

鸡胚发育过程中角膜神经的分布和变化

薛芸霞 马征来 李志杰 杨雪松

510632 广州,暨南大学医学院眼科研究所(薛芸霞、李志杰),组织学与胚胎学教研室(马征来、杨雪松)

通信作者:薛芸霞,Email:xueyunxia911@126.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.007

【摘要】 背景 了解动物或人的角膜神经分布和发育过程对于角膜疾病的临床和基础研究具有重要意义,目前关于动物角膜神经发育和特异性定位的研究结果已有发表,但是有关胚胎发育阶段角膜神经纤维的分布规律和角膜神经纤维的定量研究结果尚少见。目的 了解鸡胚发育过程中角膜神经纤维的分布,并定量评价随着鸡胚龄增长其角膜神经纤维长度和密度的变化规律。方法 选取胚胎期 6~20 d (E6~E20) 的鸡胚作为角膜胚胎发育模型,获取相应胚期的带有角膜缘的完整鸡角膜,使用 β -tubulin III 抗体进行角膜免疫荧光染色,以标记角膜神经,将角膜上皮面朝上做角膜上皮的放射状切开,制备全角膜铺片,用含 DAPI 抗荧光淬灭缓冲甘油封片。利用正置荧光显微镜拍摄获取整个角膜的神经纤维图像,使用 Photoshop CS4 测量不同胚龄的鸡胚角膜表面积和神经纤维束数量,采用 Imaris x64 7.4.2 软件测量不同胚龄的鸡胚角膜神经纤维总长度和密度。结果 全角膜铺片显示,鸡胚 E6~E8 可见神经束从颞侧巩膜进入角膜缘,E9~E10 时神经纤维在角膜缘呈环状分布,E11~E15 时延伸进入角膜中央,E16~E20 时角膜形成神经纤维丛。E6~E20 期间,鸡胚角膜表面积、角膜神经纤维长度、角膜神经纤维密度均随着胚龄的增长而逐渐增加,总体比较差异均有统计学意义($F=127.007, 227.051, 67.748$, 均 $P<0.01$),鸡胚角膜表面积与角膜神经纤维长度间呈强正相关($r=0.863, P<0.01$)。鸡胚角膜神经纤维束从 E13 开始出现,为 $(59.00\pm 1.14)/\text{mm}^2$,此后缓慢增加,至 E18 达到高峰,数量为 $(576.75\pm 29.16)/\text{mm}^2$,至 E20 时角膜神经纤维束数量减少,为 $(299.67\pm 25.46)/\text{mm}^2$,不同胚龄期鸡胚角膜神经纤维束数量的总体比较差异有统计学意义($F=13.759, P=0.000$)。结论 鸡胚角膜神经发育从 E9 开始,随着发育鸡胚角膜表面积、角膜神经纤维总长度及密度均快速增加。

【关键词】 角膜/神经分布;神经纤维/发生学;发育;眼神经/生理;鸡胚

Innervation of the chick embryo cornea during development Xue Yunxia, Ma Zhenglai, Li Zhijie, Yang Xuesong
Institute of Ophthalmology (Xue YX, Li ZJ), Department of Histology & Embryology (Ma ZL, Yang XS), Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China

Corresponding author: Xue Yunxia, Email: xueyunxia911@126.com

【Abstract】 Background To understand the distribution and development of corneal nerve in animal or human has an important significance for clinical and basic research of corneal diseases. At present, some studies on cornea nerve development and location have been performed. However, the quantified study on innervation and distribution of corneal nerve fibers as embryonic development has not been reported. Objective This study attempted to understand the distribution of corneal nerve fibers in the development of chick embryo, and to evaluate the changes of the length and density of corneal nerve fibers with aging of chick embryo. Methods Whole chick corneas with limbus were obtained from chick embryo aged 6–20 days (E6–E20), and corneal nerve fiber was labeled using immunofluorescence technique by anti-neuron-specific β -III tubulin antibody. The corneas were radially cut into 4 parts, and the integrate corneal flat mounts were prepared with the upward epithelium and mounting with anti-fade fluorescent quenching buffer glycerin containing DAPI. Fluorescence microscope was used to capture the nerve fiber images in cornea, and cornea area and the number of nerve fiber bundles were exhibited by using Photoshop CS4. Cornea nerve fiber density and total length were measured by Imaris x64 7.4.2 software. Results Total cornea flat mounts showed that the nerve bundles grew from temporal scleral forward cornea limbus at E6–E8, and the nerve fibers formed the ring surrounding by limbus during E9–E10. Then the fibers extended forward the central cornea in E11 to E15 and developed into nerve fiber plexus on the whole cornea in E16 to E20. During the period of E6–E20, the corneal surface area, the length and density of corneal nerve fibers were gradually increased with the aging of chick embryo, showing statistically significant differences among different time points ($F=127.007, 227.051, 67.748$, all at

$P < 0.01$). The increase of the corneal area of the chick embryo presented a strong positive correlation with the extending of length of the corneal nerve fiber ($r = 0.863, P < 0.01$). Chick corneal nerve fiber bundle appeared at E13, with a number of $(59.00 \pm 1.14)/\text{mm}^2$ and then increased to a peak of $(576.75 \pm 29.16)/\text{mm}^2$ at E18 and reduced to $(299.67 \pm 25.46)/\text{mm}^2$ at E20, with a significant difference among them ($F = 13.759, P = 0.000$).

Conclusions Corneal nerve starts to develop in E9 of chick embryo, and the corneal surface area, the total length of the corneal nerve fibers and the density rapidly increase concurrently with the development of chick embryo.

[Key words] Cornea/innervation; Nerve fibers, corneal/embryology; Development; Ophthalmic nerve/physiology; Chick embryo

角膜是无血管的透明组织,有神经纤维的密集分布,角膜功能的完整性主要依赖于神经纤维释放促角膜稳态的营养物质或刺激泪腺产生泪液。角膜神经具有保护和营养角膜的功能,角膜上皮的新陈代谢、细胞的黏附和创伤的愈合等均与角膜神经的分布及其正常的功能密切相关^[1-2]。此外,角膜神经还可诱导瞬目反射以维持角膜的水润状态,并可分泌神经肽以促进角膜上皮细胞的有丝分裂^[3]。因此,角膜神经缺损会引起神经营养缺失性角膜炎,导致角膜感觉消退及上皮细胞新陈代谢异常^[1]。目前已有关于角膜神经发育的研究,且已证实成年动物角膜神经的分布不存在种属间的差异^[4-6]。研究发现,来自巩膜的神经束首先在角膜缘形成神经环,随后神经束缓慢进入角膜中央并布满角膜^[7]。关于角膜神经特异性定位的研究也相继出现,如鸡胚角膜神经在发育形成神经环路过程中表现出位置的高度同源性^[8];鸡胚角膜神经分布定位的机制是基于等间距的神经纤维^[9]。目前关于胚胎发育过程中角膜神经纤维总长度及密度的定量分析研究鲜有报道。鸡胚是胚胎发育和器官形成机制研究中常用的模型^[10]。本研究中使用免疫荧光技术对鸡胚发育过程中完整角膜的所有神经纤维进行定量分析,以了解鸡胚发育中角膜神经纤维长度和密度的变化规律,为人角膜神经发育及损伤修复研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鸡胚的准备 新鲜鸡蛋 100 个购于华南农业大学禽类养殖场,置于 38 °C、相对湿度 70% 的数显电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)孵育^[11]。

1.1.2 主要试剂及仪器 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(广州捷倍斯公司); Triton X-100(北京国奥公司); 抗鼠 β -tubulin III 单克隆抗体(MAB1195, 1:50, 美国 R&D 公司); DAPI(美国 Sigma 公司)。BX53 型正置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司); GL-99TI 型解剖显微镜(桂林桂光仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光检测和鸡角膜铺片 参照文献[12-13]中的方法,解剖镜下将鸡胚 6~20 d(E6~E20)时期鸡胚单侧整个眼球取出放入含体积分数 2% 甲醛 PBS 中固定 40 min,然后修剪去除眼球中巩膜和视网膜等组织,获得具有角膜缘结构的完整角膜。PBS 洗 3 次,每次 5 min,质量分数 2% BSA 封闭处理 15 min,加入体积分数 0.2% Triton X-100($V_{2\% \text{BSA}} : V_{10\% \text{Triton X-100}} = 50 : 1$)透膜 15 min,加入 β -tubulin III 抗体,4 °C 孵育过夜,进行免疫荧光标记角膜神经。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,将角膜上皮面朝上,放射状将角膜上皮切割成 4 部分铺片,用含 DAPI 抗荧光淬灭缓冲甘油封片,避光保存。

1.2.2 图像获取和定量分析 使用正置荧光显微镜获取鸡胚角膜神经图像。鸡胚角膜在 E6 形成^[14],因此选取 E6~E20 时期鸡胚,每个时期至少选取 6 个角膜,使用 Photoshop CS4 测量鸡胚角膜表面积并计数全角膜神经纤维束数量。采用 Imaris x64 7.4.2 软件测量角膜神经纤维总长度和密度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经正态性检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立分组单因素干预多水平实验设计,不同胚期鸡胚角膜表面积、角膜神经纤维总长度、角膜神经纤维密度及全角膜神经纤维束数量的总体差异比较均采用单因素方差分析,不同胚期间多重比较采用 SNK- q 检验。E6~E20 时角膜面积与神经纤维总长度关系采用 Pearson 相关分析。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鸡胚发育过程中角膜神经的分布

E6~E8 时可见神经束从颞侧巩膜进入角膜缘,但未进入角膜;E9~E10 时神经纤维围绕角膜在角膜缘呈环状分布,少数神经纤维从角膜缘进入周边角膜;E11~E15 时神经纤维从周边角膜延伸进入角膜中央;E16~E20 时角膜神经纤维互相重叠,形成较致密的神经纤维丛(图 1)。

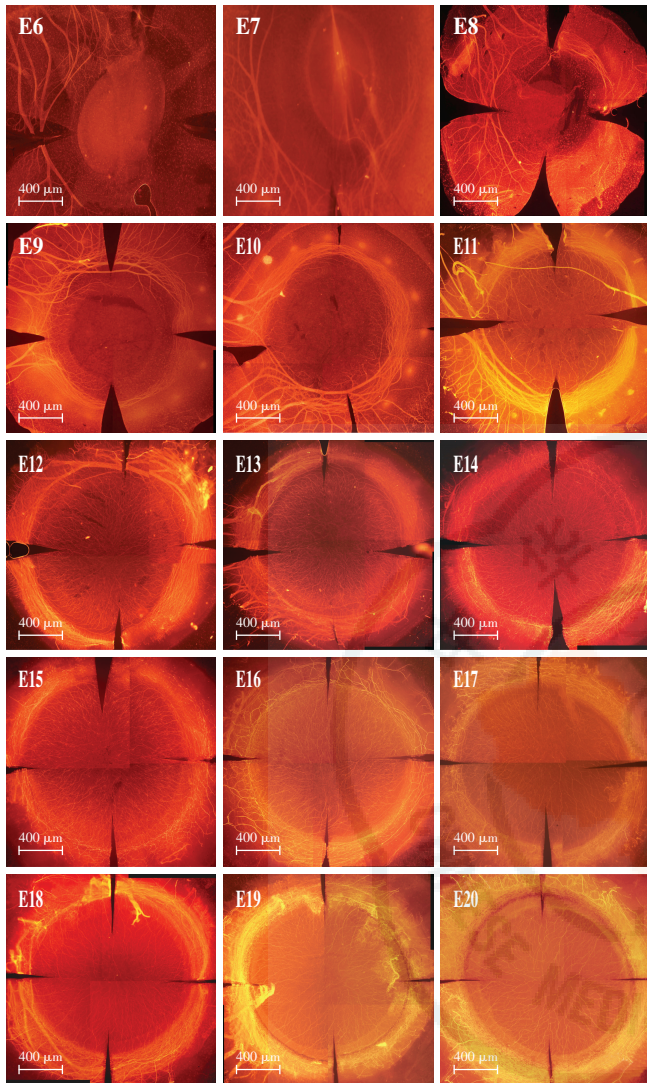


图 1 角膜整铺片免疫荧光染色观察 E6 ~ E20 角膜神经纤维的分布 (β -tubulin III, 标尺=400 μ m)

2.2 鸡胚角膜表面积随胚龄的变化

E6 ~ E20 鸡胚角膜表面积分别为 (0.83 ± 0.05)、(1.22 ± 0.19)、(1.73 ± 0.55)、(2.36 ± 0.49)、(2.56 ± 0.46)、(4.50 ± 1.04)、(5.51 ± 0.63)、(6.90 ± 0.50)、(8.35 ± 0.52)、(8.45 ± 0.42)、(8.66 ± 0.81)、(9.60 ± 1.45)、(10.33 ± 0.08)、(11.42 ± 0.16) 和 (12.10 ± 0.23) mm², 随着鸡胚胚龄的增长, 角膜的表面积逐渐增加, 不同胚龄间角膜表面积的总体比较差异有统计学意义 ($F = 127.007, P = 0.000$) (图 2A)。

2.3 鸡胚角膜神经纤维总长度随胚龄的变化

E6 ~ E20 期间鸡胚角膜神经纤维长度随胚龄的增长而增加, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 227.051, P < 0.01$)。鸡胚早期角膜神经纤维的发育分为 2 个阶段。第一阶段是 E9 ~ E15, 角膜神经纤维总长度分别为 (1.76 ± 0.14)、(1.92 ± 0.05)、(3.16 ± 0.10)、(3.64 ±

0.44)、(4.70 ± 0.54)、(5.62 ± 0.15) 和 (6.42 ± 0.61) m (图 2B), 不同胚龄间角膜神经纤维总长度的总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 49.068, P = 0.000$); 这一阶段主要表现为角膜神经纤维开始并逐渐进入角膜缘、角膜周边及角膜中央 (图 1), 且角膜神经纤维的总长度也逐渐增加。第二阶段是 E16 ~ E20, 其角膜神经纤维总长度分别为 (13.70 ± 1.57)、(15.67 ± 0.12)、(16.04 ± 0.07)、(16.37 ± 0.12) 和 (17.70 ± 1.17) m (图 2B); 不同胚龄间角膜神经纤维总长度的总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 5.438, P = 0.046$), 表现为角膜神经纤维快速生长, 相互重叠, 形成致密的神经纤维丛。E6 ~ E20 时鸡胚角膜表面积与神经纤维总长度均逐渐增加, 呈强正相关 ($r = 0.863, P < 0.01$) (图 2C)。

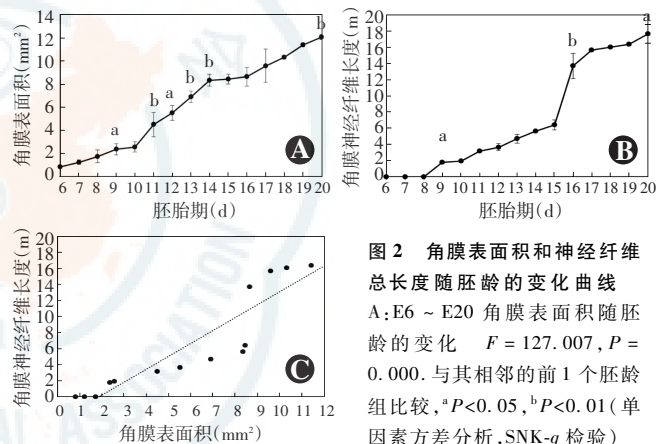


图 2 角膜表面积和神经纤维总长度随胚龄的变化曲线
A: E6 ~ E20 角膜表面积随胚龄的变化 $F = 127.007, P = 0.000$. 与其相邻的前 1 个胚龄组比较, $^a P < 0.05, ^b P < 0.01$ (单因素方差分析, SNK-q 检验)
B: E9 ~ E15 期间角膜神经纤维总长度的变化总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 49.068, P = 0.000$); E16 ~ E20 期间角膜神经纤维总长度变化总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 5.438, P = 0.046$). 与前 1 个胚龄组相比, $^a P < 0.05, ^b P < 0.01$ (单因素方差分析, SNK-q 检验)
C: E6 ~ E20 时角膜面积与神经纤维总长度关系的散点图 $r = 0.863, P < 0.01$ (Pearson 相关分析, $n = 15$)

2.4 鸡胚角膜神经纤维长度随胚龄的变化

E9 ~ E20 时单位面积角膜神经纤维长度值分别为 (0.67 ± 0.03)、(0.68 ± 0.04)、(0.70 ± 0.10)、(0.74 ± 0.20)、(0.75 ± 0.05)、(0.76 ± 0.04)、(0.80 ± 0.02)、(1.43 ± 0.08)、(1.46 ± 0.03)、(1.55 ± 0.01)、(1.58 ± 0.04) 和 (1.63 ± 0.04) m/mm², 总体比较差异有统计学意义 ($F = 67.748, P = 0.000$)。鸡胚发育过程中角膜神经纤维长度的变化呈 2 个快速增长期, 分别为 E9 和 E16 时期, 而 E10 ~ E16 时角膜神经纤维几乎无增长, E17 ~ E20 呈缓慢增长趋势 (图 3)。

2.5 鸡胚角膜神经纤维束的数量随胚龄的变化

免疫荧光检测显示, E6 ~ E12 时鸡胚角膜中无神经纤维束, 从 E13 时开始角膜中神经纤维束的数量持续缓慢增加, E18 时达高峰, 至 E20 时角膜神经纤维束

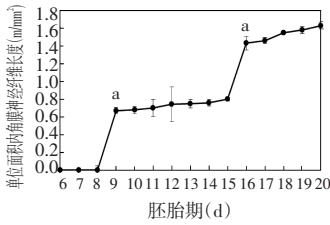


图 3 E6 ~ E20 期间单位面积内角膜神经纤维长度随胚龄的变化曲线 $F = 67.748, P = 0.000$. 与相邻的前 1 个胚龄组比较, $^a P < 0.01$ (单因素方差分析, SNK- q 检验, $n = 15$)

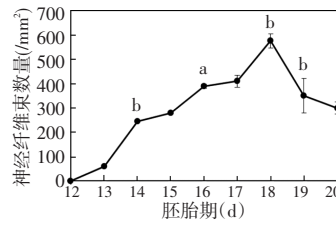


图 5 E13 ~ E20 时鸡胚角膜神经纤维束随胚龄的变化曲线 E13 ~ E20 时角膜神经纤维束数量变化趋势 $F = 13.759, P = 0.000$. 与相邻的前 1 个胚龄组比较, $^a P < 0.05, ^b P < 0.01$ (单因素方差分析, SNK- q 检验, $n = 15$)

数量减少。E13 时神经纤维束多数仅有节点, 随着胚龄的增加, E16 时角膜神经纤维束体积变大, 且神经纤维束周围的神经纤维更密集。鸡胚 E13 ~ E20 时角膜神经纤维束数量分别为 (59.00 ± 1.14) 、 (245.00 ± 2.83) 、 (280.00 ± 2.21) 、 (390.00 ± 8.49) 、 (410.00 ± 24.59) 、 (576.75 ± 29.16) 、 (351.00 ± 71.39) 和 $(299.67 \pm 25.46) / \text{mm}^2$, 随着胚龄的增加, 角膜神经纤维束数量逐渐增多, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 13.759, P = 0.000$) (图 4, 5)。

3 讨论

研究表明, 不同动物间角膜神经的发育过程无明显差别, 为了解角膜神经的发育过程, 本研究中观察随着发育鸡角膜神经的生长情况, 以便为人角膜神经发育的生理病理研究提供依据。本研究揭示了鸡胚角膜神经纤维的发育过程以及角膜神经纤维总长度和密度的变化规律: (1) 鸡胚角膜表面积随着胚龄的增加而增大, 且角膜纤维总长度的变化与角膜表面积呈正相关。(2) 角膜神经纤维密度随着鸡胚胚龄的增加而增加, 并在 E9 和 E16 期间呈现 2 个快速增长期。(3) 鸡胚角膜神经纤维束数量从 E13 持续缓慢增加, E18 达高峰后减少。

文献报道鸡胚发育过程中眼球在 E4 形成, 眼内有色素沉积, E6 可见角膜组织^[14]。近年来, 也有不同动物模型中角膜神经纤维的分布及其功能的研究^[15-18], 其中 McKenna 等^[18]研究发现, 小鼠 E12.5 时眼球出现神经纤维, E13.5 ~ E16.5 时神经纤维进入角膜基质和角膜上皮。He 等^[17]对 1 ~ 24 周龄小鼠角膜神经纤维的分布过程进行观察, 发现小鼠出生后 1 ~ 3 周, 角膜基质层神经网络已形成, 第 4 周螺旋状结构或涡流样神经逐渐增多, 出生后 8 周角膜神经已完全形成。本研究结果显示鸡胚角膜神经纤维的发育过程如下: E6 ~ E8 时来源于巩膜的神经束从颞侧进入角膜缘; E9 ~ E10 时神经束在角膜缘形成神经环, 且有少数神经纤维进入角膜周边; E11 ~ E20 时环绕在角膜缘的神经纤维进入角膜, 继而形成较致密的神经纤维丛, 该结果与 Lwigale 等^[19]的研究结果一致。此外, Kitano^[20]研究发现, 人角膜神经的发育与鸡胚角膜神经发育过程类似, 首先神经束到达角巩膜缘两端, 分出神经干, 形成环形的角巩膜缘神经丛, 然后角巩膜缘神经丛开始分层, 分化为不同形态的角巩膜缘浅神经丛和角巩膜缘深神经丛。

鸡胚角膜表面积和神经纤维总长度随胚龄的增长而增加, 角膜神经纤维密度随着鸡胚胚龄的增长而增加, 并在 E9 和 E16 呈 2 个快速增长期。免疫荧光检测结果显示, E7 ~ E8 时角膜尚无神经纤维, 而 E9 时角膜缘少数神经纤维进入角膜周围, 与角膜神经纤维

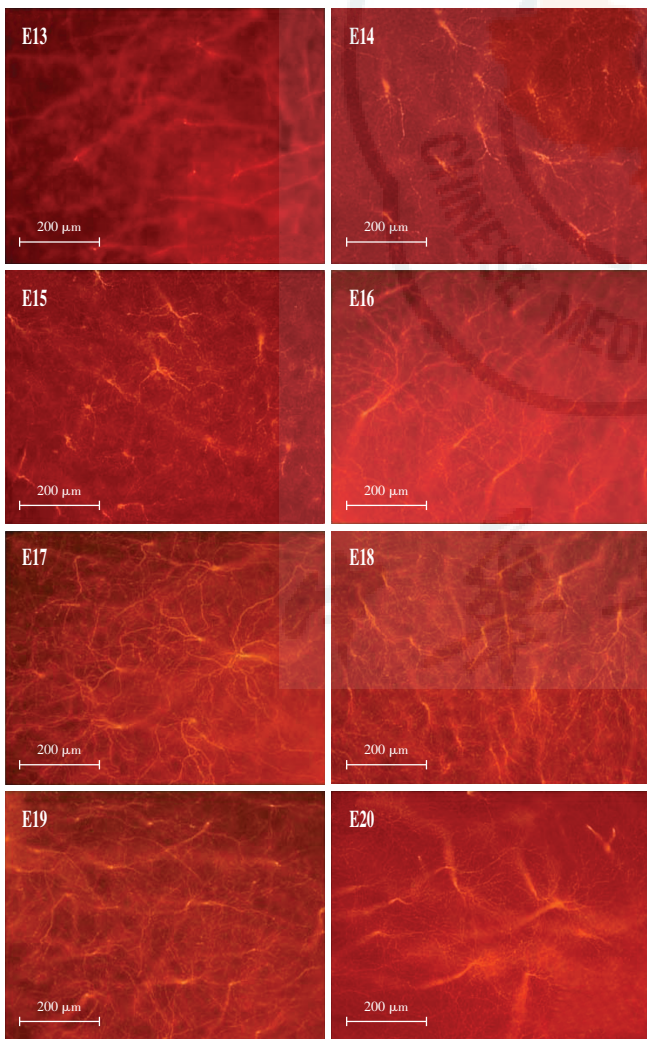


图 4 E13 ~ E20 时鸡胚角膜神经纤维束的分布 (β -tubulin III, 标尺 = 200 μm) E13 ~ E15 时鸡胚角膜神经纤维束开始生长并逐渐延伸出周围细丝状神经纤维; E16 ~ E20 时鸡胚角膜神经纤维束节点体积变大, 且周围神经纤维逐渐密集并互相重叠, 形成较致密的神经纤维丛

密度增长趋势一致。此外,本研究发现 E16 时鸡胚角膜神经纤维束出现快速增长,其体积变大且纤维束周围形成较致密的神经丛。Wang 等^[21]研究发现,1 d ~ 2 个月小鼠角膜表面积与角膜基底神经纤维密度均随鼠龄的增长而增大。许多疾病与神经纤维长度、密度及其分布密切相关,近期有研究发现,纤维肌痛综合征患者的角膜神经纤维长度和密度明显偏低^[22-23]。Al-Aqaba 等^[24]研究发现,接受穿透角膜移植术眼术后 30 年其基底神经纤维密度仍不能恢复,且角膜基底神经丛形态出现异常。可见角膜神经的生长、分布、长度和密度等发育规律与角膜神经损伤再生和修复密切相关。

综上所述,本研究通过鸡胚模型观察角膜神经胚胎发育过程,揭示了鸡胚角膜神经纤维的分布、长度、密度及神经纤维束的发育规律,可为进一步阐明角膜神经的发育过程提供有用信息,为临床治疗角膜神经相关疾病提供新的思路。

参考文献

- [1] Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, et al. Corneal nerves: structure, contents and function [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(5): 521-542.
- [2] Shaheen BS, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease [J]. *Surv Ophthalmol*, 2014, 59(3): 263-285. DOI: 10. 1016/j. survophthal. 2013. 09. 002.
- [3] Reid TW, Murphy CJ, Iwahashi CK, et al. Stimulation of epithelial cell growth by the neuropeptide substance P [J]. *J Cell Biochem*, 1993, 52(4): 476-485. DOI: 10. 1002/jcb. 240520411.
- [4] Zander E, Weddell G. Observations on the innervation of the cornea [J]. *J Anat*, 1951, 85(1): 68-99.
- [5] Marfurt CF, Cox J, Deek S, et al. Anatomy of the human corneal innervation [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(4): 478-492. DOI: 10. 1016/j. exer. 2009. 12. 010.
- [6] Wolter JR. Innervation of the corneal endothelium of the eye of the rabbit [J]. *AMA Arch Ophthalmol*, 1957, 58(2): 246-250.
- [7] Bee JA. The development and pattern of innervation of the avian cornea [J]. *Dev Biol*, 1982, 92(1): 5-15.
- [8] Bee JA, Hay RA, Lamb EM, et al. Positional specificity of corneal nerves during development [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1986, 27(1): 38-43.
- [9] Riley NC, Lwigale PY, Conrad GW. Specificity of corneal nerve positions during embryogenesis [J]. *Mol Vis*, 2001, 7: 297-304.
- [10] Kiecker C. The chick embryo as a model for the effects of prenatal exposure to alcohol on craniofacial development [J]. *Dev Biol*, 2016, 415(2): 314-325. DOI: 10. 1016/j. ydbio. 2016. 01. 007.
- [11] Wang G, Li Y, Wang XY, et al. Misexpression of *BRE* gene in the developing chick neural tube affects neurulation and somitogenesis [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(5): 978-992. DOI: 10. 1091/mbc. E14-06-1144.
- [12] Liu J, Fu T, Song F, et al. Mast cells participate in corneal development in mice [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17569 [2015-11-15]. <http://www.nature.com/articles/srep17569>. DOI: 10. 1038/srep17569.
- [13] 王存, 傅婷, 李志杰, 等. 小鼠睁眼前后角膜神经纤维长度与密度的变化及其意义 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(7): 581-585. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 07. 002. Wang C, Fu T, Li ZJ, et al. Changes in corneal nerve fiber length and density before and after eye opening in mouse and its significance [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(7): 581-585. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 07. 002.
- [14] Bellairs R, Osmond M. The atlas of chick development [M]. London: Elsevier Academic Press, 2005: 86-88.
- [15] Reichard M, Weiss H, Poletti E, et al. Age-related changes in murine corneal nerves [J]. *Curr Eye Res*, 2015: 1-8. DOI: 10. 3109/02713683. 2015. 1088952.
- [16] Müller RT, Abedi F, Cruzat A, et al. Degeneration and regeneration of subnasal corneal nerves after infectious keratitis: a longitudinal *in vivo* confocal microscopy study [J]. *Ophthalmology*, 2015, 122(11): 2200-2209. DOI: 10. 1016/j. ophtha. 2015. 06. 047.
- [17] He J, Bazan HE. Neuroanatomy and neurochemistry of mouse cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(2): 664-674.
- [18] McKenna CC, Lwigale PY. Innervation of the mouse cornea during development [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(1): 30-35.
- [19] Lwigale PY, Bronner-Fraser M. Lens-derived semaphorin3a regulates sensory innervation of the cornea [J]. *Dev Biol*, 2007, 306(2): 750-759.
- [20] Kitano S. An embryological study of the human corneal nerve [J]. *Jap J Ophthalmol*, 1957, 1(1): 48.
- [21] Wang C, Fu T, Xia C, et al. Changes in mouse corneal epithelial innervation with age [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(8): 5077-5084.
- [22] Oudejans L, He X, Niesters M, et al. Cornea nerve fiber quantification and construction of phenotypes in patients with fibromyalgia [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23573 [2015-11-04]. <http://www.nature.com/articles/srep23573>. DOI: 10. 1038/srep23573.
- [23] Caro XJ, Winter EF. Evidence of abnormal epidermal nerve fiber density in fibromyalgia: clinical and immunologic implications [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(7): 1945-1954. DOI: 10. 1002/art. 38662.
- [24] Al-Aqaba M, Alomar T, Lowe J, et al. Corneal nerve aberrations in bullous keratopathy [J]. *Am J Ophthalmol*, 2011, 151(5): 840-849. DOI: 10. 1016/j. ajo. 2010. 11. 013.

(收稿日期: 2016-02-15)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)

广告目次

拓普康 OCT 系列 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(高次非球面人工晶状体) 爱博诺德(北京)医疗科技有限公司……前插页

普南扑灵(0.1% 普拉洛芬滴眼液) 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

纯视(治疗用绷带镜) 山东博士伦福瑞达制药有限公司……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

施图伦(七叶洋地黄双苷滴眼液) 深圳市康哲药业有限公司……前插页

氟美童(氟米龙滴眼液) 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