

基础研究

大鼠髓核细胞来源外泌体对骨髓间充质干细胞
向髓核样细胞分化的作用研究蓝蔚仁¹, 潘 赛², 孙 超¹, 李海音¹, 蒋长青¹, 周 跃¹, 李长青¹

(1 陆军军医大学第二附属医院骨科 400037 重庆市; 2 中国人民解放军总医院肾科 100853 北京市)

【摘要】目的:探讨大鼠髓核细胞来源外泌体对大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)向髓核样细胞分化的作用。**方法:**采用贴壁法体外分离培养 SD 大鼠尾椎椎间盘髓核细胞和 BMSCs, 流式细胞术和三系分化实验鉴定 BMSCs。差速离心法分离髓核细胞外泌体, 透射电镜观察其形态并使用蛋白免疫印迹(Western blot)检测其蛋白标志物 CD81、Tsg101。分别使用荧光探针 CM-DIO 和 CM-DIL 标记 BMSCs 和髓核细胞外泌体, 将两者共培养 24h 后在荧光显微镜下观察 BMSCs 对髓核细胞外泌体摄取情况。将第三代 BMSCs 分为三组: 外泌体组, 加入髓核细胞外泌体(50 μ g/ml); 共培养组, 与髓核细胞非接触式共培养; 对照组, 未做任何处理。分别于 7、14、21d 时应用荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测外泌体组和对照组 II 型胶原(COL2A1)、蛋白多糖(ACAN)、SOX9 的 mRNA 表达量。14d 时应用 qRT-PCR 检测 3 组的 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 表达量。**结果:**提取的第三代大鼠髓核细胞呈多角形或不规则形状, 第三代 BMSCs 呈形态均一的长梭形。BMSCs 高表达 CD29(99.77%)、CD44(93.97%)、CD90(99.67%), 低表达 CD34(0.82%)、CD45(0.68%)。BMSCs 成骨、成脂、成软骨诱导后染色均为阳性。透射电镜观察外泌体为 30~100nm 类圆形双层膜结构, 其表达 CD81、Tsg101 蛋白, 不表达 Calnexin 蛋白。荧光显微镜下 CM-DIL 标记的外泌体可被 CM-DIO 标记的 BMSCs 摄取。诱导 7、14、21d 后, 外泌体组的 COL2A1、ACAN、SOX9 mRNA 表达量均显著高于对照组 ($P<0.05$)。14d 时共培养组 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 表达量均显著高于对照组, 低于外泌体组 ($P<0.05$)。**结论:**大鼠髓核细胞外泌体可在体外诱导 BMSCs 向髓核样细胞分化, 且诱导效果优于与髓核细胞的非接触式共培养, 可为椎间盘组织工程提供一种有效的髓核细胞来源。

【关键词】 外泌体; 骨髓间充质干细胞; 髓核细胞; 分化

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.01.12

中图分类号: Q813.1 文献标识码 A 文章编号: 1004-406X(2019)-01-0074-08

The inducing effect of rat nucleus pulposus cells derived exosomes on the differentiation of mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells/LAN Weiren, PAN Sai, SUN Chao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(1): 74-81

【Abstract】 Objectives: To investigate the roles of exosomes derived from rat nucleus pulposus cells(NPCs) in the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into nucleus pulposus-like cells. **Methods:** SD rats were sacrificed to obtain NPCs and BMSCs. BMSCs were identified by flow cytometry, and its multipotent differentiation ability was proved by the induction of osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. NPC exosomes were extracted by differential centrifugation and identified by transmission electron microscope, and western blot analyses of exosomes surface makers, such as CD81, Tsg101. NPC exosomes and MSCs were labeled by fluorescent dye CM-Dil and CM-Dio respectively and incubated for 24h. Fluorescence microscopy was used to detect the uptake of NPC exosomes by MSCs. The third generation BMSCs were divided into three groups: exosomes group(treated with NPCs exosomes, 50 μ g/ml), coculture group (indirect cocultured with NPCs) and control group(no treatment). Quantitative RT-PCR(qRT-PCR) was performed to detect the expressions of Collagen II, Aggrecan and SOX9 in exosomes group and control group in

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81572208);陆军军医大学第二附属医院临床科研重点项目(编号:2016YLC05)

第一作者简介:男(1993-),在读硕士研究生,研究方向:脊柱微创外科治疗的基础与临床

电话:(023)68774328 E-mail:lanweiren26@163.com

通讯作者:李长青 E-mail:changqli@163.com

7, 14, 21 days. QRT-PCR was performed to detect the expressions of Collagen II, Aggrecan and SOX9 in three groups at 14d. **Results:** The third generation NPCs were polygonal. The third generation BMSCs were spindle and regular. BMSCs were positive for CD29(99.77%), CD44(93.97%), CD90(99.67%) and negative for CD34(0.82%), CD45(0.68%). BMSCs showed the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. The NPCs exosomes were revealed as round-shaped vesicles with double-layer membrane structure and <100nm in diameter under the transmission electron microscope. It was positive for CD81, Tsg101 and negative for calnexin. CM-DIL labeled NPCs exosomes could be internalized by CM-DIO labeled BMSCs under fluorescence microscopy. The mRNA expressions of Collagen II, Aggrecan and SOX9 in exosomes group were higher than those in control group in 7, 14, 21 days($P<0.05$). The mRNA expressions of Collagen II, Aggrecan and SOX9 in coculture group were higher than those in control group, lower than those in exosomes group ($P<0.05$). **Conclusions:** Rat NPC exosomes can induce MSCs differentiate into NP-like cells in vitro, and its effects are better than indirect coculture system. It can provide an effective source of seed cells for intervertebral disc tissue engineering.

[Key words] Exosomes; Bone marrow mesenchymal stem cell; Nucleus pulposus cell; Differentiation

[Author's address] Department of Orthopedic, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing, 400037, China

椎间盘退行性变是目前影响较大的健康问题之一,它给社会和许多家庭带来了沉重的经济负担。传统药物及手术治疗等方式仅能改善临床症状。干细胞移植疗法因其具有逆转椎间盘退变的可能而成为研究的热点之一。该疗法的局限性之一就是缺少适合的细胞来源。因此,寻找合适的种子细胞是干细胞移植的关键。Richardson 等将人骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 与髓核细胞直接接触式共培养后发现 BMSCs 可表现出髓核细胞表型^[1]。随后的几项体外研究均证实了共培养体系对干细胞向髓核样细胞分化的诱导效果^[2-5]。但具体作用机制尚未清楚。有研究表明细胞融合^[6]或细胞间缝隙连接^[7]可介导干细胞向髓核样细胞分化。Strassburg 等^[8]则认为细胞融合和细胞间缝隙连接不是共培养中两种细胞相互作用的主要方式,细胞之间胞膜互换是 BMSCs 和髓核细胞相互作用的重要机制。该研究从共培养体系的细胞培养液中分离出直径小于 1 μ m 的微泡,并证实髓核细胞来源的微泡可被 BMSCs 摄取。此外,研究证实 BMSCs 在髓核细胞培养液作用 21d 后可表现出髓核细胞表型^[9]。说明髓核细胞可能释放了某些物质作用于 BMSCs。外泌体是细胞向外分泌的一种直径 30~100nm 的脂质双分子层囊泡^[10]。它可携带蛋白、脂质、核酸等物质,通过与细胞的直接接触而达到细胞之间物质运输和信息交换的作用^[11]。研究表明,神经元细胞来源外泌体可诱导 BMSCs 向神经元细胞分化^[12]。说明外泌体可能具有介导细

胞分化的能力。因此我们推断大鼠髓核细胞可分泌外泌体并通过外泌体诱导 BMSCs 向髓核样细胞分化。本研究拟探讨大鼠髓核细胞外泌体对 BMSCs 向髓核样细胞分化的诱导作用,并与非接触式共培养诱导效果相比较,为椎间盘退变的干细胞治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

200g SD 大鼠 40 只,80g SD 大鼠 10 只,均为雌性,由陆军军医大学新桥医院动物实验中心提供。本研究已获得新桥医院医学伦理委员会批准并严格遵循其对实验动物的相关规定。胎牛血清 (Biological industries)、DMEM/F12 培养基 (Biological industries)、大鼠骨髓间充质干细胞成骨成脂成软骨分化培养基 (Cyagen)、胰酶 (Hyclone)、青霉素-链霉素 (Beyotime)、CM-DIO/CM-DIL 荧光探针 (Beyotime)、二型胶原酶 (Sigma)、Tsg101/ Calnexin/ CD81 /CD34/ CD45 抗体 (Santa Cruz)、CD29/ 44/ 90 抗体 (Biologend)、GAPDH 抗体 (Beyotime)、兔抗大鼠二抗 (中衫新乔)、逆转录试剂盒/SYBR Premix Ex Taq II (Takara)、Transwell 小室 (8 μ m, Millipore)。超速离心机 (Hitachi 80wx)、透射电子显微镜 (JEM-1400PLUS, Japan)、荧光显微镜、PCR 仪 (ABI 7500)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠髓核细胞和 BMSCs 提取、培养 髓核

细胞提取方法如文献所述^[13];每次取 200g SD 大鼠 4 只(共 10 次),腹腔注射 2.5%戊巴比妥钠(1ml/kg)麻醉后脱颈处死,碘伏消毒后从根部离断尾椎,用碘伏浸泡并转移到无菌超净台中;切开并剥离尾部皮肤,无菌剪剥除尾椎椎间盘外的肌肉筋膜等软组织,暴露椎间盘;划开纤维环后取出胶冻状髓核组织,浸泡在无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中,将其剪碎为 1×1×1mm 大小;1500r/min 离心 5min 后弃上清,加入髓核组织 3 倍体积的 0.5mg/ml 二型胶原酶,37℃消化 5h,1500r/min 离心 5min 后弃上清,加入 5ml 含有 10%胎牛血清 100U/ml 青霉素链霉素的 DMEM/F12 培养基重悬沉淀并接种在 25cm² 透气培养瓶中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,3d 换液一次,细胞融合 90% 后 1:3 传代。

BMSCs 提取方法如文献所述^[14],每次取 80g SD 大鼠 2 只(共 5 次),雌性,腹腔注射 2.5%戊巴比妥钠(1ml/kg)麻醉后脱颈处死,乙醇浸泡消毒后离断其后腿,在无菌超净台中剥离股骨和胫骨,剪断干骺端后使用含有 10%胎牛血清 100U/ml 青霉素链霉素的 DMEM/F12 培养基吹打骨髓腔,之后反复吹打骨髓液直至骨髓组织消失形成单细胞悬液;将单细胞悬液接种到 25cm² 透气培养瓶中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,48h 后换液,之后 3d 换液一次,细胞融合达 90%后 1:3 传代。

1.2.2 大鼠 BMSCs 鉴定 标志蛋白流式鉴定:取第三代 BMSCs,胰酶消化后 1500r/min 离心 5min 弃上清,加入 PBS 重悬细胞制成 1×10⁶ 个/ml 浓度的单细胞悬液。每个 EP 管中分装 100μl 单细胞悬液,按 1×10⁶ 个细胞 1μg 抗体的比例分别加入 CD29、CD34、CD44、CD45、CD90 抗体,每组分别设置阴性对照,4℃避光孵育 30min,PBS 清洗两次以去除未结合抗体,之后上机检测并分析。

三系分化:取第三代 BMSCs,胰酶消化后接种到六孔板中;按说明书配制成骨、成脂、成软骨分化培养基;细胞融合达 90%后,成骨诱导组每孔加入 2ml SD 大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基,3d 换液一次,21d 后 4%多聚甲醛固定,茜素红染色。成脂诱导组先加入 SD 大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化完全培养基 A 液,3d 后换为 B 液,24h 后再换回 A 液,如此交替 3 次后 4%多聚甲醛固定,油红 O 染色。成软骨诱导组取 4×10⁵ 个细胞,在 15ml 离心管中

1500r/min 离心 5min 后弃上清,轻轻加入 0.5ml SD 大鼠 BMSCs 成软骨诱导分化完全培养基,3d 换液一次,21d 后 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,阿利新蓝染色。

1.2.3 大鼠髓核细胞外泌体的提取 依照文献记录^[15],外泌体提取方法如下:100000g 4℃条件下离心胎牛血清 12h,无菌超净台中小心吸取沉淀上方 90%的胎牛血清即获得无外泌体血清;使用此无外泌体血清配制成含有 10%胎牛血清 100U/ml 青霉素链霉素的 DMEM/F12 无外泌体培养基;大鼠髓核细胞培养至第三代后,转移到 75cm² 透气培养瓶中培养,细胞融合达 80%后加入上述无外泌体培养基,3d 后收集细胞上清液;细胞上清液在 4℃依次 300g 离心 10min、2000g 离心 10min、10000g 离心 30min,每次离心后收集上清弃沉淀以去除细胞及细胞碎片;之后 0.22μm 滤器过滤上清,100000g 4℃离心 70min,无菌 PBS 重悬沉淀,再次 100000g 4℃离心 70min,无菌 PBS 重悬沉淀后 BCA 法测定外泌体浓度,-80℃保存。

1.2.4 大鼠髓核细胞外泌体鉴定 根据文献^[16]记录,外泌体鉴定包含透射电镜观察和标志蛋白检测。透射电镜观察:吸取 50μl 外泌体悬液滴在铜网上,室温静置 1min,用滤纸从侧面吸干液体,使用 2%磷钨酸溶液在室温下负染 1min,滤纸吸干染液,室温晾干,透射电镜下观察并照相。

标志蛋白检测:使用含有 1% PMSF 的细胞裂解液裂解大鼠髓核细胞及其外泌体,冰上静置 10min,4℃、14000g 离心 5min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度;加入 5×SDS 上样缓冲液,煮沸 5min,各取 30μg 总蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳分离后电转至硝酸纤维素膜上;室温下含 5%蛋白干粉的封闭液封闭 1h, TBST 漂洗 3 次,各 5min;加入 CD81、Tsg101、Calnexin 抗体(1:200)4℃孵育过夜, TBST 漂洗 4 次,各 15min;辣根过氧化物酶标记二抗(1:4000)室温孵育 2h, TBST 漂洗 4 次,各 15min;加入显影剂并曝光。

1.2.5 观察 BMSCs 摄取髓核细胞外泌体 根据相关文献^[17]记录,20μg 髓核细胞外泌体与 10μM 荧光染液 CM-DIL 37℃避光孵育 30min, 100000g、4℃离心 70min 后弃上清,PBS 重悬沉淀后 100000g、4℃再次离心 70min 以去除未结合染

液,最后 50 μ l PBS 重悬外泌体;1 \times 10⁵ 个 BMSCs 与 10 μ M 荧光染液 CM-DIO 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min, PBS 冲洗两次以去除未结合染液;将染色后的外泌体与 BMSCs 避光孵育 24h, PBS 冲洗两次以去除未摄取的外泌体。荧光显微镜观察并拍照。

1.2.6 非接触式共培养体系的建立 各取 2 \times 10⁵ 个第三代 BMSCs 和大鼠髓核细胞,髓核细胞加入到 transwell (0.4 μ m) 的下层, BMSCs 加入到 transwell (0.4 μ m) 的上层;单独培养的 BMSCs 作为对照组。加入含有 10%胎牛血清 100U/ml 青霉素链霉素的 DMEM/F12 培养基 37 $^{\circ}$ C 培养, 3d 换液一次, 14d 后收集细胞做下一步检测。

1.2.7 qRT-PCR 检测 BMSCs 经大鼠髓核细胞外泌体诱导 7、14、21d 以及与髓核细胞共培养 14d 后,加入 Trizol 裂解细胞提取总 RNA,按照逆转录试剂盒说明书合成各组 cDNA;以 GAPDH 为内参,未加处理的 BMSCs 为对照,检测各个实验组 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 表达量;反应体系为 20 μ l 体系:SYBR Premix Ex Taq II 10 μ l、正反引物各 0.8 μ l、ROX 0.4 μ l、cDNA 2 μ l、无 RNA 酶水 6 μ l;反应条件:95 $^{\circ}$ C 30s(1 \times)、95 $^{\circ}$ C 5s/60 $^{\circ}$ C 34s(40 \times);每个样品设置三个副孔,采用 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.3 统计学分析

本实验使用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,每组实验重复三次。计量资料使用均数 \pm 标准差的形式表示。先用单因素方差分析检测总体是否存在差异,后使用 Bonferroni 法进行组间两两比

较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠髓核细胞的培养和 BMSCs 的培养、鉴定

原代大鼠髓核细胞为短棒状或多角形,呈集落分布,周围分布许多空泡状脊索细胞(图 1a)。传至第三代后脊索细胞消失,髓核细胞胞质变大,呈均匀分布(图 1b)。原代 BMSCs 为短棒状,呈集落分布,周围分布许多杂细胞(图 1c)。第三代 BMSCs 为长梭形,旋涡状排列(图 1d)。流式鉴定结果显示 BMSCs 高表达 CD29 (99.77%)、CD44 (93.97%)、CD90 (99.67%),低表达 CD34 (0.82%)、CD45(0.68%)。BMSCs 成骨诱导 21d 后茜素红染色可见钙结节(图 2a)。成脂诱导 14d 后油红 O 染色可见胞质内脂滴(图 2b)。成软骨诱导 21d 后阿利新蓝染色可见糖胺聚糖积累(图 2c)。

2.2 大鼠髓核细胞外泌体鉴定以及被 BMSCs 摄取情况

透射电镜下大鼠髓核细胞外泌体为类圆形,直径在 30~100nm 之间(图 3)。Western blot 检测结果显示大鼠髓核细胞外泌体表达 CD81、Tsg101 蛋白,不表达 Calnexin 蛋白(图 4)。红色荧光标记的外泌体与绿色荧光标记的 BMSCs 孵育 24h 后荧光显微镜观察显示:绿色荧光标记的 BMSCs 中出现了红色荧光点(图 5)。

2.3 大鼠髓核细胞外泌体与非接触式共培养对 BMSCs 诱导效果及效果对比

大鼠髓核细胞外泌体诱导 BMSCs 7d、14d、21d 后 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 表达量相比于对照组均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)(表 2),并表现出逐渐升高的趋势。14d 时,共培养组 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 表达量高于对照组,但低于外泌体组(表 3)。差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

退行性变发生后椎间盘内髓核细胞数量减少,II 型胶原和蛋白聚糖合成降低^[18],引起椎间盘形态和功能学上的改变,从而导致临床症状的发生。通过增加髓核细胞数量或寻找替代细胞以维持椎间盘形态和功能、逆转椎间盘退行性变,已成为研究重点之一。BMSCs 因其具有多向分化能力

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The Primer Sequences of qRT-PCR

基因 Gene	引物序列 Primer Sequences
COL2 α 1	
正向(F)	5'-ACCAGTTCTCCGAGGCACAGT-3'
反向(R)	5'-TGCCCTGCCTGACTTTAGTG-3'
Aggrecan	
正向(F)	5'-CGCTCAAGTCGCTGAACAACCA-3'
反向(R)	5'-CCTGAACCACTGACGCTGAT-3'
SOX9	
正向(F)	5'-ACCATCACGCGCTCGCAGT-3'
反向(R)	5'-TGCCTGGGTTTCATGTAGGT-3'
GAPDH	
正向(F)	5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATAGA-3'
反向(R)	5'-GCCTTGACTGTGCCGTTGA-3'

而成为椎间盘组织工程种子细胞之一。本研究提取了大鼠 BMSCs, 流式鉴定证明提取的 BMSCs 高表达干细胞阳性标志物 CD29、CD44、CD90, 低表达干细胞阴性标志物 CD34、CD45。并证明了提取

的 BMSCs 具有成骨、成脂、成软骨分化的能力。但 BMSCs 向髓核样细胞分化过程面临着操作复杂、产量低、结果不稳定等问题。因此, 简化诱导步骤、提高诱导效率是解决问题的关键。

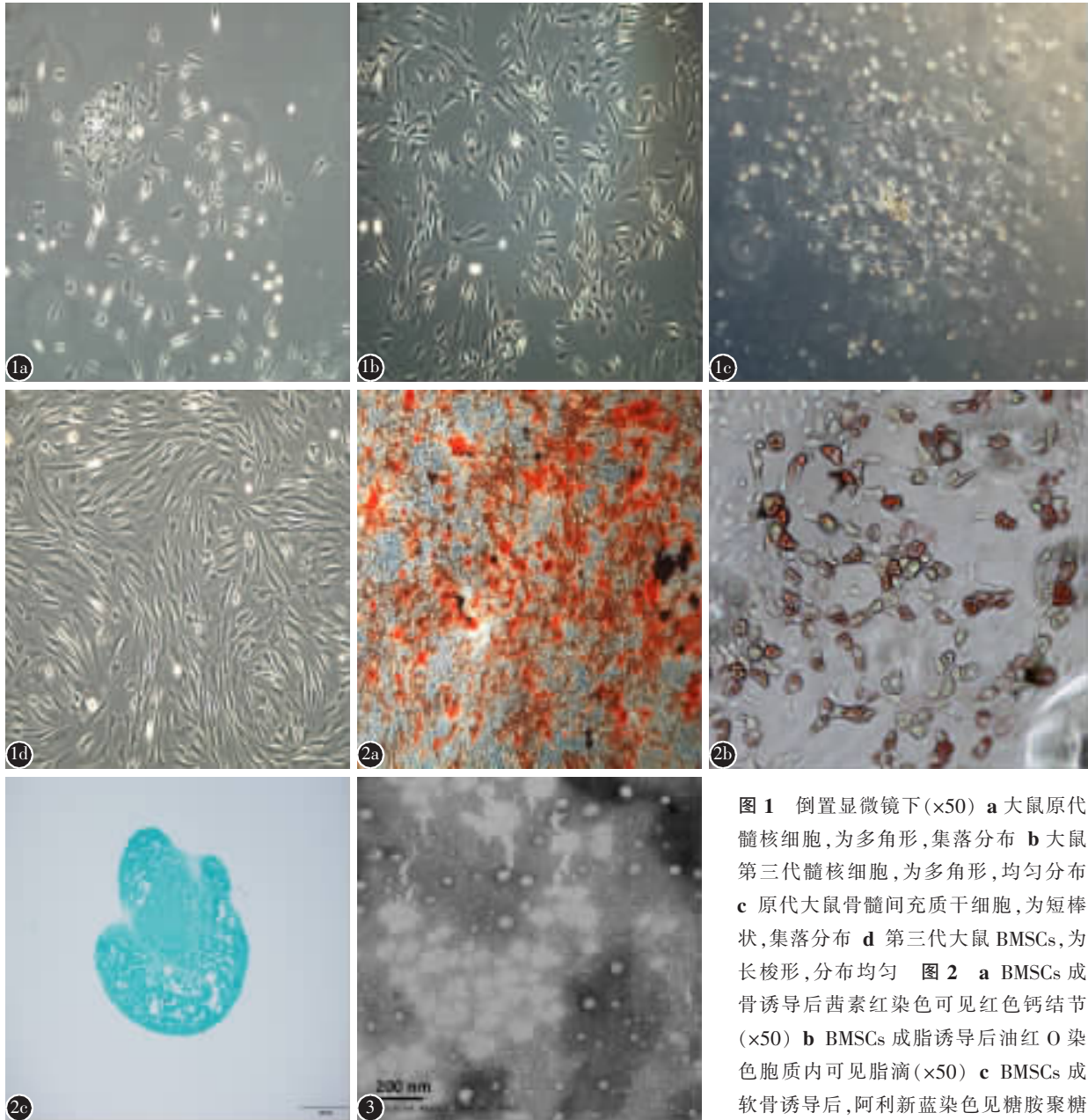


图 1 倒置显微镜下($\times 50$) a 大鼠原代髓核细胞, 为多角形, 集落分布 b 大鼠第三代髓核细胞, 为多角形, 均匀分布 c 原代大鼠骨髓间充质干细胞, 为短棒状, 集落分布 d 第三代大鼠 BMSCs, 为长梭形, 分布均匀 图 2 a BMSCs 成骨诱导后茜素红染色可见红色钙结节($\times 50$) b BMSCs 成脂诱导后油红 O 染色胞质内可见脂滴($\times 50$) c BMSCs 成软骨诱导后, 阿利新蓝染色见糖胺聚糖积累($\times 10$) 图 3 透射电镜下大鼠髓核细胞外泌体为类圆形, 直径在 30~100nm 之间

核细胞外泌体为类圆形, 直径在 30~100nm 之间

Figure 1 under the inverted microscope($\times 50$) **a** Rat primary NPCs, showed as polygonal, distributed as colony **b** The third generation NPCs, showed as polygonal and homogenous distribution **c** Primary BMSCs, showed as short rod-like, distributed as colony **d** The third generation BMSCs showed as spindle and homogenous distribution **Figure 2** **a** Stained with arizarin red, mineralization was detected in BMSCs after osteogenic induction($\times 50$) **b** Stained with oil red O, lipid droplet was seen in BMSCs after adipogenic induction($\times 50$) **c** Stained with alcian blue, formation of glucosaminoglycans was detected after chondrogenic inducitor($\times 10$) **Figure 3** Rat NPCs derived exosomes were round, diameter distributed in 30~100nm

从首次发现外泌体至今,关于外泌体的研究已深入到各个领域。已有大量研究发现肿瘤细胞、心肌细胞、关节软骨细胞等多种细胞均能分泌外泌体^[19-21]。外泌体可通过携带起源细胞的特异性生物信息对靶细胞产生影响。例如间充质干细胞来源外泌体可携带 miRNA-21,抑制髓核细胞凋亡^[22]。本课题组前期研究发现人髓核细胞来源外泌体可诱导 BMSCs 向髓核样细胞分化,但目前还没有关于大鼠髓核细胞外泌体的文献报道。为了进一步探讨外泌体的诱导分化机制并且为下一步

的体内实验奠定理论基础,我们利用大鼠髓核细胞进行诱导实验。本研究使用差速离心法从大鼠髓核细胞培养上清液中提取了外泌体。透射电镜观察结果显示,外泌体呈圆形或类圆形,直径在 30~100nm 之间,形态与既往研究^[16]中的描述一致。并且提取的外泌体还表达了外泌体标志蛋白 CD81、Tsg101,不表达阴性标志物 Calnexin。证明大鼠髓核细胞可以分泌外泌体。同时,在外泌体摄取观察实验中我们发现 BMSCs 可以摄取大鼠髓核细胞外泌体。结合 Strassburg 等^[8]得出的 BMSCs

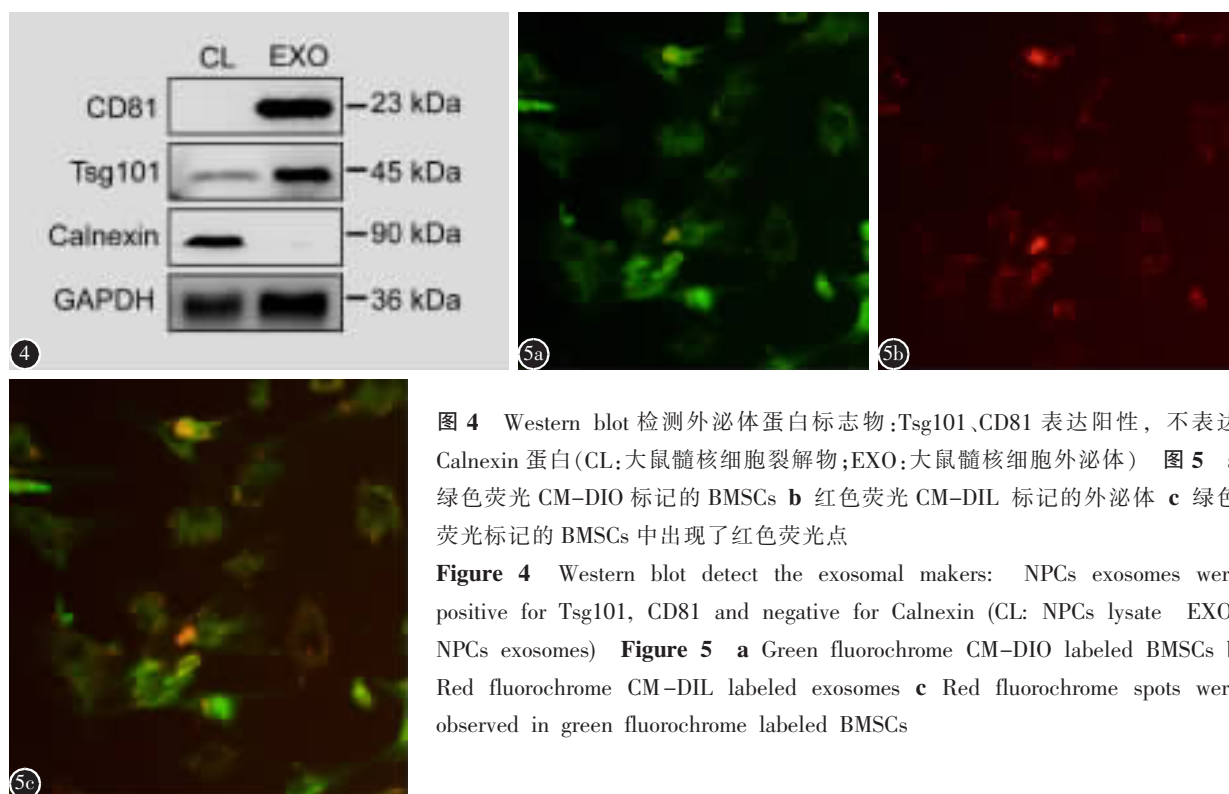


图 4 Western blot 检测外泌体蛋白标志物:Tsg101、CD81 表达阳性,不表达 Calnexin 蛋白(CL:大鼠髓核细胞裂解物;EXO:大鼠髓核细胞外泌体) 图 5 a 绿色荧光 CM-DIO 标记的 BMSCs b 红色荧光 CM-DIL 标记的外泌体 c 绿色荧光标记的 BMSCs 中出现了红色荧光点

Figure 4 Western blot detect the exosomal makers: NPCs exosomes were positive for Tsg101, CD81 and negative for Calnexin (CL: NPCs lysate EXO: NPCs exosomes) Figure 5 a Green fluorochrome CM-DIO labeled BMSCs b Red fluorochrome CM-DIL labeled exosomes c Red fluorochrome spots were observed in green fluorochrome labeled BMSCs

表 2 外泌体组与对照组 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 相对表达量 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Relative mRNA expressions of COL2A1, ACAN, SOX9 in exosomes group and control group

	对照组 Control group	外泌体组 Exosomes group		
		7d	14d	21d
II 型胶原 COL2A1	0.91±0.04	3.10±0.32 ^①	5.69±0.22 ^①	6.46±0.02 ^①
蛋白聚糖 ACAN	1.03±0.13	4.34±0.55 ^①	4.84±0.23 ^①	7.40±0.36 ^①
SOX9	0.99±0.03	3.11±0.10 ^①	2.15±0.12 ^①	4.46±0.26 ^①

注:①与对照组比较 P<0.05

Note: ①Compared with control group, P<0.05

表 3 在 14d 时各组 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 相对表达量 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 3 Relative mRNA expression of COL2A1, ACAN, SOX9 in BMSCs in 14d

	对照组 Control group	共培养组 Coculture group	外泌体组 Exosomes group
II 型胶原 COL2A1	1.02±0.03	2.70±0.15 ^②	4.27±0.19 ^①
蛋白聚糖 ACAN	1.02±0.04	3.14±0.25 ^②	5.18±0.46 ^①
SOX9	1.01±0.01	2.29±0.06 ^②	3.27±0.11 ^①

注:①与对照组比较 P<0.05;②与外泌体组比较 P<0.05

Note: ①Compared with control group, P<0.05; ②Compared with exosomes group, P<0.05

和髓核细胞通过胞膜互换而相互作用的观点,我们推测共培养中髓核细胞通过外泌体诱导 BMSCs 分化。

为了证实大鼠髓核细胞外泌体对 BMSCs 的诱导分化作用,我们将髓核细胞外泌体直接作用于 BMSCs,并与非接触式共培养对比。在大鼠髓核细胞外泌体诱导 7、14、21d 后,BMSCs 的 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 表达量均高于对照组,并且呈逐渐升高的趋势。表明大鼠髓核细胞外泌体可以诱导 BMSCs 向髓核样细胞分化。因此我们认为共培养中髓核细胞释放外泌体是诱导 BMSCs 分化的机制之一。此外,与大鼠髓核细胞非接触式共培养 14d 后,BMSCs 的 COL2A1、ACAN、SOX9 的 mRNA 表达量均高于对照组,但低于外泌体诱导组。说明外泌体在诱导 BMSCs 向髓核样细胞分化中的诱导效果优于非接触式共培养。我们推测其原因可能是非接触式共培养中髓核细胞产生的外泌体浓度较低,未到达外泌体诱导组的加样浓度(50 μ g/ml),对 BMSCs 的作用强度较低。并且非接触式共培养体系中髓核细胞释放外泌体以及外泌体扩散都需要一定时间。目前仍需进一步实验来证实这个观点。

本研究探讨了大鼠髓核细胞外泌体对 BMSCs 向髓核样细胞分化的诱导作用,并证明外泌体比非接触式共培养方式诱导效率更高,可为椎间盘组织工程提供一种新的种子细胞来源。但是参与分化过程的信号通路仍未明确。已有多项研究证明转化生长因子 β (TGF- β)超家族可诱导 BMSCs 向髓核样细胞分化。例如生长分化因子 5 (growth and differentiation factors 5,GDF5)^[23]、TGF- β 1^[24]。并且我们课题组发现髓核细胞外泌体携带了 TGF- β 蛋白^[16]。因此 TGF- β 信号通路有可能参与了 BMSCs 分化过程。此外,有研究发现 Notch 通路参与了多种细胞的分化过程并起到了抑制作用。例如抑制 Notch 通路可促进 TGF- β 1 诱导的 BMSCs 向髓核样细胞分化^[24,25]。我们推测 BMSCs 向髓核样细胞分化可能是一个多通路调控的过程。尽管外泌体具有诱导效率高,方便储存等优点,但外泌体的成分复杂,具体有效成分以及参与调控分化的信号通路尚未清楚,仍需进一步研究。

4 参考文献

- Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 707-716.
- Vadala G, Studer RK, Sowa G, et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion[J]. *Spine*, 2008, 33(8): 870-876.
- Allon AA, Butcher K, Schneider RA, et al. Structured coculture of mesenchymal stem cells and disc cells enhances differentiation and proliferation[J]. *Cells Tissues Organs*, 2012, 196(2): 99-106.
- Wei A, Chung SA, Tao H, et al. Differentiation of rodent bone marrow mesenchymal stem cells into intervertebral disc-like cells following coculture with rat disc tissue[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(9): 2581-2595.
- Hu X, Zhou Y, Zheng X, et al. Differentiation of menstrual blood-derived stem cells toward nucleus pulposus-like cells in a coculture system with nucleus pulposus cells [J]. *Spine*, 2014, 39(9): 754-760.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion [J]. *Nature*, 2002, 416(6880): 542-545.
- Yoon J, Shim WJ, Ro YM, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes[J]. *Ann Hematol*, 2005, 84(11): 715-721.
- Strassburg S, Hodson NW, Hill PL, et al. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33739.
- Salzig D, Schmiermund A, Gebauer E, et al. Influence of porcine intervertebral disc matrix on stem cell differentiation [J]. *J Funct Biomater*, 2011, 2(3): 155-172.
- Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy[J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77(1): 13-27.
- Toh WS, Lai RC, Hui J, et al. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 67(1): 56-64.
- Takeda YS, Xu Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e135111.
- 朱厚毅, 王运涛, 王锋, 等. 大鼠尾椎间盘髓核细胞的分离、培养与鉴定[J]. *东南大学学报(医学版)*, 2016, 18(1): 1-6.
- Chang J, Lei H, Liu Q, et al. Optimization of culture of mesenchymal stem cells: a comparison of conventional plate and microcarrier cultures[J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(5): 430-437.
- Sun W, Zhao C, Li Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity[J].

颈椎后凸畸形动物模型的研究进展

Advances of animal model in cervical kyphotic deformity

赖金良¹, 郑天胜², 方加虎³, 姬广林²

(1 赣南医学院 2016 级在读硕士研究生 341000 赣州市; 2 赣南医学院第一附属医院骨科 341000 赣州市;

3 南京医科大学第一附属医院骨科 210029 南京市)

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.01.13

中图分类号:R682.3,R-332 文献标识码 A 文章编号:1004-406X(2019)-01-0081-06

颈椎后凸畸形的形成与局部的颈椎退变、创伤、肿瘤、发育畸形以及医源性(颈椎前后路手术)因素有关,系统性疾病如强直性脊柱炎、类风湿关节炎也会导致本病的发生^[1]。其临床表现因原发疾病不同而表现各异,主要为颈痛、肩痛和神经压迫症状,严重的出现 chin-on-chest(下颌-胸)畸形,导致患者不能平视,呼吸和吞咽困难^[2]。现代生活方式的智能化使得低头屈颈人群变得普遍,青少年颈

椎后凸畸形发病率呈增加趋势^[3]。颈椎后凸畸形的手术治疗难度较大,手术治疗策略争议较多,治疗效果亦不能尽善尽美^[4]。颈椎后凸畸形动物模型的建立为本病的研究提供了有效的载体,根据本病致病原因分类,把已构建的动物模型分为医源性、退变性、先天发育性,综述如下。

1 医源性模型

颈椎后凸畸形过去以医源性创伤为最常见原因,椎板切除术后导致颈椎后凸多见文献报道^[5]。

Lee 等^[6]选用 4 月龄的幼龄猫以及成年猫行椎板切除术。手术中仔细分离椎板与黄韧带的间隙,切除 C3~C6 四

第一作者简介:男(1992-),硕士研究生在读,研究方向:脊柱外科
电话:(0797)8269715 E-mail:m15770790359@163.com
通讯作者:姬广林 E-mail:ganyiguke@163.com

Cell Discov, 2016, 2: 16015.

16. Lu K, Li HY, Yang K, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 108-118.
17. Yan Y, Jiang W, Tan Y, et al. HucMSC exosome-derived GPX1 is required for the recovery of hepatic oxidant injury [J]. Mol Ther, 2017, 25(2): 465-479.
18. Ma X, Lin Y, Yang K, et al. Effect of lentivirus-mediated survivin transfection on the morphology and apoptosis of nucleus pulposus cells derived from degenerative human disc in vitro[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(1): 186-194.
19. Syn NL, Wang L, Chow EK, et al. Exosomes in Cancer Nanomedicine and Immunotherapy: Prospects and Challenges [J]. Trends Biotechnol, 2017, 35(7): 665-676.
20. Hu M, Guo G, Huang Q, et al. The harsh microenvironment in infarcted heart accelerates transplanted bone marrow mesenchymal stem cells injury: the role of injured cardiomyocytes-derived exosomes[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 357-370.
21. Vonk LA, van Dooremalen S, Liv N, et al. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles promote human cartilage regeneration in vitro[J]. Theranostics, 2018, 8(4): 906-920.
22. Cheng X, Zhang G, Zhang L, et al. Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(1): 261-276.
23. Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, et al. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells[J]. Eur Cell Mater, 2011, 21(40): 533-547.
24. Han C, Jiang C, Yu C, et al. Differentiation of transforming growth factor beta1-induced mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells under simulated microgravity conditions[J]. Cell Mol Biol(Noisy-le-grand), 2015, 61(2): 50-55.
25. 莫日格乐, 邵增务. Notch-1 基因敲除兔骨髓间充质干细胞可阻止椎间盘退行性变吗?[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(36): 6403-6408.
26. 岳宗进, 刘汝银, 于露, 等. miR146 通过靶向 Notch 1 促进骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2016, 37(5): 663-668.

(收稿日期:2018-09-01 修回日期:2018-11-15)

(英文编审 郑国权/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)