

脐带间充质干细胞来源外泌体抑制焦亡改善糖尿病性角膜病变的机制研究

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：选取 SPF 级 SD 大鼠，采用链脲佐菌素（STZ）腹腔注射构建糖尿病大鼠模型，随机分为正常对照组、糖尿病模型组、hUCMSC-Exos 干预组。干预组给予 hUCMSC-Exos 点眼干预。分别采用角膜共聚焦显微镜观察角膜结构，虎红染色评估角膜上皮细胞损伤与通透性改变，荧光素钠染色评估角膜上皮连续性或缺损范围；采用 qRT-PCR 检测角膜组织中焦亡核心基因 Caspase-1 的 mRNA 表达水平。结果：与对照组相比，糖尿病组大鼠角膜虎红染色、荧光素钠染色评分显著升高，角膜上皮完整性破坏明显，Caspase-1 表达显著上调；与糖尿病组相比，hUCMSC-Exos 干预组大鼠角膜虎红染色强度明显降低，荧光素钠染色缺损面积显著缩小，Caspase-1 表达显著下调。结论：hUCMSC-Exos 可有效改善糖尿病性角膜病变，其机制与抑制焦亡核心分子 Caspase-1 的过度激活密切相关。

【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

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 依赖的炎症性程序性死亡方式，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。

1 材料和方法

1.1 材料

（1）细胞人脐带间充质干细胞由实验室常规培养，超速离心法提取、鉴定其来源外泌体（hUCMSC-Exos）。

（2）动物：SPF 级雄性 SD 大鼠，体重（200±20）g，遵循 ARVO 动物实验规范。

1.2 方法

（1）动物分组及模型建立大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 3 组：①正常对照组：腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液；②糖尿病模型组：单次腹腔注射 STZ 60mg/kg，72h 后尾静脉血糖 ≥ 16.7 mmol/L 判定为造模成功；③hUCMSC-Exos 干预组：造模成功后给予 hUCMSC-Exos 点眼，每日 2 次，连续干预 4 周。

（2）角膜共聚焦显微镜检测：干预结束后，使用角膜共聚焦显微镜观察各组大鼠角膜上皮细胞形态、基底细胞排列及角膜神经纤维分布、密度与完整性。

（3）角膜虎红染色：将虎红染色液滴入大鼠结膜囊内，轻柔瞬目后用生理盐水冲洗，裂隙灯显微镜下观察并拍照。虎红主要染色凋亡、坏死及通透性异常升高的角膜上皮细胞，染色强度反映上皮细胞损伤程度。

（4）角膜荧光素钠染色：荧光素钠试纸轻触下睑结膜囊，瞬目使染料均匀分布于眼表，裂隙灯钴蓝光下观察并拍照。荧

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）。

光素钠可渗透角膜上皮缺损区域形成明显荧光着色,用于评估上皮连续性、缺损范围与愈合情况。

(5) qRT-PCR 测定大鼠角膜组织总 RNA 采用 Trizol 法提取,反转录合成 cDNA, qRT-PCR 检测焦亡核心基因 Caspase-1 的 mRNA 表达水平,以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。

(6) 统计学分析:采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠模型构建成功及角膜病变表型

STZ 诱导后, DK 组角膜上皮完整性破坏,虎红染色、荧光素钠染色明显增强,提示糖尿病性角膜病变模型构建成功。

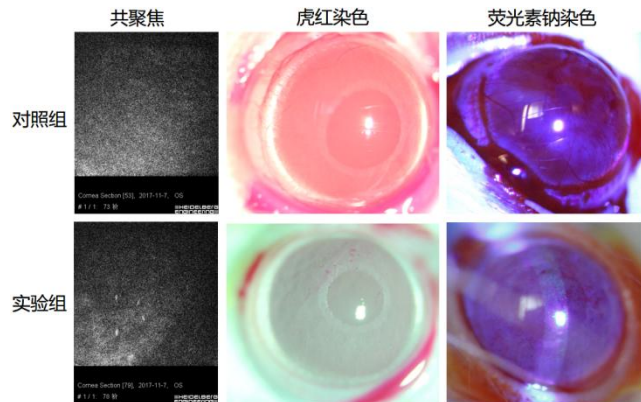


图1 正常对照组与糖尿病模型组大鼠角膜形态学观察

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。

2.2 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。

qRT-PCR 结果显示:与正常对照组相比,糖尿病模型组大鼠角膜组织中焦亡核心因子 Caspase-1 的 mRNA 表达水平显著

升高 ($P<0.01$);与糖尿病模型组相比, hUCMSC-Exos 干预组 Caspase-1 表达水平显著下调 ($P<0.01$),提示 hUCMSC-Exos 可通过抑制 Caspase-1 的过度激活,阻断焦亡通路,从而减轻糖尿病角膜上皮损伤。

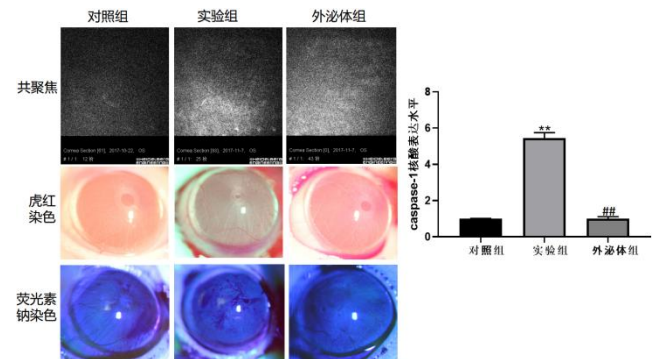


图2 三组大鼠角膜共聚焦图像、角膜虎红染色、荧光素钠染色比较

qRT-PCR 检测三组大鼠角膜组织中 Caspase-1 的 mRNA 表达水平

注:与正常对照组比较, $**P<0.01$;与糖尿病模型实验组比较, $##P<0.01$ 。

2.3 不同浓度葡萄糖及 hUCMSC-Exos 干预对 HCECs 中 Caspase-1 表达的影响

体外培养人角膜上皮细胞 (HCECs), 分别给予正常葡萄糖 (5.5 mmol/L)、高糖 (30 mmol/L)、高糖+hUCMSC-Exos 干预。qRT-PCR 结果显示:与正常糖组相比,高糖处理后 HCECs 中焦亡核心因子 Caspase-1 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$),提示高糖可直接诱导角膜上皮细胞发生 Caspase-1 介导的细胞焦亡;与高糖组相比,加入 hUCMSC-Exos 共同干预后, Caspase-1 的表达水平显著下调 ($P<0.01$),表明脐带间充质干细胞来源外泌体可在细胞水平直接抑制高糖诱导的 Caspase-1 过度激活,阻断焦亡信号通路,从而减轻角膜上皮细胞损伤。

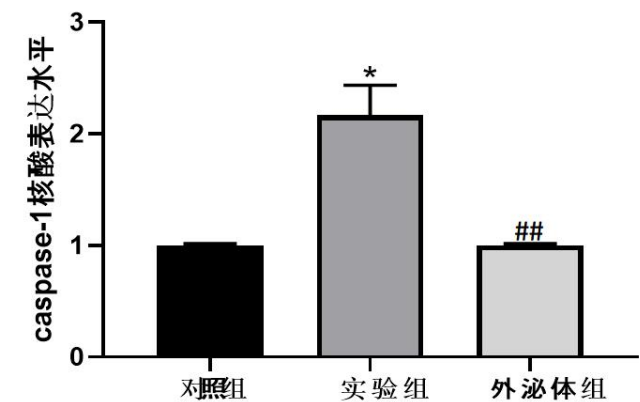


图3 不同葡萄糖浓度及 hUCMSC-Exos 干预后 HCECs 中 Caspase-1 的 mRNA 表达水平。

注:与对照组比较, $*P<0.05$;与高糖实验组比较, $##P<0.01$ 。

3 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。

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-1 β 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-1 β 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。

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- κ B/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.