

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.03.0222

论著

骨髓间充质干细胞外泌体抑制氧化应激治疗骨质疏松症的实验研究

周丽芸¹, 王岩², 董本超², 杨培川², 李光², 马剑雄², 马信龙²

(1.天津医科大学骨科临床学院, 天津 300012; 2.天津市骨科研究所, 天津市生物力学重点实验室, 天津大学天津医院, 天津 300050)

摘要 目的:探究骨髓间充质干细胞(BMSCs)衍生的外泌体(BMSCs-EXO)治疗骨质疏松症的相关机制。方法:分离并鉴定BMSCs,收集BMSCs上清,提取并鉴定BMSCs-EXO;体外实验采用MC3T3-E1细胞诱导为骨质疏松细胞模型,使用外泌体进行治疗;CCK-8实验和 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色评估细胞增殖与衰老;检测细胞活性氧簇(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA);碱性磷酸酶(ALP)染色和茜素红染色(ARS)观察细胞成骨分化和矿化;Western印迹检测细胞氧化应激和成骨分化相关蛋白;将30只雄性C57BL/6J小鼠通过随机数字表法分为3组:对照组(CON组, $n=10$),骨质疏松组(D-gal组, $n=10$),外泌体治疗组(EXO组, $n=10$);micro-CT分析骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)和骨小梁分离度(Tb.Sp)相关指标;HE染色评估治疗效果。结果:成功提取并鉴定BMSCs-EXO;细胞实验结果显示,与CON组相比,D-gal组SA- β -gal($t=5.506, P<0.001$)、ROS($t=15.11, P<0.0001$)、MDA水平显著升高($t=3.356, P<0.01$),SOD活性显著降低($t=4.071, P<0.05$),核因子E2相关因子2(Nrf-2)、血红素氧合酶(HO)-1蛋白表达显著降低($t=4.503, 3.783$, 均 $P<0.05$),ALP和ARS较浅,Runt相关转录因子2(RUNX2)、骨桥蛋白(OPN)蛋白表达水平显著降低($t=3.721, 3.376$, 均 $P<0.05$);与D-gal组相比,经EXO治疗后,SA- β -gal($t=3.083, P<0.05$)、ROS($t=6.254, P<0.001$)、MDA($t=2.519, P<0.01$)水平显著降低,Nrf-2、HO-1蛋白表达水平显著升高($t=6.997, 3.649$, 均 $P<0.05$),ALP阳性面积和ARS钙结节沉淀面积显著增加($t=7.912, 12.76$, 均 $P<0.001$),RUNX2、OPN蛋白表达水平显著升高($t=5.731, 3.539$, 均 $P<0.01$);在动物实验中,与D-gal组相比,EXO组BV/TV、Tb.N、Tb.Th显著增加($t=2.815, 4.387, 5.497$, 均 $P<0.05$),Tb.Sp显著减少($t=2.862, P<0.05$),骨小梁面积显著增加($t=4.209, P<0.01$)。结论:BMSCs-EXO通过Nrf-2/HO-1信号通路缓解氧化应激,减轻D-gal对MC3T3-E1细胞成骨分化的抑制作用,抑制骨质疏松。

关键词 骨髓间充质干细胞;外泌体;衰老;成骨分化;氧化应激

中图分类号 R683

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)03-0222-09

Experimental study on the inhibition of oxidative stress by bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes for the treatment of osteoporosis

ZHOU Liyun¹, WANG Yan², DONG Benchao², YANG Peichuan², LI Guang², MA Jianxiong², MA Xinlong²

(1.Clinical School/College of Orthopedics, Tianjin Medical University, Tianjin 300012, China; 2.Orthopedic Institute, Tianjin Key Laboratory of Orthopedic Biomechanics and Medical Engineering, Tianjin University (Tianjin Hospital), Tianjin 300050, China)

Abstract Objective: To explore the therapeutic mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes (BMSCs-EXO) in osteoporosis treatment. **Methods:** BMSCs were isolated and identified, BMSCs supernatant was collected, and BMSCs-EXO were extracted and identified. *In vitro*, MC3T3-E1 cells were induced into osteoporosis cell model and treated with exosomes. Cell proliferation and senescence were evaluated by CCK-8 assay and β -galactosidase (SA- β -gal) staining. Reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were detected. Alkaline phosphatase (ALP) staining and Alizarin Red S (ARS) staining were used to observe osteogenic differentiation and mineralization of the cells. Western blotting was used to detect the proteins related to oxidative stress and osteogenic differentiation. Thirty male C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups: control group (CON, $n=10$), osteoporosis group (D-gal, $n=10$), exosome treatment group (EXO, $n=10$). Bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N) and trabecular separation (Tb.Sp) related indexes were analyzed by micro-CT, and HE staining was used to evaluate the therapeutic effect. **Results:** BMSCs-EXO were successfully extracted and identified. The results of cell experiments showed that compared with the CON group, the levels of SA- β -gal ($t=5.506, P<0.001$), ROS ($t=15.11, P<0.0001$) and MDA ($t=3.356, P<0.01$), in the D-gal group were significantly increased and the activity of SOD was significantly decreased ($t=4.071, P<0.01$). The protein expressions of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf-2) and heme oxygenase (HO)-1 were significantly decreased ($t=4.503,$

基金资助 国家重点研发计划(2022YFC3601900);天津市自然科学基金重点项目(22JCZDJC00340);天津市卫生健康科技项目(TJWJ2022QN053)

作者简介 周丽芸(1999-),女,硕士在读,研究方向:骨质疏松;通信作者:马剑雄, E-mail: yjswtg@126.com。

3.783, both $P < 0.05$), the staining of ALP and ARS was lighter, and the protein expression levels of RUNX2 and OPN were significantly decreased ($t = 3.721, 3.376$, both $P < 0.05$). Compared with the D-gal group, the levels of SA- β -gal ($t = 3.083, P < 0.05$), ROS ($t = 6.254, P < 0.001$) and MDA ($t = 2.519, P < 0.01$) were significantly decreased after EXO treatment. The protein expression levels of Nrf-2 and HO-1 were significantly increased ($t = 6.997, 3.649$, both $P < 0.05$), ALP positive area and ARS calcium nodule precipitation area were significantly increased ($t = 7.912, 12.76$, both $P < 0.001$). The protein expression levels of RUNX2 and OPN were significantly increased ($t = 5.731, 3.539$, both $P < 0.01$). In animal experiments, BV/TV, Tb.N and Tb.Th were significantly increased ($t = 2.815, 4.387, 5.497$, all $P < 0.05$), Tb.Sp was significantly decreased ($t = 2.862, P < 0.05$), and trabecular bone area was significantly increased ($t = 4.209, P < 0.01$) in EXO group compared with D-gal group. **Conclusion:** BMSCs-EXO alleviates oxidative stress through Nrf-2/HO-1 signaling pathway, alleviates the inhibitory effect of D-gal on osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells, and reduces osteoporosis.

Key words bone marrow mesenchymal stem cells; exosomes; aging; osteogenic differentiation; oxidative stress

老年性骨质疏松症(SOP)是临床常见的退行性疾病,主要表现为与年龄相关的骨质流失、骨微结构破坏和骨再生能力受损等典型特征^[1-3]。研究表明,氧化应激与SOP密切相关,活性氧簇(ROS)水平升高会引起DNA损伤,导致细胞衰老和凋亡,最终阻碍成骨细胞分化。抗氧化与氧化应激间的不平衡是导致骨质疏松症的重要原因。尽管目前已有多种抗骨质吸收药物治疗SOP,但常伴有不良反应,如颌骨坏死和激素性股骨头坏死等^[4-6]。骨髓间充质干细胞(BMSCs)衍生的外泌体(BMSCs-EXO)含有DNA、micro-RNA、蛋白质等生物活性物质,其不仅可以调节破骨细胞和成骨细胞之间的骨代谢稳态,还可通过减少氧化损伤和炎症来增强抗氧化能力,从而在抑制炎症和调节骨稳态方面显示出独特作用。近期研究发现,BMSCs-EXO可以通过激活核因子E2相关因子2(Nrf-2)/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路以增加HO-1的表达,保护成骨细胞免受氧化应激影响。然而,BMSCs-EXO在SOP中的具体作用机制尚不明确。本研究旨在对此进行研究,以期干细胞外泌体治疗SOP提供新的见解。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 α -MEM基础培养基、胎牛血清(Gibco,美国);无外泌体胎牛血清(SBI,美国);ROS活性检测试剂盒、SA- β -半乳糖苷酶检测试剂盒、DCFH-DA试剂盒(碧云天,中国);BCA蛋白浓度检测试剂盒、Ficoll密度梯度分离液(索莱宝,中国);CD45、CD90、CD29(Biolegend,美国);Runt相关转录因子2(RUNX2)、骨桥蛋白(OPN)、山羊抗鼠二抗、山羊抗兔二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,中国);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成,中国);GAPDH(塞维尔,中国);Nrf-2和HO-1(ABclonal,美国);苏木精-伊红染色(索莱宝,中国);倒置光学显微镜(OLYMPUS,日本);倒置荧光显微镜(赛默飞,美国);透射电镜(日立HT7700,日本);超速离心机(Thermo,美国);纳米分

析系统(Malvern,英国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 采用天津医院实验动物中心的SPF级雄性C57BL/6J小鼠(4周龄)和C57BL/6J小鼠(18周龄),分别用于提取原代BMSCs和外泌体注射治疗。在自然光照、室温25℃左右,相对湿度55%左右饲养,自由饮食,所有动物实验均获得天津市天津医院实验动物伦理委员会批准(伦理号:2022YLS128),生产许可证编号:SYXK(津)2020-0007,动物批号:No.111251241100159264。

1.2.2 BMSCs的提取培养 将C57BL/6J(4周龄)小鼠经脱颈处死后,无菌环境下收集股骨和胫骨。使用眼科镊子剪开骨骼两端,以5 mL注射器抽取含10%FBS的完全培养基冲洗骨髓至清亮。将骨髓液缓慢叠加于Ficoll分离液上方,1 600 r/min离心30 min,吸取中间乳白色层至新管,加入完全培养基重悬吹打至单细胞悬液,接种于培养瓶,置入37℃、5%CO₂培养箱内培养,第2天进行半换液,待细胞完全贴壁后,全换液。

1.2.3 流式细胞仪检测 BMSCs表面标志蛋白 将BMSCs传至第3代,胰酶消化得到单细胞悬液,加CD45(1:80)、CD29(1:80)、CD90(1:80)抗体及相同稀释比例的同型对照抗体,避光孵育30 min。1 000 r/min离心5 min,洗涤两次,用500 μ L PBS重悬后上机检测,设置阴性对照。

1.2.4 BMSCs-EXO提取与鉴定 待BMSCs细胞融合70%~80%时更换为无外泌体血清培养基培养48 h,收集上清至离心管中,将所收集的上清通过超速差速离心法离心,离心条件如下:300 \times g,10 min;2 000 \times g,10 min;10 000 \times g,30 min;120 000 \times g,90 min。所获沉淀即为外泌体。使用0.22 μ m的针式滤器去除细菌,置于-80℃保存。使用透射电子显微镜(TEM)观察外泌体形态,纳米粒度分析技术(NTA)检测外泌体平均粒径,提取外泌体蛋白,4℃条件下,一抗孵育过夜(TSG101:1:1 000;CD63:1:1 000),

室温条件下,二抗孵育(Goat anti-Mouse IgG:1:10 000)60 min,利用化学发光凝胶成像系统曝光条带并拍照。

1.2.5 外泌体的摄取实验 将 MC3T3-E1 细胞在含有 10% PBS 和 1% 青霉素/链霉素的 α -MEM 中培养,然后以 1×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中,按照生产商的说明将 PKH67 标记后的外泌体与 MC3T3-E1 细胞共培养 24 h 后,吸除培养基并冲洗固定,加入含 DAPI 的防荧光封片淬灭剂,在倒置荧光显微镜观察 MC3T3-E1 细胞对外泌体的摄取情况。

1.2.6 细胞培养和分组 将 MC3T3-E1 细胞在含有 10% PBS 和 1% 青霉素/链霉素的 α -MEM 中培养,将细胞分为对照组(CON 组, $n=3$),骨质疏松组(D-gal 组, $n=3$),外泌体治疗组(EXO 组, $n=3$)。CON 组不做任何处理,D-gal 组使用 20 g/L D-gal 诱导 MC3T3-E1 细胞衰老模型,EXO 组使用外泌体干预 D-gal 诱导的衰老模型治疗 24 h,随后进行后续相关实验。

1.2.7 CCK-8 检测 将 MC3T3-E1 细胞以 2×10^3 个/孔的密度接种在 96 孔板中,通过设置不同浓度梯度的 D-gal(0、10、20、30、40 g/L)处理 48 h。每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液在培养基孵育 0.5~1 h 后,于 450 nm 处测定其 OD 值。

1.2.8 SA- β -gal 染色 PBS 洗涤 MC3T3-E1 细胞,随后与 SA- β -gal 染色固定剂在室温下孵育 15 min,去除细胞固定剂,用 SA- β -gal 染色工作液对细胞进行染色,并在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。然后在光学显微镜下观察蓝染色阳性细胞数量,并用 Image J 软件进行分析。

1.2.9 DCFH-DA 染色 使用 DCFH-DA 检测试剂盒评估细胞内 ROS 水平,将 MC3T3-E1 细胞与荧光探针 2',7'-二氯荧光素-二乙酸酯(DCFH-DA)在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 30 min,随后使用荧光显微镜捕获图像。

1.2.10 MDA 含量和 SOD 活性检测 收集细胞蛋白上清液用于评估 MDA 和 SOD 活性,使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,随后使用相应的检测试剂盒检测 SOD 和 MDA 活性。

1.2.11 细胞活/死染色 用 PBS 洗涤 MC3T3-E1 细胞,然后按照制造商的说明使用钙黄绿素-AM/PI 双染色试剂盒染色。在普通倒置荧光显微镜下观察到显示绿色荧光的活细胞和以红色荧光标记的死细胞。使用 Image J 软件分析图像。

1.2.12 鬼笔环肽染色 使用 4% 多聚甲醛溶液固定 MC3T3-E1 细胞 30 min,并用 0.1% Triton-X 透

化 10 min。PBS 洗涤后,在 37 $^{\circ}$ C 黑暗中用鬼笔环肽溶液染色过夜。细胞核用 DAPI 染色 5 min,使用普通荧光显微镜观察染色情况。

1.2.13 碱性磷酸酶(ALP)染色和茜素红染色观察细胞成骨分化和矿化 细胞融合至 70%左右时,加入成骨诱导培养基诱导 14、21 d,分别进行 ALP 染色和茜素红染色。按照制造商说明书将细胞进行适当固定之后,将 ALP 染色工作液或茜素红染色工作液加入到细胞培养板中,并将细胞在室温下避光孵育过夜。随后,弃去染色工作液,用 PBS 洗涤,然后使用光学显微镜观察。

1.2.14 Western 印迹检测 加入含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的裂解液提取细胞蛋白。使用 10% SDS-PAGE 分离 30 μ g 蛋白质转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶封闭 2 h,在 4 $^{\circ}$ C 条件下与一抗 RUNX2(1:1 000)、OPN(1:1 000)、Nrf-2(1:1 000)、HO-1(1:2 000)、GAPDH(1:2 000)、Actin(1:2 000)孵育过夜。次日,TBST 洗涤膜 3 次,室温下与山羊抗兔二抗(1:20 000)和山羊抗鼠二抗(1:2 000)孵育 1 h,洗涤后用增强型化学发光试剂进行检测成像。

1.2.15 动物分组 将 C57BL/6J 小鼠(18 周)饲养在通风的笼子里,12 h 光-暗循环,可自由获取食物和水。按照随机数字法将小鼠随机分为 3 组,每组 10 只:CON 组、D-gal 组[1 400 mg \cdot (kg \cdot d)]、D-gal 与 BMSCs-EXO 联合组。D-gal 组每周注射 5 d,连续注射 8 周。外泌体组每只小鼠尾静脉注射 100 μ g BMSCs-EXO。每周注射 3 次,连续注射 4 周后,收集不同组小鼠的股骨。

1.2.16 Micro-CT 扫描 使用 Venus Micro CT 仪器对小鼠左侧股骨皮质和骨小梁进行扫描,扫描参数设置为:电压 80 kV,电流 0.12 mA,扫描精度 6 μ m;使用 Cruiser、Recon、Avatar 软件进行数据采集、重建、图像呈现。对骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨体积分数(TV/BV)、骨小梁分离度(Tb.Sp)进行定量分析。

1.2.17 HE 染色 将小鼠股骨在 4%多聚甲醛中固定 48 h 后,脱钙两周。将组织用石蜡包埋,厚度为 5 μ m。组织切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,进行 HE 染色,脱水透明中性树胶封片后,显微镜下观察组织病理学改变,使用 Image J 软件测量骨小梁面积占总面积的比值,以评估骨量。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.0 进行统计分析处理及绘图,符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两独立

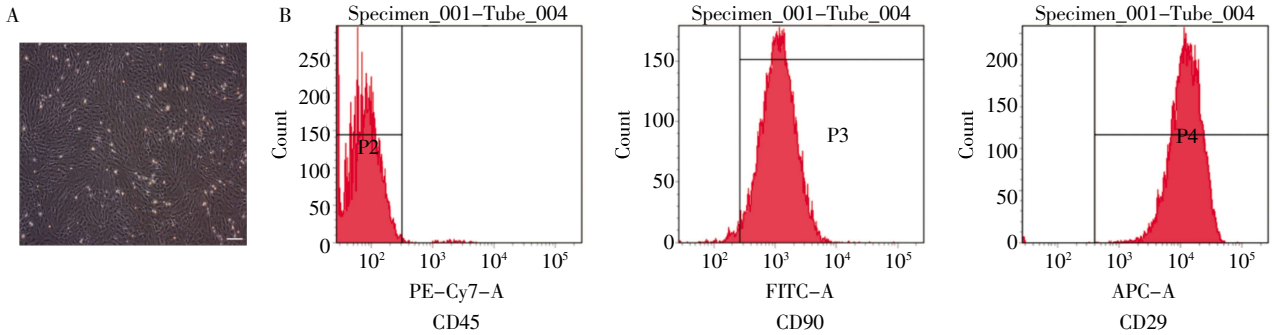
样本比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 鉴定结果 通过密度梯度分离方法提取小鼠 BMSCs, P3 细胞呈贴壁生长, 形态呈现梭形

(图 1A)。流式细胞仪检测显示 BMSCs 表面标志蛋白 CD29、CD90 阳性表达率 >95%, CD45 表达率低于 2%(图 1B)。

2.2 BMSCs-EXO 鉴定和摄取 TEM 结果显示



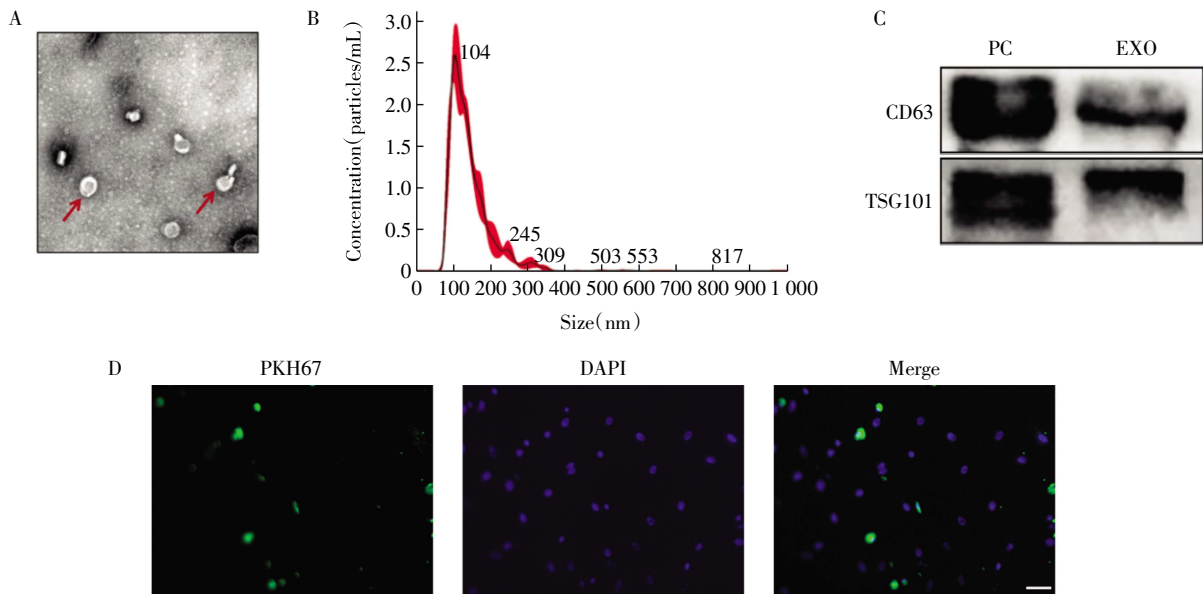
注:A:第 3 代骨髓间充质干细胞的形态观察($\times 40$);B:流式细胞术检测骨髓间充质干细胞表面抗原 CD45、CD90、CD29 表达

图 1 骨髓间充质干细胞鉴定结果

Fig.1 Results of bone mesenchymal stem cells characterization

BMSCs-EXO 呈现外泌体典型特征双层膜的杯状结构(图 2A)。NTA 结果显示 BMSCs-EXO 平均粒径为 104 nm 左右(图 2B)。Western 印迹结果显示 CD63 和 TSG101 呈阳性表达(图 2C)。为了观察 MC3T3-E1

对 BMSCs-EXO 摄取情况,用 PKH67 标记 BMSCs-EXO 后,进一步与 MC3T3-E1 共培养 24 h,发现 PKH67 标记的 BMSCs-EXO 位于 MC3T3-E1 内,并聚集在细胞核附近(图 2D)。



注:A:TEM 检测外泌体典型形态(比例尺:200 nm);B:NTA 检测结果显示外泌体的平均粒径为 104 nm;C:Western 印迹检测外泌体表面标志蛋白 CD63、TSG101 呈阳性表达;D:DAPI 染色将成骨细胞核标记为蓝色,PKH67 将 BMSCs-EXO 标记为绿色,图像融合后显示外泌体出现在成骨细胞核周围的细胞质中(比例尺:100 μm);PC:阳性对照

图 2 骨髓间充质干细胞外泌体表征鉴定及 MC3T3-E1 细胞对外泌体的摄取

Fig.2 Identification of BMSCs-EXO characterization and exosomes were taken up by MC3T3-E1 cells

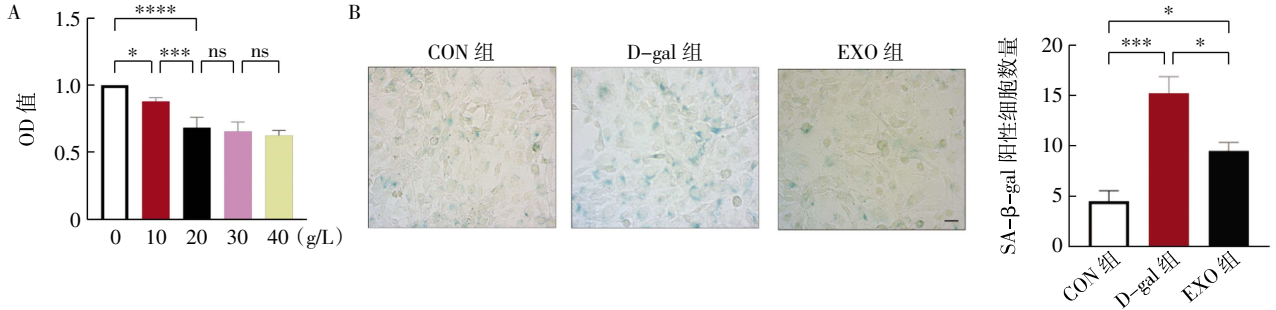
2.3 外泌体缓解 D-gal 诱导的成骨细胞衰老 利用 CCK8 实验检测不同浓度 D-gal 对 MC3T3-E1 细胞的影响,CCK-8 测定结果显示 MC3T3-E1 细胞暴露在 20 g/L 的 D-gal 48 h 后增殖活性显著降低($t = 8.234, P < 0.0001$, 图 3A)。后续采用 20 g/L 浓度的 D-gal 进行干预。SA- β -gal 染色结果显示,与 CON

组相比,D-gal 组 SA- β -gal 阳性细胞数量显著增加($t = 5.506, P < 0.001$);与 D-gal 组相比,EXO 组 SA- β -gal 阳性细胞数量显著减少($t = 3.083, P < 0.05$,图 3B)。

2.4 成骨细胞抗氧化能力的检测结果 DCFH-DA 染色结果显示,与 CON 组相比,D-gal 组荧光强度明显增强,提示 ROS 水平显著升高($t = 15.11, P < 0.0001$);

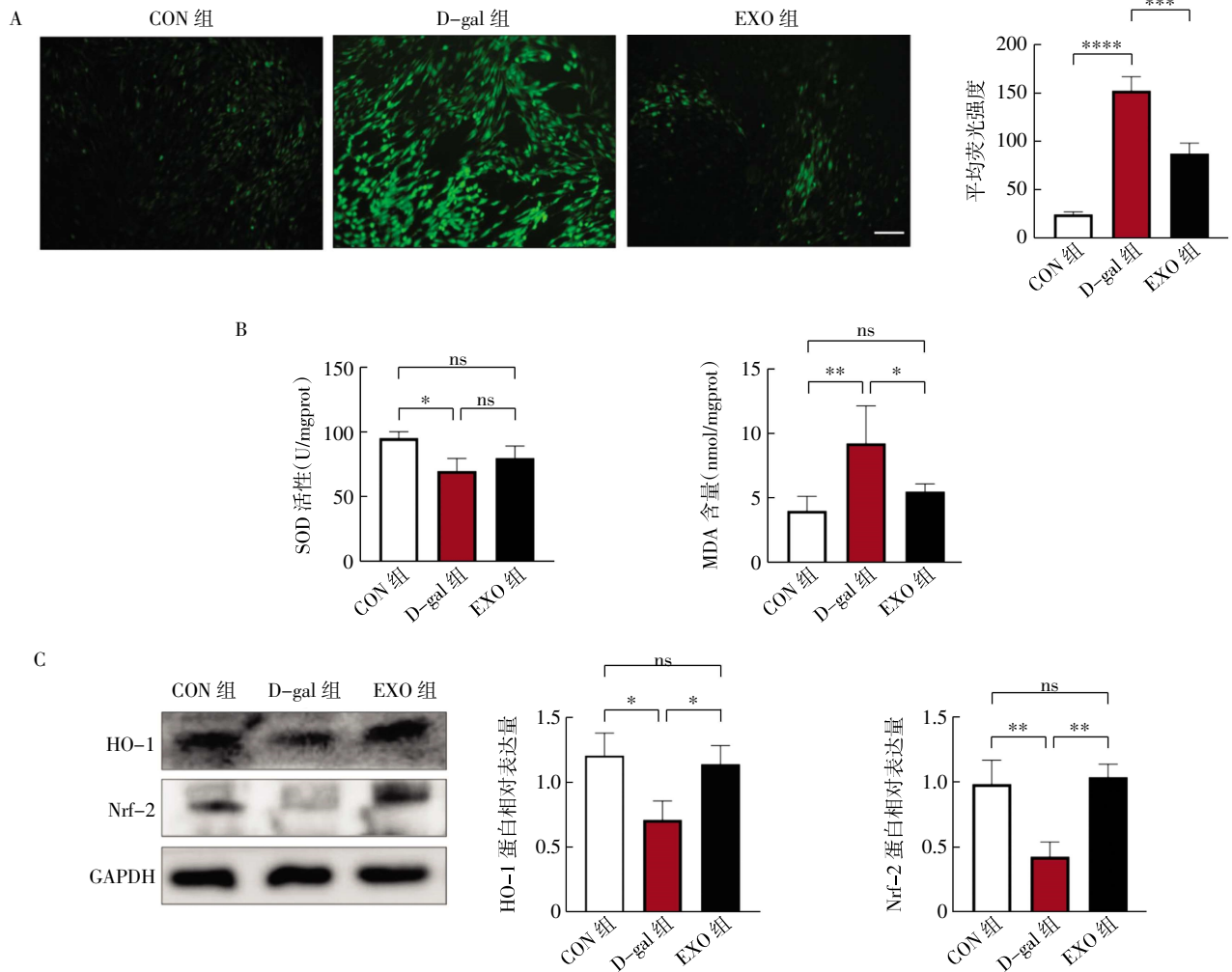
与 D-gal 组相比,EXO 组细胞内荧光强度下降($t=6.254, P<0.001$),见图 4A)。此外,与 CON 组相比,D-gal 组 SOD 含量显著降低($t=4.071, P<0.05$),MDA 水平显著升高($t=3.356, P<0.01$);与 D-gal 组相比,EXO 组 MDA 水平显著降低($t=2.519, P<0.01$),SOD 无显著

性差异(图 4B)。结合 Western 印迹结果显示,与 CON 组相比,D-gal 组细胞内 Nrf-2($t=4.503, P<0.05$)和 HO-1($t=3.783, P<0.01$)蛋白表达水平明显降低,外泌体组 Nrf-2($t=6.997, P<0.05$)和 HO-1($t=3.649, P<0.01$)蛋白表达水平增加(图 4C)。



注:A:不同浓度 D-gal 对成骨细胞增殖活性的影响;B:不同组之间 SA-β-gal 阳性细胞数量的比较(比例尺:100 μm);* $P<0.05$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

图3 SA-β-gal 染色
Fig.3 SA-β-gal staining



注:A:不同组 MC3T3-E1 内 DCFH-DA 染色(比例尺:100 μm);B:不同组细胞内 SOD 和 MDA 水平变化;C:Western 印迹检测不同组细胞内 Nrf-2 和 HO-1 蛋白表达水平的变化;SOD:超氧化物歧化酶;MDA:丙二醛;HO-1:血红素氧合酶-1;Nrf-2:核因子 E2 相关因子-2;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

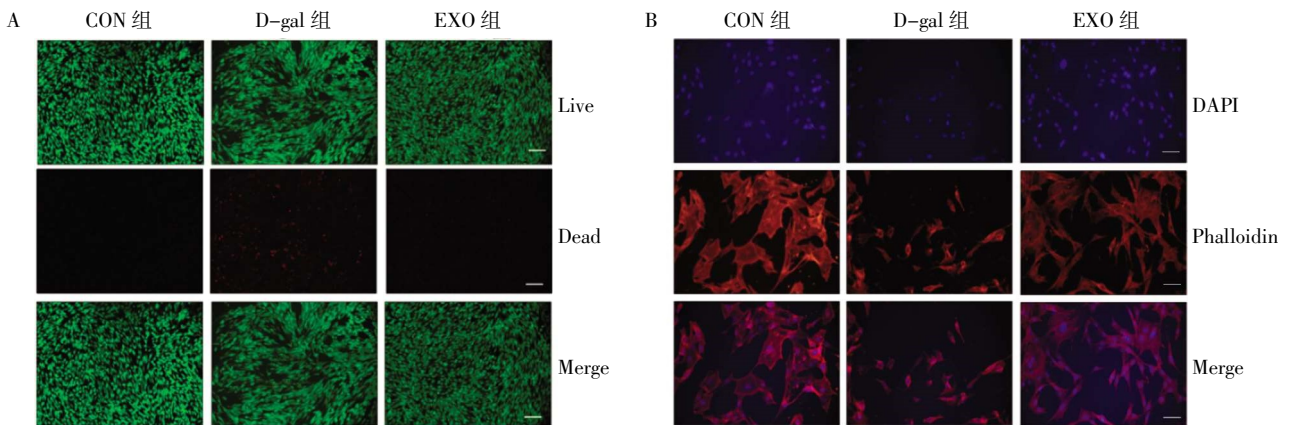
图4 3组间氧化应激指标比较
Fig.4 Comparison of oxidative stress indexes among three groups

2.5 外泌体抑制 D-gal 诱导的成骨细胞骨架破坏 细胞活/死染色显示 D-gal 干预后死细胞数量明显增加,EXO 处理后死细胞数量显著降低(图 5A)。鬼笔环肽染色表明,与 CON 组相比,D-gal 干预破坏了细胞骨架,外泌体处理后,细胞骨架明显恢复,与 CON 组差异性不大(图 5B)。

2.6 外泌体促进成骨细胞分化和矿化 与 CON 组相比,D-gal 组 ALP 相对面积以及矿化结节面积与总面积的比值显著降低($t=7.912, 12.76$, 均 $P<0.001$); EXO 干预后,与 D-gal 组相比,分化和矿化能力显

著增强($t=13.22, P<0.01; t=10.78, P<0.001$)(图 6A)。Western 印迹显示,与 CON 组相比,D-gal 组 RUNX2、OPN 表达降低($t=3.721, 3.376$, 均 $P<0.05$);与 D-gal 相比,EXO 处理后 RUNX2、OPN 蛋白表达水平显著升高($t=5.731, 3.539$, 均 $P<0.01$,图 6B)。

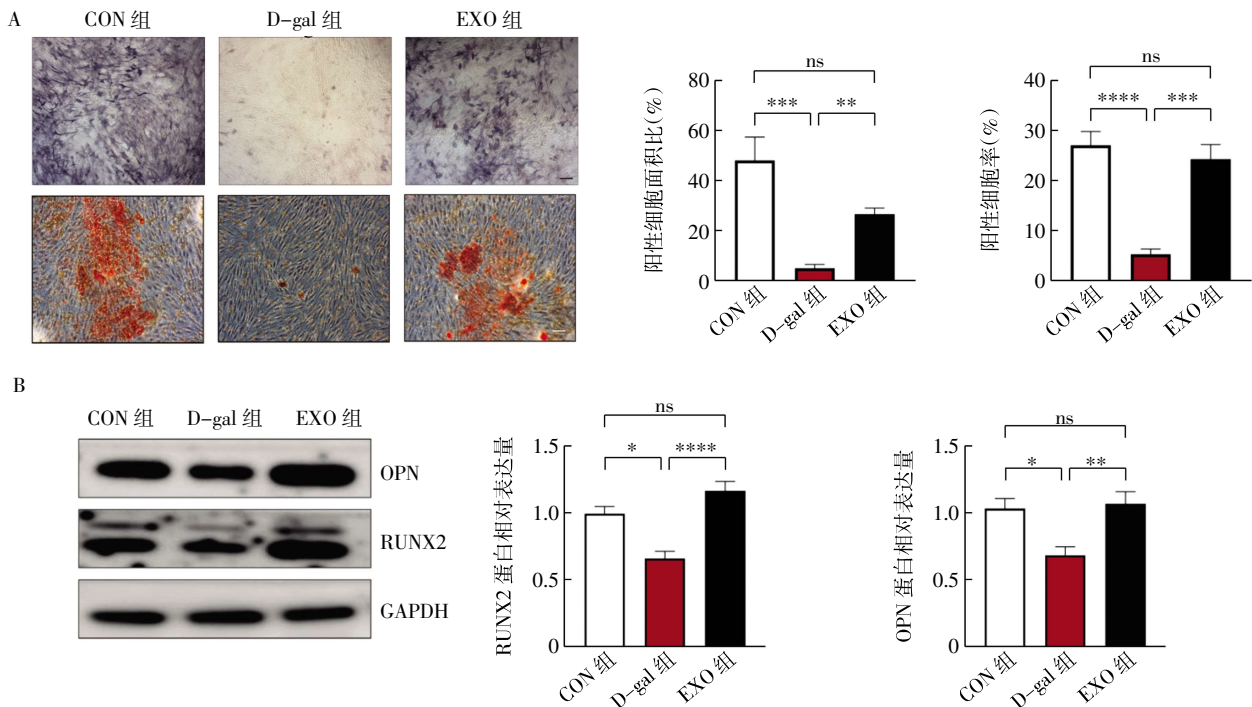
2.7 外泌体抑制衰老小鼠体内骨质流失 Micro-CT 结果表明,与 CON 组相比,D-gal 组股骨 BV/TV 降低($t=4.912, P<0.01$),Tb.N 减少($t=2.902, P<0.05$),Tb.Th 下降($t=5.100, P<0.01$),Tb.Sp 增加($t=3.828, P<0.01$);与 D-gal 组相比,EXO 组 BV/TV、Tb.N、



注:A:不同组存活细胞和死亡细胞染色分析(比例尺:200 μm);B:细胞骨架的鬼笔环肽染色分析(比例尺:100 μm)

图 5 外泌体有利于成骨细胞形态的形成和维持

Fig.5 Exosomes favor the formation and maintenance of osteoblast morphology



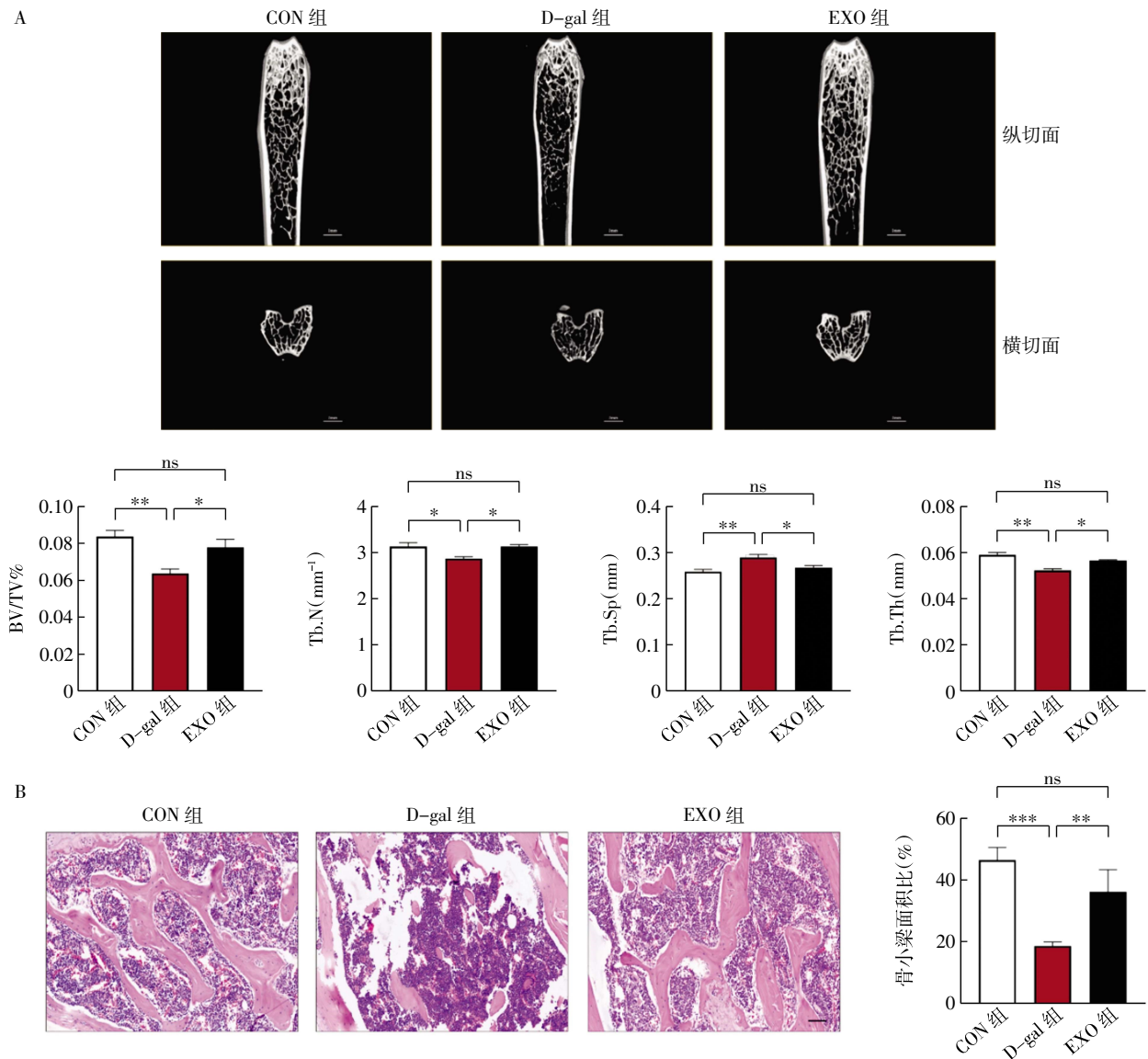
注:A:不同组 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶染色和茜素红染色(比例尺:200 μm);B:Western 印迹检测不同组细胞内 RUNX2 和 OPN 蛋白的表达水平;RUNX2:Runt 相关转录因子 2;OPN:骨桥蛋白;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

图 6 不同组 MC3T3-E1 细胞的分化及矿化情况

Fig. 6 Differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells in different groups

Tb.Th 显著增加($t=2.815, 4.387, 5.497$, 均 $P<0.05$), Tb.Sp 显著降低($t=2.862, P<0.05$, 图 7A)。HE 染色显示, 与 CON 组相比, D-gal 组骨小梁面积与总面

积比值显著降低($t=11.20, P<0.001$); 与 D-gal 组相比, EXO 治疗组骨小梁面积与总面积比值增加($t=4.209, P<0.01$, 图 7B)。



注: A: 外泌体治疗后的 micro-CT 扫描和重建; BV/TV: 骨体积分数; Tb.N: 骨小梁数量; Tb.Sp: 骨小梁间隙; Tb.Th: 骨小梁厚度; B: 不同组小鼠股骨远端 HE 染色 (比例尺: 100 μm); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图 7 外泌体抑制衰老小鼠骨质流失

Fig.7 Exosomes inhibited bone loss in senescent mice

3 讨论

SOP 是一种普遍的与年龄相关的疾病,其特征是骨量减少、骨组织的微结构损伤和骨脆性增加,导致骨折发生率增加^[7]。骨质疏松症的发病机制涉及衰老诱导的氧化应激。近年来, BMSCs-EXO 在骨组织再生修复领域的应用受到广泛关注。最近的研究强调,间充质干细胞衍生的外泌体在减少氧化损伤和减轻炎症方面具有独特作用^[8]。

骨代谢涉及骨形成和骨吸收,成骨细胞和破骨细胞在维持骨平衡方面起着至关重要的作用。衰老

破坏了这种平衡,导致骨骼相关疾病的发生、发展^[9]。据报道, D-gal 诱导的衰老模型和自然衰老模型中的骨流失过程非常相似^[10-11]。因此,本研究利用 D-gal 干预年轻小鼠以诱导过早衰老,评估小鼠骨密度并对股骨样本进行组织学分析,发现 D-gal 诱导的衰老小鼠骨体积分数、骨小梁数量减少,骨小梁结构受损。此外,在诱导衰老模型小鼠的股骨样本中发现成骨分化标志物的表达水平降低,包括 RUNX2、OPN。本研究结果与其他 D-gal 诱导的年龄相关骨质疏松症研究的结果一致^[12]。D-gal 通常用于模拟体

外细胞的衰老,广泛用于氧化应激研究。D-gal 主要通过两种不同途径诱导氧化应激。在第一种途径中,D-gal 通过增强 NADPH 氧化酶活性来增加 ROS 的产生,随后通过半乳糖氧化酶催化的反应生成醛和过氧化氢。另一种途径是在半乳糖还原酶的作用下过量摄入 D-gal 引起的半乳糖醇增加。这种半乳糖醇不能正常代谢,导致数量异常和渗透应激,从而损害抗氧化系统^[13]。本研究通过 CCK-8 实验检测不同浓度 D-gal 干预下的细胞活性,确定了 D-gal 抑制成骨细胞增殖活性的最佳浓度为 20 g/L。先前研究表明,在 D-gal 诱导的动物和细胞衰老模型中,成骨分化受到抑制且抗氧化指标下调,本研究结果与其一致^[14]。本研究还在 D-gal 处理的 MC3T3-E1 细胞中观察到成骨分化和成熟的抑制,此外,细胞氧化应激增加,表现为 ROS、MDA 产生增加,SOD、Nrf-2、HO-1 水平降低。

近些年,BMSCs-EXO 在治疗氧化应激相关疾病中的潜力得到越来越多的关注。先前的研究表明,BMSCs-EXO 通过介导抗氧化系统在治疗实验性结肠炎、心力衰竭、骨关节炎、脊髓损伤、眼部疾病等方面具有潜在的治疗益处^[15-18]。例如,BMSCs-EXO 可促进 Nrf-2 和核转位的增加,增加抗氧化相关蛋白表达,减少 ROS 的产生和细胞凋亡,改善椎间盘退化^[19]。BMSCs-EXO 联合 HA 凝胶可抑制线粒体 ROS 诱导的氧化应激损伤,缓解创伤性骨关节炎^[19]。MDA 是评估氧化应激的可靠生物标志物^[21]。SOD 是一种必需的抗氧化酶,通过催化超氧阴离子歧化成过氧化氢来清除超氧阴离子,然后过氧化氢被分解成水^[22]。Nrf-2 是一种重要的转录因子,通过直接增强各种抗氧化和解毒基因的表达来减轻氧化应激^[23-24]。本研究结果显示,以 20 g/L 浓度的 D-gal 诱导成骨细胞衰老,SA- β -gal 阳性细胞增多,抗氧化相关蛋白(Nrf-2、HO-1)表达降低,伴随着 ROS 产生的增加,SOD 含量的下降、MDA 水平的升高,导致成骨细胞氧化应激增加。外泌体处理后,逆转了 D-gal 诱导的抗氧化指标的抑制,并减少了成骨细胞中 ROS 的细胞内积累。目前已确定氧化应激为导致与年龄相关的骨质流失的重要因素^[25]。抗氧化标志物的抑制和氧化产物的积累会阻碍成骨细胞增殖和分化,促进破骨细胞分化,最终导致骨质流失^[26-27]。本研究结果表明,BMSCs-EXO 可增强抗氧化系统以减轻氧化应激,从而减轻 D-gal 处理的衰老成骨细胞对成骨细胞分化和成熟的抑制作用。但是本研究尚有一定的局限性,未来将侧重于研究外泌体内具体发挥抗氧化作用的物质,并通过体内实验研究外泌体对年龄相关性骨质疏松症的保护作用。

总之,本研究结果表明,BMSCs-EXO 可能通过激活 Nrf-2/HO-1 信号通路增强成骨分化和抗氧化反应,减轻 D-gal 诱导的衰老骨量流失。

参考文献:

- [1] LIANG B, BURLEY G, LIN S, et al. Osteoporosis pathogenesis and treatment: existing and emerging avenues[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2022, 27(1): 72.
- [2] FÖGER-SAMWALD U, KERSCHAN-SCHINDL K, BUTYLINA M M, et al. Age related osteoporosis: targeting cellular senescence[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2701.
- [3] PATEL D, WAIRKAR S. Bone regeneration in osteoporosis: opportunities and challenges[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2023, 13(2): 419-432.
- [4] VEIS D J, O'BRIEN C A. Osteoclasts, master sculptors of bone[J]. *Annu Rev Pathol*, 2023, 18: 257-281.
- [5] NAKAMURA M, AOYAMA N, YAMAGUCHI S, et al. Expression of tartrate-resistant acid phosphatase and cathepsin K during osteoclast differentiation in developing mouse mandibles[J]. *Biomed Res*, 2021, 42(1): 13-21.
- [6] RUSSELL R G. Pharmacological diversity among drugs that inhibit bone resorption[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 22: 115-130.
- [7] WANG J, FANG C L, NOLLER K, et al. Bone-derived PDGF-BB drives brain vascular calcification in male mice[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(23): e168447.
- [8] ZHANG W, WANG T, XUE Y, et al. Research progress of extracellular vesicles and exosomes derived from mesenchymal stem cells in the treatment of oxidative stress-related diseases[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1238789.
- [9] ALEJANDRO P, CONSTANTINESCU F. A review of osteoporosis in the older adult: an update[J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2018, 44(3): 437-451.
- [10] RU M, WANG W, ZHAI Z, et al. Nicotinamide mononucleotide supplementation protects the intestinal function in aging mice and D-galactose induced senescent cells[J]. *Food Funct*, 2022, 13(14): 7507-7519.
- [11] LU S, ZHOU J, YANG C, et al. γ -Glutamylcysteine ameliorates D-gal-induced senescence in PC12 cells and mice via activating AMPK and SIRT1[J]. *Food Funct*, 2022, 13(14): 7560-7571.
- [12] XIA T S, XU S Y, LAI L Y, et al. Bitter acids from humulus lupulus L. alleviate D-galactose induced osteoblastic senescence and bone loss via regulating AKT/mTOR-mediated autophagy[J]. *J Food Drug Anal*, 2024, 32(4): 506-519.
- [13] QU Z, ZHANG J, YANG H, et al. Protective effect of tetrahydropalmitine against D-galactose induced memory impairment in rat[J]. *Physiol Behav*, 2016, 154: 114-125.
- [14] TABARA Y, IKEZOE T, YAMANAKA M, et al. Advanced glycation end product accumulation is associated with low skeletal muscle mass, weak muscle strength, and reduced bone density: the Nagahama Study[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2019, 74(9): 1446-1453.
- [15] HU L, WANG B, FAN Y, et al. Exosomal miR-23b from bone marrow mesenchymal stem cells alleviates oxidative stress and pyroptosis after intracerebral hemorrhage[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18

- (3):560-567.
- [16] YANG H, CHEN J. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes carrying long noncoding RNA ZFAS1 alleviate oxidative stress and inflammation in ischemic stroke by inhibiting microRNA-15a-5p[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(7):2545-2557.
- [17] LI Y, ZHENG J, WANG X, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect trabecular meshwork from oxidative stress[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):14863.
- [18] YANG J, LIU X, FAN H, et al. Extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells protect against experimental colitis via attenuating colon inflammation, oxidative stress and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0140551.
- [19] XU G, LU X, LIU S, et al. MSC-Derived exosomes ameliorate intervertebral disc degeneration by regulating the Keap1/Nrf2 axis[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(7):2465-2480.
- [20] LIU X, CHEN Y, ZHANG T. Mechanism study of BMSC-exosomes combined with hyaluronic acid gel in the treatment of posttraumatic osteoarthritis[J]. *Heliyon*, 2024, 10(14):e34192.
- [21] GHEZZI P. Environmental risk factors and their footprints in vivo – a proposal for the classification of oxidative stress biomarkers[J]. *Redox Biol*, 2020, 34:101442.
- [22] SHENG Y, ABREU I, CABELLI D, et al. Superoxide dismutases and superoxide reductases[J]. *Chem Rev*, 2014, 114(7):3854-3918.
- [23] DE LOS SANTOS-JIMRÉNEZ J, CAMPOS-SANDOVAL J, MÁRQUEZ-TORRES C, et al. Glutaminase isoforms expression switches microRNA levels and oxidative status in glioblastoma cells[J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1):14.
- [24] JIMENEZ R, TORAL M, GÓMEZ-GUZMÁN M, et al. The role of Nrf2 signaling in PPAR β/δ -mediated vascular protection against hyperglycemia-induced oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:5852706.
- [25] CHANDRA A, RAJAWAT J. Skeletal aging and osteoporosis: mechanisms and therapeutics[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7):3553.
- [26] HYEON S, LEE H, YANG Y, et al. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65:789-799.
- [27] HANG Y, ZHONG Z, HOU G, et al. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss[J]. *J Surg Res*, 2011, 169(1):e37-e42.
- (2024-12-05 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语,文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语,请按照如下规则进行缩写:原词过长且在文中出现 3 次以上者,可在第一次出现时写出全称,并在括号内写出缩略语。不超过 5 个汉字的名称不宜使用缩略语,以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机体层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA _{1c}	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织

本刊编辑部