

羊膜提取液治疗兔干眼症的实验研究

杜娟^{1,2}, 李志辉¹, 赵奋图¹, 邵毅², 姜楠², 汤学付¹, 冯敏婷¹

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81160118, 81400372); 佛山市卫生和计生局医学科研项目 (No. 2015306)
作者单位:¹(528300) 中国广东省佛山市, 南方医科大学附属顺德第一人民医院眼科;²(330006) 中国江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院眼科

作者简介: 杜娟, 毕业于南华大学医学院, 硕士, 主治医师, 研究方向: 角膜病、眼表疾病。

通讯作者: 邵毅, 毕业于中山大学中山眼科中心, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 角膜病、眼表疾病. freebee99@163.com

收稿日期: 2016-02-29 修回日期: 2016-06-15

Therapeutic efficiency of amniotic extraction for dry eye rabbit model

Juan Du^{1,2}, Zhi-Hui Li¹, Fen-Tu Zhao¹, Yi Shao², Nan Jiang², Xue-Fu Tang¹, Min-Ting Feng¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81160118, 81400372); Medical Scientific Research Foundation of Foshan Municipal Health Bureau (No. 2015306)

¹Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Shunde, Foshan 528300, Guangdong Province, China; ²Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Yi Shao. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. freebee99@163.com

Received: 2016-02-29 Accepted: 2016-06-15

Abstract

• **AIM:** To investigate therapeutic efficiency of amniotic extraction on dry eye in rabbit model induced by topical benzalkonium chloride (BAC).

• **METHODS:** Totally 26 rabbits (26 right eyes) with dry eye model were studied and divided into two groups: group A (control group with PBS eye drops, $n=13$) and group B (amniotic extraction group, $n=13$). Another two rabbits were chosen as normal control. The Schirmer I tests (S I t) and corneal fluorescein staining (FL) were made, and the tear total protein content, amylase activity, lactoferrin, lysozyme contents, goblet cell density were performed in two groups before treatment and 1, 2, 4 and 8 wk after treatment.

• **RESULTS:** There were significant differences in SIT, FL scores, lysozyme activity and goblet cell density among different groups at different time points ($P<0.05$). But,

there was no significant differences in S I t, FL scores, lysozyme activity and goblet cell density between two groups before treatment ($P>0.05$). After 8wks' treatment with PBS, the mean differences of the group A showed great changes in S I t, lysozyme and goblet cell density compared with those before treatment ($P<0.05$); but there was no significant differences in FL scores compared with those before treatment ($P>0.05$). As for group B, 8wks after treatment, there were statistical changes in S I t, FL, lysozyme ($P<0.05$); but there was no significant differences in goblet cell density compared with those before treatment ($P>0.05$). It was evident that statistical differences were observed in S I t, FL scores, lysozyme activity and goblet cell density between two groups at each time point ($P<0.05$). However, there were no significant differences in total protein, lactoferrin, amylase activity at different time points ($P>0.05$). Meanwhile there was no significant differences in total protein, lactoferrin, amylase activity between two groups before treatment ($P>0.05$). But there were significant differences in total protein, lactoferrin, amylase activity between two groups after 4 and 8 wks' treatment ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** Amniotic extraction has significant therapeutic effect on the dry eye in rabbit model.

• **KEYWORDS:** amniotic extraction; dry eye; treatment; tear protein

Citation: Du J, Li ZH, Zhao FT, *et al.* Therapeutic efficiency of amniotic extraction for dry eye rabbit model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(7):1232-1236

摘要

目的: 研究羊膜提取液对苯扎氯铵诱导的兔干眼的治疗作用。

方法: 选择新西兰大白兔 26 只 (26 眼, 均为右眼), 使用 0.2% 的苯扎氯铵制作兔干眼症模型, 随机分为两组: 对照组 (A 组, 13 眼) 使用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 滴眼, 实验组 (B 组, 13 眼) 使用 1% 羊膜提取液 (amniotic extraction) 滴眼, 4 次/d。另选取 2 只兔作为正常对照。分别于治疗前和治疗 1、2、4、8wk 行 Schirmer I 试验 (Schirmer I test, S I t)、角膜荧光素染色 (corneal fluorescein staining, FL)、泪液总蛋白含量、淀粉酶活性、乳铁蛋白、溶菌酶含量检测, 并进行结膜印迹细胞检查。

结果: 不同组间、不同时间点间 S I t、FL、溶菌酶活性及结膜杯状细胞密度相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。治疗前两组 S I t、FL、溶菌酶活性及结膜杯状细胞密度相

比,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗1、2、4、8wk后,B组S I t、FL、溶菌酶活性较治疗前均有不同程度改善,差异有统计学意义($P<0.05$),B组结膜杯状细胞密度与治疗前相比有所增加,但差异无统计学意义($P>0.05$);治疗1、2、4、8wk后,A组S I t、溶菌酶活性及结膜杯状细胞密度均有不同程度下降,差异有统计学意义($P<0.05$),A组FL评分与治疗前相比有不同程度增加,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。A、B两组各时间点S I t、FL、溶菌酶活性及结膜杯状细胞密度相比,差异均有统计学意义($P<0.05$)。同一组内不同时间点,泪液中总蛋白量、乳铁蛋白、淀粉酶活性差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗前A、B两组泪液中总蛋白量、乳铁蛋白、淀粉酶的活性相比,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗4、8wk后两组泪液中总蛋白量、乳铁蛋白、淀粉酶的活性相比,其差异有统计学意义($P<0.05$)。

结论:羊膜提取液能有效治疗兔干眼症,具有良好的临床应用前景。

关键词:羊膜提取液;干眼;治疗;泪液蛋白

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.7.07

引用:杜娟,李志辉,赵奋图,等.羊膜提取液治疗兔干眼症的实验研究.国际眼科杂志2016;16(7):1232-1236

0 引言

干眼症是由不同的原因引起泪液质或量的异常,或因泪液动力学异常而导致的泪膜稳定性下降和(或)眼表面损害的一大类疾病的总称,患病率达5%~34%^[1]。轻度干眼可引起眼部刺激症状,如眼部干涩、烧灼、疼痛、易疲劳等,若无规范治疗,将会导致角膜上皮持续损害、角膜新生血管形成以及眼表鳞状上皮化生等眼表异常,导致视力障碍,甚至致盲^[2]。目前国内治疗干眼症主要是通过人工泪液点眼来缓解干眼症状,只对轻度干眼取得较好效果,对中重度干眼效果不好。手术行离体颌下腺移植对部分严重的干眼有一定的治疗效果,但其应用受适应证限制,且创伤大,推广有很大的难度,远期疗效有待观察。泪液保留治疗、性激素治疗、中医治疗往往受疗效、副作用和(或)患者依从性等因素限制,通常只作为干眼的辅助治疗措施,因此寻找新型的手段来治疗中重度干眼症是十分必要的。羊膜具有促进角膜上皮愈合、抗炎、抗瘢痕形成和抑制新生血管形成等诸多生物学活性,但是目前应用羊膜需行羊膜移植手术,不仅仅增加了患者的费用及潜在风险,更重要的是,羊膜覆盖在角膜表面必将对患者早期的视功能造成明显的影响,这极大地降低了患者的生活质量。我们提取羊膜中的有效成分制成眼液^[3],探讨羊膜提取液在治疗干眼损伤中的应用效果,为以后提高干眼的临床治愈率提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 羊膜提取液的制备 取排除传染性疾病的剖腹产胎盘,清洗后将羊膜分离,液氮冷冻,研磨,加入医用生理盐水,匀浆,匀浆液置于0℃~4℃保存5d,加热过滤后调节滤液pH值到3,静置过滤,再将滤液pH值调节至7.2,

在无菌条件下使用0.20~0.22μm滤膜过滤,取滤液,0℃~4℃保存备用。本研究所涉及的全部研究方法均遵循《赫尔辛基宣言》,符合医学伦理学原则,并获得南方医科大学附属顺德第一人民医院及南昌大学第一附属医院医学伦理委员会批准。

1.1.2 实验动物 取新西兰大白兔26只(均为2月龄,雌性,体质量2~2.5kg),由南昌大学动物实验室提供。使用裂隙灯显微镜及眼底镜检查眼前节、眼底无异常, Schirmer I 试验(Schirmer I test, S I t) ≥ 10 mm/5min。

1.2 方法

1.2.1 干眼动物模型的建立 依据之前的实验方法制作干眼动物模型^[4];26只实验动物均使用0.1%苯扎氯铵溶液滴眼,2次/d,持续使用2wk。造模完成后将实验动物随机分为2组(每组13只,均为右眼):磷酸盐缓冲液对照组(A组)、羊膜提取液组(B组),分别使用磷酸盐缓冲液和羊膜提取液连续滴眼2mo,4次/d。于滴眼治疗前和治疗1、2、4、8wk分别对两组兔行S I t检查、角膜荧光素染色(corneal fluorescein staining, FL)、泪液蛋白测定、结膜印迹细胞学检查。

1.2.2 S I t 检测 取5mm×35mm有刻度的试纸,一端反折5mm后放置于下方结膜囊中外1/3处,静待5min后取出滤纸,记录该纸带的润湿长度(mm)。参照文献的标准^[5],以 ≥ 10 mm/5min为正常。进行每次检查时应注意控制变量,应由同一人在相同的时间、地点、相同的照明亮度、湿度及温度下操作。

1.2.3 角膜荧光素染色 使用1滴1%荧光素钠滴眼,使其瞬目,参考国家眼科研究临床干眼评分系统^[6]将其分为0~3级:无染色(0级);少量的播散性污渍染色(1级);中度污渍染色(2级);重度融合性污渍染色(3级)。

1.2.4 泪液蛋白测定 用毛细吸管于兔下泪河吸取非刺激性泪液(约20μL),置于-80℃冰箱中保存,将小牛血清白蛋白做为标准,Brandford法测定泪液总蛋白含量。4,6-亚乙基-对硝基苯- α -D-麦芽七糖苷(EPS-PNP-G7)测量其淀粉酶活性(Leadman Group Co. Ltd,北京)^[7]。双色读数在405nm和546nm采用自动生化分析仪分析(LX20;Beckman, Fullerton, CA);使用放射免疫分析法测定乳铁蛋白含量^[8]:取泪液样品10μL,用生理盐水进行1:100稀释,制作出标准曲线后计算出乳铁蛋白含量。使用试管比浊法测定溶菌酶含量,溶菌酶试剂盒、染色菌液的制备、溶菌酶标准液的配置及标准曲线的绘制均按说明书进行;将泪液与染色菌液混匀后离心取上清液,根据测定管与样品对照管光密度差值,可查标准曲线后得出样品中溶菌酶含量。为控制变量,每次检查应由同一人在上午9:00~11:00完成。

1.2.5 结膜印迹细胞检查 参照 Cordelia 等^[9]的方法:检查前应用1%爱尔卡因表面麻醉,5min后用滤纸吸去结膜囊泪液,将醋酸纤维膜剪出3mm×3mm大小,并将其粗糙面贴于距上方角膜缘2mm的球结膜表面,轻轻加压,3~5s后撕下,于其左右相邻的区域再各贴一张,将其固定在95%酒精中30min,苏木精和碘酸-希夫(PAS)试剂染色,在双目光学显微镜高倍视野下对结膜杯状细胞计数。

表1 两组治疗前后各时段泪液分泌情况比较

($\bar{x} \pm s$, mm³/5min)

组别	眼数	治疗前	治疗 1wk	治疗 2wk	治疗 4wk	治疗 8wk
A 组	13	4.89±2.15	3.91±2.17	3.69±1.86	3.28±2.11 ^a	2.89±1.76 ^a
B 组	13	4.93±2.21	4.79±2.13	5.12±2.26	6.28±2.37 ^c	7.89±2.73 ^{a,c}

注:A组:对照组;B组:羊膜提取液组;^a $P < 0.05$ vs 治疗前;^c $P < 0.05$ vs A组。

表2 两组治疗前后各时段 FL 评分情况比较

($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	眼数	治疗前	治疗 1wk	治疗 2wk	治疗 4wk	治疗 8wk
A 组	13	4.96±1.15	5.38±1.26	5.87±1.41	6.39±2.07	6.89±2.96
B 组	13	4.99±1.01	5.26±1.29	4.19±1.37 ^c	3.28±1.02 ^{a,c}	1.93±1.23 ^{a,c}

注:A组:对照组;B组:羊膜提取液组;^a $P < 0.05$ vs 治疗前;^c $P < 0.05$ vs A组。

表3 两组治疗前后泪液蛋白情况比较

$\bar{x} \pm s$

组别	眼数	时间	泪液总蛋白量($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	乳铁蛋白($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	溶菌酶($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	淀粉酶活性
A 组	13	治疗前	8.03±2.37	1.02±0.46	0.79±0.19	55.67±51.73
		治疗 1wk	7.82±2.19	0.93±0.33	0.62±0.21 ^a	46.28±51.91
		治疗 2wk	7.31±2.25	0.81±0.35	0.55±0.19 ^a	37.27±39.94
		治疗 4wk	6.25±3.16	0.72±0.26	0.46±0.23 ^a	29.25±31.28
		治疗 8wk	5.19±2.98	0.63±0.17	0.39±0.19 ^a	21.25±31.15
B 组	13	治疗前	7.99±1.97	1.05±0.39	0.78±0.23	51.57±49.75
		治疗 1wk	8.07±1.86	1.09±0.27	0.81±0.26	53.51±34.87
		治疗 2wk	8.75±2.89	1.25±0.33	1.01±0.14 ^{a,c}	67.28±39.91
		治疗 4wk	9.86±3.01 ^c	1.35±0.19 ^c	1.13±0.19 ^{a,c}	75.19±46.63 ^c
		治疗 8wk	10.78±2.89 ^c	1.49±0.37 ^c	1.29±0.24 ^{a,c}	82.69±42.56 ^c

注:A组:对照组;B组:羊膜提取液组;^a $P < 0.05$ vs 治疗前;^c $P < 0.05$ vs A组。

统计学分析:使用 SPSS 15.0 统计软件处理实验数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用重复测量资料方差分析进行统计分析;各时间点的组间差异比较,采用独立样本 t 检验;各组的时间差异比较,采用 LSD- t 检验方法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后及两组间 S I t 检测指标结果比较 不同组间、不同时间点间 S I t 相比,差异有统计学意义($F = 6.20, 12.23, P < 0.05$)。治疗前 A、B 两组 S I t 相比,差异无统计学意义($t = 0.04, P > 0.05$)。治疗 1、2、4wk, B 组的 S I t 均较治疗前有不同程度的增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗 8wk, 与治疗前相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。治疗 1、2wk, A 组的 S I t 均较治疗前有不同程度的降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗 4、8wk, 与治疗前相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。各时间点 A、B 两组 S I t 相比,治疗 4、8wk 时差异具有统计学意义($t = 3.41, 5.56, P < 0.05$, 表 1)。

2.2 治疗前后及两组间 FL 评分结果比较 不同组间、不同时间点间 FL 相比,差异有统计学意义($F = 12.01, 5.72, P < 0.05$)。治疗前 A、B 两组的 FL 评分相比,其差异无统计学意义($t = 0.06, P > 0.05$)。治疗 1、2wk 后, B 组 FL 评分较治疗前有不同程度的降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗 4、8wk 后, 与治疗前相比其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。A 组 FL 评分与治疗前相比有不同程度增加,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。A、B 两组的 FL 评分在治疗后 2、4、8wk 比较,其差异均有统计学意义($t = 3.09, 4.87, 5.58, P < 0.05$, 表 2)。

2.3 两组用药前后各时间点泪液蛋白比较 不同组间、不同时间点间溶菌酶活性相比,差异有统计学意义($F = 31.59, 14.97, P < 0.05$)。治疗前 A、B 两组泪液中溶菌酶活性相比,差异无统计学意义($t = 0.20, P > 0.05$);在治疗 2、4、8wk 后, B 组泪液中溶菌酶活性与治疗前相比有不同程度增加,其差异有统计学意义($P < 0.05$);而治疗 1、2、4、8wk 后, A 组泪液中总溶菌酶活性与治疗前相比有不同程度下降,其差异有统计学意义($P < 0.05$);在治疗 2、4、8wk 后 A、B 两组溶菌酶活性相比,其差异有统计学意义($t = 7.13, 8.19, 10.83, P < 0.05$)。不同时间点,泪液中总蛋白量、乳铁蛋白、淀粉酶活性差异无统计学意义($F = 0.10, 0.70, 0.40, P > 0.05$)。治疗前 A、B 两组泪液中总蛋白量、乳铁蛋白、淀粉酶的活性相比,差异无统计学意义($t = 0.05, 0.20, 0.21, P > 0.05$);治疗 4、8wk 后两组泪液中总蛋白量、乳铁蛋白、淀粉酶的活性相比, B 组活性增加, A 组降低,其差异有统计学意义($t = 5.25, 8.52, 4.56, P < 0.05$, 表 3)。

2.4 两组不同时间点结膜杯状细胞密度比较 不同组间、不同时间点间结膜杯状细胞密度相比,差异有统计学意义($F = 30.03, 82.87, P < 0.05$)。治疗前 A、B 两组结膜杯状细胞密度,其差异无统计学意义($t = 0.18, P > 0.05$)。在治疗 1、2、4、8wk 后, B 组结膜杯状细胞密度与治疗前相比有所增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。在治疗 2、4、8wk 后, A 组结膜杯状细胞的密度下降,与治疗前相比其差异均有统计学意义($P < 0.05$)。A、B 两组的结膜杯状细胞密度在治疗 2、4、8wk 后相比,差异均有统计学意义($t = 6.61, 10.14, 12.50, P < 0.05$, 表 4, 图 1)。

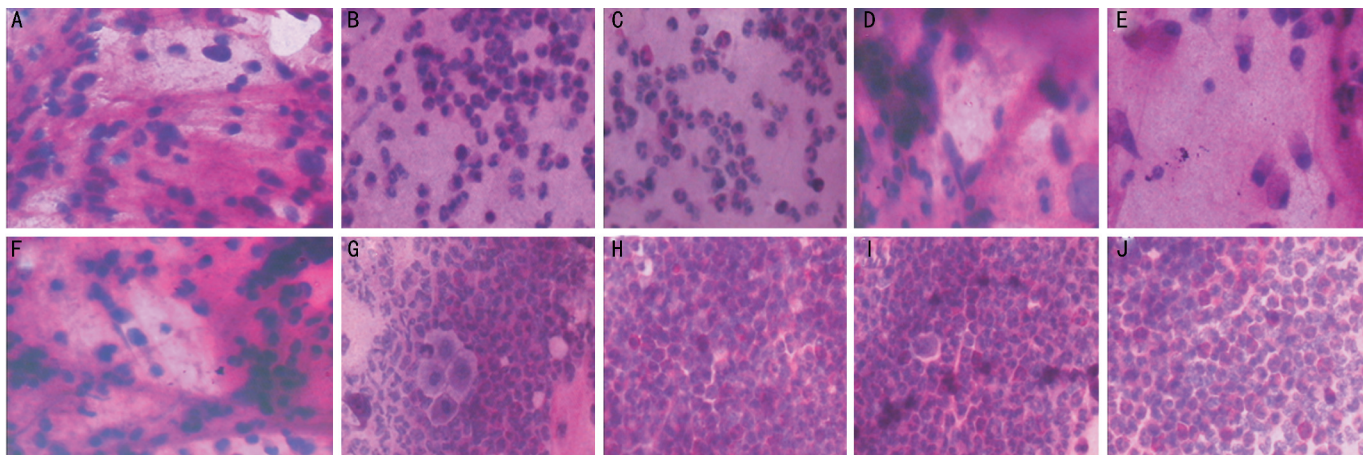


图1 两组不同时间点结膜杯状细胞密度检查结果($\times 400$) A:对照组治疗前;B:对照组治疗1wk;C:对照组2wk;D:对照组4wk;E:对照组8wk;F:羊膜提取液组治疗前;G:羊膜提取液组治疗1wk;H:羊膜提取液组2wk;I:羊膜提取液组4wk;J:羊膜提取液组8wk。

表4 两组治疗前后各时段杯状细胞密度情况比较 ($\bar{x} \pm s$, 个/高倍视野)

组别	眼数	治疗前	治疗1wk	治疗2wk	治疗4wk	治疗8wk
A组	13	119.65 \pm 18.67	112.97 \pm 15.86	90.78 \pm 14.32 ^a	81.43 \pm 13.49 ^a	66.43 \pm 13.49 ^a
B组	13	118.26 \pm 21.32	123.86 \pm 18.56	135.4 \pm 19.67 ^e	132.8 \pm 12.33 ^e	129.8 \pm 12.33 ^e

注:A组:对照组;B组:羊膜提取液组;^a $P < 0.05$ vs 治疗前;^e $P < 0.05$ vs A组。

3 讨论

我国干眼症的发病率逐渐升高并有年轻化趋势,大量的研究已经证实,中重度干眼除了因泪液缺乏和(或)异常引起的眼部不适之外,常常存在不同程度的眼表炎症。研究表明,中重度干眼眼表上皮细胞及泪液中IL-1、 γ -INF、NF- κ B等炎性相关因子含量增加,加用抗炎药物对中重度干眼治疗有效^[10-11]。引起干眼患者眼表炎症发生的原因复杂多样,可能与眼表摩擦增加、泪液渗透压增加、泪液分泌反射弧的反馈机制等因素有关。其次,由于眼表上皮与泪膜密切相关,互相依赖和影响。长期的泪液缺乏和(或)异常,还可导致眼表上皮微绒毛减少及缺乏,甚至发生鳞状上皮化生。在眼表疾病中,干眼是引起角膜和结膜鳞状上皮化生常见的原因。通过体外实验推测与证实,干眼患者长期的泪液缺乏,眼表上皮暴露于空气中,可以诱导眼表上皮角蛋白K10、Ki67、K14、K16和P63等阳性表达和上调,引起眼表上皮异常分化和增殖,导致眼表上皮鳞状上皮化生^[12-13]。此外,中重度干眼长期的眼表慢性炎症也是引起眼表上皮鳞状上皮化生重要的原因^[14]。鳞状上皮化生不仅影响了眼表上皮对泪液的黏附功能,更因为眼表上皮细胞成分的改变(如杯状细胞及副泪腺的减少与缺乏)严重影响了泪液的正常分泌,导致干眼进一步加重,形成恶性循环。

羊膜是从细胞滋养层衍化而来,位于胎膜的最内层,它包括五层:上皮层、基底膜、致密层、纤维母细胞层及海绵层,用于眼科的羊膜去除了纤维母细胞层及海绵层。1995年Kim等^[15]重新将羊膜引入眼科领域,用不含绒毛膜的保存羊膜进行移植,使兔化学烧伤模型的角膜表面获得上皮化。此后,羊膜在眼科的应用逐渐开展。由于羊膜包含了大量的生物活性成分(如bFGF、EGF、HGF、KGF等多种生长因子及神经生长因子和P物质等),对角膜神经有营养作用,具有促进角膜上皮愈合、抗瘢痕形成、抗炎和抑制新生血管形成等诸多生物学活性,因此羊膜移植已成

为当今眼表手术的一个热点,被广泛应用于眼表疾病的预防和治疗。然而羊膜移植术作为一种手术,不仅加重了患者的心理负担,而且在羊膜溶解前明显影响了患者的视觉质量,因此限制了其在干眼方面的应用。如果能够提取羊膜中的有效成分制成滴眼液,则可克服羊膜移植手术带来的缺陷。近年来,一些学者致力于这方面的研究,越来越多的研究证明:从羊膜中提取其中的可溶性成分制成羊膜提取液,同样具有抗炎、抗瘢痕形成和抑制新生血管形成等生物学活性。He等^[16]研究表明,羊膜提取液可以抑制体外培养的RAW264.7细胞的凋亡,Jiang等^[3]的体内体外实验均证实羊膜提取液具有抑制新生血管生长的作用。本课题组改进了羊膜提取液的提取方法,将其应用于准分子激光角膜切削术(photorefractive keratectomy, PRK)后的兔眼,发现其可以减轻PRK术后haze的发生。又有研究发现^[17]在一组化学伤的患者中使用羊膜提取液,其可以有效减轻眼表局部炎症反应、抑制新生血管形成及促进角膜上皮的修复。最近的体外实验还证明^[18]羊膜提取液能有效抑制结膜鳞状上皮化生,其机制可能与其抑制Wnt信号通路的活化相关。实验表明,羊膜提取液在用药2mo后可明显改善兔干眼SIt、FL评分、泪液蛋白成分及结膜杯状细胞密度,PBS治疗则改善不明显,可能的原因是羊膜提取液主要通过减轻眼表局部炎症反应、抑制结膜鳞状上皮化生从而维持了泪液的分泌水平,延缓了干眼症的发生。

综上所述,滴用羊膜提取液可较快而明显地改善干眼的症状和维持泪液蛋白成分。它是一种安全有效、给药途径简单、副反应少且廉价的治疗干眼的方法,具有广泛临床应用及推广价值,进一步将探讨其作用的受体、信号转导途径、调节机制和有关在临床方面的应用。

参考文献

1 Lemp MA. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop. *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92

- 2 Messmer EM. The pathophysiology, diagnosis, and treatment of dry eye disease. *Dtsch Arztebl Int* 2015;112(5):71-81
- 3 Jiang A, Li C, Gao Y, et al. *In vivo* and *in vitro* inhibitory effect of amniotic extraction on neovascularization. *Cornea* 2006;25(10):S36-40
- 4 Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(5):1850-1856
- 5 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 干眼临床诊疗专家共识. 中华眼科杂志 2013;49(1):73-75
- 6 Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995;21(4):221-232
- 7 Chen ZY, Jie Y, Yu GY. Treatment of severe keratoconjunctivitis sicca by parotid duct transposition after tympanic neurectomy in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6964-6970
- 8 邵毅, 余瑶, 王乐, 等. 真性糖尿病白内障患者超声乳化术后角膜神经和泪液蛋白的特点. 中国糖尿病杂志 2014;22(3):216-219
- 9 Chan CM, Liu YP, Tan DT. Ocular surface changes in pterygium. *Cornea* 2002;21(1):38-42
- 10 Chang He, Peilong Lai, Jianyu Weng, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B inflammatory responses in dry eye associated with cGVHD. *Mol Vis* 2011;17(8):2605-2611
- 11 Zhu L, Zhang C, Chuck RS. Topical steroid and non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the botulium toxin B-induced murine dry eye model. *Mol Vis* 2012;18(6):1803-1812
- 12 Li W, Hayashida Y, Chen YT, et al. Air exposure induced squamous metaplasia of human limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(1):154-162
- 13 Tan Y, Qiu FF, Qu YL, et al. Amniotic membrane inhibits squamous metaplasia of human conjunctival epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301(1):C115-125
- 14 Chen YT, Nikulina K, Lazarev S, et al. Interleukin-1 as a Phenotypic Immunomodulator in Keratinizing Squamous Metaplasia of the Ocular Surface in Sjögren's Syndrome. *Am J Pathol* 2010;177(3):1333-1343
- 15 Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995;14(5):473-484
- 16 He H, Li W, Chen SY, et al. Suppression of activation and induction of apoptosis in RAW264.7 cells by amniotic membrane extract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(10):4468-4475
- 17 Liang LY, Li W, Ling SQ, et al. Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37(3):855-863
- 18 Lin ZR, Liu XC, Zhou T, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis* 2011;17(1):257-264