

兔角膜上皮的 CFTR 分泌通路与细胞内钙信号释放的关联研究

林丽勉 罗依凌 周世有

510060 广州,中山大学中山眼科中心 中山大学眼科学国家重点实验室

通信作者:周世有,Email:zhoushiy@mail.sysu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.11.009

【摘要】 **背景** 研究表明角膜上皮中的囊性纤维跨膜电导调节因子(CFTR)是重要的阴离子和水分泌通道,CFTR 激动剂可促进泪液分泌,对于眼的治疗具有一定的意义。曾有研究认为 CFTR 通路是 cAMP-PKA 依赖通路而没有钙信号参与。然而,升高 cAMP 并不能促进角膜上皮 CFTR 通路的分泌,钙信号在角膜上皮 CFTR 分泌通道中是否发挥作用尚不清楚。**目的** 从生理学角度探讨 CFTR 在兔角膜上皮分泌功能的实现与钙信号之间的关系。**方法** 采用计算机随机数字分配法将 16 只健康新西兰白兔随机分为 2 个组,每组各 8 只。动物全身麻醉下取双眼角膜,然后处死。角膜上皮面朝向正向电流方向置于尤氏小室,奇数组兔右眼角膜仅给予单纯 ATP 刺激(ATP 刺激组),左眼角膜用 CFTR 特异性抑制剂 CFTR_{inh-172} 预处理后给予 ATP 刺激(CFTR_{inh-172} 预处理组);偶数组兔右眼角膜用于原代角膜上皮细胞培养并采用激光扫描共焦显微镜进行单个细胞胞质内钙离子荧光强度测定,左眼角膜组织用细胞内钙离子螯合剂 BMPTA/AM 预处理后给予 ATP 刺激(BMPTA/AM 预处理组),采用短路电流装置记录各组兔角膜上皮的短路电流变化。**结果** ATP 刺激组、CFTR_{inh-172} 预处理组和 BMPTA/AM 预处理组角膜上皮电流值分别为 (5.73 ± 1.36) 、 (1.30 ± 0.95) 和 $(2.47 \pm 0.55) \mu\text{A}/\text{cm}^2$,CFTR_{inh-172} 预处理组和 BMPTA/AM 预处理组角膜上皮电流值均低于单纯 ATP 刺激组,差异均有统计学意义($t=11.201, 5.508$, 均 $P<0.001$)。单细胞的细胞内钙离子检测发现,ATP 刺激后细胞内钙离子荧光强度迅速升高至 ATP 刺激前的 3.25 倍。**结论** ATP 可引起兔角膜上皮细胞分泌增加,CFTR_{inh-172} 抑制整个 CFTR 通路中 ATP 促发的角膜短路电流,而 BMPTA/AM 消除了细胞内游离的钙离子,提示兔角膜上皮细胞分泌的 CFTR 通道功能的实现与细胞内钙信号释放有关。

【关键词】 囊性纤维跨膜电导调节因子/代谢;角膜上皮细胞/药物作用;ATP;细胞培养;短路电流;钙信号;兔

基金项目: 广东省科技厅科技计划项目(2015A050502025)

Study on the relationship between CFTR physiological secretion pathway and intracellular calcium signaling in rabbit cornea epithelium Lin Limian, Luo Yiling, Zhou Shiyou

State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: Zhou Shiyou, Email: zhoushiy@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] **Background** Researches showed that cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein(CFTR) is a channel secreting anion and water, and it plays an important role in tear secreting. Traditional conception thought that CFTR pathway is cAMP-PKA -dependent without the participation of intracellular calcium. However, studies disclosed that elevating intracellular cAMP could not open the CFTR channel. So whether calcium signal is associated with CFTR-related corneal epithelial secretion is controversial. **Objective** This study was to investigate the association between CFTR secretion and intracellular calcium signaling in rabbit corneal epithelium.

Methods Sixteen New Zealand white rabbits were randomized into odd number group and even number group by computer randomized number method. The corneas were obtained under the general anesthesia and placed in Ussing Chamber for the record of short circuit current (Isc). The right eyes of rabbits in the odd number group were stimulated with ATP and served as ATP stimulating group. The left eyes were pretreated with CFTR_{inh-172} prior to ATP

stimulation and served as CFTR_{inh-172} pretreated group. In the even number group, the left eyes of rabbits were pretreated with BMPTA/AM before ATP stimulation and served as BMPTA/AM pretreated group, and the right eyes of the rabbits were used to isolate and culture corneal epithelial cells by explant adherent method, the level of intracellular calcium were evaluated using Leica SP5 laser scan confocal microscope. **Results** The ATP-induced ΔI_{sc} of corneal epithelium was (5.73 ± 1.36) , (1.30 ± 0.95) and $(2.47 \pm 0.55) \mu A/cm^2$ in the ATP stimulating group, CFTR_{inh-172} pretreated group and BMPTA/AM pretreated group, respectively, and the ΔI_{sc} was significantly reduced in the CFTR_{inh-172} pretreated group and BMPTA/AM pretreated group compared with ATP stimulating group ($t = 11.201, 5.508$, both at $P < 0.001$). The fluorescence intensity of intracellular calcium release after ATP stimulation was 3.25 folds more than that before ATP stimulation. **Conclusions** ATP promotes rapid short circuit current of corneal epithelium. CFTR_{inh-172} depresses the ATP-induced corneal epithelium ΔI_{sc} , and BMPTA/AM suppresses intracellular calcium release. It is suggested that intracellular calcium signaling secretion probably participates in the functional CFTR activity in rabbit corneal epithelium.

[Key words] Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator/metabolism; Epithelial cells, corneal/drug effects; ATP; Cells, cultured; Short circuit current; Calcium signaling; Rabbits

Fund program: Science and Technology Plan of Guangdong Science and Technology Department (2015A050502025)

角膜上皮的分泌功能对于维持泪液分泌及眼表的稳定和健康具有重要作用,与角膜上皮的损伤及多种眼表疾病密切相关,如干眼的发生和发展以及角膜感染等。囊性纤维跨电导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是由 1 480 个氨基酸组成的跨膜蛋白,其表达于角膜上皮细胞的顶膜面,可介导氯离子跨膜转运,同时伴随水分的运输,激活 CFTR 可促进泪液的分泌,缓解干眼症状^[1-2]。然而,CFTR 在角膜上皮的分泌究竟是基于何种电流通路目前尚未阐明,了解相关通路有助于干眼发病机制的研究。本研究拟采用电生理的研究方法探讨角膜上皮细胞中 CFTR 所介导的生理分泌机制,为进一步研究 CFTR 通路参与干眼发病机制奠定基础,并讨论 CFTR 受体激动剂治疗干眼的电生理基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 16 只健康新西兰大白兔购自广州花东信华实验动物养殖场,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,普通级环境中饲养于中山大学中心眼科中心实验动物中心。实验动物的使用遵循视觉与眼科学研究协会(Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO)制定的实验动物使用条例。

1.1.2 主要试剂及仪器 荧光素钠(中山大学中山眼科中心药房提供);泪液检测滤纸条(天津晶明新技术开发有限公司);ATP(德国 Sigma-Aldrich 公司)、CFTR_{inh-172}、钙离子螯合剂 BMPTA/AM(德国 Sigma-

Aldrich 公司);水合氯醛(广州化学试剂厂);钙离子荧光指示剂 Fluo-4/AM(美国 Molecular Probe 公司);DMEM/F12 培养基(美国康宁公司);胎牛血清(美国南美 R&S 公司);质量分数 0.25% Trypsin-EDTA(美国 Gibco 公司)。6 孔板适用盖玻片(中国 Nest 公司)。短路电流装置(北京泰盟科技有限公司);SP5 型激光扫描共焦显微镜(德国徕卡公司);裂隙灯照相系统(日本 Topcon 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔角膜组织样本的采集和分组 实验前所有新西兰兔行泪液分泌实验,结膜囊点荧光素,然后于裂隙灯显微镜下观察角膜染色情况并评分,纳入 16 只泪液分泌量为 10 ~ 25 mm⁵/min 及角膜无荧光素染色的兔,雌雄各半。16 只新西兰兔先按性别连续编号为 1 ~ 16(雄兔编号为 1 ~ 8,雌兔编号为 9 ~ 16),然后通过 SPSS 20.0 for Windows 软件建立对应的随机数字(种子数 20150306)将兔分为奇数组和偶数组。实验兔用质量分数 10% 水合氯醛耳缘静脉注射进行麻醉,剂量为 2.0 ~ 2.5 ml/kg,1 min 后切取兔角膜,取材结束后采用股动脉放血法处死。奇数组 8 只新西兰兔右眼角膜用于单纯 ATP 刺激的短路电流实验(ATP 刺激组),左眼角膜用于 CFTR_{inh-172} 作用的短路电流实验(CFTR_{inh-172} 预处理组);偶数组 8 只新西兰兔右眼角膜缘用于角膜上皮细胞的培养以检测细胞内钙离子含量,左眼角膜用于 BMPTA/AM 作用的短路电流实验(BMPTA/AM 预处理组)。

1.2.2 角膜上皮短路电流记录 短路电流装置简图如图 1 所示。实验前将短路电流装置的电流/电压

钳制仪器输出连接 BL420E+生物机能实验系统,将 BL420E+生物机能实验系统连接于计算机。实验时对短路电流装置进行预热,连接好电极和盐桥,向尤氏小室内灌入适量 K-H 溶液(表 1),调零电流和电压值,稳定后吸除尤氏室中的 K-H 溶液,取下钳夹组织的尤氏小室,将角膜快速钳夹于 2 个尤氏小室之间,角膜上皮面与记录装置的正向电流方向一致。向角膜组织分隔的 2 个独立小室,各注入 6 ml K-H 溶液,排出气泡,继续通入含体积分数 95% O₂和体积分数 5% CO₂的混合气体,以维持 pH 值在 7.4。设置电流记录参数,采样率为 10 Hz,扫描速度为 40.0 s/div,增益为 2,时间常数 DC,滤波为 0.3 Hz。记录角膜组织的膜阻抗后开始电流记录,5~10 min 后电流达到平衡时向 K-H 溶液中加入药物进行刺激,观察并记录电流的变化情况。ATP 刺激组的 K-H 溶液中加入终浓度为 100 μmol/L ATP,观察电流曲线的变化情况;CFTR_{inh-172} 预处理组的 K-H 溶液中加入浓度为 40 μmol/L CFTR_{inh-172},作用 10~15 min 后再加入 ATP(终浓度为 100 μmol/L),观察电流曲线的变化情况;BMPTA/AM 预处理组的 K-H 溶液中加入终浓度为 100 μmol/L BMPTA/AM,作用 10~15 min 后再加入 ATP(终浓度为 100 μmol/L),观察电流曲线的变化情况。

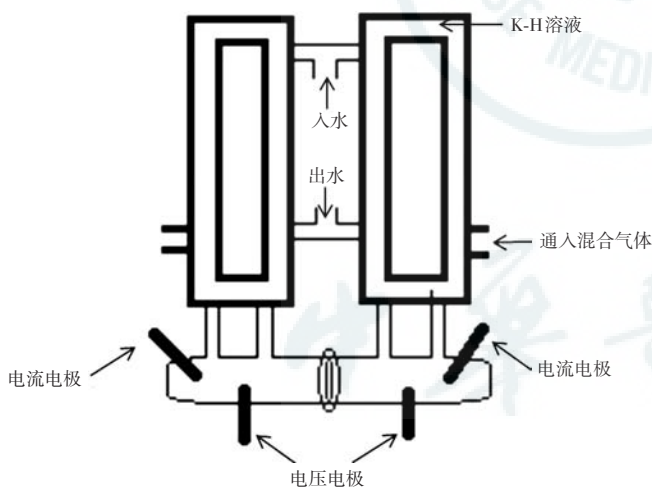


图 1 短路电流装置示意图

表 1 K-H 溶液的组成成分及浓度 (mmol/L)

成分	终浓度
NaCl	117.0
KCl	4.7
CaCl ₂	2.5
NaHCO ₃	24.8
MgSO ₄	1.2
KH ₂ PO ₄	1.2
葡萄糖	11.1

注:通入含 95% O₂和 5% CO₂的混合气体,维持溶液的 pH 值于 7.4

1.2.3 兔角膜上皮细胞的培养 参照文献[3]的方法行兔角膜上皮细胞培养。剪取宽度为 1.5~2.0 mm 的兔角膜缘,用含青霉素/链霉素的 PBS 冲洗 2~3 次,解剖显微镜下用灭菌刀片刮去角膜内皮层,剪成约 1 mm 宽的组织块,角膜上皮面朝下贴在含有盖玻片的 6 孔板中,每孔 3~4 块,常温下放置 10~15 min,使组织块与盖玻片贴附,然后每孔加入 1 ml 含体积分数 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,轻轻放入 37℃、5% CO₂的恒温培养箱,待细胞长到 20%~30% 时取出组织块继续培养,隔天换液。

1.2.4 细胞内钙离子含量测定 将 Fluo-4/AM 配制成 1 mmol/L 的储存液,于 -20℃ 容器中保存,使用时与正常生理盐溶液 (normal physiological saline solution, NPSS) (表 2) 按照容积比 1:100 混合成工作液,避光保存备用。当盖玻片上培养兔角膜上皮细胞生长到 40%~50% 时取出盖玻片,用 NPSS 轻柔润洗 2~3 次,每次 1 min,轻轻吸干水分,覆盖 100 μl 工作液,避光,37℃ 培养箱中孵育 40~60 min, NPSS 润洗 2~3 次,每次 1 min,吸除工作液,用自制装置嵌住盖玻片并置于底部,使细胞面朝上,向装置内加入约 2 ml NPSS,测定钙离子含量。采用徕卡 SP5 激光扫描共焦显微镜进行检测,氩激光光源激发波长为 494 nm,发射波长为 516 nm,采用 xyt 记录方式。荧光显微镜下选取细胞生长散在的区域,在实时显示的计算机画面上任意选取视野中 20 个独立细胞,在波长为 516 nm 处测定荧光强度。荧光强度曲线趋于平稳时加入 ATP,使终浓度 100 μmol/L,记录细胞质内钙离子含量的变化,每个细胞质内的绿色荧光强度代表一个数据,计算荧光强度百分比。荧光强度百分比 = 药物刺激后达到的荧光强度峰值/加药前的荧光强度 × 100%。参照文献[4]的方法,Fluo-4/AM 工作液孵育后,于激光扫描共焦显微镜下观察细胞中钙离子荧光强度的变化。

表 2 NPSS 成分及浓度 (mmol/L)

成分	终浓度
NaCl	137.0
KCl	5.0
HEPES	10.0
MgCl ₂	1.0
葡萄糖	10.0
CaCl ₂	2.5

注:NaOH 调节 pH 值至 7.4 NPSS:正常生理盐溶液;HEPES:羟乙基哌嗪乙磺酸

1.3 统计学方法

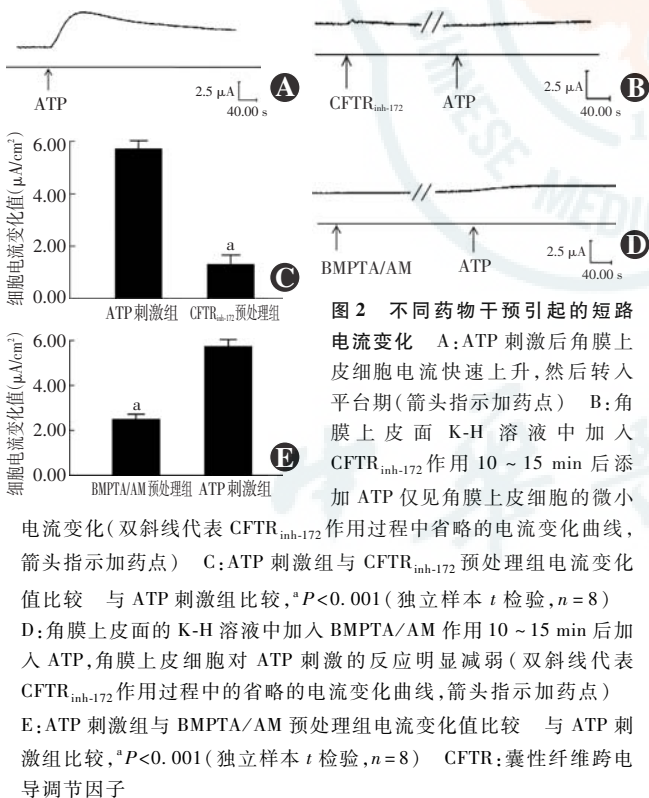
采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,采用

Origin 8.0 软件绘图。本研究中测量指标的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素干预两水平研究设计,CFTR_{inh-172} 预处理组与 ATP 刺激组间以及 BMPTA/AM 预处理组与 ATP 刺激组间角膜上皮短路电流强度的差异比较采用独立样本 t 检验。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同药物干预引起的短路电流变化

ATP 刺激组单纯 ATP 作用后角膜上皮细胞电流快速上升,随后电流稳定进入平台期(图 2A),加药前后电流变化值为 $(5.73 \pm 1.36) \mu\text{A}/\text{cm}^2$; CFTR_{inh-172} 预处理组细胞电流微弱,电流变化值为 $(1.30 \pm 0.95) \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 2 个组电流变化值比较差异有统计学意义 ($t = 11.201$, $P < 0.001$) (图 2B, C)。BMPTA/AM 预处理组兔角膜上皮细胞电流变化值为 $(2.47 \pm 0.55) \mu\text{A}/\text{cm}^2$, 显著低于 ATP 刺激组,差异有统计学意义 ($t = 5.508$, $P < 0.001$) (图 2D, E)。



2.2 兔角膜上皮细胞的培养形态

组织贴壁第 2 天即可观察到角膜上皮细胞长出(图 3A),呈圆形,透明,大小一致;培养至第 5 天时,细胞密度达到 40% (图 3B),细胞形态呈椭圆形、多边形,透明,以膜样向周边生长。

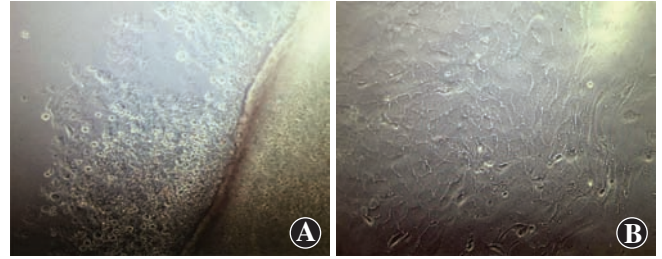
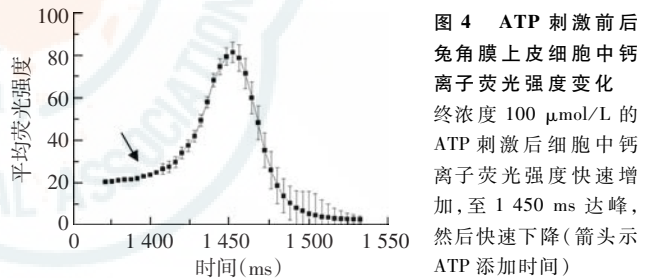


图 3 兔角膜缘组织块培养的角膜上皮细胞的生长情况 A:组织块贴附后第 2 天细胞呈圆形,透明,大小一致($\times 100$,标尺 = $10 \mu\text{m}$) B:组织块贴附后第 5 天细胞呈椭圆形或多边形,透明,以膜样向四周贴附生长($\times 400$,标尺 = $2.5 \mu\text{m}$)

2.3 ATP 刺激前后兔角膜上皮细胞中钙离子荧光强度变化

Fluo-4/AM 工作液孵育后,激光扫描共焦显微镜下可见细胞中钙离子荧光强度发生动态变化,荧光强度值在 1400 ms 前趋于平稳,荧光强度值为 20 左右,添加 ATP 后细胞中钙离子荧光强度快速上升,在 1450 ms 时荧光强度达高峰,荧光强度值为 85,为 ATP 刺激前的 3.25 倍,随后细胞中钙离子荧光强度值迅速下降,未促发细胞外钙离子内流维持细胞质内的钙浓度(图 4)。



3 讨论

早在 1991 年,Marshall 等^[5]即采用膜片钳技术检测出原代培养的角膜上皮细胞顶膜面中存在阴离子通道。最近的研究发现,筛选 CFTR 通道的小分子激动剂可增加泪液的分泌而减轻泪腺切除所引起的干眼症状^[2],但 CFTR 在角膜上皮中通过何种通路来发挥分泌功能尚未完全明了。研究发现,地瓜磷酸可通过升高角膜上皮细胞内钙信号来调节 ERK 信号通路,从而促进角膜上皮的分泌^[6]。以往的研究认为 CFTR 功能的实现是建立在 cAMP-PKA 的基础上,即通过升高胞内 cAMP 的含量而激活 CFTR 的分泌^[7]。然而,Candia 等^[8]研究发现,可明显升高细胞内 cAMP 含量的 CFTR 激动剂 Forskolin 不但不能促进角膜上皮分泌 CFTR,反而明显抑制其分泌。本研究探讨相关的 CFTR 功能通路,发现真正参与角膜上皮 CFTR 分泌调节的细胞内关键信号转导机制是细胞内钙离子浓度的变化。

短路电流实验主要用于记录上皮组织(细胞)的跨上皮电解质转运,离子的定向转运可产生电流变化,并伴随着水分的跨膜共转运,因而常可用于检测上皮细胞的功能状态,实验中添加不同的抑制剂可以检测有关通路调控关键点对上皮细胞电解质及水分跨上皮转运的影响。ATP 作为体内常见的自分泌或旁分泌物质,可作用于体内上皮细胞表面的受体,从而在上皮分泌的过程中发挥着不可替代的作用,是检测上皮组织分泌情况的主要指标。根据角膜上皮细胞的形态学特性^[9-11]及角膜组织来源的单一性(不混杂其他组织并已刮去内皮),可确定本研究中所培养的上皮细胞为角膜上皮细胞。本研究中采用 CFTR 特异性抑制剂 CFTR_{inh-172} 预处理兔角膜上皮,发现兔角膜上皮不能被 ATP 所活化,说明 ATP 诱导的兔角膜上皮分泌主要由 CFTR 所介导。采用钙离子螯合剂 BMPTA/AM 预处理兔角膜上皮,发现细胞内大量钙离子被螯合,同时 CFTR 的分泌受到抑制,故本研究认为钙信号是调控兔角膜上皮 CFTR 分泌过程的关键点。

Fluo-4/AM 为 1 种由可见光(516 nm)激发的钙离子探针,其未与钙离子结合时不会激发荧光,其中 AM 基团增加了 Fluo-4 的脂溶性而容易进入细胞内,而 Fluo-4 与细胞胞质内钙离子结合而被可见光激发并发出绿色荧光。单个兔角膜上皮细胞钙离子测定的结果显示,ATP 刺激胞质内钙荧光信号的增强,进一步证实胞质内质网钙信号的释放参与了兔角膜上皮 CFTR 分泌过程的调控。

综上所述,CFTR 可能为介导兔角膜上皮细胞分泌的主要通道,其功能的实现建立在细胞内钙信号释放的基础上。本研究从生理学的角度阐释了 CFTR 在兔角膜上皮的分泌机制,可为干眼相关机制的研究提供实验依据,本研究中的方法可用于各种干眼的动物实验和基础研究,并为进一步的临床研究提供方法学基础。然而,关于钙信号是通过何种方式和途径来活化 CFTR 的,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Al-Nakkash L, Reinach PS. Activation of a CFTR-mediated chloride current in a rabbit corneal epithelial cell line [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(10): 2364-2370.
- [2] Flores AM, Casey SD, Felix CM, et al. Small-molecule CFTR activators increase tear secretion and prevent experimental dry eye disease [J]. FASEB J, 2016, 30(5): 1789-1797. DOI: 10.1096/fj.201500180.
- [3] Huhtala A, Mannerström M, Alajuuja P, et al. Comparison of an immortalized human corneal epithelial cell line and rabbit corneal epithelial cell culture in cytotoxicity testing [J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2002, 18(2): 163-175. DOI: 10.1089/108076802317373914.
- [4] 莫镜, 崔其亮, 张费通, 等. 应用激光共聚焦扫描显微镜技术检测缺氧人肺微血管内皮细胞内钙离子浓度动态变化 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(5): 834-836.
Mo J, Cui QL, Zhang FT, et al. Detection of dynamic changes of intracellular calcium in hypoxia human pulmonary microvascular endothelial cells by laser scanning confocal microscope [J]. Prog Mod Biomed, 2011, 11(5): 834-836.
- [5] Marshall WS, Hanrahan JW. Anion channels in the apical membrane of mammalian corneal epithelium primary cultures [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991, 32(5): 1562-1568.
- [6] Byun YS, Yoo YS, Kwon JY, et al. Diquafosol promotes corneal epithelial healing via intracellular calcium-mediated ERK activation [J]. Exp Eye Res, 2016, 143: 89-97. DOI: 10.1016/j.exer.2015.10.013.
- [7] Al-Nakkash L, Reinach PS. Activation of a CFTR-mediated chloride current in a rabbit corneal epithelial cell line [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(10): 2364-2370.
- [8] Candia OA, Zamudio AC. Cl secretagogues reduce basolateral K permeability in the rabbit corneal epithelium [J]. J Membr Biol, 2002, 190(3): 197-205. DOI: 10.1007/s00232-002-1037-1.
- [9] 任攻卿, 栾洁. 兔角膜上皮细胞体外原代培养方法的研究 [J]. 东南大学学报: 医学版, 2008, 27(2): 90-94.
Ren MQ, Luan J. Culture of rabbit primary corneal epithelial cells [J]. J Southeast Univer (Med Sci Edit), 2008, 27(2): 90-94.
- [10] 刘兴华, 朱美玲, 陈逸, 等. 体外培养的角膜缘上皮细胞生物学特性 [J]. 中国医师杂志, 2003, 5(4): 450-452.
Liu XH, Zhu ML, Chen D, et al. Observation on biological character of cultivated cornea limbal epithelial cells [J]. J Chin Physic, 2003, 5(4): 450-452.
- [11] 王亚冬, 袁南荣, 杜青, 等. 兔角膜缘上皮细胞体外培养及其生物学特性的初步研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2001, 9(5): 426-428.
Wang YD, Yuan NR, Du Q, et al. A study cultivating on limbal orneal epithelial cells of rabbit and the growth characteristics *in vitro* [J]. Acta Univer Med Nanjing, 2001, 9(5): 426-428.

(收稿日期: 2016-12-08 修回日期: 2017-09-27)

(本文编辑: 尹卫靖 张获)

广告目次

- 拓普康 OCT(全能真彩扫频源 OCT) 北京拓普康医疗器械有限公司……封二
 同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页
 普诺明(肝素非球面散光矫正型人工晶状体) 爱博诺德(北京)医疗科技有限公司……前插页
 普罗纳克(0.1% 溴芬酸钠滴眼液) 深圳市瑞霖医药有限公司……前插页
 沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 武汉市威康药品有限责任公司……前插页
 立宝舒(卡波姆眼用凝胶) 博士伦(上海)贸易有限公司……前插页
 见康(拉坦前列素滴眼液) 华润紫竹药业有限公司……前插页
 灵光(复方樟柳碱注射液) 华润紫竹药业有限公司……前插页
 氟美童(抗炎症类固醇水性混悬滴眼液) 参天制药(中国)有限公司……封三
 迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底