

反射缺乏型干眼动物模型的研究

施 炜 李 桥 王育良 黄晶晶 张传伟

Establishment of an animal model of dry eye due to lack of reflection

Shi Wei, Li Qiao, Wang Yuliang, Huang Jingjing, Zhang Chuanwei. Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional College of Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract Objective This study was to establish an animal model of dry eye due to reflection lack. **Methods** Ten healthy New Zealand white rabbits were used in this study. The dry eye model was created in 10 left eyes of rabbits by lamellar corneal incision for 10 seconds following to the erection of the third eyelid gland after Harrington oppression eyeball with suction ring (corneal flap group), and only the third eyelid gland was removed after Harrington oppression eyeball with suction ring in 10 right eyes of rabbits (control group). Luciferase corneal staining and Schirmer I test were performed prior to operation and 3, 5, 7, 11, 14, 21, 30 days after operation respectively. The rabbits were sacrificed in 14, 21, 30 days after operation and the lacrimal gland and cornea specimens were collected for the histopathological examination under the light microscope. **Results** In the control group, the corneal fluorescence staining score was significantly elevated in 3, 7 and 11 days after operation in comparison to before operation ($P < 0.01$), and score in corneal flap group was obviously decreased in various time points after operation compared with before operation ($P < 0.05 - 0.01$). The corneal stain was significantly higher in corneal flap group than control group in the different time points ($P < 0.05 - 0.01$). Fourteen days later, the tear level in corneal flap group was significantly less than the control group ($P < 0.05$). In the corneal flap group, the Schirmer I test value was significantly reduced after 14 days ($P < 0.05$). The obvious infiltration of lymphatic Langhan's cells and inflammatory cells was found under the corneal epithelium in corneal flap group. No significant difference in the morphology of lacrimal gland and corneal tissue under the light microscope. **Conclusion** The combination procedure of the third eyelid and lamellar corneal incision can successfully induce dry eye due to reflection lack. It is an ideal animal model for the study of dry eye.

Key words lack of reflection; dry eye; corneal fluorescence stain; Schirmer I test

摘要 目的 制作反射缺乏所致干眼动物模型并探讨反射缺乏在干眼发病中的作用。 **方法** 健康新西兰大白兔 10 只, 左眼作为角膜瓣组, 剪除第三眼睑及部分哈氏腺后用负压环压迫眼球, 旋转式角膜板层刀做基底在上方的角膜板层切开, 掀开角膜瓣暴露 10 s 后复位; 右眼作为对照组, 剪除第三眼睑及部分哈氏腺后仅用板层刀及负压环压迫眼球而不作角膜板层切开。分别于造模前及造模后第 3、5、7、11、14、21、30 d 行角膜荧光素染色、Schirmer I 试验。在术后 14、21、30 d 分批处死实验兔, 取泪腺及角膜行光学显微镜检查。 **结果** 与造模前比较, 角膜瓣组造模后角膜染色着色程度明显加重 ($P < 0.05$); 造模后 14 d 内, 角膜瓣组与对照组的基础 Schirmer I 试验值的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 14 d 后造模组 Schirmer I 试验值较对照组显著减小 ($P < 0.05$); 角膜瓣组及对照组泪腺光镜检查结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但角膜瓣组上皮出现较多淋巴细胞和朗格罕斯细胞浸润。 **结论** 通过第三眼睑切除联合板层角膜切开制作的反射缺乏型干眼动物模型具有手术操作简便, 症状稳定, 干眼持续时间较长, 对泪腺干扰小, 为一种较好的反射缺乏型干眼动物模型。

关键词 反射缺乏; 干眼; 角膜荧光染色; Schirmer I 试验

分类号 R 777.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)04-0296-04

干眼是临床常见的眼表疾病之一。其发病机制并

不局限于泪腺的炎症反应, 泪液分泌神经刺激的紊乱, 跨膜粘蛋白和分泌性粘蛋白表达的缺陷, 以及睑板腺功能的障碍, 均可导致各种类型的干眼^[1]。目前已有多种建立干眼动物模型的方法, 如通过药物作用、改变动物性激素分泌水平、去除泪腺或眼表的神经支配、诱

本课题为江苏省科技发展计划项目资助 (BS2007093)
 作者单位: 210029 南京, 江苏省中医院眼科 (施炜、李桥、王育良);
 210029 南京中医药大学 (黄晶晶、张传伟)
 通讯作者: 施炜 (Email: shiwei-1218@163.com)

导泪腺产生自身免疫反应及手术摘出泪腺等。但这些干眼模型往往需要较高的技术条件或需要较长的时间,探索简单实用的新的干眼模型具有重要的价值。本研究采用第三眼睑切除联合板层角膜切开制作的反射缺乏型干眼动物模型取得了较好的效果,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及分组 健康新西兰大白兔 10 只,由江苏省中医院动物实验室提供(动物合格号为:SCXK(苏)2007-00D8),雌雄不限,体重 1.5~2 kg,采取左右眼对照的方式分为角膜瓣组和对照组。其中左眼(10 只眼)为角膜瓣组,右眼(10 只眼)为对照组。

1.1.2 主要试剂及仪器 0.25% 荧光素溶液(江苏省中医院眼科稀释配制);Schirmer 滤纸(天津晶明新技术开发有限公司);角膜板层刀(美国 Bausch&Lomb 公司);手术显微镜(日本 Topcon 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 模型制作 在手术显微镜下,向后切开外眦角 1 cm,剪除全部第三眼睑及部分哈氏腺,止血钳球后托起眼球使眼球脱臼并固定眼球,放置直径 8.5 mm 的负压环,用旋转式角膜板层刀做以上方为基底、厚度为 180 μm 的角膜瓣,虹膜恢复器掀开角膜瓣,暴露 10 s, BSS 液冲洗后角膜瓣复位,干燥角膜瓣 5 min 后,缝合外眦部;右眼不切开角膜板层,余操作同左眼。2 组结膜囊均涂妥布霉素眼膏。

1.2.2 检查方法 在造模前及造模后第 3、5、7、11、

14、21、30 d 检查角膜荧光素染色、Schirmer I 试验。分别于术后 14、21、30 d 空气栓塞法分批处死兔子,取泪腺及角膜行组织病理学检查,所有实验动物手术造模、泪液学检查及处死取材均由同一人完成,每次检查时间点、地点、照明、湿度及温度相同。

1.2.3 组织病理学检查 实验动物处死后取泪腺及角膜标本,用 10% 甲醛固定 72 h,梯度乙醇脱水,浸蜡、石蜡包埋,5 μm 厚连续切片,常规苏木精-伊红染色,光学显微镜检查。角膜荧光素染色评分标准^[2]:在角膜中心做水平与垂直两条线将角膜分为 4 个区,每个区按 0、1、2、3 评分,无染色为 0,染色分为轻、中、重 3 级,共 12 分。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件进行统计学分析。计量资料所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同时间角膜荧光素染色检查结果评分和 Schirmer I 试验结果的比较采用重复测试的方差分析,各时间点间的比较采用 Dunnett *t* 检验,角膜瓣组和对照组间的各检测指标的比较采用配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组角膜荧光染色检查结果

对照组术后的角膜荧光染色与手术前相比,第 3、7、11、30 d 时差异有统计学意义($P < 0.05$),但第 5、14、21 d 的结果差异无统计学意义;角膜瓣组术后的角膜染色在各时间点上与术前相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。角膜瓣组的角膜荧光染色评分明显高于同期对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 角膜瓣组和对照组角膜荧光染色检查结果评分($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The score of corneal in fluorescence stain in corneal flap group and control group($\bar{x} \pm s$)

Group	Pre-op	Score of corneal in fluorescence in post-op						
		3 d	5 d	7 d	11 d	14 d	21 d	30 d
Corneal flap	0.55 \pm 0.83	5.00 \pm 0.66 ^c	5.20 \pm 1.31 ^c	5.20 \pm 1.22 ^c	4.50 \pm 1.08 ^c	3.10 \pm 0.73 ^b	2.42 \pm 0.53 ^b	2.50 \pm 0.50 ^b
Control	0.70 \pm 0.82	3.00 \pm 1.55 ^c	1.35 \pm 1.20	1.85 \pm 1.33 ^c	1.45 \pm 0.68 ^c	1.20 \pm 0.42	1.28 \pm 0.90	1.00 \pm 0.00 ^b
<i>t</i>	0.449	-5.071	-7.783	-8.486	-9.527	-8.143	-2.562	-5.196
<i>P</i>	0.664	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043	0.035

^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs respective pre-op value (ANOVA, Paired *t* test)

表 2 角膜瓣组和对照组 Schirmer I 试验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The tear level in corneal flap group and control group($\bar{x} \pm s$)

Group	Pre-op	Tear level in post-op						
		3 d	5 d	7 d	11 d	14 d	21 d	30 d
Corneal flap	10.45 \pm 2.19	12.00 \pm 0.94 ^c	9.40 \pm 2.50	11.20 \pm 2.78	8.80 \pm 2.39	6.30 \pm 1.49	4.71 \pm 0.75	4.00 \pm 1.00
Control	10.75 \pm 1.51	12.95 \pm 1.11 ^b	10.65 \pm 1.24	9.90 \pm 2.02	9.50 \pm 0.84	10.40 \pm 1.17 ^c	10.42 \pm 2.63 ^c	9.66 \pm 1.52 ^b
<i>t</i>	0.363	-1.870	1.421	-1.378	-9.558	8.947	4.887	4.715
<i>P</i>	0.725	0.094	0.189	0.201	0.363	0.000	0.003	0.042

^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs respective pre-op value (ANOVA, Paired *t* test)

2.2 角膜瓣组和对照组 Schirmer I 试验结果

造模后 14 d 内,对照组造模后 Schirmer I 试验结果与造模前相比,只有第 3 d 明显增加;角膜瓣组则在第 14 d 后 Schirmer I 试验结果均明显少于造模前,至 30 d 时仍保持稳定;与对照组比较,造模 14 d 后角膜瓣组的 Schirmer I 试验结果均少于对照组 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.3 角膜及泪腺组织的组织病理学检测

角膜瓣组可见角膜瓣部分较角膜边缘有明显的淋巴细胞及朗格罕斯细胞浸润,此现象与角膜创伤相一致(图 1);对照组角膜上皮内及上皮下可见散在淋巴细胞及朗格罕斯细胞(图 2)。角膜瓣组及对照组泪腺组织均无明显变化(图 3,4)。

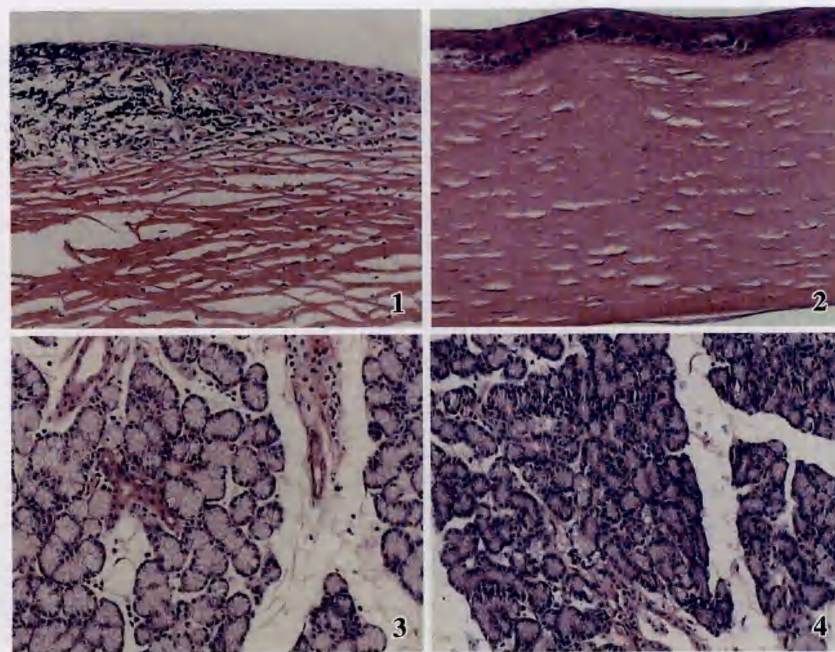


图 1 角膜瓣组术后角膜可见明显的淋巴细胞及朗格罕斯细胞堆积浸润(HE × 100)
图 2 对照组角膜上皮内及上皮下可见散在淋巴细胞及朗格罕斯细胞(HE × 100)
图 3 角膜瓣组泪腺组织无明显变化(HE × 100) 图 4 对照组泪腺组织无明显变化(HE × 100)

Fig.1 Cornea after corneal valve (HE × 100) The cornea after corneal valve surgery show more obvious lymphocytes and Langerhans cell accumulation in corneal edge **Fig.2** Corneal surgery control group (HE × 100) In surgical control group, corneal intraepithelial and subepithelial lymphocytes present scattered Langerhans cells **Fig.3** No obvious morphological change is found in the lacrimal gland tissue from corneal flap group under the light microscope (HE × 100) **Fig.4** No obvious morphological change is found in the lacrimal gland tissue from surgical control group under the light microscope(HE × 100)

3 讨论

干眼为任何原因引起的泪液质和量或动力学异常导致的泪膜不稳定,并伴有眼部不适症状,导致眼表组织病变为特征的一大类疾病的总称^[3]。其发病机制

十分复杂。目前干眼的主要发病机制学说建立在泪腺功能的基础上^[4]。正常的眼表和泪腺组织均有丰富的神经支配,通过完整的神经反射环路完成泪液分泌功能,该反馈环路中任一环节异常均可导致分泌功能的障碍^[5]。Xu 等^[6]研究表明干眼患者的角膜知觉减退。眼表知觉的减退可导致泪腺对眼表刺激反应的下降,从而引起反射性泪液减少,进一步加重眼表损害,陷入恶性循环^[7]。

在本研究中,为了减少第三眼睑及哈氏腺的切除、外眦角切开、机械性眼球脱臼等手术刺激所造成的反射性泪液分泌增加以及副泪腺的代偿分泌所引起的实验误差,我们设置了不做角膜瓣的对照组。实验结果显示通过角膜板层刀制作角膜瓣时切断了角膜的神经

传导方式,术后的角膜染色评分明显高于术前,也高于同期对照组;在泪液的分泌上,角膜瓣组在第 14 d 后的 Schirmer I 试验均明显少于造模前,至 30 d 时仍保持稳定;与对照组比较,造模 14 d 后角膜瓣组的 Schirmer I 试验均少于对照组。说明通过制作角膜瓣联合第三眼睑全部切除和哈氏腺的部分切除可成功制作干眼动物模型。

有研究发现准分子激光原位角膜磨镶术(eximer laser in situ keratomileusis, LASIK)术后角膜知觉恢复时间较长^[8], Linna 等^[9]观察到 LASIK 术后 6~12 个月角膜知觉才基本恢复。也有研究使用共焦显微镜证明 LASIK 中央基质下神经在术后 6 个月时仍保持较短和未连接状态^[10]。在本实验中联合制作角膜瓣后引起的干眼表现较单纯全部切除第三眼睑和部分切除哈氏腺的对照组更明显而持久,我们考虑为手术损伤了上皮下的角膜感觉神经,从而使角膜-泪液反射弧的阈值提高,同时摘除哈氏腺,并消除第三眼睑对眼表的保护作用可以减少基础泪液的分泌。导致泪液分泌不足、泪膜破裂时间缩短等干眼表现,因此通过这种手段制作的干眼模型为反射缺乏

型干眼模型。

人眼的角膜在组织学上共分为 5 层,但兔眼的角膜则无前弹力层,正常情况下角膜上皮内及上皮下可见散在淋巴细胞及朗格罕斯细胞,在角膜炎症及角膜创伤时可见到较多淋巴细胞及朗格罕斯细胞^[11]。

在术后角膜切片中可见角膜瓣部分较角膜边缘有明显的淋巴细胞及朗格罕斯细胞浸润,此现象与角膜创伤相一致。

泪腺是浆液性管状腺,被结缔组织分割成小叶状,腺上皮细胞为单层立方或柱状,胞质内有分泌颗粒,腺上皮外有基膜和肌上皮细胞^[11]。本研究中角膜瓣组及对照组泪腺组织均无明显变化。说明两种手术方式对泪腺的影响均较小。

总之,通过第三眼睑切除联合板层角膜切开可成功制造出反射缺乏型干眼动物模型,该模型具有手术操作简便,症状稳定,干眼持续时间较长,且对泪腺干扰小,是一种较好的反射缺乏型干眼动物模型。

参考文献

1 Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on clinical trials in dry eyes[J]. CLAO J,1995,21:221-232
 2 Koh S,Watanabe H,Hosohata J, et al. Diagnosing dry eye using a blue-free barrier filter[J]. Am J Ophthalmol,2003,136(3):513-519
 3 张梅,陈家祺,刘祖国.干眼症的诊断[J].中国实用眼科杂志,2000,

18(11):664-668
 4 Stern ME,Gao J,Siemasko KF, et al. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye[J]. Exp Eye Res,2004,78:409-416
 5 Stern ME,Beuerman RW,Fox RI, et al. The pathology of dry eye:the interaction between the ocular surface and lacrimal glands[J]. Cornea,1998,17:584-589
 6 Xu KP,Yagi Y,Tsubota K. Decrease in corneal sensitivity and change in tear function in dry eye[J]. Cornea,1996,15:235-239
 7 de Paiva CS,Pflugfelder SC. Corneal epitheliopathy of dry eye in duces hyperesthesia to mechanical air jet stimulation[J]. Am J Ophthalmol,2004,137:109-115
 8 Calvillo MP,McLaren JW,Hodge DO, et al. Corneal reinnervation after LASIK:prospective 3-years longitudinal study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2004,45:3991-3996
 9 Linna TU,Vesaluoma MH,Perez-Santonja JJ, et al. Effect of myopic LASIK on corneal sensitivity and morphology of subbasal nerves[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2000,41:393-397
 10 Erie JC,Nau CB,McLaren JW, et al. Long-term keratocyte deficits in the corneal stroma after LASIK[J]. Ophthalmology,2004,111:1356-1361
 11 高英茂.组织学和胚胎学[M].北京:人民卫生出版社,2005:271-280

(收稿:2008-07-18 修回:2009-02-09)

(本文编辑:王莉红)

· 病例报告 ·

玻璃体腔注射更昔洛韦治疗急性视网膜坏死综合征一例

侯艳丽 高立新

患者,男,43岁,因洗桑拿后右眼突然视物模糊来诊。眼科检查:视力右眼 1.0,左眼 1.0,右眼 KP(+),房水闪辉(+),眼底未见异常。诊断:右眼虹膜炎。给予典必殊、复方托品酰胺滴眼液点眼,症状无好转,视力进行性下降。1周后门诊复查,右眼视力 0.2,左眼 1.0,右眼球结膜混合性充血、水肿,角膜羊脂状 KP(++),房水闪辉(++),虹膜 7:00~8:00 点处后粘连,晶状体透明,玻璃体混浊明显。眼底检查可见视盘边界不清,黄斑中心凹反光消失,视网膜动脉呈银丝状,周围有白鞘,视网膜静脉粗细不均,周边部呈串珠状,视网膜上有散在片状出血灶,周边视网膜上有多发局限性不规则形黄白色病灶,边界清晰,未见视网膜裂孔及脱离;左眼前节正常,视网膜颞上血管旁可见小块状黄色病灶(图1)。眼压:右眼 18.8 mmHg,左眼 17.8 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。图形视觉诱发电位(VEP):右眼 P₁₀₀波潜伏期延长,左眼正常。OCT 检查示右眼黄斑区视网膜增厚。眼部 B 型超声检查见右眼视盘前局部隆起,周围视网膜增厚。实验室检查:RPR、HIV、RF、CRP、ASO、补体 C₃、C₄、ANA、ENA、抗弓形虫抗体结果均为阴性。荧光素眼底血管造影结果见图 2。入院后给予阿托品散瞳,局部应用典必殊控制眼部炎症。注射用阿昔洛韦 1 500 mg/d,每 8 h 1 次,20 d 后改为口服阿昔洛韦 200 mg,每日 5 次,强的松 500 mg 静脉滴注

3 d,改用口服强的松 80 mg,并逐渐减量。同时口服维生素 C、怡开片改善微循环,肌内注射及口服 B 族维生素营养视神经。口服拜阿司匹林 500 mg,隔日 1 次。治疗 10 d 后,右眼前节炎

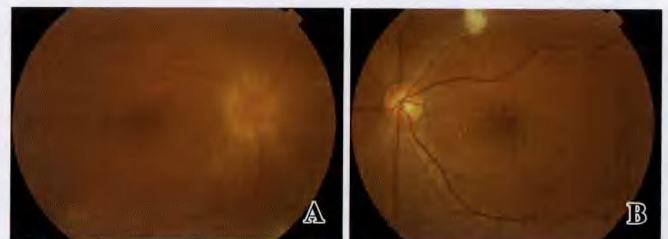


图 1 患者双眼眼底彩色照片 A:右眼 B:左眼

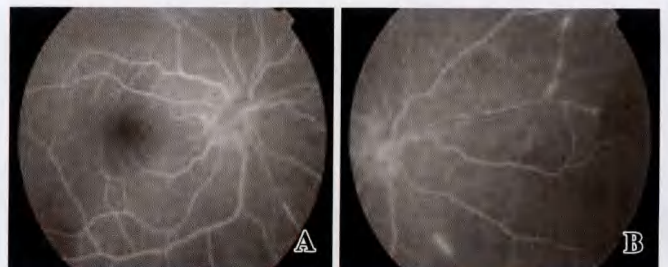


图 2 右眼荧光素眼底血管造影 静脉期:视盘边界不清,低荧光,其表面可见颞下、鼻上、鼻上动脉管壁渗漏,未见局限视网膜渗漏,晚期视盘高荧光 A:动静脉期 B:静脉期

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院眼科
 通讯作者:高立新(Email:hyl-0730@125.com)