

中国角膜病的研究现状

谢立信*

(山东省眼科研究所, 青岛 266071)

[摘要] 本文结合我国眼科角膜病防治领域十余年来在国内外发表的相关应用基础研究论文, 概述了我国在该领域的主要研究成果、学术水平以及存在的问题。随着科学技术的发展, 我国在许多方面已形成了自己的研究特色和优势, 但在分子和基因水平上的研究和国外相比仍有较大差距。

[关键词] 角膜病, 研究, 进展

中国公民因单眼和双眼角膜病致盲的盲人约一百多万, 占眼科致盲眼病的第2位, 其中80%以上为农民。由于中国人的传统观念, 加之身后捐献器官和组织尚未实现中央立法, 角膜移植受到很大制约, 故一直处于眼科学领域的临床和应用基础研究的后进地位。随着国家的改革开放, 十余年来已有明显的变化, 特别是近年来, 随着分子生物学、免疫学、遗传学等众多基础学科的飞速发展和各学科之间相互交叉、渗透的增加, 基础研究已被诸多学者重视。作为眼科学的一个重要分支, 角膜病的基础研究在我国老一辈科研工作者的带动下、众多中青年专家的努力下已经取得了长足的进步, 并且在某些研究领域已经处于国际先进和领先水平。这些成绩不仅为今后的研究奠定了基础、积累了资料, 而且也推动了角膜病临床研究的发展, 使众多的角膜病患者得到了更好的、更及时的诊断和治疗。

但目前存在的问题仍然较多, 诸如应用基础研究工作尚未明显形成规模或研究中心, 研究的总体学术水平还不高, 尤其在原始创新研究上存在明显不足, 研究成果在国外有影响的眼科学刊物上发表较少, 还没有形成我们在该领域的学术影响。现就目前中国角膜病应用基础研究的现状阐述如下:

1 常见角膜疾病的防治基础研究

对疾病的发病机制和致病原因进行探讨是认识疾病、预防和治疗疾病的基础。随着基础科学的发

展, 通过利用多种技术手段, 对常见角膜疾病的发病及致病机制已经有了进一步的认识。

1.1 单纯疱疹性角膜炎 (herpes simplex keratitis, HSK)

是世界范围内最常见的感染性角膜疾病。近年来由于其他感染性疾病发病率的增加, HSK的发病率有所下降, 但其患病的绝对数仍是逐年上升的。由于HSK易复发、迁延不愈, 以往人们对其解释仅限于HSK的病原体-I型单纯疱疹病毒(HSV-I)潜伏于三叉神经节内, 经神经纤维传导达角膜而致病。近年来, 采用多聚酶链反应、原位杂交等多种分子生物学手段对单纯疱疹病毒的不同基因序列进行检测, 经大量实验研究证明, 认为角膜也可以作为HSV-I潜伏源地并引起HSK的复发, 为临床的治疗提供了有力的理论依据^[1-3]。此外, 部分学者还对HSK患者的全身和局部的免疫状态进行了研究, 确认了免疫因素尤其是细胞免疫在疾病发生和发展过程中起重要作用, 认为免疫增强治疗对控制病情和防止HSK的复发具有十分重要的作用^[4]。

1.2 真菌性角膜炎

近年来真菌性角膜炎的发病率呈逐年上升, 在某些地区甚至占到感染性角膜疾病的首位。目前国内外对此方面的基础研究都比较缺乏, 且在临床上尚无有效的抗真菌药物, 因此治疗较为棘手。近来的研究发现, 不同的菌种对角膜组织的感染及在角膜中生长方式(水平生长、垂直生长和混合生长)^[5]

* 中国工程院院士。

本文于2003年2月11日收到。

均不相同。这就为临床选择治疗方案,尤其是选择何种角膜移植手术提供了组织病理学依据^[6,7]。我国在该学术领域,尤其是与临床治疗相关的研究,处于国际领先水平。

1.3 免疫学和生物化学的理论和技术的应用

采用免疫学和生物化学技术可进一步阐明多种角膜疾病的发病机制。如体液免疫和氧自由基在严重的角膜化学伤-碱烧伤后的溃疡形成过程中所起的关键性作用^[8];蚕蚀性角膜溃疡患者的局部和全身免疫系统存在着免疫平衡的调节紊乱,进一步证明其是一种自身免疫性疾病^[9,10];圆锥角膜的角膜基质中某些胶原纤维和金属蛋白酶的含量存在着明显的变异,而这些变异可能是引起发病的主要原因^[11,12]。

这些研究从不同的角度和深度对常见角膜疾病的发病机制进行了全面的探讨,为临床的防治提供了重要的参考依据。

2 创新性药物的研究

2.1 免疫抑制剂的研究

如何有效抑制角膜移植术后的免疫排斥反应一直是角膜病基础研究的重点。随着对角膜移植排斥机制的研究深入,已对诸多的免疫抑制剂进行此项研究。如对免疫抑制剂环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 的机制和效果的研究,其结果显示可抑制角膜免疫排斥反应并已经成功的应用于临床,目前为角膜移植术后的常规用药。在对新型免疫抑制剂 FK-506 的研究中,发现 FK-506 能够明显抑制角膜移植片中 T 淋巴细胞、巨噬细胞、白细胞介素-2 受体及多种黏附分子的表达,并能够明显延长角膜移植片的存活时间,为 FK-506 在临床应用提供了重要的理论指导,使其已初步应用于临床^[13]。此外还对雷公藤多甙、白细胞介素-1 受体拮抗剂及 Leflunomide (LEF) 等多种免疫抑制剂进行了研究,进一步丰富了临床治疗的选择^[14,15]。近年来受人们广泛关注的基因工程药物也被应用于抑制角膜移植术后的免疫排斥反应。首先是 IL-2-PE40,一种白细胞介素-2 和绿脓杆菌外毒素的重组蛋白,对表达 IL-2 受体的 T 淋巴细胞有很强的毒性,能够明显延长异种大鼠角膜移植片的存活时间^[14];细胞毒性 T 细胞相关抗原 4 (cytotoxic T lymphocyte-association antigen-4, CTLA4) 与免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 的融合蛋白 CTLA4-Ig,能够抑制 T 淋巴细胞活化所需的协同刺激信号传递,不仅在其他器官和组织移植中

起到了抑制免疫排斥反应和诱导免疫耐受的作用,在角膜移植中同样发挥了良好的效果,已经被认为是最有应用前景的免疫抑制剂。

2.2 眼用制剂的研究

由于角膜渗透性、泪液的引流等影响,传统的眼用制剂在结膜囊和眼内难以达到有效的药物浓度,生物利用度差,使治疗效果受到了影响,而对免疫抑制剂的影响尤为明显。对眼用药物新剂型的开发已经引起了广泛的重视。目前对眼用药物新剂型的研究主要是药物缓释系统的研究。通过在眼部应用药物缓释剂,可以达到有效的局部药物浓度,提高生物利用度,并可避免全身毒、副作用和频繁、反复滴药。药物缓释系统常用的药物载体如胶原罩、脂质体和高分子生物材料等,尤其是高分子生物材料中的可生物降解的材料,这种材料作为药物载体具有良好的生物相容性,并且由于体内环境的作用在不断降解的同时,使药物更容易释放出来,可以实现药物的恒速释放。通过结膜下或前房植入包被有 CsA 的可降解生物材料已交酯-丙交酯-己内酯的三元共聚物 (polyclatide-co-glycolide-co-caprolactone, PGLC), 起到较 CsA 滴眼剂更好的免疫抑制效果^[16,17]。PGLC 作为缓释载体的研究是我国的原始创新性研究成果,目前已获得科技部国家高技术研究发展计划(“863”计划)专项基金的资助。该成果可望达到眼内缓释载体的国际领先水平。

3 移植与免疫

对角膜移植术后免疫排斥反应的研究是角膜病研究的重点和难点。角膜所具有的独特解剖结构决定了角膜移植术后免疫排斥反应的发生存在着与其他器官和组织移植所不同的机制。在对角膜免疫赦免状态的研究中,发现正常角膜组织的上皮细胞和角膜基质细胞只表达主要组织相容性抗原-A、-B、-C, HLA-DR 抗原在朗罕细胞上表达,而朗罕氏细胞和 T 细胞只分布于角膜缘处^[18];正常角膜的内皮细胞和虹膜可表达重要的凋亡诱导基因 FasL 和 Fas,而 FasL 的表达要明显强于 Fas,可诱导高表达 Fas 的 T 淋巴细胞发生凋亡^[19];角膜内皮细胞可通过细胞交互作用抑制有丝分裂原刺激的淋巴细胞活化和增殖;角膜基质细胞及其分泌的免疫抑制介质可抑制淋巴细胞的活化。当这些因素被破坏后就可能引起免疫排斥反应的发生。在角膜移植免疫排斥的发生中,证实了既有细胞免疫,又有体液免疫的参与,以细胞免疫介导为主,体液免疫只在术后早期起

非决定性作用,其效应物为抗角膜内皮抗原抗体^[20]。另外,患者血清和泪液中可溶性白细胞介素-2受体的变化与角膜移植后的免疫状态密切相关,对免疫排斥的发生可能起到早期诊断的作用。而CD4⁺与CD8⁺T细胞比值的增高同样预测着角膜移植免疫排斥反应的发生。

4 角膜的组织工程学

4.1 组织工程学

组织工程学是20世纪80年代后期提出的一个新概念,其主要原理是应用生命科学和工程学的原理与方法,将活的细胞与可降解支架材料复合,在体外构建有生命的种植体,植入体内修复组织缺损、重建功能,增进或改善人体各种组织或器官损伤后的功能和形态,以达到治疗疾病、改善患者生活质量的目的。而在角膜中的具体应用则主要体现在对组织工程角膜的研究方面。一个完整的组织工程角膜需要有来源于角膜的种子细胞及支架材料。种子细胞包括角膜上皮细胞、基质细胞及内皮细胞。随着组织细胞体外培养技术的发展,以及在眼科的广泛应用,目前已成功建立了这3种细胞的常规培养方法。在角膜上皮细胞的体外培养研究中发现从角膜缘取材的上皮具有更强的分裂增殖能力,并能保持角膜上皮的特性;对表皮生长因子、角质细胞生长因子、神经生长因子及转化生长因子等多种生长因子对培养的角膜上皮及内皮细胞的促增殖作用,以及对基质细胞中酶分泌的变化进行了研究,为以后改善组织工程角膜组织中的调节环境奠定了基础。由于组织细胞的来源困难,因此采用诱导胚胎干细胞的定向分化技术以弥补其不足。目前已发现经角膜缘组织诱导后的胚胎干细胞具有角膜上皮细胞的特性^[21]。此外,对多种可作为人工角膜支架生物材料的生物相容性也进行了广泛的研究,如天然珊瑚羟基磷灰石、聚羟基乙酸等支架材料与角膜有良好的生物相容性,能与受体角膜生物愈合,可以作为构建人工角膜的理想材料,并发现用氩等离子体处理这些支架材料后能明显增加其组织相容性^[22]。有学者利用聚羟基乙酸及兔角膜基质细胞所构建的复合物已具备了角膜基质层的基本组织学特征。在这些研究基础上,已经在体外成功的用组织工程技术重建出结构较规则、透明度较高的角膜组织^[23]。

4.2 角膜缘干细胞移植

是治疗严重的眼表疾病的一种有效的方法。已经经免疫学方法证实角膜缘干细胞定位于角膜缘上

皮层基底部。但是由于其单纯的角膜缘组织移植易受多种因素的影响而难以达到有效的治疗效果。羊膜作为一种载体,其中含有多种粘连蛋白和生长因子,具有促进角膜缘干细胞的增生、抗感染及抗细胞凋亡等多种生物学作用,可作为角膜表面结构重建的理想材料^[24-26]。目前已在羊膜上培养出自体或异体角膜缘干细胞,并应用于角膜移植治疗严重的眼表疾病,取得了很好的效果。

5 角膜疾病的基因治疗

基因治疗也是当代医学和生物学中的一个崭新的研究领域,是通过特定的分子生物学技术关闭或降低异常基因的表达,或将正常的外源基因导入特定的靶细胞以弥补缺陷的基因,或将某种特定的基因导入体细胞表达以产生特定的蛋白质因子实现对疾病的治疗作用。基因治疗在眼科尤其是在角膜病的研究方面起步虽然较晚,但其所起的作用却是不可忽视的。基因治疗作为一种新的技术手段已经在各种角膜疾病的治疗中显示出了极大的应用前景。我国的眼科工作者已经对其进行了研究。首先通过利用脂质体为载体转染活体眼组织,能够有效、稳定的将外源基因转染到活体角膜、虹膜、睫状体、视网膜和脉络膜^[27];又成功的通过复制缺陷型腺病毒将Lac基因特定的转入角膜内皮细胞,为促角膜内皮细胞的分裂和角膜移植术后免疫排斥的基因治疗奠定了研究基础^[28,29]。如基因治疗可能会使一些遗传性角膜病得到控制;通过将促分裂基因导入角膜内皮细胞后促进角膜内皮细胞的分裂增生;将抑制免疫排斥的基因导入角膜细胞产生抑制因子抑制角膜移植术后的免疫排斥反应。最近有学者成功地将携带有p21WAF1基因的阳离子脂质体安全、相对高效地转入角膜基质细胞,起到了极佳的抑制人角膜基质细胞增殖的作用,而且对角膜组织无明显的毒性作用,为抑制准分子激光屈光性角膜切削术后角膜雾状浑浊(haze)的形成提供了一条崭新的途径^[30]。对角膜新生血管的治疗,正将带有对新生血管内皮细胞有抑制基因的K5蛋白和内皮抑素(endostatin, ES)转入其中,使其达到抑制角膜新生血管的作用。

参 考 文 献

- [1] 谢立信,李绍伟,董晓光. HSV- I 功能基因在角膜内潜伏感染的研究. 中华眼科杂志, 2000, 36:36-39.
- [2] 李绍伟,谢立信,董晓光. 利用核酸原位杂交技术对 HSV- I 角膜

- 内潜伏感染的研究. 中华眼科杂志, 1995, 31: 366—369.
- [3] 谢立信, 董晓光. HSV- I 在角膜内潜伏感染的研究. 中华眼科杂志, 1993, 29: 108—110.
- [4] 贺冰, 徐杰. 单疱角膜炎患者外周血白细胞介素 II 活性与自然杀伤细胞活性的关系. 眼科研究, 1997, 15: 33—34.
- [5] 谢立信, 史伟云, 董晓光等. 108 例真菌性角膜炎的临床和组织病理学研究. 眼科研究, 1999, 17: 283—285.
- [6] Xie L, Shi W, Liu Z et al. Lamellar keratoplasty for the treatment of fungal keratitis. *Cornea*, 2002, 21: 33—37.
- [7] Xie L, Dong X, Shi W. Treatment of fungal keratitis by penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol.*, 2001, 85: 1 070—1 074.
- [8] 林荣霞, 杨德旺, 郭峰. 兔眼前节碱烧伤免疫机理的研究. 中华眼科杂志, 1996, 32: 457—459.
- [9] 王铮, 陈家祺, 郑湖铃. 蚕蚀性角膜溃疡角膜及临近球结膜的免疫组织化学研究. 中华眼科杂志, 1994, 30: 218—220.
- [10] 赵京城, 金秀英. 蚕蚀性角膜溃疡发病机理的探讨. 中华眼科杂志, 1994, 30: 4—7.
- [11] 张立军, 谢立信. 正常角膜与圆锥角膜中 I 型、VI 型胶原与金属蛋白酶-2. 眼科研究, 2001, 19: 46—48.
- [12] 赵桂秋, 牛应筠, 孙为荣等. 正常人及圆锥角膜患者角膜中 IV、V 型胶原的检测. 眼科研究, 2002, 20: 19—22.
- [13] 吕岚, 张文华, 孙旭光. FK-506 抑制大鼠角膜移植免疫排斥反应的研究. 中华眼科杂志, 1999, 35: 25—28.
- [14] 吴京, 周国筠, 付瑞等. IL-2-PE40、CsA、雷公藤治疗角膜移植排斥反应实验研究. 眼科研究, 1998, 16: 251—253.
- [15] 翟长斌, 张文华, 邹留河等. 白细胞介素-1 受体拮抗剂防治角膜移植免疫排斥反应的实验研究. 中华眼科杂志, 2001, 37: 270—272.
- [16] 史伟云, 谢立信, 王身国. 环孢素 A 缓释系统植入前房抑制鼠角膜移植免疫排斥反应机制的研究. 中华眼科杂志, 2002, 38: 502—505.
- [17] Xie L, Shi W, Wang Z et al. Prolongation of corneal allograft survival using cyclosporine in a polylactide-co-glycolide polymer. *Cornea*, 2001, 20: 748—752.
- [18] Li Q, He Y. An immunohistochemical study of Langerhans cells, T cells and the HLA antigen in human cornea. *Eye Science*, 1993, 9: 121—125.
- [19] 钟一声, 程枫, 王康孙. 兔角膜 Fas 和 Fas 配体 mRNA 的表达和意义. 眼科研究, 2000, 18: 289—291.
- [20] 唐娜, 李辰, 徐锦堂. 穿透性角膜移植术后抗角膜内皮抗原抗体的检测. 中华眼科杂志, 1996, 32: 252—254.
- [21] 王智崇, 葛坚, 陈家祺等. 角膜基质诱导胚胎干细胞定向分化的初步实验研究. 眼科学报, 1999, 15: 195—198.
- [22] 吴欣怡, 张军和, 王志君等. 人工角膜支架材料在动物体内应用的生物学反应. 眼科研究, 2001, 19: 485—488.
- [23] 陈家祺, 张胜, 郭琳洁等. 应用三维培养技术体外重建角膜组织的初步研究. 中华眼科杂志, 2001, 37: 244—247.
- [24] 郭萍, 谢立信, 董晓光等. 人角膜缘干细胞在体外不同载体上培养的实验研究. 眼科研究, 2001, 19: 304—307.
- [25] 沈玺, 叶纹, 钟一声. 羊膜对兔角膜上皮细胞影响的研究. 眼科, 2000, 9: 300—302.
- [26] Pan Z, Zhang W, Wu Y et al. Transplantation of corneal stem cells cultured on amniotic membrane for corneal burn: experimental and clinical study. *Chin Med J.*, 2002, 115: 767—769.
- [27] 杨桦, 张晰, 管红兵等. 脂质体介导基因转染活体眼组织的研究. 眼科研究, 2000, 18: 227—230.
- [28] 王旭, 谢立信, 史伟云. 外源基因转入角膜内皮细胞的实验研究. 中华眼科杂志, 2002, 38: 117—118.
- [29] 郭萍, 谢立信, 史伟云等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体转基因治疗鼠角膜移植免疫排斥的研究. 中华眼科杂志, 2003, 39: 19—23.
- [30] 晏晓明, 荣蓓. 阳离子脂质体介导的 p21WAF1 基因转染对角膜基质细胞增殖的影响. 中华眼科杂志, 2002, 38: 103—107.

RESEARCH ON CORNEAL DISEASES IN CHINA

Xie Lixin

(Shandong Eye Institute & Hospital, Qingdao 266071)

Abstract The primary scientific achievements and academic levels in prevention and treatment of corneal diseases in China as well as current problems were evaluated by reviewing published clinical studies in the last 10 years. With the rapid development of science and technology, we have formed specific features and strengths in corneal research. However, the technology gap still exists between China and developed countries regarding ophthalmic molecular genetics.

Key words corneal disease, research, advance