

· 实验研究 ·

基于流式细胞术快速定量分析小鼠角膜组织中嗜中性粒细胞方法的建立

薛芸霞 刘俊 李志杰

暨南大学眼表疾病国际协同创新中心 再生医学教育部重点实验室, 广州 510632

通信作者: 李志杰, Email: zhijielee@yahoo.com

【摘要】 目的 建立一种基于流式细胞术快速定量分析小鼠角膜组织中嗜中性粒细胞的技术和方法。

方法 选取 6~8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 15 只, 使用高尔夫样刀机械性刮除小鼠角膜上皮细胞层, 生成直径 2 mm 的创面, 在创伤后 18 h 切除带有完整角膜缘的小鼠角膜, 采用胶原酶 I 和 DNA 酶联合消化法获得单细胞悬液, 采用 FACSCanto 流式细胞分析仪画门技术分选角膜细胞中嗜中性粒细胞的数量。另取 6 只小鼠, 应用随机数字表法分为创伤组和正常组, 每组 3 只, 使用抗 CD45、Ly6G 和 CD11b 荧光抗体进行角膜细胞染色, 计数并比较未创伤和创伤角膜中嗜中性粒细胞的数量变化。 **结果** 建立流式细胞仪检测角膜组织中嗜中性粒细胞的分析流程。CD45⁺ 细胞占角膜组织所有细胞的比例为 (20.93±1.72)%, 在角膜 CD45⁺ 细胞群中可分选出 Ly6G⁺ CD11b⁺ 双阳性嗜中性粒细胞群, Ly6G⁺ 和 CD11b⁺ 细胞在 CD45⁺ 细胞中所占比例分别为 (75.50±3.25)% 和 (93.40±4.53)%, Ly6G⁺ 和 CD11b⁺ 共阳性细胞占角膜组织 CD45⁺ 细胞的比例为 (67.33±2.80)%。创伤后 18 h, 角膜中角膜缘募集嗜中性粒细胞数量为 (151.47±10.82)%, 多于正常角膜的 (15.36±1.02)%, 差异有统计学意义 ($t=21.689, P<0.01$)。 **结论** 流式细胞检测方法可快速、准确地定量分析创伤角膜中嗜中性粒细胞群, 为进一步评价不同原因造成角膜炎症反应中嗜中性粒细胞的数量变化提供了一种快速定量分析方法。

【关键词】 角膜; 流式细胞术; 嗜中性粒细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81770962、81700808); 广东省自然科学基金项目 (2018A030310605); 广东省医学科研基金项目 (A2020318)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200429-00297

Protocol for the rapid quantitative analysis of neutrophils in mouse cornea by flow cytometry

Xue Yunxia, Liu Jun, Li Zhijie

Ocular Surface Disease Research Center, Jinan University School of Medicine, Guangzhou 510632, China

Corresponding author: Li Zhijie, Email: zhijielee@yahoo.com

[Abstract] Objective To provide a standard protocol for the rapid quantitative analysis of neutrophils in inflamed corneas with flow cytometry. **Methods** The corneal epithelium layer of 15 C57BL/6 mice (6–8 weeks old) was mechanically scraped off using a golf-like knife to generate a 2 mm wound region. The mouse corneas with intact limbus were cut out at 18 hours after abrasion. After mechanical shredding, the single cell suspension was obtained by collagenase I and DNase digestion. Then, the number of neutrophils in the corneal cells was sorted under the FACSCanto flow cytometer using the gate technique. Another 6 mice were taken and randomized into wounded group and normal group according to a random number table method, with 3 mice in each group. Corneal cell staining was performed using fluorescent-conjugated anti-mouse CD45, Ly6G, and CD11b antibodies. The number of neutrophils in the corneas of the two groups were enumerated and compared. The use and care of the animals complied with the Statement of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Medical College of Jinan University (No. JN-A-2002-01). **Results** A standard procedure for detecting neutrophils in the cornea by flow cytometry was established. The ratio of CD45⁺ cells in the total corneal tissue cell population was (20.93±1.72)%. The Ly6G⁺ and CD11b⁺ double positive neutrophil population was sorted in the wounded corneal cell population. The ratios of Ly6G⁺ and CD11b⁺ cells in the CD45⁺ cells were (75.50±3.25)% and (93.40±4.53)%, respectively, and the ratio of the Ly6G⁺ and CD11b⁺ double positive neutrophils in the total number of CD45⁺ cells was (67.33±2.80)%. In addition, the number of neutrophils recruited to the cornea at 18 hours after corneal abrasion was (151.47±10.82)%, which was higher than (15.36±1.02)% in the normal cornea ($t=21.689, P<0.01$). **Conclusions** Flow cytometry can quickly and accurately quantitatively analyze the neutrophil population in the wounded cornea. It provides a rapid quantitative analysis method

to further evaluate the changes of neutrophils in corneal inflammation caused by different reasons.

[Key words] Cornea; Flow cytometry; Neutrophils

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770962, 81700808); Natural Science Foundation of Guangdong Province of China (2018A030310605); The Medical Science and Technology Research Fund of Guangdong Grant (A2020318)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200429-00297

角膜约占整个视觉系统屈光力的 1/3,其正常结构和透明状态的维持是正常视觉功能的重要保障^[1-3]。然而,由于角膜直接暴露于外界环境,易受到各种外来因素的刺激,如感染、机械性和化学性外伤等。不同的外来刺激均可造成角膜发生不同程度的炎症反应。角膜的炎症反应是一种复杂的级联过程,涉及不同的免疫细胞,其中嗜中性粒细胞是炎症反应中最先募集到炎症部位的细胞,在炎症反应中的作用非常复杂,其一方面可通过释放预先合成的酶类物质和自由基类分子杀伤入侵的微生物,另一方面也可通过产生不同种类的细胞因子促进创面的修复。因此,定量分析角膜炎症状态下嗜中性粒细胞在角膜中的数量和性质极其重要。目前检测角膜组织炎症反应中嗜中性粒细胞的技术和方法较多,主要包括角膜组织切片、整铺片和检测炎症角膜中嗜中性粒细胞相关酶类物质的浓度^[4-6],这些技术各有优缺点。整铺片和组织学方法可观察浸润嗜中性粒细胞在角膜中的组织学定位,而电子显微镜下可观察嗜中性粒细胞的超微结构及其与其他细胞之间的关系。如何检测和定量分析角膜中嗜中性粒细胞的数量具有重要意义。流式细胞术是利用流式细胞仪同时对单个细胞的多个参数进行定性和定量分析的生物学分析技术,具有检测速度快、通量高、灵敏度高、采集数据量大、节约样本及成本的优点,已广泛应用于临床样本检测^[7]。但目前用于检测各种炎症状态下角膜组织中嗜中性粒细胞的技术方法鲜见文献报道。本研究建立一种基于流式细胞术快速定量分析小鼠角膜中嗜中性粒细胞的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取 6~8 周龄健康无眼疾 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 21 只,购于广东省医学实验动物中心。实验动物的使用和喂养遵循美国视觉与眼科学研究协会制定的科研动物使用规范,本研究方案经暨南大学实验动物伦理委员会审核批准(批文号:JN-A-2002-01)。

1.1.2 主要试剂及仪器 苯巴比妥钠注射液(上海碧云天生物技术有限公司);磷酸盐缓冲液(phosphate

buffer saline,PBS)(美国 GE Healthcare 公司);胶原酶 I、DNA 酶(美国 Sigma 公司);体积分数 10% Triton X-100 透膜液、牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)(广州斯佳生物技术有限公司);流式染色缓冲液(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);抗小鼠 CD16/32 抗体(美国 R&D Systems 公司);APC 标记抗小鼠 CD45-抗体、FITC 标记抗小鼠 Ly6G-抗体、Percep-Cy5.5 标记抗小鼠 CD11b-抗体(美国 BD Biosciences 公司);多聚甲醛(广州化学试剂厂)。FACSCanto 流式分析仪(美国 BD Biosciences 公司);正置荧光显微镜(BX53,日本 Olympus 公司);体式显微镜(GL-99BI,桂林桂光仪器公司);高尔夫样刀(美国 Accutome 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠角膜组织中嗜中性粒细胞的流式细胞术分析检测 (1)实验动物处理 按照文献[8]描述的方法进行,取 15 只小鼠腹腔内注射苯巴比妥钠 25~50 mg/kg 将小鼠麻醉后,使用直径 2 mm 的环钻标记角膜中央区域,并采用高尔夫样刀机械性刮除已标记的中央区角膜上皮细胞层。注意此过程中避免伤及角膜基质层。(2)角膜取材 创伤后 18 h 处死小鼠,摘出眼球置于无菌 PBS 中,于体式显微镜下修剪得到含完整角膜缘的角膜组织,将角膜组织转移至 1.5 ml 无菌 EP 管中,并使用剪刀快速将组织充分剪碎(图 1)。(3)胶原酶消化 向剪碎后的角膜组织中加入 100 μ l 质量分数 4% 的胶原酶 I 和 1 ml 无菌 PBS,再加入 2 μ l DNA 酶防止组织在消化过程中成团,然后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中消化 30 min,每隔 15 min 震荡摇匀 1 次,充分消化后将细胞混悬液转移至 10 ml 无菌离心管中,加入 8 ml 无菌 PBS,400 \times g 离心 5 min,弃上清,加入 1 ml 流式染色缓冲液重悬细胞并使用 200 目筛网过滤,离心收集细胞沉淀(图 1)。(4)抗体孵育 使用 200 μ l 流式染色缓冲液重悬细胞后加入 2 μ l 抗小鼠 CD16/32 抗体,室温下孵育 10 min 封闭抗原,随后分别加入 2 μ l 抗小鼠 CD45、Ly6G 和 CD11b 抗体,室温下避光孵育 30 min,加入 PBS 洗涤,400 \times g 离心 5 min 后弃上清,加入 400 μ l PBS 重悬细胞,过流式筛管后上机测试。注意避光,如需过夜则需加入 400 μ l 质量分数 1% 多聚甲醛并置于 4 $^{\circ}$ C 保存,过流式

筛管后上机检测。(5)流式细胞仪检测 单个角膜的细胞量不足以支撑流式细胞仪筛选,根据我们前期实验 1 个流式样品至少需要 5 只小鼠 10 只角膜一起剪碎消化完成后获取的细胞量,将 5 只小鼠 10 只角膜合并进行流式细胞仪筛选。先将同型对照样品上机划门,随后将目标样品上机进行检测,分析阳性区域的细胞百分数。

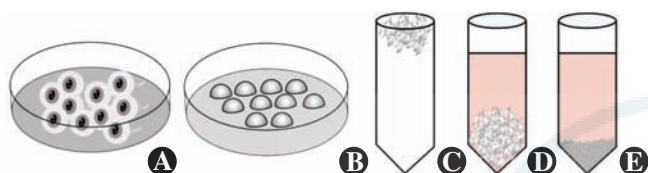


图 1 流式细胞术检测角膜组织样本中嗜中性粒细胞的操作流程
A:取眼球 B:获取角膜 C:将角膜剪成梅花状并转移至离心管机械性剪碎 D:加入 PBS、DNA 酶和胶原酶 I E:消化完成后过筛重离心

Figure 1 Operational flowchat of neutrophils detection in corneal tissue samples by flow cytometry A: Enucleate the eyeballs B: Obtain the corneas C: Cut the corneas into plum blossom shape and transfer them to the centrifuge tube for mechanical shearing D: Add PBS, DNase and collagenase I E: After digestion and sieving, obtain the single cell suspension via centrifugation

1.2.2 小鼠角膜整铺片及免疫荧光染色

取 6 只小鼠,应用随机数字表法分为创伤组和正常组,每组 3 只。参照文献[9-14]的方法,采用颈椎脱臼法处死小鼠,摘取眼球并置于 2% 多聚甲醛中固定 40 min,解剖显微镜下修剪眼球获取含有完整角膜缘的角膜组织, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次, 然后置于 500 μl 质量分数 2% BSA 封闭液中封闭 15 min, 1% Triton X-100 透膜液中透膜 15 min, 加入 2 μl 抗小鼠 FITC 标记的 Ly6G 抗体 4℃

孵育过夜, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次, 角膜上皮面朝上呈梅花状置于载玻片, 滴加含有 DAPI 的封片剂封片, 4℃ 避光保存。

1.2.3 小鼠角膜组织中嗜中性粒细胞的定量分析

参照文献[9-14]的方法,至少选取 4~6 个角膜,在 400 倍镜下,角膜缘任意选取 8 个目标视野并拍照计数,取其平均值作为募集的嗜中性粒细胞数量,分析并比较正常角膜和创伤后 18 h 角膜组织中募集嗜中性

粒细胞数量的差异。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件(美国 IBM 公司)和 GraphPad Prism 6.0 软件(美国 Graph-Pad 公司)进行统计分析。计量资料的数据经 W 检验证实呈正态分布,以 mean±SD 表示。创伤后 18 h 与正常角膜的角膜缘募集嗜中性粒细胞的数量比较采用独立样本 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 上机测试获得角膜组织中嗜中性粒细胞的定量分析

上机测试完成后,原始数据进行去细胞碎片处理,并进行单细胞筛选,进而画门筛选出 CD45⁺ 细胞占角膜组织所有细胞的比例为 (20.93±1.72)%, 并获取 Ly6G⁺ 和 CD11b⁺ 细胞在 CD45⁺ 细胞中所占比例分别为 (75.50±3.25)% 和 (93.40±4.53)%, 进一步画门筛选出 Ly6G⁺ 和 CD11b⁺ 共阳性细胞占角膜组织所有 CD45⁺ 阳性细胞的比例为 (67.33±2.80)% (图 2)。

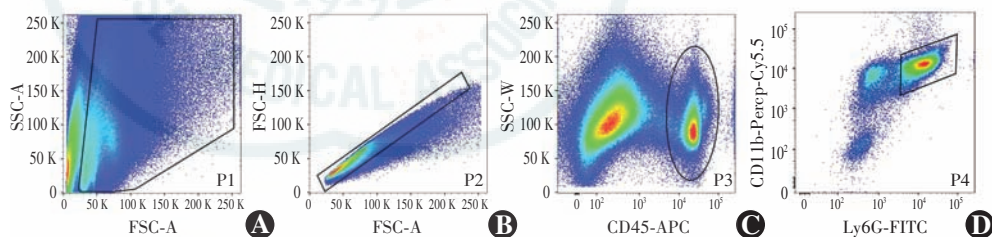


图 2 流式细胞术检测角膜组织中嗜中性粒细胞的定量分析 A:去掉细胞碎片 B:去黏连得到单细胞 C:CD45⁺ 细胞分析 D:Ly6G⁺ 和 CD11b⁺ 共阳性细胞定量分析 SSC-A:侧向散射光面积;FSC-A:前向散射光面积;FSC-H:前向散射光高度;SSC-W:侧向散射光宽度;CD45-APC:CD45 染色白细胞;Ly6G-FITC 和 CD11b 共同染色嗜中性粒细胞

Figure 2 A quantitative analysis of neutrophils in the corneal tissue samples by flow cytometry A: Remove cell debris B: Obtain the single cell suspension C: Analyze CD45⁺ cell subset D: Gate and analyze the Ly6G⁺ and CD11b⁺ double positive cell subset SSC-A: side scatter-area; FSC-A: forward scatter-area; FSC-H: forward scatter-height; SSC-W: side scatter-width; CD45-APC: allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse CD45 antibody; Ly6G-FITC: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse Ly6G antibody

2.2 免疫荧光染色观察正常和创伤角膜的嗜中性粒细胞数量变化

正置荧光显微镜下获取角膜缘 Ly6G⁺ 细胞图片并进行计数,结果显示创伤后 18 h 角膜中角膜缘募集嗜中性粒细胞数量为 (151.47±10.82)%, 明显多于正常角膜的 (15.36±1.02)%, 差异有统计学意义 (t=21.689, P<0.01) (图 3)。

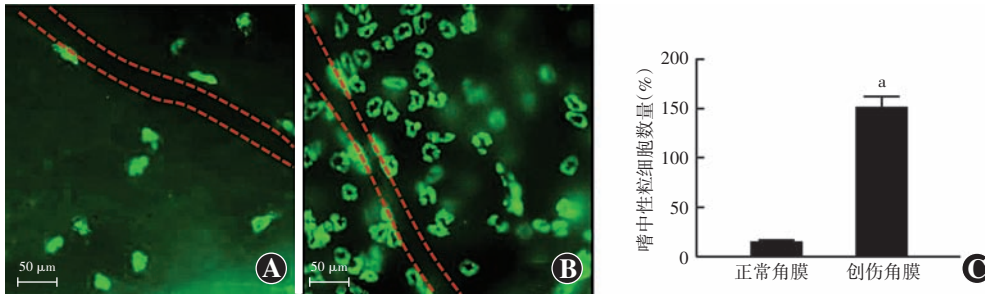


图 3 免疫荧光染色观察角膜组织中嗜中性粒细胞的数量 A: 正常角膜的角膜缘 Ly6G 抗体免疫荧光染色图片, 红色虚线标记角膜缘血管位置 ($\times 400$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) B: 创伤后 18 h 角膜的角膜缘 Ly6G 抗体免疫荧光染色图片, 红色虚线标记角膜缘血管位置 ($\times 400$, 标尺 = $50 \mu\text{m}$) C: 正常小鼠角膜缘和创伤后 18 h 角膜缘嗜中性粒细胞数量比较 与正常角膜比较, $^*P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

Figure 3 Immunofluorescence staining to enumerate the number of neutrophils in the corneal limbus A: Representative image of FITC-anti-Ly6G⁺ neutrophils in the normal corneal limbus, the red dotted lines marked the position of the limbus blood vessel ($\times 400$, bar = $50 \mu\text{m}$) B: Representative image of FITC-anti-Ly6G⁺ neutrophils in the corneal limbus at 18 hours after corneal abrasion, the red dotted lines marked the position of the limbus blood vessel ($\times 400$, bar = $50 \mu\text{m}$) C: Comparison of the numbers of limbal neutrophils in the normal mice cornea and wounded cornea at 18 hours after corneal abrasion, $^*P < 0.01$ (Independent-samples t test, $n = 3$)

3 讨论

许多因素可引起角膜的炎症反应, 我们实验室在过去 10 年间以角膜创伤修复为模型探索了角膜炎症反应的过程, 取得了许多有价值的信息。但是, 早期我们的数据都是基于去卷积显微镜下联合免疫荧光标记和角膜整铺片技术完成的, 获得的免疫细胞种类包括嗜中性粒细胞、血小板、肥大细胞、巨噬细胞、 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞、自然杀伤细胞和自然淋巴样细胞^[10-18]。然而, 该技术因在显微镜下进行人工计数, 耗费大量的人力和时间^[19-20]。2015 年, 我们开始尝试使用流式细胞术来完成该工作, 并取得了许多经验。

由于正常角膜中免疫细胞数量处于较低的休眠状态, 同样的条件下流式细胞仪检测出来的数量大多具备参考性, 另本研究旨在为角膜免疫细胞的研究提供新的方法, 因此并没有观察不同时间角膜组织中嗜中性粒细胞的比例。在具体操作中我们发现下述几种因素影响结果的稳定性: (1) 双酶联合使用 在消化标本过程中常出现细胞成团现象, 双酶联合消化方法可解决这一问题; (2) 样本消化时间 样本消化的时间需要控制在合理的范围内, 消化时间过短影响细胞总量, 消化时间过长影响细胞状态并易造成非特异性染色; (3) 保留完整的角膜缘 角膜缘是炎症细胞从角膜缘血管网向角膜中央发生募集的部位, 这是保证获得一致结果的重要因素; (4) 充分剪碎样本 角膜组织的剪碎程度直接与获取的角膜组织细胞总量相关; (5) Fc 受体的封闭 Fc 受体包括 Fc $\gamma\text{R I}$ 、Fc $\gamma\text{R II}$ 和 Fc $\gamma\text{R III}$, 表达于大量免疫细胞表面。大部分所使用的抗体容易与细胞表面的 Fc 受体非特异性结合, 造成非

特异性染色。抗 CD16 和 CD32 可以分别结合 Fc $\gamma\text{R III}$ 和 Fc $\gamma\text{R II}$, 在使用特异性抗体孵育前可使用这 2 种抗体降低非特异性染色。

综上所述, 本研究结果显示流式细胞检测方法可快速、准确地定量分析创伤角膜中嗜中性粒细胞群, 具有相对稳定、简单、实用和重复性好的特点, 为进一步评价不同原因造成角膜炎症反应中嗜中性粒细胞的数量变化提供了一种快速定量分析方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Guo Y, Xue Y, Wang P, et al. Muse cell spheroids have therapeutic effect on corneal scarring wound in mice and tree shrews [J/OL]. Sci Transl Med, 2020, 12(562) : eaaw1120 [2020-02-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32967971/>. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaw1120.
- [2] Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, et al. Corneal nerves: structure, contents and function [J]. Exp Eye Res, 2003, 76(5) : 521-542. DOI: 10.1016/S0014-4835(03)00050-2.
- [3] Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing [J]. Prog Retin Eye Res, 2015, 49 : 17-45. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.002.
- [4] Ritchey ER, Code K, Zelinka CP, et al. The chicken cornea as a model of wound healing and neuronal re-innervation [J]. Mol Vis, 2011, 17 : 2440-2454.
- [5] Carvalho AR, Naranjo C, Leiva M, et al. Canine normal corneal epithelium bears a large population of CD45-positive cells [J]. Vet J, 2009, 179(3) : 437-442. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.09.021.
- [6] Tighe S, Moein HR, Chua L, et al. Topical cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord eye drops promote re-epithelialization in a murine corneal abrasion model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(3) : 1586-1593. DOI: 10.1167/iovs.16-20834.
- [7] McKinnon KM. Flow cytometry: an overview [J/OL]. Curr Protoc Immunol, 2018, 120 : 5.1.1-5.1.11 [2020-01-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5939936/>. DOI: 10.1002/cpim.40.
- [8] Liu J, Huang S, Li F, et al. Sympathetic nerves positively regulate eosinophil-driven allergic conjunctivitis via $\alpha 1$ -adrenergic receptor signaling [J]. Am J Pathol, 2020, 190(6) : 1298-1308. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.02.004.
- [9] 何靖新, 林妍, 徐鹏洋, 等. 昼夜节律颠倒对小鼠角膜上皮创伤修复的影响 [J]. 中华实验眼科杂志, 2019, 37(7) : 514-520. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.004. He JX, Lin Y, Xu PY, et al. Wound healing of corneal epithelium in mice affected by reversed circadian rhythms [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2019, 37(7) : 514-520. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.07.004.
- [10] Li Z, Rivera CA, Burns AR, et al. Hindlimb unloading depresses corneal epithelial wound healing in mice [J]. J Appl Physiol, 2004, 97(2) :

641-647. DOI:10.1152/jappphysiol.00200.2004.

[11] Xue Y, He J, Xiao C, et al. The mouse autonomic nervous system modulates inflammation and epithelial renewal after corneal abrasion through the activation of distinct local macrophages [J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11(5): 1496-1511. DOI:10.1038/s41385-018-0031-6.

[12] Li Z, Rumbaut RE, Burns AR, et al. Platelet response to corneal abrasion is necessary for acute inflammation and efficient re-epithelialization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(11): 4794-4802. DOI:10.1167/iovs.06-0381.

[13] Liu J, Fu T, Song F, et al. Mast cells participate in corneal development in mice [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17569 [2020-01-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4667177/>. DOI:10.1038/srep17569.

[14] Wu M, Liu J, Li F, et al. Antibiotic-induced dysbiosis of gut microbiota impairs corneal development in postnatal mice by affecting CCR2 negative macrophage distribution [J]. *Mucosal Immunol*, 2020, 13(1): 47-63. DOI:10.1038/s41385-019-0193-x.

[15] Liu J, Wu M, He J, et al. Antibiotic-induced dysbiosis of gut microbiota impairs corneal nerve regeneration by affecting CCR2-negative macrophage distribution [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(12): 2786-2799. DOI:10.1016/j.ajpath.2018.08.009.

[16] Xiao C, Wu M, Liu J, et al. Acute tobacco smoke exposure exacerbates the inflammatory response to corneal wounds in mice via the sympathetic nervous system [J/OL]. *Commun Biol*, 2019, 2: 33 [2020-01-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6345828/>. DOI:10.1038/s42003-018-0270-9.

[17] Liu Q, Smith CW, Zhang W, et al. NK cells modulate the inflammatory response to corneal epithelial abrasion and thereby support wound healing [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(2): 452-462. DOI:10.1016/j.ajpath.2012.04.010.

[18] Liu J, Xiao C, Wang H, et al. Local group 2 innate lymphoid cells promote corneal regeneration after epithelial abrasion [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(6): 1313-1326. DOI:10.1016/j.ajpath.2017.02.010.

[19] Barbariga M, Fonteyne P, Ostadrezza M, et al. Substance P modulation of human and murine corneal neovascularization [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(3): 1305-1312. DOI:10.1167/iovs.17-23198.

[20] Li Z, Burns AR, Smith CW. Two waves of neutrophil emigration in response to corneal epithelial abrasion: distinct adhesion molecule requirements [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(5): 1947-1955. DOI:10.1167/iovs.05-1193.

(收稿日期:2020-04-29 修回日期:2020-12-30)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)

消息

第二十一届国际眼科学学术会议暨第二十一届国际视光学学术会议通知

由全国十二省市医学会眼科分会、中国研究型医院学会眼科学与视觉科学专委会、复旦大学附属眼耳鼻喉科医院、温州医科大学眼视光医院和上海赛诺瑞会展有限公司共同主办,复旦大学附属眼耳鼻喉科医院和上海赛诺瑞会展有限公司共同承办的第二十一届国际眼科学学术会议暨第二十一届国际视光学学术会议、第八届国际角膜塑形学术论坛、中国研究型医院学会眼科学与视觉科学专业委员会 2021 学术年会将于 2021 年 6 月 17—20 日在上海跨国采购会展中心(上海市普陀区光复西路 2739 号)举行。届时,来自中国、美国及东亚其他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。同期将举行第八届国际角膜塑形学术论坛、中国研究性医院学会眼科学会与视觉科学专业委员会 2021 学术年会。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 10 分。

投稿仅需提供论文摘要,截止日期为 2021 年 6 月 3 日。摘要要求:(1)500 字以内规范格式书写;(2)四段式摘要,包括目的、方法、结果和结论;(3)请登录大会官方网站(www.cooc.org.cn)进行在线投稿。

注册费标准:

日期	常规代表	团体(同一单位 5 人以上)	全日制在读学生(凭有效学生证)
2021 年 2 月 10 日前	800 元/人	640 元/人	400 元/人
2021 年 2 月 11 日至 6 月 11 日	900 元/人	720 元/人	450 元/人
2021 年 6 月 12 日以后及现场	1 200 元/人	1 000 元/人	600 元/人

注:需要学分的参会代表需额外收取费用 100 元

大会秘书处:

参会联络:汤老师、邓老师,联系电话:021-52665618,021-52668178,电子邮箱:realexp@cooc.org.cn。

参展联络:陈小姐(021-52665938)、黄先生(021-52662368),电子邮箱:realexp@sh163.net。

欢迎浏览大会官方网站 <http://www.cooc.org.cn>(PC 端)、<http://cooc2021.sciconf.cn>(手机端),或关注大会微信公众平台获取更多大会信息。

(会务组)



(微信:COOC 眼科会议)