

角膜中期保存液的基础研究及初步临床应用

邹文进 刘祖国 梁凌毅 王智崇 陈龙山 黄挺 许传超 许丽英 陈家祺

【摘要】 目的 研制一种配方简单、适合我国国情的角膜中期保存液。**方法** 人角膜 27 片、23 片分别保存于角膜中期保存液与 Optisol GS 液, 保存结束取周边角膜行吖吩兰和茜素红联合染色, 计算角膜内皮细胞密度及角膜内皮细胞活性率, 比较两组数据, 保存 7d 和 14d 各取 2 片角膜进行扫描电镜检查。取 8 片角膜保存于中期保存液, 所保存角膜用于临床角膜移植, 对患者定期进行裂隙灯检查, 角膜内皮照相。**结果** 角膜中期保存液组平均保存时间 (8.39 ± 0.72) d, 角膜内皮细胞平均密度为 (2743.48 ± 366.54) 个/mm²; Optisol GS 液组平均保存时间 (7.58 ± 0.34) d, 角膜内皮细胞密度为 (2568.95 ± 245.47) /mm², 两组比较, 差异无统计学意义; 角膜中期保存液组的内皮细胞平均活性率 (96.65 ± 2.59) % 高于 Optisol GS 液组 (93.47 ± 3.81) %, 差异具有统计学意义。角膜中期保存液所保存角膜用于临床, 4 例病人术后随访 4d~11m, 角膜平均内皮细胞计数 (2285.75 ± 534.05) 个/mm²。**结论** 角膜中期保存液可活性保存人角膜片长达 2w, 其保存效果与 Optisol GS 液相似, 初步临床使用显示了较好的效果。

【关键词】 角膜; 角膜移植; 穿透性; 保存液; 中期

A report on investigation and clinical application of corneal storage media ZOU Wen-jin, LIU Zu-guo, LIANG Ling-yi, et al. Zhongshan ophthalmic center, state key laboratory of ophthalmology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; Institute of Ophthalmology, Xiamen University, Xiamen 361005 China

【Abstract】 Objective To develop a new intermediate term storage media suitable for Chinese eye banks. **Methods** Human corneal buttons were stored in the new storage medium and Optisol GS. After stored for a certain days, the endothelial cell density and the survival rate of the corneal endothelial cells were examined, ultra structural examinations were carried out for the buttons. Eight human corneas stored in the new storage medium for 3 days~14 days were used for corneal transplantation clinically. **Results** There was no significant difference between human corneal buttons stored in the new storage medium and that in the Optisol GS in endothelial cell density. The survival rate of the corneal endothelial cells stored in the new storage medium was superior than that stored in Optisol GS. The corneal buttons stored in the new storage medium and the corneal buttons stored in Optisol GS had similar ultra structure of the endothelial cell surface. Four grafts were transparent in 1 week after transplantation, and mean endothelial cell density was 2285.75 ± 534.05 /mm². **Conclusion** As a safe and efficient intermediate term storage medium, the new storage medium is appropriate for Chinese eye banks.

【Key words】 Cornea; Keratoplasty; Penetrating; Storage media; Mid-term

经过多年的发展, 我国的角膜移植手术已发展成熟, 并得到一定程度的普及, 但是眼库的发展却

相对滞后, 严重地阻碍和限制了角膜移植手术的开展^[1]。角膜中期活性保存技术是世界各国保存角膜活性的最主要方法^[2]。我国由于缺乏自主知识产权的角膜中期保存液, 现在供体角膜的保存方法主要还是使用传统的湿房保存, 其活性保存角膜的时间仅为 24 小时。虽然偶有角膜中期保存的研究报道, 至今我国仍未有公认的商品化的角膜中期保存液供临床使用。Optisol GS 液是目前各国最常使用的角膜中期保存液, 但是未获得在我国的使用权, 而且价格昂贵, 不利于在我国推广使用^[2]。为此, 我们研制了

基金项目: 国家“十五”科技攻关计划 (批准号: 2004BA-720A15); 国家自然科学基金群体创新项目资助 (No. 303210004); 国家自然科学基金资助项目 (No. 30572001)

作者单位: 510060 广州, 中山大学中山眼科中心, 中山大学眼科学国家重点实验室 (邹文进, 刘祖国, 梁凌毅, 王智崇, 陈龙山, 黄挺, 许传超, 许丽英, 陈家祺); 厦门大学眼科研究所及厦门眼科中心 (刘祖国)

通讯作者: 刘祖国, E-mail: zuguol@yahoo.com

一种配方简单、易于推广应用的角膜中期保存液并应用于临床, 现将其结果分析报告如下。

资料与方法

1. 角膜中期保存液的配制 以细胞培养基 M199 培养基 (美国 Hyclon 公司) 作为基础液, 加入 2.5% 硫酸软骨素 (美国 Sigma 公司)、1% 低分子右旋糖酐 (分子量 4×10^4 , 美国 Sigma 公司)、10% 特级胎牛血清 (中国医学科学院生物工程研究所)、1 mmol/L 非必需氨基酸 (美国 Hyclon 公司)、1 mmol/L 丙酮酸钠 (美国 Hyclon 公司)、0.1% 妥布霉素 (广州白云山明兴制药有限公司)、25 mmol/L HEPES (美国 Hyclon 公司), 调 pH 值为 7.2 ~ 7.4, 渗透压为 350 mOsm/L ~ 380 mOsm/L, 经 0.2 μ m 过滤除菌, 按每瓶 20 ml 分装, 封口, 并抽样行细菌培养、真菌培养证实无污染, 然后 4℃ 保存备用。

2. 苔盼兰和茜素红联合染色 本实验所用人角膜均由广东省眼库提供。取新鲜人角膜 27 只, 置于 20 ml 中期保存液中, 4℃ 保存 7d ~ 14d, 其中 8 只角膜保存后用于角膜移植术, 所剩余的周边角膜进行 0.25% 苔盼兰和 1% 茜素红联合染色, 计算内皮细胞密度及活性率; 其余 19 只为不适于临床使用的角膜, 保存后取周边 3 mm 角膜同前法计算角膜内皮细胞密度及内皮细胞活性率; 保存 7d、14d 角膜各取 2 只进行扫描电镜检查。收集临床经 Optisol GS 保存的部分穿透角膜移植术所余的周边角膜组织共 23 只, 作为对照组, 记录保存时间, 并计算角膜内皮细胞密度及内皮细胞活性率。

3. 保存角膜超微结构的观察: 取上述两种保存液保存 7d、14d 的角膜各 2 片, 依次进行固定、脱水、干燥及金属镀膜, 然后在 PHILIPS XL-30 型

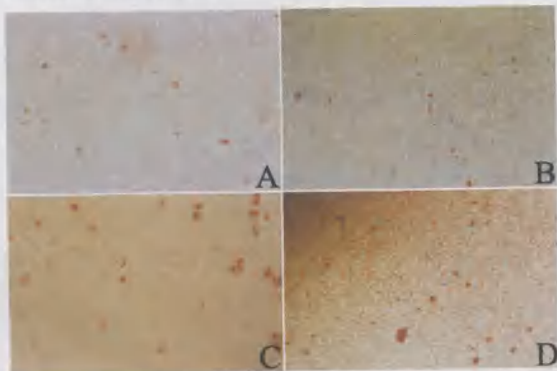


图 1 保存角膜的内皮细胞苔盼蓝和茜素红联合染色, A 角膜中期保存液保存 7d; B Optisol GS 液保存 7d; C 角膜中期保存液保存 14d; D Optisol GS 液保存 14d $\times 100$

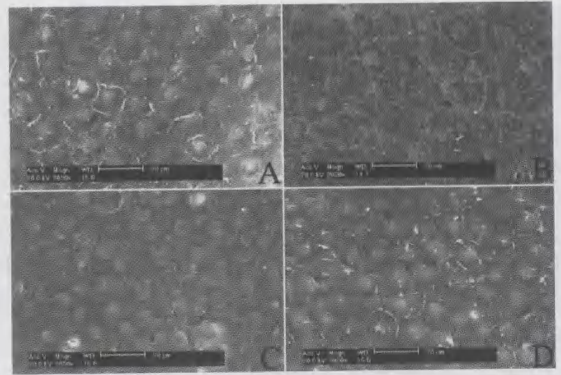


图 2 保存角膜的内皮细胞表面超微结构, A 角膜中期保存液保存 7d; B Optisol GS 液保存 7d; C 角膜中期保存液保存 14d; D Optisol GS 液保存 14d

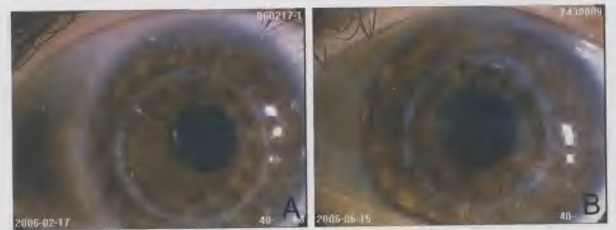


图 3 角膜中期保存液保存角膜行穿透性角膜移植术后, 角膜透明 A 术后 2 月; B 术后 11 月

扫描电镜下观察角膜内皮细胞的表面超微结构。

4. 临床应用: 由广东省眼库提供新鲜健康人角膜 8 只, 均为创伤死亡, 死亡后 6h 内摘除眼球, 12h 内进行角膜中期保存。保存角膜用于角膜移植, 6 例为感染性角膜溃疡穿孔, 2 例为角膜白斑。术时取周边角膜进行联合染色。术后病人定期门诊复诊, 进行裂隙灯检查, 使用日本 Topcon SP2000 型角膜内皮计观察角膜植片内皮细胞形态和密度。

5. 统计学处理方法: 采用 SPSS11.0 统计学软件包进行统计学处理, 角膜保存时间、角膜内皮细胞密度及角膜内皮细胞活性率均采用两个独立样本的 T 检验。

结 果

1. 保存角膜内皮细胞密度及活性率 角膜中期保存液保存角膜时间 1d ~ 14d, 平均 (8.39 ± 0.72) d; Optisol GS 液保存角膜时间 4d ~ 9d, 平均 (7.58 ± 0.34) d, 两组保存时间比较, $p > 0.05$, 差异无统计学意义。角膜中期保存液保存角膜内皮细胞平均密度 (2743.48 ± 366.54) 个/ mm^2 , Optisol GS 液保存角膜内皮细胞平均密度 (2568.95 ± 245.47) 个/ mm^2 , $p > 0.05$, 两组比较差异无统计学意义。角膜中期保存液保存角膜内皮细胞活性率为 90.8% ~ 99.5%, 平均 (96.65 ± 2.59) %; Optisol 液保存角

膜内皮细胞活性率为 82.5%~97%，平均 $(93.47 \pm 3.81)\%$ ， $p < 0.05$ ，两组比较差异具有统计学意义。

2. 扫描电镜检查：角膜中期保存液和 Optisol GS 液保存角膜的内皮细胞扫描电镜表现相似。保存 7d 的角膜内皮细胞保持完整的单层细胞结构，细胞大小一致，边界清楚，细胞间连接紧密，细胞表面可见微绒毛。保存 14d 角膜内皮细胞仍然保持完整的单层细胞结构，细胞间连接紧密，微绒毛减少，偶有散在几个细胞胞膜有破孔。

3. 临床应用结果：角膜中期保存液保存角膜 8 片，应用于临床角膜移植手术。病史较完整的有 4 例，4 例病人术后随访 4d~11m，角膜平均内皮细胞计数 (2285.75 ± 534.05) 个/mm²。例一，男，35 岁，左眼角膜白斑，行穿透性角膜移植术(植床 7mm)，角膜保存 5d，术中取供体角膜周边部分行 苳盼兰和茜素红联合染色，内皮细胞密度 2520 个/mm²，内皮细胞活性率 98.4%，术后 2w 角膜透明，角膜内皮细胞计数 2800 个/mm²，六角型细胞比例 53%；术后 11m 复诊，角膜保持透明，内皮细胞计数 2500 个/mm²，六角型细胞比例 59%。例二，男，24 岁，左眼角膜白斑，行穿透性角膜移植术(植床 7mm)，角膜保存 6d，术中取供体角膜周边部分行 苳盼兰和茜素红联合染色，角膜内皮细胞密度 2880 个/mm²，内皮细胞活性率 97.2%，术后 2 月复诊，角膜透明，内皮细胞密度 3005 个/mm²，六角型细胞比例 43%。例三，男，38 岁，左眼感染性角膜溃疡穿孔，行全角膜移植，角膜保存 14d，术后 10d 角膜轻微水肿，角膜厚度 0.581mm，内皮细胞密度 1634 个/mm²，术后 1m 复诊已发生角膜移植排斥反应。例 4，女，72 岁，右眼感染性角膜溃疡穿孔，行部分穿透性角膜移植术，角膜保存 3d，术中取供体角膜植片周边部分行 苳盼兰和茜素红联合染色，角膜内皮细胞密度 2100 个/mm²，内皮细胞活性率 95.2%，术后 4d 角膜轻度水肿，角膜厚度 0.692mm，内皮细胞密度 2184.7 个/mm²。

讨 论

目前角膜移植手术技术的不普及和落后的眼库建设工作是制约我国角膜移植复明手术开展的两个重要因素。长期以来，由于立法的滞后和封建思想的影响，我国捐献角膜的来源极少。我国所谓的眼库常常是有库无眼，远远不能满足角膜复明手术对供体角膜的需要。角膜移植手术技术的普及和眼库建设在全国各地很不均衡，有能力开展角膜移植的

单位往往得不到充足的角膜供体，而有些单位有机会拿到角膜供体却不具备开展角膜移植手术的条件。因此，将供体角膜保存起来，在单位间、地区间合理流动对于充分合理的利用珍贵的角膜供体资源具有非常重要的意义。

角膜活性保存^[3]主要有短期、中期、长期保存三种形式。短期保存采用全眼球的湿房保存法，只能保持角膜内皮活性达 24 小时，超过此保存期限的眼球将不适合用于穿透性角膜移植术。中期保存是将角膜片浸泡于角膜中期保存液内，4℃ 保存，可维持角膜内皮活性长达 14d。长期保存包括器官培养保存法和长期冷冻保存法。虽然长期保存法可以维持角膜内皮活性长达一月乃至数月之久，但这两种方法均需昂贵的仪器及很高维护费用，而且操作复杂，不适宜推广应用。因此，角膜中期保存法是目前最常用的角膜保存方法。此方法的代表是 Optisol GS 角膜中期保存液，是公认的最好的角膜中期保存液^[2]。其长达 14d 的保存期可容许眼库工作人员对供体角膜进行详细的检查，以排除恶性肿瘤、传染性疾病，从而为临床提供健康、优质的角膜片；还可方便临床医生工作，使其能够从容地组织病人，安排手术更为重要的是能够使角膜在不同地区间流动，合理配置资源。目前国内尚无公认的优质的角膜中期保存液，仍需依赖进口的 Optisol GS 液。Optisol GS 液配方复杂，价格昂贵，不适合在我国推广使用。因此，研制一种配方简单，价格便宜，适合中国国情的角膜中期保存液是当前眼科科研工作者的一项重要任务。

我们研制的角膜中期保存液成分简单，配制方便，成本价格远远低于 Optisol GS 液。M199 是中期保存液的基础培养基，其成分包含了细胞生长发育所需的大部分营养成分，可以满足保存期间角膜内皮细胞的营养需要。硫酸软骨素是一种高分子物质，其大分子基团带有负电荷，可与角膜内皮形成共价结合，从而在角膜内皮表面形成一个保护层。实验证明这一保护层对角膜内皮具有保护作用，可以显著地提高保存角膜内皮的活性。低分子右旋糖酐也是一种高分子化合物。溶液中的硫酸软骨素与低分子右旋糖酐一起产生胶体渗透压，使得保存角膜保持脱水状态，维持正常的角膜厚度，利于手术操作。特级胎牛血清含有丰富的营养成分及多种生长因子。血清中丰富的营养成分给角膜特别是内皮细胞生存提供近似于体内的环境。血清中含有多种生长因子和激素，可以提高内皮细胞的代谢，增进

内皮细胞的核酸合成,利于细胞分裂增殖。本研究使用的特级胎牛血清,无病原微生物,低内毒素,低补体,可以显著减少使用血清的不良反^[4,5]。我们利用所研制的角膜中期保存液保存人角膜平均(8.39 ± 0.72) d,保存后角膜内皮细胞平均密度为(2743.48 ± 366.54)个/mm²,与Optisol GS液比较无统计学差异;平均角膜内皮细胞活性率为(96.65 ± 2.59)%,高于Optisol GS液,考虑为我们采用的含血清保存液可能较Optisol GS液的无血清环境更适合角膜内皮细胞生存。试验结果充分说明了我们所研制的角膜中期保存液对保存人角膜具有良好的效果。

我们使用所研制的角膜中期保存液保存人角膜8片,进行角膜移植手术。资料较全的病人有4例,其角膜植片保存时间为3d至14d不等。4例病人除1例为全角膜移植外,其余3例均在术中取供体角膜周边部分行苔盼兰和茜素红联合染色,所有角膜供体内皮细胞密度均在2000个/mm²以上,角膜内皮细胞活性率均高达95%以上。术后1-2周复查角膜植片内皮细胞密度也均在2000个/mm²以上,与术中所查有较好的一致性。其中1名患者术后2月复查,角膜植片保持透明,角膜内皮细胞计数3005个/mm²;另一名患者术后11月复诊,角膜植片透明,角膜内皮细胞计数2500个/mm²。4例病人中角膜植片保存时间最常为14d,角膜植片用于全角膜移植术,术后10d角膜厚度0.583mm,角膜内皮细胞

密度为1643个/mm²。

综上所述,我们研制的角膜中期保存液经苔盼兰和茜素红联合染色及扫描电镜检查证实其保存角膜的效果与Optisol GS液相当。临床使用的角膜植片保存6d以内平均角膜内皮细胞密度为(2493.33 ± 390.04)个/mm²,角膜内皮细胞平均活性率为(96.93 ± 1.62)%,术后复诊时间长达2~11月,角膜植片透明,角膜内皮细胞计数均维持在2000个/mm²以上,证实远期效果理想。所用角膜的保存时间最长为14d,其术后角膜植片内皮细胞密度仍可达1643个/mm²,角膜仅轻微水肿,提示其保存期限达14d是可行的。我们研制的角膜中期保存液成分简单,配制方便,适合我国国情,值得进一步推广使用。

参 考 文 献

- 1 谢立信. 我国角膜手术的现状和发展策略. 中华眼科杂志, 2005, 41 (8): 702-704
- 2 董晓光, 谢立信, 张新晨, 史伟云, 李伟, 袁风波. 角膜中期保存液的研制和临床应用. 中华眼科杂志, 2000, 36 (1): 21-23
- 3 王传富, 李志杰, 王印其, 姚晓明. 角膜的保存方法. 见: 李辰, 李志杰, 姚晓明 主编: 眼库. 广州: 广东科技出版社. 1998年, 223-252
- 4 Lindstrom RL, Skelnik DL. US patent US5104787, Method for apparatus for a defined serumfree medical solution useful for corneal preservation. 1992
- 5 徐新来, 鄂征. 培养用液. 见: 鄂征 主编: 细胞培养技术. 北京: 人民卫生出版社. 1996年, 50-70

(收稿时间: 2006-09)

· 病例报告 ·

幼儿泪腺混合瘤一例

米尔沙力 古再丽

阿×男 3岁 以左眼眶缘发现肿物2月,伴眼痛1月为主诉来就医,以左眼眶肿物收入院。因患儿不合作,准确视力无法了解。左眼外上方眶内可触及约0.8cm × 0.8cm大小的肿物,其表面皮肤未见发红,质地较硬,表面光滑,活动度欠佳,有轻度触痛,边界尚清,眼睑活动及眼球活动未受限制。眼前节及后节未见异常。浅表淋巴结未触及。心肺(正常)。眼眶CT检查考虑为泪腺混合瘤,未见骨质破坏、泌尿便、血沉、心电图均为正常。在全麻下进行肿物摘除术。

术中发现肿物与周围组织粘连,表面较光滑,有完整包膜。肿物病检,确诊为泪腺混合瘤。术后常规抗炎治疗,1周后全愈出院,目前已观察10年未复发。

讨论 泪腺混合瘤是原发于眼眶中发病率最高的肿物,多数起源于眶部泪腺组织,良性居多,好发于40岁以上的成年人。幼儿发病非常少见。由于此瘤起病缓慢,早期无明显症状平均病程5年-6年。于幼儿发病且体积较大的实属少见。术中将肿物包膜完整切除,这就减少并发症和复发率。