

# 准分子激光治疗性角膜切削术治疗兔细菌性角膜病变

周欣<sup>1</sup>, 于东毅<sup>1</sup>, 何大伟<sup>2</sup>

作者单位: (215300) 中国江苏省昆山市, 江苏大学附属昆山医院<sup>1</sup>眼科; <sup>2</sup>中心实验室

作者简介: 周欣, 男, 毕业于湖南医科大学, 学士, 主任医师, 研究方向: 角膜病、白内障。

通讯作者: 周欣. 673830214@qq.com

收稿日期: 2017-11-27 修回日期: 2018-04-11

## Study on phototherapeutic keratotomy for bacterial corneal lesions in rabbit

Xin Zhou<sup>1</sup>, Dong-Yi Yu<sup>1</sup>, Da-Wei He<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology; <sup>2</sup> Central Laboratory, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China

**Correspondence to:** Xin Zhou. Department of Ophthalmology, Kunshan Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China. 673830214@qq.com

Received: 2017-11-27 Accepted: 2018-04-11

### Abstract

• **AIM:** To study the effect of phototherapeutic keratectomy (PTK) on rabbit bacterial corneal ulcer model and explore the clinical potential of this method.

• **METHODS:** Totally 48 eyes from all the 24 New Zealand rabbits were inoculated with *Staphylococcus aureus* and bacterial corneal ulcer model was established successfully. At 1d after inoculation, 48 eyes were given levofloxacin eye drops when corneal ulcer was confirmed. Then slit lamp inspection and optical coherence tomography (OCT) were performed to measure the central corneal ulcer depth. All the rabbits right eyes were treated with PTK, as an observation group, left eyes were not treated as a control group. The eye section were observed by slit lamp and central thickness of corneal ulcer was measured by OCT at 3 and 7d after this operation. Rabbits were sacrificed and the cornea was removed for pathological section 7d later.

• **RESULTS:** The corneal ulcers in both groups had a tendency to heal, showing a decrease in ulcer area and smoothness of the surface. There was no significant difference in the depth of corneal ulcer between the observation group and the control group before PTK ( $t=0.706$ ,  $P=0.484$ ). The difference between the two groups of eyes at 3 and 7d after PTK was obviously ( $P<0.05$ ).

• **CONCLUSION:** PTK can effectively cure rabbit *Staphylococcus aureus* corneal ulcer and promote ulcer wound healing, which may be used for clinical treatment of patients with bacterial corneal lesions.

• **KEYWORDS:** phototherapeutic keratectomy; rabbit eyes; bacterial keratopathy

**Citation:** Zhou X, Yu DY, He DW. Study on phototherapeutic keratotomy for bacterial corneal lesions in rabbit. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(5):807-810

### 摘要

**目的:** 研究准分子激光治疗性角膜切削术 (phototherapeutic keratectomy, PTK) 对兔眼细菌性角膜溃疡愈合的影响, 并探讨该方法用于临床上治疗细菌性角膜病变的可能性。

**方法:** 24 只新西兰大耳兔 48 眼接种金黄色葡萄球菌, 成功制作细菌性角膜溃疡模型。接种细菌后 1~2d 溃疡明显形成, 予以左氧氟沙星滴眼液滴眼。术前行双眼前节裂隙灯检查, 双眼光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 检查并测量角膜溃疡中央深度。接种 3d 后所有实验兔右眼行 PTK 手术, 左眼不予以处理作为对照眼。术后 3、7d 再行裂隙灯检查, 并行 OCT 检查测量角膜溃疡中央厚度。术后 7d 处死实验兔, 摘除双眼眼球取角膜组织行病理切片观察。

**结果:** 经裂隙灯观察, 随时间推移两组兔眼角膜溃疡均有愈合倾向, 表现为溃疡面积缩小和表面变平坦光滑。观察组术前测量角膜溃疡深度与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $t=0.706$ ,  $P=0.484$ )。观察组术后 3、7d 角膜溃疡厚度与对照眼比较, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

**结论:** PTK 能有效治疗兔眼金黄色葡萄球菌性角膜溃疡, 促进溃疡创面愈合, 这可能为 PTK 应用于临床治疗患者细菌性角膜病变提供实验依据。

**关键词:** 准分子激光治疗性角膜切削术; 兔眼; 细菌性角膜病变

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.5.08

**引用:** 周欣, 于东毅, 何大伟. 准分子激光治疗性角膜切削术治疗兔细菌性角膜病变. 国际眼科杂志 2018;18(5):807-810

### 0 引言

准分子激光治疗性角膜切削术 (phototherapeutic keratectomy, PTK) 是 20 世纪 80 年代发展起来的治疗角膜病变的新型术式<sup>[1]</sup>, 它采用氩氟气体激发产生的 193nm 波长的紫外光, 作用于角膜组织产生光化学反应, 裂解角膜细胞中的化学键分解组织。因该技术精确度高, 并发症少, 操作方便, 于 1995 年被 FDA 批准用于角膜浅表部位的疾病治疗<sup>[2]</sup>。目前 PTK 广泛用于临床治疗翼状胬肉、大泡性角膜病变、真菌性角膜炎、角膜变性、角膜营养不良、浅层角膜斑翳等, 而其在感染期细菌性角膜病变的临床应用鲜有报道。本研究旨在探索 PTK 在兔

细菌性角膜病变的治疗效果,并为PTK应用于临床治疗感染期角膜病变作为理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物和分组** 健康无疾病新西兰大耳兔24只(由苏州动物实验中心提供),12~16周龄,雌雄不限,体质量2~2.5kg。喂养和操作均符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。于标准环境中喂养,温度18℃~24℃,湿度40%~50%,明亮与黑暗时间各12h。正式实验前对兔行适应性喂养7d。实验前1d所有实验兔行双眼裂隙灯检查,筛选剔除出有角膜混浊的动物,确定无明显角膜和前房病变。所有实验兔右眼行PTK手术,左眼不予以处理作为对照眼。采用随机数字法将24只兔编号,依次实行手术。本研究经江苏大学实验动物管理委员会和江苏大学实验动物伦理审查委员会批准。

**1.1.2 主要试剂和仪器** 胰蛋白胨酵母(Luria-Bertani, LB)培养基;金黄色葡萄球菌菌株冻干粉(美国ATCC,编号ATCC25923);离心机;培养箱;光学相干断层扫描仪(德国蔡司公司Cirrus HD-OCT Version 4.0);裂隙灯显微镜及前节照相系统;准分子激光角膜治疗仪(德国蔡司公司,MEL80)。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株的制备** 将金黄色葡萄球菌冻干粉分别加入1mL无离子水,摇匀形成混悬液。吸取0.2mL均匀接种于血琼脂培养基上,40℃培养箱培养24h。将血琼脂培养基上的菌落刮取少量置入装有1mL LB培养基的离心管中,40℃摇床摇匀12h后离心管中培养基由清澈变为混浊,该混悬液即可作为接种来源。

**1.2.2 兔细菌性角膜炎模型的制作** 再次裂隙灯下观察所有实验兔双眼角膜无明显病变,前房清,丁达尔现象(Tyn)阴性。氯胺酮30mg/kg耳缘静脉注射麻醉,盐酸奥布卡因滴眼液滴双眼3次。1mL注射器吸取0.05mL细菌混悬液,针尖斜面向角膜面45°刺入角膜基质层。待针尖斜面全部进入角膜后注入细菌混悬液。可见角膜形成约1.5mm直径圆形白色水肿区(图1)。1~2d后角膜表面形成溃疡表明模型制作成功。

**1.2.3 PTK治疗** 兔眼模型制作3d后行PTK治疗。所有实验兔右眼行PTK,左眼为对照组不予手术治疗。术前双眼使用生理盐水冲洗结膜囊,奥布卡因滴眼液滴双眼3次。手术由同一名熟练医生按照编号一次完成。采用连续脉冲模式,激光能量密度160mJ/cm<sup>2</sup>,切削深度略大于溃疡深度,平均243.10±34.23μm/次,切削直径8mm,范围均大于溃疡面积,留下1~2mm的过渡区,频率10.0Hz。对于溃疡表面严重欠光整者,去除角膜上皮,抛光基质层后手术。

**1.2.4 眼前节光学相干断层扫描(AS-OCT)** 术前和术后3、7d均采用眼前节模式扫描角膜溃疡区。扫描范围6mm×6mm,深度5mm,取信号大于6/10的图像。取水平和垂直方向各6条扫描线的图像,从角膜溃疡前表面垂直测量至基质层溃疡底部,取12张图像中角膜溃疡深度最大的值作为角膜溃疡中央深度值。

**1.2.5 术后处理** 术后清理结膜囊分泌物,予左氧氟沙星滴眼液滴双眼,每天4次。术后3、7d行裂隙灯检查并予前节照相观察溃疡面积位置。术后7d处死实验兔,取

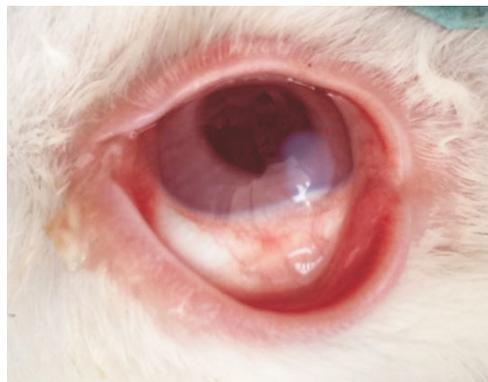


图1 兔眼角膜基质层形成直径约1.5mm的水肿区,边缘清晰,表明接种成功。

出双眼眼球,角膜组织HE染色切片观察。

统计学分析:采用SPSS19.0软件进行统计分析。使用Levene法检验方差齐性,以是否行手术治疗为组间因素,治疗时间为重复测量因素,行重复测量数据的方差分析。此外,两组间角膜溃疡深度比较采用独立样本 $t$ 检验,各时间点两两比较采用LSD- $t$ 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 裂隙灯前节检查** PTK术后1d实验组兔眼均表现为上层局限性糜烂,角膜溃疡表面呈现粗糙灰白色灶,手术区边缘角膜基质层水肿;对照眼角膜上皮糜烂不平整,隐约可见下方基质层灰白色,溃疡周围角膜上皮基质层均水肿。术后3d实验组手术区边缘水肿减轻,角膜溃疡表面光滑,但上皮仍缺失;对照眼角膜上皮糜烂,溃疡周围水肿仍存在;术后7d实验组角膜上皮长出,角膜基质层形成淡白色斑翳,可见点状或小圆形少量浸润,手术区边缘不易区分;对照组角膜上皮无糜烂,但仍有炎症浸润(图2)。

**2.2 AS-OCT检查** 接种前健康兔眼平均角膜厚度为486.83±11.99μm,其中对照组平均角膜厚度487.17±12.65μm,观察组为486.50±11.56μm,观察组与对照组角膜厚度比较,差异无统计学意义( $t=0.191, P=0.850$ )。接种金黄色葡萄球菌后溃疡形成,AS-OCT表现为角膜基质层团块样高反射信号,其下反射信号遮蔽,角膜上皮层欠平滑。术后3d观察组可见手术边缘低反射信号,深度略小于手术深度;对照组仅可见溃疡特有的高反射。术后7d观察组角膜基质层仅4眼存在颗粒状高反射,其余密度与周围组织相仿;观察组21眼存在高反射,其中13眼为小团块状,8眼为颗粒状(图3)。

重复测量数据的方差分析显示,对照组和观察组组间差异有统计学意义( $F=1417.18, P<0.01$ ),各不同治疗时间点溃疡深度差异有统计学意义( $F=854.17, P<0.01$ )。独立样本 $t$ 检验进一步比较对照组和观察组差异,手术前对照组角膜溃疡深度为219.38±26.08μm,观察组为214.42±22.42μm,两组差异无统计学意义( $t=0.706, P=0.484$ )。手术后3、7d测得的溃疡深度,观察组和对照组相比差异均有统计学意义( $P<0.01$ ,表1)。采用LSD- $t$ 检验进行各时间点两两比较,各时间之间相互差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。

**2.3 兔眼角膜溃疡病理变化** 术后7d取出兔眼,HE染

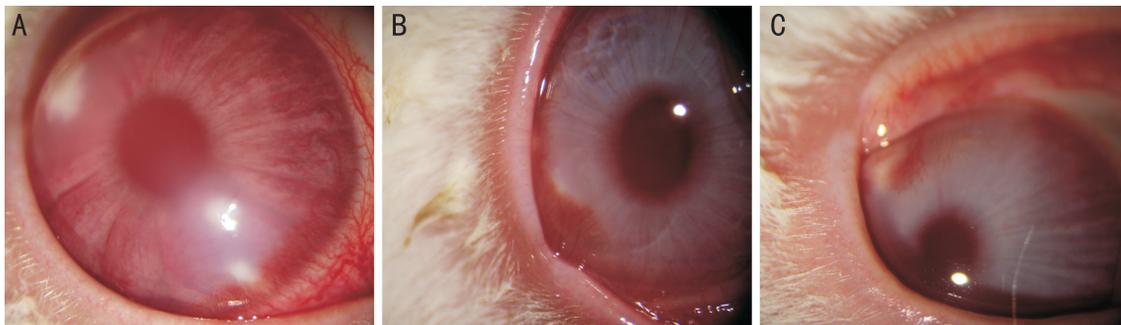


图2 裂隙灯前节检查观察组兔眼角膜溃疡变化 A:术前角膜溃疡不规则,表面粗糙,边缘稍水肿;B:PTK术后3d可见手术区边缘,手术区内角膜溃疡开始愈合;C:PTK术后7d手术区边缘已不可见,溃疡愈合新生血管长入。

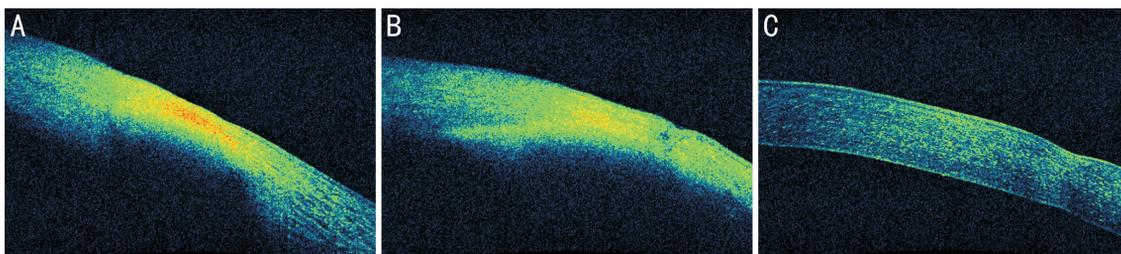


图3 OCT检查观察组兔眼各时间点角膜溃疡变化 A:术前兔眼角膜溃疡显示为表面不平坦的高反射,其下信号遮蔽;B:术后3d角膜溃疡处反射信号减弱,溃疡边缘可见低反射手术区边缘;C:术后7d仅可见少量颗粒状高反射,手术区域边缘仅可见角膜薄化区。

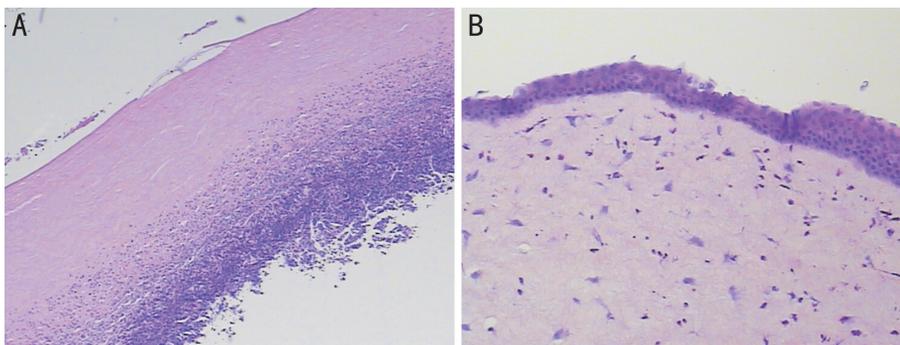


图4 溃疡处兔眼角膜病理变化 A:溃疡处角膜上皮和浅基质层大量炎性细胞浸,下方角膜深层基质层成纤维细胞排列规则( $\times 100$ );B:溃疡处角膜上皮层厚度不一,大量炎症细胞浸润,基质浅层可见坏死的上皮细胞和成纤维细胞( $\times 200$ )。

表1 各组兔眼各时间点角膜溃疡中央深度变化 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

组别	术前	术后3d	术后7d
对照组	219.38 $\pm$ 26.08	155.75 $\pm$ 19.24	78.04 $\pm$ 11.45
观察组	214.42 $\pm$ 22.42	130.58 $\pm$ 17.90	51.13 $\pm$ 13.12
<i>t</i>	0.706	4.692	7.575
<i>P</i>	0.484	<0.001	<0.001

注:观察组:实验兔右眼行PTK手术;对照组:左眼不予以处理。

色显示溃疡处角膜上皮层连续性中断,取而代之伴有大量中性粒细胞浸润和巨噬细胞,大量进入基质层,深层基质层多数健康,成纤维细胞排列规则;内皮细胞不受累,排列紧密连续(图4)。

### 3 讨论

角膜炎是眼科常见致盲性眼病, Dethorey等<sup>[3]</sup>认为,目前细菌性角膜炎主要致病菌为表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和肺炎链球菌<sup>[3]</sup>。我国张阳等<sup>[4]</sup>对2006/2015年我国北方地区细菌性角膜炎做病原学,药物敏感性回顾分析认为,角膜分离细菌中,革兰阳性球菌占62%,革兰阴性杆菌占25.4%。其中表皮葡萄球菌占第1

位,其次为金黄色葡萄球菌。它们都对喹诺酮类药物敏感。因金黄色葡萄球菌毒力强,繁殖快,容易变异,本实验使用对金黄色葡萄球菌敏感的药物左氧氟沙星滴眼液,后者为第三代喹诺酮类药物,可以有效抑制角膜病变处细菌繁殖,同时避免金黄色葡萄球菌感染扩散引起化脓性眼内炎。

Lindbohm等<sup>[5]</sup>曾报道1例LASIK术后葡萄球菌感染的患者,抗生素治疗效果不佳,后掀开角膜瓣无菌生理盐水冲洗,在角膜基质瓣和基质床行PTK治疗后感染得到明显控制。目前PTK并未作为临床治疗细菌性角膜炎的常规手段,原因可能在于通过敏感药物能够将多数细菌性角膜炎治愈,PTK相对于单纯用药并无优势。而对于少数难治性细菌性角膜炎和多次复发的角膜炎,PTK能否有效治愈或者缩短其病程,目前国内外少有相关报道。故本研究以兔为实验对象,兔眼角膜较正常人眼薄,且缺少前弹力层,表层感染易侵入基质层形成深层溃疡,便于制造角膜炎模型。目前观点认为,人眼准分子手术后角膜床厚度要保持在某安全厚度,但对此安全厚度众说不一。Wang等<sup>[6]</sup>认为剩余角膜基质床厚度低于250 $\mu\text{m}$ 时可能会增加

角膜膨隆的危险;Guirao<sup>[7]</sup>通过模拟研究,认为剩余角膜基质床厚度为250 $\mu\text{m}$ 是不够的,至少为300 $\mu\text{m}$ 。本研究剩余兔眼角膜基质床平均243.73 $\pm$ 21.07 $\mu\text{m}$ ,短期内并未出现角膜膨出,这就说明兔眼在此厚度的角膜基质床下是相对安全的。在手术过程中,我们认为切削面积大于溃疡面积更有利于病变处形成光滑创面,加速愈合。如果角膜溃疡表面多处高低差异大,激光能量将难以均匀分布于角膜,造成术后难以形成均匀光滑的角膜前表面。此时可以滴用人工泪液“填平”凹陷,或者去除部分角膜上皮,抛光角膜基质层再行PTK。

眼前节光学相干断层扫描是目前广泛普遍使用的技术,1994年Izatt等<sup>[8]</sup>首次将AS-OCT用于检查角膜、前房深度、虹膜和房角等。AS-OCT常常测量准分子手术前的角膜曲率,因其能准确测量角膜前后表面的曲率,相比传统角膜前表面曲率测量更加精确。同时AS-OCT能够准确测量角膜轮廓,通过反映角膜局部密度描述病变区域,因此作为本研究测量角膜溃疡的手段。Rush等<sup>[9]</sup>曾使用OCT测量溃疡和瘢痕深度用以指导PTK治疗角膜瘢痕,术后效果良好。本研究术前使用同样方法测量角膜溃疡深度同时明确溃疡位置,计算角膜床厚度对于PTK手术实施有重要的指导意义。术后3d OCT显示观察组溃疡深度小于对照组,这表明观察组角膜溃疡较对照组好转。其可能的机制在于一方面PTK具有直接的杀菌效果<sup>[10]</sup>,另一方面可以清除坏死的角膜组织,获得光滑的病变创面,提高药物的通透性。Lakimenko等<sup>[11]</sup>对18眼10% NaOH碱烧伤后形成的浅表角膜溃疡的兔眼行PTK。通过电镜观察到PTK组角膜溃疡边缘有激活的基底层上皮细胞,坏死的角膜基质层中巨噬细胞和活化的成纤维细胞数量较对照组明显增加,结论为PTK能加速兔眼角膜上皮愈合,清除角膜基质坏死的组织,这与本文AS-OCT观察到的结果一致。

Li等<sup>[12]</sup>回顾性研究47例经PTK治疗的耐药真菌性角膜炎患者,完全治愈41例(87.2%),治愈上皮缺损的平均时间为8.8 $\pm$ 5.6d。本研究选择术后7d测量OCT,因为此时间点处于角膜溃疡恢复旺盛期,易于区分观察组和对照组的愈合快慢程度。但PTK术后并发症包含轻度和中度的角膜混浊、远视转移、不规则散光和角膜变薄等,这些并发症都需要至少3mo以上的观察,因此本实验对于PTK术后并发症的研究尚有所欠缺。此外限于AST-OCT测量

的技术因素,本研究仅测量角膜溃疡的深度,并未测量角膜溃疡的面积,PTK对于角膜溃疡面积变化是否有影响,尚有待进一步研究。

综上所述,PTK能够有效治疗兔金黄色葡萄球菌性角膜病变,缩短病程,加快溃疡愈合,这可能为临床使用PTK治疗细菌性角膜炎作为实验依据。

#### 参考文献

- 1 Sher NA, Bowes RA, Zabel RW, *et al.* Clinical use of the 193 nm excimer laser in the treatment of corneal scars. *Arch Ophthalmol* 1991; 109(4):491-498
- 2 Ayres BD, Rapuano CJ. Excimer laser phototherapeutic keratectomy. *Ocul Surf* 2006;4(4):196-206
- 3 Dethorey G, Daruich A, Hay A, *et al.* Severe bacterial keratitis referred to ophthalmology emergency departments: a retrospective study of 268 cases. *J Fr Ophthalmol* 2013;36(2):129-137
- 4 张阳,王智群,孙旭光. 2006至2015年我国北方地区细菌性角膜炎病原学及药物敏感性分析. *中华眼科杂志* 2017;9(53):662-667
- 5 Lindbohm N, Moilanen JA, Vesaluoma MH, *et al.* Acinetobacter and staphylococcus aureus ulcerative keratitis after laser *in situ* keratomileusis treated with antibiotics and phototherapeutic keratectomy. *J Refract Surg* 2005;21(4):404-406
- 6 Wang Z, Chen J, Yang B. Posterior corneal surface topographic changes after laser *in situ* keratomileusis are related to residual corneal bed thickness. *Ophthalmology* 1999;106(2):406-409
- 7 Guirao A. Theoretical elastic response of the cornea to refractive surgery: risk factors for kerectasia. *J Refract Surg* 2005; 21(2): 176-185
- 8 Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, *et al.* Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye *in vivo* with optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 1994;112(12):1584-1589
- 9 Rush SW, Han DY, Rush RB. Optical coherence tomography-guided transepithelial phototherapeutic keratectomy for the treatment of anteriorcorneal scarring. *Am J Ophthalmol* 2013;156(6):1088-1094
- 10 Keales RH, Drago PC, Rothchild EJ. Effect of excimer laser on microbiological organisms. *Ophthalmic Surg* 1988;19(10):715-718
- 11 Lakimenko S, Buznyk O, Shchypun S, *et al.* Healing of alkali burned rabbit corneas with persistent superficial ulceration after excimer laser phototherapeutic keratectomy. Clinical and electron microscopic findings. *Klin Oczna* 2010;112(7-9):195-200
- 12 Li LM, Zhao LQ, Qu LH, *et al.* Excimer laser phototherapeutic keratectomy for the treatment of clinically presumed fungal keratitis. *J Ophthalmol* 2014;2014(2014):963287