

# 碱烧伤诱导兔部分性角膜缘干细胞失代偿模型

高晴琴<sup>1</sup>, 王平<sup>1</sup>, 王娟<sup>2</sup>, 孙明<sup>2</sup>, 徐玲娟<sup>2</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 朱晖<sup>2</sup>, 江梦琳<sup>2</sup>, 胡维琨<sup>2</sup>, 李新宇<sup>2</sup>, 李贵刚<sup>2</sup>

引用:高晴琴,王平,王娟,等. 碱烧伤诱导兔部分性角膜缘干细胞失代偿模型.国际眼科杂志 2019;19(5):734-739

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81200661, 81470606, 81570819);湖北省卫生计生委面上项目(No. WJ2017M073)

作者单位:<sup>1</sup>(443000)中国湖北省宜昌市,三峡大学附属仁和医院眼科;<sup>2</sup>(430030)中国湖北省武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院眼科

作者简介:高晴琴,女,在读硕士研究生,研究方向:角膜病。

通讯作者:王平,毕业于华中科技大学附属同济医学院,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:白内障、角膜病. 272593422@qq.com;李贵刚,毕业于华中科技大学附属同济医学院,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:角膜病. guigli@163.com

收稿日期:2018-09-28 修回日期:2019-04-03

## 摘要

**目的:**探讨诱导兔部分性角膜缘干细胞失代偿(limbal stem cell deficiency, LSCD)动物模型的一种新方法。

**方法:**分别采用C57小鼠和新西兰白兔制作完全性和部分性角膜缘干细胞失代偿动物模型。小鼠( $n=30$ )采用1mol/L氢氧化钾溶液浸泡的滤纸片(直径3mm)置于左眼中央角膜表面30s,随后用生理盐水冲洗。白兔( $n=19$ )切除瞬膜(第三眼睑)后,采用1mol/L氢氧化钾溶液浸泡的滤纸片(直径5mm)置于左眼颞上方角膜表面30s,随后用生理盐水冲洗。烧伤眼术后采用0.5%盐酸左氧氟沙星滴眼液4次/d。烧伤前、烧伤后第1、2、4wk,2mo采用裂隙灯显微镜观察、摄像,记录角膜溃疡、穿孔等并发症。术后2mo采用印迹细胞学检测角膜杯状细胞分布,根据裂隙灯显微镜检查所见和角膜印迹细胞学检查判断LSCD严重程度。术后2mo处死动物,角结膜切片观察角膜新生血管、杯状细胞分布。意外死亡动物不计入总数,计算并比较完全性LSCD和部分性LSCD的模型诱导成功率。

**结果:**30只小鼠中6只意外死亡,2只于烧伤后出现角膜穿孔,其余22只发生完全性LSCD,诱导成功率92%,烧伤后2mo小鼠角膜可见新生血管广泛分布于角膜浅层及深基质层,病理切片可见角膜新生血管。19只白兔,7只意外死亡,其余12只发生不同程度LSCD(部分性LSCD,平均累及 $1.17\pm 0.39$ 个象限),未发生角膜穿孔情况,诱导成功率100%( $P=0.543$ )。正常角膜区域无杯状细胞,LSCD区域角膜上皮印迹细胞学PAS染色可见杯状细胞,平均密度 $58.60\pm 12.58$ 个细胞/HP。

**结论:**中央角膜碱烧伤可以诱导产生完全性LSCD,部分动物会因为角膜溃疡穿孔而导致模型诱导失败,LSCD往往比较严重,且合并深层角膜新生血管。颞上方角膜碱烧伤

可以诱导产生部分性LSCD,合并较少的角膜病变,角膜新生血管位于浅层。

**关键词:**角膜缘干细胞失代偿;碱烧伤;动物模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.5.06

## Experimental study on decompensation model of rabbit corneal limbal stem cells induced by alkali burn

Qing - Qin Gao<sup>1</sup>, Ping Wang<sup>1</sup>, Juan Wang<sup>2</sup>, Ming Sun<sup>2</sup>, Ling-Juan Xu<sup>2</sup>, Wei Wang<sup>2</sup>, Hui Zhu<sup>2</sup>, Meng-Lin Jiang<sup>2</sup>, Wei - Kun Hu<sup>2</sup>, Xin - Yu Li<sup>2</sup>, Gui-Gang Li<sup>2</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No.81200661, 81470606, 81570819); Hubei Province Health and Family Planning Scientific Foundation (No.WJ2017M073)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

**Correspondence to:** Ping Wang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei Province, China. 272593422@qq.com; Gui-Gang Li. Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. guigli@163.com

Received:2018-09-28 Accepted:2019-04-03

## Abstract

• **AIM:** To explore a new method to induce the animal model of rabbit partial limbal stem cell deficiency (LSCD).

• **METHODS:** LSCD was induced through corneal alkali burn, C57 mice and New Zealand rabbits were used to establish the animal models. Corneal alkali burn manipulation was accomplished in experimental animals under general anesthesia combined with surface anesthesia in the operated eye. Specifically, mice ( $n=30$ ) were used to induce complete LSCD model. In brief, the filter paper (diameter of 3mm) that immersed in 1mol/L potassium hydroxide solution was placed on the central corneal surface of the left eye for 30s, followed by washing with saline. In addition, rabbits ( $n=19$ ) were utilized to establish the partial LSCD model. Briefly, the

nictitating membrane (third eyelid) was resected, and the filter paper (diameter of 5mm) that immersed in 1mol/L potassium hydroxide solution was placed on the superior temporal peripheral corneal surface of the left for 30s, followed by washing with saline. After surgery, the model eyes were treated with 0.5% Levofloxacin Hydrochloride Eye Drops four times a day. In addition, the slit-lamp microscope was adopted for observation and photo-taking before burn, as well as at 1, 2, 4wk and 2mo after burn; meanwhile, complications such as corneal ulcer and perforation were recorded. 2mo after surgery, the corneal goblet cell distribution was detected with impression cytology, and the severity of LSCD was classified according to slit-lamp microscopic findings and corneal impression cytology. The animals were sacrificed 2mo after surgery, cornea and conjunctiva sections were made to observe angiogenesis and goblet cell distribution in cornea. Animals died accidentally were not counted into the total number, and the successful induction rates of complete LSCD and partial LSCD models were compared.

• **RESULTS:** Six out of the 30 mice died accidentally, while 2 developed corneal perforation after burn, and the remaining 22 had developed complete LSCD only, yielding the successful induction rate of 92%. 2mo after burn, extensive angiogenesis distribution in the superficial and deep corneal stromal layers could be observed, and pathological sections revealed corneal angiogenesis. Seven out of the 19 rabbits died accidentally, while the remaining 12 had various degrees of LSCD only (partial LSCD, average involving  $1.17 \pm 0.39$  quadrants). Additionally, no corneal perforation was observed, and the successful induction rate was 100%. The result of Fisher's exact test *P* value is 0.543, without statistical difference. No goblet cells were observed in the normal corneal region, while goblet cells were observed in the LSCD region, with the average density of  $58.60 \pm 12.58$  cell/HP.

• **CONCLUSION:** Central corneal alkali burn can induce complete LSCD; however, some animals will experience failure in model induction due to corneal ulcer and perforation, LSCD is generally serious and may be combined with angiogenesis in deep cornea. Alkali burn in superior temporal cornea can induce partial LSCD, which may be combined with relatively minor corneal lesion, and the corneal angiogenesis is located in the superficial layer.

• **KEYWORDS:** limbal stem cell deficiency; alkali burn; animal model

**Citation:** Gao QQ, Wang P, Wang J, *et al.* Experimental study on decompensation model of rabbit corneal limbal stem cells induced by alkali burn. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2019;19(5):734-739

## 0 引言

角膜上皮位于正常角膜的最表层,是保护角膜免受病原体侵害的重要屏障,对保持角膜的完整和透明性至关重要。角膜上皮由复层鳞状上皮细胞组成,一生都处于不断

地更新保持动态平衡状态<sup>[1]</sup>。正常角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSC)是维持角膜上皮更新的必备条件。LSC可以分裂为两种细胞,一种是新一代的LSC细胞,维持恒定的干细胞群,这个过程被称为自我更新(self-renew);另一种是瞬时扩增细胞(transit amplifying cells, TAC),这一过程被称为分化(differentiation),TAC细胞具有旺盛的分裂增殖能力,向角膜中央不断移行,以填充角膜上皮的基底层,这些基底细胞可以持续分裂或进入细胞周期,形成角膜基底层上皮细胞和成熟的表层上皮细胞<sup>[2-3]</sup>。各种原因都会造成LSC的损伤,从而导致角膜缘干细胞失代偿(limbal stem cell deficiency, LSCD),如化学或热烧伤, Stevens Johnson 综合征, Sjögren 综合征及其他眼表慢性炎症。LSCD可以导致角膜上皮迁延不愈、角膜上皮结膜化、角膜新生血管、角膜混浊等病理改变,从而严重影响患者视力乃至致盲,并且成为同种异体角膜移植失败的重要原因。

近年来,许多研究小组运用各种动物、不同方法制作LSCD模型,用以研究LSCD发生机制,并期望寻找治疗这一疾病的最佳方法,LSCD模型的制作是这类相关研究的基础。本研究采用去除兔第三眼睑的方法,有效利用了颞上方角膜结膜容易暴露观察的特点,记录了一组采用碱烧伤诱导兔部分性LSCD的动物模型制作新方法,现报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 **材料** 选取30只眼部健康的C57小鼠、19只眼部健康新西兰白兔、1mol/L KOH溶液(0.56g KOH溶于10mL去离子水中配制而成)、滤纸、氯胺酮、0.25%盐酸奥布卡因滴眼液、生理盐水、0.5%盐酸左氧氟沙星滴眼液、醋酸纤维素微孔滤膜、4%多聚甲醛、Schiff氏溶液、苏木素染液、亚硫酸钠溶液、PBS液、70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、蒸馏水、1%盐酸酒精、二甲苯、伊红染液。

1.2 **方法** 本研究由华中科技大学同济医学院附属同济医院伦理委员会审核通过,并遵守实验动物操作伦理学规定。

1.2.1 **小鼠完全性LSCD模型制作方法** 根据文献报道的方法<sup>[4]</sup>,小鼠中央角膜碱烧伤诱导LSCD。C57小鼠腹腔内注射氯胺酮(100mg/kg)全身麻醉,左眼滴0.25%盐酸奥布卡因滴眼液,每分钟1次合计3次表面麻醉。取直径3mm圆形滤纸片置于1mol/L氢氧化钾溶液中浸润,用镊子夹取滤纸片,在一张新的滤纸上吸掉多余的液体,置于左眼中央角膜表面与角膜紧密贴敷,烧灼30s,用20mL生理盐水充分冲洗(图1A)。右眼不做烧灼,作为正常对照。

1.2.2 **兔部分性LSCD模型制作方法** 新西兰白兔肌肉注射氯胺酮(35mg/kg)全身麻醉,左眼滴0.25%盐酸奥布卡因滴眼液,每分钟1次合计3次表面麻醉,剪刀去除兔眼瞬膜(第三眼睑),取直径5mm圆形滤纸片置于1mol/L氢氧化钾溶液中浸润,将浸湿的滤纸片置于颞上方角膜表面,30s后立即用生理盐水冲洗(图1B),右眼作为正常对照。

1.2.3 **角膜印迹细胞学检查方法** 兔结膜囊内滴0.25%盐酸奥布卡因1滴,等待2min后用滤纸吸去多余泪液,显微无齿镊夹取已消毒的醋酸纤维素薄膜滤纸(预先裁剪



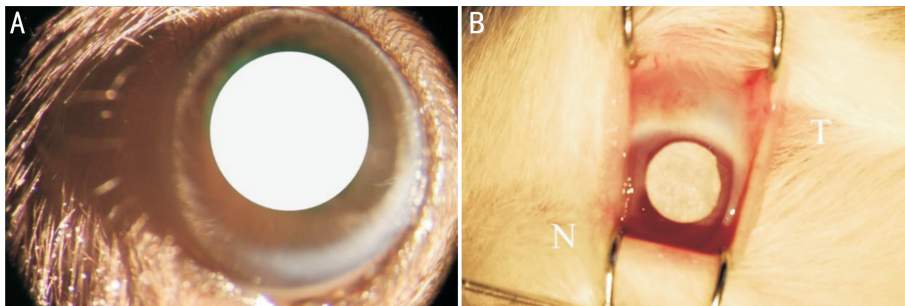


图1 角膜碱烧伤法诱导 LSCD 示意图 白色区域为角膜表面滤纸片烧灼部位,采用 1mol/L 氢氧化钾溶液浸泡滤纸片烧灼 30s,再用生理盐水冲洗干净 A: C57 小鼠,滤纸片直径 3mm; B: 新西兰白兔,滤纸片直径 5mm。T: 颞侧 N: 鼻侧。

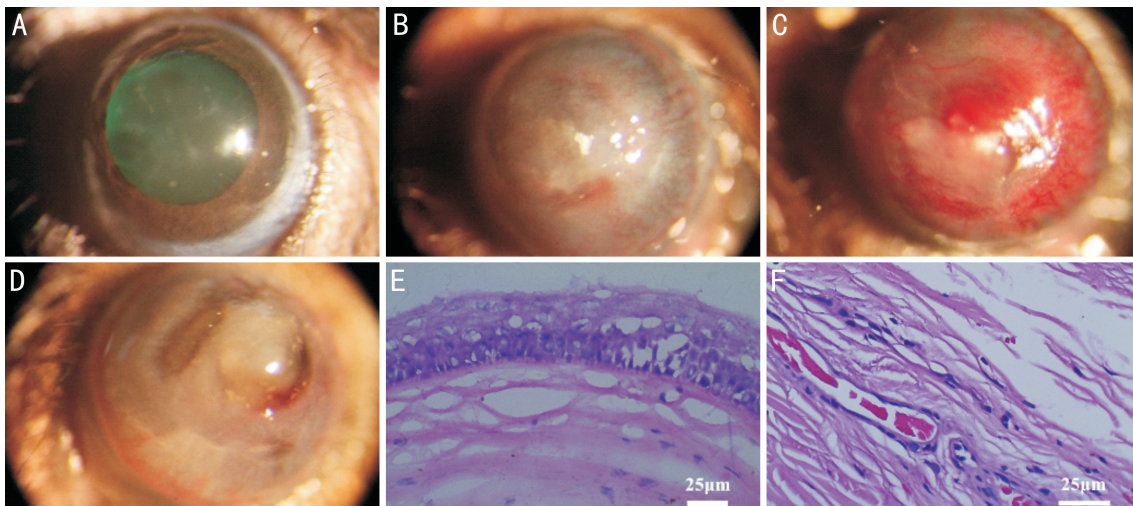


图2 鼠完全性 LSCD 模型不同阶段前段照相及 2mo 病理切片 A: 正常小鼠角膜; B: 小鼠角膜碱烧伤后 2wk; C: 小鼠角膜碱烧伤后 2wk, 角膜混浊, 新生血管长入; D: 小鼠角膜碱烧伤后 1wk, 角膜穿孔; E: 碱烧伤 2mo 鼠完全性 LSCD 模型角膜切片 HE 染色, 上皮层可见大量杯状细胞( $\times 400$ ); F: 碱烧伤 2mo 鼠完全性 LSCD 模型角膜切片 HE 染色, 基质层可见大量新生血管( $\times 400$ )。

为高约 4mm 的三角形), 将三角尖对角膜, 底边对结膜, 粗糙面贴于球结膜、病变角膜及透明角膜处, 稍加压 10s, 印取表层上皮细胞, 将滤纸片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 固定好的样品采用 PAS 染色 (periodic acid - schiff stain) 之后放置于显微镜下观察。

**1.2.4 HE 染色方法** 对取得的角膜组织进行石蜡包埋、切片后用二甲苯进行脱蜡, 随后分别用无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇以及蒸馏水进行复水, 用苏木素染液进行细胞核染色之后再用伊红染液进行细胞质染色, 随后分别用 70% 的乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇进行脱水, 将脱水后的切片放入二甲苯中浸泡使切片透明, 最后用快干胶将切片封固, 置于显微镜下观察。

**1.2.5 观察指标** 小鼠及白兔角膜碱烧伤后双眼滴用 0.5% 盐酸左氧氟沙星滴眼液, 4 次/d。术前、术后 1、2、4wk, 2mo 采用裂隙灯显微镜观察、摄像, 观察角膜上皮愈合时间, 记录角膜溃疡、穿孔等并发症。术后 2mo 处死小鼠, 角结膜切片检测角膜新生血管分布情况。计算碱烧伤诱导鼠完全性 LSCD 模型成功率。术后 2mo 采用印迹细胞学检测兔眼表杯状细胞分布 (正常角膜区域、LSCD 角膜区域、结膜)。处死动物, 角结膜切片观察角膜新生血管、杯状细胞密度。计算利用碱烧伤诱导兔部分性 LSCD 模型成功率。

LSCD 的诊断标准: (1) 裂隙灯检查见全部或部分角膜缘正常结构丧失、角膜新生血管。(2) 角膜印迹细胞学

检查可见杯状细胞<sup>[5-7]</sup>。

统计学分析: 采用 SPSS19.0 软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两种方法造模成功率运用 Fisher 确切概率法进行比较, 以  $P < 0.05$  判定差异有统计学意义。

## 2 结果

角膜碱烧伤后观察 2mo, 30 只小鼠中, 6 只因麻醉意外死亡, 2 只分别在第 7d 和第 14d 出现了角膜穿孔, 其余 22 只小鼠发生不同程度完全性 LSCD, 诱导成功率 92%, 表现为角膜新生血管、角膜混浊。19 只白兔, 其中 7 只因麻醉意外死亡, 12 只白兔造模成功, 诱导成功率 100%, 在观察过程中, 未出现角膜穿孔的情况。两种方法造模成功率比较差异无统计学意义 ( $P = 0.543$ )。

正常小鼠结膜无充血, 角膜透明, 角膜缘血管网清晰可见, 通过透明的角膜, 可以清晰显示虹膜纹理、瞳孔大小、晶状体透明 (图 2A)。角膜中央碱烧伤后 2wk, 部分小鼠 LSCD 程度适中, 表现为无明显充血, 中等程度角膜新生血管, 纤维血管膜长入角膜, 中央角膜混浊, 无法透过角膜看清虹膜及瞳孔情况, 这是比较理想的 LSCD 模型 (图 2B)。角膜中央碱烧伤后 2wk, 部分小鼠 LSCD 程度严重, 表现为睫状充血+++ , 大量角膜新生血管, 中央角膜溃疡, 无法透过角膜看到虹膜及瞳孔情况, 这种 LSCD 很难治愈, 不是理想的 LSCD 模型 (图 2C)。角膜中央碱烧伤后 1wk, 部分小鼠角膜溃疡穿孔, 无法透过角膜看到虹膜及瞳孔情况, 这种被判定为 LSCD 模型制作失败, 无法用



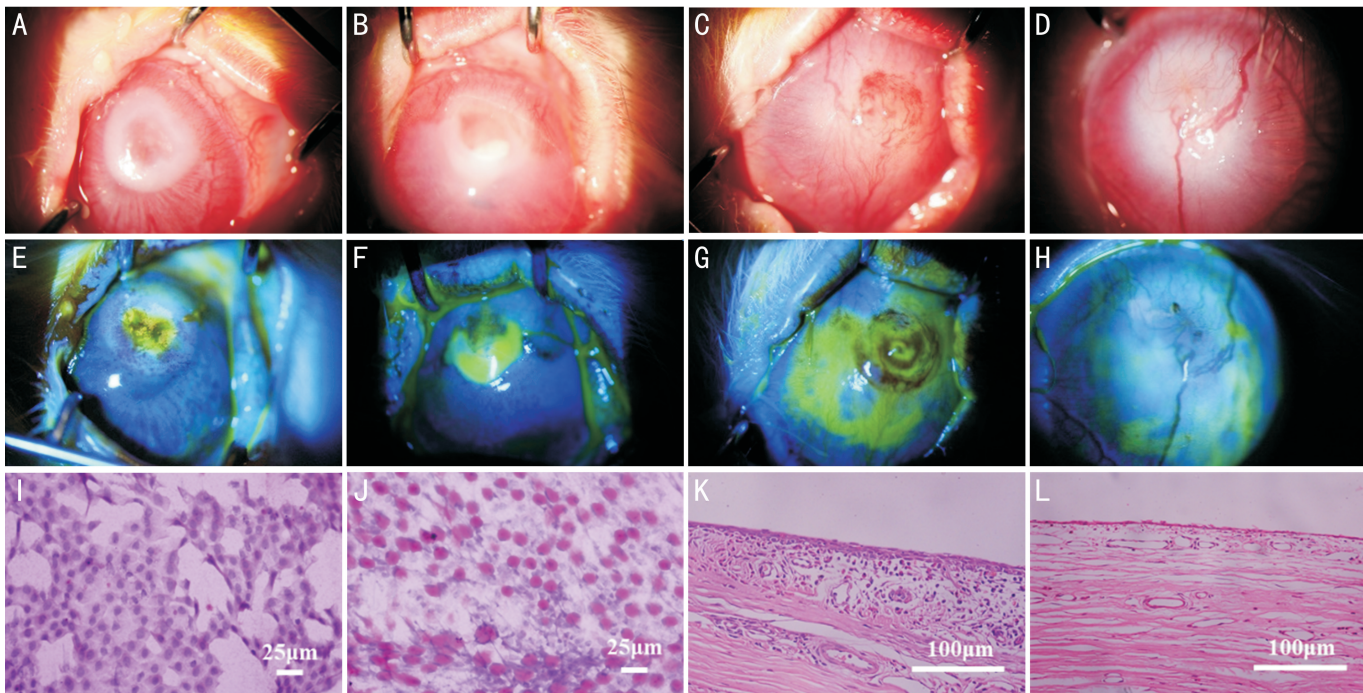


图3 兔部分性 LSCD 模型不同阶段前段照相和印记细胞学 PAS 染色及病理切片 A、E:碱烧伤后 1wk;B、F:碱烧伤后 2wk;C、G:碱烧伤后 1mo;D、H:碱烧伤后 2mo;I:碱烧伤后 2mo 兔部分性 LSCD 模型正常角膜部分印记细胞学 PAS 染色阴性( $\times 400$ );J:碱烧伤后 2mo 病变角膜印记细胞学 PAS 染色显示大量杯状细胞( $\times 400$ );K:碱烧伤后 2mo 角膜切片 HE 染色,上皮层可见大量杯状细胞( $\times 200$ );L:碱烧伤后 2mo 角膜切片 HE 染色,基质层可见大量新生血管( $\times 200$ )。

于进一步的 LSCD 治疗模型(图 2D)。碱烧伤后 2mo,小鼠角膜病理切片 HE 染色可见角膜上皮杯状细胞长入(图 2E),基质有大量新生血管(图 2F)。

兔角膜碱烧伤后 1wk,表现为轻度角膜新生血管,尚未见纤维血管膜长入角膜,角膜烧伤局部混浊明显,无法透过角膜看清虹膜及瞳孔情况,其他部位可透过角膜看清虹膜及瞳孔纹理(图 3A),烧伤局部角膜上皮荧光素钠染色阳性(图 3E)。兔角膜碱烧伤后 2wk,LSCD 程度适中,表现为中等程度角膜新生血管,纤维血管膜长入角膜,烧伤局部角膜混浊明显,其他部位角膜轻度混浊,可隐约窥见虹膜及瞳孔纹理(图 3B),角膜荧光素钠染色见局部角膜上皮缺损范围增大(图 3F)。角膜碱烧伤后 1mo,表现为角膜大量新生血管,角膜混浊加重,无法透过角膜看到虹膜及瞳孔情况(图 3C),角膜荧光素钠染色可见大片上皮缺损(图 3G)。角膜碱烧伤后 2mo,结膜无充血,角膜上皮愈合,新生血管减少,角膜混浊,无法透过角膜看到虹膜及瞳孔情况(图 3D),角膜荧光素钠染色阴性(图 3H)。透明角膜部位印记细胞学 PAS 染色未见杯状细胞(图 3I),混浊角膜部位可见大量杯状细胞(图 3J)。角膜病理切片 HE 染色可见角膜上皮杯状细胞长入(图 3K),基质新生血管主要位于浅层(图 3L)。碱烧伤后 2mo,2 只白兔角膜新生血管累及 2 个象限,其余 10 只白兔均累及 1 个象限,平均累及  $1.17 \pm 0.39$  个象限。在高倍镜(HP, $\times 400$ )下对 12 只兔部分性 LSCD 模型的角膜杯状细胞计数,平均角膜杯状细胞数为  $58.60 \pm 12.58$  个细胞/HP。

### 3 讨论

**3.1 模型动物选择兔还是小鼠** 用于制作 LSCD 模型的动物大多选用兔<sup>[8-27]</sup>和小鼠<sup>[4-5,28-29]</sup>,兔眼大小更接近人

眼,与小鼠相比角膜面积更大,因此有利于模型成功和手术操作。且兔子性情温顺,极少伤人,在制作 LSCD 模型时更易操作、更易观察,拍摄照片时也更加清晰。Ti 等<sup>[11]</sup>在完全性 LSCD 兔模型上观察到鼻侧的新生血管多于其他方向,认为兔眨眼速度慢,且存在瞬膜,会对眼表施加额外的摩擦力,尤其是鼻侧。瞬膜的存在可能会影响碱烧伤的操作和日常的角膜病变观察记录。因此我们选择去除兔眼的瞬膜,这样在观察和拍照的时候就可以不受此影响。小鼠的眼球较小,进行操作、测量新生血管面积及照相的难度都较兔子大,但小鼠可供选择的抗体较兔子齐全,有利于在同类研究中的比较。因此两种动物模型各有优缺点。

**3.2 完全性 LSCD 模型还是部分性 LSCD 模型** 就近几年的研究来看,制作完全性 LSCD 模型<sup>[5,8,11-15,18,20-25,28-29]</sup>的研究远远多于部分性<sup>[9-10,16-17,19]</sup>。但是这种研究模型在检验治疗方法的有效性的时候有一定局限性,因为合并严重的角膜病变,无论是研究组还是阳性对照的治疗方法都不容易获得治愈效果,或者治疗效果不显著,这样就难以做出治疗方法的优劣性判断。角膜化学伤诱导 LSCD,目前报道的均为完全性 LSCD,往往合并严重的角膜混浊、深层新生血管等病变。由于中央角膜碱烧伤损伤范围大,容易发生角膜溃疡不愈合、角膜穿孔而导致造模失败。Ma 等<sup>[4]</sup>在研究骨髓间充质干细胞重建鼠化学烧伤眼表时发现,80 只鼠在化学烧伤 1wk 后有 29 只(36%)因出现了严重的前房积血、前房积脓、角膜穿孔而退出研究。郭滨等<sup>[27]</sup>运用不同碱烧伤方法制作兔完全性 LSCD 模型时 A 组兔眼由于 NaOH 在角膜缘停留时间过长,6 只眼全部出现角膜穿孔、眼球萎缩而造模失败;B、C 组造模成功但 B 组因为在结膜囊滴入 NaOH 而导致睑球粘连。睑球粘连

并非是 LSCD 的必要体征,且不利于后期进行 LSCD 治疗方法的相关研究。相反,如果 LSCD 动物模型的损伤比较局限于表层组织,那么治疗方法容易取得眼表健康改善、视觉改善等阳性指标,并与对照组形成比较明显的对比,从而发现有用的治疗方法,并且客观定量评价治疗效果。

此外,由于动物角膜暴露困难,完全性 LSCD 模型不便于观察和照相,以及印迹细胞学检查等操作。而部分性 LSCD 模型更便于观察,前段照相时兔配合情况好,烧伤操作时更易精确控制部位和时间,成功率高。在研究 LSCD 微环境重建,比如角膜缘微环境细胞(limbal niche cells, LNC)的移植时,就更适合采用仍存有部分自体角膜缘干细胞的部分性 LSCD 模型。

尽管碱烧伤诱导兔部分性 LSCD 模型与碱烧伤诱导鼠完全性 LSCD 模型的成功率差异无统计学意义,但前者在 2mo 的时候已经进入无充血、角膜上皮结膜化的炎症稳定阶段,而这是接下来用于检验 LSCD 治疗方法有效性的理想状态。相对于以往报道的 3mo 制作时间,这种动物模型具有缩短实验周期,提高研究效率的优点。

**3.3 使用机械手法还是碱烧伤** 制作的 LSCD 动物模型的方法主要有 2 种,一种是机械损伤角膜缘<sup>[8-11,14-15,17,19-22,25-26,29]</sup>;另一种是化学烧伤,多采用碱,如 NaOH<sup>[4-5,12-13,20-21,23-24,27]</sup>、KOH<sup>[16]</sup> 等,少见的有硫芥子气<sup>[18]</sup>。机械损伤角膜缘的优点是可控性较好,可以诱导不同程度的 LSCD,包括完全性 LSCD 和部分性 LSCD<sup>[30]</sup>,然而这种模型与临床病例的吻合度较低,因为临床上最常见的 LSCD 发病原因为各种化学或热烧伤。2017 年中山眼科中心的一项研究对碱烧伤和角膜缘机械切除联合角膜上皮刮除这两种方法制作的完全性兔 LSCD 模型进行了比较。该研究表明这两种方法均可造模成功,碱烧伤组的角膜混浊、新生血管化较机械切除组严重,适合用于与新生血管相关的研究;角膜缘机械切除联合上皮刮除对角膜基质的损伤较小,角膜基质的微环境保存良好,更适合于研究干细胞的分化、转化、干细胞相互作用、微环境及干细胞替代疗法<sup>[21]</sup>。机械手法对术者技巧要求较高,无疑增加了可重复性的难度。最重要的是,在临床中导致 LSCD 的病因并非机械损伤,而是化学烧伤,特别是碱烧伤所导致。所以,采用碱烧伤的方法制作 LSCD 模型更贴合临床患者的实际情况。

综上所述,目前关于制作 LSCD 模型的研究中极少提及模型的制作成功率,而这一指标对研究者选择动物模型,提高研究效率有重要意义。本研究的结果提示碱烧伤诱导 LSCD 模型是比较可靠的方法(鼠完全性 LSCD 的成功率及兔部分性 LSCD 的成功率分别是 92% 和 100%)。尽管两种方法诱导 LSCD 模型的成功率差异没有统计学意义,相对于小鼠完全性 LSCD,兔部分性 LSCD 具有成功率高、易于暴露病变区域进行观察记录的优点,因此可能具有更高的可重复性,有利于不同研究者之间的结果比较和客观评价,是一种比较好的 LSCD 研究动物模型。剪除第三眼睑使这种部分性 LSCD 兔动物模型更易于被观察和记录。

#### 参考文献

1 Movahedan A, Afsharkhamesh N, Sagha HM, et al. Loss of Notch1

disrupts the barrier repair in the corneal epithelium. *PLoS One* 2013;8(7):e69113

2 Tseng SCG. Concept and application of limbal stem cells. *Eye (Lond)* 1989;3(Pt 2):141-157

3 Kasetti RB, Gaddipati S, Tian S, et al. Study of corneal epithelial progenitor origin and the Yap1 requirement using keratin 12 lineage tracing transgenic mice. *Sci Rep* 2016;6:35202

4 Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):315-321

5 元晓琳. 小鼠眼部碱烧伤后骨髓间充质干细胞归巢到角膜组织的检测及影响因素分析. 青岛大学 2013

6 Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol* 2007;52(5):483-502

7 Le Q, Xu J, Deng SX. The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf* 2018;16(1):58-69

8 Avila M, España M, Moreno C, et al. Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in a rabbit model. *Cornea* 2001;20(4):414-420

9 Sitalakshmi G, Sudha B, Madhavan HN, et al. Ex vivo cultivation of corneal limbal epithelial cells in a thermoreversible polymer (Mebiol Gel) and their transplantation in rabbits an animal model. *Tissue Eng Part A* 2009;15(2):407-415

10 Yeh SI, Ho TC, Chen SL, et al. Pigment Epithelial-Derived Factor Peptide Regenerated Limbus Serves as Regeneration Source for Limbal Regeneration in Rabbit Limbal Deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(6):2629-2636

11 Ti SE, Anderson D, Touhami A, et al. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(8):2584-2592

12 Gomes JA, Geraldes Monteiro B, Melo GB, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(3):1408-1414

13 Monteiro BG, Serafim RC, Melo GB, et al. Human immature dental pulp stem cells share key characteristic features with limbal stem cells. *Cell Prolif* 2009;42(5):587-594

14 Ono K, Yokoo S, Mimura T, et al. Autologous transplantation of conjunctival epithelial cells cultured on amniotic membrane in a rabbit model. *Mol Vis* 2007;13:1138-1143

15 Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006;12:65-75

16 Li G, Zhang Y, Cai S, et al. Human limbal niche cells are a powerful regenerative source for the prevention of limbal stem cell deficiency in a rabbit model. *Sci Rep* 2018;8(1):6566

17 Yeh SI, Ho TC, Chen SL, et al. Pigment Epithelial-Derived Factor Peptide Facilitates the Regeneration of a Functional Limbus in Rabbit Partial Limbal Deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(4):2126-2134

18 Kadar T, Horwitz V, Sahar R, et al. Delayed loss of corneal epithelial stem cells in a chemical injury model associated with limbal stem cell deficiency in rabbits. *Curr Eye Res* 2011;36(12):1098-1107

19 王向军. 角膜缘干细胞自体移植的实验研究. 第三军医大学 2007

20 徐彬. 组织工程人角膜上皮的体外重建、鉴定及其在新西兰兔角膜上皮移植中的作用研究. 中国海洋大学 2012

21 Zhang H, Lin S, Zhang M, et al. Comparison of Two Rabbit Models



with Deficiency of Corneal Epithelium and Limbal Stem Cells Established by Different Methods. *Tissue Eng Part C Methods* 2017;23(11):710-717

22 Selver OB, Durak I, Gürdal M, *et al.* Corneal recovery in a rabbit limbal stem cell deficiency model by autologous grafts of tertiary outgrowths from cultivated limbal biopsy explants. *Mol Vis* 2016; 22: 138-149

23 Holan V, Trosan P, Cejka C, *et al.* A Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells and Limbal Epithelial Stem Cells for Ocular Surface Reconstruction. *Stem Cells Transl Med* 2015;4(9):1052-1063

24 Chae JJ, Ambrose WM, Espinoza FA, *et al.* Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency. *Acta Ophthalmol* 2014;93(1):e57-66

25 Zhou Q, Liu XY, Ruan YX, *et al.* Construction of corneal epithelium

with human amniotic epithelial cells and repair of limbal deficiency in rabbit models. *Hum Cell* 2015;28(1):22-36

26 Li FJ, Nili E, Lau C, *et al.* Evaluation of the AlgerBrush II rotating burr as a tool for inducing ocular surface failure in the New Zealand White rabbit. *Exp Eye Res* 2016;147:1-11

27 郭滨, 任丛, 温莹. 眼部碱烧伤导致兔角膜缘干细胞缺乏动物模型的建立与评价. *中国实用眼科杂志* 2015;33(12):1411-1414

28 Afsharkhamseh N, Movahedan A, Gidfar S, *et al.* Stability of limbal stem cell deficiency after mechanical and thermal injuries in mice. *Exp Eye Res* 2016;145:88-92

29 Afsharkhamseh N, Ghahari E, Eslani M, *et al.* A Simple Mechanical Procedure to Create Limbal Stem Cell Deficiency in Mouse. *J Vis Exp* 2016;(117)

30 Dua HS, Azuara - Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44:415-425

## 最新中国科技核心期刊眼科学类期刊主要指标及排名

刊名	核心总被引频次		核心影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
中华眼科杂志	2040(3435)	2(2)	0.953(1.073)	1(4)	78.4	1
眼科新进展	1273(545)	3(4)	0.690(1.344)	4(3)	60.5	2
<b>国际眼科杂志</b>	<b>2446(5519)</b>	<b>1(1)</b>	<b>0.667(1.412)</b>	<b>5(2)</b>	<b>57.2</b>	<b>3</b>
中华眼底病杂志	865	5	0.878	2	54.3	4
中华实验眼科杂志	1018	4	0.692	3	46.2	5
临床眼科杂志	513	7	0.523	6	38.5	6
眼科	387	8	0.398	8	27.1	7
中华眼视光与视觉科学杂志	528	6	0.390	9	25.5	8
中国斜视与小儿眼科杂志	256	9	0.470	7	10.1	9
9种期刊平均值	1036		0.629			

摘编自 2018 版《中国科技期刊引证报告》核心版和扩展版(括号里面为扩展版的统计指标)