

· 综 述 ·

胚胎干细胞诱导分化视网膜细胞的方法新进展

赵永吉 庞丽 综述 游志鹏 审校

330008 南昌大学第二附属医院眼科

通信作者:游志鹏, Email: yzp74@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.016

【摘要】 视网膜变性疾病是引起视力丧失的重要原因,由于这类眼病的病因不明确、发病机制复杂,目前尚无有效的治疗方法。近年来,干细胞研究领域取得了突破性进展,干细胞具有分化为机体所有细胞的潜能,可以利用胚胎干细胞(ESCs)分化出各种视网膜细胞,这为视网膜变性疾病的治疗带来了新的曙光。ESCs 治疗视网膜变性疾病至关重要的一步是将 ESCs 分化为视网膜光感受器细胞和视网膜色素上皮(RPE)样细胞。本文对自发诱导培养法、共培养法、细胞因子诱导法、单层贴壁诱导培养法和 3D 诱导培养法等 ESCs 分化为视网膜光感受器细胞和 RPE 细胞方法的最新进展进行综述。

【关键词】 视网膜变性疾病; 胚胎干细胞; 分化; 视网膜细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(81460088); 江西省高等学校科技落地计划项目(KJLD14017)

Advance in methods of induced-embryonic stem cell differentiation to retinal cells Zhao Yongji, Pang Li, You Zhipeng

Department of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008, China

Corresponding author: You Zhipeng, Email: yzp74@sina.com

【Abstract】 Retinal degenerative disease is the leading cause of visual loss, the mechanism is not clear and has no effective treatment method. In recent years, the field of stem cell research has made great progress. Stem cells have the potential of differentiating into all the body cells. Embryonic stem cells (ESCs) can be used to differentiate a variety of retinal cells, which has brought a new promise for the treatment of retinal degeneration disease. However, the most important step of this treatment is how to differentiate ESCs into photoreceptor cells and retinal pigment epithelium (RPE) cells. In this paper, we introduced the recent progress in the differentiation methods of ESCs into retinal cells, which contains spontaneous differentiation method, co-culture method, growth factors and small molecules induced method, adherent monoculture method, three dimensional differentiation method.

【Key words】 Retinal degenerative disease; Embryonic stem cells; Differentiation; Retinal cells

Fund program: National Nature Science Foundation of China (81460088); Higher School Science and Technology Floor Program of Jiangxi Province (KJLD14017)

视网膜变性疾病包括年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)、视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)以及 Stargardt 病等遗传疾病^[1-2]。视网膜变性疾病是视网膜神经上皮及视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞不可逆凋亡而引起的进行性盲。目前对于此类疾病尚无有效的治疗办法,是导致发达国家人口不可逆盲的主要原因^[3]。胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)来源于囊胚期胚胎内层细胞团,它可以无限增生并分化为 3 个胚层。视网膜细胞分化与脊椎动物的眼部发育紧密相关,受到多个信号通路的调控^[4-6],对于眼部发育具有重要影响作用的 *Pax6* 是哺乳动物眼发育的关键调节基因,主导眼的分化。同时眼部发育的过程受多种转录因子,包括 *Rx1*、*Six3*、*Lhx2*、*tll* 和

Optx2 的调控,这几种细胞因子相互作用可以诱导胚胎在神经系统外产生异位的眼,包括抑制转录因子 ET 的产生导致 *Rx1*、*Pax6*、*Six3*、*Lhx2*、*tll* 和 *Optx2* 的表达增加, *otx2* 诱导前脑及中脑的分化,最后 *ET*、*Rx1*、*Pax6*、*Six3*、*Lhx2*、*tll* 和 *Optx2* 诱导眼的产生^[7]。目前对于 ESCs 治疗视网膜变性疾病的研究较多,主要是将分化的视网膜细胞移植至视网膜变性的动物进行研究,而其分化的方法有多种。

1 ESCs 分化为视网膜细胞

1.1 自发诱导法

ESCs 维持培养基去除碱性成纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),并移除小鼠胚胎成纤维细胞饲养

层, ESCs 可自发向视网膜光感受器细胞和 RPE 细胞分化。自发诱导法可分为拟胚体悬浮培养和贴连续壁诱导培养。拟胚体悬浮培养法先将拟胚体诱导为神经球体, 然后将神经球体贴壁培养分化为视网膜光感受器及 RPE 细胞。Qu 等^[8]将 ESCs 无血清拟胚体 (serum-free embryonic body, SFEB) 悬浮培养 10 d 后贴壁培养 6 d, 在细胞分化后期加入胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 可诱导大鼠 ES 细胞分化为表达 Tuj1 和 Nestin 的视网膜神经前体细胞。此细胞悬液经玻璃体腔注射至 RCS 大鼠视网膜下 4 周后, 细胞可以整合至宿主视网膜并分化为表达 rhopsin 和 recoverin 的成熟视杆细胞和视锥细胞, 更进一步的检查发现此细胞与宿主视网膜整合并表达 basson 和 synaptophysin 突触前体结构, 这表明移植细胞和宿主细胞形成新的突触结构。采用分步诱导法将人 SFEB 置于 DMEM/F₁₂、N₂、B₂₇ 诱导培养基中培养数周可发现 ESCs 向视网膜细胞分化方向发展, 表达视网膜细胞相关蛋白 Mitf、Crx、recoverin 和 opsin 的视网膜光感受器和 RPE 形成。Maruotti 等^[9]用连续贴壁培养法在无 bFGF 培养基中连续培养 4 周可见 RPE 集落出现并逐渐变大, 将 RPE 集落手工分离继续培养 10 周后可获得纯度高的单层 RPE。通过自发诱导法培养的 RPE 细胞与体内 RPE 细胞功能一致^[10]。自发诱导法可以分化出高产量、高纯度的 RPE 细胞, 但自发诱导法耗时较长。

1.2 共培养法

共培养法即将 ES 细胞与原代成体视网膜细胞或胚胎期未成熟的视网膜前体细胞共培养, 诱导 ES 细胞或视网膜前体细胞向成熟的视网膜细胞方向发展。Ikeda 等^[11]将 ESCs 分化来源的 Pax6/Rx 阳性细胞与小鼠胚胎期的视网膜光感受器细胞用 Transwell 方法共培养 12 d, 发现细胞表达视网膜光感受器细胞标志蛋白 rhopsin 和 recoverin, 将此细胞悬液经玻璃体腔注射至视网膜下发现细胞可以成功整合到动物的视网膜外核层并且形成光感受器细胞外节。此外, Nan-Kai 等^[12]发现将 C2J 小鼠 ESCs 与 PA6 细胞贴壁共培养 23 d 后, 细胞表达 RPE 细胞标志蛋白 RPE65、ZO-1 和 bestrophin 蛋白, 并且将此细胞注入 Rpe65rd12 小鼠后小鼠视网膜电位 b 波明显较未处理的对照组高, 这表明移植后小鼠视网膜功能较之前有所改善。

1.3 细胞因子诱导法

研究者们通常在培养基中添加影响干细胞分化为视网膜细胞的生长因子和小分子物质以提高 ESCs 分化为视网膜光感受器细胞和 RPE 细胞的效率。这些小分子物质是影响干细胞朝着视网膜光感受器细胞或者 RPE 细胞分化信号通路的物质。通过选择性激活或抑制细胞信号通路促进干细胞的朝着视网膜光感受器或 RPE 细胞分化, 增加干细胞的分化效率, 缩短分化时间。

1.3.1 视网膜光感受器的分化 Wnt 和 Nodal 信号通路抑制剂 Dkk1、LeftyA 可诱导 ESCs 向视网膜前体细胞分化^[11,13-14]。成骨蛋白 (bone morphogenic protein, BMP) 信号通路抑制剂 noggin 亦有相同的作用^[15], 协同增加多种培养体系中视网膜前体细胞 Pax6/Rx 阳性细胞的表达。FGF 信号通路可诱导视网膜光感受器前体细胞形成, 其激动剂 FGFs 使视网膜光感受器

前体细胞表达蛋白 Chx10 增加并且使 RPE 表达相关蛋白 mitf 表达下降, 而分化培养基中加入 FGF 信号抑制剂 SU5402, mitf 表达较正常对照组增加 11.8 倍, chx10 的表达减少 15.9 倍^[15]。Hambright 等^[16]研究证实, FGF9 和 bFGF 可诱导 ESCs 向视网膜光感受器前体细胞, 而非 RPE 细胞方向发展。对于成熟视网膜光感受器细胞的形成, Notch 信号通路抑制剂 DAPT 促进视网膜前体细胞向视网膜光感受器细胞的分化, 促进 Rx⁺ 细胞分化为 Crx⁺ 细胞。在光感受器诱导培养基中加入 DAPT 18 d, 对照组较正常组 Crx⁺ 表达增加 15%^[17]。并且在视网膜光感受器前体细胞分化为视网膜光感受器细胞后期协同加入细胞因子维甲酸、牛磺酸可使 Rhopsin⁺ 细胞表达增加 15%^[13], 与此同时 SAG、Shh 作为 Hedgehog 通路激动剂亦可以促进视杆细胞的形成^[18-19]。

1.3.2 RPE 细胞的分化 Idelson 等^[20]研究发现, 烟酰胺 (nicotinamide, NIC) 促进 ESCs 向 RPE 细胞方向分化, 增加 RPE 细胞的表达量, 当在分化后期加入 activin A, 转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) NIC 分化 RPE 细胞的作用可以放大, 其分化 RPE 的效率为 30% ~ 40%。Buchholz 等^[21]采用新方法先用 noggin、胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor-1, IGF-1)、DDK-1 和 bFGF 将 ESCs 高效分化为视网膜前体细胞, 再加入 RPE 细胞促进因子 NIC、activin A、血管活性肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 和 SU5402 分化至 14 d 后可高效表达 RPE 前体细胞基因 PMEL17, 分化效率达 80%。Wnt 信号通路可以促进 RPE 细胞的形成。Leach 等^[22]在 14 d 的分化方法中再加入 Wnt 通路激动剂 CHIR99021, 在第 14 天从 PMEL17 的表达看, RPE 分化率达 97%, 且在传代 3 次后细胞表达成熟 RPE 细胞标志物, 细胞可以吞噬光感受器细胞外节, 并且分泌细胞因子色素上皮衍生因子和血管内皮生长因子, 这与体内 RPE 细胞的功能具有一致性。

1.4 单层贴壁诱导法

由于体外的细胞培养环境不同于体内的细胞环境, 体外细胞缺乏体内细胞的三维环境。体外细胞不同于体内细胞, 细胞与细胞、细胞与细胞外基质相互作用减弱, 这有利于细胞的铺展和增生, 但不利于细胞表达分化特征。单层贴壁诱导培养法通过提供细胞生长附着物——细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 改变细胞环境, 从而对培养细胞产生影响。将悬浮培养的 SFEB Pax6⁺/Rx⁺ 视网膜前体细胞接种至多聚赖氨酸/层粘连蛋白/纤连蛋白包被的培养皿中 8 周后可以获得 RPE 细胞^[11,17], 另外使用玻连蛋白/缩氨酸/丙烯酸盐包被的基质也可培养出单层高产纯度高的 RPE 细胞, 并且细胞形态、基因表达和功能特征与天然的 RPE 细胞一致。Cho 等^[23]将 SFEB 接种至 Matrigel 包被的培养容器中发现 ESCs 分化为 RPE 细胞, 这种方法可将分化时间缩短至 5 周。此外采用分步贴壁诱导将 ESCs 分化为 RPE 细胞。首先将 ESCs 接种于琼脂糖包被的培养皿 1 周, 然后将细胞消化后接种层粘连蛋白上培养 5 周, 最后将细胞置于多聚赖氨酸/层粘连蛋白包被的培养皿中后可以获得 RPE 细胞, 此 RPE 细胞移植至 RCS 大鼠视网膜下可保护视网膜的结构和功能^[20]。

1.5 3D 诱导培养法

Eiraku 等^[24]首先提出 3D 培养法。将 Rx⁺细胞视网膜前体细胞加入去除生长因子 Matrigel, 1 ~ 6 d 神经上皮空心球体形成, 8 ~ 10 d 囊泡发生巨大的结构改变形成类视杯结构, 内陷的囊泡分化为视网膜神经上皮, 其临近的细胞外层表达 RPE 细胞标志蛋白, 将此结构中表达 Rho⁺的视网膜细胞移植至 Gnat1^{-/-}小鼠, 发现细胞可以整合至视网膜外核层 (outer nuclear layer, ONL) 并且逐渐转化为成熟视杆细胞。另外, 将 3D 培养基中形成的视网膜片段移植至视网膜变性小鼠中可发现, 视网膜片段在小鼠视网膜中整合并改善一定的视觉功能^[25]。Decembrini 等^[26]还通过 3D 培养法将 Crx-GFP⁺小鼠 ESC 在高氧 (体积分数 40%) 环境中分化出高表达、少凋亡并具有良好的整合能力的视网膜光感受器细胞。此外, 采用 3D 培养法还可联合 Transwell 方法, 在含 N₂B₂₇ 的 3D 诱导培养体系中培养 5 d, 再将神经上皮球体在 Matrigel 包被的 Transwell 滤网中培养 25 d, 细胞表达 RPE65 和 bestrophin 的具有吞噬功能的成熟 RPE 细胞^[27]。3D 培养法联合贴壁诱导法形成具有细胞极性的 RPE 细胞, 并且细胞间有紧密连接和信息传递, 这和体内的 RPE 细胞功能相似, 而自发诱导形成的 RPE 细胞不具备这一特点^[28], 3D 培养法的优点在于其此培养方法不添加外部刺激因子, 这种培养方法与眼人的形成高度相似, 最有可能提高细胞产量, 但其对实验环境和条件要求较高。

2 小结

ESCs 分化为视网膜细胞的方法中自发诱导培养法因费时较长且耗费资源成为其临床应用应用的瓶颈。共培养法与单层贴壁诱导培养法通过模拟体内视网膜细胞生长的外部环境, 建立干细胞分化的外部环境而影响 ESCs 的分化, 但其分化效率均仅为 30%。细胞因子诱导法通过影响视网膜细胞分化通路, 包括 Wnt、BMP、Nodal、FGF 和 Notch 等^[29], 使视网膜细胞分化的效率明显增加并缩短分化时间, 是 ESCs 分化为视网膜光感受器细胞和 RPE 细胞的巨大进步, 但是由于代过程中手工分离 RPE 细胞会导致细胞老化, 因此如何减少细胞手工传代次数是将 ESCs 分化来源的 RPE 细胞应用于临床治疗急需解决的问题。AMD 和 RP 的发病原因复杂, 是 RPE 和视网膜光感受器细胞的相互作用影响而产生, 3D 培养法为模仿体内视网膜结构的形成提供了实验方法, 可以使用 3D 培养来源的视杯结构中的 RPE 和视网膜神经上皮模拟疾病的发展过程, 为疾病的研究提供了新途径, 促进临床上对 AMD 和 RP 的干细胞治疗提供了新的认识^[30-31], 同时也为我们短时间内认识和模拟体内眼的发育及视网膜的形成提供了参考。

参考文献

- [1] Coleman HR, Chan CC, Ferris FL 3rd, et al. Age-related macular degeneration [J]. *Lancet*, 2008, 372 (9652) : 1835 - 1845. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61759-6.
- [2] He Y, Zhang Y, Liu X, et al. Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (8) : 14456 - 14474. DOI: 10.3390/ijms150814456.
- [3] Carr AJ, Smart MJ, Ramsden CM, et al. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration [J]. *Trends Neurosci*, 2013, 36 (7) : 385 - 395. DOI: 10.1016/j.tins.2013.03.006.
- [4] Liu W, Lagutin O, Swindell E, et al. Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (10) : 3568 - 3577. DOI: 10.1172/JCI43219.
- [5] Cui L, Guan Y, Qu Z, et al. WNT signaling determines tumorigenicity and function of ESC-derived retinal progenitors [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123 (4) : 1647 - 1661. DOI: 10.1172/JCI65048.
- [6] Olena AF, Rao MB, Thatcher EJ, et al. miR-216a regulates snx5, a novel notch signaling pathway component, during zebrafish retinal development [J]. *Dev Biol*, 2015, 400 (1) : 72 - 81. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.01.016.
- [7] Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, et al. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors [J]. *Development*, 2003, 130 (21) : 5155 - 5167. DOI: 10.1242/dev.00723.
- [8] Qu Z, Guan Y, Cui L, et al. Transplantation of rat embryonic stem cell-derived retinal progenitor cells preserves the retinal structure and function in rat retinal degeneration [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6 : 219 [2016-01-15]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4640237/>. DOI: 10.1186/s13287-015-0207-x.
- [9] Maruotti J, Wahlin K, Gorrell D, et al. A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2013, 2 (5) : 341 - 354. DOI: 10.5966/sctm.2012-0106.
- [10] Hsiung J, Zhu D, Hinton DR. Polarized human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cell monolayers have higher resistance to oxidative stress-induced cell death than nonpolarized cultures [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4 (1) : 10 - 20. DOI: 10.5966/sctm.2014-0205.
- [11] Ikeda H, Osakada F, Watanabe K, et al. Generation of Rx⁺/Pax6⁺ neural retinal precursors from embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (32) : 11331 - 11336. DOI: 10.1073/pnas.0500010102.
- [12] Nan-Kai W, Tosi J, Kaskanuki JM, et al. Transplantation of reprogrammed embryonic stem cells improves visual function in a mouse model for retinitis pigmentosa [J]. *Transplantation*, 2010, 89 (8) : 911 - 919. DOI: 10.1097/TP.0b013e3181d45a61.
- [13] Ohlemacher SK, Sridhar A, Xiao Y, et al. Stepwise differentiation of retinal ganglion cells from human pluripotent stem cells enables analysis of glaucomatous neurodegeneration [J]. *Stem Cells*, 2016, 34 (6) : 1553 - 1562. DOI: 10.1002/stem.2356.
- [14] Lamba DA, Karl MO, Ware CB, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (34) : 12769 - 12774. DOI: 10.1073/pnas.0601990103.
- [15] Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (39) : 16698 - 16703. DOI: 10.1073/pnas.0905245106.
- [16] Hambright D, Park KY, Brooks M, et al. Long-term survival and differentiation of retinal neurons derived from human embryonic stem cell lines in un-immunosuppressed mouse retina [J/OL]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 920 - 936 [2016-02-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3335781/>.
- [17] Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (2) : 215 - 224. DOI: 10.1038/nbt1384.
- [18] Nakano T, Ando S, Takata N, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10 (6) : 771 - 785. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.009.
- [19] Assawachananont J, Mandai M, Okamoto S, et al. Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 2 (5) : 662 - 674. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.03.011.

- [20] Idelson M, Alper R, Obolensky A, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(4): 396–408. DOI: 10.1016/j.stem.2009.07.002.
- [21] Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, et al. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium[J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(5): 384–393. DOI: 10.5966/scmt.2012-0163.
- [22] Leach LL, Buchholz DE, Nadar VP, et al. Canonical/b-catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 2(56): 1002–1013. DOI: 10.1167/iov.14-15835.
- [23] Cho MS, Kim SJ, Ku SY, et al. Generation of retinal pigment epithelial cells from human embryonic stem cell-derived spherical neural masses[J]. Stem Cell Res, 2012, 9(2): 101–109. DOI: 10.1016/j.scr.2012.05.002.
- [24] 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.
- [25] Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 741–747. DOI: 10.1038/nbt.2643.
- [26] Decembrini S, Koch U, Radtke F, et al. Derivation of traceable and transplantable photoreceptors from mouse embryonic stem cells[J]. Stem Cell Reports, 2014, 2(6): 853–865. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.04.010.
- [27] Zhu Y, Carido M, Meinhardt A, et al. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(1): e54552[2015-11-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554725/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0054552.
- [28] Wu W, Zeng Y, Li Z, et al. Features specific to retinal pigment epithelium cells derived from three-dimensional human embryonic stem cell cultures—a new donor for cell therapy[J]. Oncotarget, 2016, 7(16): 22819–22833. DOI: 10.18632/oncotarget.8185.
- [29] Zhou S, Flamier A, Abdouh M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into cone photoreceptors through simultaneous inhibition of BMP, TGF beta and Wnt signaling[J]. Development, 2015, 142(19): 3294–3306. DOI: 10.1242/dev.125385.
- [30] Carr AJ, Smart MJ, Ramsden CM, et al. Development of human embryonic stem cell therapies for age-related macular degeneration[J]. Trends Neurosci, 2013, 36(7): 385–395. DOI: 10.1016/j.tins.2013.03.006.
- [31] He Y, Zhang Y, Liu X, et al. Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa[J]. Int J Molecul Sci, 2014, 15(8): 14456–14474. DOI: 10.3390/ijms150814456.

(收稿日期: 2016-03-19)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

读者·作者·编者

本刊对中英文摘要的要求

论著或综述文稿正文请撰写中英文摘要。原创性论著文稿要求为结构式摘要, 包括背景(Background)、目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusions) 5 个要素, 摘要应能够回答以下问题: (1) 为什么进行这项研究。(2) 主要用什么方法进行。(3) 获得什么主要结果。(4) 通过研究得出什么结论等。其中背景部分请概括本课题所涉及的研究内容及亟待解决的问题。目的部分为本课题对上述提出问题设立的目标。方法部分应提供研究对象、样本量、分组情况、各组的干预情况、与研究相适应的观察或检测指标, 获得结局指标的手段和设备等。临床研究请说明是前瞻性研究、回顾性研究还是观察性研究。结果部分请客观描述研究的主要发现, 包括主要的形态学检查表现、相关的关键性或主要的量化资料以及相应的统计学比较结果, 须写明统计学量值及其概率值。结论部分请提出与本研究论据直接相关的、必然的推论, 避免得出过度推测性、评价性和扩大化的结论。摘要请用第三人称客观表述, 不列图表, 不引用文献, 不加评论和解释。英文摘要应与中文摘要内容相对应, 但为了对外交流的需要, 可以略详细。英文摘要应包括论文标题(正体)及全部作者姓名(汉语拼音, 姓在前, 首字母大写, 名在后, 首字母大写, 双字连写。如: Yin Xiaohui)、标准化的单位名称、城市名称(汉语拼音)、邮政编码及国家名称(全部为斜体)。并请在另起一行处提供通信作者姓名的汉语拼音和 Email 地址, 如 *Corresponding author: Yin Xiaohui, Email: xiaohuih@126.com*。专家述评或综述类文稿请撰写指示性中英文摘要, 摘要内容应包含研究涉及的概念、研究的目的、综述资料的来源、复习的文献量、研究的新发现或应用领域、综合的结果和结论及其意义等必要的信息。

研究论文为前瞻性研究者应在中英文摘要结束处提供临床试验注册号, 以“临床试验注册(Trial registration)”为标题, 提供注册机构名称和注册号。前瞻性临床研究的论著摘要应注明遵循 CONSORT 声明(Consolidated Standards of Reporting Trials) (<http://www.consort-standard.org/home>)。

《中华实验眼科杂志》声明

本刊自创刊以来未曾委托或授权任何个人、单位、社会团体及其他互联网以任何方式参与本刊的宣传、投稿、征稿和稿件发表等过程。作者投稿时请直接登录中华医学会远程稿件管理系统 (<http://www.cma.org.cn/>), 稿件处理流程等事宜请直接与本刊编辑部联系。作者可通过下列方式和途径获取本刊信息: 杂志微信平台: zhsyykzz; 期刊网址: <http://www.zhsyykzz.yiigle.com>; 编辑部联系电话: 0371-65580157, 0371-65580904。请作者和读者切勿相信“绿色通道”、“快速发表”等网上出现的虚假信息, 以免遭受损失。

(本刊编辑部)