



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107796674 A

(43)申请公布日 2018.03.13

(21)申请号 201710538216.7

G01N 33/50(2006.01)

(22)申请日 2017.07.04

G01N 33/533(2006.01)

(71)申请人 程树军

C12N 5/071(2010.01)

地址 510623 广东省广州市珠江新城华明
路39号C1座

C12N 5/079(2010.01)

申请人 广东出入境检验检疫局检验检疫技
术中心

C12Q 1/02(2006.01)

(72)发明人 程树军 刘超 秦瑶

(74)专利代理机构 广州知友专利商标代理有限
公司 44104

代理人 周克佑

(51)Int.Cl.

G01N 1/28(2006.01)

G01N 27/04(2006.01)

G01N 27/20(2006.01)

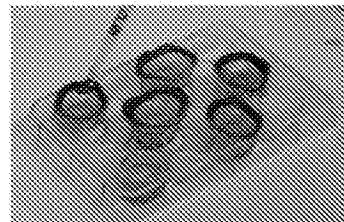
权利要求书5页 说明书16页 附图2页

(54)发明名称

一种利用动物离体角膜长期培养模型评价
眼刺激性损伤及修复作用评估的方法

(57)摘要

一种利用动物离体角膜长期培养模型评价
眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,包括以下
步骤:1.离体角膜制备;2.角膜长期培养;3.角膜
化学损伤模型及评价;4.角膜物理损伤模型及评价;
5.角膜损伤后修复作用评估;6.统计分析与
结果判定。本发明利用外源刺激物,如化学物质、
紫外线引起可逆性的角膜上皮细胞变性和基质
损伤,通过预测模型,评估眼刺激性的程度;或者
是利用化学方法、物理方法或机械方法造成角膜
上皮细胞和基质的可逆性刺激、轻微磨损或缺失
损伤,评估损伤后角膜的自身修复,或者损伤发
生后添加药物评价药物促进角膜修复作用的
方法。本方法操作简单,与体内实验相关性好,敏感
程度高,能满足角膜刺激性损伤及其修复的检测
和研究的需要。



1. 一种利用动物离体角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,其特征是包括以下步骤:

步骤1. 离体角膜制备;

步骤2. 角膜长期培养:

取清洗干净的角膜,上皮面朝下悬浮于添加有HBSS液的6孔板、12孔板或直径35mm的培养皿,使角膜完全浸没于培养液;

将融解状态的0.5-5%的琼脂-明胶-M199混合物,缓慢逐滴每次2-3滴加入角膜窝内皮面,直至内皮窝完全填满,琼脂-明胶在室温下完全凝固;

将充满凝固的琼脂-明胶的角膜倒置,转移到若干35mm培养皿中;

吸取40-60ml的M199培养基加入每个培养皿中,直到覆盖角膜缘,裸露角膜上皮面暴露于空气中;

将培养皿置于小型振荡器上,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱中培养8-24h,小型振荡器应使培养皿在每2h-3h内从水平位置摇动到45°角,使得角膜可以短暂浸泡在培养基中浸润上皮组织;

步骤3. 角膜化学损伤模型及评价;

步骤4. 角膜物理损伤模型及评价;

步骤5. 角膜损伤后修复作用评估:

(1) 化合物损伤角膜后,将角膜转移到新的培养皿中,取40ml新的M199培养基加入每个培养皿中,后孵育2小时;更换含有活性物质表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子或维生素的M199培养基,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱,按步骤2角膜长期培养方法继续培养至第14天;实验组平行样20-30个;含活性物质的M199培养基为活性修复组,不含活性物质的M199培养基为自然修复组,同时设空白对照;必要时设置基准对照;

(2) 培养期间,每2天更换含活性物质的M199培养液;分别于化学损伤后的第2h、14h、26h、38h、50h、62h、74h、86h、98h、110、170h和14d±2h等时间点,取培养液进行细胞因子测试,并取实验组其中2-3只角膜进行浊度测试、电阻测试、荧光素留评分和组织学观察,其余角膜继续培养;

(3) 角膜液细胞因子测试:在更换新的培养液前,从培养皿中移出培养液,检测培养液中的炎性因子和修复因子水平:包括1L-1a、1L-6、1L-8;

(4) 浊度变化:浊度检测前,从培养皿中取出角膜,将其固定于夹持器中,夹持器的后室和前室分别依次填充无菌不含酚红的MEM培养基,用角膜浊度仪测量并记录每个角膜的浊度值,来自不同组的角膜分别记录浊度值,OP_{活性},OP_{修复},OP_{空白};计算实验组与空白组的浊度差值;

(5) 电阻测定和荧光素观察:测完浊度后,用电阻仪测定角膜的电阻值;然后从夹持器中取下角膜,上表面滴入含2%荧光素钠(NaFL)的PBS;过量的NaFL立即用PBS冲洗,在紫外灯下观察NaFL的潴留,潴留的程度表明角膜损伤的严重性;

计算潴留面积S占整个角膜面积C的百分比值,根据S/C值对损伤/恢复程度进行评分;0分:<2%,1分:2~25%,2分:26~50%,3分:51~75%,4分:76%~100%;

(6) 组织学评价:荧光素评分完成后,取角膜加入10%中和福尔马林缓冲液中固定24h;石蜡包埋、切片、取部分切片进行HE染色;显微镜下观察并评估组织学变化;

取部分切片进行免疫组化染色:角膜上皮细胞紧密连接蛋白Occludin或Z0-1的染色或钙粘连蛋白染色,用于观察角膜修复过程中,上皮屏障功能的改善情况;

步骤6.统计分析与结果判定

将上述步骤获得的各组实验数据,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析,多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义;

化学损伤后修复综合分析角膜电阻值、荧光素染色、浊度测试、炎性因子检测和组织学观察结果;机械损伤修复不进行电阻测试和浊度测试;紫外线损伤后修复参考化学损伤;

根据不同检测参数的意义,从统计结果分析,作出修复作用的综合判断:

(1) 电阻测定和荧光素染色:随着培养时间的延长,自然修复组和活性修复组电阻值逐渐升高;荧光素染色的S/C的比值逐渐下降,评分降低;自然修复组和活性修复组与空白对照相比,S/C的比值具有统计学差异 $p<0.05$;活性修复组与自然修复组相比,电阻值的增高具有统计学意义,荧光素滞留的评分值相差1级和1级以上,认为活性物质对修复有促进作用;

(2) 浊度测试:随着培养时间的延长,自然修复组和活性修复组浊度(OP)的值逐渐下降;修复组与空白对照相比的浊度差值逐渐缩小;活性修复组与自然修复组相比,至少在2个和2个时间点以上,浊度差值相比具有统计学差异 $p<0.05$,认为活性物质对修复有促进作用;

(3) 炎性因子检测:随着培养时间的延长,自然修复组和活性修复组炎性因子的数值应呈下降或升高趋势,且具有统计学差异 $p<0.05$;同一时间下,活性修复组与自然修复组相比,特征性炎性因子或修复因子的水平具有统计学差异,提示活性物质对修复有促进作用;

(4) 组织学观察:通过HE染色和免疫组化染色,观察角膜的组织学变化,并详细记录:

角膜化学刺激性损伤发生后,组织学表现为上皮的明显缺损,上皮细胞缺失、通透性增加,紧密连接蛋白Z0-1、Occludin结构消失;随时间推移,上皮细胞增殖并向缺损处迁徙,其通透性逐渐降低,紧密连接蛋白结构逐渐形成;24h时,上皮细胞覆盖角膜上皮缺损处,但其通透性仍较正常组高,其细胞间紧密连接松散、排列紊乱;48h后,角膜通透性恢复正常,其角膜上皮细胞连接紧密,细胞间形成紧密连接结构;如果促进修复组与自然修复组相比,组织学修复时间缩短12h以上或修复程度提高,即相似组织学结构和特征观察的时间提前12小时以上,提示活性物质对修复有促进作用。

2.根据权利要求1所述的利用角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,其特征是:所述的步骤1离体角膜制备包括以下子步骤:

从屠宰场动物屠宰后的2-3小时内从眼眶摘取眼球,分离过程中避免损伤角膜;

离体眼球完全浸没于冰冷的含有抗生素的HBSS平衡盐溶液中运送到实验室;

眼角膜的切除在实验室的无菌区域进行,切取角膜前肉眼检查角膜完整性,检查有无划痕、色素沉着、混浊或机械划痕,有上述缺陷的眼球则丢弃;

猪眼球浸入含1%的聚维酮碘溶液2min,用无菌PBS冲洗,浸入含有0.1%庆大霉素的PBS 15min消毒后,进行角膜切除操作;

牛角膜从完整眼球中直接分离,分离角膜时,在角膜边缘保留2-4mm完整的环形巩膜,

切除后的离体角膜连续用5-7ml无菌的HBSS中冲洗3-5次。

3. 根据权利要求1所述的利用角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,其特征是:所述的步骤3化合物刺激损伤角膜模型及评价包括以下子步骤:

(1) 角膜培养约4-24h后开始正式实验,从培养皿中吸出培养液;把直径1.0~1.5cm的聚四氟乙烯树脂0-形环或特富龙0-形环置于角膜上皮面;

受试物为预期产生刺激作用的适当浓度的化学品液体,取液体刺激物40-100ul加入环内,暴露10~20min;若选择紫外线为损伤模型,波长为UVB,照射剂量为40-70mJ/cm²;

暴露结束后,用2-3ml PBS轻轻冲洗角膜2-3次,直到完全去除受试物残留;将其浸没于含有40-60ml M199培养基的培养皿中,32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱继续孵育2小时;每个损伤模型使用6-10个角膜;

(2) 角膜浊度变化:孵育结束后,取其中2只角膜,去除聚四氟乙烯树脂或特富龙0-形环,固定于角膜夹持器中;随后按先充满后室再充满前室的顺序添加新鲜的MEM培养液;用浊度仪检测每一角膜的浑浊度,记录浑浊度值(OP)为OP_{刺激0h}或OP_{修复0h};

同时,取空白组角膜进行浊度测试,记录浑浊度为OP_{空白};

(3) 电阻值测定和荧光素观察:同步骤5之(5);

(4) 组织学评价:同步骤5之(6);

(5) 化学损伤角膜评价:

如果浊度值变化≥3且<10,认为轻度-中度损伤已造成;

如果浊度值≥10且<25,认为中度-严重损伤已造成;

如果浊度值≥25,认为损伤程度过于严重,不可用于修复性测试;

如果电阻测定值>1,且≤5,认为角膜屏障功能受损,如果电阻值≤1,认为损伤过于严重,不可用于修复测试,空白组电阻值应>5;

荧光素染色评分若不满足损伤面积>50%,小于75%,则认为损伤程度过于严重,不能用于损伤修复评估;

组织学检查:角膜损伤后,出现上皮的不同程度的缺损,表现为上皮细胞脱落,紧密连接蛋白ZO-1、Occludin结构减少消失;基质层不同程度水肿、胶原束排列紊乱;化学物质损伤基质层,而上皮屏障功能受损不明显;组织学损伤应与浊度测试和荧光素染色对应;

(6) 剩余的角膜浸没于含有40-60ml M199培养基的培养皿中,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱,按步骤2角膜长期培养方法继续培养,进行后续自然修复或促进修复作用研究;

(7) 同时设置空白对照和阴性对照,阴性对照为去离子水,均采用相同的操作步骤。

4. 根据权利要求1所述的利用角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,其特征是:所述的步骤4物理刺激损伤角膜模型及评价包括以下子步骤:

(1) 角膜培养约24h后,从培养皿中吸出培养液;把直径1.0cm的聚四氟乙烯树脂0-形环或特富龙环置于角膜;用无菌的眼科手术刀片在眼角膜中央刮除直径为8mm的角膜中央上皮,深及角膜上皮细胞基底层,制备机械性角膜损伤模型;每个损伤模型使用6-10个角膜;取其中的2只角膜进行如下刺激程度评估测试:

(2) 荧光素观察:同步骤5之(5);NaFL染色显示损伤的角膜,黄色区域的大小表示损伤的严重程度;

(3) 物理刺激模型引进的组织学评价:同步骤5之(6);

(4) 物理损伤角膜评价:

荧光素染色评分若不满足损伤面积>50%, 小于75%, 则认为损伤程度过于严重, 不能用于损伤修复评估;

组织学检查: 角膜损伤后, 出现上皮的明显缺损, 表现为上皮细胞缺失, 紧密连接蛋白ZO-1、Occludin结构消失; 基质层上层断裂或缺失, 物理因素导致的组织学损伤应与荧光素染色对应;

(5) 剩余的角膜浸没于含有40-60ml M199培养基的培养皿中, 置于32°C±2°C、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱, 按步骤2角膜长期培养方法继续培养, 进行后续自然修复或促进修复作用研究;

(6) 同时设置阴性对照, 阴性对照为去离子水, 均采用相同的操作步骤。

5. 根据权利要求1所述的利用角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法, 其特征是: 所述的步骤1-4任意一项, 涉及角膜的分离和长期培养中:

所述的离体角膜为屠宰场废弃的猪或牛的眼球中分离所得;

所述的琼脂-猪皮明胶-M199混合物, 是指含1%低凝固点琼脂、1%猪皮凝胶或M199培养基, 维持37°C;

所述HBSS缓冲液, 是指商品化的Hank's平衡盐溶液; 所述M199培养基, 是M199培养基, 加入10%小牛血清、庆大霉素、青霉素/链霉素, 猪角膜的培养还加入由两性霉素B; 所述聚维酮碘为防腐剂, 浓度为1%;

所述的“0-形环”为聚四氟乙烯树脂惰性材料制备的白色圆环或特富龙环圆环;

若是外径为9-11mm、内径8-10mm的环, 加样量为40μL; 若是外径为13-15mm、内径为11-13mm的环, 加样量为100μL; 用于固定测试物和限定观察区域。

6. 根据权利要求1所述的利用角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法, 其特征是: 所述的步骤3-4任意一项, 涉及角膜损伤方法中:

所述的化学损伤, 是指化学物质或混合物进入眼球导致的角膜化学性刺激, 常用刺激剂为1.5%-3%的SLS、0.2mol-0.4mol的NaOH, 3%-6%的trichloro-acetic acid (TCA)、(1.5-3)%的H₂O₂, 化学物质暴露时间为10~20min, 根据化学刺激物的类型和程度进行选择: 中度到严重眼刺激的化合物选择短的作用时间, 弱到中等程度眼刺激的化合物选择较长的作用时间, 或采用预实验确定暴露时间;

所述的紫外线损伤, 属于物理性因素, 指UVB或UVA导致的角膜受损, UVB照射剂量为40mJ/cm²-70mJ/cm², UVA照射剂量为10J/cm²-50J/cm²;

所述的机械损伤, 根据研究目的, 选择直径2-3mm的打孔器损伤角膜上皮及基质表层, 但不伤及角膜基质深层; 选择刀片、针头或钝器对角膜表面进行轻微切削、划痕、擦拭、研磨或剥离, 但不伤及角膜深层; 选择其它物理方式应保证操作熟练稳定和角膜之间个体差异尽可能小。

7. 根据权利要求1所述的利用角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法, 其特征是: 所述的步骤5-6任意一项, 涉及角膜损伤修复的检测和评估中:

所述的检测活性物质修复作用的平行角膜数量, 视检测的时间点的参数而定, 若考虑组织学观察、荧光素测定和浊度测试, 同时考虑第2h、14h、26h、38h、50h、62h、74h、86h、90h、

110h、170h和14d±2h在内的5个检测时间点,每个时间取2-5个角膜进行测试,则实验组至少需要10-25个角膜数量;促进修复组、空白对照和基准物质对照也应当采用相应数量的角膜;

所述的角膜电阻是反应屏障功能的特征,用低电压交流惠登特电桥测定;

所述的浊度值是主要反应角膜基质层的完整性,用角膜浊度仪测定;

所述的检测活性物质的机械损伤后修复作用,不考虑浊度的测试;

所述的炎性因子或修复因子,是指角膜修复过程中角膜细胞分泌的特异性物质,包括炎性细胞因子:1L-1 α ,1L-1 β ,1L-6,1L-7,1L-10,1L-12,1L-12,1L-15,M1P-1 α ,M1P-1 β ,M1P-2,TNF- α 或PGE2、增殖因子、酶:LDH;

所述的免疫组化,是指利用抗原-抗体结合反应的原理,对组织学切片进行特征性标志物的染色,表明角膜屏障功能的标志物包括紧密连接蛋白Z0-1、Occludin、钙粘连蛋白,选用多克隆兔抗体牛或猪抗体为一抗,1:100~1:200稀释;选择二抗为鼠抗兔或山羊抗兔抗体;

所述的利用商业化的试剂盒,包括流式细胞术、ELISA和免疫组化方法,对收集的细胞和相应的培养基进行含量测定,与试验对照组比较,检测目标分泌物的产生情况,并通过统计分析修复过程中某些分泌物的增加或减少是否有显著变化;

所述的实验对照是指不进行任何的含有活性物质的空白对照;

所述的评价活性物质促进修复作用,以自然修复作为对照;必要时增加基准物质对照,基准物质是指已知的促进修复作用明确的物质。

8.根据权利要求1-7任意一项所述的利用角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,其特征是:

所述促进角膜修复所用的活性物质,是指在培养基中加入碱性成纤维细胞生长因子、小牛血去蛋白提取物、重组表皮生长(rhEGF)或维生素A棕榈酸酯,或直接使用含药物的眼用药水;

所述的统计学方法,是指将获得的各组实验数据,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析,多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义;

所述化学损伤修复应综合分析荧光素染色、浊度测试、炎性因子检测和组织学观察;其中的权重从大到小依次为:荧光素染色>浊度测试>组织学观察>炎性因子检测;

所述物理损伤修复应综合分析荧光素、炎性因子检测和组织学观察;其中的权重从大到小依次为:荧光素染色>组织学观察>炎性因子检测。

一种利用动物离体角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种应用于化学品、化妆品、农药和药品眼刺激性及恢复的毒理学 和药理学实验评价的利用动物如猪或牛等离体角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤 及修复作用评估的方法。

背景技术

[0002] 许多外源化学物质,如化妆品、药品、农药和大气污染物等,有可能会接触到眼 睛造成人体眼睛的健康危害。所以,检测和评估药品、日用消费品(如个人护理品、家居化学品、清洁消毒产品等)、环境污染物(如农药、烟尘、颗粒物、花粉等)潜 在眼刺激性成为保障人身安全的重要内容。眼刺激试验是眼部接触产品上市前安全评 价的强制检验项目,也是化学品标识和分类的强制要求,其目的是采用科学方法检测 和判断产品安全性以减少人类健康风险。因此对待测物的快速分类和危害识别是风险 决策的首要任务。对于眼刺激物的毒理学评价,传统方法沿用1944年Draize提出的 兔眼刺激体内实验,兔眼实验的缺点包括动物遭受极大痛苦、试验周期长、检验成本 高、结果判定主观性强、动物与人体反应存在差异等。

[0003] 另一方面,临床常见的角膜外伤性或机械性损伤的治疗,或手术后(如角膜异物剔除术后、准分子术后或白内障术后)通常需要使用一些药物促进角膜愈合,对这些 药物是否具有刺激性,及其促进角膜修复作用的观察也是药理研究的基本要求。传统 的评价方法通常使用活体动物,造成角膜缺损或刺激性损伤模型,然后通过施加药物 后检查角膜形态、结构和功能,评估药物的作用。动物实验普遍存在动物极其痛苦、试验周期长、手术稳定性差、研究成本高、与人体反应存在差异等不足。

[0004] 随着生命科学的研究和检验检测中“3R原则”,即减少(reduction)、代替(replacement)和优化(refinement)动物实验原则的国际化,特别是“21世纪毒 性测试愿景”的提出和新技术的发展,不再以动物模式为基础的测试系统已成为科学 研究的热点,一些检测和评估的方法已被许多国家的法规所接受。如欧盟化妆品法规《1223/2009/EC》对于化妆品动物实验的禁止,欧盟化学品REACH法规《1907/2006/EC》(化学品的注册、评估、许可和限制)鼓励动物试验替代方法的开发和应用。采用体 外实验系统和方法进行眼刺激性评价已取得极大成功,对于急性刺激和腐蚀性的测试,经济合作的发展组织(OECD)已确认和认可了一些方法,包括离体牛角膜的方法,角 膜细胞的短期暴露方法,上皮细胞的荧光素漏出法和重建角膜模型的方法等。如何合 理科学地使用这些方法,并在此基础上进一步创新新的测试系统和评估方法,解决现 有方法和不足,仍然是眼科毒理学和药理学评价的主要研究内容。

[0005] 根据体内眼损伤发生的机理,目前开发中的眼刺激替代方法可分为细胞系统、鸡胚、人工角膜和离体器官四类,这几类方法各有其优缺点和适用范围。细胞系统标准 化程度最高、成本低、快速,但只适用于可溶解物质的测试。鸡胚方法的标准化程度 不高,适合

模拟结膜的损伤,而对角膜损伤预测不佳。体外重建的人工角膜缺少角膜 内皮细胞层、构建成本高,操作难度大。而且,上述这些方法都不能用于角膜损伤后 恢复作用的研究和测试,因为有些轻微刺激性的物质可造成角膜的短暂可逆性损伤,只有体外培养时间较长的试验系统才能检测这种作用。此外,对于各种原因导致的角 膜机械性损伤,如角膜上皮擦伤(如指甲、树枝、隐形眼镜等异物划伤)、角膜异物 伤(如铁屑、谷壳、风沙、灰尘等)、角膜手术(如激光治疗近视眼、微创切除),也 需要开发促进角膜修复的药物并研究其作用机制。而采用单层细胞培养、鸡胚培养或 人工角膜等体外方法均不能模拟角膜的完整结构和机械性损伤。

[0006] 本发明使用的离体角膜,来自畜牧业废弃的动物眼球,切取活性角膜组织进行培养和实验,除了可以用于替代体内动物实验检测角膜刺激性以外,还可以用于角膜受 损后恢复能力的检验和评估。此外,来源于大型动物的角膜较兔、鼠或鸡的角膜更合 适用于眼刺激性的测试,特别是猪的角膜组织结构更接近于人类,是研究角角膜修复 作用的理想模型。目前基于猪和牛离体角膜模型建立的体外方法还未见相关专利和文 献报道。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题,就是提供一种利用离体猪角膜或牛角膜模型评价眼刺激性及修复作用评估的方法,本方法通用、快速、简便、成本低、对检测仪器无特 殊要求。

[0008] 解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下。

[0009] 本发明的上述目的是通过如下技术方案来实现的:一种利用离体角膜长期培养系统评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,其包含以下步骤:

[0010] 一种利用动物离体角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法,其特征是包括以下步骤:

[0011] 步骤1.离体角膜制备;

[0012] 步骤2.角膜长期培养:

[0013] 取清洗干净的角膜,上皮面朝下悬浮于添加有HBSS液的6孔板或直径35mm的 培养皿,使角膜完全浸没于培养液;

[0014] 将融解状态的0.5-5%的琼脂-明胶-M199混合物,缓慢逐滴每次2-3滴加入角膜窝 内皮面,直至内皮窝完全填满,琼脂-明胶在室温下完全凝固;

[0015] 将充满凝固的琼脂-明胶的角膜倒置,转移到若干35mm培养皿中;

[0016] 吸取40-60ml的M199培养基加入每个培养皿中,直到覆盖角膜缘,裸露角膜上 皮面暴露于空气中;

[0017] 将培养皿置于小型振荡器上,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱中 培 养8-24h,小型振荡器应使培养皿在每2-3h内从水平位置摇动到45°角,使得角膜 可以 短暂浸泡在培养基中浸润上皮组织;

[0018] 步骤3.角膜化学损伤模型及评价;

[0019] 步骤4.角膜物理损伤模型及评价;

[0020] 步骤5.角膜损伤后修复作用评估:

[0021] (1) 化合物损伤角膜后,将角膜转移到新的培养皿中,取40ml新的M199培养基 加 入每个培养皿中,后孵育2小时;更换含有活性物质表皮生长因子、碱性成纤维细 胞生长因

子或维生素的M199培养基,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱,按步骤2角膜长期培养方法继续培养至第14天;实验组平行样20-30个;含活性物质的M199培养基为活性修复组,不含活性物质的M199培养基为自然修复组,同时设空白对照;必要时设置基准对照;

[0022] (2) 培养期间,每2天更换含活性物质的M199培养液;分别于化学损伤后的第2h、14h、26h、50h、74h、98h、170h和14d±2h,取培养液进行细胞因子测试,并取实验组其中2-3只角膜进行浊度测试、荧光素留评分和组织学观察,其余角膜继续培养;

[0023] (3) 角膜液细胞因子测试:在更换新的培养液前,从培养皿中移出培养液,检测培养液中的炎性因子和修复因子水平:包括IL-1a、IL-6、IL-8;

[0024] (4) 浊度变化:浊度检测前,从培养皿中取出角膜,将其固定于夹持器中,夹持器的后室和前室分别依次填充无菌不含酚红的MEM培养基,用角膜浊度仪测量并记录每个角膜的浊度值,来自不同组的角膜分别记录浊度值,OP_{活性},OP_{修复},OP_{空白};计算实验组与空白组的浊度差值;

[0025] (5) 电阻测定和荧光素观察:测完浊度后,用电阻仪测定角膜的电阻值(Ω);然后从夹持器中取下角膜,上表面滴入含2%荧光素钠(NaFL)的PBS;过量的NaFL立即用PBS冲洗,在紫外灯下观察NaFL的滞留,滞留的程度表明角膜损伤的严重性;

[0026] 计算滞留面积S占整个角膜面积C的百分比值,根据S/C值对损伤/恢复程度进行评分;0分:<2%,1分:2~25%,2分:26~50%,3分:51~75%,4分:76%~100%;

[0027] (6) 组织学评价:荧光素评分完成后,取角膜加入10%中和福尔马林缓冲液中固定24h;石蜡包埋、切片、取部分切片进行HE染色;显微镜下观察并评估组织学变化;

[0028] 取部分切片进行免疫组化染色:角膜上皮细胞紧密连接蛋白Occludin或ZO-1的染色或钙粘连蛋白染色,用于观察角膜修复过程中,上皮屏障功能的改善情况;

[0029] 步骤6.统计分析与结果判定

[0030] 将上述步骤获得的各组实验数据,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析,多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义;

[0031] 化学损伤后修复综合分析电阻测定值、荧光素染色、浊度测定值、炎性因子检测和组织学观察结果;机械损伤修复不进行电阻测定和浊度测试;紫外线损伤后修复参考化学损伤;

[0032] 根据不同检测参数的意义,从统计结果分析,作出修复作用的综合判断;

[0033] (1) 电阻测定荧光素染色:随着培养时间的延长,自然修复组和活性修复组电阻值逐渐升高;荧光素染色的S/C的比值逐渐下降,评分降低;自然修复组和活性修复组与空白对照相比,S/C的比值具有统计学差异 $p<0.05$;活性修复组与自然修复组相比,电阻值增加具有统计学意义,荧光素滞留的评分值相差1级和1级以上,认为活性物质对修复有促进作用;

[0034] (2) 浊度测试:随着培养时间的延长,自然修复组和活性修复组浊度(OP)的值逐渐下降;修复组与空白对照相比的浊度差值逐渐缩小;活性修复组与自然修复组相比,至少在2个和2个时间点以上,浊度差值相比具有统计学差异 $p<0.05$,认为活性物质对修复

有促进作用；

[0035] (3) 炎性因子检测：随着培养时间的延长，自然修复组和活性修复组炎性因子的数值应呈下降或升高趋势，且具有统计学差异 $p<0.05$ ；同一时间下，活性修复组与自然修复组相比，特征性炎性因子或修复因子的水平具有统计学差异，提示活性物质对修复有促进作用；

[0036] (4) 组织学观察：通过HE染色和免疫组化染色，观察角膜的组织学变化，并详细记录：

[0037] 角膜化学刺激性损伤发生后，组织学通常表现为上皮的明显缺损，上皮细胞缺失、通透性增加，紧密连接蛋白ZO-1、Occludin结构消失；随时间推移，上皮细胞增殖并向缺损处迁徙，其通透性逐渐降低，紧密连接蛋白结构逐渐形成；24h时，上皮细胞覆盖角膜上皮缺损处，但其通透性仍较正常组高，其细胞间紧密连接松散、排列紊乱；48h后，角膜通透性恢复正常，其角膜上皮细胞连接紧密，细胞间形成紧密连接结构；如果促进修复组与自然修复组相比，组织学修复时间缩短12h以上或修复程度提高，即相似组织学结构和特征观察的时间提前12小时以上，提示活性物质对修复有促进作用。

[0038] 优选地，所述的步骤1离体角膜制备包括以下子步骤：

[0039] 从屠宰场动物屠宰后的2-3小时内从眼眶摘取眼球，分离过程中避免损伤角膜；

[0040] 离体眼球完全浸没于冰冷的含有抗生素的HBSS平衡盐溶液中运送到实验室；

[0041] 眼角膜的切除在实验室的无菌区域进行，切取角膜前肉眼检查角膜完整性，检查有无划痕、色素沉着、混浊或机械划痕，有上述缺陷的眼球则丢弃；

[0042] 猪眼球浸入含1%的聚维酮碘溶液2min，用无菌PBS冲洗，浸入含有0.1%庆大霉素的PBS 15min消毒后，进行角膜切除操作；

[0043] 牛角膜从完整眼球中直接分离，分离角膜时，在角膜边缘保留2-4mm完整的环形巩膜，切除后的离体角膜连续用5-7ml无菌的HBSS中冲洗3-5次。

[0044] 优选地，所述的步骤3化合物刺激损伤角膜模型及评价包括以下子步骤：

[0045] (1) 角膜培养约4-24h后开始正式实验，从培养皿中吸出培养液；把直径1.0~1.5cm的聚四氟乙烯树脂O-形环或特富龙O-形环置于角膜上皮面；

[0046] 受试物为预期产生刺激作用的适当浓度的化学品液体，如3%的SLS、100%乙醇或3%的H2O2，取液体刺激物40-100ul加入环内，暴露10~20min；若选择紫外线为损伤模型，波长为UVB，照射剂量为40-70mJ/cm2；

[0047] 暴露结束后，用2-3ml PBS轻轻冲洗角膜2-3次，直到完全去除受试物残留；将其浸没于含有40-60ml M199培养基的培养皿中，32℃±2℃、5%CO2、90%相对湿度的培养箱继续孵育2小时；每个损伤模型使用6-10个角膜；

[0048] (2) 角膜浊度变化：孵育结束后，取其中2只角膜，去除聚四氟乙烯树脂或特富龙O-形环，固定于角膜夹持器中；随后按先充满后室再充满前室的顺序添加新鲜的MEM培养液；用浊度仪检测每一角膜的浑浊度，记录浑浊度值(OP)为OP_{刺激0h}或OP_{修复0h}；

[0049] 同时，取空白组角膜进行浊度测试，记录浑浊度为OP_{空白}；

[0050] (3) 电阻测定和荧光素观察：同步骤5之(5)；

[0051] (4) 组织学评价：同步骤5之(6)；

[0052] (5) 化学损伤角膜评价：

[0053] 如果电阻测定值 >1 ,且 ≤ 5 ,可以认为角膜屏障功能受损,如果电阻值 ≤ 1 ,认为损伤过于严重,不可用于修复测试,空白组电阻值应 >5 ;如果浊度值变化 ≥ 3 且 < 10 ,认为轻度-中度损伤已造成;如果浊度值 ≥ 10 且 < 25 ,认为中度-严重损伤已造成;如果浊度值 ≥ 25 ,认为损伤程度过于严重,不可用于修复性测试;

[0054] 荧光素染色评分应为3分,即损伤面积应 $>50\%$,小于75%,否则损伤程度过于严重,不能用于损伤修复评估;

[0055] 组织学检查:角膜损伤后,通常出现上皮的不同程度的缺损,表现为上皮细胞脱落,紧密连接蛋白ZO-1、Occludin结构减少消失;基质层不同程度水肿、胶原束排列紊乱;有些化学物质,如氧化剂过氧化氢等,损伤基质层,而上皮屏障功能受损不明显;组织学损伤应与浊度测试和荧光素染色对应;

[0056] (6)剩余的角膜浸没于含有40-60ml M199培养基的培养皿中,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱,按步骤2角膜长期培养方法继续培养,进行后续自然修复或促进修复作用研究;

[0057] (7)同时设置空白对照和阴性对照,阴性对照为去离子水,均采用相同的操作步骤。

[0058] 优选地,所述的步骤4物理刺激损伤角膜模型及评价包括以下子步骤:

[0059] (1)角膜培养约24h后,从培养皿中吸出培养液;把直径1.0cm的聚四氟乙烯树脂O-形环或特富龙环置于角膜;用无菌的眼科手术刀片在眼角膜中央刮除直径为8mm的角膜中央上皮,深及角膜上皮细胞基底层,制备机械性角膜损伤模型;每个损伤模型使用6-10个角膜;取其中的2只角膜进行如下刺激程度评估测试:

[0060] (2)荧光素观察:同步骤5之(5);NaFL染色显示损伤的角膜,黄色区域的大小表示损伤的严重程度;

[0061] (3)物理刺激模型引进的组织学评价:同步骤5之(6);

[0062] (4)物理损伤角膜评价:

[0063] 荧光素染色评分应为3分,即损伤面积应 $>50\%$,小于75%,否则损伤程度过于严重,不能用于损伤修复评估

[0064] 组织学检查:角膜损伤后,应出现上皮的明显缺损,表现为上皮细胞缺失,紧密连接蛋白ZO-1、Occludin结构消失;基质层上层断裂或缺失,物理因素导致的组织学损伤应与荧光素染色对应;

[0065] (5)剩余的角膜浸没于含有40-60ml M199培养基的培养皿中,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱,按步骤2角膜长期培养方法继续培养,进行后续自然修复或促进修复作用研究;

[0066] (6)同时设置阴性对照,阴性对照为去离子水,均采用相同的操作步骤。

[0067] 优选地,所述的步骤1-4任意一项,涉及角膜的分离和长期培养中:

[0068] 所述的离体角膜为屠宰场废弃的猪或牛的眼球中分离所得;

[0069] 所述的琼脂-猪皮明胶-M199混合物,是指含1%低凝固点琼脂、1%猪皮凝胶或M199培养基,维持37℃;

[0070] 所述HBSS缓冲液,是指商品化的Hank's平衡盐溶液;

[0071] 所述M199培养基,是M199培养基,加入10%小牛血清、庆大霉素、青霉素/链霉素,

猪角膜的培养还加入由两性霉素B;

[0072] 所述聚维酮碘为防腐剂,浓度为1%;

[0073] 所述的“0-形环”为聚四氟乙烯树脂惰性材料制备的白色圆环或特富龙环圆环,对角膜无毒性、无刺激性、不与样品发生反应和粘附,可高压灭菌重复使用;

[0074] 若是外径为9-11mm、内径8-10mm的环,加样量为40 μ L;若是外径为13-15mm、内径为11-13mm的环,加样量为100 μ L;用于固定测试物和限定观察区域。

[0075] 优选地,所述的步骤3-4任意一项,涉及角膜损伤方法中:

[0076] 所述的化学损伤,是指化学物质或混合物进入眼球导致的角膜化学性刺激,常用刺激剂为1.5%-3%的SLS、0.2mol-0.4mol的NaOH,3%-6%的trichloro-acetic acid (TCA)、(1.5-3)%的H2O2,化学物质暴露时间为10~20min,根据化学刺激物的类型 和程度进行选择:中度到严重眼刺激的化合物选择短的作用时间,弱到中等程度眼刺激的化合物选择较长的作用时间,或采用预实验确定暴露时间;

[0077] 所述的紫外线损伤,属于物理性因素,指UVB或UVA导致的角膜受损,UVB照射 剂量为40mJ/cm²-70mJ/cm²,UVA照射剂量为10J/cm²-50J/cm²;

[0078] 所述的机械损伤,根据研究目的,选择直径2-3mm的打孔器损伤角膜上皮及基质表层,但不伤及角膜基质深层;选择刀片、针头或钝器对角膜表面进行轻微切削、划 痕、擦拭、研磨或剥离,但不伤及角膜深层;选择其它物理方式应保证操作熟练稳定 和角膜之间个体差异尽可能小。

[0079] 优选地,所述的步骤5-6任意一项,涉及角膜损伤修复的检测和评估中:

[0080] 所述的检测活性物质修复作用的平行角膜数量,视检测的时间点的参数而定,如果考虑组织学观察、荧光素测定和浊度测试,同时考虑第2h、14h、26h、36h、50h、74h、86h、90h、170h和14d±2h在内的5个检测时间点,每个时间取2-5个角膜进 行测试,实验组至少需要10-25个角膜数量;促进修复组、空白对照和基准物质对照 也应当采用相应数量的角膜;

[0081] 所述的检测活性物质的机械损伤后修复作用,不考虑浊度的测试;

[0082] 所述的角膜电阻是反应屏障功能的特征,可用低电压交流惠登特电桥测定;

[0083] 所述的浊度值是主要反应角膜基质层的完整性,可用角膜浊度仪测定;所述的炎性因子或修复因子,是指角膜修复过程中角膜细胞分泌的特异性物质,包括炎性细胞 因子:1L-1 α ,1L-1 β ,1L-6,1L-7,1L-10,1L-12,1L-12,1L-15,M1P-1 α , M1P-1 β ,M1P-2,TNF- α 或PGE2、增殖因子、酶:LDH;

[0084] 所述的利用商业化的试剂盒,包括流式细胞术、ELISA和免疫组化方法,对收集 的细胞和相应的培养基进行含量测定,与试验对照组比较,检测目标分泌物的产生情 况,并通过统计分析修复过程中某些分泌物的增加或减少是否有显著变化;

[0085] 所述的免疫组化,是指利用抗原-抗体结合反应的原理,对组织学切片进行特征性标志物的染色,表明角膜屏障功能的标志物包括紧密连接蛋白ZO-1、Occludin、钙 粘连蛋白,可选用多克隆兔抗体牛或猪抗体为一抗,1:100~1:200稀释;可选择二抗 为鼠抗兔或山羊抗兔抗体。

[0086] 所述的实验对照是指不进行任何的含有活性物质的空白对照;

[0087] 所述的评价活性物质促进修复作用,以自然修复作为对照;必要时增加基准物质

对照,基准物质是指已知的促进修复作用明确的物质。

[0088] 优选地,所述促进角膜修复所用的活性物质,是指在培养基中加入碱性成纤维细胞生长因子、小牛血去蛋白提取物、重组表皮生长(rhEGF)或维生素A棕榈酸酯,或直接使用含药物的眼用药水;

[0089] 所述的统计学方法,是指将获得的各组实验数据,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS22.0统计软件进行分析,多组之间差异的比较用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK检验法,显著性水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义;

[0090] 所述化学损伤修复应综合分析荧光素染色、浊度测试、炎性因子检测和组织学观察;其中的权重从大到小依次为:荧光素染色>电阻值测定>浊度测试>组织学观察>炎性因子检测;

[0091] 所述物理损伤修复应综合分析荧光素、炎性因子检测和组织学观察;其中的权重从大到小依次为:荧光素染色>组织学观察>炎性因子检测。

[0092] 本发明所提供的上述利用猪角膜或牛角膜模型评价眼刺激性及其修复过程的方法,是利用外源刺激物,如化学物质、紫外线引起可逆性的角膜上皮细胞变性和基质损伤,通过预测模型,评估眼刺激性的程度;或者是利用化学方法、物理方法或机械方法造成角膜上皮细胞和基质的可逆性刺激、轻微磨损或缺失损伤,评估损伤后角膜的自身修复,或者损伤发生后添加药物评价药物促进角膜修复作用的方法。

[0093] 该方法操作简单,与体内实验相关性好,敏感程度高,能满足角膜刺激性损伤及其修复等相关的检测和研究的需要。

[0094] 外源化合物对眼损伤的程度不仅局限于上皮,也可能涉及上层间质,轻度的损伤是可逆的和可以恢复的,而多数体外评价方法无法检测损伤后的恢复。因此,离体角膜长期培养可以作为评估化学物潜在刺激性和化学物暴露后恢复情况的体外模型,也可以作为评估角膜机械性损伤后自身修复或药物促进修复情况的体外模型。离体大动物(猪角膜和牛角膜)的眼角膜组织结构与人角膜相近,刺激性反应的发生机制和修复过程与人角膜类似。本发明用于定量指示角膜刺激性损伤及其修复的指标包括:角膜混浊程度、角膜组织形态结构、角膜炎症变化、角膜屏障功能变化等。角膜混浊度用角膜浊度仪定量测定,角膜显微结构变化通过制作组织学切片观察和评分,角膜炎症变化通过定量检测培养液中成份反应,角膜屏障功能变化通过荧光素钠滞留量的测定。

[0095] 本发明基于角膜损伤和恢复作用两项指标建立的预测模型可以用于待测物有无刺激性及刺激程度大小的判断,可以用于区分眼刺激损伤及损伤后的恢复,可用于检验自身修复或辅助修复作用的差异。可完整提供包括产品安全性、角膜损伤程度及修复过程等充分完整的信息。

[0096] 本发明涉及实验中所用的离体角膜培养技术,该培养技术成熟,操作容易,重复性好,而且价格低廉。

[0097] 有益效果:本发明可以用于替代活体动物检测外源化学损伤或机械损伤导致的角膜刺激性的恢复作用。与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0098] (1)本发明建立了离体动物角膜的长期培养模型,可在体外保持活性培养14天以上,解决了体外方法无法用于损伤后修复作用评估的不足;

[0099] (2)本发明使用的离体动物角膜,是来源稳定可靠,具有与人体角膜相似结构和

活性的三维组织材料,可直接接触刺激物损伤,适用于任何化学损伤和物理损伤作用及恢复作用的测试;

[0100] (3) 本发明检测了角膜浊度、荧光素潴留、炎性介质水平和组织学观察等多维度的参数变化,完整地评价了损伤作用及修复过程中角膜混浊程度、角膜组织形态结构、角膜炎症变化、角膜屏障功能的动态变化,检测参数全面,方法灵敏,特异性高,预测模型准确;

[0101] (4) 本发明使用天然角膜的长期培养模型,与二维细胞只能检测可溶解化学物质刺激性损伤相比,三维系统可以检测单一化合物、混合污染物、紫外线暴露和机械性造成的眼角膜损伤;

[0102] (5) 本发明建立的方法可以代替活体动物实验,提供定量和定性的角膜受损后自然和加速修复作用的检测和研究,直接用于化妆品、药品、空气污染物等产品和样品的角膜刺激及恢复作用的预测;

附图说明

- [0103] 图1离体角膜加入琼脂-猪皮明胶-M199混合物后长期培养时;
- [0104] 图2猪角膜组织学结构(某次实验的空白对照组HE染色图);
- [0105] 图3化学品损伤后的牛角膜荧光素钠染色(损伤程度评为2分);
- [0106] 图4自然恢复7天后的牛角膜荧光素钠染色(损伤程度评分为0分);
- [0107] 图5化学品损伤后的牛角膜组织学结构(对应浊度值为18);
- [0108] 图6促进恢复4天后的牛角膜组织学结构(HE染色);
- [0109] 图7牛角膜轻度损伤后的紧密连接免疫组织学(ZO-1免疫染色);
- [0110] 图8牛角膜损伤修复4天后的紧密连接免疫组织学(Occludin免疫染色);

具体实施方式

[0111] 实施例1SLS对猪角膜的损伤及自然修复作用评估

[0112] 1. 离体猪角膜制备

[0113] 1.1 猪角膜制备:猪屠宰后2h内从眼眶摘取眼球,分离过程中避免损伤角膜。离体猪眼球完全浸没于冰冷的含有两性霉素B的HBSS平衡盐溶液中运送到实验室。猪眼角膜的切除应在实验室的无菌区域进行,切取角膜前应肉眼检查角膜完整性,检查有无划痕、色素沉着、混浊和葡萄疮;如有上述缺陷的眼球应丢弃。将猪眼球浸入含1%的聚维酮碘溶液2min,用无菌PBS冲洗,浸入含有0.1%庆大霉素的PBS 15min,消毒后,进行角膜切除操作。从完整眼球中切除分离角膜,角膜边缘保留2-4mm完整的环形巩膜。将离体角膜连续用5-7ml无菌的HBSS中冲洗3-5次。

[0114] 1.2 凝胶填充:取清洗干净的猪角膜,角膜上皮面朝下悬浮于12孔板,培养孔中添加HBSS来支持角膜的悬浮状态,然后将融解状态的2%的琼脂-明胶-M199混合物缓慢逐滴加入(每次2-3滴)角膜窝内皮面,使凝胶直接与内皮接触。重复填充的操作步骤,直至内皮窝完全填满,琼脂-明胶在室温下完全凝固。然后将充满凝固凝胶的角膜倒置,转移到12孔培养板中。

[0115] 1.3 离体猪角膜培养

[0116] 吸取约40ml的M199培养基加入每个培养皿中,直到覆盖角膜缘,裸露角膜上皮面暴露于空气中。将培养皿置于小型振荡器上,置于37℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱中培养大约24±2h。小型振荡器编制振动程序,使培养皿在每2h内,可以从水平位置摇动到大约45°角,使得角膜可以短暂浸泡在培养基中湿润上皮组织。

[0117] 2. 化合物损伤模型

[0118] 2.1加样:角膜培养约6h后,从培养皿中吸出培养液。把直径1.0cm的聚四氟乙烯树脂O-环形置于角膜。分别取3%SLS和阴性对照(去离子水)40μL加入环内。每个被测物用20个角膜。

[0119] 2.2暴露:暴露时间为10min,暴露结束后,用约2ml PBS轻轻冲洗角膜,直到完全去除受试物残留。然后将角膜转移到新的含有40ml M199培养基的培养皿中,32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱继续孵育;

[0120] 3损伤程度检测及自身修复

[0121] 3.1损伤程度评估:2小时取受损组和空白对照组其中的各2只角膜进行浊度、荧光素钠染色和组织学制片,进行刺激程度评估;余下角膜浸没于含有40ml M199培养基的培养皿中,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱;

[0122] 3.2修复作用评估:继续培养至14h、26h、50h、98h,必要时增加173h,取受损组和空白对照组其中的各2只角膜进行浊度测定、电阻测定、荧光素钠染色、炎性因子检测和组织学制片,进行自身修复程度评估;

[0123] 浊度检测:检测前,去除聚四氟乙烯树脂O-形环,固定于专用角膜夹持器中。随后按先充满后室再充满前室的顺序添加新鲜的MEM培养液。用BASF3.0浊度仪检测每一角膜的浑浊度,记录浑浊度值(OP)为OP_{刺激0h}或OP_{修复0h}同时,取空白组角膜进行浊度测试,记录浑浊度为OP_{空白}。

[0124] 角膜液炎性因子测试:在更换新的培养液前,从培养皿中移出培养液,用试剂盒检测培养液中的炎性因子和修复因子水平,包括1L-1a、1L-6、1L-8等;

[0125] 电阻测定:测完浊度后,用Millipore电阻测定仪,按照仪器说明书检测角膜电阻值;

[0126] 荧光素染色:从夹持器中取下角膜,上表面滴入含2%荧光素钠(NaFL)的PBS。过量的NaFL立即用PBS冲洗,在紫外灯下可观察到NaFL的潴留,潴留的程度表明角膜损伤的严重性。计算潴留面积(S)占整个角膜面积(C)的百分比值,根据S/C值对损伤/恢复程度进行评分。0分:<2%,1分:2~25%,2分:26~50%,3分:51~75%,4分:76%~100%。

[0127] 组织学评价:荧光素评分完成后,取角膜加入10%中和福尔马林缓冲液中固定24h。石蜡包埋、切片、取部分切片进行HE染色。显微镜下观察并评估组织学变化;取部分切片进行免疫组化染色,如角膜上皮细胞紧密连接蛋白Occludin与ZO-1的染色,用于观察角膜修复过程中,上皮屏障功能的改善情况。

[0128] 4. 修复作用结果观察

[0129] 4.1浊度检测

[0130] 浊度值OP_{2h}为12,与空白组OP_{0h}相比,浊度变化变化≥3,<15,可认为轻度-中度损伤已造成;

[0131] 4.2电阻测定和荧光素染色

[0132] 用3%SLS处理角膜10min,暴露后2h检测角膜电阻值为1.12Ω;经荧光素钠染色可见超过50%角膜区域染色,损伤面积在75~85%之间,评分为3.5分;26h后约30%角膜区域染色,评分2分;50h约5%,评分1分;98h几乎不可见角膜区域染色,提示角膜上皮恢复。

[0133] 4.3细胞因子检测

[0134] 3%SLS处理角膜可造成炎性因子大量释放,炎性因子水平与损伤程度相关,随着损伤的修复,炎性因子水平下降。不同时间点的检测结果见表1;

[0135] 4.4组织学观察

[0136] 用3%SLS处理角膜后,显示上皮细胞完全损伤或丢失,上层内皮也发生活性角膜细胞丢失;暴露后26h,显示受损区域从上皮细胞迁移至基底膜;暴露50h后,仅见角膜上皮细胞嗜曙红细胞增多,提示上皮恢复明显;暴露98h后,角膜组织结构基本正常,提示角膜上皮完全恢复。

[0137] 表1 SLS化学刺激后的角膜恢复作用

[0138]

	浊度 OP	角膜电阻 (Ω)	荧光素染色	细胞因子 (IL-1a) (pg/ml)
0h(空白)	2	8.85	0	--
2h	14	1.12	3.5	0.8
26h	8	3.51	2	1.0
50h	6	5.27	1	0.6
98h	3	7.03	0	0.4
170h	3	7.68	0	0.3

[0139] 实施例2牛角膜机械损伤及自然修复作用评估

[0140] 1.离体角膜制备和培养

[0141] 1.2牛角膜制备:牛屠宰后5小时内从眼眶摘取眼球,分离过程中避免损伤角膜。离体牛眼球完全浸没于4℃含有青霉素/链霉素的HBSS中运送到实验室。切取角膜前检查牛眼状态,观察到有任何明显的血管变化、色素沉着、浑浊、葡萄疮或机械划痕则将其丢弃。从完整眼球中切除分离角膜,角膜边缘保留2-4mm完整的环形巩膜。将离体角膜连续用5-7ml无菌的HBSS中冲洗3-5次。

[0142] 1.2凝胶填充:取清洗干净的牛角膜,角膜上皮面朝下悬浮于6孔板,培养孔中添加HBSS来支持角膜的悬浮状态,然后将融解状态的%的琼脂-明胶-M199混合物缓慢逐滴加入(每次2-3滴)角膜窝内皮面,使凝胶直接与内皮接触。重复填充的操作步骤,直至内皮窝完全填满,琼脂-明胶在室温下完全凝固。然后将充满凝固凝胶的角膜倒置,转移到35mm培养皿中。

[0143] 1.3角膜培养:吸取约50ml的M199培养基加入每个培养皿中,直到覆盖角膜缘,裸露角膜上皮面暴露于空气中。将培养皿置于小型振荡器上,置于37℃、5%CO₂、90% 相对湿

度的培养箱中培养大约24±2h。小型振荡器编制振动程序,使培养皿在每2.75h 内,可以从水平位置摇动到大约45°角,使得角膜可以短暂浸泡在培养基中湿润上皮 组织。

[0144] 2. 机械性损伤模型

[0145] 角膜培养约24h后,从培养皿中吸出培养液。把直径1.3cm的聚四氟乙烯树脂O- 形环置于角膜。用无菌眼科手术刀片在眼角膜中央刮除直径为8mm的角膜上皮,深及 角膜上皮细胞基底层,制备机械性角膜损伤模型。每个损伤模型使用6-10个角膜。

[0146] 3. 修复作用评估

[0147] 3.1 机械损伤2小时取受损组和空白对照组其中的各2只角膜进行荧光素钠染 色和组织学制片,进行刺激程度评估;

[0148] 余下角膜浸没于含有40ml M199培养基的培养皿中,置于32°C±2°C、5%CO₂、90% 相对湿度的培养箱;分别在2h、26h、50h和170h,取受损组和空白对照组其中的各 2只角膜进行荧光素钠染色、炎性因子检测和组织学制片观察,进行自身修复作用评 估;

[0149] 角膜液炎性因子测试:在更换新的培养液前,从培养皿中移出培养液,用试剂盒检测培养液中的炎性因子和修复因子水平,包括1L-1a、1L-6、1L-8等;

[0150] 荧光素染色:测完浊度后,从夹持器中取下角膜,上表面滴入含2% 荧光素钠 (NaFL) 的PBS。过量的NaFL立即用PBS冲洗,在紫外灯下可观察到NaFL的潴留,潴留的程 度表明角膜损伤的严重性。计算潴留面积(S) 占整个角膜面积(C) 的百分比值,根据S/C值对 损伤/恢复程度进行评分。0分:<2%,1分:2~25%,2分:26~50%,3 分:51~75%,4分: 76%~100%。

[0151] 组织学评价:荧光素评分完成后,取角膜加入10% 中和福尔马林缓冲液中固定 24h。石蜡包埋、切片、取部分切片进行HE染色。显微镜下观察并评估组织学变化;取部 分切片进行免疫组化染色,如角膜上皮细胞紧密连接蛋白Occludin与Z0-1的染色, 用于观察角膜修复过程中,上皮屏障功能的改善情况。

[0152] 4. 修复作用结果观察

[0153] 4.1 荧光素染色

[0154] 用机械损伤后的角膜,2h后检测荧光素钠潴留,可见超过50% 角膜区域染色,损 伤面积>50%,评分为3分;26h后约30% 角膜区域染色,评分2分;50h约5%,评分 1分;98h 几乎不可见角膜区域染色,提示角膜上皮恢复。

[0155] 4.2 细胞因子检测

[0156] 机械损伤可导致细胞内酶和炎性因子释放,表现为培养液中LDH、1L-1a、1L-1b 等 增加,不同时间点的变化见表2;

[0157] 4.3 组织学观察

[0158] 机械损伤角膜后,显示上皮细胞完全缺损,基质层细胞脱落;暴露后26h,显示 上 皮细胞从未受损区域向缺损处迁移;暴露50h后,缺损处已被新生的上皮细胞填充, 提示上 皮恢复明显;暴露98h后,角膜组织结构基本正常,提示角膜上皮完全恢复。表现为上皮细 胞脱落,紧密连接蛋白Z0-1、Occludin结构消失;

[0159] 表2机械损伤后的角膜恢复及评分

[0160]

	荧光素染色	IL-1b (pg/ml)	组织学描述
0h(空白)	0	--	结构正常
2h	3.5		中央部位上皮细胞完全缺失, 基质层细胞脱落
26h	2		上皮细胞从未受损区域向缺损处迁移, 缺损区面积缩小
50h	1		缺损上皮细胞填充, 覆盖基质层表面
98h	0		角膜上皮层完整, 基质层

[0161] 实施例3重组人成纤维细胞生长因子对猪角膜损伤后的修复作用

[0162] 1. 离体猪角膜制备和培养

[0163] 1.1猪角膜制备:猪屠宰后24h内从眼眶摘取眼球,分离过程中避免损伤角膜。离体猪眼球完全浸没于冰冷的含有两性霉素B的HBSS平衡盐溶液中运送到实验室。猪眼角膜的切除应在实验室的无菌区域进行,切取肉眼检查完整无缺陷的角膜。将猪眼球浸入含1%的聚维酮碘溶液2min,用无菌PBS冲洗,浸入含有0.1%庆大霉素的PBS 15min,消毒后,进行角膜切除操作。完整眼球中切除分离角膜,角膜边缘保留2-4mm 完整的环形巩膜。将离体角膜连续用5-7ml无菌的HBSS中冲洗3-5次。

[0164] 1.2凝胶填充:取清洗干净的猪角膜,角膜上皮面朝下悬浮于12孔板,培养孔中添加HBSS来支持角膜的悬浮状态,然后将融解状态的2%的琼脂-明胶-M199混合物缓慢逐滴加入(每次2-3滴)角膜窝内皮面,使凝胶直接与内皮接触。重复填充的操作步骤,直至内皮窝完全填满,琼脂-明胶在室温下完全凝固。然后将充满凝胶的角膜倒置,转移到12孔培养板中。

[0165] 1.3角膜培养:吸取约50ml的M199培养基加入每个培养皿中,直到覆盖角膜缘,裸露角膜上皮面暴露于空气中。将培养皿置于小型振荡器上,置于37°C、5% CO₂、90% 相对湿度的培养箱中培养大约24±2h。小型振荡器编制振动程序,使培养皿在每2.75h 内,可以从水平位置摇动到大约45°角,使得角膜可以短暂浸泡在培养基中湿润上皮组织。

[0166] 2. 化合物暴露

[0167] 2.1加样:角膜培养约24h后,从培养皿中吸出培养液。把直径1.0cm的聚四氟乙烯树脂O-环形置于角膜。分别取3% H₂O₂溶液和阴性对照(去离子水) 40μl加入环内。每个受试物用6个角膜。

[0168] 2.2暴露:过氧化氢暴露时间为5min,暴露结束后,用约2ml PBS轻轻冲洗角膜,完全去除H₂O₂残留。然后将角膜转移到新的培养皿中,取40ml新的M199培养基加入每个培养皿中,培养基含90μm/ml的重组人皮表生长因子。按上述步骤1.3继续培养至第21天,每天更换含生长因子的M199培养液,观察损伤角膜的修复。以未添加生长因子的M199培养液为自然修复对照。

[0169] 3. 损伤修复作用评估

[0170] 3.1 损伤程度检测:2小时取受损组和空白对照组其中的各2只角膜进行浊度、荧光素钠染色和组织学制片,进行刺激程度评估;余下角膜浸没于含有40ml M199培养基的培养皿中,置于32℃±2℃、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱;

[0171] 3.2 修复作用评估:继续培养至2h、14h、26h、50h和98h,取受损组和空白对照组其中的各2只角膜进行浊度测定、电阻值测定、荧光素钠染色、炎性因子检测和组织学制片,进行自身修复程度评估;

[0172] 浊度检测:检测前,去除聚四氟乙烯树脂O-形环,固定于专用角膜夹持器中。随后按先充满后室再充满前室的顺序添加新鲜的MEM培养液。用浊度仪检测每一角膜的浑浊度,记录浑浊度值(OP)为OP_{刺激0h}或OP_{修复0h}同时,取空白组角膜进行浊度测试,记录浑浊度为OP_{空白}。

[0173] 角膜液炎性因子测试:在更换新的培养液前,从培养皿中移出培养液,用试剂盒检测培养液中的炎性因子和修复因子水平,包括IL-1a、IL-6、IL-8等;荧光素染色:测完浊度后,从夹持器中取下角膜,上表面滴入含2%荧光素钠(NaFL)的PBS。过量的NaFL立即用PBS冲洗,在紫外灯下可观察到NaFL的滞留,滞留的程度表明角膜损伤的严重性。计算滞留面积(S)占整个角膜面积(C)的百分比值,根据S/C值对损伤/恢复程度进行评分。0分:<2%,1分:2~25%,2分:26~50%,3分:51~75%,4分:76%~100%。

[0174] 组织学评价:荧光素评分完成后,取角膜加入10%中和福尔马林缓冲液中固定24h。石蜡包埋、切片、取部分切片进行HE染色。显微镜下观察并评估组织学变化;取部分切片进行免疫组化染色,如角膜上皮细胞紧密连接蛋白Occludin、Z0-1的染色,细胞增殖标志物Ki67的检测。

[0175] 4. 修复作用结果

[0176] 4.1 浊度检测

[0177] 浊度值OP_{2h}为23,与空白组OP_{0h}相比,浊度变化变化≥15,<25,可认为中度损伤已造成;不同时间点的浊度变化见表3.

[0178] 4.2 电阻测定和荧光素染色

[0179] 用3%H2O₂SLS处理角膜10min,暴露后2h检测角膜电阻值为3.34Ω;经荧光素钠染色可见超过70%角膜区域染色,损伤面积>50,且<75%,评分为3分;12h、26h、50h和98h不同时间点,促进和自然修复组的评分结果见表3。

[0180] 4.3 细胞因子检测

[0181] 检测培养液中炎性因子IL-1b的水平,见表3。促进修复组的炎性因子14小时到达峰值后开始下降,峰值小于自然修复组,下降幅度大于自然修复组。

[0182] 4.4 组织学观察

[0183] 组织学检查:用3%H2O₂处理角膜后2小时,显示上皮细胞缺失不明显,细胞少量脱落,紧密连接蛋白Z0-1、Occludin结构基本完整;氧化损伤造成的基质层空泡大量出现,与浊度值升高关系密切;暴露14h后,基质层空泡开始减少,暴露26h,加速修复组仅见部分基质层少量空泡,暴露50h后,上皮和基质层基本完好;暴露98h后,角膜组织结构基本正常,提示角膜上皮完全恢复。

[0184] 表3 H2O₂化学刺激后的角膜恢复及评分

[0185]

	浊度 OP		电阻值 (Ω)		荧光素染色		细胞因子(IL-1b) (pg/ml)	
	自然	促进	自然	促进	自然	促进	自然	促进
0h(空白)	1	1	8.17	8.17	0	0	--	--
2h	23	23	3.34	3.34	3	3	0.8	0.6
14h	17	12	3.79	4.27	2	1.5	1.5	1.1
26h	11	6	4.42	5.06	2	1	0.7	0.4
50h	6	4	6.65	7.16	1	0	0.4	0.3
98h	5	3	7.03	7.69	0	0	0.3	0.3

[0186] 5. 结论

[0187] 含表皮生长因子的培养液对H2O2导致的角膜化学损伤后的修复具有促进作用。

[0188] 实施例4表皮生长因子对牛角膜紫外线损伤后的修复作用的评估

[0189] 1. 离体牛猪角膜制备和培养

[0190] 1. 离体角膜制备和培养

[0191] 1.2牛角膜制备:牛屠宰后5小时内从眼眶摘取眼球,分离过程中避免损伤角膜。离体牛眼球完全浸没于4℃含有青霉素/链霉素的HBSS中运送到实验室。切取角膜前 检查牛眼状态,观察到有任何明显的血管变化、色素沉着、浑浊、葡萄疮或机械划痕 则将其丢弃。从完整眼球中切除分离角膜,角膜边缘保留2-4mm完整的环形巩膜。将 离体角膜连续用5-7ml无菌的HBSS中冲洗3-5次。

[0192] 1.2凝胶填充:取清洗干净的牛角膜,角膜上皮面朝下悬浮于12孔板,培养孔中 添加HBSS来支持角膜的悬浮状态,然后将融解状态的%的琼脂-明胶-M199混合物缓慢 逐滴加入(每次2-3滴)角膜窝内皮面,使凝胶直接与内皮接触。重复填充的操作步 骤,直至内皮 窝完全填满,琼脂-明胶在室温下完全凝固。然后将充满凝固凝胶的角 膜倒置,转移到12孔 培养板中。

[0193] 1.3角膜培养:吸取约60ml的M199培养基加入每个培养皿中,直到覆盖角膜缘, 裸露角膜上皮面暴露于空气中。将培养皿置于小型振荡器上,置于37℃、5%CO₂、90% 相对湿度的培养箱中培养大约24±2h。小型振荡器编制振动程序,使培养皿在每2.75h 内,可以从水平位置摇动到大约45°角,使得角膜可以短暂浸泡在培养基中湿润上皮 组织。

[0194] 2. 紫外线暴露

[0195] 角膜培养约24h后,从培养皿中吸出培养液。把直径1.3cm的聚四氟乙烯树脂O- 环形置于角膜。用UVB照射角膜,剂量为60mJ/cm²,时间为10分钟,暴露结束后, 将角膜转移到新的培养皿中,取40ml新的M199培养基加入每个培养皿中,培养基含 50μm/ml的重组人皮 表生长因子。按上述步骤1.3继续培养至第21天,每天更换含 生长因子的M199培养液,观察 损伤角膜的修复。以未添加生长因子的M199培养液为 自然修复对照。

[0196] 3.促进损伤修复作用评估

[0197] 3.1损伤程度检测:2小时取受损组和空白对照组其中的各2只角膜进行浊度、荧光素钠染色和组织学制片,进行刺激程度评估;余下角膜浸没于含有40ml M199培养基的培养皿中,置于32°C±2°C、5%CO₂、90%相对湿度的培养箱;

[0198] 3.2修复作用评估:培养至2h、14h、26h、50h和98h,取受损组和空白对照组其中的各2只角膜进行浊度测定、电阻值测定、荧光素钠染色、炎性因子检测和组织学制片,进行自身修复程度评估;

[0199] 浊度检测:检测前,去除聚四氟乙烯树脂O-形环,固定于专用角膜夹持器中。随后按先充满后室再充满前室的顺序添加新鲜的MEM培养液。用浊度仪检测每一角膜的浑浊度,记录浑浊度值(OP)为OP_{照射0h}或OP_{恢复0h}同时,取空白组角膜进行浊度测试,记录浑浊度为OP_{空白}。

[0200] 角膜液炎性因子测试:在更换新的培养液前,从培养皿中移出培养液,用试剂盒检测培养液中的炎性因子和修复因子水平,包括IL-1a、IL-6、IL-8等;

[0201] 荧光素染色:测完浊度后,从夹持器中取下角膜,上表面滴入含2%荧光素钠(NaFL)的PBS。过量的NaFL立即用PBS冲洗,在紫外灯下可观察到NaFL的潴留,潴留的程度表明角膜损伤的严重性。计算潴留面积(S)占整个角膜面积(C)的百分比值,根据S/C值对损伤/恢复程度进行评分。0分:<2%,1分:2~25%,2分:26~50%,3分:51~75%,4分:76%~100%。

[0202] 组织学评价:荧光素评分完成后,取角膜加入10%中和福尔马林缓冲液中固定24h。石蜡包埋、切片、取部分切片进行HE染色。显微镜下观察并评估组织学变化;取部分切片进行免疫组化染色,如角膜上皮细胞紧密连接蛋白Occludin与Z0-1的染色,用于观察角膜修复过程中,上皮屏障功能的改善情况。

[0203] 4.修复作用结果观察

[0204] 4.1浊度检测

[0205] 浊度值OP_{2h}为14,与空白组OP_{0h}相比,浊度变化变化≥5,<15,可认为轻度损伤已造成;4.2电阻测定和荧光素染色

[0206] 用UVB照射处理角膜10min,暴露后2h检测角膜电阻值为0.87Ω;经荧光素钠染色可见约超过55%角膜区域染色,损伤面积>50,且<75%,评分为3分;26h后约45%角膜区域染色,评分2分;50h约20%,评分1分;98h几乎不可见角膜区域染色,提示角膜上皮恢复。

[0207] 4.3细胞因子检测

[0208] 检测培养液中的巨噬细胞炎性蛋白(MIP-1)的变化见表4。

[0209] 4.4组织学观察

[0210] 组织学检查:用UVB处理角膜后2小时,显示上皮细胞缺失不明显,细胞少量脱落,紧密连接蛋白Z0-1、Occludin结构;但氧化损伤造成的基质层空泡大量出现,与浊度值升高关系密切;暴露后26h,加速修复组显示受损区域从上皮细胞迁移至基底膜;暴露50h后,仅见角膜上皮细胞嗜曙红细胞增多,提示上皮恢复明显;暴露98h后,角膜组织结构基本正常,提示角膜上皮完全恢复。

[0211] 表4 UVB照射后的角膜恢复及评分

[0212]

	浊度 OP		电阻值 (Ω)		荧光素染色		细胞因子(MIP-1b) (pg/mL)	
	自然	促进	自然	促进	自然	促进	自然	促进
0h(空 白)	0	1	7.86	7.86	0	0	--	--
2h	14	14	0.87	0.87	2	2	1.8	1.6
14h	12	9	2.67	3.32	2	1.5	3.5	2.4
26h	6	4	4.31	4.88	1	1	2.3	1.2
50h	4	2	6.16	6.81	1	0	1.4	0.7
98h	4	1	6.73	7.46	0	0	1.0	0.3

[0213] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围。例如本发明虽然仅列举了部分化学品、紫外线、机械损伤等角膜损伤方式,以及表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等促进角膜修复的例子。但本发明中提到的其他物质如化学刺激物(氯己定、5%苯扎氯胺、二氯苯甲酰氯、三氯乙酸等)、已知眼刺激作用的消费品、不同剂量和波长的紫外线,以及机械造成的角膜上皮擦伤(如指甲、树枝、隐形眼镜等异物划伤)、角膜异物伤(如铁屑、谷壳、风沙、灰尘等)、角膜手术(如激光治疗近视眼、微创切除)等也可以用本发明所述方法造成眼刺激损伤,维生素、氨基酸、小分子肽等也可以用本发明所述方法进行促进修复作用检测。此处不再一一列举。

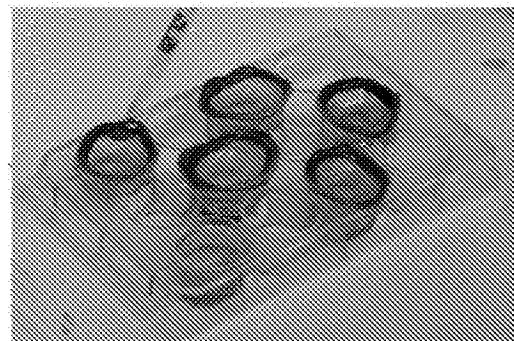


图1

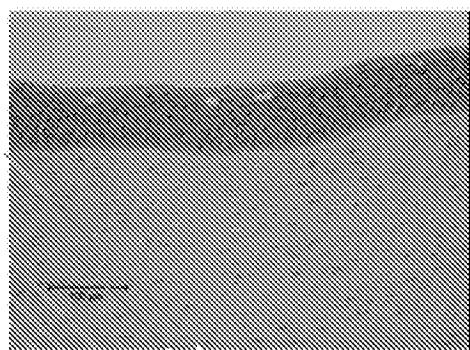


图2

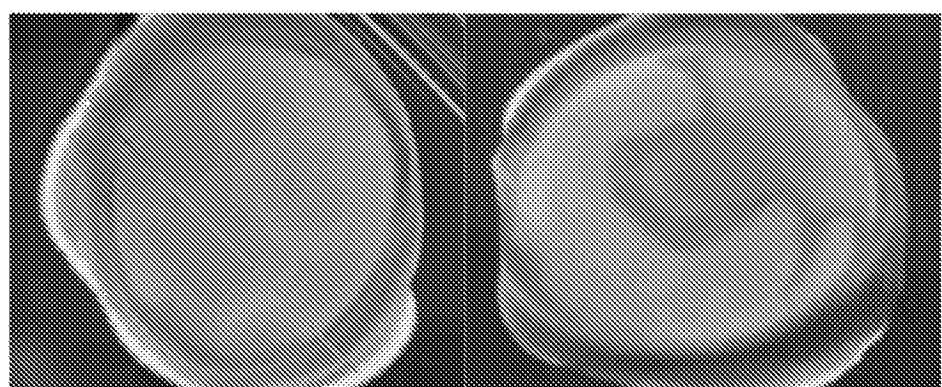


图3

图4

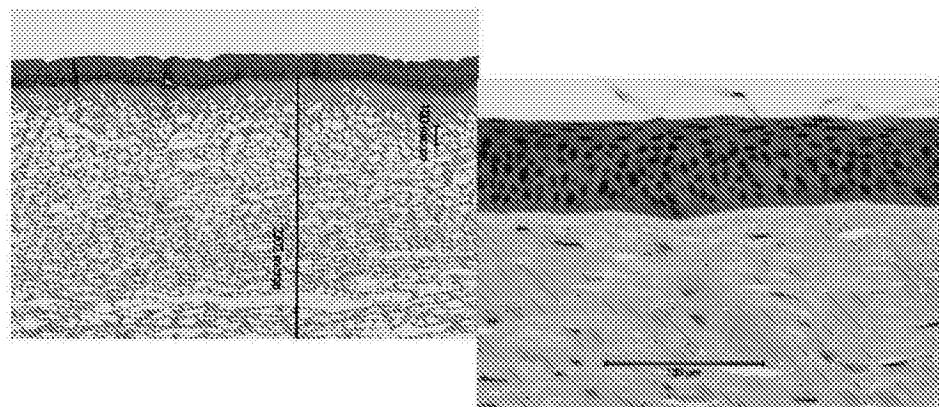


图 5

图 6

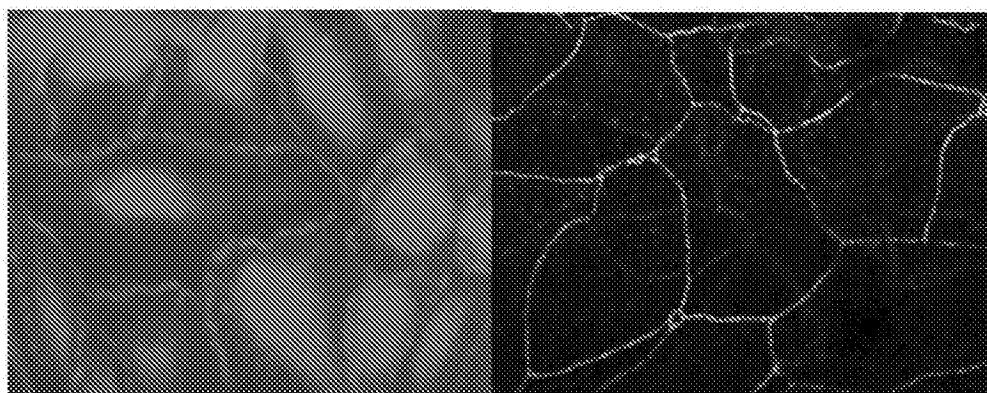


图 7

图 8

专利名称(译)	一种利用动物离体角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法		
公开(公告)号	CN107796674A	公开(公告)日	2018-03-13
申请号	CN201710538216.7	申请日	2017-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	程书俊 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	程树军 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	程树军 广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	程树军 刘超 秦瑶		
发明人	程树军 刘超 秦瑶		
IPC分类号	G01N1/28 G01N27/04 G01N27/20 G01N33/50 G01N33/533 C12N5/071 C12N5/079 C12Q1/02		
CPC分类号	C12N5/0621 C12N5/0625 G01N1/28 G01N27/041 G01N27/20 G01N33/5005 G01N33/533 G01N2001/302 G01N2333/46 G01N2333/54 G01N2333/5412 G01N2333/5421 G01N2800/7004		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

一种利用动物离体角膜长期培养模型评价眼刺激性损伤及修复作用评估的方法，包括以下步骤：1. 离体角膜制备；2. 角膜长期培养；3. 角膜化学损伤模型及评价；4. 角膜物理损伤模型及评价；5. 角膜损伤后修复作用评估；6. 统计分析与结果判定。本发明利用外源刺激物，如化学物质、紫外线引起可逆性的角膜上皮细胞变性和基质损伤，通过预测模型，评估眼刺激性的程度；或者是利用化学方法、物理方法或机械方法造成角膜上皮细胞和基质的可逆性刺激、轻微磨损或缺失损伤，评估损伤后角膜的自身修复，或者损伤发生后添加药物评价药物促进角膜修复作用的方法。本方法操作简单，与体内实验相关性好，敏感程度高，能满足角膜刺激性损伤及其修复的检测和研究的需要。

