

引文格式:蔡丽萍,孟然,张宏.眼局部应用骨髓间充质干细胞(BMSC)治疗小鼠干眼的实验研究[J].眼科新进展,2016,36(11):1024-1028. doi:10.13389/j.cnki.rao.2016.0273

【实验研究】

眼局部应用骨髓间充质干细胞(BMSC)治疗小鼠干眼的实验研究

蔡丽萍 孟然 张宏

Evaluation of topical bone marrow mesenchymal stem cell therapy in experimental dry eye

CAI Li-Ping, MENG Ran, ZHANG Hong

【Key words】 dry eye; mesenchymal stem cell; immunology; cytokine

【Abstract】 **Objective** To investigate the therapeutic effects and explore the potential mechanism of topical application of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) of dry eye rats, and compare effects of the two different methods of local transplanting BMSC. **Methods** BMSC were isolated from bone marrow of BALB/c rats and cultured by plastic adherence method. Thirty-five BALB/c rats were randomized into the normal control group, model group, positive control group, BMSC-dropped group and BMSC-injected group. Double eyes of the twenty-eight rats were topically treated with $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ benzalkonium chloride for 21 days to establish moderate or severe dry eye model. And then the model group was topically applied phosphate buffer solution (PBS). The positive control group was treated with pranoprofen. 1×10^5 BMSC suspended in PBS was applied to the conjunctival sac of the BMSC-dropped group and was injected into the intraorbital gland around main lacrimal gland of the BMSC-injected group every 3 days. Dry eye-related clinical tests of every set were performed, including ocular surface inflammation index, Schirmer I test (SIt), tear film break-up time (BUT) and scores on the 8th day after treatment. 5 eyeballs of the rats in each group were randomly sacrificed to observe histological changes of ocular surface and to count goblet cells with hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid-schiff (PAS). 4 eyes were used to prepare frozen section in order to evaluate the engraftment of the PKH67 labeled BMSC in ocular surface tissue. 5 eyes were used to detect interleukin-10 (IL-10) and interleukin-1 β (IL-1 β) concentrations in ocular surface by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Inflammation index in the model group was 0.31 ± 0.05 , and FLS scores was 8.80 ± 1.21 , which was significantly increased in comparison with 0.01 ± 0.01 and 0.14 ± 0.14 in the normal control group (all $P < 0.05$). However, inflammation index of every treated group (0.15 ± 0.03 , 0.18 ± 0.03 , 0.06 ± 0.02) were considerably lower than that in the model group (all $P < 0.05$). The BMSC-injected group of inflammation index was minimum ($P < 0.05$). Only FLS scores of the BMSC-injected group (3.93 ± 0.74) was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). SIt in the model group was $(4.00 \pm 0.39) \text{ mm}$, which was significantly declined in comparison with $(6.36 \pm 0.48) \text{ mm}$ in the normal control group ($P < 0.05$). However, SIt of the BMSC-dropped group (5.86 ± 0.54) mm was obviously longer than that in the model group (4.00 ± 0.39) mm, positive control group (3.92 ± 0.38) mm and BMSC-dropped group (3.90 ± 0.31) mm (all $P < 0.05$). BUT in the model group was $(3.00 \pm 0.21) \text{ seconds}$, which was significantly declined in comparison with $(6.00 \pm 0.21) \text{ seconds}$ in the normal control group ($P < 0.05$). However, BUT of all treated group were considerably longer than that in the model group (all $P < 0.05$). HE staining of the model group showed that the corneal epithelial cell layer was edema, lymphocytic infiltration, and the stromal layer was edema and thickening. But there was no significant difference in the BMSC-dropped group and BMSC-injected group compared with the normal control group. PAS assay revealed similar goblet cell number in BMSC-injected group (13.80 ± 2.48) and positive control group (13.17 ± 2.09), but goblet cells was remarkable lessened in the model group (5.20 ± 1.07) (all $P < 0.05$). PKH67 labeled BMSC was not shown to infiltrate the meibomian glands, conjunctival epithelium and cornea in frozen section of the BMSC-dropped group and BMSC-injected group. ELISA assay resolved that significantly augmentation in the concentrations of IL-10 in the BMSC-injected group (509.80 ± 190.21) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ in comparison with the BMSC-dropped group (43.64 ± 43.64) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ($P < 0.05$). No significant difference was found in the concentrations of IL-1 β among groups (all $P > 0.05$).

Conclusion Dry eye can be effectively treated by topical application of BMSC with the reduction of the inflammation of the ocular surface and stable tear film, the better regularity of cornea epithelium. Intraorbital gland topical application of BMSC can lead to an increase in aqueous tear volume and number of goblet cells in dry eye rats.

【中图分类号】 R777

【关键词】 干眼;骨髓间充质干细胞;免疫;炎症因子

【摘要】 目的 探讨局部应用骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSC)对干眼小鼠的治疗作用及其机制,并比较 BMSC 滴眼与眼眶注射两种不同应用途径的疗效差异。**方法** 收集 BALB/c 小鼠双侧股骨、胫骨骨髓,采用贴壁培养法纯化 BALB/c 小鼠 BMSC。利用随机数字表法将 35 只健康 6~8 周龄 BALB/c 小鼠分为正常对照组、模型组、阳性对照组、BMSC 滴眼组、BMSC 眼眶注射组,每组 7 只,除正常对照组外的 28 只小鼠使用 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯扎氯铵溶液滴双眼,连续滴 21 d,建立中重度干眼动物模型。造模结束后开始治疗,模型组给予磷酸盐缓冲液滴双眼;阳性对照组给予普拉洛芬眼液滴双眼;BMSC 滴眼组给予含 1×10^5 BMSC 的磷酸盐缓冲悬垂液滴双眼;BMSC 眼眶注射组给予含 1×10^5 BMSC 的磷酸盐缓冲悬垂液分别于治疗当天、第 4 天注射。治疗的第 8 天检测并比较各组小鼠眼表炎症指数、泪液分泌试验(Schirmer I test,SIt)、泪膜破裂时间(tear film break-up time,BUT)、角膜荧光素染色(corneal fluorescein staining,FLS)评分结果。第 9 天过量麻醉法处死 35 只小鼠,每组随机选取 5 眼制备 HE 染色、PAS 染色切片,行眼表组织病理学观察,并进行杯状细胞计数;4 眼用于制备冰冻切片,观察有无 PK67 标记的异体 BMSC 在眼表组织迁移,5 眼用于 ELISA 测定小鼠眼表组织中 IL-10、IL-1 β 蛋白含量。**结果** 模型组眼表炎症指数 0.31 ± 0.05 、FLS 评分 8.80 ± 1.21 分别高于正常对照组 0.01 ± 0.01 、 0.14 ± 0.14 ,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$);而阳性对照组、BMSC 滴眼组、BMSC 眼眶注射组炎症指数分别为 0.15 ± 0.03 、 0.18 ± 0.03 、 0.06 ± 0.02 ,均明显低于模型组,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$),且 BMSC 眼眶注射组低于 BMSC 滴眼组,差异有统计学意义($P<0.05$);仅 BMSC 眼眶注射组 FLS 评分 3.93 ± 0.74 明显低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组 SIt(4.00 ± 0.39)mm 明显小于正常对照组(6.36 ± 0.48)mm,差异有统计学意义($P<0.05$);而 BMSC 眼眶注射组 SIt(5.86 ± 0.54)mm 明显高于模型组、阳性对照组(3.92 ± 0.38)mm、BMSC 滴眼组(3.90 ± 0.31)mm,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$);模型组 BUT(3.00 ± 0.21)s 较正常对照组(6.00 ± 0.21)s 明显缩短,差异有统计学意义($P<0.05$),而阳性对照组(4.20 ± 0.29)s、BMSC 滴眼组(4.40 ± 0.27)s、BMSC 眼眶注射组(4.79 ± 0.02)s 均较模型组明显延长,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。眼表组织 HE 染色:模型组角膜上皮细胞肿胀、大量炎症细胞浸润,基质层胶原纤维排列紊乱、肿胀;BMSC 滴眼组、眼眶注射组角膜上皮表面平整,基质层胶原纤维排列紧密,形态接近正常小鼠,两组间差异不明显。PAS 染色杯状细胞数量 BMSC 眼眶注射组 13.80 ± 2.48 与阳性对照组 13.17 ± 2.09 相当,均多于模型组 5.20 ± 1.07 ,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。冰冻切片:在 BMSC 滴眼组及 BMSC 眼眶注射组睑板、结膜下及角膜均未见带 PKH67 标记的 BMSC。BMSC 眼眶注射组 IL-10 蛋白含量(509.80 ± 190.21) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 明显高于 BMSC 滴眼组(43.64 ± 43.64) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,差异有统计学意义($P<0.05$);IL-1 β 蛋白含量各组间存在差异,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 眼局部应用 BMSC 能使眼表炎症减轻、BUT 延长、角膜上皮修复,从而有效缓解干眼的症状。BMSC 眼眶注射更能显著促进泪液分泌、增加杯状细胞数量,疗效优于 BMSC 滴眼。

干眼常使患者出现干涩、异物感和视力下降等不适,还易引起焦虑、抑郁、偏头痛等神经系统症状,严重影响人们的生活质量及工作效率^[1-3]。目前认为眼局部的炎症免疫反应是引起干眼病理损害的重要机制^[4],故在补充人工泪液的基础上联合应用激素、环孢素 A、非甾体类抗炎药物等,是治疗干眼的重要策略,但这些药物均有一定的毒性作用和不良反应,且均是通过单一的分子调控产生疗效,对中重度干眼治疗难以产生较为满意的疗效。因此寻求更加安全、有效的药物,仍是干眼治疗研究中亟待解决的问题。近年在葡萄膜炎、角膜移植、干燥综合征等眼科免疫疾病中,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)展现了良好的应用前景^[5-7]。但通过静脉途径输入到血液循环中的 MSC 大部分会到达肺、肾脏等组织,真正到达眼部的量很少。因此,有学者通过眼局部途径将 MSC 应用于碱烧伤、角膜移植、视网膜损伤等疾病的研究,结果表明眼局部应用 MSC 安全有效。目前有关眼局部应用 MSC 治疗干眼的实验研究较少,本研究探讨眼局部应用骨髓间充质干细胞(bone marrow MSC, BMSC)对干眼小鼠的治疗作用及其机制,并观察 BMSC 滴眼与眼眶注射的疗效差异,为临床治疗干眼提供依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康 6~8 周龄 BALB/c

小鼠 35 只,体质量 18~20 g,雌雄兼用,购于新疆医科大学实验动物中心。采用随机数字表法将小鼠分为正常对照组、模型组、阳性对照组、BMSC 滴眼组、BMSC 眼眶注射组,每组各 7 只。在进行实验的整个过程中,将小鼠安置于标准的环境中,正常昼夜交替采光,相对湿度(60 ± 10)%,温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。实验动物的使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》,本研究经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审查批准。

1.1.2 主要试剂及仪器 苯扎氯铵($500\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,北京百灵威科技有限公司),普拉洛芬滴眼液(日本千寿制药株式会社),Pentobarbital sodium、胎牛血清、DMEM 培养基、TRYPsin(美国 Life Technologies 公司),PKH67 Fluorescent Cell Linker Kits(美国 Sigma 公司),眼科手术显微镜(德国 Zeiss 公司),酚红棉丝(天津晶明新技术开发有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 BMSC 的培养及鉴定 颈椎脱臼处死 13 只 4~6 周龄 BALB/c 小鼠,无菌取小鼠胫骨及股骨,浸泡在含硫酸庆大霉素注射液的磷酸盐缓冲液中 10 min。采用贴壁培养法纯化 BALB/c 小鼠 BMSC。用含有硫酸庆大霉素注射液磷酸盐缓冲液将腿骨浸泡式清洗 3 次后,放置在含硫酸庆大霉素注射液磷酸盐缓冲液 15 mL 离心管中。于离心管中加入 6 mL DMEM 完全培养基冲洗骨髓细胞。将胫骨与股骨从关节处分离,剪去腿骨两端,吸取 DMEM 完全培养

基,从一端冲洗腿骨。收集所有的骨髓细胞,反复吹打成单细胞悬液。 $1200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心7 min,弃上清,并用无菌磷酸盐缓冲液清洗细胞两遍后重悬于培养基中。移至培养瓶里,按 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 培养基进行接种将培养瓶放在培养箱里培养(37°C)。半换液:48 h后吸取上清液中一半的培养基弃去,再加入等量的新鲜的培养基。之后每3 d全换液1次。流式细胞仪检测CD34、CD45、CD90和CD29等表面分子。选用第3~5代MSC进行后续实验。

1.2.2 干眼动物模型的建立 除正常对照组外的其余28只小鼠按参考文献^[8]中的诱导方法制作中重度干眼的动物模型,使用苯扎氯铵溶液滴双眼($2.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),每日2次,每次25 μL ,诱导出具有干眼表现的小鼠^[9]。21 d后造模结束,开始治疗。模型组用磷酸盐缓冲液滴双眼,每日1次,每次25 μL ;阳性对照组给予普拉洛芬滴眼液滴双眼,每日3次,每次25 μL ;BMSC滴眼组用含 1×10^5 个BMSC磷酸盐缓冲悬垂液25 μL 滴双眼,每日1次;BMSC眼眶注射组用含 1×10^5 BMSC磷酸盐缓冲悬垂液25 μL 于小鼠泪腺区眼眶注射,治疗当天、第4天各1次。所有小鼠治疗的第8天进行干眼临床指标监测。

1.2.3 干眼相关检查 以浓度 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠按 $1.0\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标准腹腔注射进行麻醉,使小鼠保持静止以便观察。(1)炎症指数:睫状充血:无睫状充血计为0,出现睫状充血但范围 $<1\text{ mm}$ 为1,出现且范围 $1 \sim 2\text{ mm}$ 为2,出现且范围 $\geq 2\text{ mm}$ 为3;中央角膜水肿:无水肿计为0,出现但可以看到清晰的虹膜纹理为1,出现但看不到清晰的虹膜纹理为2,出现但看不见瞳孔为3;周边角膜水肿:无水肿计为0,出现但可以看到清晰的虹膜纹理为1,出现但是看不到清晰的虹膜纹理为2,出现但看不见虹膜为3;最终的角膜炎症指数为3部分评分总和除以9。(2)泪液分泌试验(Schirmer I test, SIt):检测小鼠泪液分泌量。用眼科显微镜挟持酚红棉线,将其放置于小鼠下睑结膜囊中外 $1/3$ 处,1 min后取出,棉线红色部分使用mm进行测量记录。每眼重复测试2次,取平均值作为最后结果。(3)泪膜破裂时间(tear film break-up time, BUT):使用 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的液态荧光素钠1 μL 滴至结膜囊,3次辅助眨眼后,自最后一次瞬目后睁眼至角膜出现第1个黑斑的时间为BUT。每只眼重复测试2次,取平均值作为最后结果。(4)角膜荧光素染色(corneal fluorescein staining, FLS)评分:每只小鼠记录完BUT时间90 s后,在裂隙灯下使用钴兰光进行角膜上皮损害分级。角膜分成4个区域,分别记录每个区域的分值,每个区域的分值相加得到最后的分值(总分,16分)。

1.2.4 组织病理学检查 治疗的第9天以 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠 $3.0\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻药过量法处死小鼠,分别在各组中随机选5眼制备HE染色、PAS染色切片;4眼制备冰冻切片;5眼用ELISA法

检测小鼠眼表组织中IL-10、IL-1 β 蛋白含量。

1.2.5 ELISA 检测眼表组织中 IL-10、IL-1 β 蛋白含量 手术显微镜下摘除上下眼睑、完整的结膜角膜组织,置于无RNA酶EP管内,液氮冷冻后置于 -80°C 冰箱冷冻保存。用组织蛋白抽提试剂盒提取眼表组织中的总蛋白。采用ELISA试剂盒检测眼表组织中IL-1 β 、IL-10的蛋白含量,按试剂盒说明书进行,在酶标仪上读取450 nm及570 nm处的吸光度A值,用 A_{450} 减去 A_{570} ,再根据标准品绘制标准曲线,计算IL-10、IL-1 β 的蛋白含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各检测指标的数据资料经K-S检验证实符合正态分布,组间均数经Levene检验证实方差齐。采用完全随机分组单因素干预5水平实验设计,正常对照组、模型组、阳性对照组、BMSC滴眼组和BMSC眼眶注射组小鼠眼表炎症指数、SIt、BUT、FLS评分、杯状细胞数量、IL-10和IL-1 β 蛋白含量的总体差异比较均采用单因素方差分析,然后用Tukey显著性检验进行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC形态观察与鉴定 小鼠BMSC培养3~4 d可见分散的细胞集落形成,细胞逐渐伸展呈梭形,贴壁生长增加;培养8~10 d细胞集落增大、增多,细胞间呈旋涡状排列;细胞传至第3代以后,细胞形态均一,大部分呈长梭形,旋涡状生长。流式细胞仪检测第3代BMSC表面标志物,结果细胞CD34、CD45阴性表达率及CD44、CD29阳性表达率均大于90%。

2.2 各组干眼观察指标的比较 阳性对照组、BMSC滴眼组、BMSC眼眶注射组眼表炎症指数均明显低于模型组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),且BMSC眼眶注射组低于BMSC滴眼组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与阳性对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);BMSC眼眶注射组SIt明显高于模型组、阳性对照组、BMSC滴眼组,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$);阳性对照组、BMSC滴眼组、BMSC眼眶注射组BUT均较模型组明显延长,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),但3组之间相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);FLS显示模型组大面积角膜着染,各治疗组着染均有不同程度的减少,BMSC眼眶注射组FLS评分明显低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$,见表1、图1)。

2.3 组织病理学检测结果

2.3.1 HE染色结果分析 光镜下观察角膜、结膜组织结构的变化。模型组角膜上皮排列欠规则,上皮细胞肿胀、层次减少,大量炎性细胞浸润,基质层胶原纤维排列紊乱、肿胀,结膜上皮多处中断、不连续,细胞层次模糊,基底细胞排列紊乱;阳性对照组

角膜上皮表面平整,角膜上皮细胞层数 3~4 层,较正常对照组、各治疗组变薄,基质层胶原纤维排列疏松,结膜上皮连续;BMSC 滴眼组、眼眶注射组角膜上

皮表面平整,角膜上皮细胞层数 5~6 层,细胞排列整齐,基质层胶原纤维排列紧密、规则,结膜上皮连续形态接近正常小鼠,两组间差异不明显(图 2)。

表 1 治疗后各组小鼠干眼临床指标					
(x±s)					
组别	n	炎症指数	SIt(L/mm)	BUT(t/s)	FLS 评分/分
正常对照组	7	0.01±0.01 [#]	6.36±0.48 ^{#*} ◆	6.00±0.21 [#]	0.14±0.14 [#]
模型组	7	0.31±0.05	4.00±0.39	3.00±0.21	8.80±1.21
阳性对照组	7	0.15±0.03 [#]	3.92±0.38	4.20±0.29 [#]	6.60±0.93
BMSC 滴眼组	7	0.18±0.03 [#]	3.90±0.31	4.40±0.27 [#]	6.10±0.88
BMSC 眼眶注射组	7	0.06±0.02 ^{#◆}	5.86±0.54 ^{#*} ◆	4.79±0.02 [#]	3.93±0.74 [#]

注:与模型组比较,[#]*P*<0.05;与阳性对照组比较,^{*}*P*<0.05;与 BMSC 滴眼组比较,◆*P*<0.05

图 1 各组小鼠 FLS 结果(裂隙灯,×16)。A:模型组;B:阳性对照组;C:BMSC 滴眼组;D:BMSC 眼眶注射组

图 2 各组小鼠角膜 HE 染色结果(×200)。A:正常对照组;B:模型组;C:阳性对照组;D:BMSC 滴眼组;E:BMSC 眼眶注射组

2.3.2 结膜 PAS 染色 PAS 染色杯状细胞数量 BMSC 眼眶注射组(13.80±2.48)与阳性对照组(13.17±2.09)相当,均多于模型组(5.20±1.07),差异均有统计学意义(均为*P*<0.05)。但 BMSC 滴眼组与模型组差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.3.3 眼球冰冻切片 冰冻切片:在 BMSC 滴眼组及 BMSC 眼眶注射组睑板、结膜下及角膜均未见带 PKH67 标记的 BMSC。

2.4 各组眼表组织 IL-10、IL-1β 蛋白含量比较 BMSC 眼眶注射组 IL-10 蛋白含量明显高于 BMSC 滴眼组,差异有统计学意义(*P*<0.05),高于模型组、阳性对照组,但差异无统计学意义(*P*>0.05);IL-1β 蛋白含量各组间存在差异,但差异无统计学意义(*P*>0.05,见表 2)。

3 讨论

干眼的发病机制复杂,病因繁多,目前认为眼局部的炎症免疫反应是引起干眼病理损害的重要机制,相应的抗炎治疗是研究的热点。根据干眼不同发病机制及实验目的建立针对性的动物模型是实验

表 2 治疗后各组眼表组织 IL-10、IL-1β 蛋白含量
(x±s,μg·g⁻¹)

组别	n	IL-10	IL-1β
正常对照组	7	68.44±51.48	116.81±10.72
模型组	7	235.20±42.91	216.20±22.15
阳性对照组	7	389.90±98.21	182.53±15.64
BMSC 滴眼组	7	43.64±43.64	179.70±15.78
BMSC 眼眶注射组	7	509.80±190.21 [*]	188.32±22.40

注:与模型组比较,^{*}*P*<0.05

研究的基础^[10],我们选用苯扎氯铵诱导出小鼠干眼模型,该模型是研究干眼炎症机制及评价抗炎疗效的理想模型^[9,11-12]。何欢等^[8]采用该模型观察普拉洛芬治疗干眼的疗效,结果表明普拉洛芬可通过减轻眼表炎症而改善干眼症状,但无明显促进泪液分泌的作用,且该药长期滴眼会出现角膜敏感性下降、上皮缺损及溃疡穿孔等并发症,故其使用具有一定的局限性。

MSC 是一种多能干细胞,具有低免疫原性、多向诱导分化、促进组织修复的特性。由于特有的弱免疫原性,在体外不但不能诱发免疫应答,还具有抑制免疫反应的作用,而且可以同时免疫反应的多个

环节发挥调节作用^[13],因而在干眼的治疗方面具有激素和免疫抑制剂无法比拟的优势。眼科学家在角膜碱烧伤、角膜移植、视网膜损伤等眼科实验中发现^[14-15]眼局部应用 MSC,不仅增加了眼表组织周围 MSC 及其分泌细胞因子的浓度,使其更好地发挥治疗作用,同时可以减少全身用药而引起的副作用。MSC 移植于角膜化学伤的多项实验表明, MSC 可以分化为角膜上皮细胞,重建眼表正常结构,同时也可减轻炎症反应,抑制新生血管形成,并通过分泌一些可溶性因子调节局部免疫反应,改善眼表角膜上皮细胞生存微环境,促进角膜修复^[16-17]。在本研究中,与模型组相比,阳性对照组、BMSC 滴眼组、BMSC 眼眶注射组均可有效降低眼表炎症指数、延长 BUT、减少 FLS、修复角膜上皮;BMSC 眼眶注射组与阳性对照组、BMSC 滴眼组相比,结膜杯状细胞数量及泪液分泌量明显增多,而阳性对照组、BMSC 滴眼组泪液分泌量无明显改善。另外,实验中未发现标记 PKH67 荧光的 BMSC 迁移到眼表组织,结合临床经验我们分析外源性注入的 BMSC 已经发生死亡。而 BEYAZYILDIZ 等^[18]通过眼局部滴 BMSC 至干眼小鼠 1 周后,在结膜、睑板组织观察到带荧光标记的 BMSC,认为是 BMSC 通过归巢机制定位于眼表损伤组织,从而发挥抑制炎症、修复结膜杯状细胞等作用,但该实验未进行分子水平相关指标的检测。炎症微环境对干细胞的归巢生存至关重要,可能是我们不同的干眼造模方法,导致眼表微环境不同,影响 BMSC 在眼表的存活、迁移以及增殖能力从而影响其在眼表的定植。

另有,LEE 等^[19]研究发现在干眼小鼠眼眶注射的 MSC 在体内快速消失,并不能长期存活修复损伤组织,干眼各项临床指标的改善是通过 MSC 的免疫调节而发挥作用,眼表组织中 IL-2、干扰素- γ 、肿瘤坏死因子- α 等炎症因子表达下降,但 IL-1 β 无明显变化,这与本实验结果一致。既往研究表明, MSC 主要是通过旁分泌或与靶细胞接触,分泌大量如吲哚胺 2,3 过氧化酶、IL-10 等可溶性细胞因子抑制 T 细胞增殖和存活,诱导调节性 T 细胞增殖发挥免疫调节作用^[20],但 LEE 等^[19]的实验中并未发现调节性 T 细胞增多;且在体外、体内实验中应用吲哚胺 2,3 过氧化酶抑制剂 1-MT 并不能逆转 CD4⁺ T 细胞的减少及泪液量及杯状细胞数量的增加。研究发现在角膜移植术后大鼠结膜下注射 MSC, MSC 对同种异体角膜移植免疫调控作用是以上调 Th2 细胞因子 IL-10 为主^[7]。而我们实验中各组 IL-10 蛋白含量的差异无统计学意义,可能与选择的实验模型及监测的炎症因子不同有关。

参考文献

[1] GRUBBS JR, TOLLESON-RINEHART S, HUYNH K, DAVIS RM. A

- review of quality of life measures in dry eye questionnaires [J]. *Cornea*, 2014, 33(2): 215-218.
- [2] UCHINO M, UCHINO Y, DOGRU M, KAWASHIMA M, YOKOI N, KOMURO A, et al. Dry eye disease and work productivity loss in visual display users; the Osaka study [J]. *Am J Ophthalmol*, 2014, 157(2): 294-300.
- [3] BARABINO S, LABETOULLE M, ROLANDO M, MESSMER EM. Understanding symptoms and quality of life in patients with dry eye syndrome [J]. *Ocul Surf*, 2016, 14(3): 365-376.
- [4] STERN ME, SCHAUMBURG CS, PFLUGFELDER SC. Dry eye as a mucosal autoimmune disease [J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(1): 19-41.
- [5] QIAO S, REN H, SHI Y, LIU W. Allogeneic compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation increases survival of mice exposed to lethal total body irradiation; a potential immunological mechanism [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(3): 475-482.
- [6] 白伶俐, 张灵君, 郑慧, 王梅艳, 东莉洁, 李筱荣, 等. 间充质干细胞对 EAU 大鼠抗原特异性 T 细胞和抗原递呈细胞功能的抑制作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(10): 870-875.
- [7] 李斐, 张琰, 茹玉莎, 刘会娟, 赵少贞. 结膜下注射间充质干细胞对大鼠角膜移植植物生存的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(5): 440-445.
- [8] 何欢, 刘祖国, 林志荣, 刘晓琛, 何卉, 肖启国. 普拉洛芬治疗苯扎氯铵诱导小鼠干眼的研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2012, 48(1): 33-40.
- [9] LIN Z, LIU X, ZHOU T, WANG Y, BAI L, HE H, et al. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride [J]. *Mol Vis*, 2011, 17: 257-264.
- [10] AICHER SA, HERMES SM, HEGARTY DM. Denervation of the lacrimal gland leads to corneal hypoalgesia in a novel rat model of aqueous dry eye disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(11): 6981-6989.
- [11] XIONG C, CHEN D, LIU J, LIU B, LI N, ZHOU Y, et al. A rabbit dry eye model induced by topical medication of a preservative benzalkonium chloride [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(5): 1850-1856.
- [12] MCCABE E, NARAYANAN S. Advancements in anti-inflammatory therapy for dry eye syndrome [J]. *Optometry*, 2009, 80(10): 555-566.
- [13] CHEN PM, YEN ML, LIU KJ, SYTWU HK, YEN BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 49.
- [14] VILLATORO AJ, FERNÁNDEZ V, CLAROS S, RICO-LLANOS GA, BECERRA J, ANDRADES JA. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2(23): 527-537.
- [15] PARK SA, REILLY CM, WOOD JA, CHUNG DJ, CARRADE DD, DEREMER SL, et al. Safety and immunomodulatory effects of allogeneic canine adipose-derived mesenchymal stromal cells transplanted into the region of the lacrimal gland, the gland of the third eyelid and the knee joint [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(12): 1498-1510.
- [16] 吴利安, 王从毅, 杨文, 杨新光, 张林, 王佳慧. 自体骨髓间充质干细胞移植对兔角膜碱烧伤炎症反应的抑制作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(9): 798-804.
- [17] 李颖, 杨磊, 宋艳萍, 丁琴, 陈中山, 陈晓. 角膜基质细胞诱导分化的脂肪间充质干细胞羊膜片移植治疗兔角膜碱烧伤的疗效及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(6): 500-506.
- [18] BEYAZYILDIZ E, PINARLI FA, BEYAZYILDIZ O, HEKIMOGLU ER, ACAR U, DEMIR MN, et al. Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model [J]. *Stem Cells Int*, 2014, 7(17): 230-250.
- [19] LEE MJ, KO AY, KO JH, LEE HJ, KIM MK, WEE WR, et al. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(1): 139-146.
- [20] BASSI ÉJ, DE ALMEIDA DC, MORAES-VIEIRA PM, CAMARA NO. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Rev*, 2012, 8(2): 329-342.