

## · 实验研究 ·

BALB/c 小鼠角膜细胞密度和大小的活体  
三维测量

张红敏 刘素素 谢艳亭 陈国铭 贺司宇 金鑫 窦新岩 王丽娅

**【摘要】** 背景 角膜细胞的形态学参数及其密度对角膜结构的完整性及其正常功能的维持具有重要意义。目前, BALB/c 小鼠已成为角膜研究中广泛应用的实验动物, 了解正常角膜细胞的大小、形态及密度可为相应的实验研究提供参考依据。目的 应用双光子激光扫描显微镜对 BALB/c 小鼠的不同角膜细胞进行活体扫描, 对细胞密度、细胞大小参数进行活体三维测量, 活体观察角膜不同细胞的形态学特征。方法 收集 6 只 8~13 周龄 BALB/c 小鼠, 麻醉后荧光解剖显微镜下于角膜基质内注射 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的胞质膜染料 1  $\mu\text{l}$ , 注射后 1.5 h 于注射部位的对侧注射 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hoechst 33342 1  $\mu\text{l}$ , 30 min 后使用双光子激光扫描荧光显微镜对角膜中央视野(XY 轴)的角膜内皮层、基质层和上皮层进行 Z 轴逐层扫描, 每层扫描厚度为 2  $\mu\text{m}$ , 图像像素为 512 $\times$ 512, 图像位数为 12 bit。应用 Imaris 软件对扫描的图像进行细胞密度以及细胞大小参数的测量, 细胞密度通过计算 3 维空间内细胞核数目获得; 通过软件自动测量角膜上皮基底层、中基质层和内皮层细胞和细胞核的表面积和体积, 并计算细胞和细胞核的表面积/体积值和细胞的核质比。结果 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层和内皮层均为单层细胞, 而中基质层包括 2 层细胞。小鼠角膜上皮基底层细胞密度为  $(108.00 \pm 18.97) \times 10^4/\text{mm}^3$ , 明显大于中基质层的  $(9.27 \pm 0.48) \times 10^4/\text{mm}^3$  和内皮层的  $(22.30 \pm 2.28) \times 10^4/\text{mm}^3$ , 3 个组间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 141.592, P = 0.000$ ); 以中基质层的细胞表面积和体积最大, 其次为内皮层, 上皮基底层的细胞表面积和体积最小, 3 层细胞间的表面积和体积的总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 2222.000, 598.504, \text{均 } P = 0.000$ )。小鼠角膜上皮基底层、中基质层和内皮层细胞的表面积/体积值分别为  $(0.80 \pm 0.13), (0.51 \pm 0.07)$  和  $(0.40 \pm 0.04)/\mu\text{m}$ , 以上皮基底层细胞最大, 3 层间总体比较差异有统计学意义 ( $F = 127.075, P = 0.000$ )。小鼠角膜以内皮层的细胞核表面积和体积最大, 其次为中基质层, 以上皮基底层细胞的细胞核表面积和体积最小, 但以上皮基底层细胞核的表面积/体积值最大, 以内皮层细胞核的表面积/体积值最小; 小鼠角膜内皮层细胞的核质比明显大于上皮基底层和中基质层细胞。结论 双光子激光扫描显微镜可对 BALB/c 小鼠中央角膜 3 层细胞参数, 包括细胞和细胞核表面积及体积进行活体定量测定, 为 BALB/c 小鼠角膜生理、病理和疾病的相关研究提供参考依据。

**【关键词】** 角膜/解剖和组织学; 细胞计数; 细胞大小; 近交系 BALB/c 小鼠; 双光子荧光显微镜

*In vivo and three-dimensional measurement of corneal cell density and size in BALB/c mice* Zhang Hongmin, Liu Susu, Xie Yanting, Chen Guoming, He Siyu, Jin Xin, Dou Xinyan, Wang Liya. Henan Eye Institute & Henan Eye Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Wang Liya, Email: wangliya\_55@126.com

**【Abstract】** **Background** Corneal cell size and density are among the primary parameters that determine the structural integrity and normal physiological function of the cornea. Recently, BALB/c mice have become the most widely used laboratory animal in corneal researches and studies. An understanding of normal corneal cell size, morphology and cell density is desirable for future comparisons when mouse models are used in corneal research.

**Objective** The aim of this study was to measure the cell size and cell density in three layers of the central cornea in

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.05.004

基金项目:国家自然科学基金项目(81170831, 81270991);河南省基础与前沿计划项目(10230040024, 112300410036, 112300410093, 132102310087);河南省医学科技攻关计划项目(201203171);河南省科技创新人才计划项目(144100510015);郑州市科技创新团队项目(131PCXTD620);郑州市国际科技合作与交流项目(141PGJHZ352)

作者单位:450003 郑州,河南省眼科研究所 & 河南省立眼科医院 郑州大学人民医院

通信作者:王丽娅, Email: wangliya\_55@126.com

the widely used inbred BALB/c mice strain based on *in vivo* three-dimensional (3D) two-photon (2PH) imaging.

**Methods** Corneal endothelium layer, corneal stromal layer and corneal epithelium layer were sequentially scanned in six BALB/c mice by using a 2PH laser scanning microscope after staining with plasma membrane stain and Hoechst 33342 by intrastromal injection with the scanning thickness 2  $\mu\text{m}$  for each layer, pixels  $512 \times 512$  and 12 bit. Good quality 3D images were selected for the cell density and cell size analyses. Cell density was determined by counting the cell nuclei in a predefined cube of 3D images. Cell size measurements including cell surface area, cell volume, nuclear surface area, and nuclear volume were automatically quantified using the Imaris software. The cell and nuclear surface-area-to-volume ratio and the cell nuclear-to-cytoplasmic ratio were calculated. **Results** Corneal basal epithelium layer and endothelium layer appeared the monolayer cells, while middle stromal layer showed the double-layer cells under the 2PH laser scanning microscope. The cell density was  $(108.00 \pm 18.97) \times 10^4 / \text{mm}^3$  in the basal epithelium layer, which was significantly higher than  $(9.27 \pm 0.48) \times 10^4 / \text{mm}^3$  in the middle stromal layer and  $(22.30 \pm 2.28) \times 10^4 / \text{mm}^3$  in the endothelium layer ( $F = 141.592, P = 0.000$ ). The cell surface area and volume were highest in the middle stromal layer and lowest in the basal epithelium layer, with significant differences among the three layers ( $F = 2222.000, 598.504$ , both at  $P = 0.000$ ). The area/volume ratios of cells were  $(0.80 \pm 0.13)$ ,  $(0.51 \pm 0.07)$  and  $(0.40 \pm 0.04) / \mu\text{m}$  in the basal epithelium layer, middle stromal layer and endothelium layer, with the highest ratio in the basal epithelium layer and lowest ratio in the endothelium layer ( $F = 127.075, P = 0.000$ ). The cell nuclear surface area and volume were highest in the endothelium and lowest in the basal epithelium. The cell nuclear surface area/volume ratio was highest in the basal epithelial cell and lowest in the endothelial cell. In addition, the nucleus/cytoplasm ratio was highest in the endothelial cells and lowest in the middle keratocytes. **Conclusions** 2PH laser scanning microscope can quantitatively measure the parameters of corneal cells *in vivo* in BALB/c mice, including cell surface area and volume, cell nuclear surface area and volume. These data provide important cell morphology features for the study of corneal physiology, pathology and disease in mice, particularly in BALB/c mice.

**[Key words]** Cornea/anatomy & histology; Cell count; Cell size; Mice, inbred BALB/c; Microscopy, fluorescence, two-photon

角膜由上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层和内皮层构成,各层细胞的形态学参数及其密度对角膜结构的完整性及其正常功能的维持具有重要意义。角膜细胞的异常可导致圆锥角膜、角膜变性与营养不良、近视、角膜炎、干眼、大泡性角膜病变和着色性干皮病<sup>[1-8]</sup>。此外,许多眼部手术以及局部药物的应用也会引起角膜细胞的损伤,导致角膜细胞体积或密度的改变,如角膜移植术、角膜磨削术、白内障手术、角膜胶原交联治疗、角膜塑形镜的佩戴以及某些眼表药物的使用<sup>[9-14]</sup>。因此,了解角膜细胞的形态学参数对于角膜的生理、病理以及疾病诊断非常必要。目前,关于人角膜细胞形态学的研究已经比较全面,但实验小鼠角膜细胞形态学参数相对缺乏,影响研究的开展。本研究采用荧光活体染料标记技术,用双光子激光扫描显微镜对成年 BALB/c 小鼠的 3 种角膜细胞进行活体测量,为相关的实验研究提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂及仪器** 细胞质膜染料 (CellMask™ Plasma Membrane Stains, 货号: C10045, 批号: 757076)、

Hoechst 33342 染料 (货号: H3570, 批号: 998468) (美国 Invitrogen 公司)。LSM 780 NLO 型双光子激光扫描显微镜、Zeiss V20 型荧光解剖显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

**1.1.2 实验动物** 选取 SPF 级 8 ~ 13 周龄雄性 BALB/c 小鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司) 10 只, 体质量为 22 ~ 30 g, 经裂隙灯显微镜和解剖显微镜检查证实角膜结构正常 (图 1), 对角膜上皮细胞、基质细胞和内皮细胞的细胞密度、细胞核体积、表面积和核质比进行三维立体测定。实验动物的饲养和使用均遵照美国视觉与眼科研究协会制定的科研动物使用规范, 本实验过程经郑州大学实验动物伦理委员会和

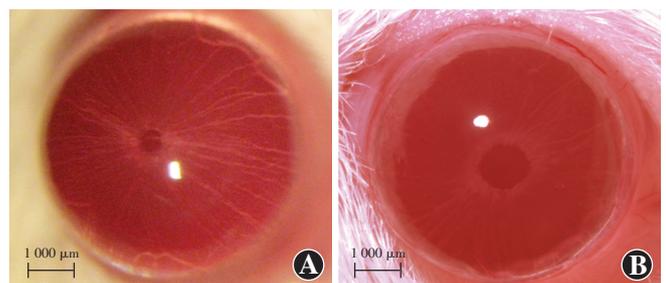


图 1 BALB/c 小鼠眼前节检查 (标尺 = 1 000  $\mu\text{m}$ ) A: 裂隙灯显微镜下小鼠角膜透明 B: 解剖显微镜下可见角膜结构正常

河南省眼科研究所生命科学实验管理与伦理审查委员会审查批准。

1.2 方法

1.2.1 小鼠活体角膜细胞染色

小鼠角膜活细胞染色参考文献[15]的方法进行。腹腔内注射戊巴比妥钠(85 mg/kg)麻醉小鼠,用质量分数 1% 盐酸丁卡因滴眼液点眼进行表面麻醉。荧光解剖显微镜下于角膜基质内注射 20 μg/ml 的胞质膜染料 1 μl,注射后 1.5 h 于注射部位的对侧注射 500 μg/ml Hoechst 33342 1 μl,30 min 后以生理盐水冲洗角膜 3 次,用双光子激光扫描显微镜采集图像。

1.2.2 角膜细胞的在体双光子三维图像采集 角膜图像的采集参考文献[15]的方法进行。小鼠侧卧位,固定其四肢及头部。待测眼放置自制眼杯,眼杯内加入生理盐水,用双光子激光扫描显微镜系统进行角膜图像扫描。所有图像均采用 20 倍水浸物镜(Carl Zeiss Plan-Apochromat 物镜,数值孔径[NA]=1.0),选取角膜中央视野(XY 轴),从角膜内皮层、基质层至上皮层进行 Z 轴连续扫描,每层扫描厚度为 2 μm,图像像素为 512×512,图像位数为 12 bit。

1.2.3 角膜细胞密度的测量 采集的双光子图像载入到 Autoaligner 软件(6.0.1 版本,瑞士 Bitplane 公司)中,矫正由于活体运动引起的图像偏差,然后将中央角膜的 Z 系列图像导入 Imaris 软件(7.3.1 X64 版本,瑞士 Bitplane 公司),生成三维图像,选择高质量的三维图像进行分析。根据典型的细胞形态确定细胞类型和层面,将角膜前弹力层、后弹力层之间细胞厚度的中 1/3 定义为中基质。对角膜基底上皮细胞、基质细胞和内皮细胞的细胞密度和形态学参数进行测定,细胞密度为在 100 μm×100 μm 范围 XY 平面×角膜层面深度(Z 平面)的三维空间内的细胞数目,用细胞数/mm<sup>3</sup> 来表示。对左侧和下方压线的细胞进行计数,右侧和上方压线的细胞不计数(图 2)。

1.2.4 角膜细胞大小的测量 细胞形态学数据来自 4 个小鼠角膜中央部位的 6 个相邻细胞,即 24 个细胞的数据。测量时将双光子拍摄的 Z 序列图像导入到 Imaris 软件后,选择“Surface”模块生成细胞和细胞核三维模型。根据细胞形态手动绘制细胞和细胞核轮廓,创建单个角膜细胞和细胞核的表面效果图。使用 Imaris 软件自动定量分析细胞表面积、细胞体积、核表

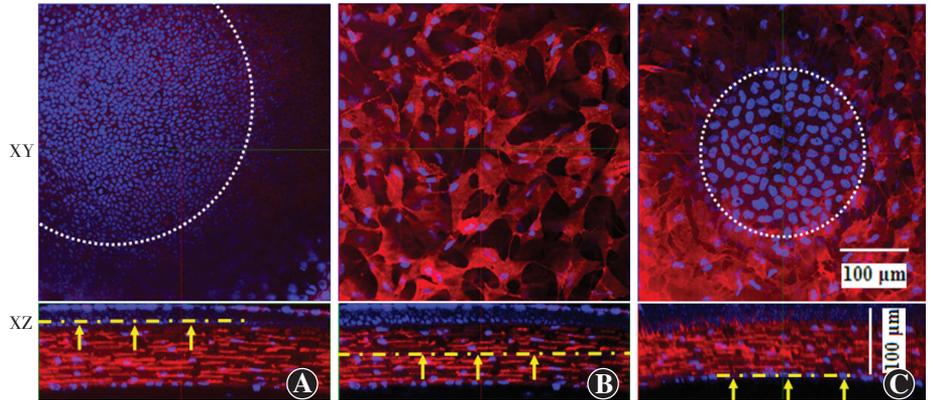


图 2 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层及内皮层细胞的活体双光子测定图片(细胞核染色采用 Hoechst 33342,细胞膜染色采用 Plasma Membrane Stains 标尺=100 μm) A:角膜上皮基底细胞(XY 平面白色虚线内及 XZ 平面内黄色虚线和箭头所示) B:角膜中基质细胞(XY 平面及 XZ 平面的黄色虚线和箭头所示) C:内皮细胞层(XY 平面白色虚线内及 XZ 平面黄色虚线和箭头所示)

面积和核体积。细胞质体积=细胞体积-细胞核体积。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件(序列号:6034524388, SPSSInc., Chicago, IL, USA)进行统计分析。本研究测量指标的数据资料以  $\bar{x} \pm s$  进行描述,角膜上皮基底层、中基质层和内皮层细胞各测量参数的总体差异比较采用单因素方差分析,角膜 3 层间各细胞参数均数经 Levene 检验方差齐,多重比较采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层与内皮层的细胞密度

角膜上皮基底层和内皮层均为单层细胞,而中基质包括 2 层细胞。角膜上皮基底层细胞密度最大,中基质层细胞密度最小,3 层细胞密度整体比较差异有统计学意义( $F = 141.592, P < 0.01$ ),各层间两两比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 1,图 3)。

角膜层面	样本量	细胞密度
上皮基底层	6	108.00 ± 18.97
中基质层	6	9.27 ± 0.48 <sup>a</sup>
内皮层	6	22.30 ± 2.28 <sup>ab</sup>
F		141.592
P		0.000

注:与上皮基底层比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与中基质层比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析, Tamhane's T2 检验)

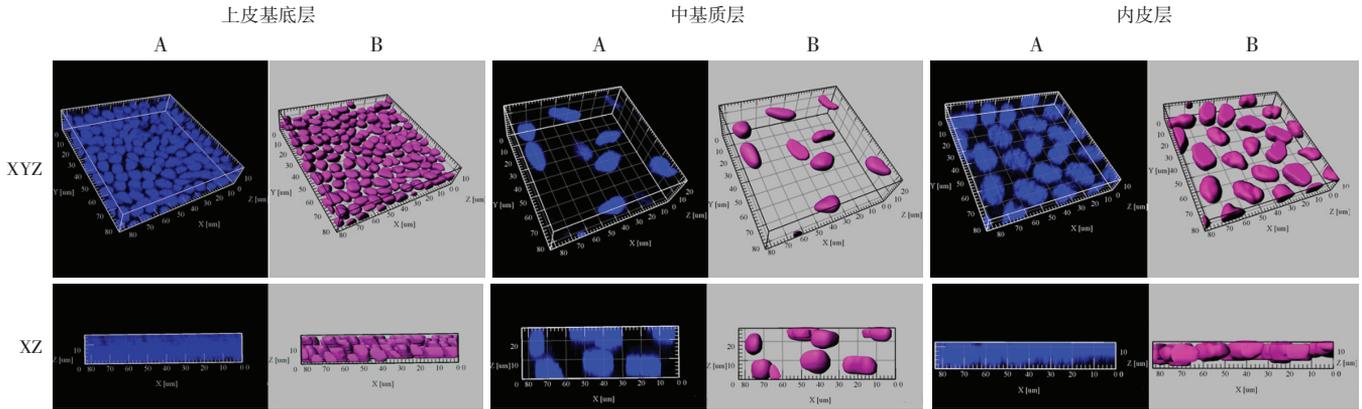


图 3 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层与内皮层的细胞密度( $\times 20$ ) A: 三维重建后展示的细胞核原始图片呈蓝色 (Hoechst 33342) B: Imaris 软件渲染的细胞核图片, 粉色伪彩示细胞核

### 2.2 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层及内皮层细胞的形状及大小

角膜上皮基底层细胞为长柱状, 中基质层细胞形状不规则, 内皮层细胞呈扁柱状。角膜上皮基底层细胞的表面积和体积均最小, 中基质层细胞的表面积和体积均最大。3 层细胞的表面积和体积总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 2\ 222.000, P < 0.01; F = 598.504, P < 0.01$ ), 表面积/体积值以上皮基底层细胞最大, 中基质层细胞和内皮层细胞依次减小, 3 层细胞的表面积/体积值总体比较差异有统计学意义 ( $F = 127.075, P < 0.01$ ) (表 2, 图 4)。

表 2 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层与内皮层的细胞大小比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

角膜层面	样本量	细胞表面积 ( $\times 10^3, \mu\text{m}^2$ )	细胞体积 ( $\times 10^3, \mu\text{m}^3$ )	细胞表面积/体积
上皮基底层	24	$0.33 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.09$	$0.80 \pm 0.13$
中基质层	24	$5.22 \pm 0.44^a$	$10.40 \pm 1.74^a$	$0.51 \pm 0.07^a$
内皮层	24	$1.26 \pm 0.16^{ab}$	$3.14 \pm 0.41^{ab}$	$0.40 \pm 0.04^{ab}$
F		2 222.000	598.504	127.075
P		0.000	0.000	0.000

注: 与上皮基底层比较,  $^a P < 0.01$ ; 与中基质层比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, Tamhane's T2 检验)

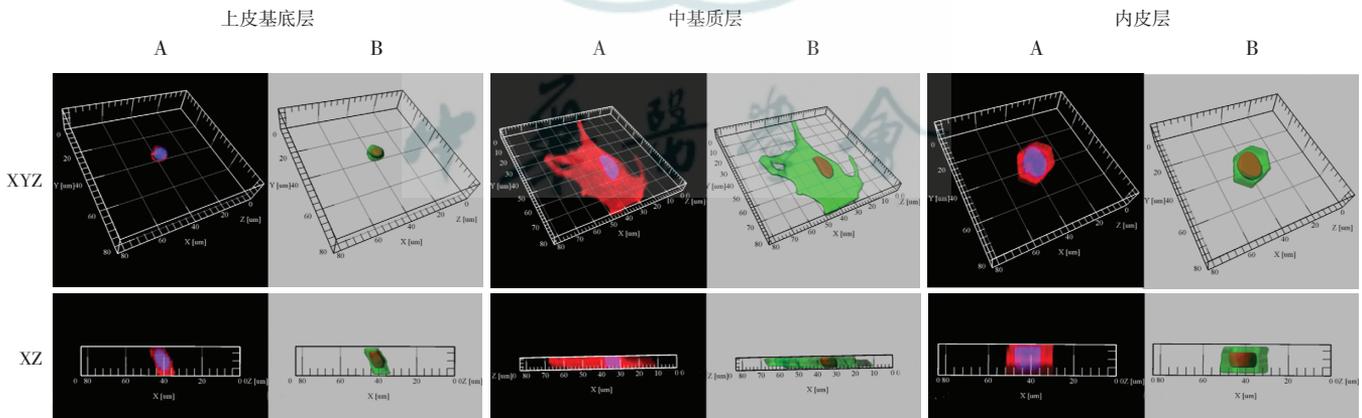


图 4 BALB/c 小鼠角膜 3 层细胞形态( $\times 20$ ) A: 三维重建后展示的细胞呈红色 (Plasma Membrane Stains), 细胞核呈蓝色 (Hoechst 33342) B: Imaris 软件渲染的细胞和细胞核, 红色伪彩示细胞核, 绿色伪彩示细胞质

### 2.3 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层及内皮层细胞核的形状及大小

角膜上皮基底层细胞核与其细胞的形状相似, 近似长柱状, 中基质层细胞的细胞核呈扁豆状或蚕豆状, 内皮层细胞的细胞核与内皮细胞的形状相似, 呈扁柱状。角膜上皮基底层的细胞核表面积和体积均最小, 中基质层细胞和内皮层细胞的核表面积和体积依次增

大。3 层细胞的细胞核表面积和体积总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 301.719, P = 0.000; F = 196.285, P = 0.000$ )。角膜上皮基底层细胞核表面积/体积值最大, 其次依次为中基质层和内皮层, 3 层细胞核的表面积/体积值总体差异有统计学意义 ( $F = 108.568, P < 0.01$ ) (表 3)。

表 3 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层与内皮层细胞核大小 ( $\bar{x}\pm s$ )

角膜层面	样本量	细胞核表面积 ( $\times 10^3, \mu\text{m}^2$ )	细胞核体积 ( $\times 10^3, \mu\text{m}^3$ )	细胞核表面积/ 体积
上皮基底层	24	0.18±0.05	0.18±0.08	1.03±0.11
中基质层	24	0.44±0.09 <sup>a</sup>	0.58±0.20 <sup>a</sup>	0.81±0.15 <sup>a</sup>
内皮层	24	0.72±0.09 <sup>ab</sup>	1.39±0.31 <sup>ab</sup>	0.53±0.08 <sup>ab</sup>
F		301.719	196.285	108.568
P		0.000	0.000	0.000

注:与上皮基底层比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与中基质层比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ (单因素方差分析,Tamhane's T2 检验)

## 2.4 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层及内皮层细胞的核质比

BALB/c 小鼠角膜内皮层细胞的核质比最大,上皮基底层细胞稍次之,以中基质细胞最小,3 层细胞核质比的整体比较差异有统计学意义( $F=58.791, P=0.000$ ),3 层间两两比较,差异均有统计学意义(均 $P=0.000$ )(表 4)。

表 4 BALB/c 小鼠角膜上皮基底层、中基质层与内皮层细胞的核质比 ( $\bar{x}\pm s$ )

角膜层面	样本量	细胞体积 ( $\times 10^3, \mu\text{m}^3$ )	细胞核体积 ( $\times 10^3, \mu\text{m}^3$ )	细胞质体积 ( $\times 10^3, \mu\text{m}^3$ )	核质比
上皮基底层	24	0.42±0.09	0.18±0.08	0.24±0.05	0.78±0.37
中基质层	24	10.40±1.74 <sup>a</sup>	0.58±0.20 <sup>a</sup>	9.82±1.57 <sup>a</sup>	0.06±0.01 <sup>a</sup>
内皮层	24	3.14±0.41 <sup>ab</sup>	1.39±0.31 <sup>ab</sup>	1.76±0.39 <sup>ab</sup>	0.85±0.31 <sup>b</sup>
F		598.504	196.285	731.963	58.791
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与上皮基底层比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与中基质层比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ (单因素方差分析,Tamhane's T2 检验)

## 3 讨论

角膜组织分为 5 层,即上皮层、前弹力层、基质层、后弹力层和内皮层,上皮层细胞又分为表层上皮细胞、翼状上皮细胞和基底上皮细胞,以往的角膜组织学研究主要采取离体的形态学研究方法,缺少活体的形态学观察,而本研究利用双光子激光扫描显微镜对角膜细胞进行活体研究。

角膜上皮的屏障作用主要由翼状上皮细胞所承担<sup>[16]</sup>,本研究中通过活体细胞染色发现翼状上皮细胞极难着色,因此难以得到清晰的翼状细胞染色图片,而表层上皮细胞呈叠瓦状,单细胞的活体染色和测量均不容易。在角膜基质层,角膜基质细胞的形状极不规则,相邻的细胞相互靠近并重叠,细胞的边界不易确定,应用三维图像重建可以测定角膜细胞的三维结构,但比较耗时。因此,本研究仅对上皮基底层、中基质层

和内皮层细胞进行了细胞密度和参数测定。

近年来,BALB/c 小鼠被越来越多地应用于眼科实验,且在眼表疾病的研究中普遍使用。然而,迄今仅有少数研究者对 BALB/c 小鼠角膜细胞密度进行了研究<sup>[6,17]</sup>,但尚缺乏角膜上皮细胞、基质细胞和内皮细胞的活体形态学参数。本研究中首次对 BALB/c 小鼠的上皮细胞、基质细胞和内皮细胞进行活体三维测量,并在三维空间内测量 3 种细胞的密度,发现 BALB/c 小鼠中基质细胞密度明显高于正常人<sup>[18-19]</sup>。

生物不同组织细胞呈现不同的大小和形状是其与内外环境及相邻细胞相互接触并相互适应的结果。以往关于小鼠角膜细胞的研究均采用体外固定标本,且细胞大小的评估均限于细胞面积和周长的测量,而到目前为止尚无细胞表面积和体积测量的结果。本研究中首次对 BALB/c 小鼠的角膜细胞和细胞核进行立体测量,包括细胞的表面积和体积,并在此基础上计算表面积与体积比。细胞的表面积与体积比对生物体相应组织和细胞的生物学行为及特定功能有重要意义,细胞的表面积与体积比增加表明细胞与环境的接触面积增大或代谢率升高。本研究的结果表明,角膜上皮基底层细胞的表面积与体积比最高,中基质层细胞和内皮层细胞依次降低,这些参数是相应细胞特点的生物学物质基础,如角膜上皮基底细胞的有丝分裂活跃,角膜基质细胞与基质接触面大,而角膜内皮细胞则终身不再增生。细胞的核质比与细胞的成熟度有关,随着细胞发育的逐渐成熟,细胞核会逐渐缩小。细胞的核质比值增大常见于癌前病变细胞的不典型增生和恶变。有文献报道核质比测量与 p63 染色可同时用于角膜缘上皮干细胞的识别<sup>[20]</sup>。核质比值可随各种病理状态而改变,该值的变化有助于疾病的诊断和监测。

BALB/c 小鼠是人类多种眼科疾病研究中常用的动物模型,本研究首次定量测定了 BALB/c 小鼠角膜活体细胞的三维密度和大小,包括角膜上皮基底细胞、基质细胞和内皮细胞的细胞和细胞核表面积、体积、表面积与体积比以及核质比,这些参数为 BALB/c 小鼠角膜生理、病理和相关疾病的研究提供了参考数据,也为人类相关疾病的实验研究提供了研究基础。

志谢 感谢 Andor/Bitplane 亚太培训和应用支持中心的王娟和南茜在使用 Imaris 软件对细胞密度和大小进行测量过程中给予的技术支持

## 参考文献

- [1] Ozgurhan EB, Kara N, Yildirim A, et al. Evaluation of corneal microstructure in keratoconus: a confocal microscopy study [J]. Am J Ophthalmol, 2013, 156(5): 885-893. doi:10.1016/j.ajo.2013.05.043.
- [2] McLaren JW, Bachman LA, Kane KM, et al. Objective assessment of the corneal endothelium in Fuchs' endothelial dystrophy [J]. Invest

- Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(2) : 1184-1190. doi:10.1167/iov.13-13041.
- [3] Delshad S, Chun JM. Corneal endothelial cell density and morphology in low and moderate myopic Chinese eyes [J]. Int J Ophthalmol, 2013, 6(4) : 467-470. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2013.04.11.
- [4] Hamrah P, Sahin A, Dastjerdi MH, et al. Cellular changes of the corneal epithelium and stroma in herpes simplex keratitis: an in vivo confocal microscopy study [J]. Ophthalmology, 2012, 119(9) : 1791-1797. doi:10.1016/j.ophtha.2012.03.005.
- [5] Lambiase A, Sacchetti M, Mastropasqua A, et al. Corneal changes in neurosurgically induced neurotrophic keratitis [J]. JAMA Ophthalmol, 2013, 131(12) : 1547-1553. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.5064.
- [6] Esquenazi S, He J, Li N, et al. Comparative in vivo high-resolution confocal microscopy of corneal epithelium, sub-basal nerves and stromal cells in mice with and without dry eye after photorefractive keratectomy [J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2007, 35(6) : 545-549. doi:10.1111/j.1442-9071.2007.01543.x.
- [7] Yuen HK, Rassier CE, Jardeleza MS, et al. A morphologic study of Fuchs dystrophy and bullous keratopathy [J]. Cornea, 2005, 24(3) : 319-327.
- [8] Chaurasia S, Mulay K, Ramappa M, et al. Corneal changes in xeroderma pigmentosum; a clinicopathologic report [J]. Am J Ophthalmol, 2014, 157(2) : 495-500. doi:10.1016/j.ajo.2013.10.016.
- [9] Møller-Pedersen T. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging [J]. Cornea, 1997, 16(3) : 333-338.
- [10] Benetz BA, Lass JH, Gal RL, et al. Endothelial morphometric measures to predict endothelial graft failure after penetrating keratoplasty [J]. JAMA Ophthalmol, 2013, 131(5) : 601-608. doi:10.1001/jamaophthalmol.2013.1693.
- [11] Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ, et al. Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis [J]. Am J Ophthalmol, 2002, 133(3) : 307-314.
- [12] Galgauskas S, Krasauskaite D, Pajaujis M, et al. Central corneal thickness and corneal endothelial characteristics in healthy, cataract, and glaucoma patients [J]. Clin Ophthalmol, 2012, 6(8) : 1195-1199. doi:10.2147/OPHT.S31821.
- [13] Hovakimyan M, Guthoff R, Reichard M, et al. In vivo confocal laser-scanning microscopy to characterize wound repair in rabbit corneas after collagen cross-linking [J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2011, 39(9) : 899-909. doi:10.1111/j.1442-9071.2011.02634.x.
- [14] Nieto-Bona A, González-Mesa A, Nieto-Bona MP, et al. Short-term effects of overnight orthokeratology on corneal cell morphology and corneal thickness [J]. Cornea, 2011, 30(6) : 646-654. doi:10.1097/ICO.0b013e31820009bc.
- [15] Zhang H, Wang L, Liu S, et al. Two-photon imaging of the cornea visualized in the living mouse using vital dyes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(10) : 6526-6536. doi:10.1167/iov.13-12214.
- [16] Yokoi N, Kinoshita S. Clinical evaluation of corneal epithelial barrier function with the slit-lamp fluorophotometer [J]. Cornea, 1995, 14(5) : 485-489.
- [17] Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, et al. Comparative in vivo confocal microscopic study of the cornea anatomy of different laboratory animals [J]. Curr Eye Res, 2010, 35(12) : 1072-1080. doi:10.3109/02713683.2010.513796.
- [18] Cañadas P, de Benito-Llopis L, Hernández-Verdejo JL, et al. Comparison of keratocyte density after femtosecond laser vs mechanical microkeratome from 3 months up to 5 years after LASIK [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2013, 251(9) : 2171-2179. doi:10.1007/s00417-013-2357-9.
- [19] Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, et al. Diabetes and corneal cell densities in humans by in vivo confocal microscopy [J]. Cornea, 2006, 25(7) : 761-768.
- [20] Arpitha P, Prajna NV, Srinivasan M, et al. High expression of p63 combined with a large N/C ratio defines a subset of human limbal epithelial cells: implications on epithelial stem cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(10) : 3631-3636.

(收稿日期:2015-02-03)

(本文编辑:尹卫靖)

## 消息

## 天津医科大学眼科医院第九届国际会议暨 中国眼底病论坛·糖尿病视网膜病变专题研讨会· 天津市医学会眼科学分会 2015 年度学术年会通知

由天津医科大学眼科医院、中华眼底病杂志以及天津市医学会眼科学分会主办,新加坡全国眼科中心协办的“天津医科大学眼科医院第九届国际会议、中华眼底病论坛·糖尿病视网膜病变专题研讨会·2015 天津市医学会眼科学分会 2015 年度学术年会”将于 2015 年 10 月 16—18 日(周五至周日)在天津举行。现将征文及注册参会事宜通知如下:

**1 征文范围** (1)“天津医科大学眼科医院第九届国际会议”征文范围涉及眼科各专业基础及临床研究进展。(2)“中国眼底病论坛·糖尿病视网膜病变专题研讨会”征文范围包括糖尿病视网膜病变诊断治疗经验以及基础研究,尤其关注糖尿病视网膜病变诊疗指南和相关规范的临床应用经验以及以疾病为中心的学科专业融合诊疗模式探索及平台建设的稿件。

**2 征文要求** (1)征文仅需提交约 600 字的以 Word 格式撰写中英文摘要。(2)务请注明作者姓名、单位、职称(职务)、通信地址和邮政编码、电子邮箱以及手机号码。(3)投稿邮箱:tmueh2015@163.com,邮件主题请注明“天津医科大学眼科医院第九届国际会议征文+作者姓名”或“中国眼底病论坛征文+作者姓名”。(4)截止日期:2015 年 7 月 31 日。

**3 注册及费用** 注册表可从网站 www.tmuec.com 下载。请于 2015 年 9 月 1 日前发回注册表,并缴纳注册费 780 元;2015 年 9 月 1 日之后缴纳者注册费为 880 元。

**4 联系方式** 联系人:杜静 杨荔 电话:022-58280725,022-58280866,022-58280836;传真:022-23346434;Email:tmueh2015@163.com。

(天津医科大学眼科医院)