

# TNF- $\alpha$ 诱导的人脐带间充质干细胞培养基对小鼠角膜缘干细胞缺乏的治疗作用

于浩南<sup>1</sup>, 钟莹莹<sup>2</sup>, 王新萌<sup>1</sup>, 张敏<sup>3</sup>, 姜清敏<sup>2</sup>, 李娜<sup>2</sup>, 李艳<sup>2</sup>

1. 潍坊医学院附属医院(临床医学院) 潍坊医学院, 山东 潍坊 261031

2. 潍坊医学院附属医院 眼科中心, 山东 潍坊 261041

3. 暨南大学番禺校区第一临床医学院, 广东 广州 511436

**摘要:** **目的** 探讨局部应用肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 诱导的人脐带间充质干细胞条件培养基 (conditioned medium for human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSC-CM) 对小鼠角膜缘干细胞缺乏 (limbal stem cell deficiency, LSCD) 的修复作用。 **方法** 应用组织块贴壁培养技术培育原代人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSCs)。用 TNF- $\alpha$  诱导第 4 代 hUCMSCs 得到 TNF- $\alpha$  诱导的人脐带间充质干细胞条件培养基 (conditioned medium for human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by TNF- $\alpha$ , hUCMSC-CMT)。48 只健康 6 周龄 C57 雄性小鼠, 随机分为对照组 (N 组) 和 LSCD 实验组, LSCD 实验组模型采取角膜缘碱烧伤方式建立, 依据造模后结膜下注射的成分不同, 分为 PBS 注射阴性对照组 (A 组)、hUCMSC-CM 注射治疗组 (B 组) 及 hUCMSC-CMT 注射治疗组 (C 组), 结膜下注射为每天 1 次, 连续 7 d。于 LSCD 造模后第 3、7 天裂隙灯显微镜下观察角膜上皮缺损程度并评分, 于 LSCD 造模后第 7、21 天裂隙灯显微镜下观察角膜新生血管情况并评分。于 LSCD 造模后第 7、21 天应用免疫组织化学染色法检测  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和眼表黏蛋白 5AC (mucin 5AC, Muc-5AC) 的表达情况。 **结果** 造模后 3 d, A 组小鼠见角膜上皮大片缺失; 7 d 见角膜缘血管扩张充血, 角膜上皮缺损面积大于 2/3 角膜; 21 天见角膜缘较多新生血管长入, 部分可及 2/3 角膜直径。B、C 各时间点减少角膜新生血管和修复角膜上皮缺损方面都有明显改善, 且 C 组效果强于 B 组。免疫组织化学染色观察发现, 对照组角膜基质中均无  $\alpha$ -SMA 表达, 角膜上皮层未见 Muc-5AC 表达。造模后 7、21 d, 各实验组  $\alpha$ -SMA 表达均为阳性, B 组和 C 组均低于 A 组。三个实验组第 7 天的 Muc-5AC 平均光密度值组间无统计学意义, 而第 21 天组间两两比较均具有统计学意义。 **结论** 结膜下注射 hUCMSC-CMT 或 hUCMSC-CM 可以增强角膜缘干细胞功能, 促进角膜上皮修复, 保护眼表组织; 且 hUCMSC-CMT 对小鼠角膜缘干细胞缺乏的修复和治疗作用强于 hUCMSC-CM。

**关键词:** 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 间充质干细胞; 角膜缘干细胞缺乏; 条件培养基

**中图分类号:** R772.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-3770(2025)03-0141-07

**引用格式:** 于浩南, 钟莹莹, 王新萌, 等. TNF- $\alpha$  诱导的人脐带间充质干细胞培养基对小鼠角膜缘干细胞缺乏的治疗作用 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2025, 39(3):141-147. YU Haonan, ZHONG Yingying, WANG Xinmeng, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by TNF- $\alpha$  on limbal stem cell deficiency in mice [J]. Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University, 2025, 39(3):141-147.

## Therapeutic effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells induced by TNF- $\alpha$ on limbal stem cell deficiency in mice

YU Haonan<sup>1</sup>, ZHONG Yingying<sup>2</sup>, WANG Xinmeng<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>3</sup>, JIANG Qingmin<sup>2</sup>, LI Nan<sup>2</sup>, LI Yan<sup>2</sup>

1. Affiliated Hospital of Weifang Medical University, School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261031, Shandong, China

2. The Eye Center, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261031, Shandong, China

3. The First Clinical Medical College, Jinan University, Guangzhou Panyu District Campus, Guangzhou 511436, Guangdong, China

**Abstract: Objective** To investigate the repairing effect of local application of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )-induced human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium (hUCMSC-CM) on limbal stem cell deficiency (LSCD) in mice. **Methods** Primary human umbilical cord mesenchymal stem cells were isolated and cultured in vitro by the adherent tissue block culture method, the fourth generation hUCMSCs were induced with TNF- $\alpha$ , and the TNF- $\alpha$ -induced human umbilical cord mesen-

chymal stem cell conditioned medium (hUCMSC-CMT) was collected. Forty-eight healthy 6-week-old C57 male mice were randomly divided into the control group (group N) and LSCD experimental group, and the LSCD experimental group model was established by limbal alkali burn and divided into negative PBS injection control group (group A), hUCMSC-CM injection treatment group (group B), and the injection treatment group hUCMSC-CMT (group C) according to the different components of subconjunctival injection after modeling, and the subconjunctival injection was once a day for 7 consecutive days. On the 3rd and 7th days after LSCD modeling, the degree of corneal epithelial defect was observed and scored by slit-lamp microscopy, and corneal neovascularization was observed and scored by slit-lamp microscopy on the 7th and 21st days after LSCD modeling. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and ocular surface mucin 5AC (Muc-5AC).

**Results** The mice in group A showed large areas of corneal epithelial defect on day 3 after modeling; obvious congested limbal blood vessels were observed on day 7 after modeling. The corneal epithelial defect developed in more than 2/3 of the cornea. On the 21st day after modeling, more neovascularization in the corneal limbus was observed, and some could reach 2/3 of the corneal diameter. According to the statistical results, both group B and group C had significant improvements in reducing corneal neovascularization and repairing corneal epithelial defect, and the curative effect was stronger in group C than in group B. Immunohistochemical staining showed that there was no expression of  $\alpha$ -SMA in the corneal stroma and no expression of Muc-5AC in the corneal epithelial layer of the normal group. At 7 and 21 days after modeling, the cornea of each experimental group showed positive expression of  $\alpha$ -SMA. The expression of  $\alpha$ -SMA was significantly lower in groups B and C than in group A. The average optical density values of Muc-5AC in three experimental groups on the 7th day after modeling were not significantly different. **Conclusion** Subconjunctival injection of hUCMSC-CMT or hUCMSC-CM could enhance the function of limbal stem cells, promote corneal epithelial repair, and protect ocular surface tissues. In addition, hUCMSC-CMT had stronger repairing and therapeutic effects on limbal stem cell deficiency in mice than hUCMSC-CM.

**Key words:** Tumor necrosis factor alpha; Human umbilical cord mesenchymal stem cells; Limbal stem cell deficiency; Conditioned medium

角膜缘干细胞缺乏 (limbal stem cell deficiency, LSCD) 是由于各种原因导致角膜缘干细胞丢失, 影响角膜上皮的正常更新, 从而出现角膜延迟愈合、新生血管形成、角膜表面结膜化等病理改变<sup>[1]</sup>。重度 LSCD 患者可使用间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的方法重建受损眼表: 经炎性细胞因子预处理后的 MSCs 可增强旁分泌作用和免疫调节功能来减轻组织损伤, 达到治疗效果<sup>[2]</sup>。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 作为促炎因子, 通过改变旁分泌因子的组成成分, 增强 MSCs 的免疫抑制能力, 达到角膜修复的目的<sup>[3]</sup>。先前研究发现, 结膜下注射 TNF- $\alpha$  诱导的骨髓间充质干细胞条件培养基可显著减轻小鼠 LSCD 症状<sup>[4]</sup>, 人脐带间充质干细胞对 LSCD 是否有较好的治疗作用还有待于进一步研究。本研究通过角膜缘碱烧伤的方式构建小鼠 LSCD 模型, 利用 hUCMSC-CMT 和 hUCMSC-CM 行结膜下注射, 比较两组培养基注射后对 LSCD 小鼠的修复和治疗作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验动物与主要试剂

实验动物为 SPF 级雄性 6 周龄 C57BL/6J 小鼠, 体重 20~30 g, 共 48 只。实验动物饲养潍坊医学院动物房, 6 只/笼, 实验期间自由饮水进食。本

实验遵循《实验动物管理条例》。TNF- $\alpha$ 、羊抗兔 IgG (中国北京 Solarbio 公司); DMEM/F12 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (中国浙江天杭生物科技股份有限公司); Anti-alpha smooth muscle Actin 抗体 (兔单克隆抗体  $\alpha$ -SMA, ab124964)、Anti-Mucin 5AC 抗体; (兔单克隆抗体 Muc-5AC, ab3649) (英国 abcam 公司); 3kD 超滤离心管 (美国 Milipore 公司); 眼科裂隙灯显微镜 (日本 Topcon 公司); 生物组织包埋机 (中国天津航空机电公司); 病理石蜡切片机 (中国江苏世泰实验器材有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 hUCMSCs 的培养及诱导

无菌条件下取足月生产新生儿脐带 15 cm, 去除血管, 剥离表皮, 残余部分即为华通氏胶, 在华通氏胶上滴加微量 DMEM/F12 完全培养基, 将其剪成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块, 采用组织块贴壁培养法进行 hUCMSCs 培养。通过诱导 hUCMSCs 分化成骨细胞和成脂细胞, 以鉴定其多向分化的能力。准备细胞融合达 70% 的第 4 代 hUCMSCs, 分为 hUCMSC-CM 组 (加入 5 mL DMEM 低糖培养基) 和 hUCMSC-CMT 组 (加入 5 mL 浓度为 20 ng/mL 的 TNF- $\alpha$  完全培养基)。培养 48 h 后收集细胞上清液, 经超滤浓缩后, -80 °C 冰箱冻存, 以备结膜下注射用。

### 1.2.2 小鼠分组、LSCD 模型建立及干预

实验动物在适应性饲养 1 周并排除眼前节疾患后随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别是空白对照组(N 组)、PBS 注射阴性对照组(A 组)、hUCMSC-CM 注射组(B 组)及 hUCMSC-CMT 注射组(C 组)。实验组小鼠按 0.01 mL/g 的剂量腹腔注射 5% 水合氯醛溶液进行麻醉, 右眼滴盐酸奥布卡因滴眼液进行眼表麻醉。制备内径为 3 mm、外径为 4 mm 的环形滤纸片并使用 2 uL 1 mol/L NaOH 溶液充分浸润, 将滤纸片贴附于小鼠右眼角膜缘处, 30 s 后去除, 用生理盐水快速清洗眼表及结膜囊 1 min。造模成功后 1 h 行首次球结膜下注射, 分别用微量进样针抽取无菌 PBS 缓冲液、hUCMSC-CM、hUCMSC-CMT 各 8  $\mu$ L, 分别缓慢推注至 A、B、C 组小鼠球结膜下, 注射后用加替沙星眼用凝胶包眼。每天给药 1 次, 连续给药 7 天。

### 1.2.3 角膜新生血管情况及角膜上皮缺损面积的统计

在裂隙灯显微镜下观察造模后眼前段表现并拍照, 记录第 7、21 天的角膜新生血管情况并评分, 0 分表示角膜正常; 1 分表示周边 1/3 角膜直径范围内有新生血管; 2 分表示周边 2/3 角膜直径范围内有新生血管; 3 分表示全角膜可见新生血管<sup>[5]</sup>。评分需经 3 人各自评定后取平均值。

分别于第 3、7 天对小鼠角膜行荧光素钠染色, 观察角膜上皮愈合程度。用染色的面积评分 $\times$ 密度评分计算得出角膜上皮荧光素染色评分, 来定义角膜上皮缺损面积大小, 面积评分结果为, 1 分表示面积小于 1/3 角膜; 2 分表示面积介于 1/3~2/3 角膜之间; 3 分表示面积超过 2/3 角膜。密度评分为: 0 分表示无点状着染; 1 分表示密度稀疏; 2 分表示密度中等; 3 分表示密度高且病变重叠<sup>[6]</sup>。评分需经 3

人各自评定后取平均值。

### 1.2.4 免疫组织化学染色

分别于第 7、21 天均随机选 A、B、C 组小鼠各 6 只取材, 且对 N 组 6 只正常小鼠取材。用麻醉过量的方式处死小鼠, 完整取下右眼眼球, 4  $^{\circ}$ C 眼球固定液中固定, 按标准流程脱水处理, 制备厚度为 4  $\mu$ m 的石蜡切片。各组取石蜡切片进行抗原修复, 消除过氧化物酶活性, 羊血清封闭, 分别加入一抗兔单克隆抗体  $\alpha$ -SMA 和 Muc-5AC (稀释 1:200), 在 4  $^{\circ}$ C 湿盒中孵育过夜, 加入相应的二抗孵育, 滴加 DAB 显色, 苏木素复染, 封片, 随机选择 5 个高倍视野拍照记录。对角膜  $\alpha$ -SMA、Muc-5AC 阳性染色运用 Image J 软件计算平均光密度值 (IOD/area)。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 及 GraphPad Prism 进行分析。非正态分布的计量资料用  $M(Q_{25}, Q_{75})$  表示, 组间多重比较采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 组间两两比较采用 Dwass-Steel-Critchlow-Fligner 方法。正态分布的计量资料 (平均光密度值) 用  $\bar{x} \pm s$  表示, 检验方差齐性后采用 one-way ANOVA 检验进行组间多重比较, 应用 LSD- $t$  法进行组间两两比较。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 LSCD 造模观察

LSCD 造模后即刻见小鼠角膜缘血管扩张, 与滤纸环接触的区域角膜水肿明显; 造模后第 1 天出现大范围角膜上皮缺失, 伤及前弹力层, 深达基质层, 角膜缘血管明显扩张充血 (图 1A); 造模后第 3 天, 角膜缘缺血苍白, 角膜基质水肿 (图 1B); 造模后第 7 天, 角膜缘新生血管长入, 角膜混浊, 出现角膜结膜化 (图 1C)。

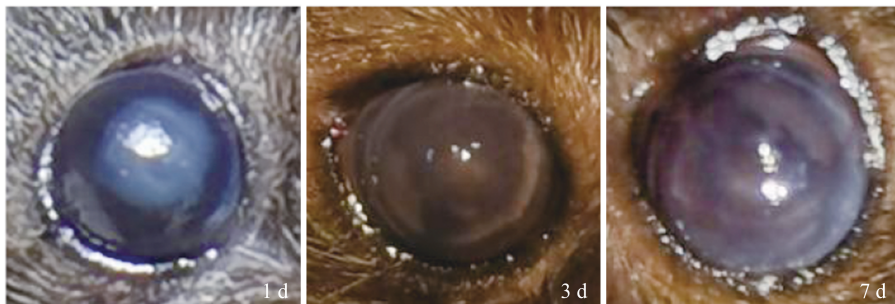


图 1 造模后第 1、3、7 天小鼠角膜情况

Figure 1 The corneas of mice on days 1st, 3rd, and 7th after modelling

### 2.2 角膜新生血管评分

LSCD 造模后第 7、21 天裂隙灯下观察各组角

膜新生血管情况, 结果见图 2。第 7 天, 对照组小鼠角膜透明, A 组小鼠角膜缘见较多新生血管长

入,部分可及 2/3 角膜直径,B 组小鼠角膜缘少量毛刷样新生血管长入,小于 1/3 角膜直径,C 组小鼠角膜缘充血明显,少数可见角膜缘有极少量分布稀疏的新生血管。A、B、C 组角膜新生血管评分分别为 1.84(1,2)、0.67(0,1)、0(0,0.67)分,组间两两比较均具有统计学意义( $H=13.1216, P=$

0.0014);第 21 天,A 组小鼠可见粗大的新生血管遮盖瞳孔区,B 组小鼠角膜缘细长的新生血管向角膜中央长入,C 组小鼠有少量血管突破角膜缘长入角膜。A、B、C 组评分分别为 3(3,3)、2(1.34,2)、1.5(1,2)分,组间两两比较均具有统计学意义( $H=15.1585, P<0.001$ )。

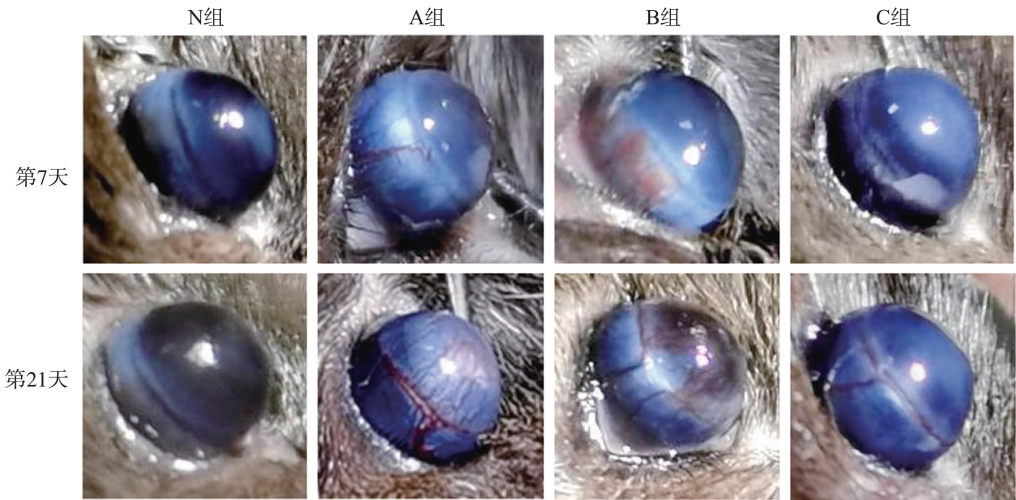


图 2 小鼠 LSCD 造模后第 7、21 天裂隙灯下观察角膜新生血管  
Figure 2 Corneal neovascularisation was observed under the slit lamp on the 7th and 21st days after LSCD modelling

### 2.3 角膜上皮缺损面积评分

分别于 LSCD 造模后第 3、7 天测定各组角膜上皮缺损面积,结果见图 3。第 3 天,对照组小鼠角膜上皮完整无缺损,A、B、C 组可见不同程度的角膜上皮缺损,A 组小鼠全角膜上皮缺损,染色密度高,B、C 组角膜上皮均呈大片团块状缺损。A、B、C 组角膜上皮缺损面积评分分别为 9(8.5,9)、9(6.5,9)、9(6,9)分,组间比较无统计学意义

( $H=1.3717, P=0.5037$ );第 7 天,A 组小鼠角膜上皮缺损面积大于 2/3 角膜,染色密度高,B 组角膜上皮呈片状缺损,缺损面积约 1/2 角膜,染色密度中等,C 组小鼠角膜小片状缺损,缺损面积小于 1/2 角膜,染色密度稀疏。A、B、C 组评分分别为 5(4,6)、3(1.84,4)、2(1.5,2)分,组间两两比较均具有统计学意义( $H=14.8921, P<0.001$ )。

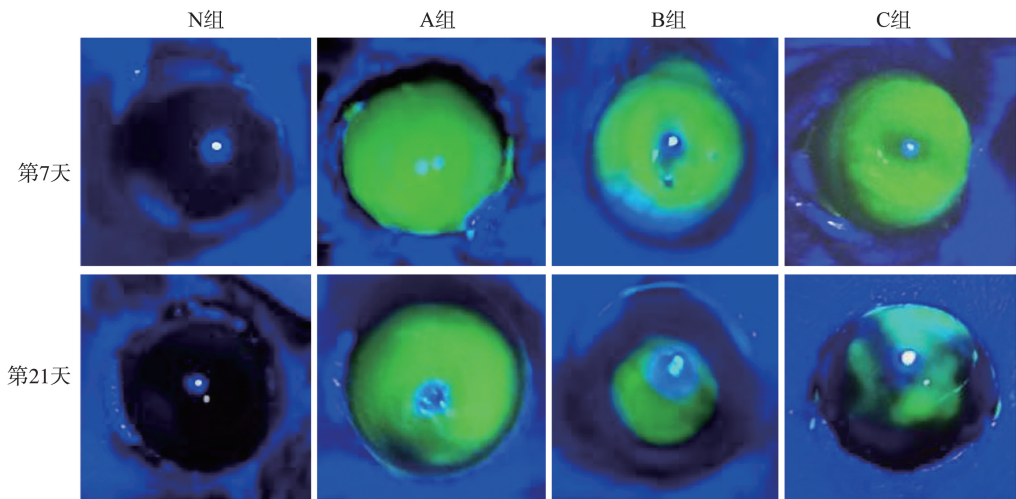


图 3 小鼠 LSCD 造模后第 3、7 天荧光素钠染色后观察角膜上皮缺损  
Figure 3 Corneal epithelial defects were observed by fluorescein sodium staining on the 3rd and 7th days after LSCD modelling

## 2.4 角膜免疫组织化学染色测定结果

### 2.4.1 $\alpha$ -SMA 的表达

$\alpha$ -SMA 是角膜纤维化的标志, 伤口愈合后  $\alpha$ -SMA 即停止表达。正常对照组无  $\alpha$ -SMA 的表

达。在 LSCD 造模后第 7 天、第 21 天, A、B、C 各组均有不同程度的  $\alpha$ -SMA 表达(图 4)。虽然 C 组与 B 组相比无统计学意义, 但呈现出 C 组较 B 组减少的趋势(表 1)。

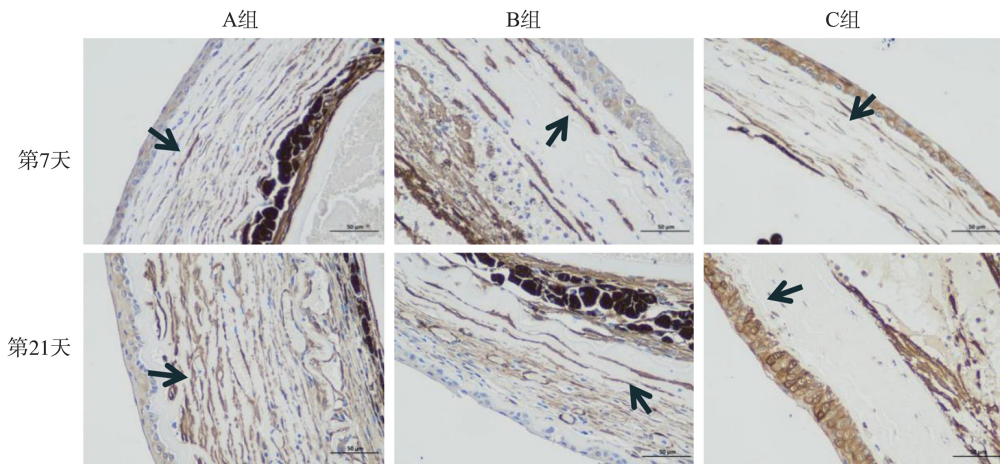


图 4 小鼠 LSCD 造模后第 7、21 天免疫组织化学染色法检测角膜组织中  $\alpha$ -SMA(箭头所示)表达  
Figure 4 The expression of  $\alpha$ -SMA in corneal tissue was assessed by immunohistochemical staining on the 7th and 21st days after LSCD modelling

表 1 小鼠 LSCD 造模后角膜基质  $\alpha$ -SMA 平均光密度值  
Table 1 Mean optical density values of corneal stromal  $\alpha$ -SMA after LSCD modelling in mice

时间	A 组	B 组	C 组	F	P
第 7 天	0.311±0.049	0.255±0.028	0.240±0.032	8.129	0.002
第 21 天	0.320±0.059	0.241±0.029	0.218±0.032	12.778	<0.001

### 2.4.2 Muc-5AC 的表达

结膜上皮细胞富含杯状细胞且高度血管化, Muc-5AC 是由结膜杯状细胞分泌的, 可通过检测 Muc-5AC

来证明结膜上皮在角膜的生长。正常对照组无 Muc-5AC 的表达。在 LSCD 造模后 7、21 d, A、B、C 各组均有不同程度的 Muc-5AC 表达(图 5, 表 2)。

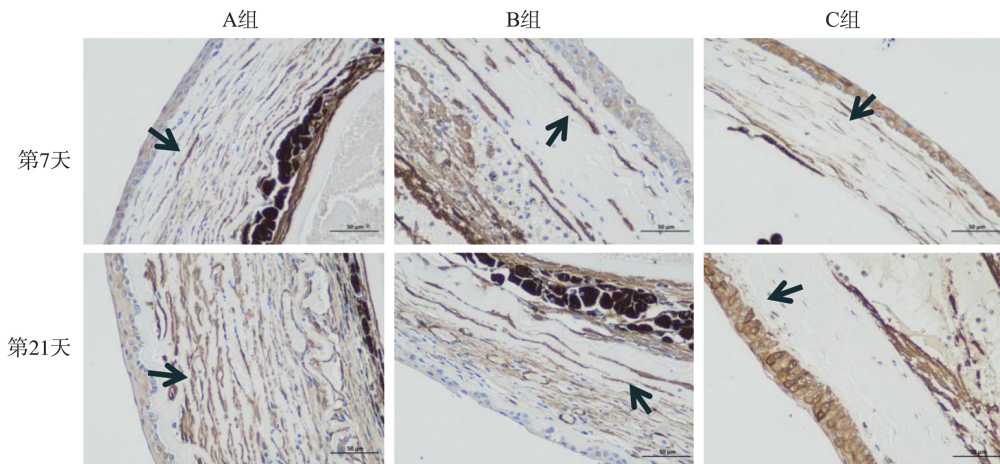


图 5 小鼠 LSCD 造模后第 7、21 天免疫组织化学染色法检测角膜组织中 Muc-5AC(箭头所示)表达  
Figure 5 The expression of Muc-5AC in corneal tissue was assessed by immunohistochemical staining on the 7th and 21st days after LSCD modelling

表 2 小鼠 LSCD 造模后 Muc-5AC 平均光密度值  
Table 2 The mean optical density of Muc-5AC in mice after LSCD modelling

时间	A 组	B 组	C 组	F	P
第 7 天	0.030±0.003	0.030±0.002	0.029±0.002	0.495	0.691
第 21 天	0.314±0.045	0.233±0.022	0.171±0.022	31.195	<0.001

### 3 讨论

LSCD 是由于角膜缘干细胞数量减少(和)或功能下降而导致角膜缘干细胞正常动态平衡不能维持的眼表疾病<sup>[7]</sup>,LSCD 的体征主要包括角膜结膜化、血管化、瘢痕化,眼表新生血管形成等<sup>[8-9]</sup>。眼表外用 NaOH 制备碱烧伤处理的 LSCD 模型是现有的标准方案<sup>[10]</sup>,当碱烧伤方式处理角膜缘干细胞后,其屏障功能被破坏,会出现结膜组织向角膜中央迁移的结膜化过程,这被认为是 LSCD 的标志<sup>[11]</sup>。在本研究中,LSCD 小鼠在造膜后第 7 天即发生角膜缘新生血管长入,角膜混浊,免疫荧光染色显示角膜组织中  $\alpha$ -SMA 及 Muc-5AC 的表达均明显增多,表明出现角膜结膜化,LSCD 模型建立成功。

角膜移植是治疗 LSCD 最有效的方法。但目前由于供体组织缺乏、培养后的角膜缘干细胞发生变化等一系列问题,仍是临床亟待解决的难题。间充质干细胞常见的来源包括骨髓、脂肪组织、牙髓等,该来源具有一定的侵入性,且相对具有伦理问题<sup>[12]</sup>,hUCMSCs 的获得方式简单、无创,可冷冻保存以供后续使用<sup>[13]</sup>,且相比于其他来源的干细胞具有更强的增殖能力、免疫调节活性及可塑性<sup>[13]</sup>。研究证明,hUCMSCs 可促进角膜上皮细胞和角膜缘干细胞的增殖<sup>[14]</sup>,抑制碱烧伤后角膜炎症<sup>[15]</sup>,加速角膜伤口愈合。研究发现 hUCMSCs 可以通过抗纤维化来减少角膜瘢痕形成,提高角膜透明度<sup>[16]</sup>,从而缓解 LSCD 症状。本实验中,hUCMSCs 处理后的  $\alpha$ -SMA 表达减少,表明了 hUCMSCs 在 LSCD 中起到了抗纤维化的作用。

hUCMSCs 的治疗效果归功于其分泌的因子,hUCMSC-CM 可以通过一个已建立完成的细胞系,在急性损伤时快速提供旁分泌因子,增强治疗效果,提供一种“及时的”替代异体干细胞治疗<sup>[17]</sup>。而且,使用 MSCs-CM 注射相比于 MSCs 注射安全性更高<sup>[18]</sup>。MSCs-CM 的优点在于可快速分泌因子、可长期储存且无功效损失、较少的伦理问题等,并得到了国内外研究人员的广泛关注<sup>[19]</sup>。本研究发现,与阴性对照组相比,hUCMSC-CM 注射治疗组角膜新生血管减少、角膜上皮缺损面积减小,表明 hUCMSC-CM 结膜下注射对 LSCD 具有一定的修复作用。

静息状态的间充质干细胞具有较低的免疫调节活性,而炎症因子刺激的间充质干细胞可分泌大量的可溶性介质,并发挥其充分的免疫抑制潜能<sup>[20]</sup>。TNF- $\alpha$  作为炎症因子的代表,其刺激后的 MSCs 可

增强其组织修复能力<sup>[21]</sup>。据研究,20 ng/mL 浓度的 TNF- $\alpha$  诱导细胞,并不会引起细胞坏死、加速凋亡、改变形态学,其生物学特性和生长情况也未影响<sup>[22]</sup>,TNF- $\alpha$  可以刺激 MSCs 中 TSG-6 的表达,TSG-6 在减少角膜伤口的炎症和疤痕方面具有重要作用,是 MSCs 发挥免疫调节的生物标志物<sup>[23]</sup>。此外,TNF- $\alpha$  可以直接诱导人角膜上皮细胞中 TSG-6 的表达来促进角膜恢复<sup>[24]</sup>。TNF- $\alpha$  也可以通过增加 IDO、PGE2、TGF- $\beta$ 1 等免疫因子的表达进而加强 hUCMSC 免疫调节能力<sup>[25]</sup>。在本实验中,hUCMSC-CMT 治疗组较 hUCMSC-CM 治疗组在促进角膜上皮修复、减少角膜新生血管生成以及减少基质成纤维细胞增生方面具有更明显的效果,但其具体的作用机制仍需要进一步实验研究。

本实验成功将 hUCMSC-CMT 通过结膜下注射的给药方式应用于小鼠 LSCD 的治疗,并取得显著的治疗效果,有望为临床治疗 LSCD 提供有价值的理论基础。

### 参考文献:

- [1] Le Q, Xu J, Deng SX. The diagnosis of limbal stem cell deficiency[J]. The ocular surface, 2018, 16(1): 58-69. doi:10.1016/j.jtos.2017.11.002
- [2] Wang Y, Chen XD, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. Nat Immunol, 2014, 15(11): 1009-1016. doi:10.1038/ni.3002
- [3] Cho KA, Park M, Kim YH, et al. Conditioned media from human palatine tonsil mesenchymal stem cells regulates the interaction between myotubes and fibroblasts by IL-1Ra activity[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(1): 130-141. doi:10.1111/jcmm.12947
- [4] Di GH, Qi X, Xu J, et al. Therapeutic effect of secretome from TNF- $\alpha$  stimulated mesenchymal stem cells in an experimental model of corneal limbal stem cell deficiency[J]. Int J Ophthalmol, 2021, 14(2): 179-185. doi:10.18240/ijo.2021.02.01
- [5] Sacchetti M, Rama P, Bruscolini A, et al. Limbal stem cell transplantation: clinical results, limits, and perspectives[J]. Stem Cells Int, 2018; 8086269. doi:10.1155/2018/8086269
- [6] Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury[J]. Stem Cells, 2008, 26(4): 1047-1055. doi:10.1634/stemcells.2007-0737
- [7] Deng SX, Borderie V, Chan CC, et al. Global consensus on definition, classification, diagnosis, and staging of

- limbal stem cell deficiency [J]. *Cornea*, 2019, 38 (3): 364-375. doi:10.1097/ICO.0000000000001820
- [8] 李典睿, 周善璧. 角膜缘干细胞研究新进展[J]. 国际眼科杂志, 2019, 19(1): 63-65. doi:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.1.13
- LI Dianrui, ZHOU Shanbi. Latest progresses of limbal stem cell [J]. *International Eye Science*, 2019, 19(1): 63-65. doi:10.3980/j.issn.1672-5123.2019.1.13
- [9] 梁庆丰, 王乐滢. 解读角膜缘干细胞缺乏诊疗的国际共识[J]. 中华眼科杂志, 2021, 57(2): 95-99. doi:10.3760/cma.j.cn112142-20200816-00537
- LIANG Qingfeng, WANG Leying. An interpretation of global consensus on the diagnosis and management of limbal stem cell deficiency [J]. *Chinese Journal of Ophthalmology*, 2021, 57(2): 95-99. doi:10.3760/cma.j.cn112142-20200816-00537
- [10] Kethiri AR, Raju E, Bokara KK, et al. Inflammation, vascularization and goblet cell differences in LSCD: Validating animal models of corneal alkali burns [J]. *Exp Eye Res*, 2019, 185: 107665. doi:10.1016/j.exer.2019.05.005
- [11] Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease [J]. *Ophthalmology*, 2006, 113(10): 1765-1772. doi:10.1016/j.ophtha.2006.04.030
- [12] Saleh R, Reza HM. Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 222. doi:10.1186/s13287-017-0679-y
- [13] Azmi SM, Salih M, Abdelrazeg S, et al. Human umbilical cord-mesenchymal stem cells: a promising strategy for corneal epithelial regeneration [J]. *Regen Med*, 2020, 15(3): 1381-1397. doi:10.2217/rme-2019-0103
- [14] Sriramulu S, Banerjee A, Di Liddo R, et al. Concise review on clinical applications of conditioned medium derived from human umbilical cord-mesenchymal stem cells (UC-MSCs) [J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2018, 12(3): 230-234
- [15] Kacham S, Bhure TS, Eswaramoorthy SD, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells promote corneal epithelial repair in vitro [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1254. doi:10.3390/cells10051254
- [16] Chen MX, Chen XN, Li XQ, et al. Subconjunctival administration of mesenchymal stem cells alleviates ocular inflammation in a murine model of corneal alkali burn [J]. *Stem Cells*, 2023, 41(6): 592-602. doi:10.1093/stmcls/sxad027
- [17] Zhang N, Luo XH, Zhang SY, et al. Subconjunctival injection of tumor necrosis factor- $\alpha$  pre-stimulated bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances anti-inflammation and anti-fibrosis in ocular alkali burns [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2021, 259(4): 929-940. doi:10.1007/s00417-020-05017-8
- [18] Rasiyah PK, Jha KA, Gentry J, et al. A long-term safety and efficacy report on intravitreal delivery of adipose stem cells and secretome on visual deficits after traumatic brain injury [J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2022, 11(10): 1. doi:10.1167/tvst.11.10.1
- [19] Bouche Djatche WH, Zhu HM, Ma WL, et al. Potential of mesenchymal stem cell-derived conditioned medium/secretome as a therapeutic option for ocular diseases [J]. *Regen Med*, 2023, 18(10): 795-807. doi:10.2217/rme-2023-0089
- [20] Li WQ, Liu QQ, Shi JC, et al. The role of TNF- $\alpha$  in the fate regulation and functional reprogramming of mesenchymal stem cells in an inflammatory microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1074863. doi:10.3389/fimmu.2023.1074863
- [21] Broekman W, Amatngalim GD, de Mooij-Eijk Y, et al. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -activated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth factor receptor [J]. *Respir Res*, 2016, 17: 3. doi:10.1186/s12931-015-0316-1
- [22] Ma HL, Zhang SY, Xu Y, et al. Analysis of differentially expressed microRNA of TNF- $\alpha$ -stimulated mesenchymal stem cells and exosomes from their culture supernatant [J]. *Arch Med Sci*, 2018, 14(5): 1102-1111. doi:10.5114/aoms.2017.70878
- [23] Di GH, Qi X, Xu J, et al. Therapeutic effect of secretome from TNF- $\alpha$  stimulated mesenchymal stem cells in an experimental model of corneal limbal stem cell deficiency [J]. *Int J Ophthalmol*, 2021, 14(2): 179-185. doi:10.18240/ijo.2021.02.01
- [24] 李孟婷, 何书喜, 王华. 炎症因子在圆锥角膜中的研究进展 [J]. 山东大学耳鼻喉眼学报, 2023, 37(2): 151-158. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.536
- LI Mengting, HE Shuxi, WANG Hua. Research progress of inflammatory factors in Keratoconus [J]. *Journal of Otolaryngology and Ophthalmology of Shandong University*, 2023, 37(2): 151-158. doi:10.6040/j.issn.1673-3770.0.2021.536
- [25] Li H, Ji XQ, Zhang SM, et al. Hypoxia and inflammatory factor preconditioning enhances the immunosuppressive properties of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *World J Stem Cells*, 2023, 15(11): 999-1016. doi:10.4252/wjcs.v15.i11.999