

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.07.009

间充质干细胞外泌体对小鼠急性肝衰竭的保护作用*

赵佳伟^{1,2} 贾蓉蓉² 王景辉² 田颖³ 袁一航⁴ 王玉刚^{2Δ} 施敏^{2Δ}

(1 江苏大学医学院 江苏 镇江 212013; 2 上海交通大学医学院附属同仁医院消化内科 上海 213300;

3 首都医科大学附属北京朝阳医院眼科 北京 100020; 4 上海交通大学医学院 上海 200025)

摘要 目的:研究小鼠骨髓间充质干细胞(Mouse bone marrow mesenchymal stem cells, mBMMSC)来源的外泌体(Exosome, Exo)对四氯化碳(Carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的急性肝衰竭(Acute liver failure, ALF)的保护作用。**方法:**采用全骨髓培养法提取Balb/c小鼠原代骨髓间充质干细胞并利用流式细胞仪进行鉴定,用试剂盒混合细胞上清后提取干细胞分泌的外泌体,透射电镜(Transmission electron microscope, TEM)鉴定外泌体形态,纳米粒径追踪分析仪(Nanoparticle tracking analysis, NTA)鉴定外泌体的粒径,Western Blot鉴定外泌体表面的标志蛋白。激光共聚焦显微镜(Confocal laser scanning microscope, CLSM)下观察肝细胞内吞外泌体。小鼠肝脏的免疫荧光切片观察外泌体的肝脏内分布。Balb/c小鼠随机分为健康对照组(Healthy)、CCl₄损伤组(CCl₄)、CCl₄损伤外泌体治疗组(Exo)。观察小鼠7d内的生存时间。检测血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、尿酸(UA)的含量,H&E染色组织切片观察肝脏病理变化,流式细胞仪和磁珠细胞试剂盒(Cytometric bead array, CBA)检测血清中白介素6(IL-6)、白介素12(IL-12)和γ干扰素的含量(IFN-γ)。**结果:**成功提取并鉴定了小鼠骨髓间充质干细胞与其外泌体,NTA测得干细胞外泌体的粒径在100 nm左右,电镜下外泌体呈现囊泡状,Western Blot测得外泌体表达CD9和CD63蛋白。CLSM下观察到L02肝细胞内吞外泌体且随时间递增,免疫荧光切片观察到外泌体靶向肝脏且在肝脏组织中均匀分布。动物实验表明相比于CCl₄组,Exo组小鼠的生存时间显著延长,血清中ALT、AST、LDH和UA的含量显著降低,肝脏组织切片显示肝脏损伤明显减少,血清中IL-6、IL-12和IFN-γ的含量显著降低。**结论:**小鼠骨髓间充质干细胞分泌的外泌体可能通过抑制炎症减轻四氯化碳诱导的急性肝衰竭。

关键词:小鼠骨髓间充质干细胞;外泌体;四氯化碳;急性肝衰竭

中图分类号:R-33;R331.2;R575.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)07-1246-07

Protective Effect of Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells on Carbon Tetrachloride Induced Acute Liver Failure in Mice*

ZHAO Jia-wei^{1,2}, JIA Rong-rong², WANG Jing-hui², TIAN Ying³, YUAN Yi-hang⁴, WANG Yu-gang^{2Δ}, SHI Min^{2Δ}

(1 School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu, 212013, China; 2 Department of Gastroenterology, Shanghai Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 213300, China;

3 Department of Ophthalmology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100020, China;

4 School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of exosomes(Exo) derived from mouse bone marrow mesenchymal stem cells(mBMMSC) on carbon tetrachloride(CCl₄)-induced acute liver failure(ALF). **Methods:** The primary bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from Balb/c mice by a whole bone marrow culture method and were further confirmed by flow cytometry. Exosomes derived from mesenchymal stem cells were extracted through a Total Exosome Isolation Reagent. The morphology of exosomes was observed by TEM and the size distribution of obtained exosomes was measured by NTA. The surface markers of exosomes were detected by Western Blot. Endocytosis of exosomes by L02 cells was observed under CLSM and its distribution was observed by immunofluorescence sections. The survival rate and lifetime of Balb/c mice within 7 days were observed and recorded. The serum level of ALT, AST, LDH, UA were measured by a fully automatic biochemical analyzer. Hematoxylin-eosin of liver tissue was conducted to observe the histopathological changes. Cytokine level of IL-6, IL-12 and IFN-γ in mouse serum were detected with a Cytometric bead array by flow cytometry. **Results:** mBMMSCs and its exosomes were successfully extracted and identified. The size of exosomes was

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81570549,81871912,81970530);上海市医学重点专科项目(ZK2019C12)

作者简介:赵佳伟(1994-),男,硕士研究生,主要研究方向:肝纤维化与急性肝衰竭,E-mail: 564787278@qq.com

Δ 通讯作者:施敏(1973-),男,硕士生导师,主任医师,主要研究方向:肝纤维化基础与临床研究,

E-mail: SM1790@shtrhospital.com,电话:18121226606;

王玉刚(1965-),男,硕士生导师,主任医师,主要研究方向:消化道肿瘤分子机制及诊治研究,

E-mail: WYG0061@shtrhospital.com,电话:18121226113

(收稿日期:2019-09-02 接受日期:2019-09-26)

around 100 nm measured by NTA and the morphology was observed under TEM to be a shape of vesicle. Expression of CD9 and CD63 protein was proved by Western Blot. Besides, endocytosis of exosomes by L02 cells in a time-dependent way was observed under CLSM. And the distribution of targeted exosomes in liver was observed by immunofluorescence sections Compared with CCl₄ group, the lifetime of Exo mice were dramatically prolonged. The serum level of ALT, AST, LDH and UA were significantly decreased and liver damage of histopathological section was substantially improved in Exo group. Cytokine level of IL-6, IL-12 and IFN- γ in Exo mouse serum were extensively decreased compared to CCl₄ group. **Conclusions:** Exosomes derived from mBMMSC may alleviate carbon tetrachloride induced acute liver failure by inhibition of inflammation.

Key words: Mouse bone marrow mesenchymal stem cells; Exosomes; Carbon tetrachloride; Acute liver failure

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.2; R575.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)07-1246-07

前言

急性肝衰竭是由毒物、感染、外伤和药物等诸多原因引起的致死性疾病,临床上表现为肝脏大面积的变性和坏死,肝功能的急剧下降甚至完全丧失,以及由之引起的多器官功能的障碍。如果不能得到及时的治疗,患者存在极高的死亡风险^[1]。急性肝衰竭会引起一系列严重的并发症,如肝性脑病,心脏和肾脏等多器官的损伤。在多器官功能障碍发生之前,肝移植是现阶段最有效的治疗方式,但是收到许多因素的限制如肝脏供体短缺、治疗费用过高等^[2]。因此,新的治疗方式亟待开发。

间充质干细胞移植,是急性肝衰竭治疗的一种新的治疗方式,有研究表明间充质干细胞能够通过细胞旁分泌的方式分泌多种具有组织修复作用的细胞因子作用于肝脏和肾脏,修复损伤的肝脏组织和肾脏组织^[3,4]。然而,细胞治疗这一治疗方式存在着一些缺陷,细胞在体内循环的过程中,容易在肺毛细血管停留而堵塞血管,导致肺栓塞;另一方面,活细胞制剂不易保存,在体内也面临被清除、生存期短等问题;更严重的是,活细胞在体内可能会发生癌变导致癌症的发生^[5]。有研究人员设计出一种纳米颗粒,该纳米颗粒由包入细胞膜的间充质干细胞上清构建而成,能够有效地治疗急性肝衰竭^[6]。

近几年来,外泌体的生物学作用受到了研究人员极大的关注,被认为是新型前沿的治疗手段^[7]。外泌体是由细胞分泌直径约 100 nm 的囊泡,该囊泡具有多种生物功能,超速差速离心是其最常见的分离方法^[8]。在最初的时候外泌体被认为是细胞的代谢废弃物,现在则被认为是细胞间通讯交流的物质。细胞分泌的外泌体内部含有多种蛋白质、脂质和核酸等物质,并且不同细胞来源的外泌体具有不同的生物学特性,发挥不同的作用^[9,10],例如心肌球来源的细胞通过分泌的外泌体表现出高水平的 miRNA-92a,此 RNA 可以增强 Wnt/ β -catenin 信号通路中蛋白的表达,激活心肌细胞中的心脏保护性骨形态发生蛋白信号传导^[11]。脂肪细胞来源的外泌体含有多种 miRNA,这些 microRNA 可以部分地改变巨噬细胞的外排能力^[12]。M2 型小胶质细胞来源的外泌体通过将 miR-124 转移到神经元中,通过调节下游基因 USP14 在缺血小鼠大脑中保护你神经元^[13]。在缺氧诱导的视网膜病变中,小胶质细胞来源的外泌体促进光感受器的存活并抑制体外缺氧介导的促血管生成因子的分泌^[14]。间充质干细胞的外泌体具有损伤修复和免疫调节等多种功能,有研究表明脐带间充质干细胞的外泌体能够促进器官的功能恢复,减少代谢内型肌营养不良中促纤维化基因的表达,降低炎症因

子,增加抗肌萎缩相关蛋白的表达^[15]。除此之外,间充质干细胞来源的外泌体能够通过激活血管内皮受体来增加组织血管新生的能力,从而使四肢缺血损伤有所恢复^[16]。本文旨在探讨小鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体对高剂量 CCl₄ 诱发的小鼠急性肝衰竭的保护作用,提取小鼠骨髓间充质干细胞并进行原代培养,获得其外泌体并进行表征,通过细胞内吞和组织冰冻切片验证外泌体对肝脏组织的靶向性能,最后通过功能学实验验证外泌体对急性肝衰竭小鼠的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

α -MEM 培养基、1640 培养基、胎牛血清、双抗(美国 Gibco 公司),胰酶(北京兰博利德公司),PVDF 膜、曝光液(美国 Millipore 公司),BCA 蛋白定量试剂盒、外泌体提取试剂盒、Exosome Spin Columns (Thermo Scientific 公司),CD9 兔抗小鼠单克隆抗体、CD63 小鼠抗小鼠单克隆抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗(Abcam 公司),CBA 试剂盒(美国 BD 公司),电泳仪(Bio-Rad 公司),多色荧光凝胶成像仪(以色列 DNR 公司),NTA 纳米颗粒跟踪分析仪(德国 Particle Metrix 公司),Vectra 荧光显微镜(美国 Perkin Elmer 公司),透射电镜(日本日立公司 Ht-7700),尼康 A1 型激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司),全自动生化分析仪(日本 Toshiba 公司),CytoFLEX 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司)。

1.2 骨髓间充质干细胞的分离和培养

颈椎脱臼法处死 5-6 周的 Balb/c 小鼠,用 75%乙醇完全浸泡小鼠皮毛 5 min 后转移至超净台内,取股骨和胫骨,剔除韧带和多余的组织,浸泡于冰浴的装有 α -MEM 培养基的小皿中。用 1 mL 注射器在骨干两段分别钻孔,另用一只注射器吸取 α -MEM 培养基,从胫骨的骨髓端刺入骨髓腔,将骨髓冲洗到 50 mL 无菌离心管中,每根骨头用冰浴的培养基反复冲洗 3 次,直至骨髓腔完全发白。将得到的骨髓液过筛滤除多余的肌肉脂肪组织及骨碎片后转移至 50 mL 无菌离心管,1500 rpm 离心 5 min,吸净弃去上清后加入 3 mL 红细胞裂解液,吹匀后于室温下静置 3-5 min 裂解红细胞,立即加入 15 mL PBS 终止反应,然后 4℃ 条件下 1500 rpm 离心 5 min 弃上清,并重复洗涤 2 次。获取的细胞接种在 6 孔板内,然后将细胞放入 37℃,含 5% CO₂ 的培养箱中静置。培养 48 h 以后第一次给细胞换液,在之后视情况每隔 2-3 天给细胞换液。培养至第 10-14 天时,细胞增殖融合度达到 85%左右,即可进行传代。利用流式细胞仪对间

充质干细胞表面的 CD29、CD31、CD44 和 CD117 蛋白进行鉴定。

1.3 间充质干细胞的外泌体提取

预先使用超速离心机 $100000\times g$ 离心 4 h 去除胎牛血清中的外泌体。取传代至第三代的间充质干细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中,利用去外泌体的胎牛血清进行培养,约培养 48 h 后待细胞生长到 80%-90%时,收集培养的细胞上清液放置于 4℃待用。外泌体的提取操作严格按照外泌体提取试剂盒的说明进行,即将收集到的细胞上清液放置于 50 mL 离心管内,4℃条件下 $2000\times g$ 离心 30 min 去除细胞和细胞碎片,将上清转移到新的离心管内,再用 100 kDa 的超滤离心管,4℃条件下 $4500\times g$ 离心 15 min,将细胞上清进行浓缩处理,按照外泌体提取试剂盒的说明书,按比例将上清浓缩液和试剂混合(上清浓缩液:试剂=2:1),充分混匀后 4℃冰箱静置过夜,次日 4℃条件下 $10000\times g$ 离心 1 h,弃上清液,用适量 PBS 缓冲液重悬离心管底部的外泌体沉淀,利用 BCA 试剂盒测定外泌体的浓度。3 天内使用的外泌体可短期在 4℃储存,其余可 -80℃冻存。

1.4 纳米颗粒追踪分析检测间充质干细胞外泌体的粒径

用双蒸水稀释收集的外泌体样品(约 1:2000-1:10000)至合适仪器检测到的浓度,用 5 mL 注射器吸取稀释后的外泌体样品,注入仪器的样品池内,设置好参数后检测外泌体的粒径大小。

1.5 Western blot 鉴定外泌体表面标志蛋白

配制 10%的分离胶和 5%的浓缩胶待用。加入 5X 上样缓冲液,与样品混匀后 95℃煮沸 5 min。上样量为每孔约 40 μg 。将蛋白质样品进行电泳:分别使用 90 V 和 120 V 的恒定电压进行电泳。电泳结束后进行转膜,在转膜槽中恒定电压 100 V 的条件下电转 1 h,转膜结束后取出 PVDF 膜,放于 5%脱脂牛奶封闭液中,在室温条件下放到脱色摇床上以 50 rpm 的速度封闭 1 h。加入兔抗小鼠 CD9 抗体(1:2000 稀释),小鼠抗小鼠 CD63 抗体(1:1000 稀释),放入 4℃冰箱孵育过夜。孵育过夜后,将 PVDF 膜放在脱色摇床上,使用 TBST 以 75 rpm 的速度洗膜 3 次,每次洗膜 10 min。将 PVDF 膜分别放置到已经稀释好的辣根氧化酶标记的山羊抗兔(1:2000 稀释)和山羊抗小鼠(1:2000 稀释)的二抗中,常温下放在脱色摇床上孵育 1 h。孵育结束后用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。滴加 DAB 发光液后放入曝光仪中曝光处理。

1.6 生物透射电镜下鉴定外泌体的形态

取 PBS 重悬的原始浓度外泌体并稀释至不同浓度,每个样品取 10 μL 滴加在普通碳支持铜网上,室温静置 3 min,用滤纸沿铜网侧面边缘轻轻吸去液体,并稍稍风干后进行染色。每个铜网滴加 10 μL 醋酸双氧钨溶液负染 30 s,再用滤纸沿铜网侧面边缘轻轻吸去液体,自然风干,在 80kV 透射电镜下观察外泌体的形貌像。

1.7 外泌体荧光标记

取 100 μg 溶解于 PBS 的外泌体溶液,加入 1 μL 20 mM 的 DiD 染料,吹匀后静置于 37℃恒温箱中,恒温孵育 1 h,1 h 后取出,利用 Exosome Spin Columns 并按照说明书所指示的内容进行操作,将混合溶液中的多余染料取出,获得 DiD 标记的

外泌体溶液。

1.8 正常肝细胞 L02 内吞外泌体

L02 细胞接种在 35 mm 的共聚焦小皿内,培养过夜贴壁后向共聚焦小皿中加入 10 μL 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 DiD 标记的外泌体溶液,混匀后在细胞培养箱中共培养 3 h 和 6 h。之后从培养箱中取出,弃去小皿中的培养基并用 PBS 轻轻冲洗 3 遍,之后用 4%多聚甲醛室温固定 30 min,固定后 PBS 轻轻冲洗 3 遍,使用鬼笔环肽室温染膜 30 min,之后 PBS 轻轻冲洗 3 遍后滴加 DAPI 溶液染核,放置于激光共聚焦显微镜下观察内吞情况。

1.9 外泌体肝脏分布

取 100 μL 1 mg/mL 的 DiD 标记的外泌体溶液,通过小鼠尾静脉注射入小鼠体内,6 h 后脱颈处死小鼠,解剖后取出小鼠肝脏后液氮速冻,OCT 固定后在恒温冰冻切片机切取小鼠肝脏冰冻切片,利用 DAPI 染色细胞核,加入抗荧光猝灭封片剂后在 vectra 荧光显微镜下观察外泌体的肝脏内分布情况。

1.10 动物实验

SPF 级 Balb/c 小鼠 60 只,体重 18-20 g,由中科院过程工程所提供(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),动物实验合格证号 1118032100038。小鼠在适宜温度和湿度的条件下适应性饲养一周,自由饮食。随机分为健康对照组(Healthy),CCl₄ 肝衰竭组(CCl₄),CCl₄ 肝衰竭外泌体治疗组(Exo),每组 10 只。

CCl₄ 肝衰竭模型:配制 30%的 CCl₄ 油溶液,按照 3:7 的比例将 CCl₄ 和橄榄油进行混合,充分吹匀后在涡旋仪上涡旋 3 次,每次 30 s。模型组每只小鼠腹腔注射给药 100 μL CCl₄ 油溶液造成 CCl₄ 的肝衰竭模型,健康对照组腹腔注射 100 μL 的橄榄油溶液。将外泌体溶液用 PBS 稀释至 1 mg/mL,造模结束后立即尾静脉注射给药,外泌体组每只给药 100 μL ,CCl₄ 和健康对照组每只给药 100 μL 的 PBS 缓冲盐溶液以排除 PBS 对小鼠的影响。60 只小鼠分两次实验,其中 30 只用于观察小鼠 7 d 内的生存曲线,另外 30 只根据生存曲线的结果在适当时间点处死取肝组织和血清以进一步检测其他指标。

1.11 指标监测

1.11.1 小鼠生存期分析 给药后观察各组小鼠 7 d 内的生存情况,每天观察一次并作记录。

1.11.2 小鼠血清 ALT、AST 含量检测 在给药 2 d 后摘眼球获取小鼠血液,室温静置 2 h 后, $10000\times g$,离心 10 min,取上层血清,使用大生化分析仪分别检测 ALT、AST 等。

1.11.3 肝脏组织切片分析 在给药 2 d 后脱颈处死小鼠,取小鼠的肝脏组织,PBS 冲洗 2 次后放入 4%的多聚甲醛中室温固定 24 h,包埋切片后进行 H&E 染色,在光学显微镜下观察肝脏组织病理变化。

1.11.4 小鼠血清细胞因子含量检测 在给药 2 d 后摘眼球获取小鼠血液,室温静置 2 h 后, $10000\times g$,4℃离心 10 min,取上层血清,使用流式细胞仪和 CBA 试剂盒检测 IL-6、IL-12 和 IFN- γ 等细胞因子。

1.12 统计学分析

应用 SPSS 22.0 统计学软件对本文所得实验数据进行处理和分析,采用 t 检验方法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代小鼠骨髓间充质干细胞及其外泌体的鉴定

原代小鼠骨髓间充质干细胞在光镜下为梭形的细长型细胞,通常表现为涡旋形生长。间充质干细胞标志物 CD29、CD44 呈阳性表达,阳性率高于 95%,干细胞造血标志物 CD31、CD117 呈现阴性表达,阳性率低于 5%。见图 1A。小鼠骨髓间充质干细胞外泌体在透射电镜下观察,呈现出典型的“茶托状”

结构,即椭圆形的囊泡状结构,直径约在 100 nm 左右。见图 1B。NTA 纳米颗粒跟踪分析仪检测结果显示,外泌体的粒径在 100 nm 左右,符合外泌体的实际直径大小情况。见图 1C。Western Blot 蛋白电泳可以看到外泌体 CD9 和 CD63 标志蛋白条带。见图 1D。以上结果证明所提取到的外泌体为小鼠骨髓间充质干细胞的外泌体,电镜、粒径和 WB 的结果均符合外泌体的特征。

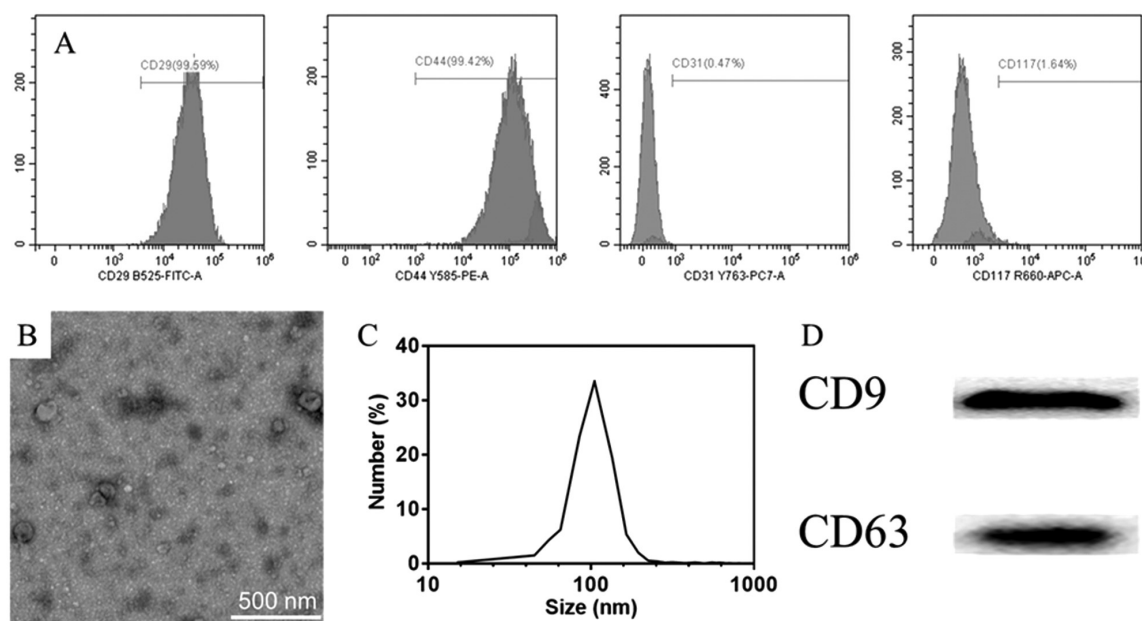


图 1 原代小鼠骨髓间充质干细胞及其外泌体的鉴定

Fig.1 Identification of primary mouse bone marrow stem cells and its exosomes

2.2 正常肝细胞对外泌体的内吞情况及外泌体在肝脏内的分布情况

L02 肝细胞与 DiD 标记的外泌体共孵育后,经过鬼笔环肽和 DAPI 的染色后,L02 细胞膜被鬼笔环肽染色后发出绿色荧光,细胞核与 DAPI 结合后发出蓝色荧光,外泌体被 DiD 染色后发出红色荧光。在激光共聚焦显微镜下能够观察到外泌体被 L02 细胞内吞,在 0 h 时,外泌体还未被内吞,能够观察到细胞核与细胞膜,而没有红色的外泌体荧光。见图 2A。在 3 h 时,能够看到 DiD 标记的外泌体发出的红色荧光。见图 2B。在 6 h 时,能够观察到大量的 DiD 标记的外泌体发出的红色荧光。见图 2C。L02 细胞对外泌体的内吞表现出时间依赖性。在荧光显微镜下观察肝脏的荧光冰冻切片,没有给药时只能观察到 DAPI 的蓝色荧光。见图 2D。而尾静脉给药 DiD 标记的外泌体后,能够观察到均匀分散在肝脏组织中的红色荧光点。见图 2E。证明外泌体能够通过血管进入肝脏组织中发挥作用。

2.3 外泌体对 CCl₄ 急性肝衰竭小鼠的治疗效果

CCl₄ 模型组小鼠在给药 1 d 后,小鼠开始出现死亡,外泌体治疗组小鼠在第 2 d 开始出现小鼠死亡,数量少于 CCl₄ 模型组,外泌体治疗组的小鼠相较于 CCl₄ 模型组小鼠 7 d 内的生存率提高了 50%。见图 3A。观察小鼠肝脏的 H&E 组织病理切片发现,健康对照组中可见肝脏组织结构正常,肝小叶边缘清晰,肝血窦未见明显病变,肝细胞形态正常,未见明显肝细胞坏死和炎症细胞的浸润。见图 3B。CCl₄ 模型组可见肝细胞有明显的

片状融合性坏死,肝小叶结构紊乱,肝血窦扩张、出血,坏死区及汇管区有大量的淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞和巨噬细胞浸润。见图 3C。外泌体治疗组中肝脏组织结构尚可,可见散在的肝细胞坏死,其内可见少量的炎症细胞浸润。见图 3D。通过测定小鼠血清中的生化指标,可以观察到外泌体组和 CCl₄ 组 ALT、AST、LDH 和 UA 含量均高于健康小鼠组,而外泌体组的 ALT、AST、LDH 和 UA 含量相比于 CCl₄ 模型组有显著下降。见图 3E。

2.4 外泌体对 CCl₄ 急性肝衰竭小鼠炎症因子的影响

通过测定小鼠血清中细胞因子 IL-6、IL-12 和 IFN- γ 的水平,可以观察到 CCl₄ 模型组小鼠的 IL-6、IL-12 和 IFN- γ 的水平相较于健康组小鼠明显升高($P < 0.05$),而外泌体治疗组小鼠的炎症因子水平相较于 CCl₄ 模型组小鼠有明显下降($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

外泌体是细胞分泌的具有磷脂双分子层的纳米级囊泡,粒径约 100 nm,在透射电镜下呈圆形或椭圆形。几乎所有细胞都能够通过分泌外泌体来实现细胞间的信号交流^[10,17,18]。有研究表明,间充质干细胞来源的外泌体能够修复骨关节炎,在骨关节炎中 MSCs 分泌的外泌体通过抑制 mTOR 保护关节软骨免受损伤^[19];间充质干细胞来源的外泌体能够通过免疫调节作用减少血管移植后的血栓和钙化形成,增强血管内皮和平滑肌细胞

的活性^[20]。组织损伤的过程往往伴随炎症的发生,多项研究表明,间充质干细胞来源的外泌体能够抑制损伤组织中炎症因子的表达,修复组织损伤,维持组织的正常功能^[21]。作为间充质干

细胞分泌的重要物质,我们提出小鼠骨髓间充质干细胞来源的外泌体能够用于治疗 CCl₄ 诱发的小鼠急性肝衰竭的假设并对其进行了验证。

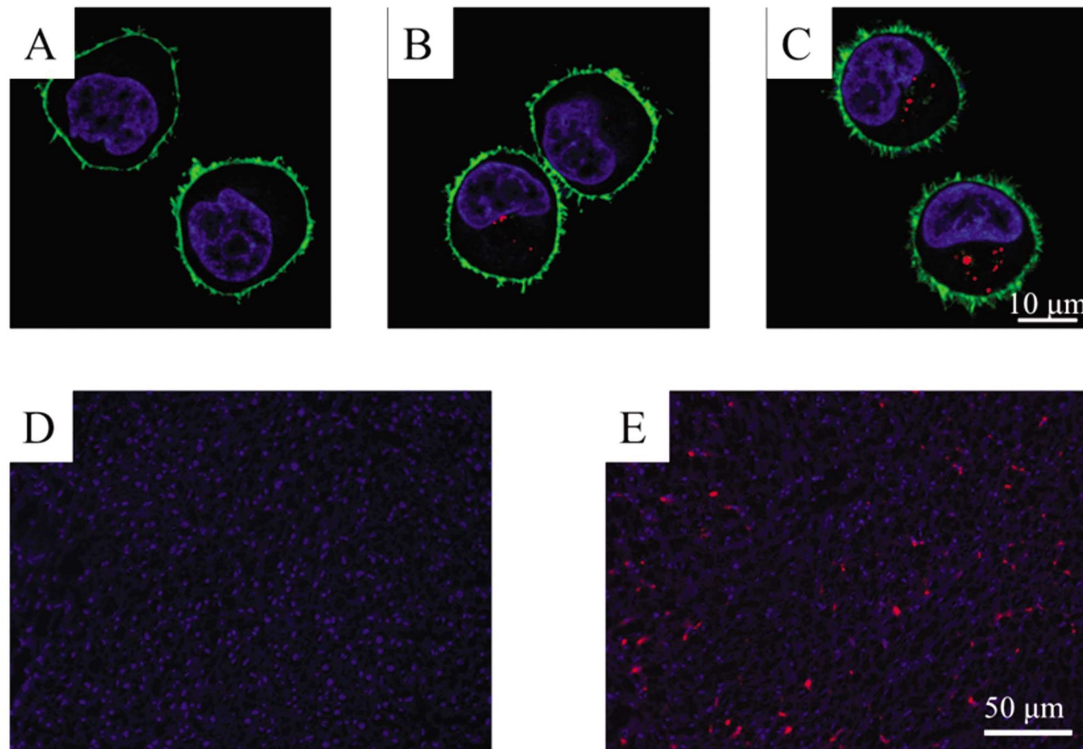


图2 L02 细胞对外泌体的内吞及外泌体在肝脏内的分布

Fig.2 Endocytosis of L02 cells to exosomes and distribution of exosomes in the liver

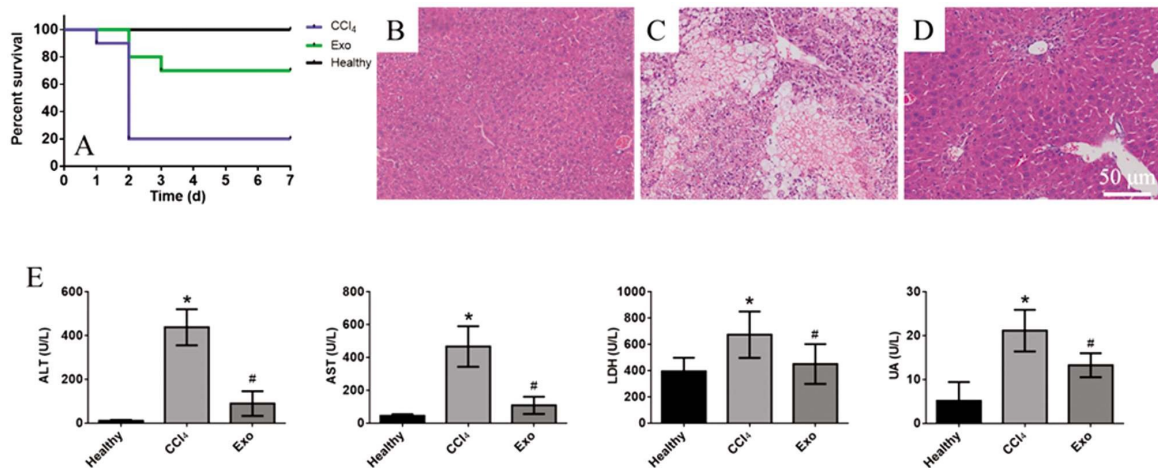


图3 外泌体对急性肝衰竭小鼠的治疗效果

Fig.3 Therapeutic effects of exosomes on ALI mice

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=6. Compared with the Healthy group, * $P < 0.05$; compared with the CCl₄ group, # $P < 0.05$.

本次研究成功地从小鼠股骨和胫骨中提取出骨髓间充质干细胞,应用流式细胞术对干细胞表面特异性抗原进行了验证;利用外泌体提取试剂盒从间充质干细胞的上清液中富集得到外泌体,并且通过 Western Blot 鉴定外泌体表面标志蛋白 CD9 和 CD63,利用 NTA 测定外泌体的粒径大小约为 100 nm,通过 TEM 拍摄到电镜下的外泌体呈现为“茶托状”的椭圆形囊泡结构,成功鉴定所提取物为间充质干细胞的外泌体^[22]。

观察小鼠的生存期,外泌体治疗组相较于 CCl₄ 模型组,生

存期显著延长,存活率显著提高,相比于 CCl₄ 组提高了 50%。从肝脏的病理组织切片上可以观察到,CCl₄ 模型组的肝脏病理切片中肝细胞有明显的片状融合性坏死,肝小叶结构紊乱无序,肝血窦有明显的扩张和出血,坏死区及汇管区能够发现大量的淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞等炎症细胞的浸润,相比之下,外泌体治疗组中肝脏组织结构基本正常,仅有点状的坏死灶,其内仅可见少量的炎症细胞浸润。众所周知,ALT 和 AST 是最常见的用于反映肝脏功能的指标,在肝脏受损,肝细胞损

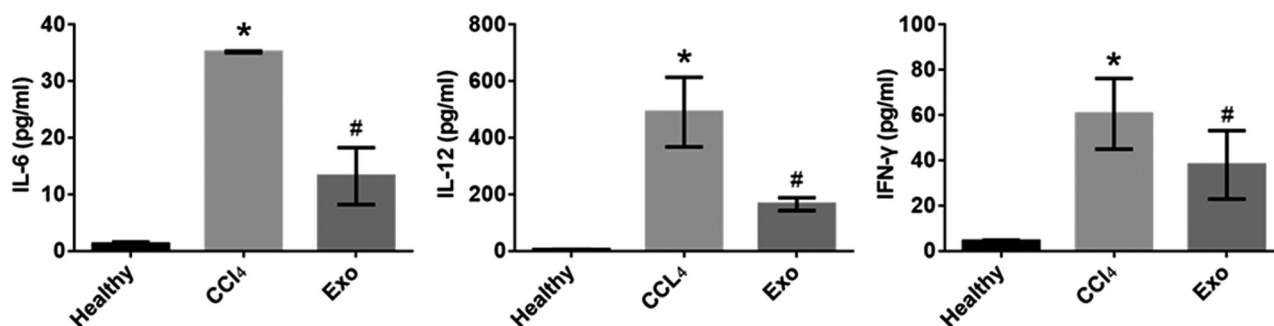


图4 外泌体对急性肝衰竭小鼠炎症因子的影响

Fig.4 Effects of exosomes on inflammation cytokines of ALI mice

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm SD$, n=6. Compared with the Healthy group, * $P < 0.05$; compared with the CCl₄ group, # $P < 0.05$.

伤后,ALT 和 AST 会从肝细胞中大量释放入血,血清中含量显著升高。在该研究中,CCl₄ 模型组小鼠的 ALT 和 AST 数值在造模 2 d 后显著升高,明显高于健康组小鼠的含量,而外泌体治疗组小鼠的 ALT 和 AST 含量相较于 CCl₄ 组则有明显的下降,另一方面,分析小鼠血清中的炎症因子,结果显示,相比较于 CCl₄ 组模型小鼠,外泌体治疗组小鼠的血清中 IL-6,IL-12 和 IFN-γ 的含量也显著下降。这提示间充质干细胞的外泌体能够显著减轻肝脏损伤,修复损伤的肝脏细胞,改善肝脏功能。

有研究显示脂肪垫干细胞来源的外泌体可以通过抑制 mTOR 信号通路来修复骨关节炎^[19]。人脂肪来源的干细胞能够通过释放 lncRNA H19 来提高急性肝衰竭大鼠的生存率^[23]。间充质干细胞外泌体能够通过调节内质网应激来保护髓核细胞并减缓椎间盘退变的速度^[21]。除此之外,还有研究人员发现间充质干细胞来源的外泌体能够透过血脑屏障,靶向损伤的脊髓组织,利用这一特性将小干扰 RNA 装载入干细胞来源的外泌体增强其治疗效果^[24]。因此,我们希望能够进一步研究间充质干细胞来源的外泌体修复急性肝衰竭小鼠的机制,深层次地探索其中的信号通路。希望能够从炎症相关的信号通路,如 TXNIP/NLRP3^[25]和 MerTK^[26]通路中,探索出间充质干细胞来源的外泌体是否能够通过影响信号通路中蛋白的表达来缓解急性肝衰竭。更进一步,我们希望能够探索出信号通路蛋白的表达变化与外泌体中 miRNA、lncRNA 等非编码 RNA 之间的关系。

我们的研究表明小鼠间充质干细胞的外泌体能够靶向小鼠肝脏,并被肝脏细胞内吞从而发挥对损伤组织的修复作用。间充质干细胞来源的外泌体在组织器官损伤的修复中发挥着重要的作用,能够抑制肝脏中炎症因子的分泌,因此可能与炎症相关的信号通路有着密切关联。总而言之,对于急性肝衰竭,间充质干细胞来源的外泌体治疗是一个新型的治疗手段,应用前景可观。

参考文献(References)

- [1] Bernal W, Wendon J. Acute liver failure[J]. N Engl J Med, 2013, 369 (26): 2525-2534
- [2] Wu Z, Han M, Chen T, et al. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury [J]. Liver International, 2010, 30 (6): 782-794
- [3] Yuan S, Jiang T, Sun L, et al. The role of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of acute liver failure[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 251846
- [4] Zhang R, Yin L, Zhang B, et al. Resveratrol improves human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells repair for cisplatin-induced acute kidney injury[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 965
- [5] Borrelli D A, Yankson K, Shukla N, et al. Extracellular vesicle therapeutics for liver disease?[J]. J Control Release, 2018, 273: 86-98
- [6] Liang H, Huang K, Su T, et al. Mesenchymal Stem Cell/Red Blood Cell-Inspired Nanoparticle Therapy in Mice with Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Failure [J]. ACS Nano, 2018, 12 (7): 6536-6544
- [7] Agrahari V, Agrahari V, Burnouf P A, et al. Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers?[J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(7): 707-729
- [8] Yang X X, Sun C, Wang L, et al. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes?[J]. J Control Release, 2019, 308: 119-129
- [9] Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, et al. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation[J]. J Extracell Vesicles, 2012, 1
- [10] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell to cell communication[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(1): 9-17
- [11] Ibrahim A G E, Li C, Rogers R, et al. Augmenting canonical Wnt signalling in therapeutically inert cells converts them into therapeutically potent exosome factories[J]. Nat Biomed Eng, 2019, 3(9): 695-705
- [12] Barberio Matthew D, Kasselmann Lora J, Playford Martin P, et al. Cholesterol efflux alterations in adolescent obesity: role of adipose-derived extracellular vesicular microRNAs [J]. Journal of Translational Medicine, 2019, 17(1): 232
- [13] Song Y, Li Z, He T, et al. M2 microglia-derived exosomes protect the mouse brain from ischemia-reperfusion injury via exosomal miR-124 [J]. Theranostics, 2019, 9(10): 2910-2923
- [14] Xu W, Wu Y, Hu Z, et al. Exosomes from Microglia Attenuate Photoreceptor Injury and Neovascularization in an Animal Model of Retinopathy of Prematurity [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 16: 778-790
- [15] Bier A, Berenstein P, Kronfeld N, et al. Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy[J]. Biomaterials, 2018, 174: 67-78

- [16] Gangadaran P, Rajendran R L, Lee H W, et al. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hindlimb ischemia [J]. *J Control Release*, 2017, 264: 112-126
- [17] Bai H, Lei K, Huang F, et al. Exo-circRNAs: a new paradigm for anticancer therapy[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 56
- [18] Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 24): 5553-5565
- [19] Wu J, Kuang L, Chen C, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis [J]. *Biomaterials*, 2019, 206: 87-100
- [20] Wei Y, Wu Y, Zhao R, et al. MSC-derived sEVs enhance patency and inhibit calcification of synthetic vascular grafts by immunomodulation in a rat model of hyperlipidemia [J]. *Biomaterials*, 2019, 204: 13-24
- [21] Liao Z, Luo R, Li G, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells modulate endoplasmic reticulum stress to protect against nucleus pulposus cell death and ameliorate intervertebral disc degeneration in vivo [J]. *Theranostics*, 2019, 9(14): 4084-4100
- [22] Rong X, Liu J, Yao X, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019, 10(1): 98
- [23] Jin Y, Wang J, Li H, et al. Extracellular Vesicles Secreted by Human Adipose-derived Stem Cells (hASCs) Improve Survival Rate of Rats with Acute Liver Failure by Releasing lncRNA H19 [J]. *EBio Medicine*, 2018, 34: 231-242
- [24] Guo S, Perets N, Betzer O, et al. Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Loaded with Phosphatase and Tensin Homolog siRNA Repairs Complete Spinal Cord Injury[J]. *ACS Nano*, 2019
- [25] Yanning L, Guohua L, Aichun L, et al. AMSC-derived exosomes alleviate lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure by miR-17-mediated reduction of TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. *EBioMedicine*, 2018, 36: 140-150
- [26] Triantafyllou E, Pop O T, Possamai L A, et al. MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of inflammation in acute liver failure[J]. *Gut*, 2018, 67(2): 333-347

(上接第 1229 页)

- [26] Hill A. S., Sahay A., Hen R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors [J]. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2015, 40(10): 2368-2378
- [27] Bedse G., Hartley N. D., Neale E., et al. Functional Redundancy Between Canonical Endocannabinoid Signaling Systems in the Modulation of Anxiety [J]. *Biological psychiatry*, 2017, 82(7): 488-499
- [28] Jenniches I., Ternes S., Albayram O., et al. Anxiety, Stress, and Fear Response in Mice With Reduced Endocannabinoid Levels [J]. *Biological psychiatry*, 2016, 79(10): 858-868
- [29] Bennett M. R., Arnold J., Hatton S. N., et al. Regulation of fear extinction by long-term depression: The roles of endocannabinoids and brain derived neurotrophic factor [J]. *Behavioural brain research*, 2017, 319: 148-164
- [30] Wang Y., Gu N., Duan T., et al. Monoacylglycerol lipase inhibitors produce pro- or antidepressant responses via hippocampal CA1 GABAergic synapses[J]. *Molecular psychiatry*, 2017, 22(2): 215-226
- [31] Wang H. N., Wang L., Zhang R. G., et al. Anti-depressive mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation in rat: the role of the endocannabinoid system [J]. *J Psychiatr Res*, 2014, 51: 79-87
- [32] Xue S S, Xue F, Ma Q R, et al. Repetitive high-frequency transcranial magnetic stimulation reverses depressive-like behaviors and protein expression at hippocampal synapses in chronic unpredictable stress-treated rats by enhancing endocannabinoid signaling [J]. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 2019, 184: 172738
- [33] 吴光源. 抗抑郁药发展历程与氟西汀的应用 [J]. *中国心理卫生杂志*, 2017, 31(12): 3
- [34] J.M. Oliva, L. Urigüen, S. Pérez-Rial, et al. Chronic treatment with fluoxetine produced time related alterations in opioid, cannabinoid and tyrosine hydroxylase gene expression in selected regions of the rat brain[J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2003