

## 干眼动物模型与干眼药物研发

王未琢 综述 陈苗 Lingyun Cheng 审校

325027 温州医科大学眼科药物研究所(王未琢、陈苗、程凌云);加州大学圣地亚哥分校医学院, Shiley 眼科研究所, 加利福尼亚 92093, 美国(程凌云)

通信作者:程凌云, Email: lingyunc@hotmail.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.12.012

**【摘要】** 干眼是目前常见的慢性眼表疾病,主要表现为眼表的慢性炎症并严重威胁视力。尽管干眼发病普遍,但特效的治疗药物却很少。这与干眼的多样性和相应动物干眼模型的匮乏有关。在药物开发过程中,临床前期的动物模型是评估在研药物安全性和治疗效果的重要环节。目前干眼研究中常见的造模方法有手术摘除泪腺、全身或局部药物诱导、人为介导自身免疫反应及基因工程介导的干眼,本文就近年来用于药物研发的干眼动物模型及其特点进行综述,为开发新的治疗药物提供参考。

**【关键词】** 干眼; 动物模型; 药物筛选; 药物试验; 疗效评估

**基金项目:** 温州市重大科技专项项目(ZS2017015)

**Dry eye animal models and dry eye drug development** Wang Weizhuo, Chen Miao, Lingyun Cheng

*Institute of Pharmacology, Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China (Wang WZ, Chen M, Cheng LY); Shiley Eye Institute, School of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA (Cheng LY)*

*Corresponding author: Lingyun Cheng, Email: lingyunc@hotmail.com*

**【Abstract】** Dry eye is the most common eye illness which manifests as a chronic inflammation on ocular surface and imposes significant threat to vision. Though dry eye is high prevalent, specific medication to treat this refractory disorder is very limited. The paucity of new drugs available can be attributed to wide range of severity distribution as well as lack of appropriate animal model. Animal disease model plays a significant role in preclinical drug screening and testing prior to clinical trial. Various techniques have been explored to create dry eye models for drug testing, including surgical removal of lacrimal gland, systemic or local drug induction, autoimmune eliciting, and genetic manipulation. This article reviewed the important dry eye models and their roles in development of dry eye drugs to provide insight and inspiration for clinicians and researchers.

**【Key words】** Dry eye; Animal models; Drug screening; Drug testing; Efficacy evaluation

**Fund program:** Wenzhou Major Scientific and Technological Special Project (ZS2017015)

干眼是由多种因素导致泪膜稳定性下降、泪液渗透压升高和眼表炎症的自身免疫性眼病,慢性干眼可导致视觉障碍和眼表组织损害<sup>[1]</sup>。近年的流行病学调查发现,随着人们工作环境和生活习惯的改变,干眼的患病率逐年升高,全球各年龄段人群的发病率为5%~35%<sup>[2]</sup>。在中国,干眼患病人群数量逐年增加,并呈现低龄化趋势<sup>[3]</sup>,如Li等<sup>[4]</sup>的研究显示,6 657名20岁以上的中国人群中,有9.54%的受试者出现症状性干眼,7.99%的受试者在临床上被诊断为干眼。Galor等<sup>[5]</sup>报道在50岁以上的美国人中,有34%的人群患有中重度干眼。干眼不仅对人群的身心健康、工作生活有负面影响,对社会生产经济的发展也有不利影响。多年来治疗干眼的手段主要为补充泪液和抑制炎症。补充泪液对轻度干眼有较好的疗效,但中度和重

度干眼均需要药物治疗,主要包括免疫抑制剂和糖皮质激素滴眼液<sup>[6]</sup>。近年来,新的干眼诊断方法不断成熟,比如泪液渗透压测试、泪液中炎性因子的定量检测以及睑板腺造影。相比之下,新药的开发却相对缓慢,其中一个原因是缺乏稳定的干眼动物模型对药物进行筛选。本文就近年来用于药物研发的干眼动物模型及其特点进行综述。

### 1 干眼的药物治疗

Behrens等<sup>[7]</sup>和Craig等<sup>[8]</sup>基于干眼严重程度的分级提出治疗建议:干眼1级多采用物理治疗、人工泪液;2级开始局部使用环孢素A(ciclosporin A, CsA)、糖皮质激素,药物剂型除常用的水剂外,还有凝胶和油膏;3级多使用四环素、泪点栓塞等

方法;4 级则推荐使用全身抗炎以及免疫抑制剂治疗。滴眼液是中国干眼治疗药物的常用剂型,由于其使用方便、价格相对较低而被多数患者接受。然而,滴眼液的生物利用度较低、药物作用时间短,需多次给药,且夜间给药不便,这使得药物浓度的峰谷现象突出,引起明显的炎症波动,发生个体化耐药。另外,患者对滴眼液的依从性很差,特别是年龄大的患者。虽然眼膏可延长药物在结膜囊内的作用时间,但其所含的基质成分透明度较低,折光率与屈光介质差异较大,容易造成视物模糊<sup>[9]</sup>。近年来,眼部新剂型药物的开发成为干眼治疗的研究热点,新剂型主要包括水凝胶和微粒系统。凝胶在眼部的滞留时间较长,流变性较好,具有良好的生物相容性和高度的生物黏膜黏附性能,但是其分布不均匀,影响视物清晰度,也不能根本改变频繁给药模式。微粒系统应用于眼部给药的研究报道较多,比如眼用脂质体能增加药物的角膜通透性以及靶向作用,能解决部分难溶性药物的给药问题,但是脂质体的热力学性质不稳定,难以高温灭菌<sup>[10]</sup>;另外,微粒系统的药物颗粒大小难以控制,且长期稳定性较差<sup>[11-12]</sup>。局部长效缓释的微创式植入微型药膜制剂可能有良好的前景,比如结膜下植入微型药膜不会引起异物感,药物可缓慢释放,且缓释时间长短也可在制作工艺中个性化调整,生物材料载体可自行降解,不影响视力。目前,这方面的研究还处于起步阶段,相关报道很少。

## 2 干眼动物模型的特点及应用

干眼动物模型可分为泪液分泌不足型、泪液蒸发过强型以及混合型。建立泪液分泌不足型干眼动物模型的常用方法有手术摘除泪腺、使用副交感神经抑制药物、摘除性腺或者实验造成泪腺的炎症等方法改变泪腺的神经调控信息。泪液蒸发过强型动物模型可通过睑板腺烧灼改变泪膜的脂质构成,或者眼部使用低浓度防腐剂引起眼表炎症和破坏泪膜稳定性。此外,基因工程和局部干燥环境精准控制也用于建立干眼动物模型。尽管干眼动物模型模拟患者干眼的某些病理特征,但没有一种动物模型可准确重现人类干眼的全部症状和体征,特别是病理变化的多样性和疾病的慢性进展性特征。所以,准确认识每种动物模型的特征和应用范围是干眼研究和药物开发中非常重要的环节。

### 2.1 手术干预干眼模型

**2.1.1 摘除泪腺** 泪腺是分泌泪液的主要腺体,手术摘除泪腺可导致基础泪液分泌减少,也可在基础泪液分泌试验(Schirmer I test, S I t)中体现其作用。然而,通过手术将犬、猫、兔及鼠的主泪腺摘除后并不能引起明显的眼表干眼症状和体征,这可能与泪腺不能干净摘除和泪液的代偿性产生有关。由于兔性情温顺,眼球大小接近人类,所以干眼模型多以兔为研究对象。Gilbard 等<sup>[13]</sup>通过术中烧灼结扎兔泪腺的外分泌管,同时摘除哈德腺和第三眼睑,建立了干眼模型,术后角膜表面泪液渗透压增加,术后 2 周结膜杯状细胞密度降低。该研究团队随后使用该模型对早期开发的人工泪液进行了疗效评估<sup>[14]</sup>。Chen 等<sup>[15]</sup>和 Li 等<sup>[16]</sup>在上述手术去除分泌腺体的基础上加用了三氯乙酸灼伤球结膜,但灼伤球结膜程度难以标准

化,也与自然发生的干眼病理不同。除了兔外,鼠也因其成本和维持费用相对较低成为干眼研究的常用动物。Fujihara 等<sup>[17]</sup>将大鼠双侧眼眶外泪腺手术去除后模型表现出眼球表面泪液减少,结膜杯状细胞减少,角膜上皮之间的屏障功能损害,与兔的干眼模型类似。手术去除分泌腺体的方法可造成轻中度干眼的一些主要表现,该手术需要完全去除泪腺和哈德腺,完全去除腺体的难度较大,结果变异也较大;但病程的维持时间较长,可达 8 周以上。由于疾病程度轻,该模型适合用来评估各种人工泪液以及促进杯状细胞分泌的滴眼剂<sup>[14,18]</sup>。

**2.1.2 神经阻滞术** 三叉神经眼支属于感觉神经,接受来自泪腺的感觉,去除三叉神经分支可以间接控制泪腺分泌,导致角膜上皮病理变化、泪膜的稳定性下降以及泪液分泌减少。该手术精细且复杂,一般采用兔作为模型。Toshida 等<sup>[19]</sup>采用该方法切除兔的 5 mm 岩大浅神经进行造模,该模型可持续 7 d;术后第 1 天, S I t 检查提示模型兔泪液分泌减少,虎红染色阳性,病理检查显示结膜杯状细胞减少。Giulio 等<sup>[20]</sup>定向电解破坏小鼠三叉神经眼支后,出现瞬目减少,角膜退化、变薄;术后 7 d,所有小鼠角膜层细胞凋亡增加,基底上皮细胞增生减少。但使用该模型测试药物治疗的研究尚未见报道,可能与该手术方法操作难度大、不可控因素过多以及模型变异较大有关。

准分子激光辅助角膜原位磨镶术(laser-assisted in situ keratomileusis, LASIK)制作角膜瓣时也会损伤角膜神经,术后角膜感觉减退,瞬目减少,也会导致干眼症状<sup>[21-22]</sup>。另外,变态反应性鼻炎的治疗方法之一是切断翼管神经,该神经不仅支配鼻腔、鼻窦血管,还支配泪腺,故会使泪腺分泌减少,术后常会发生干眼。这些干眼与泪腺或角膜的神经支配有关,均可视为轻度干眼,临床上会在半年内恢复,也可作为动物模型的制作提供参考。

**2.1.3 去势手术** 干眼在女性中的患病率高于男性,这种性别相关的干眼患病率差异在很大程度上归因于性激素<sup>[23]</sup>,而性激素水平会对泪液分泌产生影响。随着年龄的增长,雄激素在男女人群中均可出现进行性衰减。另外,女性雄激素水平降低还与雌激素水平改变有关。围绝经期妇女卵巢萎缩,卵巢合成雌激素和雄激素减少,由于下丘脑-腺垂体-卵巢的负反馈调节作用,促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)分泌增多,因此,组织中较多的 FSH 与 FSH 受体结合后激活芳香化酶,睾酮和雄烯二酮被大量转化为雌二醇和雌酮,最终导致内源性雄激素减少。

有研究对雄性小鼠、大鼠、兔实施去势手术,使性激素分泌水平显著降低,从而导致睑板腺与泪腺上皮细胞萎缩,分泌功能受损。模型的症状出现时间与动物种类有关,多数在术后 1 周至 2 个月,维持时间可长达 3~5 个月,主要症状表现为泪液分泌量降低,泪膜破裂时间(tear break-up time, TBUT)缩短、角膜荧光素染色评分增加;另外,透射电子显微镜下可见模型的角膜上皮细胞微绒毛数量减少、变短和肿胀,细胞间桥粒连接分离;检测角膜、结膜及泪腺相关基因蛋白的表达则发现,与促进细胞凋亡有关的 bax 蛋白表达增加,抑制细胞凋亡的 bcl-2 蛋白则表达减少,炎症因子核转录因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B,



NF- $\kappa$ B) 阳性呈中重度表达<sup>[24]</sup>。高阳等<sup>[25]</sup>对雌兔进行去势手术,研究雄激素是否有稳定泪膜的作用,结果显示雄激素可以在一定程度上缓解干眼。去势手术所致干眼与年长人群的干眼临床表现较为符合<sup>[26-28]</sup>,可用于慢性重度干眼治疗药物,如免疫抑制剂的筛选及试验。

**2.1.4 睑板腺烧灼** 睑板腺开口于睑缘,能分泌油脂,具有润滑眼睑、减少泪液蒸发的功能。烧灼睑板腺开口可以关闭睑板腺,阻塞腺体口,导致中央导管和导管扩张以及导管壁上皮变薄;且分泌的脂质、黏蛋白减少,泪液中的水分蒸发增加,使泪液渗透压升高从而引起炎症<sup>[29]</sup>。Gilbard 等<sup>[30]</sup>首先采用电刀烧灼单眼上下所有睑板腺开口的方法建立干眼模型,术后 4 周裂隙灯显微镜检查显示角膜有异常虎红染色;术后第 8 周时下睑的睑板腺显著扩张并形成囊肿。该方法用来评估一种增加角膜糖原和促进杯状细胞分泌的滴眼液<sup>[14]</sup>。肖启国等<sup>[31]</sup>改进了烧灼兔睑板腺开口制作干眼模型的方法,术后第 4 周开始角结膜染色评分稳定,说明模型的干眼程度稳定;术后第 6 周开始用质量分数 0.1% 强力霉素滴眼液进行治疗;至术后第 11 周荧光素染色及虎红染色评分比干眼模型轻,结膜组织炎性细胞浸润数量明显少于干眼模型。

以上几类手术各有特点,通过手术摘除泪腺及神经阻滞引起的干眼持续时间较短,而且兔的泪腺范围较大,将泪腺摘除干净需要操作者具备丰富的经验和高超的手术技巧;另外,此类方法引起的干眼症状较轻,适用于人工泪液等基本药物的筛选,但不会引起免疫炎症及眼表组织损害,故不适合模拟人类干眼慢性病程的长期状态。去势手术可以建立以泪液分泌减少为主,免疫炎症反应共同参与的干眼模型,且病程持续时间较长,常用于药物治疗干眼的疗效观察,也较适合模拟老龄人群因激素水平变化而引起的干眼,但该手术会对动物产生较大的不可逆创伤。睑板腺烧灼造模法较为简便、实用,可进一步加以改良和应用。

## 2.2 药物干预干眼模型

**2.2.1 全身药物干预** 东莨菪碱是胆碱能受体阻滞剂,可以阻断乙酰胆碱的作用,从而起到类似神经阻滞剂的作用,抑制泪液和黏蛋白的分泌,导致干眼形成。Viau 等<sup>[32]</sup>给予雌性 Lewis 大鼠皮下植入 12.5 mg/ml 东莨菪碱渗透泵,建立干眼动物模型,所有动物在给药后 17 d 表现出单侧或双侧角膜炎,给药后第 1、7、17、24 和 28 d 在结膜上皮中均观察到 Muc5AC 免疫染色密度显著降低,肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor $\alpha$ , TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 水平均升高。楚莹莹等<sup>[33]</sup>对 Wistar 大鼠腹腔内注射氢溴酸东莨菪碱,成功建立类似的干眼模型。仇晶晶等<sup>[34]</sup>研究发现,皮下注射东莨菪碱建立的兔干眼模型至少可维持干眼症状 28 d;病程中模型出现 TBUT 缩短,角膜荧光素染色阳性;用酚红棉线法测得泪液分泌量下降 58.5%;病理结果提示结膜杯状细胞形态紊乱,核淡染,部分核固缩;苏木素-伊红染色显示其泪腺周围有散在淋巴细胞和腺腔凋亡性改变,角膜上皮呈重度瘤样增生,基质层变性伴水肿;该方法较为简便,成模时间为 7~14 d。该研究团队还用该干眼兔模型研究 FK506 的作用特点,结果显示模型

在第 7 天角膜荧光素染色呈强阳性,于第 14 天开始使用 FK506 治疗后角结膜上皮 NF- $\kappa$ B 表达显著低于非治疗对照眼,不同时间点 FK506 治疗眼结膜组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9 的表达显著低于非治疗对照眼,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )<sup>[34]</sup>。Wan 等<sup>[35]</sup>用东莨菪碱制作 C57BL/6 小鼠干眼模型,CsA 治疗后 12 d, S I t 检查显示给药组的泪液浸润试纸长度比干眼非治疗对照明显延长,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),TBUT 也较非治疗对照组显著改善,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。给药组的结膜杯状细胞数目为  $50.8 \pm 2.8$ ,明显多于干眼非治疗对照组的  $27.3 \pm 2.3$  和空白对照组的  $25.0 \pm 1.8$ ,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。给药组的凋亡相关基因蛋白 caspase-3、Bax、bcl-2 的表达明显下降。Daull 等<sup>[36]</sup>将 C57BL/6 小鼠置于湿度低于 25% 的 20 °C 环境,将东莨菪碱皮贴片贴于小鼠尾部后 3 d,酚红棉线法显示泪液分泌量少于 5 mm,角膜荧光素染色评分高于 5 分,提示造模成功;应用该模型比较 CsA 阳离子乳化剂、质量分数 1% 甲基泼尼松治疗干眼的疗效发现,与对照组相比,治疗组在造模后第 3 天泪液分泌量开始恢复至基线值,且 CsA 阳离子乳化剂的疗效更好。

**2.2.2 局部药物干预** 局部给药可以较快地诱导形成干眼模型,但模型维持稳定状态的时间长短不一,与局部诱导用药的时间有关。阿托品是抗胆碱能药物,局部使用可以减少泪液分泌。Mader 等<sup>[37]</sup>使用质量分数 1% 硫酸阿托品给兔点眼,用药第 2 天角膜表面出现干斑,泪液分泌减少,干眼症状可持续 7 d。该模型主要用于泪液替代物的初步筛选<sup>[38-39]</sup>。苯扎氯胺是一种防腐剂,在不少滴眼液中均有添加。质量分数 0.1%~0.2% 的苯扎氯胺会减少泪液黏蛋白分泌,损伤角膜,引起干眼。Lin 等<sup>[40]</sup>使用 0.2% 苯扎氯胺破坏泪膜稳定性,成功建立蒸发过强型干眼模型;该鼠模型在用药第 4 天出现角膜荧光素染色和虎红染色阳性、泪液分泌量明显减少的体征;病理切片提示角膜、泪腺出现炎性细胞浸润,结膜杯状细胞密度降低,电子显微镜下可观察到角膜上皮细胞微绒毛的大小和间隔均减少;免疫组织化学染色显示穹窿部结膜中 MUC5AC 阳性细胞较少;TUNEL 检测提示角膜基底上皮细胞凋亡明显增加,TNF- $\alpha$  表达升高,K10 表达阳性。Xiong 等<sup>[41]</sup>连续 14 d 使用 0.1% 苯扎氯胺给兔点眼,第 3 天出现虎红染色阳性,随后出现泪液分泌不足等症状,第 14 天出现类似上述结果。Kwon 等<sup>[42]</sup>用苯扎氯胺给兔点眼,发现眼表组织中 TNF- $\alpha$ 、caspase-3 和 PARP 阳性的细胞数明显增多。目前,使用苯扎氯胺制作干眼模型的方法较为普遍,Xiao 等<sup>[43]</sup>用该方法建立鼠干眼模型后,局部使用表皮生长因子治疗干眼,6 d 后收集眼球标本发现,给药组的 p-ERK 上调,Ki-67 阳性细胞增加,杯状细胞数量也增加。该干眼模型被用于观察普拉洛芬、维生素 A 对干眼的治疗效果。

刀豆蛋白具有较强的促有丝分裂、刺激淋巴细胞转化的作用,可以引起免疫炎症反应。近年来,研究发现在兔双侧泪腺直接注射刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) 可导致干眼。在 Con A 注射后第 3 天, TBUT 从 50~60 s 降至 5 s, Schirmer 试纸显示泪液分泌量减少约 50%, 泪腺病理切片显示 Con A 注射组大

量淋巴细胞浸润,多灶性坏死和纤维组织增生。在泪腺和角膜中检测到 IL-1 $\beta$  升高 48%, IL-8 升高 92%, TGF- $\beta$ 1 升高 54%; 地塞米松预处理可抑制 Con A 导致的 TBUT 降低,具有预防及治疗干眼的功效<sup>[44]</sup>,但该干眼模型只能维持约 10 d。有研究者在超声引导下每周向泪腺、睑部上泪腺、眶部上泪腺注射 Con A,连续注射 3 周,可以将干眼症状延长至 3 周以上;如果在注射 Con A 当天开始每日用磷酸舒林酸局部点眼 3 次,连续点眼 21 d,可改善 TBUT、泪液渗透压和泪液中乳铁蛋白水平。多项研究显示,将辐射暴露后的兔泪腺细胞与自体淋巴细胞共培养 5 d,再将共培养细胞混合液注射到泪腺可建立自身免疫性泪囊炎模型,培养后 2 周取出该腺体发现,兔 CD18、胸腺淋巴细胞抗原表达量增加,淋巴细胞浸润灶达 50 个/4 mm<sup>2</sup>,与 Sjögren 综合症的泪腺病理表现相似<sup>[45-48]</sup>。近年来,从兔血中分离出外周血淋巴细胞与经射线照射的泪腺上皮细胞共培养,活化后注入耳缘静脉,可建立接近于 Sjögren 综合症表现的模型<sup>[49]</sup>; Mircheff 等<sup>[50]</sup>将外周血淋巴细胞与体外成熟的负载腺泡细胞微粒的树突细胞共培养后,激活外周血淋巴细胞,将其直接注射到兔的单侧泪腺也可诱导出类似模型。Lin 等<sup>[51]</sup>用这类干眼模型评估结膜下注射地塞米松缓释制剂(聚酰胺胺树枝状聚合物-地塞米松),病理检测显示腺体中炎症细胞浸润较少,萎缩性腺泡较少;免疫组织化学染色显示 CD-18 和 RTLA 阳性程度减弱;MMP-9、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的基因表达水平降低。另外,N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)也被局部使用来诱导干眼模型。NAC 是一种黏液溶解剂和还原剂,能够减少各组织的黏液分泌。Li 等<sup>[52]</sup>对雄性 Sprague-Dawley 大鼠连续局部应用质量分数 10% NAC,每天 4 次,以建立 NAC 诱导的模型,模型鼠泪液分泌量、角膜润湿能力、泪液 MUC5AC 浓度和结膜杯状细胞数量显著降低,并应用此模型对地氟酚钠(一种黏蛋白促分泌剂)进行了干眼治疗的评估。

局部给药建立干眼模型方法相对简便。因为兔眼的解剖、生理功能及代谢与人类相似度较高,自然病程也与人类相似性较大,且眼球较大,易于操作、检测和获取样本,加之动物来源广泛,经济实惠,易饲养管理,较适合做为干眼模型进行干眼药物开发的研究。此外,局部给药对动物眼部以外的干扰较小,导致干眼的原因比较明确,筛选药物时更有针对性。然而局部诱导性药物停止使用后,难以维持模型的干眼症状。今后的研究可进一步研究这些模型的结膜和角膜是否可在一段时间后(洗脱期)基本修复,以及重新局部施用诱导药物是否可将干眼重新复制并反复使用。如果模型可在同一个动物上反复使用,就可使用交叉实验设计进行药物的筛选和评估,同时减少动物使用量和减轻动物之间个体差异的影响。

### 2.3 转基因干眼模型

经转基因培育出的 MRL/lpr、NOD、NFS/sld、IQL/jic、NZB/W F1、Aly 等小鼠也可表现干眼症状,并用作干眼模型。例如, NOD B10-H2<sup>b</sup> 小鼠的 Sjögren 综合症主要体现为 B 淋巴细胞的异常活跃,产生过多自身抗体。通过基因突变技术得到的 NFS/sld 突变小鼠,携带抑制舌下腺分化的常染色体隐性基因,影响腺体中的腺泡细胞分泌黏液,并引起唾液腺损伤;若在其

出生 3 周后摘除胸腺,可出现原发性 Sjögren 综合症的症状和体征<sup>[53]</sup>。用 IQL/jic 小鼠建立的 Sjögren 综合症则是以唾液腺和泪腺中有明显的淋巴细胞浸润为特征<sup>[54]</sup>。Id3 基因在淋巴细胞的发育和功能中起重要作用,通过基因工程敲除 Id3 基因,免疫细胞的增生及分化出现调节异常,影响 T 淋巴细胞的分化,表现出多种缺陷,出现原发性 Sjögren 综合症样症状<sup>[55]</sup>。

以上这些改变基因模型共同表现出泪液分泌减少、CD4<sup>+</sup>T 细胞浸润增加,而泪腺损伤的严重程度及病程则与鼠龄、性别相关,眼表的病理变化也变异较大<sup>[56-57]</sup>。Xu 等<sup>[58]</sup>用雌性 NOD/Ltj 小鼠干眼模型,以雄性 BALB/c 小鼠和 C57BL/6-gfp 转基因小鼠作为同种异体间充质干细胞的供体,以干细胞移植方法治疗 NOD/Ltj 小鼠干眼,结果显示治疗组的下颌下腺的炎症反应减轻,唾液流速改善,同种异体间充质干细胞的治疗可有效抑制炎症并恢复 Sjögren 综合症模型小鼠唾液腺的分泌功能。

转基因的小鼠品种多样,常用于研究自身免疫性疾病,制作原发性或继发性 Sjögren 综合症泪液缺乏型干眼动物模型。然而使用小鼠模拟人类 Sjögren 综合症发生时,Sjögren 综合症小鼠仅表现出单一或部分 Sjögren 综合症的征,不能完全模拟出干眼。故在选用小鼠干眼模型测试药物时,需参考各品系小鼠的遗传背景及各自特点。

### 2.4 自发免疫性干眼和实验免疫性干眼

Williams 等<sup>[59]</sup>报道,460 只犬中有 35% 的犬患有自发性干眼,TUNEL 检测提示泪腺和结膜上皮细胞的凋亡增加。此模型已被兽医和临床研究人员广泛用于开发有效的干眼治疗药物。但是值得注意的是,犬的干眼症状较人更为严重,通常表现为结膜充血性肥厚,分泌物呈黏液细丝状,角膜新生血管化、黑色素沉着以及复发性溃疡。

犬眼球大,利于操作,可直接进行荧光素钠染色、虎红染色等检查,除此之外,犬眼泪腺中存在自身免疫性炎症反应,本身即存在一定程度的干眼,与 Sjögren 综合症具有诸多相似之处,因此更适用于抗自身免疫性药物的筛选。Kim 等<sup>[60]</sup>将 CsA 高分子材料药膜(CsA 含量为 20% ~ 30%,约为 2.5 mg)植入犬的结膜下,在第 1、3 和 6 个月时,泪腺中 CsA 质量浓度分别为(0.082 $\pm$ 0.098)、(0.025 $\pm$ 0.005)和(0.034 $\pm$ 0.006)  $\mu$ g/mg,6 个月后,S I t 均 $>$ 10 mm/min,治疗眼均未出现干眼症状复发。犬的体型较大,饲养困难且价格昂贵,所以在干眼药物的开发和研制中常作为临床前研究的后段实验动物模型。

## 3 展望

干眼的发病机制主要涉及免疫病理和炎症病理,干眼治疗需要同时针对免疫抑制和炎症控制,所以药物联合治疗是比较理想的治疗方案。联合用药可降低每种药物使用的浓度,从而减少药物不良反应,且药物之间的协同作用,可以形成一种新的治疗模式。不同药物剂型的开发过程需要使用不同类型的动物模型对产品进行临床前评价,比如,试验结膜下植入联合药物缓释药膜需要比评价滴眼液更稳定和持续的动物模型。目前,有相当数量的干眼与睑板腺功能缺陷有关,但基于睑板腺功能障碍的干眼模型较少,且尚不成熟,仍有待进一步研究开发。



一个新的产品需要在不同的模型上表征其治疗作用。首先,干眼造模方式的选择对药物筛选有很大影响,不同造模方式引起的干眼病程和严重程度迥异;其次,动物的眼部特征与人眼的相似程度也是关键。另外,造模途径和手段(手术、全身给药或局部给药)不仅与所评估的药物有关,与实验设计也密切相关;如果随着时间推移动物模型病情的稳定性发生改变,则必须设置随时间变化的观察标准和数据统计方法。因此,建立一种可重复性好、慢性、病情可调控的干眼动物模型对干眼治疗药物的开发和评估十分重要,这样的模型可用来表征和优化结膜下无创植入的缓释药膜,确定药膜的药代动力学和药效学,为干眼的治疗带来新的思路。

## 参考文献

- [1] Nelson JD, Craig JP, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II Introduction [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 269-275. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.05.005.
- [2] Stapleton F, Alves M, Bunya VY, et al. TFOS DEWS II epidemiology report [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 334-365. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.05.003.
- [3] 张正, 李银花, 丁亚丽, 等. 干眼症的发病机制及治疗现状[J]. *中华眼科医学杂志: 电子版*, 2014, 4(2): 106-108. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2014.02.013.  
Zhang Z, Li YH, Ding YL, et al. New progress in the pathogenesis and treatment of dry eyes [J]. *Chin J Ophthalmol Med (Electronic Edition)*, 2014, 4(2): 106-108. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2007.2014.02.013.
- [4] Li J, Zheng K, Deng Z, et al. Prevalence and risk factors of dry eye disease among a hospital-based population in southeast China [J]. *Eye Contact Lens*, 2015, 41(1): 44-50. DOI: 10.1097/ICL.0000000000000064.
- [5] Galor A, Feuer W, Lee DJ, et al. Prevalence and risk factors of dry eye syndrome in a United States veterans affairs population [J]. *Am J Ophthalmol*, 2011, 152(3): 377-384. DOI: 10.1016/j.ajo.2011.02.026.
- [6] Jones L, Downie LE, Korb D, et al. TFOS DEWS II management and therapy report [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 575-628. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.05.006.
- [7] Behrens A, Doyle JJ, Stern L, et al. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations [J]. *Cornea*, 2006, 25(8): 900-907. DOI: 10.1097/01.icc.0000214802.40313.fa.
- [8] Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, et al. TFOS DEWS II definition and classification report [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 276-283. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.05.008.
- [9] 刘祖国, 彭娟. 干眼的诊断与治疗规范 [J]. *眼科研究*, 2008, 26(3): 161-164.  
Liu ZG, Peng J. Normalization of diagnosis and management of dry eye [J]. *Chin Ophthalm Res*, 2008, 26(3): 161-164.
- [10] 吕慧侠, 周建平. 眼部给药系统的研究进展 [J]. *药学进展*, 2004, 28(3): 104-108.  
Lyu HX, Zhou JP. Progress and problems in ophthalmic drug delivery systems [J]. *Prog Pharma Sci*, 2004, 28(3): 104-108.
- [11] Gaudana R, Ananthula HK, Parenky A, et al. Ocular drug delivery [J]. *AAPS J*, 2010, 12(3): 348-360. DOI: 10.1208/s12248-010-9183-3.
- [12] Wagh VD, Apar DU, Surana SJ. Drug delivery and pharmacotherapy for dry eye disease [J]. *Intern J Pharm Pharm Sci*, 2012, 4(2): 42-46.
- [13] Gilbard JP, Rossi SR, Gray KL. A new rabbit model for keratoconjunctivitis sicca [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987, 28(2): 225-228.
- [14] Gilbard JP, Rossi SR. An electrolyte-based solution that increases corneal glycogen and conjunctival goblet-cell density in a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca [J]. *Ophthalmology*, 1992, 99(4): 600-604.
- [15] Chen ZY, Liang QF, Yu GY. Establishment of a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca [J]. *Cornea*, 2011, 30(9): 1024-1029. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181f1b0fe.
- [16] Li N, Deng X, Gao Y, et al. Establishment of the mild, moderate and severe dry eye models using three methods in rabbits [J/OL]. *BMC Ophthalmol*, 2013, 13: 50 [2018-03-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093832>. DOI: 10.1186/1471-2415-13-50.
- [17] Fujihara T, Murakami T, Fujita H, et al. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42(1): 96-100.
- [18] Zheng X, Goto T, Ohashi Y. Comparison of *in vivo* efficacy of different ocular lubricants in dry eye animal models [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(6): 3454-3460. DOI: 10.1167/iov.13-13730.
- [19] Toshida H, Nguyen DH, Beuerman RW, et al. Evaluation of novel dry eye model: preganglionic parasympathetic denervation in rabbit [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48(10): 4468-4475. DOI: 10.1167/iov.06-1486.
- [20] Ferreri G, Chauhan SK, Ueno H, et al. A novel mouse model for neurotrophic keratopathy; trigeminal nerve stereotactic electrolysis through the brain [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(5): 2532-2539. DOI: 10.1167/iov.10-5688.
- [21] Li XM, Hu L, Hu J, et al. Investigation of dry eye disease and analysis of the pathogenic factors in patients after cataract surgery [J]. *Cornea*, 2007, 26(9 Suppl 1): S16-20. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31812f67ea.
- [22] 刘祖国, 罗丽辉, 张振平, 等. 超声乳化白内障吸除术后泪膜的变化 [J]. *中华眼科杂志*, 2002, 38(5): 274-277.  
Liu ZG, Luo LH, Zhang ZP, et al. Tear film changes after phacoemulsification [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2002, 38(5): 274-277.
- [23] Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, et al. TFOS DEWS II sex, gender, and hormones report [J]. *Ocul Surf*, 2017, 15(3): 284-333. DOI: 10.1016/j.jtos.2017.04.001.
- [24] Li L, Kang Q, Wang S, et al. Effects of androgen on ultrastructure of corneal epithelium and function of the tear film in BALB/c mice [J]. *Cornea*, 2015, 34(3): 334-341. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000292.
- [25] 高阳, 周瑾, 孙晓芳. 雄激素疗法对去势雌性大鼠泪膜稳定性的改善作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(7): 595-599. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.004.  
Gao Y, Zhou J, Sun XF. Ameliorative effect of androgen therapy tear on film stability in castrate female rats [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(7): 595-599. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.07.004.
- [26] 罗丰年, 张汗承, 孙叙清, 等. 去势雄兔泪液分泌及泪膜稳定性的改变 [J]. *中华眼科杂志*, 2001, 37(6): 458-461. DOI: 10.3760/j.issn.0412-4081.2001.06.017.  
Luo FN, Zhang HC, Sun XQ, et al. The change of tear secretion and tear film stability in castrated male rabbits [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2001, 37(6): 458-461. DOI: 10.3760/j.issn.0412-4081.2001.06.017.
- [27] 黎黎, 王双梅, 郑璇, 等. 去势雄性小鼠泪膜功能异常及角膜上皮细胞超微结构改变 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(2): 103-107. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.002.  
Li L, Wang SM, Zheng X, et al. Dysfunction of tear film and ultrastructural changes of corneal epithelial cells in castrated male mice [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(2): 103-107. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.002.
- [28] 林静, 王传富, 杨珊珊. 去势雌干眼症模型鼠角膜上皮损伤的研究 [J]. *眼科研究*, 2007, 25(11): 814-817.  
Lin J, Wang CF, Yang SS. Impairment of corneal epithelium in estrogen-deficient rat [J]. *Chin Ophthalm Res*, 2007, 25(11): 814-817.
- [29] Eom Y, Han JY, Kang B, et al. Meibomian glands and ocular surface changes after closure of meibomian gland orifices in rabbits [J]. *Cornea*, 2018, 37(2): 218-226. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001460.
- [30] Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Tear film and ocular surface changes after closure of the meibomian gland orifices in the rabbit [J]. *Ophthalmology*, 1989, 96(8): 1180-1186.
- [31] 肖启国, 刘祖国, 张梅, 等. 强力霉素滴眼液对兔蒸发过强干眼疗效的评价 [J]. *眼视光学杂志*, 2006, 8(3): 173-176.  
Xiao QG, Liu ZG, Zhang M, et al. Effect assessment of doxycycline eye drops on evaporative dry eye [J]. *Chin J Optom Ophthalmol*, 2006,

- 8(3): 173-176.
- [32] Viau S, Maire MA, Pasquis B, et al. Time course of ocular surface and lacrimal gland changes in a new scopolamine-induced dry eye model [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2008, 246(6): 857-867. DOI: 10.1007/s00417-008-0784-9.
- [33] 楚莹莹, 华宁, 茹玉莎, 等. 富氢盐水对大鼠干眼模型眼表的保护作用[J]. *中华眼科杂志*, 2017, 53(5): 363-372. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.05.009.
- Chu YY, Hua N, Ru YS, et al. The protection of hydrogen-rich saline on a rat dry eye model induced by scopolamine hydrobromide [J]. *Chin J Ophthalmol*, 2017, 53(5): 363-372. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2017.05.009.
- [34] 仇晶晶, 袁进, 周世有, 等. 皮下注射氢溴酸东莨菪碱建立兔干眼模型的实验研究[J]. *眼科*, 2009, 18(6): 404-409.
- Qiu JJ, Yuan J, Zhou SY, et al. An experimental of rabbit tear-deficient dry eye model by subcutaneous injection of scopolamine hydrobromide [J]. *Ophthalmol CHN*, 2009, 18(6): 404-409.
- [35] Wan KH, Chen LJ, Young AL. Efficacy and safety of topical 0.05% cyclosporine eye drops in the treatment of dry eye syndrome: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Ocul Surf*, 2015, 13(3): 213-225. DOI: 10.1016/j.jtos.2014.12.006.
- [36] Daull P, Feraille L, Barabino S, et al. Efficacy of a new topical cationic emulsion of cyclosporine A on dry eye clinical signs in an experimental mouse model of dry eye [J]. *Exp Eye Res*, 2016, 153: 159-164. DOI: 10.1016/j.exer.2016.10.016.
- [37] Mader TH, Stulting RD. Keratoconjunctivitis sicca caused by diphenoxylate hydrochloride with atropine sulfate (Lomotil) [J]. *Am J Ophthalmol*, 1991, 111(3): 377-378.
- [38] Burgalassi S, Panichi L, Chetoni P, et al. Development of a simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes [J]. *Ophthalmic Res*, 1999, 31(3): 229-235. DOI: 10.1159/000055537.
- [39] Shafiee A, Bucolo C, Budzynski E, et al. *In vivo* ocular efficacy profile of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, in rabbit models of ocular disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3): 1422-1430. DOI: 10.1167/iovs.10-5598.
- [40] Lin Z, Liu X, Zhou T, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 257-264.
- [41] Xiong C, Chen D, Liu J, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(5): 1850-1856. DOI: 10.1167/iovs.07-0720.
- [42] Kwon YS, Park JS, Yun SH, et al. A dog dry eye model induced by benzalkonium chloride [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(14): 3765.
- [43] Xiao X, He H, Lin Z, et al. Therapeutic effects of epidermal growth factor on benzalkonium chloride-induced dry eye in a mouse model [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(1): 191-197. DOI: 10.1167/iovs.11-8553.
- [44] Nagelhout TJ, Gamache DA, Roberts L, et al. Preservation of tear film integrity and inhibition of corneal injury by dexamethasone in a rabbit model of lacrimal gland inflammation-induced dry eye [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2005, 21(2): 139-148. DOI: 10.1089/jop.2005.21.139.
- [45] Liu SH, Prendergast RA, Fau-Silverstein AM, et al. Experimental autoimmune dacryoadenitis. I. Lacrimal gland disease in the rat [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987, 28(2): 270-275.
- [46] Liu SH, Sakai F, Prendergast RA, et al. Experimental autoimmune dacryoadenitis. II. Harderian gland disease in the rat [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987, 28(2): 276-280.
- [47] Thomas PB, Samant DM, Selvam S, et al. Adeno-associated virus-mediated IL-10 gene transfer suppresses lacrimal gland immunopathology in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(10): 5137-5144. DOI: 10.1167/iovs.10-5423.
- [48] Guo Z, Song D, Azzarolo AM, et al. Autologous lacrimal-lymphoid mixed-cell reactions induce dacryoadenitis in rabbits [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 71(1): 23-31. DOI: 10.1006/exer.2000.0855.
- [49] Wei RH, Thomas PB, Samant DM, et al. Autoimmune dacryoadenitis and sialadenitis induced in rabbits by intravenous injection of autologous lymphocytes activated ex vivo against lacrimal antigens [J]. *Cornea*, 2012, 31(6): 693-701. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31823f8e47.
- [50] Mircheff AK, Wang Y, Schechter JE, et al. Multiple natural and experimental inflammatory rabbit lacrimal gland phenotypes [J]. *Ocul Surf*, 2016, 14(4): 460-483. DOI: 10.1016/j.jtos.2016.07.001.
- [51] Lin H, Liu Y, Kambhampati SP, et al. Subconjunctival dendrimer-drug therapy for the treatment of dry eye in a rabbit model of induced autoimmune dacryoadenitis [J]. *Ocul Surf*, 2018, 16(4): 415-423. DOI: 10.1016/j.jtos.2018.05.004.
- [52] Li X, Kang B, Woo IH, et al. Effects of topical mucolytic agents on the tears and ocular surface: a plausible animal model of mucin-deficient dry eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(7): 3104-3114. DOI: 10.1167/iovs.18-23860.
- [53] Barabino S, Dana MR. Animal models of dry eye: a critical assessment of opportunities and limitations [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45(6): 1641-1646.
- [54] Takada K, Takiguchi M, Konno A, et al. Spontaneous development of multiple glandular and extraglandular lesions in aged IQI/Jic mice: a model for primary Sjögren's syndrome [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2004, 43(7): 858-862. DOI: 10.1093/rheumatology/keh209.
- [55] Guo Z, Li H, Han M, et al. Modeling Sjögren's syndrome with Id3 conditional knockout mice [J]. *Immunol Lett*, 2011, 135(1-2): 34-42. DOI: 10.1016/j.imlet.2010.09.009.
- [56] Schrader S, Mircheff AK, Geerling G. Animal models of dry eye [J]. *Dev Ophthalmol*, 2008, 41: 298-312. DOI: 10.1159/000131097.
- [57] 蒋晶晶, 齐惠, 黄一飞. 干眼动物模型的最新研究进展 [J]. *中国实用眼科杂志*, 2012, 30(4): 359-363. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2012.04.001.
- [58] Xu J, Wang D, Liu D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome [J]. *Blood*, 2012, 120(15): 3142-3151. DOI: 10.1182/blood-2011-11-391144.
- [59] Williams DL. Immunopathogenesis of keratoconjunctivitis sicca in the dog [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2008, 38(2): 251-268. DOI: 10.1016/j.evsm.2007.12.002.
- [60] Kim YJ, Ryu JS, Park SY, et al. Comparison of topical application of TSG-6, cyclosporine, and prednisolone for treating dry eye [J]. *Cornea*, 2016, 35(4): 536-542. DOI: 10.1097/ICO.0000000000000756.

(收稿日期: 2018-10-28 修回日期: 2018-11-05)

(本文编辑: 张宇)

读者·作者·编者

## 本刊对来稿中组织病理学彩色图片及电子显微镜图片中标尺的要求

如果作者稿件中包含有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、电子显微镜图片,为了反映组织标本大小的最精确尺度,请在电子版图片的左下方附注标尺。

(本刊编辑部)