doi:10.11659/jjssx.12E022090

·临床研究·

羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗眼表及眼睑烧伤的临床观察

刘文慧,徐 烁,潘 莹,顾 焱,孙红娟,邹文军 (江南大学附属中心医院/无锡市第二人民医院眼科,江苏 无锡 214000)

[摘 要] **目的** 探讨羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗眼表及眼睑烧伤患者的临床效果。**方法** 选取于我院行手术治疗的化学或热烧伤致眼表损伤及下眼睑内翻的80例患者为研究对象,所有患者均接受羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗。患者于术前、术后8周分别进行裂隙灯显微镜检查并拍照;比较患者术前、术后8周视力变化情况、泪膜破裂时间以及血清血管内皮生长因子(VEGF)、转化生长因子β1(TGF-β1)、胰岛素生长因子1(IGF-1)水平;术后8周,采集中央角膜和角膜缘的脱落上皮细胞,采用PAS染色及免疫荧光染色进行分析。**结果** 术后8周,患者眼表状况恢复良好,眼睑内翻成功矫正,患者视力显著优于术前($P<0.05$)。与术前比较,术后8周患者泪膜破裂时间显著延长($P<0.05$),血清VEGF、TGF-β1、IGF-1水平显著升高($P<0.05$)。PAS染色显示中央角膜及角膜缘无杯状细胞;免疫荧光染色显示细胞角蛋白12(CK12)在角膜上皮细胞中高表达,在角膜缘上皮靠近角膜侧的细胞中低表达。**结论** 羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗眼部烧伤效果显著,可促进患者眼表修复,矫正眼睑内翻,改善术后视力,实现角膜干细胞的自体扩增,是一种安全有效的治疗方法。

[关键词] 羊膜移植;睑内翻矫正术;眼表烧伤;上皮细胞
[中图分类号] R779.6;R644 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-12-18

Clinical observation of amniotic membrane transplantation combined with entropion correction for ocular surface and eyelid burns

LIU Wen-hui, XU Shuo, PAN Ying, GU Yan, SUN Hong-juan, ZOU Wen-jun (Department of Ophthalmology, Jiangnan University Medical Center/Wuxi Second People's Hospital, Wuxi Jiangsu 214000, China)

Abstract: Objective To explore the clinical effect of amniotic membrane transplantation combined with entropion correction for ocular surface and eyelid burns. **Methods** A total of 80 patients with ocular surface injury and lower eyelid entropion caused by chemical or thermal burns who received surgical treatment in our hospital were selected as the research objects. All patients received amniotic membrane transplantation combined with entropion correction. All patients were examined by slit-lamp microscope and photographed before and 8 weeks after surgery. The visual acuity changes, tear film rupture time and serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor β1 (TGF-β1) and insulin growth factor 1 (IGF-1) were compared before and 8 weeks after surgery. Eight weeks after surgery, exfoliated epithelial cells of the central cornea and limbus were collected and analyzed by PAS staining and immunofluorescence staining. **Results** At 8 weeks after surgery, the patient's ocular surface condition recovered well, eyelid entropion was successfully corrected, postoperative visual acuity was significantly better than that before surgery ($P<0.05$). Compared with before surgery, the tear film rupture time 8 weeks after surgery was significantly prolonged ($P<0.05$), and the serum VEGF, TGF-β1 and IGF-1 levels 8 weeks after surgery were significantly increased ($P<0.05$). PAS staining showed that there was no goblet cell in the central cornea and limbus. Immunofluorescence staining showed that cytokeratin 12 (CK12) was highly expressed in the corneal epithelial cells, and low expressed in corneal limbal epithelial cells near the cornea. **Conclusion** Amniotic membrane transplantation combined with entropion correction has a significant therapeutic effect on patients with ocular burn, which can promote ocular surface repair, correct entropion, improve postoperative visual acuity, and achieve self-amplification of cornea stem cells. It is a safe and effective treatment method.

Keywords: amniotic membrane transplantation; entropion correction; ocular surface burn; epithelial cells

化学损伤及物理损伤均会破坏眼表的正常生理结构,对眼睛造成损伤,有时甚至波及眼球,同时会损伤角膜缘干细胞,导致其数量严重下降,引起角膜缘干细胞缺乏(limbal stem cells deficiency,LSCD),最终导致角膜上皮脱落,引发角膜基质溃疡、上皮血管新生、睑球粘连及角膜血管翳等一系列并发症,不但影响美观,而且极其损伤视力[1-3]。有研究表明,眼热烧伤或化学损伤可伤及角膜缘干细胞,占眼外伤的7.7%~18.0%,且患者呈年轻化发展,可造成不同程度的角膜穿孔及复发性角膜溃疡[3-4]。临床治疗LSCD的方法包括药物和手术治疗。药物治疗只能改善角膜缘基底层残存

[基金项目] 江苏省青年医学重点人才培养项目(QNRC2018140);无锡市卫生健康委青年项目(Q202227)

[通信作者] 刘文慧,E-mail:charmingpisces@126.com

角膜缘干细胞的生存环境,并不能使已经凋亡的角膜缘干细胞复活或增殖,因此单一药物治疗并不能治愈LSCD[3-6]。目前认为手术是治疗LSCD最为有效的方法,手术治疗主要通过移植对眼表进行重建,移植物包括羊膜、自体角膜缘干细胞、自体结膜、异体角膜缘干细胞以及体外培养角膜缘干细胞等[3,7]。研究表明,通过合适的移植物进行眼表重建能有效改善眼睑结构,提高泪膜稳定性,减轻LSCD引起的炎症反应,对于矫正烧伤引发的睑内翻,改善术后美观,恢复眼表功能意义重大[8-9]。本研究首次采用羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗化学或热烧伤致眼表损伤及下眼睑内翻,观察患者术后恢复情况,以期为眼表烧伤患者的治疗提供新思路。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2016年6月至2021年12月于我院接受诊治的80例眼部烧伤患者为研究对象。其中男53例,女27例,年龄(46.37±17.12)岁。所有患者均接受羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗。纳入标准[10]:①损伤眼部残留部分健康角膜缘;②损伤致下眼睑内翻;③临床资料完整;④年龄18~65岁。排除标准[10]:①烧伤前患有其他眼部疾病;②全角膜缘损害;③角膜基质溃疡;④合并其他疾病,不适合进行手术治疗。本研究经我院医学伦理委员会批准[2022伦理审查第(Y-171)号]。

1.2 手术方法

羊膜移植术[10]:术中于球结膜下注射2%利多卡因进行浸润麻醉。所有操作均在显微镜下进行,使用开睑器开睑,刮除干净角膜表面的坏死组织,沿角膜缘剪开球结膜,清除坏死组织,尽量保留角巩缘组织。对存在睑球粘连者,松解睑球粘连。取适当大小已于林格氏液中复水1 h的羊膜,上皮面朝上平铺于角结膜创面,10-0缝合线缝合固定于角巩膜表面。术中确保羊膜植片平整,植片下无积血、积液,黏附紧密。暴露角膜缘,将羊膜平铺于患侧,确保患侧角膜缘与羊膜的角膜缘侧贴合、无缝隙,并将外侧缘固定缝合于近穹隆处巩膜浅层,结膜部分覆盖于羊膜表面,与患侧周围球结膜缝合。

睑内翻矫正术[11]:浸润麻醉后,作睑缘牵引缝线,翻转眼睑,充分暴露睑结膜面,在平行于睑缘的睑板沟处切断睑板,切口长度一般超出瘢痕区两端1~2 mm,同时切除坏死的睑板组织以及增生的肉芽,充分暴露缺损区。将异体巩膜经乙醇浸泡复水后,根据睑板缺损区的大小制作异体巩膜条,并将巩膜条内面朝向眼睑皮肤面平贴在睑板缺损区,最后将异体巩膜条与睑缘以及周围睑结膜面以8-0可吸收尼龙线连续缝合固定。

1.3 观察指标

所有患者于术前、术后8周分别进行裂隙灯显微镜检查并拍照。采用视力表分别测定患者术前、术后8周视力,根据视力情况将患者分为视力0.3~0.5,视力0.1~<0.3和视力<0.1。比较患者术前、术后8周的泪膜破裂时间,将荧光素钠滴在眼睑里后闭眼,然后睁开眼睛在裂隙灯下用钴蓝光迅速观察,出现第一个破裂斑时即为泪膜破裂时间。分别抽取患者术前、术后8周的外周血,于4 ℃下以3 000 r/min离心5 min,收集上清液备用。采用ELISA试剂盒检测血清血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、转化生长因子β1(transforming growth factor β1,TGF-β1)、胰岛素生长因子1(insulin growth factor 1,IGF-1)水平。

1.4 PAS染色及免疫荧光染色

眼表脱落上皮细胞收集[3]:在患者结膜囊内滴盐酸奥布卡因滴眼液1~2滴,擦拭干净泪液。夹取醋酸纤维膜,并将其粗糙面接触角膜、角膜缘,同时采集部分患者的结膜脱落上皮细胞作为阳性对照。需要注意的是在收集角膜缘脱落上皮细胞时,标记端纤维膜片应与结膜侧贴合。醋酸纤维膜粗糙面与角膜接触15 s后将标本置于95%乙醇中固定处理5~10 min。

PAS染色[3]:将标本从95%乙醇中取出,用蒸馏水洗3次,滴加1滴高碘酸染色5 min,蒸馏水冲洗1次,滴加1滴Schiff氏液染色10 min,弃去Schiff氏液,滴加1滴偏重亚硫酸钠30 s后用流水冲洗1 min,然后滴加苏木素染核10 s,蒸馏水洗1次,用95%乙醇脱水10 s,最后将脱水后的标本置于载玻片上,室温下干燥,封片后于光学显微镜下观察记录并拍照。

免疫荧光染色:从95%乙醇中取出标本后用蒸馏水冲洗3次,山羊血清室温封闭1 h后,与兔抗人细胞角蛋白12(cytokeratin 12, CK12)抗体(英国Abcam公司)于4 ℃孵育16 h,加FITC标记的兔抗大鼠IgG二抗(英国Abcam公司),在室温下湿盒中孵育1 h;滴加DAPI孵育5 min,注意避光,PBST洗3次,每次3 min;加入抗荧光淬灭剂,于倒置荧光显微镜下拍照记录。

1.5 统计学处理

应用SPSS 22.0软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料符合正态分布则采用t检验,不符合正态分布则选择非参数秩和检验;计数资料以率(%)表示,采用χ^2检验;$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者手术前后眼表恢复情况

患者术前睑球粘连及下眼睑内翻,术后8周眼表恢复良好,羊膜移植在角膜表面后均存活、稳定,下眼睑内翻及倒睫得到显著改善,见图1。

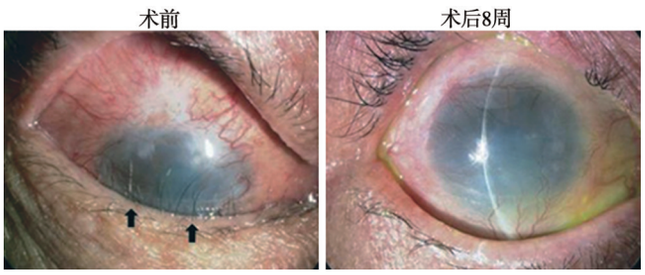


图1 手术前后患者眼表恢复情况(箭头指下眼睑内翻及倒睫)

2.2 患者手术前后视力及泪膜破裂时间

与术前比较,术后8周患者视力显著提高($P<0.05$),泪膜破裂时间显著延长($P<0.05$),见表1。

2.3 患者手术前后血清VEGF、TGF-β1、IGF-1水平

与术前比较,术后8周患者血清VEGF、TGF-β1、IGF-1水平显著升高($P<0.05$),见表2。

表1 患者手术前后视力及泪膜破裂时间($\bar{x}\pm s$)

项目	视力情况[例(%)]			泪膜破裂时间(s)
	0.3~0.5	0.1~<0.3	<0.1	
术前	12(15.00)	29(36.25)	39(48.75)	4.31±1.37
术后8周	33(41.25)	37(46.25)	10(12.50)	6.46±1.51
χ^2/t	23.126	16.033	28.116	4.032
P	0.000	0.000	0.000	0.008

表2 患者手术前后血清VEGF、TGF-β1、IGF-1水平($\bar{x}\pm s$)

项目	术前	术后8周	t	P
VEGF(ng/mL)	0.18±0.08	0.53±0.06	7.216	0.001
TGF-β1(pg/mL)	3.35±1.19	6.15±1.58	7.221	0.001
IGF-1(pg/mL)	20.55±5.27	31.39±8.67	4.983	0.017

2.4 术后角膜及角膜缘细胞情况

PAS染色结果显示,术后8周,患者结膜上皮细胞中存在较多杯状细胞,而角膜上皮和角膜缘上皮细胞中无杯状细胞,表明角膜上皮和角膜缘上皮形态正常,没有被结膜上皮化,见图2。

2.5 术后角膜及角膜缘上皮细胞CK12表达水平

免疫荧光染色结果显示,术后8周,CK12在角膜上皮细胞中高表达,而在角膜缘上皮细胞中低表达,见图3。

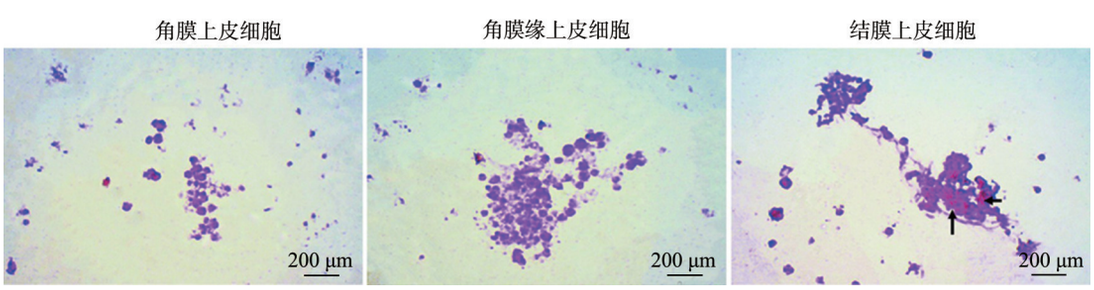


图2 角膜上皮细胞、角膜缘上皮细胞及结膜上皮细胞PAS染色结果(箭头指杯状细胞)

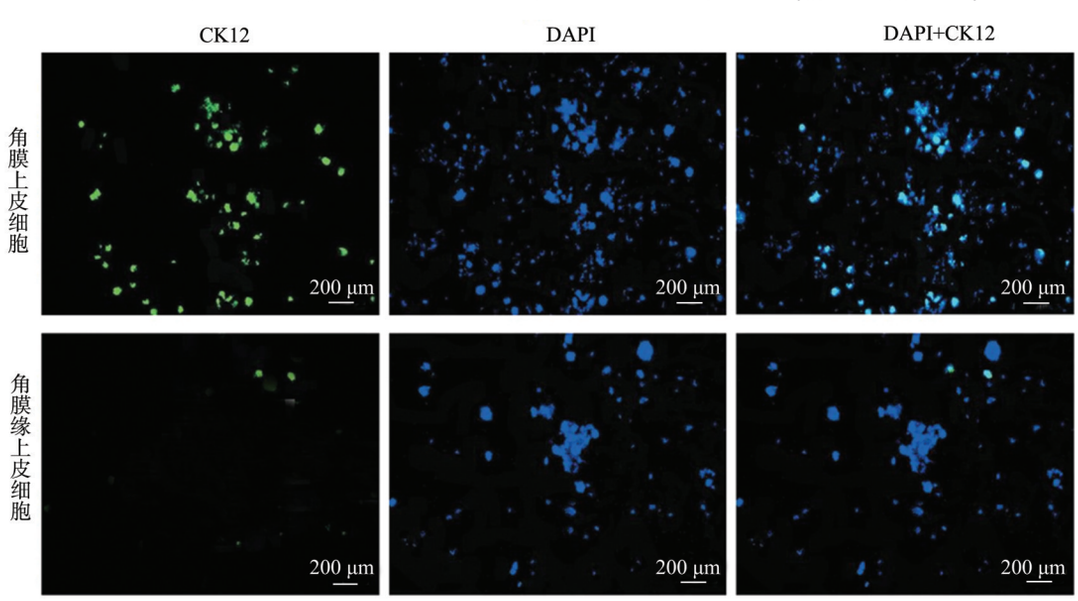


图3 角膜上皮细胞及角膜缘上皮细胞CK12免疫荧光染色

3 讨论

中度以上眼部烧伤,常因急性期结膜严重坏死,角膜缘血管血栓形成,引发角膜缺氧以及严重的营养障碍,使受损角膜上皮无法再生,此时药物治疗效果极其有限,而羊膜移植术是治疗该类眼部烧伤的常用方法[12-13]。单纯羊膜移植术能够改善角膜干细胞缺乏症状,重建患者眼部,但是由于眼部烧伤患者往往伴随睑板损伤严重,且很多患者存在睑缘变形或缺损[14]。从解剖和功能上修复烧伤后眼表损伤,恢复眼睑、结膜等组织的生理功能,从而获得持续稳定的眼表面,对提高角膜移植的疗效十分重要。以往治疗方式通常是在羊膜移植术恢复角膜干细胞后,再行眼睑矫正手术,该种方式不仅会增加患者的负担,还会因为眼睑损伤进一步造成角膜炎症反应,不利于羊膜移植术后恢复[15]。因此,羊膜移植术结合眼表重建术可能是眼部烧伤的治疗方向。

本研究所选取的患者均被诊断为全角膜上皮干细胞缺乏,均表现为严重的上皮损伤、睑球粘连、内翻,患者不仅要求重建眼睑和结膜表面,而且要求重建角膜表面,向角膜供应上皮干细胞。为此,我们用羊膜移植重建角膜表面,可补充眼角膜缘干细胞数量,在改善角膜缘屏障功能的同时,促进角膜上皮的增殖和分化,有助于维持角膜上皮的完整性,促进角膜缘干细胞的增殖,为角膜缘干细胞提供生长的微环境[16]。为修复患者睑内翻损伤,羊膜移植术结束后,立即对患者行睑内翻矫正术,以矫正睑内翻情况。结果显示,与术前相比,手术后羊膜在角膜表面存活,且恢复迅速、稳定,患者眼部恢复良好,睑内翻及视力显著改善,泪膜破裂时间显著延长,表明羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗眼部烧伤具有较好的疗效。研究发现,角膜新生血管可影响角膜透明度的恢复,而角膜内的调节因子在角膜新生血管形成过程中具有重要作用,其中VEGF具有促进血管生成和组织纤维化以及增加血管通透性的作用;TGF-β1通过诱导内皮细胞间质化促进血管新生;IGF-1通过调控VEGF的表达,参与血管内皮增生[16-18]。本研究结果显示,羊膜移植联合睑内翻矫正术后,患者血清VEGF、TGF-β1、IGF-1水平均显著高于术前,提示术后患者角膜血管新生加速。有研究表明,结膜富含杯状细胞,而角膜则不含杯状细胞[19]。本研究采用PAS染色对角膜及角膜缘细胞进行染色,结果显示,角膜及角膜缘上皮细胞不含杯状细胞,表明角膜上皮和角膜缘上皮形态正常,没有被结膜上皮化。CK12主要表达于上皮细胞,在维持组织的完整性和连续性方面具有十分重要的作用[3,20]。角膜缘上皮细胞和结膜上皮细胞均不表达CK12,只有正常角膜上皮细胞可以特异性表达CK12[3,21]。免疫荧光染色结果显示,术后8周,CK12在患者角膜上皮细胞中高表达,而在角膜缘上皮细胞中低表达,表明角膜上皮细胞形态正常,角膜缘近角膜侧的上皮细胞开始分化为角膜上皮细胞。

羊膜移植联合睑内翻矫正术治疗眼部烧伤效果显著,可促进患者眼表恢复,矫正眼睑内翻,改善术后视力,实现角膜干细胞的自体扩增及血管新生,是一种安全有效的治疗方法。

[参考文献]

[1] 梁庆丰,王乐滢. 解读角膜缘干细胞缺乏诊疗的国际共识[J]. 中华眼科杂志,2021,57(2):95-99. doi:10.3760/cma.j.cn112142-20200816-00537.

[2] Ghosh S,Salvador-Culla B,Kotagiri A,et al. Acute chemical eye injury and limbal stem cell deficiency-a prospective study in the united kingdom[J]. Cornea,2019,38(1):8-12. doi:10.1097/ICO.0000000000001739.

[3] 谭述香,曾祥云,黄 倞. 羊膜移植联合丝裂霉素C治疗角膜缘干细胞缺乏症的临床观察[J]. 赣南医学院学报,2015,35(6):829-835. doi:10.3969/j.issn.1001-5779.2015.06.001.

[4] Ahmmed AA,Ting DSJ,Figueiredo FC. A five-year retrospective study of the epidemiological characteristics and visual outcomes of pediatric ocular trauma[J]. BMC Ophthalmol,2018,18(1):10-12. doi:10.1186/s12886-018-0676-7.

[5] Voicu L,Salim S. New strategies for the management of ocular surface disease in glaucoma patients[J]. Curr Opin Ophthalmol,2021,32(2):134-140. doi:10.1097/ICU.0000000000000739.

[6] Elhusseiny AM,Soleimani M,Eleiwa TK,et al. Current and emerging therapies for limbal stem cell deficiency[J]. Stem Cells Transl Med,2022,11(3):259-268. doi:10.1093/stcltm/szab028.

[7] 王乐滢,梁庆丰. 角膜缘干细胞移植术的研究进展[J]. 中华眼科杂志,2020,56(12):956-960. doi:10.3760/cma.j.cn112142-20201022-00526.

[8] Slentz DH,Joseph SS,Nelson CC. The use of umbilical amnion for conjunctival socket,fornix,and eyelid margin reconstruction[J]. Ophthalmic Plast Reconstr Surg,2020,36(4):365-371. doi:10.1097/IOP.0000000000001555.

[9] Sprogyte L,Park M,Di Girolamo N. Pathogenesis of Alkali injury-induced limbal stem cell deficiency:a literature survey of animal models[J]. Cells,2023,12(9):1294. doi:10.3390/cells12091294.

[10] 叶国宁,田朋飞,张 敏,等. 羊膜移植联合自体角膜缘干细胞移植治疗眼部烧伤[J]. 国际眼科杂志,2018,18(10):1886-1889. doi:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.10.32.

[11] 陈士成,徐建江,杨 晋,等. 异体巩膜移植治疗烧伤后瘢痕性睑内翻[J]. 浙江实用医学,2007,12(2):126-127. doi:10.3969/j.issn.1007-3299.2007.02.029.