

角膜内皮体外模型玻璃化法保存研究

范文霞¹, 马学虎^{*1}, 于小川¹, 刘天庆¹, 崔占峰²

(1. 大连理工大学 化工学院, 辽宁 大连 116024;

2. 牛津大学 工程科学系, 牛津 OX1 3PJ)

摘要: 以角膜内皮细胞在培养至融合时的单层细胞作为角膜内皮的体外模型, 采用两种玻璃化溶液, 考察玻璃化过程对细胞活性的影响. 首先以光学显微镜和扫描电镜考察了体外模型的细胞形态和胞间连接情况, 发现培养的角膜内皮细胞融合后无论是细胞形态和胞间连接都与天然的角膜内皮相近. 然后用低温显微镜考察了两种玻璃化溶液在升降温过程的结冰情况, 发现两玻璃化溶液在 100 °C/min 的降温和升温速率下都能玻璃化且反玻璃化较弱. 设计了一套保护剂的导入和洗脱方案, 使得内皮细胞的体积变化维持在一 50%~40%. 最后以 CCK-8 试剂盒考察了玻璃化溶液的毒性和细胞经冷冻后的活性, 发现 VS² 的毒性比 VS¹ 强; 经 VS¹ 和 VS² 冷冻后的细胞活率分别为 61.3% 和 51.7%, 这说明 VS¹ 的保存效果比 VS² 好.

关键词: 角膜; 内皮细胞; 玻璃化溶液; 1,2-丙二醇; 海藻糖; 聚乙二醇

中图分类号: R318.52 **文献标志码:** A

0 引言

角膜移植是大部分严重角膜疾病复明治疗的主要方法. 而角膜移植术成功的关键是能够提供质量优良的角膜植片, 这就需要有可靠的角膜保存技术做保障. 角膜的保存要求保留角膜内皮层的形态和功能的完整性, 这对于在实施穿透性角膜移植后维持角膜的透明度是至关重要的. 深低温冷冻保存技术可最大限度地维持角膜内皮细胞的活性, 因而是角膜保存的最有效方法之一^[1,2]. 其中慢速冷冻法由于降温过程中产生冰晶, 对角膜内皮细胞会造成不可避免的机械损伤. 并且相对于单个的角膜内皮细胞, 角膜内皮层对冰晶损伤更敏感. 玻璃化是水溶液从液态到非晶态的过程^[3], 能够避免冷冻过程冰晶造成的机械损伤, 因而成为角膜超低温保存的非常有前景的方法.

到目前为止, 角膜玻璃化保存研究主要集中在玻璃化溶液的开发以及导入和洗脱方案的设计方面^[4~8]. 由于单一渗透性保护剂需要很高浓度才能实现玻璃化, 而高浓度的保护剂对细胞的毒性损伤是巨大的, 报道的玻璃化溶液多为几种渗

透性保护剂的混合物. 如 Bourne 等^[6]采用改良的 VS41A 对人角膜进行玻璃化保存, 在 0 °C 采用 4 步导入和 4 步洗脱, 每步平衡时间 10 min. 结果角膜的中央区域实现了玻璃化, 但比较厚的周边区域出现了结晶. Meltendorf 等^[8]采用 VS41A 对猪角膜的后板层进行玻璃化保存, 导入的步骤、温度和时间与文献^[6]的方法完全相同. 冻存的效果非常不理想, 其中获得的最高内皮细胞活率仅 10%. 但是, Armitage 等^[9]采用高浓度(体积分数 50%)单一的渗透性保护剂 1,2-丙二醇联合 0.25 mol/L 蔗糖实现了兔角膜的较为成功的保存. 尽管保护剂浓度很高, 但他采用了比较独特的导入和洗脱方法, 即浓度较高的几个步骤是在非常低的环境温度下进行的, 因此极大地降低了保护剂的毒性. 但是低温的采用使得导入和导出时间过长, 以致冷冻保存的总时间超过 2.5 h, 因此这种方法难以在眼库里推广使用.

本文以培养至融合的单层角膜内皮细胞作为天然角膜内皮层的体外模型, 采用两种玻璃化溶液, 同时设计一套保护剂的导入和洗脱方案, 对融合的单层角膜内皮细胞进行玻璃化保存的研究.

收稿日期: 2007-11-23; 修回日期: 2008-09-21.

基金项目: 国家自然科学基金合作资助项目(2002008); 大连市科技计划资助项目(2005E11SF068).

作者简介: 范文霞(1977-), 女, 博士生; 马学虎*(1965-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: xuehuma@dlut.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 差式扫描量热仪(DSC204, NETZSCH, 德国); 倒置光学显微镜(IX70, Olympus, 日本); 正置光学显微镜(BX51, Olympus, 日本); 扫描电镜(JEM-1200EX, 日本); 程序降温仪(BCS196, Linkam, 英国); 酶标仪(ELx800™, BIO-TEK, 美国); 圆形玻片($\phi 12$, 江苏); 24孔板(Costar, 美国).

1.1.2 主要试剂 硫酸软骨素(CS, Sigma C-9819, 美国); 1,2-丙二醇(1,2-PD, D-64291, 德国); 海藻糖(T5251, Sigma, 美国); 聚乙二醇6000(PEG 6000, 中国); Cell counting kits-8(CCK-8, Dojindo Lab., 日本).

1.2 角膜内皮体外模型的制备

1.2.1 角膜内皮细胞的原代培养 将消毒后的新鲜牛眼于角膜缘内2 mm处环形剪下角膜, 于体式显微镜下撕取内皮层, 剪碎, 贴在孔板的底部, 植块间距0.5 mm. 然后每孔放一方形玻片, 防止植块浮起. 加含15%胎牛血清的RPMI1640培养基. 约5 d后, 近植块细胞融合, 立即进行传代.

1.2.2 角膜内皮细胞的传代培养和模型制备 孔板内加入0.08%的胰蛋白酶, 镜下观察待细胞接近圆形, 立即加含15%胎牛血清的培养基中止消化. 吸管吹打, 收集细胞, 调细胞密度为 10^5 个/mL, 接种到内置有圆形玻片的24孔板. 待玻片中央细胞密度约为 $(2\ 200 \pm 250)$ 个/ mm^2 (由IPP软件确定), 光学显微镜下抓取图片, 并做扫描电镜考察体外模型与天然角膜内皮的相似性.

1.3 玻璃化溶液的配制

配制了两种玻璃化溶液, 其组成和浓度如表1所示. 所用载体溶液为CPTES, 其中含有0.08 mg/mL硫酸软骨素.

表1 玻璃化溶液的组成

Tab. 1 Components of two vitrification solutions

玻璃化溶液	$w/\%$		
	1,2-丙二醇	海藻糖	聚乙二醇
VS ¹	25	35	0
VS ²	25	35	6

其中1,2-丙二醇是玻璃化溶液的渗透性组分, 海藻糖和聚乙二醇是非渗透性组分.

1.4 玻璃化溶液的玻璃化和反玻璃化情况考察

分别应用差式扫描量热仪(DSC)和低温显微镜对所设计的两种玻璃化溶液的玻璃化和反玻璃化情况进行研究. 低温显微技术就是采用程序降温仪对两玻璃化溶液进行冷冻, 同时在显微镜下观察样品的变化. 表2和3分别是两种方法采用的降温 and 升温方案. DSC的降温和升温速率分别为30和10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, VS¹和VS²的质量分别为11.4和14.0 mg.

表2 差式扫描量热仪的降温和升温方案

Tab. 2 Cooling and thawing protocol by DSC

步骤	初温/ $^{\circ}\text{C}$	终温/ $^{\circ}\text{C}$	速率/ $(^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1})$	停留时间/min
1	10	-160	约30	0
2	-160	10	10	0

当向石英坩埚内加200 μL 玻璃化溶液时, 溶液恰好淹没玻片, 因此在应用低温显微镜考察溶液的玻璃化和反玻璃化情况时, 采用的溶液体积为200 μL (以下的实验同). 用程序降温仪实现表3所示过程, 显微镜下观察样品的变化.

表3 程序降温仪的降温和升温方案

Tab. 3 Cooling and thawing protocol by programable freezer

步骤	初温/ $^{\circ}\text{C}$	终温/ $^{\circ}\text{C}$	速率/ $(^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1})$	停留时间/min
1	22	-110	100	0
2	-110	22	100	0

1.5 玻璃化溶液导入和洗脱方案的确定

本文保护剂的导入和导出采用分步法. Madden等提出了一个冷冻保护剂的导入和导出过程中角膜内皮细胞体积的计算模型^[10]. 根据这一模型, 在已知细胞的非渗透体积这一参数的前提下, 先假设一种导入和导出的方案, 就可以计算出导入和导出过程的每一步细胞的瞬时体积和平衡体积. 因此可以通过调整导入和导出的方案, 使得细胞的体积变化维持在-50%~40% (设细胞的等渗体积为0). 由于牛角膜内皮细胞的非渗透体积未见报道, 本文在计算过程中采用了兔角膜内皮细胞的非渗透体积0.336. 但是, 这种计算方法不能提供细胞达到平衡所需要的时间. 除第4步以外, 本文采用了较长的平衡时间, 以确保能够达到渗透平衡.

1.6 毒性实验

比较两种玻璃化溶液对细胞的毒性. 具体方法是: 在孔板底部制备内皮模型, 向其中导入玻璃化溶液, 结束以后, 分别继续平衡0、1、3、5、10和

20 min,之后开始导出.导出结束立即加 CCK-8,检测细胞活性.对照组为体外模型自始至终暴露于 CPTEs 中,不经历导入和导出过程.导入和洗脱方案见表 4.细胞活率 V_{cell} 的计算公式为

$$V_{\text{cell}} = OD_{\text{mean,e}}/OD_{\text{mean,c}} \quad (1)$$

其中 $OD_{\text{mean,e}}$ 为实验组的 OD 平均值, $OD_{\text{mean,c}}$ 为对照组的 OD 平均值, OD 值是使用 CCK-8 在酶标仪上测量出的光密度. CCK-8 的基本原理为该试剂中的一种成分 WST-8 可以被细胞线粒体中的脱氢酶还原成具有高度水溶性的黄色甲臞染料.由于甲臞物的数量与细胞的活性成正比,可以利用其进行细胞活性的测定.

1.7 导入导出及冷冻

在圆形玻片上制备内皮模型,用程序降温仪对其进行冷冻.同时设导入和导出实验组及对照组.导入和导出实验组仅经历导入和导出,而不经历冷冻过程.对照组自始至终暴露于 CPTEs 中,不经历导入、导出和冷冻过程.导入和洗脱方案同表 4.程序降温仪的降温 and 升温方案同表 3.用 CCK-8 检测细胞活性.细胞活率的计算公式同式(1).

表 4 玻璃化溶液 VS^1 和 VS^2 的导入和洗脱方案

Tab. 4 Loading and removal protocols of VS^1 and VS^2

步骤	$\omega/\%$			接触时间/s
	1,2-丙二醇	海藻糖	聚乙二醇	
1	3	0	0	60
导入	2	10	0	60
	3	25	0	60
	4	25	35	6
导出	5	10	5	60
	6	3	5	60
	7	0	5	60
	8	0	0	60

2 结果与讨论

2.1 内皮细胞层体外模型与在体内皮层的比较

图 1 和 2 分别为是细胞生长至融合时的照片.从光学显微镜照片中可以看出,角膜内皮细胞大多呈现出六边形形态,与天然的细胞形态接近;从电镜照片可以看出,多数细胞间已形成细胞间连接,而天然的角膜内皮细胞间也是有连接的.说明培养的单层细胞在细胞形态和胞间连接两方面与天然的内皮层相近.

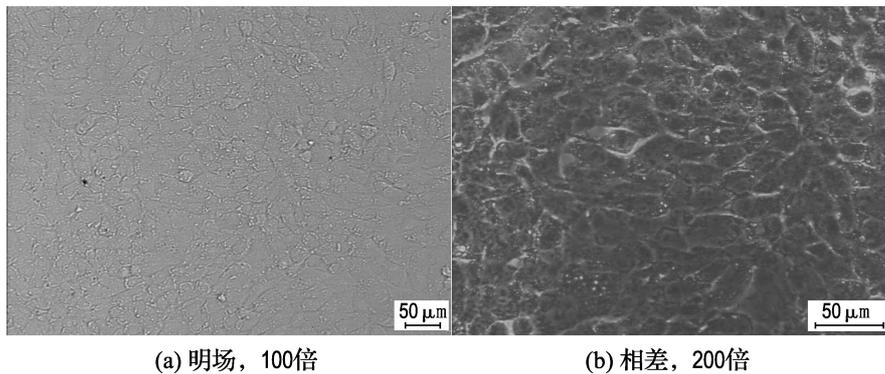


图 1 牛角膜内皮细胞(第 1 代)的光学显微镜图片

Fig. 1 Images of bovine corneal endothelial cells of passage 1 under light microscope

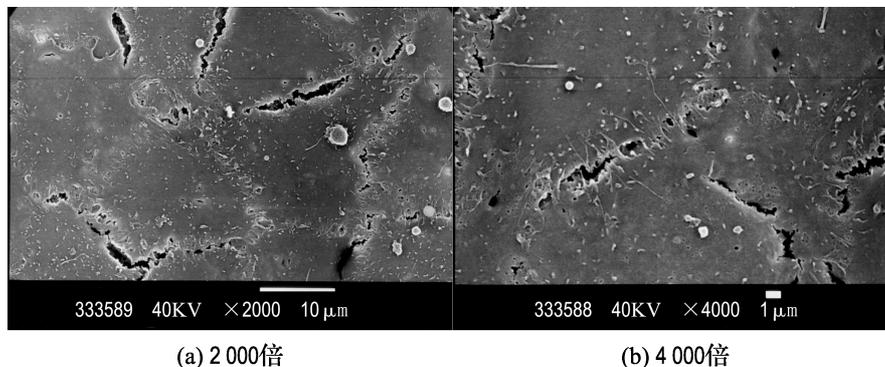


图 2 牛角膜内皮细胞(第 1 代)的扫描电镜图片

Fig. 2 SEM images of bovine corneal endothelial cells of passage 1

2.2 玻璃化溶液在冷冻和复苏过程的研究结果

图3和4是由DSC测定的两种玻璃化溶液在升温过程的热流曲线.从图中可以看出,VS¹和VS²的玻璃转变温度分别是-98.3和-97.3℃.另外,在-30℃左右有一个小的熔融峰,这表明在降温的过程中有少量冰晶形成.VS²的熔融峰的放热量(1.711 J/g)低于VS¹(2.452 J/g),这表明VS²中的聚乙二醇在一定程度上抑制了降温过程中冰晶的形成.

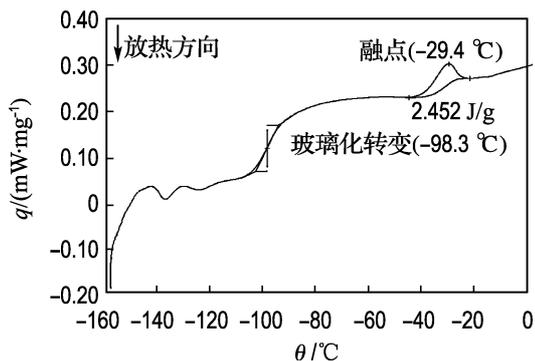


图3 玻璃化溶液VS¹升温过程的热流曲线
Fig. 3 Thermogram of VS¹ during thawing

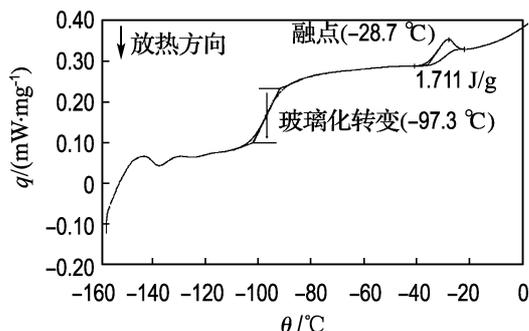


图4 玻璃化溶液VS²升温过程的热流曲线
Fig. 4 Thermogram of VS² during thawing

DSC显示溶液在降温过程中有少量的结晶,这可能是由于降温速率较低(约30℃/min)的缘故.使用程序降温仪对样品进行玻璃化冷冻时,降温速率可达到100℃/min.降温过程中,通过目镜观察发现VS¹和VS²在降温过程中一直保持透明,说明两溶液实现了完全玻璃化.同样采用程序降温仪允许的最高升温速率100℃/min对样品升温时,两溶液的反玻璃化现象都比较弱.采用Image Pro Plus软件对反玻璃化过程录像,从中抓取-45℃(在-45℃,反玻璃化最严重)的照片,如图5所示.

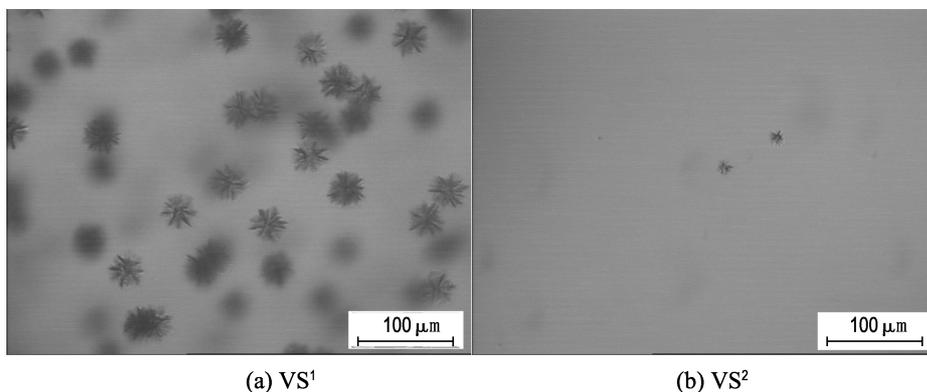


图5 溶液在升温过程的反玻璃化现象

Fig. 5 Devitrification during thawing of two vitrification solutions

从图中可以明显看出,VS¹和VS²的反玻璃化都比较弱,并且VS²比VS¹要弱得多.这是由于PEG的加入使溶液变得更粘稠,很大程度上抑制了冰晶的产生和生长.

2.3 导入和导出方案及细胞体积的计算结果

导入和导出方案见表4.各步溶液所用的载体溶液均为含有0.08 mg/mL硫酸软骨素的CPTEs.实验在室温下(约22℃)进行.

角膜内皮细胞采用表4所示的导入和导出方

案时,根据计算获得的细胞体积变化如图6所示.从图中可以看出,除了第4步,其他步骤细胞的平衡体积以及第4步细胞的瞬时体积均在-50%~40%.第4步细胞的平衡体积在图中没有给出,是因为,对于第4步,当细胞内水大量流出,细胞体积达到瞬时体积时,经计算可知,此时的细胞内保护剂体积分数达到46.2%,超过1,2-丙二醇的玻璃化临界质量分数45%^[11].因此,细胞体积达到瞬时体积后可以立即进入冷冻过程,而不需等待

保护剂渗透达到平衡. 水从细胞内渗出这一过程只需很短的时间即可完成, 因此根据经验, 规定第 4 步的时间为 15 s.

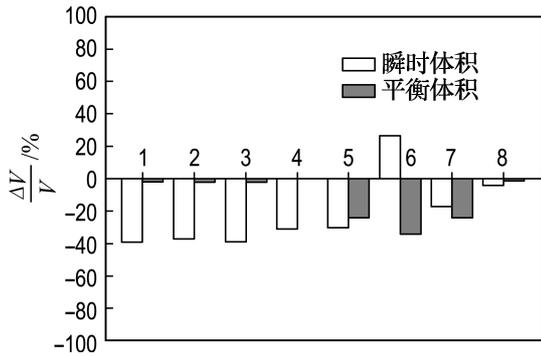


图 6 导入和导出过程中细胞体积的变化
Fig. 6 Calculated changes in endothelial cell volume during serial addition and removal

在设计导入步骤时, 1~3 步只是梯度加入 1,2-丙二醇, 没有加入海藻糖, 这是因为加入海藻糖之后会增大平衡液的黏度, 延长平衡液与细胞的接触时间, 毒性损伤增大. 在最后一步将海藻糖加入到溶液内, 使细胞内水流出, 使得在导入结束时细胞内的保护剂浓度在理论上达到了玻璃化临界浓度. 实际上, 通过显微镜观察, 发现在冷冻过程中视野中细胞的位置一直保持透明, 说明细胞内确实实现了玻璃化. 玻璃化溶液及导入方案的独特设计是本文的特色之一.

2.4 毒性实验结果

两玻璃化溶液的毒性比较结果如图 7 所示. 可以看出, 随着与玻璃化溶液接触时间的延长, 细胞的活性下降, 且暴露于 VS² 的细胞的活性下降得更快一些. 说明在室温下, 两玻璃化溶液对细胞有毒性损伤, 且 VS² 对细胞的毒性较 VS¹ 大.

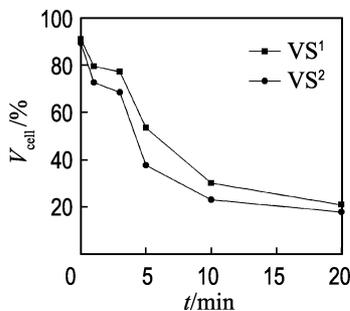


图 7 VS¹ 和 VS² 毒性的比较
Fig. 7 Comparison of toxicity of two vitrification solutions

2.5 两玻璃化溶液的导入和导出及玻璃化冻存后的结果

导入和导出及玻璃化冻存后的结果如图 8 所示.

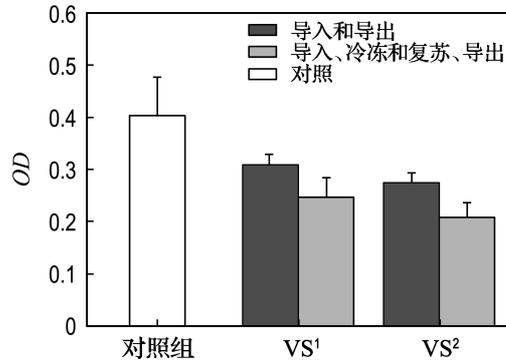


图 8 导入和导出之后及冷冻后的 OD 值 (n=3)
Fig. 8 OD values after loading, unloading and cryopreservation (n=3)

根据式 (1) 可以得出, 经历 VS¹ 和 VS² 的导入、导出之后的细胞活性分别为 76.9% 和 68.4%; 经历 VS¹ 和 VS² 的导入、冷冻和导出之后的细胞活性分别为 61.3% 和 51.6%.

无论对于 VS¹ 还是 VS², 经过导入、导出后的细胞活性低于对照组, 说明本实验设计的导入和导出过程尽管避免了渗透压损伤, 但是溶液的毒性和某些操作, 如镊子转移玻片和微量移液枪吸取和释放溶液等仍然会对细胞造成损伤. 另外, 经 VS¹ 的导入和导出后细胞活性要高于 VS², 这是由于 VS² 中聚乙二醇的毒性所致.

对于 VS¹, 经过导入、导出和冷冻全过程后的细胞活性低于只经历导入和导出的细胞活性; VS² 也同样. 说明尽管基本避免了冰晶的机械损伤, 但冷冻过程的其他因素如冷冻休克等也会损伤细胞. VS¹ 的导入、冷冻和导出后的细胞活性要高于 VS². 这是因为, 尽管 VS¹ 反玻璃化比 VS² 严重, 但 VS² 中的聚乙二醇的毒性也会损伤细胞, 两者的综合结果使得经 VS¹ 保存后的细胞活性要高于 VS², 即 VS¹ 的总的保存效果比 VS² 好一些.

在众多常用的渗透性保护剂中, 1,2-丙二醇是毒性较低的^[11]. 海藻糖在细胞冷冻过程中, 能够保护细胞质膜和细胞内蛋白, 从而提高细胞的

存活率^[12~15].海藻糖的玻璃转变温度是 -30°C 左右,显著高于传统的渗透型保护剂,因此海藻糖的加入能有效地增强溶液的玻璃化能力.另外,在保护剂的洗脱过程中,海藻糖能避免细胞的过度膨胀而造成的细胞损伤.聚乙二醇是大分子胞外保护剂,它的使用能够明显地增大玻璃化溶液的黏度,进而使反玻璃化减弱^[16~18].低浓度的1,2-丙二醇联合高浓度的海藻糖是本文设计的两种玻璃化溶液的特点.1,2-丙二醇浓度低,可以降低溶液的毒性;但是使用高浓度的海藻糖使得溶液仍然能够实现玻璃化.

在体外模型中,角膜内皮细胞胞间连接的存在使细胞的运动和形状变化受到很大的限制;另外,与玻片之间的粘附也使细胞膜顺应体积变化而发生相应变化的能力受到一定的限制,造成细胞的损伤甚至死亡,这可能是导致本文细胞活率比较低的主要原因.尽管本文的冻存结果有待改善,但对于全角膜玻璃化法保存仍然具有重要的借鉴意义.

3 结 论

(1)体外培养的融合的单层内皮细胞在细胞形态和胞间连接两方面与天然的内皮层相近,可以作为体外模型来进行冷冻保存的研究.

(2)本文设计了两种玻璃化溶液,实现了冷冻过程的玻璃化,同时反玻璃化较弱.经 VS^1 和 VS^2 保存后的细胞活性分别为61.3%和51.7%.相比之下, VS^1 的毒性较小,得到的保存效果更好.

参 考 文 献:

[1] 李广武,郑从义,唐兵.低温生物学[M].长沙:湖南科学技术出版社,1998

[2] 华泽钊,任禾盛.低温生物医学技术:2版[M].北京:科学出版社,1994

[3] FAHY G M, MACFARLANE D R, ANGELL C A, *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation [J]. **Cryobiology**, 1984, **21**(4):407-426

[4] ARMITAGE W J. Survival of corneal endothelium following exposure to a vitrification solution [J].

Cryobiology, 1989, **26**(4):318-327

[5] RICH S J, ARMITAGE W J. The potential of an equimolar combination of propane-1,2-diol and glycerol as a vitrification solution for corneas [J]. **Cryobiology**, 1991, **28**(4):314-326

[6] BOURNE W M, NELSON L R. Human corneal studies with a vitrification solution containing dimethyl sulphoxide, formamide, and 1,2-propanediol [J]. **Cryobiology**, 1994, **31**(6):522-530

[7] BOURNE W M, SHEARER D R, NELSON L R. Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethyl sulphoxide, 1,2-propanediol, and 2,3-butanediol [J]. **Cryobiology**, 1994, **31**(1):1-9

[8] MELTENDORF C, HINCHA D K, HOFFMAN N F. Vitrification of posterior corneal lamellae [J]. **Cryobiology**, 2002, **44**(2):170-178

[9] ARMITAGE W J, HALL S C, ROUTLEDGE C. Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at -110°C [J]. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2002, **43**(7):2160-2164

[10] MADDEN P W, PEGG D E. Calculation of corneal endothelial cell volume during addition and removal of cryoprotective compounds [J]. **Cryo-letters**, 1992, **13**:43-50

[11] WUSTEMANN M C, PEGG D E, ROBINSON M P, *et al.* Vitrification media: toxicity, permeability, and dielectric properties [J]. **Cryobiology**, 2002, **44**(1):24-37

[12] ERDAG G, EROGLU A, MORGAN J R, *et al.* Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular trehalose [J]. **Cryobiology**, 2002, **44**(3):218-228

[13] WRIGHT D. Use of sugars in cryopreserving human oocytes [J]. **Reproductive Biomedicine Online**, 2004, **9**(2):179-186

[14] KATENZ E, VONDRAN F W. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent [J]. **Liver Transplantation**, 2007, **13**(1):38-45

[15] WU C F, TSUNG H C, ZHAN W J, *et al.*

- Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose [J]. **Reproductive Biomedicine Online**, 2005, **11**(6):733-739
- [16] CHECURA C M, SEIDEL G E. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes [J]. **Theriogenology**, 2007, **67**(5):919-930
- [17] YAVIN S, ARAV A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions [J]. **Theriogenology**, 2007, **67**(1):81-89
- [18] O'NEIL L, PAYNTER S J, FULLER B J, *et al.* Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution [J]. **Cryobiology**, 1997, **34**(3):295-301
- [17] YAVIN S, ARAV A. Measurement of essential

Cryopreservation of *in vitro* model of corneal endothelia by vitrification

FAN Wen-xia¹, MA Xue-hu^{*1}, YU Xiao-chuan¹, LIU Tian-qing¹, CUI Zhan-feng²

(1. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China;

2. Department of Engineering Science, Oxford University, Oxford OX1 3PJ, UK)

Abstract: As an *in vitro* model of natural corneal endotheliums, confluent monolayers of bovine corneal endothelial cells (BCECs) in culture were used in two unique vitrification solutions (VSs) to examine effect of vitrification processes on viability of cells. Investigations by microscopy showed that the confluent monolayer of BCECs in culture was close to endothelium *in situ* both in cell shapes and cell junctions. Observations by cryomicroscopy indicated that both the two VSs can vitrify during cooling at 100 °C/min and weak devitrification occurred during warming also at 100°C/min. An optimal adding and removing protocol of the VSs was designed by calculations to maintain volume change of cells within - 50%-40%. The toxicity test results of VSs measured by cell counting kit-8(CCK-8) show that toxic injury of VS² is more severe than VS¹. After preservation by vitrification, cell viabilities are 61.3% and 51.65% respectively for VS¹ and VS². Thus, cryoprotective effect of VS¹ is better than that of VS².

Key words: cornea; endothelial cells; vitrification solution; propane-1,2-diol; trehalose; polyethylene glycol