

# 脐带血间充质干细胞对角膜新生血管形成的抑制作用

阿布都萨塔尔·艾山<sup>1</sup>, 刘雪珂<sup>1</sup>, 杨燕川<sup>1</sup>, 甘露<sup>2</sup>, 李霞<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学研究生院, 新疆 乌鲁木齐

<sup>2</sup>新疆石河子大学医学院, 新疆 石河子

<sup>3</sup>新疆四七四医院眼科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2024年2月27日; 录用日期: 2024年3月21日; 发布日期: 2024年3月31日

## 摘要

目的: 研究球结膜下注射人脐带血来源的间充质干细胞悬液治疗角膜碱烧伤新生血管的有效性。方法: 本研究将30只新西兰家兔制备右眼碱烧伤模型, 随机分实验组和对照组各15只(15眼)。实验组球结膜下注射脐带血来源间充质干细胞悬液, 对照组不给予球结膜下治疗。采用裂隙灯生物显微镜观察并拍照记录注射后第5天, 14天角膜新生血管情况, 计算角膜新生血管面积。取两组角膜进行HE染色, 观察角膜上皮愈合情况。结果: 实验结果显示, 第5天实验组和对照组之间的角膜新生血管面积差异没有显著性统计意义( $P > 0.05$ ), 但第14天实验组的新生血管面积显著小于对照组( $P < 0.05$ )。结论: 本研究结果证明, 球结膜下注射人脐带血间充质干细胞可抑制角膜新生血管并促进碱烧伤角膜上皮的修复。

## 关键词

脐带血间充质干细胞, 角膜碱烧伤, 角膜新生血管

# Inhibitory Effect of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Corneal Neovascularization

Abdusattar·Hasan<sup>1</sup>, Xueke Liu<sup>1</sup>, Yanchuan Yang<sup>1</sup>, Pei Gan<sup>2</sup>, Xia Li<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

<sup>2</sup>Medical Science Center, Xinjiang Shihezi University, Shihezi Xinjiang

<sup>3</sup>Department of Ophthalmology, Xinjiang 474 Hospital, Urumqi Xinjiang

Received: Feb. 27<sup>th</sup>, 2024; accepted: Mar. 21<sup>st</sup>, 2024; published: Mar. 31<sup>st</sup>, 2024

\*通讯作者。

文章引用: 阿布都萨塔尔·艾山, 刘雪珂, 杨燕川, 甘露, 李霞. 脐带血间充质干细胞对角膜新生血管形成的抑制作用[J]. 临床医学进展, 2024, 14(3): 2168-2174. DOI: 10.12677/acm.2024.143959

## Abstract

**Objective:** To study the effectiveness of subconjunctival injection of mesenchymal stem cell suspension derived from human umbilical cord blood in the treatment of neovascularization in corneal alkali burns. **Methods:** In this study, 30 rabbits in New Zealand were prepared right eye alkali burn models and randomly divided into experimental and control groups (15 eyes). Subconjunctival injection of umbilical cord blood derived mesenchymal stem cell suspension in the experimental group was not followed by subconjunctival treatment in the control group. New corneal blood vessels were observed and photographed using a fissure biopsy 5 and 14 days after injection. Two groups of corneas were taken for HE staining to observe the healing of corneal epithelium. **Results:** There was no statistically significant difference in the area of new corneal vessels between day 5 and control group ( $P > 0.05$ ), but the area of new corneal vessels was significantly smaller in day 14 group than in control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Our results demonstrate that subconjunctival injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibits new corneal vessels and promotes repair of alkali burned corneas.

## Keywords

Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells, Corneal Alkali Burns, Corneal Neovascularization

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

角膜化学伤是一种严重的眼外伤之一，占有眼外伤的 15%，其中碱烧伤是最常见的[1]。角膜碱烧伤引起的一种常见的病理改变是角膜新生血管的形成，它可以显著改变角膜的屈光状态，从而降低视觉质量，甚至可能导致失明[2]。角膜碱烧伤临床上的药物治疗方法有给予类固醇激素、非甾体抗炎药、免疫抑制剂等。手术方式有羊膜移植、角膜移植等，然而，供体资源有限，术后高排斥反应等原因此方法在临床上可能受限。因此发现一种高效的治疗方法来抑制病理性新生血管形成至关重要。

间充质干细胞(MSC)是从脂肪组织、骨髓、脐带及脐带血等组织分离出来的一种多能细胞。最近，越来越多的证据表明 MSC 具有从组织修复、再生到免疫调节，抗炎功能的多功能特性[3]。研究表明，间充质干细胞技术可能成为一种有效的角膜烧伤治疗方法，并且具有巨大的潜力[4] [5]。人脐带血间充质干细胞(Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells, hUCB-MSCs)与其他组织来源的 MSC 相比其增殖率高达 1000 倍以上[6]，而且不会引发免疫排斥反应，也不会涉及伦理学问题。目前 hUCB-MSCs 在治疗 I 型糖尿病[7]、骨关节炎[8]、急性移植物抗宿主病[9]、下肢血管闭塞等难治性疾病中取得了良好的效果[10]。鉴于上述问题，本研究旨在探讨结膜下注射脐带血来源的间充质干细胞对碱烧伤兔角膜上皮的愈合和新生血管的影响。

## 2. 方法与材料

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 动物及分组

新西兰白兔 30 只，均符合健康标准，并经过裂隙灯下检查眼前节正常，雌雄各半，体重介于 2.0~2.5

kg, (购自新疆医科大学实验动物中心), 并随机分为实验组和对照组, 每组 15 只, 在同一个饮食和环境下饲养。两组实验兔均建立右眼角膜碱烧伤模型。实验组兔右眼建模后球结膜下立即注射 hUCB-MSCs 细胞悬液; 对照组兔右眼建模后未进行处理。

### 2.1.2. 脐带血的采集

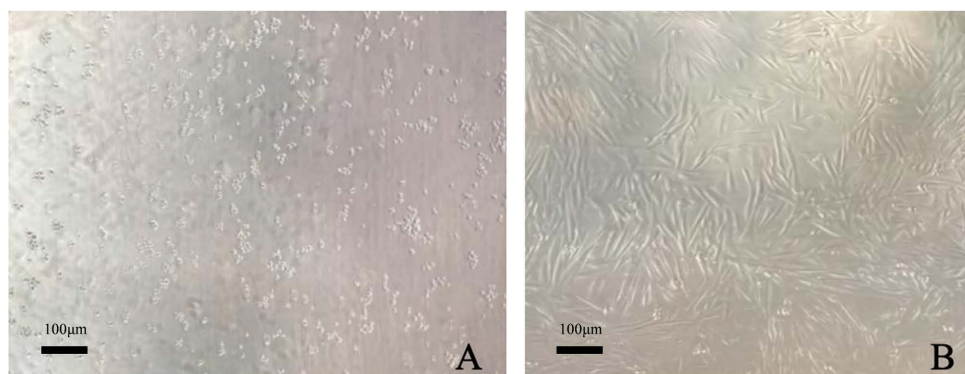
本实验经医院伦理委员会许可, 获得产妇同意并签署知情同意书, 共采集 50 例脐带血样本, 标本均来自于新疆四七四医院妇产科, 标本溶血弃之不用, 产妇无妊娠合并症, 无血液传染性疾病、家族遗传性疾病和血液系统疾病并年龄控制在 20~32 岁。无菌条件下, 采用 200 ml 一次性塑料采血袋进行脐带血的采集。采血完毕立即将血袋封口, 放置于 4℃ 的环境保存。所有标本均在收集后 6~8 小时内开始进行分离和培养。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. hUCB-MSCs 的分离和培养

密度梯度离心法分离脐带血单核细胞首先, 将脐带血与 0.9% NaCl 溶液按照 1:2 的比例稀释并充分混合, 然后在 3000 r/min 转速下离心 10 分钟, 将上清液倒掉。接下来, 加入 NaCl 溶液并重悬, 将细胞收集在 50 ml 离心管中并进行充分混合, 总体积控制在 30 ml 以内。然后, 通过 200 目的不锈钢筛网过滤细胞, 并将其叠加在 15 ml 淋巴细胞分离液上, 确保稀释脐带血与淋巴细胞分离液的比例小于 2:1。接下来, 将以 2000 r/min 转速下离心 20 分钟, 以便吸取界面层的白色云雾状单个核细胞层。随后, 将用 NaCl 溶液进行重悬, 并以 2000 r/min 转速下进行离心洗涤。然后, 以 1500 r/min 转速下进行离心洗涤。最后, 在 1000 r/min 转速下进行离心洗涤。光学显微镜下应用细胞计数板计数, 调整细胞密度制备细胞悬液, 并用盼蓝染色了解细胞活性。

对脐带血间充质干细胞进行培养的步骤如下: 首先, 将脐带血单核细胞加入 Dulbecco's 培养基中, 制成单核细胞悬液。然后, 吸取 50 ul 的稀释液, 将其混匀后进行细胞计数。根据细胞密度的要求, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  细胞密度, 并将其接种于 T25 培养瓶中。将培养瓶放置于 37℃、含有 5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度的培养箱中进行培养。在贴壁培养 3 天后, 更换新鲜的培养液。其余的操作方法与之前相同。当细胞达到 80% 融合时, 使用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 混合液进行消化。在显微镜下控制消化的时间, 并按照 1:2 的比例进行传代培养。以培养出均一、梭形的成纤维样细胞并呈漩涡状排列作为脐带血间充质干细胞(hUCB-MSCs)初步培养成功的标志。每天使用倒置相差显微镜观察原代和传代细胞的生长情况和形态特征, 并拍照(图 1)。



**Figure 1.** (A) Mononuclear cells after centrifugation of umbilical cord blood; (B) third-generation umbilical cord blood mesenchymal stem cells

**图 1.** (A)脐带血离心分离后的单个核细胞; (B)第三代脐带血间充质干细胞

### 2.2.2. 角膜碱烧伤模型的建立、球结膜下注射 hUCB-MSCs 和观察

建立角膜碱烧伤模型把滤纸剪成直径大约为 6 mm 的圆形滤纸片，然后将其放入浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液中浸泡，再用镊子小心取出并在空气中轻轻晃动以去除仍滴落的水滴。随后，把纸片放在兔子的右眼角膜中央，并计时。30 秒过后，立即将纸片取出并迅速用充足的生理盐水冲洗角膜和结膜囊，持续 3 分钟。在模型构建完成后，实验组的兔子给予球结膜下注射 hUCB-MSCs 细胞悬液，而对照组不给予球结膜下注射治疗。记录每组兔子角膜新生血管面积以及上皮细胞恢复情况。每日间隔 4 小时两组均给予局部滴眼治疗，使用左氧氟沙星滴眼液，每天总共进行四次。

### 2.2.3. HE 染色观察

将兔眼角膜组织样本置于 4% 多聚甲醛液中固定，并随后进行石蜡包埋处理。使用苏木精和伊红对切片进行染色处理。观察角膜上皮的恢复情况，检测角膜基质的水肿变化，并评估角膜基质中炎症细胞的浸润程度。

### 2.2.4. 统计学分析

数据将被用于在 SPSS 28.0 软件中进行统计分析，并使用夏皮罗-威尔克检验来进行正态性检验。对于方差齐性的检验，可以使用 Levene 检验进行采样。计量资料的均值和标准差表示，符合正态分布且具有方差齐性的数据，采用独立样本 t 检验来比较对照组和实验组之间的差异，检验水准为双侧  $\alpha = 0.05$ 。

## 3. 结果

### 3.1. UCB-MSCs 对角膜新生血管的影响

经过角膜碱烧伤模型的建立，可以观察到角膜烧伤病灶。建模 3 d 后，在角膜缘可见新生血管；对照组 7 d 时可见新生血管长入角膜烧伤区，对照组与实验组相比角膜新生血管生长快；14 d 时，实验组与对照组相比生长角膜新生血管的面积小(图 2)，两组总体差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ，见表 1)。

**Table 1.** Corneal neovascularization area in each group at different times after establishment of rabbit corneal alkali burn model (S/mm<sup>2</sup>)

**表 1.** 兔角膜碱烧伤模型建立后各组不同时间的角膜新生血管面积(S/mm<sup>2</sup>)

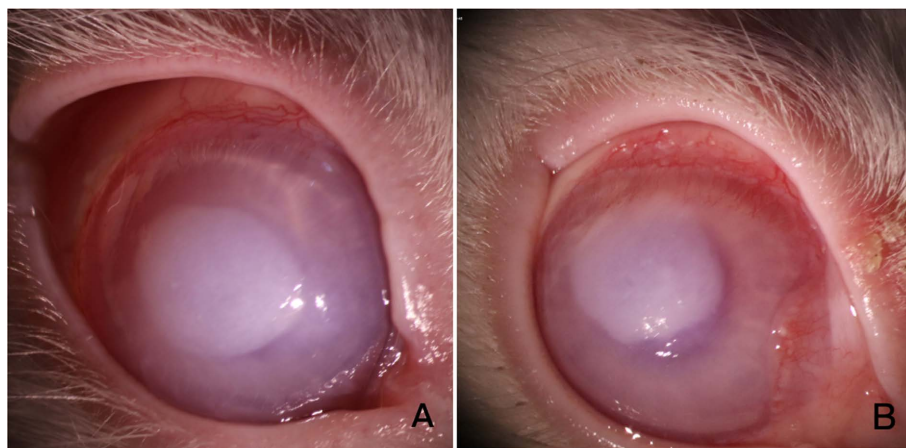
组别	Day 5	Day 14
实验组	52.98 ± 2.91	84.46 ± 6.65
对照组	51.45 ± 4.42	95.40 ± 12.87
t	1.42	2.29
P	>0.05	<0.05

### 3.2. 组织病理学

实验组碱烧伤后 3 d 观察角膜基质层水肿，炎症细胞少量浸润，随后 7 d、14 d 水肿和炎症细胞都逐渐减少。两组角膜组织造模后的第 14 d 取下来的角膜 HE 染色发现实验组角膜组织各层可见炎症细胞，角膜基质轻中度的水肿，而对照组可见大量的炎症细胞浸润，基质层明显水肿，实验组角膜上皮相对对照组修复显著快。图 3(A)为实验组；图 3(B)为空白对照组。

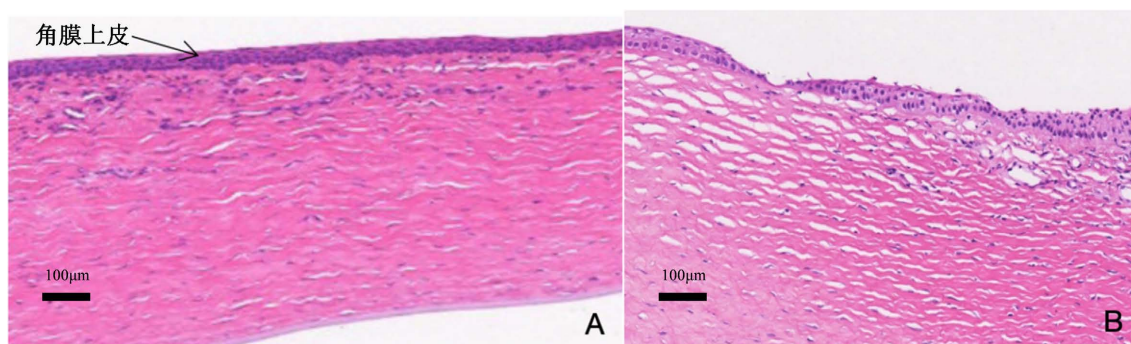
## 4. 讨论

角膜新生血管的发生机制尚不明确。角膜新生血管形成过程中的关键血管因子有 VEGF，是一种功



**Figure 2.** Fourteen days after subconjunctival injection of UCB-MSCs, the area of corneal neovascularization in the experimental group was significantly reduced compared with the control group (A: experimental group, B: control group)

**图 2.** 球结膜下注射 UCB-MSCs 后 14 d, 实验组与对照组相比角膜新生血管面积显著减少(A: 实验组, B: 对照组)



**Figure 3.** HE staining of corneal tissue 14 days after alkali burn (A: experimental group, B: control group)

**图 3.** 碱烧伤后 14 d 角膜组织 HE 染色(A: 实验组, B: 对照组)

能最显著的促血管形成因子[11]。角膜碱烧伤导致的新生血管形成可能与炎症细胞的侵入有关[12]。Yang 等研究者提出,角膜碱烧伤早期能减少炎症反应,可减少角膜新生血管形成[13][14][15]。本研究结果也提示,实验组角膜基质炎症细胞明显减少,角膜新生血管的面积也显著减少,可推测早期控制炎症细胞可减少角膜新生血管。间充质干细胞具有分泌多种因子比如:生长因子、趋化因子和细胞因子等[16][17]。间充质干细胞移植已采用不同的给药途径用于角膜疾病,例如基质内注射、结膜下给药和使用纳米纤维支架及全身给药。研究发现,羊膜作为支架材料面临着羊膜来源有限、加上无菌条件以及疾病传播的问题[18]。Ghazaryan Zhang [19]的研究表明,结膜下注射可以避免上述的羊膜的局限性,降低了 VEGF 水平,从而在角膜碱烧伤的诊疗取得了更好的效果。本研究结果同于上述研究者提出的结论,球结膜下给药虽然是一种创伤性给药方式,本实验结果也提示与其他给药方式相比球结膜下注射是一种相对安全并有效的方法。hUCB-MSCs 具有低免疫原性、用非侵入性方法收集等优势。本实验将制备好的 hUCB-MSCs 细胞悬液注射于角膜碱烧伤动物模型右眼的球结膜下,在 14 d 的观察中,实验组的角膜新生血管的生长面积明显小于对照组,推测 hUCB-MSCs 减少角膜新生血管可能与降低 VEGF 水平有关。总之脐带血来源的间充质干细胞可以作为角膜碱烧伤的干细胞治疗中的良好的选择。

## 5. 结论

从实验结果来看, hUCB-MSCs 与其他来源的间充质干细胞作用效果相似。这为角膜碱烧伤治疗提供

了新的方法，并拓宽了这种基于干细胞疗法的前景。

## 基金项目

乌鲁木齐市卫生健康委科技计划项目(202142)，新疆四七四医院院内项目合同书(2023xj474001)。

## 参考文献

- [1] Sharma, N., Kaur, M., Agarwal, T., *et al.* (2018) Treatment of Acute Ocular Chemical Burns. *Survey of Ophthalmology*, **63**, 214-235. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2017.09.005>
- [2] Li, M.S., Yu, X., Zhu, L., Jin, Y.G. and Wu, Z.H. (2021) Ocular Lamellar Crystalline Gels for Sustained Release and Enhanced Permeation of Resveratrol against Corneal Neovascularization. *Drug Delivery*, **28**, 206-217. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1872739>
- [3] Chen, M.X., Chen, X.N., Li, X.Q., *et al.* (2023) Subconjunctival Administration of Mesenchymal Stem Cells Alleviates Ocular Inflammation in a Murine Model of Corneal Alkali Burn. *Stem Cells*, **41**, 592-602. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxad027>
- [4] Lee, D.E., Ayoub, N. and Agrawal, D.K. (2016) Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Novel Methods to Increase Cell Delivery and Therapeutic Efficacy. *Stem Cell Research & Therapy*, **7**, Article No. 37. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0303-6>
- [5] Navas, A., Magaña-Guerrero, F.S., Domínguez-López, A., *et al.* (2018) Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Effects of Human Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Corneal Repair. *Stem Cells Translational Medicine*, **7**, 906-917. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0042>
- [6] Yang, S.-E., Ha, C.-W., Jung, M.H., *et al.* (2004) Mesenchymal Stem/Progenitor Cells Developed in Cultures from UC Blood. *Cytotherapy*, **6**, 476-486. <https://doi.org/10.1080/14653240410005041>
- [7] Stiner, R., Alexander, M., Liu G.Y., *et al.* (2019) Transplantation of Stem Cells from Umbilical Cord Blood as Therapy for Type 1 Diabetes. *Cell and Tissue Research*, **378**, 155-162. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03046-2>
- [8] Jeon, H.-J., Yoon, K.-A., An E.S., *et al.* (2020) Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Cartilage Acellular Matrix Mediated via Bone Morphogenic Protein 6 in a Rabbit Model of Articular Cruciate Ligament Transection. *Stem Cell Reviews and Reports*, **16**, 596-611. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09958-9>
- [9] Yang, S., Wei, Y.X., Sun, R., *et al.* (2020) Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Myeloid-Derived Suppressor Cell Proliferation By Secreting HLA-G To Reduce Acute Graft-Versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cytotherapy*, **22**, 718-733. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.07.008>
- [10] Zhang, Y.Z., Chen, W.Y., Feng, B. and Cao, H.C. (2020) The Clinical Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy for Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ageing and Disease*, **11**, 141-153. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0421>
- [11] 曹瑾, 吕旭东. PXN-pY<sup>31</sup>, PXN-pY<sup>118</sup> 在小鼠角膜新生血管形成中的表达变化[J]. 眼科新进展, 2020, 40(4): 5.
- [12] Voiculescu, O.B. (2015) Corneal Neovascularization and Biological Therapy. *Journal of Medicine and Life*, **8**, 444-448.
- [13] Yang, S.J., Jo, H., Kim, K.-A., *et al.* (2016) Diospyros Kaki Extract Inhibits Alkali Burn-Induced Corneal Neovascularization. *Journal of Medicinal Food*, **19**, 106-109. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.3404>
- [14] Han, K.-Y., Tran, J.A., Chang, J.-H., Azar D.T. and Zieske, J.D. (2017) Potential Role of Corneal Epithelial Cell-Derived Exosomes in Corneal Wound Healing and Neovascularization. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 40548. <https://doi.org/10.1038/srep40548>
- [15] Kim, J.S., Choi, J.S. and Chung, S.K. (2010) The Effect of Curcumin on Corneal Neovascularization in Rabbit Eyes. *Current Eye Research*, **35**, 274-2800. <https://doi.org/10.3109/02713680903528345>
- [16] Kumar L., P., Kandoi, S., Misra, R., *et al.* (2019) The Mesenchymal Stem Cell Secretome: A New Paradigm towards Cell-Free Therapeutic Mode in Regenerative Medicine. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **46**, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.04.002>
- [17] Gaceb, A., Barbariga, M., Özen, I. and Paul, G. (2018) The Pericyte Secretome: Potential Impact on Regeneration. *Biochimie*, **155**, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.015>
- [18] Marsit, N.M., Sidney, L.E., Britchford, E.R., *et al.* (2019) Validation and Assessment of an Antibiotic-Based, Aseptic Decontamination Manufacturing Protocol for Therapeutic, Vacuum-Dried Human Amniotic Membrane. *Scientific Reports*, **9**, Article No. 12854. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49314-7>

- [19] Ghazaryan, E., Zhang Y., He, Y.X., *et al.* (2016) Mesenchymal Stem Cells in Corneal Neovascularization: Comparison of Different Application Routes. *Molecular Medicine Reports*, **14**, 3104-3112. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5621>