

飞秒激光角膜基质透镜用于周边板层角膜移植的实验研究

高颖 张俐娜 何娜 杨咏 厉青青 程雪莹

【摘要】 目的 探讨将全飞秒激光小切口角膜基质透镜取出术中获得的角膜基质透镜用于周边板层角膜移植的方法和技术以及移植术后的结果。方法 新西兰白兔 10 只均分为 A、B 两组, 每组均采用右眼为实验眼, 12 点至 3 点钟方位制作周边角膜基质缺损模型。A 组采用单纯折叠的方法, B 组将纤维蛋白胶涂布于折叠好的透镜组织层间的方法构建板层角膜移植片。A 组用 10-0 尼龙线直接将构建好的板层角膜移植片缝合到右眼植床, 而 B 组则采用纤维蛋白胶将构建好的板层角膜移植片粘合于右眼植床, 再用 10-0 尼龙线缝合。术后观察移植片表面平整度、角膜上皮化完成和维持情况、周边角膜形态、植床和移植片的吻合度、移植片的透明度等指标。观察期末行组织病理学检查。结果 两组术后 3~5d 上皮化均完成, 且移植片表面平整, 移植片和植床吻合度佳。A 组 5 眼中有 4 眼移植片均出现新生血管长入, 轻、中度水肿混浊, 但 1 个月之后移植片完全透明, 新生血管完全消退; A 组另 1 眼在术后 10d 出现强烈的排斥反应, 予眼球摘除。而 B 组在术后早期 5 眼中即有 4 眼移植片发生强烈的异种排斥反应, 予眼球摘除; 而另 1 眼的发展过程类似 A 组 4 眼, 最终移植片完全透明。观察期末组织病理学检查发现 A 组 4 眼和 B 组 1 眼最终保持透明的移植片内为正常的角膜基质细胞, 透镜层间融合良好, 植床和移植片交界处有少许散在单核淋巴细胞和成纤维细胞; A 组 1 眼和 B 组 4 眼出现类似化脓样的白色浸润病灶, 有大量堆积的单核淋巴细胞在透镜层间和表面, 并在移植片表面出现组织坏死脱落。结论 利用飞秒激光小切口角膜基质透镜取出术中获得的角膜基质透镜经冰冻保存后用于构建周边板层角膜移植片, 并将其用于周边板层角膜移植术是可行的, 因纤维蛋白胶来源于人纤维蛋白可增加异种排斥反应。

【关键词】 飞秒激光 角膜基质透镜 周边板层角膜移植 纤维蛋白胶

Application of corneal stromal lenticules in heterogeneous peripheral lamellar keratoplasty in rabbits GAO Ying, ZHANG Lina, HE Na, et al. Department of Ophthalmology, Jinhua Hospital of Zhejiang University, Jinhua 321000, China

【Abstract】 Objective To evaluate the application of cryopreserved lenticules extracted from small incision lenticule extraction (SMILE) surgery in heterogeneous peripheral lamellar keratoplasty in of rabbits with peripheral corneal stromal defect. Methods Ten New Zealand white rabbits were randomly divided into 2 groups. Peripheral corneal stromal defect model was constructed in right eye of each rabbit. Two layers of cryopreserved lenticules were stacked up for use. In group A, the two-layer graft was sewed to the right eyes. In group B, fibrin glue was coated between the two layers to prepare the graft, and the graft and plant bed were adhered with glue before sewing. The smoothness of graft, corneal reepithelialization status, peripheral corneal condition, the graft-host fitness, and the transparency of the graft were observed. Histopathological examinations were conducted in the end of observation. Results Both groups had complete reepithelialization, smooth graft surface and good graft-host fitness were observed 3-5 days after operations. Four grafts in group A and 1 graft in group B were completely transparent in 1 month, and histopathological examination showed normal corneal stromal cells in these eyes. While 1 graft in group A and 4 grafts in group B had extreme immuno-inflammatory response and enucleation was performed in these eyes. Histopathological examinations showed severe edema, opacity and grey suppurative infiltration. Conclusion The study demonstrates that the application of cryopreserved lenticules extracted from SMILE surgery appears to be feasible and effective in heterogeneous peripheral lamellar keratoplasty in rabbits with peripheral corneal stromal defect.

【Key words】 Femtosecond laser Corneal stromal lenticules Peripheral lamellar keratoplasty Fibrin glue

Terrien 边缘角膜变性与 Mooren 角膜溃疡, 是一类发生于周边角膜的免疫性、非感染性疾病, 病变严重时可导致角膜穿孔, 严重影响视功能甚至毁损眼球^[1]。周边板层或深板层角膜移植术是唯一的治疗方法^[1-3]。由于角膜供体材料来源匮乏, 使得很多患者错失治疗机

doi: 10.12056/j.issn.1006-2785.2018.40.2.2017-2001

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2015C33282)

作者单位: 321000 浙江大学金华医院眼科

通信作者: 高颖, E-mail: gaoying59@126.com

会甚至丧失眼球。全飞秒激光小切口角膜基质透镜取出术 (small incision lenticule extraction, SMILE) 是近年来才开展的最新角膜屈光手术方式, 手术中利用 VisuMax 飞秒激光仪精准定位后, 在角膜基质层内立体切割出一定大小和厚度的透镜, 并经过 2~4mm 的周边角膜微小切口取出, 主要用于矫正近视或近视散光。通常在术中确认完整取出基质透镜后即将其丢弃。由于透镜来源于年轻健康的活体, 且来源丰富, 如能将该透镜用作角膜移植术的供体组织, “变废为宝”, 将会缓解角膜供体供需矛盾。本研究将 SMILE 术中获得的角膜基质透镜经冰冻保存后采用两种方法构建周边板层角膜移植片, 对周边角膜基质缺损的新西兰白兔进行周边板层角膜移植术的实验研究, 观察术后移植片的平整度, 植床、移植片的组织相容性, 以及移植片的存活情况。

1 材料和方法

1.1 收集和保存角膜基质透镜 取细胞冻存管 (美国 Corning Incorporated 公司, 规格 2ml), 标记左右眼, 消毒后放置于手术台, 在 VisuMax 飞秒激光仪 (德国 Carl Zeiss 公司) 下 SMILE 术中取出角膜基质透镜, 直径为 6.5mm, 中央厚度为 120~150 μm 不等, 即刻将其收集在细胞冻存管中, 做好标记并登记捐赠者的姓名、病历号及角膜基质透镜的边切厚度、中央厚度和直径, 保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱中待用。

1.2 实验动物 新西兰白兔 10 只, 雌性, 2~2.5kg, 实验室饲养 1 周。右眼为实验眼, 分 A、B 两组, 均 5 只眼。实验符合美国眼科和视觉研究协会年会 (ARVO) 动物实验伦理要求并通过医院伦理委员会审查。

1.3 制作周边角膜基质缺损模型 用 10mm 环钻在右眼鼻上方角膜压迹, 用宝石刀切除鼻上方 12 点至 3 点钟方位, 长 5mm, 宽 3mm, 厚 200~300 μm 的周边角膜基质, 形成周边角膜基质缺损模型。

1.4 构建周边板层角膜移植片 为方便辨认角膜基质透镜组织, 在制作移植片前用荧光素进行染色。采用两种方法构建周边板层移植片: A 组采用单纯折叠的方法, 将角膜基质透镜沿中轴对折, 并将 2 片角膜基质透镜交叠后进行修剪。该移植片共有 4 层, 宽和长各为 3 和 5mm, 总厚度在 250~300 μm 左右。B 组将纤维蛋白胶 (护固莱士, 中国上海莱士血液制品股份有限公司, 2ml) 涂布于折叠好的角膜基质透镜组织层间构建板层角膜移植片。

1.5 周边板层异种角膜移植术 A 组用 10-0 尼龙线

直接将构建好的板层角膜移植片缝合到右眼植床, 而 B 组则采用纤维蛋白胶将构建好的板层角膜移植片粘合于右眼植床, 再用 10-0 尼龙线缝合。构建周边板层角膜移植片及移植方法见图 1 (插页)。

1.6 术后用药 术后涂妥布霉素地塞米松眼膏 (西班牙 ALCON 公司, 3.5g) 局部抗炎, 2 次/d, 1.5 个月后改 1 次/d。

1.7 术后观察 移植后 2 周内, 每 2d 观察 1 次; 移植后 2 周~1 个月, 每 5d 观察 1 次; 移植 1 个月以上, 每 2 周观察 1 次。观察指标包括移植片表面平整度、角膜上皮化完成和维持情况、周边角膜形态、植床和移植片的吻合度、移植片的透明度、眼前节照片记录。术后 3 周拆线, 观察期共 3 个月。

1.8 组织病理学检查 观察期末或判断移植失败时处死动物, 取实验兔眼角膜行石蜡包埋, 切片, HE 染色常规组织病理学检查, 观察内容包括移植片内有无免疫炎症细胞、有无角膜基质细胞, 基质胶原的结构等。

2 结果

2.1 两组临床转归经过及结果 A 组术后 3~5d 上皮化均完成, 移植片表面平整, 移植片和植床吻合度佳 (图 2a、3a, 见插页)。A 组在术后 1~2 周内, 5 眼中有 4 眼移植片均出现了新生血管长入, 轻、中度水肿混浊 (图 2b, 见插页), 而另 1 眼在术后 10d 移植片高度水肿混浊, 且出现明确的灰白色浸润病灶 (图 3b, 见插页), 予眼球摘除, 行组织病理学检查; 3 周左右, A 组生存的 4 眼移植片水肿开始消退, 透明度恢复, 但仍有少量新生血管长入 (图 2c, 见插页); 1 个月之后, 移植片完全透明, 新生血管完全消退, 并保持至观察末期 (图 2d, 见插页)。B 组术后 3~5d 上皮化均完成, 移植片表面平整, 移植片和植床吻合度佳 (图 4a、5a, 见插页)。术后 1~2 周, 5 眼中 4 眼出现移植片高度水肿混浊, 且出现类似化脓样的灰白色浸润病灶 (图 4b, 见插页), 予眼球摘除, 行组织病理学检查。5 眼中有 1 眼, 其发展过程类似 A 组, 最终移植片完全透明 (图 5b-d, 见插页)。

2.2 两组组织病理学检查结果 A 组观察期末的组织病理学表现为: 上皮为 5~6 层形态正常的鳞状上皮细胞组成; 上皮下移植片的浅层基质内有少许散在单核淋巴细胞, 以及长梭形纤维细胞; 移植片内透镜层间的间隙不明显, 组织间融合良好, 透镜组织与植床贴合平整, 且透镜组织内的角膜基质细胞量比深层的植床内少 (这是透镜经过冰冻保存所致); 植床移植片交界处有少许散在单核淋巴细胞和成纤维细胞 (图 6a-b, 见插页)。而发生急性排斥反应的组织病理学表现如下: 上皮层缺

如,其下的透镜组织胶原纤维肿胀,清晰可见4层透镜叠加,组织内有大量的单核淋巴细胞浸润,及大量新生血管长入(图7a-b,见插页)。B组出现急性严重排斥反应的组织病理学表现为:移植片表面不仅上皮缺如,还产生透镜组织的坏死脱落,胶原纤维明显肿胀,且出现明显的层间间隙,组织内有大量的单核淋巴细胞浸润,透镜层间及透镜与植床间密集堆积单核淋巴细胞(图8a-b,见插页)。观察期末的组织病理学表现为:上皮亦为形态正常的鳞状上皮细胞组成,但稍薄,约3~4层细胞构成;移植片内透镜层间的间隙也不明显,组织间融合良好,但透镜组织与植床出现明显的间隙,植床和移植片交界处有散在单核淋巴细胞和成纤维细胞,明显较A组量多(图9a-b,见插页)。

3 讨论

近年来,越来越多的近视者得益于SMILE术摘掉眼镜,通常在术中完整取出后即丢弃的角膜基质透镜是健康的角膜组织。国际上已有文献报道将冰冻保存的角膜基质透镜重新植入到兔眼角膜基质内,观察角膜基质透镜自体重新植入的可行性,以及植入后的组织病理学变化与神经再生的情况^[4-6],结果显示组织相容性好,并具有良好的屈光效应,可行性高。其他动物实验进一步证实了同种异体角膜基质透镜移植的可行性和安全性,并且认为该方法将来可以用于某些角膜异常以及屈光不正的治疗^[7-8]。也有学者将角膜基质透镜用于人眼,2013年,Pradhan等^[9]将从一高度近视患者SMILE术中获得的透镜植入到另一白内障术后的无晶体眼(高度远视)患者中,结果显示患者术后1年无明显手术并发症,患者远视显著减轻。2015年,Sun等^[10]将5例SMILE术中取出的角膜基质透镜取出后即刻移植入患者对侧的远视眼中,在为期1年的随访期内无一眼发生并发症,所有角膜透明,尽管屈光度的预测性有待进一步提高,但研究结果提示角膜基质透镜用于自体远视矫正安全、有效、稳定性好。目前已有研究将SMILE术获得的角膜基质透镜用于治疗角膜溃疡及角膜穿孔的患者,最终角膜溃疡和穿孔呈现瘢痕愈合,结果提示当发生角膜穿孔等紧急情况而供体缺乏时,角膜基质透镜可作为一种可供选择的治療方式^[11]。此外,2016年,Yin等^[12]将SMILE术获得的角膜基质透镜和纤维蛋白胶用于双层移植片的构建,并进行体外细胞培养,发现移植片上皮化良好,将该移植片用于兔的前板层角膜移植后,能够完成上皮化并获得良好的透明性,认为此方法构建的移植片可用于角膜浅层损伤的修复和治療。

笔者选取SMILE角膜基质透镜直径为6.5mm,中央厚度为120~150 μm 不等,周边薄、中央厚,以该角膜基质透镜为供体组织行周边板层角膜移植的手术方法跟传统的手术方法不同,需要解决的关键点是如何将角膜基质透镜制作成适合周边板层角膜移植术、形状匹配的角膜移植片。因此,笔者先用荧光素染色角膜基质透镜以利于辨认角膜基质透镜的中轴线和边缘,并采用两种方法构建板层移植片:A组采用单纯折叠的方法,将基质角膜基质透镜沿中轴对折,并将2片角膜基质透镜交叠后进行修剪,该移植片共有4层,宽和长各为3和5mm,总厚度在250~300 μm 。而B组将涂布于折叠好的透镜组织层间构建板层角膜移植片。并采用两种方法进行移植:A组用10-0尼龙线直接将构建好的板层角膜移植片缝合到右眼植床,而B组则采用将构建好的板层角膜移植片粘合与植床,再用10-0尼龙线缝合。结果显示,将人眼SMILE角膜基质透镜经过冰冻保存后构建的角膜板层移植片移植到新西兰白兔后,A组和B组均在术后3~5d上皮化完成。A组4眼和B组1眼角膜移植片在经历了早期轻微的免疫炎症反应后,1个月后保持移植片透明。而A组1眼和B组4眼在术后10d左右发生强烈的异种排斥反应,组织病理学检查结果显示透镜组织胶原纤维肿胀,4层透镜间隙明显,组织内有大量的单核淋巴细胞浸润及大量新生血管长入。简言之,当采用单纯折叠构建和尼龙线缝合的方法,经过冰冻保存后的人角膜基质透镜移植到新西兰白兔后产生的异种排斥反应,可被局部2次/d的激素眼膏所抑制;而当采用纤维蛋白胶(人纤维蛋白)粘帖后再缝合的方法,尽管降低了手术难度,但却大大增加了异种排斥反应的强烈程度。

国际上有多篇报道关于冰冻保存的供体角膜用于角膜移植的文献^[13-17],结果显示,经过冰冻保存的角膜供体,无论是穿透性治疗性角膜移植,还是深板层角膜移植,或周边板层角膜移植术,术后均无同种异体排斥反应的出现,获得良好的临床结果。2014年有研究报道经冰冻保存法保存19~178d后再复苏的角膜组织透镜异体移植矫正9例远视患者,随访38~310d,评估患者的视力、光学相干断层扫描成像、角膜地形图和像差,临床指标结果显示安全有效,无一眼矫正视力丢失^[18]。这提示了SMILE角膜基质透镜经冰冻保存后若进行同种异体移植,也不会发生排斥反应。本研究结果还提示,即使是异种移植,使用2次/d的激素眼膏也可抑制排斥反应,移植片保持透明,但若加入人来源的纤维蛋白胶则可增加异种排斥反应的发生概率和程度。

4 参考文献

- [1] Shimazaki J, Yang HY, Shimmura S, et al. Terrien's marginal degeneration associated with erythema elevatum diutinum[J]. *Cornea*, 1998, 17(3): 342-344.
- [2] Cheng CL, Theng JT, Tan DT. Compressive C-shaped lamellar keratoplasty: a surgical alternative for the management of severe astigmatism from peripheral corneal degeneration[J]. *Ophthalmology*, 2005, 112(3): 425-430.
- [3] Wang T, Shi W, Ding G, et al. Ring-shaped corneoscleral lamellar keratoplasty guided by high-definition optical coherence tomography and Scheimpflug imaging for severe Terrien's marginal corneal degeneration[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250(12): 1795-1801. doi:10.1007/s00417-012-2042-4.
- [4] Angunawela RI, Riau AK, Chaurasia SS, et al. Refractive lenticule re-implantation after myopic ReLEx: a feasibility study of stromal restoration after refractive surgery in a rabbit model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(8): 4975-4985. doi:10.1167/iops.12-10170.
- [5] Riau AK, Angunawela RI, Chaurasia SS, et al. Reversible femtosecond laser-assisted myopia correction: a non-human primate study of lenticule re-implantation after refractive lenticule extraction[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67058. doi:10.1371/journal.pone.0067058.
- [6] Lim CH, Riau AK, Lwin NC, et al. LASIK following small incision lenticule extraction (SMILE) lenticule re-implantation: a feasibility study of a novel method for treatment of presbyopia[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83046. doi:10.1371/journal.pone.0083046.
- [7] Liu R, Zhao J, Xu Y, et al. Femtosecond laser-assisted corneal small incision allogenic intrastromal lenticule implantation in monkeys: a pilot study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(6): 3715-3720. doi:10.1167/iops.14-15296.
- [8] Zhao J, Shen Y, Tian M, et al. Corneal lenticule allotransplantation after femtosecond laser small incision lenticule extraction in rabbits[J]. *Cornea*, 2017, 36(2): 222-228. doi:10.1097/ICO.0000000000001076.
- [9] Pradhan KR, Reinstein DZ, Carp GI, et al. Femtosecond laser-assisted keyhole endokeratophakia: correction of hyperopia by implantation of an allogeneic lenticule obtained by SMILE from a myopic donor[J]. *J Refract Surg*, 2013, 29(11): 777-782. doi:10.3928/1081597X-20131021-07.
- [10] Sun L, Yao P, Li M, et al. The safety and predictability of implanting autologous lenticule obtained by SMILE for hyperopia[J]. *J Refract Surg*, 2015, 31(6): 374-379. doi:10.3928/1081597X-20150521-03.
- [11] Jiang Y, Li Y, Liu XW, et al. A novel tectonic keratoplasty with femtosecond laser intrastromal lenticule for corneal ulcer and perforation[J]. *Chin Med J*, 2016, 129(15): 1817-1821. doi:10.4103/0366-6999.186639.
- [12] Yin H, Qiu P, Wu F, et al. Construction of a corneal stromal equivalent with SMILE-derived lenticules and fibrin glue[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 33848. doi:10.1038/srep33848.
- [13] Yao YF, Zhang B, Zhou P, et al. Autologous limbal grafting combined with deep lamellar keratoplasty in unilateral eye with severe chemical or thermal burn at late stage[J]. *Ophthalmology*, 2002, 109(11): 2011-2017.
- [14] Yao YF. A novel technique for performing full-bed deep lamellar keratoplasty[J]. *Cornea*, 2008, 27(Suppl 1): S19-24. doi: 10.1097/ICO.0b013e31817f445f.
- [15] Wu SQ, Zhou P, Zhang B, et al. Long-term comparison of full-bed deep lamellar keratoplasty with penetrating keratoplasty in treating corneal leucoma caused by herpes simplex keratitis[J]. *Am J Ophthalmol*, 2012, 153(2): 291-299. doi:10.1016/j.ajo.2011.07.020.
- [16] Yao YF, Zhang YM, Zhou P, et al. Therapeutic penetrating keratoplasty in severe fungal keratitis using cryopreserved donor corneas[J]. *Br J Ophthalmol*, 2003, 87(5): 543-537.
- [17] Huang D, Qiu W, Zhang B, et al. Peripheral deep anterior lamellar keratoplasty using a cryopreserved donor cornea for Terrien's marginal degeneration[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2014, 15(12): 1055-1063. doi:10.1631/jzus.B1400083.
- [18] Ganesh S, Brar S, Rao PA. Cryopreservation of extracted corneal lenticules after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects[J]. *Cornea*, 2014, 33(12): 1355-1362. doi:10.1097/ICO.0000000000000276.

(收稿日期:2017-08-21)

(本文编辑:陈丽)

《浙江医学》对医学论文中有关实验动物描述的要求

在医学论文的描述中,凡涉及实验动物者,在描述中应符合以下要求:(1)品种、品系描述清楚;(2)强调来源;(3)遗传背景;(4)微生物学质量;(5)明确等级;(6)明确饲养环境和实验环境;(7)明确性别;(8)有无质量合格证;(9)有对饲养的描述(如饲料型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);(10)所有动物数量准确;(11)详细描述动物的健康状况;(12)对动物实验的处理方式有单独清楚的交代;(13)全部有对照,部分可采用双因素方差分析。

本刊编辑部