

## 改良器官培养法保存人角膜的临床研究

王旭 张华 张华(女) 张玉光 叶思勇 韩旭光

**【摘要】** 目的 探讨应用改良的器官培养法保存角膜供体的临床应用效果。方法 自行设计角膜培养瓶保存人供体角膜 13 个。供体植片在保存 25 天内分别应用于穿透性角膜移植术, 对照组是在同期应用甘油保存的供体角膜进行角膜移植术的 16 例患眼。分别在术后第 3m, 第 6m 和第 12m 检测试验组和对照组的角膜内皮细胞质量、角膜透明度和术后并发症情况, 并对比试验组于对照组之间的差异。结果 1. 试验组角膜内皮细胞术前与术后 3m 差异有统计意义 ( $t=2.12, P<0.05$ ), 术后 6m 的内皮细胞数与术后 3m 的差异无统计意义 ( $t=1.774, P>0.05$ )。术后 12m 的内皮细胞数与术后 6m 的差异有统计意义 ( $t=2.65, P<0.05$ ); 2. 试验组角膜植片透明度好于对照组 (Wilcoxon 频数表资料的两样本比较法), 术后并发症比对照组少。结论 1. 器官培养法保存角膜植片效果好于甘油保存法; 2. 器官培养法是一种有效的长期保存角膜的方法, 应用新型角膜培养瓶保存角膜经济适用, 适合在各级医院进行推广。

**【关键词】** 器官培养; 角膜移植术; 角膜培养瓶

**A Clinical Study On The Preservation of Human Cornea By The Modified Organic Culture** WANG Xu, ZHANG Hua, ZHANG Hua(F), et al. Department of Ophthalmology, Jinan No.2 Hospital, 250001, Jinan, China

**【Abstract】** **Objective** To discuss the clinical effect of the cultured corneal donor by the new culture bottle and the modified method. **Methods** Thirteen human corneal donors were cultured by the autonomic designed organ culture bottles. These donor grafts were transplanted within 25 days have been preserved. The control group composed by 16 patients who were transplanted by the glycerine- dehydrated donors. Respectively, the quality of the corneal endothelium, the clarity of cornea and the complications were detected at the 3<sup>rd</sup>, 6<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> months after the surgery. And compared the differences between the trial and the control groups. **Results** 1. In the trial group, at the 3<sup>rd</sup> months after surgery, the quality of corneal endothelium were better than before surgery ( $t=2.12, P<0.05$ ). There were no significant difficult between the 6<sup>th</sup> and 3<sup>rd</sup> month after surgery ( $t=1.774, P>0.05$ ). However, there was a significant difficult between the 12<sup>th</sup> and the 6<sup>th</sup> month ( $t=2.65, P<0.05$ ); 2. The clarity of the donor in trial group was better than the control group. And there were less complications occurred in the trial group. **Conclusions** 1. The organ culture of the corneal donors are better than the glycerine-dehydrated donors. It's an effective method to preserve the cornea donors. 2. The generalization of the new culture bottle and the modified culture method will supply a economical and suitable way on the corneal preservation in different hospital.

**【Key words】** Organ culture; Corneal Transplantation; Culture bottle

角膜移植术是治疗角膜疾病的重要手段, 但是由于传统和社会等各方面的多种原因, 角膜材料的来源仍然短缺, 无法满足临床的需要。现在临床上主要采用的角膜保存方法是湿房保存法, 保存角膜维持正常功能的时间只有 24h-48h, 常用的中期保

存液, 也只能维持 1w-2w, 而临床上常遇到角膜供体材料不能长期保存, 功能减低不适用于患者使用的情况。所以目前对角膜材料进行长期保存, 达到合理安排供体材料使用的目的, 仍是角膜病研究工作中亟待解决的主要问题之一。本研究对应用新型角膜培养瓶的改良器官培养方法保存角膜进行了前瞻性研究, 取得了较理想的效果, 现报告如下:

### 材料与方

1. 一般资料 我院眼库自 2004 年 4 月至 2005

基金项目: 山东省卫生厅 青年科学基金项目 (2001 第 CA2B ADA1 号)

作者单位: 250001 济南, 济南市第二人民医院眼科

通讯作者: 王旭, E-mail: wangxuzou@126.com

年 5 月, 共采集到新鲜角膜供体材料 98 个, 材料处理后当天行角膜移植手术者 85 眼, 其中 82 眼行穿透性角膜移植术, 3 眼行板层角膜移植术。剩余 13 个供体材料立即由眼库技术人员应用自行设计的新型角膜培养瓶, 进行改良的器官培养法保存。分别

于不同保存时间用于穿透性角膜移植术, 13 例患者临床诊断为: 真菌性角膜炎 8 眼、大泡性角膜病变 2 眼, 粘连性角膜白斑 1 眼, 暴露性角膜炎 1 眼, 圆锥角膜急性期 1 眼。13 个培养角膜临床应用情况见表 1。随访时间 12m-22m, 平均  $(16.58 \pm 3.96)$  m。

表 1 临床应用角膜材料情况

保存天数	<7d	7-10d	10-15d	16-21d	22d	23d	25d
保存角膜数量 (个)	13	8	5	4	3	2	1
使用角膜数量 (个)	5	3	1	1	1	1	1
术前角膜内皮数量 (个/mm)	$2727.2 \pm 51.67$	$2426.30 \pm 52.05$	$2355.48 \pm 59.6$	$2323.82 \pm 125.6$	$2062.61 \pm 158.47$	1791	1786
六边形细胞比例 (%)	$92.08 \pm 1.98$	$81 \pm 2.78$	$77.2 \pm 3.11$	$72.25 \pm 5.71$	73.44	70.56	70.23

2. 新型角膜培养瓶及其保存角膜片的方法: 使用自主设计并制作的角膜培养瓶 (已获得国家实用新型专利, 专利号 ZL200420038420.0) 进行培养保存, 本瓶为磨口盖玻璃瓶, 瓶高 65mm, 瓶底直径 60mm, 在瓶盖底部制成四个“倒 F 形”固定架, 固定架高 25mm (见图 1)。培养瓶容积为 85ml。13 只眼在无菌条件下制成带有 2mm 巩膜环的角膜片, 把角膜片放置在四个固定架之间。可以通过相差倒置显微镜及时有效地观察角膜内皮细胞的形态和数量 (见图 2)。31℃ 条件下 5%CO<sub>2</sub> 培养箱保存, 保存期间不需换液, 每天观察角膜供体的内皮细胞质量。手术前需对角膜片进行脱水处理, 在原培养液中加入 5% 葡聚糖 T500 (瑞典 Pharmacia 公司) 的培养液。培养条件设定为 31℃, 0.5%CO<sub>2</sub> 浓度。脱水 24 小时后用于手术 (见图 3)。



图 1 自行设计角膜培养瓶培养人角膜



图 2 人角膜培养保存 15 天, 在培养瓶中直接通过相差倒置显微镜观察, 角膜内皮细胞, 连接紧密, 形态规则。× 100



图 3 人角膜保存 10 天, 脱水 24 小时后应用于 PKP 前, 细胞边界清楚, 无间隙, 角膜透明度较好。× 400

3. 对照组设置: 同期另有 16 例是应用我院眼库提供的甘油保存角膜材料行穿透性角膜移植术, 临床诊断为真菌性角膜炎 10 眼, 化学性烧伤角膜近穿孔 4 眼, 角膜葡萄肿 1 眼, 大泡性角膜病变 1 眼。该 16 例患者为对照组。

4. 分别在术后第 3m, 第 6m 和第 12m, 应用角膜内皮显微镜 (日本 KONAN 公司 ROBD-CA) 检测试验组和对照组的角膜内皮细胞质量、角膜透明度和术后并发症情况。

应用 SPSS11.5 统计学软件, 对各组数据进行统计学处理。

## 结 果

1. 试验组角膜内皮细胞变化观察: 角膜移植后 3m、6m 和术后 1y 的内皮细胞数 (见表 2), 术前内皮细胞数为  $2386.2 \pm 376.9/\text{mm}^2$ , 术后 3m 为  $2115.8 \pm 262.9/\text{mm}^2$ , 差异有统计学意义 ( $t=2.12$ ,  $P=0.044<0.05$ ), 术后 6m 的内皮细胞数为  $1929.5 \pm 272.5/\text{mm}^2$ , 与术后 3m 的差异无统计学意义 ( $t=1.774$ ,  $P=0.089>0.05$ )。术后 12m 的内皮细胞数为  $1561.9 \pm 392.8/\text{mm}^2$  (见图 4), 与术后 6m 的差异有统计学意义 ( $t=2.65$ ,  $P=0.015<0.05$ )。对照

组角膜植片在术前和术后观察期间均不能查出内皮细胞数量。



图 4 保存 10 天的植片行角膜移植术后 1 年 (2124/mm<sup>2</sup>)

表 2 临床试验组角膜植片质量随访结果表

	术前	术后 3m	6m	12m
随访眼数	13	13	13	10
内皮细胞计数(个/mm <sup>2</sup> )	2386.2 ± 376.9	2115.8 ± 262.9	1929.5 ± 272.5	1561.9 ± 392.8
六边形细胞比例 (%)	73.22 ± 15.3	65.74 ± 21.45	60.32 ± 22.36	54.17 ± 20.38
角膜厚度	569 ± 78.7	548 ± 52.81	527.6 ± 57.1	630.77 ± 82.63

2. 角膜透明度: 临床试验组术后 3m 内, 绝大多数角膜透明, 透明度在 0-I 级以内, 只有一眼, 出现大泡性角膜病变; 术后 6m, 角膜透明度在 0-III 级以内, 有 2 眼出现大泡性角膜病变, 对照组角膜透明度都很差; 12m 后临床试验组植片透明度明显好于对照组 (见表 3)。

表 3 角膜移植术后植片透明度 (单位: 眼)

	术后第 1d		术后 3m		6m		12m	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
0 级	13	16	9	-	4	-	4	-
I 级	-	-	3	7	4	3	5	1
II 级	-	-	3	3	3	8	2	2
III 级	-	-	1	5	2	2	1	5
IV 级	-	-	1	-	3	-	1	8

第一 d 对照组与实验组的 0 级率均为 100%, 所以没有统计学意义。术后 3m 时角膜透明度比较, 有显著统计学差异 (Wilcoxon 频数表资料的两样本比较法,  $p < 0.001$ )。术后 6 个月比较, 差异有统计学意义 [Wilcoxon 频数表资料的两样本比较法,  $0.02 < P < 0.05$  (双侧),  $0.01 < P < 0.025$  (单侧)]; 术后 12m, 差异有统计学意义 (Wilcoxon 频数表资料的两样本比较法,  $p < 0.001$ )。

3. 术后并发症: 术后 3m 角膜植片内皮细胞功能失代偿发生率的差异有统计学意义, 术后 6m 和 12m 的差异有统计学意义 (见表 4)。术后继发性青

光眼, 临床试验组 2 眼出现眼压升高, 经常规治疗后恢复至正常。对照组有 6 眼眼压升高, 常规治疗后 3 眼恢复正常, 3 眼发展成为继发性青光眼, 最终行小梁切除术治疗。本组病例未出现眼内感染和原发性供体衰竭等严重并发症。

表 4 角膜植片内皮细胞功能失代偿发生率

	术后 3m	6m	12m
临床试验组	7.7% (1 眼)	15.4% (2 眼)	20% (2 眼)
对照组	31.3% (5 眼)	81.3% (13 眼)	100% (16 眼)
$\chi^2$	3.97	22.09	23.49
P 值	$< 0.05$	$< 0.01$	$< 0.01$

## 讨 论

一、研究角膜供体材料长期保存的必要性。

由于受传统观念的影响和器官捐献立法制度的不完善, 国内眼库普遍存在角膜供体材料和患者手术需求不平衡的现状。这主要表现为: 第一, 角膜供体材料的绝对缺乏, 很多需要进行角膜移植手术治疗的患者得不到新鲜的角膜供体, 贻误了手术时机, 或者要经过漫长的等待, 承受了不必要的痛苦和经济负担; 第二, 由于角膜供体材料来源的特殊性, 许多眼库往往在几个特定的时间获得大量的新鲜供体材料, 而这时又缺乏足够的患者, 形成了角膜供体材料的相对剩余。

这种不平衡状态, 直接导致了供体人角膜这种宝贵资源的浪费。现在临床上主要采用的角膜保存方法是湿房保存法, 保存角膜维持正常功能的时间只有 24-48 小时, 常用的中期保存液, 也只能维持 1-2 周<sup>[1]</sup>, 而临床上常遇到角膜供体材料不能长期保存, 功能减低不适用于患者使用的情况。

为了避免角膜供体材料的浪费, 许多眼库, 不得已采用纯甘油脱水的方法长期保存眼球<sup>[2]</sup>。而此法保存的角膜, 均造成了角膜内皮细胞的严重破坏, 一般在手术后都会出现原发供体衰竭, 只能是用作对急症病例, 如严重的角膜溃疡, 角膜穿孔和角膜溶解等, 进行治疗性角膜移植。而这样的手术大多数结果是不成功的, 又不得不给患者实行二次角膜移植手术, 增加了患者的痛苦和经济负担。

所以, 对角膜材料进行长期保存, 达到合理安排供体材料使用的目的, 仍是角膜病研究工作中亟待解决的主要问题之一。

二、改良的器官培养法是有有效的角膜长期保存方法

器官培养法是一种可以长期保存角膜供体材料的有效方法,其保存时间可以达到 4 周以上,而维持较好的内皮细胞功能<sup>[3-7]</sup>。

传统的角膜器官培养保存法仍有许多缺陷,如不能对角膜内皮细胞的形态和数量进行及时地观察,而且操作麻烦,容易形成污染<sup>[8]</sup>。换液也极不方便,污染几率高。这就需要对现有的保存方法进行改良,提高保存质量,避免污染发生。

(一) 本研究应用自行设计的角膜片培养瓶具有以下优点:

1. 较传统方法简化了制取供体材料的操作步骤,节省了操作时间并减少了污染; 2. 减少培养材料与瓶壁的接触,避免了不必要的角膜上皮细胞增生; 3. 减少了角膜内皮细胞的损伤; 4. 方便对角膜内皮细胞的动态观察,克服了以往保存方法选择角膜植片的盲目性; 5. 经济实用,易于推广,适合于各级医院眼库应用。

(二) 本方法保存角膜的应用效果好于甘油保存法

在本研究之前,对于不能及时应用于临床的剩余角膜,我院眼库也应用甘油脱水法长期保存角膜。以上研究显示本方法的临床效果优于甘油长期保存法,结果有显著性差异。

通过本课题的深入研究,证明应用本研究设计的新型角膜培养瓶,和常规角膜保存液,加上简单

的细胞培养设备,完全可以在一般的眼库中广泛开展角膜长期保存。这样可以充分地利用现有的角膜供体材料,达到供体材料资源统筹利用、合理配置的效果,有效地解决目前国内角膜供体材料和患者手术需求不平衡的现状。

### 参 考 文 献

- 1 谢立信著,角膜移植学. 第一版,北京:人民卫生出版社,2000,141-171
- 2 申尊茂,李子良,谢立信,主编,眼科新编,第一版,北京 1991,255-258
- 3 Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, et al, Optimizing microbiological controls of corneal organ culture media J Fr Ophtalmol. 2003 Oct; 26(8): 792-800
- 4 Camposampiero D, Tiso R, Zanetti E, et al. Cornea preservation in culture with bovine serum or chicken ovalbumin. Cornea. 2003 Apr; 22(3): 254-8
- 5 Gain P, Thuret G, Chiquet C, Use of a pair of blood culture bottles for sterility testing of corneal organ culture media J Fr Ophtalmol. 2002 Apr; 25(4): 367-73
- 6 Moller-Pedersen T, Hartmann U, Moller HJ, et al. Evaluation of potential organ culture media for eye banking using human donor corneas. Br J Ophthalmol. 2001 Sep; 85(9): 1075-9
- 7 Moller-Pedersen T, Hartmann U, Ehlers N, et al. Evaluation of potential organ culture media for eye banking using a human corneal endothelial cell growth assay. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2001 Oct; 239(10): 778-82
- 8 Albon J, Armstrong M, Tullo AB. Bacterial contamination of human organ-cultured corneas. Cornea. 2001 Apr; 20(3): 260-3

(收稿时间: 2006-07)

### · 病例报告 ·

## 毒蛇唾液溅入眼部致角膜炎一例

金香

目前在我国一些城市偏远郊外仍有不少蛇类出没,其中不乏一些毒蛇,但目前对毒蛇唾液喷溅入眼内病例实属罕见。我院前不久发现 1 例,现报道如下。

焦×× 男 49岁 主诉左眼9小时前被毒蛇唾液喷溅入眼部后自觉磨痛、眼胀、畏光、视物不清。该患9小时前打蛇过程中被蛇唾液喷溅入左眼内,当即觉左眼剧烈磨痛、眼胀、畏光伴视物不清,自行大量清水冲洗左眼后,仍无好转,故来我院就诊。否认风湿、结核等全身病史。左眼视力 0.5,左眼睑轻度肿胀,皮肤略潮红,左眼睑结膜、球结膜充血均明显,球结膜水肿,角膜上皮雾状混浊,并见少许泡样变,内皮皱褶,前房内见片状灰白渗出,瞳孔约 2.5mm

× 2.5mm,直接光反应迟钝,眼后节视不清。治疗:生理盐水注射液 1000ml 充分冲洗左眼结膜囊。2%利多卡因注射液 0.2ml。硫酸奈替米星注射 0.4ml,维生素 C 注射液 0.4ml 左眼球结膜下注射。1%硫酸阿托品眼膏散瞳。次日左眼视力 0.6,左眼结膜充血明显,角膜上皮光滑,内皮皱褶,前房内渗出,瞳孔药性散大约 5.5mm × 5.5mm,直接接光反应迟钝,后节未见异常。同上治疗第 4 日,左眼视力 0.8,左眼球结膜混合性充血,角膜上皮光滑,内皮仍见少许皱褶,前房清,瞳孔药性散大,直接光反应迟,余正常,第 5 日,终止上述治疗,嘱左氧氟沙星眼药水和角膜宁滴眼液均日 4 次点眼,隔 3 日后复诊,左眼视力 1.0,球结膜下略见片状出血,瞳孔药性散大可见,余正常。

讨论 因此类病例罕见,故我院上述治疗是摸索渐进的,但疗效仍觉满意。

作者单位: 124000 盘锦,盘锦市第二人民医院眼科  
通讯作者: 金香