

# 人尿源干细胞外泌体对退变髓核细胞生物学功能的影响

周荣耀<sup>1</sup>, 郭柱<sup>1</sup>, 苏炜良<sup>1</sup>, 秦明<sup>2</sup>, 张国庆<sup>1</sup>, 王岩<sup>1</sup>, 吴晓淋<sup>1</sup>, 陈五军<sup>1</sup>, 邢东明<sup>1</sup>, 相宏飞<sup>1</sup>, 陈伯华<sup>1</sup>  
(1 青岛大学附属医院脊柱外科 266000 山东省青岛市; 2 滨州医学院附属医院内分泌科 256600 山东省滨州市)

**【摘要】目的:**探讨人尿源干细胞外泌体(USC-Exos)对退变髓核细胞(NPCs)生物学功能的影响。**方法:**从健康成人尿液中获得人尿源干细胞(USCs)并进行体外培养,通过成骨、成软骨、成脂诱导分化及蛋白质免疫印迹(Western Blot, WB)技术对所提取细胞进行鉴定。使用 USCs 完全培养基培养 USCs 48h 后采用差速离心法从培养基中提取外泌体,应用电子显微镜、粒径分析及 WB 技术对 USC-Exos 进行形态、直径及表面标志物检测。从腰椎间盘突出症患者术中摘除的髓核中提取 NPCs, 并培养至 P6。以加入 50 $\mu$ g/ml USC-Exos 干预的 P6 NPCs 为实验组,以 50 $\mu$ g/ml 未培养过细胞的 USCs 完全培养基离心沉淀物干预的 P6 NPCs 为对照组,分别在干预后 1~6d 使用 CCK-8 法检测 NPCs 增殖情况。使用 PKH26 荧光染料标记 USC-Exos, 并用标记后的 USC-Exos 干预 P6 NPCs, 12h 后在激光共聚焦显微镜下观察 NPCs 对 USC-Exos 的摄取情况。两组在干预后 48h 进行  $\beta$ -半乳糖苷酶衰老染色检测 NPCs 衰老比例,免疫荧光染色观察蛋白聚糖(ACAN)、II 型胶原(COL2)的表达。干预后 3d、5d、7d 时用 RT-PCR 和 WB 检测两组 NPCs 中 ACAN、COL2、基质金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1)、多肿瘤抑制基因 P16(P16)的 mRNA 及对应蛋白的表达量,对两组 ACAN、COL2、TIMP1、P16 基因的相对表达量进行比较,  $P < 0.05$  为有统计学差异。**结果:**从人尿中提取的细胞具有干细胞特性,传代培养后可从中提取粒径为 50~100nm 的椭圆形囊泡结构,其表达 CD63 和 Tsg101,不表达 Calnexin 蛋白,符合 Exos 特性。P6 NPCs 经 USC-Exos 干预后细胞增殖速度变快。经 PKH26 标记的 USC-Exos 可被 NPCs 摄取。干预后 48h 实验组衰老细胞比例[(13.8 $\pm$ 1.4)%] 低于对照组[(19.6 $\pm$ 2.4)%], ACAN、COL2 的荧光强度高于对照组。干预后 3d、5d、7d 时,实验组细胞中 ACAN、COL2、TIMP1 mRNA 及对应蛋白的相对表达量较对照组显著性升高( $P < 0.05$ ), P16 基因 mRNA 及对应蛋白的相对表达量较对照组显著性降低( $P < 0.05$ ),而同组内不同时间点比较无显著性差异。**结论:**USC-Exos 在体外条件下可促进退变 NPCs 的增殖,提高退变 NPCs 中 ACAN、COL2、TIMP1 mRNA 及对应蛋白的表达,降低 P16 mRNA 及对应蛋白的表达。

**【关键词】**人尿源干细胞;髓核细胞;外泌体;细胞外基质

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2020.05.07

中图分类号:R681.5, Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2020)-05-0427-10

**Biological effects of human urine derived stem cell exosomes on degenerated nucleus pulposus cells/ ZHOU Rongyao, GUO Zhu, SU Weiliang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2020, 30 (5): 427-436**

**【Abstract】 Objectives:** To investigate the biological effects of human urine stem cell-derived exosomes(USC-Exos) on degenerated nucleus pulposus cells. **Methods:** Human urine-derived stem cells(USCs) were obtained from healthy adult urine and cultured in vitro. The extracted cells were identified by osteogenic, chondrogenic, adipogenic differentiation and Western Blot(WB) techniques. The USCs complete medium was used to culture USCs for 48h, and the exosomes were extracted from the medium by differential centrifugation. Under the electron microscope, particle size analysis and WB technology were used to detect the morphology, diameter and surface markers of USC-Exos. NPCs were extracted from the nucleus pulposus which was removed from

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81802190,81772412);山东省自然科学基金(编号:ZR2019BH-084);中国博士后基金(2019M652329);青岛市应用基础研究计划(编号:19-6-2-51-cg);泰山学者青年专家工程资助(编号:tsqn201909190)

第一作者简介:男(1992-),在读硕士研究生,研究方向:腰椎退行性疾病的基础研究

电话:(0532)82913562 E-mail:765481680@qq.com

通讯作者:相宏飞 E-mail:yndx2004@vip.qq.com;陈伯华 E-mail:bhchen@hotmail.com

patients with lumbar disc herniation during operations, and the cells were cultured to P6. P6 NPCs intervened with 50 $\mu$ g/ml USC-Exos were used as the experimental group, and P6 NPCs intervened with 50 $\mu$ g/ml centrifuged sediment of USCs complete medium without cultured cells were used as the control group. CCK-8 method was used to detect the proliferation of NPCs 1-6 days after intervention. USC-Exos was labeled with PKH26 fluorescent dye, and P6 NPCs were intervened with the labeled USC-Exos. After 12h, the uptake of USC-Exos by NPCs was observed under a laser confocal microscope. Both groups were tested for  $\beta$ -galactosidase aging staining 48h after intervention to detect the proportion of aging NPCs, and immunofluorescence staining was used to observe the expression of proteoglycan(ACAN) and type II collagen(COL2). The expressions of ACAN, COL2, matrix metalloproteinase tissue inhibitory factor 1 (TIMP1), multi-tumor suppressor gene P16 (P16) mRNA and corresponding proteins in NPCs of both groups were detected by RT-PCR and WB at 3d, 5d and 7d after intervention. To compare the relative expression levels of ACAN, COL2, TIMP1, P16 genes between the two groups, with  $P<0.05$  being considered statistically significant. **Results:** Cells extracted from human urine had the characteristics of somatic stem cells. After subculturing, elliptical vesicle structures with a particle size of 50-100nm could be extracted. CD63 and Tsg101 were expressed, instead of Calnexin protein, which was consistent with the characteristics of Exos. After the intervention of USC-Exos, the cell proliferation speed of P6 NPCs became faster. USC-Exos labeled with PKH26 could be taken up by NPCs. 48h after intervention, the proportion of senescent cells in the experimental group decreased[(13.8 $\pm$ 1.4)% vs (19.6 $\pm$ 2.4)%], and the fluorescence intensities of ACAN and COL2 were higher than those of the control group. At 3d, 5d, and 7d after intervention, the relative expression levels of ACAN, COL2, TIMP1 mRNA and corresponding proteins in cells of the experimental group were significantly higher than those of the control group ( $P<0.05$ ), and the relative expression levels of P16 gene mRNA and corresponding proteins were significantly decreased in the control group ( $P<0.05$ ), but no significant difference was seen in the same group at different time points. **Conclusions:** USC-Exos can promote the proliferation of degenerated NPCs in vitro condition, increase the expression of ACAN, COL2, TIMP1 mRNA and corresponding proteins in degenerated NPCs, and reduce the expression of P16 mRNA and corresponding proteins.

**【Key words】** Urine-derived stem cells; Nucleus pulposus cells; Exosome; Extracellular matrix

**【Author's address】** Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, 266000, China

椎间盘退变是人体的一种自然退变,但它可引起腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄症、腰椎滑脱症等一系列腰椎退行性疾病<sup>[1]</sup>。椎间盘退变是多层面、缓慢进展的过程,其中由于退变椎间盘髓核细胞(nucleus pulposus cells,NPCs)数量减少和活性降低而导致细胞外基质合成减少是导致椎间盘退变的重要因素之一<sup>[2]</sup>。近年来有大量研究证明,可通过干细胞移植抑制NPCs退变及凋亡<sup>[3]</sup>。亦有研究报道间充质干细胞可通过其分泌的外泌体(exosome,Exos)调节NPCs中蛋白聚糖(A-CAN)、II型胶原(COL2)的表达,从而提高NPCs活性<sup>[4]</sup>。然而间充质干细胞获取手段多为有创,且来源有限,使其应用受到限制<sup>[5]</sup>。人尿源干细胞(urine-derived stem cells,USCs)是一种来源于尿液的干细胞,其来源广泛、取材简易、安全无创、不涉及伦理道德,是外泌体的理想来源<sup>[6-8]</sup>。USCs来

源性外泌体(exosomes from human urine-derived stem cells,USC-Exos)具有改善微环境、增强代谢、促进细胞再生及组织修复等能力<sup>[8-10]</sup>。本研究使用USC-Exos体外干预退变的NPCs,旨在探索USC-Exos体外干预下是否可促进NPCs增殖及其对NPCs中ACAN、COL2、基质金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP1)和多肿瘤抑制基因P16(P16)的mRNA及对应蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与仪器

去外泌体胎牛血清(Viva Cell);肾脏上皮细胞基础培养基(renal epithelial cell basal medium,REBM)(Lonza,瑞士);重组人血小板衍生生长因子BB(platelet-derived growth factor-BB,PDGF-BB)(Peprotech,美国);重组人碱性成纤维

细胞生长因子 b (fibroblast growth factor-b, FGF-b) (Peprotech, 美国); 重组人表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) (Peprotech, 美国); 100×NEAA (Gibco, 美国)。低温超速离心机 (Hitachi CP80WX/转子 P70A-980, 日本)、透射电子显微镜 (JEM-1200EX, 日本)、激光共聚焦显微镜、PCR 仪 (ABI 7500) 等。

## 1.2 USCs 提取、体外培养及鉴定

取 3 名健康成人清洁中段尿液约 200ml, 分装于 50ml 离心管, 400g 离心 10min 后弃上清液, 使用 10ml 磷酸缓冲液 (PBS) 重悬各管沉淀, 200g 离心 10min。弃 PBS, 加入 3ml USCs 原代培养基 (10%胎牛血清, 1%青-链霉素双抗, 1:1 比例混合的 REBM 培养基与 DMEM/F-12 培养基) 重悬沉淀, 接种至 12 孔板的 3 个孔中。于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中进行培养, 第 3d 时更换培养基为 USCs 完全培养基 (去外泌体胎牛血清 10%, 1%青-链霉素双抗, 1%GlutaMAX, 1%NEAA, PDGF-BB 5ng/ml、FGF-b 5ng/ml、EGF 5ng/ml, 1:1 比例混合的 DMEM/F-12 培养基与 REBM 培养基)。当细胞密度达到 12 孔板底部 80%左右时进行传代, 取 P2 USCs, 通过成骨、成软骨、成脂细胞诱导分化验证 USCs 三系分化潜能。使用蛋白质免疫印迹 (Western Blot, WB) 技术鉴定 USCs 标志蛋白: 使用含有 1% 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的放射免疫沉淀测定 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 细胞裂解液 (北京索莱宝) 裂解 USCs, BCA 法测蛋白浓度, 凝胶电泳及转膜后, 使用 5% 脱脂牛奶封闭, 随后分别加入 CD29、CD34、CD44、CD45、CD73 和 CD90 一抗孵育 4℃过夜, 洗膜后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 1h 并显影, 在 WB 显影仪观察干细胞阳性标志物 CD29、CD44、CD73、CD90 和干细胞阴性标志物 CD34、CD45 的表达情况。

## 1.3 USCs-Exos 的提取及鉴定

**1.3.1 USCs-Exos 的提取** 取 P2 代 USCs 接种至 75cm<sup>2</sup> 培养瓶, 使用 USCs 完全培养基培养 48h 后收集细胞培养液。使用离心机于 3000g 下离心 30min 以进一步沉淀细胞碎片, 移液至超速离心管。使用超速离心机 100000g 下离心 90min, 弃上清, 使用 200μl PBS 重悬管底沉淀。

**1.3.2 USCs-Exos 的形态观察** 取 10μl 沉淀物

悬液经载样铜网吸附及 2% 磷钨酸溶液处理后, 放置于白炽灯下烘烤晾干。调节工作电压至 120kV, 于透射电镜下观察 (×150000) 外泌体。

**1.3.3 USCs-Exos 粒径分析** 使用 Nanosight 检测仪 (英国 Malvern 公司) 检测外泌体 PBS 悬液并使用 NTA 检测分析软件对外泌体粒子直径进行测量分析。

**1.3.4 USCs-Exos 标志蛋白检测** 使用含有 1% PMSF 的 RIPA 细胞裂解液 (北京索莱宝) 裂解 USC-Exos, BCA 法测定蛋白浓度后, 进行凝胶电泳及转膜, 5% 脱脂牛奶封闭后, 加入 CD63、CD81、TSG101 一抗孵育 4℃过夜, 洗膜后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 1h, 使用发光底物显影后, 置于 WB 显影仪曝光, 观察上述所测 USCs 表面标志物表达情况。

## 1.4 NPCs 的分离与培养

从腰椎间盘突出症患者行腰椎后路椎间孔镜下腰椎间盘切除术术中取出髓核组织, 于无菌 PBS 缓冲液中转移至超净台。使用无菌 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 去除终板、纤维环组织, 仅保留髓核部分, 将髓核使用眼科剪剪碎至约 1mm<sup>3</sup> 大小, 移至 15ml EP 管, 800r/min 离心 5min, 弃上清。加入含 0.2% II 型胶原酶的 DMEM/F12 培养基 10ml, 37℃恒温震荡消化 4h, 使用 150 目无菌细胞滤网过滤, 800r/min 离心滤液 5min, 弃上清。加入 NPCs 培养基吹打均匀, 接种至培养瓶, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub>、100%湿度条件细胞培养箱中静置培养。当细胞密度达到培养瓶底部 80%左右时传代培养, 选取 P6 NPCs 进行后续实验。

## 1.5 USCs-Exos 荧光标记与摄取

**1.5.1 USCs-Exos 荧光标记** 使用 PKH26 荧光染料试剂盒 (Sigma, 美国) 标记 USCs-Exos, 将 PKH26 标记的 Exos 悬液在 100000g、4℃条件下离心 70min, 以 50μl PBS 重悬所得沉淀。

**1.5.2 NPCs 摄取 USCs-Exos** 向预制的 P6 NPCs 细胞爬片中加入已被 PKH26 标记的 USCs-Exos, 避光孵育 12h 后将细胞爬片取出, DAPI 染核及甘油封片后用激光共聚焦显微镜观察 P6 NPCs 对 USC-Exos 的摄取情况。

## 1.6 生长曲线绘制

以加入 50μg/ml 浓度 USC-Exos 的 P6 NPCs 为实验组, 按照 USC-Exos 提取步骤处理未培养过细胞的 USCs 完全培养基以获取离心沉淀物;



以加入 50 $\mu$ g/ml 离心沉淀物干预的 P6 NPCs 为对照组。将干预后的两组 NPCs 等比稀释成浓度梯度,接种于 96 孔板中。干预 1~6d 每天在倒置显微镜下观察细胞生长状态,并使用 CCK-8 法检测 450nm 波长下各孔吸光度,以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。

### 1.7 髓核细胞衰老染色及胞质 ACAN、COL2 免疫荧光染色

**1.7.1 细胞衰老检测** 取 P6 NPCs 接种于 6 孔板,按实验分组干预 48h 后,使用  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒进行染色,于普通光学显微镜下观察着色的衰老细胞并通过多个随机视野计数法统计两组 NPCs 衰老细胞比例。

**1.7.2 ACAN、COL2 免疫荧光染色** 按实验分组干预 48h 的 6 孔板 NPCs 爬片,经 ACAN、COL2 单克隆抗体预混液孵育,免疫荧光二抗结合后,DAPI 染核,于激光共聚焦显微镜下观察两组 NPCs 中 ACAN、COL2 的表达情况。

### 1.8 相关基因 mRNA 和蛋白表达检测

**1.8.1 NPCs 标志基因 mRNA 相对表达量的检测** 按照分组干预 3d、5d、7d 后,Trizol 法提取两组 NPCs 的总 RNA,反转录法进行 cDNA 的合成,使用 RT-PCR 仪进行 Real-time PCR 检测 ACAN、COL2、TIMP1、P16 基因的相对表达量,引物序列见表 1,以 GAPDH 为内参,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  算法得到各组基因 mRNA 的相对表达量,并进行组间比较。

**1.8.2 NPCs 标志基因对应蛋白相对表达量的检测** 使用含有 1%PMSF 的 RIPA 细胞裂解液(北京索莱宝)裂解两组 NPCs,BCA 法测蛋白浓度,完成凝胶电泳及转膜后,加入 ACAN、COL2、TIMP1、P16 单克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加

入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗继续孵育 1h,使用发光底物显影后,置于 WB 显影仪曝光,观察两组 NPCs 中 ACAN、COL2、TIMP1、P16 蛋白的表达情况,使用 IPP6 软件测定两组 NPCs 中各蛋白灰度值,以 3、5、7d 时间点灰度值平均值计算相对表达量,并进行组间比较。

### 1.9 统计学方法

所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。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两组 3d、5d、7d 时 NPCs ACAN、COL2、TIMP1、P16 mRNA 的相对表达量进行同时间点组间比较;使用 *t* 检验对两组 3d、5d、7d 时 NPCs 中 ACAN、COL2、TIMP1、P16 蛋白表达量灰度值的平均值进行比较, $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 USCs 的分离、培养及鉴定结果

3 名健康成人尿液样本分别接种后第 5d,可观察到少量梭形贴壁细胞(图 1a),培养至第 10d 左右达 80%~90%融合(图 1b)。WB 检测干细胞阳性标志物 CD29、CD44、CD73 和 CD90 呈高表达,未检出干细胞阴性标志物 CD34 和 CD45(图 2)。经成骨分化诱导 2 周后的贴壁细胞使用茜素红染色,可见形成的钙结节(图 3a),成软骨分化诱导 4 周后使用阿利新蓝染色可见累积的糖胺聚糖(图 3b),成脂肪细胞分化诱导后 2 周使用油红 O 染色可见红染的脂滴(图 3c)。分离提取的细胞为 USCs。

### 2.2 USCs-Exos 的鉴定结果

透射电镜下观察差速离心法分离的 USCs-Exos 形态为中心凹陷的类圆形囊状体,其直径为 50~100nm(图 4a),纳米粒径分析结果显示其主峰在 90nm 附近,形态接近正态分布(图 4b),符合文献中阐述的经典 Exos 形态及大小。WB 检测 hUSCs 外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 呈高表达,而未检测到阴性蛋白 Calnexin 的表达(内参为  $\beta$ -actin,图 4c)。

### 2.3 USCs-Exos 的标记与摄取

经 PKH26 标记过的 USCs-Exos 与 P6 NPCs 共孵育 12h,在激光共聚焦显微镜下可观察到 NPCs 胞质中的红色点状荧光,说明 USC-Exos 已被 NPCs 摄取(图 5)。

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'-GCCTTGACTGTGCCGTTGAAC-3'
COL2	正向(F)5'-CGCTCAAAGTCGCTGAACAACCA-3'
	反向(R)5'-ACCAGTCTCCGAGGCACACT-3'
ACAN	正向(F)5'-TGGCCTGCCTGACTTTAGTG-3'
	反向(R)5'-CCTGAACCACTGAGGCTGAT-3'
TIMP1	正向(F)5'-GCTTCTGGTTCCCTGGCATAA-3'
	反向(R)5'-ATCGCTCTGCTAGCCCTTCTCA-3'
P16	正向(F)5'-GGCACCAGAGGCAGTAACCA-3'
	反向(R)5'-GGACCTTCGGTACTGATGATCTAA-3'

## 2.4 NPCs 生长曲线

经 USC<sub>s</sub>-Exos 干预后, 在 3d 时开始实验组 NPCs 吸光度明显高于对照组, 说明实验组 NPCs 增殖速度较对照组加快(图 6)。

## 2.5 细胞衰老检测结果

干预后 48h, 两组均可见到衰老的 NPCs, 实验组衰老细胞比例约占总细胞数的 (13.8±1.4)% (图 7a), 对照组约占 (19.6±2.4)% (图 7b)。两组细胞在激光共聚焦显微镜下均可见胞质内荧光呈高亮的点状分布或弥散分布, 绿色荧光为 ACAN, 红色荧光为 COL2, 其中实验组细胞形态更为饱满, 且荧光强度高于对照组(图 8)。

## 2.6 相关基因及对应蛋白的表达情况

干预后 3d、5d、7d 时, 两组 NPCs 的 ACAN、COL2、TIMP1、P16 基因的 mRNA 相对表达量见表 2, 实验组 ACAN、COL2、TIMP1 基因的 mRNA 相对表达量较同时间点对照组显著增高 ( $P < 0.05$ ), P16 基因 mRNA 的相对表达量较对照组显著性降低 ( $P < 0.05$ )。ACAN、COL2、TIMP1 基因对应蛋白质的相对表达量在 3d、5d、7d 实验组较对照组升高, P16 基因对应蛋白质的表达在 3d、5d、7d 实验组较对照组降低(图 9)。实验组 ACAN、COL2、TIMP1 基因对应蛋白质的表达灰度值较对照组升高, P16 基因对应蛋白质的表达灰度值较对照组降低(表 3,  $P < 0.05$ )。

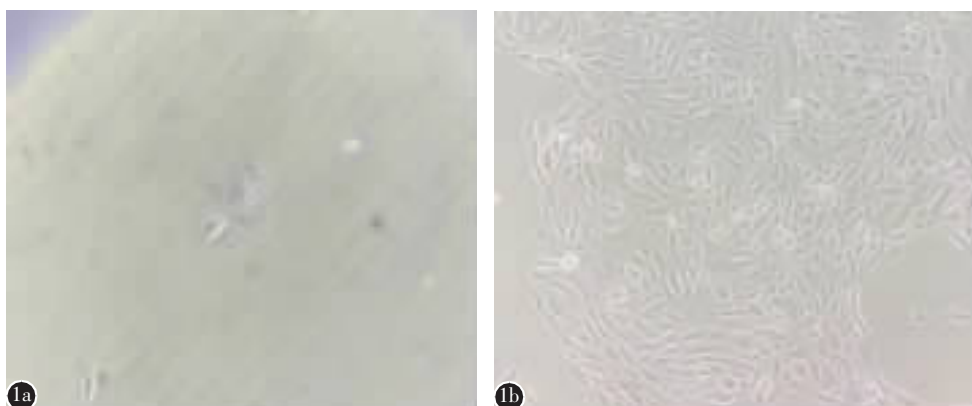


图 1 倒置显微镜下观察( $\times 100$ ) a 接种后第 5d 可见 3~5 个类圆形细胞贴壁生长 b 接种后第 10d, 细胞生长增殖形成集落, 达 80%~90% 融合

Figure 1 Observation under an inverted microscope ( $\times 100$ ) a On the 5d after inoculation, 3-5 circular cells were observed adherent to the wall b On the 10th day after inoculation, cells grew and proliferated to form colonies, which could reach 80%-90% fusion

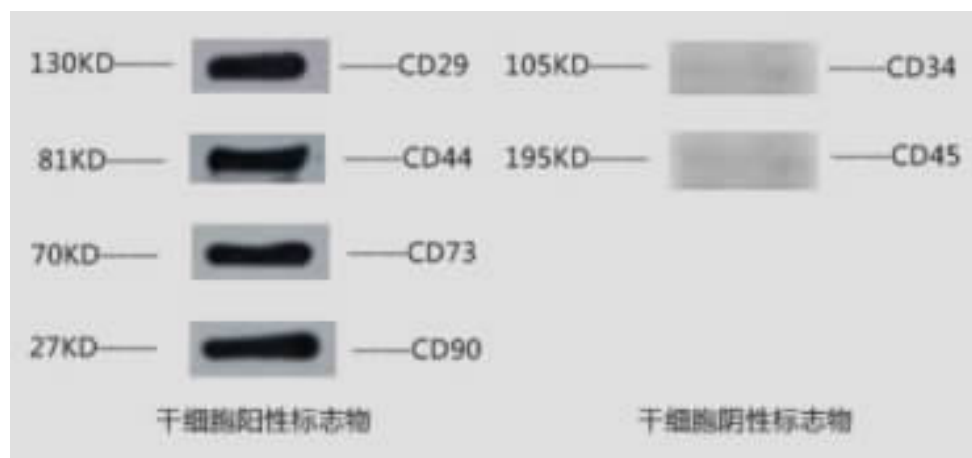


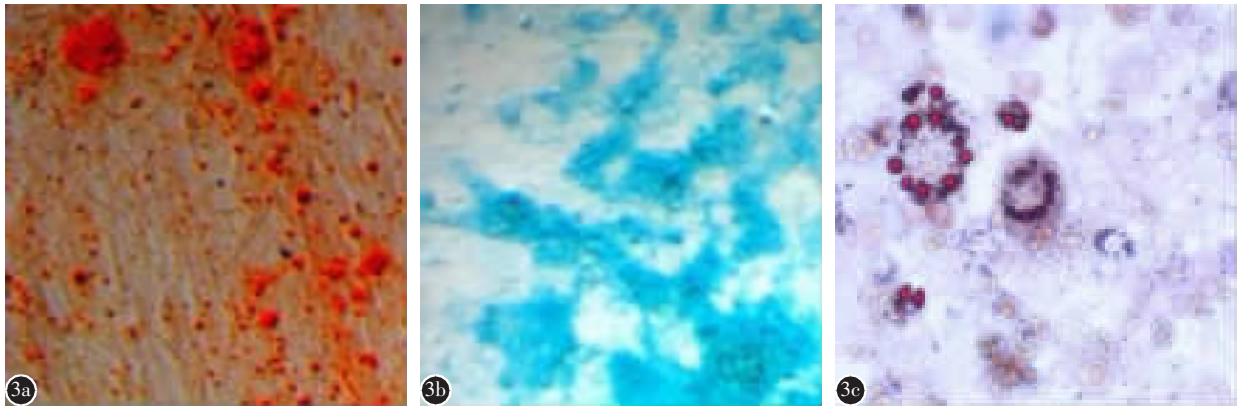
图 2 WB 检测干细胞阳性标志物 CD29、CD44、CD73 和 CD90 呈高表达, 未检出干细胞阴性标志物 CD34 和 CD45

Figure 2 CD29, CD44, CD73 and CD90, the positive markers of stem cells, were highly expressed by WB technique, while CD34 and CD45, the negative markers of stem cells, were not detected

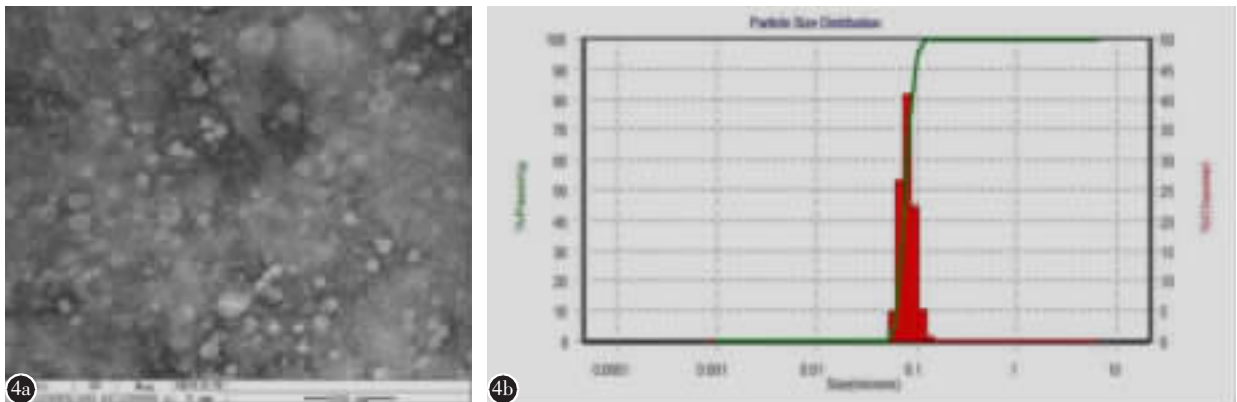
### 3 讨论

椎间盘主要的生化成分包括胶原、蛋白多糖、水和弹性蛋白等。胶原纤维作为主要结构单位在椎间盘内形成网架，蛋白聚糖等生化成分整合于胶原纤维网架结构中，形成粘液样基质。由于蛋白

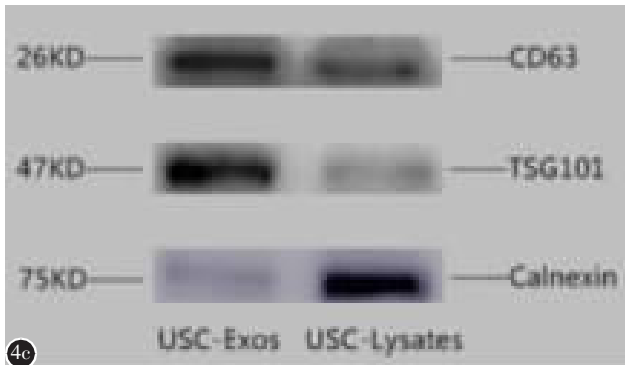
聚糖的吸水性，使髓核具有弹力和膨胀的性能，对于维持椎间盘生物力学及内环境稳定起着重要作用。目前研究认为椎间盘退变是一个由多因素参与并逐渐进展的过程，其中由于退变椎间盘 NPCs 的数量减少和活性降低而导致细胞外基质



**图 3** 倒置显微镜下( $\times 200$ )观察 **a** 经成骨分化诱导 2 周后的贴壁细胞使用茜素红染色,可见形成的钙结节 **b** 成软骨分化诱导 4 周后的使用阿利新蓝染色可见累积的糖胺聚糖 **c** 成脂肪细胞分化诱导后 2 周使用油红 O 染色可见红染的脂滴  
**Figure 3** Observation under an inverted microscope ( $\times 200$ ) **a** Two weeks after induction of osteogenic differentiation, adherent cells were stained with alizarin red and calcium nodules were seen **b** Accumulation of glycosaminoglycan was seen with alcian blue staining 4 weeks after induction of chondroblast differentiation **c** Red lipid droplets were seen with oil red O staining 2 weeks after adipocyte differentiation induction



**图 4** **a** 透射电镜下( $\times 150\ 000$ )观察 USC-Exos 形态为中心凹陷的类圆形囊状体，其直径在 50-100nm 范围 **b** 纳米粒径分析结果显示 USC-Exos 粒径主峰在 90nm 附近，形态接近正态分布 **c** WB 检测 USC-Exos 标志蛋白 CD63、Tsg101 呈高表达，而未检测到阴性蛋白 Calnexin 的表达,USC-Lysates 为尿源干细胞裂解物



**Figure 4** **a** Under transmission electron microscope ( $\times 150\ 000$ ), the shape of USC-Exos was a circular cystic body with a central depression, with a diameter of 50-100nm **b** The results of particle size analysis showed that the main peak of particle size of USC-Exos was near 90nm, and the morphology was close to normal distribution **c** CD63 and Tsg101 were highly expressed by WB, but no negative Calnexin was detected

CD63 and Tsg101 were highly expressed by WB, but no negative Calnexin was detected

合成减少是导致椎间盘退变的重要因素之一<sup>[2]</sup>。针对退变椎间盘内细胞减少及活性和功能的降低,有研究通过干细胞与 NPCs 非接触式共培养提高 NPCs 活性<sup>[11]</sup>。近几年亦有学者从干细胞培养

的上清液中提取外泌体作用于 NPCs 或动物的退变椎间盘,达到了延缓甚至逆转椎间盘退变的目的<sup>[3]</sup>。

然而干细胞的使用一直面临诸多问题,寻找

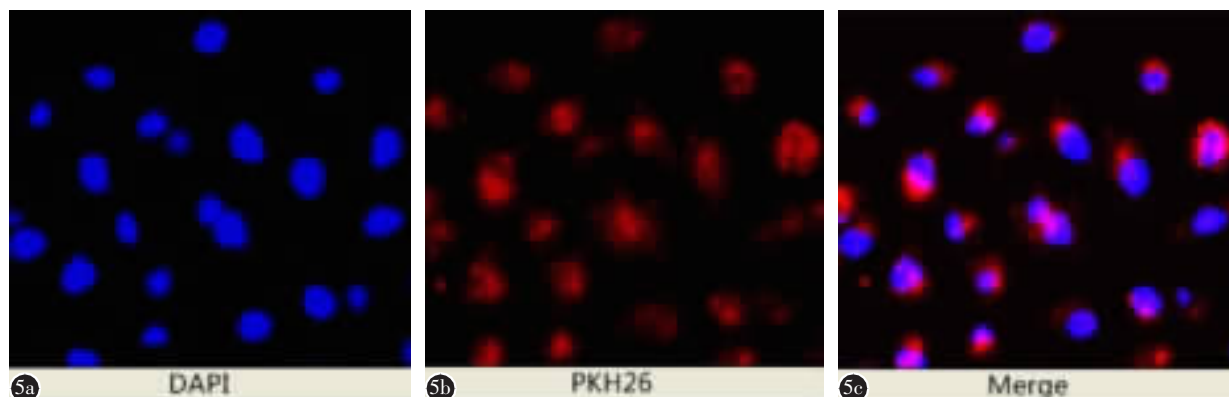


图 5 激光共聚焦显微镜下( $\times 60$ ) a DAPI 染色的 P6 NPCs 细胞核 b PKH26 红色荧光标记的 USC-Exos c P6 NPCs 摄取 USC-Exos 于胞内

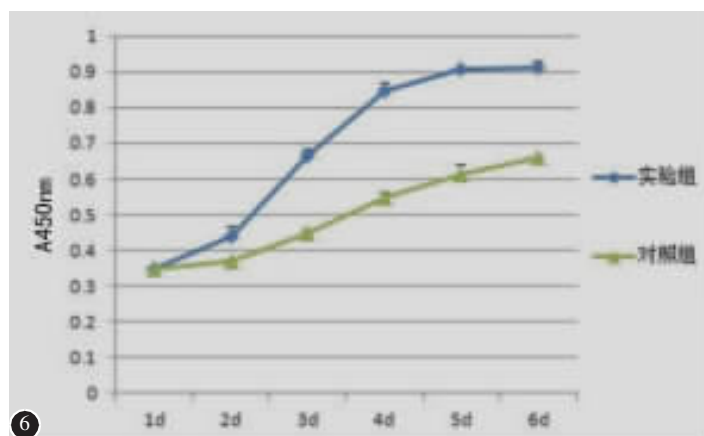


Figure 5 Under laser confocal microscope( $\times 60$ ) a The nuclei of P6 NPCs were stained by DAPI b PKH26 red fluorescence labeled USC-Exos c P6 NPCs ingested USC-Exos intracellular Figure 6 The CCK8 method was used to measure the absorbance of the two groups of NPCs at different time points, and the cell growth curve was plotted using the culture time as the abscissa and the NPCs absorbance at the A450nm wavelength as the ordinate

然而干细胞的使用一直面临诸多问题,寻找

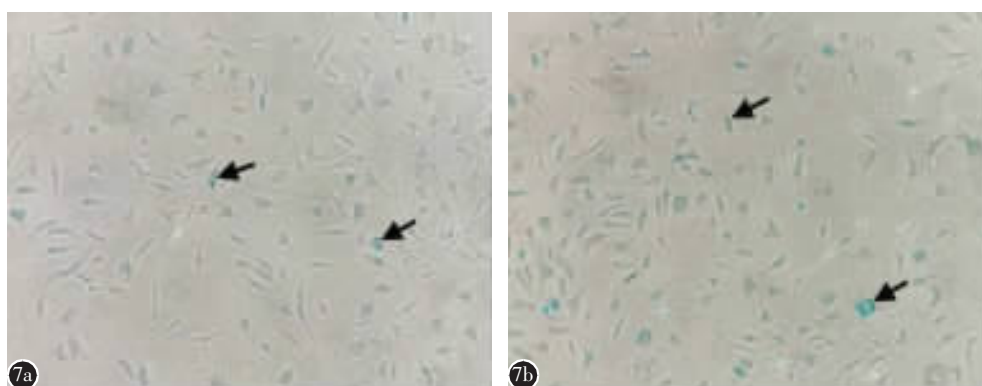


图 7 衰老 NPCs 观察( $\beta$ -半乳糖苷酶衰老染色,箭头所指蓝色细胞为衰老 NPCs) a 实验组 NPCs,多视野随机计数衰老细胞比例为  $(13.8 \pm 1.4)\%$  NPCs b 对照组 NPCs,多视野随机计数衰老细胞比例为  $(19.6 \pm 2.4)\%$

然而干细胞的使用一直面临诸多问题,寻找



一种获取方式无创并且广泛存在的干细胞对椎间盘细胞治疗的发展具有重要的意义。USCs 是从尿液中分离出的细胞群，具有干细胞的生物学特性和多项分化潜能，经数代培养仍保持核型稳定，无成瘤性，且获取途径无创且简便、培养体系稳定，可作为外泌体的理想来源<sup>[12-17]</sup>。外泌体是细胞内产生的直径约 30~100nm 的具有膜状结构的囊泡，主要由多囊泡体与细胞膜融合后释放到细胞外基质中，存在于机体的体液（如尿液、血液）及细胞培养的培养基中。单个外泌体中含有调节生物

学作用的蛋白成分可达到 2000 种，并且含有多种 mRNA、miRNA 和双链 DNA，可以与邻近细胞甚至远距离的组织进行物质和细胞信息交换<sup>[18]</sup>。目前，已有干细胞外泌体治疗肝病、急慢性缺血再灌注肾损伤、肺损伤、心肌梗死、皮肤损伤及抑制髓核细胞退变的报道<sup>[19-24]</sup>，外泌体改善微环境、减轻炎症反应、促进细胞再生、增强组织代谢的能力已得到证实。据此我们提出假设，USCs 来源性外泌体亦可影响 NPCs 的退变进程。

在本研究中，直接加入 USC-Exos 于退变

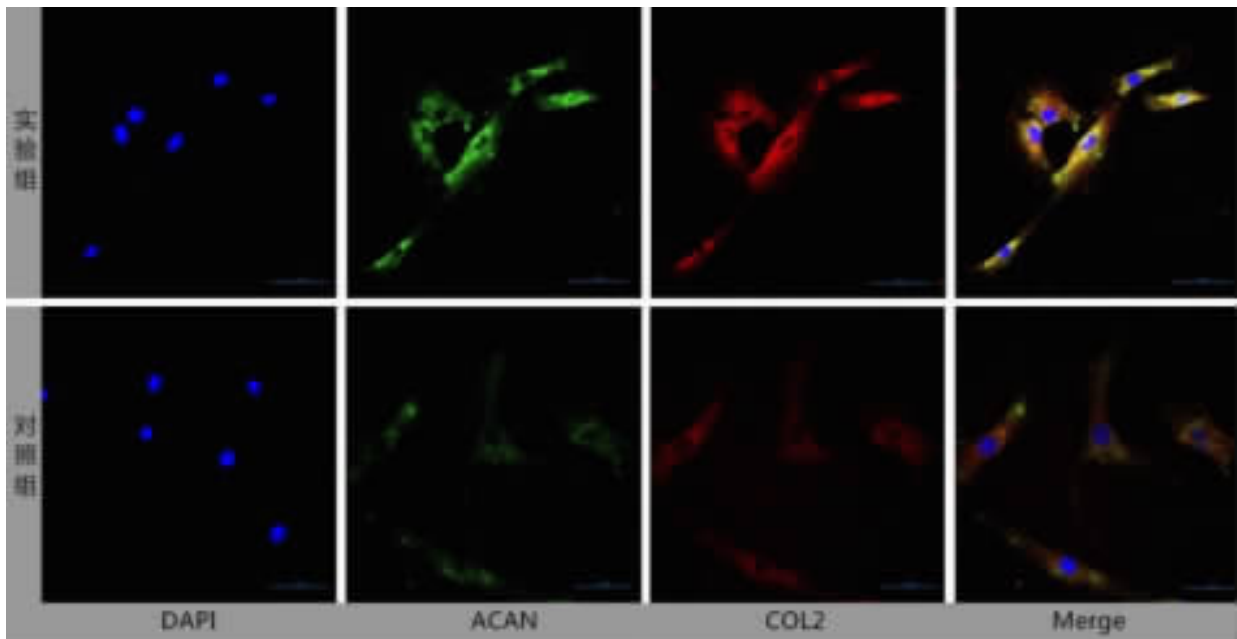


图 8 ACAN 在 488nm 波长下激发光下呈现绿色荧光，COL2 在 647nm 波长下激发光下呈现红色荧光，两组细胞在均可见胞质内荧光呈高亮的点状或弥散分布，实验组荧光强度较对照组更为强烈

Figure 8 ACAN showed green fluorescence under excitation light at 488nm wavelength, and COL2 showed red fluorescence under excitation light at 647nm wavelength. Both groups of cells showed bright dot or diffuse fluorescence distribution in the cytoplasm, but the fluorescence intensity of the experimental group was stronger than that of the control group

表 2 培养 3、5、7d 对照组和实验组 ACAN、COL2、TIMP1、P16 的 mRNA 相对表达量

Table 2 The relative mRNA expression of ACAN, COL2, TIMP1 and P16 in the control group and experimental group was measured on the 3d, 5d, and 7d

	对照组 Control group			实验组 Experimental group		
	3d	5d	7d	3d	5d	7d
ACAN	1.00±0.06	1.00±0.31	1.00±0.14	2.00±0.44 <sup>①</sup>	2.34±0.35 <sup>①</sup>	5.45±0.27 <sup>①</sup>
COL2	1.00±0.10	1.00±0.24	1.00±0.01	6.22±0.85 <sup>①</sup>	8.22±1.20 <sup>①</sup>	7.09±0.57 <sup>①</sup>
TIMP1	1.00±0.09	1.00±0.02	1.00±0.01	2.16±0.14 <sup>①</sup>	2.01±0.25 <sup>①</sup>	3.19±0.54 <sup>①</sup>
P16	1.00±0.06	1.00±0.05	1.00±0.05	0.39±0.04 <sup>①</sup>	0.37±0.01 <sup>①</sup>	0.37±0.02 <sup>①</sup>

注：①与同时时间点对对照组比较 P<0.05

Note: ①Compared with control group at the same time, P<0.05



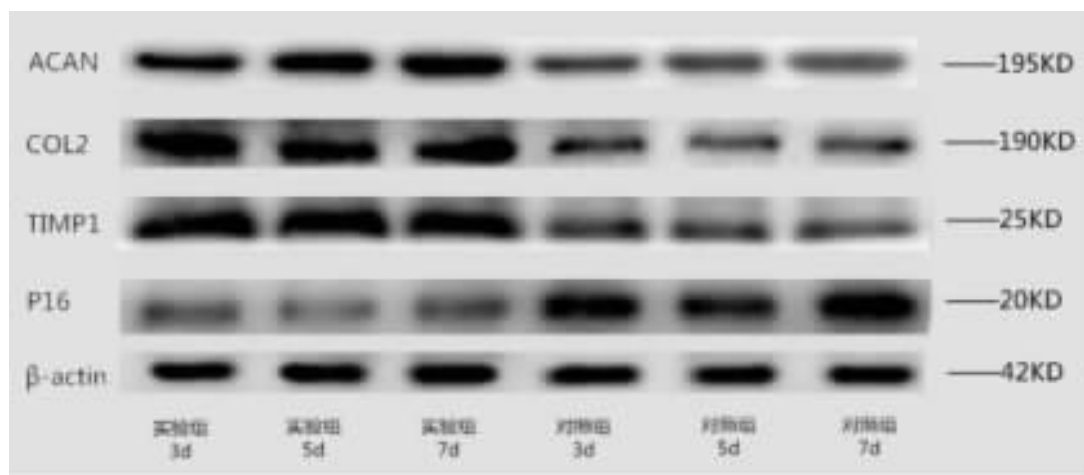


图 9 培养 3、5、7d 后,实验组和对照组 P6 NPCs 的 ACAN、COL2、TIMP1、P16 基因对应蛋白质的表达情况

**Figure 9** Protein expression of ACAN, COL2, TIMP1 and P16 genes of P6 NPCs in the experimental group and the control group after culture of 3, 5 and 7days

表 3 对照组和实验组 NPCs 中 ACAN、COL2、TIMP1、P16 蛋白相对表达量

**Table 3** The relative expression of ACAN, COL2, TIMP1, and P16 proteins in control and experimental NPCs

	对照组 Control group	实验组 Experimental group
ACAN	1.00±0.01	3.47±0.778 <sup>①</sup>
COL2	1.00±0.15	5.35±0.70 <sup>①</sup>
TIMP1	1.00±0.13	4.07±0.08 <sup>①</sup>
P16	1.00±0.19	0.28±0.05 <sup>①</sup>

注:①与对照组比较  $P<0.05$

Note: ①Compared with control group,  $P<0.05$

NPCs 中进行培养作为实验组,并在前期的研究中使用了不同浓度的 USCs-Exos 对 NPCs 进行干预。根据预实验结果及既往文献报道<sup>[25]</sup>,实验组最终加入外泌体的浓度为  $50\mu\text{g/ml}$ 。使用同样差速离心条件处理未培养过细胞的 USCs 完全培养基获得沉淀物,使用相同浓度干预退变 NPCs 作为对照组。在培养 1 周内使用 CCK-8 法检测两组细胞增殖情况,发现实验组 NPCs 增殖速度加快,行  $\beta$ -半乳糖苷酶衰老染色后的多个随机视野计数显示衰老细胞比例显著低于对照组。培养至 48h 时进行 ACAN 与 COL2 免疫荧光染色,在激光共聚焦显微镜下观察发现实验组荧光强度较对照组更为强烈。在培养 3d、5d、7d 后检测 COL2、ACAN、TIMP1、P16 mRNA 及对应蛋白质的相对表达情况,结果显示,与对照组相比,经 USCs-

Exos 干预后的 NPCs 中 ACAN、COL2、TIMP1 的 mRNA 相对表达量均显著性增高 ( $P<0.05$ ),P16 基因 mRNA 的相对表达量在 3d、5d、7d 时显著性降低 ( $P<0.05$ );ACAN、COL2、TIMP1 基因对应蛋白质的表达量较对照组升高,P16 基因对应蛋白质的相对表达量较对照组降低。在椎间盘的组成成分中,构成细胞间框架的胶原对维持椎间盘的生物力学起着至关重要的作用,而 COL2 是椎间盘中最主要的胶原成分之一,在髓核中大量表达,ACAN 等生化成分整合于胶原纤维网架结构中,对于维持椎间盘生物力学及内环境稳定起着重要作用,而 TIMP1 可通过抑制基质金属蛋白酶 (MMPs) 的表达间接抑制椎间盘基质的降解<sup>[1]</sup>。P16 基因一种细胞周期中的基本基因,直接参与细胞周期的调控,抑制细胞增殖及分裂,在衰老的髓核细胞中呈高表达<sup>[26]</sup>。本研究中我们观察到 USCs-Exos 促进了退变 NPCs 增殖及部分细胞外基质 (ACAN、COL2) 基因及蛋白的表达,且通过提高 TIMP1 基因及对应蛋白的表达,间接抑制了 ACAN、COL2 的降解;同时抑制了衰老基因 P16 及对应蛋白的表达。在不同的时间点组内比较发现明显差异,但实验组与对照组组间比较具有显著性意义,可反映 USCs-Exos 对退变 NPCs 的作用,这可能与不同时间点细胞状态有关。

在本研究中,我们将 USC-Exos 应用于人退变 NPCs 的研究中,优化了 Exos 来源,且证明了 USC-Exos 在对抗 NPCs 退变中的作用。但 Exos

所包含的成分复杂多样,发挥主要作用的因子或途径尚未完全明了,有待今后进一步研究。

#### 4 参考文献

1. 胡有谷, 陈伯华. 腰椎间盘突出症[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011. 96-128.
2. Bendtsen M, Bungler C, Colombier P, et al. Biological challenges for regeneration of the degenerated disc using cellular therapies[J]. *Acta Orthop*, 2016, 87(Suppl 363): 39-46.
3. Urits I, Capuco A, Sharma M, et al. Stem cell therapies for treatment of discogenic low back pain: a comprehensive review[J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2019, 23(9): 65-66.
4. Xia C, Zeng Z, Fang B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration via anti-oxidant and anti-inflammatory effects[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 143(1): 1-15.
5. Sakai D, Andersson GBJ. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(4): 243-256.
6. Zhang Y, Meneill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. *J Urol*, 2008, 180(5): 2226-2233.
7. Bharadwaj S, Liu G, Zhang Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(9): 1840-1856.
8. Chen L, Li L, Xing F, et al. Human urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy of cartilage defects[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 4(17): 1-14.
9. Wu R, Huang C, Wu Q, et al. Exosomes secreted by urine-derived stem cells improve stress urinary incontinence by promoting repair of pubococcygeus muscle injury in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 80-93.
10. Chen CY, Rao SS, Ren L, et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis[J]. *Theranostics*, 2018, 8(6): 1607-1623.
11. 常献, 周跃, 李长青. 人软骨终板干细胞与退变髓核细胞体外非接触共培养的实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25(1): 54-61.
12. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(12): 2080-2089.
13. 高鹏, 姜大朋, 李昭铸. 人尿源干细胞及其在骨组织工程中应用的研究进展[J]. *中华外科杂志*, 2016, 54(4): 317-320.
14. Wang L, Wang L, Huang W, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(1): 84-89.
15. Qin H, Zhu C, An Z, et al. Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at nontoxic concentrations[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 20(9): 2469-2478.
16. Liu G, Pareta RA, Wu R, et al. Skeletal myogenic differentiation of urine-derived stem cells and angiogenesis using microbeads loaded with growth factors[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1311-1326.
17. Wu S, Liu Y, Bharadwaj S, et al. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(5): 1317-1326.
18. Cocucci E, Meldolesi J. Exosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles [J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(6): 364-372.
19. Lemoine S, Thabut D, Housset C, et al. The emerging roles of microvesicles in liver diseases[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014, 11(6): 350-361.
20. Gatti S. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(5): 1474-1483.
21. Zhu Y, Feng X, Abbott J, et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(1): 116-125.
22. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Stem Cell Res*, 2010, 4(3): 214-222.
23. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, et al. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(3): 244-258.
24. Yang HL, Wu J, Liu JY, et al. Transplanted mesenchymal stem cells with pure fibrinous gelatin-transforming growth factor- $\beta$ 1 decrease rabbit intervertebral disc degeneration [J]. *Spine J*, 2010, 10(9): 802-810.
25. 蒋长青, 蓝蔚仁, 李海音, 等. 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[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(2): 147-155.
26. Le Maitre CL, Freemont AJ. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(3): R45.

(收稿日期:2019-11-29 末次修回日期:2020-02-05)

(英文编审 唐翔宇/谭 啸)

(本文编辑 卢庆霞)