

## 论 著

(基础研究)

间充质干细胞源性外泌体调控 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制髓核细胞凋亡

肖 权, 徐长明, 王永超, 周 全

**【摘要】 目的** 探究骨髓间充质干细胞源性外泌体(BMSC-Exo)对髓核细胞凋亡的影响及其机制。**方法** 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs),提取 BMSC-Exo。分离培养髓核细胞,先取部分细胞分为内毒素组、内毒素+二巯基甲酸肽吡咯烷(PDTC)组,分别加入内毒素 500  $\mu$ g/mL、内毒素 500  $\mu$ g/mL+PDTC 5  $\mu$ mol/L 孵育 24 h。流式细胞仪检测细胞凋亡率。另取细胞分为对照组、退变组、外泌体组、佛波醇酯组,分别采用基础培养基,内毒素 500  $\mu$ g/mL 刺激,内毒素和外泌体 20  $\mu$ g 刺激,内毒素、外泌体和佛波醇酯 50  $\mu$ g/mL 刺激培养 24 h。流式细胞仪检测细胞凋亡率;Western blot 检测 Cleaved Caspase-3、磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白(p-I $\kappa$ B $\alpha$ )表达情况。**结果** 成功分离培养 BMSCs 并提取 BMSC-Exo。内毒素+PDTC 组细胞凋亡率[(11.55 $\pm$ 0.86)%]较内毒素组[(28.63 $\pm$ 2.86)%]降低( $t=9.909, P=0.001$ )。对照组凋亡率[(9.05 $\pm$ 1.61)%]较退变组[(29.48 $\pm$ 2.83)%]显著升高( $t=-10.874, P=0.000$ );与退变组相比,外泌体组下降至(15.08 $\pm$ 1.65)%,差异有统计学意义( $t=7.620, P=0.002$ );与外泌体组相比,佛波醇酯组升高至(25.41 $\pm$ 1.38)%,差异有统计学意义( $t=-8.323, P=0.001$ )。与对照组比较,退变组 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达升高( $t=-10.575, P=0.000$ ),Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高( $t=-8.506, P=0.001$ );与退变组比较,外泌体组 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达降低( $t=10.052, P=0.001$ ),Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低( $t=7.419, P=0.002$ );与外泌体组比较,佛波醇酯组 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达升高( $t=-12.125, P=0.000$ ),Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高( $t=-8.421, P=0.001$ )。**结论** BMSC-Exo 可抑制内毒素诱导的髓核细胞凋亡,其作用可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路实现的。

**【关键词】** 间充质干细胞;髓核细胞;凋亡;外泌体;核因子- $\kappa$ B

**【中图分类号】** R681.53;R318.04;R496

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-271X(2020)05-0449-07

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2020.05.001

Mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit nucleus pulposus cell apoptosis by regulating NF- $\kappa$ B signaling pathwayXIAO Quan<sup>1</sup>, XU Chang-ming<sup>2</sup>, WANG Yong-chao<sup>2</sup>, ZHOU Quan<sup>1</sup>

(1. Department of Orthopaedics, the Affiliated Huai'an Hospital of Xuzhou Medical University, Huai'an 223002, Jiangsu, China; 2. Department of Orthopaedics, the Affiliated Lianshui County People's Hospital of Kangda College of Nanjing Medical University, Lianshui 223400, Jiangsu, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes (BMSC-Exo) on the apoptosis of nucleus pulposus cells and its mechanism. **Methods** Bone mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated and cultured, and BMSC-Exo were extracted. Nucleus pulposus cells were isolated, cultured, and divided into two groups: endotoxin group and endotoxin + pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) group. Endotoxin 500  $\mu$ g/mL, endotoxin 500  $\mu$ g/mL + PDTC 5  $\mu$ mol/L were

added to incubate for 24 hours, respectively. The apoptosis rates were detected by flow cytometry. Then, cells were divided into control group, degenerative group, exosome group and phorbol ester group. Cells were stimulated by basic medium, endotoxin 500  $\mu$ g/mL, endotoxin and exosomes 20  $\mu$ g,

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20171265)

作者单位:223002 淮安,徐州医科大学附属医院淮安医院骨科(肖 权、周 全);223400 涟水,南京医科大学康达学院附属涟水县人民医院骨科(徐长明、王永超)

通信作者:周 全, E-mail: wuque1@126.com

endotoxin, exosomes and phorbol ester 50  $\mu\text{g/mL}$  for 24 hours, respectively. The apoptosis rates were detected by flow cytometry, and the expressions of cleaved Caspase-3 and phosphorylated NF- $\kappa\text{B}$  inhibitor protein (p-I $\kappa\text{B}\alpha$ ) were detected by Western blotting.

**Results** BMSCs were successfully isolated and cultured and BMSC-Exo were extracted. The apoptosis rate of endotoxin + PDTC group  $[(11.55 \pm 0.86)\%]$  was lower than that of endotoxin group  $[(28.63 \pm 2.86)\%]$  ( $t=9.909$ ,  $P=0.001$ ). The apoptotic rate in control group  $(9.05 \pm 1.61)\%$  was increased than that in degenerative group  $(29.48 \pm 2.83)\%$  ( $t=-10.874$ ,  $P=0.000$ ). Compared with degenerative group, the apoptotic rate in exosome group was decreased  $(15.08 \pm 1.65)\%$  ( $t=7.620$ ,  $P=0.002$ ). Compared with exosome group, the apoptotic rate in phorbol ester group was increased  $(25.41\% \pm 1.38\%)$  ( $t=-8.323$ ,  $P=0.001$ ). Compared with control group, the expression of p-I $\kappa\text{B}\alpha$  protein was increased ( $t=-10.575$ ,  $P=0.000$ ) and cleaved Caspase-3 protein was increased ( $t=-8.506$ ,  $P=0.001$ ) in degenerative group. Compared with degenerative group, the expression of p-I $\kappa\text{B}\alpha$  protein was decreased ( $t=10.052$ ,  $P=0.001$ ) and cleaved Caspase-3 protein was decreased ( $t=7.419$ ,  $P=0.002$ ) in exosome group. Compared with exosome group, the expression of p-I $\kappa\text{B}\alpha$  protein was increased in phorbol ester group ( $t=-12.125$ ,  $P=0.000$ ), and Cleaved Caspase-3 protein expression was increased ( $t=-8.421$ ,  $P=0.001$ ).

**Conclusion** BMSC-Exo can inhibit LPS induced apoptosis of nucleus pulposus cells *via* inhibiting NF- $\kappa\text{B}$  signaling pathway.

**[Key words]** mesenchymal stem cells; nucleus pulposus cell; apoptosis; exosomes; NF- $\kappa\text{B}$

## 0 引 言

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 严重危害公众健康<sup>[1]</sup>。干细胞移植是有效的治疗手段。骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 能与髓核细胞直接接触亦能通过旁分泌促进髓核细胞增殖<sup>[2]</sup>。外泌体是旁分泌的主要介质,是具有生物学活性的微囊泡<sup>[3-4]</sup>。研究发现间充质干细胞可通过提送外泌体抑制髓核细胞凋亡缓解 IDD<sup>[5]</sup>,但关于骨髓间充质干细胞源性外泌体 (bone mesenchymal stem cell-derived exosomes, BMSC-Exo) 抑制髓核细胞凋亡的机制尚不清楚。本研究拟探讨 BMSC-Exo 调控髓核细胞凋亡的可能机制,为 IDD 治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** SPF 级雄性 6~8 周大鼠 8 只,体重  $(200 \pm 20)\text{g}$ ,购于徐州医科大学动物实验中心,许可证号: XZXK (苏) 2019-0003,合格证号: 201902056,实验大鼠采取光昼交替 (光照时间: 07:00-18:00),温度 25  $^{\circ}\text{C}$  左右,湿度 50% 左右,通风良好,自由饮食饮水,适应性喂养 7 d。本实验研究经过徐州医科大学动物伦理委员会批准 (批准号: 20190126)。

**1.1.2 主要实验试剂** 伊思柯夫改良培养液 (IMDM)、F12 细胞培养基、胎牛血清 (gibco);成骨/成脂/成软骨诱导分化培养基 (苏州赛业); II 型

胶原酶、内毒素、二巯氨基甲酸吡咯烷 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)、佛波醇酯、聚乙二醇辛基苯基醚 (triton-X100)、Tween (Sigma); 兔抗鼠 II 型胶原、Cleaved Caspase-3、磷酸化 NF- $\kappa\text{B}$  抑制蛋白 (p-I $\kappa\text{B}\alpha$ )、 $\beta$ -actin 抗体 (Sigma); HRP 标记羊抗兔二抗 (武汉博士德); ECL 试剂盒、PKH67 染色试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、Annexin V-APC/PI 凋亡检测试剂盒、DAPI 染色液 (北京百奥莱博); 兔抗鼠 CD105/44/29/90/63/9、GAPDH 和 TSG101 抗体 (BD Biosciences); RIPA 裂解液 (江苏碧云天)。

**1.1.3 主要实验仪器** 高速台式离心机 (SKFH-1600RW, 湖南湘仪); 超高速离心机 (L-90K, Beckman); 荧光倒置显微镜 (NIB900-FL, Olympus); 透射电镜 (832.10w, 北京京科瑞达); Western blot 检测装置 (125-0098, Bio-Rad); 酶标仪器 (HBS-1096A, 上海研卉); 流式细胞仪 (EpicsAltra, Beckman Coulter); 纳米颗粒跟踪分析仪 (Nanosight NS300, Malvern)。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物取材** 大鼠水合氯醛腹腔注射麻醉后拉颈处死,无菌条件下分离取出股骨、胫骨及尾椎髓核。

**1.2.2 BMSCs 的分离培养** 剪去股骨胫骨两端,无血清培养基冲洗骨髓腔,并吹打成单细胞悬液。4  $^{\circ}\text{C}$  离心半径 18 cm, 1000 r/min 离心 4 min,弃上清,加入红细胞裂解液,混匀,静置 2 min。4  $^{\circ}\text{C}$  离心半径 18 cm, 1000 r/min 离心 4 min,弃上清。PBS 洗涤 2 次。10% FBS 的 IMDM 10 mL 重悬,细胞培养箱内 (37  $^{\circ}\text{C}$ 、

5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度)静置培养。48 h 后首次换液,以后每 2~3 天换液 1 次。细胞长至 80%~90%时消化传代。本实验中所用 BMSCs 均为 P4 代。

**1.2.3 BMSCs 的三系诱导分化鉴定** 取 P4 代 BMSCs 按 6 孔板  $5 \times 10^4$ /孔密度接种,分为成脂诱导和成骨诱导。成脂诱导:细胞完全融合后交替使用成脂诱导培养基 A 液和 B 液诱导,3 周后视情况油红 O 染色。成骨诱导:细胞融合至 70%时加入成骨诱导培养基,3 d 换液 1 次,3 周后视情况茜素红染色。成软骨诱导:将  $4 \times 10^5$  个 BMSCs 转移到 15 mL 离心管中,250×g 离心 4 min,弃上清,加入 0.5 mL 成软骨诱导培养基,150×g 离心 5 min,拧松管盖,静置于细胞培养箱中。3 d 换液 1 次,3 周视软骨球形形成情况包埋切片,阿蓝利辛染色。

**1.2.4 BMSC-Exo 提取及鉴定** P4 代 BMSCs 长至 80%时,换无血清 IMDM 培养 48 h,收集上清后采用超高速离心法抽提外泌体:4 ℃,300×g 离心 10 min,保留上清液,继续 4 ℃,2000×g 离心 10 min,保留上清液,继续 4 ℃,10 000×g 离心 30 min,保留上清液,继续 4 ℃,100 000×g 离心 70 min,保留沉淀,加入 100~200 μL PBS 稀释,-80 ℃保存备用。透射电镜观察外泌体形态。Western blot 检测 BMSCs 和外泌体表面蛋白标志物。纳米颗粒跟踪分析仪观察外泌体颗粒直径分布。

**1.2.5 PKH67/DAPI 免疫荧光染色检测外泌体膜融合能力** 室温避光下取 PKH67 染色试剂盒母液 2 μL 与稀释液 18 μL 混合,再加入 1×PBS 280 μL 混匀,使 PKH67 母液 250 倍稀释。加入蛋白定量为 100 μg 的 BMSC-Exo,混匀后室温孵育 15 min。加入 10 mL 1×PBS,再加入一半体积的外泌体提取试剂盒试剂,混匀,4 ℃静置 1 h,10 000×g 离心 30 min,沉淀用 200 μL 1×PBS 重悬,即得 PKH67 标记的 BMSC-Exo。将其与培养皿中贴壁的髓核细胞共孵 48 h,多聚甲醛固定,PBST(1×PBS + 0.1% Triton X-100)洗 3 次,5 min/次。加 3 mL 1% BSA 孵育 30 min,PBST(1×PBS + 0.1% Tween)洗 3 次,5 min/次。加 0.5 μg/mL DAPI 染液 3 mL,孵育 5 min。PBST(1×PBS + 0.1% Tween)再洗 3 次,5 min/次。荧光倒置显微镜下观察拍照。

**1.2.6 髓核细胞分离培养与鉴定** 剪碎髓核,Ⅱ型胶原酶消化 90 min,滤去残渣。4 ℃,离心半径 18 cm,1000 r/min 离心 5 min。含 10% FBS 的

F12 培养基重悬,静置培养,适时传代。采用甲苯胺蓝染色及Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色进行鉴定。

**1.2.7 CCK-8 检测髓核细胞活力** 将消化后的髓核细胞按照 96 孔板密度为  $1 \times 10^4$ /孔接种,细胞贴壁生长 24 h 后,采用不同浓度(0、100、200、500、1000 μg/mL)内毒素处理 24 h,每个浓度 6 重复,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL 继续培养 1 h,酶标仪设定波长 450 nm 检测各孔 A 值,以 A 值反映细胞活力。细胞成活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} = [(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100\%$$

As:实验孔(含有细胞的培养基、CCK-8\内毒素)A 值;Ac:内毒素浓度=0 μg/mL 的细胞孔 A 值;Ab:空白孔(不含细胞和内毒素的培养基、CCK-8)A 值,本实验中 Ab=0.002。根据结果选择合适浓度的内毒素诱导髓核细胞凋亡。

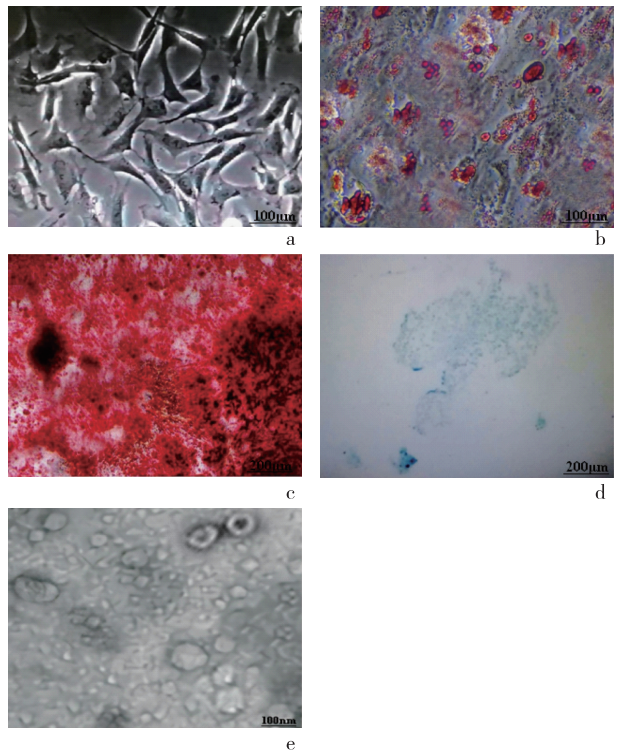
**1.2.8 检测 NF-κB 信号通路抑制后髓核细胞凋亡率的变化** 将消化后的髓核细胞按照 6 孔板密度为  $1 \times 10^5$ /孔接种并分组:内毒素组、内毒素+PDTC 组,细胞贴壁生长 24 h 后,去除细胞培养基,PBS 润洗 2 次,分别加入内毒素 500 μg/mL、内毒素 500 μg/mL +PDTC 5 μmol/L 各 2 mL 孵育 24 h。流式细胞仪检测凋亡:按分组予不同试剂培养 24 h 后收集髓核细胞,制成细胞悬液,室温下采用 Annexin V-FITC 和 PI 避光孵育 15 min,1 h 内用流式细胞仪检测。根据检测结果分析计算凋亡率,3 次重复的实验结果进行统计分析得到总体细胞凋亡率。

**1.2.9 检测内毒素、外泌体及 NF-κB 通路激活剂作用后髓核细胞凋亡率及 Cleaved Caspase-3、p-IκBα 蛋白的表达变化** 将消化后的髓核细胞按照 6 孔板密度为  $1 \times 10^5$ /孔接种并分组:对照组、退变组、外泌体组、佛波醇酯组,细胞贴壁生长 24 h 后,去除细胞培养基,PBS 润洗 2 次,分别加入基础培养液、内毒素 500 μg/mL、内毒素 500 μg/mL +外泌体 20 μg、内毒素 500 μg/mL +外泌体 20 μg +佛波醇酯 50 μg/mL 各 2 mL 孵育 24 h。流式细胞仪检测凋亡:方法同 1.2.8。蛋白质免疫印迹:收集各组髓核细胞加 RIPA 裂解,蛋白质浓度定量,每孔上样 30 μg SDS-PAGE 凝胶电泳,切胶、转膜、孵育一抗(Cleaved Caspase-3、p-IκBα、β-actin)、二抗,加 ECL 试剂曝光,计算各条带灰度值,推算各组 p-IκBα、Cleaved Caspase-3 蛋白表达量。

**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用 ANOVA 分析,两组间比较采用  $t$  检验,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

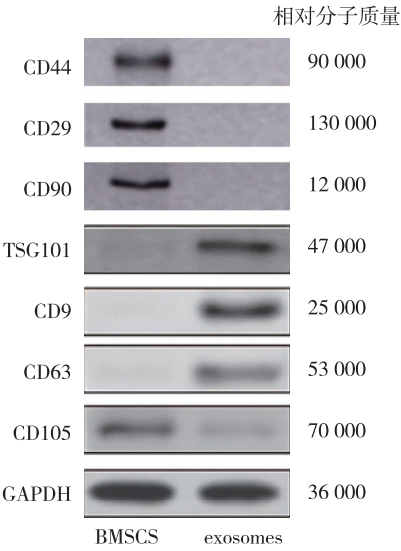
**2 结 果**

**2.1 BMSC-Exo 提取与鉴定** BMSCs 均匀生长,呈长梭形。成脂诱导分化油红 O 染色见细胞内有红色球形脂滴形成;成骨诱导分化茜素红染色见有黑色的钙结节形成;成软骨诱导分化形成小软骨球,切片后阿蓝利辛染色见淡蓝色糖胺聚糖积累。电镜下外泌体形态特征为杯托状结构。见图 1。Western blot 检测 BMSCs 特异性表达 CD105、CD44、CD29、CD90, BMSCs-Exo 表达 CD63、CD9、TSG101,见图 2。纳米颗粒跟踪分析仪显示外泌体直径多分布在 100 nm。外泌体 PKH67 染色发绿色荧光,髓核细胞细胞核 DAPI 染色发蓝色荧光,共孵后外泌体在髓核细胞胞质中发绿色荧光,说明外泌体具有膜融合能力,可被髓核细胞摄取。见图 3。

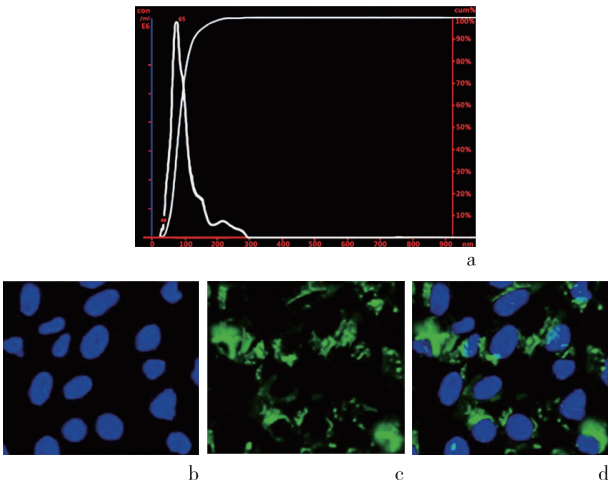


a: 原代 BMSC 细胞形态(×100); b: 成脂诱导(油红 O 染色×100); c: 成骨诱导(茜素红染色×40); d: 成软骨诱导(阿蓝利辛染色×40); e: 电镜下观察 BMSCs-Exo 形态(×50 000)

**图 1** BMSC 原代培养、三系诱导分化染色光镜下观察结果及外泌体电镜下观察



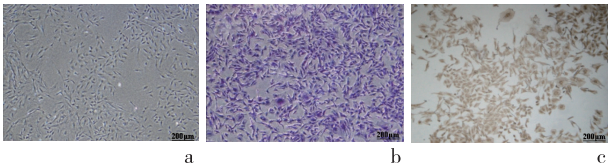
**图 2** Western blot 检测外泌体以及 BMSCs 标志蛋白表达情况



a: 纳米颗粒跟踪分析仪检测外泌体颗粒直径; b: DAPI; c: PKH67; d: 共同显示

**图 3** 纳米颗粒跟踪分析仪及免疫荧光染色检测外泌体结果(×200)

**2.2 髓核细胞培养与鉴定** 原代髓核细胞培养 14 d,形态转为长梭形,内含分泌颗粒。甲苯胺蓝染色细胞核呈蓝色,细胞外基质色稍浅,表明细胞可分泌糖胺多糖。Ⅱ型胶原免疫化学染色见细胞外基质被染成棕黄色,表明细胞质内有Ⅱ型胶原蛋白表达。见图 4。



a: 髓核细胞在光镜下形态特征; b: 髓核细胞(甲苯胺蓝染色); c: 髓核细胞Ⅱ型胶原(免疫组化染色)

**图 4** 髓核细胞镜下形态及相关染色情况(×40)

**2.3 内毒素对髓核细胞细胞活力的影响** CCK-8 实验结果结果显示:相比于内毒素浓度 0  $\mu\text{g/mL}$  处理的细胞孔,其余各浓度的  $A$  值普遍降低,细胞存活率普遍下降( $P<0.01$ ),各处理浓度下细胞存活率相对差异较大( $F=383.8, P<0.0001$ ),见表 1。由于 500  $\mu\text{g/mL}$  与 1000  $\mu\text{g/mL}$  处理后细胞存活率数值较为接近,差异无统计学意义( $F=0.491, t=1.005, P=0.339$ ),因此后续研究中采用内毒素 500  $\mu\text{g/mL}$  浓度处理髓核细胞建立凋亡模型。

表 1 CCK8 检测不同浓度内毒素对髓核细胞  $A$  值及细胞存活率的影响( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

内毒素浓度	$A_{450}$ 值	细胞存活率(%)
0 $\mu\text{g/mL}$	0.704 $\pm$ 0.006	100
100 $\mu\text{g/mL}$	0.475 $\pm$ 0.010	67.586 $\pm$ 3.201 *
200 $\mu\text{g/mL}$	0.432 $\pm$ 0.007	61.323 $\pm$ 2.388 *
500 $\mu\text{g/mL}$	0.340 $\pm$ 0.007	48.148 $\pm$ 2.636 *
1000 $\mu\text{g/mL}$	0.327 $\pm$ 0.011	46.278 $\pm$ 3.718 *

与 0  $\mu\text{g/mL}$  比较, \*  $P<0.01$

**2.4 内毒素诱导髓核细胞凋亡涉及 NF- $\kappa$ B 通路** 内毒素 + PDTC 组细胞凋亡率 [(11.55  $\pm$  0.86)%]较内毒素组 [(28.63 $\pm$ 2.86)%]明显降低( $t=9.909, P=0.001$ ),PDTC 抑制了 NF- $\kappa$ B 信号通路后内毒素诱导髓核细胞凋亡效率明显降低,这说明髓核细胞凋亡涉及 NF- $\kappa$ B 通路。见图 5。

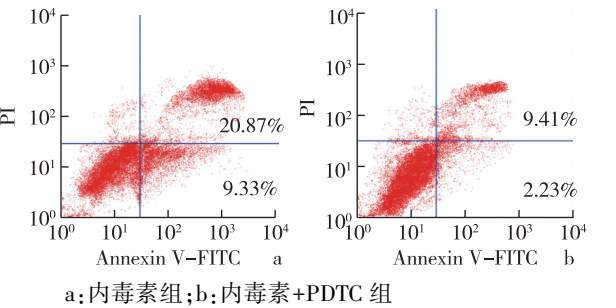
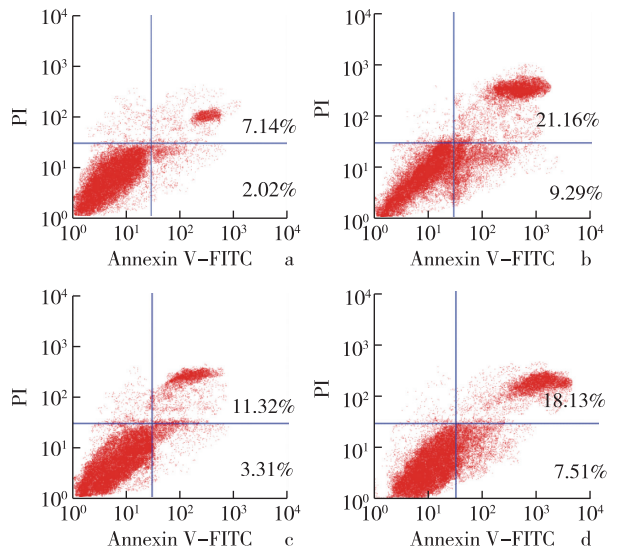


图 5 流式细胞仪检测 PDTC 对髓核细胞凋亡的影响

**2.5 BMSC-Exo 通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路抑制髓核细胞凋亡** 流式细胞仪检测的对照组凋亡率为 (9.05 $\pm$ 1.61)%,而退变组髓核细胞凋亡率升高至 (29.48 $\pm$ 2.83)%,差异有统计学意义( $t=-10.874, P=0.000$ );与退变组相比,外泌体组髓核细胞凋亡率下降至 (15.08 $\pm$ 1.65)%,差异有统计学意义( $t=7.620, P=0.002$ );与外泌体组相比,佛波醇酯组

髓核细胞凋亡率增加至 (25.41 $\pm$ 1.38)%,差异有统计学意义( $t=-8.323, P=0.001$ )。见图 6。与对照组比较,退变组 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达升高( $t=-10.575, P=0.000$ ),Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高( $t=-8.506, P=0.001$ );与退变组比较,外泌体组 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达降低( $t=10.052, P=0.001$ ),Cleaved Caspase-3 蛋白表达降低( $t=7.419, P=0.002$ );与外泌体组比较,佛波醇酯组 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达升高( $t=-12.125, P=0.000$ ),Cleaved Caspase-3 蛋白表达升高( $t=-8.421, P=0.001$ )。见图 7。



a:对照组; b:退变组; c:外泌体组; d:佛波醇酯组

图 6 流式细胞仪检测髓核细胞凋亡情况

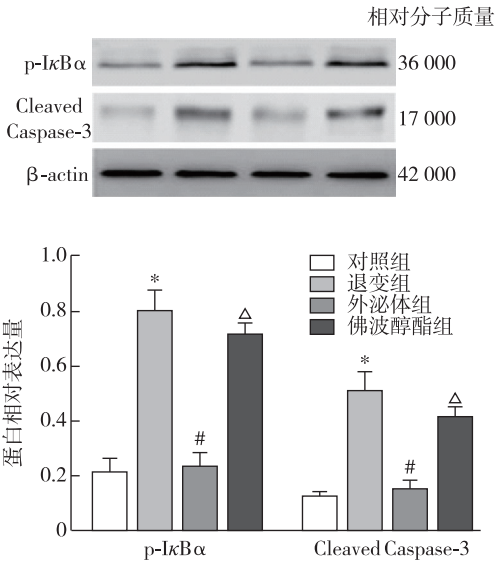


图 7 Western blot 检测各组 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、Cleaved Caspase-3 蛋白表达情况

### 3 讨 论

IDD 机制尚不清楚,目前认为与髓核细胞炎症密切相关,炎症因子在其中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。NF- $\kappa$ B 是炎症因子的上游调控因子,研究发现抑制 NF- $\kappa$ B 活性可抑制炎症因子产生<sup>[8]</sup>。亦有研究发现退变椎间盘组织 NF- $\kappa$ B 含量较正常明显增高<sup>[9]</sup>,NF- $\kappa$ B 通路抑制后,IDD 明显减缓<sup>[10-11]</sup>。内毒素可通过活化 NF- $\kappa$ B 通路促进细胞凋亡<sup>[12]</sup>。PDTC 是体外 NF- $\kappa$ B 通路研究常用的阻断剂,它能抑制 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化,阻止 NF- $\kappa$ B 入核,从而发挥通路阻断作用。因此,本研究采用内毒素作为诱导介质,建立髓核细胞细胞凋亡模型,加入 PDTC 作用于髓核凋亡细胞,流式细胞仪检测发现髓核细胞凋亡率明显下降,说明细胞凋亡确有 NF- $\kappa$ B 信号通路参与。

Caspase-3 是执行凋亡的关键分子,作为 Caspase-3 的活化形式,Cleaved Caspase-3 是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志<sup>[13]</sup>。NF- $\kappa$ B 蛋白二聚体与 I $\kappa$ B $\alpha$  结合形成三聚体而失活存在细胞质中。当细胞收到激活信号后 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化从三聚体分离,而二聚体转入细胞核内,调节靶基因的表达<sup>[14]</sup>。因此 I $\kappa$ B $\alpha$  的磷酸化(p-I $\kappa$ B $\alpha$ )是 NF- $\kappa$ B 信号通路活化的重要标志<sup>[15]</sup>。本研究用流式细胞仪检测凋亡率发现 PDTC 抑制 NF- $\kappa$ B 通路后,髓核细胞凋亡率明显下降,Western blot 检测显示 Cleaved Caspase-3 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白均明显下降,可见 PDTC 抑制了 NF- $\kappa$ B 信号通路,该通路与髓核细胞退变密切相关。

内毒素是人体中一种重要的促炎因子,它可诱导髓核细胞产生强烈炎症导致细胞凋亡,减少髓核细胞外细胞基质合成,在 IDD 过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。本研究 CCK-8 实验发现随着内毒素浓度的增加 A 值逐步降低,而 A 值与细胞存活率呈正相关,并且内毒素 500  $\mu$ g/mL 和 1000  $\mu$ g/mL 处理组之间 A 值没有显著差异,因此我们选择内毒素 500  $\mu$ g/mL 浓度建立髓核细胞凋亡模型。采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率,结果均显示内毒素有效诱导了髓核细胞凋亡。

外泌体是 40~100 nm 大小的微囊泡,内含生物活性物质<sup>[16]</sup>。研究表明,外泌体在细胞通讯和代谢调节等方面发挥重要作用<sup>[17]</sup>。BMSC-Exo 可抑制炎症介质激活减少髓核细胞凋亡<sup>[18]</sup>。研究发现,外泌体达到有效治疗作用的最低剂量是 10~100  $\mu$ g<sup>[19]</sup>,

因此本实验选择 20 $\mu$ g 作为外泌体的实验剂量。外泌体分离方法主要有超速离心法、聚合物沉淀法、超滤法、免疫亲和法、显微射流分离技术等,超速离心法是“金标准”,使用最广泛<sup>[20]</sup>。本研究中即用该方法提取外泌体。国际细胞外囊泡学会规定外泌体的鉴定必须包括粒径大小、形态以及蛋白分子标记等三方面<sup>[19]</sup>。本研究通过纳米颗粒跟踪分析仪观察粒径大小、透射电镜观察形态及免疫印迹检测表面标志物对所提取的外泌体进行鉴定,同时通过免疫荧光检测证实其确实能被髓核细胞摄取。本研究通过流式细胞仪检测发现外泌体组的髓核细胞凋亡率明显下降,提示 BMSC-Exo 可被髓核细胞摄取并减轻其凋亡。

为研究 BMSC-Exo 对髓核细胞的抗凋亡机制,本研究采用 NF- $\kappa$ B 通路经典激活剂佛波醇酯,佛波醇酯可使 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化,促使 NF- $\kappa$ B 入核,从而活化 NF- $\kappa$ B 信号通路。通过流式细胞仪检测发现,外泌体组可以抑制内毒素导致的髓核细胞凋亡,而使用佛波醇酯激活 NF- $\kappa$ B 信号通路后,髓核细胞凋亡率升高,Western blot 检测显示 Cleaved Caspase-3 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白均明显升高,提示 NF- $\kappa$ B 信号通路被佛波醇酯激活,并且该信号通路激活后外泌体的抗凋亡作用基本被逆转。

综上所述,BMSC-Exo 可以通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制髓核细胞凋亡。以上研究初步揭示了 BMSCs 对髓核细胞凋亡的作用机制,为 IDD 的治疗提供了新思路。

### 【参考文献】

- [1] 魏 兵.腰椎间盘突出症患者椎间孔镜手术后复发的危险因素分析[J].实用骨科杂志,2019,25(2):101-104,116.
- [2] 刘国科,林远方,郑晓斌,等.BMSCs 通过其分泌的外泌体促进髓核细胞增殖的实验研究[J].湖南中医杂志,2019,35(4):152-154.
- [3] Li M, Xia B, Wang Y, et al. Potential Therapeutic Roles of Exosomes in Multiple Myeloma: A Systematic Review[J]. J Cancer, 2019,10(24):6154-6160.
- [4] Bakhshandeh B, Kamaledin MA, Aalishah K. A Comprehensive Review on Exosomes and Microvesicles as Epigenetic Factors[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2017,12(1):31-36.
- [5] 徐 辰.间充质干细胞来源外泌体促进椎间盘退变修复的作用及机制研究[D].第二军医大学,2017.
- [6] 王宇翔,徐海栋.艾拉莫德对功能退变椎间盘细胞炎症因子表达的影响[J].医学研究生学报,2019,32(4):341-345.

- [7] 王明宇, 查旭东, 徐海栋. 盘源性腰痛炎性相关介质的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(1): 175-181.
- [8] 刘逸煊, 刘家伶, 郭凯, 等. 岩藻黄素通过 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 LPS 诱导的细胞炎症反应的研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2019, 35(2): 89-96.
- [9] 原野, 赵静, 李永民, 等. 腰椎间盘突出组织中 NF- $\kappa$ B、MMP-1/TIMP-1 的表达及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(19): 4-5.
- [10] Zhongyi S, Sai Z, Chao L, *et al.* Effects of nuclear factor kappa B signaling pathway in human intervertebral disc degeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2015, 40(4): 224-232.
- [11] 孙中仪. NF- $\kappa$ B 信号通路椎间盘退变的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(23): 2162-2164.
- [12] 易威威, 刘浠, 温亚枫, 等. 内毒素诱导退变人椎间盘髓核细胞凋亡[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(5): 596-600.
- [13] 杨忠信, 李晓宇, 蔡静, 等. Xklp2 靶蛋白对肺癌细胞裸鼠成瘤能力的影响及机制研究[J]. 实用医院临床杂志, 2018, 15(2): 4-8.
- [14] Yin J, Ren K, Huang Y, *et al.* Exploration about changes of IL-10, NF- $\kappa$ B and MMP-3 in a rat model of cervical spondylosis [J]. *Mol Immunol*, 2018, 93: 184-188.
- [15] 陈敏, 赵凯, 王娟, 等. 骨碎补总黄酮抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路干预大鼠椎间盘退变[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(17): 2654-2659.
- [16] 朱皓峰. 外泌体液体活检及其在肿瘤诊断治疗中的研究进展[J]. 东南国防医药, 2019, 21(5): 512-516.
- [17] Li Z, Wang Y, Xiao K, *et al.* Emerging Role of Exosomes in the Joint Diseases [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(5): 2008-2017.
- [18] Xia C, Zeng Z, 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.
- [19] Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, *et al.* Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes [J]. *Cells*, 2019, 8(4): 307.
- [20] 张玉星, 张响, 陈文杰, 等. 外泌体分离方法研究进展[J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(4): 42-46.

(收稿日期: 2020-05-25; 修回日期: 2020-06-30)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)