

骨髓间充质干细胞来源的外泌体静脉移植 对脊髓损伤的修复作用

裴 双, 王 琳, 陈雪梅, 贾延劼

(郑州大学第一附属医院 400052 郑州市)

【摘要】目的:初步探讨大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)来源的外泌体静脉移植对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的修复作用。**方法:**全骨髓培养法培养大鼠 BMSCs, 收集 P2 代细胞上清, ExoQuick Precipitation 提取法分离并纯化外泌体, 通过透射电镜观察鉴定外泌体形态, 采用 Western blot 鉴定外泌体表面标志蛋白 CD9、CD63。通过脊髓法建立大鼠 SCI 模型, 造模 1h 后尾静脉给予外泌体移植 500 μ l(外泌体蛋白浓度为 200 μ g/ml), 采用随机数字表法将 30 只大鼠分为三个组:假手术组、对照组(SCI+磷酸盐溶液)、外泌体组(SCI+外泌体), 均采用 BBB 评分、斜板实验于造模后 1、3、7、14、21、28d 评价大鼠运动功能恢复情况, 并于术后 28d 处死取材, 采用苏木精-伊红(HE)染色、髓鞘(luxol fast blue, LFB)染色观察各组脊髓组织形态学改变, 尼氏(Nissl)染色观察神经元存活数目。**结果:**透射电镜下可见大量直径 40~100nm 的立体圆形或茶托形的小囊泡结构, 外周可见完整的类脂质膜性结构, 内含低电子密度物质。Western Blot 显示 CD9、CD63 蛋白表达阳性。造模后假手术组各时间点的 BBB 评分和斜板评分均正常, 对照组和外泌体组 BBB 评分和斜板评分均低于假手术组($P<0.05$), 造模后 7、14、21、28d 外泌体组 BBB 评分分别为 6.30 $\pm$ 0.95、12.70 $\pm$ 1.57、16.60 $\pm$ 1.08、17.00 $\pm$ 0.67 分, 均高于同时点对照组的 2.50 $\pm$ 1.08、6.90 $\pm$ 0.99、10.50 $\pm$ 0.85、12.50 $\pm$ 1.08 分($P<0.05$)。造模后 7、14、21、28d 外泌体组斜板评分分别为 43.00 $\pm$ 3.50、55.50 $\pm$ 4.38、62.50 $\pm$ 2.64、65.00 $\pm$ 3.33 分, 均高于同时点对照组的 34.00 $\pm$ 3.16、43.00 $\pm$ 4.22、49.00 $\pm$ 4.59、52.50 $\pm$ 4.25 分($P<0.05$)。造模后 28d, 假手术组脊髓组织 HE 染色、LFB 染色、Nissl 染色正常, 对照组脊髓空洞形成、髓鞘排列紊乱、神经元数目减少, 外泌体组与对照组比较脊髓组织损伤程度减轻, 存活神经元数目增多($P<0.05$)。**结论:**MSCs 来源的外泌体可减轻脊髓损伤后的病理变化, 改善运动功能, 促进脊髓损伤后神经功能修复。

【关键词】外泌体; 脊髓损伤; 骨髓间充质干细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.12.10

中图分类号: R338.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2017)-12-1119-07

Vein transplantation of exosomes released from bone marrow stem cells in repairing of spinal cord injury/PEI Shuang, WANG Lin, CHEN Xuemei, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(12): 1119-1127

【Abstract】Objectives: To investigate whether the exosomes derived from bone marrow stem cells(BMSCs) by intravenous infusion can promote the regeneration of injured spinal cord. **Methods:** BMSCs from adult rats were enriched and expanded by whole bone marrow culture in vitro, collecting the cell supernatant of P2 generation, by using the ExoQuick Precipitation for separation and purification of exosomes, the exosome markers, CD9, CD63 were analyzed by using Western blot. The MSCs-Exosomes morphology was assessed by transmission electron microscopy(TEM). The rats were induced by spinal cord strike machine to establish the spinal cord models. Exosomes of 500 μ l(final concentrate of 200 μ g/ml) were infused into tail vein. The rats were randomly divided into the following three groups($n=10$ /group): sham group, control group(SCI+PBS) and exosomes group(SCI+exosomes). Neurological functions were evaluated by the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score and the slope plate experiment score at 1, 3, 7, 14, 21, 28 days after modeling. Histomorphological

第一作者简介: 女(1992-), 硕士研究生在读, 研究方向: 神经病学

电话: (0371) 67781105 E-mail: 13721416706@163.com

通讯作者: 贾延劼 E-mail: jiayanjie1971@aliyun.com

changes of spinal cord were observed at 28 days after modeling by hematoxylin-eosin(HE) staining and luxol fast blue (LFB) staining. Survivor number of nerve cells was observed at 28 days after modeling by Nissl staining. **Results:** TEM observation of MSCs-Exosomes revealed the presence of spherical vesicles with a typical cup-shape. The size distribution profile displayed a homogeneous population from 40–100nm, which was consistent with the literature description. MSCs-Exosomes were found to express high levels of CD9, CD63 by using Western blot. After modeling, BBB score and sloping plate experiment score in each time point were normal in sham group, but in control group and exosomes group were significantly lower than those in sham group ($P<0.05$), the scores of BBB in exosomes group were 6.30 ± 0.95 , 12.70 ± 1.57 , 16.60 ± 1.08 , 17.00 ± 0.67 at 7, 14, 21, 28 days respectively after modeling, which were higher than those in control group of 2.50 ± 1.08 , 6.90 ± 0.99 , 10.50 ± 0.85 , 12.50 ± 1.08 ($P<0.05$) respectively, the scores of slope plate experiment in exosomes group were 43.00 ± 3.50 , 55.50 ± 4.38 , 62.50 ± 2.64 , 65.00 ± 3.33 respectively at 7, 14, 21, 28 days after modeling, which were higher than those in control group of 34.00 ± 3.16 , 43.00 ± 4.22 , 49.00 ± 4.59 , 52.50 ± 4.25 ($P<0.05$) respectively. HE, LFB and Nissl staining showed nerve cells with normal morphology in sham group at 28 days after modeling, in control group, spinal cord porosis, disorder of myelin sheath and necrosis of nerve cells were found. The injured spinal cord was restored better and the number of neuronal survival was better in exosomes group than that in control group. TEM observation of MSCs-Exosomes revealed the presence of spherical vesicles, with a typical three-dimensional circular or cup-shape. The size distribution profile displayed a homogeneous population from 40–100nm with a complete lipid membrane structure in the peripheral region with low density content. **Conclusions:** Intravenous administration of MSCs-Exosomes promotes the restoration of injured spinal cord and improves motor functions, which plays a protective role in the repair of spinal cord injury.

[Key words] Exosomes; Spinal cord injury; Bone marrow stem cells

[Author's address] Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, 400052, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的损伤特征是原发性机械损伤后迅速触发继发性损伤,损伤区出现缺血、缺氧、炎症反应以及神经元和少突胶质细胞的凋亡。随着时间推移,星形胶质瘢痕和脊髓空洞形成并抑制神经轴突再生,导致损伤平面以下的运动和感觉功能障碍^[1,2]。近年来,随着干细胞技术的发展,干细胞移植治疗 SCI 已成为热点,其中骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植已被广泛研究,其能够抑制炎症反应和细胞凋亡,促进神经轴突和血管再生,减少星形胶质瘢痕和空洞,促进运动功能恢复^[3,4],但存在致畸致瘤、免疫排斥反应、肺栓塞等危害以及移植率、存活率低等难题。外泌体(exosomes)作为细胞间相互作用的重要手段,可通过膜受体或内吞的方式进入靶细胞,传递其携带的信使 RNA、非编码小分子 RNA、蛋白质等参与生物信息调控^[5];众多研究显示静脉注射 MSCs 来源的外泌体疗效与 MSCs 疗效相当^[6],并在创伤性脑损伤、脑卒中等中枢神经系统损伤修复过程中发挥关键作用^[7,8]。基于干细胞的外泌体基因治疗可提高基因治疗的安全性,因此有望成为干细

胞治疗的替代疗法。本实验提取 BMSCs 来源的外泌体,尾静脉移植入大鼠 SCI 模型,通过行为学和组织学观察外泌体对脊髓损伤的治疗效果,从而为 BMSCs 来源的外泌体移植治疗神经系统损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

40 只 SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠,体重 180~200g,由河南省实验动物中心提供,许可证号:SCXK(豫)2015-0004,并经郑州大学伦理委员会批准。采用随机数字表法,将大鼠随机分为 3 组,分别为假手术组、对照组(SCI+PBS)、外泌体组(SCI+外泌体),每组 10 只,其余 10 只用于原代 BMSCs 培养及备用。

1.2 主要仪器和试剂

脊髓打击器(HI-0400,美国)、倒置显微镜(OLYMPUSIX70,美国)、CO₂ 孵育箱(HERA,美国)、透射电子显微镜(日立 H-7500,日本)、光学显微镜(Olympus 公司,日本)、L-DMEM 培养基(gibco 公司,美国)、胎牛血清 FBS(gibco 公司,美

国)、外泌体提取试剂盒 ExoQuick-TC Exosome Isolation Reagent(SBI 公司,美国)、CD9(Proteintech, 中国)、CD63(Proteintech, 中国)、Luxol Fast Blue 髓鞘染色液(索莱宝公司,中国)。

1.3 大鼠 BMSCs 的分离培养

全骨髓贴壁法分离培养 BMSCs,大鼠 10%水合氯醛(0.3ml/kg)腹腔麻醉,75%乙醇全身浸泡消毒 5min。无菌条件下分离双侧股骨胫骨,剪开干骺端暴露骨髓腔,L-DMEM 培养液冲出骨髓。1000r/min 离心 5min,弃上清液,以含体积分数为 10%胎牛血清的 L-DMEM 培养液重悬沉淀,1×10⁶/L 密度接种,于 37℃、5%CO₂ 恒温箱中培养。24h 首次半量换液,以后每 2 天全量换液一次。倒置显微镜下观察 BMSCs 形态,待贴壁细胞达到 80%~90%融合后,用 0.25%胰酶消化,按 1:2 比例传代备用。

1.4 外泌体的分离及观察

P2 代 MSCs 用无外泌体的血清 (Exosome-free FBS)配制的培养基培养 24h。收集培养上清,根据 ExoQuick Precipitation 说明书取 20ml 培养上清,相对离心力 3000g(3000 倍重力加速度)离心 15min 去除细胞碎片,取上清按 5:1 的比例加入外泌体提取试剂,充分混匀后 4℃孵育过夜,置入离心机 1500g,离心 30min,弃去上清,底部沉淀即为外泌体。本研究通过透射电镜观察形态及大小、粒径分析方法、Western Blot 检测其表面标志蛋白鉴定外泌体,PBS 重悬并用 BCA 蛋白浓度检测法测定其浓度。PBS 调整浓度约为 200μg/ml,-80℃保存。取外泌体 10μl,滴加在 2mm 的载样铜网上,于室温静置 1min 后用滤纸吸去多余液体,用 2%(w/v) 磷钨酸溶液 10μl 滴加于载样铜网上室温复染 5min 后用滤纸吸去多余液体,室温晾干,于透射电子显微镜观察并照相。并于造模后 24h 取外泌体组大鼠 2 只,深度麻醉 4%戊二醛灌注后取材 T10 脊髓节段并固定 48h,常规脱水、浸透包埋并超薄切片,醋酸双氧铀染色,透射电镜下观察外泌体是否到达脊髓组织。

1.5 外泌体表面标志物鉴定

取 20ml 细胞培养上清分离纯化的外泌体,300μl 裂解液混匀冰上裂解 30min,置于 4℃下低温超高速离心机上 10000r/min 离心 5min,取上清分装并通过 BCA 法测定蛋白质浓度。吸取总蛋白的 30μg,置入 1/4 体积的 5×上样缓冲液中,99℃

水浴加热变性 10min。抽取上样 30μl,分离,经半干法电转移至聚偏氟乙烯膜 (poly vinylidene fluoride,PVDF)膜上,采用 5%脱脂奶粉,在 37℃下封闭 2h,CD9 和 CD63(以 1:1000 比例稀释)4℃过夜,应用等渗缓冲盐溶液 (tris buffer solution tween,TBST) 洗膜 5min×4 次,辣根过氧化物酶 (horseradish Peroxidase,HRP)标记的 IgG(1:1000 比例稀释)37℃孵育 2h,PBS 洗膜 2 次,ECL 法检测暗室曝光。

1.6 大鼠 SCI 模型制备

应用标准打击器建立大鼠 SCI 模型。10%水合氯醛(0.3ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠,常规备皮消毒后在无菌条件下,根据体表标志脊髓最高点为 T12,大鼠髂嵴对应大鼠 L6 等定位,以 T10 棘突为中心作背部后正中切口,逐层切开并分离肌肉,暴露椎骨,去除棘突及相应椎板,充分暴露 T10 脊髓(硬脊膜完整保留),应用标准打击器,设置 2N 的力度对大鼠 T10 段脊髓进行打击,观察到 T10 脊髓充血水肿,鼠尾痉挛性摆动,双下肢痉挛抖动。同时设假手术组,即充分暴露 T10 但未损伤脊髓,造模后仔细止血并依次缝合。外泌体组脊髓损伤后 1h 给予尾静脉注射 500μl 外泌体(外泌体蛋白浓度为 200μg/ml,即外泌体尾静脉移植量为 100μg),对照组脊髓损伤后 1h 给予尾静脉注射 500μl PBS。术后 3d 内每天腹腔注射青霉素抗感染,每只用量 3×10⁴U/d,室内保持正常湿度和温度,每天人工按摩膀胱排尿 3 次,直至膀胱功能恢复(约 7d)。

1.7 大鼠运动功能评价

脊髓损伤后 1、3、7、14、21、28d 采用 BBB 评分、斜板实验评价后肢运动功能。①BBB 评分:共 22 级,0 级,后肢完全瘫痪;21 级,功能正常,由两位熟练掌握 BBB 评分的观察者,双盲法进行 BBB 评分,主要观察关节活动次数,运动负荷及范围,前肢、后肢及尾巴的协调程度;②斜板实验:将大鼠放置在光滑的木板上,体轴垂直于板的垂直轴,每个试验斜板的角度增加 5°,当最大角度大鼠可停留 5s 时,该角度即斜板实验评分结果。由两名熟悉斜板实验的人员于大鼠 SCI 前及移植后 1、3、7、14、21、28d 的 10 点对各组进行盲法实验。

1.8 脊髓组织形态学观察

于脊髓损伤后 28d,各组大鼠深度麻醉经心脏 0.9%氯化钠溶液灌注冲尽血液,4%多聚甲醛

灌注固定,取出脊髓组织(以损伤处为中心上下 0.5cm 范围)常规脱水、石蜡包埋、切片,经二甲苯(5min×2)脱蜡处理、经梯度乙醇溶液(100% 5min、95% 3min、90% 3min)并水洗 3 遍,分别进行如下染色。HE 染色:切片苏木素染色 5min,水洗 3 次,盐酸酒精分色 20s,流水冲洗后置 1%伊红液 5min。LFB 染色:切片置于 Luxol 固蓝溶液,57℃孵育过夜,95%乙醇漂洗 3min,蒸馏水漂洗 3min,于 0.05%碳酸锂溶液分化 15s,并置于 70%乙醇继续分化 30s,直至灰白质可清晰辨别。Nissl 染色:切片滴加 1%甲苯胺蓝染色液染色 10min,后均进行常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。HE 染色、LFB 染色光镜下观察脊髓组织结构变化,Nissl 染色光镜下拍照定量分析存活神经元数目,每组 5 张计数取平均值。

1.9 统计学分析

数据分析用 SPSS 19.0 软件,计数资料以均数±标准差表示,多组间比较行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

大鼠术前 1d 进行 BBB 评分,运动功能达到 21 分的动物用于后续实验,术后 1d 进行 BBB 评分,大于 0 分的动物剔除实验组。为了减少试验误差,对实验大鼠进行筛选和补充,最终 30 只大鼠进入结果分析,未出现异常死亡情况。

2.2 BMSCs 的形态观察

培养骨髓间充质干细胞悬液 24h 后,倒置显微镜下可见部分细胞贴壁,细胞大小不一,形态多呈圆形,4~5d 左右可见贴壁细胞数量逐渐增多,开始形成细胞集落,细胞呈多角形、梭形;至第 10 天左右,细胞融合达 90%(图 1a),此时胰酶消化传代;第 2 代以后,细胞形态单一均匀,以梭形细胞为主,呈漩涡状、放射状排列,符合 BMSCs 的典型生长形态(图 1b)。

2.3 外泌体的鉴定及在脊髓组织中的观察

通过透射电镜观察外泌体,其大小均一,直径 40~100nm,呈立体圆形或茶托形的小囊泡,外周可见完整的膜性结构,内含低电子密度物质(图 2a)。Western Blot 显示外泌体表面标志蛋白 CD9、CD63 表达阳性,培养基 CD9、CD63 表达阴性(图 2b)。透射电镜观察到外泌体在脊髓损伤后 24h 到达脊髓 T10 节段的神经元胞质和髓鞘周围(图 2c、2d)。

2.4 行为学评价

BBB 评分术前 3 组大鼠后肢评分均为 21 分,术后假手术组后肢评分正常,术后 1d 对照组和外泌体组大鼠后肢评分均为 0 分,大鼠的下肢功能丧失,呈卧位拖行。BBB 评分随时间的推移均有所恢复。术后各时间点三组间单因素方差分析有统计学差异($P<0.05$),第 7、14、21、28d,外泌体组的大鼠 BBB 评分高于对照组,且两组间差异有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。斜板实验角度术前 3 组大鼠斜板实验评分均为 80°,术后各时间

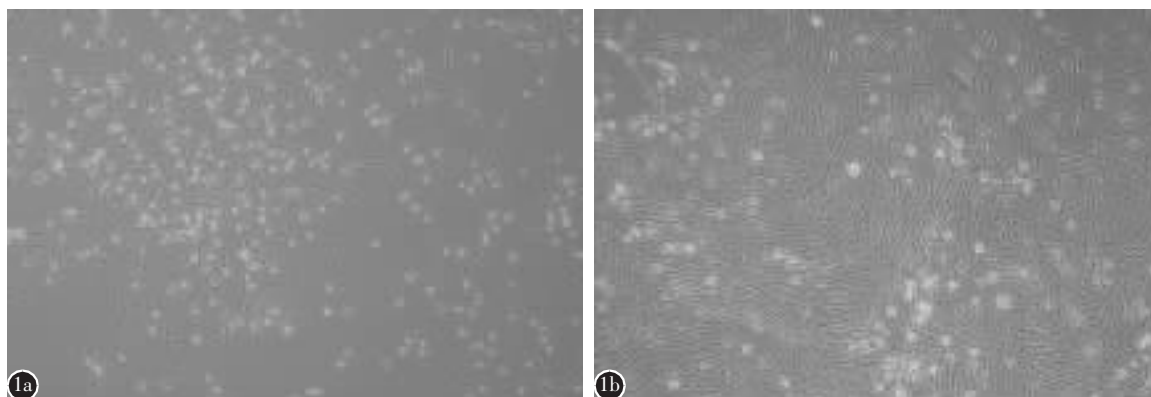


图 1 a 骨髓间充质干细胞,原代,于倒置显微镜下(×40)可见细胞贴壁生长,长梭形,形成细胞集落 b 骨髓间充质干细胞,第二代,于倒置显微镜下(×40)可见细胞形态一致均匀,呈典型的漩涡状排列

Figure 1 a cellular morphology of BMSCs: the primary generation, adherent growth, appeared as long fusiform and formed cell colony with the inverted microscope(×40) b cellular morphology of BMSCs: the second generation, homogeneous distribution and arranged in a typical swirl with the inverted microscope(×40)

点三组间单因素方差分析有统计学差异 ($P < 0.05$), 术后假手术组斜板运动功能评分正常, 对照组和外泌体组大鼠在术后 1、3d 时倾斜平面临界角度接近 ($P > 0.05$), 两组大鼠斜板实验评分随时间的推移均有所恢复。术后 7、14、21、28d, 外泌体组的斜板运动功能评分高于对照组, 且两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

2.5 脊髓组织形态学变化

HE 染色假手术组脊髓组织结构完整, 神经细胞形态正常, 灰质白质界限明显, 无炎性细胞浸润, 神经元呈多角形, 细胞核较大且轮廓清晰; 对照组脊髓形态不完整, 神经组织结构紊乱, 细胞核裂解甚至消失, 细胞及血管周围间隙扩大, 有少量瘢痕形成, 炎性细胞浸润明显, 损伤区胶质瘢痕和

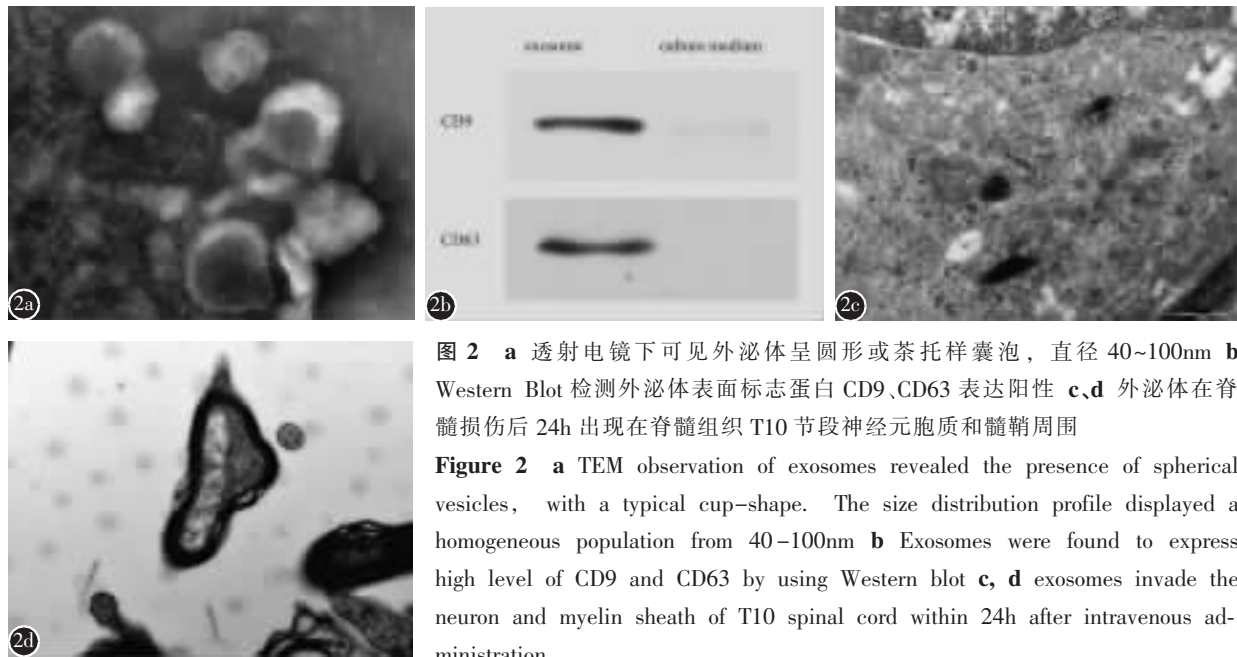


图 2 a 透射电镜下可见外泌体呈圆形或茶托样囊泡, 直径 40~100nm b Western Blot 检测外泌体表面标志蛋白 CD9、CD63 表达阳性 c、d 外泌体在脊髓损伤后 24h 出现在脊髓组织 T10 节段神经元胞质和髓鞘周围

Figure 2 a TEM observation of exosomes revealed the presence of spherical vesicles, with a typical cup-shape. The size distribution profile displayed a homogeneous population from 40~100nm b Exosomes were found to express high level of CD9 and CD63 by using Western blot c, d exosomes invade the neuron and myelin sheath of T10 spinal cord within 24h after intravenous administration

表 1 各组大鼠造模后不同时间点的 BBB 评分
($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 BBB scores of 3 groups at different times after modeling

	假手术组 Sham group	对照组 Control group	外泌体组 Exosomes group
术前 1d 1d before surgery	21±0	21±0	21±0
术后 1d 1d after surgery	19.90±0.74	0±0 ^①	0±0 ^①
术后 3d 3d after surgery	20.30±0.68	0.90±0.88 ^①	1.60±0.84 ^①
术后 7d 7d after surgery	20.90±0.32	2.50±1.08 ^①	6.30±0.95 ^{①②}
术后 14d 14d after surgery	21±0	6.90±0.99 ^①	12.70±1.57 ^{①②}
术后 21d 21d after surgery	21±0	10.50±0.85 ^①	16.60±1.08 ^{①②}
术后 28d 28d after surgery	21±0	12.50±1.08 ^①	17.00±0.67 ^{①②}

注: ①与同时时间点假手术组比较 $P < 0.05$; ②与同时时间点对照组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with sham group at the same time, $P < 0.05$; ②Compared with control group at the same time, $P < 0.05$

表 2 各组大鼠造模后不同时间点的斜板实验评分
($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Sloping plate experiment scores at different times after modeling

	假手术组 Sham group	对照组 Control group	外泌体组 Exosomes group
术前 1d 1d before surgery	80±0	80±0	80±0
术后 1d 1d after surgery	75±3.33	29.00±3.16 ^①	30.00±3.33 ^①
术后 3d 3d after surgery	78.50±2.42	30.00±2.36 ^①	32.50±3.54 ^①
术后 7d 7d after surgery	79.00±2.11	34.00±3.16 ^①	43.00±3.50 ^{①②}
术后 14d 14d after surgery	80±0	43.00±4.22 ^①	55.50±4.38 ^{①②}
术后 21d 21d after surgery	80±0	49.00±4.59 ^①	62.50±2.64 ^{①②}
术后 28d 28d after surgery	80±0	52.50±4.25 ^①	65.00±3.33 ^{①②}

注: ①与同时时间点假手术组比较 $P < 0.05$; ②与同时时间点对照组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with sham group at the same time, $P < 0.05$; ②Compared with control group at the same time, $P < 0.05$

脊髓空洞形成;外泌体组较对照组炎性细胞浸润减少、组织结构较完整,空洞面积减小(图3)。LFB 染色假手术组髓鞘排列整齐,结构完整;对照组白质纤维分布减少,髓鞘排列紊乱,髓鞘间隙扩大,髓鞘脱失,外泌体组较对照组髓鞘排列紊乱及脱失情况改善(图4)。Nissl 染色假手术组尼氏体排列整齐、均匀紧密、染色较深,呈现虎斑样,神经元数目为 131.40 ± 16.96 个/40 倍视野;对照组尼氏体分解成细颗粒状,尼氏体颜色较浅,神经元数目 73.80 ± 5.67 个/40 倍视野;外泌体组较对照组尼氏体形态及数目明显改善,神经元数目 104.60 ± 12.38 个/40 倍视野,各组间单因素方差分析有统计学差异($P < 0.05$),对照组与外泌体组比较有统计学差异($P < 0.05$)(图5)。

3 讨论

脊髓损伤是严重影响人类健康的疾病,常发

病突然、终身残疾率高,对患者和其家庭的生活产生长期的负面影响,也给社会带来巨大负担^[9]。MSCs 是具有分化为多种细胞组织潜能的多能干细胞,在急、慢性损伤修复和损伤组织重建中应用广泛^[10]。MSCs 移植能提高 SCI 患者的 ASIA 触觉评分、Frankel 评分总体改善率、日常生活能力训练评分等,促进神经功能恢复^[11,12],其旁分泌的多种营养因子在损伤修复中发挥关键作用^[13]。2010 年 Lai 分离了这些起修复作用的营养因子,首次证实为外泌体^[14],研究显示 BMSCs 相对于其他细胞可分泌更多的外泌体^[15]。外泌体作为装载蛋白质、脂质、RNA 的胞外囊泡,通过将携带的信息物质传递给靶细胞,进行细胞间信息交流。目前对 exosome 的鉴定主要是通过透射电镜下观察外泌体的形状,测量其粒径分布;Western Blot 或流式细胞术检测其表面标记蛋白,常用的标记蛋白有 CD63、CD81、CD9 等。本实验用 SBI 外泌体提取

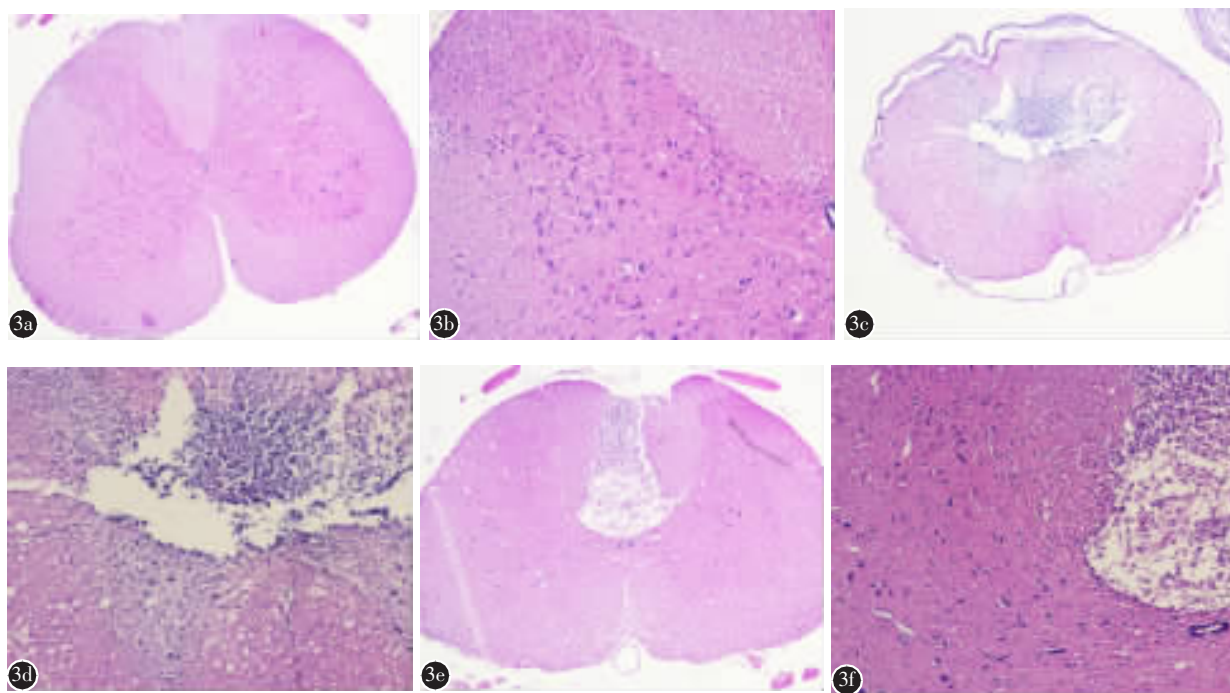


图3 各组大鼠造模后28d脊髓组织 HE 染色 a、b 假手术组脊髓组织结构完整,神经细胞形态正常,神经纤维排列规整,细胞基质较均匀 c、d 对照组损伤区脊髓组织结构紊乱,大量炎性细胞浸润 e、f 实验组损伤区脊髓组织炎性浸润较少,组织较连续、结构较清晰(a、c、e $\times 40$ b、d、f $\times 100$)

Figure 3 HE staining of spinal cord tissue at 28 days after modeling a, b HE staining of the sham group showed spinal cord tissue structural integrity, nerve cells with normal morphology, aligned nerve fibers and homogeneous matrix c, d HE staining of the control group showed amount of inflammatory cell infiltration, organizational structure serious injury and cavity e, f HE staining of the exosomes group showed less inflammatory cell infiltration, more continuous and clear structure(a, c, e $\times 40$ b, d, f $\times 100$)

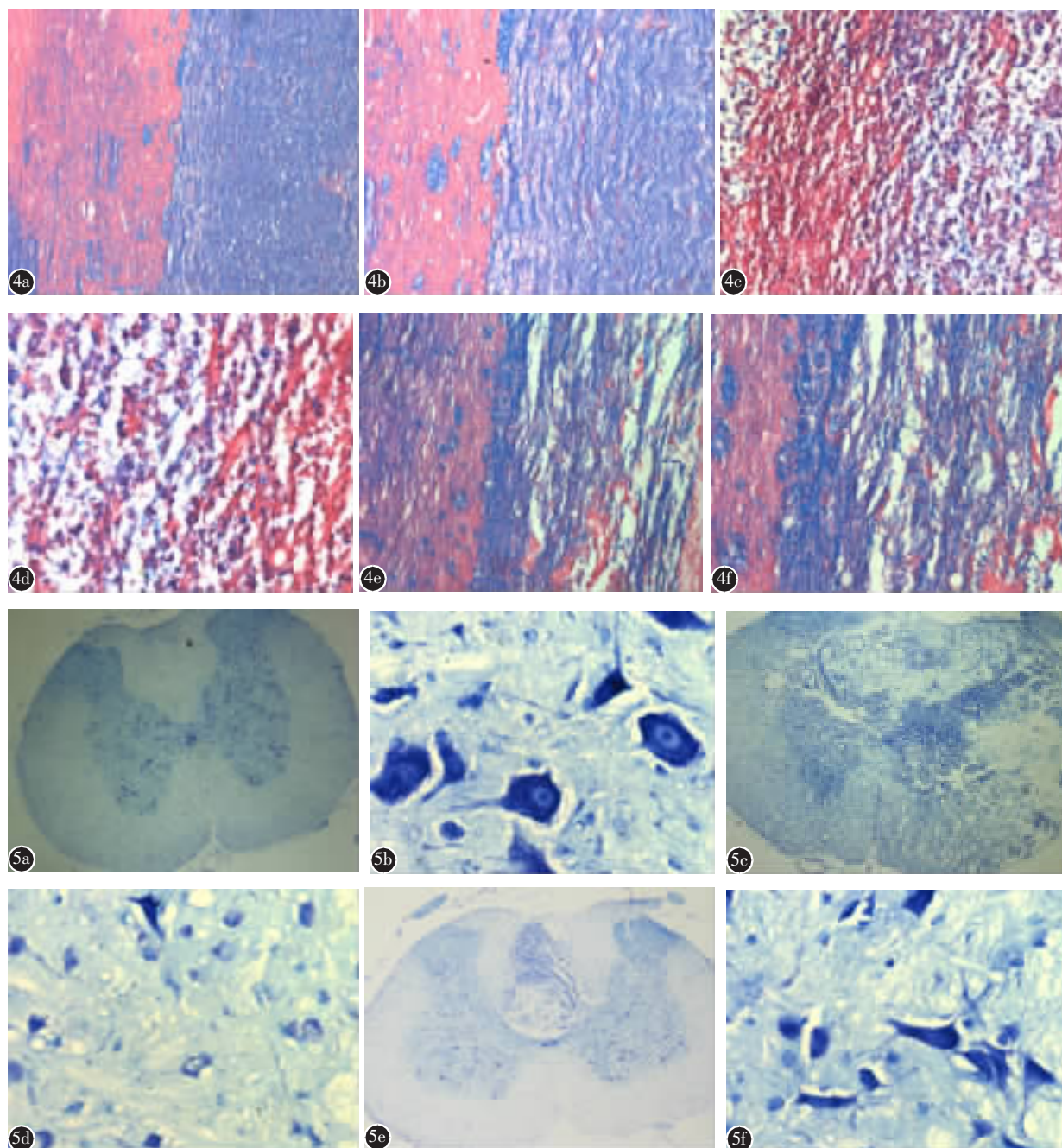


图 4 各组大鼠造模后 28d 脊髓组织 LFB 染色 **a、b** 假手术组髓鞘排列整齐, 均匀致密 **c、d** 对照组髓鞘排列紊乱, 髓鞘脱失 **e、f** 外泌体组髓鞘紊乱及脱失情况改善(**a、c、e** $\times 100$ **b、d、f** $\times 200$) **图 5** 各组大鼠造模后 28d 脊髓组织 Nissl 染色 **a、b** 假手术组尼氏体数量较多, 排列整齐、均匀致密、染色较深 **c、d** 对照组尼氏体着色的神经元数量减少, 染色较浅 **e、f** 实验组神经元尼氏体数量较对照组增多, 染色加深(**a、c、e** $\times 40$ **b、d、f** $\times 400$)

Figure 4 LFB staining of spinal cord tissue at 28 days after modeling **a, b** LFB staining of the sham group showed aligned and homogeneous myelin sheath **c, d** LFB staining of the control group showed disorder and deficiency of myelin sheath **e, f** LFB staining of the exosomes group showed improvement of the inordinate myelin sheath(**a, c, e** $\times 100$ **b, d, f** $\times 200$) **Figure 5** Nissl staining of spinal cord tissue at 28 days after modeling **a, b** The Nissl staining of the sham group showed large number Nissl's body, orderly rows, uniformly and intimately and deeply stained **c, d** The Nissl staining of the control group showed the Nissl's body decomposed to fine particulate. Nissl staining positive cell decreased **e, f** The Nissl staining of the exosomes group showed a large number of positive cell and the Nissl's body deeply stained (**a, c, e** $\times 40$ **b, d, f** $\times 400$)

试剂盒在透射电镜下观察,提取物为微囊小体结构,圆形或椭圆形茶托样,直径在 40~100nm,大小均一。Western Blot 检测所提取物表面 CD9、CD63 表达阳性,与国外文献描述一致^[16],证实本研究提取物是 MSCs 分泌的外泌体。

研究发现^[17],MSCs 外泌体能模拟 MSCs 多数的生物学功能,有效促进组织损伤修复,具有广阔的临床应用前景。目前发现 MSCs 来源的外泌体可能通过参与以下反应在中枢神经系统组织修复中发挥作用:(1)抑制凋亡^[18],Bcl-2 家族蛋白是线粒体凋亡途径调控的重要因素,脊髓损伤后神经元和胶质细胞的坏死凋亡使神经功能丧失。外泌体可下调促凋亡 Bax 相关蛋白表达,上调抗凋亡 Bcl-2 蛋白的表达,从而抑制脊髓损伤后细胞凋亡;(2)调节免疫系统,MSCs 来源的外泌体是调节免疫反应的潜在介质。Yang 等^[19]研究报道骨髓间充质干细胞来源的外泌体可以通过下调促炎性细胞因子、抑制 NF- κ B p65 信号通路,从而减少 caspase-3、caspase-8 及 caspase-9 的自我裂解,达到抑制凋亡的目的。Zhang 等^[20]研究证明 MSCs 来源的外泌体通过上调抗炎因子 IL10、TGF β 1 的表达,下调促炎因子 IL1 β 、IL6、TNF α 和 IL12p40 的表达从而参与免疫反应的调节;(3)促进新生血管生成:Huang 等^[18]在大鼠脊髓损伤模型中,尾静脉给予 MSCs 来源的外泌体,术后 3d 检测到内皮相关蛋白 PCNA/RECA-1 阳性细胞数目增多,证明外泌体可通过促进血管生成,增强脊髓损伤局部血流灌注和神经救援。

SCI 后的运动功能恢复至今仍是难以解决的问题。本研究使用标准脊髓打击器打击大鼠脊髓,构建大鼠 SCI 模型,模拟临床常见的创伤性脊髓损伤。SCI 的预后评估关键是神经运动功能的恢复情况,本研究对各观察时间点进行行为学评分发现,各组大鼠 SCI 后下肢功能丧失,呈卧位拖行。BBB 评分和斜板实验评分急剧下降,虽其后肢运动功能具有自然恢复的能力,但恢复能力有限。本实验造模后 7d 开始,外泌体组 BBB 评分和斜板运动功能评分高于对照组,充分说明了外泌体对 SCI 模型神经功能恢复和行为学评分有明显改善作用,与以往研究结果一致^[18]。

SCI 的病理生理过程可以分为原发性损伤和继发性损伤,其中继发性损伤对于决定神经功能缺陷程度尤为重要^[21]。SCI 后继发损伤病理表现为

髓鞘的崩解,伴随炎症细胞的浸润及神经细胞的坏死和凋亡。本研究脊髓 HE 染色显示外泌体组较对照组炎症细胞浸润减少、脊髓空洞面积减小。LFB 染色显示实验组较对照组髓鞘排列紊乱及脱失情况有改善,尼氏染色显示实验组较对照组尼氏体数量增多、着色加深。既往研究显示静脉移植 BMSCs 来源的外泌体可经血液循环,穿过血脑屏障到达组织损伤部位,携带生物信息修复组织损伤^[22],滴鼻途径移植外泌体后 6h 可在大脑皮层及海马等部位发现外泌体的分布^[23]。本研究尾静脉移植 MSCs 来源的外泌体,观察到移植后 24h,外泌体可到达脊髓,被神经细胞摄取或分布于髓鞘周围,BMSCs 来源的外泌体在脊髓继发性损伤时可能通过减少炎症细胞浸润、缓解髓鞘脱失并促进髓鞘修复、减少神经细胞凋亡等机制保护 SCI 区的组织,减小脊髓空洞,进而促进神经功能恢复、提高行为学评分。

外泌体为纳米级颗粒,能自由通过血脑屏障,且可避免干细胞移植的缺点及伦理问题,在治疗神经系统损伤方面具有巨大潜力。但其在脊髓损伤模型方面的研究较少,本研究尾静脉移植大鼠 BMSCs 来源的外泌体治疗脊髓损伤,采用标准脊髓打击器精确控制脊髓损伤程度,避免了损伤的个体差异对实验结果的干扰,采用多种形态学染色方法和行为学评估方法,着重观察外泌体移植对大鼠形态学和行为学的作用,并通过透射电镜观察到外泌体在脊髓损伤节段的分布,证实外泌体移植可抑制神经细胞凋亡、减轻髓鞘脱失,促进大鼠的神经运动功能改善。本研究为外泌体治疗在脊髓损伤方面的应用提供了实验依据,但 BMSCs 来源的外泌体促进脊髓损伤修复的具体机制还需深入研究。

4 参考文献

1. Papastefanaki F, Matsas R. From demyelination to remyelination: the road toward therapies for spinal cord injury[J]. *Glia*, 2015, 63(7): 1101-1125.
2. 吴周睿,朱元贵,程黎明,等. 脊髓损伤与修复的关键科学问题——第 81 期“双清论坛”综述[J]. *中国科学基金*, 2013, 27(3): 147-153.
3. Quertainmont R, Cantinieaux D, Botman O, et al. Mesenchymal stem cell graft improves recovery after spinal cord injury in adult rats through neurotrophic and pro-angiogenic actions [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39500.

4. Karaoz E, Kabatas S, Duruksu G, et al. Reduction of lesion in injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation[J]. *Turk Neurosurg*, 2012, 22(2): 207–217.
5. Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(1): 11–15.
6. Doeppner TR, Herz J, Görgens A, et al. Extracellular vesicles improve post-stroke neuroregeneration and prevent postischemic immunosuppression[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(10): 1131–1143.
7. Zhang Y, Chopp M, Liu XS, et al. Exosomes derived from mesenchymal stromal cells promote axonal growth of cortical neurons[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4): 2659–2673.
8. Kim DK, Nishida H, An SY, et al. Chromatographically isolated CD63+CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(1): 170–175.
9. New PW, Cripps RA, Bonne LB. Global maps of non-traumatic spinal cord injury epidemiology: towards a living data repository[J]. *Spinal Cord*, 2014, 52(2): 97–109.
10. Oliveri RS, Bello S, Biering-Sørensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 62: 338–353.
11. Myers SA, Bankston AN, Burke DA, et al. Does the pre-clinical evidence for functional remyelination following myelinating cell engraftment into the injured spinal cord support progression to clinical trials?[J]. *Exp Neurol*, 2016, 283(Pt B): 560–572.
12. 赵文涛, 李盼盼, 张海峰, 等. 间充质干细胞移植治疗脊髓损伤: 系统评价及 Meta 分析[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(36): 5865–5871.
13. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous HMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 54–63.
14. 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.
15. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(3): 336–341.
16. Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006, Chapter 3: Unit 3.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
17. Phinney DG, Pittenger MF. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(4): 851–858.
18. Huang JH, Yin XM, Xu Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells attenuates apoptosis, inflammation and promotes angiogenesis after contusion spinal cord injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2017, doi: 10.1089/neu.2017.5063. [Epub ahead of print]
19. Yang Y, Ye Y, Su X, et al. MSCs-derived exosomes and neuroinflammation, neurogenesis and therapy of traumatic brain injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 55.
20. Zhang Y, Chopp M, Meng Y, et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury[J]. *J Neurosurg*, 2015, 122(4): 856–867.
21. Kopper TJ, Gensel JC. Myelin as an inflammatory mediator: myelin interactions with complement, macrophages, and microglia in spinal cord injury[J]. *J Neurosci Res*, 2017, doi: 10.1002/jnr.24114. [Epub ahead of print]
22. De Rivero Vaccari JP, Brand F, Adamczak S, et al. Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury[J]. *J Neurochem*, 2016, 136(Suppl 1): 39–48.
23. Long Q, Upadhyay D, Hattiangady B, et al. Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(17): E3536–E3545.

(收稿日期:2017-09-07 修回日期:2017-11-15)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 姜雅浩)