

# 去瓣与留瓣机械法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术后泪液炎症因子的比较

张钰 陈跃国 夏英杰 齐虹

**【摘要】** 目的 研究去瓣机械法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术(Epi-LASIK)眼与留瓣 Epi-LASIK 眼术后泪液中炎症因子释放率及临床结果的差异,并探讨导致差异的可能原因。方法 前瞻性随机双盲对照研究。18 名近视患者纳入本研究,一眼接受去瓣 Epi-LASIK(去瓣组),对侧眼接受传统 Epi-LASIK(留瓣组)。术前、术后 2 h、术后 1 d、术后 5 d 分别收集每只眼的泪液。采用多通道免疫微珠分析测定泪液中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 及肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) 的浓度,并以浓度乘上泪液流量计算炎症因子的释放率。评估患者的裸眼视力、屈光状态、最佳矫正视力、角膜 haze 分级、角膜上皮愈合百分比。数据采用配对 *t* 检验、Wilcoxon 秩和检验及卡方检验进行比较。结果 与留瓣组相比,去瓣组在术后第 5 天裸眼视力更好( $t=-4.832, P<0.01$ ),角膜上皮愈合百分比更高( $Z=5.861, P<0.01$ );术后 1 个月角膜 haze 程度更轻( $U=6.045, P<0.05$ )。术前,2 组泪液中各个炎症因子的释放率差异均无统计学意义;术后 2 h,去瓣组泪液中 IL-8 和 TNF $\alpha$  的平均释放率显著低于留瓣组( $Z=-1.965, -2.145, P<0.05$ ),术后 1 d 和 5 d 2 组泪液炎症因子差异无统计学意义。结论 去瓣 Epi-LASIK 术后角膜上皮愈合及视力恢复更快,角膜 haze 程度更轻。去瓣组术后 2 h 泪液 IL-8 和 TNF $\alpha$  释放率较低可能是 2 组存在临床差异的原因之一。

**【关键词】** 角膜磨镶术,激光原位; 近视; 炎症因子; 泪液

**Comparison of inflammatory cytokines in tears when off-flap and on-flap Epi-LASIK are used**  
ZHANG Yu, CHEN Yue-guo, XIA Ying-jie, QI Hong. Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Corresponding author: CHEN Yue-guo, Email: chenyeuguo@263.net

**【Abstract】 Objective** To compare the release rate of inflammatory cytokines in tears and the clinical outcomes for off-flap epi-LASIK eyes and the contralateral on-flap Epi-LASIK eyes; to explore the possible mechanisms for the clinical differences. **Methods** This prospective and randomized study enrolled 18 myopic patients who underwent off-flap Epi-LASIK in one eye (off-flap group) and on-flap Epi-LASIK in the contralateral eye (on-flap group). Tears were collected from each eye preoperatively and 2 hours, 1 day and 5 days postoperatively. Concentrations of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) were measured by a multiplex immunobead assay. The release rate (tear fluid flow-corrected concentration) was calculated by multiplying the concentration by tear fluid flow. Uncorrected visual acuity (UCVA), refraction, best-corrected visual acuity, haze score, and percentage of corneal epithelial healing were also evaluated. Data were analyzed using a paired *t* test, Wilcoxon rank sum test, and a chi-square test. **Results** Compared with the on-flap group, the off-flap group had better UCVA outcomes ( $t=-4.832, P<0.01$ ) and higher percentages of epithelial healing ( $Z=5.861, P<0.01$ ) at 5 days after surgery, and lower levels of haze at 1 month after surgery ( $U=6.045, P<0.05$ ). Preoperatively, there were no significant differences in the release rate of all tear cytokines between the two groups. At 2 hours postoperatively, the mean release rates of IL-8 and TNF $\alpha$  in the off-flap group were significantly lower than those in the on-flap group ( $Z=-1.965, -2.145, P<0.05$ ). On postoperative days 1 and 5, no significant differences were observed in the release rate of all cytokines between the 2 groups. **Conclusion** Off-flap Epi-LASIK offers faster corneal epithelial healing and visual recovery, and temporarily less haze than from on-flap Epi-LASIK. The lower tear levels of IL-8 and TNF $\alpha$  in the off-flap group 2 hours after surgery may suggest a possible mechanism for the clinical differences.

**【Key words】** Keratomileusis, laser in situ; Myopia; Inflammatory cytokine; Tear

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-845X.2013.11.008

基金项目:国家自然科学基金(30872813)

作者单位:100191 北京大学第三医院

通信作者:陈跃国, Email: chenyeuguo@263.net

2003 年 Pallikaris 等<sup>[1]</sup>首次报道了机械法准分子激光上皮瓣下角膜磨镶术 (epipolis laser in-situ keratomileusis, Epi-LASIK)。Epi-LASIK 是一种改良的准分子激光表层切削手术,它可安全、有效地治疗近视<sup>[2]</sup>。术中利用微型角膜上皮刀钝性分离制作角膜上皮瓣,完成准分子激光切削后再将角膜上皮瓣复位。理论上,保留的角膜上皮瓣可作为生物屏障,阻止各种炎症因子作用于切削后的角膜基质。但近年国内外报道显示,新型去瓣 Epi-LASIK 与传统(留瓣)Epi-LASIK 相比,具有术后角膜上皮愈合快,视力恢复快,术后刺激症状及角膜雾状混浊(haze)相仿或更轻的特点<sup>[3-7]</sup>。目前,没有研究解释去除上皮瓣会导致临床差异的原因。

许多炎症因子参与角膜创伤愈合过程<sup>[8]</sup>。泪液中的炎症因子来自泪腺、角结膜上皮细胞及血管,其可对角膜上皮及基质细胞的愈合反应产生影响。研究去瓣与留瓣 Epi-LASIK 术后泪液中炎症因子释放率的差异可为其临床差异提供线索。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

18 例近视患者纳入此研究,其中男 2 例,女 16 例,年龄 19~36 岁,平均(27±5)岁。纳入标准:近视等效球镜度<-8 D;年龄>18 岁;屈光状态稳定 2 年以上。排除标准:屈光参差大于 2 D;眼部或全身疾病史;既往屈光手术史;睑裂小。依据投掷硬币法,随机选择患者的 1 只眼进行去瓣 Epi-LASIK(去瓣组),对侧眼进行留瓣 Epi-LASIK(留瓣组)。2 组患者术前等效球镜度、角膜厚度及切削深度差异无统计学意义(见表 1)。所有患者均被告知研究的目的是和内容,并签署知情同意书,患者本人不了解手术分组情况。

### 1.2 方法

1.2.1 手术方法 手术均由同一医师完成。利用自动角膜上皮剥离器(法国 Moria 公司)制作完整的上皮瓣。采用鹰视准分子激光机(Allegretto Eye-Q,德国 WaveLight 公司)进行角膜切削,光学区直径 6.0 mm 或 6.5 mm。根据切削深度,用 0.02%丝裂霉素棉片贴敷角膜基质床 10~40 s(双眼时间一致),用 10 ml 以上平衡盐液冲洗。一眼角膜上皮瓣完全复位(留瓣);

另一眼用平镊去除角膜上皮瓣(去瓣)。戴-0.50 D 软性角膜接触镜(Acuvue,美国强生公司),滴 0.1%妥布霉素地塞米松滴眼液(美国爱尔康公司)1 次。

1.2.2 泪液收集 术前,术后 2 h、1 d、5 d,由同一名不清楚分组情况的医生,利用 10 μl 毛细微量吸管(美国 Drummond 公司)从患者每只眼的下泪沟处吸取 10 μl 泪液,并记录收集泪液的时间。泪液标本 160 g 离心 10 min,上清液置于-80℃冰箱保存。泪液流量(μl/min)=收集泪液总量/收集时间。

1.2.3 多通道免疫微珠分析 多通道免疫微珠分析利用不同颜色的微珠作为固体载体,可以在一份泪液标本中同时检测多种因子的浓度<sup>[9]</sup>。根据厂商的技术说明书,由一名不清楚分组情况的技术员对每份泪液标本进行白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、IL-6、IL-8 和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α, TNFα)浓度的测量。泪液标本与包被特异性抗体的微珠在 4℃条件下振荡孵育 18 h,洗涤后的微珠与生物素标记的抗人细胞因子抗体于 20℃下孵 1 h,再与抗生物素-藻红蛋白孵育 30 min。采用 Luminex 200™(美国 Luminex 公司)分析标本,通过已知蛋白的标准曲线得到多种细胞因子的浓度(pg/ml)。泪液流量矫正的泪液细胞因子浓度,即细胞因子释放率(pg/min)=标本中细胞因子浓度(pg/ml)×泪液流量(μl/min)/1000。

### 1.3 术后用药及随访

术后第 1 天开始用 1%左氧氟沙星眼药水(日本参天公司)和 0.1%氟米龙眼药水(美国艾尔健公司),每日 4 次。0.1%氟米龙眼药水每月递减 1 次,共用药 4 个月。术后 2 h、1 d、5 d、1 个月、3 个月,由同一名不清楚分组情况的医生对患者进行检查和记录。术后第 5 天摘除接触镜后在裂隙灯下观测评价,以角膜上皮完全愈合的面积占角膜上皮瓣面积的百分比作为角膜上皮愈合百分比。术后 1、3 个月进行综合验光仪显然验光和裂隙灯下角膜 haze 分级。角膜 haze 分级按照混浊程度由轻到重分为 0~4 级<sup>[10]</sup>:0 级:角膜完全透明;0.5 级:裂隙灯下仔细检查可见的微量雾状混浊;1 级:裂隙灯下更明显的雾状混浊,不影响虹膜细节的观察;2 级:轻度影响虹膜细节的观察;3 级:中度影响虹膜和晶状体的观察;

表 1 去瓣 Epi-LASIK 组与留瓣 Epi-LASIK 组术前参数比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	眼数	等效球镜(D)	球镜(D)	柱镜(D)	中央角膜厚度(μm)	切削深度(μm)
去瓣组	18	-5.46±2.01	-5.02±1.65	-0.85±0.75	521.83±28.29	76.33±17.59
留瓣组	18	-5.57±2.04	-5.16±1.87	-0.90±0.84	521.83±29.03	77.33±21.69
<i>t</i> 值		0.506	0.485	0.491	0.000	-0.498
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

4 级;在切削区角膜基质完全混浊。

### 1.4 统计学方法

前瞻性随机双盲对照研究。应用 SPSS 13.0 统计软件分析数据。采用配对 *t* 检验(正态分布), Wilcoxon 秩和检验(非正态分布)及卡方检验比较 2 组手术前后的参数。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 视力及屈光度情况

术后第 5 天去瓣组的平均裸眼视力显著好于留瓣组,而术后 2 h、1 d 及 1 个月、3 个月时 2 组裸眼视力差异均无统计学意义(见表 2)。术后 1 个月、3 个月, 2 组等效球镜度、球镜度及柱镜度差异均无统计学意义(见表 3)。

### 2.2 角膜 haze 评分结果

术后 1 个月,去瓣组有 8 眼(0.5 级)出现 haze,留瓣组有 14 眼(11 眼 0.5 级;3 眼 1 级)出现 haze, 2 组差异均无统计学意义( $U=6.045, P < 0.05$ )。术后 3 个月,去瓣组有 6 眼(0.5 级)出现 haze,留瓣组有 7 眼(0.5 级)出现 haze, 2 组差异均无统计学意义( $U=0.120, P > 0.05$ )。

### 2.3 角膜上皮愈合情况

术后 5 d,去瓣组所有眼角膜上皮均完全愈合,而留瓣组仅 11 眼角膜上皮完全愈合,平均角膜上皮愈合百分比为  $90.56\% \pm 6.84\%$  ( $85\% \sim 100\%$ ), 2 组差异有统计学意义( $Z=5.861, P < 0.01$ )。留瓣组角膜上皮未愈合的 7 眼在术后 6~7 d 完全愈合。

### 2.4 泪液炎症因子检测结果

在手术前后所有眼的泪液样本中均可检测到 IL-6 和 IL-8。在 4 眼术前泪液样本及 2 眼术后泪液样本中未检测到  $TNF\alpha$ 。仅有 3 眼术后泪液样本中检测到 IL-1 $\beta$ 。与术前相比, 2 组术后 2 h 泪液中 IL-6、IL-8 和  $TNF\alpha$  的释放率显著增高, 术后 1 d 泪液中 IL-8 和  $TNF\alpha$  的释放率仍显著增高。术前 2 组泪液中 IL-6、IL-8 和  $TNF\alpha$  的释放率差异均无统计学意义。术后 2 h,去瓣组泪液中 IL-8 和  $TNF\alpha$  的释放率显著低于留瓣组。术后 1 d、5 d, 2 组泪液中 3 种炎症因子的释放率差异均无统计学意义(见表 4)。

## 3 讨论

在 Epi-LASIK 手术过程中,自动角膜上皮剥离器<sup>[1]</sup>、准分子激光切削及丝裂霉素(Mitomycin C, MMC)<sup>[7]</sup>等可损伤角膜上皮及基质细胞,从而启动细胞因子介导的一连串角膜愈合反应<sup>[8]</sup>。以往一些研

表 2 去瓣 Epi-LASIK 组与留瓣 Epi-LASIK 组术后裸眼视力的比较(logMAR,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	眼数	术后 2 h	术后 1 d	术后 5 d	术后 1 个月	术后 3 个月
去瓣组	18	0.14±0.23	0.17±0.15	0.14±0.18	0.01±0.05	-0.02±0.03
留瓣组	18	0.11±0.20	0.15±0.14	0.35±0.20	0.02±0.06	-0.04±0.06
<i>t</i> 值		0.917	0.334	-4.832	-0.862	0.912
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	<0.01	>0.05	>0.05

表 3 去瓣 Epi-LASIK 组与留瓣 Epi-LASIK 组术后屈光度的比较(D,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	眼数	术后 1 个月			术后 3 个月		
		等效球镜	球镜	柱镜	等效球镜	球镜	柱镜
去瓣组	18	-0.06±0.62	0.08±0.63	-0.38±0.57	-0.05±0.42	0.03±0.53	-0.15±0.51
留瓣组	18	-0.08±0.42	0.08±0.43	-0.42±0.61	-0.15±0.54	-0.05±0.35	-0.21±0.54
<i>t</i> 值		0.135	0.000	0.365	0.482	0.536	0.435
<i>P</i> 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 4 去瓣 Epi-LASIK 组与留瓣 Epi-LASIK 组泪液中炎症因子释放率的比较(pg/min,  $\bar{x} \pm s$ , 眼数均为 18)

组别	IL-6				IL-8				TNF $\alpha$			
	术前	术后 2 h	术后 1 d	术后 5 d	术前	术后 2 h	术后 1 d	术后 5 d	术前	术后 2 h	术后 1 d	术后 5 d
去瓣组	0.069±0.078	0.439±0.668	0.589±1.024	0.325±0.872	0.631±0.610	2.150±3.490	3.686±4.638	2.011±3.858	0.011±0.008	0.050±0.046	0.070±0.095	0.033±0.059
* <i>Z</i> 值		2.110	1.976	1.205		2.110	2.467	0.912		2.564	2.164	0.684
<i>P</i> 值		<0.05	>0.05	>0.05		<0.05	<0.05	>0.05		<0.05	<0.05	>0.05
留瓣组	0.069±0.062	0.475±0.570	1.632±4.985	0.569±0.924	0.594±0.622	2.704±4.488	4.456±7.824	2.343±4.230	0.028±0.018	0.096±0.042	0.098±0.033	0.054±0.064
* <i>Z</i> 值		2.584	1.913	1.523		1.965	2.249	0.986		2.198	2.214	0.745
* <i>P</i> 值		<0.05	>0.05	>0.05		<0.05	<0.05	>0.05		<0.05	<0.05	>0.05
** <i>Z</i> 值	0.009	-0.484	-0.402	-0.512	0.191	-1.982	-0.402	-0.385	-0.501	-2.190	-0.528	-0.621
<i>P</i> 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05

注:\* 术后与术前的比较;\*\*2 组间的比较



究发现,PRK 术后早期泪液中 TNF $\alpha$  增加<sup>[12]</sup>;离体培养的角膜基质细胞在准分子激光照射 24 h 后,培养液中 IL-1、IL-6 和 IL-8 的浓度均显著提高<sup>[13]</sup>。但目前没有 Epi-LASIK 术后泪液中炎症因子变化的报道。我们的研究发现,无论去瓣或留瓣 Epi-LASIK,术后 2 h 泪液中 IL-6、IL-8 和 TNF $\alpha$  释放率均显著增加,术后 1d 泪液中 IL-8 和 TNF $\alpha$  仍显著增加,提示炎症相关因子 IL-6、IL-8 和 TNF $\alpha$  在 Epi-LASIK 术后角膜创伤愈合过程中发挥一定的作用。

本研究发现,术后 2 h 去瓣组泪液中 IL-8 和 TNF $\alpha$  释放率显著低于留瓣组。TNF $\alpha$  由损伤的上皮细胞释放,可上调某些细胞因子及趋化因子,从而趋化和激活炎症细胞<sup>[8]</sup>。IL-8 是一种趋化因子,可以趋化和激活中性粒细胞<sup>[14]</sup>。去瓣组术后 2 h 泪液中低水平的 IL-8 和 TNF $\alpha$  提示,去瓣组术后早期眼部的炎症反应可能较轻,这可能是其术后角膜上皮愈合更快,视力恢复更快的一个原因。多数以往的临床研究表明<sup>[3,5-6]</sup>,去瓣组术后角膜上皮愈合更快。有研究表明,TNF $\alpha$  还可促进纤维母细胞的增殖<sup>[15]</sup>,与表层切削术后角膜雾状混浊有关。我们推测去瓣组术后 2 h 泪液中低水平的 TNF $\alpha$  可能是其术后 1 个月 haze 程度轻的一个原因。Wang 等<sup>[5]</sup>也发现类似的临床结果,即去瓣组术后 1 个月和 3 个月 haze 程度均显著轻于留瓣组。然而,其他一些临床研究没有发现 2 组术后 haze 程度的显著差别<sup>[3,4,6]</sup>。

本研究发现,仅在术后第 5 天去瓣组裸眼视力显著好于留瓣组,这可能与角膜上皮的愈合情况有关。术后早期(1 d 以内),留瓣组的角膜上皮轻微水肿,且主要位于旁中央区,对视力影响较小,与去瓣组差异不大;此后,留瓣组上皮水肿加重,并被新生的上皮逐渐替代,术后第 5 天,留瓣组尚有部分眼(7/18)角膜上皮未完全愈合,仍部分覆盖原有的水肿上皮,而去瓣组角膜上皮都已完全再生愈合,角膜基本清亮,因此 2 组视力有显著差异。1 个月以后,两组的角膜上皮都完全清亮,虽然留瓣组在术后 1 个月 haze 程度重于去瓣组,但只是 0.5 级至 1 级的轻度混浊,对视力和屈光度没有显著影响,因此 2 组视力没有显著差异。

本研究有 3 点局限性需说明。①每组 18 眼的样本量较小,将来需要大样本的研究进一步证实结论。②由于术中均应用了 MMC,而 MMC 可能对角膜细胞分泌细胞因子<sup>[16]</sup>及角膜上皮愈合<sup>[7]</sup>产生影响,因此,本研究的结果可能与单纯 Epi-LASIK 的结果有差异。③只有术后 2h 2 组泪液 IL-8 和 TNF $\alpha$  释放率有差异,它们可以迅速上调其它细胞因子,激活炎

症细胞及角膜基质细胞,引发一连串的角膜愈合反应,可能造成愈合反应的差异,关于更多细胞因子及细胞反应的情况,有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Pallikaris IG, Katsanevaki VJ, Kalyvianaki MI, et al. Advances in subepithelial excimer refractive surgery techniques; Epi-LASIK. *Curr Opin Ophthalmol*,2003,14:207-212.
- [2] Katsanevaki VJ, Kalyvianaki MI, Kavroulaki DS, et al. One year clinical results after Epi-LASIK for myopia. *Ophthalmology*, 2007,114:1111-1117.
- [3] Kim ST, Koh JW, Yoon GJ, et al. Clinical outcomes of epi-LASIK: 1-year results of on- and off-flap procedures with and without mitomycin-C. *Br J Ophthalmol*,2010,94:592-596.
- [4] Kalyvianaki MI, Kymionis GD, Kounis GA, et al. Comparison of Epi-LASIK and off-flap epi-LASIK for the treatment of low and moderate myopia. *Ophthalmology*,2008,115:2174-2180.
- [5] Wang QM, Fu AC, Yu Y, et al. Clinical investigation of off-flap epi-LASIK for moderate to high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2008,49:2390-2394.
- [6] Sharma N, Kaushal S, Jhanji V, et al. Comparative evaluation of 'flap on' and 'flap off' techniques of Epi-LASIK in low-to-moderate myopia. *Eye (Lond)*,2009,23:1786-1789.
- [7] Chen WL, Shen EP, Hsieh YT, et al. Comparison of in vivo confocal microscopic findings between epi-LASIK procedures with different management of epithelial flaps. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2011,52:3640-3647.
- [8] Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, et al. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory Cells. *Prog Retin Eye Res*,2001,20:625-637.
- [9] Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, et al. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol*,2009,147:198-205.
- [10] Fantes FE, Hanna KD, Waring GO 3rd, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol*,1990,108:665-675.
- [11] Choi CY, Kim JY, Kim MJ, et al. Transmission electron microscopy study of corneal epithelial flaps following removal using mechanical scraping, alcohol, and epikeratome techniques. *J Refract Surg*,2008,24:667-670.
- [12] Vesaluoma M, Teppo AM, Grönhagen-Riska C, et al. Increased release of tumour necrosis factor-alpha in human tear fluid after excimer laser induced corneal wound. *Br J Ophthalmol*, 1997,81:145-149.
- [13] Leonardi A, Tavolato M, Curnow SJ, et al. Cytokine and chemokine levels in tears and in corneal fibroblast cultures before and after excimer laser treatment. *J Cataract Refract Surg*,2009,35:240-247.
- [14] Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, et al. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*,1991,9:617-648.
- [15] Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, et al. Recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$ : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*,1985,230:943-945.
- [16] Chou SF, Chang SW, Chuang JL. Mitomycin C upregulates IL-8 and MCP-1 chemokine expression via mitogen-activated protein kinases in corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2007,48:2009-2016.

(收稿日期:2012-05-15)  
(本文编辑:黄熠,郑俊海)