

# 骨髓间充质干细胞神经保护作用在视网膜疾病治疗中的研究进展

林琳, 徐国兴

基金项目:国家自然科学基金(No. 81271026);福建省创新平台基金(No. 2010Y2003)

作者单位:(350001)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院 福建省眼科研究所

作者简介:林琳,福建医科大学眼科学硕士研究生,医师,研究方向:晶状体、视网膜病。

通讯作者:徐国兴,教授,眼科学博士生导师,主任医师,研究方向:晶状体、视网膜病。fjmuxgx@163.com

收稿日期:2014-05-25 修回日期:2015-02-09

## Research on neuroprotective effects of mesenchymal stem cells in retinal disease

Lin Lin, Guo-Xing Xu

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81271026); Innovative Platform Foundation of Fujian Province, China (No. 2010Y2003)

Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Guo-Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. fjmuxgx@163.com

Received: 2014-05-25 Accepted: 2015-02-09

### Abstract

• Mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of multipotent stem cells with various neurotrophins from bone marrow which are widely used in tissue, cell repair and alternative research. Recently, some researches have shown that MSCs could enhance the viability of neurons under a pathological circumstance by secreting some neurotrophins. So the neuroprotection of MSCs can provide a new method of the treatment on retinopathy that it possible to promote cells survival and functional recovery. Here we make a brief review on the secretory function of neurotrophin and neuroprotective effects of MSCs on retinal cells and its application in the treatment of retinal disease.

• **KEYWORDS:** mesenchymal stem cells; neurotrophic factor; neurotrophin; retinal disease

**Citation:** Lin L, Xu GX. Research on neuroprotective effects of mesenchymal stem cells in retinal disease. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(3):464-466

### 摘要

骨髓间充质干细胞(MSCs)是来源于骨髓的具有多种神经

营养因子分泌功能的多能干细胞,被广泛应用于组织、细胞的修复或替代研究中。有研究表明 MSCs 分泌的多种神经营养因子,有助于提高病理状态下神经细胞的存活能力。因此, MSCs 的神经保护功能也逐渐被应用于视网膜疾病的研究中。视网膜细胞对损伤非常敏感且自我修复能力较差,利用 MSCs 的这一功能可为病变视网膜的治疗带来新的希望。本文就 MSCs 的神经营养因子分泌功能及其对视网膜细胞产生的神经保护作用 and 在不同视网膜疾病中的研究应用进展等方面进行综述,并展望其在视网膜疾病治疗中的应用前景。

**关键词:**骨髓间充质干细胞;神经保护;神经营养因子;视网膜疾病

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.3.22

**引用:**林琳,徐国兴.骨髓间充质干细胞神经保护作用在视网膜疾病治疗中的研究进展.国际眼科杂志 2015;15(3):464-466

### 0 引言

视网膜是将光学刺激信号转换为神经冲动传入大脑的重要部位,损伤后不可再生。许多视网膜相关的疾病如视网膜缺血-再灌注损伤、青光眼、视网膜色素变性以及年龄相关性黄斑病变等由于特定的视网膜细胞的不可逆性坏死凋亡,造成了永久性的视力丧失。近年来随着对 MSCs 研究的不断深入,发现其提供的神经保护作用 and 细胞替代作用为病变视网膜的治疗提供了一个新的途径。MSCs 也因其来源广泛、稳定表达,可自体移植、避免免疫排斥反应,体外操作简便且又不存在伦理问题从而成为视网膜疾病研究的一个新热点。

### 1 神经营养因子对视网膜疾病的保护作用

连续性的神经营养因子供应对视网膜疾病具有很好的神经保护作用。在利用神经胶质细胞源性神经营养因子(BDNF)基因转染 MULLER 细胞保护视网膜光损伤时发现, BDNF 基因的转染显著改善了光感受器的生存率及结构的完整性,其神经外核层存活的比例明显高于对照组<sup>[1]</sup>。且在对光损伤模型直接进行 BDNF 玻璃体腔注射时,视网膜功能也得到有效的改善, ERG 中 B 波振幅下降减少<sup>[2]</sup>。对于视网膜色素变性(RD)模型, BDNF 和睫状神经营养因子(CNTF)转染基因的表达能显著延缓光感细胞的凋亡,使病变视网膜神经外核层增厚, ERG 也证实了视网膜救援效果的显著<sup>[3,4]</sup>。此外,神经营养因子 BDNF、CNTF 和神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的供应还可减少因眼内压过高而引起的视网膜神经节细胞(RGCs)死亡、增强其存活率,减缓青光眼的神经元损失<sup>[5-7]</sup>,并可有效增强视神经横断情况下 RGCs 的生存率<sup>[8]</sup>。而糖尿病视网膜病变引起的 RGCs 损伤,也能被神经生长因子(NGF)所保护,使疾病的进展延缓<sup>[9]</sup>。

## 2 MSCs 的神经营养因子分泌功能

已有研究表明 MSCs 能够分泌大量神经细胞营养因子如 BDNF, GDNF, CNTF, NGF 和神经营养因子 3 (NT-3) 等, 有助于提高病理状态下的神经细胞存活能力<sup>[10, 11]</sup>。Crigler 等<sup>[12]</sup>通过 PCR 的方法筛选人 MSCs 的 cDNA 文库检测到神经营养因子 BDNF 及 b-NGF 的转录编码。ELASA 分析也证明了在不同的 MSCs 亚群中 BDNF 及 b-NGF 的表达。蒋军健<sup>[13]</sup>在 MSCs 传至第 1, 3, 5 代时分别采用 RT-PCR 及 ELASA 来测定神经营养因子的表达情况。RT-PCR 结果显示 MSCs 能够表达 BDNF, NGF, NT-3, CNTF 和 GDNF。而 ELASA 证实在 MSCs 传至第 3 代时上述神经营养因子的表达处于最高峰。

在体外培养过程中, 将鼠创伤性脑损伤 (TBI) 的脑组织提取物加入 MSCs 培养液中, 发现其神经营养因子 BDNF, NGF 的分泌随时间增多。ELASA 定量分析检测表明 TBI 组 NGF 及 BDNF 的浓度明显高于正常脑组织<sup>[14]</sup>。在用脊髓匀浆上清液培养 MSCs 的实验研究中也发现, 在利用损伤脊髓匀浆上清液诱导培养 MSCs 后, 培养液内 BDNF 的含量在各个时间点均较正常脊髓匀浆上清液组有所提高<sup>[15]</sup>。这些实验研究结果都表明 MSCs 不仅可以分泌多种神经营养因子且在损伤刺激的作用下分泌增多。因此, 利用 MSCs 对神经营养因子的持续性分泌可为视网膜疾病的治疗提供一个新思路。

早在对中枢神经系统疾病的研究中就已经发现了 MSCs 的神经保护作用。在对 TBI 大鼠静脉注射 MSCs 后发现整个创伤的大脑半球 NGF, BDNF 及 NT-3 的表达明显增加。损伤 15d 后 MSCs 治疗组神经功能较对照组有了明显的恢复<sup>[16]</sup>。研究中还发现 MSCs 分化成神经元的能力有限, 但却可以分泌 NGF 和 NT-3 及表达 NGF 受体和 TrkC 受体, 证明了 MSCs 可通过神经营养因子的分泌和表达特异性受体从而实现神经保护作用<sup>[17]</sup>。这些研究成果为 MSCs 在视网膜疾病的治疗应用上提供了很好的借鉴。

## 3 MSCs 的神经保护作用在视网膜疾病中的应用进展

尽管目前许多实验研究更侧重于 MSCs 的诱导分化, 希望通过诱导定向分化来替代受损的视网膜细胞, 重建视网膜神经网络结构, 从而恢复神经传导活性改善视网膜功能。但目前 MSCs 的诱导分化机制仍不清楚, 定向分化程度还不够理想, 也无法有效准确地整合到相应的病变部位。因此, 在尚未实现准确诱导 MSCs 分化成为目的细胞之前, 利用 MSCs 的神经保护作用对病变视网膜实现保护作用更具现实意义, 更具有可行性<sup>[18]</sup>。

**3.1 MSCs 对视网膜色素变性的神经保护作用** 视网膜色素变性 (RP) 是一种进行性、遗传性、营养不良性的视网膜退行性病变, 以光感细胞的缺失, 夜盲以及慢性进行性的视野缺损为特点, 最终导致视力下降, 目前尚无有效的治疗方法。研究表明, MSCs 的移植对 RP 动物模型的光感细胞救援效果显著, 视功能也明显改善<sup>[19]</sup>。Inoue 等<sup>[20]</sup>在体外研究中发现 MSCs 的条件培养液可减少光感受器细胞的凋亡。在体内, 其利用 Pcxr2K-lacZ 转基因小鼠的 MSCs 移植入 RCS 大鼠视网膜下腔后并没有观察到 MSCs 向视网膜神经细胞层迁移或分化成为光感受器细胞。而移植后视网膜外核层的厚度却是对照组的 2 倍, 且对光感细胞的救援效果在 MSCs 注入点周围最为突出。ERG 也较对照组有明显改善。移植 8wk 后, RT-PCR 显示 MSCs

治疗组光感细胞特异性表达的基因 CRX 和恢复蛋白显著增高。而对 RCS 大鼠进行尾静脉 MSCs 注射也发现: 注射组光感细胞层的厚度明显增大, 尤其对周边视网膜光感细胞的保护作用更加明显。视敏度和亮度阈值的检测显示光感受器的功能得到明显的改善。半定量 RT-PCR 分析显示 CNTF, bFGF 和 BDNF 在 MSCs 组的表达上调, 而免疫组化也进一步证实了在注射了 MSCs 的 RCS 大鼠眼组织中神经营养因子含量有所增加<sup>[21]</sup>。说明通过增加神经营养因子的水平来减少神经元的凋亡是 MSCs 可能帮助 RP 患者视力发生恢复的一种重要机制。

**3.2 MSCs 对视网膜缺血-再灌注的神经保护作用** 研究发现视网膜缺血-再灌注损伤后各时间点大鼠 ERG 中 b 波逐渐降低。但进行 MSCs 视网膜下移植后, 可见 b 波明显改善, RGCs 密度及视网膜内层厚度增加<sup>[22]</sup>, 且与细胞凋亡相关的 P53 和 caspase-2 显著减少<sup>[23]</sup>。其治疗机制可能与 MSCs 的神经分泌作用或细胞替代作用密切相关。进一步研究则发现在缺血-再灌注视网膜损伤模型的玻璃体腔内注入 MSCs 后, 仅有少量的细胞迁移至神经节细胞层, 但视功能却明显改善。研究中还发现视网膜缺血-再灌注损伤组碱性成纤维细胞生长因子 (b-FGF) 和 CNTF 的表达较正常有所下降, 而移植 MSCs 后二者表达量又显著上调且 RGCs 数目明显多于对照组。移植 2 ~ 4wk 后, MSCs 移植组免疫荧光检测显示多种神经营养因子 CNTF, b-FGF 和 BDNF 的阳性表达, 且通过 RT-PCR 和蛋白质印迹法也分别检测到 CNTF, b-FGF 和 BDNF 相关的 mRNA 及蛋白质表达<sup>[24]</sup>。

**3.3 MSCs 对青光眼的神经保护作用** 青光眼是由于高眼压导致的视网膜神经节细胞 (RGCs) 受损而引起的视力下降, 可以通过 MSCs 移植起到一定的改善作用。Yu 等<sup>[25]</sup>在青光眼小鼠模型玻璃体腔内移植 MSCs 后观察到 RGCs 密度显著增加, 免疫组化显示 MSCs 移植组 CNTF, GDNF, BDNF 和 b-FGF 的表达。Johnson 等<sup>[26]</sup>将 MSCs 移植入通过激光光凝小梁网造成高眼压的小鼠玻璃体内也发现, MSCs 移植组 RGCs 轴突的生存率显著增加。且通过视网膜组织与 MSCs 的共培养还证实了在 MSCs 分泌的大量神经营养因子中, 血小板源性生长因子 (PDGF) 在对 RGCs 的神经保护中发挥着至关重要的作用。此外, 慢性高眼压导致的 RGCs 凋亡还可通过对玻璃体内注射 BDNF 分泌型 MSCs 得到改善。研究中发现分泌型 MSCs 的 BDNF 表达量明显较多, RGCs 的存活率显著增大。ERG 和瞳孔对光反射显示视网膜和视神经功能改善明显<sup>[27]</sup>。进一步证实了 MSCs 神经分泌功能对青光眼治疗的重要作用。

**3.4 MSCs 对年龄相关性黄斑变性的神经保护作用** 光损伤作为年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的重要危险因素之一, 诱发活性氧自由基的产生使视网膜细胞处于氧化应激状态, 从而导致光感受器细胞的凋亡和视网膜变性引发眼病。在光损伤视网膜小鼠的视网膜下移植 MSCs 后, 移植组神经外核层细胞数较对照组明显增多、凋亡减少。大多数 DAPI 标记的 MSCs 表达 BDNF。此外, 当用光照损伤 7d 的小鼠视网膜匀浆上清培养 MSCs 时也检测到了 b-FGF 和 BDNF 的表达。相对于未移植 MSCs 的光损伤组 bFGF 和 BDNF 的免疫反应性表达有所提高。且在体外研究中, 仅有 10% MSCs 出现分化倾向<sup>[28]</sup>。该研究说明 MSCs 的视网膜下移植可以通过 b-FGF 和 BDNF 分泌所产生的潜在

的视网膜营养及保护作用从而抑制光损伤眼的光感细胞凋亡,延缓其视网膜的损伤。以上研究结果对AMD的治疗具有重要的指导意义。此外,像早产儿视网膜病变(ROP)以及视网膜急性损伤等视网膜疾病都在相关研究中被证实可以通过MSCs的神经保护作用减轻或延缓视网膜组织损伤,从而改善视网膜功能。因此,MSCs的眼内注射在将来可以成为治疗视网膜疾病的一种有效手段。

#### 4 问题与展望

目前,对于视网膜疾病的治疗仍是眼科棘手的问题。尽管MSCs因其来源广泛且不存在伦理问题而具有极高的医学临床应用价值。但其在视网膜病变中的研究仍处于体外实验和动物实验阶段,要进一步进行临床试验还有许多问题需要解决。例如,目前对于如何获得、培养和扩增骨髓MSCs仍然没有十分完善的方案,也尚未建立统一的MSCs鉴定标准。对MSCs的诱导分化机制尚不了解,基本停留在外源性物质刺激诱导分化导致细胞内基因表达水平改变这个层面。至于MSCs如何向损伤区域趋化定植以及微环境中调控其增殖与分化的信号传导通路等仍然缺乏了解。相信随着对MSCs的神经保护研究的进一步深入,利用MSCs的这一功能为视网膜病变的治疗将带来新的希望。

#### 参考文献

- 1 Gauthier R, Joly S, Pernet V, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene delivery to muller glia preserves structure and function of light-damaged photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(9): 3383-3392
- 2 Ikeda K, Tanihara H, Tatsuno T, et al. Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochemistry* 2003;87(2):290-296
- 3 Okoye G, Zimmer J, Sung J, et al. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. *J Neurosci* 2003;23(10): 4164-4172
- 4 Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, et al. AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther* 2001;3(2):241-248
- 5 Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, et al. Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest ophthalmol Vis Sci* 2003;44(10):4357-4365
- 6 Ji JZ, Elyaman W, Yip HK, et al. CNTF promotes survival of retinal ganglion cells after induction of ocular hypertension in rats; the possible involvement of STAT3 pathway. *Eur J Neurosci* 2004;19(2):265-272
- 7 Koeberle PD, Ball AK. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells *in vivo*: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2002;110(3):555-567
- 8 Levkovich-Verbin H, Sadan O, Vander S, et al. Intravitreal injections of neurotrophic factors secreting mesenchymal stem cells are neuroprotective in rat eyes following optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(12):6394-6400
- 9 Mantelli F, Lambiase A, Colafrancesco V, et al. NGF and VEGF effects on retinal ganglion cell fate: new evidence from an animal model of diabetes. *Eur J Ophthalmol* 2014;24(2):247-253
- 10 Chen Q, Long Y, Yuan X, et al. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of

- neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 2005;80(5):611-619
- 11 Wilkins A, Kemp K, Ginty M, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival *in vitro*. *Stem Cell Res* 2009;3(1):63-70
- 12 Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol* 2006;198(1):54-64
- 13 蒋军健. 大鼠骨髓间充质干细胞体内外表达神经营养因子与体内移植延缓失神经骨骼肌萎缩及其机制的实验研究. 复旦大学 2010
- 14 Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: Growth factor production. *J Neurosci Res* 2002;69(5):687-691
- 15 刘然, 范东艳, 金鹏, 等. 损伤脊髓匀浆上清对骨髓间充质干细胞分泌髓鞘前脂蛋白, 脑源性神经营养因子的影响. 中国组织工程研究与临床康复 2011;15(1):7-11
- 16 Kim HJ, Lee JH, Kim SH. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *J Neurotrauma* 2010;27(1):131-138
- 17 Pisati F, Bossolasco P, Meregalli M, et al. Induction of neurotrophin expression via human adult mesenchymal stem cells: implication for cell therapy in neurodegenerative diseases. *Cell transplantation* 2007;16(1): 41-55
- 18 徐巍, 徐国兴. 间充质干细胞在视网膜疾病研究中的应用. 国际眼科杂志 2011;11(2):266-269
- 19 Tzameret A, Sher I, Belkin M, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res* 2014;118(1):135-144
- 20 Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2007;85(2):234-241
- 21 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):9200
- 22 赵岩松, 赵华锋, 王晓莉, 等. 视网膜下移植骨髓间充质干细胞对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的影响. 中国组织工程研究与临床康复 2008;12(47):9261-9263
- 23 李娜娜, 曹永亮, 范姗姗, 等. MSC移植对视网膜缺血再灌注损伤中 p53 和 caspase-2 表达的影响. 眼科新进展 2013;33(5): 419-422
- 24 Na L, Xiao-rong L, Jia-qin Y. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(4):503-514
- 25 Yu S, Tanabe T, Dezawa M, et al. Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344(4):1071-1079
- 26 Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmology Vis Sci* 2010;51(4):2051-2059
- 27 Harper MM, Grozdanic SD, Blits B, et al. Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4506-4015
- 28 Zhang Y, Wang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(7):3742-3748