

· 实验研究 ·

人脐带间充质干细胞来源外泌体对兔自身
免疫性干眼外周血巨噬细胞的调控

李娜 粘红 赵璐 韦燕凯 吴怡媛 魏瑞华

天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼视光学院 天津医科大学眼科研究所 天津市视网膜功能与疾病重点实验室 300384

通信作者:魏瑞华, Email: rwei@tmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨人脐带间充质干细胞来源外泌体(hUC-MSC-exo)对兔自身免疫性干眼外周血单核巨噬细胞表型以及相关细胞因子表达的影响。**方法** 分离培养人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)并鉴定,使用超速离心法分离纯化外泌体,透射电子显微镜下观察外泌体形态和直径分布范围,Western blot 法检测表面特异性蛋白。应用随机数字表法将 6 只实验兔随机分为正常对照组和干眼模型组,每组 3 只。干眼模型组建立兔自身免疫性干眼模型,造模后 8 周收集泪腺组织,实时荧光定量 PCR 检测巨噬细胞相关基因 mRNA 的表达。在体外,将 hUC-MSC-exo 或者等容积的磷酸盐缓冲液(PBS)与经兔泪腺上皮细胞刺激后的干眼模型组外周血单个核细胞(PBMCs)共培养,实验分为 PBS 对照组和 hUC-MSC-exo 组,48 h 后收集 PBMCs,实时荧光定量 PCR 检测巨噬细胞表型分子及相关细胞因子 mRNA 的表达。**结果** hUC-MSCs 具有 MSCs 的免疫表型和基本生物学特性。透射电子显微镜下观察可见 hUC-MSC-exo 为直径 30~100 nm 的膜性小囊泡,其可表达特异性蛋白 CD9、CD63 和 CD81。干眼模型组泪腺组织中, M1 型巨噬细胞表型分子一氧化氮合酶 2(NOS2) mRNA 以及炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) mRNA 相对表达量分别为 3.06 ± 1.00 、 2.77 ± 0.72 和 1.30 ± 0.08 ,较正常对照组的 1.00 ± 0.03 、 1.01 ± 0.02 和 1.01 ± 0.01 明显升高, M2 型巨噬细胞表型分子精氨酸酶 1(Arg1)、CD206 mRNA 以及抗炎因子 IL-10 mRNA 相对表达量分别为 0.55 ± 0.07 、 0.60 ± 0.13 和 0.65 ± 0.14 ,较正常对照组的 1.00 ± 0.00 、 1.00 ± 0.00 和 1.01 ± 0.01 明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。在体外, hUC-MSC-exo 组 PBMCs 中 M1 型巨噬细胞表型分子 NOS2 mRNA 以及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β mRNA 相对表达量分别为 0.59 ± 0.08 、 0.56 ± 0.07 和 0.47 ± 0.04 ,较 PBS 对照组的 0.98 ± 0.03 、 1.03 ± 0.11 和 1.00 ± 0.08 明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); M2 型巨噬细胞表型分子 Arg1、CD206 mRNA 以及抗炎因子 TGF- β 、IL-10、IL-4 mRNA 相对表达量分别为 2.13 ± 0.28 、 1.32 ± 0.03 、 1.53 ± 0.20 、 1.47 ± 0.08 和 1.51 ± 0.16 ,较 PBS 对照组的 1.10 ± 0.17 、 1.01 ± 0.06 、 1.05 ± 0.10 、 0.98 ± 0.03 和 1.01 ± 0.03 明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** hUC-MSC-exo 可诱导兔自身免疫性干眼外周血单核巨噬细胞向抗炎性 M2 表型极化,抑制巨噬细胞相关炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 分泌,同时升高抗炎因子 IL-10 和 TGF- β 表达,具有抑制炎症反应的潜能。

【关键词】 脐带间充质干细胞; 外泌体; 巨噬细胞; 细胞因子; 自身免疫性干眼**基金项目:** 国家自然科学基金项目(81570834、81770901); 天津市临床重点学科(专科)建设项目(TJLCZDXKT003); 天津市大学生创新创业训练计划项目(201810062038)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.002

Regulation of human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes on peripheral blood macrophages from rabbit autoimmune dry eye

Li Na, Nian Hong, Zhao Lu, Wei Yankai, Wu Yiyuan, Wei Ruihua

Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Medical University Eye Hospital, School of Optometry and Ophthalmology & Eye Institute, Tianjin 300384, China

Corresponding author: Wei Ruihua, Email: rwei@tmu.edu.cn

[Abstract] Objective To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes (hUC-MSC-exo) on the phenotype of peripheral blood macrophages from rabbit autoimmune dry eye and the expression of related cytokines. **Methods** The hUC-MSCs were isolated and characterized. Exosomes derived from

hUC-MSCs were extracted by ultracentrifugation and observed directly using electronic microscopy. Specific markers of exosomes were analyzed by Western blot. Six rabbits were randomly divided into the normal control group and the dry eye group by using the random number table method, 3 rabbits for each group. Rabbit model of autoimmune dry eye was established in the dry eye group, and the lacrimal glands were collected for quantitative real-time PCR (qRT-PCR) at the 8th week. *In vitro*, activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from rabbit autoimmune dry eye model were incubated with hUC-MSC-exo or phosphate buffered saline (PBS). After 48 hours, cells from the hUC-MSC-exo group and the PBS control group were collected. The mRNA expression levels of related cytokine genes and subpopulation-related marker genes in macrophages were quantified by qRT-PCR. The use and care of the animals complied with Regulations for the Administration of Affair Concerning Experimental Animals by State Science and Technology Commission. This study protocol was approved by Ethic Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (No. TJYY20181217001). Written informed consent was obtained from each family before obtaining umbilical cord.

Results Exosomes derived from hUC-MSCs had typical morphology and specific markers. qRT-PCR results showed that, the relative expression quantity of M1 macrophages phenotypic molecular nitric oxide synthase 2 (NOS2) mRNA and inflammatory factor tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA in the lachrymal organization in the dry eye model group was significantly higher than those in the normal control group (3.06 ± 1.00 vs. 1.00 ± 0.03 , 2.77 ± 0.72 vs. 1.01 ± 0.02 and 1.30 ± 0.08 vs. 1.01 ± 0.01 , respectively), the relative expression quantity of M2 macrophages phenotypic molecular arginase 1 (Arg1), CD206 and IL-10 mRNA in the lachrymal organization in the dry eye model group was significantly lower than those in the normal control group (0.55 ± 0.07 vs. 1.00 ± 0.00 , 0.60 ± 0.13 vs. 1.00 ± 0.00 , 0.65 ± 0.14 vs. 1.01 ± 0.01 , respectively), with significant differences between them (all at $P < 0.05$). *In vitro*, the relative expression quantity of M1 macrophages phenotypic molecular NOS2 mRNA and inflammatory factor TNF- α , IL-1 β mRNA in PBMCs in the hUC-MSC-exo group was significantly lower than those in the PBS control group (0.59 ± 0.08 vs. 0.98 ± 0.03 , 0.56 ± 0.07 vs. 1.03 ± 0.11 , 0.47 ± 0.04 vs. 1.00 ± 0.08) (all at $P < 0.05$); the relative expression quantity of M2 macrophages phenotypic molecular Arg1, CD206 mRNA and anti-inflammatory cytokine TGF- β , IL-10 and IL-4 mRNA in PBMCs in the hUC-MSC-exo group was significantly higher than those in the PBS control group (2.13 ± 0.28 vs. 1.10 ± 0.17 , 1.32 ± 0.03 vs. 1.01 ± 0.06 , 1.53 ± 0.20 vs. 1.05 ± 0.10 , 1.47 ± 0.08 vs. 0.98 ± 0.03 , 1.51 ± 0.16 vs. 1.01 ± 0.03), with significant differences between them (all at $P < 0.05$).

Conclusions hUC-MSC-exo can polarize peripheral blood macrophages toward immune-suppressive M2-like phenotype, inhibit the production of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β , and meanwhile increase the expression of anti-inflammatory factors IL-10 and TGF- β .

[Key words] Umbilical cord mesenchymal stem cells; Exosomes; Macrophages; Cytokines; Autoimmune dry eye

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81570834, 81770901); Tianjin Clinical Key Discipline Project (TJLCZDXKT003); Tianjin College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (201810062038)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.002

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一群中胚层来源的多能干细胞, 广泛存在于脂肪、骨髓、脐带、胎盘以及肝脏等组织中, 具有低免疫原性、高度自我更新和多向分化潜能, 在体外特定条件下能分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞等^[1]。近年来, MSCs 在组织修复、神经保护、抗肿瘤治疗, 特别是免疫调节方面表现出巨大的应用潜能, MSCs 的免疫调节作用主要是通过多种免疫细胞相互作用来实现, 包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、中性粒细胞以及骨髓源性抑制细胞等^[2-3]。越来越多的研究证明, MSCs 除了通过细胞间直接接触外, 主要依赖于旁分泌作用分泌可溶性细胞因子或者

细胞外囊泡等发挥生物学功能^[3-4]。间充质干细胞来源的外泌体 (mesenchymal stem cells derived exosomes, MSC-exo) 是一种纳米级 (直径 30~100 nm) 的细胞外囊泡, 携带多种功能性生物分子 (蛋白质、mRNA、微小 RNA), 作为新的细胞间信息传递物质, 在特定环境中能模拟其母系细胞的生物活性, 调节多种免疫细胞的免疫反应活性, 包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞以及单核细胞等^[5]。人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs) 因取材方便、增生能力强以及不涉及伦理问题等优点逐渐成为主要的干细胞来源^[6]。人脐带间充质干细胞来源的外泌体 (human umbilical cord mesenchymal stem cells

derived exosomes, hUC-MSC-exo) 已被证实具有与其母细胞相似的免疫调节功能^[7], 能缓解鼠实验性自身免疫性疾病, 如自身免疫性葡萄膜炎、急性移植抗宿主病和急性肝功能损伤等的发生和发展^[8-10]。干燥综合征 (Sjögren's syndrome, SS) 是一种慢性系统性自身免疫性疾病, 其特点是以唾液腺和泪腺为主的外分泌腺内淋巴细胞浸润, 主要表现为口腔和眼部干涩^[11]。SS 属于较为严重和难治的干眼类型之一^[12]。最新的研究显示, 巨噬细胞在 SS 的发病机制中扮演了重要角色^[13-15]。此外, 巨噬细胞表型转变在慢性炎症过程中发挥关键性作用^[16], 而目前 hUC-MSC-exo 对巨噬细胞的免疫调控作用尚不明确。本研究中拟用 γ 射线照射过的兔泪腺上皮细胞体外激活自体外周血淋巴细胞模拟特异性炎症环境, 探讨 hUC-MSC-exo 对兔自身免疫性干眼外周血单核巨噬细胞表型以及相关细胞因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用普通级健康无眼疾成年新西兰雌性大白兔 6 只 (北京维通利华实验动物技术有限公司提供), 体质量为 3.4~4.0 kg。应用随机数字表法将 6 只实验兔随机分为正常对照组和干眼模型组, 每组 3 只。实验动物的使用和喂养遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。本研究方案经天津医科大学眼科医院伦理委员会审批 (批文号: TJYY20181217001)。

1.1.2 主要试剂及仪器 小鼠抗人 CD9、CD63、CD81 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); 小鼠抗人 β -actin 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); HRP 标记马抗小鼠 IgG 二抗 (美国 CST 公司); 淋巴细胞分离液 (美国 GE 公司); RNA 提取试剂 Trizol (美国 Invitrogen 公司); SYBR Green 2 倍 Master Mix、逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司); II 型胶原酶、DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); Ficoll 粉、油红 O、茜素红 S (美国 Sigma 公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪有限公司)。7900HTFAST real-time PCR 仪 (爱普拜斯应用生物系统贸易上海有限公司); BX53 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); BioSpectrum 410 凝胶成像仪 (美国 UVP 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs 的分离培养 获得家属知情同意并签署知情同意后, 取足月健康剖宫产胎儿脐带, 将其浸泡在含双抗的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered

saline, PBS) 中充分洗涤, 并剔除脐带动静脉, 将剩余组织剪至 1~2 mm³ 大小后转移至 100 ml 血浆瓶中, 加入质量分数 0.1% II 型胶原酶, 在 37 °C 水浴摇床消化 1 h, 消化完毕后用 200 目滤网过滤, 消化不完全的组织用质量分数 0.05% 胰蛋白酶继续消化 20 min 后加胎牛血清终止消化, 收集 2 次消化的滤液, 离心半径 10 cm, 1 800 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀部分用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬并接种至细胞培养皿中, 于 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。每 2~3 天换液 1 次, 待细胞融合率达到 80% 时消化传代, 取生长良好的 3~5 代细胞进行实验。

1.2.2 hUC-MSCs 表面抗原的鉴定 采用逆转录 PCR 鉴定 hUC-MSCs 表面抗原。将第 3 代生长良好的 hUC-MSCs 经 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, 取 1×10⁷ 细胞加入 1 ml Trizol 提取总 mRNA, 根据逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 以 cDNA 为模板于 25 μ l 的反应体系中进行 PCR 扩增, PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1, 其中 GAPDH 为内对照。反应结束后, PCR 产物用质量分数 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 电压为 100 V, 约 40 min 后, 凝胶成像仪成像。

表 1 逆转录 PCR 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
GAPDH	正义链: CTGGGCTACACTGAGCACC
	反义链: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG
CD29	正义链: GGAGATGGGAAACTTGCTGG
	反义链: AATGACTTCTGAGGAAAGGGAAT
CD34	正义链: TGTCTTCCACTCGGTGCGTCTC
	反义链: CTGCTACTTCCAAGGCTACTAGGTGTT
CD44	正义链: CAGTCACAGACCTGCCCAATG
	反义链: AACCTCCTGAAGTGCTGCTCC
CD45	正义链: CTGAGGAGCAAGGAAGCCAATC
	反义链: GCCACCAACTGAAGGCTGAATC
CD73	正义链: GAGGTGCTGCTGGGAAGT
	反义链: TCAATGGGCGACCGGATA
CD105	正义链: CCCTGTACTAAAGAAAGAGCTTGTGCG
	反义链: TCGACAGGATATTGACCACCGCCTC
HLA-DR	正义链: GACGGTCTGGCGGCTTGAA
	反义链: ACATTGGTGATCGGAGTATAGTTGGA

注: PCR: 聚合酶链式反应; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; HLA-DR: 人类白细胞抗原 DR

1.2.3 hUC-MSCs 成骨、成脂诱导分化 (1) 成脂分化 取第 3 代 hUC-MSCs, 消化后调整细胞密度为 1×10⁵/ml 接种于 6 孔板中, 加入成脂诱导培养基诱导 3 d 后, 改用普通培养基培养 24 h。3~5 次循环后, 加入普

通培养基继续培养 7 d, 然后细胞固定, 行油红 O 染色, 光学显微镜下鉴定脂滴。(2) 成骨分化 取第 3 代 hUC-MSCs, 消化后调整细胞密度为 1.5×10^4 /ml 接种于 6 孔板中, 待细胞融合率为 60% 时, 加入成骨诱导培养基, 每 3 天换液 1 次, 诱导后 3 周, 细胞固定, 行茜素红 S 染色, 光学显微镜下鉴定钙结节。

1.2.4 hUC-MSC-exo 的提取 选择状态良好的第 3~5 代 hUC-MSCs, 使用含体积分数 10% 无外泌体血清的 DMEM/F12 培养液培养 48 h 后, 收集培养上清液。采用超速离心法, 将上清液在 4℃ 条件下依次按照 $300 \times g$ 离心 10 min、 $2\,000 \times g$ 离心 10 min、 $10\,000 \times g$ 离心 30 min 的顺序去除杂质、死亡细胞以及大的细胞外囊泡。最后以 $100\,000 \times g$ 离心 70 min, 弃上清, 沉淀用 PBS 重悬后, 再经 $100\,000 \times g$ 离心 70 min, 得到富含外泌体的沉淀, 用 200 μ l PBS 重悬, 采用 BCA 法蛋白定量, 直径 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, -80℃ 保存待用。

1.2.5 hUC-MSC-exo 的鉴定 (1) 透射电子显微镜下鉴定外泌体形态 取上述外泌体悬液 10 μ l, PBS 稀释 10 倍后, 取 20 μ l 用质量分数 2% 多聚甲醛固定, 滴于载样铜网上, 室温下静置 1 min, 自然干燥后, 滴加磷钨酸负染 1 min, 滤纸从铜网边缘吸除多余染液, 白炽灯下烤 10 min, 透射电子显微镜下观察并拍照。(2) Western blot 法鉴定外泌体表面蛋白 CD9、CD63 和 CD81 表达情况 取 50 μ g 外泌体总蛋白, 加入 5 倍上样缓冲液, 95℃ 加热 10 min, 使蛋白变性。质量分数 12% SDS-PAGE 电泳, 湿转蛋白至 PVDF 膜, 质量分数 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入一抗 β -actin (1:1 000)、CD63 (1:500)、CD9 (1:500)、CD81 (1:500) 于 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入相应二抗 (1:1 000) 室温下孵育 2 h, 洗膜后加入 ECL 显影液, 用自动显影机曝光。

1.2.6 外周血单个核细胞的分离 用静脉采血针从兔耳中动脉采血, 每只兔抽取肝素抗凝血 20 ml, 用 PBS 稀释 3 倍, 将 40 ml 稀释血缓慢加到 10 ml 淋巴细胞分离液上, $2\,000$ r/min 离心 20 min, 离心后管内分 3 层, 在上、中层界面处有白色云雾状狭窄条带, 以单个核细胞为主, 包括淋巴细胞和单核细胞, 吸取此层细胞, 加 PBS 洗涤, $2\,000$ r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬细胞。

1.2.7 自体细胞混合培养体系的建立 参照 Li 等^[17]的方法, 将兔麻醉后摘取左下泪腺, 分离提纯兔泪腺上皮细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 /ml, 接种于 96 孔板。培养 2 d 的兔泪腺上皮细胞经 25 Gy γ 射线照射后, 与相同密度的外周血单个核细胞 (peripheral

blood mononuclear cells, PBMCs) 混合培养。共培养后 3 d, 每孔加入终质量浓度为 5 μ g/ml hUC-MSC-exo, 同时设置加入等容积 PBS 作为 PBS 对照组, 继续培养 48 h, 收集 PBMCs。

1.2.8 自身免疫性兔干眼模型的建立 PBMCs 与兔泪腺上皮细胞混合培养后 5 d, 收集激活的自体淋巴细胞, 加 PBS 配制 2×10^6 /ml 的细胞悬液 1 ml, 耳缘静脉输注同一供体; 摘除正常对照组左侧泪腺, 同时耳缘静脉输注 1 ml PBS。注射前和注射后每 2 周监测临床干眼评估指标, 确定造模成功, 饲养至 8 周后, 注射戊巴比妥钠 56 mg/kg 处死实验兔并摘取泪腺。

1.2.9 巨噬细胞表型分子及其不同极化状态下相关细胞因子 mRNA 相对表达量的检测 采用实时荧光定量 PCR 检测巨噬细胞表型分子及其不同极化状态下相关细胞因子 mRNA 相对表达量。取泪腺组织以及 hUC-MSC-exo 处理后 PBMCs 加入适量 Trizol 提取总 RNA, 逆转录制备 cDNA, 以 cDNA 为模板, GAPDH 基因为内参, 严格按照说明书进行 PCR, 各引物序列见表 2。各指标均重复检测 3 次, 相对定量结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

表 2 实时荧光定量 PCR 检测目的基因引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
GAPDH	正义链: GGGTGGTGGACCTCATGCT 反义链: CGGTGGTTTGAGGGCTCTTA
IFN- γ	正义链: CTCTGCCTCATCTTGGGTTCTT 反义链: GGTGTTCTGTTTCTCTGTTAGTGTGT
IL-4	正义链: GCACTCCGGCAGTTCTACCT 反义链: CTCCGTGCTCCTTGAAGCA
IL-10	正义链: GGCTGAGGCTGCGACAAT 反义链: TGCCTTGCTCTTGTTCACAA
TGF- β	正义链: CAAGGACCTGGGCTGGAA 反义链: AGGCAGAAAGTTGGCGTGCTGA
IL-1 β	正义链: CTCCTGCCAACCTACAAACA 反义链: TCCAGAGCCACAACGACTGA
NOS2	正义链: TCCACCAGGAGATGCTCAACT 反义链: TGGGTTTCCACGCCTCTAC
Arg1	正义链: GAAGTAACTCGAACGGTGAACACA 反义链: TCCCGAGCAACTCCAAAAGA
CD206	正义链: CTGATAGATGGAGGCTGAGGTACA 反义链: CCAGATAGACGATGCTGACTTC
TNF- α	正义链: AGCTTCTCGGGCCCTGAGT 反义链: CCACTTGCGGGTTTGCTACT

注: PCR: 聚合酶链式反应; GAPDH: 磷酸甘油醛脱氢酶; IFN: 干扰素; IL: 白细胞介素; TGF: 转化生长因子; NOS: 一氧化氮合酶; Arg: 精氨酸酶; TNF: 肿瘤坏死因子

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件(软件序列号:GPW6-811517-RJJH-C213A,美国 GraphPad 公司)进行统计分析,定量资料经 W 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,正常对照组与干眼模型组一氧化氮合酶 2(nitric oxide synthase 2, NOS2)、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)、精氨酸酶 1 (arginase 1, Arg1)、CD206、IL-10 的比较,以及 PBS 对照组与 hUC-MSCs-exo 组 NOS2、TNF- α 、IL-1 β 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、Arg1、CD206、转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、IL-10、IL-4 的比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 形态观察及表型鉴定

采用胶原酶消化法分离 hUC-MSCs,培养至第 5 天左右,倒置显微镜下可见仅有极少量细胞贴壁,主要呈梭形或多角形(图 1A)。传代培养至第 3 代,细胞形态均匀一致,呈成纤维细胞样的长梭形,集落细胞的中心呈漩涡状(图 1B)。逆转录 PCR 检测结果显示,第 3 代 hUC-MSCs 高表达间充质干细胞标志物 CD44、CD73、CD105 和 CD29,不表达或者低表达造血干细胞标志物 CD45、CD34 和 MHC-II 类抗原 HLA-DR(图 2)。

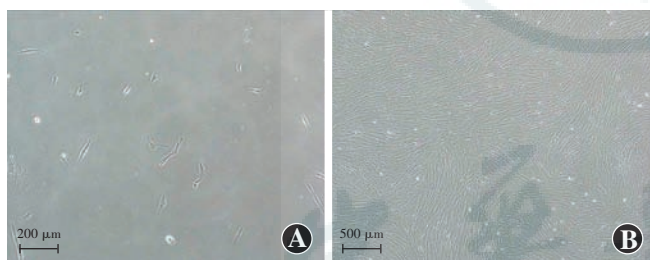


图 1 hUC-MSCs 的形态观察 A:原代分离 hUC-MSCs 培养至第 5 天,倒置显微镜下可见极少量梭形或多角形贴壁细胞(标尺 = 200 μm) B:hUC-MSCs 培养至第 3 代,呈成纤维细胞样的长梭形,漩涡状排列(标尺 = 500 μm)

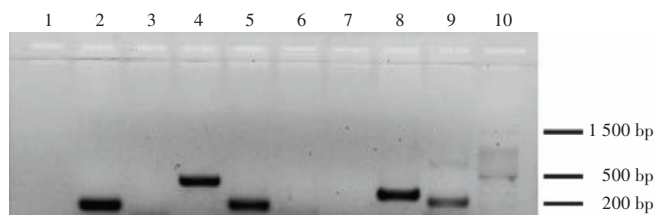


图 2 逆转录 PCR 检测第 3 代 hUC-MSCs 表面抗原的表达 体外扩增培养的 hUC-MSCs 高表达 CD44、CD73、CD105 和 CD29,不表达或者低表达 CD45、CD34 和 MHC-II 类抗原 HLA-DR 1:空白对照 2:CD44 3:HLA-DR 4:CD73 5:CD105 6:CD34 7:CD45 8:CD29 9:GAPDH 10:DNA Marker

2.2 hUC-MSCs 成骨、成脂诱导分化

第 3 代 hUC-MSCs 成骨诱导后 3 周,经茜素红 S 染色,光学显微镜下可见明显的橘红色钙结节(图 3A)。成脂诱导后 3 周用油红 O 染色,光学显微镜下可见细胞内有红色圆形脂滴(图 3B)。

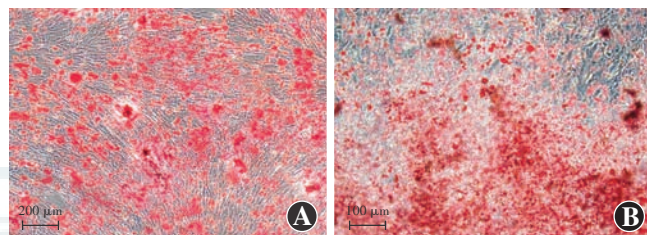


图 3 hUC-MSCs 成骨成脂诱导图像 A:hUC-MSCs 向成骨细胞分化,光学显微镜下可见大量橘红色钙结节(茜素红 S,标尺 = 200 μm) B:hUC-MSCs 向成脂细胞分化,光学显微镜下可见细胞内有红色圆形脂滴(油红 O,标尺 = 100 μm)

2.3 hUC-MSC-exo 鉴定

透射电子显微镜下可见一群呈圆形或椭圆形杯状结构的膜性小囊泡,直径为 30~100 nm,内含低电子密度成分(图 4A)。Western blot 检测结果显示,hUC-MSC-exo 表达外泌体特异性蛋白 CD9、CD63 和 CD81(图 4B)。

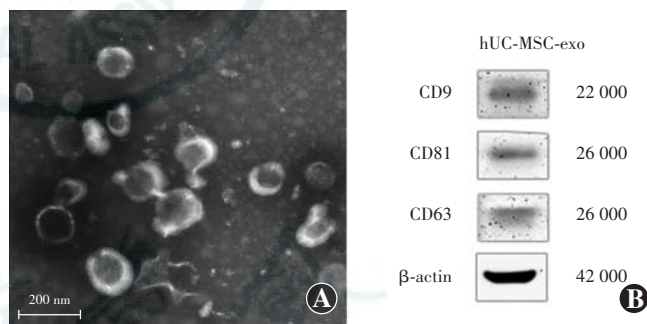


图 4 hUC-MSC-exo 的鉴定 A:透射电子显微镜下可见外泌体为圆形或者椭圆形膜性小囊泡,直径为 30~100 nm(标尺 = 200 nm) B:Western blot 检测结果显示 hUC-MSC-exo 表达外泌体特异性蛋白 CD9、CD63 和 CD81 注:hUC-MSC-exo:人脐带间充质干细胞来源外泌体; β -actin: β -肌动蛋白

2.4 兔干眼模型泪腺组织中巨噬细胞表型分子及相关细胞因子 mRNA 的相对表达

实时荧光定量 PCR 检测结果显示,干眼模型组泪腺组织中 M1 型巨噬细胞表型分子 NOS2 mRNA 以及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β mRNA 相对表达量较正常对照组明显升高,差异均有统计学意义($t = 3.58, P < 0.05$; $t = 4.25, P < 0.05$; $t = 6.12, P < 0.01$);M2 型巨噬细胞表型分子 Arg1、CD206 mRNA 以及抗炎因子 IL-10 mRNA

相对表达量较正常对照组明显降低,差异均有统计学意义($t=10.65, P<0.01$; $t=5.18, P<0.01$; $t=4.26, P<0.05$)(表 3)。

2.5 hUC-MS-C-exo 对 PBMCs 中巨噬细胞表型分子及相关细胞因子 mRNA 相对表达量的影响

实时荧光定量 PCR 检测结果显示, PBMCs 经 hUC-MS-C-exo 作用后 M1 型巨噬细胞表型分子 NOS2 mRNA 以及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β mRNA 较 PBS 对照组显著降低,差异均有统计学意义($t=7.72, P<0.01$; $t=6.47, P<0.01$; $t=10.65, P<0.01$),而炎症因子 IFN- γ mRNA 相对表达量在 2 个组中的表达量比较差异无统计学意义($t=0.08, P>0.05$)(表 4); M2 型巨噬细胞表型分子 Arg1、CD206 mRNA 以及抗炎因子 TGF- β 、IL-10、IL-4 mRNA 相对表达量较 PBS 对照组显著升高,差异均有统计学意义($t=5.44, P<0.05$; $t=7.88, P<0.01$; $t=3.66, P<0.05$; $t=10.03, P<0.01$; $t=3.31, P<0.05$)(表 5)。

表 3 正常对照组与干眼模型组泪腺组织中巨噬细胞表型分子及相关细胞因子 mRNA 相对表达量比较 (mean $\pm$ SD)

组别	样本量	NOS2	TNF- α	IL-1 β	Arg1	CD206	IL-10
正常对照组	3	1.00 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 0.01
干眼模型组	3	3.06 $\pm$ 1.00	2.77 $\pm$ 0.72	1.30 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.07	0.60 $\pm$ 0.13	0.65 $\pm$ 0.14
t 值		3.58	4.25	6.12	10.65	5.18	4.26
P 值		0.02	0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.01

注: NOS: 一氧化氮合酶; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素; Arg: 精氨酸酶 (独立样本 t 检验)

表 4 PBS 对照组与 hUC-MS-C-exo 组 M1 型巨噬细胞表型分子及细胞因子 mRNA 相对表达量的比较 (mean $\pm$ SD)

组别	样本量	NOS2	TNF- α	IL-1 β	IFN- γ
PBS 对照组	3	0.98 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.05
hUC-MS-C-exo 组	3	0.59 $\pm$ 0.08	0.56 $\pm$ 0.07	0.47 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.21
t 值		7.72	6.47	10.65	0.08
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	0.94

注: PBS: 磷酸盐缓冲液; hUC-MS-C-exo: 人脐带间充质干细胞来源外泌体; NOS: 一氧化氮合酶; TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白细胞介素; IFN: 干扰素 (独立样本 t 检验)

表 5 PBS 对照组与 hUC-MS-C-exo 组 M2 型巨噬细胞表型分子及细胞因子 mRNA 相对表达量的比较 (mean $\pm$ SD)

组别	样本量	Arg1	CD206	TGF- β	IL-10	IL-4
PBS 对照组	3	1.10 $\pm$ 0.17	1.01 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.10	0.98 $\pm$ 0.03	1.01 $\pm$ 0.03
hUC-MS-C-exo 组	3	2.13 $\pm$ 0.28	1.32 $\pm$ 0.03	1.53 $\pm$ 0.20	1.47 $\pm$ 0.08	1.51 $\pm$ 0.16
t 值		5.44	7.88	3.66	10.03	3.31
P 值		0.01	<0.01	0.02	<0.01	0.03

注: PBS: 磷酸盐缓冲液; hUC-MS-C-exo: 人脐带间充质干细胞来源外泌体; Arg: 精氨酸酶; TGF: 转化生长因子; IL: 白细胞介素 (独立样本 t 检验)

3 讨论

近年来, MSCs 由于其独特的免疫调节功能逐渐成为自身免疫性疾病领域的研究热点, 已广泛应用于系统性红斑狼疮、SS、系统性硬化以及自身免疫性葡萄膜炎等的研究中^[18-20]。已有研究表明, 同种或者异种 MSCs 对实验性鼠或者狗干眼模型有一定的治疗效果^[21-24]。我们前期研究发现, 静脉输注 hUC-MS-Cs 或兔脂肪来源的 MSCs 能有效缓解兔自身免疫性干眼的病情进展^[17,25], 且在发病前预防性输注 hUC-MS-Cs 能够取得和输注兔脂肪来源 MSCs 相似的治疗效果。但静脉输注 MSCs 可能引发静脉栓塞, 甚至有成瘤风险, 因此其在临床上的应用具有一定的局限性, 新型的解决方法亟待提出^[26]。外泌体已被证实是 MSCs 发挥治疗作用的重要媒介, 它可以通过内吞作用, 或与胞膜直接融合的方式进入细胞质, 或是通过受体-配体间相互作用, 将携带的生物信息传递给靶细胞, 从而发挥生物学功能, 调节异常微环境^[1]。越来越多的研究显示, 外泌体有望成为未来替代干细胞治疗的新手段^[5]。

已有文献报道, MSC-exo 可通过调节 T 细胞免疫应答来发挥免疫调控能力^[27]。我们前期体外实验结果显示, hUC-MS-C-exo 能上调 PBMCs 中 Treg 细胞分化, 而对 Th1 和 Th17 细胞分化的抑制作用不明显。有研究提出 MSC-exo 对 Treg 细胞的作用与抗原递呈细胞密切相关^[28]。巨噬细胞是机体内重要的天然免疫细胞, 属于专职抗原递呈细胞, 在维持机体稳态、免疫防御以及炎症调控过程中发挥关键作用^[16]。巨噬细胞有 2 种极化类型, 即经典活化的 M1 型和选择性活化的 M2 型, 其中, M1 型巨噬细胞主要由脂多糖或 Th1 类细胞因子 IFN- γ 诱导极化, 其特征是高表达 NOS2, 产生 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子, 促进炎症反应; 而 M2 型巨噬细胞, 包括 M2a、M2b、M2c 等亚型, 主要由 Th2 类细胞因子 IL-4、IL-13 等诱导生成, 其特征是高表达 CD206 和 Arg1, 分泌抗炎因子 IL-10、TGF- β 等, 控制炎症发展, 促进组织修复^[29-30]。由于其高度的可塑性及异质性, 巨噬细胞在不同微环境

中表现出一个连续动态的活化状态并具有功能上的差异^[31]。已有研究证明,巨噬细胞在 SS、自身免疫性葡萄膜炎、年龄相关性黄斑变性及糖尿病视网膜病变等免疫相关眼病的发生和发展中发挥重要作用^[32-35]。

M1 型和 M2 型巨噬细胞间的平衡与组织的免疫炎症密切相关。在单纯环境因素诱导的小鼠干眼模型中,结膜和角膜中浸润的巨噬细胞以 M1 型为主^[29,36]; Iwasa 等^[37]发现在 SS 小鼠模型中,M1 巨噬细胞在唾液腺中的聚集会加重炎症反应。尽管 Zhou 等^[13]在基因敲除鼠 SS 干眼模型中发现泪腺和角膜中浸润的巨噬细胞局部放大炎症反应,破坏组织稳态,促进自身免疫性干眼的发展,但并未对泪腺中浸润巨噬细胞表型进行研究。本研究中成功建立抗原特异性 T 细胞诱导的兔自身免疫性干眼模型,与鼠干眼模型相比,该模型已被证明能极大地模仿人类 SS^[38]。本研究中实时荧光定量 PCR 结果显示,与正常对照组比较,干眼模型组泪腺组织中 M1 型巨噬细胞表型分子 NOS2 mRNA 表达显著增加,M2 型巨噬细胞表型分子 CD206、Arg1 mRNA 表达显著减少,说明泪腺组织中浸润的巨噬细胞以炎性表型(M1 型)为主。

研究发现,在糖尿病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等疾病中,hUC-MSCs 输注后病变部位局部巨噬细胞从 M1 型转变为 M2 型^[39-41]。Du 等^[42]用 PKH-26 荧光染料标记的 MSC-exo 与 PBMCs 共孵育后,在激光扫描共焦显微镜下可以观察到 MSC-exo 被 CD14⁺ 单核细胞内化,提示 MSC-exo 可以直接与单核巨噬细胞相互作用。另外,有研究提出在系统性免疫疾病中应用 IL-1 β 或者脂多糖预处理 hUC-MSCs 后分离提纯的 hUC-MSC-exo 能驱动 M2 巨噬细胞极化,缓解炎症反应,提示 MSC-exo 在 MSCs 对巨噬细胞的调控过程中起重要作用^[43-44]。而目前 hUC-MSC-exo 对于自身免疫性干眼中巨噬细胞极化的调控作用尚未见报道,在特异性炎症微环境中,初始生理状态的 hUC-MSC-exo 对兔自身免疫性干眼外周血中单核巨噬细胞表型的调控作用还不清楚。

本研究中将分离提纯的泪腺上皮细胞用 γ 射线照射后,与干眼模型组 PBMCs 混合培养,体外激活自体外周血淋巴细胞,结果显示在这种特异性炎症微环境中,PBMCs 经 hUC-MSC-exo 作用后,M1 型巨噬细胞表型分子 NOS2 mRNA 表达明显下调,M2 型巨噬细胞表型分子 CD206、Arg1 mRNA 表达明显上调,提示 hUC-MSC-exo 诱导 M1 型巨噬细胞表型向 M2 转变。同时,Th2 类细胞因子 IL-4 以及抗炎因子 IL-10、TGF- β mRNA 表达明显增加,炎性因子 TNF- α 、IL-1 β

mRNA 表达明显下降,而 2 个组间 IFN- γ mRNA 表达量比较差异无统计学意义。细胞因子的合成和分泌是反映细胞状态的重要标志。M2 型巨噬细胞可以分泌多效性免疫抑制因子 IL-10 和 TGF- β ,同时,这些抗炎因子又协同 IL-4 进一步诱导巨噬细胞向 M2 型极化,形成一个正反馈循环^[45]。M1 型巨噬细胞分泌的炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 可诱导炎症反应,参与多种炎症疾病和自身免疫性疾病的发生和发展,成为阻断治疗的关键靶点^[46-47]。值得注意的是,研究发现 IL-1 β 在 SS 患者 PBMCs 中阳性表达且与病变程度相关^[48]; TNF- α mRNA 在 SS 相关干眼患者的结膜组织中表达升高^[49];本研究中在兔自身免疫性干眼模型的泪腺组织中也发现 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达显著增加,而抗炎因子 IL-10 mRNA 表达显著下调。由此可推测,hUC-MSC-exo 通过调控巨噬细胞表型,同时促进 IL-10、TGF- β 分泌,抑制 TNF- α 和 IL-1 β 分泌,可能具有缓解自身免疫性泪腺炎的作用。

综上所述,本研究表明 hUC-MSC-exo 可诱导兔自身免疫性干眼外周血中单核巨噬细胞向抗炎性 M2 表型极化,抑制巨噬细胞相关炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 分泌,同时升高抗炎因子 IL-10 和 TGF- β 表达,具有抑制炎症反应的潜能。尽管已有研究开展应用 MSC-exo 治疗系统性自身免疫性疾病的临床试验^[50],但 MSC-exo 的免疫调节机制仍不十分清楚。鉴于巨噬细胞是重要的炎症免疫调控细胞,以上结果提示 MSC-exo 的免疫作用机制可能与巨噬细胞表型及功能的调控有关,这为其更好地应用于临床免疫性眼病的治疗提供了新的思路和实验基础。MSC-exo 在自身免疫性干眼体内是否发挥免疫治疗作用,调控巨噬细胞免疫应答,减轻泪腺炎症反应,是我们下一步工作的重点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine [J/OL]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9 (1): 63 [2019-02-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5845209/>. DOI: 10.1186/s13287-018-0791-7.
- [2] Cheng L, Zhang K, Wu S, et al. Focus on mesenchymal stem cell-derived exosomes: opportunities and challenges in cell-free therapy [J/OL]. Stem Cells Int, 2017, 2017: 6305295 [2019-02-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5749272/>. DOI: 10.1155/2017/6305295.
- [3] Shi Y, Wang Y, Li Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14 (8): 493-507. DOI: 10.1038/s41581-018-0023-5.
- [4] Börger V, Bremer M, Ferrer-Tur R, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived extracellular vesicles and their potential as novel immunomodulatory therapeutic agents [J/OL]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (7): 1450 [2019-03-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>

- articles/PMC5535941/. DOI: 10.3390/ijms18071450.
- [5] Ren K. Exosomes in perspective: a potential surrogate for stem cell therapy[J]. *Odontology*, 2019, 107(3): 271–284. DOI: 10.1007/s10266-018-0395-9.
 - [6] El OR, Beroud J, Stoltz JF, et al. 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. DOI: 10.1089/ten.TEB.2013.0664.
 - [7] Monguió-Tortajada M, Roura S, Gálvez-Montón C, et al. Nanosized UCMSC-derived extracellular vesicles but not conditioned medium exclusively inhibit the inflammatory response of stimulated T cells: implications for nanomedicine [J]. *Theranostics*, 2017, 7(2): 270–284. DOI: 10.7150/thno.16154.
 - [8] Bai L, Shao H, Wang H, et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental autoimmune uveitis[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4323 [2019-03-13]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5489510/>. DOI: 10.1038/s41598-017-04559-y.
 - [9] Wang L, Gu Z, Zhao X, et al. Extracellular vesicles released from human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells prevent life-threatening acute graft-versus-host disease in a mouse model of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Stem Cells Dev*, 2016, 25(24): 1874–1883. DOI: 10.1089/scd.2016.0107.
 - [10] Jiang L, Zhang S, Hu H, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate acute liver failure by reducing the activity of the NLRP3 inflammasome in macrophages [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(3): 735–741. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.189.
 - [11] López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, et al. Clinical and molecular inflammatory response in Sjögren syndrome-associated dry eye patients under desiccating stress [J]. *Am J Ophthalmol*, 2016, 161: 133–141. DOI: 10.1016/j.ajo.2015.09.039.
 - [12] Bose T, Diedrichs-Möhrling M, Wildner G. Corrigendum to “Dry eye disease and uveitis: A closer look at immune mechanisms in animal models of two ocular autoimmune diseases” [AUTREV 15–12 (2016) 1181–1192] [J/OL]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(5): 555 [2019-02-23]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997217300848?via%3Dihub>. DOI: 10.1016/j.autrev.2017.03.013.
 - [13] Zhou D, Chen YT, Chen F, et al. Critical involvement of macrophage infiltration in the development of Sjögren's syndrome-associated dry eye [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(3): 753–760. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.05.014.
 - [14] Gliozzi M, Greenwell-Wild T, Jin W, et al. A link between interferon and augmented plasmin generation in exocrine gland damage in Sjögren's syndrome [J]. *J Autoimmun*, 2013, 40: 122–133. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.09.003.
 - [15] Li X, Wu K, Edman M, et al. Increased expression of cathepsins and obesity-induced proinflammatory cytokines in lacrimal glands of male NOD mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(10): 5019–5029. DOI: 10.1167/iovs.09-4523.
 - [16] Motwani MP, Gilroy MW. Macrophage development and polarization in chronic inflammation [J]. *Semin Immunol*, 2015, 27(4): 257–266. DOI: 10.1016/j.smim.2015.07.002.
 - [17] Li X, Lu X, Sun D, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduce lymphocytic infiltration in a rabbit model of induced autoimmune dacryoadenitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(13): 5161–5170. DOI: 10.1167/iovs.15-17824.
 - [18] Ma Y, Wang Z, Zhang A, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells ameliorate GVHD by modulating Th17/Tr1 balance via expression of PD-L2 [J]. *Life Sci*, 2018, 214: 98–105. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.10.061.
 - [19] Sánchez-Berná I, Santiago-Díaz C, Jiménez-Alonso J. Immunomodulatory properties of stem mesenchymal cells in autoimmune diseases [J]. *Med Clin (Barc)*, 2015, 144(2): 88–91. DOI: 10.1016/j.medcli.2014.01.014.
 - [20] 白伶伶, 张灵君, 郑慧, 等. 间充质干细胞对EAU大鼠抗原特异性T细胞和抗原递呈细胞功能的抑制作用 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(10): 870–875. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.002.
 - Bai LL, Zhang LJ, Zheng H, et al. Inhibitory effects of mesenchymal stem cells on antigen-specific T cells and antigen presenting cells in experimental autoimmune uveitis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2015, 33(10): 870–875. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.10.002.
 - [21] 黄守强, 付艳霞, 毛科杰, 等. 人脐带间充质干细胞移植对小鼠干燥综合征的治疗作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34(9): 780–785. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.003.
 - Huang SQ, Fu YX, Mao KJ, et al. Therapeutic effect and mechanism of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for Sjögren syndrome in mice [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34(9): 780–785. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.09.003.
 - [22] Lee MJ, Ko AY, Ko JH, et al. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(1): 139–146. DOI: 10.1038/mt.2014.159.
 - [23] Villatoro AJ, Fernández V, Claros S, et al. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model [J/OL]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 527926 [2019-04-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4352730/>. DOI: 10.1155/2015/527926.
 - [24] Lu X, Wang X, Nian H, et al. Mesenchymal stem cells for treating autoimmune dacryoadenitis [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 126 [2019-04-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5460436/>. DOI: 10.1186/s13287-017-0593-3.
 - [25] 王希莲, 杨丽媛, 粘红, 等. 人脐带间充质干细胞对兔自身免疫性干眼的疗效研究 [J]. *眼科新进展*, 2017, 37(1): 19–23. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0005.
 - Wang XL, Yang LY, Nian H, et al. Treatment effect of mesenchymal stem cells on rabbit autoimmune dry eye [J]. *Rec Adv Ophthalmol*, 2017, 37(1): 19–23. DOI: 10.13389/j.cnki.rao.2017.0005.
 - [26] Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy [J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(1): 36–45. DOI: 10.7150/ijms.21666.
 - [27] Riazifar M, Mohammadi MR, Pone EJ, et al. Stem cell-derived exosomes as nanotherapeutics for autoimmune and neurodegenerative disorders [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(6): 6670–6688. DOI: 10.1021/acsnano.9b01004.
 - [28] Zhang B, Yeo RWY, Lai RC, et al. Mesenchymal stromal cell exosome-enhanced regulatory T-cell production through an antigen-presenting cell-mediated pathway [J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(5): 687–696. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.02.372.
 - [29] Lee HS, Amouzegar A, Dana R. Kinetics of corneal antigen presenting cells in experimental dry eye disease [J/OL]. *BMJ Open Ophthalmol*, 2017, 1(1): e000078 [2019-02-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5721641/>. DOI: 10.1136/bmjophth-2017-000078.
 - [30] Palma A, Jarrah AS, Tieri P, et al. Gene regulatory network modeling of macrophage differentiation corroborates the continuum hypothesis of polarization states [J/OL]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1659 [2019-02-24]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6278720/>. DOI: 10.3389/fphys.2018.01659.
 - [31] Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity [J]. *Immunology*, 2018, 154(2): 186–195. DOI: 10.1111/imm.12910.
 - [32] Zhou D, McNamara NA. Macrophages: important players in primary Sjögren's syndrome? [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014, 10(4): 513–520. DOI: 10.1586/1744666X.2014.900441.
 - [33] Huang Y, He J, Liang H, et al. Aryl hydrocarbon receptor regulates apoptosis and inflammation in a murine model of experimental autoimmune uveitis [J/OL]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1713 [2019-02-23]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6068235/>. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01713.
 - [34] Yang Y, Liu F, Tang M, et al. Macrophage polarization in experimental and clinical choroidal neovascularization [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30933 [2019-02-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4973249/>. DOI: 10.1038/srep30933.
 - [35] Zhang Q, Cunha APD, Li S, et al. IL-27 regulates HIF-1 α -mediated VEGFA response in macrophages of diabetic retinopathy patients and healthy individuals [J]. *Cytokine*, 2019, 113: 238–247. DOI: 10.1016/j.cyt.2018.07.011.
 - [36] You IC, Coursey TG, Bian F, et al. Macrophage phenotype in the ocular surface of experimental murine dry eye disease [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2015, 63(4): 299–304. DOI: 10.1007/s00005-015-0335-0.
 - [37] Iwasa A, Arakaki R, Honma N, et al. Aromatase controls Sjögren syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages [J]. *Am J Pathol*,

- 2015, 185(1): 151-161. DOI:10.1016/j.ajpath.2014.09.006.
- [38] Wei RH, Thomas PB, Samant DM, et al. Autoimmune dacryoadenitis and sialadenitis induced in rabbits by intravenous injection of autologous lymphocytes activated ex vivo against lacrimal antigens [J]. Cornea, 2012, 31(6): 693-701. DOI:10.1097/ICO.0b013e31823f8e47.
- [39] Yin Y, Hao H, Cheng Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells direct macrophage polarization to alleviate pancreatic islets dysfunction in type 2 diabetic mice [J/OL]. Cell Death Dis, 2018, 9(7): 760 [2019-03-10]. <https://www.nature.com/articles/s41419-018-0801-9>. DOI:10.1038/s41419-018-0801-9.
- [40] Shin TH, Kim HS, Kang TW, et al. Human umbilical cord blood-stem cells direct macrophage polarization and block inflammasome activation to alleviate rheumatoid arthritis [J/OL]. Cell Death Dis, 2016, 7(12): e2524 [2019-03-02]. <https://www.nature.com/articles/cddis2016442>. DOI:10.1038/cddis.2016.442.
- [41] Deng W, Chen W, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells promote CD206 expression and phagocytic activity of macrophages through IL-6 in systemic lupus erythematosus [J]. Clin Immunol, 2015, 161(2): 209-216. DOI:10.1016/j.clim.2015.07.011.
- [42] Du YM, Zhuansun YX, Chen R, et al. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma [J]. Exp Cell Res, 2018, 363(1): 114-120. DOI:10.1016/j.yexcr.2017.12.021.
- [43] Song Y, Dou H, Li X, et al. Exosomal miR-146a contributes to the enhanced therapeutic efficacy of interleukin-1 β -primed mesenchymal stem cells against sepsis [J]. Stem Cells, 2017, 35(5): 1208-1221. DOI:10.1002/stem.2564.
- [44] Ti D, Hao H, Tong C, et al. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b [J/OL]. J Transl Med, 2015, 13: 308 [2019-03-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4575470/>. DOI:10.1186/s12967-015-0642-6.
- [45] Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(6): 1801 [2019-03-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6032107/>. DOI:10.3390/ijms19061801.
- [46] Zhou J, Kawai T, Yu Q. Pathogenic role of endogenous TNF- α in the development of Sjögren's-like sialadenitis and secretory dysfunction in non-obese diabetic mice [J]. Lab Invest, 2017, 97(4): 458-467. DOI:10.1038/labinvest.2016.141.
- [47] Wang F, Wang K, Xu W, et al. SIRT5 desuccinylates and activates pyruvate kinase M2 to block macrophage IL-1 β production and to prevent DSS-induced colitis in mice [J]. Cell Rep, 2017, 19(11): 2331-2344. DOI:10.1016/j.celrep.2017.05.065.
- [48] Kim SK, Choe JY, Lee GH. Enhanced expression of NLRP3 inflammasome-related inflammation in peripheral blood mononuclear cells in Sjögren's syndrome [J]. Clin Chim Acta, 2017, 474: 147-154. DOI:10.1016/j.cca.2017.09.019.
- [49] Caffery BE, Joyce E, Heynen ML, et al. Quantification of conjunctival TNF- α in aqueous-deficient dry eye [J]. Optom Vis Sci, 2014, 91(2): 156-162. DOI:10.1097/OPX.0000000000000133.
- [50] Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease [J]. Leukemia, 2014, 28(4): 970-973. DOI:10.1038/leu.2014.41.

(收稿日期:2019-06-24 修回日期:2019-10-02)

(本文编辑:刘艳)

消 息

第二十八届国际眼科学学术会议和第二十八届国际视光学学术会议通知

由全国十二省市医学会眼科分会、中国研究型医院学会眼科学与视觉科学专委会、复旦大学附属耳鼻喉科医院、温州医科大学眼视光医院和上海赛诺瑞会展有限公司共同主办,复旦大学附属耳鼻喉科医院和上海赛诺瑞会展有限公司共同承办的第二十八届国际眼科学学术会议、第二十八届国际视光学学术会议将于 2020 年 3 月 19—22 日在上海跨国采购会展中心(上海市普陀区光复西路 2739 号)举行。

届时,来自中国、美国及亚欧其他部分国家的眼科学领域和视光学领域的医生、专家、学者和知名厂商将云集上海出席本届会议。注册本届会议并符合相关要求的参会代表可获得国家级 I 类继续教育学分 8 分,参加眼科继续教育学习班者可获得国家级 I 类继续教育学分 10 分。同期将举行第七届国际角膜塑形学术论坛、中国研究型医院学会眼科学会与视觉科学专业委员会 2020 学术年会。

论文投稿截止日期为 2020 年 2 月 28 日。论文投稿只需提供摘要。摘要要求:(1)500 字以内规范格式书写;(2)四段式基本形式(包括目的、方法、结果、结论);(3)投稿方式:在线投稿,大会官方网站:www.cooc.org.cn。

注册费标准

付费日期	常规代表	团体	全日制在读学生
		团体(同一单位 5 人以上)	(凭有效学生证)
2019 年 12 月 31 日前	800 元/人	640 元/人	400 元/人
2020 年 1 月 1 日至 3 月 12 日	900 元/人	720 元/人	450 元/人
2020 年 3 月 13 日以后及现场	1 200 元/人	1 000 元/人	600 元/人

大会秘书处:(1)参会联络 联系人:汤老师、陈老师;联系电话:021-52665618、52668178;邮箱:realexp@cooc.org.cn。(2)参展联络 联系人:陈小姐;电话:021-52665938。联系人:黄先生;电话:021-52662368;邮箱:realexp@sh163.net。

更多大会信息,欢迎浏览大会官方网站:<http://www.cooc.org.cn>(PC 端);<http://cooc2019.medmeeting.org/>(手机端)。



(会务组)

大会微信公众平台