

条件性 Smad4 基因敲除鼠模型的建立和鉴定及初步表型

刘 瑛, 林 丁

作者单位: (410015) 中国湖南省长沙市, 长沙爱尔眼科医院
作者简介: 刘瑛, 博士, 主治医师, 研究方向: 眼发育、青光眼。
通讯作者: 林丁, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼、白内障。dlinoph@126.com
收稿日期: 2013-08-02 修回日期: 2013-12-12

Establishment, identification and preliminary phenotype of mouse model of specific Smad4 conditional gene knockout in lens ectoderm

Ying Liu, Ding Lin

Changsha Aier Eye Hospital, Changsha 410015, Hunan Province, China

Correspondence to: Ding Lin. Changsha Aier Eye Hospital, Changsha 410015, Hunan Province, China. dlinoph@126.com

Received: 2013-08-02 Accepted: 2013-12-12

Abstract

• AIM: To make further phenotypic analysis by establishing the mouse model of specific Smad4 conditional gene knockout in ocular tissue by Cre/LoxP system of this kind of mouse model.

• METHODS: Mouse of specific Smad4 conditional knockout in lens ectoderm (Le-Cre; Samd4fl/fl or also called mutant mouse) was obtained by mating the Pax6 promoter-driven Cre transgenic mouse (Le-Cre) with Smad4 wildtype mouse (Smad4 fl/fl). To confirm that Smad4 has been conditionally inactivated only in the specific tissue of ectoderm such as lens, cornea and ectoderm of the eyelids so on. A series of assays were carried out to reveal the validity and specificity of Smad4 gene knockout at molecular and cellular levels, including genotyping by PCR, detection of green fluorescence protein (GFP) in specific tissue and Smad4 protein. The expression of Le-Cre from LacZ staining using ROSA26 reporter genes in specific ocular tissue of mice can be visualized. Preliminary phenotype of mutant mouse was also observed.

• RESULTS: As early as around E10.0, strong GFP expression was observed in the embryonic lens and periorbital ectoderm of the mice, which showed Le-Cre was expressed in specific target tissue. Through genotyping for Smad4, Cre and Rosa genes, the mice were determined if they have carried Cre, Smad4 allele or Rosa reporter gene. It was further confirmed by lens-sampled genotyping that Smad4 gene was removed from some specific tissue such as lens. The spatial-temporal

expression and tissue specificity of Le-Cre recombinase was also revealed by LacZ staining of Rosa; Le-Cre double transgenic mouse. According to Immunohistochemical staining, Smad4 was widely expressed in normal embryonic eyes, mainly appearing in the cytoplasm at the early embryonic stage and were transferred to nucleus with gestation developing, while in mutant embryonic eyes, Smad4 was void of expression in Cre-expressed tissues. It was observed that Smad4 mutant mouse could survive the conditional gene knockout. But those mice showed abnormal appearance such as microphthalmia, sunken socket, abnormal eyelid opening, and eyelid closure failure and periocular hair loss.

• CONCLUSION: In this study, mouse model of Smad4 conditional knockout is precisely established and lack of expression of Smad4 in mutant mice is confirmed by related genetic and proteic detection. Lack of Smad4 expression in specific ocular tissues of mutant mouse can result in the abnormality of eye and adnexa, which provides a reliable animal model to investigate the ocular development and the roles of Smad4 on it.

• KEYWORDS: Smad4; conditional gene knockout; Le-Cre; reporter gene; ocular phenotype

Citation: Liu Y, Lin D. Establishment, identification and preliminary phenotype of mouse model of specific Smad4 conditional gene knockout in lens ectoderm. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(1):17-22

摘要

目的: 利用 Cre/LoxP 系统建立眼组织特异性 Smad4 基因敲除小鼠并进行初步表型分析。

方法: 通过 PAX6 启动子驱动的 Cre 转基因小鼠 (Le-Cre) 作为介导敲除的工具鼠, 将其与 Smad4 条件基因小鼠 (Smad4fl/fl) 结合获得 Le-Cre 特异性 Smad4 基因敲除小鼠或变异小鼠 (Le-Cre; Smad4fl/fl)。为了证实条件性基因敲除的特异性及有效性, 通过 PCR 技术对小鼠或鼠胚进行了相关基因分析, 特定组织绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达及 Smad4 蛋白的检测, 同时利用 ROSA26 报导基因小鼠藉 LacZ 染色显示 Le-Cre 在眼组织的表达; 并对 Smad4 变异小鼠的表型进行了观察。

结果: 早在 E10.0 左右, 鼠胚晶状体位置及眼周外胚层发现强荧光的 GFP 表达, 表明 Le-Cre 明确出现在特定的靶组织。通过小鼠基因型分析, 确定了小鼠或鼠胚是否携带 Cre 重组酶基因、Smad4 条件性等位基因和/或 Rosa 报导基因, 对小鼠晶体 DNA 的基因分析也证实 Smad4 基因在某些特异性眼组织内得到剔除。通过在 Cre 转基因小鼠导入报导基因, 并藉 LacZ 染色对 Cre 重组酶的表达进行

检测,显示了 Cre 重组酶的时空表达及其表达的组织特异性。Smad4 免疫组化染色显示,在正常发育胚鼠眼可见广泛的 Smad4 表达,早期主要存在于胞浆,随着胚眼发育向核内转移;而在 Smad4 变异鼠胚眼,结果表明 Smad4 在 Cre 重组酶所表达的组织内缺乏表达。观察发现 Smad4 变异鼠可以顺利存活,但表现出眼球缩小、眼窝凹陷、眼睑畸形开放、闭合不能及眼周毛发脱失的外观。

结论:通过基因和蛋白水平的检测证实了 Le-Cre;Smad4 基因敲除鼠的建立及 Smad4 在变异小鼠中表达的缺乏。Smad4 在眼组织的敲除导致了眼及附属器的明显异常,为深入了解眼球发育及 Smad4 对其影响的机制提供了一个可信的动物模型。

关键词:Smad4;条件性基因敲除;Le-Cre;报告基因;眼表型 DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.01.05

引用:刘瑛,林丁.条件性 Smad4 基因敲除鼠模型的建立和鉴定及初步表型.国际眼科杂志 2014;14(1):17-22

0 引言

Smad4 是 Smads 家族成员之一,是转导 TGF- β 信号的重要胞浆内信号级联分子,它与活化的受体激活型 Smad4 分子形成复合物,移位至细胞核,与其它转录因子协同作用,调节 TGF- β 应答基因的转录^[1]。Smad4 基因被完全敲除后导致动物在胚胎期即死亡^[2],因此无法对其展开进一步的研究,条件性基因敲除技术的出现解决了动物致死性难题,允许对该基因的功能进行时空特异性的在体研究^[3]。目前国际上对 Smad4 在眼部发育中的作用研究几乎一片空白,国内更是未有开展,而在其它组织器官发育中的研究表明,该基因的组织特异性敲除会导致其相应组织发育的异常^[4-11]。因此我们拟采取条件性基因敲除的方法,使 Smad4 基因的失活仅局限于眼部特定组织,以便于单纯研究其对眼部发育的影响。本研究利用 Cre/LoxP 系统,通过 Smad4fl/fl 小鼠^[3]和 Le-Cre(Lens ectoderm specific Cre)转基因小鼠^[12]的结合建立 Le-Cre;Smad4fl/fl 的条件性基因敲除小鼠模型。Le-Cre 转基因小鼠携带 Cre-IRES-GFP 基因盒,可通过绿色荧光蛋白(GFP)检测 Le-Cre 的组织特异性表达^[13,14]。本研究还使用了 ROSA26 报告基因,通过 LacZ 染色反映 Le-Cre 表达的特异性。

1 材料和方法

1.1 材料 本实验中所用动物遵循眼及视觉科学研究动物使用声明。Smad4fl/fl 小鼠由美国南加州大学 Dr. Xun Xu 实验室提供,PAX6 启动子控制下的 Le-Cre 转基因小鼠来自美国华盛顿大学 Dr. David Beebe 实验室,ROSA26 报告基因小鼠 R26R 品系购自美国 Jackson 公司。Le-Cre 的小鼠与 Smad4fl/fl 小鼠交配产生 Le-Cre;Smad4fl/+ 小鼠,Le-Cre;Smad4fl/+ 小鼠继而再与 Smad4fl/fl 小鼠交配产生 Le-Cre;Smad4fl/fl 小鼠,即研究所需要的条件性 Smad4 基因敲除小鼠(Smad4 CKO 小鼠)。Smad4fl/fl 小鼠作为对照,即 Smad4 野生鼠(Smad4 WT);R26R 转基因小鼠与 Le-Cre 转基因小鼠交配后其后代中包含携带 Le-Cre;R26R 双转基因胚鼠,Le-Cre 转基因小鼠或 R26R 转基因小鼠作为阴性对照。胎龄以阴道栓子的检查为基础确定,该日中午 12:00 为孕 0.5d,记为 E0.5;新生小鼠以出生当日记作 P0,以此类推。

1.2 方法

1.2.1 小鼠或胚鼠基因组 DNA 的提取及基因型检测 按常规提取小鼠或胚鼠的基因组 DNA;PCR 分别扩增 Cre、Smad4 及 ROSA26,扩增条件如下:(1)Cre 和 Smad4:预变性 94 $^{\circ}$ C,3min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30s;56 $^{\circ}$ C 复性 30s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30s 进行 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min,4 $^{\circ}$ C 保温;(2)R26R:58 $^{\circ}$ C 复性 30s,余同上。扩增引物序列见表 1。PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳后以紫外凝胶成像及分析系统照相记录。

1.2.2 组织学检查 于解剖显微镜下获取适当胎龄的小鼠胚胎头部,于 40g/L 的多聚甲醛中 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片 7.5 μ m 厚,常规 HE 染色观察形态学。

1.2.3 LacZ 染色 LacZ 染色液配制:溶液 1:2mmol/L 氯化镁,0.1g/L 脱氧胆酸钠,0.2g/L NP-40,PBS(pH 7.0~7.2);溶液 2:新鲜配制每 165mg 铁氰化钾溶于每 1mL 水中;溶液 3:新鲜配制每 210mg 亚铁氰化钾溶于每 1mL 水中;染色液:溶液 1 与 X-GAL 以 19:1 混匀,每毫升混合液加入 0.05mL 溶液 2,混合后上述混合液每毫升加入 0.045mL 溶液 3,混匀后调定 pH=7.0。

取适当孕期且其后代可能携带 LacZ 报告基因的母鼠,解剖显微镜下取胚鼠,剥离胚膜备 DNA 分析用;室温下于 40g/L 甲醛中固定 1~2h,染色液室温孵育过夜,PBS 浸洗终止反应;显微镜观察并拍照后组织定向包埋,冰冻切片 7.5 μ m 厚,室温下干燥 20min,PBS 洗后以核固红溶液染色 2min,PBS 洗后以封片剂封片,光学显微镜下观察并照相。

1.2.4 免疫组化 石蜡切片常规脱蜡至水,10mmol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0)微波抗原修复,30mL/L 甲醇-过氧化氢溶液室温下孵育 10min 阻断内源性过氧化物酶,抗小鼠一抗孵育:Smad4(1:100),最终以 DAB 显色,光学显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 Smad4 条件性基因敲除鼠及转基因鼠的基因型鉴定 为证实 Cre 在发育中的晶状体外胚层的表达,我们检测了晶状体外胚层特异性 GFP 的表达。早在 E10.0 左右,内凹的晶状体及眼周外胚层可见强荧光 GFP 表达(图 1A~D),暗示 Cre 已明确表达于特定靶组织继而发挥其可能的基因删除作用。

PCR 基因型分析:Le-Cre 的转基因阳性条带为一条 380 bp 大小的片段(图 1E)。Smad4 由两对引物 a 和 c 及 a 和 b 进行 PCR 扩增,后者扩增 fl 等位基因条带和野生条带。如图 1F 所示:左二左三两泳道上方条带代表 fl 等位基因,下方条带代表野生条带,提示该小鼠基因型为 Smad4fl/+;右一泳道表现为单独一条 450bp 的电泳条带,代表基因型为 Smad4fl/fl 的小鼠。Smad4a/c 引物适用于 Le-Cre;Smad4fl/fl 中重组酶所表达组织的剔除条带检测,可进一步证实 Cre 介导的 Smad4 条件性敲除是否完全。Smad4 变异型只有一条 500bp 的剔除条带(图 1G 箭头所示),暗示 Smad4 已经被 Cre 完全切除,而野生型则为一条 390bp 的野生条带(图 1G 短箭所示)。

R26R 基因型分析可以帮助我们确定是否胚鼠携带报告基因,R26R 引物 1 与 2 合成转基因条带,引物 1 与 3 合成野生型条带。如图 1H 所示,标准条带左侧的 337bp 条带为转基因片段,而右侧 598bp 条带为野生条带,胚鼠只

表 1 扩增引物序列

Cre1: 5'-TAA TCG CCA TCT TCC AGC AG-3'	Cre 2: 5'-CTC TGG TGT AGC TGA TGA TC-3'
R26R1: 5'-AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'	Smad4 a: 5'-AAG AGC CAC AGG TCA AGC AG-3'
R26R2: 5'-GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC-3'	Smad4 b: 5'-GGG CAG CGT AGC ATA TAA GA-3'
R26R3: 5'-GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG-3'	Smad4 c: 5'-GAC CCA AAC GTC ACC TTC AG-3'

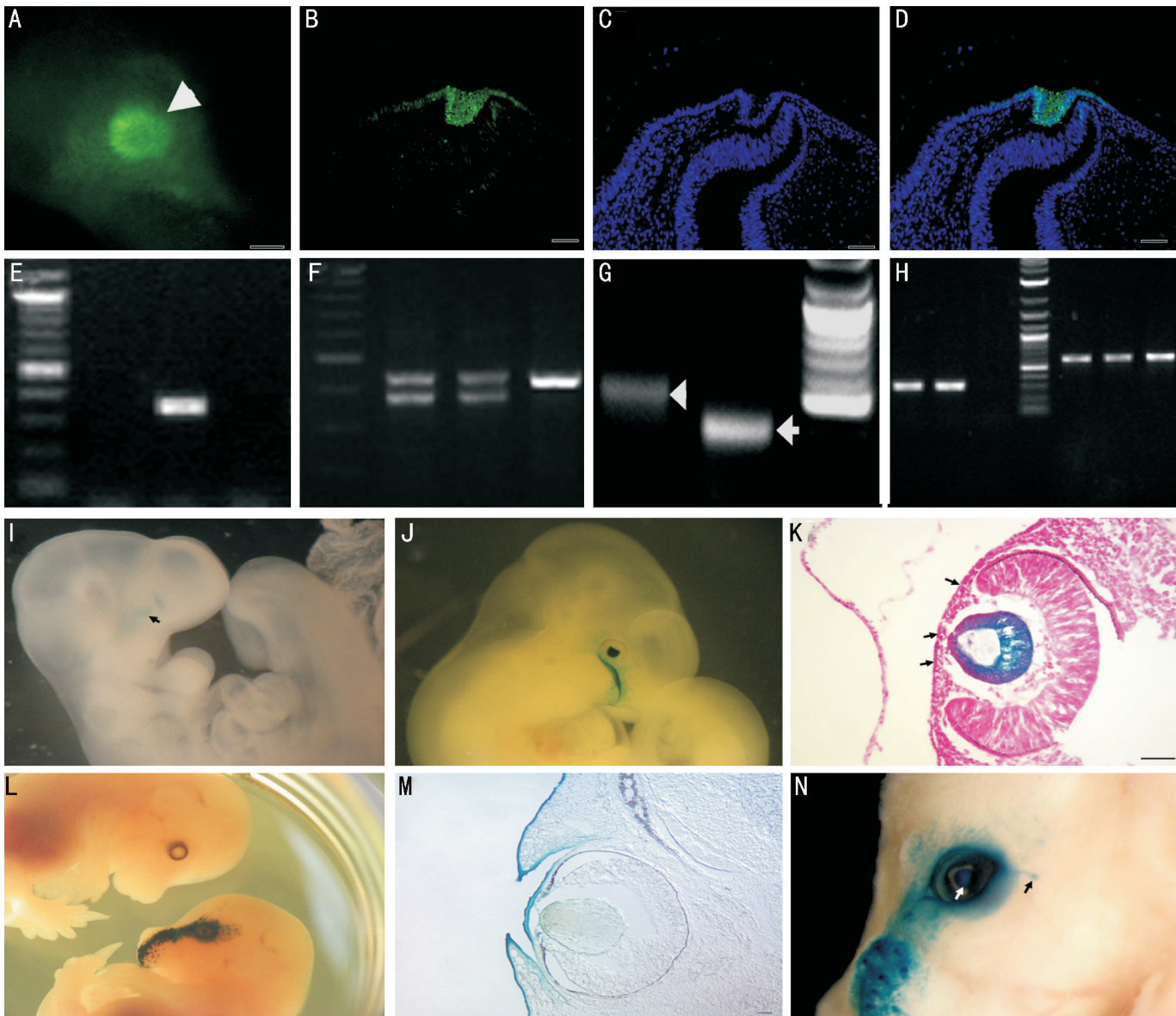


图 1 Le-Cre 绿色荧光蛋白表达、各基因型鉴定及 LacZ 染色鉴定 A ~ D: E10.0 左右的晶体泡发源位置及眼周外胚层可见绿色荧光蛋白的表达(放大倍率×20); E: 小鼠鼠尾组织 DNA 经 PCR 扩增 Cre 后电泳条带; F: 小鼠鼠尾组织 DNA 经 PCR 扩增 Smad4 后电泳条带; 上方为 β 条件性等位基因条带, 下方为野生条带; G: 小鼠晶状体 DNA 经 PCR 扩增 Smad4 后电泳条带; 左一泳道为 Smad4 变异鼠的剔除条带, 左二 Smad4 野生鼠的野生条带; H: 小鼠鼠尾组织 DNA 经 PCR 扩增 ROSA26 后电泳条带; DNA ladder 左侧为转基因条带, 右侧为野生条带。I ~ N: LacZ 染色鉴定; I: E10 左右的双转基因小鼠在晶体板发生位置出现蓝染; J, K: E11.0 左右晶体泡及眼周外胚层组织的 LacZ 染色(K 放大倍率×20); L, M: E14.5 的双转基因小鼠 LacZ 染色与阴性对照形成明显对比, 此时染色出现在晶状体、角膜、结膜、眼睑及眼周外胚层组织(M 放大倍率×10); N: E15.5 左右的双转基因小鼠 LacZ 染色包括泪腺芽(如黑箭头所示)。

要有一条 ROSA26 等位基因即可表达报告基因而显示 Cre 重组酶的表达。

2.2 Le-Cre; R26R 双转基因胚鼠的鉴定 如图 1I 所示, LacZ 染色发现早在 E10.0 左右的双转基因小鼠其晶体板发生的位置即出现蓝色特异性染色, 但染色很浅, 可能与此时 β -半乳糖苷酶表达较少有关。E11.0 左右的双转基因小鼠其晶体泡此时可以分辨, 出现特异性蓝染, 眼周外胚层也因 Cre 重组酶的表达出现蓝染, 此时已可辨认视网

膜色素层, 但未见染色(图 1J); 切片显示染色主要分布于晶体泡细胞, 表面外胚层细胞可见散在阳性染色(图 1K)。E14.5 的双转基因小鼠 LacZ 染色显示出晶体上皮、角膜、结膜、眼睑表皮及眼周皮肤的特异性蓝染, 而对照小鼠无任何染色(图 1L, M)。E15.5 的双转基因小鼠 LacZ 染色除了上述组织蓝染外, 泪腺芽亦出现染色(图 1N)。

2.3 Smad 在正常小鼠发育眼中的表达 早于 E10.5, Smad4 广泛分布于晶体泡和以后的角膜外胚层以及视泡

Smad4 WT

Smad4 CKO

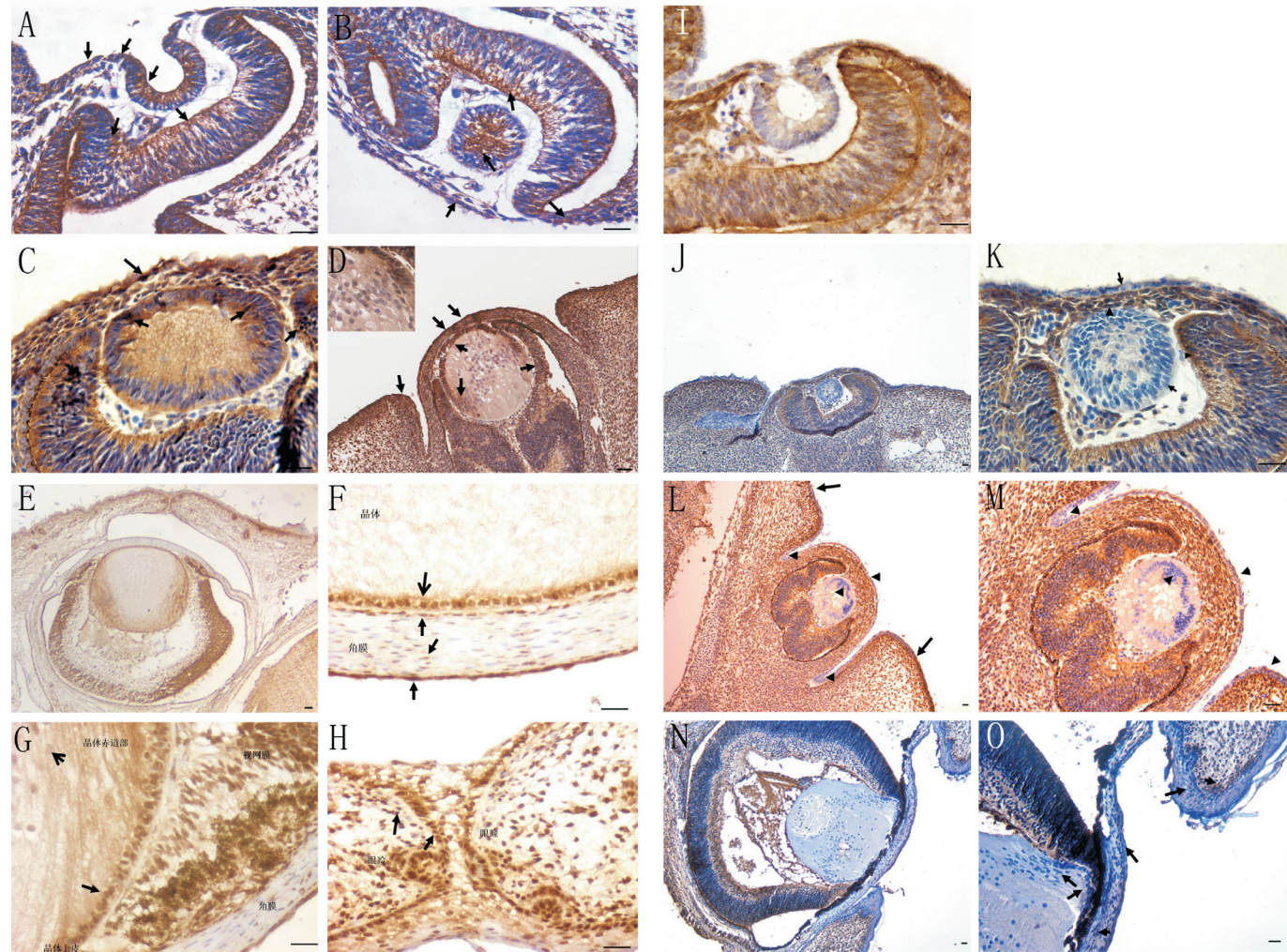


图2 Smad4 蛋白在野生型及变异小鼠胚眼发育中的表达 A~H:野生型小鼠胚眼 Smad4 的表达;A,B:在 E10.5 左右的胚胎中, Smad4 广泛表达于晶体、视泡、视网膜、表皮外胚层及眼周间质,染色主要定位于胞浆;C:E12.0,部分细胞胞核内出现 Smad4 染色(如 箭所示);D:E14.5 左右,在以上眼组织的 Smad4 免疫反应主要表现在胞核,而在晶体上皮细胞核染色较强,分化纤维内核染色较弱; E,F:E18.0,晶体上皮、角膜外胚层、内皮及部分角膜细胞胞核仍有 Smad4 强染色;G:随着晶体上皮细胞退出晶体赤道部移行区,其 Smad4 染色也随之减弱(如短箭所示);H:眼睑间质和上皮细胞胞核亦可见 Smad4 强染色;I~O: Smad4 变异鼠胚眼 Smad4 蛋白表达的 改变;I:E10.5,Smad4 在晶体泡和未来的角膜外胚层以及眼周外胚层染色阴性,而视网膜及中胚层组织染色阳性;J,K:E12.0,晶状 体和角膜外胚层缺乏 Smad4 蛋白的表达(长箭所示),视网膜及角膜基质仍可见 Smad4 强染色(箭头所示);L,M:E14.5,晶状体、角膜 外胚层、结膜和眼睑外胚层无 Smad4 阳性染色(箭及箭头所示);而在角膜基质,视网膜及眼睑间叶的细胞核内可见 Smad4 强染色;N, O:E18.0,晶状体、角膜外胚层和眼睑外胚层同样未见 Smad4 免疫染色(长箭所示),而角膜基质细胞和眼睑间质细胞仍有强的荧光染 色主要集中在胞核(短箭所示)。注:比例尺:100 μ m。

和眼周外胚层(图 2 A,B),免疫染色显示此阶段 Smad4 蛋白大部分位于细胞胞浆内。E12.0 左右时, Smad4 染色从胞浆向胞核转移,部分细胞胞核内出现移行的 Smad4(图 2C)。E14.5 左右 Smad4 的免疫活性主要存在于如角膜上皮、基质及内皮的细胞核内,晶状体上皮细胞的核内有较强染色,而分化的纤维细胞核内则染色变弱,甚至消失(图 2D),反映了晶状体上皮细胞在向纤维细胞分化的同时 Smad4 的表达逐渐减少;眼睑上皮和间质细胞的胞核也有强阳性染色。E18.0 时,Smad4 仍然表达于晶状体上皮细胞胞核(图 2E, F),但在晶状体赤道部上皮移行区,细胞核染色强度逐渐降低;角膜外胚层、内皮及部分角膜细胞胞核可见强染色(图 2G);眼睑间叶细胞和上皮细胞胞核仍有 Smad4 强荧光染色(图 2H)。

2.4 Smad4 变异鼠胚眼发育中 Smad4 蛋白表达的改变 E10.5 左右,Smad4 在晶状体泡和以后的角膜外胚层以及眼周外胚层(图 2I)均缺乏表达。此后如图 2 右侧 Smad4CKO 部分所示的 E12.0, E14.5 及 E18.0 三个不同的胎龄阶段(图 2J~O),变异胚鼠其晶状体、角膜上皮、结膜及眼睑表皮均无 Smad4 的表达,而上述组织均为 Cre 重组酶在 Pax6 启动子驱动下表达的位置,因此也间接证实了 Cre 重组酶条件性切除 Smad4 的眼组织特异性和有效性。同时在其它表达 Smad4 的组织,其 Smad4 染色模式与野生鼠胚眼并无区别,即早期主要在胞浆内表达,而随发育逐渐从胞浆内转移至胞核。

2.5 Smad4 条件性基因敲除后的初步眼表型 P10 的变异鼠与野生鼠的外观比较,此时野生鼠上下睑尚未分离,

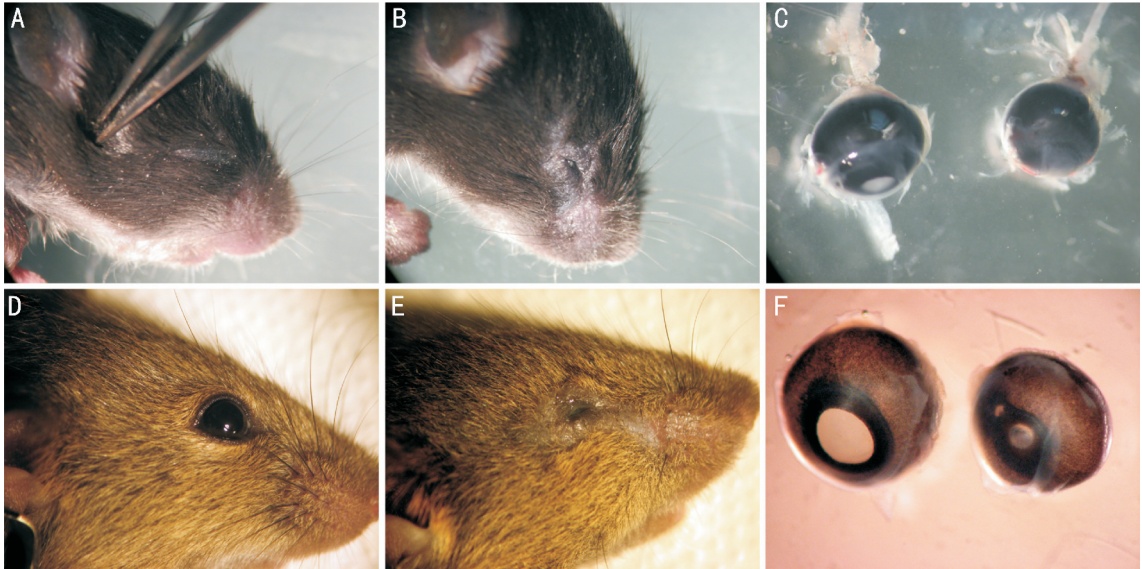


图3 Smad4 变异小鼠与野生小鼠眼外观比较 A;P10 野生小鼠眼;其上下睑开始分离,但睑裂尚未出现;B: P10 变异小鼠眼睑畸形分开、眼睑缩小、眶周毛发脱失;C:P10 的眼球:左侧来自野生小鼠,右侧来自变异小鼠,变异型者眼球变小,难以窥清眼内;D:成年野生小鼠;E:成年变异小鼠;眼窝凹陷、眼睑及睑裂缩小、眼表组织模糊;F:分离后的成年小鼠眼球:左侧来自野生小鼠,右侧来自变异小鼠。

仅能分辨睑裂,而变异鼠睑裂畸形分开,眼睑缩小,眼球也较正常明显变小,眼眶周围延伸至嘴部之毛发缺失,角膜混浊,难以透见眼内组织(图3A~C)。同时成年小鼠两者也有显著不同。与野生型相比,变异小鼠眼窝凹陷,眼睑及睑裂缩小,眼睑运动不能,眼球显著缩小,眼表结构欠清,眶周及至嘴部的皮肤毛发脱失(图3D~F)。

3 讨论

条件性基因敲除是将对某个基因的修饰限制于某些特定类型的细胞/组织或发育的某一特定时段,通常是在常规的基因敲除基础上,利用重组酶 Cre 介导的位点特异性重组技术,在基因修饰的时空范围上设置一个可调控的“按钮”,从而使对小鼠基因组的修饰处于一种时空可控状态^[15,16]。本研究利用 Cre/LoxP 系统成功构建了 Smad4 条件性基因敲除小鼠,通过 Pax6 第一启动子(P0)驱动 Cre 重组酶在眼外胚层衍生组织(晶状体、角膜上皮、结膜、眼睑表皮及泪腺)特异性表达,从而选择性删除这些组织细胞中的 Smad4 基因,研究 Smad4 基因对这些眼组织发育的影响,这与国内研究 Smad4 对内耳前庭系统的影响相似^[1,4,5]。

我们通过对小鼠基因型的分析,明确了小鼠或鼠胚是否携带 Cre 重组酶基因、Smad4 条件性等位基因和/或 ROSA26 报告基因,而对小鼠晶状体 DNA 的基因分析也证实 Smad4 基因在某些特异性组织如晶状体内得到剔除,但基因水平的检测尚不能完全证实 Cre 转基因是否得到正确表达,Smad4 基因是否被剔除后不表达相应的蛋白,也不能保证其表达或不表达的部位是否恰当,而且限于条件,某些部位无法取 DNA 进行基因分析,因此我们在 Cre 转基因小鼠内导入报告基因 ROSA26,并通过 LacZ 染色对 Cre 重组酶的表达进行检测。在 Le-Cre 重组酶表达的组织细胞内,重组酶识别 ROSA26 基因强终止子两侧的 LoxP 位点,并敲除其间的强终止子,LacZ 序列在细胞内表达

β -半乳糖苷酶,当加入外源性的 β -半乳糖苷酶作用底物 X-gal 时,表达该酶的组织出现蓝染,意味着组织内有 Le-Cre 重组酶的特异性表达,故通过 LacZ 染色可反映 Le-Cre 重组酶表达的组织特异性^[10]。我们的 LacZ 染色结果较好地显示了 Cre 重组酶于眼部组织的时空表达,同时也确定了其表达的组织特异性。

Cre 重组酶的特异性表达能否真正介导 Smad4 基因的条件性敲除,其关键仍在于 Smad4 是否在相应组织得以表达。且 Smad4 眼部组织特异性失活后,首先必须区分所出现的表型是归因于细胞的自发或原发效应亦或为非自发或继发的效应,因此我们探查了 Smad4 蛋白在整个眼发育过程中的表达模式。在正常发育胚鼠眼,组织内可见广泛的 Smad4 表达,早期主要存在于胞浆,随着胚眼发育而向核内转移,完成其信号转导的使命;而在 Smad4 变异鼠胚眼,实验结果表明 Smad4 在 Cre 重组酶所表达的组织内缺乏表达,因此也证实了 Cre 重组酶在 Smad4 变异鼠中确实发生了 Smad4 基因在某些特定组织的敲除,同时间接证明 Smad4 变异鼠所出现的表型应归因于 Smad4 基因在相应组织的敲除。

通过对 Smad4 变异鼠的初步观察,我们发现其胚鼠可成功孕育,成鼠可以顺利存活,但表现出眼球缩小、眼表组织破坏、眼窝凹陷、眼睑畸形开放、闭合不能及眼周毛发脱失的外观。总的来说,Smad4 在眼组织的敲除导致了眼及附属器的明显异常,也为更深入了解眼球发育及 Smad4 对其影响的机制提供了一个可信的动物模型。

参考文献

- 1 侯昭辉,杨仕明,郭维,等. Smad4 条件基因敲除小鼠听功能初步研究. 中华耳科学杂志 2006;4(3):176-180
- 2 Yang X, Li C, Xu X, et al. The tumor suppressor Smad4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm incution in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(7):3667-3672
- 3 Yang X, Li C, Herrera PL, et al. Generation of Smad4/Dpc4

conditional knockout mice. *Genesis* 2002;32(2):80-81
4 侯昭辉,杨仕明,胡吟燕,等. SMAD4 基因在野生型和基因缺陷小鼠耳蜗内的定位和分布. *中华耳科学杂志* 2006;4(3):168-171
5 邓安春,杨仕明,孙建和,等. Smad4 条件基因敲除小鼠前庭终器形态学研究. *中华耳科学杂志* 2006;4(3):181-185
6 Xu X, Han J, Ito Y, *et al.* Ectodermal Smad4 and p38 MAPK are functionally redundant in mediating TGF- β /BMP signaling during tooth and palate development. *Dev Cell* 2008; 15(2): 322-329
7 Gao Y, Yang G, Weng T, *et al.* Disruption of Smad4 in odontoblasts causes multiple keratocystic odontogenic tumors and tooth malformation in mice. *Mol Cell Biol* 2009; 29(21): 5941-5951
8 Rajagopal R, Huang J, Dattilo LK, *et al.* The type I BMP receptors, Bmpr1a and Acvr1, activate multiple signaling pathways to regulate lens formation. *Dev Biol* 2009; 335(2): 305-316
9 Azhar M, Wang PY, Frugier T, *et al.* Myocardial deletion of Smad4 using a novel α skeletal muscle actin Cre recombinase transgenic mouse causes misalignment of the cardiac outflow tract. *Int J Biol Sci* 2010; 20(6): 546-555

10 张鹏. 平滑肌细胞特异性 Smad4 基因敲除鼠的建立. 兰州大学 2010
11 邓安春,杨仕明,黄德亮,等. Smad4 条件基因敲除小鼠内耳前庭的组织学变化. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志* 2012;47(7):575-580
12 Ashery-Padan R, Marquardt T, Zhou X, *et al.* Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* 2000;14(21): 2701-2711
13 Pan Y, Carbe C, Powers A, *et al.* Bud specific N-sulfation of heparin sulfate regulates Shp2-dependent FGF signaling during lacrimal gland induction. *Development* 2008; 135(2): 301-310
14 Williams SC, Altmann CR, Chow RL, *et al.* A highly conserved lens transcriptional control element from the Pax-6 gene. *Mech Dev* 1998; 73(2): 225-229
15 Muller U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech Dev* 1999; 82(1-2): 3-21
16 易建红. 基因打靶技术在小鼠中的研究及在畜牧中的作用. *中国畜禽种业* 2009;23(7):146-149

COOC 2014 会议通知

由上海市医学会眼科分会、全国十省医学会眼科分会、复旦大学附属眼耳鼻喉科医院、温州医科大学眼视光学院和中国科学技术协会中国国际科技会议中心共同主办;复旦大学附属眼耳鼻喉科医院、中国国际科技会议中心和上海瑞欧展览服务有限公司共同承办的“第十四届国际眼科学学术会议”和“第十四届国际视光学学术会议”将于2014年3月27日-30日在上海跨国采购会展中心(上海市普陀区中江路35号)举行。

来自中国、美国、亚欧部分国家的眼科学领域和视光学领域的医生、专家、学者和知名厂商将云集上海出席本届会议。注册本届会议并符合相关要求的参会代表可获得国家级 I 类继续教育学分 8 分,参加眼科继续教育学习班者可获得国家级 I 类继续教育学分 10 分。同期将举行“第三届国际角膜塑形学术大会”,欢迎国内外医生踊跃投稿、注册参会。

论文投稿截止日期为2014年2月16日。论文投稿只需论文摘要。

摘要要求:① 500字以内的规范格式书写。

② 四段式基本形式(包括目的、方法、结果、结论)。

③ 投稿方式:在线上传。

大会秘书处:上海瑞欧展览服务有限公司,联系人:汤雅萍老师、黄嘉菲老师

地址:上海市中山北路2790号1007室,邮编:200063

电话:021-52665618,传真:021-52668178, E-mail:realexp@cooc.org.cn

详情,请登陆大会官方网站:www.cooc.org.cn