

### 【实验研究】

吴利安 王从毅 杨新光 王建洲 张林 范晶晶

的难点。一般认为其与角膜缘解剖及功能异常、促血管生成因子增加、抑制血管生成因子减少及免疫

炎症反应等因素有关。角膜碱烧伤后,趋化性细胞因子穿越血管内皮细胞到达受损角膜处,使巨噬细胞及T、B淋巴细胞浸润增加,产生大量IL-1、IL-6、IL-10、TNF等细胞因子,刺激多种免疫分子表达,加速炎症反应和免疫反应<sup>[1]</sup>。本研究拟探讨骨髓间充质干细胞移植(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)对兔碱烧伤后角膜新生血管的抑制作用及可能的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 取日本大白兔24只,2~3月龄,体质量1.8~2.3 kg(西安交通大学医学院动物实验中心提供);DMEM-F12培养液(美国Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青公司),二甲基亚砷(Sigma公司),胰蛋白酶(美国Gibco公司),RNAfast1000总RNA提取试剂盒与DNA Marker(陕西先锋生物科技有限公司),DreamTaq™ GREEN PCR Master Mix(美国Fermentas公司),PCR引物(上海生物工程公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及细胞的培养、传代与鉴定** 用随机数字表法将实验动物随机分为实验组和对照组,其中实验组和对照组各12只。将每只兔均给予耳缘静脉注射 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛(2~3 mL)麻醉。无菌条件下用骨穿针于股骨处抽取骨髓约5 mL, PBS液混匀, $1000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,去除上清液,重复上述步骤1次。加入5 mL DMEM-F12培养液稀释混匀后进行培养。48 h后首次换液,除去非贴壁细胞,待细胞扩增至80%~90%,按1:2或1:3比例传代培养。用倒置显微镜观察细胞形态的变化,并照相。取第三代细胞,调至细胞浓度为 $10^6\text{ L}^{-1}$ ,羊血清 $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 4℃下孵育15 min封闭Fc受体。分别加入FITC标记鼠抗兔CD90、CD31抗体各5 μL,另2管作为阴性对照(不加抗体)。以上各管避光放置30 min,分别加入2 mL PBS重悬, $1000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心8 min,弃上清,300 μL PBS重悬后上流式细胞仪检测。

**1.2.2 兔中度角膜碱烧伤模型的制备、BMSC移植和观察** 耳缘静脉注射 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛麻醉,滤纸吸除结膜囊内多余液体,将直径5 mm的圆形滤纸片和直径5~10 mm的滤纸环浸泡于 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH溶液中30 s,取出后于干燥滤纸上吸除多余液体,立即置于兔眼角膜表面30 s,生理盐水彻底冲洗角膜及结膜囊,妥布霉素滴眼液滴眼,红霉素眼膏涂眼,每天3次。实验组12只兔造模1 h后,将 $5 \times 10^6$ 个BMSC混悬于2.0 mL PBS中,于耳缘静脉注射1.5 mL细胞悬液,表面麻醉后结膜下(鼻侧、颞侧、上方、下方)注入BMSC细胞悬液共计0.5 mL。对照组12只,采用同样方法于耳缘静脉注射1.5 mL的PBS,四个点结膜下共注入0.5 mL的PBS。两组中右眼均为被观察眼。在裂隙灯下观察角膜新生血管

生长情况,拍照、计算新生血管面积。角膜新生血管面积公式为 $C/12 \times 3.14[r^2 - (r-l)^2]$ ( $r$ :角膜半径, $C$ :新生血管侵及角膜的圆周钟点数, $l$ :血管长度),测量并记录自角膜缘长出的新生血管长度及数量,以朝向受损角膜中心、连续弯曲度小、最长的新生血管为准。

**1.2.3 RT-PCR检测MMP-2、TNF-α mRNA的表达** (1)RNA的提取和纯度的检测:收集各组角膜组织、研磨,Trizol充分裂解,加入氯仿,混匀成均一的乳糜状,离心。转移上清液至无RNA酶的1.5 mL EP管,加入等体积的聚合液RB<sub>2</sub>混匀。于内套管中加入混匀的液体,离心。弃去外套管中废液,加500 μL洗液于内套管中离心,重复上述操作。将内套管移入新的EP管中,在膜中央加入洗脱液Rnase-free水,离心获得总RNA。紫外分光光度计测RNA的浓度和纯度。(2)逆转录合成cDNA:在0.5 mL EP管中依次加入总RNA 4 μL、随机引物1 μL、DEPC水7 μL,混合、离心。上机65℃5 min,迅速冰中冷却1 min。加入 $5 \times$ 反应缓冲液4 μL、RNase 1 μL、 $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP混合物2 μL、M-MLV 1 μL,混合、离心。得到的cDNA保存于-80℃。(3)RT-PCR半定量法检测基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases, MMP-2)和肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor, TNF-α)表达水平:引物序列MMP-2上游引物5'-gtcaagtggctcgtgaagta-3',下游引物5'-gagttccgccaatagtagaca-3';TNF-α上游引物5'-cccaaacaacctccatctagtc-3',下游引物5'-agtgtgagtggaggacacgtag-3'。反应程序:MMP-2、TNF-α、GAPDH均为94℃3 min→94℃30 s,56℃30 s,72℃45 s→72℃7 min,共30个循环。PCR扩增, $15\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳分离PCR扩增产物,Nikon数码相机照相。

**1.3 统计学方法** 用SPSS 16.0软件统计分析实验数据,计算得到的所有数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对照组和实验组组间差异比较采用独立样本 $t$ 检验,各检测因子mRNA的差异比较采用单因素方差分析,以双侧 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

## 2 结果

**2.1 细胞观察及鉴定结果** 倒置显微镜下观察见BMSC贴壁生长,呈梭形,紧密排列呈漩涡状,各细胞间形态较均一。对骨髓来源贴壁细胞进行的免疫学表型分析发现CD90高表达(表达率97.94%),CD31低表达(表达率0.15%)。

**2.2 移植后新生血管情况** 移植后28 d,实验组:4只兔出现角膜弥漫性混浊,上皮无缺损,角膜新生血管累及5~7个钟位,长4~5 mm。对照组:角膜弥漫性混浊,2只兔出现角膜白斑,2只兔出现角膜中央浅溃疡,角膜新生血管累及8~12个钟点,长5~6 mm。移植后28 d,实验组较对照组角膜透亮,角膜新生血管面积显著减小(图1)。移植后3 d,实验组

及对照组角膜新生血管面积数量相当,未见明显差异( $P > 0.05$ )。14 d 时,实验组角膜新生血管面积与对照组相比减小,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。28 d 时,实验组角膜新生血管面积明显小于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,见表1)。

**Figure 1** On the 28th day after transplantation, the corneal opacity in the experimental group was less than that in the control group, CNV area obviously decreased. A: Experimental group; B: Control group 移植后 28 d,实验组较对照组角膜混浊轻,角膜新生血管面积显著减小。A:实验组;B:对照组

**表 1 移植后不同时间两组角膜新生血管面积比较**  
**Table 1 Comparison of CNV area at different time after transplantation between two groups**

Group	Day 3	Day 14	Day 28
Experiment( $S/mm^2$ )	$2.43 \pm 0.60$	$85.08 \pm 8.09$	$66.91 \pm 18.17$
Control( $S/mm^2$ )	$2.27 \pm 0.63$	$94.39 \pm 18.15$	$106.45 \pm 7.55$
$t$	0.379	0.938	4.020
$P$	$>0.05$	$>0.05$	$<0.05$

2.3 移植后 MMP-2、TNF- $\alpha$  mRNA 表达变化

**2.3.1 MMP-2 mRNA 的表达** 在 BMSC 移植后 3 d,实验组与对照组 MMP-2 基因条带灰度值相比较未见明显差异( $P > 0.05$ );移植后 14 d、28 d 时,实验组基因条带的灰度值均低于对照组(均为  $P < 0.05$ ),实验组 MMP-2 mRNA 表达低于对照组且 14 d 时差异最明显( $P < 0.01$ ,见表2)。

**表 2 实验组和对照组 MMP-2/GAPDH 灰度值分析**  
**Table 2 MMP-2/GAPDH gray analysis of experimental group and control group**

Group	Day 3	Day 14	Day 28
Experiment	$0.35 \pm 0.20$	$0.40 \pm 0.25$	$0.38 \pm 0.08$
Control	$0.38 \pm 0.16$	$0.78 \pm 0.10$	$0.69 \pm 0.04$
$t$	2.17	2.64	1.95
$P$	$>0.05$	$<0.05$	$<0.05$

**2.3.2 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达** BMSC 移植后 3 d,实验组 TNF- $\alpha$  基因条带灰度值较对照组低,实验组 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达明显受到抑制,且两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );14 d 时,实验组 TNF- $\alpha$  基因表达量仍低于对照组( $P < 0.05$ )。28 d 时实验组与对照组 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量相当,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,见表3)。

3 讨论

BMSC 修复受损眼表的机制不尽相同。袁静等<sup>[2]</sup>

**表 3 实验组和对照组 TNF- $\alpha$ /GAPDH 灰度值分析**  
**Table 3 TNF- $\alpha$ /GAPDH gray analysis of experimental group and control group**

Group	Day 3	Day 14	Day 28
Experiment	$0.25 \pm 0.13$	$0.38 \pm 0.11$	$0.40 \pm 0.04$
Control	$0.72 \pm 0.20$	$0.76 \pm 0.12$	$0.48 \pm 0.03$
$t$	2.67	2.15	1.98
$P$	$<0.05$	$<0.05$	$>0.05$

研究认为,BMSC 重建角膜表面与 BMSC 的分化潜能有关,在体外特定条件下 BMSC 可被诱导分化为角膜上皮样细胞。然而,另有研究<sup>[3]</sup>表明,BMSC 可能是通过抑制炎症反应,而不是靠其分化潜能来实现眼表的修复。在这个过程中 BMSC 分泌的可溶性细胞因子发挥重要的作用,通过其抗炎作用促进伤口愈合和角膜重建<sup>[4]</sup>。Ma 等<sup>[5]</sup>推测,BMSC 可能是通过抑制 CD45、IL-2 的表达来发挥抗炎作用。BMSC 移植后通过减轻眼表炎症反应治疗角膜化学损伤<sup>[6]</sup>,通过抑制 CD4<sup>+</sup>T 细胞相关细胞因子的表达(IL-2、IFN- $\gamma$ )来发挥抗炎作用<sup>[7]</sup>。BMSC 也以旁分泌方式分泌一些细胞因子<sup>[8]</sup>,直接替代损伤细胞来抑制炎症,这样可减少组织修复过程中的纤维化<sup>[9]</sup>。这些细胞因子改变了其所在组织的微环境,建立了微环境中细胞因子间的新平衡<sup>[10-11]</sup>。

在角膜碱烧伤愈合过程中炎症扮演着重要的角色,炎症反应的强弱直接影响着角膜损伤的愈合效果。免疫分子和免疫细胞相互联系,通过体液免疫、细胞免疫介导角膜碱烧伤的病理变化。新生血管刺激因子的过度表达与抑制因子的不足是角膜新生血管发生的基础。本实验中 BMSC 移植后 3 d,角膜新生血管芽呈短刷状;14 d 及 28 d,实验组角膜新生血管面积均小于对照组,28 d 时差异最为明显。进一步分析发现,新生血管的减少与相关细胞因子的变化有关。

正常情况下 MMPs 和金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)处于动态平衡之中,在角膜碱烧伤过程中,MMP-2 能降解基底膜和细胞外基质,促进角膜新生血管的生成。MMP-2 的降解活性能被 TIMP 所抑制,从而抑制新生血管的生成。因此,基底膜及细胞外基质的降解是 MMP 及 TIMPs 间不平衡的结果,MMP-2 的过度表达或者 TIMP-2 表达降低均会导致细胞外基质降解。本实验中,BMSC 移植后,角膜新生血管数量减少,角膜上皮细胞修复快,未见角膜溃疡发生,前房炎症反应较轻。RT-PCR 分析显示 BMSC 移植后 14 d、28 d MMP-2 低表达。可以推断,BMSC 可能直接或间接引起 TIMP-2 的增多,发挥其抑制 MMP-2 的作用,进一步促进上皮细胞再生,减少细胞外基质的溶解及角膜新生血管的形成,促进角膜碱烧伤愈合。

(下转第 633 页)

参考文献

1 李凤鸣,周文炳. 眼科全书[M]. 北京:人民卫生出版社,1996;1705.

2 吴玲玲. 漫谈眼压与青光眼的临床[J]. 眼科,2006,15(2):79-81.

3 Asrani S,Zeimer R,Wilensky J,Gieser D,Vitale S,Lindenmuth K. Large diurnal fluctuations in intraocular pressure are an independent risk factor in patients with glaucoma[J]. *J Glaucoma*,2000,9(2):287-488.

4 Lam DY,Kaufman PL,Gabelt BT,To EC,Matsubara JA. Neurochemical correlates of cortical plasticity after unilateral elevated intraocular pressure in a primate model of glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2003,44(6):2573-2581.

5 史强,谢安明,张小玲. 前节光学相干断层扫描仪观察原发性闭角型青光眼激光虹膜周边切除术后前房形态的改变[J]. 新乡医学院学报,2014,31(3):208-211.

6 May JA,McLaughlin MA,Sharif NA,Hellberg MR,Dean TR. Evaluation of the ocular hypotensive response of serotonin 5-HT1A and 5-HT2 receptor ligands in conscious ocular hypertensive cynomolgus monkeys[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2003,306(1):301-309.

7 Weber AJ,Zelenak D. Experimental glaucoma in the primate induced by latex microspheres[J]. *J Neurosci Methods*,2001,111(1):39-48.

8 Hayreh SS,Pe'er J,Zimmerman MB. Morphologic changes in chronic high-pressure experimental glaucoma in rhesus monkeys[J]. *J Glaucoma*,1999,8(1):56-71.

9 Mogran JE,Uchida H,Caprioli J. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma[J]. *Br J Ophthalmol*,2000,84(3):303-310.

10 Fortune B,Cull G,Wang L,Van BEM,Cioffi GA. Factors affecting the use of multifocal electroretinography to monitor function in a primate model of glaucoma[J]. *Doc Ophthalmol*,2002,105(2):151-178.

11 Bellezza AJ,Rintalan CJ,Thompson HW,Downs JC,Hart RT,Burgoyne CF,et al. Deformation of the lamina cribrosa and anterior scleral canal wall in early experimental glaucoma[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2003,44(2):623-637.

12 Rao RV,Poksay KS,Castro-Obregon S,Schilling B,Row RH,del RG,et al. Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress[J]. *J Biol Chem*,2004,279(1):77-87.

13 Koumenis C. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression[J]. *Curr Mol Med*,2006,6(1):55.

14 Lou LX,Geng B,Yu F,Zhang J,Pan CS,Chen L,et al. Endoplasmic reticulum stress response is involved in the pathogenesis of stress induced gastric lesions in rabbits[J]. *Life Sciences*,2006,79(19):1856-1864.



(上接第 625 页)

参考文献

1 Klausner EA,Peer D,Chapman RL,Multack RF,Andurkar SV. Corneal gene therapy[J]. *J Control Release*,2007,124(3):107-133

2 袁静,俞建雄,黄冰,刘炳乾,刘敬波,江儒章,等. 恒河猴骨髓间充质干细胞在体外向角膜上皮前体细胞的诱导分化[J]. 科学通报,2007,52(14):1665-1672.

3 Yao L,Li ZR,Su WR,Li YP,Lin ML,Zhang WX,et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn[J]. *PLoS One*,2012,7(2):e30842

4 Jiang TS,Cai L,ji WY,Hui YN,Wang YS,Hu D,et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats[J]. *Mol Vis*,2010,16(12):1304-1316.

5 Ma Y,Xu Y,Xiao Z,Yang W,Zhang C,Song E,et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*,2006,24(2):315-321.

6 Zheng XF,Feng KX,Li B,Yang JZ,Ge JJ. Effect of lamellar ker-

atoplasty time on the production of serum specific antibody in corneal alkali burns[J]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*,2004,40(3):160-164.

7 Oh W,Kim DS,Yang YS,lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Cell Immunol*,2008,251(2):116-123.

8 Kinnaird T,Stabile E,Burnett MS,Shou M,lee CW,Barr S,et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms [J]. *Circulation*,2004,109(12):1543-1549.

9 Silva GV,Litovsky S,Assad JA,Sousa AL,Martin BJ,Vela D,et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model [J]. *Circulation*,2005,111(2):150-156

10 王斌,刘茹,陈春芳,钟春霞,李秋平,杜江. 血管内皮生长因子基因转染骨髓间充质干细胞对支气管肺发育不良大鼠肺发育的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(2):102-106.

11 辛毅,李娜,黄益民,刘飒,许秀芳,张兆光. 小鼠骨髓间充质干细胞定向诱导分化血管内皮细胞的实验研究[J]. 新乡医学院学报,2014,31(1):8-14.