

缝线法睑外翻手术建立兔干眼模型的实验研究

韩臻^{1,2}, 郭滨², 任丛², 代云海²

作者单位:¹(250000)中国山东省济南市,济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院;²(266071)中国山东省青岛市,山东省眼科研究所

作者简介:韩臻,女,在读硕士研究生,研究方向:角膜病、白内障、青光眼。

通讯作者:代云海,男,主治医师,研究方向:角膜病、白内障。yunhaidai@163.com

收稿日期:2012-02-15 修回日期:2012-03-27

Experimental research of rabbit dry eye model by ectropion surgery

Zhen Han^{1,2}, Bin Guo², Cong Ren², Yun-Hai Dai²

¹College of Medicine and Life Sciences of Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan University, Jinan 250000, Shandong Province, China;²Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Yun-Hai Dai. Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, Shandong Province, China. yunhaidai@163.com
Received:2012-02-15 Accepted:2012-03-27

Abstract

• AIM: To evaluate the efficiency and feasibility of "excessive evaporation" rabbit dry eye model by ectropion surgery.

• METHODS: Dry eye models of rabbits were established by ectropion surgeries in a random eye of 6 New Zealand rabbits, while the other eyes of the rabbits were used as control. Schirmer ζ test (S ζ test), fluorescence staining and 1% rose Bengal staining were performed before and 1, 3, 5, 7, 14, 28 days after surgery. Cornea, conjunctiva and lacrimal glands tissues biopsy was carried out under light microscope.

• RESULTS: S ζ test was significantly abnormal after surgery except the first day ($P < 0.05$). Fluorescence staining showed on the 5th days after surgery and appeared most significantly on the 5th day. Rose Bengal staining showed on the first day after surgery and appeared most significantly on the 14th day. The biopsy showed: the layer of the cornea epithelium of the experimental eye increased. The squamous cell disappeared irregularly. The cells arranged disorderly. The surface of the conjunctiva was not smooth. And the goblet cell developed compensatory hyperplasia. Lacrimal glands showed no significant abnormal changes.

• CONCLUSION: Using suture method ectropion surgery to prepare rabbit dry eye model is stable, simple and effective, which is worth populating.

• KEYWORDS: dry eye; animal model; rabbit; ectropion

Han Z, Guo B, Ren C, et al. Experimental research of rabbit dry eye model by ectropion surgery. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(5):832-835

摘要

目的:探讨经缝线法行睑外翻手术建立“蒸发过强型”兔干眼模型的有效性和可行性。

方法:新西兰大白兔6只(12眼),每只兔随机选1眼行睑外翻手术(实验眼),对侧眼作空白对照(对照眼)。分别于手术前及手术后1,3,5,7,14,28d行泪液分泌试验、荧光素钠染色、1%虎红染色检查,术后第28d处死实验兔,取结膜、角膜、泪腺组织行眼科病理检查。

结果:泪液分泌试验结果显示:除实验前和实验后第1d,其余各时间点实验眼与对照眼相比,结果均有不同程度降低,且有统计学差异($P < 0.05$)。实验眼术后第5d角膜开始出现荧光素钠着色,在术后第5d着色最重,之后出现不同程度的好转。实验眼术后第1d角结膜即出现轻度虎红着色,术后第14d着色最重,至28d时略有好转。组织病理学检查示:实验眼与对照眼相比,角膜上皮层次增加,表层扁平细胞不规则缺失,细胞排列紊乱;结膜上皮表面凹凸不平,细胞扁平增大,杯状细胞代偿性增生;泪腺组织光镜下未见明显异常改变。

结论:缝线法睑外翻手术制备兔干眼模型效果稳定、操作简便、成本低廉,是一种值得推广的干眼模型制作方法。

关键词:干眼;动物模型;兔;睑外翻

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.05.08

韩臻,郭滨,任丛,等.缝线法睑外翻手术建立兔干眼模型的实验研究.国际眼科杂志2012;12(5):832-835

0 引言

干眼病是因泪液低分泌或其他原因引起泪膜异常而发生眼表上皮干变的常见眼病。随着电脑终端工作者的人数逐年增加以及人口老龄化问题的出现等,干眼发病率正逐年上升,流行病学调查表明^[1],30~40岁人群中超过20%患有干眼病,70岁以上人群中患病率则高达36.1%,干眼病的研究和防治工作越来越受到重视。动物实验是干眼病研究的重要手段,建立合适的干眼动物模型是实验的前提条件。目前干眼病的动物模型较多^[2-8],但或费时费力,或实验成本高,各有其优缺点,本研究旨在利用睑外翻手术法建立一种成本低廉、便于操作、效果稳定的干眼模型,为干眼病的病因学研究及药物治疗提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康新西兰大白兔6只,雌雄不限,体质量2.0~2.5kg,每只兔随机选1眼行睑外翻手术(实验眼),对侧眼作自身空白对照(对照眼)。1%虎红溶液(山东省

表 1 两组实验兔干眼模型泪液分泌试验后的滤纸湿长变化 ($\bar{x} \pm s$, mm/5min)

分组	实验前	D1	D3	D5	D7	D14	D28
实验组	11.83±7.36	8.00±4.47	6.50±4.51	4.83±9.17	4.17±9.00	3.50±1.38	8.00±2.37
对照组	13.67±10.82	7.50±4.14	7.83±3.66	9.17±3.19	9.00±3.69	11.50±4.23	10.67±3.44
<i>t</i>	0.173	2.419	4.347	2.907	3.780	3.008	2.599
<i>P</i>	0.869	0.060	0.007	0.034	0.013	0.030	0.048

眼科研究所药物药理学实验室制备)、泪液检测滤纸条和荧光素钠眼科检测试纸(天津晶明新技术开发有限公司)。
1.2 方法 每只兔随机选1眼作为实验组,对侧眼作为对照组。给予盐酸氯丙嗪 10mg/kg,盐酸氯胺酮 50mg/kg 混合肌肉注射麻醉,5g/L 爱尔凯因表面麻醉,将眼睑局部聚维酮碘消毒、铺洞巾;完整摘除第3眼睑,用4-0 尼龙线由下睑缘下方 8mm 处进针,经睑板前眼轮匝肌,再由下睑缘外侧皮肤穿出,扎紧缝线,共缝 3~4 针,使间距适中,可造成下睑缘轻度外翻,使睑板缘开口不与眼表接触,但又不影响其闭合眼睑;相同方法处理上睑(图 1)。分别于实验前及实验后 1,3,5,7,14,28d (D1, D3, D5, D7, D14, D28) 行泪液分泌试验(Schirmer I 试验)、荧光素钠染色、1% 角膜虎红染色;第 28d 处死实验兔,取结膜、角膜、泪腺组织行石蜡切片眼科病理检查,结膜组织行 PAS 染色,其余行 HE 染色观察。(1) Schirmer I 试验:在暗室条件下,用爱尔凯因 0.1mL 滴眼表面麻醉 5min 后,吸干余泪,4min 后置滤纸于下睑中部 1/3 处,5min 后取出滤纸,测量湿长。以湿长>10mm 为基础分泌正常,<10mm 为基础分泌减退。(2) 荧光素染色:荧光素可渗透至细胞间的间隙,染色阳性提示角膜上皮细胞层的完整性破坏,其评分标准为:将角膜分为 4 个象限,染色程度分为 0~3 级,分别记 0~3 分,因此共 0~12 分^[9]。(3) 虎红染色:虎红对失去活力的细胞及沉淀的黏蛋白极易染色,将睑裂区眼表分为鼻侧球结膜、颞侧球结膜及角膜 3 个区,每区按 0~3 分评分,共计 9 分。其中 0 分,无染色;1 分,染色在 10 个点以下;2 分,染色在 10 个点上且 30 个点以下;3 分,染色在 30 个点上或呈片状^[9]。以上的实验动物泪液学检查均由同一人完成,每次检查时间、地点、照明、湿度及温度相同。

统计学分析:采用 SPSS 18.0 软件包对各项指标进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对泪液分泌试验结果行配对 *t* 检验,设定 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泪液分泌试验 泪液分泌试验结果示,除实验前和实验后第 1d,其余各时间点实验眼与对照眼相比,结果均有统计学意义(*P*<0.05,表 1,图 2)。

2.2 荧光素钠染色结果 实验组术后第 5d 角膜开始出现荧光素钠着色,在术后第 5d 着色最重(图 3),之后出现不同程度的好转。术后第 5,7,14,28d 的荧光素钠染色评分的平均值分别为 2.83±2.32,2.33±1.63,0.67±0.82,1.83±1.47。

2.3 虎红染色结果 实验组术后第 1d 角结膜即出现轻度虎红着色,术后第 14d 着色最重(图 4),至 28d 时略有好转。术后第 1,3,5,7,14,28d 虎红染色评分的平均值分别为 1.50±0.84,1.33±0.82,2.67±1.21,3.67±1.21,6.83±2.04,5.33±2.25。

2.4 组织病理学结果

2.4.1 角膜 正常对照组角膜上皮浅层可见 2~3 层扁平



图 1 缝线法睑外翻手术制备蒸发过强型兔干眼模型。

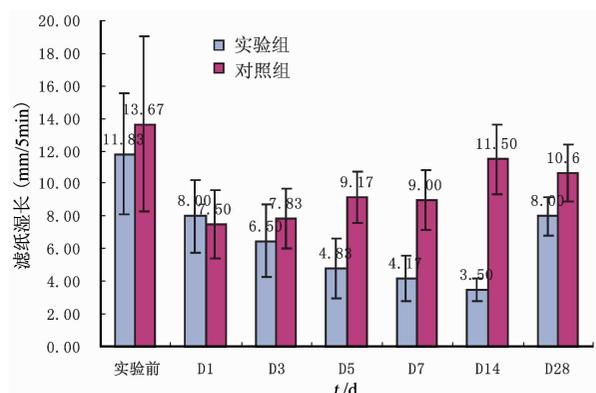


图 2 实验组和对照组泪液分泌试验时的滤纸湿长。

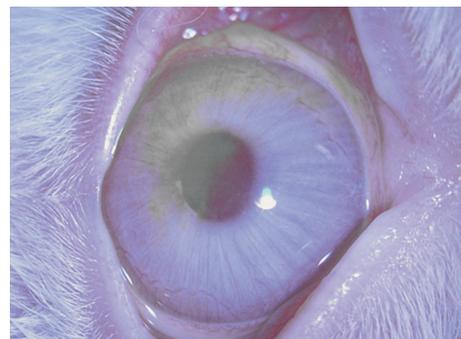


图 3 术后第 5d 荧光素钠染色示角膜上皮大面积着色。

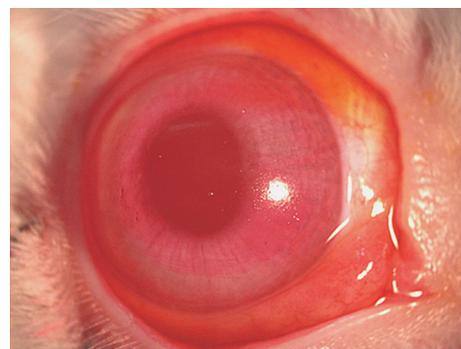


图 4 术后第 14d 虎红染色示角结膜呈片状红染。

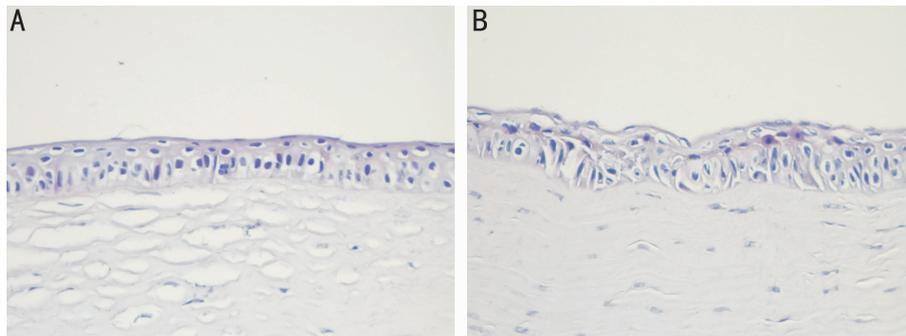


图5 两组实验兔干眼模型中角膜病理学变化(HE×400) A:对照组;B:实验组。

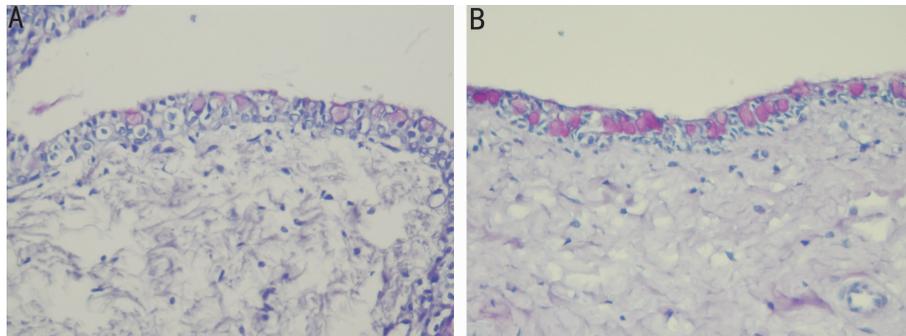


图6 两组实验兔干眼模型中结膜病理学变化(PAS×400) A:对照组;B:实验组。

鳞状上皮细胞,中间为1~2层翼状上皮细胞,基底层为1层立方上皮细胞(图5A)。实验眼均可见角膜上皮层次增加,表层扁平细胞不规则缺失,翼状细胞外露,细胞排列紊乱,胞核小而深染(图5B)。

2.4.2 结膜 正常对照组可见结膜上皮层为排列整齐的柱状上皮,上皮层完整光滑,其间可见富含分泌颗粒的杯状细胞,呈散在性分布(图6A)。实验组可见结膜上皮表面凹凸不平,细胞扁平增大,杯状细胞代偿性增生(图6B)。

2.4.3 泪腺 实验组泪腺上皮细胞为高柱状,核居基底部,腺泡大小均匀,排列紧密,实验眼与对照眼相比光镜下未见明显异常。

3 讨论

目前干眼病的动物模型主要分成3大类:泪液分泌减少型、泪液蒸发过强型以及混合型。针对不同的类型,选做干眼模型的动物主要有小鼠、大鼠、兔、狗及猴子等,诸多模型中,以小鼠模型居多,但由于小鼠眼球小,在研究泪液动力学及干眼体征方面存在一定不足;狗和猴子眼球体积大,适合观察泪液动力学及干眼体征,但其实验成本较高,且狗性格不够温顺,易发生一定危险;兔眼球体积大,性格温顺,可直接观察到荧光素染色、虎红染色、Shirmer试验等各项泪液学指标的变化,是常用的干眼动物模型之一^[10]。

本研究应用“泪液蒸发过强”原理建立干眼模型。睑板腺分泌的脂质是泪膜的最外层——脂质层的主要来源。睑板腺功能障碍可导致泪膜脂质层缺乏,使泪膜的破裂时间明显缩短,泪液的蒸发率明显增加,并引起泪液的渗透压增加,造成眼表损害,导致干眼。Gilbard等^[11]用纤细的电刀插入兔睑板腺开口逐个进行灼烙(每个开口灼烙时间约1s),破坏泪液脂质层的分泌,从而导致泪膜稳定性破坏产生制备泪液蒸发过强型干眼。我们进行52wk的观察,发现此法成功率较高,但因为需要将电刀逐个插入

睑板腺开口,因而操作费时。肖启国等^[12]将此方法进行改进,采用手术将烧灼器直接烧灼睑板腺开口,使操作更简便快速,但由于采用烧灼器直接烧灼睑板腺开口,对睑板的损伤较大,早期(2wk内)局部的炎症反应较重,因而会对眼表上皮产生一定损害,对泪膜的稳定性也有较大影响。上述两种封闭睑板腺开口制作干眼模型的方法虽然具有快速、可靠的优点,但可导致睑板腺功能不可逆损害,与临床上许多睑板腺功能障碍干眼(通常为可逆)存在较大的差别,不适于观察对睑板腺功能有影响的药物的疗效。本实验利用缝线法制作睑外翻兔模型,使睑板腺口暴露于空气中,不与泪膜接触,造成泪膜脂质层缺乏,泪液蒸发过快,形成干眼。实验结果显示,行睑外翻手术后第1d,即出现干眼症状,对泪液分泌试验结果行统计学分析,除实验前和实验后第1d,其余各时间点实验眼与对照眼相比,结果均有统计学意义。除第28d外,实验眼泪液分泌试验结果的均值逐日降低,这可能是由于术后14d后,由于实验兔挠抓等因素影响,有部分睑板腺缝线松脱,这一方面提示在实验建模时要注意扎紧缝线,必要时使用双臂缝线,经常观察实验兔的睑外翻情况,如发现缝线松脱,根据实验需要可及时补充缝线;另一方面也提示此种实验方法在造成干眼方面有一定的可逆性。

综上所述,睑外翻法制备兔干眼模型操作简便、成本低廉、效果较为稳定,是一种值得推广的干眼模型制作方法。

参考文献

- 1 胡道德,顾磊,刘焰,等. 干眼症的研究进展. 眼科新进展 2007;5(27):380-382
- 2 Burgalassi S, Panichi L, Chetoni P, et al. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes. *Ophthalmic Res* 1999;31(3):229-235
- 3 Dursun D, Wang M, Monroy D. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(3):632-638
- 4 Strong B, Farley W, Stern ME. Topical cyclosporine inhibits

conjunctival epithelial apoptosis in experimental murine keratoconjunctivitis sicca. *Cornea* 2005;24(1):80-85

5 Viau S, Pasquis B, Maire MA, *et al.* No consequences of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency on the severity of scopolamine-induced dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(4):547-557

6 Takahashi M, Ishimaru N, Yanagi K, *et al.* High incidence of autoimmune dacryoadenitis in male non-obese diabetic mice depending on sex steroid. *Clin Exp Immunol* 1997;109(3):555-561

7 Chen W, Zhang X, Zhang J. A murine model of dry eye induced by an intelligently controlled environmental system. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(4):1386-1391

8 Gao J, Schwalb TA, Addeo JV, *et al.* The role of apoptosis in the

pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporin a therapy. *Cornea* 1998;17(6):654-663

9 肖启国,刘祖国,张梅,等. 强力霉素滴眼液对兔蒸发过强型干眼疗效的评价. *眼视光学杂志* 2006;8(3):173-176

10 肖启国,刘祖国. 干眼模型的建立方法及评价. *眼科研究* 2004;22(4):438-441

11 Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit. *Ophthalmology* 1989;96(8):1180-1186

12 肖启国,刘祖国,张梅. 烧灼睑板腺开口制作兔干眼模型的评价. *南华大学学报* 2005;33(4):510-513

《国际眼科杂志·IES》简介

《国际眼科杂志》(International Eye Science, IES)是在世界卫生组织(WHO)和世界眼科学会(ICO)的指导和支持下,由中华医学会西安分会主办的国际性中英文混合版眼科专业学术期刊。中国标准连续出版物 ISSN 1672-5123, CN 61-1419/R。本刊于2000年创刊,现为月刊。《国际眼科》杂志社是经国家工商总局审名注册的独立法人机构,胡秀文总编为法人代表。本刊由世界眼科学会(ICO)主席 G. O. H. Naumann/Bruce E. Spivey 教授和世界卫生组织特别顾问 R. Pararajasegaram 教授及国际防盲协会主席 G. N. Rao 教授出任总顾问;中华眼科学会原主任委员张士元教授,亚太眼科学会秘书长/CEO Dennis Lam 教授等出任名誉总编;国家医学教育发展中心主任委员胡秀文教授任社长/总编辑;第四军医大学全军眼科研究所原所长惠延年教授任主编;中华眼科学会前任主任委员黎晓新教授和侯任主任委员王宁利教授及中华眼科学会常委/陕西省眼科学会主任委员王雨生教授等任副主编。

本刊已被荷兰《斯高帕斯(Scopus)》、《医学文摘(EM)》、美国《化学文摘(CA)》、波兰《哥白尼索引(IC)》和国家科技部中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)等国内外权威性检索系统收录,并被评为陕西省优秀科技期刊。它是我国眼科领域唯一的国际性刊物,遵照“让中国眼科走向世界,让世界眼科关注中国”的办刊宗旨,现已率先实现编委会及稿源国际化。英文论著栏目为本刊特色栏目,所刊发的全英文论文和国际论文居国内眼科杂志之首。它已成为我国眼科界对外交流的一个重要窗口,并已成为海内外知名的国际性眼科专业学术期刊。《国际眼科杂志》英文版-《International Journal of Ophthalmology·IJO》已经成为唯一被最权威的国际数据库 SCI Expanded 和 PubMed Central 双重收录的中国眼科学期刊。