

# 硫酸软骨素在甘油冷冻液中对角膜内皮保护作用的实验研究

王宏伟, 邱 姣, 赵 青

基金项目: 中国辽宁省教育厅高等学校科学研究资助项目 (No. 2009A445)

作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 王宏伟, 女, 教授, 研究方向: 角膜病与眼表疾病。

通讯作者: 王宏伟. flashing7712@sina. com. cn

收稿日期: 2011-06-03 修回日期: 2011-07-22

## Experimental study of the chondroitin sulfate in glycerol freezing solution on the protection of corneal endothelium

Hong-Wei Wang, Jiao Qiu, Qing Zhao

**Foundation item:** Scientific Research Project of Liaoning Provincial Education Department for Institution of Higher Learning, China (No. 2009A445)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

**Correspondence to:** Hong-Wei Wang, Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. flashing7712@sina. com. cn

Received: 2011-06-03 Accepted: 2011-07-22

### Abstract

• **AIM:** To evaluate chondroitin sulfate on the glycerol cryopreservation of corneal endothelial cells (CEC).

• **METHODS:** Forty Wistar rats corneal pieces were divided into the experimental group: glycerol cryopreservation medium containing chondroitin sulfate (CS); and the control group: mere glycerol cryopreservation medium. The two groups were saved at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 2 months. All pieces were examined with trypan blue combined with alizarin red staining (viability staining) and electron-microscope examination for CEC. 30 SD rats were taken to establish Wistar-SD rat model of allogenic penetrating keratoplasty. Slit lamp microscope detected the occurrence of corneal rejection,  $\text{TNF-}\alpha$  and  $\text{IFN-}\gamma$  expression was examined by immunohistochemistry to test the effect of preservation.

• **RESULTS:** The staining results, electron-microscope examination and  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  expression showed, the difference was significant in these two groups ( $P < 0.05$ ), the results of the experimental group was better than the control group after the saving and the corneal transplantation ( $P < 0.05$ ). The electron-microscope examination showed individual vacuoles in CEC cytoplasm, slight swelling of mitochondrial and endoplasmic reticulum

in experimental group, obvious swelling of CEC mitochondrial and endoplasmic reticulum in control group.

• **CONCLUSION:** Glycerol cryopreservation can preserve the viability of CEC. Chondroitin sulfate can obviously improve the effect of preservation.

• **KEYWORDS:** chondroitin sulfate; glycerol cryopreservation; cornea; corneal endothelial cells

Wang HW, Qiu J, Zhao Q. Experimental study of the chondroitin sulfate in glycerol freezing solution on the protection of corneal endothelium. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11(9): 1525-1527

### 摘要

**目的:** 探讨硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 在甘油冷冻保存角膜中对角膜内皮细胞 (corneal epithelial cells, CEC) 的保护作用。

**方法:** Wistar 大鼠角膜片 40 只随机分为实验组和对照组, 对照组角膜片直接放入纯甘油中, 实验组则在在内皮面均匀黏附 10g/L CS 后再放入甘油中。  $-20^{\circ}\text{C}$  保存 2mo 后行 CEC 台盼蓝-茜素红活性染色及电镜检查。取 30 只 SD 大鼠与保存后角膜片建立 Wistar-SD 同种异体穿透性角膜移植模型, 测定术后不同时间点植片内  $\text{TNF-}\alpha$  和  $\text{IFN-}\gamma$  的表达水平, 检验保存效果。

**结果:** 台盼蓝-茜素红活性染色结果及术后植片内  $\text{TNF-}\alpha$  和  $\text{IFN-}\gamma$  的表达结果显示, 两组差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 实验组保存效果和角膜移植术后效果均优于对照组。电镜检查示, 实验组 CEC 胞质内可见个别空泡, 线粒体及内质网轻度肿胀; 对照组 CEC 线粒体及内质网明显肿胀。

**结论:** 甘油冷冻能够保持 CEC 的活性, 且 CS 能进一步增进保存效果。

**关键词:** 硫酸软骨素; 甘油冷冻; 角膜; 角膜内皮细胞

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 09. 009

王宏伟, 邱姣, 赵青. 硫酸软骨素在甘油冷冻液中对角膜内皮保护作用的实验研究. 国际眼科杂志 2011; 11(9): 1525-1527

### 0 引言

角膜内皮细胞 (corneal epithelial cells, CEC) 的活性是角膜移植成功的关键。甘油用作角膜保存已有较长的历史, 但甘油与角膜内皮接触对 CEC 可造成一定损害。硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 因其特有的生物活性而广泛用于临床尤其眼科中, 本研究旨在探讨 CS 在甘油冷冻保存角膜时对 CEC 的保护作用, 以期获得更好的眼库保存效果。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 成年健康 Wistar 大鼠 20 只(购自中国医科大学实验动物中心),成年健康 SD 大鼠 30 只(购自辽宁医学院实验动物中心),CS(Alcon 公司),无水甘油(天津市东丽区天大化学试剂厂),手术显微镜(德国 NIDEK 公司),RM2135 切片机(德国 Leica 公司),CIAS-1000 型细胞图像分析系统(北京大恒图像视觉有限公司),兔抗大鼠 TNF- $\alpha$  抗体、兔抗大鼠 IFN- $\gamma$  抗体、SABC 二抗试剂盒、DAB 显色液(北京博奥森生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 甘油保存液的配制** 取 125 mL 的广口瓶装入 80 mL 纯甘油,140 $^{\circ}$ C 电烤箱消毒 2h,用高压灭菌的青霉素空瓶分装甘油 2.5 mL,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内预冷备用。

**1.2.2 角膜片的制作和分组及保存** 以成年健康 Wistar 大鼠(购自中国医科大学实验动物中心)20 只为实验对象,按文献报告方法眼库常规处理<sup>[1]</sup>,取下带 2 mm 巩膜环的角膜片,于庆大霉素复方氯化钠溶液中浸泡 10 min,共取得 40 只角膜片,随机分为 2 组,每组 20 只眼角膜。对照组:直接将角膜片内皮面向上装入甘油保存液中。实验组:在每个角膜片的内皮面均匀黏附 10 g/L CS 0.2 mL,然后内皮面向上装入甘油保存液中。两组均放入 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存,保存时间为 2 mo。

**1.2.3 角膜片的复温和复水** 保存到期后,将两组角膜片取出,立即置于 100 mL 4 $^{\circ}$ C 眼内冲洗液中,每 2 min 轻轻漂洗 1 次以洗去黏附的甘油,5 min 后再转置于另一杯 100 mL 4 $^{\circ}$ C 眼内冲洗液中,再复水 5 min。

**1.2.4 应用冷冻保存的角膜行穿透性角膜移植术** 取 30 只 SD 大鼠,随机分为 2 组,每组 15 只大鼠,按文献报告方法常规处理后,均以 3.0 mm 直径环钻(苏州六六仪器厂)在大鼠右眼角膜中央区压痕,制作植床。将复温复水后带巩膜环的两组经保存角膜片随机各取 15 只自内皮面用直径 3.5 mm 环钻冲切获取中央植片,建立 Wistar-SD 同种异体穿透性角膜移植模型。

**1.2.5 茜素红-台盼蓝活性染色检查** 经保存角膜片复温复水后,将每组未移植的 5 个角膜片于复温复水后以安全刀片剖为两半,一半用于活性染色检查,另一半按常规行透射电镜检查。用于移植的角膜片首先在术中取手术钻切剩下的角膜环进行染色。染色剂配制参照谢立信<sup>[2]</sup>的方法,以细胞核明显蓝染或细胞内有茜素红斑为细胞死亡标准。每个角膜观察 5 个视野,计算标定面积内的 CEC 密度、细胞死亡率及异形细胞率。

**1.2.6 电镜检查** 按常规超薄切片制作方法做超薄切片(包括取材、固定、脱水、浸透、包埋聚合、切片染色等步骤),在透射电镜(JEM-1200EX Electron Microscope)下观察 CEC 超微结构变化。

**1.2.7 免疫组织化学检查** 测定各组术后 14 d 移植片内 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的免疫组织化学表达水平。每张切片随机取 5 个视野( $\times 400$  倍),用 CIAS-1000 型细胞图像分析系统分析阳性细胞数,结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 软件包进行数据处理,采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CEC 形态学变化** 对照组细胞轻度水肿,细胞间隙增宽,细胞形态多呈不规则六边形或近圆形,可见散在分

表 1 两组最佳保存区域的角膜内皮细胞活性染色结果  $\bar{x} \pm s$

组别	细胞密度 (个/mm <sup>2</sup> )	细胞死亡率 (%)	非六边形细胞率 (%)
实验组	2499 $\pm$ 343	3.22 $\pm$ 0.65	6.69 $\pm$ 1.90
对照组	2261 $\pm$ 387 <sup>a</sup>	8.44 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	15.50 $\pm$ 2.90 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 实验组。

表 2 角膜移植术后 14 d 各组植片 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  阳性面积百分比 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	TNF- $\alpha$	IFN- $\gamma$
实验组	12.421 $\pm$ 0.3455	12.756 $\pm$ 0.2412
对照组	34.088 $\pm$ 0.5872 <sup>a</sup>	33.797 $\pm$ 0.6130 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 实验组。

布的核明显蓝染的细胞,细胞边界不清晰。实验组未见明显细胞脱落区,细胞多呈规则六边形,细胞连接紧密,边界清楚,极少量细胞核明显蓝染。CEC 密度、细胞死亡率及异形细胞率两组之间差异有显著性( $P < 0.05$ ,表 1)。

**2.2 CEC 超微结构变化** 实验组 CEC 胞膜完整,胞浆丰富,胞质内可见个别空泡,线粒体及内质网轻度肿胀;对照组 CEC 核膜完整,核仁存在,胞浆较丰富,线粒体及内质网明显肿胀。

**2.3 角膜植片内 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的变化** TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  在大鼠完整的角膜上皮层、内皮层均有基本表达;在病变角膜,其主要表达于上皮基底部和基质层以及浸润的炎症细胞,在胞浆中染成棕黄色,着色的深浅表示阳性程度。实验组与对照组间 14 d 时,TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  阳性面积百分比有统计学差异( $P < 0.05$ ,表 2)。

## 3 讨论

角膜移植术是治疗角膜盲的主要手段,但是角膜供体严重缺乏,研制一种简便高效的长期角膜保存方法十分必要。CEC 的活性是角膜移植成功的关键,甘油用作角膜保存已有较长的历史,有研究发现 -20 $^{\circ}$ C 甘油冷冻保存后的角膜用于穿透性角膜移植可部分保持植片长期透明<sup>[3]</sup>。但采用甘油保存角膜片时<sup>[4]</sup>,CEC 直接与甘油接触,细胞因迅速脱水而皱缩,导致细胞间隙增宽,细胞连接受损,从而影响 CEC 的泵功能。此外,甘油在高温消毒过程中会少量分解,并与空气中的氧及氮发生反应,生成微量的硝酸甘油及醛类等有毒物质,这些物质能对 CEC 均造成损害。因此,有必要采取一定的措施消除在甘油冷冻保存角膜的过程中对 CEC 的损害。

CS 是一类广泛存在于人和动物的软骨等组织中的一类酸性黏多糖,是动物蛋白聚糖的代表物质<sup>[5]</sup>,因其特有的生物活性而广泛用于临床。CS 用作滴眼液能改善眼角膜组织的水分代谢,在角膜表面形成透气保水膜,促进角膜创伤愈合及改善眼部干燥症状<sup>[6]</sup>。角膜中期保存法研究证明,Optisol 角膜保存液中含有的 CS 和低分子右旋糖苷可保持角膜的半透明状态<sup>[7]</sup>。CS 对角膜胶原纤维有保护作用,能促进基质中的纤维增长,增强通透性,改善血液循环,加速新陈代谢,促进渗透液的吸收及炎症的消除,其聚阴离子有强保水性,能改善眼角膜组织的水代谢,对角膜有较强的亲和力。黏弹剂在眼科手术中有重要作用,30 g/L 透明质酸(hyaluronan, HA)与 40 g/L CS 的合剂(商品名 Viseoat)兼具高黏滞性和良好的涂敷性,能较好地维

持前房并保护 CEC,有利于减少异位性白内障患者因行晶状体手术所引发视网膜脱离的发病率<sup>[8]</sup>。但 CS 用于长期甘油冷冻保存是否对 CEC 也具有保护作用的研究较少。我们认为,可能加入 CS 后既能充分利用甘油保存角膜的特性,又能避免甘油与角膜内皮直接接触对 CEC 造成的不良影响。

台盼蓝-茜素红活性染色是评价 CEC 活性最常用的一种方法<sup>[9]</sup>,透射电镜检查能进一步观察 CEC 的超微结构。活性染色结果显示,在角膜内皮面添加 CS 进行长期甘油冷冻保存后,CEC 密度较高、细胞死亡率及异形细胞率降低,明显减少了角膜内皮与甘油直接接触对 CEC 所造成的损害。透射电镜观察,虽然有部分空泡变,这可能与固定过程和操作手法有关,但 CEC 结构尚完整,细胞器损伤程度较轻。以上结果均证实,在甘油冷冻保存角膜内皮面添加 CS 对 CEC 具有明显的保护作用,能长期保持 CEC 的活性。

有研究 TNF- $\alpha$  参与介导角膜移植排斥反应的发生,术后监测血清 TNF- $\alpha$  水平有助于对排斥反应的早期预测及诊断<sup>[10]</sup>。Skurkovich 等<sup>[11]</sup>经研究证明,IFN- $\gamma$  在角膜移植排斥反应中起着重要作用。结果表明,行移植术后植片中 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的表达水平实验组明显低于对照组。本研究结果表明,在角膜内皮面添加 CS 后,CS 可聚集在 CEC 周围,形成一层保护外壳,减慢 CEC 脱水与复水的速度,并消除甘油内的有毒物质对 CEC 的损害,防止机械性因素对 CEC 微绒毛及细胞膜的损害,起到了一定的保护作用。同时,CS 降解产生糖醛酸,可与 CEC 氧化代谢所产生的毒物结合成无毒物质排出体外,有一定的解毒作用。CS 作为一种抗氧化剂,可抵抗氧自由基的侵袭,防止细胞膜脂类的过氧化反应,维持细胞膜的稳定<sup>[12]</sup>,保护细胞的完整性和正常功能,提高 CEC 的抗氧化能力及生物

活性,使自由基对细胞的损伤减低,有效延长角膜保存时间。

综上所述,加入 CS 进行长期甘油冷冻保存角膜可视为一种简便易行、经济实用,适合基层医院普及推广的长期有效的保存方法,其临床应用效果值得进一步研究。

#### 参考文献

- 1 谢立信. 角膜病学. 北京:人民卫生出版社 2007;421-422
- 2 谢立信. 角膜移植学. 北京:人民卫生出版社 2000;155-156
- 3 谢立信,董晓光,李绍伟,等. 甘油冷冻保存角膜用于穿透性角膜移植的初步报告. 眼科研究 1999;17(3):202-205
- 4 蒋华,范军华. 透明质酸钠在甘油冷冻保存角膜中的应用. 解放军医学杂志 2007;32(7):694-696
- 5 徐传屯,关瑞章,郑江. 硫酸软骨素测定方法的研究进展. 集美大学学报(自然科学版) 2008;13(1):52-56
- 6 宋涛. 硫酸软骨素研究概况. 食品与药品 2006;8(7A):31-32
- 7 Wagoner MD, Gonnah el-S. Corneal graft survival after prolonged storage in Optisol-GS. *Cornea* 2005;24(8):976-979
- 8 Rainer G, Menapace R, Schmid K, et al. Natural course of intraocular pressure after cataract surgery with sodium hyaluronate 3% versus hydroxypropylmethylcellulose 4%. *Ophthalmology* 2005;112(10):1714-1718
- 9 Liou SW, Chiu CJ, Wang IJ, et al. Effect of intracameral injection of lidocaine and carbachol on the rabbit corneal endothelium. *J Cataract Refract Surg* 2004;30(6):1351-1355
- 10 Zhu S, Dekaris I, Duncker G, et al. Early expression of proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha after corneal transplantation. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19(6):661-669
- 11 Skurkovich S, Kasparov A, Narbut N, et al. Treatment of corneal transplant rejection in humans with anti-interferon-gamma antibodies. *Am J Ophthalmol* 2002;133(6):829-830
- 12 Koh SW, Waschek JA. Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(13):4085-4092