

羊膜提取液抑制兔 Epi-LASIK 术后 haze 形成的作用和机制

夏世刚¹, 王俞方¹, 肖启国¹, 彭 华²

基金项目:湖南省卫生厅科研计划项目(No. B2010-052)

作者单位:(421001)中国湖南省衡阳市,南华大学附属第二医院¹眼科;²耳鼻喉科

作者简介:夏世刚,硕士,副主任医师,研究方向:眼表疾病。

通讯作者:彭华,硕士,副主任医师. Peng_Hua123@yahoo.com

收稿日期:2017-03-20 修回日期:2017-07-04

Study on the mechanism of amniotic extraction inhibiting haze formation after Epi-LASIK in rabbit cornea

Shi-Gang Xia¹, Yu-Fang Wang¹, Qi-Guo Xiao¹, Hua Peng²

Foundation item: Scientific Research Project of Hunan Provincial Health Department (No. B2010-052)

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Otolaryngology, the Second Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Correspondence to: Hua Peng. Department of Otolaryngology, the Second Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China. Peng_Hua123@yahoo.com

Received:2017-03-20 Accepted:2017-07-04

Abstract

• **AIM:** To investigate the probably mechanism of amniotic extraction inhibiting haze formation after epipolis laser *in situ* keratomileusis (Epi-LASIK) in rabbit cornea.

• **METHODS:** Thirty rabbit corneas were performed with Epi-LASIK. All eyes were randomly divided into three groups: eyes treated with amniotic extraction (AE group), eyes treated with 1g/L dexamethasone (hormone group) and eyes treated with solvent (solvent control group). Haze grade evaluation was performed under the slit lamp after Epi-LASIK for 1, 4 and 8wk. The repair of corneal epithelium was observed by using HE staining, and the expression of NF- κ B protein P65 was detected by immunohistochemistry. The expression levels of inflammatory cytokines (TNF- α , TGF- β 1 and IL-1) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13) were determined by ELISA.

• **RESULTS:** HE staining showed that the basal cells of corneal epithelium were more uniform and arranged regularly in AE groups after Epi-LASIK for 1wk as compared with the hormone group and the solvent

control group. After 4wk, there were a few of new collagen fibers in the superficial stroma of AE group, forming a small amount of scar. After 8wk, the corneal stroma of AE group showed a small amount of new collagen fibers, arranged regularly, and rarely formed scar. At the early stage (1 and 4wk), AE treatment has an obviously effect on inhibiting the secretion of inflammatory factors (TNF- α , TGF- β 1 and IL-1) and anti-inflammatory factors (IL-4, IL-10 and IL-13), and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Moreover, the activation of the NF- κ B signaling pathway was significantly inhibited by treatment with AE in the early postoperative period (1 and 4wk).

• **CONCLUSION:** Amniotic extraction may reduce the inflammatory response in corneal epithelial cells by inhibiting the NF- κ B signaling pathway, thereby inhibiting the formation of collagen and scar and the occurrence of haze.

• **KEYWORDS:** amniotic extraction; epipolis laser *in situ* keratomileusis; corneal haze; NF- κ B pathway; inflammatory cytokines

Citation: Xia SG, Wang YF, Xiao QG, *et al.* Study on the mechanism of amniotic extraction inhibiting haze formation after Epi-LASIK in rabbit cornea. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(8):1427-1432

摘要

目的:探讨羊膜提取液(AE)抑制兔微型角膜刀法准分子激光角膜上皮瓣下磨镶术(Epi-LASIK)后角膜上皮雾状混浊(haze)形成的作用和机制。

方法:新西兰白兔36只72眼按照随机数字表法分为三组:AE组、激素组和溶媒对照组。构建Epi-LASIK动物模型,术后AE组滴用AE眼液,激素组滴用1g/L磷酸地塞米松眼液,溶媒对照组滴用不含AE的溶媒眼液。术后1、4、8wk在裂隙灯下进行haze分级评估。HE染色观察角膜上皮的修复,免疫组织化学法观察角膜上皮细胞NF- κ B P65蛋白的表达。用ELISA法检测炎症细胞因子(TNF- α 、TGF- β 1和IL-1 β)和抗炎细胞因子(IL-4、IL-10和IL-13)的表达水平。

结果:HE染色结果显示,与激素组和溶媒对照组比较,Epi-LASIK术后1wk,AE组兔角膜上皮基底细胞形态较均匀,排列较规则;术后4wk时,AE组浅基质层内出现少量新生胶原纤维,排列较规则,形成少量瘢痕;术后8wk,AE组角膜浅基质层见少量新生胶原纤维,排列规则,极少形成瘢痕。在术后早期(1wk和4wk),AE组与激素

组、溶媒对照组相比,具有明显抑制炎症因子(TNF- α 、TGF- β 1和IL-1 β)和促进抗炎症因子(IL-4、IL-10和IL-13)分泌的作用,组间比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。而且,在术后早期(1wk和4wk),AE组与激素组、溶媒对照组相比,角膜上皮细胞NF- κ B通路关键组份P65蛋白浅染,细胞核淡染,明显抑制NF- κ B信号通路的激活。

结论:羊膜提取液可能通过抑制角膜上皮细胞的NF- κ B信号通路,减轻炎症反应,从而减少胶原与瘢痕形成和haze的发生。

关键词:羊膜提取液;微型角膜刀法准分子激光角膜上皮瓣下磨镶术;角膜混浊;NF- κ B通路;炎症细胞因子

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.8.09

引用:夏世刚,王俞方,肖启国,等.羊膜提取液抑制兔Epi-LASIK术后haze形成的作用和机制.国际眼科杂志2017;17(8):1427-1432

0 引言

屈光不正(尤其是近视眼)已成为一种世界性眼病,而我国尤为严重^[1]。微型角膜刀法准分子激光角膜上皮瓣下磨镶术(Epi-LASIK)是在LASIK和LASEK两种手术方式基础上发展起来的一项崭新的屈光手术技术,该手术稳定性较好,预测性较强,切削组织精确,是目前广泛应用的屈光矫治手术^[2]。但资料统计表明,部分患者在准分子激光术后早期角膜前基质发生不同程度的角膜上皮皮下雾状混浊(haze),这不仅影响了角膜的透明性,而且还会造成屈光度数回退,因而严重地影响了术后的矫正视力^[3-4]。因此,如何抑制或减少Epi-LASIK术后haze的发生,是眼科领域的研究重点与难点。目前临床上用于预防haze形成的主要药物是糖皮质激素类,其最为严重的并发症是引起青光眼和白内障等眼科疾病,更为甚者是造成视功能永久性丧失^[5]。大量的研究结果显示,羊膜中含有多种因子成份,包括抗纤维化因子以及抑制炎症和新生血管形成的因子,这些因子可促进眼表正常上皮细胞的修复、抑制眼表炎症的发生和新生血管的生长以及减少眼表瘢痕形成等多种功能,因此,羊膜已广泛用于多种眼表疾病的治疗^[6]。我们科室前期利用兔准分子激光角膜屈光性手术(PRK)模型,术后开始滴用羊膜提取液(AE)治疗,发现AE具有明显抑制haze发生的效果^[7]。但是羊膜提取液是否具有减轻Epi-LASIK术后haze发生及其作用机制尚不清楚。本研究提取羊膜中的有效成分制成滴眼液,探讨羊膜提取液抑制兔Epi-LASIK术后haze形成的作用和机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性健康新西兰大耳白兔36只,体重2.0~2.5kg,由南华大学动物部提供,经裂隙灯检查无眼前节病变。动物置于清洁级环境饲养,实验动物的使用和处死遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂和仪器 GM6001(德国Merk公司);0.4%盐酸奥布卡因(日本参天制药株式会社);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);Technolas 217Z准分子激光仪(美国,博士伦公司);Confocal 3.0共焦显微镜(日本Nikon公司);石蜡切片机(德国Leica公司);角膜接触镜(美国强生公司);免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德公司);ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);AE(中山大学中山眼科中心制备,溶媒为1%甲基纤维素);0.1%磷酸地塞米松滴眼液(美国Sigma公司;中山大学中山眼科中心配制);溶媒眼液(中山大学中山眼科中心配制,成分为1%甲基纤维素)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 采用随机数字表法,将36只兔(72眼)随机分为三组:AE组、激素组与溶媒对照组,每组各12只兔(24眼)。

1.2.2 Epi-LASIK动物模型的建立 参考文献[8]方法,术前2d诺氟沙星滴眼液点双眼,3次/d。术前林可霉素滴眼液冲洗结膜囊,用注射器从兔耳缘静脉缓慢推注30~40mL/kg戊巴比妥钠麻醉实验兔,局部滴5g/L利多卡因麻醉眼,2000U/mL庆大霉素消毒液反复冲洗兔眼结膜囊,开睑器撑开眼睑。用KM-5000D微型角膜刀制作上皮瓣,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,无菌PBS冲洗基质床并复位上皮瓣,滴诺氟沙星滴眼液,戴角膜接触镜,并于睑裂三等分处间断缝合睑缘两针。术后第1d起,AE组、激素组与溶媒对照组分别滴用AE、1g/L磷酸地塞米松滴眼液和溶媒眼液,4次/d,持续用药时间1wk。各组动物均使用氯霉素滴眼液滴眼,4次/d,红霉素眼膏涂眼1次/d,直至所有实验兔结膜充血消失和角膜上皮愈合。

1.2.3 眼部症状、体征和haze的观察与分级 参考文献[8]方法,自手术后第1d开始,每日在裂隙灯下观察兔眼部有无感染等并发症的发生。术后分别于1、4、8wk用裂隙灯照相,观察和记录各组兔haze形成情况,按Fantes等级分类法^[9]分级并计算评分。其评分标准为:0级记0分,角膜完全透明;1级记1分,用裂隙灯直接聚焦照明法仔细观察才能见到低密度混浊;2级记2分,用裂隙灯照明法容易见到轻度混浊,已影响视力;3级记3分,中密度的混浊,遮挡部分虹膜结构;4级记4分,严重的混浊,遮挡眼内结构。

1.2.4 组织病理切片和HE染色观察兔角膜病理形态变化 各组分别于术后1、4、8wk处死兔4只,摘取眼球,解剖取1/2角膜组织做病理切片(厚约4 μ m)和HE染色,光镜下观察兔角膜病理形态变化并拍照。

1.2.5 酶联免疫吸附测定 取材时间和角膜数量同1.2.4,解剖取1/2角膜组织,用组织研磨器研碎组织,离心后取上清,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测上清液中TNF- α 、TGF- β 1、IL-1 β 、IL-4、IL-10和IL-13的表达。具体步骤如下:用0.05mmol/L pH=9.0的碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至蛋白质含量为1~10 μ g/mL。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加0.1mL,4 $^{\circ}$ C过夜。次日,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液洗3次,3min/次。加一定稀释的待检样品0.1mL于上述已包被之反应孔中,置37 $^{\circ}$ C孵育1h。然后洗涤3次,3min/次(同时做空白孔、阴性对照孔和阳性对照孔)。于各反应孔中,加入新鲜稀释

的酶标抗体 0.1 mL。37℃ 孵育 0.5 ~ 1h, 洗涤 3 次, 3min/次。于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 mL, 37℃ 10 ~ 30min。于各反应孔中加入 2mmol/L 硫酸 0.05 mL 终止反应。在 ELISA 检测仪上, 于 450nm 处, 以空白对照孔调零后测各孔 OD 值, 若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.0 倍, 即为阳性。

1.2.6 免疫组织化学染色观察角膜上皮细胞 NF- κ B P65 蛋白的表达

取材时间和角膜数量以及石蜡切片制备同 1.2.4, 检测组织中 NF- κ B P65 蛋白的表达, 具体步骤如下: 石蜡切片脱蜡至水, 柠檬酸盐抗原热修复, 封闭液封闭 1h 后, 一抗用小鼠抗兔 P65 (稀释度为 1:100, 4℃ 孵育过夜), 二抗羊抗小鼠 IgG (稀释度为 1:100) 孵育 20min, DAB 显色 1 ~ 5min, 苏木素染色 1 ~ 5min, 自来水中返蓝 10min, 系列酒精梯度脱水和二甲苯透明后, 中性树脂封片剂封片, 显微镜下观察、拍照。

统计学分析: 应用统计软件包 SPSS17.0 处理, 所得结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用多样本等级资料的秩和检验 (Kruskal-Wallis H 检验) 对 haze 分级评分进行统计分析; 用重复测量数据的方差分析比较组间差异性和测量值的时间差异性, 用 LSD- t 检验分析各时间点的组间差异和各组的时间差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 羊膜提取液对 haze 形成的影响

Epi-LASIK 手术后, 所有手术眼在 1wk 时开始出现不同程度的 haze, 3 ~ 4wk 时尤其明显, 第 8wk 减轻。分别对三组兔眼术后 1、4、8wk 时 haze 形成情况按 Fantes 等级评分和统计学分析, AE 组与激素组、溶媒对照组相比, 术后 1、4、8wk 的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 各组兔角膜病理形态变化

角膜组织切片 HE 染色显示, Epi-LASIK 术后 1wk, 激素组和溶媒对照组兔角膜上皮细胞增生并完全覆盖激光切削面, 上皮基底细胞形态不均, 排列极不规则, 出现不同程度的基质细胞积聚; AE 组兔角膜上皮细胞增生并完全覆盖激光切削面, 上皮基底细胞形态较均匀, 排列较规则, 出现不同程度的基质细胞积聚。术后 4wk 时, 激素组和溶媒对照组兔角膜浅基质层内较多新生胶原纤维, 排列不规则, 失去板层结构, 瘢痕形成; AE 组浅基质层内出现少量新生胶原纤维, 排列较规则, 形成少量瘢痕。术后 8wk, 激素组和溶媒对照组角膜浅基质层见大量新生胶原纤维, 排列极不规则; AE 组角膜浅基质层见少量新生胶原纤维, 排列规则, 极少形成瘢痕 (图 1)。

2.3 羊膜提取液对炎症细胞因子表达的影响

通过 ELISA 实验, 其结果 (表 2 ~ 4) 显示, Epi-LASIK 手术后, 所有手术眼在 1wk 时均可检测到不同程度的炎症因子 (TNF- α , TGF- β 1 和 IL-1 β) 表达, 其中溶媒对照组角膜组织炎症因子分泌显著增加, AE 组角膜组织炎症因子分泌明显降低, 与溶媒对照组和激素组比较具有显著统计学差异 ($P < 0.01$); 激素组也部分抑制炎症因子的表达, 与溶媒对照组比较具有统计学差异 ($P < 0.05$)。术后 4wk 时, 溶媒对照组角膜组织炎症因子分泌降低, AE 组炎症因子的表达降低至术前水平, 与溶媒对照组和激素组比较, 具有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。第 8wk 三组角膜组织炎症因子分泌与术前相当。

2.4 羊膜提取液对抗炎症细胞因子表达的影响

ELISA 实验结果 (表 5 ~ 7) 显示, Epi-LASIK 手术后, 所有手术眼在 1wk 时均可检测到不同程度的抗炎症因子 (IL-4、IL-10 和 IL-13) 表达, 其中溶媒对照组角膜组织抗炎症因子分泌水平低, AE 组角膜组织抗炎症因子分泌明显增加, 与溶媒对照组和激素组比较, 具有显著统计学差异 ($P < 0.01$); 激素组也部分促进抗炎症因子的表达, 与溶媒对照组比较具有统计学差异 ($P < 0.05$)。术后 4wk 时, 溶媒对照组角膜组织抗炎症因子分泌增加, AE 组抗炎症因子的表达增加至术前水平, 与溶媒对照组和激素组比较, 具有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。第 8wk 三组角膜组织抗炎症因子表达与术前相当。

2.5 羊膜提取液对 NF- κ B P65 表达的影响

炎症与抗炎症因子的表达主要受经典的 NF- κ B 信号通路调控。因此我们检测 NF- κ B 通路关键组份 P65 蛋白的磷酸化水平及定位是否发生变化, 从而观察 NF- κ B 信号通路的激活情况。角膜组织切片免疫组织化学染色 (图 2) 显示, Epi-LASIK 术后 1wk, 溶媒对照组兔角膜上皮细胞 P65 呈强阳性染色, 尤其是细胞核呈深染 (5+); AE 组兔角膜上皮细胞 P65 呈中等阳性染色, 细胞核呈浅染 (3+); 激素组 P65 呈强阳性染色, 细胞核呈深染 (4+)。术后 4wk 时, 溶媒对照组兔角膜上皮细胞 P65 呈中等阳性染色, 尤其是细胞核呈浅染 (3+); AE 组兔角膜上皮细胞 P65 呈弱阳性染色, 细胞核呈淡染 (1+); 激素组 P65 呈中等阳性染色, 细胞核呈浅染 (2+)。术后 8wk, 三组角膜上皮细胞 P65 呈弱阳性染色, 细胞核呈浅染 (1+), 与术前相当。

3 讨论

Epi-LASIK 手术是 2003 年在 LASIK 和 LASEK 两种手术基础上发展起来的屈光术式, 术后的视觉质量和舒适度得到大幅提高, 被越来越多的屈光手术医师采用, 但术后仍然有部分患者发生 haze。其主要原因是由于角膜上皮的损伤导致角膜浅层基质细胞发生凋亡, 随后诱发后层及周围的角膜基质细胞通过迁移、活化、增殖与转化进行代偿, 活化的角膜基质细胞向成纤维细胞转化, 产生大量排列紊乱的胶原纤维, 导致细胞外基质重塑, 从而引起 haze 的形成^[10]。因此, 如何预防 haze 的发生一直是眼科领域的研究重点和难点。

羊膜具有多种生物学特性, 如抗新生血管形成、抗炎症、抗菌和抗病毒等活性, 使其具有广泛的应用。尤其是降低炎症反应、抑制纤维形成和促进上皮细胞迁移的特性是眼科创伤和手术修复的理想材料。近年来的研究证实, 羊膜移植可以减轻准分子激光角膜屈光手术后 haze 的形成。Wang 等^[11] 在兔准分子激光术后, 将保存的人羊膜缝合于角膜上, 发现可以减轻 haze 的形成以及降低细胞凋亡的发生。Woo 等^[12] 也有相似的发现, 研究显示 haze 的发生主要与术后早期炎症反应和角膜细胞凋亡以及由此启动的角膜创伤愈合反应有关。Park 等^[13] 观察发现, 在兔 PRK 术后早期应用羊膜可阻止多形核白细胞的浸润, 减少脂质过氧化和基质细胞的死亡, 从而提出羊膜可减少术后 haze 和瘢痕化的发生。Kim 等^[14] 在实验性碱烧伤模型中也发现羊膜移植能减少角膜组织蛋白酶活性而加快愈合修复。同时发现羊膜能减少由准分子激

表1 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组 haze 分布情况

眼

组别	术后 1wk(各组 20 眼)					术后 4wk(各组 14 眼)					术后 8wk(各组 8 眼)				
	0级	1级	2级	3级	4级	0级	1级	2级	3级	4级	0级	1级	2级	3级	4级
AE 组	3	15	2	0	0	2	8	4	0	0	5	3	0	0	0
激素组	1	11	8	0	0	1	3	7	2	1	0	2	3	3	0
溶媒对照组	0	3	14	2	1	0	1	4	7	2	0	0	3	4	1
χ^2	14.79					5.81					8.49				
P	0.001					0.048					0.014				

注:AE 组:滴用 AE 眼液;激素组:滴用 1g/L 磷酸地塞米松眼液;溶媒对照组:滴用不含 AE 的溶媒眼液。

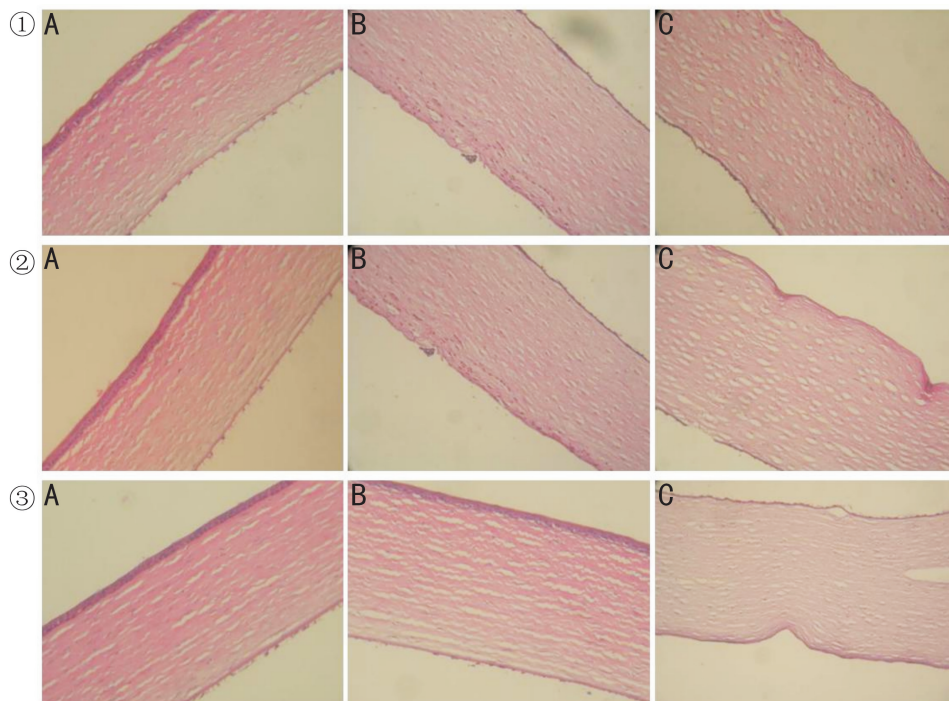


图1 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组角膜组织形态(HE×100) ①:AE 组;②激素组;③溶媒对照组;A:术后 1wk;B:术后 4wk;C:术后 8wk。

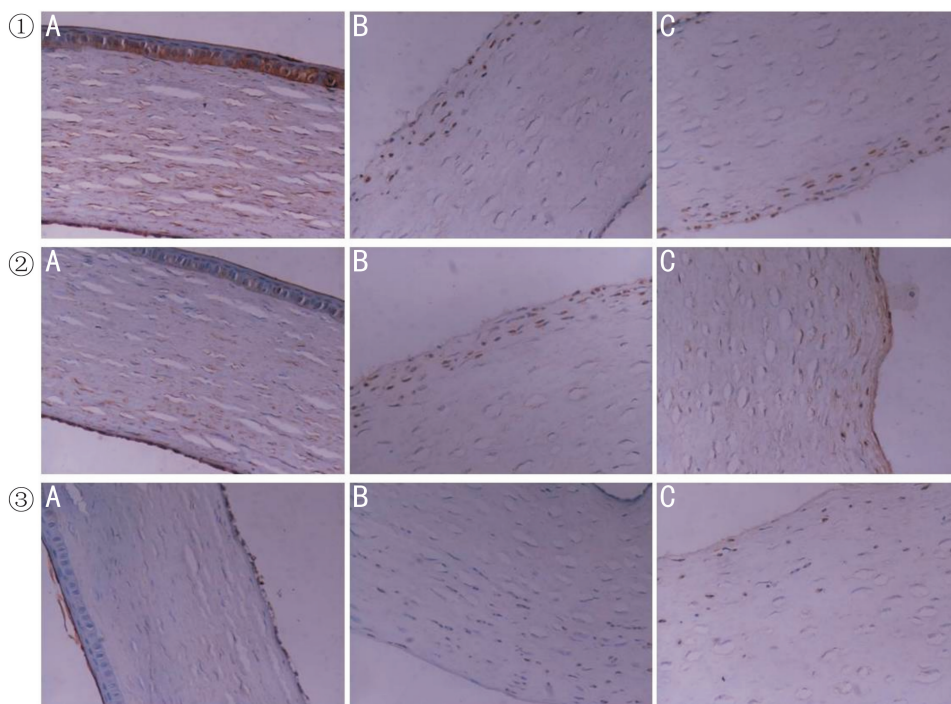


图2 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组角膜组织 NF-kB P65 蛋白表达(免疫组织化学染色×200) ①:AE 组;②激素组;③溶媒对照组;A:术后 1wk;B:术后 4wk;C:术后 8wk。

表2 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组的 TNF- α 蛋白含量

($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	术后 1wk	术后 4wk	术后 8wk	F	P
AE 组	92.61 \pm 5.11 ^a	56.34 \pm 6.10 ^{a,c}	36.75 \pm 3.87 ^{c,e}	32.13	<0.01
激素组	195.49 \pm 19.78 ^a	129.58 \pm 7.69 ^{a,c}	43.33 \pm 3.70 ^{c,e}	75.62	<0.01
溶媒对照组	135.66 \pm 9.06	86.44 \pm 5.02 ^c	42.49 \pm 3.11 ^{c,e}	51.46	<0.01
F	48.12	100.38	3.01		
P	<0.01	<0.01	0.124		

注:AE 组:滴用 AE 眼液;激素组:滴用 1g/L 磷酸地塞米松眼液;溶媒对照组:滴用不含 AE 的溶媒眼液。^aP<0.05 vs 溶媒对照组;^cP<0.05 vs 术后 1wk;^eP<0.05 vs 术后 4wk。

表3 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组的 TGF- β 1 蛋白含量

($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	术后 1wk	术后 4wk	术后 8wk	F	P
AE 组	211.60 \pm 13.22 ^a	147.34 \pm 8.11 ^{a,c}	105.66 \pm 4.87 ^{c,e}	78.34	<0.01
激素组	501.84 \pm 18.14 ^a	339.98 \pm 8.77 ^{a,c}	133.44 \pm 7.62 ^{a,c,e}	167.42	<0.01
溶媒对照组	325.67 \pm 20.02	216.83 \pm 11.27 ^c	115.22 \pm 7.73 ^{c,e}	114.39	<0.01
F	212.72	157.21	12.67		
P	<0.01	<0.01	0.007		

注:AE 组:滴用 AE 眼液;激素组:滴用 1g/L 磷酸地塞米松眼液;溶媒对照组:滴用不含 AE 的溶媒眼液。^aP<0.05 vs 溶媒对照组;^cP<0.05 vs 术后 1wk 组;^eP<0.05 vs 术后 4wk。

表4 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组的 IL-1 β 蛋白含量

($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	术后 1wk	术后 4wk	术后 8wk	F	P
AE 组	51.79 \pm 6.38 ^a	25.30 \pm 3.45 ^{a,c}	11.59 \pm 3.24 ^{c,e}	19.73	<0.01
激素组	124.58 \pm 9.17 ^a	70.20 \pm 6.21 ^{a,c}	21.48 \pm 2.98 ^{a,c,e}	68.56	<0.01
溶媒对照组	82.84 \pm 5.84	49.24 \pm 3.30 ^c	14.54 \pm 1.99 ^{c,e}	29.45	<0.01
F	75.55	74.06	9.96		
P	<0.01	<0.01	0.012		

注:AE 组:滴用 AE 眼液;激素组:滴用 1g/L 磷酸地塞米松眼液;溶媒对照组:滴用不含 AE 的溶媒眼液。^aP<0.05 vs 溶媒对照组;^cP<0.05 vs 术后 1wk 组;^eP<0.05 vs 术后 4wk。

表5 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组的 IL-4 蛋白含量

($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	术后 1wk	术后 4wk	术后 8wk	F	P
AE 组	19.51 \pm 2.18 ^a	13.07 \pm 1.07 ^{a,c}	4.11 \pm 0.90 ^{c,e}	34.72	<0.01
激素组	13.66 \pm 0.88 ^a	8.71 \pm 0.87 ^{a,c}	4.21 \pm 0.78 ^{c,e}	21.53	<0.01
溶媒对照组	8.78 \pm 0.55	5.78 \pm 0.66 ^c	3.67 \pm 0.77 ^{c,e}	25.84	<0.05
F	44.45	52.24	0.365		
P	<0.01	<0.01	0.709		

注:AE 组:滴用 AE 眼液;激素组:滴用 1g/L 磷酸地塞米松眼液;溶媒对照组:滴用不含 AE 的溶媒眼液。^aP<0.05 vs 溶媒对照组;^cP<0.05 vs 术后 1wk 组;^eP<0.05 vs 术后 4wk。

表6 三个组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组的 IL-10 蛋白含量

($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	术后 1wk	术后 4wk	术后 8wk	F	P
AE 组	50.47 \pm 2.17 ^a	33.36 \pm 2.24 ^{a,c}	13.40 \pm 1.48 ^{c,e}	86.73	<0.01
激素组	32.73 \pm 1.87 ^a	21.36 \pm 1.67 ^{a,c}	11.31 \pm 1.33 ^{c,e}	51.39	<0.01
溶媒对照组	21.31 \pm 1.84	14.60 \pm 1.16 ^c	10.33 \pm 1.06 ^{c,e}	12.74	<0.01
F	167.64	88.88	4.35		
P	<0.01	<0.01	0.068		

注:AE 组:滴用 AE 眼液;激素组:滴用 1g/L 磷酸地塞米松眼液;溶媒对照组:滴用不含 AE 的溶媒眼液。^aP<0.05 vs 溶媒对照组;^cP<0.05 vs 术后 1wk 组;^eP<0.05 vs 术后 4wk。

光分解及浸润的 PMN 所引起的氧自由基对角膜基质细胞的损伤作用。因此,羊膜能多途径、多环节地减轻准分子激光术后早期的炎症反应,并保护角膜基质细胞免受凋亡。Tseng 实验室先后在体外培养角膜成纤维细胞、角膜缘成纤维细胞、结膜成纤维细胞等加入羊膜匀浆组织,发

现这些细胞的三种 TGF- β 1 系统及受体在羊膜作用早期即开始受到抑制,24h 更明显,细胞 DNA 合成下降,向成肌纤维细胞分化的能力也下降^[15-16]。钟一声等^[17]也报道羊膜移植能降低准分子激光术后角膜组织 TGF- β 1 的表达水平。我们科室前期利用兔 PRK 模型,术后开始滴用

表7 三组兔 Epi-LASIK 术后不同时间各组的 IL-13 蛋白含量

($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	术后 1wk	术后 4wk	术后 8wk	F	P
AE 组	13.80±1.25 ^a	6.43±0.83 ^{a,c}	2.07±0.91 ^{c,e}	17.63	<0.01
激素组	8.36±1.06 ^a	5.06±0.80 ^{a,c}	1.60±0.39 ^{c,e}	12.75	<0.05
溶媒对照组	5.22±0.86	2.61±0.24 ^e	1.43±0.38 ^{c,e}	5.84	<0.05
F	49.41	24.49	0.88		
P	<0.01	0.01	0.463		

注:AE 组:滴用 AE 眼液;激素组:滴用 1g/L 磷酸地塞米松眼液;溶媒对照组:滴用不含 AE 的溶媒眼液。^aP<0.05 vs 溶媒对照组;^cP<0.05 vs 术后 1wk 组;^eP<0.05 vs 术后 4wk 组。

AE 治疗,发现 AE 具有明显抑制 haze 发生的效果^[7]。但是羊膜提取液是否具有减轻 Epi-LASIK 术后 haze 发生尚不清楚。

角膜上皮缺损对角膜基质细胞凋亡及修复反应有重要影响。本研究结果显示,AE 组角膜上皮修复速度明显快于激素组及溶媒对照组,说明 AE 滴眼液在早期促进了角膜上皮细胞的迁移和上皮组织的修复。在此基础上,进一步采用 ELISA 方法检测 Epi-LASIK 后不同组兔角膜组织中多种炎症因子(TNF- α 、TGF- β 1 和 IL-1 β)和抗炎细胞因子(IL-10、IL-4 和 IL-13)的表达,结果显示 AE 可以明显降低 Epi-LASIK 手术后炎症因子的表达,而且,有趣的是,AE 具有促进抗炎因子的作用,提示 AE 抑制 haze 的发生可能与其抑制角膜上皮细胞分泌炎症因子以及激活 Th2 细胞的功能密切相关。

总之,本研究表明,AE 能有效抑制兔 Epi-LASIK 术后 haze 的形成,其机制可能与 AE 能够促进角膜上皮组织修复,降低角膜上皮细胞的炎症反应,以及同时激活 Th2 细胞分泌抗炎因子抑制炎症反应,进而减少肌成纤维细胞的生成与聚集,最终减少胶原与瘢痕形成有关。

参考文献

1 任晓磊,刘丽娟,游启生,等. 近视眼流行病学调查现状. 国际眼科纵览 2015;39(3):175-179
 2 Yuksel N, Bilgihan K, Hondur AM, et al. Long term results of Epi-LASIK and LASEK for myopia. *Contact Lens and Anterior Eye* 2014;37(3):132-135
 3 Reilly CD, Panday V, Lazos V, et al. PRK vs LASEK vs Epi-LASIK: A comparison of corneal haze, postoperative pain and visual recovery in moderate to high myopia. *Nepal J Ophthalmol* 2010;2(2):97-104
 4 Sia RK, Coe CD, Edwards JD, et al. Visual outcomes after Epi-LASIK and PRK for low and moderate myopia. *J Refract Surg* 2012;28(1):65-71
 5 Callanan DG, Jaffe GJ, Martin DF, et al. Treatment of posterior uveitis with a fluocinolone acetonide implant: three-year clinical trial results. *Arch Ophthalmol* 2008;126(9):1191

6 Costa E, Murta JN. Amniotic Membrane. *Springer Netherlands* 2015:105-122
 7 肖启国,陈媛,杜娟,等. 羊膜提取液对兔准分子激光角膜切削术后角膜上皮雾状混浊的影响. *中华眼科杂志* 2014;50(1):42-50
 8 张元钧,陆勤康,陈辉,等. Epi-LASIK 动物模型的建立方法. *现代实用医学* 2011;23(3):302-303
 9 Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1990;108(5):665-675
 10 Richoz O, Mavrakas N, Pajic B, et al. Corneal collagen cross-linking for ectasia after LASIK and photorefractive keratectomy: long-term results. *Ophthalmology* 2013;120(7):1354-1359
 11 Wang MX, Gray TB, Park WC, et al. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 2001;27(2):310-319
 12 Woo HM, Kim MS, Kweon OK, et al. Effects of amniotic membrane on epithelial wound healing and stromal remodelling after excimer laser keratectomy in rabbit cornea. *Br J Ophthalmol* 2001;85(3):345-349
 13 Park WC, Tseng SCG. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(10):2906-2914
 14 Kim JS, Kim JC, Na BK, et al. Amniotic membrane patching promotes healing and inhibits proteinase activity on wound healing following acute corneal alkali burn. *Exp Eye Res* 2000;70(3):329-337
 15 Lee SB, Li DQ, Tan DTH, et al. Suppression of TGF- β signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Curr Eye Res* 2000;20(4):325-334
 16 Tseng SCG, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF- β receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *J Cell Physiol* 1999;179(3):325-335
 17 钟一声,翟祖康,周颖明,等. 羊膜对准分子激光屈光性角膜切削术后角膜组织表达 TGF- β 1 及 I, III 型胶原和纤维连接蛋白的影响. *眼科学报* 2000;16(4):239-242