

人角膜基质透镜长期超低温保存的可行性评估

韦琦¹ 丁辉² 钟探² 余瀚洋¹ 杨镇朵² 范红明² 何林艺² 钟兴武¹

¹中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室 广东省眼科视觉科学重点实验室, 广州 510060; ²中山大学中山眼科中心海南眼科医院 海南省眼科学重点实验室, 海口 570300

通信作者: 钟兴武, Email: zhongxwu@mail.sysu.edu.cn

【摘要】 目的 观察超低温环境下长期保存后人角膜基质透镜的透明度及结构变化, 探讨简单可行且有效的角膜基质透镜长期保存方案。 **方法** 收集 2013—2020 年于中山大学中山眼科中心海南眼科医院行飞秒激光小切口角膜透镜取出术 (SMILE) 200 眼, 手术中获取完整人角膜基质透镜标本 200 份。将人角膜基质透镜标本置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存, 按照保存时间的不同将标本分为 1 个月组、24 个月组、60 个月组和 84 个月组, 每组 50 份。采用超微量分光光度计测量各组在 300~800 nm 波长范围内角膜基质透镜的透光率, 每个透镜共连续检测 10 次, 每次间隔 50 nm; 分别采用苏木精-伊红染色和 Masson 染色观察各组角膜基质透镜的组织学形态变化和胶原纤维结构改变; 采用透射电子显微镜观察各组角膜基质透镜中胶原纤维排列方式及角膜基质细胞的超微结构变化; 采用 TUNEL 染色法检测各组人角膜基质透镜中角膜基质细胞凋亡情况。 **结果** 各组 450~800 nm 波长范围内角膜基质透镜透光率比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。Masson 染色结果显示, 1 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列整齐、紧密, 24 个月组部分胶原纤维间出现空泡, 60 个月组胶原纤维排列疏松, 空泡增多, 84 个月组部分胶原纤维脱落, 角膜基质透镜变薄; 苏木精-伊红染色显示角膜基质透镜形态改变与胶原纤维变化相对应。透射电子显微镜下可见 1 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列规则, 角膜基质细胞呈长梭形, 核膜完整, 胞质丰富; 24 个月组胶原纤维排列稍疏松, 角膜基质细胞变形, 核膜不完整; 60 个月组胶原纤维排列疏松、不整齐, 细胞核萎缩变形; 84 个月组胶原纤维排列紊乱, 角膜基质细胞皱缩, 核膜不连续, 核质裂解。TUNEL 染色结果显示, 1 个月组、24 个月组、60 个月组和 84 个月组透镜中基质细胞凋亡率分别为 $(87.80\pm 1.17)\%$ 、 $(89.50\pm 1.05)\%$ 、 $(89.30\pm 1.51)\%$ 和 $(90.20\pm 1.47)\%$, 总体比较差异无统计学意义 ($F=4.525, P=0.053$)。 **结论** 人角膜基质透镜超低温环境下保存 84 个月可见胶原纤维排列紊乱及角膜基质细胞凋亡, 但其透明度和完整性仍较好。超低温保存技术长期保存角膜基质透镜有效且简单可行。

【关键词】 角膜疾病; 角膜移植; 角膜基质; 生物保存; 低温贮藏; 超微结构; 凋亡; 透明度

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81870681); 海南省临床医学中心和海南省重点研发计划项目 (ZDYF2020151)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210413-00249

Feasibility of cryopreservation of human corneal stromal lenticles

Wei Qi¹, Ding Hui², Zhong Tan², Yu Hanyang¹, Yang Zhenduo², Fan Hongming², He Linyi², Zhong Xingwu¹

¹State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology and Visual Science, Guangzhou 510060, China; ²Hainan Eye Hospital and Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Haikou 570300, China

Corresponding author: Zhong Xingwu, Email: zhongxwu@mail.sysu.edu.cn

[Abstract] Objective To observe the transparency and tissue structure changes of human corneal stromal lenticles after long-term cryopreservation and explore a simple and feasible method for long-term effective preservation of corneal stromal lenticles. **Methods** Two hundred samples of intact human corneal stromal lenticles from 200 eyes were obtained during femtosecond laser small-incision lenticule extraction (SMILE) in Hainan Eye Hospital, Zhongshan Ophthalmic Center from 2013 to 2020. The samples were divided into 1-month, 24-month, 60-month and 80-month group and were stored in an ultra-low temperature freezer for 1, 24, 60 and 84

months respectively at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ according to grouping, with 50 samples in each group. Transmittance of the corneal lenticules at wavelength of 300–800 nm was measured with an ultra-micro spectrophotometer and every lenticule was measured for 10 times with a 50 nm interval. The histomorphology and collagen fiber structure of the corneal lenticules were examined by hematoxylin-eosin staining and Masson staining, respectively. The arrangement of collagen fibers and ultrastructure changes of keratocytes in the samples were inspected with a transmission electron microscope. The apoptosis rate of keratocytes was determined by TUNEL staining. The study protocol was approved by an Ethics Committee of Hainan Eye Hospital at Zhongshan Ophthalmic Center (No. 2013-003). This study complied with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from each subject before surgery. **Results** The corneal lenticules were clear and intact in all groups and no significant difference in the transmittance within 450–800 nm wavelength was seen among the 4 groups (all at $P>0.05$). Masson staining revealed that the collagen fibers in the lenticules were neatly arranged and tightly packed in the 1-month group. In the 24-month group, interfibrillar vacuoles were found in some collagen fibers. The arrangement of the collagen fibers was loose and more vacuoles were displayed in the 60-month group, and the loss of some collagen fibers appeared and the lenticules were thinned in the 84-month group. It was found through hematoxylin-eosin staining that the morphological changes of corneal stromal lenticules corresponded to the alterations of collagen fibers. Transmission electron microscopy showed that in the 1-month group, the collagen fibers of the corneal stroma lenticules were neatly arranged and regular, and the corneal stromal cells were elongated and spindle-shaped, and the nuclear membrane was intact and the cytoplasm was abundant. In the 24-month group, the collagen fibers showed slightly loose arrangement, and the corneal stromal cells were deformed with incomplete nuclear membrane. In the 60-month group, the collagen fibers were in loose and irregular arrangement, and the nuclei were atrophied and deformed. The 84-month group showed disorganized arrangement of collagen fibers, wrinkled and atrophied corneal stromal cells, discontinuous nucleus membrane and nucleoplasmic lysis. TUNEL staining showed that the percentage of apoptotic corneal cells in lenticules was $(87.80\pm 1.17)\%$, $(89.50\pm 1.05)\%$, $(89.30\pm 1.51)\%$ and $(90.20\pm 1.47)\%$ in the 1-month, 24-month, 60-month and 84-month groups, respectively, with no statistically significant difference found in overall comparison ($F=4.525, P=0.053$). **Conclusions** The disorder of collagen fibers and apoptosis of keratocytes occur in the human corneal stromal lenticules till 84 months after cryopreservation, however, the transparency and integrity remain excellent. The ultra-low temperature preservation technique provides an effective and simple solution for long-term storage of human corneal stromal lenticule.

[Key words] Corneal diseases; Corneal transplantation; Corneal stroma; Preservation, biological; Cryopreservation; Ultrastructure; Apoptosis; Transparency

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81870681); Hainan Province Clinical Medical Center, and Science and Technology Planning Project of Hainan Province (ZDYF2020151)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210413-00249

角膜供体来源匮乏一直是影响角膜移植手术实施的主要问题之一。近年来各国研究者们都在努力探寻更加安全、高效的移植材料来缓解角膜供体紧张的局面。目前有研究将聚甲基丙烯酸甲酯和水凝胶等人工合成材料植入角膜基质中进行观察,但均有中毒性角膜基质炎、植片排出和植片溶解等并发症发生^[1-2],人工合成角膜移植材料还有待改进。目前应用异种生物材料进行角膜移植开始受到关注,但如何有效地通过化学或者物理方法去除移植组织中的细胞成分,同时保持组织的固有结构是目前所面临的主要难题之一^[3]。飞秒激光小切口角膜透镜取出术 (small-incision lenticule extraction, SMILE) 代表着当今角膜屈光手术

的发展趋势,是目前的主流术式之一,其利用飞秒激光精准聚焦定位的立体切割技术在角膜基质层内特定深度中切割出一定大小和厚度的透镜,从而达到矫正屈光不正的目的。我们前期的研究已证明人角膜基质透镜在经过 100 Gy 的 X 射线照射或甘油低温处理后 2 周内仍能保持良好的纤维结构,并且通过飞秒激光辅助角膜基质透镜移植术在动物实验和临床研究中取得了良好的效果^[4-7]。因此,角膜基质透镜在眼科学再生领域具有重要的应用潜力,可为角膜基质混浊、老视、圆锥角膜及角膜扩张等患者提供新的治疗手段^[8]。如何能够长期有效且简单地保存角膜基质透镜仍然是角膜基质透镜移植术推广所面临的主要问题

之一^[9]。本研究对超低温环境下保存不同时间的人角膜基质透镜组织结构变化和透明性进行观察,拟寻求一种长期有效且简单可行的角膜基质透镜保存方法,为角膜基质透镜的长期保存及其在眼科疾病治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 纳入 2013—2020 年在中山大学中山眼科中心海南眼科医院行 SMILE 的 200 眼,术中获取角膜基质透镜标本共 200 份。标本来源患者中男 59 例 112 眼,女 45 例 88 眼;平均年龄(20.87 ± 1.20)岁;术前等效球镜度为(3.63 ± 0.68)D。本研究中人体组织样本使用及研究方案经中山大学中山眼科中心海南眼科医院伦理委员会审核批准(批文号:2013-003),实验过程均符合《赫尔辛基宣言》。所有患者知晓手术方法及研究目的,均自愿签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 OCT 冷冻切片包埋剂(日本 Sakura 公司);苏木精-伊红染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Masson 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);TUNEL 试剂盒(瑞士 Roche 公司)。Forma902 超低温冰箱(美国 GP-ULTS 公司);P330 型超微量分光光度计(德国 Implen 公司);Axioylan2 型倒置光学显微镜、LSM880 激光扫描共焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司);Tecnai G² Spirit Twin 透射电子显微镜(美国 FEI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SMILE 手术及角膜基质透镜标本收集 手术由同一经验丰富的主任医师完成。采用 VisuMax 飞秒激光对屈光不正患者行 SMILE,术中行角膜基质内双层同心圆螺旋式扫描以制作角膜基质透镜,用分离铲自开口处分离角膜基质透镜后表面及前表面,用显微镊取出完整角膜基质透镜,透镜光学区直径为(6.50 ± 0.13)mm,厚度为(65.00 ± 1.58) μ m。将角膜基质透镜置于 -80 °C 超低温冰箱内保存。

1.2.2 角膜基质透镜透明度检测 按照角膜基质透镜保存时间不同分为 1 个月组、24 个月组、60 个月组和 84 个月组,每组 50 份。按照分组时间点将角膜基质透镜从 -80 °C 超低温冰箱中取出后平放于 96 孔板中,在水浴中解冻 10 min,加入少量磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)完全覆盖角膜基质透镜。每组取 10 片角膜基质透镜,采用超微量分光光度计检测角膜基质透镜透明度,检测波长为 300~800 nm,每个透镜共连续检测 10 次,每次测定的间隔波长为

50 nm,计算每个角膜基质透镜透光率。将每组透镜标本平铺于有黑色 E 字的白纸上,观察透过角膜基质透镜标本显示 E 字的清晰度,评估其透明性,并在低倍显微镜下观察每组透镜标本的透明度和完整性。

1.2.3 苏木精-伊红染色法观察角膜基质透镜的组织形态 每组取 10 片角膜基质透镜,用质量分数 4% 多聚甲醛固定,以质量分数 30% 蔗糖脱水,常规 OCT 混合剂包埋, -20 °C 下冰冻切片切片,切片厚度 7 μ m。切片以 4% 多聚甲醛固定 10 min,超纯水冲洗 2 min,苏木素染色 5 min,自来水冲洗 2 次,每次 5 min;吸干切片上水分,用盐酸乙醇分化液分化 10 s;自来水冲洗 2 次,每次 5 min;伊红染色液染色 1 min;自来水冲洗 5 min;封片剂封片。倒置光学显微镜下观察切片组织形态并拍照。

1.2.4 Masson 染色法观察胶原纤维结构 每组取 10 片角膜基质透镜,组织固定、脱水、包埋及切片方法同 1.2.3。切片以铁苏木素染色液染色 5 min,自来水冲洗;吸干切片上水分,酸性乙醇分化液分化 10 s,水洗;用 Masson 蓝化液返蓝 5 min,蒸馏水浸洗 1 min;丽春红酸性品红染色液染色 5 min;弱酸工作液洗 1 min;磷钼酸溶液洗 1 min;弱酸工作液洗 1 min,直接置于苯胺蓝染色液中染色 2 min;弱酸工作液洗 1 min;体积分数 95% 乙醇快速脱水;无水乙醇脱水 3 次,每次 5 s;二甲苯溶液透明 3 次,每次 1 min;封片剂封片。倒置光学显微镜下观察胶原纤维结构变化并拍照。

1.2.5 透射电子显微镜下观察角膜基质透镜超微结构变化 每组取 10 片角膜基质透镜,置于质量分数 2.5% 戊二醛溶液中 4 °C 固定 24 h,质量分数 1% 锇酸固定 2 h,用 30%、50%、70%、90% 乙醇及 90% 乙醇与 90% 丙酮混合液逐级脱水,每次 15 min,用 Epon812 包埋树脂 35 °C 下作用 2 h 以包埋组织,烤箱聚合后制作成 70 nm 厚切片,用铜网捞片,醋酸铀染色 15 min,水洗 3 次,硝酸铅染 15 min,水洗 3 次。透射电子显微镜下观察切片组织胶原纤维及角膜基质细胞超微结构变化并拍照。

1.2.6 TUNEL 法检测角膜基质透镜基质细胞凋亡 每组取 10 片角膜基质透镜,组织固定、脱水、包埋及切片方法同 1.2.3。用 4% 多聚甲醛于 $15 \sim 25$ °C 下固定冰冻切片 20 min, PBS 清洗 3 次,每次 10 min;体积分数 3% 双氧水 $15 \sim 25$ °C 下封闭 10 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,切片浸入通透液中, $2 \sim 8$ °C 条件下促渗 2 min;以脱氧核糖核酸酶 I 在室温下处理 10 min 的切片作为阳性对照,将 TdTQ 酶和标记液混合(1:9)作为 TUNEL 反应液, 37 °C 湿盒避光孵育 1 h,将经固定和通透处理的细胞与每孔 50 μ l 的标记液一起孵育,以标

记液中无末端转移酶作为阴性对照。孵育结束后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min, DAPI 染色液染核,室温下湿盒内避光孵育 15 min,用 PBS 清洗 3 次,每次 3 min,吸干切片水分,封片剂封片;采用激光扫描共焦显微镜观察基质细胞凋亡及细胞核染色情况,基质细胞呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。采用 ImageJ 图像分析软件计算 TUNEL 阳性细胞数量。计算细胞凋亡率,细胞凋亡率 = 阳性细胞数/细胞总数 × 100%。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验满足正态分布者以 mean ± SD 表示,1 个月组、24 个月组、60 个月组和 84 个月组间计量资料总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;非正态分布资料以 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,总体差异比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验,组间两两比较采用 Wilcoxon 秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组角膜基质透镜透明度比较

4 个组角膜基质透镜低倍显微镜下均完整、光滑,未见明显混浊、碎裂和斑块,透过角膜基质透镜的 E 字均清晰可见(图 1)。在 350 nm 和 400 nm 波长处 4 个组角膜基质透镜透光率明显不同,总体比较差异均有统计学意义($F = 8.118, P = 0.044; F = 11.647, P = 0.009$),其中 60 个月组角膜基质透镜透光率高于 1 个月组,60 个月组和 84 个月组透光率均高于 24 个月组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。波长 450~800 nm

范围内各组间角膜基质透镜透光率总体比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表 1)。

2.2 各组角膜基质透镜组织学和胶原纤维形态比较

Masson 染色和苏木精-伊红染色结果显示,1 个月组角膜基质透镜中胶原纤维表面光滑,排列致密整齐,透镜组织表面完整,结构排列整齐;24 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列稍疏松,可见部分胶原纤维排列紊乱,部分纤维间出现空泡;角膜基质透镜表面不光滑,透镜组织增厚,组织间可见大小不一的空泡。60 个月组角膜基质透镜胶原纤维及透镜组织排列疏松呈网状,纤维间可见大量空泡,透镜表面形态凹凸不平,但组织仍较厚;84 个月组角膜基质透镜中部分胶原纤维脱落,厚度变薄(图 2)。

2.3 各组角膜基质透镜超微结构变化

透射电子显微镜下观察结果显示,1 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列整齐,角膜基质细胞呈细长梭形,核膜完整,细胞质丰富;24 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列较疏松,但仍整齐,角膜基质细胞的细胞核萎缩变形,核膜不完整;60 个月组角膜基质透镜胶原纤维稀疏,排列不整齐,细胞核进一步萎缩变形;84 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列紊乱,结构疏松,角膜基质细胞皱缩,核膜不完整,核质裂解(图 3)。

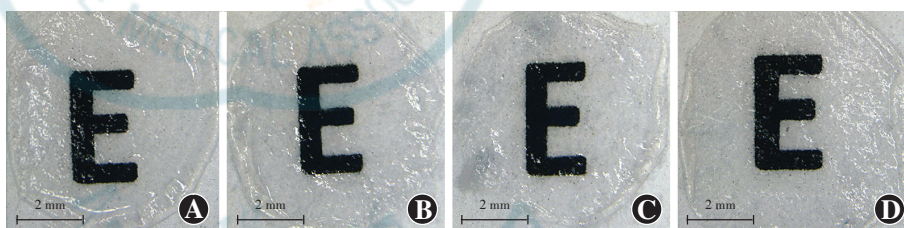


图 1 各组角膜基质透镜的大体组织透明度观察(×10,标尺=2 mm) 各组角膜基质透镜完整、透明,可清晰透见其下方的字母 A:1 个月组 B:24 个月组 C:60 个月组 D:84 个月组

Figure 1 Gross observation of corneal stromal lenticules in different groups (×10, bar=2 mm) Corneal stromal lenticules were intact and the 'E' under the lenticules was clearly visible in various groups A:1-month group B:24-month group C:60-month group D:84-month group

表 1 各组角膜基质透镜透光率比较(mean±SD, %)
Table 1 Comparison of transmittance of corneal lenticules among different groups (mean±SD, %)

组别	样本量	不同波长的透光率										
		300 nm	350 nm	400 nm	450 nm	500 nm	550 nm	600 nm	650 nm	700 nm	750 nm	800 nm
1 个月组	10	18.52±1.71	40.47±2.43	51.30±1.41	54.20±1.32	58.07±1.92	64.32±0.84	68.47±1.74	69.87±1.76	74.10±2.37	74.57±1.92	74.47±2.02
24 个月组	10	15.15±1.26	35.30±3.37	45.50±1.27	61.07±2.86	51.92±2.69	59.35±6.39	64.97±0.81	68.50±4.30	68.60±1.35	67.12±5.04	67.52±3.51
60 个月组	10	25.15±2.94	51.70±2.25 ^{ab}	59.62±1.31 ^{ab}	59.02±1.75	62.65±5.79	72.25±3.75	69.82±2.56	79.20±3.27	79.27±3.73	80.97±2.96	75.72±1.75
84 个月组	10	17.70±6.42	47.52±5.93 ^b	55.85±3.53 ^b	62.01±5.93	57.70±1.75	63.75±5.08	66.22±3.75	72.17±8.01	70.77±5.08	70.05±4.93	72.72±4.13
<i>F</i> 值		6.750	8.118	11.647	3.584	4.926	3.574	3.336	2.541	5.208	4.831	3.999
<i>P</i> 值		0.080	0.044	0.009	0.310	0.177	0.311	0.343	0.468	0.157	0.185	0.262

注:与各自 1 个月组比较,^a $P < 0.05$;与各自 24 个月组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析, LSD-*t* 检验)

Note: Compared with respective 1-month group, ^a $P < 0.05$; compared with respective 24-month group, ^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA, LSD-*t* test)

2.4 各组角膜基质透镜中基质细胞凋亡率比较

TUNEL 染色结果显示,1 个月组、24 个月组和 60 个月组角膜基质细胞荧光强度接近,84 个月组 TUNEL 阳性细胞稍增多。1 个月组、24 个月组、60 个

月组和 84 个月组细胞凋亡率分别为 $(87.80 \pm 1.17)\%$ 、 $(89.50 \pm 1.05)\%$ 、 $(89.30 \pm 1.51)\%$ 和 $(90.20 \pm 1.47)\%$, 各组间总体比较差异无统计学意义 ($F = 4.525, P = 0.053$) (图 4)。

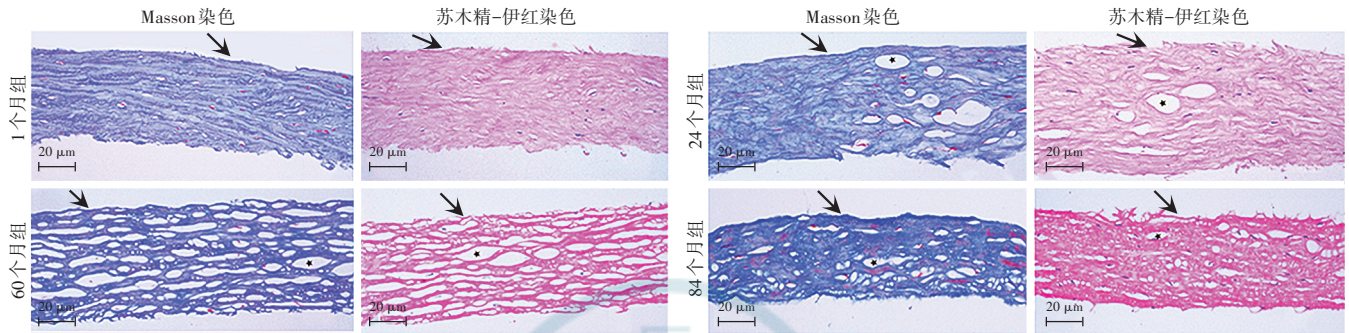


图 2 各组角膜基质透镜胶原纤维和组织学形态表现 ($\times 200$, 标尺 = $20 \mu\text{m}$) 1 个月组角膜基质透镜胶原纤维和透镜组织结构排列整齐, 组织表面光滑 (箭头); 24 个月组角膜基质透镜中部分胶原纤维排列紊乱, 组织表面不平 (箭头), 角膜基质透镜组织中出现空泡 (星号); 60 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列明显疏松呈网状, 透镜组织中有大量空泡 (星号), 组织表面不平 (箭头); 84 个月组角膜基质透镜部分胶原纤维脱落, 组织表面不光滑 (箭头), 纤维间空泡变少 (星号), 组织变薄

Figure 2 Histological examination of corneal stromal lenticules in different groups ($\times 200$, bar = $20 \mu\text{m}$) The collagen fibers of corneal stromal lenticules were neatly arranged and tightly packed and the appearance of the lenticules (arrow) was intact in the 1-month group. The interlayer disorders, vacuoles (star) and uneven surface (arrow) were displayed in the collagen fibers and lenticule tissue in the 24-month group. In the 60-month group, a reticulate structure was found in the collagen fibers and the lenticule tissue, showing loosened structure and more interlayer vacuoles (star) and uneven surface (arrow). In the 84-month group, loss of some collagen fibers and thinning of the stromal lenticules, uneven surface (arrow) and fewer vacuoles (star) were seen

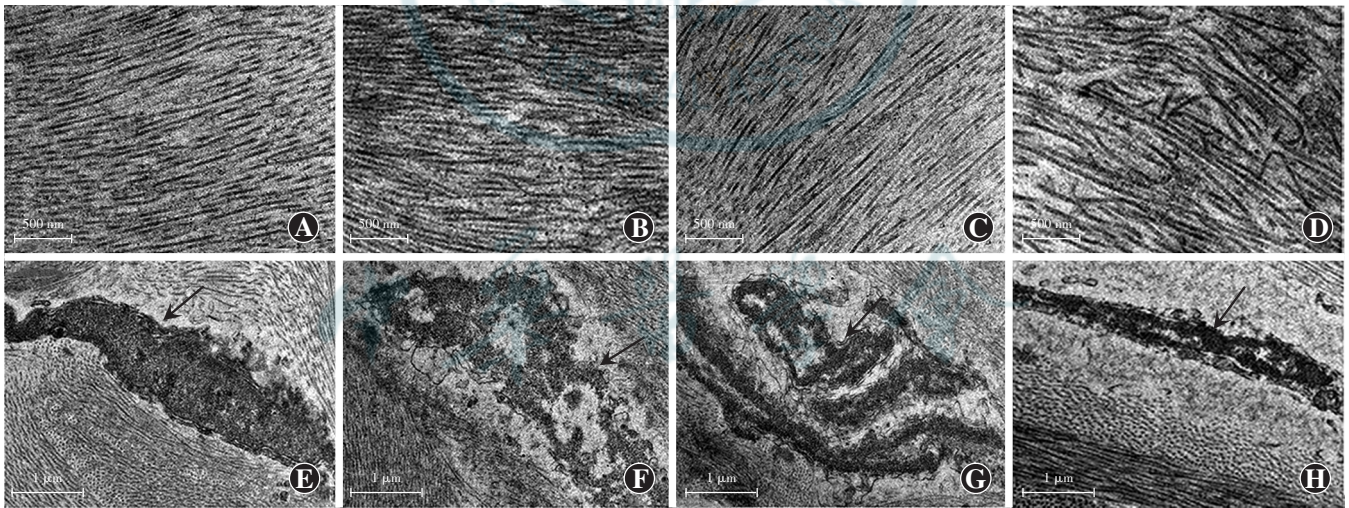


图 3 各组角膜基质透镜超微结构变化 A:1 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列整齐规则 ($\times 5000$, 标尺 = 500 nm) B:24 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列较疏松 ($\times 5000$, 标尺 = 500 nm) C:60 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列疏松 ($\times 5000$, 标尺 = 500 nm) D:84 个月组角膜基质透镜胶原纤维排列紊乱 ($\times 5000$, 标尺 = 500 nm) E:1 个月组角膜基质细胞呈长梭形, 核膜完整, 细胞质丰富 (箭头) ($\times 10000$, 标尺 = $1 \mu\text{m}$) F:24 个月组角膜基质细胞的细胞核形态不规则, 核膜不完整 (箭头) ($\times 10000$, 标尺 = $1 \mu\text{m}$) G:60 个月组角膜基质细胞萎缩, 细胞内结构紊乱 (箭头) ($\times 10000$, 标尺 = $1 \mu\text{m}$) H:84 个月组角膜基质细胞皱缩, 核膜结构不连续, 核质裂解 (箭头) ($\times 10000$, 标尺 = $1 \mu\text{m}$)

Figure 3 Ultrastructures of corneal stromal lenticules in different groups A: The collagen fibers were arranged neatly and regularly in the 1-month group ($\times 5000$, bar = 500 nm) B: The arrangement of collagen fibers in the 24-month group was a little looser but still regular ($\times 5000$, bar = 500 nm) C: Irregular and loose arrangement of collagen fibers was displayed in the 60-month group ($\times 5000$, bar = 500 nm) D: The collagen arrangement in the 84-month group was disordered ($\times 5000$, bar = 500 nm) E: The keratocytes in the 1-month group showed elongated and spindle-shaped, and the nuclear membrane was intact and cytoplasm (arrow) was abundant ($\times 10000$, bar = $1 \mu\text{m}$) F: The cellular nuclei in the 24-month group became deformed and nuclear membrane (arrow) was intact ($\times 10000$, bar = $1 \mu\text{m}$) G: The cells (arrow) were atrophied and deformed in the 60-month group ($\times 10000$, bar = $1 \mu\text{m}$) H: The corneal stromal cells (arrow) were wrinkled and atrophied with discontinuous nuclear membrane and lysed nucleoplasm in the 84-month group ($\times 10000$, bar = $1 \mu\text{m}$)

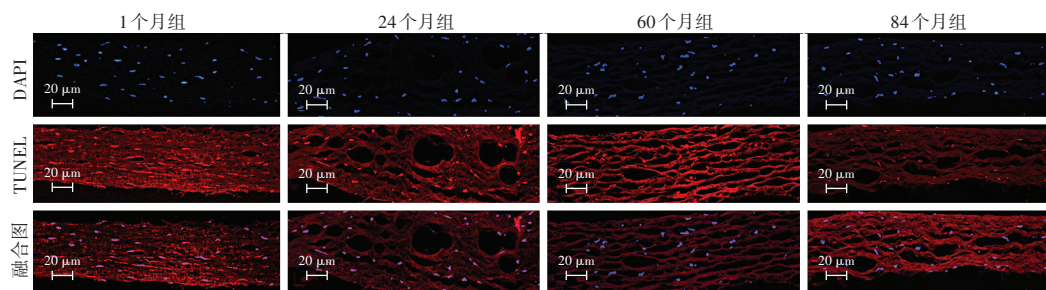


图 4 各组角膜基质透镜中 TUNEL 阳性细胞比较 (×200, 标尺 = 20 μm) 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI), TUNEL 阳性细胞为红色荧光 (DAB)。84 个月组 TUNEL 阳性细胞稍增多 DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; TUNEL: DNA 末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法

Figure 4 Comparison of TUNEL-positive cells in corneal stromal lenticules among various groups (×200, bar = 20 μm) Cellular nuclei showed blue fluorescence (DAPI) and TUNEL-positive cells showed red fluorescence (DAB). The TUNEL-positive cells were slightly increased in the 84-month group DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole; TUNEL: TdT-mediated biotinylated-dUTP nick-end labeling

3 讨论

SMILE 手术中取出的健康生物材料“角膜基质透镜”是位于角膜中央区基质前层的胶原纤维组织。由于角膜的硬度主要来自胶原纤维层,角膜基质层厚度与角膜硬度呈正相关,因此胶原纤维层对维持角膜的生物力学特性起着主导作用^[10],角膜基质透镜应用研究为眼科部分疾病的治疗拓展了新的途径^[5,11-12]。

角膜基质透镜的临床应用面临的主要挑战之一是找到简单、经济且能长期保存角膜基质透镜的有效方法,使之能够广泛用于药物载体研究、生物移植材料和眼科疾病的手术治疗^[8-9,13]。目前的相关研究主要集中在不同保存液对角膜基质透镜的中短期保存方面,Liang 等^[14]研究发现,4℃条件下短期保存(1~14 d)的角膜基质透镜在 Optisol 角膜保存液中细胞结构变化较慢。Yam 等^[15]研究认为,在 21 周内经过质量分数 0.1% 十二烷基硫酸钠处理后的角膜基质透镜仍能保持稳定的光学特性。然而,Optisol 角膜保存液及其他保存液均存在有效期较短且费用较高,不适合长期使用的问题。Liu 等^[16]研究发现,用不同保存液在 4℃或室温下(约 20℃)保存 48 h 可有效维持角膜基质透镜的透明度、完整性和低免疫原性,这为新鲜角膜基质透镜的转运和定点保存提供了方法学依据。

甘油保存法是目前应用较广的长期保存角膜的方法之一。Liang 等^[14]研究发现,无水甘油或硅胶干燥剂保存的角膜基质透镜更易出现细胞破坏和水肿。本课题组前期研究发现,-20℃低温下甘油保存 3 个月角膜基质透镜中大量胶原纤维断裂且结构排列紊乱,与其他研究结果相似^[14,17],因此用甘油长期保存角膜基质透镜具有一定的限制性。超低温保存法是一种长期保存生物组织的方法,也可用于角膜的保存,但存在

角膜内皮损伤的缺点,因此很少用于角膜长期保存^[18-19]。角膜基质透镜主要由 I 型和 V 型胶原纤维构成,保存时除要保持基质透镜的完整性和透明度外,无需维持角膜内皮的生存和完整性,也可避免后弹力层皱褶带来的影响,因此超低温技术保存角膜基质透镜具

有一定的应用前景。本研究发现,-80℃环境下长期保存的角膜基质透镜组织未见混浊、碎裂和斑块,450~800 nm 波长范围内保存不同时间组的透镜透光率接近,但 350~400 nm 波长范围内 4 个组的透镜透光率有较大差异,与 Yam 等^[15]的研究结果近似。因 450~800 nm 为可见光,而 350~400 nm 为紫外光,紫外光比可见光具有更高的能量,70%~75%的紫外光由角膜基质层吸收^[20-21],推测保存 60 个月的角膜基质透镜中含水量增多和胶原纤维排列紊乱是导致这种差异的原因。

规则的胶原纤维排列是保持角膜透明性的必要条件之一^[22]。本研究中对角膜基质透镜的组织形态学和超微结构进行观察,发现与保存 1 个月相比,保存 24 个月的角膜基质透镜开始出现部分胶原纤维结构排列稍疏松,纤维间出现空泡,保存 60 个月胶原纤维排列疏松,部分胶原纤维排列不规则,空泡增多,保存 84 个月胶原纤维排列紊乱,组织松散脱落。Liu 等^[16]研究发现,人角膜基质透镜可经冷冻技术保存,虽然随着保存时间的延长细胞凋亡率较高,但是对角膜基质透镜的透明性及其在一些疾病治疗中的临床应用的影响不大。本研究发现,虽然角膜基质透镜在超低温环境下保存时间超过 60 个月会出现明显的组织结构变化,但其透明度和完整性仍良好,这为保存的角膜基质透镜作为角膜移植材料提供了依据,即超低温保存技术长期保存角膜基质透镜有效且简单可行。Rovere 等^[23]研究发现,超低温保存可降低主要组织相容性复合体的表达,减少术后免疫排斥反应。我们推测角膜基质透镜在超低温环境下长期保存后会形成低免疫原性角膜基质支架,当受体角膜内皮细胞能够维持正常的屏障功能和离子泵作用时,即可减轻术后角膜水肿,保持角膜的透明性。我们认为保存时间>60 个月的

角膜基质透镜可用于蚕食性角膜溃疡等免疫性角膜疾病的手术治疗,保存时间<24 个月的角膜基质透镜适合于角膜基质混浊、老视和圆锥角膜等的手术治疗。

本实验尚未明确角膜基质透镜胶原纤维结构发生变化的时间点,也缺乏长期保存角膜基质透镜用于临床治疗的研究证据。本课题组根据本研究结果已将各组角膜基质透镜分别建立角膜移植动物模型,并对移植受体角膜的各项生理指标和生物力学特性进行监测,以进一步明确角膜基质透镜胶原纤维结构发生变化的时间点,为超低温保存下角膜基质透镜治疗角膜基质混浊、老视和圆锥角膜等疾病的研究提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bachmann BO, Schrader S. Biomaterials or donor tissue-what is the future of tissue engineering for cornea reconstruction? [J]. Klin Monbl Augenheilkd, 2017, 234(6): 758-762. DOI: 10. 1055/s-0043-109024.
- [2] Chen Z, You J, Liu X, et al. Biomaterials for corneal bioengineering [J/OL]. Biomed Mater, 2018, 13(3): 032002 [2021-03-06]. https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-605X/aa92d2. DOI: 10.1088/1748-605X/aa92d2.
- [3] 靳荷, 钟兴武. 异种生物材料应用于角膜移植的研究进展[J]. 医学综述, 2019, 25(23): 4636-4640. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.23.008.
Jin H, Zhong XW. Research advances in application of xenogeneic biomaterials in corneal transplantation [J]. Med Recapitul, 2019, 25(23): 4636-4640. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2019.23.008.
- [4] Jin H, Liu L, Ding H, et al. Comparison of femtosecond laser-assisted corneal intrastromal xenotransplantation and the allotransplantation in rhesus monkeys[J/OL]. BMC Ophthalmol, 2017, 17(1): 202 [2021-03-06]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29121878/. DOI: 10.1186/s12886-017-0595-z.
- [5] Jin H, He M, Liu H, et al. Small-incision femtosecond laser-assisted intracorneal concave lenticule implantation in patients with keratoconus [J]. Cornea, 2019, 38(4): 446-453. DOI: 10.1097/ICO.00000000000001877.
- [6] He M, Jin H, He H, et al. Femtosecond laser-assisted small incision endokeratophakia using a xenogeneic lenticule in rhesus monkeys[J]. Cornea, 2018, 37(3): 354-361. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001470.
- [7] 刘良平, 王泳, 何森, 等. 飞秒激光辅助猴眼角膜基质透镜移植观察[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2015, 36(3): 449-455.
Liu LP, Wang Y, He M, et al. Preliminary investigation femtosecond laser-assisted refractive lenticule transplantation in rhesus monkeys[J]. J Sun Yat-sen Univ (Med Sci), 2015, 36(3): 449-455.
- [8] 尚艳峰, 张丰菊. 飞秒激光小切口角膜基质透镜取出术人体角膜基质透镜再利用的研究新进展[J]. 中华眼科杂志, 2020, 56(2): 144-148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2020.02.001.
Shang YF, Zhang FJ. New progress in the reuse of human corneal stromal lenticules from SMILE[J]. Chin J Ophthalmol, 2020, 56(2): 144-148. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4081.2020.02.001.
- [9] 晏利, 周文天. 角膜基质透镜在眼科疾病治疗中的应用及展望[J]. 中华实验眼科杂志, 2021, 39(2): 172-176. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190604-00241.
Yan L, Zhou WT. Application and prospect of corneal stromal lenticules in the treatment of ophthalmic diseases [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39(2): 172-176. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190604-00241.
- [10] Vellara HR, Patel DV. Biomechanical properties of the keratoconic cornea: a review [J]. Clin Exp Optom, 2015, 98(1): 31-38. DOI: 10.1111/cxo.12211.
- [11] Jacob S, Kumar DA, Agarwal A, et al. Preliminary evidence of successful near vision enhancement with a new technique: PrEsbyopic allogenic refractive lenticule (PEARL) corneal inlay using a SMILE lenticule [J]. J Refract Surg, 2017, 33(4): 224-229. DOI: 10.3928/1081597X-20170111-03.
- [12] Jiang Y, Li Y, Liu XW, et al. A novel tectonic keratoplasty with femtosecond laser intrastromal lenticule for corneal ulcer and perforation [J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(15): 1817-1821. DOI: 10.4103/0366-6999.186639.
- [13] 饶静, 陈建苏, 顾佳宁, 等. 载药交联脱细胞角膜基质透镜的制备及体外药物缓释效果评价[J]. 中华实验眼科杂志, 2020, 38(12): 1004-1010. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190817-00353.
Rao J, Chen JS, Gu JN, et al. Preparation and drug release effect evaluation of drug-loaded cross-linked decellularized corneal stromal lenticules *in vitro* [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2020, 38(12): 1004-1010. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20190817-00353.
- [14] Liang G, Wang L, Pan Z, et al. Comparison of the different preservative methods for refractive lenticules following SMILE [J]. Curr Eye Res, 2019, 44(8): 832-839. DOI: 10.1080/02713683.2019.1597890.
- [15] Yam GH, Yusoff NZ, Goh TW, et al. Decellularization of human stromal refractive lenticules for corneal tissue engineering [J/OL]. Sci Rep, 2016, 6: 26339 [2021-03-14]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27210519/. DOI: 10.1038/srep26339.
- [16] Liu YC, Williams GP, George BL, et al. Corneal lenticule storage before reimplantation [J]. Mol Vis, 2017, 23: 753-764.
- [17] Xia F, Zhao J, Fu D, et al. Optical transmittance and ultrastructure of SMILE-derived lenticules subjected to three different preservative methods [J/OL]. Exp Eye Res, 2020, 201: 108357 [2021-03-16]. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483520306151? via%3Dihub. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108357.
- [18] Chaurasia S, Das S, Roy A. A review of long-term corneal preservation techniques: relevance and renewed interests in the COVID-19 era [J]. Indian J Ophthalmol, 2020, 68(7): 1357-1363. DOI: 10.4103/ijoo.IJO_1505_20.
- [19] 陈丽, 陆佳骏, 盛敏杰, 等. 角膜保存方法现状及进展 [J]. 国际眼科杂志, 2017, 17(6): 1060-1062. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.6.12.
Chen L, Lu JJ, Sheng MJ, et al. Current status and progress of corneal preservation methods [J]. Int Eye Sci, 2017, 17(6): 1060-1062. DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.6.12.
- [20] Podskochy A. Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage [J]. Acta Ophthalmol Scand, 2004, 82(6): 714-717. DOI: 10.1111/j.1600-0420.2004.00369.x.
- [21] Kolozsvári L, Nógrádi A, Hopp B, et al. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(7): 2165-2168.
- [22] Qazi Y, Wong G, Monson B, et al. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction [J]. Brain Res Bull, 2010, 81(2-3): 198-210. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2009.05.019.
- [23] Rovere MR, Ouilhon C, Salmon D, et al. Development and characterization of lyophilized transpanted decellularized stroma as a replacement for living cornea in deep anterior lamellar keratoplasty [J]. Cell Tissue Bank, 2019, 20(1): 49-59. DOI: 10.1007/s10561-018-9742-x.

(收稿日期: 2021-04-13 修回日期: 2021-11-08)

(本文编辑: 尹卫靖 刘艳)