

BMSCs 联合 ChABC 对视网膜变性大鼠光感受器细胞凋亡的影响

郑祥榕¹, 柳林^{1,2}, 高朋芬³

作者单位:¹(200433)中国上海市,第二军医大学附属长海医院眼科;²(200127)中国上海市,上海交通大学医学院附属仁济医院眼科;³(350025)中国福建省福州市,南京军区福州总医院眼科
作者简介:郑祥榕,硕士研究生,主治医师,研究方向:角膜病、眼底病。

通讯作者:柳林,教授,主任医师,研究方向:屈光系统及视网膜外科. linliu@sh163.net

收稿日期:2014-08-27 修回日期:2015-02-11

Bone mesenchymal stem cells and chondroitinaseABC on photoreceptor apoptosis in degenerated retina of rats

Xiang-Rong Zheng¹, Lin Liu^{1,2}, Peng-Fen Gao³

¹Department of Ophthalmology, Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²Department of Ophthalmology, Renji Hospital of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China;

³Department of Ophthalmology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Lin Liu. Department of Ophthalmology, Changhai Hospital of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. linliu@sh163.net

Received:2014-08-27 Accepted:2015-02-11

Abstract

• **AIM:** To study the effect of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) and chondroitinaseABC (ChABC) on photoreceptor apoptosis in the retina of sodium iodate-induced rats.

• **METHODS:** Forty Sprague Dawley rats (SD rats) were intraperitoneally injected with NaIO₃ (30g/L, 100mg/kg) to establish the retinal degeneration models (postnatal 28d). These rats were divided into 4 groups. Group A was not injected, group B was injected with BMSCs, group C was injected with BMSCs and ChABC, and group D was injected with phosphate buffer saline (PBS). After 28d, subretinal injection were applied. Hematoxylin - eosin staining (HE), tunel and immunohistochemistry were performed at 21d after subretinal injection.

• **RESULTS:** Photoreceptor number and photoreceptor apoptosis rate of B and C groups were more than those of A and D groups, and there was significant difference statistically ($P < 0.05$). Photoreceptor number and

photoreceptor apoptosis rate of group B were compared with those of group C, and there was no statistical significance between B and C groups ($P > 0.05$). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) was expressed by BMSCs after intraocular injection.

• **CONCLUSION:** BMSCs and ChABC injected into subretinal space may alleviate photoreceptor apoptosis so as to protect retinal photoreceptor cells in degenerated rats.

• **KEYWORDS:** bone mesenchymal stem cells; chondroitinaseABC; retinal degeneration; apoptosis

Citation: Zheng XR, Liu L, Gao PF. Bone mesenchymal stem cells and chondroitinaseABC on photoreceptor apoptosis in degenerated retina of rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015; 15(3):407-410

摘要

目的:研究骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)联合硫酸软骨素酶(chondroitinaseABC, ChABC)行视网膜下腔注射对碘酸钠诱导的视网膜变性大鼠光感受器细胞凋亡的影响。

方法:选取40只SD大鼠行腹腔注射碘酸钠(NaIO₃, 30g/L, 100mg/kg)造视网膜变性模型,分为A组不干预组, B组BMSCs注射组, C组BMSCs+ChABC注射组, D组PBS注射组。造模后28d将ChABC处理或未处理的BMSCs注射入大鼠视网膜下腔,对照组注射PBS液, 21d后处死大鼠并取出眼球,行视网膜HE染色、视网膜细胞凋亡及免疫组化检测。

结果:B组凋亡率、外核层细胞数与A组、D组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。C组凋亡率、外核层细胞数与A组、D组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。B组凋亡率、外核层细胞数与C组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。免疫组化显示BMSCs在眼内表达GFAP抗原。

结论:BMSCs联合ChABC行视网膜下腔注射可缓解视网膜变性大鼠光感受器细胞的凋亡,延缓细胞数目的减少,从而保护视网膜光感受器细胞。

关键词:骨髓间充质干细胞;硫酸软骨素酶;视网膜变性;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.3.07

引用:郑祥榕,柳林,高朋芬. BMSCs联合ChABC对视网膜变性大鼠光感受器细胞凋亡的影响. 国际眼科杂志 2015; 15(3): 407-410

0 引言

视网膜变性是一类难治性疾病,其中最常见的是视网膜色素变性(retinitis pigmentosa, RP)。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)因其具有取材容易,无伦理限制,有多向分化潜能等特点成为近年研究的热点。已证实, BMSCs在体外可分化为视网膜神经细胞^[1],眼内注射可以延缓RCS鼠光感受器变性的过程^[2],可抑制青光眼大鼠神经节细胞的凋亡^[3],因而近年来成为干细胞移植治疗视网膜变性的一种重要的细胞来源^[4]。相关研究已证实,硫酸软骨素酶(chondroitinase ABC, ChABC)玻璃体腔注射可缓解视网膜变性大鼠光感受器细胞的凋亡^[5]。本实验旨在研究BMSCs联合ChABC视网膜下腔注射对于视网膜变性大鼠光感受器细胞凋亡的影响,寻找提高BMSCs缓解视网膜变性功效的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂 NaIO₃(上海生工生物技术服务有限公司), ChABC酶(美国Sigma公司), 溴脱氧尿嘧啶BrdU(SIGMA), 小鼠抗溴脱氧尿嘧啶BrdU单克隆抗体(SIGMA), 小鼠抗GFAP单克隆抗体(SIGMA), CO₂细胞培养箱(NAPCO), 原位凋亡检测试剂(瑞士Roche公司), 8-0可吸收缝线(美国强生公司), 5μL微量进样器(北京鼎国生物技术公司)。

1.1.2 实验动物及分组 BMSCs培养采用健康成年SD雄性大鼠2只,验证NaIO₃注射造RP模型采用健康清洁级SD大鼠15只,造RP模型并纳入试验采用健康清洁级SD大鼠40只(上海斯莱克实验动物有限责任公司提供),4周龄,体质量约150~200g。将40只SD大鼠随机分为4组, A组不干预组, B组BMSCs移植组, C组BMSCs+ChABC酶移植组, D组PBS注射组, 每组各10只大鼠。饲养条件遵照视觉与眼科学研究协会(ARVO)关于眼科和视觉研究饲养和使用动物的标准^[6], 动物饲养于50 lm、12h明/12h暗循环光照的动物房内, 给予适量食物和饮水。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型的制备 15只SD大鼠腹腔注射新配制的30g/L NaIO₃溶液(按100mg/kg的注射剂量), 通过NaIO₃特异性地破坏RPE细胞, 建立视网膜变性模型^[7], 分别于注射后7, 14, 28d过量麻醉处死5只, 行病理学切片, 观察视网膜形态验证造模情况。造模成功后, 另对40只SD大鼠腹腔注射新配制的30g/L NaIO₃溶液(按100mg/kg的注射剂量)造实验模型。

1.2.2 大鼠BMSCs的分离、培养、鉴定和标记 取SD大鼠2只, 麻醉后, 无菌条件下取出大鼠双侧股骨、胫骨, 用PBS液反复冲洗骨髓腔, 将冲洗液以1000r/min离心5min。弃去上清收集细胞, 加入含100g/L胎牛血清(Hyclone公司)的DMEM/F12培养基(Hyclone公司), 制成细胞悬液, 接种于培养瓶, 在37℃、体积分数50g/L的CO₂、饱和湿度条件的培养箱中培养, 24h后首次换液, 以后每3d换液1次, 原代细胞7~9d融合, 1:2或1:3传代。P3代BMSCs进行流式细胞仪检测, 细胞标志包括CD34, CD44, CD45, CD90。P3代BMSCs加入含BrdU(SIGMA公司)10μmol/L的DMEM培养液, 48h后行BMSCs细胞免疫化学鉴定。取细胞爬片, PBS冲洗3次, 40g/L多聚

甲醛固定15min, PBS洗3次, 滴加小鼠抗溴脱氧尿嘧啶BrdU单克隆抗体(1:200, SIGMA), 4℃孵育过夜, PBS洗3次, 滴加生物素化二抗工作液, 37℃孵育40min, PBS洗3次, Olympus显微镜拍照。

1.2.3 BrdU标记的BMSCs行视网膜下移植 100g/L水合氯醛(360mg/kg)腹腔注射麻醉, 复方托吡酰胺散瞳, 在手术显微镜下, 行前房穿刺放液降低眼压。利用北京鼎国生物技术公司5μL微量注射器, 前端连接拉细的硅胶毛细管, 以巩膜缝线为标记, 经右眼颞侧巩膜向视网膜下腔注射4μL细胞悬液或PBS液^[8](注射后眼底镜观察视网膜青灰色隆起)。B组BMSCs注射组注射的细胞浓度为2×10⁴/μL, C组BMSCs+ChABC酶注射组加入ChABC(0.01U/μL)^[8]后BMSCs浓度为2×10⁴/μL(注射ChABC的量为0.02U), D组鼠的视网膜下腔注入4μL PBS液作为阴性对照。

1.2.4 视网膜病理切片 视网膜下腔注射后21d将大鼠过量麻醉处死, 快速取眼球, 置于多聚甲醛中固定1h, 300g/L蔗糖溶液4℃过夜脱水, 沿巩膜缝线标志与视神经所成平面将眼球剖开, 行冰冻切片。HE染色, 镜下观察各组切片的视网膜变性情况, 取正常SD大鼠作为对照。同时计算外核层细胞数目, 方法为高倍镜下观察计数4个或5个100μm长度视网膜外核层细胞数目, 计算平均数。每次随机选取10个视野计数, 平行重复3次。

1.2.5 Tunel法检测视网膜细胞凋亡 眼球冰冻切片以5g/L胃蛋白酶消化30min, PBS冲洗, 加Tunel反应液50μL于孵育盒中37℃, 60min, PBS冲洗, 加50μL的碱性磷酸酶抗体, 孵育盒中37℃, 30min, PBS冲洗, 加BCIP/NBT, 室温下孵育30min, 冲洗, 核快红复染15min, 水性封片剂封片, 60℃烘干。结果判定: 凋亡细胞细胞核呈棕褐色, 普通光学显微镜随机选取10个高倍视野, 计算外核层凋亡细胞数, 并算出凋亡细胞数与外核层总细胞数的比值, 即凋亡率, 平行重复3次。

1.2.6 免疫组化检测 冰冻切片于室温下凉干, 加30g/L过氧化氢室温下孵育10min, 山羊血清封闭10min, 加50μL抗GFAP抗体(1:100), 室温下孵育60min。PBS冲洗3次, 加50μL即用型MaxVision™室温下孵育15min。PBS洗3次, 每次3min, DAB显色, 显微镜下观察。荧光显微镜下观察, 照相, 红色为阳性染色。观察BMSCs在视网膜上是否表达GFAP。

统计学分析: 数据以均数±标准差表示, 采用Excel统计学方法对数据进行统计学处理, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD法, α=0.05, P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模后大鼠视网膜形态 健康成年SD大鼠的视网膜结构清晰, RPE细胞, 视杆视锥层, 外核层及内核层各层均排列整齐。造模后SD大鼠视网膜HE染色发现RPE细胞变形、萎缩, 视杆视锥层出现空泡样改变, 结构紊乱, 外核层细胞呈波浪状改变, 见图1。

2.2 大鼠BMSCs的培养、鉴定和标记 BMSCs为梭形贴壁细胞(图2A)。流式细胞仪鉴定P3代后>95%的BMSCs的表面标志表达CD44、CD90, 不表达CD34、CD45等造血干细胞标志物。BrdU染色后行免疫细胞化学检测, 示细胞核呈棕黄色, 胞浆未着色, 未做标记的细胞不着色(图2B)。

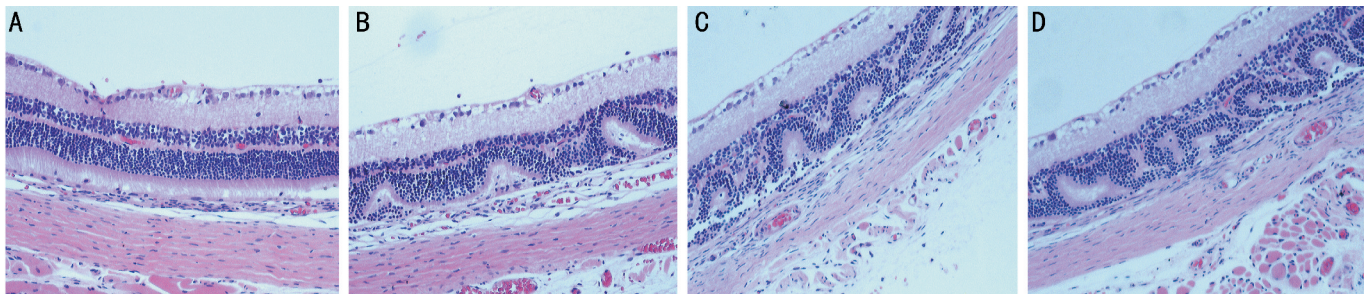


图1 视网膜(HE×10) A:正常视网膜;B:造模后7d;C:造模后14d;D:造模后28d。

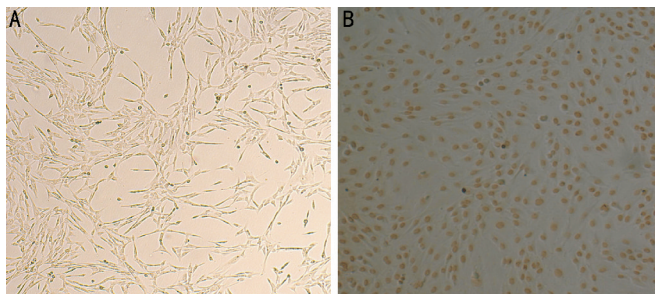


图2 大鼠BMSCs的培养、鉴定和标记 A:培养的BMSCs;B: BrdU免疫染色图。

2.3 视网膜下腔注射后动物观察 术后1d,30只鼠眼轻度结膜充血,2眼视网膜出血,2眼前房大量积血,予以剔除,余角膜透明,晶状体透明,无玻璃体积血,后极部视网膜轻度白色隆起。术后6~8d,所有眼结膜充血减轻,角膜、晶状体透明,局限性视网膜脱离已恢复。

2.4 视网膜外核层细胞计数 以巩膜缝线作为标记,移植部位附近的视网膜外核层细胞数分别为A组 83.9 ± 6.52 个/100 μm ,B组 104.8 ± 6.46 个/100 μm ,C组 110.3 ± 8.9 个/100 μm ,D组 92.6 ± 7.09 个/100 μm 。其中,B组与A组、D组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),C组外核层细胞数分别与A组、D组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。B组与C组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图3。

2.5 视网膜细胞凋亡检测 视网膜细胞凋亡检测显示,凋亡细胞以外核层为主(图4),各组凋亡率分别为A组不干预组(45.5±3.87)%、B组BMSCs注射组(37.4±3.95)%、C组BMSCs+ChABC酶注射组(35.3±3.43)%、D组PBS注射组(43.3±2.45)%。B组与A组、D组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。C组与A组、D组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。B组与C组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图5。

2.6 免疫组化检测 视网膜下腔注射BMSCs 21d后,免疫组化检测发现B、C组切片中迁移至视网膜外核层的BMSCs在眼内表达GFAP(图6)。

3 讨论

视网膜色素变性的动物模型有自然模型和人工模型。碘酸钠是一种无机氧化剂,大剂量碘酸钠(100mg/kg)体内注射6h后出现RPE坏死,24h后出现外核层细胞出现凋亡^[7]。本实验的视网膜病理切片显示,腹腔注射碘酸钠后RPE细胞变形、萎缩,视杆视锥层出现空泡样改变,结构紊乱,外核层细胞呈波浪状改变,符合视网膜变性的形态改变^[7]。由于碘酸钠注射造动物模型容易通过控制剂量

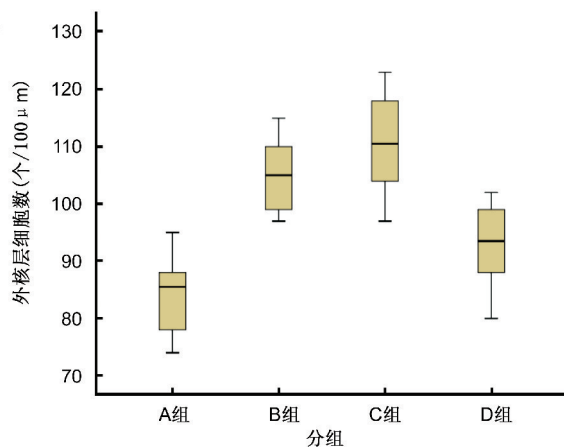


图3 BMSCs注射后21d各组每100 μm 视网膜外核层细胞数目 A组:不干预组;B组:BMSCs注射组;C组:BMSCs+ChABC酶注射组;D组:PBS注射组。

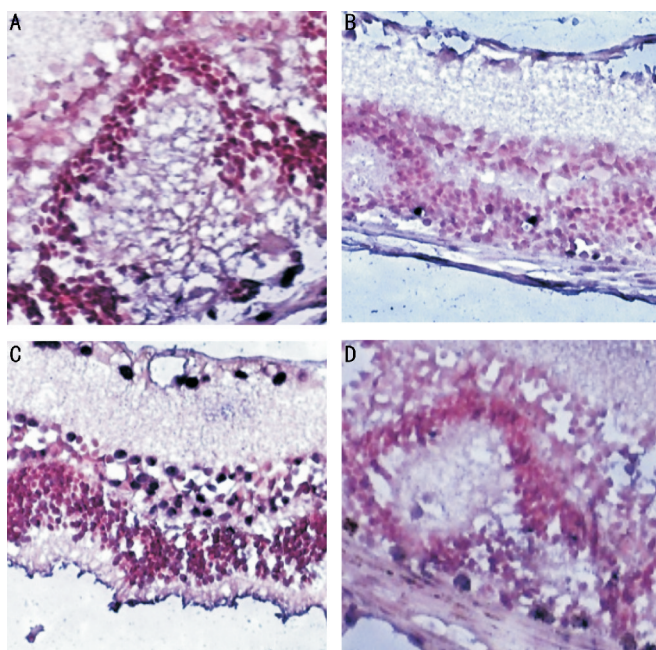


图4 视网膜细胞凋亡图(×20) A:不干预组;B:BMSCs注射组;C:BMSCs+ChABC酶注射组;D:PBS注射组。

和时间来改变视网膜变性的程度,也适用于大中小型动物,因此我们应用碘酸钠诱导的视网膜变性大鼠作为本实验的动物模型。

将视网膜变性的果蝇和具有凋亡抑制基因(p35)的果蝇杂交,结果发现杂交后的果蝇不发生视网膜变性,从而证实了视网膜变性疾病中RPE细胞和感光细胞的死亡主要通过凋亡的形式来完成^[10]。视网膜变性时发生了神

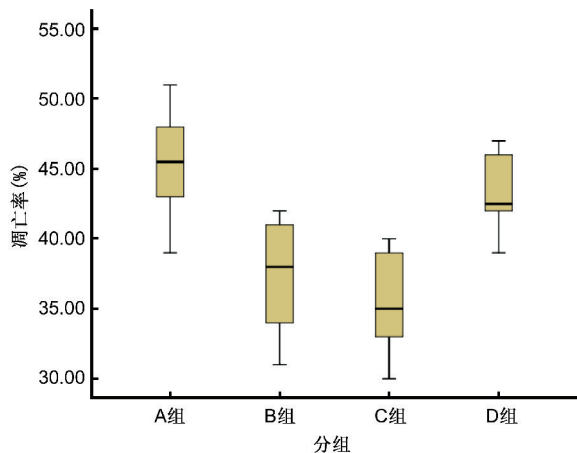


图5 各组凋亡率 A组: 不干预组(45.5±3.87)% ; B组: BMSCs 注射组(37.4±3.95)% ; C组: BMSCs+ChABC 酶注射组(35.3±3.43)% ; D组: PBS 注射组(43.3±2.45)%。

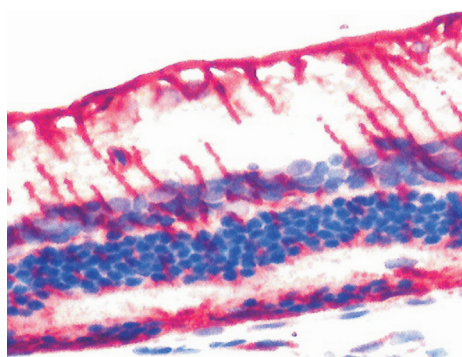


图6 BMSCs 移植 21d 后免疫组化检测。

经胶质激活和神经胶质瘢痕形成的过程^[11], 硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)是神经胶质瘢痕中的一种重要成分,对神经轴突生长起抑制作用^[9,12]。本课题前半部分已证实,NaIO₃诱导的视网膜变性大鼠视网膜上存在异常沉积的CSPGs,而玻璃体腔注射ChABC酶可有效降解视网膜上的CSPGs,缓解视网膜细胞的凋亡^[5]。已有实验表明,BMSCs注射至RCS鼠视网膜下腔可以延缓其光感受器细胞的变性^[3],能否进一步提高BMSCs缓解视网膜变性的功效呢?我们考虑BMSCs联合硫酸软骨素酶(ChABC酶)行眼内注射。本实验在眼内注射后21d应用Tunel法观察到,视网膜变性时细胞凋亡主要发生在外核层,B组BMSCs注射组和C组BMSCs+ChABC注射组外核层细胞凋亡率比A组和D组有显著性下降,B组及C组的外核层细胞数目多于A组及D组,说明BMSCs联合ChABC行视网膜下腔注射可缓解视网膜变性大鼠光感受器细胞的凋亡,延缓细胞数目的减少,从而在一定程度上起到保护光感受器的作用。但同时也发现,B组和C组的外核层细胞凋亡率无显著性差异,提示BMSCs联合ChABC注射虽然能够减轻外核层细胞的凋亡,但浓度为0.01U/μL的ChABC不能对BMSCs起到协同增强作用。其原因可能是ChABC酶浓度太小或在视网膜下腔降解太快,可以考虑调整ChABC酶的浓度或者设计理想的持续给药的方式,以探寻提高BMSCs缓解视网膜变性功效的方法。

已证实BMSCs能分泌多种营养因子,包括脑源性神经营养因子(BDNF)、成纤维母细胞生长因子(bFGF)、神经生长因子(NGF)等^[13],从而促进神经细胞的存活。对于本实验外核层细胞凋亡率下降的原因,我们推测与BMSCs分泌的神经营养因子有关^[14],可在今后的进一步实验中检测这些神经营养因子加以验证。

Tomita等^[15]将BMSCs移植入视网膜损伤大鼠的玻璃体腔,发现BMSCs表达星形胶质细胞的表面抗原GFAP和光感受器细胞的表面抗原rhodopsin。本实验也发现BMSCs在眼内具有分化潜能,能够表达GFAP,提示BMSCs在视网膜变性的微环境中可向神经胶质细胞方向分化。至于BMSCs在眼内保持分化潜能的时间能持续多久,能否在功能上对视网膜起到修复作用,须进一步摸索。

综上所述,BMSCs联合ChABC行视网膜下腔注射可缓解视网膜变性大鼠光感受器细胞的凋亡,延缓细胞数目的减少,从而保护视网膜光感受器细胞。

参考文献

- 1 Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Neuro Sci Res* 2000; 61(4):364-370
- 2 Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2007;85(2):234-241
- 3 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
- 4 Bertolotti E, Neri A, Campanini M, et al. Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation. *Prog Retin Eye Res* 2014;42:130-144
- 5 黄玉苗,高朋芬,杨丽霞. 硫酸软骨素蛋白多糖在视网膜变性动物模型中表达的研究. *中华眼视光与视觉科学杂志* 2012;14(5):300-304
- 6 Rusche B. The 3Rs and animal welfare—conflict or the way forward? *Altex* 2003;20(Suppl 1):63-76
- 7 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
- 8 唐仕波,罗艳,李加青,等. 经巩膜外路至视网膜下腔移植视网膜细胞的实验研究. *中华眼科杂志* 2003;39(10):610-615
- 9 Sinqhal S, Lawrence JM, Bhatia B, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans and microglia prevent migration and integration of grafted Müller stem cells into degenerating retina. *Stem Cells* 2008;26(4):1074-1082
- 10 Jacobson MD. Anti-apoptosis therapy: a way of treating neural degeneration. *Curr Biol* 1998;8(12):418-421
- 11 Roque RS, Imperial CJ, Caldwell RB. Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(1):196-203
- 12 Selle's-Navarro I, Ellezam B, Fajardo R, et al. Retinal ganglion cell and nonneuronal cell responses to a microcrush lesion of adult rat optic nerve. *Exp Neurol* 2001;167(2):282-289
- 13 Chen Q, Long Y, Yuan X, et al. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *Neurosci Res* 2005;80(5):611-619
- 14 He Y, Zhang Y, Liu X, et al. Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa. *Int J Mol Sci* 2014;15(8):14456-14474
- 15 Tomita M, Adaehi 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