

家兔棘阿米巴角膜炎动物模型的建立

邓新国¹ 郭雪² 庞广仁¹ 田小莉¹

1 河南省眼科研究所 郑州 450003

2 河南省卫生防疫站 郑州 450003

提要 目的: 建立棘阿米巴角膜炎的动物模型。方法: 在 6 只新西兰家兔角膜基质层内注射地塞米松 3 d 后, 再注入棘阿米巴原虫悬液。结果: 6 只家兔均发生角膜炎。经家兔角膜刮片用 10% 氢氧化钾封片镜检、角膜组织原虫培养和病理切片染色检查证实, 成功地建立了家兔棘阿米巴角膜炎动物模型。结论: 通过角膜基质内注射建立的家兔棘阿米巴角膜炎动物模型, 方法简便又易于操作。

关键词 棘阿米巴角膜炎 基质内注射 动物模型

棘阿米巴原虫可引起人类两种疾病, 一种是原发性脑炎, 另一种是角膜炎^[1]。棘阿米巴角膜炎是一种严重的角膜疾患, 药物治疗时间较长, 效果不佳, 常需角膜板层移植或角膜全层移植进行治疗^[2]。

棘阿米巴原虫属自由生活的阿米巴, 在自然界中分布广泛。从湖水、温泉、泳池、泥土、角膜接触镜的清洗液和人的鼻腔内, 均曾分离出棘阿米巴原虫^[3,4]。在国外, 棘阿米巴角膜炎主要是由配戴角膜接触镜所引起^[5]; 而我们经培养证实的 3 例棘阿米巴原虫性角膜炎, 无角膜接触镜配戴史, 发病原因不明^[6]。目前的观点认为, 角膜轻度擦伤以及机体抵抗力降低是棘阿米巴角膜炎的主要原因^[3,7]。

目前, 对于棘阿米巴角膜炎的病因学、免疫学、病理生理学以及药物治疗等方面的研究有待深入。为此, 我们在家兔角膜基质层内注入培养的纯棘阿米巴原虫悬液, 制成棘阿米巴角膜炎的动物模型, 为今后深入开展棘阿米巴角膜炎的研究, 提供一种有价值的动物模型。

材料与方法

1 原虫培养

棘阿米巴原虫来自角膜炎患者手术切除的角膜材料中分离的棘阿米巴原虫, 该原虫经北京医科大学易有云教授鉴定。根据 Silvaný 等^[8]报道的棘阿米巴原虫纯培养的方法进行培养, 培养基主要由蛋白胨-酵母-葡萄糖 (PYG) 组成, 且含有青霉素 (500 U/ml) 和链霉素 (500 U/ml)。棘阿米巴原虫培养 3 d~ 5 d 后, 用生理盐水将培养的棘阿米巴原虫洗 3 次 (300 g 离心, 每次 5 min), 最后用生理盐水调至原虫浓度为 3×10^6 个原虫/ml (80%~ 90% 滋养体, 10%~ 20% 包囊); 并用台盼蓝染色确定原虫的活力, 原虫的活力 > 90%。

2 动物模型

新西兰家兔 6 只, 左眼为实验组, 右眼为对照组。实验前 3 d 每只家兔每眼先行结膜下注射地塞米松 2 mg, 每天 1 次, 同时用 0.5% 氢化考的松眼水点眼, 每天 3 次~ 4 次。实验开始, 停用激素, 家兔固定后双眼经 0.5% 的可卡因点眼局麻, 开睑器开睑, 用 5 号针头在家兔角膜基质内注入棘阿米巴原虫悬液 0.2 ml, 对照右眼角膜基质内注入生理盐水 0.2 ml。于注射原虫后 6 h、12 h、24 h 以及以后每天观察兔眼角膜病变情况, 直到 30 d。

3 10% 氢氧化钾湿封片镜检

在家兔角膜注射棘阿米巴原虫悬液后 d₁₀、d₂₀ 及 d₃₀ 分别作角膜刮片, 刮取眼角膜较深层病变组织涂于载玻片上, 显微镜下检查。

4 棘阿米巴原虫培养

于注入棘阿米巴原虫悬液 d₁₀、d₂₀ 及 d₃₀ 分别解剖两只家兔, 取家兔角膜放入 2% 无营养琼脂培养基中央表面, 在接种物上滴入 1 滴~ 2 滴活大肠杆菌肉汤, 胶布密封后置 35℃ 温箱内进行棘阿米巴原虫培养。

5 病理检查

分别取 d₁₀、d₂₀ 及 d₃₀ 解剖的家兔角膜材料, 经固定、脱水、石蜡包埋、切片及脱蜡, 最后经苏木素-伊红 (H. E.) 染色和高碘酸 Schiff (PAS) 染色, 显微镜下检查组织病变中的棘阿米巴包囊和滋养体。

结 果

1 临床表现

6 只新西兰家兔实验左眼全部形成角膜基质炎, 对照右眼正常。形成角膜炎的家兔左眼在注射棘阿米巴原虫悬液后 6 h, 局部反应较轻, 12 h 结膜囊内出现分泌物, 注射局部出现炎症反应, 24 h 外眼分泌物较多, 局部形成炎性斑块, 球结膜及睑结膜充血; d₃~ d₄ 症状逐渐加重, 炎性斑块逐渐增大, 整个

角膜呈弥漫性点状混浊(图 1), 外眼分泌物更多, 球结膜及睑结膜充血更严重。d₁₅~ d₃₀症状停止发展, 外眼分泌物逐渐减少, 球结膜及睑结膜充血稍有减轻, 新生血管开始向炎症斑块内长入。对照右眼未出现炎症反应。

2 湿封片镜检

刮取家兔眼角膜组织经 10% KOH 湿封片镜检, 实验眼全部看到棘阿米巴原虫的双层壁包囊, 对照眼呈阴性。

3 棘阿米巴原虫培养

家兔眼角膜经棘阿米巴原虫培养, 实验眼全部培养出棘阿米巴原虫, 对照右眼棘阿米巴原虫培养呈阴性。

4 病理检查

家兔眼角膜病理切片姬姆萨液染色, 实验眼可见病变部位大量炎性细胞浸润(主要是中性粒细胞), 见图 2, 对照眼正常; PAS 染色可见实验眼病变部位大量棘阿米巴原虫的包囊和滋养体, 见图 3。

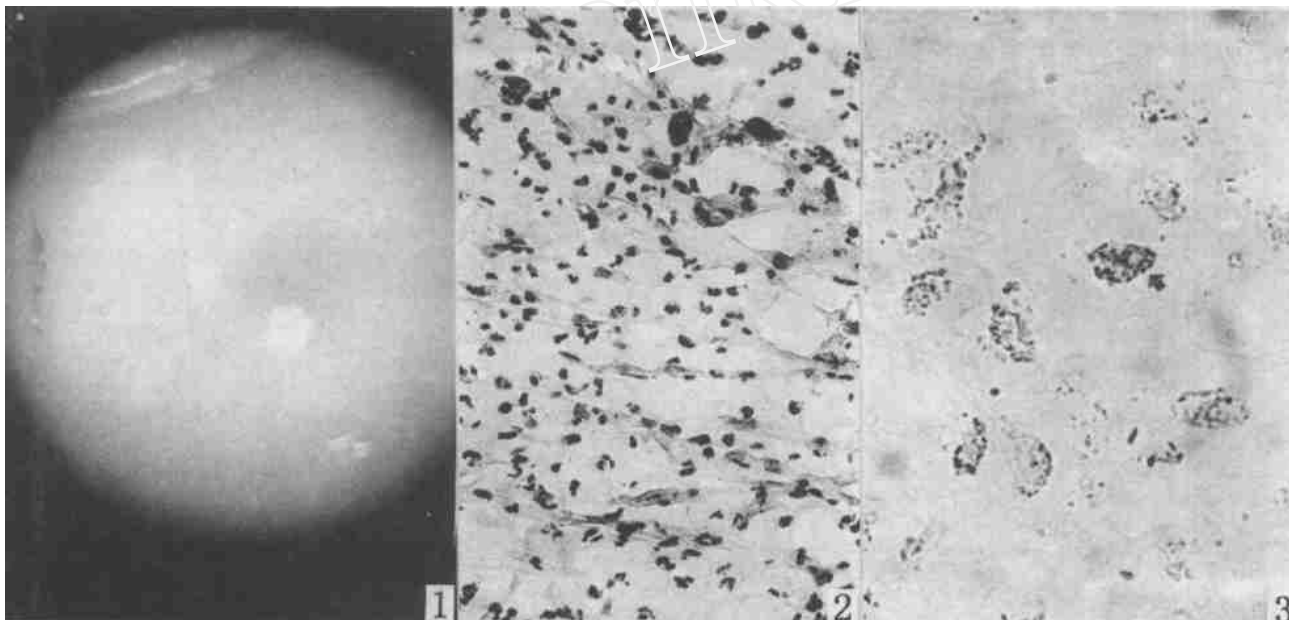


图 1 家兔角膜基质内注入棘阿米巴原虫悬液 d₄, 裂隙灯下观察, 注射部位 3 点处呈现白色炎症斑块, 整个角膜呈灰白色基质炎症 10 × 图 2 家兔角膜基质内注入棘阿米巴原虫悬液 d₈, 角膜组织病理切片, H E 染色, 显示角膜基质水肿, 炎性细胞浸润, 可见棘阿米巴原虫() 400 × 图 3 家兔角膜基质内注入棘阿米巴原虫悬液 d₈, 角膜组织病理切片, PAS 染色, 显示棘阿米巴原虫() 1 000 ×

Fig 1 Four days after the corneal intrastromal injection of *Acanthamoeba* protozoa in the rabbit, showing white inflammation patches and keratitis under slit lamp 10 × Fig 2 Eight days after the corneal intrastromal injection of *Acanthamoeba* protozoa in the rabbit H E stain section showing corneal intrastromal swelling, inflammatory cell infiltration and *Acanthamoeba* protozoa () 400 × Fig 3 Eight days after the corneal intrastromal injection of *Acanthamoeba* protozoa in the rabbit PAS stain section showing *Acanthamoeba* protozoa () 1 000 ×

讨 论

棘阿米巴角膜炎是一种少见的与较为严重的角膜疾患, 自 1974 年 Nagington 等^[9]首次报道第一例棘阿米巴角膜炎以来, 对该病的研究报道逐年增多, 该病的发病率也呈逐年增加之势^[3]。

建立棘阿米巴原虫角膜炎动物模型, 不但可深入研究该病的致病机制及生理病理特征, 而且尚可验证药物的治疗作用, 筛选有效的抗棘阿米巴原虫新药以及进行角膜移植研究等。

在国外由于配戴角膜接触镜的人数较多, 棘阿米巴角膜炎的发病率相对较高, 目前已经证实, 人们

配戴原虫污染的接触镜引起角膜轻度擦伤是诱发棘阿米巴角膜炎的主要原因^[10, 11]。一些学者通过中国地鼠和猪配戴棘阿米巴原虫污染的角膜接触镜成功地制成了棘阿米巴角膜炎的动物模型^[12, 13]。1990 年 Larkin 和 Eastly 报道^[14], 应用 Wistar 大鼠通过角膜基质内注射棘阿米巴原虫悬液可诱发大鼠棘阿米巴角膜炎。Niederkmorn 等^[15]通过体外培养技术证实, 棘阿米巴原虫对人、中国地鼠和猪的角膜易感, 而对小鼠、大鼠和家兔的角膜不易感。为了能成功地建立家兔棘阿米巴角膜炎动物模型, 我们采用实验前 3 d 在家兔结膜下注入地塞米松, 同时应用激素点眼, 然后在兔角膜基质内直接注入棘阿米巴原虫

的滋养体和包囊悬液,成功地制成了棘阿米巴角膜炎的动物模型。目前已知,眼局部的免疫细胞可抑制棘阿米巴角膜炎的形成,通过激素的应用,降低了眼局部免疫细胞的免疫作用,有利于棘阿米巴角膜炎的形成^[7,16]。

建立棘阿米巴原虫角膜炎动物模型的关键有两点:第一点是棘阿米巴原虫的纯培养技术,我们根据 Silvano 等^[8]报道的蛋白胨-酵母-葡萄糖培养基纯培养棘阿米巴原虫技术进行了纯培养;另一点是棘阿米巴原虫悬液直接注射到激素诱导的眼局部免疫功能受抑制的动物角膜基质内。我们制成的棘阿米巴角膜炎动物模型,经角膜刮片 10% KOH 湿封片镜检、病变角膜原虫培养和角膜病理切片染色检查均得以证实。该模型建成快、技术简便及易于操作,适合眼科基础和临床方面的研究,为今后继续开展棘阿米巴角膜炎的免疫学、细胞生物学和治疗方面的研究,提供了一个有价值的研究工具。

参 考 文 献

- 1 Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, et al *N aegleria* and *A canthamoeba* infections: review. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 490
- 2 Auran JD, Starr MB, Jakobiec FA. *A canthamoeba* keratitis: a review of the literature. *Cornea* 1987; 6: 2
- 3 Schaumberg DA, Snow KK, Dana MR. The epidemic of *A canthamoeba* keratitis: where do we stand? *Cornea* 1998; 17: 3
- 4 彭晓谋, 刘多, 谢长松, 等. 自由环境下分离出致病性自由生活的阿米巴. *湖南医科大学学报* 1989; 14: 221

- 5 Stehr-Green JK, Bailey TM, Visvesvara GS. The epidemiology of *A canthamoeba* keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* 1989; 107: 331
- 6 邓新国, 庞广仁, 孙秉基, 等. 棘阿米巴角膜炎的实验室检查和原虫的鉴定. *眼科研究* 1997; 15: 95
- 7 VanKlink F, Taylor WM, Alizadeh H, et al. The role of macrophages in *A canthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1271
- 8 Silvano RE, Dougherty JM, McCulley JP, et al. The effect of currently available contact lens disinfection systems on *A canthamoeba castellanii* and *A canthamoeba polyphaga*. *Ophthalmology* 1990; 97: 286
- 9 Nagington J, Watson PG, Playfair TJ, et al. Amoebic infection of the eye. *Lancet* 1974; 2: 1537
- 10 Gorlin AI, Gabriel MM, Wilson LA, et al. Binding of *A canthamoeba* to hydrogel contact lenses. *Curr Eye Res* 1996; 15: 151
- 11 Cohen EJ, Fulton JC, Hoffman CJ, et al. Trends in contact lens-associated corneal ulcers. *Cornea* 1996; 15: 566
- 12 Van Klink F, Alizadeh H, He Yu, et al. The role of contact lenses, trauma, and langerhans cells in a Chinese hamster model of *A canthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 1937
- 13 He Yu, McCulley JP, Alizadeh H, et al. A pig model of *A canthamoeba* keratitis: transmission via contaminated contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 23: 126
- 14 Larkin DFP, Easty DL. Experimental *A canthamoeba* keratitis: I. Preliminary findings. *Br J Ophthalmol* 1990; 74: 551
- 15 Niederkorn JY, Ubelake JE, McCulley JP, et al. Susceptibility of corneas from various animal species to *in vitro* binding and invasion by *A canthamoeba castellanii*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 104
- 16 Larkin DFP, Easty DL. Experimental *A canthamoeba* keratitis: II. Immunohistochemical evaluation. *Br J Ophthalmol* 1991; 95: 421

1998年6月29日收稿 1999年5月25日修回
(编辑: 李雅卿)

ESTABLISHMENT OF A RABBIT MODEL OF ACANTHAMOEBIA KERATITIS

DENG Xinguo¹, GUO Xue², PANG Guangren¹, TIAN Xiaoli¹

1 Henan Institute of Ophthalmology, Zhengzhou 450003
2 Henan Health and Epidemic Station, Zhengzhou 450003

ABSTRACT

AM: To establish an animal model of *A canthamoeba* keratitis **METHODS:** Six New Zealand white rabbits were each injected intrastromally with *A canthamoeba* suspension 3 days after subconjunctival injection with dexamethasone. **RESULTS:** All of the 6 rabbits developed keratitis. *A canthamoeba* protozoa were identified by the methods of corneal scraping with 10% potassium hydroxide wet mount examined under microscope, corneal protozoa culture and pathological section examination. **CONCLUSION:** A rabbit model of *A canthamoeba* keratitis was established.

Key words: *A canthamoeba* keratitis, animal model, intrastromal injection