

流体切应力对人脐带血间充质干细胞形态、黏附及增生能力的影响

段素娟¹ 崔雯雯² 柳星² 黄国富¹

¹南昌大学第三附属医院眼科 330000; ²南昌大学医学部研究生院 330006

通信作者:黄国富, Email: hgf2222@sina.com.cn

【摘要】 目的 探讨流体切应力对人脐带血间充质干细胞(hUC-MSCs)形态、黏附及增生能力的影响。

方法 将体外培养的hUC-MSCs置于流动小室系统中,分别施加不同强度(1、2、3、4 dye/cm²)的流体切应力作用2 h、6 h,以未施加切应力的hUC-MSCs为静态对照组,倒置相差显微镜下比较各组细胞的形态改变;免疫荧光染色观察各组细胞骨架变化;real-time PCR法检测细胞间黏附因子-1(ICAM-1)、Ki67 mRNA表达水平的差异。**结果** 与静态杂乱无章的细胞相比,流体切应力作用后hUC-MSCs顺着流体方向排列。免疫荧光结果显示,流体作用后细胞骨架蛋白F-actin肌丝延长,与2 dye/cm²切应力作用2 h组相比,2 dye/cm²切应力作用6 h组细胞骨架被进一步拉长,部分细胞骨架呈松散状态。Real-time PCR结果显示,静态对照组与不同梯度流体切应力作用组ICAM-1、Ki67 mRNA相对表达量比较,差异均有统计学意义($F = 17.141, P = 0.000; F = 11.336, P = 0.001$),其中1、2、3、4 dye/cm²切应力流体作用后细胞表面ICAM-1 mRNA的相对表达量分别为 $2.74 \pm 0.32, 9.77 \pm 1.19, 6.70 \pm 0.92$ 和 5.69 ± 0.72 ,较静态对照组的 1.00 ± 0.28 明显上调,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);3 dye/cm²、4 dye/cm²切应力组Ki67 mRNA的相对表达量分别为 0.39 ± 0.09 和 0.04 ± 0.02 ,较静态对照组的 1.00 ± 0.24 明显减低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 流体切应力作用后,hUC-MSCs顺流体方向排列,流体切应力作用2 h可促进hUC-MSCs黏附,随着流体切应力作用强度的增加,细胞增生受到抑制。

【关键词】 流体切应力; 人脐带血间充质干细胞; 角膜内皮细胞; 细胞间黏附因子-1

基金项目: 国家自然科学基金项目(81560158)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.004

Effects of shear stress on morphology, adhesion and proliferation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells

Duan Sujuan¹, Cui Wenwen², Liu Xing², Huang Guofu¹

¹Department of Ophthalmology, Third Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, China; ²Department of Medicine, Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: Huang Guofu, Email: hgf2222@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of shear stress on morphology, adhesion and proliferation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (hUC-MSCs). **Methods** The hUC-MSCs were cultured *in vitro* until confluence and then placed in a flow system. The cells were subjected to different shear stress (1, 2, 3, 4 dye/cm²) for 2 hours and 6 hours, and no shear stress treatment cells served as a static control. The morphological changes of hUC-MSCs in different groups were analyzed by phase contrast microscopy and immunofluorescence. The mRNA expression levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and Ki67 were detected by real-time PCR.

Results Compared with the static control group, the hUC-MSCs cells were arranged in the direction of fluid after treated with shear stress. The immunofluorescence results showed that the cytoskeletal protein F-actin filaments was prolonged after shear stress. The cytoskeleton was further elongated in the 2 dye/cm² for 6 hours group when compared with 2 dye/cm² for 2 hours group, and the cytoskeleton was loosened when time extended to 6 hours. Real-time PCR results showed that the relative expressions of ICAM-1 mRNA and Ki67 mRNA in the static control group and different gradient shear stress groups were significantly different, with significant differences among them ($F = 17.141, P = 0.000; F = 11.336, P = 0.001$). The relative expression of ICAM-1 mRNA in the 1, 2, 3, 4 dye/cm² shear stress group

was 2.74 ± 0.32 , 9.77 ± 1.19 , 6.70 ± 0.92 and 5.69 ± 0.72 , respectively, which was significantly higher than 1.00 ± 0.28 in the static control group, with significant differences between them (all at $P < 0.05$). The relative expression of Ki67 mRNA in the 3 dye/cm² and 4 dye/cm² shear stress group was 0.39 ± 0.09 and 0.04 ± 0.02 , respectively, which was significantly lower than 1.00 ± 0.24 in the static control group, with statistically significant differences between them (both at $P < 0.05$). **Conclusions** After treated with fluid shear stress, hUC-MSCs are arranged in the direction of fluid. Shear stress can promote the adhesion of hUC-MSCs. As the increase of shear stress intensity, cell proliferation is inhibited.

[Key words] Fluid shear stress; Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells; Corneal endothelial cells; Intercellular adhesion molecule-1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560158)

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.11.004

根据全国抽样调查统计显示,中国角膜盲占致盲眼病的第二位^[1],角膜内皮移植是治疗角膜盲患者唯一有效的途径,但目前捐献的角膜数量远远无法满足社会的需求。众所周知,自体人角膜内皮细胞阻滞在细胞周期的 G₁ 期^[2-4],几乎无再生能力,在体外培养扩增有限,因此寻求角膜内皮细胞以外的其他细胞来代替内皮细胞是目前组织工程研究的方向之一。组织工程角膜是目前研究的热点,其体外构建成功的关键在于使用理想的载体支架承载种子细胞的正常生长和增生^[5-6]。近年来,美国、日本等国家开展了角膜组织工程及移植技术^[7-8],并获得了一定的成功,但是组织工程角膜和生物角膜同质性差距甚远,产品化还需要大量的科研投入和不断的探索。通过微环境诱导使各种干细胞向特定细胞定向分化是目前组织工程研究的常用方法。人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)因其易获取、无创、较强的增生分化能力、低免疫原性和无致瘤等特点,在再生医学领域受到广泛的关注^[8-9]。hUC-MSCs 可以从人脐带血、血管内膜和血管周围组织中获取。动物实验证实其对脑卒中、2 型糖尿病、年龄相关性黄斑变性、视网膜色素变性均有潜在的治疗作用^[10-12]。平行板流动小室产生的流体切应力属于机械刺激,这种力学信号可对离体细胞生物学行为进行调控。流体切应力对血管内皮细胞的影响研究在心血管领域已有较大的进展^[13-15]。已有文献证实各类干细胞在流体切应力作用下可向血管内皮细胞分化^[16-22],人角膜内皮细胞与血管内皮细胞在结构和功能上具有很多相似性。目前的研究认为,间充质干细胞在体内的分化主要取决于所处的环境,角膜内皮细胞处于与血管内皮类似的流体环境,受房水剪切应力作用,但切应力对 hUC-MSCs 作用如何尚鲜有文献报道。因此,本研究中应用平板流动腔产生的机械刺激力作用于 hUC-MSCs,旨在了解流体切应力梯度对

hUC-MSCs 形态及功能的影响,为将来流体诱导 hUC-MSCs 向角膜内皮细胞定向分化提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

hUC-MSCs(广州赛莱拉干细胞有限公司);DMEM(11965-092)、澳洲胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(10099141)(美国 Gibco 公司);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司);细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK8)检测试剂盒(CK04,日本同仁化学研究所);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒(RR420A,大连 Takara 公司);兔抗人 F-actin 抗体(4970T,美国 CST 公司);cy3 标记的羊抗兔二抗(E031620,美国 Earthox 公司)。圆形平板流动腔(Cat#: 31-010,美国 Glycotech 公司);BT100-1L 型蠕动泵(保定恒流泵有限公司);DG3022A 型酶联免疫检测仪、CFX96 型 PCR 实时反应仪(美国 BIO-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs 培养 选用 5~8 代 hUC-MSCs,以 5×10^5 /cm² 接种于 6 孔板,每孔加 2 ml DMEM+10% FBS,置 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱中进行培养,待细胞生长至 70%~80% 融合时,用质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化传代,重悬后均匀接种在质量分数 0.5% 明胶包被的直径 35 mm 的培养皿中,待细胞融合后进行后续流体实验。

1.2.2 流体切应力的实施 使用的流体加载装置包括圆形平板流动小室系统、蠕动泵(可调节流量)、真空泵、温度控制系统和稳定 pH 值的液体灌流系统(含 Hanks 完全培养基),平板流动小室包括进液口、出液口和真空连接口(图 1)。采用下式计算通过流动腔的切应力大小,即 $T = 6 \mu Q / wh^2$,公式中 T 代表流体切应力, Q 为流量, μ 为液体黏度, w 和 h 分别代表流动腔的宽和高。

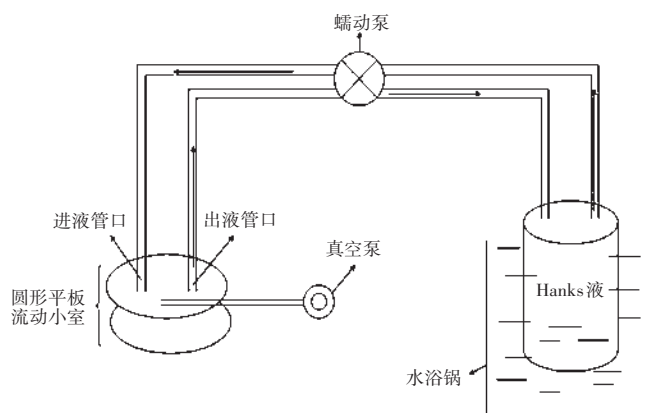


图 1 流体切应力装置实施过程简图

1.2.3 实验分组 采用圆形平板流动小室进行流体实验,由 BT100-1L 型蠕动泵提供稳定层流流体切应力,将长满细胞的培养皿置于上述流体装置,设置不同梯度流体切应力(1、2、3、4 dye/cm^2),按切应力强度及加载时间分为静态对照组、1 dye/cm^2 切应力作用 2 h 组、2 dye/cm^2 切应力作用 2 h 组、3 dye/cm^2 切应力作用 2 h 组、4 dye/cm^2 切应力作用 2 h 组、1 dye/cm^2 切应力作用 6 h 组和 2 dye/cm^2 切应力作用 6 h 组。

1.2.4 MTT 法检测细胞生长活力 选用对数期生长细胞,胰蛋白酶消化后以 3×10^3 /孔的密度接种至 96 孔板,总体积为 300 μl ,培养时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 d,每孔加 5 mg/L MTT 溶液 10 μl ,继续在培养箱中孵育 4 h,终止培养,离心吸弃孔内上清,每孔加 DMSO 100 μl ,振荡 10 min 使结晶充分溶解,酶联免疫检测仪上测定波长 490 nm 处各孔吸光度(A)值,以时间为横坐标、A 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.5 免疫荧光染色检测 F-actin 的表达 将流体处理后的不同组细胞同时进行免疫荧光染色,具体步骤如下:PBS 洗 5 min,共 3 次,质量分数 4% 多聚甲醛固定 20 min,继而体积分数 0.3% Triton X-100 透膜 15 min,质量分数 3% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h,加兔抗人 F-actin 一抗(1:100),湿盒内 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗后孵育二抗(1:200)2 h,DAPI 染核 5 min,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 Real-time PCR 检测 ICAM-1 mRNA 和 Ki67 mRNA 的相对表达量 收集各组流体切应力处理 2 h 后的细胞,Trizol 法提取细胞总 RNA,用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,ICAM-1、Ki67 及管家基因 GAPDH 的引物设计见表 1,将 cDNA 产物进行 real-time PCR 反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min;然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s,40 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。待反应结束后

确认 real-time PCR 的扩增曲线和融解曲线,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对各组样品目的基因的表达水平进行相对定量分析。实验重复 3 次,取平均值。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段长度(bp)
ICAM-1	正向:ACAGACACTAGAGGAGTGAGCA	247
	反向:GTGAGCGTCCATATTTAGGCATGG	
Ki67	正向:ACTTGCCCTCCTAATACGCC	133
	反向:TTACTACATCTGCCCATGA	
GAPDH	正向:CCATGGAGAAGGCTGGGG	160
	反向:CAAAGTTGTCATGGATGACC	

注:PCR:聚合酶链式反应;ICAM:细胞间黏附分子;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件(序列号:4106532834,美国 IBM 公司)进行统计分析。定量资料的数据经 Kolmogorov-Smirnov 检验证实呈正态分布,以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。接种后不同时间点 hUC-MSCs 增生活力(A 值)比较及各组间 ICAM-1 mRNA 和 ki67 mRNA 相对表达量的总体比较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 hUC-MSCs 细胞培养及生长曲线

倒置相差显微镜下观察,细胞呈梭形、成纤维样生长(图 2A),MTT 结果显示以 $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 接种后细胞呈对数生长,约 4 d 时达到平台期(图 2B)。随着培养时间延长,不同时间点细胞生长活力(A 值)总体比较,差异有统计学意义($F = 43.90, P = 0.00$),与初始生长状态(0.5 d)比较,培养后 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 d 细胞 A 值明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表 2)。

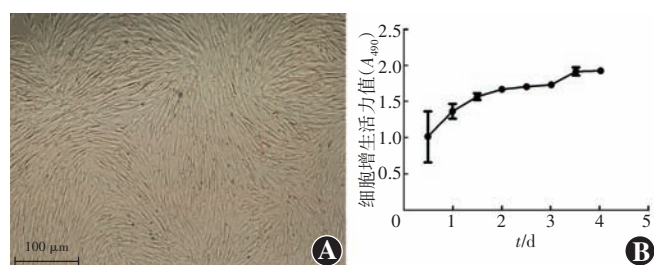


图 2 hUC-MSCs 的培养 A:hUC-MSCs 呈纺锤样贴壁生长($\times 40$, 标尺 = 100 μm) B:hUC-MSCs 生长曲线($n = 3$)

表 2 接种后不同时间点 hUC-MSCs 增生活力比较 (mean±SD, A 值)

时间 (d)	样本量	hUC-MSCs A 值
0.5	3	1.03±0.38
1.0	3	1.41±0.11 ^a
1.5	3	1.63±0.05 ^a
2.0	3	1.74±0.02 ^a
2.5	3	1.78±0.03 ^a
3.0	3	1.81±0.02 ^a
3.5	3	2.01±0.06 ^a
4.0	3	2.02±0.03 ^a
F 值		43.90
P 值		0.00

注:与 0.5 d 值比较, ^aP<0.05 (单因素方差分析, LSD-t 检验)
hUC-MSCs: 人脐带间充质干细胞

2.2 流体切应力作用对 hUC-MSCs 细胞骨架的影响

免疫荧光结果显示,静态对照组细胞为短梭形,呈不规则排列;流体切应力作用后细胞骨架蛋白 F-actin 肌丝延长,与 2 dye/cm² 切应力作用 2 h 组相比,2 dye/cm² 切应力作用 6 h 组细胞骨架被进一步拉长(图 3);但当作用时间延长至 6 h 时,不同流体切应力干预下的细胞骨架均会出现松散,部分细胞的骨架稀疏拉长(图 4)。

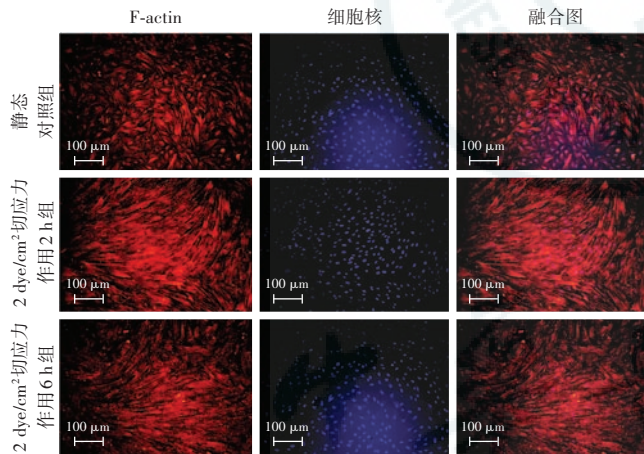


图 3 2 dye/cm² 流体切应力作用后不同时间 hUC-MSCs 改变 (Cy3, DAPI ×40, 标尺 = 100 μm) 静态对照组细胞为短梭形,呈不规则排列,2 dye/cm² 切应力作用 2 h 细胞呈长梭形,骨架蛋白顺应流体方向被拉伸,作用时间延长至 6 h,细胞骨架进一步拉长,并出现不同程度细胞脱落 注:F-actin:F-肌动蛋白

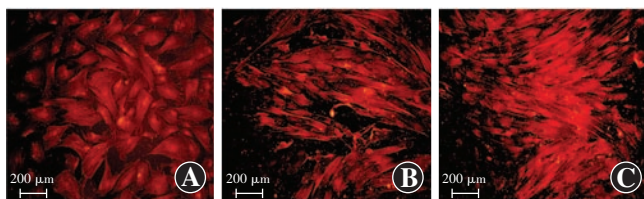


图 4 不同流体切应力作用后 6 h hUC-MSCs 改变 (Cy3, DAPI ×100, 标尺 = 200 μm) 静态对照组细胞为短梭形,不同流体切应力作用后 6 h 细胞均呈现不同程度脱落 A:静态对照组 B:1 dye/cm² 切应力作用 6 h 组 C:2 dye/cm² 切应力作用 6 h 组

2.3 不同梯度流体切应力作用后 ICAM-1、Ki67 mRNA 相对表达量的变化

Real-time PCR 结果显示,静态对照组与不同梯度流体切应力组 ICAM-1、Ki67 mRNA 相对表达量总体比较,差异均有统计学意义 ($F = 17.141, P = 0.000; F = 11.336, P = 0.001$),其中 1、2、3、4 dye/cm² 切应力组细胞表面 ICAM-1 mRNA 的相对表达量较静态对照组明显上调,2 dye/cm² 切应力组上调最显著,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$);1 dye/cm²、2 dye/cm² 切应力组 Ki67 mRNA 的相对表达量与静态对照组比较,差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$),3 dye/cm²、4 dye/cm² 切应力组 Ki67 mRNA 相对表达量较静态对照组明显降低,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 3)。

表 3 静态对照组与不同梯度流体切应力作用组 ICAM-1、Ki67 mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)

组别	样本量	ICAM-1 mRNA 相对表达量	Ki67 mRNA 相对表达量
静态对照组	3	1.00±0.28	1.00±0.24
1 dye/cm ² 切应力组	3	2.74±0.32 ^a	0.88±0.19
2 dye/cm ² 切应力组	3	9.77±1.19 ^a	0.72±0.27
3 dye/cm ² 切应力组	3	6.70±0.92 ^a	0.39±0.09 ^a
4 dye/cm ² 切应力组	3	5.69±0.72 ^a	0.04±0.02 ^a
F 值		17.141	11.336
P 值		0.000	0.001

注:与静态对照组比较, ^aP<0.05 (单因素方差分析, LSD-t 检验)
ICAM: 细胞间黏附分子

3 讨论

越来越多的证据表明微环境中的细胞暴露于多种力,包括剪切应力、静水压力、张力、机械压缩,以及细胞外基质等的作用中,从而对细胞的生物学功能进行调控。机械力信号作用于不同种类的细胞会激活不同的信号通路、基因表达及细胞生理变化^[23]。脐带可以提供取之不尽的低成本 hUC-MSCs 来源, hUC-MSCs 免疫排斥反应低、不具有致瘤性及具有多向分化潜能等特点使其成为角膜组织工程可靠的种子细胞来源。已有文献报道, hUC-MSCs 能促进角膜内皮损伤修复^[24],也有报道提出间充质干细胞能够通过微环境诱导分化为内皮样细胞^[25-27]。但关于机械刺激对角膜组织工程种子细胞 hUC-MSCs 的影响尚不清楚,因此,本研究提出将流体切应力作用于角膜组织工程种子细胞 hUC-MSCs,研究 hUC-MSCs 在切应力作用下黏附、增生的变化。

本研究结果表明, hUC-MSCs 对流体切应力敏感, hUC-MSCs 在形态和功能上能随着流体切应力的变化而发生变化。本研究结果发现, 正常体外培养的 hUC-MSCs 呈短梭形、纺锤样生长, 流体作用后 hUC-MSCs 变细长且顺着流体方向排列; 细胞骨架蛋白 F-actin 肌丝延长, 与 2 dye/cm² 切应力作用 2 h 组相比, 2 dye/cm² 切应力作用后 6 h 细胞骨架被进一步拉长; 不同流体切应力干预后 6 h 细胞骨架均会出现松散, 且部分细胞的骨架被拉长。说明随着作用时间延长, 细胞骨架会有一定损伤, 从而出现不同程度细胞脱落, 这与流体切应力大小及作用时间均相关。细胞骨架是细胞与外部环境相接触的重要结构, 细胞骨架的成分之一 F-actin 肌丝参与细胞间的信号传导, 已有文献报道流体作用于血管内皮细胞后细胞骨架蛋白 F-actin 发生重塑^[28-30], 与本研究结果类似。但不同细胞对流体耐受性不同, 导致同一流体切应力作用下细胞骨架蛋白呈现不完全一致的改变, 本研究中结果显示 1 dye/cm² 切应力组和 2 dye/cm² 切应力组细胞骨架均出现不同程度脱离, 分析可能与细胞密度、体外培养细胞自身活力以及人为操作等因素有关。

有研究显示切应力能明显提高内皮细胞的增生能力^[31-33]。Vara 等^[34]研究表明, 用低流体切应力预处理内皮细胞可以增强细胞黏附性, 改进细胞生物学功能, 但仍无法达到理想效果。种子细胞移植至载体后容易出现细胞凋亡、脱落、黏附不良及功能不理想一直是角膜内皮组织工程研究的瓶颈, 使移植成功率大大降低。本研究结果表明, 与静态对照组相比, 1、2、3、4 dye/cm² 切应力均能促进 hUC-MSCs 中 ICAM-1 的表达上调, 且 2 dye/cm² 切应力作用后上调最显著, 表明适宜流体刺激能促进种子细胞的黏附能力。目前关于剪切应力是否有助于种子细胞的体外增生尚存在争议。有研究表明, 切应力可促进内皮细胞增生^[35], 也有研究表明高强度流体切应力可抑制内皮细胞增生, 低强度流体切应力对内皮细胞增生无影响^[36]。本研究结果显示, 低强度 (1 dye/cm²、2 dye/cm²) 流体切应力作用后细胞增生标志物 Ki67 mRNA 相对表达量与静态对照组相比无明显变化, 但随着切应力强度的增大 (3 dye/cm²、4 dye/cm²), Ki67 mRNA 的表达受到明显抑制, 这可能与较大切应力下细胞启动分化会关闭某些与增生相关的基因或信号通路有关^[37-40]。

总之, 本研究发现 hUC-MSCs 经流体切应力刺激后细胞骨架发生重塑, ICAM-1 表达上调, 为今后流体切应力诱导 hUC-MSCs 成为理想的角膜内皮种子细胞提供了实验基础, 但细胞是如何感知流体信号、接受流

体刺激后的细胞发生怎样的信号通路改变等尚需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Song X, Xie L, Tan X, et al. A multi-center, cross-sectional study on the burden of infectious keratitis in China [J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9 (12) : e113843 [2018-10-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4250054/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0113843.
- [2] Joyce NC, Harris DL, Mello DM. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43 (7) : 2152-2159.
- [3] Yoshida K, Kase S, Nakayama K, et al. Involvement of p27KIP1 in the proliferation of the developing corneal endothelium [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45 (7) : 2163-2167. DOI: 10.1167/iops.03-1238.
- [4] Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2003, 22 (3) : 359-389.
- [5] Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 35 : 1-17. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.01.003.
- [6] Palchesko RN, Carrasquilla SD, Feinberg AW. Natural biomaterials for corneal tissue engineering, repair, and regeneration [J/OL]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7 (16) : e1701434 [2018-10-06]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/adhm.201701434>. DOI: 10.1002/adhm.201701434.
- [7] Huang G, Gonzalez E, Lee R, et al. Anatomic predictors for anterior chamber angle opening after laser peripheral iridotomy in narrow angle eyes [J]. *Curr Eye Res*, 2012, 37 (7) : 575-582. DOI: 10.3109/02713683.2012.655396.
- [8] Huang G, Lin SC. When should we give up filtration surgery: indications, techniques and results of cyclodestruction [J]. *Dev Ophthalmol*, 2012, 50 : 173-183. DOI: 10.1159/000334800.
- [9] Ziaei M, Zhang J, Patel DV, et al. Umbilical cord stem cells in the treatment of corneal disease [J]. *Surv Ophthalmol*, 2017, 62 (6) : 803-815. DOI: 10.1016/j.survophthal.2017.02.002.
- [10] Lund RD, Wang S, Lu B, et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (3) : 602-611. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0308.
- [11] Jomura S, Uy M, Mitchell K, et al. Potential treatment of cerebral global ischemia with Oct-4⁺ umbilical cord matrix cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (1) : 98-106. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0055.
- [12] Chao KC, Chao KF, Fu YS, et al. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes [J/OL]. *PLoS One*, 2008, 3 (1) : e1451 [2018-10-08]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001451>. DOI: 10.1371/journal.pone.0001451.
- [13] Hetterich H, Jaber A, Gehring M, et al. Coronary computed tomography angiography based assessment of endothelial shear stress and its association with atherosclerotic plaque distribution *in-vivo* [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10 (1) : e0115408 [2018-10-01]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0115408>. DOI: 10.1371/journal.pone.0115408.
- [14] Scheitlin CG, Nair DM, Crestanello JA, et al. Fluid mechanical forces and endothelial mitochondria: a bioengineering perspective [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2014, 7 (4) : 483-496. DOI: 10.1007/s12195-014-0357-4.
- [15] Kim S, Giddens DP. Mass transport of low density lipoprotein in reconstructed hemodynamic environments of human carotid arteries: the role of volume and solute flux through the endothelium [J/OL]. *J Biomech Eng*, 2015, 137 (4) : 041007 [2018-10-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4340191/>. DOI: 10.1115/1.

- 4028969.
- [16] Ahsan T, Nerem RM. Fluid shear stress promotes an endothelial-like phenotype during the early differentiation of embryonic stem cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16 (11) : 3547–3553. DOI: 10. 1089/ten. TEA. 2010. 0014.
- [17] Dong JD, Gu YQ, Li CM, et al. Response of mesenchymal stem cells to shear stress in tissue-engineered vascular grafts [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(5) : 530–536. DOI: 10. 1038/aps. 2009. 40.
- [18] Fischer LJ, McIlhenny S, Tulenko T, et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force [J]. *J Surg Res*, 2009, 152(1) : 157–166. DOI: 10. 1016/j. jss. 2008. 06. 029.
- [19] Huang NF, Li S. Mesenchymal stem cells for vascular regeneration [J]. *Regen Med*, 2008, 3(6) : 877–892. DOI: 10. 2217/17460751. 3. 6. 877.
- [20] 杨震, 陶军, 王洁梅, 等. 流体切应力对内皮祖细胞内皮型一氧化氮合酶基因表达和一氧化氮分泌的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(4) : 359–362.
- Yang Z, Tao J, Wang JM, et al. Fluid shear stress upregulated endothelial nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide formation in human endothelial progenitor cells [J]. *Chin J Cardiol*, 2007, 35(4) : 359–362.
- [21] 李利芳, 王安才. 具有梯度的流体切应力促进血管内皮细胞增殖 [J]. *医用生物力学*, 2008, 23(4) : 266–269.
- Li LF, Wang AC. Gradient shear stress induces vascular endothelial cells proliferation [J]. *J Med Biomechanics*, 2008, 23(4) : 266–269.
- [22] 张峰, 陈瀚. 激光虹膜切开术对角膜内皮细胞所受切应力影响的数值研究 [J]. *医用生物力学*, 2016, 31(1) : 33–39. DOI: 10. 3871/j. 1004-7220. 2016. 01. 033.
- Zhang F, Chen H. Numerical investigation of laser iridotomy influence on shear stress exerted on corneal endothelial cells [J]. *J Med Biomechanics*, 2016, 31(1) : 33–39. DOI: 10. 3871/j. 1004-7220. 2016. 01. 033.
- [23] Sun J, Luo Q, Liu L, et al. Low-level shear stress promotes migration of liver cancer stem cells via the FAK-ERK1/2 signalling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2018, 427 : 1–8. DOI: 10. 1016/j. canlet. 2018. 04. 015.
- [24] Joyce NC, Harris DL, Markov V, et al. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium [J]. *Mol Vis*, 2012, 18 : 547–564.
- [25] Engelmayr GC, Sales VL, Mayer JE, et al. Cyclic flexure and laminar flow synergistically accelerate mesenchymal stem cell-mediated engineered tissue formation: Implications for engineered heart valve tissues [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(36) : 6083–6095. DOI: 10. 1016/j. biomaterials. 2006. 07. 045.
- [26] Yamashita K, Inagaki E, Hatou S, et al. Corneal endothelial regeneration using mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(16) : 1097–1108. DOI: 10. 1089/scd. 2017. 0297.
- [27] Ziaei M, Zhang J, Patel DV, et al. Umbilical cord stem cells in the treatment of corneal disease [J]. *Surv Ophthalmol*, 2017, 62(6) : 803–815. DOI: 10. 1016/j. survophthal. 2017. 02. 002.
- [28] Franke RP, Gräfe M, Schnittler H, et al. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress [J]. *Nature*, 1984, 307(5952) : 648–649. DOI: 10. 1038/307648a0.
- [29] Galbraith CG, Skalak R, Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998, 40(4) : 317–330. DOI: 10. 1002/(SICI) 1097-0169(1998)40:4<317::AID-CM1>3.0.CO;2-8.
- [30] Birukov KG, Birukova AA, Dudek SM, et al. Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26(4) : 453–464. DOI: 10. 1165/ajrcmb. 26. 4. 4725.
- [31] Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress [J]. *J Appl Physiol (1985)*, 2003, 95(5) : 2081–2088. DOI: 10. 1152/jappphysiol. 00232. 2003.
- [32] Kuang B, Zeng Z, Qin Q. Biomechanically stimulated chondrocytes promote osteoclastic bone resorption in the mandibular condyle [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 98 : 248–257. DOI: 10. 1016/j. archoralbio. 2018. 12. 002.
- [33] Lambert LM, Pipinos II, Baxter BT, et al. *In vitro* measurements of hemodynamic forces and their effects on endothelial cell mechanics at the sub-cellular level [J/OL]. *Biomicrofluidics*, 2018, 12(6) : 064101 [2018-09-20]. <https://sci-hub.tw/10.1063/1.5028122>. DOI: 10. 1063/1. 5028122.
- [34] Vara DS, Punshon G, Sales KM, et al. Endothelial cell retention on a viscoelastic nanocomposite vascular conduit is improved by exposure to shear stress preconditioning prior to physiological flow [J]. *Artif Organs*, 2008, 32(12) : 977–981. DOI: 10. 1111/j. 1525-1594. 2008. 00659. x.
- [35] Kapur S, Baylink DJ, Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways [J]. *Bone*, 2003, 32(3) : 241–251. DOI: 10. 1016/s8756-3282(02)00979-1.
- [36] 胡江, 胡嘉, 高宇欣, 等. 流动剪切和不同流型对血管内皮细胞增殖的影响 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2003, 20(3) : 422–424.
- Hu J, Hu J, Gao YX, et al. The effect of shear stress and flow pattern on proliferation of vascular endothelial cells [J]. *J Biomed Engineer*, 2003, 20(3) : 422–424.
- [37] Ji JY. Endothelial nuclear lamina in mechanotransduction under shear stress [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1097 : 83–104. DOI: 10. 1007/978-3-319-96445-4_5.
- [38] Shin H, Haga JH, Kosawada T, et al. Fine control of endothelial VEGFR-2 activation: caveolae as fluid shear stress shelters for membrane receptors [J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2019, 18(1) : 5–16. DOI: 10. 1007/s10237-018-1063-2.
- [39] Lee JY, Chung J, Kim KH, et al. Fluid shear stress regulates the expression of Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 via KLF2-AP-1 pathway depending on its intensity and pattern in endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 270 : 76–88. DOI: 10. 1016/j. atherosclerosis. 2018. 01. 038.
- [40] Fang JS, Coon BG, Gillis N, et al. Shear-induced Notch-Cx37-p27 axis arrests endothelial cell cycle to enable arterial specification [J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8(1) : 2149 [2018-10-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5732288/>. DOI: 10. 1038/s41467-017-01742-7.

(收稿日期:2019-04-11 修回日期:2019-09-30)

(本文编辑:刘艳)

更正

《中华实验眼科杂志》2019 年第 37 卷第 8 期 608~612 页《基于 FA-Net 的视网膜眼底图像质量评估》、613~618 页《基于生成对抗网络的糖尿病视网膜病变眼底图像生成》、619~623 页《多通道条件生成对抗网络视网膜血管分割算法》中,由于作者疏忽,“基金项目:国家自然科学基金项目 (GBA1604401);江苏省自然科学基金项目 (PAF16022)”,应改为“基金项目:国家自然科学基金项目 (61603182);江苏省自然科学基金项目 (BK20160803)”,特此更正。

(本刊编辑部)