**引文格式**:李娟,周颖,谭钢,王甜,鲜盼盼,龙乾发.间充质干细胞外泌体治疗小鼠干眼的疗效评价[J].眼科新进展,2019,39(10):901-905. doi:10.13389/j.cnki.rao.2019.0205

【实验研究】

# 间充质干细胞外泌体治疗小鼠干眼的疗效评价△

李娟 周颖 谭钢 王甜 鲜盼盼 龙乾发

**作者简介**:李娟,女,1981年4月出生,陕西西安人,博士,副主任医师,陕西省青年科技新星。研究方向:眼表及屈光不正防治。联系电话:18229017197;E-mail:cornea@163.com;ORCID:0000-0001-9831-3686

**作者简介**:周颖,女,1992年8月出生,湖南常德人,硕士研究生。研究方向:眼表及角膜疾病。联系电话:15570972455;E-mail:472779506@qq.com;ORCID:0000-0002-3739-3093

注:李娟和周颖同为第一作者!

**About LI Juan**: Female, born in April, 1981. Tel: 18229017197; E-mail: cornea@163.com; ORCID: 0000-0001-9831-3686

**About ZHOU Ying**: Female, born in August, 1992. Tel: 15570972455; E-mail: 472779506@qq.com; ORCID: 0000-0002-3739-3093

**收稿日期**:2019-01-03
**修回日期**:2019-06-26
**本文编辑**:付中静
△**基金项目**:国家自然科学基金资助(编号:81400424、81871084);2017年陕西省创新人才推进计划项目-青年科技新星项目(编号:2017KJXX-87);陕西省科学技术研究发展计划项目(编号:2014K11-03-07-04);中央高校基本科研业务费专项资金资助(编号:xzy012019122)

**作者单位**:710004 陕西省西安市,西安市第四医院眼科,陕西省眼科医院,西安交通大学附属广仁医院(李娟);415003 湖南省常德市,常德市第一人民医院眼科(周颖);421001 湖南省衡阳市,南华大学附属第一医院眼科(谭钢);710001 陕西省西安市,西安市中心医院神经外科(王甜,鲜盼盼,龙乾发)
**通讯作者**:龙乾发,E-mail:lonva@live.cn;ORCID:0000-0001-8848-9688

**Received date**:Jan 3,2019
**Accepted date**:Jun 26,2019
**Foundation item**: Supported by National Natural Science Foundation of China (No:81400424,81871084); Innovative Talents Promotion Project of Shaanxi Province (No:2017KJXX-87); Science and Technology Research and Development Project of Shaanxi Province (No:2014K11-03-07-04); Funda-mental Research Funds for the Central Universities (No:xzy012019122)

From the *Department of Ophthalmology, Xi'an No.* 4 *Hospital, Shaanxi Eye Hospital, Affiliated Guangren Hospital School of Medicine, Xi'an Jiaotong University* (LI Juan), *Xi'an* 710004, *Shaanxi Province, China*; *Department of Ophthalmology, the First People's Hospital of Changde* (ZHOU Ying), *Changde* 415003, *Hunan Province, China*; *Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of the University of South China* (TAN Gang), *Hengyang* 421001, *Hunan Province, China*; *Department of Neurosurgery, Xi'an Central Hospital* (WANG Tian, XIAN Pan-Pan, LONG Qian-Fa), *Xi'an* 710001, *Shaanxi Province, China*
**Responsible author**: LONG QIAN-Fa, E-mail: lonva@live.cn; ORCID: 0000-0001-8848-9688

# Therapeutic effects of mesenchymal stem cells derived exosomes on dry eye mice

LI Juan, ZHOU Ying, TAN Gang, WANG Tian, XIAN Pan-Pan, LONG Qian-Fa

**【Abstract】** **Objective** To investigate the therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes (MSC-Exo) on a mouse model of dry eye. **Methods** Thirty-two healthy adult male BALB/c mice (64 eyes) aged 6-8 weeks were selected in this study and divided into four groups randomly (group A, B, C and D), with each group consisting of 8 mice. The dry eye model was induced by eye drop of 2 $g \cdot L^{-1}$ benzalkonium chloridefor 14 consecutive days in group A, group B and group C. Group D served as the normal controls without any treatment. The A group was given 25 $g \cdot L^{-1}$ MSC-Exo eye drops, while the group B was given PBS eye drops and the group C were not received any treatment as the negative control. The Schirmer I test (SIT), tear break-up time (BUT) and corneal fluorescein staining (FL) were evaluated before and after eye drops on day 1, day 4 and day 7. The cornea samples of all mice were collected for histological investigation of corneal epithelium using hematoxylin and eosin staining, and ultrastructure of corneal epithelial cells was further examined by transmission electron microscopy (TEM). **Results** There were no statistical changes in SIT, BUT before therapy and 1 day after treatment among group A, group B and group C, and no statistical changes in FL between group A and group B at both time points. Moreover there were significant differences in SIT, BUT between group A, B, C and group D (all $P<0.05$). Significantly more tear volume and longer BUT were shown on day 4 and day 7 after treatment in group A than group B and group C (all $P<0.05$). On day 4 and day 7 after treatment, SIT and BUT were significantly increased in group A (both $P<0.05$), and FL score was lower than before treatment ($P<0.05$). There were no significant differences in SIT, BUT, FL before and after treatment in group B (all $P>0.05$). No treatment was performed after modeling in group C, and no treatment was performed in group D. There were no significant changes in parameters of the two groups (all $P>0.05$). TEM showed that the number of microvilli of corneal epithelium was large in group A, and they arranged neatly and had finger-like protrusions; the microvilli in group B decreased, shortened and arranged disorderly; they were significantly reduced, shedding, and missing, and their arrangement was disordered in group C, while the microvilli in group D were finger-like, neatly arranged and numerous. Group C was very different from group A and group D. **Conclusion** The exosomes derived from mesenchymal stem cells exhibit signicantly therapeutic effects on dry eye mice model, which suggest that MSC-Exo administration is a promising method for the treatment of dry eye.

**【Key words】** exosomes; dry eye; tear film function

【摘要】 **目的** 探讨人脐带血间充质干细胞外泌体(mesenchymal stem cells derived exosomes,MSC-Exo)治疗小鼠干眼的效果。**方法** 选取32只(64眼)雄性6~8周龄BALB/c小鼠,随机分为A、B、C、D组,每组各8只。除D组不予处理外,其余24只均给予2 g·L$^{-1}$苯扎氯铵滴双眼,连续14 d,各建立中重度干眼模型。造模结束后,A组用25 g·L$^{-1}$MSC-Exo滴眼液点眼,B组用磷酸盐缓冲液点眼,C组为阴性对照组,造模后不予处理。分别在治疗前和治疗后第1、4、7天进行小鼠泪膜功能相关检查,包括泪液分泌实验(Schirmer Ⅰ test,SIT)、泪膜破裂时间(tear break-up time,BUT)、荧光素染色评分(corneal fluorescein staining,FL)测定。于相应时间点收集其角膜组织,行苏木精-伊红染色及透射电子显微镜下观察角膜上皮组织结构变化。**结果** 治疗前及治疗后第1天,A、B、C三组SIT、BUT及FL(FL仅A、B组比较)差异均无统计学意义(均为$P>0.05$),各时间点SIT、BUT A、B、C组与D组差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。治疗后第4天、第7天,A组SIT较B组、C组明显增加,A组BUT较B组、C组明显延长,差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。治疗后第4天、第7天,A组SIT较B组,C组明显增加,A组BUT较B组、C组明显延长,差异均有统计学意义(均为$P<0.05$)。治疗后第4天和第7天,A组SIT、BUT均较治疗前明显增加(均为$P<0.05$),FL评分较治疗前降低($P<0.05$);而B组SIT、BUT与治疗前差异均无统计学意义(均为$P>0.05$),FL差异无统计学意义($P>0.05$);C组造模后未行治疗;D组未行任何处理,两组各项检测指标均未见明显变化(均为$P>0.05$)。电镜观察可见:A组角膜上皮微绒毛呈指状突起,微绒毛数量多,排列整齐;B组角膜上皮微绒毛减少、变短、排列紊乱;C组角膜上皮微绒毛可见明显减少、脱落、缺失,排列紊乱;D组角膜上皮微绒毛形态呈指状突起,排列整齐,数量多;C组与A组和D组有很大差异。**结论** MSC-Exo滴眼液对小鼠干眼有明显的治疗作用,有望为临床干眼的治疗带来新方法。

【关键词】 外泌体;干眼;泪膜功能
【中图分类号】 R772.2

外泌体(exosome)是细胞胞外囊泡的一种,直径30~150 nm,由细胞内多囊泡体与质膜融合后从胞膜释放,携带大量的蛋白、脂类和核酸如microRNA(miRNA)等[1],近年来其作为治疗药物、运输载体、生物学标记物等备受关注[2]。有研究证实,间充质干细胞外泌体(mesenchymal stem cells derived exosomes,MSC-Exo)参与免疫抗原呈递、肿瘤的生长与迁移、炎症反应、细胞自噬、组织损伤的修复等许多病理生理过程[3]。新近证据表明,MSC-Exo对眼底疾病如年龄相关性黄斑病变、脉络膜黑色素瘤、眼底缺血性病变及新生血管性疾病等具有积极治疗潜能,而且还对角膜移植排斥反应有抑制作用[4-6]。尽管如此,目前尚无MSC-Exo治疗干眼的相关研究,同时考虑干眼发生的最关键因素是眼表炎症[7-8],因此推测MSC-Exo对小鼠干眼模型具有一定的治疗作用。本课题利用苯扎氯铵连续滴眼建立小鼠干眼模型,而后接受MSC-Exo或PBS处理,通过泪膜功能及系统的组织学分析研究其对小鼠干眼模型的治疗效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 选取32只健康雄性BALB/c小鼠,6~8周龄,体质量18~22 g,购于西安交通大学医学部实验动物中心,为无特定病原体级实验动物(SPF级动物)。使用裂隙灯显微镜及眼底镜检查眼前节、眼底无异常。将24只小鼠置于标准环境:室温(25±1)℃,湿度(60±10)%,交替的12 h明暗周期(8:00~20:00)。所有的小鼠都给予相同的水量和食物。本研究所涉及的全部研究方法均遵循《赫尔辛基宣言》,动物实验符合视觉与眼科协会规定的对于动物眼科和视觉研究的使用,同时获得了西安交通大学医学部(陕西省)动物伦理委员会批准。

**1.1.2 人脐带血MSC-Exo滴眼液的制备** MSC-Exo滴眼液的制备(中国发明专利申请号201811538991.3):MSC-Exo经提取、鉴定,-80 ℃保存备用[9]。25 g·L$^{-1}$外泌体,准备密封容器,配置辅配料,滴眼液配置,最终分装成无菌方便使用的制剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及处理** 32只(64眼)健康雄性BALB/c小鼠,随机分为A、B、C、D四组,每组8只(16眼)。除D组正常对照的8只不予处理外,其余24只均以2 g·L$^{-1}$苯扎氯铵滴双眼,每天2次,连续2周,建立中重度干眼模型[10]。造模成功后开始治疗,A组选用MSC-Exo滴眼液滴眼,每天3次,连续7 d;B组PBS缓冲液滴眼,每天3次,连续7 d;C组为阴性对照组,造模后不予治疗。分别在治疗前和治疗后第1、4、7天观察实验小鼠泪膜功能相关指标,包括:泪液分泌实验(Schirmer Ⅰ test,SIT)、泪膜破裂时间(tear break-up time,BUT)、角膜荧光素染色(corneal fluorescein staining,FL)评分。于相应时间点收集其角结膜组织,行苏木精-伊红染色及透射电子显微镜下观察角膜上皮组织超微结构变化。

**1.2.2 SIT检测** 取酚红棉线,一端置于小鼠右眼外眦中外1/3处,计时60 s。用游标卡尺测量酚红棉线红色部分的长度,计算泪液分泌量[10]。进行每次检查时应注意控制变量,应由同一人在相同的时间、地点、照明亮度、湿度及温度下操作。

**1.2.3 BUT检测** 使用1 μL 10 g·L$^{-1}$荧光素钠滴眼液滴入实验小鼠结膜囊中,使其瞬目,在裂隙灯显微镜钴蓝光下观察记录角膜染色区出现第1个破裂点的时间[11]。进行每次检查时应注意控制变量,应由同一人在相同的时间、地点、照明亮度、湿度及温度下操作。

**1.2.4 角膜FL评分** 用1 μL 10 g·L$^{-1}$荧光素钠滴眼液滴入实验小鼠结膜囊中,使其瞬目,在裂隙灯显微镜下观察各组小鼠角膜上皮缺损的部分及范围。评分参考文献[11]将角膜划分为4个象限,每一象限0-3分,每个象限评分标准为:(1)0分:无染色;(2)1分:轻度染色<5个点;(3)2分:中度染

色≥5 个点;(4)3 分:重度染色≥5 个点,并有丝状染色或溃疡,总分上限为 12 分。

**1.2.5　HE 染色**　治疗 1 周后收集各组实验动物的角膜及结膜组织,40 g·$L^{-1}$多聚甲醛固定后,常规石蜡包埋、切片,行苏木精-伊红染色。显微镜下观察、拍照。

**1.2.6　透射电子显微镜观察**　参照文献[11－12],实验动物角膜标本经体积分数 2.5% 戊二醛前固定 2 h,10 g·$L^{-1}$锇酸固定 1～2 h,乙醇梯度脱水,包埋,经枸橼酸铅和醋酸双氧铀双重染色后于透射电子显微镜下观察并拍照。

**1.3　统计学方法**　使用 SPSS 20.0 统计软件及 GraphPad Prism 7.00 处理实验数据,计量资料以均数±标准差表示,计数资料用$\chi^2$ 检验;两组治疗前后及两组间同一时间点的均数比较采用重复测量设计方差分析,三组比较采用方差分析后的两两比较,检验水准:$\alpha=0.05$。

## 2　结果

**2.1　各组小鼠治疗前后干眼检测指标结果比较**　治疗前以及治疗后各时间点 A、B、C 三组与 D 组 SIT、BUT 差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$),治疗前 A、B、C 三组间差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。治疗后第 1 天,各组SIT及 BUT 均未见明显改变,组间差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。治疗后第 4 天、第 7 天:A 组SIT显著增加,BUT 延长,治疗前后差异均有统计学意义 (均为$P<0.05$)。B 组SIT、BUT 无明显改变,治疗前后差异均无统计学意义(均为$P>0.05$)。C 组各项指标差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。第 4 天、第 7 天,A 组 SIT较 B 组、C 组明显增加,A 组 BUT 较 B 组、C 组明显延长,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$)。D 组各时间点差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。

**2.2　角膜 FL 评分**　A 组治疗后第 7 天,角膜基本透明,未见着染(图 1A);B 组治疗后第 7 天,角膜可见点片状着染(图 1B);C 组整个角膜 FL 评分区域明显增加,呈点片状着染(图 1C);D 组角膜光滑,透明,未见着染(图 1D)。

A、B 两组治疗前和治疗后第 1 天角膜 FL 评分相比较,差异均无统计学意义($t_A=0.341$,$t_B=0.512$,均为 $P>0.05$),两组间治疗前和治疗后第 1 天角膜 FL 评分比较,差异均无统计学意义($t_A=0.469$,$t_B=0.573$,均为 $P>0.05$)。治疗后第 4 天、第 7 天,A 组角膜 FL 评分较治疗前明显好转,差异有统计学意义(均为$P<0.05$),而 B 组角膜 FL 评分较治疗前无明显变化,差异无统计学意义($t_4=7.432$,$t_7=1.143$,均为 $P>0.05$);两组 FL 评分相比,差异有统计学意义($t_4=5.893$,$t_7=2.214$,均为$P<0.05$,见表 3)。C 组、D 组未行任何处理,治疗后第 1、4、7 天 FL 评分均未见明显改变(均为 $P>0.05$)。

**表 1　各组小鼠治疗前和治疗后各时间点SIT比较**　($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | 治疗前 SIT/mm | 治疗后SIT/mm | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 第 1 天 | 第 4 天 | 第 7 天 |
| A 组 | 16 | 2.68±0.53 | 3.12±0.44 | 4.37±0.64* | 5.88±0.64* |
| B 组 | 16 | 2.81±0.70 | 2.75±0.53 | 2.93±0.41 | 2.93±0.32 |
| C 组 | 16 | 2.75±0.46 | 2.68±0.25 | 2.87±0.44 | 2.75±0.46 |
| D 组 | 16 | 5.68±0.65 | 5.56±0.41 | 5.62±0.51 | 5.69±0.53 |

注:与 B 组、C 组相比,A 组自治疗后第 4 天起SIT差异均有统计学意义,*$P<0.05$

**表 2　各组小鼠治疗前和治疗后各时间点 BUT 比较**　($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | 治疗前 BUT/s | 治疗后 BUT/s | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 第 1 天 | 第 4 天 | 第 7 天 |
| A 组 | 16 | 3.80±0.83 | 4.20±0.44 | 5.20±0.83* | 5.20±1.30* |
| B 组 | 16 | 3.60±0.89 | 3.80±0.44 | 4.00±0.70 | 3.80±0.44 |
| C 组 | 16 | 3.60±0.89 | 3.60±0.54 | 3.60±0.54 | 3.80±0.44 |
| D 组 | 16 | 6.40±0.54 | 5.20±0.44 | 5.40±0.54 | 5.80±0.83 |

注:与 B 组、C 组相比,A 组自治疗后第 4 天起 BUT 差异有统计学意义,*$P<0.05$

**表 3　各组小鼠治疗前和治疗后各时间点角膜 FL 评分比较**　($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | 治疗前 | 治疗后 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 第 1 天 | 第 4 天 | 第 7 天 |
| A 组 | 16 | 4.20±1.30 | 3.80±1.09 | 2.00±1.00* | 0.40±0.54* |
| B 组 | 16 | 4.40±0.89 | 4.20±0.83 | 4.20±0.86 | 3.60±0.54 |
| C 组 | 16 | 4.80±0.83 | 4.40±0.54 | 4.04±0.70 | 4.00±0.71 |
| D 组 | 16 | 0 | 0.2±0.44 | 0 | 0 |

注:与 B 组相比,A 组自治疗后第 4 天起角膜 FL 评分差异有统计学意义,*$P<0.05$

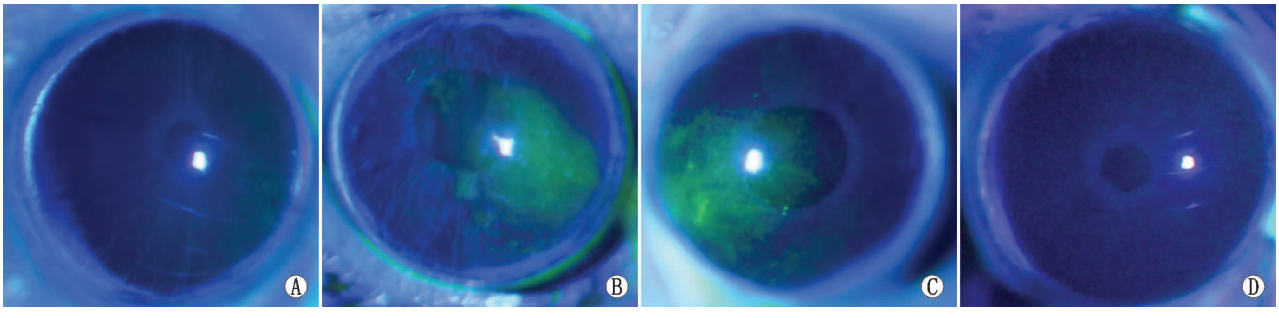


**图 1　治疗后第 7 天,各组小鼠角膜 FL 染色情况。**A～D 分别表示 A 组、B 组、C 组、D 组

**2.3 各组小鼠角膜 HE 染色情况比较** 正常角膜上皮 HE 染色常表现为整齐排列的 4 ~ 6 层上皮细胞,基底细胞为单层柱状上皮细胞层,排列紧密整齐。A 组治疗后第 7 天,角膜上皮细胞层数为(5 ± 1)层,组织形态基本恢复正常,大致整齐(图 2A)。B 组治疗后第 7 天角膜上皮细胞层数为(8 ± 1)层(图 2B),伴有表层上皮细胞损伤、脱落,角膜表面欠光滑(图 2B,箭头所示)。C 组滴眼后 2 周,角膜上皮细胞层数开始增多,上皮厚度增加,翼状细胞及基底细胞排列紊乱(图 2C)。D 组角膜上皮细胞 HE 染色排列紧密整齐,表现正常(图 2D)。各组小鼠角膜上皮层数 A 组较 B 组、C 组明显减少,差异均有统计学意义(均为 $P<0.05$),与 D 组相比,差异均无统计学意义(均为 $P>0.05$)。

**2.4 各组小鼠角膜超微结构的变化** 正常角膜上皮细胞会向外伸出许多微绒毛和微皱襞,排列整齐。通过透射电镜下可见 A 组丰富的微绒毛,呈指状突起,排列规则(图 3A);B 组存在微绒毛脱落、缺失,排列紊乱(图 3B);C 组未进行治疗,角膜上皮微绒毛可见明显减少、脱落、缺失,排列紊乱;D 组角膜上皮微绒毛形态呈指状突起,排列整齐,数量多;C 组也与 A 组和 D 组有很大差别(图 3C、D)。

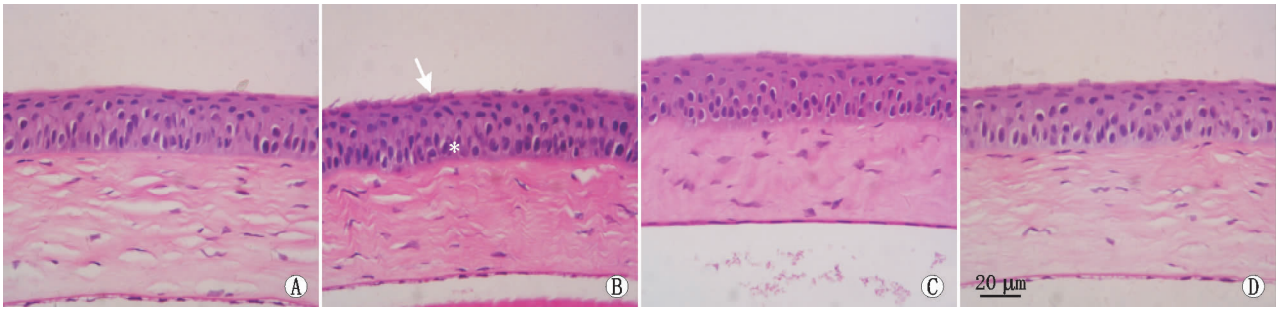


**图 2 治疗后第 7 天各组小鼠角膜组织 HE 染色情况。**A ~ D 分别表示 A 组、B 组、C 组、D 组。* 示排列紊乱的基底细胞及翼状细胞

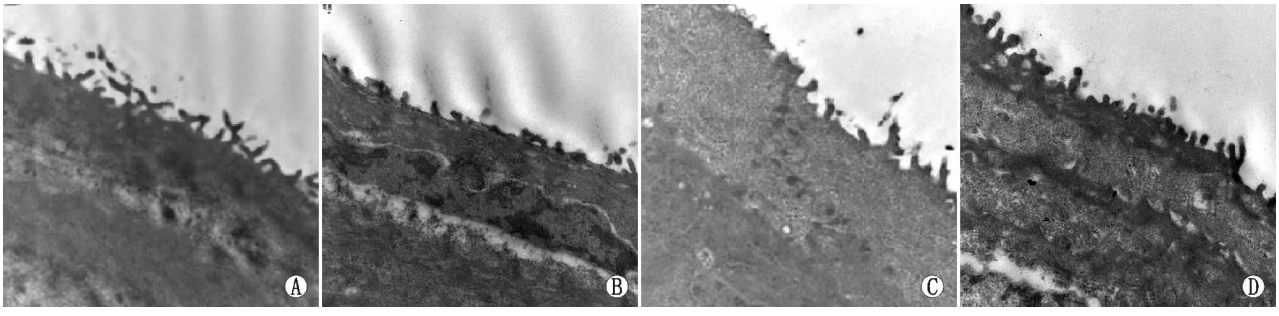


**图 3 治疗后第 7 天各组小鼠角膜组织透射电镜下超微结构情况**( ×10 000)。A ~ D 分别表示 A 组、B 组、C 组、D 组

## 3 讨论

外泌体是直径 30 ~ 150 nm 的双分子层囊泡,可以由几乎所有类型的细胞分泌释放出来,其中含有多种物质,且其内容物可随分泌细胞种类的不同而改变,在血液等体液内传播,包括外周血、尿液、唾液等,几乎分布于全身各处[13-16]。最初研究认为,外泌体就是一种简单的细胞排泄物,不具备生物学功能。然而,越来越多的研究证实外泌体在细胞间的交流通讯中发挥着重要作用,它能够携带其来源细胞的蛋白质、脂质及核酸,并将这些物质传递给附近或远处的受体细胞进而传递生物信号,影响细胞的微环境并调节相关蛋白的表达。此外,还有研究表明,外泌体还能够促进 T 细胞的免疫性能,通过呈递抗原到 CD4 + 或 CD8 + T 细胞,激活或者抑制免疫系统和调节补体系统来参与免疫反应的调节,进而很好地抵抗细菌的感染,抑制 T 淋巴细胞增殖和 IFN-γ 的释放,促进抗炎分子 IL-10 的分泌,并降低炎症分子 IL-1β、IL-6、TNF-α 和 IL-12 的转录[13]。同时,外泌体富含重要的蛋白和基因,具有调控和诱导修复受损组织细胞的功能[3-4]。而且与细胞相比,外泌体更加稳定而且储备容易,能够避免细胞治疗所带来的致瘤、致栓的不良后果,在体内或局部给药后发生免疫排斥反应的可能性小[6,17]。

目前,干眼患者在眼科门诊就诊的患者中占比率较大,2017 年国际泪膜和眼表协会干眼疾病工作组第二次会议(TFOS DEWS Ⅱ)的统计数据显示干眼患者正逐年增加,患病率在全球达到了 5% ~ 50%[8,18-19]。而炎症因素被认为是干眼的主要致病因素[19-21],因此本研究针对外泌体具有免疫抗原呈递、抑制炎症因子参与免疫调节、细胞自噬及组织损伤的修复等生物功能[13],而展开了外泌体对干眼治

疗的研究。本研究采用苯扎氯铵诱导的小鼠干眼模型、脐带血 MSC-Exo 作为研究材料。其中,苯扎氯铵是临床滴眼液中常用的防腐剂,经研究证实由苯扎氯铵诱导的小鼠干眼模型不仅在眼部临床体征上和人类干眼相似,在眼部组织病理改变中也与人类干眼改变大致相同[10,12]。而间充质干细胞是最容易获得的主要细胞之一,可以很容易地从脂肪组织、脐带血、肝脏、羊水、胎盘等多种组织中提取得来[13]。贾喆等[6]的研究中将 MSC-Exo 应用于角膜移植的动物模型,证实 MSC-Exo 对角膜移植排斥反应有一定的抑制作用。本研究通过将 MSC-Exo 制成混悬液对干眼模型小鼠进行治疗,发现外泌体混悬液能使干眼小鼠SIT增加,BUT 延长,角膜 FL 染色评分降低,从而表明 MSC-Exo 混悬液对干眼模型小鼠有一定的治疗作用。同时经外泌体治疗后小鼠角结膜的组织病理学及超微结构检测的结果也表明,经外泌体治疗后,小鼠角膜和结膜中浸润的炎症细胞较前减少,而且角膜上皮细胞形态更加规整,透射电镜结果显示外泌体治疗后的角膜上皮细胞连接规则,排列整齐,微绒毛浓密,相比模型组的微绒毛脱落和细胞连接缺失展现了明显的治疗效果。从而说明 MSC-Exo 混悬液可以减轻干眼小鼠角膜上皮的损伤,从而对干眼产生治疗作用。

眼表炎症目前被认为是干眼发生的关键因素,有研究表明,IL-6、IL-8、IL-1β 和 TNF-α 在各种类型的干眼患者及动物模型中均呈现高表达,干眼的结膜及角膜上皮本身均可以产生 IL-1β 和 TNF-α,它们不仅对干眼眼表炎症的发生及发展具有重要作用,而且其表达水平与干眼的严重程度正相关。本研究结果表明,MSC-Exo 能够降低炎症分子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的转录,激活或者抑制免疫系统和调节补体系统来参与免疫反应的调节,由此我们推测,MSC-Exo 混悬液可以通过降低这些与干眼相关的炎症分子 IL-1β、IL-6、TNF-α 而减轻干眼小鼠角膜上皮的损伤[11,19,22]。由于客观原因的限制,本研究并未进行相关炎症因子的进一步检测,将在后续研究中对外泌体治疗干眼的具体机制进行进一步研究。同时,有研究表明,外泌体和自噬存在协调机制,相互影响参与清除和排出细胞内受损或过剩的蛋白和细胞器[23],那么外泌体是否还能通过影响细胞自噬而调节泪液蛋白的分泌而对干眼起到一定的治疗作用还有待进一步研究。

## 参考文献

[1] ZHOU J,TAN X,TAN Y,LI Q,MA J,WANG G. Mesenchymal stem cell derived exosomes in cancer progression, metastasis and drug delivery:A Comprehensive Review[J]. *J Cancer*, 2018,9(17):3129-3137.

[2] NIEL G V,D'ANGELO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2018,19(4):213-228.

[3] HE C,ZHENG S,LUO Y. Exosome theranostics:biology and translational medicine[J]. *Theranostics*,2018,8(1):237-255.

[4] KLINGEBORN M,DISMUKE W M,RICKMAN C B,STAMER W D. Roles of exosomes in the normal and diseased eye[J]. *Prog Retin Eye Res*,2017,59:158-177.

[5] LI J J,HUI SHAO. Research progress of exosome in ocular fundus diseases[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2018,38(2):197-200.
李娟娟,HUI Shao. Exosome 在眼底疾病中的研究新进展[J]. 眼科新进展,2018,38(2):197-200.

[6] JIA Z,LI F,LV Y,ZENG X Y,LU X X,ZHAO S Z. Suppressive effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells on keratoplasty rejection[J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2018, 38(11):1010-1013.
贾喆,李斐,吕瑛,曾孝宇,路晓晓,赵少贞. 间充质干细胞来源外泌体(MSCs-exo) 对大鼠角膜移植排斥反应的抑制作用[J]. 眼科新进展,2018,38(11):1010-1013.

[7] MAAYAN C. Dry eye[J]. *N Engl J Med*,2018,379(11):e19.

[8] CRAIG J P,NICHOLS K K,AKPEK E K,CAFFERY B,DUA H S,JOO C K,*et al*. TFOS DEWS II Definition and Classification Report[J]. *Ocul Surf*,2017,15(3):276-283.

[9] LONG Q,UPADHYA D,HATTIANGADY B,*et al*. Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(17): E3536-3545.

[10] LIN Z,LIU X,ZHOU T,*et al*. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride[J]. *Mol Vis*,2011,17:257-264.

[11] LI J,TAN G,DING X,*et al*. A mouse dry eye model induced by topical administration of the air pollutant particulate matter 10[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,96:524-534.

[12] LIN Z,HE H,ZHOU T,*et al*. A mouse model of limbal stem cell deficiency induced by topical medication with the preservative benzalkonium chloride[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2013,54(9):6314-6325.

[13] YU B,ZHANG X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells[J]. *Int J Mol Sci*,2014,15(3):4142-4157.

[14] HE C,ZHENG S,LUO Y. Exosome theranostics:biology and translational medicine[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 237-255.

[15] MILANE L,SINGH A,MATTHEOLABAKISattheolabakis G,*et al*. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment[J]. *J Control Release*,2015,219:278-294.

[16] YU G,XIE F. Research progress of exosomes[J]. *Chin J Lab Diagn*,2017,21(12):2206-2208.
于歌,谢风. 外泌体的研究进展[J]. 中国实验诊断学,2017,21(12):2206-2208.

[17] MONGUIO-TORTAJADA M,LAUZURICA-VALDEMOROS R. Tolerance in organ transplantation:from conventional immunosuppression to extracellular vesicles[J]. *Front Immunol*,2014,5:416.

[18] STAPLETON F,ALVES M,BUNYA V Y,*et al*. TFOS DEWS II Epidemiology Report[J]. *Ocul Surf*,2017,15(3):334-365.

[19] SHAO Y. Interpretation of TFOS DEWS Ⅱ[J]. *Rec Adv Ophthalmol*,2018,38(1):1-12.
邵毅. 国际干眼新共识(TFOSDEWS Ⅱ)解读[J]. 眼科新进展,2018,38(1):1-12.

[20] OUSLER G,DEVRIES D K,KARPECKI P M. An evaluation of Retaine™ ophthalmic emulsion in the management of tear film stability and ocular surface staining in patients diagnosed with dry eye[J]. *Clin Ophthalmol*, 2015, 9: 235-243.

[21] BITTON E,LACROIX Z. *In vivo* heat retention comparison of eyelid warming masks[J]. *Cont Lens Anterior Eye*,2016, 39(4):311-315.

[22] CLAYTON J. Dry eye[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(23): 2212-2223.

[23] BAIXAULI F,LOPEZ-OTIN C. Exosomes and autophagy:coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness[J]. *Front Immunol*,2014,5(20):403.