

# 角膜伤口愈合机制对准分子激光角膜屈光手术的启示

钱一峰 综述 戴锦晖 审校

## Enlightenment from corneal wound healing for excimer laser refractive surgery

Qian Yifeng, Dai Jinhui. Department of Ophthalmology, Eye & ENT Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China

**Abstract** Wound healing in the human cornea has distinctive characteristics in comparison to most other tissues in the body. The corneal wound healing response is a remarkably complex cascade mediated by cytokines, growth factors, and chemokines. The interactions in the epithelial, stromal, neural, lacrimal gland, immune cells are interwoven in the corneal response to injury. Corneal epithelial cells and basement membrane play important roles in this process. However, both of them are usually impaired during the procedures of excimer laser refractive surgery for myopia, hyperopia, or astigmatism, and complications such as overcorrection, undercorrection, regression, refractive instability, and haze may occur after surgery. A complete corneal wound healing process, the biologic and molecular processes that contribute to the healing response, and anomalies that lead to complications are critical for improving the efficacy and safety of excimer laser refractive surgical procedures.

**Key words** corneal wound healing; epithelial cells; basement membrane; refractive surgery; haze

**摘要** 角膜伤口愈合反应是由细胞因子、生长因子、趋化因子介导的复杂级联反应。角膜上皮细胞和基底膜在这一过程中起了重要的作用,而二者在准分子激光角膜屈光手术中常常被损伤。因此,深刻理解角膜伤口愈合过程以及并发症产生的原因,对提高准分子激光角膜屈光手术的有效性和安全性具有重要意义。就角膜伤口愈合过程及其机制进行综述。

**关键词** 角膜伤口愈合; 上皮细胞; 基底膜; 屈光手术; 上皮下雾状混浊

**分类号** R 778.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)12-1146-04

角膜伤口愈合反应与角膜屈光手术密切相关,是手术有效性和安全性的主要决定因素之一。愈合过程中主要涉及的组织器官包括角膜上皮细胞、基质、神经纤维、炎性细胞以及泪腺,其相互作用促进角膜伤口愈合,以保持和恢复角膜的结构功能。由于多种细胞因子和生长因子介导的细胞相互作用出现在角膜伤口中,因此角膜愈合过程存在多样性,从而导致术后过矫、欠矫、回退、屈光不稳定以及上皮下雾状混浊(haze)形成等。

### 1 角膜各层组织在伤口愈合中的作用

角膜上皮为非角化复层鳞状上皮组织,厚度 40 ~ 50 μm,其覆盖于眼球前表面起着第一道隔离泪液和眼外环境的屏障作用<sup>[1]</sup>;其完整性对保持上皮和基质

相互作用的平衡是非常必要的;而这种相互作用可以激活并产生细胞因子促进角膜损伤修复,诱导角膜细胞的凋亡,促进肌成纤维细胞的转化生成,引起角膜新生血管化<sup>[2]</sup>。因此,在屈光手术中保持角膜上皮的活力和完整性对于角膜伤口的良好愈合、避免并发症的发生以及取得最佳术后视力非常重要。

基底膜位于上皮细胞下,是角膜上皮细胞的产物,与前弹力层连接紧密。基底膜能影响角膜基质细胞的增生、移行和分化,在角膜伤口愈合及形态重塑中起重要作用。

人正常角膜前弹力层(Bowman's membrane, Bowman层)由直径 22 nm 的 I 型胶原纤维及蛋白多糖组成,为上皮基底膜下一层相对均一、无细胞的胶原纤维膜<sup>[3]</sup>。目前, Bowman 层的作用和功能尚不清楚<sup>[4]</sup>, Obata 等<sup>[5]</sup>推测 Bowman 层可能是一生物和生理屏障,可保持角膜内环境稳定,在术中应尽量不损伤

作者单位:200031 上海,复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科  
通讯作者:戴锦晖 (Email: daijinhui8@126.com)

Bowman 层,以防止上皮下纤维化和 haze 的发生。

角膜基质主要由不溶性胶原纤维、水溶性的蛋白聚糖和角膜细胞组成。胶原纤维的主要作用是保持形状和形成抗张力。蛋白聚糖能吸收水分填补胶原纤维间的空隙,发挥抗挤压作用。角膜细胞能够合成并维持细胞外基质中胶原纤维和蛋白聚糖的含量,在愈合过程中还能分化成肌纤维母细胞。角膜组织的精确构建是形成角膜透明性的主要因素,这要求胶原纤维直径精确、均一,相互之间平行排列,浸于蛋白聚糖中<sup>[6-7]</sup>。

## 2 角膜伤口愈合的过程

从组织细胞学上讲,上皮、基质、神经、泪腺、免疫细胞间的相互作用推动了角膜伤口的愈合。而这种相互作用是由它们释放的各种介质介导的。角膜伤口愈合反应实际上是由细胞因子、生长因子、趋化因子介导的非常复杂的级联反应。角膜上皮损伤后,立即通过释放细胞因子和生长因子来启动愈合过程。这些因子包括转化生长因子- $\beta_2$  (transforming growth factor- $\beta_2$ , TGF- $\beta_2$ )<sup>[8]</sup>、白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、骨形态形成蛋白 2 (bone morphogenetic proteins 2, BMP2)、BMP4、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF),它们均由角膜上皮和基底膜合成并释放<sup>[9]</sup>。IL-1 $\alpha$  通过调节愈合中的关键步骤,起到了一种特殊的协调组织作用。例如,上调肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)、角化细胞生长因子 (keratinocyte growth factor, KGF)、PDGF 以及其他因子在角膜细胞的表达。泪腺细胞分泌的各种介质对调节上皮和基质的愈合以及免疫细胞的浸润也是非常重要的。损伤导致的上皮基底膜机械屏障的缺损使得这些介质能够到达基质,并与角膜细胞上的受体结合,启动各种细胞应答。应答产生的复杂级联反应导致角膜细胞的凋亡、坏死、激活、增生及分化产生肌纤维母细胞。在损伤后 12 ~ 24 h, 未经历前 2 个过程的角膜细胞被激活并开始增生和迁移。这些增生的角膜细胞被认为能够激活更多的角膜细胞、纤维母细胞以及肌纤维母细胞。在损伤后 8 ~ 24 h, 通过上皮细胞的直接激活或者细胞因子 (例如 IL-1 和 TNF- $\alpha$ ) 激活角膜细胞合成、释放大量趋化因子吸引炎性细胞进入角膜基质。这些炎性细胞的作用是吞噬凋亡小体和坏死细胞的碎片。坏死基质的降解和去除主要由纤溶酶原激活物/纤溶酶系统、基质金属蛋白酶和其他酶类协调进行<sup>[9]</sup>。

肌纤维母细胞在损伤后 1 ~ 2 周出现在基质中,其数量依赖于损伤的深度和受损表面的规则性。损伤越深、表面越不规则,肌纤维母细胞出现的越多。目前认为肌纤维母细胞起源于角膜细胞,是角膜细胞在 TGF- $\beta$ , 特别是 TGF- $\beta_2$  的作用下转化生成的,其特征性表达  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), 以及钙黏素和 TGF- $\beta$  受体的高表达,特点是透明度下降。该细胞一旦生成,会产生大量生长因子,如 HGF 和 KGF, 同时合成胶原、葡萄糖胺聚糖、胶原酶、明胶酶和金属蛋白酶,进行角膜基质重塑。在角膜屈光手术中,肌纤维母细胞的出现与严重的 haze 有关,该细胞又可经过数年自行消失。随着其逐渐消失,紊乱的基质胶原纤维和细胞外间质会发生重构,使基质瘢痕透明化。其机制目前尚不清楚,凋亡和转化都可能参与其中<sup>[9]</sup>。

## 3 角膜上皮基底膜

角膜上皮基底膜厚仅约 150 nm,由透明层 (50 nm) 和致密层 (60 ~ 90 nm) 组成。其主要成分是 IV 型胶原、层粘连蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白多糖等。角膜上皮细胞和激活的基质细胞都能合成基底膜成分和黏附结构,上皮基底细胞起了主导作用<sup>[10]</sup>。基底膜能影响角膜基质细胞的增生、移行和分化,在角膜伤口愈合及形态重塑中起重要作用。层粘连蛋白是基底膜中主要的非胶原成分<sup>[11]</sup>,同时也是角膜上皮黏附复合体的重要组分,并且已知其参与上皮细胞的附着、移行和增生<sup>[12]</sup>。基底膜通过半桥粒和上皮基底细胞连接,黏附上皮细胞。黏附复合体使上皮和 Bowman 层黏附在一起,它由半桥粒及其相连结构组成,这些相连结构包括锚丝、致密层、固定纤维等<sup>[13]</sup>。

研究发现,准分子激光角膜切削术 (photorefractive keratectomy, PRK) 术中将上皮及基底膜清除后暴露角膜基质,然后进行激光切削,术后基质床角膜细胞被激活产生纤维化反应;准分子激光原位角膜磨镶术 (laser in-situ keratomileusis, LASIK) 术中制作角膜基质瓣,只在瓣边缘切断基底膜,术后瓣边缘上皮和基质间发生纤维化修复,瓣中央和旁中央不发生;由上皮-基质相互作用介导的纤维化修复可导致角膜纤维瘢痕和 haze,角膜上皮细胞分泌的细胞因子能够决定这一纤维化反应<sup>[14]</sup>,其中最主要的是 TGF- $\beta_2$ <sup>[8]</sup>。并且起调节作用的是基底膜的完整性。具体来讲,当损伤发生时,基底膜完整则角膜能完全修复,基底膜破损则在不连续处进行纤维修复<sup>[8]</sup>。基底膜破损的伤口修复时,当上皮细胞在无基底膜的基质上迁移时,合成和释放 TGF- $\beta_2$  增加,发生纤维化修复反应;当角膜上皮细胞

黏附于重建的基底膜上时, TGF- $\beta_2$  合成和释放会明显下调; 当原先进行纤维化修复的伤口区域重新形成完整的基底膜时,  $\alpha$ -SMA 的表达和 TGF- $\beta_2$  的分布会在角膜基质中消失。重新形成的基底膜作为一个调节因素降低了 TGF- $\beta_2$  的合成和释放, 同时也作为一个屏障使其不能到达其靶细胞——角膜细胞。而单纯角膜上皮损伤, 基底膜完整, 上皮可完全再生, 没有纤维化反应和基质重塑<sup>[15]</sup>, 完整的基底膜可以解释为什么基质中缺失 TGF- $\beta_2$  和  $\alpha$ -SMA 的表达。因此, 基底膜的完整性能够决定角膜损伤修复过程中纤维化的程度<sup>[8]</sup>。

#### 4 准分子激光角膜屈光手术后的伤口愈合

准分子激光术后角膜的伤口愈合慢且不完全, 整个过程需持续 3~4 年。光镜下可见 LASIK 瓣愈合后在中央和旁中央接触面形成一种少细胞性的原始间质瘢痕, 而在瓣边缘形成一种多细胞性纤维间质瘢痕。电镜下可见, 前者由电子致密颗粒样物质组成, 混合有散乱疏松的网状小直径 (21 nm) 胶原纤维, 以及极少的角膜细胞; 后者由高密度不规则网状排列的胶原纤维 (直径为 26 nm) 组成, 中间散在分布有许多角膜细胞, 有时可见肌纤维母细胞。虽然所有这些新生的胶原纤维处于瓣和基质床之间, 但都没有与二者纤维形成新的连接, 因此愈合区域非常脆弱<sup>[16]</sup>。

准分子激光屈光矫正手术后角膜基质变薄, 其生物力学稳定性下降。角膜粘合抗张力 (cohesive tensile strength, CTS) 是角膜生物力学的重要指标, 它反映的是板层间保持粘合状态、抵抗分离和滑动的力。正常角膜 CTS, Bowman 层 > 周边前 1/3 厚角膜 > 中央前 1/3 厚角膜 > 周边后 2/3 厚角膜 > 中央后 2/3 厚角膜 > 后弹力层。角膜基质 CTS 大小的分界是在前 40% 处<sup>[3]</sup>。LASIK 瓣的愈合特点导致角膜瓣和基质床接触界面处角膜 CTS 非常低, 术后 7~10 年, 该界面中央和旁中央愈合后 CTS 值平均为正常角膜的 2.4%, 在瓣边缘相对较高为 28.1%<sup>[3]</sup>。

LASIK 术后伤口愈合处的 CTS 非常重要, 直接关系到术后角膜瓣的牢固性。传统 LASIK 或薄瓣 LASIK 术后形成的低细胞性纤维基质瘢痕只有很低的 CTS, 因此可能发生外伤性瓣脱位。并且由于愈合面存在这样一个潜在空间, 可能在术后发生伤口界面并发症, 包括弥漫性板层角膜炎 (diffuse lamellar keratitis, DLK)<sup>[17-18]</sup>、界面液化综合征<sup>[19-20]</sup>、感染<sup>[21]</sup>。

在残余基质床, 角膜板层间 CTS 的大小决定了在眼压作用下是否会发生板层间的滑动, 残余基质床和角膜基质瓣的愈合又共同关系到整个角膜形态的稳定

性。LASIK 矫正屈光不正度数越高, 切削越深, 术后基质床越薄, CTS 越低, 发生角膜扩张的可能性越大。传统 LASIK 制瓣厚度为 130~160  $\mu\text{m}$ , 并且其厚度预测性较差<sup>[22]</sup>, 如果制作成过厚瓣后仍按术前计算的量进行激光切削, 残余基质床厚度可能更小。使用飞秒激光进行薄瓣 LASIK<sup>[23]</sup>, 其制作的瓣厚度为 90~110  $\mu\text{m}$ , 或者更薄, 且变异度小, 使得切削后能保留较多能承受高应力的基质。基质瓣越薄, 最终残余基质床厚度越厚, 更多高 CTS 的角膜基质得以保留, 术后角膜更稳定。

PRK 和 LASIK 术后伤口愈合具有不同特点。兔眼高度数的 PRK 同高度数的 LASIK 及中低度的 PRK 相比, 角膜细胞凋亡、增生和肌纤维母细胞的生成均明显增多; LASIK 术后瓣中央与基质床接触面的上下基质中均无肌纤维母细胞出现; PRK 的情况却相反<sup>[24]</sup>。这与临床上通过 PRK 矫正高度屈光不正时易出现明显的 haze 相一致。LASIK 的基质瓣中央和旁中央保持了上皮及基底膜的完整性, 屏障了上皮和基质的相互作用, 使角膜细胞的凋亡和坏死减少, 最主要的是角膜细胞的增生和肌纤维母细胞生成的减少, 最终 haze 很少发生。PRK 术后基质床完全暴露在外, 使得前部角膜细胞直接与泪液接触, 并且随着周边上皮细胞的迁移进行再上皮化, 角膜细胞和上皮细胞直接接触的机会大大增加。因此这一修复反应在 PRK 极其强烈, 术后并发症, 例如屈光回退和 haze, 同其他术式相比更为明显。

Haze 的生成直接与肌纤维母细胞的出现有关, 此外还与许多物质相关, 如葡萄糖胺聚糖、纤维连接蛋白、Ⅲ型胶原、硫酸角质素、透明质酸等<sup>[25]</sup>。Javier 等<sup>[26]</sup>发现, PRK 术后角膜Ⅲ型胶原的沉积量是乙醇法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术 (laser subepithelial keratomileusis, LASEK) 术后的 3 倍, 差异有统计学意义。推测其在 haze 的形成中具有重要意义。

目前, 由于准分子激光切削更加平滑, 上皮瓣制作更加精良, LASEK 和机械法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术 (epipolis laser in-situ keratomileusis, Epi-LASIK) 术后 haze 进一步减少。根本原因是其术中制作的上皮瓣完整性高、上皮细胞活性强, 并且保留了基底膜, 使得瓣复位后上皮和基质的接触机会减少<sup>[27]</sup>。

#### 5 小结与展望

角膜上皮细胞活性是影响术后的重要因素。受损的上皮细胞释放的细胞因子可以诱导级联反应作用于角膜基质细胞, 导致 haze 的发生和瘢痕的形成<sup>[8]</sup>。保

持角膜上皮细胞活性避免损伤,可能是减少术后并发症的有效方法。

基底膜的完整性是控制角膜伤口愈合的决定因素之一。角膜受损处基底膜破裂,会促进上皮-基质相互作用并激活上皮细胞合成和释放多种介质,并且失去屏障功能,会发生复杂的级联反应,导致伤口纤维化修复。因此角膜屈光手术中应避免基底膜的损伤,尽可能多的保留基底膜,以减少 haze 等并发症的发生。

LASEK 和 Epi-LASIK 以及薄瓣 LASIK 是改进的准分子激光角膜屈光手术,与传统的 LASIK 和 PRK 相比可减少角膜扩张和 haze 的发生。但它们仍存在伤口愈合问题,如 LASEK 和 Epi-LASIK 仍然有术后疼痛和不适、缓慢的视觉恢复以及 haze 的发生;薄瓣 LASIK 仍可能发生瓣脱位和界面并发症。因此,仍需要寻找一种具有更高安全性的手术方式。利用飞秒激光进行角膜基质内切削<sup>[28]</sup>的手术方式避免了角膜瓣的制作,保持了上皮和基底膜的完整性,为找到理想的手术方式带来了新的希望。

## 参考文献

- 1 Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, et al. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(9): 2506 - 2513
- 2 Chen CC, Chang JH, Lee JB, et al. Human corneal epithelial cell viability and morphology after dilute alcohol exposure [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43(8): 2593 - 2602
- 3 Dawson DG, Grossniklaus HE, McCarey BE, et al. Biomechanical and wound healing characteristics of corneas after excimer laser keratorefractive surgery: Is there a difference between advanced surface ablation and sub-Bowman's keratomileusis [J]. *J Refract Surg*, 2008, 24(1): S90 - 96
- 4 Wilson SE, Hong JW. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis [J]. *Cornea*, 2000, 19(4): 417 - 420
- 5 Obata H, Tsuru T. Corneal wound healing from the perspective of keratoplasty specimens with special reference to the function of the Bowman layer and Descemet membrane [J]. *Cornea*, 2007, 26(9): S82 - 89
- 6 Boote C, Dennis S, Newton RH, et al. Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(7): 2941 - 2948
- 7 Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure; a role for fibroblasts in corneal fibrosis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 45629 - 45637
- 8 Stramer BM, Zieske JD, Jung JC, et al. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10): 4237 - 4246
- 9 Netto MV, Mohan RR, Ambrósio RJ, et al. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy [J]. *Cornea*, 2005, 24(5): 509 - 522
- 10 Lee YC, Wang IJ, Hu FR, et al. Immunohistochemical study of subepithelial haze after phototherapeutic keratectomy [J]. *J Refract Surg*, 2001, 17(3): 334 - 341
- 11 Bystrom B, Virtanen I, Rousselle P, et al. Distribution of laminins in the developing human eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(3): 777 - 785
- 12 Iglesia DD, Stepp MA. Disruption of the basement membrane after corneal debridement [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41(5): 1045 - 1053
- 13 Stock EL, Kurpakus MA, Sambol B, et al. Adhesion complex formation after small keratectomy wounds in the cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33(2): 304 - 313
- 14 Wilson SE, Mohan RR, Ambrosio R, Jr, et al. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2001, 20(5): 625 - 637
- 15 Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement [J]. *Exp Eye Res*, 2001, 72(1): 33 - 39
- 16 Ingo S, Daniel GD, Bernard EM, et al. Cohesive tensile strength of human LASIK wounds with histologic, ultrastructural, and clinical correlations [J]. *J Refract Surg*, 2005, 21(5): 433 - 446
- 17 Rosman M, Chua WH, Tseng PS, et al. Diffuse lamellar keratitis after laser in situ keratomileusis associated with surgical marker pens [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(6): 974 - 979
- 18 Hadden OB, McGhee CN, Morris AT, et al. Outbreak of diffuse lamellar keratitis caused by marking-pen toxicity [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(7): 1121 - 1124
- 19 Hoffman RS, Fine IH, Packer M. Persistent interface fluid syndrome [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(8): 1405 - 1408
- 20 Wheeldon CE, Hadden OB, Niederer RL, et al. Presumed late diffuse lamellar keratitis progressing to interface fluid syndrome [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(2): 322 - 326
- 21 Cox SG, Stone DU. Diffuse lamellar keratitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2008, 34(2): 337
- 22 Choudhri SA, Feigenbaum SK, Pepose JS. Factors predictive of LASIK flap thickness with the Hansatome zero compression microkeratome [J]. *J Refract Surg*, 2005, 21(3): 253 - 259
- 23 Slade SG. Thin-flap laser-assisted in situ keratomileusis [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2008, 19(4): 325 - 329
- 24 Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(1): 71 - 87
- 25 Fagerholm P. Wound healing after photorefractive keratectomy [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2000, 26(3): 432 - 447
- 26 Javier JA, Lee JB, Oliveira HB, et al. Basement membrane and collagen deposition after laser subepithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy in the leghorn chick eye [J]. *Arch Ophthalmol*, 2006, 124(5): 703 - 709
- 27 Netto MV, Mohan RR, Sinha S, et al. Stromal haze, myofibroblasts, and surface irregularity after PRK [J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(5): 788 - 797
- 28 Ratkay-Traub I, Ferencz IE, Juhasz T, et al. First clinical results with the femtosecond neodymium-glass laser in refractive surgery [J]. *J Refract Surg*, 2003, 19(2): 94 - 103

(收稿:2009-02-16 修回:2009-09-25)

(本文编辑:尹卫靖)