

骨髓间充质干细胞应用于角膜疾病的研究进展

靳娜, 刘红玲, 张春梅, 傅少颖

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81301325)

作者单位: (150001) 中国黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 靳娜, 硕士, 医师, 研究方向: 眼外伤与角膜病。

通讯作者: 傅少颖, 硕士, 主任医师, 教授, 主任, 研究方向: 眼外伤与角膜病. fushaoying@126.com

收稿日期: 2015-05-29 修回日期: 2015-08-05

Progress of bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of corneal diseases

Na Jin, Hong-Ling Liu, Chun-Mei Zhang, Shao-Ying Fu

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81301325)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Shao-Ying Fu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. fushaoying@126.com

Received: 2015-05-29 Accepted: 2015-08-05

Abstract

• In recent years, with the rapid development of stem cells science, mesenchymal stem cells (MSCs) have become a research hotspot. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) are MSCs that derived from bone marrow with some advantages, such as the potential of multi-directional differentiation, low immunogenicity, promoting damage repair and stable performance. The study by many scholars found that BMSCs are promising special cells in the field of medicine, and BMSCs have been widely used in almost every system in treatment of disease. For treatment of corneal disease, ophthalmology scholars found that BMSCs have already become a kind of seed cells with clinical and science value. BMSCs brought promising to the patients who have complex corneal disease. In this paper, we introduce the function of BMSCs on the treatment of corneal injury and corneal allograft rejection.

• **KEYWORDS:** bone marrow mesenchymal stem cells; corneal injury; corneal allograft rejection

Citation: Jin N, Liu HL, Zhang CM, et al. Progress of bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of corneal diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(9):1546-1549

摘要

随着干细胞科学的飞速发展, 近年间充质干细胞 (MSCs) 的研究已成为热点。骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 是来源于骨髓中的 MSCs, 具有免疫原性低、有多向分化潜能、促进损伤修复、性能稳定等生物学优点。研究发现, BMSCs 是医学领域中极具前景的一种特殊细胞, 几乎在各系统疾病的治疗方面都有广泛应用。眼科学者的研究也发现, BMSCs 已经成为角膜疾病中一种兼具科研价值和临床价值的种子细胞, 为角膜盲患者的康复带来了一线希望。本文就 BMSCs 对角膜损伤与角膜移植排斥反应治疗方面的研究做一综述。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 角膜损伤; 角膜移植排斥反应
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.14

引用: 靳娜, 刘红玲, 张春梅, 等. 骨髓间充质干细胞应用于角膜疾病的研究进展. 国际眼科杂志 2015;15(9):1546-1549

0 引言

角膜是视觉器官的一个重要组成部分, 由于其所处解剖位置的特殊, 很容易受到损伤, 表现为角膜混浊、水肿、全层穿孔甚至失明等, 严重威胁着患者的生活质量, 采取有效的治疗措施控制角膜盲是全世界眼科领域所关注的重点。近年来, 随着干细胞科学的发展, 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 因具有免疫调控性强、有多向分化潜能、促进损伤修复能力强、易于获得及性能稳定等优点, 在各系统疾病均有广泛地应用^[1-4]。BMSCs 在角膜疾病中的研究越来越受到眼科学者的重视, 为复明事业的进一步发展带来了希望。

1 BMSCs

1.1 BMSCs 概况 近年来, BMSCs 的广泛应用引起了医学界的关注。1987年, Friedenstein 等^[5]首次发现了 BMSCs 的存在, BMSCs 是贴壁骨髓单核细胞, 在一定条件下可分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞和肌细胞, 在扩增 20~30 代后仍能保持其多向分化潜能。随着科学技术及医学事业的迅猛发展, BMSCs 得到了广泛的临床应用与研究, 在泌尿系统、骨骼系统、心血管系统等学科都有研究^[1-4]。BMSCs 在眼科疾病的研究也越来越多, 包括常规方法难以治疗的角膜疾病、视网膜疾病等^[6-7]。

1.2 BMSCs 的生物学特性

1.2.1 BMSCs 的多向分化潜能 BMSCs 在合适的诱导条

件下可以向多种细胞分化。Kale 等^[1]通过将 BMSCs 移植到肾小管,发现 BMSCs 能够定居于肾脏并分化为肾脏细胞,可显著降低血清尿素氮水平,促进肾功能恢复;Noel 等^[2]发现 BMSCs 可以向成骨细胞分化,促进骨损伤修复;方利君等^[3]研究发现,在创面局部微环境的诱导下, BMSCs 具有向表皮细胞分化的潜能; BMSCs 还可以分化为心肌细胞等^[4];在眼科也有 BMSCs 可以分化为视网膜细胞、类角膜上皮细胞的报道^[8-9]。

1.2.2 BMSCs 的抗炎性 Thomas 等^[10]发现将 BMSCs 和自然杀伤细胞(NK)共同培养,比单独培养的 NK 多分泌了 2.5~4 倍的具有抗炎作用的干扰素(INF),证明了 BMSCs 有抗炎作用;Brandau 等^[11]发现 BMSCs 通过促进中性粒细胞的抗微生物活性,起到抑制炎症反应的作用;Kehoe 等^[12]通过将 BMSCs 注入关节炎动物模型膝关节腔内,可以使软骨缺失、炎性渗出、关节炎指数以及 INF- α 都明显减少;Eliopoulos 等^[13]在急性肾损伤动物模型中,通过腹腔注射 BMSCs 的方法,明显改善了肾脏功能,降低了炎症因子的表达,证明 BMSCs 可以通过控制炎症促进肾小管恢复。

1.2.3 免疫调节性 BMSCs 具有免疫抑制性和非常低的免疫原性。Toll 受体(TLR)是免疫反应中重要的中介物质,可以增加 BMSCs 的免疫抑制表型。Tomchuck 等^[14]的研究表明 BMSCs 可以表达 TLR,经 TLR 刺激剂的刺激,下游信号(包括 NF- κ B、AKT 和 MAPK)被激活,产生白细胞介素等一系列细胞因子,从而促进 BMSCs 的免疫调节。Nicola 等^[15]将 T 淋巴细胞与 BMSCs 混合培养时发现,T 淋巴细胞在受刺激时增殖能力被抑制,这种效果能被加入转化细胞因子 β 1 或肝细胞生长因子的中和抗体所逆转,说明这种抑制是由于 BMSCs 的作用引起的;Jiang 等^[16]发现与先天性免疫细胞相比, BMSCs 可以抑制树突状细胞(DC)的生成,减少人的白细胞抗原 DR(HLA-DR)、CD80 和 CD86 的表达。

1.2.4 促进损伤修复性 当创伤发生时, BMSCs 可以使细胞再生,并且向受损的组织迁移,这使得 BMSCs 可以通过促进细胞再生来治疗严重损伤。Kim 等^[17]表明 BMSCs 不仅可以促进组织再生,还可以促进中枢和外周神经系统损伤后的功能恢复;Qu 等^[18]发现 BMSCs 在鼠炎性肠疾病模型中可以向受损伤的肠组织迁移,并分化为肠黏膜细胞,表明 BMSCs 可以促进损伤的肠黏膜修复;Basiouny 等^[19]在鼠全层皮肤损伤模型中,发现 BMSCs 可以促进表皮、毛囊和真皮的再生,伤后第 3wk,伤口出现表皮完全再生、胶原重组和 VEGF 阳性细胞减少等迹象。

1.2.5 营养功能 随着对 BMSCs 研究的深入,许多学者认为 BMSCs 的治疗作用与其营养作用存在着密切的关系,并通过实验研究证明了 BMSCs 可以分泌多种营养因子,在神经功能恢复等方面发挥了一定作用。Jeong 等^[20]发现在缺血性脑卒中的动物模型中, BMSCs 不仅可以促进脑源性神经营养因子(BDNF)的分泌,而且本身可以分泌 BDNF,在内源性神经干细胞增殖和功能恢复方面均有作用。范东艳等^[21]通过在体外共同培养活化的小胶质细

胞和 BMSCs,发现小胶质细胞活化刺激 BMSCs 上调了胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的表达,使得多巴胺能神经元免受毒素的损害,抑制了多巴胺能神经元的延迟性死亡,说明 BMSCs 可以通过释放营养因子保护神经细胞。

2 BMSCs 与角膜损伤及角膜移植排斥反应

2.1 BMSCs 与角膜损伤 角膜损伤可导致角膜炎症、溃疡、新生血管等病理改变。角膜缘干细胞的大量缺失引起角膜新生血管、角膜瘢痕形成;结膜上皮细胞的缺失使结膜分泌的黏蛋白减少,从而影响泪膜的形成,最终也会累及角膜;很多眼表问题的产生,都会造成角膜瘢痕的形成,甚至导致视力的丧失。这类眼部疾病的治疗主要有抗炎、促进角膜修复、单纯羊膜移植、板层角膜移植等,但因供体来源不足及异体移植引起排斥反应而极度受限,所以寻找一种更有效的治疗方法显得尤为重要。随着 BMSCs 应用的日益成熟,其在眼科的研究也越来越多。国内外眼科学者的共同努力,阐明了 BMSCs 在眼表疾病中角膜损伤中的作用。

2.1.1 抗炎抗新生血管 刘国华等^[22]将碱烧伤大鼠模型用 BMSCs 治疗后发现,角膜新生血管和炎性细胞减少、透明度增加,成功重建了碱烧伤大鼠眼表;Roddy 等^[23]研究表明 BMSCs 静脉注射或者腹腔注射后,可以分泌治疗因子如 TSG-6,减轻角膜受损后的混浊和炎症反应;Yao 等^[24]研究发现结膜下注射 BMSCs,可以抑制炎症和抗血管生成,促进碱烧伤角膜的修复;Joo 等^[6]研究发现, BMSCs 作用于鼠化学伤模型中,通过增加 IL-10 和 TGF-1、IL-6、TSP-1,降低 IL-2 和 IFN- γ 、CD4、MMP-2 炎症相关因子的分泌,减少了角膜的炎症和新生血管的发生。

2.1.2 分化为类角膜上皮 Jiang 等^[25]发现 BMSCs 可以被角膜基质细胞诱导分化为类角膜上皮细胞,并且表达角膜上皮细胞表面标志 CK12。将这种细胞移植于碱烧伤角膜,可以减轻角膜混浊、角膜荧光着色和新生血管,利于角膜损伤后的抗炎与角膜上皮重建;Park 等^[26]发现 BMSCs 附着于羊膜表面,处于角膜细胞生长微环境中, BMSCs 可以直接分化为类角膜细胞;Gu 等^[9]将 BMSCs 移植到角膜化学伤模型,促进了受损角膜上皮愈合,表达了 CK3,成功重建了损伤的角膜表面。本研究体外结果也表明, BMSCs 可以迅速分化成与角膜上皮细胞的分子表型和形态相似的细胞。

2.1.3 归巢作用 归巢是指 BMSCs 在多种因素的作用下趋向性迁移至靶组织(炎症及损伤部位)并定植的过程。归巢涉及的细胞因子及其受体、作用机制、信号传导通路等机制较为复杂,现有研究表明趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 的相互作用始终贯穿于归巢和植入过程,起着决定性作用^[27]。有学者发现角膜损伤可以促进内源性 BMSCs 入血并到达角膜损伤处促进其愈合,说明 BMSCs 在角膜损伤时具有重要的参与修复作用^[28];Qiao 等^[29]将 BMSCs 注射到角膜缘碱烧伤动物模型中,激光共聚焦显微镜观察到外源性 BMSCs 迁移至损伤的角膜;Ye 等^[30]制作碱烧伤动物模型,静脉注射 BMSCs 后发现, BMSCs 向损伤的角膜及角膜缘干细胞处迁移,促进碱烧伤角膜的愈合。

2.2 BMSCs 与角膜移植排斥反应 目前,各种严重影响视力的角膜疾病(如角膜白斑、圆锥角膜以及角膜溃疡等)主要采取角膜移植的方法来治疗。角膜移植可分为穿透性角膜移植、板层角膜移植、角膜上皮细胞移植等。角膜移植的成功率居器官移植的首位,但是由于角膜含有多种抗原,可以发生角膜移植排斥反应。目前,治疗角膜移植排斥反应主要采用糖皮质激素及环孢素 A(CsA)等免疫抑制剂,但是耐药性及长期使用的毒副作用又限制了这些药物的应用。BMSCs 以其优良的生物学特性,在防治角膜移植排斥反应中的作用越来越明朗。

2.2.1 免疫调节作用 1994年 Proekop^[31]通过对自身免疫小鼠的骨髓移植实验指出,BMSCs 不仅可以防止免疫移植失败,而且可以在 T、B 淋巴细胞的免疫调节中发挥重要作用;Oh 等^[32]也证明将同种异体鼠角膜移植后,静脉注射 BMSCs 延长了角膜移植片的存活时间,免疫序列显示,注射 BMSCs 的鼠角膜,MHCII+细胞数量比对照组发生排斥反应的数量明显减少,表明 BMSCs 可以通过抗早期的炎症反应和增加角膜表面抗原提呈细胞的活性来增加植片存活时间;Jia 等^[33]的研究也表明,角膜移植术后注射 BMSCs 可以延长植片的存活时间,BMSCs 抑制了 T 细胞反应,减少了术后 Th1 炎症因子,增加了调节性 T 细胞;Treacy 等^[34]研究也发现 BMSCs 通过免疫调节作用,可以延长鼠同种异体角膜移植片的存活时间。

2.2.2 分化为类角膜细胞 施文建等^[35]将第3代 BMSCs 接种于去上皮的猪角膜基质上,培养4d后移植到广泛损伤的兔角膜上。BMSCs 在猪角膜基质上贴附、生长迅速,术后植片在植床上存活良好,无排斥反应,角膜较对照组透明,新生血管少。实验组角膜免疫组织化学及免疫荧光染色均检测出 CK12 阳性细胞,说明种植 BMSCs 的猪角膜基质移植到损伤兔角膜后可以存活,BMSCs 可以分化为角膜上皮样细胞,具有构建组织工程角膜的潜能;Takayama 等^[36]通过绿色荧光蛋白示踪法表明 BMSCs 可以分化为两种类型的类角膜细胞,一种是类角膜基质细胞,一种是类角膜上皮细胞。

3 小结

综上所述,由于 BMSCs 具有多向分化潜能、抗炎、免疫抑制及促进损伤修复等作用,所以可以将其视为一种很有临床应用前景的种子细胞,但还有许多问题需要去解释清楚。许多研究的结果都显示,经全身输入的 BMSCs 会不可避免地被肺部截留^[37],这也在一定程度上限制了静脉注射的 BMSCs 向其他部位的迁移效率。所以,利用 BMSCs 静脉输入来进行细胞治疗时必须要考虑 BMSCs 的肺部截留问题。另外,进入眼内的最佳、最安全的给药方式还不确定,相信随着细胞生物学、干细胞组织工程学和药剂学等的发展,BMSCs 的研究也会得到进一步的突破,从而进入临床造福患者。

参考文献

1 Kale S, Karihaloo A, Clark PR, *et al*. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 2003; 112(1):42-49

2 Noel D, Djouad F, Jorgense C, *et al*. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Invest Drugs* 2002;3(7):1000-1004

3 方利君,付小兵,孙同柱,等.在体诱导骨髓间充质干细胞分化为表皮细胞的初步观察. *中华创伤杂志* 2003;19(4):212-214

4 Kawada H, Fujita J, Kinjo K, *et al*. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104(12):3581-3587

5 Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tiss Kinet* 1987;20(3):263-272

6 Joo Youn Oh, Mee KK, Mi SS, *et al*. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 2008;26(4):1047-1055

7 Lu B, Wang S, Girman S, *et al*. Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2010;91(3):449-455

8 Tomita M, Adachi Y, Yamada H, *et al*. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells* 2002; 20(4):279-283

9 Gu S, Xing C, Han J, *et al*. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells *in vivo* and *ex vivo*. *Mol Vis* 2009;15:99-107

10 Thomas H, Jager M, Mauel K, *et al*. Interaction with mesenchymal stem cells provokes natural killer cells for enhance IL-12/IL-18-induced interferon-gamma secretion. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:143463

11 Brandau S, Jakob M, Bruderek K, *et al*. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS One* 2014; 9(9):e106903

12 Kehoe O, Cartwright A, Askari A, *et al*. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells leads to reduced inflammation and cartilage damage in murine antigen-induced arthritis. *J Transl Med* 2014;12:157

13 Eliopoulos N, Zhao J, Bouchentouf M, *et al*. Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin renotoxicity *in vitro* and *in vivo* and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299(6): F1288-1298

14 Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, *et al*. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 2008;26(1):99-107

15 Nicola MD, Carlo-Stella C, Magni M, *et al*. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99(10):3838-3843

16 Jiang XX, Zhang Y, Liu B, *et al*. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005;105(10):4120-4126

17 Kim BC, Yoon JH, Choi B, *et al*. Mandibular reconstruction with autologous human bone marrow stem cells and autogenous bone graft in a patient with plexiform ameloblastoma. *J Craniofacial Surg* 2013;24(4):e409-e411

18 Qu B, Xin GR, Zhao LX, *et al*. Testing stem cell therapy in a rat model of inflammatory bowel disease: role of bone marrow stem cells and stem cell factor in mucosal regeneration. *PLoS One* 2014; 9(10):e107891

19 Basiouny HS, Salama NM, Maadawi ZM, *et al*. Effect of bone marrow derived mesenchymal stem cells on healing of induced full-

- thickness skin wounds in albino rat. *Int J Stem Cells* 2013;6(1):12-25
- 20 Jeong CH, Kim SM, Lim JY, et al. Mesenchymal stem cells expressing brain - derived neurotrophic factor enhance endogenous neurogenesis in an ischemic stroke model. *Bio Med Research International* 2014;2014:129145
- 21 范东艳,王苹,刘然,等.小胶质细胞活化刺激骨髓间充质干细胞释放胶质细胞源性神经营养因子保护多巴胺能神经元的实验. *中国组织工程研究与临床康复* 2010;14(6):979-984
- 22 刘国华,晏晓明,杨松霖,等.骨髓间充质干细胞移植重建碱烧伤眼表的实验研究. *眼科研究* 2008;26(11):810-813
- 23 Roddy GW, Oh JY, Lee RH, et al. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells* 2011;29(10):1572-1579
- 24 Yao L, Li ZR, Su WR, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 2012; 7(2):e30842
- 25 Jiang TS, Cai L, Ji WY, et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 2010; 14(16):1304-1316
- 26 Park SH, Kim KW, Chun YS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate into keratocyte-like cells in keratocyte-conditioned medium. *Exp Eye Res* 2012;8(101):16-26
- 27 Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum* 2009; 60(3):813-823
- 28 Lan Y, Kodati S, Lee HS, et al. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(7):3638-3644
- 29 Qiao LP, Hou SK, Yao LX, et al. Research on dynamic distribution of the bone marrow mesenchymal stem cells after intravenous transplantation in the corneal injury model. *J Med Postgra* 2013; 2(26): 128-133
- 30 Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye (Lond)* 2006;20(4):482-490
- 31 Proekop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309):71-74
- 32 Oh JY, Lee RH, Yu JM, et al. Intravenous mesenchymal stem cells prevented rejection of allogeneic corneal transplants by aborting the early inflammatory response. *Mol Ther* 2012; 20(11):2143-2152
- 33 Jia Z, Jiao CN, Li X, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model. *Exp Eye Res* 2012; 9(102):44-46
- 34 Treacy O, O'Flynn L, Ryan AE, et al. Mesenchymal stem cell therapy promotes corneal allograft survival in rats by local and systemic immunomodulation. *Am J Transplant* 2014;14(9):2023-2036
- 35 施文建,侯光辉,吴静,等.种植人骨髓间充质干细胞的猪角膜板层移植治疗兔角膜损伤的初步研究. *眼科研究* 2010; 28(4):300-305
- 36 Takayama T, Kondo T, Kobayashi M, et al. Characteristic morphology and distribution of bone marrow derived cells in the cornea. *The Anatomical Record* 2009;292(5):756-763
- 37 Nystedt J, Anderson H, Tikkanen J, et al. Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2013; 31(2): 317-326