

体外骨髓间充质干细胞对脂多糖活化的视网膜小胶质细胞生物学功能的影响

黄礼彬 徐国兴 谢茂松 林雯 崔乙 李剑冰

350005 福州,福建医科大学附属第一医院眼科 福建省眼科研究所

通信作者:徐国兴,Email:fjmuxgx@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.002

【摘要】 背景 视网膜小胶质细胞(RMG)的活化在视网膜变性疾病的发病过程中发挥重要作用,趋化因子 CX3C 模体配体 1(CX3CL1)参与小胶质细胞稳态的调节。骨髓间充质干细胞(BMSCs)可通过旁分泌的方式释放可溶性因子,保护中枢神经系统组织细胞的生物功能,但其对治疗视网膜变性疾病的途径和靶细胞是否为 RMG 尚不清楚。目的 观察 BMSCs 对脂多糖(LPS)活化的 RMG 生物学功能的影响,探讨 CX3CL1/CX3CR1 信号通路对二者相互作用的影响。方法 采用视网膜胶质细胞混合培养和振荡分离的方法分离培养 SD 大鼠 RMG,采用免疫荧光染色法观察细胞中 CD11b、Iba1 和谷氨酰胺合成酶(GS)的表达以鉴定培养的 RMG。在细胞培养液中添加 1 mg/ml 的 LPS 液 2 μ l 以刺激 RMG 24 h,然后将细胞分为 LPS 对照组、BMSCs 组和 CB-BMSCs 组,其中 BMSCs 组将 RMG 与 BMSCs 共培养 24 h,CB-BMSCs 组将 RMG 与中性抗体封闭 CX3CL1 的 BMSCs 共培养 24 h,未予 LPS 刺激的 RMG 作为空白对照组。采用 ELISA 法检测共培养体系中 RMG 分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的变化;采用 EdU 法观察各组 RMG 的增生能力;采用流式细胞术检测 RMG 吞噬荧光微球后的平均荧光强度(MFI);利用 Transwell 小室试验检测 RMG 的迁移细胞数。结果 用视网膜胶质细胞混合培养和振荡分离的方法成功分离和培养出 RMG,细胞中 CD11b 和 Iba1 阳性表达呈绿色荧光,GS 呈阴性表达。空白对照组、LPS 对照组、BMSCs 组和 CB-BMSCs 组细胞上清液中 TNF- α 的分泌量分别为(2.55 \pm 0.97)、(24.91 \pm 3.07)、(20.38 \pm 2.97)和(24.90 \pm 1.88) ng/ml,总体比较差异有统计学意义($F=119.90, P<0.05$);IL-1 β 的分泌量分别为(1.12 \pm 0.36)、(10.40 \pm 2.76)、(7.00 \pm 1.75)和(9.55 \pm 1.11) ng/ml,总体比较差异有统计学意义($F=34.96, P<0.05$);其中 BMSCs 组 TNF- α 和 IL-1 β 分泌量均低于 LPS 对照组(均 $P<0.05$),而 CB-BMSCs 组与 LPS 对照组间 TNF- α 和 IL-1 β 分泌量的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。各组间 RMG 增生率的总体比较差异有统计学意义($F=42.94, P<0.05$),其中 BMSCs 组 RMG 增生率明显低于 LPS 对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),而 BMSCs 组与 CB-BMSCs 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。各组间 RMG 的 MFI 值和迁移细胞数量的总体比较差异均有统计学意义($F=70.55、15.49, 均 P<0.05$),其中 BMSCs 组 MFI 值和迁移细胞数量均明显高于 LPS 对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),而 CB-BMSCs 组与 LPS 对照组间 MFI 值和迁移细胞数量的比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。结论 BMSCs 能够抑制 LPS 活化的 RMG 的增生能力,可能通过 CX3CL1/CX3CR1 信号通路来抑制活化的 RMG 分泌促炎性因子,并增强 RMG 的吞噬和迁移能力。

【关键词】 小胶质细胞/病理; 间充质干细胞/代谢; 趋化因子 CX3CL1/代谢; 视网膜变性; 炎症; 细胞培养; SD 大鼠

基金项目:国家自然科学基金项目(81271026)

***In vitro* effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the biological behavior of lipopolysaccharide-activated retinal microglia** Huang Libin, Xu Guoxing, Xie Maosong, Lin Wen, Cui Yi, Li Jianbing

Department of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian Institute of Ophthalmology, Fuzhou 350005, China

Corresponding author: Xu Guoxing, Email: fjmuxgx@163.com

【Abstract】 **Background** Retinal microglia (RMG) plays an important role in the pathogenesis of retinal degenerative diseases, while chemokine CX3CL1 participates in the regulation of steady-state of microglia. It has been determined that bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) have a remarkable role to modulate the immune response and protect the central nervous system through the release of soluble factors in a paracrine fashion and further affect the functional behavior of cells. However, whether BMSCs are able to interact with RMG and activate related signaling pathway for the maintaining of homeostasis in the retina is still unclear. **Objective** The aim of

this study was to investigate the interaction between BMSCs and lipopolysaccharide (LPS)-activated RMG *in vitro*, and dissect the effects of CX3CL1/CX3CR1 signaling pathway on the biological behavior of BMSCs and RMG.

Methods RMG was isolated from SD rats, cultured with mixed culture of retinal glial cells and purified by shaking. The cells were identified by detecting the expression of CD11b, Iba1 and glutamine synthetase (GS) with indirect immunofluorescence assay. LPS (1 mg/ml, 2 μ l) was added in the medium for 24 hours to stimulate RMG, and then the cells were divided into LPS control group, BMSCs group (cocultured with BMSCs for 24 hours) and CB-BMSCs group (cocultured with CX3CL1-blocking-BMSCs for 24 hours). The cells without LPS stimulation served as the blank control group. The functions of RMG, including the release content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β), the proliferation, phagocytosis, and migration of RMG were examined. **Results** RMG was successfully isolated and harvested from SD rats by using mixed culture of retinal glial cells and purified by shaking. CD11b and Iba1 showed the positive expression with the green fluorescence in the cells and GS was absent. The contents of TNF- α in the cell supernatant were (2.55 \pm 0.97) ng/ml, (24.91 \pm 3.07) ng/ml, (20.38 \pm 2.97) ng/ml and (24.90 \pm 1.88) ng/ml in the blank control group, LPS control group, BMSCs group and CB-BMSCs group, respectively, showing a significant difference among the groups ($F=119.90, P<0.05$). The contents of IL-1 β in the cell supernatant were (1.12 \pm 0.36) ng/ml, (10.40 \pm 2.76) ng/ml, (7.00 \pm 1.75) ng/ml and (9.55 \pm 1.11) ng/ml in the blank control group, LPS control group, BMSCs group and CB-BMSCs group, respectively, showing a significant difference among the groups ($F=34.96, P<0.05$). The secretory volume of TNF- α and IL-1 β were evidently lower in the BMSCs group than those in the LPS control group (both at $P<0.05$), and no significant differences were found in the secretory volume of TNF- α and IL-1 β between CB-BMSCs group and LPS control group (both at $P>0.05$). The proliferative rate of RMG was lower in the BMSCs group than that in the LPS control group ($P<0.05$), while there was no statistical difference between BMSCs group and CB-BMSCs group ($P>0.05$). The mean fluorescence intensity (MFI) and the number of migrated RMG were considerably different among the four groups ($F=70.55, 15.49$, both at $P<0.05$), and those in the BMSCs group were significantly increased in comparison with the LPS control group (both at $P<0.05$), while there was no significant difference between CB-BMSCs group and LPS control group (both at $P>0.05$). **Conclusions** BMSCs could suppress the proliferation of LPS-activated RMG. Moreover, BMSCs might inhibit proinflammatory cytokines releasing, enhance phagocytosis and migration capabilities of RMG via CX3CL1/CX3CR1 signaling pathway.

[Key words] Microglia/pathology; Mesenchymal stem cells/metabolism; Chemokine CX3CL1/metabolism; Retinal degeneration; Inflammation; Cells, cultured; Rat, SD

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271026)

骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有可塑性、神经保护、免疫调控等特性, 在视网膜变性疾病的治疗研究中受到了越来越多的关注^[1]。视网膜小胶质细胞 (retinal microglia, RMG) 的活化与遗传性视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD)、糖尿病视网膜病变等视网膜变性疾病的发生和发展关系密切^[2]。然而, RMG 能否作为 BMSCs 移植治疗视网膜变性疾病的靶细胞尚不十分明确。研究证实, 趋化因子 CX3C 模体配体 1 (chemokine C-X3-C motif ligand 1, CX3CL1) 是维持小胶质细胞稳态的主要调节器^[3], 其特异性受体 CX3C 趋化因子受体 1 (CX3C chemokine receptor 1, CX3CR1) 主要表达于小胶质细胞, 研究还发现, BMSCs 并不表达 CX3CR1, 但却能表达 CX3CL1^[4], 提示 BMSCs 与 RMG 可能存在信号交互, 因此在 BMSCs 眼内移植治疗视网膜变性疾病过程中, BMSCs 与活化 RMG 间的相互关系值得关注。本研究中建立 BMSCs 与活化 RMG 的体外共培养体系, 观察 BMSCs 对活化的 RMG 生物学功能的影响, 探讨

CX3CL1/CX3CR1 信号通路在 BMSCs 和 RMG 相互影响中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 4~6 周龄雄性 SD 大鼠 10 只, 体质量 80~100 g, 用于 BMSCs 的培养; SPF 级 0~3 日龄 SD 大鼠 36 只, 雌雄不限, 体质量 20~30 g, 用于 RMG 的培养。SD 大鼠均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK (沪) 2013-0006。所有大鼠均排除眼部及全身疾病, 实验过程遵循《实验动物管理条例》及《福建医科大学实验动物伦理委员会章程》。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养液、质量分数 0.025% 胰蛋白酶、体积分数 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 Gibco 公司); 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、荧光微球 (黄绿色荧光, 平均直径 1 μ m) (美国 Sigma 公司); EdU 细胞增生检测试剂盒 (广州锐博公司); 兔抗大鼠谷氨酰胺合成酶

(glutamine synthetase, GS) 抗体(英国 Abcam 公司);小鼠抗大鼠 CD11b 抗体(sc-53086)、小鼠抗大鼠 Iba1 抗体(sc-32725)、FITC-山羊抗小鼠 IgG 二抗(sc-2010)、CY3-山羊抗兔 IgG 二抗(sc-3739)(美国 Santa Cruz 公司);大鼠 CX3CL1 中和性抗体(AF573)(美国 R&D 公司);大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(美国 eBioscience 公司)。荧光倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);iMARK 酶标仪(美国 BioTek 公司);CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Forma 公司);Transwell 小室(0.4 μ m、8.0 μ m)(美国 Corning 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的培养及鉴定 采用全骨髓贴壁法^[5]从 4~6 周龄雄性分离并培养 BMSCs,采用间质干细胞成骨、成脂分化诱导试剂盒对每批第 3 代细胞进行诱导分化和鉴定,采用流式细胞术检测分化的细胞中细胞表面抗原 CD90、CD34 和 CD44 阳性细胞的比例。

1.2.2 大鼠 RMG 的培养及鉴定 参照文献[6-7]的方法行大鼠 RMG 的原代培养。采用质量分数 10% 水合氯醛溶液过量腹腔内注射麻醉法处死 0~3 日龄 SD 大鼠,无菌条件下摘取眼球,小心分离视网膜并剪成小片,采用胰蛋白酶消化 30 min,加入 1 ml 含 FBS 及质量分数 1% 小胶质细胞生长添加剂的 DMEM/F12 培养液终止消化,轻轻吹打形成细胞悬液,离心半径 15 cm,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,完全培养液重悬,接种于 75 cm² 培养瓶中,置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内培养。接种 24 h 后首次换液,培养 10 d 后第 2 次换液,将培养瓶置于 37 °C 恒温摇床上 200 r/min 振荡 1 h。收集培养液,移至 25 cm² 培养瓶中,培养后 24 h 换液,以后间隔 5 d 换液 1 次,共 3 次。传代后细胞间隔 1~2 d 换液,至细胞生长至 80% 融合后继续传代。对每批第 3 代细胞进行鉴定,用质量分数 4% 多聚甲醛室温下固定 30 min,滴加小鼠抗 CD11b 抗体(1:100)或兔抗 GS 抗体(1:300),湿盒内 4 °C 孵育过夜。室温放置 30 min,分别滴加 FITC-山羊抗小鼠 IgG(1:500)或 Cy3-山羊抗兔 IgG 二抗(1:500),37 °C 避光孵育 2 h,PBS 洗涤 3 遍。同型 IgG 抗体代替一抗作为阴性对照。滴加 DAPI 工作液复染核,室温下避光孵育 10 min,PBS 洗涤 3 遍,荧光显微镜下观察细胞中 CD11b 和 GS 的表达。

1.2.3 CX3CL1 中和性抗体封闭 BMSCs 将第 3 代的 BMSCs 按 1×10^5 /孔接种于 6 孔板,次日更换为新鲜的完全培养液,每孔 1 ml。每孔加入 200 μ g/ml

CX3CL1 中和抗体 5 μ l,轻晃混匀,37 °C 孵育 2 h,PBS 洗涤 2 遍,即为 CX3CL1 封闭的 BMSCs(CB-BMSCs)。

1.2.4 LPS 刺激 RMG 将第 3 代 RMG 按 1×10^5 /孔接种于 6 孔板,次日更换为新鲜的完全培养液,每孔 2 ml。每孔加入 1 mg/ml LPS 2 μ l,终质量浓度为 1 μ g/ml,振荡混匀,继续培养 24 h。

1.2.5 BMSCs 与 RMG 共培养体系的建立 将 LPS 刺激后的 RMG 分为 LPS 对照组、BMSCs 共培养组和 CB-BMSCs 共培养组,未予 LPS 刺激的正常培养的 RMG 作为空白对照组。将 BMSCs、CB-BMSCs 分别接种于孔径 0.4 μ m 的 Transwell 小室中,每个小室约 2×10^4 个细胞,对照组不进行接种。于培养后 24 h 更换为新鲜的完全培养液,每孔 1.5 ml。将小室置于预先接种 RMG 的 6 孔板上以建立共培养体系,放回培养箱培养 24 h。

1.2.6 ELISA 法检测共培养后 RMG 中 TNF- α 、IL-1 β 的表达情况 收集各组 RMG 上清液,按照 TNF- α 、IL-1 β 的 ELISA 试剂盒说明书进行检测。96 孔板每孔(除空白孔外)各加入标准品或待测样品 100 μ l,每孔中加入一抗工作液 50 μ l,充分混匀后 37 °C 条件下反应 120 min,洗板,滤纸印干;每孔加酶标抗体工作液 100 μ l,将反应板 37 °C 条件下反应 60 min,洗板,滤纸印干;每孔加入底物工作液 100 μ l,37 °C 条件下暗处反应 10 min;每孔加入 100 μ l 终止液混匀。30 min 内用酶标仪在 450 nm 波长处测吸光度(A)值。根据标准品测定结果,计算待测培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的质量浓度。每组设 3 个复孔,实验重复 6 次。

1.2.7 EdU 法检测共培养后 RMG 的增生能力 各组 RMG 按 EdU 细胞增生检测试剂盒说明书进行,每孔加入 50 μ mol/L EdU 培养液 100 μ l 孵育细胞 2 h,弃培养液,PBS 洗涤;每孔加入 4% 多聚甲醛 1 ml,室温下孵育 30 min,弃固定液;每孔加入 2 mg/ml 甘氨酸 250 μ l,脱色摇床孵育 5 min;PBS 洗涤,每孔加入渗透剂 500 μ l(含质量分数 0.5% TritonX-100 的 PBS),脱色摇床孵育 10 min;每孔加入 1 倍 Apollo[®] 染色反应液 500 μ l,避光、室温、脱色摇床孵育 30 min,弃染色反应液;加入渗透剂 500 μ l,脱色摇床清洗 2~3 次,每次 10 min,弃渗透剂;每孔加入甲醇 500 μ l 清洗 1~2 次,每次 5 min;PBS 洗涤,每孔加入 1 倍 Hoechst 33342 反应液 500 μ l,避光、室温、脱色摇床孵育 30 min,PBS 洗涤;采用 Image Pro Plus 6.0 软件计数 EdU 染色(红色荧光)和 Hoechst 33342 染色(蓝色荧光)的细胞数量。荧光显微镜下任意选取 6 个视野,计算细胞增生率。实验重复 3 次,取其平均值。

1.2.8 流式细胞术检测共培养后 RMG 吞噬能力 各组 RMG 消化后利用无血清的 DMEM/F12 培养液进行培养,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$,取 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液加入 1.5 ml EP 管中,并设立阴性对照管。将 EP 管置于 37°C 、 5% CO_2 培养箱内孵育 30 min ,每管加入荧光微球工作液 $10 \mu\text{l}$ (阴性对照管不加), 37°C 下轻轻振荡 30 min ,加入冰 PBS 终止吞噬。采用流式细胞术检测 FL-1 通道的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI), MFI 值越高,表明 RMG 的吞噬能力越强。实验重复 3 次。

1.2.9 共培养后 RMG 迁移能力的检测 利用孔径 $8 \mu\text{m}$ 的 Transwell 小室和 24 孔板进行细胞的迁移实验。于 Transwell 小室的下室中加入含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养液 $600 \mu\text{l}$,放上小室,置于培养箱内孵育 2 h 。各组 RMG 消化后,用含 2% FBS 的 DMEM/F12 培养液调整细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,在上室中分别加入各组 RMG 悬液 $100 \mu\text{l}$,放回培养箱中孵育 6 h ,用 4% 多聚甲醛固定 10 min ,风干。用质量分数 0.1% 结晶紫染液染色 20 min ,PBS 洗涤 3 遍,棉签擦去小室聚碳酸酯膜正面残留的细胞。光学显微镜下任意选取 6 个视野,采用 Image Pro Plus 6.0 软件计数跨膜的 RMG 数量。实验重复 6 次,取其平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件 (美国 IBM 公司) 进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间方差经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组、单因素干预多水平实验设计,空白对照组、LPS 对照组、BMSCs 组和 CB-BMSCs 组间 BMSCs 上清液中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 质量浓度以及各组 RMG 增生率、MFI 和迁移细胞数的总体差异比较均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 法。采用双尾检测法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态学特征

培养的第 3 代细胞贴壁生长,呈纺锤状,用间质干细胞成骨、成脂分化诱导后可分化为成骨细胞和脂肪细胞形态,CD90、CD34 和 CD44 表达的阳性细胞率分别为 $(95.21 \pm 2.13)\%$ 、 $(1.84 \pm 0.92)\%$ 和 $(96.75 \pm 3.30)\%$,证实为 BMSCs。

2.2 RMG 的形态学特征及鉴定

大鼠视网膜分离和培养后 1 d 可见细胞贴壁生长,细胞体为圆形或椭圆形,突起较少。原代培养后 3 d ,约半数细胞的胞体变长,突起增多,呈不对称分支状。

继续培养后 10 d ,分支状细胞占多数,细胞体变大,突起变长 (图 1A)。培养的第 3 代细胞 CD11b、Iba1 表达阳性,在荧光显微镜下呈绿色荧光 (图 1B,C),但不表达 GS,因此未见红色荧光 (图 1D)。阴性对照片均未见绿色或红色荧光。结合细胞的组织来源、细胞的形态特征及免疫荧光染色结果,证实为 RMG。

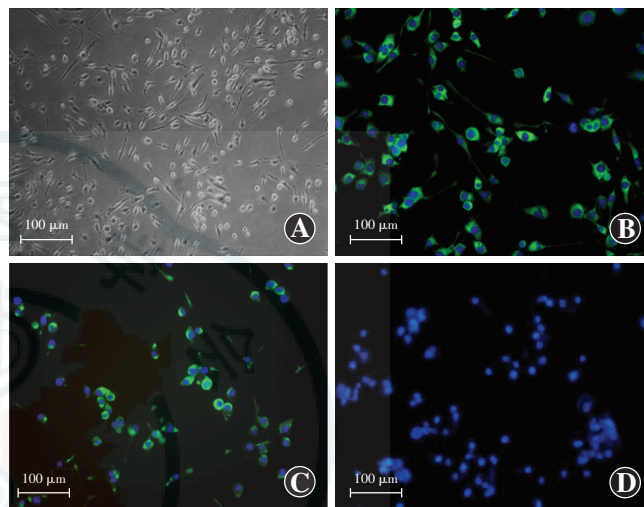


图 1 SD 大鼠 RMG 的培养及鉴定 (标尺 = $100 \mu\text{m}$) A: RMG 纯化分离后继续培养 10 d 可见分支状的细胞占多数 B: 培养的 RMG 中 CD11b 细胞表达阳性,呈绿色荧光 (FITC),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) C: 培养的 RMG 中 Iba1 细胞表达阳性,呈绿色荧光 (FITC),细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) D: 培养的 RMG 中未见 GS 表达 (Cy3),仅可见细胞核的蓝色荧光 (DAPI)

2.3 LPS 活化后 RMG 的形态学改变

LPS 刺激后 24 h ,RMG 的形态由分支状转变为阿米巴样,细胞大小不一,细胞体呈椭圆形或短棒状,突起变短,突起数量减少 (图 2)。

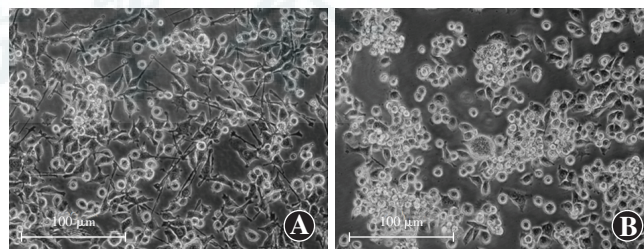


图 2 LPS 刺激前后 RMG 的形态学观察 (标尺 = $100 \mu\text{m}$) A: LPS 刺激前 RMG 细胞多呈分支状 B: LPS 刺激后 24 h 细胞呈阿米巴样

2.4 各组 BMSCs 上清液中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 的质量浓度

ELISA 法检测发现,空白对照组、LPS 对照组、BMSCs 组和 CB-BMSCs 组细胞上清液中 $\text{TNF-}\alpha$ 的质量浓度分别为 (2.55 ± 0.97) 、 (24.91 ± 3.07) 、 (20.38 ± 2.97) 和 $(24.90 \pm 1.88) \text{ ng/ml}$,总体比较差异有统计学意义 ($F = 119.90, P < 0.05$);空白对照组、LPS 对照组、

BMSCs 组和 CB-BMSCs 组细胞上清液中 IL-1 β 的质量浓度分别为 (1.12 \pm 0.36)、(10.40 \pm 2.76)、(7.00 \pm 1.75) 和 (9.55 \pm 1.11) ng/ml, 总体比较差异有统计学意义 ($F = 34.96, P < 0.05$)。LPS 对照组、BMSCs 组和 CB-BMSCs 组细胞上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 的质量浓度均明显高于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), BMSCs 组 TNF- α 和 IL-1 β 的质量浓度均明显低于 LPS 对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 而 CB-BMSCs 组与 LPS 对照组间细胞上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 质量浓度的比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (图 3)。

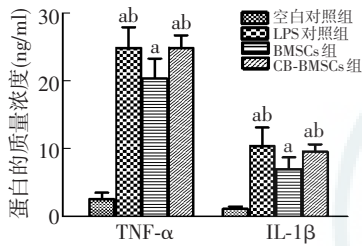


图 3 各组共培养体系上清液中 TNF- α 和 IL-1 β 的质量浓度 TNF- α : $F = 119.90, P < 0.05$; IL-1 β : $F = 34.96, P < 0.05$ 。与各自的空白对照组比较, $^a P < 0.05$, 与各自的 BMSCs 组比较, $^b P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK- q 检验, $n = 6$) LPS: 脂多糖; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素; BMSCs: 骨髓间充质干细胞; CB-BMSC: CX3CL1 封闭的骨髓间充质干细胞

2.5 各组共培养体系中 RMG 增生率的比较

EdU 细胞增生检测显示, LPS 对照组、BMSCs 组、CB-BMSCs 组和空白对照组 RMG 增生率的总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 42.94, P < 0.05$)。空白对照

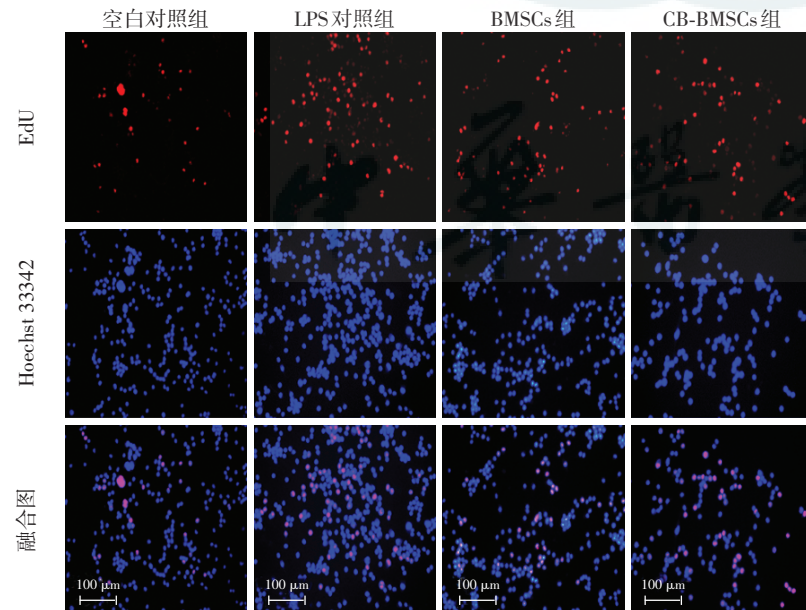


图 4 各组共培养体系中 RMG 的增生情况 (标尺 = 100 μ m) 增生的 RMG 呈红色荧光 (EdU), 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst33342)。空白对照组仅见少量增生 RMG, LPS 对照组增生的 RMG 数明显增多, BMSCs 组增生细胞少于 LPS 对照组, 而 CB-BMSCs 组增生细胞与 BMSCs 组无明显差别 LPS: 脂多糖; BMSCs: 骨髓间充质干细胞; CB-BMSCs: CX3CL1 封闭的 BMSCs

组、BMSCs 组、CB-BMSCs 组 RMG 的增生率明显高于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); BMSCs 组 RMG 增生率明显低于 LPS 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 CB-BMSCs 组与 BMSCs 组间 RMG 增生率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4, 表 1)。

表 1 各组共培养体系中 RMG 增生率、MFI 和迁移细胞数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	增生率 (%) ($n = 3$)	吞噬荧光微球后 MFI ($n = 3$)	迁移细胞数 (个) ($n = 6$)
空白对照组	10.98 \pm 2.67	26.99 \pm 4.23	23.33 \pm 5.51
LPS 对照组	38.21 \pm 4.01 ^a	63.74 \pm 2.84 ^{ac}	35.00 \pm 6.25 ^{ac}
BMSCs 组	28.09 \pm 3.40 ^{ab}	72.68 \pm 3.05 ^a	50.33 \pm 4.73 ^a
CB-BMSCs 组	29.61 \pm 3.70 ^{ab}	66.18 \pm 2.61 ^{ac}	40.33 \pm 2.52 ^{ac}
F	42.94	70.55	15.49
P	0.00	0.00	0.00

注: 与各自的空白对照组比较, $^a P < 0.05$; 与各自的 LPS 对照组比较, $^b P < 0.05$; 与各自的 BMSCs 组比较, $^c P < 0.05$ (单因素方差分析, SNK- q 检验) RMG: 视网膜小胶质细胞; MFI: 平均荧光强度; LPS: 脂多糖; BMSCs: 骨髓间充质干细胞; CB-BMSCs: CX3CL1 封闭的骨髓间充质干细胞

2.6 各组共培养体系中 RMG 吞噬能力的比较

采用流式细胞术检测 RMG 吞噬荧光微球后的 MFI。LPS 对照组、BMSCs 组、CB-BMSCs 组和空白对照组 MFI 值的总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 70.55, P < 0.05$), LPS 对照组、BMSCs 组、CB-BMSCs 组

RMG 的 MFI 值均高于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); BMSCs 组 RMG 的 MFI 值明显高于 LPS 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CB-BMSCs 组与 LPS 对照组间 RMG 的 MFI 值比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5, 表 1)。

2.7 BMSCs 对 RMG 迁移能力的影响

LPS 对照组、BMSCs 组、CB-BMSCs 组和空白对照组迁移细胞数量的总体比较, 差异有统计学意义 ($F = 15.49, P < 0.05$)。LPS 对照组、BMSCs 组、CB-BMSCs 组的迁移细胞数量明显多于空白对照组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。BMSCs 组迁移细胞数量多于 LPS 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 CB-BMSCs 组与 LPS 对照组迁移细胞数量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 6, 表 1)。

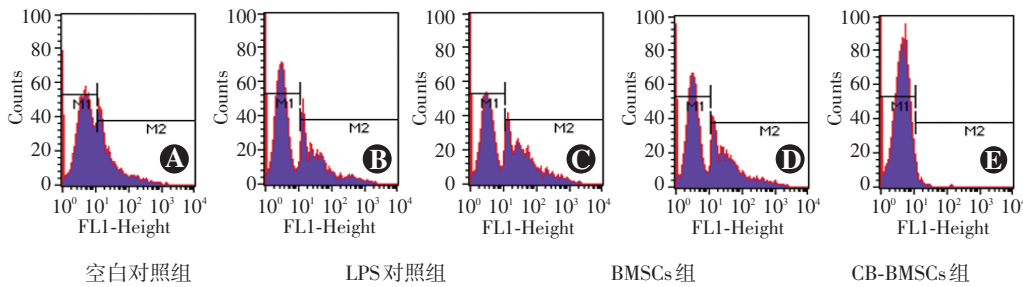


图 5 各组 RMG 吞噬荧光微球后的流式细胞图 LPS 对照组、BMSCs 组、CB-BMSCs 组 RMG 吞噬荧光微球后的 MFI 均高于空白对照组,而 BMSCs 组 RMG 的 MFI 高于 CB-BMSCs 组和 LPS 对照组 A:空白对照组 B:LPS 对照组 C:BMSCs 组 D:CB-BMSCs 组 E:阴性对照

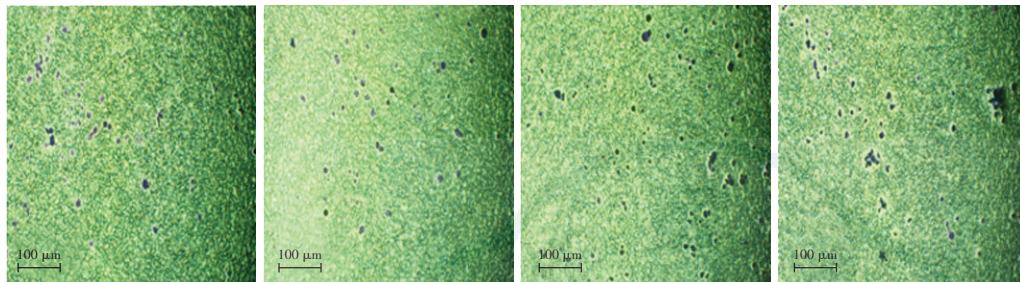


图 6 各组 RMG 迁移能力的检测(标尺 = 100 μm) 发生迁移的 RMG 呈紫色着色, LPS 对照组、BMSCs 组和 CB-BMSCs 组细胞迁移数量多于空白对照组,而 BMSCs 组细胞迁移数量高于 LPS 对照组和 CB-BMSCs 组 LPS: 脂多糖; BMSCs: 骨髓间充质干细胞; CB-BMSCs: CX3CL1 封闭的骨髓间充质干细胞

3 讨论

视网膜变性疾病是难治的致盲眼病,目前对其发病机制尚缺乏透彻的了解。研究认为, RMG 的活化及其诱发的炎症反应在视网膜变性疾病的发病过程中起到重要作用^[3]。在视网膜变性疾病发病的早期,各种应激反应均可引起 RMG 的活化。活化的 RMG 能分泌保护性因子,延缓感光细胞和视网膜神经节细胞的凋亡^[8]。然而, RMG 的过度或持续活化可产生蛋白酶、活性氧、促炎性因子等细胞毒性分子,诱发视网膜炎症反应,导致严重的病理性改变,最终形成不可逆性损伤^[9]。本研究中发现, LPS 刺激 RMG 后 24 h, RMG 形态发生改变,其分泌的 TNF-α 和 IL-1β 增加,且细胞的增生、吞噬和迁移能力增强,这与 Jiang 等^[10]的研究结果一致,证明 LPS 能够活化 RMG,有利于在体外模拟变性的视网膜上 RMG 的状态。现已证实, BMSCs 在中枢神经系统中能够调节小胶质细胞的活化状态,发挥神经保护和免疫调控作用^[11],而关于 BMSCs 能否与 RMG 相互作用,以激活相关信号通路,维持视网膜稳态的相关报道较少。

BMSCs 对视网膜炎症反应的调控是近年来研究的热点之一。在炎症微环境中, BMSCs 能够对炎症信号产生反应,释放 CX3CL1 等扩散性可溶性因子,发挥抗炎作用^[4,12]。CX3CL1 在体外通过抑制 TNF-α 等促炎性因子的分泌,下调诱导型氮氧化物合酶在 LPS 活化的小胶质细胞中的表达,扮演着抗炎分子的作用^[13]。本研究中也发现,与 BMSCs 共培养后,活化的 RMG 上清液中 TNF-α 和 IL-1β 的分泌量减少,而封闭 BMSCs 上的 CX3CL1 能够逆转 BMSCs 的这种抗炎作

用,提示 CX3CL1/CX3CR1 信号通路可能参与了 BMSCs 对 RMG 相关炎症反应的调控。

本研究中发现, RMG 与 BMSCs 共培养后, EdU 标志(即处于细胞周期 S 期)的 RMG 细胞百分数较 LPS 对照组降低,说明 BMSCs 能够降低 RMG 的增生率,这一现象可能与共培养后 RMG 自身分泌的 TNF-α、IL-1β 等促炎性因子的减少有关。BMSCs 能够选择性抑制淋巴细胞的增生活性,阻止单核细胞向树突状细胞分化,并遏制树突状细胞的成熟及其抗原递呈作用,而这些效应均需要炎症介质的参与^[14]。IL-1β 等促炎性因子可作为分裂素,刺激小胶质细胞的增生^[15]。Jose 等^[16]研究认为, BMSCs 的这种抗增生作用是 TNF-α 依赖性的, BMSCs 能够通过减少活化的小胶质细胞分泌 TNF-α,使其细胞周期恢复到活化前的水平,从而实现对其增生活性的抑制。本研究中发现, CB-BMSCs 同样能抑制 RMG 增生,与 BMSCs 比较差异无统计学意义,表明 RMG 增生可能受多种因素影响。

在 RMG 的吞噬能力方面,小胶质细胞具有吞噬 β 淀粉样蛋白的能力,减少其在脑部的沉积,减轻阿尔茨海默病的症状^[17]; RMG 还能吞噬侵入视网膜的真菌等微生物^[18]。衰老、细胞应激等能够促使表达 CX3CR1 的 RMG 吞噬变性或死亡的视网膜细胞,清除细胞碎片,而在相同条件下, CX3CR1 基因缺陷致使 RMG 吞噬能力减弱,引起大量细胞碎片的堆积,加重炎症反应,进一步诱导感光细胞凋亡,引发 AMD^[19]。本研究结果显示, BMSCs 能够增强活化的 RMG 的吞噬能力;相反,封闭 BMSCs 上的 CX3CL1 后,其吞噬能力与 LPS 对照组无显著差异,提示 BMSCs 表面的 CX3CL1 与 RMG 上的 CX3CR1 发生交联后可能有助

于 RMG 清除视网膜上的细胞碎片,延缓视网膜变性的进展。

本研究中对 RMG 迁移能力的实验表明, RMG 与 BMSCs 共培养能够促进活化的 RMG 发生迁移,而 CX3CL1 封闭后会抑制 BMSCs 的这种促迁移作用。活化的小胶质细胞能够迁移到损伤区域,这一过程由可溶性因子调控^[20],通过形成浓度梯度改变受损或病变的组织细胞外基质,引导小胶质细胞迁移。在视网膜光损伤体外模型中加入外源性 CX3CL1 能促进 RMG 的迁移,减少感光细胞凋亡^[21]。Combadiere 等^[22]研究发现,人类 *CX3CR1 M280* 基因多态性与 RMG 的迁移能力异常有关,增加了罹患 AMD 的风险。*CX3CR1* 基因敲除小鼠视网膜上 RMG 的迁移能力减弱,使 RMG 积聚于视网膜下腔,释放血管内皮生长因子,诱发与人 AMD 相似的形态学和病理学改变^[23]。

综上所述, BMSCs 能够在体外抑制 LPS 活化的 RMG 的增生能力,可能通过激活 CX3CL1/CX3CR1 信号通路增强 RMG 的吞噬和迁移能力,使 RMG 从致病性表型向保护性表型转变,减轻视网膜的炎症反应,从而维持视网膜微环境的相对稳定状态。然而, CX3CL1/CX3CR1 的下游通路如何传导以及是否有其他的信号通路参与 BMSCs 对 RMG 生物学功能的调控等问题尚未阐明,有待进一步研究。尽管如此,本研究在一定程度上解释了 BMSCs 眼内移植治疗视网膜变性疾病的作用机制,并为进一步开展相关的临床研究奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Xu W, Xu GX. Mesenchymal stem cells for retinal diseases [J]. Int J Ophthalmol, 2011, 4(4): 413-421. DOI:10.3980/j.issn.2222-3959.2011.04.19.
- [2] 李娟娟, 李燕. Fractalkine/cx3cr1 与小胶质细胞在眼底疾病中的研究进展 [J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(9): 861-864. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.021.
- [3] Li JJ, Li Y. Research progression of Fractalkine/cx3cr1 and microglia in retina diseases [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2015, 33(9): 861-864. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.021.
- [4] Xu H, Chen M, Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina [J]. Prog Retin Eye Res, 2009, 28(5): 348-368. DOI:10.1016/j.preteyeres.2009.06.001.
- [5] Giunti D, Parodi B, Usai C, et al. Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1 [J]. Stem Cells, 2012, 30(9): 2044-2053. DOI:10.1002/stem.1174.
- [6] 谢茂松, 徐国兴, 李琼, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养方法的比较 [J]. 国际眼科杂志, 2007, 7(5): 1285-1287.
- [7] Xie MS, Xu GX, Li Q, et al. Isolation and culture of rat marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Int J Ophthalmol, 2007, 7(5): 1285-1287.
- [8] 吴楠, 王艳华, 王蕊, 等. α 晶状体蛋白对脂多糖诱导的视网膜小胶质细胞增生及 TNF- α 表达的影响 [J]. 眼科研究, 2007, 25(12): 912-915.
- [9] Wu N, Wang YH, Wang R, et al. Effect of α -crystallin on lipopolysaccharide induced retinal microglia and expression of TNF- α [J]. Chin Ophthalmic Res, 2007.
- [10] Dong N, Li X, Xiao L, et al. Upregulation of retinal neuronal MCP-1 in the rodent model of diabetic retinopathy and its function *in vitro* [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(12): 7567-7575. DOI:10.1167/iovs.12-9446.
- [11] Harry GJ. Microglia during development and aging [J]. Pharmacol Ther, 2013, 139(3): 313-326. DOI:10.1016/j.pharmthera.2013.04.013.
- [12] Kaur C, Rathnasamy G, Ling EA. Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2013, 8(1): 66-78. DOI:10.1007/s11481-012-9347-2.
- [13] Jiang X, Ni Y, Liu T, et al. Inhibition of LPS-induced retinal microglia activation by naloxone does not prevent photoreceptor death [J]. Inflammation, 2013, 36(1): 42-52. DOI:10.1007/s10753-012-9518-6.
- [14] Kim YJ, Park HJ, Lee G, et al. Neuroprotective effects of human mesenchymal stem cells on dopaminergic neurons through anti-inflammatory action [J]. Glia, 2009, 57(1): 13-23. DOI:10.1002/glia.20731.
- [15] Zhou C, Zhang C, Chi S, et al. Effects of human marrow stromal cells on activation of microglial cells and production of inflammatory factors induced by lipopolysaccharide [J]. Brain Res, 2009, 1269: 23-30. DOI:10.1016/j.brainres.2009.02.049.
- [16] Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, et al. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system [J]. Brain Res, 2003, 979(1-2): 65-70. DOI:10.1016/S0006-8993(03)02867-1.
- [17] Xue Q, Luan XY, Gu YZ, et al. The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity [J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(1): 27-38. DOI:10.1089/scd.2009.0076.
- [18] Cuenca N, Fernandez-Sanchez L, Campello L, et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases [J]. Prog Retin Eye Res, 2014, 43: 17-75. DOI:10.1016/j.preteyeres.2014.07.001.
- [19] Jose S, Tan SW, Ooi YY, et al. Mesenchymal stem cells exert anti-proliferative effect on lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by reducing tumour necrosis factor-alpha levels [J/OL]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 149 [2015-12-02]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156657/>. DOI:10.1186/s12974-014-0149-8.
- [20] Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model [J]. Neurosci Lett, 2009, 450(2): 136-141. DOI:10.1016/j.neulet.2008.11.059.
- [21] Maneu V, Noailles A, Megias J, et al. Retinal microglia are activated by systemic fungal infection [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55(6): 3578-3585. DOI:10.1167/iovs.14-14051.
- [22] Chen J, Connor KM, Smith LE. Overstaying their welcome: defective CX3CR1 microglia eyed in macular degeneration [J]. J Clin Invest, 2007, 117(10): 2758-2762. DOI:10.1172/JCI33513.
- [23] Garden GA, Moller T. Microglia biology in health and disease [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2006, 1(2): 127-137. DOI:10.1007/s11481-006-9015-5.
- [24] Zhang M, Xu G, Liu W, et al. Role of fractalkine/CX3CR1 interaction in light-induced photoreceptor degeneration through regulating retinal microglial activation and migration [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(4): e35446 [2015-11-04]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035446>. DOI:10.1371/journal.pone.0035446.
- [25] Combadiere C, Feumi C, Raoul W, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration [J]. J Clin Invest, 2007, 117(10): 2920-2928. DOI:10.1172/JCI31692.
- [26] Liang KJ, Lee JE, Wang YD, et al. Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009, 50(9): 4444-4451. DOI:10.1167/iovs.08-3357.

(收稿日期: 2016-02-11)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)