

# 骨髓间充质干细胞玻璃体腔移植对大鼠青光眼模型视神经的保护作用

田洪益<sup>1</sup>, 谢碧华<sup>2</sup>, 罗清礼<sup>1</sup>

引用: 田洪益, 谢碧华, 罗清礼. 骨髓间充质干细胞玻璃体腔移植对大鼠青光眼模型视神经的保护作用. 国际眼科杂志 2020; 20(11):1866-1870

基金项目: 四川省科技计划项目 (No.18YYJC0605)

作者单位: <sup>1</sup>(610000) 中国四川省成都市, 成都华夏眼科医院; <sup>2</sup>(610000) 中国四川省成都市第一人民医院眼科

作者简介: 田洪益, 男, 毕业于重庆医科大学, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 玻璃体视网膜疾病。

通讯作者: 罗清礼, 男, 毕业于四川大学华西临床医学院, 硕士研究生, 主任医师, 研究方向: 眼眶病. 283931507@qq.com

收稿日期: 2019-09-09 修回日期: 2020-09-28

## 摘要

目的: 探讨骨髓间充质干细胞玻璃体腔移植对大鼠青光眼模型的神经保护作用。

方法: 提取大鼠原代骨髓间充质干细胞并进行鉴定; Lewis大鼠分别随机分为3组: 对照组、青光眼模型组和骨髓间充质干细胞组, 并制作青光眼大鼠模型; 左眼为实验眼(青光眼), 右眼为对照眼, 并进行鉴定; 然后进行骨髓间充质干细胞玻璃体腔移植; HE染色观察视网膜组织形态; 免疫荧光法检测视网膜神经节细胞数量; TUNEL染色观察视网膜神经节细胞凋亡情况; Western blot检测视网膜组织中IGF1和BDNF蛋白表达情况。

结果: 大鼠实验眼的眼内压均明显高于对照眼 ( $P < 0.01$ ), 表明青光眼大鼠模型均建造成功; 青光眼模型组大鼠视网膜神经纤维排列不整齐, 视网膜神经节细胞数量和视网膜厚度显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 视网膜神经节细胞凋亡数量显著高于对照组 ( $P < 0.001$ ); 骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜神经纤维细胞排列较整齐, 视网膜神经节细胞数量和视网膜厚度明显高于青光眼模型组 ( $P < 0.05$ ), 视网膜神经节细胞凋亡数量明显低于青光眼模型组 ( $P < 0.05$ ); 青光眼模型组大鼠视网膜中IGF1和BDNF蛋白表达量明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 骨髓间充质干细胞组大鼠的视网膜中IGF1和BDNF蛋白表达量高于青光眼模型组 ( $P < 0.05$ )。

结论: 骨髓间充质干细胞玻璃体腔移植能改善大鼠青光眼, 可以保护视网膜神经节细胞。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 玻璃体腔移植; 青光眼; 视神经; 保护作用

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2020.11.05

## Effect of vitreous cavity transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on optic nerve protection in rat glaucoma model

Hong-Yi Tian<sup>1</sup>, Bi-Hua Xie<sup>2</sup>, Qing-Li Luo<sup>1</sup>

Foundation item: Sichuan Science and Technology Plan Project

(No.18YYJC0605)

<sup>1</sup>Chengdu Huaxia Ophthalmological Hospital, Chengdu 610000, Sichuan Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, Chengdu First People's Hospital, Chengdu 610000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Qing - Li Luo. Chengdu Huaxia Ophthalmological Hospital, Chengdu 610000, Sichuan Province, China. 283931507@qq.com

Received: 2019-09-09 Accepted: 2020-09-28

## Abstract

• AIM: To investigate the neuroprotective effect of vitreous cavity transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on rat glaucoma model.

• METHODS: Rat primary bone marrow mesenchymal stem cells were extracted and identified; Lewis rats were randomly divided into 3 groups: Control group, Glaucoma group and bone marrow mesenchymal stem cell group (BMMSCs group), and rat glaucoma model were made; the left eye was the experimental eye (glaucoma), the right eye is the control eye, and identified them. Then vitreous cavity transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells were performed; HE staining was used to observe the morphology of the retina; The number of retinal ganglion cells was detected by immunofluorescence; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of retinal ganglion cells; The expression of IGF1 and BDNF protein in retinal tissue was detected by Western blot.

• RESULTS: The intraocular pressure of the experimental eyes of the rats was significantly higher than that of the control eyes ( $P < 0.01$ ), indicating that the glaucoma rat models were successfully constructed; In the Glaucoma group, the retinal nerve fibers were irregularly arranged, the number of retinal ganglion cells and retinal thickness were significantly lower than that of the control group ( $P < 0.01$ ), and the number of apoptosis of retinal ganglion cells was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.001$ ); The retinal nerve fiber cells in the BMMSCs group were arranged neatly. The number of retinal ganglion cells and retinal thickness were significantly higher than those in the Glaucoma group ( $P < 0.05$ ), and the number of apoptosis of retinal ganglion cells was significantly lower than that of Glaucoma group ( $P < 0.01$ ); The expression of IGF1 and BDNF in the retina of the Glaucoma group was significantly lower than that in the control group ( $P < 0.01$ ), the expression of IGF1 and BDNF in the retina of the BMMSCs group was higher than that in the Glaucoma group ( $P < 0.05$ ).

• CONCLUSION: Bone marrow mesenchymal stem cell

vitreous cavity transplantation can improve glaucoma in rats and protect retinal ganglion cells.

• **KEYWORDS:** bone marrow mesenchymal stem cells; vitreous cavity transplantation; glaucoma; optic nerve; protective effect

**Citation:** Tian HY, Xie BH, Luo QL. Effect of vitreous cavity transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells on optic nerve protection in rat glaucoma model. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(11):1866-1870

## 0 引言

青光眼 (glaucoma) 是老年人群中常见的眼科疾病, 具有不可逆性<sup>[1]</sup>。青光眼的特征是视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 的进行性退化和不能分裂或再生, 被视为神经干细胞生成性疾病, 与其他疾病如阿尔茨海默氏症或帕金森病一样, 最终由神经功能缺陷引起<sup>[2]</sup>。青光眼的临床治疗主要有药物和手术治疗, 但其治疗效果不是很理想, 不能有效阻止视网膜神经节细胞凋亡<sup>[3]</sup>。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是一种能够自我更新的多能干细胞, 具有多向分化潜能和免疫调节作用, 包括脐带间充质干细胞、骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 等<sup>[4]</sup>。其中, 骨髓间充质干细胞是具有自我更新的非造血干细胞, 具有多系分化潜能, 能够分化为多种细胞谱系, 如: 脂肪细胞、成骨细胞、表皮细胞等<sup>[5-6]</sup>。因此, 本实验研究骨髓间充质干细胞玻璃体腔移植是否对大鼠青光眼模型有改善作用, 是否对视网膜神经节细胞有保护作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 35 只体质量 180~220g Lewis 大鼠购自中国科学院上海斯莱克实验动物有限公司。IMDM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。Percoll 分离液、PBS 溶液、茜素红 S、油红 O 和葡聚糖四甲基罗丹明购自美国 Sigma 公司。pGFP-N 试剂购自美国 Clontech 公司。CD29 抗体、CD45 抗体、CD44 抗体、CD90 抗体、CD106 抗体和 CD14 抗体购自美国 Abcam 公司。HE 试剂盒购自北京中杉金桥公司。RIPA 裂解液购自北京索莱宝公司。IGF1 抗体、BDNF 抗体、 $\beta$ -actin 抗体和山羊抗兔 (鼠) IgG 二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 取 5 只雄性 Lewis 大鼠, 采用麻醉处死, 立即用 75% 乙醇浸泡, 移入超净工作台内, 固定大鼠四肢于工作台面的泡沫板上。酒精棉球擦拭, 无菌条件下用灭菌消毒后的镊子和剪刀分离出大鼠股骨, 剔除骨头表面肌肉, PBS 溶液冲洗两遍。将股骨两端剪断, 用 2mL 无菌注射器吸取 IMDM 培养基冲出股骨中的骨髓于离心管中, 反复冲洗几次。将冲出的骨髓吹打成悬液, 1000r/min 离心 5min, 弃上清。IMDM 培养基重悬细胞, 将悬液加入到装有等体积 Percoll 分离液的离心管中, 用吸管吹打成细胞悬液, 2000r/min, 离心 20min。吸取中间骨髓基质细胞层 (白色混浊状), IMDM 培养基洗 3 次。用含 15% 胎牛血清、100U/mL 青霉素、100U/mL 链霉素的 IMDM 培养基重悬。以  $1 \times 10^6$ /mL 接种于细胞培养瓶中, 置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。48h 后弃去培养基, PBS 溶液冲洗

2~3 次去除未贴壁细胞, 加入完全培养基继续培养。以后每 3d 换液 1 次, 以保证细胞所需的营养成分, 并于倒置显微镜下观察细胞生长的形态变化。

**1.2.2 骨髓间充质干细胞的体外分化** 对于成骨分化, 将骨髓间充质干细胞在含有 100nmol/mL 地塞米松, 0.05mmol/mL 抗坏血酸-2-磷酸和 10mmol/mL  $\beta$ -甘油磷酸酯的完全培养基中培养 4wk, 进行成骨分化。通过用 2% 茜素红 S (pH 4.1~4.3) 染色评估。对于成脂分化, 通过在含有 0.5mmol/mL 异丁基-甲基黄嘌呤, 100nmol/L 地塞米松, 10mg/mL 胰岛素和 200 $\mu$ mol/mL 吡啶美辛的完全培养基中培养骨髓间充质干细胞, 进行脂肪形成分化 2wk。通过用 0.5% 油红 O 染色细胞内脂滴来显示脂肪形成分化。

**1.2.3 流式细胞术** 在第 3 代后, 收获骨髓间充质干细胞。每 1mL 细胞悬液中加入 20 $\mu$ L 抗体 (CD29 抗体、CD45 抗体、CD44 抗体、CD90 抗体、CD106 抗体、CD14 抗体), 室温、避光孵育 30min 后, 1000r/min 离心 5min, 弃去上清液。PBS 清洗细胞后加入培养基重悬细胞, 使用 FACS Calibur 仪器进行流式细胞术分析。用 Cell Quest 软件分析数据。

**1.2.4 动物分组及给药** 将 30 只 Lewis 大鼠饲养在有锯屑垫料的标准塑料笼中, 室内温度为 21°C  $\pm$  2°C, 动物可以不受限制地获得食物和水, 保持 12h 光照/12h 黑暗循环, 并且在实验之前使大鼠适应环境至少 2wk。将大鼠分别随机分为 3 组: (1) 对照组: 建模后第 7d 向玻璃体腔内注射 3 $\mu$ L PBS 溶液; (2) 青光眼模型组: 建模后第 7d 向玻璃体腔内注射 3 $\mu$ L PBS 溶液; (3) 骨髓间充质干细胞组: 在建模后第 7d 向玻璃体腔内注射 3 $\mu$ L 骨髓间充质干细胞悬浮液 (含有  $1 \times 10^5$  个细胞), 连续给药 30d。

**1.2.5 模型制作** 按照文献 [7] 进行青光眼模型制作。Lewis 大鼠经戊巴比妥钠全身麻醉, 将每只大鼠的左眼为实验眼 (青光眼), 右眼为对照眼。实验前测量每只眼的眼内压, 在裂隙灯下, 从 532nm 二极管激光器向左眼施加 0.75W 脉冲 (直径 50 $\mu$ m, 0.5s), 经过 50 个激光脉。在第 7、14、21、30d 测双眼眼内压, 实验眼内压比对照眼内压大于 10mmHg (1mmHg = 0.133kPa) 为青光眼模型制作成功。对照组只麻醉大鼠, 不进行手术。动物实验设计计划严格经过成都市第一人民医院伦理委员会审查。

**1.2.6 HE 染色** 将视网膜组织快速在 10% 福尔马林溶液中固定 24h。固定后, 视网膜组织样品包埋于石蜡中并进行切片 (切片的厚度 5 $\mu$ m)。将 5 $\mu$ m 厚的组织固定在带正电荷的载玻片上, 然后进行脱水-再水化, 切片进行苏木精-曙红染色。所有切片均用光学显微镜进行拍摄。

**1.2.7 视网膜神经节细胞计数** 葡聚糖四甲基罗丹明 (DTMR) 盐溶液 (终浓度 1mg/mL) 从大鼠玻璃体腔注入, 给予 DTMR 48h 后, 将进行免疫荧光分析的动物处死, 并摘除眼球。将眼球在甲醛中固定 2h, 然后将视网膜移出并平放, 使用 PBS/甘油 (1:1) 将 RGC 层置于最上方, 并标记上视网膜的方向。将平置的视网膜放置在显微镜载玻片上, 并使用适当的滤光片套件立即用免疫荧光显微镜进行检查, 通过图像分析软件 Image Pro Plus 对图像进行计数。

**1.2.8 TUNEL 染色** 视网膜组织经固定、OCT 包埋, 并制作成 6 $\mu$ m 厚的冰冻切片。切片滴加蛋白酶 K 工作液

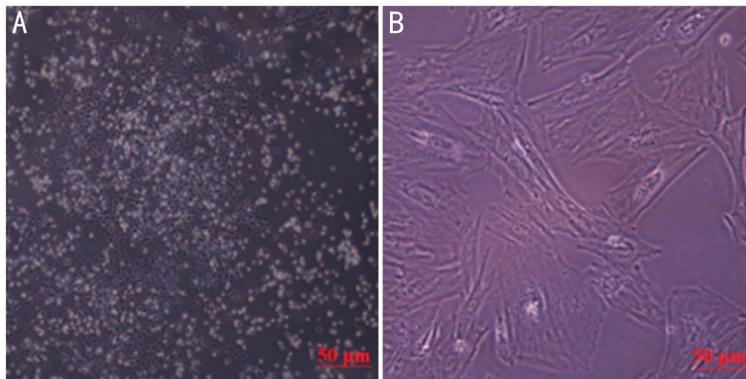


图1 骨髓间充质干细胞形态( $\times 100$ ) A:第0代,第5d;B:第3代,第4d。

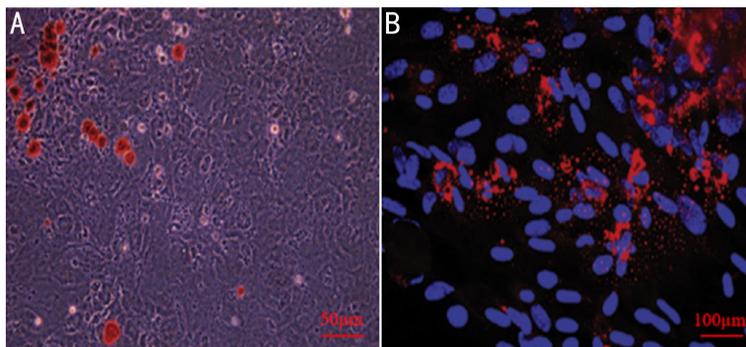


图2 骨髓间充质干细胞的体外分化 A:成骨分化( $\times 100$ );B:成脂分化( $\times 200$ ),蓝色表示细胞核。

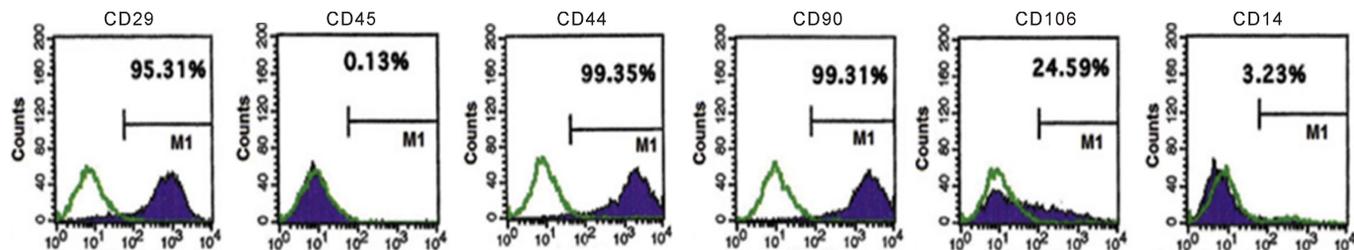


图3 流式细胞术检测 BMMSCs 的免疫表型特征。

( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $37^\circ\text{C}$  温育  $10\sim 30\text{min}$ , PBS 清洗 3 次。接着切片在 4% 的多聚甲醛溶液中室温固定  $5\text{min}$ , PBS 清洗 3 次。然后切片上滴加 DNse I 反应液,  $37^\circ\text{C}$  温育  $30\text{min}$ , PBS 清洗 3 次。用吸水纸小心吸去样本区域周围的多余液体, 滴加 TdT 酶反应液于样本区域上, 于  $37^\circ\text{C}$  湿盒中孵育  $60\text{min}$  (避光), PBS 清洗 3 次。用吸水纸小心吸去样本周围的液体, 每个样本上滴加 Streptavidin-Fluorescein 标记液, 放入温盒中,  $37^\circ\text{C}$  反应  $30\text{min}$  (避光), PBS 清洗 3 次。最后 DAPI 染色液复染细胞核, 室温避光反应  $10\text{min}$ , PBS 洗涤, 加适量封片剂, 荧光显微镜观察并拍照。

**1.2.9 Western blot** 视网膜组织中加入  $1\text{mL}$  制备好的 RIPA 裂解液提取蛋白, 用 BCA 法测定总蛋白含量。用 12% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。用含有 5% 脱脂牛奶的 PBS 封闭膜  $1\text{h}$ , 之后加入稀释后的胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1) ( $1:1000$ )、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) ( $1:1000$ ) 和  $\beta$ -actin ( $1:1000$ ) 一抗,  $4^\circ\text{C}$  摇床上孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次  $10\text{min}$ , 加入对应于一抗种属来源的 HRP 标记的二抗 ( $1:2000$ ), 在室温摇床上孵育  $1\text{h}$ , TBST 洗膜 3 次, 每次  $10\text{min}$ 。使用 ECL 化学发光液显色发光, 凝胶成像系统拍照, Image Pro Plus 图像分析系统对蛋白条带进行分析。

统计学分析: 采用统计学软件 SPSS19.0 进行分析, 至

少取 3 次独立实验结果, 以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 重复测量实验采用重复测量数据的方差分析, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组间的两两比较采用 LSD- $t$  检验, 率的比较采用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 骨髓间充质干细胞的形态** 如图 1 所示, 原代培养第 5d 出现小集落, 细胞形状为类圆形; 传至第 3 代时, 细胞呈现出大的, 扁平的或成纤维细胞样的形态。

**2.2 骨髓间充质干细胞的体外分化** 如图 2 所示, 成骨诱导后, 用茜素红 S 染色将矿物结节染色为阳性; 成脂诱导后, 用油红 O 染色发现中性脂质空泡; 提示所提取的原代细胞为骨髓间充质干细胞。

**2.3 流式细胞术实验** 如图 3 所示, 流式细胞术分析数据表明 BMMSCs 表达 CD29, CD44, CD90 和 CD106, 但不表达 CD45 和 CD14, 并且它们在随后的传代中保持其表型。

**2.4 大鼠青光眼模型鉴定** 由表 1 可以看出, 20 只大鼠对照眼、实验眼的眼内压在各时间点比较差异均有统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 20.45, P_{\text{时间}} < 0.01; F_{\text{组间}} = 24.78, P_{\text{组间}} < 0.01; F_{\text{组间} \times \text{时间}} = 18.34, P_{\text{组间} \times \text{时间}} < 0.01$ )。在术后第 7、14、21、30d 时大鼠实验眼的眼内压均明显高于对照眼, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明青光眼大鼠模型均建造成功。

**2.5 视网膜组织形态表现** 如图 4 所示, 对照组、青光眼

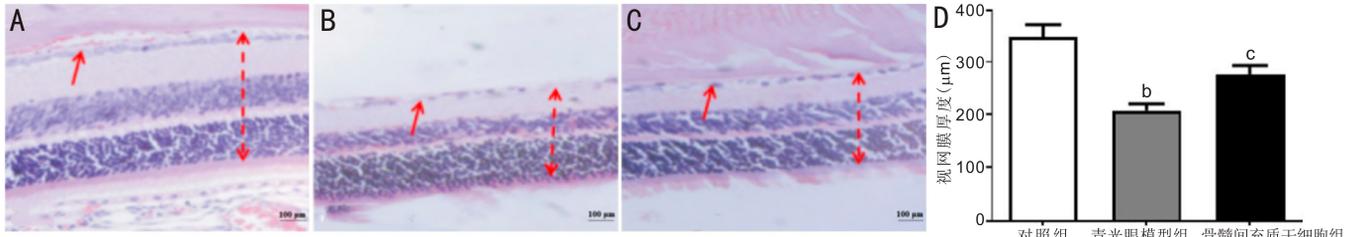


图4 HE染色观察各组大鼠视网膜厚度变化( $\times 200$ )。单箭头:视网膜神经节细胞;双箭头:视网膜厚度。A:对照组;B:青光眼模型组;C:骨髓间充质干细胞组;D:三组大鼠视网膜厚度比较。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 青光眼模型组。

表1 对照眼和实验眼术后第7、14、21、30d的眼内压

组别	$(\bar{x} \pm S, \text{mmHg})$			
	术后7d	术后14d	术后21d	术后30d
对照眼	14.12 $\pm$ 0.98	14.56 $\pm$ 1.78	14.43 $\pm$ 0.97	14.54 $\pm$ 1.12
实验眼	28.34 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	32.32 $\pm$ 1.15 <sup>b</sup>	35.14 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	38.87 $\pm$ 1.32 <sup>b</sup>
<i>t</i>	2.54	4.20	4.48	5.32
<i>P</i>	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

注:实验眼:每只大鼠的左眼,青光眼;对照眼:右眼。<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,  
<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照眼。

模型组、骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜厚度分别为345.67 $\pm$ 23.12、203.45 $\pm$ 13.56、287.89 $\pm$ 18.23 $\mu\text{m}$ ,差异有统计学意义( $F = 18.21, P < 0.01$ )。对照组大鼠视网膜神经纤维排列整齐,视网膜神经节细胞数量多,视网膜厚度正常;与对照组比较,青光眼模型组大鼠视网膜神经纤维排列不整齐,视网膜神经节细胞数量明显减少,视网膜厚度变薄( $P < 0.01$ );骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜神经纤维细胞排列较整齐,视网膜神经节细胞数量和视网膜厚度高于青光眼模型组( $P < 0.05$ )。

**2.6 视网膜神经节细胞计数** 如图5所示,对照组、青光眼模型组、骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜神经节细胞数量分别为1267.34 $\pm$ 67.32、632.56 $\pm$ 34.78、1057.21 $\pm$ 58.32个/ $\text{mm}^2$ ,差异有统计学意义( $F = 21.74, P < 0.01$ )。青光眼模型组大鼠视网膜神经节细胞数量明显低于对照组( $P < 0.01$ ),BMSCs组大鼠的视网膜神经节细胞数量高于青光眼模型组( $P < 0.05$ )。

**2.7 视网膜神经节细胞凋亡** 如图6所示,对照组、青光眼模型组、骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜神经节细胞凋亡数量分别为0.68 $\pm$ 0.10、5.75 $\pm$ 1.13、3.34 $\pm$ 0.78个,差异有统计学意义( $F = 67.58, P < 0.001$ )。青光眼组大鼠视网膜神经节细胞凋亡数量显著高于对照组( $P < 0.001$ ),骨髓间充质干细胞组大鼠的视网膜神经节细胞凋亡数量明显低于青光眼模型组( $P < 0.05$ )。

**2.8 Western blot** 如图7所示,对照组、青光眼模型组、骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜中IGF1和BDNF蛋白表达差异有统计学意义( $F = 25.62, 28.60$ ,均 $P < 0.01$ )。青光眼模型组大鼠视网膜中IGF1(0.21 $\pm$ 0.07)和BDNF(0.18 $\pm$ 0.04)蛋白表达量明显低于对照组(0.57 $\pm$ 0.11, 0.49 $\pm$ 0.12)(均 $P < 0.01$ ),骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜中IGF1(0.38 $\pm$ 0.06)和BDNF(0.29 $\pm$ 0.05)蛋白表达量高于青光眼模型组(均 $P < 0.05$ )。

**3 讨论**

青光眼是一种视神经病变,其特征在于视网膜神经节细胞的进行性退化。青光眼影响全球7000多万人,其中

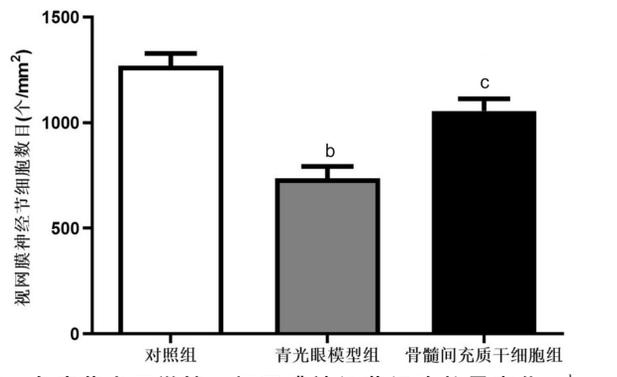


图5 免疫荧光显微镜下视网膜神经节细胞数量变化。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 青光眼模型组。

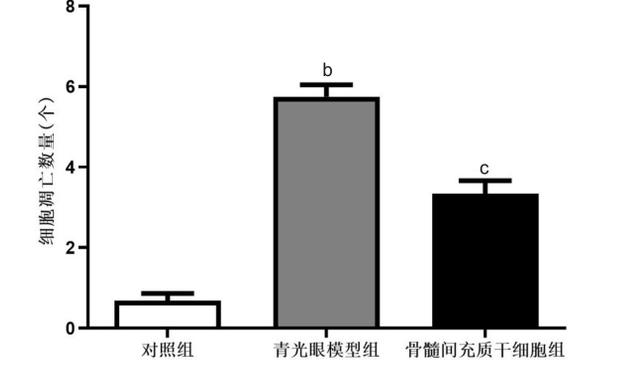


图6 TUNEL染色观察各组大鼠视网膜神经节细胞凋亡变化。<sup>b</sup> $P < 0.001$  vs 对照组;<sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 青光眼模型组。

约10%是双眼失明,使其成为不可逆转性失明的主要原因<sup>[8]</sup>。青光眼可分为两大类:开角型青光眼和闭角型青光眼。在美国,超过80%的病例是开角型青光眼;然而,闭角型青光眼是造成严重视力丧失的重要原因。开角型和闭角型青光眼均可作为原发性疾病。继发性青光眼可由创伤,某些药物如皮质类固醇,炎症,肿瘤或诸如色素分散或假去角质的病症引起<sup>[9]</sup>。因此,早期诊断和治疗可以预防视力丧失。青光眼的神经保护治疗宗旨在预防视网膜神经节细胞的死亡。在某种程度上,降低眼压可以在一定程度上保护神经,从而防止神经元的破坏和减少神经节的不可逆损失<sup>[10]</sup>。然而,目前没有保护视网膜神经节细胞的预防性治疗。

干细胞已经用于医学领域的神经保护治疗。研究发现,视网膜干细胞移植对青光眼视网膜神经节细胞有保护作用<sup>[11]</sup>,MSCs在神经保护疗法中具有吸引力<sup>[12]</sup>。间充质干细胞分泌BDNF,神经生长因子,神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF),睫状神经营养因子(CNTF),IGF1等各种细胞因子和神经营养因子<sup>[13]</sup>。这些由MSCs分泌的因子已被证明可对缺血<sup>[14]</sup>、脑缺血再灌注<sup>[15]</sup>等疾病具有

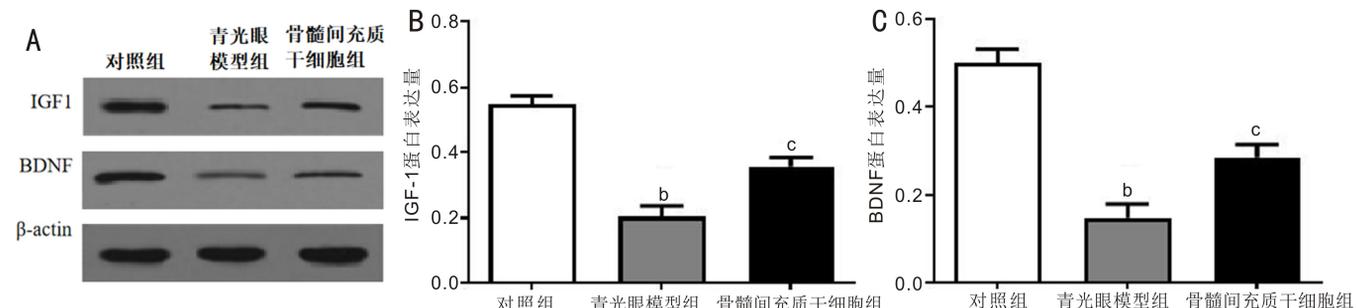


图7 Western blot 检测各组大鼠视网膜中 IGF1 和 BDNF 蛋白变化 A:三组大鼠视网膜中 IGF1 和 BDNF 蛋白表达;B:三组大鼠视网膜中 IGF1 蛋白表达;C:三组大鼠视网膜中 BDNF 蛋白表达。<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 青光眼模型组。

神经保护作用。研究表明,涉及青光眼治疗中 MSCs, BMMSCs 在动物模型中有效维持视网膜神经节细胞活力<sup>[7]</sup>,并且 BMMSCs 治疗青光眼被广泛研究。在本研究中,我们将大鼠 BMMSCs 用于大鼠青光眼模型中来研究其对视网膜神经的神经保护和整合能力,是否对青光眼有保护作用。

本实验探究骨髓间充质干细胞是否对青光眼大鼠模型有保护作用,我们先提取了大鼠原代骨髓间充质干细胞并进行了鉴定,得到纯度高的骨髓间充质干细胞。接着,我们制作了大鼠青光眼模型,并检测了大鼠眼内压,结果表明青光眼大鼠模型均建造成功。为了进一步探究骨髓间充质干细胞经玻璃体腔移植后的作用,进行了如下实验:HE 染色结果表明,对照组大鼠视网膜神经纤维排列整齐,视网膜神经节细胞数量多,视网膜厚度正常,青光眼组大鼠视网膜神经纤维排列不整齐,视网膜神经节细胞数量明显减少,视网膜厚度变薄,骨髓间充质干细胞组大鼠视网膜神经纤维细胞排列较整齐,视网膜神经节细胞数量和视网膜厚度明显高于青光眼组;视网膜神经节计数结果表明,青光眼模型组大鼠视网膜神经节细胞数量明显低于对照组,骨髓间充质干细胞组大鼠的视网膜神经节细胞数量明显高于青光眼组,但低于对照组;TUNEL 染色结果表明,青光眼模型组大鼠视网膜神经节细胞凋亡数量显著高于对照组,骨髓间充质干细胞组大鼠的视网膜神经节细胞凋亡数量明显低于青光眼模型组;Western blot 结果表明,青光眼模型组大鼠视网膜中 IGF1 和 BDNF 蛋白表达量明显低于对照组,骨髓间充质干细胞组大鼠的视网膜中 IGF1 和 BDNF 蛋白表达量高于青光眼模型组。因此,骨髓间充质干细胞玻璃体腔移植能治疗大鼠青光眼,可以保护视网膜神经节细胞。

综上所述,骨髓间充质干细胞的玻璃体腔移植可以在体内抑制视网膜神经节细胞凋亡,对视网膜神经节细胞具有保护作用,其中间充质干细胞分泌多种细胞因子和生长因子,在青光眼病理过程中对神经节细胞的保护起关键作用。

#### 参考文献

- 1 Yip VCH, Wong HT, Yong VKY, *et al.* Optical coherence tomography angiography of optic disc and macula vessel density in glaucoma and healthy eyes. *J Glaucoma* 2019;28(1):80-87
- 2 王霞, 刘瀛, 刘旭, 等. 诱导多功能干细胞在青光眼治疗中的应用研究进展. *眼科新进展* 2017;37(12):1185-1188
- 3 肖婷婷, 石珂, 廖振忠, 等. 临床抗青光眼药物的新进展. *眼科新进展* 2019;39(2):192-196
- 4 黄庆雷, 沈丽, 邓钺. 间充质干细胞作用机制的研究进展. *中国科学:生命科学* 2019;49(2):108-128
- 5 李季, 蔡锦芳, 邹林, 等. 骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤模型大鼠 Toll 样受体 4 表达的影响. *中国老年学杂志* 2019;39(1):147-151
- 6 Lebouvier A, Poignard A, Cavet M, *et al.* Development of a simple procedure for the treatment of femoral head osteonecrosis with intra-osseous injection of bone marrow mesenchymal stromal cells; study of their biodistribution in the early time points after injection. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:68
- 7 Hu Y, Tan HB, Wang XM, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma. *Clin Interv Aging* 2013;8:1467-1470
- 8 杨瑾, 孙嘉悦, 刘涛. 原发性闭角型青光眼遗传流行病学研究进展. *眼科新进展* 2019;39(4):389-393
- 9 Aref AA, Gedde SJ, Budenz DL. Glaucoma drainage implant surgery. *Dev Ophthalmol* 2017;59:43-52
- 10 田源, 张殷建, 董志国. 青光眼视神经保护相关研究进展. *临床眼科杂志* 2019;27(1):95-97
- 11 顾志敏, 周利晓, 齐若. 视网膜干细胞移植对青光眼视网膜神经节细胞的保护. *中国组织工程研究* 2016;20(28):4203-4209
- 12 高坤, 朱文秀, 刘伟东, 等. 再生医学治疗新选择:间充质干细胞来源的外泌体. *中国组织工程研究* 2019;23(13):2107-2112
- 13 El-Sayed M, El-Feky MA, El-Amir MI, *et al.* Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells: Cell origin and cell quality variations. *Mol Biol Rep* 2019;46(1):1157-1165
- 14 Deng YB, Ye WB, Hu ZZ, *et al.* Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats. *Neurol Res* 2010;32(2):148-156
- 15 Li N, Li XR, Yuan JQ. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreouscavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(4):503-514