

# Smile 来源的角膜基质透镜构建组织工程角膜基质支架的实验研究

叶青<sup>1</sup>, Ackbarkhan Zacharia<sup>2</sup>, 纪佳月<sup>2</sup>, 曾静<sup>2</sup>

引用:叶青, Ackbarkhan Zacharia, 纪佳月, 等. Smile 来源的角膜基质透镜构建组织工程角膜基质支架的实验研究. 国际眼科杂志 2020;20(4):594-598

基金项目:广西科技计划项目(No.桂科 AB18221038);广西壮族自治区高等学校科学研究项目(No.KY2015YB070)

作者单位:<sup>1</sup>(430015)中国湖北省武汉市,湖北省中西医结合医院眼科;<sup>2</sup>(530021)中国广西壮族自治区南宁市,广西医科大学第一附属医院眼科

作者简介:叶青,毕业于广西医科大学,眼科学硕士,住院医师,研究方向:眼表疾病、屈光不正。

通讯作者:曾静,毕业于中山医科大学,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:角膜及眼表疾病. nanzjzy@163.com

收稿日期:2019-06-21 修回日期:2020-03-19

## 摘要

**目的:**探究用全飞秒激光小切口微透镜摘除术(Smile)来源的角膜基质透镜构建组织工程角膜基质支架的可行性及最佳保存条件。

**方法:**从 Smile 来源的角膜基质透镜中分离培养人角膜基质细胞(HCFs),采用 MTT 法检测人纤维蛋白粘合剂(FS)对细胞的毒性作用;将 FS 粘贴双层角膜基质透镜构建的双层透镜支架分别置于不同介质(无水甘油、透明质酸钠、胎牛血清、模拟湿房环境)及不同温度(常温、4℃、-20℃)中保存,对比支架透明度及硬度。

**结果:**MTT 检测结果显示,FS 作用 0~72h, HCFs 与正常培养细胞具有相似的增殖趋势,细胞毒性评级为 0~1 级,相对生存率均超过 90%。FS 粘贴的双层基质透镜支架表面平整、贴合紧密、透明度良好且硬度适宜。4℃ 保存 14d 后,无水甘油中 9 枚支架复水后均未出现开裂情况,透明度良好;透明质酸钠中 9 枚支架中 3 枚出现开裂,剩余 6 枚完整,透明度尚可;模拟湿房环境中 9 枚支架均无开裂现象,但皱缩严重;胎牛血清中 9 枚支架全部开裂,水肿严重。保存 14d 后,常温无水甘油中的 15 枚支架其中 2 枚保持无色透明,5 枚轻微变黄但透明度尚可,8 枚严重变黄且透明度明显降低;4℃ 无水甘油中的 15 枚支架其中 5 枚无色透明,10 枚轻微变黄且透明度良好;-20℃ 无水甘油中的 15 枚支架均保持无色透明状态,未出现变黄情况。

**结论:**FS 是一种安全无毒的生物胶,可利用 FS 粘贴 Smile 来源的角膜基质透镜构建稳定性好、透明度高且硬度适宜的角膜基质支架,且-20℃ 无水甘油是角膜基质透镜支架的较佳保存条件。

**关键词:**组织工程角膜;角膜基质透镜;纤维蛋白粘合剂;细胞毒性;保存

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.4.03

## An experimental study on the construction of tissue engineering corneal stromal stent with Smile derived corneal stromal lens

Qing Ye<sup>1</sup>, Ackbarkhan Zacharia<sup>2</sup>, Jia - Yue Ji<sup>2</sup>, Jing Zeng<sup>2</sup>

**Foundation items:** Science and Technology Planning Project of Guangxi Province of China (No.AB18221038); Scientific Research Project of Ministry of Education in Guangxi Zhuang Autonomous Region of China (No.KY2015YB070)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese & Western Medicine, Wuhan 430015, Hubei Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

**Correspondence to:** Jing Zeng. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. nanzjzy@163.com

Received:2019-06-21 Accepted:2020-03-19

## Abstract

• **AIM:** To investigate the feasibility of constructing corneal stromal scaffolds and the optimal preservation conditions of corneal stromal lenses obtained from the small incision lenticule extraction (Smile) surgery.

• **METHODS:** Constructing a bilayer lens by adhering together two corneal stromal lenses with human fibrin sealant (FS). Human corneal fibroblasts were isolated and cultured from Smile derived corneal stromal lenses *in vitro*, and the toxicity of FS on human corneal fibroblasts was detected by MTT method. The bilayer lenses were then placed in anhydrous glycerin, sodium hyaluronate eye drops, a simulated wet room environment and fetal bovine serum groups respectively, and stored at 4℃ for 14d. The transparency, hardness and stability of the scaffolds were then compared. Afterwards, the bilayer lens scaffolds were stored in anhydrous glycerin at room temperature, 4℃ and -20℃. After 14d of preservation, the diverse effects of temperature on the transparency and hardness of the scaffolds were compared.

• **RESULTS:** MTT results showed that the cells of the experimental group and the control group had similar proliferation trend within 0-72h. The cytotoxicity rating of the experimental group was 0 at 36-48h and 1 at 24h and 60-72h. The relative survival rate of the cells within 0-72h

was over 90%. FS - bonded bilayer lens scaffold had a smooth surface, close bonding, good transparency and suitable hardness. After 14d of storage at 4°C, none of the nine bilayer lens scaffolds in the anhydrous glycerol group showed signs of cracking after rehydration, and their transparency was good. In the sodium hyaluronate group, three of the nine scaffolds cracked and the remaining six were still intact. In the simulated wet room environment group, none of the 9 scaffolds cracked, but there were different degrees of shrinkage, their surface was rough and transparency was lower. In the fetal bovine serum group, all the 9 stents were cracked, and the single corneal stromal lens was soft and edema was serious. Out of the 15 bilayer lens scaffolds preserved in anhydrous glycerol at room temperature, 2 remained colourless and transparent, 5 slightly yellowed but still remained transparent, 8 yellowed substantially with a significant reduction in transparency. Out of the 15 bilayer lens scaffolds preserved in anhydrous glycerol at 4°C, 5 remained colourless and transparent, and 10 slightly yellowed while remaining transparent. Of the 15 bilayer lens scaffolds preserved in anhydrous glycerol at -20°C, none of the scaffolds yellowed, therefore, remaining colourless and transparent.

• **CONCLUSION:** FS is a safe and non-toxic bio-gel. It can be used to glue Smile-derived corneal stromal lenses to construct corneal stromal scaffolds with good stability, high transparency and suitable hardness. Anhydrous glycerol at -20°C is the best preservation condition for corneal stromal lens scaffolds.

• **KEYWORDS:** tissue-engineered cornea; corneal stromal lens; fibrin adhesive; cytotoxicity; preservation

**Citation:** Ye Q, Zico, Ji JY, et al. An experimental study on the construction of tissue engineering corneal stromal stent with Smile derived corneal stromal lens. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020; 20(4):594-598

## 0 引言

角膜病是世界第四大致盲性疾病<sup>[1]</sup>,角膜移植是角膜病重要的复明及治疗手段。角膜存在的“免疫赦免”机制,使得角膜移植术成为成功率最高的器官移植手术,但角膜病变时常伴有强烈且持续的炎症反应,因此角膜移植术后仍可出现免疫排斥反应。近年来,关于角膜移植的热点问题主要集中在两个方面:(1)如何扩增角膜供体来源;(2)如何减轻或避免移植后排斥反应。角膜供体的缺乏使得研究者致力于开发角膜替代物。组织工程角膜利用生物学、材料学、临床医学等知识,构建具有良好生物相容性的种子细胞-生物材料支架的复合体。在多种生物支架材料中,猪角膜基质由于仅表达少量异种糖原抗体,且胶原的物种差异较小,因此成为目前研究最多的支架材料之一<sup>[2]</sup>。但猪角膜基质存在宗教或伦理道德的限制,以及感染异种疾病的风险,临床实际应用受限。随着全飞秒激光小切口微透镜摘除术(small incision lenticule extraction, Smile)的兴起,术中取出的光滑平整的人角膜基质透镜,为组织工程角膜提供了更优的同种角膜基质组

织材料来源。本研究利用人纤维蛋白粘合剂(fibrin sealant, FS)粘贴 Smile 术中取出的角膜基质透镜,构建双层角膜基质透镜支架,探究不同保存方式对支架硬度、稳定性、透明度的影响;此外,从细胞生长、增殖等方面评估 FS 对人角膜基质细胞(human corneal fibroblasts, HCFs)的毒性作用,以期为临床提供一种安全无毒、简单易得的组织工程角膜支架材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 **主要试剂和仪器** 纤维蛋白粘合剂(RAAS), I 型胶原酶(Sigma), 胎牛血清、RPMI-1640 培养基(Gibco), MTT 试剂盒(Multi Sciences), 无水甘油(Solarbio), 透明质酸钠(Santen); 酶标分析仪(Thermo), 荧光显微镜(Nikon), 眼科手术显微镜(Zeiss)。

1.1.2 **组织来源** 人角膜基质透镜取自 2019-01/03 于广西医科大学第一附属医院眼科行 Smile 术的近视患者 97 例 194 眼,其中男 46 例,女 51 例,年龄 19~36 岁,均排除其他眼部及全身疾病。角膜基质透镜取出后立即置于无菌 RPMI-1640 培养基,于 2h 内转移至超净台。编号并记录患者的姓名、性别、年龄、术前屈光度、角膜基质透镜的直径及中央厚度。本次研究已通过广西医科大学第一附属医院伦理委员会审查。

### 1.2 方法

1.2.1 **HCFs 体外分离和培养** 由于 Smile 手术是直接于角膜基质层做预设深度的切削,取出的组织仅有角膜基质组织,而角膜基质组织主要是由大量的胶原纤维和成纤维细胞构成的,因此用 I 型胶原酶消化取出的角膜基质组织,将得到的细胞悬液进行体外培养后,得到的细胞即是基质层来源的角膜成纤维细胞。将术中取出的角膜基质透镜置于 PBS 缓冲液中洗涤 2~3 次,用 1.5g/L I 型胶原酶溶液于 37°C 消化至组织块溶解,1000r/min 离心 5min,弃上清,将细胞稀释后接种于培养瓶,2~3d 换液 1 次,约 7d 后按 1:3 接种传代。

1.2.2 **MTT 法检测细胞生存率** 将纤维蛋白粘合剂置于 15mL 完全培养基(含 10%胎牛血清)中,于 37°C 恒温箱中 72h,收集浸提液。以 3 000 个/孔的密度将 HCFs 接种于 96 孔板,于 37°C 培养。24h 后按以下分组全量换液:(1)浸提液组:每孔 100μL 浸提液;(2)完全培养基组:每孔 100μL 完全培养基;(3)空白对照组:无细胞,每孔 100μL 完全培养基。分别于换液 24、36、48、60、72h 后检测各组在 570nm 波长处的吸光度值(OD 值),计算细胞相对生存率(RGR),绘制细胞生长曲线,并参照细胞毒性分级标准(表 1)进行细胞毒性评级。每组设 5 个复孔。细胞相对生存率  $RGR(\%) = \frac{\text{实验组平均 OD 值} - \text{空白对照组平均 OD 值}}{\text{正常对照组平均 OD 值} - \text{空白对照组平均 OD 值}} \times 100\%$ 。

1.2.3 **角膜基质支架的制备** 将术中取出的同一患者来源的两片角膜基质透镜平铺于清洁盖玻片上,吸除周围残留的 RPMI-1640 培养基。于手术显微镜下,先后滴加等量(3~5μL)纤维蛋白粘合剂、凝血酶溶液于其中一片角膜基质透镜表面,并迅速将另一片透镜覆盖其上,于 10s 内调整至两片透镜完全重叠。

表1 细胞毒性分级

等级	RGR (%)	细胞形态	细胞增殖能力	毒性作用
0	≥100	细胞形态完整,贴壁良好,无细胞溶解	优	-
1	80~99	少于20%的细胞呈圆形,贴壁松散,无胞浆颗粒,偶见细胞溶解	优	-
2	50~79	少于50%的细胞呈圆形,无胞浆颗粒,可见明显细胞溶解	良	+
3	30~49	少于70%的细胞呈圆形或溶解	中	++
4	0~29	几乎所有细胞结构均不完整	差	+++

表2 培养不同时间浸提液组与完全培养基组细胞的OD值与细胞毒性评级

培养时间	浸提液组( $\bar{x} \pm s$ )	完全培养基组( $\bar{x} \pm s$ )	RGR (%)	等级	毒性作用
24h	0.513±0.047	0.524±0.080	97.80	1	-
36h	0.723±0.056	0.662±0.057	109.42	0	-
48h	0.880±0.102	0.844±0.107	104.57	0	-
60h	0.946±0.098	1.040±0.075	91.04	1	-
72h	1.109±0.055	1.204±0.343	92.13	1	-

1.2.4 不同保存介质对支架的影响 将36枚双层角膜基质透镜支架转移至6孔板中,按照保存介质不同分为以下4组:无水甘油组、透明质酸钠组、胎牛血清组及模拟湿房环境组(生理盐水浸湿的棉球)。每组设置3个复孔,每孔放置3枚基质透镜支架。将6孔板置于4℃环境保存14d,观察并评价透镜支架的硬度、透明度及稳定性(以开裂情况作为稳定性判断标准),硬度和透明度均在眼前段相机下进行直观评判。

1.2.5 不同保存温度对支架的影响 将45枚双层角膜基质透镜随机分为3组,置于无水甘油中脱水,其中15枚支架于常温(25℃)环境保存(常温组),15枚支架于4℃环境中保存(4℃组),15枚支架于-20℃环境中保存(-20℃组)。14d后复水,并观察比较3种温度保存的支架硬度、透明度及稳定性。

统计学分析:使用SPSS 23.0软件进行统计学分析。计数资料的组间比较采用Fisher确切概率法;等级资料的组间比较采用Kruskal-Wallis H检验,若组间存在差异,再采用Nemenyi检验进行各组间的两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HCFs的形态特征 细胞种瓶后24h,大部分HCFs贴壁,约48h后可见HCFs伸展为长梭形或三角形,细胞核为圆形或椭圆形,核仁清晰,贴壁紧密,排列整齐,呈涡旋状生长。

2.2 MTT法检测细胞生存率 倒置相差显微镜下可见浸提液组和完全培养基组细胞均具有正常的细胞形态,细胞贴壁良好、形状完整,无胞浆颗粒。MTT检测结果显示,0~72h内浸提液组与完全培养基组细胞具有相似的增殖趋势。浸提液组细胞培养36~48h细胞毒性评级为0级,24h内及60~72h细胞毒性评级为1级,0~72h细胞相对生存率均超过90%(表2,图1)。按照美国药典的毒性评级标准,RGR ≥ 80%即可认为材料无毒。

2.3 双层角膜基质支架的构建 用纤维蛋白粘合剂粘帖后的双层角膜基质透镜支架表面平整光滑,厚度及硬度增加,透明度良好,双层透镜间贴合紧密。

2.4 不同保存介质对双层透镜支架的影响 4℃保存14d

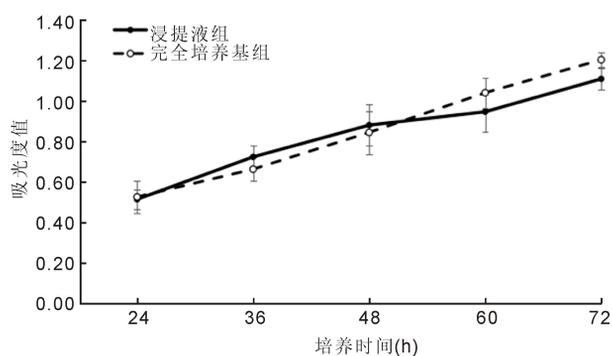


图1 HCFs在纤维蛋白粘合剂作用下的生长曲线。

后,无水甘油组9枚双层基质透镜支架复水后均未出现开裂情况,透明度良好,硬度较甘油保存前增加,厚度稍增加(图2A);透明质酸钠组9枚支架中,3枚出现开裂,剩余6枚完整,透明度尚可,硬度较保存前下降,支架略呈水肿状态,厚度增加(图2B);模拟湿房环境组9枚支架均无开裂现象,但存在不同程度的皱缩,表面粗糙不平,厚度及透明度均较保存前降低(图2C);胎牛血清组9枚支架全部开裂,单层基质透镜质软且水肿严重。以4℃保存14d后双层角膜基质透镜支架开裂情况为判断标准,比较4种保存方式的稳定性,无水甘油和湿房保存的支架稳定性最高,均优于透明质酸钠,而胎牛血清保存的支架稳定性最低( $P < 0.05$ ,表3)。

2.5 不同保存温度对双层透镜支架的影响 于常温、4℃及-20℃的无水甘油中保存14d后,各组双层角膜基质透镜复水后硬度相似,但透明度及颜色出现明显差异。于常温无水甘油中保存的15枚双层透镜支架,其中2枚保持无色透明,5枚轻微变黄但透明度尚可,8枚严重变黄且透明度明显降低;于4℃无水甘油中保存的15枚双层透镜支架,其中5枚保持无色透明,10枚轻微变黄且透明度良好;于-20℃无水甘油中保存的15枚双层透镜支架均保持无色透明状态,未出现变黄情况。以保存14d后双层角膜基质透镜支架透明度情况为判断标准,比较3种保存温度的保存效果,不同温度的无水甘油对双层角膜基质透镜支架的保存效果差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),其中常温组和4℃组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),-20℃组与其余

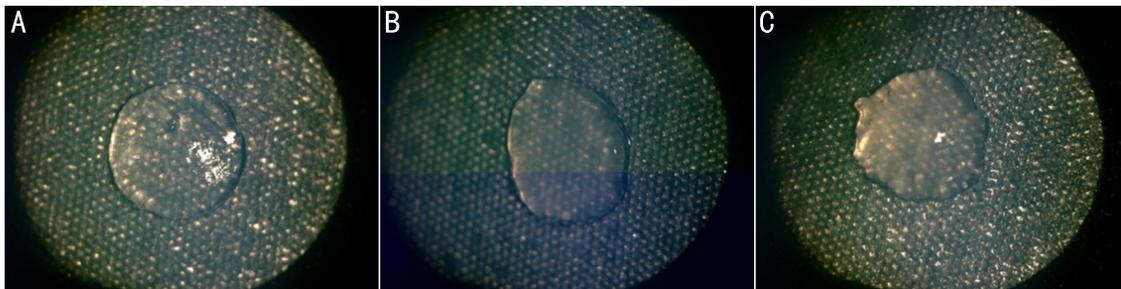


图2 不同保存介质对双层角膜基质透镜支架复水后,未出现开裂情况,透明度良好,硬度较保存前增加,厚度稍增加;B:透明质酸钠组,透明质酸钠中保存14d的双层角膜基质透镜透明度尚可,硬度较保存前降低,支架呈水肿状态,厚度增加;C:模拟湿房环境组,模拟湿房环境保存14d的双层角膜基质透镜透明度欠佳,存在不同程度皱缩,表面粗糙不平,厚度及硬度均较保存前降低。

表3 不同保存介质对双层角膜基质透镜支架稳定性的影响 枚

组别	n	开裂	未开裂
无水甘油组	9	0	9
透明质酸钠组	9	3	6
模拟湿房环境组	9	0	9
胎牛血清组	9	9	0

表4 不同保存温度对双层角膜基质透镜支架透明度的影响 枚

组别	n	-	+	++
常温组	15	2	5	8
4℃组	15	5	10	0
-20℃组	15	15	0	0

注:-;无色透明;+;透明但轻微变黄;++;严重变黄且透明度降低。

两组差异均有统计学差异意义( $P < 0.05$ ),表明-20℃组的保存效果最佳(表4)。

### 3 讨论

角膜基质是维持角膜透明性的关键结构成分,因此,寻找具有类似天然角膜基质结构和生化成分的角膜基质替代物是组织工程角膜研发的重点之一<sup>[3]</sup>。理想的角膜基质支架材料应具有材料透明、良好的生物相容性、适宜的强度、良好的稳定性,可供细胞黏附、增殖和迁移等特点<sup>[4]</sup>。目前研究最多的支架材料主要有胶原及其复合物、脱细胞角膜基质、丝素蛋白、纤维蛋白、壳聚糖等<sup>[5]</sup>。在多种支架材料中,脱细胞角膜基质来源于天然的角膜组织,既保留了角膜组织的结构及组成成分,还保留了上皮细胞和内皮细胞的附着位点,因此成为支架材料的理想选择。但传统的脱细胞基质主要来源于猪的角膜组织,存在一定的宗教及伦理学争议,且存在感染异种疾病的风险,因此临床实际应用受限。

Smile 术的兴起为角膜基质材料提供了新的来源。Smile 是在角膜基质层进行两次预设深度和弧度的扫描切削,分离透镜前后表面后,将透镜从小切口完整取出。取出的角膜基质透镜前后表面光滑平整,因直接取自于人的角膜基质层,理论上保留了正常角膜基质的胶原结构、光学透明度、生物力学强度及生物相容性。单层角膜基质透镜厚度约 100 $\mu\text{m}$ ,可承受的眼内压有限,因此对于 3mm 以上(<5mm)的较大角膜穿孔,可叠加使用多层角膜基质透

镜作为支架材料,以提高支架材料的抗张强度。FS 是从健康人的血浆中提取出的一种天然生物蛋白粘合剂,呈透明凝胶状,多用于手术中喷洒创面使组织黏附并止血<sup>[6-9]</sup>,因此可选用 FS 粘贴多层角膜基质透镜,以适应不同程度角膜穿孔的抗张强度需求。为探究 FS 对角膜基质细胞的毒性影响,本研究将 Smile 来源的角膜成纤维细胞与 FS 浸提液共同培养 72h,通过 MTT 法检测细胞的增殖情况,证实 FS 对角膜成纤维细胞无毒性作用,具有良好的生物相容性,可用于构建组织工程角膜基质支架。FS 粘贴的双层角膜基质透镜支架表面光滑平整,硬度增加,透明度良好,两片透镜贴合紧密,不易移位。

传统的角膜保存方法主要分为短期、中期、长期及超长期保存法<sup>[10]</sup>。短期保存一般采用湿房保存的方式,保存时间较短,一般为 24~48h;中期保存主要是用角膜中期保存液将角膜保存 4~14d,中期保存液中一般添加有硫酸软骨素、透明质酸钠、自体或受体血清、青霉素及皮质类固醇等添加剂以延长保存时间;长期保存多采用器官培养法,但此法操作复杂,价格昂贵,国内应用较少;超长期保存则多采用甘油保存法,操作简便、成本低廉,且可将保存时间延长至数年<sup>[11]</sup>。综合考虑上述保存方式,本研究选择无水甘油、透明质酸钠、胎牛血清及模拟湿房环境作为角膜支架的保存介质,以探究角膜支架的适宜保存方式。通过对比不同保存介质中支架的透明度、开裂情况、硬度及厚度,证实无水甘油是双层角膜基质支架的较佳保存介质。通过进一步对比常温、4℃及-20℃无水甘油中保存的透镜支架的透明度,证实-20℃是较佳保存温度。在-20℃无水甘油中保存的角膜基质透镜支架复水后,其硬度、厚度、透明度及稳定性均较好。

综上所述,本研究利用 FS 粘贴 Smile 来源的角膜基质透镜构建双层角膜基质透镜支架,为组织工程角膜支架材料提供了新的来源途径。将 Smile 来源的角膜基质细胞与 FS 浸提液共培养,通过 MTT 法证实 FS 对角膜基质细胞无毒性作用,可用于构建组织工程角膜基质支架。通过对比不同保存介质、不同保存温度下透镜支架的稳定性、硬度及透明度,证实-20℃无水甘油是双层角膜基质透镜较为理想的保存条件。不仅扩充了角膜支架材料的来源,可直接用于修补 3mm 以下的角膜穿孔,而且为下一步联合种子细胞构建组织工程角膜提供了前期实验依据。

参考文献

- 1 Stevens GA, White RA, Flaxman SR, *et al.* Global prevalence of vision impairment and blindness; magnitude and temporal trends, 1990–2010. *Ophthalmology* 2013; 120(12): 2377–2384
- 2 Porzionato A, Stocco E, Barbon S, *et al.* Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices; A Systematic Review and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2018; 19(12): E4117
- 3 周庆军, 谢立信. 组织工程角膜的基础研究和临床应用现状. *中华细胞与干细胞杂志* 2014; 4(1): 1–4
- 4 Shah A, Brugnano J, Sun S, *et al.* The development of a tissue-engineered cornea: biomaterials and culture methods. *Pediatr Res* 2008; 63(5): 535–544
- 5 Matthyssen S, Van den Bogerd B, Dhubhghaill SN, *et al.* Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomater* 2018; 69: 31–41
- 6 Ito TE, Martin AL, Henderson EF, *et al.* Systematic Review of Topical Hemostatic Agent Use in Minimally Invasive Gynecologic Surgery. *JSLs* 2018; 22(4): e2018
- 7 Skovgaard C, Holm B, Troelsen A, *et al.* No effect of fibrin sealant on drain output or functional recovery following simultaneous bilateral total knee arthroplasty: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Acta Orthop* 2013; 84(2): 153–158
- 8 Okuda T, Fujita M, Yoshioka H, *et al.* Novel surgical technique to solidify cyst-type metastatic brain tumors using autologous fibrin glue for complete resection. *Surg Neurol Int* 2014; 5: 100
- 9 Docimo G, Limongelli P, Conzo G, *et al.* Axillary lymphadenectomy for breast cancer in elderly patients and fibrin glue. *BMC Surg* 2013; 13 Suppl 2: S8
- 10 陈丽, 陆佳骏, 盛敏杰, 等. 角膜保存方法现状及进展. *国际眼科杂志* 2017; 17(6): 1060–1062
- 11 Niu G, Zhou Q, Huang X, *et al.* Individualized penetrating keratoplasty using edge-trimmed glycerol-preserved donor corneas for perforated corneal ulcers. *BMC Ophthalmol* 2019; 19(1): 85