

文章编号 1006-8147(2020)05-0397-04

论 著

## 雪旺细胞外泌体影响胶质瘢痕形成修复小鼠脊髓损伤的实验研究

潘大宇, 宁广智, 冯世庆

(天津医科大学总医院骨科, 天津市神经科学院, 中枢神经系统神经损伤后神经修复和再生教育部重点实验室, 天津 300052)

**摘要** 目的:探讨雪旺细胞外泌体(SCDEs)对小鼠脊髓损伤的修复作用。方法:从小鼠坐骨神经中提取原代雪旺细胞,并将雪旺细胞培养上清分次超速离心得到雪旺细胞外泌体。透射电镜鉴定外泌体,尾静脉注射外泌体,每周2次,每次3  $\mu$ L/只,BMS评分观察小鼠行为学功能恢复,免疫荧光染色观察外泌体神经保护作用 and 胶质瘢痕变化情况。结果:SCDEs的直径范围为40~100 nm;与PBS组相比,SCDEs组行为学BMS评分增加( $P<0.05$ ),神经学功能指标有所恢复( $P<0.01$ ),胶质瘢痕增加( $P<0.01$ )。结论:SCDEs可以促进损伤后胶质瘢痕的增加,修复脊髓损伤。

**关键词** 脊髓损伤;雪旺细胞;外泌体;胶质瘢痕

中图分类号 R68

文献标志码 A

### Schwann cell-derived exosomes promote functional recovery of spinal cord injury in mice via affecting glial scar formation

PAN Da-yu, NING Guang-zhi, FENG Shi-qing

(Department of Orthopedics, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Neurological Institute, Key Laboratory of Post-Neuroinjury Neuro-Repair and Regeneration in Central Nervous System, Ministry of Education and Tianjin City, Tianjin 300052, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the repair effect of schwann cell-derived exosomes(SCDEs) on spinal cord injury in mice. **Methods:** Primary schwann cells were extracted from the sciatic nerve of mice, and the schwann cell culture supernatant was subjected to ultracentrifugation to obtain SCDEs. Transmission electron microscopy was used to identify exosomes, and exosomes were injected via tail vein 2 times a week, 3  $\mu$ L each mouse. Basso mouse scale (BMS) was used to observe the behavioral function, nerve function recovery and changes scar were observed by immunofluorescence staining. **Results:** SCDEs ranged in size from 40 to 100 nm. Compared with the PBS group, BMS was increased ( $P<0.05$ ), neurological functional recovery was induced ( $P<0.001$ ), glial scar formation was increased in the SCDEs group ( $P<0.001$ ). **Conclusion:** SCDEs can promote the increase of glial scar and repairing spinal cord injuries.

**Key words** spinal cord injury; schwann cells; exosomes; glial scar

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后轴突严重受损和神经元死亡,导致运动和/或感觉功能永久丧失,影响脊髓通过大脑向身体损伤部位以下控制感觉、运动以及自主功能的系统传递信息的能力<sup>[1-5]</sup>。雪旺细胞的外表面有基膜,能够分泌营养因子来支持轴突生长,包括神经生长因子、脑源性神经营养因子、胶质细胞系神经营养因子和神经营养素<sup>[6-8]</sup>,能够促进损伤后轴突的去分化和增殖,去除髓鞘和轴突碎片,其再生能力已被用于修复中枢神经系统内的损伤<sup>[9]</sup>。外泌体首先是在20世纪80年代被发

现,并被描述为网状细胞分泌的内体衍生的小囊泡(30~150 nm),包含复杂的RNA和蛋白质,直径为40~100 nm的盘状囊泡<sup>[10-11]</sup>。外泌体能够充当信号导体并将生物活性分子传递至特定的受体细胞以进行细胞间通讯<sup>[12]</sup>。研究表明,外泌体参与中枢神经系统(central nerve system, CNS)的许多生物学过程,如突触可塑性、髓鞘膜生物发生的调节以及将蛋白质或者核酸局部转运至高度极化的结构<sup>[13-14]</sup>。而雪旺细胞外泌体(schwann cell-derived exosomes, SCDEs)最近引起了越来越多实验团队的注意,已经有研究结果显示,SCDEs包含mRNA、miRNA和蛋白质,并能够在体内外增强轴突的再生<sup>[17-18]</sup>。因此,本研究的目的是研究小鼠脊髓损伤后SCDEs在功能修复的作用及其可能的机制。本研究的发现可能有助于开发治疗临床脊髓损伤的新型治疗策略。

基金项目 国家自然科学基金国际合作与交流项目(81620108018);  
国家自然科学基金资助项目(81930070)

作者简介 潘大宇(1993-),男,硕士在读,研究方向:骨外科学;通信作者:宁广智, E-mail: ningguangzhi@foxmail.com; 冯世庆, E-mail: sqfeng@tmu.edu.cn。

## 1 材料与方法

**1.1 雪旺细胞的原代提取和培养** 由于雪旺细胞存在于外周神经,所以本研究选择大的外周神经坐骨神经来提取雪旺细胞。首先麻醉小鼠,然后使用颈椎脱臼法处死小鼠并用75%的乙醇全身消毒。将坐骨神经分离出来后汇集到装有灭菌PBS的培养皿中,然后抽出PBS加入1 mL DMEM培养基(dulbecco's modified eagle's medium,DMEM)和300  $\mu$ L 10 mg/mL 胶原酶孵育消化并分别用1 mL 移液器吸头、18 G和21 G 针头多次吸出和吹打组织,然后将细胞悬液通过70  $\mu$ m 细胞过滤器滤入离心管中,500 $\times$ g 离心10 min后,丢弃上清液,用10 mL DMEM 重叠细胞沉淀,轻轻摇动以均匀分布细胞,转入到5%CO<sub>2</sub>的37  $^{\circ}$ C恒温箱中培养细胞1 d。第2天更换培养基。

**1.2 SCDEs 的提取** 当雪旺细胞传至足够的皿数并具有一定细胞密度后,更换培养基为不含FBS的DMEM进行培养,并每3 d收集1次雪旺细胞培养基,将收集到的培养基通过多次超速离心获得SCDEs。第1次以1 000 $\times$ g 离心10 min,第2次以10 000 $\times$ g 离心30 min。随后,第3次收集上清液,并在100 000 $\times$ g 下超速离心1 h以沉淀外泌体。用PBS洗涤SCDEs后,在100 000 $\times$ g 下超速离心最后1 h后得到SCDEs。

**1.3 SCDEs 鉴定** 先使用醋酸戊酯浸没处理1 h,再用蒸馏水冲洗3次,然后浸没在无水乙醇中以去除铜网上的污物,在无菌容器中备有一定量的无菌水,然后加入2%的火棉胶醋酸戊酯溶液于液面中央来制备支持膜,通过控制无菌水水流流速将支持膜转移到载网上,然后制片后在透射电镜下观察。

**1.4 SCI 动物模型的建立和外泌体治疗** 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心获得6~8周龄雌性C57小鼠24只。给小鼠提供足够的标准食物和水,并在12 h/12 h的明暗周期下饲养。术前称重,并通过腹膜内注射3 mL/kg的4%水合氯醛对小鼠进行深度麻醉。使用显微剪对T10椎骨进行背侧椎板切除术以暴露脊髓,将微型止血钳横向钳夹暴露处整个脊髓5 s后松开,可观察到小鼠痉挛性摆尾,双下肢及躯体回缩扑动后双下肢瘫痪,以及硬脊膜充血水肿,从而造成脊髓挫伤模型。假手术组除了不进行脊髓钳夹,其他操作与上述操作一致。SCDEs治疗组和PBS组均通过尾静脉注射,每周2次,每次3  $\mu$ L/只。

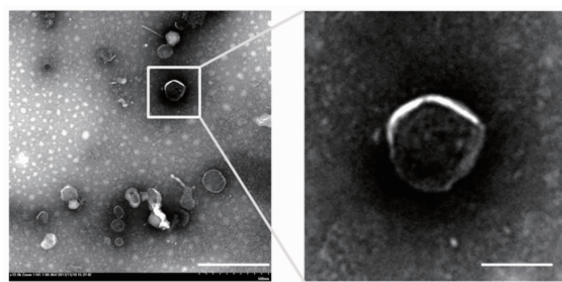
**1.5 免疫荧光染色** 首先灌注取材,取出脊髓后4%多聚甲醛固定24 h,转入30%蔗糖溶液中脱水24 h,然后冰冻包埋后切片,厚度为10  $\mu$ m,置于37  $^{\circ}$ C烘箱中烘烤1 h,后使用PBS复水5 min,加入封闭

液封闭1 h,然后孵育一抗,置于湿盒中4  $^{\circ}$ C过夜,所用一抗为5-HT、 $\beta$ -III-tublin和GFAP。第2天将湿盒取出常温复温1 h后用TBST洗3次,每次10 min,避光常温孵育二抗1 h。孵育完成后使用TBST洗3次,每次10 min,甘油封片后显微镜下观察。

**1.6 统计学分析** 所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。通过GraphPad Prism 7 软件进行统计分析,并使用Student's *t* 检验进行成对比较。使用带有Tukey事后检验的Two-way ANOVAs 分析确定行为学分析中的显著差异,包括重复的数据。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 SCDEs 鉴定** 本研究选用透射电子显微镜来观测外泌体双层囊膜超微结构。结果显示,SCDEs的直径范围为40~100 nm,证实已经分离出SCDEs(图1)。

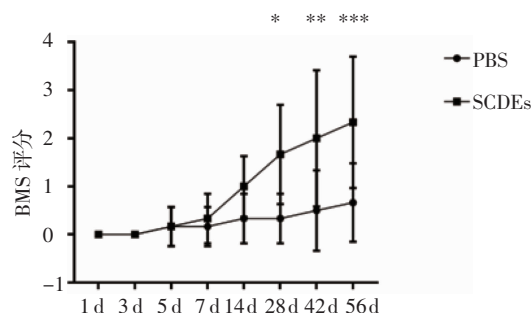


注:比例尺:左图500 nm,右图100 nm

图1 SCDEs 鉴定

Fig 1 Identification of SCDEs

**2.2 BMS 评分** 对于体内实验,本研究评估了SCI后使用PBS和使用SCDEs治疗第1、3、5、7、14、28、42及56天的小鼠的恢复情况。通过对小鼠后肢运动功能评价,本研究发现在SCDEs治疗组和PBS治疗组小鼠的BMS评分之间存在统计学上显著的时间依赖性变化,第28天 $P < 0.05$ ,第42天 $P < 0.01$ ,第56天 $P < 0.001$ 。该发现表明,SCDEs改善了SCI后运动功能的恢复(图2)。



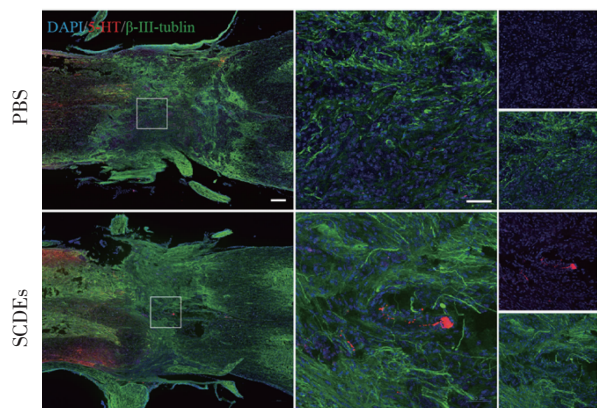
注:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n = 6$

图2 BMS 评分

Fig 2 BMS score



**2.3 SCDEs 促进 SCI 后的神经保护** 为了研究 SCDEs 是否能够促进 SCI 后的神经保护,本研究在小鼠损伤部位检测了 5-HT 和  $\beta$ -III-tubulin 的表达水平。免疫荧光的结果表明,SCI 后,和 PBS 处理组相比,SCDEs 治疗组的 5-HT 标记的神经递质向下传递增多,同时  $\beta$ -III-tubulin 标记的神经在损伤区的分布密度增加而且损伤部位两侧正常神经结构的距离缩短(图 3)。

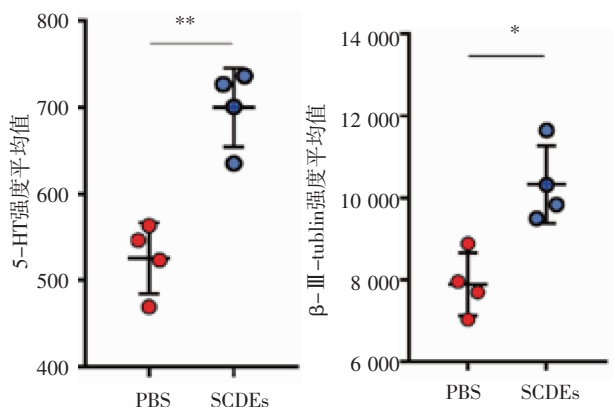


注:比例尺:左边 200  $\mu$ m,中间、右边放大后 50  $\mu$ m

图 3 SCDEs 对 SCI 后神经保护的影响

Fig 3 Effects of SCDEs on neuron protection after SCI

**2.4 SCDEs 促进 SCI 后神经保护的定量分析** 定量分析的结果表明,和 PBS 处理组相比,SCDEs 治疗组的 5-HT 和  $\beta$ -III-tubulin 含量增高且差异具有统计学意义(图 4,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。

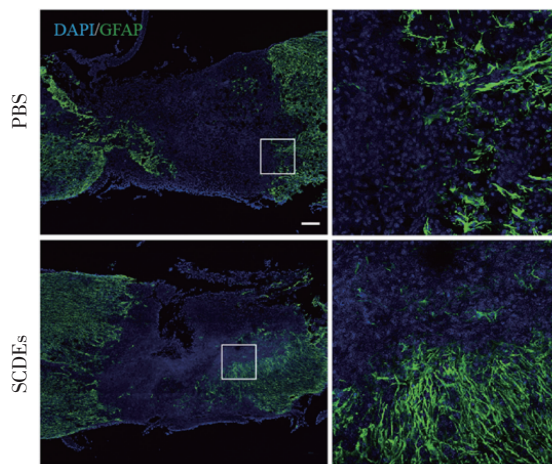


注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 4 SCDEs 对 SCI 后神经保护的定量分析

Fig 4 Quantitative data of SCDEs induced neuron protection after SCI

**2.5 SCDEs 治疗增加 SCI 后胶质瘢痕的形成** 为探索 SCDEs 促进神经学功能恢复的机制,通过检测 GFAP 表达水平来观察胶质瘢痕的变化情况,免疫荧光的数据显示,与 PBS 组相比,SCDEs 组胶质瘢痕表达增加,并且生长密度和延伸趋势明显(图 5)。

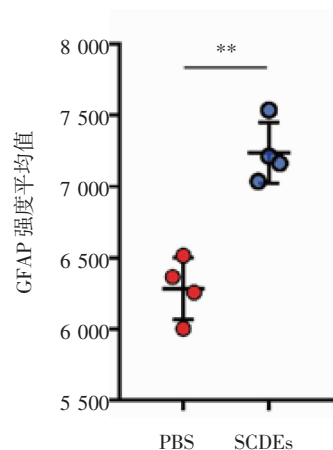


注:比例尺 200  $\mu$ m

图 5 SCDEs 对胶质瘢痕形成的影响

Fig 5 Effects of SCDEs on glial scar formation

**2.6 SCDEs 治疗增加 SCI 后胶质瘢痕形成的定量分析** 定量分析的结果表明,与 PBS 组相比,SCDEs 组胶质瘢痕表达增加,差异具有统计学意义(图 6)。



注: \*\* $P < 0.01$

图 6 SCDEs 对胶质瘢痕形成影响的定量分析

Fig 6 Quantitative data of SCDEs affected glial scar formation

### 3 讨论

本研究通过提取原代雪旺细胞并从其培养上清中超速离心出 SCDEs,与 PBS 组相比,SCDEs 组小鼠的行为学功能改善,神经学功能指标具有显著性改善,同时胶质瘢痕形成增加。以上结果表明,SCDEs 可以通过影响胶质瘢痕的形成,从而增加神经元的存活和修复小鼠脊髓损伤。

在周围神经系统中,轴突在神经损伤后有效地再生,雪旺细胞在其中发挥重要作用<sup>[15]</sup>,而在中枢神经系统中,由于神经元固有的局限性和限制再生的纤维瘢痕,再生能力差<sup>[16]</sup>。最近,有研究表明 SCDEs 包含 mRNA、miRNA 和蛋白质,并在体外和体内增

强轴突再生<sup>[17-18]</sup>。此外,该研究还证明,p75NTR 存在于 SCDEs 中,是一种前体再生的蛋白质。该蛋白在去分化的雪旺细胞中高表达,在病变区域丰富,并且 p75NTR 通过 RhoA 来调节生长锥状丝状伪足<sup>[14]</sup>。因此 SCDEs 的神经保护作用越来越受到关注。但是真正将 SCDEs 应用于中枢神经损伤治疗的研究屈指可数,本研究使用超速离心法分离出 SCDEs 进行小鼠脊髓损伤治疗,观察到 SCDEs 具有神经保护作用,并可恢复小鼠行为学功能,由于 SCDEs 获取相对比较困难,耗时间且成本投入高,所以如何更快更好的获取足量的 SCDEs 可能是临床转化中一个非常重要的限制因素。

近年来,对于胶质瘢痕的作用褒贬不一,之前很多学者认为胶质瘢痕在 SCI 后更多的扮演一个物理阻隔的作用,限制了轴突的再生和神经元的存活,而目前越来越多的研究显示,胶质瘢痕主要由星形胶质细胞、少突胶质细胞等构成,这些细胞本身就是构成轴突和支撑神经元的重要胶质细胞,所以它们的存在可以促进轴突的再生和神经元的存活<sup>[19-20]</sup>。本研究发现胶质瘢痕可以受到 SCDEs 的激活而表达增多,从而促进脊髓损伤后运动功能以及神经学功能的修复,但是 SCDEs 如何影响胶质瘢痕形成的机制还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] McDonald J W, Sadowsky C. Spinal-cord injury[J]. Lancet, 2002, 359(9304):417
- [2] Holmes D. Spinal-cord injury: spurring regrowth[J]. Nature, 2017, 552(7684):S49
- [3] Kucera K L, Yau R K, Register-Mihalik J, et al. Traumatic brain and spinal cord fatalities among high school and college football players—united states, 2005–2014 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2017, 65(52):1465
- [4] Stower H. Cell therapy for spinal cord injury[J]. Nat Med, 2018, 24(8):1088
- [5] Chhabra H S, Sarda K. Clinical translation of stem cell based interventions for spinal cord injury – Are we there yet?[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017(120):41
- [6] Mothe A J, Tator C H. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury[J]. J Clin Invest, 2012, 122(11): 3824
- [7] Fang X, Zhang C, Zhang C, et al. Reactivation of denervated schwann cells by embryonic spinal cord neurons to promote axon regeneration and remyelination[J]. Stem Cells Int, 2019, (2019):7378594
- [8] Fu X M, Wang Y, Fu W L, et al. The combination of adipose-derived schwann-like cells and acellular nerve allografts promotes sciatic nerve regeneration and repair through the JAK2/STAT3 signaling pathway in rats[J]. Neuroscience, 2019, (422):134
- [9] Mousavi M, Hedayatpour A, Mortezaee K, et al. Schwann cell transplantation exerts neuroprotective roles in rat model of spinal cord injury by combating inflammasome activation and improving motor recovery and remyelination[J]. Metab Brain Dis, 2019, 34(4):1117
- [10] Marquardt L M, Doullames V M, Wang A T, et al. Designer, injectable gels to prevent transplanted Schwann cell loss during spinal cord injury therapy[J]. Sci Adv, 2020, 6(14): eaaz1039
- [11] Yang B, Chen Y, Shi J. Exosome biochemistry and advanced nanotechnology for next-generation theranostic platforms[J]. Adv Mater, 2019, 31(2): e1802896
- [12] Hyder A A, Wunderlich C A, Puvanachandra P, et al. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective[J]. NeuroRehabilitation, 2007, 22(5):341
- [13] Lopez-Verrilli M A, Picou F, Court F A. Schwann cell-derived exosomes enhance axonal regeneration in the peripheral nervous system[J]. Glia, 2013, 61(11):1795
- [14] Aryani A, Denecke B. Exosomes as a nanodelivery system: a key to the future of neuromedicine?[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 818
- [15] Marklund N, Bakshi A, Castelbuono D J, et al. Evaluation of pharmacological treatment strategies in traumatic brain injury [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(13):1645
- [16] Blesch A, Tuszynski M H. Spinal cord injury: plasticity, regeneration and the challenge of translational drug development[J]. Trends Neurosci, 2009, 32(1):41
- [17] Filbin M T. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(9):703
- [18] Court F A, Coleman M P. Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli[J]. Trends Neurosci, 2012, 35(6):364
- [19] Lopez-Verrilli M A, Court F A. Transfer of vesicles from schwann cells to axons: a novel mechanism of communication in the peripheral nervous system[J]. Front Physiol, 2012, (3):205
- [20] Klingeborn M, Dismuke W M, Bowes Rickman C, et al. Roles of exosomes in the normal and diseased eye [J]. Prog Retin Eye Res, 2017(59): 158

(2020-03-25 收稿)