

## 准分子激光原位角膜磨镶术后 角膜细胞凋亡的研究

陆勤康 盛艳 杨亚波 王惠云 童奇湖 忻双华 龚维坤

**【摘要】目的** 了解准分子激光原位角膜磨镶术(laser in situ keratomileusis, LASIK)后早期角膜基质细胞凋亡的特点并探索LASIK术后角膜愈合反应程度与角膜刀的机械损伤、激光能量的相关性。**方法** 20只新西兰白兔,其中10只兔左眼为LASIK-4.0D组、右眼为LASIK-8.0D组、另10只兔左眼为单纯角膜瓣组、右眼作为空白对照组,在术后4小时处死兔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端标法(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差别。**结果** 三个手术组中角膜基质中均出现凋亡细胞,主要分布于角膜瓣和基质床交接面两侧50 $\mu$ m范围内的基质层中;瓣缘的凋亡水平高于中央部。而空白对照组中,凋亡细胞仅出现在表层上皮,角膜基质细胞未见凋亡。三个手术组的TUNEL阳性细胞计数进行方差分析,三组之间差异无显著意义( $F=1.008$ ,  $P>0.05$ );每组不同个体的TUNEL阳性细胞计数存在明显的差异。**结论** 正常角膜基质细胞不发生凋亡。角膜基质细胞凋亡与角膜损伤有关。LASIK术后早期即可出现角膜基质细胞的凋亡表达,该表达与角膜瓣的制作有关,与激光切削的深度、能量无明显的相关性。

**【关键词】** 凋亡;角膜细胞;角膜基质;准分子激光原位角膜磨镶术;TUNEL

### Experimental study on the keratocyte apoptosis in the stoma following LASIK

LU qin-kang, SHENG yan, YANG yabo, WANG hua-yan, TONG ji-hu, XIN shuang-hua, GONG wei-kun.  
Department of Ophthalmology, NinBo YinZhou Peoples Hospital, NinBo 315040, China

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to investigate the character of the keratocyte apoptosis after LASIK and to discuss the correlation between the level of apoptosis and the mechanical injury by micro-keratome, laser ablation respectively. **Methods** A total of 20 12 to 15 week-old New Zealand white rabbits weighting 3.5~4.0kg each were included in the data analysis in this study. The 40 eyes were divided into 4 groups. Ten of these rabbits were operated with LASIK and were corrected -4.0 diopters on left eyes and -8.0 diopters on right eyes. The left eyes of the other ten rabbits were produced a flap with microkeratome without subsequent laser ablation and the right eyes were control without any treatment. At 4 hours after surgery the rabbits 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** In the control group, TUNEL-positive cells only appearing in the epithelium and no keratocyte apoptosis expression in stoma, but keratocyte apoptosis was noted in the other three surgery groups. LASIK Keratocytes undergoing apoptosis were distributed within a zone approximatedly 50 $\mu$ m anteriorly and posteriorly to the interface and were more in the peripheral than in the central cornea. There were no statistically significant differences in the TUNEL positive cells among the three operated groups ( $F=1.008$ ,  $P>0.05$ ). Keratocyte apoptosis was variable from eye to eye with each operated group. **Conclusions** There was no keratocyte apoptosis expression in normal stoma, The

基金项目:宁波市科委资助项目(2005C100081);鄞州科技局资助项目(2005B02)

作者单位:315040 宁波市鄞州人民医院眼科中心(陆勤康 王惠云 童奇湖 忻双华 龚维坤);310009 浙江大学医学院附属第二医院眼科中心(盛艳 杨亚波)

通讯作者:陆勤康, E-mail:luqinkang@163.com

keratocyte apoptosis in stroma was related to corneal injury. There were keratocytes undergoing apoptosis in stroma after 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 laser ablation.

**【Key words】** Apoptosis; Keratocytes; Stroma; Laser in situ keratomileusis; TUNEL

屈光手术后角膜的创伤修复是一个复杂的过程,通常包括:细胞的凋亡、激活、增殖、分化,细胞因子的释放,细胞外基质的合成与重构等<sup>[1]</sup>。此过程是由多种细胞和众多细胞因子在时间相空间上高度协调而完成的,直接影响着创伤修复的质量。创伤修复反应的差异性已日益成为一种影响各种屈光性角膜手术术后稳定性和可预测性的重要决定因素。目前,国内外对LASIK术后角膜愈合机制的研究较多,但对于LASIK术后角膜细胞的凋亡研究很少,对不同矫正度数与LASIK术后的角膜基质的凋亡水平的关系尚无报道,对单纯制作角膜瓣与进行一般LASIK术后的角膜基质的凋亡水平是否存在差异尚无报道。以前的研究认为屈光手术后角膜细胞的凋亡启动了角膜基质的重构的过程<sup>[2]</sup>,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呈正相关<sup>[3]</sup>。我们通过在兔眼上建立不同屈光度的LASIK模型,并设立空白组与单纯角膜瓣组进行对照,术后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) 观察各组角膜的凋亡细胞的数量,从而探索LASIK术后角膜愈合反应程度与角膜刀的机械损伤、激光能量的相关性,从而提高LASIK手术的预测性和安全性。

## 材料与方法

### 一、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 20 只, 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 (Philips 公司)

### 二、方法

1. 实验分组: 20 只新西兰白兔随机分为两组, 每组 10 只, 第一组兔的左眼为 LASIK-4.0D 组、右眼为 LASIK-8.0D 组, 另一组兔左眼为单纯角膜瓣组、右眼作为空白对照组。

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: 实验动物置于手术台上, 无菌生理盐水冲洗结膜囊。用 Moria M2 微型角膜刀的 0 号负压吸引环, 厚度设置为 160 $\mu$ m 的微型角膜板层刀制作一完整的角膜瓣, 随后将瓣掀起后, 不进行激光切削, 仅进行层间 BBS 冲洗, 角膜瓣复位; B 组: 以同样方法制备相同厚度的角膜瓣, 随后将瓣掀起后, 瓣下基质面以 193nm 的准分子激光进行 -4.00D 角膜切削, 切削区直径为 6-8mm。层间 BBS 冲洗, 角膜瓣复位; C 组: 手术方法同 B 组; 但进行 -8.00D 角膜切削; D 组: 空白对照。

3. 组织病理学检查: 术后 4 小时处死兔, 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, HE 染色, 行光镜检查; 另一半 4% 戊二醛固定后行透射电镜观察。

4. 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; (3) TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记: 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时; (4) PI (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 $\mu$ g/ml DNA 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。

### 5. 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  $M \pm SD$  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. 角膜基质细胞原位凋亡数检测(激光共焦显微镜观察)

凋亡的生化反应主要是细胞内发生一系列信号传递反应。染色质DNA在核小体联接部被核酸内切酶所降解,产生大小不一的多聚核苷酸片段;被切割后,每个片段均含有3-OH末端。TUNEL法是直接标记染色体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。在对照组中,即正常未受损伤的角膜,凋亡细胞仅出现在角膜表层上皮,角膜基质和内皮层均无凋亡细胞表达(图1A)。在三个手术组中角膜基质中均出现凋亡细胞,主要分布在角膜瓣和基质床交接面两侧50 $\mu$ m范围内的基质层中(图1B, 1C); LASIK术后,角膜瓣边缘基质内的细胞凋亡水平远高于基质中央部(图1D)。从图2中可以发现无论是单纯角膜瓣组或LASIK组,各组中的不同标本之间存在很大的个体差异。对三个手术组的TUNEL阳性细胞计数进行方差分析,三组之间差异无显著意义( $F=1.008, P>0.05$ )(表1)。三手术组TUNEL阳性细胞计数值两两比较,(AB、AC、BC),  $t$ 值分别为-1.236、-1.321、-0.52,  $p$ 均 $>0.05$ 。

表3 术后4小时各组TUNEL阳性细胞计数的比较  
(个/10个高倍视野)

组别	细胞个数	F	P
A组	26.10 $\pm$ 23.34		
B组	41.10 $\pm$ 30.46	1.008	$>0.05$
C组	41.80 $\pm$ 29.46		

### 2. 透射电镜观察

透射电镜下,三个手术组角膜均出现角膜细胞核固缩、染色质边集在核膜内侧呈新月形;及凋亡小体的形成;胞浆浓缩、小泡形成;胞膜结构完整、没有内容物释放等符合细胞凋亡特征的形态学变化。对照组角膜细胞形态正常,基质中未发现凋亡的角膜细胞(图3)。透射电镜所观察到的结果也证实了上述TUNEL染色的结果。

## 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<sup>[4]</sup>。许多研究已经表明,损伤诱发的角膜细胞的凋亡是通过受伤的上皮释放凋亡前细胞

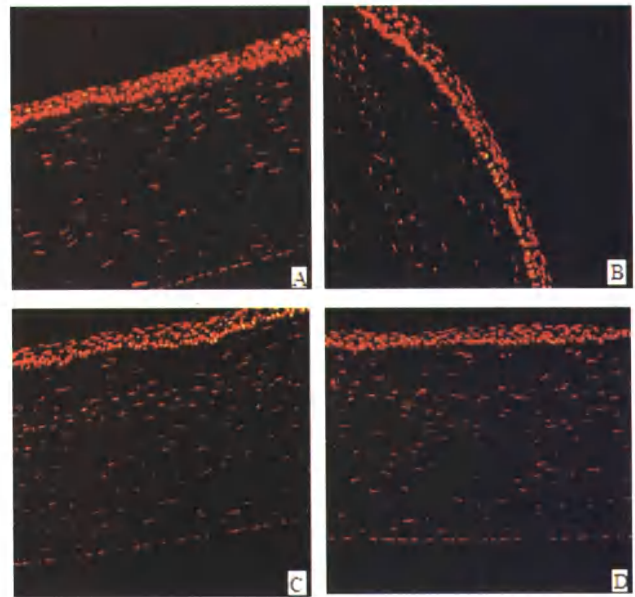


图1 A图为正常的角膜细胞,凋亡细胞仅出现在表层上皮。B图为LASIK-4.0D组的角膜,可见角膜瓣和基质床交接面两侧有凋亡细胞,且上方角膜瓣边缘基质内的细胞凋亡水平远高于基质中央部。C、D图均为LASIK-8.0D组的不同样本中央区角膜TUNEL法标记后激光共焦显微镜下图象,两幅图中凋亡的角膜细胞均分布在角膜瓣切口,但C图中凋亡细胞的数量明显多于D图。

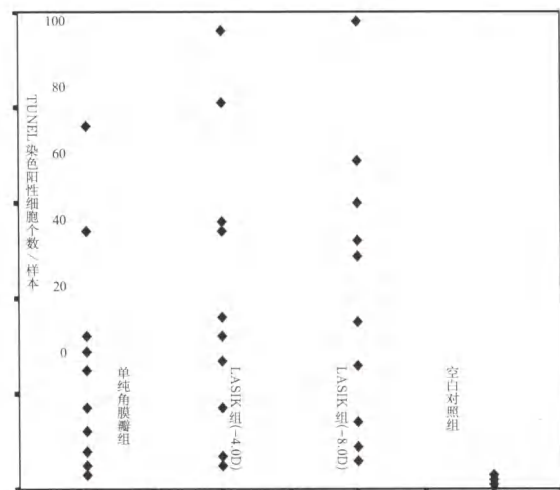


图2 各样本TUNEL染色阳性细胞计数分布图(个/10个高倍视野)

因子进行介导的,这些细胞因子可以相互作用引发角膜细胞的凋亡。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<sup>[5]</sup>。细胞凋亡可能是活性角膜细胞产生和基质重构的启动因素<sup>[2]</sup>,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细胞及成纤

维细胞的数量成正相关<sup>[3]</sup>。

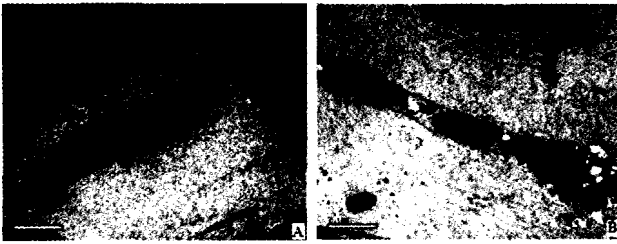


图3 (A) 图为正常的兔角膜标本,透射电镜下可见角膜细胞核核膜光滑(↑),染色质密度均匀。×6200,(B)为LASIK(-8.00D)术后4小时的兔角膜标本,透射电镜下可见角膜细胞体积变小,核固缩、染色质边集(↑);胞浆浓缩、小泡形成;胞膜结构完整、没有内容物释放。×6200

本研究发现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 $\mu$ m范围内的基质层中;且LASIK术后,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Mohan等的研究相似<sup>[3]</sup>。LASIK术后早期基质中的凋亡细胞的分布特点不同于PRK术后,有研究报道发现PRK术后早期基质中的凋亡细胞主要分布在浅层基质中<sup>[3,6]</sup>,即PRK手术中损伤上皮的下方会立即发生角膜基质细胞的凋亡。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细胞凋亡的发生机制进行解释,因为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;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。

本研究对A、B、C三组术后4小时各组TUNEL阳性细胞计数进行比较发现三组之间差异无显著意义,但A组平均TUNEL阳性细胞个数少于B、C两组,这可能是因为B、C两组均进行了角膜基质的激光切削,由于切削后基质床表面的曲率发生变化使得切削后的角膜瓣与基质床之间会产生一个潜在的腔隙,从而有更多的泪液、上皮细胞的碎屑可以在此存留,故有更多的细胞因子释放并诱导角膜细胞发生凋亡。B、C两组TUNEL阳性细胞计数的平均值很接近,这也表明在LASIK术中,不同的矫正度数对术后角膜基质细胞凋亡的影响较小,即LASIK术中激光切削的时间、深度可能不会加重术后早期的角膜基质细胞的凋亡;Mohan等的研究发现不同矫正度数的PRK术后,早期发生凋亡的角膜基质细胞数量有明显的差异,矫正度数为-9.0D的

PRK术后凋亡细胞计数明显高于矫正度数为-4.5D的PRK术后,并发现后期的角膜基质中活化的角膜细胞及成纤维细胞的数量与早期凋亡细胞的量成正相关;从这样的研究结果我们也许可以推测对于LASIK术,不同的矫正度数对角膜的愈合反应程度可能影响较小,这与PRK术不同。临床上也发现对矫正度数高的患者,PRK术后的回退主要是基质的愈合反应导致的成纤维细胞的激活和排列紊乱的胶原的合成而使角膜增厚<sup>[7]</sup>,LASIK术后的回退主要是术后角膜基质床变薄,在眼内压的作用下角膜向前膨隆而使角膜的曲率发生改变<sup>[8,9]</sup>。本实验结果也从一个侧面证明了上述临床上所观察到的现象。

在图2各样本TUNEL染色阳性细胞计数分布图中我们可以发现,无论是单纯角膜瓣组或不同矫正度数的LASIK组,每组不同个体间存在明显的差异,出现这种个体差异的原因可能是不同的个体本身愈合反应的程度存在差异;同时也可能是手术过程中不同个体上皮受损的程度不同,释放细胞因子的量有差异,因而发生凋亡的细胞数量也存在明显的差异。我们在临床上也会发现一些矫正相同度数的病人、甚至是同一病人的不同眼其预后都会存在一定的差异。

#### 参考文献

- 1 Tuft SJ, Gartry DS, Rawe IM, et al. Photorefractive Keratectomy: implications of corneal wound healing. *Br J Ophthalmol*, 1993;77: 243-247
- 2 Gao J, Gelber-Schwab TA, Addeo JV, et al. Apoptosis in the rabbit cornea after photorefractive keratectomy. *Cornea*, 1997;16:200-208
- 3 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: 71-87
- 4 Wilson SE, Kim W-J. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998;39:220-226
- 5 Mohan RR, Liang Q, Kim WJ, et al. Apoptosis in cornea: Further characterization of Fas/Fas ligand system. *Exp Eye Res*, 1997;65: 575-589
- 6 李岩, 庞国祥, 詹素华, 等. 准分子激光兔角膜切削术后细胞凋亡和增殖. *中华眼科杂志*, 1999; 35: 29-32
- 7 Jester JV, Petroll WM, Avnanagh HD. Corneal Stromal Wound Healing in Refractive Surgery: the Role of Myofibroblasts. *Prog Retinal Eye Res*, 1999;18:311-356
- 8 Baek TM, Lee KH, Kagaya F, et al. Factors affecting the forward shift of posterior corneal surface after laser in situ keratomileusis. *Ophthalmology*, 2001;108:317-320
- 9 Miyata K, Tokunaga T, Nakahara M, et al. Residual bed thickness and corneal forward shift after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*, 2005;30:1067-1072

(收稿时间: 2006-09)