

人脐带间充质干细胞来源外泌体的提取、鉴定和蛋白组学分析

https://doi.org/10.12307/2022.383

单政铭, 陶述春, 胡春梅, 张治元, 丁一楠, 何梦铖, 唐秋莎

投稿日期: 2021-01-11

采用日期: 2021-02-07

修回日期: 2021-07-26

在线日期: 2021-08-11

中图分类号:

R459.9; R394.2; R318.08

文章编号:

2095-4344(2022)19-03036-07

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△从蛋白组学层面验证人脐带间充质干细胞来源外泌体与人脐带间充质干细胞的差异是否会影响其免疫原性;
△通过一系列蛋白组学研究,进一步验证人脐带间充质干细胞来源外泌体的安全性,以便后续研究评价其作为体内基因(药物)递送载体的价值。

人脐带间充质干细胞提取与鉴定

人脐带间充质干细胞来源外泌体的提取

人脐带间充质干细胞来源外泌体的鉴定

- (1) 透射电镜观察;
- (2) 纳米颗粒跟踪分析;
- (3) 蛋白浓度分析;
- (4) Western blot 检测 CD9、CD63 的表达。

人脐带间充质干细胞来源外泌体的蛋白组学分析

- (1) 蛋白质定性、定量分析;
- (2) 蛋白质聚类分析;
- (3) GO 分析;
- (4) KEGG 分析。

文题释义:

外泌体: 是平均直径为30–150 nm的细胞外囊泡, 有双层脂质膜结构, 具有识别未知细胞和分子机制的潜力, 这些机制在细胞间通讯、维持体内稳态和疾病的发生发展中发挥着重要作用。外泌体由于具有低免疫原性、易于获得储存等优点, 被认为是药物和天然化合物的优良运载工具。

人脐带间充质干细胞: 相比于目前的骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞, 人脐带间充质干细胞具有更好的增殖性和更低的免疫原性, 能定向分化成机体内的各种功能细胞, 促进组织修复, 调节免疫反应, 被应用于神经再生、子宫内膜癌、肝衰竭方面的治疗, 但其长时间植入体内后, 可能会有异常分化的问题。

摘要

背景: 现有的外泌体蛋白组学研究中, 只有不同来源外泌体或者不同条件下分泌的外泌体之间的蛋白组学对比, 没有外泌体和其母体细胞之间的对比分析。

目的: 对人脐带间充质干细胞来源外泌体进行提取鉴定和蛋白组学分析。

方法: 培养人脐带间充质干细胞并采用超滤序贯超离法提取外泌体, 通过透射电镜、纳米颗粒跟踪分析、蛋白质定量、蛋白质印迹法及蛋白组学分析等技术鉴定。

结果与结论: ①提取的外泌体分散度较好且均一, 多为杯状圆形或类圆形的膜性小囊泡, 可见囊泡的双膜性结构, 中央为低电子密度成分, 分布较集中且边界清晰; ②外泌体粒径分布峰值为(129.5±8.7) nm, 膜表面带负电荷, 浓度为 8.375×10^{10} 粒子/mL, 平均zeta电位为(-28.1±3.6) mV; ③外泌体有特征性膜蛋白CD9、CD63的表达; ④蛋白组学分析外泌体中高表达的蛋白质大多参与RNA剪接、mRNA加工、蛋白折叠等生物过程, 参与RNA/DNA等遗传物质及蛋白质的合成、加工、降解过程, 参与组成多种细胞器及亚细胞膜结构, 参与多条信号通路、细胞黏附、细胞外基质受体相互作用, 与多种疾病和病毒致癌也密切相关; ⑤通过分析认为外泌体与其母体细胞相比有一定的同质性和差异性, 差异蛋白功能均和免疫无关, 故验证了人脐带间充质干细胞来源外泌体的低免疫原性和安全性。

关键词: 干细胞; 人脐带间充质干细胞; 外泌体; 蛋白组学; 免疫原性; 安全性

Extraction, identification and proteomic analysis of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells

Shan Zhengming, Tao Shuchun, Hu Chunmei, Zhang Zhiyuan, Ding Yinan, He Mengcheng, Tang Qiusha

Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Shan Zhengming, Master candidate, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Tang Qiusha, MD, Professor, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China

东南大学医学院病理与病理生理学系, 江苏省南京市 210000

第一作者: 单政铭, 男, 1996年生, 江苏省南通市人, 汉族, 在读硕士, 主要从事病理与病理生理学方面的研究。

通讯作者: 唐秋莎, 博士, 教授, 东南大学医学院病理与病理生理学系, 江苏省南京市 210000

https://orcid.org/0000-0001-8366-5259 (单政铭)

基金资助: 江苏社会发展项目 (BE2018606), 项目负责人: 胡春梅; 江苏省六大大人才高峰 (wsw-028), 项目负责人: 张治元; 南京市卫生科技发展专项资金项目计划 (ZKX18042), 项目负责人: 胡春梅

引用本文: 单政铭, 陶述春, 胡春梅, 张治元, 丁一楠, 何梦铖, 唐秋莎. 人脐带间充质干细胞来源外泌体的提取、鉴定和蛋白组学分析 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(19):3036-3042.



Abstract

BACKGROUND: Current proteomics studies of exosomes only have proteomic comparisons between exosomes from different sources or exosomes secreted under different conditions. There is no comparative analysis between exosomes and their parent cells.

OBJECTIVE: To extract, identify and analyze the exosomes of human umbilical cord mesenchymal stem cells.

METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were cultured and exosomes were extracted using sequential ultrafiltration and identified using transmission electron microscope, nanoparticle tracking analysis, bicinchoninic acid, western blot assay, and proteomics analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The extracted exosomes had good dispersion and uniformity. Most of them were cup-shaped or round-like membranous vesicles. The double membranous structure of the vesicles could be seen, with low electron density components in the center, which were more concentrated and distributed. The boundary was clear. (2) The peak size distribution of exosomes was (129.5±8.7) nm. The membrane surface was negatively charged; the concentration was 8.375×10^{10} particles/mL; and the average zeta potential was (-28.1±3.6) mV. (3) Exosomes showed the expression of characteristic membrane proteins CD9 and CD63. (4) Proteomics analysis showed that most of the highly expressed proteins in exosomes were involved in biological processes, such as RNA splicing, mRNA processing, and protein folding, involved in the synthesis, processing, and degradation of RNA/DNA and other genetic material and proteins, and participated in the composition of organelles and subcellular membrane structures, involved in multiple signal pathways, cell adhesion, extracellular matrix receptor interactions, and were also closely related to a variety of diseases and viral carcinogenesis. (5) It is concluded that after proteomics analysis, it is believed that the exosomes have certain homogeneity and differences compared with their parent cells. Differential protein function has nothing to do with immunity. Therefore, the low immunogenicity and safety of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells are verified.

Key words: stem cells; human umbilical cord mesenchymal stem cells; exosomes; proteomics; immunogenicity; safety

Funding: the Jiangsu Social Development Project, No. BE2018606 (to HCM); the Six Talent Peaks in Jiangsu Province, No. wsw-028 (to ZZY); the Health Science and Technology Development Special Fund Project Plan of Nanjing, No. ZKX18042 (to HCM)

How to cite this article: SHAN ZM, TAO SC, HU CM, ZHANG ZY, DING YN, HE MC, TANG QS. Extraction, identification and proteomic analysis of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(19):3036-3042.

0 引言 Introduction

间充质干细胞源于中胚层，是一类具有向不同谱系分化能力和自我增殖能力的干细胞，间充质干细胞可以从多种组织中分离出来，如脐带、子宫内膜息肉、月经期血液、骨髓、脂肪组织等^[1]，因为间充质干细胞的来源多样性以及可大量获得，使得其对实验和临床应用有很大的研究意义。很多临床试验是基于间充质干细胞的分化潜能而进行的，但由于功能改善和损伤修复与细胞植入或者细胞分化之间缺乏明显相关性，所以 LAI 等^[2]认为间充质干细胞是通过其分泌产物发挥作用的。据报道，间充质干细胞可分泌多种细胞外囊泡^[3]，其中包含外泌体，外泌体被认为是间充质干细胞发挥作用的一种重要途径。外泌体是平均直径为 30–150 nm 的细胞外囊泡，有双层脂质膜结构，具有识别未知细胞和分子机制的潜力，这些机制在细胞间通讯、维持体内稳态和疾病的发生发展中发挥着重要作用。外泌体为细胞及组织改变提供了新视角，通过检测体液中的外泌体可以为疾病诊断提供新的思路，基于外泌体的物质信息传递能力可以设计相关治疗疗法^[4]。

人脐带间充质干细胞来源丰富^[5]，可以通过非侵入性手段获得，拥有更好的增殖性和更低的免疫原性^[6]，能定向分化成机体内的各种功能细胞，促进组织修复，调节免疫反应^[7]，但其长时间植入体内后，可能会有异常分化的问题^[2]，而人脐带间充质干细胞来源外泌体能够避免干细胞异常分化、肿瘤发生和细胞复苏的问题，且拥有低免疫原性、易于获得储存等优点^[8-9]，近年来，研究者一直致力于研究干细胞来源外泌体替代干细胞治疗^[10-12]。

外泌体作为药物和天然化合物的运载工具是目前研究的热点^[13]，该实验提取人脐带间充质干细胞来源外泌体并鉴定，将人脐带间充质干细胞与其分泌的外泌体进行蛋白质组学分析对比，从蛋白质组学层面验证人脐带间充质干细胞来源外泌体与人脐带间充质干细胞的差异是否会影响其免疫原性，从而验证人脐带间充质干细胞来源外泌体的安全性，以便后续研究评价其作为体内基因(药物)递送载体的价值。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验，两样本均数差异采用 t 检验，多样本均数差异采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 9 月至 2020 年 3 月在东南大学医学院完成。

1.3 材料 脐带由南京大学医学院附属鼓楼医院提供，产妇对脐带处理均情同意。实验获得南京大学医学院附属鼓楼医院医学伦理委员会批准。

实验试剂和仪器: 胎牛血清(美国 Gibco 公司); DMEM 低糖培养基、0.25% 胰蛋白酶(北京依托华茂生物科技有限公司); TrypLESelect(美国 Gibco 公司); 二甲基亚砜(美国 Sigma 公司); 小鼠抗人 PE 或 APC 标记的单抗 CD73、CD90、CD166、CD34、CD45(南京福麦斯生物公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(杭州碧云天生物技术公司); 兔抗鼠 CD63、CD9 抗体(英国 Abcam 公司); 兔源 GAPDH 抗体(英国 Abcam 公司); 聚偏二氯乙烯膜(德国默克密理博公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(二抗)(南京福麦斯生物公司); 化学发光底物(德国默克密理博公司); 超速离心机(美国库勒贝克曼公司); DY702S 型稳流电压电泳仪(江苏南达生物科技有限公司); DYC-40C 型湿转膜电泳仪(北京六一科学仪器); 全自动凝胶成像系统(法国 Vilber 公司); H-7600 型高分辨透射电镜(日本 Hitachi 公司); Zetaview 型纳米颗粒跟踪分析仪(德国 ParticleMetrix 公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞培养及鉴定

(1) 人脐带间充质干细胞的原代培养: 在 6 h 内处理采集的脐带，切除双侧不新鲜的有夹痕或者淤血的部分，用含双抗的 PBS 充分冲洗脐带外周以及脐静脉内腔，沿脐静脉内腔纵向剪开血管，剥离脐静脉内膜，将剩余组织切成 1 mm×1 mm×1 mm 大小组织块，贴于用 DMEM 完全培养基(体积分数为 10% 胎牛血清+1% 青链霉素+DMEM 低糖培养

基)湿润的 T75 培养瓶底壁,底壁朝上,置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度孵箱中,2 h 后翻转培养瓶,加入 5 mL DMEM 完全培养基,5 d 后加入 5 mL 上述培养基,12 d 后全量换液,观察贴块周围贴壁细胞爬出情况,然后隔天换液,当细胞达 70%–80% 融合时,用 2 mL TrypLESelect 消化液消化后,以 1 : 4 传代培养,计为第 1 代细胞,取生长良好的第 3–6 代细胞进行实验^[14]。

(2) 流式细胞仪鉴定:以 TrypLESelect 消化液消化收集第 2 代人脐带间充质干细胞, PBS 洗涤 2 次,分装成每管 5×10⁵ 细胞,分别加入小鼠抗人 PE 或 APC 标记的单抗 CD73、CD90、CD166、CD34、CD45 及同型对照 10 μL,4 °C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤后用 10 g/L 多聚甲醛固定,流式细胞仪检测分析^[15–16]。

人脐带间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	人脐带
原代培养方法:	组织块贴壁法
基础培养基:	DMEM 低糖培养基
添加材料:	体积分数为 10% 胎牛血清 +1% 青链霉素
原代培养时间:	原代细胞培养 12 d 开始换液去除组织块,隔天再次换液,之后两三天换液 1 次,培养 16 d 开始传代
细胞传代:	细胞融合至 70%–80% 时用 2 mL TrypLE 消化液消化传至下 1 代,以 1 : 4 比例传代,三四天传 1 代,共传 12 代
细胞鉴定:	流式鉴定
伦理学批准:	该实验经过南京大学医学院附属鼓楼医院医学伦理委员会批准

1.4.2 超滤序贯超离法提取外泌体 采取将上清液先超滤浓缩再超离沉淀的方式,提高外泌体的提取效率和浓度。具体步骤如下:收集生长良好的第 3–6 代细胞培养上清液,向 100 kD 的超滤离心管中加入上述上清液 1 200 mL,以 4 000×g 转速离心 30 min,加入 pH 7.4 的 PBS,轻柔吹打,得到含外泌体的超滤浓缩液约 120 mL。将上述混悬液按照 300×g 离心 10 min,2 000×g 离心 10 min,10 000×g 离心 30 min,100 000×g 离心 70 min×2 次的步骤进行梯度离心,所得贴于试管底壁淡黄沉淀物即为外泌体,用 1 mL PBS 轻柔充分地吹打混匀,使外泌体充分重悬,保存于 -80 °C 冰箱内备用^[17]。

1.4.3 外泌体表征

(1) 透射电镜观察外泌体大体形貌:将上述外泌体混悬液约 10 μL 滴于 200 目碳膜铜网上,静置于超净台内通风 15 min,用无菌干净滤纸吸取多余的液体,再加入 1% 醋酸双氧铀负染 5 min,用无菌干净滤纸吸去多余负染液,静置 30 min 室温下晾干,通过透射电镜观察外泌体形貌、大小,初步估算浓度。

(2) 纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径大小、浓度及表面电位:用超纯水将上述外泌体混悬液稀释 1 000 倍,充分混匀,用 ParticleMetrix 纳米颗粒跟踪分析仪测量外泌体浓度(囊泡数/mL)、粒径分布范围及外泌体膜 zeta 电位。

(3) BCA 法测蛋白含量:按 BCA 试剂盒步骤测定蛋白浓

度,并根据所得浓度调整外泌体稀释倍数,以保证测量的准确性。参数:20 μL 标本 +200 μL BCA 工作液,37 °C 放置 30 min,用酶标仪测定各孔在 562 nm 处吸光度值。

(4) Western blot 检测外泌体中 CD9、CD63 蛋白表达^[18]:用含有蛋白酶抑制剂鸡尾酒的 RIPA 缓冲液裂解细胞,收集的蛋白质样品在 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将电泳的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上,并在室温下用 5% 脱脂乳封闭,加入 GAPDH、CD9、CD63(1 : 1 000) 一抗在 4 °C 孵育过夜,洗涤印迹,然后在室温下与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1 : 3 000) 孵育 1 h,使用化学发光底物在凝胶成像仪曝光检测蛋白表达。

1.4.4 人脐带间充质干细胞来源外泌体蛋白质组学分析 首先进行预实验,分别提取人脐带间充质干细胞及其外泌体中的蛋白质^[19],通过蛋白质定量和凝胶电泳进行质量评估,随后进行 FASP 酶解质谱分析,通过数据库比对再次进行样本质量评估。质量评估通过后,对样本进行肽段脱盐、质谱分析,再与数据库对比,选择的数据库为 Uniprot_HomoSapiens_20386_20180905,采用 MaxQuant 软件(版本号 1.5.5.1)搜索数据库进行蛋白质定性分析,采用 LFQ 算法进行蛋白质定量分析^[19–20]。GO 注释通过 Blast2GO 对目标蛋白质集合进行序列比对、GO 条目提取、GO 注释和补充注释^[21–22]。KEGG 通路注释则通过 KOALA 软件^[23],首先通过比对 KEGG GENES 数据库,将目标蛋白质序列进行 KO 归类,并根据 KO 归类自动获取目标蛋白质序列参与的通路信息。GO 注释与 KEGG 注释的富集分析则通过 Fisher 精确检验,比较各个 GO 分类或 KEGG 通路在目标蛋白质集合和总体蛋白质集合中的分布情况,最后进行蛋白质聚类分析,详细实验方法和步骤参照文献^[24–25]。

1.5 主要观察指标 ①人脐带间充质干细胞的形态及表面标记物表达;②人脐带间充质干细胞来源外泌体的形态学特征、粒径大小、浓度及表面电位、表面标记物 CD9、CD63 表达;③人脐带间充质干细胞来源外泌体的蛋白组学分析。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 *t* 检验比较两样本均数差异,使用单因素方差分析比较多样本均数差异,*P* < 0.05 为差异有显著性意义,*P* < 0.01 为差异有非常显著性意义。

2 结果 Results

2.1 人脐带间充质干细胞形态学 采用组织贴壁法原代培养 10 d 左右,低倍镜下即可观察到有细胞从组织块中爬出,贴壁细胞的形态为多角形或梭形,梭形细胞多呈短纤维状或纺锤形,也有呈圆形的细胞,培养两三周至细胞融合达到 80% 即可消化传代,可见成纤维状细胞群落生长^[26],见图 1。

2.2 人脐带间充质干细胞表面标记物的表达 CD73、CD90、CD166 为阳性表达,CD34、CD45 为阴性表达,见图 2,判定培养细胞为人脐带间充质干细胞。

2.3 人脐带间充质干细胞来源外泌体的形态学特征 透射电镜下观察提取的外泌体分散度较好,多呈杯状圆形或类圆形的膜性小囊泡,可见囊泡的双膜性结构,中央为低电子密度成分,分布较集中且边界清晰,总体粒径范围在 40–150 nm 之间,见图 3,所得外泌体大小较均一。

2.4 纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径大小、浓度及表面电位 外泌体粒径分布峰值为 (129.5±8.7) nm,膜表面带负电荷,平均 zeta 电位为 (-28.1±3.6) mV,浓度为 8.375×10¹⁰ 粒子/mL,见图 4。

2.5 人脐带间充质干细胞来源表面标记物 CD9、CD63 的表达 1 200 mL 无血清培养的人脐带间充质干细胞上清液可分离获得约 1 mL 外泌体混悬液,其蛋白质浓度为 0.64 g/L,见图 5A。Western blot 检测结果显示所得外泌体有特征性膜蛋白 CD9、CD63 表达,见图 5B。

2.6 人脐带间充质干细胞来源外泌体的蛋白组学分析 在定量结果的显著性差异分析和蛋白质聚类分析中,筛选进行统计分析的样本为组内 3 次重复实验数据中至少有 2 个非空值的数据,差异表达蛋白质的选择标准为:表达差异倍数大于 2.0 倍(上下调)且 P 值(t 检验) < 0.05。经测算,细胞和外泌体样品中总可数蛋白数为 2 998 种,其中一致性表达的蛋白(差异比 < 2)为 785 种,细胞中高表达的蛋白为 1 755 种,外泌体中高表达的蛋白为 458 种,提示外泌体及其源细胞在蛋白组成方面有一定的同源性和差异性,推测这些差异性表达的蛋白很可能参与了外泌体的合成或者某些特殊的病理状态并与外泌体的功能密切相关,见图 6A, B。将外泌体中过表达的蛋白进一步行 GO 分析,描绘生物学过程、细胞成分、分子功能等属性,KEGG 信号通路结果见图 6C, D,推测外泌体的功能。结果显示,在外泌体中高表达的蛋白质大多参与了 RNA 剪接、mRNA 加工、蛋白折叠等生物过程,从而参与 RNA/DNA 等遗传物质及蛋白质的合成、加工、降解过程,并与多种细胞器及亚细胞膜结构密切相关。KEGG 分析也进一步验证了其参与多条信号通路、细胞黏附、细胞外基质受体相互作用,并且还和病毒的致癌作用和多种心肌疾病有关。

3 讨论 Discussion

近年来人脐带间充质干细胞来源外泌体是一个非常活跃的研究领域^[27]。随着开发更多标准化的纯化和分析程序,使得人脐带间充质干细胞来源外泌体的提取效率得到提高,在神经再生^[28]、神经损伤^[29-30]、子宫内膜癌^[31]、肝衰竭方面的治疗潜力被充分发掘^[32]。国内外许多研究表明人脐带间充质干细胞具有来源广泛、低免疫原性、非自我复制性等诸多优点^[6, 27],使其在组织修复和疾病治疗方面有着广阔的应用前景^[33-37],人脐带间充质干细胞静脉移植被认为是治疗重症新冠肺炎的一种安全有效的方法^[38-39],可以被认为是重度新冠肺炎的抢救和优先治疗方案。人脐带间充质干细胞显示出低免疫原性是因为主要组织相容性复合体的实际缺失和共刺

激配体如 CD40、CD80 和 CD86 的缺乏^[12, 27, 40-41]。LIU 等^[42]发现人脐带间充质干细胞来源外泌体能够明显抑制 CD4⁺、CD8⁺ 细胞增殖,在体外具有免疫调节作用;WANG 等^[43]发现人脐带间充质干细胞来源外泌体在组织损伤修复中更为突出,并且有减轻免疫炎症反应的作用^[44]。

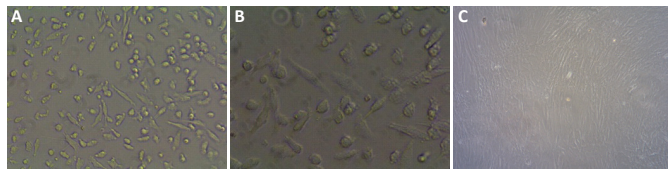
作者认为,由人脐带间充质干细胞分泌的外泌体具有母体细胞的特性,同时由于外泌体是纳米级的膜性小囊泡,没有干细胞移植后异常分化和肿瘤发生的风险。现有的外泌体蛋白组学研究中,只有不同来源外泌体或者不同条件下分泌的外泌体之间的蛋白组学对比,没有对外泌体和其母体细胞进行全面的对比分析,同时也没有对两者的低免疫原性进行全面的说明。

该实验采用蛋白组学分析,将人脐带间充质干细胞和其分泌的外泌体进行对比,一方面分析人脐带间充质干细胞分泌的外泌体是否具有人脐带间充质干细胞本身的低免疫原性的优势特性,另一方面希望能够发现证明人脐带间充质干细胞来源外泌体与母体细胞的差异不会影响其低免疫原性的实验依据,从而证明人脐带间充质干细胞来源外泌体的安全性,以便后续研究评价其作为体内基因(药物)递送载体的价值。

有关外泌体表征的鉴定,目前主要通过透射电镜、纳米颗粒跟踪分析仪等进行大体特征观察。透射电镜可以简单直观观察到外泌体的形貌包括形状、大小和部分结构等,可以初步判断外泌体的提取是否成功及提取的外泌体质量。透射电镜观察到该实验提取的外泌体分散度较好,多呈杯状圆形或类圆形的膜性小囊泡,囊泡具有双膜性结构,中央为低电子密度成分,分布较集中且边界清晰,总体粒径范围在 40–150 nm 之间,所得外泌体大小较均一,与部分文献中提到的外泌体结构符合^[45]。纳米颗粒跟踪分析仪可以测量 10¹⁰ L⁻¹ 甚至颗粒浓度更低的样品,是目前应用最广泛的外泌体粒径分析方法,该实验中外泌体粒径和浓度与文献报道一致^[46]。

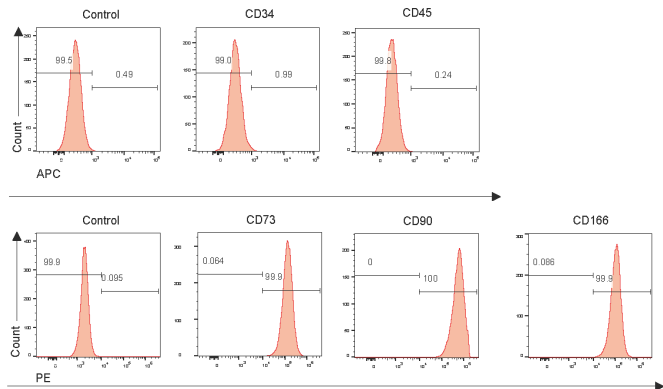
研究发现,外泌体大约有 4 400 余种膜蛋白/分子,这类蛋白质可能参与了免疫、凝血、肿瘤形成等生理病理过程,且可能与细胞的物质传递和信号传导功能有关,因此被认为有成为生物学标志物的潜力^[3, 47]。既往研究发现 CD9、CD63 均为外泌体膜的四跨膜家族成员蛋白,也是目前受到研究者广泛认可的外泌体特征性蛋白,可以作为鉴定样品是否为外泌体的指标^[48]。CD9 在细胞黏附、细胞运动、激活、分化等方面都发挥着重要的调控作用,CD63 与病毒感染、肿瘤的浸润与侵袭、免疫及生殖功能等具有密切的关系^[49]。Western blot 检测发现提取的外泌体中 CD9、CD63 呈明显的高表达,结合形貌特征及粒径分析,可以认定提取物为外泌体。

实验对所提取的外泌体使用 BCA 法进行蛋白定量,1 200 mL 无血清培养的人脐带间充质干细胞上清液可分离获得约 1 mL 外泌体混悬液,其蛋白质浓度为 0.64 g/L,与多数文献报道接近^[50-51]。



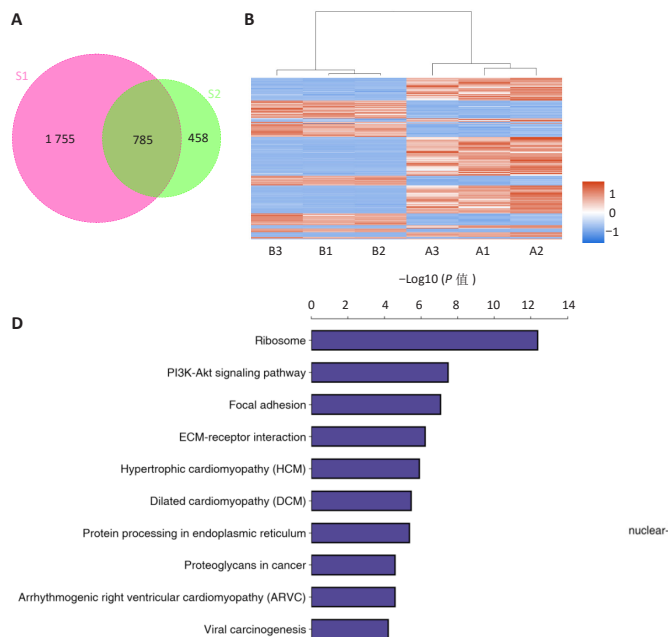
图注：图中 A 为原代培养 10 d，有细胞从组织块中爬出，呈梭形（倒置显微镜，×10）；B 为原代培养 14 d（倒置显微镜，×20）；C 为第 4 代人脐带间充质干细胞，细胞分布均匀，呈成纤维样细胞形态（倒置显微镜，×4）
图 1 | 人脐带间充质干细胞形态学观察

Figure 1 | Morphological observation of human umbilical cord mesenchymal stem cells



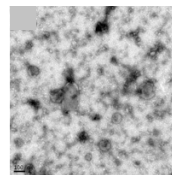
图注：培养的第 4 代人脐带间充质干细胞 CD73、CD90、CD166 为阳性表达，而 CD34、CD45 为阴性表达
图 2 | 人脐带间充质干细胞表面标记物的表达

Figure 2 | Expression of surface markers on human umbilical cord mesenchymal stem cells



图注：图中 A 为鉴定蛋白质韦恩图，该图显示在人脐带间充质干细胞 (S1) 和细胞上清外泌体 (S2) 中鉴定到的蛋白质集合的重叠情况；B 为蛋白质聚类分析；C 为外泌体中高表达蛋白 GO 分析；D 为 KEGG 信号通路分析。图中纵坐标表示聚类属性，横坐标 P 值 (log10) 表示聚类蛋白表达结果，数值越高表示该种类蛋白富集越显著，表达量越高。蛋白质定性结果：选用 HomoSapiens 数据库物种，鉴定到肽段总数为 22065；鉴定到蛋白质总数为 2854；蛋白质定量结果统计：人脐带间充质干细胞来源外泌体与其母体细胞相比，共有 454 个差异表达蛋白质，其中上调差异表达蛋白 167 个，下调差异表达蛋白 287 个
图 6 | 外泌体中高表达蛋白 GO 及 KEGG 富集分析

Figure 6 | Highly expressed protein GO and KEGG enrichment analysis in exosomes



图注：透射电镜下见分散度较好的膜性小囊泡，多呈杯状圆形或类圆形，囊泡具有双膜性结构，中央为低电子密度成分，分布较集中且边界清晰，总体粒径范围在 40–150 nm 之间

图 3 | 人脐带间充质干细胞来源外泌体的形态学特征 (标尺为 100 nm)
Figure 3 | Morphological characteristics of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells (scale bar: 100 nm)

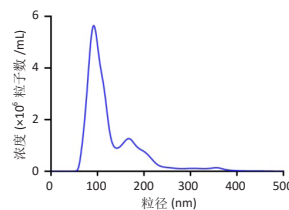
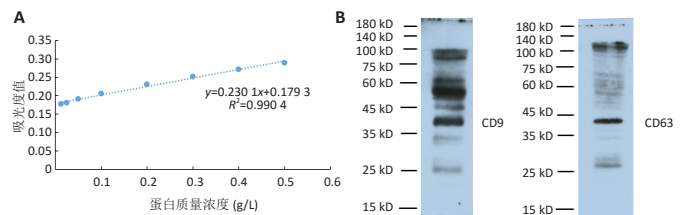


图 4 | 纳米颗粒跟踪分析仪测定人脐带间充质干细胞来源外泌体粒径分布

Figure 4 | Nanoparticle tracking analyzer to determine the size distribution of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells



图注：图中 A 为 BCA 法测蛋白含量；B 为 Western blot 检测外泌体特征性膜蛋白 (CD9、CD63) 的表达，GAPDH 作为内参

图 5 | 外泌体浓度及表征结果

Figure 5 | Exosome concentration and characterization results

蛋白组学分析结果显示,细胞和外泌体样品中总可数蛋白数有 2 998 种,其中 785 种为一致性表达的蛋白,细胞中有 1 755 种高表达的蛋白,外泌体中有 458 种高表达的蛋白,这显示外泌体和其源细胞在蛋白组成方面有同源性,但也存在差异性,进一步对差异的蛋白品种是否参与免疫过程进行了具体分析;根据 GO 分析结果,在外泌体中高表达的主要差异蛋白大多参与细胞的构成、钙、铁等离子的结合、蛋白的结合和受体的组成,这直接或者间接与外泌体所具有的结构和功能有关,高表达的主要差异蛋白中有很多细胞组成蛋白,也可以证明外泌体与母体的相似性,证明了外泌体的来源。同时高表达的主要差异蛋白也参与了 RNA 剪接、mRNA 加工、蛋白折叠等生物过程,从而参与 RNA/DNA 等遗传物质及蛋白质的合成、加工、降解过程,KEGG 分析也进一步验证了其参与多条信号通路、细胞黏附、细胞外基质受体相互作用,并且还病毒的致癌作用有关,值得注意的是,其与肥厚型心肌病、扩张型心肌病、致心律失常性右室心肌病等疾病也密切相关。WANG 等^[52]也发现人脐带间充质干细胞来源外泌体可通过抑制 miR-125b-5p 来促进 Smad7 表达,可作为改善急性心肌梗死后心肌修复的潜在治疗方法。在 GO 分析的差异高表达蛋白以及 KEGG 分析中,作者并没有发现有关免疫方面的差异或对免疫功能的影响,证明外泌体和母体细胞一样具有较好的低免疫原性和安全性。

总体而言,人脐带间充质干细胞及其来源外泌体可通过细胞学技术成功提取、鉴定及保存,经过蛋白组学分析,认为外泌体与其母体细胞相比有一定的同质性和差异性,同质性可以直接证明该外泌体确实来源于人脐带间充质干细胞,而通过 GO 分析和 KEGG 分析发现高表达的差异蛋白功能均和免疫无关,故证明人脐带间充质干细胞来源外泌体较好地继承了母体细胞的免疫特性即拥有低免疫原性,进一步验证了人脐带间充质干细胞来源外泌体的安全性,后续实验进一步深入研究体内基因(药物)递送载体的价值。

作者贡献: 实验设计为唐秋莎、单政铭、丁一楠,实验实施为单政铭、陶述春、丁一楠、何梦斌,实验评估为唐秋莎、胡春梅、张治元,资料收集为单政铭、唐秋莎、陶述春、丁一楠。

经费支持: 该文章接受了“江苏社会发展项目(BE2018606)”“江苏省六大人才高峰(wsw-028)”和“南京市卫生科技发展专项资金项目计划(ZKX18042)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 该研究的实施符合南京大学医学院附属鼓楼医院的相关伦理要求(伦理批号 2017-161-01)。

知情同意问题: 脐带由南京大学医学院附属鼓楼医院提供,产妇对脐带处理知情同意。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过东南大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] DING DC, SHYU WC, LIN SZ. Mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 2011;20(1):5-14.
- [2] LAI RC, YEO RW, LIM SK. Mesenchymal stem cell exosomes. Semin Cell Dev Biol. 2015;40:82-88.
- [3] PATHAN M, FONSEKA P, CHITTI SV, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D516-D519.
- [4] HE C, ZHENG S, LUO Y, et al. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. Theranostics. 2018;8(1):237-255.
- [5] WEISS ML, TROYER DL. Stem cells in the umbilical cord. Stem Cell Rev. 2006;2(2):155-162.
- [6] DING DC, CHANG YH, SHYU WC, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. Cell Transplant. 2015;24(3):339-347.
- [7] YAGHOUBI Y, MOVASSAGHPOUR A, ZAMANI M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment. Life Sci. 2019;233:116733.
- [8] MENDT M, REZVANI K, SHPALL E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. Bone Marrow Transplant. 2019;54(Suppl 2):789-792.
- [9] LOU G, CHEN Z, ZHENG M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. Exp Mol Med. 2017;49(6):e346.
- [10] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science. 2020;367(6478):eaaau6977.
- [11] THÉRY C, ZITVOGEL L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol. 2002;2(8):569-579.
- [12] WORTZEL I, DROR S, KENIFIC CM, et al. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. Dev Cell. 2019;49(3):347-360.
- [13] FAROOQI AA, DESAI NN, QURESHI MZ, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds. Biotechnol Adv. 2018;36(1):328-334.
- [14] LI T, XIA M, GAO Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. Expert Opin Biol Ther. 2015;15(9):1293-1306.
- [15] 王雨涵,程福,蒋文学,等.人脐带间充质干细胞来源外泌体的提取与鉴定[J].中国社区医师,2020,36(34):4-5.
- [16] 徐燕,李长虹,孟恒星,等.人脐带间充质干细胞分离培养条件的优化及其生物学特性[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(32):6289-6294.
- [17] ZHANG B, SHEN L, SHI H, et al. Exosomes from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: Identification, Purification, and Biological Characteristics. Stem Cells Int. 2016;2016:1929536.
- [18] 贾刚,唐秋莎.外泌体在肿瘤治疗中的应用研究进展[J].东南大学学报(医学版),2018,37(1):157-161.
- [19] COX J, HEIN MY, LUBER CA, et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. Mol Cell Proteomics. 2014;13(9):2513-2526.

- [20] COX J, NEUHAUSER N, MICHALSKI A, et al. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res.* 2011;10(4):1794-1805.
- [21] ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-29.
- [22] GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ JM, TEROL J, et al. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(10):3420-3435.
- [23] KANEHISA M, SATO Y, MORISHIMA K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol.* 2016;428(4):726-731.
- [24] HUANG DA W, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.
- [25] HUANG DA W, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
- [26] CAN A, BALCI D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol.* 2011;698:51-62.
- [27] BATSALI AK, KASTRINAKI MC, PAPADAKI HA, et al. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013;8(2):144-155.
- [28] MA Y, DONG L, ZHOU D, et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve nerve regeneration after sciatic nerve transection in rats. *J Cell Mol Med.* 2019;23(4):2822-2835.
- [29] SUN G, LI G, LI D, et al. hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2018;89:194-204.
- [30] ZHANG Y, WANG WT, GONG CR, et al. Combination of olfactory ensheathing cells and human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes sciatic nerve regeneration. *Neural Regen Res.* 2020;15(10):1903-1911.
- [31] LI X, LIU LL, YAO JL, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Endometrial Cancer Cell Proliferation and Migration through Delivery of Exogenous miR-302a. *Stem Cells Int.* 2019;2019:8108576.
- [32] JIANG L, ZHANG S, HU H, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate acute liver failure by reducing the activity of the NLRP3 inflammasome in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;508(3):735-741.
- [33] JIANG W, TAN Y, CAI M, et al. Human Umbilical Cord MSC-Derived Exosomes Suppress the Development of CCl4-Induced Liver Injury through Antioxidant Effect. *Stem Cells Int.* 2018;2018:6079642.
- [34] YIN S, JI C, WU P, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and exosomes: bioactive ways of tissue injury repair. *Am J Transl Res.* 2019;11(3):1230-1240.
- [35] DING Y, CAO F, SUN H, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Lett.* 2019;442:351-361.
- [36] LIU B, DING F, HU D, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium attenuates renal fibrosis by reducing inflammation and epithelial-to-mesenchymal transition via the TLR4/NF- κ B signaling pathway in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):7.
- [37] JIA H, LIU W, ZHANG B, et al. HucMSC exosomes-delivered 14-3-3 ζ enhanced autophagy via modulation of ATG16L in preventing cisplatin-induced acute kidney injury. *Am J Transl Res.* 2018;10(1):101-113.
- [38] SHU L, NIU C, LI R, et al. Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):361.
- [39] ATLURI S, MANCHIKANTI L, HIRSCH JA. Expanded Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (UC-MSCs) as a Therapeutic Strategy in Managing Critically Ill COVID-19 Patients: The Case for Compassionate Use. *Pain Physician.* 2020;23(2):E71-E83.
- [40] XIE K, LIU L, CHEN J, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells improve hepatic ischemia reperfusion injury via delivering miR-1246. *Cell Cycle.* 2019;18(24):3491-3501.
- [41] CHO PS, MESSINA DJ, HIRSH EL, et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood.* 2008;111(1):430-438.
- [42] LIU M, WANG J, LIU M, et al. Study of immunomodulatory function of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2015;95(32):2630-2633.
- [43] WANG ZG, HE ZY, LIANG S, et al. Comprehensive proteomic analysis of exosomes derived from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):511.
- [44] DING M, SHEN Y, WANG P, et al. Exosomes Isolated From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Neuroinflammation and Reduce Amyloid-Beta Deposition by Modulating Microglial Activation in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res.* 2018;43(11):2165-2177.
- [45] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3.22.
- [46] DRAGOVIC RA, GARDINER C, BROOKS AS, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine.* 2011;7(6):780-788.
- [47] KEERTHIKUMAR S, CHISANGA D, ARIYARATNE D, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol.* 2016;428(4):688-692.
- [48] YOSHIOKA Y, KONISHI Y, KOSAKA N, et al. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles.* 2013;2.
- [49] SALUNKHE S, DHEERAJ, BASAK M, et al. Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and in vivo imaging & tracking: Strategies and significance. *J Control Release.* 2020;326:599-614.
- [50] 宋玉仙, 张东亚, 许玉君, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体可调控巨噬细胞的极化 [J]. *中国组织工程研究*, 2019,23(13):2002-2008.
- [51] 郭莹, 王秀伟, 牛玉虎, 等. 人脐带间充质干细胞来源外泌体提取方法的比较 [J]. *中国组织工程研究*, 2018,22(9):1382-1388.
- [52] WANG XL, ZHAO YY, SUN L, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve myocardial repair via upregulation of Smad7. *Int J Mol Med.* 2018;41(5):3063-3072.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)