

· 基础研究 ·

神经生长因子过表达的人脐带血间充质干细胞来源 外泌体修复大鼠坐骨神经慢性压迫损伤的效果 及作用机制研究

郑良良, 张弛

(金华市中心医院, 浙江 金华 321000)

摘要 目的:探讨神经生长因子(nerve growth factor, NGF)过表达的人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)来源外泌体(exosome, Exo)修复大鼠坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury, CCI)的效果及作用机制。**方法:**①取培养至第2代的hUCB-MSCs, 采用流式细胞仪对其进行鉴定。②根据NGF基因序列, 构建NGF过表达的慢病毒载体, 包装后转染hUCB-MSCs, 并测定hUCB-MSCs转染率。③采用超速离心法提取NGF过表达的hUCB-MSCs来源Exo(NGF-hUCB-MSCs-Exo), 进行Exo形态及标志蛋白的鉴定。④采用不同的荧光染色试剂分别对hUCB-MSCs细胞核、细胞骨架及NGF-hUCB-MSCs-Exo进行染色, 在荧光显微镜下观察hUCB-MSCs摄取内化NGF-hUCB-MSCs-Exo。⑤从20只雄性Sprague Dawley大鼠中选取15只, 采用手术建立坐骨神经CCI模型, 分别于术后第1天、第3天、第5天、第7天采用IITC动物热痛刺激仪测定大鼠机械刺激缩足反射阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)和热刺激缩足反射潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL), 评价造模是否成功。⑥分别采用空载体慢病毒和NGF过表达慢病毒转染hUCB-MSCs, 制备空载体慢病毒转染hUCB-MSCs来源Exo(hUCB-MSCs-Exo)和NGF-hUCB-MSCs-Exo。将15只坐骨神经CCI模型大鼠随机分为坐骨神经CCI模型组、hUCB-MSCs-Exo注射组和NGF-hUCB-MSCs-Exo注射组, 每组5只; 将剩余5只正常大鼠纳入正常对照组。正常对照组大鼠不做任何处理, 坐骨神经CCI模型组大鼠于尾静脉注射1 mL PBS, hUCB-MSCs-Exo注射组大鼠于尾静脉注射1 mL hUCB-MSCs-Exo和hUCB-MSCs混合液, NGF-hUCB-MSCs-Exo注射组大鼠于尾静脉注射1 mL NGF-hUCB-MSCs-Exo与hUCB-MSCs混合液, 每周注射1次, 连续注射3周。3周后处死大鼠, 取L₄~L₅制备冷冻切片, 进行HE染色, 采用Allen脊髓后角灰质病变评分标准评价脊髓后角灰质的病理变化; 进行TUNEL染色, 于显微镜下观察, 评价L₄~L₅脊髓组织的细胞凋亡情况; 提取大鼠脊髓组织总蛋白, 采用蛋白印迹法检测大鼠脊髓组织中NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、白细胞介素(interleukin, IL)-1、兔抗鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)-1和Caspase-3的蛋白表达量。**结果:**①hUCB-MSCs鉴定结果。流式细胞仪检测第2代hUCB-MSCs, CD34阳性率0.4%, CD45阳性率0.6%, CD90阳性率95.8%, CD105阳性率98.3%, 符合hUCB-MSCs表面蛋白表达特征。②重组慢病毒转染结果。重组慢病毒转染72 h, hUCB-MSCs转染率(89.22±6.91)%。③NGF-hUCB-MSCs-Exo鉴定结果。透射电子显微镜结果显示, NGF-hUCB-MSCs-Exo为杯口状结构。蛋白印迹法检测结果显示, NGF-hUCB-MSCs-Exo标志蛋白CD63、CD9和CD81表达量高于hUCB-MSCs, 表明Exo提取成功。④hUCB-MSCs摄取内化NGF-hUCB-MSCs-Exo观察结果。hUCB-MSCs与NGF-hUCB-MSCs-Exo共培养12 h后, 观察到hUCB-MSCs摄取并内化NGF-hUCB-MSCs-Exo。⑤坐骨神经CCI模型建立结果。术后第1天、第3天、第5天、第7天, 坐骨神经CCI模型大鼠的PWMT和PWTL均低于正常大鼠[PWMT: (3.05±0.06)g, (7.34±0.08)g, $t=3.903$, $P=0.000$; (3.07±0.04)g, (7.39±0.06)g, $t=3.342$, $P=0.001$; (3.11±0.05)g, (7.47±0.04)g, $t=3.892$, $P=0.000$; (2.89±0.02)g, (7.56±0.09)g, $t=4.903$, $P=0.000$; PWTL: (6.13±0.03)s, (18.12±0.45)s, $t=3.562$, $P=0.000$; (6.07±0.05)s, (18.09±0.36)s, $t=3.769$, $P=0.000$; (6.01±0.04)s, (18.77±0.44)s, $t=3.809$, $P=0.000$; (5.77±0.09)s, (18.37±0.39)s, $t=4.651$, $P=0.000$], 表明造模成功。⑥病理学检查结果。正常对照组、坐骨神经CCI模型组、hUCB-MSCs-Exo注射组和NGF-hUCB-MSCs-Exo注射组大鼠Allen脊髓后角灰质病变评分比较, 差异有统计学意义[(0.32±0.04)分, (4.21±0.11)分, (4.09±0.15)分, (1.89±0.17)分, $F=11.714$, $P=0.000$]。坐骨神经CCI模型组、hUCB-MSCs-Exo注射组和NGF-hUCB-MSCs-Exo注射组大鼠Allen脊髓后角灰质病变评分均高于正常对照组($q=2.783$, $P=0.015$; $q=3.921$, $P=0.000$; $q=3.784$, $P=0.000$); hUCB-MSCs-Exo注射组和NGF-hUCB-MSCs-Exo注射组大鼠Allen脊髓后角灰质病变评分均低于坐骨神经CCI模型组($q=2.059$, $P=0.024$; $q=2.071$, $P=0.021$); NGF-hUCB-MSCs-Exo注射组大鼠Allen脊髓后角灰质病变评分低于hUCB-MSCs-Exo注射组($q=2.809$, $P=0.013$)。⑦细胞凋亡检测结果。正常对照组、坐骨神经CCI模型组、hUCB-MSCs-Exo注射组和NGF-hUCB-MSCs-Exo注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率比较, 差异有统计学

意义 $[(0.15 \pm 0.02)\%, (8.98 \pm 0.37)\%, (8.14 \pm 0.29)\%, (3.46 \pm 0.31)\%, F = 9.908, P = 0.012]$ 。坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率均高于正常对照组($q = 2.142, P = 0.017; q = 3.287, P = 0.000; q = 2.275, P = 0.025$)；hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率均低于坐骨神经 CCI 模型组($q = 2.021, P = 0.021; q = 2.086, P = 0.024$)；NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率低于 hUCB-MSCs-Exo 注射组($q = 3.008, P = 0.011$)。⑧炎症反应和细胞凋亡相关基因的蛋白表达分析结果。正常对照组、坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义($122.16 \pm 15.23, 764.29 \pm 20.14, 627.86 \pm 21.17, 198.25 \pm 14.37, F = 12.428, P = 0.000; 106.27 \pm 14.11, 698.11 \pm 24.57, 687.45 \pm 22.36, 208.42 \pm 19.79, F = 15.008, P = 0.000; 108.43 \pm 13.79, 305.58 \pm 24.36, 301.25 \pm 27.72, 153.14 \pm 11.99, F = 19.897, P = 0.000; 102.58 \pm 12.17, 725.16 \pm 21.24, 711.32 \pm 20.37, 215.33 \pm 19.27, F = 12.278, P = 0.000$)。坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白表达量均高于正常对照组(坐骨神经 CCI 模型组: $q = 3.709, P = 0.000; q = 3.328, P = 0.000; q = 3.145, P = 0.000; q = 2.974, P = 0.000$; hUCB-MSCs-Exo 注射组: $q = 2.893, P = 0.019; q = 2.944, P = 0.013; q = 3.008, P = 0.009; q = 3.852, P = 0.000$; NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组: $q = 2.428, P = 0.022; q = 4.903, P = 0.000; q = 3.884, P = 0.000; q = 4.382, P = 0.000$)；hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白表达量均低于坐骨神经 CCI 模型组(hUCB-MSCs-Exo 注射组: $q = 3.609, P = 0.000; q = 3.811, P = 0.000; q = 3.476, P = 0.000; q = 3.889, P = 0.000$; NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组: $q = 2.338, P = 0.000; q = 3.098, P = 0.000; q = 2.358, P = 0.000; q = 3.775, P = 0.000$)；NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白表达量均低于 hUCB-MSCs-Exo 注射组($q = 3.798, P = 0.000; q = 3.573, P = 0.000; q = 2.998, P = 0.000; q = 3.208, P = 0.000$)。结论:NGF-hUCB-MSCs-Exo 治疗大鼠坐骨神经 CCI,能够抑制脊髓后角灰质病变和脊髓细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 的表达有关。

关键词 坐骨神经;大鼠;慢性压迫损伤;干细胞;神经生长因子;外泌体;动物实验

Efficacy and mechanism of exosomes derived from nerve growth factor – overexpressing human umbilical cord blood – derived mesenchymal stem cells against chronic constriction injury of sciatic nerve in rats

ZHENG Liangliang, ZHANG Chi

Jinhua Municipal Central Hospital, Jinhua 321000, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects and mechanism of exosome(Exo) derived from nerve growth factor(NGF) – overexpressing (OE) human umbilical cord blood – derived mesenchymal stem cells(hUCB-MSCs) in repairing chronic constriction injury(CCI) of sciatic nerve in rats. **Methods:** ①The second – generation hUCB-MSCs were identified by flow cytometry(FCM). ②According to NGF gene sequence, a NGF – OE lentiviral vector was constructed, packaged and then transfected into hUCB-MSCs, followed by the determination of its transfection rate. ③The NGF – OE hUCB-MSCs – derived Exo(NGF-hUCB-MSCs-Exo) was extracted by ultracentrifugation for identifying its morphology and marker protein. ④The nuclei and cytoskeletons of hUCB-MSCs and NGF-hUCB-MSCs-Exo were stained with different fluorescent dyes and then the uptake and internalization of NGF-hUCB-MSCs-Exo by hUCB-MSCs were observed under a fluorescence microscope. ⑤Among the 20 male Sprague Dawley(SD) rats, 15 ones were selected and subjected to surgery for inducing CCI of sciatic nerve. The paw withdrawal mechanical threshold(PWMT) and paw withdrawal thermal latency(PWTL) were measured on days 1, 3, 5 and 7 after the surgery respectively with a tail flick analgesia meter to evaluate whether the modeling was successful. ⑥The empty vector lentivirus – and NGF – OE lentivirus – transfected hUCB-MSCs were separately used to prepare hUCB-MSCs-Exo and NGF-hUCB-MSCs-Exo. The 15 rats were randomly divided into CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group, 5 cases in each group. The remained 5 normal rats were assigned into the normal control group without any treatment, while those in CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group were injected with PBS(1 mL), a mixture of hUCB-MSCs-Exo and hUCB-MSCs(1 mL) and a mixture of NGF-hUCB-MSCs-Exo and hUCB-MSCs(1 mL) respectively via the tail vein, once a week for consecutive 3 weeks. Afterwards, the rats were sacrificed and sampled from L₄ and L₅ tissues for preparing frozen sections, which were stained with HE and used for evaluating the pathological changes of gray matter of spinal dorsal horn(SDH) based on Allen SDH gray matter lesion scoring criterion. Followed by TUNEL staining, the section were

observed under the microscope for evaluating the apoptosis of L_4 and L_5 myeloid tissue. The total protein was extracted from myeloid tissue of rats, and the protein expression levels of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), interleukin (IL)-1, rabbit anti-mouse cysteine aspartic acid specific protease (Caspase)-1 and Caspase-3 were assayed by Western blotting. **Results:** ①The results of hUCB-MSCs identification. The positive rates of CD34, CD45, CD90 and CD105 in second-generation hUCB-MSCs were 0.4%, 0.6%, 95.8% and 98.3% respectively, which accorded with the surface protein expression characteristics of hUCB-MSCs. ②The results of recombinant lentivirus transfection. The transfection rate of hUCB-MSCs was $89.22 \pm 6.91\%$ after 72-h transfection with recombinant lentivirus. ③The results of NGF-hUCB-MSCs-Exo identification. As demonstrated by transmission electron microscopy, NGF-hUCB-MSCs-Exo exhibited as a cup-like structure. The Western blotting results showed that the expression levels of NGF-hUCB-MSCs-Exo marker proteins CD63, CD9 and CD81 were higher than those of hUCB-MSCs, indicating success in the extraction of Exo. ④The results of uptake and internalization of NGF-hUCB-MSCs-Exo by hUCB-MSCs. NGF-hUCB-MSCs-Exo was taken up and internalized by hUCB-MSCs after hUCB-MSCs were co-cultured with NGF-hUCB-MSCs-Exo for 12 hours. ⑤The results of sciatic nerve CCI modeling. The PWMT and PWTL of sciatic nerve CCI model rats declined as compared with those of the normal rats on days 1, 3, 5 and 7 after the surgery (PWMT: 3.05 ± 0.06 vs 7.34 ± 0.08 g, $t = 3.903$, $P = 0.000$; 3.07 ± 0.04 vs 7.39 ± 0.06 g, $t = 3.342$, $P = 0.001$; 3.11 ± 0.05 vs 7.47 ± 0.04 g, $t = 3.892$, $P = 0.000$; 2.89 ± 0.02 vs 7.56 ± 0.09 g, $t = 4.903$, $P = 0.000$; PWTL: 6.13 ± 0.03 vs 18.12 ± 0.45 seconds, $t = 3.562$, $P = 0.000$; 6.07 ± 0.05 vs 18.09 ± 0.36 seconds, $t = 3.769$, $P = 0.000$; 6.01 ± 0.04 vs 18.77 ± 0.44 seconds, $t = 3.809$, $P = 0.000$; 5.77 ± 0.09 vs 18.37 ± 0.39 seconds, $t = 4.651$, $P = 0.000$), which suggested the models were successfully built. ⑥The results of pathological examination. There was statistical difference in Allen SDH gray matter lesion scores among normal control group, CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group (0.32 ± 0.04 , 4.21 ± 0.11 , 4.09 ± 0.15 , 1.89 ± 0.17 points, $F = 11.714$, $P = 0.000$). The Allen SDH gray matter lesion scores were all higher in CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group compared to normal control group ($q = 2.783$, $P = 0.015$; $q = 3.921$, $P = 0.000$; $q = 3.784$, $P = 0.000$), and were lower in hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group compared to CCI model group ($q = 2.059$, $P = 0.024$; $q = 2.071$, $P = 0.021$); and were lowest in NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group ($q = 2.809$, $P = 0.013$). ⑦The results of apoptosis detection. There was statistical difference in apoptosis rate of the rat myeloid tissue among normal control group, CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group (0.15 ± 0.02 , 8.98 ± 0.37 , 8.14 ± 0.29 , $3.46 \pm 0.31\%$, $F = 9.908$, $P = 0.012$). The apoptosis rate of rat myeloid tissue were all higher in CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group compared to normal control group ($q = 2.142$, $P = 0.017$; $q = 3.287$, $P = 0.000$; $q = 2.275$, $P = 0.025$), and were lower in hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group compared to CCI model group ($q = 2.021$, $P = 0.021$; $q = 2.086$, $P = 0.024$); and was lowest in NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group ($q = 3.008$, $P = 0.011$). ⑧The results of analysis on protein expression of genes related to inflammation and apoptosis. There was statistical difference in the protein expression levels of NLRP3, IL-1 β , Caspase-1 and Caspase-3 in myeloid tissue of rats among normal control group, CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group (122.16 ± 15.23 , 764.29 ± 20.14 , 627.86 ± 21.17 , 198.25 ± 14.37 , $F = 12.428$, $P = 0.000$; 106.27 ± 14.11 , 698.11 ± 24.57 , 687.45 ± 22.36 , 208.42 ± 19.79 , $F = 15.008$, $P = 0.000$; 108.43 ± 13.79 , 305.58 ± 24.36 , 301.25 ± 27.72 , 153.14 ± 11.99 , $F = 19.897$, $P = 0.000$; 102.58 ± 12.17 , 725.16 ± 21.24 , 711.32 ± 20.37 , 215.33 ± 19.27 , $F = 12.278$, $P = 0.000$). The protein expression levels of NLRP3, IL-1 β , Caspase-1 and Caspase-3 in myeloid tissues of rats were all higher in CCI model group, hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group compared to normal control group (CCI model group: $q = 3.709$, $P = 0.000$; $q = 3.328$, $P = 0.000$; $q = 3.145$, $P = 0.000$; $q = 2.974$, $P = 0.000$; hUCB-MSCs-Exo injection group: $q = 2.893$, $P = 0.019$; $q = 2.944$, $P = 0.013$; $q = 3.008$, $P = 0.009$; $q = 3.852$, $P = 0.000$; NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group: $q = 2.428$, $P = 0.022$; $q = 4.903$, $P = 0.000$; $q = 3.884$, $P = 0.000$; $q = 4.382$, $P = 0.000$); and were lower in hUCB-MSCs-Exo injection group and NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group compared to CCI model group (hUCB-MSCs-Exo injection group: $q = 3.609$, $P = 0.000$; $q = 3.811$, $P = 0.000$; $q = 3.476$, $P = 0.000$; $q = 3.889$, $P = 0.000$; NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group: $q = 2.338$, $P = 0.000$; $q = 3.098$, $P = 0.000$; $q = 2.358$, $P = 0.000$; $q = 3.775$, $P = 0.000$); and were lowest in NGF-hUCB-MSCs-Exo injection group ($q = 3.798$, $P = 0.000$; $q = 3.573$, $P = 0.000$; $q = 2.998$, $P = 0.000$; $q = 3.208$, $P = 0.000$). **Conclusion:** NGF-hUCB-MSCs-Exo can inhibit SDH gray matter lesion and apoptosis in repairing CCI of sciatic nerve in rats, its mechanisms may be that it can inhibit the expression of NLRP3, IL-1 β , Caspase-1 and Caspase-3.

Keywords sciatic nerve; rats; chronic constriction injury; stem cells; nerve growth factor; exosomes; animal experimentation

神经损伤包括中枢神经损伤和外周神经损伤,坐骨神经损伤是常见的外周神经损伤,多由慢性疾病导致^[1-2]。神经损伤的修复始终是临床上的热点和难点问题。目前,临床常采用电疗法、营养神经药物治疗及干细胞移植疗法等^[3-4]。干细胞具有多向分化潜能,如人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)可以分化为脂肪细胞和神经细胞等^[5-6]。但干细胞易老化且分化方向不易控制,限制了干细胞在神经损伤修复中的广泛应用^[7-8]。外泌体(exosome, Exo)是一类由细胞分泌的具有双层磷脂结构的囊泡,其携带大量遗传物质,能够通过膜融合和胞吞的方式,将遗传信息传递至受体细胞中,影响受体细胞的增殖、分化^[9-12]。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是由神经元分泌的重要生长因子,能够促进神经元增殖和分化。研究表明,NGF能够促进骨髓间充质干细胞向神经元分化,具有保护神经胶质细胞的作用^[13]。为了探究 NGF 过表达的 hUCB-MSCs 来源 Exo (NGF-hUCB-MSCs-Exo)修复大鼠坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury, CCI)的效果及作用机制,我们围绕 NGF-hUCB-MSCs-Exo 开展了相关的实验研究,现总结报告如下。

1 材料和仪器

1.1 实验材料 hUCB-MSCs(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所)。雄性 Sprague Dawley 大鼠(浙江中医药大学实验动物中心),均为无特定病原体动物,年龄(3.46 ± 0.12)周,体质量(255 ± 32)g,实验动物许可证:SYXK(浙)2019-0024。实验方案经金华市中心医院医学动物实验伦理委员会审查通过。

1.2 实验试剂 胎牛血清和 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),非特异性兔抗鼠 CD34、CD45、CD90 和 CD105 一抗(英国 Abcam 公司),荧光素标记整合素 avb3 抗体免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)G、多聚甲醛、磷酸钨酸溶液、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 二抗、罗丹明标记鬼笔环肽、水合氯醛、增强型 DAB 显色试剂盒(北京伊塔生物科技有限公司),基因合成引物、重组慢病毒载体由上海吉凯基因生物科技有限公司制备,放射免疫沉淀法(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液(上海梵态生物科技有限公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定

试剂盒(上海吉至生化科技有限公司),兔抗鼠 CD63、CD9、CD81、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、NOD 样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)、白细胞介素(interleukin, IL)-1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)-1、Caspase-3 和 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(英国 Abcam 公司),SuperSignal™ West Femto 最大灵敏度底物(上海研卉生物科技有限公司),PKH67 荧光探针细胞膜染色试剂盒(上海西格生物科技有限公司),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液、末端脱氧核苷酸转移酶、生物素化鼠抗地高辛(北京百奥莱博科技有限公司),抗荧光淬灭剂(北京雷根生物技术有限公司),4.0 铬制羊肠线(上海金环生物有限公司),苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、蛋白酶 K(北京索莱宝科技有限公司),ECL 化学发光试剂盒(北京碧云天试剂公司)。

1.3 实验仪器 流式细胞仪(美国 NovoCyte 公司),倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司),透射电子显微镜(北京欧波同光学技术有限公司),凝胶成像分析系统(杭州申花科技有限公司),IITC 动物热痛刺激仪(美国 IITC 公司)。

2 方法

2.1 hUCB-MSCs 的鉴定 取第 2 代 hUCB-MSCs 接种于 25 mL 培养瓶中。待细胞汇合率达到 80%~90%时,向培养瓶中加入 1 mL 胰蛋白酶溶液(0.25%),消化 1~2 min 后,加入 1 mL 含胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化反应。轻轻吹打悬浮细胞后,转入 5 mL 的无菌离心管,以 $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径:5 cm)离心 8 min。去上清, PBS 洗涤 2 次,用含胎牛血清的 DMEM 培养液进行重悬,调整细胞浓度至 $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取 100 μL 细胞液至 EP 管,依次加入非特异性兔抗鼠 CD34、CD45、CD90 和 CD105 一抗(稀释比例为 1:5000)各 100 μL ,于室温避光孵育 35 min,以 $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径:5 cm)离心 8 min。去上清, PBS 洗涤 2 次,加入 500 μL PBS 悬浮。加入 20 μL 荧光素标记整合素 avb3 抗体 IgG,常温下避光孵育 30 min, $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径:5 cm)离心 8 min,去上清, PBS 洗涤 3 次。以 PBS 悬浮细胞,加入 500 μL 1% 多聚甲醛溶液,加入

流式管中,采用流式细胞仪检测 hUCB - MSCs 的表面蛋白 CD34、CD45、CD90 和 CD105 的表达。

2.2 重组慢病毒的构建与转染

2.2.1 NGF 过表达慢病毒载体的构建 根据 NGF 基因序列(5' - TGGCTGGTCCT - 3')设计 NGF 基因合成引物:正义链为 5' - ACCTGCCATTGCCT - 3',反义链为 5' - TTGCTAGTGCCTCGA - 3'。采用 LV3 载体构建 NGF 过表达慢病毒载体,并进行慢病毒包装。

2.2.2 重组慢病毒的转染 取 2 mL 培养至第 2 代的 hUCB - MSCs 接种于 6 孔板中,于温度 37 ℃、CO₂ 浓度 5% 的细胞培养箱中培养。待细胞汇合率达 50% 时,根据慢病毒转染说明书进行慢病毒转染,感染复数为 50,慢病毒滴度为 3.0×10^7 转导单位(transducing units, TU) · mL⁻¹。转染 72 h 后,于倒置荧光显微镜下观察并测定 hUCB - MSCs 转染率,随机选择 5 个区域,统计细胞数量。hUCB - MSCs 转染率 = 荧光视野细胞数/白光视野细胞数 × 100%。

2.3 NGF - hUCB - MSCs - Exo 的提取和鉴定

2.3.1 NGF - hUCB - MSCs - Exo 的提取 重组慢病毒转染 72 h,弃去培养基,PBS 洗涤 3 次,加入 2 mL DMEM 培养基,于温度 37 ℃、CO₂ 浓度 5% 的细胞培养箱中孵育 48 h。收集培养液,于 4 ℃ 条件下以 300 r · min⁻¹ (离心半径:5 cm) 离心 10 min;转移上清于离心管,于 4 ℃ 条件下以 2000 r · min⁻¹ (离心半径:5 cm) 离心 20 min;取上清,经 0.22 μm 过滤器过滤后转移至离心管中,于 4 ℃ 条件下以 10 000 r · min⁻¹ (离心半径:5 cm) 离心 70 min;取沉淀,PBS 洗涤 1 次,于 4 ℃ 条件下以 10 000 r · min⁻¹ (离心半径:5 cm) 离心 70 min;小心弃去上清,即得到 NGF - hUCB - MSCs - Exo 沉淀,于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

2.3.2 NGF - hUCB - MSCs - Exo 形态的鉴定 在 NGF - hUCB - MSCs - Exo 沉淀中加入 100 μL PBS 重新悬浮 NGF - hUCB - MSCs - Exo,取 30 μL NGF - hUCB - MSCs - Exo 悬液,置于载样铜网上,室温下静置 3 min,加入 30 μL 磷钨酸溶液(3%)进行染色,5 min 后弃去染色液,室温下静置至铜网干燥,采用透射电子显微镜观察 NGF - hUCB - MSCs - Exo 形态。

2.3.3 NGF - hUCB - MSCs - Exo 标志蛋白的鉴定 分别取一定量的 hUCB - MSCs 悬液和 NGF - hUCB - MSCs - Exo 悬液于 EP 管,置于冰上预冷,采用 RIPA

裂解液分别提取 hUCB - MSCs 和 NGF - hUCB - MSCs - Exo 总蛋白。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,调整蛋白上样量为 30 μg,采用 SDS - PAGE 分离蛋白。电泳结束后,采用电转移的方式将凝胶上的蛋白转到聚偏氟乙烯膜。将膜浸入封闭液中,在室温下于摇床上封闭 2 h;加入兔抗鼠 CD63、CD9、CD81 和 GAPDH 一抗(稀释比例为 1:10000),4 ℃ 过夜孵育;用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min;加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(稀释比例为 1:2000),室温避光孵育 10 min;用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min;加入 SuperSignalTM West Femto 最大灵敏度底物,于凝胶成像分析系统显影并拍照。

2.4 hUCB - MSCs 摄取内化 NGF - hUCB - MSCs - Exo 的观察

在 NGF - hUCB - MSCs - Exo 沉淀中加入 100 μL PBS 重新悬浮 NGF - hUCB - MSCs - Exo,加入 4 μL PKH67 荧光探针溶液,于室温下孵育 10 min;加入 1 mL 的 10% BSA 溶液,采用超速离心法收集 PKH67 标记的 NGF - hUCB - MSCs - Exo 以备用。将 hUCB - MSCs 分为对照组和实验组,分别接种于预先铺有盖玻片的 24 孔板中,每孔接种 300 μL 细胞液(细胞浓度约 1.0×10^6 个 · mL⁻¹),每组接种 3 个复孔。待贴壁细胞占爬片面积的 60% 以上,弃去培养基,PBS 洗涤 3 次。实验组中加入 100 μL PKH67 标记的 NGF - hUCB - MSCs - Exo 混悬液,对照组加入 100 μL PBS,置于温度为 37 ℃、CO₂ 浓度 5% 的细胞培养箱中孵育 12 h。孵育后加入 10 μL 的鬼笔环肽,室温下避光孵育 20 min,弃去染色剂,PBS 洗涤 3 次,使用 4% 的多聚甲醛溶液固定 30 min;再加入适量的 DAPI 染色液,室温下避光孵育 15 min;PBS 洗涤 3 次;加入抗荧光淬灭剂,指甲油封片,于荧光显微镜下观察。

2.5 NGF - hUCB - MSCs - Exo 修复大鼠坐骨神经 CCI 的观察

2.5.1 造模及模型鉴定方法 取大鼠 20 只,随机取 15 只构建坐骨神经 CCI 模型,另外 5 只不做处理。于大鼠腹腔注射 3% 水合氯醛麻醉,用量 0.4 mL · kg⁻¹。麻醉后于右下肢背侧做 2 cm 纵形切口,逐层切开皮肤、皮下组织,钝性分离股二头肌,暴露坐骨神经主干。采用 4.0 铬制羊肠线环扎坐骨神经,环绕 4 圈,每圈间距 1 mm,松紧度以单环恰可上下活动为度;注意保护神经外膜血供。碘伏消毒,逐层缝合切口。分

别于术后第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天采用 IITC 动物热痛刺激仪测定大鼠机械刺激缩足反射阈值 (paw withdrawal mechanical threshold, PWMT) 和热刺激缩足反射潜伏期 (paw withdrawal thermal latency, PWTL)。

2.5.2 Exo 与 hUCB - MSCs 混合液的制备方法 根据方法 2.2 分别采用空载体慢病毒和重组慢病毒转染 hUCB - MSCs, 并制备空载体慢病毒转染 hUCB - MSCs 来源 Exo (hUCB - MSCs - Exo) 和 NGF - hUCB - MSCs - Exo。取 100 μL hUCB - MSCs - Exo 和 100 μL NGF - hUCB - MSCs - Exo 分别与 900 μL DMEM 培养基混匀, 分别加入至 1 mL hUCB - MSCs (细胞浓度 1.0×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$), 制成 Exo 与 hUCB - MSCs 混合液。

2.5.3 干预方法 造模成功后, 取未做处理的 5 只大鼠为正常对照组, 不做任何处理; 将 15 只坐骨神经 CCI 模型大鼠随机分为坐骨神经 CCI 模型组、hUCB - MSCs - Exo 注射组和 NGF - hUCB - MSCs - Exo 注射组。坐骨神经 CCI 模型组大鼠于尾静脉注射 1 mL PBS, hUCB - MSCs - Exo 注射组大鼠于尾静脉注射 1 mL hUCB - MSCs - Exo 和 hUCB - MSCs 混合液, NGF - hUCB - MSCs - Exo 注射组大鼠于尾静脉注射 1 mL NGF - hUCB - MSCs - Exo 与 hUCB - MSCs 混合液。每周注射 1 次, 连续注射 3 周。将所有大鼠于温度 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50% ~ 65% 条件下正常饲养。

2.6 NGF - hUCB - MSCs - Exo 修复大鼠坐骨神经 CCI 的效果评价

2.6.1 病理学检查方法 3 周后处死大鼠, 取 $L_4 \sim L_5$ 制备冷冻切片, 切片厚度 8 μm , 采用 HE 染色试剂盒进行染色, 于显微镜下观察脊髓后角灰质的病理变化。采用 Allen 脊髓后角灰质病变评分标准^[14]进行评分: 0 分, 未观察到病变; 1 分, 灰质中含有 1 ~ 5 个嗜酸性神经元; 2 分, 灰质中含有 6 ~ 10 个嗜酸性神经元; 3 分, 灰质中含有 10 个以上嗜酸性神经元; 4 分, 灰质梗死灶面积 < 灰质面积的 1/3; 5 分, 灰质面积的 $1/3 \leq$ 灰质梗死灶面积 < 灰质面积的 1/2; 6 分, 灰质梗死灶面积 \geq 灰质面积的 1/2。

2.6.2 细胞凋亡检测方法 采用 TUNEL 染色法评估 $L_4 \sim L_5$ 脊髓组织的细胞凋亡情况。取 $L_4 \sim L_5$ 制备冷冻切片, 放置于载玻片, 采用 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入一定量的含有 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K 溶液, 于室温下孵育 15 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。加入 3% H_2O_2 溶

液孵育 5 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。再加入末端脱氧核苷酸转移酶缓冲液孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。再加入生物素化鼠抗地高辛溶液孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。采用增强型 DAB 显色试剂盒显色。于显微镜下观察, 随机选择 5 个区域, 统计细胞总数及凋亡细胞数量。细胞凋亡率 = 凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

2.6.3 炎症反应和细胞凋亡相关基因的蛋白表达分析方法 收集各组大鼠脊髓组织各 1 mg, 分别加入 1 mL RIPA 裂解液, 于冰上裂解 30 min。转移至 1.5 mL 离心管, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径: 10 cm) 离心 5 min; 取上清, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (离心半径: 10 cm) 离心 10 min; 取沉淀, 加入 100 μL PBS 重悬后, 取 1 μL 重悬液测定蛋白浓度, 剩余加入上样缓冲液, 采用 SDS - PAGE 分离蛋白。将凝胶上的蛋白转移至聚偏氟乙烯膜, 加入 2 mL 5% 脱脂奶粉溶液封闭 30 min, 分别加入 100 μL 兔抗鼠 NLRP3、IL - 1 β 、Caspase - 1、Caspase - 3 和 β - actin 一抗稀释液 (稀释比例 1:10 000) 于封闭液中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜。PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。将 ECL 化学发光试剂盒中的 A 液和 B 液等比例混合后, 加在膜上进行显色。拍照后采用 Image - J 图像处理软件处理图片, 提取蛋白条带灰度值, 比较蛋白表达水平。

2.7 数据统计 采用 SPSS16.0 统计软件对所得数据进行统计学分析。坐骨神经 CCI 模型大鼠与正常大鼠不同时间点 PMWT、PWTL 的组间比较均采用 t 检验; 正常对照组、坐骨神经 CCI 模型组、hUCB - MSCs - Exo 注射组和 NGF - hUCB - MSCs - Exo 注射组大鼠 Allen 脊髓后角灰质病变评分、脊髓组织细胞凋亡率以及脊髓组织中 NLRP3、IL - 1 β 、Caspase - 1、Caspase - 3 的蛋白表达量的组间比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较均采用 q 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结 果

3.1 hUCB - MSCs 鉴定结果 流式细胞仪检测第 2 代 hUCB - MSCs, CD34 阳性率 0.4%, CD45 阳性率 0.6%, CD90 阳性率 95.8%, CD105 阳性率 98.3%, 符合 hUCB - MSCs 表面蛋白表达特征。

3.2 重组慢病毒转染 hUCB - MSCs 结果 重组慢病毒转染 72 h, hUCB - MSCs 转染率 (89.22 ± 6.91)% (图 1)。

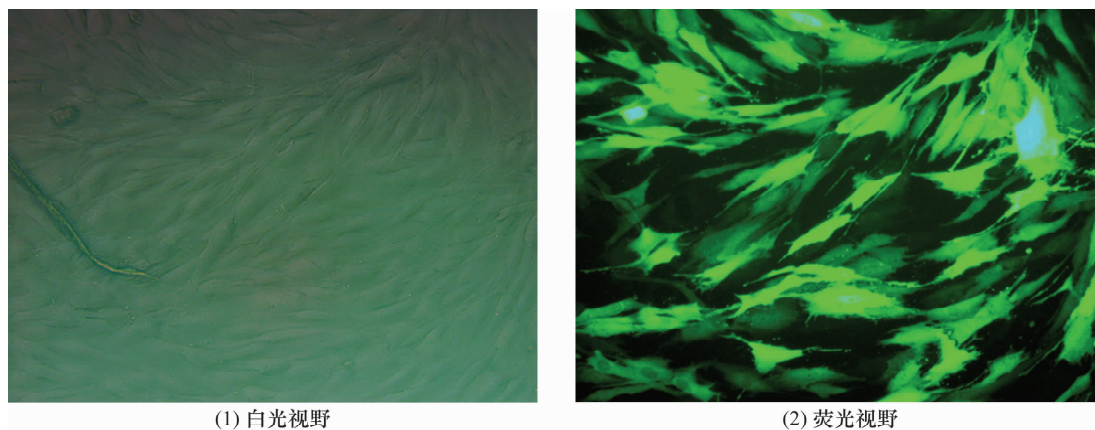


图 1 重组慢病毒转染 72 h 后的脐带血间充质干细胞 (×400)

3.3 NGF-hUCB-MSCs-Exo 鉴定结果 透射电子显微镜结果显示, NGF-hUCB-MSCs-Exo 为杯口状结构(图 2)。蛋白印迹法检测结果显示, NGF-hUCB-MSCs-Exo 标志蛋白 CD63、CD9 和 CD81 表达量高于 hUCB-MSCs, 表明 Exo 提取成功(图 3)。

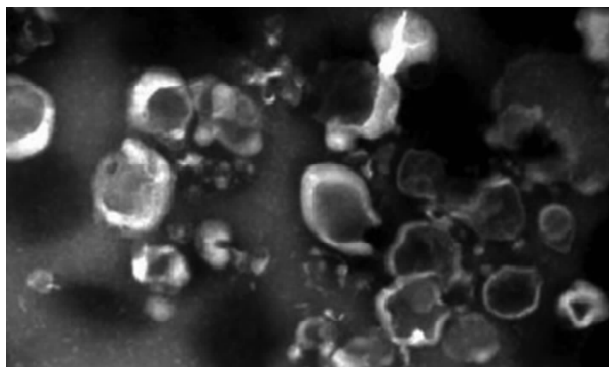
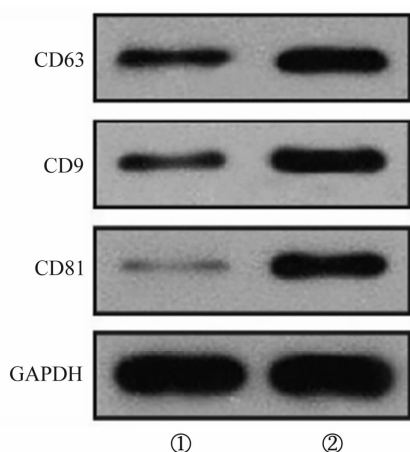


图 2 透射电子显微镜下的外泌体 (×200 000)



GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; ①人脐带血间充质干细胞; ②神经生长因子过表达人脐带血间充质干细胞来源外泌体。

图 3 外泌体标志蛋白的蛋白印迹法检测结果

3.4 hUCB-MSCs 摄取及内化 NGF-hUCB-MSCs-Exo 观察结果 hUCB-MSCs 与 NGF-

hUCB-MSCs-Exo 共培养 12 h 后, 观察到 hUCB-MSCs 摄取并内化 NGF-hUCB-MSCs-Exo(图 4)。

3.5 大鼠坐骨神经 CCI 模型鉴定结果 术后第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天, 坐骨神经 CCI 模型大鼠的 PWMT 和 PWTL 均低于正常大鼠, 表明造模成功(表 1)。

3.6 病理学检查结果 正常对照组、坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠 Allen 脊髓后角灰质病变评分比较, 差异有统计学意义[(0.32 ± 0.04)分, (4.21 ± 0.11)分, (4.09 ± 0.15)分, (1.89 ± 0.17)分, $F = 11.714$, $P = 0.000$]。坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠 Allen 脊髓后角灰质病变评分均高于正常对照组($q = 2.783$, $P = 0.015$; $q = 3.921$, $P = 0.000$; $q = 3.784$, $P = 0.000$); hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠 Allen 脊髓后角灰质病变评分均低于坐骨神经 CCI 模型组($q = 2.059$, $P = 0.024$; $q = 2.071$, $P = 0.021$); NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠 Allen 脊髓后角灰质病变评分低于 hUCB-MSCs-Exo 注射组($q = 2.809$, $P = 0.013$)。见图 5。

3.7 细胞凋亡检测结果 正常对照组、坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义[(0.15 ± 0.02)%, (8.98 ± 0.37)%, (8.14 ± 0.29)%, (3.46 ± 0.31)%, $F = 9.908$, $P = 0.012$]。坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率均高于正常对照组($q = 2.142$, $P = 0.017$; $q = 3.287$, $P = 0.000$; $q = 2.275$, $P =$

0.025); hUCB - MSCs - Exo 注射组和 NGF - hUCB - MSCs - Exo 注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率均低于坐骨神经 CCI 模型组 ($q = 2.021, P = 0.021; q =$

$2.086, P = 0.024$); NGF - hUCB - MSCs - Exo 注射组大鼠脊髓组织细胞凋亡率低于 hUCB - MSCs - Exo 注射组 ($q = 3.008, P = 0.011$)。见图 6。

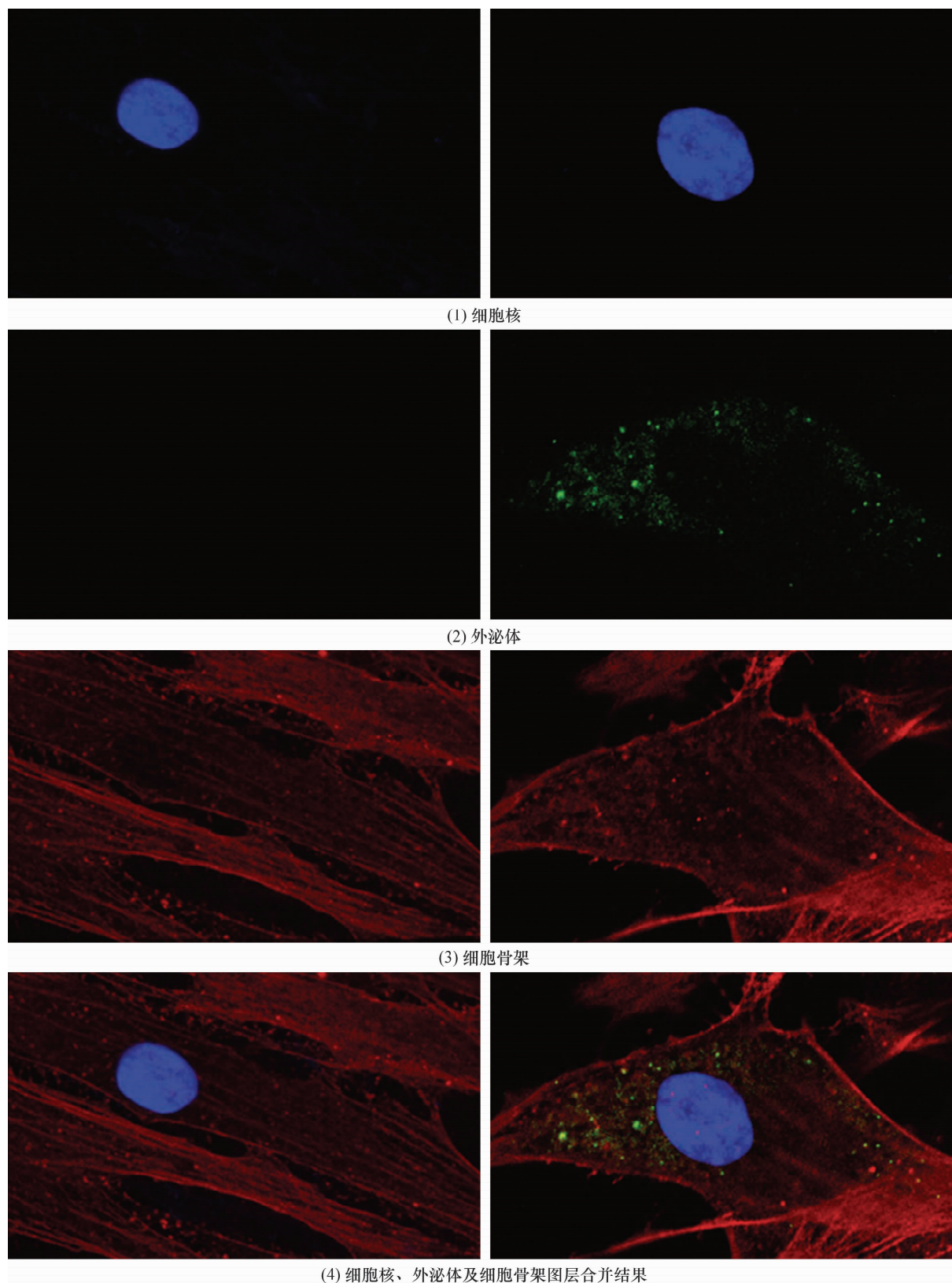


图 4 荧光显微镜下间充质干细胞摄取及内化外泌体观察结果 ($\times 800$)

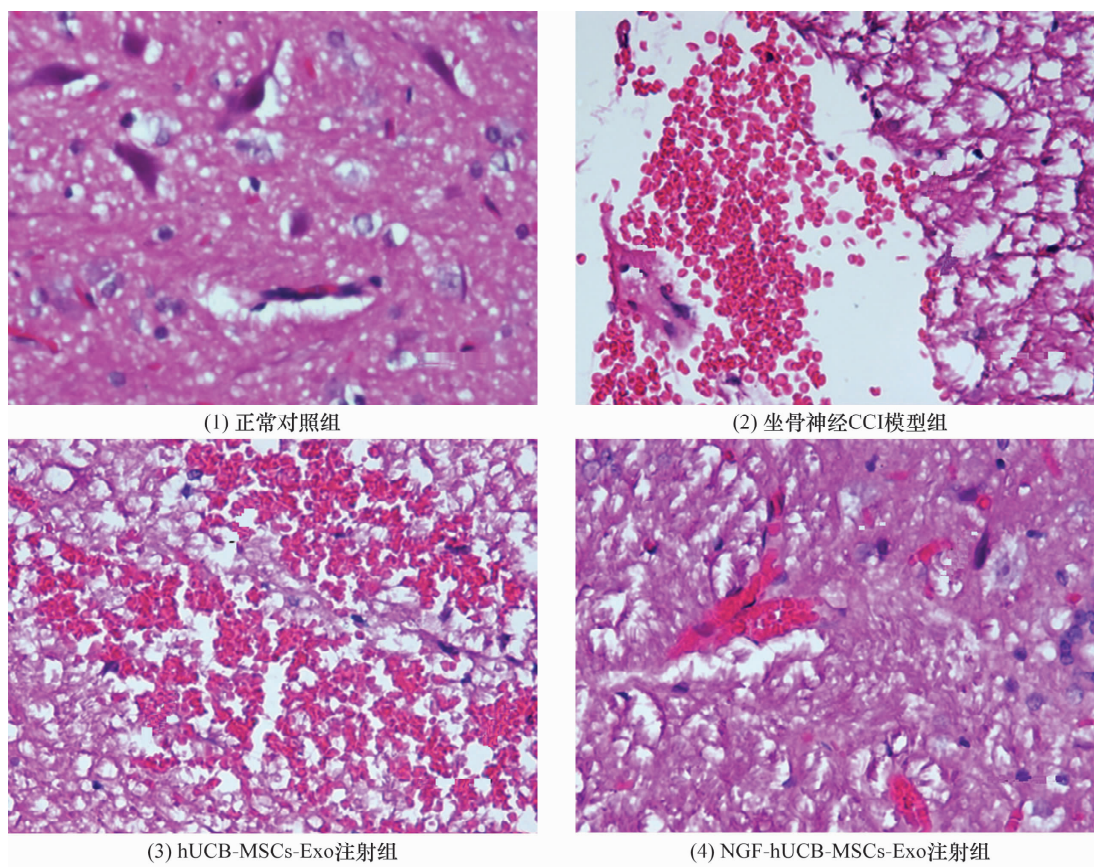
注:左侧为对照组,右侧为实验组。

表 1 2 组大鼠术后机械刺激缩足反射阈值和热刺激缩足反射潜伏期

组别	样本量/只	机械刺激缩足反射阈值/($\bar{x} \pm s, g$)			
		术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 5 天	术后第 7 天
正常大鼠	5	7.34 \pm 0.08	7.39 \pm 0.06	7.47 \pm 0.04	7.56 \pm 0.09
坐骨神经 CCI ⁽¹⁾ 模型大鼠	15	3.05 \pm 0.06	3.07 \pm 0.04	3.11 \pm 0.05	2.89 \pm 0.02
<i>t</i> 值		3.903	3.342	3.892	4.903
<i>P</i> 值		0.000	0.001	0.000	0.000

组别	热刺激缩足反射潜伏期/($\bar{x} \pm s, s$)			
	术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 5 天	术后第 7 天
正常大鼠	18.12 \pm 0.45	18.09 \pm 0.36	18.77 \pm 0.44	18.37 \pm 0.39
坐骨神经 CCI ⁽¹⁾ 模型大鼠	6.13 \pm 0.03	6.07 \pm 0.05	6.01 \pm 0.04	5.77 \pm 0.09
<i>t</i> 值	3.562	3.769	3.809	4.651
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

1) 慢性压迫损伤。



CCI:慢性压迫损伤;hUCB-MSCs:人脐带血间充质干细胞;Exo:外泌体;NGF:神经生长因子。

图 5 大鼠 L₄~L₅ 组织 HE 染色图片 (×200)

3.8 炎症反应及细胞凋亡相关基因的蛋白表达分析
结果 正常对照组、坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白表达量比较,组间差异均有统计学意义。坐骨神经 CCI 模型组、hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白表

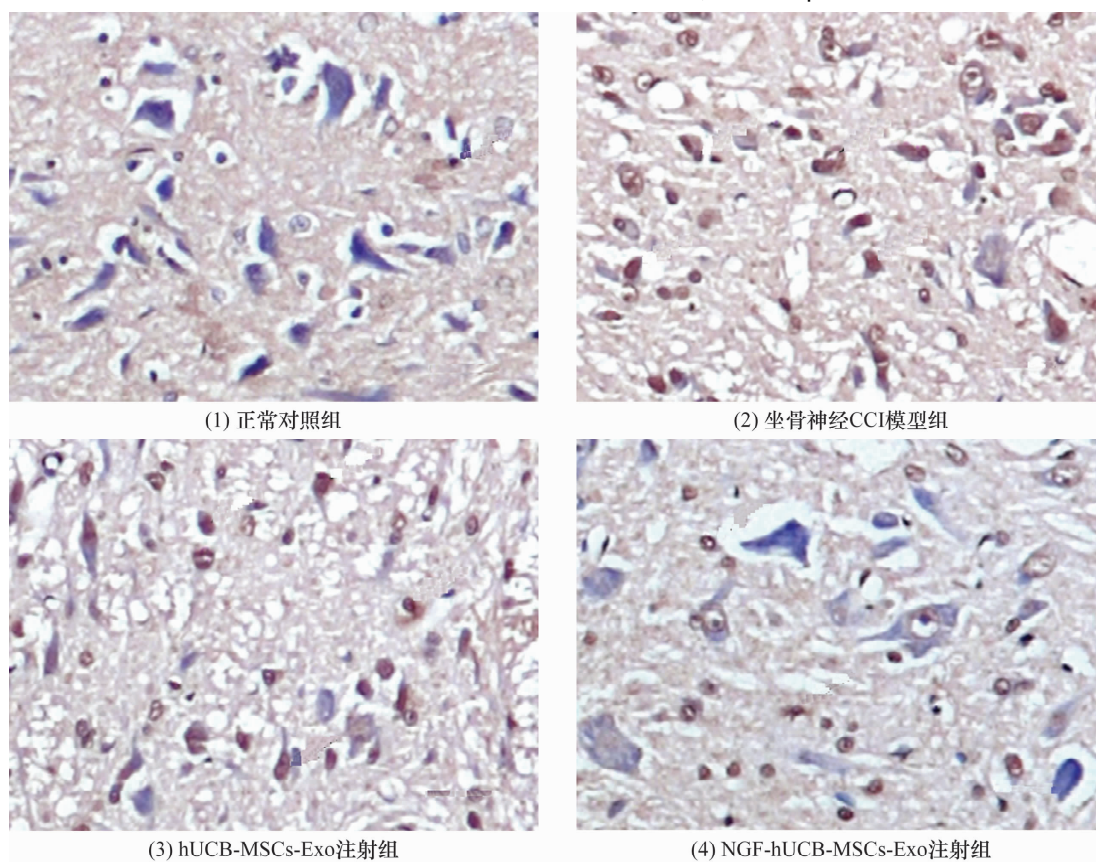
达量均高于正常对照组(坐骨神经 CCI 模型组: $q = 3.709, P = 0.000; q = 3.328, P = 0.000; q = 3.145, P = 0.000; q = 2.974, P = 0.000$;hUCB-MSCs-Exo 注射组: $q = 2.893, P = 0.019; q = 2.944, P = 0.013; q = 3.008, P = 0.009; q = 3.852, P = 0.000$;NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组: $q = 2.428, P = 0.022; q = 4.903, P = 0.000; q = 3.884, P = 0.000; q = 4.382, P = 0.000$);hUCB-MSCs-Exo 注射组和 NGF-hUCB-

MSCs - Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL - 1 β 、Caspase - 1 和 Caspase - 3 蛋白表达量均低于坐骨神经 CCI 模型组 (hUCB - MSCs - Exo 注射组: $q = 3.609, P = 0.000; q = 3.811, P = 0.000; q = 3.476, P = 0.000; q = 3.889, P = 0.000$; NGF - hUCB - MSCs - Exo 注射组: $q = 2.338, P = 0.000; q = 3.098, P = 0.000; q = 2.358, P = 0.000; q = 3.775, P = 0.000$); NGF - hUCB - MSCs - Exo 注射组大鼠的脊髓组织中 NLRP3、IL - 1 β 、Caspase - 1 和 Caspase - 3 蛋白表达量均低于 hUCB - MSCs - Exo 注射组 ($q = 3.798, P =$

$0.000; q = 3.573, P = 0.000; q = 2.998, P = 0.000; q = 3.208, P = 0.000$)。见表 2、图 7。

4 讨论

神经损伤的原因包括直接暴力和慢性疾病,其中腰椎间盘突出症、梨状肌综合征、肘管综合征等是导致神经损伤的常见慢性损伤性疾病^[15-16]。神经损伤严重影响患者的生活质量,而神经损伤的修复较为缓慢,研究表明在无张力条件下神经损伤的最快修复速度是 $1 \sim 2 \text{ nm} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[17-18]。NGF 是由神经元分泌的生长因子,是由 α 、 β 、 λ 3 个亚基构成的蛋白三聚体;



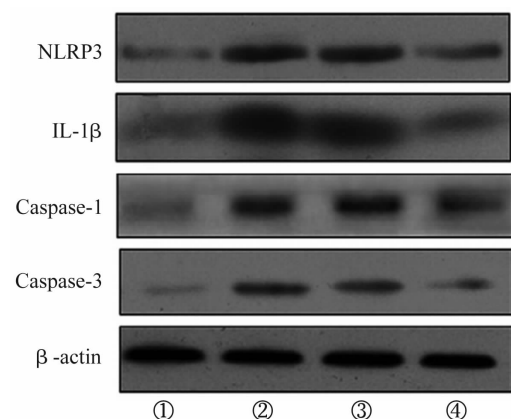
CCI:慢性压迫损伤;hUCB - MSCs:人脐带血间充质干细胞;Exo:外泌体;NGF:神经生长因子。

图 6 大鼠 L₄ ~ L₅ 组织 TUNEL 染色图片 (×200)

表 2 4 组大鼠脊髓组织中炎症反应及细胞凋亡相关基因蛋白表达量

组别	样本量/只	灰度值($\bar{x} \pm s$)			
		NLRP3 ⁵⁾	IL ⁶⁾ - 1 β	Caspase ⁷⁾ - 1	Caspase ⁷⁾ - 3
正常对照组	5	122.16 \pm 15.23	106.27 \pm 14.11	108.43 \pm 13.79	102.58 \pm 12.17
坐骨神经 CCI ¹⁾ 模型组	5	764.29 \pm 20.14	698.11 \pm 24.57	305.58 \pm 24.36	725.16 \pm 21.24
hUCB - MSCs ²⁾ - Exo ³⁾ 注射组	5	627.86 \pm 21.17	687.45 \pm 22.36	301.25 \pm 27.72	711.32 \pm 20.37
NGF ⁴⁾ - hUCB - MSCs ²⁾ - Exo ³⁾ 注射组	5	198.25 \pm 14.37	208.42 \pm 19.79	153.14 \pm 11.99	215.33 \pm 19.27
F 值		12.428	15.008	19.897	12.278
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

1)慢性压迫损伤;2)人脐带血间充质干细胞;3)外泌体;4)神经生长因子;5)NOD 样受体蛋白 3;6)白细胞介素;7)半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。



NLRP3: NOD 样受体蛋白 3; IL: 白细胞介素; Caspase: 兔抗鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; β -actin: β -肌动蛋白; ①为正常对照组; ②为坐骨神经慢性压迫损伤模型组; ③为人脐带血间充质干细胞外泌体注射组; ④为神经生长因子过表达人脐带血间充质干细胞外泌体注射组。

图 7 4 组大鼠脊髓组织炎症反应及细胞凋亡相关基因蛋白表达蛋白印迹法检测结果

其中 β 亚基与神经细胞的修复和再生密切相关^[19]。研究表明, NGF 可以与 Trk 蛋白相结合, 通过 MAPK 信号通路调节神经细胞的增殖和分化^[20]。干细胞具有多向分化潜能, 在特定条件诱导下可向神经细胞分化, 但 NGF 过表达干细胞存在易老化、传代后分化方向不确定等不足, 难以充分发挥 NGF 的诱导作用。因此, 从 NGF 过表达干细胞中提取 Exo, 可以利用 Exo 携带 NGF 基因信息的特点发挥长期诱导干细胞向神经细胞分化的作用。我们通过构建 NGF 过表达慢病毒载体, 通过慢病毒将 NGF 基因导入 hUCB-MSCs, 并成功提取 NGF-hUCB-MSCs-Exo, 将 NGF-hUCB-MSCs-Exo 与 hUCB-MSCs 注入坐骨神经损伤的大鼠体内, 发挥 NGF 诱导 hUCB-MSCs 向神经元分化的作用, 进而修复大鼠坐骨神经损伤。研究表明, NGF-hUCB-MSCs-Exo 能够抑制脊髓后角灰质发生病变、降低脊髓组织细胞凋亡率、抑制脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 等蛋白的表达, 发挥修复神经损伤的作用, 为临床神经损伤的治疗提供新的思路和方法。

坐骨神经损伤与神经组织中炎症因子的表达关系密切。陈亚军等^[21]研究发现, 炎症因子能够刺激大鼠脊髓小胶质细胞表达 NLRP3 炎症小体, 进而引起大鼠神经性疼痛加剧。IL-1 是由单核细胞产生的细胞因子, 能促进免疫应答, 参与炎症反应; 其中 IL-1 β 作为 NLRP3 的下游因子, 可通过 NLRP3/

Caspase-1 信号通路介导小鼠急性脊髓损伤的炎症疼痛反应^[22]。Caspase 家族是一类结构相似的蛋白水解酶, 具有较高的同源性, 在细胞程序性死亡过程中发挥着重要作用。Caspase-1 是参与炎症反应信号通路的关键蛋白, 其作为 NLRP3 的下游分子, 在炎症反应的传递中发挥重要作用^[23-24]。Caspase-3 是细胞凋亡的 executor, 能够促进细胞凋亡, 其可被炎症反应、机械损伤等多种因素刺激而活化^[25]。本研究表明, NGF-hUCB-MSCs-Exo 注射组大鼠脊髓组织中 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 蛋白相对表达量显著低于坐骨神经 CCI 模型组和 hUCB-MSCs-Exo 注射组, 提示 NGF-hUCB-MSCs-Exo 能够显著抑制坐骨神经 CCI 大鼠脊髓组织中的炎症反应和细胞凋亡。

本研究表明, NGF-hUCB-MSCs-Exo 治疗大鼠坐骨神经 CCI, 能够抑制脊髓后角灰质病变和脊髓细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制 NLRP3、IL-1 β 、Caspase-1 和 Caspase-3 的表达有关。

参考文献

- [1] 陈向荣, 寇红伟, 包德明, 等. 表皮生长因子受体/ARE 通路在小鼠脑外伤中的神经保护作用[J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(12): 2224-2226.
- [2] 彭艳. 神经节苷脂对早产儿颅内出血引起的神经系统损伤的临床效果及神经、运动功能的影响分析[J]. 中外医学研究, 2019, 17(3): 40-42.
- [3] 于敏, 李承鑫, 张素蕊, 等. 高频电疗法促进周围神经损伤后再生研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(9): 56-57.
- [4] 季航宇, 顾军, 谢凌寒, 等. 干细胞、组织工程支架与神经营养因子在脊髓损伤治疗中的应用[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(25): 4088-4093.
- [5] 于海微, 李佩玲, 庄如锦, 等. 人脐带血和骨髓来源间充质干细胞的体外分离、培养、分化及生物学特性比较[J]. 中国组织工程研究, 2009, 13(6): 1021-1024.
- [6] 吴奕江, 章何陋, 高炆, 等. 白藜芦醇影响骨髓间充质干细胞体外分化的研究进展[J]. 中医正骨, 2020, 32(10): 47-51.
- [7] LI Z J, LIU F, HE X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate inflammation and demyelination of the central nervous system in EAE rats by regulating the polarization of microglia[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 67: 268-280.
- [8] CHAU M J, DEVEAU T C, GU X, et al. Delayed and repeated intranasal delivery of bone marrow stromal cells increases regeneration and functional recovery after ischemic

- stroke in mice[J]. BMC Neurosci, 2018, 19(1): 20.
- [9] YANG F, LIAO X Z, TIAN Y, et al. Exosome separation using microfluidic systems: size - based, immunoaffinity - based and dynamic methodologies[J]. Biotechnol J, 2017, 12(4): 11 - 19.
- [10] MILANE L, SINGH A, MATTHEOLABAKIS G, et al. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment[J]. J Control Release, 2015, 219: 278 - 294.
- [11] WORTZEL I, DROR S, KENIFIC C M, et al. Exosome - mediated metastasis: communication from a distance[J]. Dev Cell, 2019, 49(3): 347 - 360.
- [12] YAMASHITA T, TAKAHASHI Y, TAKAKURA Y. Possibility of exosome - based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application[J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(6): 835 - 842.
- [13] 林平, 陈毅, 梁淑霞, 等. NGF 和 PTEN 双基因诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化效果观察[J]. 浙江医学, 2020, 42(10): 1000 - 1005.
- [14] ALLEN A R. Surgery for experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report[J]. JAMA, 1911, 57(4): 878 - 880.
- [15] 蔡伟森, 尹传瑞, 田宗光. 梨状肌综合征的影像学与临床特点分析[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2018, 33(8): 840 - 841.
- [16] 赵睿, 丛锐, 田通, 等. 肘管综合征一期手术失败原因探讨及肘管翻修术的临床疗效评估[J]. 中华手外科杂志, 2019, 35(5): 347 - 350.
- [17] RICCIO M, MARCHESINI A, PUGLIESE P, et al. Nerve repair and regeneration: Biological tubulization limits and future perspectives[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(4): 3362 - 3375.
- [18] YANNAS I V, TZERANIS D S, SO P T C. Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation[J]. Wound Repair Regen, 2017, 25(2): 177 - 191.
- [19] 朱斌, 关炳瑜, 贺元, 等. 电针调控大鼠脊髓损伤后灰质中 BDNF, NGF 和 NT3 的表达[J]. 上海针灸杂志, 2019, 38(10): 1188 - 1194.
- [20] 刘菲菲. NGF 和 BDNF 联合诱导 NSC 分化及其在 192 - IgG - saporin 致阿尔茨海默病模型鼠中的应用[D]. 广州: 广州医科大学, 2014.
- [21] 陈亚军, 韩焕芝, 陈红光, 等. NLRP3 炎症小体在神经病理性痛大鼠脊髓小胶质细胞激活中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(12): 1464 - 1467.
- [22] 王丽蓉, 朱进飘, 方媛媛, 等. 大鼠炎性痛形成时脊髓神经元 P2X7 受体与 NLRP3/IL - 1 β 信号通路的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2020, 40(4): 437 - 441.
- [23] BECKWITH K S, BECKWITH M S, ULLMANN S, et al. Plasma membrane damage causes NLRP3 activation and pyroptosis during Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2270.
- [24] SUN X D, TANG Y, JIANG C H, et al. Oxidative stress, NF - κ B signaling, NLRP3 inflammasome, and caspase apoptotic pathways are activated in mammary gland of ketotic Holstein cows[J]. J Dairy Sci, 2021, 104(1): 849 - 861.
- [25] 刘朝圣, 申梦洁, 韩晓凤, 等. 红景天苷对 UVB 辐射 HaCat 细胞活性及 Caspase - 3/9 蛋白表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(8): 952 - 956.