

DOI:10.13350/j.cjpb.250111

• 论著 •

角膜缘干细胞移植对真菌性角膜溃疡的疗效 及其对微生物组的影响*

王兵^{1*}, 耿若君², 付珂³, 邹培⁴, 曾明范³

(1. 南阳医专一附院医疗美容科, 河南南阳 473000; 2. 南阳医学高等专科学校眼视光教研室; 3. 南阳医专一附院眼科;
4. 新野县人民医院神经内科)

【摘要】 目的 本研究旨在评估角膜缘干细胞移植(LSCT)在真菌性角膜溃疡治疗中的临床疗效,并探讨其对角膜微生物组的影响。方法 本研究为对照试验,共纳入100例真菌性角膜溃疡患者,分为LSCT治疗组和标准抗真菌药物治疗组(对照组),每组50例。主要疗效评估指标包括角膜溃疡的愈合情况、视力恢复、角膜炎症反应的改善以及角膜微生物组的变化。患者在治疗前(基线)及治疗后第1周、第2周、第4周和第8周接受详细的眼科检查,并通过16S rRNA基因测序分析微生物群落结构。结果 LSCT组在各时间点均表现出显著优于对照组的疗效。治疗第1周,LSCT组的角膜溃疡面积显著减少($4.50 \pm 1.16 \text{ mm}^2$ vs $5.78 \pm 1.30 \text{ mm}^2$, $t = -5.268$, $P < 0.01$),至第8周几乎完全愈合($0.18 \pm 0.29 \text{ mm}^2$ vs $1.52 \pm 0.88 \text{ mm}^2$, $t = -9.414$, $P < 0.01$)。视力恢复方面,LSCT组UCVA在第8周改善至 0.31 ± 0.17 LogMAR,对照组为 0.62 ± 0.28 LogMAR($t = -6.934$, $P < 0.01$);BCVA在LSCT组为 0.21 ± 0.12 LogMAR,对照组为 0.41 ± 0.18 LogMAR($t = -6.233$, $P < 0.01$)。角膜炎症反应的改善也显著优于对照组,LSCT组的前房炎症细胞计数在第8周降至 0.32 ± 0.29 个/高倍视野,对照组为 1.00 ± 0.46 个/高倍视野($t = -8.186$, $P < 0.01$)。微生物组分析显示,LSCT组的Shannon指数在第8周显著增加(5.37 ± 0.51 vs 4.23 ± 0.60 , $t = 10.059$, $P < 0.01$),并且表皮葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的相对丰度与角膜溃疡愈合和视力恢复呈显著正相关(Spearman r 分别为0.432和0.356, $P < 0.05$)。结论 角膜缘干细胞移植在真菌性角膜溃疡的治疗中表现出显著的疗效,能够加速角膜溃疡的愈合、改善视力恢复,并有效减轻角膜炎症反应。此外,LSCT还通过调节角膜微生物组的多样性和关键物种的相对丰度,进一步促进角膜愈合。

【关键词】 角膜缘干细胞移植;真菌性角膜溃疡;微生物组;视力恢复;角膜炎症

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)01-0057-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2025 Jan.;20(01):57-63.]

Efficacy of corneal limbal stem cell transplantation in the treatment of fungal corneal ulcers and its effect on the microbiome

WANG Bing¹, GENG Ruojun², FU Ke³, ZOU Pei⁴, ZENG Mingfan³ (1. Medical Aesthetic Department, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang 473000, Henan, China; 2. Ophthalmology Teaching and Research Section of Nanyang Medical College; 3. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Nanyang Medical College; 4. Department of Neurology, Xinye Country Hospital) **

【Abstract】 Purpose To evaluate the clinical efficacy of limbal stem cell transplantation (LSCT) in the treatment of fungal corneal ulcers and explore its impact on the corneal microbiome. **Methods** This study was a controlled trial. A total of 100 patients with fungal corneal ulcers were included and divided into a LSCT treatment group and a standard antifungal drug treatment group (control group), with 50 cases in each group. The main efficacy evaluation indicators include corneal ulcer healing, visual recovery, improvement of corneal inflammatory response, and changes in the corneal microbiome. Patients underwent detailed eye examinations before treatment (baseline) and at weeks 1, 2, 4, and 8 after treatment, and the microbial community structure was analyzed by 16S rRNA gene sequencing. **Results** The LSCT group showed significantly better efficacy than the control group at each time point. In the 1st week of treatment, the corneal ulcer area in the LSCT group was significantly reduced ($4.50 \pm 1.16 \text{ mm}^2$ vs $5.78 \pm 1.30 \text{ mm}^2$, $t = -5.268$, $P < 0.01$), and was almost completely healed by the 8th week ($0.18 \pm 0.29 \text{ mm}^2$ vs $1.52 \pm 0.88 \text{ mm}^2$, $t = -9.414$, $P < 0.01$). In terms of visual acuity recovery, UCVA in the LSCT group improved to 0.31 ± 0.17 LogMAR at the 8th week, compared with 0.62 ± 0.28 LogMAR in the control group ($t = -6.934$, $P < 0.01$); BCVA in the LSCT group was $0.21 \pm$

* **【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(No. 82074076);河南省科技发展计划项目(No. 202300410022)。

** **【通讯作者(简介)】** 王兵(1982-),女,河南南阳人,本科,副主任医师,主要研究方向:眼表疾病及眼整形。E-mail:sunkengkeng@126.com

0.12 LogMAR, compared with 0.41 in the control group. 0.18 LogMAR ($t = -6.233, P < 0.01$). The improvement of corneal inflammatory response was also significantly better than that of the control group. The anterior chamber inflammatory cell count in the LSCT group dropped to 0.32 ± 0.29 cells/high power field at the 8th week, compared with 1.00 ± 0.46 cells/high power field in the control group ($t = -8.186, P < 0.01$). Microbiome analysis showed that the Shannon index of the LSCT group increased significantly at week 8 (5.37 ± 0.51 vs $4.23 \pm 0.60, t = 10.059, P < 0.01$), and the relative abundance of *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* was associated with corneal ulcer healing and There was a significant positive correlation with visual acuity recovery (Spearman r was 0.432 and 0.356 respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** Limbal stem cell transplantation shows significant efficacy in the treatment of fungal corneal ulcers. It can accelerate the healing of corneal ulcers, improve visual recovery, and effectively reduce corneal inflammatory reactions.

【Keywords】 Limbal stem cell transplantation; fungal corneal ulcer; microbiome; vision restoration; corneal inflammation

真菌性角膜溃疡(fungal keratitis)是一种严重的眼部感染,在农业劳动者、眼外伤患者和免疫功能低下者中发病率较高^[1]。该疾病具有较高的致盲风险,主要表现为角膜溃疡、炎症反应和角膜穿孔^[2-3]。尽管当前临床上常用的抗真菌药物如氟康唑(fluconazole)、两性霉素B(amphotericin B)能够抑制病原菌生长,但由于角膜表层屏障作用和真菌生物膜的形成,药物渗透性差,常导致疗效不佳^[4]。此外,抗真菌治疗的副作用和耐药性问题也进一步限制了其临床应用^[5]。因此,寻找更为有效的治疗方法以改善真菌性角膜溃疡的预后显得尤为重要。

角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSCs)是角膜上皮再生的重要来源,主要分布在角膜缘区域^[6]。这些干细胞具有自我更新和多向分化的潜能,能够维持角膜上皮的结构和功能完整性。近年来,角膜缘干细胞移植在治疗角膜上皮干细胞缺乏症(LSCD)等疾病中取得了显著进展^[7]。临床研究表明,角膜缘干细胞移植能够有效恢复角膜上皮的完整性,同时减少瘢痕形成和血管新生^[8]。基于这些特性,角膜缘干细胞移植也被认为在治疗真菌性角膜溃疡中具有潜在的应用价值。角膜及其周围组织的微生物组在维持角膜健康和预防感染中起着关键作用^[9]。健康的角膜微生物组具有多样性和稳定性,能够通过竞争性排斥机制抑制病原菌的入侵^[10]。但角膜溃疡的发生可能会导致微生物组的失衡,进一步加重感染和炎症反应^[10]。因此,研究角膜缘干细胞移植对角膜微生物组的影响可能为理解其治疗机制提供新的视角。

尽管角膜缘干细胞在角膜疾病治疗中的应用已取得一定进展,但目前关于其在真菌性角膜溃疡治疗中的疗效及其对角膜微生物组影响的研究仍然有限。本研究旨在系统评估角膜缘干细胞移植在真菌性角膜溃疡治疗中的临床疗效,并探讨其对角膜微生物组的调节作用。通过将角膜缘干细胞移植与标准抗真菌药物治疗进行对比,本研究期望验证角膜缘干细胞移植的

有效性,揭示其潜在的微生物组调节机制,为真菌性角膜溃疡的治疗提供新的理论依据和临床支持。

对象和方法

1 研究对象

本研究采用对照试验设计,研究对象为2023年10月至2024年2月于南阳医专一附院医疗美容科和眼科就诊的真菌性角膜溃疡的患者。本研究纳入标准包括年龄18~65岁,确诊为真菌性角膜溃疡的患者,男女不限。真菌性角膜溃疡的诊断依据包括典型的临床表现,如角膜溃疡伴有真菌感染的典型症状(疼痛、视力下降、角膜白斑等),以及实验室检测结果(角膜刮片涂片的真菌阳性结果或真菌培养阳性)。此外,患者应无其他类型的角膜病变,如病毒性或细菌性角膜炎,且无严重的全身性疾病。排除标准包括(1)对角膜缘干细胞或抗真菌药物有过敏史的患者;(2)入组时正在接受免疫抑制治疗或有免疫功能低下的患者;(3)孕妇或哺乳期女性;(4)有其他眼科手术史或患有影响角膜健康的系统性疾病,如糖尿病、类风湿性关节炎等。根据预试验结果,角膜缘干细胞移植后真菌性角膜溃疡患者的临床治愈率预计为70%,而对照组(标准抗真菌药物治疗组)的治愈率预计为45%。基于显著性水平($\alpha = 0.05$)和80%的检验功效($\beta = 0.20$),功效分析最终计算得出每组至少需要45名患者。考虑10%随访脱落率,每组计划招募50名患者。本研究分为2组:角膜缘干细胞移植治疗组(LSCT组)和标准抗真菌药物治疗组(对照组)。

本研究严格遵循《赫尔辛基宣言》关于人体研究的伦理原则,获得南阳医专一附院医院伦理委员会的批准(批准号:IRB-Y-2024073)。所有患者在参与研究前均被告知研究的目的、流程、可能的风险和益处,并签署了知情同意书。

2 LSC细胞移植与对照治疗

2.1 LSC细胞制备 LSC细胞来源于患者的健康同

侧或对侧角膜缘区域。在无菌条件下使用手术刀从角膜缘区域切取约 1~2 mm 角膜缘组织,放入含有 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)和 10% 胎牛血清(FBS)的培养皿中。在体外,使用胰蛋白酶-EDTA 消化角膜缘组织以分离出角膜缘干细胞。消化后的细胞悬液通过细胞过滤器进行过滤。随后,将角膜缘干细胞种植于涂有纤维连接蛋白(Fibronectin)的培养瓶中,培养条件为 37 °C、5% CO₂。细胞培养基每 2~3 d 更换一次,细胞达到 80%~90% 汇合度时使用胰蛋白酶-EDTA 进行细胞消化、离心并重悬于无菌生理盐水中,调整细胞浓度至 1×10⁶/mL 的悬浮液,于手术当天使用。

2.2 LSC 细胞移植 角膜缘干细胞移植术(LSCT)在显微镜下采用局部麻醉(0.5% 盐酸丙胺卡因)进行。使用显微手术刀对受损角膜区域进行去上皮处理,以暴露真菌性角膜溃疡的病灶。随后,将制备好的角膜缘干细胞悬浮液均匀滴加至去上皮后的病灶区域,并轻轻覆盖一片生物羊膜以促进细胞的黏附与存活。手术结束后,使用无菌纱布轻轻覆盖患眼,并给予抗生素眼膏以预防术后感染。患者在术后接受常规抗生素滴眼液治疗 7 d,以防止术后细菌感染。

2.3 对照组治疗 对照组患者接受标准的抗真菌药物治疗。局部用药方面,患者每日接受 0.15% 氟康唑滴眼液,每小时滴眼 1 次,治疗至少持续 2 周。系统用药方面,患者口服 150 mg 氟康唑,每日 1 次,疗程为 2~4 周,具体视患者的临床反应和真菌培养结果而定。所有患者的用药剂量和疗程均由同一名经验丰富的眼科医生制定及监督。

3 临床疗效评估

本研究的主要疗效评估指标包括角膜溃疡的愈合情况、角膜透明度、视力恢复以及炎症反应的改善。所有患者将在治疗前(基线)以及治疗后第 1 周、第 2 周、第 4 周和第 8 周接受详细的眼科检查。使用裂隙灯显微镜对角膜溃疡进行评估,具体记录溃疡的面积、深度以及边缘的清晰度。溃疡面积通过计算机辅助的数字图像分析软件进行测量,并以毫米平方(mm²)表示。溃疡深度则根据裂隙灯显微镜下的观察分为浅层、中层和深层溃疡。角膜透明度的评估则采用标准化的角膜透明度评分系统,将角膜的不透明程度分为 0 至 4 级,其中 0 级代表完全透明,4 级代表完全不透明。视力的恢复情况通过裸眼视力(uncorrected visual acuity, UCVA)和最佳矫正视力(best-corrected visual acuity, BCVA)的变化来评估。视力评估采用 LogMAR 视力表进行测量,并记录每次随访的视力变化。角膜炎症反应评估通过前房炎症细胞计数和后纤维沉着物(keratic precipitates, KPs)的数量来评估。

前房炎症细胞计数是通过裂隙灯显微镜观察前房内的炎症细胞数量,并根据标准化的前房细胞计数等级(0~4 级)进行评分。KPs 的数量则通过观察角膜后表面沉着物的数量和分布情况进行记录。

4 微生物组分析

4.1 样本采集 本研究于治疗前(基线)、治疗后第 2 周和第 8 周采集样本。使用无菌生理盐水轻轻冲洗角膜表面,随后由医生使用无菌棉签在患者的角膜和结膜囊区域轻轻擦拭数次。采集的棉签样本立即放入无菌的微生物运输管中,并在 4 °C 下保存,随后送至实验室进行 DNA 提取和分析。

4.2 DNA 提取与测序 在实验室中,使用 Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒提取总 DNA,随后使用 NanoDrop 分光光度计(Thermo Fisher Scientific)测定其浓度和纯度,并通过琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 的完整性。提取的微生物 DNA 采用 16S rRNA 基因测序(Illumina MiSeq)以分析细菌的群落结构。真菌群落使用内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)引物进行真菌 DNA 的扩增和测序。

4.3 数据处理与分析 测序数据经过质量控制后使用 QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2)软件进行进一步分析。通过 DADA2 算法进行序列去噪,生成操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)。随后将这些序列与 Greengenes 和 SILVA 参考数据库进行比对鉴定微生物的分类信息。

5 统计学分析

本研究的数据分析使用 R 语言(版本 4.0.5)进行。定量数据将以均值±标准差(mean±SD)表示。定性数据将以频数和百分比表示,数据的正态性通过 Shapiro-Wilk 检验评估。采用独立样本 *t* 检验分析 LSCT 组与对照组之间的差异。定性数据(如治愈率、并发症发生率等)使用卡方检验进行组间比较。微生物组数据的分析包括 α 多样性和 β 多样性的比较。α 多样性指标(Shannon 指数、Chao1 指数)在不同组别和时间点之间的差异使用 Wilcoxon 符号秩检验进行分析。β 多样性分析使用 PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance)来评估不同组别和时间点之间微生物群落结构的差异,并通过主坐标分析(PCoA)进行可视化。本研究采用 Spearman 相关性分析评估微生物组的变化与临床疗效(如溃疡愈合、视力改善等)之间的关系。所有统计检验均为双侧检验,显著性水平(α 值)设定为 0.05。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 基线特征

本研究共纳入 100 例真菌性角膜溃疡患者,随机分为角膜缘干细胞移植治疗组(LSCT 组)和标准抗真菌药物治疗组(对照组),每组各 50 例。2 组患者在基线时的年龄、性别、角膜溃疡面积、深度以及裸眼视力(UCVA)和最佳矫正视力(BCVA)等方面均无显著性差异($P>0.05$)。LSCT 组患者的平均年龄为 45.20 ± 9.58 岁,对照组患者的平均年龄为 46.18 ± 9.43 岁($t=-0.487, P=0.627$)。角膜溃疡的平均面积在 LSCT 组: $7.25 \pm 1.52 \text{ mm}^2$ vs 对照组: $7.30 \pm 1.58 \text{ mm}^2$ ($t=-0.146, P=0.884$)。此外,LSCT 组患者的基线 UCVA 为 $1.20 \pm 0.51 \text{ LogMAR}$, 对照组为 $1.27 \pm 0.55 \text{ LogMAR}$ ($t=-0.631, P=0.530$); BCVA 为 LSCT 组: $0.81 \pm 0.41 \text{ LogMAR}$ vs 对照组: $0.88 \pm 0.45 \text{ LogMAR}$ ($t=-0.784, P=0.435$)。

2 临床疗效评估结果

2.1 角膜溃疡愈合情况 角膜溃疡面积的愈合情况在 LSCT 组和对照组之间存在显著差异。治疗第 1 周,平均溃疡面积为 LSCT 组 $4.50 \pm 1.16 \text{ mm}^2$, 对照组 $5.78 \pm 1.30 \text{ mm}^2$, 差异有统计学意义($t=-5.268, P<0.01$)。第 2 周时,LSCT 组的平均溃疡面积进一步减少至 $2.48 \pm 1.02 \text{ mm}^2$, 而对照组为 $4.00 \pm 1.05 \text{ mm}^2$, 2 组之间的差异依然显著($t=-7.054, P<0.01$)。第 4 周时,LSCT 组的溃疡面积缩小至 $0.98 \pm 0.76 \text{ mm}^2$, 而对照组为 $2.54 \pm 1.00 \text{ mm}^2$ ($t=-8.669, P<0.01$)。到第 8 周,LSCT 组患者的溃疡面积几乎完全愈合,平均为 $0.18 \pm 0.29 \text{ mm}^2$, 而对照组则为 $1.52 \pm 0.88 \text{ mm}^2$ ($t=-9.414, P<0.01$)。LSCT 组的溃疡愈合速度显著快于对照组,表明角膜缘干细胞移植在促进角膜溃疡愈合方面具有显著的优势。

2.2 视力恢复情况 LSCT 组和对照组在各时间点均表现出显著差异。在第 1 周,LSCT 组患者的平均裸眼视力(UCVA)为 $1.00 \pm 0.39 \text{ LogMAR}$, 对照组为 $1.23 \pm 0.47 \text{ LogMAR}$, 2 组之间差异显著($t=-2.623, P=0.010$)。第 2 周时,LSCT 组的 UCVA 进一步改善至 $0.80 \pm 0.32 \text{ LogMAR}$, 而对照组为 $1.11 \pm 0.40 \text{ LogMAR}$ ($t=-4.091, P<0.01$)。在第 4 周,LSCT 组的 UCVA 为 $0.52 \pm 0.21 \text{ LogMAR}$, 对照组为 $0.87 \pm 0.31 \text{ LogMAR}$ ($t=-6.306, P<0.01$)。到第 8 周,LSCT 组的 UCVA 进一步改善至 $0.31 \pm 0.17 \text{ LogMAR}$, 对照组则为 $0.62 \pm 0.28 \text{ LogMAR}$ ($t=-6.934, P<0.01$)。类似地,最佳矫正视力(BCVA)的恢复也显示出 LSCT 组的显著优势。在治疗第 1 周,

LSCT 组患者的平均 BCVA 为 $0.71 \pm 0.29 \text{ LogMAR}$, 对照组为 $0.88 \pm 0.38 \text{ LogMAR}$, 差异具有统计学意义($t=-2.414, P=0.018$)。到第 2 周时,LSCT 组的 BCVA 改善至 $0.52 \pm 0.23 \text{ LogMAR}$, 而对照组为 $0.73 \pm 0.28 \text{ LogMAR}$ ($t=-4.035, P<0.01$)。在第 4 周,LSCT 组的 BCVA 为 $0.32 \pm 0.19 \text{ LogMAR}$, 对照组为 $0.52 \pm 0.21 \text{ LogMAR}$ ($t=-5.292, P<0.01$)。到第 8 周,LSCT 组的 BCVA 为 $0.21 \pm 0.12 \text{ LogMAR}$, 对照组为 $0.41 \pm 0.18 \text{ LogMAR}$ ($t=-6.233, P<0.01$)。

2.3 角膜炎症反应改善情况 在角膜炎症反应的改善方面,LSCT 组表现出显著优于对照组的效应。在第 1 周,前房炎症细胞计数为 LSCT 组: 2.50 ± 0.81 个/高倍视野 vs 对照组: 3.18 ± 0.85 个/高倍视野 ($t=-4.016, P<0.01$)。第 2 周时,LSCT 组的前房炎症细胞计数减少至 1.52 ± 0.67 个/高倍视野,而对照组为 2.46 ± 0.79 个/高倍视野 ($t=-6.631, P<0.01$)。在第 4 周,LSCT 组的前房炎症细胞计数进一步减少至 0.82 ± 0.48 个/高倍视野,对照组为 1.54 ± 0.72 个/高倍视野 ($t=-5.683, P<0.01$)。到第 8 周,LSCT 组的前房炎症细胞计数降至 0.32 ± 0.29 个/高倍视野,而对照组为 1.00 ± 0.46 个/高倍视野 ($t=-8.186, P<0.01$)。

后纤维沉着物(KPs)数量的改善情况也显示 LSCT 组显著优于对照组。在第 1 周,LSCT 组患者的平均 KPs 数量为 2.18 ± 0.92 个/高倍视野,而对照组为 2.86 ± 1.03 个/高倍视野,差异显著($t=-3.453, P=0.001$)。第 2 周时,LSCT 组的 KPs 数量为 1.28 ± 0.69 个/高倍视野,而对照组为 2.00 ± 0.87 个/高倍视野 ($t=-4.670, P<0.01$)。在第 4 周,LSCT 组的 KPs 数量进一步减少至 0.74 ± 0.50 个/高倍视野,对照组为 1.12 ± 0.61 个/高倍视野 ($t=-3.560, P=0.001$)。到第 8 周,LSCT 组的 KPs 数量降至 0.26 ± 0.21 个/高倍视野,对照组为 0.68 ± 0.39 个/高倍视野 ($t=-6.363, P<0.01$)。

3 微生物组学分析结果

3.1 α 多样性分析 在微生物群落的 α 多样性分析中,Shannon 指数用于衡量群落的多样性和均匀度。基线时,LSCT 组和对照组的 Shannon 指数无显著差异(4.50 ± 0.49 vs 4.41 ± 0.60 ; $t=0.839, P=0.403$),表明 2 组患者在治疗前的微生物群落多样性水平一致。但在治疗后,LSCT 组的 Shannon 指数显著增加,而对照组的多样性则略有下降。具体而言,在治疗第 2 周,LSCT 组的 Shannon 指数增加至 5.01 ± 0.57 , 而对照组为 4.28 ± 0.65 , 差异有统计学意义($t=5.779, P<0.01$)。到第 8 周,LSCT 组的 Shannon

指数进一步增加至 5.37 ± 0.51 , 而对照组则下降至 4.23 ± 0.60 ($t = 10.059, P < 0.01$)。这些结果表明, 角膜缘干细胞移植不仅有效促进了真菌性角膜溃疡的临床愈合, 还显著提高了角膜及其周围微生物群落的多样性。相较之下, 标准抗真菌药物治疗的患者在治疗过程中微生物群落多样性有所下降, 可能与抗真菌药物的广谱抑菌效应有关。

3.2 β 多样性分析 β 多样性分析用于评估不同组别和时间点之间微生物群落结构的差异。本研究中使用 Bray-Curtis 距离矩阵进行主坐标分析(PCoA), 并通过 PERMANOVA 分析组间差异的显著性。从 PCoA 结果来看(图 1), LSCT 组和对照组在治疗后的微生物群落结构上表现出明显的分离。在 PCoA 1(解释了总变异的 35.2%) 和 PCoA 2(解释了总变异的 18.7%) 轴上, LSCT 组样本主要聚集在图的右上方, 而对照组样本则主要分布在左下方。95% 置信椭圆的重叠很小, 表明 2 组之间的微生物结构差异显著。PERMANOVA 分析进一步证实了这一区别的显著性, 组间差异的 F 值为 88.358, 解释了 47.4% 的总变异 ($P < 0.01$), 表明 LSCT 组和对照组在治疗后的微生物群落结构上存在显著差异。LSCT 组的微生物群落结构更趋于恢复正常, 而对照组的微生物群落多样性则相对较低, 这可能与抗真菌药物的广谱抑菌效应有关。这些结果表明, 角膜缘干细胞移植不仅有助于促进真菌性角膜溃疡的临床愈合, 还可能通过调节角膜及其周围的微生物群落结构, 发挥进一步的临床治疗效果。

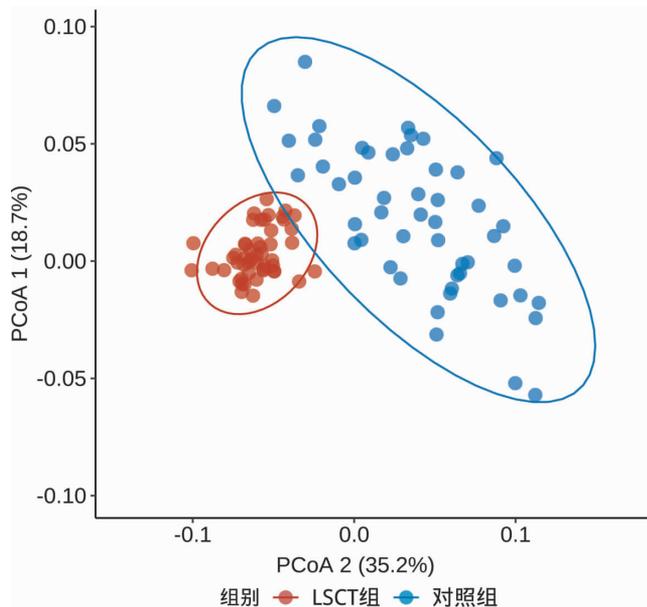


图 1 基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(PCA)
Fig. 1 Principal coordinate analysis (PCoA) based on Bray-Curtis distance

3.3 微生物群落结构 2 组中相对丰度排名前 10 的物种(Top 10)堆积柱状图见图 2。LSCT 组和对照组在治疗后表现出明显不同的微生物群落结构。在 LSCT 组中, 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 和痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*) 的相对丰度显著增加, 占据了更大的比例, 而对照组中这些物种的丰度相对较低, 反而是棒状杆菌属 (*Corynebacterium spp.*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 等物种在对照组中占据了较大比例。结果表明, 角膜缘干细胞移植不仅可以促进角膜愈合, 还可能通过调节角膜及其周围的微生物群落结构, 改变微生物的物种组成和相对丰度。

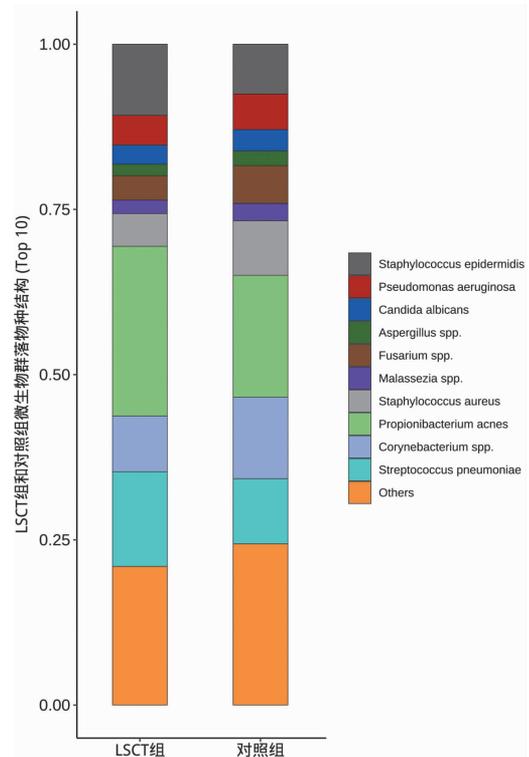


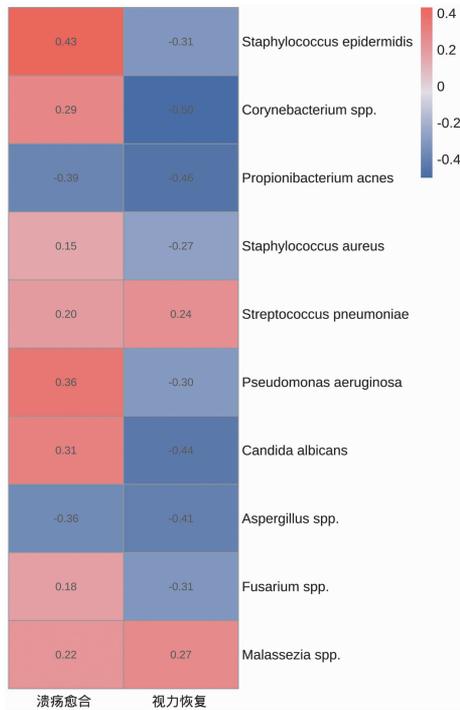
图 2 LSCT 组和对照组的微生物群落物种结构
Fig. 2 Microbial community species structure in the LSCT group and the control group

3.4 临床疗效与微生物组变化的相关性 通过 Spearman 相关性分析, 评估了临床疗效(包括溃疡愈合率和视力恢复率)与 Top 10 物种相对丰度之间的关系(表 1, 图 3)。分析结果表明, 表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 和痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*) 的相对丰度与溃疡愈合和视力恢复均呈正相关, 尤其是表皮葡萄球菌与溃疡愈合的相关性最高, 相关系数为 0.432, 显示出其在角膜愈合过程中的潜在有益作用。相反, S 表皮葡萄球菌和肺炎链球菌的相对丰度与溃疡愈合和视力恢复均呈负相关, 表明这些致病菌的相对丰度增加可能会延缓角膜愈合并影响视力恢复, 尤其是表皮葡萄球菌, 其与

溃疡愈合的相关系数为-0.501,显著负相关。此外,真菌物种白色念珠菌(*Candida albicans*)和镰刀菌属(*Fusarium spp.*)与溃疡愈合和视力恢复的相关性较弱,且呈轻微正相关,这可能表明这些真菌在角膜修复过程中并未起到显著的负面作用。这些结果提示,角膜缘干细胞移植可能通过调节关键微生物物种的丰度来促进角膜溃疡的愈合和视力的恢复。

表 1 临床疗效与微生物组 Spearman 相关性分析结果
Table 1 Spearman correlation analysis results between clinical efficacy and microbiome

物种	溃疡愈合相关性(r)	P 值	视力恢复相关性(r)	P 值
表皮葡萄球菌	0.432	0.001	0.356	0.002
棒状杆菌属	-0.312	0.014	-0.297	0.018
痤疮丙酸杆菌	0.287	0.020	0.310	0.015
金黄色葡萄球菌	-0.501	<0.01	-0.438	<0.01
肺炎链球菌	-0.389	0.003	-0.362	0.006
铜绿假单胞菌	-0.456	<0.01	-0.412	0.001
白色念珠菌	0.153	0.132	0.178	0.089
曲霉属	-0.271	0.028	-0.312	0.014
镰刀菌属	0.198	0.049	0.223	0.030
马拉色菌属	0.241	0.037	0.267	0.024



注:红色表示正相关,蓝色表示负相关,颜色越深表示相关性越强。矩阵中的数值代表相应的 Spearman 相关系数。

图 3 临床疗效与微生物组相对丰度的 Spearman 相关性矩阵
Fig. 3 Spearman correlation matrix of clinical efficacy and relative abundance of microbiome

讨论

本研究的目的是评估角膜缘干细胞移植(LSCT)在真菌性角膜溃疡治疗中的临床疗效,并探讨其对角膜微生物组的影响。通过与标准抗真菌药物治疗组进

行比较,发现 LSCT 组在角膜溃疡愈合、视力恢复以及角膜炎症反应的改善方面均表现出显著优势。此外,微生物组分析结果表明,LSCT 能够显著提高角膜及其周围微生物群落的多样性,并调节关键物种的相对丰度,这可能是其促进角膜愈合的重要机制之一。

本研究结果显示,LSCT 组患者的角膜溃疡愈合速度明显快于对照组,且视力恢复效果更为显著,这一发现与已有文献报道一致^[11]。角膜缘干细胞具有强大的再生潜力,能够有效修复受损的角膜上皮^[12]。此外,LSCT 组中溃疡面积的显著减少可能与干细胞分泌的生物活性因子有关,如角质形成细胞生长因子(KGF)、表皮生长因子(EGF)及血管内皮生长因子(VEGF),这些因子在促进角膜上皮细胞增殖和迁移、减少瘢痕形成方面起到了关键作用^[13-15]。视力恢复方面,LSCT 组不仅在裸眼视力(UCVA)上表现出更快的改善,在最佳矫正视力(BCVA)上也优于对照组。这可能与 LSCT 能够更好地恢复角膜的透明度和光学性能有关。角膜缘干细胞移植能够减少角膜瘢痕和新生血管的形成,从而维持角膜的光学性能。此外,LSCT 可能通过其免疫调节作用,减少局部炎症反应,有助于视力的恢复^[16,17]。在角膜炎症反应方面,LSCT 组也显示出显著优于对照组的效果。具体而言,LSCT 组患者的前房炎症细胞计数和后纤维沉着物(KPs)数量在治疗过程中显著减少。已有研究表明,角膜缘干细胞不仅能够修复角膜上皮,还能通过分泌抗炎因子(如 IL-10、TGF-β)抑制炎症反应^[18-19],这些抗炎因子能够降低炎症细胞的浸润,减少炎症介质的释放,从而减轻角膜组织的损伤。本研究结果进一步支持了这一观点,表明 LSCT 在减少真菌性角膜溃疡相关的炎症反应方面具有显著效果。微生物组分析结果表明,LSCT 组患者的角膜微生物群落多样性显著增加,而对照组的多样性则略有下降。Shannon 指数显示,LSCT 组在治疗后微生物群落的多样性和均匀度均有所提高,这可能与角膜缘干细胞的免疫调节作用有关^[20]。健康的微生物群落具有抑制病原菌定植的能力,LSCT 可能通过恢复角膜的微生物平衡,进一步防止了真菌的再次感染^[21-22]。

此外,特定微生物物种的相对丰度变化提供了重要线索。研究发现,表皮葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的相对丰度与角膜溃疡的愈合和视力的恢复呈正相关。表皮葡萄球菌是一种常见的共生细菌,已被证明在保护宿主皮肤和黏膜免受病原体感染方面具有重要作用^[23]。相反,表皮葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌的相对丰度增加则与角膜溃疡的迟缓愈合和视力的下降相关。这些结果表明,LSCT 可能通过调节皮肤常驻菌的丰度,抑制病原微生物的繁殖,从而促进角膜愈合和视功

能恢复。本研究仍然存在一些局限性。首先,本研究的样本量有限,结论的普遍适用性仍需更大规模的多中心研究中验证。其次,尽管观察到了角膜微生物组的变化,但尚不清楚这些变化是因果关系还是仅仅是伴随现象。未来的研究应进一步探讨微生物组变化的潜在机制,尤其是其与干细胞治疗之间的相互作用。此外,随访时间的延长也将有助于评估 LSCT 的长期疗效与安全性。

综上,本研究系统评估了角膜缘干细胞移植在真菌性角膜溃疡治疗中的疗效,并探讨了其对角膜微生物组的潜在调节作用。研究结果表明,LSCT 不仅能够显著促进角膜溃疡的愈合和视力的恢复,还可能通过调节角膜及其周围的微生物群落结构,发挥进一步的治疗效果。因此,角膜缘干细胞移植有望成为一种治疗真菌性角膜溃疡的有效方法,未来有必要开展更多的研究以进一步探索其潜在机制和临床应用前景。

【参考文献】

- [1] Sharma N, Bagga B, Singhal D, et al. Fungal keratitis: A review of clinical presentations, treatment strategies and outcomes [J]. *Ocul Surf*, 2022, 24: 22-30.
- [2] Cabrera-Aguas M, Khoo P, Watson SL. Infectious keratitis: A review [J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2022, 50(5): 543-562.
- [3] 张晓茜, 菅淑惠, 陈穗桦. 开放性眼外伤合并感染性眼内炎患者结膜囊病原体及房水 IL-6、IL-10、VCAM 水平变化的临床意义[J]. *中国病原生物学杂志*, 2024, 19(3): 328-332.
- [4] Donovan C, Arenas E, Ayyala RS, et al. Fungal keratitis: Mechanisms of infection and management strategies [J]. *Surv Ophthalmol*, 2022, 67(3): 758-769.
- [5] Lee Y, Puumala E, Robbins N, et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond [J]. *Chem Rev*, 2021, 121(6): 3390-3411.
- [6] Bonnet C, Roberts JS, Deng SX. Limbal stem cell diseases [J]. *Exp Eye Res*, 2021, 205: 108437.
- [7] 郭笑霄, 李新宇. 角膜缘干细胞缺乏动物模型建立方法研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2024, 42(2): 202-208.
- [8] 周月. 脐带间充质干细胞对真菌性角膜炎角膜瘢痕形成的影响 [D]. 河南: 郑州大学, 2018.
- [9] Zilliox MJ, Bouchard CS. The microbiome, ocular surface, and corneal disorders [J]. *Am J Pathol*, 2023, 193(11): 1648-1661.
- [10] 戴鹏飞, 王玉倩, 李晶, 等. 角膜基质透镜联合生物工程角膜移植治疗感染性角膜溃疡伴穿孔的临床观察 [J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2023, 25(5): 366-371.
- [11] Gonzalez-Gallardo C, Martinez-Atienza J, Mataix B, et al. Successful restoration of corneal surface integrity with a tissue-engineered allogeneic implant in severe keratitis patients [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114612.
- [12] Bonnet C, Gonzalez S, Deng SX. Limbal stem cell therapy [J]. *Curr Opin Ophthalmol*, 2024, 35(4): 309-314.
- [13] Buznyk O, Azharuddin M, Islam MM, et al. Collagen-based scaffolds with infused anti-VEGF release system as potential cornea substitute for high-risk keratoplasty: A preliminary in vitro evaluation [J]. *Heliyon*, 2020, 6(10): e05105.
- [14] 武小斐, 张怡, 柯洪敏, 等. 模拟角膜缘干细胞微环境诱导人多潜能干细胞分化为角膜上皮细胞的研究 [J]. *国际眼科杂志*, 2024, 24(1): 30-35.
- [15] Na KS, Kim D, Kim H, et al. The combined effect of epidermal growth factor and keratinocyte growth factor delivered by hyaluronic acid hydrogel on corneal wound healing [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 270(Pt 1): 132365.
- [16] Collin J, Queen R, Zerti D, et al. A single cell atlas of human cornea that defines its development, limbal progenitor cells and their interactions with the immune cells [J]. *Ocul Surf*, 2021, 21: 279-298.
- [17] Meshko B, Volatier TLA, Hadrian K, et al. ABCB5 + limbal epithelial stem cells inhibit developmental but promote inflammatory (lymph) angiogenesis while preventing corneal inflammation [J]. *Cells*, 2023, 12(13): 1731.
- [18] Cadenas-Martin M, Arnalich-Montiel F, Miguel MP. Derivation of limbal stem cells from human adult mesenchymal stem cells for the treatment of limbal stem cell deficiency [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2350.
- [19] 邵岩. 真菌性角膜炎致病原因分析及预后相关性 [D]. 辽宁: 大连医科大学, 2018.
- [20] Tominac Trcin M, Zdraveva E, Dolenc T, et al. Poly(epsilon-caprolactone) titanium dioxide and cefuroxime antimicrobial scaffolds for cultivation of human limbal stem cells [J]. *Polymers (Basel)*, 2020, 12(8): 1758.
- [21] Smits JGA, Cunha DL, Amini M, et al. Identification of the regulatory circuit governing corneal epithelial fate determination and disease [J]. *PLoS Biol*, 2023, 21(10): e3002336.
- [22] 陈柳, 邱敏, 代解杰. 病原体感染角膜炎机制及动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2022, 32(4): 137-144.
- [23] Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2020, 84(3): e00026-19.

【收稿日期】 2024-07-11 【修回日期】 2024-10-06