

# 地塞米松对液氮深低温保存猪角膜浸润细胞的影响

刘芳,熊国平,王晶,王立,彭超,黄燕然

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@163.com  
收稿日期:2013-11-28 修回日期:2013-12-30

## Influences of dexamethasone on infiltrative porcine corneal cells cryopreserved in liquid nitrogen

Fang Liu, Guo-Ping Xiong, Jing Wang, Li Wang, Chao Peng, Yan-Ran Huang

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

Correspondence to: Fang Liu. Department of Ophthalmology, Jiangmen Central Hospital, Jiangmen 529030, Guangdong Province, China. happysky1019@163.com

Received:2013-11-28 Accepted:2013-12-30

### Abstract

• AIM: To study the influences of dexamethasone on the immunogenicity of porcine cornea cryopreserved in liquid nitrogen and the involved mechanism.

• METHODS: Fresh porcine corneas were drilled down by 13mm-diameter trephine. Then the samples were put into four kinds of cryoprotectants in turn for cooling equilibrium with "simplified four-step" method and then stored in liquid nitrogen. All samples were thawed in water at 40°C before being used. The samples treated with dexamethasone were made and the preceding three cooling steps were same. But the samples were additionally incubated in 0.01, 0.03, 0.05mg/mL dexamethasone for 18h at 4°C before the last cooling step. Totally 50 BALB/c mice were randomly divided into 5 groups including 10 mice in each group: the control group; routine cooling group which were treated through four cooling steps; dexamethasone group I, dexamethasone group II and dexamethasone group III which were treated with 0.01, 0.03, 0.05mg/mL dexamethasone successively. After treatment, corneal samples were transplanted into the hypodermis on the back of mice. After 14d, the samples were taken out, imbedded in paraffin, and stained by HE and CD25/FasL immunohistochemistry. All the samples were investigated under light microscope.

• RESULTS: On the 14th day, all the samples were taken out. We found the samples which adhered to surrounding tissues swelled obviously and showed translucent and a bit yellow. Through HE staining, fresh corneal samples in the control group were infiltrated with large amount of lymphocytes throughout each layer; the amount of infiltrating cells in the routine cooling group was less than the control group in which most cells were distributed in endodermis and epitheliums. In the dexamethasone-treated groups, the amount of infiltrated cells were the least. Immunohistochemical results showed that compared with the the routine cooling group and dexamethasone-treated groups, the amount of CD25 and FasL in the control group was the most, the difference was significant. Compared with dexamethasone-treated groups, the amount of CD25 and FasL positive infiltrating cells in the routine cooling group were more. ALL the differences were significant. But there was no significant difference in the amount of CD25 and FasL positive infiltrating cells among each dexamethasone treated group.

• CONCLUSION: Corneas in dexamethasone-treated groups showed the lowest immunogenicity. Corneal immunogenicity was irrelevant with the concentration of dexamethasone at the range of 0.01-0.05mg/mL.

• KEYWORDS: corneal transplantation; immunogenicity; cryopreservation; dexamethasone

Citation: Liu F, Xiong GP, Wang J, et al. Influences of dexamethasone on infiltrative porcine corneal cells cryopreserved in liquid nitrogen. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2014;14(2):210-213

### 摘要

目的:本实验结合液氮深低温冻存技术与地塞米松预处理方法,研究其对猪角膜免疫原性影响情况及可能机制。

方法:选择新鲜猪角膜,以13mm直径环钻制取角膜标本,依次放入四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。BALB/c小鼠50只,随机分为阳性对照组(新鲜组)、程序冻存组、地塞米松程序冻存组I、地塞米松程序冻存组II和地塞米松程序冻存组III,每组10只。各组角膜植入到BALB/c小鼠背部皮下,术后14d取出,做石蜡包埋,HE染色、CD25和FasL免疫组化染色,光镜观察。

**结果:**术后 14d 剖取角膜植片,见植片与周围组织粘连,植片明显肿胀,半透明,色微黄。HE 染色结果:新鲜组角膜植片全层有大量淋巴细胞浸润;程序冻存组角膜浸润细胞较新鲜组减少,多位于内皮和上皮层分布;地塞米松作用各组细胞浸润数最少。免疫组化显示:新鲜组植片 CD25<sup>+</sup>和 FasL<sup>+</sup>浸润细胞数最多,与程序冻存组、各地塞米松作用组比较有明显统计学差异。程序冻存组 CD25<sup>+</sup>和 FasL<sup>+</sup>浸润细胞数多于各地塞米松作用组,比较有显著性差异。各地塞米松作用组 CD25<sup>+</sup>和 FasL<sup>+</sup>浸润细胞数差异比较无统计学意义。

**结论:**地塞米松作用组角膜免疫原性最低。各地塞米松作用组角膜免疫原性在 0.01~0.05mg/mL 范围内无浓度依赖效应。

**关键词:**角膜移植;免疫原性;深低温冻存;地塞米松

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.02.04

**引用:**刘芳,熊国平,王晶,等.地塞米松对液氮深低温保存猪角膜浸润细胞的影响.国际眼科杂志 2014;14(2):210-213

## 0 引言

糖皮质激素是一种强效免疫抑制、抗炎抗过敏类药物,能引起体内树突状细胞(DCs)数量减少,使 DC 低水平表达协同刺激分子和分泌白细胞介素-12(IL-12),从而明显降低 DC 对 T 细胞的刺激能力。胡竹林等<sup>[1]</sup>通过对比研究发现保存的角膜植片较新鲜植片术后发生免疫排斥率更低,植片存活时间更长。Klaue 等<sup>[2]</sup>在室温下用不同种糖皮质激素类药物溶液或悬液浸泡植皮 60min 后用于移植,发现均能延长植皮存活天数,与对照组比较有显著差异。但是关于糖皮质激素在角膜移植预处理方面却未见报道。本试验通过小鼠异位移植模型研究地塞米松联合简化四步法液氮深低温冻存对角膜植片浸润细胞 CD25 和 FasL 表达的影响,探讨地塞米松与深低温冻存对植片免疫原性影响情况和可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 新鲜猪眼球 50 只,二甲基亚砜(DMSO),20%人血白蛋白(HAS),地塞米松。BALB/c 小鼠 50 只,随机分为阳性对照组(新鲜组)、程序冻存组、地塞米松程序冻存组 I、地塞米松程序冻存组 II 和地塞米松程序冻存组 III,每组 10 只。

## 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(地塞米松程序冻存组 I~III),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℃ 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℃,放入液氮中(-196℃),保存 3mo。

**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℃,放入液氮中(-196℃),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 手术方法** 2% 水合氯醛 0.5mL 小鼠腹腔注射麻醉。背部正中纵行皮肤切口长 1cm,钝性分离皮下组织,制成囊袋,将猪角膜植片内皮面向内植入囊袋内。4 号丝线间断缝合皮肤切口,每日换药 1 次,无感染者列入实验组。

**1.2.5 检测方法** 行 HE 染色和免疫组化染色。全面观察角膜组织细胞染色情况,于 400 倍视野下随机选择 9 个视野,进行阳性染色细胞计数,取平均值。

统计学分析:数据处理采用 SPSS 13.0 软件处理,免疫组化染色数据均用均数±标准差表示,组间比较采用方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$  认为差异有显著性。

## 2 结果

术后 14d 取出皮下埋植的角膜植片,见植片与周围组织粘连,似形成包裹囊,植片明显肿胀,半透明,色微黄。

**2.1 HE 染色结果** 100 倍显微镜下观察到,新鲜组角膜植片水肿增厚,角膜全层有大量淋巴细胞浸润,偶尔可见新生血管,基质板层纤维出现空泡,排列不规则(图 1A)。程序冻存组角膜植片肿胀,基质有多量淋巴细胞浸润,多位于靠近角膜上皮和内皮的基质内,纤维板层排列欠规则(图 1B)。地塞米松作用组植片浸润淋巴细胞较前两组少,基质板层纤维排列也欠规则(图 1C~E)。

**2.2 免疫组化染色结果** 400 倍显微镜下观察各组角膜植片 CD25<sup>+</sup>浸润细胞情况:阳性细胞胞浆呈棕褐色(图 2);400 倍显微镜下各组角膜植片 FasL<sup>+</sup>浸润细胞表达情况:阳性细胞为棕褐色(图 3)。

由表 1 可见,CPM 中加入地塞米松的三组植片 CD25<sup>+</sup>染色细胞数值略有差别,以地塞米松作用组 I 的均数较大。三组进行方差分析发现,差异无统计学意义( $F = 1.80, P = 0.19$ )。与新鲜角膜组比较,程序冻存组植片 CD25<sup>+</sup>表达细胞数有明显减少趋势,二者比较差异有显著性( $t = 14.51, P < 0.001$ )。地塞米松作用组 I 植片 CD25<sup>+</sup>

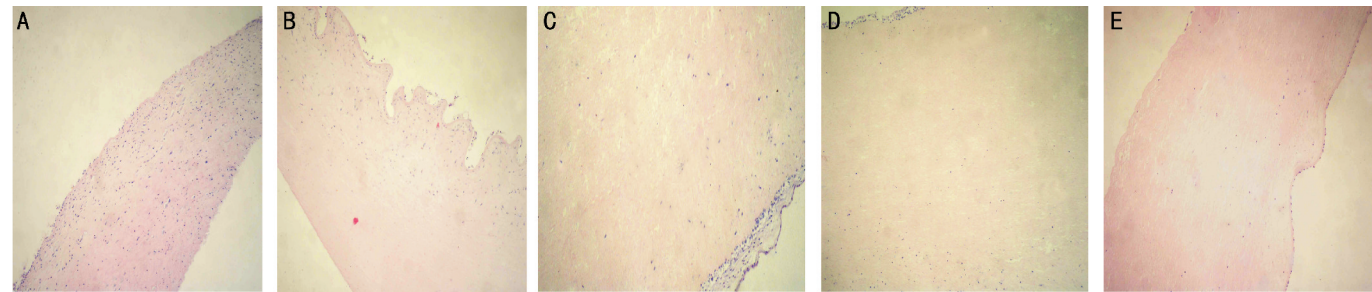


图1 HE染色结果( $\times 100$ ) A:新鲜组角膜植片;B:程序冻存组角膜植片;C:地塞米松作用组 I;D:地塞米松作用组 II;E:地塞米松作用组 III。

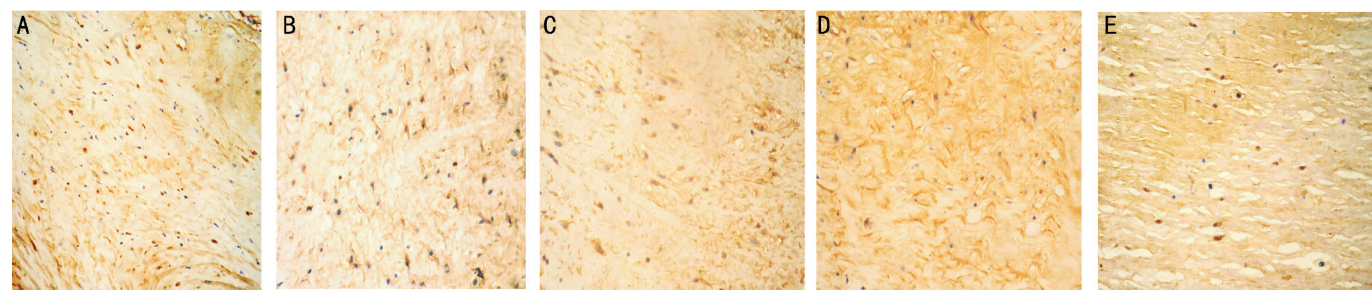


图2 角膜植片 CD25<sup>+</sup>浸润细胞免疫组化染色结果( $\times 400$ ) A:新鲜组角膜植片;B:程序冻存组角膜植片;C:地塞米松作用组 I;D:地塞米松作用组 II;E:地塞米松作用组 III。

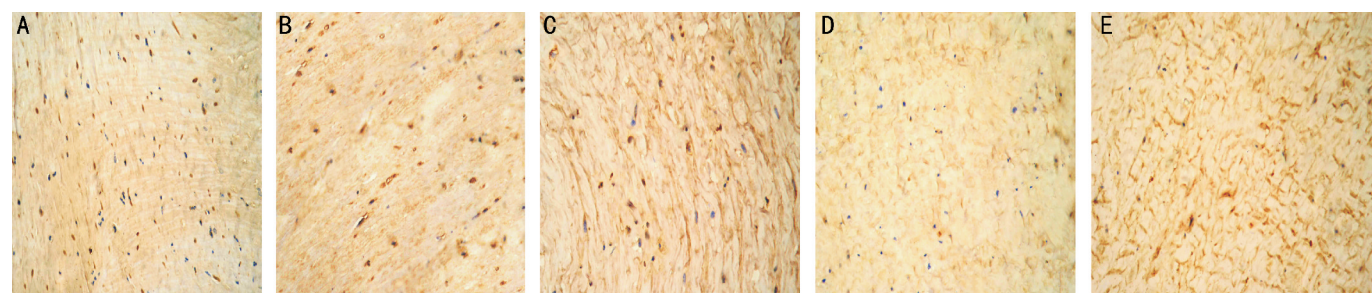


图3 角膜植片 FasL<sup>+</sup>浸润细胞免疫组化染色结果( $\times 400$ ) A:新鲜组角膜植片;B:程序冻存组角膜植片;C:地塞米松作用组 I;D:地塞米松作用组 II;E:地塞米松作用组 III。

表1 各组植片阳性细胞表达情况

( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

指标	新鲜组	程序冻存组	地塞米松作用组 I	地塞米松作用组 II	地塞米松作用组 III
CD25 <sup>+</sup>	55.1 $\pm$ 8.5	28.0 $\pm$ 6.3	20.2 $\pm$ 3.2	16.0 $\pm$ 4.9	18.2 $\pm$ 4.4
FasL <sup>+</sup>	54.3 $\pm$ 7.9	30.6 $\pm$ 4.7	22.5 $\pm$ 2.9	18.6 $\pm$ 4.0	17.4 $\pm$ 5.0

表达细胞数比新鲜组和程序冻存组都减少,分别与二组比较差异有显著性( $t=20.38, 7.74, P<0.001$ )。FasL<sup>+</sup>在各组浸润细胞的表达趋势与 CD25<sup>+</sup>类似。地塞米松作用组 I, II, III 进行单因素方差分析后,差异无统计学意义( $F=2.65, P>0.05$ )。将地塞米松作用组 I 与新鲜和程序冻存组分别比较,有显著性差异( $t=19.64, 5.71, P<0.001$ )。程序冻存组阳性细胞与新鲜组比较有减少趋势,二者比较有显著性差异( $t=12.56, P<0.001$ )。

### 3 讨论

**3.1 程序降温液氮深低温冻存与角膜植片免疫原性的关系** 从 HE 染色切片看,程序冻存组角膜植片浸润细胞数比新鲜角膜少,多于靠近角膜上皮和内皮部的基质分布,中间部基质分布减少。而新鲜组角膜浸润细胞则遍布植片全层。免疫组化染色分析也说明,程序冻存组浸润细胞数和新鲜组有显著差异。因此可推测经过程序降温液氮冻存的角膜免疫原性是下降的。

树突状细胞在抗原呈递细胞中是功能最强的一类。

角膜朗格罕氏细胞(LCs)是树突状细胞的不成熟形式。树突状细胞与淋巴细胞和巨噬细胞相似,属于低温敏感细胞,低温能引起这类细胞损伤<sup>[3]</sup>。在本眼库电脑控制梯度降温过程中,采用(1~3) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率降温至 $-30^{\circ}\text{C}$ ,再采用(3~10) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率降温至 $-80^{\circ}\text{C}$ 。从实验结果推测,后段降温速度大大加快极可能引起相当数量活性 LCs 死亡,而对角膜免疫原性产生质的影响。

**3.2 地塞米松局部作用与角膜植片免疫原性关系** 糖皮质激素类药物具有很强的免疫抑制作用,被广泛用于各种器官组织移植后抗排斥治疗。它通过抑制核因子- $\kappa\text{B}$  活性来抑制多种免疫调节细胞因子的基因表达<sup>[4]</sup>。糖皮质激素还能够诱导 T 细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。某些研究者在术前将此类药物单纯作用于移植器官获得相当时间免疫耐受,为术后减少激素类药物用量提供可能<sup>[2]</sup>。

糖皮质激素具有非特异性免疫抑制作用,能降低树突状细胞生存能力,下调其表达协同刺激分子和分泌白介素功能,损害其抗原呈递能力,降低其激发 T 细胞活化增殖

的能力<sup>[6]</sup>。在本实验中,采用三种不同浓度地塞米松保护液孵育的植片浸润细胞数都比新鲜组明显减少,比较有明显统计学意义;和程序冻存组比较差异也有统计学意义。虽然经过地塞米松孵育后达不到 100% 抑制排斥的目的,但从浸润细胞数可以说明这三组的排斥反应强度明显低于前两组,所以这三组植片免疫原性低于程序冻存组和新鲜角膜组。由此推测,通过地塞米松孵育后角膜免疫原性大大降低。18h 孵育时间为地塞米松等成分渗透进植片创造了充分条件。

CD25 是白细胞介素-2 受体(IL-2R),与 IL-2 结合后为 T 细胞克隆增殖提供重要信号。FasL 仅在活化 T 细胞上高表达。FasL<sup>+</sup>细胞与 Fas<sup>+</sup>细胞接触后导致 Fas<sup>+</sup>细胞凋亡,是细胞毒 T 细胞(CTL)破坏靶细胞的主要效应分子<sup>[7-9]</sup>。在角膜排斥发生时组织细胞凋亡增多,其机制与 FasL-Fas 交联不无相关。因此,FasL 表达程度是排斥反应强弱的标尺。

从实验结果看:三组不同浓度地塞米松作用组 CD25<sup>+</sup>和 FasL<sup>+</sup>浸润细胞数略有差别,数据分析无统计学差异( $P > 0.05$ )。新鲜角膜组 CD25<sup>+</sup>和 FasL<sup>+</sup>浸润细胞数最多,排斥反应最强烈,分别与程序冻存组和地塞米松作用组比较,差异有显著意义( $P < 0.001$ )。程序冻存组 CD25<sup>+</sup>和 FasL<sup>+</sup>浸润细胞数介于新鲜组和地塞米松作用组之间,与地塞米松作用组 I 比较,有明显统计学差异( $P < 0.01$ )。以上结果说明,与新鲜角膜比较,程序冻存角膜和经过地塞米松孵育的角膜免疫原性降低。地塞米松孵育角膜免疫原性

低于程序冻存角膜,引起的排斥反应最弱,但 0.01 ~ 0.05mg/mL 范围内未出现浓度依赖效应。

#### 参考文献

- 1 胡竹林,赵旭丽,李妍.保存角膜与新鲜角膜行大植片穿透角膜移植的临床研究.国际眼科杂志 2007;7(6):1634-1635
- 2 Klaue P, Jolley WB. The comparative effectiveness of corticosteroids applied topically as pretreatment of rabbit skin allografts. *Surgery* 1971; 70(5):718-722
- 3 Taylor MF, London NJ, Thirdborough SM, et al. The cryobiology of rat and human cells: preservation and destruction of membrane integrity by freezing. *Cryobiology* 1990;27(3):269-278
- 4 Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, et al. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270(5234):283-286
- 5 Migita K, Eguchi K, Kawabe Y, et al. Apoptosis induction in human peripheral blood T lymphocytes by high dose steroid therapy. *Transplantation* 1997;63(4):583-587
- 6 Moser M, De Smedt T, Sornasse T, et al. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function *in vitro* and *in vivo*. *Eur J Immunol* 1995;25(10):2818-2824
- 7 Suda T, Takahashi T, Golstein P, et al. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75(6):1169-1178
- 8 Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994;152(3):1127-1133
- 9 Qian S, Lu L, Fu F, et al. Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts. *J Immunol* 1997; 158(10):4654-4661