

· 专家述评 ·

# 正确认识角膜内皮移植新术式:前房内注射角膜内皮细胞

徐建江 洪佳旭

复旦大学附属眼耳鼻喉科医院,上海 200031

通信作者:徐建江,Email:jianjiangxu@126.com

**【摘要】** 角膜内皮移植(EK)由于其手术时间短、术后愈合快及视觉质量佳,近年来逐步取代穿透角膜移植术成为治疗角膜内皮失代偿的首选术式。最近有学者报道了利用人角膜内皮细胞体外培养并进行前房注射成功治疗大泡性角膜病变的临床研究结果,开启了EK的新纪元。该方法简化了手术流程,避免了角膜内皮移植植片脱位相关并发症,并显著提高了供体角膜材料的利用率。尽管如此,在临床推广该治疗前,应明确患者接受前房注射异体角膜内皮细胞的远期预后与转归。

**【关键词】** 角膜移植;角膜内皮细胞;预后

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.001

## A novel technique of endothelium keratoplasty: injection of corneal endothelial cells into anterior chamber

Xu Jianjiang, Hong Jiayu

Department of Ophthalmology and Visual Science, Shanghai Eye and ENT Hospital, Shanghai Medical School, Fudan University, Shanghai 200031, China

Corresponding author: Xu Jianjiang, Email: jianjiangxu@126.com

**【Abstract】** Endothelium keratoplasty (EK), due to its short operation time, fast postoperative healing and better postoperative visual prognosis, has gradually replaced penetrating keratoplasty in recent years as the preferred surgery for treating corneal endothelial decompensation. A recent study has reported the clinical results of the successful treatment of bullous keratopathy with human corneal endothelial cells cultured *in vitro* and anterior chamber injection, which opened a new era of EK. This method simplifies the operation procedure, avoids the complications related to the dislocation of corneal endothelial graft, and significantly improves the utilization rate of donor corneal materials. Nevertheless, long-term prognosis and outcome of patients undergoing this treatment remain to be clarified before introducing this approach into wider clinical practice.

**【Key words】** Keratoplasty; Corneal endothelial cells; Prognosis

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.03.001

自20世纪初澳大利亚医生Eduard成功开展了第一例异体角膜移植手术用于治疗角膜盲患者以来,角膜移植逐步成为临床上常见的组织/器官移植之一。据估计,全球每年角膜移植手术量约10万例<sup>[1]</sup>;其中接近50%的角膜移植手术患者是由于角膜内皮细胞功能失代偿而导致的角膜盲。自2000年以来,在欧美地区,角膜内皮移植术(endothelium keratoplasty, EK)已超越穿透角膜移植术(penetrating keratoplasty, PKP)成为治疗角膜内皮病变的首选术式<sup>[2-4]</sup>。EK的核心步骤是选择性地去除异常角膜内皮和后弹力层,保留受体角膜正常的上皮和基质层,可避免切口愈合延迟、感染及术后高散光等PKP并发症,并降低了术后发生

排斥反应的概率<sup>[5-9]</sup>。随着组织工程角膜技术及小分子药物研究的发展, EK也出现了革命性的变化<sup>[10-12]</sup>。2018年3月,日本京都府立医科大学Kinoshita研究团队报道了世界首次进行体外培养人类角膜内皮细胞并成功进行异体移植的临床研究结果<sup>[13]</sup>。该治疗策略的核心创新点是:(1)能够从单个角膜内皮供体上获得用于多个受体移植所需的内皮细胞数量;(2)通过rho相关蛋白激酶(rho-associated protein kinase, ROCK)抑制剂调控并保留角膜内皮细胞活力;(3)通过前房内注射角膜内皮细胞,避免传统手术操作造成的医源性角膜内皮细胞损伤。在该研究中, Kinoshita等<sup>[13]</sup>首先将取自健康人的角膜内皮细胞进行体外培

养,获得  $1.5 \times 10^6$  个角膜内皮细胞后将其与含有 ROCK 抑制剂的  $450 \mu\text{l}$  改良角膜保存液配制成混悬液;在去除患者中央角膜直径  $8 \text{ mm}$  异常角膜内皮层后,直接将混悬液注射到患者前房中,注射后要求患者俯卧位  $3 \text{ h}$  以促进细胞黏附于后弹力层。该研究于 2013 年 12 月至 2014 年 12 月期间入组了 11 例患者,患者年龄为  $49 \sim 80$  岁,临床结果显示术后 24 周,注射到所有患者前房内的角膜内皮细胞均顺利成活,平均角膜内皮细胞密度均  $>500/\text{mm}^2$ ;其中 10 例患者的角膜恢复了透明,平均角膜内皮细胞密度  $>1\,000/\text{mm}^2$ ,中央角膜厚度  $<630 \mu\text{m}$ ,9 例患者的视力显著提高 2 行以上。

Kinoshita 等<sup>[13]</sup>的研究结果提供了一种全新的治疗角膜内皮失代偿的策略,随访结果也令人满意。然而,应当清醒认识到,目前该技术尚未到在临床上推广的阶段。该技术仍有许多临床问题悬而未决,如供体的最佳年龄、角膜内皮细胞体外扩增的合适代数(保证细胞保持活力且不发生畸变)以及细胞悬液的最佳浓度等<sup>[14]</sup>。另一方面,前房内注射组织工程角膜种子细胞并非该研究首次创新,该研究中使用了小分子药物 ROCK 抑制剂来增强疗效,但目前 ROCK 抑制剂降低角膜水肿的机制尚未完全阐明。事实上,ROCK 抑制剂本身也具有促进细胞黏附、存活及增生的能力<sup>[15-16]</sup>。既往研究也显示,无论对于角膜内皮损伤动物模型还是角膜内皮失代偿患者,局部使用 ROCK 抑制剂滴眼液都能起到促进角膜内皮修复、降低角膜水肿的作用<sup>[17]</sup>。该研究虽然去除了中央角膜内皮层,但仍保留了患者周边角膜内皮细胞,故并不能完全排除这部分保留的内皮细胞对临床疗效的干扰,即无法确定真正起作用的是残存的周边角膜内皮细胞还是注射的体外角膜内皮细胞。

值得注意的是,前房内注射体外培养人角膜内皮细胞的安全性并不十分明确,仍需要充分评估。目前,角膜内皮细胞最佳移植密度尚未明确,且未黏附于后弹力层的异体角膜内皮细胞转归尚不清楚。理论上,这些未黏附或者过量的角膜内皮细胞有可能会进入受体小梁网组织,从而妨碍房水引流功能导致患者眼压升高,乃至青光眼<sup>[18]</sup>。此外,如果角膜内皮细胞通过房水循环进一步进入患者全身血液,是否会导致其他异常?已有研究表明,小鼠前房内注射培养的异体角膜内皮细胞并不会诱发排斥反应<sup>[19]</sup>,但在人体上是否存在同样的现象?前房内注射体外培养的人角膜内皮细胞后,患者眼部免疫微环境发生怎样的变化?该方法仅移植异体角膜内皮细胞,是否适用于伴有后弹力层异常的患者?以上这些问题都需要在未来的研究中

逐一进行解答。

总之,前房内注射体外培养人角膜内皮细胞用于治疗角膜内皮功能失代偿是一种全新且极具前景的治疗策略。相对于传统 EK,该方法具有微创、供体利用率高、手术时间短、无植片相关并发症等优点<sup>[20]</sup>。然而,眼科医师也要清楚地认识到该方法可能存在的确定性,在明确本文提到的问题和获取角膜内皮细胞的最优参数、细胞转归、远期预后之前,目前尚不适合在临床中大规模开展此类治疗。尽管如此,前房注射体外培养人角膜内皮细胞仍然不失为 EK 手术发展的方向,真正意义上的 EK 手术时代已经初见曙光。

## 参考文献

- [1] Gain P, Jullienne R, He Z, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking [J]. *JAMA Ophthalmol*, 2016, 134 (2): 167-173. DOI:10.1001/jamaophthalmol.2015.4776.
- [2] 洪晶.角膜内皮移植手术并发症分析[J].中华实验眼科杂志, 2011, 29(3): 193-195. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.03.001.
- [3] Hong J. Complications of Descemet's stripping with automated endothelial keratoplasty [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2011, 29 (3): 193-195. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2011.03.001.
- [4] Deng SX, Lee WB, Hammersmith KM, et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty: safety and outcomes: a report by the American Academy of Ophthalmology [J]. *Ophthalmology*, 2018, 125 (2): 295-310. DOI:10.1016/j.ophtha.2017.08.015.
- [5] Birbal RS, Parker J, Dirisamer M, et al. Descemet membrane endothelial transfer: ultimate outcome [J]. *Cornea*, 2018, 37 (2): 141-144. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001395.
- [6] Thompson JM, Truong AH, Stern HD, et al. A multicenter study evaluating the risk factors and outcomes of repeat descemet stripping endothelial keratoplasty [J]. *Cornea*, 2019, 38(2): 177-182. DOI:10.1097/ICO.0000000000001817.
- [7] Samicola C, Farooq AV, Colby K. Fuchs endothelial corneal dystrophy: update on pathogenesis and future directions [J]. *Eye Contact Lens*, 2019, 45(1): 1-10. DOI:10.1097/ICL.0000000000000469.
- [8] Einan-Lifshitz A, Belkin A, Sorkin N, et al. Descemet membrane endothelial keratoplasty after penetrating keratoplasty: features for success [J]. *Cornea*, 2018, 37(9): 1093-1097. DOI:10.1097/ICO.0000000000001628.
- [9] Singh A, Zarei-Ghanavati M, Avadhanam V, et al. Systematic review and Meta-Analysis of clinical outcomes of descemet membrane endothelial keratoplasty versus descemet stripping endothelial keratoplasty/descemet stripping automated endothelial keratoplasty [J]. *Cornea*, 2017, 36(11): 1437-1443. DOI:10.1097/ICO.0000000000001320.
- [10] Li S, Liu L, Wang W, et al. Efficacy and safety of Descemet's membrane endothelial keratoplasty versus Descemet's stripping endothelial keratoplasty: a systematic review and meta-analysis [J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0182275 [2018-05-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5734733/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0182275.
- [11] Soh YQ, Mehta JS. Regenerative therapy for Fuchs endothelial corneal dystrophy [J]. *Cornea*, 2018, 37(4): 523-527. DOI:10.1097/ICO.0000000000001518.
- [12] Chen WS, Cao Z, Sugaya S, et al. Pathological lymphangiogenesis is modulated by galectin-8-dependent crosstalk between podoplanin and integrin-associated VEGFR-3 [J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11302 [2018-05-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4832077/>. DOI:10.1038/ncomms11302.
- [13] Lai JY, Cheng HY, Ma DH. Investigation of overrun-processed porous hyaluronic acid carriers in corneal endothelial tissue engineering [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0136067 [2018-06-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4546624/>. DOI:10.1371/journal.pone.0136067.
- [14] Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, et al. Injection of cultured cells with a

- ROCK inhibitor for bullous keratopathy [ J ]. N Engl J Med, 2018, 378 ( 11 ) : 995-910. DOI:10.1056/NEJMoa1712770.
- [ 14 ] Soh YQ, Mehta JS. Regenerative therapy for fuchs endothelial corneal dystrophy [ J ]. Cornea, 2018, 37 ( 4 ) : 523-527. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001518.
- [ 15 ] Liu J, Wada Y, Katsura M, et al. Rho-associated coiled-coil kinase ( ROCK ) in molecular regulation of angiogenesis [ J ]. Theranostics, 2018, 8 ( 21 ) : 6053-6069. DOI:10.7150/thno.30305.
- [ 16 ] Meng Y, Ren Z, Xu F, et al. Nicotinamide promotes cell survival and differentiation as kinase inhibitor in human pluripotent stem cells [ J ]. Stem Cell Reports, 2018, 11 ( 6 ) : 1347-1356. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.10.023.
- [ 17 ] Okumura N, Koizumi N, Kay EP, et al. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing [ J ]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54 : 2439-2502. DOI:10.1167/iovs.12-11320.
- [ 18 ] van den Bogerd B, Dhuhghaill SN, Koppen C, et al. A review of the evidence for *in vivo* corneal endothelial regeneration [ J ]. Surv Ophthalmol, 2018, 63 ( 2 ) : 149-165. DOI: 10.1016/j.survophthal.2017.07.004.
- [ 19 ] Yamada J, Ueno M, Toda M, et al. Allogeneic sensitization and tolerance induction after corneal endothelial cell transplantation in mice [ J ]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 : 4572-4280. DOI:10.1167/iovs.15-19020.
- [ 20 ] Zavala J, López Jaime GR, Rodríguez Barrientos CA, et al. Corneal endothelium; developmental strategies for regeneration [ J ]. Eye ( Lond ), 2013, 27 ( 5 ) : 579-588. DOI:10.1038/eye.2013.

(收稿日期:2018-12-19 修回日期:2019-01-28)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

## 本刊对来稿中电子版图片的要求

自我刊开通网上投稿以来,作者均采用将 Word 文档从网上在线投稿的方式,但部分来稿中所包含的图片像素较低,这些图片便于网上审稿,并不能用于制版印刷。因为显示器与彩印纸品的色彩形成截然不同,显示器应用红、绿、蓝的三原色原理发射光线形成图像,这种色彩形成的原理被称为 RGB 模式;而彩色印刷品是蓝、红、黄、黑四色油墨印制在纸制品上来形成彩色图像,这种原理被称为 CMYK 模式。那些在显示器上看起来比较清晰但分辨率较低的图片在实际印刷时不能转换为高质量 CMYK 模式的图片。为了保证论文的刊出质量及本刊的印刷出版质量,如果作者的来稿中附有组织病理图、免疫荧光染色图、免疫组织化学图、细胞图,请作者将原图保存为 TIFF 格式或 JPG 格式,图片的分辨率至少 300 dpi。

## 本刊对统计学方法的要求

研究论文如有量化测试指标时须有统计学分析的内容,分析并在方法部分提供统计学方法的描述,反应变量为单变量时请提供测量指标数据资料的性质(如定量数据资料及定性数据资料的表达方式)、多个样本定量数据资料正态分布检验的名称及方差齐性检验的名称、实(试)验设计方法及与之相匹配的统计学设计方法(如配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等)、与统计设计相应的统计方法名称(如  $t$  检验、方差分析)以及检验标准。选择方差分析统计设计时,应根据单因素或多因素设计选择正确的方法,不宜简单套用单因素方差分析。反应变量为双变量时,应根据实(试)验设计正确选择简单直线相关分析、回归分析或其他方法,不宜简单套用直线相关分析。统计学的检验标准请提供为双侧检验或单侧性检验。论文结果部分的统计学分析内容可用相应的图表表达。

统计学符号的著录执行 GB/T 3358.1—2009/ISO 3534-1:2006《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体,如样本量用  $n$ ; 样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$ ; 中位数用英文大写  $M$ , 标准差用英文小写  $s$ , 样本均数的标准误差用英文小写  $\sigma_{\bar{x}}$ ,  $t$  检验用英文小写  $t$ ,  $F$  检验用英文大写  $F$ , 卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ , 相关系数用英文小写  $r$ , 确定系数用  $R^2$ , 自由度用希腊文小写  $\nu$ ; 概率用英文大写  $P$ ; 检验水准用  $\alpha$ 。

统计结果的解释和表达采用对比组或比较对象之间差异有统计学意义的描述方法,而不用对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异的描述。论文的统计学分析结果提倡提供统计学量值和  $P$  值的具体数据,如不能提供  $P$  值的具体数据时,必须提供统计学量值如  $\chi^2$  值、 $t$  值、 $F$  值等。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,请给出 95% 可信区间(CI)。

## 本刊对基金项目的证明和著录要求

文稿所涉及的课题如为国家级、部级、省级等基金资助项目,请分别用中英文表述并分别列于文章中中英文摘要关键词之下,“基金项目:”进行标识,并注明基金项目名称,并在圆括号内注明项目编号。基金项目名称应按国家有关部门规定的正式名称填写,多个基金资助的项目请全部列出,按资助机构的等级顺序排列,并以“;”隔开。如:基金项目:国家自然科学基金项目(30271269);国家重点基础研究发展规划(973 计划)(2013CB532002);Fund program: National Natural Science Foundation of China(30271269);National Key Basic Research Program of China(973 Program)(2013CB532002)。获得基金项目资助的论文投稿时请提供基金项目资助证明的复印件或扫描后发至编辑部信箱。

(本刊编辑部)