

脐带间充质干细胞来源外泌体对糖尿病性角膜病变的保护作用及对 Caspase-1 的调控机制

张艳艳¹ 彭银艳² 马嘉骏³ 席亚慧⁴ (通讯作者) 邵雪丽¹ (通讯作者)

1.宁波市眼科医院 浙江 宁波 315100

2.湖南省直中医医院 湖南 株洲 412000

3.牡丹江医学院 黑龙江 牡丹江 157000

4.安康市中心医院 陕西 安康 725000

【摘要】目的：探讨脐带间充质干细胞来源外泌体（hUCMSC-Exos）对糖尿病性角膜病变（DK）的保护作用及对焦亡核心因子 Caspase-1 的调控机制。方法：SPF 级 SD 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组（STZ 腹腔注射）及 hUCMSC-Exos 干预组；采用角膜共聚焦显微镜、荧光素钠及虎红染色评估角膜表型。体外以高糖（25 mmol/L）培养人角膜上皮细胞（HCECs）同法验证。结果：hUCMSC-Exos 干预可显著降低荧光素钠染色评分（ $P < 0.05$ ），改善角膜上皮连续性；体内外结果显示高糖状态下角膜 Caspase-1 mRNA 上调，hUCMSC-Exos 干预后恢复正常水平，高度一致。结论：hUCMSC-Exos 可改善 DK 角膜上皮损伤，其保护机制可能与抑制 Caspase-1 依赖的细胞焦亡通路有关，为 DK 防治提供了新的实验依据。

【关键词】：糖尿病性角膜病变；脐带间充质干细胞；外泌体；细胞焦亡；Caspase-1；角膜上皮损伤

DOI:10.12417/2811-051X.26.08.011

1 引言

糖尿病性角膜病变（diabetic keratopathy, DK）是糖尿病常见眼表并发症，以角膜上皮反复糜烂、愈合延迟、知觉减退为主要特征，约 47%~64% 的糖尿病患者可出现不同程度的 DK 表现^[1,2]。高糖引发炎症激活是 DK 的核心病理环节^[2-4]。细胞焦亡是一种 Caspase-1 依赖的炎症程序性死亡方式，其过度激活可导致 IL-1 β 、IL-18 大量释放，加重组织损伤。

脐带间充质干细胞来源外泌体（hUCMSC-Exos）具有低免疫原性、抗炎、促修复等功能，可通过携带功能性 miRNA 及活性蛋白靶向调控相关通路，在角膜修复、干眼等眼表疾病中具有良好应用前景^[5-7]。然而，hUCMSC-Exos 是否能通过抑制 Caspase-1 依赖焦亡改善 DK，目前尚不明确。本研究通过体内外实验初步阐明机制。

2 材料与方法

2.1 动物实验与分组

SPF 级雄性 SD 大鼠（200±20 g）随机分为 3 组（ $n=3$ ）：正常对照组（腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液）、糖尿病模型组（STZ 60 mg/kg 腹腔注射，72 h 后血糖 ≥ 16.7 mmol/L 判定造模

成功）及 hUCMSC-Exos 干预组（造模成功后点眼给药，每日 2 次，连续 4 周）。hUCMSC-Exos 经超速离心法提取，经透射电镜、纳米颗粒跟踪分析及 Western blot（CD9、CD63、CD81、TSG101）鉴定确认符合外泌体特征标准。动物实验经机构伦理委员会批准，遵循 ARVO 规范。

2.2 角膜表型评估

干预结束后，采用角膜共聚焦显微镜观察角膜上皮细胞形态及神经纤维分布；荧光素钠染色（钴蓝光激发）评估上皮连续性与缺损范围；虎红染色评估角膜上皮细胞损伤与通透性，均参照 OSS 评分标准半定量评分。

2.3 体外细胞实验

体外培养人角膜上皮细胞（HCECs），分为正常葡萄糖组（5.5 mmol/L）、高糖组（25 mmol/L）及高糖+hUCMSC-Exos 组，各设 3 个独立重复孔（ $n=3$ ）。

2.4 qRT-PCR

高糖及外泌体干预 HCECs 后搜集总 RNA 采用 Trizol 法提取，反转录后以 qRT-PCR 检测 Caspase-1 mRNA 表达水平，以 GAPDH 为内参， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

作者简介：

第一作者：张艳艳；彭银艳

第二作者：马嘉骏

基金项目：宁波市鄞州区农社发展科技计划项目 [No. 鄞科[2022]8 号-22]；鄞州区计划城市经济创新人才项目；2025 年度浙江省医药卫生科技计划项目（2025KY1459）。

基金：宁波市鄞州区农业与社会发展科技计划项目（2022AS022）。

2.5 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 糖尿病大鼠模型构建及角膜表型

STZ 诱导后，模型组与干预组血糖均显著高于正常对照组（均 $P < 0.001$ ），两组间差异无统计学意义（ $P = 0.763$ ），排除 hUCMSC-Exos 全身降糖效应的干扰（表 1、2）。角膜共聚焦显微镜下，模型组上皮排列紊乱、神经纤维密度下降，干预组角膜结构较模型组改善。

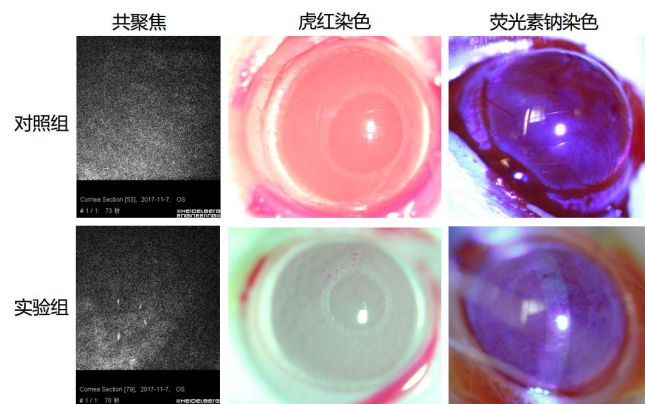


图 1 正常对照组与糖尿病模型组大鼠角膜形态学观察

注：左：角膜共聚焦图像；中：角膜虎红染色；右：角膜荧光素钠染色。与正常对照组比较， $*P < 0.05$ 。

3.2 hUCMSC-Exos 改善角膜上皮损伤及眼表染色评分

DK 大鼠角膜中焦亡信号通路因子的表达情况，外泌体点眼后角膜情况虎红染色结果显示：正常对照组角膜上皮细胞完整；糖尿病模型组角膜呈弥漫性强阳性虎红染色，提示角膜上皮细胞大量损伤；hUCMSC-Exos 干预后，角膜染色范围与强度显著降低，仅见少量散在淡染色，表明外泌体可有效减轻高糖导致的角膜上皮细胞损伤，恢复上皮细胞膜完整性与屏障功能。

荧光素钠染色结果显示：正常对照组角膜无明显荧光着色，上皮连续完整；糖尿病模型组角膜出现大面积、高密度荧光缺损区，提示角膜上皮连续性中断、缺损范围广泛、愈合能力显著下降；hUCMSC-Exos 干预后，荧光缺损区域明显缩小，着色强度显著降低，上皮连续性明显恢复，提示外泌体可有效促进糖尿病角膜上皮修复，缩小上皮缺损面积，维护角膜结构完整性。

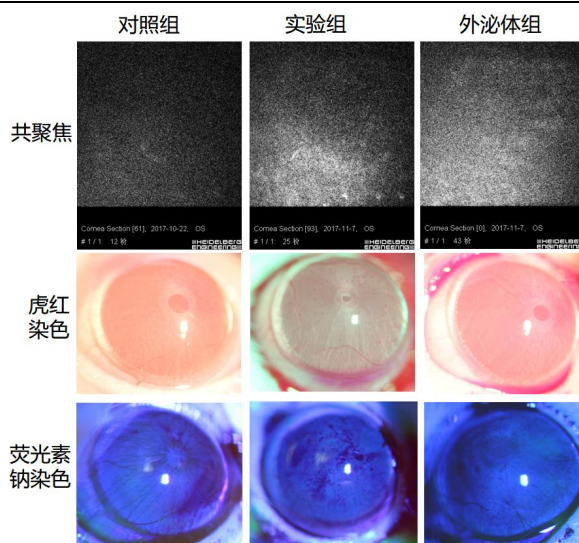


图 2 三组大鼠角膜共聚焦图像、角膜虎红染色、荧光素钠染色比较

与正常对照组相比，模型组荧光素钠及虎红染色评分均显著升高（ $P < 0.001$ ， $P = 0.002$ ）。hUCMSC-Exos 干预后荧光素钠染色评分显著下降（ $P = 0.025$ ），虎红染色评分呈下降趋势（ $P = 0.101$ ，表 1、2）。

表 1 各组角膜眼表染色评分（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$ ）

组别	正常对照组	糖尿病模型组	hUCMSC-Exos 干预组	F 值	P 值
荧光素钠评分	0.00±0.00	3.33±0.58	1.00±1.00	19.750	0.002
虎红评分	0.00±0.00	2.33±0.58	1.33±0.58	18.500	0.003

表 2 染色评分两两比较 P 值

指标	正常 vs 模型	正常 vs 干预	模型 vs 干预
荧光素钠评分	<0.001	0.158	0.025
虎红评分	0.002	0.016	0.101

3.3 体外验证

高糖培养的 HCECs Caspase-1 mRNA 上调；hUCMSC-Exos 干预后恢复至正常水平，与体内结果完全一致（ $F = 619.551$ ， $P < 0.001$ ；表 3、4），证实高糖可直接诱导角膜上皮细胞焦亡通路激活，hUCMSC-Exos 在细胞水平具有相同的抑制效应。

表 3 HCECs Caspase-1 mRNA 相对表达量（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$ ）

组别	正常葡萄糖组	高糖组	高糖+hUCMSC-Exos 组	F 值	P 值
Caspase-1 相对表达量	1.001±0.016	5.457±0.292	1.008±0.101	619.551	<0.001

表4 HCECs Caspase-1 mRNA 两两比较 P 值

比较组别	P 值
正常葡萄糖组 vs 高糖组	<0.001
正常葡萄糖组 vs 高糖+hUCMSC-Exos 组	0.910
高糖组 vs 高糖+hUCMSC-Exos 组	<0.001

4 讨论

本研究通过体内 STZ 大鼠模型与体外 HCECs 细胞模型，系统证实 hUCMSC-Exos 可有效改善 DK 角膜上皮损伤，可能通过抑制 Caspase-1 依赖焦亡通路实现。这与 Wang 等^[1]报道 mADSC-EVs 显著改善角膜愈合的结论一致，亦支持外泌体作为眼表局部治疗手段的特异性。

参考文献:

- [1] Wang G,Zeng L,Gong C,et al.Extracellular vesicles derived from mouse adipose-derived mesenchymal stem cells promote diabetic corneal epithelial wound healing through NGF/TrkA pathway activation involving dendritic cells[J].Exp Eye Res,2023,231:109484.
- [2] Wan L,Bai X,Zhou Q,et al.The advanced glycation end-products(AGEs)/ROS/NLRP3 inflammasome axis contributes to delayed diabetic corneal wound healing and nerve regeneration[J].Int J Biol Sci,2022,18(2):809-825.
- [3] Somayajulu M,McClellan S A,Pitchaikannu A,et al.Effects of Glycyrrhizin Treatment on Diabetic Cornea[J].J Ocul Pharmacol Ther,2021,37(1):42-53.
- [4] Jiang K,Zhang F,Chen Y,et al.Fosfenopril attenuates inflammatory response in diabetic dry eye models by inhibiting the TLR4/NF-κB/NLRP3 signaling pathway[J].Invest Ophthalmol Vis Sci,2024,65(6):2.
- [5] Cheng S,Ma Y,Huang F,et al.Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for Ocular Diseases:Therapeutic Mechanisms and Clinical Perspectives[J].Int J Nanomedicine,2025,20:14521-14550.
- [6] Li W,He S,Lin C,et al.Mesenchymal stem cell-derived exosomes carry miR-125a-5p to improve diabetic keratopathy by regulating endoplasmic reticulum stress[J].Tissue Cell,2025,93:102669.
- [7] Massoumi H,Amin S,Soleimani M,et al.Extracellular-Vesicle-Based Therapeutics in Neuro-Ophthalmic Disorders[J].Int J Mol Sci, 2023,24(10):9006.

hUCMSC-Exos 使荧光素钠染色评分显著下降，提示角膜上皮屏障功能得到有效修复。既往研究表明 MSC 外泌体修复 DK 的机制是多通路协同的：Li 等^[6]证实骨髓 MSC 外泌体携带 miR-125a-5p 抑制内质网应激而改善角膜上皮活力；Wang 等^[1]发现脂肪 MSC 细胞外囊泡通过促进上皮愈合与神经再生；Cheng 等^[5]综述指出脐带 MSC 外泌体中的 miR-21 可激活 PI3K/Akt 通路加速角膜修复。

糖尿病状态下角膜 Caspase-1 mRNA 上调，揭示焦亡通路激活是 DK 炎症的重要驱动力。学者进一步证实 AGEs 激活 Caspase-1 介导角膜上皮焦亡，引发 IL-1β 大量释放，形成“焦亡—炎症”正反馈环路，导致上皮增殖减少、愈合延迟^[2-4]。

本研究各仅检测 Caspase-1 mRNA，未补充 IL-1β 等下游效应分子验证，后续研究应扩大样本量，系统检测焦亡通路蛋白，并结合缓释递送系统推动临床转化。