

· 实验研究 ·

准分子激光角膜切削术与磨镶术后兔角膜基质细胞凋亡的研究

盛艳 陆勤康 杨亚波

【摘要】 目的 研究准分子激光角膜切削术 (photorefractive keratectomy, PRK) 和准分子激光原位角膜磨镶术 (laser in situ keratomileusis, LASIK) 后不同时间点角膜基质细胞凋亡的特点并探索不同手术方式、不同的矫正度数对角膜基质细胞凋亡水平的影响。**方法** 50 只新西兰纯种白兔随机分为 A、B 两大组, 每组 25 只; A 组兔子为 PRK 组, B 组兔子为 LASIK 组; 每组兔子左眼进行 -4.0D 激光切削, 右眼进行 -8.0D 激光切削。分别在术后 4h、24h、1w、4w 和 3m 五个时间点处死兔子, 每个时间点每组随即处死 5 只兔子, 取角膜制作病理切片, 行透射电镜检查, 用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 原位显示凋亡细胞, 激光扫描共聚焦显微镜观察凋亡细胞形态, 定量统计比较凋亡水平的差别。**结果** 在术后 4h、24h PRK 组角膜基质中凋亡细胞较多, 其中 PRK-8.0D 组的凋亡细胞数较 PRK-4.0D 组多, 其差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 在术后 4h、24h 两个时间点, PRK-8.0D 组与 LASIK-8.0D 组的角膜基质中的凋亡细胞数进行比较, 两者差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 在不同的时间点, LASIK-4.0D 组与 LASIK-8.0D 组 TUNEL 阳性细胞计数的比较, 两者之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。**结论** LASIK 术后角膜基质细胞的凋亡水平较 PRK 低, 凋亡程度与制瓣中的角膜损伤有关, 与切削深度无明显相关; PRK 术后角膜基质细胞的凋亡水平随切削深度增加而增高。

【关键词】 凋亡 角膜细胞 角膜基质 准分子激光角膜切削术 准分子激光原位角膜磨镶术

Experimental study on the keratocyte apoptosis in the stroma of rabbit following PRK and LASIK
SHENG Yan*, LU Qin-kang, YANG Ya-bo. The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the character of the keratocyte apoptosis at each particular time point following photorefractive keratectomy (PRK) and laser in situ keratomileusis (LASIK) and to discuss the correlation between the level of apoptosis and the type of surgery and the deepness of laser ablation. **Methods** A total of 50 New Zealand white rabbits weighting 3.5 ~ 4.0 Kg were divided into 2 groups (A and B) at random. Twenty-five of these rabbits were operated with PRK and other twenty-five rabbits were operated with LASIK. Each rabbit was corrected -4.0 diopters on left eyes and -8.0 diopters on right eyes. At 4h, 24h, 1w, 4w and 3m after surgery there were 5 rabbits of each group be selected at random and be killed. Then the eyes were enucleated and the corneas were bisected. Cellular morphologic changes were evaluated by transmission electron microscopy. Keratocyte apoptosis was monitored by terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) to detect DNA fragmentation. **Results** At 4h and 24h time points there were statistically significant differences in the TUNEL positive cells between the -4.0D PRK group and the -8.0D PRK group ($P > 0.05$). At 4h and 24h time points there were statistically significant differences in the TUNEL positive cells between the -8.0D PRK group and the -8.0D LASIK group ($P > 0.05$). There were no statistically significant differences in the TUNEL positive cells between the -4.0D LASIK group and the -8.0D LASIK group at each time point ($P > 0.05$). **Conclusions** The apoptosis degree in stroma following

作者单位: 310003 杭州, 浙江大学医学院附属第一医院眼科 (盛艳); 宁波鄞州人民医院眼科 (陆勤康); 浙江大学医学院附属第二医院眼科中心 (杨亚波)
通讯作者: 盛艳, E-mail: yansheng326@126.com

PRK were higher than that following LASIK. The keratocytes apoptosis in stroma after LASIK may be related with the production of the flap but there was no significant correlation between keratocytes apoptosis and the depth of corneal ablation by laser. There were positive relation ship between the apoptosis degree in stroma and the depth of corneal ablation by laser.

【Key Words】 apoptosis; keratocyte; stroma; photorefractive keratectomy; laser in situ keratomileusis

目前,国内外对屈光术后角膜愈合机制的研究很多,但对于屈光术后角膜基质细胞凋亡的报道很少。以前的研究认为PRK术后角膜基质细胞的凋亡启动了角膜基质的重构的过程^[1],并且发现屈光手术后早期凋亡细胞的数量与角膜愈合反应的程度成正相关^[2]。本研究通过在健康无眼疾的新西兰纯种白兔眼上建立不同矫正度数的PRK与LASIK模型,术后用TUNEL法,观察角膜基质细胞凋亡的形态并计数,对比凋亡水平;研究PRK和LASIK术后不同时间点角膜基质细胞凋亡的特点;并探索不同手术方式、不同的矫正度数对角膜基质细胞凋亡水平的影响。

材料与方 法

1. 材料

(1)试剂 TUNEL试剂盒(德国Boehringer Mannheim公司):含TdT酶,荧光标记的dUTP等核苷酸,羊抗荧光抗体-碱性磷酸酶联合剂;DNA酶I(美国Sigma公司);碘化乙啶(propidium iodide, PI)(北京中杉金桥生物技术公司)

(2)动物 选择体重3.5~4kg的新西兰纯种白兔50雌雄兼有,健康无眼病(本校动物中心提供)

(3)仪器 MEL70准分子激光治疗仪(德国Asclepion-Meditec公司);Moria M2微型角膜刀(法国Moria公司);LSM510激光扫描共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);TECNAI10电子显微镜(荷兰Philips公司)

2. 方法

(1)实验分组 50只新西兰白兔随机分为A、B两组,每组25只;A组兔子为PRK组,B组兔子为LASIK组;每组兔子左眼进行-4.0D激光切削,右眼进行-8.0D激光切削。

(2)手术方法 30g/L戊巴比妥静脉麻醉(1ml/kg)动物后,用0.4%盐酸奥布卡因眼液(日本参天公司)行表面麻醉;A组:按PRK常规方法,刮除瞳孔区7mm直径范围内的角膜上皮,以193nm的准分子激光进行角膜切削(左眼-4.0D,右眼-8.0D),切削直径为6mm;B组:按LASIK常规方

法,用Moria M2微型角膜刀的0号负压吸引环,厚度设置为130 μ m的微型角膜板层刀制作一完整的角膜瓣,瓣下基质面以193nm的准分子激光进行角膜切削(左眼-4.0D,右眼-8.0D),切削区直径为6~8mm。

(3)标本取材与制作 分别在术后4小时、24小时、1周、4周和3月五个时间点处死兔子,每个时间点每组随即处死5只兔子,取中央直径为9mm角膜,其中一半角膜片用10%甲醛固定,石蜡包埋,制作石蜡切片,进行TUNEL染色,行激光共聚焦显微镜;另一半用4%戊二醛固定后行透射电镜观察。

(4)TUNEL染色 TdT介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL):参照TUNEL试剂盒方法:①脱蜡、水化;②高温高压修复:加入0.01mol/L枸橼酸缓冲液(pH=6),高温高压煮沸1分40秒;③TdT介导的dUTP缺口末端标记:37 $^{\circ}$ C孵育1小时;④PI(2.5mg/ml,含0.1%RNA酶)复染:37 $^{\circ}$ C孵育5分钟;⑤甘油缓冲液封片,激光扫描共聚焦显微镜读片。每次TUNEL均设立:①阳性对照:TUNEL前加1 μ g/mlDNA酶I,25 $^{\circ}$ C孵育10分钟。②阴性对照:仅加dUTP反应液,不加TdT。③正常对照。

3. 数据处理与统计分析

(1)凋亡细胞计数 由未参加实验的人员在各中央区角膜切片全基质层范围内随机选取10个高倍视野(400 \times),计数凋亡细胞总数,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

(2)统计分析 应用SPSS10.0统计软件对数据进行方差分析。

结 果

1. 激光共聚焦显微镜观察(角膜原位凋亡检测)

TUNEL法是直接标记细胞凋亡后染色体DNA双链或单链断裂所产生的3-OH末端,从而能早期并灵敏的原位显现凋亡的细胞。对细胞进行双标记荧光染色(FITC, PI),在激光共聚焦显微镜下正常生理状态下的细胞核发红色荧光,暴露3-OH末端的凋亡细胞核为黄色荧光(图1)。

术后4h、24h和1w三个时间点四个手术组角膜中央区均出现TUNEL阳性细胞,术后4h、24h

两个时间点各组角膜中央区 TUNEL 阳性细胞计数较多; 在术后 1w, 无论是 PRK 术后还是 LASIK 术后均只有部分角膜样本的基质中出现凋亡细胞, 且数目明显少于术后 4h、24h。在术后 4w 和 3m 两个时间点时, 仅个别角膜中出现极少的凋亡细胞, 其各组的平均 TUNEL 阳性细胞计数基本为零。各实验组在术后 4h、24h、1w、4w 和 3m 不同时间点的 TUNEL 阳性细胞计数及方差分析见表 1。在术后 4h、24h 两个时间点对四组进行单因素方差分析, 两个时间点的组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而在术后 1w、4w 和 3m 三个时间点对四组进行单因素方差分析, 三个时间点的组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在图 2 中将不同组别不同时间点角膜中央区 10 个高倍视野 ($400 \times$) 的平均 TUNEL 阳性细胞计数用柱形图表示, 并用符号标出组间的差异性。

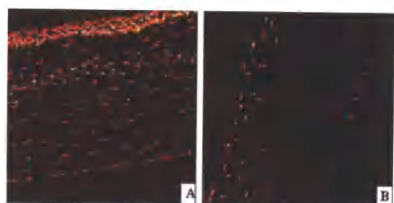


图 1 TUNEL 染色图象

图 A 为术后 4h 时 LASIK-8.0D 组的角膜样本中央区角膜图像, 凋亡细胞分布在角膜瓣和基质床交接面两侧。(× 200)

图 B 为术后 4h 时 PRK-8.0D 组的角膜, 凋亡细胞出现在损伤上皮的下方浅层基质中;(× 200)

表 1 各组不同时间点角膜基质中平均 TUNEL 染色阳性细胞计数及方差分析 ($\bar{x} \pm s$)

	PRK (-4.0D)	PRK (-8.0D)	LASIK (-4.0D)	LASIK (-8.0D)	F	P
4h	29.60 ± 14.67	51.60 ± 12.30	13.40 ± 7.23	19.00 ± 9.35	11.23	<0.05
24h	20.60 ± 6.43	28.40 ± 8.20	12.40 ± 4.62	14.60 ± 9.45	4.68	<0.05
1w	3.80 ± 1.92	2.60 ± 2.52	2.40 ± 1.67	3.40 ± 2.07	0.511	>0.05
4w	0.36 ± 0.23	0.14 ± 0.11	0.05 ± 0.04	0.08 ± 0.04	2.613	2.613
3m	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.02 ± 0.02	0.251	>0.05

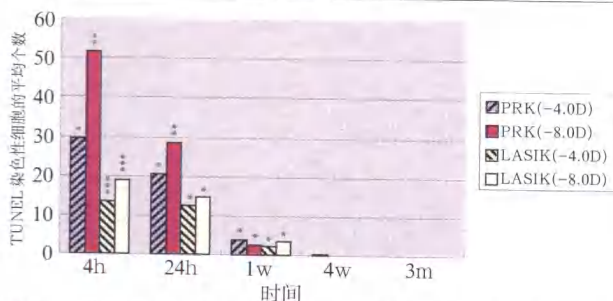


图 2 各组不同时间点角膜基质中平均 TUNEL 染色阳性细胞计数及方差分析 ($\bar{x} \pm s$)

(注: *, ** 与 *** 表示每个时间点各组间的差异性)

2. 透射电镜观察

透射电镜下正常的兔角膜基质细胞形态如图 3A, 角膜基质细胞核核膜光滑 (↑), 染色质密度均匀。透射电镜的结果证实了在 PRK 与 LASIK 后 4h 时角膜基质中的大部分的死亡细胞表现为典型的凋亡细胞的形态——角膜基质细胞核固缩、染色质边集在核膜内侧呈新月形; 及凋亡小体的形成; 胞膜结构完整、没有内容物释放(图 3B)。

在术后 24h 和 1w 时, 经常很难分辨细胞时发生了凋亡还是坏死。可以看到一些角膜基质细胞的胞浆中含有大量的粗面内质网, 考虑可能是被激活后的角膜基质细胞所演变成的成纤维母细胞。



图 3 透射电镜图像

图 A 为透射电镜下正常的兔角膜基质细胞, 可见角膜基质细胞核核膜光滑 (↑), 染色质密度均匀。× 6,200

图 B 为透射电镜下发生凋亡的兔角膜基质细胞, 可见角膜基质细胞体积变小, 核固缩、染色质边集 (↑); 胞浆浓缩、小泡形成; 胞膜结构完整、没有内容物释放。× 6,200

注: 图 A 与图 B 均为 LASIK (-8.00D) 组术后 4 小时的兔角膜基质细胞。

讨 论

角膜的凋亡是在角膜受伤后可以首先检测到的情况。它几乎立即发生, 在基质和上皮中激活一个复杂的串联反应^[3]。许多研究已经表明, 损伤诱发的角膜基质细胞的凋亡是通过受伤的上皮释放凋亡前细胞因子进行介导的, 这些细胞因子可以相互作用引发角膜基质细胞的凋亡。其中 IL-1 和可溶性 Fas-L 可能是这一过程中起重要作用的细胞因子。角膜上皮损伤后释放 IL-1, IL-1 与基质细胞上的 IL-1 受体结合, 同时激活 Fas/Fas 配体系统, 诱导基质细胞发生凋亡^[4]。细胞凋亡可能是活性角膜基质细胞产生和基质重构的启动因素^[3], 并有研究发现早期角膜基质细胞凋亡的数量与后期角膜基质中活化的角膜基质细胞及成纤维细胞的数量成正相关^[2]。

本研究通过对手术后不同时间点角膜基质细胞凋亡的观察表明, 屈光手术后细胞的凋亡是一个动态的过程, 在上皮损伤后立即发生, 4 小时达到高峰, 可持续至 1 周以上, 一个月时基本消失。这与

Wilson 等的报道相吻合^[3]。

本研究的结果显示 PRK 术后基质中的凋亡细胞主要分布在浅层基质, 而 LASIK 术后角膜基质细胞凋亡的分布特点不同, LASIK 术后凋亡细胞主要分布在角膜瓣和基质床交接面两侧 50 μ m 范围内的基质层中; 且角膜瓣边缘基质内的细胞凋亡水平远高于基质中央部。这与 Wilson 和 Gao 等的研究结果相似^[3,5]。PRK 与 LASIK 术后早期基质中凋亡细胞的分布特点可以用上述的角膜基质细胞凋亡的发生机制进行解释, 因为 PRK 术后损伤的上皮细胞释放的细胞因子直接与激光切削后的角膜基质表面接触, 故术后早期基质中的凋亡细胞主要分布在浅层基质中。而 LASIK 术损伤角膜瓣边缘的上皮细胞, 损伤的上皮细胞所释放的细胞因子可能是通过泪液、上皮细胞的碎屑等弥散到交界面, 并启动了角膜瓣和基质床交接面两侧角膜基质细胞的凋亡。

本研究通过对各实验组在术后 4h、24h、1w、4w 和 3m 不同时间点的 TUNEL 阳性细胞计数及方差分析发现, 在术后 4h、24h 两个时间点的组间差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 而在术后 1w、4w 和 3m 三个时间点组间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。再对 4h、24h 两个时间点的组间进行两两比较发现: (1) 在术后 4h、24h PRK-8.0D 组的凋亡细胞数较 PRK-4.0D 组多, 其差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 在 PRK-4.0D 与 PRK-8.0D 组术后角膜基质细胞凋亡水平的差异可能原因是前基质的角膜基质细胞与后基质的角膜基质细胞对损伤所产生的反应程度不同, 后基质的损伤可诱发更明显的角膜愈合反

应; 这一现象可能是临床上所发生的高度近视患者 PRK 术后屈光回退、角膜混浊的发生率高于低度近视患者的潜在生物学基础。(2) 在术后 4h、24h LASIK-8.0D 组的凋亡细胞数较 PRK-8.0D 组少, 其差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 其原因可能是 LASIK 术对角膜上皮的损伤明显轻于 PRK 术, 因而角膜损伤后释放的相关细胞因子也少, 故 LASIK 术早期角膜基质中的凋亡细胞明显少于 PRK 术。这也与临床中所见到的对高度近视患者 LASIK 术后屈光回退、角膜混浊的发生率明显低于 PRK 术。

综上所述, LASIK 术后角膜基质细胞的凋亡水平较 PRK 低, 凋亡程度与制瓣中的角膜损伤有关, 与切削深度无明显相关; PRK 术后角膜基质细胞的凋亡水平随切削深度增加而增高; PRK 与 LASIK 术后角膜基质细胞的凋亡水平可能在一定程度上决定了 PRK 与 LASIK 术后角膜愈合反应程度继而影响其疗效, 如: 屈光回退、角膜混浊等。

参 考 文 献

- 1 Gao J, Gelber-Schwalb TA, Addeo JV, et al. Apoptosis in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy[J]. *Cornea*, 1997; 16(2): 200-208
- 2 Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp. Eye Res*, 2003; 76(1): 71-87
- 3 Wilson SE, Kim W-J. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998; 39(2): 220-226
- 4 Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, et al. Apoptosis in cornea: Further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp. Eye Res*, 1997; 65(4): 575-589

(收稿时间: 2004-04)