

低温治疗及在眼科中的应用研究

孟 希 谢 平

摘 要 低温在医学领域应用广泛,从对组织器官的保存,到降低器官的炎性损伤,已成为一种重要的临床治疗方法。低温同样应用于眼科很多方面:如对移植物的保存,对眼表疾病的辅助治疗,缓解术后的炎性反应,治疗青光眼、眼底疾病等。本文将就低温治疗的作用机制及低温在眼科疾病中的应用等方面予以综述。

关键词 低温 作用机制 眼库 眼科疾病 眼科手术

中图分类号 R77 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.04.035

低温疗法广泛应用于临床医学,特别是对于严重脑卒中、颅脑外伤以及一些重要器官缺血再灌注后的保护。冷冻疗法也运用于在皮肤科、器官移植以及生殖医学等领域,在一定程度上可以降低手术风险、延长器官的生存时间。对眼科而言,低温常运用于眼库中移植物的保存;内眼手术时局部降温有助于保护角膜内皮和视网膜组织;通过冷凝术治疗难治性青光眼和视网膜裂孔等。本文将简述低温治疗的发展历史、作用机制,并就低温在眼科疾病中的应用做一综述。

一、低温治疗的发展简史

人类开始应用低温治疗疾病,最早可追溯到公元前 3500 年,据记载当时的医师 Edwin Smith Papyrus 已开始运用局部低温修复伤口;公元前 2000 年,古埃及人发现冷敷可获得良好的镇痛效果;拿破仑时期为了减轻因战伤截肢的痛苦,军医将伤者放在冰水中行手术操作。

20 世纪以来,低温在临床中得到更广泛的应用:1950 年美国杜克大学 Sealy 教授首先将低温运用于心脏灌注手术;Bigelow 等研究发现,降低患者体表温度可明显改善心肺衰竭,低温疗法被迅速推广及并用于心血管外科手术;1964 年国际低温生物学和低温医学会正式成立;20 世纪 90 年代初期固体二氧化碳、液氮开始应用于临床,冷冻医疗初见雏形;随着医疗技术发展,低温医学日趋成熟。

二、低温治疗的作用机制

1. 低温对细胞代谢的影响:研究发现低温通过降低细胞耗氧量、影响线粒体和内质网的功能等方面发挥对于器官的保护作用。三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)通过与二磷酸腺苷相互转化实现贮能和放能,为细胞生命活动供能。线粒体作为合成 ATP 的重要场所,其正常功能需要一系列酶的参与,而细胞内许多酶的活性在低温下降低。Simkhovich 等^[1]利用家兔模型研究发现适当降低局部心肌温度可以保护心肌免受持续缺血损伤,局部低温的保护机制是通过维持临界能量代谢来介导的。

低温对线粒体也有一定保护作用,Pamenter 等^[2]通过小鼠大脑模型研究不同温度对其线粒体功能的影响,结果表明低体温可通过提高线粒体的呼吸效率从而提升缺氧大脑的能量保存和细胞活力。Huang 等^[3]研究发现低温可减少线粒体通透性转换孔的开放,使线粒体细胞色素 C 还原酶活性提升,从而保护线粒体的完整性。内质网是细胞内部的一种膜质结构,一些有害因素例如缺氧常诱导内质网应激导致细胞凋亡,而低温可通过抑制内质网应激反应阻止神经元的凋亡^[4]。

2. 低温与冷诱导 RNA 结合蛋白:冷诱导 RNA 结合蛋白(cold inducible RNA binding protein, CIRP)主要用于调控细胞的周期,通常在组织及细胞中广泛低水平表达,低温、紫外线、低氧等应激和炎症条件可诱导其表达上调^[5]。低温疗法已被证实对神经损伤的患者具有神经保护作用。CIRP 和冷诱导 RNA 结合蛋白基序 3(cold inducible RNA-binding protein motif 3, RBM3)是两种主要的用于神经保护的冷诱导蛋白。Rey-Funes 等^[6]研究报道,8℃ 的低温条件可保护大鼠视网膜免受创伤性神经病变的损害,缓解视功

基金项目:江苏省卫生和计划生育委员会医学科研课题计划项目(H201608)

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院眼科

通信作者:谢平,主任医师,博士生导师,电子信箱:xieping9@126.com

com

能损伤,他们推测起保护作用的分子机制包括两种冷休克蛋白 RBM3 和 CIRP 的上调。

3. 低温与炎症反应:许多实验证实,创伤和手术后,损伤组织激发固有免疫反应,从而引起小胶质细胞及白细胞激活,这类激活的免疫细胞通过释放多种因子,进一步激活炎性细胞,导致细胞死亡及免疫激活的恶性循环。参与创伤反应的细胞因子主要包括肿瘤坏死因子(TNF- α),白细胞介素(IL)-1、IL-2、IL-6、IL-8 和 IL-10 等。Kimura 等^[7]研究证实低温(33.5℃)抑制小胶质细胞诱导型一氧化氮合酶和促炎性细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,同时低温通过抑制小胶质细胞活化减轻神经元损伤。小胶质细胞是炎症致敏性缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain injury, HI)后炎症反应的早期关键介质,在 HI 发生 24h 后,小胶质细胞极化成主要的促炎症表型。临床上 Bilkhu 等^[8]研究发现冷敷联合人工泪液或是盐酸依匹斯汀治疗急性季节性过敏性结膜炎,比其他治疗更能减少结膜充血,增强了药物单独应用的疗效,可降低抗原升高的眼表温度,是在抗原激发后 1h 内将症状降至基线有效的治疗方法。

三、低温保存在眼库中的应用研究

目前,器官移植在临床中通常用来有效根治终末期器官衰竭,眼科开展移植手术革新了许多致盲眼病的治疗。低温保存是利用较低的温度保存结构完整的活细胞和组织,该技术目前仍作为器官移植保存方法的首选。低温状态下可降低离体器官的代谢,同时提升对缺血再灌注损伤的耐受性,显著提高了移植手术的成功率^[9]。

1. 低温保存与角膜移植:角膜移植手术是治疗角膜病最有效的方法,而开展此类手术的基本条件就是眼库及角膜保存技术。我国研究者曾对不同保存方法的大鼠角膜内皮细胞进行活性染色,发现深低温保存后复温的角膜植片具有良好的内皮活性,深低温抑制细胞能量代谢,使其长期处于休眠状态,经过复温后的细胞可恢复其正常的生物学功能^[10]。角膜排斥反应是角膜移植手术失败的主因,如何降低其发生率一直是研究的热点。牛晓霞等^[11]通过观察大鼠穿透性角膜移植术后的角膜排斥反应指数、植片存活时间和植片的病理变化,发现深低温保存组植片存活时间明显延长,并且术后 10 天时 HE 染色显示深低温组炎症反应较其他组明显减轻。

以上提及的深低温保存对内皮细胞密度影响的

研究主要是基于动物实验,目前临床研究数据较少。原因是虽然深低温保存法可明显延长角膜保存时间、杜绝微生物对角膜的污染、同时避免自身代谢产物的毒性反应,但该方法存在设备昂贵、过程复杂、技术要求较高等情况,所以在国内尚未普及。相信随着冷冻保护剂的开发和利用,该技术将会普遍应用于国内的医疗环境中。

姜涛等^[12]用深低温保存的角膜材料行板层角膜移植术治疗边缘性角膜变性,结果发现所有病例术后角膜边缘病变均未发展,术后视力基本不受影响,尤其是术前未发生角膜穿孔的病例,术后几乎没有眼压升高、瞳孔粘连、前房反应等并发症。深低温保存的角膜材料弥补了新鲜角膜的来源限制与时效限制,是治疗边缘性角膜变性的理想材料。

2. 低温保存与眼科其他移植手术:角膜缘干细胞(limbal stem cells, LSC)的缺乏导致进行性视力丧失,通过自体 LSC 移植可治疗多种眼表疾病,如复发性翼状胬肉、眼表化学损伤、角膜缘溃疡等。郑穗联等^[13]采用“简化二步法”冻贮 LSC,光镜、电镜、动物实验均证明深低温保存 LSC 结构完整、功能良好。他们以二甲基亚砜作为冷冻保护剂,更好地保护角膜内皮;液氮具有的超低温性抑制细胞代谢;控速降温避免严重的细胞损伤,而快速复温可提高细胞成活率,加快其功能恢复。Osei-Bempong 等^[14]研究发现当冻存保护剂的浓度超过 5% 时,细胞膜的完整性、代谢和集落形成效率降低,而保护剂的种类对这些特性没有显著影响,这对眼库低温保存剂的选择有一定指导意义。

羊膜间质干细胞可通过分泌损伤部位的治疗因子减轻角膜损伤^[15]。如今保存羊膜已广泛应用于眼科,临床观察其重建眼表的作用、疗效及预后也与新鲜羊膜无明显差异。鲁静等^[16]曾通过观察组织形态和细胞超微结构,研究了 4 种常用的羊膜保存方法,结论是以 DMEM/甘油深低温保存法效果最好,因为深低温冷冻保存减缓了反应和细胞死亡,并且培养基中所含的葡萄糖具有维持细胞渗透压、抑制细胞水肿的作用。

Li 等^[17]研究发现,低温保存的人胚胎干细胞来源的视网膜色素上皮(human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelium, hESC-RPE)细胞不仅保留了诱导的视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞的特异性基因表达谱、形态和超微结构,还具有极化单层、紧密连接和缝隙连接结构,数

据显示,即使经过低温保存和解冻的 hESC - RPE 细胞仍然可以作为治疗视网膜变性疾病的供体细胞来源。

四、低温治疗在眼科手术中的应用研究

1. 低温与眼睑手术:睑缘色素痣的切除手术时常导致的并发症有倒睫、眼睑内外翻甚至眼睑畸形等,严重影响美观。低温冷冻治疗色素痣通过破坏黑色素细胞,使其中断输送到表皮细胞,从而使色素痣脱色素。冷冻治疗操作简单、不易造成明显眼睑畸形及瘢痕残留,恢复后外观较为自然,值得推广应用^[18]。

2. 低温与角膜屈光手术:机械法 - 准分子激光上角膜皮瓣下磨镶术(epipolis laser in situ keratomileusis, Epi - LASIK)是在准分子激光上皮下角膜磨镶术的基础上发展起来的一项崭新的屈光手术技术,依旧存在术后角膜上皮雾状混浊(haze)等并发症。预防角膜 haze 常见的方法有应用丝裂霉素(mitomycin, MMC)浸润角膜基质切削面、低温平衡盐溶液(chilled balanced salt solution, CBSS)冲洗等。沈政伟等^[19]选择 Epi - LASIK 作为研究术式,在术中分别应用 0.2% MMC 及 4℃ CBSS 处理基质表面,发现两组患者术后裸眼视力、残余等效球镜度以及上皮并发症方面,CBSS 组均稍优于 MMC 组,原因可能与低温抑制细胞凋亡、MMC 的角膜上皮毒性有关,CBSS 抑制 Epi - LASIK 术后角膜 haze 更有效和安全。

经上皮准分子激光角膜切削术(trans - Epithelial photorefractive keratectomy, TPRK)存在角膜表层手术固有的术后疼痛、炎性反应明显等问题,术中激光可使基质床温度升高,引起烧灼感和刺痛感,临床上主要使用镇痛药物来抑制疼痛,这可能会延迟角膜上皮的愈合,甚至造成严重的角膜毒性。周友惠等^[20]在术中采用 4℃ CBSS 冲洗结膜囊加上术后即刻冷敷术眼 1h,发现患者手术当天疼痛评分、术后 5 天角膜上皮愈合及结膜充血明显优于常温组,局部冷疗可以抑制神经细胞的感知能力,降低神经末梢敏感度,可明显减轻患者术后早期疼痛,减少止痛药的使用。

3. 低温与白内障超声乳化手术:白内障超声乳化手术(phacoemulsification, Phaco)术中超声探头高频振动产生的能量及乳化颗粒的机械损伤难免会引起角膜内皮细胞的结构、数量和功能的破坏。Alzner 等^[21]曾监测发现 Phaco 术中能量的释放使房水温度升高 12℃ 以上,房水实时温度高达 36℃,远超角膜所能耐受的最高温度 32℃,可直接造成角膜内皮细胞损伤。因此,通过各种手段降低 Phaco 术后角膜水肿

及角膜内皮细胞的保护,长期成为研究的热点。

低温灌注能够降低 Phaco 产生的热效应,Wan 等^[22]对硬核白内障的兔眼行 Phaco 手术,分别在术中行低温(4℃)和常温(24℃)灌注,术后测量角膜中央厚度和切缘厚度,检测角膜内皮细胞计数和观察前房(anterior chamber, AC)炎性细胞计数,证实了低温灌注能有效保护角膜内皮,减轻术后角膜水肿和 AC 炎症。Jiang 等^[23]观察葡萄膜炎相关性白内障患者行 Phaco 手术,发现低温灌注组的患者术后第 1 天前房闪辉、房水细胞评分及角膜切口平均厚度均低于常温组,显示低温灌注应用于特殊类型的白内障同样安全有效。证实瞬态低温可有效预处理刺激,相关组织的代谢率降低,以此诱导机体耐受缺血性或低氧性损伤^[22]。

4. 低温与抗青光眼手术:睫状体冷凝术通过冷冻破坏睫状体上皮和血管系统,同时可破坏角膜缘处神经组织,达到减少房水生成、缓解疼痛的效果,目前主要应用于难治性青光眼的治疗。曲建梅等^[24]对青光眼滤过术后眼压未被控制的患者进行睫状体冷凝术,术后眼压明显下降,患者需用降眼压药物的数量明显减少;术后 3 个月无炎性反应或疼痛。需要注意的是,睫状体冷凝术一次手术过量可导致低眼压及眼球萎缩,且没有任何恢复眼压的措施,因此选择患者要慎重,只有在其他治疗失败或不能进行时作为一项补救措施,不能一味追求过度降低眼压。

5. 低温与玻璃体视网膜手术:Tamai 等^[25]曾研究不同温度对家兔玻璃体切除术的影响,将眼内灌注液分别维持在 9、22、37℃,术后灌洗玻璃体腔 60min,分别于术前和术中监测兔眼的温度和葡萄膜血流,术后第 1、7、14 天检测房水蛋白浓度,发现局部低温可以减少术中脉络膜出血及术后早期的炎性反应。我国研究者也做过类似研究,证实局部低温对家兔术眼血 - 房水屏障及血 - 视网膜屏障均有一定的保护作用。

冷凝可导致细胞死亡、组织无菌性坏死,由于这种机制,视网膜冷凝术可形成局部炎性反应,导致脉络膜和视网膜的瘢痕黏连,从而达到封闭视网膜裂孔、预防视网膜脱离的作用^[26]。视网膜冷凝术也可抑制因缺血缺氧而产生的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),从而消除视网膜新生血管。随着玻璃体腔注射抗 VEGF 药物的普及,抗 VEGF 联合视网膜冷凝术可更加有效地治疗如 3 期 Coats 病、早产儿视网膜病变(retinopathy of prema-

turity, ROP)等疾病,达到消除异常血管和渗出、减轻视网膜脱离和预防 NVG 等并发症的目的。然而,过度冷凝会造成 RPE 破坏以及血-视网膜屏障破裂,导致色素细胞较多游离、炎症和血管生成介质的释放增加,易引起增殖性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)的发生,因此应避免过度大面积冷凝。如今视网膜手术中多使用冷凝与激光相结合的方法,以减轻对 RPE 细胞的损害,阻止或减轻 PVR 的进展。

五、展 望

目前低温在眼科的运用相对集中于眼库、炎症的控制和一些眼科手术的辅助治疗。未来应更深入地探究例如低温对神经保护的具体治疗方案、如何解决低温可能存在的不良反应、低温对人视网膜缺血或光损伤病理改变的影响等问题,需要更多实验数据支持以及进一步的临床观察。

参考文献

- Simkhovich BZ, Hale SL, Kloner RA. Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue[J]. J Cardiovasc Pharmacol Therapeut, 2016, 9(2): 83-90
- Pamenter ME, Lau GY, Richards JG. Effects of cold on murine brain mitochondrial function[J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208453
- Huang CH, Tsai MS, Chiang CY, *et al.* Activation of mitochondrial STAT-3 and reduced mitochondria damage during hypothermia treatment for post-cardiac arrest myocardial dysfunction[J]. Basic Res Cardiol, 2015, 110(6): 59
- Zhang B, Gu Q, Chen X, *et al.* Temperature variability does not attenuate the beneficial effects of therapeutic hypothermia on cellular apoptosis and endoplasmic reticulum stress in the cerebral cortex of a swine cardiac arrest model[J]. Neurocrit Care, 2020, 34(3): 769-780
- Liao Y, Tong L, Tang L, *et al.* The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response[J]. Int J Cancer, 2017, 141(11): 2164-2173
- Rey-Funes M, Larrayoz IM, Contartese DS, *et al.* Hypothermia prevents retinal damage generated by optic nerve trauma in the rat[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 6966
- Kimura T, Toriuchi K, Kakita H, *et al.* Hypothermia attenuates neuronal damage via inhibition of microglial activation, including suppression of microglial cytokine production and phagocytosis[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 41(3): 459-468
- Bilkhu PS, Wolffsohn JS, Naroo SA, *et al.* Effectiveness of nonpharmacologic treatments for acute seasonal allergic conjunctivitis[J]. Ophthalmology, 2014, 121(1): 72-78
- 王勇, 叶少军, 王彦峰, 等. 器官保存的研究进展[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2016, 37(4): 560-564
- 牛晓霞, 洪晶, 段辉, 等. 不同保存方法对角膜内皮细胞活性的影响[J]. 国际眼科杂志, 2006, 6(5): 1015-1017
- 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[J]. 国际眼科杂志, 2014, 6: 1005-1008
- 姜涛, 周杨, 傅秀艳, 等. 用深低温保存的角膜材料行板层角膜移植术治疗边缘性角膜变性[J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(6): 1058-1060
- 郑穗联, 蔡剑秋, 陈峰, 等. 深低温保存的异体角膜缘干细胞的角膜移植术[J]. 眼视光学杂志, 2003, 5(2): 97-99
- Osei-Bempong C, Ghareeb AE, Lako M, *et al.* Defining the optimal cryoprotectant and concentration for cryopreservation of limbal stem cells[J]. Cryobiology, 2018, 84: 98-102
- Al-Jaibaji O, Swioklo S, Shortt A, *et al.* Hypothermically stored adipose-derived mesenchymal stromal cell alginate bandages facilitate use of paracrine molecules for corneal wound healing[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16): 5849
- 鲁静, 赵敏, 张琪, 等. 四种方法保存羊膜的组织形态学研究[J]. 眼科新进展, 2007, 27(7): 509-513
- Li QY, Zou T, Gong Y, *et al.* Functional assessment of cryopreserved clinical grade hESC-RPE cells as a qualified cell source for stem cell therapy of retinal degenerative diseases[J]. Exp Eye Res, 2021, 202: 108305
- 范军华, 李学喜. 低温冷冻治疗睑缘色素痣疗效观察[J]. 临床眼科杂志, 2010, 18(2): 167-168
- 沈政伟, 刘颖, 姜黎. 术中应用丝裂霉素与低温平衡盐溶液对 Epi-LASIK 术后疗效的影响[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2015, 17(12): 726-729
- 周友惠, 熊洁, 张辰星, 等. 低温冲洗联合局部冷敷对降低 Trans-PRK 术后疼痛及炎症反应的效果分析[J]. 重庆医学, 2020, 49(21): 3574-3577
- Alzner E, Walkow T, Anders N, *et al.* Endothelial cell counts following pars plana vitrectomy in pseudophakic and aphakic eyes[J]. J Cataract Refract Surg, 1999, 25(8): 800-804
- Wan W, Jiang L, Ji Y, *et al.* Effect of hypothermic perfusion on phacoemulsification in eyes with hard nuclear cataract: randomized trial[J]. J Cataract Refract Surg, 2019, 45(12): 1717-1724
- Jiang L, Wan W, Xun Y, *et al.* Effect of hypothermic perfusion on phacoemulsification in cataract patients complicated with uveitis: a randomised trial[J]. BMC Ophthalmol, 2020, 20(1): 232
- 曲建梅, 赵军梅. 睫状体冷凝术治疗手术失败的青光眼的效果[J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2017, 39(10): 757-760
- Tamai K, Majima A, Yan C. Effects of local hypothermia on uveal blood flow and postoperative inflammation in vitrectomy[J]. Jpn J Ophthalmol, 1995, 39(1): 43-48
- 黎晓新, 王景昭. 玻璃体视网膜手术学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 159-160

(收稿日期: 2021-11-06)

(修回日期: 2021-12-20)