

· 论 著 ·

骨髓间充质干细胞来源的外泌体对骨再生机制研究

何伟 陈荣春 曾芳俊 曾文丛*

赣州市人民医院, 江西 赣州 341000

中图分类号: R681.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 04-0477-07

摘要: **目的** 本研究旨在检测骨髓间充质干细胞外泌体(BMSC-Exos)的特征,并通过体内体外实验探讨其对成骨分化的影响及对骨再生的机制。**方法** ①原代培养人骨髓间充质干细胞(BMSCs),并对其表面抗原和多系分化潜能进行鉴定;②收集BMSC的P4~P6代细胞培养的培养上清液,应用试剂盒提取BMSC-Exos;③透射电镜观察BMSC-Exos的形态结构,免疫电泳检测BMSC-Exos的表面抗原;④茜素红、ALP染色验证BMSC-Exos在体外成骨分化中的作用;⑤通过大鼠颅骨缺损动物模型验证BMSC-Exos在体内骨再生的作用;⑥通过免疫电泳和qRT-PCR检测加入BMSC-Exos后的成骨细胞中相关蛋白和基因的表达情况。**结果** ①分离培养的BMSCs形态呈多角形或长梭形,表面抗原CD90、CD29、CD44为阳性,符合间充质干细胞的特征;②BMSC-Exos呈双面凹的圆形或椭圆形,直径约40~120 nm(81.7 ± 19.9),表面抗原与BMSC一致;③经茜素红染色和ALP染色后,染色强度与Exo浓度呈正相关;④通过对大鼠颅骨缺损模型拍摄X片、组织学分析,外泌体可促进大鼠颅骨缺损的修复和新生骨的形成;⑤免疫电泳显示经外泌体处理后,BMSC中的OCN、Runx2、 β -catenin蛋白含量增加,qRT-PCR结果显示Runx2、 β -catenin的基因表达上调。**结论** BMSC-Exos有促进骨再生的能力,并与上调Wnt/ β -catenin通路有关。

关键词: 外泌体;骨髓间充质干细胞;成骨分化;骨再生

The mechanism of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes for bone regeneration

HE Wei, CHEN Rongchun, ZENG Fangjun, ZENG Wencong*

Department of Spinal surgery, Ganzhou People's Hospital, Ganzhou 341000, China

* Corresponding author; ZENG Wencong, Email: 54391871@qq.com

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes (BMSC-Exos) and to verify its ability to promote osteogenic differentiation through in vitro and in vivo experiments, as well as to explore its mechanism of promoting bone regeneration. **Methods** ①Primary human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were cultured and their surface antigen and multilineage differentiation potentials were identified; ② Culture supernatants of P4-P6 generation cell culture of BMSC were collected and passed. BMSC-Exos was extracted by the kit method; ③The morphological structure of BMSC-Exos was observed by transmission electron microscope; the surface antigen of BMSC-Exos was detected by immunoelectrophoresis; ④ Alizarin red and ALP staining was used to confirm that BMSC-Exos promoted osteogenic differentiation in vitro; ⑤ The ability of BMSC-Exos to promote bone regeneration was verified in vivo through a rat skull defect animal model; ⑥ The expression of related proteins and genes in osteoblasts after adding BMSC-Exos was detected by immunoelectrophoresis and qRT-PCR. **Results** ①The isolated and cultured BMSCs were polygonal or spindle-shaped, and the surface antigens CD 90, CD 29 and CD 44 were positive, which was consistent with the characteristics of mesenchymal stem cells; ② BMSC-Exos was of a biconcave round or oval shape with a diameter of about 40–120 nm (81.7 ± 19.9), and the surface antigen was consistent with BMSC; ③ After Alizarin red staining and ALP staining, the Exo group staining intensity was significantly higher than that of the control group, and the staining intensity was positively correlated with the Exo concentration; ④X-ray and histological analysis of the rat skull defect model showed that the repair of the bone defect in the exosome group was better than that of the control group, and there were more new bone formation; ⑤ Immunoelectrophoresis showed that after treatment with exosomes, the content of OCN, Runx 2 and β -catenin protein in MSC cells increased, and qRT-PCR showed that the gene expression of Runx2 and β -catenin was up-regulated. **Conclusion** BMSC-Exos has the ability to promote bone regeneration and is associated with the up-regulation of Wnt/ β -catenin pathway.

Key words: exosomes; bone marrow mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation; bone regeneration

* 通信作者: 曾文丛, Email: 54391871@qq.com

骨再生一直是骨科领域研究的热点问题,有效的骨再生治疗依然存在巨大临床需求。随着组织工程研究的逐渐深入,间充质干细胞在组织再生中的重要性得到了越来越多的关注。骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)因其获取方法方便而较为常用。BMSCs具有修复骨组织损伤的能力^[1-2]。BMSCs的上清液同样有修复受损组织的功能,其作用可能与干细胞通过旁分泌囊泡调节靶细胞功能有关^[3-4]。外泌体(Exosome)作为干细胞旁分泌成分之一,在干细胞调节靶细胞功能中起到了十分重要的作用。外泌体一般直径为40~160 nm,其内包含来源细胞内合成的mRNA、miRNA、酶等成分^[5-8],通过出芽的方式进入细胞外基质,被靶细胞内吞后释放内部成分,完成细胞间的通讯和信息交流^[9-11]。外泌体可以有效修复受损的组织、器官^[12-15](如心、肺、肾、脑等),说明移植外泌体可以发挥移植干细胞类似的作用。因此假设骨髓间充质干细胞来源的外泌体(BMSC-Exos)能表现出与BMSC相似的生物学功能,即促进骨再生。本研究将验证BMSC-Exos对骨再生的作用,初步探索其骨再生的机制,希望能为将来外泌体治疗骨再生提供理论依据,同时为临床探索骨再生问题提供新的线索和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人骨髓间充质干细胞取自外伤病人的股骨骨髓(经知情同意后),大鼠成骨细胞取自乳鼠(SD大鼠)颅骨。DMEM/F-12培养基、IMDM培养基购自美国Gibco公司,FBS购自美国hyclone公司,外泌体分离试剂盒购自美国Invitrogen公司,用于流式细胞检测的单克隆抗体购自美国Pharmingen公司,成骨诱导培养基和成脂诱导培养基的各组分购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 BMSC培养:采集骨髓血置于15 mL离心管中,加入等量PBS,1 500 r/min离心20 min,弃去脂肪层,重复两次。取Ficoll分离液5 mL(1.077 g/mL)加入新的离心管中,将上述稀释后的骨髓液缓慢沿着管壁加至Ficoll分离液上层。室温下2 500 r/min离心20 min。吸取离心管中白色细胞层至另一离心管中,此层细胞包含了BMSC、造血干细胞等,加适量PBS重悬并冲洗,1 500 r/min离心15 min,重复两次。用DMEM/F-12完全培养基重悬细胞沉淀,接种至T25培养瓶中,CO₂恒温培养箱培养

72 h后第一次换液,此时BMSC已贴壁生长,后每3天换液一次。原代细胞培养14 d左右可传代,传代细胞培养6 d左右可再次传代。

1.2.2 BMSC表面抗原和多系分化能力鉴定:①取P4~P6代BMSC细胞,通过流式细胞仪检测BMSC表达CD29、CD44、CD90、CD34、CD45的情况;②进行成脂诱导培养。在6孔板中接种BMSC,加入脂肪分化诱导培养基,每3天更换培养液,诱导3周后进行油红O染色鉴定;③进行成骨诱导培养。在6孔板中接种BMSC,加入成骨分化诱导培养基,每3天更换培养液,诱导3周后进行茜素红染色鉴定。

1.2.3 BMSC-Exos提取与鉴定:通过invitrogen试剂盒提取BMSC-Exos。BMSCs培养至P4~P6代,每次为细胞换液时注意收集培养上清,暂时保存在4℃中。吸取培养上清至高速离心管中,在4℃以2 000 g离心30 min,以去除杂质。转移上清液至新的离心管中,按照上清液:试剂=2:1的比例加入试剂,在涡旋振荡器上充分混匀后在4℃冰箱孵育12 h。取出离心管,在4℃以10 000 g离心60 min,弃去上清液,小心用PBS重悬离心沉淀即为BMSC-Exos悬液,将其置于-20℃保存。通过透射电镜(TEM)和免疫电泳(Western Blot)观察BMSC-Exos的形态和抗原表达。

1.2.4 体外验证BMSC-Exos骨分化能力:参照文献方法^[16]培养原代成骨细胞。无菌条件下取出出生24 h内乳鼠(SD大鼠)的颅盖骨,放入盛有PBS溶液(内含1%双抗)的培养皿中,并刮去表面结缔组织(如骨膜、血管)。剪碎骨片成1 mm大小,用2.5 g/L的胰蛋白酶37℃消化20 min,PBS冲洗后弃去上清。再用1.0 g/L的II型胶原酶消化2次,每次1 h。吸取上清液加入至DMEM培养基(内含10% FBS,1%双抗)中,置于二氧化碳恒温培养箱培养,每3天换液一次。收集P4~P5代成骨细胞,接种至6孔板上,加入DMEM培养基。每3天换液一次,每次换液除了加入2 mL DMEM外,按照如下分组加入BMSC-Exos悬液:①Exo悬液(50 μL);②Exo悬液(20 μL)+PBS(30 μL);③PBS(50 μL)。以上3组细胞培养12 d后,一部分细胞行茜素红和碱性磷酸酶(ALP)染色,一部分细胞行分子生物学检测。

1.2.5 BMSC-Exos对骨再生机制的探索:取上述经过BMSC-Exos处理12 d后的3组成骨细胞。一部分用于提取蛋白,行Western Blot检测。用RIPA细胞裂解液裂解细胞,获得细胞内总蛋白,通过免疫电泳检测成骨细胞中OCN、Runx2、β-catenin蛋白含

量,并比较组间差异。另一部分细胞用于提取 RNA,行 qRT-PCR 检测。用 RNA 提取试剂盒提取细胞内的总 RNA,通过 qRT-PCR 定量检测 Runx2 基因表达量,并比较组间差异。

1.2.6 体外验证 BMSC-Exos 促进细胞增殖能力:取 P4~P5 代成骨细胞接种于 96 孔板上,通过 CCK-8 细胞增殖实验检测 BMSC-Exos 对成骨细胞增殖能力的影响。按照每天加入培养基的不同分为以下 3 组:①Exo 悬液 50 μ L + DMEM 培养基 50 μ L;②Exo 悬液 20 μ L + DMEM 培养基 80 μ L;③Exo 悬液 0 μ L + DMEM 培养基 100 μ L。每组设置 5 个复孔,每孔加入 10 μ L CCK-8 检测液后 37 $^{\circ}$ C 孵育 2.5 h,放于酶标仪上测 450 nm 处的吸光度(OD 450)。连续测定一周,绘制成骨细胞生长曲线。

1.2.7 体内验证 BMSC-Exos 修复大鼠颅骨缺损能力:取 3 月龄 SD 大鼠 16 只,实验组与对照组各 8 只。4%水合氯醛腹腔麻醉,麻醉后备皮、消毒、无菌手术,在大鼠头部正中做 2.5 cm 切口,逐层分离至颅骨正中线,分离骨膜。用磨钻于双侧顶骨各做直径 5 mm 的全层颅骨缺损,注意不可钻过深以避免伤及颅内组织。实验组在颅骨缺损处注射 100 μ L BMSC-Exos 悬液,对照组颅骨缺损处注射 100 μ L PBS 缓冲液。术毕缝合,肌肉注射青霉素预防感染,放置在动物房中统一饲养。术后 8 周,将大鼠过量麻醉致死,取出颅盖骨,清理表面软组织后,一部分标本行 micro-CT 检测,一部分标本脱钙后制作石蜡切片观察。动物实验通过了赣州市人民医院医学伦理委员会批准。

1.3 统计学方法

所有实验数据通过 3 次以上独立实验得出,以均值 $\pm$ 标准差形式表示,组间差异比较通过方差分

析和 t 检验完成, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSC 培养与鉴定

原代提取的 BMSC 在镜下呈长梭形或多角形,贴壁生长,细胞核大,形态均一。表面抗原高表达 CD 29、CD 44、CD 90($\times 400$ 倍)这些间充质干细胞标志物,低表达 CD 34、CD 45 等造血细胞标志物,BMSC 细胞形态见图 1。CD 29、CD 44、CD 90 的 BMSC 百分比(%)分别为:97 $\pm$ 0.43,98 $\pm$ 0.22,98 $\pm$ 0.78,未见 CD 34、CD 45 表达。经过成骨诱导培养和成脂诱导培养后,茜素红染色和油红 O 染色均为阳性($\times 100$ 倍),见图 2。以上结果表明分离培养所得的 BMSC 符合间充质干细胞特征。

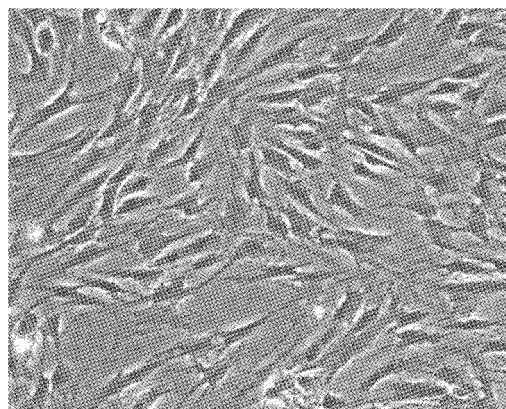


图 1 BMSC 细胞形态及表面抗原表达情况

Fig. 1 BMSC cell morphology and surface antigen expression

2.2 BMSC-Exos 鉴定

TEM 下观察外泌体呈两面凹的椭圆形或圆形,直径 40~120 nm(81.7 $\pm$ 19.9),有完整的磷脂双分

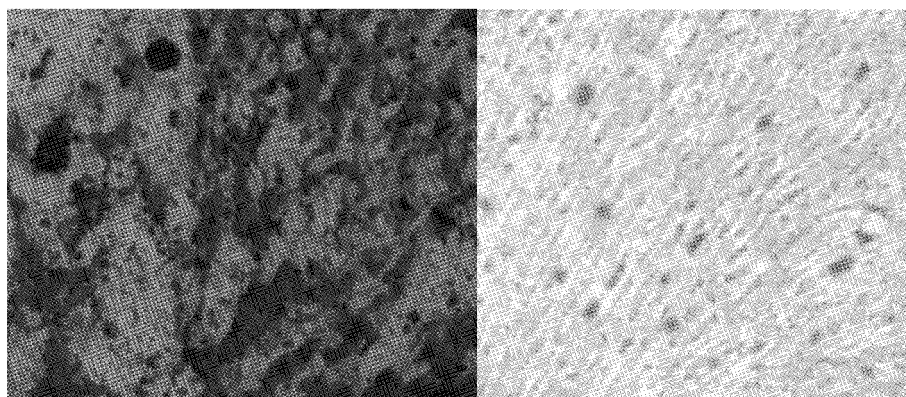


图 2 BMSC 分别经成骨诱导培养和成脂诱导培养后,茜素红染色(左)和油红 O 染色(右)均呈阳性($\times 100$ 倍)

Fig.2 BMSCs were positive for alizarin red staining (left) and oil red O staining (right) after osteogenic induction and adipogenic induction culture, respectively ($\times 100$ times)

子层膜结构。Western Blot 显示 BMSC-Exos 表达源 细胞表面蛋白 CD 69、CD 81($\times 100$)。

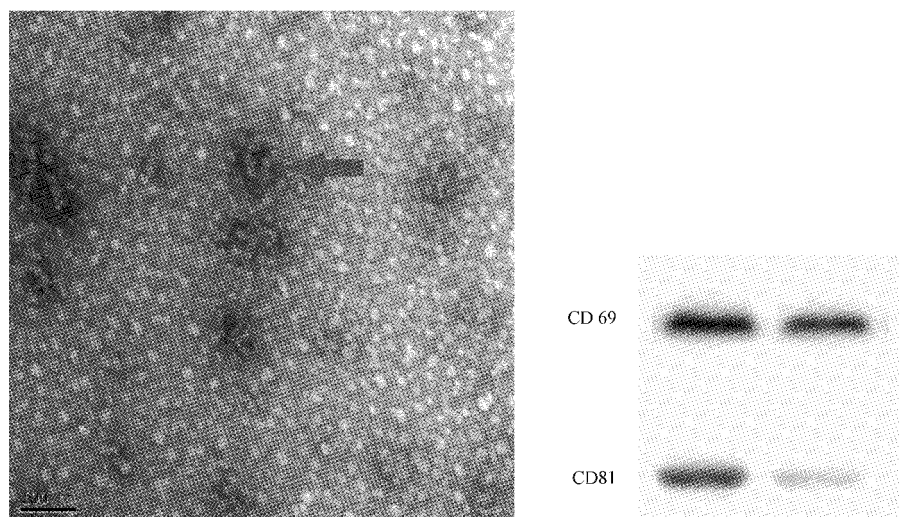


图3 TEM下BMSC-Exos形态

Fig.3 The morphology of BMSC-Exos in TEM

2.3 BMSC-Exos 体外促成骨、促细胞增殖

成骨细胞培养 12 d 后,茜素红染色和碱性磷酸酶(ALP)染色结果呈阳性。茜素红染色强度与成骨细胞内钙盐沉积量呈正相关,ALP 染色强度与成骨

细胞内 ALP 活性呈正相关。染色强度从强到弱依次为:Exos (50 μ L) 组,Exos (20 μ L) 组,PBS 对照组。表明 BMSC-Exos 的存在可以促进成骨细胞矿化过程($\times 100$ 倍)。

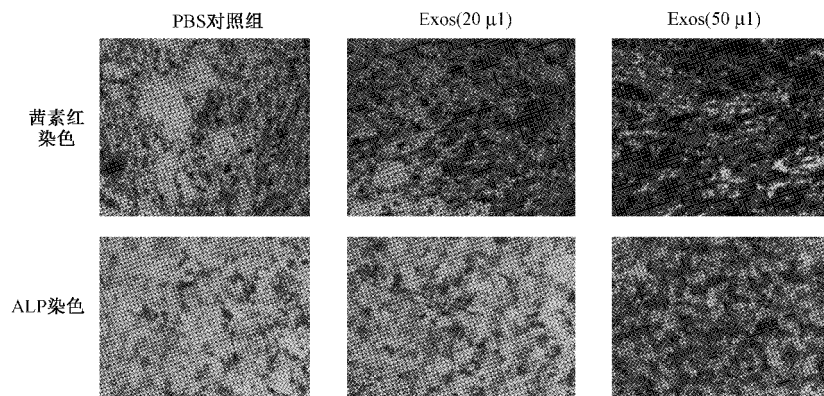


图4 茜素红和 ALP 染色结果

Fig.4 Alizarin red and ALP staining results

通过 CCK-8 细胞增殖实验,验证 BMSC-Exos 对成骨细胞的增殖影响,结果可以看出加入 BMSC-Exos 后成骨细胞增殖速度明显提高,且提高程度与加入 BMSC-Exos 的量呈正相关。结果提示 BMSC-Exos 对成骨细胞增殖有促进作用。

2.4 BMSC-Exos 体内促进骨再生

对术后 8 周的标本行 Micro-CT 检测,结果如 6 图所示。加入 BMSC-Exos 的实验组(右)与空白对照组(左)相比,新生骨量更多,骨缺损修复程度更好。

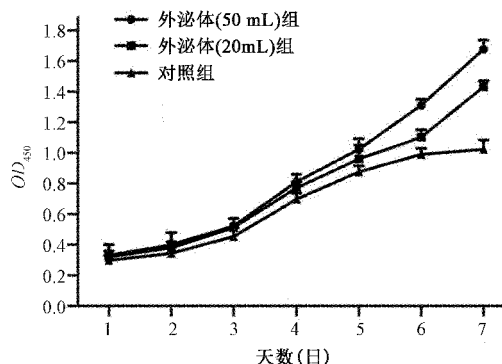


图5 CCK-8 细胞增殖实验验证 BMSC-Exos 对成骨细胞增殖的影响

Fig.5 CCK-8 cell proliferation assay verified the effect of BMSC-Exos on osteoblast proliferation

对象,结果显示这群人群中骨质疏松症发病率为 38.8%,男女早餐膳食习惯均与骨密度显著相关,不吃早餐者骨密度显著低于每天吃和经常吃者。不同性别人群进食早餐的频率有显著差异,男性不吃早餐者更常见。

国内大型流行病学调查^[6]结果显示,我国 50 岁以上骨质疏松患病率女性为 20.7%,男性为 14.4%。本研究中 40~69 岁高级职称医务人员的骨质疏松发病率远高于普通人群,提示国内医务人员的骨骼健康状况不容乐观。流行病学调查显示国内骨质疏松患者就诊率不足 1/4,治疗率仅 2%。本研究中经 DEXA 检测符合骨质疏松症的有 27 人,但在问卷中未自答骨质疏松,即骨质疏松的诊断率为 34.14%。所有研究对象中有 15 人规律服用钙剂,相比之下本研究中医务人员的骨质疏松诊断率和治疗率均较高,可能得益于自身的专业知识和易于获得的就诊条件。

健康的膳食组分会提供更多的钙、磷元素,有利于骨密度的维持^[2,7-9]。多项研究报道膳食与骨密度的关系不仅取决于膳食组分,进餐频率也与骨密度相关,尤其是早餐,不吃早餐者骨密度显著低于规律吃早餐者,与笔者的研究结果一致。有关进食早餐影响骨密度的机制分析^[10-11]表明,吃早餐与不吃早餐者每日摄入的食物种类有差异,包括营养元素和能量。每天吃早餐的人,日均钙和维生素 D 摄入量较高^[12-13],利于骨密度峰值的建立和维持。研究^[14-17]还发现,不吃早餐者虽然减少一餐,但全天摄入的总热量与吃早餐者无差异,且全谷类、水果和膳食纤维更少,甚至不吃早餐者更容易在晚间摄入更多的空能量食品,反而更容易发生腹型肥胖、糖尿病及代谢综合征,糖脂代谢异常也是影响骨密度的因素。吃或不吃早餐,不仅仅是营养元素和能量供给的差异,也代表了不同生活方式。Widaman 等^[18]及 Nakade 等^[19]研究发现,不吃早餐与慢性应激及其他社会心理因素有关;高允锁等^[20]研究表明医务人员不吃早餐和疲劳感密切相关,而慢性应激与疲劳导致骨密度下降已得到大量研究证实^[21-23],这种作用可能是通过影响丘脑-垂体-靶腺轴功能形成的,包括肾上腺、性腺、甲状腺激素以及生长激素分泌的改变^[24-26]。

本研究中,医务人员不吃早餐的比例分别为男性 13.7%,女性 2.5%,其中男性医务人员不吃早餐的比例高于中国疾病预防控制中心报道的 2010 年中国成年人就餐行为情况分析,女性医务人员与该

报道结果相似^[27]。分析其原因,首先多数研究^[4]发现男性不吃早餐较女性更常见;其次,本研究男性医务人员中外科医生占比例较高,工作及就餐时间更不规律,而女性医务人员多为内科医生或护士,工作时间相对规律。另外,2010 年中国成年人就餐行为情况分析报道^[27]中男女选择早餐进餐方式有显著差异,女性更多在家吃早餐,与本研究结果相似。从本次调查结果看,医务人员不吃早餐现象不容忽视,尤其是男性,应采取针对性措施,以便更有效地改善医务人员的膳食习惯。

本研究仅在郑州大学第一附属医院职工中开展,代表性有限,亟需在全国多中心调查医务人员的膳食习惯与骨密度状况。另外,早餐膳食习惯仅代表生活方式的一部分,早餐习惯是否和运动、户外时间、熬夜等生活不规律有关,这些因素是否也影响了不吃早餐人群的骨密度,本研究组拟针对这部分内容开展进一步的研究。

4 结论

高级职称医务人员中骨质疏松症发病率较高,不吃早餐可能是造成骨量丢失的原因。男性高职医务人员不吃早餐的现象更为常见,膳食习惯有待改善。高级职称医务人员的膳食理念不仅影响自身健康,也会对周围同事及他们所诊治患者的健康理念有重要影响。因此,应积极采取切实可行的措施,以改善高职医务人员的膳食习惯,加强其对骨骼健康的认识。

【参 考 文 献】

- [1] Prentice A. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis[J]. Public Health Nutr, 2004, 7(1A): 227-243.
- [2] Tucker KL, Chen H, Hannan MT, et al. Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study[J]. Am J Clin Nutr, 2002, 76(1): 245-252.
- [3] Hardesty AC, Aucott L, Fraser WD, et al. Dietary patterns, bone resorption and bone mineral density in early post-menopausal Scottish women[J]. Eur J Clin Nutr, 2011, 65(3): 378-385.
- [4] Ishimoto Y, Yoshida M, Nagata K, et al. Consuming breakfast and exercising longer during high school increases bone mineral density in young adult men[J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(3): 329-336.
- [5] Kuroda T, Onoe Y, Yoshikata R, et al. Relationship between skipping breakfast and bone mineral density in young Japanese women[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2013, 22(4): 583-589.
- [6] 中国健康促进基金会骨质疏松防治中国白皮书编委会. 骨质疏松症中国白皮书[J]. 中华健康管理学杂志, 2009, 3(3):