

腺病毒构建过表达睫状神经营养因子对骨髓间充质干细胞的影响

林雯^{1,2}, 徐国兴²

引用:林雯,徐国兴. 腺病毒构建过表达睫状神经营养因子对骨髓间充质干细胞的影响.国际眼科杂志 2020;20(12):2039-2043

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81770948);福建省科技创新领军人才基金资助项目(No.2016B011)

作者单位:¹(350001)中国福建省福州市,福建省立医院眼科;
²(350005)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院眼科福建省眼科研究所

作者简介:林雯,博士,住院医师,研究方向:晶状体、视网膜膜疾病。

通讯作者:徐国兴,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:晶状体、视网膜膜疾病. zjfmuxgx@163.com

收稿日期:2020-05-24 修回日期:2020-11-11

摘要

目的:构建过表达睫状神经营养因子(CNTF)的腺病毒,利用腺病毒载体转染骨髓间充质干细胞,使其在体外持续高效表达CNTF,为视网膜病变的体外研究提供新途径。

方法:构建空载GFP-腺病毒及CNTF-腺病毒,取第3代BMSCs用于转染实验,分为3组:空白对照组(未转染腺病毒组)、阴性对照组(GFP-腺病毒转染组)和实验组(CNTF-腺病毒转染组)。ELISA测转染后1、2、3d各组上清液的CNTF蛋白分泌量。

结果:成功构建空载GFP-腺病毒及CNTF-腺病毒,实验组的CNTF表达量明显高于空白对照组和阴性对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

结论:利用腺病毒载体可使BMSCs在体外持续高效表达CNTF。

关键词:骨髓间充质干细胞;睫状神经营养因子;视网膜病变;腺病毒

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.12.05

Effects of ciliary neurotrophic factor over-expression by adenovirus on bone marrow mesenchymal stem cells

Wen Lin^{1,2}, Guo-Xing Xu²

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81770948); Fujian Provincial Science and Technology Innovation Leadership Talent Foundation (No.2016B011)

¹Department of Ophthalmology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China; ²Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Guo - Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology; Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. zjfmuxgx@163.com

Received:2020-05-24 Accepted:2020-11-11

Abstract

• **AIM:** To establish the model of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) over-expressing ciliary neurotrophic factor (CNTF) by applying adenovirus. It may provide novel strategies for *in-vitro* investigations of retinopathies.

• **METHODS:** GFP-adenovirus and CNTF-adenovirus were synthesized then used to transfect BMSCs of passage 3. Blank control group (without adenovirus transfected group), negative control group (GFP-adenovirus transfected group), and experimental group (CNTF-adenovirus transfected group) were included in this study. On the 1, 2, 3d post-transfected, ELISA assay was applied to examine CNTF protein-secretion in the supernate.

• **RESULTS:** GFP-adenovirus and CNTF-adenovirus models were successfully established. The CNTF protein levels in the supernate were higher in experimental group than those in the blank control group and negative control group ($P<0.05$).

• **CONCLUSION:** CNTF-modified BMSCs by adenovirus could efficiently secrete CNTF protein *in-vitro*.

• **KEYWORDS:** bone marrow mesenchymal stem cells; ciliary neurotrophic factor; retinopathis; adenovirus

Citation: Lin W, Xu GX. Effects of ciliary neurotrophic factor over-expression by adenovirus on bone marrow mesenchymal stem cells. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2020;20(12):2039-2043

0 引言

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一类存在于骨髓间质组织中的成体干细胞,来源广泛、易培养,可高效扩增,进行自体移植无伦理争议及免疫排斥,是移植治疗病变视网膜的种子细胞。近年来,干细胞治疗视网膜病变的研究和试验已获得一定的进展,其中间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)最引人注目。MSCs是来源于中胚层的成体干细胞,其视网膜保护机制主要有:(1)细胞替代治疗:MSCs在特定微环境中可被诱导分化为视网膜细胞,在一定程度上起到替代作用^[1],从而达到治疗目的;(2)旁分泌作用:MSCs可以分泌睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor,

CNTF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)等多种神经营养因子,调节周围受损组织的微环境,激活靶器官的修复机制,抑制视网膜细胞凋亡^[2]; (3)调控血管生成的微环境,抑制新生血管的大量产生^[3]; (4)促进视网膜形成新的突触连接和信号转导,提高视功能^[4]; (5)MSCs还具有免疫调节能力,抑制炎症因子的释放^[5-6],自体或异体移植后无免疫排斥反应,并且在体内移植后归巢至受损靶组织^[7]。Tracy等^[8]利用基因修饰的MSCs过表达可溶性溶酶体酶来治疗因PPT-1基因突变引起的溶酶体酶缺陷性视网膜变性,并未观察到MSCs在玻璃体发生增殖或侵袭,说明基因修饰的MSCs在眼内长期分泌所需蛋白治疗视网膜变性是一种安全可靠的方法。还有其他研究表明MSCs是良好的基因载体^[9-11]。由此可见,基因修饰的MSCs在视网膜病变研究中展现出广阔的应用前景。本研究拟通过腺病毒载体修饰BMSCs,使其过表达CNTF,为视网膜病变的体外研究提供新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠骨髓间充质干细胞(广州赛业),大鼠骨髓间充质干细胞完全培养液(广州赛业),0.25%胰酶(美国Gibco),293A细胞(上海汉恒生物),载体pHBAd-MCMV-GFP(上海汉恒生物),大肠杆菌菌株DH5 α (北京Tiangen),限制性内切酶(美国Fermentas),T4连接酶(美国Fermentas),质粒DNA小、大量抽提试剂盒(北京康为世纪),凝胶回收试剂盒(美国Axygen),琼脂糖、琼脂粉(法国Biowest),DNA ladder(美国Fermentas),一次性培养瓶/培养皿(美国Corning),ELISA试剂盒(英国Abcam)。PCR仪(美国Applied Biosystems),紫外分光光度计(美国Beckman),DNA电泳仪(美国Applied Biosystems),凝胶分析仪(美国Bio Rad),荧光显微镜(日本奥林巴斯),酶标仪(美国Molecular Devices)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的培养及传代 BMSCs以 5×10^5 个/皿密度接种于10cm培养皿,每盘加入完全培养液10mL,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂和95%相对湿度的培养箱中培养,每2d进行换液,当细胞密度超过80%时进行传代。吸除培养皿内旧培养液,用PBS洗涤2遍,加入0.25%胰酶1mL,放入培养箱内孵育1min后,把培养皿放置在倒置显微镜下进行观察,发现胞质回缩变圆时,应立即用等量完全培养液终止消化,反复吹打,形成细胞悬液,以1:2传代接种在新培养皿内,传代后间隔2d换液,直至细胞生长至80%汇合后,继续传代,如此反复,取第3代细胞用于后续实验。

1.2.2 腺病毒包装和扩增及纯化 (1)目的基因片段的获取:根据Genebank上大鼠CNTF基因(NM_013166.1)编码区(CDS),委托基因公司化学合成目的基因,pHBAd-MCMV-GFP载体用BamH I和EcoR I双酶切(酶切体系含载体、BamH I、EcoR I、10 \times buffer和水),载体酶切完成后胶回收。(2)合成的序列载体用BamH I和EcoR I双酶切获得CNTF片段,目的片段与载体连接,酶切完成后胶回收。(3)转化感受态细胞:事先准备好用于包装病毒的293A细胞和病毒质粒,转染每个直径为6cm的培养皿,complex成分:穿核质粒2 μg ,p-BHG(delta)E1,3 cre 4 μg 。Opti MEM在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热,Lipofiter TM转染试剂恢复

至室温后使用,使用前摇匀,抗性:Amp,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。转染后6h换新鲜培养液。(4)病毒的收集:病毒收集前观察病毒空斑是否形成,为限制病毒的扩散及空斑更好的形成,在培养液中加入琼脂糖,空斑形成后连着琼脂糖一起将空斑挑起,放入新鲜培养基中过夜。转化后的CNTF平板挑菌,37 $^{\circ}\text{C}$,250r/min摇菌14h,菌液进行PCR鉴定,并将阳性克隆菌液送基因公司测序。(5)病毒的扩增:将培养基中病毒加入新鲜293A细胞培养液中进行病毒少量扩增。至细胞再次出现空斑,收集细胞及上清,反复冻融三次收集病毒,以此病毒为P1代病毒,以P1代腺病毒感染293A细胞,连续进行三代感染,至P4代进行腺病毒的大量扩增,待空斑形成后收集病毒并对病毒进行体外纯化和浓缩。(6)病毒的纯化:采用CsCl密度梯度离心-透析联用法纯化病毒,CsCl梯度的制备方法如下:加入2.0mL密度为1.40g/mL的CsCl溶液,然后缓慢加入3.0mL密度为1.30g/mL的CsCl溶液,再加入5mL的病毒悬浮液,透析袋使用前用10mmol/L的EDTA-Na₂煮沸10min,20000r/min室温离心2h,收集密度在1.3~1.4g/mL的病毒条带至透析袋中,配制透析缓冲液:50g蔗糖,10mL 1mmol/L Tris-HCl,pH8.0,2mL 1mmol/L MgCl₂定容至1L,在透析缓冲液4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌透析过夜,中间换一次透析液。收集病毒,测定病毒滴度。(7)病毒重悬和保存:500 μL 的PBS重悬病毒沉淀,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 腺病毒感染BMSCs 取第3代生长良好的BMSCs,以 2×10^4 个/mL的密度接种于24孔板中,每孔加入0.5mL,培养18h后细胞融合率约50%~60%,每孔更换为新鲜完全培养液1mL,调整腺病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)为10,加入稀释好的腺病毒液,轻晃混匀,继续感染7h后,PBS洗3遍,更换为新鲜完全培养液。

1.2.4 ELISA检测细胞上清液中CNTF分泌水平 调整BMSCs密度,按 2×10^4 个/孔的密度接种于6孔板,24h后细胞约为 5×10^4 个/孔,更换不含青霉素-链霉素和胎牛血清的新鲜培养基,1mL/孔;设置三组:空白对照组(未转染腺病毒组)、GFP-BMSCs组(空载腺病毒感染,病毒滴度 2×10^{10} TU/mL,MOI=200)、CNTF-BMSCs组(CNTF腺病毒感染,病毒滴度 10^{10} TU/mL,MOI=200),感染7h后PBS洗3次,1mL/孔全量更换培养液,更换为含FBS和青霉素-链霉素的大鼠BMSCs完全培养液,1、2、3d后收集各组细胞上清液,2000r/min离心20min,取上清液,按照ELISA试剂盒操作说明书测定各组上清液中CNTF的蛋白浓度。比较三组上清液中CNTF的蛋白浓度。

统计学分析:采用SPSS 20.0统计软件进行分析,CNTF蛋白浓度以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组在不同时间点CNTF蛋白浓度的比较用重复测量方差分析,并行正态性检验及方差球形检验,若存在时间差异或组间差异,组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 合成的目的基因序列 合成的目的基因为含有CNTF序列的pHBAd-MCMV-GFP载体,ggatcc及gaattc分别为BamH I和EcoR I酶切位点,目的基因序列如下:

```
ggatccATGGCTTTCGCAGAGCAAACACCTCTGACCCTT  
CACCGCCGGACCTCTGTAGCCGTTCTATCTGGCTAGCAA  
GGAAGATTCGTTTCAGACCTGACTGCTCTTATGGAATCTTA  
TGTAACATCAGGGCCTGAATAAAAATATCAACCTTGAC
```

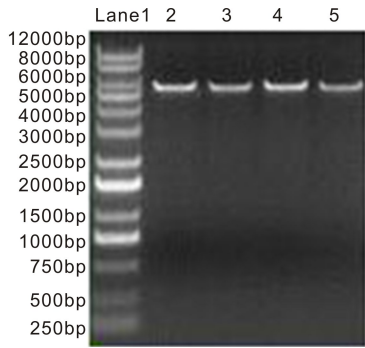


图1 pHBAd-MCMV-GFP 载体胶回收结果 Lane1: DNA Marker, Lane2~5: pHBAd-MCMV-GFP 载体。

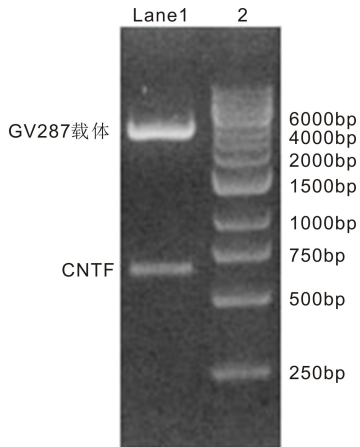


图2 合成载体双酶切胶回收结果 Lane1: CNTF 合成载体双酶切产物,上方为 GV287 载体,下方为 CNTF 基因; Lane2: DNA Marker。

TCAGTGGATGGTGTACCAGTGGCAAGCACTGATCGTTGGA
 GTGAGATGACTGAGGCAGAGCGACTCCAAGAGAACCTCC
 AGGCTTACCGTACCTTCCAAGGGATGTTAACCAAGCTCTT
 AGAAGACCAGAGAGTACATTTACCCCAACTGAAGGTGA
 CTTCCATCAGGCAATACATACTCTTATGCTCCAAGTTTCT
 GCCTTTCCTACCAGCTAGAGGAGTTAATGGTGCCTTCTGG
 AACAGAAGATCCCTGAAAATGAGGCTGATGGGATGCCTG
 CCACAGTTGGAGATGGTGGTCTCTTTGAGAAGAAGCTAT
 GGGGCTTGAAGGTCTTCAAGAGCTCTCACAGTGGACTG
 TGAGGTCTATCCATGACCTTCGTGTCAATTTCTTCTCATCA
 GATGGGAATCTCAGCACTTGAGAGCCATTATGGGGCCAA
 AGATAAGCAGATGTAGgaattc。

2.2 含有 CNTF 的 pHBAd-MCMV-GFP 载体酶切回收结果 含有 CNTF 的 pHBAd-MCMV-GFP 载体酶切后得到约 5500bp 大小的产物,如图 1 Lane2~5 所示,与 pHBAd-MCMV-GFP 载体大小一致。

2.3 合成的序列载体用 BamH I 和 EcoR I 双酶切获得 CNTF 片段并且酶切完成后胶回收 合成的序列用 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,获得约 5500bp 及 600bp 大小的产物(图 2, Lane1),分别与载体和 CNTF 大小一致,说明目的基因构建成功。

2.4 CNTF 单克隆 PCR 鉴定结果 用通用引物对 CNTF 单克隆进行 PCR 检测,得到的目的基因比 CNTF 大 200bp 左右(图 3, Lane2~7),与引物大小一致,说明 CNTF 单克隆构建成功。

2.5 pHBAd-MCMV-GFP-CNTF 重组载体测序结果 CNTF 过表达载体测序结果:

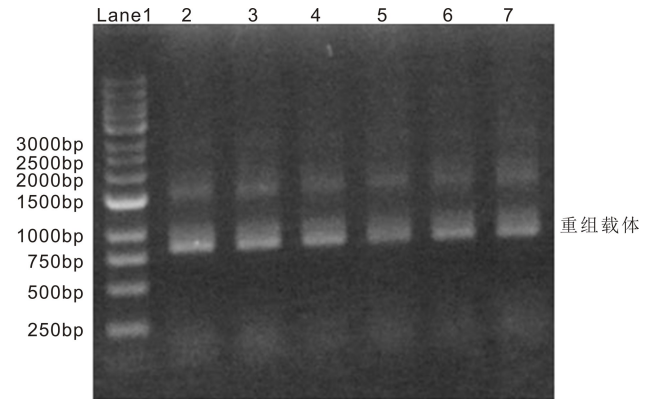


图3 CNTF 单克隆 PCR 鉴定结果 Lane1: DNA Marker; Lane2~7: 重组载体。

CGCGAAGGCTCGGTGCTCGCAGTCTTCCGGTCTGACCA
 CCGTAGAACGCAGATCGAATTAAGCTTGGGCTGCAGGTCC
 ACTCTAGAGGATCCATGGCTTTCGCAGAGCAAACACCTCT
 GACCCTTCACCGCCGGGACCTCTGTAGCCGTTCTATCTGCC
 TAGCAAGGAAGATTTCGTTACAGACCTGACTGCTCTTATGGAA
 TCTTATGTA AAAACATCAGGGCCCTGAATAAAAATATCAACCT
 TGA CTCACTGGATGGTGTACCAGTGGCAAGCACTGATCGTT
 GGAGTGAGATGACTGAGGCAGAGCGACTCCAAGAGAACCT
 CCAGGCTTACCGTACCTTCCAAGGGATGTTAACCAAGCTCT
 TAGAAGACCAGAGAGTACATTTACCCCAACTGAAGGTGA
 CTTCCATCAGGCAATACATACTCTTATGCTCCAAGTTTCTG
 CCTTTCCTACCAGCTAGAGGAGTTAATGGTGTCTTCTGGAA
 CAGAAGATCCCTGAAAATGAGGCTGATGGGATGCCTGCCA
 CAGTTGGAGATGGTGGTCTCTTTGAGAAGAAGCTATGGGG
 CTTGAAGGTCTTCAAGAGCTCTCACAGTGGACTGTGAGG
 TCTATCCATGACCTTCGTGTCAATTTCTTCTCATCAGATGGG
 AATCTCAGCACTTGAGAGCCATTATGGGGCCAAAGATAAG
 CAGATGTAGGAATTCAGATCTGGTACCGTCCGACCGGCCG
 CTCGAGCCGATATCATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGT
 TATTAATAGTAATCAATACGGGGTCAATAGTTTCATAGCCC
 ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC
 CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTC
 AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTT
 TCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCC
 CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG。

测序结果比对显示:阳性克隆中的序列与 CNTF 上(NM_013166.1)的 CDS 区完全一致(图 4,绿色标记部分),表明克隆成功。
2.6 各组在不同时间点上清液的 CNTF 蛋白浓度 腺病毒转染后 1、2、3d,检测三个组的 CNTF 蛋白浓度(表 3)。结果表明,各组在不同时间点 CNTF 蛋白浓度差异有统计学意义($F_{时间} = 2266.250, P_{时间} < 0.001; F_{组间} = 14969.493, P_{组间} < 0.001; F_{组间 \times 时间} = 3336.505, P_{组间 \times 时间} < 0.001$)。1、2、3d 各时间点,与空白对照组相比,实验组的 CNTF 蛋白浓度上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与阴性对照组相比,实验组的 CNTF 蛋白浓度上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在实验组内,CNTF 蛋白浓度随时间延长而提高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

3 讨论

CNTF 对视网膜的保护机制主要有:(1)直接作用于感光细胞^[12-13],阻止光感受器的变性和凋亡;(2)激活 Müller 细胞^[14],使之分泌保护光感受器的神经营养因子;



图4 阳性克隆的测序结果分析。

表3 各组在不同时间点上清液中的 CNTF 蛋白浓度

组别	($\bar{x} \pm s$, ng/mL)		
	1d	2d	3d
空白对照组	7.53±0.56	7.01±0.64	5.79±0.66
阴性对照组	9.34±0.55	8.44±0.60	4.74±0.54
实验组	27.0±0.78	46.89±0.91	79.35±1.27

注:空白对照组:未转染腺病毒组;阴性对照组:GFP-腺病毒转染组;实验组: CNTF-腺病毒转染组。

(3) 促进谷氨酰盐转运蛋白的合成或分布,提高谷氨酰盐的处理效率,减少对视网膜神经元的兴奋毒性损伤^[15]; (4) 增强视网膜细胞对新陈代谢损害的抵抗力,提高视网膜的应激能力^[15]。CNTF 可以促进动物视细胞的存活^[16],在变性视网膜中,CNTF 可以加快视锥细胞外段的更新^[17],还能抑制视网膜神经节细胞凋亡,其视网膜神经保护功能已被广泛研究。在啮齿类动物中,经玻璃体腔注射 CNTF 蛋白可引起 Müller 细胞和视网膜神经节细胞的信号转导及转录活化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 磷酸化显著增加,而感光细胞的 STAT3 无明显改变^[15, 18]。因此, CNTF 也有可能是间接通过其他细胞,如 Müller 细胞分泌细胞因子从而保护光感受器。RPE 细胞顶端存在 CNTF 受体复合物,提示 RPE 细胞可对 CNTF 产生应答^[19]。CNTF 可促进 RPE 细胞存活,加速光感受器的更新,促进 Müller 细胞分泌神经营养因子等,从而保护视网膜。综上, CNTF 对视网膜的保护研究具有重要意义。

使 BMSCs 过表达 CNTF,可通过非病毒载体和病毒载体。非病毒载体表达时间短,对细胞转染率低并且不易保存。腺病毒载体构建周期短,转染时间短且转染率高,使用方便,但不能整合到靶细胞基因组中^[20],因此适合作为短期的体外实验。慢病毒可携带较大的基因片段,并整合到靶细胞基因组中,可以在宿主内长期、高效稳定地表达^[21-22],然而合成周期较长,扩增步骤繁琐,适用于较长时间的体内实验,国内已有武晶晶等^[23]利用慢病毒对 BMSCs 进行基因修饰,使其过表达 CNTF。单纯注射或单

剂量使用 CNTF 蛋白,药物半衰期短^[24]、浓度波动较大,为使 CNTF 在体外高效稳定地表达,进一步研究过表达 CNTF 蛋白的 BMSCs 在体外研究中对视网膜的保护作用,我们成功构建了过表达 CNTF 的腺病毒,并利用病毒系统感染 BMSCs,使其持续高效表达 CNTF 成为可能,以期对视网膜疾病的体外研究提供新思路。

参考文献

- 1 Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, et al. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells* 2014;6 (2):111-119
- 2 Alonso - Alonso ML, Srivastava GK. Current focus of stem cell application in retinal repair. *World J Stem Cells* 2015;7(3):641-648
- 3 Fernandes-Cunha GM, Na KS, Putra I, et al. Corneal Wound Healing Effects of Mesenchymal Stem Cell Secretome Delivered Within a Viscoelastic Gel Carrier. *Stem Cells Transl Med* 2019;8(5):478-489
- 4 He Y, Zhang Y, Liu X, et al. Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa. *Curr Stem Cell Res Ther* 2014;15(8):14456-14474
- 5 Li Y, Qu YH, Wu YF, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppressing activation of allogeneic cytokine-induced killer/natural killer cells either by direct or indirect interaction. *Cell Biol Int* 2015;39(4):435-445
- 6 Hermankova B, Kossel J, Bohacova P, et al. The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stem Cells in a Retinal Inflammatory Environment. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15(6):880-891
- 7 Rahimzadeh A, Mirakabad FS, Movassaghpour A, et al. Biotechnological and biomedical applications of mesenchymal stem cells as a therapeutic system. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2016;44(2):559-570
- 8 Tracy CJ, Sanders DN, Bryan JN, et al. Intravitreal Implantation of Genetically Modified Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cells for Treating Retinal Disorders. *Adv Exp Med Biol* 2016;854:571-577
- 9 Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004;11(14):1155-1164
- 10 Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted - delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(21):1593-1603
- 11 Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow -

derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005;65(8):3307-3318

12 Chew EY, Clemons TE, Jaffe GJ, *et al.* Effect of Ciliary Neurotrophic Factor on Retinal Neurodegeneration in Patients with Macular Telangiectasia Type 2: A Randomized Clinical Trial. *Ophthalmology* 2019;126(4):540-549

13 Di Pierdomenico J, Scholz R, Valiente - Soriano FJ, *et al.* Neuroprotective Effects of FGF2 and Minocycline in Two Animal Models of Inherited Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59(11):4392-4403

14 Todd L, Squires N, Suarez L, *et al.* Jak/Stat signaling regulates the proliferation and neurogenic potential of Müller glia-derived progenitor cells in the avian retina. *Sci Rep* 2016;6:35703

15 Escartin C, Brouillet E, Gubellini P, *et al.* Ciliary neurotrophic factor activates astrocytes, redistributes their glutamate transporters GLAST and GLT-1 to raft microdomains, and improves glutamate handling *in vivo*. *J Neurosci* 2006;26(22):5978-5989

16 Marangoni D, Vijayasathya C, Bush RA, *et al.* Intravitreal Ciliary Neurotrophic Factor Transiently Improves Cone-Mediated Function in a CNGB3^{-/-} Mouse Model of Achromatopsia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(11):6810-6822

17 Li Y, Tao W, Luo L, *et al.* CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One* 2010; 5

(3):e9495

18 Wen R, Song Y, Kjellstrom S, *et al.* Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci* 2006;26(52):13523-13530

19 Li R, Wen R, Banzon T, *et al.* CNTF mediates neurotrophic factor secretion and fluid absorption in human retinal pigment epithelium. *PLoS One* 2011;6(9):e23148

20 Pan Y, Yin H, Lv J, *et al.* A novel hybrid baculovirus - adeno - associated viral vector - mediated radionuclide reporter gene imaging system for stem cells transplantation monitoring. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99(3):1415-1426

21 McGinley L, McMahon J, Strappe P, *et al.* Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Res Ther* 2011;2(2):12

22 Zhu Q, Liu Z, Wang C, *et al.* Lentiviral-mediated growth-associated protein-43 modification of bone marrow mesenchymal stem cells improves traumatic optic neuropathy in rats. *Mol Med Rep* 2015; 12(4):5691-5700

23 武晶晶, 华宁, 东莉洁, 等. 睫状神经营养因子基因修饰的大鼠骨髓间充质干细胞的构建. *中华实验眼科杂志* 2014; 32(5):392-397

24 Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Di Pierdomenico J, *et al.* Topical Brimonidine or Intravitreal BDNF, CNTF, or bFGF Protect Cones Against Phototoxicity. *Transl Vis Sci Technol* 2019; 8(6):36