

【实验研究】

徐静 陈尧 李娜 牛膺筠

导致的一种进行性致盲性眼病,现全球范围大约有 170 万人因 AMD 而致盲^[1],然而目前临床上仍没有

理想的治疗药物,因此急需一种有效的预防或治疗措施,尤其对于老龄化严重的国家。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)作为一种新型细胞治疗手段近来广泛应用于临床及基础研究^[2,4]。Swaminathan等^[5]研究显示,hUCMSCs移植可以减轻急性及慢性肾脏损伤,并促进其功能恢复;还有实验表明,hUCMSCs移植可以促进神经损伤修复^[6]。因此,本研究通过视网膜光损伤模型及消化法培养hUCMSCs,观察玻璃体内注射hUCMSCs对视网膜光损伤组织形态变化的影响,为AMD的治疗提供新的思路及方向。

1 材料与方法

1.1 材料 健康无眼疾成熟雄性SD大鼠(购自潍坊医学院实验室)24只,鼠龄8周,体质量250~300 g。DMEM/F12培养基(美国Hyclone公司),CM-Dil(活细胞染色剂)、NSE抗体、NF抗体(美国Santa),流式细胞仪(Becton Dickinson公司),荧光显微镜(Bio-Rad公司)等。

1.2 分组方法 以大鼠右眼作为实验眼,随机分为正常对照组、光损伤组、PBS治疗组及hUCMSCs治疗组,每组6只。光损伤组、PBS治疗组及hUCMSCs治疗组的大鼠于暗环境饲养24 h后放入光损伤仪中(北京大学医学部仪器厂制作)饲养24 h,光照强度为 (950 ± 50) lx,波长为480~520 nm,随后置于黑暗中3 d,正常环境中再饲养7 d后进行玻璃体内注射手术,14 d后摘除眼球用于实验。

1.3 hUCMSCs的提取、培养和鉴定 无菌取健康足月剖宫产胎儿脐带10 cm,分离脐带外膜和血管组织,即可获得脐带Wharton胶组织,在无菌平皿内将其剪碎至约 1 mm^3 大小,加入 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶和 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ⅱ型胶原酶消化液20 mL,当其消化至半透明状态时使用移液管吹打,细胞悬液均过200目铜网,室温 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清,细胞沉淀重悬于25T培养瓶中培养,将第3代hUCMSCs用流式细胞仪进行鉴定,结果为CD34-、CD45-、抗HLA-DR阴性,CD73+、CD105+、抗HLA-ABC阳性。

1.4 CM-Dil标记hUCMSCs 将CM-Dil(每管50 μg)用50 μL 的二甲基亚砜(DMSO)溶解分装, -20°C 避光保存,培养的第3代hUCMSCs贴壁融合达80%时加入含 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CM-Dil的培养基中避光孵育8 min,再于 4°C 、含体积分数5% CO_2 条件下避光孵育20 min,2 mL PBS冲洗细胞3次,再用台盼蓝按1:10比例稀释后在细胞计数板上计数细胞,观察拒染率即细胞的生存率。细胞生存率(%) = 活细胞总数/(活细胞总数 + 死细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.5 hUCMSCs移植 PBS治疗组及hUCMSCs治疗组大鼠在光损伤后7 d,分别于角膜缘后0.5 mm处先用1 mL的注射器做一浅穿刺,然后用5 μL 的微量注射器向眼球后面视神经盘的方向进入玻璃体

内,从瞳孔区观察到针尖后,分别注入灭菌PBS 5 μL 及CM-Dil标记的hUCMSCs混悬液5 μL (2×10^6 个细胞),术后所有实验眼使用红霉素眼膏涂眼,氯霉素眼液滴眼,每天3次,所有实验眼未见感染发生。

1.6 视网膜病理改变的观察 玻璃体内注射2周后各组大鼠麻醉处死,摘取实验眼,体积分数4%甲醛固定液固定1周,制作蜡块、切片,免疫荧光和苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察视网膜各层组织结构损伤变化情况并照相,荧光显微镜下观察hUCMSCs移植后在光损伤大鼠玻璃体内的存活和迁移情况。应用Image-Pro Plus6.0专业图像分析软件系统测定各组大鼠眼视网膜外核层厚度。

1.7 统计学处理 本研究应用SPSS 11.0软件进行统计分析,所有计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据进行方差齐性检验后,采用两样本均数比较的 t 检验和单因素方差分析并行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUCMSCs生长情况 hUCMSCs接种于培养液中48 h可见个别细胞开始贴壁,经原代培养3~5 d后细胞数量明显增多,呈长梭形,形态较为均一(图1)。10~14 d后可见细胞铺满瓶底,完全融合时形成紧密排列的漩涡状结构(图2)。传代后细胞增殖旺盛,2~3 d后可见细胞铺满瓶底,仍呈梭形及漩涡状排列。

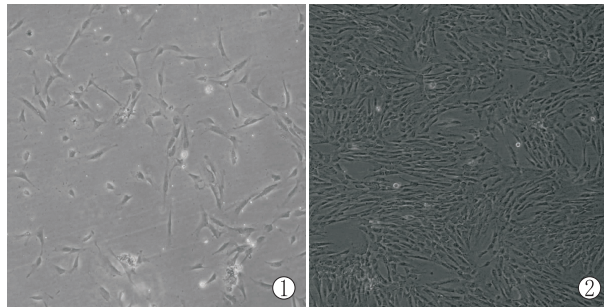


图1 接种后第4天半量换液后的hUCMSCs($\times 40$)。图2 原代达融合的贴壁细胞,呈漩涡状排列($\times 40$)

2.2 CM-Dil标记hUCMSCs CM-Dil标记的hUCMSCs在荧光显微镜下发红色荧光,标记率达90%以上(图3),染色后的细胞呈现红色荧光,细胞形状表现为三角形、椭圆形,细胞膜和细胞质着染,细胞核未被染色。

2.3 光损伤大鼠视网膜组织病理学变化 HE染色结果显示,视网膜光损伤后光感受器细胞外节和内节变短甚至消失,外核层细胞明显减少。正常对照组外核层平均13层细胞(图4)。hUCMSCs治疗组外核层平均约10层细胞(图5),视网膜各层完整,结构清晰;外核层排列整齐,厚度较正常对照组变薄,但厚于光损伤组及PBS治疗组;感光细胞内节、外

节排列规则,无明显空泡。光损伤组外核层仅约3层细胞(图6),且外核层结构疏松,分界不清,细胞排列紊乱。PBS治疗组外核层平均约4层细胞(图7),视网膜各层排列较不规则,也可见核层排列紊乱,但各层间分界隐约可见。正常对照组外核层厚度为 $(40.73 \pm 1.32) \mu\text{m}$,而光损伤组 $[(12.68 \pm 1.42) \mu\text{m}]$ 、PBS治疗组 $[(17.21 \pm 1.02) \mu\text{m}]$ 及hUCMSCs治疗组 $[(31.28 \pm 1.79) \mu\text{m}]$ 均有不同程度变薄,各组间比较,差异均有统计学意义(均为 $P < 0.05$),表明hUCMSCs玻璃体内移植明显减轻了光损伤导致的视网膜细胞的丢失,对视网膜起到了保护作用。

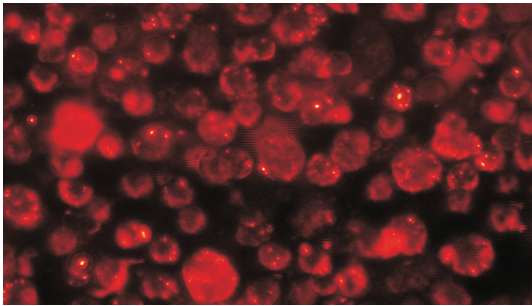


图3 细胞标记率近100%CM-Dil标记hUCMSCs(×40)

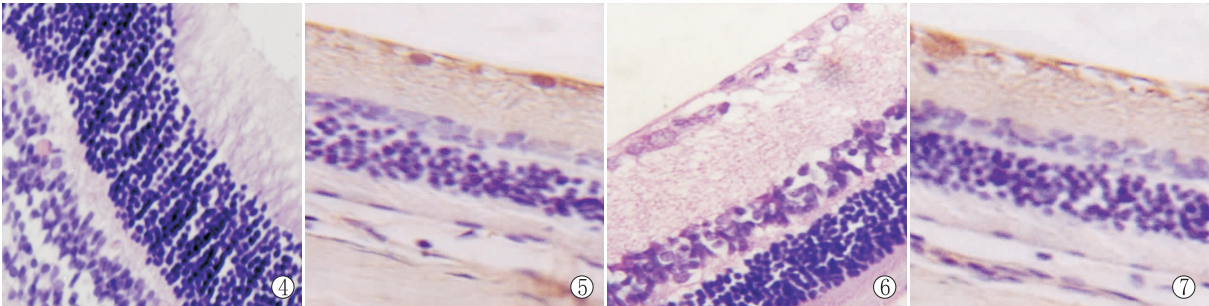


图4 正常对照组大鼠视网膜HE染色结果(×40)。外核层细胞规整、排列紧密。图5 hUCMSCs治疗组大鼠视网膜HE染色结果(×40)。外核层细胞轻度变薄,细胞排列规整。图6 光损伤组大鼠视网膜HE染色结果(×40)。外核层细胞减少,结构疏松。图7 PBS治疗组大鼠视网膜HE染色结果(×40)。外核层变薄,细胞排列尚规整

2.4 hUCMSCs在眼内整合情况 移植到光损伤大鼠玻璃体内的hUCMSCs至少可以存活2周,而且存活的hUCMSCs发生了迁移,CM-Dil标记的hUCMSCs主要迁移到视网膜表面并沿内界膜分布,并且部分hUCMSCs整合到视网膜神经纤维层中(图8),这说明少数移植到光损伤大鼠玻璃体内的hUCMSCs在某种因素诱导下可以向视网膜神经细胞分化或整合入视网膜组织,进而参与对损伤视网膜的修复。

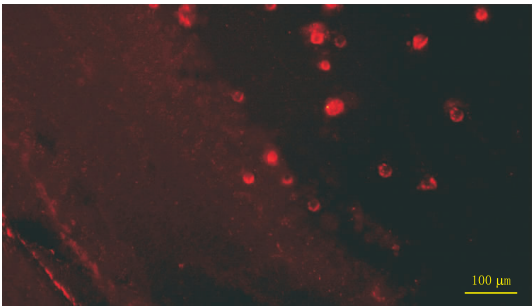


图8 Dil标记的hUCMSCs玻璃体内整合入光损伤的视网膜神经纤维层中(×100)

3 讨论

hUCMSCs是从人脐带获取的具有增殖和多向分化潜能的干细胞^[7],免疫原性低,容易获取且不存在伦理道德问题^[8-9],现日趋成为细胞再生研究的热点。相关报道显示,hUCMSCs可以修复各种原因引

起的组织器官损伤^[10-12],国内外已有许多研究证明通过不同途径移植hUCMSCs可以治疗多种眼部疾病^[13-14],如Kong等^[15]研究发现,hUCMSCs玻璃体内移植可以明显改善糖尿病视网膜膜的功能,对视网膜起到一定的保护作用;hUCMSCs可分泌多种细胞因子抑制细胞的凋亡,并促进损伤神经的修复^[16]。Scalinci等^[17]将hUCMSCs注入鼠玻璃体内后检测发现,玻璃体内及视网膜中多种神经营养因子的含量升高,如脑源性生长因子、神经生长因子等,可以推测hUCMSCs能够分泌神经营养因子,营养受损的视网膜。hUCMSCs还可以被诱导分化为神经样细胞、视网膜神经节细胞、胶质细胞和光感受器细胞^[18-19],使其具有应用于修复受伤或病变神经组织的能力^[20-21]。这些研究为hUCMSCs眼内移植治疗提供了理论基础,但目前还未见关于视网膜光损伤保护的相关报道,故本研究分析hUCMSCs玻璃体内移植对视网膜光损伤的保护作用。在本研究中,我们采用酶消化法成功分离获得hUCMSCs,证实其具有贴壁生长特征且表达间充质干细胞表型,结果显示:CD34-、CD45-、抗HLA-DR阴性,CD73+、CD105+、抗HLA-ABC阳性,说明本研究通过反复换液和传代可以获得高纯度的hUCMSCs。

我们发现,视网膜光损伤后视盘上方2~3PD损伤最重,因此我们用这部分视网膜作为进一步研究对象,结果发现,光损伤后视网膜外核层细胞损伤严重,细胞减少,结构破坏,而hUCMSCs移植可显著

减少视网膜光感受器细胞凋亡,减轻外核层损伤,增加细胞数量,优化视网膜结构,从而对光损伤视网膜起保护作用。而且本实验发现,单纯注射 PBS 也可一定程度减少光感受器凋亡,其作用机制有待进一步研究。

玻璃体内注射 hUCMSCs 后 2 周,荧光显微镜下观察见玻璃体内红色荧光,表明细胞能够较长时间存活于玻璃体,移植到光损伤大鼠玻璃体内的 hUCMSCs 能存活并向视网膜迁移且整合到受损视网膜。说明移植后的 hUCMSCs 可能参与了视网膜损伤的修复,推测其原因可能是细胞本身具有抑制细胞凋亡及促进神经损伤修复的作用,加强了抑制神经细胞凋亡的作用,并能进一步减少和修复细胞损伤,亦有可能通过分泌细胞因子参与视网膜细胞的修复。Kong 等^[15]研究也发现,玻璃体内注射 hUCMSCs 后可以减轻糖尿病视网膜病变的细胞损伤,并检测到了神经生长因子表达的增加。

综上所述,移植到玻璃体的 hUCMSCs 能够存活及迁移,并能整合到受损视网膜中且可抑制光感受器细胞的凋亡,说明在视网膜受损状态下 hUCMSCs 可能受到某种因子趋化而整合到视网膜中,通过刺激分泌细胞因子发挥其营养支持作用,亦有可能转化为神经细胞从而对光感受器细胞产生保护作用。

参考文献

- [1] PENNINGTON K L, DEANGELIS M M. Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD); associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors [J]. *Eye Vis*, 2016, 3 (1): 1-20.
- [2] EL OMAR R, BEROUD J, STOLTZ J F, MENU P, VELOT E, DECOT V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies [J]? *Tissue Eng Part B Rev*, 2014, 20 (5): 523-544.
- [3] DING D C, CHANG Y H, SHYU W C, LIN S Z. Human umbilical cord mesenchymal stem cells; a new era for stem cell therapy [J]. *Cell Transpl*, 2015, 24 (3): 339-347.
- [4] FAN C G, ZHANG Q J, ZHOU J R. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7 (1): 195-207.
- [5] SWAMINATHAN M, STAFFORD-SMITH M, CHERTOW G M, WARNOCK D G, PARAGAMIAN V, BRENNER R M. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of AKI after cardiac surgery [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29 (1): 260-267.
- [6] FAN C G, ZHOU J R, ZHANG Q J. Recent advances of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases [J]. *J Int Neurol Neurosurg*, 2009, 36 (3): 242-245.
范存刚, 周景儒, 张庆俊. 人脐带间充质干细胞治疗神经系统疾病的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36 (3): 242-245.
- [7] LI W W, YAO X Y, YANG L M, ZHAO P W, ZHANG G H. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells was induced *in vitro* [J]. *J Clin Reha-*

- bil Tis Eng Res*, 2014, 18 (1): 75-80.
- 李伟伟, 姚星宇, 杨丽敏, 赵鹏伟, 张国华. 体外诱导人脐带间充质干细胞向神经干细胞的分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18 (1): 75-80.
- [8] YANG Z, LI K, YAN X, DONG F, ZHAO C. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010, 248 (10): 1415-1422.
- [9] LI G, ZHANG X A, WANG H, WANG X, MENG C L, CHAN C Y, *et al.* Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta; implication in the migration [J]. *Proteomics*, 2009, 9 (1): 20-30.
- [10] ZHANG B, WU X D, ZHANG X, SUN X Y, YAN Y M, SHI H, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/beta-catenin pathway [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4 (5): 513-522.
- [11] MA J, ZHAO Y, SUN L, SUN X, ZHAO X, SUN X, *et al.* Exosomes derived from Akt-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells improve cardiac regeneration and promote angiogenesis via activating platelet-derived growth factor D [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6 (1): 51-59.
- [12] ZHU Y, YU J, YIN L, ZHOU Y, SUN Z, JIA H, *et al.* MicroRNA-146b, a sensitive indicator of mesenchymal stem cell repair of acute renal injury [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5 (10): 1406-1415.
- [13] SCALINCI S Z, SCOROLLI L, CORRADETTI G, DOMANICO D, VINGOLO E M, MEDURI A, *et al.* Potential role of intravitreal human placental stem cell implants in inhibiting progression of diabetic retinopathy in type 2 diabetes: neuro-protective growth factors in the vitreous [J]. *Clin Ophthalmol*, 2011, 5 (5): 691-696.
- [14] BI X, CHEN S, LIN J Y, WANG Y C. Systemic and ocular transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into rats with diabetic retinopathy [J]. *Chin J Ocul Fundus Dis*, 2014, 30 (2): 209-211.
- [15] KONG J H, ZHENG D, CHEN S, DUAN H T, WANG Y X, DONG M, *et al.* A comparative study on the transplantation of different concentrations of human umbilical mesenchymal cells into diabetic rats [J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8 (2): 257-262.
- [16] SI Y L, ZHAO Y L, HAO H J, FU X B, HAN W D. MSC: biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns [J]. *Ageing Res Rev*, 2011, 10 (1): 93-103.
- [17] SCALINCI S Z, CALINCI S Z, SCOROLLI L, CORRADET T I. Potential role of intravitreal human placental stem cell implants in inhibiting progression of diabetic retinopathy in type 2 diabetes: neuro-protective growth factors in the vitreous [J]. *Clin Ophthalmol*, 2011, 10 (5): 691-696.
- [18] XU W, WANG X, XU G, GUO J. Light-induced retinal injury enhanced neurotrophins secretion and neurotrophic effect of mesenchymal stem cells *in vitro* [J]. *Arq Bras Oftalmol*, 2013, 76 (20): 105-110.
- [19] HSIAO S T, ASGARI A, LOKMIC Z, SINCLAIR R, DUSTING G J, LIM S Y, *et al.* Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21 (12): 2189-2203.
- [20] YANG H, XIE Z, WEI L, YANG H, YANG S, ZHU Z, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells rescue memory deficits and reduce amyloid-beta deposition in an AβPP/PS1 transgenic mouse model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 3 (4): 76.
- [21] ZHANG Z P, MA K J, DENG Y G, YU W, HU Z B. Experimental study on effect of citicoline in inducing differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells to neuron-like cells [J]. *Pharm Today*, 2013, 23 (3): 129-131.