

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.04.03

◆ 论著 ◆

鼠神经生长因子对兔眼 LASIK 术后角膜知觉恢复和泪液动力学指标及细胞因子的影响

曹娟, 马波, 李海燕

(西安市第四医院眼科, 陕西 西安 710004)

【摘要】目的: 分析鼠神经生长因子(mNGF)对兔眼准分子激光原位角膜磨镶术(LASIK)术后角膜神经修复和角膜知觉恢复的影响。**方法:** 随机选取3只兔子(6只眼),作为空白对照组,不做任何处理。将造模成功的60只动物(120只眼)平均分成两组,每组兔两只眼睛均接受LASIK手术,手术后治疗组(mNGF组)每日滴配制的神经生长因子(NGF)滴眼液,阴性对照组(NC组)每日滴生理盐水溶液。每日给药6次,每次1滴,每天均在同一时间滴眼。分别于术前、术后对两组兔的角膜知觉、泪液分泌量、泪膜破裂时间(BUT)、泪液中生化指标、新生神经纤维数量、上皮细胞微绒毛密度和HE染色结果等进行检测。**结果:** (1)角膜知觉恢复:除术后第1天外,其余各时间点mNGF组治疗效果优于NC组,且两组的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。(2)泪液动力学指标检查:LASIK术后术后1周、2周、1月、3月和6月时,mNGF组兔眼泪液分泌量以及泪膜破裂时间均高于NC组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。(3)泪液细胞因子检查:术后短期内NGF对TNF- α 、IL-2炎症因子表达控制和促进明显优于NC组。(4)术后第1天至2周,mNGF组上皮细胞微绒毛密度明显高于NC组,两组数据差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:** (1)mNGF促进兔眼LASIK术后角膜神经上皮细胞结构恢复和角膜神经修复,其机制可能与降低炎症反应,促进NGF分泌有关。(2)mNGF局部滴眼可以改善LASIK术后干眼的症状,促进角膜知觉恢复。

【关键词】 神经生长因子;角膜;神经修复;准分子激光原位角膜磨镶术;炎症因子

【中图分类号】 R779.6 **【文献标志码】** A

Effect of mouse nerve growth factor on corneal perceptual recovery and tear fluid dynamics indicators and cytokines after LASIK in rabbits

CAO Juan, MA Bo, LI Hai-yan

(Department of Ophthalmology, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an 710004, Shaanxi, China)

【Abstract】 Objective: To analyze the effects of mouse nerve growth factor (NGF) on corneal nerve repair and corneal perception recovery after laser in situ keratomileusis (LASIK). **Methods:** 3 rabbits (6 eyes) were randomly selected as the blank control group without any treatment. 60 animals (120 eyes) were divided into two groups. Each group received LASIK. After operation, the treatment group (mNGF group) received NGF eye drops every day, while the negative control group (NC group) received normal saline solution every day. The drug was given 6 times a day, 1 drop each time, and the eyes were dropped at the same time every day. The corneal perception, tear secretion, tear break-up time (but), biochemical indexes in tear, number of new nerve fibers, microvilli density of epithelial cells and the staining results were measured before and after operation. **Results:** (1) Corneal sensory recovery, except the first day after operation, the therapeutic effect of mNGF group was better than NC group at other time points, and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). (2) Dynamics index examination in tear; at 1w, 2w, 1m, 3m and 6m after LASIK, the amount of tear secretion and tear film rupture time in the mNGF group were higher than those in the NC group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). (3) Examination of cytokine in tear; In the short term after operation, NGF could control the expression of TNF- α , IL-2 inflammatory factors and promote NGF significantly better than NC group. (4) The number of microvilli density of epithelial cells in mNGF group were significantly higher than those in NC group from the 1 d to the 2 w after operation ($P < 0.05$). **Conclusions:** (1) mNGF can promote the corneal neuroepithelial cell structure and corneal nerve repair after LASIK, which may be related to the reduction of inflammatory response and the promotion of NGF secretion. (2) After LASIK, the symptom of dry eye can be improved and the recovery of corneal perception can be promoted.

【Key words】 Nerve growth factor; Cornea; Nerve regeneration; Laser in situ keratomileusis leukemia suppressor; Inflammation

基金项目: 国家自然科学基金(81273902)

作者简介: 曹娟(1981-),女,硕士,副主任医师。E-mail:caojuan_198106@163.com

通讯作者: 李海燕。E-mail:lihaoyanry@163.com

角膜屈光手术在近视、远视、散光、老视等矫正方面已取得了良好的临床效果,特别准分子激光原位角膜磨镶术(laser in situ keratomileusis, LASIK)自开展以来,经过二十多年的发展,已成为当前角膜屈光矫治手术中的主流术式,其具有高度的安全性、稳定性和可预测性^[1-2]。由于LASIK术对角膜神经丛和角膜上皮具有损伤,因此LASIK术后不可避免的存在神经营养性角膜上皮病变^[3]、上皮损伤、角膜知觉降低、干眼症等手术并发症^[4]。研究发现干眼症和角膜知觉降低是LASIK术后常见的并发症,表现为眼部干涩、异物感、烧灼感、眼痒、视物不清、角膜知觉下降等^[5-7],其中,角膜神经损伤是出现术后干眼症和角膜知觉降低的根本原因^[8]。目前国内眼科临床尚无专门针对角膜神经修复和再生的有效药剂。

神经生长因子(nervr growth factor, NGF)是重要的神经营养因子,其在调节神经元和神经递质功能方面具有重要作用,目前已证实NGF可通过小鼠角膜新生血管中神经周围神经支配,从而促进角膜修复的作用^[9]。鼠神经生长因子(mouse nerve growth factor, mNGF)是一种外源性的NGF,其可应用于多种眼科疾病的治疗,包括角膜、结膜、虹膜、视神经、视网膜及视皮层等相关疾病^[10-11]。但其对LASIK术后角膜神经修复和神经知觉恢复的相关报道较少。本研究旨在通过对手术前后两组兔角膜知觉、泪液分泌量、泪膜破裂时间(tear break-up time, BUT)、泪液中生化指标等进行检测,确定mNGF对兔眼LASIK术后角膜神经修复和角膜知觉恢复的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物选择和分组

选取SPF级健康新西兰大白兔122只(陕西省医学实验动物中心提供),体重2.0~2.5 kg,雌雄各半。在成模动物中选取60只(120只眼)平均分成两组,每组兔两只眼睛均接受LASIK手术,手术后治疗组(mNGF组)每日滴配制的NGF滴眼液,阴性对照组(NC组)每日滴生理盐水溶液。

1.2 药物配制及给药方法

将10 g注射级mNGF粉剂溶于50 μ L生理盐水中,过滤除菌后粉状、避光、密闭,放入4 $^{\circ}$ C冰箱中保存。自LASIK术后第1天,治疗眼采用配制NGF溶液滴眼,NC组用生理盐水滴眼,给药6次/d,每次1滴。

1.3 LASIK动物模型眼的建立^[12]

术前3 d所有动物使用左氧氟沙星滴眼,4次/

d。然后麻醉动物,用塑料袋包裹并暴露头部置于手术台上。盐酸林可霉素滴眼液冲洗结膜囊2次,倍诺喜滴眼液2滴进行表面麻醉,实行双眼手术。角膜瓣制作:采用无齿止血钳将眼球挤出眼睑,充分暴露,+2号负压固定环吸附眼球,Moria-M2微型角膜板层刀制作蒂厚度为110 μ m的角膜瓣。翻转角膜瓣:然后基质层做激光削切,削切直径6 mm、厚度60 μ m,切削深度36 μ m。激光切削结束后用生理盐水冲洗基质床并复位角膜瓣,10-0缝线缝合固定角膜瓣,观察角膜瓣平贴、无皱后,于结膜囊内点典必殊滴眼液1滴,复位眼球,轻轻将眼睑闭合。成模标准:术中无碎瓣,无偏斜,瓣光滑平整盖回即可。

1.4 观察指标及评价方法

1.4.1 角膜知觉的检查 采用Cochet-Bonnet角膜知觉仪测量角膜中央知觉。每一纤维长度测量中央角膜压力3次,3次中有2次出现眨眼动作为阳性,出现阳性反应时的最大纤维长度即作为角膜知觉的阈值。术后1 d清晨使用药物干预,术后作用1 d检测实际为第2 d清晨药物干预前,检测后的动物不再用于后续实验。

1.4.2 泪液动力学指标 (1)泪液分泌量检查(Schirmer I试验):取Schirmer泪液检测滤纸条,用无菌镊将一端反折5 mm并将折弯部分放入兔下睑内侧1/3结膜囊内,闭合兔眼5 min后取出滤纸,记录滤纸被泪水浸湿的长度,一般长度短于10 mm为异常。(2)BUT:分别于LASIK术后1 d、1周、2周、1月、3月和6月由同一人对泪膜破裂时间进行检测。取眼科荧光素试纸条,用1滴生理盐水将荧光素钠部分蘸湿后轻轻接触兔眼角膜,用手使兔眼轻轻闭合睁开数次使荧光素在角膜上均匀分布,在裂隙灯下通过钴蓝光观察、记录自最后一次睁眼至角膜出现第一个干燥斑(黑斑)的时间,连续测试3次取平均值即为BUT,一般BUT小于10 s为异常。

1.4.3 泪液中细胞因子检测 采用兔ELISA试剂盒(购自武汉默沙克生物科技有限公司,货号:69-36852、69-22178、69-22207)分别对兔泪液中的肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-2(IL-2)和NGF含量进行检测,具体检测流程参考试剂盒说明书,反应终止后,酶标仪测定各组530 nm和450 nm处OD值,绘制标准曲线,计算其相对表达量。

1.4.4 角膜组织超微结构检查 分别于LASIK术后1 d、1周、2周及1月每组各取3只兔,麻醉后处死,沿摘取双侧眼球,生理盐水冲洗后剪下角膜,将角膜均分为两部分,一半置于10%甲醛固定液中,制作角膜病理切片,光镜下观察比较LASIK术后两组动物角膜各层细胞结构的变化。另一半切成长约

3~4 mm、宽约 1 mm 小组织块,置于 4% 戊二醛固定液中固定 2 h(4 ℃),经乙醇、丙酮梯度脱水等处理后行透射电镜观察并拍照,对角膜上皮细胞微绒毛的平均密度进行计数。

1.5 统计学分析

SPSS 18.0 软件对数据进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,对 mNGF 组和 NC 组组间比较 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜知觉的检查

术前 mNGF 组和 NC 组动物角膜知觉测量数值差异无统计学意义($P > 0.05$),术后 1 周、2 周、1 月、3 月和 6 月时,mNGF 组动物角膜知觉恢复明显快于 NC 组动物,两组检测数值差异有统计学意义($P < 0.05$),术后 1 d 两组该指标差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 LASIK 术前术后两组动物角膜知觉比较(mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	mNGF 组	NC 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
术前	36	60.84 ± 1.57	60.89 ± 4.03	0.07	0.948
1 d	36	8.07 ± 0.94	8.02 ± 0.36	0.298	0.767
1 周	30	14.89 ± 1.48	16.13 ± 1.48	3.245	0.002
2 周	24	17.22 ± 1.36	14.46 ± 1.33	7.108	<0.001
1 月	18	23.17 ± 1.81	20.05 ± 1.97	4.948	<0.001
3 月	12	34.02 ± 0.94	27.93 ± 2.12	9.097	<0.001
6 月	6	55.07 ± 0.83	46.63 ± 0.89	16.988	<0.001

2.2 泪液分泌量检查

术前两组动物泪液分泌量无显著差异($P > 0.05$),LASIK 术后术后 1 周、2 周、1 月、3 月和 6 月时,mNGF 组兔眼 Schirmer I 试验检查值均高于 NC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 LASIK 术前术后两组动物泪液分泌量比较(mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	mNGF 组	NC 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
术前	36	17.82 ± 0.26	17.76 ± 0.41	0.51	0.609
1 d	36	7.30 ± 0.18	7.20 ± 0.16	1.13	0.263
1 周	30	8.51 ± 0.43	8.15 ± 0.13	4.30	<0.001
2 周	24	11.84 ± 0.68	11.03 ± 0.16	5.71	<0.001
1 月	18	14.39 ± 0.43	12.74 ± 0.15	15.31	<0.001
3 月	12	15.39 ± 0.54	13.34 ± 0.49	9.67	<0.001
6 月	6	16.40 ± 0.80	15.54 ± 0.28	2.51	0.031

2.3 泪膜破裂时间(BUT)

术前 mNGF 组和 NC 组动物的 BUT 检测数值差异无统计学意义($P > 0.05$)。LASIK 术后 1 d、1 周、

2 周、1 月、3 月和 6 月时,mNGF 组动物 BUT 试验所测数据均高于 NC 组,两组试验数据差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 3。

表 3 LASIK 术前术后两组 BUT 比较($s, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	mNGF 组	NC 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
术前	36	17.19 ± 0.19	17.11 ± 0.34	1.21	0.231
1 d	36	7.21 ± 0.14	6.84 ± 0.41	4.79	<0.001
1 周	30	7.60 ± 0.27	7.32 ± 0.26	4.11	<0.001
2 周	24	9.51 ± 0.28	8.38 ± 0.30	13.40	<0.001
1 月	18	11.97 ± 0.30	10.55 ± 0.44	11.30	<0.001
3 月	12	14.19 ± 0.28	11.90 ± 0.31	18.89	<0.001
6 月	6	15.77 ± 0.27	14.35 ± 0.16	11.06	<0.001

2.4 泪液中细胞因子检测

术前两组动物泪液中 TNF- α 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。LASIK 术后术后 1 d、1 周、2 周和 1 月时,mNGF 组动物泪液中 TNF- α 含量均低于 NC 组,两组动物泪液中 TNF- α 含量差异有统计学意义($P < 0.001$);术后 3 月和 6 月时,两组试验数据差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 LASIK 术前术后两组 TNF- α 比较($ng/L, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	mNGF 组	NC 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
术前	36	11.09 ± 0.42	11.03 ± 0.41	0.65	0.519
1 d	36	12.16 ± 0.22	12.94 ± 0.30	13.69	<0.001
1 周	30	12.99 ± 0.29	17.16 ± 0.26	58.32	<0.001
2 周	24	13.36 ± 0.49	16.29 ± 0.25	26.19	<0.001
1 月	18	12.01 ± 0.24	12.59 ± 0.46	4.75	<0.001
3 月	12	11.15 ± 0.20	11.30 ± 0.19	1.86	0.077
6 月	6	10.84 ± 0.14	10.97 ± 0.17	1.44	0.181

术前 mNGF 组和 NC 组兔泪液中 IL-2 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)术后 1 d、1 周、2 周、1 月、3 月和 6 月时,mNGF 组动物泪液中 IL-2 含量均高于 NC 组动物,两组试验数据差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 LASIK 术前术后两组 IL-2 比较($ng/L, \bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	mNGF 组	NC 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
术前	36	15.84 ± 0.41	15.87 ± 0.37	3.77	0.708
1 d	36	9.89 ± 0.17	6.19 ± 0.33	40.72	<0.001
1 周	30	11.58 ± 0.25	8.14 ± 0.23	55.46	<0.001
2 周	24	12.93 ± 0.32	9.35 ± 0.27	41.75	<0.001
1 月	18	13.49 ± 0.27	11.53 ± 0.47	15.44	<0.001
3 月	12	14.49 ± 0.26	14.00 ± 0.20	5.16	<0.001
6 月	6	15.73 ± 0.50	14.97 ± 0.19	3.45	0.006

术前两组动物泪液中 NGF 含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。LASIK 术后 1 d、1 周、2 周、1 月、3 月和 6 月时,两组兔泪液中 NGF 含量检测数据差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 6。

表 6 LASIK 术前术后两组 NGF 比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	mNGF 组	NC 组	t 值	P 值
术前	36	47.19 ± 1.24	47.82 ± 3.80	7.80	0.438
1 d	36	95.59 ± 1.75	87.88 ± 3.40	12.64	<0.001
1 周	30	195.07 ± 2.59	149.49 ± 6.23	36.99	<0.001
2 周	24	203.77 ± 6.14	157.41 ± 3.11	33.01	<0.001
1 月	18	181.60 ± 2.56	166.20 ± 2.68	17.66	<0.001
3 月	12	101.22 ± 4.20	88.57 ± 3.25	8.25	<0.001
6 月	6	76.34 ± 2.44	53.93 ± 2.66	15.22	<0.001

2.5 角膜上皮细胞微绒毛密度比较

术前两组动物角膜上皮细胞微绒毛密度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。术后 1 周、2 周和 6 月时, 两组兔角膜表面微绒毛数量均逐渐增加, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 7 和图 1。

表 7 LASIK 术后两组角膜上皮细胞微绒毛密度比较 (个/mm², $\bar{x} \pm s$)

组别	n	mNGF 组	NC 组	F 值	t 值	P 值
术前	6	5.81 ± 0.12	5.81 ± 0.12			
1 d	6	3.83 ± 0.62	3.09 ± 0.14	9.28	2.81	0.018
1 周	6	5.16 ± 0.17	4.14 ± 0.10	1.02	13.05	<0.01
2 周	6	5.41 ± 0.14	5.00 ± 0.08	1.12	6.34	<0.01
6 月	6	5.63 ± 0.11	5.47 ± 0.13	0.24	2.27	0.048

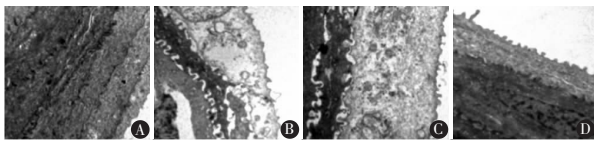


图 1 透射电镜下 mNGF 组角膜上皮细胞微绒毛结构 (×15 000)

A. 术后 1 d, 眼角膜表面微绒毛密度降低; B. 术后 1 周, 眼角膜表面微绒毛密度增加; C. 术后 2 周, 眼角膜表面微绒毛密度增加; D. 术后 6 月, 眼角膜表面微绒毛密度几乎接近正常, 角膜基质细胞整齐排列, 未发现空泡现象。

3 讨论

LASIK 是屈光手术中应用广泛的近视矫正手术之一, 具有损伤小、反应轻、术后恢复快等优点, 是目前主流的屈光矫治手术。但其在使屈光不正患者获得良好裸眼视力的同时, 同样不可避免的存在着神经营养性角膜上皮病变、上皮损伤、角膜知觉降低、干眼症等手术并发症。干眼症和角膜知觉降低是 LASIK 术后常见的并发症, 主要表现为眼部干涩、异物感、烧灼感、眼痒、视物不清、角膜知觉下降等。引起干眼症和角膜知觉较低的原因主要包括角膜神经损伤、角膜上皮损伤、眼表微环境改变等。角膜透明无血管, 但含有丰富的神经纤维。角膜的营养与代谢和其神经支配有着密切的联系。因此, 促进 LASIK

术后神经修复是减少 LASIK 术后不良反应的关键。

NGF 是一种对中枢和周围神经系统末梢的再生有重要调节作用的小分子多肽类促细胞分裂因子, 作为最重要的神经营养因子, NGF 具有调节神经细胞和非神经源性细胞增殖分化的作用, 已在其他角膜神经损伤性疾病中得到广泛研究^[13]。mNGF 是由鼠身上提取的最典型、研究最多的一种外源性的 NGF, 被发现能够加强角膜上皮细胞增殖, 促进角膜缘干细胞增殖、分化, 促进神经再生等作用^[14-15]。本研究从角膜知觉、泪液分泌量、BUT、NGF、新生神经纤维数量、上皮细胞微绒毛密度和 HE 染色结果等分析 mNGF 对 LASIK 术后角膜知觉恢复和角膜神经修复的影响。研究发现, 术后 mNGF 组和 NC 组兔眼角膜知觉、泪液分泌量、BUT、新生神经纤维数量和上皮细胞微绒毛密度较术前显著降低, 随着时间推移, 两组动物角膜知觉均逐渐恢复, 且 mNGF 组恢复速度快于 NC 组, 但直到术后 6 月均未恢复到术前水平, 可能原因是 LASIK 术可引起角膜神经损伤和减少, 角膜神经的减少直接导致了角膜知觉的下降, NGF 能够加强角膜上皮细胞增殖, 促进角膜缘干细胞增殖、分化, 促进神经再生等作用, 因此 mNGF 组动物角膜知觉恢复明显快于 NC 组动物。两组兔泪液中 NGF 含量术后 1 d 至 2 周呈上升趋势, 2 周至 6 月呈下降趋势, mNGF 组泪液中 NGF 含量明显高于 NC 组。HE 染色结果显示, 术后第 1 d、1 周和 2 周时, mNGF 组角膜各层结构破坏明显, 上皮细胞排列不整齐, 均有一定程度的凋亡、坏死情况, 部分细胞核不清晰, 术后 6 月时, NGF 组和 NC 组兔角膜各层结构正常与正常角膜无明显差异, 上皮细胞排列整齐、无增生、坏死及凋亡情况, 细胞核清晰可见; 整个过程中 mNGF 组角膜修复效果均好于 NC 组。

另外, 有学者认为眼表面的炎症反应是影响干眼 LASIK 术后眼干症状的重要因素之一。LASIK 术后伤口愈合是一系列细胞因子相互协调完成的, 研究表明干眼症患者泪液中含有 TNF- α 浓度与角膜上皮受损成正相关^[16-17]。白细胞介素是多种细胞可以产生的、能够作用于多种细胞的一类细胞因子, 参与了免疫细胞的增殖、分化等, 且与多种眼部功能相关。本研究通过对泪液中 TNF- α 和 IL-2 含量检测发现, mNGF 组和 NC 组术后 2 周内 TNF- α 含量呈上升趋势, 2 周至 6 月逐渐降低, mNGF 组 TNF- α 含量上升趋势低于 NC 组。术后 mNGF 组 IL-2 含量均低于 NC 组, 说明 mNGF 组炎症反应较小。

(下转第 602 页)