DOI:10.16016/j.2097-0927.202402033

TGM2 过表达的骨髓间充质干细胞外泌体抑制乳酸介导的髓核细胞氧化应激性凋亡

娄金辉,高小新,张雨尧,翟 羽,李长青 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院骨科

[**摘要**] **目的** 探究转谷氨酰胺酶 2(transglutaminase2,TGM2)过表达的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)来源外泌体在乳酸介导的髓核细胞氧化应激性凋亡中的作用及机制。**方法** 选用 20 只 6 周龄雄性 SD 大鼠[体质量(350±50)g]用于提取髓核细胞。利用乳酸构建原代髓核细胞氧化应激性凋亡模型;利用慢病毒载体在 BMSCs 中过表达 TGM2 蛋白,提取外泌体并进行鉴定;后为验证 TGM2 过表达的外泌体抗髓核细胞氧化应激性凋亡潜在机制,利用流式细胞术对髓核细胞活性氧水平进行检测,Western blot、免疫荧光对髓核细胞 Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase3、磷酸化 PI3K、磷酸化 Akt、核内 Nrf2、胞质 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平及 Nrf2 核内荧光表达情况进行检测,分为 4 组($n=3$):对照组、乳酸处理组、乳酸+对照外泌体组、乳酸+TGM2 过表达外泌体组,评估髓核细胞的氧化应激性凋亡程度及 PI3K/Akt/Nrf2 通路变化情况。**结果** 10 mmol/L 乳酸能够更好的诱导髓核细胞氧化应激性凋亡($P<0.05$);对照 BMSCs 组和 TGM2 过表达 BMSCs 组均可产生外泌体且能够稳定过表达 TGM2($P<0.05$,$P<0.01$);且相较于乳酸处理组,乳酸+TGM2 过表达外泌体组和乳酸+对照外泌体组的髓核细胞均表现为凋亡率降低($P<0.05$),活性氧水平下降($P<0.05$),乳酸+TGM2 过表达外泌体组抗凋亡、活性氧蓄积效果更好($P<0.05$),髓核细胞内 Bax、Cleaved-Caspase3 蛋白表达均下降($P<0.05$),Bcl-2 蛋白水平均增高($P<0.05$),PI3K、Akt 磷酸化程度均增强($P<0.05$),Nrf2 核内表达均增加,抗氧化应激因子 HO-1 表达均增多,乳酸+TGM2 过表达外泌体组抗凋亡及 PI3K/Akt/Nrf2 通路激活程度更强($P<0.05$)。**结论** TGM2 过表达的 BMSCs 外泌体可抑制乳酸介导的髓核细胞氧化应激性凋亡,其机制可能与 PI3K/Akt/Nrf2 通路激活有关。

[**关键词**] 氧化应激性凋亡;外泌体;骨髓间充质干细胞;转谷氨酰胺酶 2;髓核细胞
[**中图法分类号**] R322.72; R329.28; R394.2 [**文献标志码**] A

BMSCs-derived exosomes overexpressing TGM2 inhibit lactate-induced oxidative stress related apoptosis in nucleus pulposus cells

LOU Jinhui, GAO Xiaoxin, ZHANG Yuyao, ZHAI Yu, LI Changqing Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and mechanism of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) overexpressing transglutaminase 2 (TGM2) in lactate-mediated oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. **Methods** Twenty 6-week-old male SD rats (350±50 g) were used to extract nucleus pulposus cells. Lactic acid was utilized to establish a model of oxidative stress-induced apoptosis in primary nucleus pulposus cells. Lentiviral vectors carrying TGM2 were employed to transfect BMSCs to overexpress the protein, and then exosomes were extracted from the BMSCs and identified. Subsequently, to investigate the potential mechanisms of TGM2-overexpressing exosomes against oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells, flow cytometry was used to detect the production of reactive oxygen species (ROS), and Western blotting and immunofluorescence assay were applied to measure the expression levels of Bax, Bcl-2, Cleaved-Caspase3, p-PI3K, p-Akt, n-Nrf2, c-Nrf2 and HO-1, and Nrf2

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(82172488)
[**通信作者**] 李长青,E-mail:changqli1970@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 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/)

nuclear translocation. The rate of oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells and changes in the PI3K/Akt/Nrf2 pathway were assessed in 4 groups of cells ($n=3$): control group, lactate treatment group, lactate+control exosome group, and lactate+TGM2-overexpressing exosomes group. **Results** Lactic acid of 10 mmol/L was found to be more effective in inducing oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells ($P<0.05$). Both control BMSCs and TGM2-overexpressing BMSCs could produce exosomes and stably overexpress TGM2 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the lactate treatment group, the nucleus pulposus cells in the lactate+TGM2-overexpressing exosome group and the lactate+control exosome group showed reduced apoptotic rates ($P<0.05$), as well as decreased ROS level ($P<0.05$). The lactate+TGM2-overexpressing exosome group exhibited better anti-apoptosis and ROS accumulation effects ($P<0.05$). Additionally, the expression of Bax and Cleaved-Caspase3 was decreased ($P<0.05$), that of Bcl-2 protein was increased ($P<0.05$), the phosphorylation of PI3K/Akt was enhanced ($P<0.05$), and both Nrf2 nuclear translocation and the expression of the antioxidant stress factor HO-1 were increased in nucleus pulposus cells. The lactic acid + TGM2-overexpressing exosome group showed stronger anti-apoptotic effects and activation of the PI3K/Akt/Nrf2 pathway ($P<0.05$). **Conclusion** Exosomes derived from BMSCs overexpressing TGM2 can inhibit lactate-mediated oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells, and the mechanism may be related to the activation of the PI3K/Akt/Nrf2 pathway.

[**Key words**] oxidative stress-induced apoptosis; exosomes; bone marrow mesenchymal stem cells; transglutaminase 2; nucleus pulposus cells

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82172488). Corresponding author: LI Changqing, E-mail: changqli1970@126.com

椎间盘退变是导致老年人慢性腰痛的重要原因。在目前的临床诊治方案中,止痛类药物、康复理疗等只是缓解疼痛症状的初级手段,而对于保守治疗效果不佳者最终都会走向手术治疗,但现有的手术方式均无法完全恢复退变椎间盘的生理功能。因此,如何实现退变椎间盘的修复和功能重建已是脊柱外科的研究热点和难点之一[1-4]。诸多研究表明,在椎间盘退变进程中,乳酸是导致髓核细胞氧化应激性损伤及其诱导的细胞凋亡的主要原因之一[5-8]。前期研究发现,乳酸在椎间盘无氧代谢活动中会大量蓄积,可进一步导致髓核细胞内活性氧蓄积,进而导致氧化应激性损伤及衰老[9],最终引起椎间盘退变,而氧化应激及其诱导的细胞凋亡要比衰老进展更为迅速。因此抑制乳酸介导的髓核细胞氧化应激性凋亡可能是治疗椎间盘退变的有效途径。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)移植在椎间盘退变的治疗上已展现出较好的疗效[10]。但由于椎间盘内独特的微环境,干细胞活性会受到抑制[11]。BMSCs 来源的外泌体是 BMSCs 分泌的生物活性囊泡,内含大量生物活性物质,如蛋白质、miRNA、细胞因子等,是参与细胞间通讯交流、旁分泌信号传导等生物学进程的重要媒介。此外,外泌体还具有低免疫原性、易于保存、性质稳定等特点,在椎间盘退变的治疗上与 BMSCs 生物学效应相似,已被广泛用于椎间盘退变的治疗[12]。

转谷氨酰胺酶 2(transglutaminase2,TGM2)是转谷氨酰胺酶家族中的一员,是具有三磷酸鸟苷水解酶活性的多功能蛋白,参与细胞凋亡、血管生成、伤口愈合、细胞分化、神经元再生和骨骼发育等多种生物学活动[13-14]。据报道,TGM2 参与多种骨骼相关疾病,可通过激活增强 BMSCs 的迁移和分化,促进 BMSCs 成骨相关基因的表达,并且与抗凋亡通路高度相关[15-16]。因此,我们推测 TGM2 过表达的外泌体在抗髓核细胞氧化应激性凋亡中具有更好的治疗效果。本研究拟探讨 TGM2 过表达的 BMSCs 外泌体在髓核细胞氧化应激性凋亡中的作用及机制,为基于 BMSCs 外泌体的椎间盘退变的无细胞疗法提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用陆军军医大学第二附属医院实验动物中心提供的 6 周龄雄性 SD 大鼠 20 只[体质量(350±50)g],用于提取髓核细胞。大鼠源性骨髓间充质干细胞购自中国赛业生物有限公司,所有实验均经陆军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(AMUWEC20226272)。

1.2 髓核细胞提取

20 只 SD 大鼠用 2%戊巴比妥钠过量麻醉处死,碘伏浸泡 30 min;去除尾部皮肤,用尖刀片从第 2 尾椎处依次获得 6~8 节段的尾椎髓核组织,1 000 r/min 离心 5 min;加入 5 mL 0.2% Ⅱ型胶原酶(中国索莱宝生物

有限公司),37 ℃恒温消化 1 h;70 目滤液器过滤,1 000 r/min 离心 5 min,在含有 12%胎牛血清(美国 HyClone 生物有限公司)的 DMEM/F12 完全培养基(美国 HyClone 生物有限公司)中培养。培养环境要求:5%CO_2,37 ℃恒温无菌孵箱。24、48 h 分别观察细胞贴壁情况,当细胞增长至 80%时,利用 0.25%胰蛋白酶(EDTA 0.02%)消化收集细胞并进行传代培养,2 代之前的髓核细胞被用于后续实验。

1.3 氧化应激性凋亡模型构建

分别利用 0、2、6、10 mmol/L 4 组浓度的乳酸(美国 Sigma 生物有限公司)对髓核细胞进行干预,处理条件参照本课题组前期文献[9]。

1.4 TGM2 过表达慢病毒体系构建

为构建 TGM2 过表达体系,根据处理条件将 BMSCs 分为对照 BMSCs 组、TGM2 过表达 BMSCs 组、对照慢病毒处理 BMSCs 组($n=3$)。根据文献[14]构建 TGM2 过表达慢病毒、对照慢病毒,病毒由中国吉凯基因公司协助构建。将 BMSCs(2×10^4/孔)接种于 24 孔板内,培养 24 h 后达到约 80%的融合度。选择感染复数(multiplicity of infection,MOI)为 20 的慢病毒对细胞进行转染。孵育 48 h 后,分别加入 0.5 μg/mL 嘌呤霉素(美国 MCE 生物有限公司)。筛选稳定转染细胞进行传代培养。Western blot 检测 TGM2 的相对水平,验证病毒转染效果。

1.5 细胞凋亡率检测

为构建髓核细胞氧化应激性凋亡模型,根据乳酸浓度(0、2、6、10 mmol/L)将髓核细胞分为 4 组($n=3$)。为验证 TGM2 过表达的 BMSCs 外泌体抗髓核细胞氧化应激性凋亡效果,根据处理因素将髓核细胞分为对照组、乳酸处理组、乳酸+对照外泌体组、乳酸+TGM2 过表达外泌体组($n=3$)。利用 AnnexinV-PE/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒(中国碧云天生物有限公司)。使用不含 EDTA 的胰酶消化并收集髓核细胞,PBS 洗涤后离心、重悬,每管加入 5 μL AnnexinV-PE 和 7-AAD,室温下避光孵育 15 min,流式细胞分析仪(美国 Gallios 公司)检测标记细胞,用 FlowJo 软件进行数据分析。

1.6 活性氧水平检测

该实验分组与 1.5 相同;使用活性氧检测试剂盒(中国索莱宝生物有限公司)检测不同处理组髓核细胞内活性氧水平差异。向髓核细胞中加入 2 mL 浓度为 10 μmol/L DCFH-DA 探针(无血清培养基稀释),37 ℃避光孵育 20 min。用 PBS 充分洗涤以去除未加载的探针,使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,PBS 避光洗涤后重悬,上机检测。根据流式细胞仪读取的 DCFH-DA 探针的相对荧光强度进行统计分析。

1.7 外泌体提取

为提取 BMSCs 外泌体,根据处理条件将 BMSCs 分为对照 BMSCs 组、TGM2 过表达 BMSCs 组、对照慢病毒处理 BMSCs 组($n=3$)。分别在含有 10%无外泌体血清的培养基(中国 VivaCell 生物有限公司)培养,待细胞融合度达到 70%~80%后,收集培养基上清。超速离心法提取外泌体[17]。离心操作步骤如下:将培养上清以 500×g 离心 10 min,去除活细胞;2 000×g 离心 30 min 去除死细胞;10 000×g 离心 2 次去除大囊泡;用 0.22 μm 滤器过滤,100 000×g 超高速离心 70 min,共 2 次,得到外泌体沉淀,将其悬浮于 100 μL PBS 待用。

1.8 外泌体鉴定

为验证 BMSCs 外泌体被成功提取,根据处理条件将 BMSCs 外泌体分为对照外泌体组、TGM2 过表达外泌体组($n=3$)。首先使用纳米透射电镜(加速电压设置为 80 kV)对外泌体形态进行观察;取 5 μL 外泌体滴加在铜网上,滴加 2%的乙酸双氧铀室温孵育 1 min。孵育结束后,吸干多余液体,室温干燥 20 min,上机观察。接下来利用纳米粒径追踪分析仪对外泌体粒径和颗粒浓度进行检测。取冻存样本,25 ℃水浴解冻,冰上放置。1×PBS 稀释,确保每个视野外泌体含量 40~50 个,上机检测。

1.9 Western blot 检测

为验证 BMSCs 外泌体被成功提取,利用 Western blot 试验对外泌体表面特异性标志物进行检测,并进行如下分组:对照外泌体组、TGM2 过表达外泌体组、对照慢病毒处理 BMSCs 组($n=3$)。为验证 BMSCs 外泌体内 TGM2 被成功过表达,根据处理条件将 BMSCs 外泌体分为对照外泌体组、TGM2 过表达外泌体组、对照慢病毒处理外泌体组($n=3$)。

使用 RIPA 裂解缓冲液(中国索莱宝生物有限公司)及 1% PMSF(中国索莱宝生物有限公司)冰上裂解髓核细胞 30 min,4 ℃下 15 000 r/min 离心 5 min。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物有限公司)测定样品蛋白浓度,后向样品中加入等量上样缓冲液(中国索莱宝生物有限公司),沸水浴 5 min。采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,然后将蛋白转至聚偏氟乙烯膜(PVDF)上(德国默克生物有限公司)。5%的脱脂奶粉室温封闭 1 h,使用一抗如下:CD81、Calnexin、TSG101、Bcl-2、Cleaved-Caspase3、Bax、TGM2、HO-1、CD81、Calnexin、TSG101 购自美国三鹰生物有限公司;p-PI3K 购自美国 Invitrogen 生物有限公司;p-Akt 购自中国 CST 生物有限公司;Nrf2 和 Keap1 购自英国 Abcam 生物有限公司;LaminB 购自英国 Abcam 公司;β-actin 购自中国爱博泰克生物有限公司。按说明书比例稀释,抗体 4 ℃摇床孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 次

后,相应种属二抗室温孵育 1 h。最后使用 Omni-ECL™ 超灵敏化学发光检测试剂盒(飞克级)和 ChemiDoc 成像系统对条带进行曝光成像。利用 Image J 软件对条带的灰度值进行测量和分析,所有结果一化于 β-actin 相对表达量。

1.10　Nrf2 免疫荧光

为验证 TGM2 过表达外泌体抗髓核细胞氧化应激性凋亡潜在机制,根据处理条件,将髓核细胞分为对照组、乳酸处理组、乳酸+对照外泌体组、乳酸+TGM2 过表达外泌体组($n=3$)。将髓核细胞接种于 24 孔板中,分组处理。待融合率达 80%时,去除培养基,用含 3%胎牛血清 PBS 充分洗涤,加入新鲜配制 4%多聚甲醛固定,洗涤 3 次;加入免疫染色通透液(中国碧云天生物有限公司)进行通透。加入 Nrf2 抗体,4 ℃环境下湿盒避光孵育过夜。洗涤后每孔加入荧光标记二抗,37 ℃孵育 60 min。使用荧光显微镜(德国蔡司)对结果进行观察并拍照。使用 Image J 软件对各组胞核与胞质荧光强度进行定量分析。

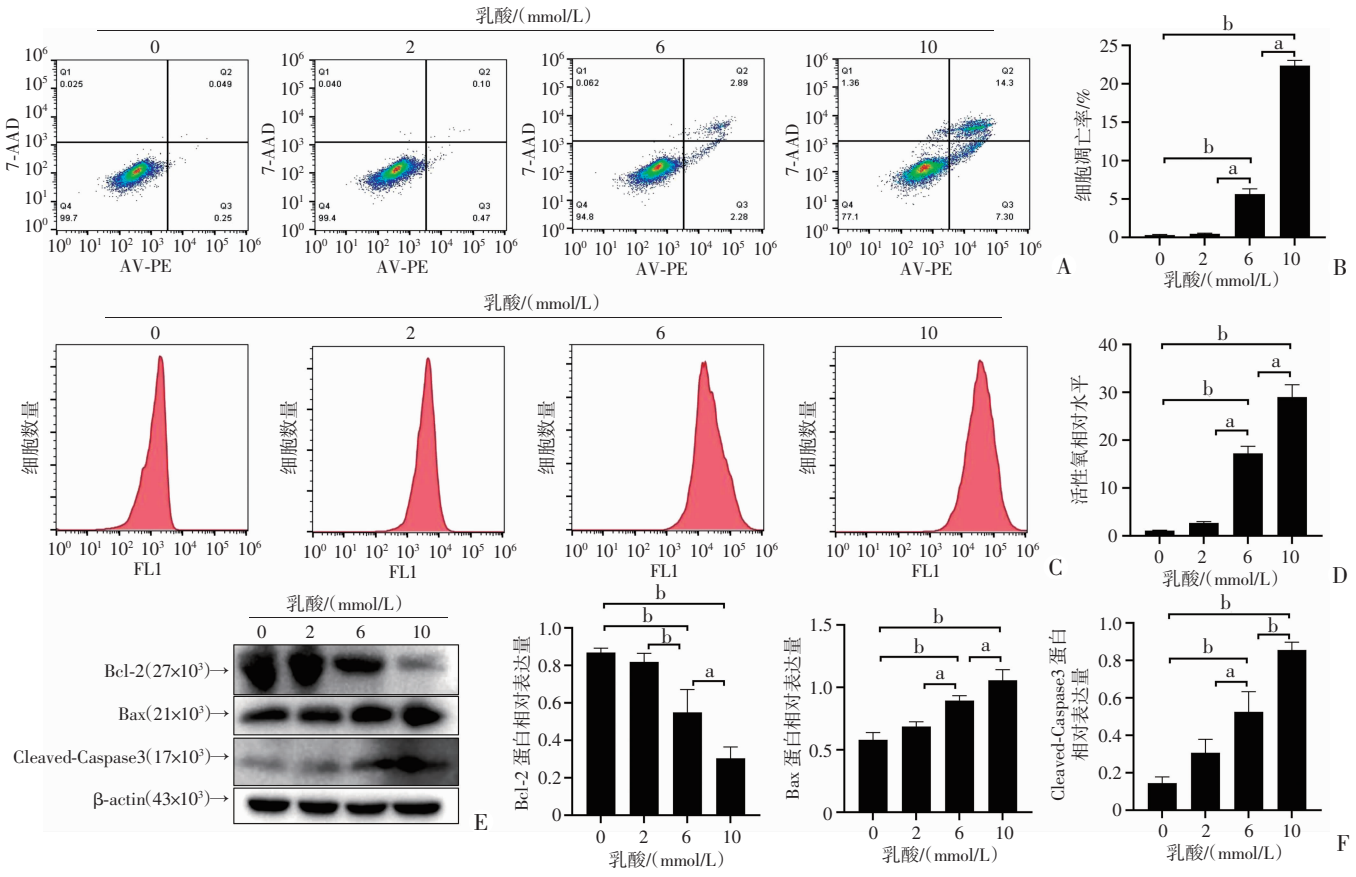
1.11　统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。每个实验至少重复 3 次。多组间比较采用单因素方差分析。使用 GraphPad Prism 10.2 进行统计分析和统计图绘制。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　构建乳酸介导的氧化应激性凋亡细胞模型

流式细胞术检测结果显示,与 0 mmol/L 乳酸处理比较,2、6、10 mmol/L 乳酸处理的髓核细胞凋亡率显著增加($P<0.05$,图 1A、B),活性氧水平亦显著增加($P<0.05$,图 1C、D)。Western blot 结果显示,随着乳酸处理浓度的变化,凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase3、Bax 表达量显著增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著减低($P<0.01$,$P<0.05$,图 1E、F)。上述结果表明,随着乳酸浓度增加,髓核细胞氧化应激水平增加,细胞凋亡程度加重。证实乳酸介导的髓核细胞氧化应激性凋亡模型建立成功。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:流式细胞术检测不同浓度乳酸处理后髓核细胞凋亡情况;B:髓核细胞凋亡率统计结果;C:流式细胞术检测不同浓度乳酸处理组髓核细胞内活性氧水平差异;D:髓核细胞活性氧水平统计结果;E:Western blot 检测各组髓核细胞凋亡相关蛋白表达量;F:蛋白相对表达量统计结果

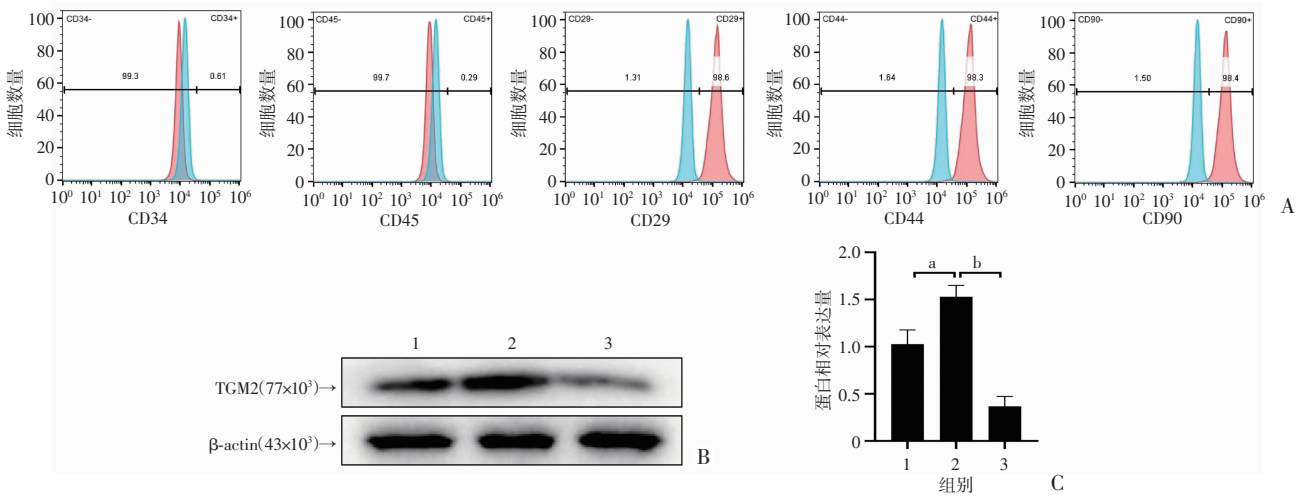
图 1　不同浓度乳酸处理后髓核细胞氧化应激性凋亡检测结果

2.2　BMSCs 干性鉴定及构建 TGM2 过表达的 BMSCs

通过流式细胞术对干细胞表面标志物进行检测,结果显示:干细胞阳性标志物 CD90、CD29、CD44 表达率高于 95%,干细胞阴性标志物 CD34、CD45 表达率低于 5%(图 2A),证明大鼠 BMSCs 具有干细胞特性。TGM2 过表达慢病毒转染构建 TGM2 过表达的 BMSCs,Western blot 结果提示,与对照 BMSCs 组及对照慢病毒处理 BMSCs 组比较,TGM2 过表达慢病毒可以显著增加 BMSCs 中 TGM2 蛋白的表达量($P<0.01$,图 2B、C)。

2.3　TGM2 过表达的外泌体提取、鉴定

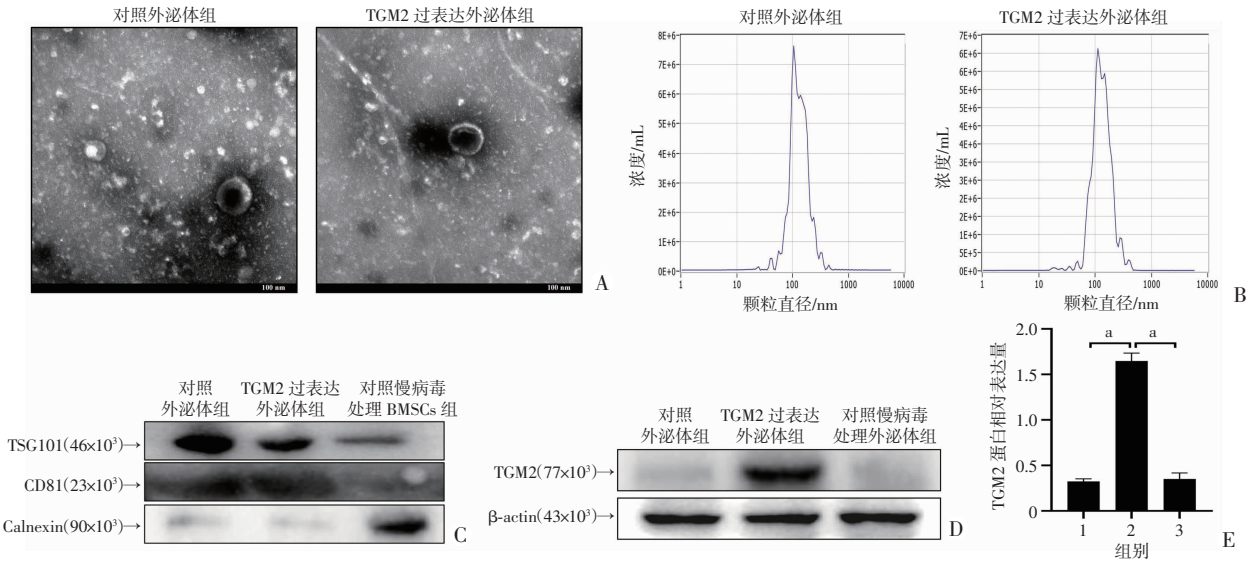
利用超速离心法提取 BMSCs 外泌体,纳米透射电镜及纳米粒径追踪分析检测结果提示:2 组外泌体形态均呈茶杯托样(图 3A),直径集中于 30~150 nm(图 3B),符合外泌体形态学特征。Western blot 实验结果显示,对照外泌体组和 TGM2 过表达外泌体组均高表达外泌体阳性标志蛋白 CD81、TSG101,低表达外泌体阴性标志蛋白 Calnexin(图 3C)。且与对照外泌体组及对照慢病毒处理外泌体组比较,过表达 BMSCs 内 TGM2 亦可显著增加 BMSCs 来源外泌体中 TGM2 蛋白的含量($P<0.05$,图 3D、E)。



1:对照 BMSCs 组;2:TGM2 过表达 BMSCs 组;3:对照慢病毒处理 BMSCs 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:流式细胞术检测 BMSCs 干细胞表型;B:Western blot 检测各组髓核细胞 TGM2 相对表达量;C:蛋白相对表达量统计结果

图 2　干细胞鉴定、TGM2 表达量检测结果



A:电镜观察外泌体形态;B:对照外泌体组(左)、TGM2 过表达外泌体组(右)的粒径分析;C:Western blot 检测外泌体相关蛋白表达;D:Western blot 检测各组外泌体 TGM2 表达量;E:TGM2 蛋白相对表达量统计结果　1:对照外泌体组;2:TGM2 过表达外泌体组;3:对照慢病毒处理外泌体组;a:$P<0.05$

图 3　外泌体提取鉴定及 TGM2 含量检测结果

2.4　TGM2 过表达的外泌体具有更强的抗髓核细胞氧化应激性凋亡的作用

流式细胞术结果表明:相较于乳酸处理组,乳酸+对照外泌体组和乳酸+TGM2 过表达外泌体组髓核细胞均表现为凋亡率减低,活性氧水平下降,乳酸+TGM2 过表达外泌体组较乳酸+对照外泌体组改善效果更好($P<0.01$,图 4A~D)。Western blot 结果表明:相较于乳酸处理组,乳酸+对照外泌体组和乳酸+TGM2 过表达外泌体组髓核细胞 Cleaved-Caspase3、Bax 表达量均减低,Bcl-2 表达量增加,乳酸+TGM2 过表达外泌体组较乳酸+对照外泌体组改善效果亦更显著($P<0.01$,$P<0.05$,图 4E、F)。上述结果证实:TGM2 过表达的外泌体能够显著抑制乳酸介导的髓核细胞氧化应激性凋亡。

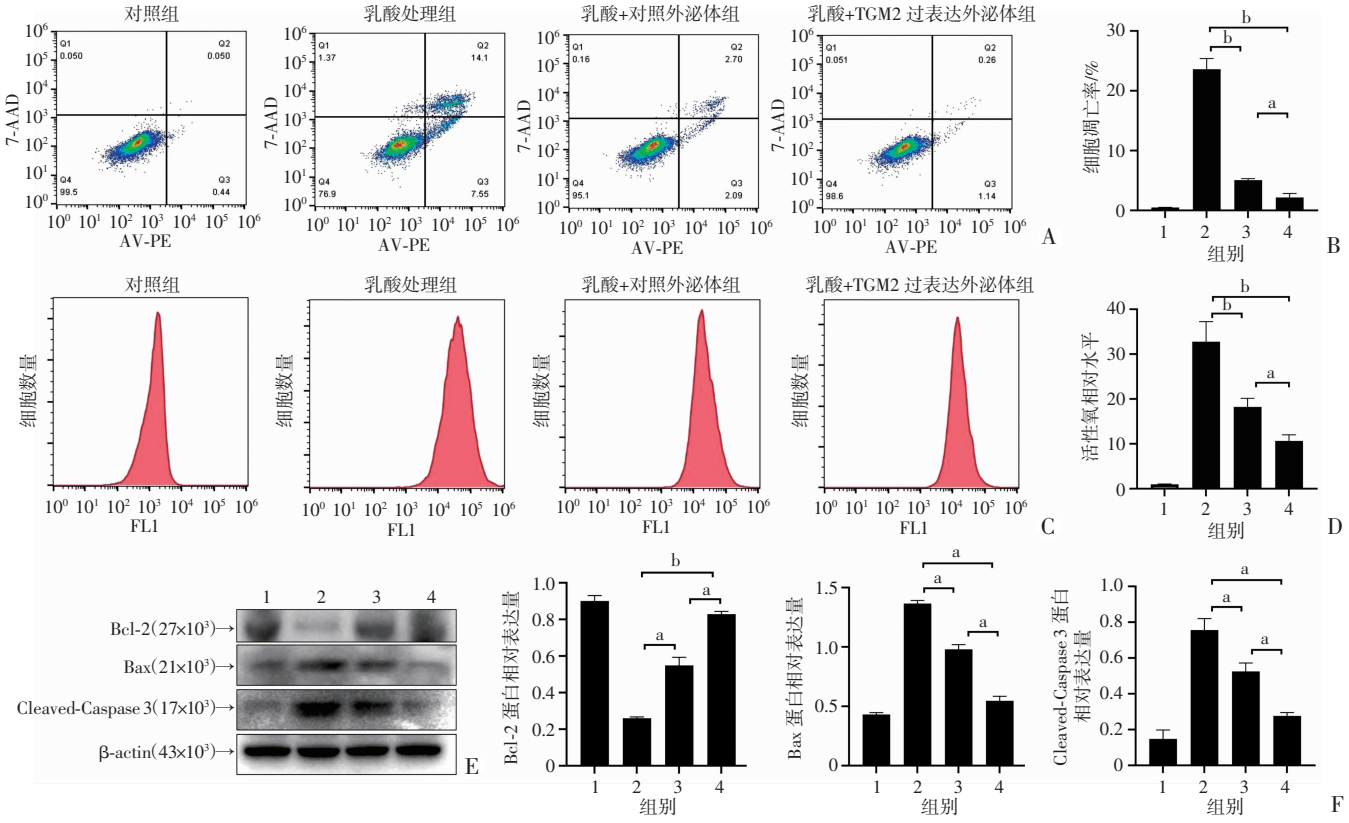
2.5　TGM2 过表达的外泌体可进一步激活 PI3K/Akt/Nrf2 通路

Western blot 结果表明:乳酸处理可下调髓核细胞内 PI3K、Akt 磷酸化水平和 Nrf2 核内表达水平,下调抗氧化应激因子 HO-1 的表达($P<0.01$,$P<0.05$,图 5A、B)。与乳酸+对照外泌体组比较,乳酸+TGM2 过表达外泌体组髓核细胞内 PI3K、Akt 磷酸化程度更高,Nrf2 核内表达水平更高,下游抗氧化应激因子 HO-1 表达量增加更为显著($P<0.01$,$P<0.05$,图 5A、B)。免疫荧光结果显示乳酸可抑制髓核细胞中 Nrf2 蛋白入核,乳酸+对照外泌体组和 TGM2 过表达外泌体组均可增强髓核细胞中 Nrf2 蛋白入核,乳酸+TGM2 过表达外泌体组亦更为显著($P<0.01$,图 5C、D)。

3　讨论

BMSCs 外泌体在椎间盘退变的治疗过程中已得到广泛的应用并展现出良好的治疗效果。由于椎间盘是人体最大的无血管组织结构,所以外泌体治疗主要通过椎间盘内注射的方式进行[18]。BMSCs 外泌体注射具有低免疫原性、易于保存、适合椎间盘内微环境、性质稳定等优点,在诸多文献和临床研究中已证实该种给药方式能够有效的将外泌体递送至椎间盘,并发挥抑制髓核细胞衰老、氧化应激性损伤、细胞凋亡等效果[19-20]。

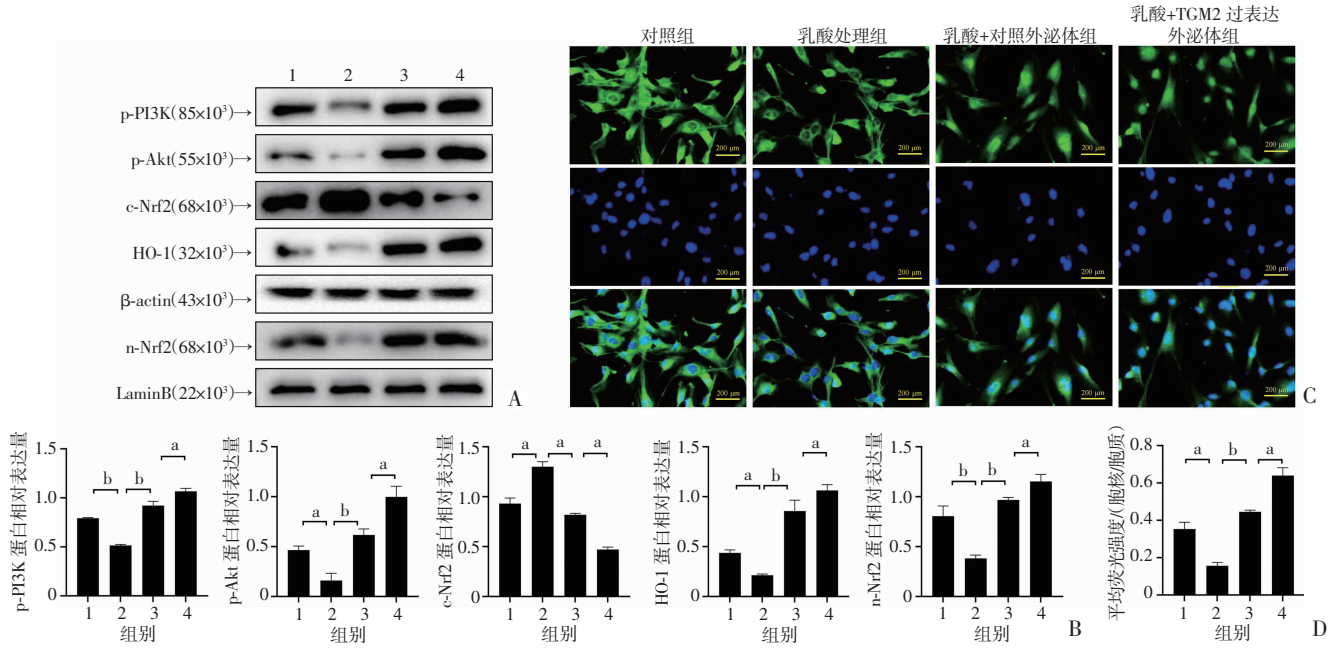
氧化应激参与椎间盘退变的发生发展[21]。在椎



1:对照组;2:乳酸处理组;3:乳酸+对照外泌体组;4:乳酸+ TGM2 过表达外泌体组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:流式细胞术检测不同处理组髓核细胞凋亡情况;B:髓核细胞凋亡率统计结果;C:流式细胞术检测不同处理组髓核细胞活性氧水平;D:髓核细胞活性氧水平统计结果;E:Western blot 检测各组髓核细胞凋亡相关蛋白表达量;F:Bcl-2,Bax, Cleaved-Caspase3 蛋白相对表达量统计结果

图 4　各组髓核细胞氧化应激性凋亡检测结果



1:对照组;2:乳酸处理组;3:乳酸+对照外泌体组;4:乳酸+ TGM2 过表达外泌体组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:Western blot 检测各组髓核细胞相关蛋白表达量;B:蛋白相对表达量统计结果;C:不同处理组 Nrf2 核内荧光表达情况;D:荧光强度统计分析

图 5 各组髓核细胞 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路变化情况及 Nrf2 免疫荧光入核情况检测结果

间盘退变进程中,过度的氧化应激即氧化应激性损伤会诱导髓核细胞发生凋亡[22],细胞凋亡可减少功能性椎间盘细胞的数量[23-24]。活性氧是介导氧化应激性损伤的重要物质,已被证实为促髓核细胞凋亡因子并可直接通过线粒体凋亡途径诱导髓核细胞凋亡[25-27]。椎间盘内的营养供应依靠于软骨终板的渗透,造就了其偏酸、低营养的特殊微环境[28]。椎间盘内恶劣的微环境可导致乳酸大量蓄积。前期研究表明,乳酸通过抑制 Akt 途径促进髓核细胞活性氧蓄积及线粒体损伤,进而导致髓核细胞氧化应激性衰老[9]。而相对于氧化应激性衰老,氧化应激性凋亡进展更快。本实验使用 0、2、6、10 mmol/L 浓度梯度的乳酸处理髓核细胞,发现髓核细胞氧化应激性凋亡程度随乳酸浓度增加而增加,其中 10 mmol/L 乳酸对髓核细胞的有害作用更显著,与前期结果一致[9]。

TGM2 蛋白是一种多功能酶,在 BMSCs 中有表达。既往研究表明,TGM2 蛋白在肿瘤耐药与转移、风湿免疫、缺血再灌注等领域被广泛报道,可通过激活下游 PI3K/Akt 通路发挥抗细胞凋亡、抗氧化应激等生物学功能[13,17,29-31]。并且 TGM2 过表达已被证实可以增强 BMSCs 本身的治疗效果[15],而抗氧化应激蛋白/抗凋亡蛋白过表达后的 BMSCs 外泌体可增强 BMSCs 外泌体的治疗效果[32-36]。但 TGM2 过表达的 BMSCs 外泌体是否在髓核细胞氧化应激性凋亡中具有更强的治疗作用,目前并不清楚。因此我们猜测,TGM2 过表达可增强 BMSCs 来源外泌体抗髓核细胞氧化应激性凋亡的能力。本研究利用前期构建的乳酸诱导髓核细胞氧化应激性凋亡模型,通过 Western blot、免疫荧光、流式细胞术方法明确了乳酸+TGM2 过表达外泌体组相对于乳酸+对照外泌体组在治疗乳酸介导的髓核细胞氧化应激性凋亡中的效果更佳,其作用可能通过激活 PI3K/Akt/Nrf2 信号通路所导致。

TGM2 主要分布于细胞内的胞浆和胞核中[37]。同时亦可分泌到细胞外基质中[38],BMSCs 是否可以直接分泌 TGM2 抑制髓核细胞氧化应激和凋亡,目前并缺少研究进行探讨。TGM2 已被证实可以通过外泌体进行分泌转运,影响下游细胞的生物学进程[39-40]。本研究主要证明了在 BMSCs 中过表达 TGM2 可以通过提升 BMSCs 外泌体中 TGM2 的表达含量,进而增强 BMSCs 外泌体的治疗效果,但未探讨 BMSCs 是否直接分泌 TGM2,进而抑制髓核细胞氧化应激和凋亡的作用,这也是本研究工作的不足之一。此外,本研究未使用动物实验对于 TGM2 过表达的 BMSCs 外泌体延缓椎间盘退变的效果进行验证。在后续实验将利用多种氧化应激的诱导剂诱导髓核细胞氧化应激性凋亡后,明确 TGM2 过表达 BMSCs 外泌体的治疗是否具有广泛普适性,并进一步使用大鼠椎间盘退变模型验证 TGM2 过表达 BMSCs 外泌体的治疗效果。

综上所述,本研究揭示了 TGM2 过表达的 BMSCs 外泌体抑制髓核细胞的氧化应激性凋亡潜在机制,为未来基于 BMSCs 外泌体治疗椎间盘退变提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] MA K, CHEN S, LI Z, *et al*. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2019, 27(1): 41-48. DOI: 10.1016/j.joca.2018.08.021.

[2] ANDERSSON G B. Epidemiological features of chronic low-back pain[J]. Lancet, 1999, 354(9178): 581-585. DOI: 10.1016/s0140-6736(99)01312-4.

[3] KRUT Z, PELLED G, GAZIT D, *et al*. Stem cells and exosomes: new therapies for intervertebral disc degeneration[J]. Cells, 2021, 10(9): 2241. DOI: 10.3390/cells10092241.

[4] LIU W Z, MA Z J, WANG Y G, *et al*. Multiple nano-drug delivery systems for intervertebral disc degeneration: Current status and future perspectives[J]. Bioact Mater, 2023, 23: 274-299. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.11.006.

[5] SILAGI E S, NOVAIS E J, BISETTO S, *et al*. Lactate efflux from intervertebral disc cells is required for maintenance of spine health[J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(3): 550-570. DOI: 10.1002/jbmr.3908.

[6] XIE Z Y, CHEN L, WANG F, *et al*. Endoplasmic reticulum stress is involved in nucleus pulposus degeneration and attenuates low pH-induced apoptosis of rat nucleus pulposus cells[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(8): 627-637. DOI: 10.1089/dna.2017.3736.

[7] SHEN J L, CHEN A, CAI Z W, *et al*. Exhausted local lactate accumulation *via* injectable nanozyme-functionalized hydrogel microsphere for inflammation relief and tissue regeneration[J]. Bioact Mater, 2022, 12: 153-168. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.10.013.

[8] WANG C Y, HSIEH M K, HU Y J, *et al*. Monocarboxylate transporter 1-mediated lactate accumulation promotes nucleus pulposus degeneration under hypoxia in a 3D multilayered nucleus pulposus degeneration model[J]. Eur Cell Mater, 2022, 43: 53-65. DOI: 10.22203/eCM.v043a06.

[9] ZHANG Y Y, LIU L, QI Y H, *et al*. Lactic acid promotes nucleus pulposus cell senescence and corresponding intervertebral disc degeneration *via* interacting with Akt[J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81(1): 24. DOI: 10.1007/s00018-023-05094-y.

[10] MATTA A, KARIM M Z, GERAMI H, *et al*. A comparative study of mesenchymal stem cell transplantation and NTG-101 molecular therapy to treat degenerative disc disease[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 14804. DOI: 10.1038/s41598-021-94173-w.

[11] ZHANG Y Y, HU Z L, QI Y H, *et al*. Pretreatment of nucleus pulposus mesenchymal stem cells with appropriate concentration of H_2O_2 enhances their ability to treat intervertebral disc degeneration[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 340. DOI: 10.1186/s13287-022-03031-7.

[12] CHEN F, LI S Z, WU J, *et al*. Exosomes derived from mouse bone marrow mesenchymal stem cells attenuate nucleus pulposus cell apoptosis *via* the miR-155-5p/Trim32 axis[J]. Curr Mol Med, 2023. DOI: 10.2174/1566524023666230816090843.

[13] WANG F J, WANG L, QU C, *et al*. Kaempferol induces ROS-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells *via* TGM2-mediated Akt/mTOR signaling[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 396. DOI: 10.1186/s12885-021-08158-z.

[14] LEE C S, PARK H H. Structural aspects of transglutaminase 2: functional, structural, and regulatory diversity[J]. Apoptosis, 2017, 22(9): 1057-1068. DOI: 10.1007/s10495-017-1396-9.

[15] LIU F, WU M Z, WU X X, *et al*. TGM2 accelerates migration and differentiation of BMSCs by activating Wnt/β-catenin signaling[J]. J Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 168. DOI: 10.1186/s13018-023-03656-1.

[16] WANG J M, XU H M, CHENG X F, *et al*. Calcium relieves fluoride-induced bone damage through the PI3K/AKT pathway[J]. Food Funct, 2020, 11(1): 1155-1164. DOI: 10.1039/c9fo02491c.

[17] ZHANG L, LI Q Y, YANG J, *et al*. Cytosolic TGM2 promotes malignant progression in gastric cancer by suppressing the TRIM21-mediated ubiquitination/degradation of STAT1 in a GTP binding-dependent modality[J]. Cancer Commun, 2023, 43(1): 123-149. DOI: 10.1002/cac2.12386.

[18] LUO L W, GONG J F, WANG Z G, *et al*. Injectable cartilage matrix hydrogel loaded with cartilage endplate stem cells engineered to release exosomes for non-invasive treatment of intervertebral disc degeneration[J]. Bioact Mater, 2022, 15: 29-43. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.12.007.

[19] XIA C, ZENG Z Y, FANG B, *et al*. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration *via* anti-oxidant and anti-inflammatory effects[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 143: 1-15. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.026.

[20] XING H Y, ZHANG Z J, MAO Q J, *et al*. Injectable exosome-functionalized extracellular matrix hydrogel for metabolism balance and pyroptosis regulation in intervertebral disc degeneration[J]. J Nanobiotechnology, 2021, 19(1): 264. DOI: 10.1186/s12951-021-00991-5.

[21] HU Y Q, TAO R Y, WANG L F, *et al*. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells alleviate compression-

induced nucleus pulposus cell apoptosis by inhibiting oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 2310025. DOI: 10.1155/2021/2310025.

[22] ZHOU M H, ZHANG H, XU W J, *et al*. Effect of PI3K/AKT/HIF-1α signaling pathway on oxidative stress and apoptosis in nucleus pulposus cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2024, 28(2): 446-456. DOI: 10.26355/eurrev_202401_35043.

[23] DONG Z C, YANG P, JI Z W, *et al*. MIF inhibition attenuates intervertebral disc degeneration by reducing nucleus pulposus cell apoptosis and inflammation[J]. Exp Cell Res, 2024, 439(1): 114089. DOI: 10.1016/j.yexcr.2024.114089.

[24] MA M, ZHANG C J, ZHONG Z Y, *et al*. siRNA incorporated in slow-release injectable hydrogel continuously silences DDIT4 and regulates nucleus pulposus cell pyroptosis through the ROS/TXNIP/NLRP3 axis to alleviate intervertebral disc degeneration[J]. Bone Joint Res, 2024, 13(5): 247-260. DOI: 10.1302/2046-3758.135.BJR-2023-0320.R1.

[25] ISHIBASHI H, TONOMURA H, IKEDA T, *et al*. Hepatocyte growth factor/c-met promotes proliferation, suppresses apoptosis, and improves matrix metabolism in rabbit nucleus pulposus cells *in vitro*[J]. J Orthop Res, 2016, 34(4): 709-716. DOI: 10.1002/jor.23063.

[26] YANG L J, RONG Z J, ZENG M J, *et al*. Pyrroloquinoline quinone protects nucleus pulposus cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis by inhibiting the mitochondria-mediated pathway[J]. Eur Spine J, 2015, 24(8): 1702-1710. DOI: 10.1007/s00586-014-3630-2.

[27] PAN C R, HOU W J, DENG X F, *et al*. The pivotal role of Nrf2 signal axis in intervertebral disc degeneration[J]. J Inflamm Res, 2023, 16: 5819-5833. DOI: 10.2147/JIR.S432575.

[28] GANSAU J, MCDONNELL E E, BUCKLEY C T. Development and characterization of antacid microcapsules to buffer the acidic intervertebral disc microenvironment[J]. J Biomed Mater Res A, 2024. DOI: 10.1002/jbm.a.37755.

[29] ZHANG S F, FU B B, XIONG Y, *et al*. Tgm2 alleviates LPS-induced apoptosis by inhibiting JNK/Bcl-2 signaling pathway through interacting with Aga in macrophages[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101(Pt A): 108178. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108178.

[30] THOMAS K, ZONDLER L, LUDWIG N, et al. Glutamine prevents acute kidney injury by modulating oxidative stress and apoptosis in tubular epithelial cells[J]. JCI Insight, 2022, 7(21): e163161. DOI: 10.1172/jci.insight.163161.

[31] LIN X, TAO C, ZHANG R, *et al*. N6-methyladenosine modification of TGM2 mRNA contributes to the inhibitory activity of sarsasapogenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. Phytomedicine, 2022, 95: 153871. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153871.

[32] LIU D W, SONG C Y, LV C L, *et al*. Bone marrow mesenchymal stromal cell-derived exosomal NRF2 ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by transcriptionally activating Lin28a[J]. Shock, 2024. DOI: 10.1097/SHK.0000000000002348.

[33] ZHAO J L, ZHAO L, ZHAN Q N, *et al*. BMSC-derived exosomes ameliorate peritoneal Dialysis-associated peritoneal fibrosis *via* the miR-27a-3p/TP53 pathway[J]. Curr Med Sci, 2024, 44(2): 333-345. DOI: 10.1007/s11596-024-2853-7.

[34] DENG M Y, HOU Y, LIU J Y, *et al*. Mesenchymal stem cell-derived exosomes overexpressing SRC-3 protect mice from cerebral ischemia by inhibiting ferroptosis[J]. Brain Res Bull, 2024, 211: 110948. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2024.110948.

[35] XIE X C, YANG X, WU J X, *et al*. Exosome from indoleamine 2, 3-dioxygenase-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerates repair process of ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by regulating macrophages polarization[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 367. DOI: 10.1186/s13287-022-03075-9.

[36] DU J B, WAN Z, WANG C, *et al*. Designer exosomes for targeted and efficient ferroptosis induction in cancer *via* chemo-photodynamic therapy[J]. Theranostics, 2021, 11(17): 8185-8196. DOI: 10.7150/thno.59121.

[37] LESORT M, ATTANAVANICH K, ZHANG J, *et al*. Distinct nuclear localization and activity of tissue transglutaminase[J]. J Biol Chem, 1998, 273(20): 11991-11994. DOI: 10.1074/jbc.273.20.11991.

[38] LORAND L, GRAHAM R M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(2): 140-156. DOI: 10.1038/nrm1014.

[39] SHAFIQ A, SUWAKULSIRI W, RAI A, *et al*. Transglutaminase-2, RNA-binding proteins and mitochondrial proteins selectively traffic to MDCK cell-derived microvesicles following H-Ras-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. Proteomics, 2021, 21(13/14): e2000221. DOI: 10.1002/pmic.202000221.

[40] FURINI G, SCHROEDER N, HUANG L H, *et al*. Proteomic profiling reveals the transglutaminase-2 externalization pathway in kidneys after unilateral ureteric obstruction[J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(3): 880-905. DOI: 10.1681/ASN.2017050479.

(收稿:2024-02-08;修回:2024-06-07)

(编辑 张 维)