

生物工程角膜移植术后排斥反应的临床及免疫病理观察:附 5 例报告

程 燕,吴 洁,朱海峰,惠 玲,郝 咪

引用:程燕,吴洁,朱海峰,等.生物工程角膜移植术后排斥反应的临床及免疫病理观察:附 5 例报告.国际眼科杂志 2021; 21(9):1661-1664

基金项目:西安市科技计划项目[No.201805097YX5SF31(7)]
作者单位:(710002)中国陕西省西安市第一医院眼科 西北大学附属第一医院眼科 陕西省眼科研究所
作者简介:程燕,在读博士研究生,主任医师,角膜病区主任,研究方向:角膜病、眼表疾病。
通讯作者:吴洁,毕业于西安交通大学医学院,教授,主任医师,硕士研究生导师,眼科医院副院长,研究方向:角膜病、眼表疾病. wutu63@163.com
收稿日期:2021-02-19 修回日期:2021-08-11

摘要

目的:对生物工程角膜移植术后发生免疫排斥反应患者进行激光共焦显微镜观察和免疫病理研究,初步探究生物工程角膜移植排斥反应的发生机制。

方法:回顾性病例研究。纳入 2018-09/2020-12 我院收治的感染性角膜炎行生物工程角膜移植术后发生免疫排斥患者 5 例 5 眼。裂隙灯检查角膜透明度、角膜新生血管;激光共焦显微镜对角膜进行动态观察,记录免疫排斥反应后角膜上皮下角膜朗格罕氏细胞和基质炎症细胞密度,并以对侧眼作为对照进行统计分析。行同种异体角膜移植时取下生物工程角膜,免疫组织化学染色后对 CD4⁺细胞和 CD8⁺细胞及炎症细胞的浸润和分布进行观察。

结果:激光共焦显微镜显示,术眼角膜上皮可见大量活化朗格罕氏细胞,其活化比例与对侧眼比较有差异($\chi^2 = 38.29, P < 0.001$)。基质层大量炎症细胞,与对侧眼比较具有差异($t = 32.5, P < 0.05$)。对生物工程角膜组织进行免疫组织化学染色和 HE 染色,角膜基质层均可见 CD4⁺细胞和 CD8⁺细胞,仅 1 眼角膜基质层可见大量嗜酸性粒细胞。

结论:生物工程角膜移植术后免疫排斥反应经免疫病理证实以 T 细胞介导的细胞免疫在发病机制中具有重要作用,对异种抗原的超敏反应可能参与其中。

关键词:生物工程角膜;免疫排斥反应;免疫组织化学;激光共焦显微镜

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2021.9.35

Clinical and immunopathological study of rejection after bioengineered keratoplasty: a report of 5 cases

Yan Cheng, Jie Wu, Hai-Feng Zhu, Ling Hui, Mi Hao

Foundation item: Xi'an Science and Technology Project [No.

201805097YX5SF31(7)]

Department of Ophthalmology, Xi'an No.1 Hospital; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Northwest University; Shaanxi Institute of Ophthalmology, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jie Wu. Department of Ophthalmology, Xi'an No.1 Hospital; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Northwest University; Shaanxi Institute of Ophthalmology, Xi'an 710002, Shaanxi Province, China. wutu63@163.com

Received:2021-02-19 Accepted:2021-08-11

Abstract

• AIM: To explore the mechanism of rejection of bioengineered keratoplasty by the laser confocal microscope and immunopathological studies.

• METHODS: Retrospective case study. Five patients (5 eyes) who underwent bioengineered keratoplasty for infectious keratitis from Sep.2018 to Dec.2020 and were immunologically rejected included. All observers were monocular. Slit-lamp was used to examine corneal transparency and corneal neovascularization. The cornea was dynamically observed under laser confocal microscopy, the density of subepithelial langerhans cells and stromal inflammatory cells was recorded after graft rejection, and the contralateral eye was used as the control group for statistical analysis. The infiltration and distribution of CD4⁺ cells, CD8⁺ cells and inflammatory cells were observed after immunohistochemical staining of bioengineered corneas during corneal allograft.

• RESULTS: Confocal laser microscopy showed that a large number of langerhans cells were activated under the corneal epithelium of the intraoperative eye, and the activation ratio was significantly different from that of the contralateral eye ($\chi^2 = 38.29, P < 0.001$). The stromal layer was rich in inflammatory cells, which was significantly different from that of the contralateral eye ($t = 32.5, P < 0.05$). Immunohistochemical staining and HE staining were performed on the bioengineering corneal tissue. CD4⁺ and CD8⁺ cells were observed in all corneal stromal layers, and only one case had a large number of eosinophils.

• CONCLUSION: Immunopathology of rejection after bioengineered keratoplasty confirmed that T-cell-mediated cellular immunity plays an important role in the pathogenesis, and hypersensitivity to xenoantigen may be involved in it.

• KEYWORDS: bioengineered cornea; immunological rejection; immunohistochemistry; confocal microscope

Citation: Cheng Y, Wu J, Zhu HF, et al. Clinical and immunopathological study of rejection after bioengineered keratoplasty: a report of 5 cases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2021;21(9):1661-1664

0 引言

角膜病是我国主要致盲眼病之一,其中角膜盲占盲人总数的1/4,而感染性角膜炎是角膜盲的主要原因^[1-2]。发展中国家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、病毒和棘阿米巴原虫^[3]。角膜移植仍然是治疗感染性角膜炎的最有效的方法,能够治愈80%以上的角膜炎患者。近年来,因为同种异体角膜供体的缺乏,所以猪来源的生物角膜因在去细胞和去抗原处理后可降低其免疫原性并保留角膜的三维立体结构,具有良好的生物相容性而应用于临床,解决了部分角膜供体来源缺乏的窘境。然而生物角膜作为异种材料在移植到人眼后是否有免疫排斥反应的发生,免疫排斥反应的临床表现和病理机制等一系列问题目前较少报道。本研究在此方面进行了探索,对生物工程角膜移植术后排斥反应的临床表现、体征、激光共焦显微镜及免疫组织化学染色等方面进行了一系列的观察,对生物工程角膜移植排斥发生机制进行初步的探究,为进一步的临床治疗提供依据。

1 对象和方法

1.1 对象 采用回顾性系列病例观察研究,收集2018-09/2019-12在西安市第一医院就诊并确诊为感染性角膜炎患者180例180眼中术后发生免疫排斥患者5例5眼。纳入标准:(1)诊断为感染性角膜炎患者,行生物工程角膜移植手术并发生免疫排斥反应,判断标准参照Holland评分(表1)^[4]方法,以角膜混浊、水肿、新生血管3项评分之和定义为角膜免疫排斥反应指数(rejection index, RI),当RI \geq 6时即认为发生免疫排斥反应。(2)术前接受规范的抗免疫排斥治疗病情无明显好转者。(3)角膜植片严重混浊或者基质溶解,须行同种异体角膜移植。排除标准:(1)既往原发及继发干燥综合征、糖尿病及其他自身免疫性疾病。(2)上皮型、基质型及内皮型等各型病毒性角膜炎。(3)对侧眼有角膜炎、青光眼、高度近视等眼部疾病者。本试验通过西安市第一医院伦理委员会批准和国家食品药品监督管理局(国家药品监督管理局)医疗器械技术审评中心备案,患者入组前均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 手术步骤 手术均由同一位经验丰富的医师完成。术眼使用2%的布比卡因和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,用妥布霉素稀液充分冲洗结膜囊,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,选择与病灶角膜直径等大的环钻制作植片,采用10-0尼龙线将生物工程角膜植片间断对位缝合于角膜植床,线结转埋。

1.2.2 术后治疗 所有患者均在术后1、3、6、9、12mo进行随访观察。参照Holland评分方法,以角膜混浊、水肿、新生血管3项评分之和定义为免疫排斥反应指数(rejection index, RI),当RI \geq 6时即认为发生免疫排斥反应,应用1%醋酸泼尼松龙滴眼液、0.1%他克莫司滴眼液、0.1%玻璃酸钠滴眼液点眼,均每日4次,妥布霉素地塞米松眼膏睡前点眼1次,给予静脉滴注地塞米松10mg并逐渐减量

治疗。观察2wk患者病情无缓解,再行同种异体穿透角膜移植手术,并对生物工程角膜组织进行免疫病理检查。RI \leq 6患者给予1%醋酸泼尼松龙滴眼液、0.1%他克莫司滴眼液、0.1%玻璃酸钠滴眼液点眼,均每日3次,角膜植片逐渐透明。

1.2.3 激光共焦显微镜检查 应用HRT3激光共焦显微镜(分辨率为1 μ m,放大倍数为800倍)对所有生物工程角膜移植术后出现免疫排斥反应患者术眼及对侧眼进行检查,应用0.4%盐酸奥布卡因滴眼液点眼2次进行表面麻醉,嘱咐患者下颌放于显微镜托架上,保持头正位,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,采集各层角膜图片并保存。利用NAVIS软件对角膜各层细胞形态、组织结构进行综合分析,尤其是角膜上皮下朗格罕氏细胞的活化程度[又名树突状细胞(dendritic cells, DCs),静止期形态为短棒状,活化期有明显突起]和基质层内炎症细胞(表现为圆形或椭圆形细胞,体积较角膜基质细胞略小)密度。

1.2.4 免疫组织化学染色及HE染色实验 石蜡切片免疫组化染色采用S-P法。以正常羊血清孵育替代一抗孵育,作为阴性对照;以PBS孵育替代一抗孵育,作为空白对照。采用Olympus-BX43光学显微镜观察并摄片。试剂:CD4、CD8单克隆抗体(即用型),即用型免疫组化UltraSensitive™ plus广谱试剂盒,抗原修复液(EDTA法),正常羊血清,DAB显色液。以上试剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司。HE染色步骤如下:脱蜡,脱蜡二甲苯I、II各10min,事先准备好盖玻片;覆水,100%(I、II)、90%、80%、70%酒精各5min,自来水冲洗5min \times 3;苏木精染色5min,流水冲洗;5%乙酸分化1min,流水冲洗,用吸管滴加乙酸,布满玻片上的组织即可,分化后颜色变浅了一些,成为蓝色;伊红染色1min,流水冲洗;脱水:70%、80%、90%、100%酒精各10s,二甲苯1min,可以在通风橱自然晾干再封片,约5min;滴上中性树胶,封片,用吸管滴上一滴即可,尽量少滴,但压片后要将组织全部覆盖完,避免中间有气泡。

统计学分析:采用SPSS17.0统计学软件进行统计分析。术眼与对侧眼出现角膜上皮下活化的朗格罕氏细胞比例的比较采用卡方检验。角膜基质中炎症细胞密度术眼与对侧眼比较采用配对样本t检验,以P $<$ 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳入患者一般资料情况 本研究共收集生物工程角膜移植术后患者180眼,其中发生免疫排斥反应患者5眼,免疫排斥反应发生率为2.8%。其中男4例,女1例,年龄45~61岁。5眼中细菌性角膜炎2眼(1眼因角膜异物导致细菌性角膜炎,1眼为眼部碱烧伤后继发细菌性角膜炎);真菌性角膜炎3眼。

2.2 裂隙灯及激光共焦显微镜检查 病例1,男,61岁,术前BCVA:数指/40cm,临床诊断为右眼细菌性角膜炎,行生物工程角膜板层移植术,术后6mo角膜植片高度水肿,可见角膜上皮缺损,鼻侧新生血管长入,RI评分12分;激光共焦显微镜检查显示上皮下及浅基质层存在大量活化的朗格罕氏细胞(具有短树突或长树突的细胞),基质层可见大量圆形高反光的炎症细胞,见图1。病例2,女,50岁,术前BCVA:手动/30cm,右眼真菌性角膜炎,角膜移植

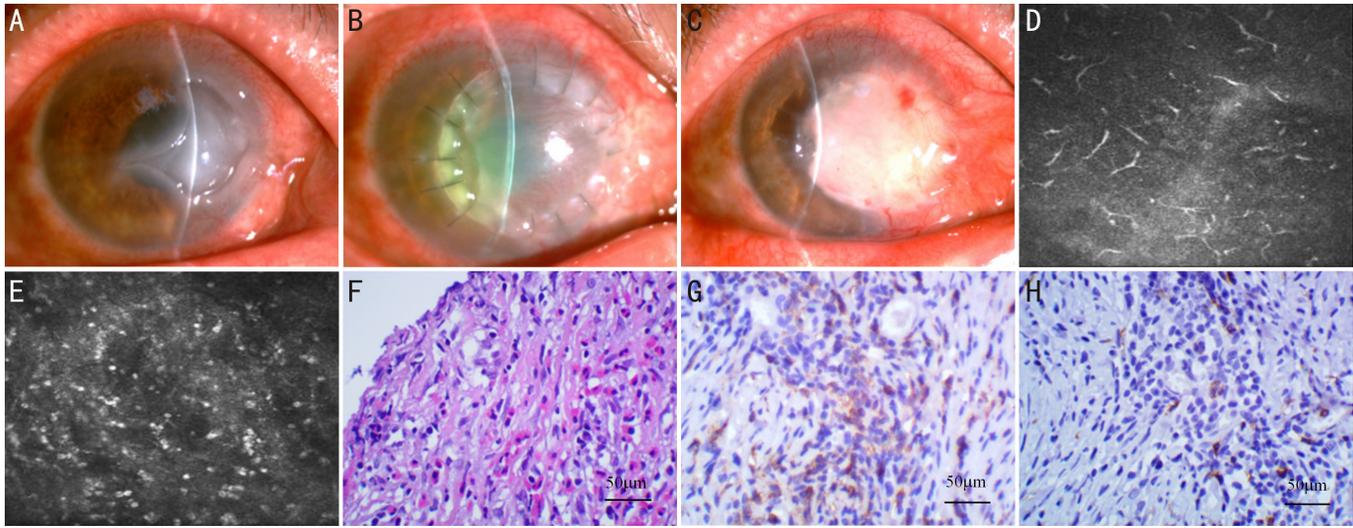


图1 病例1术眼前节和激光共焦显微镜照片及免疫病理图片 A~C:眼前节照片;D、E:激光共焦显微镜照片;F:HE染色;G、H:S-P染色。

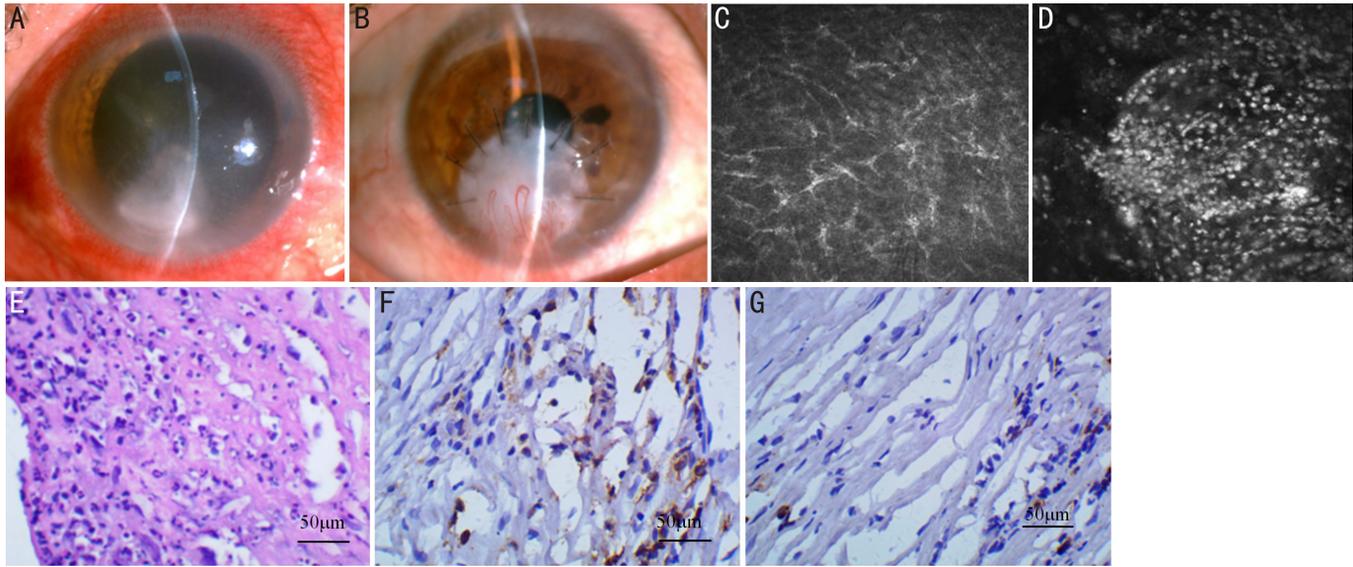


图2 病例5术眼前节和激光共焦显微镜照片及免疫病理图片 A、B:眼前节照片;C、D:激光共焦显微镜照片;E:HE染色;F、G:S-P染色。

表1 角膜移植各项观察指标评分标准

观察项目	0分	1分	2分	3分	4分
角膜水肿	无水肿	轻度上皮水肿	上皮和基质轻度水肿	上皮和基质明显水肿	大泡性角膜病变
角膜混浊	无混浊	虹膜纹理可见	虹膜纹理不清	重度浸润, 隐见瞳孔	完全混浊, 前房不清
角膜新生血管	无新生血管	角膜植床新生血管	进入角膜植片小于2mm或角膜缘小于1个象限	进入角膜植片大于2mm或角膜缘大于1个象限	新生血管布满角膜

术后5mo发生免疫排斥反应, RI评分10分;激光共焦显微镜检查显示浅基质层活化的朗格罕氏细胞及炎症细胞。病例3,男,45岁,术前BCVA:数指/50cm,右眼碱烧伤继发细菌性角膜炎,角膜移植术后9mo发生免疫排斥反应, RI评分9分;激光共焦显微镜检查亦可见活化的朗格罕氏细胞和炎症细胞。病例4,男,56岁,术前BCVA:手动/20cm,左眼真菌性角膜炎,术后6mo发生排斥反应, RI评分9分;角膜基质层可见朗格罕氏细胞和炎症细胞。病例5,男,53岁,术前BCVA:0.1,左眼真菌性角膜炎,术后7mo发生免疫排斥反应, RI评分10分;激光共焦显微镜可见朗格罕氏细胞和炎症细胞,见图2。

镜检查显示术眼角膜上皮可见活化朗格罕氏细胞,其活化比例74.2%,与对侧眼15.2%比较差异有统计学意义($\chi^2 = 38.29, P < 0.001$)。基质层大量炎症细胞 $1641 \pm 160/\text{mm}^2$,与对侧眼 $78 \pm 23/\text{mm}^2$ 比较差异有统计学意义($t = 32.5, P < 0.05$)。

2.3 免疫病理检查结果 病例1在角膜全层HE染色均可见炎症细胞及嗜酸性粒细胞(图1F),在角膜基质深层及浅层均可见CD4⁺细胞的表达(图1G),同样可见CD8⁺细胞的表达(图1H)。病例2、3、4及5的患者HE染色角膜基质全层可见炎症细胞,未见嗜酸性粒细胞,在角膜基质层可见CD4⁺细胞的表达,亦可见CD8⁺细胞的表达,病例5免疫病理图片见图2。

术眼的RI为9~12(平均 10 ± 1.1)分。激光共焦显微

3 讨论

目前临床主要应用的生物工程角膜是猪角膜脱细胞基质,这是一种基于细胞组织工程学的角膜替代材料,在同种异体角膜供体材料缺乏的今天,在一定程度上缓解了角膜供体匮乏的局面,为临床感染性角膜患者保留了眼球,并恢复部分患者视力。然而即使是脱细胞的角膜基质降低了移植术后的免疫排斥反应^[5-7],我们在临床应用中仍可见免疫排斥反应的发生。本研究收集我院生物工程角膜移植术后发生免疫排斥反应患者作为研究对象,对其进行裂隙灯检查、激光共焦显微镜和免疫组织病理研究,以期从临床体征、活体细胞观察、免疫病理等方面深入揭示生物工程角膜移植免疫排斥反应发生的机制,为临床治疗提供依据,提高手术的成功率。

本研究发现生物工程角膜移植术后免疫排斥反应表现为角膜植片的水肿、混浊、新生血管的长入,早期还存在角膜上皮缺损。如果此时未能得到及时诊治,角膜植片的溶解和混浊加重,会严重影响患者术后视力。同时,角膜植片溶解进展的后果是严重的,可能会发生角膜穿孔等并发症。因此,对于行生物工程角膜移植术的患者需要更加严密的随访与观察。另外,除了术后糖皮质激素和免疫抑制剂的应用外,术前对生物工程角膜移植适应证的选择、术中植床植片的对合良好及术后及时拆除缝线等对预防术后免疫排斥反应亦是至关重要的影响因素。术前患者角膜溃疡直径较大、溃疡偏位、溃疡深度达到角膜厚度的1/2以上、睑板腺功能障碍及睑缘炎等均会导致术后免疫排斥反应率增加。根据生物工程角膜移植术后免疫排斥反应机制的观察及研究,治疗仍以糖皮质激素及免疫抑制剂等药物治疗为主^[8],若进行性进展,则须再次行同种异体角膜移植手术。

激光共焦显微镜是一种高分辨率、高放大倍数并且无创的显微镜,为我们进一步了解生物工程角膜移植术后免疫排斥反应发生时角膜的细胞形态和结构变化的动态评估提供了重要的工具^[9]。本研究对患眼的共焦显微镜检查发现,角膜上皮及基质层可见大量活化的朗格罕氏细胞及炎症细胞,这点与同种异体角膜移植排斥相同^[10],推测是由于细胞免疫在角膜移植免疫排斥反应中的作用,多种细胞参与其中,如辅助性T细胞、细胞毒性T细胞及巨噬细胞等重要的免疫活性细胞和效应细胞。同样在生物工程角膜移植术后免疫排斥反应中,角膜上皮及基质层活化的树突状细胞仍然是重要的抗原呈递细胞,能够介导细胞免疫的发生。DCs是目前已知的功能最强的抗原呈递细胞,也是活化初始T细胞最有效的细胞,未成熟的DCs刺激初始T细胞活化的能力很弱,但成熟的DCs能有效刺激活化初始T细胞,对免疫反应进行启动、调控及应答^[8]。

为进一步证实共焦显微镜下炎症细胞的性质,我们对所有患者再次手术时取下的生物工程角膜组织进行免疫组化和HE染色,研究发现所有生物工程角膜移植术后排斥反应患者角膜基质浅层、深层及全层均有不同程度的CD4⁺细胞和CD8⁺细胞的表达,由此推断细胞免疫参与生

物工程角膜移植术后免疫排斥反应,多种细胞因子介导下的CD4⁺细胞引起的迟发型超敏反应和CD8⁺细胞所致的细胞毒作用会对移植片造成组织损伤。这与以往文献报道的生物工程角膜移植动物试验中结果一致^[11]。另外,在我们的研究中有1眼角膜组织经HE染色后发现了大量的嗜酸性粒细胞。嗜酸性粒细胞是淋巴细胞活化因子RANTES与IL-16的主要来源,通过上调黏附分子的表面表达增强跨内皮移动,从而刺激细胞脱颗粒,进而参与免疫反应;同时,RANTES与IL-16对淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞有很强的趋化作用,会进一步加重组织的炎症和损伤^[12]。在生物工程角膜移植免疫排斥中发现的大量嗜酸性粒细胞,可能是因为异种抗原移植而诱发的超敏反应,进一步机制有待探索和研究。

生物工程角膜应用于板层角膜移植治疗感染性角膜炎,不仅可以有效控制感染,提高患者视力,而且其免疫排斥反应与同种异体人角膜移植机制类似,但术后糖皮质激素和免疫抑制剂等药物的应用对于减少免疫排斥反应仍属必要。生物工程角膜移植术后的免疫排斥反应需要从围手术期的各环节进行防控,以保证生物工程角膜植片良好的透明性恢复角膜视觉功能。生物工程角膜有效缓解了角膜供体来源不足的现状。

参考文献

- 1 Zhang SY, Zou LH, Gao YQ, et al. National epidemiological survey of blindness and low vision in China. *Chin Med J* 1992;105(7): 603-608
- 2 National Bureau of Statistics of China. Communique on Major Figures of the 2000 Population Census (No.1).
- 3 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. *中华实验眼科杂志* 2016;34(2):144-149
- 4 Tan DTH, Dart JKG, Holland EJ, et al. Corneal transplantation. *Lancet* 2012;379(9827):1749-1761
- 5 Pang K, Du L, Wu X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials* 2010;31(28):7257-7265
- 6 Li N, Wang X, Wan P, et al. Tectonic lamellar keratoplasty with acellular corneal stroma in high-risk corneal transplantation. *Mol Vis* 2011;17:1909-1917
- 7 Shao Y, Yu Y, Pei CG, et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications. *Int J Ophthalmol* 2012;5(4):415-418
- 8 罗丹, 赵敏. 角膜移植免疫排斥反应细胞疗法的研究进展. *中华实验眼科杂志* 2017; 35(9):848-851
- 9 de Nicola R, Labbe A, Amar N, et al. *In vivo* confocal microscopy and ocular surface diseases: anatomical-clinical correlations. *J Fr Ophthalmol* 2005;28(7):691-698
- 10 吕岚, 张华, 王兴翠, 等. 角膜移植免疫排斥反应的免疫病理学研究. *中国实用眼科杂志* 2006;12:1256-1258
- 11 Higuchi R, Streilein JW. CD8⁺ T cell-mediated delayed rejection of orthotopic Guinea pig cornea grafts in mice deficient in CD4⁺ T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(1):175-182
- 12 李莹. RANTES——与角膜移植排斥反应有关的细胞因子. *国外医学眼科学分册* 2001;4:196-199