

# 人嗅觉黏膜间充质干细胞来源的外泌体促进内皮细胞的血管生成

葛丽特<sup>1),2)#</sup>, 寻成峰<sup>1)#</sup>, 卓毅<sup>1),2)</sup>, 金圣榆<sup>2)</sup>, 陈伟<sup>2)</sup>, 李文水<sup>2)</sup>,  
黄雁<sup>2)</sup>, 段答<sup>2)</sup>, 陈平<sup>1)\*</sup>, 卢明<sup>1),2)\*</sup>

(<sup>1</sup>)湖南师范大学生命科学学院 动物多肽药物创制国家地方联合工程实验室,长沙 410081;

(<sup>2</sup>)湖南师范大学第二附属医院神经修复学湖南省重点实验室,长沙 410003)

**摘要** 外泌体作为是细胞旁分泌的重要介质,在促血管形成方面有重要作用。在我们前期研究中,已经成功从嗅觉黏膜间充质干细胞(olfactory mucosa mesenchymal stem cells, OM-MSCs)分离、鉴定了其外泌体,然而,OM-MSCs 源外泌体对血管生成的影响尚不清楚。本研究旨在探讨 OM-MSCs 来源外泌体对内皮细胞血管生成能力的影响。采用 PKH67 荧光标记 OM-MSCs 源外泌体,与人脑微血管内皮细胞(human brain microvessel endothelial cells, HBMECs) 共培养,观察 OM-MSCs 外泌体能否进入 HBMECs。采用 CCK-8 法、Transwell 迁移实验和小管实验,观察 OM-MSCs 外泌体对 HBMECs 增殖、迁移及管状结构形成的影响。采用基质胶塞实验及 CD31 免疫荧光,观察 OM-MSCs 外泌体在体内对血管生成的影响。上述研究均以等量 PBS 作为对照。结果提示,OM-MSCs 外泌体可被 HBMECs 摄取。CCK-8 法检测显示,在处理 1、2、3、4、5 d 各时间点,实验组细胞增殖均优于对照组( $1.32 \pm 0.14$  vs.  $0.98 \pm 0.04$ ,  $1.36 \pm 0.14$  vs.  $1.04 \pm 0.06$ ,  $1.75 \pm 0.18$  vs.  $1.33 \pm 0.11$ ,  $2.16 \pm 0.11$  vs.  $1.50 \pm 0.19$ ,  $2.71 \pm 0.11$  vs.  $1.81 \pm 0.20$ ,  $P < 0.01$ )。Transwell 实验结果显示,实验组跨膜迁移细胞吸光度值较对照组显著增多( $1.12 \pm 0.05$  vs.  $0.02 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ )。在体外小管实验中,从节点、交叉点、网眼数、血管分支数和总长度 5 个方面,实验组均高于空白对照组( $374.33 \pm 127.74$  vs.  $193.33 \pm 44.79$ ,  $104.56 \pm 33.07$  vs.  $54.33 \pm 11.65$ ,  $20.11 \pm 11.20$  vs.  $7.56 \pm 3.64$ ,  $81.67 \pm 19.07$  vs.  $57.00 \pm 13.02$ ,  $11466.22 \pm 2781.03$  vs.  $8544.00 \pm 1848.61$ ,  $P < 0.05$ );在体内实验中,实验组成血管及 CD31 阳性率(%)亦显著高于对照组( $85.00 \pm 5.57$  vs.  $8.00 \pm 2.08$ ,  $P < 0.05$ )。本研究表明:OM-MSCs 外泌体可促进 HBMECs 增殖、迁移及管样结构形成,提示 OM-MSCs 外泌体可促进血管新生。

**关键词** 间充质干细胞;嗅觉黏膜;外泌体;内皮细胞;血管新生

中图分类号 Q2

## Exosomes from Human Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cells Enhance the Angiogenesis of Endothelial Cells

GE Li-Te<sup>1),2)#</sup>, XUN Cheng-Feng<sup>1)#</sup>, ZHUO Yi<sup>1),2)</sup>, JIN Sheng-Yu<sup>2)</sup>, CHEN Wei<sup>2)</sup>, LI Wen-Shui<sup>2)</sup>,  
HUANG Yan<sup>2)</sup>, DAUN Da<sup>2)</sup>, CHEN Ping<sup>1)\*</sup>, LU Ming<sup>1),2)\*</sup>

(<sup>1</sup>)The National & Local Joint Engineering Laboratory of Animal Peptide Drug Development, College of Life Sciences, Hunan

Normal University, Changsha 410081, China; 2)Hunan Provincial Key Laboratory of Neurorestoratology, Second Affiliated

Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410003, China)

收稿日期:2019-08-07;修回日期:2019-10-25;接受日期:2019-11-20

国家自然科学基金项目(No.81371358);湖南省湖南省高校科研项目(No.16B159);湖南省研究生科研创新项目(No.CX2018B309, No. CX2018B240)资助

\* 通讯作者 Tel: 0731-84184249; E-mail: lumings163@163.com; Tel: 0731-88872930; E-mail: chenp@hunnu.edu.cn

# 共同第一作者

Received: August 7, 2019; Revised: October 25, 2019; Accepted: November 20, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.81371358); Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (No. 16B159); Hunan Provincial Innovation Foundation for Postgraduate(No.CX2018B309, No.CX2018B240)

\* Corresponding author Tel: 0731-84184249; E-mail: lumings163@163.com; Tel: 0731-88872930; E-mail: chenp@hunnu.edu.cn

# Co-first author

**Abstract** Exosome, as an important mediator of cell paracrine, plays an important role in promoting angiogenesis. In our preliminary studies, we have successfully isolated and identified exosomes from olfactory mucosa mesenchymal stem cells (OM-MSCs). However, the effect of OM-MSCs exosomes (OM-MSC-Exos) on angiogenesis is still unknown. This study was to evaluate OM-MSC-Exos angiogenesis promotion *in vitro* and *in vivo*. After co-culture of PKH67 fluorescently labeled OM-MSC-Exos with human brain microvessel endothelial cells (HBMECs), fluorescence microscopy had been used to observe whether OM-MSCs-Exos could absorbed by HBMECs. The proliferation, migration and effect of tubular structure formation of endothelial cells were detected by cell counting kit 8 (CCK-8), transwell and tube formation assays. Effect of OM-MSCs derived exosomes on angiogenesis *in vivo* was detected by the Matrigel plug assay and CD31 immunofluorescence. The same amount of PBS was used as control in the above experiments. The results showed that OM-MSCs-Exos could be absorbed by HBMECs. The CCK-8 analysis showed that experimental group could promote HBMECs proliferation in processing 1, 2, 3, 4, 5 d each time point, when compared with the control group ( $1.32 \pm 0.14$  vs.  $0.98 \pm 0.04$ ,  $1.36 \pm 0.14$  vs.  $1.04 \pm 0.06$ ,  $1.75 \pm 0.18$  vs.  $1.33 \pm 0.11$ ,  $2.16 \pm 0.11$  vs.  $1.50 \pm 0.19$ ,  $2.71 \pm 0.11$  vs.  $1.81 \pm 0.20$ ,  $P < 0.05$ ). The result of Transwell assay showed that the absorbance value of trans-membrane migration cells in the experimental group were significantly higher than that in the control group ( $1.12 \pm 0.05$  vs.  $0.02 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ ). *In vitro*, Matrigel tube-forming experiment showed that the number of the nodes, junctions, meshes, branches and total length in the experimental group was significantly higher than that of the control group ( $374.33 \pm 127.74$  vs.  $193.33 \pm 44.79$ ,  $104.56 \pm 33.07$  vs.  $54.33 \pm 11.65$ ,  $20.11 \pm 11.20$  vs.  $7.56 \pm 3.64$ ,  $81.67 \pm 19.07$  vs.  $57.00 \pm 13.02$ ,  $11466.22 \pm 2781.03$  vs.  $8544.00 \pm 1848.61$ ,  $P < 0.05$ ). *In vivo*, the percentage of CD31+ cells in the experimental group was significantly higher than that of the control group ( $85.00 \pm 5.57$  vs.  $8.00 \pm 2.08$ ,  $P < 0.05$ ). The above results indicated that the exosomes from OM-MSCs can induce the angiogenesis performance of endothelial cells.

**Key words** mesenchymal stem cells (MSCs); olfactory mucosa (OM); exosomes; endothelial cells; angiogenesis

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类可自我更新的组织源性细胞,具有维持和补充内源性干细胞、免疫调节和血管生成的潜能<sup>[1-3]</sup>,使其成为修复中风、心肌梗死、脑梗死等缺血性疾病的理想种子细胞之一<sup>[4-6]</sup>。近期的研究发现,在各种血管疾病模型(如中风和外周动脉疾病)中, MSCs的许多组织愈合特性都是通过旁分泌效应介导的。在这些旁分泌因子中,外泌体(exosomes)作为细胞旁分泌的重要介质,可能在促血管形成方面有重要作用。外泌体是由细胞内吞作用产生的纳米级膜泡,是调节供体和周围细胞之间蛋白质和遗传物质交换的重要细胞间通讯介质<sup>[7, 8]</sup>。研究发现,从人骨髓间充质干细胞中提取的外泌体能促进组织再生中的血管生成。外泌体通过传递小 miRNA 和活性蛋白质来促进血管生成<sup>[9]</sup>。

嗅黏膜间充质干细胞(olfactory mucosa mesenchymal stem cells, OM-MSCs)作为一类新发现的间充质干细胞,具有获取便捷、对患者损伤小,生物学活性不受年龄影响,可实现自体移植等优势<sup>[10, 11]</sup>。在我们前期研究中,已经成功从 OM-MSCs 分离、鉴定了其外泌体,并对其生物学特性进行了初

步研究<sup>[12]</sup>。然而, OM-MSCs 源外泌体对血管生成的影响尚不清楚。内皮细胞是新生血管的主要成分,血管生成需要多种内皮细胞功能。本文通过研究 OM-MSCs 来源外泌体对血管内皮细胞迁移、增殖和成管能力的影响,来揭示 OM-MSCs 对血管生成的作用,以期对未来外泌体治疗缺血性疾病提供新思路及新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本文嗅黏膜组织获取及培养均在湖南师范大学第二附属医院、解放军联勤保障部队第九二一医院神经外科干细胞移植实验室完成,该实验室为神经修复学湖南省重点实验室。获取嗅黏膜及进行细胞培养均获得湖南师范大学及解放军联勤保障部队第九二一医院伦理委员会批准,且经过志愿者同意并签署自愿书与知情同意书。

本文主要试剂:DMEM-F12 培养基(Gibco),胰蛋白酶消化液(Gibco),胎牛血清(Gibco),双抗(Gibco),DAPI(Sigma),PKH67 荧光染料(Sigma),人脑微血管内皮细胞(中科院上海细胞库),细胞培

养专用冻存液, Matrigel 基质胶( Corning ), Transwell 板( Corning ), 96 孔板( Corning ), CD31( Abcam ), 细胞计数试剂盒 8( cell countingkit 8, CCK- 8; 日本同仁)等。

## 1.2 OM-MSCs 源外泌体获取及分离

按照我们之前的 OM-MSCs 细胞培养方法, 进行细胞培养<sup>[13]</sup>和培养上清液提取, 当细胞铺满瓶底时进行传代。将含 20% FBS 的高糖 DF-12 培养基, 100 000×g 4 ℃ 离心 18 h 收集培养基上清液, 稀释成 10% FBS, 制备成无外泌体培养基。取传至 4 代的细胞吸去原培养基, 用无菌 PBS 清洗 3 次, 每次 3 min, 再加入无外泌体培养基孵育 48 h, 收集培养上清液 40 mL。采用差速离心的方法, 分为 300×g、离心 10 min, 2 000×g、离心 10 min, 10 000×g、离心 30 min。先后去除细胞、死细胞合细胞碎片。留取的上清液再经 0.22 μm 滤膜过滤, 在 4 ℃ 条件下 100 000 ×g 离心 2 h, 收集底部沉淀用 1×PBS 重悬, 再次 100 000×g 离心 2 h、洗涤 1 次, 最后收集沉淀用 1×PBS 重悬, 按说明书使用 BCA 试剂盒进行定量, 分装后 -80 ℃ 保存备用<sup>[12]</sup>。

## 1.3 PKH67 染色

取浓度为 100 μg/mL 的 OM-MSCs 外泌体, 加入染料工作液 500 μL, 巴氏管吹散外泌体。然后, 取一新 EP 管, 加入 500 μL 染料工作液, 再将 4 μL PKH67 荧光染料溶液加入新的含有 EP 管中并混匀, 再将两个 EP 管内的工作液混匀。避光 4 min, 随后, 加入完全培养基终止染色; 超速离心 70 min, 去除多余染料, 弃上清液, 加入完全培养基重悬外泌体。取第 5 代人脑微血管内皮细胞( human brain microvessel endothelial cells, HBMECs ), 加入上述 PKH67 荧光标记的 OM-MSCs 外泌体, 孵育 8 h, 进行常规免疫荧光染色, 在荧光显微镜下观察。镜下 PKH67 荧光标记外泌体呈绿色荧光。

## 1.4 CCK-8 细胞增殖实验

以  $5 \times 10^3$  个/mL 的细胞密度, 将 HBMECs 接种于 96 孔板内, 每孔 100 μL 细胞悬液, 在培养箱内预培养。再将细胞分组, 其中实验组添加 10 μL 浓度为 100 μg/mL 的 OM-MSCs 外泌体, 对照组添加 10 μL PBS。分别培养 1、2、3、4、5 d, 每组取 5 孔, 每孔加入 10 μL 用完全培养基配制的 CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h, 于 Bio-Tek 酶标仪分析 450 nm 处各孔的吸光值(A 值)。

## 1.5 Transwell 迁移实验

以  $2 \times 10^5$  个/mL 的细胞密度, 将 HBMECs 接种于 Transwell 板内。实验组 Transwell 上室接种 200 μL 细胞悬液, Transwell 下室加入共 500 μL 混合有浓度为 100 μg/mL 的 10 μL OM-MSCs 外泌体的无血清培养基; 空白对照组 Transwell 上室接种 200 μL 细胞悬液, Transwell 下室加入共 500 μL 混合有 10 μL PBS 的无血清培养基。37 ℃ 培养箱中孵育 48 h。取出上室, 放到装有 PBS 的新孔中, 上室用 PBS 洗 3 次, 用棉球擦干净上室细胞。用甲醇和丙酮等体积混合配成固定液, 固定 20 min, 去除固定液, 水洗 2 次, 0.1% 结晶紫染色 5 min, 水洗 3 ~ 5 次, 置膜于载玻片上, 膜底面朝上, 封片, 镜下拍照。细胞拍照: 倒置显微镜下, 观察上室外表面细胞, 各取 3 个视野。取出小室脱色测 A 值, 加入到 500 μL 10% 的醋酸浸泡, 使脱色, 550 nm 处, 酶标仪测定吸光度值(A 值), 每组重复 3 次。

## 1.6 小管实验分析

将 130 μL Matrigel 基质胶均匀铺置于 24 孔板中, 避免气泡。静置 3 ~ 4 min, 于 37 ℃ 孵育 5 ~ 6 h 使其凝固。将 HBMECs 接种至 24 孔板中, 每孔  $5 \times 10^4$  个细胞。实验组加入 10 μL 浓度为 100 μg/mL 的 OM-MSCs 外泌体, 对照组加入 10 μL PBS。37 ℃ 培养箱孵育 8 h, 在倒置相差显微镜下, 观察管腔样血管形态的形成情况, 并通过 Image J 对每组的节点、交叉点、网眼数、血管分支数和总长度 5 个方面数每孔管样结构数量。

## 1.7 体内基质胶塞检测

取 12 只 BALB/c 裸鼠, 腹腔注射 1.5% 戊巴比妥(40 mg/kg) 麻醉, 实验组在右下腹部皮下注射 0.6 mL 的基质胶混液(含 0.1 mL OM-MSCs 外泌体(100 μg/mL)的 PBS 混悬液+0.5 mL matrigel 基质胶), 对照组则是 0.1 mL PBS 缓冲液+0.5 mL matrigel 基质胶。2 周后处死裸鼠后切开皮肤, 大体观察 matrigel 基质胶形态和胶内血管生成情况, 切取基质胶栓置于 4% 多聚甲醛固定 4 h, 常规石蜡包埋切片, 进行后续实验。

## 1.8 免疫荧光染色

将石蜡包埋后的基质胶切片 60 ℃ 烤片 30 ~ 60 min; 将切片置于二甲苯中 10 min×2 次; 常规脱蜡后, 进行热修复抗原。修复抗原后, 用 0.01 mol/L PBS(pH7.2~7.6) 洗涤切片, 每次 3 min, 共洗涤 3

次。随后,将切片置于硼氢化钠溶液中 30 min,水漂洗 5 min;置于苏丹黑染液中室温下 5 min,水冲洗 3 min;用 10% 正常血清/5% BSA 封闭 60 min;按照 1:50 孵育一抗 CD31(Proteintech),4 ℃ 过夜。次日,PBS 冲洗 5 min×3 次;再孵育二抗,滴加 50~100 uL 抗-Rabbit-IgG 标记荧光抗体(Proteintech),孵育 90 min,PBS 冲洗 5 min×3 次;DAPI 工作液 37 ℃ 染核 10 min,PBS 冲洗 5 min×3 次;缓冲甘油封片。置于荧光显微镜下观察,随机取 6 个视野高倍镜下,计数 CD31 阳性细胞数,计算细胞阳性率,每组取均值。

1.9 统计学处理

采用 Graphpad Prism 6 统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

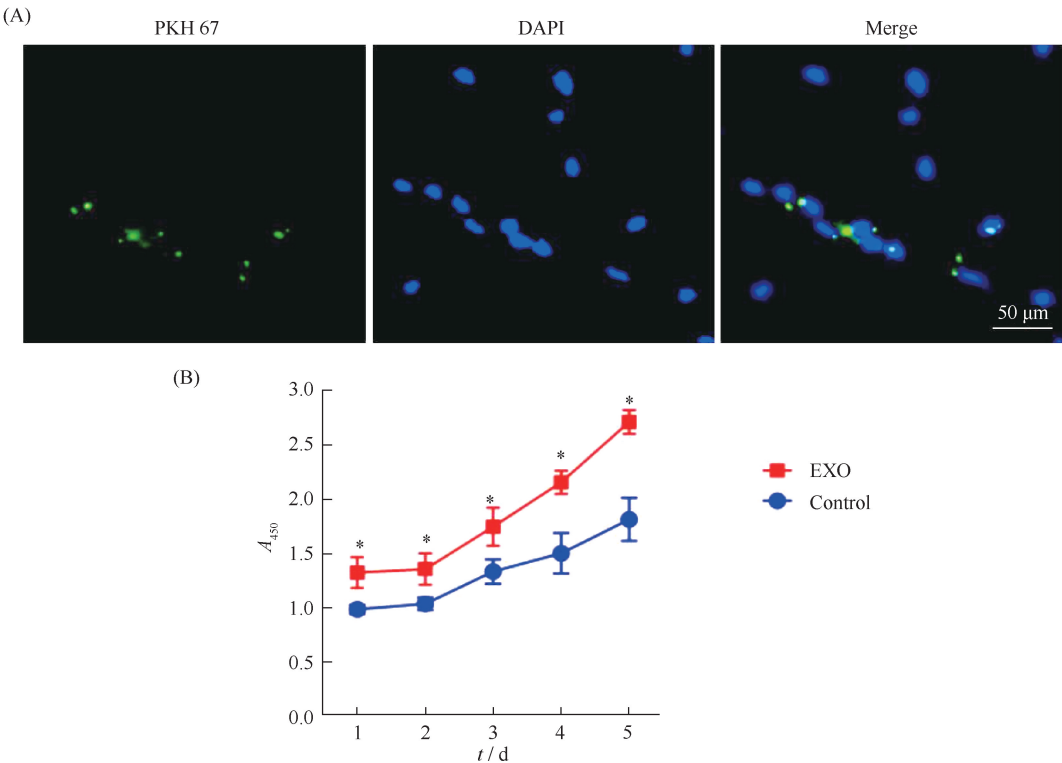
2.1 OM-MSCs 来源外泌体能够进入 HBMECs 细胞内并促进其增殖

为了检测 OM-MSCs 来源外泌体对 HBMECs 是否具有作用,首先必须证明 OM-MSCs 来源外泌体可以进入这些细胞内。采用 PKH67 荧光抗体标记外

泌体,进行外泌体摄取实验。荧光显微镜下,可见经 PKH67 染色的 OM-MSCs 源外泌体被 HBMECs 摄取,并分布在细胞核周围。表明 OM-MSCs 来源外泌体可进入 HBMECs (Fig.1A)。其次,为了验证 OM-MSCs 来源外泌体对 HBMECs 增殖的影响,采用 CCK-8 法进行验证。结果提示,外泌体处理组各时间点吸光度值(1.32±0.14,1.36±0.14,1.75±0.18,2.16±0.11,2.71±0.11)均显著高于空白对照组(0.98±0.04,1.04±0.06,1.33±0.11,1.50±0.19,1.81±0.20),并具有统计学意义(*P*<0.01),说明 OM-MSCs 来源外泌体可以促进 HBMECs 细胞增殖 (Fig.1B)。

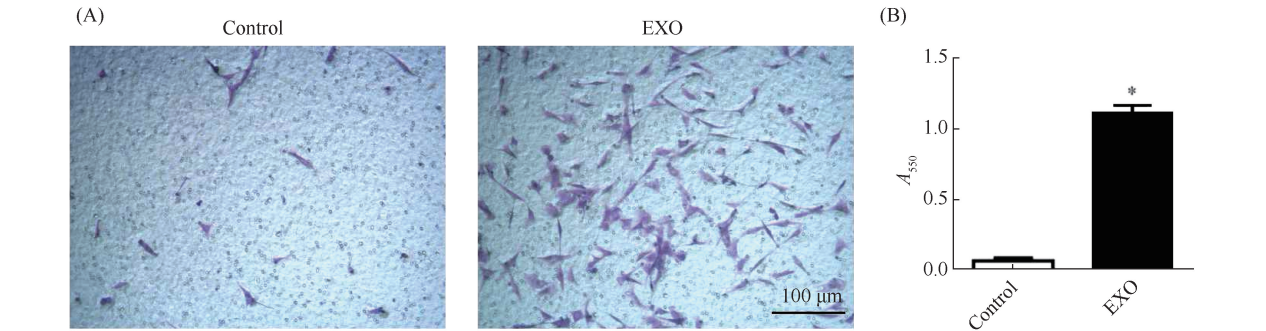
2.2 OM-MSCs 来源外泌体促进 HBMECs 细胞迁移

为验证 OM-MSCs 来源外泌体对 HBMECs 迁移的影响,采用 Transwell 小室实验进行观察,并对迁移后二组的细胞进行了吸光度检测及统计。结果显示,经过 48 h 迁移,可见实验组迁移的细胞较空白对照组明显增多 (Fig.2A)。经检测两组之间的吸光度值,实验组跨膜迁移吸光度值为(1.12±0.05),较空白对照组吸光度值(0.02±0.02)显著增多,比较差异有统计学意义(*P*<0.01) (Fig.2B)。

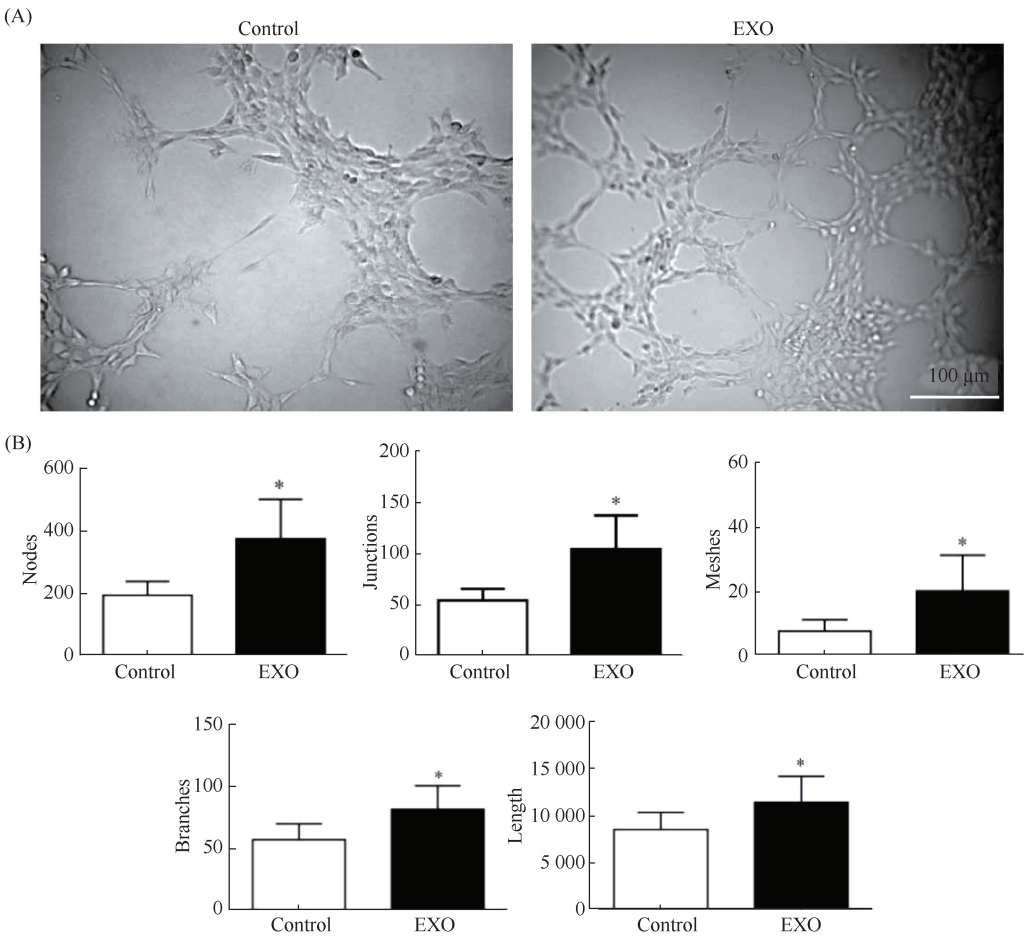


**Fig.1 OM-MSCs derived exosomes could be internalized into HBMECs and promote proliferation** (A) Fluorescence microscopy analysis of PKH67-labeled OM-MSCs derived exosomes internalization by HBMECs. The green-labeled exosomes were visible in the perinuclear region of recipient cells. (B) The absorbance value at different time points was detected by CCK-8 assay. *n* = 3 per group. \* *P* < 0.05 vs. control group





**Fig.2 OM-MSCs derived exosomes enhance the migration of HBMECs** (A) The migration of HBMECs stimulated by OM-MSCs derived exosomes or an equal volume of PBS was detected by transwell assay. (B) Quantitative analysis of the absorbance value.  $n=3$  per group. \*  $P < 0.05$  vs. PBS (control) group



**Fig.3 In vitro angiogenesis capacity of OM-MSCs-Exosomes** (A) Representative images of the tube-like structures for the different conditions of the experiment. (B) Quantitative analysis of the nodes, junctions, meshes, branches and total length.  $n=3$  per group. \*  $P < 0.05$ , compared to control group

2.3 OM-MSCs 来源外泌体促进 HBMECs 小管形成

为验证 OM-MSCs 来源外泌体对 HBMEs 成管能力的影响,进行了小管实验,并对二组的节点、交叉点、网眼数、血管分支数和总长度 5 个方面进行统计

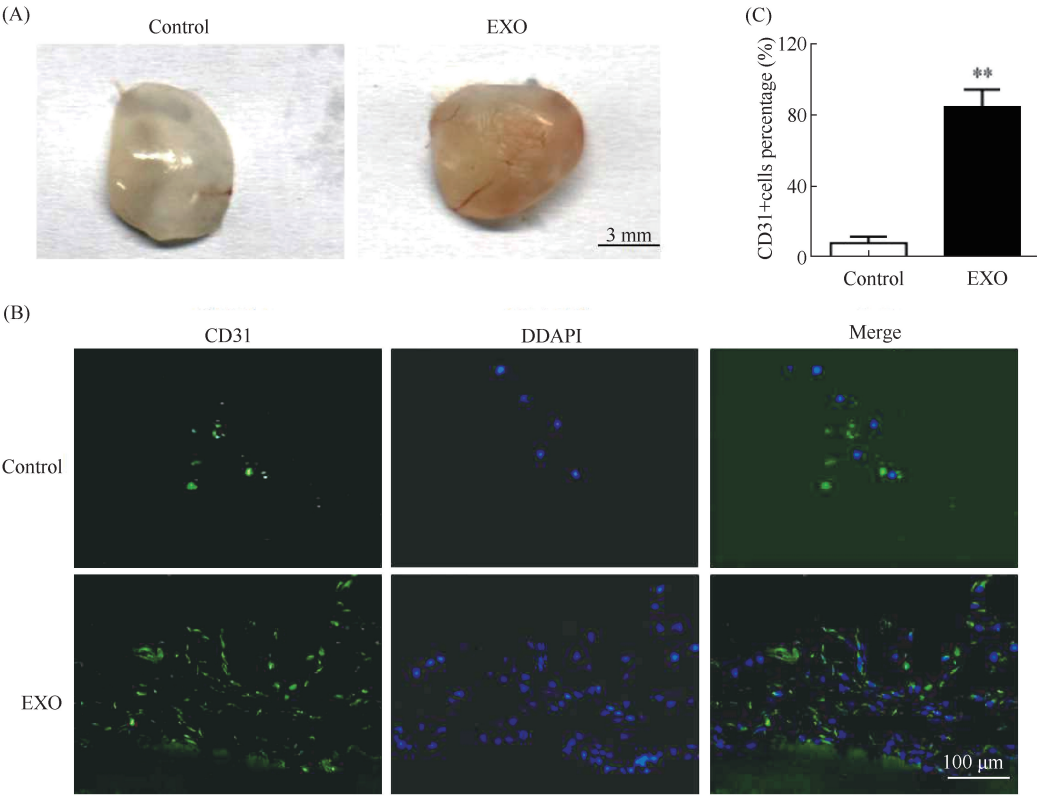
和分析。倒置相差显微镜观察显示,空白对照组内小管形成较少,仅可见不完全闭合的多边形;而外泌体处理组,则已出现较多闭合的成管腔样的血管形态 (Fig. 3A)。外泌体处理组在节点数 (nodes,  $374.33 \pm 127.74$ )、交叉点数 (junctions,  $104.56 \pm$

33.07)、网眼数(meshes,  $20.11 \pm 11.20$ )、血管分支数(branches,  $81.67 \pm 19.07$ )、总长度(total length,  $11466.22 \pm 2781.03$ ),较空白对照组的节点数( $193.33 \pm 44.79$ )、交叉点数( $54.33 \pm 11.65$ )、网眼数( $7.56 \pm 3.64$ )、血管分支数( $57.00 \pm 13.02$ )、总长度( $8544.00 \pm 1848.61$ ),明显增高,比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )(见 Fig.3B)。

2.4 OM-MSCs 来源外泌体促进血管形成

为了评估 OM-MSCs 来源外泌体对体内新生血管

形成的影响,在裸鼠体内进行了基质胶塞检测。取出培养 14 d 后的裸鼠体内基质胶栓并进行大体检查。肉眼下外泌体组内可见有血管长入胶栓,而对照组无血管或较少血管长入(Fig.4A)。随后,对基质胶塞石蜡包埋后进行免疫组织化学分析,并使用针对内皮生物标志物 CD31 的抗体进行定量分析。结果提示,外泌体处理组的 CD31 阳性的细胞比例( $85.00 \pm 5.57$ )%明显多于空白对照组( $8.00 \pm 2.08$ )%,比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )(Fig.4B,C)。



**Fig.4 Effect of OM-MSCs-Exosomes on angiogenesis using the matrigel plug assay** (A) Images of representative matrigel plugs showing vessel growth. (B) CD31 staining (green) in matrigel plugs. Slides were counterstained with DAPI (blue). (C) Percentage of CD31 positive cells quantified using Image J ( $n=3$ ), \*  $P < 0.05$ , compared to control group

3 讨论

间充质干细胞被认为是治疗缺血性组织相关疾病,例如严重的后肢缺血、脑卒中或急性心肌梗死的理想种子细胞之一<sup>[14-16]</sup>。虽然研究者对它们诱导血管生成的机制仍知之甚少,但研究人员的研究重点仍放在了它们所分泌包括 VEGF 和 PDGF 在内的生长因子上。事实上,近期的研究发现:MSCs 的组织愈合特性大多是通过旁分泌效应来介导的<sup>[17, 18]</sup>。而在这其中,外泌体作为旁分泌效应的关键部分,正被越来越多的学者们关注。研究发现,MSCs 已经被确定可以通过旁分泌作用创造特定的微环境来控制

血管密度和功能<sup>[19]</sup>。相比干细胞移植, MSCs 来源的外泌体不仅具备稳定的物理化学性质、高靶向性和 MSCs 的内在生物学活性,还避免了 MSCs 存在致癌风险的可能性、体内定向分化率低以及体内移植后的存活率低、靶向性低等缺点,使之成为了干细胞治疗研究领域的新突破点<sup>[20]</sup>。因此,研究 MSCs 外泌体对血管生成的作用具有重要意义。

本研究在前期实验成功分离,并鉴定 OM-MSCs 来源外泌体的基础上<sup>[12]</sup>,通过 PKH67 标记外泌体,进行外泌体摄取实验,发现在与 HBMECs 共孵育后,OM-MSCs 来源外泌体可进入 HBMECs 细胞内,并促进 HBMECs 增殖、迁移及管样分化。同时,本

文通过体内基质胶塞实验,将含有外泌体的基质胶注入到裸鼠皮下,观察到 14 d 后的血管数量显著高于对照组。由此可见,OM-MSCs 来源外泌体可促进体内血管新生,对于未来缺血性疾病治疗及构建组织工程血管具有重要意义。目前,外泌体的作用机制尚不明确。研究认为,与外泌体内携带多种 microRNA 和蛋白质有关。Zhang 等<sup>[21]</sup>发现:脐带间充质干细胞外泌体在体外能够提高血管内皮细胞的成管能力,促进大鼠皮肤深度 II 度烧伤模型的血管生成,其内在机制与 WNT4 蛋白传递给内皮细胞,随后增强了  $\beta$ -联蛋白( $\beta$ -catenin)的核易位有关。此外,有研究发现,骨髓间充质干细胞外泌体表面的 WNT 也可在细胞外空间中传播,通过典型的 WNT 信号通路,帮助传输外部 WNT3A 蛋白信号到内皮细胞的 WNT 与低密度脂蛋白相关蛋白 6 (LRP6) 的共受体,从而促进了血管生成<sup>[22]</sup>。本文已对 OM-MSCs 来源外泌体内的蛋白质进行蛋白质组学研究(相关数据正在投稿中),发现 OM-MSCs 外泌体内与 VEGF 通路有关的许多蛋白质下一步我们将进一步深入研究相关机制及其作用蛋白质。此外,我们还会将 OM-MSCs 来源外泌体运用于更贴近临床病例的动物模型中,以便更有利于探索 OM-MSCs 来源外泌体的临床应用前景。

综上所述,本研究初步证实,OM-MSCs 来源外泌体能够进入内皮细胞内,并诱导其增殖、迁移及小管形成,甚至促进体内血管生成。这为我们进一步研究 OM-MSCs 来源外泌体治疗缺血性疾病提供了重要的思路 and 方向,也为其日后应用于临床治疗带来新的可能!

## 参考文献 (References)

- [1] Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease [J]. *Circ Res*, 2015, **116**(8): 1413-1430
- [2] Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views [J]. *Stem Cells*, 2007, **25**(11): 2896-2902
- [3] Satija NK, Singh VK, Verma YK, *et al.* Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(11-12): 4385-4402
- [4] Samper E, Diez-Juan A, Montero JA, *et al.* Cardiac cell therapy: boosting mesenchymal stem cells effects [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2013, **9**(3): 266-280
- [5] Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, *et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(32): 11474-11479
- [6] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, *et al.* Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution [J]. *Circulation*, 2003, **108**(7): 863-868
- [7] Li Q, Shao Y, Zhang X, *et al.* Plasma long noncoding RNA protected by exosomes as a potential stable biomarker for gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2015, **36**(3): 2007-2012
- [8] Bang C, Thum T. Exosomes: new players in cell-cell communication [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, **44**(11): 2060-2064
- [9] Valadi H, Ekström K, Bossios A, *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, **9**(6): 654-659
- [10] Delorme B, Nivet E, Gaillard J, *et al.* The human nose harbors a niche of olfactory ectomesenchymal stem cells displaying neurogenic and osteogenic properties [J]. *Stem Cells Dev*, 2010, **19**(6): 853-866
- [11] Hwang SH, Park SH, Choi J, *et al.* Age-related characteristics of multipotent human nasal inferior turbinate-derived mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e74330
- [12] 葛丽特, 寻成峰, 卓毅, 等. 人嗅黏膜间充质干细胞来源外泌体的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Ge L, Xun C, Zhuo Y, *et al.* Isolation, Identification and Biological Characterization of Exosomes Derived from Human Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cells [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2019, **35**(10): 1128-1134
- [13] Ge L, Jiang M, Duan D, *et al.* Secretome of Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cell, a Multiple Potential Stem Cell [J]. *Stem Cells Int*, 2016, **2016**: 1243659
- [14] Cao Y, Sun Z, Liao L, *et al.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **332**(2): 370-379
- [15] Hoffmann CJ, Harms U, Rex A, *et al.* Vascular signal transducer and activator of transcription-3 promotes angiogenesis and neuroplasticity long-term after stroke [J]. *Circulation*, 2015, **131**(20): 1772-1782
- [16] Annex BH. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischaemia [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2013, **10**(7): 387-396
- [17] Than UTT, Guanzone D, Leavesley D, *et al.* Association of Extracellular Membrane Vesicles with Cutaneous Wound Healing [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(5).pii: E956
- [18] Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J, *et al.* Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, **57**: 125-154
- [19] Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, *et al.* Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, **143**(2): 181-196
- [20] Konala VB, Mamidi MK, Bionde R, *et al.* The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration [J]. *Cytotherapy*, 2016, **18**(1): 13-24
- [21] Zhang B, Wu X, Zhang X, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ $\beta$ -catenin pathway [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, **4**(5): 513-522
- [22] McBride JD, Rodriguez-Menocal L, Guzman W, *et al.* Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived CD63 + Exosomes Transport Wnt3a Exteriorly and Enhance Dermal Fibroblast Proliferation, Migration, and Angiogenesis In Vitro [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, **26**(19): 1384-1398