

脂肪间充质干细胞外泌体对体外培养压力损伤的大鼠 RGCs 的保护作用

陈一丹, 戴敏, 郑志坤

引用: 陈一丹, 戴敏, 郑志坤. 脂肪间充质干细胞外泌体对体外培养压力损伤的大鼠 RGCs 的保护作用. 国际眼科杂志, 2024, 24(11):1695-1700.

基金项目: 云南省高层次人才培养支持计划青年拔尖人才专项 (No. YNWR-QNBJ-2020-237); 云南省自然科学基金项目 (No. 202301AT070190); 昆医联合专项基金项目 (No. 202301AY070001-222); 云南省眼科疾病防治研究重点实验室项目 (No. 2017DG008); 云南省科技计划项目 (No. 202105AF150067)

作者单位: (650021) 中国云南省昆明市, 云南大学附属医院眼科 云南省眼科医院 云南省眼科研究所 云南省眼科疾病防治研究重点实验室 云南省第二人民医院白内障与眼底疾病防治省创新团队 云南省姚克专家工作站 云南省眼部疾病临床医学研究中心 云南省眼科疾病临床医学中心

作者简介: 陈一丹, 毕业于昆明医科大学, 硕士, 住院医师, 研究方向: 青光眼。

通讯作者: 戴敏, 毕业于中南大学湘雅医学院, 博士, 主任医师, 研究方向: 青光眼、白内障. dm9024@163.com

收稿日期: 2024-03-18 修回日期: 2024-09-27

摘要

目的: 通过体外建立大鼠视网膜神经节细胞 (RGCs) 压力损伤模型, 研究脂肪间充质干细胞 (ADSCs) 外泌体对损伤的 RGCs 的保护作用。

方法: 培养 ADSCs 收集上清提取并鉴定外泌体, 将体外培养大鼠 RGCs 分为正常培养的 RGCs 对照组、不同压力 (40、80、120 mmHg) 培养的 RGCs 模型组、不同压力培养的 RGCs 加入外泌体治疗组, 通过 CCK-8 法检测各组 RGCs 细胞增殖活力, qPCR 法检测各组 RGCs 中 BDNF、Caspase-3 的 mRNA 表达水平, Western Blot 检测各组 RGCs 中 BDNF、Caspase-3 的蛋白表达水平。

结果: CCK-8 法检测发现, 在对照组中, 与 24 h 的细胞增殖活力相比, 48 h 时细胞增殖活力上升 ($P < 0.05$)。在 48 h 时, 与加压 40、80、120 mmHg 模型组相比, 加入外泌体后细胞活力均上升 (均 $P < 0.05$)。qPCR 法检测发现, 与对照组比较, 40 mmHg 组中 BDNF mRNA 表达下降, 但无差异 ($P > 0.05$), 80、120 mmHg 组中 BDNF mRNA 表达下降 (均 $P < 0.05$)。加压 40、80 mmHg 组加入外泌体后 RGCs 的 BDNF mRNA 表达均上升 (均 $P < 0.05$), 加压 120 mmHg 组加入外泌体后 RGCs 的 BDNF mRNA 表达上升, 但无差异 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 加压 40 mmHg 组中 Caspase-3 的 mRNA 表达上升, 但无差异 ($P > 0.05$), 加压 80、120 mmHg 组中 Caspase-3 mRNA 表达均上升 (均 $P < 0.05$)。加压 40、80 mmHg 组加入外泌体治疗后 RGCs 的 Caspase-3 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), 加压 120 mmHg 组加入外泌体治疗后 RGCs Caspase-3 的 mRNA 表达下降,

但无差异 ($P > 0.05$)。Western Blot 检测发现, 与对照组比较, 加压 40 mmHg 组中 BDNF 蛋白表达下降, 但无差异 ($P > 0.05$), 加压 80、120 mmHg 组中 BDNF 蛋白表达下降 (均 $P < 0.001$)。与模型组相比, 加入外泌体治疗后 BDNF 蛋白表达均上升 (均 $P < 0.05$)。与对照组比, 加压后各模型组中 Caspase-3 蛋白表达均上升 (均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 加入外泌体治疗后各组 Caspase-3 蛋白表达均下降 (均 $P < 0.05$)。

结论: ADSCs 来源的外泌体能够增加体外培养不同压力损伤的大鼠 RGCs 的细胞增殖活力, 提高 BDNF 的 mRNA 及蛋白表达水平, 降低 Caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达水平, 说明 ADSCs 来源的外泌体对体外培养压力损伤的大鼠 RGCs 具有保护作用。

关键词: 压力损伤; 脂肪间充质干细胞外泌体; 视网膜神经节细胞 (RGCs); 脑源性神经营养因子; Caspase-3

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2024.11.02

Protective effects of adipose tissue - derived stromal cells exosomes against pressure-induced injury in retinal ganglion cells of cultured rat *in vitro*

Chen Yidan, Dai Min, Zheng Zhikun

Foundation items: Yunnan Provincial High - level Talent Cultivation Support Program for Young Top - notch Talents (No. YNWR-QNBJ-2020-237); Yunnan Natural Science Foundation (No.202301AT070190); Kunming Medical University Joint Special Fund (No.202301AY070001-222); Project of Key Laboratory for Prevention and Treatment of Ophthalmic Diseases in Yunnan Province (No. 2017DG008); Science and Technology Project of Yunnan Province (No.202105AF150067)

Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yunnan University; Yunnan Eye Hospital; Yunnan Eye Institute; Key Laboratory for Prevention and Treatment of Ophthalmic Diseases in Yunnan; The Cataract and Retinal Diseases Prevention and Treatment Innovation Team of Yunnan Province Second People's Hospital; Yao Ke Expert Workstation in Yunnan Province Clinical Medical Research Center for Ocular Disease in Yunnan; Yunnan Clinical Medical Center for Ophthalmic Disease, Kunming 650021, Yunnan Province, China

Correspondence to: Dai Min. Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Yunnan University; Yunnan Eye Hospital; Yunnan Eye Institute; Key Laboratory for Prevention and Treatment of Ophthalmic Diseases in Yunnan; The Cataract and Retinal Diseases Prevention and Treatment Innovation Team of Yunnan Province Second People's Hospital; Yao Ke Expert Workstation in

Yunnan Province Clinical Medical Research Center for Ocular Disease in Yunnan; Yunnan Clinical Medical Center for Ophthalmic Disease, Kunming 650021, Yunnan Province, China. dm9024@163.com

Received:2024-03-18 Accepted:2024-09-27

Abstract

• **AIM:** To assess the protective effect of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) exosomes on injured retinal ganglion cells (RGCs) by establishing an *in vitro* rat RGC pressure injury model.

• **METHODS:** ADSCs were cultured, and exosomes were extracted from the supernatant and identified. Rat RGCs were divided into a control group, pressure model groups (40, 80, 120 mmHg), and exosome-treated groups under different pressures. Cell proliferation activity was assessed using the CCK-8 assay. The mRNA expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and Caspase-3 in RGCs were detected by qPCR, and protein levels were measured by Western Blot.

• **RESULTS:** The CCK-8 assay showed that cell proliferation activity in the control group increased significantly at 48 h compared to 24 h ($P < 0.05$). At 48 h, cell viability in the exosome-treated groups increased significantly compared to the 40, 80, and 120 mmHg pressure model groups (all $P < 0.05$). qPCR results indicated that BDNF mRNA expression decreased in the 40 mmHg pressure model group without statistical significance ($P > 0.05$), and significantly decreased in the 80 and 120 mmHg pressure model groups (all $P < 0.05$). BDNF mRNA expression significantly increased in the 40 and 80 mmHg pressure model groups after exosome treatment (both $P < 0.05$), and increased in the 120 mmHg pressure model group without statistical significance ($P > 0.05$). Caspase-3 mRNA expression increased in the 40 mmHg pressure model group without statistical significance ($P > 0.05$), and significantly increased in the 80 and 120 mmHg pressure model groups (all $P < 0.05$). Caspase-3 mRNA expression significantly decreased in the 40 and 80 mmHg pressure model groups after exosome treatment ($P < 0.05$), and decreased in the 120 mmHg pressure model group without statistical significance ($P > 0.05$). Western Blot analysis showed that BDNF protein expression decreased in the 40 mmHg pressure model group without statistical significance ($P > 0.05$), and significantly decreased in the 80 and 120 mmHg pressure model groups (all $P < 0.001$). After exosome treatment, BDNF protein expression significantly increased compared to the pressure model groups (all $P < 0.05$). Caspase-3 protein expression increased significantly in all pressure model groups compared to the control group (all $P < 0.05$), and significantly decreased in all exosome-treated groups compared to the model groups (all $P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** ADSCs-derived exosomes enhance cell proliferation and viability in cultured rat RGCs *in vitro* under different pressure-induced injuries, enhance BDNF mRNA and protein expression levels, and reduce Caspase-3 mRNA and protein expression levels, suggesting that ADSCs-derived exosomes have a

protective effect on pressure-injured in cultured rat RGCs *in vitro*.

• **KEYWORDS:** pressure injury; adipose tissue-derived stromal cells exosomes; retinal ganglion cells (RGCs); brain-derived neurotrophic factor; Caspase-3

Citation: Chen YD, Dai M, Zheng ZK. Protective effects of adipose tissue stromal cells exosomes against pressure-induced injury in retinal ganglion cells of cultured rat *in vitro*. Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci), 2024,24(11):1695-1700.

0 引言

青光眼是一组进行性的视神经凹陷性萎缩及视野缺损为共同特征的疾病,是全球导致视力不可逆损害的主要原因。2020年在全球50岁及以上人群中,青光眼是失明的第二大原因^[1]。青光眼不可逆的视功能损害是由于视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)死亡导致^[2]。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有分化为RGCs的潜能,但干细胞移植具有局限性,无法在临床广泛应用^[3]。研究发现干细胞还可通过旁分泌机制分泌多种细胞因子保护RGCs, MSCs分泌的外泌体(exosomes, EXO)通过旁分泌功能传递生物活性分子,介导细胞间通讯来发挥MSCs的作用^[4]。脂肪间充质干细胞(adipose tissue-derived stromal cells, ADSCs)作为最常见和易获取的间充质干细胞之一,可通过旁分泌机制分泌外泌体及包括脑源神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)在内的多种神经营养因子^[5]。研究发现从脂肪组织分离的干细胞数量是等量骨髓组织中分离的干细胞数量的500倍,而且ADSCs与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)相比具有更强的增殖能力^[6-7]。因此,我们选择ADSCs外泌体进行实验,通过检测加入ADSCs外泌体后体外培养压力损伤大鼠RGCs的细胞增殖活力、BDNF及凋亡因子Caspase-3的表达水平,探索ADSCs外泌体对体外培养压力导致大鼠RGCs损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ADSCs(购买自武汉普诺赛生命科技有限公司, CP-R198)、大鼠RGCs(购买自武汉普诺赛生命科技有限公司, CP-R122)、DMEM培养基、Neurobasal培养基、B27添加剂(美国Gibco公司)、新西兰胎牛血清(澳大利亚Bovogen公司)、青霉素-链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶-EDTA(以色列BioInd公司)、CCK-8试剂盒(美国Proteintech Group公司)、Trizol Reagent RNA提取试剂、2xRealstar Green Fast Mixture with ROXII、BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京康润诚业生物科技有限公司)、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)、兔抗大鼠 β -actin抗体、山羊抗兔二抗、Anti-Caspase-3抗体、Anti-BDNF抗体(美国Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 体外培养ADSCs并收集上清液 将冻存ADSCs进行复苏,接种至T75瓶,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,细胞融合度达到80%-90%后进行传代。传至3-5代细胞生长至融合度约为80%,吸取丢弃原细胞培养基,加入适量PBS清洗,将完全培养基更换为无血清培养基继

续培养 48 h,收集上清液并以 1 200 r/min 离心 20 min,取上清液并分装保存于-80 °C 的冰箱。

1.2.2 提取并鉴定外泌体 将收集的上清 4 °C 条件下,300×g 离心 10 min,依次将上清 2 000×g、4 °C、10 min;10 000×g、4 °C、30 min;4 °C、100 000 g、150 min 离心。去除上清,用预冷 PBS 重悬后再次 4 °C、100 000 g、150 min 超速离心。去上清再次适量 PBS 重悬,提取后的外泌体应该立即检测或者冻存-80 °C。采用磷钨酸染色后通过透射电子显微镜观察及 Western 印迹检测外泌体表面的特异性分子标志(CD9、CD63、CD81)。

1.2.3 复苏 RGCs 并根据不同分组处理培养 RGCs 复苏冻存的 RGCs,加入 Neurobasal 完全培养基(10%胎牛血清 FBS、1%双抗、2% B27 补充剂、1% L-谷氨酰胺),将其接种于 T25 培养瓶中,密度为 1×10^5 cell/mL,37 °C,5% CO₂ 细胞培养箱培养。

根据分组培养 RGCs:对照组:正常培养 RGCs。模型组:自行设计加压装置(T 型三通管的橡皮塞封闭培养瓶,使用打气球从三通管打入消毒后的空气,将三通管的另一管用于压力表和培养瓶的连通,使压力度数达到预期值)进行密闭加压,使压力分别达到 40、80、120 mmHg,持续 8 h 后,取出培养板,于正常细胞培养条件(37 °C,5% CO₂)培养箱继续培养 48 h,分别收集各组细胞进行后续检测。外泌体治疗组:在模型组加压 8 h 后,加入外泌体,外泌体浓度由 BCA 法测定,浓度为 1.37 mg/mL,按每 1 mL 培养基加入 100 μg 外泌体,方法参考师恩祎等的研究^[8]。

1.2.4 CCK-8 检测各组细胞活力 将对照组 RGCs 充分消化后重悬,以每孔 100 μL 悬液将细胞接种于 96 孔板中,按试剂盒说明书检测 24、48 h 细胞活力。确定时间最佳培养时间点后,通过 CCK-8 实验检测模型组及治疗组细胞活力。

1.2.5 qPCR 检测各组 RGCs 中 BDNF 及 Caspase-3 的 mRNA 表达水平 Trizol 溶液提取各组 RGCs 的细胞总 RNA,测定 RNA 浓度后按照 qPCR 试剂盒操作步骤进行逆转录合成 cDNA,设计引物 Caspase-3 - F: 5'-AAGGAGCAGCTTTGTGTGTG-3', Caspase-3 - R: 5'-TGTCTCAATGCCACAGTCCA-3', BDNF - F: 5'-TAATGCAGCATGATGGGAAA-3', BDNF - R: 5'-TCACAGTCAAAGCACCTTGC-3',以 GAPDH 为内参进行 PCR 扩增。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.2.6 Western Blot 检测各组 RGCs 中 BDNF 及 Caspase-3 的蛋白表达水平 RIPA 蛋白裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,在蛋白中加入上样缓冲液,混匀后 95 °C 金属浴加热 5 min。依次上样后通过 SDS-PAGE 电泳将蛋白转至 PVDF 膜,5% BSA 中封闭后加入,分别加入 BDNF 抗体及 Caspase-3 抗体 4 °C 孵育过夜,次日加入二抗孵育后进行显影。

统计学分析:使用 SPSS25.0 及 GraphPad Prism 9.4.1 统计软件进行统计学处理。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组定量数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),组内多重比较采用 LSD-t 检验,两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 外泌体形态及特点 外泌体在透射电镜下形

态呈圆形或者类圆形的膜性囊泡小体,具有典型的双层膜结构,膜结构完整。囊泡直径约在 60-120 nm 左右(图 1A)。Western Blot 检测 ADSCs 外泌体特异性蛋白 CD9、CD63、CD81 的表达呈阳性(图 1B)。

2.2 体外 RGCs 培养 接种培养的细胞于 3-4 h 开始贴壁,贴壁后的细胞呈圆形,呈单层排列形,少量聚集呈团,核圆相对透明。12 h 细胞开始变为多边形,有粗细不等,长短不一的突起长出。24 h 细胞胞体增大,突起变长,开始互相连接,有聚集生长的现象(图 2)。

2.3 不同分组处理培养下的 RGCs 形态变化 不同分组细胞培养 24 h 时可见模型组与对照组相比,随着压力的增高,细胞皱缩死亡,失去细胞形态无法贴壁生长,存活细胞因压力呈漩涡状层状生长,120 mmHg 死亡最多。外泌体治疗组与模型组比较可见细胞死亡减少,细胞密度增加。40 mmHg+exo 及 80 mmHg+exo 组较为明显,甚至因压力产生的间隙也减少,但 120 mmHg+exo 组细胞密度较 120 mmHg 模型组并无明显改变,见图 3、4。

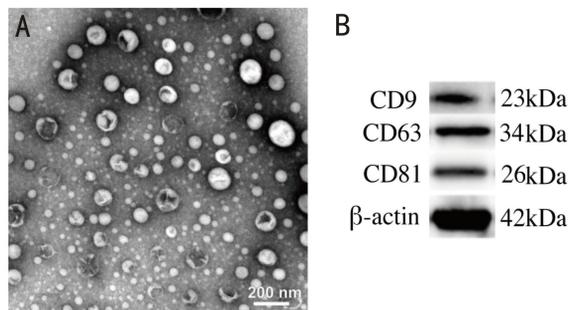


图 1 ADSCs 外泌体形态及鉴定图 A:透射电镜图;B:外泌体表面特异性蛋白条带图。

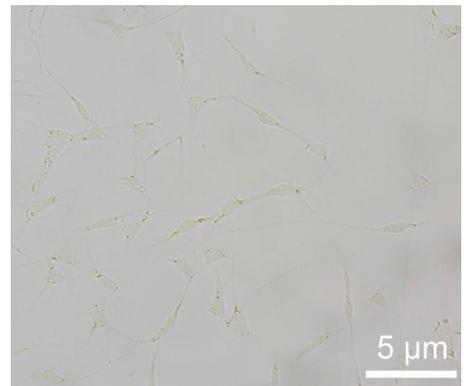


图 2 RGCs 细胞形态图。

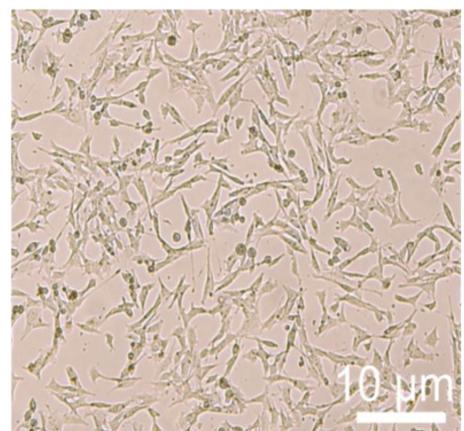


图 3 对照组 RGCs 培养 24 h 形态图。

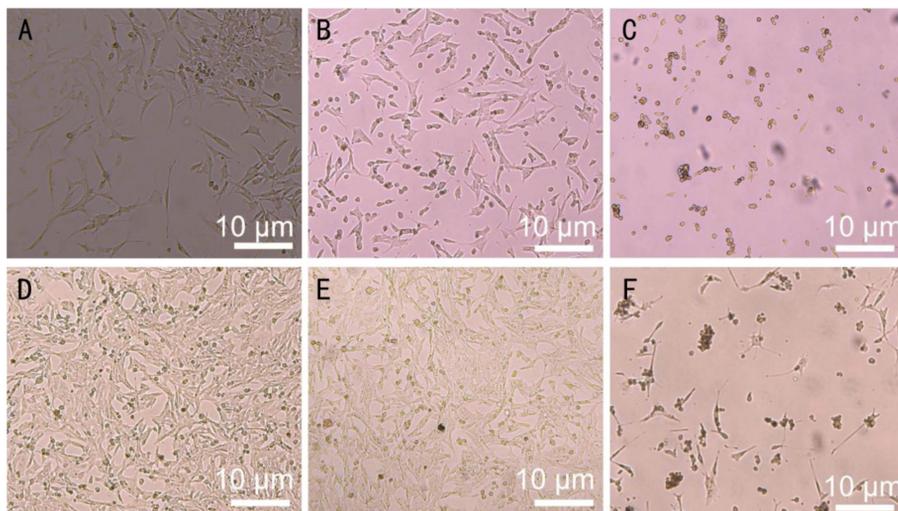


图4 模型组及治疗组 RGCs 培养 24 h 形态对比图 A:加压 40 mmHg 的模型组;B:加压 80 mmHg 的模型组;C:加压 120 mmHg 的模型组;D:40 mmHg+exo 组;E:80 mmHg+exo 组;F:120 mmHg+exo 组。

2.4 CCK8 检测各组 RGCs 细胞活力变化 对照组中培养 24、48 h 的 RGCs 的 OD 值为 0.663 ± 0.046 、 1.284 ± 0.122 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 48 h 时, 对照组、加压 40、80、120 mmHg 的 RGCs 的 OD 值为 1.284 ± 0.122 、 0.887 ± 0.074 、 0.581 ± 0.041 、 0.332 ± 0.041 , 差异有统计学意义 ($F = 113.802, P = 0.001$), 见图 5。与加压 40 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 OD 值为 0.985 ± 0.006 , 细胞活力上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与加压 80 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 OD 值为 0.703 ± 0.054 , 细胞活力上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与加压 120 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 OD 值为 0.475 ± 0.029 , 细胞活力上升, 差异有统计学意义 ($P = 0.001$)。

2.5 qPCR 检测各组 RGCs 中 BDNF 及 Caspase-3 的 mRNA 表达变化

2.5.1 各组中 BDNF mRNA 表达变化 对照组、加压 40、80、120 mmHg 组的 RGCs 中 BDNF mRNA 表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 0.906 ± 0.140 、 0.769 ± 0.126 、 0.534 ± 0.006 , 差异有统计学意义 ($F = 13.775, P < 0.05$)。与对照组相比, 加压 40 mmHg 后 RGCs 中 BDNF mRNA 表达下降, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。加压 80、120 mmHg 后 RGCs 中 BDNF mRNA 表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.001$)。与加压 40 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 RGCs 中 BDNF mRNA 表达量 (1.423 ± 0.167) 上升, 差异有统计学意义 ($t = -4.112, P = 0.016$)。与加压 80 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 RGCs 中 BDNF mRNA 表达量 (1.148 ± 0.182) 上升, 差异有统计学意义 ($t = -2.961, P = 0.042$)。与加压 120 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 RGCs 中 BDNF mRNA 表达量 (0.795 ± 0.163) 上升, 但差异无统计学意义 ($t = -2.760, P = 0.051$)。

2.5.2 各组中 Caspase-3 mRNA 表达变化 对照组、加压 40、80、120 mmHg 组 RGCs 中 Caspase-3 mRNA 表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 1.378 ± 0.285 、 4.700 ± 0.498 、 8.870 ± 3.837 , 差异有统计学意义 ($F = 10.651, P < 0.05$)。与对照组相比, 加压 40 mmHg 后 RGCs 中 Caspase-3 mRNA 表达上升, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。加压 80、120 mmHg 后 RGCs 中 Caspase-3 mRNA 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P = 0.001$)。与加压 40 mmHg 模型组相比, 加

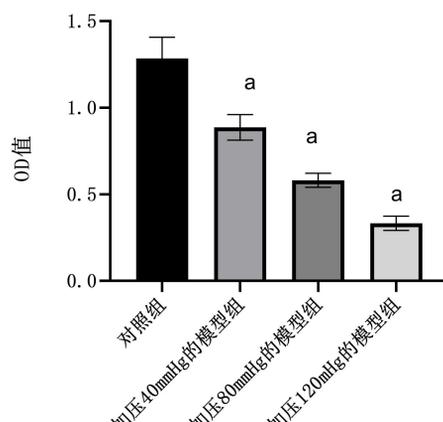


图5 对照组与各模型组 48 h 细胞增殖活力柱状图 ^a $P < 0.05$ vs 对照组。

入外泌体治疗后 RGCs 中 Caspase-3 mRNA 表达量 (0.892 ± 0.067) 下降, 差异有统计学意义 ($t = 2.870, P = 0.045$)。与加压 80 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 RGCs 中 Caspase-3 mRNA 表达量 (2.162 ± 0.406) 下降, 差异有统计学意义 ($t = 6.844, P = 0.002$)。与加压 120 mmHg 模型组相比, 加入外泌体治疗后 RGCs 中 Caspase-3 mRNA 表达量 (5.188 ± 0.249) 下降, 但差异无统计学意义 ($t = 1.658, P = 0.173$)。

2.6 Western Blot 检测各组 RGCs 中 BDNF 及 Caspase-3 的蛋白表达变化

2.6.1 各组中 BDNF 蛋白表达变化 与对照组比较, 加压 40 mmHg 后 RGCs 的 BDNF 蛋白表达稍有下降, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。加压 80、120 mmHg 后 RGCs 的 BDNF 蛋白表达均下降, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$), 见图 6、7A。不同压力的 RGCs 治疗组的 BDNF 蛋白表达量与模型组比较, 表达量均上升, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见图 7B。

2.6.2 各组中 Caspase-3 蛋白表达变化 与对照组比较, 加压 40、80、120 mmHg 模型组中 Caspase-3 蛋白表达均上升, 差异有统计学意义 ($P = 0.001, < 0.001, < 0.001$), 见图 8A。不同压力的 RGCs 治疗组 Caspase-3 蛋白表达量与模型组比较, 表达量均下降, 差异有统计学意义 ($P = 0.001, P < 0.05, P < 0.05$), 见图 8B。

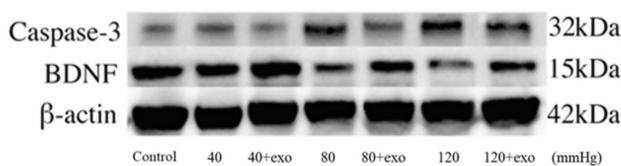
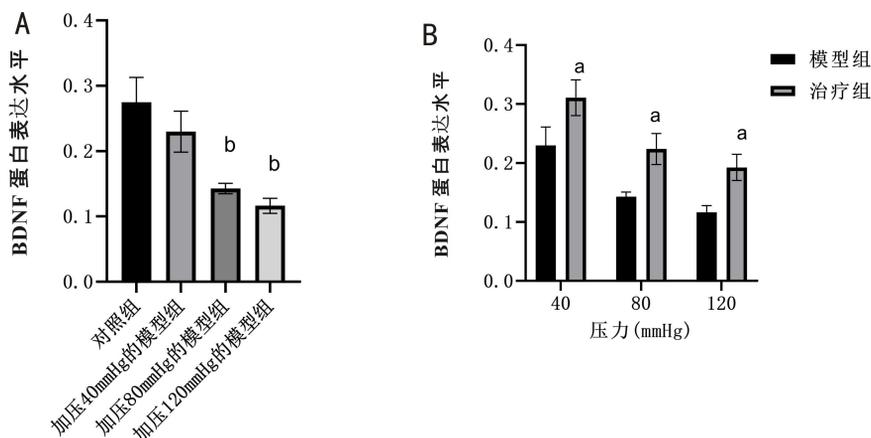
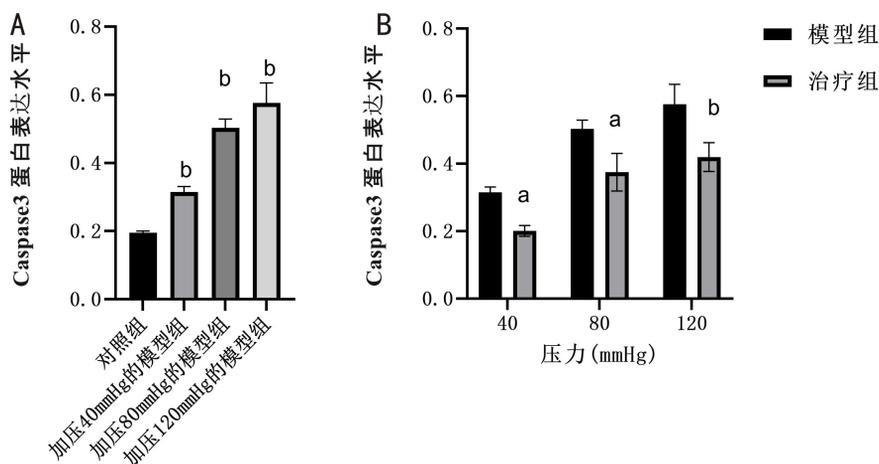


图6 各组 BDNF 及 Caspase-3 的蛋白表达条带图。

图7 各组细胞中 BDNF 的蛋白表达水平柱状图 A: $bP<0.01$ vs 对照组; B: $aP<0.05$ vs 模型组。图8 各组 RGCs 中 Caspase-3 蛋白表达水平柱状图 A: $bP<0.01$ vs 对照组; B: $aP<0.05$, $bP<0.01$ vs 模型组。

3 讨论

Cordeiro 等^[9]通过可视化分析证实了高眼压大鼠模型中 RGCs 的凋亡。RGCs 的不可逆死亡导致了青光眼患者永久的视功能损伤。此前有研究证实玻璃体腔内注射移植 MSCs, 可使 RGCs 轴突存活率在统计学上显著增加^[10]。但 MSCs 移植会导致视网膜脱离、出血、视力下降等并发症^[11]。MSCs 除了多能分化潜力外, 其旁分泌功能也被认为是组织修复再生的机制之一^[12]。而细胞分泌的外泌体是发挥旁分泌功能的关键^[13]。

本实验在不同压力下培养 RGCs, 检测各组细胞 Caspase-3、BDNF 的蛋白和 mRNA 表达, 以及细胞增殖活力来确定 RGCs 的损伤程度。本研究表明, 加压后 RGCs 的细胞活力下降, Caspase-3 的 mRNA 及蛋白的表达显著升高, 这与研究小鼠视神经挤压和横断模型中 RGCs 受损后检测到激活 Caspase-3 的表达一致^[14]。同时本研究发现压力损伤后 RGCs 中 BDNF 的 mRNA 及蛋白的表达下降, 随着压力的增加, RGC 死亡进一步增多, BDNF 表达进一步下降。这可能是由于 RGCs 受损后的细胞代谢的相关基因表达下调, 减少细胞葡萄糖的摄取及能量的产生,

造成细胞线粒体功能障碍, 导致细胞自身合成多种蛋白受阻, 从而导致神经营养因子及其受体的剥夺^[15]。但在我们的研究中, 加压 40 mmHg 组与对照组相比 RGCs 的 Caspase-3 mRNA 表达上升但不显著, BDNF 的 mRNA 及蛋白的表达下降但不显著, 这可能是压力小导致 RGCs 损伤程度不严重引起。

与其他 MSCs 相比, ADSCs 的主要优点有组织来源丰富、组织收集和细胞分离方法比较简单, 同样 ADSCs 外泌体含有并能转移多种功能性生物分子^[16]。我们的实验检测了模型组和 ADSCs 外泌体治疗组 RGCs 的细胞增殖活力以及 Caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达水平, 发现压力损伤的 RGCs 加入外泌体后, 增殖活力上升, Caspase-3 表达降低, 这表明外泌体对压力损伤的 RGCs 有保护作用。外泌体如何发挥保护作用, 我们也进行了初步探索。BDNF 作为神经营养因子之一对 RGCs 的保护作用已被证实。它在上丘合成后通过 RGCs 轴突逆行运输到视网膜^[17]。同时也能在视网膜神经节细胞层和内核层细胞表达^[18]。本实验通过比较不同压力损伤的 RGCs 加入外泌体治疗前后 BDNF 的表达, 发现加入外泌体治疗后, RGCs 中

BDNF的 mRNA 及蛋白表达增加。本实验在加压 120 mmHg 的 RGCs 组加入外泌体治疗后, BDNF 的 mRNA 表达升高, Caspase-3 的 mRNA 表达降低, 但差异无统计学意义, 考虑是由于 RGCs 在加压 120 mmHg 时凋亡增多, 加入外泌体后能调节的 BDNF 及 Caspase-3 的表达十分有限导致。有研究发现 MSCs 来源的外泌体的保护作用可能与神经营养因子有关。小鼠实验坐骨神经挤压模型中, 注射 ADSCs 外泌体后使得轴突再生, 实验还发现 ADSCs 外泌体中存在多种神经营养因子转录产物^[19]。BMSCs、ADSCs 和牙髓干细胞 (dental pulp stem cells, DPSCs) 可通过旁分泌机制分泌包括 BDNF 在内的多种神经营养因子^[5]。有研究也检测到了脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells, UMSCs) 外泌体携带 BDNF, 并通过 BDNF-TrkB 通路对大鼠高糖模型中的 RGCs 发挥保护作用^[20]。这些研究结果表明 ADSCs 外泌体对压力导致大鼠 RGCs 损伤的保护作用可能与 BDNF 有关。BDNF 的表达增加是因为外泌体的直接转移导致还是其携带的生物活性分子调控还需进一步研究。细胞的凋亡程序复杂, Caspase-3 只是作为其中一个凋亡因子表达, 与多条凋亡通路相关。但外泌体是通过什么途径减少 RGCs 凋亡, 还需要进一步研究其上游或下游的因子的表达来确定。

综上所述, 加入 ADSCs 外泌体可提高体外培养压力损伤的 RGCs 的细胞活力, 增加 BDNF 的 mRNA 及蛋白表达, 降低 Caspase-3 的 mRNA 及蛋白表达。ADSCs 外泌体对压力导致大鼠 RGCs 的损伤有保护作用, 可能与增加 BDNF 的表达及减少凋亡因子 Caspase-3 的表达有关, 但此实验仅为体外实验, 在动物实验中还缺乏验证, 具体作用机制及通路也有待进一步研究, 实验具有局限性。因此, 之后我们将建立大鼠高血压模型, 通过玻璃体腔注射外泌体, 进一步验证 ADSCs 外泌体对视神经的保护作用, 探究外泌体作用于 RGCs 中某些特定蛋白或通路来改善视神经损伤的分子机制, 为青光眼等视神经疾病的治疗提供新思路。

参考文献

[1] GBD Blindness and Vision Impairment Collaborators, Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the right to sight: an analysis for the global burden of disease study. *Lancet Glob Health*, 2021, 9(2): e144-e160.

[2] Jutley G, Luk SM, Dehabadi MH, et al. Management of glaucoma as a neurodegenerative disease. *Neurodegener Dis Manag*, 2017, 7(2): 157-172.

[3] Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(17): 3323-3348.

[4] 王滋润, 梁丽萍, 肖成伟, 等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体通过 miR-210 介导大鼠脊髓损伤后的神经保护作用. *现代免疫学*, 2022, 42(1): 15-24, 36.

[5] Mead B, Logan A, Berry M, et al. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomized retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109305.

[6] Zhang Y, Khan D, Delling J, et al. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *Sci World J*, 2012, 2012: 793823.

[7] Lotfy A, Salama M, Zahran F, et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells*, 2014, 7(2): 135-142.

[8] 时将, 高诗仑, 刘金铎, 等. 骨髓间充质干细胞外泌体减轻海马神经细胞氧糖剥夺再灌注损伤. *中国组织工程研究*, 2019, 23(21): 3316-3322.

[9] Cordeiro MF, Normando EM, Cardoso MJ, et al. Real-time imaging of single neuronal cell apoptosis in patients with glaucoma. *Brain*, 2017, 140(6): 1757-1767.

[10] Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(4): 2051-2059.

[11] Kuriyan AE, Albin TA, Townsend JH, et al. Vision loss after intravitreal injection of autologous "stem cells" for AMD. *N Engl J Med*, 2017, 376(11): 1047-1053.

[12] Liang XT, Ding Y, Zhang YL, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant*, 2014, 23(9): 1045-1059.

[13] Joo HS, Suh JH, Lee HJ, et al. Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 727.

[14] Liu YY, Yan H, Chen S, et al. Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK enhances retinal ganglion cell survival and vision restoration after rabbit traumatic optic nerve injury. *Restor Neurol Neurosci*, 2015, 33(2): 205-220.

[15] Guo Y, Johnson EC, Cepurna WO, et al. Early gene expression changes in the retinal ganglion cell layer of a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(3): 1460-1473.

[16] Bunnell BA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cells*, 2021, 10(12): 3433.

[17] Herzog KH, von Bartheld CS. Contributions of the optic tectum and the retina as sources of brain-derived neurotrophic factor for retinal ganglion cells in the chick embryo. *J Neurosci*, 1998, 18(8): 2891-2906.

[18] Perez MTR, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett*, 1995, 183(1-2): 96-99.

[19] Bucan V, Vaslaitis D, Peck CT, et al. Effect of exosomes from rat adipose-derived mesenchymal stem cells on neurite outgrowth and sciatic nerve regeneration after crush injury. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(3): 1812-1824.

[20] Gao X, He GH, Zhang XT, et al. Protective effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes on rat retinal neurons in hyperglycemia through the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway. *Int J Ophthalmol*, 2021, 14(11): 1683-1689.