

# 光损伤鼠视网膜片培养上清液诱导 MSCs 分化为视网膜样细胞的研究

白月, 徐国兴

基金项目:国家自然科学基金课题(No. 81070715);中国卫生部科研基金课题(No. WKJ2008-2-61);福建省创新平台基金课题(No. 2010Y2003)

作者单位:(350001)中国福建省福州市,福建医科大学附属第一医院 福建省眼科研究所

作者简介:白月,硕士,研究方向:晶状体与视网膜病。

通讯作者:徐国兴,教授,博士研究生导师,研究方向:晶状体与视网膜病。fjmuxgx@163.com

收稿日期:2013-11-18 修回日期:2014-01-28

## *In vitro* differentiation of MSCs into retina-like cells by the supernatant fluid of light-injured neurosensory retina

Yue Bai, Guo-Xing Xu

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (No. 81070715); Ministry of Health Research Projects Funded Project, China (No. WKJ2008-2-61); Innovative Platform Foundation of Fujian Province, China (No. 2010Y2003)

Fujian Institute of Ophthalmology; the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

**Correspondence to:** Guo-Xing Xu. Fujian Institute of Ophthalmology; the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. fjmuxgx@163.com

Received:2013-11-18 Accepted:2014-01-28

## Abstract

• **AIM:** To explore the possibility of inducing rat mesenchymal stem cells (MSCs) into retina-like cells by the supernatant fluid of light-injured neurosensory retina *in vitro*.

• **METHODS:** MSCs were isolated and attached to the wall of culture dishes by their specific adherent ability. Then the cells were characterized by flow cytometry. The neurosensory retina was isolated from retina of SD rat and it was tested by hematoxylin-eosin (HE) staining. The pathological changes of light-injured neurosensory retina was observed under transmission electron microscope. Three kinds of supernatant fluid of light-injured neurosensory retina of SD rats were prepared. The third passage of MSCs were cultured with these mixed medium for 7-8d, we used RT-PCR to see whether they could express rhodopsin, neuron-specific enolase (NSE), and glial fibrillary acidic protein (GFAP), and positive cells were counted and analyzed.

• **RESULTS:** HE staining showed the retinal sheets included full-thickness neural retina. Neurosensory retina

developed ultrastructural destructions by light injury. RT-PCR showed that the medium of mixed I expressed higher positive rate of rhodopsin ( $0.3915 \pm 0.00644$ ), NSE ( $0.2019 \pm 0.00682$ ), GFAP ( $0.1972 \pm 0.00211$ ) than the medium of mixed II rhodopsin ( $0.0983 \pm 0.00319$ ), NSE ( $0.1048 \pm 0.00323$ ), GFAP ( $0.1040 \pm 0.00254$ ) and medium of mixed III rhodopsin ( $0.0044 \pm 0.00126$ ), NSE ( $0.0498 \pm 0.00149$ ), GFAP ( $0.0467 \pm 0.00333$ ). The difference of intergroup has statistical significance.

• **CONCLUSION:** The supernatant fluid of light-injured neurosensory retina of SD rats can induce MSCs to differentiate into retina-like cells and provide new insights of stem cell therapy for retinopathy.

• **KEYWORDS:** mesenchymal stem cells; retina-like cells; light injury; differentiation

**Citation:** Bai Y, Xu GX. *In vitro* differentiation of MSCs into retina-like cells by the supernatant fluid of light-injured neurosensory retina. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(3):394-398

## 摘要

**目的:**应用大鼠视网膜片光损伤后的培养上清液,在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)成为视网膜样细胞的可能性。

**方法:**贴壁筛选法分离、培养大鼠 MSCs,流式细胞仪对其细胞纯度鉴定。取材大鼠视网膜神经上皮层作为视网膜片,常规石蜡切片 HE 染色鉴定各层组织完整性。电镜观察大鼠视网膜片光损伤程度。制备 3 种诱导分化大鼠 MSCs 的条件培养液。3 种条件培养液均培养诱导至第 3 代大鼠 MSCs 7~8d,用 RT-PCR 检测视紫红质(Rhodopsin)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)等视网膜细胞标志物在诱导后细胞中的表达情况。

**结果:**HE 染色显示大鼠视网膜片取材结构完整,电镜显示大鼠视网膜片光损伤后结构损伤严重。RT-PCR 鉴定:条件培养液诱导大鼠 MSCs 7~8d,条件培养液 I 组 Rhodopsin ( $0.3915 \pm 0.00644$ )、NSE ( $0.2019 \pm 0.00682$ )、GFAP ( $0.1972 \pm 0.00211$ ),条件培养液 II 组 Rhodopsin ( $0.0983 \pm 0.00319$ )、NSE ( $0.1048 \pm 0.00323$ )、GFAP ( $0.1040 \pm 0.00254$ ),条件培养液 III 组 Rhodopsin ( $0.0044 \pm 0.00126$ )、NSE ( $0.0498 \pm 0.00149$ )、GFAP ( $0.0467 \pm 0.00333$ ),组间差异有统计学意义。

**结论:**光损伤大鼠视网膜片培养上清液可诱导大鼠 MSCs 分化为视网膜样细胞,为干细胞治疗视网膜变性疾病提供新思路。

**关键词:** MSCs; 视网膜样细胞; 光损伤; 分化

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.03.04

引用:白月,徐国兴.光损伤鼠视网膜片培养上清液诱导 MSCs 分化为视网膜样细胞的研究.国际眼科杂志 2014;14(3):394-398

## 0 引言

视网膜视细胞具有感光作用,损伤后会导致多种引起视力障碍的视网膜疾病,因其无法再生修复,使得这些疾病缺乏有效的治疗。细胞移植治疗视网膜疾病的研究已有 20 余年历史,异体细胞由于排斥反应,自身细胞又因变性及功能减弱等,均不是理想的移植物,因此,非视网膜来源的,可替代视网膜细胞功能的自体细胞成为人们寻找的理想种子细胞。MSCs 具有自我更新和多向分化潜能,大量实验已经证明 MSCs 在体外特定的条件下可被诱导分化为神经细胞、骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞等<sup>[1,2]</sup>,视网膜光损伤的病理过程与视网膜色素变性有许多相似之处<sup>[3]</sup>,视网膜片光损伤后释放的因子组成的诱导液也是最接近视网膜变性修复时的微环境组成。不同的细胞有不同的免疫标志物,视网膜光感受器细胞有 Rhodopsin、Recoverin 蛋白等,视网膜神经节细胞有 Nestin、神经元特异性烯醇化酶(NSE)和神经丝蛋白,神经胶质细胞有胶质纤维酸性蛋白(GFAP)等。本实验采用 Rhodopsin、NSE、GFAP 的特征性标记检测在培养的 MSCs 的表达情况,探索体外将 MSCs 定向分化为视网膜样细胞的诱导条件,为干细胞治疗视网膜变性疾病提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验动物:清洁级健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,体质量 120 ~ 150g,雌雄不限,排除眼部各种疾病。主要仪器: AIR-TECH BCM-1000A 型生物洁净工作台; THERMO FORMA 3111 CO<sub>2</sub>培养箱; THERMO FORMA 925 超低温冰箱; MILLEX-GV 一次性滤器; MILLIPORE 超净水过滤器; OLYMPUS PMCB20 摄影器材; OLYMPUS BH-2 型光学显微镜; Gene Amp 9700 型 PCR 扩增仪; JY3000+型多用途电泳仪; 台式高速冷冻离心机; THERMO FORMA 微量移液器; 超级微量恒温器振荡仪(HW-8B 型); Bio-Rad 凝胶成像分析系统(Gel DOC2000); Bio-Rad 聚丙烯酰胺凝胶电泳装置; Bio-Rad 酶标仪; X 线片洗片机(Amersham 公司); 照度计 TES1330A。试剂: DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA(Gibco 公司)、胎牛血清、Neurobasal 培养基、B27 (Invitrogen 公司)、Trizol Reagent(美国 Fermentas 公司)、2× Taq PCR Master Mix(北京天为时代科技有限公司)、PCR 引物、PCR Marker、总抽提试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司)、琼脂糖胶(深圳晶美生物工程有限公司)、异丙醇、氯仿、乙醇等(国药集团化学试剂有限公司)。

**1.2 方法** (1)取材大鼠视网膜片:用显微剪剪除角膜、晶状体、玻璃体后,留有外层覆盖巩膜的视网膜杯(图 1A)。再用显微镊钝性分离出视网膜色素上皮层和视网膜神经上皮层,在视神经处剪断(图 1B),将神经上皮层作为视网膜片行常规石蜡切片 HE 染色(图 1C)及电镜观察(图 1D)。(2)在超净台内,50W,12V 的白光卤素灯作为光源,光照强度为 1950±200Lux,持续光照盛有 8mL Neurobasal 培养基 A(其中加入 1:50 的 B27 和 0.5mol/L L-glutamine)及视网膜片[显微镜下用眼科显微剪把完整的视网膜神经上皮层修剪成(1×1×1)mm<sup>3</sup>大小]的小培养皿 45min,光照后将放入 37℃、5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱继续培养 75min。

(3)大鼠视网膜片光损伤前后的电镜观察。(4)用光损伤大鼠视网膜片培养的上清液制备条件培养液:条件培养液 I:将大鼠视网膜片光损伤后的上清液与 10% FBS 的 LG-DMEM 以 2:3 混合而成。条件培养液 II:未光损伤大鼠视网膜片培养的上清液与 10% FBS 的 LG-DMEM 以 2:3 混合而成。条件培养液 III:直接用 Neurobasal 培养基 A(其中加入 1:50 的 B27 和 0.5mol/L L-glutamine)与 10% FBS 的 LG-DMEM 以 2:3 混合制成。(5)大鼠 MSCs 的分离和培养。(6)光损伤视网膜片培养上清液体外诱导大鼠 MSCs:取第 3 代 MSCs,24h 待 MSCs 贴壁后,弃培养液,将细胞分为 3 组:第 1 组换用条件培养液 I,第 2 组换用条件培养液 II,第三组换用条件培养液 III,每孔条件培养液均为 2mL,3 个组均在 37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱孵育。每 2d 换一次条件培养液,培养至第 7~8d 时停止。(7)大鼠 MSCs 诱导后 RT-PCR 检测:PBS 洗涤各组细胞,在培养瓶中加入 TrizolRNA 提取液,按说明书步骤提取总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒(两步法)操作,总反应体积为 20μL。β-Actin 的反应参数:3.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>,94℃ 预变性 2min,扩增 94℃ 15s,55℃ 30s,72℃ 30s,30 个循环,最终延伸 72℃ 7min; Rhodopsin 反应参数:3.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>,94℃ 预变性 2min,扩增 94℃ 15s,54℃ 30s,72℃ 30s,30 个循环,最终延伸 72℃ 7min; GFAP 反应参数:4.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>,94℃ 预变性 5min,扩增 94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 30s,30 个循环,最终延伸 72℃ 7min; NSE 反应参数:4.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>,94℃ 预变性 2min,扩增 94℃ 15s,54℃ 30s,72℃ 30s,30 个循环,最终延伸 72℃ 7min; PCR 产物均在 4℃ 冰箱保存。引物合成和设计见表 1。琼脂糖凝胶电泳配制 1.5% 琼脂糖凝胶,用 DL2000 Marker 作为分子量参照,分别取各 PCR 产物 5μL、β-Actin 5μL、DL2000Marker 5μL,100V 条件下电泳 30min,待 Marker 各条带分离良好时终止电泳,置凝胶于凝胶成像分析系统进行灰度扫描,Quantity one4.4.1 自动分析软件对条带进行灰度值的分析。

统计学分析:将 3 种培养条件下所表达的的目的基因进行半定量分析:目的基因的表达指数=目的基因条带的积分密度值/β-Actin 的吸光度(A)值,再分别计算两者比值。测量值均以均数±标准差,统计数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理。组间差异采用 ANOVA 分析。以 P<0.05 为差别有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 SD 大鼠视网膜片光损伤后的改变** 神经节细胞内线粒体肿胀,线粒体嵴消失(图 2A),内核层细胞染色质凝聚附于核膜周边(图 2B),感光细胞的胞核体积缩小而核染色质密度增高,外段肿胀成圆形,盘膜结构紊乱,叠状机构解离,膜间隙增大(图 2C),内节线粒体固缩和肿胀,空泡变性(图 2D)。

**2.2 SD 大鼠 MSCs 细胞形态学观察** 贴壁生长的 MSCs 开始呈大小均一的圆形,包膜清晰,胞体透亮(图 3A),5~7d 细胞呈梭形、多角形生长,增殖迅速(图 3B)。第 3 代 MSCs,贴壁细胞迅速增殖,融合,形成细胞克隆,旋涡状单层铺满整个培养皿(图 3C)。

**2.3 大鼠 MSCs 流式细胞术鉴定结果** 大鼠 MSCs 流式细胞术鉴定结果显示:培养的第 3 代 MSCs 干细胞表面标志



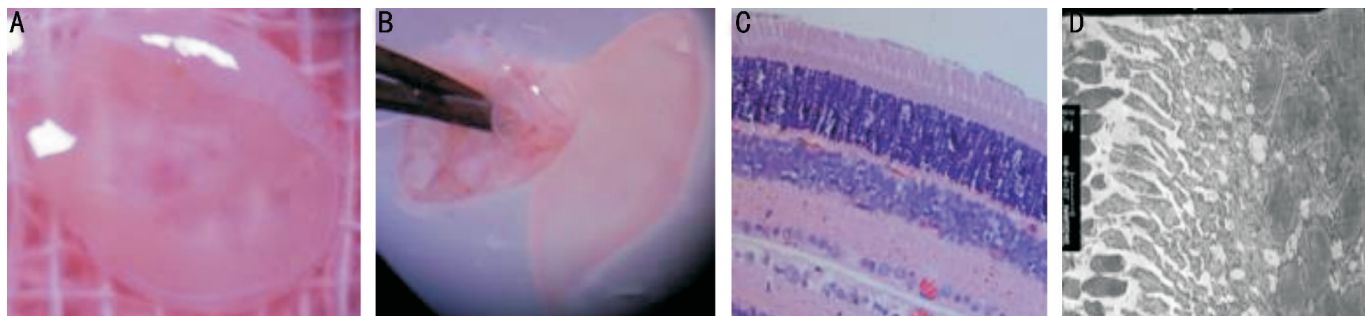


图1 A:外层覆盖巩膜的视网膜杯;B:分离出视网膜色素上皮层和视网膜神经上皮层;C:神经上皮层9层结构排列整齐,染色鲜艳( $\times 10$ );D:正常SD大鼠视网膜神经上皮层的超微结构( $\times 2500$ )。

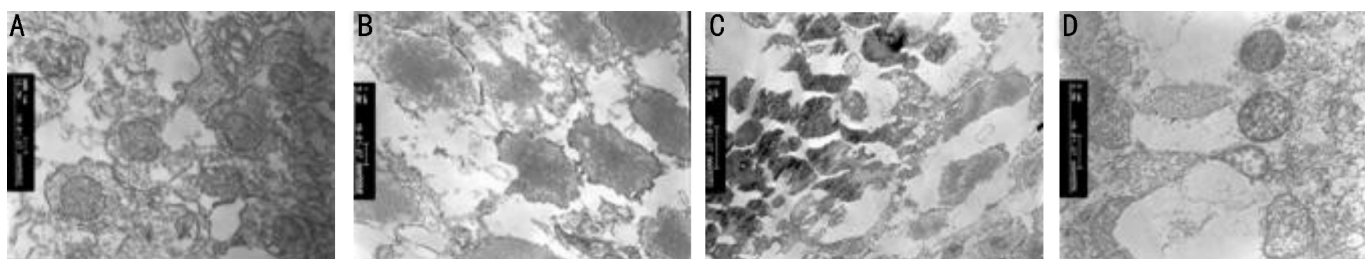


图2 光损伤后SD大鼠视网膜片出现显著改变 A: $\times 12500$ ;B: $\times 5000$ ;C: $\times 3150$ ;D: $\times 6300$ 。



图3 SD大鼠MSCs细胞形态学观察 A,B:原代SD大鼠MSCs( $\times 100$ );C:第3代SD大鼠MSCs( $\times 300$ )。

表1 引物合成和设计

基因	序列	大小(bp)	退火温度( $^{\circ}\text{C}$ )
$\beta$ -Actin	上游 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3'	240	55
	下游 3'-TGACACAACCGTATCTCCAGAAAT-5'		
Rhodopsin	上游 5'-ATGTTCTGTTCCACTTCA-3'	107	54
	下游 3'-CGTTGTCCTCAGCCGATG-5'		
NSE	上游 5'-CTGTGGTGGAGCAGGAGA-3'	156	54
	下游 3'-GGGAGATAGCGGTGTAAC-5'		
GFAP	上游 5'-TAGGAGTGGTAGGGCAGACTTG-3'	482	58
	下游 3'-GCAACCAGGAATAGACCTTCACAA-5'		

CD90 阳性 ( $\text{CD90}^+/\text{CD34}^-$ : 92%), 基质细胞表面标志 CD44 阳性 ( $\text{CD44}^+/\text{CD34}^-$ : 93%)<sup>[4]</sup>; SD 大鼠 MSCs 诱导分化后的细胞形态可见 3d 后梭形的 MSCs 胞体收缩成圆形或椭圆形, 细胞边缘不规整, 有零星的细胞突起; 4d 后 MSCs 有较多突起, 突起末端锥样膨大; 7d 后细胞发生迁移, 相互间建立突触联系, 而对照组 MSCs 细胞变形明显较少, 少有建立突触联系的细胞<sup>[4]</sup>。免疫细胞化学染色: 在条件培养液 I 组中 Rhodopsin 的表达率高达 (37.97  $\pm$  7.84)%, 出现 NSE 阳性的细胞为 (21.59  $\pm$  2.98)%, GFAP 阳性的细胞为 (20.73  $\pm$  5.25)%。在条件培养液 II 组中各指标的表达都明显低于条件培养液 I 组: Rhodopsin 阳性的细胞为 (10.23  $\pm$  2.05)%, NSE 阳性的细胞为 (16.24  $\pm$  1.10)%, GFAP 阳性的细胞为 (15.92  $\pm$  0.96)%; 但仍高于条件培养液 III 组 [Rhodopsin: 0, NSE: (6.24  $\pm$  4.58)%, GFAP: (4.96  $\pm$  1.79)%], 组间差异有统计学意义 (Rhodopsin:  $F = 88.210, P < 0.01$ ; NSE:  $F = 29.260, P < 0.01$ ; GFAP:  $F =$

30.956,  $P < 0.01$ )<sup>[4]</sup>。

2.4 RT-PCR 鉴定结果 诱导分化后 MSCs 细胞 Rhodopsin、GFAP、NSE mRNA 表达 (图 4); 条件培养液 I 组和条件培养液 II 组均可见目的基因 Rhodopsin、GFAP 和 NSE 的 mRNA 条带表达, 分别位于预期大小 107, 156, 482bp 处 (表 2)。条件培养液 I 组 Rhodopsin (0.3915  $\pm$  0.00644) 表达、NSE (0.2019  $\pm$  0.00682) 的表达、GFAP 表达 (0.1972  $\pm$  0.00211) 明显高于条件培养液 II 组 Rhodopsin (0.0983  $\pm$  0.00319) 表达、NSE (0.1048  $\pm$  0.00323) 的表达、GFAP (0.1040  $\pm$  0.00254) 的表达, 而条件培养液 III 组几乎没有 Rhodopsin、GFAP、NSE mRNA 的表达。经计算机 Quantity one 4.4.1 自动分析软件分析, 并与内参  $\beta$ -actin 比较, 计算相对 mRNA 表达量, 组间差异有统计学意义 (Rhodopsin:  $F = 6891.571, P < 0.01$ ; NSE:  $F = 902.292, P < 0.01$ ; GFAP:  $F = 2359.509, P < 0.01$ )。

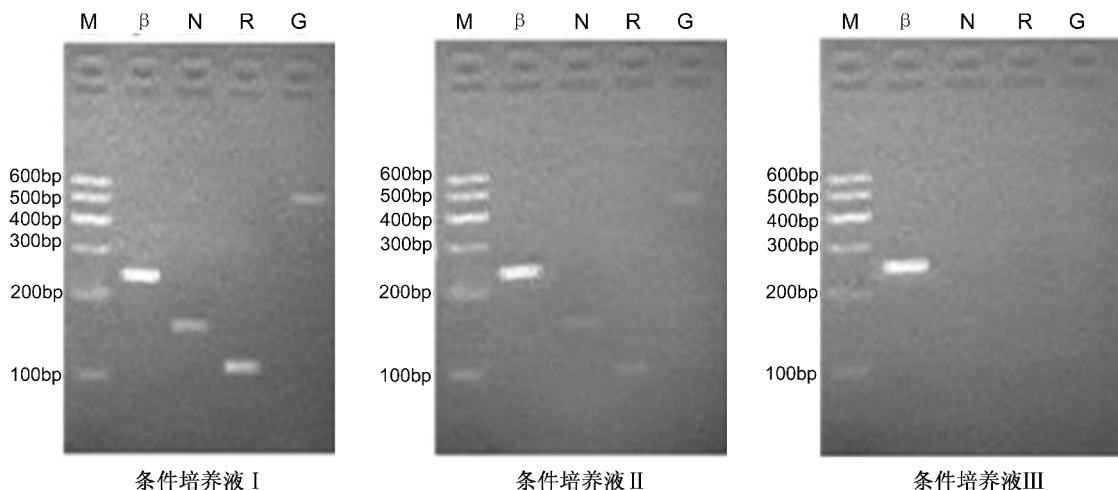


图4 RT-PCR 鉴定结果 M:marker; $\beta$ : $\beta$ -actin; N:NSE; R:Rhodopsin; G:GFAP。

表2 不同诱导条件下吸光度值统计结果

基因	条件培养液 I 组	条件培养液 II 组	条件培养液 III 组	<i>F</i>	<i>P</i>
Rhodopsin	0.3915 $\pm$ 0.00644	0.0983 $\pm$ 0.00319	0.0044 $\pm$ 0.00126	6891.571	<0.01
GFAP	0.1972 $\pm$ 0.00211	0.1040 $\pm$ 0.00254	0.0467 $\pm$ 0.00333	2359.509	<0.01
NSE	0.2019 $\pm$ 0.00682	0.1048 $\pm$ 0.00323	0.0498 $\pm$ 0.00149	902.292	<0.01

### 3 讨论

干细胞分化与微环境密切相关。体内培养虽适于 MSCs 分化的微环境,但体内微环境复杂,诱导移植细胞分化的影响因素诸多,比如移植细胞的预处理,受体的年龄、发育状态、视网膜神经退化,相近或相接触的细胞分泌的某种或某些生长因子、营养因子、趋化因子、细胞因子。并且移植细胞的分化方向不确定,往往无法定向分化成所需细胞。相反,体外环境可控且相对恒定,可人工添加各种生长因子,培养液中成分明确便于分析,可排除诸多复杂因素的干扰,针对单一实验因素的效果进行研究,更能直接观察和检测指标。MSCs 来源充足、取材方便、易于体外扩增,可塑性强,且不存在伦理学问题,但 MSCs 分化为视网膜样细胞机制尚未明确,准确将 MSCs 诱导分化为特定类型的细胞或前体细胞有很大难度,所以体外培养条件也一直处于摸索中。

目前,国内外有用各种诱导介质体外诱导 MSCs 分化为视网膜细胞,Kicic 等<sup>[5]</sup>发现 EGF、taurine 或 activinA 体外诱导大鼠 MSCs,有 20%~32% 表达视网膜光感受器细胞的表面抗原视紫红质。牟大鹏等<sup>[6]</sup>将视网膜神经细胞培养液的上清液收集后按 2:3 比例与 DMEM 培养液混合后诱导分化 2~4 代的 rMSC,可见诱导后的细胞表达  $\beta$ -tubulin III (又称微管蛋白,是 RGCs 早期和成熟期的标志物)和 Neurofilament protein(NF,神经丝蛋白,是神经元的特异性标志物)。也有将 MSCs 与新生乳鼠视网膜神经细胞共培养,发现 MSCs 分化为 RGCs (retinal ganglion cells, 视网膜神经节细胞)特异性抗体 Thy1.1 表达阳性的细胞<sup>[7]</sup>。安刚等<sup>[8]</sup>用 transwell 6 孔板非接触共培养方式建立人视网膜色素上皮细胞和 MSCs 共培养体系,发现诱导后的 MSCs 具有色素上皮细胞的特异性标志。Vischer<sup>[9]</sup>的研究表明,新生负鼠脊髓损伤后可引起脊髓中脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA 的表达明显增加,未损伤组没有发现 BDNF mRNA

的表达。因此推测光损伤的视网膜片匀浆上清液中也可能包含着促使 MSCs 向视网膜神经细胞分化的诱导因子或趋化因子,同时也可能包含着多种神经细胞因子、神经营养因子和生长因子等。早在 1994 年 Mitsumoto 等<sup>[10]</sup>就提出“两个神经营养因子优于一个”的理论,光损伤后的视网膜片,不仅含有多种营养因子,而且其中很多因子是由损伤刺激后,组织之间联系和作用而释放,具有重要价值。条件培养液可能含有细胞分泌的生物活性物质,适合细胞生存的微环境,或已将具有细胞毒性的物质代谢分解,对诱导分化细胞可能起到积极的作用,本实验研究中用神经培养基 Neurobasal 培养基 A (其中加入 1:50 的 B27 和 0.5mol/L L-glutamine) 加到光损伤的视网膜片中培养一段时间,收集上清液与 10% FBS-LGDMEM 以 2:3 混合制成条件培养液 I,同时制备条件培养液 II 和 III 进行结果对照。

检测是否被诱导成为目的细胞需要一定的检测指标,近年来,许多研究者都在寻找不同细胞可靠的生化标志物用于细胞类型的检测。其中免疫标志物是较为可靠的指标,且在成为功能细胞前即可出现。不同的细胞有不同的免疫标志物,视紫红质 (Rhodopsin) 是视锥细胞、视杆细胞的外节盘膜固有蛋白,分子量约为 27~28kDa,是一种结合蛋白,由一分子称为视蛋白 (opsin) 的蛋白质和一分子称为视黄醛 (retinal) 的生色基团所组成。也是一种功能蛋白,存在于视杆细胞外段膜盘和胞浆膜上,对视觉生理过程中有重要影响。视紫红质可作为视锥细胞和视杆细胞的特异性表面标志,也是晚期光感受器细胞标记,可用于鉴定光感受器细胞<sup>[11,12]</sup>。神经细胞的分化发育需经历几个阶段:多潜能细胞分化为神经干细胞,神经干细胞分化为神经前体细胞,神经前体细胞进一步分化为成熟神经元等。而成熟神经元标记 NSE 则可作为视网膜神经节细胞的检测指标。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是一个 50 $\times$ 10<sup>3</sup> 的胞质内丝状酸性蛋

白,属细胞骨骼蛋白,是中间丝蛋白之一,存在于中枢神经系统不同的胶质细胞中。视网膜中胶质细胞主要为星形胶质细胞和 Müller 细胞,除了一般的支持和营养作用外,胶质细胞在保持视网膜内环境稳定中担任了重要角色<sup>[13]</sup>。在正常人视网膜,Müller 胶质细胞内的 GFAP 在内、外界膜之间及其余视网膜各层的免疫组化染色为阴性<sup>[14]</sup>,在正常哺乳动物视网膜,Müller 细胞是否表达 GFAP 尚无定论<sup>[15]</sup>。而蛋白质标记物 GFAP 在星形胶质细胞中却有丰富的、唯一的表达。可作为星形胶质细胞的特异性标记物,在诊断和鉴别诊断上具有重要价值。

本实验通过 RT-PCR 对分化的细胞进行视网膜光感受器、视网膜神经节细胞、神经胶质细胞标志物表达的检测,观察评估 SD 大鼠骨髓间充质干细胞向视网膜细胞分化情况。结果显示同样的培养环境下,条件培养液 II 和 III 中 Rhodopsin、GFAP、NSE 表达明显少于条件培养液 I 组。而条件培养液 III 组中表达 Rhodopsin 的阳性细胞数为零,这说明光损伤刺激所释放的分泌物对大鼠 MSCs 诱导分化成为视网膜样细胞起到了至关重要的作用。对有初步诱导分化结果的诱导液,可进一步应用蛋白质组学技术检测不同诱导微环境间的蛋白差异,阐明各种蛋白在诱导骨髓间充质干细胞分化为视网膜细胞中的作用,发现诱导液中起调控的关键因子,并能对诱导分化的分子生物学机制进行研究,使构建体外诱导骨髓间充质干细胞定向分化的微环境更完善,并且为下一步的 MSCs 移植治疗提供了新思路。

#### 参考文献

- 1 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-147
- 2 Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, *et al.* Bone marrow stromal stem cells:nature,biology,and potential applications. *Stem Cells* 2001;19(3):

180-192

- 3 Marc RE, Jones BW, Watt CB, *et al.* Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis* 2008;14:782-806
- 4 白月,徐国兴,陈金国,等.光损伤视网膜片培养上清液诱导大鼠骨髓间充质干细胞为视网膜样细胞的研究. *海峡科学* 2010;5(5):64-67
- 5 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
- 6 牟大鹏,苏冠方,徐春玲,等.视网膜神经节细胞培养上清液对骨髓间充质干细胞向神经样细胞的诱导作用. *中国实验诊断学* 2007;11(3):364-366
- 7 余克明,葛坚,庄菁,等.新生乳鼠视网膜细胞诱导骨髓间充质干细胞向视网膜神经样细胞分化. *中国病理生理杂志* 2005;21(1):6-10
- 8 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;29(7):492-496
- 9 Vischer HA. BDNF is expressed at the crush site after spinal cord lesion in newborn opossum (*Monodelphis domestica*). *Eur J Neurosci* 1997;9(9):1993-1997
- 10 Mistumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, *et al.* Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 1994;265(5175):1107-1110
- 11 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
- 12 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
- 13 Newman E, Reichenbach A. The Müller cell;a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 1996;19(8):307-312
- 14 成令忠.组织学.第2版.北京:人民卫生出版社 1993:672
- 15 Semple-Rowland SL. Expression of glial fibrillary acidic protein by Müller cells in rd chick retina. *J Comp Neurol* 1991;305(4):582-590