

· 实验研究 ·

人脐带间充质干细胞对光诱导视网膜色素上皮细胞损伤的保护作用

庄宏¹ 张荣² 舒秦蒙¹ 章淑杰² 徐格致¹¹复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科 上海市视觉损害与重建重点实验室,上海 200031;²复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼科研究院,上海 200031

通信作者:徐格致,Email:drxugezhi@163.com

【摘要】 目的 体外观察脐带间充质干细胞(UCMSCs)对光诱导视网膜色素上皮(RPE)细胞损伤是否具有保护作用。方法 培养扩增人 UCMSCs,对 UCMSCs 的免疫表型进行流式检测鉴定。原代分离培养人眼 RPE 细胞,制备蓝光损伤的 RPE 细胞模型。利用 Transwell 小室建立光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 的非接触共培养体系。RPE 细胞分为正常对照组、模型对照组和 UCMSCs 共培养组。正常对照组不予处理,模型对照组采用蓝光照射诱导 RPE 细胞损伤,UCMSCs 共培养组为光损伤 RPE 细胞+UCMSCs 共培养。光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 共培养后 24 h 和 48 h,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组 RPE 细胞增殖活力;共培养 48 h,收集各组细胞培养上清液,酶联免疫吸附测定(ELISA)法定量检测色素上皮衍生因子(PEDF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)质量浓度,并进行 RPE 细胞吞噬感光细胞外节段膜盘(POS)试验。结果 UCMSCs 形态呈梭形,细胞表面抗原 CD29、CD44、CD90 和 CD105 呈阳性表达,同时细胞表面抗原 CD34 和 CD45 呈阴性表达。RPE 细胞呈多边形,阳性表达特异性标志物 RPE65 蛋白。各组共培养后不同时间点 RPE 细胞增殖能力(A 值)总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{组别}} = 132.388, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 231.440, P = 0.000$),其中培养后 24 h、48 h,模型对照组和 UCMSCs 共培养组的细胞 A 值均较正常对照组明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);UCMSCs 共培养组细胞在相应时间点的细胞 A 值显著高于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。RPE 细胞 POS 吞噬试验的量化计算结果显示,3 个组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数总体比较,差异有统计学意义($F = 28.087, P = 0.000$),其中模型对照组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数较正常对照组明显减少,UCMSCs 共培养组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数较模型对照组明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。ELISA 法检测结果显示,正常对照组、模型对照组和 UCMSCs 共培养组 RPE 细胞上清液中 PEDF 质量浓度分别为 (18.8 ± 1.9) 、 (10.0 ± 1.7) 和 (20.2 ± 6.0) ng/ml, bFGF 质量浓度分别为 (25.2 ± 1.5) 、 (26.3 ± 3.6) 和 (61.9 ± 14.3) pg/ml,总体比较差异均有统计学意义($F = 8.654, P = 0.008; F = 23.698, P = 0.000$)。模型对照组 PEDF 质量浓度较正常对照组明显下降,UCMSCs 共培养组 PEDF 质量浓度较模型对照组明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);UCMSCs 共培养组 bFGF 质量浓度较正常对照组和模型对照组均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结论 与 UCMSCs 非接触共培养可以改善光损伤 RPE 细胞的增殖能力和吞噬功能,促进 RPE 细胞分泌 PEDF。UCMSCs 可能通过旁分泌的方式分泌 bFGF,减轻 RPE 细胞的光损伤。

【关键词】 视网膜;脐带间充质干细胞;光损伤;视网膜色素上皮细胞;神经营养作用**基金项目:** 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(2013CB967503);国家自然科学基金项目(81600739)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.003

Protective effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on light-damaged retinal pigment epithelial cells

Zhuang Hong¹, Zhang Rong², Shu Qinmeng¹, Zhang Shujie², Xu Gezhi¹¹Department of Ophthalmology, Eye and ENT Hospital of Fudan University, Shanghai Key Laboratory of Visual Impairment and Restoration, Shanghai 200031, China; ²Eye Institute, Eye and ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200031, China

Corresponding author: Xu Gezhi, Email: drxugezhi@163.com

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells

(UCMSCs) on light-damaged retinal pigment epithelial (RPE) cells *in vitro*. **Methods** Human UCMSCs were cultured, and then identified by flow cytometry. Human RPE cells were isolated and cultured, and then the model of light-damaged RPE cells was prepared. The noncontact co-culture system of light-damaged RPE cells and UCMSCs was established by Transwell chamber. RPE cells were divided into normal control group, model control group and UCMSCs co-culture group. RPE cells in the normal control group were not treated. RPE cells in the model control group were treated with blue light to induce RPE cell damage. Co-culture system of light-damaged RPE cells and UCMSCs was established in the UCMSCs co-culture group. The proliferative ability of RPE cells was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay at 24 hours and 48 hours after co-culture. ELISA kits were used to quantitatively measure the levels of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in the culture supernatant at 48 hours after co-culture. And the photoreceptor outer segments (POS) phagocytosis assay of RPE cells was also conducted. **Results** UCMSCs displayed spindle-shaped morphology, positively expressed CD29, CD44, CD90 and CD105, while negatively expressed CD34 and CD45. RPE cells were polygonal in morphology and positive for the specific marker RPE65 protein. The proliferative ability (*A* value) of RPE cells in the three groups at different timepoints were significantly different ($F_{\text{group}} = 132.388, P = 0.000; F_{\text{time}} = 231.440, P = 0.000$), the *A* values of RPE cells in model control group and UCMSCs co-culture group were significantly lower than that in the normal control group, the *A* value of RPE cells in UCMSCs co-culture group was significantly higher than that in the model control group, and the differences were statistically significant both at 24 hours and 48 hours after co-culture (all at $P < 0.01$). POS phagocytosis test showed that there was a significant difference in the average number of POS particles phagocytized by RPE cells among the three groups ($F = 28.087, P = 0.000$). The average number of POS particles phagocytized by RPE cells in model control group was significantly lower than that in normal control group, and the average number of POS particles phagocytized by RPE cells in UCMSCs co-culture group was significantly more than that in model control group (all at $P < 0.01$). ELISA showed that the concentrations of PEDF in RPE cell supernatant of normal control group, model control group and UCMSCs co-culture group were $(18.8 \pm 1.9), (10.0 \pm 1.7)$ and (20.2 ± 6.0) ng/ml, respectively. The concentrations of bFGF in RPE cell supernatant were $(25.2 \pm 1.5), (26.3 \pm 3.6)$ and (61.9 ± 14.3) pg/ml, respectively. There were significant differences in PEDF and bFGF concentrations among the three groups ($F = 8.654, P = 0.008; F = 23.698, P = 0.000$). The concentration of PEDF in the model control group was significantly lower than that in the normal control group, and the concentration of PEDF in the UCMSCs co-culture group was significantly higher than that in the model control group (all at $P < 0.01$). The concentration of bFGF in UCMSCs co-culture group was significantly higher than that in the normal control group and model control group (all at $P < 0.01$). **Conclusions** Cocultivation with UCMSCs can improve the proliferation ability and phagocytosis function of light-damaged RPE cells, and promote the secretion of PEDF by RPE cells. UCMSCs may protect RPE cells from light damage through paracrine secretion of bFGF.

[Key words] Retina; Umbilical cord mesenchymal stem cells; Light damage; Retinal pigment epithelial cells; Neurotrophic effect

Fund program: National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2013CB967503); National Natural Science Foundation of China (81600739)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.003

视网膜变性疾病包括年龄相关性黄斑变性和视网膜色素变性等,会导致严重视觉障碍,是世界范围内主要的不可逆性致盲眼病。视网膜变性以进行性感光细胞死亡和视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞病变为特征,目前尚缺乏有效的治疗手段。近年来,干细胞技术的兴起为视网膜变性的治疗带来曙光^[1]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是起源于中胚层的多能干细胞,可来源于骨髓、脐带等组织。MSCs具有多向分化的潜能,并可以规避

使用胚胎干细胞带来的伦理争议和成瘤风险。既往研究证实, MSCs 可以跨胚层分化为神经外胚层细胞,比如神经元样细胞或者视网膜细胞^[2-4]。因此许多研究者尝试应用 MSCs 治疗视网膜变性等神经退行性疾病^[5-8]。MSCs 的另一个重要特性是细胞旁分泌功能,从而发挥神经保护和免疫调节作用^[9-10]。已有研究表明, MSCs 可通过旁分泌的方式分泌多种神经营养因子,包括碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、脑源性神经营养因子(brain-

derived neurotrophic factor, BDNF) 等^[11-13]。Hsieh 等^[14]比较分析骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 和脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs) 的神经保护作用,发现 BMSCs 和 UCMSCs 均具有保护皮层神经元的作用,而 UCMSCs 可以更好地促进神经元突触生长和减少缺氧神经元的死亡。既往研究表明,UCMSCs 具有神经营养作用,并且脐带组织较骨髓组织取材方便^[12-14]。然而,关于 UCMSCs 对于 RPE 细胞功能的影响并不明确,目前仅有个别研究报道^[15]。本实验将建立 UCMSCs 与 RPE 细胞的非接触共培养体系,观察 UCMSCs 是否可以起到保护光损伤 RPE 细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (fetal bovin serum, FBS)、质量分数 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 流式检测抗体 CD29-PE (557332)、CD44-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) (555478)、CD90-PE (561970)、CD105-APC (562408)、CD34-PE (550761)、CD45-PerCP-Cy5.5 (564105) (美国 Becton Dickinson 公司); 小鼠抗人 RPE65 单克隆抗体 (NB100-355) (美国 Novus 公司); Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (A0428) (美国 Invitrogen 公司); 核酸荧光染料 DAPI (美国 Molecular Probes 公司); FITC、四甲基偶氮唑盐 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司); 色素上皮衍生因子 (pigment epithelium-derived factor, PEDF) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (CYT420) (美国 Merck Millipore 公司); bFGF ELISA 试剂盒 (DFB50) (美国 RD 公司)。细胞培养板、Transwell 小室 (美国 Corning 公司); 体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); 倒置相差显微镜、荧光显微镜 (德国 Leica 公司); Synergy H1 多功能酶标仪 (美国 BioTek Instruments 公司)。

1.2 方法

1.2.1 UCMSCs 的培养与鉴定 UCMSCs 由课题组所在实验室前期从人脐带华通氏胶中分离获得^[2]。UCMSCs 采用含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况。细胞生长至 80%~90% 融合时,进行传代培养。取第 3~5 代 UCMSCs 用于后续实验。取第 3 代 UCMSCs 进行细胞免疫表型的鉴定。制备 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的 UCMSCs 单细胞

悬液,分别加入 CD29-PE、CD44-FITC、CD90-PE、CD105-APC、CD34-PE、CD45-PerCP-Cy5.5 荧光标记抗体 (抗体浓度均为 1:500),避光孵育 30 min,离心半径 12 cm,1 000 r/min 离心 5 min,磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 充分洗涤后,立即进行流式细胞仪检测分析。

1.2.2 原代 RPE 细胞的分离培养及鉴定 用于原代分离 RPE 细胞的眼球来自复旦大学附属眼耳鼻喉科医院眼库,为角膜移植术后的供体眼球。无菌条件下,用眼科剪环形剪除眼球前段组织,轻柔去除玻璃体和视网膜神经上皮层,保留剩余眼杯。向眼杯内加入 0.25% 胰蛋白酶,37 °C 条件下消化 30 min,吸除消化液,用小牛血清终止消化,并用吸管轻轻吹打眼球内壁促使 RPE 细胞脱落,获得 RPE 细胞悬液。用培养液调整 RPE 细胞密度至 $5 \times 10^4/\text{ml}$,接种于细胞培养瓶中,用含 10% FBS 的 DMEM/F12 继续培养,10~14 d 后 RPE 细胞汇合,进行传代培养扩增。取第 3~6 代 RPE 细胞用于后续实验。采用 RPE 细胞特异性标志物 RPE65 进行免疫荧光染色,对分离得到的 RPE 细胞进行鉴定。细胞用质量分数 4% 多聚甲醛固定后,体积分数 0.2% Triton X-100 透膜处理,山羊血清封闭 30 min。滴加小鼠抗人 RPE65 单克隆抗体 (1:200) 4 °C 孵育过夜,滴加 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:500) 避光孵育 1 h,滴加 DAPI 复染细胞核。抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察到 RPE 细胞发绿色荧光鉴定为阳性表达 RPE65 蛋白。

1.2.3 RPE 细胞实验分组 将 RPE 细胞分为正常对照组、模型对照组和 UCMSCs 共培养组。正常对照组不予处理,模型对照组采用蓝光照射诱导 RPE 细胞损伤,UCMSCs 共培养组为光损伤 RPE 细胞+UCMSCs 共培养,通过 Transwell 小室建立光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 非接触共培养体系。

1.2.4 RPE 细胞光损伤模型的制备 采用自制直排蓝光灯管照射装置,蓝光波长为 450~500 nm,在 37 °C 恒温细胞培养箱中照光,以维持细胞培养的温度和湿度等条件。对照组的 RPE 细胞培养板用锡箔纸完全包裹避光,放置于同一细胞培养箱中。RPE 细胞的蓝光照射光强度为 5 000 lx,光照时长为 1 h。

1.2.5 光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 非接触共培养 采用 Transwell 小室建立光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 的非接触共培养体系。Transwell 膜孔径为 0.4 μm ,细胞不能迁移通过,但允许可溶性蛋白分子自由通过。将 RPE 细胞按照 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于细胞培养板,同时将 UCMSCs 按照 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种于

Transwell 小室,2 种细胞分别培养 1 d 后,对 RPE 细胞行蓝光照射 1 h。然后将含有 UCMSCs 的 Transwell 嵌套小室插入含有光损伤 RPE 细胞的培养板内,实行 2 种细胞的非接触共培养(图 1)。

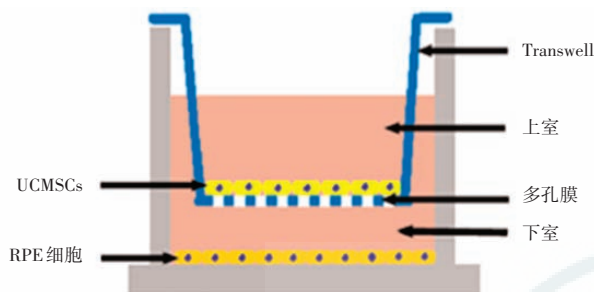


图 1 2 种细胞非接触共培养模式图 注:UCMSC:脐带间充质干细胞;RPE:视网膜色素上皮

1.2.6 MTT 法检测 RPE 细胞增生活力 光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 共培养后 24 h 和 48 h,采用 MTT 法检测各组 RPE 细胞增生活力。在 RPE 细胞培养孔内加入含质量分数 10% MTT 的培养液,37 °C 恒温细胞培养箱中继续培养 4 h,轻轻吸去含 MTT 的培养液,加入等量的 DMSO,在摇床上低速振荡 10 min,使紫色结晶物完全溶解。在酶标仪上测定波长 570 nm 处吸光度(A)值。

1.2.7 感光细胞外节段膜盘分离提取与 RPE 细胞吞噬试验 光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 共培养后 48 h,收集各组细胞培养上清液并进行 RPE 细胞吞噬试验。根据 Papermaster 等^[16]描述的方法,分离提取猪视网膜感光细胞外节段膜盘(photoreceptor outer segments,POS)。由于分离提取 POS 的过程包括剧烈振荡和超速离心等步骤,最终得到的 POS 呈细小颗粒状。采用 1 mg/ml FITC 染液(发绿色荧光)标记分离提取的 POS。将含有 1×10^7 /ml POS 的细胞培养液加入 RPE 细胞培养孔内,37 °C 细胞培养箱内孵育 12 h。吸除含 POS 的细胞培养液,以 PBS 漂洗 2 次,终止 RPE 细胞吞噬 POS 的过程。用质量分数 0.2% 锥虫兰处理细胞 10 min,以猝灭结合于 RPE 细胞表面的 POS 荧光颗粒。PBS 漂洗 3 次后,用 DAPI 染核。荧光显微镜下,任意选择 10 个 200 倍镜视野,拍照记录图片。POS 颗粒发出绿色荧光,细胞核 DAPI 染色发出蓝色荧光。采用 Image J 图像软件,自动分析每个视野图片中细胞内吞噬的 POS 颗粒,以及 DAPI 标记的细胞核总数。每个 RPE 细胞的平均吞噬 POS 颗粒数(颗粒数/细胞)=吞噬总颗粒数/细胞核总数。

1.2.8 ELISA 法检测细胞上清液中细胞因子质量浓度 收集细胞培养上清液,采用 ELISA 试剂盒定量检测上清液中 PEDF 和 bFGF 质量浓度。根据试剂盒说

明书进行加样、洗板、加酶结合抗体、洗板和显色。在终止反应 30 min 内读板,在酶标仪上测定波长 450 nm 处 A 值。按照梯度稀释的标准品 A 值,绘制细胞因子浓度的标准曲线。根据标准曲线,计算样本上清液中 PEDF、bFGF 质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(美国 SPSS 公司)进行统计分析。定量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。正常对照组、模型对照组和 UCMSCs 共培养组培养后不同时间点细胞 A 值的总体差异比较采用两因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。3 个组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数、PEDF 质量浓度、bFGF 质量浓度的总体差异比较均采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UCMSCs 与 RPE 细胞的形态特征与鉴定

UCMSCs 贴壁生长,大部分细胞呈梭形(图 2A)。汇合后的梭形 UCMSCs 呈漩涡状生长(图 2B)。细胞免疫表型流式细胞术检测结果显示,实验中使用的 UCMSCs 阳性(>95%)表达细胞表面抗原 CD29、CD44、CD90 和 CD105,同时阴性表达(<2%)细胞表面抗原 CD34 和 CD45(图 2C),符合 MSCs 的免疫表型特点。

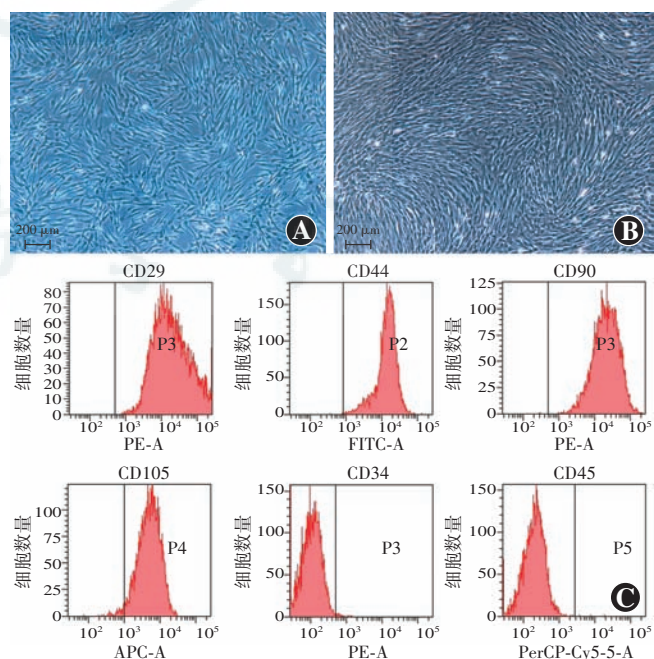


图 2 UCMSCs 形态观察与免疫表型流式细胞术鉴定 A:UCMSCs 呈梭形 B:UCMSCs 汇合后呈漩涡状生长(标尺=200 μm) C:UCMSCs 细胞免疫表型流式鉴定 UCMSCs 阳性表达细胞表面抗原 CD29、CD44、CD90 和 CD105,同时阴性表达细胞表面抗原 CD34 和 CD45

倒置显微镜下可见刚贴壁的原代 RPE 细胞富含棕黑色的色素颗粒,细胞核呈清晰透明状(图 3A)。RPE 细胞在传代过程中色素颗粒逐渐脱失。RPE 细胞汇合后呈典型铺路石样生长,细胞呈多边形(图 3B)。RPE 细胞免疫荧光染色鉴定显示,RPE 细胞均阳性表达特异性标志物 RPE65 蛋白(图 3C)。

2.2 各组 RPE 细胞增生情况比较

各组共培养后不同时间点 RPE 细胞增生能力(A 值)总体比较,差异均有统计学意义($F_{\text{组别}} = 132.388$, $P = 0.000$; $F_{\text{时间}} = 231.440$, $P = 0.000$),其中培养后 24 h、48 h,模型对照组和 UCMSCs 共培养组细胞 A 值均较正常对照组明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);UCMSCs 共培养组细胞在相应时间点的 A 值显著高于模型对照组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)(表 1)。

表 1 各组共培养后不同时间点细胞增生能力比较 (mean $\pm$ SD, A 值)

组别	样本量	不同时间点细胞 A 值	
		24 h	48 h
正常对照组	5	0.524 $\pm$ 0.022	0.731 $\pm$ 0.025
模型对照组	5	0.371 $\pm$ 0.019 ^a	0.491 $\pm$ 0.020 ^a
UCMSCs 共培养组	5	0.413 $\pm$ 0.014 ^{ab}	0.553 $\pm$ 0.020 ^{ab}

注: $F_{\text{组别}} = 132.388$, $P = 0.000$; $F_{\text{时间}} = 231.440$, $P = 0.000$. 与各自时间点正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与各自时间点模型对照组比较, ^b $P < 0.01$ (两因素方差分析, LSD- t 检验) UCMSCs: 脐带间充质干细胞

2.3 各组 RPE 细胞吞噬 POS 情况比较

分离提取的 POS 经 FITC 标记后,在荧光显微镜下发出绿色荧光(图 4A)。RPE 细胞吞噬 POS 颗粒后,胞内 POS 发绿色荧光,DAPI 染核呈蓝色荧光(图 4B)。

RPE 细胞 POS 吞噬试验量化计算结果显示,正常对照组、模型对照组和 UCMSCs 共培养组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数分别为(12.5 $\pm$ 1.1)、(7.7 $\pm$ 0.6)和(12.8 $\pm$ 1.4)个/细胞,3 个组总体比较差异有统计学意义($F = 28.087$, $P = 0.000$),其中模型对照组 RPE 细胞

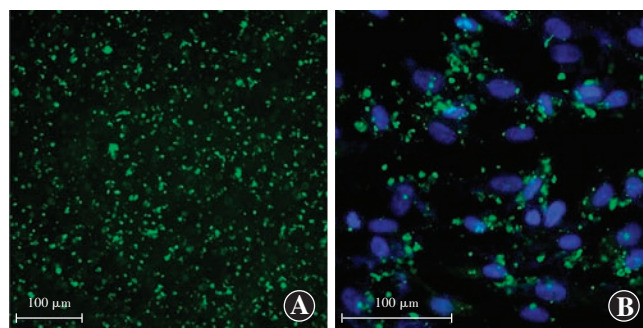


图 4 FITC 标记 POS 及 RPE 细胞吞噬 POS 颗粒的荧光显微镜观察(标尺 = 100 μ m) A: FITC 标记的 POS 颗粒 B: 吞入 RPE 细胞内的 POS 颗粒(绿色荧光)围绕于 DAPI 染色的细胞核(蓝色荧光)周围

平均吞噬 POS 颗粒数较正常对照组明显减少,UCMSCs 共培养组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数较模型对照组明显增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);UCMSCs 共培养组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 5)。

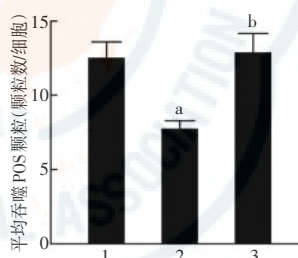


图 5 3 个组 RPE 细胞平均吞噬 POS 颗粒数比较 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型对照组比较, ^b $P < 0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n = 4$) 1: 正常对照组 2: 模型对照组 3: UCMSCs 共培养组 注: POS: 感光细胞外节段膜盘

2.4 各组细胞上清液中 PEDF、bFGF 质量浓度比较

ELISA 法检测结果显示,正常对照组、模型对照组和 UCMSCs 共培养组 RPE 细胞上清液中 PEDF 质量浓度分别为(18.8 $\pm$ 1.9)、(10.0 $\pm$ 1.7)和(20.2 $\pm$ 6.0) ng/ml,总体比较差异有统计学意义($F = 8.654$, $P = 0.008$),其中模型对照组 PEDF 质量浓度较正常对照组明显下降,UCMSCs 共培养组 PEDF 质量浓度较模型对照组明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);UCMSCs 共培养组 PEDF 质量浓度与正常对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(图 6A)。

正常对照组、模型对照组和 UCMSCs 共培养组 bFGF 质量浓度分别为(25.2 $\pm$ 1.5)、(26.3 $\pm$ 3.6)和(61.9 $\pm$ 14.3) pg/ml,总体

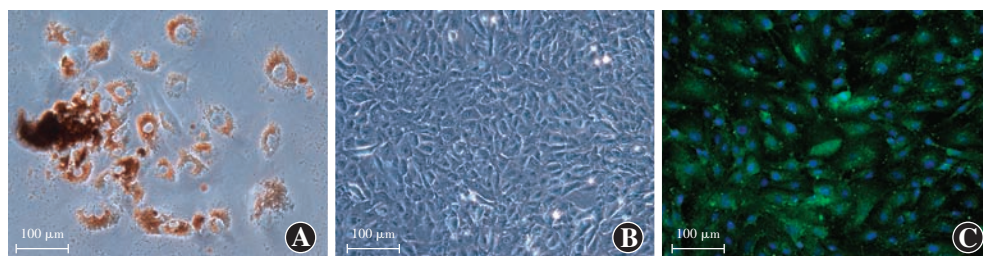


图 3 RPE 细胞形态观察及免疫荧光染色鉴定(标尺 = 100 μ m) A: 刚贴壁的原代 RPE 细胞富含色素颗粒 B: 汇合时的 RPE 细胞呈铺路石样生长,细胞呈多边形 C: RPE 细胞阳性表达特异性标志物 RPE65 (Alexa Fluor 488 标记二抗呈绿色荧光),DAPI 染色的细胞核呈蓝色荧光

比较差异有统计学意义 ($F=23.698, P=0.000$), 其中正常对照组和模型对照组 RPE 细胞上清液中均仅检测到低质量浓度 bFGF, 2 个组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); UCMSCs 共培养组 bFGF 质量浓度较正常对照组和模型对照组均明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$) (图 6B)。

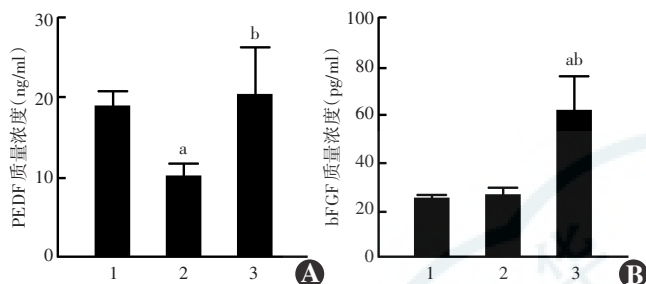


图 6 3 个组 RPE 细胞培养上清液中细胞因子质量浓度比较 A: 3 个组 RPE 细胞培养上清液中 PEDF 质量浓度比较 与正常对照组比较, $^a P<0.01$; 与模型对照组比较, $^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=5$) B: 3 个组 RPE 细胞培养上清液中 bFGF 质量浓度比较 与正常对照组比较, $^a P<0.01$; 与模型对照组比较, $^b P<0.01$ (单因素方差分析, LSD- t 检验, $n=5$) 1: 正常对照组 2: 模型对照组 3: UCMSCs 共培养组 注: PEDF: 色素上皮衍生因子; bFGF: 碱性成纤维细胞生长因子

3 讨论

RPE 细胞具有营养支持感光细胞的作用, 包括参与视色素循环、吞噬消化 POS 等。如果 RPE 细胞发生功能障碍, 会继发视网膜感光细胞变性死亡, 造成视网膜变性发生和发展^[17]。视网膜变性的治疗应考虑如何维持和恢复 RPE 细胞的生理功能。UCMSCs 具有旁分泌功能, 可分泌多种神经营养因子, 包括 bFGF、BDNF 等^[12-14]。因此本研究中尝试观察 UCMSCs 对于光损伤 RPE 细胞的影响。

通常认为蓝光照射引起 RPE 细胞光化学损伤, 可能与氧化应激反应有关^[18]。RPE 细胞的损伤程度与蓝光照射剂量有直接关系。在前期预实验的基础上, 本研究中采用蓝光照射光照度为 5 000 lx, 光照时长为 1 h。在前期预实验中, 我们曾检测 RPE 细胞光照后凋亡/坏死情况, 发现该光照剂量下 RPE 细胞凋亡/坏死的比率均低于 2%, 说明该蓝光照射剂量虽未达到致死剂量, 但会造成 RPE 细胞增生能力下降和吞噬功能障碍。本研究中发现, 与 UCMSCs 共培养后, 光损伤 RPE 细胞的增生能力和 POS 吞噬能力得到显著改善。

PEDF 是 RPE 细胞生理性分泌的一种保护性细胞因子, 且具有抑制病理性新生血管的作用^[19]。RPE 细胞在受到光损伤后, 会出现 PEDF 分泌量下降, 而血管

内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 分泌量上升^[20]。何广辉等^[15]研究发现, UCMSCs 外泌体可有效降低光损伤 RPE 细胞的 VEGF 表达量。本研究着重观察 UCMSCs 对光损伤 RPE 细胞 PEDF 分泌量的影响, 结果发现与 UCMSCs 共培养后, 光损伤 RPE 细胞的 PEDF 分泌量明显升高, 提示 UCMSCs 对 RPE 细胞发挥保护作用。

bFGF 是一种重要的神经营养因子, 可以促进神经细胞的存活和分裂增生^[21]。本研究中发现, 光损伤 RPE 细胞与 UCMSCs 共培养后, 共培养体系上清液中 bFGF 质量浓度明显升高。可能是由于 UCMSCs 通过旁分泌的方式分泌 bFGF, 从而提高 2 种细胞共培养体系上清液中的 bFGF 质量浓度, 对 RPE 细胞发挥保护作用。

综上所述, 本研究结果表明蓝光照射会造成 RPE 细胞增生能力下降和吞噬功能障碍, 与 UCMSCs 非接触共培养可以改善光损伤 RPE 细胞的增生能力和吞噬功能, 促进 RPE 细胞分泌 PEDF。UCMSCs 可能通过旁分泌方式分泌 bFGF, 保护 RPE 细胞减轻光损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张珂凡, 曲秀霞, 范国平. 干细胞治疗视网膜退行性疾病[J]. 中华实验眼科杂志, 2018, 36(11): 871-877. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 11. 011.
- [2] Zhang KF, Qu XX, Fan GP. Research progress of stem cells in the treatment of retinal degenerative diseases[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(11): 871-877. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 11. 011.
- [3] Zhuang H, Zhang R, Zhang S, et al. Altered expression of microRNAs in the neuronal differentiation of human Wharton's Jelly mesenchymal stem cells[J]. Neurosci Lett, 2015, 600: 69-74. DOI: 10. 1016/j. neulet. 2015. 05. 061.
- [4] Shu Q, Zhuang H, Fan J, et al. Wogonin induces retinal neuron-like differentiation of bone marrow stem cells by inhibiting Notch-1 signaling[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 28431-28441. DOI: 10. 18632/oncotarget. 16085.
- [5] 洪玉, 徐国兴. 骨髓间充质干细胞分化为光感受器样细胞的体外诱导和微环境研究[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31(7): 659-663. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 07. 010.
- [6] Hong Y, Xu GX. Induce and differentiation of marrow mesenchymal stem cell into photoreceptor-like cell *in vitro* and microenvironment[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2013, 31(7): 659-663. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2013. 07. 010.
- [7] Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye[J]. J Neurosci, 2003, 23(21): 7742-7749.
- [8] 管圆, 崔璐, 吴亚兰, 等. 移植骨髓间充质干细胞治疗大鼠变性性视网膜病变[J]. 中华眼底病杂志, 2009, 25(4): 249-253. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2009. 04. 02.
- [9] Guan Y, Cui L, Wu YL, et al. Transplantation of bone-marrow derived mesenchymal stem cells to treat rat retinal degeneration[J]. Chin J Ocular Fund Dis, 2009, 25(4): 249-253. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2009. 04. 02.
- [10] 梁庆玲, 李世迎, 段平, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗增生性糖尿病视网膜病变的安全性[J]. 中华实验眼科杂志, 2018,

- 36(11): 852-858. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 11. 007.
- Liang QL, Li SY, Duan P, et al. Safety of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in proliferative diabetic retinopathy patients [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2018, 36(11): 852-858. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2018. 11. 007.
- [8] 王立新, 李惠平. 人脐带间充质干细胞不同移植途径治疗缺血性脑损伤以及生物发光技术示踪的研究及进展[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(33): 5407-5412. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-4344. 2017. 33. 025.
- Wang LX, Li HP. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation by different pathways and stem cell tracing by bioluminescence imaging in the treatment of ischemic brain injury [J]. Chin J Tissue Engineer Res, 2017, 21(33): 5407-5412. DOI: 10. 3969/j. issn. 2095-4344. 2017. 33. 025.
- [9] Cui Y, Xu N, Xu W, et al. Mesenchymal stem cells attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress and enhance neuroprotective effects in retinal ganglion cells [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2017, 53(4): 328-335. DOI: 10. 1007/s11626-016-0115-0.
- [10] 袁立飞, 张晓敏, 李光达, 等. 间充质干细胞对大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎视网膜中白细胞介素 17 表达的影响[J]. 中华实验眼科杂志, 2012, 30(5): 392-396. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 05. 003.
- Yuan LF, Zhang XM, Li GD, et al. Effect of mesenchymal stem cells on the expression of interleukin-17 in the retina of experimental autoimmune uveoretinitis [J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2012, 30(5): 392-396. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2012. 05. 003.
- [11] Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z, 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. DOI: 10. 1089/scd. 2011. 0674.
- [12] 何远东, 王玉, 彭江. 人脐带间充质干细胞中神经营养因子的表达[J]. 中华神经医学杂志, 2012, 11(5): 438-442. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-8925. 2012. 05. 002.
- He YD, Wang Y, Peng J. Expression of neurotrophic factors in human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells [J]. Chin J Neuromed, 2012, 11(5): 438-442. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-8925. 2012. 05. 002.
- [13] 侯跃龙, 李彤, 严晓晔, 等. 缺氧预处理对脐带间充质干细胞 bFGF 分泌的影响[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(3): 297-300.
- Hou YL, Li T, Yan XY, et al. Effect of hypoxic preconditioning on bFGF secretion of the umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2010, 35(3): 297-300.
- [14] Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis [J/OL]. PLoS One, 2013, 8(8): e72604 [2019-02-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3749979/>. DOI: 10. 1371/journal.pone.0072604.
- [15] 何广辉, 陈松, 马映雪, 等. 人脐带间充质干细胞外泌体对蓝光损伤人视网膜色素上皮细胞血管内皮生长因子 A 表达的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2016, 32(6): 605-610. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2016. 06. 010.
- He GH, Chen S, Ma YX, et al. Effect of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells on the expression of vascular endothelial growth factor A in blue light injured human retinal pigment epithelial cells [J]. Chin J Ocular Fund Dis, 2016, 32(6): 605-610. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1005-1015. 2016. 06. 010.
- [16] Papermaster DS, Dreyer WJ. Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods [J]. Biochemistry, 1974, 13(11): 2438-2444. DOI: 10. 1021/bi00708a031.
- [17] Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease [J]. Curr Mol Med, 2010, 10(9): 802-823. DOI: 10. 2174/156652410793937813.
- [18] 马修彬, 陈松. 蓝光对视网膜色素上皮细胞的损伤机制[J]. 国际眼科纵览, 2007, 31(6): 415-419.
- Ma XB, Chen S. Mechanism of blue-light-induced damage to the retinal pigment epithelium cells [J]. Int Rev Ophthalmol, 2007, 31(6): 415-419.
- [19] Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(8): 628-636. DOI: 10. 1038/nrn1176.
- [20] 生晖, 卢奕, 卿凤翎. 蓝光及蓝光滤过型人工晶状体对体外培养人视网膜色素上皮细胞的影响[J]. 眼视光学杂志, 2008, 10(3): 178-181, 185.
- Sheng H, Lu Y, Qing FL. The effect of blue light exposure and use of intraocular lens on A2E-containing retinal pigment epithelial cells [J]. Chin J Optom Ophthalmol, 2008, 10(3): 178-181, 185.
- [21] Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors [J/OL]. Genome Biol, 2001, 2(3): REVIEWS3005 [2019-02-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC138918/>.

(收稿日期: 2019-05-08 修回日期: 2019-10-10)

(本文编辑: 刘艳)

读者·作者·编者

本刊对医学研究中知情同意和医学伦理学描述的要求

根据国际医学期刊编辑委员会提供的“生物医学期刊投稿统一要求”的表述, 本刊对作者撰写稿件时关于“知情同意”和“医学伦理学”的描述提出如下要求:

(1) 知情同意 在未事先获得知情同意的情况下, 患者有隐私不被侵犯的权力。患者的身份信息, 包括姓名、来源、住院号等均不应该以文字、图片或家系信息的方式在出版物上公开, 除非这些信息对于本研究是必需的, 如需在出版物上显示, 应征得患者(或者父母、监护人)签署的书面同意书。

发表的文章中应该省略不必要的患者个人信息, 但难以做到完全匿名时(如在照片中掩盖患者的眼部, 不足以保护患者的隐私权), 应提供知情同意的信息。如果用改变患者的身份特征(如遗传家系等)以保护患者隐私权的方法, 作者应该确保这些改变不影响研究的科学性, 并且编辑应在文中对此予以说明。

(2) 医学伦理学 以人体为试验对象的研究, 作者应该提及试验步骤是否符合相应的负责机构、国家委员会或 1975 年赫尔辛基宣言(2005 年修订)的医学伦理学标准。如果研究过程对是否符合赫尔辛基宣言有疑问或存在一定的问题, 作者应当做出客观说明并解释研究的合理性, 提交已通过审查机构的批准情况。以动物为实验对象的研究, 作者应当说明是否遵循当地的相关机构、学会(国内或国外)及国家实验动物保护和利用指南。

(本刊编辑部)