DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.025
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2146 2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)23-2146-03

改良M-K液中添加透明质酸钠对角膜保存时间影响的研究

杨 娟[1],赵 敏[2],徐智勇[3],李 鸿[2] (重庆医科大学:[1]应用技术学院医院眼科,重庆 400050,[2]临床学院眼科,重庆 400016,[3]第二临床学院眼科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨在改良M-K液中加入透明质酸钠(SH),对提高保存角膜质量和延长保存时间的作用。方法 参考M-K液配方进行改良,自制中期保存液(MMK液),另加入SH制成保存液Ⅰ(0.05%SH)、Ⅱ(0.03%SH)、Ⅲ(0.01%SH),对照组为MMK液,在保存3、5、7、10 d时,对保存兔角膜片行大体形态观察,台盼蓝-茜素红联合染色、SDH、G-6-P酶活性检测及超微结构观察。结果 各组在保存后不同时间点大体形态观察均有较明显差异;实验Ⅰ组(0.05%SH)与同期各组比较,其角膜片的透明度最好,水肿最轻。台盼蓝-茜素红染色活性内皮细胞百分率比较,实验Ⅰ组最高,对照组最低,各组间比较有显著差异($P<0.01$);SDH和G-6-P酶染色平均透光密度值比较,各组间有显著性差异($P<0.01$)。结论 在改良M-K液中加入SH可延长角膜保存时间,保存效果与SH的浓度有关。

关键词:角膜保存;透明质酸钠
中图法分类号:R322.91;R779.6 文献标识码:A

Effects of sodium hyaluronate in reformed M-K liquid on prolonging duration of the preserved corneas

YANG Juan[1], ZHAO Min[2], XU Zhi-yong[3], LI Hong[2] ([1]Department of Ophthalmology, Medical Science Practical Technology School Subsidiary Hospital, [2]Department of Ophthalmology, College of Clinical Medicine; [3]Department of Ophthalmology, Second Affiliated Clinical Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400050, China)

Abstract: **Objective** To investigate the roles of sodium hyaluronate (SH) in the preservation of corneas. **Methods** Referred to M-K prescription Preserving liquid MMK was employed as the control. Different concentrations of SH added into the preserving liquid MMK were employed as the experiment groups: group Ⅰ (0.05% SH), group Ⅱ (0.03% SH), and group Ⅲ (0.01%). At 3, 5, 7, and 10 d after preservation in the preserving liquids, the ultrastuctures of the rabbit corneas were observed by scan electron microscopy and light microscopy, the corneas were stained by typan blue alizarin red staining, and the activities of SDH and G-6-P were detected by enzymohistochemistry. **Results** There was difference in macrostructure of the corneas in each group. Morphological changes in group Ⅰ were not obvious, but those in the control group were remarkable. Trypan blue-alizarin red staining indicated the highest vitality of corneal endothelial cells (CECs) in group Ⅰ, but the lowest in the control group. In addition, the activities of SDH and G-6-P in each group were significantly different. **Conclusion** The addition of SH in reformed M-K liquid can prolong the duration of the mid-term preserved corneas and the protective effect is in a dose-dependent manner.

Key words: cornea preservation; sodium hyaluronate

为了适应我国角膜移植手术的发展,提高角膜移植手术的成功率,必须保证高质量的角膜供体材料,如何提高保存角膜质量和延长保存时间已成为角膜保存研究的重点。透明质酸钠作为一种重要的生物医学材料,不但具有独特的流变学特性,而且具有良好的生物相容性,对细胞生长、移行、增殖、分化等过程均有重要的调节作用。本研究在保存液中加入SH,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在保存液中对延长保存时间和提高角膜质量的作用。

1 材料与方法

1.1 角膜保存液的配制

自制中期保存液MMK(参考M-K液配方),主要成分有M-199,葡聚糖,HEPES,庆大霉素,硫酸链霉素等。将MMK液分装成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24只(重庆医科大学实验动物中

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助课题(1999-3003)
Supported by the Scientific Research Foundation of Health Bureau of Chongqing (1999-3003)

作者简介:杨 娟(1963-),女,四川省射洪县人,硕士,主治医师,主要从事眼表疾病和角膜保存方面的研究。电话:(023)68851743

收稿日期:2004-07-20;修回日期:2004-10-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

心提供), 耳缘静脉注入空气致死, 眼部消毒后行全眼球摘除, 在 1∶2 000庆大霉素生理盐水中浸泡 20 min 后, 切取带 2 mm 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), 3 组均为实验组, 对照组为未加 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

在保存 3、5、7、10 d, 对角膜片进行: ① 大体形态观察。② 台盼蓝-茜素红联合染色, 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, 采用两因素重复测定的方差分析。

2　结果

2.1　角膜大体形态观察

各组保存液均澄清, 无混浊污染现象。保存 3、5 d: 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、10 天: 实验组角膜出现轻度水肿, 对照组则较明显水肿, 透明度差; 实验Ⅰ组(0.05%SH)与同期各组比较, 其角膜水肿增厚最轻, 保存时间最长, 保存效果最好。

2.2　台盼蓝-茜素红联合染色光学显微镜观察(表 1)

在保存的 4 组中, 实验Ⅰ组 CEC 活性细胞百分率最高(图 1), 而对照组 CEC 活性细胞百分率最低(图 2)。统计结果显示各组间比较有显著性差异($P<0.01$), 各时间点比较也有显著性差异($P<0.01$)。

表 1　台盼蓝-茜素红联合染色内皮细胞活性细胞百分率比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of the percentages of cell vitality by trypan blue-alizarin red staining in CECs ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Preserving time (d)			
	3	5 **	7 **	10 **
Ⅰ liquid	97.62±1.49	92.97±2.62	87.60±3.41	84.25±6.49
Ⅱ liquid *	93.67±3.43	89.65±4.98	82.45±5.45	76.80±3.89
Ⅲ liquid *	90.57±1.71	83.82±4.35	74.38±6.36	65.38±4.74
MMK liquid *	83.08±6.40	65.17±4.97	55.18±8.21	33.37±4.48

*: $F=140.10$, $P<0.01$, *vs* Ⅰ liquid; **: $F=143.96$, $P<0.01$, *vs* 3 d



图 1　Ⅰ液保存 7 d, CEC 形态正常, 核染色细胞少　(IM×200)

Fig 1　Normal morphology of CECs and fewer nuclei stained in group Ⅰ at 7 d after preservation　(IM × 200)

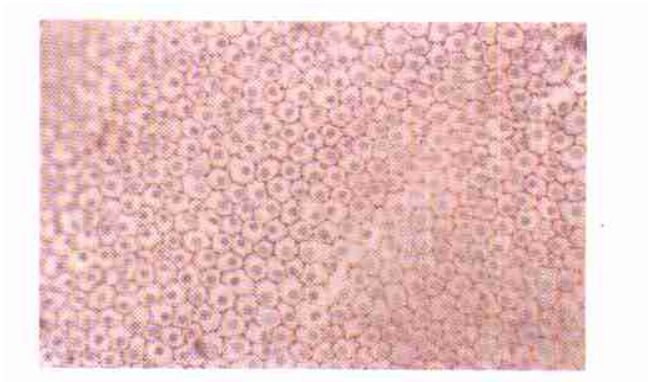


图 2　对照组保存 7 d, CEC 形态差, 核染色细胞多　(IM×200)

Fig 2　Morphological changes of CECs at 7 d after preservation in the control group　(IM × 200)

2.3　酶组织化学染色检测角膜内皮细胞 SDH 和 G-6-P 酶的活性(表 2)

所有阴性对照为无色; 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 d 4 组角膜内皮细胞行 SDH 和 G-6-P 酶组织化学染色后, 经生物医学图像分析系统测定, 实验Ⅰ组角膜内皮细胞 SDH 和 G-6-P 酶活性最高, 对照组角膜内皮细胞酶活性最低, 统计分析 4 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($P<0.01$); 各时间点比较也有显著性差异($P<0.01$)。

表 2　角膜内皮细胞 SDH 和 G-6-P 染色平均透光密度值比较($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Comparison of the average optical density values in CECs stained with SDH and G-6-P enzyme in the 4 groups ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	SDH (d)				G-6-P (d)			
	3	5 **	7 **	10 **	3	5△△	7△△	10△△
Ⅰ liquid△	5.37±0.19	5.19±0.33	4.82±0.37	4.72±0.31	3.26±0.27	3.16±0.30	3.03±0.18	2.65±0.26
Ⅱ liquid *△	4.96±0.18	4.78±0.34	4.17±0.41	3.63±0.42	3.19±0.38	3.00±0.25	2.68±0.38	1.96±0.38
Ⅲ liquid *△	3.21±0.26	3.02±0.43	2.28±0.35	1.72±0.38	1.73±0.50	1.24±0.58	0.95±0.37	0.39±0.18
MMK liquid *△	2.42±0.47	1.33±0.52	0.83±0.34	0.92±0.47	0.48±0.21	0.38±0.20	0.24±0.16	0.35±0.26

*: $F=691.83$, $P<0.01$ *vs* Ⅰ liquid; **: $F=62.65$, $P<0.01$, *vs* 3 d; △: $F=404.31$, $P<0.01$, *vs* Ⅰ liquid; △△: $F=34.46$, $P<0.01$, *vs* 3 d

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 超微结构观察

保存5 d,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,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。透射电镜发现该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7 d时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,常染色质较多异染色质较少;而对照组的角膜内皮凋亡坏死现象很明显,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,胞质内可见髓样结构,细胞核固缩等,说明内皮细胞已严重受损,细胞活性明显下降。

3 讨论

虽然SH在眼科临床中的应用已十分广泛[1,2],但SH用于角膜保存的研究甚少。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[3,4],虽然取得了一些成绩使保存效果得到提高,但还有诸多问题,如:角膜内皮细胞在一定条件下是否可能分裂,角膜保存的极限时间有多长,还有哪些介质对保存角膜内皮细胞活性会更好,仍需进一步研究。本实验正是基于这一思路,将生物活性物质——SH加入中期保存液中,通过对保存后角膜内皮细胞形态学和超微结构的观察以及台盼蓝-茜素红联合染色检测CEC活性和酶组织化学染色检测SDH、G-6-P活性[5],来证明SH在延长保存角膜内皮细胞活性中的作用。

SH是一种天然的生物活性物质,广泛存在于动物组织细胞中,在体内构成多种基质,起到维持细胞及组织结构的完整性、调节渗透压、调控大分子物质的转运、调节细胞功能、保持内环境稳定等作用。通过其溶液的粘弹性,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[6]。SH对细胞增殖和分化的作用至少受3个因素的影响——浓度,粘弹性和被作用的细胞。本实验中以Ⅰ组(0.05%SH)效果最好,但何为最佳浓度还值得探讨。SH对细胞生成有促进作用,当基质SH浓度提高时,细胞合成SH能力明显加快,说明SH对合成细胞的作用为正反馈调节机制[7]。SH通过纤维连接蛋白与CD_{44}受体结合后,可增强角膜细胞的有丝分裂活性[8]。

中期保存法是目前眼库应用较多的一种角膜保存方法,其保存CEC活性4~14 d。现在各国眼库最常用的中期保存液是Optisol液[9],我国也主要依靠进口,由于价格昂贵,数量很少,不能满足角膜移植的需求,急需研制出一种适合我国国情的中期保存液。本实验参考M-K液配方,把外源性的SH加入到此保存液中,在保存3、5、7、10 d分别对角膜内皮细胞进行多种生物活性指标检测。结果显示:在加入SH的3组保存液中CEC各项指标均好于对照组,统计学处理有显著性差异($P<0.01$);3个实验组比较差异有显著性($P<0.01$),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活性均最高。其可能机制在于SH在细胞周形成物理屏障,同时调节细胞多种功能,促进CEC有丝分裂、减少内皮细胞的丧失,,通过胶渗作用维持角膜相对透明,减轻角膜水肿以及保存液中其他成分的协同或联合作用有关。实验结果证明SH加入中期保存液中,可提高和增强该保存液对角膜的保存效果,延长保存时间。

参考文献:

[1] Weber U, Holak N. Visusrelevante physikalischchemische parameter von Viskoelastika bei kataraktoperationen[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] Panda A, Kumar G, Basak S K, *et al*. The effects of corticosteroid and reduced glutathione on the endothelial viability during culture in MK medium. A light microscopy study[J]. Acta Ophthalmol, 1994, 72(6): 731-736.

[4] Hoppenreijs P S, Pels E L, Vrensen G M, *et al*. Corneal endothelium and growth factors[J]. Surv Ophthalmol, 1996, 41(2): 155-164.

[5] 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.

[6] Glasser D B, Matsuda M, Edelhauser H F. A comparison of the efficacy and toxicity of and intraocular pressure response to visco us solution in the anterior chamber[J]. Arch Ophthalmol, 1986, 104(12): 1819-1824.

[7] Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, *et al*. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate[J]. Cell, 1990, 61(7): 1303-1313.

[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.

[9] Kaufman H E, Beuerman R W, Steinemann T L, *et al*. Optisol corneal storage medium[J]. Arch Ophthalmol, 1991, 109(6): 864-868.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net