论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0586-05

自制人血清中期角膜保存液对兔角膜的保存效果

杨 扬,周善璧,陈小雄,刘珍珍 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院眼科,重庆市眼科学重点实验室)

【摘要】 **目的** 研制一种适合我国国情的人血清角膜中期保存液。**方法** 配制人血清浓度分别为10%(A组)、20%(B组)、30%(C组)、0%(D组)的角膜保存液保存兔角膜,用Optisol-GS角膜保存液作对照组,分别在保存第3、7、10、14天进行角膜内皮细胞活性率检测、HE染色、扫描电镜超微结构观察,并检测角膜保存液的理化性质及生物安全性。**结果** 兔角膜保存至第14天时,C组角膜内皮细胞活性率与对照组比较差异无明显统计学意义($P>0.05$),C组被保存的角膜组织病理学和超微结构与对照组Optisol-GS比较无显著差异。各组血清角膜保存液理化性质稳定,无生物危险性。D、A、B组与对照组比较,角膜内皮细胞活性率分别在保存第3、7、10天时差异具有明显的统计学意义($P<0.05$);角膜组织病理学比较,在保存第7天,各实验组与对照组无明显差异,随着时间延长,D、A、B组先后依次出现组织病理学改变;超微结构比较,在保存第7天时,D组与C组及对照组具有明显差异。**结论** 30%浓度的人血清角膜保存液具有良好的兔角膜保存效果,其理化性质稳定且安全,可保存兔角膜7~10 d。

【关键词】 角膜保存液;人血清;兔角膜;角膜内皮细胞

【中图法分类号】 R779.65;R318.52 【文献标志码】 A

Preservation effect of self-made medium-term corneal storage medium containing human serum on rabbits' corneas

Yang Yang, Zhou Shanbi, Chen Xiaoxiong, Liu Zhenzhen (Department of Ophthalmology, Chongqing Key Laboratory of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To develop a medium-term corneal storage medium containing human serum and investigate its preservation effect on rabbits' corneas. **Methods** Corneal storage media containing human serum 10% (group A), 20% (group B), 30% (group C), and 0% (group D) were prepared. Rabbits' corneas were stored in the above corneal storage media as well as Optisol-GS cornea storage medium (control group). On the 3rd, 7th, 10th and 14th day after preservation, the viability of corneal endothelial cells, the corneal histopathology, the corneal microstructure, and the physicochemical properties and biological safety of corneal storage media were examined using trypan blue-alizarin red staining, pathological sections of corneas, scanning electron microscopy, and microbiological evaluation, respectively. **Results** On the 14th day after preservation, the viability of corneal endothelial cells, the corneal histopathology and the corneal microstructure showed no significant differences between group C and the control group ($P>0.05$). Besides, the physicochemical properties of corneal storage media were stable without any biological hazard. On the 3rd, 7th and 10th day after preservation, the viability of the corneal endothelial cells showed significant differences between groups A, B and D and the control group ($P<0.05$). On the 7 th day after preservation, the corneal histopathology showed no significant differences between the experimental groups and the control group, and histopathological changes occurred in groups D, A and B sequentially with time. At the 7th day after preservation, the corneal microstructure showed significant differences between group D and group C or the control group. **Conclusion** The medium-term corneal storage medium containing human serum 30% can preserve rabbits' corneal tissues for 7 to 10 d. It has stable physicochemical properties, and it is safe and effective.

【通信作者】 周善璧, E-mail:zhoushanbi@yahoo.com.cn

【Key words】 corneal storage medium; human autologous serum; cornea of rabbits; corneal endothelial cells

Corresponding author: Zhou Shanbi, E-mail: zhoushanbi@yahoo.com.cn

角膜病是一种常见的高致盲率眼科疾病,而角膜移植无疑是使角膜盲患者重见光明的重要方法。收集、制备、保存供体角膜组织的眼库是实施角膜移植手术的前提,眼库收集和保存角膜需要角膜保存液,特别是中期角膜保存液,而我国缺乏自主知识产权的角膜中期保存液,使得国内很多眼库不可能收集捐献者角膜,只能收集眼球,湿房保存,尽可能在24 h内实施角膜移植[1]。为了眼库能够收集角膜,为了角膜移植手术平诊化,迫切需要研制一种独立知识产权,保存效果好,价格低廉的角膜中期保存液。

人血清是血液去除细胞成分和纤维蛋白原,保留大量活性因子的一种生物营养液,与正常泪液具有相似的生物学特性,可提供眼表上皮修复所需的活性因子和营养物质[2]。随着自体血清滴眼液在眼表疾病的广泛应用,血清的制备技术得到了大大提高。本实验拟研制一种以人血清为主要成分,适合我国国情的角膜中期保存液。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

角膜中期保存液基本成分及浓度:人血清,由20名健康志愿者提供;MEM培养基(低限量基础培养基)(9.6 g/L),购自美国Gibco公司;羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES,25 mmol/L),购自美国Sigma公司;2%低分子右旋糖苷购自Pharmacia公司;0.2%玻璃酸钠购自上海其胜生物制剂有限公司;地塞米松磷酸钠注射液(0.05 mmol/L),购自北京宝曼生物科技有限公司;硫酸庆大霉素注射液(100 000 U/L),购自西南药业股份有限公司;注射用青霉素钠(100 000 U/L),购自华北制药厂;碳酸氢钠2.2 g/L,购自自贡鸿鹤制药有限公司;Optisol-GS角膜保存液经香港中文大学转购。以上配方成分及浓度均参考国内外各角膜中期保存液报道成分及浓度制备。

1.2 自体血清的配制

20名健康志愿者年龄25~40岁,男女不限。采血前行常规体检,排除HIV、HBV、梅毒抗体阳性的患者,签订实验知情同意书后,使用4 ml真空采血管于清晨空腹采取静脉血,每人采血20 ml。将采血管于室温(24~26 ℃)下静置2 h,等待血清完全析出。血清完全析出后,将采血管置于8 ℃低温离心机,3 000×g条件下离心15 min。此凝固时间和离心方式采集的血清能增进角膜上皮细胞的增殖、迁移和分化能力[3]。然后在超净工作台上,小心将离心后的血清从采血管吸入同一只无菌血清瓶内。再将血清瓶放入56 ℃水浴箱内,补体灭活30 min。在超净工作台上,使用孔径为0.22 μm的一次性滤器,将血清过滤除菌。最后保存血清,将除菌后的血清封存于同一血清瓶内,-20 ℃冰箱保存1个月后配制成不同浓度的血清角膜保存液备用。

1.3 配制血清角膜保存液并进行实验分组及制备兔角膜移植片

对照组为国际常用的Optisol-GS角膜中期保存液。实验组分4组,分别配制人血清浓度为10%(A组)、20%(B组)、30%(C组)、0%(D组)的角膜中期保存液,使用HEPES调节溶液pH值至7.2~7.4,碳酸氢钠粉剂调整渗透压至320~390 mmol/L。每组8瓶,每瓶20 ml,4 ℃冰箱保存。2~3月龄的新西兰大白兔20只(购自重庆医科大学实验动物中心),耳缘静脉气体栓塞处死,取带2 mm巩膜缘的角膜片,分配到对照组和4个实验组中,每瓶角膜保存液装有1片兔角膜,每组8片兔角膜,于保存第3、7、10、14天的时间,对各项保存指标进行检测。

1.4 检测方法

1.4.1 大体情况及裂隙灯观察 通过眼库裂隙灯[4],观察兔角膜透明度、有无水肿增厚、是否存在后弹力层皱褶。

1.4.2 兔角膜内皮细胞活性率检测 将每个角膜片平均分成4份,选取2份采用台盼蓝-茜素红联合染色方法,×20倍光学显微镜下,每份标本取5个不同视野拍照,每组选取10个视野进行角膜内皮细胞活性率计算,然后计算各组视野均值。

1.4.3 兔角膜组织病理学观察 于各检测时间点,从各组选取2份分割好的角膜片,行石蜡包埋、常规HE染色,光学显微镜下观察各组角膜组织结构并照相。

1.4.4 角膜组织超微结构观察 于角膜保存第7天,从C、D组及对照组选取2片角膜片行扫描电镜检测,观察对比3组角膜内皮细胞的超微结构。

1.4.5 人血清角膜保存液理化性质及生物安全性检测 于保存角膜后的第3、7、14、20天,观察保存液的颜色、浑浊度、沉淀及污染分层现象,进行pH值、渗透压检测,并在保存后7、14 d 2个时间点每次分别抽5 ml血清角膜保存液进行细菌和真菌培养,观察有无微生物生长。

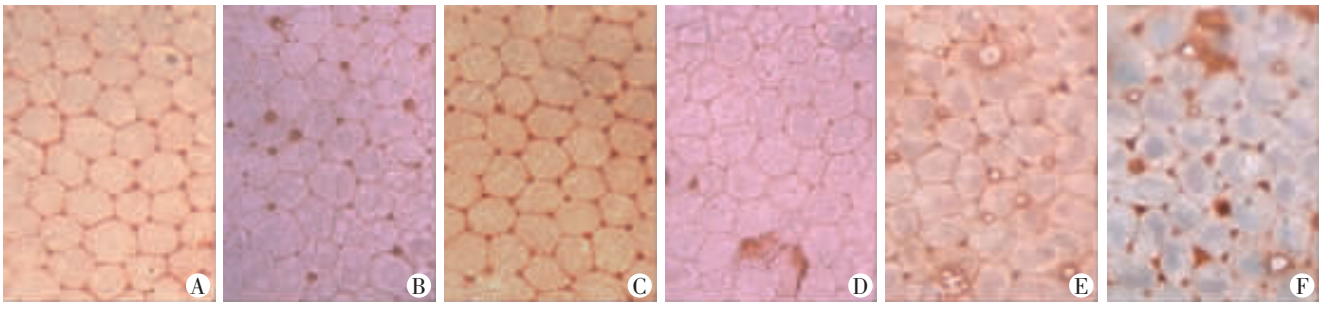
1.5 统计学分析

采用SSPS 16.0统计软件,行t检验和单因素方差分析分析各组兔角膜内皮细胞活性率之间差异。

2 结果

2.1 大体情况及裂隙灯观察

保存第3、7天时,各实验组及对照组角膜片均保持透明,



A:C组保存第7天;B:C组保存第14天;C:对照组保存第7天;D:对照组保存第14天;E:D组保存第7天;F:D组保存第14天

图1 兔角膜内皮细胞活性染色的观察 (台盼蓝-茜红素联合染色 ×20)

无明显水肿及增厚。保存第10天时,A、B组出现轻微水肿及增厚,角膜片微浑浊,D组水肿、浑浊明显。裂隙灯下A、B、D组各层结构基本清晰,A、B组基质层微浊,后弹力层轻微皱褶,D组基质层浑浊明显。C组及对照组角膜片仍保持透明,无明显水肿及增厚,裂隙灯下各层结构清晰。保存第14天时,A组基质层明显浑浊、增厚,后弹力层皱褶,B组基质层微浑浊,后弹力层出现轻微皱褶,D组浑浊增厚明显,裂隙灯下各层结构不清晰。C组及对照组轻微水肿,基本透明,裂隙灯下各层结构基本清晰。

2.2 角膜内皮细胞活性率检测

在角膜保存的第7天,C组和对照组角膜内皮细胞形态规则,排列紧密,无明显肿胀,核染色少(图1A、C)。D组角膜内皮明显肿胀、缺失,核染色多(图1E)。在角膜保存的第14天,C组和对照组角膜内皮细胞轻微肿胀,内皮细胞连接基本紧密,可见部分核染色(图1B、D)。D组角膜内皮细胞连接松弛,核染色较多(图1F)。可见随着保存时间的延长,各组角膜内皮细胞开始出现肿胀、死亡、连接松弛,而C组和对照组在角膜内皮细胞活性及形态上无明显差异,但两组相对于无血清成分的D组比较,在相同的时间内均能更好地保持角膜内皮细胞的活性及形态,说明血清成分对角膜内皮细胞的活性起到一定的保护作用。

由表1可见,保存第3天时,各实验组及对照组角膜内皮细胞活性率均较高,D组与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。之后随着保存时间的延长,A、B组与对照组相比,内皮细胞活性率相继出现统计学差异($P<0.05$)。角膜保存第14天时,C组与对照组相比,内皮细胞活性率差异无明显统计学意义($P=0.052$)。由此可知,随着血清浓度的增加,人血清角膜保存液保存的角膜内皮细胞活性率越高,本实验测得人血清角膜保存液最佳血清浓度为30%,可保存角膜7~10 d。

由实验组及对照组组内各检测时间点角膜内皮细胞活性率单因素方差分析可见,各实验组及对照组在角膜的不同保存时间,角膜内皮细胞活性率差异均具有明显的统计学意义($P<0.05$),说明保存时间的长短可以影响各实验组及对照组的角膜内皮细胞活性率,随着保存时间的延长,各组角膜内皮细胞活性率均降低。

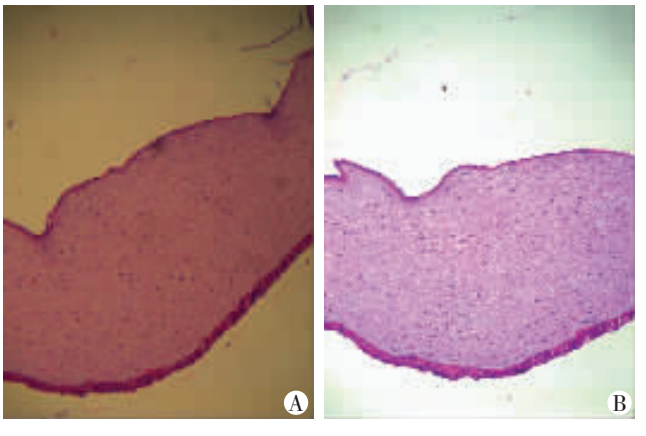
表1 不同保存时间实验组和对照组角膜内皮细胞活性率比较 (%, $\bar{x}\pm s$)

组别	视野组数	3 d	7 d	10 d	14 d	*P* 值
对照组	10	99.24±0.66	98.72±0.45	98.50±0.57	93.35±0.62	0.000
A组	10	98.78±0.86	96.90±0.99[a]	87.43±0.99	74.93±1.01	0.000
B组	10	98.84±0.63	98.37±0.53	95.74±0.54[a]	80.47±0.88	0.000
C组	10	99.04±0.94	98.25±0.84	98.52±0.08	92.75±0.66	0.000
D组	10	97.94±1.33[a]	91.76±1.25	68.90±1.42	58.28±0.99	0.000

a:$P<0.05$,与对照组比较

2.3 角膜组织病理学观察

在10倍光学显微镜下可见,保存第3、7天各实验组及对照组角膜组织无明显肿胀、增厚,角膜上皮层多层细胞排列整齐、无缺失,基质层无明显增厚,单层内皮细胞层与后弹力层连接紧密,基本无缺失。随着保存时间的延长,A、B、D组出现基质层的不同程度的增厚、断裂,上皮层及内皮细胞层与其黏附的组织层之间也出现不同程度脱离、缺失,D组尤为严重。C组及对照组各组织层在保存第14天时,连接紧密,均未发生明显改变,角膜组织无明显肿胀、增厚,细胞完整(图2A、B)。



A:C组;B:对照组

图2 保存第14天兔角膜的组织病理学观察 (HE ×10)

在40倍光学显微镜下可见,保存第3、7天,各实验组及对照组角膜组织基质层无明显增厚及水肿,成纤维细胞排列整齐、紧密。上皮层及内皮细胞层基本无缺失,角膜组织各层次间连接紧密。随着保存时间的延长,D、B、A组先后依次出现基质层增厚,成纤维细胞之间出现裂痕,纤维水肿。上皮层及内

皮细胞层出现不同程度细胞缺失及与黏附组织层的脱离,后弹力层结构基本完整。保存第14天时,C组及对照组组织改变不明显,仅有轻微基质层增厚。

2.4 角膜组织超微结构观察

低倍镜(×450)下可见,C组及对照组角膜组织在保存7 d时,角膜内皮细胞呈六边形,排列整齐,形态规则,无空缺。D组角膜内皮细胞形态基本规则,个别细胞出现肿胀突起。高倍镜下(×2 000)可见,C组及对照组角膜组织内皮细胞无明显肿胀、坏死、脱落,内皮细胞间紧密连接,Y型连接连续紧密,细胞表面微绒毛存在,两组之间超微结构差异不明显。D组内皮细胞肿胀明显,出现部分坏死、融合、脱落,个别Y型连接消失,细胞表面微绒毛较少,与C组及对照组超微结构差异明显。见图3。

2.5 自制血清角膜保存液理化性质、生物安全性检测

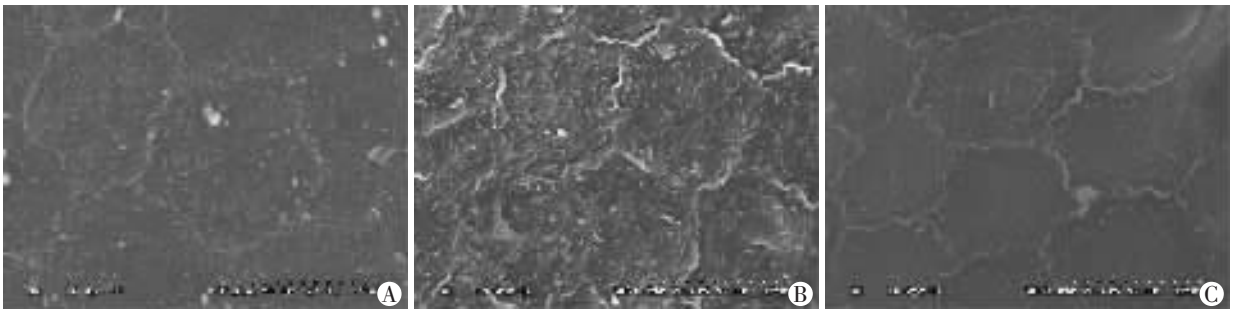
保存液配置后的各个监测时间点,保存液均保持棕红色,澄清透明、无污染分层现象。维持pH在7.2~7.4,渗透压320~390 mmol/L。细菌和真菌培养均为阴性。

3 讨论

角膜活性保存按保存时间长短可分为短期4 ℃湿房保存、中期保存和长期深低温保存。有研究表明这3种保存方法均可维持角膜内皮细胞的活性率在80%以上,但短期保存方法要取全眼球,且保存时间太短,针对较远或临时需要活性角膜进行移植的患者大为不便[5]。长期深低温保存实验技术要求较高,费用也相对较高,故本实验致力于中期角膜保存液的研究。目前国际常用的角膜中期保存液为美国Optisol-GS保存液,它可以在4 ℃保持角膜内皮细胞活性至第14天,但因各种原因目前尚未引入国内。国内学者在角膜中期保存液的研制方面已取得了不错成果,如2000年董晓光等[6]报道的DX角膜中期保存液,在兔实验结果显示保存2~11 d与Optisol-GS液差异无统计学意义。这些无血清角膜中期保存液的研究主要集中于在Optisol-GS液的基础上增加或删减一些成分,仍未见突破性的进展。

本实验研制的角膜中期保存液以人自体血清为主要成分,添加细胞培养的MEM基础培养基和对角膜内皮细胞具有保护和稳定作用的透明质酸等成分[7],配制成不同浓度的人血清角膜保存液,以探究人血清角膜保存液的保存效果及最佳血清浓度。通过对角膜内皮细胞活性率检测发现,30%浓度的人血清角膜保存液在角膜保存第14天与Optisol-GS保存液差异无明显统计学意义($P>0.05$),组织病理学检测及超微结构检测也无明显差异。而无血清D组在角膜保存第3天时,与Optisol-GS保存液保存的角膜内皮细胞活性率差异具有明显统计学意义。说明血清对保持角膜内皮细胞的活性起着一定的支持营养作用,这可能与血清本身的特性有关。据报道自体血清滴眼液对于治疗干眼等相关眼表疾病具有良好的效果[2]。血清可提供眼表上皮细胞修复所需的营养物质和活性因子,如维生素A、各种细胞因子、微量元素和激素等。维生素A可以抑制脂质过氧化反应及角膜内皮细胞的凋亡,可以应用于角膜保存,延长角膜植片存活时间[8]。血清的主要成分白蛋白,以及血清中含有的细胞因子如成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、神经生长因子(NGF)等,可以加速眼表上皮细胞修复和再生[9]。有研究证明角膜中期保存液中加入bFGF可以减少角膜内皮细胞的凋亡,提高角膜内皮细胞的活性[10]。血清中还含有结合毒性物质的因子,可以解除蛋白质、重金属和脂肪酸的毒性;同时含有的抗体、补体和溶菌酶,具有抑菌、杀菌作用,可以避免附加防腐剂所引起的副作用,这是一般商品制剂不具备的特性。

在欧洲,将近2/3的人角膜采用器官培养的方法进行保存,培养液中一般含有胎牛血清,用于提供角膜



A:C组;B:D组;C:对照组

图3 保存第7天兔角膜的超微结构观察 (SEM ×2 000)

培养过程中的必要生长因子。但是由于胎牛血清的加入,势必会引起传播疯牛病、牛海绵组织脑炎等传染性疾病的隐患[11],以及增加异种异体免疫排斥反应的危险因素。1981年谢立信等在国际上首次研制成功并报道了"人脐带血清角膜活性保存液"的实验研究,随后又成功研制出"角膜器官培养保存液",证实人脐带血清可替代胎牛血清保存角膜内皮细胞活性达4周[12]。但人脐带血清来源少,采集不便,不适宜推广。如果采集接受角膜移植手术患者的自体血清制备角膜保存液,将会形成来源方便、经济,操作简单,保存的角膜能够避免自体传染性疾病的传播,降低同种异体免疫排斥反应的美好前景,这也是本实验选用人自体血清作为角膜保存液主要成分的初衷。随着人自体血清滴眼液在眼表疾病治疗中的广泛应用,有研究证实100%浓度的人自体血清滴眼液能够使大多数眼表疾病患者的症状有所改善[13]。经过长期跟踪随访证实,使用人自体血清滴眼液治疗复发性角膜溃疡是一种安全有效的治疗方法[14]。本实验设计的实验组血清浓度分别为10%、20%、30%和0%。有研究发现,当血清浓度在12.5%~25%时,角膜上皮增殖可达最高峰,提示可能在此浓度区间,各种细胞成分之间互相作用,能够达到刺激细胞增殖的最佳浓度。各种文献记载血清滴眼液的浓度在20%~100%。随着对血清的进一步了解,发现血清中的某些成分要比泪液中高出很多倍,这些成分有些是促进细胞增殖的,有些则是抑制细胞增殖的。Watson等[15]发现高浓度血清可导致较严重角膜基质瘢痕,故浓度越高,不一定对角膜保存的效果更好。本实验设计研制的30%人自体血清角膜中期保存液,证实为最佳血清浓度,在角膜保存第14天与Optisol-GS保存液达到相同的保存效果。高于30%浓度可能保存效果会更好,由于本实验尚处于研究的初步阶段,对更高浓度的研究尚未涉及,对角膜植片存活质量的作用机制也尚未研究,这也是本实验进一步研究的内容,根据本实验角膜内皮细胞活性率检测、组织病理学检测及超微结构分析,故推荐角膜保存最佳时间为7~10 d。由于人自体血清来源方便、经济、操作简单,针对接受角膜移植的患者能够更加个体化保存角膜和进行治疗,因此其保存角膜活性的作用机制及是否存在更好的浓度范围,值得进一步研究。

志谢 感谢香港中文大学眼科医院工作人员、重庆市眼科学重点实验室彭周贵以及重庆市眼库辜凤娟在本实验中给予的热情帮助

参考文献:

[1] 潘志强,张文华. 规范我国眼库建设[J]. 中华眼科杂志,2005,41(5):385-386.

[2] Quinto G G, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases [J]. Arq Bras Oftalmol, 2008, 71(6 Suppl):47-54.

[3] Liu L, Hartwig D, Harloff S, *et al*. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops[J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2005, 243(7):706-714.

[4] 周善璧,彭俊超,陆蓉,等. 眼库用裂隙灯显微镜的改良[J]. 重庆医科大学学报,2003,28(6):795-796.

[5] 曾玉晓,谢汉平,翁传煌,等. 三种不同方法保存的兔角膜内皮细胞形态学观察[J]. 第三军医大学学报,2007,29(15):1539-1540.

[6] 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.

[7] 于莉,高维奇,刘平,等. 透明质酸钠联合抗氧化剂中期保存兔角膜[J]. 眼科新进展,2007,27(10):746-749.

[8] Serbecic N, Beutelspacher S C. Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells[J]. Cell Tissue Res, 2005, 320(3):465-475.

[9] Unterlauft J D, Kohlhaas M, Hofbauer I, *et al*. Albumin eye drops for treatment of ocular surface diseases[J]. Ophthalmologe, 2009, 106(10):932-937.

[10] 杨玉洁,高杉,高晓唯,等. 碱性成纤维细胞生长因子和肌肽对中期保存液中角膜的保护作用[J]. 国际眼科杂志,2009,9(4):684-687.

[11] Frueh B E, Bohnke M. Prospective, randomized clinical evaluation of Optisol vs organ culture corneal storage media[J]. Arch Ophthalmol, 2000, 118(6):757-760.

[12] 赵靖,谢立信,臧新杰,等. 人脐带血清器官培养液保存猪角膜的实验研究[J]. 中华眼科杂志,2004,40(8):533-538.

[13] Jover-Botella A, Marquez-Peiro J F, Marques K, *et al*. Effectiveness of 100% autologous serum drops in ocular surface disorders[J]. Farm Hosp, 2011, 35(1):8-13.

[14] Ziakas N G, Boboridis K G, Terzidou C, *et al*. Long-term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions[J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2010, 38(7):683-687.

[15] Watson S L, Secker G A, Daniels J T. The effect of therapeutic human serum drops on corneal stromal wound-healing activity[J]. Curr Eye Res, 2008, 33(8):641-652.

(收稿 2010-10-17 修回 2010-12-15)

(编辑 王小宴)