

doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.03

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.03>

猪脱细胞角膜基质人板层角膜移植术后植片上皮化的临床观察

段虎成, 陈瑞, 罗嘉婧

(佛山市第二人民医院眼科, 广东 佛山 528000)

[摘要] 目的: 观察猪脱细胞角膜基质进行人板层角膜移植术后角膜植片上皮化的临床过程。方法: 收集2017年1月至2018年1月在佛山市第二人民医院经药物治疗无效的感染性角膜炎患者5例。采用脱细胞角膜基质(商品名: 艾欣瞳)行板层移植术, 以对侧眼为对照。术后3 d, 7 d, 1个月, 3个月, 6个月对患者进行随访, 在裂隙灯显微镜下观察移植后植片上皮化完成过程。术后1, 3, 6个月共聚焦显微镜观察植片上角膜上皮细胞密度及上皮神经纤维修复情况。结果: 脱细胞角膜基质板层角膜移植术后3 d开始出现上皮化, 术后10 d上皮化逐步完成, 但角膜上皮排列疏松, 荧光素染色仍有点状染色。激光扫描共聚焦显微镜检查结果显示: 术后1, 3, 6个月角膜上皮细胞排列规则、紧密, 与对侧眼比较角膜上皮细胞密度差异无统计学意义($P>0.05$)。结论: 应用脱细胞角膜基质行板层角膜移植术后植片上皮化过程能够顺利完成。

[关键词] 猪角膜脱细胞基质; 板层角膜移植; 异种移植; 生物工程角膜

Clinical observation of the epithelization of grafts after human lamellar keratoplasty with acellular porcine corneal stroma

DUAN Hucheng, CHEN Rui, LUO Jiajing

(Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Foshan, Foshan Guangdong 528000, China)

Abstract **Objective:** To observe the epithelization process of grafts after human lamellar keratoplasty with acellular porcine corneal stroma (APCS). **Methods:** Five patients with infectious keratitis who were unresponsive to medication treatment were enrolled from January 2017 to January 2018 at the Second People's Hospital of Foshan. Corneal lamellar transplantation was performed with APCS (product name: Acornea) as grafts and the contralateral eyes as control. Patients were followed up at postoperative 3 d, 7 d, 1 month, 3 months and 6 months. The morphology and density of corneal epithelial cells and subepithelial neural fibers were examined by laser confocal microscope at 1, 3 and 6 months after surgery. **Results:** Epithelization of grafts was seen at postoperative 3 days

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-15

通信作者 (Corresponding author): 段虎成, Email: dhcydd@163.com

基金项目 (Foundation item): 佛山市科技局医学类科技攻关项目 (2017AB002931); 广东省中医药局科研项目 (20191322)。This work was supported by Foshan Technology Bureau (2017AB002931) and Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province (20191322), China.

and gradually completed at 10 days after surgery, while the corneal epithelial cells were still loosely arranged with punctate fluorescein staining. Results of confocal laser scanning microscopy showed that corneal epithelial cells were regularly and tightly arranged at 1, 3 and 6 months after surgery without statistically significant difference compared with those in the contralateral eyes ($P>0.05$). **Conclusion:** Complete epithelialization of corneal grafts can be successfully achieved after lamellar keratoplasty with acellular corneal stroma.

Keywords acellular porcine corneal stroma; corneal transplantation; heterograft; bioengineered corneas

角膜病是主要致盲眼病之一, 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。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治疗的重要措施, 由于国内角膜供体材料缺乏使多数患者失去治疗时机^[1-2]。近年来研究^[3-4]显示: 猪来源的角膜在经过脱细胞和去抗原处理后可降低其免疫原性, 并可保留角膜三维立体结构, 具有良好的生物相容性并已制备成商品化的生物角膜材料。其应用于人板层角膜移植术后植片的长期存活及恢复过程受到临床眼科医师的关注^[5]。术后角膜上皮化情况直接影响到角膜植片的存活、修复及透明度, 顺利的角膜上皮化过程可以减少新生血管长入, 免疫排斥反应的发生及植片溶解。本研究应用猪脱细胞角膜基质行角膜板层移植, 术后重点观察角膜上皮化过程, 评价脱细胞生物角膜作为异种材料进行人眼板层角膜移植的有效性及其安全性。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2017年1月至2018年1月在佛山市第二人民医院诊断为单眼感染性角膜炎行脱细胞角膜基质板层角膜移植的患者5例, 年龄56~86岁。采用脱细胞角膜基质(商品名: 艾欣瞳)行板层移植术, 以对侧眼为对照观察角膜上皮化修复过程。入选标准: 确诊为感染性角膜炎, 前期经过规范的药物治疗病情无明显好转, 需要手术治疗。排除标准: 经检查病灶累及全层, 对侧眼有角膜炎、干眼、青光眼及屈光不正等眼部疾病。本研究经佛山市第二人民医院伦理委员会批准, 所有患者入组前签署手术知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 生物角膜材料来源

生物角膜是由深圳艾尼尔角膜工程有限公司提供的猪角膜脱细胞基质(商品名: 艾欣瞳)。

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2%布比卡因和0.75%利多卡因1:1混合剂行球后麻醉, 置开睑器, 固定上、下直肌, 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, 范围超过病灶区0.25~0.5 mm。板层剖切病变角膜, 至病灶完全清除, 选择大于病灶角膜直径0.5 mm的环钻制作脱细胞角膜植片, 厚度400 μm , 采用10.0尼龙线将植片间断对位缝合于角膜植床, 线结埋藏。术后依据病情应用0.5%左氧氟沙星滴眼液、更昔洛韦滴眼液、那他霉素滴眼液或妥布霉素地塞米松滴眼液联合他克莫司滴眼液点眼, 4次/d。

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个月对患者进行随访, 在裂隙灯显微镜下观察移植后植片上皮化程度、植片透明情况及免疫排斥反应。术后1, 3及6个月采用共聚焦显微镜检查角膜上皮细胞形态及密度, 利用内置NAVIS软件对细胞形态、组织结构进行综合分析, 与对侧眼角膜上皮细胞密度比较, 观察角膜上皮化过程及上皮下神经纤维生长情况。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析。术后角膜上皮细胞密度数据资料经检验符合正态分布, 手术前后不同时间点角膜上皮细胞密度采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后植片上皮化过程

裂隙灯显微镜下可见: 术后1~3 d角膜水肿明显, 植片混浊, 角膜缘血管充血, 术后3 d在植片边缘线结处观察角膜上皮生长。至术后10 d角膜水肿基本消退, 角膜上皮细胞跨过植片边缘, 向中心生长, 逐步完成角膜上皮化, 但是荧光素染色仍能观察到点状染色。术后1个月植片透明度逐渐恢复, 角膜上皮化良好。病毒性角膜炎患者上皮化时间延长, 1例患者术后20 d才完成角膜上皮

化, 植片透明度明显低于其他病例。术后6个月植片逐渐恢复透明, 无感染复发现象(图1)。

2.2 激光扫描共聚焦显微镜下角膜形态学检查

术后1, 3, 6个月激光扫描共聚焦显微镜下可见术眼角膜植片上皮基底细胞排列规则、紧密, 呈多边形, 细胞边界清晰, 复层结构。上皮细胞密度与对侧健眼接近, 总体差异无统计学意义($P>0.05$, 表1)。术后6个月可见植片上皮下有稀疏、弯曲的神经纤维长入。

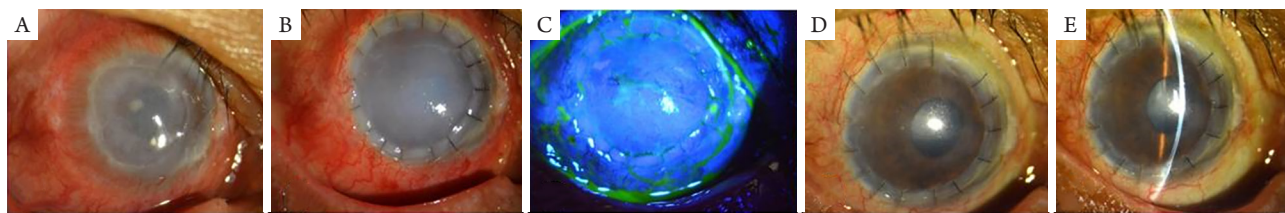


图1 病例1术前、术后裂隙灯显微镜检查

Figure 1 Preoperative and postoperative slit-lamp microscope examination of case 1

(A)术前; (B)术后1周角膜植片水肿吸收, 上皮修复, 但植片仍明显混浊; (C)术后1周角膜染色显示上皮基本愈合, 表面点状染色; (D)术后3个月, 角膜植片透明, 上皮修复; (E)术后6个月, 角膜透明性稳定, 无排斥反应。

(A) Preoperative; (B) 1 week postoperatively, corneal graft edema resolved, epithelium repaired, but the graft was still obviously opaque; (C) 1 week postoperatively, corneal staining showed the epithelium was basically healed with superficial punctate fluorescein staining; (D) 3 months postoperatively, corneal graft was transparent, epithelium repaired; (E) 6 months postoperatively, the transparency of cornea was stable, no rejection.

表1 术眼术后不同时间点与对侧眼角膜上皮细胞密度值的比较($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of corneal epithelial cell density between the operated eyes and the contralateral eyes at different postoperative time points ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	上皮细胞密度/mm
对侧眼	6 129 ± 169
1个月	5 873 ± 145
3个月	5 980 ± 165
6个月	5 988 ± 178

2.3 随访结果

入组5例患者均应用他克莫司滴眼液预防免疫排斥反应。术后6个月, 植片无水肿, 无免疫排斥反应发生。1例患者植片边缘缝线处有新生血管长入, 予以拆除局部缝线。1例在术后8个月自行停用他克莫司眼液后发生排斥反应, 早期表现为植片水肿, 缝线处新生血管长入, 后期出现角膜植片边缘混浊溶解, 予以局部及全身应用激素, 增加他克莫司滴眼频率, 排斥反应控制, 新生血管长入植片边缘。

3 讨论

猪脱细胞角膜基质作为拥有我国自主知识产权并上市的生物角膜材料, 其临床应用还处于早期研究阶段, 应用于人板层角膜移植手术的临床大样本研究的相关报道^[5-6]并不多。在角膜移植术后, 角膜迅速上皮化有利于角膜移植片水肿吸收和炎症反应消退, 同时减少角膜新生血管长入, 减少角膜移植术后排斥反应的发生。角膜植片上皮长期缺损将导致角膜植片水肿、混浊, 甚至直接溶解。我们观察到: 脱细胞角膜基质上皮化时间与入角膜移植术后上皮化时间基本一致, 3 d左右明显观察到角膜上皮跨过植片边缘生长, 术后7~10 d完成角膜上皮化, 其早期愈合过程与人角膜板层角膜移植恢复过程基本一致, 表明移植的脱细胞角膜基质完全适合角膜上皮的移行和生长。角膜上皮化与患者原发病、植片与植床对合情况、缝线等多因素有关。入组病例中病毒性角膜炎患者角膜上皮愈合延迟, 1例患者术后20 d角膜上皮才最终愈合, 植片透明度恢复差。分析原因可能与病毒性角膜炎患者神经营养不良及本身泪液分泌情况异常等因素有关^[7-8], 也提示临床医师在开展上述手术过程中应慎重选择合适的患者作为手术治疗对象。

术后1, 3, 6个月激光扫描共聚焦显微镜下可见术眼角膜植片上皮基底细胞排列规则、紧密, 呈多边形, 细胞边界清晰, 复层结构。上皮细胞密度与对侧健眼接近, 总体差异无统计学意义。王素娟等^[8-9]报道: 应用脱细胞角膜基质对15例角膜炎患者行板层角膜移植, 术后应用共聚焦显微镜观察角膜上皮修复情况与本研究结果相近, 提示一旦角膜植片完成上皮化过程, 经过一段时间的上皮细胞更替, 细胞结构稳定, 也表明猪脱细胞角膜基质能够与角膜上皮细胞形成紧密结合, 上皮细胞黏附稳定。良好稳定的角膜上皮细胞结构也利于移植片逐渐恢复透明。

术后6个月观察期内, 在应用免疫抑制剂的条件下患者未出现植片免疫排斥反应。生物工程角膜材料的免疫原性在临床应用中是否会出现免疫排斥反应及出现免疫排斥反应后药物是否可以控制一直是眼科临床医师关注的焦点问题。后期随访发现: 1例患者在术后8个月自行停止应用他克莫司滴眼液后出现了局部角膜水肿, 缝线处新生

血管长入, 随后出现角膜植片局部混浊及溶解。予以口服激素, 局部增加激素滴眼液用量和他克莫司滴眼液用量, 联合使用人工泪液后, 患者的免疫排斥反应控制, 但是局部角膜植片变薄, 新生血管长入。因此, 术后植片免疫排斥反应仍旧是影响植片存活的主要问题, 合理应用免疫抑制剂可以预防局部免疫反应的发生。

在同种异体角膜供体匮乏的情况下, 应用猪脱细胞角膜基质板层角膜移植治疗感染性角膜炎后, 移植片能够迅速完成角膜上皮化过程, 达到控制感染, 保存眼球的临床目的。但本研究观察的样本量较少, 观察时间较短, 其远期效果及安全性评价还需更大样本量的长期随访观察。

参考文献

1. 张明昌. 我国角膜移植材料的匮乏问题及解决对策[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(4): 289-292.
ZHANG Mingchang. Strategies to resolve the problem of lack of keratoplasty materials in China[J]. Chinese Journal Ophthalmology, 2007, 43(4): 289-292.
2. 史伟云, 谢立信. 关注我国首个生物工程角膜的临床应用[J]. 中华眼科杂志, 2016, 52(3): 161-163.
SHI Weiyun, XIE Lixin. Focus on the clinical application of the first artificial bioengineered cornea in China[J]. Chinese Journal Ophthalmology, 2016, 52(3): 161-163.
3. 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.
4. Shao Y, Yu Y, Pei CG, et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications[J]. Int J Ophthalmol, 2012, 5(4): 415-418.
5. Zhang MC, Liu X, Jin Y, et al. Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma[J]. Am J Transplant, 2015, 15(4): 1068-1075.
6. 廖福红, 余自忠, 胡斌. 使用猪角膜脱细胞基质的人板层角膜移植治疗真菌性角膜炎的临床观察[J]. 国际眼科杂志, 2017, 17(9): 1750-1752.
LIAO Fuhong, YU Zizhong, HU Bin. Clinical study on human lamellar keratoplasty for fungal corneal ulcers with porcine acellular corneal stroma[J]. International Eye Science, 2017, 17(9): 1750-1752.
7. 史伟云, 谢立信. 感染性角膜炎的规范化诊断及治疗[J]. 眼科,

- 2008, 3(17): 148-150.
- SHI Weiyun, XIE Lixin. Normalized diagnosis and treatment of infectious keratitis[J]. Ophthalmology in China, 2008, 3(17): 148-150.
8. 张冰洁, 孙恒, 张远平, 等. 角膜移植的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2015, 15(6): 989-992.
- ZHANG Bingjie, SUN Heng, ZHANG Yuanping, et al. Research progress of corneal transplantation[J]. International Eye Science, 2015, 15(6): 989-992.
9. 王素娟, 张月琴, 李金, 等. 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[J]. 中华实验眼科杂志, 2016, 34(2): 144-149.
- WANG Sujuan, ZHANG Yueqin, LI Jin, et al. Clinical effect of bioengineered cornea and in vivo confocal microscopy observation after human lamellar keratoplasty[J]. Chinese Journal of Experimental Ophthalmology, 2016, 34(2): 144-149.

本文引用: 段虎成, 陈瑞, 罗嘉婧. 猪脱细胞角膜基质人板层角膜移植术后植片上皮化的临床观察[J]. 眼科学报, 2019, 34(2): 85-89. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.03

Cite this article as: DUAN Hucheng, CHEN Rui, LUO Jiajing. Clinical observation of the epithelization of grafts after human lamellar keratoplasty with acellular porcine corneal stroma[J]. Yan Ke Xue Bao, 2019, 34(2): 85-89. doi: 10.3978/j.issn.1000-4432.2019.05.03