

# 汉防己甲素抑制兔 Epi-LASIK 术后上皮雾状混浊形成的组织病理研究

赵武校 杜之渝 黄正 刘维锋

**【摘要】 目的** 观察汉防己甲素对微型号角膜刀法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术 (Epi-lasik) 术后角膜上皮下角雾状混浊 (Haze) 的治疗效果。**方法** 健康新西兰大耳兔 27 只, 双眼行 -10.00D 激光切削的 Epi-LASIK 手术, 采用自身对照按眼别随机分 3 组, 分别为阴性对照 (negative control, NC) 组、汉防己甲素 (Tetrandrine, Tet) 组、艾氟龙 (Fluoromethalone, FML) 组, 每组 18 只眼。定期在裂隙灯下对兔 Epi-LASIK 术后 Haze 进行分级评估。分别于术后 0.5 月、1 月、2 月共 3 个时间点每组随机选取 6 眼, 取角膜行光镜、透射电镜、胶原纤维染色等方法观察。**结果** 术后 0.5 月和 1 月, Haze 分级水平与 III 型胶原表达结果显示: 组间比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Tet 组和 FML 组 Haze 分级水平明显低于 NC 组 ( $P < 0.01$ ), 但 Tet 组和 FML 组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.01$ ); 术后 2 月组间整体比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); I 型胶原在术后各时间点的表达, 组间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); HE 染色和透射电镜检测结果发现, 各组不同时间点上皮层结构清晰完整, 而 Tet 组和 FML 组上皮手术区前基质层增生反应程度明显弱于 NC 组, 提示这两种药物对成纤维细胞的增生均有抑制作用。**结论** Tet 通过抑制基质层角膜细胞增殖和降低 III 型胶原表达, 能有效抑制兔 Epi-LASIK 术后 Haze 形成, 其疗效与 FML 相似。

**【关键词】** 汉防己甲素; Epi-LASIK; Haze

**A histopathologic study of the inhibitive effect of tetrandrine on corneal haze after epipolis laser in situ keratomileusis in rabbits** ZHAO Wu-xiao, DU Zhi-yu, HUANG Zheng, LIU Wei-feng. Department of Ophthalmology, the second hospital affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

**【Abstract】 Objective** This study was to investigate the therapeutic effect of Terandrine on corneal haze formation arter epipolis laser in situ keratomileusis (Epi-LASIK). **Methods** Twenty-seven New Zealand white rabbits were performed bilateral -10.00 diopters epi-LASIK, then randomly divided into 3 groups by self-control, NC group, Terandrine group, Fluoromethalone group. And there were eighteen eyes in each group. Corneal haze grade were evaluated by slim light at 0.5-1-and 2 month postoperative intervals. Six corneal samples were randomly harvested in each group at different postoperative intervals and then examined by optical and transmission electron microscope and Sirius red dyeing analyses. **Results** Corneal haze grades and collagen type III expression at 0.5-and 1 month after surgery were significant different among the groups ( $P < 0.05$ ), Comparing with the NC group, The Corneal haze grade and collagen type III expression in Tet and FML groups were apparently lower ( $P < 0.01$ ), but there was no significant difference between Tet and Fml groups ( $P > 0.01$ ). There was no sigrificaet differense. among the there groups at 2 month postoperatively ( $P > 0.05$ ). Collagen type I expression among the groups were no significant difference too ( $P > 0.05$ ). The optical and transmission electron microscope examination discovered that the structure of the epithelial layer in each groupa was intact. And the anterior stromal proliferative reactions between Tet and FML groups were apparently weaker than that in NC groups, which suggested that both medicines have inhibitive effect on corneal haze formation. **Concluions** Tet has inhibitive effect on corneal haze formation after Epi-LASIL by suppression keratocytyes' proliferation and decreasing the expression level of collagen type III, whose efficacy was similar to FML.

**【Key Words】** Tetrandrine; Epi-LASIK ; Haze

Haze 是准分子激光角膜表面切削后出现的主要并发症。目前临床上主要使用皮质类固醇药物来抑制 Haze 形成,但使用过程中存在发生激素性高眼压或激素性青光眼等副作用,给患者带来了用药风险和精神负担。因此,积极探寻副作用更小的抗 Haze 新药,无论对患者还是眼屈光医生都有积极意义。

Haze 的形成是一个复杂的过度创伤愈合反应过程,包括角膜基质细胞的活化增生、转化、细胞外基质的合成和分泌等多个环节。已有报道汉防己甲素(Tetrandrinr, Tet)能有效抑制离体兔角膜基质细胞的增殖<sup>[1,2]</sup>。本研究对 Tet 抑制兔 Epi-LASIK 术后 Haze 形成的作用进行了组织病理学观察,现报道如下。

## 材料和方法

1. 实验动物、药物试剂及仪器设备:健康新西兰大白兔 27 只由重庆医科大学实验动物中心提供,排除眼前节疾病,体重 2.0~2.5kg,雌雄不限。速眠新 II 注射液和苏醒灵注射液(长春军需大学兽医研究所);倍诺喜(日本参天制药株式会社);角膜接触镜(强生公司,含水量 58%、基弧 8.5、DK 值为  $33 \times 10^{-9}$  (cm<sup>2</sup>/s)(mlO<sub>2</sub>/ml × kPa);天狼星玫瑰红(美国 FluKa 公司);KM-5000D 自动旋转式微型角膜刀(江苏无锡市康宁医疗电子设备开发公司),准分子激光仪(美国 VISX),石蜡切片机(德国 Leica),透射电子显微镜(荷兰 Philips),偏振光显微镜(重庆康华医疗设备有限公司)。

### 2. 实验方法

(1) 兔 Epi-LASIK 模型制作与分组:术前 2 天诺氟沙星滴眼液点双眼,3 次/天,手术当天林可霉素滴眼液冲洗结膜囊。速眠新 II 注射液按 0.1ml/Kg 肌肉注射麻醉动物,倍诺喜表面麻醉。KM-5000D 微型角膜刀制作上皮瓣,负压 60mmHg,行光学切削区直径 6.00mm、矫正屈光度 -10.00DS 的准分子激光切削后, BBS 冲洗基质床并复位上皮瓣、点诺氟沙星滴眼液、戴角膜接触镜、于睑裂三等分处间断缝合睑缘两针。术毕苏醒灵注射液按 0.1ml/Kg 肌肉注射按 0.1ml/Kg 肌肉注射催醒。术后诺氟沙星滴眼液点眼,3 次/天,至上皮愈合后取接触镜。

实验动物 27 只共 54 眼,采用自身对照按眼别随机分 3 组,分别为 NC 组、Tet 组、FML 组,每组 18 眼。NC 组使用不含 Tet 的溶剂制成的滴眼液, Tet 组使用浓度为 0.1% Tet 制成的滴眼液, FML 组

使用 0.1%FML 滴眼液作阳性对照。滴眼液使用方法 待角膜上皮愈合后,各组模拟临床用药 4 次/天,逐月递减。各组按药物干预后不同时间点再细分为术后 0.5 月组、1 月组及 2 月组,每个亚组 6 只眼。

(2) 大体观察:定期在裂隙灯下观察并记录兔 Epi-LASIK 术后 Haze 分级标准<sup>[3]</sup>:0 级,角膜透明;0.5 级,斜照法可见轻度混浊;1 级,裂隙灯下容易发现角膜混浊,不影响观察虹膜纹理;2 级,角膜混浊,轻度影响观察虹膜纹理;3 级,角膜明显混浊,中度影响观察虹膜纹理;4 级,角膜重度混浊,不能窥见虹膜纹理。

(3) 角膜苏木素-伊红(HE)染色:经耳缘静脉空气栓塞处死实验动物后,组织钳固定眼球,立即用一次性手术刀片刺穿前房,沿光学切削区边缘取角膜组织,4%多聚甲醛溶液中固定 6h,60%、70%、80%、90%及 100%乙醇梯度脱水,石蜡包埋,连续切片,5μm 厚,HE 染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

(4) 角膜组织超微结构的观察:角膜透射电镜标本制作:角膜标本置于 2.5%戊二醛中前固定 24h 0.1mol/L 磷酸缓冲液漂洗,1%锇酸后固定 2h, PBS 冲洗 3 遍。30%、50%、70%、90%乙醇与 90%丙酮混合液逐级脱水,每次 15min,90%、100%丙酮脱水各 3 次,每次 15min。环氧树脂 Epon-812 包埋,半薄切片定位,经醋酸铀-柠檬铅双染色 20~30min,透射电镜观察。

(5) 天狼星红-偏振光法检测 I、III 型胶原:常规石蜡切片脱蜡至水。在 0.1g/L 苦味酸天狼星玫瑰红溶液中染色 1h,流水冲洗 5min,用苏木精复染,透明,中性树胶封片,在带有起偏器(U-POT),检偏器(U-ANT)显微镜下观察,拍照。结果采用 Image-Pro plus 5.1 图像分析系统处理。测定条件:物象放大倍数 20 × 10,每张切片随机测定 5 个视野,测出 I、III 型胶原染色面积,取 5 个视野均值作为结果。

3. 统计学处理:本文数据运用 SPSS13.0 统计软件处理,对 Haze 分级数据采用 Fisher's exact test 检验。I 型、III 型胶原纤维表达的数据采用 ANOVA 法行方差分析, L-S-D 法进行三组之间两两比较。以 P 值 < 0.05 代表总体比较差异有统计学意义,以 P 值 < 0.01 代表组间两两比较差异有统计学意义。

## 结果

1. 兔眼部的大体观察:兔 Epi-lasik 术后第 2

天下午拆眼睑缝线观察,见不同程度的结膜充血、角膜水肿等炎症反应的表现。自术后第 3 天上午取接触镜后,连续用荧光素钠染色裂隙灯显微镜下观察,发现角膜上皮愈合时间约在术后 3~5 天。上皮愈合后采用自身对照开始点药,并定期进行 Haze 分级评估(图 1A~1C)。兔 Epi-LASIK 术后各组不同时间点 Haze 分级评估情况见表 1。结果显示:术后 0.5 和 1 月,组间差异均有统计学意义 ( $P=0.003, 0.002$ )。其中 Tet 组和 FML 组的 Haze 等级均明显低于 NC 组: Tet 组与 NC 组相比,  $P$  值分别为 0.002 和 0.003; FML 组与 NC 组相比,  $P$  值分别为 0.007 和 0.012; Tet 组和 FML 组比较无统计学差异 ( $P$  值为 1.000)。术后 2 月组间差异无统计学意义 ( $P=0.350$ )。

表 1 兔 Epi-LASIK 术后各组不同时间点 Haze 分级评估情况(眼数)

	0.5 个月		1 个月		2 个月	
	< 0.5 级	> 1 级	< 0.5 级	> 1 级	< 0.5 级	> 1 级
FML	14	4	9	3	4	2
Tet	15	3*	10	2*	5	1
NC	5	13 $\Delta$ *	2	10 $\Delta$ *	2	4 $\blacklozenge$
P 值	0.003		0.002		0.350	

注: 术后 0.5 月和 1 月  $\Delta$  FML 组与 NC 组相比, 差异有显著性意义 ( $P<0.01$ ),  $\star$  Tet 组与 NC 组相比, 差异亦有显著性意义 ( $P<0.01$ ),  $\blacklozenge$  Tet 组和 FML 组相比较无统计学差异 ( $P>0.01$ );  $\blacklozenge$  术后 2 月组间比较无统计学差异。

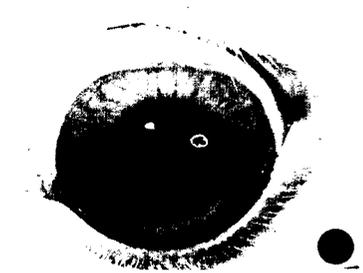


图 1A NC 组角膜中央区近圆形的 2 级 Haze

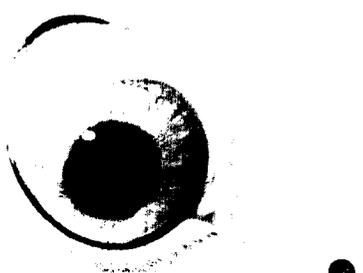


图 1B Tet 组角膜中央区偏下方弧形的 1 级 Haze

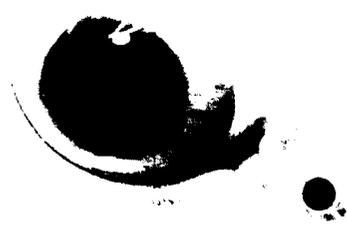


图 1C FML 组亦可见角膜中央区偏下方弧形的 1 级 Haze, 面积较 Tet 组稍大

2. 角膜 HE 染色: 兔 Epi-LASIK 术后不同时间点光镜下均见角膜上皮呈 4~5 层, 而各组上皮前基质层则表现出较大差异: NC 组前基质层有较多成纤维细胞局部聚集。细胞外基质明显增加(图 2A); Tet 组前基质层成纤维细胞较少, 细胞外基质略有增加(图 2B); FML 组的上皮下前基质层情况与 Tet 组相近。(图 2C)。



图 2A NC 组角膜上皮前基质层有较多成纤维细胞聚集, 新生成的细胞外基质排列疏松紊乱



图 2B Tet 组仅少数成纤维细胞出现在上皮前基质层, 新生成的细胞外基质排列较整齐

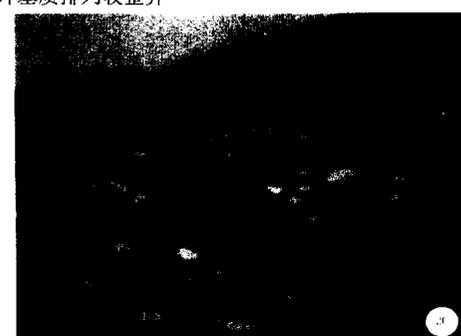


图 2C FML 组少许成纤维细胞呈线状出现在上皮前基质层, 新生成的细胞外基质排列较整齐

3.透射电镜观察:兔 Epi-LASIK 术后各时间点,各组上皮细胞形态及细胞间连接均大致正常,基底膜结构完整。但手术区前基质层之超微结构则表现出较大差别:NC 组前基质层有较多成纤维细胞分布,细胞体积和细胞核均较大,粗面内质网、线粒体、高尔基体等细胞器含量丰富,表明该类细胞新陈代谢高,增殖旺盛。细胞外胶原纤维粗细不均且排列紊乱(图 3A)。Tet 组前基质层成纤维细胞较少,细胞体积和细胞核明显较 NC 组小,细胞外胶原纤维粗细均匀,排列的规则程度明显优于 NC 组(图 3B)。FML 组上皮前基质层超微结构与 Tet 组相接近(图 3C)。

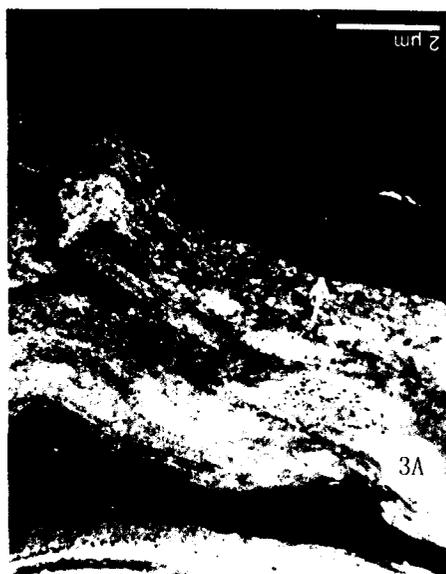


图 3A NC 组上皮层基底膜完整,基质层胶原纤维粗细不均且走行紊乱,成纤维细胞体积较大,细胞器含量丰富,处于增殖期



图 3B Tet 组角膜基质层胶原纤维粗细均匀且排列整齐规则,成纤维细胞体积小,细胞器含量少,细胞较稳定



图 3C FML 组前基质层胶原排列紊乱,成纤维细胞体积较大,核浆比大,处于增殖期

4. 角膜基质层 I、III 型胶原表达情况:天狼猩红是阴离子强酸染料,易与胶原纤维中的碱性基团反应。偏振光显微镜下 I 型胶原示为黄红色,III 型胶原纤维为绿色<sup>[4]</sup>。统计结果显示,I 型胶原在 Epi-LASIK 术后各时间点的表达组间比较均无统计学差异(表 2);III 型胶原的表达在术后 0.5 月和 1 月时组间比较,差异均有显著性意义(表 3),其中 Tet 组和 FML 组与 NC 组相比,P 值均为 0.000;Tet 组和 FML 组比较无统计学差异(P 值分别为 0.404, 0.653)。术后 2 月,组间差异无统计学意义(P=0.733)。III 型胶原纤维的动态表达呈现出先升高后降低的特点,在术后 1 月时达高峰(图 4)。

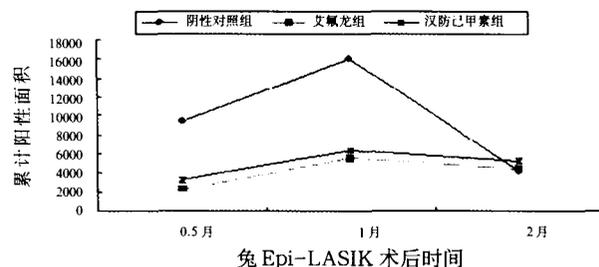


图 4 兔 Epi-LASIK 术后各组 III 型胶原纤维的动态表达

表 2 兔 Epi-LASIK 术后不同时间点各组 I 型胶原表达情况 ( $\bar{X} \pm s$ )

	0.5 月	1 月	2 月
FML	1858.4 ± 687.3	16381.8 ± 789.9	7404.5 ± 475.9
Tet	3381.0 ± 1809.7	16973.8 ± 1039.8	7336.0 ± 618.2
NC	2781.6 ± 861.7	17382.6 ± 192.18	7258.8 ± 566.7
F 值	1.966	0.818	0.101
P 值	0.183	0.463	0.904

注:各组资料均近似正态分布,术后各时间点三组之间比较总体无统计学差异;均为 P>0.05)

表 3 兔 Epi-LASIK 术后不同时间点各组 III 型胶原表达情况 ( $\bar{X} \pm s$ )

	0.5 月	1 月	2 月
FML	2340.4 ± 1033.6	5454.3 ± 1639.2	4450.0 ± 1473.3
Tet	3258.4 ± 811.3 <sup>☆</sup>	6398.6 ± 2548.8 <sup>★</sup>	5217.0 ± 2956.1
NC	9377.6 ± 2593.2 <sup>△★</sup>	16081.2 ± 5248.9 <sup>△★</sup>	4107.5 ± 2549.0 <sup>◆</sup>
F 值	25.976	15.635	0.318
P 值	0.000	0.000	0.733

注: 术后 0.5 月和 1 月△FML 组与 NC 组相比, 差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ ), ★Tet 组与 NC 组相比, 差异亦有显著性意义 ( $P < 0.01$ ), ☆Tet 组与 FML 组相比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); ◆术后 2 月组间比较无统计学差异。

## 讨 论

Haze 是准分子激光角膜表面切削术, 如准分子激光角膜切削术 (PRK)、准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术 (LASEK) 以及 Epi-LASIK 等术后出现的主要并发症。而不同手术方式 Haze 发生率不同。其中, Epi-LASIK 手术由于保留有较完整的基底膜, 术后角膜创伤愈合反应轻, 其 Haze 发生率较 PRK、LASIK 更少<sup>[5-7]</sup>。本实验中设立 NC 组, 是为了观察 Tet 抑制术后 Haze 形成的有效性。与此同时, 使用临床公认的有效抗 Haze 药物 FML 作阳性对照, 借以判断该药的临床应用价值。实验中采用一系列形态学方法对各组用药后的组织病理结构进行了较充分地观察。

裂隙灯显微镜下观察发现 Haze 在兔 Epi-LASIK 术后 5~7 天出现、术后 1 月达高峰, 之后进入消退期。药物干预结果显示: 从 Haze 出现直至达高峰期, 组间差异均具有统计学意义, 且与 NC 组相比, Tet 和 FML 均显示出良好的治疗作用。但二者相比差异无统计学意义, 说明 Tet 和 FML 的疗效相似; 术后 2 月 Haze 处在消退期, 组间的差异无统计学意义。但我们在临床上观察到: 人眼 Haze 形成的高峰期大约在术后 3~4 月左右; 而 1 级左右的 Haze 其最终完全消退时间约在术后 6 个月至 1 年左右, 2 级以上的 Haze 其消退期则相应更长。另外, 在行相同度数切削的患者中, 术后严格按照医嘱使用艾氟龙眼液者, 由于 Haze 形成轻, 其消退时间要明显早于未严格遵医嘱使用药的患者, 且术后未按医嘱应用激素类眼液的患者其 Haze 形成的程度明显重于按医嘱使用药者。本实验中发现兔眼在 Epi-LASIK 术后 Haze 形成的高峰期及消退期均明显早于人眼, 这可能是兔自身的组织修复能力要强于人眼的缘故。兔眼 Epi-LASIK 术后 2 月 Haze 处在消

退期, 组间差异无统计学意义。但从表 1 的实验数据可以看出, 在术后各时间点, Tet 组和 FML 组中的 Haze  $\leq 0.5$  级所占比例均要高于 NC 组, 术后 2 月组间差异无统计学意义可能是样本最小所致。



图 4A NC 组中与黄红色强双折光的 I 型胶原相比, 弱双折光绿色纤细的 III 型胶原所占比例较大, 说明该组新生的 III 型胶原的量较多



图 4B Tet 组中 III 型胶原含量与 I 型胶原相比, 相对较少, 说明该组新生的 III 型胶原的量较少



图 4C FML 组中 I、III 型胶原相间排列, 该组新生的 III 型胶原的量亦较少

各组角膜 HE 染色和透射电镜观察结果均显示: 术后各时间点上皮层结构清晰完整, 上皮下手术区前基质层增生反应程度差异较大。NC 组角膜前基质层的成纤维细胞体积, 细胞器含量以及核浆比值均明显高于 Tet 组和 FML 组, 其胶原纤维排列

方式亦明显较后二者紊乱。不规则的胶原纤维排列必然导致光线在经过角膜时发生散射,形成裂隙灯下所见到的Haze,并且排列越紊乱Haze就越严重,视觉质量也就越差。各组总体增生反应强弱程度随时间变化的特点与Haze的动态变化规律相吻合。

正常角膜基质中含有I、III、V、VI型胶原蛋白,以I型为主,而创伤后重新合成的胶原以III型胶原蛋白为主<sup>[8]</sup>。本实验运用天狼星红-偏振光法检测并比较术后训组间角膜组织I、III型胶原的含量,以此评价药物对胶原纤维产生的抑制作用。结果提示:兔Epi-LASIK术后0.5月角膜I、III型胶原的含量开始升高,约在术后1月达高峰,术后2月时呈降低趋势。组间比较,各时间点角膜I型胶原的含量均无统计学差异。这可能是由于在正常情况下角膜基质以I型为主,术后新生成I型胶原的量与角膜组织固有的I型胶原含量相比相对较少,而且,使用天狼星红染色是对I型胶原进行检测时,无法将新生成的I型胶原和角膜固有的I型胶原严格区分开来,导致各组尽管在数据上显示出一定程度的差别,但无统计学意义。而III型胶原的含量在术后0.5月和1月时,Tet组和FML组分别与NC组比较,差异均具有统计学意义,而Tet组和FML组比较,以及术后2月时三组间两两比较均无统计学差异。这说明Epi-LASIK术后各组Haze分级评估结果的差异主要是由III型胶原的表达差异引起。换言之,Tet和Fml可能主要是抑制了角膜III型胶原的表达,从而抑制了Haze形成。三者术后2月时角膜III型胶原的表达无统计学差异,这与活体上观察到的Haze分级情况高度一致。但角膜的超微结构仍显示

出一定程度的差异,这说明Haze进入消退期后,继续药物干预虽然对新生胶原含量无明显影响,但有助于胶原纤维的规则排列。

综合以上组织病理学检测结果,作为一种非甾体抗炎药和新型钙通道阻滞剂,Tet已初步显示出良好的抗Haze效果,甚至具有替代皮质类固醇类药物的抗Haze形成和屈光回退作用的潜质。但在眼科临床应用之前,其眼部使用的安全性以及眼局部的药代动力学物点等诸多方面还有待研究。

#### 参考文献

- 1 牟章兵,杜之渝,晏丕松. 汉防己甲素等5种抗纤维化药物对离体兔角膜基质细胞的抑制作用. 眼科新进展, 2006,8(26): 592-596.
- 2 牟章兵,杜之渝,晏丕松. 汉防己甲素对离体兔角膜基质细胞抑制机理实验研究. 眼科研究, 2007,25(1):29-32.
- 3 Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, et al. Wound healing after eacimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. Arch Ophthalmol, 1990,108(5):665-675.
- 4 李玉松. 病理学技术. 第一版: 人民卫生出版社, 2000: 144-145.
- 5 Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R jr, et al. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. Cornea, 2005,24(5):509-522.
- 6 Espana EM, Grueterich M, Mateo A, et al. Cleavage of corneal basement membrane components by ethanol exposure in laser-assisted subepithelial keratectomy. J Cataract Refract Surg, 2003,29(6):1192-1197.
- 7 Pallikaris IG, Naoumidi II, Kalyvianaki MI, et al. Epi-LASIK: comparative histological evaluation of mechanical and alcohol-assisted epithelial separation. J Cataract Refract Surg, 2003,29(8):1496-1501  
Ahmadi AJ, Jakobiec FA. Corneal wound healing: cytokines and extracellular matrix proteins Int Ophthalmol Clin, 2002,42(3):13-22.

(收稿时间: 2007-04)