

文章编号: 1001-6325(2025)12-1557-08

## 研究论文

## 骨髓间充质干细胞来源的外泌体缓解低氧/复氧引起的心肌细胞损伤

文 雯<sup>1</sup>, 刘晨曦<sup>1</sup>, 陈双景<sup>2</sup>, 陆晓炯<sup>1</sup>, 靳志涛<sup>3</sup>, 张 锋<sup>3\*</sup>

1. 锦州医科大学火箭军特色医学中心研究生培养基地 心血管内科, 北京 100088;  
中国人民解放军火箭军特色医学中心 2. 研究部, 3. 心血管内科, 北京 100088

**摘要:**目的 探讨骨髓间充质干细胞(BMMSCs)来源的外泌体(BMMSCs-Exo)对低氧/复氧(H/R)诱导大鼠心肌细胞系(H9c2)损伤的作用及机制。方法 高速离心法分离BMMSCs-Exo。将细胞分为对照组(control)、H/R组和H/R+BMMSCs-Exo组(H/R+Exo), 低氧12 h 复氧6 h 构建细胞低氧/复氧(H/R)损伤模型。流式细胞术检测细胞凋亡,DHE染色评估细胞ROS水平,JC-1免疫荧光染色检测线粒体膜电位,Western blot检测线粒体自噬相关蛋白。结果 BMMSCs-Exo处理能显著减轻氧化应激,恢复线粒体膜电位,降低线粒体自噬水平,并有效减少心肌细胞凋亡。**结论**骨髓间充质干细胞来源的外泌体缓解H/R诱导的心肌细胞损伤。

**关键词:**外泌体; 低氧/复氧; 氧化应激; 线粒体; 凋亡

中图分类号:R541.4 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2025.12.1557

## Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells alleviate hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury

WEN Wen<sup>1</sup>, LIU Chenxi<sup>1</sup>, CHEN Shuangjing<sup>2</sup>, LU Xiaojiong<sup>1</sup>, JIN Zhitao<sup>3</sup>, ZHANG Zheng<sup>3\*</sup>

1. Department of Cardiology, Graduate Training Base of Jinzhou Medical University, PLA Rocket Force Characteristic Medical Center, Beijing 100088;  
2. Research Department; 3. Department of Cardiology, PLA Rocket Force Characteristic Medical Center, Beijing 100088, China

**Abstract: Objective** To explore the effects and mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cell (BMMSC)-derived exosomes (BMMSC-Exo) on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced injury in rat cardiomyocyte cell line (H9c2). **Methods** BMMSC-Exosomes were isolated by ultracentrifugation. The cells were divided into three groups: control, H/R, and H/R+BMMSC-Exo (H/R+Exo). A hypoxia/reoxygenation (H/R) injury model was established by exposing cells to 12 hours of hypoxia followed by 6 hours of reoxygenation. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis, DHE staining was used to assess cellular ROS levels, JC-1 immunofluorescence staining was used to evaluate mitochondrial membrane potential, and Western blot was used to detect mitochondrial autophagy-related proteins. **Results** BMMSC-Exo treatment significantly alleviated oxidative stress, restored mitochondrial membrane potential, reduced mitochondrial autophagy levels, and effectively decreased cardiomyocyte apoptosis. **Conclusions** Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviate H/R-induced cardiomyocyte injury.

**Key words:** exosomes; hypoxia/reoxygenation; oxidative stress; mitochondria; apoptosis

收稿日期:2024-11-13 修回日期:2025-03-25

基金项目:北京市自然科学基金(7222229)

\*通信作者(corresponding author):faithword@163.com

心肌缺血再灌注损伤是指心肌在经历长时间缺血后,血液供应恢复时所引发的多种细胞损伤反应<sup>[1]</sup>。这种损伤可导致心肌梗死、心律失常和心力衰竭,增加心脏病风险,并可能引发心肌细胞死亡和心功能下降,严重威胁患者生命。因此,深入了解缺血再灌注损伤的病理生理机制,对于寻找预防和改善临床结局的有效策略至关重要。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)是一种特殊的基质细胞,具有治疗缺血性心脏病的潜力,可以有效地减少心肌梗死面积、改善心脏功能、增强血管生成和调节炎性反应<sup>[2]</sup>,并能调节线粒体能量代谢,从而减缓心肌损伤<sup>[3]</sup>。越来越多的证据表明,BMMSCs通过旁分泌效应发挥心肌保护作用<sup>[4]</sup>。外泌体(exosome)是一类含有蛋白质、脂质、RNA和DNA的直径约30~160 nm的小囊泡,参与细胞间通讯和调节生物过程,如免疫反应、细胞迁移等<sup>[5]</sup>。近期研究表明,BMMSCs衍生外泌体(BMMSCs-Exo)可以改善心肌缺血损伤<sup>[6]</sup>,但其缓解心肌低氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤及具体机制仍需探索。本研究通过建立心肌细胞H/R模型,探讨BMMSCs-Exo对心肌细胞凋亡、氧化应激、线粒体膜电位及线粒体自噬的影响,初步分析其在心肌缺血再灌注损伤中的作用及机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

大鼠心肌细胞系H9c2(武汉普诺赛生命科技有限公司);无糖DMEM、DMEM培养基、胰蛋白酶及青链霉素混合液(Gibco公司);DHE探针(上海奥默生物科技有限公司);annexin V-APC/Cyanine7/PI Apoptosis Kit(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);CCK-8试剂盒和JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司);血清(FBS)(北京翱擎生物科技有限公司);总蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);7-aad(Biolegend公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 BMMSCs细胞的分离及培养:从小鼠胫骨和股骨分离BMMSCs,并在添加10%胎牛血清(FBS)的α-MEM培养基中培养。H9c2细胞的培养条件为含10%FBS的DMEM培养基,所有细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>和21%O<sub>2</sub>环境下维持增殖。

1.2.2 BMMSCs-Exo的分离及鉴定:采用超速离心法分离BMMSCs-Exo。BMMSCs-Exo的鉴定通过纳米流式检测仪测量粒径分布。使用不同直径的二氧化硅标准球(68、91、113、155 nm),建立散射光强度与粒径的标准曲线,转化样品的散射光强度为粒径信息,从而获得BMMSCs-Exo的粒径分布。电镜鉴定步骤为:将10 μL外泌体溶液滴加至铜网上,室温孵育10 min后,用吸水纸去除多余液体,再滴加10 μL 2%的醋酸双氧铀复染1 min,滤纸吸去浮液,最后在白炽灯下烘干2 min。铜网放置于透射电镜下,在80 kV电压下拍摄影像。

1.2.3 H9c2的分组及处理:将H9c2细胞分为对照组(control)、H/R组和H/R+BMMSCs-Exo(H/R+Exo)组,低氧/复氧时,H9c2细胞更换为无糖培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>、1%O<sub>2</sub>条件下培养12 h,再更换为含有10%FBS的DMEM中培养6 h;H/R+Exo组中,将H9c2接种在6孔板中,细胞数为1×10<sup>5</sup>/孔,进行后续实验,培养基中的BMMSCs-Exo浓度为400 mg/L。

1.2.4 CCK-8检测细胞活力:将心肌细胞铺在96孔板中,每孔8 000个细胞。CCK-8溶液与基础培养基按1:9的比例混合配置为工作液,加入心肌细胞中,每孔100 μL。将板在37℃下孵育2 h,并使用酶标仪(Thermo)在450 nm处测量吸光度值。

1.2.5 流式检测细胞凋亡:将每孔细胞上清转移至离心管,使用不含EDTA的胰蛋白酶进行消化,收集得到的细胞悬液。离心后重悬细胞,取(5~10)×10<sup>4</sup>个细胞,再次离心,加入500 μL稀释的1×annexin V Binding Buffer重悬。随后向细胞悬液中加入5 μL annexin V-APC/Cyanine7试剂和5 μL 7-AAD,混匀后在室温(20~25℃)避光孵育20 min。最后将细胞置于冰浴中,并立即使用流式细胞仪检测。

1.2.6 免疫荧光染色检测H9c2氧化应激及线粒体膜电位变化:将H9c2细胞接种在共聚焦小皿中,使细胞增殖至70%~80%汇合度。各组细胞进行相应处理。用无血清培养基稀释荧光染料。移除培养板中的培养基,并用PBS轻轻洗涤细胞2次,向每皿中加入含有荧光染料的工作溶液。在37℃、5%CO<sub>2</sub>的避光条件下孵育细胞20~30 min,在荧光显微镜下观察细胞。

1.2.7 Western blot检测蛋白表达:从H9c2细胞中

使用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白，并通过 BCA 蛋白检测法进行定量。30 μg 的蛋白样品使用 12% SDS-PAGE 进行分离，并转移到 PVDF 膜上，随后用一抗和相应的二抗进行检测。蛋白条带通过 Image Lab 软件进行检测，并使用 Image J 软件进行分析。

### 1.3 统计学分析

GraphPad Prism 7 (GraphPad 软件)用于数据分析。所有的实验都至少重复 3 次，数据以平均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。单因素方差分析(ANOVA)用于比较各组之间的差异。Tukey-t 检验比较组间数据差异。

## 2 结果

### 2.1 BMMSC-Exo 的鉴定

BMMSC-Exo 具有 50~160 nm 的直径(图 1A)。进一步使用透射电子显微镜检测 BMMSC-Exo 的微观结构，显示 BMMSC-Exo 具有典型的杯状形态及双层膜结构，符合外泌体特征(图 1B)。

### 2.2 H/R 引起心肌细胞损伤

随着复氧时间延长，细胞凋亡率逐渐增加(图 2A)，细胞活力随复氧时间增加而逐渐恢复(图 2C)。因此，在后续研究中选择 H/R 12~6 h 作为 H9c2 心肌细胞 H/R 损伤模型。

### 2.3 BMMSC-Exo 减轻 H/R 引起的心肌细胞凋亡

H/R 组、H/R+Exo 组细胞的凋亡率均显著高于对照组( $P < 0.05$ )(图 3A)，但 H/R+Exo 组细胞凋亡率显著低于 H/R 组( $P < 0.05$ )(图 3B)。

### 2.4 BMMSCs-Exo 缓解 H/R 导致的心肌细胞氧化应激损伤

H/R 组细胞 DHE 荧光强度显著高于对照组，

经过 BMMSCs-Exo 处理后，H/R 条件下的 H9c2 细胞荧光强度显著下降( $P < 0.05$ )(图 4)。

### 2.5 BMMSCs-Exo 减轻 H/R 引起的线粒体氧化应激水平

H/R 组细胞 MitoSOX RED 荧光强度显著高于对照组，而 BMMSCs-Exo 处理显著降低了荧光强度(图 5A)。流式细胞术检测结果与荧光染色一致( $P < 0.05$ )(图 5B)。

### 2.6 BMMSCs-Exo 减轻 H/R 引起的线粒体膜电位改变

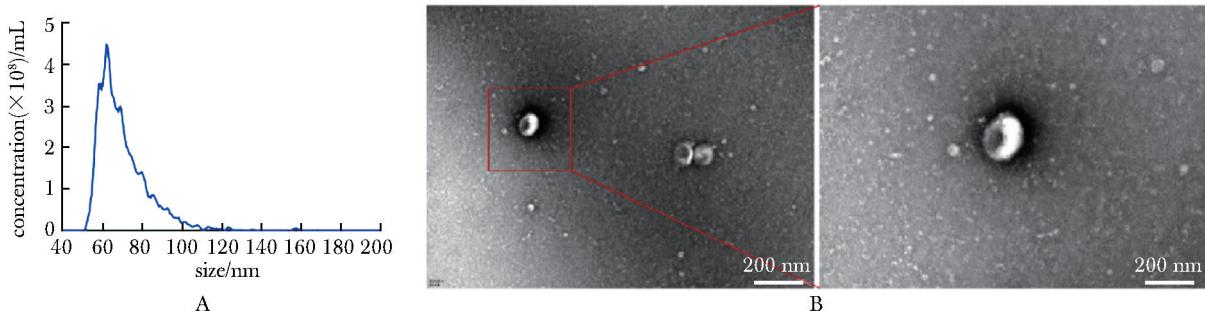
H/R 组 JC-1 聚合物(JC-1 aggregates)较对照组减少，JC-1 单体(JC-1 monomers)增加(图 6A)。H/R 组线粒体膜电位显著降低，但 H/R+Exo 组显著减弱了这一改变，相较于 H/R 组而言，其 JC-1 aggregates 增加，JC-1 monomers 降低( $P < 0.05$ )(图 6B,C)。

### 2.7 BMMSCs-Exo 减轻 H/R 引起的线粒体自噬

在 H/R 组中 LC 3 II/I 的表达水平显著高于对照组，p62 水平显著下降，同时线粒体膜内蛋白和线粒体膜外蛋白显著低于对照组(图 7)，而外泌体治疗显著逆转了这一情况( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

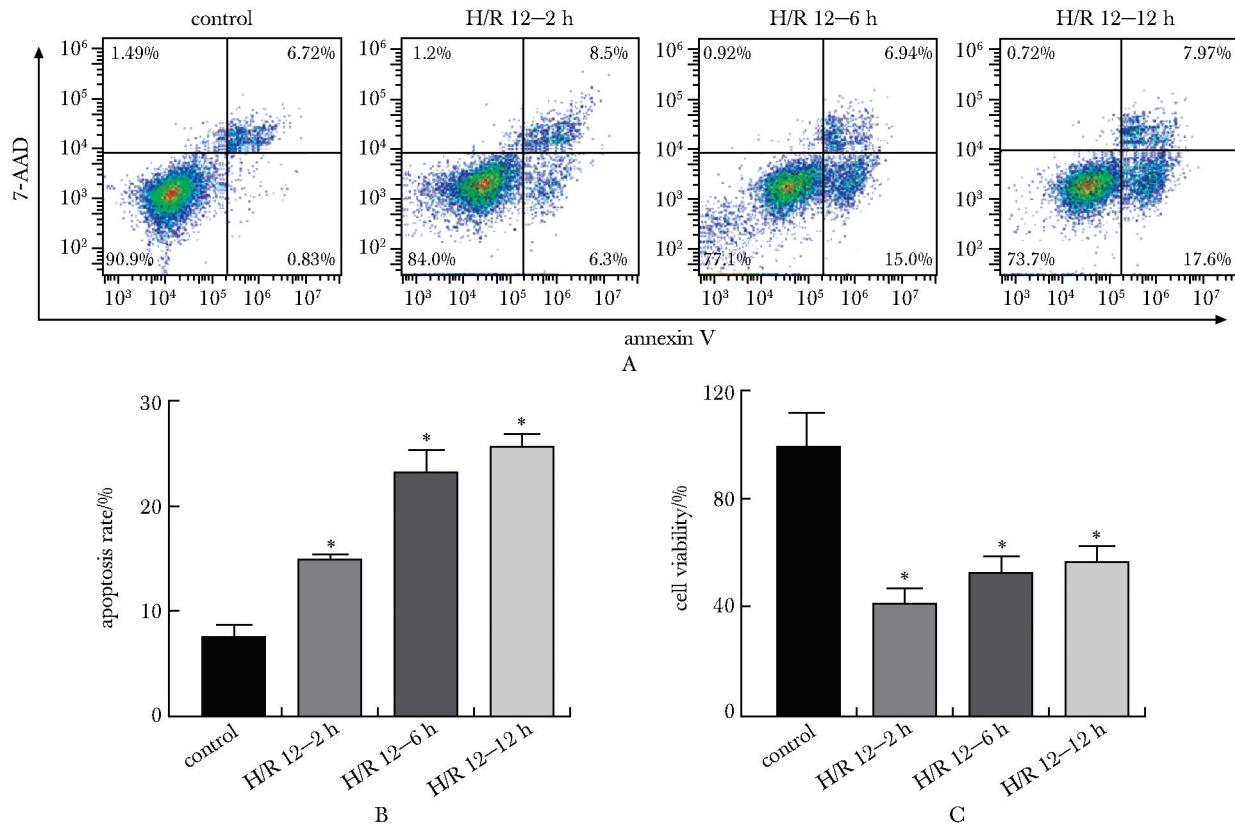
本实验通过 H9c2 心肌细胞系模拟心肌缺血再灌注损伤模型<sup>[7]</sup>。因外泌体具有低免疫原性、高生物相容性、易储存和可控性等独特优势，故本实验采用小鼠 BMMSCs-Exo 治疗 H/R 诱导的心肌细胞损伤<sup>[8]</sup>。低氧/复氧(H/R)条件下，心肌细胞凋亡显著增加，ROS 水平升高，线粒体氧化应激增强。JC-1 染色结果显示，线粒体膜电位丧失的表现为 JC-1



A. the diameter of BMMSCs-Exo; B. TEM scanning of BMMSCs-Exo

图 1 小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体 BMMSCs-Exo 的表征

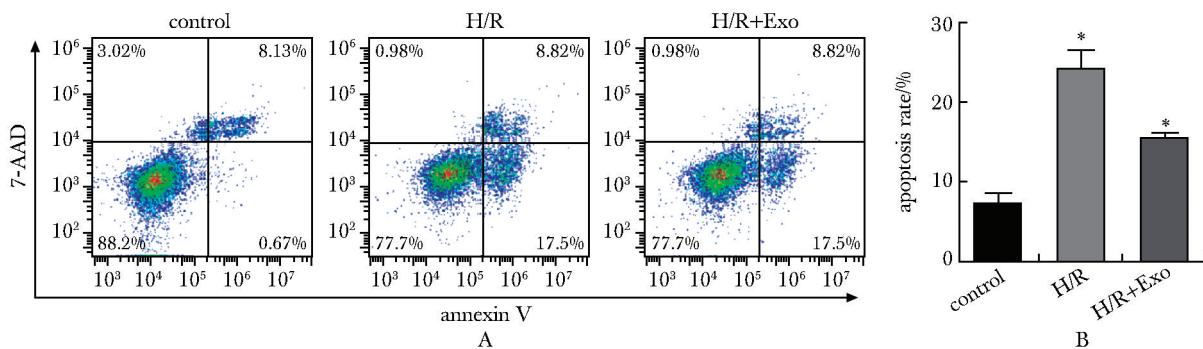
Fig 1 Characterization of BMMSCs-Exo from mice



A. flow cytometry analysis of apoptosis rate in H9c2 cells; B. semi-quantitative analysis of apoptosis rate in H9c2 cells; C. CCK-8 assay for detecting cell viability; \*P<0.05 compared with control group.

图 2 低氧/复氧对细胞凋亡率及细胞活力的影响

Fig 2 The effects of hypoxia/reoxygenation on cell apoptosis rate and cell viability



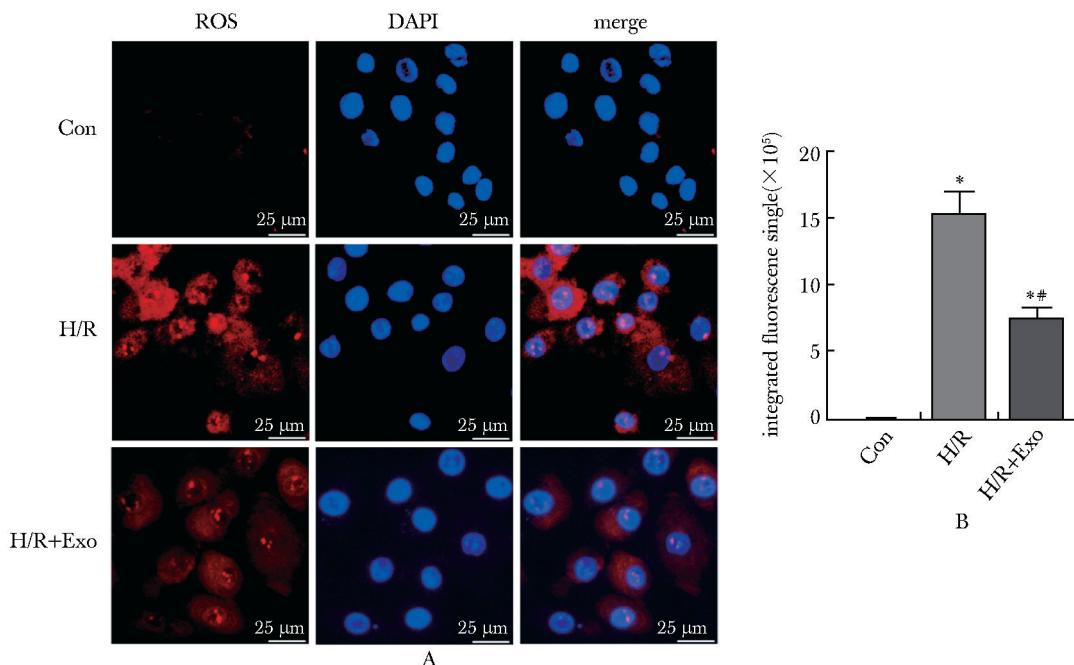
A. flow cytometry analysis of apoptosis rate in H9c2 cells; B. semi-quantitative analysis of apoptosis rate in H9c2 cells; \*P<0.05 compared with control group.

图 3 H9c2 凋亡率检测

Fig 3 Detection of apoptosis rate in H9c2 cells

monomers减少, JC-1 aggregates增加,提示膜电位发生变化。Western blot 分析进一步证实,H/R 诱导了线粒体自噬的过度激活。综合分析表明,H/R 引起的细胞凋亡与 ROS 积累与线粒体功能障碍密切相

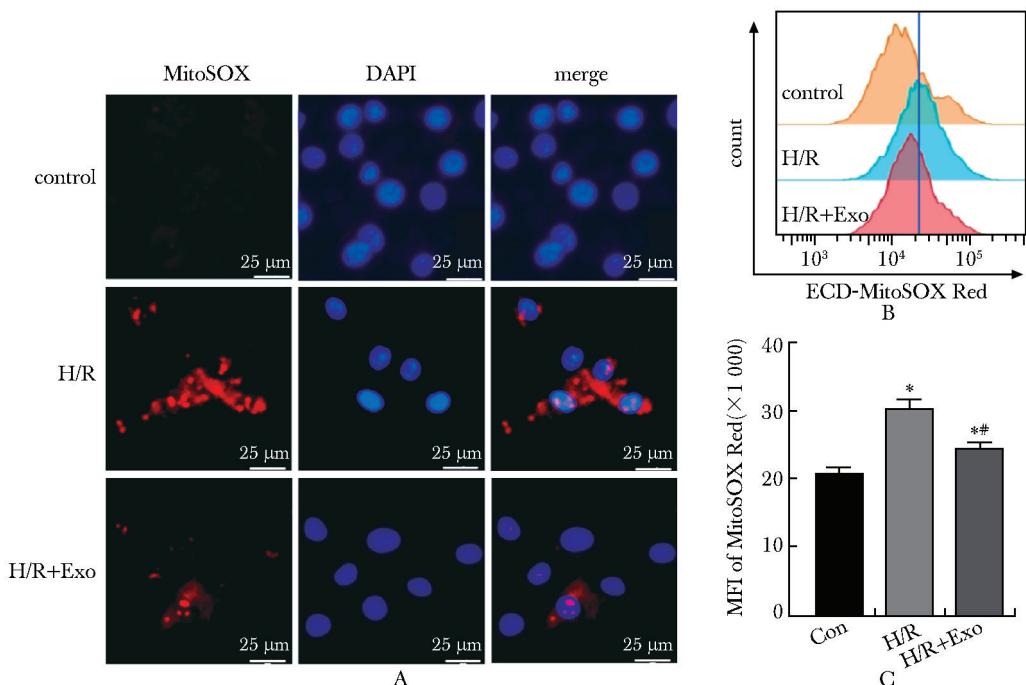
关,过量的 ROS 生成导致线粒体膜损伤,进而加剧氧化应激,最终诱导线粒体膜电位丧失及自噬的发生。前期研究表明,心脏 I/R 损伤主要表现为心肌细胞凋亡和坏死的增加、氧化应激反应的增强、炎性



A. DHE fluorescence staining to detect mitochondrial oxidative stress; B, C. quantitative analysis of oxidative stress in H2c9 cells; \* $P<0.05$  compared with control group; \*\* $P<0.05$  compared with H/R group.

图 4 H9c2 细胞氧化应激水平检测

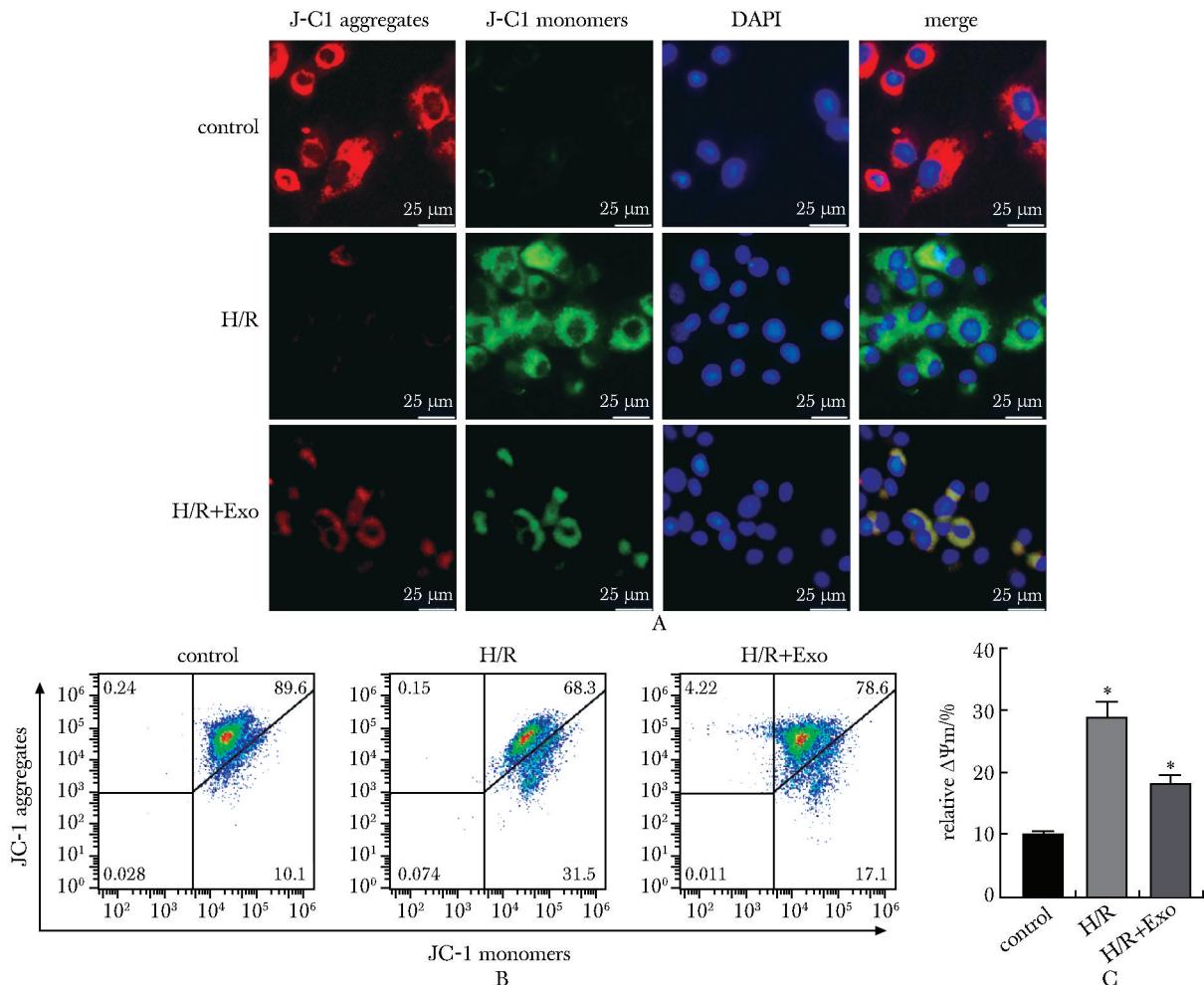
Fig 4 Detection of oxidative stress levels in H9c2 cells



A. MitoSOX Red fluorescence staining to detect mitochondrial oxidative stress; B, C. flow cytometry to detect mitochondrial oxidative stress and quantitative analysis; \* $P<0.05$  compared with control group; \*\* $P<0.05$  compared with H/R group.

图 5 H9c2 细胞线粒体氧化应激水平的检测

Fig 5 Detection of mitochondrial oxidative stress levels in H9c2 cells



A. mitochondrial membrane potential fluorescence staining; B, C. flow cytometry to detect mitochondrial membrane potential and quantitative analysis; \* $P<0.05$  compared with control group.

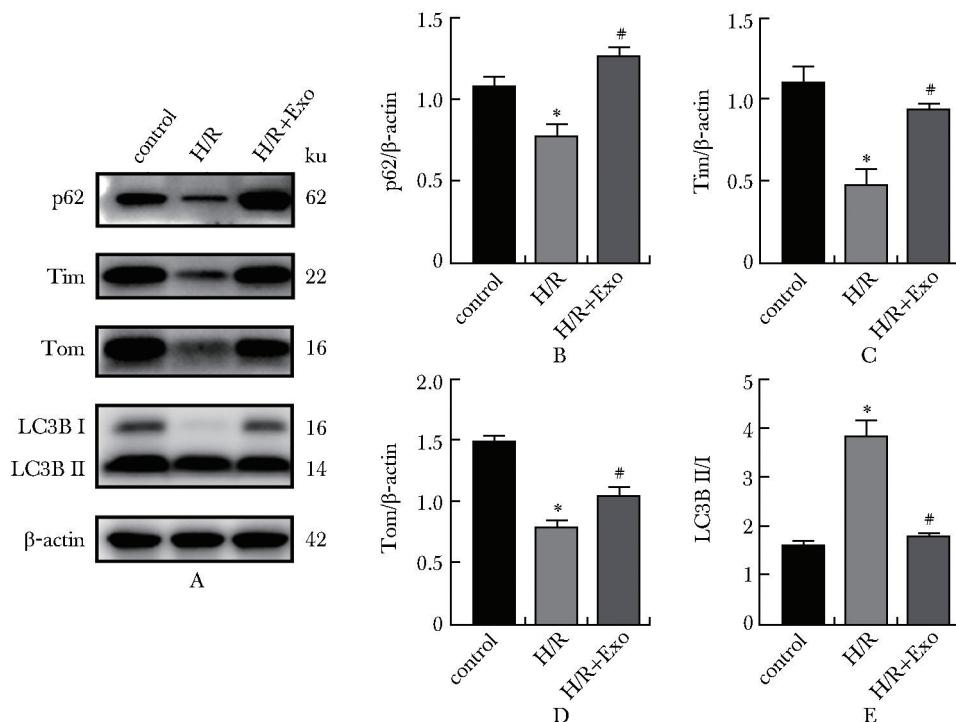
图 6 H9c2 细胞线粒体膜电位水平检测

Fig 6 Detection of mitochondrial membrane potential in H9c2 cells

反应的激活以及线粒体功能的受损<sup>[9]</sup>。再灌注过程还会引起钙超载,破坏细胞内的钙稳态,导致细胞凋亡<sup>[10]</sup>。此外,线粒体膜电位的改变和线粒体通透性转换孔的开放也是 I/R 损伤的重要特征<sup>[11]</sup>。这些损伤相互作用导致心肌细胞能量代谢障碍和功能失调,严重影响心脏功能,这与本研究结果一致。

本研究中发现 BMMSCs-Exo 能够部分逆转 H/R 引起的心肌细胞损伤,提示其可能通过线粒体保护发挥作用。BMMSCs-Exo 含有多种生物活性分子,如 miRNA、蛋白质和脂质,这些分子可以调控细胞氧化还原状态,从而影响 ROS 的生成。近期的研究表明,抑制 miR-34 可通过调节 miR-34a/SIRT1 信号通路降低 ROS<sup>[12]</sup>,从而减轻氧化应激对细胞的损伤。

BMMSCs-Exo 通过维持线粒体膜电位( $\Delta\psi_m$ )来保护心肌细胞免受 H/R 损伤。H/R 导致  $\Delta\psi_m$  下降,激活线粒体膜通透性转换孔(mPTP),从而引发细胞凋亡<sup>[13]</sup>。实验结果表明,BMMSCs-Exo 能通过调节线粒体膜上的离子通道和运输蛋白,维持  $\Delta\psi_m$  稳定,防止 mPTP 开放,抑制线粒体介导的细胞凋亡。此外,线粒体生物合成和自噬在维持线粒体稳态中起关键作用<sup>[14]</sup>。BMMSCs-Exo 通过增强自噬清除受损线粒体,恢复线粒体膜电位,减少氧化应激,从而减轻 H/R 诱导的线粒体功能障碍,显著降低细胞凋亡率。这些结果表明,BMMSCs-Exo 在调控线粒体质量和维持线粒体稳态方面具有重要的治疗潜力,可能通过与受损线粒体膜相互作用修复膜结构,增强膜稳定性,进一步减轻线粒体自噬的发生<sup>[15-16]</sup>。



A. expression of mitochondrial autophagy-related proteins; B. semi-quantitative analysis of mitochondrial autophagy protein expression; \*P<0.05 compared with control group; #P<0.05 compared with H/R group.

图 7 BMMSCs-Exo 减轻 H/R 诱导的线粒体自噬

**Fig 7 BMMSCs-Exo alleviates mitochondrial autophagy induced by H/R**

综上所述, BMMSCs-Exo 可以通过多种途径发挥保护作用, 这些发现为 BMMSCs-Exo 在心肌缺血/再灌注损伤中的潜在治疗应用提供了理论基础, 并

为进一步研究 BMMSCs-Exo 的保护机制和临床应用奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 92-100.
- [2] Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos KE, et al. Rebuilding the damaged heart: Mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(3): 1127-1168.
- [3] Chen J, Luo Y, Wang S, et al. Roles and mechanisms of sumoylation on key proteins in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 134: 154-164.
- [4] Kishore R, Khan M. More than tiny sacks: Stem cell exosomes as cell-free modality for cardiac repair [J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 330-343.
- [5] Sluijter JP, Verhage V, Deddens JC, et al. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 102(2): 302-311.
- [6] Li Q, Bu Y, Shao H, et al. Protective effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes on cardiomyoblast hypoxia-reperfusion injury through the HAND2-AS1/mir-17-5p/mfn2 axis [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2023, 23(1): 114. doi: 10.1186/s12872-023-03148-4.
- [7] 闫霖, 陆珏秀, 罗颖, 等. BM-MSCs 来源外泌体介导铁死亡减轻大鼠心肌细胞系 H9c2 缺氧/复氧损伤 [J]. 基础医学与临床, 2023, 43(3): 771-776.
- [8] Zhu LP, Tian T, Wang JY, et al. Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through mir-125b-mediated prevention of cell death

- in myocardial infarction [ J ]. Theranostics , 2018 , 8(2): 6163-6177.
- [9] Khuanjing T, Palee S, Kerdphoo S, et al. Donepezil attenuated cardiac ischemia/reperfusion injury through balancing mitochondrial dynamics, mitophagy, and autophagy [ J ]. Transl Res , 2021, 230: 82-97.
- [10] Carreira RS, Facundo HT and Kowaltowski AJ. Mitochondrial  $K^+$  transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion [ J ]. Braz J Med Biol Res , 2005, 38(3): 345-352.
- [11] Wu MY, Yang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [ J ]. Cell Physiol Biochem , 2018, 46(4): 1650-1667.
- [12] Zhao WJ, Liu X, Hu M, et al. Quercetin ameliorates oxidative stress-induced senescence in rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells via the mir-34a-5p/sirt1 axis [ J ]. World J Stem Cells , 2023, 15(8): 842-855.
- [13] Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update [ J ]. Apoptosis , 2003, 8(2): 115-128.
- [14] Gottlieb RA, Piplani H, Sin J, et al. At the heart of mitochondrial quality control: Many roads to the top [ J ]. Cell Mol Life Sci , 2021, 78(18): 3791-3801.
- [15] Zhu L, Wang H, Yuhan J, et al. Exosomes mediated the delivery of ochratoxin A-induced cytotoxicity in HEK293 cells [ J ]. Toxicology , 2021, 461: 152926. doi: 10.1016/j.tox.2021.152926.
- [16] Gao P, Yi J, Chen W, et al. Pericyte-derived exosomal miR-210 improves mitochondrial function and inhibits lipid peroxidation in vascular endothelial cells after traumatic spinal cord injury by activating JAK1/STAT3 signaling pathway [ J ]. J Nanobiotechnology , 2023, 21(4): 452. doi: 10.1186/s12951-023-02110-y.

## 本刊稿件格式要求(1)

**1.1 题名:**应与内容相符,言简意赅,体现创新点或主要结论,避免过大、空泛,一般不超过20个汉字,不用副标题。英文题名应与中文一致,除专有名词外,只第1个词的首字母大写,其他均小写。

**1.2 基金:**在首页页脚标注所受资助的基金项目及编号。

例:基金项目:国家自然科学基金(39470325)。

**1.3 作者:**应是对文章做出贡献、能对内容负责者,一般≤7个。如有不同单位作者,在右上角标注不同数字以区别。通信作者以“\*”标注。作者英文的“姓”需用全称并且大写,“名”的第1个字拼音的首字母大写,后面均用小写。

例:WANG Xiaohong。

**1.4 作者单位:**

**1.4.1 中文:**写标准全称(由大单位到小单位,中间用空格隔开)、所在省份、城市及邮编。如有不同单位,以作者右上角标的数字对应标注单位。

例:华中科技大学 同济医学院 1. 免疫学系;2. 病理生理学系,湖北 武汉 430022

**1.4.2 英文:**由小单位到大单位,中间用“,”隔开,省份略去。每个实义词的首字母大写。

例:1. Department of Immunology;2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China