

· 基础研究 ·

RUNX2 基因过表达载体修饰 BMSC 来源外泌体联合碳酸钙支架系统在骨缺损中的应用

赵有顺, 林平, 涂迎春, 安涛, 吴裕平, 李晓飞

(浙江大学附属金华医院 金华市中心医院骨三科, 金华 浙江 321000)

【摘要】 目的:探究 RUNX2 基因过表达载体修饰骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)来源的外泌体联合碳酸钙支架系统在骨缺损中的效果。方法:以兔源 BMSCs 为研究对象,利用流式细胞仪对 BMSCs 进行鉴定。构建 RUNX2 基因过表达载体,利用慢病毒转染 BMSCs,采用超速离心法进行收集外泌体。利用透射电子显微镜观察外泌体的形态,利用 Western blot 法检测外泌体标志物 CD63 分子的表达,利用三室并联自动温控反应系统,构建碳酸钙支架。根据是否转染 RUNX2 基因过表达载体,将 BMSCs 与碳酸钙支架的复合物分成 3 组,即 BMSCs 组, RUNX2 过表达组和外泌体组。利用油红 O 染色和逆转录-聚合酶链反应(reverse-transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 BMSCs 的成骨分化。采购成年健康雄性新西兰大白兔 9 只,清洁级,年龄(12.97±1.21)个月,体质量(19.3±3.6) kg,每组 3 只。利用手术方法构建颅骨缺损动物模型,利用影像学,HE 染色和 Masson 染色评估骨缺损的修复。结果:流式细胞仪检测结果表明,BMSCs 细胞表面 CD29 蛋白表达为 99.5%,CD44 蛋白表达为 100%,CD11b 蛋白表达为 0.1%,CD45 蛋白表达为 0.1%。透射电镜结果显示,外泌体为直径 50~150 nm 的双层膜囊泡状结构。Western blot 结果显示,外泌体的分子标志物 CD63 表达阳性。油红 O 染色结果显示,外泌体组 BMSCs 的成骨分化要明显高于 RUNX2 过表达组和 BMSCs 组。RT-PCR 检测结果显示,外泌体组 BMSCs 的 RUNX2, BMP-2 和碱性磷酸酶的 mRNA 相对表达量要明显高于 RUNX2 过表达组和 BMSCs 组($P<0.05$)。影像学结果显示,外泌体组颅骨缺损修复效果要优于 RUNX2 过表达组。HE 染色和 Masson 染色结果显示,外泌体组颅骨缺损修复效果要优于 RUNX2 过表达组($P<0.05$)。结论:相较于 RUNX2 基因过表达载体转染,直接提取外泌体,可以更高效的促进 BMSCs 向成骨细胞分化,与碳酸钙支架相结合后,可以更好地促进骨缺损的愈合,从而为临床上骨缺损的治疗提供新思路和方法。

【关键词】 外泌体; 骨缺损; 骨髓间充质干细胞; 慢病毒

中图分类号:R681

DOI:10.12200/j.issn.1003-0034.2022.04.016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Application of RUNX2 gene over expression vector modified exosomes from BMSC combined with calcium carbonate scaffold system in bone defect ZHAO You-shun, LIN Ping, TU Ying-chun, AN Tao, WU Yu-ping, and LI Xiao-fei. Department of Bone Surgery, Affiliated Jinhua Hospital, Zhejiang University School of Medicine, The Jinhua Municipal Central Hospital, Jinhua 321000, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of RUNX2 gene overexpression vector modified exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) combined with calcium carbonate scaffold system in bone defect. **Methods:** Rabbit BMSCs were used as the research object, and BMSCs were identified by flow cytometry. Construct RUNX2 gene overexpression vector, transfect BMSCs with lentivirus, and collect exosomes by ultracentrifugation. The morphology of exosomes was observed by transmission electron microscope, the expression of exosome marker CD63 was detected by Western blot, and the calcium carbonate scaffold was constructed by three chamber parallel automatic temperature control reaction system. According to whether the RUNX2 gene overexpression vector was transfected or not, the complex of BMSCs and calcium carbonate scaffold was divided into three groups, namely BMSCs group, RUNX2 overexpression group and exosome group. The osteogenic differentiation of BMSCs was detected by oil red O staining and RT-PCR. There were 9 clean adult healthy male New Zealand white rabbits, aged (12.97±1.21) months, with a body weight of (19.3±3.6) kg, with 3 rabbits in each group. The animal model of skull defect was constructed by surgical method, and the repair of bone defect was evaluated by imaging, he staining and

基金项目:浙江省自然科学基金项目(编号:Q20H060058);浙江省医药卫生科技项目(编号:2020KY343);金华市公益类项目(编号:2019-4-002)

Fund program: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Q20H060058)

通讯作者:李晓飞 E-mail: professorlxf@163.com

Corresponding author: LI Xiao-fei E-mail: professorlxf@163.com

Masson staining. **Results:** The results of flow cytometry showed that the expression of CD29 protein, CD44 protein, CD11b protein and CD45 protein on the surface of BMSCs were 99.5%, 100%, 0.1% and 0.1%, respectively. Transmission electron microscopy showed that the exosomes were bilayer vesicles with a diameter of 50 to 150 nm. Western blot showed that the molecular marker CD63 of exosomes was positive. Oil red O staining showed that the osteogenic differentiation of BMSCs in exosome group was significantly higher than that in RUNX2 overexpression group and BMSCs group. The results of RT-PCR showed that the relative expressions of RUNX2, BMP-2 and ALP mRNA in BMSCs in exosome group were significantly higher than those in RUNX2 overexpression group and BMSCs group ($P<0.05$). The imaging results showed that the repair effect of skull defect in exosome group was better than that in RUNX2 overexpression group. HE staining and Masson staining showed that the repair effect of skull defect in exosome group was better than that in RUNX2 overexpression group ($P<0.05$). MSCs in exosome group was significantly higher than that in RUNX2 overexpression group and BMSCs group. The results of RT-PCR showed that the relative expressions of RUNX2, BMP-2 and ALP mRNA in BMSCs in exosome group were significantly higher than those in RUNX2 overexpression group and BMSCs group ($P<0.05$). The imaging results showed that the repair effect of skull defect in exosome group was better than that in RUNX2 overexpression group. HE staining and Masson staining showed that the repair effect of skull defect in exosome group was better than that in RUNX2 overexpression group ($P<0.05$). **Conclusion:** Compared with RUNX2 gene overexpression vector transfection, extraction of exosomes directly can promote the differentiation of BMSCs into osteoblasts more efficiently, and the combination with calcium carbonate scaffold can better promote the healing of bone defects. So as to provide new ideas and methods for the clinical treatment of bone defects.

KEYWORDS Exosomes; Bone defects; Bone marrow mesenchymal stem cells; Lentivirus

随着我国经济的不断发展,交通工具也在逐渐普及化,随之而来的高能量交通事故伤也在逐年增加。在高能量致伤因素中,四肢骨折伤最为常见,而影响骨折愈合的关键因素就是骨缺损,会导致骨折的不愈合或者延迟愈合,从而导致患者个人的痛苦和社会医保资源的浪费^[1-2]。对于骨缺损治疗的研究中,干细胞具有明显的优势,具有多向分化的特点,这种“种子”细胞可以在特定细胞环境中分化为目的细胞,从而起到修复特定组织的作用^[3-4]。其中骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)因为来源广泛,自身排异反应低而广受关注^[5]。但是,BMSCs也因为培养周期长,分化方向不定,易老化等问题而限制其进一步应用^[6-7]。外泌体也是最新的热门领域,可以摆脱细胞培养周期长,易老化的问题,从而可以更好的传递生物学信息^[8-9]。RUNT 相关转录因子(runt-related transcription factor, RUNX)2 基因与干细胞的骨细胞分化密切相关,有研究表明,RUNX2 基因可以诱导干细胞向成骨细胞分化,从而影响骨的生成和发育^[10]。本研究再此基础上,利用 Cas-9 技术构建 RUNX2 的基因过表达载体,利用慢病毒转染 BMSCs,提取基因过表达载体修饰后 BMSCs 分泌的外泌体成分,与碳酸钙支架构成复合物,观察其对 BMSCs 的分化作用和对骨缺损动物模型的修复作用,以期为临床上骨缺损的治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

胎牛血清购自以色列 BI 公司;DMEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司;2.5 g/L 胰蛋白酶和购自北

京碧云天生物有限公司;油红 O 染色,茜素红染液等均购自北京碧云天公司;TUNEL 凋亡检测试剂盒购自北京碧云天公司。

JIDI-20D 台式多用途高速离心机购自中国广州吉迪仪器有限公司,型号为 JIDI-20D;低电压台式透射电子显微镜购自 QUANTUM 量子科学仪器贸易(北京)有限公司,型号为 LVEM5;荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,型号为 7900;蛋白显影仪购自美国 Azure Biosystems 公司,型号为 Azure C300;Micro CT 影像系统和模块购自上海然哲设备有限公司,倒置荧光显微镜购自美国 Invitrogen 公司,型号为 EVOS M7000。

1.2 实验动物

采购成年健康的新西兰大白兔 9 只,清洁级实验动物,均检测合格,雄性,年龄(12.97±1.21)个月,体质量为(19.3±3.6) kg,购自浙江中医药大学实验动物中心[SCXK(浙)2019-8744];实验动物饲养于浙江中医药大学实验动物研究中心,室温为(22.9±4.2)℃,湿度为 45%~55% RH,无菌饲料喂养。

1.3 兔源 BMSCs 的培养和鉴定

1.3.1 BMSCs 的培养 新西兰大白兔采用 10%水合氯醛腹腔注射进行麻醉,2~3 ml/kg,麻醉成功后股骨备皮,逐层切开皮肤,筋膜和肌肉,至股骨骨髓腔,取 2~3 ml 骨髓,加入 4 ml 含 20%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的(dulbeccos modified eagle medium, DMEM)培养基,接种在细胞培养瓶中,37℃,15% CO₂ 细胞培养箱中培养,3 d 换液 1 次,待细胞融合率达 80%时,进行细胞传代。

1.3.2 BMSCs 的鉴定 采用 P3 代 BMSCs,用流式

细胞仪检测 BMSCs 的 CD29, CD44, CD11b 和 CD45 的表达, 待细胞融入率为 90% 时, 利用胰蛋白酶将 P3 代 BMSCs 消化, 利用培养基进行重悬, 先进行细胞计数, 细胞数量达到 5×10^6 后, 3 个流式管分装, 常温离心机 2 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, PBS 清洗 3 次, 常温离心机 2 000 r/min 离心 5 min, 再次去上清液, 其中 2 个流式管加入兔抗人 CD29, CD44, CD11b 和 CD45 (稀释比例为 1:200), 剩余 1 管不加任何抗体, 作为阴性对照。避光条件下 4 °C 下孵育 20~30 min, PBS 液清洗 2 次, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 0.5 ml PBS 重悬, 流式细胞仪检测 BMSCs 细胞表面标记物 CD29, CD44, CD11b 和 CD45 的表达情况, 实验重复 3 次。以表面标记物阳性百分比 (%) 来表示。

1.4 RUNX2 过表达载体质粒构建和转染

RUNX2 基因过表达载体的构建和筛选由上海吉玛生物有限公司完成。目的基因进行过表达引物设计, 设计序列为: RUNX2(1655-22): AATTGCCTA AAAGTATGTAC。将目的基因扩增序列加入线性化表达载体, 选取上海吉凯公司提供的 hU6-MCS-CMV-EGFP 慢病毒载体作为酶切对象, 加入过表达载体序列后, 进行克隆测定, 然后进行质粒的抽提, 慢病毒的包装后转染 BMSCs。倒置荧光显微镜观察慢病毒的转染效率, 转染效率 = (绿色荧光细胞/白色细胞数) $\times 100\%$ 。

1.5 外泌体的提取和鉴定

1.5.1 外泌体的提取 本研究采用超速离心法进行收集外泌体。待 P3 代 RUNX2 基因过表达载体转染的 BMSCs 融合率达 80% 以上时, PBS 溶液清洗 3 次, 更换无 FBS 的 DMEM 培养基, 孵育 48 h, 收集细胞上清液, 4 °C 300 r/min, 离心 10 min, 取上清液, 4 °C 2 000 r/min, 离心 20 min, 取上清液, 重悬后经 0.22 μm 滤器过滤, 转移至超速离心管中, 4 °C 10 000 r/min, 离心 70 min, 取沉淀。PBS 冲洗后, 4 °C 10 000 r/min, 离心 70 min, 重复 3 次, -80 °C 冰箱中保存。

1.5.2 透射电子显微镜观察外泌体形态 取 30 μl RUNX2 基因过表达载体转染的 BMSCs 来源的外泌体悬液, 放置于栽样铜网上, 室温下静置 3 min, 加入 3% 磷钨酸溶液 30 μl , 室温下负染 5 min, 室温下孵育直至铜网干燥, 然后透射电镜观察并拍摄。

1.5.3 Western blot 法检测外泌体标志物 CD63 分子的表达 将 RUNX2 基因过表达载体转染的 BMSCs 来源的外泌体置于 EP 管中, 冰上预冷 10 s, 加入 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液后, 提取总蛋白, 利用 BCA (bicinchoninic acid) 试剂盒

确定蛋白浓度。按照 SDS-PAGE 说明书要求配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 根据需要, 插入分子梳。取 30 μg 蛋白质上样, 先使用 80 V 电压进行电泳, 待条带跑至浓缩胶和分离胶的交接点后, 改为 120 V 电压。待条带跑至分离胶底部, 停止电泳。利用聚偏二氟乙烯膜 (poly vinylidene fluoride, PVDF) 和滤纸进行转膜, 设置转膜电流为 200 mA, 转膜槽放到冰袋中低温处理。转膜成功后浸入封闭液中, 摇床封闭 2 h, 加入 CD63 分子蛋白的一抗稀释液 (1:10 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 溶液清洗 3 次, 每次 5 min, 加入稀释好的辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 二抗溶液 (1:2 000), 孵育二抗, TBST 缓冲液漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入 Supersignal west femto 试剂盒显影液, 分光发光成像分析仪显影并拍照。

1.6 磷酸钙支架的制备

利用三室并联自动温控反应系统, 以改良的人体组织液的电解质为背景电解质, 调节至 pH 7.4, 制备仿生矿化磷酸钙纳米粒材料。借助高分辨电镜进行阶段性超微结构观察。

1.7 细胞分组

根据是否转染 RUNX2 基因过表达载体, 将 BMSCs 与碳酸钙支架的复合物分成 3 组, 即 BMSCs 组, BMSCs 与碳酸钙支架构成复合物。RUNX2 过表达组, 慢病毒介导 RUNX2 基因过表达载体转染 BMSCs, 与碳酸钙支架构成复合物。外泌体组, 慢病毒介导 RUNX2 基因过表达载体转染 BMSCs, 提取 BMSCs 分泌的外泌体, 与碳酸钙支架构成复合物。

1.8 BMSCs 成骨分化鉴定

1.8.1 油红 O 染色 取上述 3 组细胞, 经骨诱导, 接种于 24 孔板, 待细胞融合率 $>60\%$, PBS 冲洗 3 次, 加入 10% 甲醛进行固定 30 min, 加入经去离子水稀释的油红染液, 室温避光孵育 30 min, 75% 乙醇进行脱色, 甘油明胶封片后倒置光学显微镜下观察。

1.8.2 RT-PCR 检测各组 慢病毒处理 2 周后, 利用细胞刮提取各组细胞, 加入 1 ml Trizol 试剂, 研磨棒充分研磨, 已入 EP 管中, 静置后加入 0.2 ml 的氯仿, 离心机离心, 10 000 r/min, 离心 5 min, 取上层溶剂, 加入 1 ml 75% 乙醇, 7 500 r/min 离心 5 min, 测定 RNA 的 OD 值, 保证纯度在 1.8~2.1。然后利用逆转录试剂盒, 将 RNA 逆转为 DNA, 采用 20 μl 逆转录反应体系, 按照逆转录试剂盒说明书加入各试剂。应用荧光定量 PCR 试剂盒, 测定总 RNA 中的 RUNX2, BMP-2 和 ALP 的 mRNA 相对表达量。采用 50 μl 荧光定量 PCR 反应体系, 按照试剂盒说明书加入各试剂。加入美国 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪, 设定 50 个循环, 记录 CT 值, 应用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 行比较分

表 1 BMSCs 成骨分化的基因序列

Tab.1 Gene sequence of osteogenic differentiation of BMSCs

靶基因	序列
RUNX2	正义链 5'-TGGGATGCCTTGTGGAAC-3'
	反义链 5'-GAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC-3'
BMP-2	正义链 5'-AGATCCCAGAGTTGAGCCG-3'
	反义链 5'-CCATCCCTTCGTCCTCT-3'
ALP	正义链 5'-CCTTTTGCCTTCAGGTTTCAT-3'
	反义链 5'-GAGACTCGCTCAGCTTCTTG-3'
GAPDH	正义链 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	反义链 5'-GCTGTGAAGACGCCAGTGA-3'

析。引物序列由上海生物化学有限公司提供。见表 1。

1.9 颅骨缺损动物模型的构建和分组

实验动物术前 4 h 禁食水,称量体重,1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,常规皮肤消毒后,无菌条件下正中切开头皮,充分暴露颅骨,制备直径 20 mm 极量颅骨缺损。根据加入修复复合物不同将动物分成 3 组。BMSCs 组动物模型中加入 BMSCs+ 碳酸钙复合物;RUNX2 过表达组动物模型中加入慢病毒介导 RUNX2 基因过表达载体转染 BMSCs+ 碳酸钙复合物;外泌体组动物模型中加入慢病毒介导 RUNX2 基因过表达载体转染 BMSCs,提取 BMSCs 分泌的外泌体,与碳酸钙支架构成复合物。

1.10 动物模型的评估

1.10.1 影像学评估 利用颅脑 CT 对动物模型进行评估,通过矢状位和冠状位对动物模型进行评估。

1.10.2 HE 染色 利用骨穿刺针对随机选取实验动物骨组织进行活检,记录模型骨缺损的早期愈合过程。进行冰冻切片固定,PBS 溶液冲洗 3 次,加入苏木精染液,60℃水浴箱孵育 10 min,PBS 溶液冲洗 3 次,1%盐酸乙醇处理 5 s,0.5%伊红染液,60℃水

浴箱孵育 10 min,PBS 溶液冲洗 3 次,75%、80%、85%乙醇梯度处理样本,二甲苯 I 和二甲苯 II 梯度处理,中性树脂固定,倒置光学显微镜观察。

1.10.3 Masson 染色 利用骨穿刺针对随机选取实验动物骨组织进行活检,记录模型骨缺损的早期愈合过程。进行石蜡凝块固定,常温脱蜡后切片,PBS 溶液冲洗 3 次,利用 Masson 丽春红酸性染液处理 5 min,用 2%冰醋酸水浸润,PBS 溶液冲洗 3 次,75%、80%、85%乙醇梯度处理样本,二甲苯 I 和二甲苯 II 梯度处理,中性树脂固定,倒置光学显微镜观察。

1.11 统计学处理

应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,定量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行表示,BMSCs 组,RUNX2 过表达组,外泌体组等比较采用 F 检验,组间比较采用 q 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔源骨髓间充质干细胞的培养和鉴定

结果显示,原代 BMSCs 呈多角形,贴壁生长(图 1a)。P3 代 BMSCs 细胞成长梭形(图 1b);流式细胞仪检测细胞表明 CD29 蛋白表达为 99.5%,CD44 蛋白表达为 100%,CD11b 蛋白表达为 0.1%,CD45 蛋白表达为 0.1%(图 1c,1d,1e,1f)。

2.2 慢病毒转染 BMSCs

结果显示,慢病毒转染效率较高,为(92.11±4.22)%。见图 2。

2.3 BMSCs 细胞来源的外泌体和鉴定

透射电镜结果显示,外泌体为直径 50~150 nm 的双层膜囊泡状结构。Western blot 结果显示,外泌体的分子标志物 CD63 表达阳性。见图 3。

2.4 透射电镜下碳酸钙支架复合物检测结果

结果显示,碳酸钙支架排列疏松,无序(见 4a)。复合 BMSCs 后复合物排列较为紧密(图 4b)。加入外

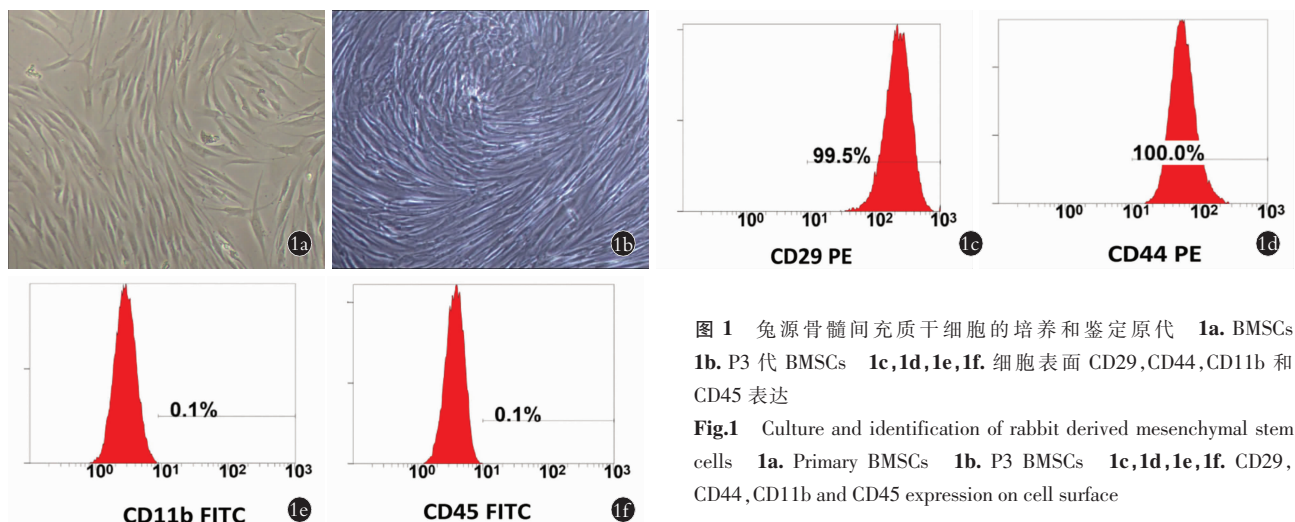


图 1 兔源骨髓间充质干细胞的培养和鉴定原代 1a. BMSCs 1b. P3 代 BMSCs 1c,1d,1e,1f. 细胞表面 CD29,CD44,CD11b 和 CD45 表达

Fig.1 Culture and identification of rabbit derived mesenchymal stem cells 1a. Primary BMSCs 1b. P3 BMSCs 1c,1d,1e,1f. CD29, CD44, CD11b and CD45 expression on cell surface

泌体后可以与碳酸钙相结合(图 4c)。

2.5 体外 BMSCs 的成骨分化检测

2.5.1 油红 O 染色和矿化结节检测 结果显示, RUNX2 过表达组 BMSCs 的成骨分化要明显高于 BMSCs 组, 并且外泌体组 BMSCs 的成骨分化要明显高于 RUNX2 过表达组和 BMSCs 组。见图 5。

2.5.2 RT-PCR 检测各组细胞中 BMSCs 成骨分化的基因结果 结果显示, RUNX2 过表达组 BMSCs 的 RUNX2 mRNA 表达量要明显高于 BMSCs 组($q=2.077, P=0.013<0.05$), 外泌体组 BMSCs 的 RUNX2 mRNA 表达量要明显高于 RUNX2 过表达组($q=2.126, P=0.009<0.05$)。RUNX2 过表达组 BMSCs 的 BMP-2 mRNA 表达量要明显高于 BMSCs 组($q=2.499, P=0.009<0.05$), 外泌体组 BMSCs 的 BMP-2 mRNA 表达量要明显高于 RUNX2 过表达组($q=2.591, P=0.006<0.05$)。RUNX2 过表达组 BMSCs 的 ALP mRNA 表达量要明显高于 BM-

SCs 组($q=2.987, P=0.000<0.05$), 外泌体组 BMSCs 的 ALP mRNA 表达量要明显高于 RUNX2 过表达组($q=3.009, P=0.000<0.05$)。见图 6 和表 2。

2.6 颅骨缺损的动物模型大体结果

结果显示, 根据颅骨缺损的形状, 加入 BMSCs 和碳酸钙支架复合物, 贴合性较好。见图 7。

2.7 颅骨缺损动物模型修复的检测结果

2.7.1 影像学结果 结果显示, RUNX2 过表达组

表 2 各组细胞中 BMSCs 成骨分化的基因 RT-PCR 检测结果($\bar{x}\pm s$)
Fig.2 Results of osteogenic differentiation genes of BMSCs detected by RT-PCR among three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	RUNX2 mRNA 的相对表达量	BMP-2 mRNA 的相对表达量	ALP mRNA 的相对表达量
BMSCs 组	3	1.09±0.03	1.04±0.05	1.07±0.06
RUNX2 过表达组	3	2.02±0.35	4.24±1.56	6.43±1.79
外泌体组	3	4.15±1.24	7.47±2.09	11.05±3.53
F 值		13.167	33.574	48.998
P 值		0.000	0.000	0.000

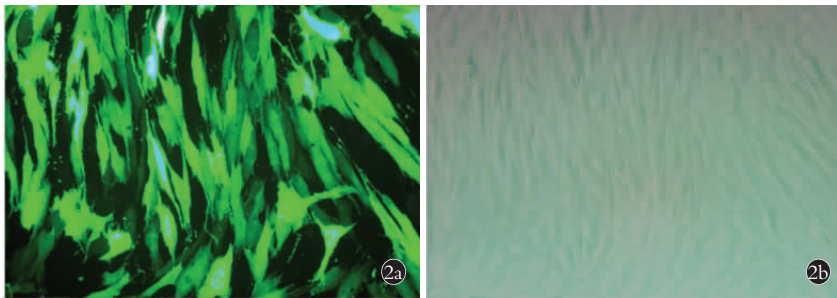


图 2 慢病毒转染 BMSCs 同一视野下细胞
2a. 荧光下 2b. 白光下
Fig.2 BMSCs transfected with lentivirus in the same field 2a. Under fluorescence 2b. Under white light

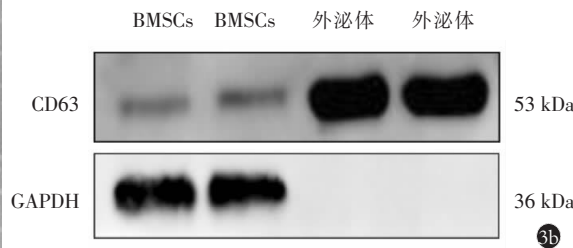
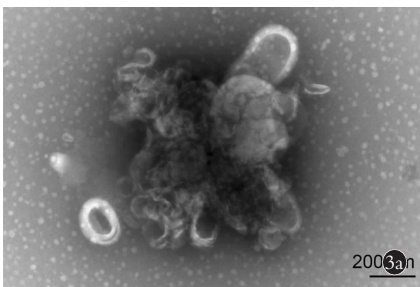


图 3 外泌体的提取和鉴定
3a. 透射电镜检测外泌体
3b. 外泌体的鉴定
Fig.3 Extraction and identification of exosomes 3a. Detection of exosomes by transmission electron microscopy 3b. Identification of exosomes

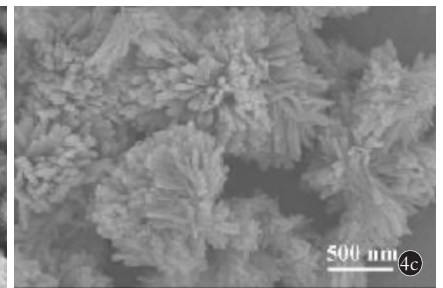
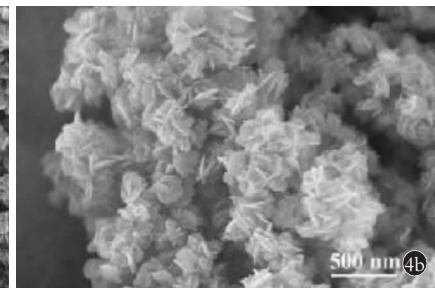
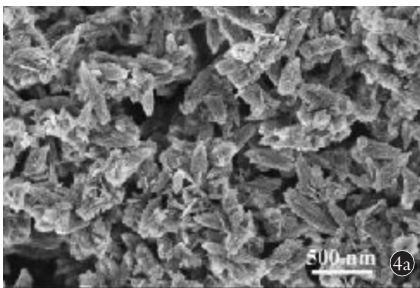


图 4 碳酸钙支架复合物 4a. 碳酸钙支架 4b. 碳酸钙复合 BMSCs 4c. 碳酸钙复合外泌体
Fig.4 Calcium carbonate scaffold complex 4a. Calcium carbonate scaffolds 4b. Calcium carbonate composite BMSCs 4c. Calcium carbonate composite exosomes

颅骨缺损修复效果要优于 BMSCs 组,外泌体组颅骨缺损修复效果要优于 RUNX2 过表达组。见图 8。

2.7.2 HE 染色和 Masson 染色结果 利用 O' Driscoll 评分和 Makin 评分比较各组 HE 染色和 Masson 染色结果。其中 RUNX2 过表达组 O' Driscoll 评分为 (11.27±2.77)分,而 BMSCs 组 O' Driscoll 评分为 (18.77±2.13)分,差异有统计学意义 ($q=2.896; P=0.011 < 0.05$),RUNX2 过表达组 Makin 评分为

(0.42±0.09)分,而 BMSCs 组的 Makin 评分为 (0.23±0.03)分,差异有统计学意义 ($q=3.907; P=0.000 < 0.05$)。外泌体组 O' Driscoll 评分和 Makin 评分为 (8.12±1.08)分和 (1.24±0.11)分,与 RUNX2 过表达组比较差异有统计学意义 ($q=3.982, 2.072; P=0.000, 0.023 < 0.05$)。见图 9 和表 3。

3 讨论

3.1 间充质干细胞来源外泌体可能成为骨缺损修复研究的热点

间充质干细胞的治疗手段已经应用于各种疾病的治疗,比如软骨的缺损,骨缺损和骨质疏松等疾病^[11-13]。既往研究表明,利用间充质干细胞移植技术,对于新西兰大白兔的软骨缺损,骨缺损模型具有治疗作用,其作用机制是可以促进干细胞的定向分化和增殖,对缺损组织起到修复作用^[14]。但是干细胞具有分化方向不定,易老化的特点,所以,修复效果不佳。外泌体是存在于细胞内部的囊泡结构,有研究表明,干细胞的细胞质中含有大量的颗粒

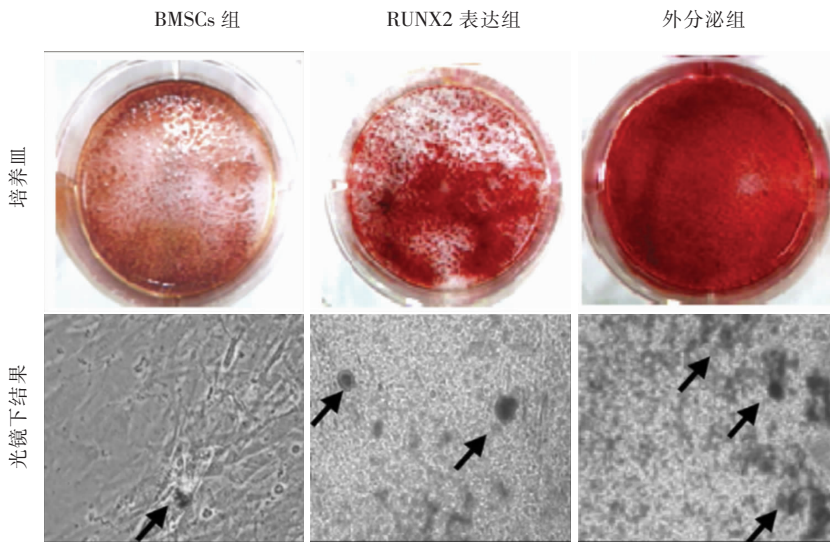


图 5 油红 O 染色和光镜下矿化结节(箭头所示)

Fig.5 Oil red O staining and mineralized nodule under light microscope (arrow on the figure)

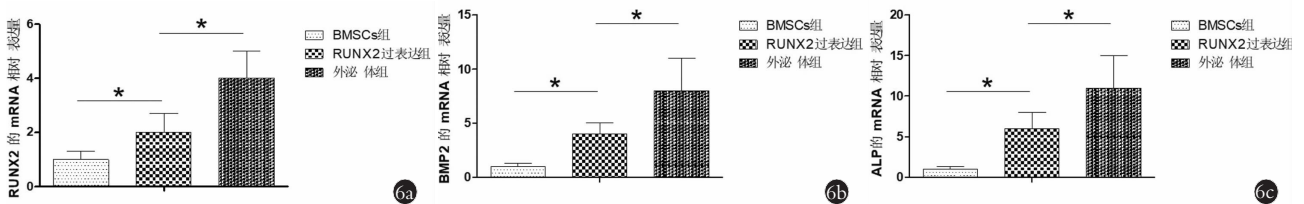


图 6 各组 BMSCs 成骨分化的 RT-PCR 结果与前面邻组比较, * $P < 0.05$ 6a. RUNX2 mRNA 的相对表达量 6b. BMP-2 mRNA 的相对表达量 6c. ALP mRNA 的相对表达量

Fig.6 Results of the RT-PCR about the osteogenic differentiation of BMSCs among three groups. Comparison with previous neighbor group, * $P < 0.05$ 6a. Relative expression of RUNX2 mRNA 6b. Relative expression of BMP-2 mRNA 6c. Relative expression of ALP mRNA;

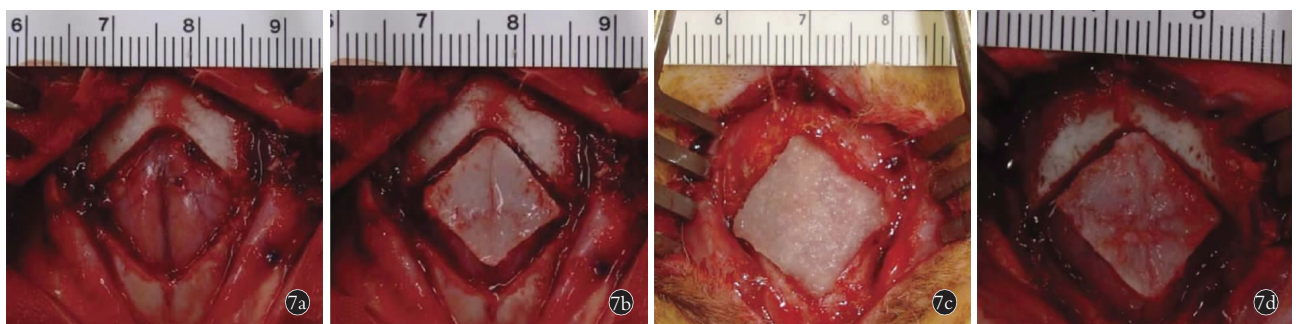


图 7 颅骨缺损的动物模型大体结果 7a. 颅骨缺损模型的建立 7b. BMSCs 组 7c. RUNX2 过表达组 7d. 外泌体组

Fig.7 General results of animal model of skull defect 7a. Skull defect model 7b. BMSCs group 7c. RUNX2 overexpression group 7d. Exosome group

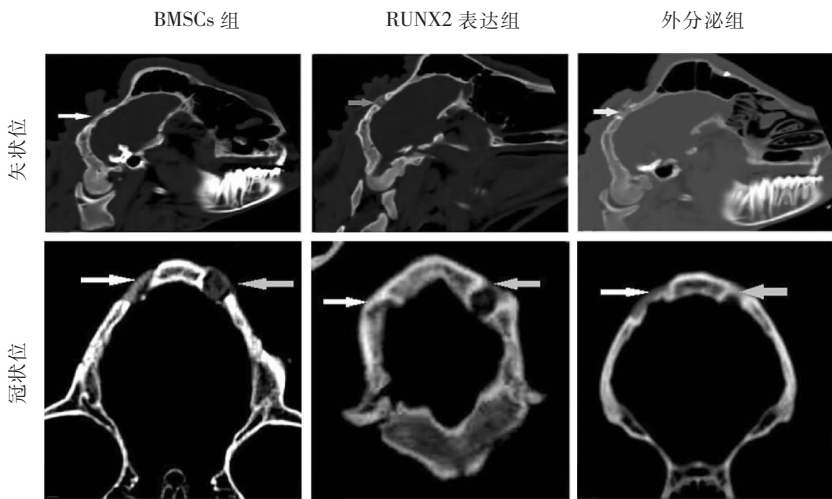


图 8 颅骨缺损动物模型修复的影像学结果(箭头所示)
Fig.8 Imaging results of animal model repair of skull defect (arrow on the figure)

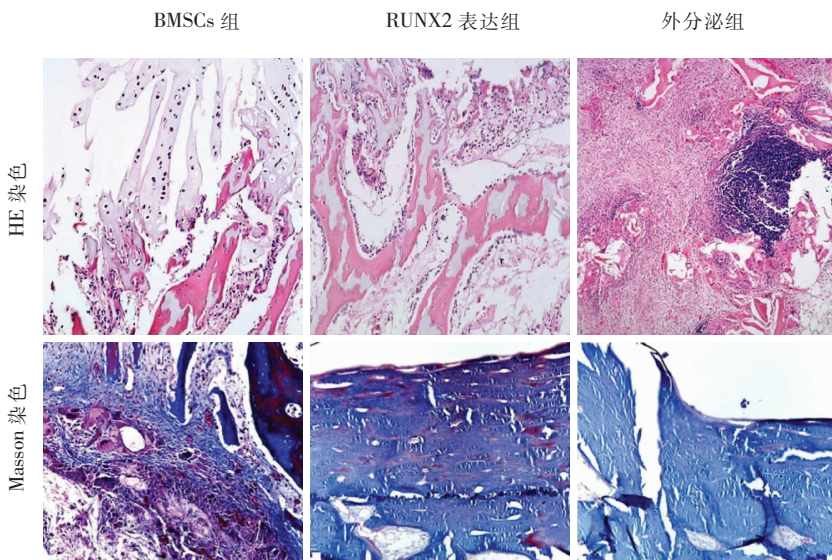


图 9 颅骨缺损动物模型修复的 HE 染色和 Masson 染色结果
Fig.9 HE staining and Masson staining results of skull defect animal model repair

样的外泌体,外泌体起到信号传递的作用,可以传递干细胞的生物信息^[10]。本研究中以 BMSCs 为研究对象,其主要优点是来源广泛,组织兼容性强,排异性低。利用流式细胞仪对脂肪干细胞进行鉴定,从而明确细胞类型,为下面的研究奠定基础。并且利用超速离心法提取 BMSCs 来源的外泌体,并且利用透射电镜技术和 Western blot 等方法对外泌体进行鉴定,结果表明,囊泡直径大小合适,并且可以表达外泌体特异性蛋白 CD63。从而完成了外泌体的提取和鉴定,从而为进一步的研究奠定基础。

3.2 RUNX2 基因过表达载体可以促进 BMSCs 性成骨细胞分化

RUNX2 基因是目前发现的新型基因,与干细胞

的成骨分化密切相关,其本身是一种基因转录因子,有研究表明,RUNX2 基因可以促进干细胞向成骨细胞分化,抑制其向脂肪细胞分化,抑制其向软骨细胞分化^[15]。也有研究表明,对于 RUNX2 基因缺失的小鼠,其软骨内成骨和骨膜内成骨的过程均会受到明显的抑制,所以,他们认为 RUNX2 基因在骨生成过程中是必不可少的^[16]。与上述研究结果相同,在本研究中,通过构建 RUNX2 基因的过表达载体,利用慢病毒转染 BMSCs,从而促进 BMSCs 向成骨细胞分化。RT-PCR 检测各组细胞中 BMSCs 成骨分化的基因,结果显示,RUNX2 过表达组 BMSCs 的 RUNX2, BMP-2 和 ALP mRNA 表达量要明显高于 BMSCs 组 ($P < 0.05$), 外泌体组 BMSCs 的 RUNX2, BMP-2 和 ALP mRNA 表达量要明显高于 RUNX2 过表达组 ($P < 0.05$)。结果说明, RUNX2 的过度表达,可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化。另外,本实验还利用油红 O 染色,结果显示,外泌体组 BMSCs 的矿结节的数量明显高于 BMSCs 组和 RUNX2 过表达组。更加证明, RUNX2 的过度表达,可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化。

3.3 基因修饰 BMSCs 来源外泌体与碳酸钙支架相结合可以促进骨缺损动物模型的修复

外泌体是目前研究的热点问题,可以摆脱细胞的桎梏,携带关键遗传信息,从而更好的干预生物学行为。为了进一步验证外泌体的功能,既往研究表明,外泌体可以携带细胞增殖和凋亡的相关信息,参与细胞的增殖,凋亡和侵袭^[17-18]。在本研究发现相较于 RUNX2 基因过表达载体转染 BMSCs 组,外泌体组可以更好地促进 BMSCs 向成骨细胞分化,分析其原因可能为,高浓度的外泌体可以携带大量的生物学信息,可以更好地促进 BMSCs 的分化。另外,还通过构建新西兰大白兔的颅骨缺损模型,在体内对外泌体的生物学行为进行检测,HE 染色和 Masson 染色结果表明,外泌体组颅骨缺损修复效果要优于 RUNX2 过表达组, O' Driscoll 评分较低, Makin 评分

表 3 各组改良 O'Driscoll 评分和 Makin 评分比较

($\bar{x} \pm s$, 分)

Tab.3 Comparison of O'Driscoll score and Makin score in each group ($\bar{x} \pm s$, score)

组别	样本量	改良 O'Driscoll 评分	Makin 评分
BMSCs 组	3	18.77±2.13*	0.23±0.03**
RUNX2 过表达组	3	11.27±2.77 [△]	0.42±0.09 ^{△△}
外泌体组	3	8.12±1.08	1.24±0.11
F 值		9.078	9.221
P 值		0.000	0.002

注:与 BMSCs 组比较, * $q=2.896, P=0.011<0.05$; ** $q=3.907, P=0.000<0.05$ 。与 RUNX2 过表达组比较, [△] $q=3.982, P=0.000$; ^{△△} $q=2.072, P=0.023<0.05$

Note:Compared with BMSCs group, * $q=2.896, P=0.011<0.05$; ** $q=3.907, P=0.000<0.05$ 。Compared with RUNX2 overexpression group, [△] $q=3.982, P=0.000$, ^{△△} $q=2.072, P=0.023<0.05$

较高。充分说明,相较于 RUNX2 基因过表达载体转染,直接提取外泌体,可以更高效地促进 BMSCs 向成骨细胞分化,与碳酸钙支架相结合后,可以更好地促进骨缺损的愈合。

参考文献

[1] 李树源,周琦石,李悦,等.自体富血小板血浆联合植骨应用于诱导膜技术修复骨缺损[J]. 中国骨伤,2019,32(4):302-307.
LI SY,ZHOU QS,LI Y,et al. Autologous platelet-rich plasma combined with bone grafting in inducing membrane technology [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2019,32(4):302-307. Chinese with abstract in English.

[2] Alkhashki HM. Shock wave therapy of fracture nonunion[J]. Injury,2015,46(11):2248-2252.

[3] Cong Q,Xu R,Yang Y. Gas signaling in skeletal development, homeostasis and diseases[J]. Curr Top Dev Biol,2019,133:281-307.

[4] Liu X,Zheng L,Zhou Y,et al. BMSC Transplantation aggravates inflammation,oxidative stress,and fibrosis and impairs skeletal muscle regeneration[J]. Front Physiol,2019,10:87.

[5] Liu X,Xu W,Zhang Z,et al. VEGF-transfected BMSC improve the recovery of motor and sensory functions of rats with spinal cord injury[J]. Spine(Phila Pa 1976),2020,45(7):E364-E372.

[6] Futrega K,Mosaad E,Chambers K,et al. Bone marrow-derived stem/stromal cells(BMSC) 3D microtissues cultured in BMP-2 supplemented osteogenic induction medium are prone to adipogen-

esis[J]. Cell Tissue Res,2018,374(3):541-553.

[7] Fu X,Liu G,Halim A,et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair[J]. Cells,2019,8(8):784.

[8] Jeppesen DK,Fenix AM,Franklin JL,et al. Reassessment of exosome composition[J]. Cell,2019,177(2):428-445.

[9] Wortzel I,Dror S,Kenific CM,et al. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance[J]. Dev Cell,2019,49(3):347-360.

[10] Shen GY,Ren H,Huang JJ,et al. Plastrum testudinis extracts promote BMSC proliferation and osteogenic differentiation by regulating let-7f-5p and the TNFR2/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem,2018,47(6):2307-2318.

[11] Sun Y,You Y,Jiang W,et al. 3D-bioprinting a genetically inspired cartilage scaffold with GDF5-conjugated BMSC-laden hydrogel and polymer for cartilage repair[J]. Theranostics,2019,9(23):6949-6961.

[12] Wang K,Li J,Li Z,et al. Chondrogenic progenitor cells exhibit superiority over mesenchymal stem cells and chondrocytes in platelet-rich plasma scaffold-based cartilage regeneration[J]. Am J Sports Med,2019,47(9):2200-2215.

[13] Chen Y,Xue K,Zhang X,et al. Exosomes derived from mature chondrocytes facilitate subcutaneous stable ectopic chondrogenesis of cartilage progenitor cells[J]. Stem Cell Res Ther,2018,9(1):318-324.

[14] 王洪君,蔡波,赵星宇,等. VEGF165 基因修饰脂肪干细胞对糖尿病大鼠骨缺损的修复研究[J]. 中国骨伤,2017,30(6):545-551.
WANG HJ,CAI B,ZHAO XY,et al. Repairing diabetic rats with bone defect by VEGF165 gene modified adipose-derived stem cells [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma,2017,30(6):545-551. Chinese with abstract in English.

[15] Jiang Z,Wang H,Yu K,et al. Light-controlled BMSC sheet-implant complexes with improved osteogenesis via an LRP5/ β -Catenin/RUNX2 regulatory loop[J]. ACS Appl Mater Interfaces,2017,9(40):34674-34686.

[16] Tang J,Zhang Z,Jin X,et al. miR-383 negatively regulates osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats by targeting Satb2[J]. Bone,2018,114:137-143.

[17] Wu P,Zhang B,Shi H,et al. MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration[J]. Cytotherapy,2018,20(3):291-301.

[18] Joyce DP,Kerin MJ,Dwyer RM. Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for breast cancer[J]. Int J Cancer,2016,139(7):1443-1448.

(收稿日期:2020-12-20 本文编辑:王玉蔓)