

复方倍他米松对异种角膜板层移植术后免疫排斥反应的影响

程 燕, 刘先宁, 吴 洁, 肖湘华, 潘士印, 朱秀萍

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目 (No. 2015SF206); 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (No. 2012KTCQ03-11)

作者单位: (710002) 中国陕西省西安市第一医院眼科 陕西省眼科研究所 陕西省眼科学重点实验室

作者简介: 程燕, 女, 在读博士研究生, 副主任医师, 病区副主任, 研究方向: 角膜及眼表疾病。

通讯作者: 刘先宁, 毕业于西安交通大学, 本科, 研究员, 陕西省眼科学重点实验室副主任, 研究方向: 角膜眼表疾病实验室诊断及组织工程. 877707200@qq.com

收稿日期: 2017-05-25 修回日期: 2017-11-24

Effect of compound betamethasone on immunological rejection after xenogeneic corneal lamellar transplantation

Yan Cheng, Xian-Ning Liu, Jie Wu, Xiang-Hua Xiao, Shi-Yin Pan, Xiu-Ping Zhu

Foundation items: Shaanxi Province Social Development and Technology Research Project (No. 2015SF206); Shaanxi Province Science and Technology Coordination and Innovation Project (No. 2012KTCQ03-11)

Shaanxi Institute of Ophthalmology; Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Xian-Ning Liu. Shaanxi Institute of Ophthalmology; Shaanxi Key Laboratory of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, Xi'an No. 1 Hospital, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. 877707200@qq.com

Received: 2017-05-25 Accepted: 2017-11-24

Abstract

• **AIM:** To observe the sustained-release effect of compound betamethasone by subconjunctival injection on immunological rejection after ostrich-rabbit lamellar keratoplasty.

• **METHODS:** Sixteen healthy New Zealand white rabbits with 6wk old received corneal lamellar keratoplasty, and the corneal graft was ostrich acellular corneal stroma. After surgery all subjects were divided into two groups, Group A (experimental group) were administrated with subconjunctival injection of compound betamethasone injection (once every 7d), and Group B (control group) were administrated with subconjunctival injection of dexamethasone sodium phosphate (once every 7d). At 1, 2wk, 1, 2mo after the surgery, rabbit corneas were taken for paraffin sections, and were observed with H-E

staining, in the meantime changes of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were observed by immunofluorescence.

• **RESULTS:** Two months after surgery, in Group A corneal grafts remained transparent, and showed little neovascularization; HE staining and indirect immunofluorescence showed that only a few neutrophil infiltration, no CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. In Group B, the inflammatory reaction was observable at different time points, the corneal graft was turbid; and the tissue sections and indirect immunofluorescence staining showed that neutrophil infiltration was predominant, and CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes were also seen.

• **CONCLUSION:** Compound betamethasone is able to inhibit the ostrich-rabbit corneal transplantation immune rejection, prolong the survival time of the grafts. The present study lay the foundation for further research and clinical application.

• **KEYWORDS:** ostrich acellular corneal stroma; xenogeneic lamellar keratoplasty; immunological rejection; CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes

Citation: Cheng Y, Liu XN, Wu J, *et al.* Effect of compound betamethasone on immunological rejection after xenogeneic corneal lamellar transplantation. *Guoji Yanke Zazhi* 2018;18(1):21-26

摘要

目的: 观察结膜下注射复方倍他米松对鸵鸟-兔眼板层角膜移植术后免疫排斥反应的缓释治疗作用。

方法: 16只6周龄健康新西兰白兔角膜(单眼)行板层角膜移植术, 植片应用鸵鸟脱细胞的角膜基质, 术后分成两组, 实验组术毕及术后结膜下注射复方倍他米松注射液(每隔7d一次), 对照组术毕及术后结膜下注射地塞米松磷酸钠注射液(每隔7d一次)。分别于术后1、2wk, 1、2mo取兔角膜组织做石蜡包埋切片, 进行HE染色观察组织特点, 同时进行间接免疫荧光法检测CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞的变化。

结果: 术后2mo, 实验组角膜植片在位, 并保持透明, 新生血管极少, 组织切片HE染色和间接免疫荧光染色结果显示, 仅见少许中性粒细胞浸润, 未见CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞; 对照组炎症反应明显, 角膜植片混浊, 组织切片HE染色和间接免疫荧光染色结果显示, 炎症反应以中性粒细胞浸润为主, 可见CD4⁺、CD8⁺T淋巴细胞。

结论: 复方倍他米松作为长效缓释剂可有效抑制鸵鸟-兔板层角膜移植术后免疫排斥反应, 延长植片的存活时间。

关键词: 鸵鸟去细胞角膜基质; 异种板层角膜移植; 免疫排斥反应; CD4⁺T淋巴细胞; CD8⁺T淋巴细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2018.1.05

引用:程燕,刘先宁,吴洁,等. 复方倍他米松对异种角膜板层移植术后免疫排斥反应的影响. 国际眼科杂志 2018;18(1):21-26

0 引言

角膜移植手术是治疗角膜盲的重要手段之一。目前,我国每年仅有几千例眼角膜移植手术,而按照国际比例,我国每年应进行20~30万例眼角膜移植手术。异种角膜基质由于其具有和角膜最接近的光学性能和韧性及天然结构,且来源广泛等优点,已成为近年的研究热点之一^[1-4]。Hori等^[5]研究表明,在角膜移植排斥反应中起主要作用的是角膜上皮的郎格罕斯(Langerhans)细胞,而去除了上皮和内皮层的角膜植片则不会诱导发生受体特异型迟发超敏反应。王智崇等^[6]对异种角膜不同成分的免疫抗原性进行研究显示,角膜基质的免疫抗原性最弱。现已证实,尽管脱细胞角膜基质免疫原性很弱,但移植后依然会存在一定的免疫排斥反应,且角膜移植术后排斥反应与早期的非特异性炎症反应呈正相关关系^[7]。因此,如果能减少角膜移植术后早期的角膜水肿和炎细胞浸润,便可以减少角膜移植术后的排斥反应和角膜新生血管(corneal neovascularization, CNV)。本研究利用我所制备的鸵鸟脱细胞角膜基质,进行兔角膜板层角膜移植术后,结膜下注射复方倍他米松注射液,评价其抑制排斥反应的长效缓释疗效,为异种脱细胞角膜基质材料的临床应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和分组 受体选用健康新西兰幼龄白兔(<8周龄)16只,雌雄不限,体质量 2.0 ± 0.5 kg,由陕西省食品药品监督检验所动物中心提供,标准动物房饲养,实验前经裂隙灯检查,双眼均正常。供体选用全身情况良好的成年鸵鸟8只,雌雄不限,由陕西英考鸵鸟产业有限公司下属的鸵鸟养殖基地提供,实验前检查无眼部疾患。实验分组:将16只兔随机分成两组,每组8只,其中实验组板层角膜移植术毕及术后每隔7d给予结膜下注射复方倍他米松注射液0.3mL(7mg/mL);对照组术毕及术后每隔7d结膜下注射地塞米松磷酸钠注射液0.4mL(5mg/mL)。本课题动物实验方案符合动物保护、动物福利和动物实验伦理学原则。

1.1.2 主要试剂和仪器 胰蛋白酶(GIBCOBRL公司);小鼠抗兔CD4单克隆抗体(美国Thermo公司);小鼠抗兔CD8单克隆抗体(美国SANTA CRUZ公司);羊抗鼠IgG抗体(武汉博士德公司);地塞米松磷酸钠注射液(5mg/mL,广州白云山天心制药股份有限公司);复方倍他米松注射液(7mg/mL,比利时Schering-Plough公司);BX41荧光显微镜(日本OLYMPUS);手术显微镜900A(德国目乐)。

1.2 方法

1.2.1 鸵鸟脱细胞角膜基质的制备和保存 取新鲜鸵鸟眼球16只,用生理盐水和含400U/mL妥布霉素的生理盐水交替冲洗,刮除角膜上皮,在手术显微镜下无菌操作,以直径8mm的刻度环钻钻取约300 μ m厚的板层角膜,将角膜于-80℃冰箱-室温反复冻融3次,4℃下无菌去离子水中充分溶胀角膜12h。用含2.5g/L胰蛋白酶、0.2g/L EDTA的Hanks缓冲液37℃消化60min去除残余的上皮和基质游离细胞。将处理好的角膜基质放于无菌平皿中,置于干燥器内,干燥器盖边缘涂凡士林旋紧密封,室温干

燥脱水48h后取出,在无菌条件下转入准备好的保存瓶内,加盖密封,钴60辐射灭菌消毒。

1.2.2 鸵鸟-兔眼板层角膜移植 所有手术均选择受体右眼为术眼。(1)植床的制备:采用盐酸塞拉嗪注射液肌肉注射进行全身麻醉(0.2~0.4mL/kg),奥布卡因滴眼液进行眼部表面麻醉。用直径7mm的环钻在兔角膜中央区作深约300 μ m的角膜厚度环形钻切,板层刀剖切,制作直径为7mm植床,生理盐水冲洗植床。(2)植片复水和修剪准备:将制备的鸵鸟脱细胞角膜基质片复水15min,取直径为7.25mm的环钻钻取植片备用。(3)板层角膜移植:将植片原内皮面朝下覆盖于植床上,10-0缝线间断缝合鸵鸟脱细胞角膜基质植片16针。术毕,对照组球结膜下注射地塞米松磷酸钠注射液0.4mL(5mg/mL);实验组球结膜下注射复方倍他米松注射液0.3mL(7mg/mL);两组均涂红霉素眼膏,并用3-0缝线做眼睑缘缝合。两组均于术后第3d拆睑缘缝线后使用妥布霉素滴眼液点眼,每日2次,晚上涂红霉素眼膏1次。实验组术后每隔7d结膜下注射复方倍他米松注射液0.3mL(7mg/mL),对照组术后每隔7d结膜下注射地塞米松磷酸钠注射液0.4mL(5mg/mL)。两组治疗时间均为8wk。

1.2.3 术后观察

1.2.3.1 排斥反应 术后1、2wk,1、2mo在裂隙灯显微镜下观察角膜植片透明度、角膜水肿、角膜新生血管情况,测量角膜新生血管伸入植片的长度,并拍照记录。参照Holland等^[8]建立的临床观察评分标准(表1)进行评分并记录。以上3项观察指标评分之和为角膜移植反应指数(RI),定期记录RI,若RI ≥ 5 表示发生排斥反应。

1.2.3.2 HE染色 术后1、2wk,1、2mo,剪下边缘带1mm巩膜组织的受体角膜植片,置于中性甲醛溶液中固定24h,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,进行HE染色。光学显微镜下观察并摄影记录。

1.2.3.3 免疫荧光组织化学检测CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞 取石蜡包埋组织切片,经二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水,使用体积分数为10%羊血清37℃孵育30min,甩去血清。0.4%胃蛋白酶消化10min修复抗原。在标本上分别滴加按1:100稀释的小鼠抗兔CD4、CD8单克隆抗体(一抗),4℃湿盒过夜,复温1h,PBS缓冲液振荡洗涤3次,每次5min。滴加1:50稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG抗体(二抗),避光条件下,37℃孵育1h,PBS缓冲液振荡洗涤2次,每次5min,然后用蒸馏水振荡洗涤1次,用50%无荧光缓冲甘油封固。用正常兔淋巴结石蜡包埋切片做阳性对照,阴性对照用PBS缓冲液代替一抗进行染色,其余步骤不变。荧光显微镜下观察并拍照。

统计学分析:所有数据均采用SPSS17.0软件进行分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,重复测量数据采用重复测量数据的方差分析,若差异具有统计学意义,可进一步进行比较,组间比较采用独立样本t检验,组内比较采用LSD-t检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 鸵鸟脱细胞角膜基质组织学特点 鸵鸟脱细胞角膜基质复水后呈灰白色、半透明状,具有角膜原有的基本形态和韧性(图1)。石蜡包埋组织切片HE染色后可见较致密的角膜基质纤维,排列较整齐,呈波浪状,纤维间有大小不等的空隙,无完整细胞成分(图2)。

表 1 临床观察评分标准

观察指标	0分	1分	2分	3分	4分
角膜植片透明度	清亮	轻度混浊	混浊加重、前房清晰可见	混浊加重、前房模糊可见	全混浊、前房看不见
角膜水肿	无基质水肿或上皮水肿	轻度基质增厚	弥漫性基质水肿	弥漫性基质水肿伴上皮水肿	大泡性角膜病变
角膜新生血管	无新生血管	周边部新生血管	切口部新生血管	植片新生血管	全角膜新生血管

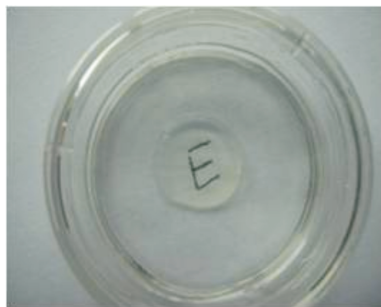


图 1 鸵鸟脱细胞角膜基质复水后外观。

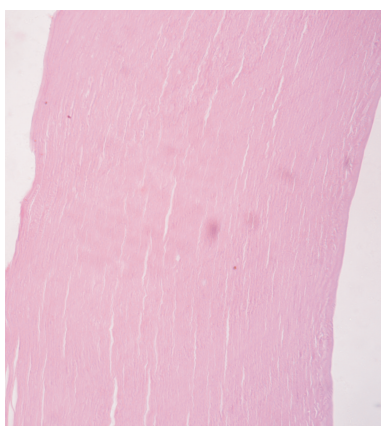


图 2 鸵鸟脱细胞角膜基质组织切片 HE 染色结果 (×200)。

2.2 鸵鸟-兔眼板层角膜移植术后角膜局部体征 板层角膜移植术毕,对照组和实验组脱细胞角膜基质植片均较透明(图3)。术后1、2wk,1mo,实验组鸵鸟脱细胞角膜植片均在位存活,植片透明,新生血管极少,上皮生长良好,术后2mo时仅可见角膜轻度混浊,角膜植片边缘少许新生血管长入(图4)。对照组术后1wk出现植片水肿,并逐渐加重,术后2wk时局部缝线松动,缝线根部首先出现白色分泌物,术后1mo植片出现混浊、溶解,新生血管从角膜缘长入植片,术后2mo时角膜上皮缺损愈合,但植片上可见大量新生血管,植片混浊,瞳孔及眼内结构无法窥清(图5)。

2.3 角膜移植术后角膜组织形态 HE染色结果显示,术后2wk,实验组植片疏松胶原纤维组织内可见少量成纤维细胞增生,植片和植床交界面清晰,可见表层上皮细胞;术后1mo,上皮细胞表层为扁平、翼状,中间为卵圆形或多边形,基底为矮柱状或立方体细胞,在植片和植床交界面处成纤维细胞增生活跃(图6A);术后2mo,植片和植床紧密吻合,上皮完整,基质胶原排列整齐,两者边界已模糊,似正常角膜组织,无炎症反应或在少数缝合部靠近角膜缘部位出现轻微的以中性粒细胞为主的炎细胞浸润,同时伴有单个细小的新生血管(图7A)。术后2wk,1mo,对照组上皮生长不完整,基质水肿,植片和植床交界面、缝线周围、角膜缘处均可见大量炎细胞浸润(以中性粒细胞为主并伴有单个核淋巴细胞存在)及炎性坏死灶,并有较多的新

表 2 术后两组 RI 值比较

时间	实验组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
术后 1wk	1.25±0.46	1.50±0.53	1.000	0.334
术后 2wk	1.38±0.52	4.63±0.74	10.142	<0.001
术后 1mo	1.88±0.64	7.50±0.92	14.130	<0.001
术后 2mo	2.75±0.71	10.13±0.99	17.134	<0.001

注:实验组:结膜下注射复方倍他米松注射液;对照组:结膜下注射地塞米松磷酸钠注射液。

生血管(图6B);术后2mo,上皮不完整,角膜基质层有新生血管,基质胶原排列紊乱,纤维母细胞增生,有大量炎细胞(中性粒细胞和淋巴细胞)浸润(图7B)。

2.4 角膜移植术后排斥反应情况 两组术后 RI 值比较,差异具有统计学意义($F_{\text{组间}} = 338.80, P_{\text{组间}} < 0.001; F_{\text{时间}} = 184.942, P_{\text{时间}} < 0.001$)。术后1wk,实验组和对照组 RI 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后2wk,1、2mo,两组 RI 值比较,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。随着移植术后时间的推移,对照组 RI 值呈升高趋势,表现为明显的排斥反应(表2)。

2.5 移植术后角膜组织 CD4⁺ 和 CD8⁺T 淋巴细胞检测结果 免疫荧光组织化学检测结果显示,术后1、2wk,实验组和对照组角膜组织中 CD4⁺、CD8⁺T 细胞均呈阴性。术后1、2mo,对照组 CD4⁺、CD8⁺T 细胞呈阳性,实验组呈阴性(图8、9)。

3 讨论

眼外伤和感染性角膜疾病是我国第二大致盲原因。目前,角膜移植已被公认为是治疗角膜严重瘢痕变性、恢复视力的唯一有效方法,并且该手术成功率较高,但因角膜供体来源缺乏,具有一定的局限性,严重影响了此类手术在临床上的应用和开展。异种角膜供体材料是一种天然结构,来源丰富,取材容易,具有以下优点^[9]:(1)基质本身免疫原性很小,脱细胞后更小,残留的微量抗原不足以诱发排斥反应;(2)角膜基质内含有多种细胞因子,经物理或化学方法处理后仍有部分保留,这样的微环境有利于上皮和基质细胞的生长、增殖;(3)抗拉力强、可以缝合;(4)移植后角膜可以透明愈合^[10-12];(5)异种基质移植后,基质细胞可以重新长入,且排列有序;(6)受体角膜神经可以长入被移植的角膜基质^[13];(7)可以根据需要进行塑形。

本研究中,鸵鸟角膜基质经脱细胞处理后,角膜植片外观大致透明,角膜基质胶原纤维的排列规则,无细胞结构,避免了组织细胞诱发的排斥反应,可以作为一种较好的角膜供体材料,但其具体应用尚需进一步的实验研究论证。尽管如此,术后免疫排斥反应的发生仍是导致手术失败的主要原因,严重阻碍了该类角膜移植术的开展^[14]。发生排斥反应的机制有以下几点:(1)创伤修复和炎症:在创伤、缝线等刺激下,趋化郎格罕氏细胞等进入损伤部位,为排斥反应的发生奠定了基础^[15];(2)致敏与免疫活

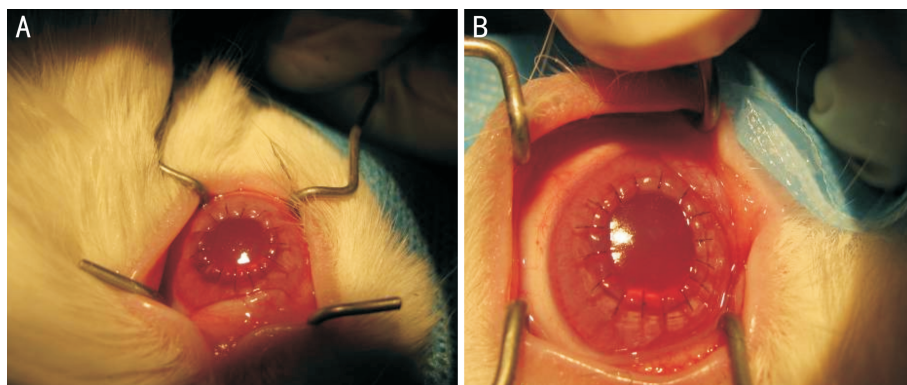


图3 角膜移植术后脱细胞角膜基质植片眼前节照片 A:实验组;B:对照组。

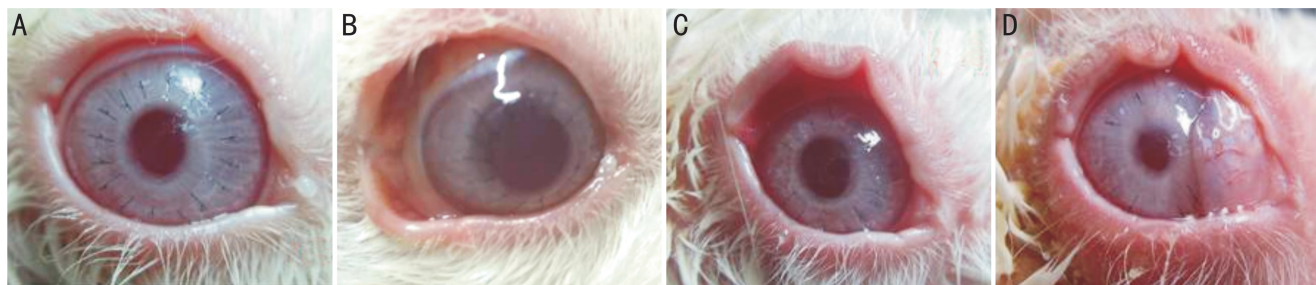


图4 实验组角膜移植术后脱细胞角膜基质植片眼前节照片 A:术后1wk;B:术后2wk;C:术后1mo;D:术后2mo。

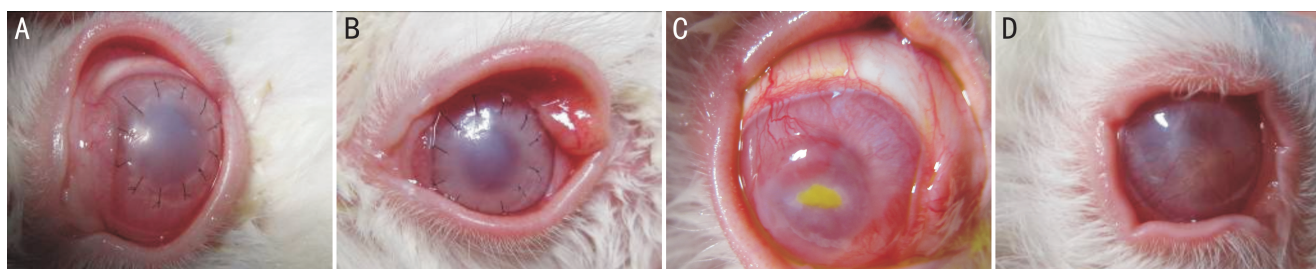


图5 对照组角膜移植术后脱细胞角膜基质植片眼前节照片 A:术后1wk;B:术后2wk;C:术后1mo;D:术后2mo。

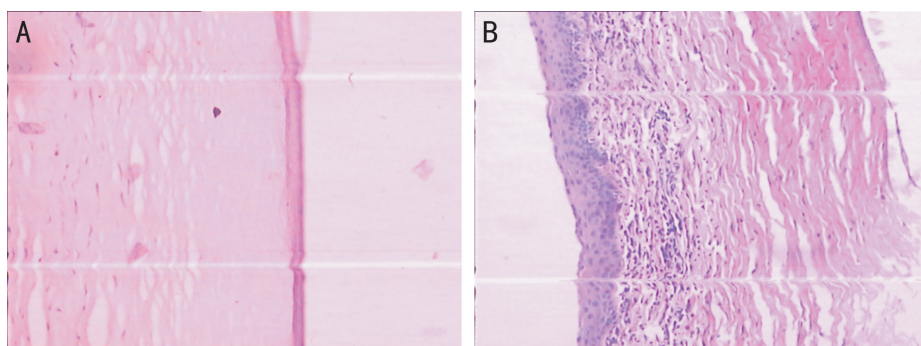


图6 术后1mo角膜组织HE染色结果($\times 200$) A:实验组,角膜上皮完整,可见层间成纤维细胞增生,少见炎细胞浸润;B:对照组,可见角膜基质水肿,大量炎细胞浸润及新生血管。

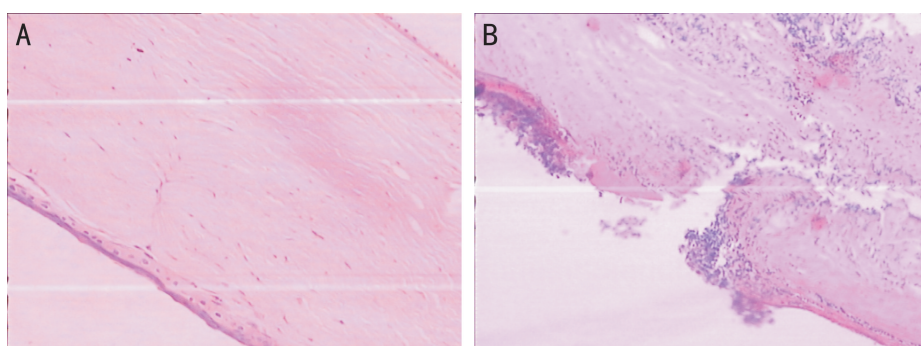


图7 术后2mo角膜组织HE染色结果($\times 200$) A:实验组,植片植床紧密贴合,基质胶原排列整齐,少见炎细胞浸润;B:对照组,基质胶原纤维排列紊乱,大量炎细胞浸润。

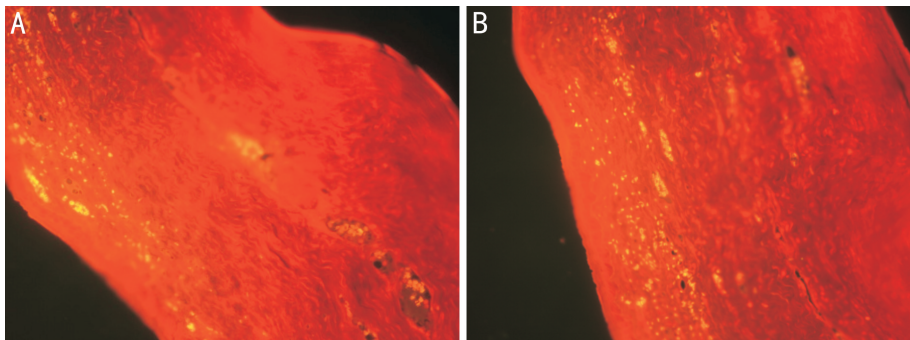


图8 术后2mo 对照眼角膜组织切片 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞($\times 200$) A:CD4⁺ T 淋巴细胞;B:CD8⁺ T 淋巴细胞。

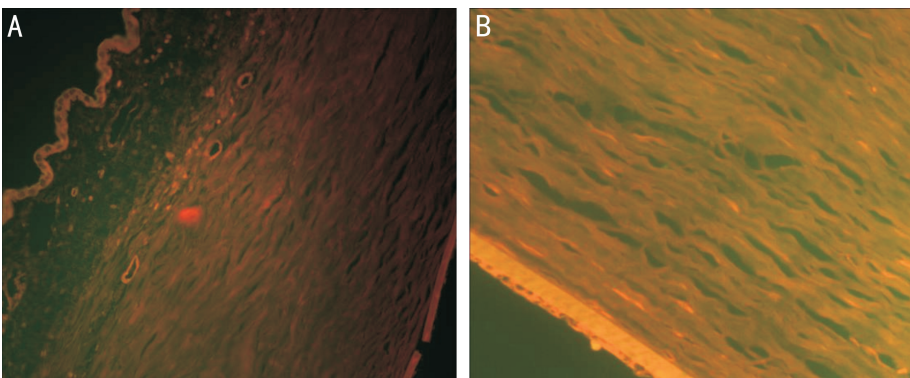


图9 术后2mo 实验眼角膜组织切片 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞($\times 200$) A:CD4⁺ T 淋巴细胞;B:CD8⁺ T 淋巴细胞。

性细胞特异性增殖:在切口的缝线外,各层损伤或脱落的细胞在非特异性炎症反应趋化来的抗原递呈细胞(包括郎格罕氏细胞)的作用下,增殖并释放更多的淋巴因子,促进淋巴细胞增殖,增强主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)抗原表达和对炎性细胞的趋化^[16]。参与角膜移植免疫排斥反应的主要是T淋巴细胞,包括 CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞。在排斥反应早期,角膜移植片内已有 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞浸润^[17]。CD4 和 CD8 基因敲除小鼠角膜移植实验显示,CD4⁺ T 淋巴细胞在角膜移植术后免疫排斥反应中起关键作用,而 CD8⁺ T 淋巴细胞可能与 CD4⁺ T 淋巴细胞有协同和加强免疫排斥的作用^[18]。CD4⁺ T 淋巴细胞通过迟发型超敏反应(DTH)参与介导排斥反应。在 DTH 发生过程中,活化的 CD4⁺ T 淋巴细胞分化为 1 型辅助性 T 细胞(Th1)、2 型辅助性 T 细胞(Th2)或 3 型辅助性 T 细胞(Th3)^[19]。在本研究中,对照组在角膜移植术后 2wk 开始出现角膜植片水肿,缝线松动,角膜植片上皮缺损,角膜基质轻度溶解,大量新生血管长入植片,RI 值呈现逐步升高趋势,提示角膜移植排斥反应的发生随移植时间的延长加重;与此同时,角膜组织中 CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞均呈现阳性,这与角膜移植排斥反应的发生密切相关,该结果与以往的研究结果一致^[20]。同时,术后 2mo,实验组 CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞均呈阴性,角膜组织切片显示植片和植床紧密贴合,基质胶原纤维排列整齐,角膜大致透明。进一步说明了复方倍他米松能够有效抑制异种角膜移植术后的免疫排斥反应,并发挥其长效缓释机制,保持移植角膜供体透明,为移植后期研究提供条件,奠定基础。

复方倍他米松注射液是二丙酸倍他米松和倍他米松磷酸钠的灭菌混悬注射液,每 1mL 含二丙酸倍他米松

5mg 和倍他米松磷酸钠 2mg,是一种可溶性倍他米松酯与微溶性倍他米松酯的复方制剂,具有强效抗炎、抗排斥、抗过敏作用,其抗炎、抗排斥作用均较地塞米松强。肌肉注射地塞米松磷酸钠或地塞米松醋酸酯后分别于注射后 1、8h 达血药浓度峰值,其血浆半衰期为 190min,组织半衰期为 3d。而可溶性倍他米松磷酸钠注射后能被很快吸收而迅速起效;微溶性的二丙酸倍他米松注射后,能够暂时贮藏于体内,成为一个供缓慢吸收的贮库,巩固药效,从而使得复方倍他米松能够长时间抑制免疫排斥反应^[21]。

角膜移植术后植片上皮的尽早愈合是这类手术成功的早期关键因素,眼表频繁使用糖皮质激素类滴眼液点眼势必会影响植片的上皮愈合,导致愈合延迟,进而诱发角膜植片的溶解或继发感染,因此,术后早期植片上皮未能完全愈合的情况下应尽量避免滴用糖皮质激素类滴眼液。临床上可以在术后早期给予患者全身静脉糖皮质激素抗排斥治疗,但是对于动物实验而言,则无法静脉给药,在此情况下,眼局部注射就显得非常重要。地塞米松磷酸钠注射液虽起效快,但因其半衰期短,频繁的眼结膜下注射对于动物实验来说操作难度大,寻找一种强效激素并能较长时间维持作用浓度的药物至关重要。本研究中术后早期结膜下注射复方倍他米松注射液能够发挥强效的抗排斥作用,有效地防止排斥反应的发生。这也为我们后期临床研究抗排斥反应的药物提供了实验依据。

近年来,由于角膜材料的来源仍处于匮乏状态,异种角膜细胞基质作为板层角膜移植的供体或组织工程角膜的支架材料已研究成为研究的热点,但组织的相容性、免疫排斥反应等问题的发生机制仍不清楚,我们将进一步深入研究探索。

参考文献

- 1 Kuwabara Y. Studies on heterotransplantation of corneas. *Am J Ophthalmol* 1962;53(6):911-917
- 2 Werblin TP, Kaufman HE, Friedlander MH, et al. Epikeratophakia; the surgical correction of aphakia. III. Preliminary results of a prospective clinical trial. *Arch Ophthalmol* 1981;99(11):1957-1960
- 3 McDonald MB, Koenig SB, Safir A, et al. Epikeratophakia; the surgical correction of aphakia. *Ophthalmology* 1983;90(6):668-672
- 4 徐锦堂, 李辰, 杜晶. 蜂蜜脱水低温保存同种和异种板层角膜片移植后植片的命运. *眼科研究* 1986;4(4):193-197
- 5 Hori J, Joyce NC, Streilein JW. Immune privilege and immunogenicity reside among different layers of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(10):3032-3042
- 6 王智崇, 葛坚, 徐锦堂, 等. 角膜不同组织免疫原性分析. *中华眼科杂志* 2002;38(9):535-539
- 7 罗小玲, 徐锦堂, 江振友, 等. 异种角膜基质异位移植对大鼠外周血 T 细胞亚群的影响. *中国病理生理杂志* 2004;20(4):613-616
- 8 Holland EJ, Chan CC, Wetzig RP. Clinical and immunohistologic studies of corneal rejection in the rat penetrating keratoplasty model. *Cornea* 1991;10(5):374-380
- 9 王智崇, 葛坚, 徐锦堂, 等. 角膜不同组织免疫原性分析. *中华眼科杂志* 2002;38(9):535-539
- 10 Ponce Márquez S, Martínez VS, McIntosh Ambrose W, et al. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 2009;5(6):1839-1847
- 11 Xu YG, Xu YS, Huang C, et al. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis* 2008;14(18):2180-2189
- 12 Amano S. Transplantation of cultured human cornea endothelial cells. *Cornea* 2003;22(7):66-74
- 13 陈根云, 吴静, 徐锦堂, 等. 异种角膜基质材料正位植入后神经再生的研究. *眼科新进展* 2005;25(6):485-491
- 14 吴连胜, 陈建苏, 徐锦堂, 等. 异种全厚板层角膜移植术后局部应用高渗葡萄糖的研究. *眼外伤职业眼病杂志* 2008;30(1):5-8
- 15 马生虎, 陈建宏, 金秉义. 异种角膜移植临床研究. *眼科新进展* 2006;2(20):43-44
- 16 Dorrepaal SJ, Cao KY, Slomovic AR, et al. Indications for penetration keratoplasty in a tertiary referral centre in Canada, 1996-2004. *Can J Ophthalmol* 2007;42(2):244-250
- 17 Miyazaki D, Inoue Y, Yao YF, et al. T-cell-mediated immune responses in alloepithelial rejection after murine keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2590-2597
- 18 史伟云, 谢立信. CD4 和 CD8 基因敲除鼠行穿透性角膜移植术后免疫排斥特征的研究. *中华眼科杂志* 2005;41(4):350-354
- 19 Niederkorn JY. Immunology and immunomodulation of corneal transplantation. *Int Rev Immunol* 2002;21(2-3):173-196
- 20 Miyazaki D, Inoue Y, Yao YF, et al. T-Cell-Mediated immune responses in alloepithelial rejection after murine kerato-epithelioplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(11):2590-2597
- 21 Young JM, Youll BE, Wagner BM. Topical betamethasone 17 valerate is an anticorticostemid in the rat. I. Dermal atrophy. *Br J Dermatol* 1978;99(6):655-663