

· 实验研究 ·

间充质干细胞来源小胞外囊泡对视网膜光损伤的治疗作用及其机制

于波¹ 王康² 张明亮¹ 邢小丽¹ 李筱荣¹ 张晓敏¹

¹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 国家眼耳鼻喉疾病临床医学研究中心天津市分中心 天津市视网膜功能与疾病重点实验室,天津 300384;²滨州医学院附属医院眼科,滨州 256600

通信作者:张晓敏, Email: xzhang08@tmu. edu. cn

【摘要】 目的 研究间充质干细胞(MSCs)来源小胞外囊泡(sEVs)对小鼠视网膜光损伤的作用及其可能的机制。方法 人脐带来源 MSCs 采用流式细胞术鉴定表面标记蛋白,收集第 3~5 代 MSCs 培养上清,超速离心收集 sEVs 并采用透射电子显微镜鉴定形态。将 65 只清洁级 8~10 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠按照随机数字表法随机分为正常组(17 只)、磷酸盐缓冲液(PBS)组(24 只)和 sEVs 组(24 只)。PBS 组和 sEVs 组小鼠右眼玻璃体腔分别注射 2 μ l PBS 和 2 μ l sEVs 后,在蓝光照射度 930 lx 的环境下照射 6 h;正常组小鼠不做处理。分组处理后 3 d,采用苏木精-伊红染色观察视网膜结构,原位末端转移酶标记(TUNEL)染色进行凋亡细胞计数,视网膜电图(ERG)检测小鼠视网膜功能,mRNA 转录组测序技术检测 PBS 组与 sEVs 组小鼠视网膜 mRNA 表达差异情况,并进行差异基因 KEGG 聚类分析,实时荧光定量 PCR 法进一步验证差异基因表达。

结果 培养的 MSCs 中 CD90、CD105 表达阳性,而 CD34、CD45 表达阴性,提取的 MSC-sEVs 呈直径为 80~140 nm 的双层膜囊泡结构。苏木精-伊红染色结果显示,PBS 组小鼠视网膜外核层细胞核排列紊乱,sEVs 组视网膜结构紊乱程度轻于 PBS 组。sEVs 组视网膜凋亡细胞计数为(14.60 \pm 4.04)个/视野,少于 PBS 组的(24.00 \pm 8.52)个/视野,差异有统计学意义($t=2.37, P<0.05$)。sEVs 组 ERG a 波振幅为(64.38 \pm 16.70) μ V,高于 PBS 组的(16.78 \pm 6.37) μ V,差异有统计学意义($P<0.05$);PBS 组和 sEVs 组 b 波振幅分别为(132.40 \pm 39.41) μ V 和(154.86 \pm 34.08) μ V,明显低于正常组的(338.38 \pm 27.41) μ V,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。mRNA 测序共发现差异表达基因 110 个,其中 sEVs 组下调基因 109 个。KEGG 聚类分析结果提示,差异基因主要集中于炎症性疾病、免疫相关信号通路。PCR 结果显示,sEVs 组视网膜中趋化因子配体 2、趋化因子受体 2、白三烯 B4、白细胞免疫球蛋白白样受体 A6 和白细胞介素 1 β 的 mRNA 相对表达水平低于 PBS 组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。 **结论** MSC-sEVs 可以减轻蓝光造成的视网膜结构和功能损害,这种保护作用可能是通过抑制炎症反应来实现的。

【关键词】 视网膜;光损伤;间充质干细胞;胞外囊泡

基金项目: 国家自然科学基金项目(81800825);天津市自然科学基金多元投入基金项目(21JJCQNJC01630);天津市视网膜功能与疾病重点实验室自主与开放课题项目(2021tjswmq002)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989s-20220412-00157

Therapeutic effect of small extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells on retinal light injury and its mechanism

Yu Bo¹, Wang Kang², Zhang Mingliang¹, Xing Xiaoli¹, Li Xiaorong¹, Zhang Xiaomin¹

¹Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases, Tianjin Branch of National Clinical Research Center for Ocular Disease, Eye Institute and School of Optometry, Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin 300384, China; ²Department of Ophthalmology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China

Corresponding author: Zhang Xiaomin, Email: xzhang08@tmu. edu. cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of small extracellular vesicles (sEVs) derived from mesenchymal stem cells (MSCs) in mouse model of retinal light injury and the possible mechanism. **Methods** Human umbilical cord derived MSCs were identified by flow cytometry. Supernatants of passage 3-5 MSCs were collected. sEVs were harvested by ultracentrifugation and were identified by transmission electron microscopy. Sixty-five healthy female SPF-grade BALB/c mice aged 8-10 weeks were randomly divided into normal group (17 mice), phosphate buffered saline (PBS) group (24 mice) and sEVs group (24 mice). Mice in PBS and sEVs groups were

intravitreally injected with 2 μ l of PBS and sEVs, respectively, and were exposed to 930 lx blue light for 6 hours. No intervention was administered to the normal group. Three days after lighting, mice retinal structure was observed by hematoxylin-eosin staining. Apoptotic retinal cells were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL). Retinal function was tested by electroretinogram. Differentially expressed mRNAs between PBS group and sEVs group were assayed by mRNA transcriptome sequencing and were analyzed through KEGG cluster analysis. The differential mRNAs were verified via real-time quantitative PCR. The study protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Tianjin Medical University Eye Hospital (No. TJYY20201221035).

Results MSCs were positive for CD90 and CD105, negative for CD34 and CD45. The extracted MSC-sEVs showed a bilayer membrane vesicle with a diameter of 80–140 nm. Hematoxylin-eosin staining showed the arrangement of photoreceptor nuclei was disordered in outer nuclear layer in PBS group. The disorder of photoreceptor nuclei arrangement of sEVs group was slighter than that of PBS group. The apoptotic cell number of sEVs group was (14.60 ± 4.04) /visual field, which was lower than (24.00 ± 8.52) /visual field of PBS group, with a statistically significant difference ($t=2.37, P<0.05$). The a-wave amplitude of sEVs group was (64.38 ± 16.70) μ V, which was higher than (16.78 ± 6.37) μ V of PBS group, showing a statistically significant difference ($P<0.05$). The b-wave amplitudes of PBS and sEVs groups were (132.40 ± 39.41) μ V and (154.86 ± 34.08) μ V, respectively, which were lower than (338.38 ± 27.41) μ V of normal group, and the differences were statistically significant (both at $P<0.05$). A total of 110 differentially expressed mRNAs were detected. There were 109 downregulated mRNAs in sEVs group. Differentially expressed mRNAs were mainly inflammation- and immune-related pathways. PCR showed that the expression level of C-C motif chemokine ligand 2, C-C motif chemokine receptor 2, leukotriene B4, leukocyte Ig-like receptor A6 and interleukin-1 β in sEVs group were significantly decreased in comparison with PBS group (all at $P<0.05$). **Conclusions** MSC-sEVs can ameliorate blue light-induced retinal structural and functional damage. The protective effect may be achieved through inhibiting inflammatory response.

[Key words] Retina; Light/injury; Mesenchymal stem cells; Small extracellular vesicle

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81800825); Tianjin Natural Science Foundation (21JCQNJC01630); Open Project of Tianjin Key Laboratory of Retinal Functions and Diseases (2021tjswmq002)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20220412-00157

蓝光照射会对视网膜造成光化学损伤,引起光感受器细胞的氧化应激损伤和功能下降,最终导致光感受器细胞的变性、凋亡和坏死。视网膜光损伤与视网膜退行性疾病中的视觉神经细胞损伤病理过程相似^[1],因此小鼠视网膜光损伤模型是研究视网膜变性疾病和视细胞损伤的常用动物模型之一。抗氧化剂如苯基-N-叔丁基硝基酮、藏红花等被证实可以在视网膜损伤动物模型中发挥神经保护作用^[2-3];局部注射睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)可以减少光感受器细胞变性并保护视网膜功能^[4];近年来,基因治疗也被证实可以延缓小鼠视网膜变性模型中的神经退行性病变,从而发挥神经保护作用^[5]。目前,临床上针对视网膜变性疾病和视网膜损伤以预防为主,对已经发生的神经细胞变性或凋亡尚无有效挽救方法。大量研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源的小胞外囊泡(small extracellular vesicles, sEVs)具有与MSCs相似的生物学功能,如抗炎、神经保护、免疫调节和促进组织损伤修复等^[6-8]。多项研究结果显示,MSC-sEVs在葡萄膜炎、角膜移植排斥反应、视网膜脱离、视网膜激光损伤等动物模型中发挥治

疗作用^[9];但其在视网膜光损伤模型中的应用未见报道。本研究通过制作小鼠视网膜光损伤模型研究MSC-sEVs对视网膜神经细胞损伤的保护作用及其可能的机制,以期对视网膜神经保护治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 MSCs 来源 原代人脐带 MSCs 购于北京贝来生物科技有限公司。

1.1.2 实验动物 清洁级 8~10 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠 65 只,体质量 18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。所有小鼠屈光间质清晰。实验动物饲养环境和操作规程均符合国家科学技术委员会《实验动物管理条例》的规定,饲养于 SPF 级动物房内,室温 (23 ± 2) $^{\circ}$ C,湿度 (55 ± 10) %,光照黑暗各 12 h。本研究方案经天津医科大学眼科医院动物伦理委员会审核批准(批文号:TJYY20201221035)。

1.1.3 主要试剂及仪器 RNA 提取试剂盒(EZB-RN4)、逆转录试剂盒(EZB-A0010CGQ)(美国 EZBioscience 公司);原位末端转移酶标记(terminal

deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒 (德国 Roche 公司); FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); CM10 透射电子显微镜 (荷兰 Phillips Electron Optics 公司); BX51 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); Ganzfeld scotopic 视网膜电图 (electroretinogram, ERG) 仪 (美国 Phoenix Research Labs 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MSCs 的培养和鉴定及 MSC-sEVs 的收集和鉴定

MSCs 于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。根据细胞生长情况,每 2~3 d 换液 1 次,当 MSCs 达到 80% 融合状态时传代。自第 3 代更换为无外泌体胎牛血清配制的完全培养基,收集第 3~5 代细胞培养上清,300×g 离心 10 min 并取上清,2 000×g 离心 20 min 并取上清,10 000×g 离心 30 min 并取上清,110 000×g 离心 2 次,每次 70 min,收集沉淀即为 MSC-sEVs,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬至蛋白质量浓度为 0.5 g/L,0.22 μm 滤器过滤后收集备用。参照文献 [10] 的方法采用流式细胞术鉴定 MSCs 表面标记蛋白 CD90、CD105、CD34 和 CD43 的表达情况,采用透射电子显微镜鉴定 MSC-sEVs 的形态特征。

1.2.2 视网膜光损伤动物模型构建及分组处理

采用随机数字表法将小鼠分为正常组 17 只、PBS 组 24 只和 sEVs 组 24 只。PBS 组小鼠和 sEVs 组小鼠右眼涂硫酸阿托品凝胶扩瞳,玻璃体腔分别注射 PBS 和 0.5 g/L sEVs 各 2 μl 后立即置于笼底各处蓝光强度均为 (930±5) lx 的笼中,为避免小鼠互相遮挡,实行单笼单鼠连续照射 6 h;正常组小鼠不做任何处理。PBS 组和 sEVs 组小鼠处理后 3 d 进行下述实验。

1.2.3 苏木精-伊红染色观察视网膜结构

采用随机数字表法各组随机选取 5 只小鼠,颈椎脱臼法处死后摘取右眼眼球。眼球经不同体积分数的乙醇溶液 (70%、80%、90%、100% 和 100%) 各浸泡 40 min 进行脱水,再浸泡入二甲苯,石蜡包埋。靠近或穿过视神经沿眼球矢状轴行石蜡切片,切片厚度为 4 μm,依次浸泡于二甲苯溶液和梯度乙醇中进行脱蜡,常规苏木素和伊红染色后于光学显微镜下观察并拍照。

1.2.4 TUNEL 染色检测视网膜凋亡情况

采用随机数字表法随机取正常组 1 只, PBS 组和 sEVs 组各 5 只小鼠,颈椎脱臼法处死后摘取右眼眼球,按照 1.2.3 方法制作石蜡切片。按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤进行染色:将石蜡切片依次浸泡于二甲苯溶液和梯度乙醇中进行脱蜡,质量分数 0.1% 柠檬酸

钠 Triton 破膜液中破膜 10 min, PBS 漂洗,加入荧光染色试剂后于湿盒中 37 °C 避光孵育 60 min, DAPI 避光染核后立即用抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下进行凋亡细胞观察和计数。计数方法为:每张切片在显微镜 400 倍下,取 3 个不连续视野分别进行凋亡细胞计数,取平均值。

1.2.5 ERG 检测视网膜功能

采用随机数字表法随机选择正常组、PBS 组和 sEVs 组小鼠各 5 只,在暗室内适应 16 h,在同一环境下注射用盐酸替来他明盐酸唑拉西洋 65 mg/kg+盐酸赛拉嗪 10 mg/kg 腹腔内注射充分麻醉小鼠,复方托吡卡胺滴眼液点右眼扩瞳,0.5% 盐酸丙美卡因滴眼液表面麻醉并涂小牛血去蛋白提取物眼用凝胶,放置环形角膜接触电极,针状参考电极和接地电极分别插入头部和尾部皮下。在 3.1 log cd·s/m² 闪光强度白光刺激下使用 Ganzfeld scotopic ERG 系统记录右眼暗视 ERG 结果^[11]。观察 a 波及 b 波振幅变化并进行组间比较。

1.2.6 mRNA 转录组测序并分析差异表达 mRNA

采用随机数字表法随机选取 PBS 组和 sEVs 组小鼠各 3 只,颈椎脱臼法处死后摘取右眼眼球,沿角膜缘剪开超过半周,取出晶状体,用镊子轻轻夹出视网膜组织并装入离心管中,立即放入液氮内并储存于 -80 °C 冰箱中。采用干冰转样本,由华大基因公司提取 mRNA 并进行 mRNA 转录组测序,筛选出差异表达基因 (筛选条件:差异倍数为 2 倍, Q 值 < 0.05),并对差异基因进行 KEGG 聚类分析。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 验证差异基因 mRNA 表达

PBS 组和 sEVs 组小鼠各剩余 6 只,颈椎脱臼法处死后摘取右眼眼球,分离视网膜组织,采用 RNA 提取试剂盒提取视网膜总 RNA,采用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。分别将待验证基因趋化因子配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2) 及其受体 (C-C motif chemokine receptor 2, CCR2)、白三烯 (leukotriene, LTB₄)、C 型凝集素结构域家族 (C-type lectin domain family, CLEC4D)、白细胞免疫球蛋白样受体 (leukocyte Ig-like receptor, LILRA6)、钙结合蛋白 (S100 calcium binding protein, S100A9)、CD300 抗原样家族成员 B (CD300 molecule-like family member B, CD300LB)、睡眠因子 1 (schlafen 1, SLFN1) 和白细胞介素 (interleukin, IL)-1β 的引物、cDNA 和 SYBR (EZB-A0012-R1) 加入到 384 孔板中,反应体系为 10 μl。反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火及延伸 30 s,循环 40 次。以 GAPDH 作为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法计算各目的基因 mRNA 表达水平。每孔设立

2 个复孔,实验重复 3 次,取平均值。引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列
Table 1 Primer sequences of target genes

基因	序列	产物长度 (bp)
GAPDH	正向引物:5'-TGTGTCCGTCGGATCTGA-3' 反向引物:5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3'	77
CCL2	正向引物:5'-CAGGTCCTGTCATGCTTCTG-3' 反向引物:5'-GAGCCAACACGTGGATGCT-3'	67
CCR2	正向引物:5'-ATCCACGGCATACTATCAACATC-3' 反向引物:5'-CAAGGCTCACCATCATCGTAG-3'	104
LTB4	正向引物:5'-ATGGCTGCAAACACTACATCTC-3' 反向引物:5'-GACCGTGCCTTCTGCATC-3'	162
CLEC4D	正向引物:5'-ACCCGACATCCCAACTGAT-3' 反向引物:5'-CTCTCGTCCAGCGTAAAAAGT-3'	118
LILRA6	正向引物:5'-CCCTGGTCTAGTAGTACAG-3' 反向引物:5'-GTGATAGCTCTGCGAAGACTC-3'	119
S100A9	正向引物:5'-ATACTTAGGAAGGAAGGACACC-3' 反向引物:5'-TCCATGATGTCATTTATGAGGGC-3'	129
CD300LB	正向引物:5'-TGCAGGGTCTCATCCGAT-3' 反向引物:5'-TGTCCGTGTCATTTGTCCTGA-3'	130
SLFN1	正向引物:5'-CTAAATGCAGGAGGGATCAGAC-3' 反向引物:5'-GAGCACACAGAGCTTTTGTAAATG-3'	103
IL-1β	正向引物:5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3' 反向引物:5'-ATCTTTTGGGTCCGTCAACT-3'	89

注:CCL:趋化因子配体;CCR:趋化因子受体;LTB4:白三烯 B4;CLEC4D:C 型凝集素结构域家族 4D;LILRA6:白细胞免疫球蛋白样受体 A6;S100A9:S100 钙结合蛋白 A9;CD300LB:CD300 抗原样家族成员 B;SLFN1:睡眠因子 1;IL:白细胞介素

Note: CCL: C-C motif chemokine; CCR: C-C motif chemokine receptor; LTB4: leukotriene B4; CLEC4D: C-type lectin domain family 4D; LILRA6: leukocyte Ig-like receptor A6; S100A9: S100 calcium binding protein A9; CD300LB: CD300 antigen-like family member B; SLFN1: Schlafen 1; IL: interleukin

1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。各计量资料经绘制直方图观察接近正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 个组间参数比较采用独立样本 *t* 检验,3 个组各参数总体差异比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Tukey 检验。采用双尾检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 和 MSC-sEVs 的鉴定

流式细胞仪检测显示,培养的细胞 CD90、CD105 表达阳性,而 CD34、CD45 表达阴性(图 1A~D)。光学显微镜下观察第 1 次传代后 3 d,细胞呈梭形,排列紧密,贴壁漩涡状生长(图 1E),符合 MSCs 特征。透射

电子显微镜观察发现,提取的 MSC-sEVs 呈直径为 80~140 nm 的圆形双层膜囊泡结构(图 1F)。

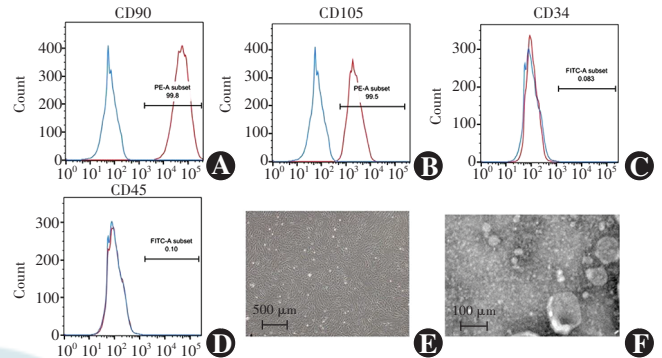


图 1 MSCs 和 MSC-sEVs 的鉴定 A:流式细胞图显示 99.8% 细胞表达 CD90 B:流式细胞图显示 99.5% 细胞表达 CD105 C:流式细胞图显示极少数细胞表达 CD34 D:流式细胞图显示极少数 MSCs 表达 CD45 E:光学显微镜下观察第 1 代 MSCs 形态呈梭形,贴壁生长($\times 40$,标尺=500 μm) F:透射电子显微镜下观察 MSC-sEVs 呈直径为 80~140 nm 的圆形囊泡结构($\times 12\,000$,标尺=100 nm)

Figure 1 Identification of MSCs and MSC-sEVs A:Flow cytometry showed 99.8% MSCs were CD90-positive B:Flow cytometry showed 99.5% MSCs were CD105-positive C:Flow cytometry showed very few MSCs were CD34-positive D:Flow cytometry showed few MSCs were CD45-positive E:Passage 1 MSCs showed spindle-shaped and adherent under a light microscope ($\times 40$,bar=500 μm) F:MSC-sEVs showed a circular vesicle structure with a diameter of 80-140 nm by transmission electron microscopy ($\times 12\,000$,bar=100 nm)

2.2 各组视网膜组织病理学表现

正常组小鼠视网膜结构完整,各层细胞排列均匀整齐(图 2A);PBS 组光感受器细胞核排列紊乱,数量减少,并出现形态改变,外节细胞核分布稀疏紊乱(图 2B);sEVs 组视网膜组织出现与 PBS 组相似的改变,但损害程度较 PBS 组轻(图 2C)。

2.3 各组视网膜凋亡情况

PBS 组和 sEVs 组视网膜外核层出现大量凋亡细胞(图 3A,B)。凋亡细胞计数结果显示,PBS 组凋亡细胞数为(24.00 \pm 8.52)个/视野,明显多于 sEVs 组的(14.60 \pm 4.04)个/视野,差异有统计学意义($t = 2.37$, $P < 0.05$)(图 3C)。

2.4 各组小鼠暗适应 ERG 表现

正常组、PBS 组和 sEVs 组 ERG a 波振幅分别为(193.20 \pm 12.50)、(16.78 \pm 6.37)和(64.38 \pm 16.70) μV ,b 波振幅分别为(338.38 \pm 27.41)、(132.40 \pm 39.41)和(154.86 \pm 34.08) μV ,总体比较差异均有统计学意义($F = 262.70$ 、55.26,均 $P < 0.05$);其中 PBS 组 a 波、b 波振幅明显低于正常组,但高于 sEVs 组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(图 4)。

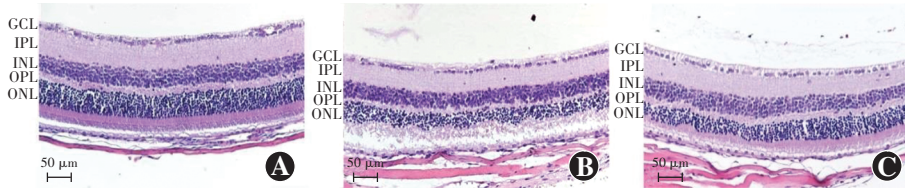


图 2 各组小鼠视网膜组织结构变化 (HE ×200, 标尺 = 50 μm) A: 正常组视网膜结构完整, 各层细胞排列均匀整齐 B: PBS 组光感受器细胞核排列紊乱, 外节分布稀疏紊乱 C: sEVs 组结构损伤程度较 PBS 组轻 GCL: 神经节细胞层; IPL: 内丛状层; INL: 内核层; OPL: 外丛状层; ONL: 外核层

Figure 2 Histopathological changes of mice retinas (HE × 200, bar = 50 μm) A: Normal group Retinal structure was complete with orderly cell arrangement B: PBS group Photoreceptor nuclei displacement and sparsely disordered photoreceptor outer segments were observed C: sEVs group The structural damage was slighter compared with PBS group GCL: ganglion cell layer; IPL: inner plexiform layer; INL: inner nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; ONL: outer nuclear layer

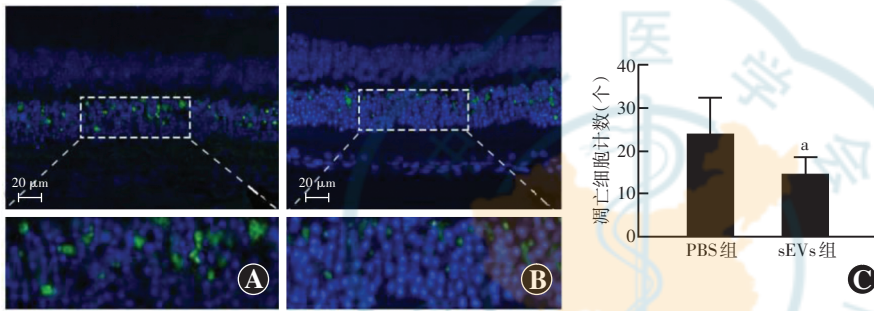


图 3 PBS 组与 sEVs 组小鼠视网膜 TUNEL 染色图像和凋亡细胞计数比较 A: PBS 组外核层可见大量凋亡细胞 (绿色荧光) (FITC/DAPI ×400, 标尺 = 20 μm) B: sEVs 组外核层可见少量凋亡细胞 (FITC/DAPI ×400, 标尺 = 20 μm) C: 2 个组间视网膜凋亡细胞计数比较 与 PBS 组比较, $^aP < 0.05$ (独立样本 *t* 检验, $n = 5$) PBS: 磷酸盐缓冲液; sEVs: 小胞外囊泡

Figure 3 TUNEL staining and cell apoptosis in mice retina A: A large number of apoptotic cells (green fluorescence) were observed in outer nuclear layer of PBS group (FITC/DAPI × 400, bar = 20 μm) B: A small number of apoptotic cells were observed in outer nuclear layer of sEVs group (FITC/DAPI × 400, bar = 20 μm) C: Comparison of apoptotic cells count between two groups Compared with PBS group, $^aP < 0.05$ (Independent samples *t*-test, $n = 5$) PBS: phosphate buffered saline; sEVs: small extracellular vesicles

2.5 PBS 组与 sEVs 组小鼠视网膜差异表达基因及其功能通路分析

相对表达量总体比较, 差异无统计学意义 ($F = 1.60, P > 0.05$) (表 2)。

mRNA 转录组测序结果显示, PBS 组与 sEVs 组间差异表达基因共 110 个, 与 PBS 组相比, sEVs 治疗组中下调基因共 109 个, 上调基因 1 个 (图 5A)。KEGG 聚类分析结果显示, 差异基因主要参与炎症、免疫相关信号通路。在差异倍数排序前十的基因中, 与视网膜损伤相关性较大的信号通路包括自然杀伤细胞介导的细胞毒性、B 细胞受体信号通路、趋化因子信号通路、白细胞跨内皮迁移和吞噬 (图 5B)。

2.6 各组 CCL2、CCR2、LTB4、CLEC4D、LILRA6、S100A9、CD300LB、SLFN1 和 IL-1β mRNA 表达水平比较

正常组、PBS 组和 sEVs 组 CCL2、CCR2、LTB4、LILRA6、IL-1β、CLEC4D、S100A9、SLFN1 mRNA 相对表达量总体比较, 差异均有统计学意义 ($F = 92.49、45.49、104.10、80.32、40.44、31.16、12.95、21.89$, 均 $P < 0.05$); 而 PBS 组与 sEV 组间 CLEC4D、S100A9、SLFN1 mRNA 相对表达量比较, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。各组 CD300LB mRNA

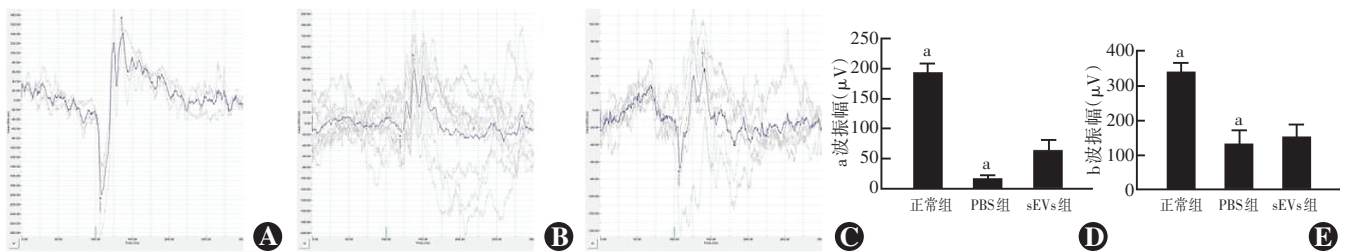


图 4 各组暗适应 ERG a 波、b 波振幅比较 A: 正常组暗适应 ERG 波形图 B: PBS 组暗适应 ERG 波形图 C: sEVs 组暗适应 ERG 波形图 D: 各组间 a 波振幅比较 $F = 262.70, P < 0.05$ 。与 sEVs 组比较, $^aP < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 5$) E: 各组间 b 波振幅比较 $F = 55.26, P < 0.05$ 。与 sEVs 组比较, $^aP < 0.05$ (单因素方差分析, Tukey 检验, $n = 5$) PBS: 磷酸盐缓冲液; sEVs: 小胞外囊泡

Figure 4 Comparison of a- and b-wave amplitudes of scotopic ERG among three groups A: Scotopic ERG wave pattern of normal group B: Scotopic ERG wave pattern of PBS group C: Scotopic ERG wave pattern of sEVs group D: Comparison of a-wave amplitude among three groups $F = 262.70, P < 0.05$. Compared with sEVs group, $^aP < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test, $n = 5$) E: Comparison of b-wave amplitude among three groups $F = 55.26, P < 0.05$. Compared with sEVs group, $^aP < 0.05$ (One-way ANOVA, Tukey test, $n = 5$) PBS: phosphate buffered saline; sEVs: small extracellular vesicles

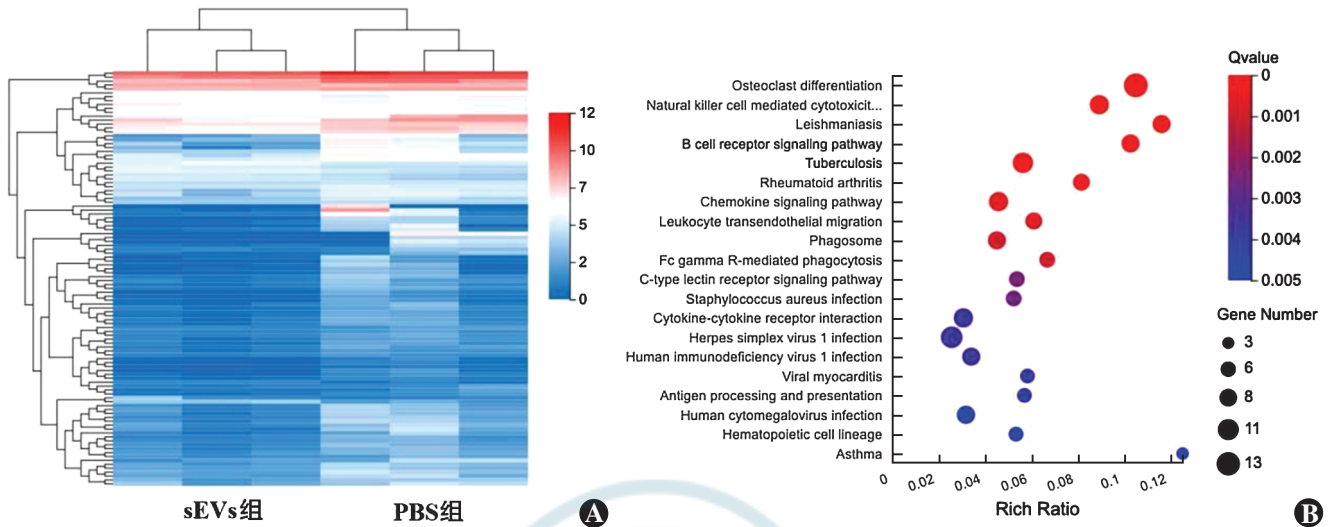


图 5 转录组测序及差异基因 KEGG 分析 A: sEVs 组与 PBS 组基因表达差异热图(基因表达量经 Log10 转换后绘制热图) B: 差异基因 KEGG 聚类分析 sEVs: 小胞外囊泡; PBS: 磷酸盐缓冲液

Figure 5 Transcriptome sequencing and KEGG analysis of differentially expressed genes (Log10-transformed gene expression) A: Heat map of differentially expressed genes between sEVs and PBS groups B: KEGG cluster analysis of differentially expressed genes sEVs: small extracellular vesicles; PBS: phosphate buffered saline

表 2 各组视网膜差异基因 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of mRNA relative expression level of retinal differential genes among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	眼数	mRNA 相对表达量								
		CCL2	CCR2	LTB4	LILRA6	IL-1 β	CLEC4D	S100A9	SLFN1	CD300LB
正常组	6	1.025 \pm 0.100	1.023 \pm 0.078	1.008 \pm 0.025	1.016 \pm 0.104	1.019 \pm 0.078	1.014 \pm 0.091	0.988 \pm 0.032	1.012 \pm 0.089	1.002 \pm 0.100
PBS 组	6	14.861 \pm 2.555 ^a	7.687 \pm 1.642 ^a	18.311 \pm 2.983 ^a	4.350 \pm 0.667 ^a	15.164 \pm 2.090 ^a	5.077 \pm 2.143 ^a	1.249 \pm 0.432 ^a	5.101 \pm 1.087 ^a	19.584 \pm 5.707
sEVs 组	6	5.371 \pm 1.791 ^{ab}	3.911 \pm 1.311 ^{ab}	10.719 \pm 2.027 ^{ab}	4.788 \pm 1.415 ^{ab}	9.090 \pm 2.232 ^{ab}	4.295 \pm 1.366 ^a	1.059 \pm 0.127 ^a	4.313 \pm 1.637 ^a	11.012 \pm 2.432
F 值		92.49	45.49	104.10	80.32	40.44	31.16	12.95	21.89	1.60
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与 PBS 组比较,^b $P < 0.05$ (单因素方差分析,Tukey 检验) PBS:磷酸盐缓冲液;sEVs:小胞外囊泡;CCL:趋化因子配体;CCR:趋化因子受体;LTB4:白三烯 B4;LILRA6:白细胞免疫球蛋白样受体 A6;IL:白细胞介素;CLEC4D:C 型凝集素结构域家族 4D;S100A9:S100 钙结合蛋白 A9;SLFN1:睡眠因子 1;CD300LB:CD300 抗原样家族成员 B

Note:Compared with normal group,^a $P < 0.05$;compared with PBS group,^b $P < 0.05$ (One-way ANOVA,Tukey test) PBS:phosphate buffered saline;sEVs: small extracellular vesicles;CCL:C-C motif chemokine;CCR:C-C motif chemokine receptor;LTB4:leukotriene B4;LILRA6:leukocyte Ig-like receptor A6;IL: interleukin;CLEC4D:C-type lectin domain family 4D;S100A9:S100 calcium binding protein A9;SLFN1:schlafen 1;CD300LB:CD300 antigen-like family member B

3 讨论

MSC-sEVs 是由 MSCs 分泌的直径小于 200 nm 的微囊泡,主要功能成分为外泌体。sEVs 具有脂质双层膜结构,内部包裹蛋白质和核酸,可介导细胞间生物信息传递^[12]。本研究通过建立小鼠视网膜光损伤模型,发现 MSC-sEVs 在视网膜光感受器细胞损伤早期的修复作用,结果显示玻璃体腔注射 MSC-sEVs 可以减轻视网膜结构破坏,减少视细胞凋亡,并改善视网膜功能。

MSC-sEVs 最早被证实在心肌缺血-再灌注模型中具有治疗作用^[13]。此后,MSC-sEVs 在全身各系统

疾病中的有益作用得到广泛验证,如 MSC-sEVs 可以促进皮肤上皮再生、软骨组织修复和脑神经损伤修复等^[7,14-15]。在眼部疾病中,MSC-sEVs 可以促进角膜上皮损伤修复、治疗葡萄膜炎、修复视神经损伤等^[16-18]。本课题组前期研究也发现,在小鼠视网膜激光损伤模型中 MSC-sEVs 可以发挥与 MSCs 相似的损伤修复作用^[10];在临床试验中,MSC-sEVs 可以促进巨大黄斑裂孔玻璃体切割术后的愈合^[19]。本研究结果证实了 MSC-sEVs 对组织损伤的修复作用,尤其是在视网膜神经细胞损伤方面的治疗优势。与干细胞治疗相比,MSC-sEVs 更易保存运输,也可以避免玻璃体腔注射中因注射细胞引起的玻璃体混浊和严重免疫反应。

MSC-sEVs 具有脂质双层膜结构,可以保护其内携带的物质不被酶所降解,且拥有良好的组织穿透性,使其成为药物或治疗性基因蛋白包装的理想载体^[20]。再结合其本身的作用,MSC-sEVs 有望在眼部疾病治疗中发挥更显著的效果^[21]。

本研究采用经典的视网膜光损伤模型,视网膜光损伤后主要产生的病理变化为光感受器细胞凋亡,伴随着视网膜色素上皮细胞损伤^[22],因此该模型可用于神经细胞损伤和视网膜变性疾病研究。由于蓝光的穿透力较强,在同等照度情况下,蓝光引起的视网膜光感受器细胞损伤更重,因此蓝光更多地用于光损伤模型的建立^[23-24]。本研究中光损伤会引起视网膜的炎症和氧化应激反应,引起相关炎症因子上调,研究结果为视网膜变性疾病及视网膜损伤的修复研究提供了新的方向。

本研究中 KEGG 聚类分析结果显示,差异表达基因主要涉及炎症和免疫反应。经荧光定量 PCR 验证 CCL2、CCR2、LTB4、LILRA6 和 IL-1 β mRNA 表达在 sEVs 组和 PBS 组间有显著差异。其中 CCL2 促进单核巨噬细胞向损伤部位迁移,IL-1 β 可以介导免疫细胞的活化和增生,LTB4 是一种中性粒细胞趋化剂,它们都在炎症反应中发挥重要作用^[25-26]。而 LILRA6 是巨噬细胞介导的免疫应答中关键的因子。这些炎症相关因子的下调,证明了 MSC-sEVs 抑制炎症反应的作用。已有研究显示,MSC-sEVs 玻璃体腔注射可以下调视神经损伤模型和视网膜脱离模型中视网膜 CCL2 和 IL-1 β 的表达水平^[18,27];MSC 可以通过下调 LTB4 的表达水平起到保护骨骼肌的作用^[28]。但 Hao 等^[29]研究发现,MSC-sEVs 可以通过上调 LTB4 来发挥对细菌性炎症诱导肺损伤的保护作用,推测这种差异是由于 LTB4 高表达可以募集更多中性粒细胞,在细菌性炎症中起到抗菌作用,但在非细菌性炎症中,会引起组织损伤加重。在肿瘤研究中,MSC-sEVs 对各因子表达水平的作用也可能受不同疾病微环境的影响^[30]。本研究中 KEGG 聚类分析结果并未涉及神经保护和凋亡相关通路,推测 MSC-sEVs 在视网膜神经保护方面的修复作用主要通过抑制炎症反应来实现。

综上,本研究发现了 MSC-sEVs 在视网膜光损伤中的保护作用,通过 mRNA 转录组测序分析发现 sEVs 可以抑制多种炎症因子的表达水平。本研究对 MSC-sEVs 神经保护作用的机制进行了探索,为视网膜变性疾病和视网膜损伤修复提供了新的研究方向。但本研究也存在一定的局限性,如未对炎症因子变化和 sEVs 影响机制间的因果关系进行探讨。未来还可以对炎症

相关通路的上游靶点进行干预,以进一步研究 MSC-sEVs 的具体作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 于波:设计实验、实施研究、分析数据、起草文章;王康:实施研究、采集数据;张明亮:解释数据、统计分析;邢小丽:指导实验、统计分析;李筱荣:酝酿实验;张晓敏:指导实验、审阅文章

参考文献

- [1] Ardeljan D, Chan CC. Aging is not a disease; distinguishing age-related macular degeneration from aging [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2013, 37: 68-89. DOI:10.1016/j.preteyeres.2013.07.003.
- [2] Tomita H, Kotake Y, Anderson RE. Mechanism of protection from light-induced retinal degeneration by the synthetic antioxidant phenyl-N-tert-butyl nitron [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(2): 427-434. DOI:10.1167/iovs.04-0946.
- [3] Maccarone R, Di Marco S, Bisti S. Saffron supplement maintains morphology and function after exposure to damaging light in mammalian retina [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(3): 1254-1261. DOI:10.1167/iovs.07-0438.
- [4] Ghasemi M, Alizadeh E, Saei Arezoumand K, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) delivery to retina: an overview of current research advancements [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8): 1694-1707. DOI:10.1080/21691401.2017.1391820.
- [5] Sahu B, Leon LM, Zhang W, et al. Oxidative stress resistance 1 gene therapy retards neurodegeneration in the rd1 mutant mouse model of retinopathy [J/OL]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2021, 62(12): 8 [2022-05-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34505865>. DOI:10.1167/iovs.62.12.8.
- [6] Shen Z, Huang W, Liu J, et al. Effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on autoimmune diseases [J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 749192 [2022-05-06]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34646275>. DOI:10.3389/fimmu.2021.749192.
- [7] Ha DH, Kim HK, Lee J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration [J/OL]. *Cells*, 2020, 9(5): 1157 [2022-05-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32392899>. DOI:10.3390/cells9051157.
- [8] Guo M, Yin Z, Chen F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome: a promising alternative in the therapy of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2020, 12(1): 109 [2022-05-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32928293>. DOI:10.1186/s13195-020-00670-x.
- [9] 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.
- [10] Yu B, Shao H, Su C, et al. Exosomes derived from MSCs ameliorate retinal laser injury partially by inhibition of MCP-1 [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 34562 [2022-05-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27686625>. DOI:10.1038/srep34562.
- [11] Zhu Y, Aredo B, Chen B, et al. Mice with a combined deficiency of superoxide dismutase 1 (Sod1), DJ-1 (Park7), and Parkin (Prkn) develop spontaneous retinal degeneration with aging [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(12): 3740-3751. DOI:10.1167/iovs.19-27212.
- [12] Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917-6934. DOI:10.2147/IJN.S264498.
- [13] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces

- myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3): 214-222. DOI: 10.1016/j.scr.2009.12.003.
- [14] Kim YG, Choi J, Kim K. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for effective cartilage tissue repair and treatment of osteoarthritis[J/OL]. *Biotechnol J*, 2020, 15(12): e2000082[2022-05-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32559340>. DOI: 10.1002/biot.202000082.
- [15] Thomi G, Surbek D, Haesler V, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 105[2022-05-16]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30898154>. DOI: 10.1186/s13287-019-1207-z.
- [16] Samaeekia R, Rabiee B, Putra I, et al. Effect of human corneal mesenchymal stromal cell-derived exosomes on corneal epithelial wound healing[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(12): 5194-5200. DOI: 10.1167/iovs.18-24803.
- [17] 栗勇涛, 段雅楠, 李焕, 等. 人脐带间充质干细胞源性小细胞外囊泡静脉注射对小鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎的治疗作用[J]. *中华实验眼科杂志*, 2021, 39(11): 949-956. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200430-00302.
Li YT, Duan YN, Li H, et al. Effects of intravenous injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived small extracellular vesicles on experimental autoimmune uveitis in mice[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2021, 39(11): 949-956. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200430-00302.
- [18] Cui Y, Liu C, Huang L, et al. Protective effects of intravitreal administration of mesenchymal stem cell-derived exosomes in an experimental model of optic nerve injury[J/OL]. *Exp Cell Res*, 2021, 407(1): 112792[2022-05-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34454924>. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112792.
- [19] Zhang X, Liu J, Yu B, et al. Effects of mesenchymal stem cells and their exosomes on the healing of large and refractory macular holes[J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2018, 256(11): 2041-2052. DOI: 10.1007/s00417-018-4097-3.
- [20] Zhang L, Song Y, Chen L, et al. MiR-20a-containing exosomes from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates liver ischemia/reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3698-3710. DOI: 10.1002/jcp.29264.
- [21] 林浩, 王颖. 间充质干细胞来源外泌体靶向修饰在眼病治疗中的应用前景[J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(10): 890-894. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200319-00186.
Lin H, Wang Y. Modification of mesenchymal stem cell derived exosomes and its application prospects in the treatment of eye disease[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(10): 890-894. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200319-00186.
- [22] Parver LM, Auken CR, Fine BS. Observations on monkey eyes exposed to light from an operating microscope[J]. *Ophthalmology*, 1983, 90(8): 964-972. DOI: 10.1016/s0161-6420(83)80024-4.
- [23] Shang YM, Wang GS, Sliney D, et al. White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model[J]. *Environ Health Perspect*, 2014, 122(3): 269-276. DOI: 10.1289/ehp.1307294.
- [24] Fan B, Zhang C, Chi J, et al. The molecular mechanism of retina light injury focusing on damage from short wavelength light[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 8482149[2022-05-26]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35498134>. DOI: 10.1155/2022/8482149.
- [25] O'Connor T, Borsig L, Heikenwalder M. CCL2-CCR2 signaling in disease pathogenesis[J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2015, 15(2): 105-118. DOI: 10.2174/1871530315666150316120920.
- [26] Mendiola AS, Cardona AE. The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2018, 125(5): 781-795. DOI: 10.1007/s00702-017-1732-9.
- [27] Ma M, Li B, Zhang M, et al. Therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on retinal detachment[J/OL]. *Exp Eye Res*, 2020, 191: 107899[2022-05-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31866431>. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107899.
- [28] Su WH, Wang CJ, Fu HC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells extricate bupivacaine-impaired skeletal muscle function via mitigating neutrophil-mediated acute inflammation and protecting against fibrosis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17): 4312[2022-05-28]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31484417>. DOI: 10.3390/ijms20174312.
- [29] Hao Q, Gudapati V, Monsel A, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles decrease lung injury in mice[J]. *J Immunol*, 2019, 203(7): 1961-1972. DOI: 10.4049/jimmunol.1801534.
- [30] Shojaei S, Hashemi SM, Ghanbarian H, et al. Effect of mesenchymal stem cells-derived exosomes on tumor microenvironment: tumor progression versus tumor suppression[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 3394-3409. DOI: 10.1002/jcp.27326.

(收稿日期:2022-06-20 修回日期:2022-12-11)

(本文编辑:张宇)

广告目次

瑞秀复(眼科用生物羊膜) 广州瑞泰生物科技有限公司……封二

同息通(曲安奈德注射液) 广东省医药进出口公司珠海公司……前插页

沃丽汀(卵磷脂络合碘片) 广东泰恩康医药股份有限公司……前插页

中华医学期刊全文数据库 《中华医学杂志》社有限责任公司……后插页

中华医学会杂志社英文系列期刊 《中华医学杂志》社有限责任公司……后插页

递法明片 惠州市百吉瑞医药有限公司……封三

迈达科技 天津迈达科技股份有限公司……封底