

高危角膜移植排斥反应的预防和治疗进展

王丽超, 周伟

作者单位: (650000) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第二附属医院眼科

作者简介: 王丽超, 女, 昆明医科大学在读硕士研究生, 研究方向: 角膜病、白内障。

通讯作者: 周伟, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障。464961466@qq.com

收稿日期: 2014-04-21 修回日期: 2014-07-14

Prevention and therapy progress in allograft rejection of high - risk corneal transplantation

Li-Chao Wang, Wei Zhou

Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China

Correspondence to: Wei Zhou. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, Yunnan Province, China. 464961466@qq.com

Received: 2014-04-21 Accepted: 2014-07-14

Abstract

• High - risk corneal transplantation immunological rejection is a primary factor affecting the success or failure of the corneal transplantation. As a result, application of immunosuppressive agent in high - risk corneal transplantation rejection reaction occupies an irreplaceable position. However, many local and systemic adverse reactions appeared in the process of application. In order to improve the achievement ratio of the corneal transplantation, experts and scholars at home and abroad have obtained remarkable achievements in dosage form, route of administration and drug combination; meanwhile, a considerable progress was also made in genetic engineering. This paper is a review of prevention and treatment on high - risk corneal graft rejection reaction.

• **KEYWORDS:** corneal transplantation; high - risk; rejection; immunosuppressive agent

Citation: Wang LC, Zhou W. Prevention and therapy progress in allograft rejection of high-risk corneal transplantation. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(8):1413-1416

摘要

高危角膜移植术后免疫排斥反应是影响角膜移植成败的首要因素,因此,免疫抑制剂在高危角膜移植排斥反应中的应用占有不可替代的地位。然而,在应用过程中出现许

多局部和全身不良反应,为了提高角膜移植成功率,国内外专家、学者在剂型、用药途径以及联合用药方面都做了卓著的研究;同时在基因工程方面也有可观的进步。本文就高危角膜移植排斥反应的预防和治疗方面做一综述。

关键词: 角膜移植; 高危; 排斥反应; 免疫抑制剂

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.08.12

引用: 王丽超, 周伟. 高危角膜移植排斥反应的预防和治疗进展. *国际眼科杂志* 2014;14(8):1413-1416

0 引言

角膜移植是治疗严重角膜病的最终手段,但角膜移植术后免疫排斥反应是导致角膜移植失败的主要原因^[1],尤其是高危角膜移植患者,角膜植片存活率小于 35%^[2]。因此,早期及时发现角膜移植排斥反应,并给予积极合理治疗,是提高角膜移植成功率的关键。类固醇激素是预防和治疗角膜移植免疫排斥反应的一线用药,环孢素 A、FK506、雷帕霉素、霉酚酸酯、FTY720 均能有效延长角膜植片的存活时间。近几年对几种免疫抑制剂缓释剂型的研究也逐渐进入临床试验阶段,在减少药物不良反应方面有了最新的突破;同时,环孢素 A 和其他免疫抑制剂联合使用不仅减少抑制剂的用量和药物不良反应的发生,而且使药物之间达到最佳疗效。基因治疗具有目的性强,生物利用度好及不良反应小等优点,是治疗高危角膜移植排斥反应新的突破点。现就高危角膜移植排斥反应的预防和治疗方面进行如下综述。

1 角膜移植免疫排斥反应的危险因素

正常角膜无血管、淋巴管,处于“免疫赦免”状态,严重病变的角膜如有新生血管长入,改变了角膜的“免疫赦免”状态,血管化的角膜大量淋巴细胞、炎性介质游走,加速了角膜内皮细胞内、外免疫成分的运动^[3]。有研究发现^[4]高危角膜病变免疫排斥反应几率明显增加,发生时间及持续时间较长,该研究中高危角膜病变病例,术后排斥反应发生率为 75%,排斥反应发生时间为术后 2wk ~ 3a,非高危角膜病变排斥反应发生率为 25%。凡是造成角膜上皮持续缺损、泪膜破坏、新生血管长入、假性胬肉及睑球粘连等并发症的因素,均是导致角膜移植术后免疫排斥反应的高危因素,新生血管化植床、大植片移植和接受其他器官移植者称为高危移植^[5]。因此应根据不同角膜病变在术前、术中、术后采取相应措施来减少排斥反应的发生率。

2 药物治疗进展

2.1 皮质类固醇激素 皮质类固醇激素用于预防和治疗角膜移植免疫排斥反应的作用机制是通过抑制磷脂酶 A2 和脂氧途径阻断前列腺素合成,减少细胞和纤维渗出,抑制趋化和吞噬,恢复毛细血管通透性,稳定多形核白细胞的溶酶体膜,抑制植片血管化等^[6]。该药物的免疫抑制作

用与其用药剂量密切相关,局部使用糖皮质激素预防角膜移植术后免疫排斥反应,常用剂型包括地塞米松、氟米龙、醋酸泼尼松滴眼液;有研究表明对于已经发生免疫排斥反应的病例,及时采用糖皮质激素局部和全身联合治疗,至少有50%的免疫排斥反应可以得到逆转,最关键的是早期发现;但是长期局部应用激素不仅可影响角膜伤口的愈合,导致创口容易发生感染,引起角膜上皮的损害,还可导致类固醇激素性青光眼和并发性白内障,全身应用则引起骨质疏松、代谢紊乱、高血糖、高血压等并发症的发生^[7]。据文献报道^[8]大剂量冲击治疗不但能控制排斥反应,而且还可降低排斥反应的复发率,同时也避免长期应用皮质类固醇激素引起的伤口延迟愈合,在减少角膜内皮细胞的破坏,长期维持角膜植片的透明度方面有确切疗效。糖皮质激素作为免疫抑制药物用于临床已经有很长的历史,至今仍是预防和治疗角膜移植免疫排斥反应的一线用药。

2.2 环孢霉素 A 环孢霉素 A (Cyclosporine A, CsA) 主要通过抑制抗原提呈和淋巴因子的产生,抑制白介素-2(IL-2)的产生,抑制 CD4⁺和 CD8⁺淋巴细胞的活化以达到抑制免疫反应的目的。由于 CsA 为脂溶性、分子量较大、角膜穿透性差及局部用药难以达到有效的眼内药物浓度,不能预防急性移植排斥反应。全身长期应用 CsA 具有肝、肾毒性,神经紊乱(震颤、惊厥、神经痛、精神错乱、共济失调、四肢瘫痪、昏迷等)、牙龈增生,增加发生肿瘤和感染等全身毒副作用的危险。有研究报道^[9],给高危角膜移植术后大鼠局部常规应用 1% CsA 滴眼,术后 10d 所有的大鼠均出现角膜免疫排斥反应。研究发现,1% CsA 滴眼后到达角膜内皮细胞层的药量只占 8%,而到达前房仅为 1%,绝大部分药物残留在角膜上皮及浅基质层,不能控制术后排斥反应。Poon 等^[10]对高危角膜移植患者的回顾性研究报告中,全身应用 CsA 的治疗组排斥反应发生率和对照组差异无统计学意义,但治疗组全身应用 CsA 所致的不良反应发生率高达 44.9%,故不主张全身应用 CsA。为改善有效的眼内药物浓度和避免 CsA 全身应用的毒副作用,Shimazaki 等^[11]研发了前房植入 CsA 药物缓释系统(drug-delivery system, DDS)治疗高危角膜移植免疫排斥反应,取得良好效果, CsA-DDS 具有不受泪液冲洗和稀释影响、用药量极少、能长时间在眼内缓慢释放等特点,可以避免血-眼屏障和角膜屏障,在眼内达到较高的药物浓度。随后在给药途径方面也有了新的突破,有研究通过将 CsA 药物缓释系统植入巩膜和眼筋膜囊之间,有效地将药物缓慢释放到角膜内达 1a 以上,从而达到防治高危角膜移植排斥反应的目的^[12]。

2.3 FK506 FK506(他克莫司)与 CsA 作用机制相似,是一种新型强效免疫抑制剂,但其作用远强于 CsA 近 100 倍^[13]。Shi 等^[14]通过动物实验研究表明,FK506 滴眼组由于眼内房水中的药物浓度低(<0.13ng/mL),虽然能预防急性排斥反应的发生,但无法抑制内皮型排斥反应的发生,而前房内植入 FK506 药物缓释系统能够长时间维持房水内的药物浓度,抑制角膜植片内的 IL-2 受体 α 、单核细胞趋化蛋白 1、Fas 及 FasLmRNA 的表达,可长期有效地抑制高危角膜移植术后免疫排斥反应的发生;在实验观察期间未见明显的全身和眼局部的毒副作用。FK506 DDS 具有良好的生物相容性和缓释性能,为 FK506 提供了一种良好的药物剂型与用药途径,对于将来临床应用 FK506 DDS 进行防治高危角膜移植排斥反应有重要意义。

2.4 雷帕霉素 雷帕霉素(RAPA,西罗莫司)主要通过与其细胞浆内免疫亲和素—FK506 结合蛋白(FK506 binding protein, FKBP)结合形成复合物 FKBP-RAPA,阻断免疫细胞的蛋白质及 DNA 合成,阻断细胞由 G1 相向 S 相转化,抑制免疫细胞增殖,发挥抑制免疫排斥反应的作用^[15]。有研究报道^[16],RAPA 亦兼有较强的抑制新生血管生成作用,抑制免疫排斥反应效果比 CsA 强 50 倍、比 FK506 强 30 倍,其机制可能是抑制角膜组织和外周血液中的蛋白质 P、缺氧诱导因子(HIF-1 α)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达起作用,在用药过程中,角膜烧伤部位周围新生血管数量显著减少,直观反映了西罗莫司能够抑制角膜新生血管的生成。随着对 RAPA 的深入研究,发现全身大量用药后的不良反应:胃肠道不适,血小板减少、白细胞减少、贫血、肾毒性,高胆固醇血症,周围性水肿等^[17,18]。因此,免疫抑制剂的局部用药必将取代全身用药在眼科治疗中的地位,高华等^[19]用 1% RAPA 滴眼液及 0.5mg RAPA 缓释片前房植入均观察到鼠或新西兰白兔的角膜移植片存活时间比对照组明显延长,角膜新生血管明显地减少,表明 RAPA 不同的给药方式均有抑制角膜移植术后的免疫排斥反应的药效和抑制角膜新生血管的作用。Shi 等^[20]应用西罗莫司药物控释系统防治兔高危角膜移植术后排斥反应,结果证实载药缓释薄膜能够显著延迟高危角膜移植术后排斥反应出现的时间,且能够抑制角膜新生血管的生成;由于眼部“血-眼屏障”、“血-房水屏障”的存在,亲脂性的 RAPA 不能很好地穿透泪膜到达角膜;而载药缓释薄膜则直接将药物植入前房,从中缓慢释放至房水,保持前房内有治疗作用的药物浓度,从而达到治疗目的。

2.5 霉酚酸酯 霉酚酸酯(MMF)属于特异性抗细胞 DNA 代谢药物,由于大量激活增殖的淋巴细胞高度依赖嘌呤核苷酸从头合成途径合成 DNA,而体内大多数体细胞嘌呤合成可通过补救途径合成,其抗免疫排斥反应机制正是通过非竞争性抑制次黄嘌呤核苷酸脱氢酶(IMP DH),阻碍嘌呤核苷酸从头合成途径,选择性地干扰淋巴细胞的 DNA 合成,达到抑制免疫排斥反应的目的;但 MMF 对非淋巴细胞无抑制作用,因此,与其他免疫抑制剂相比肝肾骨髓毒性相对较小^[21]。研究表明全身应用 MMF 可有效抑制部分高危角膜移植患者发生免疫排斥反应^[22],但因其全身给药后的一些不良反应,限制了 MMF 在眼科中的进一步应用。近年来辛萌等研究霉酚酸酯眼内植入型缓释剂(MMF-DDS)抑制兔高危角膜移植术后免疫排斥反应的实验,结果证实 MMF-DDS 抑制兔高危角膜移植术后免疫排斥反应的有效性,亦对 MMF-DDS 临床应用的安全性做出初步判断,同时也得出了 MMF-DDS 在疗效上略优于 CsA-DDS 植入剂的结论。

2.6 FTY720 FTY720 是一种强效、低毒、新型免疫抑制剂,其选择性地作用于外周淋巴细胞,诱导外周血淋巴细胞的归巢,并抑制淋巴组织细胞的游出,对 CD4⁺T 淋巴细胞的影响明显强于对 CD8⁺T 淋巴细胞和 NK 细胞的影响^[23]。Liu 等^[24]发现局部应用 FTY720 滴眼剂可明显延长小鼠角膜植片的存活时间,有较好的抗排斥的效果。有研究报道^[25]FTY720 可减少外周淋巴细胞和移植物中的细胞毒性 T 细胞,不仅单独使用 FTY720 具有良好的预防治疗作用,而且与 CsA、FK506 和 RAD 等其他药物合用,具有协同增效的作用,可减少 CsA、FK506 等药物的用量,

降低毒副作用,提高疗效。FTY720 毒副作用少,主要有肠胃不适、心动过缓等症状,但无肾毒性,且至今尚未发现 FTY720 的神经毒性、致突变性、基因断裂的作用^[26]。Zhang 等^[27]研究发现口服 FTY720 能显著延长大鼠角膜植片的存活时间,抑制角膜移植免疫排斥反应。CsA 与 FTY720 联合用药具有协同作用,优于单独用药组。FTY720 的用量远远低于 CsA,但治疗效果等同于 CsA,说明 FTY720 抗排斥作用更强。联合用药可减少药物的用量,从而减轻后者肝、肾及神经毒性。因此,FTY720 可望成为防治角膜移植排斥的临床新药。

3 提高组织相容性抗原

3.1 组织配型 HLA 抗原是器官移植免疫排斥反应中的重要免疫分子。有研究表明对高危角膜移植患者,排斥反应发生率与 HLA 错配数有一定关系,高错配的排斥反应率高达 59.11%,低错配的排斥反应率则为 20.14%,HLA 高错配组的排斥反应率高于低错配组^[28]。在移植前,供者和受者间先进行组织配型试验及组织配对试验,选择最合适的供者,以降低排斥反应的发生率^[29]。但是也有研究表明组织配型并不能降低角膜移植排斥率,因此是否应该配型尚未有定论。

3.2 降低供体移植物的抗原量 角膜移植术后排斥反应是一种多因素参与、极其复杂和高度调节的反应过程。角膜组织内存在 MHC-I, II 类抗原和抗原提呈细胞如树突状细胞(DC)等,在角膜排斥反应中起到重要作用,有研究通过紫外线照射供体角膜,移植排斥反应较对照组明显降低,而且随着紫外线照射剂量增加排斥反应发生率随之下降。但因为紫外线及高压氧处理后会对手角膜内皮细胞产生毒性作用,此方法至今未应用于临床。Busch 等^[30]报道将表达抗大鼠 MHC-I 类抗原分子抗体的基因转入大鼠皮肤上皮细胞,对 MHC-I 类抗原的表达产生了明显的抑制作用。

4 基因治疗

基因工程在角膜移植中的应用主要是通过基因转导技术将外源基因插入适当受体细胞中,使外源基因表达产物在受体内起治疗疾病的作用。相关研究表明将表达 CTLA-Ig 基因的腺病毒转染到大鼠角膜植片内皮细胞,可使角膜植片的存活明显延长^[31]。付燕等^[32]利用 CCR7 及 imDC 的特点,将含大鼠 CCR7 基因的腺病毒转染修饰 imDC,通过静脉途径输入受体体内,被 CCR7 基因修饰的 imDC 可以明显延长大鼠高危角膜移植术后角膜植片存活时间,抑制角膜移植免疫排斥反应。国外有关 RNA 干扰技术的研究,通过人工合成的小分子干扰 RNA (siRNA) 特异性地抑制、降解同源 mRNA 序列,有效阻止相应蛋白的表达。Sato 等^[33]通过动物实验证实,siRNA 可通过基因修饰下调移植物的内源性抗原达到抗移植排斥的目的。Rayner 等^[34]将携带 TNF 受体的腺病毒体外转染供体角膜内皮细胞,并进行同种异体角膜移植,结果显示能延长角膜植片存活时间。目前,基因治疗在角膜移植排斥反应中的应用仍处于动物实验阶段,但相较于传统免疫抑制剂,它具有目的性强,生物利用度好及不良反应小等优点;为此,国内外眼科界学者们竞相研究,希望基因工程在角膜移植排斥反应的临床治疗中能有新的突破。

5 改进给药方式

目前各种免疫抑制剂疗效在角膜移植排斥反应治疗中得到了肯定,同时也发现不少的不良反应。为此,学者

们在给药方式和途径方面做了很多研究^[35],希望得到既能使免疫抑制剂发挥最大效用,又能很好降低不良反应的方法。眼内植入型药物缓释剂(Ocular Implantable Drug Delivery System)是目前众多专家在努力研究的一种新型药物制剂,其能避开血-眼屏障和角膜屏障,用药量极少、能长时间在眼内缓慢释放,在眼内达到较高的药物浓度,提高高危角膜移植术成功率的关键。CsA,FK506,RAPA,MMF 等免疫抑制剂的药物控释系统均有相关研究。利用免疫抑制剂不同的作用机制的特点,联合用药可选择作用机制互补、无毒性叠加或潜在不良相互作用的药物联合使用,达到最佳疗效。RAPA 抑制 T 免疫细胞由 G1 到 S 期的增殖,而 CsA 则抑制 T 免疫细胞由 G0 到 G1 期的增殖,因此西罗莫司与 CsA 联合用药有着协同作用,能够产生免疫抑制叠加效应,发挥更强的免疫抑制效果^[36]。Stanojlovic 等^[37]研究结果显示,术后单独使用西罗莫司能够推迟排斥反应出现的时间,联合 CsA 使用能够明显抑制 CD3,IL-2,IFN- γ 和 IL-10 等炎症因子的 mRNA 水平,明显延长植片生存时间。

6 小结

在局部或全身应用免疫抑制剂的情况下,高危角膜移植术后免疫排斥反应的发生率仍高达 65%^[12,38]。且在角膜源匮乏的情况下,减少术后免疫排斥反应的发生,避免二次角膜移植迫在眉睫。当前,药物对高危角膜移植术后免疫排斥反应治疗仍然是首选;随着对现用免疫抑制剂的深入研究,局部或全身的药物不良反应越来越多,许多学者在给药途径、药物剂型及联合用药方面也作出了很大努力。近年来,国内外学者们对基因工程在角膜移植排斥反应中的应用也做了不少研究,目前仍处于动物实验阶段,但相较于传统免疫抑制剂,它具有自己的优点,有朝一日基因工程运用于高危角膜移植排斥反应的预防和治疗中,将会是眼科界新的突破。

参考文献

- Baddona A, Jones M, Armitage J, et al. A review of allograft ophthalmic tissue in eye surgery. *Cell Tissue Bank* 2010;11(1):29-38
- 陆燕,邹留河,吕岚,等. 大鼠角膜移植排斥动物模型的建立. *实验动物科学与管理* 2002;19(3):8-11
- 谢立信,史伟云,董晓光,等. 高危角膜移植术后免疫排斥反应规律的临床研究. *眼科研究* 2000;18(5):439-441
- 李兰,李云川,曹倩,等. 角膜移植术后排斥反应的防治探讨. *国际眼科杂志* 2011;11(12):2206-2207
- 史伟云,谢立信. 重视角膜移植术后免疫排斥反应的防治. *中华眼科杂志* 2006;42(1):3-5
- Panda A, Vanathi M, Kumar A, et al. Corneal graft rejection. *Surv Ophthalmol* 2007;52(4):375-396
- Scheer S, Touzeau O, Borderie V, et al. Immunosuppression in corneal transplantation. *J Fr Ophthalmol* 2003;26(6):637-647
- 洪朝阳,徐海铭. 大剂量甲基强的松龙冲击治疗角膜移植术后排斥反应的临床疗效观察. *临床眼科杂志* 2007;15(2):147-148
- 谢立信,史伟云,王治宇,等. 前房植入环孢素 A 缓释系统抑制鼠高危角膜移植术后的免疫排斥反应. *中华眼科杂志* 2002;38(7):442-425
- Poon AC, Forbes JE, Dart JK, et al. Systemic cyclosporin A in high risk penetrating keratoplasties: a case-control study. *Br J Ophthalmol* 2001;85(12):1464-1469
- Shimazaki J, Den S, Omoto M, et al. Prospective, randomized study of the efficacy of systemic cyclosporine in high-risk corneal transplantation. *Am J Ophthalmol* 2011;152(1):33-39
- Shi W, Chen M, Xie L, et al. A novel cyclosporine a drug-delivery

system for prevention of human corneal rejection after high - risk keratoplasty; a clinical study. *Ophthalmology* 2013;120(4):695-702

13 Matsuda S, Koyasu S. Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. *Curr Top Med Chem* 2003;3(12):1358-1367

14 Shi WY, Liu T, Borderie V, et al. Implantation of FK506 drug delivery system into the anterior chamber for inhibiting corneal rejection in high risk rabbit corneal allograft. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2006;42(4):299-304

15 Xiong Y, Sheen J. Rapamycin and glucose - target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J Biol Chem* 2012;287(4):2836-2842

16 Cicora F, Roberti J, Vasquez D, et al. Preconditioning donor with a combination of tacrolimus and rapamycin to decrease ischaemia - reperfusion injury in a rat syngenic kidney transplantation model. *Clin Exp Immunol* 2012;167(1):169-177

17 Dugel PU, Blumenkranz MS, Haller JA, et al. A randomized, dose-escalation study of subconjunctival and intravitreal injections of sirolimus in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2012;119(1):124-131

18 Birnbaum F, Reis A, Bohringer D, et al. An open prospective pilot study on the use of rapamycin after penetrating high-risk keratoplasty. *Transplantation* 2006;81(5):767-772

19 高华,史伟云,谢立信,等.雷帕霉素缓释片防治兔高危角膜移植免疫排斥反应和新生血管增殖的研究. *中华眼科杂志* 2006;42(1):6-11

20 Shi WY, Gao H, Xie LX, et al. Sustained intraocular rapamycin delivery effectively prevents high - risk corneal allograft rejection and neovascularization in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(8):3339-3344

21 Birnbaum F, Bohringer D, Sokolovska Y, et al. Immunosuppression with cyclosporine A and mycophenolatemofetil after penetrating high-risk keratoplasty: a retrospective study. *Transplantation* 2005;79(8):964-968

22 Mayer K, Reinhard T, Reis A, et al. Synergistic antiherpetic effect of acyclovir and mycophenolatemofetil following keratoplasty in patients with herpetic eye disease: first results of a randomised pilot study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;41(12):1051-1054

23 Kowarik MC, Pellkofer HL, Cepok S, et al. Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. *Neurology* 2011;76(14):1214-1221

24 Liu Y, Jiang J, Xiao H, et al. Topical application of FTY720 and

cyclosporin A prolong corneal graft survival in mice. *Mol Vis* 2012;18:624-633

25 付德才,郑汝娜,吕海军,等.免疫抑制剂 FTY720 的研究进展. *中国新药杂志* 2007;16(8):582-585

26 黄小勇,刘翔,谭小玲,等.角膜移植排斥反应的基础研究进展. *眼视光学杂志* 2007;9(1):62-65

27 Zhang EP, Muller A, Ignatius R, et al. Significant prolongation of orthotopic corneal-graft survival in FTY720-treated mice. *Transplantation* 2003;76(10):1511-1513

28 陈梅珠,杨丽霞,王庆华,等.高危角膜移植术前 HLA 配型的初步临床研究. *中国实用眼科杂志* 2003;21(5):333-334

29 Bohringer D, Schwartzkopff J, Maier PC, et al. HLA matching in keratoplasty: lessons learned from lamellar techniques. *Klin Monbl Augenheilkd* 2013;230(5):490-493

30 Busch A, Marasco WA, Doebis C, et al. MHC class I manipulation on cell surfaces by gene transfer of anti-MHC class I intrabodies--a tool for decreased immunogenicity of allogeneic tissue and cell transplants. *Methods* 2004;34(2):240-249

31 Comer RM, King WJ, Ardjomand N, et al. Effect of administration of CTLA4 - Ig as protein or cDNA on corneal allograft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43(4):1095-1103

32 付燕,周琨,高晓唯,等.CCR7 基因修饰的未成熟树突状细胞在大鼠高危角膜移植免疫排斥反应中的作用. *眼科新进展* 2014;34(1):17-21

33 Sato Y, Ajiki T, Inoue S, et al. Gene silencing in rat-liver and limb grafts by rapid injection of small interference RNA. *Transplantation* 2005;79(2):240-243

34 Rayner SA, Larkin DF, George AJ, et al. TNF receptor secretion after ex vivo adenoviral gene transfer to cornea and effect on *in vivo* graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(7):1568-1573

35 Guilbert E, Laroche L, Borderie V, et al. Rejection of corneal allografts. *J Fr Ophtalmol* 2011;34(5):331-348

36 Kim JY, Ghee JY, Lim SW, et al. Comparison of early and late conversion of sirolimus in experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *J Korean Med Sci* 2012;27(2):160-169

37 Stanojlovic S, Schlickeiser S, Appelt C, et al. Influence of combined treatment of low dose rapamycin and cyclosporin A on corneal allograft survival. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;48(10):1447-1456

38 Yildiz EH, Hoskins E, Fram N, et al. Third or greater penetrating keratoplasties: indications, survival, and visual outcomes. *Cornea* 2010;29(3):254-259