

# 大鼠角膜碱烧伤模型制备方法的研究

顾宏卫, 胡楠

作者单位: (226001) 中国江苏省南通市, 南通大学附属医院眼科

作者简介: 顾宏卫, 硕士, 讲师, 研究方向: 眼表疾病。

通讯作者: 胡楠, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼表疾病、视神经疾病。hunaneyeye@hotmail.com

收稿日期: 2012-12-14 修回日期: 2013-05-27

## Study on the establishment of corneal alkali chemical injury on rats

Hong-Wei Gu, Nan Hu

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Nan Hu. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. hunaneyeye@hotmail.com

Received: 2012-12-14 Accepted: 2013-05-27

### Abstract

• **AIM:** To investigate the appropriate methods to establish corneal alkali chemical injury on rats.

• **METHODS:** The rats ( $n=87$ ) were randomly divided into three groups. Corneal alkali injury was induced by placing 1mol/L NaOH soaked filter paper on the limbus of right cornea for 20 seconds (group A,  $n=34$ ) or 40 seconds (group B,  $n=23$ ), and on the central axis of the right cornea for 40 seconds (group C,  $n=30$ ) respectively. Corneal transparency, corneal ulceration, and corneal neovascularization were observed and recorded under slit-lamp biomicroscope on day 7 post-operation.

• **RESULTS:** Incidence of corneal ulceration, corneal perforation and positive rate of corneal fluorescein staining in limbal corneal injury groups (group A and B) were significantly higher than that of central corneal injury group (group C) ( $P < 0.05$ ). Incidence of corneal ulceration and corneal perforation in group B was significantly higher than group A ( $P < 0.05$ ). Corneal neovascularization was observed in all three groups.

• **CONCLUSION:** Corneal alkali burns induced by 3mm diameter central cornea injury are fit for the study of corneal neovascularization, while those induced by limbus injury for 20 seconds are fit for the study on limbal stem cells deficiency.

• **KEYWORDS:** corneal; alkali injury; animal models; corneal neovascularization; rat

**Citation:** Gu HW, Hu N. Study on the establishment of corneal alkali chemical injury on rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(6):1093-1095

### 摘要

**目的:** 探索相对稳定性强、一致性好的大鼠角膜碱烧伤动物模型。

**方法:** 将 87 只 SD 大鼠分为角膜缘碱烧伤 20s 组 (A 组, 34 只), 角膜缘碱烧伤 40s 组 (B 组, 23 只), 角膜中央碱烧伤 40s 组 (C 组, 30 只), 用浸润 1mol/L 氢氧化钠的滤纸片, 分别烧灼大鼠角膜缘和角膜中央, 术后 7d 裂隙灯显微镜观察角膜透明度、角膜溃疡及角膜新生血管情况, 并记录上述指标。

**结果:** 角膜缘碱烧伤 (B 组) 较角膜中央烧伤 (C 组) 溃疡发生率、角膜穿孔率和角膜上皮荧光素钠染色阳性率高, 且有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 角膜缘烧灼时间长组 (B 组) 溃疡发生率及角膜穿孔率高于角膜缘烧灼时间短组 (A 组), 且有统计学差异 ( $P < 0.05$ ); 烧灼角膜缘和角膜中央 (A, B, C 组) 均能诱导出角膜新生血管。

**结论:** 对于研究角膜新生血管的动物模型, 以选择 3mm 圆形滤纸片角膜中央烧伤为佳; 对于研究角膜缘干细胞缺乏所致角膜病变的实验, 以选择环形滤纸片放置于角膜缘 20s 为佳。

**关键词:** 角膜; 碱烧伤; 动物模型; 新生血管; 大鼠

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.06.08

**引用:** 顾宏卫, 胡楠. 大鼠角膜碱烧伤模型制备方法的研究. 国际眼科杂志 2013;13(6):1093-1095

### 0 引言

大鼠角膜碱烧伤是研究眼表损伤所致角结膜病理生理变化及对各项治疗措施反应最常见的动物模型, 该模型制备的基本方法是将浸泡过氢氧化钠的滤纸片置于角膜表面造成角膜损伤, 但氢氧化钠的浓度、滤纸片大小及放置时间的长短等因素对角膜的损伤程度、模型制备的成功率有很大影响, 目前国内外尚无统一标准。我们比较了三种不同方法对角膜上皮缺损、溃疡形成及新生血管范围的影响, 以期建立一种比较稳定的大鼠角膜碱烧伤动物模型。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康清洁级 SD 大鼠 87 只, 雌雄不限, 体质量 200 ~ 220g, 购自南通大学医学院动物实验中心提供。裂隙灯活体显微镜检查排除眼部病变。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型制作** 将大鼠随机分为角膜缘碱烧伤 20s 组 (A 组) 34 只, 角膜缘碱烧伤 40s 组 (B 组) 23 只, 角膜中央碱烧伤 40s 组 (C 组) 30 只。所有动物给予 10% 水合氯醛 3mg/kg 腹腔注射全身麻醉, 5g/L 盐酸丙美卡因滴眼液局部麻醉, 干棉棒拭去结膜囊多余液体。A 组: 将内直径 4mm, 外直径 8mm 的单层环形滤纸片浸泡于浓度为 1mmol/L NaOH 溶液中 20s 后, 置于干燥滤纸上 1s 蘸去多

余的碱液,显微镜下将滤纸片放在大鼠右眼角膜缘,轻压滤纸,使之与角膜缘贴合,烧灼20s,然后生理盐水冲洗1min。B组:将碱烧灼时间增加为40s,其余步骤同A组。C组:将直径3mm的单层圆形滤纸片,浸泡NaOH后放在大鼠右眼角膜中央烧灼40s,然后生理盐水冲洗1min。未烧灼处的角膜上皮均予手术刀片刮除,造模后未给予任何治疗,常规喂养。

**1.2.2 观察指标** 大鼠角膜碱烧伤后,每天在裂隙灯显微镜下观察角膜、结膜及前房情况,第7d行眼前段照相,记录角膜透明度、角膜溃疡发生率及穿孔率,测量角膜新生血管(CNV)的长度并计算面积。角膜透明度评分标准<sup>[1]</sup>:0分,角膜透明,无混浊;1分,角膜轻度混浊,虹膜纹理可见;2分,角膜中度混浊,虹膜纹理不清;3分,角膜重度混浊,隐见瞳孔;4分,角膜极重度混浊,瞳孔不见。角膜新生血管测量及面积计算:根据颜世龙等<sup>[2]</sup>报道,以大鼠角膜缘9:00~3:00位划一横线将角膜分成上下两部分,再由12:00~6:00位划一条线,这两条线将角膜分成4个象限,分别用圆规测量各象限内最长的一支血管长度(以连续且弯曲度小,并与角膜缘切线垂直的新生血管长度为准)。角膜新生血管面积计算: $A = C/12 \times 3.1416 [r^2 - (r-l)^2]$ <sup>[3]</sup>,其中C为CNV累及角膜的圆周钟点数,l即所取的血管长度,大鼠角膜半径 $r = 3\text{mm}$ 。CNV总面积等于4个象限面积之和。

统计学分析:数据统计运算采用Stata 10统计软件进行处理,角膜溃疡发生率、穿孔率、新生血管诱导率、角膜上皮荧光素钠染色率采用 $\chi^2$ 检验;角膜透明度采用秩和检验;新生血管长度、新生血管面积、角膜上皮缺损面积采用单因素方差分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 形态学观察** A组和B组角膜缘碱烧伤后即见:角膜缘缺血,邻近结膜苍白,烧灼部位角膜上皮脱落。C组角膜中央碱烧伤后即可见结膜混合充血,角膜中央可见一个边界清晰、直径3mm的圆形上皮缺损区。三组大鼠角膜碱烧伤后1d均见明显结膜混合充血,角膜轻度水肿、混浊,角膜荧光素钠染色阳性。3d时即有新生血管自角膜缘向透明角膜生长,呈毛刷状,相互之间形成吻合支。此后,新生血管不断生长,第4~7d,新生血管面积增长最快。

**2.2 角膜透明度** 碱烧伤后7d,角膜透明度检查情况见表1,A组和B组之间角膜透明度无统计学差异( $t = 1.414, P > 0.05$ );但C组角膜透明度明显好于B组( $t = 3.587, P < 0.05$ )。

**2.3 角膜溃疡发生率、角膜穿孔率、角膜上皮荧光素钠染色阳性率及角膜新生血管诱导率** 碱烧伤后7d,三组角膜溃疡发生率、角膜穿孔率、角膜上皮荧光素钠染色阳性率及角膜新生血管诱导率见表2及图1。角膜溃疡发生率和角膜穿孔率B组高于A组和C组( $P < 0.05$ );角膜上皮荧光素钠染色阳性率B组高于C组( $P < 0.05$ ),A组和B组间无统计学差异( $P > 0.05$ );角膜新生血管诱导率B组高于C组( $P < 0.05$ ),A组和B组间无统计学差异( $P > 0.05$ )。

**2.4 角膜新生血管长度及面积** 碱烧伤后7d,三组角膜新生血管长度和面积见表3,A组新生血管面积小于B组( $P < 0.05$ )。B组和C组新生血管长度和面积无统计学差异( $P > 0.05$ )。

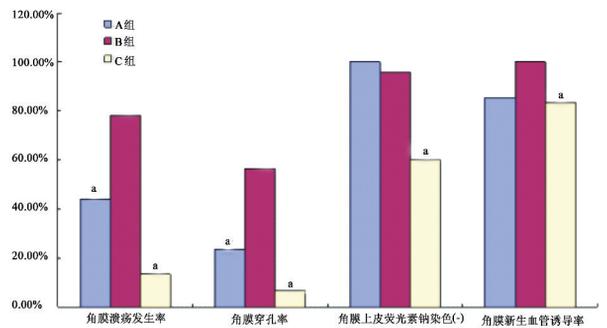


图1 三组大鼠角膜溃疡发生率、角膜穿孔率、角膜上皮荧光素钠染色阳性率和角膜新生血管诱导率的比较 <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs B组。

表1 三组大鼠角膜碱烧伤后7d角膜透明度

分组	n	角膜混浊度评分				
		0分	1分	2分	3分	4分
A组	34	0	0	4	4	26
B组	23	0	0	0	4	19
C组	30	0	7	3	10	10

表2 三组大鼠角膜溃疡、穿孔、角膜上皮荧光素钠染色阳性率和角膜新生血管的变化

分组	n	角膜溃疡	角膜穿孔	角膜荧光素钠染色	角膜新生血管
A组	34	15(44.12) <sup>a</sup>	8(23.53) <sup>a</sup>	34(100)	29(85.29)
B组	23	18(78.26)	13(56.52)	22(95.65)	23(100)
C组	30	4(13.33) <sup>a</sup>	2(6.67) <sup>a</sup>	18(60) <sup>a</sup>	25(83.33) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs B组。

表3 三组大鼠角膜碱烧伤后7d角膜新生血管长度及面积  $\bar{x} \pm s$

分组	n(眼)	新生血管长度(mm)	新生血管面积(mm <sup>2</sup> )
A组	34	1.690±0.509	11.543±7.497 <sup>a</sup>
B组	23	2.041±0.458	18.339±3.088
C组	30	2.221±0.543	19.823±6.740

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs B组。

## 3 讨论

大鼠角膜碱烧伤可诱发角膜上皮缺损、角膜基质水肿、角膜溃疡形成及角膜新生血管形成等病理改变,是研究角膜化学烧伤、热烧伤、手术创伤、自身免疫性疾病如Steven-Johnson综合症、角膜瘢痕性类天疱疮等众多角膜疾病理想的动物模型。

目前的研究多数用大鼠建造模型,还有用小鼠、家兔、新西兰大白兔等。所选择的滤纸有环形滤纸<sup>[4,5]</sup>和圆形滤纸。但圆形滤纸直径不统一,直径为2~6mm不等<sup>[6-10]</sup>。碱烧伤所用的NaOH的浓度多数为1mol/L<sup>[1,2,5]</sup>,也有研究者使用的浓度为0.5mol/L<sup>[11,12]</sup>。碱烧灼部位多为角膜中央,时间长短不一,从10~180s<sup>[12-20]</sup>不等;还有的烧灼角膜缘30s<sup>[4,5]</sup>;或烧灼包括角膜缘在内的整个角膜30s<sup>[10]</sup>。我们对上述文献中制作模型的方法和碱烧灼角膜时间并进行了预实验,根据预实验结果选择了烧灼角膜缘40s,20s和烧灼角膜中央40s共3组进行比较。

角膜碱烧伤程度的控制是建模是否成功的关键,Ma等<sup>[5]</sup>用环形滤纸片烧灼大鼠角膜缘30s,有36.25%(29/80)发生角膜穿孔等严重并发症而造模失败。我们设计了用直径3mm圆形滤纸片、内直径4mm外直径8mm环形滤纸片浸泡1mol/L NaOH后分别放置于角膜中央和角膜缘,

并对放置时间进行严格控制和比较,结果显示:角膜缘碱烧伤较角膜中央烧伤溃疡发生率和角膜穿孔率高且有统计学差异( $P<0.05$ );角膜缘烧灼时间长溃疡发生率及角膜穿孔率高且有统计学差异( $P<0.05$ );3组均能诱导出角膜新生血管。

我们的实验结果还提示,不同的实验目的应该选择不同的建模方法。对于研究角膜新生血管的动物模型,以选择3mm圆形滤纸片角膜中央烧伤为佳,此时角膜形成新生血管的比例达85%,新生血管生长均匀一致,长度及面积均能达到实验所需要求,且角膜溃疡、角膜穿孔的比例明显低于角膜缘烧伤组。对于研究角膜缘干细胞缺乏所致角膜病变的实验,应选择环形滤纸片放置于角膜缘20s,此时既可以诱发角膜上皮缺损(100%)、角膜溃疡(44.12%)、角膜新生血管形成(85.29%)等病理改变,角膜穿孔率却明显低于环形滤纸片放置于角膜缘40s组,提高了建模的成功率。

此外,在实验操作过程中尚需注意以下细节:(1)滤纸片浸润碱液的量要适宜,否则易造成角膜的弥漫性烧伤或烧伤偏轻;(2)烧灼时尽量不要持续压迫滤纸片,否则易加剧碱液穿透角膜,并发症发生率增加;(3)制作角膜缘碱烧伤时轻压滤纸使之与角膜缘很好贴合,使角膜缘一周烧灼的时间和程度相同;(4)擦干结膜囊内多余水份,主要是泪液,以免碱性液体弥散后烧灼周围组织及降低滤纸片的碱浓度,可用开睑器撑开眼睑,阻止瞬目。

#### 参考文献

- 1 袁进,陈家祺,刘祖国,等. IL-1ra 治疗角膜碱烧伤的免疫学机制研究. 眼科研究 2007;25:5-9
- 2 颜世龙,梁丹,林妙丽,等. 碱烧伤大鼠角膜新生血管模型的初步探索. 眼科学报 2005;21:165-172
- 3 D'Amato RJ, Laughnan MS, Flyy E, et al. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:4082-4085
- 4 刘国华,晏晓明,杨松霖,等. 骨髓间充质干细胞移植重建碱烧伤眼表的实验研究. 眼科研究 2008;26:810-813

- 5 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;24:315-321
- 6 董媛,张明昌. 环氧合酶-2 及其抑制剂对角膜新生血管作用的研究. 眼科研究 2007;25:424-427
- 7 刘丹宁,谢汉平. 诺帝滴眼液对大鼠角膜碱烧伤的治疗作用. 眼科新进展 2009;29:110-113
- 8 李瑾,傅瑶,贾仁兵,等. 大鼠角膜碱烧伤行培养角膜上皮移植后 VEGF 的表达. 眼科研究 2008;26:9-12
- 9 李雪,徐锦堂,崔浩,等. TGF- $\beta$ 2 局部应用对大鼠角膜碱烧伤后 CD44 和 E-selectin 表达的影响. 眼科新进展 2006;26:491-494
- 10 Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 2008;26:1047-1055
- 11 王冰,王传富. 层粘连蛋白在大鼠角膜碱烧伤中的表达及意义. 眼外伤职业眼病杂志 2005;27(3):161-163
- 12 沈玺,叶纹,钟一声. 羊膜移植对大鼠角膜碱烧伤后基质金属蛋白酶的影响. 眼视光学杂志 2005;7:76-79
- 13 陈琳,孙旭光,王智群,等. 内皮抑素对大鼠角膜碱烧伤后新生血管抑制作用的实验研究. 中华眼科杂志 2005;41:940-941
- 14 孙广莉,张明昌. HIF1 $\alpha$  在大鼠碱烧伤角膜新生血管形成中的表达. 临床眼科杂志 2006;14:459-462
- 15 秦静,李丽,詹玉蕊,等. BMPR-IA 在实验性大鼠角膜碱烧伤中的表达及意义. 眼外伤职业眼病杂志 2008;30:161-163
- 16 孙京华,张煜昭,王慧,等. VEGF 和 PEDF 在实验性大鼠角膜新生血管组织中的动态表达. 眼科新进展 2006;26:573-576
- 17 李琰,夏丽坤. 大鼠角膜碱烧伤后 CD-105 在新生血管化角膜中的表达. 国际眼科杂志 2009;9(3):451-453
- 18 Zhang YX, Zhang MC. Inhibitory effects of pioglitazone on alkaline burn-induced corneal neovascularization in rats. *Int J Ophthalmol(Guoji Yanke Zazhi)* 2007;7(6):1202-1205
- 19 孙京华,陈艳艳,刘常明,等. b-FGF, VEGF 在碱烧伤大鼠角膜中的表达与新生血管的关系. 眼外伤职业眼病杂志 2007;29:81-84
- 20 翁夷平. 低分子肝素对大鼠角膜碱烧伤后 VEGF 和 HGF 表达的影响. 河北医科大学硕士论文 2008