

骨髓间充质干细胞在视网膜移植领域的研究进展

徐志刚, 吕淑慧, 穆敬中, 张雪岩, 齐艳秀, 朱金玲

基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No. 12521530)
作者单位: (154002) 中国黑龙江省佳木斯市, 佳木斯大学附属第一医院眼科

作者简介: 徐志刚, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 眼底病学。

通讯作者: 徐志刚. Xuzhigang1977@163.com

收稿日期: 2012-10-16 修回日期: 2012-12-17

Research progress of bone marrow mesenchymal stem cells applied to the retina transplantation photoreceptor-like cell

Zhi-Gang Xu, Shu-Hui Lü, Jing-Zhong Mu, Xue-Yan Zhang, Yan-Xiu Qi, Jin-Ling Zhu

Foundation item: Science and Technology Project of Education Department of Heilongjiang Province, China (No. 12521530)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jia Mu Si University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Zhi-Gang Xu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jia Mu Si University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China. Xuzhigang1977@163.com

Received: 2012-10-16 Accepted: 2012-12-17

Abstract

• Nowadays, treatments for retinal degenerative diseases mainly stay in supportive treatments such as improve circulation, nourishing nerve in the clinical. It still lacks effective treatment. As bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) have high expansion potential and autologous immunological characteristics, people have tried various ways of isolation, induction, transplantation and so on, with a purpose to transform BMSCs to retinal nerve cells, and ultimately make cell-replaced therapy available. We reviewed the current literature for trials and case reports on retina transplantation of BMSCs, to provide help for the further research.

• KEYWORDS: bone marrow mesenchymal stem cells; retinal nerve-like cells; photoreceptor-like cell

Citation: Xu ZG, Lü SH, Mu JZ, et al. Research progress of bone marrow mesenchymal stem cells applied to the retina transplantation photoreceptor-like cell. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(1):79-81

摘要

临床上对于视网膜退行性疾病的治疗仍然只停留在改善循环、营养神经等支持治疗阶段, 缺少特效的治疗方法, 骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是具有较强自我复制功能和多向分化潜能的一类细胞, 人们开始通过尝试不同的分离、诱导、移植等手段, 以实现其向

视网膜细胞的转化, 并最终实现体内的替代治疗。我们就BMSCs在视网膜移植领域的研究进展进行综述, 以为进一步的研究提供参考。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 视网膜神经样细胞; 光感受器样细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.19

引用: 徐志刚, 吕淑慧, 穆敬中, 等. 骨髓间充质干细胞在视网膜移植领域的研究进展. *国际眼科杂志* 2013;13(1):79-81

0 引言

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)作为干细胞家族的成员之一已广泛应用于眼科学视网膜移植领域。近年来许多研究表明, BMSCs在体内外适宜的条件下可分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌腱、肌肉细胞、神经细胞等多种细胞或具有相应细胞特异性标志的细胞, 移植入体内相应组织不仅可以存活, 而且可以改善、修复甚至替代自身原有细胞而行使功能^[1]。近几年, 眼科学者们开始尝试将BMSCs转化为视网膜细胞以达到修复和治疗的目的。目前对于BMSCs视网膜移植领域研究的焦点主要存在于分离、培养、鉴定以及其诱导分化潜能等方面。

1 BMSCs 视网膜移植领域研究概况

1.1 研究意义 干细胞是一类具有自我更新能力和多向分化潜能的细胞, 随着细胞生物学和基因工程的发展, 人们对于干细胞的研究现已日趋白热化并取得了突破性的进展。干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞两大类。胚胎干细胞可以向内、中、外三个胚层的各种细胞和组织分化, 但移植后的排斥反应和伦理问题使胚胎干细胞的应用受到限制。相反, 成体干细胞则不存在伦理问题, 同时又具备了多向分化潜能, 现已成为细胞和基因治疗等方面研究的新方向。存在于骨髓中的间充质干细胞是成体干细胞的一种, 在不同诱导环境下它可分化成骨细胞、软骨细胞、肌细胞等源于中胚层的间质细胞, 因而称这种细胞为间充质干细胞。BMSCs有无限或较长期的自我扩增能力, Deans等^[2]发现, BMSCs可以传至40代而分化能力并无明显改变。由于BMSCs不存在伦理问题, 免疫排斥反应亦较弱, 因此更易被临床实验研究所接受。

1.2 分离纯化 BMSCs在成人骨髓中密度较低, 平均每10万个有核细胞中存在一个BMSCs, 随着年龄增大, 细胞数量还会逐渐减少, 而且在生理状态约20%为静止期细胞^[3], 直到1968年Fridenstein等^[4]才首先发现骨髓中存在一种细胞能够贴附培养皿, 形态呈纺锤形、成纤维细胞样, 培养时能形成克隆集落单位, 并发现其有分化潜能, 这种细胞即BMSCs。对于如何分离出纯度较高的BMSCs至今仍找不到较有效方法, 目前从骨髓中分离BMSCs的方法主要有: (1) 贴壁筛选法: 该筛选法借鉴于Fridenstein的实验方法, 根据BMSCs在培养皿中贴壁生长而造血细胞易悬浮生长的特点进行分离。但所得BMSCs纯度差, 反复换液传代, 其纯度方可达95%左右^[5,6], 值得注意的是,

反复换液传代后的 BMSCs 仍能保持多向分化的潜能,未发现自然分化,且增加换液的频率可以提高 BMSCs 增殖的速度。该方法操作简单,无需特殊的仪器,对细胞干扰较小,不易污染而且经济实用,过往许多研究证明效果良好。(2)密度梯度离心法:此方法是在贴壁筛选法的基础上根据 BMSCs 与其他细胞密度、沉降率不同的原理,将其置于某一梯度的分离液试管中离心,吸取上层的单个核的细胞层,用 PBS 液洗涤 2 遍,细胞计数板计数,用 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液调整浓度,以一定密度接种于塑料平皿中培养传代即得^[7]。此方法不仅利用了贴壁培养,而且反复换液,有效地将绝大部分红细胞、粒细胞、脂肪细胞和血小板除去,获得 BMSCs 纯度相对较高。(3)免疫磁珠分选法(MACS):用免疫磁珠做细胞分选法的原理是用已包被二抗的免疫磁珠从骨髓基质中分离出 BMSCs。Encina 等^[8]用 STRO-1 抗体包被的免疫磁珠从人骨髓中分离出 BMSCs 培养,其中 98% 的 BMSCs 分化为骨细胞。免疫磁珠分选法是一种简便高效的方法,但需要特殊的设备,如磁分离器等,价格不菲,而且对细胞活力也有一定影响。(4)流式细胞仪分选法:根据细胞大小不同或者根据细胞表面的一些特殊标志来分离。Van Vlasselaer 等^[9]用流式细胞仪分选法分离出了 BMSCs。Kicic 等^[10]将荧光标记的 CD90 单克隆体作用后,经流式细胞仪分离,可得到高纯度的 CD90 单阳性的 BMSCs,分离后的 BMSCs 具有多向分化潜能。流式细胞分选法需要流式细胞仪,需要用于筛选的多种相关抗体,且要能够分离到一定数量的、无污染的、具有扩增能力的 BMSCs 细胞,难度很大。

1.3 鉴定 目前,对 BMSCs 的鉴定尚未找到理想的特异性表面标记和方法,许多研究仍处于摸索阶段。BMSCs 表达 SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 等表面蛋白及高端酯酶活性,不表达如 II, III 型胶原、骨桥蛋白等分化相关标志;白细胞共同抗原 CD45, MHC II 类分子;也不表达 B7-1, B7-2 分子;同时 e-kit 和 Sea-1 标记阳性;CD1a, CD31, CD34, CD14, CD45, CD56, EsA 标记阴性^[11,12]。由于在骨髓贴壁细胞中造血细胞及成纤维细胞最为常见,因此常常选择代表这两类细胞的抗原进行检测。现在 BMSCs 鉴定的方法大多是通过排除法进而推断,如应用流式细胞仪鉴定常用的 BMSCs 标记物:CD90(+), CD31 和 CD45(-),许多研究表明此方法分离得到的 BMSCs 细胞纯度普遍达 93% 以上^[4,13]。

1.4 标记 BMSCs 本身没有特异的检测指标,为了方便移植后追踪记录,常常需要对 BMSCs 进行标记。目前常用的标记方法主要有三种:(1)BrdU 法:BrdU 是胸腺嘧啶类似物,用 BrdU 与 BMSCs 一起孵育,BrdU 就可以取代胸腺嘧啶而整合入 BMSCs 的 DNA 之中,被 BrdU 标记的 BMSCs 细胞核被染色或发荧光,用免疫荧光或免疫组化法即可检测^[14]。(2)DAPI 探针法:DAPI 即 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole),是一种能够与 DNA 强力结合的荧光染料,DAPI 探针法是将 BMSCs 与荧光染料一起孵育后,这样 BMSCs 就具有了荧光标记,移植后在荧光显微镜下即可直接进行观察^[15]。(3)GFP 转基因法:GFP 是一种现成的发绿色荧光的蛋白质,因此使用特别容易,它的发现使定量研究活细胞的动态过程成为可能。GFP 转基因法是近年新兴的细胞示踪技术,因其较好的操作性和实用性而被广泛应用,此方法是用 GFP 转染 BMSCs 细胞,使 BMSCs 具有了绿色荧光的特性,移植后能在荧光显微镜下进行观察^[16]。

前两种标记方法通过 DAPI 和 BrdU 的掺入而使 BMSCs 具有了新的遗传标志,有一定的实用性,但也存在如下弊端:如高浓度的 BrdU 有细胞毒性,一般应将浓度控制在 40pg/mL 以下^[17]。另外细胞内的标记物含量随着 DNA 的半保留复制,一次次被平分到子代细胞中,导致标记物的荧光强度也逐渐减弱,最终就很难被检测出,无法满足长期实验的需要。用免疫组织化学法分析 BrdU 标记的细胞也较复杂;相比之下,GFP 作为一种具有自发荧光的小分子蛋白,具有易于检测、特异性强、可以实现活细胞观察等优势。而且整合到被标记细胞的染色体中的 GFP 基因可稳定表达,不会减弱子代细胞标记效果,实现细胞的长时效标记,同时避免所使用的 BrdU、荧光染料等标记物标记过程的各种处理步骤影响细胞的活性。

1.5 诱导 现在眼科学领域研究较多的是诱导 BMSCs 分化为视网膜神经细胞,许多学者^[6,7,10]将未诱导 BMSCs 直接移植至视网膜受损大鼠的视网膜下腔,可以观察到 BMSCs 在视网膜下腔存活、迁移并整合到宿主视网膜,移植后宿主视网膜功能得到一定改善,因此人们设想视网膜微环境内可能存在促进 BMSCs 分化的细胞因子和细胞外基质成分。由于直接注入到体内能够分化的 BMSCs 比例较低,迁移能力不强,许多研究开始尝试模拟视网膜的微环境先进行诱导以获得较高比例的、功能性更好的目标细胞,然后再进行体内植入。现在的方法主要有两种:(1)共培养方法:有学者^[15]将人 BMSCs 与视网膜色素上皮细胞共培养,21d 后 BMSCs opsin 表达阳性,表明 BMSCs 发生了分化。此外,有学者^[18]还将 BMSCs 与新生乳鼠视网膜细胞在体外共培养,结果显示 BMSCs 可向视网膜神经元特异的细胞分化。总之,BMSCs 在一定的微环境下,可以分化为具有视网膜神经细胞特异性标记物的细胞。(2)细胞因子化学性诱导的方法:目前发现的参与干细胞趋化、迁移及分化相关的细胞因子有 GM-CSF, G-CSF, M-CSF, aFGF, bFGF, IGF, CNTF, BDNF 和 β 型转化生长因子等^[19]。Sanchez-Ramos 等^[20]用神经营养因子 5 及 RTRA 为诱导剂诱导实现了 BMSCs 的诱导分化。Woodbury 等^[21]以 bFGF, DOSO, BHA 为诱导剂,将成年大鼠和成人的骨髓基质细胞在体外培养传代后可实现其定向诱导。Sekiya 等^[22]在培养基中添加 BMP-6 (bone morphogenetic protein-6) 增强了人 BMSCs 分化成软骨的分化能力。

1.6 移植途径 目前较多用的移植方法有两种:一种是经巩膜、脉络膜将移植植物植入视网膜下腔^[23],由于此方法不经玻璃体,因此可避免玻璃体损伤而引起增殖性玻璃体视网膜病变,但术中须切断直肌附着点,损伤较大,出血较多。第二种是指经角膜或睫状体平坦部切口入路,刺穿神经视网膜,植入移植植物^[24],此法精确可靠,但也有引起增殖性玻璃体视网膜病变的可能性。有些学者因此而同时实行玻璃体切除术。

1.7 移植后的分布和存活及分化情况 2002 年 Otani 等^[25]首次发表了 BMSCs 在眼科学领域的文章,他们用小鼠骨髓的内皮祖细胞注入小鼠玻璃体内,内皮祖细胞是 BMSCs 的一个亚群,注入后不仅能参与小鼠眼内视网膜血管的形成,而且能保护视网膜色素变性模型小鼠的视网膜血管,促进血管的发育。张杰等^[26,27]将 BMSCs 移植至成年正常 Wistar 大鼠的视网膜下腔,发现主要分布在视网膜色素上皮层、视细胞层、双极细胞层及节细胞层。随后他们将 BMSCs 移植入激光致视网膜损伤的大鼠眼内,移植细胞可在视网膜存活并逐渐从损伤部位向周围扩展,分布的部位与正常大鼠相同。Tomita 等^[28]发现 BMSCs 移植到视网

膜局部受损的大鼠玻璃体腔后,能够迁延至损伤处视网膜的外核层,并同时表达星形胶质细胞的表面抗原神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)以及视网膜光感受器细胞的标志物表面抗原视紫红质(rhodopsin)。Morrison等^[29]也发现,将BMSCs移植到RCS鼠的视网膜下腔后,可表达rhodopsin。Schraermeyer等^[30]将ESCs移植至RCS(Royal College of Surgeons)大鼠的视网膜下腔,结果发现未进行ESCs移植的对照组视网膜外核层细胞发生变性而ESCs移植组外核层仍保留8排左右细胞,说明移植的BESCs能延缓视网膜细胞的变性。Kicic等^[10]发现大鼠BMSCs与含有表皮生长因子(EGF)、牛磺酸(Taurine)或活化素A(activinA)的培养基一起孵育,20%~32%的BMSCs可表达rhodopsin,随后将孵育后的BMSCs移植到RCS鼠视网膜下腔,2wk后观察BMSCs主要位于视网膜的外核层并可表达rhodopsin,进一步研究表明分化后的细胞能吸引突触泡,说明其可能改善信号传导,而且对移植后的视网膜损伤大鼠进行ERG检查,示ERG b波有显著改善。诸多实验研究表明,BMSCs在体内体外具有向视网膜细胞分化的可能性,并有可能进一步参与信号传导,改善视网膜功能。

2 展望

基因工程细胞替代治疗和基因治疗已成为眼科学领域新的研究方向,BMSCs因取材容易、易于体外培养扩增、扩增后仍保持多向分化潜能、移植后排斥反应较弱等特点而逐渐被重视。但对BMSCs的争论也一直没停止过,至今对于分化后的细胞大多数只停留在标志物的检测,而对其在移植组织内的生理功能及与周围细胞的信号联系等鲜有报道。另外,有学者在分离BMSCs时同时分离出了一种更原始的多能成体祖细胞(multipotent adult progenitor cell, MAPC)^[31],MAPC功能与BMSCs相似,甚至可分化为BMSCs、上皮、血细胞等多种细胞。而BMSCs的多向分化性是来自于其本身还是来自于MAPC,以及二者是否有联系尚需进一步研究。

参考文献

- 张纯. 干细胞治疗青光眼患者有多远?——十年干细胞研究的回顾. *眼科* 2009;18:10-13
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-884
- Halleux C, Sottile V, Gasser JA, et al. Multilineage potential of human mesenchymal stem cells following clonal expansion. *Musculoskel Neuron Interact* 2001;2(1):71-76
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-247
- Hu BY, Weick JP, Yu J, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;9:4335-4340
- Francis PJ, Wang S, Zhang Y, et al. Subretinal transplantation of forebrain progenitor cells in nonhuman primates: survival and intact retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3425-3431
- 安刚,路璐,许苑,等. 体外诱导人骨髓间充质干细胞向色素上皮样细胞分化的研究. *眼科新进展* 2009;7:299-300
- Encina NR, Billotte WQ, Hofmann MC. Immunomagnetic isolation of osteoprogenitors from human bone marrow stroma. *Lab Invest* 1999;79(4):449-457
- Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H. Characterization and purification of Osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-sea-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood*

- 1994;84(3):753-763
- 10 Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci* 2003;23(21):7742-7749
- 11 Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Comparison of Rabbit Corneal Endothelial Cell Precursors in the Central and Peripheral Cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3645-3648
- 12 Whitehart DR, Parikh CH, Vaughn AV, et al. Evidence suggesting the existence of stem cells for the human corneal endothelium. *Mol Vis* 2005;11:816-824
- 13 Zhang M, Song T, Yang L, et al. Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patient. *J Exp Clin Cancer Res* 2008;27(1):85
- 14 Hendrickson ML, Rao AJ, Demerdash ON, et al. Expression of nestin by neural cells in the adult rat and human brain. *PLoS One* 2011;6(4):e18535
- 15 Burtelow MA, Longacre TA. Utility of microtubule associated protein-2 (MAP-2) immunohistochemistry for identification of ganglion cells in paraffin-embedded rectal suction biopsies. *Am J Surg Pathol* 2009;33(7):1025-1030
- 16 Tan XF, Qin JB, Jin GH, et al. Effects of Brn-4 on the neuronal differentiation of neural stem cells derived from rat midbrain. *Cell Biol Int* 2010;34(9):877-882
- 17 Jung JU, Ko K, Lee DH, et al. The roles of glycosphingolipids in the proliferation and neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Exp Mol Med* 2009;41(12):935-945
- 18 Johnson J, Wu V, Donovan M, et al. Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *PNAS* 2010;107(4):17374-17378
- 19 国海东,谭玉珍,王海杰. 细胞因子在干细胞移植存活与分化中的作用. *国际心血管病杂志* 2007;34:23-26
- 20 Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164(2):247-256
- 21 Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-370
- 22 Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284(2):411-418
- 23 Schraermeyer U, Thumann G, Luther T, et al. Subretinally transplanted embryonic stem cells from degeneration in the RCS rats. *Cell Transplant* 2001;10(8):673-680
- 24 Zhao X, Liu JN, Ahmad I. Differentiation of embryonic stem cells into retinal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297(2):177-184
- 25 Otani A, Kinder K, Ewalt K, et al. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med* 2002;8(9):1004-1010
- 26 张杰,单清,马萍,等. 大鼠骨髓间充质干细胞视网膜下移植观察. *眼科新进展* 2003;23:82-85
- 27 张杰,单清,马萍,等. 骨髓间充质干细胞在激光损伤大鼠视网膜下分化的观察. *中华医学杂志* 2003;83(22):1993-1998
- 28 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
- 29 Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287-298
- 30 Schraermeyer U, Thumann G, Luther T, et al. Subretinally transplanted embryonic stem cells rescue photoreceptor cells from degeneration in the RCS rats. *Cell Transplant* 2001;10(8):673-680
- 31 Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30(8):896-904