

补肾益精方对外周血 BMSCs 在干性 ARMD 小鼠中视网膜分化及 CNTF 表达的影响

许凯, 唐由之, 梁丽娜, 张晶, 侯乐, 梁洁, 陈强, 马群英

引用: 许凯, 唐由之, 梁丽娜, 等. 补肾益精方对外周血 BMSCs 在干性 ARMD 小鼠中视网膜分化及 CNTF 表达的影响. 国际眼科杂志 2021; 21(4): 597-603

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81973912, 81473736); 北京市自然科学基金资助项目 (No. 7192236); 首都卫生发展科研专项项目 (No. 2020-2-4183)

作者单位: (100040) 中国北京市, 中国中医科学院眼科医院
作者简介: 许凯, 毕业于中国中医科学院, 硕士, 住院医师, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 梁丽娜, 博士, 研究员, 研究方向: 眼底病. lianglina163@163.com

收稿日期: 2020-05-08 修回日期: 2021-03-09

摘要

目的: 观察补肾益精方对外周血移植骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 在视网膜分化及睫状神经营养因子 (CNTF) 表达的影响, 探讨补肾益精方治疗干性年龄相关性黄斑变性 (ARMD) 的作用机制。

方法: 将 24 只 C57BL/6 小鼠以碘酸钠 (NaIO_3) 尾静脉注射的方法建立干性 ARMD 模型。造模后第 1d, 尾静脉注射 3×10^6 个绿色荧光蛋白标记的骨髓间充质干细胞 (GFP-BMSCs), 按随机数字表法分为蒸馏水组 (12 只, 给予蒸馏水灌胃) 及补肾益精方组 (12 只, 给予补肾益精方灌胃)。另选 12 只健康 C57BL/6 小鼠常规饲养作为正常组。治疗 14d 时, 采用免疫荧光染色观察 GFP-BMSCs 在视网膜的分化情况; 免疫荧光染色及实时荧光定量 PCR 检测 CNTF 在视网膜中的表达情况。

结果: 免疫荧光染色显示补肾益精方组胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 及 GFP 双染细胞阳性率高于蒸馏水组 ($P < 0.01$); 两组视网膜色素上皮细胞特异蛋白 65 (RPE65) 及 GFP 双染细胞阳性率无差异 ($P > 0.05$); 两组均未见视紫红质 (Rhodopsin) 与 GFP 双染阳性细胞。免疫荧光染色及实时荧光定量 PCR 显示补肾益精方组 CNTF 的表达高于蒸馏水组 ($P < 0.05$)。

结论: 补肾益精方能够促进外周血 BMSCs 在视网膜分化为胶质细胞, 并促进 CNTF 的表达, 这可能是补肾益精方治疗干性 ARMD 的作用机制之一。

关键词: 补肾益精方; 骨髓间充质干细胞; 细胞分化; 睫状神经营养因子; 干性年龄相关性黄斑变性

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2021.4.06

Effect of Bu Shen Yi Jing Fang on differentiation of peripheral blood stem cells and expression of ciliary neurotrophic factor in retina of dry ARMD mouse model

Kai Xu, You-Zhi Tang, Li-Na Liang, Jing Zhang, Le Hou, Jie Liang, Qiang Chen, Qun-Ying Ma

Foundation items: National Natural Foundation of China (No.

81973912, 81473736); Beijing Natural Science Foundation (No. 7192236); Capital's Funds for Health Improvement and Research (No. 2020-2-4183)

Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China

Correspondence to: Li-Na Liang. Eye Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100040, China. lianglina163@163.com

Received: 2020-05-08 Accepted: 2021-03-09

Abstract

• AIM: To explore the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from peripheral blood to the retina and the expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). We also investigate the mechanism by which Bu Shen Yi Jing Fang could treat dry age-related macular degeneration (ARMD).

• METHODS: C57BL/6 mice were administered with sodium iodate (NaIO_3) by tail intravenous injection. One day after modeling, 3×10^6 green fluorescent protein labeled bone marrow-derived mesenchymal stem cells (GFP-BMSCs) were injected into the tail vein. The injected mice were randomly divided into distilled water group and Bu Shen Yi Jing Fang group according to random number table, and 12 mice in each group. The mice were intragastrical administrated with either Bu Shen Yi Jing Fang solution or distilled water every day. Twelve healthy C57BL/6 mice were fed regularly as the normal group. At 14d after the treatment, the differentiation of GFP-BMSCs in retina was determined by immunofluorescence, and the expression of CNTF in the retina was detected by immunofluorescence and quantitative real-time PCR.

• RESULTS: Immunofluorescence staining showed that there were more glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFP double-stained positive cells in the Bu Shen Yi Jing Fang group than in the distilled water group ($P < 0.01$), and the positive rate of retinal pigment epithelium 65 (RPE65) was not significantly different between two groups ($P > 0.05$). There were no Rhodopsin and GFP double-stained positive cells in the two groups. Immunofluorescence and quantitative real-time PCR showed that the expression of CNTF in the Bu Shen Yi Jing Fang group was higher than which in the distilled water group ($P < 0.05$).

• CONCLUSION: Bu Shen Yi Jing Fang facilitated the differentiation of peripheral blood stem cells into glial cells in the retina and the expression of CNTF, which might be one of the mechanisms of Bu Shen Yi Jing Fang

in the treatment of dry ARMD.

• KEYWORDS: Bu Shen Yi Jing Fang; bone marrow - derived mesenchymal stem cells; cell differentiation; ciliary neurotrophic factor; dry age - related macular degeneration

Citation: Xu K, Tang YZ, Liang LN, *et al.* Effect of Bu Shen Yi Jing Fang on differentiation of peripheral blood stem cells and expression of ciliary neurotrophic factor in retina of dry ARMD mouse model. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2021;21(4):597-603

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age - related macular degeneration, ARMD) 是发达国家 50 岁以上人群不可逆性盲的首位病因, 在我国的发病率也呈逐年上升趋势。根据有无视网膜下脉络膜新生血管 (choroidal neovascularization, CNV) 分为干性 ARMD 和湿性 ARMD。随着对 CNV 研究的深入, 通过药物治疗、激光光凝、光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 及手术等方法, 湿性 ARMD 的治疗已取得较好的临床效果。干性 ARMD 由于脂质过氧化物和氧自由基等在视网膜内蓄积, 导致视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞凋亡及感光细胞损伤, 目前尚无确切的药物疗法^[1]。近年来, 干细胞研究的快速发展为干性 ARMD 的治疗带来了潜在的希望。补肾益精方是唐由之研究员治疗干性 ARMD 的经验方, 前期动物实验研究显示该方对干性 ARMD 小鼠视网膜有一定的保护作用, 并可以动员自体骨髓间充质干细胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs) 向外周血迁移及向视网膜组织归巢^[2-3]。基于前期研究结果, 本实验观察补肾益精方是否可以促进外周血干细胞向视网膜细胞分化以及视网膜组织中睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF) 的表达, 以进一步明确其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 动物选用 SPF 级健康无眼疾 C57BL/6 小鼠 36 只, 约 6~8 周龄, 雄性 [北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证编号: SCXK (京) 2016-0006]。适应性饲养 7d 后, 按随机数字表法选择其中的 24 只予 40mg/kg 碘酸钠 (NaIO₃) 尾静脉注射造模, 并评定造模情况^[3-4], 本研究纳入动物均造模成功。

造模后第 1d, 尾静脉注射 3×10⁶ 个绿色荧光蛋白标记的 C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞 (green fluorescent protein labeled bone marrow - derived mesenchymal stem cells, GFP-BMSCs), 然后随机分为蒸馏水组及补肾益精方组, 每组 12 只。干细胞注射后第 1d, 补肾益精方组予补肾益精方药液灌胃 (8.8g/kg), 每天 1 次。蒸馏水组每天予等量的蒸馏水灌胃。另选 12 只健康 C57BL/6 小鼠常规饲养作为正常组。治疗 14d 时进行相关指标评价。动物实验程序与福利均符合实验动物伦理学要求。

1.1.2 实验试剂及仪器 补肾益精方由何首乌、枸杞、黄芪、黄精等组成, 煎剂由中国中医科学院眼科医院药学部制备而成, 浓度为 880g/L。绿色荧光蛋白标记的 C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞 (GFP-BMSCs) 购自 Cyagen 公司, NaIO₃ (SIGMA-ALDRICH 公司), Triton-100 (北京优尼康生物科

技有限公司), 牛血清白蛋白 (BSA) (北京元亨圣马生物技术有限公司), Anti - RPE65 (ab78036)、Anti - Rhodopsin (ab5417)、Anti - GFAP (ab7260)、Anti - CNTF (ab46172)、Alexa Fluor® 647 标记的驴抗小鼠 IgG H&L (ab150107) 购自 Abcam 公司, 罗丹明标记山羊抗兔 IgG H&L (ZF-0316) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司, TaqDNA 聚合酶 (Amplified Biosystems 公司), Trizol Reagent RNA 提取试剂盒 (Ambion 公司), M-MLV Reverse Transcriptase cDNA 第一链合成试剂盒 (Invitrogen 公司), 氯仿、异丙醇 (北京化工厂), loading buffer、DNA marker (北京优尼康生物科技有限公司), CM1850 冰冻切片机、DM2500 显微镜 (德国 Leica 公司), 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司), 荧光定量 PCR 仪 (Amplified Biosystem 公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫荧光染色 颈椎脱臼法处死小鼠, 立即摘除右眼眼球, 制作冰冻切片。一抗孵育 (Anti - RPE65, 1:500; Anti - Rhodopsin, 1:50; Anti - GFAP, 1:500; Anti - CNTF, 1:500), 4℃ 过夜; PBST 洗涤 3 次, 二抗孵育 (Alexa Fluor® 647 标记的驴抗小鼠 IgG H&L, 1:500; 罗丹明标记山羊抗兔 IgG H&L, 1:100), 避光室温孵育 2h; PBST 洗涤 3 次, DAPI 复染; PBS 洗涤, 抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜下观察。计数每个视野中 RPE65⁺、Rhodopsin⁺、GFAP⁺ 细胞 (即红色荧光)、GFP⁺ 细胞 (即绿色荧光) 以及 RPE65、Rhodopsin、GFAP 细胞与 GFP 双染细胞 (即黄色荧光) 数量, 计算比值 [BMSCs 分化率 (%) = 双染阳性细胞数/同视野 GFP⁺ 细胞数 × 100%], 并进行统计分析。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 颈椎脱臼法处死小鼠, 立即摘除左眼眼球, 分离出新鲜视网膜, 按 Trizol Reagent RNA 提取试剂盒说明书提取视网膜样本中总 RNA。应用 M-MLV Reverse Transcriptase cDNA 第一链合成试剂盒逆转录合成 cDNA, 紫外分光光度计测定其浓度。以 β-actin 为内参, 引物基因序列如下: CNTF: 5' - GCTTTTCGAGAGCAATCAC - 3', 3' - AGAGGCCACCATCTCCAAT - 3'; β-actin: 5' - ATATCGCTGCGCTGGTCGTC - 3', 3' - AGGATGGCGTGAGGGAGAGC - 3'。扩增条件为: 95℃ 5min, (95℃ 15s, 60℃ 15s, 72℃ 15s) × 45 个循环, 分析溶解曲线。采用 2^{-ΔΔct} 方法进行数据的相对定量分析, ΔΔct = (实验组目的基因平均 ct 值 - 实验组内参基因平均 ct 值) - (对照组目的基因平均 ct 值 - 对照组内参基因平均 ct 值)。统计各组视网膜组织中 CNTF mRNA 的相对表达量。

统计学分析: 采用 SPSS19.0 统计软件包进行统计分析, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。GFP-BMSCs 分化为视网膜细胞的阳性率分析采用 Mann - Whitney 检验, CNTF mRNA 相对表达量采用完全随机设计单因素方差分析, 两两比较由于方差不齐采用 Tamhane 法检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补肾益精方对 GFP-BMSCs 在视网膜分化的影响 RPE 细胞特异性抗体 RPE65 免疫荧光染色发现, 正常组 RPE 细胞排列规整, 呈强阳性 (红色荧光) 染色; 蒸馏水组和补肾益精方组 RPE65 阳性染色减少减弱, 细胞排列不规整, 可见散在 RPE65 及 GFP 双染阳性细胞, 两组双染细胞阳性率分别为 (12.63 ± 2.69)%、(14.32 ± 5.57)%。虽然补肾益精方组的双染色阳性细胞总数较蒸馏水组多, 但阳

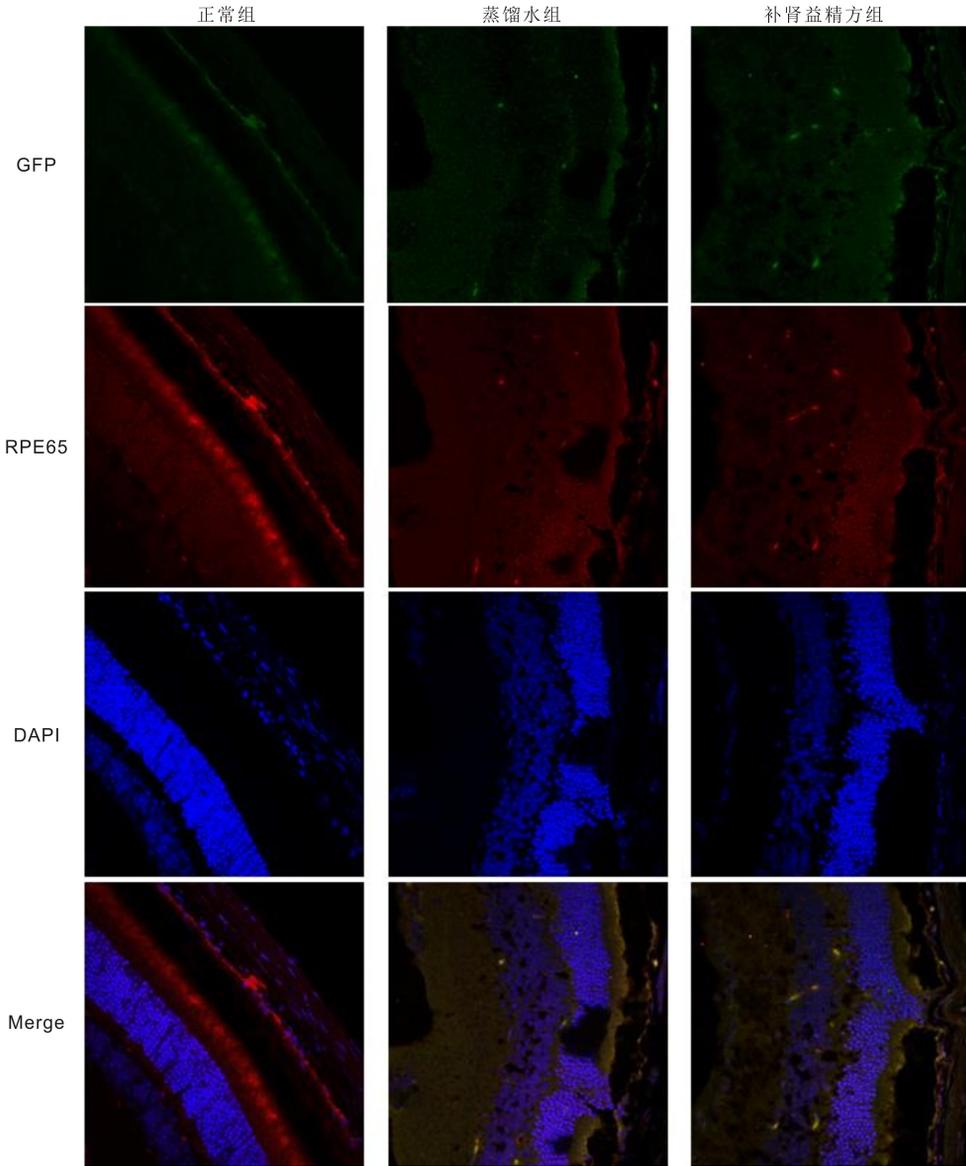


图1 免疫荧光观察各组视网膜 RPE65 表达情况 (×400)。

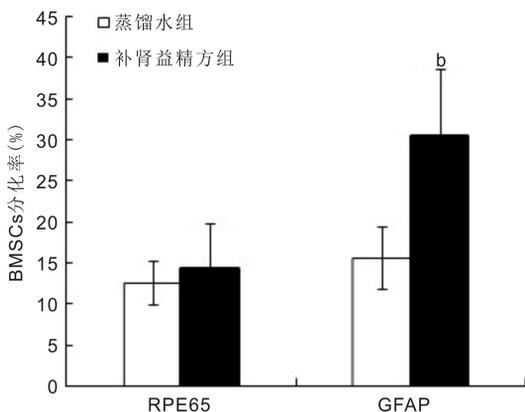


图2 两组 BMSCs 分化率比较 ^b $P < 0.01$ vs 蒸馏水组。

性率两组差异无统计学意义 ($P = 0.857$), 见图 1、2。感光细胞特异性抗体 Rhodopsin 免疫荧光染色发现, 正常组 Rhodopsin 主要在感光细胞外节段表达, 呈强阳性 (红色荧光) 染色; 蒸馏水组和补肾益精方组外节段结构紊乱, 呈碎片化弱阳性染色, 均可见 GFP 阳性细胞, 但在外节段区未发现双染细胞 (图 3)。胶质细胞特异性抗体 GFAP 免疫荧光染色发现, 正常组 GFAP 在星形胶质细胞、Müller

细胞靠近视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells, RGCs) 部位有少量表达 (红色荧光); 蒸馏水组和补肾益精方组 GFAP 阳性表达均较正常组增强, 可见 GFAP、GFP 双染阳性细胞。蒸馏水组在神经节细胞层可见较强 GFAP 阳性染色。补肾益精方组 GFAP 在神经节细胞层、内丛状层呈垂直视网膜分布的线条状阳性染色, 内核层呈细点状染色。补肾益精方组双染细胞阳性率为 $(30.50 \pm 8.10)\%$, 明显高于蒸馏水组 $(15.65 \pm 3.89)\%$, 两组间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2、4。

2.2 补肾益精方对视网膜 CNTF 表达的影响

2.2.1 免疫荧光检测视网膜中 CNTF 蛋白表达情况 结果发现, 正常组 CNTF 在神经节细胞层表达, 呈强阳性 (红色荧光) 染色。蒸馏水组视网膜中表达较弱, 仅在神经节细胞层、内核层有少量阳性细胞。补肾益精方组 CNTF 阳性表达虽然较正常组弱, 但强于蒸馏水组, 在神经节细胞层、内核层均可见大量阳性细胞, 外核层有少量阳性细胞 (图 5)。

2.2.2 实时定量 PCR 检测视网膜中 CNTF mRNA 表达情况 三组 CNTF mRNA 表达比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。蒸馏水组和补肾益精方组视网膜中 CNTF mRNA

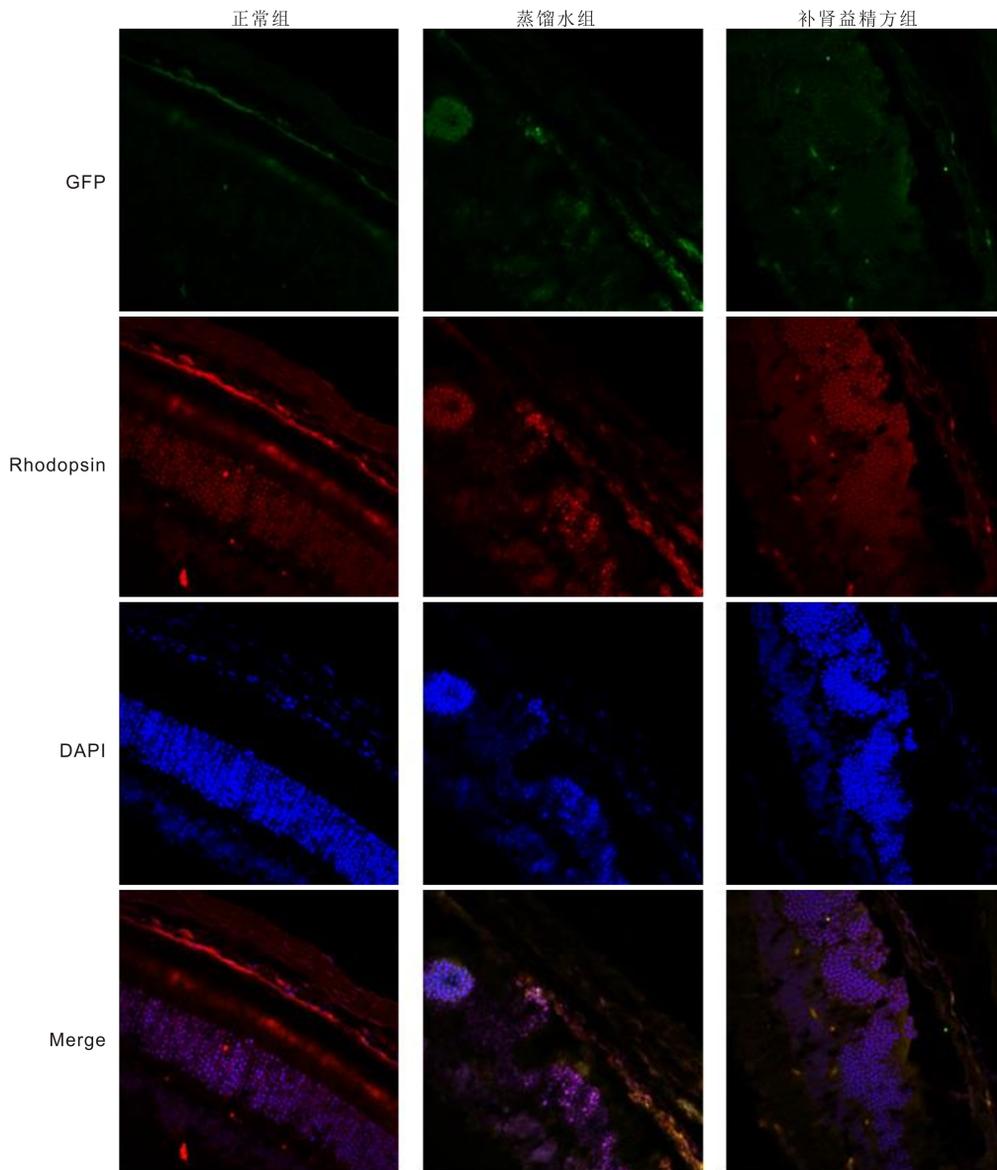


图3 免疫荧光观察各组视网膜 Rhodopsin 表达情况($\times 400$)。

表1 给药14d时各组视网膜CNTF mRNA表达情况 $\bar{x} \pm s$

组别	CNTF mRNA 表达
正常组	1.00 \pm 0.000
蒸馏水组	1.313 \pm 0.069
补肾益精方组	3.643 \pm 0.521
<i>F</i>	67.810
<i>P</i>	<0.01

的表达与正常组相比均增加,差异有统计学意义($P=0.047, 0.038$)。补肾益精方组较蒸馏水组显著增加,差异有统计学意义($P=0.044$),见表1。

3 讨论

本研究选择的动物模型是 NaIO_3 诱导的干性 ARMD 模型,是目前国内外公认且应用较多的造模方法。研究显示^[5],C57BL/6 小鼠在注射 NaIO_3 6h 后,RPE 细胞出现坏死;24h 后,感光细胞外节断裂,并出现感光细胞凋亡;3d 时,感光细胞凋亡达到高峰;7d 时,感光细胞完全凋亡。此模型选择性地引起 RPE 层损伤,继而导致感光细胞等组织发生病理改变的特性与干性 ARMD 的发病特点相

似。因此,选用该模型进行实验。

对于干性 ARMD 的治疗,虽然膳食补充剂疗法在一定程度上减缓了疾病的进展,但还未发现其他疗效确切的治疗药物。近年来,细胞替代治疗方法的出现,尤其是干细胞研究的快速发展使干性 ARMD 的治疗成为可能,并被认为是目前最有应用前景和临床转化潜能的治疗策略之一^[6]。尽管既往研究取得了一些成果,但仍存在不少问题,比如移植后视网膜功能改善维持时间短,移植细胞不能很好地整合于宿主细胞及分化成视网膜细胞等,如何解决这些问题是干细胞更好应用于临床的关键。中医学认为,精是人体生命活动的根本物质。“肾者主蛰,封藏之本,精之处也”,肾精充足,则能发挥化生的作用,这与干细胞的理论有相似之处。因此,通过补肾益精方,有可能通过增强自身 BMSCs 的修复能力,发挥保护视网膜变性损伤的作用。

补肾益精方是唐由之研究员治疗干性 ARMD 的经验方,该方以制首乌滋补肝肾、填精益髓;枸杞滋养肝肾,益精明目;黄芪补气健脾;黄精补气养阴,健脾益肾,诸药合用,使精血畅达,上注于目,临床上用于治疗视网膜变性疾病。前期我们研究发现补肾益精方可以延缓先天性视网

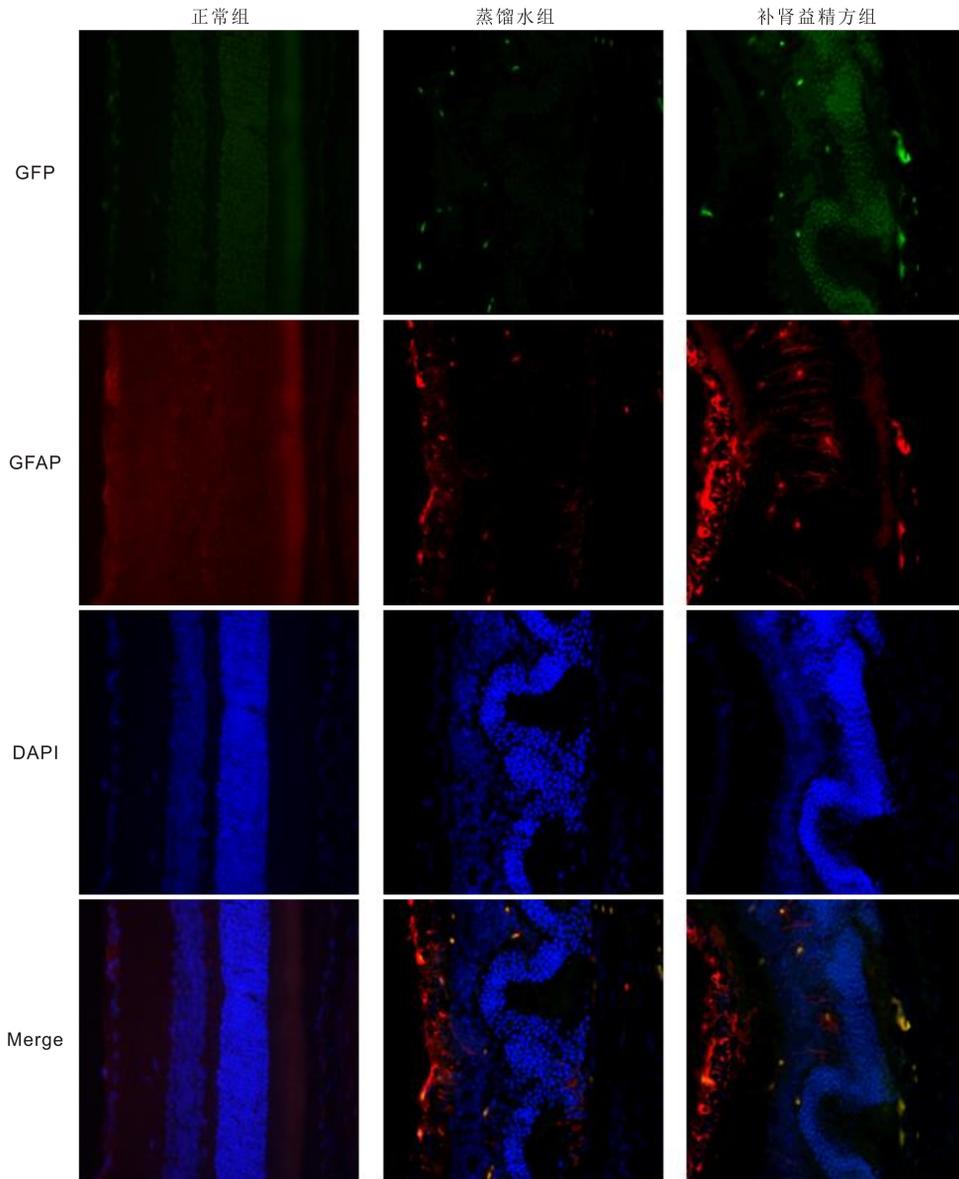


图4 免疫荧光观察各组视网膜GFAP表达情况($\times 400$)。

膜变性模型英国皇家外科学院(Royal College of Surgeons, RCS)大鼠视网膜细胞的凋亡^[7],促进外周血干细胞在视网膜的聚集及神经营养因子分泌^[8],另外,补肾益精方对NaIO₃诱导的干性ARMD小鼠也有保护作用,并可以促进外周血BMSCs在视网膜归巢^[2-3]。归巢后的BMSCs是否能分化为具有功能的视网膜细胞需要进一步探讨。现代药理学研究发现,制首乌可保护神经细胞,并促进神经干细胞向神经元分化^[9-10];枸杞可促进BMSCs向神经元分化,增加海马神经元干细胞的分化速率,促进海马神经元再生,保护神经系统^[11-14];黄芪可促使BMSCs的增殖、动员及向神经细胞分化^[15-18];黄精可促进BMSCs的增殖以及动员因子粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)的表达^[19]。本实验结果显示补肾益精方不能促进BMSCs分化为RPE细胞和感光细胞,但是对分化为胶质细胞具有较为明显的促进作用。在生理状态下,胶质细胞起支持、指引神经元迁移、参与血-脑屏障的诱导及形成的作用,同时在维持细胞周围微环境的稳态方面通过分泌多种细胞因子和神经递质,参与激素和神经递质的代谢,并在信号转导和免疫调节等方面具有重

要作用,其功能的完整性是正常视功能所必须的^[20-22]。在视网膜损伤早期,胶质细胞为保护组织免受进一步损伤,会出现反应性的胶质增多,GFAP表达增加,释放神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)和抗氧化剂,发挥神经保护作用^[23-24]。其他研究也发现,无论是体内还是体外培养,MSCs在一定条件下都能分化成神经胶质细胞和神经元,表现出修复神经的功能,呈现向损伤处迁移的特性^[25-26]。

目前认为MSCs修复视网膜变性损伤的机制一方面在趋化因子介导下,迁移至损伤部位,并跨胚层分化为视网膜细胞,直接替代坏死或凋亡的细胞^[27-31];另一方面通过旁分泌作用产生CNTF、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等NTFs以及抗凋亡相关因子等,使其在受损视网膜的微环境中表达上调,促进视网膜修复^[32-35]。CNTF作为视网膜保护中被研究最多的神经营养因子之一,主要由胶质细胞和神经所支配的组织产生,对视网膜神经元具有明显的保护作用^[36-38],研究表明,CNTF能增加外核层厚度,减少感光细胞凋亡,

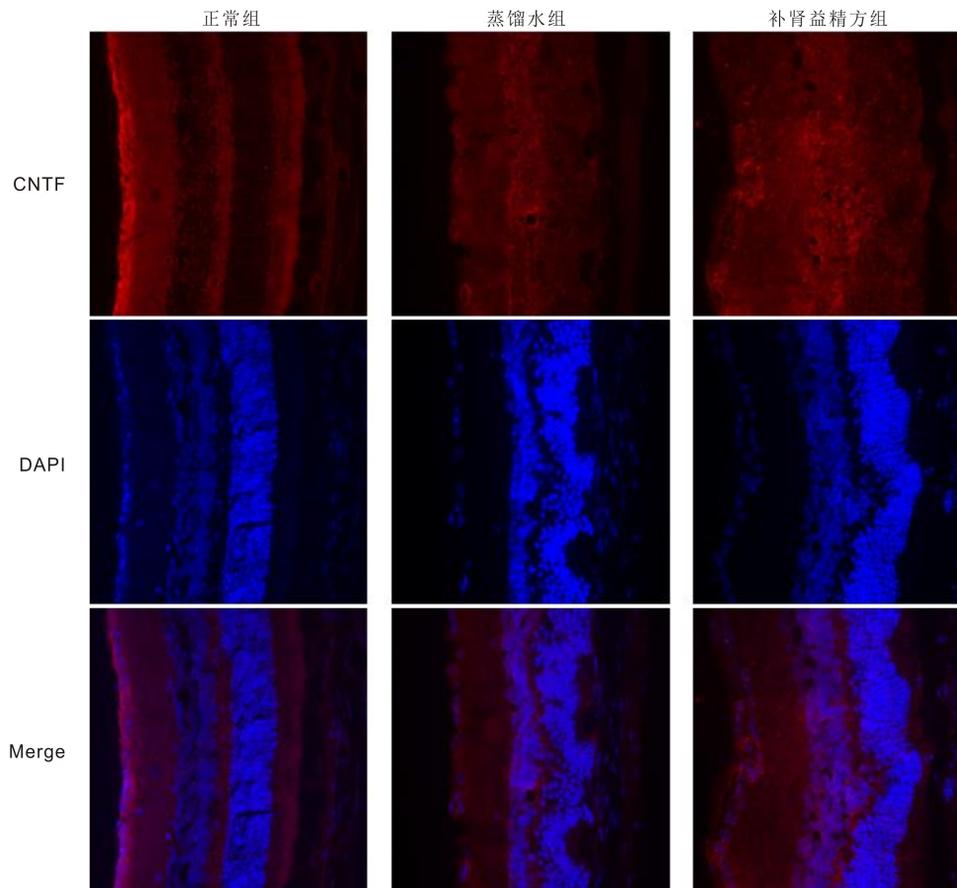


图5 免疫荧光观察各组视网膜CNTF表达情况($\times 400$)。

提高感光细胞的存活能力,延缓疾病发展^[39-43]。并且可以显著增强信号传导及转录激活蛋白3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)的磷酸化,调节感光细胞对光子的传导性,保护视网膜细胞^[44]。因此,本实验观察了补肾益精方对CNTF在视网膜表达的影响,结果发现补肾益精方组CNTF mRNA和蛋白的表达量较蒸馏水组均增加,提示补肾益精方可以促进CNTF的表达。另有研究发现,在中枢神经系统,胶质细胞在受损伤早期可以分泌CNTF。当中枢神经受损时,CNTF从胶质细胞中释放,并在损伤区域周围聚集^[20,45]。在本实验中,由于CNTF mRNA和蛋白表达量趋势与胶质细胞特征性标志物GFAP相一致,因此我们认为补肾益精方一方面促进视网膜本身CNTF表达增加,另外也可能通过促进分化的胶质细胞释放CNTF,保护受损视网膜。

综上所述,通过本实验我们发现补肾益精方能够促进BMSCs在干性ARMD小鼠模型视网膜分化为胶质细胞,并促进视网膜CNTF的表达,这可能是补肾益精方保护视网膜变性损伤的作用机制。

参考文献

- 1 Parmeggiani F, Romano MR, Costagliola C, et al. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm* 2012; 2012(11):546786
- 2 侯乐,唐由之,梁丽娜. 补肾益精方对干性年龄相关性黄斑变性动物模型骨髓来源干细胞动员的影响. *中国中医眼科杂志* 2017; 27(1):3-7
- 3 侯乐. 补肾益精方促进自身骨髓干细胞修复干性年龄相关性黄斑变性的作用研究. *中国中医科学院* 2017
- 4 朱颖婷,邓新国,高杨,等. 碘酸钠诱导大鼠视网膜损伤的病理改

- 变和SOD、CAT的变化. *中国病理生理杂志* 2010; 26(9):1851-1854
- 5 Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, et al. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Curr Eye Res* 2002; 25(6):373-379
- 6 李雪丽,范吉平,梁丽娜. 干细胞移植治疗视网膜退行性疾病的研究进展. *中国中医眼科杂志* 2015; 25(6):444-447
- 7 梁丽娜,李雪丽,许凯,等. 补肾益精方对先天性视网膜色素变性RCS大鼠感光细胞凋亡的抑制作用. *眼科新进展* 2018; 38(7):611-615
- 8 李雪丽,唐由之,许凯,等. 补肾益精方对外周血干细胞在RCS大鼠视网膜上的募集及睫状神经营养因子表达的影响. *中华眼视光学与视觉科学杂志* 2018; 20(8):475-483
- 9 徐泽鹤,易佳佳. 何首乌有效成分二苯乙烯甙对神经细胞保护作用机制研究. *亚太传统医药* 2013; 9(7):61-62
- 10 张玉莲,张琳琳,宋宛珊,等. 三种补肾中药有效成分对AD小鼠胚胎神经干细胞自我更新及神经元样分化作用研究. *中国中西医结合杂志* 2014; 34(10):1245-1249
- 11 Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379(9817):713-720
- 12 Pavan B, Capuzzo A, Forlani G. Highglucose-induced barrier impairment of human retinal pigment epithelium ameliorated by treatment with Goji berry extracts through modulation of cAMP levels. *Exp Eye Res* 2014; 120(2):50-54
- 13 Gao J, Chen C, Liu Y, et al. Lyciumbarbarum polysaccharide improves traumatic cognition via reversing imbalance of apoptosis/regeneration in hippocampal neurons after stress. *Life Sci* 2015; 121:124-134
- 14 Lam CS, Tipoe GL, So KF, et al. Neuroprotective mechanism of Lyciumbarbarum polysaccharides against hippocampal-dependent spatial memory deficits in a rat model of obstructive sleep apnea. *PLoS One*

2015;10(2):e0117990

15 李鹏涛, 杨晓楠, 霍艳丽, 等. 黄芪联合骨髓间充质干细胞治疗阿尔茨海默病的新思路. *神经药理学报* 2016;6(2):31-36

16 张睿, 倪敏, 周春根, 等. 从中医“精气转化”探讨黄芪对间充质干细胞增殖及分化的影响. *中华中医药学刊* 2020;38(10):146-149

17 高志红, 左亚奇, 李鹏涛, 等. 黄芪甲苷IV诱导小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化机制的研究. *中药材* 2019;42(7):1640-1645

18 石特, 王杨凯. 黄芪对间充质干细胞增殖及分化的影响. *解剖学杂志* 2019;42(2):194-196

19 黄进, 张进, 徐志伟. 黄精含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖的效应及机制. *中国组织工程研究与临床康复* 2010;14(49):9221-9224

20 李慧. 压力介导的星形胶质细胞的活化对其分泌睫状神经生长因子的影响. 中国医科大学 2018

21 Gadea A, Schinelli S, Gallo V. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci* 2008;28(10):2394-2408

22 宋天玲. 人脐带间充质干细胞对早期糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡、胶质细胞活化及神经炎症的干预作用. 青岛大学 2018

23 蔡琴华, 夏春林. 视网膜 Müller 细胞的研究现状. *国际眼科纵览* 2008;32(1):19-23

24 Cheslow L, Alvarez JI. Glial-endothelial crosstalk regulates blood-brain barrier function. *Curr Opin Pharmacol* 2015;26:39-46

25 刘文华, 马艳萍. 多发性骨髓瘤细胞中胰岛素样生长因子结合蛋白7的基因表达及甲基化调控. *中国实验血液学杂志* 2017;25(3):813-817

26 陈东平, 侯淑红, 郭元, 等. 人胎盘间充质干细胞移植对脑梗死大鼠的神经保护作用. *中国组织工程研究* 2018;22(1):65-69

27 Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15(9):1293-1306

28 Eisenberg LM, Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defect Res C* 2003;69(3):209-218

29 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

30 Arnholt 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

31 Nadri S, Yazdani S, Arefian E, et al. Mesenchymal stem cells from trabecular meshwork become photoreceptor-like cells on amniotic membrane. *Neurosci Lett* 2013;541:43-48

32 Alonso - Alonso ML, Srivastava GK. Current focus of stem cell application in retinal repair. *World J Stem Cells* 2015;7(3):641-648

33 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

34 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

35 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

36 Pasquin S, Sharma M, Gauchat JF. Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015;26(5):507-515

37 Wen R, Tao W, Li Y, et al. CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res* 2012;31(2):136-151

38 LaVail MM, Nishikawa S, Steinberg RH, et al. Phenotypic characterization of P23H and S334ter rhodopsin transgenic rat models of inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2018;167:56-90

39 Azadi S, Johnson LE, Paquet - Durand F, et al. CNTF + BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res* 2007;1129(1):116-129

40 Lavail MM, Nishikawa S, Duncan JL, et al. Sustained delivery of NT-3 from lens fiber cells in transgenic mice reveals specificity of neuroprotection in retinal degenerations. *J Comp Neurol* 2008;511(6):724-735

41 Thanos C, Emerich D. Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5(11):1443-1452

42 Joly S, Pernet V, Chemtob S, et al. Neuroprotection in the Juvenile Rat Model of Light-Induced Retinopathy: Evidence Suggesting a Role for FGF-2 and CNTF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(5):2311-2320

43 Engelhardt M, Di Cristo G, Berardi N, et al. Differential effects of NT-4, NGF and BDNF on development of neurochemical architecture and cell size regulation in rat visual cortex during the critical period. *Eur J Neurosci* 2007;25(2):529-540

44 Wen R, Song Y, Liu Y, et al. CNTF negatively regulates the phototransduction machinery in rod photoreceptors: implication for light-induced photostasis plasticity. *Adv Exp Med Biol* 2008;613:407-413

45 Brambilla R, Neary JT, Cattabeni F, et al. Induction of COX-2 and reactive gliosis by P2Y receptors in rat cortical astrocytes is dependent on ERK1/2 but independent of calcium signalling. *J Neurochem* 2002;83(6):1285-1296