

激光消融对角膜细胞的影响

蓝之琳 王康孙

(上海第二医科大学附属瑞金医院眼科, 上海 200025)

摘要 本文用计算机图像定量分析 308 nm 准分子, 193 nm 准分子和 2.94 μm Er: YAG 激光分别照射角膜后, 角膜上皮细胞和内皮细胞的形态变化。结果表明: 308 nm 激光对角膜上皮细胞有明显损伤; 193 nm 对再生的上皮细胞无明显影响, 而 2.94 μm 对上皮细胞无影响。但若使用 2.94 μm 激光能量密度过高或切削过深, 则对内皮细胞有影响。

关键词 激光, 消融, 角膜细胞

Corneal cell reactions to laser ablation

LAN Zhilin, WANG Kangsun

(Shanghai Ruijing Hospital Ophthalmology Department, Shanghai 200025)

Abstract Different wavelength lasers (308 nm, 193 nm and 2.94 μm) were used to irradiate cornea. Morphological changes of epithelial and endothelial cells were observed by quantitative image analysis. It was found that epithelial cells of cornea irradiated by 308 nm excimer laser have apparent changes in nuclear area and morphology. The epithelial cells regenerated after 193 nm laser irradiation have no obvious change. After 2.94 μm laser irradiation, no change in nuclear morphology and area was observed. But it was harmful to endothelial cells, if energy density or ablating depth was excessive.

Key words corneal cell, laser, ablation

1 引言

以改变角膜曲率来治疗近视眼的手术疗法正方兴未艾。但是目前用钻石刀做的角膜放射状切开手术有其不可避免的缺点: 切口愈合缓慢, 切口均匀度及深度不易掌握, 为此无法预测所要矫正的屈光度, 且容易发生角膜穿孔, 并有感染的可能。自从八十年代初 Trokel 等用准分子激光进行动物实验做角膜手术, 可部分或全部矫正屈光不正^[1]以来, 激光做角膜手术已成为近视眼治疗的一个新手段。其优点在于切口均匀, 热损伤轻微, 深度易于掌握等。但是准分子激光是强烈的紫外光源, 具有致畸、致突、致癌的可能。因此选择更为安全的激光波段做角膜手术便成为一个重要的研究课题。最近国际上开始重视中红外激光, 它被组织的水份吸收, 主要

产生热效应,切割组织可达理想深度,看来是很有发展前途的激光波段^[2,3]。

但是 Er : YAG 激光和 ArF 准分子激光照射角膜后,角膜的上皮细胞及内皮细胞是否受到影响? 本文就此问题从图像分析来进行系统的定量研究。

2 材料和方法

第一组: 取体重约 4 kg 的新西兰白兔 7 只(11 只眼), 其中 1 只眼作为正常对照, 另 10 只眼随机分为三组, 保留角膜上皮, 分别受 308 nm 准分子激光和 2.94 μm 激光散在点状照射角膜。

308 nm 准分子激光的能量密度为 223~235 mJ/cm^2 , 脉宽为 20 ns, 光斑面积为 $0.13 \times 0.33 \text{ cm}^2$, 照射脉冲次数为 40 个。

2.94 μm Er : YAG 激光的能量密度为 600~1000 mJ/cm^2 , 脉宽为 200 μs , 光斑面积为 $0.1 \times 0.2 \text{ cm}^2$, 照射脉冲次数为 40 个。

均分别于激光照射后立即、6、12、24 h 及 1 周, 将兔子用戊巴比妥钠全身麻醉后, 用玻璃片刮下角膜上皮, 制成角膜上皮细胞涂片, 经无水酒精、乙醚和冰醋酸等量混合液固定 10 min, 用 HE(Hematoxylin-Eosin) 方法染色。然后将涂片通过显微分光光度计, 摄入全自动图像分析系统, 进行细胞核浆比 (N/C) 及细胞核形态指数 (SF) 的计算机图像定量分析测定。考虑到受辐射后的细胞变化主要在细胞核, 因此我们着重分析细胞核的形态变化。

第二组: 新西兰白兔 14 只, 其中 1 只作为正常对照, 另 13 只随机分为二组, 均在地卡因表面麻醉下刮除角膜上皮, 固定头部, 再分别用 193 nm 激光和 2.94 μm 激光直接照射角膜中央部位。

193 nm 准分子激光的能量密度为 583~667 mJ/cm^2 , 脉宽为 30 ns, 光斑面积为 $0.3 \times 0.4 \text{ cm}^2$, 照射脉冲次数为 360 个。

2.94 μm Er : YAG 激光的能量密度为 1250~1960 mJ/cm^2 , 脉宽为 150 μs , 光斑面积为 $0.45 \times 0.4 \text{ cm}^2$, 照射脉冲次数为 60 或 120 个。

均分别于照射后 3 天、1 周及 1 月将白兔全身麻醉后, 剪下角膜, 制成上皮细胞印片, 再进行计算机图像定量分析。印片的固定和染色方法及图像分析方法同第一组。

另外再将二组分别于照射后立即, 24 h、3 d、20 d、1 月、3 月、4 月和半年, 将白兔用戊巴比妥钠全身麻醉后, 摘除一只眼球, 剪下角膜, 立即用 2% 戊二醛固定, 制成扫描电镜标本, 然后在扫描电镜下观察角膜内皮细胞, 对中央照射部位进行摄影。将照片摄入全自动图像分析系统, 对内皮细胞的面积, 形态指数及细胞长、短轴之比进行计算机图像定量分析测定。

3 结 果

3.1 角膜上皮细胞的图像定量分析

第一组: 光镜下可见 2.94 μm Er : YAG 激光组在照射后立即有少量细胞核破裂, 其余无明显变化。照射后 6 h 细胞核略增大, 12 h 后细胞基本恢复正常形态(图 1)。而 308 nm 准分子激光组变化较明显, 照射后立即有部分细胞核呈碎片, 部分细胞核肿胀、增大、变形, 并有空泡出现。照射后 6 h 核仍肿胀、变形, 术后 12 h 核增大更为明显, 形态不规则, 边缘不光滑, 有空泡。24 h 后肉眼观察形态基本恢复正常(图 2)。

图像分析结果基本证实了肉眼所见, 但 308 nm 准分子激光组在照射后 1 周核浆比与核

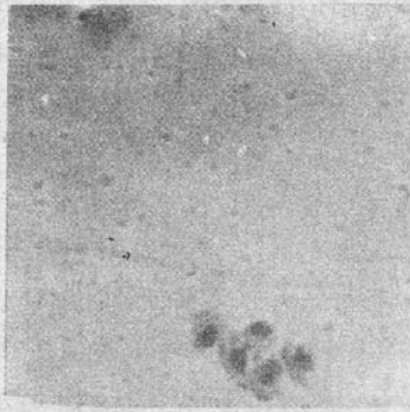


Fig. 1 The smear of corneal epithelial cell after 2.94 μm Er : YAG laser irradiation. The nuclear morphology and area are normal

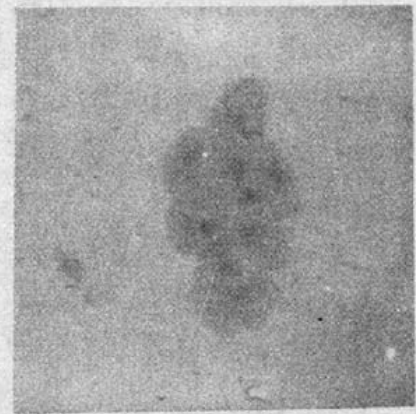


Fig. 2 The smear of corneal epithelial cell after 308 nm excimer laser irradiation. The swollen nuclei displays various shape, like horseshoe and rectangle

形态指数均未恢复正常,统计学结果与正常细胞对照仍有显著差异(表 1~4)。308 nm 准分子激光组与 2.94 μm Er : YAG 激光照射后的细胞恢复过程明显不同(图 3,4)。

Table 1 The changes of nuclear ratio of the epithelial cells after 2.94 μm laser irradiation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	0.1196 \pm 0.0185	
<15'	0.1240 \pm 0.0275	$P > 0.05$
6 h	0.1483 \pm 0.0258	$P < 0.01$
12 h	0.1368 \pm 0.0270	$P < 0.05$
24 h	0.1231 \pm 0.0276	$P > 0.05$
1 周	0.1177 \pm 0.0246	$P > 0.05$

Table 2 The changes of nuclear ratio of the epithelial cells after 308 nm laser irradiation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	0.1196 \pm 0.0185	
<15'	0.13650 \pm 0.0238	$P > 0.05$
6 h	0.1696 \pm 0.0404	$P < 0.01$
12 h	0.1799 \pm 0.0383	$P < 0.01$
24 h	0.1526 \pm 0.0286	$P > 0.01$
1 周	0.1324 \pm 0.0273	$P < 0.05$

Table 3 The changes of nuclear shape figure of the epithelial cells after 2.94 μm laser irradiation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	1.3050 \pm 0.1192	
<15'	1.3103 \pm 0.1684	$P > 0.05$
6 h	1.4177 \pm 0.2182	$P < 0.05$
12 h	1.3465 \pm 0.1370	$P > 0.05$
24 h	1.3051 \pm 0.08836	$P > 0.05$
1 周	1.2996 \pm 0.1284	$P > 0.05$

Table 4 The changes of nuclear shape figure of the epithelial cells after 308 nm laser irradiation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	1.3050 \pm 0.1192	
<15'	1.6698 \pm 0.3859	$P < 0.01$
6 h	1.5577 \pm 0.3692	$P < 0.01$
12 h	1.7386 \pm 0.4819	$P < 0.01$
24 h	1.5022 \pm 0.1980	$P < 0.01$
1 周	1.3890 \pm 0.1812	$P < 0.05$

以上结果表明,308 nm 准分子激光对角膜上皮细胞核损伤较大,且恢复缓慢,而 2.94 μm Er : YAG 激光则对细胞无明显影响。

第二组:光镜下的观察及图像定量分析结果表明,193 nm 准分子激光和 2.94 μm Er : YAG 激光对再生后的角膜上皮细胞均无明显影响(图 5,6,表 5~8)。

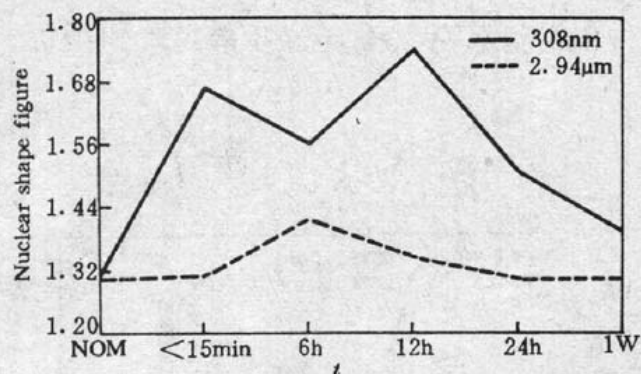


Fig. 3 Contrast of the ratio of nuclei to cell after 308 nm and 2.94 μm laser irradiation

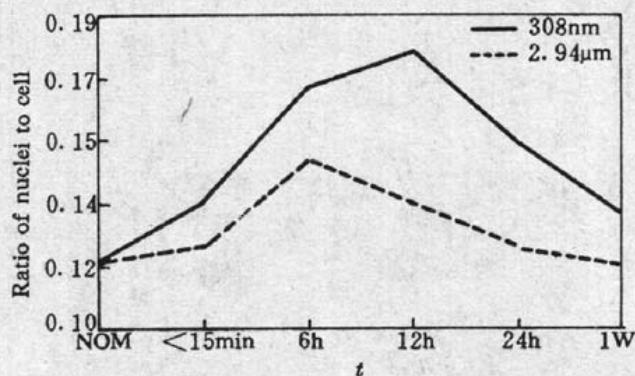


Fig. 4 Contrast of nuclear shape figure after 308 nm and 2.94 μm laser irradiation

3.2 角膜内皮细胞的图像定量分析

将扫描电镜观察下所摄内皮细胞照片用计算机图像定量分析测定细胞的面积、形态指数及长短轴之比。经 2.94 μm Er : YAG 激光高能量密度(1960 mJ/cm²)照射 60 个脉冲和低能量密度(1250 mJ/cm²)照射 120 个脉冲的内皮细胞,在照射后 3 个月和 4 个月的面积均见增大,如图 7 (a) 所示,与正常细胞相比 ($H < 0.01$) 有显著差异。而 Er : YAG 激光低能量密度照射 60 个脉冲和 193 nm 准分子激光照射后的内皮细胞面积则无明显变化,如图 7 (b)、图 8 所示,与正常细胞相比, $P > 0.05$ (图 9)。

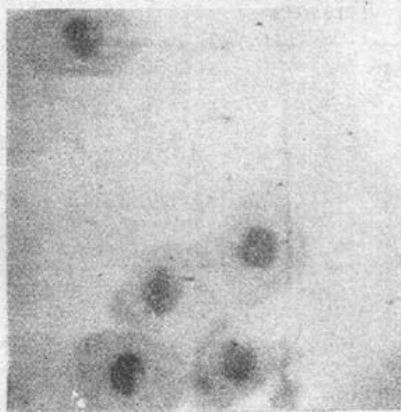


Fig. 5 The print of regenerated corneal epithelial cell after 2.94 μm laser ablation. The nuclear morphology is normal

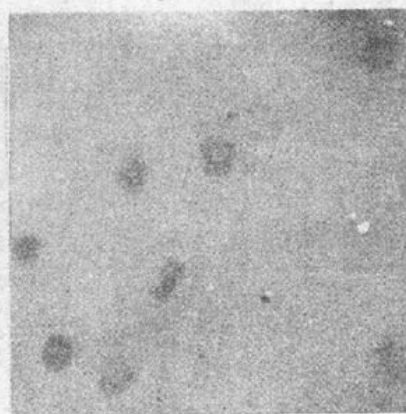


Fig. 6 The print of regenerated corneal epithelial cell after 193 nm laser ablation. The nuclear morphology is normal

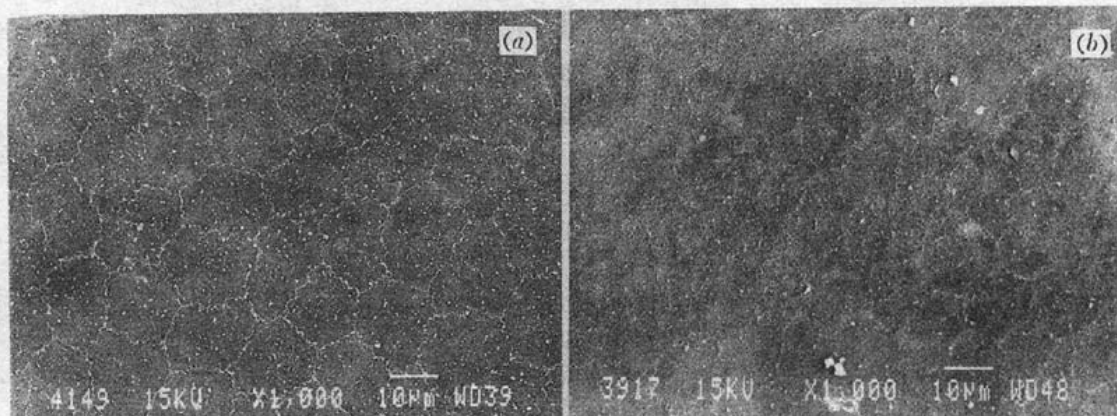


Fig. 7 (a) 4-month-endothelial cell after 60 pulses ablation by Er : YAG laser in high energy density
(b) 3-month-endothelial cell after 60 pulses ablation by Er : YAG laser in lower energy density

另外,激光切削角膜后 3 d 左右可有暂时性的内皮细胞水肿,微绒毛减少等现象(图 10)。但术后 1 月便恢复正常。

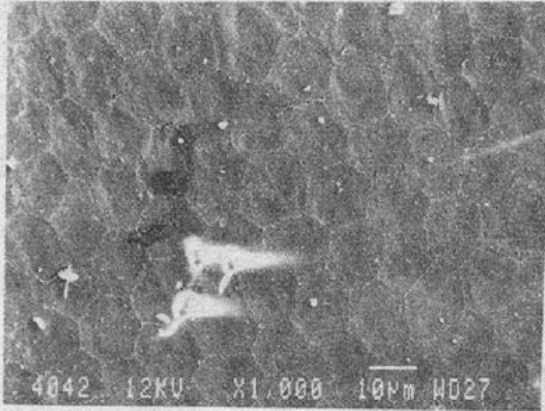


Fig. 8 3-month-endothelial cell after 193 nm laser ablation

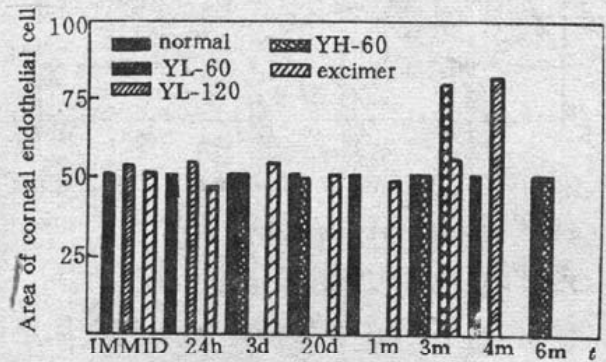


Fig. 9 Area change of corneal endothelial cell after laser ablation

Table 5 The changes of nuclear ratio of the epithelial cells after 2.94 μm laser ablation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	0.1869 \pm 0.0578	
3d	0.1727 \pm 0.0525	$P > 0.05$
1 周	0.1646 \pm 0.0562	$P > 0.05$
1 月	0.1943 \pm 0.0751	$P > 0.05$

Table 6 The changes of nuclear ratio of the epithelial cells after 139 nm laser ablation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	0.1869 \pm 0.0578	
3 d	0.2009 \pm 0.0607	$P > 0.05$
1 周	0.1881 \pm 0.0772	$P > 0.05$
1 月	0.1608 \pm 0.0782	$P > 0.05$

Table 7 The changes of nuclear shape figure of the epithelial cells after 2.94 μm laser ablation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	0.8416 \pm 0.0859	
3 d	0.8146 \pm 0.0861	$P > 0.05$
1 周	0.8368 \pm 0.0962	$P > 0.05$
1 月	0.8028 \pm 0.0755	$P > 0.05$

Table 8 The changes of nuclear shape figure of the epithelial cells after 193 nm laser ablation

Time	N/C	P (t-test)
non-irradiated	0.8417 \pm 0.0859	
3 d	0.8323 \pm 0.0981	$P > 0.05$
1 周	0.7906 \pm 0.0934	$P > 0.05$
1 月	0.8549 \pm 0.0614	$P > 0.05$

至于内皮细胞的形态指数均在 0.7~0.8 范围内,长轴与短轴之比均在 1.3~1.4 范围内。与正常细胞对照, $P > 0.05$,无显著差异。

4 讨 论

4.1 不同激光波长对细胞核结构的影响

辐射的生物效应是与生物机体组织的吸收和辐射能量相联系的^[4]。308 nm 紫外激光由生物大分子(主要是 DNA 分子)所吸收^[5],可使 DNA 分子中的特殊化学键断裂,改变分子的内部结构^[6]。2.94 μm 中红外激光则由组织中的水分子吸收,因此不会引起分子结构的改

变^[2,3]。

本实验的结果也间接地证实了这一点。308 nm 准分子激光照射后,对细胞核的损伤很大。而 2.94 μm 激光照射后细胞核变化不大,且很快恢复正常。对于在激光照射前刮除角膜上皮细胞的角膜,虽然受到 193 nm 紫外激光的照射,由于再生的上皮细胞未受到紫外光的辐射,因此对细胞核的面积及形态无明显影响。

据此,我们认为在角膜手术中,或者采用中红外激光,或者先将角膜上皮层去除,再进行激光照射,这样可以大大降低细胞畸变、突变的可能性。

4.2 不同波长激光对细胞周期的影响

一方面紫外激光照射后引起 DNA 结构改变(如前述),以及核膜肿胀、折叠^[7],上皮细胞 DNA 在 12 h 开始出现 4 倍体^[8]。另一方面受到紫外辐射的细胞,其细胞周期中的各期均受到不同程度的抑制和阻断,使细胞周期延长^[9]。在形态上则表现为 N/C 与 SF 在 12 h 时均达到高峰,随后才缓慢地恢复正常。

而 2.94 μm 中红外激光为水分子吸收,仅引起热效应,因此照射后上皮细胞很快开始进行损伤修复,有丝分裂,6 h 时达到高峰,24 h 内修复完成。此与正常的上皮损伤修复过程一致。

4.3 激光照射方法对角膜内皮细胞的影响

本实验中,用 Er:YAG 激光能量密度过高(1960 mJ/cm^2 ,照射 60 个脉冲),或切削过深(1250 mJ/cm^2 照射 120 个脉冲)(深度可达 50~64%的角膜厚度^[10]),均可造成内皮细胞损害,表现为术后 3~4 个月细胞面积增大。但用 1250 mJ/cm^2 照射 60 个脉冲,即切削深度明显为浅,则对内皮细胞无明显影响。我们认为在临床应用中切削深度仅在角膜厚度的 10%左右,因此对内皮细胞不会有损害。

综上所述,选择适当的能量密度及照射次数是极其重要的,这样既能有效地进行切削,又能减少对角膜内皮的扰乱,从而取得理想的矫正屈光度效果,并保持角膜的透明性。

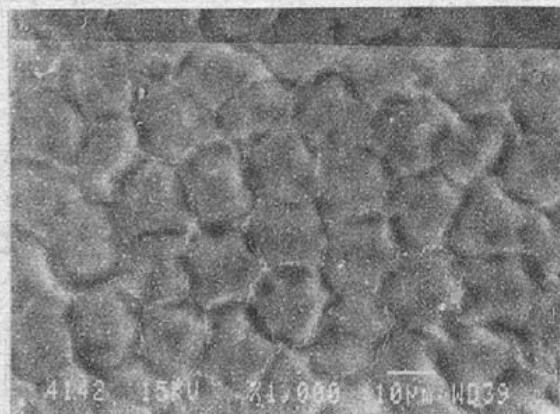


Fig. 10 After 3 days by laser ablation, endothelial cells have temporary edema and decrease of microvilli

参 考 文 献

- 1 Trokel S, Srimiraasan R. , *Am. J. Ophthalmol.* , **96**, 710~715(1983)
- 2 Peyman G. A. , Badaro R. M. *et al.* , *Ophthalmology* , **96**, 1160~1170(1989)
- 3 Stern D. , Puliatito C. A. *et al.* , *Ophthalmology* , **95**, 1434~1441(1988)
- 4 K. I. 奥尔特曼 等著,葛忠粮 等译,辐射生物化学,第一卷 细胞,原子能出版社,1980,33
- 5 夏寿萱,高凤鸣 *et al.* ,辐射生物学,朱壬葆 等主编,科学出版社,1987,105~165
- 6 Puliafito C. A. *et al.* , *Ophthalmology* , **92**, 741(1985)
- 7 夏寿萱 *et al.* ,辐射生物学,朱壬葆 等主编,科学出版社,1987,215
- 8 王康孙 *et al.* ,上海第二医科大学学报, **11**(3), 227(1991)
- 9 夏寿萱 *et al.* ,辐射生物学,朱壬葆 等主编,科学出版社,1987,207~246
- 10 王康孙 *et al.* ,中国激光医学杂志,(待发表)