维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0664－04

透明质酸钠在角膜中期保存中的实验研究

杨 娟,赵 敏,徐智勇,李 鸿

(重庆医科大学临床学院眼科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究透明质酸钠(SH)在角膜中期保存中的作用。方法:在中期保存液(MMK 液)中,加入 SH 制成保存液Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ(浓度分别为 0.05%、0.03%、0.01%),以未加 SH 的 MMK 液作对照并作组间对照。对保存后的兔角膜片行大体和超微结构观察、内皮细胞苔盼兰－茜素红染色、琥珀酸脱氢酶(SDH)、葡萄糖－6－磷酸酶(G－6－P)活性检测。结果:加入 SH 的三组所保存的角膜片其透明度、超微结构均好于对照组,角膜内皮细胞活性以实验Ⅰ组最高,对照组最低,各组间比较有显著性差异。结论:SH 对角膜内皮细胞有明显的保护作用,可提高保存角膜的质量,延长保存时间,其效果与 SH 浓度有关。

【关键词】透明质酸钠;内皮细胞;角膜保存;眼库技术

【中国图书分类法分类号】R779 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－29

An experimental investigation on sodium hyaluronate in mid－Term cornea preservation

YANG Juan, et al

(*Department of Ophthalmology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the action of SH in mid－term cornea preservation. *Methods*: SH was added into mid－term preservation solution(MMK) to make the new storage media with SH of three different concentration (0.05%, 0.03%, 0.01%). The contrast group was MMK medium without SH. The corneal appearance, transparence and ultrastructure were observed, and trypan blue－alizarin red staining of CEC, SDH and G－6－P enzyme staining with histochemistry were made in different storage time. *Results*: The transparence of cornea and ultrastructure of CEC in all the experimental groups were better than that of the contrast. The activity degree of CEC was highest in group I, lowest in the contrast, and statistically significant among all the groups. *Conclusion*: SH plays an important role in protecting CEC in middle storage medium, and enhances the quality and prolongs the duration of the preserved corneas. The protective effect is determined by the consistence of SH.

【Key words】Sodium hyaluronate; Corneal endothelial cells; Cornea preservation; Eyebank technique

透明质酸及其盐(HA)是机体内重要的生物活性物质,目前已广泛应用于眼科多种手术中。它不但作为一种粘弹剂发挥了粘弹性衬垫、缓冲、分离等功能,还具有保护角膜内皮,减轻角膜水肿和改善视力等作用。近年研究发现,透明质酸钠(SH)可促进角膜内皮细胞(CEC)的有丝分裂过程,对角膜内皮细胞生长、移行、增殖、分化等过程均有重要的调节作用。本研究将 SH 加入角膜中期保存液中,通过对角膜内皮细胞形态学、细胞活性、超微结构等检测,探讨 SH 用于角膜保存的可行性,为不断改进和完善保存方法提供理论和实验依据。

作者介绍:杨 娟(1963－),女,主治医师,硕士,主要研究方向:眼表疾病和角膜保存。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助课题(1999－3003)。

1 材料及方法

1.1 角膜保存液的配制

参考 M－K 液配方进行配制,培养基用 M－199,另加入 HEPES 稳定 pH 值,以庆大霉素代替青霉素,其余成分相同,命名为 MMK 液,将其分装成 20 ml/瓶,密封置于 4℃冰箱内备用。

1.2 角膜片的制备与保存

2～3 月龄新西兰大白兔(重庆医科大学实验动物中心提供),耳缘静脉注入空气致死,眼部消毒后行全眼球摘除,1:2000 的庆大霉素生理盐水浸泡 20min 后,切取带 2mm 巩膜缘的全角膜片。将保存液从 4℃冰箱取出复温后,加入 SH(山东正大福瑞达制药有限公司)制成浓度为 0.05%(Ⅰ液)、0.03%(Ⅱ液)、0.01%(Ⅲ液),三组均为实验组,对照组

维普资讯 http://www.cqvip.com

为未加 SH 的 MMK 液，将取下的角巩膜片迅速放入各组保存液中，密封置于 4℃ 保存。

1.3 检测内容

对保存 3、5、7、10 天角膜片进行：①大体观察②台盼兰－茜素红联合染色检测角膜内皮细胞，计算活性内皮细胞百分率③透射电镜和扫描电镜观察④酶组织化学染色检测 SDH、G－6－P 酶活性，定量测定各种酶染色的透光密度值。

1.4 统计学处理

所有数据用 SAS8.2 统计软件包处理，以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用两因素重复测定的方差分析，显著性标准为 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 角膜大体形态观察

各组保存液均滑清，无混浊污染现象。保存 3、5 天时，实验组角膜均透明，无水肿增厚，而对照组角膜已出现轻微水肿；第 7 天时，实验组角膜出现轻度水肿，对照组则较明显水肿，透明度差；保存第 10 天时，各组角膜片外观均有不同程度水肿增厚，但实验 I 组 (0.05%SH) 与同期各组比较，其角膜透明度最好，水肿增厚最轻。

表 1 台盼兰－茜素红联合染色中期保存中内皮细胞活性细胞百分率 (%) ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	保存时间			
		3d	5d	7d	10d
I 液	6	97.62±1.49	92.97±2.62	87.60±3.41	84.25±6.49
II 液	6	93.67±3.43	89.65±4.98	82.45±5.45	76.80±3.89
III 液	6	90.57±1.71	83.82±4.35	74.38±6.36	65.38±4.74
MMK 组	6	83.08±6.40	65.17±4.97	55.18±8.21	33.37±4.48

注：group * group $F=140.10$ $P<0.01$ time * time $F=143.96$ $P<0.01$ time * group $F=13.11$ $P<0.01$

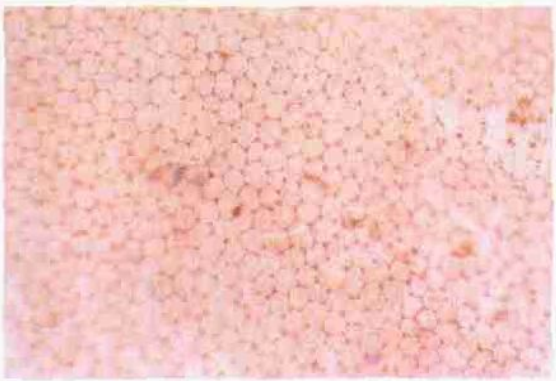


图 1 I 液保存 5 天，CEC 形态好，有少许核染色细胞 (LM×200)



图 2 对照组保存 5 天，CEC 轮廓欠清，有较多核染色细胞 (LM×200)

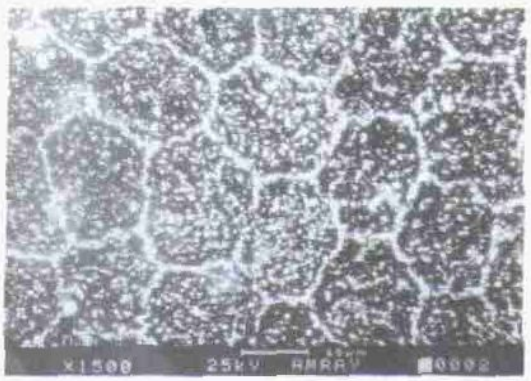


图 3 I 液保存 7 天，CEC 形态正常，连接紧密，细胞表面微绒毛丰富 (SEM×1500)



图 4 对照组保存 7 天，CEC 边界不清，形态变异，细胞表面微绒毛稀少 (SEM×2500)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 四组中期保存液中角膜内皮细胞 SDH 染色平均透光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	保存时间			
		3d	5d	7d	10d
Ⅰ液	6	5.37±0.19	5.19±0.33	4.82±0.37	4.72±0.31
Ⅱ液	6	4.96±0.18	4.78±0.34	4.17±0.41	3.63±0.42
Ⅲ液	6	3.21±0.26	3.02±0.43	2.28±0.35	1.72±0.38
MMK 组	6	2.42±0.47	1.33±0.52	0.83±0.34	0.35±0.26

注:group * group $F=691.83$ $P<0.01$ time * time $F=62.65$ $P<0.01$ time * group $F=3.32$ $P<0.01$

表 3 四组中期保存液中角膜内皮细胞 G-6-P 酶染色平均透光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	保存时间			
		3d	5d	7d	10d
Ⅰ液	6	3.26±0.27	3.16±0.30	3.03±0.18	2.65±0.26
Ⅱ液	6	3.19±0.38	3.00±0.25	2.68±0.38	1.96±0.38
Ⅲ液	6	1.73±0.50	1.24±0.58	0.95±0.37	0.39±0.18
MMK	6	0.92±0.47	0.48±0.21	0.38±0.20	0.24±0.16

注:group * group $F=404.31$ $P<0.01$ time * time $F=34.46$ $P<0.01$ time * group $F=2.51$ $P<0.01$

2.2 台盼兰-茜素红联合染色光学显微镜观察见表 1

在保存的四组中，实验Ⅰ组 CEC 活性细胞百分率最高（图 1），随保存时间的延长活性细胞百分率下降最慢，而对照组 CEC 活性细胞百分率最低（图 2），随保存时间的延长活性细胞百分率下降最明显。统计结果显示各组间比较有显著性差异($P<0.01$)。

2.3 超微结构观察

保存 7 天时，实验Ⅰ组扫描电镜见角膜内皮细胞连接紧密，细胞边界清晰，细胞表面微绒毛较长，数量丰富(图 3)，而对照组的角膜内皮细胞边界不规则，形态有变异，细胞表面微绒毛短，数量稀少(图 4)。透射电镜发现实验Ⅰ组同期角膜内皮细胞的胞膜完整清晰，胞体较大，胞浆丰富，线粒体和内质网多，无水肿扩张，常染色质多，胶原纤维排列整齐，而对照组保存后的角膜内皮细胞已出现明显的衰老现象，核质显颗粒状聚集，细胞质有空泡形成，线粒体肿胀，内质网扩张，胶原纤维排列不整。实验Ⅰ组保存 10 天的角膜内皮细胞胞膜完整，胞质内有少量空泡，可见少量线粒体水肿，内质网轻度扩张；而对照组的角膜内皮细胞变性坏死现象很明显，胞膜不整，细胞质有大量空泡形成，线粒体严重水肿，内质网扩张明显，胞质内可见髓样结构，说明内皮细胞已严重受损，细胞活性明显下降。

2.4 酶组织化学染色检测角膜内皮细胞 SDH 和 G-6-P 酶的活性见表 2、3

阴性对照：不显色；阳性对照：SDH 为蓝紫色沉淀，G-6-P 为棕黄色沉淀。保存 3,5,7,10 天四组角膜内皮细胞 SDH 和 G-6-P 酶组织化学染色后，经生物医学图象分析系统测定，实验Ⅰ组角膜内皮细胞 SDH 和 G-6-P 酶活性最高，随时间变化下降最慢，对照组角膜内皮细胞酶活性最低，随时间变化下降最明显，统计结果显示四组之间 SDH 和 G-6-P 酶染色平均透光密度值比较有显著性差异($P<0.01$)。

3 讨 论

透明质酸钠在医学界特别是眼科临床已有广泛的应用[1,2]，但用于角膜保存却少有研究，特别是作为一种眼库技术报道甚少。为了寻求出一种理想的角膜保存方法，即达到保存时间长，角膜内皮细胞活性高的目的，国内外学者进行了大量的实验研究[3]，通过对保存液中添加某些新的抗生素、营养介质、糖皮质激素、抗氧化剂和生长因子等，对保存方法进行不断的改进和提高。在 2001 年的 ARVO 会议上，Cro 等报告了将 SH 加入自制中期保存液中，与 MK 液和 Optisol 液比较，其临床初步观察结果显示有保护角膜内皮细胞减轻角膜水肿的作用。为了进一步探讨 SH 在角膜保存中的作用，证实 SH 是一种新的活性角膜保存的添加剂，并能用于角膜保存，对此极有必要进行严格的动物对照实验。

角膜保存最重要的目的是保存内皮细胞的活性，它是衡量被保存角膜质量的关键指标。本实验采用了多项检测指标对 CEC 进行综合评定。大体

维普资讯 http://www.cqvip.com

观察是最直观的检查手段,依靠观察角膜片的厚度、有否水肿来评判 CEC 的状况。苔盼兰 - 茜素红联合染色光学显微镜观察,是检测 CEC 活性的经典实验,细胞损伤程度与着染程度和着染速度呈正相关,严重损伤的内皮细胞,其轮廓不清,边界模糊。电镜观察 CEC 的亚细胞结构,是对 CEC 较深层次的研究。酶组织化学染色可进一步检测 CEC 活性和功能状态,目前国内也有学者用此法来评估 CEC 活性[4]。本实验检测了 SDH 和 G - 6 - P 酶的活性,前者是脱氢酶中最重要的酶,三羧酸循环的标志酶;后者为糖代谢的关键酶。内皮细胞中这两种酶的活性程度反映了细胞的活性程度。本研究通过上述系列检测,从不同角度对保存 CEC 进行综合评定。

中期保存是将离体角膜片放入保存液中 4℃低温条件下保存,能使 CEC 活性保持 4～14 天的一种活性保存方法,是目前眼库主要应用的角膜保存方法。其特点是:保存时间较长,内皮细胞活性维持较久,但保存液要求严格,成分较多。现在各国眼库最常用的中期保存液是 Optisol 液[5],我国也主要依靠进口,价格昂贵。目前还没有一种十分满意且价格低廉的中期保存液。为了适应我国角膜移植的需求,不断完善角膜保存技术,需要在这方面进行深入的研究,本课题正是基于这一思路,参照 MK 液配方进行改良,加入外源性的 SH,制成不同浓度的新的活性角膜中期保存液,对保存 3、5、7、10 天角膜片分别进行上述指标检测,其目的不是研究 MK 液本身,而主要是想观察 SH 加入保存液中,是否可增强该保存液的作用,由此推断或评价 SH 用于眼库角膜保存的价值。结果显示:在加入 SH 的三组保存液中 CEC 各项指标均明显好于对照组,统计学处理有显著性差异($P<0.01$);三个实验组比较也有不同($P<0.01$),保存效果与 SH 在保存液中的浓度有关,实验Ⅰ组(0.05%SH)保存效果最好,角膜透明度最高,SDH、G - 6 - P 酶和 CEC 活性百分率均最高。这提示 SH 加入中期保存液中,可提高和增强该保存液对角膜的保护作用,并延长保存时间,其效果与 SH 在保存液中的浓度有关,也就是说,SH 在保存液中的含量逐渐增大时,其保存效果越来越好,但 SH 浓度过高时,反而对细胞的增殖和分化具有抑制作用[6]。故何为最佳浓度还值得进一步探讨。

SH 加入中期保存液,延长角膜保存时间的机理在于:依靠 SH 溶液的粘弹性,聚集在细胞表面形成保护膜,可减少氧自由基对细胞的损害。体外和体内实验均证实 HA 溶液可保护动物 CEC,明显降低 CEC 的丧失率[7]。SH 通过与 CEC 的 HA 膜受体 CD_{44} 结合,加厚了组织表面的保护膜,达到稳定内环境,促进 CEC 有丝分裂活性减少内皮细胞的丧失[8]、调节内皮细胞的移行、增殖、分化过程,以及通过胶渗作用维持角膜相对透明,减轻角膜水肿等有关。另外,也可能存在 SH 与保存液中其他成分的协同或联合作用,使保存液的综合效应得以提高。该新的角膜活性保存液配制简单易行,安全有效。

参 考 文 献

[1] Weber - U, Holak - N. Visusrelevante physikalischchemische Parameter von viskoelastika bei kataraktoperatimen [J]. Ophthalmologe, 2001; 98(5): 466 - 471.

[2] Scheer - S, Borderic - V. Effect of sodium hyaluronate administered at the end of penetrating keratoplasty on reepithelialization of the graft[J]. J - Fr - Ophthalmol, 1999; 22(8): 859 - 863.

[3] Means TL, Geroski DH, L'Hemault N, et al. The corneal epithelium of Optisol - Gs storage[J]. Cornea, 1996; 15(6): 599 - 605.

[4] 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.

[5] Kaufman HE, Beuerman RW, Steinermann TL, et al. Optisol corneal storage medium[J]. Arch Ophthalmol, 1991; 109 (6): 864 - 868.

[6] Hronowski L, Anastassiades TP. The effect of cell density on net rates of glycosaminoglycan synthesis and secretion by cultured rat fibroblasts[J]. Biol Chem, 1980; 255(21): 10091 - 10099.

[7] Glasser DB, Matsuda M, Edelhauser HF. A comparison of the efficacy and toxicity of and intraocular pressure response to viscous solution in the anterior chamber[J]. Arch Ophthalmol, 1986; 104(12): 1819 - 1824.

[8] Miyazaki - T, Miyauchi - S, Nakamura - T, et al. The effect of sodium hyaluronate on the growth of rabbit corneal epithelial cells in vitro[J]. J - Ocul - Pharmacol - Ther, 1996; 12 (4): 409 - 415.