $P < 0.001$ 。与各自的 AAV 组比较,  $^*P < 0.01$  (两因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 4$ ) AAV: 腺相关病毒; RGC: 视网膜神经节细胞

Figure 1 The cell density and morphology of RGCs labeled with fluoro-gold and AAV in the C57BL/J mice A: The schematic drawing of AAV2/2-EF1 $\alpha$ -EYFP injection into the superior colliculus site of C57BL/J mice B: The whole retina image in the AAV group (Alexa Fluor 488, scale bar = 1 mm,  $\times 40$ ) C: Enlarged image of the square box in the image B (EYFP, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) D: The image of cell bodies and dendrites of fluorescence labeled RGCs in the AAV group (Alexa Fluor 488, scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1\,000$ ) E: The schematic drawing of fluoro-gold injection into the superior colliculus site of C57BL/J mice F: The whole retina image in the fluorogold group (FG, scale bar = 1 mm,  $\times 40$ ) G: Enlarged image of the square box in the image F (FG, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) H: The image of cell bodies of fluorescence labeled RGCs in the fluoro-gold group (FG, scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1\,000$ ) I: The statistic graph for the densities of fluorescence labeled RGCs in the different areas of retina from different groups.  $F_{\text{area}} = 0.541$ ,  $P = 0.590$ ,  $F_{\text{group}} = 40.898$ ,  $P < 0.001$ . Compared with the corresponding AAV group,  $^*P < 0.01$  (two-way ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 4$ ) AAV: adeno-associated virus; RGC: retinal ganglion cell

H129 组随取材时间不同, 标记细胞数及脑区有所不同; 注射后 4 d 小鼠上丘脑区标记的神经元数量较注射后 3 d 明显增加, 注射后 4 d 位于视觉皮层 (V1) 等脑区的突触后细胞也开始被标记。PRV 组注射后 4 d 小鼠视网膜外核层、内核层和 RGC 层可见大量荧光标记细胞, 根据标记细胞的形态和位置推测分别为双极细胞 (retina bipolar cells, RBCs)、无长突细胞、Müller 细胞和光感受器细胞 (图 3)。



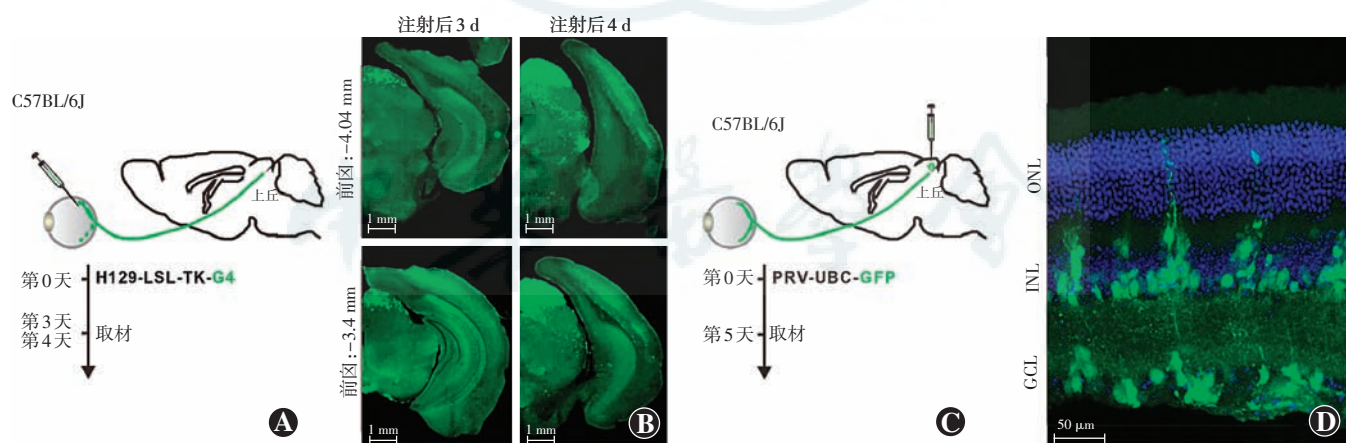
**图 2** AAV 标记 *GAD2-Cre* 小鼠 GABA 能 RGCs 的形态和分布 A: DIO 组小鼠上丘脑区定位注射 AAV2-EF1 $\alpha$ -DIO-EYFP-EYFP 示意图 B: DIO 组小鼠的视网膜铺片全景图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 1 mm,  $\times 40$ ) C: B 图中方框 1 的局部放大图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) D: B 图中方框 2 的局部放大图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) E: fDIO 组小鼠上丘脑区定位注射 AAV2-FLP-DIO 同时在玻璃体腔注射 AAV2-Ef1 $\alpha$ -fDIO-EYFP 示意图 F: fDIO 组小鼠视网膜铺片全景图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 1 mm,  $\times 40$ ) G: F 图中方框 1 的局部放大图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) H: F 图中方框 2 的局部放大图 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) AAV: 腺相关病毒

**Figure 2** The morphology and distribution of GABAergic RGCs labeled with AAV in the *GAD2-Cre* mice A: The schematic drawing of AAV2-EF1 $\alpha$ -DIO-EYFP-EYFP injection into the superior colliculus site of mice in the DIO group B: The whole retina image in the DIO group (Alexa Fluor 488, scale bar = 1 mm,  $\times 40$ ) C: The enlarged image of the square box 1 in the image B (Alexa Fluor 488, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) D: The enlarged image of the square box 2 in the image B (Alexa Fluor 488, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) E: The schematic drawing of AAV2-FLP-DIO injection into the superior colliculus site and AAV2-Ef1 $\alpha$ -fDIO-EYFP injection into vitreous chamber of *GAD2-Cre* mice in the fDIO group F: The whole retina image in the fDIO group (Alexa Fluor 488, scale bar = 1 mm,  $\times 40$ ) G: The enlarged image of the square box 1 in the image F (Alexa Fluor 488, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) H: The enlarged image of the square box 2 in the image F (Alexa Fluor 488, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) AAV: adeno-associated virus

## 2.4 从视网膜到脑的视觉形成环路 RGCs 的跨突触病毒标记

在上丘注射跨单级突触的病毒来逆向标记 RGC 脑区投射的区域,结果显示上丘浅层可见大量 EGFP 标记的神经元;上丘其他各层仅见 DsRed 标记的神经元,为上丘浅层 EGFP 标记细胞的突触前细胞。视网膜冰冻切片免疫荧光染色结果显示 RGC 层和内核层少量 DsRed 标记细胞,位于 RGC 层为 RV-DsRed 跨突触后所感染的 RGC 细胞(上丘到 RGC 跨突触);位于内核层为 RGC 的突触前细胞(如 RGC 到 RBC 跨突触)(图 4)。

通过全细胞膜片钳技术对单纯 DsRed 标记的视网膜内核层的神经元进行电生理特征记录,结果显示在  $-40\text{ mV}$  的钳制电压下,离子型谷氨酸受体激动剂 AMPA ( $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ ) 所诱导的超极化电流,提示该神经元为 OFF 型 RBC (图 4)。



**图 3** H129 病毒顺向及 PRV 病毒逆向跨多突触标记 C57BL/6J 小鼠视觉环路 A: C57BL/6J 小鼠玻璃体腔注射 H129 病毒(H129-G4)示意图 B: H129 病毒注射后 3 d 和 4 d 小鼠脑片上丘(前窗-3.4 mm 处)和 V1 脑区(前窗-4.04 mm 处)荧光标记情况 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 1 mm,  $\times 40$ ) C: C57BL/6J 小鼠上丘脑区定位注射 PRV 病毒 (PRV-UBC-GFP) 示意图 D: PRV 注射后 5 d 小鼠视网膜各层荧光标记观察 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 50  $\mu\text{m}$ ,  $\times 200$ ) GFP: 绿色荧光蛋白; ONL: 外核层; INL: 内核层; GCL: 神经节细胞层

**Figure 3** The visual circuit labeled transsynaptically with H129 virus and PRV virus in C57BL/6J mice A: The schematic drawing of H129-G4 injection into the vitreous chamber of C57BL/6J mice in the H129 group B: The fluorescent labeling of superior colliculus (Bregma -3.4 mm) and V1 brain area (Bregma -4.04 mm) at 3 days and 4 days after injection (Alexa Fluor 488, scale bar = 1 mm,  $\times 40$ ) C: The schematic drawing of PRV-UBC-GFP injection into the superior colliculus site of C57BL/6J mice in the PRV group D: The fluorescence labeling of retina at 5 days after PRV injection (Alexa Fluor 488, scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ,  $\times 200$ ) GFP: green fluorescent protein; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer

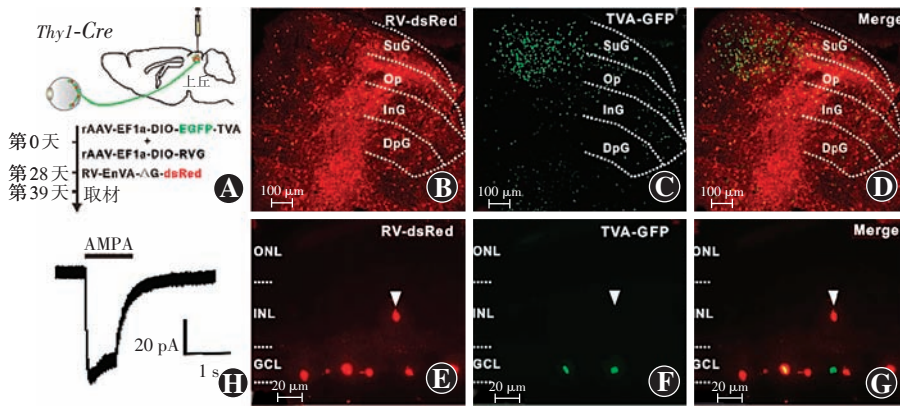


图 4 重组 RV 逆向跨单级突触标记 *Thy1-Cre* 小鼠 RGCs A: 上丘脑区示踪病毒注射示意图 B: 小鼠脑组织切片上丘区 DsRed 标记细胞荧光表达结果 (Alexa Fluor 594, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) C: 小鼠脑组织切片上丘区 EGFP 标记细胞荧光表达结果 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) D: 图 B 和图 C 融合图 E: 小鼠视网膜切片 DsRed 标记细胞荧光表达结果 (Alexa Fluor 594, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1000$ ) F: 小鼠视网膜切片 EGFP 标记细胞荧光表达结果 (Alexa Fluor 488, 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1000$ ) G: 图 E 与图 F 融合图 H: 视网膜内核层 RV-DsRed 标记的细胞上记录的 100  $\mu\text{mol/L}$  AMPA 诱导的电流 RV: 狂犬病毒; SuG: 浅灰质层; Op: 视神经层; InG: 中灰质层; DpG: 深灰质层; ONL: 外核层; INL: 内核层; GCL: 神经节细胞层

Figure 4 The RGCs and their presynaptic cells labeled by recombinant RV in *Thy1-Cre* mice A: The schematic drawing of AAV-DIO-RVG, AAV-DIO-EGFP-TVA and RV- $\Delta$ G-DsRed injection B: The expression of DsRed labeled cells in the brain tissue section of *Thy1-Cre* mice (Alexa Fluor 594, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) C: The expression of EGFP labeled cells in the brain tissue section of *Thy1-Cre* mice (Alexa Fluor 488, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 400$ ) D: The merged image of B and C E: The expression of DsRed labeled cells in the retinal sections of *Thy1-Cre* mice (Alexa Fluor 594, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1000$ ) F: The expression of EGFP labeled cells in the retinal sections of *Thy1-Cre* mice (Alexa Fluor 488, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $\times 1000$ ) G: The merged image of E and F H: The current change induced by AMPA (100  $\mu\text{mol/L}$ ) recorded in one cell in inner nuclear layer labelled by RV-DsRed RV: rabies virus; SuG: superficial gray layer; Op: optic nerve layer; InG: intermediate gray layer; DpG: deep gray layer; ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer

### 3 讨论

荧光金是一种高信号的无机荧光分子示踪剂,无选择性地标记细胞的胞体,且荧光信号不持久<sup>[3,16-19]</sup>。荧光金的神经毒性会损害细胞的基因转录和翻译,注射后 4~5 周,标记的细胞开始死亡,故不适用于长时程标记细胞<sup>[20]</sup>。

重组 AAV 可更清楚、完整地显示标记细胞的形态学特征,在细胞内长期稳定安全地表达,但 AAV 是有选择性地感染特定细胞。近年发展了多种新型重组病毒示踪工具,其中包括部分细小病毒科、疱疹病毒科、弹状病毒科的病毒<sup>[3]</sup>。AAV、H129、PRV 和 RV 已用于神经示踪,可成为解析视觉神经环路连接的重要工具。结合其他病毒工具或技术,AAV 在神经环路的结构和功能研究上有更广泛的应用<sup>[4]</sup>。谷氨酸脱羧酶 2 (glutamic acid decarboxylase 2, GAD 2) 是 GABA 的一种合成酶,本研究结合 *GAD2-cre* 小鼠和 Cre-loxP 系统,将 AAV2-Ef1 $\alpha$ -DIO-EYFP-EYFP 注射到上丘后能逆 RGC 轴突到达 RGC 胞体,在 GABA 能 RGC 内 Cre

蛋白的作用下表达荧光蛋白。但 AAV2-Ef1 $\alpha$ -DIO-EYFP-EYFP 同时也标记了投射到上丘的其他 GABA 能神经元。为标记 GABA 能 RGC,本研究中测试了 fDIO 组 2 种不同的 AAV。AAV2-Ef1 $\alpha$ -DIO-FLP-WPRE-pA 注射入上丘后能逆 RGC 的轴突到达胞体,在 Cre 蛋白的作用下表达 FLP 蛋白。AAV2-Ef1 $\alpha$ -fDIO-EYFP-WPRE-pA 注射入玻璃体腔后直接感染 RGC 胞体,并在 FLP 蛋白的作用下表达荧光蛋白。故 GABA 能 RGC 只有被这 2 种 AAV 同时感染后才能显示荧光信号。相应地, fDIO 组联合使用 Cre/loxP 和 FLP/FRT 系统标记 RGC 的效率比 DIO 组单纯使用 Cre/loxP 系统稍低。

重组 AAV 主要的缺点是可携载体量小,最大只能携带约 4.8 kb 基因<sup>[3]</sup>。其次,AAV 基因表达需较长的时间,且衣壳血清型决定了被感染神经元的类型<sup>[21]</sup>。设计携带较大基因时可考虑由 2 种 AAV 各携带一半基因,在细胞内表达后整合为一个基因<sup>[22]</sup>。目前,AAV 结

合 Cre/loxP 系统、CRISPR-case9 技术或 Caspase3 等工具来研究基因功能的方法已经很成熟,且由于 AAV 具有较好的安全性,大量临床试验已开始采用 AAV 作为基因治疗的载体,其针对难治性眼病,如遗传性眼病的基因治疗已经上市<sup>[7-9]</sup>。

除 AAV 外, H129, PRV 和 RV 病毒具有不同的方向选择性和跨突触能力,目前已经被广泛用于多种神经环路追踪。其中 H129 和 PRV 是双链 DNA 病毒,体量大,有包膜,属于疱疹病毒科<sup>[3]</sup>。H129 顺向跨多突触传递, PRV 则逆向跨多突触传递。本研究结果显示,在小鼠玻璃体腔注射 H129 后 72 h,上丘脑区神经元开始被标记;注射后 96 h,其他脑区的突触后细胞开始被标记。上丘注射 PRV 后 3 天内有极少的细胞被标记;而注射后第 4 天时已有大量无长突细胞、Müller 细胞、RBCs 和 RGCs 被标记;注射后第 5 天标记细胞量相比之前增加并不多。H129 和 PRV 都对小鼠有致死性,注射病毒后小鼠生存期 < 7 d<sup>[23-24]</sup>。选择合适的实验时长和确定小鼠处死时间非常关键。若能降低

H129 和 PRV 对小鼠神经元的毒性作用,或减慢 H129 和 PRV 跨突触传递的进程,则更利于我们对视觉环路细胞亚型的研究<sup>[12,25-26]</sup>。

RV 属弹状病毒科,在辅助 G 蛋白的作用下,RV 能逆向跨多突触传递<sup>[27-29]</sup>。Thy1-cre 小鼠的 RGC 都能表达 Cre 蛋白,2 个 AAV 辅助病毒在 RGC 内被剪切,并在细胞膜表达 TVA 受体蛋白,在细胞质表达 G 蛋白和 EGFP 绿色荧光蛋白。4 周后注射重组 RV,RV 结合 TVA/EnvA 系统可有效控制感染细胞的特定类型<sup>[11,28-33]</sup>。EnvA 是禽肉瘤白血病毒包膜的包膜蛋白,能特异性识别并结合 TVA 受体<sup>[34]</sup>,而 TVA 受体天然在哺乳动物体内不表达,故利用 EnvA 包裹重组 RV 就能定向感染表达 TVA 受体的细胞<sup>[35]</sup>,并在细胞内表达 DsRed 红色荧光蛋白。当 RGC 同时被这 3 种病毒感染,重组 RV 就能在 G 蛋白存在的情况下定向传递到突触前细胞。本研究结果显示,RV 注射后 10~12 d,RV 逆向跨单突触标记系统才能少量标记视网膜环路 RGC 的突触前细胞。但由于 RV 的毒性作用,其注射后小鼠生存期<13 d。若能降低 RV 的细胞毒性,延长小鼠生存时间,则可能会有更多的跨突触细胞被标记。

综上所述,示踪病毒工具相较传统示踪工具优点非常显著,AAV 可用于更清晰细致地显示细胞的形态特征;H129、PRV 和 RV 可用于研究神经元间的突触联系;若结合转基因小鼠,还能精确控制特定的类型细胞。故示踪病毒工具适用于视觉环路和功能研究以及难治性眼病的探索和治疗。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 黄蔚,黄萍,惠延年. 荧光金逆行标记大鼠视网膜节细胞[J]. 中华眼底病杂志,1999,15(3):178.
- [2] Jara JH, Genç B, Klessner JL, et al. Retrograde labeling, transduction, and genetic targeting allow cellular analysis of corticospinal motor neurons: implications in health and disease[J]. Front Neuroanat, 2014, 8: 16. DOI:10.3389/fnana.2014.00016.
- [3] Mondello SE, Jefferson SC, O'Steen WA, et al. Enhancing Fluorogold-based neural tract tracing[J]. J Neurosci Methods, 2016, 270: 85-91. DOI:10.1016/j.jneumeth.2016.06.004.
- [4] Nassi JJ, Cepko CL, Born RT, et al. Neuroanatomy goes viral! [J]. Front Neuroanat, 2015, 9: 80. DOI:10.3389/fnana.2015.00080.
- [5] Madigan VJ, Asokan A. Engineering AAV receptor footprints for gene therapy[J]. Curr Opin Virol, 2016, 18: 89-96. DOI:10.1016/j.coviro.2016.05.001.
- [6] Yu H, Koilkonda RD, Chou TH, et al. Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(20): E1238-1247. DOI:10.1073/pnas.1119577109.
- [7] 杨硕,刘磊,裴晗,等. 腺相关病毒 2-ND4 基因转染细胞线粒体的研究[J]. 中华实验眼科杂志,2014,32(8):693-695. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.08.15.
- [8] Yang S, Liu L, Pei H, et al. Study on transfection of adeno associated virus 2-ND4 gene into mitochondria[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(8): 693-695. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.08.15.
- [9] 吴艺君,郑钦象. Leber 先天性黑矇基因治疗的临床前基础研究现状[J]. 中华实验眼科杂志,2014,32(8):764-768. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.08.021.
- [10] Wu YJ, Zheng QX. The research status of preclinical animal experiments of gene therapy for Leber congenital amaurosis[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32(8): 764-768. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.08.021.
- [9] 杨红霞,邱一果. 重组腺相关病毒介导遗传性色盲基因治疗的研究进展[J]. 中华实验眼科杂志,2013,31(9):881-884. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.018.
- [10] Yang HX, Qiu YG. Advance in recombinant adeno-associated virus mediated gene therapy for color blindness[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(9): 881-884. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.09.018.
- [10] Wojaczynski GJ, Engel EA, Steren KE, et al. The neuroinvasive profiles of H129 (herpes simplex virus type 1) recombinants with putative anterograde-only transneuronal spread properties [J]. Brain Struct Funct, 2015, 220(3): 1395-1420. DOI:10.1007/s00429-014-0733-9.
- [11] Osakada F, Mori T, Cetin AH, et al. New rabies virus variants for monitoring and manipulating activity and gene expression in defined neural circuits[J]. Neuron, 2011, 71(4): 617-631. DOI:10.1016/j.neuron.2011.07.005.
- [12] Rinaman L, Schwartz G. Anterograde transneuronal viral tracing of central viscerosensory pathways in rats[J]. J Neurosci, 2004, 24(11): 2782-2786. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5329-03.2004.
- [13] Zeng WB, Jiang HF, Gang YD, et al. Anterograde monosynaptic transneuronal tracers derived from herpes simplex virus 1 strain H129 [J]. Mol Neurodegener, 2017, 12(1): 38. DOI:10.1186/s13024-017-0179-7.
- [14] Kim T, Soto F, Kerschensteiner D. An excitatory amacrine cell detects object motion and provides feature-selective input to ganglion cells in the mouse retina [J/OL]. Elife, 2015, 4: e08025 [2019-10-21]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25988808/. DOI:10.7554/eLife.08025.
- [15] 常成,高晓群. 病毒在神经通路示踪中的应用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(2):250-254. DOI:10.3870/j.issn.1004-1850.2004.02.026.
- [16] Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, et al. Two methods to trace retinal ganglion cells with fluorogold: from the intact optic nerve or by stereotactic injection into the optic tract[J]. Exp Eye Res, 2015, 131: 12-19. DOI:10.1016/j.exer.2014.12.005.
- [17] Agbandje-McKenna M, Kleinschmidt J. AAV capsid structure and cell interactions[J]. Methods Mol Biol, 2011, 807: 47-92. DOI:10.1007/978-1-61779-370-7\_3.
- [18] 陈春林,叶剑,尹小磊. 荧光金逆行示踪标记视神经轴突纤维[J]. 中华实验眼科杂志,2007,25(4):320.
- [19] Köbbert C, Apps R, Bechmann I, et al. Current concepts in neuroanatomical tracing[J]. Prog Neurobiol, 2000, 62(4): 327-351. DOI:10.1016/s0301-0082(00)00019-8.
- [20] Schmued LC, Fallon JH. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties[J]. Brain Res, 1986, 377(1): 147-154. DOI:10.1016/0006-8993(86)91199-6.
- [21] Ghosh A, Duan D. Expanding adeno-associated viral vector capacity: a tale of two vectors[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 2007, 24: 165-177. DOI:10.1080/02648725.2007.10648098.
- [22] Vélez-Fort M, Rousseau CV, Niedworok CJ, et al. The stimulus selectivity and connectivity of layer six principal cells reveals cortical microcircuits underlying visual processing[J]. Neuron, 2014, 84(1): 238. DOI:10.1016/j.neuron.2014.09.026.
- [23] King A, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2018) [J].

- Arch Virol, 2018, 163 (9) : 2601-2631. DOI: 10. 1007/s00705-018-3847-1.
- [24] Wickersham IR, Finke S, Conzelmann KK, et al. Retrograde neuronal tracing with a deletion-mutant rabies virus [J]. Nat Methods, 2007, 4(1) : 47-49. DOI: 10. 1038/nmeth999.
- [25] Ugolini G. Advances in viral transneuronal tracing [J]. J Neurosci Methods, 2010, 194(1) : 2-20. DOI: 10. 1016/j. jneumeth. 2009. 12. 001.
- [26] Rinaman L, Levitt P, Card JP. Progressive postnatal assembly of limbic-autonomic circuits revealed by central transneuronal transport of pseudorabies virus [J]. J Neurosci, 2000, 20(7) : 2731-2741.
- [27] Yonehara K, Balint K, Noda M, et al. Spatially asymmetric reorganization of inhibition establishes a motion-sensitive circuit [J]. Nature, 2011, 469(7330) : 407-410. DOI: 10. 1038/nature09711.
- [28] Wall NR, Wickersham IR, Cetin A, et al. Monosynaptic circuit tracing *in vivo* through Cre-dependent targeting and complementation of modified rabies virus [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(50) : 21848-21853. DOI: 10. 1073/pnas. 1011756107.
- [29] Wickersham IR, Lyon DC, Barnard RJ, et al. Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons [J]. Neuron, 2007, 53(5) : 639-647. DOI: 10. 1016/j. neuron. 2007. 01. 033.
- [30] Osakada F, Callaway EM. Design and generation of recombinant rabies virus vectors [J]. Nat Protoc, 2013, 8(8) : 1583-1601. DOI: 10. 1038/nprot. 2013. 094.
- [31] Young JA, Bates P, Varmus HE. Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses [J]. J Virol, 1993, 67(4) : 1811-1816.
- [32] Haubensack W, Kunwar PS, Cai H, et al. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear [J]. Nature, 2010, 468(7321) : 270-276. DOI: 10. 1038/nature09553.
- [33] Barnard RJ, Elleder D, Young JA. Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: from classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion [J]. Virology, 2006, 344(1) : 25-29. DOI: 10. 1016/j. virol. 2005. 09. 021.
- [34] Deshpande A, Bergami M, Ghanem A, et al. Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(12) : E1152-1161. DOI: 10. 1073/pnas. 1218991110.
- [35] Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann KK. Infectious rabies viruses from cloned cDNA [J]. EMBO J, 1994, 13(18) : 4195-4203.

(收稿日期:2020-03-11 修回日期:2020-05-29)

(本文编辑:张宇)

## 消息

## 《眼科研究实用实验技术指南》出版发行

由武汉大学人民医院沈吟教授和邢怡桥教授主编的《眼科研究实用实验技术指南》一书于 2019 年 11 月由科学出版社出版。该书是介绍眼科专业基础实验研究技术的参考书籍,系统归纳了眼科实验研究常用的细胞实验和动物实验中的基本技术和操作方法。全书共分 7 个章节,包括细胞培养、组织生化、眼科常见动物模型、活体动物眼科检测、视网膜细胞电生理功能学实验、眼科特定注射技术和常用科研软件使用等。本书为每个眼科专有实验制订了详细的方案和流程,还结合实际操作经验,总结出实验中易犯错误和问题,强化了获得更佳实验结果的重点要点。本书适用于从事视觉科学和眼科实验操作的专业技术人员,也可作为眼科研究生、从事眼科基础研究领域的眼科医生以及眼科实验技术人员的参考用书。

本书定价 75 元,在全国各大新华书店,京东商城、当当网、淘宝网等网上书店均有售。

(本刊编辑部)



## 《北京协和医院眼科病例精解》出版发行

由陈有信教授主编的《北京协和医院眼科病例精解》一书于 2020 年 7 月由科学技术文献出版社正式出版。本书收集了 42 例眼科典型病例,涉及眼科各专业,图文并茂。书中包括眼科眼底病专家张承芬教授生前亲自整理的病例,主要展现常见眼底疾病的诊疗思路,是老一辈眼科专家留下的宝贵资料。此外,书中收集了眼科教授和年轻医生在近年来临床诊疗工作中的典型病例及手术技巧,特别需要提出的是,有相当部分的病例涉及全身疾病。本书中典型病例有助于各层次医生相互学习借鉴,快速掌握专家的诊疗思路,提高诊疗水平,非常值得阅读。

本书定价 138 元,全国各大新华书店,以及京东商城、当当网、淘宝网等网上书店均有售。

(本刊编辑部)

