

# 大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体对退变髓核细胞的影响

蒋长青, 蓝蔚仁, 李海音, 路康, 李长青

(陆军军医大学附属新桥医院骨科 400037 重庆市)

**【摘要】目的:**探讨大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)来源外泌体对退变髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)的影响。**方法:**利用全骨髓法提取 SD 大鼠骨髓内贴壁细胞,通过成骨、成脂、成软骨三系分化及流式细胞技术鉴定所提取细胞是否为 BMSCs,鉴定成功后,收取细胞培养液上清,对上清液进行差速离心,Western-blot(WB)法测定离心沉淀物质 CD63、CD81、TSG101、Calnexin 蛋白表达情况,并对沉淀物进行透射电镜观察鉴定是否为外泌体。取 SD 大鼠尾 NPCs,传代培养,通过细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色法鉴定 P6 NPCs 是否较 P2 NPCs 产生退变;在激光共聚焦显微镜下观察 BMSCs 外泌体被 P6 NPCs 摄取情况;设置 P6 NPCs 为对照组, BMSCs 和 P6 NPCs 一起培养为共培养组,直接加入 BMSCs 外泌体诱导 P6 NPCs 为实验组。培养 3d、7d、10d、14d 后用 RT-PCR 法检测 3 组 NPCs 中蛋白聚糖(ACAN)、II 型胶原(COL2)、性别决定区 Y 方框 9(SOX-9)、金属蛋白酶组织抑制剂 1(TIMP1)、基质金属蛋白酶 1(MMP1)基因 mRNA 的相对表达量;WB 法检测 ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1、MMP1 对应蛋白的相对表达情况。**结果:**通过成骨、成脂、成软骨三系分化及流式细胞技术鉴定利用全骨髓法提取的贴壁细胞为 BMSCs。BMSCs 培养液上清利用差速离心法提取的沉淀物形态为直径 30~100nm 的圆形或椭圆形,与文献记载的经典外泌体大小吻合,沉淀物 CD63、CD81、TSG101 高表达,Calnexin 未表达。通过细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色法鉴定 P6 NPCs 较 P2 NPCs 产生明显退变。在激光共聚焦显微镜下观察到外泌体能够被 P6 NPCs 所摄取。ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1 基因 mRNA 的相对表达量在 3d、7d、10d、14d 共培养组较对照组明显升高( $P<0.05$ ),实验组较共培养组明显升高( $P<0.05$ ),共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显升高( $P<0.05$ )、10d 较 7d 明显升高( $P<0.05$ )、14d 较 10d 明显升高( $P<0.05$ );MMP1 基因 mRNA 的相对表达量在 3d、7d、10d、14d 共培养组较对照组明显降低( $P<0.05$ ),实验组较共培养组明显降低( $P<0.05$ ),共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显降低( $P<0.05$ )、10d 较 7d 明显降低( $P<0.05$ )、14d 较 10d 明显降低( $P<0.05$ );ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1、MMP1 基因相对蛋白质表现出同样趋势。**结论:**在体外实验中,大鼠 BMSCs 能够分泌外泌体且外泌体能够被退变 NPCs 摄取,外泌体能够改善退变 NPCs 标志基因及基因对应蛋白质的表达,可为髓核细胞退变类疾病的治疗提供一种新的思路。

**【关键词】**髓核细胞;骨髓间充质干细胞;外泌体;共培养;SD 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2019.02.09

中图分类号:Q786 文献标识码 A 文章编号:1004-406X(2019)-02-0147-09

Effects of exosome derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells on degenerative nucleus pulposus cells/JIANG Changqing, LAN Weiren, LI Haiyin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(2): 147-155

**【Abstract】 Objectives:** To explore the effect of exosome derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) on degenerative nucleus pulposus cells(NPCs). **Methods:** The adherent cells were extracted from bone marrow of SD rats by whole bone marrow method. After BMSCs were successfully identified by osteoblast differentiation and flow cytometry, the supernatant of cultured cells was collected. The supernatant was centrifuged by differential centrifugation, and the expressions of CD63, CD81, TSG101, Calnexin protein in the precipitate were determined by Western-blot(WB) method, and whether the precipitate exosome or not was observed by transmission electron microscope. After extracting NPCs from SD rats tail, P6 NPCs were i-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81572208)

第一作者简介:男(1990-),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:786327163@qq.com

通讯作者:李长青 E-mail:changqli@163.com

identified whether it was more degenerative than P2 NPCs by senescence  $\beta$ -galactosidase staining. The uptake of BMSCs exosome was observed by P6 NPCs under laser confocal microscope. P6 NPCs were taken as the control group, BMSCs and P6 NPCs were as the co-culture group, and P6 NPCs which were induced by BMSCs exosome were taken as the experimental group. The proteoglycan (ACAN), type II collagen (COL2), sex-determining region Y box 9(SOX-9), tissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP1) and the relative expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP1) gene mRNA of NPCs in the three groups were detected by RT-PCR method. Relative expressions of ACAN, COL2, SOX-9, TIMP1, MMP1 gene corresponding protein were detected by WB. **Results:** The adherent cells which were extracted by whole bone marrow method were BMSCs and they were identified by osteogenesis and adipogenic cartilage differentiation method and flow cytometry method. The precipitates extracted from BMSCs supernatant by differential centrifugation were circular or elliptical in diameter of 30–100nm, which were coincided with the classical exosome size recorded in literature. CD63, CD81, TSG101 were highly expressed and Calnexin was not expressed in the supernatant. Identified by cell senescence  $\beta$ -galactosidase staining, P6 NPCs were more degenerative than P2 NPCs, and the exosome could be absorbed by P6 NPCs observed under the confocal laser microscope. The relative expressions of mRNA of ACAN, COL2, SOX-9, TIMP1 gene were significantly higher in the co-culture group than those in the control group on the 3rd day, 7th day, 10th day and 14th day ( $P<0.05$ ), and those in the experimental group were significantly higher than those in the co-culture group ( $P<0.05$ ). In the co-culture group and the experimental group, those on the 7th day were significantly higher than those on the 3rd day ( $P<0.05$ ), and those on the 10th day were significantly higher than those on the 7th day ( $P<0.05$ ), and those on the 14th day were significantly higher than those on the 10th day ( $P<0.05$ ). The relative expression of mRNA of MMP1 gene was significantly lower in the co-culture group than that in the control group on the 3rd day, 7th day, 10th day and 14th day ( $P<0.05$ ), and that in the experimental group was significantly lower than that in the co-culture group ( $P<0.05$ ). In the co-culture group and experimental group, there was a significant decrease in the 7th day compared with the 3rd day ( $P<0.05$ ), and decrease also showed in the 10th day in comparison with the 7th day ( $P<0.05$ ), and the 14th day in comparison with the 10th day ( $P<0.05$ ). ACAN, COL2, SOX-9, TIMP1, MMP1 gene corresponding protein showed the same trend. **Conclusions:** In vitro, rat BMSCs can secrete exosome and the exosome can be taken up by degenerative NPCs. Exosome can improve the expression of degenerative NPCs marker gene and gene corresponding protein. It can provide a new idea for the treatment of degenerative diseases of nucleus pulposus cells.

**【Key words】** Nucleus pulposus cells; Bone marrow mesenchymal stem cells; Exosome; Coculture; SD rats

**【Author's address】** Department of Orthopedic, New Bridge Hospital, Military Medical University of the Army, Chongqing, 400037, China

腰痛在社会人群中所占比例越来越高,给个人、家庭乃至整个社会带来沉重负担。引起腰痛的主要原因是椎间盘退变性疾病(degenerative disease of intervertebral disc, DDD)<sup>[1]</sup>。临床上治疗 DDD 的方案有保守治疗、椎间盘切除术、椎间融合术以及椎间盘置换术等,这些方法虽然能不同程度缓解临床症状,但对退变的椎间盘本身并无根本治疗作用。近些年,组织工程学飞速发展,干细胞移植是各个学科的研究热点并且取得喜人进展。在 DDD 领域,关于干细胞的研究也得到巨大进展,有文献报道骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)与髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)进行非接触式共培养后, BMSCs 可表现出 NPCs 的表型。且在文献中提

及共培养的 NPCs 表现出较实验前退变改善的趋势<sup>[2]</sup>。随着研究的深入,学者们发现外泌体在细胞间信息交流中作用突出,逐渐得到众多学者的认可<sup>[3]</sup>。本课题组前期的研究发现加入 NPCs 外泌体对 BMSCs 直接接触诱导后上述现象表现出比非接触式共培养更明显的效果<sup>[4]</sup>。但 BMSCs 是否分泌外泌体以及对 NPCs 的影响和具体机制是什么仍需要进一步研究。本研究旨在探索 SD 大鼠 BMSCs 是否分泌外泌体,以及 BMSCs 外泌体对 NPCs 的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、主要试剂与仪器

(1)实验动物:50 只 SD 大鼠(雌性,8 周龄)

用于分离培养 NPCs 和 BMSCs, 均由新桥医院动物房提供(符合伦理审查)。(2)主要试剂:胎牛血清(BI)、DMEM/F-12 培养基(Hyclone)、胰酶、BMSCs 培养基(Cyagen)、CM-Dil 和 CM-Dio 荧光染料、Transwell 小室(1 $\mu$ m, Milipore)、六孔板、细胞衰老  $\beta$ -半乳糖半乳糖苷酶染色试剂盒等。(3)主要仪器设备:亚超速低温离心机(Beckman/AJ -30I)、透射电子显微镜(JEM-1400PLUS, Japan)、激光共聚焦显微镜、PCR 仪(ABI 7500 型)等。

## 1.2 BMSCs 的分离培养及鉴定

选取 30 只 SD 大鼠, 体重为 100~120g, 在动物实验手术室断颈处死, 用碘伏给 SD 大鼠后半身消毒后取后肢股骨和胫骨并用刀片刮除肌肉组织, 浸泡于碘伏中 3min。在超净台内用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗 3 次去污, 剪除骨两端, 暴露骨髓腔, 放于含有无血清干细胞培养基的无菌培养皿, 用无菌注射器抽吸培养基冲出骨髓于培养皿中, 在培养皿中反复抽吸吹打, 直至血凝块消失。接种于细胞培养瓶中, 置于 5%CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中培养。48h 后更换培养液, 之后每 3d 换液 1 次并收集培养液, 将收集到的培养液保存于-20℃冰箱中。在显微镜下观察细胞培养瓶中细胞, 当细胞密度达到培养瓶底部 80%左右时, 按 1:3 比例传代, 换液或者传代的同时收集培养液并保存。根据生产商说明书对提取的 SD 大鼠 P3 BMSCs 进行成骨、成脂成、软骨三系诱导分化鉴定及流式细胞术鉴定。

## 1.3 BMSCs 外泌体的收集和提取

用亚超速低温离心机离心 12h (100000g、4℃)胎牛血清以去除血清中的外泌体, 按 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素及 BMSCs 培养基配制无外泌体培养基。调整 BMSCs 浓度为 2 $\times$ 10<sup>6</sup>/ml, 接种至 25cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 48h 后通过换液或者传代开始收集细胞培养液, 用孔径为 0.22 $\mu$ m 的过滤器过滤收集到的培养液, 用亚超速低温离心机离心 70min (100000g、4℃)后弃上清, 用 PBS 洗涤离心管底部和侧壁 1 次, 再次离心 70min (100000g、4℃), 获得的沉淀即为外泌体<sup>[5-7]</sup>。用 1ml PBS 重悬后, 用 BCA 法检测浓度并记录, 将所得外泌体置于-80℃冰箱低温保存备用。

## 1.4 外泌体的形态观察及标志蛋白检测

**1.4.1 外泌体的形态观察** 室温下, 滴 20 $\mu$ l 外泌体悬液于载样铜网上, 静置 1min, 用滤纸从铜网侧面吸干多余液体, 随后在铜网上滴加 2%磷钨酸溶液(pH 值 6.8)30 $\mu$ l, 1min 后用滤纸吸干多余溶液, 在白炽灯下烤 10min。调节工作电压至 120kV, 透射电镜下观察外泌体形态及大小并照相。

**1.4.2 外泌体标志蛋白检测 (Western blot, WB)** 将外泌体沉淀用 100 $\mu$ l WB 细胞裂解液 [含 1% 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)]裂解, BCA 法测蛋白浓度后, 加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液 20 $\mu$ l, 煮沸 5min, 加入凝胶上样孔, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转至硝酸纤维素膜上, 室温下用含 5%脱脂牛奶的封闭液封闭处理 1h, 经含 0.05%吐温的缓冲盐溶液洗脱后, 加入 CD63、CD81、TSG101 及 Calnexin 在 4℃下过夜, 再次洗脱后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗继续孵育 2h 并用发光底物显影, 放置于 WB 显影仪上曝光并保存图片。

## 1.5 NPCs 的提取、培养及退变模型的建立

选取 20 只 SD 大鼠, 体重为 120~180g, 在动物实验手术室断颈处死, 用碘伏给 SD 大鼠后半身消毒后剪取尾部, 剥离并丢弃皮肤, 将剩余尾部放于碘伏中浸泡 3min。在超净台内用无菌 PBS 冲洗 3 次去污, 用无菌尖刀取出髓核组织置于无菌培养皿中, 用 0.25%胰蛋白酶在 37℃条件下消化 20min, 300g 离心 5min, 弃上清。37℃条件下用 0.5mg/ml 浓度的 II 型胶原酶静置消化 4h, 至组织块消失。300g 离心 5min, 弃上清后用加入 5ml 含青霉素 100U/ml、链霉素 100U/ml 和 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液重悬。接种于细胞培养瓶中, 置于 5%CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中培养。第 1 次换液为 6d 后, 之后每 3d 换液 1 次。在显微镜下观察细胞培养瓶中细胞, 当细胞密度达到培养瓶底部 80%左右时, 按 1:3 比例传代。

分离培养的 NPCs 持续培养并传代, 对 P2 NPCs 和 P6 NPCs 进行细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色鉴定:两份细胞用 6 孔板培养贴壁, 用滴管吸除培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 1ml  $\beta$ -半乳糖半乳糖苷酶染色固定液, 室温固定 15min; 吸除固定液后用 PBS 洗涤 3 次; 加入 1ml 染色工作液 (10 $\mu$ l 染色液 A, 10 $\mu$ l 染色液 B, 930 $\mu$ l 染色液 C, 50 $\mu$ l X-Gal 溶液); 37℃孵育过夜; 普通光学显微



镜下观察两份细胞的形态及染色情况并照相。

### 1.6 P6 NPCs 摄取大鼠 BMSCs 外泌体的观察

根据生产商说明书分别用 CM-Dil 和 CM-Dio (Thermo Fisher) 标记 SD 大鼠 BMSCs 外泌体和 SD 大鼠 P6 NPCs。SD 大鼠 BMSCs 外泌体 (20 $\mu$ g) 与 SD 大鼠 P6 NPCs (1 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml) 在温度为 37 $^{\circ}$ C 的黑暗环境中分别和 CM-Dil 与 CM-Dio 混合 30min。CM-Dil 标记的 SD 大鼠 BMSCs 外泌体用 PBS 漂洗后 100000g 离心 80min。300g 离心 5min 以除去 SD 大鼠 P6 NPCs 的未结合 CM-Dio。然后在 37 $^{\circ}$ C 下把用 CM-Dil 标记的 BMSCs 外泌体和用 CM-Dio 标记的 P6 NPCs 共同培养 24h<sup>[8]</sup>。然后在激光共聚焦显微镜下采集明亮的视野和荧光图像, 观察 SD 大鼠 P6 NPCs 摄取 SD 大鼠 BMSCs 外泌体的情况。

### 1.7 P6 NPCs 标志基因 mRNA 的相对表达情况

在六孔板中, 以 P6 NPCs 为空白对照组, 以 P3 BMSCs 与 P6 NPCs 在 Transwell 系统中培养为共培养组, 以 BMSCs 外泌体浓度为 50 $\mu$ g/ml 的培养基诱导 P6 NPCs 为实验组。培养 3d、7d、10d、14d 后用 Trizol 法提取各组总的 mRNA, cDNA 合成参照反转录试剂盒 (TaKaRa Prime Script RT reagent Kit) 说明书进行, 用 ABI 7500 型 PCR 仪进行 RT-PCR 反应, 检测标志基因蛋白聚糖 (aggrecan, ACAN)、II 型胶原 (collagen II, COL2)、性别决定区 Y 方框 9 (sex determining region Y-box 9, SOX-9)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP1)、基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase 1, MMP1) mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1, 以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 算法得到各组 ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1、MMP1 基因的相对表达量。

### 1.8 P6 NPCs 的 ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1、MMP1 基因对应蛋白质相对表达情况

采用 WB 法, 将 3 组 P6 NPCs 用 WB 细胞裂解液 (含 1% PMSF) 裂解, BCA 法测蛋白浓度后, 加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液 20 $\mu$ l, 煮沸 5min, 加入凝胶上样孔, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转至硝酸纤维素膜上, 室温下用含 5% 脱脂牛奶的封闭液封闭处理 1h, 经含 0.05% 吐温的缓冲盐溶液洗脱后, 加入 ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1 及 MMP1 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜, 再次洗脱后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗继续孵育 2h 并用发

表 1 基因引物序列表

Table 1 The primer sequence of genes

基因名称 Gene	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
GADPH	正向 (F) 5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATAGA-3'
	反向 (R) 5'-GCCTTGACTGTGCCGTTGAACT-3'
II 型胶原 COL2	正向 (F) 5'-CGCTCAAGTCGCTGAACAACCA-3'
	反向 (R) 5'-ACCAGTCTTCGAGGCACACT-3'
SOX-9	正向 (F) 5'-ACCATCAGCGCTCGCAGT-3'
	反向 (R) 5'-TGGCGTGGGTTTCATGTAGGT-3'
蛋白聚糖 ACAN	正向 (F) 5'-TGGCCTGCCTGACTTTAGTG-3'
	反向 (R) 5'-CCTGAACCACTGACGCTGAT-3'
TIMP1	正向 (F) 5'-GCTTCTGTTCCCTGGCATAA-3'
	反向 (R) 5'-ATCGCTCTGGTAGCCCTTCTCA-3'
MMP1	正向 (F) 5'-TTGAGGAGGAGGTTGATATTGTGTTTCG-3'
	反向 (R) 5'-ATCGCTCTGGTAGCCCTTCTCA-3'

光底物显影, 放置于 WB 显影仪上曝光后比较条带形态并保存图片。

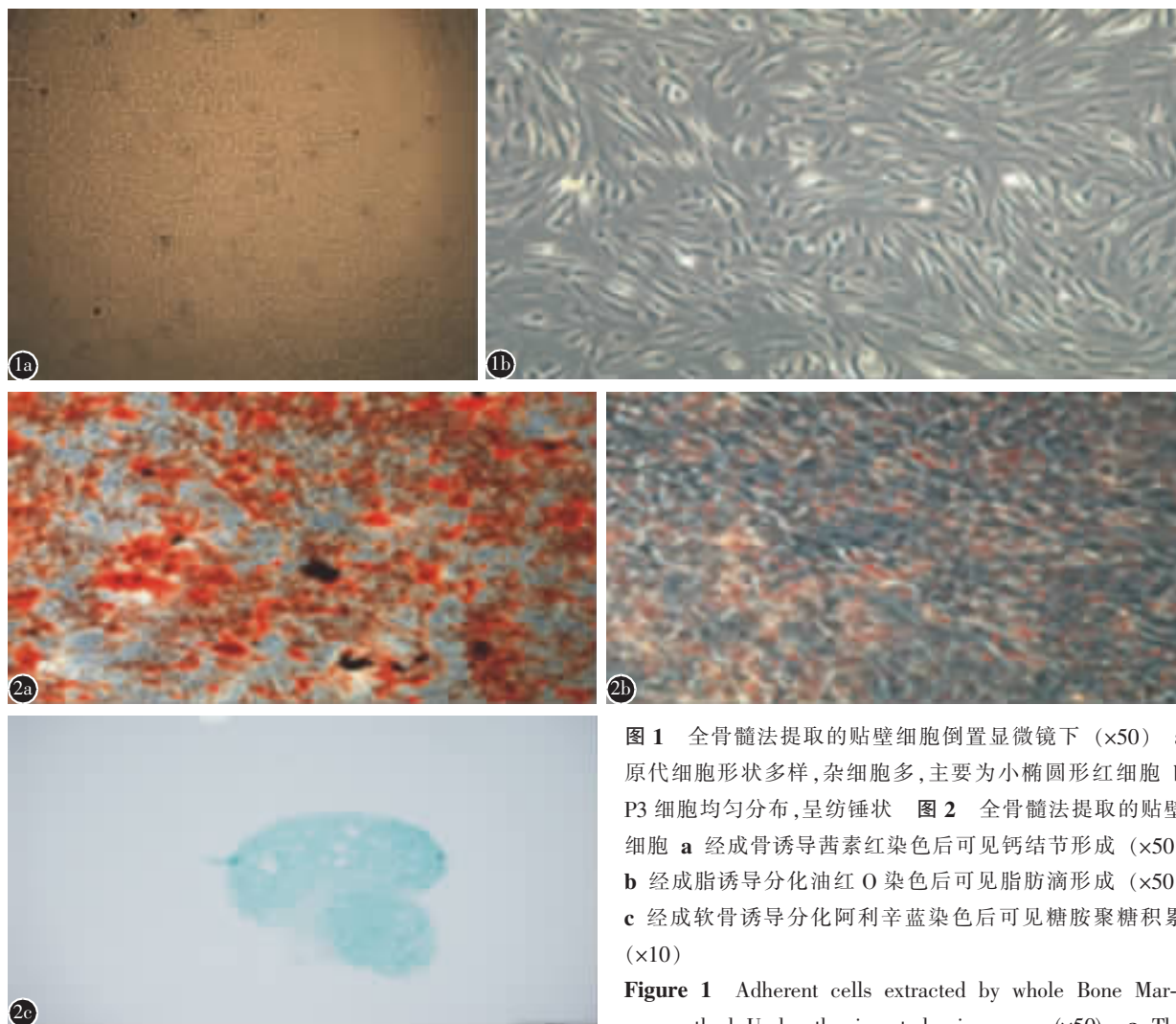
### 1.9 统计学方法

所有数据采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 所有实验均至少重复 3 次, 计量数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示。用单因素方差分析对对照组、共培养组、实验组 ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1、MMP1 mRNA 的相对表达量的均值进行整体比较, 并用 Bonferoni 统计分析方法进行组间多重比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BMSCs 的分离、培养和鉴定结果

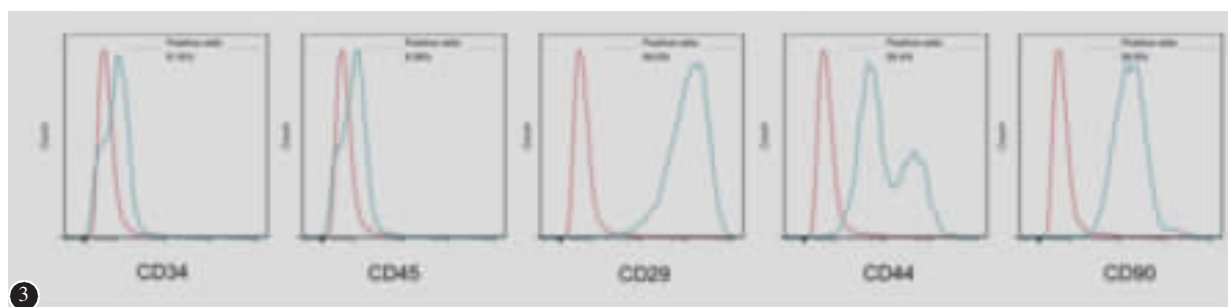
原代细胞提取操作后, 24h 开始出现少量贴壁细胞, 贴壁细胞继续培养 3d 后开始大量增殖, 伸展为椭圆形、短梭形、多角形及不规则形等, 但仍有较多杂质细胞, 主要为小椭圆形红细胞 (图 1a)。当细胞长满达 80% 左右, 按 1:3 比例传代, 传至 P3 时可见细胞密度、大小均匀, 呈旋涡状生长, 极少杂细胞 (图 1b)。贴壁细胞经过成骨诱导分化后用茜素红染色后可见钙结节形成 (图 2a)、经成脂诱导分化后用油红 O 染色后可见脂肪滴形成 (图 2b)、经成软骨诱导分化后用阿利辛蓝染色后可见糖胺聚糖积累 (图 2c)。流式细胞术鉴定干细胞阴性标志物 CD34 和 CD45 分别表达 6.16% 和 6.08%, 干细胞阳性标志物 CD29、CD44 和 CD90 分别表达 99.8%、95.4% 和 99.8% (图 3)。通过成骨、成脂、成软骨三系分化及流式细胞技术



**图 1** 全骨髓法提取的贴壁细胞倒置显微镜下 (×50) **a** 原代细胞形状多样, 杂细胞多, 主要为小椭圆形红细胞 **b** P3 细胞均匀分布, 呈纺锤状 **图 2** 全骨髓法提取的贴壁细胞 **a** 经成骨诱导茜素红染色后可见钙结节形成 (×50) **b** 经成脂诱导分化油红 O 染色后可见脂肪滴形成 (×50) **c** 经成软骨诱导分化阿利辛蓝染色后可见糖胺聚糖积累 (×10)

**Figure 1** Adherent cells extracted by whole Bone Marrow method Under the inverted microscope (×50) **a** The

shape of primary cells is diverse, the mainly miscellaneous cell is the small oval red blood cell **b** P3 cells distributed uniformly in spindle shape **Figure 2** Adherent cells extracted by whole Bone Marrow method **a** The formation of calcium nodules can be seen after alizarin red staining induced by osteogenesis (×50) **b** Fat droplet formation can be seen after oil red O staining induced by adipogenesis (×50) **c** The accumulation of glycosaminoglycan can be seen after alisin blue staining induced by chondrogenic differentiation (×10)



**图 3** 全骨髓法提取的贴壁细胞流式细胞术图: CD34 和 CD45 分别表达 6.16% 和 6.08%, CD29、CD44 和 CD90 分别表达 99.8%、95.4% 和 99.8%

**Figure 3** Flow Cytometry of adherent cells extracted by whole bone marrow method: The negative markers of CD34 and CD45 were expressed in 6.16% and 6.08%, respectively. The positive markers of CD29, CD44 and CD90 were 99.8%, 95.4% and 99.8%, respectively

鉴定利用全骨髓法提取的贴壁细胞为 BMSCs。

## 2.2 NPCs 的分离、培养和传代

提取原代 NPCs 后 5d 左右可见短梭状细胞在髓核组织块周围出现,围绕组织块增殖,细胞形态较为简单(图 4a)。当细胞长满达 80%左右或已出现拥挤状态时,按 1:3 比例传代,传至 P3 之后,细胞形态不一,呈长梭形、多角形及不规则形(图 4b)。

分离培养的 NPCs 持续培养传代,对 P2 和 P6 进行细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色,显微镜下观:P2 细胞(图 5a)染色颜色较 P6 细胞(图 5b)浅,P2 染色细胞比例(约 20%)明显低于 P6(约 75%),说明经过传代,P6 细胞已发生明显衰老和退变。

## 2.3 BMSCs 外泌体鉴定

在透射电镜下,PBS 为模糊一片,未见颗粒状物质(图 6a)。在透射电镜下,BMSCs 培养液上清以差速离心法提取出的物质形态为圆形或椭圆形,多数直径在 30~100nm 范围内,与文献<sup>[4]</sup>中报道的经典的的外泌体形态大小一致(图 6b)。WB 检测 BMSCs 外泌体标志蛋白 CD63、CD81、TSG101 均有表达,未检测到阴性蛋白 Calnexin 的表达(图

6c)。

## 2.4 P6 NPCs 摄取 BMSCs 外泌体的观察

在 37℃ 下将用 CM-Dil 标记的 BMSCs 外泌体和用 CM-Dio 标记的 P6 NPCs 培养 24h。在激光共聚焦显微镜下采集明亮的视野和荧光图像,见 P6 NPCs 摄取 BMSCs 外泌体于胞内(图 7)。

## 2.5 3 组 P6 NPCs 的 COL2、SOX-9、ACAN、TIMP1、MMP1 基因 mRNA 相对表达量及基因对应蛋白质相对表达情况

(1)在培养 3d、7d、10d、14d 时,ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1 基因 mRNA 的相对表达量共培养组较对照组明显升高( $P<0.05$ ),实验组较共培养组明显升高( $P<0.05$ ),共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显升高( $P<0.05$ ),10d 较 7d 明显升高( $P<0.05$ ),14d 较 10d 明显升高( $P<0.05$ ),MMP1 基因 mRNA 的相对表达量在 3d、7d、10d、14d 共培养组较对照组明显降低( $P<0.05$ ),实验组较共培养组明显降低( $P<0.05$ ),共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显降低( $P<0.05$ ),10d 较 7d 明显降低( $P<0.05$ ),14d 较 10d 明显降低( $P<0.05$ )(表 2)。

(2)COL2、SOX-9、ACAN、TIMP1 基因对应蛋白质的相对表达量在 3d、7d、10d、14d 共培养组较

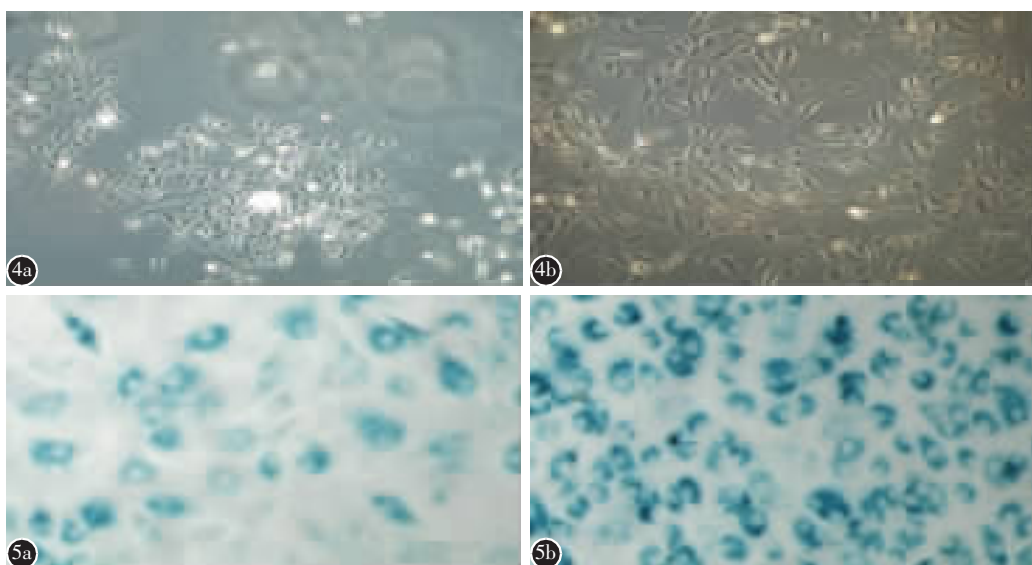


图 4 NPCs 倒置显微镜下( $\times 50$ ) a 原代短梭状 NPCs 在髓核组织块周围出现,细胞形态较为简单 b P3 NPCs 细胞形态不一,呈长梭形、多角形及不规则形 图 5  $\beta$ -半乳糖苷酶染色后显微镜下观( $\times 50$ ) a P2 染色细胞数量比例约 20% b P6 染色细胞数量比例约 75%

Figure 4 NPCs under the inverted microscope ( $\times 50$ ) a The short fusiform NPCs appeared around the nucleus pulposus tissue, and the morphology of the cells was relatively simple b The third generation NPCs in different shapes, long fusiform, polygonal and irregular Figure 5 Under the inverted microscope( $\times 50$ ) a The percentage of P2 staining cells is about 20% b The percentage of P6 staining cells was about 75%

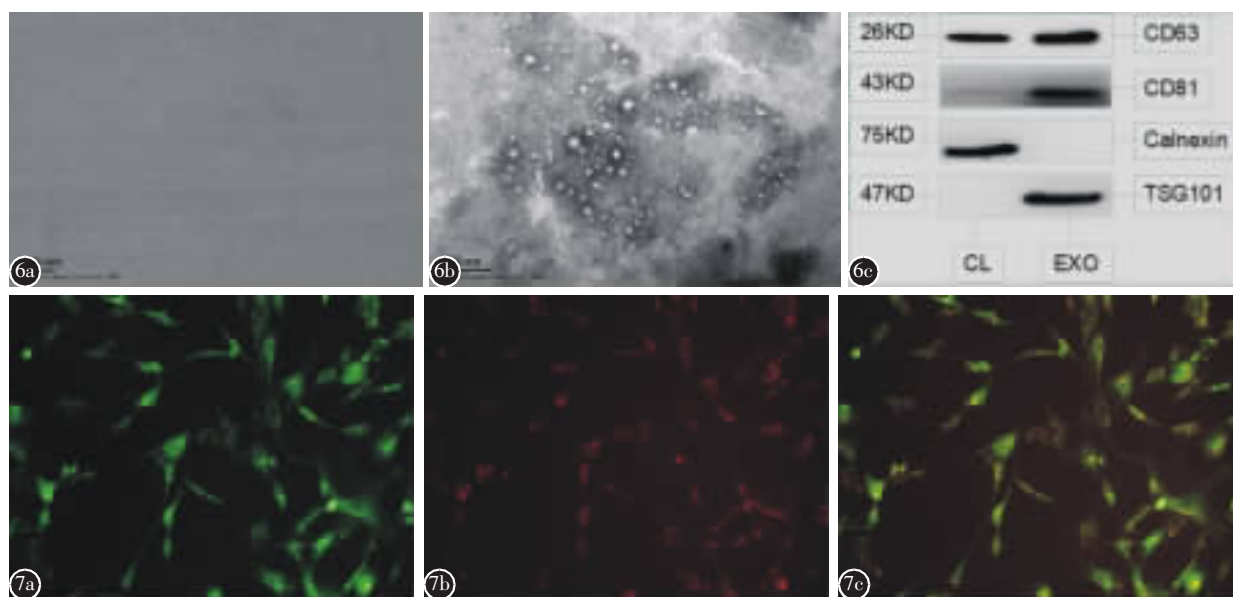


对照组明显升高,实验组较共培养组明显升高,共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显升高,10d 较 7d 明显增加,14d 较 10d 明显增加,MMP1 基因对应蛋白质的相对表达量在 3d、7d、10d、14d 共培养组较对照组明显降低,实验组较共培养组明显降

低,共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显降低,10d 较 7d 明显降低,14d 较 10d 明显降低(图 8)。

### 3 讨论

目前得到业界公认的椎间盘退变机制是



**图 6** 透射电镜下 **a** PBS 为模糊一片,未见到颗粒状物质 **b** MSCs 上清差速离心法提取出的物质形态为圆形或椭圆形,多数直径在 30~100nm 范围内,与文献中经典的外泌体形态大小一致 **c** CL 为细胞溶解物,EXO 为外泌体,外泌体标志蛋白 CD63、CD81、TSG101 均有表达,未检测到阴性蛋白 Calnexin 的表达 **图 7** 荧光显微镜下( $\times 100$ ) **a** CM-Dio 染色的 P6 NPCs **b** CM-Dil 染色的 BMSCs 外泌体 **c** P6 NPCs 摄取 BMSCs 外泌体于胞内

**Figure 6** Under the transmission electron microscope **a** PBS is a blur with no granular substance **b** The shape of the material extracted by differential centrifugation was round or elliptical, and most of the diameters were within the range of 30~100nm, which was consistent with the size of the classical exosome in the literature **c** CL was cell lysate, EXO was exosome. Exosome marker CD63, CD81 and TSG101 were found, and the negative protein Calnexin can not be detected **Figure 7** Under the fluorescence microscope( $\times 100$ ) **a** CM-Dio stained P6 NPCs **b** CM-Dil stained BMSCs exosome **c** P6 NPCs ingest BMSCs exosome into the cell

**表 2** 在 3、7、10、14d 对照组、共培养组和实验组 COL2A1、SOX-9、ACAN、TIMP1、MMP1 的 mRNA 相对表达量 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

**Table 2** The relative mRNA expression of COL2, SOX-9, ACAN, TIMP1, MMP1 in the control, co-culture group and the experimental group was measured on the 3rd day, 7th day, 10th day and the 14th day

	对照组 Control group	共培养组 Co-culture group				实验组 Experimental group			
		3d	7d	10d	14d	3d	7d	10d	14d
COL2	1.00±0.02	3.10±0.22 <sup>①</sup>	6.30±0.04 <sup>②</sup>	10.10±0.15 <sup>②</sup>	11.10±0.02 <sup>①</sup>	4.70±0.12	9.50±0.03 <sup>②③</sup>	12.70±0.12 <sup>②③</sup>	15.80±0.23 <sup>②③</sup>
ACAN	1.00±0.01	2.70±0.25 <sup>①</sup>	7.40±0.16 <sup>②</sup>	10.20±0.11 <sup>②</sup>	11.40±0.25 <sup>②</sup>	5.10±0.13 <sup>③</sup>	9.30±0.08 <sup>②③</sup>	13.30±0.15 <sup>②③</sup>	14.30±0.16 <sup>②③</sup>
SOX-9	1.00±0.02	3.10±0.10 <sup>①</sup>	5.40±0.13 <sup>②</sup>	8.60±0.38 <sup>②</sup>	10.40±0.02 <sup>②</sup>	4.10±0.11 <sup>③</sup>	9.20±0.04 <sup>②③</sup>	10.30±0.22 <sup>②③</sup>	13.80±0.15 <sup>②③</sup>
TIMP1	1.00±0.03	2.50±0.13 <sup>①</sup>	5.20±0.08 <sup>②</sup>	8.10±0.12 <sup>②</sup>	10.50±0.02 <sup>②</sup>	3.90±0.09 <sup>③</sup>	8.80±0.13 <sup>②③</sup>	11.20±0.22 <sup>②③</sup>	14.80±0.24 <sup>②③</sup>
MMP1	1.00±0.03	0.80±0.04 <sup>①</sup>	0.60±0.02 <sup>②</sup>	0.20±0.02 <sup>②</sup>	0.20±0.02 <sup>①</sup>	0.70±0.06 <sup>③</sup>	0.20±0.03 <sup>②③</sup>	0.10±0.02 <sup>②③</sup>	0.10±0.03 <sup>③</sup>

注:对照组为不加处理的 NPCs,共培养组为 NPCs 和 MSCs 共培养组,实验组为加入 MSCs 外泌体(50 $\mu$ g/ml)诱导的 NPCs;①与对照组相比  $P < 0.05$ ;②同一组内,本时间点与前一个时间点比较,  $P < 0.05$ ;③与相同培养天数共培养组比较,  $P < 0.05$

Note: the control group is untreated NPCs, the co-culture group is NPCs and MSCs co-culture group, the experimental group is induced by MSCs exosome body(50 $\mu$ g/ml); ①compared with the control group,  $P < 0.05$ ; ②In the same group, the time point was lower than the previous time point,  $P < 0.05$ ; ③compared with the corresponding days co-culture group,  $P < 0.05$

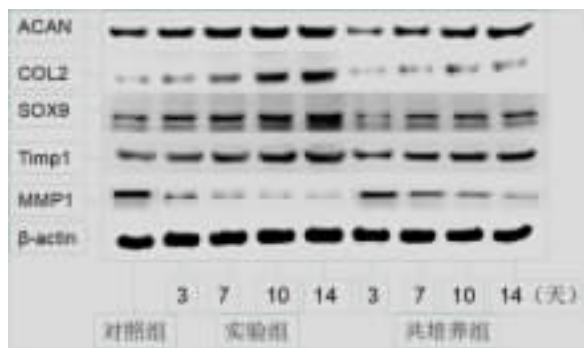


图 8 培养 3、7、10、14d 后,对照组、共培养组和实验组 P6 NPCs 的 COL2、SOX-9、ACAN、TIMP1、MMP1 基因对应蛋白质的表达情况

**Figure 8** The protein expression of P6 NPCs COL2, SOX9, ACAN, TIMP1, MMP1 gene in the control group, co-culture group and the experimental group was detected after 3, 7, 10, 14 days

NPCs 数量减少、活性降低,导致细胞外基质合成减少,进而出现髓核脱水变性<sup>[9]</sup>。所以目前组织工程针对椎间盘退变的研究主要有两个方向,一是诱导间充质干细胞分化,增加髓核细胞的数量;二是延缓、阻止甚至逆转髓核细胞本身的退变过程。

自 30 多年前首次出现关于外泌体的报道后,近些年对于外泌体的研究取得了重大进展,但是离真正解读外泌体全貌还有很长的距离。外泌体在体内广泛存在,起源于细胞内多泡体,是直径为 30~100nm(也有报道为 40~120nm)<sup>[10]</sup>的亚细胞双层膜囊泡,多数外泌体携带有微管蛋白和肌动蛋白等细胞骨架蛋白、四种跨膜蛋白(CD63、CD9、CD81、CD82)、热休克蛋白 hsp70 和 hsp90、TSG101、Alix 等。此外,外泌体中也含有多种形式的 mRNA 和 micRNA,外泌体通过多泡体与细胞膜融合释放到细胞外基质中<sup>[7]</sup>。同时,外泌体也拥有反映细胞来源的特异性蛋白,而且外泌体的功能与起源细胞高度相关,其一般功能是携带起源细胞的特定信息通过旁分泌或者远距运输方式与靶细胞进行相互作用,进而影响后者的生物学行为<sup>[11]</sup>。关于外泌体与靶细胞的相互作用方式,本课题组研究发现,外泌体与靶细胞分别染色后在透射电镜下观察,并未见靶细胞膜上有外泌体附着,说明外泌体很可能是通过内吞作用进入靶细胞并产生作用的。

外泌体作为细胞间信息交换的重要途径被各个研究领域所重视<sup>[12,13]</sup>,在 DDD 领域,有研究表

明,BMSCs 与 NPCs 非接触式共培养后,BMSCs 可表现出 NPCs 的表型<sup>[2,14]</sup>。加入 NPCs 外泌体对 BMSCs 直接接触诱导表现出比非接触式共培养更强的效果,而 NPCs 则表现出退变减缓趋势<sup>[4]</sup>。Strassburg 等<sup>[15]</sup>的研究证实在共培养系统中存在膜的双向交换。据此我们推断,无论是直接接触还是非接触式共培养系统中外泌体都发挥着重要作用。根据以往研究中提及在共培养后 NPCs 表现出退变减缓的趋势,我们提出假设,BMSCs 也可分泌特定的外泌体来调节 NPCs 的退变进程,而且直接接触培养比非接触式共培养有更加明显的效果。

为了验证提出的假设以及方便后续相应机制以及活体动物研究,我们选择 SD 大鼠作为标本来源,为了实验的严谨性,本课题组利用全骨髓法提取 BMSCs,并通过三系分化及流式细胞技术进行干细胞鉴定,在鉴定此种方式提取的细胞为 BMSCs 后,开始大量培养并收集上清,利用差速离心法对上清进行离心,提取的物质经过透射电镜及外泌体标志蛋白的检测,证明提取出的物质为 BMSCs 外泌体。我们直接加入 BMSCs 外泌体对退变 NPCs 进行培养作为实验组,根据本课题组前期研究成果<sup>[4]</sup>,我们拟定加入外泌体的浓度为 50μg/ml。BMSCs 和退变 NPCs 在 Transwell 小室中培养为共培养组,设置退变 NPCs 为对照组,分别培养 3d、7d、10d、14d 后检测 COL2、SOX-9、ACAN、TIMP1、MMP1 mRNA 及对应蛋白质的相对表达情况。结果显示:ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1 基因 mRNA 的相对表达量在 3d、7d、10d、14d 共培养组较对照组明显升高,实验组较共培养组明显升高,共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显升高,10d 较 7d 明显升高,14d 较 10d 明显升高,MMP1 基因 mRNA 的相对表达量在 3d、7d、10d、14d 共培养组较对照组明显降低,实验组较共培养组明显降低,共培养组和实验组组内 7d 较 3d 明显降低,10d 较 7d 明显降低,14d 较 10d 明显降低(均  $P < 0.05$ );ACAN、COL2、SOX-9、TIMP1、MMP1 基因相对应蛋白质表现出同样趋势。说明 BMSCs 外泌体对退变 NPCs 有减缓甚至逆转退变的作用,而且直接接触比非接触式共培养效果更加明显。本研究补充说明了 NPCs 和 BMSCs 在非接触式共培养条件下,不仅仅是 NPCs 外泌体对于 BMSCs 有诱导分化作用,BMSCs 外泌体对



NPCs 也有营养作用。而且说明直接接触培养比非接触式共培养的效果更加明显。该实验虽然是体外实验且实验细胞来源于 SD 大鼠, 但为研究髓核细胞退变类疾病的治疗提供了新的思路, 为从根本上治疗 DDD 提供了新的可能, 也为干细胞移植的可行性提供了有利的证据。

本研究将外泌体作为一个整体为研究对象, 充分说明了大鼠 BMSCs 能够分泌外泌体, 并且通过外泌体途径对退变 NPCs 产生正向营养作用, 但是外泌体内部的成分复杂多样, 到底是外泌体内哪种成分或者因子起主要作用以及是哪一条通路起的主要作用不清楚, 本课题组将把此问题作为下一步研究的切入点进行探究。本研究属于体外实验, 细胞生长环境较体内环境相对简单, 在体内环境中, BMSCs 外泌体对 NPCs 具体作用尚需进一步探索。

#### 4 参考文献

1. Vos T, Flaxman AD, et al. Years lived with disability(YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2163–2196.
2. 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.
3. Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy[J]. *Annu Rev Physiol*, 2015, 77(1): 13–27.
4. Lu K, Li H Y, 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.
5. Busser H, Najjar M, Raicevic G, et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cell subpopulations: comparison of bone marrow and adipose tissue[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(18): 2142–2157.
6. Antonyak MA, Cerione RA. Emerging picture of the distinct traits and functions of microvesicles and exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(12): 3589–3590.
7. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(6): 364–372.
8. 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.
9. Bendtsen M, Bungler C, Colombier P, et al. Biological challenges for regeneration of the degenerated disc using cellular therapies[J]. *Acta Orthop*, 2016, 87(sup363): 39–46.
10. EL Andaloussi S, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 347–357.
11. Simons M, Raposo G. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(4): 575–581.
12. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 707–716.
13. 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.
14. Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, et al. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype[J]. *Regen Med*, 2010, 5(5): 701–711.
15. Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, 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.

(收稿日期: 2018-09-08 修回日期: 2018-11-21)

(英文编审 孙浩林/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)