文章编号:1000-5404(2007)15-1539-02

技术方法

三种不同方法保存的兔角膜内皮细胞形态学观察

曾玉晓,谢汉平,翁传煌,陈丽峰 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

提 要:目的 通过观察兔角膜内皮细胞形态,了解不同保存方法和不同保存时期及时间点对角膜内皮细胞活性和密度的影响。**方法** 采用短期湿房4 ℃保存6 h、D-X角膜中期保存液4 ℃保存3 d、长期深低温保存3个月,取3组各自限定时间的保存角膜片进行检测,分别行角膜内皮细胞茜素红和台盼蓝活性染色、光学显微镜观察及图像分析。**结果** 长期深低温保存后的兔角膜内皮细胞活性率、细胞密度及六边形细胞率低于前两组,细胞面积高于前2组,均具有统计学差异。**结论** 正确掌握3种方法,维持角膜内皮细胞生物活性,虽然深低温保存方法对角膜内皮细胞活性和密度有一定影响,但其活性率在80%以上,仍在角膜移植手术可接受的范围内。

角膜保存是眼库的重要技术之一,分为活性与非活性保存两种,活性保存根据角膜内皮细胞活性的保存时间分为短期、中期和长期3种保存。维持角膜透明的主要细胞是内皮细胞,在本质上角膜移植就是移植相当数量的活性内皮细胞,角膜保存的根本目的也是维持供体角膜内皮细胞的活性[1],因此本实验采用兔角膜进行3种时期的保存,通过观察角膜内皮细胞形态,了解不同保存方法和不同保存时期对兔角膜内皮细胞生物活性的影响。

1 材料与方法

1.1 兔角膜片的制备

取健康杂种成年家兔9只,体质量2.0~2.5 kg,由重庆渝达实验兔场提供,雌雄不拘,分3组每组3只6眼。将兔空气栓塞致死,立即取出眼球,用含800 U/ml妥布霉素的生理盐水冲洗并浸洗3次,每次10 min,然后沿角膜缘取带2 mm巩膜环的角膜片。

1.2 3种不同时期的保存方法

1.2.1 常规短期湿房保存 4 ℃保存6 h。处理好的全眼球置于含800 U/ml妥布霉素的生理盐水纱布上,待检测时再取角膜片。

1.2.2 D-X角膜中期保存液保存 4 ℃保存3 d。将角膜片分别置于20 ml保存液中,保存液购于山东大学眼库,其配制方法见文献[2]。

1.2.3 长期深低温保存 -196 ℃液氮保存3个月。将角膜片分别经过冷冻保护剂(人血白蛋白+二甲基亚砜)5.5%1号液和7.5% 2号液预冷20 min,降温程序[3]从5 ℃开始,以-0.5 ℃/min的速度,降至-10 ℃,维持2 min;以-3 ℃/min的速度,由-10℃降至-30℃,维持2 min;再以-8℃/min的速度,由-30 ℃降至-80 ℃,维持5min;然后移入液氮(-196 ℃)中保存。复温时将冻存管立即放入40 ℃水浴锅,轻轻摇摆加速融化,1 min左右,观察角膜片残留一层薄冰块即可,转入20%人血白蛋白中浸泡10 min备用。

1.3 兔角膜内皮细胞活性染色

取3组各自限定时间的保存角膜片进行中央区内皮细胞的检测,分别行角膜内皮细胞茜素红和台盼蓝活性染色:配制0.2%茜素红溶液、0.25%氨水和0.25%台盼蓝溶液,用氨水调茜素红溶液pH值4.2左右,1个月内使用。先用0.9%生理盐水清洗角膜片,吸干后0.25%台盼蓝染色1 min 30 s,0.2%茜素红染色4 min左右,清洗后将角膜片轻轻剪成梅花状,便于显微镜观察照相,并评价角膜内皮细胞活性率。

1.4 图像分析

采用德国Leica Qwin图像分析系统,对显微镜拍片的图像进行角膜内皮细胞平均密度、细胞平均面积及六边形细胞百分率进行图像分析。

1.5 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 兔角膜内皮细胞活性观察

光学显微镜观察3组方法保存后的角膜,可见连续的细胞单层,内皮细胞边界清晰,为较典型的六边形细胞,排列整齐,细胞核蓝染的细胞少见,其死亡或受损的细胞率较低;长期深低温保存后的角膜内皮细胞形态较差于湿房和D-X液保存组,细胞核蓝染的细胞相对前2组较多,出现较多的茜素红颗粒沉积,个别细胞失去规则的六边形细胞形态。各组角膜保存后台盼蓝+茜素红内皮细胞活性染色。见图1。

2.2 图像分析及统计处理

2.2.1 角膜内皮细胞活性率比较 3组角膜保存方法后,深低温组[(87.97±2.12)%]明显低于湿房组[(97.21±1.31)%]和D-X液组[(95.66±1.63)%],具有非常显著统计学差异($P<0.01$)。

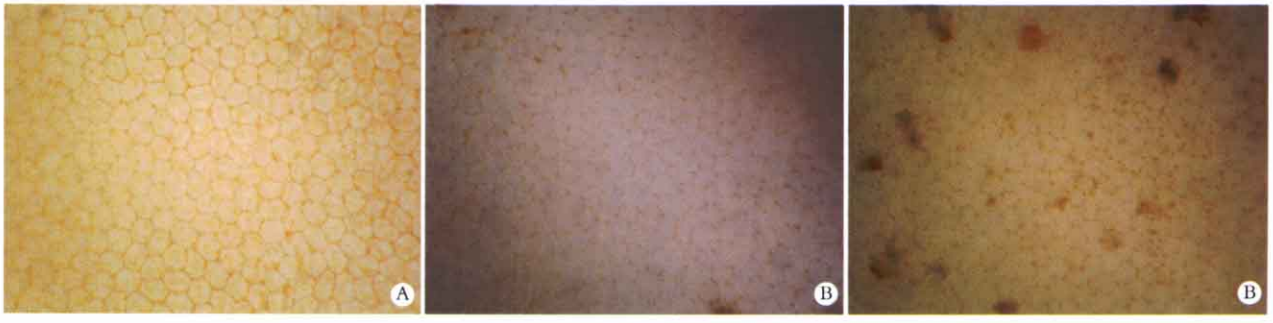
2.2.2 角膜内皮细胞密度、面积、六边形细胞率比较 3组角膜保存方法后,湿房组细胞密度高于深低温组,具有统计学

作者简介:曾玉晓(1977-),女,四川省自贡市人,助理实验师,主要从事眼库及细胞培养方面的研究。电话:(023)68754403,13678415377,E-mail:zengyuxiao_cq@163.com

通讯作者:谢汉平,电话:(023)68765377,E-mail:xiehanping@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-11-15;修回日期:2007-03-26

差异($P<0.05$)；湿房、D-X 液组细胞面积明显低于深低温组，具有非常显著统计学差异($P<0.01$)；湿房、D-X 液组六边形细胞率明显高于深低温组，具有非常显著统计学差异($P<0.01$)。见表1。



A：短期湿房保存后的角膜；B：中期 D-X 液保存后的角膜；C：长期深低温保存后的角膜

图1 角膜内皮细胞活性染色 （×400）

表1 3组角膜保存方法后兔角膜内皮细胞密度、面积、六边形细胞率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞密度(个/mm²)	细胞面积(μm²)	六边形细胞率(%)
湿房保存	2 523 ±42.3[a]	349.7 ±5.96[b]	82.5 ±3.7[b]
D-X 保存液保存	2 455 ±41.3	356.3 ±5.47[b]	79.5 ±2.8[b]
深低温保存	2 145 ±24.9	370.1 ±11.42	74.0 ±5.8

a：$P<0.05$，与深低温组比较；b：$P<0.01$，与深低温组比较

3 讨论

本实验选择不同时期的不同时间点对兔角膜进行保存后观察：湿房保存6 h、D-X 角膜中期保存液保存3 d、长期深低温保存3个月，因为湿房保存6 h 和 D-X 角膜中期保存液保存3 d，都是角膜保存非常安全、有效的期限；而角膜长期深低温保存技术的最大特点是保存期间内皮细胞活性不随保存时间延长而减弱[4]；另外考虑临床上的实际需要，一旦有角膜捐献来源，病房现有的或医院附近的患者在6 h 内就能接受角膜移植手术；所以实验中湿房保存定为6 h；而针对较远的或临时需要行活性角膜移植的患者，可选择中期保存液保存3 d 或长期深低温保存3 月的角膜材料，使供体角膜在时间和空间上得到最大限度的利用，以充分满足临床需求。

通过3种保存方法和不同保存时期及时间点，对兔角膜内皮细胞作形态学观察，作细胞活性率、平均密度、平均面积及六边形细胞百分率分析，结果显示3种方法对角膜内皮细胞生物活性均无影响。临床上以细胞活性率、六边形细胞率、细胞面积和密度作为评价角膜内皮细胞的指标，因角膜内皮细胞活性染色是评价功能的最常用方法，其直接提示细胞的存活程度；细胞面积和密度则是检测内皮细胞功能状态及角膜片功能储备量的重要指标，六边形细胞率的下降则是反映内皮损害及不稳定的敏感指标[5,6]。本实验中长期深低温保存后的角膜内皮细胞形态较差于湿房和 D-X 液保存，茜素红颗粒的沉积出现较多，虽然其活性率与湿房组有统计学差异，细胞面积和密度及六边形细胞率与前2组也有统计学差异，但是其活性率仍保持在80%以上。研究提示活性保存使角膜内皮细胞存活率达到70%以上，并且其他指标也属于正常范围之内就可用于穿透角膜移植术。长期深低温保存与前两组之间的差异主要原因是其保存和复苏过程复杂，导致细胞受损的因素较多，但是针对中国具体国情和临床使用实际，长期深低温保存角膜还是有一定的临床价值，尤其在角膜来源缺乏地区作为供体还是有临床意义的。

本实验先通过动物兔角膜实验建立扎实的不同角膜保存的眼库技术，保证人角膜材料能充分利用。随着近几年角膜捐献的不断宣传，角膜捐献志愿者也逐渐增多，正确掌握角膜保存方法应用于眼库，这一技术非常关键，临床上根据患者病情和实际情况的需要，可以选择不同时期不同方法保存的供体角膜进行角膜移植。

关键词：角膜内皮细胞；保存方法；形态学
中图法分类号：R329.24 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 李 辰，李志杰，姚晓明．眼库[M]．广州：广东科技出版社，1998：284－285.
[2] 董晓光，谢立信，张新晨，等．角膜中期保存液的研制和临床应用[J]．中华眼科杂志，2000，36(1)：21－23.
[3] 黄挺，陈家祺，郑健梁，等．深低温冻存角膜复温后内皮细胞活性的变化[J]．眼科研究，2000，18(6)：515－517.
[4] Hagenah M，Simon B，Bohnke M. Experimental corneal cryopreservation：impact of postmortem time on corneal endothelial cell survival [J]. Ophthalmic Res，1993，25(4)：210－215.
[5] Nath K A，Fischereder M，Hostetter T H. The role of oxidants in progressive renal injury[J]. Kidney Int Suppl，1994，45：S111－S115.
[6] 屈 晨，盛敏杰，林安娟．中期保存的兔角膜内皮细胞的形态学观察[J]．同济大学学报：医学版，2004，25(5)：374－377.

（编辑 王 红）