

羟乙基淀粉 130/0.4 对器官培养法保存兔角膜的脱水作用

魏捷, 蒋华

作者单位: (250031) 中国山东省济南市, 济南军区总医院眼科
作者简介: 魏捷, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 角膜供体保存及角膜移植排斥反应。
通讯作者: 蒋华, 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病. jianghua108@126.com
收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2013-12-16

Dehydration of hydroxyethyl starch 130/0.4 on organ-cultured rabbit corneas

Jie Wei, Hua Jiang

Department of Ophthalmology, Jinan Military Command General Hospital, Jinan 250031, Shandong Province, China

Correspondence to: Hua Jiang. Department of Ophthalmology, Jinan Military Command General Hospital, Jinan 250031, Shandong Province, China. jianghua108@126.com

Received: 2013-10-08 Accepted: 2013-12-16

Abstract

• **AIM:** To investigate the feasibility to use a new dilation agent, hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4, as a new deswelling additive in cornea organ-culture.

• **METHODS:** A half of 20 pairs of rabbit corneas just were cultured in ACF medium with a supplement of 10% HES 130/0.4 for 28d as the experimental group. The control was cultured in ACF for 28d and then dehydrated in 5% dextran T500 for 48h. The evaluation parameters included the endothelial cells viability, the mean corneal central thickness before and after preservation, the mean water content after storage, the corneal transparency and folding, F-actin expression of corneal endothelium using Western blotting, and the electron microscopy observation of corneal endothelial cells.

• **RESULTS:** After storage, the mean endothelial cell density of the HES 130/0.4 experimental group was $2371 \pm 159/\text{mm}^2$. The experimental group also exhibited a thinner corneal thickness, better transparency and less folding compared with the control. After additional dehydration, the control became thin and transparent, however, its final endothelial cell density decreased greatly to $2138 \pm 182/\text{mm}^2$. F-actin could be seen in corneal endothelium of two groups using Western blotting, whose expression level achieved higher in the experiment group. The ultrastructure of endothelial cells of the experiment group remained good compared with normal cornea.

• **CONCLUSION:** HES 130/0.4 has low toxicity, and is well tolerated for endothelial cells and can be used as a continuous supplement during organ culture. It also

avoids excessive cornea swelling, simplifies the storage steps, reduces infection risk, and appears to be an alternative deswelling additive in cornea organ-culture.

• **KEYWORDS:** corneal endothelial cells; organ culture; hydroxyethyl starch; dehydration

Citation: Wei J, Jiang H. Dehydration of hydroxyethyl starch 130/0.4 on organ-cultured rabbit corneas. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(1):13-16

摘要

目的: 研究羟乙基淀粉的最新剂型 HES 130/0.4 对器官培养保存角膜的持续脱水效果。

方法: 20 对配对兔角膜, 一半于含 10% HES 130/0.4 的 ACF 培养液中保存 28d 作为实验组, 不再单独脱水; 另一半于 ACF 培养液中保存 28d 后再葡聚糖 T500 脱水 48h 作为对照组。内皮细胞活性和植片质量评估指标包括: 内皮细胞计数、角膜厚度和含水量、角膜透明度和后弹力层皱褶程度、内皮层中肌动蛋白微丝 (filament actin, F-actin) 的表达, 及透射电镜下内皮细胞超微结构的变化。

结果: 保存结束时, 实验组植片明显较薄, 角膜透明度和皱褶程度也优于对照组, 内皮细胞密度为 $2371 \pm 159/\text{mm}^2$ 。对照组继续脱水后, 角膜厚度、含水量和透明度与实验组间差别变小, 内皮细胞密度却降至 $2138 \pm 182/\text{mm}^2$ 。免疫印迹法证实 F-actin 在两组内皮层都有表达, 实验组的 F-actin 表达水平更高。电镜下实验组的细胞超微结构改变较小。

结论: HES 130/0.4 的细胞毒性小, 可成为器官保存液中的持续添加组分, 不仅避免角膜过度水肿, 还简化了保存程序, 减轻了感染风险, 有望成为新型角膜脱水剂。

关键词: 角膜内皮细胞; 器官培养法; 羟乙基淀粉; 脱水

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.01.04

引用: 魏捷, 蒋华. 羟乙基淀粉 130/0.4 对器官培养法保存兔角膜的脱水作用. 国际眼科杂志 2014;14(1):13-16

0 引言

器官培养法是目前国际上应用最广泛的角膜长期保存法, 长达 4wk 的保存期不仅利于合理配置角膜资源, 还能降低角膜的抗原性, 减少移植排斥反应的发生率^[1]。保存时常添加一定浓度的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 以满足角膜内皮细胞 (corneal endothelial cells, CEC) 生存所需。但为克服 FBS 的不稳定性和潜在生物危害性, 无血清培养方式成为器官培养法保存角膜内皮活性发展过程中的必然趋势^[2,3]。我们的前期研究也已证实, 新型无动物成分培养基 (animal compound free medium, ACF) 可以用于无血清器官培养法保存角膜, 其营养丰富, 对 CEC 的保护作用明显超越传统 MEM 基础培养基, 而且成分明

确,便于进行对比研究,还可以排除病原体传染风险,在无血清器官培养保存角膜内皮细胞活性方面极具发展潜力^[4,5]。但器官培养保存过程中伴随的角膜基质过度水肿可以加重 CEC 损伤,并使手术缝合极为困难^[6],所以,移植前需常规将角膜移至含 5% 葡聚糖 T500 的培养液中脱水 48h。不过近来研究发现该过程可引发 CEC 数量明显下降,密闭保存环境的打破也增加了植片感染风险。因此,有必要寻找更理想的脱水剂和更简化的脱水方式。本实验拟将人工胶体羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch, HES)的最新剂型 HES 130/0.4 自培养之初就加入到无血清 ACF 培养液中,探讨它对角膜片的脱水效果。

1 材料和方法

1.1 材料

健康成年新西兰大白兔 20 只(山东大学动物实验中心提供,SPF 级),体质量 2.0~2.5kg,雌雄不限,空气栓塞法处死,摘除双侧眼球。将所得角膜按配对方式随机分为 2 组,每组 20 只,各选 6 只用于测量角膜含水量,剩余 14 只用于保存。实验组:角膜保存于 80mL 含 10% HES 130/0.4 的 ACF 培养液中 28d。对照组:角膜于 80mL ACF 中保存 28d,再移至含 5% 葡聚糖 T-500 的 20mL 培养液中脱水 48h。ACF 培养基(美国 Sciencell 公司),葡聚糖 T-500(美国 Pharmacia 公司),HES130/0.4 原料药(青岛首和金海制药有限公司),小鼠单克隆抗 F-actin (filament actin,肌动蛋白微丝)抗体(abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 角膜器官培养保存方法

在超净工作台上按眼库无菌化程序处理兔眼球:首先生理盐水充分冲洗,再依序浸泡于 0.5% 碘伏溶液和含 500U/mL 庆大霉素的乳酸林格氏液中,时间分别为 3min 和 20min。剪下带约 1~2mm 巩膜的完整角膜,5-0 丝线缝合角巩膜缘 1 针后悬吊于保存液中,缝线另一端固定于橡胶瓶塞,旋紧瓶口并密封,置于 31℃ 恒温箱中保存 28d。保存期间不换液。

1.2.2 角膜保存效果的评价方法

1.2.2.1 保存前后 CEC 计数

分别在两组角膜保存 0, 28d 和对照组脱水 2d 后进行检测。保存前各组角膜的内皮细胞密度(endothelial cells density, ECD)使用角膜内皮细胞计检测;保存 28d 的对照组角膜则移至无菌培养皿中生理盐水浸泡 4min,暂时扩大细胞间隙,倒置显微镜下行 CEC 计数^[6]。保存结束后,两组角膜内皮面滴 0.25% 台盼蓝染色 1min,生理盐水缓慢漂洗,再滴 1% 茜素红染色 2min,生理盐水漂洗后光学显微镜下行 CEC 计数。

1.2.2.2 角膜厚度测量

保存前,使用角膜内皮细胞计直接测定角膜中央区厚度。保存结束后,将角膜置于光学显微镜下,从调焦旋钮行程刻度读出中央区厚度,每只测量 3 次,取均值^[1]。

1.2.2.3 角膜含水量测定

采用干湿比重法^[7]。在保存前、后每组各取 6 只角膜,剪除巩膜组织,蘸干表面水分,电子分析天平上称取角膜湿重,再于 110℃ 干燥箱中烘干 1h,称取角膜干重。角膜含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.2.4 角膜透明度和后弹力层皱褶程度评价

参考 Zhao 等^[8]的分级法,将角膜置于无菌载玻片或平皿上,下面垫一绘有黑色线条的硬纸片,观察线条的清晰度和变形程度。透明度分级:所有线条清晰可见为“良好”,有 2 条或 2 条以上线条模糊不清为“一般”。后弹力层皱褶分

级:所有线条清晰或仅轻度变形为“轻微”,所有线条明显变形甚至走行中断为“明显”。

1.2.2.5 免疫印迹法半定量检测内皮层中 F-actin 蛋白的表达

每组取 6 只保存后兔角膜,撕下全部后弹力层,立即置于 200μL 细胞裂解缓冲液中,组织粉碎,匀浆,冰浴 30min。4℃ 15000r/min 离心 10min,取上清液检测蛋白浓度。各样本统一稀释为 5μg/μL, -70℃ 冰箱保存。取 10μL 样本及 5μL 的预染 Marker,加入上样缓冲液;混合后 100℃ 煮沸蛋白变性 5min,分别经 10% 和 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离 1h 或 2h。电转 30min,取出硝酸纤维素膜,染色 1min,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1h,洗膜 3 次,每次 10min。加入 1:200 稀释的一抗,以 1:500 稀释的 β-tubulin 为内参,4℃ 孵育过夜。漂洗 3 次后加入 1:500 稀释的二抗(山羊抗小鼠 IgG),室温孵育 1h。放射自显影法检测 F-actin 和 β-tubulin 蛋白条带。采用 Adobe Photoshop 软件定量测量平均光密度(OD)值。

1.2.2.6 透射电镜标本制作

两组各取 1 只角膜,4℃ 下 2.5% 戊二醛前固定 1h,切割成 1mm×1mm×1mm 小块,1% 四氧化锇后固定 1h,不同浓度乙醇系列脱水, Epon812 包埋,固化,超薄切片机切片约 50nm,醋酸铀、硝酸铅双重染色,透射电镜观察拍照。同时送检一正常角膜。

统计学分析:采用 SPSS 15.0 统计分析软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布者行配对 *t* 检验,不符合正态分布者行 Wilcoxon 非参秩和检验。角膜透明度和皱褶评分采用 χ^2 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 保存前后 CEC 计数

保存前两组兔角膜 ECD 值差异无统计学意义。培养保存 28d 后,实验组与对照组角膜 ECD 值分别降至 2371±159 个/mm² 和 2427±167 个/mm²,比较组间差异无统计学意义(*t* = -1.157, *P* = 0.268)。计算 28d 内日均 CEC 丢失率[(保存后 ECD-保存前 ECD)/保存前 ECD×100%÷28]衡量 CEC 损失程度,发现实验组结果略高,但两组比较差异无统计学意义(*t* = 1.320, *P* = 0.210)。对照组葡聚糖中脱水 2d,日均 CEC 丢失率上升为 10.42%±3.12%,ECD 值降至 2138±182 个/mm²,细胞死亡率为 3.42%±0.67%,与实验组保存结束时比较有显著性差异(*t* = 4.896, -6.159, *P* = 0.000, 表 1)。

2.2 角膜厚度和含水量变化

保存 4wk 后,对照组角膜厚度增至保存前的 3~4 倍,经葡聚糖脱水后明显变薄,但仍明显厚于保存前(*t* = -30.127, *P* = 0.000)。实验组角膜在保存期间水肿程度轻,发展速度慢,至保存结束厚度维持在保存前 2 倍以内,与保存前厚度比较差异有统计学意义(*t* = -21.457, *P* = 0.000),但薄于脱水后对照组植片厚度(*t* = 29.662, *P* = 0.000)。保存结束后,实验组平均角膜含水量由 83.92% 增至 87.85%,对照组增幅则由保存前 84.07% 增至葡聚糖脱水后的 89.25%,两者比较差异有统计学意义(*t* = -18.844, *P* = 0.000, 表 2)。

2.3 保存后角膜透明度和后弹力层皱褶程度比较

实验组角膜水肿轻,后弹力层皱褶细小,因此透明度良好,线条清晰,变形程度轻。对照组角膜则因基质过度水肿,透明度降低,线条多模糊不清,变形明显甚至走行中断。进一步葡聚糖脱水后,角膜透明度明显改善,后弹力层皱褶减少,与实验组比较差异无统计学意义(表 3)。

表1 保存前后两组兔角膜内皮细胞密度

($\bar{x} \pm s$, \uparrow/mm^2 , $n=14$)

分组	0d	28d	脱水 2d 后	日均丢失 (%)		死亡 (%)
				28d	脱水 2d 后	
实验组	2807±145	2371±159 ^a	-	0.91±0.28 ^b	-	2.16±0.50 ^a
对照组	2768±177	2427±167	2138±182	0.74±0.35	10.42±3.12	3.42±0.67

^a $P<0.05$ vs 对照组脱水 2d; ^b $P<0.01$ vs 对照组保存 28d。

表2 保存前后兔角膜中央厚度和含水量比较

($\bar{x} \pm s$, μm)

检测时间	植片中央厚度 ($n=14$)		角膜含水量 (%) ($n=6$)	
	实验组	对照组	实验组	对照组
0d	376.6±32.3	384.7±39.6	83.92±2.86	84.07±3.25
28d	638.8±69.5 ^{b,d}	1338.8±119.1 ^b	87.85±3.02 ^d	-
脱水 2d	-	736.8±59.2 ^b	-	89.52±2.88

^b $P<0.01$ vs 各组保存前; ^d $P<0.01$ vs 对照组脱水 2d。

表3 兔角膜保存后透明度和后弹力层皱褶 ($\bar{x} \pm s$, $n=14$)

分组	透明度(良好/一般)	皱褶(轻微/明显)
实验组	12/2	11/3
对照组脱水 2d	11/3	10/4
P	0.628	0.668

2.4 免疫印迹法检测 F-actin 蛋白在保存后角膜内皮层中的表达 结果显示两组兔角膜内皮层中均检测到 F-actin 蛋白的表达,分子量为 45kDa,与目的蛋白大小一致(图 1)。经 ECL 系统分析,实验组和对照组中 F-actin 蛋白与内参 β -tubulin 比值的平均值分别为 0.4835±0.0236 和 0.3262±0.0316,实验组 F-actin 蛋白的表达水平高于对照组($t=9.776$, $P=0.000$),与两组角膜 ECD 值结果趋势一致。

2.5 透射电镜下 CEC 的超微结构变化 保存结束后,实验组和对照组 CEC 的超微结构均保存较好(图 2)。与正常角膜相比,两组的细胞核有轻度变形,胞质中残留一些大小不等的空泡,细胞核和细胞质的电子密度尚正常。各种细胞器清晰易于辨认,线粒体数量众多,结构基本正常,实验组中细胞器种类更为多样,可见到粗面内质网和高尔基体。实验组的细胞间连接基本正常,对照组则部分明显增宽。

3 讨论

长期以来,眼库工作者一直采用 5% 葡聚糖 T500 中短期脱水的方式来解决器官培养法保存后角膜的过度水肿问题,普遍认为这样可以充分避免葡聚糖的细胞毒性作用,不会影响 CEC 活性^[9,10]。但近来这种观点开始受到质疑,如 Borderie 等^[11]报道,角膜用此方法脱水 1~4d 后 CEC 损失率平均高达 8.4%。而 Thuret 等^[6]的研究表明,人角膜在 5% 葡聚糖 T500 中脱水 48h 后,CEC 损失率甚至达到了 15% 左右,远超过保存期间低于 1% 的日均水平。因此,有必要寻找更加理想的角膜脱水剂,最大限度减少植片 CEC 的丢失。

HES 是 20 世纪 70 年代面世的一类新型人造胶体,主要由高分子质量的支链淀粉组成。HES 溶液的扩容强度和维持时间,决定于其浓度和相对分子质量(使其具有要求的流变性质),以及克分子取代程度和取代方式(防止其受到淀粉酶的快速分解)。平均分子质量越大,取代程度越高,C2/C6 比率越大,扩容强度就越高。HES 130/0.4

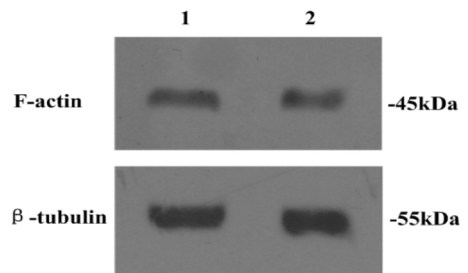


图1 免疫印迹法检测器官培养后兔角膜内皮层中 F-actin 蛋白的表达 ($n=6$) 1:实验组;2:对照组脱水 2d 后。

作为最新的第三代中分子量 HES 类产品,扩容效力更持久,全身应用安全性高,最大程度满足了临床“理想胶体溶液”的需求,在德国等欧洲国家广泛应用,我国已于 2004-04 批准进口该药(商品名万汶, VOLUVEN)^[12-14]。

ECD 是眼库工作中评价角膜保存效果最重要的定量指标。本实验结果显示,添加 10% HES 130/0.4 4wk 后,实验组兔角膜 ECD 略低于对照组。但对对照组进一步经 5% 葡聚糖 T500 脱水 2d 后,ECD 值明显降低,CEC 日均损失率由 0.74% 大幅升至 5.2%,与实验组比较有显著性差异。这证明 CEC 对 HES 的耐受度优于葡聚糖,HES 的长期添加没有增加 CEC 的丢失程度。Reim 等^[15]和 Redbrake 等^[16]多位学者尝试将不同分子质量的 HES 应用到角膜的器官培养保存研究中,证实 HES 的细胞毒性并不明显,作用比葡聚糖更加温和。本实验同时显示,保存结束后,实验组角膜平均厚度为 630.8 μm ,对照组则达到了 736.8 μm ,但两组在透明度和后弹力层皱褶程度两项与成像质量分级相关的指标上得分区别并不大。由此可见,持续添加 10% HES 130/0.4 并未彻底避免角膜基质发生水肿,但 HES 的确显著延缓了基质水肿的发展速度。

细胞骨架的完整性和细胞间连接的紧密程度也影响到 CEC 屏障作用的有效发挥。细胞骨架有微丝(filament)、微管和中间丝三种结构,以微丝所起作用最为重要,而微丝主要由肌动蛋白(actin)组成,所以 F-actin 对维持细胞骨架的完整性极为重要^[17,18]。同时,F-actin 还通过密集斑片状方式在侧膜间与 ZO-1、occludin 等重要的细胞连接蛋白相互联系,而侧膜间被认为代表着特殊的内部连接位点,该位点是跨膜连接渗透的屏障所在之处。

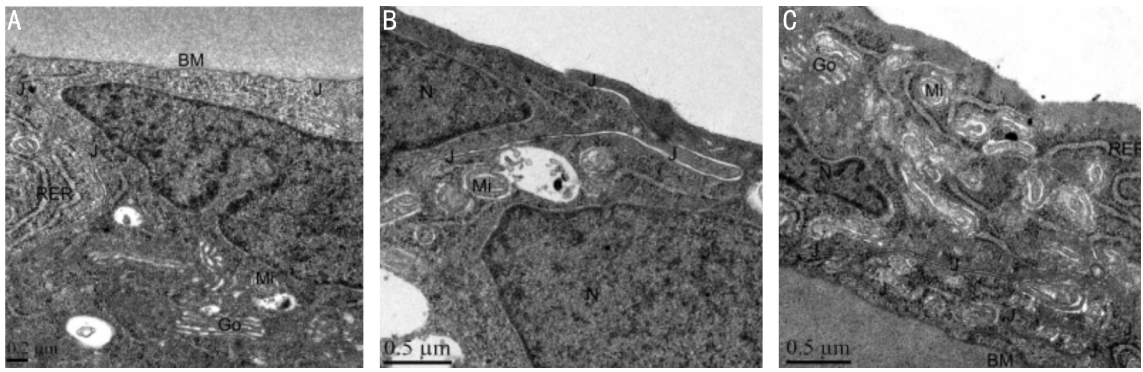


图2 透射电镜下角膜内皮细胞超微结构变化 A:实验组($\times 25000$);B:对照组脱水后($\times 36000$);C:正常角膜($\times 36000$)。注:N:细胞核;J:细胞间连接;Mi:线粒体;Go:高尔基体;BM:基底膜;RER:粗面内质网。

大量实验已证实,F-actin 蛋白在角膜内皮层的表达强度与 CEC 状态密切相关,对于维持 CEC 细胞骨架完整性和屏障功能都发挥着重要的调控作用^[19-21]。所以本实验引入 F-actin 指标来协助衡量保存后的内皮细胞层质量。免疫印迹法(WB)半定量检测清晰显示实验组 F-actin 的表达强度明显高于对照组脱水后水平,说明 HES 130/0.4 对内皮细胞间紧密连接的屏障功能破坏很小,从另一侧面证明了 HES 130/0.4 良好的细胞耐受性。透射电镜观察证实实验组 CEC 的超微结构要好于对照组,细胞器种类丰富,数量众多,细胞间连接基本正常,与 WB 结果趋势一致。

综上所述,HES 130/0.4 作为一种最新合成的人工胶体,细胞毒性小于葡聚糖 T500,可以作为角膜器官保存液中的持续添加组分,有效避免角膜发生过度水肿,同时简化了保存步骤,减轻了植片感染风险,有潜力成为角膜器官培养保存法中的新型脱水剂。

参考文献

- 1 刘涛,潘志强,王立,等. 兔角膜器官培养保存与应用的研究. 中华眼科杂志 2006;42(9):808-813
- 2 Bednarz J, Doubilei V, Wollnik PC, et al. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 2001;85(12):1416-1420
- 3 Slettedal JK, Lyberg T, Røger M, et al. Regeneration with proliferation of the endothelium of cultured human donor corneas with extended postmortem time. *Cornea* 2008;27(2):212-219
- 4 魏捷,蒋华. 无血清器官培养法保存大鼠角膜内皮细胞的活性. 国际眼科杂志 2011;11(5):775-778
- 5 魏捷,蒋华. 两种新型无血清培养基器官培养保存兔角膜内皮细胞活性的实验研究. 中华眼外伤职业眼病杂志 2011;33(8):561-565
- 6 Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, et al. Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(3):816-822
- 7 邓磊,钱锁开,刘小年. 高压氧对颅脑损伤大鼠脑组织水通道蛋白-4 表达的影响. 中华神经医学杂志 2010;9(4):366-369
- 8 Zhao M, Thuret G, Piselli S, et al. Use of Poloxamers for Deswelling of Organ-Cultured Corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(2):550-559
- 9 Pels E, Schuchard Y. The effects of high molecular weight dextran on the preservation of human corneas. *Cornea* 1984-1985;3(3):219-227
- 10 Salla S, Redbrake C, Becker J, et al. Remarks on the vitality of the

- human cornea after organ culture. *Cornea* 1995;14(5):502-508
- 11 Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, et al. Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture. *Cornea* 1997;16(2):215-223
- 12 Standl T, Burmeister MA, Schroeder F, et al. Hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 provides larger and faster increases in tissue oxygen tension in comparison with prehemodilution values than HES 70/0.5 or HES 200/0.5 in volunteers undergoing acute normovolemic hemodilution. *Anesth Analg* 2003;96(4):936-943
- 13 Jungheinrich C, Scharpf R, Wargenau M, et al. The pharmacokinetics and tolerability of an intravenous infusion of the new hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%, 500 mL) in mild-to-severe renal impairment. *Anesth Analg* 2002;95(3):544-551
- 14 许幸,吴新民,薛张纲,等. 全麻非心脏手术患者羟乙基淀粉 130/0.4 电解质注射液与羟乙基淀粉 130/0.4 氯化钠溶液容量治疗效果的比较:多中心、前瞻、随机、双盲、对照研究. 中华麻醉学杂志 2011;31(10):1165-1169
- 15 Reim M, Pantenburg FJ, Ziegler CD. Effect of serum and osmotically active substances on metabolism in 262 tissue cultures of pig's corneas: improved preservation of donor tissue for keratoplasty. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001;218(2):95-101
- 16 Redbrake C, Kompa S, Altmann G, et al. HES 130 as a continuous supplement for organ culture of human corneas? *Ophthalmologe* 2006;103(1):43-47
- 17 Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB J* 2002;16(13):1835-1837
- 18 Gordon SR, Wood M. Soybean agglutinin binding to corneal endothelial cell surfaces disrupts in situ monolayer integrity and actin organization and interferes with wound repair. *Cell Tissue Res* 2009;335(3):551-563
- 19 Zhu YT, Hayashida Y, Kheirkhah A, et al. Characterization and comparison of intercellular adherent junctions expressed by human corneal endothelial cells in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49(9):3879-3886
- 20 Grasso S, Hernández JA, Chifflet S. Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293(4):C1327-1337
- 21 Crewe JM, Armitage WJ. Integrity of Epithelium and Endothelium in Organ-Cultured Human Corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1757-1761