

干眼动物模型制备规范(草案)

中华中医药学会 中药实验药理专业委员会

[摘要] 干眼是临床最为常见的一种眼科疾病,其主要表现为眼部干涩、流泪、异物感以及视物模糊、视力疲劳等。目前干眼发病机制尚不明确,现有干眼动物模型主要是病理模型,且以西医指标为主。基于对于眼中西医临床病证特点的分析及其对现有动物模型的大量实验研究,形成了如下干眼动物模型制备规范(草案),为该模型的相关研究提供参考。

[关键词] 干眼; 动物模型; 规范; 草案; 苯扎氯铵; 第三眼睑; 泪膜破裂时间

[中图分类号] R24;R22;TU202;R285;S857.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0006-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20183001

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171229.1111.001.html>

[网络出版时间] 2018-01-03 11:37

Specifications for Preparation of Dry Eye Animal Models (Draft)

Traditional Chinese Medicine Experimental Pharmacology Professional Committee,
China Association of Chinese Medicine

[Abstract] Dry eye is one of the most common ophthalmic diseases in clinic. Its main manifestations are dry eyes, tears, foreign body sensation, blurred vision, asthenopia and so on. At present, the pathogenesis of dry eye is uncertain, the present dry eye animal model is mainly pathological model, and mainly based on western medicine indicators. Based on the analysis of the characteristics of clinical symptoms of Chinese and western medicine in dry eye and the large number of experimental studies on the existing animal models, this article forms the following specifications (draft) for the preparation of dry eye animal models.

[Key words] dry eye; animal models; specification; draft; benzalkonium chloride; nictitating membrane; break up time

1 造模动物

现用于制备干眼模型的动物主要有大鼠、小鼠、家兔等。以大鼠、小鼠最为常用,一般选成年动物,雌雄各半或单一性别。

2 造模方法

2.1 泪液分泌不足+蒸发过度制备小鼠干眼模型

2.1.1 原理 皮下注射东莨菪碱配合干燥环境建立干眼动物模型,东莨菪碱可引起泪液分泌量减少,眼表润滑不足;长期处于干燥环境可刺激眼表感觉神经末梢,引起神经源性炎症加重眼表损害。

2.1.2 方法 C57BL/6小鼠,6~8周龄,给小鼠皮下注射氢溴酸东莨菪碱($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每日3次,每

次间隔4 h以上。将电风扇置于笼盒上方,中速(约 $600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)每日吹12 h,使笼盒内湿度保持在40%以下。连续15~20 d,小鼠干眼模型即可制备成功。该模型持续不少于14 d。

2.2 苯扎氯铵诱导制备大(小)鼠干眼模型

2.2.1 原理 苯扎氯铵是临床滴眼液中常用防腐剂,也是临床上引起干眼的常见因素,防腐剂的毒性作用可引起角膜上皮点状剥脱和泪膜稳定性下降。

2.2.2 方法 BALB/c小鼠,8周龄,给小鼠用0.2%苯扎氯铵溶液滴眼,每天2次,每次 $5\text{ }\mu\text{L}$,间隔10 h以上,连续给药14 d,小鼠干眼模型即可制备成功,该模型持续不少于14 d。SD大鼠,体质量

[收稿日期] 20171020(009)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI53B09);国家中医药管理局中医药标准化专项(2017-149-11);国家自然科学基金项目(81173474)

180~220 g,给大鼠用0.2%苯扎氯铵溶液滴眼,每天2次,每次5 μL ,间隔10 h以上,连续给药14 d,大鼠干眼模型即可制备成功,该模型持续不少于14 d。

2.3 机械阻止瞬目制备大鼠干眼模型

2.3.1 原理 机械阻止瞬目法可导致泪液无法到达眼表面,且泪膜中水分蒸发加快,使泪膜渗透压增加和角膜组织脱水,眼表上皮干燥失活。

2.3.2 方法 Wistar大鼠,180~220 g,给大鼠腹腔注射10%水合氯醛($3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),麻醉后将大鼠固定于固定板上,消毒眼睛周围皮肤,1号黑丝线分别褥式缝合上下眼睑并固定于眶周相应皮肤上,通过机械性阻止大鼠瞬目,持续暴露角膜24 h,大鼠干眼模型即可制备成功。该模型持续不少于14 d。

2.4 第三眼睑切除+板层角膜切开制备家兔干眼模型

2.4.1 原理 在正常生理状况下,眼表和泪腺组织中的神经反射环路完成泪液分泌功能,如果反馈环路中任一环节出现异常,都会导致分泌功能出现障碍。

2.4.2 方法 新西兰家兔,1.5~2.0 kg,给家兔腹腔注射3%戊巴比妥钠($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),麻醉家兔后固定,在显微镜下,将眼球向前推挤,剪开外眦角1 cm,手术剪刀去除全部第三眼睑和部分哈氏腺,使用止血钳托起眼球使眼球脱臼并放置直径8.5 mm的负压环,用角膜板层刀做180 μm 厚度角膜瓣,虹膜恢复器掀开角膜瓣,暴露10 s,手术平衡液清洗,角膜瓣复位,缝合外眦部。手术后给肌内注射青霉素(剂量3万 $\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续3 d,以防感染。3 d后家兔干眼模型即可制备成功。该模型持续不少于

14 d。

3 观测指标

3.1 表观指标 泪液分泌量、眼睛红肿和畏光程度等是干眼动物模型是否成功的重要表观指标。干眼模型制备成功后,可出现泪液分泌量明显减少,眼睛出现一定程度红肿、畏光等现象。表观指标在干眼临床诊断中占有重要地位,也是模型是否成功的直接相关指标,现将权重系数定为0.4。

3.2 病理指标 角膜荧光素染色及炎症指数评分是干眼模型成功与否的重要标志。模型制备成功后,将1%荧光素钠溶液滴在动物结膜囊内1滴,等待1 min,于裂隙灯显微镜的钴蓝光下,可见动物角膜上皮着色点较多;进行泪膜破裂时间(BUT)测定,可见 $\text{BUT}\leq 10\text{ s}$ 。采用苏木精-伊红(HE)染色法,光镜下可见眼角膜上皮细胞层次明显增加,表层细胞显著缺失,有增大的空泡样变性细胞,基底细胞排列紊乱,基质层有少许水肿。动物角膜组织病理指标是判断干眼是否成功的直接证据,属于直接相关指标,现将权重系数定为0.4。

3.3 生化指标 干眼模型会有生化指标的变化,如眼结膜中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)等表达会升高。生化指标在干眼模型的发展、治疗阶段有一定参考价值,然而特异性并不高,属于间接相关指标,现将权重系数定为0.2。

4 备注

该制备规范(草案)记载的动物模型是目前应用多,且与中西医临床病症特点较吻合的模型。手术摘除泪腺法和单纯环境因素诱导等方法所致干眼模型,或因成功率低,或因模型不稳定、持续时间短等因素,未纳入本制备规范(草案)。

干眼动物模型制备规范(草案)起草说明

1 造模动物^[1-3]

现用于制备干眼模型的动物有家兔、小鼠、大鼠等。由于小鼠、大鼠具有廉价、普遍、种纯等优势,最常使用。常见选用的动物为成年,雌雄各半或单一性别。

2 饲养环境^[4-6]

动物饲养环境应符合《实验动物国家标准》《实验动物管理条例》,GB 14925-2010《实验动物环境及设施》《中华人民共和国动物保护法》等要求,应符合相应标准和饲养环境的要求。

3 造模原理及评价依据

干眼病因病机尚不确定,一般认为其发病机制与泪腺功能异常有关,主要有蒸发过强和泪液缺乏2种。

现有干眼动物模型多为病理模型,多采用抑制泪液分泌或者直接破坏泪腺,也有通过外界环境加快泪液蒸发等方法进行造模。现干眼模型主要体现为西医临床指标,中医标准作为参考。西医标准采用的是2013年中华医学会眼科学分会角膜病学组所制定的《干眼临床诊疗专家共识》:①疲劳感、

视力模糊、视力波动等主观症状之一；②有干燥感、异物感、疼痛感等主观症状之一；③ BUT ≤ 10 s；④ Schirmer I 试验（无表面麻醉） ≤ 2 mm \cdot min⁻¹；⑤角结膜荧光素染色阳性。

干眼的中医诊断标准根据国家中医药管理局 2012 年发布的《中医病症诊断疗效标准》中神水将枯症（干眼）的诊断依据^[7]，包括①肺阴不足证的主证为目珠干燥乏泽，干涩、磨痛；次证为口干，鼻燥，大便干。舌红少津，脉细数。②阴虚湿热证的主证为目珠干燥乏泽，干涩、疼痛，畏光，视力模糊；次证为口鼻干燥，关节疼痛，小便黄，大便干。舌质红，苔薄黄，脉数。③气阴两虚证的主证为目珠干燥乏泽，干涩，畏光，眼疲劳、视力模糊；次证为口干，唇燥裂，神疲乏力。舌质红，脉细弱。以上各证型主证必见，具备主证及次证 2 项或者以上，并参照舌脉即可诊断为干眼。

3.1 泪液分泌不足 + 蒸发过度制备小鼠干眼模型^[2,8] 东莨菪碱属于 M 胆碱受体阻滞药，能选择性阻断节后胆碱能神经所支配的效应器细胞膜上的 M 胆碱受体，产生抗 M 样作用，泪腺上面分布有 M3 受体，因此可以抑制小鼠泪液分泌。在低湿度、高气流的空气中，实验动物会出现神经源性炎症，眼表上皮病变以及凋亡标志物的高表达。符合临床西医诊断标准③④⑤，吻合度 $\geq 60\%$ 。注意保持恒定的环境湿度、温度和气体流量。

3.2 苯扎氯铵诱导制备大（小）鼠干眼模型^[9-11] 苯扎氯铵是滴眼液中最常用的防腐剂，其可破坏泪膜，损伤角膜、结膜上皮和细胞间连接蛋白，损伤杯状细胞分泌功能，诱发眼表炎症，使泪膜稳定性下降等，出现干眼症状。符合临床西医诊断标准③④⑤，吻合度 $\geq 60\%$ 。注意实验动物左右 2 只眼睛都应滴注等量的苯扎氯铵。

3.3 机械阻止瞬目制备大鼠干眼模型^[12-13] 固定实验动物眼睑，控制瞬目次数的方法，加快泪液蒸发，使眼部长期间干涩，泪液中黏蛋白缺乏，眼表组织继而干燥失活，角膜上皮细胞坏死缺损，由此引起角膜上皮屏障功能的损害而出现干眼的表现。符合临床西医诊断标准③④⑤，吻合度 $\geq 60\%$ 。注意实验动物一般不选用家兔，因其有第三眼睑的存在，会使模型成功率下降。

3.4 第三眼睑切除 + 板层角膜切开制备家兔干眼模型^[14-15] 损伤上皮下的角膜感觉神经，可使角膜-泪液反射弧的阈值提高；摘除哈氏腺，并消除第三眼睑对眼表的保护作用，可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。符合临床西医诊断标准③④⑤，吻合度 $\geq 60\%$ 。注意事项为手术造模、泪液学检查应由同一个人完成，以减少误差。

4 观测指标

4.1 表观指标——Ⅱ类直接相关指标 表观指标应为干眼模型的直接相关指标，已经成为干眼病的临床诊断重要判定依据，其临床诊断依据为表观的变化。干眼模型建立后泪液分泌量（Schirmer I 试验，无表面麻醉） ≤ 2 mm \cdot min⁻¹，会出现眼睛红肿、畏光等现象。从各个表观指标所具有的特点出发，对其进行半定量积分，将会对模型的判断上享有较大优势。现将表观指标的权重系数定为 0.4。干眼动物模型主要表观指标的分类见表 1。

表 1 干眼动物模型表观指标的分级

Table 1 Classification of apparent indicators of dry eye animal models

分级	泪液分泌量/mm \cdot min ⁻¹	红肿程度	畏光程度
1	>3	无	无
2	2~3	轻度	轻度
3	1~2	中度	中度
4	<1	重度	重度

4.2 病理学指标——Ⅱ类直接相关指标 眼部组织病理改变是判定模型成功与否的直接证据。病理学观察可以更加准确地说明干眼的具体情况，模型制备成功后，进行 BUT 测定，可见 BUT ≤ 10 s；进行角膜上皮荧光素钠染色及评分，可见有较多着色点，甚至成斑状；采用 HE 染色法，通过光学显微镜观察动物眼角膜的显微结构，可以较直观地了解眼角膜的结构形态改变，模型复制成功后，光镜下眼角膜上皮细胞层次明显增加，表层细胞显著缺失，有增大的空泡样变性细胞，基底细胞排列紊乱，基质层有少许水肿。干眼动物眼角膜病理变化分级参考标准^[15]：“-”表示眼角膜上皮细胞层次清晰可见，基底细胞排列规整有次序；“+”表示眼角膜上皮细胞层次轻微增加，表层细胞形态基本整齐；“++”表示眼角膜上皮细胞层次增加，表层细胞少量缺失，基底细胞排列不紧密；“+++”表示眼角膜上皮细胞层次明显增加，表层细胞显著缺失，增大的空泡样变性细胞，基底细胞排列紊乱。病理指标可直接反映干眼的局部病变特点，是直接相关指标，现将病理学的权重系数定为 0.4。

4.3 生化指标——Ⅲ类间接相关指标 有学者认为炎症是干眼发病的一个重要因素。在干眼发病过

程中 TNF- α 和 IL-1 β 是普遍存在且十分重要的炎症因子。干眼动物模型的结膜上皮组织中均可以检测到 TNF- α 和 IL-1 β , 二者在干眼疾病的发生和发展中占有较高的地位, 且随着干眼的严重程度增加, 其表达水平随之上升。生化指标是干眼动物模型的指标之一, 由于其特征性并不强, 是间接相关指标, 现将生化指标的权重系数定为 0.2。

4.4 指标分类^[16-17] 整体定为 1 来计算干眼动物模型各类指标的积分, 属于一类里面的指标, 如表观指标由畏光、红肿、泪液分泌量 3 项指标构成, 规定这 3 项指标的贡献度一样来进行计算, 即进行计算时每个小指标的权重都是 1/3, 同时这个指标的最高分按 1/3 计算。如其他类指标中有特殊的小指标, 可先依据该类指标具有的特点进行分类, 再确定其所含小指标的权重系数, 最后对同一类指标中的每个小指标进行积分。

每一类指标计算出的积分与对应的权重系数相乘, 最后相加, 计算出的总数即为该干眼动物模型的总积分。通过以上规则计算, 结果泪液分泌不足 + 蒸发过度制备小鼠干眼模型的总积分约 0.87, 苯扎氯铵诱导制备大(小)鼠干眼模型的总积分约 0.87, 机械阻止瞬目制备大鼠干眼模型的总积分约 0.87, 第三眼睑切除 + 板层角膜切开制备家兔干眼模型的总积分约 0.73。因干眼动物模型的成功率较高, 为使每次制备的模型偏差较小, 建议总积分可以有 20% 的波动, 并以此来作为模型成功与否的标准。按照上述方法得到的总积分 > 0.58 时, 即可认为该模型制备成功。本规范(草案)制定的分类方式和积分计算方法仅供研究者参考, 研究人员可在制备不同模型时, 另行对需要的指标进行权重设定和偏差调整。

4.5 说明 本规范(草案)制定的权重系数仅是为了体现该类指标在干眼模型判定时的重要程度, 具有一定的调整空间。研究者可根据实际情况适当进行调整。因在不同的干眼模型中采用的标准不一致, 上述指标的定制仅作为参考使用, 研究者应结合各指标对模型的贡献度大小来进行分类, 并尽量把单纯的定性描述转为量化或半量化的指标。总之, 本规范(草案)及其起草说明仅供参考, 研究者要根据具体干眼实验研究的特点, 对其进行增加、减少或者另行设定。

[起草人] 苗明三, 彭孟凡, 白明, 刘保松

[参考文献]

[1] 刘莉, 何慧琴. 干眼动物模型制作的研究进展[J]. 长

春中医药大学报, 2012, 28(5): 922-924.

- [2] 张晓燕, 陈铁舟, 林安娟, 等. 干眼小鼠模型的建立及眼表病理生理学改变[J]. 同济大学学报: 医学版, 2010, 31(4): 24-29.
- [3] 苗明三, 朱飞鹏. 常用医药研究动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 13-14.
- [4] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物环境及设施: GB 14925-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 1-24.
- [5] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 白癩风动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 1-5.
- [6] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 湿疹动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 6-10.
- [7] 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 干眼临床诊疗专家共识(2013年)[J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(1): 73-75.
- [8] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 烧(烫)伤动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 11-16.
- [9] 张慧芹, 李颖, 许永根. 实验性干眼大鼠的角结膜上皮组织学改变[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 45-50.
- [10] 蔡伟浩, 彭玲, 陆晓和, 等. omega-3 治疗大鼠干眼的实验研究[J]. 眼科新进展, 2016, 36(9): 801-805.
- [11] 冯刚, 李世玮, 李晖. 依那西普滴眼液用于小鼠干眼的效果及其机制[J]. 山东医药, 2016, 56(24): 37-39.
- [12] 杨雯, 田琪, 马贤德, 等. 中西医结合疗法对暴露性干眼症大鼠的干预研究[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(3): 126-129.
- [13] 翟丽丽, 刘华. 海藻糖对鼠蒸发过强型干眼模型结膜杯状细胞的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(12): 2123-2126.
- [14] 施炜, 李桥, 王育良, 等. 反射缺乏型干眼动物模型的研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2009, 27(4): 296-299.
- [15] 秦爽, 周文君, 李华, 等. p38/MAPK 信号通路在高渗透压破坏角膜上皮屏障功能中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(23): 2282-2288.
- [16] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 乳腺增生动物模型制备规范(草案)[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(24): 17-22.
- [17] 马瑞娟, 苗明三. 一种中药药效的多指标评价新方法——综合权重法[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(5): 569-572.

[责任编辑 刘德文]