

# 角膜保存方法现状及进展

陈丽<sup>1</sup>, 陆佳骏<sup>2</sup>, 盛敏杰<sup>1</sup>, 李冰<sup>1</sup>

基金项目:国家自然科学基金青年项目(No. 81400373)

作者单位:<sup>1</sup>(200090)中国上海市杨浦区中心医院 同济大学附属杨浦医院;<sup>2</sup>(200092)中国上海市,同济大学医学院

作者简介:陈丽,毕业于同济大学,硕士研究生,住院医师,研究方向:角膜病。

通讯作者:李冰,博士研究生,主治医师. bing-li-2007@163.com

收稿日期:2017-01-20 修回日期:2017-04-28

## Current status and progress of corneal preservation methods

Li Chen<sup>1</sup>, Jia-Jun Lu<sup>2</sup>, Min-Jie Sheng<sup>1</sup>, Bing Li<sup>1</sup>

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81400373)

<sup>1</sup>Yangpu Hospital, Tongji University, Shanghai 200090, China;

<sup>2</sup>Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Bing Li. Yangpu Hospital, Tongji University, Shanghai 200090, China. bing-li-2007@163.com

Received: 2017-01-20 Accepted: 2017-04-28

## Abstract

• Corneal endothelial cell (CEC) is the most critical part for the cornea, of which activity can influence the postoperative vision. It is very important for the clinical cornea preservation considering the function and its self-purification of donor cornea. There are a variety of classical methods, which can significantly prolong the saving time of donor cornea with its good quality of CEC. We reviewed the published papers about present preservation methods of cornea, which can give us many suggestions for the clinical cornea preservation.

• KEYWORDS: corneal endothelial cell; eye bank; moist chamber storage; organ culture storage

Citation: Chen L, Lu JJ, Sheng MJ, et al. Current status and progress of corneal preservation methods. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(6):1060-1062

## 摘要

角膜内皮细胞(corneal endothelial cell, CEC)是保证角膜正常生理功能的基础,角膜移植术后患者的视力恢复与角膜内皮细胞的活性有很大关系,保持供体角膜正常的自净状态和角膜内皮细胞的功能状态具有重要的临床意义。国内外目前有多种经典的角膜保存方法,明显延长了角膜保存的时间,提高了供体角膜的质量。本文将就供体角膜的保存方法的现状及其进展进行综述。

关键词:角膜内皮细胞;眼库;湿房保存;器官培养

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.6.12

引用:陈丽,陆佳骏,盛敏杰,等. 角膜保存方法现状及进展. 国际眼科杂志 2017;17(6):1060-1062

## 0 引言

捐赠者逝去后房水生成突然停止,导致养分和氧气供应至眼睛的时间变长,并在室温下逐渐耗尽,继而导致角膜细胞的自溶,造成角膜的初始损伤<sup>[1]</sup>。从捐赠者死亡到取出并存储供体期间,尸体基本暴露于室温,因此,要尽可能缩短这段时间,从而保证初始的供体角膜健康完整,内皮细胞功能良好。目前用于角膜移植的角膜保存技术有两个主要的目标:(1)维持内皮生存能力和完整性,有足够的活的角膜内皮细胞并保持粘附于后弹力层,从而保持内皮细胞的“液泵”功能完好;(2)延长角膜存储的安全时间,以便有效地利用供体角膜。国外角膜保存主要分为短期保存、中期保存、长期保存和超长期角膜保存。

## 1 短期保存

短期存储角膜供体材料数天,主要是指湿房保存。自20世纪30年代,由前苏联医生 Filotov 首先创立4℃湿房保存眼球,并沿用至今,也是发展中国家眼库保存角膜的基本技术。其保存时间较短,在24~48h之内,有研究表明<sup>[2]</sup>,湿房保存2d后内皮细胞的活性将下降50%。进行湿房保存时,整个供体眼睛经消毒处理后放置于无菌罐中,并置于4℃的湿润环境中。如果供体的死亡和眼球摘除之间的时间短于4~6h,供体眼睛一般可存放在湿房2d。当然,存储的时间越短,对角膜内皮细胞的影响就越小,接受角膜移植的患者术后恢复越好。此方法存储的是一个完整的眼球,自眼球取出后角膜内皮层就暴露于捐赠者死后的房水中,随着时间延长,房水中的少量养分消耗殆尽,同时产生许多有害代谢产物。

湿房保存是目前所有角膜存储技术中最简单、最便宜的,正因如此,更适合用于发展中国家。但国内多数地方缺乏眼库,或缺乏专业眼库管理人员,因此多数的眼科医生在取到供体后都是尽可能在最短的时间内,为患者进行手术。许多外地或偏远地区需要手术的角膜患者无法及时到达医院,从而角膜移植术也由择期手术变成了急诊手术。

## 2 中期保存

中期角膜保存主要是使用角膜保存液在4℃条件下保存角膜片达到4~14d的角膜保存方法。角膜保存时间的延长,为手术患者争取更多的时间,对医生来说,手术时间得以灵活调整,甚至满足了血液测试和角膜运输的时间。

2.1 M-K液 自1973年 McCarey 等<sup>[3]</sup>使用M-K液保存角膜,延长角膜的存储时间至96h,开创了角膜中期保存的先河,为角膜移植手术赢得了足够的时间。M-K液是组织培养基(Tc-199)和5%葡聚糖的混合物<sup>[4]</sup>。Tc-199是一种早期的细胞培养基,含有69种成分,所含营养物质

质繁多。将角膜片放置于此混合物中,并置于4℃环境下,避免了将角膜内皮直接暴露于大量毒性代谢产物的房水中<sup>[5]</sup>。葡聚糖作为胶体渗透剂,有效防止角膜片在液态培养基中发生基质过度肿胀<sup>[6]</sup>,从而保持角膜的透明度。

**2.2 中期保存液的成分** 随着保存技术的改进,角膜保存液的成分不断改变,保存的角膜内皮细胞的活性也逐渐提高。在M-K液的基础上,除了葡聚糖,许多其它添加剂,例如,HEPES[2-4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl ethanesulfonic acid,羟乙基哌嗪乙硫磺酸]缓冲液<sup>[1]</sup>、硫酸软骨素(chondroitin sulfate,ChS)、透明质酸钠、受体血清、青霉素、皮质类固醇、抗氧化剂以及生长因子、庆大霉素和多粘菌素抗生素的组合等被添加入角膜保存液中。ChS是构成角膜内皮细胞间质的主要成分之一,对维持细胞内环境的相对稳定性和正常功能有非常重要的作用。近年ChS被广泛用于眼科,尤其是眼外科手术、角膜保存、角膜损伤治疗、角膜病等方面<sup>[7]</sup>。20世纪60年代ChS开始用于保存角膜,由日本学者Mizukawa等<sup>[8]</sup>率先添加入角膜保存液。研究证实,角膜中期保存液含有ChS,对角膜内皮细胞有显著的保护作用<sup>[9]</sup>。ChS是渗透剂,同时由于它带有较多负电荷,并在CEC表面形成一层硫酸软骨素薄膜,可以清除组织中所产生的自由基<sup>[10]</sup>,保护细胞免受细胞毒素等物质的毒性作用,且由于ChS具有减缓机械拖拽的作用,故也可以减轻运输或处理过程中机械震动造成的物理损伤,长期保持CEC活性<sup>[11]</sup>,作为膜稳定剂和抗氧化剂<sup>[12]</sup>,它可以减轻内皮细胞的组织自溶<sup>[13]</sup>。透明质酸钠与ChS一样具有胶渗作用和角膜保护作用<sup>[14-15]</sup>,是眼组织的成分之一,存在于角膜、房水以及玻璃体中。在眼科手术中,其合剂具有高粘滞性以及良好的涂敷作用,较好地维持前房并保护CEC。自体血清在眼表角膜疾病中的使用已经体现出其对角膜良好的修复作用<sup>[16]</sup>,它含有大量活性因子:维生素A、细胞因子、微量元素和激素,具有抗氧化作用从而减少角膜内皮细胞的凋亡,应用于角膜中期保存,延长角膜内皮细胞存活时间<sup>[17]</sup>。我国的研究人员已经将人血清用于兔角膜的中期保存<sup>[18-19]</sup>,并取得良好的效果,30%浓度的人血清角膜保存液可保存兔角膜7~10d<sup>[19]</sup>。皮质类固醇最初是由Basu等<sup>[1]</sup>提出利用其减轻组织自溶性的特性用于角膜保存,继而减少保存过程中角膜的自溶作用。并且随后和他们的团队提出许多证据,确定了类固醇类物质对存储角膜的效果,明确表明含类固醇介质对于角膜保存是有利的。Hull等<sup>[20-21]</sup>也在角膜超微结构水平上证明了其用于角膜中期保存有利于增强角膜内皮细胞的活力。皮质类固醇成本较低,制备简便,已经从试验阶段进入临床应用阶段,成为某些角膜培养基的基础成分。

**2.3 中期角膜保存液的发展** K-液、GSM液是改良的角膜保存液,即在M-K液中加入一定浓度的硫酸软骨素,从而能减轻角膜保存过程中出现的肿胀状态。Dexsol角膜保存液是一种在GSM保存液中加入低分子右旋糖酐而产生的保存液,由于同时含有硫酸软骨素和右旋糖酐,更加强了对角膜的“去肿胀作用,保持供体角膜片处于无水腫、半透明状态”<sup>[22]</sup>。Optisol角膜中期保存液自20世纪90年代初由Lindstrom等<sup>[23]</sup>提出后,已成为美国眼库最为常用的角膜活性保存液,其主要是K-液和Dexsol液

的混合物,含有葡聚糖,2.5%硫酸软骨素、维生素、三磷酸腺苷前体(腺苷、肌苷和腺嘌呤)等。Optisol保存液不仅延长角膜安全保存时间至2wk以上,还保证了良好的角膜保存效果:角膜的厚度稳定,内皮细胞保持单层结构,极少有异常形态改变。国内相关研究表明<sup>[24]</sup>,山东省眼科研究所研制的DX液,以细胞培养基为基础液,添加了皮质类固醇,去除了多种维生素及上皮细胞生长因子等复杂成分,降低了角膜保存过程中的代谢,减少增殖,同时皮质类固醇可稳定各种生物膜,增强了细胞对外界毒素的抵御力,其保存1wk内的角膜内皮细胞形态与Optisol保存的角膜内皮细胞形态及功能无明显差异,是比较理想的价格低廉且适合国内国情的角膜保存液。

### 3 长期保存

角膜的长期保存主要是指角膜的器官培养法(organ culture storage)。1973年Sumerlin等<sup>[25]</sup>提出并应用器官培养技术保存角膜片,可以较好地保存内皮细胞活性。目前,器官培养法已经成为欧洲眼库最常用的角膜保存法,主要是模拟人正常的角膜存在环境,在30℃~37℃环境下使用培养液进行培养,并定时换液,继而达到保持角膜活性的目的。角膜器官培养法将保存时间延长5wk左右,角膜透明度和内皮细胞功能仍能保持良好。角膜的基质层主要由I型、IV型胶原纤维构成,厚约500μm,占整个角膜厚度的90%。Smith等<sup>[26]</sup>培养角膜基质金属蛋白酶的一项研究表明,角膜含有活性金属蛋白酶,其活性随培养时间而增强,能导致角膜基质的I型胶原断裂和角膜上皮基底膜损伤,认为角膜器官培养时间不应超过4wk。角膜Langerhans细胞(LCS)具有很强的抗原递呈功能,与免疫排斥反应的发生密切相关。用器官培养方法保存角膜可以减少LCS,并同时减少捐献角膜的HLA-DR抗原但不影响HLA-A,-B,-C抗原<sup>[27]</sup>,使得移植后排斥率大大降低<sup>[28]</sup>。但是器官培养保存角膜对设备及检测要求较高,操作复杂、易发生感染,且费用较高,因此在我国现阶段环境下较难推广。

### 4 超长期角膜保存

角膜的超长期保存主要包括甘油保存角膜法和深低温保存法。

**4.1 甘油保存法** 该方法是将整个眼球浸泡于甘油中,再冰冻保存的一种方法,将保存时间延长至数月甚至数年。但由于脱水作用,这种无活性的角膜保存方法保存的角膜一般仅用于做板层移植或角膜溃疡穿孔和破裂伤时短时间无法获得新鲜角膜材料的急诊角膜修补术,较少用于穿透移植术。此法保存的角膜是我国急诊角膜手术时常用的角膜来源,为许多患者免除了眼球摘除之苦。且由于保存方法操作简单易行,价格便宜,在我国许多基层医院仍为实用性较强的保存方法。

**4.2 深低温保存法** 1954年,Eastcott等<sup>[29]</sup>第一次用15%甘油预处理后,进行冷冻保存全层角膜。此方法一般是将角膜在冷冻剂保护下,降低温度到-80℃,再贮存于-196℃液氮中,使角膜内皮细胞处于“休眠状态”,使用时进行适当的复温处理,恢复角膜活性。此法可完全抑制细胞的代谢,免除了因代谢产物积聚所带来的毒性作用,也避免了器官培养过程中必须进行换液以维持代谢所需,此外,深低温保存时,亦会抑制微生物的繁殖,使角膜免遭微生物侵犯而受污染。目前的角膜冷冻保护

剂中常含有的成分有二甲亚砜(DMSO)、丙二醇、ChS、蔗糖等。DMSO是较稳定的保护剂,可保持角膜细胞的完整性<sup>[30]</sup>,而蔗糖分子在角膜保护中起到缓冲剂的作用,ChS能改善深低温保存的角膜内皮细胞活性<sup>[31-32]</sup>。超低温保存法克服了许多其它角膜保存方法的弊端,使角膜保存时间明显延长,也减少了污染,避免了自身代谢物质的毒性作用。但是该方法保存的设备昂贵,过程复杂,技术要求较高,而且复温时易造成CEC损伤。在中国一般患者难以负担,医院也难以开展。但尽管如此,随着冷冻保护剂的开发和利用,在未来的中国医疗环境中,超低温保存角膜有广阔的发展前景。

## 5 小结

随着角膜保存技术的发展,在保存时间和保持角膜活性方面不断进行突破,以上角膜保存方法均在不同程度上延长了角膜保存时间,是目前国际上常用的保存方法,各有优缺点。鉴于我国的国情,湿房保存是目前我国最常使用的角膜保存方法,此保存方法简单易学,所需保存要求较低,易于推广,但保存时间短,许多偏远地区患者无法及时接受治疗;角膜中期保存是美国眼库最常用的角膜保存方法,可明显延长角膜保存时间并保持良好的角膜活性,是比较理想的角膜保存方法,目前国内无药监局规定的商品角膜保存液,且国外进口的角膜保存液价格偏高,难以在基层医院进行推广。器官培养和超低温保存法可将角膜内皮细胞活性保存数周甚至数年,解决了角膜保存时间和角膜内皮细胞活性变差的难题,但设备复杂,价格昂贵,并且不易运输,技术支持困难,且器官培养法易污染,不符和我国现阶段国情。

内皮细胞的功能状态和角膜透明状态在角膜保存的发展过程中一直具有重要的评价意义。随着研究者对角膜内皮细胞功能和特性的认识逐渐深入,也会使我们不断尝试并发现更有利于角膜保存的方法和介质,从而找到操作简单、价格合理、减少角膜的抗原性、保持角膜免受微生物污染的保存技术;找到真正实现角膜的长期有效地保持活性,并且适合我国现阶段眼库和医疗情况的角膜保存方法。

## 参考文献

- 1 Basu PK, Hasany S. Autolysis of the cornea of stored human donor eyes. *Can J Ophthalmol* 1974;9(2):229-235
- 2 Means TL, Geroski DH, Hadley A, et al. Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Arch Ophthalmol* 1995;113(6):805-809
- 3 McCarey BE, Kaufman HE. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 1974;13(3):165-173
- 4 Morgan JF, Morton HJ, Parker RC. Nutrition of animal cells in tissue culture initial studies on a synthetic medium. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950;73(1):1-8
- 5 Bito LZ, Salvador EV. Intraocular fluid dynamics. II. Postmortem changes in solute concentrations. *Exp Eye Res* 1970;10(2):273-287
- 6 Slack JW, Kangas TA, Edelhauser HF, et al. Comparison of corneal preservation media for corneal hydration and stromal proteoglycan loss. *Cornea* 1992;11(3):204-210
- 7 潘福军, 杨幼萍. 黏弹剂在眼外伤手术中的应用. *眼科研究* 2003;21(1):42
- 8 Mizukawa T, Manabe R. Recent advances in keratoplasty, with special reference to the advantages of liquid preservation. *Nihon Ganka Kyo* 1968;19(12):1310-1318
- 9 Stein RM, Bourne WM, Campbell RJ. Chondroitin sulfate for corneal preservation at 4 degrees C. Evaluation by electron microscopy. *Arch*

- Ophthalmol* 1986;104(9):1358-1361
- 10 Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, et al. Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* 1992;114(3):345-356
- 11 Belda JI, Artola A, Garcia-Manzanares MD, et al. Hyaluronic acid combined with mannitol to improve protection against free-radical endothelial damage: experimental model. *J Cataract Refract Surg* 2005;31(6):1213-1218
- 12 Koh SW, Waschek J. Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(13):4085-4092
- 13 Engelmann K, Sobattka Ventura A, Drexler D, et al. A sensitive method for testing the quality of organ culture media and of individual medium components in a cornea bank. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236(4):312-319
- 14 Walkenbach RJ, Boney F, Ye GS. The effects of UW solution and its components on corneal thickness during and after storage. *Curr Eye Res* 1991;10(12):1129-1136
- 15 Ogino H, Yukari K, Terada H, et al. Effect of a newly developed corneal storage medium on corneal endothelium-morphological study by scanning electron microscopy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1995;99(4):387-391
- 16 Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71(6):47-54
- 17 Serbecic N, Beutelspacher SC. Anti-oxidative vitamins prevent lipid-peroxidation and apoptosis in corneal endothelial cells. *Cell Tissue Res* 2005;320(3):465-475
- 18 杨玉洁, 高斌, 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. *国际眼科杂志* 2009;9(4):684-687
- 19 杨扬, 周善璧, 陈小雄, 等. 自制人血清中期角膜保存液对兔角膜的保存效果. *第三军医大学学报* 2011;6(33):586-590
- 20 Hull DS, Green K, Bowman K, et al. Corneal endothelial cell function after storage in MK medium and hydrocortisone. *Can J Ophthalmol* 1979;14(2):114-116
- 21 Hull DS, Green K, Buyer J. Cornea endothelial bicarbonate fluxes following storage in moist chamber, MK medium, and MK medium with added hydrocortisone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18(5):484-489
- 22 Wagoner MD, Gonnahel S. Corneal graft survival after prolonged storage in Optisol-GS. *Cornea* 2005;24(8):976-979
- 23 Lindstrom RL, Kaufman HE, Skelnik DL, et al. Optisol corneal storage medium. *Am J Ophthalmol* 1992;114(3):345-356
- 24 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. *中华眼科杂志* 2000;36(1):21-23
- 25 Summerlin WT, Miller GE, Harris JE, et al. The organ-cultured cornea: an *in vitro* study. *Invest Ophthalmol* 1973;12(3):176-180
- 26 Smith VA, El-Rakhawy A, Easty DL. Matrix metalloproteinase 2 activation in cultured corneas. *Ophthalmic Res* 2001;3(1):1-6
- 27 Pels E, van der Gaag R. HLA-A, B, C, and HLA-DR antigens and dendritic cells in fresh and organ culture preserved corneas. *Cornea* 1984;3(4):231-239
- 28 Sano Y, Ksander BR, Streilein JW. Langerhans cells, orthotopic corneal allografts, and direct and indirect pathways of T-cell allorecognition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(6):1422-1431
- 29 Eastcott HH, Cross AG, Leigh AG, et al. Preservation of corneal grafts by freezing. *Lancet* 1954;266(6805):237-239
- 30 Borderie VM, Lopez M, Lombet A, et al. Cryopreservation and culture of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(8):1511-1519
- 31 Hagenah M, Bohnke M. Latent endothelial cell damage after experimental corneal cryopreservation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231(9):529-532
- 32 黄挺, 陈家祺, 郑湖玲. 硫酸软骨素在深低温角膜保存中对内皮细胞的保护作用. *中国实用眼科杂志* 1998;16(2):95-98