

变应性结膜炎动物造模研究进展

张佳讯¹ 综述 何宇茜² 张妍³ 审校

¹吉林大学白求恩第二临床医学院, 长春 130041; ²吉林大学第二医院眼科中心, 长春 130022;

³上海交通大学医学院附属第一人民医院眼科, 上海 200080

通信作者: 张妍, Email: zhangy66@jlu.edu.cn

【摘要】 变应性结膜炎发病率高, 反复发作不易根治, 严重影响人们的生活质量。动物模型是变应性结膜炎疾病研究的主要工具和手段, 动物造模是变应性结膜炎疾病研究的重要步骤。由于变应性结膜炎的研究相对晚于其他变应性疾病, 因此变应性结膜炎动物造模主要参考了变应性哮喘、变应性鼻炎等变应性疾病的动物造模方式, 或在其基础上进行改进, 致使动物造模方式多样化, 动物造模方法可参考性差, 并且动物造模的成活率和成功率较低。本文总结了变应性结膜炎的发病机制和动物造模目的, 检索 PubMed 近 10 年文献中关于变应性结膜炎的动物造模方法, 根据致敏机制对造模方法进行了梳理和分析, 归纳出 4 种造模过程模型, 为变应性结膜炎动物造模中动物品系选择、致敏剂量和致敏过程提供了参考。

【关键词】 变应性结膜炎; 造模方法; 动物模型; 致敏细胞

基金项目: 吉林省卫生健康科技能力提升项目 (2021JC015); 吉林省卫生专项项目 (2020SCZT089、2020SCZT025); 吉林省科技厅国际科技合作项目 (20200801016GH); 吉林大学青年师生交叉学科培育项目 (2022-JCXX-28)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220930-00464

Research progress in animal models of allergic conjunctivitis

Zhang Jiaxun¹, He Yuxi², Zhang Yan³

¹Bethune Second Clinical Medical College of Jilin University, Changchun 130041, China; ²Eye Center of the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130022, China; ³Department of Ophthalmology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Zhang Yan, Email: zhangy66@jlu.edu.cn

【Abstract】 Allergic conjunctivitis has a high incidence rate, which is difficult to cure after repeated attacks, and seriously affects people's quality of life. Animal models are the main tools and means for the study of allergic conjunctivitis diseases, and animal modeling is an important step in the study of allergic conjunctivitis diseases. Because the study of allergic conjunctivitis is relatively late than that of other allergic diseases, the animal model of allergic conjunctivitis mainly refers to the animal model building methods of allergic asthma, rhinitis and other allergic diseases, or makes improvements on them, resulting in a variety of animal model building methods, poor reference of animal model building methods, and low survival rate and success rate of animal model building. This paper analyzes the pathogenic mechanism of allergic conjunctivitis and the purpose of animal modeling, searches and analyzes the modeling process of allergic conjunctivitis in Pubmed in the past 10 years, sorted and analyzed the modeling methods according to the sensitization mechanism, and summarized four modeling process models, which provided a reference for the selection of animal strains, sensitization dose and sensitization process in the modeling of allergic conjunctivitis.

【Key words】 Allergic conjunctivitis; Modeling method; Animal model; Sensitized cells

Fund program: Jilin Province Health Science and Technology Capability Enhancement Project (2021JC015); Jilin Province Health Special Project (2020SCZT089, 2020SCZT025); International Science and Technology Cooperation Project of Jilin Provincial Department of Science and Technology (20200801016GH); Jilin University Interdisciplinary Cultivation Project for Young Teachers and Students (2022-JCXX-28)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20220930-00464

变应性疾病目前已成为人类广泛关注的健康问题,其患病率正在逐渐升高,据统计变应性结膜炎全球患病率为 10%~30%^[1]。变应性结膜炎是结膜对外界变应原的一种超敏免疫反应,以眼痒为典型症状,并伴有结膜充血、水肿、眼睑水肿和溢泪,严重影响人们的生活质量。通过对变应性疾病的文献检索可见,变应性疾病早期的研究大量集中在变应性哮喘的病理生理学和药理学上,而眼部过敏的研究较少^[2-3]。随着人类生活方式和生态环境的改变,变应性结膜炎的患病率和发病率逐年升高,而且容易反复发作,不易根治。目前,变应性结膜炎的研究主要包括药物治疗评估、药理药效评估以及病理生理学、神经生理学、遗传学和免疫学方面的发病机制研究^[3]。变应性结膜炎研究中所采用的动物模型造模方法不尽相同,较多采用了早期变应性疾病动物造模方案,有些采用变应性哮喘动物模型的造模方式,也有些是在变应性豚鼠药物模型的造模方式上进行改进。在动物品系、致敏原种类、致敏剂量、致敏方式等方面的选择上尚无统一标准,导致变应性结膜炎动物模型的重复性和一致性差,造模成活率和成功率低^[4],进而影响变应性结膜炎发病机制和治疗药物药理药效的研究。本文就变应性结膜炎的发病机制和应用于不同研究目的动物模型的造模方式进行综述,以期对变应性结膜炎的深入研究提供适用的动物造模方法。

1 变应性结膜炎的发病机制

1.1 变应性结膜炎的致敏机制

变应性结膜炎的发病机制包括致敏、激发和效应 3 个阶段(图 1)。致敏过程是外源性抗原进入结膜,结膜处的朗格汉斯细胞吞噬外源性抗原并迁移进入结膜相关淋巴组织,利用溶酶体蛋白酶将这些抗原蛋白加工成长度可变的肽段,随后将肽段呈递到主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) II 类分子上,形成抗原肽-MHC II 类分子复合物,该复合物表达于抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)表面,它可被 CD4⁺T 细胞识别,激活 T 细胞分化产生辅助性 T 细胞 2(T helper 2 cell, Th2)^[5]。Th2 分泌产生白细胞介素 4(interleukin-4, IL-4)、IL-5、IL-13 等细胞因子,从而导致 B 细胞分化为浆细胞和记忆细胞,浆细胞产生免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE) 抗体^[6]。IgE 为亲细胞抗体, IgE 的 Fc 段与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的 Fc epsilon 受体 I (Fc epsilon receptor I, FcεR I) 结合,形成 IgE-FcεR I 复合物使机体致敏^[7]。在此过程形成的结合有 IgE 的肥大细胞和嗜碱性粒细胞称为致敏细胞,含有致敏细胞的机体则处于致敏状态。由于结合于细胞表面的 IgE 稳定,不易降解,机体的致敏状态一般可持续数月、数年或更长时间。

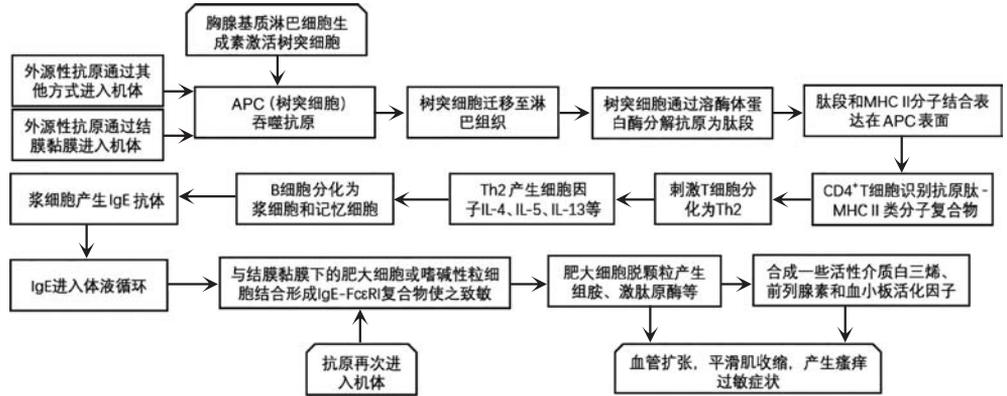


图 1 变应性结膜炎的发病机制 APC: 抗原呈递细胞; MHC: 主要组织相容性复合体; Th2: 辅助性 T 细胞 2; IL: 白细胞介素; IgE: 免疫球蛋白 E; FcεR I: Fc epsilon 受体 I

动物造模致敏过程中 IgE 抗体和肥大细胞的结合形成 IgE-FcεR I 致敏细胞是关键,其中 IgE 抗体的产生主要由 APC 呈递的淋巴组织完成,肥大细胞是结膜黏膜下的肥大细胞。变应性结膜炎动物造模方法主要采用基础致敏和局部激发完成,基础致敏的注射部位主要有脚垫、腹腔和尾根。致敏部位的选取决定了树突细胞吞噬抗原后迁移的淋巴器官,进而激活相关淋巴器官的 T 细胞和 B 细胞产生 IgE 抗体。IgE 抗体通过体液系统和结膜黏膜下的肥大细胞结合成致敏细胞。基础致敏使得 IgE 抗体需要通过体液系统完成与全身各部位肥大细胞结合的全身致敏过程。然而变应性结膜炎表现为局部接触变应原引起的局部过敏症状,与全身致敏有差异。鼠系动物有着丰富的淋巴组织,外来刺激可使淋巴系统增生。小鼠全身主要有颈部淋巴结、腋窝淋巴结、臂淋巴结、胸淋巴结、腹股沟部淋巴结、胰部淋巴结、肠系淋巴结、腰部淋巴结、尾部淋巴结、胃部淋巴结、腋窝淋巴结等,能够较好保证局部注射实现基础致敏^[8]。

1.2 变应性结膜炎的激发和效应过程

激发过程是指相同的变应原再次进入机体与致敏细胞 IgE-FcεR I 复合物上 2 个或 2 个以上 IgE 分子结合并发生交联,激活信号蛋白引起细胞内一系列活化反应,导致肥大细胞脱颗粒,释放颗粒内储备介质,如组胺、激肽原酶等,并新合成一些活性介质,如白三烯、前列腺素和血小板活化因子等^[9]。效应过程指活性介质与效应器官上相应受体结合后,引起局部或全身发生病理变化的阶段^[10]。致敏动物模型的激发过程是在通过基础致敏后,在结膜上使用大量变应原重复点眼,使得结膜黏膜下的致敏细胞 IgE-FcεR I 和变应原交联,导致肥大细胞脱颗粒,此操作过程与真实过敏激发过程较好吻合。在动物模型出现过敏症状后,为评估动物模型的过敏症状和用药后过敏症状的变化情况,需要对动物模型进行过敏程度评估,评估指标包括临床动物行为学判断、组织学观察以及细胞分子机制检测等,根据需要可采取定位和非定位检测、定性或定量分析等方法。

2 变应性结膜炎动物模型

2.1 造模目的

变应性结膜炎动物模型的建立不仅要符合理想动物模型的特点,还要根据模型的应用不同有共性需求和个性需求。共

性需求需要综合考虑模型成活率、造模成功率、造模周期、造模经济性等。个性需求需要考虑变应性结膜炎动物造模的目的和内容,主要有药理学、病理生理学、遗传学、神经生理学和免疫学研究模型。在造模过程中应根据研究需求的特点进行不同动物品系、致敏原、致敏剂量、致敏途径和方式的选择。

2.2 动物品系选择

变应性疾病使用的动物模型主要有豚鼠、大鼠和小鼠。豚鼠模型被证明是评估各种药物抗过敏作用的有效模型。豚鼠模型在 1960—2010 年大量应用于变应性呼吸道疾病的研究中,并在变应性疾病的药物评估中发挥了重要作用^[11]。在后续的变应性结膜炎药物研究中,豚鼠模型成为评估药物在眼部抗过敏作用的有效性模型,在模型中采用 6~8 周龄成年 Hartley 雄性豚鼠居多^[12]。基于豚鼠模型研究了大量成熟的抗过敏药物,如抗组胺类药物、前列腺素受体拮抗剂、白三烯受体拮抗剂等。关于药理作用表征的疗效及其频繁使用,豚鼠模型已建立了较好的药物疗效评估研究基础。关于神经系统对过敏反应的病理机制及药物作用研究,研究者在豚鼠模型中也积累了大量的研究基础。多项研究报告显示,豚鼠模型也适用于研究变应性结膜炎的基础机制,特别是在药物开发的早期阶段可用作简单的筛选模型^[13]。由于豚鼠体内引发过敏反应的抗体是 IgG,人体内引发过敏反应的抗体是 IgE,豚鼠在过敏过程中仅有少量 IgE 产生,因此变应性结膜炎豚鼠模型逐渐被大鼠和小鼠模型取代^[14]。

大鼠模型适合病理生理和药理学研究,大鼠在生理特征、形态和基因上更接近人类,同时大鼠较大的身体和器官尺寸便于多次采样,以及进行电生理学、神经外科影像学操作。在变应性结膜炎模型中较多使用的大鼠有 Brown Norway 大鼠、Sprague Dawley 大鼠和 Wistar 大鼠。

变应性结膜炎小鼠模型是在豚鼠和大鼠模型被人们接受后建立的。用于变应性结膜炎模型的小鼠中 C57BL/6 和 BALB/c 较多,近年来 BALB/c 小鼠造模应用频繁,原因是相比于 C57BL/6 小鼠,其更偏向于 Th2 诱导的致敏通路^[15]。小鼠模型的巨大优势是研究者已充分了解小鼠的基因组序列,加速了对小鼠疾病基因位点的鉴定和克隆,利于在遗传学、基因研究中的应用,从而使得小鼠成为人类疾病研究中动物模型的首选。此外,小鼠还具有造模简单、成功率高、繁殖速度快、价格低廉、适合连续性实验的特点。小鼠模型是目前眼部过敏性研究的首选,特别是对于变应性结膜炎分子和基因组机制,以及在此基础上的后续相关研究。

2.3 变应原选择及致敏剂量

通过在 PubMed 中检索近 10 年变应性结膜炎动物模型相关文献,选取影响因子高并剔除相互重复参考的文献,分析整理了有代表性的变应性结膜炎动物模型的造模过程。变应性结膜炎致敏原主要有卵清蛋白类(ovalbumin, OVA)、豚草花粉类(ragweed pollen, RW)和短豚草花粉类(short ragweed pollen, SRW),致敏剂量和致敏方式多依据经验。根据文献统计结果显示,变应原多采用 SRW 致敏,SRW 在构建变应性结膜炎小鼠动物模型中具有更好的致敏性,也更符合季节性变应性结膜炎

的致敏原因^[16]。变应性结膜炎动物造模研究概况见表 1。

使用 SRW 作为变应原的研究中,致敏剂量的选择大体相同。基础致敏阶段致敏剂量一般都采用 50 μ g SRW 和 5 mg 氢氧化铝佐剂混合溶解到 100~200 μ l PBS 中进行注射,局部激发每次使用含有 1.5 mg SRW 的 10 μ l PBS 溶液点眼激发^[17,20-24,26,36,40]。采取合适注射剂量和变应原花粉含量能够较好地满足致敏的充分性和动物的耐受性,1 次注射的总剂量可根据鼠种大小选择上限或下限,避免注射量过大造成动物异常死亡。氢氧化铝佐剂能够吸附花粉,便于花粉分散吸收。

使用 OVA 作为变应原的研究中致敏剂量相差较大。基础致敏阶段致敏剂量 OVA 为 10~200 μ g,局部激发每次点眼致敏剂量是基础致敏剂量的 2~200 倍。OVA 作为变应原用在变应性结膜炎动物模型中的研究较少,应用在呼吸道变应性疾病的动物模型上较多。基础致敏阶段 OVA 致敏剂量采用 10~100 μ g,氢氧化铝佐剂 1~5 mg 混合溶解到 100~200 μ l PBS 中进行注射;局部激发每次剂量是基础致敏的 10~50 倍,溶解到 10 μ l PBS,应用其进行点眼是变应性结膜炎实验中较多采用的致敏剂量参考范围。

2.4 致敏途径与方式

致敏方式有注射致敏原和灌胃致敏原 2 种方式,灌胃能很好地激发消化道下淋巴系统致敏进而引起全身免疫,导致一系列食物过敏性症状,但 SRW 采用灌胃法进入胃内后在胃蛋白酶的作用下,其分子结构发生改变,致使全身致敏效应下降。变应性结膜炎模型主要采用注射法,注射部位主要有脚垫、腹腔、尾根和结膜囊,研究显示注射致敏具有较好的致敏效果,注射脚垫或尾根操作方便简单易行。

表 1 中各造模方式均获成功,但缺少针对每种致敏过程中动物成活率和造模成功率分析,有研究报道采取不当的致敏过程会导致致敏成功率低和动物死亡的情况发生,致使动物造模时致敏过程无法做到统一,形成了多种致敏过程^[16]。本文根据表 1 已有研究的实验数据进行分析并总结,将变应性结膜炎动物造模过程归纳为以下 4 种类型:(1)第 1 种模型 采用多次(2 次或 3 次)脚垫注射法进行基础致敏,再采用结膜囊处滴注变应原激发过敏。如第 1、7、14 天进行脚垫注射基础致敏,第 21 天后连续每天结膜囊点眼激发过敏^[25];或者第 1、5 天进行脚垫注射基础致敏,第 10 天后连续每天结膜囊点眼激发过敏^[26]。(2)第 2 种模型 仅采用 1 次脚垫注射法进行基础致敏,再多次采用结膜囊处点眼激发过敏。如第 1 天仅进行 1 次脚垫注射致敏,第 10 天后连续每天点眼激发过敏^[36]。(3)第 3 种模型 第 1 天采用结膜囊下注射局部致敏,10~15 d 后连续每天结膜囊处点眼激发过敏^[27]。(4)第 4 种模型 将致敏效应物直接作用到动物结膜上产生过敏症状。例如,将结膜直接暴露于组胺,引起变应性结膜炎的豚鼠模型,以此来验证药物疗效^[18]。

2.5 动物模型的应用

变应性哮喘豚鼠模型的建立多采用上述第 1 种模型的致敏过程,研究显示多次基础致敏后局部激发的主动致敏方式建立的动物模型,致敏效果好、动物模型成功率高^[25]。在部分研

表 1 变应性结膜炎动物造模研究概况

实验动物	变应原	致敏方式	致敏剂量	激发剂量	造模目的	模型分类	文献
6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠	SRW	第 0,5 天脚垫注射,10~14 d 点眼激发	50 μ g SRW	1.5 mg SRW 溶解在 10 μ l PBS 中	药物治疗效果	第 1 种	[17]
6~7 周龄雄性 Hartley 豚鼠	组胺	将组胺溶液直接点到双眼结膜囊中以诱导结膜炎	无	2 mg/ μ l,12.5 μ l/眼	药物模型	第 4 种	[18]
4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠	OVA	第 0,5 天腹腔内注射,10~14 d 每日点眼激发	10 μ g OVA 和 4 mg 氢氧化铝佐剂	2 mg OVA 溶解在 5 μ l PBS 中	药物治疗效果	第 1 种	[19]
6~8 周龄 BALB/c 小鼠	SRW	第 0 天脚垫注射,10~16 d 每日点眼激发	5 mg 氢氧化铝佐剂和 50 μ g SRW	1.5 mg SRW 溶解在 10 μ l PBS 中	病理机制	第 2 种	[20]
7~8 周龄 BALB/c 小鼠	SRW	第 0 天腹腔内注射,6~12 d 每日点眼激发	5 mg 氢氧化铝佐剂和 50 μ g SRW	0.5 mg SRW 溶解在 10 μ l PBS 中	神经病理机制	第 2 种	[21]
6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠	SRW	第 0 天脚垫注射,第 5 天重复致敏,10~14 d 每日点眼激发	5 mg 氢氧化铝佐剂和 50 μ g SRW	1.5 mg SRW 溶解在 10 μ l PBS 中	病理机制	第 1 种	[22]
6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠	SRW	第 0 天脚垫注射,10~15 d 每日点眼激发	50 μ g SRW	1.5 mg SRW	病理机制	第 2 种	[23]
BALB/c 小鼠	RW	第 0 天注射到左后脚垫和尾根中,第 14 天使用右后脚垫进行第 2 次免疫,26~29 d 每日点眼激发	50 μ l 乳化的 RW (50 μ g RW 和 50 μ l 明矾)	2 mg RW 溶解在 10 μ l PBS 中	病理机制	第 1 种	[24]
6~8 周龄雄性 Hartley 白化豚鼠	OVA	第 1,7 和 14 天腹腔内注射,第 21 天点眼激发	200 μ g OVA 和 40 mg 氢氧化铝悬浮在 200 μ l 生理盐水	30 μ l 含有 3 mg OVA 的生理盐水	药物治疗效果	第 1 种	[25]
BALB/c 小鼠	SRW	在第 0,5 天脚垫注射,10~38 d 每日 1 次点眼激发	50 μ g SRW 和 5 mg 氢氧化铝	1.5 mg SRW 溶解在 10 μ l PBS 中	药物治疗效果	第 1 种	[26]
3 周龄豚鼠	OVA	第 0 天结膜下注射;第 15,17 和 19 天,给予 OVA 溶液点眼激发	2 μ g OVA 和 2 mg 氢氧化铝	20 μ l 2.5% OVA 溶液	药物模型	第 3 种	[27]
10 周龄雄性 Wistar 大鼠	OVA	第 0 天腹腔内注射,2 周后点双眼激发	100 μ g OVA 和 20 mg 氢氧化铝溶解在 PBS 中	10 μ l 100 mg/ml OVA 的 PBS 溶液	药物模型	第 2 种	[28]
4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠	RW	第 0 天左后脚垫和尾基注射,10~14 d 点双眼激发	50 μ l RW (20 mg 明矾中 0.5 mg RW)	10 μ l 0.2 g/L 的 RW 和 PBS 混合溶液	病理机制	第 2 种	[29]
8 周龄雌性 BALB/c 小鼠	OVA	第 0,7 天腹腔内注射,15~18 d 点双眼激发	10 μ g OVA 和 200 μ l 1.5% 氢氧化铝	250 μ g OVA	药物治疗效果	第 1 种	[30]
C57BL/6 小鼠	OVA	间隔 2 周的腹腔内注射,初始致敏后 5 周点眼激发	50 μ g OVA 和 1 mg 氢氧化铝溶解在 200 μ l 无菌生理盐水	含有 500 μ g OVA 的 5 μ l 生理盐水	病理机制	第 1 种	[31]
8 周龄雌性 BALB/c 小鼠	OVA	第 1,8 天腹腔内注射,第 15,17 和 19 天点眼激发	0.2 ml PBS 中溶解 OVA 10 μ g 和 2.0 mg 氢氧化铝	5 μ l 含 5% OVA 的 PBS 溶液	病理机制	第 1 种	[32]
4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠	OVA	第 0,7 天腹腔内注射,15~18 d 每日点眼激发	100 μ g OVA 和 200 μ l 1.5% 氢氧化铝	5 ml OVA (PBS 中 OVA 为 100 ng/ml)	病理机制	第 1 种	[33]
8~12 周龄雌性 C57BL/6 小鼠	OVA	第 0,7 天腹腔内注射,9~18 d 每日点眼激发	10 μ g OVA 和 200 μ l 1.5% 氢氧化铝	250 μ g OVA	病理机制	第 1 种	[34]
BALB/c 小鼠	RW	第 0 天注射到左后脚垫和尾基部,2 周后右后脚垫第 2 次免疫接种,26~29 d 每日点眼激发	50 μ g RW 和 50 μ l 明矾	含有 2 mg RW 的 PBS 和 RW 混合液	病理机制	第 1 种	[35]
4~6 周龄 BALB/c 小鼠	SRW	第 0 天脚垫注射,第 10 天后,每日 1 次点眼激发	50 μ g SRW 和 5 mg 明矾	含有 1.5 mg SRW 的 10 μ l PBS 和 SRW 混合液	病理机制	第 2 种	[36]
雄性 BALB/c 小鼠	OVA	第 0,7 天皮下注射,14~16 d 直接滴注到结膜囊中激发	5 μ g OVA 和 15 mg/ml 氢氧化铝佐剂溶解在 200 μ l 生理盐水	250 μ g OVA 溶解在 10 μ l 生理盐水中	病理机制	第 1 种	[37]
6~7 周龄雌性 BALB/c 小鼠	RW	第 0 天腹腔内注射,第 10 天后点双眼激发	200 μ l PBS 含 50 μ g RW 和 0.25 ml 氢氧化铝佐剂	1.25 mg RW	药物治疗效果	第 2 种	[38]
8~10 周龄雌性 BALB/c 小鼠	SRW	第 0 天腹腔内注射,10~16 d 点右眼激发	50 μ g SRW 和 5 mg 明矾	1.5 mg SRW 溶解在 10 μ l PBS 中	病理机制	第 2 种	[39]
6~8 周龄 BALB/c 小鼠	SRW	第 0 天脚垫注射,10~12 d 每日 1 次点眼激发	50 μ g SRW 和 5 mg 明矾	1.5 mg SRW 溶解在 10 μ l PBS 中	病理机制	第 2 种	[40]

注:SRW:短豚草花粉类;RW:豚草花粉类;OVA:卵清蛋白类;PBS:磷酸盐缓冲液。模型分类中,第 1 种模型指多次基础致敏后局部激发;第 2 种模型指仅 1 次基础致敏后多次局部激发;第 3 种模型指局部致敏后局部激发;第 4 种模型指直接在眼部点过敏原产生过敏症状

究中,验证药物疗效的变应性结膜炎的动物模型也多采用第 1 种模型的致敏过程^[26]。用药前后通过眼部表现评估、血管通透性检测、细胞因子和趋化因子检测等手段确定过敏症状等级,进行药物有效性验证与评估。然而,第 1 种模型的致敏过程采用第 1、7、14 天多次注射的全身基础致敏方法,容易导致实验动物呼吸道、肠道等全身多处的致敏和过敏反应,引发动物的异常反应,甚至死亡,而非引起关注部位的过敏反应,与实际变应性结膜炎的发生有较大差异。另外,采用第 1 种模型致敏过程建立的豚鼠模型在验证药物疗效时存在着较多的不确定性和主观性,模型中动物的过敏程度、过敏部位、个体差异不易用于药物疗效的直接验证与评估,建议在第 4 种方法无法实现的情况下才考虑此方法的实施。

基于病理生理学的变应性结膜炎动物模型阐述了发病机制和细胞分子传导机制,其普遍采用第 2 种模型,即 1 次全身基础致敏、多次局部激发的主动致敏方式,可以在致敏和激发各个阶段对研究的内容进行评价与检测^[23],这也是近些年来变应性结膜炎动物造模较多采用的致敏方式。为了保证致敏的成功率,有研究在脚垫、尾根注射的基础上进行了局部结膜囊处加强致敏的措施,较好保障了局部充分致敏^[40]。仅进行 1 次注射基础致敏和结膜囊处加强致敏,再局部激发的变应性结膜炎动物模型造模方式具有较好的参考性。

变应性结膜炎发病机制中,致敏主要是结膜黏膜下的肥大细胞和淋巴组织产生的 IgE 结合产生致敏细胞,IgE 可以是脾脏系统免疫组织或局部淋巴组织产生,系统免疫组织产生的 IgE 要经过体液循环遍布全身,局部淋巴组织产生的 IgE 可更好完成局部渗透。小鼠颈部淋巴结位于左右颌下腺的浅表和外侧,采用结膜下注射致敏原便于此处淋巴系统产生抗体并充分接触结膜黏膜下的肥大细胞。第 2 种模型致敏过程中基础致敏是否有效,多次局部激发中的第 1 次激发是否起到了致敏作用,还需要实验验证。第 3 种模型中采用局部致敏,再局部激发也能够成功完成动物造模。第 2 种模型致敏过程中如基础致敏未达到效果,就变成了第 3 种模型致敏过程,完全是局部致敏和局部激发的结果。

变应性结膜炎动物造模采用全身基础致敏还是局部致敏,哪种效果较好尚未见相关报道。全身基础致敏的方式更适用于变应性哮喘,因为此类疾病不具备局部致敏的方式。变应性结膜炎具备局部致敏的条件,有研究采用结膜下注射变应原,再通过结膜囊点眼激发过敏症状,建立变应性结膜炎动物模型。首先在结膜下注射含 2 μg OVA 和 2 mg 氢氧化铝的 PBS 溶液;在第 15、17 和 19 天,采用 20 μl 2.5% OVA 溶液点眼激发过敏,成功建立了局部致敏后局部激发的动物模型^[24]。第 3 种模型致敏过程还需经过大量实验验证变应性结膜炎的造模成功情况。

验证药物有效性的动物模型宜采用第 4 种模型,实验动物建议选用豚鼠。该方法不受动物免疫反应的显著影响,可以大部分消除由个体差异引起的变异,并且直接反映某一过敏因子的影响程度,针对性强。此外,其操作过程易标准化,操作过程的标准化可达到高度准确和可重复的结果。有研究显示,选用

6~7 周龄 Hartley 雄性豚鼠,使用 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 组胺 12.5 $\mu\text{l}/\text{眼}$ 制备豚鼠变应性结膜炎动物模型,点眼后 30 min 从结膜到上下眼睑均可观察到水肿和充血,出现中度变应性结膜炎症状,是合适的模型条件^[18],能够较好地建立药物评估动物模型。

基于变应性鼻炎、哮喘等变应性疾病的动物模型对变应性结膜炎动物模型的建立具有一定参考性,但不同的过敏部位在模型建立时又有各自不同的方法,应在实践过程中不断改进。

3 动物模型与人类变应性结膜炎的机制和治疗异同

人类疾病动物模型是疾病基础研究的重要工具和手段,疾病动物模型的构建是人类疾病临床试验研究之前的重要步骤,有助于全面认知疾病本质和药物安全性。变应性结膜炎动物模型的病理机制依据选取动物的不同有一定差异。动物的选取应以与人类具有相似的生物特性为主,动物模型应可重复和标准化、可特异地反映该种疾病,同时动物背景资料要完整。研究显示,大鼠和小鼠变应性结膜炎模型能较好地复制人类变应性结膜炎的症状和体征,如眼痒表现为高频次的眼部抓挠行为、眼部有黏液性分泌物、结膜充血、眼睑水肿等^[1]。此外,鼠系动物模型与人类变应性结膜炎的发病机制相同,表现为致敏后血清中 IgE 高表达和 IL-4、IL-5、IL-13 等倾向于 Th2 型细胞因子生成增加,造成明显的炎症表现和病理损伤^[41]。BALB/c 小鼠和 Brown Norway 大鼠均为具有高 IgE 表达且倾向于 Th2 反应的实验动物。然而,动物模型也存在一定的局限性,大鼠、小鼠与人类在先天和适应性免疫系统发育以及对外来应激反应方面仍存在一定差异,可能导致动物实验与临床试验结果存在差异。

根据 I 型超敏反应的发生机制,结合致敏和过敏过程,变应性结膜炎的治疗靶点分为上游靶点和下游靶点。Th2 是治疗变应性结膜炎的上游关键靶点,其主要效应是辅助 B 细胞活化,其分泌的细胞因子可以促进 B 细胞增殖、分化和抗体的生成。Th0 所在局部环境中的细胞因子类型是影响 Th1/Th2 极化的关键因素。其中,IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子则促使 Th0 向 Th2 分化,同时抑制 Th1 增殖。IL-12、IFN- γ 和 IL-2 等细胞因子促使 Th0 向 Th1 分化,并抑制向 Th2 分化^[42]。此外,致敏状态形成的 IgE-Fc ϵ R I 复合物也是上游重要靶点,在结膜肥大细胞上分解 IgE-Fc ϵ R I 复合物对治疗有靶向作用^[11]。肥大细胞脱颗粒产生和合成的活性物质是下游的靶点,靶向这些介质并抑制其活性以减弱炎症因子的表达是针对下游的治疗方法。当前变应性结膜炎的治疗措施主要集中在下游靶点。目前用于治疗变应性结膜炎的药物包括抗组胺药、肥大细胞稳定剂或抗组胺药/肥大细胞稳定剂联合用药、糖皮质激素以及免疫抑制剂^[43]。长期给予抗组胺药/肥大细胞稳定剂和糖皮质激素可能导致各种不良反应,无法达到根治的目的,因此需要寻找新的变应性结膜炎疗法。

4 小结与展望

现代分子生物学技术使我们能够使用基因组学、蛋白质组学、形态学和经典生理学方法在转录、转化和功能水平上研究

疾病机制,变应性结膜炎细胞分子机制的信号传导研究将会更加深入。变应性结膜炎小鼠模型是评估变应性结膜炎分子机制的有用工具。在某些情况下,如在新药的疗效评估中,变应性结膜炎的豚鼠模型可以提供更接近人类状况的复制品;如在涉及到解剖实验时,变应性结膜炎的大鼠模型就具备更大的优势。基于发病机制研究和动物实验目的要求,科学合理选择动物模型、优化致敏过程与致敏方式、高效利用实验动物是疾病研究过程中的重要环节。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

志谢 感谢课题组刘莹瑞老师对本文的悉心指导

参考文献

- 王泽茜,曹明卓,李秀敏,等.基于中西医临床病证特点的过敏性结膜炎动物模型分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(7):187-192. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20210106.
Wang ZQ, Cao MZ, Li XM, et al. Analysis of animal models of allergic conjunctivitis based on characteristics of clinical symptoms in Chinese and western medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(7): 187-192. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20210106.
- 杜小曼,李燕明.过敏性疾病的发展历史和未来展望[J].临床药物治疗杂志,2019,17(1):14-17. DOI:10.3969/j.issn.1672-3384.2019.01.004.
Du XM, Li YM. Development history and future prospect of allergic diseases [J]. Clin Med J, 2019, 17(1): 14-17. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3384.2019.01.004.
- Groneberg DA, Bielory L, Fischer A, et al. Animal models of allergic and inflammatory conjunctivitis [J]. Allergy, 2003, 58(11): 1101-1113. DOI: 10.1046/j.1398-9995.2003.00326.x.
- 王朋,谭程,张佳佳,等.经卵清蛋白致敏过敏性鼻炎模型豚鼠造模方法探讨[J].临床误诊误治,2012,25(3):32-35. DOI:10.3969/j.issn.1002-3429.2012.03.020.
Wang P, Tan C, Zhang JJ, et al. Improvement of modeling method for allergic rhinitis model in guinea pigs by ovalbumin [J]. Clin Misdiag Mistherapy, 2012, 25(3): 32-35. DOI: 10.3969/j.issn.1002-3429.2012.03.020.
- Siebelmann S, Gehlsen U, Hüttmann G, et al. Development, alteration and real time dynamics of conjunctiva-associated lymphoid tissue [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(12): e82355 [2024-10-08]. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3869694/. DOI: 10.1371/journal.pone.0082355.
- Labib BA, Chigbu DI. Therapeutic targets in allergic conjunctivitis [J/OL]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(5): 547 [2024-10-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35631374/. DOI: 10.3390/ph15050547.
- Cui H, Liu F, Fang Y, et al. Neuronal FcεR1α directly mediates ocular itch via IgE-immune complex in a mouse model of allergic conjunctivitis [J/OL]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 55 [2024-10-08]. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8867756/. DOI: 10.1186/s12974-022-02417-x.
- Van den Broeck W, Derore A, Simoens P. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice [J]. J Immunol Methods, 2006, 312(1-2): 12-19. DOI: 10.1016/j.jim.2006.01.022.
- 洪晶.重视过敏性角结膜炎治疗药物的选择[J].中华实验眼科杂志,2018,36(9):657-660. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.09.001.
Hong J. Pay attention to the drug selection for allergic keratoconjunctivitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(9): 657-660. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2018.09.001.
- 蔡乐琪,李晔,柯婉仪.过敏性结膜炎发病机制的研究进展[J].眼科学报,2022,37(4):342-347. DOI:10.3978/j.issn.1000-4432.2022.02.01.
Cai LQ, Li Y, Ke WY. Research progress in the pathogenesis of allergic conjunctivitis [J]. Eye Sci, 2022, 37(4): 342-347. DOI: 10.3978/j.issn.1000-4432.2022.02.01.
- Li Y, Leung P, Gershwin ME, et al. New mechanistic advances in FcεR1-mast cell-mediated allergic signaling [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2022, 63(3): 431-446. DOI: 10.1007/s12016-022-08955-9.
- Graziano FM, Stahl JL, Cook EB, et al. Conjunctival mast cells in ocular allergic disease [J]. Allergy Asthma Proc, 2001, 22(3): 121-126. DOI: 10.2500/108854101778148782.
- Mochizuki H, Suyama S, Youm SY, et al. Characteristics of histamine H4 receptor agonist-induced allergic conjunctivitis model in guinea pigs [J/OL]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2023, 119: 107203 [2024-10-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35842185/. DOI: 10.1016/j.vascn.2022.107203.
- Kianmehr M, Ghorani V, Boskabady MH. Animal model of asthma, various methods and measured parameters: a methodological review [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016, 15(6): 445-465.
- Parkinson JE, Pearson S, Rückerl D, et al. The magnitude of airway remodeling is not altered by distinct allergic inflammatory responses in BALB/c versus C57BL/6 mice but matrix composition differs [J]. Immunol Cell Biol, 2021, 99(6): 640-655. DOI: 10.1111/imcb.12448.
- 白梦天,李韵,胡竹林.不同条件下建立过敏性结膜炎小鼠模型比较研究[J].中国实验动物学报,2020,28(3):330-337. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.006.
Bai MT, Li Y, Hu ZL. Comparison of mouse models of allergic conjunctivitis under different conditions [J]. Acta Laborat Animalis Scientia Sinica, 2020, 28(3): 330-337. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.006.
- Luo F, Tao Y, Wang M, et al. The protective effects of KAT5 inhibition on ocular inflammation by mediating the PI3K/AKT pathway in a murine model of allergic conjunctivitis [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2022, 63(5): 4 [2024-10-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35503228/. DOI: 10.1167/iovs.63.5.4.
- Mochizuki H, Suyama S, Cha JY, et al. Optimization of a histamine-induced allergic conjunctivitis model in guinea pigs [J/OL]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2022, 113: 107133 [2024-10-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34798284/. DOI: 10.1016/j.vascn.2021.107133.
- Li Y, Liu X, Yu J, et al. Tofacitinib suppresses mast cell degranulation and attenuates experimental allergic conjunctivitis [J/OL]. Int Immunopharmacol, 2020, 86: 106737 [2024-10-08]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32615452/. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106737.
- Hu J, Gao N, Zhang Y, et al. IL-33/ST2/IL-9/IL-9R signaling disrupts ocular surface barrier in allergic inflammation [J]. Mucosal Immunol, 2020, 13(6): 919-930. DOI: 10.1038/s41385-020-0288-4.
- Liu J, Huang S, Li F, et al. Sympathetic nerves positively regulate eosinophil-driven allergic conjunctivitis via α1-adrenergic receptor signaling [J]. Am J Pathol, 2020, 190(6): 1298-1308. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.02.004.
- Guo C, Liu J, Hao P, et al. The potential inhibitory effects of miR-19b on ocular inflammation are mediated upstream of the JAK/STAT pathway in a murine model of allergic conjunctivitis [J/OL]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(3): 8 [2024-10-08]. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7401772/. DOI: 10.1167/iovs.61.3.8.
- Deng R, Chen X, Zhang Y, et al. Short ragweed pollen promotes M2 macrophage polarization via TSLP/TSLPR/OX40L signaling in allergic inflammation [J]. Mucosal Immunol, 2019, 12(5): 1141-1149. DOI: 10.1038/s41385-019-0187-8.
- Asada Y, Okano M, Ishida W, et al. Periostin deletion suppresses late-phase response in mouse experimental allergic conjunctivitis [J]. Allergol Int, 2019, 68(2): 233-239. DOI: 10.1016/j.alit.2018.09.007.
- Dattoli SD, Baiula M, De Marco R, et al. DS-70, a novel and potent α4



integrin antagonist, is an effective treatment for experimental allergic conjunctivitis in guinea pigs [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175 (20) : 3891-3910. DOI:10. 1111/bph. 14458.

[26] Liu YC, Ng XW, Teo E, et al. A biodegradable, sustained-released, tacrolimus microfilm drug delivery system for the management of allergic conjunctivitis in a mouse model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018, 59 (2) : 675-684. DOI:10. 1167/iov. 17-23066.

[27] Nakazawa Y, Oka M, Takehana M. Model for studying anti- allergic drugs for allergic conjunctivitis in animals [J]. Open Med (Wars), 2017, 12 : 231-238. DOI:10. 1515/med-2017-0034.

[28] Jauhonen HM, Laihia J, Oksala O, et al. Topical cis-urocanic acid prevents ocular surface irritation in both IgE -independent and - mediated rat model [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2017, 255 (12) : 2357-2362. DOI:10. 1007/s00417-017-3781-z.

[29] Yang Y, Yin X, Yi J, et al. MiR-146a overexpression effectively improves experimental allergic conjunctivitis through regulating CD4⁺ CD25⁻ T cells [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 94 : 937-943. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2017. 07. 157.

[30] Lee HJ, Kim BM, Shin S, et al. Superoxide dismutase 3 attenuates experimental Th2-driven allergic conjunctivitis [J]. Clin Immunol, 2017, 176 : 49-54. DOI:10. 1016/j. clim. 2016. 12. 010.

[31] Kuo CH, Collins AM, Boettner DR, et al. Role of CCL7 in type I hypersensitivity reactions in murine experimental allergic conjunctivitis [J]. J Immunol, 2017, 198 (2) : 645-656. DOI:10. 4049/jimmunol. 1502416.

[32] Lee YJ, Han SJ, Lee H, et al. Development of allergic conjunctivitis induced by house dust mite extract from dermatophagoides pteronyssinus [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (4) : 1773-1781. DOI:10. 1167/iov. 15-17340.

[33] Chen J, Zhang J, Zhao R, et al. Topical application of interleukin-28A attenuates allergic conjunctivitis in an ovalbumin-induced mouse model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (2) : 604-610. DOI:10. 1167/iov. 15-18457.

[34] Chung SH, Chang SY, Lee HJ, et al. The C-C chemokine receptor 6 (CCR6) is crucial for Th2-driven allergic conjunctivitis [J]. Clin Immunol, 2015, 161 (2) : 110-119. DOI:10. 1016/j. clim. 2015. 08. 004.

[35] Asada Y, Nakae S, Ishida W, et al. Roles of epithelial cell-derived type 2-initiating cytokines in experimental allergic conjunctivitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56 (9) : 5194-5202. DOI:10. 1167/iov. 15-16563.

[36] Sun W, Sheng Y, Chen J, et al. Down-regulation of miR-146a expression induces allergic conjunctivitis in mice by increasing TSLP level [J]. Med Sci Monit, 2015, 21 : 2000-2007. DOI:10. 12659/MSM. 894563.

[37] Mello CB, Ramos L, Gimenes AD, et al. Immunomodulatory effects of galectin-1 on an IgE-mediated allergic conjunctivitis model [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56 (2) : 693-704. DOI:10. 1167/iov. 14-15100.

[38] Córdova C, Gutiérrez B, Martínez-García C, et al. Oleonic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (4) : e91282 [2024-10-10]. https://pmc. ncbi. nlm. gov/articles/PMC3974667/. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0091282.

[39] Reyes NJ, Chen PW, Niederkorn JY. Allergic conjunctivitis renders CD4⁺ T cells resistant to t regulatory cells and exacerbates corneal allograft rejection [J]. Am J Transplant, 2013, 13 (5) : 1181-1192. DOI:10. 1111/ajt. 12198.

[40] Zheng X, Ma P, de Paiva CS, et al. TSLP and downstream molecules in experimental mouse allergic conjunctivitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51 (6) : 3076-3082. DOI:10. 1167/iov. 09-4122.

[41] Shoji J. Ocular allergy test and biomarkers on the ocular surface; clinical test for evaluating the ocular surface condition in allergic conjunctival diseases [J]. Allergol Int, 2020, 69 (4) : 496-504. DOI:10. 1016/j. alit. 2020. 05. 003.

[42] 姚娟, 李冰, 郑晓汾. 不同类型过敏性结膜炎患者眼表组织中白细胞介素-4、5 和 13 的表达 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33 (10) : 924-929. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 10. 013.

Yao J, Li B, Zheng XF. Expressions of interleukin-4, 5 and 13 in ocular surface with different types of allergic conjunctivitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33 (10) : 924-929. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 10. 013.

[43] 李炜炜, 王智群, 张阳, 等. 745 例变应性结膜炎的临床特点 [J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35 (7) : 645-650. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 07. 015.

Li WW, Wang ZQ, Zhang Y, et al. Clinical characteristics of 745 cases of allergic conjunctivitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35 (7) : 645-650. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2017. 07. 015.

(收稿日期:2024-10-15 修回日期:2025-03-08)

(本文编辑:刘艳 施晓萌)



眼科常用英文缩略语名词解释(二)

IOL:人工晶状体 (intraocular lens)

IRBP:光间受体视黄类物质结合蛋白 (interphotoreceptor retinoid binding protein)

LASIK:准分子激光角膜原位磨镶术 (laser in situ keratomileusis)

ICGA:吲哚菁绿血管造影 (indocyanine green angiography)

LECs:晶状体上皮细胞 (lens epithelial cells)

miRNA:微小 RNA (microRNA)

MMP:基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase)

mTOR:哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin)

shRNA:短发夹 RNA (short hairpin RNA)

siRNA:小干扰 RNA (small interfering RNA)

α-SMA:α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin)

TAO:甲状腺相关眼病 (thyroid-associated ophthalmopathy)

TGF:转化生长因子 (transforming growth factor)

TNF:肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)

UBM:超声生物显微镜 (ultrasound biomicroscope)

VEGF:血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor)

VEP:视觉诱发电位 (visual evoked potential)

(本刊编辑部)