

自体骨髓间充质干细胞移植对兔角膜碱烧伤炎症反应的抑制作用

吴利安 王从毅 杨文 杨新光 张林 王佳慧

【摘要】 背景 眼表碱烧伤可引起角膜溃疡及角膜新生血管形成,导致角膜混浊,目前尚无有效的疗法。已有研究认为间充质干细胞(MSCs)移植具有修复角膜损伤的作用,但其在体内对角膜碱烧伤治疗的作用机制尚不清楚。目的 研究兔自体骨髓间充质干细胞(BMSCs)对碱烧伤角膜的抗炎机制。方法 抽取2~3月龄日本大白兔骨髓,经体外分离培养得到BMSCs并进行传代,取第3代细胞用于实验,倒置相差显微镜下观察培养细胞的形态,采用流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达,对细胞进行生物学鉴定。采用角膜贴敷NaOH滤纸法在24只日本大白兔的右眼建立中度角膜碱烧伤模型,然后将造模成功的实验兔应用随机数字表法随机分为2个组,于碱烧伤后1h分别在模型眼结膜下注射同种自体BMSCs悬液300 μ l(细胞密度 $5\times 10^6/\mu$ l)(BMSCs组)或等容积PBS(PBS组),每组各12只。分别于移植后3、14和28d于裂隙灯显微镜下观察角膜的混浊度变化并进行评分,采用组织病理学方法检查角膜组织中炎症反应程度并进行多形核中性粒细胞(PMNs)计数;采用免疫组织化学染色法定位并检测角膜组织中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达。结果 体外分离培养的兔BMSCs贴壁生长,呈长梭形,细胞形态均一,传代后其形态无明显改变。细胞表面黏附分子标志物CD29和CD90阳性表达的细胞比例分别为99.18%和97.94%,而造血细胞标志物CD34和CD31的阳性表达分别为0.74%和0.15%。造模后右眼出现角膜混浊、上皮脱落、角膜基质水肿和新生血管形成,移植后14d和28dBMSCs组混浊度评分分别为 2.37 ± 0.52 和 2.25 ± 0.50 ,均明显低于PBS组的 3.00 ± 0.53 和 3.25 ± 0.50 ,差异均有统计学意义($t=2.376, 2.828$,均 $P<0.05$);移植后14d和28dBMSCs组角膜中PMNs数目分别为 $(34.17\pm 1.85)/12$ 个视野和 $(25.64\pm 3.86)/12$ 个视野,明显少于PBS组的 $(42.70\pm 1.54)/12$ 个视野和 $(32.67\pm 1.42)/12$ 个视野,差异均有统计学意义($t=10.021, 4.832$,均 $P=0.000$);移植后14d和28dBMSCs组角膜组织中MMP-2蛋白的阳性表达量(A值)分别为 0.388 ± 0.016 和 0.384 ± 0.006 ,明显低于PBS组的 0.438 ± 0.006 和 0.412 ± 0.005 ,差异均有统计学意义($t=10.205, 13.514$,均 $P=0.000$)。结论 角膜碱烧伤后早期行自体BMSCs移植可减少PMNs浸润,减轻角膜的炎症反应,下调或抑制MMP-2在受损角膜处的表达,抑制基质胶原纤维的降解,从而减少碱烧伤后角膜溃疡的发生。

【关键词】 骨髓间充质干细胞移植/方法;生物分子标志物;化学烧伤/治疗;角膜病/治疗;病理性新生血管/化学诱导;炎症/预防和治疗;基质金属蛋白酶;动物模型

Inhibition of bone marrow mesenchymal stem cell autologous transplantation on inflammation following rabbit corneal alkali burn Wu Li'an, Wang Congyi, Yang Wen, Yang Xinguang, Zhang Lin, Wang Jiahui.

Department of Ophthalmology, Xi'an Fourth Hospital, Xi'an 710004, China

Corresponding author: Wu Li'an, Email: wla105@126.com

[Abstract] **Background** Ocular alkali burns leads to corneal ulcer and angiogenesis and even corneal opacity. There is still no ideal treatment method. Studies showed that mesenchymal stem cells (MSCs) can repair corneal wound *in vivo*, but the specific mechanism is still not clear. **Objective** This study aimed to observe the histopathological change after the early transplantation of bone marrow MSCs (BMSCs) for corneal alkali burn model in rabbits and explore the anti-inflammatory effects of MSCs after corneal alkali burn. **Methods** Bone marrow of 4 ml

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.007

基金项目:陕西省自然科学基金项目(2010JQ4015)

作者单位:710004 西安市第四医院眼科 西安交通大学医学院附属广仁医院 陕西省眼科医疗中心(吴利安、王从毅、杨文、杨新光);710061 西安交通大学医学院第一附属医院眼科(张林、王佳慧)

通信作者:吴利安, Email: wla105@126.com

was collected from 2-3 month-old Japanese rabbit. BMSCs were isolated and cultured from the bone marrow of rabbits, and the third generation of cells were used in this study. Cultured cells were identified by morphology and the expressions of surface markers. Corneal alkali burn models were established in the right eyes of 24 rabbits by attaching the filter paper with 0.1% NaOH at the central cornea for 30 seconds, and then the models were randomized into 2 groups. BMSCs suspension of 300 μl (concentration $5 \times 10^6 / \mu\text{l}$) was subconjunctivally injected 1 hour after modeling in the BMSCs group, and equal volume of PBS was used in the same way in the PBS group. Corneal opacification was scored under the slit lamp microscope in 3, 14 and 28 days after injection. The polymorphonuclear neutrophils (PMNs) were counted by histopathological examination, and the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the corneal tissue was evaluated by immunohistochemistry in various time points. The use and care of the rabbits followed the statement of ARVO. **Results** The rabbit BMSCs were plastic-adherent cells that exhibited a fibroblast-like shape. Cultured cells highly expressed surface adhesion molecular markers CD29 and CD90 (99.18% and 97.94%) and lowly expressed hematopoietic cell markers CD34 and CD31 (0.74% and 0.15%). Opacification of cornea, defect of corneal epithelium, stromal edema and neovascularization appeared after modeling. In 14 days and 28 days after modeling, the opacification scores in the BMSCs group were 2.37 ± 0.52 and 2.25 ± 0.50 , which were significantly lower than 3.00 ± 0.53 and 3.25 ± 0.50 in the PBS group ($t = 2.376, 2.828$, both at $P < 0.05$). After subconjunctival injection, the number of PMNs was $(34.17 \pm 1.85) / 12$ fields and $(25.64 \pm 3.86) / 12$ fields in the BMSCs group, showing significant decrease in comparison with $(42.70 \pm 1.54) / 12$ fields and $(32.67 \pm 1.42) / 12$ fields in the PBS group ($t = 10.021, 4.832$, both at $P = 0.000$). The expression levels of MMP-2 (A value) in cornea were 0.388 ± 0.016 and 0.384 ± 0.006 in the BMSCs group, with considerable decreases in comparison with 0.438 ± 0.006 and 0.412 ± 0.005 in the PBS group ($t = 10.205, 13.514$, both at $P = 0.000$). **Conclusions** Early transplantation of BMSCs can arrest the occurrence of corneal ulcer by suppressing the infiltration of PMNs, alleviating the inflammation reaction, downregulating the expression of MMP-2 in cornea and inhibiting the degradation of stromal collagen fibers.

[Key words] Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation/methods; Biological markers; Burns, chemical/therapy; Corneal diseases/therapy; Neovascularization, pathologic/chemically induced; Inflammation/prevention & control; Matrix metalloproteinase; Disease models, animal

眼部碱烧伤常导致严重的眼表异常,如角膜溃疡及新生血管形成,致角膜混浊,危害视力,临床疗效不理想。角膜碱烧伤的治疗方法有自体角膜缘干细胞(limbus stem cells, LSCs)移植^[1-2]、异体 LSCs 移植、羊膜移植等,但上述手术在临床应用中均受到一定的限制,如自体角膜缘植片取自健眼,从健眼取多少角膜缘组织既不影响健眼,又能有效治疗患眼的问题仍未解决;异体 LSCs 移植供体来源受限,且免疫排斥反应不容忽视;羊膜移植仅能治疗一定程度的眼表损伤。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗眼表损伤取得了一定进展^[3-6],但其在体内的具体作用机制尚不完全清楚^[7]。目前对于 MSCs 修复眼表损伤的适应证、移植时机、移植剂量、移植途径和远期疗效等问题均需进一步探讨。本研究中采用兔自体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)进行体外培养,扩增后的细胞经结膜下注射途径移植至碱烧伤的角膜,观察移植后的炎症反应,探讨 BMSCs 可能的抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2~3 月龄日本大白兔 32 只,体质量 1.8~2.3 kg,雌雄不限,购自西安交通大学医学院动物实验中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM-F12 培养液、质量分数 0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);体积分数 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(杭州四季青公司);EDTA、DMSO、质量分数 1% 苯巴比妥钠(美国 Sigma 公司);鼠抗兔 CD29-FITC 抗体、鼠抗兔 CD34-FITC 抗体、鼠抗兔 CD90-FITC 和抗 CD31-FITC 抗体(美国 Santa Cruz 公司);兔抗小鼠基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)多克隆抗体(1:50)、SP-0023 免疫组织化学试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);Percoll 淋巴细胞分离液(美国法玛西亚公司);质量分数 0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液(日本参天制药株式会社);妥布霉素滴眼液(美国 Alcon 公

司)。流式细胞仪(美国 BD 公司);滤纸(英国 Whatman 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 兔 BMSCs 的培养 按 30 mg/kg 的剂量经兔耳缘静脉注射 1% 苯巴比妥钠全身麻醉大白兔。选取股骨下端穿刺点,质量分数 1% 利多卡因局部注射。无菌条件下以 18G 骨髓穿刺针接 5 ml 注射器,内含 3 000 U/ml(商品单位)肝素 0.2 ml,自膝关节间隙上方 1.0 ~ 1.5 cm 处垂直于股骨轴线从外向内后方刺入,抽取约 4 ml 骨髓后立即用等容积 PBS 洗涤 2 次,弃上清;4 ml PBS 混悬细胞沉淀,缓慢注入含 4 ml Percoll 淋巴细胞分离液的 10 ml 离心管中,离心半径 15 cm,2 000 r/min 离心 20 min,吸取分离后的含单核细胞的乳白色絮状界面层。4 ml PBS 混悬,1 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤 2 次后弃上清,接种于含 10% FBS、质量分数 1% 双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM-F12 培养液的 75 ml 塑料培养瓶内,置于培养箱中,在 37 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下进行细胞培养。72 h 后换液,去除非贴壁细胞,即为原代细胞。此后每 3 天换液 1 次。

当贴壁细胞生长至 80% ~ 90% 融合后常规传代,弃去培养基,PBS 洗涤 2 次,加入 0.25% 胰蛋白酶(含质量分数 0.02% EDTA)消化 1 min,显微镜下观察,待细胞边缘收缩呈椭圆形且即将脱离瓶壁时加入等容积含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养基终止消化后反复吹打。收集细胞悬液,室温下 1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,以 1:2 或 1:3 比例传代培养。每 3 天换液 1 次,待细胞长至 80% 后再次按上述方法传代培养。

1.2.2 流式细胞术检测兔 BMSCs 表面标志物 倒置相差显微镜下观察原代、第 1 ~ 5 代 MSCs 细胞的形态学变化。收集培养的第 3 代细胞,PBS 洗涤,含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 重悬,调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\mu\text{l}$,50 mg/L 山羊血清 4 °C 下孵育 15 min 以封闭 Fc 受体,加入 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鼠抗兔 CD29-FITC、鼠抗兔 CD90-FITC、鼠抗兔 CD34-FITC、鼠抗兔 CD31-FITC 抗体各 5 μl ,另外 4 管细胞不加抗体作为阴性对照。4 °C 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,加入 300 μl PBS 重悬,行流式细胞仪检测。

1.2.3 兔角膜碱烧伤模型的建立 按 30 mg/kg 的剂量经兔耳缘静脉注射苯巴比妥钠以全身麻醉大白兔。0.4% 盐酸奥布卡因滴眼液点右眼 3 次,每隔 2 分钟点眼 1 次。开睑器暴露眼球,将直径 6 mm 的滤纸圆片和直径 6 ~ 14 mm 的滤纸环浸于 1 mol/L NaOH 溶液中 30 s,吸去多余液体。将滤纸圆片和滤纸环置于兔右

眼角膜(包括角膜缘)表面 30 s,立即以质量分数 0.9% NaCl 溶液 100 ml 充分冲洗结膜囊,制备角膜碱烧伤模型。术后红霉素眼膏涂右眼,每日 2 次。共 32 只实验兔用于制备碱烧伤模型,其中 6 只死亡,2 只发生角膜溃疡,故剔除。实验动物的喂养和使用遵循视觉与眼科学研究协会(Association for Research in Vision and Ophthalmology,ARVO)的管理规定执行。

1.2.4 实验分组 将碱烧伤造模成功的实验兔应用随机数字表法随机分为 BMSCs 组和 PBS 组。将 $5 \times 10^6/\mu\text{l}$ 3 ~ 4 代 BMSCs 混悬于 300 μl PBS 中,BMSCs 组于兔鼻侧、颞侧、上方、下方结膜下注入 BMSCs 细胞悬液各 75 μl ,PBS 组兔以用等容积 PBS 结膜下注射。每组 12 只实验兔,术后均妥布霉素滴眼液点眼,每日 3 次。

1.2.5 角膜混浊度评分 移植后 3、14 和 28 d 裂隙灯显微镜下观察各组右眼角膜。按照文献[8]的标准对角膜混浊度进行评分并拍照。角膜混浊度评分标准:0 分:角膜透明,无混浊;1 分:角膜轻度混浊,可观察虹膜纹理;2 分:角膜中度混浊,虹膜纹理细节窥不清;3 分:角膜重度混浊,瞳孔隐约可见;4 分:角膜极度混浊,眼内结构窥不清。

1.2.6 组织病理学检查角膜组织的炎症反应情况 BMSCs 移植后 3、14 和 28 d,BMSCs 组和 PBS 组任意选取 4 只实验兔,耳缘静脉推注空气法处死,沿角膜缘外 2 mm 剪取完整角膜,快速自鼻侧至颞侧分开,置于质量分数 10% 中性甲醛中固定 12 h。梯度乙醇脱水,二甲苯透明 20 min,共 2 次,60 °C 浸蜡 2 h,石蜡包埋。石蜡切片机 5 ~ 6 μm 厚切片,每个角膜标本共切片 10 张。60 °C 烤片 6 ~ 8 h。脱蜡,脱水,苏木素染色 5 min 后冲洗,质量分数 1% 盐酸乙醇分化 10 s 后冲洗,伊红染色 30 s 后冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。每个标本任意选取 3 张切片,每张切片任意选取 4 个视野,计数多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils,PMNs)并拍照。

1.2.7 免疫组织化学染色检测细胞中 MMP-2 蛋白的表达 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法进行免疫组织化学检测。将切片浸入 pH 6.0 的 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液,微波炉高火加热 3 min,转低火 10 min,5 min 后重复 1 次。室温静置 30 min 后 PBS 洗涤。滴加体积分数 3% H₂O₂ 作用 15 min,阻断内源性过氧化物酶活性,PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。滴加山羊血清室温孵育 20 min;滴加 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗兔 MMP-2 一抗 30 μl (1:100),4 °C 过夜。隔夜取出孵育湿盒,37 °C 复温 45 min,PBS 洗涤。滴加 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 山羊

抗兔 IgG 抗体(1:100),37℃ 孵育 30 min 后 PBS 洗涤。滴加 50 μ l 辣根酶标记链霉卵白素工作液(1:100),37℃ 孵育 30 min 后 PBS 洗涤。取 1 ml 蒸馏水,加 DAB 试剂盒中 A、B、C 液各 1 滴,混匀后滴加至切片,显微镜下控制显色时间。蒸馏水冲洗。苏木素复染 0.5~1 min,显微镜下控制染色时间。蒸馏水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。每个 MMP-2 染色标本任意选取 3 张切片,每张切片任意选取 5 个视野照相。以细胞膜和细胞质出现棕黄色颗粒为阳性反应。采用 Image-Pro Plus(6.0 版本)图像分析软件测得染色后 MMP-2 的吸光度(A)值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件(美国 IBM SPSS 公司)进行统计分析。本研究中测量指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数经 Levene 检验证实方差齐。采用完全随机分组两水平实验设计,BMSCs 组与 PBS 组在兔眼结膜下注射后 3、14 和 28 d 角膜炎症评分的总体差异比较采用重复测量两因素方差分析,2 个组在不同时间点兔角膜中 PMNs 细胞计数和 MMP-2 表达的总体差异比较均采用区组设计两因素方差分析,多重比较采用 SNK-*q* 检验。采用双尾检测法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 兔 BMSCs 的形态观察和鉴定

原代细胞培养 7~8 d 时贴壁,形态呈长梭形,类似成纤维细胞样,漩涡状排列。在培养 12~14 d 时,贴壁细胞融合约 90%(图 1),按 1:2~1:3 的比例传代。传代 3~5 d 时细胞达 90% 融合,呈排列紧密的漩涡样结构,可再次进行传代培养。每 3~5 天传代 1 次,至第 5 代细胞可见形态无明显变化。

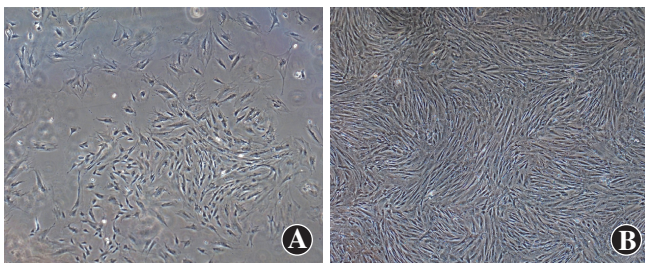


图 1 培养的兔 BMSCs 形态特征($\times 100$) A:原代细胞培养 7 d,贴壁细胞增加,呈短梭状三角形,放射状生长 B:原代细胞培养 12 d,细胞呈长梭形,漩涡状排列,细胞融合达 90%

第 3 代兔 BMSCs 对表面黏附分子 CD29 的阳性表达为 99.18%,CD90 的阳性表达为 97.94%,而对造血

细胞标志物 CD34 的阳性表达仅为 0.74%,CD31 的阳性表达为 0.15%。

2.2 兔角膜碱烧伤成模情况

造模后裂隙灯显微镜下可见兔角膜上皮水肿,基质呈轻度白色混浊,角膜缘缺血,邻近部位的球结膜水肿,前房内部结构隐约可见,虹膜纹理不清,为中度角膜碱烧伤(图 2)。



图 2 兔角膜中度碱烧伤($\times 10$) 模型眼角膜基质层白色混浊,瞳孔隐约可见,虹膜纹理窥不清楚

2.3 各组角膜的炎症过程及评分

移植后 3 d,PBS 组角膜弥漫性水肿,中央角膜基质呈白色混浊,8 只眼出现上皮缺损,1 只眼前房出血,3 只眼晶状体混浊;BMSCs 组角膜弥漫性水肿,中央角膜呈雾状混浊,6 只眼出现上皮缺损,瞳孔隐约可见,3 只眼晶状体轻度混浊。与 PBS 组相比,BMSCs 组角膜水肿较轻,眼内并发症少,角膜透明。移植后 14 d,PBS 组 6 只眼角膜弥漫性混浊,2 只眼中央角膜浅层溃疡,直径约为 2 mm,5 只眼角膜上皮缺损,角膜缘新生血管累及 7~12 个钟点;BMSCs 组 5 只眼角膜弥漫性混浊,3 只眼角膜周边透明,2 只眼角膜上皮缺损,角膜缘新生血管累及 2~8 个钟点。与 PBS 组相比,BMSCs 组角膜水肿明显减轻,角膜透明度增加。移植后 28 d,PBS 组角膜弥漫性混浊,2 只眼角膜白斑,2 只眼中央角膜浅层溃疡,新生血管累及 8~12 个钟点,2 只眼角膜满布新生血管;BMSCs 组 4 只眼角膜弥漫性雾状混浊,上皮轻度缺损及角膜新生血管累及 5~7 个钟点,血管纤细,部分闭塞(图 3)。

移植后随着时间的延长,BMSCs 组兔角膜混浊度评分逐渐较造模后早期下降,而 PBS 组则逐渐升高,总体比较差异无统计学意义($F_{\text{时间}}=0.540, P=0.583$);不同组间角膜混浊度评分的总体比较,差异有统计学意义($F_{\text{分组}}=25.531, P=0.000$)。移植后 3 d,2 个组间角膜混浊度评分的差异无统计学意义($t=0.432, P=0.670$);移植后 14 d 和 28 d,BMSCs 组角膜混浊度评分值均明显低于 PBS 组,差异均有统计学意义($t=2.376, P=0.032; t=2.828, P=0.030$)。移

植后 28 d PBS 组角膜混浊度评分与移植后 3 d 的 PBS 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

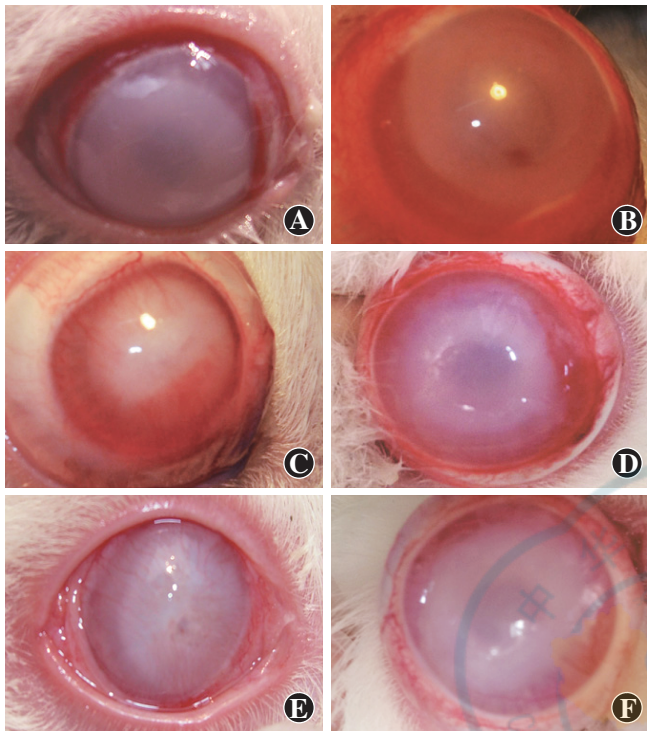


图 3 移植后不同时间点 PBS 组和 BMSCs 组兔眼的角膜炎症表现 ($\times 10$) A: 移植后 3 d 可见 PBS 组角膜弥漫性水肿, 角膜基质呈白色混浊 B: 移植后 3 d BMSCs 组角膜弥漫性水肿, 中央角膜呈雾状混浊 C: 移植后 14 d PBS 组角膜弥漫性混浊, 中央角膜出现浅层溃疡 D: 移植后 14 d BMSCs 组角膜弥漫性混浊, 可见少量上皮缺损 E: 移植后 28 d PBS 组角膜弥漫性混浊, 出现白斑, 中央角膜浅层溃疡 F: 移植后 28 d BMSCs 组角膜雾状混浊, 可见上皮轻度缺损

表 1 各组移植后不同时间点角膜混浊度评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	移植后不同时间点评分		
		3 d	14 d	28 d
BMSCs 组	12	2.67 \pm 0.49	2.37 \pm 0.52 ^a	2.25 \pm 0.50 ^a
PBS 组	12	2.50 \pm 0.45	3.00 \pm 0.53	3.25 \pm 0.50 ^b

注: $F_{\text{分组}} = 25.531, P = 0.000$; $F_{\text{时间}} = 0.540, P = 0.583$; $F_{\text{交互作用}} = 5.084, P = 0.011$ 。与各自时间点的 PBS 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 PBS 组内 3 d 值比较, ^b $P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, SNK-q 检验) BMSCs: 骨髓间充质干细胞

2.4 各组兔角膜组织病理学表现

移植后 3 d, 光学显微镜下可见 BMSCs 组部分角膜上皮细胞脱落, 角膜基质水肿, 同时可见大量炎性细胞浸润; PBS 组角膜上皮变性或坏死, 角膜上皮细胞严重脱落, 角膜基质轻度水肿、纤维崩解, 可见角膜组织中大量炎性细胞浸润。移植后 14 d, BMSCs 组角膜上皮轻度增生, 角膜基质内炎症反应较轻, 少量纤维增生, 可见散在炎性细胞, 角膜新生血管较少, 角膜基质

层结构排列较规则, 角膜内皮细胞部分丢失; PBS 组角膜上皮细胞层数较多, 基底细胞由扁平状向柱状转化, 上皮出现纤维结缔组织, 角膜基质层内可见大量新生血管及炎性细胞, 内皮细胞丢失。移植后 28 d, BMSCs 组角膜上皮完整, 上皮可见纤维增生, 角膜组织内炎性细胞及角膜新生血管减少, 以淋巴细胞、纤维母细胞浸润为主; PBS 组角膜上皮脱落, 可见浅层基质大量炎性细胞浸润及纤维增生, 基质纤维呈波浪状, 排列疏松 (图 4)。

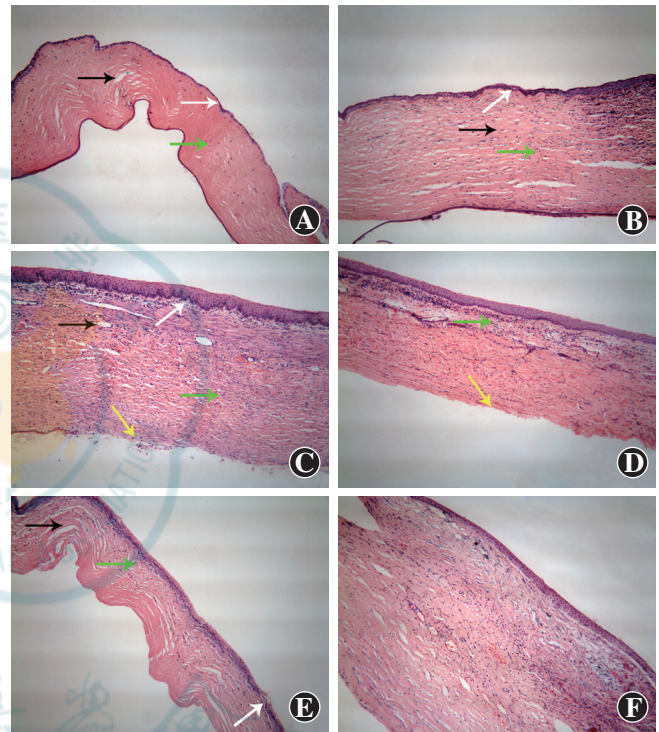


图 4 移植后不同时间点 PBS 组和 BMSCs 组角膜组织病理学表现 (HE $\times 100$) A: 移植后 3 d PBS 组角膜上皮变性、坏死 (白箭头), 角膜基质结构排列疏松 (黑箭头), 可见大量炎性细胞浸润 (绿箭头) B: 移植后 3 d BMSCs 组角膜部分上皮细胞脱落 (白箭头), 角膜基质水肿增厚 (黑箭头), 可见大量炎性细胞浸润 (绿箭头) C: 移植后 14 d PBS 组角膜上皮纤维结缔组织 (白箭头), 基质层内可见大量新生血管 (黑箭头) 及炎性细胞 (绿箭头), 内皮细胞脱落 (黄箭头) D: 移植后 14 d BMSCs 组角膜上皮轻度增生, 角膜基质散在炎性细胞 (绿箭头), 内皮细胞部分脱落 (黄箭头) E: 移植后 28 d PBS 组角膜上皮部分脱落 (白箭头), 浅层基质炎性细胞浸润 (绿箭头), 基质纤维疏松 (黑箭头) F: 移植后 28 d BMSCs 组角膜上皮基本完整, 炎性细胞及角膜新生血管减少

2.5 各组兔角膜组织的 PMNs 计数

不同时间点各组 PMNs 数目的总体比较差异均有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 148.555, P = 0.000$; $F_{\text{分组}} = 53.747, P = 0.000$)。移植后 3 d, BMSCs 组与 PBS 组间 PMNs 数目的差异无统计学意义 ($t = 0.176, P = 0.863$), 移植后 14 d 和 28 d, BMSCs 组角膜组织中 PMNs 均明显少于 PBS 组, 差异均有统计学意义 ($t = 10.021, 4.832$, 均

$P=0.000$), PBS 组移植后 28 d, PMNs 明显少于移植后 3 d, BMSCs 组移植后 14 d 和 28 d, PMNs 均明显少于移植后 3 d, 差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。(表 2)。

表 2 各组移植后不同时间点角膜组织中 PMNs 数目比较($\bar{x}\pm s$, /12 个视野)

组别	样本量	移植后不同时间点 PMNs 数目		
		3 d	14 d	28 d
BMSCs 组	4	46.00±0.94	34.17±1.85 ^{ab}	25.64±3.86 ^{ab}
PBS 组	4	45.90±1.31	42.70±1.54	32.67±1.42 ^b

注: $F_{\text{分组}} = 53.747, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 148.555, P = 0.000; F_{\text{交互作用}} = 9.204, P = 0.004$ 。与各自时间点的 PBS 组比较, $^a P < 0.05$; 与各自组内 3 d 值比较, $^b P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, SNK- q 检验) PMNs: 多形核中性粒细胞; BMSCs: 骨髓间充质干细胞

2.6 各组角膜组织中 MMP-2 的表达

免疫组织化学染色显示, 移植后 14 d MMP-2 蛋白主要表达于碱烧伤角膜组织的上皮细胞、CNV 内皮细胞及炎性细胞的细胞质中, BMSCs 组 MMP-2 蛋白表达的强度较弱, 阳性细胞数较少, 而 PBS 组 MMP-2 蛋白表达的强度较强, 阳性细胞数较多(图 5)。移植后随着时间的延长, BMSCs 组兔角膜 MMP-2 蛋白的表达量(A 值)逐渐增加, 而 PBS 组增加更为明显, 但总体比较差异无统计学意义($F_{\text{时间}} = 1.121, P = 0.263$); 不同组间角膜 MMP-2 蛋白的表达量(A 值)的总体比较, 差异有统计学意义($F_{\text{分组}} = 16.356, P = 0.000$)。移植后 3 d, BMSCs 组与 PBS 组角膜组织中 MMP-2 蛋白的表达量(A 值)比较, 差异无统计学意义($t = 1.538, P = 0.138$); 移植后 14 d 和 28 d, BMSCs 组角膜组织中 MMP-2 蛋白的表达量均明显低于 PBS 组, 差异均有统计学意义($t = 10.205, 13.514$, 均 $P = 0.000$)。PBS 组移植后 14 d 与移植后 3 d 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 3)。

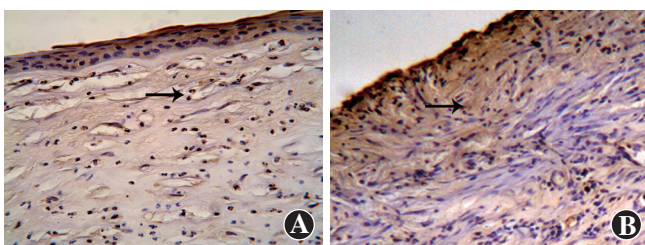


图 5 移植后 14 d PBS 组和 BMSCs 组角膜组织中 MMP-2 的表达($\times 400$) A: PBS 组角膜组织中上皮细胞、CNV 内皮细胞及炎性细胞的细胞质中 MMP-2 表达较多(箭头) B: BMSCs 组角膜组织中表达少量 MMP-2(箭头)

表 3 各组移植后不同时间点角膜组织中 MMP-2 蛋白表达量的比较($\bar{x}\pm s, A$)

组别	样本量	移植后不同时间点 MMP-2 表达量		
		3 d	14 d	28 d
BMSCs 组	4	0.327±0.008	0.388±0.016 ^a	0.384±0.006
PBS 组	4	0.322±0.011	0.438±0.006 ^b	0.412±0.005

注: $F_{\text{分组}} = 16.356, P = 0.000; F_{\text{时间}} = 1.121, P = 0.263$ 。与各自时间点的 PBS 组比较, $^a P < 0.05$ (重复测量两因素方差分析, SNK- q 检验) MMP: 基质金属蛋白酶; BMSCs: 骨髓间充质干细胞

3 讨论

眼部碱烧伤时, 碱性物质与眼表组织接触后逐渐渗透到眼内组织, 造成细胞的变性坏死, 同时启动免疫炎症反应, 释放大量的 PMNs 和淋巴细胞, 分泌相关调节因子以清除坏死物质, 其后续效应可造成角膜溃疡, 甚至角膜穿孔。研究证实, 自体 LSCs 可用于治疗眼表疾病, 但由于眼表碱烧伤患者 LSCs 来源有限, 而双眼 LSCs 严重缺乏者更无法进行自体移植, 此外, 异体 LSCs 移植容易导致严重的免疫排斥反应, 也影响了眼表碱烧伤的治疗效果, 因此寻找新的细胞来源具有重要的临床意义。

MSCs 是来源于中胚层的具有多向分化潜能的干细胞, 在骨髓组织中含丰富。研究发现, BMSCs 移植可促进角膜上皮的修复和角膜内皮细胞的扩增, 抑制基质中成纤维细胞的生长, 减少角膜的瘢痕化^[9-10]。有学者将 BMSCs 移植到碱烧伤后的兔角膜, 发现 BMSCs 可部分地表达上皮细胞标志物^[11], 认为在 LSCs 缺乏的兔模型中, 部分 BMSCs 可转分化为角膜上皮细胞的祖细胞^[12]。目前一些体外研究还发现, 与角膜基质细胞共培养的 MSCs 可转分化为上皮细胞, 但相关机制仍不清楚^[13]。另有研究认为, MSCs 移植后并未分化为角膜上皮细胞, 而是通过调节及分泌大量细胞因子来调节机体的免疫功能, 静脉输注 MSCs 可抑制外周免疫反应和促进免疫调节, 改善角膜所处微环境, 从而达到“治疗”效果^[14-15]。

角膜碱烧伤后, 趋化性细胞因子到达受损角膜处, 同时巨噬细胞及淋巴细胞浸润增加, 表达多种免疫分子, 加速炎症反应和免疫反应的进展^[16]。PMNs 吞噬坏死角膜组织后使其自溶破裂, 释放酶颗粒, 坏死的角膜组织又能吸引 PMNs 浸润, 从而不断加重角膜溃疡, 甚至角膜穿孔, 故认为严重碱烧伤后大量 PMNs 浸润是导致无菌性溃疡及穿孔的主要原因。角膜碱烧伤后 PMNs 浸润有 2 个高峰期, 分别在角膜损伤后 12~24 h 和 10~21 d, 第 1 个高峰由碱性物质引起, 第 2 个高峰与机体自身免疫反应相关。本研究中观察了 BMSCs

移植后模型眼角膜组织的病理变化,显示移植后 14 d 角膜上皮增生,角膜基质内炎症反应较轻,新生血管少,水肿的基质胶原纤维排列整齐;而移植后 28 d, BMSCs 组角膜基质内炎性细胞浸润明显少于 PBS 组,同时相应时间点 BMSCs 组角膜中 PMNs 计数明显少于 PBS 组。此外,各时间点的角膜组织病理学结果也显示, BMSCs 移植后明显减轻了碱烧伤后角膜的炎症反应及血管化程度,有利于角膜上皮的修复及减少相关并发症。

MMPs 是一组降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的内源性蛋白水解酶,由巨噬细胞、中性粒细胞等炎性细胞和成纤维细胞、内皮细胞等合成和分泌,能够降解 ECM 的有效成分,直接或间接参与组织重塑及创伤修复等生理过程。Saika 等^[17]发现 MMPs 可以被过氧化物酶体增生物激活受体下调,减轻碱烧伤后角膜的炎症反应及新生血管。MMP-2 在正常角膜组织中角膜上皮、基质及内皮细胞可有少量表达, Kvant 等^[18]研究发现脉络膜新生血管中 MMP-2 的表达增加,可能通过降解角膜上皮基底膜及 ECM 而参与新生血管形成并进入角膜基质。冯玉梅等^[19]研究发现,在碱烧伤后 72 h 免疫组织化学检测显示 MMP-2 在角膜上皮、基质及内皮表达均增强,10 d 时 MMP-2 表达明显增强,20 d 后 MMP-2 表达减弱。本研究中免疫组织化学结果显示,移植后 3 d, MMP-2 在角膜上皮和基质炎性细胞的细胞质及新生血管管腔中均有表达;移植后 14 d, MMP-2 表达明显增强, BMSCs 组角膜 MMP-2 的表达量低于 PBS 组,并持续至移植后 28 d,提示碱烧伤后 BMSCs 可能下调 MMP-2 的表达,减少角膜炎性创伤。Oh 等^[20]也发现大鼠角膜化学伤后 3 周移植组 MMP-2 mRNA 的表达低于对照组。MMP-2 可由炎性细胞分泌。本研究结果提示, BMSCs 可抑制碱烧伤后角膜中 PMNs 浸润,从而间接减少了 MMP-2 的分泌,发挥抗炎作用。

综上所述, MSCs 可减轻角膜碱烧伤后 PMNs 浸润,下调 MMP-2 蛋白水平的表达,抑制炎症反应,减少角膜溃疡的发生,为碱烧伤后的角膜修复提供有利条件。

参考文献

- [1] Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency [J]. *Br J Ophthalmol*, 2000, 84(3): 273-278. doi: 10. 1136/bjo. 84. 3. 273.
- [2] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, et al. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells [J]. *Circ Res*, 2007, 100(2): 263-272. doi: 10. 1161/01. RES. 0000257776. 05673. ff.
- [3] Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction, amniotic membrane, and cultivated epithelial cells from the limbus [J]. *Br J Ophthalmol*, 2003, 87(12): 1437-1439. doi: 10. 1136/bjo. 87. 12. 1437-a.
- [4] Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing [J]. *Eye (Lond)*, 2006, 20(4): 482-490. doi: 10. 1038/sj. eye. 6701913.
- [5] Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? [J]. *Nat Med*, 2001, 7(4): 393-395. doi: 10. 1038/86439.
- [6] 李颖, 杨磊, 宋艳萍, 等. 角膜基质细胞诱导分化的脂肪间充质干细胞羊膜片移植治疗兔角膜碱烧伤的疗效及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2015, 33(6): 500-506. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 2095-0160. 2015. 06. 004.
- [7] Yao L, Li ZR, Su WR, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30842 [2014-10-23]. <http://dx. plos. org/10. 1371/journal. pone. 0030842>. doi: 10. 1371/journal. pone. 0030842.
- [8] Fantès FE, Hanna KD, Waring GO 3rd, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys [J]. *F Arch Ophthalmol*, 1990, 108(5): 665-675. doi: 10. 1001/archophth. 1990. 01070070051034.
- [9] Nakahara M, Okumura N, Kay EP, et al. Corneal endothelial expansion promoted by human bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69009 [2015-03-09]. <http://journals. plos. org/plosone/article? id = 10. 1371/journal. pone. 0069009>. doi: 10. 1371/journal. pone. 0069009.
- [10] Watson SL, Marcal H, Sarris M, et al. The effect of mesenchymal stem cell conditioned media on corneal stromal fibroblast wound healing activities [J]. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94(8): 1067-1073. doi: 10. 1136/bjo. 2009. 165837.
- [11] 郭彤, 王薇, 张君, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗眼表损害的初步实验研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(3): 246-250.
- [12] Reinschagen H, Auw-Haedrich C, Sorg RV, et al. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits [J]. *Acta Ophthalmol*, 2011, 89(8): 741-748. doi: 10. 1111/j. 1755-3768. 2009. 01812. x.
- [13] Jiang TS, Cai L, Ji WY, et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats [J]. *Mol Vis*, 2010, 16: 1304-1316.
- [14] Ma Y, Xu Y, Xiao Z, et al. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 315-321. doi: 10. 1634/stemcells. 2005-0046.
- [15] Treacy O, O'Flynn L, Ryan AE, et al. Mesenchymal stem cell therapy promotes corneal allograft survival in rats by local and systemic immunomodulation [J]. *Am J Transplant*, 2014, 14(9): 2023-2036. doi: 10. 1111/ajt. 12828.
- [16] Klausner EA, Peer D, Chapman RL, et al. Corneal gene therapy [J]. *J Control Release*, 2007, 124(3): 107-133. doi: 10. 1016/j. jconrel. 2007. 05. 041.
- [17] Saika S, Yamanaka O, Okada Y, et al. Effect of overexpression of PPARgamma on the healing process of corneal alkali burn in mice [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293(1): C75-86.
- [18] Kvant A, Sarman S, Fagerholm P, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in inflammation-associated corneal neovascularization [J]. *Exp Eye Res*, 2000, 70(4): 419-428.
- [19] 冯玉梅, 冯怡, 朱旭东, 等. 基质金属蛋白酶 2、9 和血管内皮生长因子在碱烧伤小鼠角膜组织中的表达 [J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(6): 561-565. doi: 10. 3969/j. issn. 1009-0002. 2004. 06. 006.
- [20] Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 1047-1055. doi: 10. 1634/stemcells. 2007-0737.

(收稿日期: 2015-03-19)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)