DOI:10.16016/j.1000-5404.201907063

骨髓间充质干细胞源外泌体调控心肌微血管内皮细胞增殖的机制研究

李朝富,王 艳,赵然尊,龙仙萍,张 巍,陈攀科,石 蓓 563000 贵州 遵义,遵义医科大学附属医院心内科

[摘要] **目的** 探讨缺氧预处理骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)来源的外泌体(exosomes)调控心肌微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells,CMVECs)增殖的机制。**方法** 采用酶消化法联合差速贴壁法培养大鼠 CMVECs,超高速离心法提取常氧及缺氧预处理的 BMSCs exosomes,免疫荧光检测 CMVECs 内化 exosomes 情况。实验分为 4 组($n=3$):①正常对照组(Control),②去除 exosomes 后的 BMSCs 条件培养基的空白对照组(Free-Exos),③常氧外泌体组(Nor-Exos),④缺氧外泌体组(Hypoxia-Exos,外泌体浓度为 400 μg/μL,与 CMVECs 共培养 24 h)。采用 Edu 法及流式细胞术细胞周期法检测细胞增殖能力,qRT-PCR 检测 exosomes 和 CMVECs 各组中 miR-214 表达变化。抑制 exosomes 中 miR-214 后,qRT-PCR 检测 exosomes 及 CMVECs 中 miR-214 的表达变化,并观察细胞增殖情况。**结果** 经透射电镜及免疫印迹法验证提取的囊泡状物质为外泌体,并通过免疫荧光分析发现 DiI 标记的 exosomes 可被 CMVECs 内化;Edu 及细胞周期结果显示,Hypoxia-Exos 组较 Nor-Exos 组具有更强的促 CMVECs 增殖能力($P<0.05$)。qRT-PCR 结果显示,与 Nor-Exos 组比较,Hypoxic-Exos 组中 miR-214 表达显著升高($P<0.05$)。下调 Hypoxia-Exos 中的 miR-214 表达后,Edu 及细胞周期结果显示 Hypoxia-Exos 组的促进细胞增殖能力被部分阻断($P<0.05$)。**结论** 缺氧预处理骨髓间充质干细胞源 exosomes 可能通过传递 miR-214 促进 CMVECs 增殖效应。

[关键词] 骨髓间充质干细胞;外泌体;心肌微血管内皮细胞;细胞增殖;细胞分化
[中图法分类号] R322.11; R329.21; R329.28 [文献标志码] A

Mechanism of exosomes released from bone marrow stem cells regulating proliferation of cardiac microvascular endothelial cells

LI Chaofu, WANG Yan, ZHAO Ranzun, LONG Xianping, ZHANG Wei, CHEN Panke, SHI Bei Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of exosomes released from bone marrow stem cells (BMSCs) on the proliferation in cardiac microvascular endothelial cells (CMVECs) by miR-214 regulation. **Methods** Rat CMVECs were cultured by enzyme digestion combined with differential adherence. Ultra-high speed centrifugation was used to extract exosomes from normal-oxygen or hypoxic-pretreated BMSCs. Immunofluorescence assay was employed to track the internalization of exosomes in CMVECs. Then the BMSCs were divided into 4 groups: ①control group, ②free exosomes (Free-Exos), ③normal exosomes (Nor-Exos), and ④hypoxia exosomes (Hypoxia-Exos, 400 μg/μL exosome co-cultured with CMVECs for 24 h). The cell proliferation was measured by Edu assay and flow cytometry. The miR-214 levels in exosomes or CMVECs were assessed using qRT-PCR, and the levels were measured again after miR-214 in exosomes were inhibited. And the cell proliferation was observed again by the above methods. Finally, after liposome 2000 was employed to transfect miR-214 mimics into CMVECs, the cell proliferation ability was measured by the Edu assay. **Results** Transmission electron microscopy and immunoblotting indicated that the extracted

[基金项目] 国家自然科学基金地区项目(81760042,81860061);贵州省科技计划项目(黔科合 LH 字[2017]7107 号)
[通信作者] 石 蓓,E-mail:shibei2147@163.com

vesicles were exosomes. Immunofluorescence assay revealed that DiI-labeled exosomes could be internalized by CMVECs. Edu assay and cell cycle assay showed that Hypoxic-Exos had stronger potential to promote cell proliferation than Nor-Exos in CMVECs. qRT-PCR results showed that miR-214 was highly expressed in Hypoxic-Exos compared with Nor-Exos ($P<0.05$). In CMVECs, the expression of miR-214 in Hypoxia-Exos group was significantly higher than that in Control group and Nor-Exos group ($P<0.05$). In addition, Hypoxia-Exos's ability to promote cell proliferation was partially blocked by down-regulation of miR-214 in Hypoxia-Exos. However, after overexpression of mir-214 in CMVECs, cell proliferation ability was enhanced. **Conclusion** Exosomes released from hypoxic-pretreated BMSCs can promote CMVECs proliferation by medicating miR-214.

[**Key words**] bone marrow mesenchymal stem cells; exosomes; cardiac microvascular endothelial cells; cell proliferation; cell differentiation

Supported by the Region Program of National Natural Science Foundation of China (81760042, 81860061) and the Science and Technology Project of Guizhou Province (LH-2017-7107). Corresponding author: SHI Bei, E-mail: shibei2147@163.com

心肌梗死后,有效的血管网络重建和功能性心肌细胞存活二者在恢复心功能上相辅相佐,缺一不可[1]。因此,心肌缺血后若能建立有效的微循环系统对保护心脏功能、改善远期预后起着举足轻重的作用。心肌微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells,CMVECs)是冠状动脉微血管衍生而来的特殊细胞类型,与大血管内皮细胞相比,其具有快速扩张和促进血管生成的能力[2-3]。因此,心肌梗死后新生血管的形成离不开心肌微血管内皮细胞的增殖和迁移。外泌体(exosomes)作为细胞旁分泌效应的主要产物,因其生物安全性及有效性而被广泛用于预处理细胞,促进细胞增殖、分化及存活等研究。然而,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)来源的 exosomes 是否具有促进心肌微血管内皮细胞增殖及机制仍不清楚。

外泌体是细胞在不同应激状态下所释放出的直径介于 30~100 nm 的双凹圆盘状囊泡样小体[4-5]。主要通过所携带的与供体细胞来源密切相关的遗传信息如 microRNA、蛋白质及 mRNA 等发挥生物学作用。目前已有大量研究报道骨髓间充质干细胞源外泌体(BMSC-exosomes)参与调控包括血管内皮细胞、多发性骨髓瘤细胞及成纤维细胞增殖[6-7]。然而,不同细胞来源及不同的应激环境下分泌的 exosomes 所携带的遗传信息有所不同,所产生的生物学效应也存在差异[8]。目前,微小核糖核酸(microRNA,miRNA)已被证明是 exosomes 发挥功能作用的重要物质,更重要的是,GRAY 等[9]报道,与常氧来源的干细胞 exosomes 相比,缺氧预处理的细胞源 exosomes 具有更显著的组织修复能力,并验证了该作用可能与缺氧环境改变 exosomes 中 miRNA 水平有关,后者经 exosomes 传递至靶细胞发挥作用。

经检索 Exocarta 数据库(http://exocarta.org/index.html)发现骨髓细胞系所分泌的 exosomes 中富含 miRNA-214。我们前期研究发现,缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 高表达 miR-214,并具有抗细胞氧化应激效应[10],但其是否对心肌微血管内皮细胞增殖产生影响,目前尚不清楚。因此,本研究拟通过分离提取常氧及缺氧预处理的 BMSCs 源 exosomes,将其与 CMVECs 共培养,观察不同处理的 exosomes 后 CMVECs 细胞增殖作用及 miR-214 表达变化,验证 BMSCs 源 exosomes 传递 miR-214 对 CMVECs 细胞增殖作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级 2~3 周龄 SD 大鼠 30 只,雌雄不拘,体质量 40~50 g[陆军军医大学动物实验中心,许可证号:SCXK-(渝)2007-0005];EBM-2 培养液购自 HyClone 公司;胎牛血清购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司;L-DMEM 培养液、胰蛋白酶购自 Gibco 公司;Ⅱ型胶原酶购自 Sigma 公司;双抗购自 Solarbio 公司;Edu 试剂盒购自广州锐博生物有限公司;细胞周期试剂盒购自上海索莱宝生物科技有限公司。

1.2 大鼠 BMSCs 分离、培养及缺氧预处理

颈椎脱臼法处死大鼠,于 75%酒精中浸泡 10 min;无菌条件下取双下肢骨骼至含 4%双抗的无菌培养皿内,分离去除软组织及肌肉,剪去骨两端,充分暴露骨髓腔,用 5 mL 无菌注射器抽吸 L-DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔获取骨髓细胞,收集于 50 mL 无菌离心管

中,800 ×g 离心 5 min,去上清后用 L-DMEM 完全培养基重悬,分装于培养瓶,37 ℃、5%CO_2 孵箱培养,待细胞融合达 90%左右,进行传代培养。细胞传代后,3 d 换液 1 次,反复传代扩增,最终取 P3~P5 BMSCs 用于后续实验。MSCs 按既往摸索的缺氧条件预处理[10],即予以含 94%N_2、1%O_2、5%CO_2 的条件培养细胞 24 h 作为缺氧预处理条件。

1.3 大鼠 CMVECs 的培养

SD 大鼠肝素化后行颈椎脱臼法处死,无菌条件下取出心脏,分离心室并将其剪成约 1 mm×1 mm×1 mm 组织碎块;随后加入 5 mL 0.1% Ⅱ胶原酶,37 ℃恒温下磁力搅拌器搅拌消化 10 min,终止消化后静置,并收集细胞悬液备用。再次向沉淀内加入 5 mL 0.1% Ⅱ胶原酶,重复操作,待大部分组织块变成白色后,800×*g* 离心 5 min,收集细胞悬液并用 200 目细胞筛网过滤,800×*g* 离心 5 min,弃上清,细胞沉淀用含体积分数为 10%胎牛血清的 EBM-2 完全培养基重悬,分装于培养瓶中,置于 37 ℃培养箱中培养。60 min 差速贴壁后(心肌成纤维细胞最先贴壁),将未贴壁的细胞悬液(含有心肌细胞及心肌微血管内皮细胞)收集到离心管中,800×*g* 离心 5 min,弃上清,加入含 10%胎牛血清的 EBM-2 完全培养基重悬细胞,接种于事先包被纤连蛋白的培养瓶内,37 ℃培养箱继续培养。观察细胞贴壁情况,进行换液,待细胞融合至 80%~90%,可行 CMVECs 的传代培养,并进行后续实验。

1.4 骨髓间充质干细胞 exosomes 分离提取

采用差速超速离心法(4 ℃,100 000×*g*,10 h)制备不含外泌体的胎牛血清(Exosomes-Free FBS);取常氧或缺氧预处理的生长良好的 P_3~P_5 代 BMSCs,弃尽培养基,PBS 洗 2 次;换 15%不含外泌体的胎牛血清配置 L-DMEM 培养基,孵箱中继续培养 48 h(缺氧组按上述缺氧条件处理 24 h),随后收集 BMSCs 培养基上清液,经两次离心(4 ℃,500×*g*,5 min 及 4 ℃,2 000×*g*,20 min)去除死细胞及细胞碎片、保留上清液,0.22 μm 滤器过滤上清液进一步去除死细胞及细胞碎片。将过滤后的上清液转移至超速离心管中,加满、勿留气泡;第 1 次超速离心(4 ℃,100 000×*g*,2 h)、弃尽上清液;10 mL PBS 反复冲洗全管内壁;将重悬的 exosomes 悬液转移至新的超速离心管中;第 2 次超速离心(4 ℃,100 000×*g*,70 min),弃尽上清液;沉淀为所提取的 exosomes,予以 100 μL PBS 反复冲洗全管内壁,置于-80 ℃低温冰箱保存备用。

1.5 骨髓间充质干细胞 exosomes 鉴定

透射电镜检测 exosomes 形态:取 50 μL exosomes 悬液,2.5%戊二醛固定于 100 目碳膜铜网置于滤纸上,将 20 μL 已固定的 exosomes 悬液滴于碳膜铜网上,室温静置 2 min,再使用红外灯烘干。随后滴加 1 滴 1%磷钨酸钠溶液(pH = 6.8)染色,室温静置 2 min,红外灯烘干;透射电镜下观察 exosomes 的形态。

Western blot 检测 exosomes 标记物 CD63、CD9、Alix:取各组细胞蛋白并测定浓度(按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作),所提取蛋白与上样缓冲液按比例混合后煮沸 6 min,等量上样至 SDS-PAGE 凝胶,80 V,55 min 跑积层胶,120 V 跑至胶底部,然后转膜至 PVDF 膜,5%脱脂奶封闭 1 h,一抗孵育 4 ℃过夜,加入辣根过氧化酶标记二抗室温孵育 1 h,用 Bio-blot 曝光仪检测灰度值,实验重复 3 次。

为验证 BMSCs 源 exosomes 对 CMVECs 增殖的影响,将实验分为 4 组:①正常对照组(Control):正常培养的 CMVECs;②空白对照组(free exosomes,Free-Exos):CMVECs 的培养基中加入去除 exosomes 的 BMSCs 条件培养基 200 μL;③常氧外泌体组(normal exosomes,Nor-Exos):CMVECs 的培养基中加入 200 μL 含常氧处理 BMSCs 源 exosomes 的 PBS 液;④缺氧外泌体组(hypoxia exosome,Hypoxia-Exos):CMVECs 的培养基中加入 200 μL 含缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 的 PBS 液(外泌体浓度为 400 μg/μL,与 CMVECs 共培养 24 h)。

1.6 CMVECs 内化 BMSCs 来源的 exosomes

CMVECs 以 10^5/mL 接种至 pitro 皿中;取约 100 μg 的 BMSCs-exosomes,加入 1 mL 的 Dil 染色液(1 μg/mL),混匀后 37 ℃孵育 5 min,随后转移至 4 ℃冰箱中 15 min,PBS 洗 1 次,超速离心(100 000×*g*,2 h)、弃上清,100 μL EBM-2 培养液重悬 exosomes-Dil;待心肌微血管内皮细胞贴壁后,将 exosomes-Dil 悬液滴加至心肌微血管内皮细胞培养液中,“8”字轨迹轻摇混匀,孵箱继续培养(37 ℃,5%CO_2)24 h;PBS 洗 2 次,弃尽残留液体,再加入 DAPI 染色液染色 5 min;PBS 洗 2 次,弃尽残留液体,滴加抗荧光淬灭剂的封片液,荧光显微镜观察结果。

1.7 Edu 法检测 CMVECs 增殖效应

按照各组处理条件及时间内处理细胞后,每个皿内加入 50 μmol/L Edu 培养基,37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养 2 h,弃培养基,PBS 洗 2 遍/5 min,4%多聚甲醛室温固定 30 min,弃固定液,加入 0.2%甘氨酸摇床孵育 5 min,PBS 洗 5 min,加入 0.5% Triton-100 破膜 10 min,PBS 洗 1 遍/5 min,每孔加入 100 μL Apollo 染色反应液,避光室温摇床孵育 30 min,弃反应液,加入 0.5%

Triton-100 摇床清洗 2 次/10 min,之后加入 100 μL 甲醇清洗 1 次/5 min,PBS 洗 1 次/5 min; DAPI 染色 20 min,PBS 洗 3 次/5 min,荧光显微镜观察结果。

1.8 细胞周期法检测细胞增殖

按不同处理条件干预培养,随后收集细胞进行离心(1 000×*g*,5 min),弃上清液,加入 PBS 2 mL 重悬细胞,随后 1 000×*g*,5 min 后按照细胞周期试剂盒操作说明用流式细胞仪进行细胞周期测定,并分析不同周期细胞所占比例,每组重复 3 次进行统计学分析。

1.9 荧光定量 RCR 检测外泌体及细胞中 miRNA-214 的表达

按 RNA 抽提试剂盒说明书进行,提取总 RNA,通过茎环法反转录试剂盒说明书进行反转录,按 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒进行 cDNA 扩增。以 U6 为内参,miR-214 反转录引物 5′-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCGAT-3′; miR-214 上游引物 5′-TTGGGCATATGTGACCATCA-3′,下游引物 5′-GGAGCTCAACCATACCAGGA-3′;U6 反转录引物 5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′;U6 上游引物 5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′, 下游引物 5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′。实验重复 3 次,数据通过 Ct 比较法进行分析,定量 $2^{-\triangle\triangle ct}$ 表示 miR-214 的相对表达量。

1.10 抑制缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 中 miR-214 的表达

取生长良好的 BMSCs,经消化、离心收集细胞并进行细胞计数,按每孔 5×10^5 个的细胞接种于 6 孔板中,37℃孵箱继续培养过夜,观察细胞生长状态、弃去培养基,然后每孔加入 F12 培养基 1.5 mL(预实验中按 30、50、100 nmol/L 浓度摸索出最佳转染浓度为 50 nmol/L)。配制溶液 A:245 μL F12 培养基加 5 μL miRNA inhibitor(Inhibitor-Exos 组)/inhibitor negative control(INC-Exos 组);配制溶液 B:245 μL F12 培养基加 5 μL 脂质体 2000;孵育 5 min 后,将 A 液与 B 液轻轻混匀,室温孵育 20 min 后,加入 6 孔板内,继续孵育 4~6 h 后(37 ℃,5%CO_2)更换成完全培养基继续培养 48 h,并予以上述缺氧预处理条件处理细胞后提取 exosomes,qRT-PCR 验证 exosomes 中 miR-214 的相对表达量变化。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,正态分布资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Tambane's T2 法,偏态分布资料采用多个独立样本非参数比较。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞源 exosomes 鉴定

提取的 exosomes 在透射电镜下观察。可见较多个大小不一、圆形或椭圆形,有脂质膜结构的囊状小泡,腔内可见低密度光亮区,电子显微镜观察 exosomes 直径 30~100 nm(图 1)。Western blot 测定 exosomes 膜蛋白表达情况,结果显示,exosomes 膜蛋白 CD63、CD9、Alix 为阳性表达(图 2)。

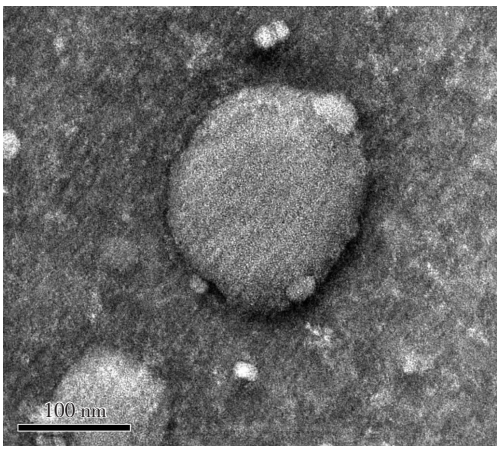


图 1 透射电子显微镜观察缺氧预处理大鼠间充质干细胞源 exosomes 形态

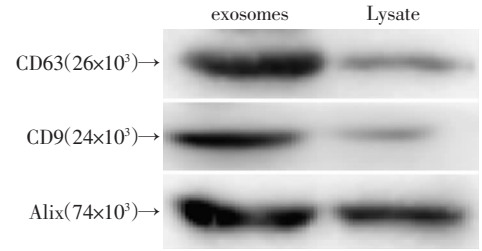


图 2 Western blot 鉴定 exosomes 膜表面分子

2.2 CMVECs 内化 BMSCs 源 exosomes

应用 Dil 膜染色剂标记 exosomes,将 exosomes-Dil 与 CMVECs 共培养 24 h 后,经荧光显微镜检可见红色荧光点聚集于细胞内,说明 CMVECs 摄取了 exosomes(图 3)。

2.3 Edu 检测 BMSCs 源 exosomes 对 CMVECs 增殖的影响

Control、Free-Exos 两组中均可见细胞核表达绿色荧光,但组间差异无统计学意义($P>0.05$),Nor-Exos 组中绿色荧光表达明显较 Control 及 Free-Exos 组中增多($P<0.05$),与 Nor-Exos 组比较,Hypoxic-Exos 组中细胞增殖活性增加更为显著($P<0.05$,图 4),推测缺氧预处理 BMSCs 来源的 exosomes 可有效促进 CMVECs 增殖。

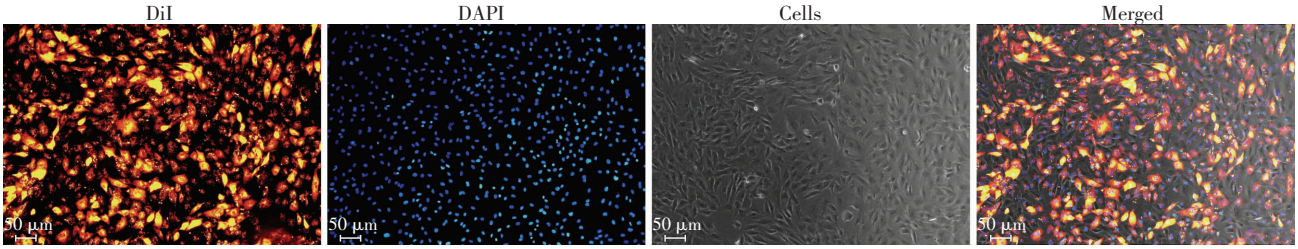


图 3　荧光显微镜观察细胞内化 DiI 标记的 exosomes(表达红色荧光)

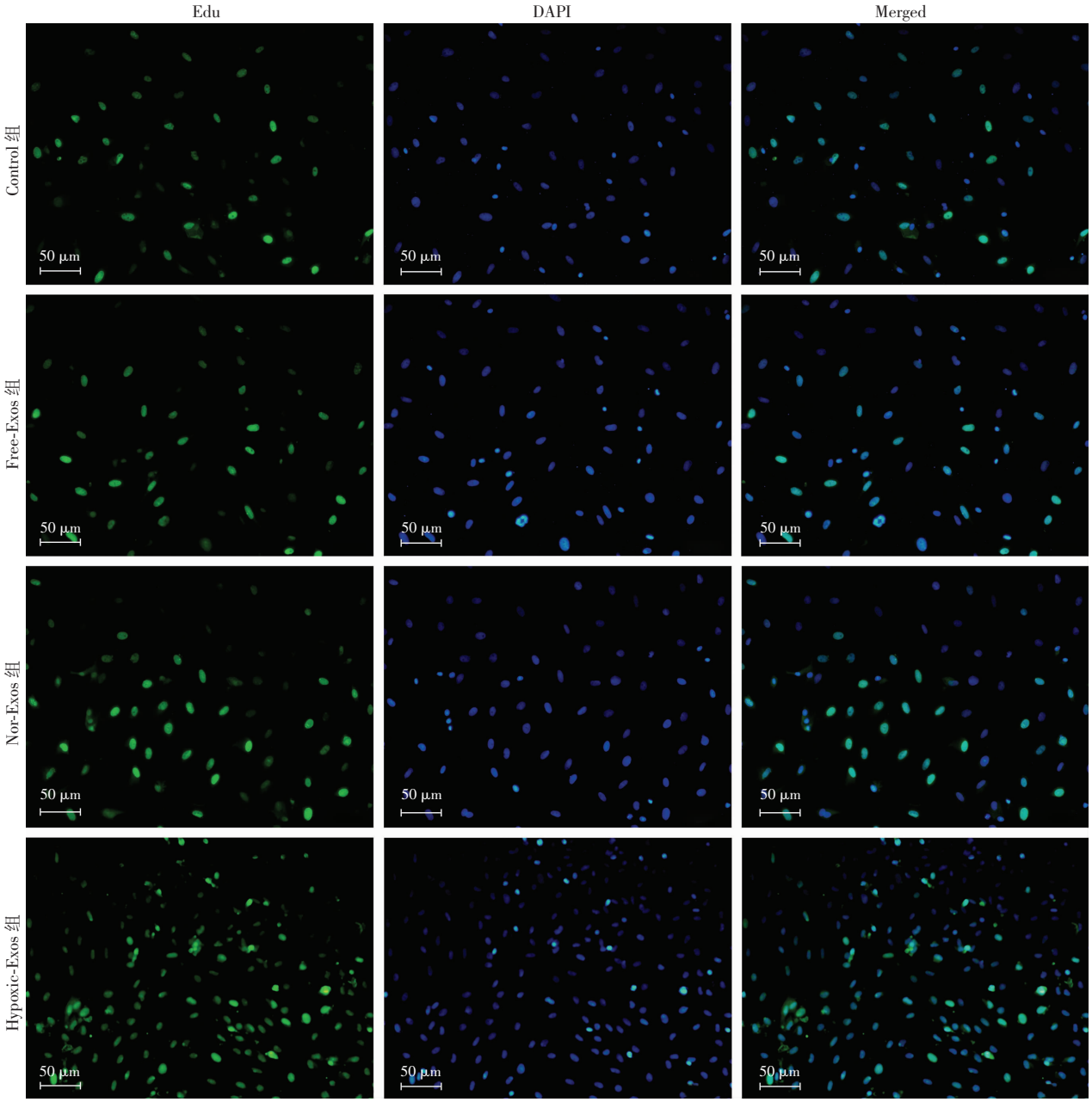
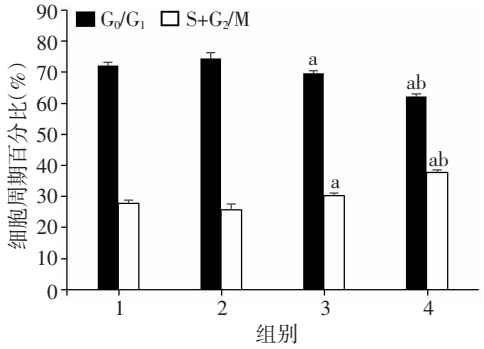


图 4　BMSCs 源 exosomes 增强 CMVECs 增殖能力

2.4　流式细胞术检测 exosomes 对 CMVECs 周期的影响

与 Control 组比较,Free-Exos 组 G_0/G_1 和 $S+G_2/M$ 期细胞无明显变化($P>0.05$);与 Free-Exos 组比较,Nor-Exos 组细胞 $S+G_2/M$ 期比例明显升高($P<0.05$);与 Nor-Exos 组比较,Hypoxic-Exos 组细胞 $S+G_2/M$ 期比例明显升高($P<0.05$,图 5)。

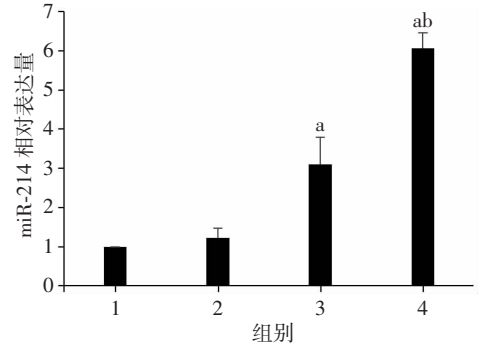


1:Control 组;2:Free-Exos 组; 3:Nor-Exos 组;4:Hypoxia-Exos 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Nor-Exos 组比较

图 5 不同条件处理后流式细胞术检测 CMVECs 周期变化 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 qRT-PCR 检测 exosomes 处理后的 CMVECs 中 miR-214 表达变化

与 Nor-Exos 组比较,经缺氧预处理后 BMSCs-Exosomal miRNA-214 明显上升($P<0.05$)。将常氧及缺氧预处理的 exosomes 与 CMVECs 共培养 24 h,待其内化后,检测各组细胞中 miR-214 表达变化,qRT-PCR 结果显示(图 6),与 Control 组比较,Free-Exos 组中 miRNA-214 表达无显著差异,内化 BMSCs-exosomes 后,Nor-Exos 组及 Hypoxia-Exos 组中 miR-214 均上调,且后者明显高于前者,差异具有统计学意义($P<0.05$)。推测缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 的促增殖作用可能通过传递 miR-214 至 CMVECs。

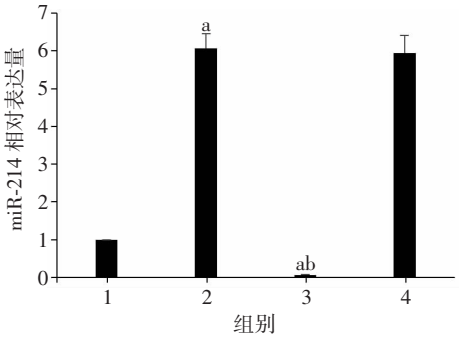


1:Control 组;2:Free-Exos 组; 3:Nor-Exos 组;4:Hypoxia-Exos 组; a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 Nor-Exos 组比较

图 6 qRT-PCR 检测各组 CMVECs 中 miRNA-214 相对表达量 ($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

2.6 qRT-PCR 检测 miR-214 抑制剂对缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 中 miR-214 表达的影响

与 Hypoxia-Exos 组比较,miR-214 抑制剂转染可显著降低缺氧预处理来源 exosomes 中 miR-214 的表达量($P<0.05$)。将 Nor-Exos、Hypoxia-Exos、Inhibitor-Exos、INC-Exos 与 CMVECs 共培养 24 h,待其内化后 qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-214 表达变化,结果显示(图 7):与 Nor-Exos 组比较,Hypoxia-Exos 组中 miRNA-214 表达显著增加($P<0.05$),而与 Hypoxia-Exos 组比较,Inhibitor-Exos 组中 miR-214 表达明显下降($P<0.05$)。由此可见,缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 可能通过携带 miR-214 发挥促进 CMVECs 增殖作用。



1: Nor-Exos 组; 2: Hypoxia-Exos 组; 3: Inhibitor-Exos 组; 4:INC-Exos 组;a:$P<0.05$,与 Nor-Exos 组比较;b:$P<0.05$,与 Hypoxia-Exos 组比较

图 7 qRT-PCR 检测 miR-214 抑制剂对 CMVECs 中 miRNA-214 相对表达量的影响 ($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

2.7 Edu 法检测下调 miR-214 后 exosomes 对 CMVECs 增殖作用的影响

与 Nor-Exos 组比较,Hypoxia-Exos 组中细胞增殖活性增加更为显著($P<0.05$),而 Inhibitor-Exos 组中表达 Edu 绿色荧光的细胞数较 Hypoxia-Exos 组明显减少($P<0.05$,图 8),说明 miR-214 是缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 促进心肌微血管内皮细胞增殖的效应分子之一。

2.8 流式细胞术检测抑制 miR-214 的 exosomes 对 CMVECs 周期的影响

与 Nor-Exos 组比较,Hypoxic-Exos 组细胞 $S+G_2/M$ 期比例明显升高($P<0.05$),提示细胞处于增殖状态的细胞比例增加,而与 Hypoxic-Exos 组比较,抑制 miR-214 后,细胞处于 $S+G_2/M$ 期的比例明显减少($P<0.05$,图 9)。进一步验证上述结论,即缺氧预处理的 BMSCs 源 exosomes 可能通过 miR-214 发挥促进 CMVECs 增殖的作用。

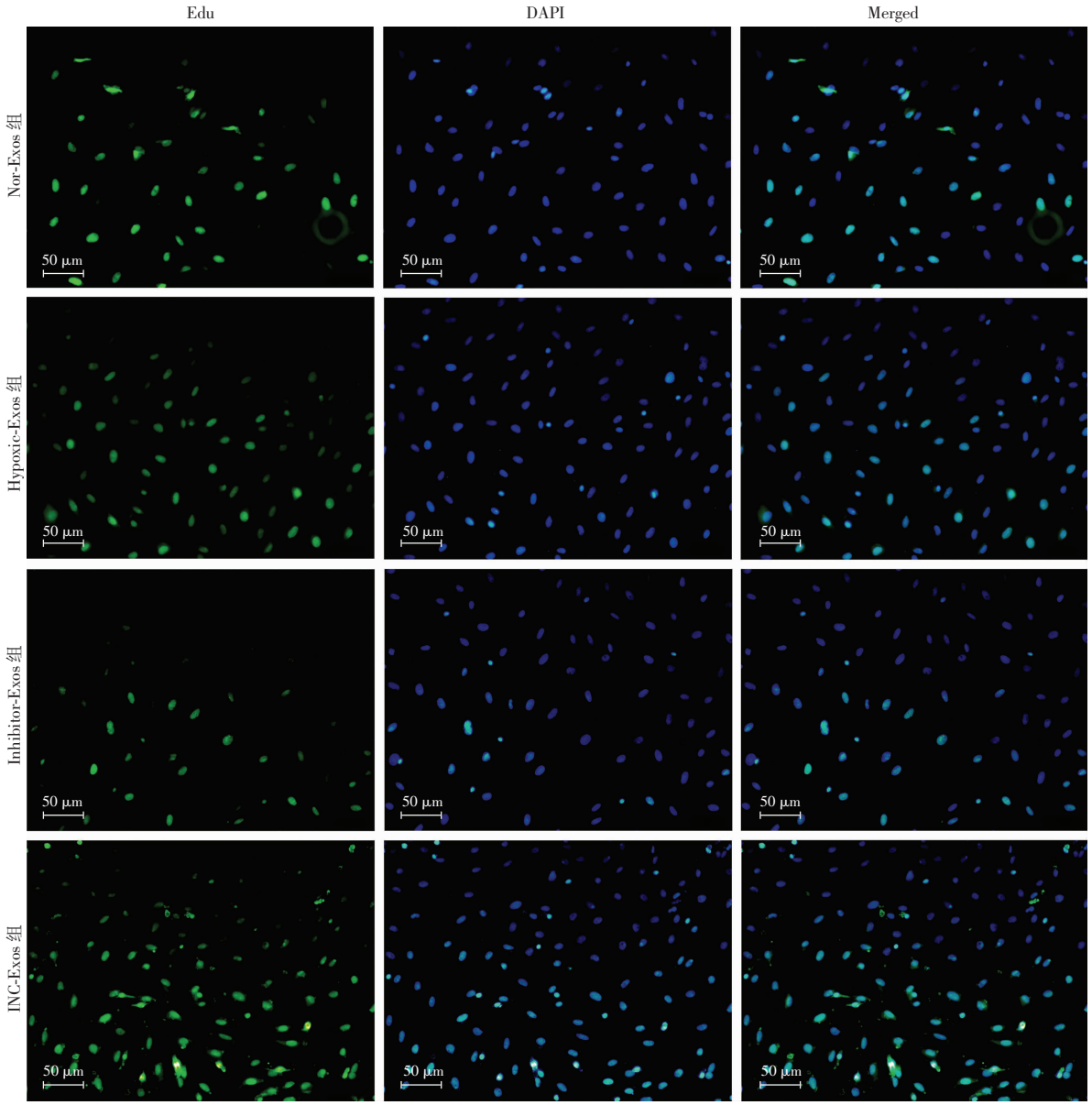
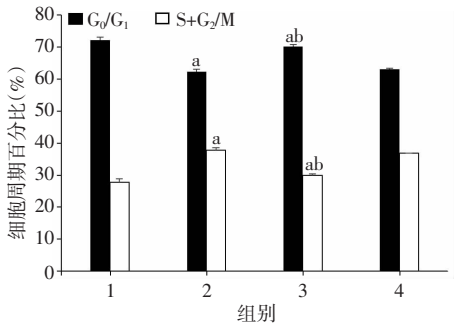


图 8 荧光显微镜检测下调 BMSCs 源 exosomes 中 miR-214 抑制 CMVECs 增殖能力



1:Nor-Exos 组;2:Hypoxia-Exos 组;3:Inhibitor-Exos 组;4:INC-Exos 组;a:$P<0.05$,与 Nor-Exos 组比较;b:$P<0.05$,与 Hypoxia-Exos 组比较

图 9 不同条件处理后流式细胞术检测心肌微血管内皮细胞周期 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

心肌微血管内皮细胞 CMVECs 通过细胞间连接,在心肌细胞之间形成连续的内皮,对调节和维持心脏功能起着十分重要的作用[11]。心肌梗死后如果受损心肌微血管内皮细胞不能及时增殖补充,微血管壁连续性破坏,造成冠脉微循环障碍,促使原本存活的心肌细胞凋亡或坏死,严重者可致患者出现心功能不全和心源性死亡[12]。近年来,细胞旁分泌效应在改善心肌梗死局部微环境、修复梗死心肌中发挥着举足轻重的作用,其中 exosomes 是旁分泌途径发挥作用的主要物质,已经成为血管再生和心脏修复的关键调节剂[13]。Exosomes 富含大量细胞特异性蛋白、mRNA 及 miRNA

等遗传物质,在介导细胞间信号传导及免疫调控等多种生物学过程中扮演重要角色[14]。BMSCs 因其强大的旁分泌效应,体外容易分离培养,增殖速率快,扩增能力强,不易污染,生存能力强等优点成为提取 exosomes 最理想的种子细胞。近年来,已有大量研究报道 BMSCs-exosomes 在治疗心血管疾病[15]、糖尿病肾损伤[16]、免疫性疾病[17]、肿瘤[18]中取得可喜成绩。在心肌梗死治疗方面,有研究者在猪和老鼠急性心肌梗死模型中注射 BMSC 的条件培养液,发现其可明显减小心肌梗死面积[19-20]。这为 BMSCs-exosomes 治疗急性心肌梗死的相关研究奠定了基石,但 BMSCs 外泌体是否对心肌微血管内皮细胞增殖、分化产生影响尚不明确。

Exosomes 是在某些特殊生理或者病理状态下,细胞选择性地将一部分蛋白以及遗传物质包裹进入囊泡继而释放到细胞外环境中的直径介于 30 ~100 nm 的胞外囊泡样小体[21]。研究发现 exosomes 可通过向受体细胞传递特异性 mRNA、microRNA 及蛋白质等遗传物质,在调控细胞间信号传递等多种生物学过程中扮演着举足轻重的作用[22]。目前 exosomes 提取的方法主要有超速离心法[23]、试剂盒提取法[24]及 PEG 聚沉+超速离心清洗法[19]等。超速离心法被认为是目前获取 exosomes 纯度较高的方法,因此本研究采用超速离心法提取外泌体,透射电镜下可见 exosomes 呈大小不一、圆形或椭圆形,有脂质膜结构的囊状小体,且直径在 30~100 nm 之间; Western blot 检测 exosomes 中特异性标记 CD63 、CD9 及 Alix 呈阳性表达。

Exosomes 必须先被受体细胞内化摄取,才能进一步发挥信息传递作用。根据文献报道,予 DiI 荧光染料标记的 BMSCs-exosomes 与 CMVECs 共培养 24 h,在荧光显微镜下观察到 CMVECs 可以追踪到 DiI 标记 exosomes 的红色荧光,说明 exosomes 可被 CMVECs 内化摄取。研究显示,缺氧预处理可有效促进 BMSCs 释放外泌体,此外缺氧预处理的骨髓间充质干细胞 exosomes 可显著改善心肌梗死后心梗面积及血管网络[25]。本研究 Edu 及细胞周期结果显示,常氧预处理的 BMSCs 源 exosomes 可有效促进 CMVECs 增殖,而同等体积的去掉 exosomes 的 BMSCs 条件培养基对 CMVECs 增殖无明显作用,重要的是,缺氧预处理的 BMSCs 源 exosomes 较常氧来源的 exosomes 的促细胞增殖效应更强,但作用的具体机制不清楚。

miRNA 已被公认为是 exosomes 发挥功能作用的重要物质之一,且不同病理生理条件下 exosomes 中 miRNA 表达有所差异, FENG 等[26]发现通过缺氧预处理诱导多能干细胞 iPS-MSCs 后,其 exosomal miRNA-2、miRNA-22、miRNA-24、miRNA-199a-3p 及 miRNA-210 明显升高,且对组织细胞修复效应显著增强。在众多 miRNAs 中,miRNA-214 为心脏谱系 miRNAs,在缺血性心脏病发生发展过程中发挥重要作用。LU 等[27]报道,在缺血性疾病患者血液中发现 miRNA-214 明显升高,此外,在心肌梗死鼠模型的心梗区域及心梗边缘区亦发现升高趋势。本实验发现 BMSCs-exosomes 含有 miR-214,在 BMSCs 经缺氧预处理后外泌体中的 miR-214 表达明显上调,这与 ExoCarta 数据库及 miR-214 生物特性相符合。提取的 exosomes 经 CMVECs 内化后采用 qRT-PCR 检测发现,缺氧预处理的 BMSCs 源 exosomes 处理可使 CMVECs 中 miR-214 表达量显著增高,这与 exosomes 通过传递 miRNA 介导细胞间信息交流,发挥生物学作用的研究相符。进一步采用 miR-214 抑制剂转染 BMSCs,经缺氧预处理后提取细胞 exosomes,采用 qRT-PCR 检测发现 exosomes 中 miR-214 的表达量明显下降。此外,抑制了 miR-214 的 exosomes 促进细胞增殖的能力被显著抑制,而过表达 CMVECs 中 miR-214 后,细胞增殖能力也显著增强。

综上所述,缺氧预处理 BMSCs 源 exosomes 可明显促进 CMVECs 增殖效应,并验证了该作用可能为缺氧预处理促进 BMSCs 释放的 exosomes 中 miR-214 表达升高,从而将其传递至 CMVECs 发挥促增殖效应。

参考文献:

[1] DÍEZ VILLANUEVA P, SANZ-RUIZ R, NÚÑEZ GARCÍA A, *et al*. Functional multipotency of stem cells: What do we need from them in the heart? [J]. Stem Cells Int, 2012, 2012:817364. DOI: 10.1155/2012/817364.

[2] YU F, LIU Y Z, XU J M. Pro-BDNF contributes to hypoxia/reoxygenation injury in myocardial microvascular endothelial cells: roles of receptors $p75^{NTR}$ and sortilin and activation of JNK and caspase 3[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 3091424. DOI:10.1155/2018/3091424.

[3] SEILER C, STOLLER M, PITT B, *et al*. The human coronary collateral circulation: development and clinical importance[J]. Eur Heart J, 2013, 34(34): 2674-2682. DOI: 10.1093/eurheartj/eht195.

[4] SHAO L B, ZHANG Y, LAN B B, *et al*. MiRNA-sequence indicates that mesenchymal stem cells and exosomes have similar mechanism to enhance cardiac repair[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 4150705. DOI: 10.1155/2017/4150705.

[5] XIAO K, THUM T. Exosomal microRNAs released by pediatric cardiac progenitor cells[J]. Circ Res, 2017, 120(4): 607-609. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.117.310443.

[6] LIU X L, LI Q, NIU X, *et al*. Exosomes secreted from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal

stem cells prevent osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis[J]. Int J Biol Sci, 2017, 13(2): 232-244. DOI:10.7150/ijbs.16951.

[7] SHABBIR A, COX A, RODRIGUEZ-MENOCAL L, *et al*. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis *in vitro*[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(14): 1635-1647. DOI:10.1089/scd.2014.0316.

[8] SLUIJTER J P, VERHAGE V, DEDDENS J C, *et al*. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication[J]. Cardiovasc Res, 2014, 102(2): 302-311. DOI:10.1093/cvr/cvu022.

[9] GRAY W D, FRENCH K M, GHOSH-CHOUDHARY S, *et al*. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology[J]. Circ Res, 2015, 116(2): 255-263. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.116.304360.

[10] WANG Y, ZHAO R Z, LIU D B, *et al*. Exosomes derived from miR-214-enriched bone marrow-derived mesenchymal stem cells regulate oxidative damage in cardiac stem cells by targeting CaMK Ⅱ[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018: 4971261. DOI:10.1155/2018/4971261.

[11] WEIR R A, MURPHY C A, PETRIE C J, *et al*. Microvascular obstruction remains a portent of adverse remodeling in optimally treated patients with left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction[J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2010, 3(4): 360-367. DOI:10.1161/CIRCIMAGING.109.897439.

[12] HEWSON C, CAPRARO D, BURDACH J, *et al*. Extracellular vesicle associated long non-coding RNAs functionally enhance cell viability[J]. Noncoding RNA Res, 2016, 1(1): 3-11. DOI:10.1016/j.ncrna.2016.06.001.

[13] RIBEIRO-RODRIGUES T M, LAUNDOS T L, PEREIRA-CARVALHO R, *et al*. Exosomes secreted by cardiomyocytes subjected to ischaemia promote cardiac angiogenesis[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(11): 1338-1350. DOI:10.1093/cvr/cvx118.

[14] BLONDIAUX E, PIDIAL L, AUTRET G, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-loaded fibrin patches act as a reservoir of paracrine factors in chronic myocardial infarction[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2017, 11(12): 3417-3427. DOI:10.1002/term.2255.

[15] ZHANG W, ZHOU X J, ZHANG H, *et al*. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2016, 311(5): F844-F851. DOI:10.1152/ajprenal.00429.2016.

[16] CZERNEK L, DÜCHLER M. Functions of cancer-derived extracellular vesicles in immunosuppression[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2017, 65(4): 311-323. DOI:10.1007/s00005-016-0453-3.

[17] GAJOS-MICHNIEWICZ A, CZYZ M. Role of miRNAs in melanoma metastasis[J]. Cancers (Basel), 2019, 11(3): E326. DOI:10.3390/cancers11030326.

[18] XIAO T T, ZHANG W W, JIAO B, *et al*. The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer' disease[J]. Transl Neurodegener, 2017, 6: 3. DOI: 10.1186/s40035-017-0072-x.

[19] LAI R C, ARSLAN F, LEE M M, *et al*. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Stem Cell Res, 2010, 4(3): 214-222. DOI:10.1016/j.scr.2009.12.003.

[20] KREKE M, SMITH R R, MARBÁN L, *et al*. Cardiospheres and cardiosphere-derived cells as therapeutic agents following myocardial infarction[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2012, 10(9): 1185-1194. DOI:10.1586/erc.12.102.

[21] KISHORE R, KHAN M. Cardiac cell-derived exosomes: changing face of regenerative biology[J]. Eur Heart J, 2017, 38(3): 212-215. DOI:10.1093/eurheartj/ehw324.

[22] JIANG X C, GAO J Q. Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery[J]. Int J Pharm, 2017, 521(1/2): 167-175. DOI:10.1016/j.ijpharm.2017.02.038.

[23] HELWA I, CAI J W, DREWRY M D, *et al*. A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents[J]. PLoS ONE, 2017, 12(1): e0170628. DOI: 10.1371/journal.pone.0170628.

[24] ZLOTOGORSKI-HURVITZ A, DAYAN D, CHAUSHU G, *et al*. Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation[J]. J Histochem Cytochem, 2015, 63(3): 181-189. DOI:10.1369/0022155414564219.

[25] BIAN S Y, ZHANG L P, DUAN L F, *et al*. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model[J]. J Mol Med, 2014, 92(4): 387-397. DOI:10.1007/s00109-013-1110-5.

[26] FENG Y L, HUANG W, WANI M, *et al*. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 *via* miR-22[J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e88685. DOI:10.1371/journal.pone.0088685.

[27] LU H Q, LIANG C, HE Z Q, *et al*. Circulating miR-214 is associated with the severity of coronary artery disease[J]. J Geriatr Cardiol, 2013, 10(1): 34-38. DOI:10.3969/j.issn.1671-5411.2013.01.007.

(收稿:2019-07-08;修回:2019-09-27)

(编辑 栾 嘉)