

# 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

葛丽特<sup>1),2)#</sup>, 寻成峰<sup>1)#</sup>, 卓毅<sup>1),2)</sup>, 胡莉<sup>2)</sup>, 龙浪<sup>2)</sup>, 段答<sup>2)</sup>,  
陈平<sup>1),2)\*</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** 外泌体是指释放到细胞外微环境中的直径约 50~130 nm 的纳米级的膜性囊泡。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,在许多疾病中均具有治疗作用,且其内在机制与其旁分泌的外泌体密切相关,但 OM-MSCs 外泌体的分离、鉴定及生物学特性的研究尚未见报道。本研究采用超速离心法提取 OM-MSCs 培养液中的外泌体,应用流式细胞术及免疫荧光进行细胞鉴定后,分别用透射电子显微镜、纳米粒径分析及 Western 印迹对外泌体形态、颗粒大小和表面的特异性分子标志进行分析鉴定。采用 CCK8 增殖实验,Western 印迹和划痕实验,分析其对人脑微血管内皮细胞增殖和迁移的影响。电镜、Western 印迹和纳米粒径分析的结果显示:OM-MSCs 来源外泌体形态多为圆形,直径约为 40~150 nm;表达外泌体标记物 CD63,CD81;CCK-8 法检测显示:不同浓度的 OM-MSCs 源外泌体可提高人脑微血管内皮细胞的增殖活性,且其增殖促进作用具有浓度依赖性( $P<0.05$ )。Western 印迹检测结果显示:相比空白对照组,OM-MSCs 源外泌体可显著提高内皮细胞的增殖细胞核抗原蛋白质水平表达( $P<0.01$ ),细胞划痕实验结果显示,OM-MSCs 源外泌体可增强内皮细胞的迁移能力,且高于对照组( $P<0.01$ )。本研究表明:通过超速离心法可以分离纯化获得 OM-MSCs 源外泌体,且该外泌体具有促进人脑微血管内皮细胞迁移和增殖的作用。

**关键词** 间充质干细胞;嗅黏膜;外泌体;增殖;迁移

中图分类号 Q2

## Isolation, Identification and Biological Characterization of Exosomes Derived from Human Olfactory Mucosa Mesenchymal Stem Cells

GE Li-Te<sup>1),2)#</sup>, XUN Cheng-Feng<sup>1)#</sup>, ZHUO Yi<sup>1),2)</sup>, HU Li<sup>2)</sup>, LONG Lang<sup>2)</sup>,  
DAUN Da<sup>2)</sup>, CHEN Ping<sup>1),2)\*</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;<sup>(2)</sup>Hunan Provincial Key Laboratory of Neurorestoratology,

The Second Affiliated Hospital of Hunan Normal University, Changsha 410003, China)

收稿日期: 2019-05-14; 修回日期: 2019-06-19; 接受日期: 2019-07-16

国家自然科学基金项目(No.81371358),湖南省高校科研项目(16B159),湖南省研究生科研创新项目(No.CX2018B309, CX2018B240, CX20190409)

\* 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: May 14, 2019; Revised: June 19, 2019; Accepted: July 16, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.81371358); Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (16B159); Hunan Provincial Innovation Foundation for Postgraduate(No.CX2018B309, No.CX2018B240, CX20190409)

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

# Co-first author

**Abstract** Exosomes released into the extracellular microenvironment are nanoscale membrane vesicles with a diameter of 30-150 nm. As a kind of newly discovered mesenchymal stem cells, olfactory mucosa mesenchymal stem cells (OM-MSCs) are potential therapeutic targets for various diseases, and the mechanism of action is postulated to be mediated by secretion of paracrine factors—exosomes. However, the studies for isolation, identification and biological characterization of OM-MSC exosomes remain unreported. In this study, ultracentrifugation was used to isolate exosomes from conditioned medium of OM-MSCs. After the OM-MSCs were isolated and cultured, we used flow cytometry and immunofluorescence for identification. Transmission electron microscopy, nanoparticle size analysis and Western blotting were used to analyze and identify the shape, particle size and specific surface molecular markers of exosomes, respectively. CCK8 proliferation tests, Western blotting and scratch tests were used to analyze the effects of exosomes on the proliferation and migration of human brain microvessel endothelial cells (HBMECs). Our results showed that the OM-MSC exosome morphology was mostly round with a diameter of 40-150 nm, and they expressed exosome markers CD63 and CD81. Moreover, OM-MSC exosomes could significantly promote HBMEC proliferation and migration. This study demonstrates that exosomes can be successfully isolated and purified from the supernatant of OM-MSCs by ultracentrifugation and these exosomes can significantly promote the proliferation and migration of HBMECs.

**Key words** mesenchymal stem cells(MSCs); olfactory mucosa; exosomes; proliferation; migration

外泌体(exosomes)是一类由细胞内多泡体(multivesicular body, MVB)与细胞膜融合,释放到细胞外微环境中的纳米级的膜性小囊泡。外泌体富含多种蛋白质、脂质、mRNAs、microRNAs、信号分子等具有生物学活性的物质<sup>[1, 2]</sup>,在细胞迁移、血管新生、细胞通讯、免疫反应和抑制或促进肿瘤细胞生长等方面发挥了重要的作用,参与许多重要的人体生理或病理过程,影响疾病的发生发展<sup>[3, 4]</sup>。因此,外泌体的生物学研究受到普遍关注。我们前期在国内首次成功分离培养出嗅黏膜间充质干细胞(olfactory mucosa mesenchymal stem cells, OM-MSCs),并对其生物学特性进行初步的研究<sup>[5-9]</sup>。OM-MSCs遗传背景稳定,安全性高,可自体移植,因而无免疫排斥反应,避免了伦理问题,且在体外易于提取并培养,具有多向分化潜能。同时,这种干细胞来源于外胚层,具有向神经元分化的天然优势,是中胚层来源的间充质干细胞如骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞难以比拟的,这些优势使其成为神经修复与再生中更为理想的种子细胞<sup>[10-13]</sup>。据相关文献报道,间充质干细胞能够通过旁分泌有效生物学活性物质——外泌体,从而在组织损伤中起到修复效果<sup>[14-16]</sup>。因此深入研究人嗅黏膜间充质干细胞来源的外泌体,对于进一步探究 OM-MSCs 作用机制,为未来将其开发成为一种既保留自身优点而又能克服其缺陷的新型治疗方式,具有重大的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验嗅黏膜组织获取及培养均在湖南师范大学第二附属医院及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。

主要试剂:高糖 DMEM-F12 培养基(1:1),DMEM 培养基(Gibco),胎牛血清(Gibco),双抗(青霉素 20 000 U/mL、链霉素 20 000 ng/mL),0.125%胰蛋白酶消化液(Gibco),细胞培养专用冻存液,鼠抗人单克隆抗体 CD34- ECD、CD45- PC7、CD73- FITC、CD90 - FITC(BD,美国),CCK8 试剂(碧云天),外泌体标志物分子(CD81, CD63)一抗购自美国 Proteintech 公司,焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、硫酸铵(ammonium persulfate, APS)、nestin 一抗(abcam 公司,美国)、STRO-1(abcam 公司,美国),十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)、四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯(Tween-20)、丙烯酰胺、甘氨酸、甲叉双丙烯酰胺等均购自美国 Sigma 公司。

## 1.2 OM-MSCs 获取和培养

按照已建立的方法<sup>[5]</sup>进行培养<sup>[5]</sup>,具体步骤如下:在排除嗅黏膜损伤、萎缩性鼻炎等嗅黏膜疾病的前提下,鼻毛清理,滴加氯霉素 3 d。获取前鼻内麻醉,获取部位为中鼻甲靠根部内侧。黏膜取出后,用无血清高糖 DMEM/F12 ( $V/V=1:1$ ) 混合培养基(含青霉素 200 U/mL 和链霉素 200 U/mL)漂洗 3 次去除血迹,置于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM/F-12 培养基。用眼科剪充分剪碎,剪成  $1\text{ mm}^3$ ,离心弃上清,再接种于培养瓶,置  $\text{CO}_2$  培养箱内 ( $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ) 培养。以后每 3 d,换液 1 次,当细胞铺满瓶底时进行传代。将第 5 代细胞接种于 6 孔细胞培养板,分别用于 OM-MSCs 流式细胞术鉴定及免疫荧光鉴定。

## 1.3 免疫荧光染色

取第 5 代的 OM-MSCs 进行免疫荧光染色鉴定。步骤如下:取出 6 孔板内铺满细胞的载玻片,先用 PBS 清洗细胞载玻片 3 次,每次 5 min;再将细胞进行固定,时间为 15 min;固定结束后冲洗掉固定液,加入一抗,将载玻片放置于  $4^\circ\text{C}$  的冰箱内孵育过夜;次日取出,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;再加入二抗(稀释倍数为 200 倍),避光常温下孵育 1 h,用 PBS 洗掉二抗,每遍 5 min,洗 3 次;加入 DAPI 染细胞核,孵育 15 min;最后用甲醇再清洗 1 次(因配制的 DAPI 溶液是溶于甲醇的,因此最后仅需使用甲醇清洗),接着用抗荧光猝灭剂进行最后的封片,置于荧光显微镜下观察结果并拍照记录。

## 1.4 流式细胞仪测定

取第 5 代 OM-MSCs,常规清洗消化后分为每管 0.1 mL。阴性对照管加入抗 IgG-FITC、IgG-PE;其它管分别加入鼠抗人抗体 CD34-ECD、CD45-PC7、CD73-FITC、CD90-FITC,室温孵育 30 min,流式细胞仪计数。

## 1.5 外泌体的分离纯化

将含 20% FBS 的高糖 DF-12 培养基,  $100\ 000\times g$   $4^\circ\text{C}$  离心 18 h,收集培养基上清液,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  $300\times g$ 、离心 10 min,  $2\ 000\times g$ 、离心 10 min,  $10\ 000\times g$ 、30 min。先后去除细胞、死细胞、细胞碎片。留取的上清液再经  $0.22\ \mu\text{m}$  滤膜过滤,在  $4^\circ\text{C}$  下,  $100\ 000\times g$  离心 2 h,收集底部沉淀用  $1\times\text{PBS}$  重悬,再次  $100\ 000\times g$  离心 2 h、洗涤 1 次,最后收集

沉淀用  $1\times\text{PBS}$  重悬,按说明书使用 BCA 试剂盒进行定量,分装后  $-80^\circ\text{C}$  保存备用。

## 1.6 外泌体的电镜鉴定

取分离纯化外泌体  $10\ \mu\text{L}$ ,滴加于 200 目的载样铜网上,于室温静置 1 min,用滤纸将浮液吸去,用醋酸双氧钨水溶液 (1%, pH4.0) 室温负染 5 min,用双蒸水洗 1 遍后室温晾干,在透射电子显微镜观察并拍照。

## 1.7 免疫印迹测定

取外泌体和 OM-MSCs 细胞裂解液样品,用  $5\times$  上样缓冲液配平总量为  $15\ \mu\text{g}$ 。12% PAGE,待溴酚蓝至凝胶底部时,将蛋白质转移至硝酸纤维素膜。用  $1\times$  等渗缓冲液 (tris buffered salina with Tween-20, TBST) (Tris-HCl, NaCl, Tween-20) 配制 5% 脱脂奶粉液室温封闭 2 h,将膜浸入,室温放置 1 h。再加入一抗  $4^\circ\text{C}$  摇床孵育过夜,用 TBST 洗膜 3 次,用  $1\times$  TBST 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗,稀释比例 1:4000,将稀释后的二抗与膜共同孵育 45~60 min。孵育结束用  $1\times$  TBST 洗 3 次,每次 15 min。使用电化学发光液 (electrochemical luminescence, ECL) 与膜孵育 3 min,用保鲜膜将膜包裹杂交膜,在与 X 胶片曝光后显影冲洗。

## 1.8 纳米颗粒示踪分析

外泌体样品用  $1\times\text{PBS}$  稀释,用 1 mL 注射器将样品注射至检测槽中,避免产生气泡。根据 Nanosight NS300 (Malvern 马尔文, UK) 记录的颗粒数调整稀释浓度,以视频视野中 20~30 个颗粒为宜,待机器自动读数,记录并生成报告。

## 1.9 细胞增殖实验

96 孔板接种  $1\times 10^3$ /孔人脑微血管内皮细胞 (human brain microvascular endothelial cells, HBMECs),先用 10% FBS DMEM 培养基在  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  细胞培养箱中培养过夜,待细胞贴壁后除去原培养基并用 PBS 洗 3 次,每孔加入无血清 DMEM 培养基  $100\ \mu\text{L}$ ,并分别加入 10, 20 和  $40\ \mu\text{g}$  OM-MSCs 源外泌体进行处理。培养 24 h 后每孔加入  $10\ \mu\text{L}$  的 CCK8 试剂,在  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  细胞培养箱中孵育 4 h。酶标仪  $A_{450\text{nm}}$  测量各孔吸光值。

## 1.10 划痕迁移分析

将 HBMECs 细胞以  $5\times 10^5$ /孔的密度接种于 48 孔板。用枪头比着直尺划线,枪头要垂直;吸去原培养基后用 PBS 清洗细胞 2 次,洗去划下的细胞。每孔加入无血清 DMEM 培养基  $300\ \mu\text{L}$ ,并加入  $40\ \mu\text{g}$  OM-MSCs 外泌体进行处理,之后放置在

37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育。按 0、6 和 12 h 取样, 拍照; 使用 Image-pro plus 分析图像, 并计算相对迁移率。

### 1.11 统计学处理

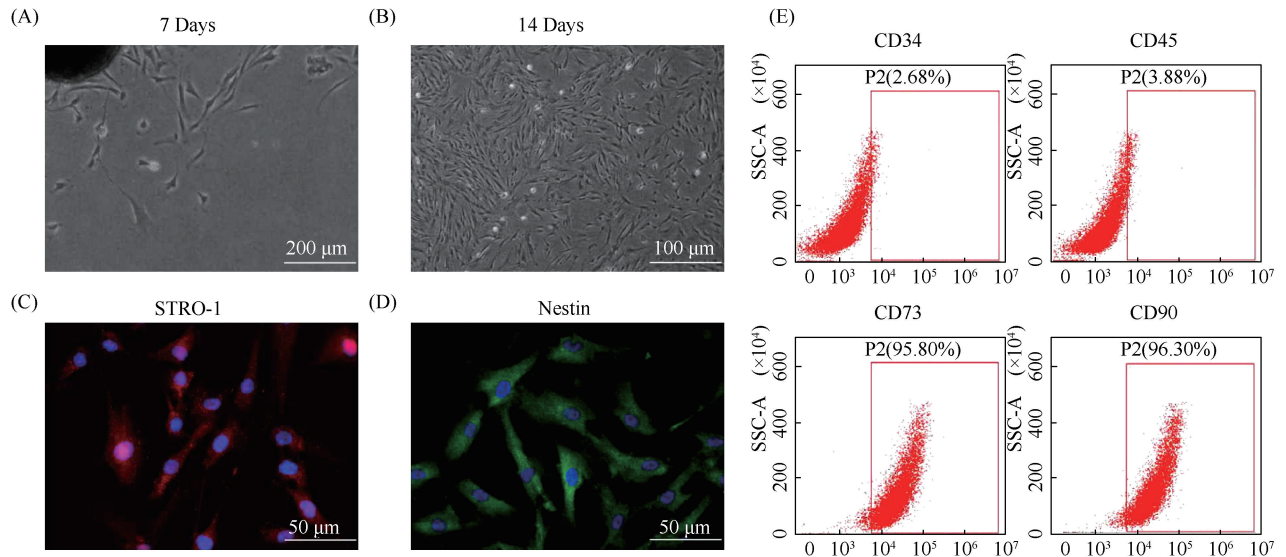
用 SPSS 18.0 软件包进行 *t* 检验及直线回归, 以双侧  $\alpha=0.05$  为检验水准。数据均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OM-MSCs 的获取及鉴定

OM-MSCs 的获取及鉴定结果见 Fig. 1。OM-MSCs 在培养 7~8 d 时, 可见组织块旁边有细胞爬

出, 细胞形态呈梭形和多角形。当培养至 12~14 d 时, 细胞生长速度明显加快, 融合可达 80%~90%, 并无接触抑制的现象发生, 此时可进行传代。(A) 传代后细胞生长更加旺盛, 形态上也更加趋于一致, 均为成纤维细胞样, 紧密排列, 界限也变模糊。(B) 贴壁细胞从外植体迁移。(C) 免疫荧光染色鉴定显示, OM-MSCs 不仅表达间充质干细胞标记物基质细胞抗原蛋白质(stromal cell antigen, STRO-1)。(D) OM-MSCs 还可以同时表达其特征性的标记物巢蛋白(nestin)。(E) 流式细胞术检测结果显示, OM-MSCs 不表达造血干细胞标志 CD34 和 CD45, 而高表达黏附分子和基质细胞标记 CD73、CD90。



**Fig.1 Morphological observation and expression of markers of OM-MSCs** (A) Human middle turbinate lamina propria cultured seven days *in vitro*. Adherent cells migrate from the explant. (B) After 14 days, adherent cells approached confluence, and the spindle cell proliferation were markedly atypical. (C) OM-MSCs expressed the mesenchymal stem cell marker STRO-1. (D) OM-MSCs expressed the nestin. (E) Flow cytometry revealed that the MSCs were rich in CD73, CD90 and low in CD34, CD45

### 2.2 OM-MSCs 来源外泌体分析与鉴定

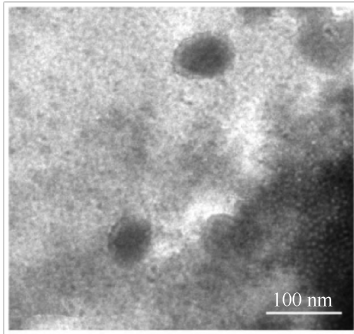
透射电子显微镜观察 (Fig.2) 显示, (A) OM-MSCs 来源的外泌体呈圆形或椭圆形的膜性小囊泡, 囊泡外周可见其膜性结构, 大小不一, 直径为 100 nm 左右。(B) 以细胞为参照, Western 印迹检测外泌体特异性标志蛋白质。结果显示, 提取前的培养上清液及外泌体提取液均表达 CD81、CD63, 说明我们分离获得较为完全的嗅黏膜间充质干细胞外泌体。(C) 纳米颗粒跟踪分析仪结果显示, MODE 曲线线性流畅, 表明所含杂质少, 粒径峰值 125 nm 与理论外泌体大小值相符。(D) 颗粒散点图 (曲线图) 提示, 外泌体直径大小较为集中, 大部分介于 30~150 nm 间, 原始粒子浓度为  $1.9 \times 10^{11}$  个/m。

### 2.3 OM-MSCs 来源外泌体促进 HBMECs 细胞体外增殖

为验证获得的 OM-MSCs 是否具有生物学活性及功能, 以人脑微血管内皮细胞 (human brain microvessel endothelial cell, HBMECs) 作为检测对象, 分别用 10、20、40  $\mu\text{g}$  外泌体处理 HBMECs 细胞。孵育 12 h 时, 通过 CCK8 实验测定 OM-MSCs 源外泌体对 HBMECs 细胞增殖的影响。相对于空白对照组, OM-MSCs 源外泌体能够显著地促进 HBMECs 细胞的增殖 (10  $\mu\text{g}$ ;  $P<0.05$  和 20  $\mu\text{g}$ ; 40  $\mu\text{g}$ ;  $P<0.01$ ), 并且与外泌体含量及浓度呈依赖关系。增殖细胞核抗原蛋白 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 与细胞 DNA 合成关系密切, 在细胞增殖的

启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标。随后,采用 Western 印迹检测 40  $\mu\text{g}$  外泌体处理 HBMECs 细胞和未处理的 HBMECs 的 PCNA 蛋白质水平表达。结果显示,外泌体处理组中 PCNA 的

(A)

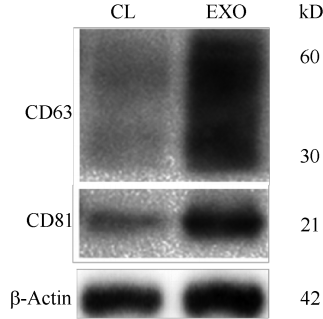


(C)

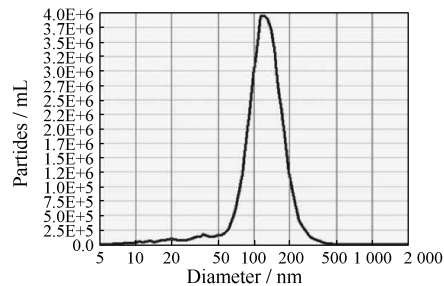


表达水平明显高于空白对照组。将结果进行灰度值统计分析,具有统计学差异( $P < 0.01$ )。此结果进一步证实了 OM-MSCs 源外泌体具有促进 HBMECs 增殖的作用(见 Fig.3)。

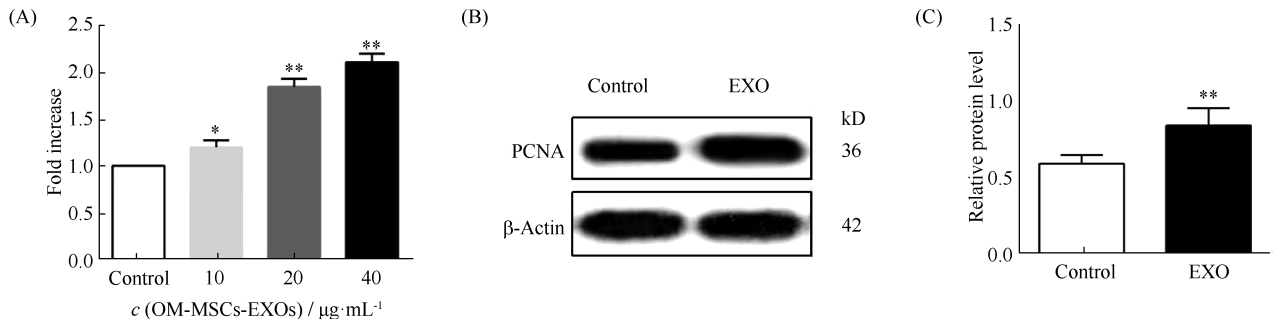
(B)



(D)



**Fig.2 Analysis and identification of OM-MSC-derived exosomes** (A) Images of exosomes observed by transmission electron microscopy. The supernatant contains exosomes, which are regular in shape and mostly round cystic structures with clear edges. (B) Surface marker CD63 and CD81 were tested by Western blotting. Protein extracts from OM-MSCs and exosomes were assessed using antibodies against exosomal protein markers (CD63 and CD81). (C) A representative screen shot of the NTA videos, the bright white dot indicated one moving particle. (D) NTA estimated the size of the EV between 50 and 300 nm and the mode of these particles is 125 nm. And we predicted the proper concentration is around  $4.6 \times 10^7$  particles/mL; Dilution factor is 4 000; Original concentration:  $1.9 \times 10^{11}$  particles/mL



**Fig.3 OM-MSC-Exosomes stimulated proliferation of HBMEC cells *in vitro*** (A) OM-MSC- exosomes promoted cell proliferation in a dose-dependent manner by CCK8 assays. Results were shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared to the control group. (B) Western blotting analysis of the expression of the indicated proteins in HBMECs treated with PBS (Control) or 40  $\mu\text{g}$  OM-MSCs-EXOs. Actin was used as a protein loading control. (C) Quantification of PCNA levels from (B). \*\*  $P < 0.01$ , compared to the control group

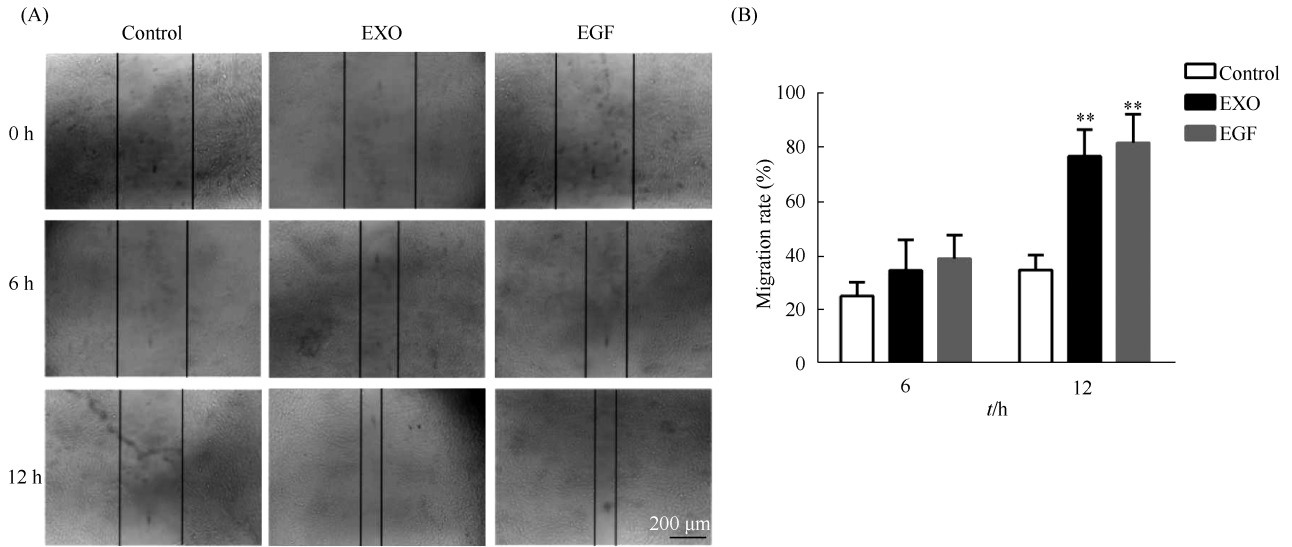
### 2.3 OM-MSCs 来源外泌体促进 HBMECs 细胞体外迁移

细胞划痕实验(wound-healing assay)能很好地反

映细胞的迁移能力。因此,采用其来测定 OM-MSCs 源外泌体对 HBMECs 细胞迁移的影响。分别设置了加入 40  $\mu\text{g}$  OM-MSCs 源外泌体的处理组,加入等体积

PBS 的阴性对照组,以及加入 3  $\mu\text{g}$  表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF, 终浓度为 10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) 的阳性对照组,处理 6 h 和 12 h 时,观察 HBMECs 细胞迁移程度。结果表明:40  $\mu\text{g}$  OM-MSCs 源外泌体处

理 HBMECs 细胞 12 h 后,与阳性对照 EGF 组相同,能显著提高细胞的迁移率( $P < 0.01$ )。经统计学分析,与 EGF 组无统计学差别。说明 OM-MSCs 源外泌体能够增强 HBMECs 的迁移能力(见 Fig.4)。



**Fig.4 OM-MSC-Exosomes stimulate migration of HBMEC cells in vitro** (A) Phase contrast images showing wound closure at 0, 6, and 12 hours after no treatment, treatment with 40  $\mu\text{g}$  OM-MSC-EXOs or treatment with 10  $\text{ng}/\text{mL}$  EGF. (B) Data quantified from the experiment in (A). Results were shown as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared to the control group

### 3 讨论

OM-MSCs 作为一种新发现的干细胞,不仅具有间充质干细胞的一般特性,还具有一些自身的独特性<sup>[5, 6, 17]</sup>:(1) 嗅黏膜来源稳定,在体外易于获取;(2) 遗传背景稳定,安全性高;(3) 可自体移植,因而无免疫排斥反应,避免了伦理问题;(4) 细胞起源于外胚层,与神经发生同源,为细胞分化提供了更为有效的自然途径。有研究<sup>[18]</sup>发现,将鼻黏膜来源的 OM-MSCs 传代后移植到海马区受损大鼠模型中,能明显促进大鼠神经功能的恢复。这些都说明,OM-MSCs 可能比中胚层来源的 MSCs 更适合作为神经修复与再生的种子细胞。我们在前期研究中,曾对 OM-MSCs 进行分离、培养及鉴定,并对其生物学特性进行初步的研究<sup>[5-7]</sup>。

大量文献证实, MSCs 具有潜在的免疫调节,调控细胞生长、分化以及组织再生修复作用,但 MSCs 移植进入体内后,存在异常分化及肿瘤形成等风险<sup>[19]</sup>。近期的研究发现表明, MSCs 通过旁分泌释放了一类有效生物学活性物质——外泌体,该物质包含多种蛋白质、miRNA、RNA 和 DNA 片段,在细胞间进行信息传递,进而发挥组织损伤修复作

用<sup>[1, 20-23]</sup>。MSCs 的外泌体与其细胞本身相比,具有易于保存、避免细胞复苏等优点。同时,也克服了 MSCs 移植后异常分化及肿瘤的问题,使 MSCs 来源的外泌体成为一种既具有 MSCs 作用特点,而又能规避其缺陷的新型治疗手段<sup>[24]</sup>。尽管 MSCs 来源的外泌体的相关研究已取得了较大的进展,但国内外对于 OM-MSCs 来源的外泌体的研究仍知之甚少。所以,研究 OM-MSCs 来源的外泌体,初步的探讨获取方法及其生物学特性,具有较大的意义。

目前,外泌体提取方法都是通过利用外泌体的特性<sup>[25]</sup>,例如:密度、粒径大小、表面标志物、亲疏水性和表面电荷等来实现的,对外泌体进行分离并分析鉴定,是研究外泌体的前提和保证。目前,外泌体的提取方法种类繁多,包括:超速离心法、蔗糖密度梯度离心、尺寸排阻、切向流过滤、免疫磁珠等。而超速离心法是最早且最常用的经典分离方法,几乎所有的生物体液(如脑脊液、尿液、唾液、细胞培养液和血液等)都能采用该方法。本文首先从人嗅黏膜中分离培养 OM-MSCs,并对分离所得的细胞进行了流式细胞学及免疫荧光鉴定;随后将细胞体外进行了扩增,收集其上清液,采用超速离心法,成功分离了 OM-MSCs 来源的外泌体,并对外泌体进行形

态、直径、浓度和表达标志物进行了鉴定和分析,结果显示:所获得的的外泌体呈膜性结构,直径在 30~150 nm 之间,表达外泌体的标记物 CD63、CD81,均符合外泌体的鉴定标准及特征且本文所获得的的外泌体数量多、纯度高、提取较为完整。

此外,为探讨 OM-MSCs 源外泌体的部分生物特性,本文初步研究其对 HBMECs 增殖及迁徙的影响。研究结果证明,OM-MSCs 源的外泌体能够显著增加 HBMECs 的增殖能力与迁移能力。说明通过差速离心获得的 OM-MSCs 源外泌体是具有功能活性。

综上所述,本文通过简单实用的方法分离出 OM-MSCs 源的外泌体。为后续进一步探讨外泌体在组织损伤及修复中的生物学功能,以及相关机制的实验奠定了基础,从而为 OM-MSCs 源外泌体在临床医学等方面的应用提供必要的前期依据。这为未来的“无细胞”干细胞治疗提供了崭新的思路。

## 参考文献 (References)

- [ 1 ] Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(8): 569-579
- [ 2 ] Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, *et al.* Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(9): 1143-1149
- [ 3 ] Lee Y, Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, **21**(R1): R125-134
- [ 4 ] Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications [J]. *F1000 Biol Rep*, 2011, **3**: 15
- [ 5 ] 葛丽特, 卓毅, 段答, 等. 人嗅黏膜间充质干细胞的生物学特性 [J]. 中南大学学报(医学版) (Ge L, Zhuo Y, Duan D, *et al.* Biological characteristics of human olfactory mucosa mesenchymal stem cells [J]. *J Central South Univ (Med Ed)*, 2015, **40**(1): 53-58
- [ 6 ] 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
- [ 7 ] Wang L, Duan D, Zhao Z, *et al.* Differentiation of C17.2 neural stem cells into neural cells induced by serum-free conditioned medium of olfactory ensheathing cells and cell viability detection of differentiated cells [J]. *Zhongguo Xue Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2014, **28**(5): 633-638
- [ 8 ] 卓毅, 吴沛, 段答, 等. 鼻黏膜间充质干细胞的培养、鉴定及诱导分化 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志 (Zhuo Y, Wu P, Duan D, *et al.* Culture, differentiation and characterization of nasal mucosa mesenchymal stem cells [J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2018, **27**(1): 66-71
- [ 9 ] 卓毅, 袁挺, 段答, 等. 低氧微环境促进嗅黏膜间充质干细胞向神经元分化及其相关机制 [J]. 中南大学学报(医学版) (Zhuo Y, Yuan T, Duan D, *et al.* Hypoxic condition promotes olfactory mucosa mesenchymal stem cells to differentiate into neurons and underlying mechanisms [J]. *J Central South Univ (Med Ed)*, 2016, **41**(12): 1252-1259
- [ 10 ] Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC, *et al.* Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro [J]. *Glia*, 2013, **61**(3): 368-382
- [ 11 ] 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
- [ 12 ] Goldstein BJ, Hare JM, Lieberman S, *et al.* Adult human nasal mesenchymal stem cells have an unexpected broad anatomic distribution [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2013, **3**(7): 550-555
- [ 13 ] Murrell W, Wetzig A, Donnellan M, *et al.* Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease [J]. *Stem Cells*, 2008, **26**(8): 2183-2192
- [ 14 ] Li T, Yan Y, Wang B, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, **22**(6): 845-854
- [ 15 ] Bruno S, Grange C, Deregibus MC, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, **20**(5): 1053-1067
- [ 16 ] Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, *et al.* Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, **26**(5): 1474-1483
- [ 17 ] 葛丽特, 卢明. 嗅黏膜间充质干细胞在神经修复中的研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志 (Ge L, Lu M. Research progress of olfactory mucosa mesenchymal stem cells in nerve repair [J]. *J Int Neurol Neurosurg*, 2014, **41**(1): 66-69
- [ 18 ] Nivet E, Vignes M, Girard SD, *et al.* Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions [J]. *J Clin Invest*, 2011, **121**(7): 2808-2820
- [ 19 ] Ramasamy R, Lam EW, Szeio I, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth [J]. *Leukemia*, 2007, **21**(2): 304-310
- [ 20 ] Dreyer F, Baur A. Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, **1448**: 201-216
- [ 21 ] Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, *et al.* Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function [J]. *Immunol Lett*, 2006, **107**(2): 102-108
- [ 22 ] Choi EW, Seo MK, Woo EY, *et al.* Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts [J]. *Exp Dermatol*, 2018, **27**(10): 1170-1172
- [ 23 ] 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
- [ 24 ] Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy [J]. *Front Physiol*, 2012, **3**: 359
- [ 25 ] Théry C, Witwer KW, Aikawa E, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, **7**(1): 1535750