

# 间充质干细胞外泌体促进低氧血管化的研究

朱斌 王得春 段安帅 张文皓 刘权

中国人民解放军西藏军区总医院

DOI:10.12238/bmtr.v7i1.11813

**[摘要]** 目的: 探究脂肪间充质干细胞来源的外泌体促进低氧条件下的血管化机制。方法: 通过超速离心法, 分别从正常和低氧条件下的脂肪间充质干细胞获得外泌体; 本项目利用人脐静脉内皮细胞, 采用CCK-8、Transwell等方法测定其活性及迁移能力, 成管试验测定其对内皮细胞成血管的影响, 同时采用Western blot技术检测血管新生蛋白低氧诱导因子-1 $\alpha$ 和血管内皮生长因子的表达。结果: 在低氧环境下, 脂肪间充质干细胞外泌体的释放可促进人脐静脉内皮细胞的增殖、迁移和血管新生, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 血管相关蛋白HIF-1 $\alpha$ 、VEGF显著上调, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 同时磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)的表达显著增强, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 在低氧环境下, 脂肪间充质干细胞外泌体可以通过上调HIF-1 $\alpha$ /VEGF/JNK通路促进血管生成, 为临床治疗血管生成、血管损伤修复疾病提供相关治疗方向。

**[关键词]** 脂肪间充质干细胞; 外泌体; 低氧; 血管化; 血管内皮生长因子

中图分类号: Q2 文献标识码: A

## Study on the effect of mesenchymal stem cell exosomes on promoting hypoxic vascularization

Bin Zhu Dechun Wang Anshuai Duan Wenhao Zhang Quan Liu

General Hospital of the Tibet Military Region of the Chinese People's Liberation Army

**[Abstract]** Objective: To investigate the mechanism by which adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes promote vascularization under hypoxic conditions. Methods: Exosomes were obtained from adipose-derived mesenchymal stem cells under normal and hypoxic conditions by ultracentrifugation. Human umbilical vein endothelial cells were used in this project, and their activity and migration ability were determined by CCK-8 and Transwell methods. Tube formation assay was used to determine its effect on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells, and Western blot technique was used to detect the expression of angiogenesis proteins hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor. Results: Under hypoxic conditions, the release of exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells promoted the proliferation, migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ); the vascular-related protein HIF-1 $\alpha$ , VEGF were significantly upregulated, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), and the expression of phosphorylated c-Jun amino-terminal kinase (p-JNK) was significantly enhanced, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Under hypoxic conditions, adipose-derived mesenchymal stem cell exosomes can promote angiogenesis by upregulating the HIF-1 $\alpha$ /VEGF/JNK pathway, providing relevant therapeutic directions for the clinical treatment of angiogenesis and vascular damage repair diseases.

**[Key words]** Adipose-derived mesenchymal stem cells; exosomes; hypoxia; vascularization; vascular endothelial growth factor

## 引言

研究表明, 在低氧条件下, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)能促进HUVEC增殖、迁移和新生血管生成, 两者之间存在显著差异( $P < 0.05$ ), 低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia induci-

ble factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)显著增加( $P < 0.05$ ), p-jnk( $P < 0.05$ )显著增加( $P < 0.05$ )<sup>[1]</sup>。血管新生在许多疾病中发挥着重要作用。MSCs分泌外泌体, 向受体细胞输送各种营养物质, 并影响其表

型和功能。MSCs在正常氧含量(P0212%)下生长,但在正常生理状态下,其氧含量大多为2%~8%,与正常血氧含量相差甚远<sup>[2]</sup>。氧含量是控制细胞能量代谢的重要因素,也是细胞生物学特性的重要组成部分。既往研究表明, MSCs能在低氧水平下增加分泌因子的表达。其机制主要是MSCs中存在HIF-1 $\alpha$ ,能转录控制VEGF的表达,并促进VEGF的表达<sup>[3-4]</sup>。然而,其内容物的种类和数量并不稳定,与所含物质无关,对细胞周围的环境也很敏感,这证实它是对外界刺激的一种反馈机制。根据相关研究, MSCs在低氧条件下分泌的外泌体可改善下肢缺血和脑损伤,但其机制尚不清楚<sup>[5]</sup>。因此,我们研究了在低氧和常态氧条件下,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的外泌体对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVECs)造成增殖、迁移和新生血管的机制。

### 1 材料与方法

本研究所用材料及设备见表1。

表1 研究所用材料及设备

类别	类别	来源
材料及试剂	BMSCs、HUVECs	广州赛业生物
	Transwell 小室	Corning
	胎牛血清	Gibco
	CCK8 检测试剂盒	广州水云天生物
	低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )	
	血管内皮生长因子 (VEGF)	武汉博士德生物科技有限公司
	c-Jun 氨基末端激酶(JNK)	
	p-JNK、CD9、CD63、内参抗体	
	二氧化碳细胞培养箱	Thermo, USA
	酶标仪	
主要仪器	离心机	
	倒置荧光显微镜	Nikon, Japan
	超净工作台	苏州净化
	蛋白转膜系统	Bio-rad, USA

1.1 方法。(1)细胞培养。将BMSCs移植到T25培养皿中,等待细胞贴壁,去除原来的培养基,加入不含外显子的培养基,转移到去苛性碱槽(1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub>)中24小时,收集透明液体。此外,将HUVECs接种到6孔板中,加入ECM基质,转移到二氧化碳

培养箱中,每3天回收和更换一次。(2)外泌体的提取和鉴定。采用低氧/常态氧BMSC培养基,应用超快速离心分离技术,透射电镜观察形态学变化,Western-blot测定特征性CD9和CD63蛋白的表达。(3)CCK8测定。在96孔板中以103 $\mu$ m培养HUVEC24小时。低氧和常态氧BMSC外泌体48小时后,按照CCK8试剂盒说明书加入CCK8,室温孵育4小时。在450nm波长下检测光密度(OD)值。(4)五成管试验。在96孔板中加入50ml/孔的Ru液体基质凝胶,在37 $^{\circ}$ C下加热30分钟后固化。本研究使用HUVEC。用消化-离心、d-gal、d-gal+hyhamc-exos培养的hUVEC作为研究对象。将整个ECM培养物作为悬浮液,加入100升混合悬浮液和100L基质凝胶。3.5h后,在40x显微镜下随机拍摄每组3张图像,并使用ImageJ软件计算试管长度。(5)Westernblot。本项目使用低氧和常态氧状态下的hUVECs,用RIPA水解,用BCA纸测定蛋白质含量,用dss-pages倒模,脱脂奶粉室温封闭1h,孵育一抗,二抗,采用电子化学发光用于成像。

1.2 统计学方法。本研究中计数资料采用[n, (%)]表示,进行卡方检验,对计量资料进行统计分析,统计值以()表示,组间差异以t表示,使用统计学软件为SPSS25.0, P<0.05为差异显著。

### 2 结果

2.1 提取和识别外泌体。将成功收集的低氧与常态氧环境下的BMSCs培养基超离心后,采用透射电镜观察(图1a)。通过Westernblot检测外泌体中CD9和CD63的表现(图1b),表明研究成功提取外泌体。

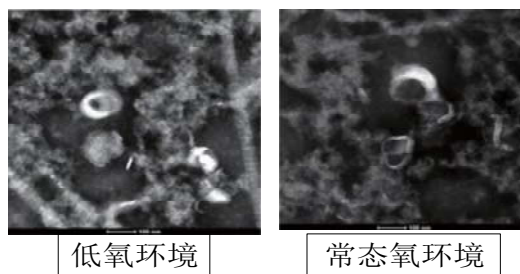


图1a 透射电镜观察结果

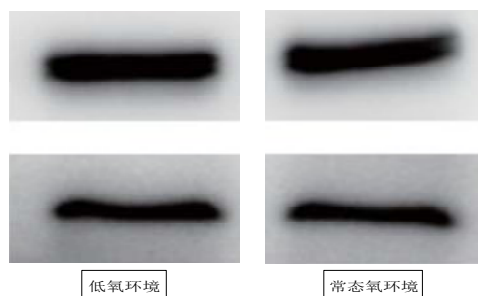


图1b Westernblot检测结果

2.2 CCK8检测hUVECs活性。在低氧环境下与常态氧环境下将BMSCs外泌体处理hUVECs后,采用CCK8测定其活性,发现低氧外泌体组的HUVECs活性明显更强(P<0.05),见表2,因此,我们提出了BMSC外泌体在低氧环境中刺激hUVEC活性的假设。

表2 HUVECs活性、迁移、血管生成检测情况(%)

组别	CCK8 检测	Transwell 检测	
	HUVECs 活性	HUVECs 的迁移情况	HUVECs 血管生成功能的成管实验
低氧环境组	1.4	95	75
常态氧环境组	0.8	75	48
$\chi^2$	6.136	14.157	14.275
P	0.013	<0.001	<0.001

2.3 Transwell检测hUVECs的迁移情况。收集低氧与常态氧环境下的BMSCs外泌体处理HUVECs的Transwell小室,结果显示低氧环境下的hUVECs的迁移数量明显较多( $P<0.05$ ),见图2。表明低氧环境下的BMSC外泌体可促进 hUVECs迁移。

2.4 hUVECs血管生成功能的成管实验。在低氧环境下与常态氧环境下将BMSCs外泌体处理hUVECs后,成管试验结果显示低氧环境下的血管生成长度更明显( $P<0.05$ ),见图2,表明BMSC外泌体在低氧情况下可促进血管形成。

2.5 Westernblot对细胞中相应蛋白质表达的影响。在低氧环境下与常态氧环境下将BMSCs外泌体处理hUVECs后,采用Westernblot检测,结果显示,低氧环境下HIF-1 $\alpha$ 和VEGF的表达以及p-JNK的蛋白表达量明显增加( $P<0.05$ ),见图2。表明低氧条件下BMSCs外泌体有可能通过HIF-1 $\alpha$ /VEGF/JNK通路控制新生血管的形成。

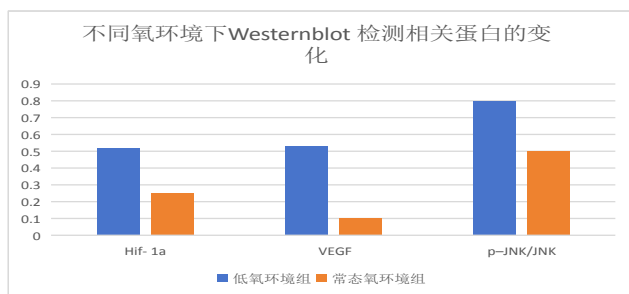


图2 不同氧环境下Westernblot检测结果

### 3 讨论

血管新生参与各种生理过程,如组织发育、缺血、炎症和组织修复<sup>[6-7]</sup>。在低氧情况下, hUVECs的外泌体发挥着重要作用,但其确切的控制机制尚不清楚。因此,本研究假设HUVECs在低氧环境中释放外泌体,通过HIF-1 $\alpha$ /VEGF/JNK信号通路促进血管新生。

VEGF是促进血管新生的主要因子,而HIF-1 $\alpha$ 是控制细胞内氧代谢的重要分子,在低氧环境中发挥着重要作用。据报道<sup>[8]</sup>,低氧会增加HIF-1 $\alpha$ 和VEGF的表达,促进血管新生。以往的研究表明<sup>[9]</sup>,高迁移率族蛋白B1(high mobility group box protein 1, HMGB1)通过HIF-1 $\alpha$ /VEGF信号通路促进血管新生。本研究实

验结果也显示,低氧组HIF-1 $\alpha$ 和VEGF的表达均显著增加,与常态氧环境相比差异具有统计学意义( $p<0.05$ ),表明低氧时,BMSC外泌体可通过上调HIF-1 $\alpha$ /VEGF促进血管新生。

JNK信号通路在细胞增殖、分化、存活和移动中发挥着重要作用。JNK信号通路在血管生成中发挥着重要作用HMGB1通过JNK信号通路促进肿瘤细胞的增殖、凋亡和迁移。以往的研究表明<sup>[10]</sup>,缺氧时JNK的表达明显增加,而且JNK通路在促进外显子血管生成中发挥着重要作用。本研究结果显示,在低氧环境下,JNK的磷酸化水平明显上升,与常态氧环境相比差异具有统计学意义( $p<0.05$ ),表明了低氧时,BMSC外泌体可通过上调JNK水平促进血管新生。

综上所述,本研究结果表明BMSCs释放的外泌体可促进在低氧环境下hUVECs的增殖、迁移和新生血管生成,激活JNK信号,上调HIF-1 $\alpha$ /VEGF并促进hUVECs新生血管生成。因此,低氧MSCs来源的外泌体有望成为治疗血管新生相关疾病的一种新方法。

#### [基金项目]

西藏自治区重点研发计划项目(XZ202001ZY0059G);中央引导地方基地创新建设项目(ZYYD202201YD004C)。

#### [参考文献]

- [1]卓海涛,张浩群.低氧预处理间充质干细胞来源外泌体的应用进展[J].中国病理生理杂志,2023,39(8):1522-1528.
- [2]Takeuchi R, Katagiri W, Endo S, et al. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis[J]. PLoS one, 2019, 14(11):e0225472.
- [3]Qiu X, Liu J, Zheng C, et al. Exosomes released from educated mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing via promoting angiogenesis[J]. Cell Proliferation, 2020, 53(8):e12830.
- [4]刘树安,王凯,叶梦杰,等.间充质干细胞及其来源外泌体治疗急性呼吸窘迫综合征后肺纤维化的研究进展[J].临床肺科杂志,2023,28(2):280-285.
- [5]李放,姜帆,马新妞,等.低氧诱导间充质干细胞外泌体通过改变M1/M2巨噬细胞极化减少椎间盘细胞凋亡和衰老[J].中华实验外科杂志,2024,41(04):803-806.
- [6]梁国豪,张茜,张研.间充质干细胞及其衍生物治疗高原低氧环境下心血管疾病的研究进展[J].中华细胞与干细胞杂志电子版,2024,14(02):107-112.
- [7]张雨薇,刘川川,毛稼琦,等.低氧预处理脐带间充质干细胞源外泌体抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖[J].中国组织工程研究,2023,27(19):2986-2992.
- [8]闫焱,周昆,张芳宾,等.低氧肺癌来源的外泌体微小RNA-1278对巨噬细胞M2极化的调节作用及其机制[J].中华实验外科杂志,2022,39(10):1931-1935.

#### 作者简介:

朱斌(1987—),男,汉族,陕西西安人,博士研究生,副主任医师,研究方向:干细胞与组织工程医学。