

引文格式: 王宝英, 胡成虎, 俞小瑞. 骨髓间充质干细胞 (MSCs) 对 N-甲基-N-亚硝脲 (MNU) 诱导的 C57BL 小鼠视网膜膜变性的治疗作用[J]. 眼科新进展, 2017, 37(9): 810-815. doi:10.13389/j.cnki.rao.2017.0205

【实验研究】

# 骨髓间充质干细胞 (MSCs) 对 N-甲基-N-亚硝脲 (MNU) 诱导的 C57BL 小鼠视网膜膜变性的治疗作用<sup>△</sup>

王宝英 胡成虎 俞小瑞

作者简介: 王宝英, 女, 1985 年 3 月出生, 在读博士研究生。联系电话: 13659142773; E-mail: wbaoying423@126.com; ORCID: 0000-0002-6839-7281

About WANG Bao-Ying: Female, born in March, 1985. Doctor of Science. Tel: 13659142773; E-mail: wbaoying423@126.com; ORCID: 0000-0002-6839-7281

收稿日期: 2017-07-17

修回日期: 2017-08-01

本文编辑: 方红玲

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助 (编号: 81271013); 教育部高等学校博士点专项科研基金资助 (编号: 20120201110051)

作者单位: 710061 陕西省西安市, 西安交通大学医学部基础医学院生物化学与分子生物学系 (王宝英, 胡成虎, 俞小瑞); 710032 陕西省西安市, 西安组织工程与再生医学研究所 (胡成虎); 710061 陕西省西安市, 西安交通大学教育部环境与疾病相关重点实验室 (俞小瑞)

通讯作者: 俞小瑞, E-mail: xiaorui@xjtu.edu.cn; ORCID: 0000-0002-3987-6208

Received date: Jul 17, 2017

Accepted date: Aug 1, 2017

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No: 81271013); National Research Foundation for the Doctoral Program of Higher Education of China (No: 20120201110051)

From the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University (WANG Bao-Ying, HU Cheng-Hu, YU Xiao-Rui), Xi'an 710061, Shaanxi Province, China; Xi'an Institute of Tissue Engineering & Regenerative Medicine (HU Cheng-Hu), 710032 Xi'an, Shaanxi Province, China; Environment and Genes Related to Diseases Key Laboratory of Education Ministry, Xi'an Jiaotong University (YU Xiao-Rui), Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Responsible author: YU Xiao-Rui, E-mail: xiaorui@xjtu.edu.cn; ORCID: 0000-0002-3987-6208

## Therapeutic effects of mesenchymal stem cells (MSCs) on N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced retinitis pigmentosa in C57BL mice

WANG Bao-Ying, HU Cheng-Hu, YU Xiao-Rui

【Key words】 mesenchymal stem cells; N-methyl-N-nitrosourea; retinitis pigmentosa; mice

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effects of mesenchymal stem cells (MSCs) on N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced retinal degeneration in C57BL mice. Methods Different doses of MNU (30 mg · kg<sup>-1</sup>, 45 mg · kg<sup>-1</sup>, 60 mg · kg<sup>-1</sup>, 75 mg · kg<sup>-1</sup> and 90 mg · kg<sup>-1</sup>) were injected to C57BL mice for 7 days. Then electroretinogram (ERG) detection and HE staining were performed to examine retinal electrophysiological function and morphological changes on day 1, day 3 and day 7 after MNU treatment, respectively. Then we could explore the optimum condition to establish stable animal model of retinitis pigmentosa. MSCs were transplanted to C57BL mice by intravitreal or tail intravenous injection. Then ERG detection and HE staining were performed to evaluate the effect of MSCs on retinitis pigmentosa induced by MNU. Results When compared with control group, 30 mg · kg<sup>-1</sup> and 45 mg · kg<sup>-1</sup> MNU could cause mild retinal damage in morphology and function in mice; while 60 mg · kg<sup>-1</sup> and above dose of MNU induced serious retinal damage, leading to decreased ERG amplitude of the retina (all  $P < 0.001$ ) and outer nuclear layer (ONL) thickness (all  $P < 0.001$ ). On day 1 and day 3 after single dose of 60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU injection, ERG amplitude of the retina was decreased, and outer nuclear layer thickness became thin; while the retinal damage was serious badly in morphological structure on day 7, with the ERG amplitude extinguished (all  $P < 0.001$ ), ONL thickness thin (all  $P < 0.001$ ) and internal and external nuclear layer fusion. When compared with MNU alone treatment group, following injection of 60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU for 1 day MSCs were transplanted to C57BL mice by intravitreal or tail intravenous injection, and the amplitude of ERG and retinal ONL thickness were increased on day 7 after MSCs transplantation (all  $P < 0.001$ ). Conclusion MSCs transplantation has a certain therapeutic effect on MNU-induced retinitis pigmentosa in C57BL mice.

【中图分类号】 R774

【关键词】 骨髓间充质干细胞; N-甲基-N-亚硝脲; 视网膜色素变性; 小鼠

【摘要】 目的 观察骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 对 N-甲基-N-亚硝脲 (N-methyl-N-nitrosourea, MNU) 诱导的 C57BL 小鼠视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 的治疗作用。方法 应用不同剂量 (30 mg · kg<sup>-1</sup>, 45 mg · kg<sup>-1</sup>, 60 mg · kg<sup>-1</sup>, 75 mg · kg<sup>-1</sup>, 90 mg · kg<sup>-1</sup>) 的 MNU 腹腔注射给予 C57BL 小鼠和 MNU 作用不同时间 (1 d, 3 d, 7 d) 后, 通过视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 和 HE 染色检测小鼠视网膜的电生理功能和组织形态变化, 优化建立稳定的 RP 动物模型的最佳条件; 在此动物模型的基础上, 经玻璃体内注射和尾静脉注射给予 MSCs 移植, 并应用 ERG 和 HE 染色评估 MSCs 对 MNU 诱导的 RP 的治疗作用。结果 与对照组相比, 30 mg · kg<sup>-1</sup>, 45 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量的 MNU 可引起视网膜形态和功能的轻微损伤, 而 60 mg · kg<sup>-1</sup> 及其以上剂量的 MNU 可使视网膜 ERG 波幅明显降低 (均为  $P < 0.001$ ), 视网膜外核层 (outer nuclear layer, ONL) 厚度明显变薄 ( $P < 0.001$ ), 损伤严重; 与对照组相比, 60 mg · kg<sup>-1</sup> 的 MNU 作用后 1 d 和 3 d, 视网膜 ERG 波形开始降低, 形态结构开始出现 ONL 厚度变薄的损伤, 作用 7 d 时, ERG 波形呈现熄灭型 (均为  $P < 0.001$ ), ONL 厚度明显变薄 ( $P < 0.001$ ), 内外核层融合, 损伤严重。与 MNU 单独作用组相比,

60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 作用 1 d 后给予 MSCs 移植,7 d 后 MSCs 组内 ONL 厚度增加( $P < 0.001$ ),视网膜 ERG 波形趋于恢复(均为  $P < 0.001$ )。结论 MSCs 移植对 MNU 诱导的视网膜退行性变有一定的治疗作用。

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)是一系列以进行性感光细胞及色素上皮功能丧失为共同表现的视网膜退行性疾病,能损害视力并最终致盲,严重影响患者的生活质量,已引起人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。RP 病理机制复杂且尚未明确,现有治疗方法均有一定的局限性,未能有效治愈 RP<sup>[2]</sup>。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我更新能力和多向分化潜能而且免疫原性弱。特定小分子可在体外诱导 MSCs 分化为视网膜感光细胞、神经节细胞或类神经元细胞<sup>[3-6]</sup>。近年来,N-甲基-N-亚硝脲(N-methyl-N-nitrosourea, MNU)诱导的 RP 模型被国内外学者广泛使用<sup>[7-8]</sup>。本研究旨在应用 MNU 诱导的 RP 动物模型来探索 MSCs 对该类疾病的治疗作用,从而为视网膜疾病的治疗提供理论基础及实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** SPF 级健康成年雄性 C57BL 小鼠 90 只,6~8 周龄,体质量 18~22 g,由西安交通大学医学部实验动物中心提供。MNU 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清(FBS)、 $\alpha$ -MEM 培养基。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MNU 诱导 RP 动物模型的条件优化

**1.2.1.1 不同剂量的 MNU 对视网膜组织形态和电生理功能的影响** 将 36 只 C57BL 小鼠随机分为 6 组,每组 6 只,具体分组为:对照组、30 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组、45 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组、60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组、75 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组、90 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组。每只小鼠进行标记、称体质量并记录,按照体质量及指定剂量注射相应体积的 MNU;给药方式为腹腔注射。MNU 注射完成后将各组小鼠放置于 6 个笼子里,正常喂养 7 d 后,分别进行视网膜电图(electroretinogram, ERG)检测和 HE 染色。

**1.2.1.2 MNU 作用不同时间对视网膜组织形态和电生理功能的影响** 选择最佳剂量的 MNU 给药后,观察作用不同时间后视网膜组织的功能及形态学变化。将 24 只 C57BL 小鼠随机分为 4 组,每组 6 只,具体分组为对照组、D1 组、D3 组和 D7 组。MNU 给药后,分别在 1 d、3 d 和 7 d 时进行 ERG 检测和 HE 染色,观察视网膜电生理功能和视网膜组织形态变化。

**1.2.2 MSCs 的提取、鉴定与筛选** 从 6 只 C57BL 小鼠的长骨中提取骨髓细胞,种于 100 mm 的培养皿中,在 37 °C 环境培养 3 h 以促进黏附细胞附着,随后 PBS 清洗 2 次去除未黏附细胞。将提取的 MSCs 用含体积分数 10% FBS 的  $\alpha$ -MEM 培养基进行重悬种植;置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。MSCs 培养 12~15 d 后形成黏附菌落,应用相关

标记分子对其进行鉴定和筛选。MSCs 鉴定和筛选:阳性指标有 CD29(95.4%)、CD44(91.8%)、CD90(97.8%)、CD105(98.4%)、CD146(57.1%)和 Sca-1(60.5%);阴性指标有 CD34(6.5%)、CD14(2.3%)和 CD45(0.5%)。

**1.2.3 MSCs 移植** 本研究采用的 MSCs 移植方式有以下两种:(1) MSCs-1 组:系统性移植,尾静脉注射<sup>[9]</sup> MSCs 1 mL,共  $3 \times 10^6$  个细胞;(2) MSCs-2 组:眼内局部移植,玻璃体内注射<sup>[10]</sup> MSCs 2  $\mu$ L,共  $50 \times 10^3$  个细胞。以优化的 MNU 诱导 RP 小鼠动物模型为研究对象,进行视网膜 MSCs 移植,观察 MSCs 对小鼠视网膜损伤的治疗作用。将 24 只 C57BL 小鼠随机分为以下 4 组,每组 6 只小鼠:(1)空白对照组;(2)MNU 单独作用组;(3)MSCs-1 组:MNU(D1) + MSCs(尾静脉注射,D7);(4)MSCs-2 组:MNU(D1) + MSCs(玻璃体内注射,D7)。MSCs 注射 7 d 后进行 ERG 检测和 HE 染色,观察视网膜电生理功能和视网膜组织形态变化。

**1.2.4 ERG 检测** ERG 检测前需将实验小鼠 84 只置于暗环境下进行暗适应 16~24 h。ERG 检测的整个过程亦在暗环境下进行(可使用相对较弱的红光照明)。依次进行小鼠麻醉、散瞳、眼内局部麻醉后,将小鼠置于三脚架平台上,连接相应的视觉电生理仪电极,采用视觉电生理仪专用的软件进行 ERG 数据采集,阻抗应低于 5%,记录视杆反应-视网膜电图(Rod-ERG)和最大反应-视网膜电图(Max-ERG),并保存所得结果,整理数据并进行统计分析。

**1.2.5 视网膜 HE 染色** 所有小鼠眼球在体积分数 10% 中性甲醛中固定 24 h;用蒸馏水冲洗附着的固定液,随后依次采用体积分数 55%、65%、75%、85% 的乙醇溶液进行梯度脱水各 45 min;去除眼前节;再依次采用体积分数 90%、100% 的乙醇溶液进行梯度脱水各 20 min;三氯甲烷透明 10 min;软蜡浸泡 30 min,硬蜡浸泡 30 min;包埋制作组织石蜡块。将包埋好的蜡块切成厚 4  $\mu$ m 的组织切片,充分烘干后备用。将视网膜组织石蜡切片进行常规 HE 染色,测量视网膜外核层(outer nuclear layer, ONL)厚度并进行统计分析,来评估视网膜的组织结构形态。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行实验结果的数据分析;涉及实验均为多组实验,均采用 One-way ANOVA 的方差分析;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同剂量的 MNU 对 C57BL 小鼠视网膜组织形态和电生理功能的影响** ERG 结果显示:与对照组相

比,30 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 给药 7 d 后可引起 ERG 波幅轻微降低,只有 Max-ERG 的 a 波明显降低( $P < 0.01$ ),其他 ERG 波幅均与对照组无明显差异。45 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 给药 7 d 后可引起 ERG 波幅明显降低(ERG 各波形均为  $P < 0.001$ )。与对照组相比,60 mg · kg<sup>-1</sup> 及其以上剂量(75 mg · kg<sup>-1</sup>、90 mg · kg<sup>-1</sup>)的 MNU 给药 7 d 后,ERG 波幅明显降低(ERG 各波形均为  $P < 0.001$ ;见图 1),视网膜损害十分严重。

HE 结果显示:与对照组相比,30 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 可引起视网膜形态相对轻微的损伤,视网膜 ONL 厚度有所变薄,但其细胞排列基本规律整齐;45 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 可引起视网膜 ONL 厚度变薄,细胞排列基

本规律整齐;而 60 mg · kg<sup>-1</sup> 及其以上剂量(75 mg · kg<sup>-1</sup>、90 mg · kg<sup>-1</sup>)的 MNU 可使视网膜 ONL 厚度明显变薄,组织结构混乱,内外核层融合,损伤严重(图 2)。HE 结果的统计分析(图 3)表明:与对照组相比,30 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组的 ONL 厚度无明显变化( $P > 0.05$ );45 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组的 ONL 厚度开始变薄( $P < 0.05$ );60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组、75 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组和 90 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组的 ONL 厚度明显变薄(均为  $P < 0.001$ )。综上结果,60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 可引起视网膜电生理功能及形态结构的严重损伤,故后续实验均采用 60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 作为模型建立的最佳剂量。

图 1 不同剂量 MNU 诱导 C57BL 小鼠视网膜电生理功能损伤的观察。Con:对照组;30、45、60、75、90 分别指示 MNU 剂量,单位均为 mg · kg<sup>-1</sup>。与对照组相比,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n = 6$

图 2 不同剂量 MNU 诱导 C57BL 小鼠视网膜组织结构损伤的观察。A:对照组;B:30 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组;C:45 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组;D:60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组;E:75 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组;F:90 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 组

图 3 不同剂量 MNU 诱导 C57BL 小鼠视网膜组织结构损伤的视网膜 ONL 厚度的统计分析图。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n = 6$

**2.2 最佳剂量的 MNU 作用不同时间对 C57BL 小鼠视网膜组织形态和电生理功能的影响** ERG 结果显示:与对照组相比,60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 作用后 1 d 和 3 d 开始,视网膜功能即出现明显降低趋势(D1 组:Max-ERG,a 波, $P < 0.01$ ,b 波, $P < 0.05$ ;D3 组:ERG 各波形均为  $P < 0.001$ );60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 作用后 7 d,ERG 波幅明显降低,呈现熄灭型波形,视网膜损害十分严重(D7 组:ERG 各波形均为  $P < 0.001$ ;见图 4)。

HE 结果显示:与对照组相比,60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 作用后 1 d、3 d,视网膜形态结构开始出现 ONL 厚度变薄等轻微损伤,作用后 7 d,视网膜 ONL 厚度更

薄,内外核层融合,损害严重(图5)。HE 结果的统计分析(图6)表明:与对照组相比,D1 组和 D3 组的视网膜 ONL 厚度呈现一定程度的变薄(D1 组, $P < 0.05$ ;D3 组, $P < 0.001$ ),D7 组最为严重(D7 组, $P <$

$0.001$ )。  
综上结果,MNU 作用 1 d 开始,视网膜电生理功能及形态结构均开始呈现损伤,到 7 d 时,视网膜损害最为严重。

图4 MNU 注射后不同时间的视网膜电生理功能的观察。Con:对照组;D1、D3 和 D7 分别指示 MNU 作用 1 d、3 d 和 7 d。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n = 6$

图5 MNU 注射后不同时间的视网膜组织形态观察。A:对照组;B:D1 组;C:D3 组;D:D7 组

图6 MNU 注射后不同时间的视网膜 ONL 厚度的统计分析图。Con:对照组。与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n = 6$

**2.3 移植 MSCs 对 MNU 诱导的 C57BL 小鼠视网膜变性的治疗作用** ERG 结果显示:与对照组相比,60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 作用后 7 d(MNU 单独作用组)ERG 检测波幅明显降低,呈现熄灭型波形,视网膜损害严重(与对照组相比,ERG 各波形均为  $P <$

$0.001$ );与 MNU 单独作用组相比,MSCs-1 组作用 7 d 后,小鼠视网膜的 ERG 波形明显恢复,呈现一定的治疗作用(与 MNU 单独作用组相比,ERG 各波形均为  $P < 0.001$ );MSCs-2 组作用 7 d 后,呈现与 MSCs-1 组类似的治疗作用,即 ERG 波形的各个波幅均有所恢复(与 MNU 单独作用组相比,ERG 各波形均为  $P < 0.001$ ;见图 7)。  
HE 结果显示:与对照组相比,MNU 单独作用组视网膜形态结构出现厚度变薄、细胞结构混乱、内外核层逐渐融合等损伤;与 MNU 单独作用组相比,MSCs-1 组作用 7 d 后,呈现一定的治疗作用,即视网膜的 ONL 厚度均趋于恢复,内外核层间距恢复,视网膜整体厚度亦加厚;MSCs-2 组作用 7 d 后,呈现与 MSCs-1 组类似的治疗作用(图 8)。HE 结果的统计分析(图 9)表明:与对照组相比,MNU 单独作用组视网膜 ONL 厚度明显变薄( $P < 0.001$ );与 MNU 单独作用组相比,MSCs-1 组和 MSCs-2 组视网膜 ONL 厚度均呈现一定程度的增加(均为  $P < 0.001$ )。

图7 MSCs 移植治疗对 MNU 诱导小鼠视网膜电生理功能的影响。Con:空白对照组;MNU:MNU 单独作用组;MSCs-1:MSCs-1 组;MSCs-2:MSCs-2 组。组别之间比较,\*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 6$

图8 MSCs 移植治疗对 MNU 诱导 RP 小鼠视网膜组织形态的影响。A:空白对照组;B:MNU 单独作用组;C:MSCs-1 组;D:MSCs-2 组

图9 MSCs 移植治疗 MNU 诱导 RP 的视网膜 ONL 厚度分析。Con:空白对照组。组别之间比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ ,  $n = 6$

3 讨论

RP 是一组进行性致盲的遗传性视网膜退行性变疾病,共同的发病机制为感光细胞死亡或缺失。感光细胞属于神经细胞,其损伤后不可自我修复及再生,目前尚无能治愈 RP 的治疗方法<sup>[11]</sup>。因此,针对 RP 的有效治疗方案亟待解决。低剂量的烷化剂 MNU 经腹腔单次注射可诱导选择性的视网膜感光细胞损伤,如 SD 大鼠、挪威鼠、兔等,是目前广泛应

用的 RP 动物模型<sup>[7,12]</sup>。不同品系动物模型所用 MNU 剂量略有不同。本研究进一步优化了 MNU 诱导 C57BL 小鼠 RP 模型的条件,结果表明:60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 是引起 C57BL 小鼠视网膜电生理功能及形态结构严重损伤的最佳剂量;60 mg · kg<sup>-1</sup> MNU 作用的动态变化趋势是:1 d 时视网膜电生理功能及形态结构均开始呈现损伤,到 7 d 时,视网膜损害最为严重。

目前针对 RP 这类疾病,主要是对症治疗及缓解视网膜细胞变性,包括药物治疗、营养支持治疗、神经生长因子的应用等,现有这些治疗方法可在不同程度上阻止病程进展,但缺乏有效促进视网膜细胞再生的方法,尚不能治愈 RP<sup>[13]</sup>。干细胞具有自我更新能力和多项分化潜能,因此干细胞移植治疗有望成为该类疾病具有潜力的治疗手段和较为热点的研究问题<sup>[14]</sup>。MSCs 是目前研究相对深入的一群具有多向分化潜能的成体干细胞。近年来研究发现 MSCs 体外可诱导分化为视网膜感光细胞<sup>[5-6,15-16]</sup>;将 MSCs 经视网膜下腔注射给 RCS(royal college of surgeons)大鼠, MSCs 可与宿主视网膜结构相融合,形成感光细胞层<sup>[16]</sup>。这使得应用 MSCs 移植治疗 RP 成为可能。目前尚未见关于 MSCs 对于 MNU 诱导的 RP 小鼠模型影响的相关研究。本研究应用 MNU 诱导 C57BL 小鼠 RP 模型,系统性移植(尾静脉注射)

和眼内局部移植(玻璃体内注射)MSCs,发现 MSCs 移植对 MNU 注射后诱导产生的视网膜形态结构和电生理功能损伤均具有一定的修复作用,两种不同方法移植 MSCs 后对 MNU 诱导的视网膜损伤具有一定的治疗作用。在 RP 早期(MNU 刺激后 1 d)给予 MSCs 移植干预,有效阻止了 RP 的进一步病程发展。

在碘化钠诱导的视网膜退化大鼠模型中,视网膜下注射 MSCs 向视网膜感光细胞和色素上皮细胞分化<sup>[17]</sup>。视网膜下注射高表达 CX3CL1 的 MSCs 对光损伤大鼠模型具有免疫调节作用<sup>[18]</sup>。我们推测 MSCs 移植的治疗作用的发挥可能同时存在两种机制:(1)MSCs 向视网膜感光细胞和色素上皮细胞分化,替代损伤细胞修复组织;(2)分泌免疫因子调节局部微环境而阻止进一步视网膜损伤。这些还需要在后续工作中进一步探索。

综上所述,经尾静脉注射和玻璃体内注射移植 MSCs 对于 MNU 诱导的 RP 小鼠模型具有一定的治疗作用,包括视网膜电生理功能的恢复,内核层和 ONL 厚度、细胞排列及视网膜组织厚度的恢复。同时,MSCs 具有来源丰富、取材方便,避免伦理道德问题等优越性,因而在 RP 等视网膜退行性变疾病的治疗中具有良好的应用前景。

参考文献

[1] FERRARI S, DI IORIO E, BARBARO V, PONZIN D, SORRENTINO FS, PARMEGGIANI F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms[J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(4): 238-249.

[2] SHU X, PANG JJ, ZHANG H, MANSFIELD D. Retinitis pigmentosa: disease mechanisms, diagnosis, and therapies[J]. *J Ophthalmol*, 2015, 2015: 819452.

[3] JIN W, XING YQ, YANG AH. Epidermal growth factor promotes the differentiation of stem cells derived from human umbilical cord blood into neuron-like cells via taurine induction *in vitro*[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2009, 45(7): 321-327.

[4] 李康寓, 朱梦漾, 葛坚. 精准诱导干细胞分化视网膜神经节细胞的研究进展[J]. *中华眼科杂志*, 2017, 53(5): 381-385.

LI KJ, ZHU MY, GE J. The advances in research on precisely inducing retinal ganglion cells from stem cell[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2017, 53(5): 381-385.

[5] 陈红, 彭广华. 小分子化合物诱导干细胞向视网膜感光细胞分化的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(14): 2797-2800.

CHEN H, PENG GH. Research progress of the differentiation of stem cells into retinal photoreceptor cells induced by small molecular compounds[J]. *Prog Modern Biomed*, 2017, 17(14): 2797-2800.

[6] 许卓珺, 余克明, 庄菁. 诱导多能干细胞向神经视网膜细胞定向分化的研究进展[J]. *眼科新进展*, 2016, 36(9): 885-888.

XU ZJ, YU KM, ZHUANG J. Research progress on differentia-

tion from induced pluripotent stem cells into neural retinal cells[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2016, 36(9): 885-888.

[7] LIN FL, LIN CH, HO JD, YEN JL, CHANG HM, CHIOU GC, *et al.* The natural retinoprotectant chrysophanol attenuated photoreceptor cell apoptosis in an N-methyl-N-nitrosourea-induced mouse model of retinal degeneration[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41086.

[8] 金玮, 邢怡桥, 梅海峰, 王文俊, 杨安怀. Rhodopsin 和 recoverin 在 MNU 诱导的光感受器损伤中的表达变化[J]. *国际眼科杂志*, 2014, 14(10): 1755-1759.

JIN W, XING YQ, MEI HF, WANG WJ, YANG AH. Expression changes of Rhodopsin and recoverin in MNU-induced photoreceptor degeneration in rats[J]. *Int Eye Sci*, 2014, 14(10): 1755-1759.

[9] SINISCALCO D, GIORDANO C, GALDERISI U, LUOGO L, DE NOVELLIS V, ROSSI F, *et al.* Long-lasting effects of human mesenchymal stem cell systemic administration on pain-like behaviors, cellular, and biomolecular modifications in neuropathic mice[J]. *Front Integr Neurosci*, 2011, 5: 79.

[10] TOMITA M, ADACHI Y, YAMADA H, TAKAHASHI K, KIUCHI K, OYAIZU H, *et al.* Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina[J]. *Stem Cells*, 2002, 20(4): 279-283.

[11] 李淑贤, 刘铁城, 陈晓菲, 代艾艾, 高旭辉, 李润璞. 视网膜色素变性的基因治疗进展[J]. *解放军医学院学报*, 2017, 38(1): 82-84, 88.

LI SX, LIU TC, CHEN XF, DAI AA, GAO XH, LI RP. Advances in gene therapy for retinitis pigmentosa[J]. *Academ J Chin Pla Med School*, 2017, 38(1): 82-84, 88.

[12] OGINO H, ITO M, MATSUMOTO K, YAGYU S, TSUDA H, HIRONO I, *et al.* Retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea and detection of 7-methyldeoxyguanosine in the rat retina[J]. *Toxicol Pathol*, 1993, 21(1): 21-25.

[13] 邢怡桥, 黄蓉, 李敏. 视网膜色素变性分类的研究进展[J]. *临床眼科杂志*, 2017, 25(2): 173-176.

XING YQ, HUANG R, LI M. Research progress in classification of retinitis pigmentosa[J]. *J Clin Ophthalmol*, 2017, 25(2): 173-176.

[14] 吴创, 徐国兴. 干细胞在视网膜退行性疾病中的应用新进展[J]. *国际眼科杂志*, 2017, 17(4): 661-664.

WU C, XU GX. New research and application of stem cells in retina degeneration diseases[J]. *Int Eye Sci*, 2017, 17(4): 661-664.

[15] 许卓再, 王婧, 毛鑫, 余烁, 卢弘, 董方田. 大鼠的两种干细胞向光感受器细胞和视网膜色素上皮细胞分化的实验研究[J]. *临床眼科杂志*, 2016, 24(3): 264-267.

XU ZY, WANG J, MAO C, YU S, LU H, DONG FT. Differentiation of rat two-derived stem cells into photoreceptors and RPE cells[J]. *J Clin Ophthalmol*, 2016, 24(3): 264-267.

[16] KICIC A, SHEN WY, WILSON AS, CONSTABLE IJ, ROBERTSON T, RAKOCZY PE. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(21): 7742-7749.

[17] HUO DM, DONG FT, YU WH, GAO F. Differentiation of mesenchymal stem cell in the microenvironment of retinitis pigmentosa[J]. *Int J Ophthalmol*, 2010, 3(3): 216-219.

[18] HUANG L, XU W, XU G. Transplantation of CX3CL1-expressing mesenchymal stem cells provides neuroprotective and immunomodulatory effects in a rat model of retinal degeneration[J]. *Ocul Immunol Inflamm*, 2013, 21(4): 276-285.