

移植 PEDF-hUCMSCs 在治疗大鼠视网膜色素变性的作用

闻慧¹, 闫晓河¹, 朱远飞¹, 旷龙昊¹, 阿洛丹²

基金项目: 深圳市未来产业专项资金技术开发项目 (No. CXZZ20140905095554702)

作者单位:¹(518000) 中国广东省深圳市眼科医院眼底病区 深圳眼科学重点实验室 深圳市眼外伤治疗与干细胞定向分化公共服务平台 暨南大学附属深圳眼科医院;²(400715) 中国重庆市, 西南大学生命科学学院

作者简介: 闻慧, 女, 毕业于第三军医大学, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 闻慧. 1943569786@qq.com

收稿日期: 2018-02-22 修回日期: 2018-07-10

Effect of transplanted PEDF-hUCMSCs in the treatment of retinitis pigmentosa in rats

Hui Wen¹, Xiao-He Yan¹, Yuan-Fei Zhu¹, Long-Hao Kuang¹, Luo-Dan A²

Foundation item: Shenzhen Future Industries Funds--Technology Development Program (No. CXZZ20140905095554702)

¹Department of Fundus Disease, Shenzhen Eye Hospital; Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology; Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation Public Service Platform of Shenzhen; Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; ²College of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Correspondence to: Hui Wen. Department of Fundus Disease, Shenzhen Eye Hospital; Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology; Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation Public Service Platform of Shenzhen; Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China. 1943569786@qq.com

Received: 2018-02-22 Accepted: 2018-07-10

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of transplanted pigmented epithelium-derived factor (PEDF) on human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (hUCMSCs) in the treatment of retinitis pigmentosa in rat models.

• **METHODS:** The hUCMSCs were isolated and cultured, hUCMSCs were transfected with PEDF recombinant lentivirus. Experimental royal college of surgeon (RCS) rats were randomly divided into 3 groups, 8 rats in each group. The experimental group was injected with PEDF-hUCMSCs subcutaneously. The hUCMSCs control group

was injected with the same amount of hUCMSCs. The PBS control group was injected with the same amount of PBS. At 4 and 8wk after injection, electroretinography (ERG), the thickness of retinal outer nuclear layer (ONL) and green fluorescent protein (GFP) staining were observed. Immunofluorescence staining of retinal sections and the phagocytosis of MERTK protein were evaluated to determine phagocytosis.

• **RESULTS:** PEDF gene carrying recombinant lentiviral vector could efficiently infect hUCMSCs. After infection, hUCMSCs were sub cultured and the lentivirus prolonged the expression in the cells of the target gene. At 8wk after transplantation, the amplitude of b-wave in ERG were significantly higher in the experimental group than in the control groups. At 4 and 8wk after transplantation, morphological changes of ONL thickness in the experimental group were significantly higher than those in the control groups (all $P < 0.05$). At 4 and 8wk after transplantation, hUCMSCs infected by lentiviral vector carrying PEDF were found survival in the subretinal cavity by GFP staining, and the PEDF-hUCMSCs were found having phagocytosis for outer segment fragments of photoreceptor cells by immunofluorescence staining. At 4 and 8wk after transplantation, the Protein band gray values in experimental group were significantly higher than that in control groups, which indicated that the expressions of MERTK protein in experimental group were also increased significantly, and the phagocytic capacity of RPE were improved.

• **CONCLUSION:** Transplantation of pigment epithelium-derived protein modified human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells has a protective effect on the retina of RCS rats.

• **KEYWORDS:** pigment epithelium-derived factor; lentiviral vector; human umbilical cord mesenchymal stem cells; retinitis pigmentosa

Citation: Wen H, Yan XH, Zhu YF, *et al.* Effect of transplanted PEDF-hUCMSCs in the treatment of retinitis pigmentosa in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2018;18(8):1374-1380

摘要

目的: 探讨移植色素上皮衍生因子 (pigment epithelial-derived factor, PEDF) 蛋白修饰人脐带来源间充质干细胞 (human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 在治疗大鼠视网膜色素变性的作用。

方法: 分离和培养 hUCMSCs, 以 PEDF 重组慢病毒转染

hUCMSCs。实验 RCS 大鼠(royal college of surgeon rat, RCS)随机分为3组干预,每组8只。实验组视网膜下腔注射 PEDF-hUCMSCs; hUCMSCs 对照组注射等量 hUCMSCs, PBS 对照组注射等量 PBS。注射后4、8wk 观察视网膜电图(electroretinogram, ERG), 检测视网膜外核层厚度, 观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 了解细胞的存活情况, 通过视网膜切片免疫荧光染色观察其在体吞噬功能, 通过 MERTK 蛋白的表达检测重建吞噬能力来评价疗效。

结果:携带 PEDF 基因的重组慢病毒载体, 能高效感染 hUCMSCs, 感染后的 hUCMSCs 进行传代培养, 慢病毒可延长目的基因在细胞内的表达。移植后8wk 视功能上 ERG 中 b 波幅值实验组明显高于对照组, 移植后4、8wk 形态学上视网膜外核层(outer nuclear layer, ONL) 厚度实验组均高于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。移植后4、8wk 时 GFP 染色发现转染 PEDF 慢病毒的 hUCMSCs 细胞均能在视网膜下腔存活, 视网膜切片行免疫荧光染色显示移植的 PEDF-hUCMSCs 对感光细胞脱落的外节碎片有吞噬作用。移植后4、8wk 时 MERTK 蛋白的表达检测实验组蛋白条带灰度值明显高于对照组, 提示实验组中 MERTK 蛋白表达也明显增加, RPE 重建吞噬能力提高。

结论:移植 PEDF 蛋白修饰 hUCMSCs 对 RCS 大鼠视网膜有保护作用。

关键词:色素上皮衍生因子; 慢病毒载体; 人脐带间充质干细胞; 视网膜色素变性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2018.8.04

引用: 闻慧, 闫晓河, 朱远飞, 等. 移植 PEDF-hUCMSCs 在治疗大鼠视网膜色素变性的作用. 国际眼科杂志 2018; 18(8): 1374-1380

0 引言

视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP) 是一组以进行性感光细胞及色素上皮功能丧失为共同表现的遗传性视网膜变性疾病, 以夜盲、进行性视野损害、眼底色素沉着和视网膜电图异常或无波为主要临床特征^[1]。RP 发生的主要原因是视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE) 的变性、坏死和丢失, 从而导致其对光感受器外节脱落的陈旧性膜盘吞噬功能下降, 使脱落的膜盘在视网膜外层堆积, 视网膜结构紊乱, 最终导致感光细胞变性死亡, 从而引起视觉功能障碍。目前尚无有效治疗 RP 的方法, 寻找一种安全有效的防治 RP 的治疗方法, 提高患者生存质量, 减轻患者失明带来的痛苦, 减轻家庭、社会的经济负担, 具有重要的意义和深远的影响。

色素上皮衍生因子(pigment epithelial derived factor, PEDF) 是一种在人眼组织中广泛分布的可溶性糖蛋白, 发挥其多种生物学活性, 如神经营养、神经保护、促进细胞分化等, 已用于治疗多种眼部疾病和肿瘤疾病^[2-3]。人脐带来源间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell, hUCMSCs) 具有自我更新能力及多向分化潜能等特征^[4]。本研究利用 PEDF 蛋白修饰 hUCMSCs 治疗大鼠 RP, 探索治疗 RP 的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物: 出生21d 的 SPF 级 RCS 雄性大鼠33 只, 体质量220~250g, 由第三军医大学眼科实验室提供, 许可证号: SCXK-(军)-2012-0011, 符合动物管理条例。细胞株及重组慢病毒: 人脐带间充质干细胞 hUCMSCs 和 PEDF 重组慢病毒(均由深圳市茵冠生物科技有限公司制备和提供)。主要试剂及仪器: MEM 培养基(美国 Gibco 公司), 胎牛血清(美国 Gibco 公司), 胰蛋白酶(碧云天, 中国), DMSO (Amresco, 美国), 青霉素-链霉素溶液($\times 100$, 碧云天, 中国), PBS(北京中杉), 电生理检测器(Roland Consult Color Ganzfeld Q450C), 激光扫描共聚焦显微镜(Bio-Tek, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 人脐带间充质干细胞的分离、培养和表型鉴定

取正常足月产健康新生儿脐带, 将华通氏胶剪成1mm \times 1mm \times 1mm 大小, 经0.1% 胶原酶和0.125% 胰酶消化30min, 用100 目和200 目滤网过滤, 接种于含10% FBS 的 DMEM 培养瓶内, 放入37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。倒置显微镜每天观察细胞生长情况。原代培养12d 可生长融合达到90%, 胰酶常规消化后, 按5000 个/cm² 接种传代扩增培养。当传代细胞生长接近单层汇合80% 时, 可继续传代。倒置显微镜下观察培养过程中 hUCMSCs 的形态学特点。取第2 代细胞用流式细胞仪检测细胞表型。

1.2.2 PEDF 重组慢病毒感染人脐带间充质干细胞 收集 hUCMSCs, 用 DMEM 完全培养液重悬细胞, 调整细胞密度为2.5 $\times 10^4$ 个/mL, 6 孔板每孔接入5 $\times 10^4$ 个细胞, 放入培养箱中培养。准备病毒: 取出冻存在-80 $^{\circ}$ C 的病毒, 先在冰上融化。根据实验将准确计算好的慢病毒稀释到培养基中, 并尽可能保证所获得的含有慢病毒的培养基的总体积为最小体积, 以期获得最佳的感染效率。第2d 换液, 换成1mL 含2% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 根据预实验确认5 $\times 10^4$ 个细胞加入10 μ L 慢病毒进行后续试验。8~12h 以后观察细胞状态。细胞状态与未感染组无明显差异, 表明慢病毒对细胞没有明显毒性作用, 继续培养, 24h 后更换为新鲜培养基。感染48h 后, 荧光显微镜观察荧光表达情况, 估计慢病毒感染目的细胞的效率, 扩大培养进行后续实验检测。

1.2.3 动物建模 实验大鼠随机分为实验组、hUCMSCs 对照组和 PBS 对照组, 每组8 只。建模过程中如模型鼠发生死亡、感染或建模失败, 予补充。实验组: RCS 大鼠视网膜下腔移植3 μ L (5 $\times 10^5$ 个) PEDF-hUCMSCs; hUCMSCs 对照组: RCS 大鼠视网膜下腔移植等量 hUCMSCs; PBS 对照组: RCS 大鼠视网膜下腔移植等量 PBS。建模方法如下: 取出生后21d 的 RCS 大鼠, 采用1% 戊巴比妥钠按0.8mL/100g 体质量计算, 进行腹腔麻醉后将大鼠侧卧于手术台上, 显微镜下洗眼, 散瞳及表面麻醉后, 3:00 位分离结膜、筋膜并暴露巩膜, 9:00 位行前房穿刺适量放房水。3:00 位于角巩缘后2mm 处, 使用20G 针头与巩膜呈近15 $^{\circ}$ 水平刺穿巩膜, 将 Hamilton 微量注射器(32G) 放入视网膜下腔, 缓慢注射3 μ L 细胞(约5 $\times 10^5$ 个), 空白对照组注射3 μ L 灭菌 PBS, 手术显微镜下清楚可见眼底局部白色隆起, 表示建模成功。

1.2.4 主要观察指标

1.2.4.1 细胞移植后的视功能检测——闪光视网膜电图(F-ERG) hUCMSCs 细胞移植治疗后 4、8wk,所有大鼠接受 F-ERG 检查,测量 a 波、b 波的幅值。暗适应 > 12h,注意通风,在暗红光下操作。刺激间隔:即不同刺激光强间需要间隔的时间,通常情况下,光强越强,间隔时间需要越长。对于普通大鼠 30~60s 足够,但对于变性鼠(RP 或光照损伤)则需要延长间隔时间,大于 120s。

1.2.4.2 移植后视网膜外核层厚度的测量 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,使用生理盐水灌注,再用 4% PFA 进行灌注,取出眼球,去前节(角膜、晶状体和玻璃体),制成眼杯,OCT 冰冻包埋液,切成 10 μ m 切片,DAPI 染色,滴加抗荧光淬灭封片剂,加盖盖玻片封片,4 $^{\circ}$ C 保存。荧光显微镜观察,每个视野取 3 个位置测量视网膜外核层厚度,求平均值。

1.2.4.3 细胞移植后细胞的存活情况——观察 GFP 同前制作 10 μ m 冰冻切片,使用 PBS 漂洗视网膜冰冻切片,5min,3 次。滴加 0.3% Triton-X100 处理切片,10min。使用 PBS 漂洗,5min,3 次。滴加 3% BSA 封闭液,室温孵育 1h。移除 3% BSA,滴加一抗(GFP 抗体,1:2000,使用 3% BSA 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育,过夜;使用 PBS 漂洗切片,5min,3 次;加入二抗(Goat Anti-Rabbit IgG H&L,1:1000,使用 PBS 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育,1h 后使用 PBS 漂洗切片,5min,3 次;滴加 DAPI(1:10 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 15min;使用 PBS 漂洗切片,5min,3 次;使用吸水纸吸去多余水分,滴加抗荧光淬灭封片剂,加盖盖玻片封片,4 $^{\circ}$ C 保存;荧光显微镜观察。

1.2.4.4 移植后视网膜切片免疫荧光染色观察视网膜在体吞噬功能 同前制作冰冻切片。使用 PBS 漂洗视网膜冰冻切片,5min,3 次;滴加 0.3% Triton-X100 处理切片,10min;使用 PBS 漂洗,5min,3 次;滴加 3% BSA 封闭液,室温孵育 1h;移除 3% BSA,滴加一抗(PEDF 抗体,1:800, rhodopsin 抗体,1:500,使用 1% BSA 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育,过夜;使用 PBS 漂洗切片,5min,3 次;加入二抗(Alexa Fluoro 488 标记的兔抗羊 IgM,1:800, PE-Cy3 标记的小鼠抗兔 IgG,1:800,使用 PBS 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育,1h 后使用 PBS 漂洗切片,5min,3 次;滴加 DAPI(1:10 稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 15min;使用 PBS 漂洗切片,5min,3 次;使用吸水纸吸去多余水分,滴加抗荧光淬灭封片剂,加盖盖玻片封片,4 $^{\circ}$ C 保存;荧光显微镜观察。

1.2.4.5 移植后视网膜细胞 MERTK 蛋白表达观察视网膜在体吞噬功能 移植后 4、8wk,每组各取 2 只大鼠视网膜,细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白。提取上述转染后细胞的总蛋白质,测定蛋白浓度,将收集蛋白加入蛋白上样缓冲液,沸水浴使蛋白变性,蛋白冷却至室温后进行电泳,用 PVDF 转膜,转膜后加入 Western 洗涤液中漂洗,加入脱脂奶粉封闭,封闭后加入一抗(兔来源 MERTK 抗体,1:500)孵育,洗涤后加入二抗(羊抗兔 IgG,1:1000)孵育,洗涤,加入 ECL 工作液,经显影、水洗、定影和水洗后检测结果。

统计学分析:采用 SPSS17.0 统计分析软件,计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEDF 重组慢病毒感染人脐带间充质干细胞 PEDF 重组慢病毒感染 hUCMSCs 48h 后,激光共聚焦显微镜下观察到 hUCMSCs 的细胞质出现大量的绿色荧光,细胞形态未发生明显的变化。细胞状态与未感染组无明显差异,表明慢病毒对细胞没有明显毒性作用(图 1A、B);流式细胞仪检测 PEDF 重组慢病毒感染 hUCMSCs 的免疫表型 CD90、CD73、CD105 均呈阳性表达(>98%),而 CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR 呈阴性表达(<2%,图 1C)。

2.2 PEDF-hUCMSCs 细胞移植 RCS 大鼠视网膜下腔后的视网膜电生理 ERG 检测及视网膜外核层厚度变化 PBS、hUCMSCs 细胞和 PEDF-hUCMSCs 细胞分别移植到 RCS 大鼠视网膜下腔,ERG 检测发现,光强分别为 0、5、10db 刺激下,4wk 时 PBS 阴性对照组(157.54 \pm 65.549、144.84 \pm 75.220、127.02 \pm 43.222 μ V)、hUCMSCs 细胞组(139.58 \pm 81.899、126.57 \pm 78.211、104.29 \pm 68.083 μ V)及 PEDF-hUCMSCs 细胞组(151.62 \pm 52.656、155.51 \pm 46.259、131.71 \pm 41.342 μ V) b 波振幅比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);8wk 时与 PBS 阴性对照组(13.17 \pm 9.126、15.20 \pm 9.638、5.33 \pm 3.583 μ V)及 hUCMSCs 细胞组(28 \pm 14.130、19.69 \pm 11.516、15.56 \pm 9.538 μ V)相比,PEDF-hUCMSCs 细胞组(43.68 \pm 10.131、35.72 \pm 10.426、35.70 \pm 9.521 μ V) b 波振幅明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 hUCMSCs 细胞组与 PBS 阴性对照组 b 波振幅比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),这提示 PEDF-hUCMSCs 细胞移植 8wk 时对 RCS 大鼠视网膜变性具有保护作用(图 2)。我们进一步观察 RCS 大鼠视网膜下腔移植 PEDF-hUCMSCs 于 4、8wk 后 DAPI 染色荧光及测量 ONL 的厚度,发现 PEDF 转染 hUCMSCs 组视网膜外核层厚度(20.45 \pm 1.00、12.38 \pm 1.13 μ m)明显厚于 hUCMSCs 组(14.82 \pm 1.95、7.54 \pm 0.96 μ m)与 PBS 对照组(11.93 \pm 1.05、6.13 \pm 1.10 μ m),差异有统计学意义($P < 0.05$),而 hUCMSCs 组与 PBS 组相比,4wk 时差异无统计学意义($P > 0.05$),8wk 时差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 PEDF-hUCMSCs 细胞移植对感光细胞层具有更明显的保护作用(图 3)。

2.3 PEDF-hUCMSCs 细胞移植后的细胞存活情况 RCS 大鼠视网膜下腔移植 PEDF-hUCMSCs 于 4、8wk 应用 GFP 染色观察细胞的存活情况,发现 4、8wk 时转染 PEDF 慢病毒的 hUCMSCs 细胞均能在视网膜下腔存活(图 4)。

2.4 PEDF-hUCMSCs 移植后视网膜切片行相关免疫荧光染色观察其在体吞噬功能及重建吞噬能力相关蛋白 MERTK 表达变化 PEDF-hUCMSCs 移植后视网膜切片行相关免疫荧光染色,PEDF 和 rhodopsin 双染,图 5 中红色代表转染感光细胞 rhodopsin 的部分,绿色代表转染了慢病毒 PEDF 的 hUCMSCs 细胞部分,红色和绿色重叠部分会呈现黄色,代表移植的 PEDF-hUCMSCs 对感光细胞脱落的外节碎片有吞噬作用,反映 RPE 的吞噬能力良

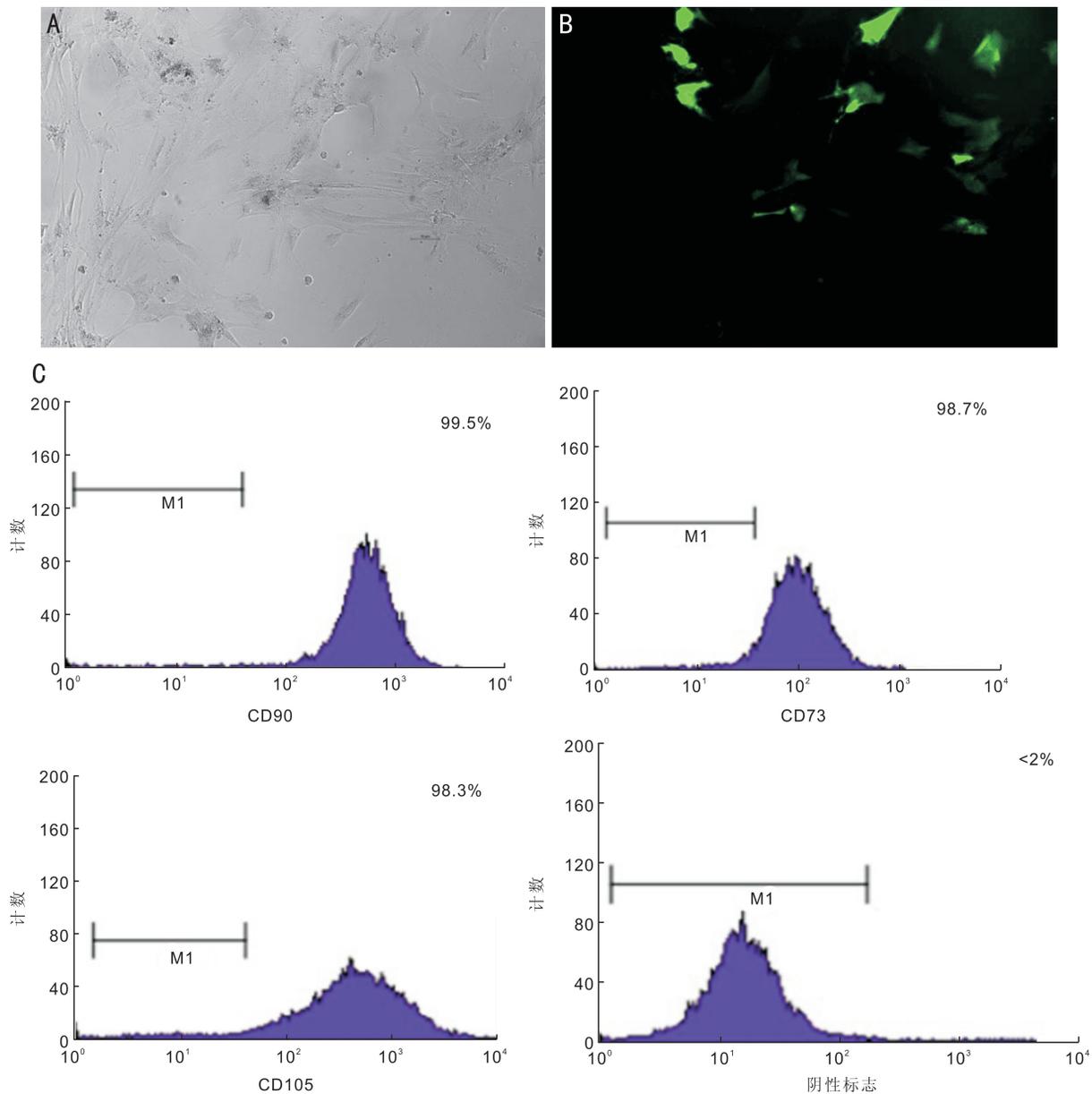


图1 慢病毒颗粒感染 hUCMSCs 细胞后的形态图及流式细胞仪检测结果 A:慢病毒颗粒感染 hUCMSCs 细胞 48h 后的白光图 ($\times 100$);B:慢病毒颗粒感染 hUCMSCs 细胞 48h 后荧光图 ($\times 100$);C:PEDF-hUCMSCs 流式细胞术检测结果(阴性标记物包括 CD34、CD45、CD14、CD19 和 HLA-DR)。

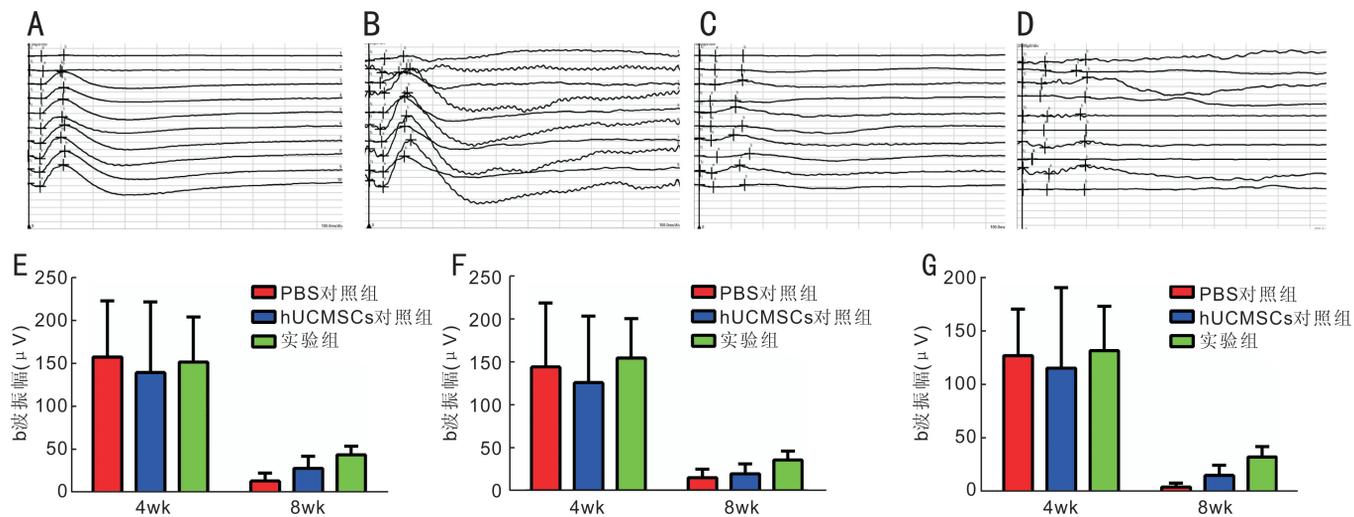


图2 各组视网膜电生理 ERG 检测 A:hUCMSCs 对照组治疗后 4wk ERG 结果;B:实验组治疗后 4wk ERG 结果;C:hUCMSCs 对照组治疗后 8wk ERG 结果;D:实验组治疗后 8wk ERG 结果;E~G:光强分别为 0、5、10db 刺激条件下 b 波振幅情况比较。

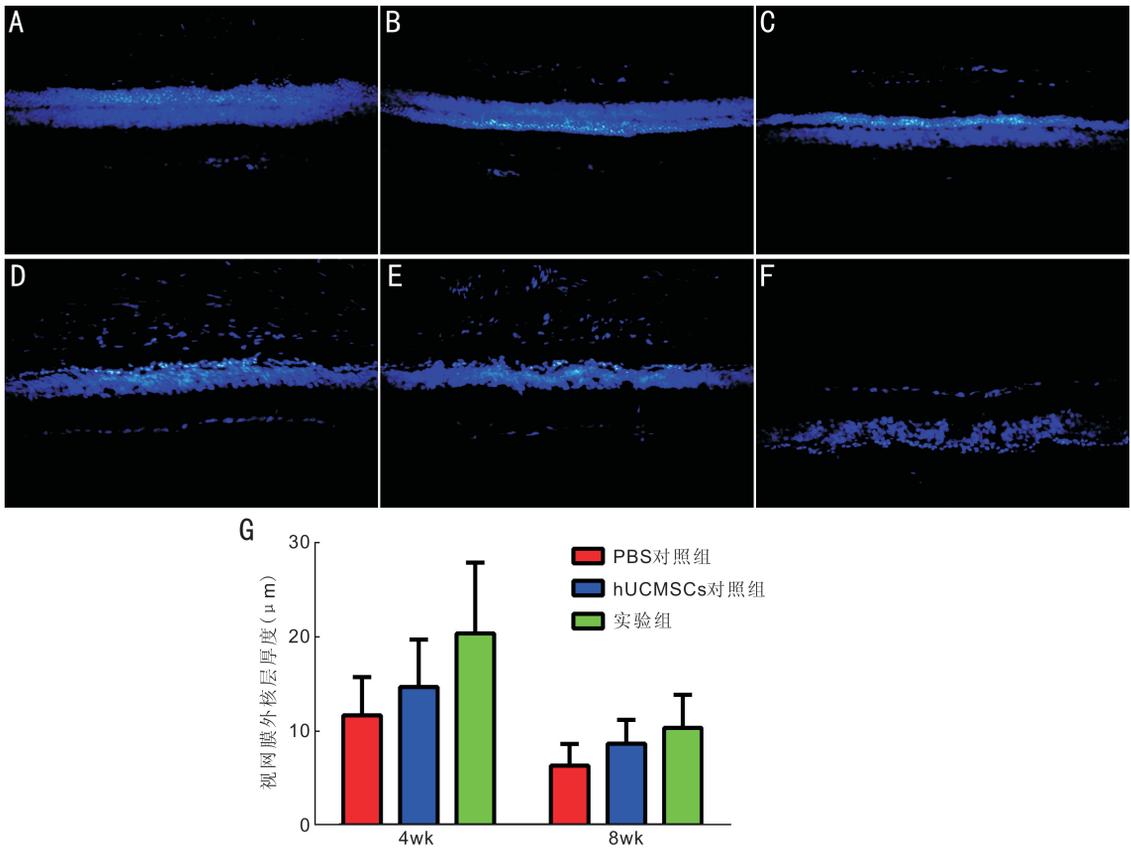


图3 各组视网膜外核层厚度测量 A:实验组治疗后4wk时 DAPI 染色荧光图($\times 400$);B:hUCMSCs 对照组治疗后4wk时 DAPI 染色荧光图($\times 400$);C:PBS 对照组治疗后4wk时 DAPI 染色荧光图($\times 400$);D:实验组治疗后8wk时 DAPI 染色荧光图($\times 400$);E:hUCMSCs 对照组治疗后8wk时 DAPI 染色荧光图($\times 400$);F:PBS 对照组治疗后8wk时 DAPI 染色荧光图($\times 400$);G:细胞移植后4、8wk,实验组、hUCMSCs 对照组与 PBS 对照组 ONL 厚度比较。

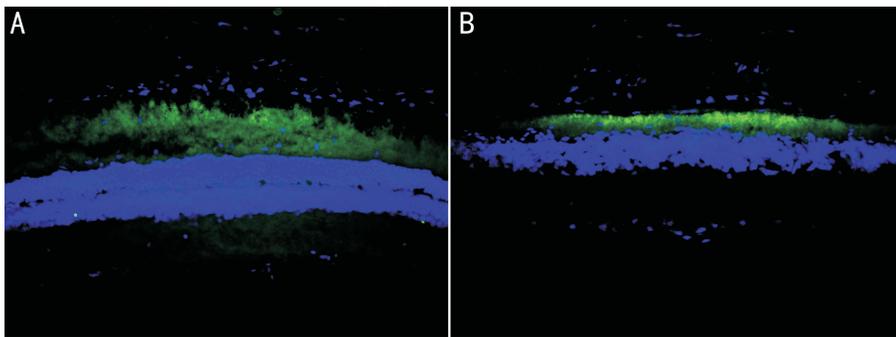


图4 移植 PEDF-hUCMSCs 后 GFP 染色观察细胞存活情况 A:移植4wk后,绿色 GFP 代表转染 PEDF 慢病毒的 hUCMSCs 细胞,蓝色代表染核的部分($\times 400$);B:移植8wk后,绿色 GFP 代表转染 PEDF 慢病毒的 hUCMSCs 细胞,蓝色代表染核的部分($\times 400$)。

好。吞噬能力相关的 MERTK 蛋白的表达,蛋白条带灰度值用于衡量蛋白表达的多少,经内参(β -actin)校正后,灰度值越高,表明该目标蛋白表达越多。RCS 大鼠视网膜下腔移植 PEDF-hUCMSCs 组(A组)、hUCMSCs 组(B组)及 PBS 组(C组)于4、8wk后吞噬能力相关蛋白 MERTK 的表达(每组每个时间点两个样本,分别用 MERTK-1 和 MERTK-2 表示),PEDF-hUCMSCs 组明显高于 hUCMSCs 组与 PBS 对照组。

3 讨论

RP 发生主要是因为 RPE 的变性、坏死和丢失,从而导致其对光感受器外节脱落的陈旧性膜盘吞噬功能下降,使脱落的膜盘在视网膜外层堆积,视网膜结构紊乱,最终导致感光细胞变性死亡,从而引起视觉功能障碍。目前尚无有效治疗 RPE 变性的方法,其中细胞移植治疗被认为是最有前景的治疗方法^[5]。

细胞移植治疗包括色素上皮细胞移植、感光细胞移植、干细胞移植等,色素上皮细胞移植、感光细胞移植是将具有正常结构和功能的细胞移植至病损区,以替代被破坏了的细胞,重建其功能,研究发现该疗法虽能促进视力的提高^[6],但存在免疫排斥的问题。干细胞是一类具有分化潜能和维持自我更新能力保持未分化状态的细胞,根据来源分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)和成体干细胞。许多研究成果已经能够成功将 ESCs 和 iPSCs 诱导分化为表型特征非常类似于 RPE 的细胞,使得干细胞来源的 RPE 细胞移植成为了治疗视网膜变性的可能途径^[7]。然而 ESCs 和 iPSCs 来源的 RPE 细胞存在免疫排斥和致瘤性等问题。成体干细胞可避免免疫排斥和成瘤风险,且取材无伦理道德问题,人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived

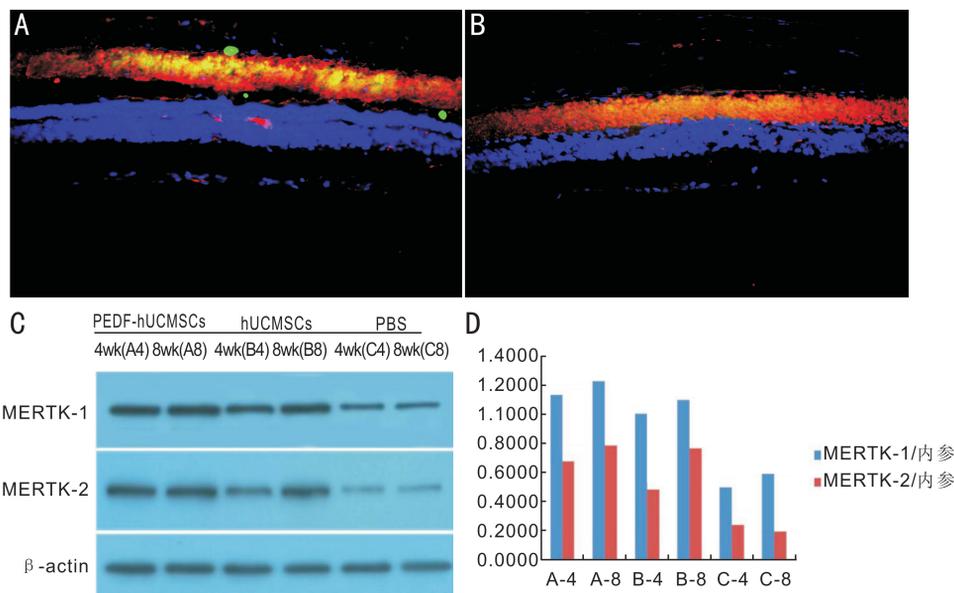


图5 实验组在体吞噬功能观察及各组重建吞噬能力相关蛋白 MERTK 表达变化 A:移植 PEDF-hUCMSCs 后 4wk 视网膜切片免疫荧光染色,黄色代表移植的 PEDF-hUCMSCs 对感光细胞脱落的外节碎片吞噬作用良好($\times 400$);B:移植 PEDF-hUCMSCs 后 8wk,免疫荧光染色提示移植的 PEDF-hUCMSCs 对感光细胞脱落的外节碎片仍有吞噬作用($\times 400$);C:吞噬能力相关的 MERTK 蛋白的表达,各组蛋白条带显示实验组 4wk 和 8wk 目标蛋白表达多于 hUCMSCs 及 PBS 对照组;D:各组蛋白条带灰度值经内参校正后的柱状图显示,移植后 4wk 和 8wk 后吞噬能力相关蛋白 MERTK 的表达,PEDF-hUCMSCs 组明显高于 hUCMSCs 组与 PBS 对照组。

mesenchymal stem cells, hUCMSCs) 是至今研究的最为广泛的成体干细胞,能分化形成多种组织的细胞,有希望成为治疗 RPE 细胞相关疾病的理想种子细胞^[8]。此外,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)易于进行基因操纵,具有较高的代谢活性,内在突变率低,并能有效分泌多种蛋白,是多种转基因蛋白分子的理想细胞载体。

目前,MSCs 已用于多个系统的多种疾病治疗研究,涉及疾病包括多种自身免疫性疾病、血管性疾病、器官移植、退行性病变、神经损伤、骨关节重建和重度感染等,已取得了较多令人鼓舞的结果。MSCs 在视网膜疾病的应用方面,根据视网膜疾病的病因不同,需要采用不同的 MSCs 治疗策略:MSCs 定向诱导分化替代受损细胞,如光感受器细胞和 RPE;利用其免疫抑制作用治疗自身免疫性葡萄膜视网膜炎;利用其神经保护作用减轻或延缓视网膜组织损伤,如目前的 RP、视网膜缺血再灌注损伤和青光眼动物模型;转基因后的 MSCs 移植靶向治疗,如脉络膜新生血管的治疗;利用 MSCs 抗炎和促进创面愈合作用治疗多种视网膜疾病。其中,MSCs 用于治疗视网膜疾病的移植途径主要有两类:全身静脉注射和局部移植。静脉注射的优点是 MSCs 通过血液循环到达范围较广,可以惠及整个视网膜,而且便于进行重复注射,但是全身注射需要大量细胞,并且会增加过敏反应的可能性。局部移植有视网膜下注射和玻璃体内注射两种方法,局部移植可以使 MSCs 直接作用于局部组织,具有更好的针对性,但也存在一定的局限性,如视网膜下注射对于以视网膜外层病变为主的疾病较为合适,但 MSCs 往往只能分布在局部视网膜下,仅能改善局部视网膜功能,对于距离注射部位较远的视网膜则缺乏治疗效果;玻璃体内注射适用于治疗视网膜内层病变,但由于视网膜固有地阻止细胞迁移屏障的存在,细胞

难以迁移和整合到视网膜^[9]。有研究表明,在 RP 动物模型中,给 RP 大鼠视网膜下或静脉注射 MSCs,虽然成功抑制了视网膜变性进展,保护了视网膜功能,但移植的 MSCs 并非通过向视网膜细胞分化实现功效,而 MSCs 分泌的神经营养因子可能是其发挥作用的主要原因^[10-12]。

色素上皮衍生因子(pigment epithelial-derived factor, PEDF)^[13]是一个分子大小为 50kD 的糖蛋白,由 418 个氨基酸残基组成,在人眼组织中广泛分布,眼部 PEDF 主要由 RPE 细胞产生,分泌至光感受器间基质,包绕光感受器外节,发挥生理功能。PEDF 具有多种生物学活性,目前已越来越多地被应用于眼部疾病和肿瘤疾病的临床治疗当中,给视网膜变性疾病和新生血管性疾病等治疗带来希望^[14]。然而 PEDF 在体内很快被代谢分解掉,难以持续发挥生理学作用。

携带 PEDF 基因的重组慢病毒载体,能高效感染 hUCMSCs,感染后的 hUCMSCs 进行传代培养,细胞活力、形态、增殖能力和细胞表型无明显影响,表明慢病毒本身对 hUCMSCs 无毒性作用,慢病毒可延长目的基因在细胞内的表达。本研究中重组慢病毒成功感染后的 hUCMSCs 注入于 RCS 大鼠视网膜下腔,结果发现移植的 PEDF-hUCMSCs 细胞均能在视网膜下腔存活,且对感光细胞脱落的外节碎片有吞噬作用。移植后 8wk 视网膜上 ERG 中 b 波幅值实验组明显高于对照组。移植后 4、8wk 形态学上 ONL 厚度实验组均高于对照组,检测移植 MERTK 蛋白的表达显示实验组蛋白条带灰度值明显高于对照组,提示实验组中 MERTK 蛋白表达也明显增加,RPE 细胞重建吞噬能力提高^[5,15]。综上所述,移植色素上皮衍生因子蛋白修饰 hUCMSCs 对 RCS 大鼠视网膜有保护作用。

本研究将干细胞技术与先进的基因载体治疗手段相结合,开发安全高效可用于临床的干细胞转基因技术,为研发临床级 PEDF-hUCMSCs 干细胞治疗视网膜色素变性提供技术支持和理论依据。

参考文献

- 1 李鹏,李宗义,王丽,等. 诱导人脐带间充质干细胞分化为视网膜色素上皮样细胞的研究. *中华细胞与干细胞杂志* 2014;4(1):35-40
- 2 He Y, Leung KW, Ren Y, *et al.* PEDF improves mitochondrial function in RPE cells during oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(10):6742-6755
- 3 Garcia-Garcia L, Recalde S, Hernandez M, *et al.* Long-term PEDF release in rat iris and retinal epithelial cells after sleeping beauty transposon-mediated gene delivery. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;9:1-11
- 4 张惟,陈松,王继明,等. 人脐带间充质干细胞向神经细胞分化的实验研究. *临床眼科杂志* 2015;23(4):365-370
- 5 邢怡桥,黄蓉,李敏. 视网膜色素变性分类的研究进展. *临床眼科杂志* 2017;25(2):173-176
- 6 王丽,范文斌,吕立夏,等. 转录因子诱导人脐带间充质干细胞转分化为视网膜色素上皮样细胞的研究. *同济大学学报* 2015;36(5):1-7
- 7 高俊彦,张芸,李明,等. 生长相关蛋白43基因修饰脂肪间充质干细胞对视网膜色素变性的修复及保护. *中国组织工程研究* 2017;21(25):3977-3982
- 8 蓝建发,潘华,罗新,等. 人脐带间充质干细胞移植治疗大鼠压力性尿失禁. *兰州大学学报(医学版)* 2017;43(5):1-6
- 9 李筱荣,张晓敏. 间充质干细胞在视网膜疾病中的临床应用展望. *眼科* 2011;20(4):222-225
- 10 Wang S, Lu B, Girman S, *et al.* Non-invasive stem cell therapy in a rat model for retinal degeneration and vascular pathology. *PLoS One* 2010;5(2):e9200
- 11 Arnhold S, Absenger Y, Klein H, *et al.* Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245(3):414-422
- 12 Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, *et al.* Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(9):4121-4129
- 13 Sun J, Mandai M, Kamao H, *et al.* Protective Effects of Human iPS-Derived Retinal Pigmented Epithelial Cells in Comparison with Human Mesenchymal Stromal Cells and Human Neural Stem Cells on the Degenerating Retina in rd1 mice. *Stem Cells* 2015;33(5):1543-1553
- 14 闻慧,张芸,纪惜鑫,等. 色素上皮衍生因子修饰的人脐带间充质干细胞构建方法. *国际眼科杂志* 2017;17(7):1226-1231
- 15 Sun YZ, Peng RM, Liu JW, *et al.* The alteration of MERTK gene in different passage of retinal pigment epithelium cells. *Int Eye Sci* 2013;13(3):421-424