文章编号:1000-5404(2005)06-0507-04

论著

兔LASEK与PRK术后角膜Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原检测及意义

崔 馨,白 继,贺翔鸽 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所眼科,重庆 400042)

提 要:目的 用Western blot法比较准分子激光上皮下角膜磨镶术(LASEK)与准分子激光角膜切削术(PRK)术后角膜Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原的动态变化情况。**方法** 52只新西兰白兔分为8组,每只兔右眼行LASEK,左眼行PRK。术后1、7 d、1、3、4、5、6个月观察haze情况,处死动物取角膜行Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原的动态变化过程的Western blot检测。**结果** 经Western blot检测发现LASEK组术后角膜基质中Ⅰ、Ⅲ型胶原开始增生的时间早于PRK组,表达的强度与PRK组有显著差异;两组的Ⅴ、Ⅵ型胶原动态变化曲线相似,达到表达高峰的时间一致,PRK组Ⅴ、Ⅵ型胶原的表达均明显高于LASEK组,术后6个月时LASEK组表达显著弱于PRK组。**结论** PRK手术后角膜基质中Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原的表达强度、达到高峰及恢复正常的时间与LASEK相比存在显著差异,表明PRK术后基质内有胶原的过量沉积,可能是临床PRK术后haze严重及屈光回退的组织学基础。

关键词: 角膜;准分子激光上皮下角膜磨镶术;准分子激光角膜切削术;近视;胶原
中图法分类号: R322.91; R341.25; R779.63 **文献标识码:** A

Western blot analysis of types Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ, and Ⅵ collagens after LASEK and PRK in cornea of rabbits and the significance

CUI Xin, BAI Ji, HE Xiang-ge (Department of Ophthalmology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military medical university, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe and compare the accurate dynamic changes of types Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ, and Ⅵ collagens in the wound healing processes of the rabbit cornea undergoing laser epithelial keratomileusis (LASEK) or photorefractive keratectomy (PRK) and to investigate the possible mechanisms of corneal haze and myopic regression. **Methods** New Zealand White rabbits were divided into 8 groups: normal control group ($n = 6$), 1, 7 d, and 1, 3, 4, 5, and 6 month groups ($n = 14$). Every rabbit underwent LASEK in one eye while the other one with PRK. We used Western blot analysis to compare the wound healing process of dynamic changes of types Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ, and Ⅵ collagens in the rabbit cornea at every time point. The results were analyzed with data analysis software. **Results** Western blot analysis showed that after LASEK, the cornea wound healing with types Ⅰ and Ⅲ collagens were much faster than that of PRK, and the wound response was also much weaker. Whereas for types Ⅴ and Ⅵ collagens, their dynamic changes were similar between LASEK and PRK, and they both reached the peak value at 3 month after the surgery, but LASEK group returned to normal earlier than PRK group. The value of these two types of collagens after PRK was higher than that by LASEK. The changes of these four types of collagens may offer us at least partial explanation to the difference of formation of corneal haze and refractive regression. **Conclusion** There are significant differences between LASEK and PRK in types Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ, and Ⅵ collagens or the time of reacting, reaching apex, and returning to normal. LASEK has slighter intensity of reaction. The results indicate that there is excessive aggradation of collagens after PRK, which may be the histological foundation of obvious haze and myopia regression.

Key words: cornea; laser epithelial keratomileusis; photorefractive keratectomy; myopia; collagen

激光角膜切削术(photorefractive keratectomy, PRK)自1983年用于治疗近视以来,对于中、低度近视的矫正目前被认为是安全和有效的,但对于超过-6.00 D以上的高度近视则由于术后较为明显的角膜雾状混浊

作者简介:崔 馨(1977-),女,山东省莱芜市人,博士研究生,医师,主要从事眼表疾病及视光学方面的研究。电话:(023)68757341, E-mail: cuixin5316@vip.sina.com

收稿日期:2004-07-27;修回日期:2004-10-20

以及屈光回退而受到了限制。激光上皮下角膜磨镶术(LASEK)是一种改良的PRK手术[1],近年部分临床报道证实LASEK与PRK相比,术后眼部刺激症状、视力恢复以及稳定程度均好于后者,因此有人设想LASEK是否最终可取代PRK。但与此同时也有一些学者的临床研究结果与上述结论不同,他们认为尽管LASEK矫正近视是安全、有效的,但与PRK无本质的差别,并且无可信服的组织病理学研究支持。本研究通过比较LASEK和PRK术后兔眼角膜愈合过程中Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原的动态变化过程,较准确地从组织学角度探讨haze与屈光度数回退的可能成因,为近视眼的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

①电泳仪、垂直电泳槽及电泳转移槽(北京东方仪器厂产)、低温高速离心机(Backman公司产)。②SDS(Bio-Rad公司产品),脱脂奶粉(台湾产品);Ⅰ型胶原单克隆抗体(Sigma,美国);Ⅲ型胶原单克隆抗体(Oncogene,美国);Ⅴ型胶原单克隆抗体(博士德,武汉);Ⅵ型胶原单克隆抗体(博士德,武汉)。③辣根过氧化物酶标记IgG(Bio-Rad公司),Trisbase和Tris.HCl(IBI公司),牛血清白蛋白(美国Sigma公司),增强型化学发光(ECL)显影药盒(美国杜邦NEN公司)。

1.2 实验动物及分组

选用健康的新西兰大白兔52只,104只眼,雌雄兼用,体质量2.0~2.5 kg,月龄4~5个月(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)。

实验分组:分为术后1、7 d、1、3、4、5、6个月组及正常对照组,共8组;每只兔随机选择一眼行LASEK手术,另一只眼行PRK手术。除正常对照组6只眼外,其余每组7只兔,14只眼,分别在术后1、7 d及1、3、4、5、6个月用空气栓塞法处死后取眼球。

1.3 实验方法

1.3.1 取材固定 每个时相点用空气栓塞法处死动物,取出眼球后用剪刀沿角巩膜缘取下新鲜角膜,用锡纸包裹好并置于液氮中保存。

1.3.2 细胞浆、膜蛋白的制备 将冷冻组织置于4 ℃预冷的含0.4 mmol/L PMSF,1 mmol/L 1.10 Phenanthroline,1 mmol/L Iodoacetamide和1 μmol/L PepstatinA的pH 7.0的匀浆缓冲液(NaH_2PO_4 0.08 mol/L, Na_2HPO_4 0.32 mol/L, NaCl 3.6%)1 ml中,冰浴下剪碎、匀浆(14 000 r/min,20 s×2次)。2 100 r/min,离心15 min,取上清,12 000 r/min离心25 min。上清为浆蛋白,沉淀为膜蛋白。膜蛋白洗涤1次。浆、膜蛋白均存于-70 ℃备用。离心均在4℃进行。

1.3.3 电泳 将制备的浆、膜蛋白样品用改良的福林酚法定量,牛血清白蛋白为标准。按1:1加入样品缓冲液(2% SDS,10% Glycerol, pH 7.6的80 mmol/L Tris·HCl,用前按9:0.5:0.5加入此缓冲液,0.1%溴酚蓝,0.5% DTT贮备液),终浓度为2 g/L,100 ℃处理3 min, 10 000 r/min,离心30 s。用11%聚丙烯酰胺凝胶(dH_2O_2 18 ml,3.0 mol/L Tris 1.5 ml, 30% Arc 2.2 ml, 10% SDS 0.12 ml, 10% APS 60 μl, TEMED 5 μl)垂直平板电泳,胶为非连续性,上样量30~80 μg,每样至少上两块平行胶,用Amersham公司产中分子彩虹蛋白分子量标准作为确定分子量的依据。预电泳电压50 V,15 min;电泳电压100 V,电泳缓冲液为甘氨酸溶液(0.303% Trisbase, 1.444% Glycine,用前加0.1% SDS),3 h后,取下凝胶将相同的两块胶一块用于考马斯亮蓝染色,确认上样量的一致性,另一张用于电转印。

1.3.4 电转印 将胶及硝酸纤维素膜(Ncm)夹于两张滤纸之间,放入已装有电转液(pH 8.2~8.3, Glycine 190 mmol/L, Trisbase 20 mmol/L, Methanol 20%, SDS 0.02)的电转移槽,电压15 V,转印10 h后取出,将转移后的凝胶染色,检查转印是否完全,然后将Ncm仔细做好标记。

1.3.5 免疫印记 将做好标记的Ncm置于含脱脂奶粉的pH 7.2的PBS中封闭12 h,PBS漂洗1×15 min,2×5 min后加入一抗(一抗分别为Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原小鼠抗兔单克隆抗体,稀释比为1:1 000),室温反应1 h后,将Ncm用PBS清洗1次×5 min,2次×5 min后置于辣根过氧化物酶标记的IgG中反应40~60 min,PBS洗1次×15 min,4次×5 min后待检测。抗体稀释均用含3%牛血清白蛋白的pH 7.2的PBS。

1.3.6 检测 将待测的Ncm置于Amersham公司产的ECL蛋白免疫印迹检测试剂中反应1 min,然后迅速用塑料薄膜包好,与X线胶片一同放入暗盒曝光10 s至3 min,再将X线胶片显影定影。

1.3.7 分子量确定 仔细检查Ncm上的彩虹分子量标准在X线片上的对应位置及电泳起始点,计算各目标带的分子量。

1.3.8 结果分析 将X线胶片置于图像扫描仪下,对目标带进行密度分析,结果用灰阶×面积表示。校正上样量根据同时进行的电泳复本胶染色干燥后形成影像的密度进行校正。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件进行分析。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 Ⅰ型胶原Western blot检测结果

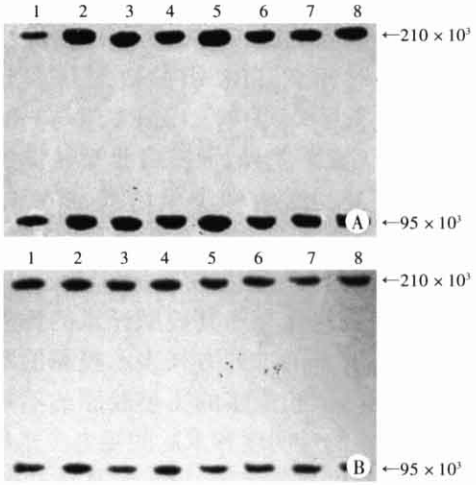
2.1.1 LASEK组术后动态变化 术后7 d起表达开始增强,1个月表达高峰,3个月时开始减弱,6个月时接近正常水平(图1A)。

2.1.2 PRK组术后动态变化 术后1 d到3个月表达不断增强,3个月为表达高峰,然后明显减弱,术后6个月时表达强于LASEK组(图1B)。

2.2 Ⅲ型胶原Western blot检测结果

2.2.1 LASEK组术后动态变化 术后7 d达表达高峰,1~3个月明显减弱,6个月时接近正常(图2A)。

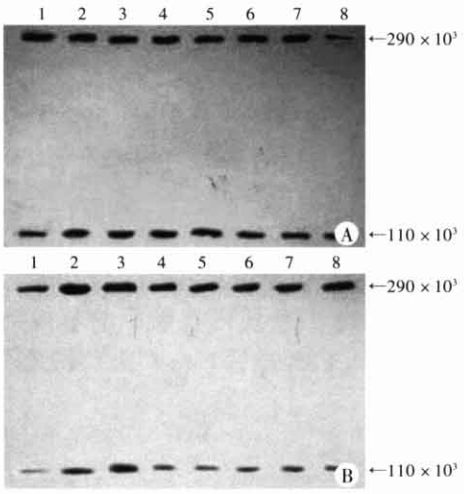
2.2.2 PRK组术后动态变化 术后1 d到3个月的表达呈持续增强状态,3个月时达到高峰,然后开始下降,6个月时恢复到略高于术后1 d的水平(图2B)。



A: Group LASEK; B: Group PRK; 1: Control; 2 – 8: Postoperative day 1 and 7 and postoperative months 1, 3, 4, 5, and 6

图 1　术后Ⅰ型胶原 Western blot 检测结果

Fig 1　Western blot analysis of type Ⅰ collagen after LASEK and PRK



A: Group LASEK; B: Group PRK; 1: Control; 2 – 8: Postoperative day 1 and 7 and postoperative months 1, 3, 4, 5, and 6

图 2　术后Ⅲ型胶原 Western blot 检验结果

Fig 2 Western blot analysis of type Ⅲ collagen after LASEK and PRK

2.3　Ⅴ型胶原 Western blot 检测结果

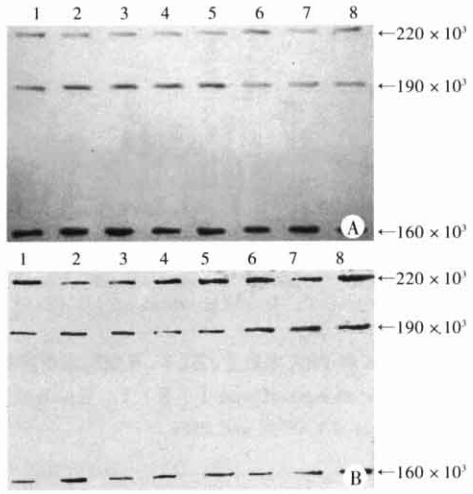
2.3.1　LASEK 组术后动态变化　　术后 1 d 到 3 个月表达持续增强，3 个月时达到高峰，4 个月显著减弱，6 个月时基本恢复正常(图 3A)。

2.3.2　PRK 组术后动态变化　　总体变化趋势同 LASEK 组，6 个月时仍处于较 LASEK 组高的水平，尚未恢复正常(图 3B)。

2.4　Ⅵ型胶原 Western blot 检测结果

2.4.1　LASEK 组术后动态变化　　术后 1 d 到 3 个月表达持续增加，3 个月为表达高峰，6 个月时基本正常(图 4A)。

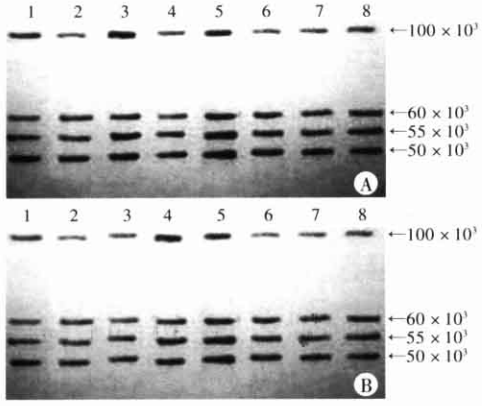
2.4.2　PRK 组术后动态变化　　术后 1 d 到 3 个月的变化趋势与 LASEK 组相同，在 3 个月时达到高峰，术后 4、5 个月比 3 个月表达减弱，但 5～6 个月时仍明显强于同时相点 LASEK 组(图 4B)。



A: Group LASEK; B: Group PRK; 1: Control; 2 – 8: Postoperative day 1 and 7 and postoperative month 1, 3, 4, 5, and 6

图 3　术后Ⅴ型胶原 Western blot 检测结果

Fig 3　Western blot analysis of type Ⅴ collagen after LASEK and PRK



A: Group LASEK; B: Group PRK; 1: Control; 2 – 8: Postoperative day 1 and 7 and postoperative month 1, 3, 4, 5, and 6

图 4　术后Ⅵ型胶原 Western blot 检测结果

Fig 4　Western blot analysis of type Ⅵ collagen after LASEK and PRK

2.5　Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原两组之间各时相点比较

从图 5 可以看出，两组间Ⅰ型胶原的表达在术后各相同时相点的表达均有显著差异($P < 0.05$)，PRK 组的表达从术后 1 d 起即明显强于 LASEK 组，一直持续到术后 6 个月；两组间Ⅲ型胶原术后 1 d 及 1 个月表达有显著差异($P < 0.05$)，二者达到高峰的时间相差很大，LASEK 组为术后 7 d，PRK 组为术后 3 个月。差异最明显的时期体现在术后 3～6 个月。这几个时相点中 PRK 组的表达显著强于 LASEK 组，并且持续到术后 6 个月。

图 5 中可看出两组间术后Ⅴ型胶原 7 d 时表达有显著差异，差异最明显的时期体现在术后 3～6 个月。在这几个时相点中，PRK 组的表达明显强于 LASEK 组，这种现象一直持续到术后 6 个月。Ⅵ型胶原 PRK 组的表达在各个时相点均高于 LASEK 组，两组术后 1 d 即有显著差异，7 d 至 3 个月都存在明显差异，尤其是 3 个月时。LASEK 组术后 6 个月时恢复到接近正常水平，而 PRK 组在 6 个月时表达仍处于较高水平。

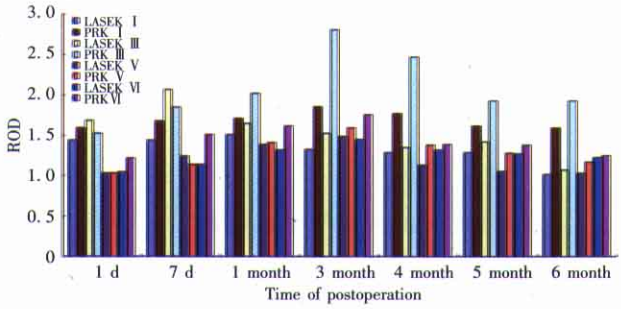


图5 LASEK与PRK术后Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原动态变化

Fig 5 Dynamic changes of type Ⅰ, Ⅲ, Ⅴ, Ⅵ collagen after operation of LASEK and PRK

3 讨论

角膜中含有大量与损伤修复相关的细胞外基质成分,最重要的两种是胶原与蛋白多糖。胶原蛋白是角膜的主要组成成分,不仅起支架作用,而且具有特殊的生理功能,尤其在创伤修复中。机体通过胶原合成和降解,对组织创伤愈合后的改建使得组织修复得以完成和完善[1,2]。Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ型胶原蛋白在角膜基质中共聚成角膜基质纤维。Ⅰ型胶原是角膜中的主要胶原,排列有序的Ⅰ型胶原保证了角膜的透明性。目前关于Ⅲ型胶原是否存在于正常角膜组织中争议也很大,由于动物种属差异或检测方法不同,使研究结果相悖[3~5]。Ⅴ型胶原占胶原总量的10%左右。经免疫定位显示,Ⅵ型胶原蛋白连接整个角膜基质纤维,因此尽管Ⅵ型胶原蛋白不与其它3种胶原蛋白共同构成角膜基质纤维,且对角膜基质纤维的直径影响不大,但其在保持角膜基质的有序板层结构及维护胶原蛋白纤维的柔性方面起着重要作用。我们选择此4种胶原进行研究。

胶原与角膜创伤愈合的关系:Maurice的格子理论认为胶原纤维正常排列被破坏,新生的胶原纤维粗细不匀或纤维间隔不等,这些都将影响角膜的透明度,是构成角膜上皮下混浊的基础[6,7]。

以往对准分子激光术后角膜组织病理学的研究多采用免疫组化法,但其结果往往带有较大程度的主观判断性,而Western blot法具有客观性较强及准确性较高的特点,很适合用以探讨兔角膜中是否存在某些类型的胶原以及各种胶原在准分子激光术后的动态变化情况。本实验通过Western blot检测方法较准确地证明兔正常角膜组织中存在Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原蛋白。

本实验结果显示LASEK手术后Ⅰ、Ⅲ型胶原的增生反应快于PRK,并分别在术后1个月、7 d时达到反应的高峰期,在此阶段LASEK组反应的强度处于增强状态,其后便开始下降,于术后6个月时基本恢复到正常状态。PRK组Ⅰ、Ⅲ型胶原的增生反应起步晚于LASEK组,达到反应的高峰期都在术后3个月,其峰值与此时已经开始降低的LASEK组相比有显著差异。在相同的下降时相点,PRK组的数值基本上均高于LASEK组。在术后6个月时,LASEK组与PRK组Ⅰ型胶原的表达已无显著差异,而二者Ⅲ型胶原的表达则仍存在显著差异。这两种类型的胶原在LASEK及PRK手术后表达上的区别主要体现在"反应时间"与"反应强度"的不同上。Ⅰ型胶原是角膜胶原的最主要成分,PRK组免疫组化显示其胶原纤维的排列明显比LASEK组紊乱,紊乱的排列方式表示胶原的不规则沉积,数量比其他类型胶原多的Ⅰ型胶原的不规则沉积会显著影响角膜的透明度和术后的视力。Ⅲ型胶原则是修复过程中新生量最大的一种,尤其是PRK组更为明显,它的大量沉积同样会对角膜透明度和术后视力造成影响。Ⅴ、Ⅵ型胶原的变化趋势与Ⅰ、Ⅲ型胶原有所不同,LASEK组与PRK组的动态曲线相似,都在术后3个月时达到表达高峰,在这段时间里,二者Ⅴ型胶原的显著差异主要表现在术后3~6个月,PRK组表达均明显高于LASEK组;Ⅵ型胶原的显著差异则体现在术后1 d到3个月,PRK组的表达也高于LASEK组。这两种胶原的区别主要体现在"反应强度"的不同上,即PRK组Ⅴ、Ⅵ型胶原增生的量均大于LASEK组,表示PRK组有过多的胶原合成。

LASEK术后角膜基质中Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ、Ⅵ型胶原的表达强度、达到高峰及恢复正常的时间与PRK存在显著差异,表明PRK术后基质内有胶原的不规则过量沉积,这可能是临床PRK术后haze严重及屈光回退明显的组织学基础。

参考文献:

[1] Connon C J, Meek K M. The structure and swelling of corneal scar tissue in penetrating full-thickness wounds[J]. Cornea, 2004, 23(2): 165-171.

[2] Doughty M J, Bergmanson J P. Collagen fibril characteristics at the corneo-scleral boundary and rabbit corneal stromal swelling[J]. Clin Exp Optom, 2004, 87(2): 81-92.

[3] Newsome D A, Gross J, Hassellj R, *et al*. Human corneal stroma contains three distinct collagens[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1982, 22(1): 376-380.

[4] Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, *et al*. Distrbiution of type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ collagen in normal and keratoconus corneas[J]. Ophthalmic Res, 1986, 18(1): 1.

[5] Ben-Zvi A, Rodrigues M M, Krachmer J H, *et al*. Immunohistochemical characterization of extracellular matrix in the developing human cornea[J]. Curr Eye Res, 1985, 5(1): 105-109.

[6] 张 晶, 何静雯, 王泰龄, 等. 苦味酸天狼星红偏振光法鉴别Ⅰ型及Ⅲ型胶原纤维[J]. 中华病理学杂志, 1996, 25(3): 180-181.

[7] 孙秉基, 徐锦堂. 角膜病的理论基础与临床[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1994. 24-26.

(编辑 陈聪连)