

# 地塞米松对深低温保存猪角膜内皮细胞的影响

刘芳,熊国平,沈慧莲

作者单位:(529030)中国广东省江门市中心医院眼科  
作者简介:刘芳,硕士,主治医师,研究方向:角膜移植、斜弱视、眼表疾病。  
通讯作者:刘芳.happysky1019@tom.com  
收稿日期:2012-09-14 修回日期:2013-01-14

## Study on the influences of dexamethasone to cryopreserved cornea endothelial cells

Fang Liu, Guo-Ping Xiong, Hui-Lian Shen

Department of Ophthalmology, Central Hospital of Jiangmen City, Jiangmen 529030, Guangdong Province, China

**Correspondence to:** Fang Liu. Department of Ophthalmology, Central Hospital of Jiangmen City, Jiangmen 529030, Guangdong Province, China. happysky1019@tom.com

Received:2012-09-14 Accepted:2013-01-14

### Abstract

• **AIM:** To study the influences of dexamethasone to cryopreserved cornea endothelial cells.

• **METHODS:** Fresh pig corneas were drilled down by 13mm-diameter trephine. Then the grafts were put into four kinds of cool cryoprotective media by turns and equilibrated with 'simplified four-step' method. All grafts were thawed in 40°C. All dexamethasone pretreatment corneas were additionally incubated in the last cool cryoprotective medium which had 0.01mg/mL, 0.03mg/mL or 0.05mg/mL dexamethasone for 18 hours in 4°C before cryopreservation. Corneas thawed were stained by typan blue and alizarin Bordeaux. Survival rates of endothelial cells were observed.

• **RESULTS:** There were no significant differences in endothelial survival rate among rate-freezing group and every dexamethasone pretreatment group.

• **CONCLUSION:** In 0.01-0.05mg/mL of concentrations, dexamethasone shows no toxic effects. Survival rate of endothelial cells was more than 90%.

• **KEYWORDS:** corneal transplantation; endothelial cell; immunogenicity cryopreservation; dexamethasone

**Citation:** Liu F, Xiong GP, Shen HL. Study on the influences of dexamethasone to cryopreserved cornea endothelial cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013;13(2):260-261

### 摘要

**目的:**研究地塞米松预处理对液氮深低温冻存猪角膜内皮细胞的影响。

**方法:**选择新鲜猪角膜,以13mm直径环钻制取角膜标本,

依次放入4种冷冻保护液中冷平衡,“简化四步法”程序降温后放入液氮中保存,使用前40°C水浴复温。地塞米松作用组以同法制备植片,前三步冷平衡同前,最后分别放入含0.01,0.03,0.05mg/mL地塞米松保护液中4°C孵育18h,再程序降温液氮冻存。复温后用于锥兰-茜素红染色,观察内皮细胞存活情况。

**结果:**内皮细胞染色结果显示:程序冻存组和地塞米松作用组的内皮细胞存活率均超过90%,差异比较无统计学意义( $P>0.05$ )。

**结论:**在0.01~0.05mg/mL浓度范围内,未见地塞米松毒性作用,内皮细胞维持正常六角形形态,内皮细胞存活率超过90%。

**关键词:**角膜移植;内皮细胞;深低温冻存;地塞米松

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.10

**引用:**刘芳,熊国平,沈慧莲.地塞米松对深低温保存猪角膜内皮细胞的影响.国际眼科杂志2013;13(2):260-261

### 0 引言

角膜移植术发展至今已有百年历史。伴随移植术发展的是器官保存培养技术。为了给临床提供活性优质移植材料,多种保存角膜技术和方法应运而生。简化四步法液氮深低温保存角膜,各项指标与新鲜角膜接近,符合临床应用标准<sup>[1,2]</sup>。糖皮质激素是一种强效免疫抑制、抗炎抗过敏类药物。有研究显示,经糖皮质激素预处理的角膜抗原性降低,但预处理后植片的活性能否达到移植的需要未有报道。本实验旨在研究经地塞米松冷冻液孵育及简化四步法液氮深低温冻存后角膜植片的内皮细胞活性变化。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 新鲜猪眼球10只,二甲基亚砜(DMSO),200g/L人血白蛋白(HAS),地塞米松,锥兰,茜素红。

### 1.2 方法

**1.2.1 试剂配制** 冷冻保护液(CPM)的配制:以200g/L人血白蛋白为溶剂,加入二甲基亚砜,配成20,40,60,75mL/L的CPM,超净台下无菌分装入经消毒处理的青霉素瓶中,每瓶加入2.5mL CPM。含地塞米松冷冻保护液的配制:将75mL/L CPM分成三组,每组加入相应剂量地塞米松配成浓度为0.01,0.03,0.05mg/mL的CPM,再无菌分装入青霉素瓶中,每瓶加入2.5mL CPM。

### 1.2.2 角膜的处理与保存

**1.2.2.1 程序冻存组角膜处理** 取新鲜猪眼球10只,以生理盐水(庆大霉素320U/mL)冲洗3遍,钻取13mm中央角膜,立即在4°C冰箱中将角膜由低至高浓度放入上述4种CPM中进行冷平衡,每种浓度各15min,再将角膜放入程序降温仪内,按预设降温方案逐渐降至-80°C,放入液氮中(-196°C),保存3mo。

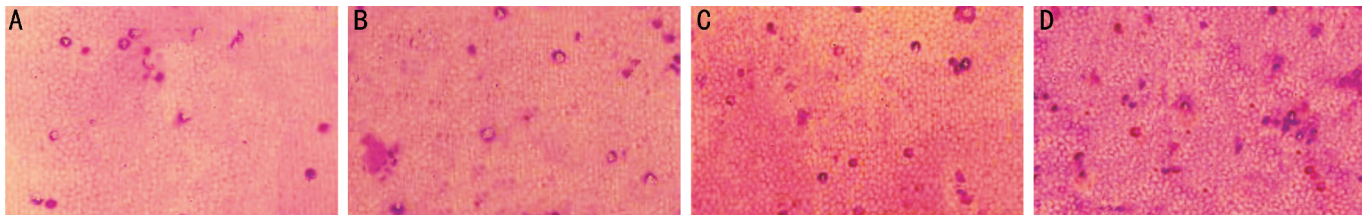


图1 各组猪眼角膜内皮细胞形态学变化( $\times 100$ ) A:程序冻存组;B:地塞米松作用组 I;C:地塞米松作用组 II;D:地塞米松作用组 III。

**1.2.2.2 地塞米松程序冻存组 I 角膜处理** 取新鲜猪眼球 10 只,角膜制备、冷平衡同上法,只 75mL/L CPM 含 0.01mg/mL 地塞米松,冷平衡结束后,角膜在 4℃ 冰箱中孵育 18h。再将角膜放入程序降温仪内,按预设降温方案逐渐降至 $-80^{\circ}\text{C}$ ,放入液氮中( $-196^{\circ}\text{C}$ ),保存 3mo。

**1.2.2.3 地塞米松程序冻存组 II 角膜处理** 取新鲜猪眼球 10 只,角膜制备、冷平衡、孵育、降温和保存同上法,只 75mL/L CPM 含 0.03mg/mL 地塞米松。

**1.2.2.4 地塞米松程序冻存组 III 角膜处理** 取新鲜猪眼球 10 只,角膜制备、冷平衡、孵育、降温和保存同上法,只 75mL/L CPM 含 0.05mg/mL 地塞米松。

**1.2.3 角膜复温方法** 从液氮中取出角膜冷冻瓶,待瓶内残存的液氮自然蒸发后,立即移入 40℃ 恒温水浴箱中,当角膜周围仅留一层薄冰并与角膜内皮面分开时,取出冷冻瓶,打开瓶盖,用无菌镊子轻镊角膜边缘取出角膜片,立即放入 200g/L 人血白蛋白中,备用。

**1.2.4 角膜内皮细胞活性染色** 将角膜内皮朝上放在特制的锥形容器内,2.5g/L 锥兰溶液滴入内皮细胞表面,染色 90s,用生理盐水浸洗 3 次,吸去多余液体后,滴 2g/L 的茜素红溶液,再染色 90s,生理盐水漂洗 3 次。将角膜放于载玻片上,显微镜观察,评定角膜内皮细胞存活率(ESR)和内皮细胞形态。全面观察角膜组织细胞染色情况,于 $\times 100$  倍视野下随机选择 9 个以上视野,进行计数,取平均值。

统计学分析:数据处理采用 SPSS 13.0 软件处理,ESR 数据(P)经反正弦函数转换做单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组猪眼角膜中 ESR 的比较** 各组猪眼角膜 ESR 分别为:程序冻存组 92.2%,地塞米松组 I 为 92.0%,地塞米松组 II 为 93.7%,地塞米松组 III 为 91.7%。四组 ESR 存活率经反正弦函数换算后,进行单因素方差分析,无统计学差异( $P > 0.05$ )。

**2.2 各组猪眼角膜内皮细胞形态学变化** 光镜下观察见四个不同处理组角膜内皮细胞连接紧密,边界清晰,细胞透亮,胞浆染成淡橘粉色,典型的大小均匀六角形内皮细

胞镶嵌排列,部分细胞胞膜破裂而深染,部分细胞胞核兰染(图 1)。

## 3 讨论

角膜内皮层由单层六角形扁平细胞构成。该层细胞具有独特的“泵”功能,能将基质内多余水分泵入前房,使基质含水量恒定而保持角膜透明。婴幼儿角膜内皮细胞能进行有丝分裂,但成年人角膜内皮不能再生,只能靠临近细胞扩张和移行来填补缺损。如果内皮细胞密度低于 500 个/ $\text{mm}^2$ ,则失去代偿功能,角膜出现水肿和大泡性病变。内皮细胞还能持续分泌生成角膜后弹力层。

所以,角膜内皮细胞的活性数量与移植效果密切相关,只有存活率 $>70\%$ 、内皮细胞密度 $>2000$  个/ $\text{mm}^2$  才能作为移植供体<sup>[3]</sup>。1981 年谢立信研制人脐带血营养液甲液中含有地塞米松磷酸钠,浓度为 0.03mg/mL<sup>[4]</sup>。在此我们选用 0.01~0.05mg/mL 的三种浓度。从光镜观察结果看,4 个不同处理组内皮细胞连接紧密,边界清晰,细胞透亮,胞浆染成淡橘粉色,典型的大小均匀六角形内皮细胞镶嵌排列,部分细胞胞膜破裂而深染,部分细胞胞核兰染。各组 ESR 都远远超过 70%,完全符合移植要求。程序冻存组和三组地塞米松处理组 ESR 比较,差异无统计学意义。这说明,在 0.01~0.05mg/mL 浓度范围内,地塞米松的浓度适宜,无局部毒性作用,内皮细胞活性保存良好,与程序冻存组相似,同样可用于移植。

通过本实验,在 0.01~0.05mg/mL 浓度范围内,地塞米松无毒性作用。经地塞米松孵育液预处理、液氮深低温保存角膜的内皮细胞连接紧密,边界清晰,六边形细胞轮廓典型,大小均匀,活性良好,可用于移植。

## 参考文献

- 1 蓝平,高明宏,孟彤柏,等.长期低温保存角膜方法的建立和临床应用.中国实用眼科杂志 2001;19(2):135-138
- 2 高明宏,蓝平,陈伟,等.简化四步法低温保存角膜的实验研究.中国实用眼科杂志 2000;18(6):350-352
- 3 Matter RM, Heck EL, Cavanagh HD. The impact on tissue utilization of screening donor corneas by specular microscopy at the university of Texas southwestern medical center. *Cornea* 1995;14(6):562-567
- 4 杨朝忠,柳林.现代角膜移植学.第 1 版.北京.人民军医出版社 1998:263