

# 角膜不同保存方法与术后免疫排斥反应相关性的比较研究

牛晓霞<sup>1</sup>, 洪晶<sup>2</sup>, 李云峰<sup>1</sup>, 战露阳<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(150076)中国黑龙江省哈尔滨市,哈尔滨爱尔眼科医院;<sup>2</sup>(100191)中国北京市,北京大学第三医院眼科  
作者简介:牛晓霞,博士,副主任医师,角膜眼表病科主任,研究方向:角膜移植。  
通讯作者:牛晓霞. 80112579@qq.com  
收稿日期:2013-12-26 修回日期:2014-05-07

## Comparative study on the correlation of penetrating keratoplasty rejection with different cornea preservation methods

Xiao-Xia Niu<sup>1</sup>, Jing Hong<sup>2</sup>, Yun-Feng Li<sup>1</sup>, Lu-Yang Zhan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Harbin Aier Eye Hospital, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Correspondence to: Xiao-Xia Niu. Harbin Aier Eye Hospital, Harbin 150076, Heilongjiang Province, China. 80112579@qq.com  
Received:2013-12-26 Accepted:2014-05-07

## Abstract

• AIM: To understand the relation between the penetrating keratoplasty rejection and the methods of cornea preservation.

• METHODS: The 30 Wistar rats as donator and 60 SD rats as receptor were used to establish the animal models of penetrating keratoplasty rejection. And 60 SD rats were randomly divided into 3 groups. Donor cornea of Wistar rats preserved in different methods were used separately in 3 groups. The penetrating keratoplasty rejection index (RI), means survival time (MST) of corneal grafts and pathological changes in post-operation were analyzed.

• RESULTS: The MST was (10.4 ± 1.70) d in moist-chamber-preserved group (I), (12.9 ± 1.81) d in medium-term-preserved group (II) and (16.1 ± 2.57) d in cryopreserved group (III). The MST in the cryopreserved group was evidently prolonged, showing a significant correlation compared with other two groups ( $P < 0.01$ ). The sections with HE staining revealed that the severity of inflammation in III group was reduced compared with that of I, II group after 10d of keratoplasty.

• CONCLUSION: The postoperative rejection of penetrating keratoplasty in rats is decreased and rejection time is delayed in cryopreserved cornea.

• KEYWORDS: preserving methods; penetrating keratoplasty rejection; rats

Citation: Niu XX, Hong J, Li YF, et al. Comparative study on the correlation of penetrating keratoplasty rejection with different cornea preservation methods. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(6):1005-1008

## 摘要

目的:探讨角膜不同保存方法与术后免疫排斥反应的关系。

方法:随机用 Wistar 大鼠 30 只作为供体,SD 大鼠 60 只作为受体。建立角膜移植排斥反应动物模型。将 SD 大鼠随机分 3 组,各组分别使用不同保存方法的 Wistar 鼠眼为供体角膜。观察 3 组角膜移植术后排斥反应指数(RI)、植片存活时间(MST)和植片的病理变化。

结果:MST 湿房保存组(I组)为 10.4 ± 1.70d,中期保存液保存组(II组)为 12.9 ± 1.81d,深低温保存组(III组)为 16.1 ± 2.57d。III 组 MST 明显延长,与其他两组比较均有显著性( $P < 0.01$ )。角膜移植术后 10d 时 HE 染色显示 III 组炎性反应较 I 组、II 组明显减轻。

结论:深低温保存的大鼠角膜移植术后排斥反应发生率降低,发生时间延迟。

关键词:保存方法;角膜移植排斥;大鼠

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.06.06

引用:牛晓霞,洪晶,李云峰,等.角膜不同保存方法与术后免疫排斥反应相关性的比较研究.国际眼科杂志 2014;14(6):1005-1008

## 0 引言

角膜移植手术是治疗角膜病患者脱盲最有效的方法,术后角膜排斥反应是角膜移植手术失败的主要原因。我们采用大鼠穿透性角膜移植模型,通过对不同保存方法的角膜进行移植来探讨术后排斥反应的发生率并分析其原因,为提高角膜移植的成功率减少排斥反应的发生探索新的途径。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级 SD 大鼠 60 只,Wistar 大鼠 30 只。月龄 2 个月,体质量 180 ~ 200g,均为雌性。购于中国医科大学实验动物中心。动物分组:选用 Wistar 鼠 30 只 60 眼随机用 3 种不同方法保存(每组 20 眼)。实验均选不同保存方法 Wistar 鼠眼为供体,SD 大鼠为受体(术眼均选为右眼),将受体 SD 大鼠 60 只随机分为 3 组,每组 20 只。

1.2 方法 实验 I 组为异体湿房保存组:供体为湿房保存 12h Wistar 鼠眼角膜(摘取 Wistar 大鼠眼角膜置 4℃ 冰箱保存 12h);实验 II 组为异体中期保存组:供体为中期保存液保存 7d Wistar 鼠眼角膜[角膜配置简易中期保存液,以细胞培养基 MEM 作为基础液,加入 10g/L 的低分子右旋糖苷、2.5g/L 的硫酸软骨素;用碳酸氢钠调节 pH

值为7.2~7.4,过滤器过滤除菌;分装。用前加入庆大霉素使之浓度为100~200U/mL(10 $\mu$ L)。4 $^{\circ}$ C冰箱保存<sup>[1]</sup>。角膜植片的制备:处死后尽早取材,用庆大霉素生理盐水冲洗;在超净台上减取带1mm巩膜环的角膜片,小心取出色素膜组织,注意整个过程勿伤及角膜内皮。将制备好的角膜植片(10片)内皮面向上置于分装好的中期保存液中保存7d;实验Ⅲ组为异体长期保存组;供体为深低温长期保存12wk Wistar 鼠角膜。制备冷冻保存液:按成分(%),V/V 配制:①号液:20%人血清白蛋白92%;DMSO 5.5%;硫酸软骨素2.5%。②号液:20%人血清白蛋白90%;DMSO 7.5%;硫酸软骨素2.5%。

微机监控程序降温及深低温保存:将配制好的抗冻剂装入高压灭菌的EP管中,每管1.5mL,将无菌条件下制备好的角膜植片(10片)内皮面向上置于预冷备用的①号液中,4 $^{\circ}$ C冰箱平衡10min;再将角膜片放入②号液中,4 $^{\circ}$ C冰箱再平衡10min;将②号液从冰箱中移出,置于微机监控的程序化降温仪(Cryomed Freezer, U. S. A.)。所设程序为:设一个装有同样冷冻剂的对照瓶,将角膜标本温度探针插入保护剂中,以测定标本中的温度变化。降温时以角膜保护剂的温度为标准,先从4 $^{\circ}$ C以1 $^{\circ}$ C/min降至-10 $^{\circ}$ C,稳定2min;再以2 $^{\circ}$ C/min降至-30 $^{\circ}$ C(这期间当温度降至-5 $^{\circ}$ C左右时,可见有3 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C的温度回升的释放热曲线),稳定5min;最后以5 $^{\circ}$ C/min降至-80 $^{\circ}$ C,稳定4min。此时将角膜容器连同角膜片直接浸泡于液氮中,并做好标记,贮存时间为12wk。复温具体操作技术:将EP管从液氮中取出,待管内渗存的液氮自然喷蒸后,迅速放入50 $^{\circ}$ C水浴箱中自轻轻飘动,待瓶内冷冻保护液融化,角膜片周围仅存留一层薄冰时,从水浴箱中取出,用无齿镊夹取角膜片外缘的巩膜环,立即移入4 $^{\circ}$ C冰箱预冷的白蛋白中,10min后可以供实验所用<sup>[2]</sup>。

药品:碘伏消毒液,10%水合氯醛,美多利-P滴眼液,倍诺喜滴眼液,10g/L阿托品滴眼液(锦州医学院附属第一医院药剂科),硫酸庆大霉素注射液,复方氯化钠注射液,12500U肝素。

角膜移植方法:按文献[3,4]报道方法,术前30min SD大鼠用美多利-P和阿托品散瞳共点眼3次(防止术后虹膜后粘连),100g/L水合氯醛腹腔麻醉(4mL/kg)。

手术在严格无菌的条件下进行,常规碘伏消毒铺巾,术眼庆大霉素复方氯化钠溶液冲洗,清洁结膜囊。在手术显微镜下,5-0尼龙线牵引上下眼睑固定,3.5mm直径环钻钻切保存角膜做成植片(实验Ⅱ组和Ⅲ组术中取出角膜,轻轻吸出表面的液体,于内皮面涂适量的透明质酸钠制作角膜植片),植于植床直径为3.0mm的受体角膜上。10-0尼龙线间断缝合8针,线结不埋藏。前房注消毒空气以形成前房,结膜下注射庆大霉素2000U,金霉素眼膏涂眼,眼睑缝合<sup>[5]</sup>。

术后1d右眼睑缝线拆除,每日术眼点10g/L阿托品眼药水2次,2.5g/L氯霉素眼药水4次,以防虹膜粘连和术后感染。不拆除角膜缝线。每日裂隙灯下观察,直到排斥反应为止。按照Larkin等建立的临床观察评分标准(表1),以角膜混浊、水肿、新生血管3项之和为角膜移植排斥反应指数(rejection index, RI),每日纪录RI,当RI $\geq$ 5时为排斥反应已经发生。记录角膜存活时间(means survival time, MST)。术后3d内有严重前房出血,虹膜广泛前粘连,白内障,植片感染等并发症者剔除<sup>[6]</sup>。

表1 角膜植片指数评分标准

角膜植片的临床观察	评分
角膜植片混浊	0~4
植片完全透明	0
植片透明度轻度丢失	1
植片透明度中度丢失,虹膜血管可见	2
虹膜血管轮廓不清,但瞳孔轮廓可见	3
瞳孔轮廓窥不清	4
角膜植片水肿	0~2
无水肿	0
中度水肿	1
伴有植片增厚的显著水肿	2
角膜植片新生血管	0~4
无新生血管	0
新生血管在任何象限深入达到植片半径的25%	1
新生血管达到植片半径的50%	2
新生血管达到植片半径的75%	3
新生血管达到植片的中央	4
总分	10

组织学检查:角膜植片取材:分别于术后20d,将各组SD大鼠麻醉,取材时剪下全部角膜组织及少许巩膜,于10%中性甲醛液固定,常规石蜡包埋,切片,苏木素-伊红染色,Olympus显微镜下观察,摄像。观察角膜排斥反应的程度,炎性细胞浸润情况及炎性反应程度。

统计学分析:所得数据均根据数据正态性,采用SPSS 17.0方差分析及LSD两组间比较方法t检验进行统计分析,以P<0.05为有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同组别角膜移植术后植片的情况 在60只大鼠角膜移植术后,56只用于对比研究,4只因各种原因而排除,其中包括麻醉死亡1只;术后白内障1只;术后角膜溃疡1只;术后虹膜前粘连1只。

2.2 术后每日裂隙灯观察结果 术后每日裂隙灯观察结果见表2。

2.3 实验组角膜移植片存活时间 记录出现角膜移植排斥反应指数RI $\geq$ 5的天数,RI $\geq$ 5即为角膜发生排斥反应。Ⅰ组角膜移植片于术后8d开始发生免疫排斥反应,10d达到高峰,存活时间最长者达13(平均10.4 $\pm$ 1.70)d。Ⅱ组角膜移植片于术后11d开始发生免疫排斥反应并达到高峰,存活时间最长者达16(平均12.9 $\pm$ 1.81)d,与Ⅰ组比较有统计学意义(P<0.05)。Ⅲ组角膜移植片于术后13d开始发生免疫排斥反应,14d达到高峰,存活时间最长者达20(平均16.1 $\pm$ 2.57)d,与Ⅰ组、Ⅱ组比较均有统计学意义(P均<0.01)。

2.4 各组术后20d时的情况 Ⅰ组角膜植片均明显水肿,上皮糜烂,前房窥不清,有大量新生血管(图1A,B);Ⅱ组角膜植片均有中度水肿,混浊不明显仍可见瞳孔,前房深浅正常。周边植床见新生血管(图1C,D);Ⅲ组角膜植片有轻度水肿,混浊轻微可看清虹膜纹理,前房深浅正常,偶见植床新生血管(图1E,F)。

2.5 病理学检查 Ⅰ组角膜发生急性排斥反应,角膜上皮糜烂,组织水肿增厚,缝线周围出现大量单核细胞和淋巴细胞浸润,见大量的新生血管(图2A)。Ⅱ组角膜植

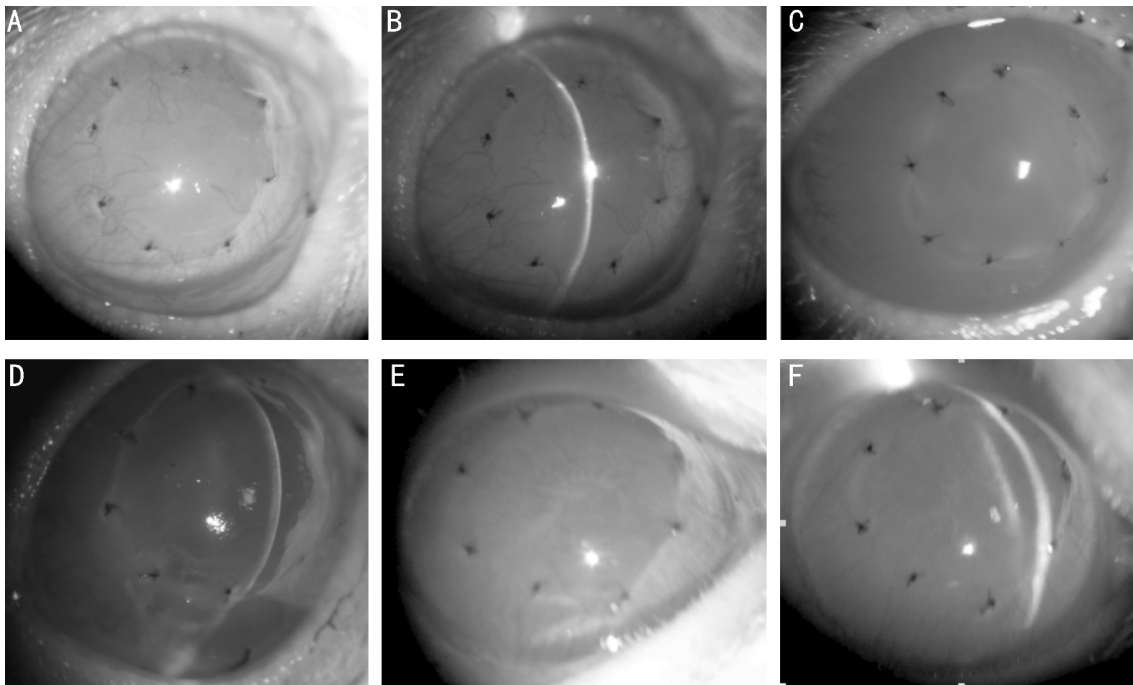


图1 大鼠角膜 20d 时情况 (×16) A,C,E:I~Ⅲ组大体像;B,D,F:I~Ⅲ组裂隙像;A,B:I组;C,D:Ⅱ组;E,F:Ⅲ组。

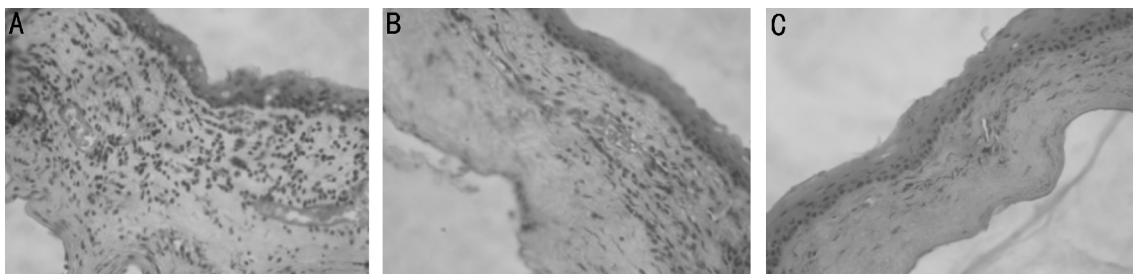


图2 三组大鼠 20d 时角膜情况 (HE 40×10) A: I 组;B: Ⅱ组;C: Ⅲ组。

分组	n	透明性	水肿	新生血管	RI
I	19	2.33±0.50	1.44±0.53	2.89±0.34	6.67±0.87
II	18	1.75±0.71	1.25±0.46	1.37±0.52	4.38±0.51 <sup>a</sup>
III	19	1.54±0.54	1.22±0.45	1.33±0.50	4.10±0.51 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs I 组。

片可见上皮及基质层有水肿,血管,淋巴细胞浸润均较少(图 2B)。Ⅲ组角膜植片水肿轻微,植床及植片交接处见少量血管及淋巴细胞(图 2C)。

### 3 讨论

角膜移植术后排斥反应是角膜移植失败主要原因,占 33%~60%。该反应是一个多因素参与,极其复杂和高度调节的过程<sup>[7]</sup>。本研究发现,在大鼠同种异体角膜移植术中,从平均 RI 的结果可以看出:长期保存组的角膜  $4.10 \pm 0.51$  优于中期保存的角膜  $4.38 \pm 0.51$ ,中期保存的角膜又优于湿房保存的角膜  $6.67 \pm 0.87$ 。Yamagami 等动物实验报告,角膜移植片在没有抗排斥反应药物治疗的情况下, MST 为  $5.8 \pm 0.8$  d,而且体液免疫和细胞免疫在初期异种角膜移植的免疫排斥反应中起着重要作用<sup>[8]</sup>。我们的实验结果显示湿房保存的角膜材料行异种角膜移植术后植片 MST 为  $10.4 \pm 1.70$  d,湿房保存角膜材料行角膜移植术后出现排斥反应的时间较早,而且发展快、反应重,RI 较高。深低温保存的角膜行异种角膜移植术后植片 MST 为

$16.1 \pm 2.57$  d,深低温保存的角膜材料行角膜移植术后出现排斥反应的时间较晚,且发展慢、反应较轻,RI 最低。中期保存组 MST  $12.9 \pm 1.81$  d 则介于两者之间。这与 Ardjomand 等结果显示的 HLA-DR 抗原的丧失主要与保存时间有关的结果相一致。各实验组结果对比显示:长期保存与短期保存在穿透角膜移植术后,其排斥反应出现的时间有明显差别( $P < 0.01$ )<sup>[9]</sup>。长期保存方法和中期保存方法以及中期保存方法和短期保存方法在穿透角膜移植术后,其排斥反应出现的时间均有明显差别( $P < 0.01$ )。湿房保存的角膜材料术后出现排斥反应的时间较早,与 HLA 抗原的未丢失有关<sup>[10]</sup>。动物实验也证实,大部分保存 2~3wk 的供体角膜没有朗格汉斯细胞(Langerhan'cell, LC),同时发现 LC 的丢失与供体角膜上皮细胞的状况直接相关,其丢失的 LC 在脱落的角膜上皮层内<sup>[11,12]</sup>。因此可以说明保存 2~3wk 以上的角膜材料比湿房保存角膜材料行同种异体角膜移植术后出现排斥反应的时间晚、发展慢且反应轻<sup>[13,14]</sup>。Nguyen 等也报道长期保存方法与短期



保存方法在穿透角膜移植术后,长期保存的供体角膜术后有一个较低的移植片失败发生率<sup>[15]</sup>。总之,我们发现保存的角膜时间越长,大鼠角膜移植术后排斥反应降低,发生时间延长,期望对于临床工作有一定的指导意义。

#### 参考文献

- 1 董晓光,谢立信,张新晨.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
- 2 Ritterband DC, Meskin SW, Seedor JA, et al. Efficacy and safety of voriconazole as an additive in Optisol GS: a preservation medium for corneal donor tissue. *Cornea* 2007;26(3):343-347
- 3 陆燕,邹留河,吕岚,等.大鼠角膜移植排斥动物模型的建立.实验动物科学与管理 2002;19(3):8-11
- 4 高玉,罗媛媛,景明,等.大鼠同种异体穿透性角膜移植排斥模型的建立与评价.中国美容医学 2013;22(20):2027-2030
- 5 李兵,洪晶,孙昱昭,等.雷帕霉素抑制大鼠角膜移植排斥反应的实验研究.眼科新进展 2006;26(3):184-187
- 6 赵剑峰.细胞因子与角膜新生血管形成研究进展.西部医学 2013;25(11):1742-1744
- 7 叶芬,於翔,黄振平,等.角膜新生血管发生机制及治疗研究新进展.国际眼科杂志 2013;13(1):82-84

- 8 Neuyen P, Yiu SC. Strategies for local gene therapy of corneal allograft rejection. *Middle East Afr J Ophthalmol* 1990;20(1):11-25
- 9 Amano S, Rohan R, Kuroki M, et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(1):18-22
- 10 余洪华,邓金印,陆晓和.缝线诱导角膜新生血管形成:术后核因子κB表达的动态变化.中国组织工程研究与临床康复 2007;11(49):10004-10008
- 11 王婷,史伟云,李素霞,等.大鼠角膜新生血管生长与其周围基质内相关生物因子表达关系的研究.中华眼科杂志 2009;45(2):158-163
- 12 周炼红,邢怡桥,张云成.角膜碱烧伤后 VEGF 的表达与新生血管的关系.眼科新进展 2005;25(4):315-317
- 13 谢立信,史伟云,董晓光.高危角膜移植围手术期治疗.眼科新进展 2000;20(3):196-198
- 14 赵敏,陈家祺,杨培增.鼠角膜碱烧伤的免疫学研究.中华眼科杂志 2000;36(1):40-42
- 15 陈晓敏,李鹏程,张明昌,等.可诱导的共刺激分子在大鼠角膜中的表达.眼科研究 2008;26(3):214-218

## 科技期刊对论文题目的要求

题名,是论文的总纲,是能反映论文最主要的特定内容的最恰当、最简明的词语的逻辑组合。

首先,题名应准确得体。应以最恰当的词语反映论文的特定内容,把论文的主题明白无误地告诉读者,并且使之起到画龙点睛、启迪读者阅读兴趣的作用。题目的用词十分重要,它直接关系到读者对论文取舍的态度,务必字字斟酌。题名不能使用笼统和华而不实的词语,一般也不用主、谓、宾齐全的完整句子,而用以名词性词组做中心语的偏正词组并切忌写成标语口号似的“题名”。

其次,题名应简短精练。GB/T 7713-1987 规定,论文题名一般不超过 20 个汉字。在拟定题名或编辑加工时,应删去多余的词语,避免存在无用的字和词。这是为了醒目,便于记忆和引用。使用简短的题名而语意未尽时,或系列工作分篇报道时,可借助于副题名,以补充题名之不足。

第三,题名应便于检索。题名所用的词语必须有助于选定关键词和编制题录、索引等二次文献,以便为检索提供特定的实用信息。这就要求题名中一定要有反映论文特定内容的关键词,关键词多一些更好。

第四,题名应容易认读。题名中应当避免使用数学公式、化学结构式,以及非共知共用的缩略词、首字母缩写字、字符、代号等。

摘自《科学技术期刊编辑教程》