

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003159

## 脐带间充质干细胞外泌体修复骨质疏松大鼠颅骨缺损的研究

刘耘佟<sup>1</sup>, 李汶洋<sup>2</sup>, 向学熔<sup>3</sup>

(重庆医科大学附属口腔医院、口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室、重庆市高校市级口腔生物医学工程重点实验室

1. 牙周科; 2. 颌面外科; 3. VIP 中心, 重庆 401147)

**【摘要】目的:**探讨人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HucMSCs)来源外泌体对骨质疏松大鼠颅骨缺损的修复作用。**方法:**提取 HucMSCs 来源外泌体,使用透射电镜及纳米颗粒追踪分析鉴定其形态及大小,使用 Western blot 鉴定其表面标志物;分离培养大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)并使用流式细胞术鉴定其表面标志物;将外泌体(空白对照、20  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ 、60  $\mu\text{g/mL}$ 、80  $\mu\text{g/mL}$ )与 BMSCs 共培养,检测不同浓度的外泌体对 BMSCs 增殖及成骨向分化的影响;选取 SD 大鼠通过卵巢切除术(ovariectomy, OVX)构建骨质疏松模型,在颅骨缺损模型建立的同时注射外泌体悬液,术后 8 周处死大鼠,取术区组织进行 micro-CT 扫描并进行骨量分析,HE 染色后显微镜下观察骨缺损愈合情况,评价 HucMSCs 来源外泌体对骨质疏松大鼠颅骨缺损的修复潜能。**结果:**透射电镜及纳米颗粒追踪分析结果显示,提取的 HucMSCs 来源外泌体形态及大小符合要求,表面蛋白标志物 CD63 及 CD81 表达均呈阳性。大鼠 BMSCs 表面标志物 CD29 高表达(99.86%)、CD90 高表达(99.50%)、CD45 低表达(4.12%),符合间充质干细胞特征。将 60  $\mu\text{g/mL}$  的外泌体与 BMSCs 共培养 5 d 后细胞活力为对照组的(127.782  $\pm$  7.184)%( $P=0.001$ ),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)的表达为对照组的(2.715  $\pm$  0.095)倍( $P=0.003$ ),Runx 家族转录因子 2(Runx family transcription factor 2, Runx2)的表达为对照组的(2.175  $\pm$  0.731)倍( $P=0.140$ )。在 OVX 诱导的骨质疏松 SD 大鼠颅骨缺损模型的修复中,micro-CT 显示外泌体组相对于对照组出现了明显的骨愈合增加,骨量分析结果显示外泌体组骨组织比例为(11.000  $\pm$  1.708)%( $P=0.008$ ),骨小梁数目为(0.742  $\pm$  0.112)  $\text{mm}^{-1}$ ( $P=0.014$ ),骨小梁厚度为(0.175  $\pm$  0.008)  $\text{mm}$ ( $P=0.005$ ),骨小梁间隙为(1.402  $\pm$  0.507)  $\text{mm}$ ( $P=0.022$ )。组织学结果显示新生骨的结构完整、层次清晰,为致密的板层样骨,有均匀的骨基质和骨陷窝。**结论:**HucMSCs 来源的外泌体能够促进 BMSCs 的增殖活性及成骨向分化,具有修复骨质疏松骨缺损的能力。

**【关键词】**脐带间充质干细胞;外泌体;骨质疏松;颅骨缺损;骨再生**【中图分类号】**R78**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2022-04-08

## Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells repair skull defect of osteoporosis rats: an experimental study

Liu Yuntong<sup>1</sup>, Li Wenyang<sup>2</sup>, Xiang Xuerong<sup>3</sup>

(1. Department of Periodontology; 2. Department of Maxillofacial Surgery; 3. VIP Center, Stomatological Hospital of Chongqing Medical University/Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences/Chongqing Municipal Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering of Higher Education)

**【Abstract】Objective:** To explore the repairing effect of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells(HucMSCs) on the skull defect of osteoporosis rats. **Methods:** Isolation the exosomes from HucMSCs, the morphology and size of the exosomes were identified by transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis, and the surface markers were identified by Western blot. Rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) were isolated and their surface markers were identified by flow cytometry. Exosomes(control, 20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 60  $\mu\text{g/mL}$ , 80  $\mu\text{g/mL}$ ) were co-cultured with BMSCs, and the effects of different concentrations of exosomes on proliferation and early osteogenic differentiation of BMSCs were detected. Osteoporosis model was established

by ovariectomy(OVX) in SD rats. Exosomes suspension was

injected at the same time as the skull defect model was estab-

lished. Eight weeks after operation, the rats were euthanized.

micro-CT scanning and bone mass analysis was performed on the tissue of the operation area, and the healing of bone defect

was observed under microscope after HE staining, so as to

evaluate the repairing potential of exosomes from HucMSCs on the skull defect of osteoporosis rats. **Results:** The results of transmission electron microscope and nanoparticle tracking analysis showed that the shape and size of exosomes derived from HucMSCs met the requirements, and the expression of surface protein markers CD63 and CD81 were positive. The surface markers CD29, CD90 and CD45 of rats BMSCs were expressed as 99.86%, 99.50% and 4.12% respectively, which accorded with the characteristics of mesenchymal stem cells. After co-culturing 60  $\mu\text{g/mL}$  exosomes with BMSCs for 5 days, the cell viability was  $(127.782 \pm 7.184)\%$  of the control group ( $P=0.001$ ), the expression of alkaline phosphatase (ALP) was  $(2.715 \pm 0.095)$  times of the control group ( $P=0.003$ ), and the expression of Runx family transcription factor 2 (Runx2) was  $(2.175 \pm 0.731)$  times of the control group ( $P=0.140$ ). In the repair of an OVX-induced osteoporosis SD rat skull defect model, micro-CT showed that the exosome group had a significant increase in bone healing compared with the control group. The results of bone mass analysis showed that in the exosome group, the bone volume/tissue volume was  $(11.000 \pm 1.708)\%$  ( $P=0.008$ ), the trabecular number was  $(0.742 \pm 0.112) \text{ mm}^{-1}$  ( $P=0.014$ ), the trabecular thickness was  $(0.175 \pm 0.008) \text{ mm}$  ( $P=0.005$ ), and the trabecular separation was  $(1.402 \pm 0.507) \text{ mm}$  ( $P=0.022$ ). Histological results showed that the new bone had a complete structure, with clear layers, as dense lamellar bone, and uniform bone matrix and bone lacunae. **Conclusion:** The exosomes derived from HucMSCs can promote the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs, and have the ability to repair osteoporotic bone defects.

**[Key words]** umbilical cord mesenchymal stem cell; exosome; osteoporosis; skull defect; bone regeneration

骨质疏松症是一种多因素的世界性骨骼疾病, 容易发生与疾病相关的骨折<sup>[1]</sup>, 常见于绝经后妇女、老年人和营养不平衡或营养缺乏的患者<sup>[2]</sup>。探索各种科学的方法改善骨质疏松症患者的骨代谢状况、预防骨折发生、促进骨质疏松状态下骨缺损愈合, 是学科领域内亟待解决的难题。

利用干细胞修复组织损伤, 一直以来都是骨再生领域研究的热点方向之一。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HucMSCs)具有增殖分化能力强、免疫原性低的特点, 是干细胞移植最理想的选择<sup>[3]</sup>。

有研究指出, 干细胞的组织再生功能主要来源于其旁分泌效应, 通过向损伤的部位释放信号分子, 从而达到组织修复的目的<sup>[4]</sup>。在干细胞所释放的功能物质中, 外泌体(exosomes, Exos)发挥了重要的调节作用。外泌体是细胞在正常或病理状态下所分泌的一种脂质双分子层结构纳米级囊泡, 直径30~200 nm<sup>[5]</sup>。外泌体携带多种生物活性物质, 包括蛋白质、脂质、mRNA 和 miRNA 等, 作为细胞间的信使介导信息交流, 既参与正常生理过程, 也在多种疾病的病理过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。迄今为止, 已有许多报道提示: 干细胞外泌体具有类似甚至效果更优的干

细胞样促进骨再生功能。相比于干细胞, 干细胞来源外泌体作为无细胞疗法, 抗原性更低, 性质更稳定, 更易于保存和运输, 且其生物学功能不易随时间延长而衰减<sup>[7]</sup>。

本研究拟利用 HucMSCs 来源外泌体, 通过体外实验评价其调控骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)增殖和成骨向分化的能力, 并通过骨质疏松大鼠颅骨缺损实验评价其修复潜能。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

HucMSCs (陕西干细胞工程有限公司赠予), CD63 及 CD81 抗体 (Abcam), CD29、CD45 及 CD90 抗体 (Biolegend), 雌性 SD 大鼠 (重庆医科大学动物实验中心), 胎牛血清、青霉素链霉素、DMEM 低糖培养基、 $\alpha$ -MEM 培养基 (Hyclone), 细胞计数试剂盒、RNA 抽提试剂盒、茜素红染色试剂盒 (碧云天), 逆转录试剂、PCR 试剂盒、合成引物 (具体序列见表 1; Takara), HE 染色试剂盒 (索莱宝); 超速离心机 (Beckman Coulter), 透射电子显微镜 (Tecnai), 纳米颗粒追踪分析仪 (Particle Metrix), 多功能成像系统、荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad), 流式细胞仪 (BD), Micro-CT 机 (Scanco Medical)。

表 1 合成引物序列

| 基因名   | 前引物序列 (5'-3')          | 后引物序列 (5'-3')          |
|-------|------------------------|------------------------|
| GAPDH | CTTCTCTGTGACAAAGTGACA  | CACCCCATTTGATGTTAGCG   |
| ALP   | AGATGTGCCGCTCTTTGC     | TCAGAACAGGTCGCTAGG     |
| Runx2 | GGCGTATTCAGATGATGACACT | AACTGAAGGTGGCTGGATAGTG |

## 1.2 HucMSCs 来源外泌体的提取与鉴定

1.2.1 外泌体的提取 将 HucMSCs 以无血清的 DMEM 低糖培养基处理 48 h, 取上清按以下步骤 4℃ 离心得到外泌体: 300g 10 min → 2 000g 10 min → 10 000g 30 min → 100 000g 70 min → PBS 重悬沉淀后再次 100 000g 70 min。

1.2.2 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM) 取 20  $\mu$ L 外泌体悬液, 滴至电镜铜网状栅中, 2% 醋酸双氧铀水溶液负染固定 1~10 min, 干燥后在 120 kV 下观察并拍照。

1.2.3 纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)

以去离子水清洗样本池, 以聚苯乙烯微球(110 nm)校准, 以 1 × PBS 清洗样本池, 外泌体样本以 1 × PBS 稀释, 进样检测。

1.2.4 Western blot 外泌体沉淀用裂解液(含磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂)反复吹打, 4℃ 裂解 30 min, 4℃ 12 000g 离心 30 min 收集上清, BCA(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒测量蛋白浓度。采用 12% SDS-PAGE 胶分离蛋白质, 并转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入 CD63、CD81 抗体于 4℃ 过夜, 室温下与带 HRP 的人抗兔 IgG 孵育 1 h, 化学发光试剂显影。

## 1.3 大鼠 BMSCs 的培养与鉴定

1.3.1 大鼠 BMSCs 的培养 本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会制定的伦理学标准。取 3 周龄健康 SD 大鼠, 脱颈处死后用 75% 酒精浸泡 10 min, 于超净台内取出其股骨、胫骨并显露骨髓腔, 用含 10% 胎牛血清及 1% 青霉素链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基冲洗出骨髓至培养皿中并剪碎, 7 d 后清洗换液, 进行正常培养及传代, 第 3~5 代获得的大鼠 BMSCs 用于本研究中。

1.3.2 流式细胞术鉴定 选用第 3 代呈对数生长的细胞, 消化后以每管  $10^6$  个细胞重悬, 400g 4℃ 离心 5 min, 分别加入抗 CD29、CD45、CD90-FITC 工作液 4℃ 避光孵育 30 min 后, 反复清洗离心 3 次, 细筛网过滤后上机检测。

## 1.4 体外实验

1.4.1 细胞增殖实验与毒性分析(cell counting kit-8, CCK-8) BMSCs 以 1 000 个/孔接种于 96 孔板培养至贴壁后, 使用空白对照、20  $\mu$ g/mL、40  $\mu$ g/mL、60  $\mu$ g/mL、80  $\mu$ g/mL 的 Exos 条件培养基分别孵育 1 d、3 d、5 d, 每 2 d 换液。按 10:1 的比例加入 CCK-8 工作液 37℃ 孵育 1 h, 在 450 nm 波长处测定各孔光密度(optical density, OD)值, 计算细胞活力。

1.4.2 细胞成骨向分化基因表达分析(quantitative real-time PCR, RT-qPCR) BMSCs 以  $2 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板培养至贴壁后, 使用空白对照、20  $\mu$ g/mL、40  $\mu$ g/mL、60  $\mu$ g/mL、80  $\mu$ g/mL 的 Exos 条件培养基培养 5 d, 每 2 d 换液。使用 RNA 抽提试剂盒提取细胞 RNA, 每组取 500 ng RNA 进行逆转录后, 通过 RT-qPCR 进行碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、Runx 家族转录因子 2(Runx family transcription factor 2, Runx2)基因表达检测, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)表达水平进行归一。

1.4.3 茜素红染色结果分析 BMSCs 以  $2 \times 10^4$  个/孔接种于 24 孔板培养至贴壁后, 使用空白对照、60  $\mu$ g/mL 的 Exos 条件培养基培养 21 d 后吸去废液, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 茜素红工作液室温染色 30 min, 显微镜下观察并采图。

## 1.5 体内实验

1.5.1 动物模型的建立 本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。6~8 周龄的雌性 SD 大鼠均进行双侧卵巢切除手术, 术后 2 个月形成骨质疏松模型。异氟烷麻醉大鼠, 于颅骨中线全层切开并暴露骨面, 直径 5 mm 的环钻紧贴人字缝两侧, 以 1 000 r/min 的转速、55 N 的扭力全层钻开颅骨后完整剥离骨片, 随机分为对照组(缺损留空)和实验组(缺损骨面注射 60  $\mu$ g/mL 的外泌体悬液), 分层缝合后碘伏消毒切口, 肌注青霉素 3 d。

1.5.2 标本采集及处理 术后 8 周使用 CO<sub>2</sub> 安乐死处死动物。于双侧眼眶间及颅骨与上颌骨之间离断, 完整取下颅顶骨, 生理盐水清洗并切磨标本至合适大小, 4% 组织细胞固定液固定 24 h, 流水冲洗过夜后保存于 75% 乙醇内。使用 micro-CT 对标本扫描成像并三维重建, 以每个骨缺损中心绘制直径 5 mm 的圆, 进行缺损处骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数目(trabecular number, Tb.N)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)和骨小梁间距(trabecular separation, Tb.Sp)分析。乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetracetic acid, EDTA)脱钙液脱钙, 梯度脱水包埋后切片(厚度=5  $\mu$ m)并进行 HE 染色。

## 1.6 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行统计分析。数据采用 *t* 检验和单因素方差分析, 以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。此外, 采用 Bonferroni 和 Dunnett's T3 进行事后检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

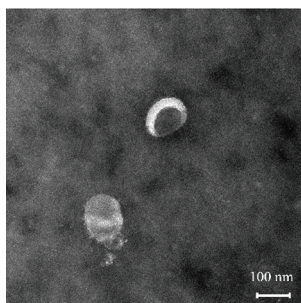
# 2 结果

## 2.1 外泌体的鉴定

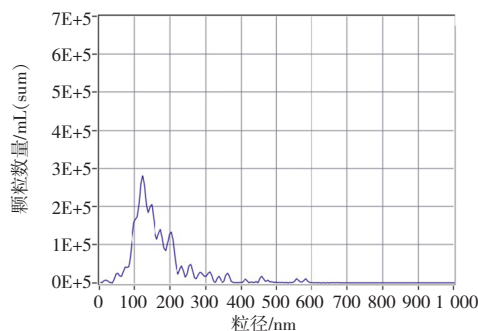
对 HucMSCs 来源的外泌体进行 TEM 检测, 结果显示视野中的外泌体直径为 50~200 nm, 为囊泡外缘具有清晰膜包裹的茶托样结构(图 1A), 符合外泌体电镜检测结果; 采用 NTA 检测所提取外泌体的大小及分布情况, 结果显示外泌体直径介于 50~250 nm 之间, 主要集中在 120 nm 处(图 1B), 符合外泌体粒径范围。CD63 和 CD81 是 4 次跨膜蛋白家族成员, 定位于胞膜, 被用作外泌体表面蛋白标志物, 采用 Western blot 检测其表达, 结果显示 DMEM 培养基内表达为阴性, 外泌体 CD63 及 CD81 表达均呈阳性(图 1C)。

## 2.2 BMSCs 的鉴定

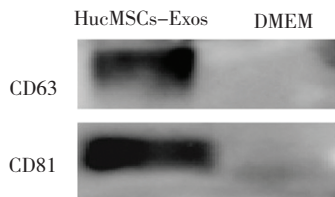
采用细胞流式鉴定术对大鼠 BMSCs 进行表面标志物鉴定, 结果显示阴性对照组表达为 1.03%(图 2A), 间充质干细胞标志物 CD29 高表达(99.86%)(图 2B)、CD90 高表达(99.50%)(图 2C), 造血干细胞标志物 CD45 低表达(4.12%)(图 2D), 符合间充质干细胞的表面标志特征, 可用于后续实验。



A. 外泌体的透射电镜图片



B. 外泌体的纳米颗粒跟踪分析结果



C. 外泌体表面标记物的表达结果

图 1 外泌体的形态及鉴定结果

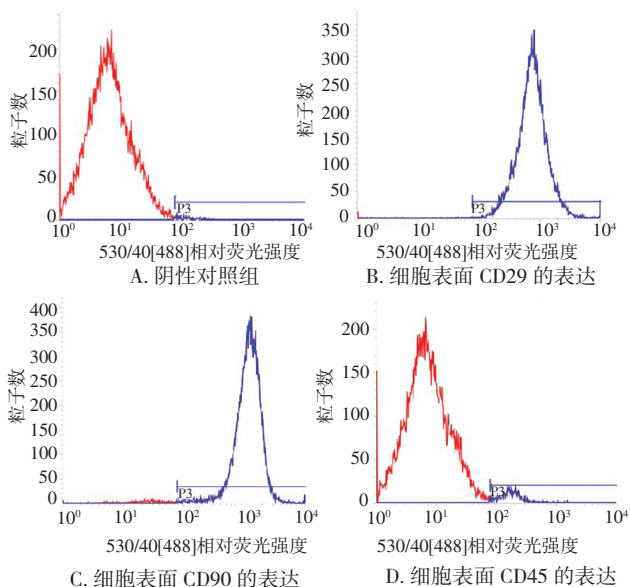


图 2 BMSCs 的流式细胞术鉴定结果

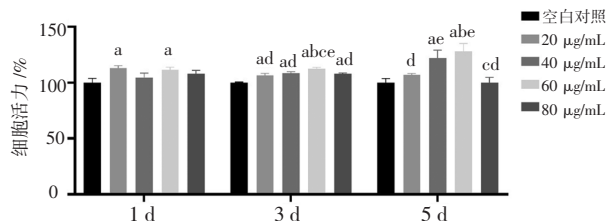
### 2.3 外泌体对 BMSCs 增殖及成骨向分化的影响

本研究使用空白对照、20  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ 、60  $\mu\text{g/mL}$ 、80  $\mu\text{g/mL}$  的 Exos 与 BMSCs 共培养,分别于 1 d、3 d、5 d 用 CCK-8 试剂进行细胞增殖及毒性分析,如图 3A 及表 2 结果

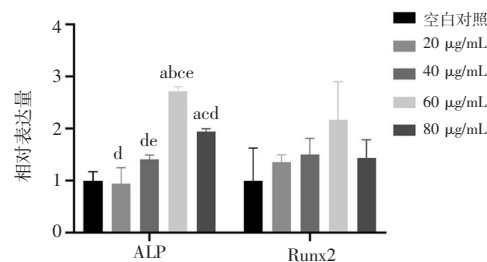
显示,60  $\mu\text{g/mL}$  浓度的外泌体与细胞共培养,在 1 d 时细胞活力为对照组的  $(111.307 \pm 2.452)\%$  ( $P=0.013$ ),3 d 时细胞活力为对照组的  $(112.380 \pm 1.277)\%$  ( $P=0.000$ ),5 d 时细胞活力为对照组的  $(127.782 \pm 7.184)\%$  ( $P=0.001$ ),表明该浓度 Exos 具有一定的促 BMSCs 增殖的作用。

以同样的分组及方法将 Exos 与 BMSCs 共培养 5 d 后进行 RT-qPCR 实验检测成骨早期标志物 ALP 及 Runx2 基因的表达,如图 3B 及表 3 结果显示,60  $\mu\text{g/mL}$  浓度的外泌体与细胞共培养,5 d 后 ALP 基因的表达为对照组的  $(2.715 \pm 0.095)$  倍 ( $P=0.003$ ),且与其他浓度的基因表达差异均具有统计学意义;Runx2 基因的表达为对照组的  $(2.175 \pm 0.731)$  倍 ( $P=0.140$ ),因组内差异均较大,虽 60  $\mu\text{g/mL}$  浓度的表达结果升高趋势最明显,但各浓度组间差异无统计学意义。

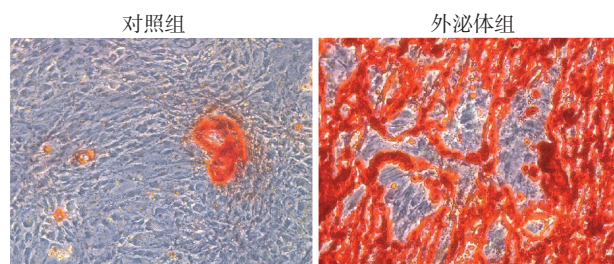
综合 Exos 对 BMSCs 增殖及成骨向分化的影响结果,选择 60  $\mu\text{g/mL}$  为最佳外泌体浓度,进行 21 d 的诱导后茜素红染色观察成骨效果,如图 3C 结果显示,对照组仅有少量的结节形成,而外泌体组可见大量红染区域,即表明细胞间产生了大量钙结节,与茜素红螯合形成了红色或橘红色复合物,证明 HucMSCs 来源的 Exos 具有一定的促进 BMSCs 成骨向分化的作用。



A. 不同浓度外泌体对 BMSCs 增殖的影响



B. 不同浓度外泌体对 BMSCs 成骨向分化基因表达的影响

C. 茜素红染色 (100 $\times$ )

注:a,与对照组相比, $P<0.05$ ;b,与 20  $\mu\text{g/mL}$  组相比, $P<0.05$ ;c,与 40  $\mu\text{g/mL}$  组相比, $P<0.05$ ;d,与 60  $\mu\text{g/mL}$  组相比, $P<0.05$ ;e,与 80  $\mu\text{g/mL}$  组相比, $P<0.05$

图 3 不同浓度外泌体对 BMSCs 增殖及成骨向分化的影响

表 2 CCK-8 测定不同浓度外泌体对 BMSCs 增殖能力的影响  
(%; $\bar{x} \pm s$ ;  $n=3$ )

| 组别                    | 1 d                              | 3 d                                | 5 d                                |
|-----------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 对照组                   | 100.000 $\pm$ 3.753              | 100.000 $\pm$ 0.518                | 100.000 $\pm$ 3.677                |
| 20 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 112.822 $\pm$ 2.348 <sup>a</sup> | 106.473 $\pm$ 1.805 <sup>ad</sup>  | 106.766 $\pm$ 1.384 <sup>d</sup>   |
| 40 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 104.735 $\pm$ 3.875              | 108.620 $\pm$ 1.168 <sup>ad</sup>  | 121.932 $\pm$ 7.103 <sup>ae</sup>  |
| 60 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 111.307 $\pm$ 2.452 <sup>a</sup> | 112.380 $\pm$ 1.277 <sup>abc</sup> | 127.782 $\pm$ 7.184 <sup>abc</sup> |
| 80 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 107.955 $\pm$ 3.016              | 108.019 $\pm$ 0.727 <sup>ad</sup>  | 100.049 $\pm$ 4.612 <sup>cd</sup>  |
| F 值                   | 8.064                            | 43.527                             | 17.822                             |
| P 值                   | 0.004                            | 0.000                              | 0.000                              |

注:a,与对照组相比较, $P<0.05$ ;b,与 20  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$ ;c,与 40  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$ ;d,与 60  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$ ;e,与 80  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$

表 3 RT-qPCR 测定不同浓度外泌体对 BMSCs 成骨向分化能力的影响 (倍; $\bar{x} \pm s$ ;  $n=3$ )

| 组别                    | ALP                              | Runx2             |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------|
| 对照组                   | 1.000 $\pm$ 0.176                | 1.000 $\pm$ 0.630 |
| 20 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 0.946 $\pm$ 0.305 <sup>d</sup>   | 1.358 $\pm$ 0.141 |
| 40 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 1.411 $\pm$ 0.084 <sup>ab</sup>  | 1.504 $\pm$ 0.311 |
| 60 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 2.715 $\pm$ 0.095 <sup>abc</sup> | 2.175 $\pm$ 0.731 |
| 80 $\mu\text{g/mL}$ 组 | 1.937 $\pm$ 0.064 <sup>acd</sup> | 1.436 $\pm$ 0.353 |
| F 值                   | 56.956                           | 2.335             |
| P 值                   | 0.000                            | 0.126             |

注:a,与对照组相比较, $P<0.05$ ;b,与 20  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$ ;c,与 40  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$ ;d,与 60  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$ ;e,与 80  $\mu\text{g/mL}$  组相比较, $P<0.05$

## 2.4 外泌体对骨质疏松大鼠颅骨缺损的修复作用

本研究采用卵巢切除术(ovariectomy, OVX)诱导的骨质疏松 SD 大鼠建立颅骨缺损模型来评价人脐带 MSCs 来源外泌体对骨质疏松骨缺损的修复作用。micro-CT 的 3D 重建结果(图 4A)显示,对照组的骨缺损愈合明显不足,而 Exos 组出现了明显的愈合增加。骨量分析结果(图 4B,表 4)显示,Exos 组的新生骨组织比例大于对照组( $P=0.008$ ),新生成的骨小梁数目更多( $P=0.014$ ),骨小梁厚度更高( $P=0.005$ ),且骨小梁间隙更小( $P=0.022$ )。表明 Exos 组相较于对照组,缺损处新生成的骨量更多,骨质更佳,骨小梁结构排列更紧密。组织学 HE 染色结果(图 4C)显示,在骨质疏松状态下,对照组表现为缺损处大量的纤维结缔组织增生及炎性细胞浸润,而 Exos 组可以观察到大量的新生骨,虽与周围原始骨层相比,厚度稍微不足,但其内部骨质较为致密,呈板层样,有均匀的骨基质和骨陷窝,结构完整,层次清晰,表明 HucMSCs 来源外泌体具有修复骨质疏松骨缺损的良好作用。

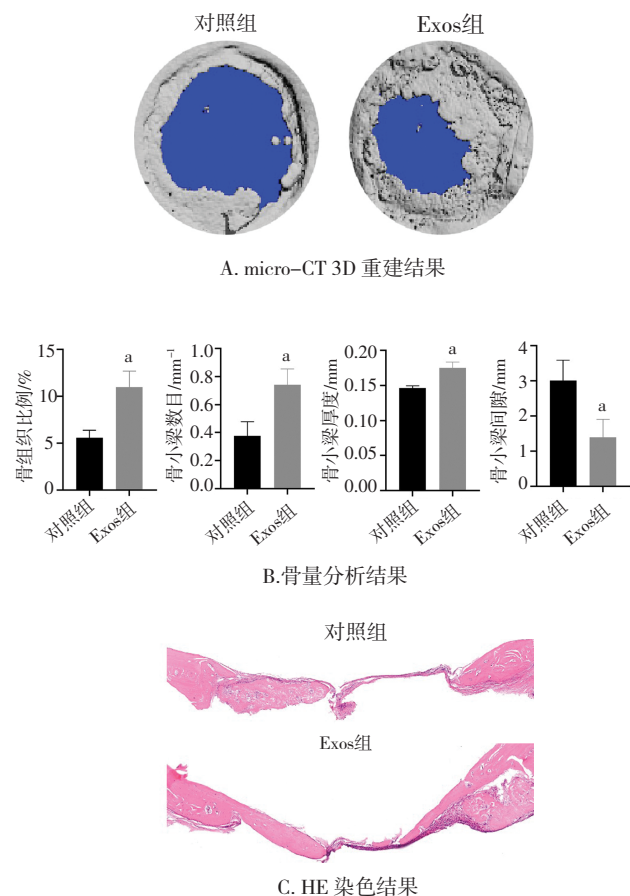


图 4 HucMSCs 来源外泌体对骨质疏松骨缺损的修复作用

表 4 对照组和 Exos 组 micro-CT 骨量分析结果 ( $\bar{x} \pm s$ ;  $n=3$ )

| 组别     | 骨组织比例<br>/%                     | 骨小梁数目<br>/mm                   | 骨小梁厚度<br>/mm                   | 骨小梁间隙<br>/mm                   |
|--------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照组    | 5.570 $\pm$ 0.823               | 0.375 $\pm$ 0.103              | 0.146 $\pm$ 0.003              | 3.016 $\pm$ 0.576              |
| Exos 组 | 11.000 $\pm$ 1.708 <sup>a</sup> | 0.742 $\pm$ 0.112 <sup>a</sup> | 0.175 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup> | 1.402 $\pm$ 0.507 <sup>a</sup> |
| t 值    | 4.959                           | 4.185                          | 5.619                          | 3.643                          |
| P 值    | 0.008                           | 0.014                          | 0.005                          | 0.022                          |

注:a,与对照组相比较, $P<0.05$

## 3 讨论

骨质疏松症是一种以骨重建平衡破坏导致的骨量进行性丢失和微结构退化为特征的骨骼疾病,可导致骨骼脆性增加和对骨折的易感性<sup>[8]</sup>,特别是在老年人和雌激素分泌减少的绝经后妇女中多发。临床上治疗骨质疏松的药物主要有雌激素类、降钙素类、甲状旁腺激素类、双膦酸盐类、地诺单抗等,但存在可能导致心血管事件、增加患癌风险、引起颌骨骨坏死及不典型股骨骨折等副作用<sup>[9]</sup>;对于骨质疏松患者骨缺损及骨折的手术治疗,主要是自体骨移植、同种异体骨移植、生物材料等,也存在骨量

有限、潜在疾病传播风险、排斥反应、术后骨愈合不良等难题<sup>[10]</sup>。

利用干细胞来修复组织的损伤,一直以来都是骨再生领域研究的热点方向之一。人脐带间充质干细胞是再生医学中非常有前途的干细胞群体,与成人组织和新生儿其他组织中能获得的间充质干细胞相比,可无伤获得,且具有更强的增殖能力和更低的免疫原性<sup>[11]</sup>。有研究证实,外泌体移植具有与直接移植干细胞相似的治疗效果和功能特性,且不良反应更少<sup>[12]</sup>。间充质干细胞外泌体具有调节免疫细胞的表型、功能和归巢的作用,能减轻自身免疫性及治疗炎症性疾病<sup>[13]</sup>;还可以促进组织再生中的血管生成、增殖和迁移,并促进骨折的愈合<sup>[14]</sup>。但外泌体的给药剂量及频率在各个文献中尚未统一,本研究拟通过梯度的外泌体浓度设置,进行增殖和成骨向分化检测。ALP 是一种在哺乳动物组织中广泛表达的同工酶,可水解磷酸盐和焦磷酸盐,消除其对骨形成的抑制作用,有利于进一步的骨形成。在成骨分化早期,ALP 的活性可以指示成骨细胞的分化程度,并作为评价成骨细胞矿化能力的指标之一<sup>[15]</sup>。Runx2 的表达是成骨细胞分化的开始。它可以启动和激活骨髓基质干细胞向成骨细胞的分化,Runx2 也是早期成骨分化的常用检测指标之一<sup>[16]</sup>。

本研究结果显示,60  $\mu\text{g/mL}$  的外泌体浓度具有较强的促 BMSCs 增殖活性作用,并增强 ALP 及 Runx2 的表达,具有早期成骨向分化能力。在细胞成骨分化的后期会出现钙沉积,产生矿化结节,茜素红染色结果显示 Exos 处理后生成的矿化结节面积更大。且在 OVX 诱导的骨质疏松 SD 大鼠颅骨缺损模型修复中,Exos 组相对于对照组出现了明显的骨愈合增加,骨量分析结果显示 Exos 组缺损处新生成的骨量更多,骨质更佳,骨小梁结构排列更紧密。组织学结果显示新生骨的结构完整、层次清晰,为致密的板层样骨,有均匀的骨基质和骨陷窝。

综上所述,HucMSCs 来源的外泌体能够促进 BMSCs 的增殖活性及成骨向分化,具有修复骨质疏松骨缺损的能力,为临床治疗提供了新的方向和思路,但其详细的潜在机制还不清楚,需要进一步研究及探讨。

## 参 考 文 献

[1] Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures[J]. Osteoporos Int, 2006, 17(12): 1726–1733.

- [2] Yu B, Wang CY. Osteoporosis: the result of an ‘aged’ bone microenvironment[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(8): 641–644.
- [3] 韩宁宁, 左进富, 孙 森, 等. 脐带间充质干细胞在骨组织工程中的应用与进展[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(13): 2079–2086.
- Han NN, Zuo JF, Sun M, et al. Application and progress of umbilical cord mesenchymal stem cells in bone tissue engineering[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(13): 2079–2086.
- [4] Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(1): 11–15.
- [5] 高方园, 焦丰龙, 张养军, 等. 外泌体分离技术及其临床应用研究进展[J]. 色谱, 2019, 37(10): 1071–1083.
- Gao FY, Jiao FL, Zhang YJ, et al. Advances in separation techniques for exosomes and their clinical applications[J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(10): 1071–1083.
- [6] Milane L, Singh A, Matheolabakis G, et al. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment[J]. J Control Release, 2015, 219: 278–294.
- [7] 张 静, 易阳艳, 阳水发, 等. 脂肪干细胞来源外泌体对人脐静脉血管内皮细胞增殖、迁移及管样分化的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(10): 1351–1357.
- Zhang J, Yi YY, Yang SF, et al. Effects of adipose-derived stem cell released exosomes on proliferation, migration, and tube-like differentiation of human umbilical vein endothelial cells[J]. Chin J Reparative Reconstr Surg, 2018, 32(10): 1351–1357.
- [8] 马远征, 王以朋, 刘 强, 等. 中国老年骨质疏松诊疗指南(2018)[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(11): 2557–2575.
- Ma YZ, Wang YP, Liu Q, et al. 2018 China guideline for the diagnosis and treatment of senile osteoporosis[J]. Chin J Gerontol, 2019, 39(11): 2557–2575.
- [9] Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017, 5(11): 898–907.
- [10] Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, et al. Bone regeneration: current concepts and future directions[J]. BMC Med, 2011, 9: 66.
- [11] Hass R, Kasper C, Böhm S, et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC[J]. Cell Commun Signal, 2011, 9: 12.
- [12] Liu W, Li LW, Rong YL, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126[J]. Acta Biomater, 2020, 103: 196–212.
- [13] Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and other extracellular vesicles as new remedies in the therapy of inflammatory diseases[J]. Cells, 2019, 8(12): E1605.
- [14] Zhang YT, Xie Y, Hao ZC, et al. Umbilical mesenchymal stem cell-derived exosome-encapsulated hydrogels accelerate bone repair by enhancing angiogenesis[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(16): 18472–18487.
- [15] Park CS, Ha TH, Kim M, et al. Fast and sensitive near-infrared fluorescent probes for ALP detection and 3d printed calcium phosphate scaffold imaging *in vivo*[J]. Biosens Bioelectron, 2018, 105: 151–158.
- [16] Wei JW, Shimazu J, Makinistoglu MP, et al. Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation[J]. Cell, 2015, 161(7): 1576–1591.

(责任编辑:唐秋姗)