

# 圆锥角膜相关成纤维细胞的培养与鉴定

王亚妮 刘先宁 王小东 高伟 银勇 朱秀萍

西安市第一医院眼科 陕西省眼科研究所 陕西省眼科学重点实验室 陕西省眼科疾病临床医学研究中心 西北大学附属第一医院 710002

通信作者:朱秀萍,Email:xiuping\_zhu@126.com

**【摘要】** 目的 分离、培养并鉴定人圆锥角膜相关成纤维细胞(HKCs)。方法 采用组织块贴壁法培养 HKCs 和 正常人角膜成纤维细胞(HCFs),倒置相差显微镜和电子显微镜下分别观察细胞形态和超显微结构,细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞增生,Western blot 法检测成纤维细胞标志性蛋白  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)及  $\alpha$ 1-1 型胶原蛋白(COL1A1)和  $\alpha$ 1-3 型胶原蛋白(COL3A1)蛋白的表达水平。结果 与 HCFs 相比,HKCs 生长速度较快,胶原纤维变细减少,线粒体肿大,嵴消失,高尔基体明显扩张,内质网严重肿胀。培养后不同时间点 2 种角膜成纤维细胞 A 值比较,差异均有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 5\ 023.13, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 38\ 518.16, P < 0.01$ ),其中同一时间点 HKCs 细胞 A 值均明显大于 HCFs 细胞 A 值,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。HKCs 和 HCFs 中  $\alpha$ -SMA 的相对表达量分别为  $120.00 \pm 5.77$  和  $100.00 \pm 0.00$ ,COL3A1 的相对表达量分别为  $158.33 \pm 4.41$  和  $100.00 \pm 0.00$ ,COL1A1 相对表达量为  $88.33 \pm 1.67$  和  $100.00 \pm 0.00$ ,HKCs 中  $\alpha$ -SMA 和 COL3A1 的相对表达量均较 HCFs 明显升高,HKCs 中 COL1A1 的相对表达量较 HCFs 明显降低,差异均有统计学意义( $t = -3.46, P < 0.05; t = -13.23, P < 0.01; t = 7.00, P < 0.05$ )。结论 成功培养并鉴定 HKCs,该细胞适用于建立体外圆锥角膜细胞模型。

**【关键词】** 圆锥角膜;成纤维细胞;细胞培养;细胞鉴定

**基金项目:** 陕西省自然科学基金面上项目(2017JM8040);陕西省重点研发计划项目(2018ZDXM-SF-056)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.02.002

## Cultivation and identification of keratoconus associated-fibroblasts

Wang Yani, Liu Xianning, Wang Xiaodong, Gao Wei, Yin Yong, Zhu Xiuping

Xi'an No. 1 Hospital, Shaanxi Ophthalmological Institute, Shaanxi Key Lab of Ophthalmology, Clinical Research Center for Ophthalmology Diseases of Shaanxi Province, First Affiliated Hospital of Northwest University, Xi'an 710002, China  
Corresponding author: Zhu Xiuping, Email: xiuping\_zhu@126.com

**[Abstract] Objective** To culture and identify corneal fibroblasts from human keratoconus patients (HKCs).

**Methods** HKCs and corneal fibroblasts from human healthy controls (HCFs) were cultured by tissue block adherence method. Cellular morphology and ultrastructure were observed by inverted phase contrast microscope and electron microscopy respectively. Cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay.  $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) and collagen type 3 alpha 1 (COL3A1) protein expression levels were detected by Western blot. This study protocol was approved by Ethic Committee of Xi'an No. 1 Hospital (No. 1504). **Results** Compared with HCFs, HKCs showed several distinguishing properties. First of all, its growth speed was faster, with collagen fibers decreased and attenuated. At the same time, mitochondrion swelled and mitochondrial cristae disappeared. Additionally, Golgi apparatus presented significant expansion and endoplasmic reticulum displayed severe swelling. There were statistically significant differences in A values between the two kinds of corneal fibroblasts at different time points after culture ( $F_{\text{group}} = 5\ 023.13, P < 0.01; F_{\text{time}} = 38\ 518.16, P < 0.01$ ), the A value of HKCs was significantly higher than that of HCFs at the same time point, and the difference was statistically significant (all at  $P < 0.01$ ). The relative expression of  $\alpha$ -SMA, COL3A1 and COL1A1 was  $120.00 \pm 5.77, 158.33 \pm 4.41$  and  $88.33 \pm 1.67$ , respectively in HKCs, the relative expression of  $\alpha$ -SMA, COL3A1 and COL1A1 was  $100.00 \pm 0.00, 100.00 \pm 0.00$  and  $100.00 \pm 0.00$ , respectively in HCFs, the relative expressions of  $\alpha$ -SMA and COL3A1 were significantly increased in HKCs than those in HCFs, the relative expression of COL1A1 was significantly decreased in HKCs than that in HCFs, with significant differences between them ( $t = -3.46, P < 0.05; t = -13.23, P < 0.01; t = 7.00, P < 0.05$ ). **Conclusions** HKCs are cultured and identified, which is suitable for establishing *in vitro* cell model of keratoconus.

**[Key words]** Keratoconus; Fibroblasts; Cell culture; Identification

**Fund program:** Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2017JM8040); Key Research and Development Plan Project of Shaanxi Province (2018ZDXM-SF-056)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.02.002

圆锥角膜是一种急性或持续性角膜扩张性疾病,最终导致高度散光或角膜瘢痕,严重时致盲。圆锥角膜发病通常始于青春期,随着年龄的增长逐渐进展,也可急性发病。由于圆锥角膜早期不易诊断,往往被误诊为近视,并且早期病变组织极难获得,关于其发病机制的研究较少,发病机制尚不清楚<sup>[1]</sup>。圆锥角膜患者角膜超微结构变化提示该病的原发病变可能在角膜基质层,主要是肌成纤维细胞的出现和细胞外基质的合成与降解异常,使角膜胶原蛋白成分和代谢发生改变<sup>[2]</sup>。因此,成功分离培养人圆锥角膜相关成纤维细胞(*corneal fibroblasts from human keratoconus patients*, HKCs)成为进一步明确圆锥角膜发病机制的基础。本研究旨在探索有效分离培养 HKCs 的方法,并将 HKCs 与正常人角膜成纤维细胞(*corneal fibroblasts from human healthy controls*, HCFs)的生物学特性进行比较。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 标本来源** 收集西安市第一医院 2016 年 1 月至 2017 年 1 月收治的 10 例急性圆锥角膜患者行角膜移植术后的角膜标本,标本获取前均获得患者本人同意,并签署知情同意书。正常角膜组织来源于西安市第一医院眼库。本研究经西安市第一医院医学科研伦理委员会批准(批文号:1504)。在无菌条件下切取组织标本,置于预冷磷酸盐缓冲液(*phosphate buffered saline*, PBS)中,于 30 min 内移回实验室。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 最低必需培养液(*Eagle's minimum essential medium*, EMEM)(美国 ATCC 公司);胰蛋白酶、胎牛血清(美国 HyClone 公司);小鼠抗人  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)单克隆抗体(A5228)、小鼠抗人  $\alpha$ 1-1 型胶原蛋白(*collagen type 1 alpha 1*, COL1A1)单克隆抗体(SAB1402151)、小鼠抗人  $\alpha$ 1-3 型胶原蛋白(*collagen type 3 alpha 1*, COL3A1)单克隆抗体(C7805)(美国 Sigma 公司);辣根过氧化物酶(*horseradish peroxidase*, HRP)标记羊抗小鼠多克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司);细胞增生检测试剂盒(*cell counting kit-8*, CCK-8)、电化学发光(*electrochemiluminescence*, ECL)显色试剂盒(上海生工生物工程公司)。CO<sub>2</sub> 培养箱(上海力申科学仪器有限公司);酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);Odyssey 双色红外荧光成像系统(美国 LI-COR 公司)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 HKCs 和 HCFs 的分离、培养及传代** 无菌条

件下,将圆锥角膜患者病变角膜组织和来自眼库的正常角膜组织分别置于含 1 000 U/ml(商品单位)青链霉素 PBS 中,清洗 2 次。显微镜下用刀片分别刮掉上皮和内皮层,基质组织剪成 2 mm×2 mm 大小,均匀平铺于细胞培养皿中,加入约 2 ml EMEM 培养基(含体积分数 10% FBS、质量分数 1% 青链霉素),置于 37 ℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养,每日倒置显微镜下观察细胞生长情况,每周换液 2~3 次。待上述原代细胞长满培养皿底部面积约 80%,进行 1:2 传代培养。用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入质量分数 0.25% 胰蛋白酶约 1 ml 进行消化。显微镜下见细胞质回缩、细胞趋向圆形时,立即加入完全培养基终止消化,吹打混匀制成细胞悬液。离心半径 9 cm,1 000 r/min 离心 5 min,去胰蛋白酶后分 2 个培养皿置于 2 ml EMEM 培养基(含 10% FBS、1% 青链霉素、0.5 mmol/L 维生素 C)中培养,每周换液 2~3 次,持续 4 周。

**1.2.2 HKCs 和 HCFs 的形态学观察** 倒置相差显微镜下观察原代及传代细胞的大小、形态。第 2 代 HKCs 和 HCFs 培养后 4 周,培养细胞已贴壁成膜状,弃去培养液,PBS 清洗 2 遍,用细胞刮铲刮下贴壁细胞置于小离心管中,1 000 r/min 离心 10 min,使细胞成团,戊二醛固定,制备电子显微镜超薄切片,透射电子显微镜下观察细胞的超微结构。

**1.2.3 CCK-8 法检测细胞增生** 取培养 4 周的第 2 代 HKCs 和 HCFs,制备细胞悬液,细胞计数调整密度为  $4 \times 10^3$ /孔,接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l。细胞贴壁后经同步化 24 h,每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ l,继续孵育 3 h,用酶标仪于波长 450 nm 处检测各孔吸光度(A)值,连续 7 d 同一时间点进行观察,每组均设 6 个复孔,重复测量取平均值。

**1.2.4 Western blot 法检测细胞标志物** 取培养 4 周的第 2 代 HKCs 和 HCFs,细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。50  $\mu$ g 总蛋白进行质量分数 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,随后进行 PVDF 转膜。以  $\alpha$ -SMA(1:2 000)、COL1A1(1:2 500)和 COL3A1(1:2 000)小鼠抗人单克隆抗体为一抗,HRP 标记山羊抗小鼠为二抗(1:5 000),采用 ECL 法显色,Odyssey 双色红外荧光成像系统检测,并以  $\beta$ -actin 为内参,计算各目的蛋白相对表达量。

### 1.3 统 计 学 方 法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(美国 IBM 公司)和 GraphPad Prism 5.0(美国 Graphpad 公司)进行统计分析。计量数据资料经 Shapiro-Wallis 检验证实呈正态分布,以 mean $\pm$ SD 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。

培养后不同时间点 2 种角膜成纤维细胞 A 值比较采用重复测量两因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。2 种角膜成纤维细胞中  $\alpha$ -SMA、COL1A1 和 COL3A1 相对表达量的比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 培养细胞的形态学表现

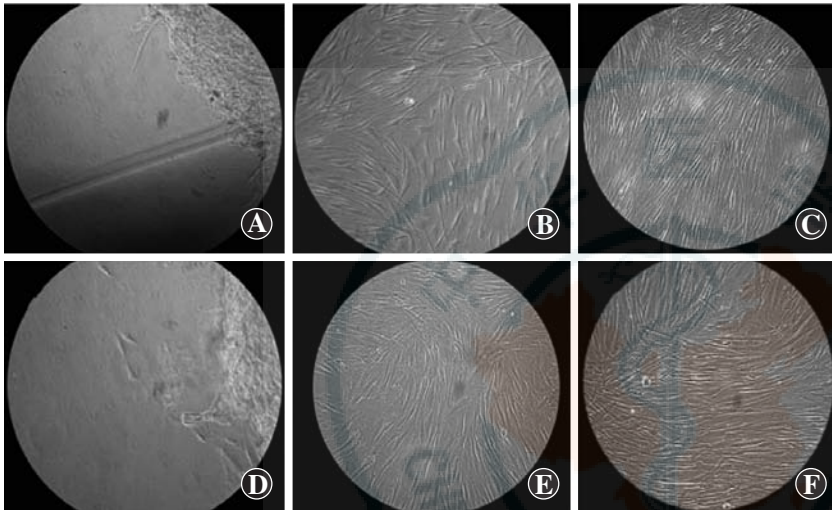


图 1 光学显微镜下培养细胞的形态学表现( $\times 200$ ) A:培养7 d原代 HCFs B:培养14 d原代 HCFs C:培养4周第2代 HCFs D:培养7 d原代 HKCs E:培养14 d原代 HKCs F:培养4周第2代 HKCs

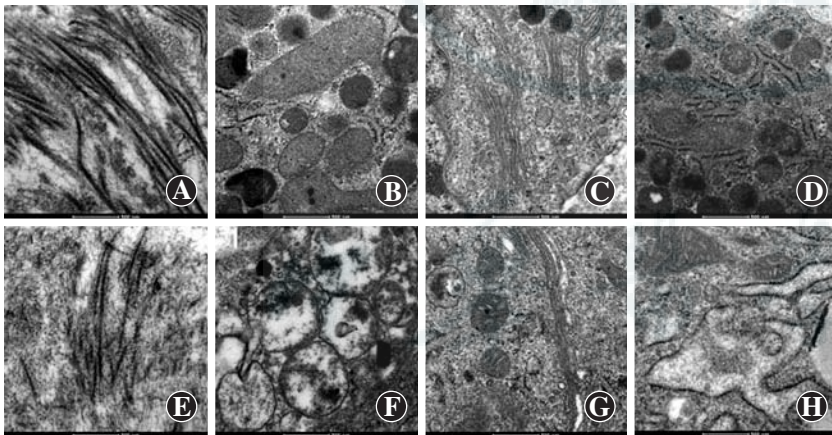


图 2 透射电子显微镜下细胞超微结构表现( $\times 43\ 000$ ) 与 HCFs 相比, HKCs 胶原纤维变细、数目减少,线粒体肿大、嵴消失,高尔基体明显扩张,内质网严重肿胀 A: HCFs 胶原纤维 B: HCFs 线粒体 C: HCFs 内质网 D: HCFs 高尔基体 E: HKCs 胶原纤维 F: HKCs 线粒体 G: HKCs 内质网 H: HKCs 高尔基体

原代培养7 d,组织片周围有新生细胞长出, HCFs 仅伸出少许细胞伪足, HKCs 已有细胞迁移; 培养14 d, 细胞几乎铺满培养皿, HKCs 稍显肿胀, 边缘不规则, 有突起, HCFs 边缘规则, 排列有一定的方向性(图 1)。

与 HCFs 相比, 第 2 代 HKCs 胶原纤维变细, 数量减少, 线粒体肿大、嵴消失, 高尔基体明显扩张, 内质网严重肿胀(图 2)。

### 2.2 人角膜成纤维细胞生长曲线

第 2 代 HKCs 与 HCFs 在同样的培养条件下, 种植细胞数目相同和观察时间相同, 培养 1~2 d 细胞增生较少, 为细胞适应生长期; 3~6 d 细胞量明显增多, 为细胞对数生长期, 第 6 天后, 细胞 A 值出现平台期, 细胞数不变(图 3)。培养后不同时间点 2 种角膜成纤维细胞 A 值比较, 差异均有统计学意义( $F_{\text{组间}} = 5\ 023.13, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 38\ 518.16, P < 0.01$ ), 其中同一时间点 HKCs 细胞 A 值均明显大于 HCFs 细胞 A 值, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 1)。

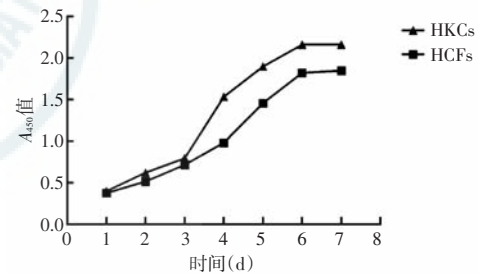


图 3 人角膜成纤维细胞生长曲线 培养 1~2 d 细胞增生较少, 3~6 d 细胞量明显增多, 第 6 天后, 细胞 A 值出现平台期, 细胞数不变 HKCs: 人圆锥角膜相关成纤维细胞; HCFs: 正常人角膜成纤维细胞

### 2.3 2 种细胞中 $\alpha$ -SMA、COL1A1 和 COL3A1 相对表达量的比较

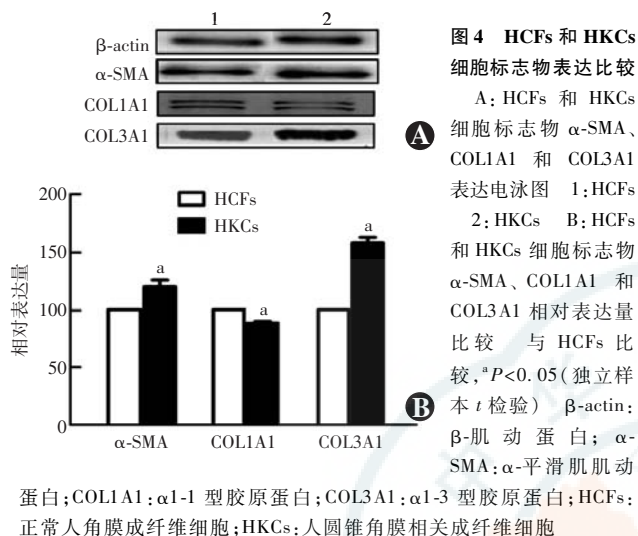
Odyssey 软件测定  $\alpha$ -SMA、COL1A1 和 COL3A1 相对灰度值结果显示, HKCs 和 HCFs 中  $\alpha$ -SMA 的相对表达量分别为  $120.00 \pm 5.77$  和  $100.00 \pm 0.00$ , COL3A1 的相对表达量分别为  $158.33 \pm 4.41$  和  $100.00 \pm 0.00$ , COL1A1 相对表达量为  $88.33 \pm 1.67$  和  $100.00 \pm 0.00$ , HKCs 中  $\alpha$ -SMA 和 COL3A1 的相对表达量均较 HCFs 明显升高, HKCs 中 COL1A1

表 1 培养后不同时间点 2 种角膜成纤维细胞 A 值比较 (mean $\pm$ SD)

细胞类型	样本量	培养后不同时间点角膜成纤维细胞 A 值						
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
HCFs	10	0.37 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.02	1.46 $\pm$ 0.02	1.82 $\pm$ 0.02	1.85 $\pm$ 0.02
HKCs	10	0.40 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.53 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.90 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	2.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

注:  $F_{\text{组间}} = 5\ 023.13, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 38\ 518.16, P < 0.01$ . 与 HCFs 比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$  (重复测量两因素方差分析, LSD-t 检验) HCFs: 正常人角膜成纤维细胞; HKCs: 人圆锥角膜相关成纤维细胞

的相对表达量较 HCFs 明显降低,差异均有统计学意义( $t = -3.46, P < 0.05; t = -13.23, P < 0.01; t = 7.00, P < 0.05$ ) (图 4)。



### 3 讨论

圆锥角膜主要发生于青少年群体,会引起致盲致残的严重后果。Bykhovskaya 等<sup>[3]</sup>报道,圆锥角膜的发病率约为 1/2 000,中国尚缺乏相关的流行病学资料。北京地区圆锥角膜的发病率为 1/2 500<sup>[4]</sup>;谢立信等<sup>[5]</sup>调查结果显示,自 2000 年起,山东省眼科研究所收治的圆锥角膜患者呈直线增多,位居角膜移植术第 2 位。圆锥角膜眼早期可通过配戴近视镜片或硬性透气性角膜接触镜加以控制,然而并不能完全阻止疾病发展;近年来,国际上应用核黄素紫外光胶原交联术治疗圆锥角膜取得了一定的疗效,但急性发作期及晚期圆锥角膜患者发生角膜水肿或瘢痕形成,造成视力障碍,只能通过角膜移植手术恢复,术后视力往往不佳<sup>[6-9]</sup>,加之角膜移植材料匮乏,患者不能得到及时治疗,是临床上棘手的眼病之一。圆锥角膜的发病机制一直是临床上多年尚未解决的难题,其相关的发病机制、预防疾病进展的措施等均待深入研究<sup>[10]</sup>。

圆锥角膜动物模型尚不成熟,目前采用的圆锥角膜小鼠模型是基因突变造成的角膜炎引起的继发性角膜扩张,与圆锥角膜的发病机制、疾病进展过程等方面有很大不同,并不能被认为是真正的圆锥角膜动物模型<sup>[11]</sup>。从新鲜的活体组织分离培养获得的细胞抗原丢失少,仍保留原来的遗传特性,与体内细胞微环境更接近,因此,从圆锥角膜患者角膜组织中分离纯化 HKCs 是研究该病发病机制的基础<sup>[12-13]</sup>。本研究从圆锥角膜患者角膜组织和正常人角膜组织中分别成功分

离、培养了 HKCs 和 HCFs。由于成纤维细胞需要附着因子黏附,并且在表面生长扩散,其生长密度很低,不需要高浓度的营养物质,因此本研究中采用含 10% 胎牛血清的 EMEM 培养基。成纤维细胞合成和分泌胶原蛋白,维生素 C 不仅是主要的抗氧化剂,也是胶原合成的辅助因子。胶原蛋白富含羟脯氨酸和羟赖氨酸,维生素 C 参与脯氨酸羟化,因此,本研究在培养基中加入维生素 C (终浓度 0.5 mmol/L)<sup>[14]</sup>。

本研究中光学显微镜下观察结果显示,10 例圆锥角膜患者角膜组织分离培养出的 HKCs 与 10 例正常人角膜组织分离培养的 HCFs 形态差异不大。尽管 CCK-8 测定结果显示,同一时间点 HKCs 的细胞增殖率高于 HCFs,但透射电子显微镜观察发现 HKCs 胶原纤维变细、减少,线粒体肿大、嵴消失,高尔基体明显扩张,内质网严重肿胀,提示圆锥角膜主要是细胞微环境的改变。角膜基质损伤修复时,部分角膜成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,肌成纤维细胞是介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间的一种终末分化细胞,含有特殊的骨架蛋白  $\alpha$ -SMA,该蛋白是肌成纤维细胞收缩表型的标志<sup>[15]</sup>。HKCs 高表达  $\alpha$ -SMA,证明圆锥角膜成纤维细胞活化为肌成纤维细胞,导致细胞外基质异常分泌,活化的肌成纤维细胞与新合成的细胞外基质构成细胞-细胞外基质网络,参与角膜基质重建,同时其具有的收缩特性使角膜瘢痕收缩,严重影响视功能<sup>[16]</sup>。正常角膜胶原占角膜干质量的 71%,角膜基质主要由 I 型和 VI 型胶原构成, I 型胶原主要起支架作用,是保持角膜机械张力的重要因素<sup>[17-19]</sup>。Delaigue 等<sup>[20]</sup>报道了圆锥角膜患者与正常人角膜相比, I 型胶原蛋白含量与 3 型胶原蛋白含量比值下降。本研究中 Western blot 检测发现, HKCs 与 HCFs 相比, COL1A1 表达下降, COL3A1 表达上升,与 Delaigue 等<sup>[20]</sup>的研究结果一致,结合透射电子显微镜检查结果,进一步提示细胞微环境的改变导致角膜胶原蛋白成分改变,使得角膜机械抵抗力降低,从而使相应部位的角膜前突、变薄,引发圆锥角膜。

综上所述,本研究中成功分离培养了 HKCs,并鉴定了其生物学特性,这一体外细胞模型的建立对进一步研究圆锥角膜的发病机制具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Galvis V, Sherwin T, Tello A, et al. Keratoconus: an inflammatory disorder? [J]. Eye (Lond), 2015, 29(7): 843-859. DOI: 10.1038/eye.2015.63.
- [2] Mathew JH, Goosey JD, Söderberg PG, et al. Lamellar changes in the keratoconic cornea [J]. Acta Ophthalmol, 2015, 93(8): 767-773. DOI: 10.1111/aos.12811.

- [3] Bykhovskaya Y, Margines B, Rabinowitz YS. Genetics in keratoconus: where are we? [J/OL]. Eye Vis (Lond), 2016, 3(16): 2017-04-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4922054/>. DOI:10.1186/s40662-016-0047-5.
- [4] 谢培英. 图释圆锥角膜[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 13.
- [5] 谢立信, 王富华, 史伟云. 1997 至 2002 年山东省眼科研究所穿透性角膜移植术的原因分析[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(8): 704-708. Xie LX, Wang FH, Shi WY. Analysis of causes for penetrating keratoplasty at Shandong Eye Institute from 1997 to 2002 [J]. Chin J Ophthalmol, 2006, 42(8): 704-708.
- [6] Spadea L, de Rosa V. Current techniques of lamellar keratoplasty for keratoconus [J]. Saudi Med J, 2016, 37(2): 127-136. DOI: 10.15537/smj.2016.2.12985.
- [7] Farjadnia M, Naderan M. Corneal cross-linking treatment of keratoconus [J]. Oman J Ophthalmol, 2015, 8(2): 86-91. DOI: 10.4103/0974-620X.159105.
- [8] Sultan P, Dogan C, Sकेleli G. A retrospective analysis of vision correction and safety in keratoconus patients wearing Toris K soft contact lenses [J]. Int Ophthalmol, 2016, 36(6): 799-805. DOI: 10.1007/s10792-016-0200-0.
- [9] 张佳, 陈世豪, 李旖旎, 等. 保留上皮角膜胶原交联术治疗青少年圆锥角膜的疗效分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(2): 135-138. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.009. Zhang J, Chen SH, Li YN, et al. Clinical results of transepithelial corneal collagen cross-linking for pediatric keratoconus [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(2): 135-138. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.02.009.
- [10] Karolak JA, Gajecka M. Genomic strategies to understand causes of keratoconus [J]. Mol Genet Genomics, 2017, 292(2): 251-269. DOI: 10.1007/s00438-016-1283-z.
- [11] 乔静, 晏晓明. 角膜扩张疾病模型的研究进展 [J]. 国际眼科纵览, 2016, 40(4): 246-251. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2016.04.007. Qiao J, Yan XM. Research progress on disease models of corneal ectasia [J]. Int Rev Ophthalmol, 2016, 40(4): 246-251. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-5803.2016.04.007.
- [12] Karamichos D, Zareian R, Guo X, et al. Novel *in vitro* model for keratoconus disease [J]. J Funct Biomater, 2012, 3(4): 760-775. DOI: 10.3390/jfb3040760.
- [13] Wisse RP, Kuiper JJ, Gans R, et al. Cytokine expression in keratoconus and its corneal microenvironment: a systematic review [J]. Ocul Surf, 2015, 13(4): 272-283. DOI: 10.1016/j.jtos.2015.04.006.
- [14] 王洋, 张朝东, 韩漫夫, 等. 碱性成纤维细胞生长因子及维生素 C 对骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. 中国全科医学, 2009, 12(22): 2025-2028. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2009.22.005. Wang Y, Zhang CD, Han MF, et al. Effects of basic fibroblast growth factor or vitamin C on proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin General Pract, 2009, 12(22): 2025-2028. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2009.22.005.
- [15] Muchaneta-Kubara EC, el Nahas AM. Myofibroblast phenotypes expression in experimental renal scarring [J]. Nephrol Dial Transplant, 1997, 12(5): 904-915.
- [16] Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneur E, et al. The genetic and environmental factors for keratoconus [J/OL]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 795738 [2017-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449900/>. DOI: 10.1155/2015/795738.
- [17] 谢立信. 临床角膜病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 117.
- [18] White TL, Lewis PN, Young RD, et al. Elastic microfibril distribution in the cornea: differences between normal and keratoconic stroma [J]. Exp Eye Res, 2017, 159: 40-48. DOI: 10.1016/j.exer.2017.03.002.
- [19] McKay TB, Lyon D, Sarker-Nag A, et al. Quercetin attenuates lactate production and extracellular matrix secretion in keratoconus [J/OL]. Sci Rep, 2015, 5: 9003 [2017-01-26]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355637/>. DOI: 10.1038/srep09003.
- [20] Delaigue O, Arbeille B, Rossazza C, et al. Quantitative analysis of immunogold labellings of collagen types I, III, IV and VI in healthy and pathological human corneas [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1995, 233(6): 331-338.

(收稿日期: 2018-04-12 修回日期: 2018-12-21)

(本文编辑: 刘艳)

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和使用指南。

## 本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片, 为了反映组织标本大小的最精确尺度, 请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)