

去卵巢食蟹猴眼表状态的动态观察

李磊 张晓峰 李萌萌 阙丽娟 黎畅

810000 西宁,青海省人民医院眼科(李磊);215006 苏州大学附属第一医院眼科(张晓峰、李萌萌、阙丽娟、黎畅)

通信作者:张晓峰,Email:zhangxiaofeng@suda.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.02.008

【摘要】目的 探讨去卵巢食蟹猴作为绝经期干眼研究动物模型的可行性。**方法** 选择 4~6 岁健康成年雌性食蟹猴 6 只,采用随机数字表法将食蟹猴分为卵巢摘除组和假手术组,每组各 3 只。卵巢摘除组食蟹猴手术摘除双侧卵巢,假手术组以相同的手术方式进行操作但不摘除卵巢。分别于术前及术后 1、3、6 个月收集各组食蟹猴下肢静脉血各 3 ml,采用放射免疫法检测猴血清雌二醇和睾酮质量浓度。分别于上述时间点采用泪液渗透压仪 5600 检测各组食蟹猴泪液渗透压,并进行干眼相关检查,包括基础泪液分泌试验(SIT)、角膜荧光素染色及结膜印迹细胞学检查。**结果** 卵巢摘除组食蟹猴手术前后血清雌二醇、睾酮质量浓度均低于假手术组,但各组间差异均无统计学意义($F_{\text{分组}}=5.16, P=0.09$; $F_{\text{分组}}=1.46, P=0.29$);卵巢摘除组和假手术组食蟹猴组间泪液渗透压的比较,差异无统计学意义($F_{\text{分组}}=0.83, P=0.37$),卵巢摘除组食蟹猴术后 3 个月泪液渗透压较术后 1 个月明显升高,差异有统计学意义($t=5.12, P<0.05$);卵巢摘除组与假手术组食蟹猴 SIT 检测值比较,差异无统计学意义($F_{\text{分组}}=0.06, P=0.82$),卵巢摘除组食蟹猴术后 3 个月 SIT 检测值较术后 1 个月明显降低,差异有统计学意义($t=1.13, P<0.05$);各组食蟹猴手术前后各时间点均未见角膜荧光素染色。结膜印迹细胞学检查表明,卵巢摘除组食蟹猴术前及术后 1 个月结膜上皮细胞形态正常,结膜杯状细胞数量多,过碘酸希夫染色呈紫色,与假手术组食蟹猴结膜上皮细胞和杯状细胞形态相似;卵巢摘除组食蟹猴术后 3 个月结膜上皮细胞体积较大,形态多样,结膜杯状细胞体积缩小;术后 6 个月结膜上皮细胞形态多样且不易分辨,杯状细胞数量明显减少。**结论** 去卵巢食蟹猴眼表结膜细胞形态发生异常变化,泪液渗透压升高,其眼表动态变化与血清雌激素水平下降趋势一致,因此去卵巢食蟹猴可作为性激素相关干眼研究的动物模型。

【关键词】 干眼; 性激素; 眼表; 泪液渗透压; 结膜/细胞学; 动物模型, 猴

Dynamic observation of ocular surface in ovariectomized cynomolgus monkey Li Lei, Zhang Xiaofeng, Li Mengmeng, Que Lijuan, Li Chang

Department of Ophthalmology, People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810000, China (Li Lei); Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China (Zhang XF, Li MM, Que LJ, Li C)

Corresponding author: Zhang Xiaofeng, Email: zhangxiaofeng@suda.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the feasibility of ovariectomized cynomolgus monkey as an animal model of postmenopausal dry eye. **Methods** Six healthy adult female cynomolgus monkeys (aged 4–6 years old) were selected. Cynomolgus monkeys were divided into ovariectomized group and sham operation group by random number table. Bilateral ovariectomy was performed in each cynomolgus of the ovariectomy group, and the same operation was operated in the sham group but the ovaries were not removed. The venous blood of the lower extremities of each cynomolgus monkey was collected before operation and at 1 month, 3 and 6 months after operation respectively. The concentrations of estradiol and testosterone were measured by radioimmunoassay. At the above time points, tear-liquid osmotic pressure detector 5600 was used to detect the tear osmotic pressure of cynomolgus monkeys in each group, and dry eye related examinations, including Schirmer I test (SIT), corneal fluorescein staining and conjunctive impression cytology were performed. **Results** Preoperative and postoperative serum estradiol, testosterone concentrations in the ovariectomy group were lower than those in the sham operation group, but there were no significant differences between the two groups ($F_{\text{group}}=5.16, P=0.09$; $F_{\text{group}}=1.46, P=0.29$). There was no significant difference in the osmotic pressure between the two groups ($F_{\text{group}}=0.83, P=0.37$). The osmotic pressure in the 3 months after ovariectomy was higher than that in the 1 month after ovariectomy in the ovariectomy group, with a significant difference between them ($t=5.12, P<0.05$). There was no significant difference in SIT between ovariectomized group and sham operation group ($F_{\text{group}}=0.06, P=0.82$), the SIT in the 3 months after ovariectomy was lower than that in the 1 month after ovariectomy in the ovariectomy group, with a significant difference between them ($t=1.13, P<0.05$). There was no corneal fluorescein staining at each time points before and after ovariectomy

in each group. The conjunctive impression cytology examination showed that, in the ovariectomy group, the morphology of conjunctival epithelial cells was normal, the number of conjunctival goblet cells was large, the periodic acid Schiff staining was purple before and 1 month after ovariectomy, which were similar to those in the sham operation group; three months after ovariectomy, the conjunctiva epithelial cell body was larger and had diverse forms, goblet cells were shrunk; six months after ovariectomy, the shapes of conjunctival epithelial cells were diverse and not easily distinguished, the number of goblet cells was distinctly decreased. **Conclusions** The ocular conjunctival cells in the ovariectomized cynomolgus monkey have abnormal changes in morphology, and tear osmotic pressure increase, the ocular surface dynamic changes are consistent with the decrease of serum estrogen level, so ovariectomized cynomolgus monkeys can be used as sex hormone-related dry eye animal models.

[Key words] Dry eye; Sex hormones; Ocular surface; Tears osmotic pressure; Conjunctival/cytology; Disease models, monkey

研究表明,性激素可调控泪腺和睑板腺的形态、发育、分化及分泌功能,雄激素可调节睑板腺功能,并可刺激睑板腺分泌以形成泪膜脂质层;雄激素的缺乏引起睑板腺分泌的脂质成分改变,引起睑板腺功能障碍,导致泪膜破裂时间缩短,继而导致蒸发过强型干眼^[1]。研究证实,绝经期女性体内性激素水平下降,干眼的发病率高于年轻女性和男性^[2],认为绝经是干眼发病的一个重要危险因素^[3]。泪腺及睑板腺均有雌激素受体,雌激素分泌减少引起的眼表改变包括泪液分泌量减少、睑板腺功能障碍及杯状细胞密度减少等^[4],因此,性激素相关干眼发病机制一直是研究热点。目前,模拟女性性激素相关干眼病理生理机制的实验研究主要以鼠、兔、狗为主要的动物模型。本研究组前期的研究表明,雌性大鼠双侧卵巢切除后3个月血清雌激素和睾酮含量均低于正常鼠,结膜上皮细胞层数增多,结膜组织排列紊乱,泪腺腺泡萎缩,结膜组织中白细胞介素(interleukin, IL)-17A、IL-1 β 、IL-6及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子表达均增加^[5]。但是,上述动物模型均为低等动物,与人类干眼的自然病程尚有一定的差别,而猴是接近人类的灵长类动物,猴干眼模型是最接近人类干眼的理想研究工具^[6]。为了进一步研究性激素相关干眼发病机制,本实验拟研究去卵巢食蟹猴体内性激素水平与干眼发病和相关眼表功能的关系,为性激素相关干眼的眼表病变研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康清洁级雌性食蟹猴6只(苏州昭衍新药研究中心有限公司提供),年龄4~6岁,体质量2.9~4.0 kg。实验动物的饲养与管理遵循苏州昭衍新药研究中心有限公司的SOP条例,实验动物的使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。采用随机数字表法将实验动物随机分为卵巢

摘除组和假手术组,每组各3只。本研究实验动物的使用经苏州昭衍新药研究中心有限公司动物伦理委员会审核批准(批文号:AUC15-420)。

1.1.2 主要试剂及仪器 酚红棉线、质量分数1%荧光素钠眼科检测试纸(天津晶明新技术开发有限公司);雌二醇放射免疫检测试剂盒、睾酮放射免疫检测试剂盒(北京华英生物技术研究所);过碘酸希夫染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司)。泪液渗透压仪5600(美国WESCOR公司);裂隙灯显微镜、YZ5X1型眼前节照相系统(苏州六六视觉科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 卵巢摘除手术 卵巢摘除组猴术前至少禁食1 d,采用50 mg/ml氯胺酮行肌肉注射,剂量为10 mg/kg,待动物安静后用20 mg/ml戊巴比妥钠静脉注射麻醉,剂量为20 mg/kg。动物仰面固定于手术台上,暴露下腹部并备皮,用安尔碘行皮肤消毒,沿下腹部正中线做一长4~5 cm的纵向皮肤切口,逐层分离肌肉和壁腹膜后进入腹腔,暴露双侧卵巢,结扎卵巢下输卵管,摘除卵巢后分层缝合肌肉和皮肤。假手术组猴术前准备和腹腔切开方法同卵巢摘除组,找到卵巢后不切除,缝合肌肉和皮肤。术后3 d常规换药,术后7 d拆除皮肤缝线。

1.2.2 采用血清放射免疫法检测血清雌二醇和睾酮质量浓度 分别于术前,术后1、3和6个月测定食蟹猴血清雌二醇和睾酮质量浓度。用真空采血促凝管分别采集各组食蟹猴下肢静脉全血3 ml,离心半径13.5 cm,3 000 r/min离心15 min,用微量加样器吸取血清,留存于-20℃冰箱。用放射免疫法检测猴血清雌二醇和睾酮质量浓度,检测由苏州大学附属第一医院核医学科完成。

1.2.3 食蟹猴干眼相关检查和眼表状况评估 术后记录动物的一般情况,并分别于术前、术后1、3和6个月进行眼表状况评估,检查前用50 mg/ml氯胺酮肌肉注射使动物保持安静。(1)泪液渗透压检查 使用标

准校正液对仪器进行校准,将直径 3 mm 的干燥无菌滤纸片放入食蟹猴下睑结膜囊内,待滤纸片完全浸湿后取出,置入渗透压仪的探测凹槽中,连续测量 5 次,取平均值。(2)基础泪液分泌试验(Schirmer I test, S I t) 将酚红棉线的一端折弯 3 mm,置入食蟹猴下睑外侧 1/3 处结膜囊内,酚红棉线的其他部分垂悬于皮肤表面,1 min 后取出(请核实时间),记录酚红棉线的润湿长度(不包括反折长度)。(3)角膜荧光素钠染色 用荧光素钠试纸轻触下睑结膜,闭合眼睑,在裂隙灯显微镜下用钴蓝光观察角膜上皮染色情况,参照 Park 计分方法^[7]对角膜荧光素染色情况进行评分:角膜无着色为 0 分;角膜点状着色 $\leq 1/8$ 象限为 1 分;角膜点状着色 $>1/8$ 象限 $\sim \leq 1/4$ 象限为 2 分;角膜点状着色 $>1/4$ 象限 $\sim \leq 1/2$ 象限为 3 分;角膜点状着色 $>1/2$ 象限为 4 分。(4)结膜印迹细胞学检查 将醋酸纤维素滤纸剪成 4 mm \times 5 mm 梯形小纸片,高压灭菌后干燥待用。食蟹猴取平卧位,采用质量分数 0.04% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼行表面麻醉,用消毒无齿镊夹住醋酸纤维素滤纸一角,将粗糙面贴附于颞侧球结膜,轻轻加压 5 s 后取出,置于体积分数 95% 乙醇中固定,过碘酸希夫染色。采用 Nelson 分级方法进行分级:上皮细胞小而圆,易分辨,细胞间结合紧密,细胞质红,核大,核质比为 1:1 \sim 1:2,杯状细胞大而圆,过碘酸希夫重染为 0 级;上皮细胞较大,形态多样,易分辨,细胞间距离较 0 级大,细胞体积大,细胞核小,核质比为 1:3,杯状细胞圆而丰满,过碘酸希夫染色阳性为 I 级;上皮细胞大,形态多样,分辨差,细胞间距大,细胞核可呈多核状,核小,核质比为 1:4 \sim 1:5,无角质化,杯状细胞形态小,边界不清,过碘酸希夫染色差为 II 级;上皮细胞大而多形,孤立,细胞质嗜蓝,细胞核小,核固缩并有较多无核细胞,核质比 $>1:6$,杯状细胞数量明显减少,甚至消失为 III 级。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究检测指标的数据资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用随机分组两水平研究设计,卵巢切除组与假手术组食蟹猴在手术前后不同时间点 S I t、泪液渗透压及血清性激素质量浓度的差异比较均采用重复测量两因素方差分析,多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组食蟹猴血清性激素水平变化

卵巢切除组食蟹猴手术前后血清雌二醇、睾酮质

量浓度均低于假手术组,但各组间差异均无统计学意义(雌二醇: $F_{\text{分组}}=5.16, P=0.09; F_{\text{时间}}=11.45, P=0.08; F_{\text{交互作用}}=4.85, P=0.18$ 。睾酮: $F_{\text{分组}}=1.46, P=0.29; F_{\text{时间}}=1.67, P=0.40; F_{\text{交互作用}}=0.63, P=0.66$) (表 1, 2)。

表 1 各组食蟹猴手术前后不同时间点血清雌二醇质量浓度比较($\bar{x}\pm s, \text{pg/ml}$)

组别	样本量	不同时间点雌二醇质量浓度			
		术前	术后 1 个月	术后 3 个月	术后 6 个月
卵巢摘除组	3	42.34 \pm 18.27	31.67 \pm 20.31	18.67 \pm 13.61	43.67 \pm 33.23
假手术组	3	51.37 \pm 14.56	62.67 \pm 37.75	60.33 \pm 20.03	121.00 \pm 36.29

注: $F_{\text{分组}}=5.16, P=0.09; F_{\text{时间}}=11.45, P=0.08; F_{\text{交互作用}}=4.85, P=0.18$ (重复测量两因素方差分析)

表 2 各组食蟹猴手术前后不同时间点血清睾酮质量浓度比较($\bar{x}\pm s, \text{ng/ml}$)

组别	样本量	不同时间点睾酮质量浓度			
		术前	术后 1 个月	术后 3 个月	术后 6 个月
卵巢摘除组	3	0.14 \pm 0.05	0.15 \pm 0.03	0.19 \pm 0.10	0.20 \pm 0.07
假手术组	3	0.15 \pm 0.08	0.16 \pm 0.14	0.25 \pm 0.07	0.34 \pm 0.15

注: $F_{\text{分组}}=1.46, P=0.29; F_{\text{时间}}=1.67, P=0.40; F_{\text{交互作用}}=0.63, P=0.66$ (重复测量两因素方差分析)

2.2 各组食蟹猴手术前后泪液渗透压变化

卵巢摘除组和假手术组食蟹猴泪液渗透压的比较,差异无统计学意义($F_{\text{分组}}=0.83, P=0.37$),各组手术前后不同时间点泪液渗透压总体比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}}=23.28, P=0.00$)。卵巢摘除组食蟹猴术后 3 个月泪液渗透压明显较术后 1 个月升高,差异有统计学意义($t=5.12, P<0.05$) (表 3)。

表 3 各组食蟹猴手术前后不同时间点泪液渗透压检测结果比较($\bar{x}\pm s, \text{mOsm/L}$)

组别	眼数	不同时间点泪液渗透压			
		术前	术后 1 个月	术后 3 个月	术后 6 个月
卵巢摘除组	3	466.17 \pm 79.84	404.96 \pm 81.97	475.67 \pm 71.86 ^a	417.03 \pm 41.20
假手术组	3	425.65 \pm 112.56	371.46 \pm 73.02	408.75 \pm 55.56	381.63 \pm 23.87

注: $F_{\text{分组}}=0.83, P=0.37; F_{\text{时间}}=23.28, P=0.00; F_{\text{交互作用}}=3.34, P=0.04$ 。与组内术后 1 个月比较,^a $P<0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD-*t* 检验)

2.3 各组食蟹猴手术前后 S I t 变化

卵巢摘除组与假手术组食蟹猴 S I t 检测值总体比较,差异无统计学意义($F_{\text{分组}}=0.06, P=0.82$),各组手术前后不同时间点 S I t 值总体比较差异有统计学意义($F_{\text{时间}}=9.65, P=0.00$)。卵巢摘除组食蟹猴术后

3 个月 S I t 检测值明显较术后 1 个月降低, 差异有统计学意义 ($t=1.13, P<0.05$) (表 4)。

表 4 各组食蟹猴手术前后不同时间点 S I t 值比较 ($\bar{x}\pm s, mm$)

组别	眼数	不同时间点 S I t 值			
		术前	术后 1 个月	术后 3 个月	术后 6 个月
卵巢摘除组	3	10.58±7.79	8.25±4.79	2.08±1.51 ^a	2.17±1.60
假手术组	3	10.17±9.60	7.17±6.94	3.33±2.96	2.00±1.41

注: $F_{\text{分组}}=0.06, P=0.82; F_{\text{时间}}=9.65, P=0.00; F_{\text{交互作用}}=2.46, P=0.92$. 与组内术后 1 个月比较, ^a $P<0.05$ (重复测量两因素方差分析, LSD- t 检验) S I t: 基础泪液分泌试验

2.4 各组食蟹猴手术前后角膜荧光素染色情况

卵巢摘除组和假手术组食蟹猴术前, 术后 1、3 和 6 个月均未见角膜荧光素染色, 角膜荧光素染色评分均为 0 分 (图 1)。

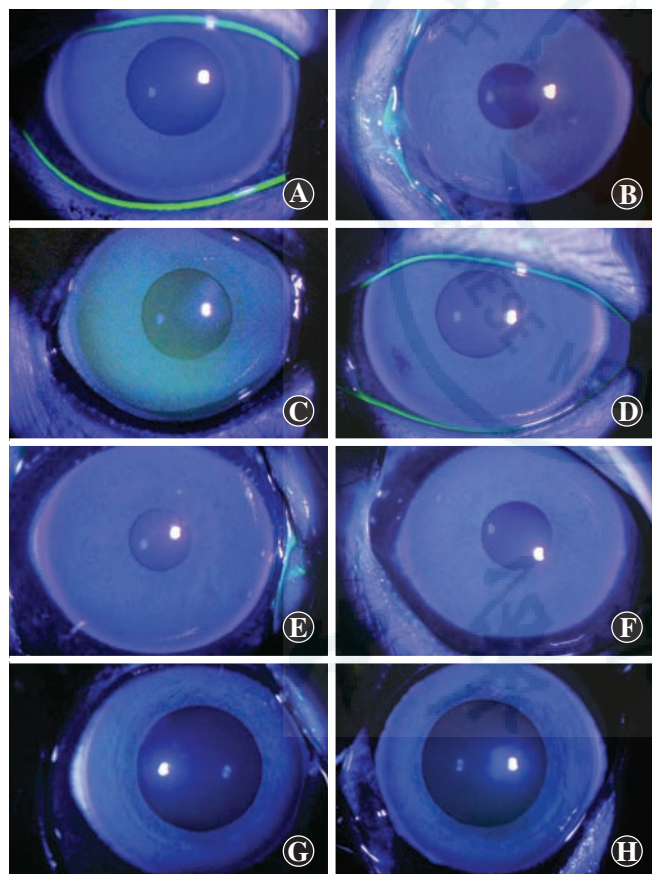


图 1 各组食蟹猴角膜荧光素钠染色 A: 卵巢摘除组术前角膜透明, 未发现角膜荧光素染色 B: 卵巢摘除组术后 1 个月角膜上皮完整 C: 卵巢摘除组术后 3 个月未发现角膜荧光素染色 D: 卵巢摘除组术后 6 个月未发现角膜荧光素染色 E: 假手术组术前角膜表面正常 F: 假手术组术后 1 个月未见角膜荧光素染色 G: 假手术组术后 3 个月未发现角膜荧光素染色 H: 假手术组术后 6 个月未发现角膜荧光素染色

2.5 各组食蟹猴结膜上皮形态学变化

卵巢摘除组食蟹猴术后 1 个月时结膜上皮细胞分

级为 0 级, 上皮细胞体积较大, 形态较多样, 易于分辨; 结膜杯状细胞数量多, 过碘酸希夫染色呈紫红色。卵巢摘除组食蟹猴术后 3 个月结膜上皮细胞分级为 I 级, 上皮细胞体积较大, 形态多样; 结膜杯状细胞体积缩小, 过碘酸希夫染色呈深红色。卵巢摘除组食蟹猴术后 6 个月结膜上皮细胞为 II 级改变, 呈多种形态, 不易分辨; 结膜杯状细胞数量减少, 边界不清, 过碘酸希夫染色呈红色。假手术组食蟹猴术前及术后结膜上皮细胞分级均为 0 级, 结膜杯状细胞数量多, 过碘酸希夫染色呈紫红色 (图 2)。

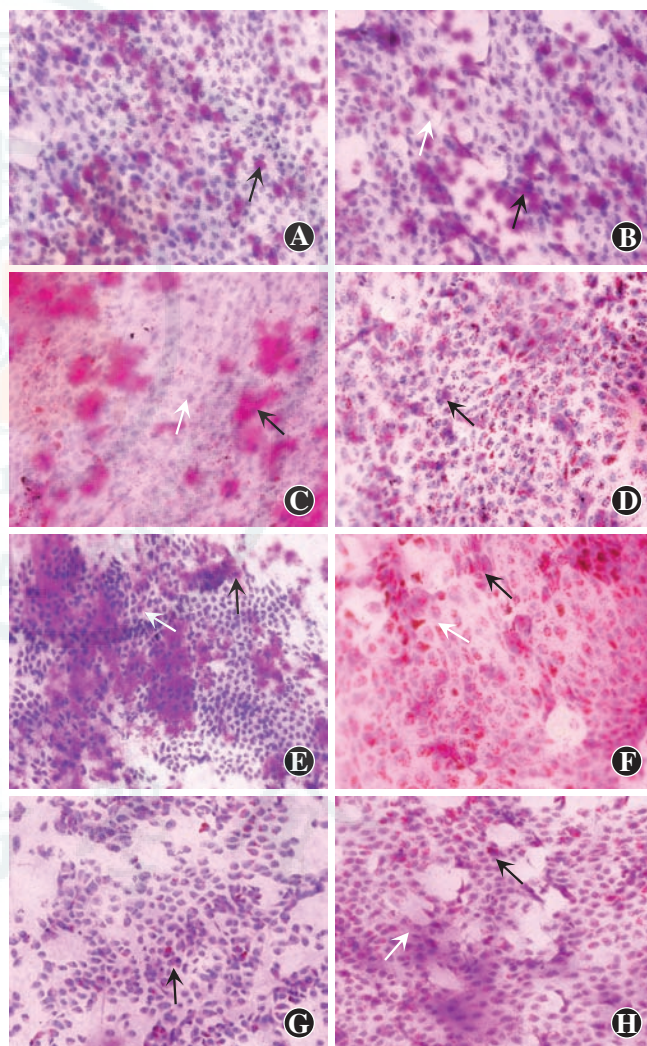


图 2 各组食蟹猴结膜印迹细胞学检查 (PAS ×400) A: 卵巢摘除组食蟹猴术前结膜上皮细胞正常 (白箭头), 结膜杯状细胞数量多 (黑箭头) B: 卵巢摘除组食蟹猴术后 1 个月结膜上皮细胞体积较大 (白箭头), 结膜杯状细胞数量较多 (黑箭头) C: 卵巢摘除组食蟹猴术后 3 个月结膜上皮细胞体积变大 (白箭头), 结膜杯状细胞体积缩小 (黑箭头) D: 卵巢摘除组食蟹猴术后 6 个月结膜上皮细胞不易分辨 (白箭头), 结膜杯状细胞数量减少 (黑箭头) E: 假手术组食蟹猴术前结膜上皮细胞正常 (白箭头), 杯状细胞数量较多 (黑箭头) F: 假手术组食蟹猴术后 1 个月结膜上皮细胞易于分辨 (白箭头), 杯状细胞数量多 (黑箭头) G: 假手术组食蟹猴术后 3 个月结膜上皮细胞形态清晰 (白箭头), 杯状细胞数量多 (黑箭头) H: 假手术组食蟹猴术后 6 个月结膜上皮细胞形态正常 (白箭头), 杯状细胞数量多 (黑箭头)

3 讨论

干眼发病机制复杂,现阶段研究主要包括炎症因子的介导、细胞凋亡、神经调节异常及体内性激素水平等因素的影响。绝经期女性体内性激素水平的改变是引起干眼的重要因素之一。Baudouin^[8]报道了促黄体激素、促卵泡激素、催乳素、促甲状腺腺激素、雌激素及孕激素对泪膜稳定的影响,发现这些激素控制着泪腺的代谢功能,能引起泪液分泌量的变化。研究发现,多种眼组织中均有性激素受体的存在,如泪腺、睑板、睑球结膜、角膜、虹膜、睫状体、晶状体和视网膜^[9]。Sullivan 等^[10]研究认为,雄激素缺乏是引起干燥综合征女性蒸发过强型干眼的重要因素,研究还发现雄激素可调节睑板腺的分泌,从而参与泪膜稳定性的维持^[11]。Versura 等^[3]报道绝经期女性卵巢出现萎缩及功能退化,体内的性激素水平呈明显下降趋势,与干眼发病明显相关。研究证明,去卵巢大鼠在术后 2 周即可出现子宫萎缩和血清性激素水平的下降^[12]。本研究中卵巢摘除组食蟹猴术后相对于假手术组性激素下降并不明显,可能与去卵巢猴体内肾上腺皮质的代偿分泌有关。绝经期女性体内性激素的变化是由卵泡消失所致的雌激素分泌减少,睾酮分泌主要由肾上腺皮质分泌,少部分来自卵巢间质^[13],说明去卵巢食蟹猴早期体内内分泌改变与人类女性绝经期体内激素早期改变相符,而雄激素水平的下降需要更长时间才能出现。

猴眼部生理构造与人类相似,所以猴干眼动物模型的判定标准与人类干眼诊断标准一致,判定指标主要包括泪液分泌量、泪膜破裂时间及角膜荧光素染色等眼表特异性改变的指标,本实验中由于食蟹猴处于麻醉状态,泪膜破裂时间的观察存在人为影响因素,所以未观察比较。此外,由于泪液渗透压及结膜印迹细胞学检查的临床特异性表现,能够作为比较客观的辅助诊断标准,所以本研究将这两项指标纳入其中。

2007 年国际干眼工作组的研究认定,泪液渗透压升高可作为干眼的辅助诊断依据。泪液渗透压升高与泪液中钠离子滞留有关,其影响因素包括泪液中水液生成减少、蒸发过强、涂布不均匀或清除延缓等^[14]。泪液渗透压的升高导致眼表组织细胞脱水及其形态学改变,还可激活信号转导通路,引起炎症反应和细胞凋亡,加重干眼症状^[15-16]。Suzuki 等^[17]研究发现,泪液渗透压与 S I t、泪膜破裂时间、角膜荧光素染色及结膜丽丝氨绿染色均有相关性,其中泪液渗透压与 S I t 的相关系数最高,认为泪液渗透压可作为评定干眼严

重程度的重要依据。泪液渗透压测量值是客观的检测指标,但其检测数据受测量方法的影响^[18],其他影响其结果判断的因素还包括人种、性别、年龄、取材部位、取材量、环境(温度、湿度、污染度)、昼夜波动、瞬目、反射性泪液分泌等^[19-20]。本实验采用泪液渗透压仪 5600 检测各组食蟹猴泪液渗透压,对于单个样本采用多次测量求平均值的方法,除去环境等因素的影响,测量结果能准确反映各组术前与术后泪液渗透压的变化趋势。

干眼的临床特征决定了其早期或潜在的眼表损害首先累及结膜表层细胞。结膜印迹细胞学检查是临床上广泛采用的无创检测方法,采取睑球结膜组织相同部位的表层细胞进行固定和染色,按照显微镜下观察的结膜上皮细胞大小、数量、形态、核质比及结膜杯状细胞的形态、染色程度的观察进行分级,从而直接评估眼表结膜组织的变性及损伤情况^[21],能直接、客观地反映干眼病理损伤程度,对于干眼的临床诊断及分级具有重要意义。本实验中卵巢摘除组食蟹猴术后 3 个月可观察到结膜上皮细胞的核质比变大,杯状细胞数量减少且细胞缩小,术后 6 个月结膜上皮细胞核质比进一步变大,细胞呈多核状,杯状细胞数量较少,说明食蟹猴去卵巢后出现结膜上皮细胞鳞状化改变,符合干眼结膜损伤的病理变化。

本研究中发现,卵巢摘除组与假手术组食蟹猴术后角膜荧光染色结果无明显差异,卵巢摘除组食蟹猴术后 1 个月与 3 个月 S I t 检测值差异有统计学意义。曾有报道称,在模拟干燥综合征大鼠干眼动物模型中,虽观察到了 CD4⁺T 淋巴细胞浸润增加所致的泪腺炎症表现,但未见相关干眼眼表体征的变化^[22],因此考虑本研究中去卵巢食蟹猴未出现眼表特异性改变的主要原因主要如下:(1)研究对象的种属差异,食蟹猴泪液分泌较人类发达,其副泪腺的分泌能够达到足够的代偿作用。(2)本研究中虽观察到去卵巢食蟹猴结膜上皮的鳞状化改变,但尚未达到中重度干眼的程度(3)绝经期女性体内性激素变化是长期、复杂的免疫反应过程,本研究中观察的时间长度有限,去卵巢猴内分泌紊乱与睑板腺功能障碍及相关炎症因子表达间的相互关系仍需进一步研究。(4)本研究的实验动物样本量小,统计学结果不能代替临床意义,实验结果仅供参考。

本研究中食蟹猴均由苏州昭衍新药研究中心提供,昭衍新药研究中心是有国际认证的新药研发机构,其动物的选用和饲养、实验的进行、动物福利的保障均依照严格的执行标准。本实验中食蟹猴手术及麻醉后

由专人进行护理,术后每日观察食蟹猴全身情况,伤口皮肤换药,术后 7 d 拆除皮肤缝线。临床上类似的研究多以鼠、狗、兔为主,存在种属差异。使用食蟹猴作为研究对象能更好地观察女性绝经期体内性激素及眼表体征的特异性变化,在实验中便于取样和分析,后期还可进行相应的临床药物治疗绝经期干眼的研究。本研究发现去卵巢食蟹猴可作为绝经期女性干眼研究的动物模型,可用于绝经期女性眼表变化及其病理机制的研究。

参考文献

- [1] Sullivan DA, Jensen RV, Suzuki T, et al. Do sex steroids exert sex-specific and/or opposite effects on gene expression in lacrimal and meibomian glands? [J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 1553-1572.
- [2] Sullivan DA, Hammit KM, Schaumberg DA, et al. Report of the TFOS/ARVO Symposium on global treatments for dry eye disease: an unmet need [J]. *Ocul Surf*, 2012, 10(2): 108-116. DOI: 10.1016/j.jtos.2012.02.001.
- [3] Versura P, Campos EC. Menopause and dry eye. A possible relationship [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2005, 20(5): 289-298.
- [4] Ozcura F, DüNDAR SO, Cetin ED, et al. Effects of estrogen replacement therapy on apoptosis and vascular endothelial growth factor expression in ocular surface epithelial cells: an experimental study [J]. *Int J Ophthalmol*, 2012, 5(1): 64-68. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.01.13.
- [5] 钟蕾, 张晓峰, 夏静, 等. 去卵巢大鼠结膜组织中炎症因子的表达变化及干眼相关检查的评估 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(9): 807-812. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.008. Zhong L, Zhang XF, Xia J, et al. Expression of inflammatory factors in conjunctiva and assessment of dry-eye associated examination in ovariectomized rat [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2014, 32(9): 807-812. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.008.
- [6] Schrader S, Mircheff AK, Geerling G. Animal models of dry eye [J]. *Dev Ophthalmol*, 2008, 41: 298-312. DOI: 10.1159/000131097.
- [7] Park CY, Zhuang W, Lekhanont K, et al. Lacrimal gland inflammatory cytokine gene expression in the botulinum toxin B-induced murine dry eye model [J]. *Mol Vis*, 2007, 13: 2222-2232.
- [8] Baudouin C. The pathology of dry eye [J]. *Surv Ophthalmol*, 2001, 45 Suppl 2: S211-220.
- [9] Gupta PD, Johar K, Nagpal K, et al. Sex hormone receptors in the human eye [J]. *Surv Ophthalmol*, 2005, 50(3): 274-284. DOI: 10.1016/j.survophthal.2005.02.005.
- [10] Sullivan DA, Bélanger A, Cermak JM, et al. Are women with Sjögren's syndrome androgen-deficient? [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30(11): 2413-2419.
- [11] Sullivan BD, Evans JE, Dana MR, et al. Impact of androgen deficiency on the lipid profiles in human meibomian gland secretions [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 506(Pt A): 449-458.
- [12] Zaid SS, Sulaiman SA, Sirajudeen KN, et al. The effects of Tualang honey on female reproductive organs, tibia bone and hormonal profile in ovariectomized rats - animal model for menopause [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2010, 10: 82 [2016-10-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022897/>. DOI: 10.1186/1472-6882-10-82.
- [13] Labrie F, Diamond P, Cusan L, et al. Effect of 12-month dehydroepiandrosterone replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(10): 3498-3505. DOI: 10.1210/jcem.82.10.4306.
- [14] The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007) [J]. *Ocul Surf*, 2007, 5(2): 75-92.
- [15] Chen Z, Tong L, Li Z, et al. Hyperosmolarity-induced cornification of human corneal epithelial cells is regulated by JNK MAPK [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(2): 539-549. DOI: 10.1167/iov.07-0569.
- [16] Chen M, Hu DN, Pan Z, et al. Curcumin protects against hyperosmoticity-induced IL-1beta elevation in human corneal epithelial cell via MAPK pathways [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 90(3): 437-443. DOI: 10.1016/j.exer.2009.12.004.
- [17] Suzuki M, Massingale ML, Ye F, et al. Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(9): 4557-4561. DOI: 10.1167/iov.09-4596.
- [18] White KM, Benjamin WJ, Hm RM. Human basic tear fluid osmolality: I. importance of sample collection strategy [J]. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 1993, 71: 524-529.
- [19] Lee YB, Koh JW, Hyon JY, et al. Sleep deprivation reduces tear secretion and impairs the tear film [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(6): 3525-3531. DOI: 10.1167/iov.14-13881.
- [20] Niimi J, Tan B, Chang J, et al. Diurnal pattern of tear osmolarity and its relationship to corneal thickness and deswelling [J]. *Cornea*, 2013, 32(10): 1305-1310. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31829b21d1.
- [21] Doughty MJ. Objective assessment of conjunctival squamous metaplasia by measures of cell and nucleus dimensions [J]. *Diagn Cytopathol*, 2011, 39(6): 409-423. DOI: 10.1002/dc.21404.
- [22] Haneji N, Hamano H, Yanagi K, et al. A new animal model for primary Sjögren's syndrome in NFS/sld mutant mice [J]. *J Immunol*, 1994, 153: 2769-2777.

(收稿日期: 2017-03-15 修回日期: 2017-11-27)

(本文编辑: 尹卫靖)

读者 · 作者 · 编者

本刊对来稿中作者署名的著录要求

作者向本刊投稿时署名应符合以下条件: (1) 参与课题的选题和实验设计, 参与实验资料的收集、分析和论证。 (2) 参与论文的起草或能够对论文中的方法学或关键部分进行修改。 (3) 能对审稿专家和编辑提出的修改意见进行核修, 能够答辩并承担责任。仅参与筹得资金或收集资料者以及仅对科研小组进行一般管理者均不宜署名为作者。文中如有外籍作者, 应附外籍作者亲笔签名在本刊发表的同意函。集体署名的文章应于题名下列出署名单位, 于文末列出论文整理者的姓名, 并须明确该文的主要责任者。

作者署名的名次应按对论文贡献大小顺序排列于文题下方, 每篇论文须列出通信作者 1 名。如无特殊约定, 则视第一作者为通信作者。作者 (包括通信作者) 的署名及其排序应在投稿前由所有研究者共同讨论确定, 在编排过程中不宜变更或增减, 尤其是通信作者和前三名作者, 若确需变动者须提供所有署名作者的签名同意函并出示单位证明。有英文文题的论著和综述应有全部作者姓名的汉语拼音, 列于英文文题之下。

(本刊编辑部)