

深板层角膜内皮层移植治疗角膜内皮损伤的实验研究

高桂平, 邵毅, 王军花, 裴重刚, 杨璐, 周琼

基金项目: 中国江西省卫生厅资助项目 (No. 20071021); 中国江西省卫生厅科技计划立项资助项目 (No. 20091069)

作者单位: (330006) 中国江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院眼科

作者简介: 高桂平, 男, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜病与眼表疾病。

通讯作者: 高桂平. freebee992296@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-04-06 修回日期: 2011-07-04

Experiment study on the deep lamellar endothelial keratoplasty for corneal endothelial wound in rabbit model

Gui-Ping Gao, Yi Shao, Jun-Hua Wang, Chong-Gang Pei, Lu Yang, Qiong Zhou

Foundaion items: Health Department Foundation of Jiangxi Province, China (No. 20071021); Jiangxi Provincial Science and Technology Funded Project, China (No. 20091069)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Gui-Ping Gao. Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. freebee992296@yahoo.com.cn

Received: 2011-04-06 Accepted: 2011-07-04

Abstract

• **AIM:** To evaluate the deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK) for corneal endothelial wound in a rabbit model.

• **METHODS:** Totally 48 eyes (24 cases) with corneal endothelial wound model were studied, which were divided into 2 groups in postoperative 2nd day: the DLEK surgery was performed on experimental group ($n = 12$) and the other cases ($n = 12$) were as the control group. The postoperative examinations including the intraocular pressure (IOP), reaction of the anterior chamber and complications were performed on 1, 2, 3, 7, 14 days; 1 month after surgery respectively. A rabbit selected randomly in the two groups ($n = 6$, respectively) was killed in 1 month after operation and extirpated the eyeball to observe the condition of myofibroblast and inflammatory cells and compare their difference.

• **RESULTS:** There were no significant difference of IOP and reaction of the anterior chamber among the two groups at 3d after operations ($P > 0.05$); Comparing with control group, the complications didn't increased. There was

significant difference on myofibroblast ($t = 5.716, P < 0.05$) and inflammatory cells ($t = 6.991, P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** DLEK have less complications, inflammatory reaction and reaction of the anterior chamber, also can maintain IOP and cornea transpance for corneal decompensation rabbit model.

• **KEYWORDS:** DLEK; corneal endothelial wound; myofibroblast; inflammatory

Gao GP, Shao Y, Wang JH, *et al.* Experiment study on the deep lamellar endothelial keratoplasty for corneal endothelial wound in rabbit model. *Gugji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(8):1321-1323

摘要

目的: 探讨深板层角膜内皮层移植在兔角膜内皮损伤模型的应用效果。

方法: 选择新西兰白兔 24 只, 制作兔角膜内皮损伤模型第 2d 随机分为两组: 实验组进行深板层角膜内皮层移植术组, 对照组不予处理。分别于术后 1, 2, 3, 7, 14d; 1mo 观察眼压、前房反应、并发症情况, 术后 1mo 每组处死 12 只兔子, 摘除眼球, 12 眼 (两组各 6 眼) 作病理切片检查, HE 染色观察炎症细胞情况; 另 12 眼 (两组各 6 眼) 用 α -SMA Wholmount 染色法观察兔角膜内皮细胞瘢痕和肌成纤维细胞情况并进行细胞计数。

结果: 实验组角膜术后一直维持透明, 对照组在术后 5d 明显变混浊, 眼压、前房反应和并发症在两组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。术后 1mo 两组实验兔在单位面积 ($500\mu\text{m}^2$) 肌成纤维细胞数和炎症细胞数均有显著性差异 ($t = 5.716, 6.991; P < 0.05$)。

结论: 深板层角膜内皮层移植应用于兔角膜内皮损伤模型中炎症反应小, 前房反应轻, 能保持角膜透明, 且并发症少。

关键词: 深板层角膜内皮层移植; 角膜内皮损伤; 肌成纤维细胞; 炎症

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.08.004

高桂平, 邵毅, 王军花, 等. 深板层角膜内皮层移植治疗角膜内皮损伤的实验研究. 国际眼科杂志 2011;11(8):1321-1323

0 引言

角膜内皮损伤为常见眼科致盲病, 且有相当一部分是由于无晶状体眼/人工晶状体眼大泡性角膜病变、虹膜角膜内皮综合征和 Fuchs 角膜内皮病变等引起, 对这些患者目前倾向于接受穿透性角膜移植手术 (penetrating keratoplasty, PK)。但 PK 术后, 由于角膜排斥反应发生,

有超过1/2的患者角膜内皮失代偿,再次造成视功能的损害。近年来,深板层角膜内皮层移植(deep lamellar endothelial keratoplasty, DLEK)的广泛应用明显提高了手术成功率,但因人体内很难评价其危险性,因此探讨其在活体的反应至关重要。我们对角膜内皮损伤的动物模型进行了DLEK治疗,旨在探讨DLEK临床上用于治疗角膜内皮损伤患者的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 成年健康雌性新西兰白兔24只,体质量1.80~2.20kg(由南昌大学医学院动物实验部提供)。角膜内皮损伤模型制作第2d随机分为两组:实验组12只12眼行DLEK,对照组12只12眼未行手术。

1.2 方法

1.2.1 角膜内皮损伤模型制备 所有动物术前耳缘静脉注射30g/L戊巴比妥(30mg/kg)全身麻醉,用1:1000汞和生理盐水冲洗右眼3次,常规消毒铺无菌巾,先在角膜正中区用直径8mm角膜环钻在角膜上环钻,以能看清印迹区为宜。9:00位角巩缘内侧方行双眼前房穿刺,将撕囊镊伸入前房并对印迹区内的角膜内皮进行刮除。所有兔角膜内皮损伤模型均在右眼进行。

1.2.2 DLEK模型制备^[1,2] 在角膜内皮损伤模型制作第2d,实验组动物术前耳缘静脉注射30g/L戊巴比妥(30mg/kg)全身麻醉,常规消毒铺巾,先做右角膜隧道切口,将泪道冲洗针头在角膜内皮内刮除内皮细胞,直径大约6mm。待角膜内皮细胞失代偿模型形成后,术前耳缘静脉注射30g/L戊巴比妥(30mg/kg)全身麻醉,常规消毒铺巾,行右眼球结膜下浸润麻醉,制作带蒂的角膜瓣,然后掀起角膜瓣,移植其下部角膜组织。供体角膜内皮面向上,轻轻环钻后揭下9mm直径的Descemet's膜,卷缩成DM膜卷备用。受体角巩缘作5mm的隧道切口,用导管在受体前房内揭下直径9mm大小的Descemet's膜作为植床。将DM卷入前房并展开。向前房注入气泡,使DM充分展平与植床贴附,角巩膜隧道切口自动闭合。所有手术操作均由1名临床经验丰富的眼科医师执行。

1.2.3 活体观察指标 分别于手术前和手术后第1,2,3,7,14d;1mo用接触性眼压计测量眼压,记录3次测量值的平均值。并于上述相应时间观察角膜透明情况、前房反应和并发症,如眼内炎、大泡性角膜病、浅前房、低眼压、角膜穿透、角膜层间新生血管、移植片移位、移植片翻转倒位等。前房反应以+表示闪辉,++表示闪辉明显,+++表示可见细胞。

1.2.4 肌成纤维细胞与炎症细胞计数 分别于术后1mo处死受试兔各6只,摘除眼球,剪下全层角膜,进行5 μ m切片后HE染色,光学显微镜($\times 400$)下观察内皮细胞炎症情况,并拍照使用Image Pro Plus V6.0软件(ipp 6.0, Media Cybernetics, Silver Spring, USA)计算单位面积炎症细胞数。另12只受试兔(两组各6眼)分别于术后1mo处死,摘除眼球,剪下全层角膜,显微镜下撕下带有后弹力层的内皮层,将其平铺于玻片上,待其风干后,进行 α -SMA Wholemount染色,荧光共聚焦显微镜下观察肌成纤维细胞增殖情况。每张铺片在荧光共聚焦显微镜高倍镜下($\times 400$)拍6张照片,使用ipp 6.0软件计算单位面积肌

表1 各组手术前后各时段眼压 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

时间(d)	n(眼)	组别		t	P
		对照组	实验组		
术前正常眼压	24	18.8 \pm 2.6	19.2 \pm 2.4	0.814	>0.05
术前模型眼压	24	19.9 \pm 2.3	20.7 \pm 2.2	0.361	>0.05
术后1d	24	24.3 \pm 2.2	23.8 \pm 2.3	0.866	>0.05
2d	24	23.6 \pm 2.7	22.1 \pm 1.9	1.042	>0.05
3d	24	20.4 \pm 3.2	20.2 \pm 2.7	0.978	>0.05
术后1wk	24	20.9 \pm 2.1	21.9 \pm 3.3	1.274	>0.05
2wk	24	20.6 \pm 2.2	20.9 \pm 2.1	0.896	>0.05
1mo	24	20.4 \pm 2.2	21.1 \pm 1.6	1.318	>0.05

成纤维细胞数。

统计学分析:采用SPSS 15.0统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准均为 $\alpha = 0.05$;其中比较两组前房反应差异用 χ^2 检验;比较两组术后各时间眼压差异、炎症细胞和肌成纤维细胞等用两样本t检验。

2 结果

2.1 眼压 两组术后眼压3d后稳定在术前水平($P > 0.05$)。两组之间各时段平均眼压进行两样本t检验,术后两组各时间点比较差异无显著性($t = 0.866, 1.042, 0.978, 1.274, 0.896, 1.318; P > 0.05$;表1)。

2.2 角膜情况和前房反应 实验组角膜在手术3d后一直维持透明情况,而对照组在手术5d后明显变混浊,部分区域有白色瘢痕形成。角膜手术后第1,2d两组前房反应较重,所有兔眼前房反应++,3d后两组前房反应均消失,两组比较无显著差别($P > 0.05$)。

2.3 并发症 两组均未发生眼内炎、大泡性角膜病、浅前房、低眼压、角膜穿透、角膜层间新生血管等,实验组未发生移植片移位、翻转倒位等并发症。

2.4 炎症细胞和肌成纤维细胞计数 实验组术后第1wk,有少量周边的角膜内皮细胞向中央区移行,移植的角膜内皮细胞周边有少量炎症细胞和肌成纤维细胞增生。对照组术后第1wk,部分周边的角膜内皮细胞向中央区移行,可见有较多炎症细胞和肌成纤维细胞长入角膜内皮刮出区。术后1mo实验组肌成纤维细胞计数为 0.367 ± 0.034 个/ $500\mu\text{m}^2$;而对照组肌成纤维细胞计数为 3.165 ± 0.696 个/ $500\mu\text{m}^2$,两者有显著性差异($t = 5.716, P < 0.05$);HE染色后,显微镜下拍照计算术后1mo炎症细胞计数,结果显示实验组(0.014 ± 0.003 个/ $500\mu\text{m}^2$)与对照组(8.332 ± 1.467 个/ $500\mu\text{m}^2$)炎症细胞数有显著性差异($t = 6.991, P < 0.05$)。

3 讨论

目前,无晶状体眼/人工晶状体眼大泡性角膜病变、ICE综合征和Fuchs角膜内皮病变等角膜内皮细胞失代偿患者的人数不断增加,而接受穿透性角膜移植手术(PK)的患者中超过1/2属于角膜内皮失代偿。给这些前层角膜基质内未形成瘢痕的患者行传统PK手术虽然已取得良好效果,但却要丢弃患者自身健康的前部角膜组织,而且术后严重的排斥反应仍是手术失败的主因。随着眼科显微手术技术的发展,仅移植角膜内皮细胞层已成为可能。DLEK主要移植以角膜内皮层为主的带有Descemet's膜和薄层后部基质板层的角膜组织^[3,4],保留患者健康的部分

甚至全部基质组织,从而保留角膜前表面的球面性质^[5,6],散光小,可使患者获得较好的术后矫正视力^[7];无缝线保存了大部分的角膜神经,创伤小,术后不需拆线,切口小而密闭^[8];角膜表面为自体角膜,移植抗原量小,抗原性低,减少了来自供体的抗原呈递细胞,符合眼生理及并发症少的特点,是西方角膜内皮疾病首选术式。

本实验采用角膜内皮损伤模型模拟角膜内皮细胞失代偿,结果表明两组在手术前后眼压基本稳定,可见两组手术均没有诱发青光眼的发生。同时,两组未出现其他并发症如前房出血、眼内炎等。因此,DLEK治疗角膜内皮失代偿能够有效地减少炎症反应,减少瘢痕形成,并发症少,从而提高了手术远期的成功率。肌成纤维细胞和炎症细胞计数结果表明,实验组肌成纤维细胞数较少,统计学上有显著性差异,说明DLEK能有效地减少炎症反应和瘢痕形成。此外,DLEK可利用婴幼儿的角膜供体,来源扩大,解决了目前角膜材料严重匮乏的现状,术后疗效好。

我们的动物实验显示,DLEK是一种治疗角膜内皮损伤的有效手术方式,有较好的临床应用价值。但DLEK具有一定的局限性,仅适用于同种角膜内皮移植的患者。本研究旨在为寻求一种治疗角膜内皮细胞损伤的理想方法提供实验依据,为进一步临床应用提供理论基础。至于异种角膜内皮移植是否同样可行还有待于进一步实验研究。

参考文献

- 1 Bahar I, Kaiserman I, McAllum P, et al. Comparison of posterior lamellar keratoplasty techniques to penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* 2008;115(9):1525-1533
- 2 Melles GR, Eggink FA, Lander F, et al. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* 1998;17(6):618-626
- 3 杨艳峰,黄一飞. 选择性角膜内皮移植术. 国际眼科杂志 2005;5(2):303-308
- 4 潘东艳,柳林. 板层角膜移植术手术方式及植片材料研究进展. 国际眼科杂志 2005;5(4):738-741
- 5 Lombardo M, Lombardo G, Friend DJ, et al. Long-term anterior and posterior topographic analysis of the cornea after deep lamellar endothelial keratoplasty. *Cornea* 2009;28(4):408-415
- 6 Dirisamer M, Acis G, Dapena I, et al. Secondary "Thin-DSEK" after long-term graft failure in DLEK: a double transplanted cornea. *Cornea* 2011;30(7):828-831
- 7 Ferr LA, Nada O, Sherknies D, et al. Optical coherence tomography anatomy of the corneal endothelial transplantation wound. *Cornea* 2010;29(7):737-744
- 8 Mashor RS, Kaiserman I, Kumar NL, et al. Deep lamellar endothelial keratoplasty: up to 5-year follow-up. *Ophthalmology* 2010;117(4):680-686

热烈祝贺《国际眼科杂志》中文版进入美国《化学文摘》千刊表

(1)据中国高等学校自然科学学报研究会外事工作委员会/中国科学技术期刊编辑学会国际交流工作委员会2010年统计,在《美国化学文摘》数据库共10000种以上期刊中,《国际眼科杂志》进入2009年引文频次最高的1000种期刊。这1000种期刊中收录中国期刊(含港台)236种,本刊排序144(CA总排序694)。它是我国唯一进入CA千刊表的眼科杂志。

(2)据《波兰哥白尼索引》2011年6月13日发来邮件,《国际眼科杂志》2010年的《哥白尼索引》评估值(ICV)=9.00,在其收录中国495种期刊中名列前茅。以上信息表明,本刊中文版已在国际上具有较强的影响力,这是本刊国际化发展中取得的丰硕成果。