

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¹, 刘晨曦¹, 陈双景², 陆晓炯¹, 靳志涛³, 张铮^{3*}

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(BMSCs)来源的外泌体(BMSCs-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BMSCs-Exo。将细胞分为对照组(control)、H/R组和H/R+BMSCs-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 BMSCs-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 Wen¹, LIU Chenxi¹, CHEN Shuangjing², LU Xiaojiong¹, JIN Zhitao³, ZHANG Zheng^{3*}

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 (BMSC)-derived exosomes (BMSC-Exo) on hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced injury in rat cardiomyocyte cell line (H9c2). **Methods** BMSC-Exosomes were isolated by ultracentrifugation. The cells were divided into three groups: control, H/R, and H/R+BMSC-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** BMSC-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^[1]。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症反应^[2],并能调节线粒体能量代谢,从而减缓心肌损伤^[3]。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^[4]。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^[5]。近期研究表明,BMMSCs衍生外泌体(BMMSCs-Exo)可以改善心肌缺血损伤^[6],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% CO₂和21% O₂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 μ L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 μ L 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% CO₂、1% O₂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 1×10^5 /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 μ L。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 $(5 \sim 10) \times 10^4$ 个细胞,再次离心,加入500 μ L稀释的1 \times annexin V Binding Buffer重悬。随后向细胞悬液中加入5 μ L annexin V-APC/Cyanine7试剂和5 μ L 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% CO₂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 \pm 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 细胞荧光强度显著回降($P<0.05$)(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

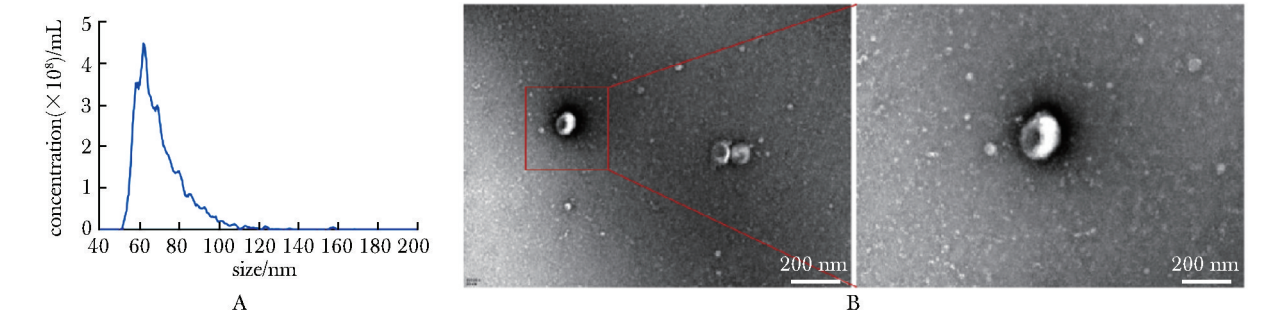
H/R 组 JC-1 聚合物(JC-1 aggregates)较对照组减少,JC-1 单体(JC-1 monomers)增加(图 6A)。H/R 组线粒体膜电位显著降低,但 H/R+Exo 组显著减弱了这一改变,相较于 H/R 组而言,其 JC-1 aggregates 增加,JC-1 monomers 降低($P<0.05$)(图 6B,C)。

2.7 BMMSCs-Exo 减轻 H/R 引起的线粒体自噬

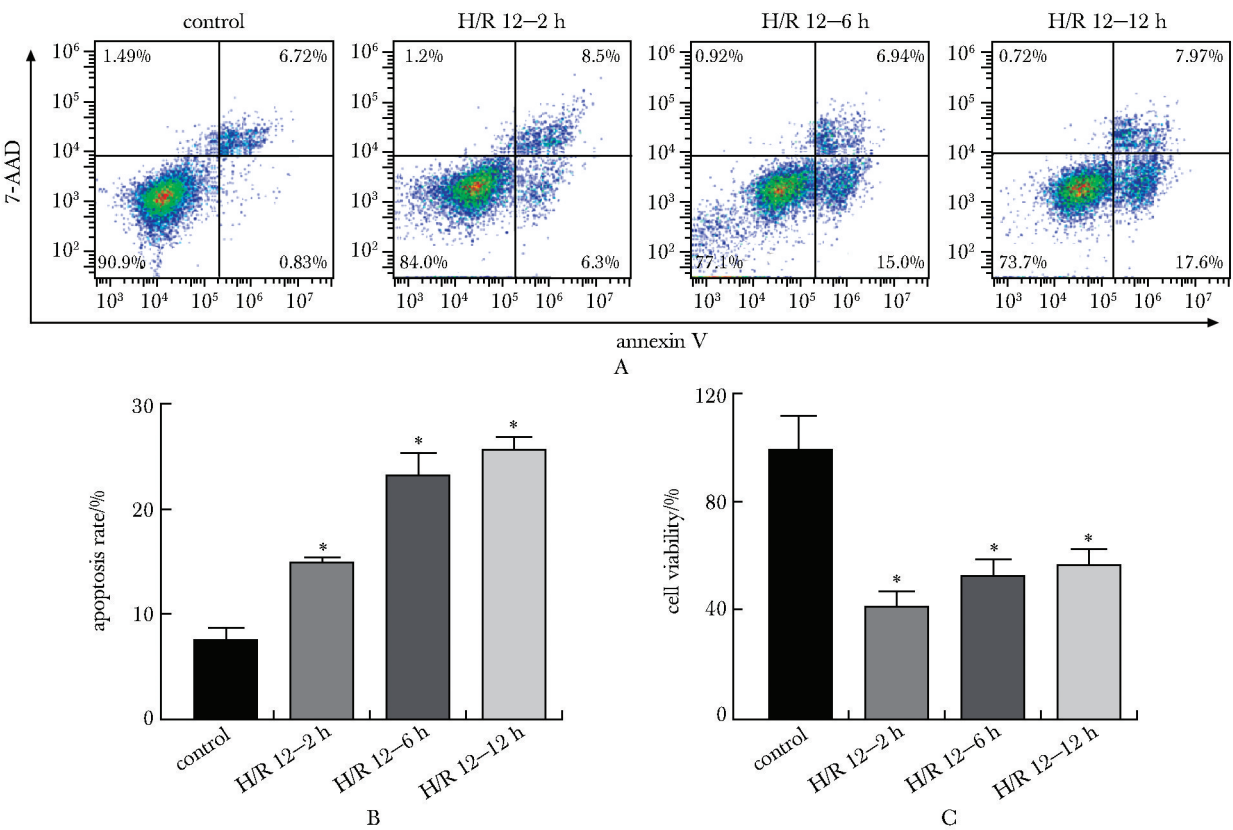
在 H/R 组中 LC 3 II/I 的表达水平显著高于对照组,p62 水平显著回降,同时线粒体膜内蛋白和线粒体膜外蛋白显著低于对照组(图 7),而外泌体治疗显著逆转了这一情况($P<0.05$)。

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^[7]。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^[8]。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



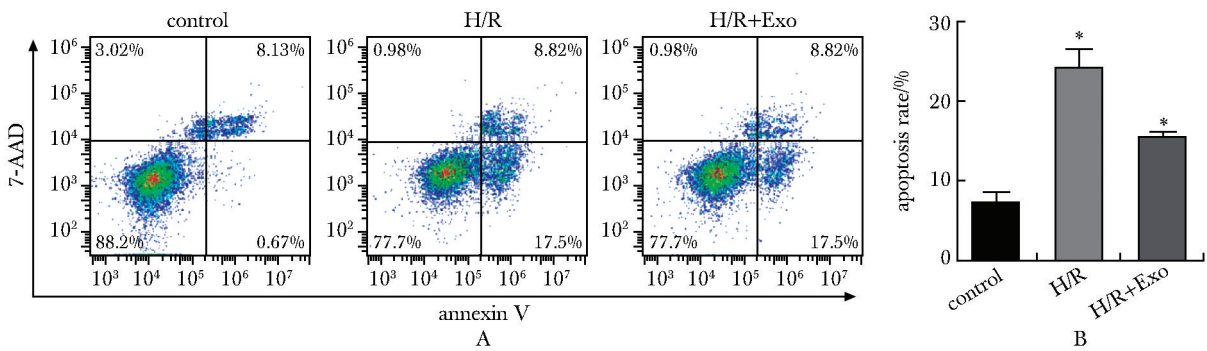
A. the diameter of BMMSCs-Exo; B. TEM scanning of BMMSCs-Exo
图1 小鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体 BMMSCs-Exo 的表征
Fig 1 Characterization of BMMSCs-Exo from mice



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



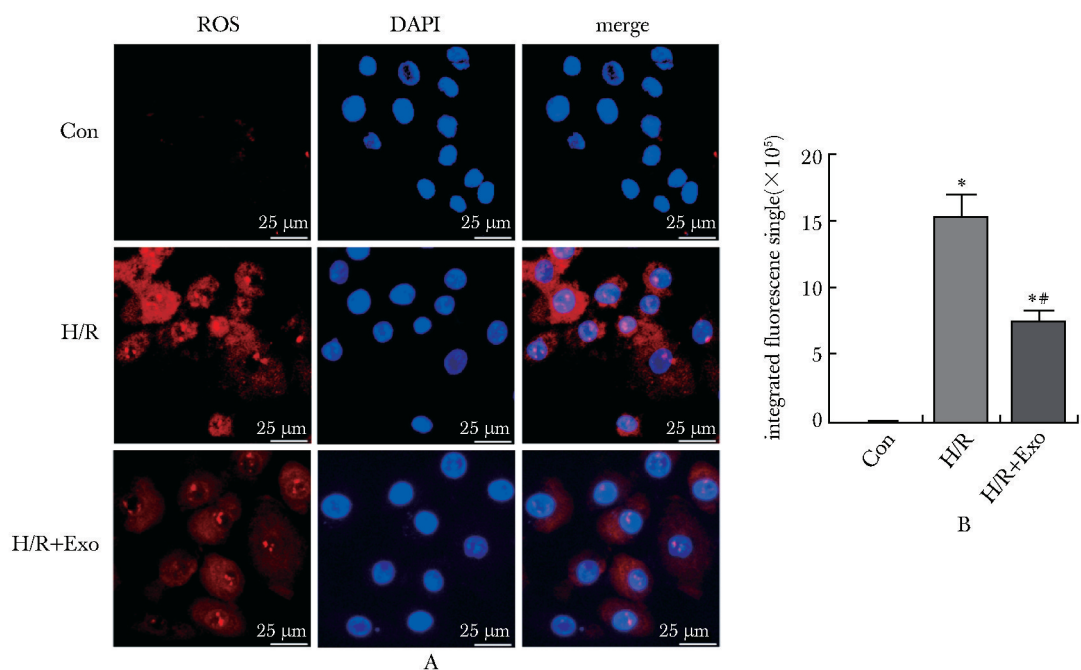
A. flow cytometry analysis of apoptosis rate in H9c2 cells; B. semi-quantitative analysis of apoptosis rate in H9c2 cells; **P*<0.05 compared with control group.

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

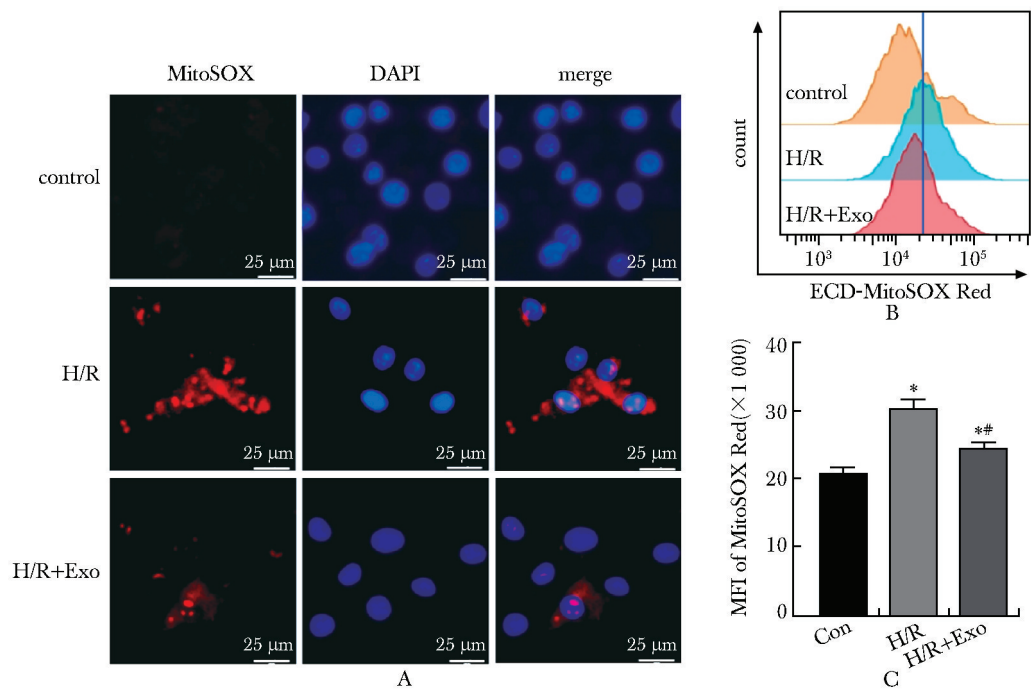
关,过量的 ROS 生成导致线粒体膜损伤,进而加剧氧化应激,最终诱导线粒体膜电位丧失及自噬的发生。前期研究表明,心脏 I/R 损伤主要表现为心肌细胞凋亡和坏死的增加、氧化应激反应的增强、炎性



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

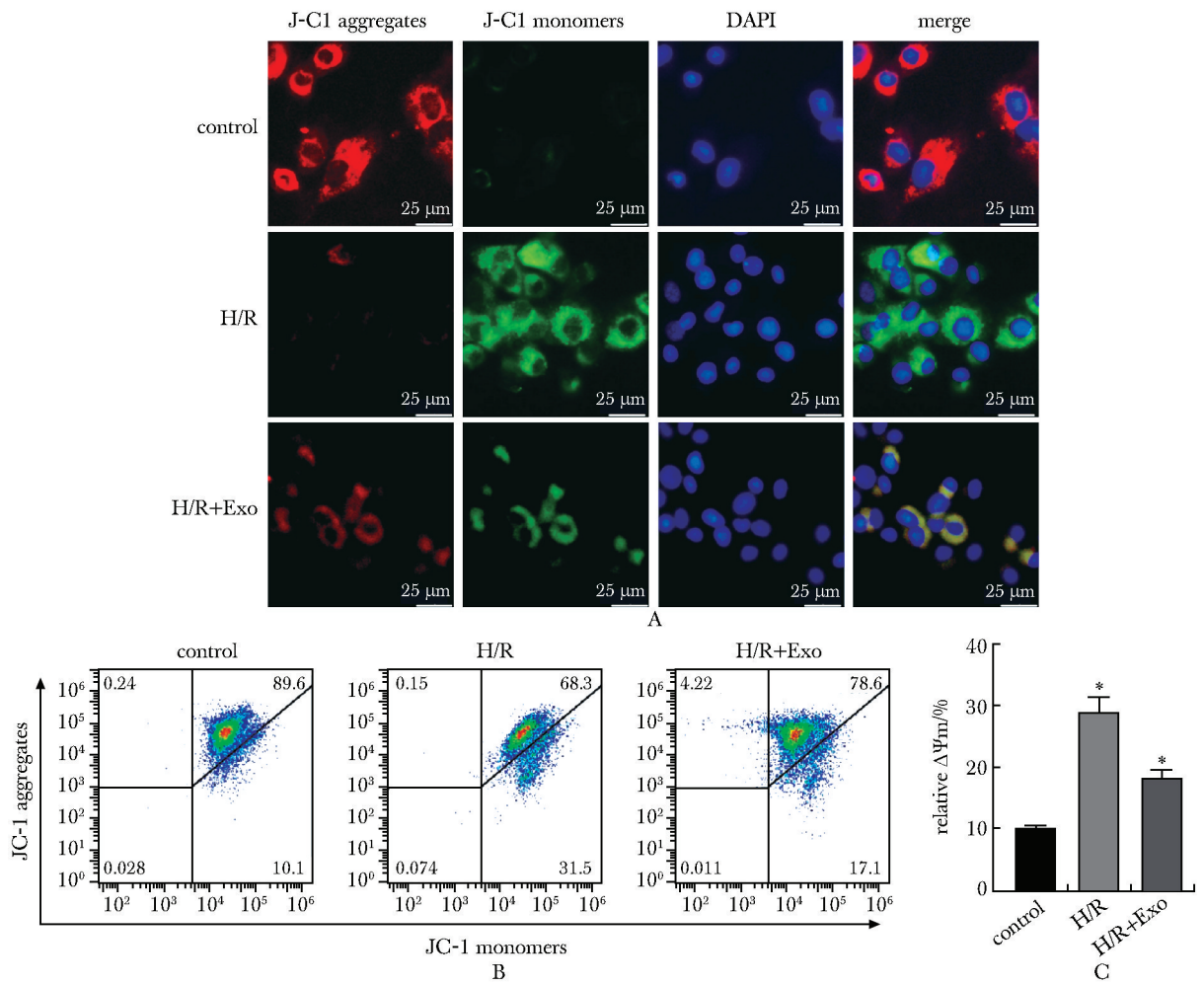
Fig 4 Detection of oxidative stress levels in H9c2 cells



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.

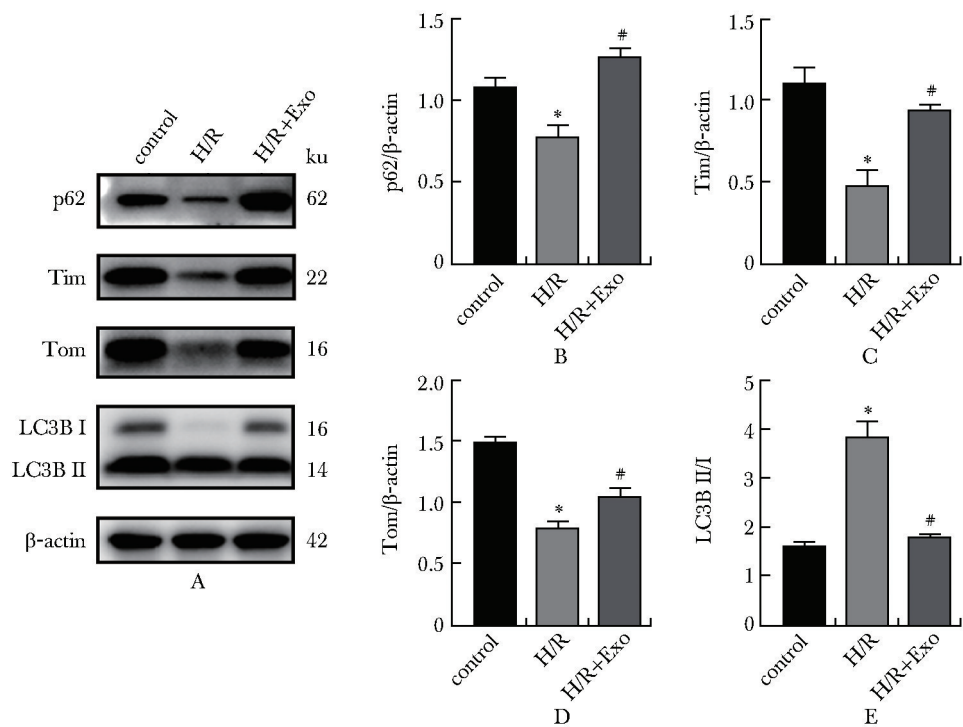
图 6 H9c2 细胞线粒体膜电位水平检测

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^[9]。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^[10]。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^[11]。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^[12],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^[13]。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^[14]。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^[15-16]。



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: 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: 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: 330-343.

[5] Sluijter JP, Verhage V, Deddens JC, et al. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication [J]. Cardiovasc Res, 2014, 102: 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: 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: 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 , 822 : 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 , 383 : 345-352.

[11] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, *et al.* Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. Cell Physiol Biochem , 2018 , 464 : 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 , 158 : 842-865.

[13] Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) in apoptosis; an update [J]. Apoptosis , 2003 , 82 : 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 , 788 : 3791-3801.

[15] Zhu L, Wang H, Yuhua 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 , 211 : 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