

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.18.008

## BMSCs 移植对视神经损伤家猫 RGCs 损伤及 BDNF 表达的影响 \*

李俊义<sup>1</sup> 李秀梅<sup>2</sup> 万京明<sup>1</sup> 刘娟<sup>1</sup> 毕京玉<sup>1</sup> 姜彦<sup>3</sup> 李娜<sup>3</sup>

(1 济南市人民医院耳鼻喉科 山东 济南 271100; 2 单县中医院 山东 菏泽 274300;

3 青岛大学附属医院耳鼻喉头颈外科 山东 青岛 266003)

**摘要 目的:**探讨玻璃体腔内注射移植体外培养的骨髓间充质干细胞(Bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)对家猫视神经损伤后视网膜神经节细胞(Retinal ganglion cells, RGCs)的影响及其可能的作用机制。**方法:**参照标准化家猫外伤性视神经损伤动物模型建立的方法建立右视神经夹伤家猫模型,然后将其分为以下四组:(1)A组:右眼 BMSCs 注射移植组,玻璃体腔内接受注射移植 BMSCs 浓度为  $1 \times 10^5$  细胞/ $\mu\text{L}$  的单细胞悬液 0.1 mL;(2)B组:右眼 PBS 注射组,玻璃体腔内注射 PBS 缓冲液 0.1 mL;(3)C组:假损伤控制组,BMSCs 左眼组,仅暴露视神经而不损伤,不接受治疗;(4)D组:正常对照组,PBS 左眼组,正常眼,不做任何处理。分别在移植后的 3、7、14 及 28 天,用免疫荧光染色双十八烷基四甲基吡啶羧基花青高氯酸盐染色标记法观察分离视网膜的 RGCs 存活率,用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验方法检测分离视网膜的脑源性神经营养因子 (Brain derived neurotrophic factor, BDNF) 的含量。**结果:**术后 3、7、14 及 28 天,在周边区及中央区视网膜上 RGCs 密度均显著减少(周边区:  $P_{3d}=0.0446$ ,  $P_{7d}=0.0011$ ,  $P_{14d}<0.001$ ,  $P_{28d}<0.001$ ; 中央区:  $P_{3d}=0.0437$ ,  $P_{7d}=0.0067$ ,  $P_{14d}<0.001$ ,  $P_{28d}<0.001$ )。7 天、14 天、28 天后, A 组 RGCs 密度及 BDNF 含量均显著高于 B 组( $P<0.05$ )。**结论:**BMSCs 移植可以减缓外伤性视神经损伤家猫 RGCs 凋亡,可能与其增加 BDNF 表达有关。

**关键词:**骨髓间充质干细胞;视神经损伤;移植;视网膜神经节细胞;脑源性神经营养因子

**中图分类号:**R-33;R774.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)18-3438-05

## Influence of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation on the Retinal Ganglion Cells and Brain Derived Neurotrophic Factor after Traumatic Optic Neuropathy in Cats\*

LI Jun-yi<sup>1</sup>, LI Xiu-mei<sup>2</sup>, WAN Jing-ming<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>1</sup>, BI Jing-yu<sup>1</sup>, JIANG Yan<sup>3</sup>, LI Na<sup>3</sup>

(1 Department of otorhinolaryngology, people's hospital of Jinan city, Ji'nan, Shandong, 271100, China;

2 Shanxian County Hospital of traditional Chinese medicine, Heze, Shandong, 274300, China;

3 Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, Shandong, 266003, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of intravitreal injection of bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) cultured in vitro on the retinal ganglion cells after optic nerve injury in cats and its possible mechanisms. **Methods:** A cat model of right optic nerve injury was established and divided into four groups: (1)Group A: Right eye BMSCs injection transplantation group, intravitreal injection transplantation BMSCs concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL single cell suspension 0.1 mL;(2)Group B: right eye PBS injection group, intravitreal PBS buffer 0.1 mL;(3)Group C: Sham-injured control group, BMSCs left eye group, only exposed optic nerve without injury, no treatment;(4)Group D: normal control group, PBS left eye group, normal eyes, without any treatment. The survival rate of RGCs isolated from retina was observed by immunofluorescence staining with dicarboxyl tetramethylindole carbonyl cyanide perchlorate staining at 3, 7, 14 and 28 days after transplantation. The content of brain-derived neurotrophic factor in isolated retina was detected by double antibody sandwich ELISA. **Results:** At 3, 7, 14 and 28 days after operation, the RGCs density in peripheral and central retina decreased significantly (peripheral area:  $P_{3d}=0.0446$ ,  $P_{7d}=0.0011$ ,  $P_{14d}<0.001$ ,  $P_{28d}<0.001$ ; central area:  $P_{3d}=0.0437$ ,  $P_{7d}=0.0067$ ,  $P_{14d}<0.001$ ,  $P_{28d}<0.001$ ). After 7 days, 14 days and 28 days, RGCs density and BDNF content in group A were significantly higher than those in group B ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** BMSCs transplantation can slow down the apoptosis of RGCs in cats with traumatic optic nerve injury, which may be related to the increase of BDNF expression.

**Key words:** Bone marrow mesenchymal stem cells; Optic nerve injury; Transplantation; Retinal ganglion cells; Brain derived neurotrophic factor

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170895)

作者简介:李俊义,男,医学博士,副主任医师,主要研究方向:鼻腔、鼻窦、鼻咽底疾病的内镜手术及微创治疗,

E-mail: lijyent@163.com

(收稿日期:2019-03-23 接受日期:2019-04-18)

Chinese Library Classification: R-33; R774.6 Document code: A

Article ID:1673-6273(2019)18-3438-05

## 前言

随着各种意外创伤的增多,外伤性视神经病(trumatic optic neuropathy, TON)的发病率有升高趋势,很多 TON 患者的视功能受到了严重伤害<sup>[1-5]</sup>,部分患者甚至因此失明致残,给其工作生活带来严重的影响。视神经和中枢神经系统一样再生能力极弱<sup>[6,7]</sup>,视神经受损后 RGCs 容易发生凋亡,如何防止或减少视神经外伤后 RGCs 的继发性凋亡,增加 RGCs 存活的数量,是挽救外伤性视神经病患者视力的研究重点之一。

近年来, BMSCs 移植在治疗中枢神经系统疾病方面显示了巨大的优势和潜力<sup>[8-10]</sup>,为神经损伤疾病的治疗带来了新的希望。本研究首先建立视神经损伤家猫模型并进行分组, BMSCs 移植组予玻璃体腔内注射移植 BMSCs, 磷酸盐缓冲液(PBS)组予玻璃体腔内注射 PBS, 在术后不同时间段分别观察计数家猫模型的 RGCs 存活数量, 检测 BDNF 含量表达变化, 探究二者动态变化之间可能存在的关联以及其可能的潜在作用机制, 旨在为视神经损伤后再生修复治疗提供新的途径方法和思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要实验仪器、试剂、动物

酶标仪(450 nm)(美国 Molecular Devices 公司), 组织匀浆机(瑞士 KINEMATICA 公司), 微量注射器(上海精密仪器有限公司), 高精度加样器及枪头(日本 Nichiryo 公司), 自动洗板机(美国 BIOTEK 公司), 细胞计数板(上海玉光光学), 倒置显微镜(日本 Nikon), 显微数码照相系统(日本 Olympus), 猫脑源性神经营养因子 ELISA 检测试剂盒(武汉博士德公司)。家猫由青岛市实验动物和动物实验中心提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物与分组** 健康无眼疾的家猫 48 只, 体重 1.5~2.0 kg, 雌雄不限, 由青岛市实验动物和动物实验中心提供。参照标准化家猫外伤性视神经损伤动物模型建立的方法建立右眼视神经夹伤家猫模型<sup>[11]</sup>, 以自身右眼为实验眼, 左眼作为对照。随机进行分组, 具体分组情况如下: (1) A 组: 右眼 BMSCs 注射移植组(BMSCs transplantation group), 玻璃体腔内接受注射移植 BMSCs 浓度为  $1 \times 10^5$  细胞/ $\mu\text{L}$  的单细胞悬液 0.1 mL; (2) B 组: 右眼 PBS 注射组(PBS injection group), 玻璃体腔内注射 PBS 缓冲液 0.1 mL; (3) C 组: 假损伤控制组(sham-injured control group), BMSCs 左眼组, 仅暴露视神经而不损伤, 不接受治疗; (4) D 组: 正常对照组(normal control group), PBS 左眼组, 正常眼, 不做任何处理。A、B、C、D 四组均为 24 只眼, 同一只家猫中 A 组右眼对应 C 组左眼, B 组右眼对应 D 组左眼。实验按预先设计方案分别于治疗后 3d、7d、14d 和 28d 处死动物并取材行相关视网膜神经节细胞(RGCs)计数检测及 BDNF 表达含量测定。

**1.2.2 骨髓间充质干细胞的移植方法** 根据实验设计, 将盐酸氯胺酮注射液(4.8 mg/kg)、咪达唑仑注射液(0.1 mg/kg)、酒石酸

布托啡诺注射液(0.1 mg/kg) 肌肉注射镇静麻醉各实验组家猫。参照猫骨髓间充质干细胞的体外分离培养、纯化中的方法体外培养获得猫骨髓间充质干细胞<sup>[12]</sup>, 并制成浓度为  $1 \times 10^5$  细胞/ $\mu\text{L}$  的单细胞悬液。微量注射器吸取细胞浓度为  $1 \times 10^5$  细胞/ $\mu\text{L}$  的骨髓间充质干细胞单细胞悬液 0.1 mL 备用。用无菌生理盐水常规冲洗术眼结膜囊, 消毒手术区, 暴露术眼, 盐酸布比卡因结膜囊表面麻醉, 用有齿镊固定眼球, 在角膜缘后 2 mm、右眼 9 点方位, 用微量注射器针头刺入眼球约 3 mm-4 mm 深, 针头斜向玻璃体腔中央, 然后缓慢注入单细胞悬液。单细胞悬液注完后, 迅速拔出针头, 立即用湿棉签压迫针眼 1 分钟, 术毕结膜囊点滴妥布霉素滴眼液 2-3 滴。PBS 组以同样的方法向玻璃体腔内注入 PBS 缓冲液 0.1 mL。

**1.2.3 视网膜固定铺片及免疫荧光染色** 免疫荧光染色双十八烷基四甲基吡啶花青高氯酸盐(Dil)(美国 Molecular Probe 公司)溶于二甲亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司) 配成 2 mg/mL 的储存溶液, 再加入 4%多聚甲醛溶液(PBS 配制), 配成 Dil 浓度为 10  $\mu\text{M}$  的荧光染色混合液, -20℃避光保存。采用过量麻醉方法处死实验家猫, 用缝线缝合于眼球 9 点钟方位球结膜标记好眼球, 立即完整摘除眼球, 沿眼球赤道切开两半, 含视神经部分眼球浸泡于 4%多聚甲醛的溶液中固定 12 小时。取出固定后的眼球, 沿角巩膜缘剪去角膜并除去晶状体、玻璃体, 分离出完整的视网膜。按 3、6、9、12 点钟 4 方位放射状剪开视网膜, 再次放入 4%多聚甲醛溶液中固定 12 小时。取出固定后的视网膜平铺于干净的载玻片上, 再将视网膜浸泡于 Dil 浓度为 10  $\mu\text{M}$  的荧光染色混合液中避光固定染色 15 分钟后取出, PBS 轻轻洗片 2 次, 封片。封片后在荧光显微镜下观察并计数 RGCs。以视神经乳头为中心沿每叶视网膜的中轴线分别连续拍摄中心及外周视网膜各 5 张照片, 取 5 个视野视网膜神经节细胞计数密度的平均值作为最终的实验结果。

**1.2.4 脑源性神经营养因子含量的测定** 采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)方法对沿眼球赤道切开角膜侧眼球分离的视网膜的 BDNF 含量进行测定。试剂盒采用武汉博士德公司 ELISA 试剂盒, 严格按照说明书中的操作时间、方法步骤进行实验检测, 所有液体组在检测使用前充分摇匀。往预先包被 BDNF 抗体的包被微孔中, 按照顺序逐步加入标本、标准品、辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体, 将微孔板转入温箱后 37℃温育 2 小时, 取出微孔板进行充分洗涤。加入底物四甲基联苯胺(TMB)进行显色, 四甲基联苯胺在 HRP 的催化下转化成蓝色, 并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 BDNF 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值))计算实验检测样品的浓度。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS17.0 统计软件分析数据, 实验数据资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用带方差分析, 进一步两组间比较采用 SNK-q 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

## 2.1 全视网膜神经节细胞的细胞密度

视网膜固定铺片及免疫荧光 Dil 染色后,用荧光显微镜定性观察显示 RGCs 密度,具体各组不同时间 RGCs 的平均密度改变见表 1。在治疗后 7d、14d 和 28d,RGCs 的存活数量 A 组显著高于 B 组,A 组 RGCs 数量降低趋势较 B 组明显缓和。统计分析表明在术后 3 天,A 组、B 组在周边区及中央区视网膜的 RGCs 密度无统计学差异( $F = 4.822, P = 0.0564$ );治疗后 7d、14d 和 28d,在周边区及中央区视网膜 RGCs 密度 A、B 组间有显著差异( $P < 0.05$ )。与 C 组相比,A、B 组无论在周边区视网膜还是在中央区视网膜的 RGCs 在外伤并治疗后各个时间均呈显著衰减 (周边网膜 : $P3d=0.0446, P7d=0.0011, P14d<0.001,$

$P28d<0.001$ ; 中央区网膜 : $P3d=0.0437, P7d=0.0067, P14d<0.001, P28d<0.001$ )。视神经损伤后 RGCs 密度随时间延长而呈下降趋势,A、B 两组在周边区和中央区视网膜,最明显的衰减期存在于视神经夹伤后 7d~14d(图 1)。相对于 D 组,A 组 BMSCs 移植治疗后 3d、7d、14d 和 28d RGCs 在周边区视网膜分别减少了 7.4%,11.5%,48.3%,53.3%,在中央区视网膜分别减少了 6.6%,10.3%,29.9%,32.4%;B 组注射 PBS 后 3d、7d、14d 和 28d RGCs 在周边区视网膜分别减少了 9.5%,15.6%,70.2%,72.7%,在中央区视网膜分别减少了 7.9%,14.9%,41.8%,45.7%。D 组与 C 组各亚组之间的 RGCs 的计数比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 各组不同时间 RGCs 的平均密度改变(个/mm<sup>2</sup>)

Table 1 Average density changes of RGCs at different time points in each group (number/mm<sup>2</sup>)

| Time<br>Groups | 0d              |              | 3d              |              | 7d              |              | 14d             |              | 28d             |              |
|----------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|
|                | Peripheral area | Central area | Peripheral area | Central area | Peripheral area | Central area | Peripheral area | Central area | Peripheral area | Central area |
| Group A        | -               | -            | 410± 38         | 830± 48      | 392± 34         | 797± 42      | 229± 35         | 623± 43      | 207± 26         | 601± 35      |
| Group B        | -               | -            | 401± 34         | 819± 47      | 374± 26         | 756± 42      | 132± 18         | 517± 33      | 121± 15         | 483± 26      |
| Group C        | -               | -            | 453± 42         | 879± 46      | 441± 38         | 897± 52      | 434± 35         | 886± 43      | 452± 37         | 871± 50      |
| Group D        | 443± 39         | 889± 47      | -               | -            | -               | -            | -               | -            | -               | -            |

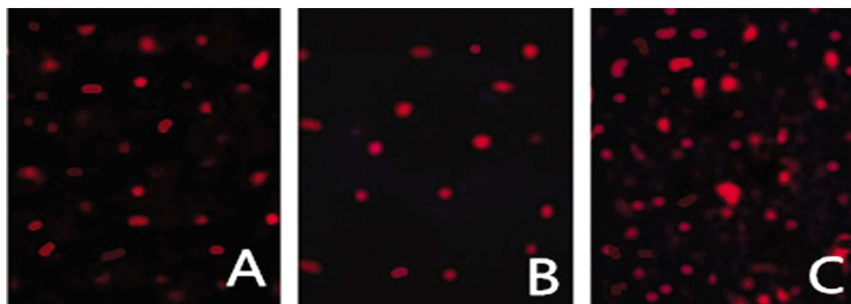


图 1 A、B 两组在外伤治疗 14d 后用荧光显微镜定性观察显示免疫荧光 Dil 染色标记的中央区视网膜的 RGCs 密度与 C 组比较

注:图中 A 部分对应 A 组,图中 B 部分对应 B 组,图中 C 部分对应 C 组(RGCs× 400)。

Fig. 1 Qualitative observation of immunofluorescence Dil staining markers by fluorescence microscopy after 14 days of trauma treatment in groups A and B Comparisons of RGC Density in Central Retina with Group C

Note: Part A corresponds to Group A, Part B corresponds to Group B, and Part C corresponds to Group C (RGCs × 400).

## 2.2 脑源性神经营养因子的含量

采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验(ELISA)方法对分离的视网膜的 BDNF 含量进行测定,具体各组不同时间 BDNF 含量测定结果见表 2。3d、7d、14d 和 28d 后,与 C 组相比,视网膜匀浆中的 BDNF 含量在 A、B 组均表现高表达( $P < 0.05$ )。3d 后,A、B 二组 BDNF 含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。7d、14d、28d 后,A 组 BDNF 含量明显高于 B 组( $P < 0.001$ )。A 组 3d 后 BDNF 含量到达峰值,7d 降低后到 14d 又重新升高,28d 后 BDNF 含量趋于稳定。B 组 3d 后 BDNF 含量到达峰值,7d、14d、28d 后 BDNF 含量趋于稳定。A、B、C 三组不同时间 BDNF 含量测定结果及比较详见图 2。C 组 BDNF 水平保持稳定,在各时间点差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。D 组与 C 组各亚组之间的 BDNF 含量测定结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

根据患者受伤后的眼部临床表现、视神经视觉电生理检查、视神经骨管毗邻结构影像学检查等,TON 的诊断已相对容易。TON 的治疗已经引起众多专家学者的关注<sup>[13-18]</sup>,不论采取何种治疗方式,其最终的治疗目的都是尽可能的修复受损伤的视神经,恢复患者的有效视功能。但是由于视神经和中枢神经系统一样再生能力极弱,TON 临床实际治疗效果并不理想,目前有效防止视网膜神经节细胞凋亡及治疗视神经损伤的方法还很有限。近年来,骨髓间充质干细胞移植在治疗中枢神经系统疾病或外伤性视神经病方面显示出巨大的潜力和优势。随着细胞生物工程技术快速发展,BMSCs 目前已成为比较理想的移植种子细胞,BMSCs 移植技术为视神经损伤疾病的治疗提供了新的思路。

表 2 各组不同时间 BDNF 含量测定结果(pg/mL)

Table 2 The determination results of BDNF content at different time in each group (pg/mL)

| Time<br>Groups | 0d          | 3d            | 7d           | 14d          | 28d          |
|----------------|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| Group A        | -           | 106.39± 10.25 | 87.13± 11.37 | 97.70± 13.08 | 92.54± 8.95  |
| Group B        | -           | 100.23± 8.98  | 78.21± 12.38 | 74.06± 10.09 | 72.89± 6.11  |
| Group C        | -           | 66.55± 12.25  | 63.34± 9.92  | 69.27± 11.31 | 61.89± 11.12 |
| Group D        | 67.32± 7.56 | -             | -            | -            | -            |

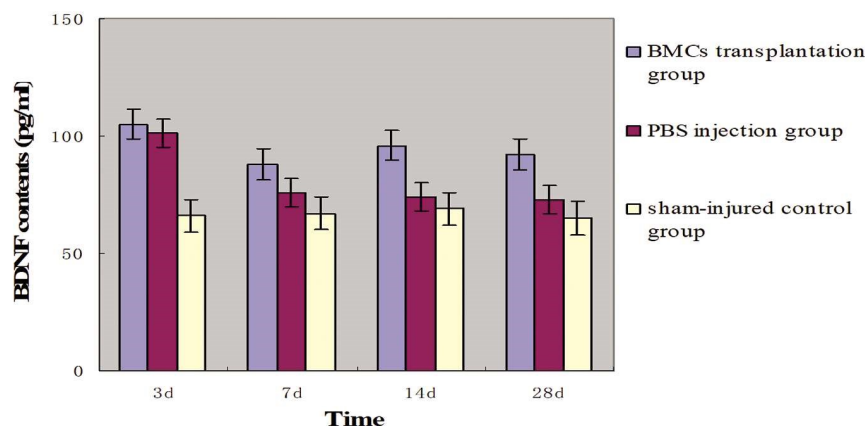


图 2 A、B、C 三组不同时间 BDNF 含量测定结果及比较

Fig. 2 Determination and comparison of BDNF content in groups A, B and C at different time

RGCs 的轴突是构成视神经的重要组成部分,是视网膜中向高级视觉中枢传导神经冲动、投射信息的神经元。视神经受损后引发 RGCs 坏死、凋亡,使得 RGCs 数量进行丢失减少,造成视功能下降<sup>[19]</sup>。在一些较严重的视神经损伤晚期,RGCs 往往大部分发生凋亡,最终造成不可恢复的视功能损害。视功能的恢复程度主要依赖于损伤后 RGCs 的最终存活数量,视神经损伤后一定数量存活的 RGCs 是视功能恢复的基础。本实验观察到治疗后 7d、14d 和 28d,BMSCs 注射移植组 RGCs 的存活数量显著高于 PBS 注射组,RGCs 数量降低趋势较 PBS 注射组明显缓和,表明玻璃体腔内注射移植 BMSCs 可以减缓视神经损伤后 RGCs 的凋亡,提高 RGCs 的存活数量,移植的 BMSCs 对 RGCs 具有一定的保护作用,从而为玻璃体腔内注射移植 BMSCs 治疗视神经损伤提供了一定的实验基础。治疗后 3d,BMSCs 注射移植组和 PBS 注射组周边区及中央区视网膜的 RGCs 密度差异无统计学意义,估计与玻璃体腔内注射移植 BMSCs 后发挥其作用需要一个渐进的时间过程有关。与假损伤控制组相比,BMSCs 注射移植组和 PBS 注射组无论在周边区视网膜还是在中央区网膜的 RGCs 在外伤并治疗后各个时间均呈显著衰减,表明视神经损伤后无论治疗与否,均会伴有 RGCs 凋亡,RGCs 凋亡是导致不可逆转的视功能损害的重要原因之一,最明显的衰减期存在于视神经夹伤后 7d~14d,28d 后衰减趋势减缓。这与 2002 年 Watanabe M 等所报道的猫视神经急性挫伤后 RGCs 的密度数量衰减变化略有差异<sup>[20]</sup>。这种 RGCs 的密度数量衰减变化趋势的不同可能与引起的视神经损伤因素、方式及程度的不同有关。当然,实验动物的种属不同以及不同的损伤方式、程度及部位对损伤后 RGCs 的变化也会有显著的影响。PBS 注射组 RGCs 随时间变化的密度

数量变化趋势基本反应了视神经损伤后 RGCs 凋亡的变化趋势。正常对照组与假损伤控制组各亚组之间的 RGCs 计数差异无统计学意义,表明其 RGCs 密度数量基本代表正常家猫 RGCs 常态下的密度数量。

视神经急性损伤后 RGCs 的动态变化表明视神经损伤后 RGCs 凋亡亦是一个渐进的过程,这个过程的快慢与视神经损伤的严重程度成正相关。在 RGCs 凋亡的进程中,把握住早期有利时机进行临床早期诊断和治疗就显得非常重要。在视神经损伤后 RGCs 凋亡早期,如果得不到有效的治疗,随着病变的进展,RGCs 迅速大量凋亡,视功能的恢复将会非常困难。在本实验中,BMSCs 注射移植组和 PBS 注射组相对于假损伤控制组和正常对照组,在视神经外伤后,无论在周边区视网膜的 RGCs 还是在中央区视网膜的 RGCs 均随时间延长而呈现出密度数量逐步衰减下降的趋势。因此,如何防止视神经外伤后 RGCs 的凋亡,增加 RGCs 存活的数量,是治疗恢复外伤性视神经病患者视功能的关键。足够数量的 RGCs 存活是视神经再生及视力恢复的前提条件。

神经营养因子(NTFs)是一类由神经所支配的肌肉、组织和星形胶质细胞分泌的蛋白质,为神经元分化、生长、存活中必不可少的一类物质。作为神经营养因子家族的一员,BDNF 在视网膜神经节细胞的生命周期中持续供应是维持 RGCs 正常功能的重要因素。本实验中我们观察到,视网膜匀浆中的 BDNF 含量在 BMSCs 注射移植组和 PBS 注射组与假损伤控制组相比均表现高表达,表明视神经损伤后无论治疗与否,均会伴有视网膜匀浆中的 BDNF 表达的升高,但升高水平不同。3d 后,BMSCs 注射移植组和 PBS 注射组 BDNF 含量差异无统计学意义。7d、14d、28d 后,BMSCs 注射移植组 BDNF 含量明显高

于 PBS 注射组,表明玻璃体腔内注射移植 BMSCs 可以增加视网膜 BDNF 的表达含量,同样玻璃体腔内注射移植 BMSCs 后促进 BDNF 含量升高需要一个渐进的时间过程。BMSCs 注射移植组和 PBS 注射组 BDNF 含量在视神经损伤 3d 时均达到最高峰值,这与 Chidlow 等学者实验研究基本吻合<sup>[21]</sup>。本试验中 BDNF 含量在视神经损伤 3d 时达到峰值,2 周之后逐渐降低,表明内源性 BDNF 在视神经损伤后短时期内可能产生应激反应性升高,其可能是自身机体对视神经损伤的一种保护机制反应,该内源性 BDNF 升高可部分减缓 RGCs 凋亡。7d、14d、28d 后 B 组 BDNF 含量趋于稳定,表明内源性 BDNF 升高为机体的暂时性反应,其维持时间较短暂,持续性差,单纯靠机体的自身反应来保持 BDNF 的高水平很难实现,不能足够有效的挽救 RGCs,难以起到有效的神经修复作用。PBS 注射组伤后 BDNF 的表达水平基本上反映了视神经损伤后内源性 BDNF 表达水平。值得一提的是,由于内源性 BDNF 作用持续时间很短,先前研究已经揭示注射外源性 BDNF 的影响,同样由于其有效半衰期短,其保护减少 RGCs 损失的作用时间亦短暂<sup>[22]</sup>。

Sanchez 等学者证实 BDNF 可以促进神经元轴突生长,并有助于神经元之间发生突触联系<sup>[23]</sup>。视网膜神经节细胞的死亡可能与营养因子供应缺乏有关,或许生长因子可以帮助扭转这一进程<sup>[24-26]</sup>。脑源性神经营养因子(BDNF)可以营养支持现有的生存神经元并帮助生长和分化新的神经元。神经营养因子剥夺已被证明是 RGCs 凋亡的重要原因之一<sup>[27]</sup>。以前的研究已经表明各种神经营养因子不仅对成熟的神经元具有营养的作用,而且也参与诱导轴突再生,促进神经元功能恢复<sup>[28]</sup>。作为神经营养因子家族的一员,BDNF 对 RGCs 再生具有深刻的影响,其不仅有利于 RGCs 神经元之间的突触连接<sup>[29]</sup>,而且对视网膜 RGCs 的存活数量也发挥着重要作用<sup>[30-32]</sup>。视神经外伤后轴索损伤,神经营养因子轴浆运输发生障碍,RGCs 所获靶源性 NTFs 减少或缺乏,导致 RGCs 损伤加速,最终致 RGCs 快速凋亡。

综上所述,作为神经营养因子家族重要成员的 BDNF 在 RGCs 的生命周期中持续供应是维持 RGCs 正常功能的重要因素,对视网膜 RGCs 的再生及存活数量发挥着重要作用。视神经损伤后一定数量存活的 RGCs 是视功能恢复的前提,并最终影响到视功能的恢复程度。因此,我们推测玻璃体腔内注射移植 BMSCs 后其对 RGCs 的保护作用可能是通过促进分泌 BDNF 来实现的,但这一结论还有待进一步研究明确。

#### 参考文献(References)

- [1] Nilkantha Sen. An insight into the vision impairment following Traumatic Brain Injury[J]. *Neurochem Int*, 2017, 111: 103-107
- [2] Ju-Yeun Lee, Kyuyeon Cho, Kyung-Ah Park, et al. Analysis of Retinal Layer Thicknesses and Their Clinical Correlation in Patients with Traumatic Optic Neuropathy[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157388
- [3] Kasturi Bhattacharjee, Samir Serasiya, Deepika Kapoor, et al. Navigation-guided optic canal decompression for traumatic optic neuropathy: Two case reports [J]. *Indian J Ophthalmol*, 2018, 66(6): 879-882
- [4] Yonju Ha, Hua Liu, Shuang Zhu, et al. Critical Role of the CXCL10/C-X-C Chemokine Receptor 3 Axis in Promoting Leukocyte Recruitment and Neuronal Injury during Traumatic Optic Neuropathy Induced by Optic Nerve Crush [J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(2): 352-365
- [5] Zhen-Hua He, Zheng-Bo Lan, Ao Xiong, et al. Endoscopic decompression of the optic canal for traumatic optic neuropathy[J]. *Chin J Traumatol*, 2016, 19(6): 330-332
- [6] Francisco M. Nadal-Nicolás, Caridad Galindo-Romero, Francisco J. Valiente-Soriano, et al. Involvement of P2X7 receptor in neuronal degeneration triggered by traumatic injury[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38499
- [7] Mead B, Tomarev S. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Promote Survival of Retinal Ganglion Cells Through miRNA-Dependent Mechanism [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(4): 1273-1285
- [8] 鲁玉宝,杨洋,王允昌,等. 骨髓间充质干细胞治疗脊髓损伤的热点及方向[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(29): 4736-4742
- [9] 李统帅,王晓璞,杜廷福,等. 骨髓间充质干细胞移植治疗帕金森病的研究进展[J]. *医药导报*, 2018, 37(10): 1227-1233
- [10] 郑斌,张韬,林振恩,等. 骨髓间充质干细胞靶向移植和促红细胞生成素联合治疗脊髓损伤 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33 (11): 2490-2492
- [11] 李俊义,徐华林,万京明,等. 猫骨髓间充质干细胞的体外分离培养、纯化、鉴定[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(1): 48-52
- [12] 李俊义,李秀梅,万京明,等. 标准化家猫外伤性视神经损伤动物模型的建立[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2018, 32(4): 43-47
- [13] Ying-Jie Ma, Bo Yu, Yun-Hai Tu. Prognostic factors of trans-ethmosphenoid optic canal decompression for indirect traumatic optic neuropathy[J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(7): 1222-1226
- [14] Min Chen, Yan Jiang, Jisheng Zhang, et al. Clinical treatment of traumatic optic neuropathy in children: Summary of 29 cases [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3562-3566
- [15] 周兵.鼻科和眼科在鼻内镜鼻眼相关外科发展中的交互作用[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 52(9): 645-647
- [16] 史凌改,王广科,刘军,等.微创鼻内镜下视神经减压术在外伤性视神经病患者中的应用[J]. *眼科新进展*, 2017, 37(7): 640-642
- [17] Juni EJYJ, Wen-Jeat Ang, Wan-Hazabbah WH, et al. Craniotomy Improves Traumatic Optic Neuropathy[J]. *Cureus*, 2018, 10(6): e2835
- [18] 陈敏,姜彦,温君凤,等.外伤性视神经病 265 例临床特征分析[J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 52(9): 659-663
- [19] Zhu XH, Jung B, Zhang P, et al. Effect of human umbilical cord blood stem cells on flash visual evoked potential in traumatic optic neuropathy in rats[J]. *Cent South Univ*, 2011, 36(5): 405-410
- [20] Watanabe M, Fukuda Y. Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2002, 21 (6): 529-553
- [21] Chidlow G, Casson R, Sobrado Calvo P, et al. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve tran section: an RT-PCR study [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 387-396
- [22] Gass P, Hellweg R. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker for affective disorders? [J]. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2010, 13 (01): 1-4
- [23] Sanchez AL, Matthews BJ, Menyard MM, et al. BDNF in creases synapse density in dendrites of developing tectal neurons in vivo [J]. *Development*, 2006, 133(13): 2477-2486
- [24] Alexander P, Thomson HA, Luff AJ, et al. Retinal pigment epithelium transplantation: concepts, challenges, and future prospects [J]. *Eye (Lond)*, 2015, 29(8): 992-1002

- quality of life in elderly patients with a pacemaker [J]. *J Bras Pneumol*, 2019, 45(1): e20170333
- [12] Inoshita A, Kasai T, Matsuoka R, et al. Age-stratified sex differences in polysomnographic findings and pharyngeal morphology among children with obstructive sleep apnea [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(12): 6702-6710
- [13] Llewellyn CM, Noller MW, Camacho M. Cautery-assisted palatal stiffening operation for obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis [J]. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 2018, 5(1): 49-56
- [14] Archontogeorgis K, Voulgaris A, Papanas N, et al. Mean Platelet Volume and Platelet Distribution Width in Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Concurrent Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2018, 24(8): 1216-1222
- [15] Zicari AM, Occasi F, Di Mauro F, et al. Mean Platelet Volume, Vitamin D and C Reactive Protein Levels in Normal Weight Children with Primary Snoring and Obstructive Sleep Apnea Syndrome [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152497
- [16] Yazgan S, Erboy F, Celik HU, et al. Peripapillary Choroidal Thickness and Retinal Nerve Fiber Layer in Untreated Patients with Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome: A Case-Control Study [J]. *Current Eye Research*, 2017, 42(11): 1-9
- [17] 谭小燕,况九龙.外周血 MMP-9 及 NF- $\kappa$ B 在 OSAHS 合并高血压中的表达及其相关性研究[J].*重庆医学*, 2017, 46(14): 1900-1903
- [18] 肖斌,刘建敏,汪永宽,等.老年 OSAHS 患者 MPO 和 ICAM-1 的表达及其意义 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2017, 19(16): 1269-1272
- [19] 张强.探讨心脑血管疾病患者 MPV、PDW 和 RDW 检测的临床价值[J].*吉林医学*, 2015, 36(5): 916
- [20] 杨浩,施颖超,朱乾坤,等.红细胞分布宽度与急性心肌梗死的相关性研究[J].*牡丹江医学院学报*, 2018, 39(1): 33-35, 52
- [21] 袁平,王文君,李东风,等.阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者巨噬细胞移动抑制因子的表达及其与血管内皮细胞损伤的关系研究[J].*中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(11): 871-875
- [22] Uyama H, Yamauchi M, Fujita Y, et al. The effects of arousal accompanying an apneic event on blood pressure and sympathetic nerve activity in severe obstructive sleep apnea [J]. *Sleep Breath*, 2018, 22(1): 149-155
- [23] Goya TT, Silva RF, Guerra RS, et al. Increased Muscle Sympathetic Nerve Activity and Impaired Executive Performance Capacity in Obstructive Sleep Apnea[J]. *Sleep*, 2016, 39(1): 25-33
- [24] 国玉,史军艳,陈顺通.体质指数和阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的相关性分析[J].*世界睡眠医学杂志*, 2017, 4(6): 348-351
- [25] 邹东,戎立华,徐宝华.Berlin 问卷在阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征筛查中的应用[J].*中日友好医院学报*, 2017, 31(1): 50-52
- [26] 王琴,杨毅宁.冠心病心力衰竭患者平均血小板体积变化及意义[J].*山东医药*, 2016, 56(44): 55-57
- [27] 鲜晓燕,黎源,罗凤鸣.OSAHS 合并心血管疾病的血液生化标志物研究进展[J].*国际呼吸杂志*, 2018, 38(23): 1825-1829
- [28] Lacedonia D, Carpagnano GE, Sabato R, et al. Characterization of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSA) population by means of cluster analysis[J]. *J Sleep Res*, 2016, 25(6): 724-730
- [29] 陈碧,陈昊,张森,等.红细胞分布宽度与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征病情和颈动脉内膜中层厚度的相关性[J].*国际呼吸杂志*, 2015, 35(23): 1799-1803
- [30] 蒋倩,李涛平,庞碑,等.重度阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者启动早期肾损害[J].*南方医科大学学报*, 2016, 36(3): 339-344

(上接第 3442 页)

- [25] Thomas BB, Zhu D, Zhang L, et al. Survival and functionality of hESC-derived retinal pigment epithelium cells cultured as a monolayer on polymer substrates transplanted in Rcs rats [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(6): 2877-2887
- [26] Binley KE, Ng WS, Yves Alain B, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents dendritic retraction of adult mouse retinal ganglion cells [J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 44(3): 20128-2039
- [27] Park K, Luo J M, Hishih S, et al. Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells[J]. *The Journal of neuroscience*, 2004, 24(48): 10806-10815
- [28] Fang M, Wang J, Huang JY, et al. The Neuroprotective Effects of Reg-2 Following Spinal Cord Transection Injury [J]. *The Anatomical Record*, 2011, 294(1): 24-45
- [29] Bonnet D, Garcia M, Vecino E, et al. Brain-derived neurotrophic factor signalling in adult pig retinal ganglion cell neurite regeneration *in vitro*[J]. *Brain research*, 2004, 1007(1): 142-3-151
- [30] Nowak A, Majsterek I, Przybyłowska Sygut K, et al. Analysis of the expression and polymorphism of APOE, HSP, BDNF, and GRIN2B genes associated with the neurodegeneration process in the pathogenesis of primary open angle glaucoma [J]. *Bio Med Res Inter*, 2015: 258-281
- [31] Chen DW, Foldvari M. In vitro bioassay model for screening non-viral neurotrophic factor gene delivery systems for glaucoma treatment[J]. *Drug Deliv Transl Re*, 2016, 6(6): 676-685
- [32] Igarashi T, Miyake K, Kobayashi M, et al, Tyrosine triple mutated AAV2-BDNF gene therapy in a rat model of transient IOP elevation [J]. *Mol Vis*, 2016, 22: 816-826