

· 临床研究 ·

生物角膜用于人角膜板层移植术后的临床疗效及激光扫描共焦显微镜动态观察

王素娟 张月琴 李金 余晓菲 窦新岩 王丽娅

450003 郑州大学人民医院 河南省眼科研究所 河南省立眼科医院

通信作者:王丽娅, Email: wangliya55@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.02.011

【摘要】 背景 近年来由于角膜供体材料的缺乏,异种角膜移植研究逐渐受到研究者的关注,猪角膜脱细胞基质构建的生物角膜支架具有良好的生物相容性并已制备成生物角膜材料,但其用于人眼角膜移植后的临床效果及其组织形态学变化特征尚不清楚。**目的** 观察用生物角膜进行人板层角膜移植术后的临床效果,并利用激光扫描共焦显微镜进行活体动态观察,评估生物角膜作为新型角膜替代材料进行人眼角膜板层移植的可行性。**方法** 采用前瞻性系列病例观察研究方法,于 2014 年 2—8 月在河南省立眼科医院纳入药物治疗无效的感染性角膜炎或陈旧性角膜白斑患者 15 例 15 眼,包括真菌性角膜炎 4 例,细菌性角膜炎 1 例,混合感染性角膜炎 9 例,陈旧性角膜白斑 1 例。采用猪角膜脱细胞基质构建的生物角膜行患眼生物角膜板层移植术,以术眼的对侧正常眼作为对照。分别于术后 3 d、7 d、1 个月、3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月对术眼进行随访,对植片愈合情况进行评分,随访时间为 1 年。疗效指标主要包括角膜透明度、新生血管形成、角膜植片有无溶解或感染复发、最佳矫正视力(logMAR)。分别于术后 3、6、9 和 12 个月利用激光扫描共焦显微镜对角膜进行动态观察,记录和分析移植后角膜上皮和内皮细胞的形态和密度、角膜基质的形态特征以及角膜上皮神经纤维的恢复情况。**结果** 术眼术后 3 d 早期出现角膜水肿等炎症反应,术后 7 d 炎症反应消退。术后 1 个月植片透明,随访期间未出现角膜溶解、感染复发现象。术后 6 个月时 1 例患者出现青光眼,术后 12 个月时 1 例患者发生排斥反应。术眼前及术后不同时间点 logMAR、角膜透明度评分、角膜新生血管评分的总体比较差异均有统计学意义($\chi^2=92.63, 59.37, 10.50$, 均 $P<0.05$),其中术后视力、角膜透明度均较术前明显改善,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。激光扫描共焦显微镜检查结果显示,术眼术后受体角膜上皮细胞逐渐覆盖植片,完成正常的上皮化,角膜上皮细胞形态接近对侧正常眼,但角膜内皮细胞体积大于对侧眼,而植片角膜基质中无细胞生长,明显与对侧眼角膜基质不同;术后 6 个月时 8 例患者植片内有上皮神经纤维长入,但神经纤维走行弯曲,密度明显低于对侧正常眼。术后不同时间点角膜上皮细胞密度总体比较差异均无统计学意义($F=1.48, P=0.22$)。对侧正常眼、术眼术后 3、6、9 和 12 个月角膜内皮细胞密度分别为 (2542 ± 119) 、 (1895 ± 129) 、 (1869 ± 135) 、 (1854 ± 101) 和 (1844 ± 103) 个/ mm^2 ,术眼术后各个时间点角膜内皮细胞密度均明显低于对侧正常眼,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);术后 6、9 和 12 个月角膜上皮神经纤维密度值分别为 (1.26 ± 0.13) 、 (3.62 ± 0.81) 和 (5.98 ± 0.44) mm/mm^2 ,均明显高于前 1 个时间点的测定值,差异均有统计学意义($t=-8.16, -7.24$, 均 $P=0.00$)。**结论** 用生物角膜行人眼角膜板层移植术后植片即可长期存活,重建眼表结构,改善患者视力,可替代人角膜供体材料。

【关键词】 角膜移植; 异种移植; 植片生存/免疫; 共焦显微镜; 人; 生物工程角膜; 猪角膜脱细胞基质

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81170831、81270991); 河南省基础与前沿计划项目 (10230040024、112300410036、112300410093、132102310087); 河南省医学科技攻关计划攻关项目 (201203170、201203171)

Clinical effect of bioengineered cornea and *in vivo* confocal microscopy observation after human lamellar keraplasty Wang Sujuan, Zhang Yueqin, Li Jin, Yu Xiaofei, Dou Xinyan, Wang Liya

People's Hospital of Zhengzhou University, Henan Eye Institute, Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Wang Liya, Email: wangliya55@126.com

[Abstract] Background Xenotransplantation is arousing more attention of researchers because of the lack of corneal donors. Biological corneal scaffolds constructed by porcine corneal acellular stroma appears to have an acceptable biocompatibility. However, its clinical effects and the histomorphological features in the corneal tissue of

receipts' are still unclear. **Objective** This study was to evaluate the viability of bioengineered corneas as a new material of human lamellar keratoplasty and observe the *in vivo* biological features after human keratoplasty under the laser confocal microscope. **Methods** A prospective serial cases observational study was carried out. Fifteen eyes of 15 patients with infectious keratitis were enrolled in Henan Eye Hospital from February to August 2014 under the approval of Ethic Committee of Henan Eye Hospital and informed consent of each patient, including 4 eyes of fungal keratitis, 1 eye of bacterial keratitis, 9 eyes of mixed infectious keratitis and 1 eye of leucoma. Corneal lamellar transplantation was performed on the eyes with the bioengineered corneas as grafts and the follow-up time was one year. The survival of grafts was assessed and scored, and the indices including corneal transparency, neovascularization, graft lysis or inflammatory recurrence and visual acuity (logMAR) were evaluated. The morphology and density of corneal epithelial cells and endothelial cells, corneal stroma and subepithelial neural fibers were examined by laser confocal microscope 3, 6, 9 and 12 months after surgery. **Results** Postoperative inflammatory response was seen 3 days and disappeared 7 days after surgery. The grafts were clear 1 month after surgery, and no corneal dissolution was found during the follow-up duration. Glaucoma occurred in 1 eye at 6 months and graft rejection occurred in another eye 12 months after surgery. The logMAR, corneal transparency scores and corneal neovascularization scores improved after surgery in comparison with before surgery, with a significant difference among various time points ($\chi^2 = 92.63, 59.37, 10.50$, all at $P < 0.05$). Complete epithelization of grafts was seen. Compared with the contralateral eyes, the morphology of epithelial cells was similar and endothelial cells were enlarged in the operated eyes. In addition, no stromal cell structure was seen in the corneal stroma in the operative eyes. Subepithelial nerve fibers appeared in 8 eyes at 6 months, but the fiber density was lower in the operated eyes than that in the contralateral eyes. Significant difference was found in epithelial cell density among different time points ($F = 1.48, P = 0.22$). The endothelial cell densities were $(2542 \pm 119), (1895 \pm 129), (1869 \pm 135), (1854 \pm 101)$ and $(1844 \pm 103)/\text{mm}^2$ before surgery and 3, 6, 9 and 12 months after surgery, showing significant differences between preoperation and postoperative time points (all at $P < 0.05$). The subepithelial nerve fibers densities were $(1.26 \pm 0.13), (3.62 \pm 0.81)$ and $(5.98 \pm 0.44) \text{ mm/mm}^2$ at 6, 9 and 12 months after surgery, with significant differences between adjacent two time points ($t' = -8.16, -7.24$; both at $P = 0.00$). **Conclusions** Bioengineered corneal grafts survive well in human eye after lamellar transplantation, which can reconstruct ocular surface and improve the visual acuity. Biological cornea can replace human corneal materials.

[Key words] Corneal transplantation; Transplantation, heterologous; Graft survival/immunology; Microscopy, confocal; Humans; Bioengineered corneas; Porcine corneal acellular stroma

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81170831, 81270991); Foundation and Frontier Project of Henan Province (10230040024, 112300410036, 112300410093, 132102310087); Medical Science and Technology Research Plan Project of Henan Province (201203170, 201203171)

角膜病是世界上仅次于白内障的主要致盲眼病之一,统计数据表明,全世界约 400 万人罹患角膜盲^[1],其中感染性角膜病是致盲的主要原因之一。感染性角膜炎在发展中国家的发病率和致盲率很高,每年由角膜感染引起的单眼盲患者约 150 万例,主要病原体包括细菌、真菌、病毒和棘阿米巴^[2-3]。感染性角膜炎在药物治疗无效的情况下及时行角膜移植术是重建眼表的重要治疗措施,角膜移植术对 80% 的角膜盲患者有重要的治疗价值^[4]。目前角膜供体主要来源于同种异体角膜,角膜供体的匮乏使多数患者延误治疗。因此,近年来异种角膜移植材料一直是眼科研究的热点。目前的研究表明,猪来源的生物角膜在去细胞和去抗原处理后可降低其免疫原性,并可保留其天然角膜三维立体结构,具有良好的生物相容性,然而生物角膜作为异种材料在移植到人眼后存活情况、移植后受体角膜的组织结构变化、患者的视力改善与否等一系列临床应用问题尚不清楚。本研究中应用生物角膜对感染

性角膜病患者行角膜板层移植术,观察术后临床效果及激光扫描共焦显微镜动态观察,评价生物角膜做为异种材料进行人眼角膜移植的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用前瞻性系列病例观察研究设计,收集 2014 年 2—8 月在河南省立眼科医院就诊并诊断为单眼感染性角膜炎或陈旧性角膜白斑的患者 15 例 15 眼,其中男 7 例,女 8 例;年龄 33 ~ 66 岁,平均 (50.28 ± 8.78) 岁。纳入患者的基线情况见表 1。所有患者术前均经裂隙灯显微镜、激光扫描共焦显微镜以及角膜刮片检查进行确诊。纳入标准:(1)诊断为感染性角膜炎或陈旧性角膜白斑者。(2)术前接受规范的药物抗感染治疗病情无明显好转者。(3)术前裸眼视力(logMAR)为光感 ~ 3.6 者。排除标准:(1)经裂隙灯显微镜、眼前节 OCT 检查病灶累及后弹力层者。(2)对

侧眼有角膜炎、干眼、青光眼、屈光不正等眼部疾病者。以术眼为实验组,对侧眼为对照。本研究经河南省立眼科医院伦理委员会批准,伦理号:[2013]眼伦审械临字第(7)号,患者入组前均签署知情同意书。

表 1 纳入患者的基线资料

| 序号 | 性别 | 年龄(岁) | 眼别 | 术前诊断 | 术前视力 | 随访时间(月) |
|----|----|-------|----|----------|------------|---------|
| 1 | 男 | 33 | OS | 陈旧性角膜白斑 | 3.6 logMAR | 12 |
| 2 | 男 | 47 | OS | 真菌性角膜炎 | 手动/20 cm | 12 |
| 3 | 男 | 66 | OS | 真菌性角膜炎 | 手动/30 cm | 12 |
| 4 | 女 | 51 | OS | 真菌性角膜炎 | 数指/50 cm | 12 |
| 5 | 女 | 42 | OD | 真菌性角膜炎 | 手动/15 cm | 12 |
| 6 | 男 | 63 | OD | 细菌性角膜炎 | 数指/30 cm | 12 |
| 7 | 男 | 57 | OS | 混合感染性角膜炎 | 手动/10 cm | 12 |
| 8 | 男 | 62 | OD | 混合感染性角膜炎 | 手动/15 cm | 12 |
| 9 | 男 | 50 | OS | 混合感染性角膜炎 | 3.6 logMAR | 7 |
| 10 | 男 | 49 | OS | 混合感染性角膜炎 | 手动/30 cm | 12 |
| 11 | 女 | 44 | OD | 混合感染性角膜炎 | 手动/10 cm | 12 |
| 12 | 女 | 44 | OS | 混合感染性角膜炎 | 数指/40 cm | 12 |
| 13 | 女 | 51 | OD | 混合感染性角膜炎 | 光感(+) | 12 |
| 14 | 女 | 50 | OS | 混合感染性角膜炎 | 光感(+) | 12 |
| 15 | 男 | 45 | OD | 混合感染性角膜炎 | 数指/30 cm | 13 |

注:OS:左眼;OD:右眼

1.2 方法

1.2.1 生物角膜材料来源 生物角膜是由广州优得清生物科技有限公司提供的猪角膜脱细胞基质。

1.2.2 手术步骤 手术均由同一位经验丰富的医师完成。术眼用质量分数 2% 的布比卡因和质量分数 0.75% 的利多卡因 1:1 混合剂行球后麻醉,置开睑器,固定上、下直肌,用庆大霉素稀释液充分冲洗结膜囊,根据病灶直径选择合适的角膜环钻制作角膜植床,用手术刀片逐层剖切病变角膜,至病灶完全清除,选择大于病灶角膜直径 0.5 ~ 1.0 mm 的环钻制作角膜植片,采用 10-0 尼龙线将植片间断对位缝合于角膜植床,线结转埋。术后用质量分数 0.5% 左氧氟沙星滴眼液、妥布霉素地塞米松滴眼液、他克莫司滴眼液点眼,均每日 3 次。

1.2.3 主要疗效指标 分别于术后 3 d、7 d、1 个月、3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月对患者进行随访,在裂隙灯显微镜下观察移植后植片愈合情况,并进行评分。评分标准:(1)植片混浊程度 透明度好,无混浊、无云翳者为 1 分;透明度较好,轻度雾状混浊,虹膜清晰可见者为 2 分;角膜浅层混浊,透过角膜可见瞳孔及虹膜者为 3 分;角膜全层致密混浊者为 4 分。(2)植片新生血管长入 无明显新生血管增生者为 1 分;角膜缘少量新生血管,仅累及角膜周边者为 2 分;新生血管

长入植片者为 3 分。(3)植片脱落、溶解 植片脱离植床者为 5 分。(4)感染复发 角膜出现溃疡、积脓、穿孔坏死者为 5 分。记录角膜移植后最佳矫正视力(logMAR)。

1.2.4 激光扫描共焦显微镜成像及分析 术后 3、6、9、12 个月对术眼进行激光扫描共焦显微镜(HRT 3 和 Rostock 角膜模块组成)(德国海德堡公司)检查,放大倍数为 800 倍,分辨率为 1 μm 。受检眼用质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点眼 1 次进行表面麻醉,在显微镜探头表面涂抹眼用凝胶,在探头前套上一次角膜接触帽,用开睑器撑开受检者眼睑,嘱受检者下颌放于显微镜托架上,额部顶紧上方头带,保持头正位,双眼固视前方,移动手柄,使角膜接触帽定位在受检者角膜中央部位,调节成像焦点平面,使角膜各层图像通过计算机屏幕同步显示,采集图片并保存。利用内置 NAVIS 软件对各层细胞形态、组织结构进行综合分析,用 ImageJ 软件计量角膜神经纤维密度,即神经纤维的长度/ mm^2 。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中视力、角膜混浊度和新生血管评分的数据资料经 W 检验不符合正态分布,以 $M(Q_1, Q_3)$ 表达,角膜上皮细胞密度、角膜内皮细胞密度及神经纤维密度测定的数据资料经 W 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表达,其中角膜上皮细胞密度和角膜内皮细胞密度的方法经 Levene 检验显示方差齐,角膜上皮神经纤维密度经 Levene 检验显示方差不齐。采用自身对照系列病例观察试验设计,手术前后不同时间点视力、角膜混浊度和新生血管评分的总体差异比较采用 Friedman 检验,多重比较采用 Wilcoxon 符号秩检验;各时间点间角膜上皮细胞、内皮细胞及神经纤维密度的总体差异比较均采用重复测量单因素方差分析,角膜上皮细胞及内皮细胞密度各个时间点间的多重比较采用 LSD-t 检验,上皮神经纤维密度各个时间点间的多重比较采用校正 t' 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术眼术后临床表现

裂隙灯显微镜下可见术后 3 d 角膜严重水肿,角膜缘血管充血,术后 7 d 角膜水肿稍减轻,术后 1 个月时角膜水肿减退,植片透明,完全上皮化。1 眼于术后 6 个月发生青光眼,出现持续性眼压增高、结膜充血、眼球胀痛、视力模糊症状;1 眼于术后 12 个月发生免疫排斥反应,患眼充血、视力下降、植片水肿、上皮浸

润;13 眼随访期间植床与植片愈合良好,角膜透明,无植片溶解以及感染复发现象(图 1)。所有术眼术前及术后不同时间点间 logMAR 总体比较差异有统计学意义($\chi^2=92.63, P=0.00$),与术前相比较,术眼术后 3 d logMAR 无明显提高,差异无统计学意义($Z=-0.71, P=0.48$);术后 7 d、1 个月、3 个月、6 个月、9 个月术眼 logMAR 分别高于前一时间点,差异均有统计学意义($Z=-2.11、-3.32、-3.22、-2.96、-2.06$, 均 $P<0.05$);术后 9 个月 logMAR 相对稳定,与术后 12 个月比较差异无统计学意义($Z=-1.00, P=0.32$)。术前及术后不同时间点间角膜混浊度评分的总体比较差异有统计学意义($\chi^2=59.37, P=0.00$),术后 1 个月角膜混浊度评分与术前相比明显下降,差异有统计学意义($Z=-3.37, P=0.01$),之后趋于稳定。术前及术后不同时间点间角膜新生血管评分之间的总体比较差异有统计学意义($\chi^2=10.50, P=0.02$),其中术后 3 d 角膜新生血管评分值明显低于术前,差异有统计学意义($Z=-2.24, P=0.03$),之后新生血管评分无显著变化(表 2)。随访期间未发现角膜溶解及病变复发者。

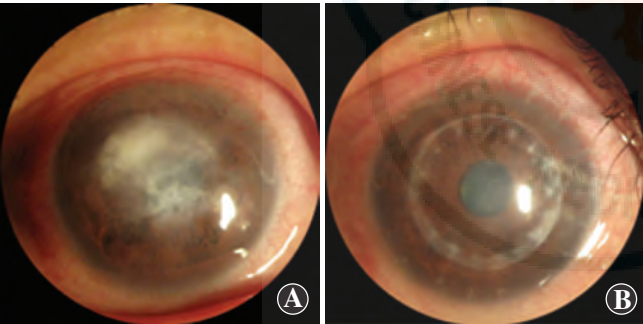


图 1 混合感染性角膜炎患者术前及术后 12 个月裂隙灯显微镜照 A:术前角膜中央可见灰白色溃疡灶,视力为手动 40 cm B:术后 12 个月角膜透明,视力为 0.5

表 2 患者术前及术后不同时间点视力、角膜混浊和新生血管评分比较 [$M(Q_1, Q_3)$]

| 时间 | 眼数 | 视力(logMAR) | 角膜混浊度 | 新生血管 |
|----------|----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 术前 | 15 | 3.3(3.3,3.3) | 4.0(4.0,4.0) | 1.0(1.0,2.0) |
| 术后 3 d | 15 | 3.3(3.7,3.3) | 3.0(3.0,3.0) ^a | 2.0(1.0,2.0) ^a |
| 术后 7 d | 15 | 3.3(3.8,4.0) ^b | 3.0(3.0,3.0) | 2.0(1.0,2.0) |
| 术后 1 个月 | 15 | 4.3(4.2,4.4) ^c | 1.0(1.0,1.0) ^c | 1.0(1.0,2.0) |
| 术后 3 个月 | 15 | 4.3(4.2,4.4) ^d | 1.0(1.0,1.0) | 1.0(1.0,2.0) |
| 术后 6 个月 | 15 | 4.3(4.6,4.7) ^e | 1.0(1.0,1.0) | 1.0(1.0,2.0) |
| 术后 9 个月 | 14 | 4.3(4.6,4.7) ^f | 1.0(1.0,1.0) | 1.0(1.0,2.0) |
| 术后 12 个月 | 14 | 4.3(4.6,4.7) | 1.0(1.0,1.0) | 1.0(1.0,2.0) |
| χ^2 | | 92.63 | 59.37 | 10.50 |
| P | | 0.00 | 0.00 | 0.02 |

注:与各自的术前值比较,^a $P<0.05$;与各自的术后 3 d 值比较,^b $P<0.05$;与各自的术后 7 d 值比较,^c $P<0.05$;与各自的术后 1 个月值比较,^d $P<0.05$;与各自的术后 3 个月值比较,^e $P<0.05$;与各自的术后 6 个月值比较,^f $P<0.05$ (Friedman 检验, Wilcoxon 符号秩检验)

2.2 术眼术后不同时间点角膜上皮细胞、内皮细胞及神经纤维密度与对侧眼的比较

术眼术后不同时间点上皮细胞密度值稳定,均稍低于对侧眼,但总体比较无统计学意义($F=1.48, P=0.22$),内皮细胞密度总体比较差异有统计学意义($F=98.50, P=0.00$),术眼术后 3、6、9 和 12 个月角膜内皮细胞密度均明显低于对侧眼,差异均有统计学意义($t=14.80、15.57、15.93、16.17$, 均 $P<0.05$);术眼术后 3、6、9 和 12 个月之间内皮细胞密度随时间延长轻度下降,但差异均无统计学意义($P=0.55、0.73、0.81$)。术后不同时间点及对侧眼间角膜上皮神经纤维密度的总体比较差异有统计学意义($F=535.32, P=0.00$),术眼术后 6、9 和 12 个月角膜上皮神经纤维密度均明显低于对侧眼($t=42.88、25.92、24.70$, 均 $P<0.05$),其中术眼术后 9 个月角膜上皮神经纤维密度明显低于术后 6 个月,术后 12 个月角膜上皮神经纤维密度明显低于术后 9 个月,差异均有统计学意义($P=0.00、0.00$)(表 3)。

表 3 术眼术后不同时间点及对侧眼角膜上皮细胞、内皮细胞和上皮神经纤维密度值的比较 ($\bar{x}\pm s$)

| 时间 | 眼数 | 上皮细胞密度 (/mm ²) | 内皮细胞密度 (/mm ²) | 上皮神经纤维密度 (mm/mm ²) |
|----------|----|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 正常对侧眼 | 15 | 6 202±161 | 2 542±119 | 14.41±1.17 |
| 术后 3 个月 | 15 | 6 111±134 | 1 895±129 ^a | - |
| 术后 6 个月 | 15 | 6 113±114 | 1 869±135 | 1.26±0.13 |
| 术后 9 个月 | 14 | 6 112±102 | 1 854±101 | 3.62±0.81 ^b |
| 术后 12 个月 | 14 | 6 113±120 | 1 844±103 | 5.98±0.44 ^c |
| F | | 1.48 | 98.50 | 535.32 |
| P | | 0.22 | 0.00 | 0.00 |

注:-:无 与正常对侧眼比较,^a $P=0.00$;与术后 6 个月相比,^b $P=0.00$;与术后 9 个月相比,^c $P=0.00$ (重复测量单因素方差分析, LSD-t 检验)

2.3 术后术眼与对侧眼角膜激光扫描共焦显微镜下形态学比较

术后 3、6、9 和 12 个月激光扫描共焦显微镜下可见术眼角膜植片上皮基底细胞形态规则,呈蜂窝状紧密排列,细胞呈多边形,细胞边界呈高反光,未显示任何细胞核结构,术眼基底细胞与对侧眼细胞形态相似(图 2A);术眼角膜基质为高反光无结构物质,未显示任何细胞成分,而对侧眼基质细胞核呈扁平状,细胞核呈高反光,细胞边界呈低反光(图 2B)。术眼角膜内皮细胞较对侧眼体积大,排列规则,细胞体呈中高度反光,细胞边界呈低反光(图 2C)。术后 6 个月可见 8 眼植片内有上皮神经纤维长入,但较对侧眼稀疏,走行弯曲(图 2D)。

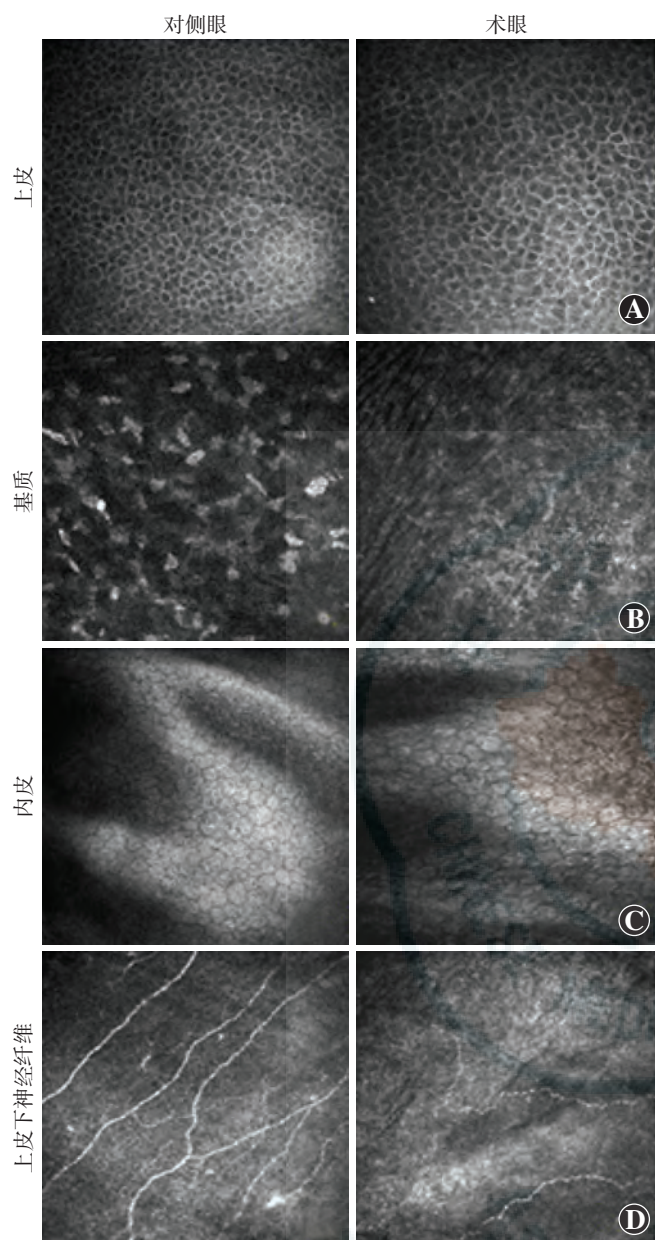


图2 激光扫描共焦显微镜下术眼角膜植片与对侧眼角膜各层细胞的形态学比较 A:上皮基底细胞形态接近对侧眼 B:术眼基质层未显示细胞结构,而对侧眼基质细胞核呈扁平状 C:术眼角膜内皮细胞较对侧眼体积增大 D:术眼角膜上皮上下神经纤维较对侧眼稀疏

3 讨论

角膜移植是治疗角膜盲的主要手术方法,但人类捐献角膜的数量远远不能满足患者的需求,尤其是在亚洲地区,因此用异种来源的角膜移植材料作为人类角膜替代物的研究受到许多研究者的关注^[5-7]。

研究证实,猪角膜与人角膜在解剖学、生理学以及生物力学特性上有很多相似之处,理论上猪角膜可以作为人角膜移植的理想材料,且符合伦理学的要求^[8-11]。自1983年研究者已经开始尝试异种角膜移植研究^[12]。角膜是无血管组织,对异种角膜移植有一

定程度的免疫赦免作用,但异种角膜移植仍面临着排斥反应和生物安全性方面的挑战,移植的成功率与手术方式本身也密切相关^[13-15]。有研究表明,异种角膜移植后的排斥反应主要是由CD4⁺T细胞介导的细胞免疫,当CD4⁺T细胞缺乏或功能受到抑制时主要由CD8⁺T细胞和自然杀伤细胞介导^[16-17]。也有研究证实,角膜内皮的免疫原性最强,其次依次是角膜上皮和基质,因此可用脱细胞的角膜基质作为支架进行角膜移植^[18]。脱细胞基质通过生物化学方法去除了细胞成分,但仍可保持正常的细胞外基质结构,并降低角膜的免疫原性,减轻异种移植的排斥反应^[19]。已有研究表明,与完整新鲜角膜相比较,脱细胞的猪角膜透明性更好,免疫原性显著降低^[20]。体内研究表明,脱细胞的猪角膜植片进行异种移植时比完整新鲜猪角膜植片存活时间长^[21]。此外,脱细胞的角膜组织仍保留其天然的三维立体结构,并具有良好的生物相容性,优于合成的角膜植片替代物^[22-23]。一项实验研究显示,把猪角膜移植到非人类灵长类动物模型上后应用糖皮质激素进行抗排斥反应治疗,植片存活时间不超过120 d,而使用强效免疫抑制剂治疗后,植片存活时间超过6个月,因此加强异种角膜移植后的免疫移植治疗对移植物的存活应该是相当重要的^[24]。本研究中将猪角膜脱细胞基质移植到人感染性角膜病患眼,术后立即使用妥布霉素地塞米松滴眼液和他克莫司滴眼液点眼,术后初期发现术眼炎症反应较重,随着术后时间的延长,炎症反应逐渐消退,到术后1个月时角膜透明,患者视力明显提高,术后9个月术眼视力相对稳定,发现猪角膜脱细胞基质在人眼中组织相容性好,随访期间未发生植片溶解或感染复发现象。本研究中将猪角膜脱细胞基质移植到人感染性角膜病患眼,术后立即使用妥布霉素地塞米松滴眼液和他克莫司滴眼液点眼,术后初期发现术眼炎症反应较重,随着术后时间的延长,炎症反应逐渐消退,到术后1个月时角膜透明,患者视力明显提高,术后9个月术眼视力相对稳定,发现猪角膜脱细胞基质在人眼中组织相容性好,随访期间未发生植片溶解或感染复发现象。本研究中1眼术后9个月时植片透明,最佳矫正视力达到0.6,但停止应用抗排斥药物后于术后12个月时出现严重的排斥反应,经再次加强抗排斥治疗后无效,导致角膜完全混浊,分析其原因可能与停用抗排斥药物有关。另有1例患者在术后6个月时发生青光眼,药物降眼压治疗无效后行小梁切除术,其发生青光眼的原因尚不清楚。

激光扫描共焦显微镜是一种新型的无创、高分辨率、高放大倍数的显微镜,可对活体角膜进行四维(三维空间和时间)水平扫描,直接观察活体角膜的各层细胞形态,为角膜移植术后角膜的细胞形态、结构变化的动态评估提供了新的手段^[25]。利用激光扫描共焦显微镜对兔角膜进行活体观察,发现其上皮细胞、基质细胞、内皮细胞均可在猪角膜脱细胞基质内生长和增生^[26]。本研究中对异种角膜移植术后3个月的患者进行激光扫描共焦显微镜检查,发现受体角膜上皮细

胞能够生长至猪脱细胞基质植片上并逐渐上皮化,受体内角膜内皮细胞密度与对侧眼比较有一定程度的下降,并在 1 年内保持稳定,说明猪脱细胞基质的生物相容性较好,但观察还显示,移植的猪脱细胞基质内并未出现基质细胞,推测猪角膜基质本身并不适合人角膜基质细胞的生长,此外我们也不能排除所用的猪角膜脱细胞基质存在一定缺陷的可能性,值得进一步研究。

综上所述,用生物角膜板层移植法治疗感染性角膜炎后,移植的生物角膜能够在人眼存活较长时间,患者的视力得到很大程度提高,在同种异体角膜供体匮乏的情况下,可考虑作为替代材料对患者进行角膜移植。但本研究观察的样本量较少,观察时间较短,其确切疗效、远期效果及安全性评价还需更大样本量的长期观察和研究。

参考文献

- [1] Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment; 2010 [J]. Br J Ophthalmol, 2012, 96 (5) : 614-618. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2011-300539.
- [2] 张红敏, 刘素素, 陈国铭, 等. 中性粒细胞在不同品系正常小鼠角膜的分布及其与角膜创伤修复的关系 [J]. 中华实验眼科杂志, 2014, 32 (9) : 780-785. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.09.003. Zhang HM, Liu SS, Chen GM, et al. Distribution trait of neutrophils in corneas of different strains of normal mice and their effects on corneal wound healing [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2014, 32 (9) : 780-785.
- [3] 鲜依鲜, 邓应平. 感染性角膜炎的流行病学研究现状 [J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30 (1) : 86-90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.01.022. Xian YP, Deng YP. Research progress in epidemiology of microbial keratitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30 (1) : 86-90.
- [4] Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D. Global data on visual impairment in the year 2002 [J]. Bull World Health Organ, 2004, 82 (11) : 844-851.
- [5] Tan DT, Dart JK, Holland EJ, et al. Corneal transplantation [J]. Lancet, 2012, 379 (9827) : 1749-1761. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60437-1.
- [6] Kim MK, Wee WR, Park CG, et al. Xenocorneal transplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2011, 16 (2) : 231-236. DOI: 10.1097/MOT.0b013e328344870c.
- [7] Coster DJ, Williams KA. Donor cornea procurement: some special problems in Asia [J]. Asia-Pacific J Ophthalmol, 1992, 4 : 7-12.
- [8] Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach [J]. Surv Ophthalmol, 2000, 44 (5) : 367-408. DOI: 10.1016/S0039-6257(00)00110-7.
- [9] Faber C, Scherfig E, Prause JU, et al. Corneal thickness in pigs measured by ultrasound pachymetry in vivo [J]. Scand J Lab Anim Sci, 2008, 35 (1) : 39-43.
- [10] Hara H, Cooper DK. Xenotransplantation-the future of corneal transplantation? [J]. Cornea, 2011, 30 (4) : 371-378. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3281f237ef.
- [11] Cooper DK, Gollackner B, Sachs DH. Will the pig solve the transplantation backlog? [J]. Annu Rev Med, 2002, 53 : 133-147. DOI: 10.1146/annurev.med.53.082901.103900.
- [12] Moffatt SL, Cartwright VA, Stumpf TH. Centennial review of corneal transplantation [J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2005, 33 (6) : 642-657. DOI: 10.1111/j.1442-9071.2005.01134.x.
- [13] Yamagami S, Isobe M, Yamagami H, et al. Mechanism of concordant corneal xenograft rejection in mice: synergistic effects of anti-leukocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody and fk506 [J]. Transplantation, 1997, 64 (1) : 42-48.
- [14] Hara H, Cooper DK. The immunology of corneal xenotransplantation: a review of the literature [J]. Xenotransplantation, 2010, 17 (5) : 338-349. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2010.00608.x.
- [15] Fishman JA, Patience C. Xenotransplantation: infectious risk revisited [J]. Am J Transplant, 2004, 4 (9) : 1383-1390. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00542.x.
- [16] Tanaka K, Yamada J, Streilein JW. Xenoreactive CD4⁺ cells and acute rejection of orthotopic guinea pig corneas in mice [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41 (7) : 1827-1832.
- [17] Higuchi R, Streilein JW. CD8⁺ T cell-mediated delayed rejection of orthotopic guinea pig cornea grafts in mice deficient in CD4⁺ T cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44 (1) : 175-182. DOI: 10.1167/iov.02-0050.
- [18] 王智崇, 葛坚, 徐锦堂, 等. 角膜不同组织免疫原性分析 [J]. 中华眼科杂志, 2002, 38 (9) : 535-538. DOI: 10.3760/j.issn.0412-4081.2002.09.008. Wang ZC, Ge J, Xu JT, et al. Relative quantitative analysis of corneal immunogenicity [J]. Chin J Ophthalmol, 2002, 38 (9) : 535-538.
- [19] Li A, Pan Z, Jie Y, et al. Comparison of immunogenicity and porcine-to-rhesus lamellar corneal xenografts survival between fresh preserved and dehydrated porcine corneas [J]. Xenotransplantation, 2011, 18 (1) : 46-55. DOI: 10.1111/j.1399-3089.2011.00626.x.
- [20] Lee W, Miyagawa Y, Long C, et al. A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity [J]. Int J Ophthalmol, 2014, 7 (4) : 587-593. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.04.01.
- [21] Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, et al. Efficacy of pig-to-rhesus lamellar corneal xenotransplantation [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52 (9) : 6643-6650. DOI: 10.1167/iov.11-7273.
- [22] Lynch AP, Ahearne M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds [J]. Exp Eye Res, 2013, 108 : 42-47. DOI: 10.1016/j.exer.2012.12.012.
- [23] Obara T, Matsuura S, Narita S, et al. Bladder acellular matrix grafting regenerates urinary bladder in the spinal cord injury rat [J]. Urology, 2006, 68 (4) : 892-897. DOI: 10.1016/j.urolgy.2006.04.030.
- [24] Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering [J]. Biomaterials, 2010, 31 (14) : 3941-3948. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.122.
- [25] de Nicola R, Labbe A, Amar N, et al. In vivo confocal microscopy and ocular surface diseases: anatomical-clinical correlations [J]. J Fr Ophthalmol, 2005, 28 (7) : 691-698. DOI: JFO-09-2005-28-7-0181-5512-101019-200503205.
- [26] Xu YG, Xu YS, Huang C, et al. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate [J]. Mol Vis, 2008, 14 : 2180-2189.

(收稿日期: 2015-12-11)

(本文编辑: 尹卫靖 张宇)