

· 实验研究 ·

# 骨髓间充质干细胞条件培养基对人自发永生化 Müller 细胞系增生、黏附和分化的促进作用

葛玲玲 李沂键 黎其友 古贤梁 黄小娜 陶醉 徐海伟

陆军军医大学第一附属医院眼科 视觉损伤与再生修复重庆市重点实验室, 重庆 400038

通信作者: 陶醉, Email: taozui\_sure@163.com; 徐海伟, Email: xuhaiwei@tmmu.edu.cn

**【摘要】** 目的 探讨骨髓间充质干细胞(BMSCs)来源的条件培养基对人永生化 Müller 细胞系 MIO-M1 细胞增生、黏附和分化的作用。方法 BMSCs 传至第 3 代进行成骨、成软骨及成脂诱导培养基诱导分化,并分别使用茜素红、阿利辛蓝及油红 O 染色进行分化鉴定;采用流式细胞仪检测细胞中间充质干细胞标志物 CD73、CD90 和 CD105 以及造血干细胞标志物 CD34、CD45 和人类白细胞 DR 抗原(HLA-DR)表达。采用免疫荧光染色法检测 MIO-M1 细胞中 Müller 细胞标志物 SOX9、谷氨酰胺合成酶(GS)、vimentin 和胞内视黄醛结合蛋白(CRALBP),视网膜干细胞标志物 SOX2、nestin 和 CHX10,以及细胞增生标志物细胞周期蛋白 D3(CCND3)的表达。将 MIO-M1 细胞分为标准培养基组、293T 条件培养基组和 BMSC 条件培养基组,分别在标准培养基、293T 培养上清液和 BMSC 培养上清液中培养。定量分析各组细胞面积、圆度、伸长系数、周长等形态参数;采用流式细胞仪检测细胞周期,采用成球实验和 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)染色法检测细胞增生情况。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测各组培养上清液中血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)的表达;采用荧光定量 PCR 法检测各组细胞中 VCAM-1 mRNA 表达。采用免疫荧光染色法和荧光定量 PCR 法分别检测各组细胞诱导分化培养后视网膜神经元标志物蛋白激酶 C(PKC $\alpha$ )、Rhodopsin、微管相关蛋白 2(MAP2)和  $\beta$ -微管蛋白(Tuj1)的表达变化。结果 培养的 BMSCs 高表达 CD73、CD90 和 CD105,低表达 CD34、CD45 和 HLA-DR,并可成功诱导分化为成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞。MIO-M1 细胞表达 SOX9、GS、vimentin、CRALBP、SOX2、CHX10、nestin 和 CCND3。与标准培养基和 293T 条件培养基组比较,BMSC 条件培养基组的 MIO-M1 细胞形态发生改变,形成细长的纺锤形或多极形态,且细胞面积减少,伸长系数增加,圆度降低,差异均有统计学意义( $F=6.973, 12.370, 6.311$ , 均  $P<0.01$ );与标准培养基和 293T 条件培养基组比较,不同时间点 BMSC 条件培养基组 MIO-M1 细胞形成的神经球面积明显增大,差异均有统计学意义( $F_{\text{组别}}=134.300, P<0.001; F_{\text{时间}}=82.910, P<0.001$ );与标准培养基和 293T 条件培养基组比较,BMSC 条件培养基组 MIO-M1 细胞的 EdU 阳性率和细胞增生指数均显著提高,差异均有统计学意义( $F=6.973, 74.110$ , 均  $P<0.05$ );与标准培养基和 293T 条件培养基组比较,BMSC 条件培养基组的细胞上清液中 VCAM-1 蛋白质量浓度和细胞中的 VCAM-1 mRNA 相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义( $F=13.720, 7.896$ , 均  $P<0.05$ );MIO-M1 细胞在分化条件下,BMSC 条件培养基组的 MIO-M1 细胞在 mRNA 水平的 PKC $\alpha$ 、Rhodopsin、Tuj1 和 MAP2 相对表达量较标准培养基组和 293T 条件培养基组均明显升高,差异均有统计学意义( $F=14.490, 5.424, 14.330, 7.405$ , 均  $P<0.05$ )。结论 BMSC 条件培养基可以改变 Müller 细胞的形态,并促进其增生、黏附和向视网膜神经元的分化。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞; 干细胞; 细胞增生; 细胞分化; Müller 细胞

基金项目: 国家自然科学基金项目(31930068、81873688)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20210702-00386

## Promoting effect of conditioned medium of human bone mesenchymal stem cells on proliferation, adhesion and neuronal differentiation of immortalized human Müller cell line

Ge Lingling, Li Yijian, Li Qiyu, Gu Xianliang, Huang Xiaona, Tao Zui, Xu Haiwei

Department of Ophthalmology, Southwest Hospital/Southwest Eye Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Key Lab of Visual Damage and Regeneration &amp; Restoration of Chongqing, Chongqing 400038, China

Corresponding authors: Tao Zui, Email: taozui\_sure@163.com; Xu Haiwei, Email: xuhaiwei@tmmu.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** To explore the effects of conditioned medium of human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on the proliferation, adhesion and differentiation of immortalized human Müller cell line (MIO-M1). **Methods** The differentiation was induced in the third-passage BMSCs with osteogenic, chondrogenic and



adipogenic medium and identified by alizarin red, alcian blue and oil red O staining, respectively. The expression levels of mesenchymal stem cell markers CD73, CD90 and CD105 and hematopoietic cell markers CD34, CD45 and human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) were assayed by flow cytometry. The expressions levels of Müller cell markers SOX9, glutamine synthetase (GS), vimentin and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP), retinal stem cell markers SOX2, nestin and CHX10, and cell proliferation marker cyclin D3 (CCND3) in MIO-M1 cells were detected by immunofluorescence staining. The MIO-M1 cells were divided into standard medium group, 293T conditioned medium group, and BMSC conditioned medium group and were incubated in the medium according to grouping. The cellular area, circularity, elongation factor and perimeter were analyzed quantitatively. The cell cycle was detected by flow cytometry, and the cell proliferation was determined by neurospora experiment and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining. The expression of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) at protein and mRNA levels in the culture supernatant was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR), respectively. The expression of retinal neuron markers protein kinase C (PKC $\alpha$ ), Rhodopsin, microtubule-associated protein 2 (MAP2) and  $\beta$ -tubulin (Tuj1) was detected by immunofluorescence staining and qRT-PCR. **Results** CD73, CD90, CD105 showed an enhanced expression, and CD34, CD45 and HLA-DR showed weakened expression in the BMSCs. The BMSCs differentiated into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. Expression of SOX9, GS, vimentin and CRALBP, SOX2, CHX10, nestin and CCND3 was found in the MIO-M1 cells. Compared with standard medium group and 293T conditioned medium group, MIO-M1 cells cultured in BMSC conditioned medium group changed into an elongated spindle-shaped or multipolar morphology with reduced cell area, increased elongation index and decreased circularity, showing statistically significant differences among them ( $F = 6.973, 12.370, 6.311$ ; all at  $P < 0.01$ ). There were increased neurospheres formed by MIO-M1 cells in BMSC conditioned medium group compared with standard medium group and 293T conditioned medium group at different time points ( $F_{\text{group}} = 134.300, P < 0.001$ ;  $F_{\text{time}} = 82.910, P < 0.001$ ). Compared with the standard medium group and 293T conditioned medium group, the EdU-positive rate and proliferation index of MIO-M1 cells in BMSC conditioned medium group were significantly increased, with statistically significant differences ( $F = 6.973, 74.110$ ; all at  $P < 0.05$ ); the VCAM-1 protein expression in cell supernatant and the relative expression level of VCAM-1 mRNA in BMSC conditioned medium group were significantly increased ( $F = 13.720, 7.896$ ; all at  $P < 0.05$ ); the mRNA expression levels of PKC $\alpha$ , Rhodopsin, Tuj1 and MAP2 were higher in MIO-M1 cells of BMSC conditioned medium group under the condition of differentiation ( $F = 14.490, 5.424, 14.330, 7.405$ ; all at  $P < 0.05$ ). **Conclusions** BMSCs conditioned medium can change the morphology of MIO-M1 cells and promote their proliferation, adhesion and differentiation into retinal neurons.

**[Key words]** Bone marrow mesenchymal stem cells; Stem cells; Cell proliferation; Cell differentiation; Müller cell

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (31930068, 81873688)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20210702-00386

视网膜变性疾病是包含视网膜色素变性、年龄相关性黄斑变性和糖尿病视网膜病变等在内的一类疾病,可导致视力障碍,严重影响患者的生活质量。该类疾病的主要特点是视网膜神经元功能障碍和丧失,继而导致视觉功能不可逆的损害,目前尚无有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。细胞替代治疗是恢复异常视网膜视觉功能一种潜在的有效方法,已成为视网膜再生研究的重要方向。通过干细胞移植可再生损伤的视网膜神经元,但存在增生能力偏低、难以向特定神经元优先分化等问题,成为有效修复视网膜的技术瓶颈<sup>[2]</sup>。MIO-M1细胞是自然筛选的人源永生化的Müller细胞系,具有自我更新的干细胞特性,并有分化成为各种视网膜神经元的潜能<sup>[3-4]</sup>。研究表明,MIO-M1细胞能够与视网膜神经元进行细胞整合和分化<sup>[4-5]</sup>,取代退化的视网膜细胞,是一种理想的移植细胞来源,但MIO-M1细胞同样存在上述增生能力和定向分化问题。有报道间

充质干细胞条件培养基可以提高细胞增生和分化的潜力<sup>[6-7]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是骨髓内存在的一类非造血干细胞,可以通过成熟的技术获得,因此受到广泛关注。前期有研究表明,BMSCs能通过产生神经营养因子促进神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增生和分化,具有较强的神经保护作用<sup>[8-9]</sup>。在视网膜的研究中,BMSCs分泌的神经营养因子、抗炎细胞因子和外囊泡对青光眼和光损伤视网膜模型有较好的治疗效果<sup>[9-14]</sup>。本实验室前期研究发现,BMSCs和视网膜祖细胞(retinal progenitor cells, RPCs)联合移植于视网膜变性大鼠的视网膜下腔,较单独移植一种细胞(BMSCs或RPCs)能更好地维持视网膜功能,并提高RPCs向感光细胞分化的比率<sup>[15-16]</sup>。此外,既往研究也表明,BMSCs与NSCs体外共培养可促进NSCs分化和轴突发育<sup>[17]</sup>。然而BMSCs对MIO-M1细胞增生能力和定

向分化的影响尚未明确。本研究中拟探索 BMSCs 来源的条件培养基对 MIO-M1 细胞增生和分化的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** BMSCs 由陆军军医大学第一附属医院生物样品库提供<sup>[18]</sup>;293T 细胞购自美国 ATCC 细胞库;Müller 细胞系 MIO-M1 细胞由上海交通大学附属第一人民医院眼科张敬法教授馈赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 高糖 DMEM、DMEM/F12 培养基、质量分数 0.25% 胰蛋白酶、磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) (美国 HyClone 公司); 特级南美胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (乌拉圭 Lonsera 公司); 兔抗 SOX9 单克隆抗体 (ab185966)、兔抗 Rhodopsin 单克隆抗体 (ab221664)、小鼠抗胞内视黄醛结合蛋白 (cellular retinaldehyde-binding protein, CRALBP) 单克隆抗体 (ab15051)、兔抗 MAP2 多克隆抗体 (ab183830)、兔抗 SOX2 多克隆抗体 (ab97959) (美国 Abcam 公司); 小鼠抗 vimentin 单克隆抗体 (SC6260)、小鼠抗 CHX10 单克隆抗体 (SC369915) (美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 单克隆抗体 (MAB302)、小鼠抗 Tuj1 单克隆抗体 (T5076) (美国 Sigma-Aldrich 公司); 兔抗 CCND3 多克隆抗体 (PA5-86224) (美国 Invitrogen 公司); 流式检测抗体 CD34-FITC (11-0349-41)、CD45-FITC (MHCD4501)、人类白细胞 DR 抗原 (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)-FITC (MHLDR01)、CD73-PE (12-0739-41)、CD90-PE (12-0909-42)、CD105-PE (12-1057-42) (美国 Thermo 公司); Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG (A-11029)、Alexa Fluor 568 标记山羊抗小鼠 IgG (A-11031)、BeyoClick™5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)-488 细胞增生检测试剂盒 (上海碧云天生物科技有限公司); OriCell 成人 BMSC 成骨、成脂、成软骨诱导分化培养基试剂盒 [赛业 (苏州) 生物科技有限公司]; 人源表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) (美国 PeproTech 公司); 血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (武汉云克隆科技股份有限公司); 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) (北京索莱宝科技有限公司); 逆转录试剂盒 (RR047A)、实时荧光定量试剂盒 (RR820A) (宝日医

生物技术有限公司)。ACEA NovoCyte 流式细胞仪 (杭州艾森生物有限公司); OLYMPUS-IX70 型生物显微镜 (日本 Olympus 公司); LSM880 型激光扫描共聚焦显微镜 (德国蔡司公司); Thermo Scientific™ Stratos™ 离心机、酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 BMSCs 的培养及鉴定** BMSCs 用含体积分数 10% FBS 和质量分数 1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养基培养, 光学显微镜下观察细胞生长情况; 待细胞生长至 80%~90% 融合度时进行传代, 取第 3~5 代 BMSCs 用于后续实验。使用成骨、成软骨及成脂诱导培养基诱导培养第 3 代 BMSCs, 使用茜素红、阿利辛蓝及油红 O 进行染色。制备  $1 \times 10^6$  个/ml 的 BMSCs 单细胞悬液, 使用流式抗体对细胞进行避光孵育 30 min, 1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞, PBS 漂洗后进行流式细胞仪检测分析。

**1.2.2 293T 细胞和 MIO-M1 细胞的培养** 293T 细胞和 MIO-M1 细胞用含 10% FBS 和 1% 青链霉素的高糖 DMEM 培养基于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养; 待细胞生长至融合度为 90%, 用 0.25% 胰蛋白酶消化进行传代。

**1.2.3 免疫荧光法鉴定 MIO-M1 细胞特性** 取常规培养的 MIO-M1 细胞, 采用免疫荧光染色法检测 Müller 细胞标志物 SOX9、GS、vimentin 和 CRALBP 蛋白的表达以及视网膜干细胞标志物 SOX2、nestin 和 CHX10 的表达。将 MIO-M1 细胞以 1 000 个/cm<sup>2</sup> 接种于含去分化培养基 (含体积分数 2% B27、20 ng/ml EGF、10 ng/ml bFGF、1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养液) 的低黏附培养板中, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养; 取培养 3 d 的神经球滴于包被多聚赖氨酸的细胞爬片上, 继续培养 1 d 后采用免疫荧光染色法检测神经球中干细胞标志物 SOX2、CHX10 和细胞增生标志物 CCND3 的表达。

### 1.2.4 293T 细胞、BMSC 培养上清的收集及实验分组

将 BMSCs 和 293T 细胞接种至直径 10 cm 培养皿中培养, 待融合度至 70%~80% 时, 弃去培养液并用 PBS 洗 3 次, 换为含 1% 青链霉素的基础培养基 (DMEM/F12); 培养 24 h 收集培养上清液, 2 000×g 离心 10 min 后, 取培养上清液用 0.22 μm 滤器过滤, -80 °C 保存。将 MIO-M1 细胞分为标准培养基组、293T 条件培养基组和 BMSC 条件培养基组, 分别在标准培养基、293T 培养上清液和 BMSC 培养上清液中培养 72 h。

**1.2.5 MIO-M1 细胞形态学分析和细胞计数** 将标准培养基组、293T 条件培养基组和 BMSC 条件培养基

组的 MIO-M1 细胞免疫标记 vimentin 和 DAPI,并在激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。使用 ImageJ 软件对细胞的形态学进行计算分析。形态学参数包括细胞面积、周长、圆度 [ $4\pi(\text{细胞面积})/(\text{细胞周长})^2$ ] 和伸长系数(细胞长轴与短轴的比值)。细胞计数是至少计数 5 个独立区域共 30 个细胞中 DAPI 染色的细胞核。

**1.2.6 MIO-M1 神经球形态学分析** 将标准培养基组、293T 条件培养基组和 BMSC 条件培养基组的神经球在光学显微镜下观察并拍照。使用 ImageJ 软件对细胞面积进行计算分析。100 倍视野下,随机选取 20 个神经球进行统计分析。

**1.2.7 EdU 染色法检测细胞增生** 将 MIO-M1 细胞接种于细胞爬片上分组培养 24 h,将 37 °C 预热的 EdU (终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 加入细胞中,继续孵育 4 h。EdU 标记细胞完成后,去除培养液,并加入质量分数 4% 多聚甲醛固定,用 0.5% TritonX-100 室温破膜 10 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。然后根据 BeyoClick™ EdU-488 细胞增生检测试剂盒的说明书进行实验,加入现配的 Click 反应液室温下避光孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加 DAPI 室温下避光孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;最后用抗荧光淬灭剂进行封片,利用激光扫描共聚焦显微镜于波长 488 nm 和 405 nm 分别检测 EdU 和细胞核染色情况。

**1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期** 将标准培养基组、293T 条件培养基组和 BMSC 条件培养基组的细胞制备成单细胞悬液,用 PBS 洗 1 次,1 500 r/min 离心 5 min 收集细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml;取 1 ml 单细胞悬液,离心后,去上清,用少许 PBS 重悬细胞,再加入 500  $\mu\text{l}$  体积分数 70% 预冷乙醇 4 °C 固定过夜;用 PBS 洗 1 次,加入 100  $\mu\text{l}$  RNase A 溶液重悬细胞,37 °C 水浴 30 min;再加入 200  $\mu\text{l}$  PI 染色液,4 °C 避光孵育 30 min,直接流式细胞仪上机检测;计算细胞增生指数,细胞增生指数 =  $[(S + G2/M)/(G0/G1 + S + G2/M)] \times 100\%$ 。

**1.2.9 ELISA 法检测细胞培养上清液中 VCAM-1 质量浓度** 取各组培养 24 h 的上清液,2 000  $\times g$  离心 10 min 后,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤。按照 VCAM-1 的 ELISA 试剂盒说明书进行检测,分别设空白孔、标准品孔、待测样品孔,除空白孔外每孔加入 50  $\mu\text{l}$  对应样本,用封板膜封板后 37 °C 温育 30 min,洗涤 5 次,甩干;每孔加酶标试剂 50  $\mu\text{l}$  后用封板膜封板后 37 °C 温育 30 min,洗涤 5 次,甩干;每孔先后加入显色液 A 和 B 各 50  $\mu\text{l}$ ,轻轻震荡混匀,37 °C 避光显色 15 min,最后加入终止液 50  $\mu\text{l}$  终止反应,在酶标仪 450 nm 波长下

测量各孔的吸光度(A)值。根据标准品测定结果,计算各组上清液中 VCAM-1 质量浓度。

**1.2.10 MIO-M1 细胞诱导分化** 将 MIO-M1 细胞接种于包被纤连蛋白的分化培养基[含有体积分数 1% N2、2 mmol/L 谷氨酰胺、1% 青链霉素、5% FBS 和 1.2 ng/ml bFGF 的标准培养基(DMEM/F12)、293T 条件培养基或 BMSC 条件培养基]的培养板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中培养 7 d。收集不同培养条件下的细胞进行实时荧光定量 PCR 检测。

**1.2.11 实时荧光定量 PCR 检测细胞中各视网膜神经元标志物基因的表达** 取各组培养细胞,弃去培养基,用 PBS 洗细胞 1 次,加入 Trizol 裂解液提取细胞总 RNA。按照逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,检测 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)  $\alpha$ 、Rhodopsin、 $\beta$ -微管蛋白( $\beta$ -tubulin, Tuj1)和微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2)的 mRNA 相对表达水平,本研究使用的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系:SYBR Green 7.5  $\mu\text{l}$ 、双蒸水 5.5  $\mu\text{l}$ 、正向和反向引物各 0.5  $\mu\text{l}$ 、cDNA 1.0  $\mu\text{l}$ ,总反应体系 15.0  $\mu\text{l}$ 。扩增条件为 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参照,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因相对表达量。

表 1 各基因 PCR 引物序列  
Table 1 PCR primer sequence of genes

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
GAPDH	正向:CCATGTTGTCATGGGTGTGA	140
	反向:CATGAGTCTTCCACGATACCA	
PKC $\alpha$	正向:GCCTATGGCGTCTGTGTGA	271
	反向:GTGGCTGGATCTCCCTGTTC	
Rhodopsin	正向:CTACGTGCCCTTCTCCAATG	213
	反向:GCTAGGTTGAGCAGGATGTAGTTG	
Tuj1	正向:CAGCAAGGTGCGTGAGGAGTA	185
	反向:TGGGAAGCAGATGTCGTAGA	
MAP2	正向:CATACAGGGAGGATGAAGAGG	266
	反向:TGGAGAAGGAGGCAGATTAG	
VCAM-1	正向:GTCAATGTTGCCCCAGAGA	112
	反向:TTTTCGGAGCAGAAAGCCC	

注:GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶;PKC:蛋白激酶 C;Tuj1: $\beta$ -微管蛋白;MAP2:微管相关蛋白 2;VCAM:血管细胞黏附分子

Note: GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PKC: protein kinase C; Tuj1:  $\beta$ -tubulin; MAP2: microtubule-associated protein 2; VCAM: vascular cell adhesion molecule

**1.2.12 免疫荧光染色观察细胞中各视网膜神经元标志物蛋白的表达** 将细胞接种于细胞爬片上,用 4% 多聚甲醛固定 10 min,0.5% TritonX-100 破膜 10 min,并用 5% BSA 封闭 1 h;分别滴加 SOX9 抗体(1:400)、CRALBP 抗体(1:200)、vimentin 抗体(1:200)、GS 抗体(1:500)、MAP2 抗体(1:200)、Tuj1 抗体(1:200)、Rhodopsin 抗体(1:200)、SOX2 抗体(1:200)、CHX10 抗体(1:200)、CCND3 抗体(1:400)于 4 °C 条件下孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,滴加相应二抗室温孵育 1 h;PBS 漂洗 3 次,加入 DAPI 染液室温孵育 10 min;PBS 漂洗 3 次,抗荧光淬灭剂封片,激光扫描共聚焦显微镜下采集荧光图像。

**1.3 统计学方法**

采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。各计量资料数据经 Shapiro-Wilk 检验证实呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  进行表达。采用均衡分组三水平研究设计,3 个组间细胞形态学相应指标、细胞增生率、不同细胞周期细胞比例、细胞黏附特性和细胞分化能力相应指标的总差异比较均采用单因素方差分析,各组细胞培养不同时间点

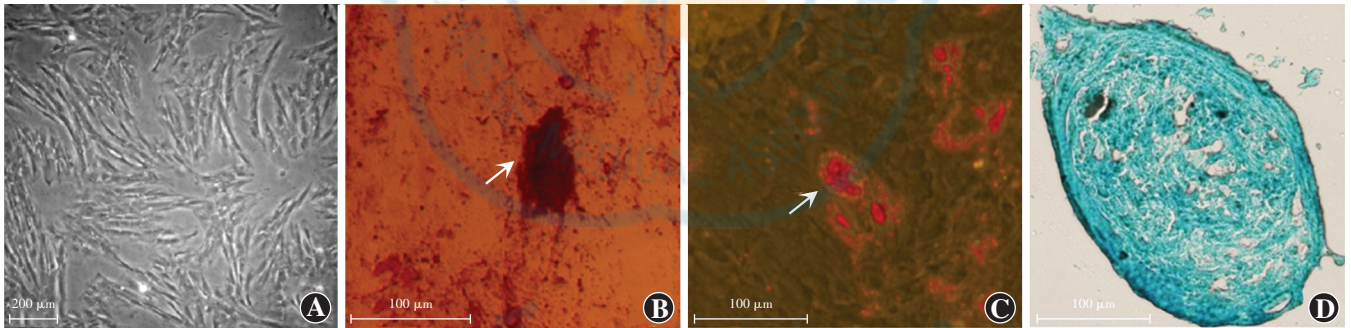
细胞面积的总差异比较采用两因素方差分析,多重比较均采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 BMSCs 细胞形态及鉴定**

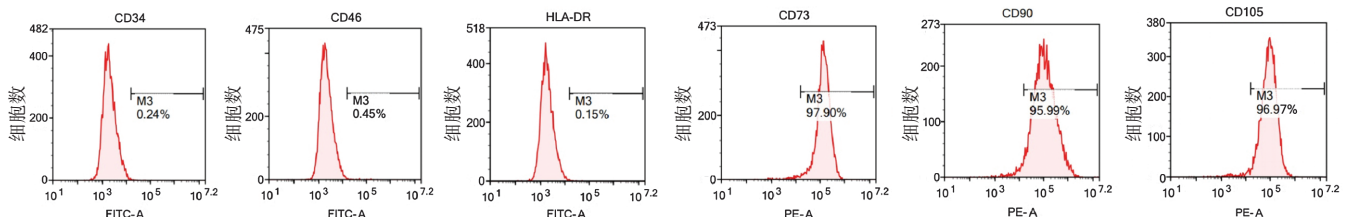
光学显微镜下可见第 3 代 BMSCs 贴壁生长,形态均匀一致,呈纺锤形(图 1A)。BMSCs 成骨诱导后 3 周,中心细胞发生钙化,茜素红染色阳性;成脂诱导分化后 3 周,细胞内出现融合的脂肪滴,油红 O 染色阳性;成软骨诱导分化后 4 周,细胞内出现酸性黏多糖,阿利辛蓝染色阳性(图 1B~D)。上述结果表明,BMSCs 可成功诱导为成骨细胞、脂肪细胞和成软骨细胞。

流式细胞术鉴定结果显示,第 3 代 BMSCs 中造血干细胞相关的表面抗原 CD34、CD45 和 HLA-DR 呈低表达,百分率分别为 0.24%、0.45% 和 0.15%,表面抗原 CD73、CD90 和 CD105 呈高表达,百分率分别为 97.90%、95.99% 和 96.97%,符合 BMSCs 的生物学特性,提示第 3 代 BMSCs 纯度较高,可用于后续实验(图 2)。



**图 1 BMSCs 细胞形态及鉴定** A:光学显微镜下细胞形态( $\times 100$ ,标尺=200  $\mu\text{m}$ ) 第 3 代 BMSCs 呈纺锤形 B:BMSCs 细胞成骨诱导分化鉴定(茜素红  $\times 200$ ,标尺=100  $\mu\text{m}$ ) 细胞发生钙化,茜素红染色阳性(箭头) C:BMSCs 细胞成脂诱导分化鉴定(油红 O  $\times 200$ ,标尺=100  $\mu\text{m}$ ) 细胞内出现融合的脂肪滴,油红 O 染色阳性(箭头) D:BMSCs 细胞成软骨诱导分化鉴定(阿利辛蓝  $\times 200$ ,标尺=100  $\mu\text{m}$ ) 细胞内出现酸性黏多糖,阿利辛蓝染色阳性

**Figure 1 Morphology and identification of BMSCs** A:Cell morphology under light microscope ( $\times 100$ ,bar=200  $\mu\text{m}$ ) The morphology of the third-passage human BMSCs was spindle-shaped B:Identification of osteogenic differentiation of BMSCs (Alizarin red  $\times 200$ ,bar=100  $\mu\text{m}$ ) The cells were calcified and alizarin red staining was positive (arrow) C:Identification of adipogenic differentiation of BMSCs (Oil red O  $\times 200$ ,bar=100  $\mu\text{m}$ ) Integrated fat granules were found in the cells and oil red O staining was positive (arrow) D:Identification of chondrogenic differentiation of BMSCs (Alcian blue  $\times 200$ ,bar=100  $\mu\text{m}$ ) Acid mucopolysaccharide was found in the cells and alcian blue staining was positive



**图 2 第 3 代 BMSCs 的表面抗原流式细胞检测** BMSCs 的造血干细胞相关表面抗原 CD34、CD45 和 HLA-DR 呈低表达,表面抗原 CD73、CD90 和 CD105 呈高表达 HLA-DR:人类白细胞 DR 抗原

**Figure 2 Assay of surface antigen of P3 BMSCs by flow cytometry** The expression of hematopoietic stem cell-associated surface antigens CD34,CD90 and CD105 was enhanced,and the expression of CD34,CD46 and HLA-DR was weakened HLA-DR:human leukocyte antigen DR

### 2.2 MIO-M1 细胞的 Müller 细胞及干细胞特征鉴定

MIO-M1 细胞中 Müller 细胞标志蛋白 SOX9 和 GS 染色呈阳性表达,细胞骨架蛋白 vimentin 染色阳性,细胞质和细胞核 CRALBP 染色阳性(图 3)。同时贴壁培养的 MIO-M1 细胞中视网膜干细胞标志物 SOX 2、

nestin 和 CHX10 表达阳性;在干细胞诱导培养基中 MIO-M1 细胞可形成神经球,同时表达干细胞标志物 SOX2、CHX10 和细胞增生标志物 CCND3(图 4),提示 MIO-M1 细胞具有干细胞特性。

### 2.3 各组 MIO-M1 细胞形态学特征比较

标准培养基组和 293T 条件培养基组细胞维持扁平细胞形状, BMSC 条件培养基组细胞形成细长的纺锤形或多极形态(图 5A)。定量形态学分析表明,各组细胞面积、圆度、伸长系数总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 6.973, P = 0.002; F = 12.370, P < 0.001; F = 6.311, P = 0.003$ );与标准培养基组和 293T 条件培养基组比较, BMSC 条件培养基组细胞面积减少,圆度降低,伸长系数升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ) (图 5B~D)。各组细胞周长总体比较,差异无统计学意义 ( $F = 1.669, P = 0.197$ ) (图 5E)。

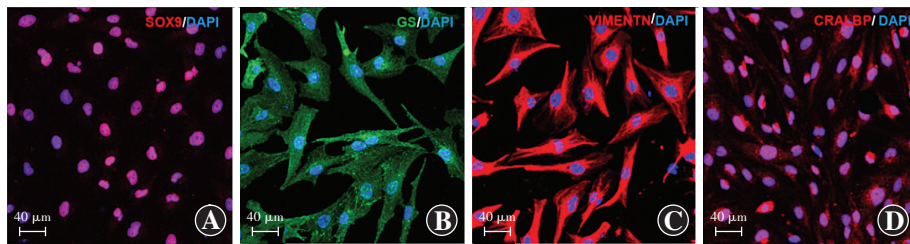


图 3 MIO-M1 细胞中 Müller 细胞标志物免疫荧光染色图(×200,标尺=40 μm) A:SOX9 蛋白免疫荧光染色 细胞核呈红色荧光(Alexa Fluor 568) B:GS 蛋白免疫荧光染色 细胞质呈绿色荧光(Alexa Fluor 488) C:Vimentin 蛋白免疫荧光染色 细胞骨架呈红色荧光(Alexa Fluor 568) D:CRALBP 蛋白免疫荧光染色 细胞质和细胞核呈红色荧光(Alexa Fluor 568) GS:谷氨酰胺合成酶;CRALBP:胞内视黄醛结合蛋白

Figure 3 Immunofluorescence staining of Müller cell markers in MIO-M1 cells (×200, bar = 40 μm) A:Immunofluorescence staining of SOX9 protein Nuclei showed red fluorescence (Alexa Fluor 568) B:Immunofluorescence staining of GS protein Cytoplasm presented green fluorescence (Alexa Fluor 488) C:Immunofluorescence staining of vimentin protein Cytoskeleton exhibited red fluorescence (Alexa Fluor 568) D:Immunofluorescence staining of CRALBP protein Cytoplasm and nuclei both showed red fluorescence (Alexa Fluor 568) GS:glutamine synthetase;CRALBP:cellular retinaldehyde-binding protein

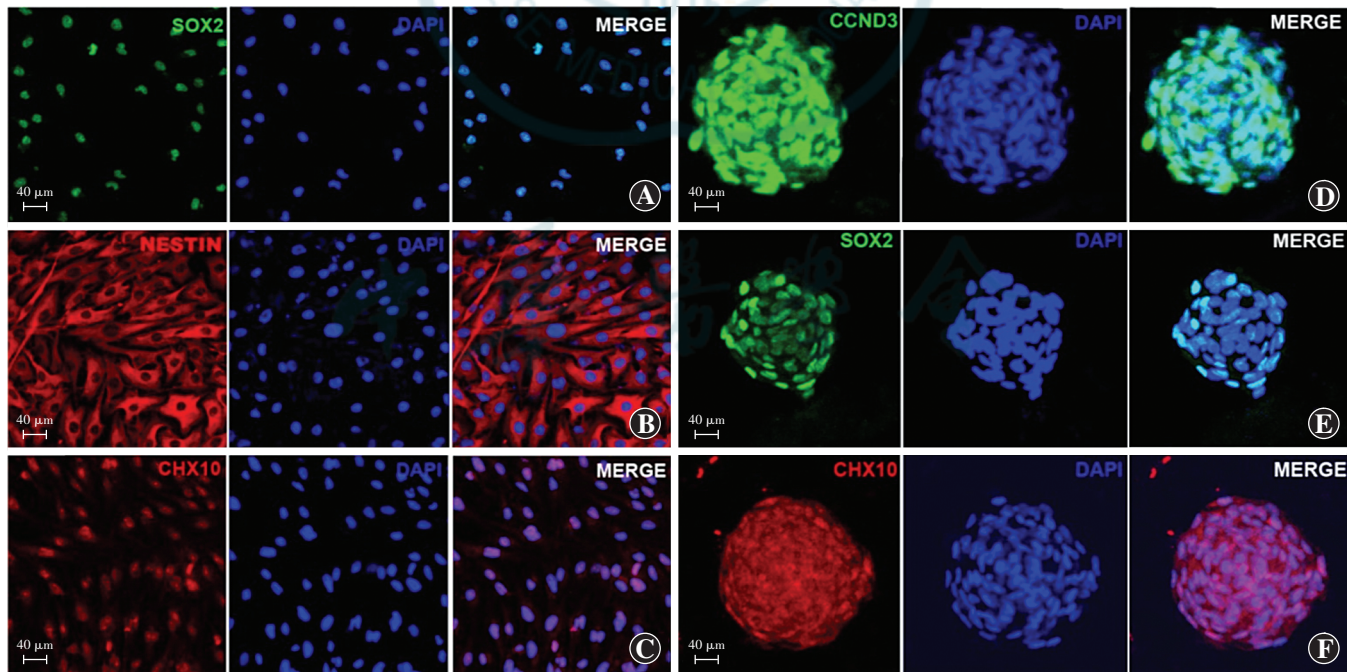
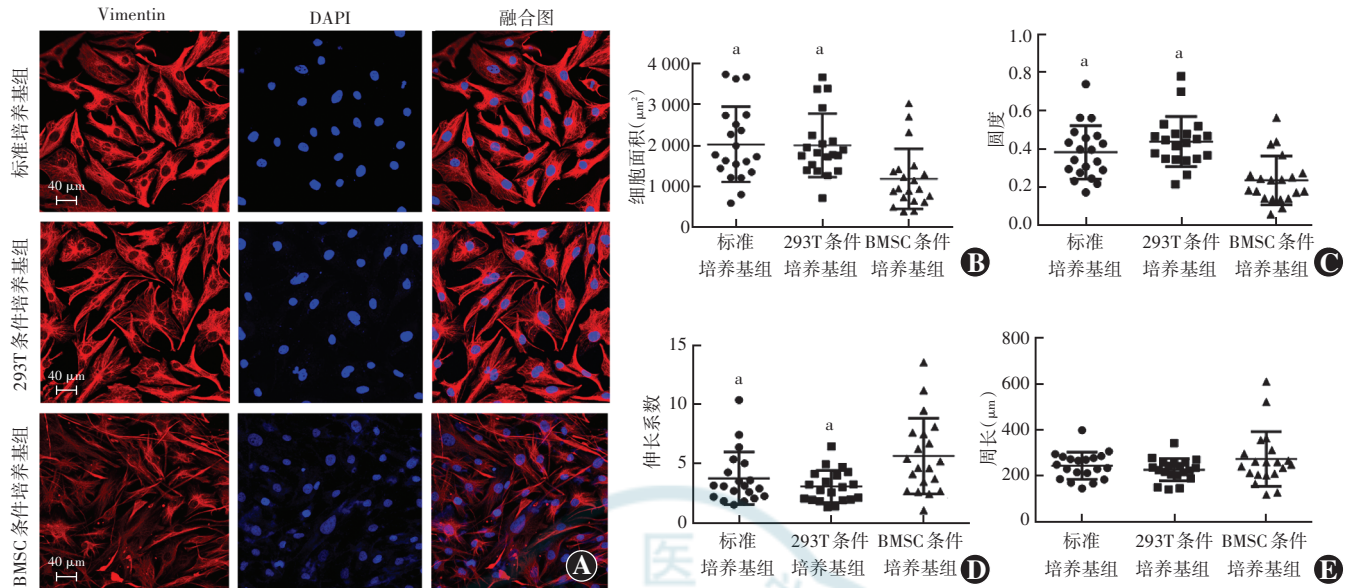


图 4 MIO-M1 细胞干细胞标志物免疫荧光染色图(×200,标尺=40 μm) A~C:贴壁培养的 MIO-M1 细胞表达干细胞标志物 SOX2(Alexa Fluor 488)、nestin(Alexa Fluor 568)和 CHX10(Alexa Fluor 568) D~F:MIO-M1 神经球表达细胞增生标志物 CCND3(Alexa Fluor 488)和干细胞标志物 SOX2(Alexa Fluor 488)、CHX10(Alexa Fluor 568) CCND3:细胞周期蛋白 D3

Figure 4 Immunofluorescence staining of stem cell markers in MIO-M1 cells (×200, bar = 40 μm) A~C:The stem cell markers SOX2 (Alexa Fluor 488), nestin (Alexa Fluor 568) and CHX10 (Alexa Fluor 568), showed a positive expression in adherently incubated MIO-M1 cells D~F:The cell proliferation marker CCND3 (Alexa Fluor 488) and stem cell markers SOX2 (Alexa Fluor 488) and CHX10 (Alexa Fluor 568) were positively expressed in MIO-M1 neurospheres CCND3:cyclin D3

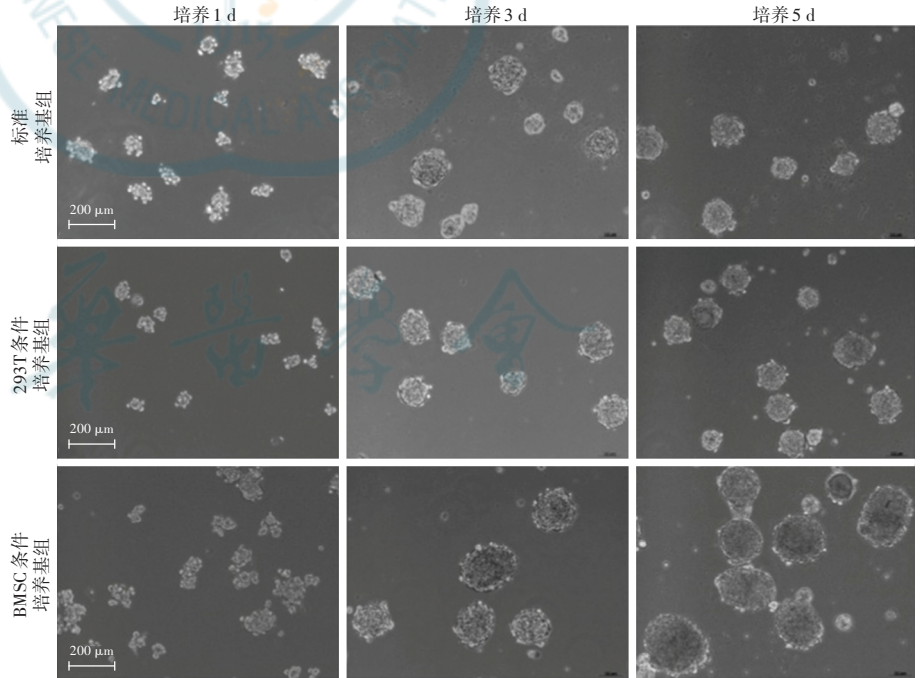


**图 5 各组 MIO-M1 细胞形态变化** A: 各组细胞骨架蛋白 vimentin 免疫荧光染色图 (Alexa Fluor 568 × 200, 标尺 = 40 μm) BMSC 条件培养基组细胞形成细长的纺锤形或多极形态 B~E: 各组细胞面积、圆度、伸长因子和周长定量分析 细胞面积:  $F = 6.973, P = 0.002$ ; 圆度:  $F = 12.370, P < 0.001$ ; 伸长因子:  $F = 6.311, P = 0.003$ ; 周长:  $F = 1.669, P = 0.197$ . 与 BMSC 条件培养基组比较,  $^a P < 0.05$  (单因素方差分析, Tukey 检验,  $n = 30$ ) BMSC: 骨髓间充质干细胞

**Figure 5 Morphological changes of MIO-M1 cells** A: Immunofluorescence staining of cytoskeleton protein vimentin in various groups (Alexa Fluor 568 × 200, bar = 40 μm) The cells in BMSC conditioned medium group were slender spindle-shaped or multipolar B~E: Quantitative analysis of the morphological parameters Cellular area:  $F = 6.973, P = 0.002$ ; Circularity:  $F = 12.370, P < 0.001$ ; Elongation factor:  $F = 6.311, P = 0.003$ ; Perimeter:  $F = 1.669, P = 0.197$ . Compared with BMSC conditioned medium group,  $^a P < 0.05$  (One-way ANOVA, Tukey test,  $n = 30$ ) BMSC: bone marrow mesenchymal stem cell

#### 2.4 各组 MIO-M1 细胞增生能力变化

在去分化培养条件下, 各组不同时间点神经球面积总体比较差异均有统计学意义 ( $F_{组别} = 134.300, P < 0.001$ ;  $F_{时间} = 82.910, P < 0.001$ ); BMSC 条件培养基组培养 1、3 和 5 d 时细胞形成的神经球面积均较标准培养基组和 293T 条件培养基组大, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 6, 表 2)。标准培养基组、293T 条件培养基组和 BMSC 条件培养基组 EdU 阳性细胞率分别为  $(43.38 \pm 3.25)\%$ 、 $(45.30 \pm 9.93)\%$  和  $(67.69 \pm 15.65)\%$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 6.973, P = 0.002$ ), 其中 BMSC 条件培养基组 EdU 阳性细胞率明显高于标准培养基组和 293T 条件培养基组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 7)。



**图 6 各组 MIO-M1 细胞去分化诱导培养不同时间点神经球大小变化** ( $\times 100$ , 标尺 = 200 μm) BMSC 条件培养基组各时间点形成的神经球面积较相应时间点标准培养基组和 293T 条件培养基组大 BMSC: 骨髓间充质干细胞

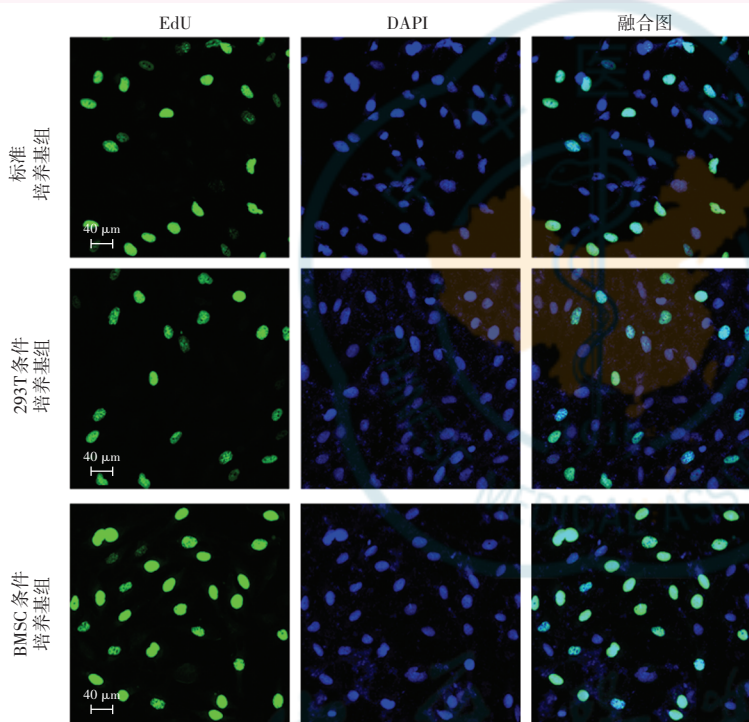
**Figure 6 Changes of neurosphere size of MIO-M1 cells at different time points in different groups after dedifferentiation induction** ( $\times 100$ , bar = 200 μm) At different time points of dedifferentiation induction, the area of neurospheres of MIO-M1 cells formed in BMSC conditioned medium group was increased than standard medium group and 293T conditioned medium group BMSC: bone marrow mesenchymal stem cell

**表 2 各组不同时间点神经球面积比较 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}^2$ )**  
**Table 2 Comparison of neurosphere area at various time points among different groups ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}^2$ )**

组别	样本量	不同时间点神经球面积		
		培养 1 d	培养 3 d	培养 5 d
标准培养基组	20	4 029±2 147	16 411±7 133	17 794±6 120
293T 条件培养基组	20	3 832±1 725	15 585±3 562	16 286±4 415
BMSC 条件培养基组	20	11 497±6 164 <sup>ab</sup>	26 407±6 765 <sup>ab</sup>	34 214±9 345 <sup>ab</sup>

注:  $F_{\text{组别}} = 134.300, P < 0.001; F_{\text{时间}} = 82.910, P < 0.001$ 。与同时点标准培养基组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与同时点 293T 条件培养基组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (两因素方差分析, Tukey 检验) BMSC: 骨髓间充质干细胞

Note:  $F_{\text{group}} = 134.300, P < 0.001; F_{\text{time}} = 82.910, P < 0.001$ . Compared with standard medium group, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with 293T conditioned medium group, <sup>b</sup> $P < 0.01$  (Two-way ANOVA, Tukey test) BMSC: bone marrow mesenchymal stem cell



**图 7 各组细胞 EdU 染色比较 ( $\times 200$ , 标尺 = 40  $\mu\text{m}$ )** BMSC 条件培养基组 EdU 阳性细胞较标准培养基组和 293T 条件培养基组多 EdU 染色呈绿色荧光 (Azide 488), 细胞核呈蓝色荧光 (DAPI) EdU: 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基咪唑二盐酸盐; BMSC: 骨髓间充质干细胞

**Figure 7 Comparison of EdU-positive cells among different groups ( $\times 200$ , bar = 40  $\mu\text{m}$ )** More EdU-positive cells were seen in BMSC conditioned medium group compared with standard medium group and 293T conditioned medium group EdU staining showed green fluorescence (Azide 488) in cytoplasm and blue fluorescence (DAPI) in the nuclei EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; BMSC: bone marrow mesenchymal stem cell

各组 MIO-M1 细胞增生指数总体比较, 差异有统计学意义 ( $F = 74.110, P < 0.001$ ), 其中 BMSC 条件培养基组 MIO-M1 细胞的增生指数均高于标准培养基组和 293T 条件培养基组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 8, 表 3)。

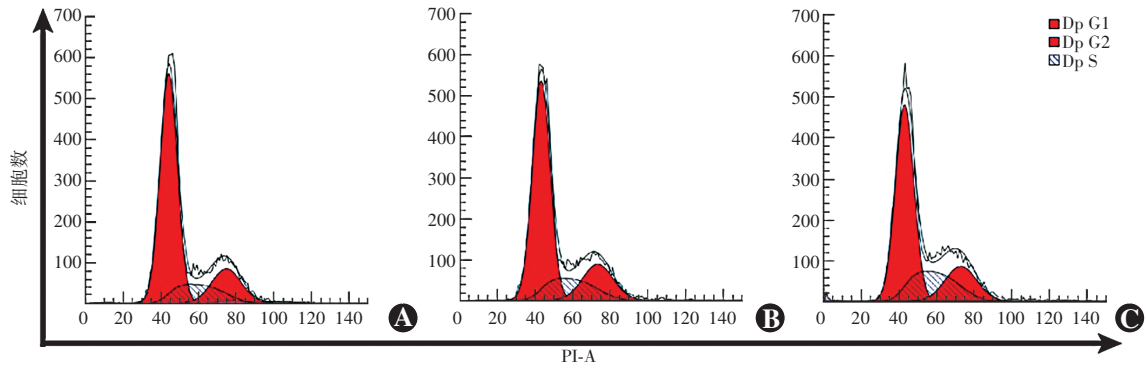
**2.5 各组 MIO-M1 细胞贴壁能力及 VCAM-1 表达比较**

细胞接种于未包被的培养瓶中培养 4 h, 光学显微镜下可见 BMSC 条件培养基组贴壁细胞较标准培养基组和 293T 条件培养基组多 (图 9A)。BMSC 条件培养基组、293T 条件培养基组和标准培养基组培养上清液中 VCAM-1 质量浓度分别为 ( $1 568.00 \pm 135.70$ )、( $1 313.00 \pm 73.29$ ) 和 ( $1 100.00 \pm 111.20$ )  $\text{pg/ml}$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 13.720, P = 0.006$ ), 其中 BMSC 条件培养基组培养上清液中 VCAM-1 质量浓度明显高于标准培养基组和 293T 条件培养基组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 9B)。BMSC 条件培养基组、293T 条件培养基组相对于标准培养基组细胞 VCAM-1 mRNA 相对表达量分别为  $1.80 \pm 0.46$  和  $1.08 \pm 0.08$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 7.896, P = 0.021$ ); BMSC 条件培养基组 VCAM-1 mRNA 相对表达量明显高于标准培养基组和 293T 条件培养基组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 9C)。

**2.6 各组 MIO-M1 细胞分化能力比较**

MIO-M1 细胞诱导分化 7 d, 各组细胞均表现出神经元形态, 免疫荧光染色结果显示分化细胞表达视网膜神经元标志物 PKC $\alpha$ 、Rhodopsin、MAP2 和 Tuj1 (图 10)。各组间 PKC $\alpha$ 、Rhodopsin、Tuj1 和 MAP2 mRNA 相对表达量总体比较差异均有统计学意义 ( $F = 14.490, P = 0.005; F = 5.424, P = 0.045; F = 14.330, P = 0.005; F = 7.405, P = 0.024$ ); BMSC 条件培养基组 PKC $\alpha$ 、Rhodopsin、Tuj1 和 MAP2 mRNA 相对表达量明显高于标准培养基组和 293T 条件培养基组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 4)。





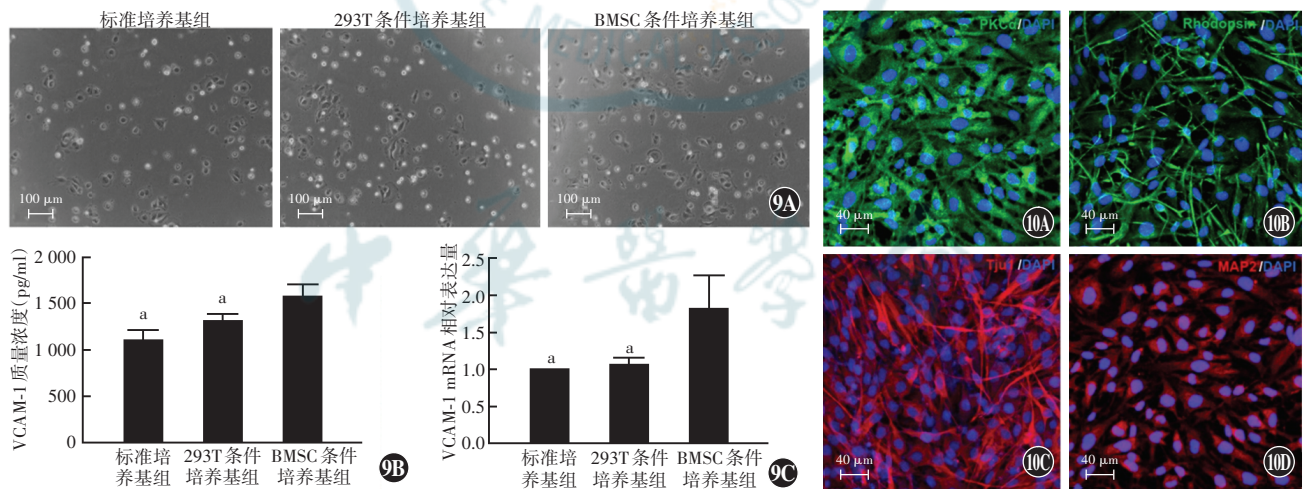
**图 8 不同培养基中 MIO-M1 细胞周期图** BMSC 条件培养基中细胞 S 期和 G2/M 期比率之和较标准培养基和 293T 条件培养基更高 A: 标准培养基组 B: 293T 条件培养基组 C: BMSC 条件培养基组  
**Figure 8 MIO-M1 cell cycle in different groups** The sum of S-phase and G2/M-phase cells proportion in BMSC conditioned medium group was higher than that in standard medium group and 293T conditioned medium group A: Standard medium group B: 293T conditioned medium group C: BMSC conditioned medium group

**表 3 不同培养基培养后 MIO-M1 细胞增生指数比较 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**  
**Table 3 Comparison of proliferation index of MIO-M1 cells among different groups ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	样本量	细胞周期的各时期占比			增生指数
		G0/G1 期	S 期	G2/M 期	
标准培养基组	3	63.93±1.29	22.53± 8.38	13.54±8.66	36.07±1.29 <sup>a</sup>
293T 条件培养基组	3	60.81±0.03	26.91± 8.50	12.28±8.07	39.19±0.03 <sup>a</sup>
BMSC 条件培养基组	3	55.50±0.74	35.52±10.21	8.98±9.47	44.50±0.74
F 值					74.110
P 值					<0.001

注:与 BMSC 条件培养基组比较,<sup>a</sup>P<0.01(单因素方差分析,Tukey 检验) BMSC:骨髓间充质干细胞

Note: Compared with BMSC conditioned medium group,<sup>a</sup>P<0.01 (One-way ANOVA, Tukey test) BMSC: bone marrow mesenchymal stem cell



**图 9 各组 MIO-M1 细胞贴壁及 VCAM-1 表达水平比较** A: 各组培养 4 h 细胞光学显微镜下观察 ( $\times 100$ , 标尺 = 100  $\mu\text{m}$ ) BMSC 条件培养基组贴壁细胞数较标准培养基组和 293T 条件培养基组多 B: 各组培养上清液中 VCAM-1 质量浓度比较  $F = 13.720, P = 0.004$ . 与 BMSC 条件培养基组比较,<sup>a</sup>P<0.05(单因素方差分析,Tukey 检验, $n = 3$ ) C: 各组细胞 VCAM-1 mRNA 相对表达量比较  $F = 7.896, P = 0.021$ . 与 BMSC 条件培养基组比较,<sup>a</sup>P<0.05(单因素方差分析,Tukey 检验, $n = 3$ ) BMSC: 骨髓间充质干细胞; VCAM-1: 血管细胞黏附分子-1 **图 10 BMSC 条件培养基培养 7 d MIO-M1 细胞各视网膜神经元标志物免疫荧光染色图** ( $\times 200$ , 标尺 = 40  $\mu\text{m}$ ) A: PKC $\alpha$  B: Rhodopsin C: Tuj1 D: MAP2

**Figure 9 Comparison of MIO-M1 cell adhesion and VCAM-1 expression level among different groups** A: Observation of MIO-M1 cells of different groups after 4-hour culture under an optical microscope ( $\times 100$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ ) There were more adherent MIO-M1 cells in BMSC conditioned medium group than standard medium group and 293T conditioned medium group B: Comparison of VCAM-1 mass concentration in MIO-M1 cell culture supernatants among different groups  $F = 13.720, P = 0.004$ . Compared with BMSC conditioned medium group,<sup>a</sup>P<0.05 (One-way ANOVA, Tukey test,  $n = 3$ ) C: Comparison of VCAM-1 mRNA relative expression level in MIO-M1 cells among different groups  $F = 7.896, P = 0.021$ . Compared with BMSC conditioned medium group,<sup>a</sup>P<0.05 (One-way ANOVA, Tukey test,  $n = 3$ ) BMSC: bone marrow mesenchymal stem cell; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1 **Figure 10 Immunofluorescence staining of retinal neuron markers in MIO-M1 cells after 7-day culture of BMSC conditioned medium** ( $\times 200$ , bar = 40  $\mu\text{m}$ ) A: PKC $\alpha$  B: Rhodopsin C: Tuj1 D: MAP2

表 4 不同分化培养基培养后 MIO-M1 细胞各基因的 mRNA 相对表达量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 4 Comparison of mRNA relative expression levels of various genes in MIO-M1 cells cultured among different groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本量	各基因 mRNA 相对表达量			
		PKC $\alpha$	Rhodopsin	Tuj1	MAP2
标准培养基组	3	1.00	1.00	1.00	1.00
293T 条件培养基组	3	1.09 $\pm$ 0.13	1.21 $\pm$ 0.37	1.25 $\pm$ 0.09	0.77 $\pm$ 0.17
BMSC 条件培养基组	3	1.92 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	1.97 $\pm$ 0.546 7 <sup>ab</sup>	2.18 $\pm$ 0.49 <sup>ab</sup>	2.15 $\pm$ 0.69 <sup>ab</sup>
F 值		14.490	5.424	14.330	7.405
P 值		0.005	0.045	0.005	0.024

注:与标准培养基组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 293T 条件培养基组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析,Tukey 检验) BMSC:骨髓间充质干细胞;PKC:蛋白激酶 C;Tuj1: $\beta$ -微管蛋白;MAP2:微管相关蛋白 2

Note: Compared with standard medium group,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ; compared with 293T conditioned medium group,<sup>b</sup> $P < 0.01$  (One-way ANOVA, Tukey test) BMSC: bone marrow mesenchymal stem cell; PKC: protein kinase C; Tuj1:  $\beta$ -tubulin; MAP2: microtubule-associated protein 2

### 3 讨论

MIO-M1 细胞是取自人类视网膜的一株永生化的 Müller 细胞系,具有 Müller 细胞和干细胞的特性,但低表达胶质纤维酸性蛋白,表明其在体外未被激活<sup>[3]</sup>。MIO-M1 细胞在体外具有较强的增生能力,能够分化为多种视网膜神经元<sup>[4]</sup>。已有研究证明 MIO-M1 细胞可以整合到视网膜变性大鼠视网膜中并分化<sup>[19]</sup>。此外,成人来源的视网膜细胞系避免了从胚胎或胎儿组织分离细胞的伦理问题。这些特性使 MIO-M1 细胞和相关细胞系成为视网膜神经退行性疾病细胞替代疗法中极具吸引力的候选者。有研究报道,MIO-M1 细胞在大鼠青光眼模型中具有与视网膜整合并分化为视网膜神经元的潜力<sup>[5,16]</sup>。在本研究中,BMSC 条件培养基处理的 MIO-M1 细胞在相同时间内形成的神经球面积较标准培养基和 293T 条件培养基更大,EdU 阳性率更高,与细胞周期的增生指数一致,表明 BMSC 条件培养基对 MIO-M1 细胞增生有显著促进作用。

微环境中相邻分化细胞和细胞分泌因子的信号对干细胞的自我更新和多谱系分化起着重要作用<sup>[20-23]</sup>。有研究报道 BMSCs 可能通过旁分泌细胞保护因子和有丝分裂因子对神经元产生影响<sup>[24-25]</sup>。同时,本研究发现,BMSC 条件培养基处理的 MIO-M1 细胞可分泌更多的 VCAM-1。既往有研究表明 VCAM-1 除了促进细胞黏附外,还在促进细胞增生中发挥作用<sup>[26]</sup>。推测 BMSC 条件培养基可能通过有丝分裂因子和黏附因子促进 MIO-M1 细胞黏附,有利于细胞生长。

视网膜神经退行性疾病细胞替代治疗的最佳目标是诱导干细胞或祖细胞分化成高比例的视网膜神经元。本研究结果显示,BMSC 条件培养基组细胞诱导分化后高表达中间神经元标志物 PKC $\alpha$  和 MAP2,视

网膜神经节细胞标志物 Tuj1 和感光细胞标志物 Rhodopsin,说明 BMSC 条件培养基可刺激 MIO-M1 细胞向视网膜神经元细胞分化。这些结果与以往的研究结果一致,即 BMSCs 与 NSCs 体外共培养或 BMSC 条件培养基处理 RPC 时,均可以促进 NSCs 或 RPCs 的增生和神经元分化<sup>[6-7,27]</sup>。此外,有研究表明在 BMSC 条件培养基中加入睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)和 bFGF 抗体,RPC 向神经元分化

的能力减弱,而在标准分化培养基中加入 CNTF, RPCs 视网膜神经元标志物 MAP2、Brn3a 和 Rhodopsin 的表达水平明显升高,推测 BMSC 条件培养基对 MIO-M1 细胞分化的影响可能是由 CNTF 介导的<sup>[6,21]</sup>。

综上所述,本研究结果表明 BMSC 条件培养基促进 Müller 细胞系 MIO-M1 细胞增生、黏附及神经元的分化。该研究结果为提高视网膜祖细胞的活力和向神经元分化的能力提供了一种新的策略,有利于视网膜干细胞的治疗。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 葛玲玲: 酝酿和设计实验, 实施研究, 采集数据, 分析/解释数据, 起草文章, 统计分析; 李沂键: 实施研究, 采集数据, 分析/解释数据, 统计分析; 黎其友: 实施研究, 采集数据, 统计分析, 行政、技术或材料支持; 古贤梁: 实施研究, 采集数据, 行政、技术或材料支持; 黄小娜: 实施研究; 陶醉: 酝酿和设计实验, 统计分析, 对文章的知识性内容作批判性审阅; 徐海伟: 酝酿和设计实验, 对文章的知识性内容作批判性审阅, 获取研究经费, 指导实验

### 参考文献

- [1] Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, et al. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(10): 1219-1227. DOI: 10.1093/hmg/11.10.1219.
- [2] Wong IY, Poon MW, Pang RT, et al. Promises of stem cell therapy for retinal degenerative diseases [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011, 249(10): 1439-1448. DOI: 10.1007/s00417-011-1764-z.
- [3] Limb GA, Salt TE, Munro PM, et al. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1) [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(3): 864-869.
- [4] Lawrence JM, Singhal S, Bhatia B, et al. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics [J]. Stem Cells, 2007, 25(8): 2033-2043. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0724.
- [5] Bull ND, Limb GA, Martin KR. Human Müller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(8): 3449-3456. DOI: 10.1167/iovs.08-1770.
- [6] Xia J, Luo M, Ni N, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells

- stimulate proliferation and neuronal differentiation of retinal progenitor cells[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(9): e76157 [2021-05-04]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098776>. DOI: 10.1371/journal.pone.0076157.
- [7] Zhang M, Zhang F, Sun J, et al. The condition medium of mesenchymal stem cells promotes proliferation, adhesion and neuronal differentiation of retinal progenitor cells[J]. Neurosci Lett, 2017, 657: 62-68. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.07.053.
- [8] Mead B, Logan A, Berry M, et al. Paracrine-mediated neuroprotection and neurogenesis of axotomized retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells; comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(10): e109305 [2021-05-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25290916>. DOI: 10.1371/journal.pone.0109305.
- [9] Sadan O, Shemesh N, Barzilay R, et al. Mesenchymal stem cells induced to secrete neurotrophic factors attenuate quinolinic acid toxicity: a potential therapy for Huntington's disease[J]. Exp Neurol, 2012, 234(2): 417-427. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.12.045.
- [10] Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(4): 2051-2059. DOI: 10.1167/iovs.09-4509.
- [11] Zhang Y, Wang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(7): 3742-3748. DOI: 10.1167/iovs.08-3314.
- [12] Wang S, Zhu C, Zhang B, et al. BMSC-derived extracellular matrix better optimizes the microenvironment to support nerve regeneration[J]. Biomaterials, 2022, 280: 121251 [2022-02-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34810037>. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121251.
- [13] Yu B, Li XR, Zhang XM. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as a new therapeutic strategy for ocular diseases[J]. World J Stem Cells, 2020, 12(3): 178-187. DOI: 10.4252/wjsc.v12.i3.178.
- [14] Deng CL, Hu CB, Ling ST, et al. Photoreceptor protection by mesenchymal stem cell transplantation identifies exosomal MiR-21 as a therapeutic for retinal degeneration[J]. Cell Death Differ, 2021, 28(3): 1041-1061. DOI: 10.1038/s41418-020-00636-4.
- [15] Qu L, Gao L, Xu H, et al. Combined transplantation of human mesenchymal stem cells and human retinal progenitor cells into the subretinal space of RCS rats[J/OL]. Sci Rep, 2017, 7(1): 199 [2021-06-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28298640>. DOI: 10.1038/s41598-017-00241-5.
- [16] Weiss JN, Levy S. Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS): bone marrow-derived stem cells in the treatment of age-related macular degeneration[J/OL]. Medicines (Basel), 2020, 7(4): 16 [2021-06-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32231088>. DOI: 10.3390/medicines7040016.
- [17] Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells[J]. Exp Neurol, 2009, 216(2): 329-341. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.12.010.
- [18] Gu X, Yu X, Zhao C, et al. Efficacy and safety of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with diabetic retinopathy[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(1): 40-52. DOI: 10.1159/000492838.
- [19] Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, et al. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002, 43(2): 402-410.
- [20] Wang Y, Zhao M, Li W, et al. BMSC-derived small extracellular vesicles induce cartilage reconstruction of temporomandibular joint osteoarthritis via autotaxin-YAP signaling axis[J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 656153 [2021-06-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33869221>. DOI: 10.3389/fcell.2021.656153.
- [21] Gu P, Yang J, Wang J, et al. Sequential changes in the gene expression profile of murine retinal progenitor cells during the induction of differentiation[J]. Mol Vis, 2009, 15: 2111-2122.
- [22] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche[J]. Cell, 2004, 116(6): 769-778. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00255-7.
- [23] Yang J, Klassen H, Pries M, et al. Aqueous humor enhances the proliferation of rat retinal precursor cells in culture, and this effect is partially reproduced by ascorbic acid[J]. Stem Cells, 2006, 24(12): 2766-2775. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0103.
- [24] Longhi L, Zanier ER, Royo N, et al. Stem cell transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury[J]. Transpl Immunol, 2005, 15(2): 143-148. DOI: 10.1016/j.trim.2005.09.003.
- [25] Nakanishi C, Yamagishi M, Yamahara K, et al. Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(1): 11-16. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.06.074.
- [26] Zhou Z, Zhou Q, Wu X, et al. VCAM-1 secreted from cancer-associated fibroblasts enhances the growth and invasion of lung cancer cells through AKT and MAPK signaling[J]. Cancer Lett, 2020, 473: 62-73. DOI: 10.1016/j.canlet.2019.12.039.
- [27] Hu Y, Ji J, Xia J, et al. An *in vitro* comparison study: the effects of fetal bovine serum concentration on retinal progenitor cell multipotentiality[J]. Neurosci Lett, 2013, 534: 90-95. DOI: 10.1016/j.neulet.2012.11.006.

(收稿日期:2021-08-18 修回日期:2022-02-07)

(本文编辑:张宇)

读者·作者·编者

## 本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿:登陆中华医学会网站(<http://www.cma.org.cn>)→点击页面右上角的“注册”→选项注册账号→返回首页→点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型),投稿后请注意自留原稿,并保留论文相关的原始资料,以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载“中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版)”,填写有关项目并请每位作者亲笔签字,加盖第一作者单位公章后寄 2 份至本刊编辑部,其中作者签名顺序和作者单位署名名称应与投稿时文章中署录的相一致,如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意:(1)在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章不属于一稿两投,但投稿时应向编辑部说明,非中文文字期刊已发表的文稿再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(2)作者须告知与该研究有关的利益冲突,如该研究被某机构资金资助的声明等利益关系。(3)如涉及保密问题,需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)