

· 基础研究 ·

人脐带间充质干细胞外泌体的分离鉴定及其溶血性能研究

杨玮杰¹, 李佳翌¹, 陈良键¹, 张婧¹, 刘凯鲁^{1,2}, 张驰¹, 肖月¹, 李晶^{1*}

¹南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第一附属医院生殖医学中心, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**分离并鉴定人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSC)分泌的外泌体, 研究其对入血的溶血性能。**方法:**通过超速离心法从脐带干细胞培养上清中分离外泌体, 采用蛋白免疫印迹法、透射电镜和纳米颗粒跟踪分析法进行鉴定; 制备人红细胞悬液, 加入不同浓度外泌体, 进行溶血试验, 用试管法观察并用紫外分光光度法测定计算溶血度。**结果:**分离获得的外泌体特异富集蛋白CD9、CD81、Alix, 不含有高尔基体蛋白Gm130; 透射电镜下可见其呈杯盘状结构, 粒径直径为40~120 nm; 脐带干细胞外泌体对人血的溶血率小于5%。**结论:**HUCMSC分泌的外泌体具有外泌体的经典结构及典型特征, 不引起人血溶血反应, 为未来脐带干细胞外泌体作为载体进行药物递送提供了实验依据。

[关键词] 人脐带间充质干细胞; 外泌体; 溶血试验

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)02-165-06

doi:10.7655/NYDXBNS20190201

Isolation and identification of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells and hemolysis effect of exosomes

Yang Weijie¹, Li Jiazhao¹, Chen Liangjian¹, Zhang Jing¹, Liu Kailu^{1,2}, Zhang Chi¹, Xiao Yue¹, Li Jing^{1*}

¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine, NMU, Nanjing 211166; ²Center of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To isolate and identify exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSC) and to testify the potential of hemolysis of exosomes. **Methods:** HUCMSC-derived exosomes were isolated and purified through ultracentrifugation. Western blot and transmission electron microscope were used to identify the characteristic of the exosome. Exosomes were incubated with human erythrocyte suspension to observe the hemolysis. **Results:** HUCMSCs derived exosomes expressed positive makers of CD9, CD81 and Alix, didn't express the Golgi Body protein Gm130 as negative marker. The particles size displayed range from 40-120 nm. It can be seen a classical doughnut shape of exosomes through transmission electron microscope. And the exosome derived from HUCMSCs didn't cause the hemolysis of human red cell. **Conclusion:** Exosomes secreted by human umbilical cord stem cells possessed classical characteristics of exosomes and had no effects on hemolysis, which provide the experimental basis of potential clinical use of HUCMSC exosomes for drug delivery.

[Key words] HUCMSCs; exosome; hemolysis

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02): 165-170]

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一类具有自我更新潜能, 拥有较强多向分化潜能的细胞, 其广泛存在于结缔组织、脂肪组织、胎盘、脐

[基金项目] 国家自然科学基金(31671202); 南京医科大学科技发展基金(2016NJMUZD018)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: ljwth@njmu.edu.cn

带等部位^[1]。其中人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMSC)具有取材方便, 采集时不存在伦理学上的争议和对供体的损伤的特点, 并且与其他来源的MSC相比, HUCMSC更原始, 其分化和增殖能力低于胚胎干细胞但明显高于其他成体干细胞^[2], 具有更短的倍增时间和更强的

扩增能力,方便大规模获得及应用。目前已经有较多关于HUCMSC在缺血性疾病治疗和组织损伤修复应用^[3-4],以及生育力保护方面相关的研究报道^[5]。

近年来研究者认为脐带干细胞在很大程度上是通过释放细胞外囊泡(EV)来发挥作用的^[6]。外泌体是EV中被研究最多的一个亚群,在1983年第1次被详细报道,它是一类早期细胞内体来源的具有膜结构的小囊泡,可以被大多数细胞所产生并分泌,直径介于40~150 nm之间,内部含有蛋白、脂质、核酸等多种物质,并且不同细胞来源的外泌体成分各不相同^[7]。HUCMSC来源的外泌体表现出在创伤修复和组织重建、炎症反应、缺血性疾病等方面丰富的治疗潜能^[8]。外泌体作为一种无细胞(cell-free)的治疗方式,经过修饰等方式还可以利用其包裹药物靶向输送至特定部位,具有较高的应用潜能和价值^[9]。目前很多研究者将MSC外泌体作为药物递送的理想载体进行研究^[10],关于脐带干细胞来源外泌体安全性的动物实验研究在此前已有相关文献发表^[11],但其对人血溶血作用的影响尚未被报道。本研究旨在从细胞条件培养基中提取并鉴定HUCMSC来源的外泌体,并以此研究HUCMSC外泌体在人血中的溶血性能,为未来用其作为载体在临床上进行药物递送的安全性提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

足月产新生儿脐带及健康志愿者血液均来自于南京医科大学第三附属医院,经捐赠者知情同意并经南京医科大学伦理委员会批准通过。DMEM/F12培养基、青霉素/链霉素双抗溶液、0.25% EDTA胰酶(GE公司,美国);胎牛血清(FBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)(Gibco公司,美国);脐带干细胞诱导分化培养基、茜素红染液、油红O染液、阿利辛蓝染液(Cyagen公司,美国);FITC标记CD44、CD34、CD45抗体,PE标记CD73、CD90、CD11b抗体(BD公司,美国);鼠抗CD9抗体、Alix抗体(Abcam公司,美国);兔抗CD81抗体(SBI公司,美国);鼠抗Gm130抗体(BD公司,美国);HRP标记山羊抗小鼠、抗兔二抗,RIPA裂解液(Thermo公司,美国);超速离心机,超速离心管(Beckman公司,美国);透射电子显微镜(FEI公司,美国);Qubit3.0检测仪(Thermo公司,美国);分析型流式细胞仪(BD公司,美国);酶标仪(BioTek公司,美国);纳米颗粒跟踪分析仪(Particle Metrix公司,德国);EDTA抗凝真空采血管(BD公

司,美国);15 mL离心管,6孔细胞培养板(Thermo公司,美国);100 mm培养皿(NEST公司,香港)。

1.2 方法

1.2.1 HUCMSC的分离培养

将新鲜脐带置于含有青霉素/链霉素双抗的PBS缓冲液中,冰上运输至生物安全柜中,用前述溶液反复清洗残留血液后,用手术器械机械剥离脐带动脉及静脉,再反复清洗至无血液残留。将干净的脐带剩余部分用眼科剪剪成1 mm³大小的小块,均匀放置在100 mm培养皿中,加入含10%FBS和1%双抗的DMEM/F12培养基2 mL,置于37 ℃、5%CO₂培养箱中24 h后,加入5 mL培养基,每2~3 d换液1次,至细胞汇合度达到80%~90%时,用0.25% EDTA-胰酶消化,1:3传代。P3至P7代细胞用于实验。

1.2.2 HUCMSC的诱导分化

P5代细胞汇合度达到80%~90%时,胰酶消化,成骨及成脂诱导分化接种于6孔板中,成软骨诱导分化以悬浮细胞球培养于15 mL离心管中。成骨诱导分化的细胞汇合度达到80%~90%时更换诱导分化培养基,每2~3 d换液1次,21 d后茜素红染液染色观察;成脂诱导分化的细胞汇合度达到100%时更换诱导分化培养基,每2~3 d换液1次,21 d后油红O染液染色观察;成软骨诱导分化的细胞直接使用诱导分化培养基,每2 d换液1次,28 d后将细胞球包埋切片,用阿利辛蓝染液染色观察。

1.2.3 HUCMSC的流式细胞学检测

第5代细胞汇合度达到80%~90%时,胰酶消化,用PBS清洗并重悬细胞,按抗体说明书加入FITC标记的CD44、CD34、CD45抗体和PE标记的CD73、CD90、CD11b抗体避光孵育,并加入碘化丙啶(PI)标记死亡细胞,共染30 min后,400 g离心5 min去除未结合的抗体,用200 μL PBS重悬细胞于流式检测管中,上机检测。

1.2.4 去外泌体胎牛血清的制备

将FBS置于超速离心管中,4 ℃环境下使用相对离心力120 000 g离心18 h,用注射器吸取上层颜色较淡液体,分装保存于-80 ℃冰箱备用。

1.2.5 脐带干细胞外泌体的提取

当脐带干细胞汇合度达到60%~70%时,弃去培养液,用PBS溶液小心清洗贴壁细胞3遍,加入含10%去外泌体胎牛血清和1%双抗的DMEM/F12溶液,培养48 h后收集细胞条件培养上清。将收集到的条件培养基500 g离心10 min以去除细胞,2 000 g离心20 min以去除细胞碎片,10 000 g离心30 min以

去除大囊泡及凋亡小体,以上所得培养液用 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌滤器过滤后,转移至超速离心管中, $120\ 000\ g$ 离心 $90\ \text{min}$,小心去除上清,用 $1\ \text{mL}$ PBS重悬离心管底部沉淀后,加入PBS至充满离心管, $120\ 000\ g$ 再次离心 $90\ \text{min}$ 以清洗外泌体,小心去除上清液,用 $150\sim 200\ \mu\text{L}$ PBS重悬外泌体以供后续实验使用,以上各步离心均在 $4\ ^\circ\text{C}$ 环境下进行。

1.2.6 外泌体蛋白的检测

将超离提取的HUCMSC外泌体加入 $50\ \mu\text{L}$ RIPA蛋白裂解液,对照样品使用脐带干细胞蛋白,取 1.0×10^6 个细胞,消化离心后用PBS重悬,离心后小心吸取上清,加入 $100\ \mu\text{L}$ RIPA蛋白裂解液,以上2组均在冰上裂解 $20\ \text{min}$ 用Qubit3.0检测仪测定蛋白浓度。蛋白煮沸变性后,使用10%SDS-PAGE蛋白分离胶进行电泳,每孔上样 $30\ \mu\text{g}$ 蛋白,蛋白分离后使用 $300\ \text{mA}$ 恒定电流 $80\ \text{min}$ 将其转至PVDF膜上,1% PBS/BSA溶液封闭 $1\ \text{h}$ 后, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育一抗CD9、CD81、Alix、Gm130(1:1 000稀释)过夜,TBST洗膜3遍,每遍 $10\ \text{min}$ 后,孵育HRP标记的山羊抗小鼠,抗兔二抗(1:4 000稀释)室温孵育 $1\ \text{h}$,TBST洗膜2遍,每遍 $10\ \text{min}$,TBS洗膜 $10\ \text{min}$ 后,加入ECL发光液,使用数码成像发光仪曝光。

1.2.7 外泌体纳米粒径的检测

采用纳米粒子跟踪分析的技术,将需检测的外泌体样品稀释 $50\sim 100$ 倍后上机运行,检测样品的粒径分布范围及粒子数目。

1.2.8 透射电镜检测外泌体形态

超速离心获得的外泌体沉淀用 $100\ \mu\text{L}$ 2.5%的戊二醛溶液固定, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜,吸取 $20\ \mu\text{L}$ 样品置于铜网上,小心吸干液体,室温干燥 $2\ \text{min}$ 后,取2%的醋酸双氧铀室温染色 $2\ \text{min}$,干燥后小心将铜网转移至超纯水的小滴中, $2\ \text{min}$ 后用无尘纸吸去液体,室温干燥后上机观察。

1.2.9 人红细胞生理盐水悬液的制备

用注射器抽取健康志愿者静脉血 $2\ \text{mL}$ 至EDTA抗凝采血管中,将抗凝全血转移至 $15\ \text{mL}$ 离心管中, $1\ 000\ g$ $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 $10\ \text{min}$,吸去上层血清,加入 $10\ \text{mL}$ PBS溶液重悬沉淀,小心混匀后 $1\ 000\ g$ 离心 $10\ \text{min}$,吸去上清,重复3遍,按1:50的比例用生理盐水重悬红细胞,制成2%的红细胞生理盐水悬液供后续实验使用。

1.2.10 常规体外溶血实验

将实验组分为6组,编为组1~6,每组设3个平行管,每管加入 $2.5\ \text{mL}$ 红细胞悬液。组1为阴性对照

组,加入 $2.5\ \text{mL}$ 生理盐水;组2为阳性对照组,加入 $2.5\ \text{mL}$ 蒸馏水;组3加入 $2.5\ \text{mL}$ PBS;组4~组6分别加HUCMSC外泌体至终浓度分别为 200 、 500 和 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$,每组取3份血液样本,轻轻混匀后放置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴锅中, $3\ \text{h}$ 后观察离心管内液体颜色,判断溶血情况,上层液体透明或黄色,下层红色不透明为不溶血;上层液体红色混浊为部分溶血;上层液体红色透明为完全溶血。

1.2.11 紫外分光光度法检测溶血情况

将水浴 $3\ \text{h}$ 后各组样品试管 $800\ \text{g}$ 离心 $5\ \text{min}$,吸取管中上清液,加入酶标板中,用酶标仪检测各孔在波长为 $545\ \text{nm}$ 光处吸光值,计算样品溶血率,公式为溶血率(%)=(样品吸光值-阴性对照吸光值)/(阳性对照吸光值-阴性对照吸光值) $\times 100\%$,溶血率 $<5\%$ 时为溶血试验合格。

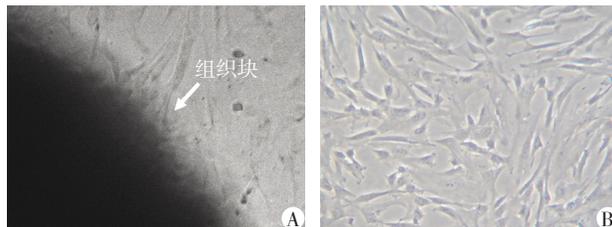
1.3 统计学方法

所有数据均采用SPSS 20.0软件进行分析。各组数据均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验进行分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUCMSC的形态学特征

新生儿脐带洗净后用组织块法贴壁培养,使用含10% FBS的DMEM/F12培养基,在第7天时可见少量细胞从组织块周围爬出,贴壁生长。观察其形态学特征,待细胞汇合度达到 $80\%\sim 90\%$ 时消化传代。细胞培养至第5代时可见细胞呈旋涡样生长,形态呈梭形,两头较细,中间较粗(图1)。



A:原代细胞培养7 d时,可见白色箭头所指组织块附近有细胞爬出;B:第5代细胞形态。

图1 HUCMSC形态学特征($\times 100$)

Figure 1 Morphology of HUCMSC($\times 100$)

2.2 HUCMSC的多向诱导分化

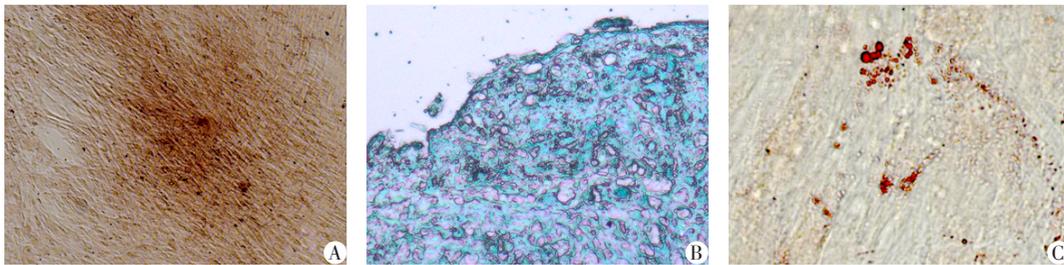
取第5代HUCMSC汇合度达到 $80\%\sim 90\%$ 时消化,按前文所述方法进行诱导分化实验,诱导第21天时固定细胞,使用茜素红染液染色可见被染成红色的钙结节,证明干细胞成骨分化;使用油红O染液染色可见被染成红色的脂滴,证明干细胞成脂分化;

第28天时将细胞球固定切片,可见被阿利新蓝染液染成蓝色的酸性黏多糖,证明细胞成软骨分化,具有多向分化潜能(图2)。

2.3 HUCMSC表面标志的鉴定

取第5代HUCMSC,当细胞汇合度达到80%~90%时消化,用荧光标记的CD44、CD73、CD90、

CD11b、CD34、CD45抗体对细胞进行标记并进行细胞流式学分析,检测细胞表面特异性抗原标记物。结果显示培养的人脐带间充质细胞阳性标记物CD44、CD73、CD90均达到95%以上的阳性率,而其阴性标记物CD11b、CD34、CD45表达均低于2%(图3)。以上结果表明所培养的细胞为纯度较高的HUCMSC。



A: 钙结节茜素红染色(×40); B: 软骨内酸性黏多糖阿利新蓝染色(×40); C: 脂滴油红O染色(×100)。

图2 HUCMSC多向诱导分化

Figure 2 Osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation of HUCMSC

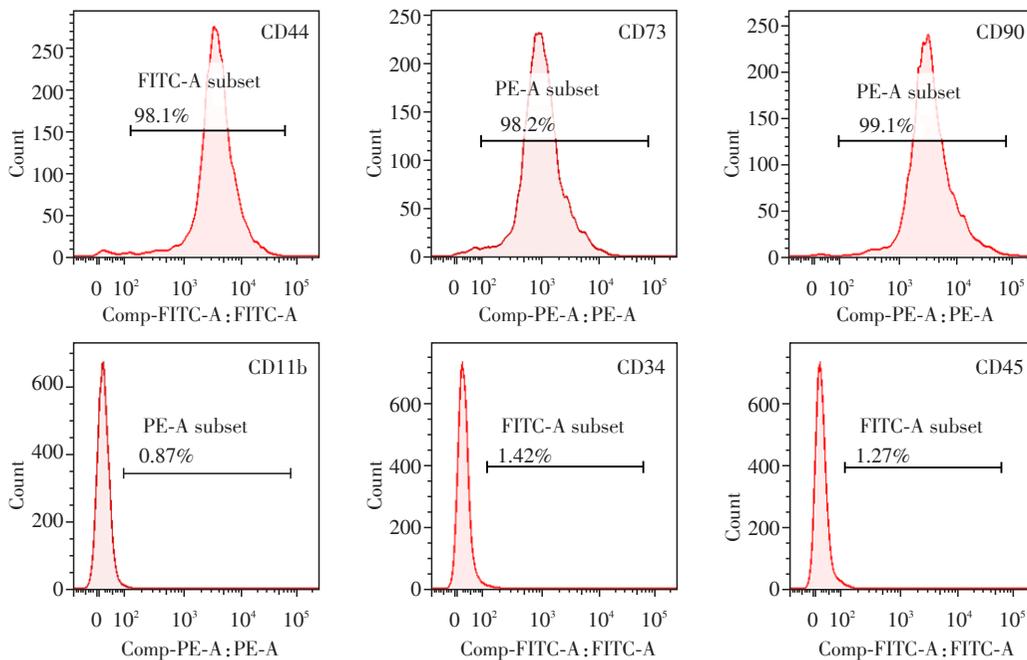


图3 HUCMSC表面标志物流式细胞学鉴定

Figure 3 FACS of surface markers of HUCMSC

2.4 HUCMSC外泌体的鉴定

超速离心得到的外泌体蛋白及对照细胞蛋白进行Westerblot检测,结果显示外泌体及细胞均表达四跨膜蛋白CD9、CD81和囊泡相关蛋白Alix,细胞表达高尔基体蛋白Gm130而外泌体不表达,证明分离得到较为纯净的外泌体(图4)。使用NTA仪器检测分离得到的HUCMSC外泌体直径介于(83.8 ± 37.8)nm之间。透射电镜观察外泌体形态,可见超

离获得的外泌体具有典型的类圆形杯盘状结构(图5)。

2.5 HUCMSC体外溶血试验观察

组1为阴性对照组,上层液体无色澄清,未发生溶血现象;组2为阳性对照组,上层液体呈红色透明,发生明显的溶血现象;组3为外泌体溶剂PBS组,组4~6为加入不同浓度外泌体组,组3~6上层液体均澄清透明,未见明显溶血现象(图6)。

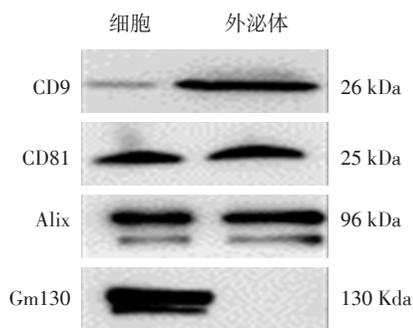
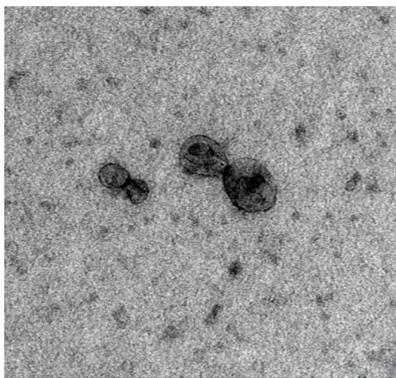


图4 外泌体表面蛋白表达情况
Figure 4 Protein markers of exosome



可见典型结构。
图5 外泌体透射电镜下形态图($\times 1\ 000$)
Figure 5 Shape of exosome in TEM($\times 1\ 000$)

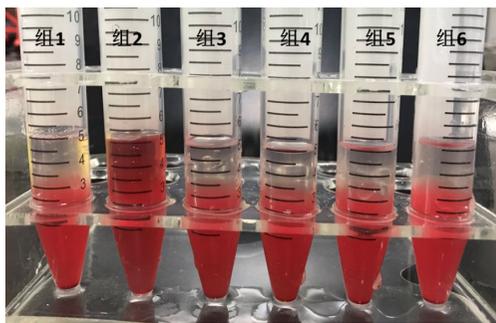


图6 体外溶血实验肉眼观察
Figure 6 Visulazing of hemolysis experiment *in vitro*

2.6 HUCMSC 溶血试验吸光度比较及溶血率计算

将各样品管离心后取上层液体,加入96孔酶标板中,使用酶标仪检测样品在波长为545 nm处的吸光值,并按前文所述公式计算溶血程度,以阳性对照组溶血程度为100%进行统计学计算。PBS组溶血度为 $(1.28 \pm 0.19)\%$,低浓度外泌体组溶血度为 $(1.18 \pm 0.43)\%$,中浓度外泌体组溶血度为 $(0.30 \pm 0.15)\%$,高浓度外泌体组溶血度为 $(0.43 \pm 0.16)\%$ 。各组数据与阳性对照组做*t*检验比较,*P*值均 < 0.005 ,具有统计学意义。同时各组样品溶血度均低

于5%,符合国际标准^[12],认为不会引起溶血反应。

3 讨论

间充质干细胞来源于骨髓、脂肪、脐带、经期脱落的子宫内膜等多种组织^[1],具有较强的组织修复、促血管生成、调节免疫反应等能力,近年来研究发现MSC分泌的外泌体在上述过程中发挥了重要作用。MSC外泌体不仅可以介导细胞间的交流通讯,递呈信息,调控靶细胞的生物学功能,并且具有促进细胞增殖,促进损伤组织修复等方面的功能^[13]。目前已经有大量关于MSC功能和机制的研究,同时也有不少临床试验项目已经获批或正在进行中,但对MSC来源外泌体的研究在很大程度上还局限在动物模型上^[14-15]。脐带干细胞获取方便,培养简单,分泌外泌体量较多,是用于组织修复再生研究的理想囊泡,同时也是用于药物装载递送研究的理想生物学载体。本研究首先成功分离并鉴定了脐带干细胞来源的外泌体,并从实验血液学角度进一步研究了它的生物安全性。

溶血试验是评价一种药物或材料的血液相容性和体外急性溶血性能简单而重要的方法,可以在一定程度上评估研究材料或药物的细胞毒性。当溶血成分存在时,红细胞发生变形,结构被破坏,血红蛋白释放,引发溶血反应,对机体产生不利影响。本研究中采用了肉眼直接观察法快速判断HUCMSC外泌体对人血的溶血作用,同时利用紫外分光光度法进行检测,具有更高的准确性,可以更客观地评价外泌体对红细胞的溶血影响。

在早前的研究中发现外泌体可以减少血液丢失,降低感染的风险,并证实人卵泡液来源的外泌体不会引起凝血反应^[16]。但是关于HUCMSC来源外泌体对溶血性能和细胞毒性的研究较少,且局限于动物模型中,同时用于实验的外泌体蛋白定量一般为 $400\sim 800\ \mu\text{g}$ ^[11,17]。本研究首次采用了人血作为HUCMSC外泌体溶血性能的研究对象,且设置了多个不同浓度的样品组,最高剂量为 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 外泌体/血液,更好地模拟了未来临床应用注射包裹药物的外泌体的实际情况。通过研究发现,在不同浓度外泌体的实验组中,HUCMSC分泌的外泌体均不会引起人血的溶血反应,且各组溶血度均小于5%。本研究发现,HUCMSC来源的外泌体不会引起急性溶血反应,为未来脐带干细胞来源外泌体作为载体递送药物治疗各项疾病的临床研究和应用提供了实验依据。

[参考文献]

[1] Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM, et al. The evolving concept of a stem cell[J]. Cell, 2001, 105(7): 829-841

[2] Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? [J]. Regenerative Medicine, 2009, 4(3): 423-433

[3] Ding DC, Chang YH, Shyu WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy[J]. Cell Transplantation, 2015, 24(3): 339-347

[4] Ren G, Chen X, Dong F, et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues [J]. Stem Cells Translational Medicine, 2012, 1(1): 51-58

[5] Fazeli Z, Abedinco A, Omrani MD, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: A systematic review[J]. Stem Cell Rev, 2018, 14(1): 1-12

[6] Rani S, Ryan AF, Griffin MD, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications[J]. Mol Ther, 2015, 23(5): 812-823

[7] Colombo M, Raposo G, Thery C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30(2): 255-289

[8] Phinney DG, Pittenger MF. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy [J]. Stem Cells, 2017, 35(4): 851-858

[9] Shahabipour F, Barati N, Johnston TP, et al. Exosomes: Nanoparticulate tools for RNA interference and drug delivery[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(7): 1660

[10] 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

[11] Sun L, Xu R, Sun X, et al. Safety evaluation of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cell[J]. Cytotherapy, 2016, 18(3): 413-422

[12] Shih AWY, Mcfarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation [J]. Am J Hematol, 2014, 89(4): 443-447

[13] Lai RC, Yeo RWY, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes [J]. Sem Cell Developmental Biology, 2015, 40(1): 82-88

[14] Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, et al. Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: A phase 1 clinical trial [J]. Lancet Respir Med, 2015, 3(1): 24-32

[15] Suk KT, Yoon JH, Kim MY, et al. Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial [J]. Hepatology, 2016, 64(6): 2185

[16] Franz C, Böing AN, Montag M, et al. Extracellular vesicles in human follicular fluid do not promote coagulation [J]. Reprod Biomed Online, 2016, 33(5): 652-655

[17] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated-wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing [J]. Stem Cells, 2015, 33(7): 2158

[收稿日期] 2018-01-23

