

· 实验研究 ·

ROCK 抑制剂 Y-27632 在角膜保存时对角膜缘干细胞活性的促进作用

王瑶 段豪云 杨玲玲 曲明俐 周庆军

【摘要】 背景 角膜缘干细胞(LSCs)对维持角膜上皮的稳定和角膜组织透明性有重要作用。Rho 关联卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)抑制剂 Y-27632 能够促进人胚胎干细胞、角质上皮细胞等的增生,减少细胞凋亡。目的 探讨 Y-27632 对离体兔角膜保存和体外 LSCs 扩增能力的影响。方法 在细胞培养基 MEM 中加入质量分数 12.5% 硫酸软骨素、质量分数 10.0% 低分子右旋糖酐、20.0 mg/L 地塞米松、100 mg/L 妥布霉素注射液、9.5 g/L HEPES,使用时添加 0.375 mg/L L-谷氨酰胺,制备成角膜活性保存液。将新西兰大白兔的角膜组织片分别置于含或不含 Y-27632 的角膜活性保存液中保存 4、7、14 d,采用质量分数 0.25% 锥虫蓝和质量分数 0.2% 茜素红染色法观察角膜内皮细胞密度及形态,采用 Giemsa 染色法并使用 Image J 图像分析软件计数克隆球数量和 LSCs 活性,计算 LSCs 存活率和克隆形成效率。结果 角膜片保存 4 d 时,Y-27632 保存液组和单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞形态无明显差别,角膜片保存 7 d 时,Y-27632 保存液组角膜内皮细胞形态仍保持规则的六边形,而单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞的细胞膜轻微皱缩,少数细胞体积变大。角膜片保存 14 d 时单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞可见较多的茜素红斑。单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞计数为 $(2\ 262 \pm 75)/\text{mm}^2$,Y-27632 保存液组角膜内皮细胞计数为 $(2\ 425 \pm 95)/\text{mm}^2$,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。新鲜角膜片和角膜片保存 4 d 时,Y-27632 保存液组和单纯角膜中期保存液组 LSCs 的克隆球均较大,其内细胞数较多,而保存 7 d 和 14 d 时,与 Y-27632 保存液组比较,单纯角膜中期保存液组 LSCs 克隆球直径明显缩小。新鲜分离的角膜片和角膜片保存 4 d 时,Y-27632 保存液组与单纯角膜中期保存液组 LSCs 的克隆形成率和角膜上皮细胞存活率的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);角膜片保存 7 d 和 14 d 时,角膜缘上皮细胞的活性率分别为 $(73.00 \pm 2.12)\%$ 和 $(56.00 \pm 0.71)\%$,明显高于单纯角膜中期培养液组的 $(66.00 \pm 4.00)\%$ 和 $(49.00 \pm 0.71)\%$,差异均有统计学意义($t = 3.098, P = 0.018; t = 9.798, P = 0.000$);角膜片保存 7 d 和 14 d 时,Y-27632 保存液组与单纯角膜中期保存液组 LSCs 的克隆形成效率分别为 $(11.05 \pm 0.21)\%$ 和 $(3.10 \pm 1.97)\%$,明显高于单纯角膜中期保存液组中的 $(2.05 \pm 1.20)\%$ 和 $(0.40 \pm 0.14)\%$,差异均有统计学意义($t = 18.107, P = 0.000; t = 3.184, P = 0.017$)。结论 角膜保存液中添加 Y-27632 可明显提高离体角膜保存的效果,同时可维持 LSCs 的活性及克隆形成能力。Y-27632 可作为角膜保存液的有效添加成分。

【关键词】 Rho 相关激酶/拮抗剂 & 抑制剂; 细胞培养; 角膜缘/细胞学; 干细胞; 角膜上皮; 细胞生存/药物作用; 角膜保存; 兔

The promoting effects of ROCK inhibitor Y-27632 on the activity of limbal stem cells in corneal preservation medium Wang Yao, Duan Haoyun, Yang Lingling, Qu Mingli, Zhou Qingjun. Shandong Provincial Key Laboratory of Ophthalmology, Shandong Eye Institute, Qingdao 266071, China

Corresponding author: Zhou Qingjun, Email: qjzhou2000@hotmail.com

【Abstract】 Background Limbal stem cells (LSCs) play an important role on the stability of corneal epithelium and corneal transparency. Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (ROCK) inhibitor can promote cell proliferation and reduce apoptosis, such as human embryonic stem cells and keratin epithelial cells.

Objective This study was to investigate the improving effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on the activity of rabbit LSCs in corneal preservation medium. **Methods** Corneal preservation solution was prepared by adding 12.5% chondroitin sulfate, 10.0% low molecular dextran, 20.0 mg/L dexamethasone, 100 mg/L tobramycin sulfate, 9.5 g/L HEPES and 0.375 mg/L L-glutamine in MEM. The corneas of New Zealand white rabbits were collected and preserved in the corneal preservation solution with or without Y-27632 for 4, 7, 14 days, and the density and morphology of corneal endothelial cells were examined by using 0.25% trypan blue staining and 0.2% alizarin red staining. Isolated corneal

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.004

基金项目:国家自然科学基金项目(81200665);山东省自然科学基金项目(ZR2010HQ019)

作者单位:266071 青岛,山东省眼科研究所 山东省眼科学重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地

通信作者:周庆军,Email:qjzhou2000@hotmail.com

epithelial cells were seeded on 3T3 feeder layer and cultured for 7–10 days until colonies formation. Colony shape of LSCs was observed under the light microscope, and colony-formation efficiency was analyzed after Giemsa staining by Image J software. **Results** The morphology and density of corneal endothelial cells were normal in the corneal preservation solution with and without Y-27632 for 4 days. In the seventh day after preservation, the cells remained the regular hexagon in shape in the preservation solution with Y-27632, however, the cellular membrane was slightly shrinking with the positive staining for alizarin red in the preservation solution without Y-27632. The density of corneal endothelial cells in the corneal preservation solution without Y-27632 was $(2\ 262 \pm 75)$ cells/mm², while in the preservation solution with Y-27632 was $(2\ 425 \pm 95)$ cells/mm² ($P < 0.001$). The cloning spheres of LSCs were similar in preservation solution both with and without Y-27632 in the freshly isolated cornea or preserved corneas and exhibited more cells inside. But in 7 days and 14 days after preservation, the cloning spheres were much smaller in the preservation solution without Y-27632 group than those in the preservation with Y-27632 group. No significant differences were found in the cloning-formation rate and survival rate of corneal epithelial cells in corneas freshly isolated or preserved for 4 days in both groups (all at $P > 0.05$). In 7 days and 14 days after preservation, the active rates of corneal epithelial cells were $(73.00 \pm 2.12)\%$ and $(56.00 \pm 0.71)\%$ in the preservation solution with Y-27632, which were significantly higher than $(66.00 \pm 4.00)\%$ and $(49.00 \pm 0.71)\%$ in the preservation solution without Y-27632, showing statistically significant differences between them ($t = 3.098, P = 0.018; t = 9.798, P = 0.000$). In addition, the cloning-formation rates of LSCs were $(11.05 \pm 0.21)\%$ and $(3.10 \pm 1.97)\%$ in the preservation solution with Y-27632 in 7 days and 14 days after preservation, revealing significantly elevation in comparison with $(2.05 \pm 1.20)\%$ and $(0.40 \pm 0.14)\%$ in the preservation solution without Y-27632 ($t = 18.107, P = 0.000; t = 3.184, P = 0.017$). **Conclusions** Y-27632 promotes the vitality and cloning-formation ability of LSCs in corneal preservation medium, suggesting its potential use during storage of cornea.

[**Key words**] Rho-associated kinases/antagonists & inhibitors; Cells cultured; Limbus cornea/cytology; Stem cells; Epithelium, cornea; Cell survival/drug effects; Cornea preservation; Rabbit

角膜缘干细胞 (limbal stem cells, LSCs) 对维持角膜上皮的动态稳定和角膜组织的透明性有重要作用。各种严重眼表疾病常导致 LSCs 部分或全部缺失, 眼表组织广泛破坏, 继发持续性角膜上皮缺损、慢性炎症、角膜上皮结膜化和新生血管侵入, 引起角膜透明度下降, 造成患者严重视力障碍。对于部分 LSCs 缺失患者可进行羊膜移植, 促进角膜上皮细胞迁移到缺损区, 从而对角膜病变区进行修复; 对于全部 LSCs 缺失患者则须采用自体或异体 LSCs 移植, 以得到稳定的角膜上皮表型^[1-2]。近年来采用体外培养的角膜缘上皮移植法治疗 LSCs 缺乏病变的研究取得了显著进展, 但研究表明角膜缘上皮膜片中干细胞比例 >3% 才能使移植成功率 >70%^[3-4], 因此移植材料中 LSCs 的数量和质量是角膜移植手术成功的关键, 而维持角膜上皮, 尤其是 LSCs 的活性和功能也是保存液的重要评价标准。目前对角膜保存液效果的评价多以角膜内皮细胞的活性和功能作为主要指标, 较少关注角膜上皮细胞的活性和功能。角膜活性保存液是本研究所研制的中期角膜保存液, 制作和使用简单、方便, 维持一定的角膜内皮细胞密度可达 $7 \sim 10 \text{ d}^{[5]}$, 但前期研究中发现, 角膜片在该保存液中保存超过 4 d 后, LSCs 克隆形成能力显著下降^[6]。Y-27632 是选择性 Rho 关联卷曲螺旋蛋白激酶 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase, ROCK) 抑制剂, 可增加人胚胎干细胞、角质上

皮细胞和角膜内皮细胞的克隆效率, 减少细胞凋亡, 甚至诱导细胞永生^[7-9]。本研究中观察角膜保存液中添加 Y-27632 后角膜内皮细胞的密度变化及角膜缘上皮细胞的存活率和克隆形成效率变化, 评价 Y-27632 是否可用于角膜活性保存液的改良, 从而维持角膜内皮和 LSCs 的活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级新西兰大白兔 11 只, 购于青岛康大兔业发展有限公司, 由山东省眼科研究所实验动物中心饲养。实验动物的使用遵循 2011 年修订的《实验动物管理条例》。

1.1.2 主要试剂及仪器 MEM 培养基、质量分数 10% 低分子右旋糖酐、0.375 mg/L L-谷氨酰胺 (美国 Gibco 公司); 质量分数 12.5% 硫酸软骨素、9.5 g/L Hepes、锥虫蓝溶液、质量分数 0.25% 胰酶-质量分数 0.02% EDTA (美国 Sigma 公司); 青链霉素 (美国 Corning 公司); 20.0 mg/L 地塞米松 (济南利民制药厂); 100 mg/L 妥布霉素注射液 (江苏鹏鹞药业有限公司); 2.4 U/ml (商品单位) Dispase II (美国 Roche 公司); 质量分数 0.2% 茜素红溶液 (美国 ScienCell 公司); 冰甲醇 (北京中国医药集团总公司)。6.0 mm 角膜环钻 (苏州协和医疗器械公司); S6D 型解剖显微镜

(美国 Leica 公司); CKX-41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); TC10 型细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 角膜活性保存液的配制

采用本研究中自主研发的角膜中期保存液(专利号:200410091007.5),以细胞培养基 MEM 为基础培养液,分别加入 12.5% 硫酸软骨素、10.0% 低分子右旋糖酐、20.0 mg/L 地塞米松、100 mg/L 妥布霉素注射液、9.5 g/L Hepes,使用时添加 0.375 mg/L L-谷氨酰胺,保存液 pH 值均为 7.2~7.4,渗透压为 300~380 mOsm。

1.2.2 离体角膜片的保存及分组

耳缘静脉空气栓塞法处死新西兰大白兔,取出双侧眼球,用含青链霉素的无菌生理盐水冲洗浸泡,无菌条件下剪取完整兔角膜并保留 1~2 mm 巩膜,将取下的角膜分别置于无或含有 10 μmol/L Y-27632 的角膜中期保存液中分别保存 4、7 和 14 d,新鲜取材的角膜视为 0 d。

1.2.3 角膜内皮及上皮细胞活性检测

取出在角膜中期保存液中保存的角膜,6.0 mm 环钻钻取中央角膜,将配制好的质量分数 0.25% 锥虫蓝溶液滴入角膜内皮面。覆盖染色 1 min 后吸去染料,生理盐水漂洗 2 次,再滴入 0.2% 茜素红溶液染色 2 min,生理盐水漂洗 2 次。显微镜下计数相同面积的内皮细胞数量并照相。

1.2.4 LSCs 活性及克隆形成能力检测

取出保存 4、7、14 d 的兔角膜,用 6.0 mm 环钻将中央角膜去除,将角膜环浸没于 2.4 U/ml Dispase II 中,37 °C 消化 1.5 h 后取出,解剖显微镜下分离角膜缘上皮细胞层,加入 0.25% 胰酶-0.02% EDTA,37 °C 消化 15 min,离心半径 20 cm,1 500 r/min 离心 5 min,加入 LSCs 培养基离心重悬制成单细胞悬液,取 10 μl 细胞悬液,加入 10 μl 0.4% 锥虫蓝溶液混匀,细胞计数仪检测并计数活性细胞的比例和总细胞数量。将分离的角膜缘上皮细胞进行克隆培养,按 1×10^3 /孔接种于预铺 3T3 饲养层的 6 孔板,37 °C 静置培养 10~14 d,倒置显微镜下观察。所形成细胞克隆经冰甲醇固定, Giemsa 染色后拍照,使用 Image J 图像分析软件计数克隆数量,计算克隆形成率^[10]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计学软件进行统计分析。本研究测量指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用完全随机分组两水平实验设计,单纯角膜中期保存液组与 Y-27632 保存液组间兔角膜上皮细胞活性率及克隆形成率的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 角膜内皮细胞形态

角膜片保存 4 d 时,Y-27632 保存液组和单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞形态和密度无明显差异。角膜片保存 7 d 时,Y-27632 保存液组角膜内皮细胞形态仍保持规则的六边形,而单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞膜轻微皱缩,细胞形态近似六角形,可见少数大细胞。角膜片保存 14 d 时,单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞可见较多的茜素红斑(图 1),提示内皮细胞受损。单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞计数为 $(2\ 262 \pm 75)/\text{mm}^2$,Y-27632 保存液组角膜内皮细胞计数为 $(2\ 425 \pm 95)/\text{mm}^2$,2 个组比较差异有统计学意义($P < 0.001$),但 2 个组角膜内皮细胞均未发现锥虫蓝着染。

2.2 角膜缘上皮细胞的存活比例

随着角膜片保存时间的延长,角膜缘上皮细胞中活细胞比例均逐渐下降。新鲜取材的角膜视为 0 d,角膜片保存 4 d 时,单纯角膜中期保存液组和 Y-27632 保存液组角膜缘上皮细胞活性分别为 $(68.00 \pm 1.41)\%$ 和 $(68.00 \pm 6.36)\%$,差异无统计学意义($t =$

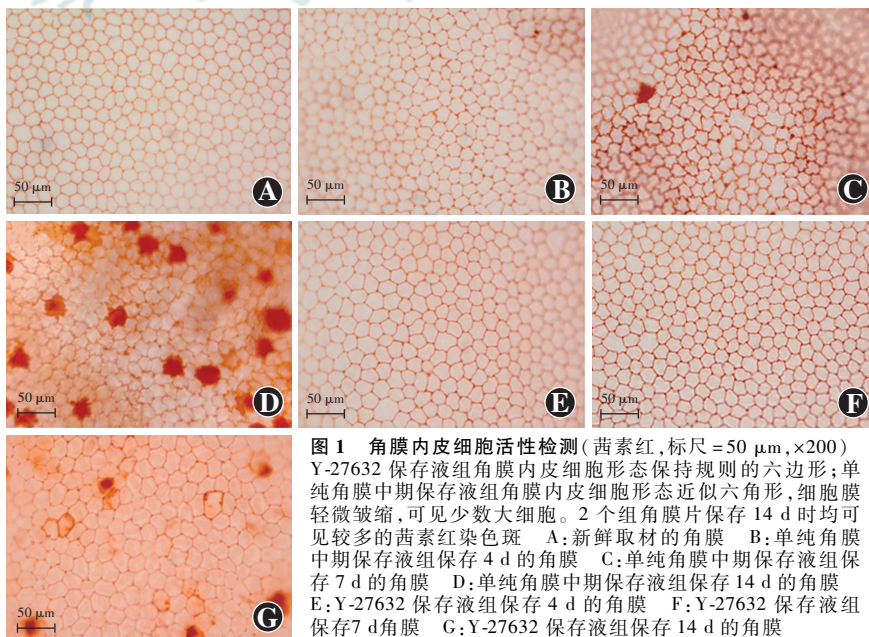


图 1 角膜内皮细胞活性检测(茜素红,标尺=50 μm,×200) Y-27632 保存液组角膜内皮细胞形态保持规则的六边形;单纯角膜中期保存液组角膜内皮细胞形态近似六角形,细胞膜轻微皱缩,可见少数大细胞。2 个组角膜片保存 14 d 时均可见较多的茜素红染色斑 A:新鲜取材的角膜 B:单纯角膜中期保存液组保存 4 d 的角膜 C:单纯角膜中期保存液组保存 7 d 的角膜 D:单纯角膜中期保存液组保存 14 d 的角膜 E:Y-27632 保存液组保存 4 d 的角膜 F:Y-27632 保存液组保存 7 d 角膜 G:Y-27632 保存液组保存 14 d 的角膜

0.677, $P=0.268$); 角膜片保存 7 d 时, Y-27632 保存液组角膜缘上皮细胞活性为 $(73.00 \pm 2.12)\%$, 明显高于单纯角膜中期保存液组的 $(66.00 \pm 4.00)\%$, 差异有统计学意义 ($t=3.098, P=0.018$); 保存 14 d 时, Y-27632 保存液组角膜缘上皮细胞活性为 $(56.00 \pm 0.71)\%$, 明显高于单纯角膜中期保存液组的 $(49.00 \pm 0.71)\%$, 差异有统计学意义 ($t=9.798, P=0.000$) (图 2)。

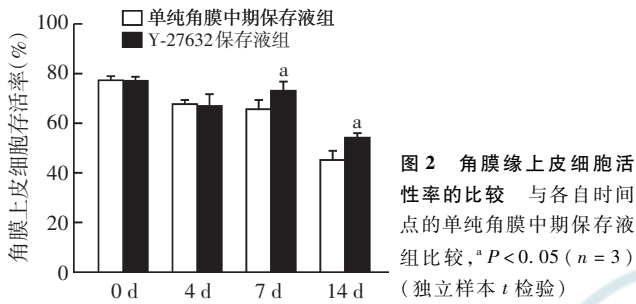


图 2 角膜缘上皮细胞活性率的比较 与各自时间点的单纯角膜中期保存液组比较, $^a P < 0.05 (n = 3)$ (独立样本 t 检验)

2.3 LSCs 的克隆形成能力

新鲜分离的兔角膜缘上皮细胞所形成的细胞克隆边界清楚, 形态规则, 克隆内细胞排列紧密, 细胞形态

均一, 呈圆形或卵圆形, 细胞核质比较大。单纯角膜中期保存液组保存后 4 d 的 LSCs 克隆直径接近新鲜分离的克隆, 保存 7 d 时细胞克隆变小, 其内细胞数量急剧减少, 保存 14 d 后, 形成的细胞克隆非常小, 细胞数极少; Y-27632 保存液组保存后 4 d、7 d 的 LSCs 克隆直径均明显大于相应时间点单纯角膜中期保存液组, 克隆内细胞数量多, 保存 14 d 时仍能形成较大的细胞克隆 (图 3)。

新鲜分离的兔角膜缘上皮细胞克隆形成率为 $(19.9 \pm 0.85)\%$, 保存 4 d 时单纯角膜中期保存液组和 Y-27632 保存液组分别为 $(17.2 \pm 1.56)\%$ 和 $(16.3 \pm 1.98)\%$, 2 个组间差异无统计学意义 ($t=0.618, P=0.258$), 保存 7 d 时 Y-27632 保存液组角膜缘上皮细胞克隆形成率为 $(11.05 \pm 0.21)\%$, 显著高于单纯角膜中期保存液组的 $(2.05 \pm 1.20)\%$, 差异有统计学意义 ($t=18.107, P=0.000$); 保存 14 d 时, Y-27632 保存液组角膜缘上皮细胞克隆形成率为 $(3.10 \pm 1.97)\%$, 显著高于单纯角膜中期保存液组的 $(0.40 \pm 0.14)\%$, 差异有统计学意义 ($t=3.184, P=0.017$) (图 4)。

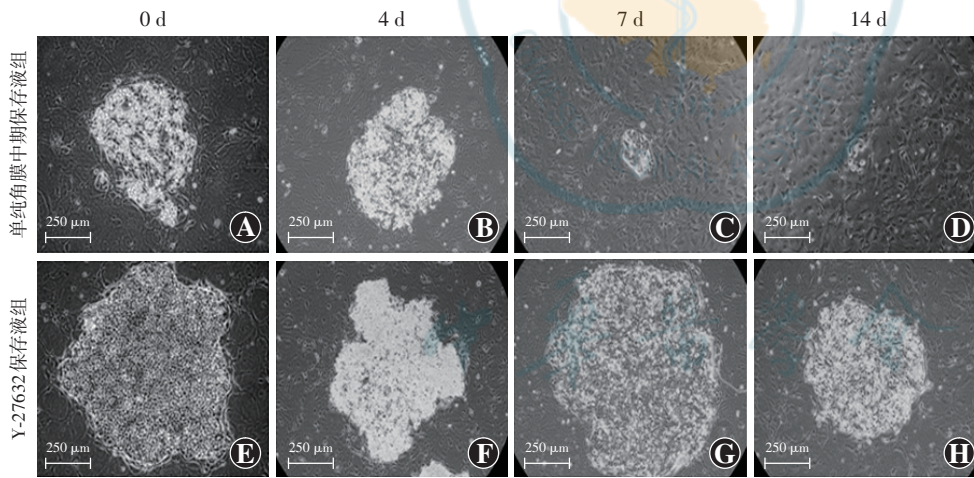


图 3 LSCs 的克隆形态 (标尺 = 250 μm) 2 个组间新鲜分离的角膜缘上皮细胞形成的克隆球边界清楚, 形态规则, 克隆内细胞排列紧密, 细胞形态均一, 呈圆形或卵圆形, Y-27632 保存液组克隆直径比单纯角膜中期培养液组大。保存 7 d 和 14 d 时, Y-27632 保存液组克隆形态及大小明显优于单纯角膜中期保存液组

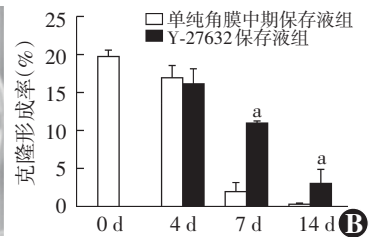
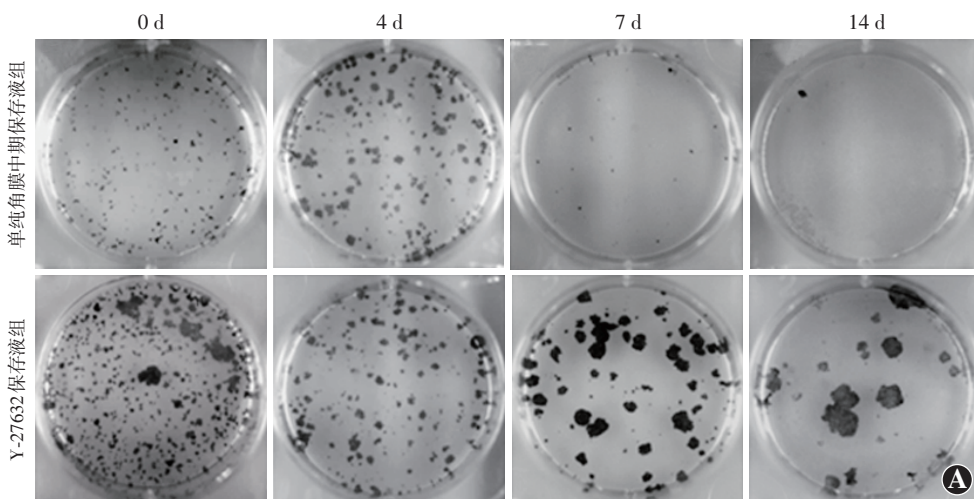


图 4 两个组 LSCs 克隆形成率 A: 角膜片保存后 4 d, 2 个组间 LSCs 克隆细胞数接近, 保存 7 d 和 14 d 时, Y-27632 保存液组 LSCs 克隆数明显多于单纯角膜中期保存液组 B: 与各自时间点的单纯角膜中期保存液组比较, $^a P < 0.05$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

3 讨论

ROCK 抑制剂 Y-27632 是近年来研究较多的一种小分子化合物,能减少人胚胎干细胞的分离性凋亡,提高胚胎干细胞存活率,同时维持自我更新和多向分化能力^[11-12]。此外,Y-27632 在成体细胞中可显著提高表皮干细胞的体外扩增能力,甚至诱导细胞永生,且可促进人角膜内皮细胞的体外扩增,同时可用于角膜内皮细胞移植^[13-15]。本研究旨在验证角膜活性保存液中添加 Y-27632 是否可提高角膜,尤其是 LSCs 活性的保存,以改良现有的角膜活性保存液,使其可同时保存角膜内皮细胞和 LSCs。

角膜缘组织移植或体外培养的 LSCs 移植已成为治疗 LSCs 缺乏症的主要手段,Rama 等^[4]研究发现,体外培养的角膜上皮细胞膜片中 Δ NP63⁺LSCs 含量至关重要,若 Δ NP63⁺细胞大于 3%,则干细胞移植成功率为 78%;若 Δ NP63⁺细胞少于 3%,则移植成功率仅为 11%^[4]。移植材料中 LSCs 的数量和功能对移植治疗的成败起决定性作用。目前,角膜保存方法中很少关注 LSCs 的功能。研究表明,Optisol-GS 角膜保存液能够保存角膜内皮活性达 2 周,但角膜上皮最佳保存时间仅为 4~6 d^[16-17]。本课题组前期对谢立信教授发明的角膜活性保存液保存 LSCs 的能力进行了检测,发现其能保存角膜内皮至 14 d,但对 LSCs 的克隆形成能力只能维持 4 d。本研究中对此保存液改良后发现,保存 7 d、14 d 时 Y-27632 保存液组角膜缘上皮细胞克隆形成率明显高于单纯角膜中期保存液组,克隆形成率的高低与干细胞数量的多少一致,说明添加 Y-27632 的角膜活性保存液能够更好地维持 LSCs 的活性,且 Y-27632 保存液组大克隆更多,说明 LSCs 的增生能力强。此外本研究中还发现,角膜片短期保存时 (≤ 4 d),2 种保存液的保存效果差异无统计学意义,说明含 Y-27632 角膜保存液对于组织材料的长期保存效果更好,能够为临床上角膜材料的使用争取更多时间。

根据 Y-27632 有利于上皮细胞体外扩增的相关报道^[18-19],本研究中比较了 Y-27632 分别作为保存液成分和培养基成分在维持 LSCs 克隆形成能力中的作用,结果显示单纯在体外培养阶段添加 Y-27632 并不能维持 LSCs 的克隆形成能力,当保存时间延长至 14 d 时,其克隆形成率急剧下降至 1.2%;而在保存液中添加 Y-27632 的 LSCs 克隆形成率仍大于 3%。由此说明,LSCs 的功能在保存过程容易损失,也印证了保存液改良的重要性和 Y-27632 活性角膜保存液的有效性。因

此,ROCK 抑制剂 Y-27632 可有效促进细胞的存活和增生,明显提高现有角膜保存液的效果,可用于对角膜保存液的改良。

参考文献

- [1] 谢立信,董晓光,史伟云. 角膜缘组织移植治疗眼表疾病的初步报告[J]. 中华眼科杂志,2000,36(6):449-451.
- [2] Cauchi PA, Ang GS, Azuara-Blanco A, et al. A systematic literature review of surgical interventions for limbal stem cell deficiency in humans[J]. Am J Ophthalmol,2008,146(2):251-259. doi:10.1016/j.ajo.2008.03.018.
- [3] Shortt AJ, Tuft SJ, Daniels JT. Ex vivo cultured limbal epithelial transplantation. A clinical perspective[J]. Ocul Surf,2010,8(2):80-90.
- [4] Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration [J]. N Engl J Med,2010,363(2):147-155. doi:10.1056/NEJMoA0905955.
- [5] 董晓光,谢立信,张新晨. 角膜中期保存液的研制和临床应用[J]. 中华眼科杂志,2000,36(1):21-23.
- [6] Liu T, Wang Y, Duan HY, et al. Effects of preservation time on proliferative potential of human limbal stem/progenitor cells[J]. Int J Ophthalmol,2012,5(5):549-554. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2012.05.02.
- [7] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol,2007,25(6):681-686. doi:10.1038/nbt1310.
- [8] Liu X, Ory V, Chapman S, et al. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells [J]. Am J Pathol,2012,180(2):599-607. doi:10.1016/j.ajpath.2011.10.036.
- [9] Chapman S, Liu X, Meyers C, et al. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor [J]. J Clin Invest,2010,120(7):2619-2626. doi:10.1172/JCI42297.
- [10] Zhou Q, Duan H, Wang Y, et al. ROCK inhibitor Y-27632 increases the cloning efficiency of limbal stem/progenitor cells by improving their adherence and ROS-scavenging capacity [J]. Tissue Eng Part C Methods,2013,19(7):531-537. doi:10.1089/ten. TEC.2012.0429.
- [11] Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol,2007,25(6):681-686. doi:10.1038/nbt1310.
- [12] Gauthaman K, Fong CY, Subramanian A, et al. ROCK inhibitor Y-27632 increases thaw-survival rates and preserves stemness and differentiation potential of human Wharton's jelly stem cells after cryopreservation [J]. Stem Cell Rev,2010,6(4):665-676. doi:10.1007/s12015-010-9184-8.
- [13] Heng BC. Effect of Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Tissue Cell,2009,41(5):376-380. doi:10.1016/j.tice.2009.01.004.
- [14] Zhang L, Valdez JM, Zhang B, et al. ROCK inhibitor Y-27632 suppresses dissociation-induced apoptosis of murine prostate stem/progenitor cells and increases their cloning efficiency [J/OL]. PLoS One,2011,6(3):e18271 [2015-04-25]. http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0018271. doi:10.1371/journal.pone.0018271.
- [15] Takehara T, Teramura T, Onodera Y, et al. Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 promotes survival of cynomolgus monkey embryonic stem cells [J]. Mol Hum Reprod,2008,14(11):627-634. doi:10.1093/molehr/gan061.

[16] Means TL, Geroski DH, L'Hernault N, et al. The corneal epithelium after optisol-GS storage[J]. Cornea, 1996, 15(6): 599-605.
 [17] Greenbaum A, Hasany SM, Rootman D. Optisol vs Dextsol as storage media for preservation of human corneal epithelium[J]. Eye (Lond), 2004, 18(5): 519-524. doi:10. 1038/sj. eye. 6700693.
 [18] Ichikawa H, Nakata N, Abo Y, et al. Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cells[J]. Cryobiology, 2012, 64(1): 12-22. doi:10. 1016/j. cryobiol. 2011. 11. 005.

[19] Terunuma A, Limgala RP, Park CJ, et al. Efficient procurement of epithelial stem cells from human tissue specimens using a Rho-associated protein kinase inhibitor Y-27632 [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(4): 1363-1368. doi:10. 1089/ten. TEA. 2009. 0339.

(收稿日期:2015-03-26)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)

· 临床经验 ·

2.4 mm 切口下取出一片式折叠型人工晶状体的原因分析及方法改良

王丽翌 李立刚 孟永安 张德秀

目前,白内障手术的主切口可小至 1.8 mm,规则的微创切口能更好地实现屈光性手术的目标^[1-2],但术中出现异常需取出人工晶状体(intraocular lens, IOL)时,多数情况下需要进一步扩大切口,且由于 IOL 材质、设计不同,取出时的难易程度也有差异^[3-4]。本研究分析一片式折叠型 IOL 首次植入后即需取出的原因,探讨在 2.4 mm 切口下 IOL 的取出方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2011 年 1 月至 2014 年 10 月在西安爱尔古城眼科医院行白内障超声乳化(phacoemulsification, Phace)摘出联合折叠 IOL 植入术中出现异常,需将 IOL 取出的白内障患者 24 例 24 眼,其中男 10 例 10 眼,女 14 例 14 眼;年龄 55~79 岁,平均 66 岁;术前诊断为年龄相关性白内障者 19 例 19 眼,高度近视并发性白内障者 5 例 5 眼。

1.2 术眼植入的 IOL 类型 疏水性丙烯酸酯(Stableforce 襟) IOL(全长/光学部直径 13.00 mm/6.00 mm)(美国 Alcon 公司);920H 型亲水性丙烯酸酯(AVH 襟) IOL(英国 Rayner 公司)(全长/光学部直径 12.50 mm/6.25 mm);亲水性丙烯酸酯(改良 C 型襟) IOL(全长/光学部直径 12.00 mm/5.75 mm、12.50 mm/6.00 mm)(德国 HumanOptics 公司)。上述折叠型 IOL 的屈光度范围为+1.0~+28.0 D。

1.3 改良 IOL 取出方式 术眼用盐酸丙美卡因滴眼液点眼 3 次,选择行 2.4 mm 三平面角膜缘切口,连续环形撕囊及 Phaco/chop 处理晶状体核,确保 IOL 完全转至前房,在前房及囊袋内充填足量黏弹剂,调位钩于侧切口处辅助,用较细的囊膜剪从主切口进入,靠近顺主切口方向的一襟根部,彻底剪断部分光学部,使 IOL 变小,用镊子将小的部分取出,适当调整残余部分,尽量分为二等分,但不完全剪开光学部,末端保持联系,有齿镊夹住一端将其顺向旋转拉出。避免将主切口扩大,减少对下一步操作的影响(图 1)。

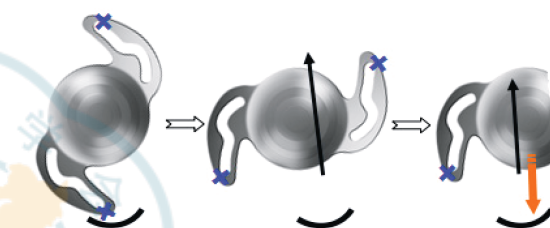


图 1 双襟断裂 IOL 剪断部位设计和取出示意图 x:角膜缘主切口;x:襟断裂;→:剪断部位;↗:牵拉部位和旋转取出方向

2 结果

2.1 需取出的 IOL 类型及原因分析 需取出 IOL 的首要原因是襟断裂,其次为后囊膜破裂和光学部折裂(表 1,图 2)。2011 年 1—10 月植入 920H 型折叠型 IOL 的 4 眼在取出 IOL 时均适当扩大主切口,将 IOL 剪断为 2 个部分,然后分别取出。因剪断 IOL 时无法均做到二等分,故其中 2 眼 IOL 嵌顿至切口处,需再次扩大切口后取出,1 例因 IOL 襟残端触及虹膜根部发生少许前房出血(图 3)。

表 1 不同材质折叠型 IOL 术中取出原因(n/%)

IOL 材质	眼数	不同原因取出 IOL 的眼数			
		襟断裂	光学部折裂	屈光度错误	植入时后囊破裂
疏水性丙烯酸酯	9	4	3	1	1
亲水性丙烯酸酯	15	12	0	0	3
合计	24	16/66.67	3/12.50	1/4.16	4/16.67

注:IOL:人工晶状体

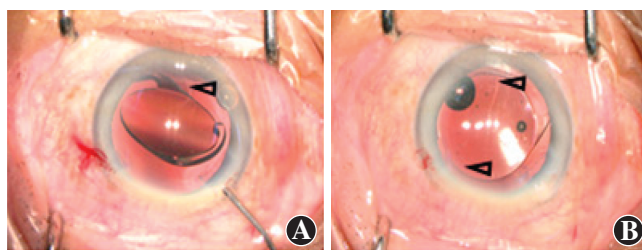


图 2 IOL 植入术中发生的意外情况 A:SA60AT 型 IOL 植入时后囊膜破裂(△),范围不确定 B:IOL 转平后可见至少 1/3 后囊膜破裂(△)

DOI:10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 09. 005

作者单位:710014 西安爱尔古城眼科医院

通信作者:王丽翌,Email:wz2349@163. com