

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.10.007

体外共培养模式下神经干细胞对视网膜小胶质细胞生物学功能的影响*

李征亚 邹秀兰 彭亮红 张 楚 周文杰 陈轩阁 邹玉平[△]

(中国人民解放军南部战区总医院眼科 广东 广州 510010)

摘要 目的:通过构建体外共培养体系,探讨神经干细胞(NSCs)对脂多糖(LPS)活化后的视网膜小胶质细胞(RMG)生物学功能的影响及 TIMP1/MMP9 途径在其中的可能作用。**方法:**采用振荡分离法获取 C57/BL6 小鼠原代 RMG,通过免疫荧光技术检测细胞 Iba1 的表达对其进行鉴定。采用含有 LPS 的培养基 (终浓度为 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激 RMG 24h 后,将其分为 LPS 对照组、NSCs 组、TB-NSCs 组,其中 NSCs 组将 RMG 与 NSCs 共培养 24 h, TB-NSCs 组将 RMG 与用中和性抗体封闭 TIMP1 的 NSCs 共培养 24h;同时,未予以 LPS 刺激的 RMG 作为空白对照组。采用免疫荧光技术检测各组 RMG 的 Ki67 表达情况,观察其增殖能力;TUNEL 技术检测各组 RMG 凋亡情况;ELISA 方法检测各组 RMG 上清液中 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 的蛋白质量浓度。**结果:**采用振荡分离法获取的原代 RMG 经免疫荧光染色鉴定 Iba1 呈阳性。NSCs 组 Ki67 阳性率较 LPS 对照组降低($P<0.05$),而 TB-NSCs 组 Ki67 阳性率较 NSCs 组升高($P<0.05$)。NSCs 组 TUNEL 阳性率较 LPS 对照明显升高($P<0.05$),而 TB-NSCs 组 TUNEL 阳性率与 NSCs 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。空白对照组、LPS 对照组、NSCs 组、TB-NSCs 组 RMG 上清液中 $\text{TNF-}\alpha$ 蛋白质量浓度分别为 (2.10 ± 0.65) 、 (25.69 ± 2.01) 、 (20.01 ± 1.63) 、 $(23.76\pm 1.45)\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,总体比较差异显著($F_{\text{TNF-}\alpha}=302.65, P_{\text{TNF-}\alpha}<0.05$); $\text{IL-1}\beta$ 蛋白质量浓度分别为 (1.77 ± 0.74) 、 (15.38 ± 1.18) 、 (10.88 ± 0.95) 、 $(13.45\pm 1.41)\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,总体比较差异非常显著($F_{\text{IL-1}\beta}=179.84, P_{\text{IL-1}\beta}<0.05$);其中,NSCs 组 $\text{TNF-}\alpha$ 及 $\text{IL-1}\beta$ 蛋白质量浓度均较 LPS 对照组显著降低 ($P<0.05$),TB-NSCs 组 $\text{TNF-}\alpha$ 及 $\text{IL-1}\beta$ 蛋白质量浓度较 NSCs 组明显升高($P<0.05$)。**结论:**体外共培养模式下,NSCs 可抑制 RMG 增殖能力,提高其凋亡水平,并抑制其分泌促炎因子 $\text{TNF-}\alpha$ 及 $\text{IL-1}\beta$,该效应可能与调控 TIMP1/MMP9 相关。

关键词:视网膜小胶质细胞;神经干细胞;体外共培养;免疫调控作用

中图分类号:R-33;R774;R329.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)10-1829-06

Effects of Neural Stem Cells on the Biological Behavior of Retinal Microglia after Co-culture in Vitro*

LI Zheng-ya, ZOU Xiu-lan, PENG Liang-hong, ZHANG Chu, ZHOU Wen-jie, CHEN Xuan-ge, ZOU Yu-ping[△]

(Department of Ophthalmology, General Hospital of Southern Theater Command of PLA, Guangzhou, Guangdong, 510010, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the biological effects of NSCs on lipopolysaccharide (LPS)-activated RMG after co-culture in vitro, and the signal role played by TIMP1/MMP9 on this interaction. **Methods:** Primary RMG were isolated from C57/BL6 mice and purified by shaking methods. Immunofluorescence technique was applied to detect the expression of Iba1 to identify microglia. RMG from three groups including LPS control group, NSCs group (co-cultured with NSCs for 24 hours) and TB-NSCs group (co-cultured with TIMP1-blocking-NSCs for 24 hours) were pre-stimulated by LPS ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) medium for 24 hours. The cells without LPS stimulation were blank control group. The proliferation status of RMG (Ki67 positive rate) was investigated by immunofluorescence technique and the apoptosis statue was investigated by TUNEL. The release contents including tumor necrosis factor- α ($\text{TNF-}\alpha$) and interleukin- 1β ($\text{IL-1}\beta$) of RMG were detected by ELISA. **Results:** Primary RMG, which were successfully purified by shaking method, were mostly Iba1 positive. The percentage of Ki67 positive cells was significantly different among the four groups ($F=211.26, P<0.05$). That of NSCs group was lower than that of LPS control group ($P<0.05$), while that of TB-NSCs group was higher than that of NSCs group ($P<0.05$). The percentage of TUNEL positive cells was also significantly different among the four groups ($F=98.65, P<0.05$). That of NSCs group was higher than that of LPS control group ($P<0.05$), while there was no statistical difference between TB-NSCs group and NSCs group ($P>0.05$). The contents of $\text{TNF-}\alpha$ in RMG supernatant from blank group, LPS control group, NSCs group, and TB-NSCs group were respectively $(2.10\pm 0.65) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $(25.69\pm 2.01) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $(20.01\pm 1.63) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $(23.76\pm 1.45) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, which were statistically different ($F_{\text{TNF-}\alpha}=302.65, P_{\text{TNF-}\alpha}<0.05$). The contents of $\text{IL-1}\beta$ in RMG supernatant from blank group, LPS control group, NSCs group, and TB-NSCs group were respectively $(1.77\pm 0.74) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $(15.38\pm 1.18) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $(10.88\pm 0.95) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $(13.45\pm 1.41) \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,

* 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2018372)

作者简介:李征亚(1990-),女,博士,主治医师,研究方向:眼底病临床与基础研究、干细胞免疫调控研究,

电话:020-88653516, E-mail: ya13hao@163.com

[△] 通讯作者:邹玉平, E-mail: gzzouyuping@163.com

(收稿日期:2019-10-29 接受日期:2019-11-25)

which were also statistically different ($F_{IL-1\beta}=179.84, P_{IL-1\beta}<0.05$). The contents of TNF- α and IL-1 β in NSCs group were both lower than that in LPS control group ($P<0.05$), while those in TB-NSCs group were both higher than those in NSCs group ($P<0.05$). **Conclusion:** NSCs might suppress proliferation ability, promote apoptosis level and inhibit proinflammatory cytokines releasing of LPS-activated RMG through TIMP1/MMP9 signal.

Key words: Retinal microglia; Neural stem cells; Co-culture in vitro; Immunomodulation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R774; R329.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)10-1829-06

前言

视网膜小胶质细胞(retinal microglia, RMG)作为视网膜内的单核细胞,与糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、遗传性视网膜色素变性等疾病的发生发展密切相关^[1-2]。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有较强分化潜能及免疫调控特性,被广泛用于干细胞移植治疗领域的研究^[3-5]。然而,NSCs对RMG的免疫调控机制尚不明确。

基质金属蛋白酶(metalloproteinases, MMPs)家族是小胶质细胞参与胞外基质降解、迁移及炎症反应的重要因素^[6]。研究表明^[7]NSCs与RMG共培养后,许多细胞因子包括基质金属蛋白酶抑制剂1(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP1)的表达显著上升,而TIMP1正是MMP9的特异性抑制剂,提示NSCs与RMG间可能存在信号沟通。因此,本研究通过构建体外共培养体系,探讨NSCs对RMG生物学功能的影响及TIMP1/MMP9在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞与动物 SPF级新生C57/BL6小鼠(出生1-3d内)由南部战区总医院动物实验中心提供,雌雄不限,用于提取RMG。所有动物均符合《实验动物管理条例》及伦理学要求,排除眼部及全身疾病。NSCs由陆军军医大学第一附属医院眼科实验室提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM/DF12培养基、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、胰蛋白酶、青霉素/链霉素混合抗生素液(美国Hyclone公司);优质胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司);脂多糖(LPS)、DAPI染核工作液(美国Sigma公司);TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(美国Roche);兔抗小鼠Iba1抗体、兔抗小鼠Ki67抗体、小鼠TIMP1中和性抗体(美国Abcam公司)、Cy3-山羊抗兔IgG二抗(美国Biochemical公司);抗荧光淬灭封片剂(中国碧云天公司);小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素- β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA试剂盒(日本Olympus公司);Transwell培养板、细胞培养板、细胞培养瓶(美国Corning公司)。激光共聚焦显微镜及图像分析系统(德国Leica公司);iMARK酶标仪(美国BioTek公司);细胞超净工作台、温控湿控细胞培养箱(江苏恒天设备仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 视网膜小胶质细胞的提取与培养 采用常规方法提取视网膜小胶质细胞^[8]。断头处死新生SPF级C57/BL6小鼠,碘伏浸泡5 min后取出,无菌条件下摘除眼球并漂洗,取出视网膜剪碎,采用胰蛋白酶37℃下消化20 min,使用含10%FBS的

DMEM/F12培养基终止消化,轻轻吹打细胞悬液后过筛至离心管,1000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,加入细胞培养液重悬,以 2×10^6 浓度接种于75 cm²细胞培养瓶,并放置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱中。24 h后首次换液,以后每3 d换液一次。视网膜细胞混合培养10 d后,于37℃恒温摇床上以200 r·min⁻¹震荡1 h。收集培养液,接种于25 cm²培养瓶中继续培养,24 h首次换液去除未贴壁细胞。以后每间隔5 d换液1次,至细胞生长贴壁至80%瓶壁后传代,传至第3代时予以细胞鉴定。

1.2.2 NSCs的复苏与传代 将NSCs从液氮中取出,37℃水中复温。吸出细胞悬液,加入15 mL离心管后,1500 r·min⁻¹,4℃离心5 min,弃上清,常规用5 mL含10% FBS的DMEM/F12培养基重悬,充分吹打为单细胞悬液后接种于25 cm²培养瓶中(密度约 10^5 个/瓶),置于37℃恒温孵育箱中,每3 d消化并传代1次。

1.2.3 LPS激活视网膜小胶质细胞 将RMG按 1×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,待次日贴壁后,吸除原培养基,加入LPS浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的新培养基,于培养箱中继续培养24 h后换液。

1.2.4 利用中和性抗体封闭NSCs中TIMP1的表达 将NSCs按 1×10^5 /孔的密度接种于Transwell培养小室中,每孔培养基为1 mL,待第2天细胞贴壁后滴加小鼠TIMP1中和性抗体2 μL ,轻轻混匀后37℃孵育2 h,PBS漂洗3次后即为本TB-NSCs。

1.2.5 体外共培养模式的建立 本实验设立4个实验分组:未予以LPS刺激的RMG为空白对照组,其余三组RMG均予以LPS刺激24 h,分为LPS对照组、NSCs组和TB-NSCs组。LPS对照组RMG不予以细胞共培养。NSCs组、TB-NSCs组分别将NSCs、TB-NSCs接种于Transwell小室(约 5×10^4 个细胞)后,置于已接种RMG(约 1×10^5 个细胞)的六孔板上,自此即建立体外共培养模式并开始计时,共培养时间为24 h。

1.2.6 免疫荧光法鉴定RMG 取RMG细胞爬片,室温下4%多聚甲醛固定15 min,PBS漂洗3次后0.3% Triton 破膜10 min,正常山羊血清封闭20 min,随后滴加1:500稀释后的兔抗小鼠Iba1抗体,于湿盒中4℃孵育过夜。取出后室温下PBS漂洗3次,滴加1:500稀释后的Cy3-山羊抗兔IgG二抗,于湿盒中37℃孵育2 h,PBS漂洗3次后DAPI工作液复染10 min,再次PBS漂洗3次,抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察细胞Iba1阳性表达情况。

1.2.7 免疫荧光法检测Ki67的表达情况 共培养24 h后,取出各组RMG细胞爬片,同1.2.6方法进行Ki67免疫荧光检测。荧光显微镜下观察细胞Ki67表达情况。

1.2.8 TUNEL法检测RMG的凋亡情况 共培养24 h后,取

出各组 RMG 细胞爬片, 室温下 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 3 次后, 用山羊血清封闭处理 30 min, 再次 PBS 漂洗。按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒中说明书中操作步骤, 将 1 号液 (Enzyme) 与 2 号液 (Buffer) 按 1:9 比例混匀, 每张爬片上各滴加 20 μ L, 于湿盒内 37 $^{\circ}$ C 反应 2 h。PBS 漂洗 3 次后, DAPI 工作液复染 10 min, 再次 PBS 漂洗, 抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察细胞 TUNEL 表达情况。

1.2.9 ELISA 方法检测 RMG 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的蛋白浓度 每组细胞各收取 3 孔培养基上清液作为样本, 分组如前所述。所有检测样品均按照试剂盒说明书采用双孔实验, 所得拟合曲线 R^2 值 >0.99 , 并重复 3 次。细胞培养液离心后取上清液, 在 96 孔板中依次加入标准品、待测样本各 50 μ L, 同时做好复孔。每孔加入生物素标记物 10 μ L 后, 加入酶联亲和物 50 μ L, 于湿盒中 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 清洗 5 次。分别于每孔中加入底物 I 和底物 II 各一滴, 室温下避光反应 15 min 后, 加入终止液终止反应。立即在酶标仪中检测 OD 值, 波长 450 nm。以标准品浓度和 OD 值绘制标准曲线图, 拟合回归方程, 计算出待测样本 TNF- α 、IL-1 β 的蛋白质量浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计学软件进行数据分析。本研究中所有相关指标经检验均呈正态分布, 总体差异比较采用单因素方差分析法, 组间两两比较采用 SNK-q 法, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间方差齐。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 激活后原代 RMG 的形态学特征及鉴定

C57/BL6 小鼠 RMG 经原代提取、纯化后培养第 3d, 约半数细胞已贴壁生长, 胞体突起。继续培养至 10d 后, 胞体呈不对称分枝状, 突起较长 (图 1A), 大部分细胞 Iba1 表达阳性 (图 1C), 证实该细胞为小胶质细胞。经 LPS 刺激 24h 后, RMG 突起数量明显减少, 胞体呈阿米巴样 (图 1B)。

2.2 各组 RMG 共培养后 Ki67 的表达情况

共培养 24 h 后, 取各组 RMG 细胞爬片进行抗 Ki67 免疫荧光染色并进行阳性率统计分析, 比较各组 RMG 的增殖能力。结果显示 LPS 对照组 (图 2B)、NSCs 组 (图 2C) 及 TB-NSCs 组 (图 2D) Ki67 阳性率均较空白对照组 (图 2A) 明显升高 ($P < 0.05$, 图 2E); NSCs 组 Ki67 阳性率较 LPS 对照组降低, 而 TB-NSCs 组 Ki67 阳性率较 NSCs 组升高 (单因素方差分析, SNK-q 检验, $n=6$; $F=211.26$, $*P < 0.05$, 与空白对照组比较; $\#P < 0.05$, 与 NSCs 组比较)。

2.3 各组 RMG 共培养后 TUNEL 的表达情况

共培养 24 h 后, 取各组 RMG 细胞爬片进行 TUNEL 检测并进行阳性率统计分析, 以比较各组 RMG 的凋亡水平。结果显示 LPS 对照组 (图 3B)、NSCs 组 (图 3C) 及 TB-NSCs 组 (图 3D) TUNEL 阳性率均较空白对照组 (图 3A) 升高 ($P < 0.05$, 图 3E); NSCs 组 TUNEL 阳性率较 LPS 对照组稍高 ($P < 0.05$), 而 TB-NSCs 组 TUNEL 阳性率与 NSCs 组间差异无统计学意义。 (单因素方差分析, SNK-q 检验, $n=6$; $F=98.65$; $*P < 0.05$, 与空白对照组比较; $\#P < 0.05$, 与 NSCs 组比较)。

2.4 各组 RMG 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的表达情况

采用 ELISA 方法, 所有检测样品均采用双孔实验, 所得拟合曲线 R^2 值 >0.99 , 结果准确可靠。结果显示空白对照组、LPS 对照组、NSCs 组、TB-NSCs 组 RMG 上清液中 TNF- α 蛋白质量浓度分别为 (2.10 ± 0.65) 、 (25.69 ± 2.01) 、 (20.01 ± 1.63) 、 $(23.76 \pm 1.45) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 同时, IL-1 β 蛋白质量浓度分别为 (1.77 ± 0.74) 、 (15.38 ± 1.18) 、 (10.88 ± 0.95) 、 $(13.45 \pm 1.41) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。LPS 对照组、NSCs 组及 TB-NSCs 组细胞上清液中 TNF- α 及 IL-1 β 蛋白质量浓度较空白对照组明显升高, 差异非常显著; 而 NSCs 组 TNF- α 及 IL-1 β 蛋白质量浓度较 LPS 对照组均降低, 差异具有统计学意义; 另一方面, TB-NSCs 组 TNF- α 及 IL-1 β 蛋白质量浓度却较 NSCs 组有所升高, 差异具有统计学意义。 (单因素方差分析, SNK-q 检验, $n=6$; $F_{\text{TNF-}\alpha}=302.65$, $F_{\text{IL-1}\beta}=179.84$, $*P < 0.05$, 与空白对照组比较, $\#P < 0.05$, 与 NSCs 组比较) (此处为图 4)。

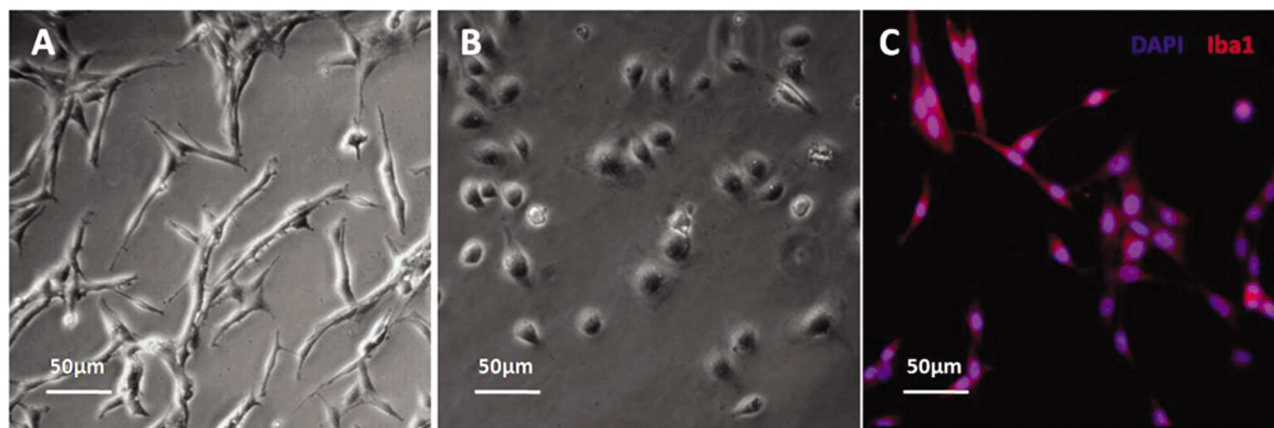


图 1 RMG 的形态学特征及鉴定

注: A. RMG 经纯化后分离培养 10d, 胞体呈分枝状, 贴壁生长 B. LPS 刺激 24 h 后 RMG 呈阿米巴样

C. 纯化及分离培养后的 RMG 细胞呈 Iba1 阳性

Fig.1 Morphological characteristic and identification of RMG

Note: A. Ramified-RMG grew adherent to the wall 10 days after purified by shaking methods B. Amoeboid RMG activated by LPS

C. Primary RMG purified by shaking method were mostly Iba1 positive

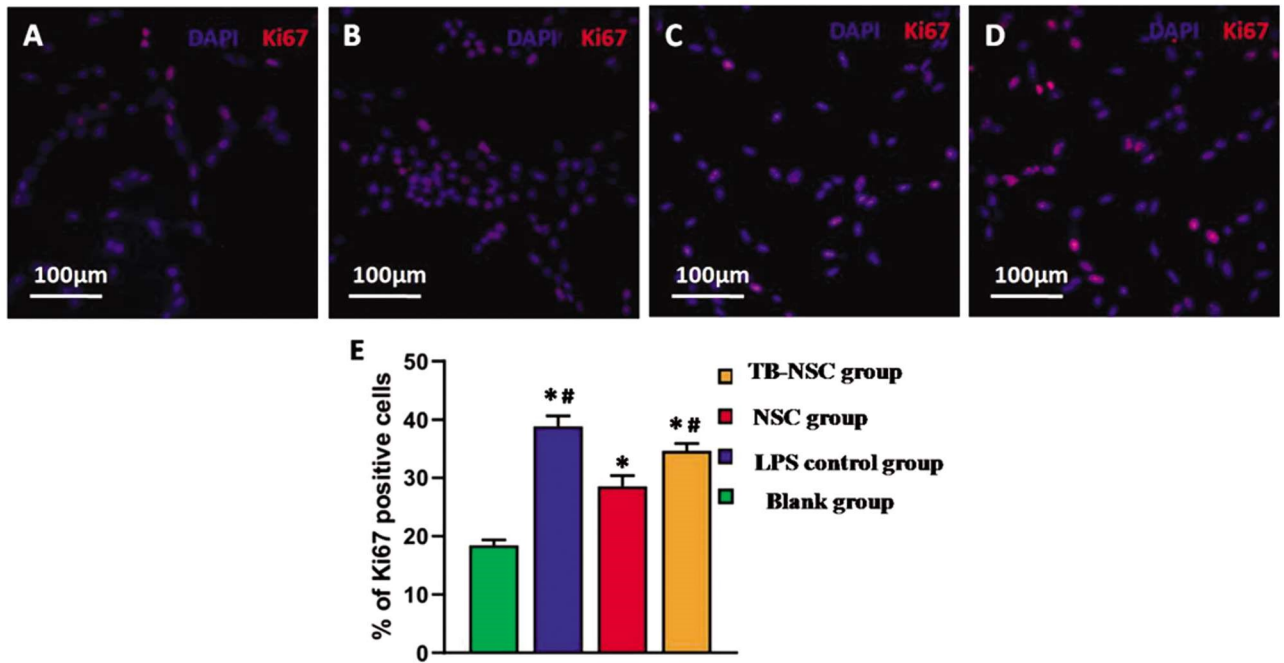


图2 各组RMG共培养后Ki67的表达情况

注: A~D. 各组RMG共培养后Ki67免疫荧光染色 E. 各组RMG共培养后Ki67表达情况统计图(单因素方差分析, SNK-q 检验, $n=6$; $F=211.26$, $*P<0.05$ 与空白对照组比较, $^{\#}P<0.05$ 与 NSCs 组比较)

Fig.2 Comparison of Ki67 positive cells in each group after co-culture

Note: A~D. Immunofluorescence of Ki67 in each group after co-culture E. Histogram of Ki67 rate in each group after co-culture (One-way ANOVA, SNK-q test, $n=6$, $F=211.26$. $*P<0.05$, compared with blank group, $^{\#}P<0.05$, compared with NSC group)

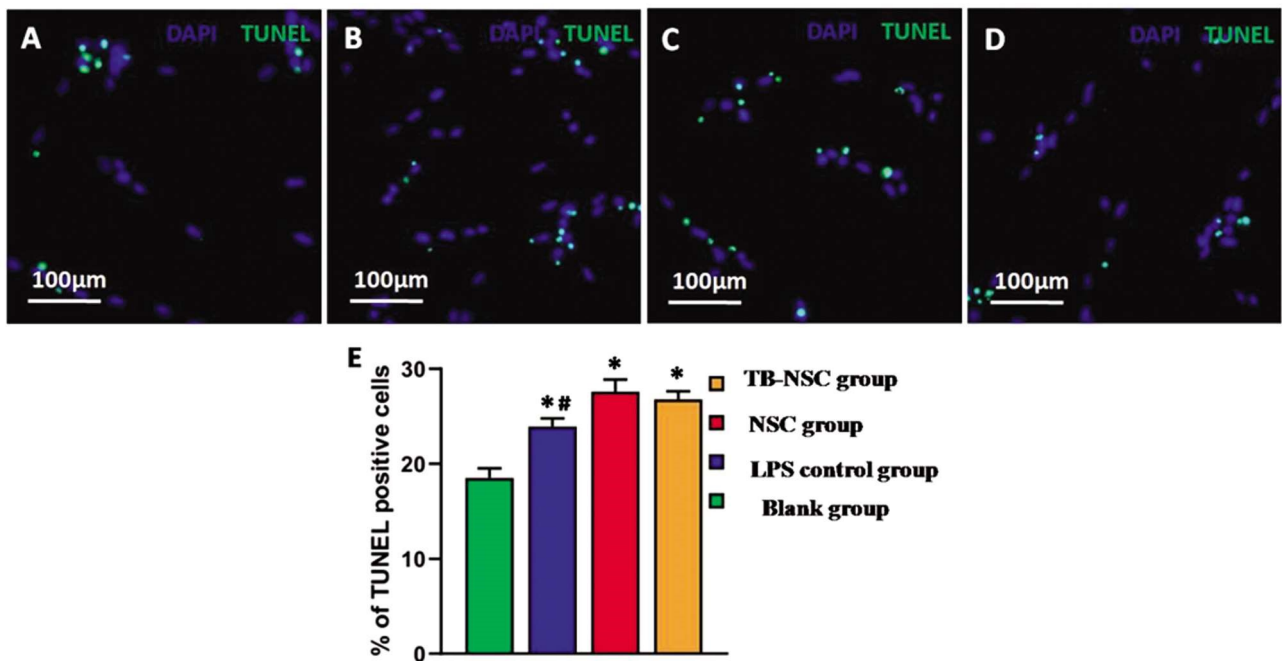


图3 各组RMG共培养后TUNEL的表达情况

注: A. 各组RMG共培养后TUNEL荧光表达 E. 各组RMG共培养后TUNEL表达情况统计图(单因素方差分析, SNK-q 检验, $n=6$; $F=98.65$, $*P<0.05$ 与空白对照组比较, $^{\#}P<0.05$ 与 NSCs 组比较)

Fig.3 Comparison of TUNEL expression in each group after co-culture

Note: A~D. TUNEL expression in each group after co-culture E. Histogram of TUNEL rate in each group after co-culture (One-way ANOVA, SNK-q test, $n=6$, $F=98.65$. $*P<0.05$, compared with blank group, $^{\#}P<0.05$, compared with NSC group)

3 讨论

研究表明 RMG 的活化及其诱发的炎症反应在糖尿病视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、遗传性视网膜色素变性等多

种疾病的发生发展中起重要作用^[1,9-11]。在正常生理状态下, RMG 处于静息状态, 呈分枝状, 监视视网膜内环境稳定, 维持自身平衡; 而在病理状态下, RMG 发生活化反应, 形态呈阿米巴状, 分泌大量细胞因子, 引发下游炎症反应, 起到“双刃剑”作用^[2,12-14]。本研究通过提取原代 RMG, 并利用 LPS 将其激活, 发现提取的 RMG 在激活后突起减少, 胞体呈阿米巴样。另外, 其分泌的炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 也较空白对照组显著增加, 说明可以此模拟病变视网膜中小胶质细胞的在体活化状态。

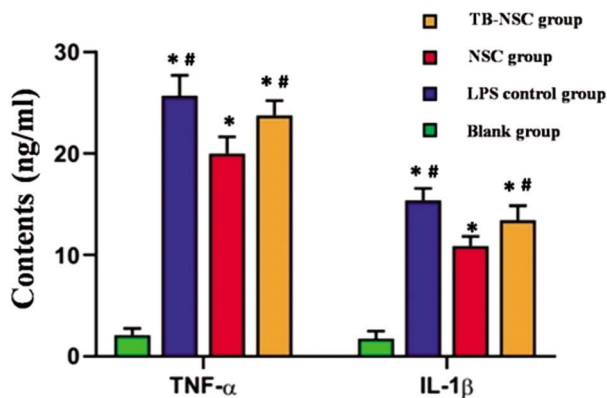


图4 各组共培养体系细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 的蛋白质量浓度

(单因素方差分析, SNK-q 检验, $n=6$; $F_{\text{TNF-}\alpha}=302.65$, $F_{\text{IL-1}\beta}=179.84$, $*P<0.05$ 与各自空白对照组比较, $\#P<0.05$ 与各自 NSCs 组比较)

Fig.4 Contents of TNF- α and IL-1 β from supernatant in each co-culture group

Note: One-way ANOVA, SNK-q test, $n=6$, $F_{\text{TNF-}\alpha}=302.65$, $F_{\text{IL-1}\beta}=179.84$.

$*P<0.05$, compared with blank group, $\#P<0.05$, compared with NSC group

大量研究已证实 NSCs 具有较强的分化潜能及免疫调控特性, 目前已被广泛用于干细胞移植治疗领域的研究^[3,4,15-18]。早期有学者利用 EAE 动物模型证实将 NSCs 注射在小鼠受损脊髓的邻侧和末端后能够降低 M1 型小胶质细胞浸润, 促进受损脊髓恢复^[19]。另外, Gao 等^[20]通过在闭合性脑损伤动物模型中的研究也发现将 NSCs 移植入中枢神经系统后, 可通过 CX-CL12/CXCR4 信号通路抑制小胶质细胞的活化反应, 从而挽救神经元死亡, 发挥神经保护作用。在眼科领域, 本小组前期研究成果已经证实 rd1 小鼠视网膜变性进程中, NSCs 早期移植入变性视网膜下腔可以有效抑制 RMG 向活化状态转变及迁移, 降低外核层光感受器细胞凋亡率, 延缓视网膜变性进程^[21]。但由于病变视网膜内免疫环境复杂多变, 且在体研究方法有限, 本研究中我们构建了 Transwell 体外共培养模式, 其中两类细胞并不相互接触, 但允许细胞因子的自由交换, 以便于进一步探索 NSCs 对 RMG 生物学功能的影响及相关分子机制。

本研究通过免疫荧光法检测 Ki67 以及 TUNEL 细胞凋亡染色技术, 发现 RMG 与 NSCs 体外共培养后, 增殖能力降低, 凋亡水平升高。另一方面, 经 LPS 活化的 RMG 分泌 TNF- α 及 IL-1 β 的蛋白表达量均显著上升, 而 NSCs 组的蛋白表达量较 LPS 对照组均有所下降, 提示 NSCs 不仅可调控 RMG 的增殖和凋亡能力, 还可抑制 RMG 分泌促炎因子, 影响下游相关的免疫反应。这与前述中枢神经系统中 NSCs 对小胶质细胞的相

关免疫调控作用相一致, 也与本研究小组前期的在体实验研究结果相匹配。

目前, 关于 NSCs 对 RMG 的免疫调控机制仍缺乏细致探讨。Plachino 等人^[22]总结干细胞与免疫环境间相互作用的机制大致可分为四类: 第一, 内分泌作用, 即干细胞通过分泌不同细胞因子入血后到达相应病变组织产生调控效应^[23]; 第二, 旁分泌作用, 是通过干细胞分泌相关免疫调控因子, 到达与其邻近的病变组织产生调控效应^[24]; 第三, 细胞间直接接触, 即与免疫细胞产生直接接触后的信号通路传递调控因子^[25]; 第四, 细胞外囊泡, 即分泌出包含有相关调控因子的微囊泡或外泌体(exosome), 当微囊泡被靶细胞内吞后发生下游调控效应^[26,27]。Mosher 等^[27]将 NSCs 移植入大鼠颅内后, 发现如果阻断 NSCs 释放 VEGF, 小胶质细胞的活性及增殖能力较非处理组明显升高, 而人为的重新添加 VEGF 后, 这种差别消失, 提示 NSCs 可能通过分泌 VEGF 产生旁分泌作用从而调控中枢神经系统的免疫环境。该研究小组通过蛋白芯片技术还发现 NSCs 与小胶质细胞共培养后, 还有许多其他的细胞因子表达也出现显著上升, 包括基质金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP1)、结合珠蛋白(haptoglobin, Hp)等。

基质金属蛋白酶 9(metalloproteinases, MMP9)是小胶质细胞参与胞外基质降解、迁移及炎症反应的重要因素^[6], 而 NSCs 分泌的 TIMP1 正是 MMP9 的特异性抑制剂, 可以与 MMP9 的酶原或活化之后的催化区特异性结合, 形成复合物, 从而降低其活性。本研究小组前期工作中也证实 NSCs 在共培养组中 TIMP1 表达量明显升高, 并降低了共培养体系中 BV2 小胶质细胞 MMP9 的蛋白表达量^[21]。本研究通过提取原代 RMG 则进一步发现经 LPS 活化的 RMG 与 NSCs 共培养后, 增殖能力降低, 凋亡水平升高, TNF- α 及 IL-1 β 的分泌量明显减少, 说明 NSCs 确实对 RMG 的相关生物学功能产生了影响; 而封闭 NSCs 所分泌的 TIMP1 后能够逆转该生物学影响, 提示 TIMP1/MMP9 可能参与了 NSCs 对 RMG 的免疫调控作用。

综上所述, 体外共培养模式下, NSCs 可抑制 RMG 增殖能力, 提高其凋亡水平, 并抑制其分泌促炎因子 TNF- α 及 IL-1 β , 该效应可能与 TIMP1/MMP9 调控途径相关。虽然 TIMP1/MMP9 的下游信号通路尚未详细阐明, 亦不能逆转共培养后 RMG 凋亡水平的上升, 但本研究在一定程度上解释了 NSCs 对 RMG 生物学功能产生影响的相关机制, 为 NSCs 应用于眼内移植的干细胞治疗做出了新的探索。

参考文献(References)

- [1] Di Marco S, Carnicelli V, Franceschini N, et al. Saffron: A Multitask Neuroprotective Agent for Retinal Degenerative Diseases[J]. Antioxidants (Basel, Switzerland), 2019, 8(7)[Epub ahead of print]
- [2] Lin JB, Apte RS. Visualizing the Heterogeneity of Retinal Microglia [J]. Immunity, 2019, 50(3): 544-546
- [3] Katoh H, Yokota K, Fehlings MG. Regeneration of Spinal Cord Connectivity Through Stem Cell Transplantation and Biomaterial Scaffolds [J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2019, 13[Epub ahead of print]
- [4] Liao L-Y, Lau BW-M, Sanchez-Vidana DI, et al. Exogenous neural stem cell transplantation for cerebral ischemia [J]. Neural Regeneration Research, 2019, 14(7): 1129

- [5] Cusimano M, Bizziato D, Brambilla E, et al. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord[J]. *Brain*, 2012, 135(Pt 2): 447-460
- [6] De Groef L, Andries L, Lemmens K, et al. Matrix metalloproteinases in the mouse retina: a comparative study of expression patterns and MMP antibodies[J]. *Bmc Ophthalmology*, 2015, 15: 187
- [7] Mosher KI, Andres RH, Fukuhara T, et al. Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 1485-1487
- [8] 吴楠, 王艳华, 王蕊, 等. α 晶状体蛋白对脂多糖诱导的视网膜小胶质细胞增生及 TNF- α 表达的影响 [J]. *眼科研究*, 2007, 25(12): 912-915
- [9] Wooff Y, Man SM, Aggio-Bruce R, et al. IL-1 Family Members Mediate Cell Death, Inflammation and Angiogenesis in Retinal Degenerative Diseases [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10 [Epub ahead of print]
- [10] Chen M, Luo C, Zhao J, et al. Immune regulation in the aging retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2019, 69: 159-172
- [11] Peng B, Xiao J, Wang K, et al. Suppression of microglial activation is neuroprotective in a mouse model of human retinitis pigmentosa[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(24): 8139-8150
- [12] Di Pierdomenico J, Garcia-Ayuso D, Agudo-Barriuso M, et al. Role of microglial cells in photoreceptor degeneration. *Neural Regeneration Research*, 2019, 14(7): 1186-1190
- [13] Zeng H, Ding M, Chen XX, et al. Microglial NADPH oxidase activation mediates rod cell death in the retinal degeneration in rd mice[J]. *Neuroscience*, 2014, 275: 54-61
- [14] Karlstetter S, Scholz R, Rutar M, et al. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy?[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2015, 45: 30-57
- [15] Kokaia Z, Martino G, Schwartz M, et al. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15: 1078-1087
- [16] Zhang JX, Wang NL, Lu QJ. Development of gene and stem cell therapy for ocular neurodegeneration [J]. *Int J Ophthalmol*, 2015, 8: 622-630
- [17] Liu J, Hjorth E, Zhu M, et al. Interplay between human microglia and neural stem/progenitor cells in an allogeneic co-culture model [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(11): 1434-1443
- [18] McGill TJ, Cottam B, Lu B, et al. Transplantation of human central nervous system stem cells - neuroprotection in retinal degeneration[J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 35: 468-477
- [19] Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism[J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 266-271
- [20] Gao M, Dong Q, Yao H, et al. Induced neural stem cells modulate microglia activation states via CXCL12/CXCR4 signaling [J]. *Brain Behavior and Immunity*, 2017, 59: 288-299
- [21] Li Z, Zeng Y, Chen X, et al. Neural stem cells transplanted to the sub-retinal space of rd1 mice delay retinal degeneration by suppressing microglia activation[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(6): 771-784
- [22] Pluchino S, Cossetti C. How stem cells speak with host immune cells in inflammatory brain diseases[J]. *Glia*, 2013, 61: 1379-1401
- [23] Lee S-T, Chu K, Jung K-H, et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke [J]. *Brain*, 2008, 131: 616-629
- [24] Bai L, Lennon DP, Caplan AI, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models[J]. *Nature Neuroscience*, 2012, 15(6): 862-U86
- [25] Cselenyak A, Pankotai E, Horvath EM, et al., Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections[J]. *Bmc Cell Biology*, 2010, 11: 29
- [26] Martino G, Pluchino S, Bonfanti L, et al. Brain Regeneration in Physiology and Pathology: The Immune Signature Driving Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells [J]. *Physiological Reviews*, 2011, 91(4): 1281-1304
- [27] Xin H, Li Y, Buller B, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth[J]. *Stem Cells*, 2012, 30(7): 1556-1564

(上接第 1839 页)

- [30] Drulis-Fajdasz D, Gizak A, Wojtowicz T, et al. Aging-associated changes in hippocampal glycogen metabolism in mice [J]. *Evidence for and against astrocyte-to-neuron lactate shuttle*, 2018, 66(7): 1481-1495
- [31] Mooradian AD, Morin AM, Cipp LJ, et al. Glucose transport is reduced in the blood-brain barrier of aged rats[J]. *Brain Res*, 1991, 551(1-2): 145-149
- [32] Hooijmans CR, Graven C, Dederen PJ, et al. Amyloid beta deposition is related to decreased glucose transporter-1 levels and hippocampal atrophy in brains of aged APP/PS1 mice[J]. *Brain Res*, 2007, 1181: 93-103