DOI:10.16016/j.1000-5404.202104089

人脂肪干细胞外泌体对烟熏诱导小鼠炎症和肺部损伤的治疗作用

连细华[1],苏小珊[2],叶祥嘉[2],王大春[3],曾奕明[2,3],朱志兴[2,3] 362000 福建 泉州,福建医科大学附属第二医院:医学影像科[1],呼吸与危重症医学科,福建省呼吸医学中心[2],干细胞实验室[3]

[摘要] **目的** 探讨人脂肪干细胞(human adipose-derived stem cells, hADSCs)外泌体对烟熏诱导慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)小鼠炎症反应和肺部损伤的治疗作用和机制,每组8只。**方法** 从hADSCs的培养上清液中分离外泌体。C57bl/6小鼠按照随机数字表法分为对照组、COPD组和外泌体组,每组8只。烟熏4周构建COPD模型,外泌体组小鼠经气道滴注30 μL外泌体(蛋白浓度100 mg/L),其余2组小鼠仅滴注等体积PBS,4周后处死小鼠并收集标本。ELISA法检测血清TNF-α、IL-6和趋化因子CXCL1水平;免疫荧光测定肺组织焦亡相关蛋白Caspase-1、NLRP3和ACS水平;Western blot测定肺组织凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、Caspase-3和Caspase-9的水平;HE和PAS染色观察肺组织病变和粘液分泌情况。**结果** 与对照组比较,COPD组小鼠体质量增长缓慢;血清TNF-α、IL-6和CXCL1均升高;肺组织Caspase-1、NLRP3和ACS表达增多,Bcl-2表达减少,而Bax、Caspase-3和Caspase-9表达均增加($P<0.05$)。与COPD组比较,外泌体组小鼠体质量增长较快;血清TNF-α、IL-6和CXCL1均降低($P<0.05$);肺组织Caspase-1、NLRP3和ACS表达减少,Bcl-2表达增加,而Bax、Caspase-3和Caspase-9表达减少($P<0.05$)。COPD组小鼠肺组织破坏明显,可见大量粘液分泌;外泌体治疗后小鼠肺组织损伤减轻,粘液分泌明显减少。**结论** hADSCs外泌体可减轻烟熏诱导的炎症水平,抑制肺组织焦亡和凋亡发生,减少气道粘液分泌,促进肺损伤修复从而治疗COPD。

[关键词] 脂肪干细胞外泌体;炎症;细胞焦亡;细胞凋亡;粘液分泌;肺损伤
[中图法分类号] R-332; R329.2; R563.05 [文献标志码] A

Therapeutic effect and underlying mechanism of exosomes from human adipose-derived stem cells on smoke-induced inflammation and lung injury in mice

LIAN Xihua[1], SU Xiaoshan[2], YE Xiangjia[2], WANG Dachun[3], ZENG Yiming[2,3], ZHU Zhixing[2,3] [1]Department of Medical Imaging, [2]Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Respiratory Medicine Centre of Fujian Province, [3]Stem cell Research Lab, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian Province, 362000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the therapeutic effects of exosomes from human adipose-derived stem cells (hADSCs-Exos) on the inflammation and lung injury in mice with smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and explore the underlying mechanism. **Methods** Exosomes were isolated from culture supernatant of hADSCs. A total of 24 male C57bl/6 mice were randomly divided into 3 groups ($n=8$ for each group), namely the control, COPD and exosomes-treated group, respectively. The mice of the latter 2 groups were exposed to cigarette smoke for 4 weeks to establish the COPD model. The exosomes-treated group received intratracheal instillation of 30 μL hADSCs-Exos (100 mg/L), while the control and COPD groups were treated with 30 μL PBS. Their body weights were monitored weekly for 4 weeks before being sacrificed. The concentrations of TNF-α, IL-6 and chemokine CXCL1 were detected by ELISA. The levels of pyroptosis-related proteins in the lungs like Caspase-1, ASC and NLRP3 were determined using

[基金项目] 国家重点研发计划(2016YFC1304);国家自然科学基金面上项目(82070021)
[通信作者] 朱志兴,E-mail:zhu_zhi_xing@fjmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

immunofluorescence assay, and the expression levels of apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were measured by Western blotting. In addition, pathological abnormalities of the lungs and mucus secretion in the airway were observed after HE and PAS staining. **Results** Compared with the control group, the mice in the COPD group had lower body weight and higher concentrations of TNF-α, IL-6 and CXCL1, up-regulated expression of Caspase-1, ASC and NLRP3 but down-regulated level of Bcl-2 in the lungs, and those of Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were increased (all $P<0.05$). In comparison with the COPD group, the exosomes-treated group had higher body weight, lower levels of TNF-α, IL-6 and CXCL1, as well as down-regulated Caspase-1, ASC, NLRP2, Bax, Caspase-3 and Caspase-9, while the expression of Bcl-2 was increased (all $P<0.05$). Histologically, lung tissues were severely damaged and pulmonary mucus secretion was obvious in the COPD group, whereas, the injuries were relieved with diminished mucus production in the exosomes-treated group. **Conclusion** hADSCs-Exos can alleviate smoke-induced inflammation, inhibit pyroptosis and apoptosis, reduce mucus secretion in lung tissues, and then thereby contribute to the repair of lungs in COPD.

[**Key words**] exosomes from adipose-derived stem cells; inflammation; pyroptosis; apoptosis; mucus secretion; lung injury

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFC1304) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (82070021). Corresponding author: ZHU Zhixing, E-mail: zhu_zhi_xing@fjmu.edu.cn

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的以气流持续受限为特征的慢性气道炎症性疾病,具有很高的致残率和致死率,给人类带来了巨大的生命威胁和沉重的经济负担[1]。尽管越来越多的治疗策略应用于 COPD 的治疗[2],但仍缺乏可减轻肺损伤和促进肺损伤修复的治疗方法[3]。

干细胞是一类具有自我更新和多向分化潜能的细胞,具有强大的组织修复功能。干细胞疗法逐渐成为多种疾病新的治疗手段[3]。脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)因其来源广泛、取材方便和增殖活性高等特点已成为干细胞治疗领域的研究热点[4]。研究表明,ADSCs 移植可减轻 COPD 肺损伤并促进肺减容术后肺组织修复[5-6]。然而,ADSCs 在 COPD 炎症反应和肺损伤中的研究仍较少,其作用和机制需进一步探明。

外泌体是一种细胞分泌,由细胞膜包被,在细胞间通讯中起重要作用的小囊泡[7]。干细胞外泌体是干细胞发挥治疗作用的主要成分。相较于干细胞疗法而言,干细胞外泌体疗法的致癌和致肺栓塞风险均低,且外泌体具有低免疫原性、易保存和耐低温等优点[8],因此,外泌体作为干细胞无细胞治疗的工具为多种疾病的治疗开辟了新的方向[9]。研究显示,ADSCs 外泌体具有多种生理效应,如减少缺血再灌注导致的神经元凋亡和脑梗死面积、抑制弹性蛋白酶诱导的肺气肿的形成、促进糖尿病小鼠创面愈合和诱导促炎巨噬细胞向抗炎巨噬细胞转化等[10-13]。然而,其对烟熏诱导的 COPD 的肺损伤的治疗作用及其机制仍未明确。

因此,本研究采用原代培养人脂肪干细胞(hADSCs),提取其来源的外泌体,建立烟熏诱导的 COPD 小鼠模型,探讨 hADSCs 外泌体对 COPD 小鼠炎症反应和肺损伤的治疗作用及其机制,从而为 hADSCs 外泌体在 COPD 治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级健康雄性 C57bl/6 小鼠,体质量 18~20 g,6~8 周龄,购自华中农业大学实验动物中心,生产许可证号:SCXY(鄂)2015-0019。实验前适应性喂养 1 周。

1.2 主要试剂和仪器

CD44-FITC、CD90-PE 和 GAPDH 一抗购自美国 Biolegend 公司;CD9、CD81、Flotillin、Calnexin、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 和同型抗体一抗购自美国 CST 公司;Caspase-1、ACS 和 NPRP3 一抗购自英国 Abcam 公司;DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;成脂培养基、成骨培养基和成软骨培养基购自赛业生物科技有限公司;外泌体提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;TNF-α、IL-6 和趋化因子(CXCL1)ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司;蛋白质提取试剂盒、BCA 蛋白定量剂盒、油红 O 染色、茜素红染色、阿尔新蓝染色、HE 染色、PAS 染色染液购自上海碧云天生物技术有限公司;NovoCyte 流式细胞仪购自美国安捷伦科技公司;透射电子显微镜购自日本 HITACHI 公

司;正置光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;电泳仪、电泳槽、转印槽购自美国 Bio-Rad Laboratories;酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;石蜡包埋机及切片机购自德国 Leica Biosystems;数字病理扫描系统购自匈牙利 3DHISTECH 公司。

1.3 方法

本研究方案经福建医科大学附属第二医院伦理委员会审批通过(2021-351),动物实验符合《实验动物管理条例》。

1.3.1 hADSCs 的原代培养 参考文献的方法原代培养和鉴定 hADSCs[14]。用预冷的无菌 PBS 溶液冲洗收集的腹部皮下脂肪组织,用无菌眼科剪剪碎并置于含双抗的 PBS 溶液中浸泡 30 min。用不含双抗的 PBS 溶液充分清洗后置于新鲜无菌 PBS 溶液中,加入等体积的 0.25%的Ⅰ型胶原酶,置于摇床上震荡消化 30 min(37 ℃),加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化。细胞悬液经离心后用新鲜含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基重悬,置于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养,每 3 天更换 1 次培养液,待细胞融合度为 80%~90%时按 1∶2比例传代。取处于对数生长期的第 3~6 代细胞用于后续实验。

1.3.2 hADSCs 的鉴定 用流式细胞术检测干细胞表面标志物 CD44 和 CD90 的表达;此外,用脂肪细胞分化诱导液、成骨细胞诱导液和成软骨细胞分化诱导液培养 hADSCs,置于显微镜下观察细胞形态并分别行油红 O 染色、茜素红染色和阿尔新蓝染色,评估 hADSCs 的多向分化能力。

1.3.3 外泌体提取、鉴定及浓度测定 取第 4 代 hADSCs,待其融合度为 80%时更换无外泌体的基础培养基(不含胎牛血清)培养 24 h,收集培养上清液,根据外泌体提取试剂盒说明书提取 hADSCs 外泌体。电镜下观察外泌体的大小和形态;Western blot 法检测外泌体标志物 CD9、CD81、Flotillin 和内质网标记蛋白 Calnexin 水平;流式细胞术检测 CD9 和 CD81 表达情况;BCA 法测定外泌体的蛋白浓度,用无菌 PBS 溶液重悬外泌体,并调整外泌体浓度至蛋白浓度为 100 mg/L,置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.3.4 小鼠分组及处理 24 只小鼠按照随机数字表法分为对照组、COPD 组和外泌体组,每组各 8 只。将 COPD 组和外泌体组小鼠置于有机玻璃箱内建立烟熏诱导的 COPD 小鼠模型[15]。对照组小鼠仅置于箱内而不进行烟熏。烟熏 4 周后(最后一次烟熏 24 h 后),外泌体组小鼠经气道滴注 30 μL 调整好浓度的外泌体,而对照组和 COPD 组小鼠仅滴注等体积的 PBS。

1.3.5 小鼠体质量监测 每周固定时间测定小鼠体质量,测定 8 周以评估小鼠体质量变化。

1.3.6 小鼠血清炎症因子水平测定 小鼠经腹腔注射过量戊巴比妥钠(0.15 g/kg)处死,充分暴露胸腔,心脏穿刺收集血液标本,静置 20 min,4 ℃离心后取上清,ELISA 法测定血清 TNF-α、IL-6 和 CXCL1 的浓度。

1.3.7 小鼠肺组织焦亡相关蛋白检测 小鼠左肺组织于中性福尔马林中固定 24 h,随后制成组织蜡块。将蜡块切成 4 μm 厚切片,切片脱蜡复水后免疫荧光染色测定肺组织焦亡相关蛋白 Caspase-1、ACS 和 NLRP3 的表达。

1.3.8 小鼠肺组织凋亡相关蛋白检测 将小鼠部分肺组织置于研钵中,加入液氮充分研磨,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后用 Western blot 法测定肺组织凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 的表达。

1.3.9 小鼠肺组织病理学检查 肺组织切片经脱蜡复水后行 HE 和 PAS 染色,染色后的切片置于显微镜下观察并分析肺组织损伤及粘液分泌情况。

1.4 统计学分析

所有数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,满足正态分布和方差齐性的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 LSD-t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

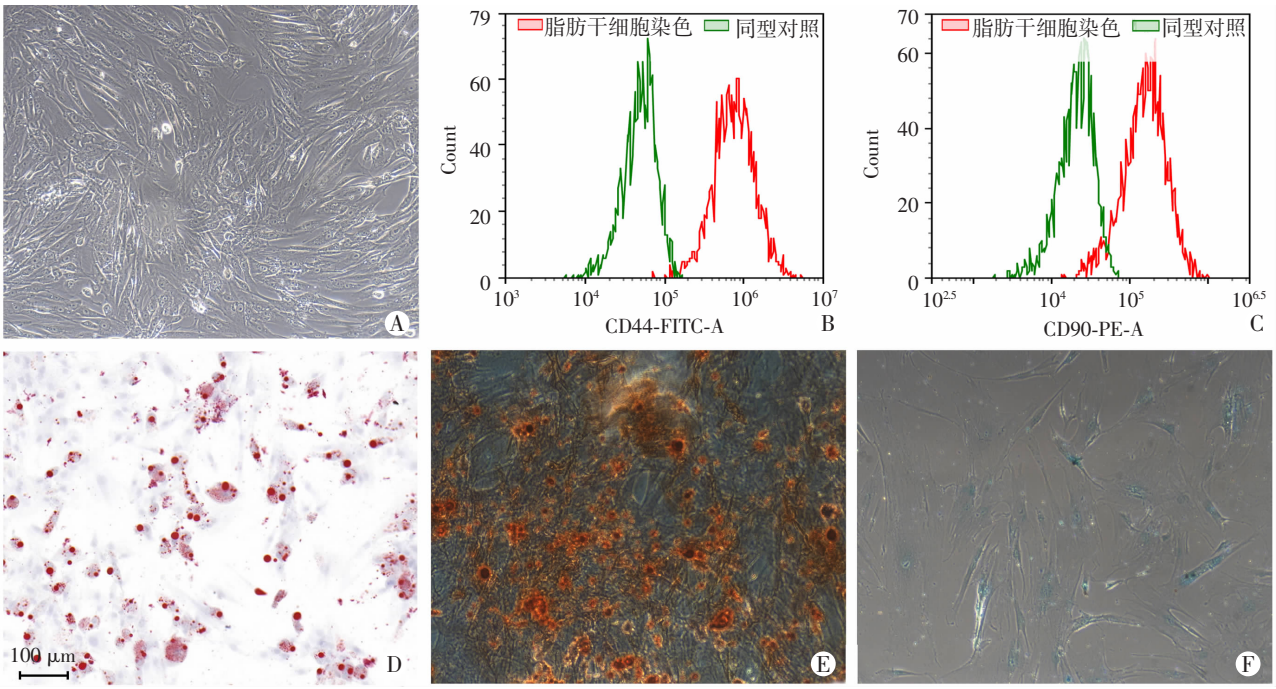
2 结果

2.1 hADSCs 培养结果

hADSCs 培养 24 h 后贴壁,大部分 hADSCs 呈圆形,随培养时间延长逐渐转变为长梭形,排列紧密,呈巢状(图 1A)。流式细胞术结果显示干细胞特异标志物 CD44 和 CD90 均为阳性,阳性率分别为 90.03%和 99.29%(图 1B、C)。hADSCs 经成脂诱导后逐渐变为圆形,显微镜下可见脂滴,油红 O 染色可见大量红色脂质(图 1D);经成骨诱导后,hADSCs 逐渐呈现不规则的多角型,显微镜下表现为重叠生长和矿盐沉积,茜素红染色可见红色钙结节(图 1E);经成软骨诱导后,hADSCs 逐渐形成聚集的细胞团块,阿尔新蓝染色阳性(图 1F)。

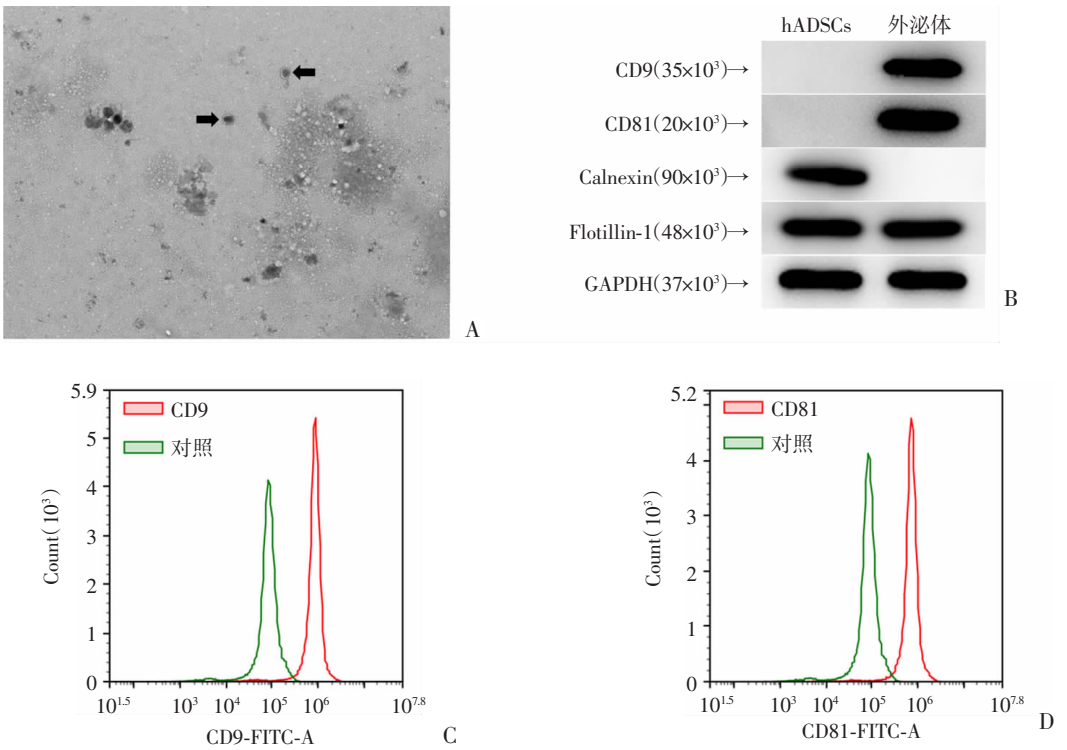
2.2 外泌体鉴定

从培养上清液提取的囊泡经磷钨酸负染后呈杯状,直径约为 100 nm,可见膜结构包被(图 2A)。Western blot 结果显示外泌体标记物 CD9、CD81 和 Flotillin 均为阳性,而内质网标记蛋白 Calnexin 为阴性(图 2B)。流式细胞术结果显示 CD9 和 CD81 均为阳性,阳性率分别为 96.05%和 95.19%(图 2C、D)。



A:hADSCs 的形态观察(×100);B、C:流式细胞术显示 hADSCs 的特异标志物 CD44 和 CD90 均为阳性;D~F:hADSCs 油红 O 染色、茜素红染色和阿尔新蓝染色均阳性(×200)

图 1 hADSCs 的培养和鉴定



A:电镜下观察 hADSCs 来源的外泌体的形态(×5 000,箭头示);B:Western blot 检测 CD9、CD81、Flotillin 和 Calnexin 在 hADSCs 和 hADSCs 来源的外泌体中的表达;C、D:流式细胞术检测 CD9 和 CD81 在 hADSCs 来源的外泌体中的表达;E:半定量分析

图 2 hADSCs 来源的外泌体鉴定

表 1 各组小鼠体质量变化情况(g, $\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周
对照组	19.25±0.89	20.87±1.12	22.75±0.89	25.00±0.54	26.37±0.52	28.00±0.76	29.25±1.28	30.75±0.71
COPD 组	19.50±0.53	20.37±0.52	21.00±0.53[a]	21.87±0.83[a]	23.12±0.64[a]	24.25±0.89[a]	25.25±0.71[a]	26.50±0.76[a]
外泌体组	19.50±0.75	20.25±0.71	20.50±0.53[a]	22.00±0.76[a]	24.00±0.53[ab]	25.75±0.71[ac]	26.75±0.46[ac]	28.00±0.76[ac]

a: $P<0.01$, 与对照组比较;b: $P<0.05$, c: $P<0.01$,与 COPD 组比较

2.3 小鼠体质量变化

如表 1 所示,从第 3 周开始,COPD 组和外泌体组小鼠体质量低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。从第 5 周开始,外泌体组小鼠超过 COPD 组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 小鼠血清炎症因子水平

如表 2 所示,相对于对照组,COPD 组小鼠血清 TNF-α、IL-6 和 CXCL1 水平均升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。外泌体组小鼠血清 TNF-α、IL-6 和 CXCL1 水平较 COPD 组均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 各组小鼠血清 TNF-α、IL-6 和 CXCL1 水平(ng/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	TNF-α	IL-6	CXCL1
对照组	13.41±3.15	13.61±2.64	51.21±9.46
COPD 组	48.13±6.59[a]	31.27±4.51[a]	109.29±16.03[a]
外泌体组	18.37±4.42[b]	13.51±0.94[b]	70.59±8.60[b]

a: $P<0.01$, 与对照组比较;b: $P<0.01$, 与 COPD 组比较

2.5 小鼠肺组织焦亡和凋亡相关蛋白表达

如图 3 所示,与对照组相比,COPD 组小鼠肺组织 Caspase-1、ACS 和 NLRP3 表达增加,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于 COPD 组,外泌体组小鼠肺组织 Caspase-1、ACS 和 NLRP3 表达减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,COPD 组小鼠肺组织 Bcl-2 表达下降,而 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达上升;相较于 COPD 组,外泌体组小鼠肺组织 Bcl-2 表达增高,而 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 的表达下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。Caspase-3 和 Caspase-9 的前体 pro-Caspase-3 和 pro-Caspase-9 在 3 组小鼠肺组织中的表达水平无明显差异。

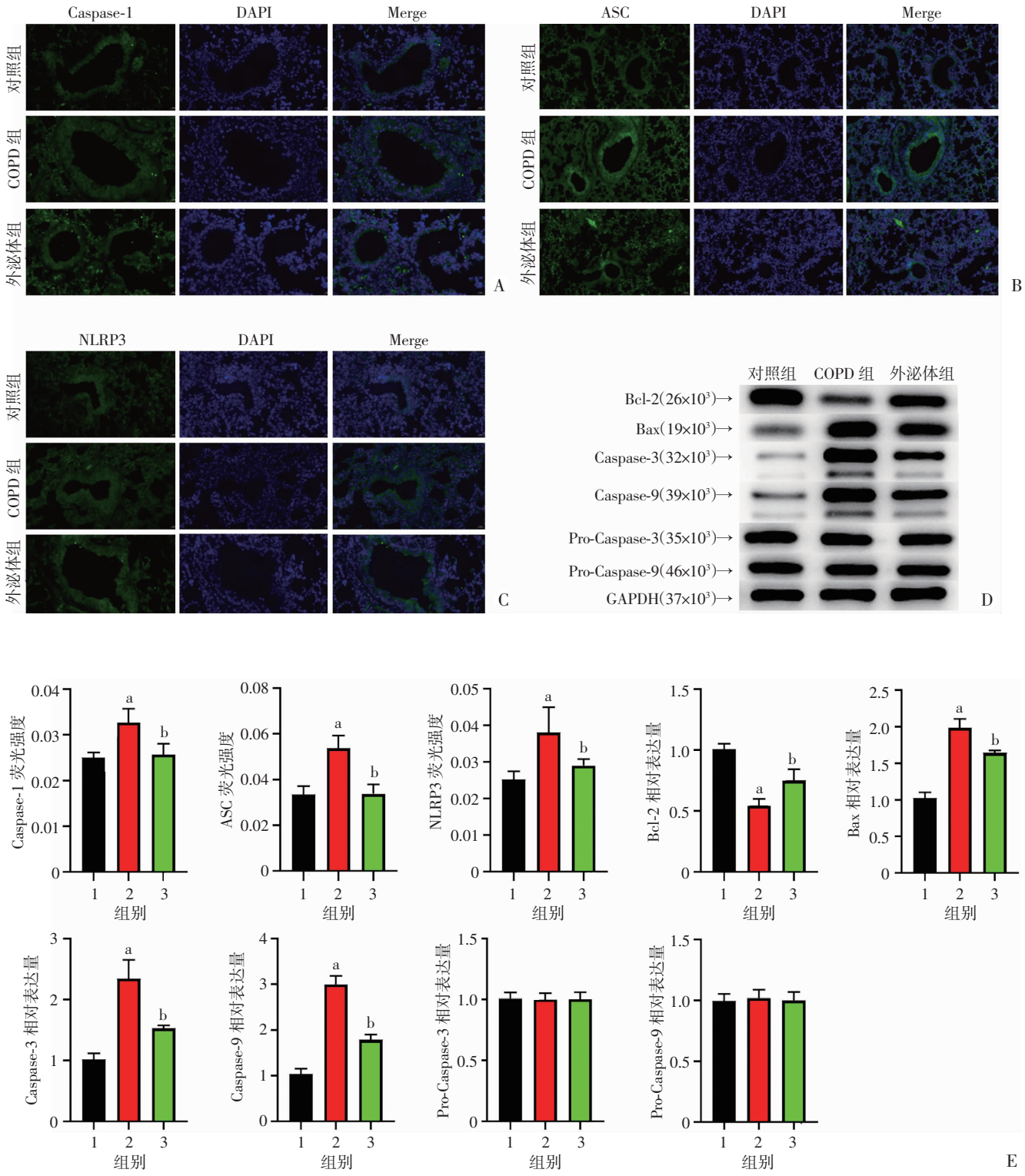
2.6 小鼠肺组织病理学改变

HE 染色结果显示,对照组小鼠肺泡细胞结构完整,血管形态正常,肺组织未见明显病变(图 4A);而 COPD 组小鼠支气管壁增厚,上皮细胞增多,充满整个管腔,血管平滑肌疏松水肿,血管管腔可见粘液栓,肺泡壁增厚(图 4B);外泌体组小鼠支气管上皮细胞完整,支气管腔内干净,血管形态正常,仅个别血管管腔可见粘液栓(图 4C)。PAS 染色结果显示,对照组小鼠肺组织内无明显粘液分泌(图 4D);COPD 组小鼠肺组织内可见大量粘液分泌(4E);而外泌体组小鼠肺组织内粘液分泌明显减少(图 4F)。

3 讨论

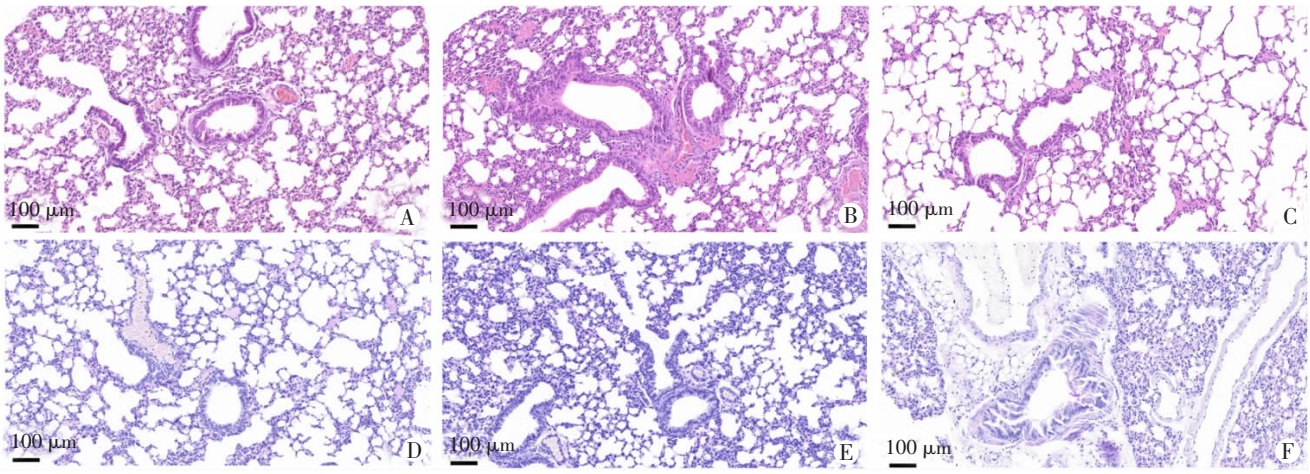
随着对干细胞研究的深入,干细胞疗法有望成为多种疾病新的治疗选择,然而,其临床应用仍存在很多挑战[16]。干细胞旁分泌效应是干细胞疗法的主要机制,而干细胞外泌体可在细胞间传递多种生物活性物质,是干细胞旁分泌效应的主要执行者之一[8]。近年来,干细胞外泌体已成为干细胞治疗的研究热点[12]。随着全球人口老龄化及环境污染的加剧,COPD 的发病率持续升高,且居全球死因第 3 位,已成为威胁人类健康的重大公共卫生问题之一[1,17]。探索一种可以有效减轻炎症反应水平和修复肺损伤的治疗方法是 COPD 研究领域亟须解决的难点和重点。初步研究表明,ADSCs 及其外泌体具有抑制肺气肿形成、降低肺损伤严重程度及促进肺减容术后肺组织修复的作用[5-6,11],因此,ADSCs 及其外泌体可能成为 COPD 治疗的曙光。鉴于干细胞的缺点及外泌体的优点[8],本研究对 hADSCs 来源的外泌体在 COPD 炎症反应和肺损伤治疗中的作用及机制进行探讨。

本研究结果表明,原代培养的细胞可贴壁于培养皿上,阳性表达干细胞表面标志物,具有多向分化潜能且符合 ADSCs 典型的形态学特征[18],因此,获得的细胞可确认为 hADSCs。hADSCs 上清液中的囊泡阳性表达外泌体标记蛋白,未表达内质网标记蛋白,且其大小和形态均与外泌体特点相符[18],因此,从 hADSCs 上清液中分离的囊泡可确认为 hADSCs 来源的外泌体,且纯度较高。小鼠经烟雾诱导后体质量增长减慢,炎症反应水平升高,气道粘液分泌增多且肺组织病理学表现符合 COPD 病理学改变特点[19],表明烟熏诱导的 COPD 小鼠模型制备成功。经 hADSCs 来源的外泌体治疗后,COPD 小鼠体质量增长速度逐渐加快,炎症反应水平降低,气道粘液分泌减少,肺组织病变明显减轻。上述结果表明 hADSCs 外泌体可减轻 COPD 小鼠炎症反应水平,减少气道粘液分泌,减轻肺损伤的严重程度从而改善 COPD 小鼠的一般状态。



A~C:免疫荧光检测 Caspase-1、ACS 和 NLRP3 在对照组、COPD 组和外泌体组小鼠肺组织中的表达(×200);D:Western blot 检测焦亡及凋亡相关蛋白在对照组、COPD 组和外泌体组小鼠肺组织中的表达;E:半定量分析 1:对照组;2:COPD 组;3:外泌体组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 COPD 组比较

图 3 各组小鼠肺组织焦亡及凋亡相关蛋白表达



A~C:分别为对照组、COPD 组和外泌体组小鼠肺组织 HE 染色;D~F:分别为对照组、COPD 组和外泌体组小鼠肺组织 PAS 染色

图 4 各组小鼠肺组织病理变化

炎症细胞活化并分泌多种促炎介质是 COPD 患者的主要特征之一,因此,可在 COPD 患者血清中检测到多种浓度升高的细胞因子和趋化因子[20-21]。其中,TNF-α 和 IL-6 在炎症的形成和级联放大中起重要作用[20],而趋化因子 CXCL1 可趋化多种炎症细胞至损伤部位[21]。因此,血清中 TNF-α、IL-6 和 CXCL1 的水平可反映 COPD 炎症反应的程度。本研究结果显示,与对照组相比,COPD 小鼠血清 TNF-α、IL-6 和 CXCL1 的水平均明显升高,表明 COPD 小鼠炎症反应水平升高,与既往研究结果一致;而外泌体治疗后,TNF-α、IL-6 和 CXCL1 水平均明显下降。上述结果提示 hADSCs 外泌体可降低 COPD 炎症反应的水平。

细胞焦亡是最具炎性的细胞死亡方式,以细胞核固缩、DNA 断裂、细胞肿胀破裂和炎症介质释放为特征,在多种疾病的发生、发展中起重要作用[22]。细胞焦亡主要受 Caspase-1 的调节,活化的 Caspase-1 可与 ASC 和 NLRP3 组成 NLRP3 小体。而 NLRP3 小体的活化是细胞发生焦亡的前提[23]。研究显示,焦亡相关蛋白 Caspase-1、ASC 和 NLRP3 在 COPD 中表达升高,而 NLRP3 小体在 COPD 的炎症反应中起重要的调节作用[24-25]。本研究结果显示,与对照组相比,COPD 组小鼠肺组织 Caspase-1,ASC 和 NLRP3 表达量增多,表明 COPD 小鼠肺组织焦亡水平升高,与既往研究一致[24, 26]。hADSCs 外泌体治疗后,COPD 小鼠肺组织 Caspase-1,ASC 和 NLRP3 表达水平明显降低,细胞焦亡减少,表明 hADSCs 外泌体可降低 COPD 肺组织的焦亡水平。

细胞凋亡是一种以细胞膜收缩、染色质浓缩、细胞核碎裂和质膜起泡为特征的细胞死亡方式,在维持组织器官稳态中起重要作用,而失衡的细胞凋亡可促进多种疾病的发生、发展[27]。研究显示,COPD 肺组织凋亡水平升高;而肺组织凋亡水平升高与 COPD 肺气肿及肺损伤的发生密切相关[28]。细胞凋亡主要受 Bcl-2 和 Caspase 家族蛋白的调节[27]。本研究结果发现,相较于对照组,COPD 小鼠肺组织抗凋亡因子 Bcl-2 表达水平下降,而促凋亡蛋白 Bax 和凋亡执行蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 表达量则增多,说明 COPD 小鼠肺组织凋亡水平升高,与既往研究结果一致[29]。hADSCs 外泌体治疗后,COPD 小鼠肺组织 Bcl-2 表达升高,而 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达减少,细胞凋亡水平降低,提示 hADSCs 外泌体可降低 COPD 肺组织的凋亡水平。

本研究也存在一些不足,如烟熏 4 周的小鼠只能代表早期 COPD[30],也未对小鼠进行肺功能检测。因此,hADSCs 外泌体是否可以减轻长期烟熏所致的炎症反应和肺损伤,是否可以改善烟熏诱发的气流受限尚需进一步研究。

综上,hADSCs 外泌体可减轻 COPD 小鼠炎症反应水平、气道粘液分泌及肺损伤的程度,从而改善 COPD 小鼠一般状况,提示 hADSCs 外泌体具有治疗 COPD 的潜在作用。其机制可能与 hADSCs 外泌体抑制肺组织焦亡和凋亡水平、减轻炎症反应程度和减少粘液分泌从而促进肺损伤修复有关。

参考文献:

[1] RABE K F, WATZ H. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet (London, England), 2017, 389(10082): 1931-1940. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31222-9.

[2] WANG C X, ZHOU J D, WANG J Q, *et al*. Progress in the

mechanism and targeted drug therapy for COPD [J]. Signal Transduction Targeted Therapy, 2020, 5(1): 248. DOI: 10.1038/s41392-020-00345-x.

[3] HARRELL C R, SADIKOT R, PASCUAL J, *et al*. Mesenchymal stem cell-based therapy of inflammatory lung diseases: Current understanding and future perspectives [J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 4236973. DOI: 10.1155/2019/4236973.

[4] ARGENTATI C, MORENA F, BAZZUCCHI M, *et al*. Adipose stem cell translational applications: From bench-to-bedside [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3475. DOI: 10.3390/ijms19113475.

[5] SCHWEITZER K S, JOHNSTONE B H, GARRISON J, *et al*. Adipose stem cell treatment in mice attenuates lung and systemic injury induced by cigarette smoking [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(2): 215-225. DOI: 10.1164/rccm.201001-0126OC.

[6] SHIGEMURA N, OKUMURA M, MIZUNO S, *et al*. Lung tissue engineering technique with adipose stromal cells improves surgical outcome for pulmonary emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(11): 1199-1205. DOI: 10.1164/rccm.200603-406OC.

[7] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. Science, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.

[8] FORSBERG M H, KINK J A, HEMATTI P, *et al*. Mesenchymal stromal cells and exosomes: Progress and challenges [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 665. DOI: 10.3389/fcell.2020.00665.

[9] 刘培培, 杨晟楠, 代华平, 等. 外泌体在肺部疾病中的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(8): 692-697. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20190914-00629.
LIU P P, YANG S N, DAI H P, *et al*. The role of exosome in the lung diseases[J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2020, 43(8): 692-697. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20190914-00629.

[10] 郝海珍, 郭铁, 余丹. 脂肪间充质干细胞来源外泌体对脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡及炎症因子影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(17): 1656-1665. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201904034.
HAO H Z, GUO T, YU D. Effect of exosomes derived from adipose-derived mesenchymal stem cells on neuron apoptosis and inflammatory cytokines in a rat model of cerebral ischemia reperfusion[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(17): 1656-1665. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201904034.

[11] KIM Y S, KIM J Y, CHO R, *et al*. Adipose stem cell-derived nanovesicles inhibit emphysema primarily *via* an FGF2-dependent pathway [J]. Exp Mol Med, 2017, 49(1): e284. DOI: 10.1038/emm.2016.127.

[12] 王江文, 易阳艳, 朱元正, 等. 脂肪干细胞来源外泌体促进糖尿病小鼠创面愈合的实验研究[J]. 干细胞与组织工程, 2020, 34(1): 124-131. DOI: 10.7507/1002-1892.201903058.
WANG J W, YI Y Y, ZHU Y Z, *et al*. Experimental study of adipose-derived stem cell-derived exosomes in promoting wound healing in diabetic mice [J]. Stem Cell Tissue Engineering, 2020, 34(1): 124-131. DOI: 10.7507/1002-1892.201903058.

[13] 吴林, 张斌, 王倩梅, 等. 脂肪间充质干细胞来源外泌体对 M1 型巨噬细胞向 M2 型转化的影响[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(3): 1-7. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2019.03.001.
WU L, ZHANG B, WANG Q M, *et al*. Effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on transformation of M1 macrophages to M2 macrophages[J]. Med Pharm J Chin PLA, 2019, 31(3): 1-7. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2019.03.001.

[14] HEO J S, CHOI Y, KIM H O. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote M2 macrophage phenotype through exosomes[J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 7921760. DOI: 10.1155/2019/7921760.

[15] YANG D Q, XU D, WANG T, *et al*. Mitoquinone ameliorates cigarette smoke-induced airway inflammation and mucus hypersecretion in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90: 107149. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107149.

[16] YAMANAKA S. Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges[J]. Cell Stem Cell, 2020, 27(4): 523-531. DOI: 10.1016/j.stem.2020.09.014.

[17] ZHOU M G, WANG H D, ZENG X Y, *et al*. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-1158. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30427-1.

[18] TIAN M, TICER T, WANG Q K, *et al*. Adipose-derived biogenic nanoparticles for suppression of inflammation[J]. Small, 2020, 16(10): e1904064. DOI: 10.1002/smll.201904064.

[19] BERG K, WRIGHT J L. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease: progress in the 20th and 21st centuries[J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140(12): 1423-1428. DOI: 10.5858/arpa.2015-0455-RS.

[20] SHIN I S, SHIN N R, PARK J W, *et al*. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases *via* the suppression of Erk-Sp1 signaling[J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 50-60. DOI: 10.1111/jpi.12192.

[21] HENROT P, PREVEL R, BERGER P, *et al*. Chemokines in COPD: from implication to therapeutic use[J]. Int J Mol

Sci, 2019, 20(11): 2785. DOI:10.3390/ijms20112785.

[22] YU P, ZHANG X, LIU N, *et al*. Pyroptosis: mechanisms and diseases [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128. DOI: 10.1038/s41392-021-00507-5.

[23] SWANSON K V, DENG M, TING J P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(8): 477-489. DOI: 10.1038/s41577-019-0165-0.

[24] PINKERTON J W, KIM R Y, ROBERTSON A A B, *et al*. Inflammasomes in the lung [J]. Mol Immunol, 2017, 86: 44-55. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.01.014.

[25] 何子凡, 高岩, 王晓玲, 等. NLRP3 炎性小体在慢性阻塞性肺疾病患者机体炎症反应中作用的研究[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(2): 119-123. DOI: 10.7507/1671-6205.201707043.
HE Z F, GAO Y, WANG X L, *et al*. The role of NLRP3 inflammasome in inflammatory response in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin J Respir Crit Care Med, 2018, 17(2): 119-123. DOI: 10.7507/1671-6205.201707043.

[26] PENG Z Y, ZHANG W X, QIAO J F, *et al*. Melatonin attenuates airway inflammation *via* SIRT1 dependent inhibition of NLRP3 inflammasome and IL-1β in rats with COPD [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 62: 23-28. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.06.033.

[27] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193. DOI: 10.1038/s41580-018-0089-8.

[28] SAULER M, BAZAN I S, LEE P J. Cell death in the lung: the apoptosis-necroptosis axis [J]. Annu Rev Physiol, 2019, 81: 375-402. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114320.

[29] ZENG H H, LI T, HE X, *et al*. Oxidative stress mediates the apoptosis and epigenetic modification of the Bcl-2 promoter *via* DNMT1 in a cigarette smoke-induced emphysema model [J]. Respir Res, 2020, 21(1): 229. DOI: 10.1186/s12931-020-01495-w.

[30] FRICKER M, DEANE A, HANSBRO P M. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Expert Opin Drug Discov, 2014, 9(6): 629-645. DOI: 10.1517/17460441.2014.909805.

(收稿:2021-04-14;修回:2021-07-02)

(编辑 邓强庭)