

# BTX-B 诱导大鼠干眼模型的建立及评价标准

朱海峰,郝兆芹,程 钰,高 伟

基金项目:陕西省科学技术厅资助项目(No. S2010JC376);西安市科技计划资助项目[No. SF1022(1)]

作者单位:(710002)中国陕西省西安市第一医院眼科 陕西省眼科研究所

作者简介:朱海峰,学士,副主任医师,研究方向:角膜、眼表疾病。

通讯作者:高伟,硕士,主任医师,研究方向:角膜疾病、白内障。  
gaoweiz@163.com

收稿日期:2015-05-27 修回日期:2015-08-17

## Evaluation criterions and establishment of dry eye model of rats induced by BTX-B

Hai-Feng Zhu, Zhao-Qin Hao, Yu Cheng, Wei Gao

**Foundation item:** Funding Project of Shaanxi Science and Technology Department (No. S2010JC376); Funding Project of Xi'an Science and Technology Plan[No. SF1022(1)]

Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Shaanxi Ophthalmology Institute, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Wei Gao. Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Shaanxi Ophthalmology Institute, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. gaoweiz@163.com

Received:2015-05-27 Accepted:2015-08-17

## Abstract

• **AIM:** To establish dry eye model of rats induced by botulinum toxin B (BTX-B) and provide the basis for the pathogenesis and experimental treatment of dry eye caused by inflammation.

• **METHODS:** Thirty-six healthy female SD rats were selected and divided into four groups randomly, and the experimental group included three groups, which were individually injected 0.1mL 1.25, 5, and 10mU BTX-B solution on the right lacrimal gland; the control group was injected 0.1mL normal saline on the right lacrimal gland, then received Schirmer I test (S I t) and examination of corneal fluorescein (FL) staining respectively at the 3, 7, 14 and 28d. The other 32 rats were selected and divided into two groups randomly, the rats in the experimental group were injected 0.1mL 1.25mU BTX-B solution on the right lacrimal gland and then five rats were randomly chosen to be removed lacrimal gland tissue respectively at the 3, 7, 14, 21, 42d. The Lacritin protein was detected in the qualitative and quantitative way by immunofluorescence and Western-blot, and the histopathological test was received by routine HE staining.

• **RESULTS:** The three groups in the experimental group during the preparation of the model appeared that tear

secretions decreased and corneal epithelium got damaged at 3d, but there was no significant difference for each other of two changes ( $P>0.05$ ). The change was reached the peak at 7d and improved at 14d. The tear secretions returned to normal level at 28d, but the damage of corneal epithelium was still existed. The expression of Lacritin protein was only observed in acinar cells of both experimental group and control group, and the content of Lacritin protein in the experimental group decreased significantly. The decreasing situation appeared at 3d, reached the peak at 7d, improved at 14d, began to recover at 28d, and returned to the normal level at 42d.

• **CONCLUSION:** Dry eye model of SD rats can be successfully established by lacrimal gland injection of 1.25mU BTX-B solution, with symptoms of dry eyes such as tear secretions reducing and corneal epithelial injury, which can provide experimental basis and foundation for the research on the pathogenesis and experimental treatment of dry eye. Lacritin protein only expresses in acinar cells of lacrimal gland, and the content of Lacritin protein has a synchronous change with tear secretions and degree of dry eye, which provides a new basis for perfecting the standards on evaluating the degree of dry eye.

• **KEYWORDS:** dry eye; inflammation; Lacritin protein; animal model

**Citation:** Zhu HF, Hao ZQ, Cheng Y, et al. Evaluation criterions and establishment of dry eye model of rats induced by BTX-B. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2015;15(9):1512-1515

## 摘要

**目的:**建立肉毒杆菌毒素 B (BTX-B) 诱导的大鼠干眼模型,为研究炎症参与的干眼症的发病机制和实验性治疗提供依据。

**方法:**健康雌性 SD 大鼠 36 只随机分为 4 组,实验组为三组,分别给予右侧泪腺注射 0.1mL 1.25、5、10mU 的 BTX-B 溶液,对照组右侧泪腺注射 0.1mL 生理盐水,分别在第 3、7、14、28d 行泪液实验 I (S I t)、角膜荧光素染色 (FL) 检查。另选取 32 只大鼠,随机分为两组,实验组大鼠右侧泪腺注射 0.1mL 1.25mU 的 BTX-B 溶液,分别于第 3、7、14、21、42d 时选取 5 只实验大鼠摘除泪腺组织,采用免疫荧光法和 Western-blot 法对 Lacritin 蛋白进行定性和定量检测,组织病理学检测采用常规 HE 染色。

**结果:**模型制备中三个实验组均在第 3d 开始出现泪液分泌减少和角膜上皮损害,但两两之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),7d 时达到高峰,14d 时好转,28d 时泪液分泌恢复正常,但角膜上皮仍见损伤。实验组和对照组大鼠泪腺组织中均仅见腺泡细胞表达 Lacritin 蛋白,实验组大鼠

Lacritin 蛋白含量明显下降,自第 3d 开始出现,7d 时达到高峰,14d 时好转,28d 时开始恢复,42d 时达到正常。

**结论:**泪腺注射 1.25mU 的 BTX-B 溶液可成功建立 SD 大鼠干眼模型,可见泪液分泌减少、角膜上皮损伤等干眼体征,可为干眼的发病机制和实验性治疗研究提供实验依据和基础;Lacritin 蛋白仅在泪腺腺泡细胞中表达,其含量与泪液分泌量和干眼程度呈同步变化,可为干眼程度评价标准的完善提供新的依据。

**关键词:**干眼;炎症;Lacritin 蛋白;动物模型

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.05

**引用:**朱海峰,郝兆芹,程钰,等. BTX-B 诱导大鼠干眼模型的建立及评价标准. 国际眼科杂志 2015;15(9):1512-1515

## 0 引言

干眼是眼科最常见的眼表疾病之一,是由于泪液的量或质或流体动力学异常引起的泪膜不稳定和(或)眼表损害,从而导致眼不适症状和视功能障碍的一类疾病。随着现代生活的发展、各种视频仪器的广泛应用、角膜接触镜的佩戴、环境的改变等诸多因素的影响,其发病率逐年升高,给越来越多的人们带来了痛苦,同时也引起了更多的眼科学者关注。为了进一步规范我国干眼临床工作,提高干眼诊治水平,中华医学会已制定了《2013 干眼临床诊疗专家共识》,对我国干眼临床诊疗进行了规范,但因干眼确切的发病机制并未完全明确,临床上很难制定有针对性的个体化治疗方案,治疗效果不佳。目前的研究显示其发病可能与炎症、性激素改变及神经功能障碍有关。为探讨炎症引起的干眼的发病机制并寻找更好的治疗方法,我们进行了如下研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康雌性 SD 大鼠 68 只,8 周龄,无眼疾,体质量 200~250g(西安交通大学医学院动物中心)。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(中国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),兔抗鼠 Lacritin 蛋白,羊抗兔 IgG(美国 Santa Cruz 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 大鼠干眼动物模型的制作及干眼检测** 选取 36 只健康 SD 大鼠,随机分为 4 组,三组为实验组,每组 10 只,分别给予右侧泪腺注射 0.1mL 1.25、5、10mU 的肉毒杆菌毒素 B(botulinum toxin B, BTX-B) 溶液;第 4 组为对照组,6 只大鼠,均给予右侧泪腺注射 0.1mL 生理盐水。四组大鼠分别于第 3、7、14、28d 行泪液实验 I (Schirmertest I, S I t)、角膜荧光素染色(fluorescent, FL)检查,以观察泪液分泌、角膜上皮损伤情况。两组动物均由同一人检查,每次检查时间、地点、照明亮度、湿度及温度相同。泪液试验方法:麻醉安静状态下,放入试纸条,5min 后检测试纸泪液长度。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。

**1.2.2 标本取材及处理** 另选取 32 只大鼠,随机分为两组,实验组 25 只,对照组 7 只,实验组大鼠右侧泪腺注射

0.1mL 1.25mU 的 BTX-B 溶液,分别于第 3、7、14、28、42d 时随机选取 5 只实验大鼠空气栓塞法处死后摘取泪腺组织,采用免疫荧光法和 Western-blot 法对 Lacritin 蛋白进行定性和定量检测,组织病理学检测采用常规 HE 染色。

**1.2.3 免疫荧光染色法检测大鼠泪腺中 Lacritin 蛋白的表达** 摘取泪腺组织后立即取其放入 4% 聚甲醛液中固定 24h,常规石蜡包埋切片。免疫荧光染色采用常规方法,逐步滴加一抗兔抗大鼠 Lacritin,工作浓度为 1:50,4 $^{\circ}$ C 过夜。二抗为 FITC 标记的羊抗兔 IgG,工作浓度为 1:200,室温避光孵育 2h,封片前加入细胞核染料 DAPI。图像采集时,抽取各组组织切片,在显微镜下选取目标区域,保持光源亮度不变,在组织切片的空白处进行白平衡操作,记录照片的分辨率、放大倍数和标尺大小。荧光染色切片在 BX51 荧光显微镜(Olympus)下采集,在无组织部位进行黑平衡操作,对目标部位进行照像,切片选项原则同上。

**1.2.4 Western-blot 法检测大鼠泪腺中 Lacritin 蛋白的表达** 大鼠麻醉后,在冰上快速切取泪腺组织,加入适量裂解液(100 $\mu$ L 裂解液可裂解 5mg 组织),用眼科剪刀将组织剪碎,然后用组织机械粉碎仪将组织研碎,再用超声破碎仪使组织充分粉碎(72kJ,20% 振幅,超声 5s,间歇 25s,共 5min,冰浴中进行)。然后 4 $^{\circ}$ C,12 000g 离心 10min,将上清转移至另一个预冷的 Eppendorf 管中-80 $^{\circ}$ C 保存。提取的组织匀浆上清用 Bradford 法进行蛋白定量;取 15 $\mu$ g 样品,加入等体积的 2 $\times$ 上样缓冲液混匀,在 100 $^{\circ}$ C 沸水中煮 2min,用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,分离的蛋白用半干电转移法转移到 PVDF 膜,室温下用封闭液作用 1h 后加入用封闭液稀释的一抗(兔抗大鼠,1:2 000),4 $^{\circ}$ C 过夜;洗液洗涤 3 $\times$ 10min;辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔 IgG,1:2000 稀释),孵育 2h;洗液洗涤 3 $\times$ 10min;用增强型化学发光显色系统显示蛋白条带,感光在胶片上。实验重复 3 次,以  $\beta$ -actin 作内参照,用英国 SYNGENE 公司的 GeneTools 软件对采集的 Western-blot 结果进行条带的变化趋势分析。

统计学分析:用统计学软件 SPSS 16.0 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 SNK-q 检验,角膜荧光染色得分通过 Friedman M 检验分析,以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 泪液分泌实验结果** S I t 显示三个实验组中大鼠在第 3、7、14d 泪液分泌量与对照组比较均有统计学差异( $P < 0.05$ ),泪液分泌量均在第 3d 时开始减少,7d 时达到高峰,14d 时好转,各实验组组间泪液分泌量无统计学差异( $P > 0.05$ ),第 28d 实验组大鼠泪液分泌恢复正常,实验组与对照组比较没有统计学差异( $P > 0.05$ ,表 1)。

**2.2 荧光素钠染色结果** 各时间点实验组与对照组大鼠角膜荧光染色得分均有统计学差异( $P < 0.05$ ),实验组大鼠第 3d 开始出现角膜上皮点染,逐渐增多,第 7d 时上皮缺损逐渐融合呈片状,之后角膜上皮染色范围未继续扩大且逐渐缩小,14d 时明显好转,但一直到 28d 时仍未恢复(表 2)。对照组角膜光亮,无上皮损伤。同时,三个实验组之间角膜荧光染色得分没有统计学差异( $P > 0.05$ )。

**2.3 四组大鼠泪腺中 Lacritin 蛋白的免疫荧光结果** 在生理盐水注射的对照组,Lacritin 蛋白的表达(绿色荧光,蓝色为细胞核)仅在泪腺腺泡细胞中可见,其他泪腺组织和



表1 不同浓度实验组和对照组大鼠泪液分泌结果

分组	给药前	第3d	第7d	第14d	第28d
对照组	5.01±0.25	5.04±0.72	5.01±0.42	4.78±0.54	5.00±0.21
实验组					
1.25mU	5.02±0.35	2.46±0.28 <sup>a</sup>	1.88±0.27 <sup>a</sup>	2.01±0.78 <sup>a</sup>	4.04±0.46
5mU	5.12±0.43	2.21±0.45 <sup>a</sup>	3.02±0.12 <sup>a</sup>	1.97±0.54 <sup>a</sup>	4.86±0.41
10mU	4.98±0.24	2.35±0.12 <sup>a</sup>	3.02±0.12 <sup>a</sup>	2.14±0.34 <sup>a</sup>	4.12±0.32

注:两两比较采用SNK-q检验,  $F_{\text{分组}}=29.673, P<0.01$ ;  $F_{\text{时间}}=3.088, P=0.013$ ; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组。

表2 不同浓度实验组和对照组大鼠角膜荧光染色得分结果

分组	给药前	第3d	第7d	第14d	第28d
对照组	0.01±0.00	0.04±0.02	0.01±0.01	0.08±0.02	0.05±0.01
实验组					
1.25mU	0.02±0.01	1.32±0.52 <sup>a</sup>	2.03±0.86 <sup>a</sup>	2.51±0.78 <sup>a</sup>	3.54±0.46 <sup>a</sup>
5mU	0.01±0.00	1.02±0.76 <sup>a</sup>	2.02±0.42 <sup>a</sup>	2.48±0.37 <sup>a</sup>	2.95±0.42 <sup>a</sup>
10mU	0.02±0.00	1.12±0.43 <sup>a</sup>	2.02±0.41 <sup>a</sup>	3.01±0.65 <sup>a</sup>	2.45±0.61 <sup>a</sup>

注:采用Friedman M检验,  $\chi^2=16.714, P=0.001$ ,提示治疗前后各个实验组有统计学差异; <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组。

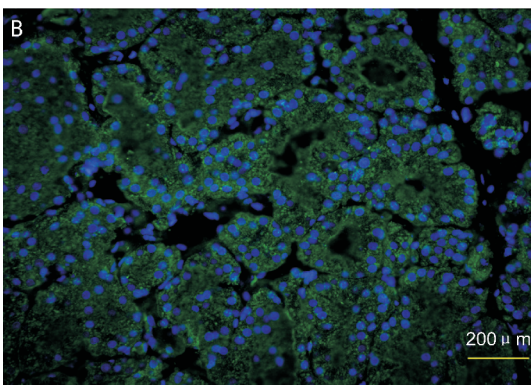
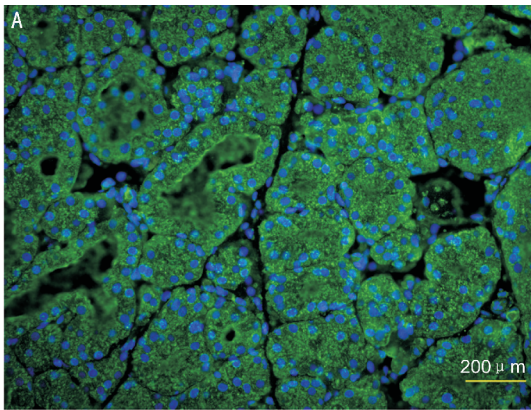


图1 泪腺腺泡细胞浆中Lacritin蛋白表达(绿色荧光) A:对照组; B:BTX-B注射后7d组。

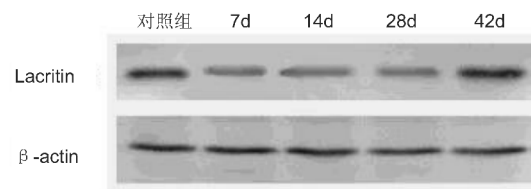


图2 各时间点Lacritin蛋白电泳图。

腺管中未见(图1A)。在BTX-B注射组大鼠的泪腺, Lacritin表达有所减弱,以BTX-B注射后7d组最为显著,仅少部分细胞可见中等程度的绿荧光染色(图1B)。

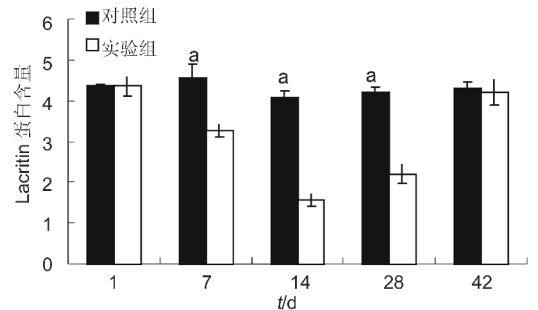


图3 两组大鼠各时间点Lacritin蛋白的Western-blot结果 <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 实验组。

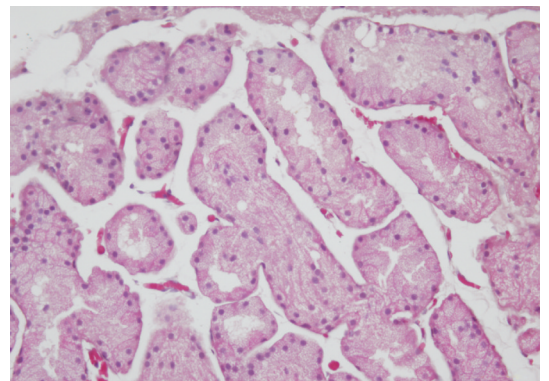


图4 BTX-B注射后14d泪腺组织切片HE染色(×100),未见组织坏死、细胞肿胀、炎症细胞浸润。

2.4 四组大鼠泪腺中Lacritin蛋白的Western-blot结果 在第7、14、28d时实验组与对照组大鼠泪腺Lacritin蛋白含量比较有统计学差异( $P<0.05$ ),实验组Lacritin蛋白表达检测显示在第7d开始减少,14d时含量变化不明显,28d开始恢复,但仍处于低表达,42d时含量与对照组无统计学差异( $P>0.05$ ,图2)。对照组Lacritin蛋白含量未变化(图3)。

2.5 泪腺的病理学改变 为了观察注射BTX-B后泪腺组织各细胞的病理学改变,我们进行了HE组织学染色,各组泪腺的组织切片显示:未见明显的组织坏死,但多数腺泡细胞肿胀,周围有炎性细胞浸润(图4)。

### 3 讨论

干眼是眼科最常见的眼表疾病之一,泪膜、泪腺、角结膜上皮和睑板腺共同构成了泪液功能单位以保护眼表完整和功能正常,神经联系和系统激素控制着体内外各种应答,也是维持眼表稳定的重要因素<sup>[1]</sup>。干眼是多因素疾病,与炎症、泪膜不稳定、泪膜渗透性升高、性激素改变及神经机能障碍等有关,以眼表干涩和刺激为特征,虽然目前其发病机制未完全明了,但研究表明炎症在干眼的发生和发展上起到了重要作用<sup>[2-3]</sup>,其中自身免疫反应是炎症反应的关键因素。

肉毒杆菌毒素可以通过抑制突触前膜与神经递质囊泡的融合,阻断汗腺和泪腺的神经肌肉和胆碱能神经连接,从而抑制泪液和汗液分泌。实验表明,与人类不同,大鼠中 BTX-A 与 BTX-B 的作用差异不大<sup>[4]</sup>,且 BTX-B 作用组织更为广泛且引起的机体反应更加迅速,所以我们选用了 BTX-B 进行泪腺注射,结果显示采用泪腺注射 BTX-B 的方法可以成功建立大鼠干眼模型:大鼠在第 3d 开始出现明显干眼体征,泪液分泌量下降、角膜上皮缺损,这个过程持续 2~4wk,在第 28d 时虽然泪液分泌恢复正常但角膜上皮持续缺损,同时所有的观察对象均未发生组织坏死溶解。Lin 等<sup>[5]</sup>研究发现,在第 28d 后会出现短暂的泪液分泌增加现象,但是本实验未发现这类现象,推测可能与大鼠的检测方法、周围环境、观察时间有关。

本实验中我们发现泪腺注射 BTX-B 1.25、5、10mU 均可产生泪液减少,且三组之间没有统计学差异,均未出现眼表及泪腺组织的药物损伤和毒性反应,这可能与我们的观察的指标有关,如眼表细小的着色无法进行组间比较等。通过本研究,我们发现泪腺注射 1.25mU 的 BTX-B 就可以产生泪液减少、角膜上皮损伤等干眼模型的指标,并未见药物性组织和眼表损伤,因此 1.25mU BTX-B 是泪腺注射制备大鼠干眼模型的安全有效药物剂量。

泪液中大约有 400 种蛋白,但是参与眼表疾病的蛋白不超过 5%,而 Lacritin 蛋白是目前发现的唯一一个有促进泪液分泌功能的蛋白。Lacritin 蛋白在泪液功能单位表达广泛,是泪液中较为重要的组成部分<sup>[4]</sup>,随着对其结构和功能的深入研究,发现其作为一种类生长因素蛋白,在干眼的发生和发展中起到了重要作用<sup>[6-7]</sup>,但具体的作用机制还没有完全明确,已成为干眼研究的一个重要方向。Lacritin 蛋白主要由泪腺分泌,经过腺管分泌到眼表面,具有促进有丝分裂、角膜上皮细胞增殖和泪液分泌的作用,当出现干眼时,其在泪液、眼表的表达是减低的<sup>[6]</sup>。Sandeep 等将人重组体 Lacritin 蛋白用于兔干眼模型动物点眼,14d 后发现其可以增加泪液基础分泌量 50%<sup>[8]</sup>。通过本实验我们发现泪腺中 Lacritin 蛋白仅在腺泡细胞中表达,从注射肉毒杆菌毒素第 3d 后出现表达减低,一直持续 6wk,与泪液的分泌减少和眼表损害呈同步变化,从而间

接地证实了 Lacritin 蛋白在干眼病引起的临床症状中扮演着重要角色。泪腺其他组织无 Lacritin 蛋白的表达,表明其在腺泡产生后随腺管排出到眼表发挥作用,只能对自身腺泡起到促分泌的作用,对周围组织无影响。目前,对 Lacritin 蛋白的研究为干眼疾病的病理研究和治疗提供了一个新的思路。

以往干眼模型的建立多采用手术方式,如泪腺摘除、去势雄或雌兔制备等<sup>[9]</sup>,创伤大、副反应及并发症多且耗时较长,通过本研究我们发现泪腺注射 1.25mU BTX-B 可成功建立大鼠干眼模型,其优点是操作简单、损伤小、耗时短(3d)、维持时间长(1mo)、干眼体征明显。前期实验已发现该模型眼表病理检测炎症反应明显,但组织切片显示注射 BTX-B 后泪腺组织没有发现炎症细胞浸润,分析可能是 BTX-B 损害了泪腺及其神经的正常功能,致使泪液分泌量下降,引起 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞等炎症因子的产生,诱发眼表炎症反应,进一步加剧了泪液量的减少,造成恶性循环。此动物模型可区别于其他先造成泪腺炎症而后出现干眼的动物模型,为那些非干燥综合症引起的常见的干眼类型研究提供基础。

总之,采用泪腺注射 BTX-B 的方法可建立大鼠干眼模型,此模型的建立为眼科学者们进行干眼研究提供了新的、更简便有效的方法,为进一步阐明和完善炎症性干眼的发病机制和干眼程度的量化提供了依据,为炎症性干眼的治疗研究奠定了实验基础,将会对干眼的研究发展起到重要的推进作用。

#### 参考文献

- 1 Moss SE, Klein R, Klein BE. Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2000;118(9):1264-1268
- 2 Johnson ME, Murphy PJ. Changes in the tear film and ocular surface from dryeye syndrome. *Prog Retin Eye Res* 2004;23(4):449-474
- 3 Smith RE. The tear film complex: pathogenesis and emerging therapies for dry eyes. *Cornea* 2005;24(1):1-7
- 4 Zhu L, Shen J, Zhang C, et al. Inflammatory cytokine expression on the ocular surface in the Botulium 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 Sanghi S, Kumar R, Lumsden A, et al. cDNA and genomic cloning of lacritin, a novel secretion enhancing factor from the human lacrimal gland. *J Mol Biol* 2001;310(1):127-139
- 7 Ma P, Beck SL, Raab RW, et al. Heparanase deglycanation of syndecan - 1 is required for binding of the epithelial - restricted prosecretory mitogen lacritin. *J Cell Biol* 2006;174(7):1097-1106
- 8 Samudre S, Lattanzio FA Jr, Lossen V, et al. A novel human tear glycoprotein, promotes sustained basal tearing and is well tolerated. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6265-6270
- 9 蒋晶晶, 齐惠, 黄一飞. 干眼动物模型最新研究现状. *中国实用眼科杂志* 2012;30(4):359-361