

·临床研究·

准分子激光原位角膜磨镶术创面愈合机制的免疫组化实验

杨斌, 林小铭, 王铮, 陈家祺, 郑湖玲

(中山医科大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】研究准分子激光原位角膜磨镶术(laser in situ keratomileusis, LASIK)后角膜创面的愈合机制。【方法】对10只兔右眼施行LASIK手术, 分别于术后1 d、1周、1个月、3个月和6个月取标本, 应用病理学和免疫组化的方法研究及观察角膜基质成分的变化。【结果】LASIK后1周中央区角膜有少量的角膜细胞出现及产生少许III型胶原及纤维连接蛋白, 术后1~3个月时达高峰, 6个月时明显减少。【结论】LASIK后, 角膜愈合反应极轻, 因而较少引起角膜混浊的发生。

关键词: 准分子激光; 角膜磨镶术; 免疫组织化学

中图分类号: R775.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)05-0356-03

Experimental Research on the Healing Mechanism of Corneal Wound after LASIK

YANG Bin, LIN Xiao-ming, WANG Zheng, CHEN Jia-qi, ZHENG Hu-ling

(Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To study the healing mechanism of corneal wound after laser in situ keratomileusis (LASIK). 【Methods】LASIK was performed on the right eye of 10 New Zealand white rabbits. The corneal specimen was prepared at 1 day, 1 week, 1, 3 and 6 months after surgery. The componential changes of corneal stroma were studied with the method of routine histological and immunohistochemical staining. 【Results】There were a few keratocytes and collagen III and fibronectin in the central cornea at 1 week after LASIK, with the peak in 1 to 3 months, and marked reduction at 6 months. 【Conclusion】The corneal wound healing response is minimum and this is responsible for the absence of corneal haze after LASIK.

Key words: excimer laser; keratomileusis; immunohistochemical staining

准分子激光原位角膜磨镶术(laser in situ keratomileusis, LASIK)在临床上已经被广泛地开展, 也取得了较为满意的临床效果。部分学者^[1]应用组织学的方法研究LASIK后角膜创面的愈合过程, 发现LASIK后角膜创面的愈合反应较轻, 角膜胶原纤维排列正常。我们应用免疫组化的方法研究LASIK后角膜基质成分的变化, 能更好地了解LASIK后的愈合机制, 以探讨LASIK术后角膜创面愈合机制及其与准分子激光屈光性角膜切削术(photorefractive keratectomy, PRK)的区别。

1 材料和方法

1.1 选择的手术设备

激光机采用的是美国Chiron Vision公司生产的Keracor116型准分子激光机, 微型角膜刀采用MLK系统。

1.2 动物及分组

选用新西兰白兔10只, 体质量约2.0~2.5 kg, 月龄3~4个月。术前进行裂隙灯检查, 排除眼前段病变。用DGH超声角膜测厚仪测量兔角膜中

收稿日期: 2001-03-10

基金项目: 广东省重点科技攻关基金资助项目(1998)

作者简介: 杨斌(1963-), 男, 江西波阳人, 博士, 副教授。

央的厚度,并对兔眼做术前角膜内皮摄影。手术均在右眼施行,左眼作正常对照。

1.3 手术方法

采用氯胺酮和冬眠灵肌肉注射麻醉,用量为按体质量 50 mg/kg 氯胺酮,12.5 mg/kg 冬眠灵。手术前再点用表麻滴瞳液作表面麻醉。术前用升汞和生理盐水冲洗术眼,常规消毒铺巾,开睑器开睑。用自制眼球负压吸附环放置于兔眼球表面,必要时仍需将兔的眼裂剪开。启动负压泵,将兔角膜吸附后,用微型角膜刀对兔角膜施行横向切开,获得一以鼻侧为基底的带蒂角膜瓣。角膜瓣的直径约为 7.5 mm,角膜瓣厚度约为 100~110 μm 。将角膜瓣翻开,准确对焦后发射准分子激光对角膜基质床进行切削,对角膜组织的切削量设定为 -5.00 m^{-1} (diopter)的近视,切削光区直径为 5 mm,切削深度为 62 μm 。然后将角膜瓣复位,待角膜瓣干燥后结束手术。

1.4 术后处理

术后第 1 天起,术眼滴 Tarivid 滴眼液和点帕力百滴眼液,每日 3 次,共 1 周,于术后 1 天、1 周、1 个月、3 个月和 6 个月进行裂隙灯照相、超声角膜测厚和角膜内皮照相,并随机处死 1 只动物,取术眼角膜,并将其分为两部分,一部分用甲醇分析固定,用于常规组织学检查,另一部分用组织包埋剂 (Tissue-TEK OCT)包埋后置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于行免疫组织化学染色检查。

1.5 免疫组织化学染色

1.5.1 标本制备 将包埋于 OCT 的兔角膜作 6 mm 的冷冻切片,术后 1 周、1 个月、3 个月和 6 个月的标本,其中每个标本分别作 8 个切片,每个标本、每种抗体染 2 片。切片完成后,将切片平铺于载玻片上,用丙酮和甲醛 (1:1) 固定 5 min,在空气中晾干。

1.5.2 试剂 ① LAB-SA 链霉亲和素-生物素法试剂盒:WAK-CHEMIE Medical GmbH 公司,上海中达医学应用研究所提供。② 单克隆抗体:II 型胶原为美国 Life Technologies 公司生产,IV 型胶原、VII 型胶原和纤维连接蛋白为美国 Sigma 公司生产。

1.5.3 染色方法^[4] 血清孵育 10 min 后,加入第一抗体;60 min 后,用缓冲液漂洗 3 次共 6 min,加入第二抗体;20 min 后,漂洗 3 次共 6 min,然后加入 DAB 底物;反应 30 min 后漂洗 3 次共 6 min,再用苏木素复染 10 min,自来水冲洗,甘油明胶封片。

以正常的角膜组织作对照,在光学显微镜下观察及摄影。

2 结果

2.1 大体观察

3 只兔眼在术后第 1 天出现角膜瓣的移位,致使角膜瓣明显水肿,放弃追踪。其余兔眼角膜瓣透明,角膜瓣位置良好,无移位及脱失出现;角膜床的角膜基质呈轻度雾状混浊,角膜上皮细胞已经覆盖于角膜伤口的边缘。2 只眼术后存在角膜层间异物残留,未予处理,经随访观察,未见继续发展。术后 1 个月时,角膜基质的混浊已明显减轻,3 个月时完全消失。

2.2 组织病理学检查

从术后 1 周起,正常的角膜上皮已将角膜瓣完全覆盖,但在角膜瓣边缘的上皮则变厚(图 1)。变厚的上皮基底细胞呈圆柱状,且比邻近未损伤区域的角膜上皮增大,它们的排列也呈现轻度不规则。变厚的上皮细胞向角膜瓣的中央区逐渐变成正常。在切削区边缘变厚的上皮下角膜细胞增多。角膜瓣的基质中比邻近未受损区域的角膜细胞少,而在中央区,角膜瓣和切削区之间的角膜细胞则稍许增多,残留的角膜基质和角膜内皮层无异常。角膜基质排列基本规则。随着时间的延长,角膜上皮逐渐正常,角膜细胞也逐渐正常,术后 3 个月时已完全正常。

2.3 免疫组化染色

正常对照组织不表达 III、IV 型胶原和纤维连接蛋白,角膜上皮细胞的基底膜表达连续性分布的 VI 型胶原(表 1)。LASIK 术后 1 周时,VI 型胶原已呈现正常连续性的表达。II 型胶原于术后 1 周左右开始出现于角膜实质层中央部位,术后 1 个月时达到高峰(图 2),术后 3 个月时逐渐减少,术后 6 个月时角膜实质层中央仍有 II 型胶原的表达。术后角膜实质层中也未表达 IV 型胶原。纤维连接蛋白也于术后 1 月开始出现(图 3),1~3 个月内达高峰,术后 6 个月时明显较少。

3 讨论

临床上,准分子激光屈光性角膜切削术 (Photorefractive keratectomy, PRK) 对于 -6.00 m^{-1} 以

表 1 兔角膜组织 LASIK 后免疫组化染色结果

Table 1 The results of immunohistochemical staining in rabbit cornea after LASIK

	Collagen III	Collagen IV	Collagen VII	Fibronectin
Control	—	—	linear	—
LASIK 1 day	—	—	linear	—
LASIK 1 week	+	—	linear	—
LASIK 1 month	++	—	linear	+
LASIK 3 months	+	—	linear	++
LASIK 6 months	+	—	linear	+

下的近视的治疗被认为是安全和有效的^[3],但对于超过 -6.00 m^{-1} 的近视,屈光矫正的预测性则大大降低,而角膜混浊和屈光回退发生的可能性大大升高^[4]。尽管改进了激光发射系统,如多区切削或逐渐过渡区(tapered transition zone)的切削,仍然不能避免以上情况的发生。LASIK 似乎克服了 PRK 的这种局限性,临床结果表明, LASIK 治疗高度近视具有屈光稳定快,较少出现屈光回退及几乎无角膜混浊的发生^[5]。

大量的研究表明, PRK 后角膜的前弹力层被切除,缺损区在术后 4~6 个月内会出现上皮增生和胶原及新合成物质的进行性填充,从而导致屈光的回退。同时,增厚的上皮下的新生的胶原堆积也导致临床上出现的角膜雾状混浊^[6]。我们在前一阶段的实验研究中也发现^[7,8], PRK 术后,角膜上皮层明显增厚,角膜细胞数明显增多,使 II 型胶原及纤维连接蛋白和层粘连蛋白的产生明显增多,且一直延续到术后 6 个月仍未消失。有研究表明, LASIK 术后角膜愈合反应较 PRK 明显为轻,且局限在角膜瓣边缘^[9]。本研究中我们观察到,术后早期角膜上皮已正常覆盖角膜瓣,仅在角膜瓣边缘处的上皮出现增生的情况,但向中央逐渐演变成正常,不影响中央部的屈光效应。角膜基质排列正常,且仅有少许角膜细胞增加,故能保持角膜的透明性。角膜瓣边缘处角膜上皮增生及上皮下角膜细胞增多的原因可能是角膜瓣复位时,在干燥的空气下,角膜瓣的边缘会出现轻度的收缩,从而在手术边缘留下一沟状伤口缘,使角膜基质被直接暴露在表面,而引起覆盖缺损区的增生反应。而中央区角膜则显示极轻的愈合反应。

近来研究提示, PRK 和 LASIK 术后屈光效应的回退与角膜创面出现的愈合反应有关, II 型胶原的沉积是其中的一个主要原因^[10]。在正常情况

下, II 型胶原表达于胚胎角膜。在本研究中,正常对照组 II 型胶原染色阴性,而 LASIK 术后却在术后 1 周起在角膜基质内出现了 II 型胶原和纤维连接蛋白,但较少量,且术后 3 个月起已逐渐减少。这表明 LASIK 后,尽管中央区角膜出现角膜细胞及产生新的物质,但反应较轻,且角膜基质内增加的 II 型胶原等仅维持非常短的时期,这与临床上 LASIK 后角膜通常不会或极少出现混浊的现象,且较少出现屈光回退的情况是一致的。我们认为, LASIK 后保留了角膜结构的完整性,没有破坏角膜的前弹力膜,因而引起的角膜愈合反应极轻,从而减少了角膜混浊的发生,保证了手术的屈光效应。

(本文图 1~3 见插页 4)

参考文献:

- [1] Park C K, Kim J H. Comparison of wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbit[J]. *Cataract Refract Surg*, 1999, 25(6): 842.
- [2] 梁小玲,高汝龙,李绍珍,等. 生长因子在视网膜增殖膜的表达[J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(4): 273.
- [3] Tengroth B, Epstein D, Fagerholm P, *et al.* Excimer laser photorefractive keratectomy for myopia: clinical results in sighted eyes[J]. *Ophthalmology*, 1993, 100(5): 739.
- [4] Ehlers N, Hjortdal J O. Excimer laser refractive keratectomy for high myopia: 6 month follow-up of patients treated bilaterally[J]. *Acta Ophthalmol*, 1992, 70(5): 578.
- [5] Pallikaris I G, Siganos D S. Excimer laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy for correction of high myopia[J]. *Refract Corneal Surg*, 1994, 10(5): 498.

(下转第 361 页)

体的直径制备合适洞形,保证牙种植体植入的贴合与稳定度。在应用 ITI 种植体时,一般地,牙槽骨扩骨制备骨内洞形直径比牙种植体直径稍小,用扭转力把工具施力将螺旋形种植体旋入,从而获得较佳的初期种植稳定度。常规的牙种植术,如不作骨材料的移植和生物膜的骨引导术,那么要求植牙时,牙槽骨顶部的宽度至少应在 5.0 mm 以上。采用骨扩宽技术则只要牙槽骨宽度在 3.0 mm 以上,即可作牙种植修复失牙。如果牙槽骨顶部小于 3.0 mm,则该技术不适用或不能单独应用。一般地,种植体植入时要求唇舌侧有 1 mm 以上的骨质支持,在牙槽骨顶部的宽度较小时(如 3.0 mm),先用更小的 1 mm 直径裂钻横行钻入,继用扁薄骨凿分开唇舌骨板,此后才开始应用先锋钻。总而言之,必须保持唇舌骨质覆盖种植体,必要时,植入骨内牙种植体顶部距离牙槽骨顶部 1 mm。我们在选择病例作该项技术的应用时,术前采用螺旋 CT 检查牙槽骨的多层面重建图像,能较准确地测量牙槽骨的宽度与牙槽骨的横截面形态^[3],从而确定牙种植体植入点与植入方向,预测牙槽骨扩骨的效果。

关于牙槽骨扩宽器,我们选用了德国产的牙槽骨扩宽器械,主要是用 2.2 mm 的先锋钻造孔后,用 1 级、2 级扩宽器械扩宽,获得 3.0 mm 直径的牙槽骨内圆柱洞形,适合植入 3.3 mm 直径的 ITI 系统种植体。用第 3 级扩宽器械扩宽后,可获得 3.4 mm 直径的牙槽骨内圆柱洞形,适合 3.5 mm 直径的 Endopore 系统的种植体。用第 4 级扩宽器

械扩宽后,可获得 4.0 mm 直径的牙槽骨内圆柱洞形,适合 4.3 mm 直径的 ITI 系统种植体和 4.1 mm 直径的 Endopore 系统种植体。在临床实践中,我们体会到牙槽骨内圆柱洞直径稍小于种植体直径有利于种植体植入后的早期稳定。即使相差 0.3 mm,由于上颌骨骨质密度相对疏松,手术中仍可较顺利地在骨洞内植入种植体。在上颌骨扩骨过程中,骨质受到一定的压缩,但不影响牙种植体与骨组织的直接结合,骨性结合正常形成^[4]。

参考文献:

- [1] Simion M, Baldoni M, Zaffe D. Jawbone enlargement using immediate implant placement associated with a split-crest technique and guided tissue regeneration[J]. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1992, 12(6): 462.
- [2] Sethi A, Kaus T. Maxillary ridge expansion with simultaneous implant placement: 5-year results of an ongoing clinical study [J]. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000, 15(4): 491.
- [3] 陈松龄,林尔坚,匡代军,等.螺旋 CT 颌骨多层面重建图像及其用于牙种植的临床评价[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(11): 54.
- [4] Scipioni A, Bruschi G B, Calesini G, *et al*. Bone regeneration in the edentulous ridge expansion technique: histologic and ultrastructural study of 20 clinical cases[J]. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1999, 19(3): 269.

(编辑 刘清海)

(上接第 358 页)

- [6] Balestrazzi E, De Molfetta V, Spadea L, *et al*. Histological, immunohistochemical, and ultrastructural findings in human corneas after photorefractive keratectomy [J]. *Refract Surg*, 1995, 11(3): 181.
- [7] 王 铮,陈家祺,李绍珍,等.准分子激光角膜切削术动物实验初步观察[J]. *眼科研究*, 1995, 13(3): 166.
- [8] 王 铮,陈家祺,李绍珍,等.准分子激光角膜切削术后角膜创面的愈合及皮质类固醇影响的初步实验研究[J]. *中华眼科杂志*, 1996, 32(4): 245.
- [9] Wachtlin J, Langenbeck K, Schunder S, *et al*. Im-

munohistology of corneal wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis[J]. *Refract Surg*, 1999, 15(4): 451.

- [10] Park C K, Kim J H. Comparison of wound healing after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis in rabbits[J]. *Cataract Refract Surg*, 1999, 25(6): 842.

(编辑 刘清海)

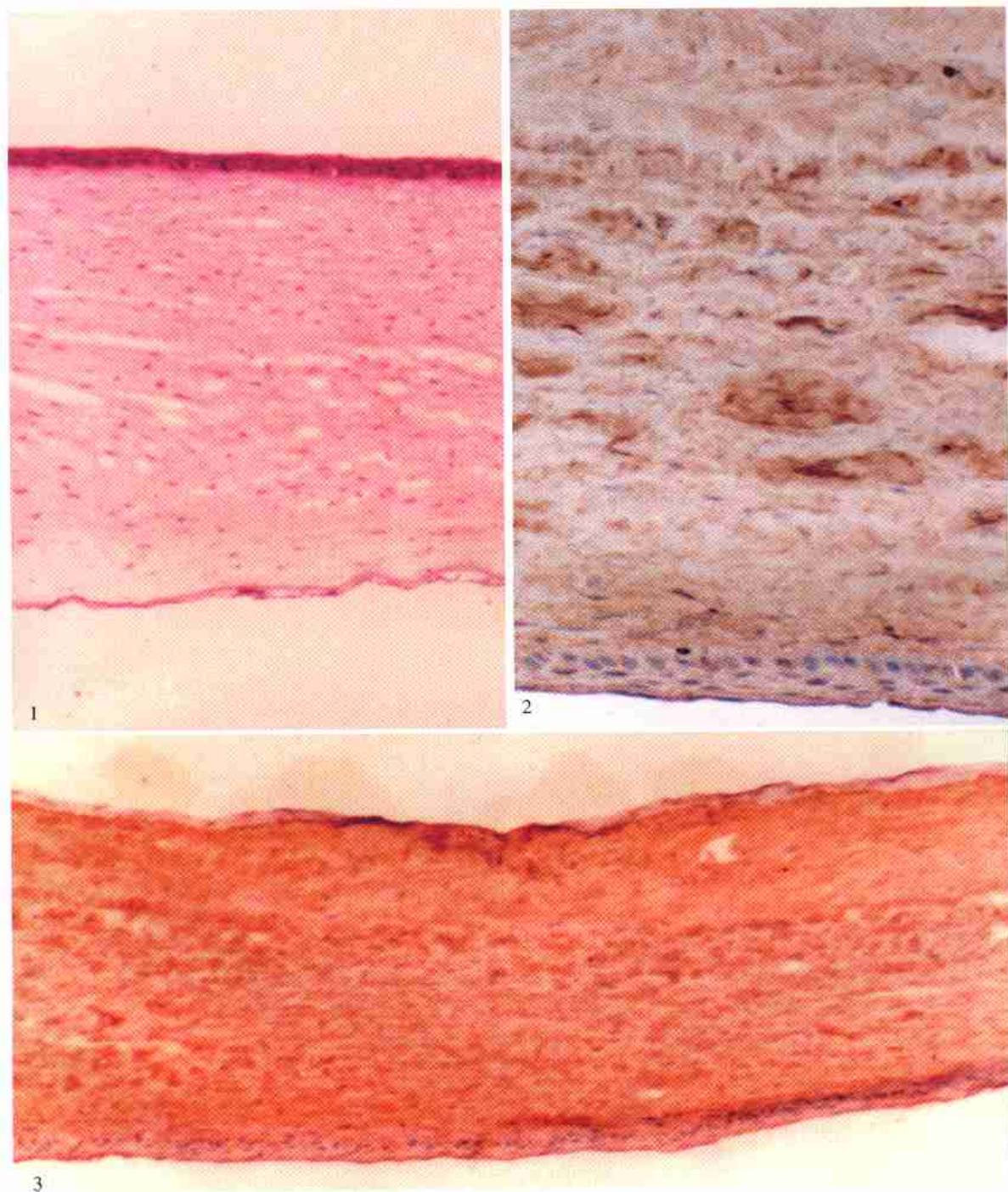


图 1 兔眼 LASIK 术后 1 个月角膜 HE 染色

图 2 兔眼 LASIK 术后 1 个月角膜Ⅲ型胶原

图 3 兔眼 LASIK 术后 1 个月角膜纤维连接蛋白

Fig. 1 HE staining of rabbit cornea 1 month after LASIK ($\times 100$)

Fig. 2 Immunohistochemical staining of rabbit cornea for collagen type III 1 month after LASIK ($\times 100$).

Fig. 3 Immunohistochemical staining of rabbit cornea for fibronectin 1 month after LASIK ($\times 100$)