

# 肉毒杆菌 B 诱导大鼠干眼模型中泪腺炎症因子表达研究

赵 帅<sup>1</sup>, 康前雁<sup>1</sup>, 高 伟<sup>2</sup>

基金项目: 西安市科技计划项目 [No. SF1022(1)]; 2010 陕西省自然科学基础研究计划项目 (No. 2010JM4011)

作者单位:<sup>1</sup>(710061) 中国陕西省西安市, 西安交通大学医学院第一附属医院眼科;<sup>2</sup>(710002) 中国陕西省西安市眼科医院 陕西省眼科研究所

作者简介: 赵帅, 男, 在读硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 眼科临床。

通讯作者: 康前雁, 女, 主任医师, 教授, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 青光眼、眼底病. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-05-17 修回日期: 2013-07-19

## Study on the expression of inflammatory factors in the botulium toxin B-induced rats dry eye model

Shuai Zhao<sup>1</sup>, Qian-Yan Kang<sup>1</sup>, Wei Gao<sup>2</sup>

**Foundation items:** Science and Technology Plan Project of Xi'an [No. SF1022(1)]; Natural Science Foundation Research Project of Shaanxi Province, 2010. (No. 2010JM4011)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China;

<sup>2</sup>Xi'an Eye Hospital; Eye Research Institute of Shaanxi Province, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Qian-Yan Kang. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. kangqy@mail.xjtu.edu.cn

Received: 2013-05-17 Accepted: 2013-07-19

## Abstract

• **AIM:** To explore the changes of macrophage migration inhibitory factor (MIF), interleukin 1 (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in the botulium toxin B-induced murine dry eye model.

• **METHODS:** The rats were randomly divided into two groups, 20 mice received injection of botulium toxin B (0.1mL), and 10 mice were injected physiological saline (0.1mL). Schirmer I test, corneal fluorescein staining and the levels of MIF, IL-6, TNF- $\alpha$  were performed before and 3, 7, 28, 42 days after injection. The levels of MIF, IL-6, TNF- $\alpha$  were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

• **RESULTS:** The tear production was significantly decreased at 4 points and the corneal fluorescein staining increased at 5 points in BTX-B-injected mice compared with control mice. In the BTX-B-injected mice, the level of IL-1 $\beta$  increased significantly at the 3 days and 1, 4, 6 week, and the level of MIF in lacrimal gland increased significantly since the 4<sup>th</sup> week compared with control

mice. The level of TNF- $\alpha$  has no difference between the two groups.

• **CONCLUSION:** Injection botulium toxin B can successfully established the mice model of dry eye. This model has the characteristic changes of the expression of inflammatory factors, which is an ideal animal model for dry eye experiment.

• **KEYWORDS:** dry eye; botulium toxin B; inflammatory

**Citation:** Zhao S, Kang QY, Gao W. Study on the expression of inflammatory factors in the botulium toxin B-induced rats dry eye model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(8):1537-1539

## 摘要

**目的:** 建立肉毒杆菌 B 诱导大鼠炎症干眼模型, 通过观察泪腺炎症因子表达变化为干眼病实验研究提供实验依据。

**方法:** 健康 8 周龄雌性 SD 大鼠, 30 只, 随机分为 2 组, 20 只为实验组, 10 只为对照组。右侧泪腺注射肉毒杆菌 B 0.1mL (20mU), 生理盐水 0.1mL。分别于实验前 1d 及实验后第 3d; 1, 4, 6wk, 观察基础泪液分泌量、角膜荧光染色, 并且酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测泪腺组织中白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) 变化。

**结果:** 术后实验组从第 3d 时出现泪液分泌减少, 4wk 达到高峰, 6wk 后恢复; 角膜荧光染色第 3d 时出现, 持续 6wk; 泪腺组织 IL-1 $\beta$  从第 3d 开始出现增加, 持续 6wk; TNF- $\alpha$  表达水平未增加, MIF 检测从第 4wk 开始表达增加, 持续 6wk。

**结论:** 泪腺注射肉毒杆菌 B 可以成功诱导大鼠炎症干眼模型, 炎症因子的表达变化具有一定的特征性, 为干眼病实验提供较理想的动物模型。

**关键词:** 干眼; 肉毒杆菌 B; 炎症

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.08.06

**引用:** 赵帅, 康前雁, 高伟. 肉毒杆菌 B 诱导大鼠干眼模型中泪腺炎症因子表达研究. *国际眼科杂志* 2013;13(8):1537-1539

## 0 引言

近年来随着生活环境和生活习惯的改变, 干眼病的发病率在逐渐增加, 统计学显示全球成年人的发病率已经高达 13% ~ 20%, 其已经成为最常见的眼表疾病<sup>[1]</sup>。引起干眼症的病因很多, 其发病机制十分复杂。近年来, 对于干眼病的研究也逐渐增多, 动物模型的建立为干眼病的研究起到重要的基础作用, 其中炎症模型的建立更为重要。我们利用肉毒杆菌 B 诱导大鼠建立干眼炎症模型, 通过观察泪腺组织白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏

表1 两组泪液分泌试验结果 ( $\bar{x}\pm s, \text{mm}^3/\text{5min}$ )

时间	实验组	对照组	P
造模前1d	3.02±0.12	3.01±0.25	0.852
造模第3d	1.86±0.72	3.04±0.72	0.028
造模第1wk	2.03±0.86	3.01±0.42	0.035
造模第4wk	1.04±0.46	3.00±0.21	0.017
造模第6wk	2.94±0.64	3.01±0.54	0.284

表2 两组角膜荧光染色得分结果 ( $\bar{x}\pm s, \text{分}$ )

时间	实验组	对照组	P
造模前1d	0.02±0.12	0.11±0.33	0.754
造模第3d	1.32±0.72	0.04±0.42	0.092
造模第1wk	2.03±0.86	0.01±0.95	0.031
造模第4wk	3.54±0.46	0.05±0.56	0.012
造模第6wk	2.94±0.64	0.03±0.12	0.034

表3 两组动物泪腺组织 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  及 MIF 检测结果比较 ( $\bar{x}\pm s, \text{ng/L}$ )

因子	造模前1d		造模第3d		造模第1wk		造模第4wk		造模第6wk	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
IL-1 $\beta$	6.24±2.78	6.78±6.21	5.97±5.14 <sup>a</sup>	8.44±6.77	6.20±0.58 <sup>a</sup>	9.04±4.42	6.39±1.25 <sup>a</sup>	9.54±5.12	6.39±5.12 <sup>a</sup>	9.21±4.12
TNF- $\alpha$	12.54±3.21	11.54±4.11	13.21±4.10	12.58±1.27	11.36±4.25	12.01±2.36	12.74±1.25	12.84±6.12	12.48±4.21	12.58±6.14
MIF	6.28±2.14	6.02±4.12	7.01±3.14	6.87±2.54	6.74±5.01	7.00±0.84	6.74±1.05 <sup>a</sup>	9.65±4.54	6.78±1.87 <sup>a</sup>	9.14±4.20

注:<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组。

死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)的变化,旨在模仿一种更接近人类的慢性假性免疫干眼大鼠模型。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康8周龄雌性SD大鼠,30只,体质量200~250g,随机分为2组,20只为实验组,10只为对照组。注射用肉毒杆菌B:美国ELan公司;泪液检测滤纸条:天津晶明新技术发展有限公司;抗大鼠TNF- $\alpha$ 单克隆抗体:中杉金桥生物技术有限公司;羊抗大鼠IL-6单克隆抗体:美国PeproTech公司;IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 和MIF试剂盒:北京科美东亚生物技术有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 随机取20只大鼠腹腔注射10%水合氯醛(4mL/kg),待动物麻醉后在手术显微镜下暴露泪腺,将大鼠的右侧泪腺注射肉毒杆菌B(BTX-B)0.1mL(20mU),10只作为对照组同样方法注射生理盐水0.1mL。室内常温无菌饲养。

1.2.2 检查项目 分别于实验前1d及实验后第3d;1,4,6wk,将大鼠基础麻醉后检测泪液的分泌,将泪液检测滤纸条置于下穹隆处结膜中,5min后测量变色长度。使用1%荧光素钠溶液染色,1min后观察角膜荧光染色并在照相裂隙显微镜下拍照。采用Park计分方法:0分:无着色点;1分:点状着色 $\leq 1/8$ 象限;2分:点状着色 $\leq 1/4$ 象限;3分:点状着色 $\leq 1/2$ 象限;4分:点状着色 $\geq 1/2$ 象限。

## 1.2.3 ELISA法检测泪腺组织 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 和 MIF 表达

采用ELISA方法分别于实验前1d及实验后第3d;1,4,6wk取泪腺组织检测IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 和MIF。试剂盒来源于北京科美东亚生物技术有限公司,操作严格按照试剂盒说明书进行,各项质量指标及质控参数均在允许范围内。

统计学分析:采用SPSS 16.0系统进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各组间采用独立样本t检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学差异。

## 2 结果

2.1 泪液分泌试验 术后从第3d时出现泪液分泌减少,实验组为1.86 $\pm$ 0.72mm<sup>3</sup>/5min,对照组3.04 $\pm$ 0.72mm<sup>3</sup>/5min,差异有统计学差异( $P<0.05$ ),在第4wk泪液分泌减少达到最高峰1.32 $\pm$ 0.25mm<sup>3</sup>/5min,第6wk泪液分泌恢复,与对照组无统计学差异( $P>0.05$ ,表1)。

2.2 荧光素钠染色结果 实验组术后第3d角膜开始出现荧光素钠着色,在术后第4wk着色最重,之后出现不同程度的好转,但在第6wk仍存在荧光素钠着色,与对照组有统计学差异( $P<0.05$ ,表2)。

2.3 两组动物泪腺组织 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  及 MIF 检测结果比较 术后第3d开始实验组IL-1 $\beta$ 表达是持续增高的, TNF- $\alpha$ 表达与对照组没有统计学差异, MIF从第4wk后表达增加,与对照组有统计学差异( $P<0.05$ ),并持续到第6wk。

## 3 讨论

眼表(角膜、结膜、副泪腺和睑板腺)、主泪腺和它们之间的神经连接由于其密切的解剖和功能联系构成一个整体功能单位,共同发挥对泪液分泌和泪膜形成的调控作用,维护眼表健康,任一环节的损害均可导致泪膜完整性和功能的破坏,从而出现干眼症不适症状<sup>[2]</sup>。而主泪腺在这个功能单位中发挥着主导作用。泪腺的神经支配非常丰富,有来自于面神经的副交感神经和来自颈上神经节的细小交感神经纤维共同支配维持泪液的基础分泌。当泪腺发生炎症或者病变时会导致严重的干眼病出现,致盲率较高。

尽管干眼症的病因多种多样,一旦进入进展阶段,炎症就成为干眼症发病机制中最关键的因素,大量淋巴细胞在泪腺和眼表组织的浸润以及炎症因子的释放导致了免疫相关性炎症,炎症因子的释放会损害正常泪液分泌的神经传导,影响泪液分泌的质和量,形成恶性循环<sup>[3]</sup>。在干眼疾病中,炎症会影响到这个功能单位每一个组织,从而得到一个观点:免疫反应是这个功能单位的一部分。因此,目前对于严重干眼的研究已经集中到炎症与干眼的关系,所以建立一个更接近人类的一种慢性假性免疫干眼动物模型就较为重要。

目前报道的干眼模型有很多种,而针对泪液分泌障碍和免疫性干眼动物模型主要有转基因动物模型和基因敲除动物模型以及诱导性动物模型。Zhu等<sup>[4]</sup>通过实验建立了一种动物炎症模型,他们将兔子一侧泪腺摘除,通过对上皮细胞的培养增殖获得自体外周淋巴细胞注射到对侧泪腺制造干燥综合征兔眼模型。组织病理图片显示与干燥综合征患者相似,可以看到泪腺组织主要为CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞浸润,同时泪液产生的减少和角膜荧光染色均与

干燥综合征患者相同,从而证实 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞浸润泪腺组织的作用。Lin 等<sup>[5]</sup>将 Lewis 鼠的一侧泪腺摘出匀浆,对匀浆的泪腺组织加入灭活的百日咳杆菌,进行进一步处理,然后回注入对侧泪腺,可增强其抗原性,诱导更严重的泪腺和唾液腺自身免疫反应,制成干眼症炎症模型。Toshida 等<sup>[6]</sup>从兔内耳通路切除 5mm 长岩大浅神经,术后 7d 发现结膜出现严重的刚果红染色,角膜荧光素染色阳性,泪液分泌下降约 26%,但持续时间只有 1wk,这种诱导方法持续时间很短,不能很好地建立模型。而前几种存在技术复杂和实验成本较高的缺点,我们通过对大鼠泪腺中注射肉毒杆菌 B,在神经肌肉接头处抑制乙酰胆碱的释放而阻断胆碱能神经活动传递,达到减少泪液分泌的作用。结果显示:泪液分泌在注射后第 3d 开始出现减少,第 4wk 达到高峰,角膜上皮缺损持续出现 6wk,未出现其他眼部和全身的副作用。表明其方法可以模仿更接近人类的一种慢性假性免疫干眼大鼠模型。6wk 后肉毒杆菌 B 的作用逐渐消退,因为泪腺的结构组织没有破坏,泪腺功能逐渐恢复,而 6wk 后角膜上皮损伤依然存在,间接说明角膜上皮的修复和稳定需要一个多因素的环境,眼表微环境的正常以及炎症因子的减退是一个较长的恢复过程。

临床上干眼严重的患者均合并眼表的炎症,尽管炎症做为首发机制还没有被证实。首先会引起炎症产生的原因可能为刺激,如外界干燥的环境和泪液的变化,刺激可以引起促炎症细胞因子的表达(如细胞因子,趋化因子,黏附因子)。有证据间接证明,眼表的变化与炎症的第一步直接相关,例如,增加的细胞炎症因子(如 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1)在 Sjogren's 综合征的患者中结膜表面被发现,同时伴随泪液中 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 的浓度增加。上皮细胞的增殖、角化,新生血管的发生均是与这些炎症因子的增加有关<sup>[7,8]</sup>。关于干眼疾病的免疫发病机制还有很多,在一些中、重型干眼病患者均看到这种炎症变化,因此早期的免疫改变和确切的机制对于干眼的研究和治疗是非常关键的。

我们的动物实验发现,在注射肉毒杆菌 B 后第 3d 开始泪腺组织中的 IL-1 $\beta$  表达是持续增高的,与眼表的损害相对应。这说明注射肉毒杆菌 B 后泪腺组织出现炎症因子的增加和激活,同时也间接说明泪腺产生的炎症因子会随着泪液分泌到眼表组织。我们通过病理切片还发现泪腺组织结构仍然保持良好和未发现 T 细胞浸润,意味着各种炎症细胞因子是直接分泌到眼泪而不是弥漫到泪腺基质,与 Fang 等<sup>[9]</sup>结果一致。

尽管已有的实验发现,在中、重度干眼患者中眼表和泪液中 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达是增高的<sup>[10,11]</sup>,但是我们的实验发现,在泪腺组织中 TNF- $\alpha$  的表达未出现增高,这种泪腺和眼表组织炎症因子的表达差异可能与注射肉毒杆菌 B 后大鼠泪腺分泌泪液水分较少,致使泪液呈高渗状态,激活了 MAPK 信号转导通路而造成眼表组织的二次炎症反应, TNF- $\alpha$  的表达继发性增高有关<sup>[4]</sup>。

MIF 参与了免疫相关的作用,与多种炎症性疾病相关,体内及体外实验证明 MIF 在机体内多种炎症疾病的发病中起到了重要调节作用,有望成为重要的作为生物标志物和治疗靶标<sup>[12]</sup>。现今认为, MIF 是集细胞因子、神经内分泌激素和酶特性于一身的多效能蛋白分子,但是 MIF 在泪腺功能单元的功能仍不清楚。我们的实验发现, MIF 的表达在注射后第 4wk 才出现升高,但随后一直持续,这就为以后研究这个强炎症介质的生物学特性提供了有力的实验基础。

总之,泪腺注射肉毒杆菌 B 可以诱导大鼠建立一种可以模仿更接近人类的慢性假性免疫干眼大鼠模型,以后根据泪腺组织中炎症因子不同的表达变化,可以针对性地研究各自在干眼病发病中的作用,为干眼病的免疫学研究和治疗提供一个基础。

#### 参考文献

- 1 Moss SE, Klein R, Klein BE. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1264-1268
- 2 Management and Therapy of Dry Eye Disease: Report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop(2007). *Ocul Surf* 2007;5(2):163-178
- 3 Brignole F, Pisella PJ, Goldschild M, et al. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1356-1363
- 4 Zhu L, Shen J, Zhang C, et al. Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulinum toxin B induced murine dry eye model. *Mol Vis* 2009;15:250-258
- 5 Lin Z, Liu X, Zhou T, et al. A mouse dry eye model induced topical administration of benzalkonium chloride. *Mol Vis* 2011;17:257-264
- 6 Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, et al. Evaluation of ovel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:468-475
- 7 Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71:89-95
- 8 Sonoda S, Uchino E, Nakao K, et al. Inflammatory cytokine of basal and reflex tears analysed by multicytokine assay. *Br J Ophthalmol* 2006;90:120-122
- 9 Fang Y, Choi D, Searles RP, et al. A time course microarray study of gene expression in the mouse lacrimal gland after acute corneal trauma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:461-469
- 10 Nguyen DH, Toshida H, Schurr J, et al. Microarray analysis of the rat lacrimal gland following the loss of parasympathetic control of secretion. *Physiol Genomics* 2004;18:108-118
- 11 Trousdale MD, Zhu Z, Stevenson D, et al. Expression of TNF inhibitor gene in the lacrimal gland promotes recovery of tear production and tear stability and reduced immunopathology in rabbits with induced autoimmune dacryoadenitis. *J Autoimmune Dis* 2005;2:6
- 12 Lekhanont K, Park CY, Smith JA, et al. Effects of topical anti-inflammatory agents in a botulinum toxin B-induced mouse model of kerato conjunctivitis sicca. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007;23:27-34