

# 角膜移植后患者角膜新生淋巴管与新生血管和炎症的关联

严浩<sup>1</sup>, 凌士奇<sup>2,3</sup>, 黎韦华<sup>2</sup>, 梁凌毅<sup>2</sup>, 徐建刚<sup>2</sup>

**基金项目:** 中国国家自然科学基金资助项目(No. 30700927); 中国广东省科技计划资助项目(No. 93068); 中国广东省深圳市科技计划资助项目(No. 200903269)

**作者单位:** <sup>1</sup>(518052) 中国广东省深圳市, 广东医学院附属南山医院眼科; <sup>2</sup>(510060) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心; <sup>3</sup>(510120) 中国广东省广州市妇女儿童医疗中心眼科

**作者简介:** 严浩, 男, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 眼表疾病及眼底病。

**通讯作者:** 凌士奇, 男, 博士后, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 眼表疾病. lingshiqi123@163.com

收稿日期: 2010-07-05 修回日期: 2010-07-16

## Clinical research of corneal lymphangiogenesis after corneal transplantation

Hao Yan<sup>1</sup>, Shi-Qi Ling<sup>2,3</sup>, Wei-Hua Li<sup>2</sup>, Ling-Yi Liang<sup>2</sup>, Jian-Gang Xu<sup>2</sup>

**Foundation items:** China National Natural Science Fund (No. 30700927); The Science and Technology Plan Project of Guangdong Province, China (No. 93068); Shenzhen Science and Technology Plan Project, Guangdong Province, China (No. 200903269)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, the Nanshan Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen 518052, Guangdong Province, China;

<sup>2</sup>Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Guangzhou Women and Children Medical Center, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Shi-Qi Ling. Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. lingshiqi123@163.com

Received: 2010-07-05 Accepted: 2010-07-16

## Abstract

• **AIM:** To discuss the association of corneal hemangiogenesis, corneal inflammation with corneal lymphangiogenesis after human corneal transplantation.

• **METHODS:** Nineteen human corneas were obtained from 19 patients undergoing a second corneal transplantation from 2005 to 2008. Corneal hemangiogenesis and lymphangiogenesis were examined by lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1) and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) double immunohisto-chemistry. The state of corneal inflammation was evaluated by inflammation index (IF) grading. Then, the association of blood vessel counting (BVC), IF, corneal transplantation history (TH) with lymphatic vessel count-ing (LVC) was examined.

• **RESULTS:** LVC was strongly and positively correlated with both BVC ( $r = 0.725$ ;  $P < 0.01$ ) and IF ( $r = 0.661$ ;  $P < 0.01$ ) in transplanted human corneas. However, LVC was

significantly and inversely correlated with TH ( $r = -0.301$ ;  $P < 0.01$ ). Although the development of corneal lymphangiogenesis, hemangiogenesis and inflammation was parallel in general, corneal lymphangiogenesis disappeared followed by the inflammation of corneas and corneal blood vessels.

• **CONCLUSION:** Corneal lymphangiogenesis correlates closely with corneal hemangiogenesis and inflammation after human corneal transplantation.

• **KEYWORDS:** corneal transplantation; lymphangiogenesis; hemangiogenesis; inflammation

Yan H, Ling SQ, Li WH, et al. Clinical research of corneal lymphangiogenesis after corneal transplantation. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(8):1500-1502

## 摘要

**目的:** 研究角膜移植后角膜新生淋巴管与新生血管和炎症的关联。

**方法:** 人角膜取自行二次角膜移植的患者 19 例。淋巴内皮细胞受体(lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor, LYVE-1)和内皮细胞黏附因子-1(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)双重免疫组化法标记角膜中的新生血管和淋巴管,进行淋巴管计数(lymphatic vessels counting, LVC)和血管计数(blood vessels counting, BVC),比较 BVC、炎症指数(inflammation index, IF)、移植历史(transplantation history, TH)与 LVC 之间的关联。

**结果:** 角膜移植后 BVC、IF 与 LVC 间均呈显著性正相关,而 TH 与 LVC 间呈显著性负相关。角膜移植后新生淋巴管、血管、眼表炎症间大致成平行发展,新生淋巴管最先退化,其次是眼表炎症,新生血管最后消退。

**结论:** 人角膜移植后角膜新生淋巴管与新生血管、眼表炎症之间存在着极为密切的关联。

**关键词:** 角膜移植; 新生淋巴管; 新生血管; 炎症

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.08.015

严浩, 凌士奇, 黎韦华, 等. 角膜移植后患者角膜新生淋巴管与新生血管和炎症的关联. 国际眼科杂志 2010;10(8):1500-1502

## 0 引言

角膜移植后存在着角膜新生淋巴管<sup>[1]</sup>。新生淋巴管可以加速角膜的抗原呈递,破坏角膜的免疫赦免,从而加快免疫应答的发生<sup>[2]</sup>。角膜新生淋巴管有望成为抗移植排斥反应的新靶点。然而,目前对人角膜淋巴管的研究只限于通过钻取角膜,组织切片后行电镜检查或组化染色标记后在显微镜下观察,而无法在活体上观察角膜新生淋巴管的生长情况,评估抗淋巴管治疗的疗效,极大地限制了该领域的发展。近年研究发现,在血管化角膜中,角膜新生血管和淋巴管呈平行发展<sup>[3]</sup>;而 Mouta 等<sup>[4]</sup>的研究认为炎症对角膜新生淋巴管的形成至关重要。既然角膜新生淋巴管和新生血管、炎症之间可能存在着一定的联系,而

原发病	n	IF	$\bar{x} \pm s(\text{range})$
			TH
病毒性角膜炎	4	0.44 ± 0.24(0.22 ~ 0.78)	4.2 ± 2.9(1.1 ~ 8.0)
角膜变性	4	0.44 ± 0.24(0.11 ~ 0.67)	3.6 ± 1.6(1.3 ~ 4.1)
眼外伤	4	0.55 ± 0.29(0.22 ~ 0.89)	3.3 ± 2.5(0.8 ~ 6.5)
圆锥角膜	4	0.39 ± 0.22(0.11 ~ 0.56)	3.9 ± 2.6(1.5 ~ 7.0)
大泡性角膜病变	3	0.44 ± 0.30(0.22 ~ 0.78)	3.8 ± 2.3(1.6 ~ 6.2)

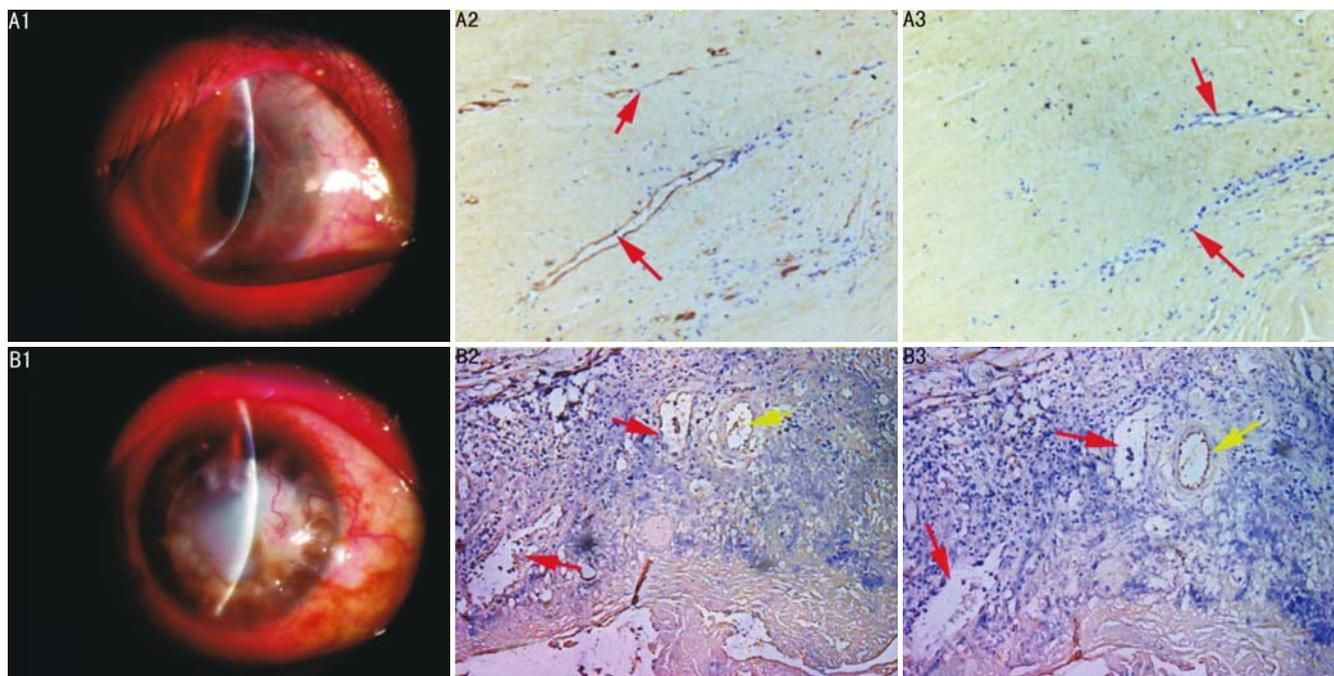


图 1 LYVE-1 和 PECAM-1 免疫组化法标记人角膜中的新生血管和淋巴管(SABC × 200) A1 ~ A3:病毒性角膜炎移植史 1.3a,角膜中无明显的炎症征象和淋巴管新生征象,但出现了角膜新生血管;B1 ~ B3:病毒性角膜炎移植史 1.6a,角膜中存在着大量的炎症细胞浸润,且在出现了角膜新生血管的同时,出现了角膜新生淋巴管。

后两者又极易通过裂隙灯观察,我们能否通过检测其与角膜新生淋巴管间的关联,从而间接评估角膜移植后的角膜新生淋巴管呢?目前有关这方面的研究国内外均未见报道。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 病变角膜来自 2005 年在中山大学中山眼科中心行二次角膜移植的患者 19 例。所有患者在首次角膜移植前均未出现角膜新生血管。角膜移植史 < 1a 者 1 例, 1 ~ 2a 者 6 例, 2 ~ 5a 者 8 例, > 5a 者 4 例(表 1)。每个患者均被告知试验程序并签署知情同意书,所有程序均遵循 Helsinki 原则。正常对照为拟用于角膜移植的 3 只正常供体角膜。

**1.2 方法** 钻取角膜组织后,快速沿直径方向从鼻侧向颞侧分成两半,40g/L 中性甲醛液中固定 24h,制备角膜蜡块后,作 4μm 厚连续切片,每个蜡块切 40 张,采用 SABC 法进行染色,一抗分别为小鼠抗人 LYVE-1、mAb 小鼠抗人 PECAM-1 mAb(R&D systems, MN, USA),二抗为生物素化兔抗小鼠 IgG, DAB 显色,苏木素复染,显微镜下观察,棕褐色管腔者为阳性。PECAM-1<sup>(+)</sup>LYVE-1<sup>(-)</sup>的管腔为角膜新生血管,而 PECAM-1<sup>(+)</sup>LYVE-1<sup>(+)</sup>的管腔为角膜新生淋巴管。LVC 和 BVC 为所有切片中的数目总和后除以 40。LVC 和 BVC 的检测由 2 位不知试验内容的检验者分别单独进行,并重复 1 次。所有患者术前均在裂隙灯下观察并记录炎症指数。炎症指数的计算参照前期的方法<sup>[5]</sup>。简言之,角膜炎症的情况主要包括 3 个参数,即睫状充血、中

央角膜水肿、周边角膜水肿。每项参数最低为 0 分,最高为 3 分。炎症指数(inflammation index, IF)为 3 项总和除以 9。

统计学分析:数据应用 SPSS 10.5 软件进行统计分析,计量资料  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用配对 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计学意义。Pearson's 相关分析用于分析 BCV, IF, TH 与 LVC 之间的相关性。

## 2 结果

**2.1 LYVE-1 和 PECAM-1 的免疫组织化学染色** 正常人角膜中无新生血管和淋巴管,亦无炎症细胞浸润。19 例角膜移植的患者中,2 例(11%)角膜中仅存在着轻度的炎症征象;12 例(63%)虽然存在着角膜新生血管,但无新生淋巴管的出现;5 例(26%)同时出现了新生血管和淋巴管,其中包括角膜移植史 < 1a 者 1 例(100%), 1 ~ 2a 者 2 例(33%), 2 ~ 5a 者 2 例(25%)。所有 5 例存在着角膜新生淋巴管的患者同时存在着角膜新生血管和不同程度的炎症细胞浸润(图 1)。

**2.2 LVC, BVC 和 IF 的变化及关联** LVC 和 BVC, LVC 和 IF 成显著性正相关(*P* < 0.01),提示角膜移植后角膜新生淋巴管与新生血管、炎症存在着密切的关联。而 LVC 与 TH 呈显著性负相关,表明角膜移植的时间越长,角膜新生淋巴管的数目越少。角膜移植后 LVC, BVC 和 IF 的变化在总体上成平行趋势,但 LVC 先于 BVC 和 IF 消退。角膜

表2 角膜新生淋巴管与BVC,IF和TH的差异  $\bar{x} \pm s$  (range)

指标	角膜新生淋巴管	
	有(n=5)	无(n=14)
BVC	8.49 ± 1.84 (4~12)	1.95 ± 2.41 (0~9) <sup>b</sup>
IF	2.40 ± 0.81 (1~3)	0.64 ± 0.61 (0~2) <sup>b</sup>
TH(y)	4.04 ± 2.13 (1.3~8)	2.01 ± 1.06 (0.8~4.3) <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P < 0.01 vs有角膜新生淋巴管。

移植后存在角膜新生淋巴管和无角膜新生淋巴管的患者相比,BVC,IF和TH均存在着显著性差异(表2)。

### 3 讨论

在角膜免疫反应中,新生血管和淋巴管构成了角膜的免疫双臂。新生血管提供了免疫效应细胞进入角膜的通路,而淋巴管则加速角膜抗原物质进入引流区淋巴结,是角膜免疫的出口<sup>[2]</sup>。新生血管和淋巴管在角膜移植免疫中起着至关重要的作用。然而,长期以来的研究重点主要集中在角膜新生血管上,而有关角膜移植后新生淋巴管的研究几乎是空白。我们采用PECAM-1联合LYVE-1 mAb成功地标记并区分角膜新生血管和淋巴管。PECAM-1是特异性的内皮细胞受体,在血管和淋巴管上均表达。而LYVE-1是目前被证实的特异性最高的淋巴管内皮细胞受体,它仅在淋巴管上表达。因此,PECAM-1<sup>(+)</sup>LYVE-1<sup>(-)</sup>的管腔为角膜新生血管,而PECAM-1<sup>(+)</sup>LYVE-1<sup>(+)</sup>的管腔为角膜新生淋巴管。然而,该法只有建立在钻除病患角膜的前提下,继而进行组织切片后标记角膜新生淋巴管。国外最新的研究也与我们的方法相似,只能通过免疫组化法在显微镜下观察而无法在活体上标记或检测人的角膜新生淋巴管,因此缺乏临床可行性。虽然国外最新的研究及我们前期的研究均证实角膜移植后存在着角膜新生淋巴管<sup>[1,6]</sup>,但临床眼科医生更为关心的是在角膜移植后如何评估新生淋巴管的生长情况,以了解抗淋巴管治疗的疗效或选择最佳的再次角膜移植的时机。近年来的研究表明角膜淋巴管和血管、炎症之间可能存在着一定的关联,我们的前期研究结果亦提示角膜淋巴管与移植史之间密切相关,因此我们着重统计患者的LVC,BVC,IF和TH,并检测它们之间的相关性。为了减少眼部原发病对结果的干扰,我们选取的原发病中均无角膜新生血管,且各组之间的IF,TH及平均年龄间的差异均无显著性意义。我们的研究表明,LVC与BVC和IF间存在着显著性正相关,而与TH间呈显著性负相关,提示角膜移植后,角膜新生血管越丰富,炎症越严重,移植历史越短,角膜新生淋巴管出现的概率越大。为了进一步验证我们的结论,我们按是否存在着角膜新生淋巴管将患者分为两组,分别比较两组患者的BVC,IF和TH,结果显示两组患者中(BVC,IF和TH)之间均存在着显著性差异(表2)。继而,我们将BVC,LVC和IF按移植时间归类,记录并绘制曲线,观察

角膜移植后角膜新生淋巴管、血管、炎症随时间的动态变化。我们发现,角膜移植后角膜新生淋巴管、新生血管、炎症之间的变化大致成平行趋势,提示了在角膜移植后我们可以根据角膜新生血管和炎症的变化粗略估计角膜新生淋巴管的状况。同时,我们的研究结果显示角膜新生淋巴管的存在时间明显较血管和炎症短,角膜新生淋巴管最先消退,继而是眼表炎症,角膜新生血管最后消退。因此,对于再次角膜移植的患者,如果角膜新生血管已完全消失,意味着角膜新生淋巴管可能早已消退,角膜上无新生血管和淋巴管,角膜的免疫双臂失去作用,此时行角膜移植手术其成功率必将大为提高。但是,有时角膜新生血管的退化是一个极为漫长的过程,特别是对于一些成熟的、较大的新生血管而言,往往无法完全消退<sup>[7]</sup>。对于这些患者,我们是否可以以炎症的消退作为手术的时机呢?因为炎症完全消退时角膜新生淋巴管也已消失,而较角膜新生血管而言,新生淋巴管在角膜移植中可能起着相同或更为重要的作用<sup>[8]</sup>。下一步的研究将进一步深入。总之,我们的研究首次检测了角膜移植后角膜新生淋巴管、新生血管和炎症的关联,阐明了三者之间呈显著性相关;进而观察三者之间在角膜移植后的动态变化,提出以角膜新生血管和炎症间接评估新生淋巴管的推测。该研究对于拓展、深入角膜新生淋巴管的研究及提高角膜移植成功率必将具有重要的意义。

### 参考文献

- Ling SQ, Xiao Q, Hu YH. Lymphangiogenesis occurring in transplanted corneas. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006;26(2):241-244
- Cursiefen C, Chen L, Dana MR, et al. Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology. *Cornea* 2003;22(3):273-281
- Mimura T, Amano S, Usui T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in corneal lymphangiogenesis. *Exp Eye Res* 2001;72(1):71-78
- Mouta C, Heroult M. Inflammatory triggers of lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 2003;1(3):201-218
- Zhang Z, Ma J, Liu Z, et al. Plasminogen Kringle 5 Inhibits Alkali Burn-induced corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4062-4071
- Cursiefen C, Cao J, Chen L, et al. Inhibition of hemangiogenesis and lymphangiogenesis after normal-risk corneal transplantation by neutralizing VEGF promotes graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2666-2673
- Gee MS, Procopio WN, Maknonen S, et al. Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *Am J Pathol* 2003;162:183-193
- Yamagami S, Dana MR, Tsuru T. Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation. *Cornea* 2002;21(4):405-409