

## 脂肪干细胞源性外泌体对体外巨噬细胞迁移能力的影响

袁博<sup>1,2,3</sup>, 谢佳忆<sup>4</sup>, 江思瑜<sup>1,5</sup>, 孟亚军<sup>1</sup>, 朱清华<sup>1</sup>, 李晓飞<sup>1</sup>, 付秀美<sup>1,3</sup>, 谢利德<sup>1</sup>

(1. 承德医学院基础医学院人体解剖学教研室, 河北承德 067000; 2. 承德护理职业学院病原生物与免疫教研室, 河北承德 067000; 3. 河北省神经损伤与修复重点实验室, 河北承德 067000; 4. 清华大学信息科学技术学院自动化系, 北京 100062; 5. 河北医科大学第一医院中心实验室, 河北石家庄 050000)

**[摘要]** **目的:** 探讨脂肪干细胞源性外泌体 (ADSC-Exos) 对巨噬细胞 RAW264.7 迁移能力的影响, 阐明其促进巨噬细胞功能的作用。**方法:** 分离 SD 大鼠附睾旁脂肪组织, 进行脂肪源性干细胞 (ADSCs) 原代培养, 通过成脂和成骨分化诱导, 结合油红 O 和茜素红染色检测 ADSCs 的多向分化潜能。采用 Western blotting 法和免疫荧光法检测 ADSCs 标记物 CD29 及 CD44 阳性表达情况, 采用外泌体 (Exos) 分离试剂盒提取 ADSC-Exos, 透射电子显微镜和纳米颗粒跟踪分析仪检测 ADSC-Exos 的形态大小和粒径分布范围, Western blotting 法检测 Exos 特异性标记物 CD9 和 TSG101 蛋白表达情况, 示踪法观察巨噬细胞摄取 ADSC-Exos 情况。将巨噬细胞 RAW264.7 分为对照组、10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组、20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组和 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组。5-乙基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 染色检测各组巨噬细胞活性, Transwell 小室实验检测各组巨噬细胞迁移细胞数, 荧光显微镜观察各组巨噬细胞黏附情况。**结果:** 原代 ADSCs 培养 24 h 后细胞贴壁生长, 呈散在、长梭形; 培养 7 d, 贴壁细胞呈齿梳状、旋涡状有序排列, 呈成纤维细胞样外观; 培养 10 代后 ADSCs 形态不规则, 增殖速度减慢。分离提取的 ADSCs 具有成骨和成脂分化潜能, CD29 和 CD44 蛋白表达阳性。透射电子显微镜下 ADSC-Exos 呈茶碟状, ADSC-Exos 的粒径主峰分布于 132 nm 附近, ADSC-Exos 中 CD9 和 TSG101 蛋白表达阳性, 即 ADSC-Exos 提取成功。荧光显微镜下 RAW264.7 细胞核周围可检测到红色荧光信号, 即 ADSC-Exos 可以被巨噬细胞摄取。与对照组比较, 10、20 和 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组 EdU 阳性细胞率均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组比较, 20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组 EdU 阳性细胞率均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 10、20 和 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组巨噬细胞迁移细胞数均明显增加 ( $P < 0.05$ ); 与 10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组比较, 20 和 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组巨噬细胞迁移细胞数均明显增加 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 10、20 和 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组巨噬细胞黏附细胞数均明显增加 ( $P < 0.05$ ); 与 10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组比较, 20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos 组巨噬细胞黏附细胞数明显增加 ( $P < 0.05$ )。**结论:** ADSC-Exos 可被巨噬细胞摄取, 其通过影响细胞黏附提高巨噬细胞的迁移能力。

**[关键词]** 脂肪干细胞; 外泌体; 巨噬细胞; 细胞迁移; 细胞黏附

**[中图分类号]** Q25 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-06-26

**[基金项目]** 河北省科技厅自然科学基金项目 (H2021406056); 河北省高等学校科学研究计划项目 (ZD2020178); 承德医学院人体解剖与组织胚胎学优势学科资助项目 ([2023] 22号); 河北省神经损伤与修复重点实验室开放项目 (NJKF-202403)

**[作者简介]** 袁博 (1988—), 女, 河北省承德市人, 讲师, 医学硕士, 主要从事神经损伤与修复方面的研究。

**[通信作者]** 谢利德, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: xielide65@163.com);  
付秀美, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: fuxiumei2012@163.com)

## Effect of adipose-derived stem cell-derived exosomes on migration ability of macrophages *in vitro*

YUAN Bo<sup>1,2,3</sup>, XIE Jiayi<sup>4</sup>, JIANG Siyu<sup>1,5</sup>, MENG Yajun<sup>1</sup>, ZHU Qinghua<sup>1</sup>, LI Xiaofei<sup>1</sup>,  
FU Xiumei<sup>1,3</sup>, XIE Lide<sup>1</sup>

(1. Department of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 2. Department of Pathogens and Immunology, Chengde Nursing Vocational College, Chengde 067000, China; 3. Key Laboratory of Nerve Injury and Repair of Hebei Province, Chengde 067000, China; 4. Department of Automation, School of Information Science and Technology, Tsinghua University, Beijing 100062, China; 5. Central Laboratory, First Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the effect of adipose-derived stem cell-derived exosomes (ADSC-Exos) on the migration ability of the macrophages RAW264.7, and to clarify its role in promoting function of the macrophages. **Methods:** The adipose tissue adjacent to epididymis of the SD rats was isolated to perform primary culture of the adipose-derived stem cells (ADSCs). The adipogenic and osteogenic differentiation induction was conducted, and the multidirectional differentiation potential of the ADSCs was detected by oil Red O and Alizarin red staining. Western blotting and immunofluorescence methods were used to detect the positive expressions of the ADSCs markers CD29 and CD44; the ADSC-Exos were extracted by Exos isolation kit, and the morphology, size, and distribution of particle size of the ADSC-Exos were examined by transmission electron microscope and nanoparticle tracking analyzer; the expression levels of exosome-specific markers CD9 and TSG101 proteins in the ADSC-Exos were detected by Western blotting method; the uptake of ADSC-Exos by the macrophages was observed by tracing method. The macrophages RAW264.7 were divided into control group, 10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos group, 20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos group, and 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos group. The activities of the macrophages in various groups were detected by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining; the number of migration macrophages in various groups was detected by Transwell chamber assay; the adhesion of macrophages in various groups was observed by fluorescence microscope. **Results:** After 24 h of primary culture, the ADSCs adhered to the wall and exhibited scattered, elongated shapes; after 7 d of culture, the adherent cells showed a comb-like, vortex-like orderly arrangement, resembling fibroblasts; after 10 passages, the irregular morphology of the ADSCs and decreased proliferation rate were found. The isolated ADSCs showed potential for the osteogenic and adipogenic differentiation, and the expressions of CD29 and CD44 proteins were positive. The transmission electron microscope observation results showed that the ADSC-Exos appeared disc-shaped, and the main peak of particle size distribution was around 132 nm. The CD9 and TSG101 proteins were positively expressed in the ADSC-Exos, indicating successful extraction. The fluorescence microscope results showed red fluorescence signals around the nuclei of the RAW264.7 cells, indicating the uptake of ADSC-Exos by the macrophages. Compared with control group, the rates of EdU positive cells in 10, 20, and 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with 10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos group, the rate of EdU positive cells in 20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the numbers of migration cells in 10, 20, and 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with 10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos group, the numbers of migration cells in 20 and 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the numbers of the adherent macrophages in 10, 20, and 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos groups were significantly increased ( $P < 0.05$ );

compared with  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group, the number of adherent macrophages in  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The ADSC-Exos can be internalized by the macrophages and they can enhance the migration ability of the macrophages by affecting the cell adhesion.

**KEYWORDS** Adipogenic stem cells; Exosomes; Macrophages; Cell migration; Cell adhesion

脂肪源性干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)是一种能够自我更新并具有多向分化潜能的干细胞,因其来源广泛、易于获取和安全性高受到研究者的广泛关注<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-4]</sup>显示:ADSCs在组织修复、自身免疫病和神经再生等领域发挥的治疗作用主要归因于其衍生的外泌体(exosomes, Exos)。脂肪干细胞源性外泌体(adipose-derived stem cells-derived exosomes, ADSC-Exos)作为一种无细胞治疗策略,复制了ADSCs的生物学活性,且具有较高的化学稳定性、易贮存和低免疫原性等优势,在细胞间的信息交流和物质运输中充当重要的媒介,具有广阔的应用前景<sup>[5]</sup>。巨噬细胞是人体重要的固有免疫细胞,在维持机体内环境稳态、免疫防御和组织修复中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。在机体组织受损或局部发生感染期间,生长因子、促炎细胞因子和微生物代谢产物等多种物质使局部微环境发生变化,诱导巨噬细胞发生迁移<sup>[7]</sup>。巨噬细胞迁移是炎症性疾病和自身免疫性疾病等多种疾病发生发展过程中的关键环节<sup>[6]</sup>。研究<sup>[8]</sup>显示:在动脉粥样硬化早期,巨噬细胞被募集到动脉壁的内皮下间隙,以吞噬碎片和低密度脂蛋白等有毒分子,巨噬细胞吞噬脂质后迁移能力受损并聚集成斑块,是动脉粥样硬化进程的重要环节。ZOU等<sup>[9]</sup>发现:巨噬细胞的迁移和吞噬等功能被沉默信息调节蛋白6(silent information regulator 6, SIRT6)抑制后能够延缓周围神经的修复。因此,明确影响巨噬细胞迁移能力的因素可能成为疾病治疗的切入点。本研究提取ADSC-Exos,并将其加入到巨噬细胞RAW264.7培养液中,通过检测RAW264.7细胞活性、细胞迁移和黏附能力的变化,探讨ADSC-Exos对巨噬细胞迁移能力的影响,以期ADSC-Exos促进巨噬细胞发挥功能提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器** 6只4周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量80~120 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0008。巨噬细胞系RAW264.7由

北京大学医学部馈赠。4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液、抗荧光淬灭封片液和I型胶原酶均购自北京索莱宝科技有限公司,DMEM/F12细胞培养基和0.25%胰酶-EDTA购自美国Gibco公司,茜素红染液、油红O染液、大鼠脂肪间充质干细胞成脂和成骨诱导分化培养基购自武汉普诺赛生物科技有限公司,兔抗CD29抗体、CD44抗体、Cy3/FITC标记山羊抗兔IgG荧光二抗和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG均购自美国Abclonal公司,CD9和TSG101购自美国Proteintech公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自武汉普诺赛生物科技有限公司,Exos提取试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司,BCA蛋白定量试剂盒购自北京鼎国昌盛技术有限公司,无外泌体FBS(exosome-depleted FBS, Exo-FBS)购自美国SBI公司,PKH26购自上海宇玫博生物科技有限公司,5-乙基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)细胞增殖检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。荧光显微镜(型号:BX43)和倒置显微镜(型号:CKX53)均购自日本Olympus公司。

**1.2 大鼠ADSCs分离和培养** 无菌条件下提取雄性SD大鼠附睾旁脂肪组织,采用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)(pH=7.4)充分清洗组织,剔除筋膜和血管并剪碎,用0.1%的I型胶原酶37℃震荡消化45~60 min,200目滤网过滤,加入含10%FBS的DMEM/F12完全培养基终止消化,1000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min获取沉淀,重新悬浮细胞,再次过滤离心重悬,接种于培养皿中并培养,48 h后换液,每2~3 d换液1次。待细胞融合度为80%时,采用0.25%胰酶-EDTA消化并收集细胞,按1:2比例传代培养。

**1.3 ADSCs鉴定** 取第3代ADSCs,用0.25%胰酶-EDTA消化成单细胞悬液,以 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于6孔细胞培养板中。当贴壁细胞达到80%时,更换为成脂和成骨诱导培养液,2~3 d常规换液1次,成脂诱导培养液诱导10~14 d行油红

O染色,成骨诱导培养液诱导28~32 d行茜素红染色,倒置显微镜下观察细胞内脂滴和钙结节形成情况。另取ADSCs进行细胞爬片培养,48 h后用4%多聚甲醛固定细胞30 min,用浓度为0.2%的Triton X-100于冰上避光透膜10 min,滴加5% BSA封闭液在37℃水浴箱恒温孵育1 h,分别加入兔抗CD29(1:100)和CD44(1:200),4℃孵育过夜,室温平衡1 h后,再分别加入Cy3标记的山羊抗兔IgG(1:800)和FITC标记的山羊抗兔IgG(1:400),37℃水浴箱恒温避光孵育1 h,最后DAPI染核和封片,荧光显微镜下观察CD29和CD44蛋白阳性表达情况并采集图像。ADSCs常规培养后采用Western blotting法检测CD29和CD44蛋白表达水平。待细胞融合度达到80%,加入RIPA裂解液,于冰上裂解30~45 min,4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,获取细胞总蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒定量蛋白;100℃水浴5 min使蛋白变性,进行SDS-PAGE分离、转膜和封闭,加入兔抗CD29(1:1 000)、CD44(1:1 000)和小鼠抗β-actin(1:5 000),4℃过夜,室温平衡1 h后弃液,TBST缓冲液清洗3次,每次10 min。加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:10 000)室温孵育1 h,TBST缓冲液清洗3次,每次5 min,ECL化学发光法显影,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以β-actin为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.4 ADSC-Exos分离提取** 当常规培养细胞融合度为60%~70%时,更换含10% Exo-FBS的DMEM/F12培养基继续培养48~72 h,至细胞融合度为80%~90%。收集细胞上清于无菌离心管内,4℃、3 000 g离心15 min,吸取上清,加入Exos分离试剂250 mL·L<sup>-1</sup>,轻柔混匀,4℃静置2 h,4℃、12 000 g离心20 min,所得沉淀即为ADSC-Exos,用100 μL无菌PBS缓冲液重悬,分装备用。

**1.5 ADSC-Exos鉴定** 吸取20 μL ADSC-Exos悬液滴至铜网上,自然吸附5~10 min,再滴加20 μL 2%磷钨酸溶液于铜网上,静置3~5 min,用滤纸条吸除多余液滴,白炽灯下晾干,透射电子显微镜下观察ADSC-Exos形态表现并拍照。PBS缓冲液稀释ADSC-Exos,0.22 μm滤菌器过滤,使用注射器向纳米颗粒跟踪分析仪的样品池缓慢注入1 mL

样品,将激光模块放回底座上,并将温度计探头放入激光模块面板的铜孔内,依照屏幕提示完成粒径分析,检测ADSC-Exos大小。按照“1.3”中Western blotting法检测ADSC-Exos中Exos标记物CD9和TSG101蛋白表达水平,以鉴定分离的ADSC-Exos。

#### 1.6 示踪法观察巨噬细胞摄取ADSC-Exos情况

用通用膜标记稀释液Diluent C 10倍稀释PKH26,制成工作液,取ADSC-Exos加入PKH26染色工作液混匀后静置10 min,再加入10 mL无菌PBS缓冲液,利用Exos分离试剂,再次提取ADSC-Exos<sup>[10]</sup>。将对数生长期RAW264.7细胞接种于24孔细胞培养板内,待细胞融合度为60%~70%,加入标记好的ADSC-Exos,使其终浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>,继续培养24 h,4%多聚甲醛室温固定30 min,0.2% Triton X-100室温透膜10 min,PBS缓冲液清洗3次。5% BSA封闭1 h,DAPI复染细胞核,荧光淬灭封片液封片,立即在荧光显微镜下观察PKH26标记的ADSC-Exos分布情况并采集图像。

**1.7 实验分组和处理** 取对数生长期RAW264.7细胞,分为对照组(每皿加入200 μL PBS缓冲液)、10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组(加入200 μL ADSC-Exos,使其终浓度为10 mg·L<sup>-1</sup>)、20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组(加入200 μL ADSC-Exos,使其终浓度为20 mg·L<sup>-1</sup>)和40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组(加入200 μL ADSC-Exos,使其终浓度为40 mg·L<sup>-1</sup>)。

**1.8 EdU染色检测各组巨噬细胞活性** RAW264.7细胞爬片接种于24孔细胞培养板,培养24 h后,分别用0、10、20和40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos作用RAW264.7细胞24 h。加入预热的EdU工作液半量换液,终浓度为10 μmol·L<sup>-1</sup>,37℃培养箱继续孵育2 h。4%多聚甲醛室温固定30 min,加入0.2% Triton X-100,室温透膜10 min,洗涤液清洗3次,加入Click反应液,室温避光孵育30 min,洗涤液清洗3次,Hoechst33342复染细胞核,荧光淬灭封片液封片,随机选择5个视野于荧光显微镜下观察,采用Image J软件分别计数每个视野下EdU阳性细胞数(绿色荧光)和细胞核总数(蓝色荧光),并计算平均值,以EdU阳性细胞率代表巨噬细胞活性。EdU阳性细胞率=EdU阳性细胞数/细胞核总数×100%。

**1.9 Transwell小室实验检测各组巨噬细胞迁移细胞数** 将Transwell小室放入24孔细胞培养板,于

小室下层加入含20%血清的DMEM培养基及不同浓度的ADSC-Exos。上层加入预处理细胞200  $\mu\text{L}$ ，重新放回孵箱迁移24 h。取出24孔细胞培养板，弃掉培养基，用无菌PBS缓冲液浸洗3次，4%多聚甲醛固定30 min，结晶紫染色20 min。用棉签擦去小室上层未迁移细胞，随机选取5个视野于显微镜下观察，采用Image J软件计数每个视野中迁移细胞数，取平均值。

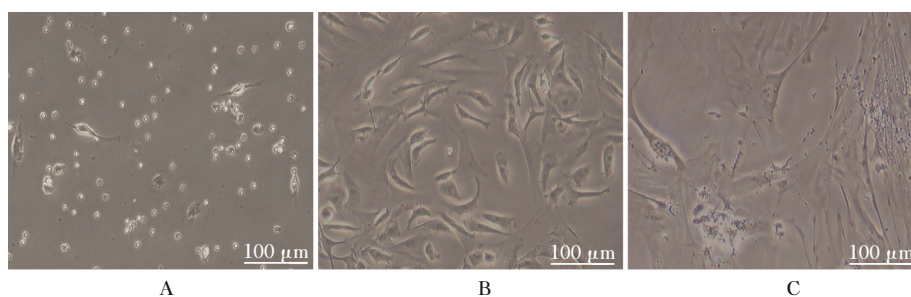
**1.10 荧光显微镜观察各组巨噬细胞黏附情况** 制备单细胞悬液，以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的浓度爬片接种于24孔细胞培养板内，黏附4 h<sup>[11]</sup>。PBS缓冲液洗去未黏附的细胞，4%多聚甲醛室温固定30 min，采用含1% Triton X-100和3% BSA的混合液室温透膜封闭15 min，含DAPI的封片剂封片。随机选取5个视野于荧光显微镜下观察，采用Image J软件计

数每个视野中黏附细胞数，对5个视野取平均值。

**1.11 统计学分析** 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析，GraphPad Prism 8软件绘制图像。各组细胞EdU阳性细胞率、迁移细胞数和黏附细胞数均符合正态分布，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 培养不同时间ADSCs形态表现** 原代ADSCs培养24 h后细胞贴壁生长，呈散在、长梭形。培养7 d，贴壁细胞呈齿梳状、旋涡状有序排列，呈成纤维细胞样外观。培养10代后ADSCs细胞形态不规则，增殖速度减慢。见图1。



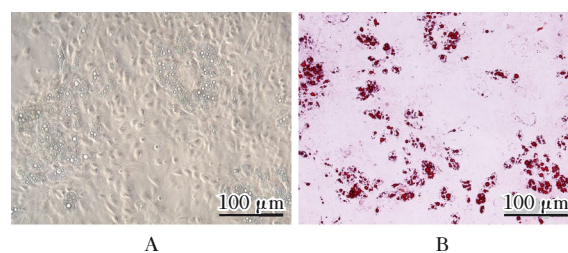
A: Primary ADSCs after culture for 24 h; B: Primary ADSCs after culture for 7 d; C: Morphology of ADSCs after culture for 10 passages.

图1 培养不同时间ADSCs形态表现

Fig. 1 Morphology of ADSCs after cultured for different time

**2.2 ADSCs鉴定** ADSCs成脂诱导14 d后，经油红O染色，显微镜下可见大量红色脂滴。ADSCs经成骨分化诱导32 d后，行茜素红染色，显微镜下可见大量钙化结节。免疫荧光检测结果显示：CD29和CD44蛋白表达阳性，阳性蛋白产物主要位于细胞浆中。Western blotting法检测结果显示：ADSCs中CD29和CD44蛋白表达阳性。见图2~5。

**2.3 ADSC-Exos鉴定和巨噬细胞摄取情况** 透射电子显微镜下ADSC-Exos呈茶碟状。纳米颗粒跟踪分析仪测得ADSC-Exos的粒径主峰分布于132 nm附近。Western blotting法检测结果显示：ADSC-Exos中Exos标记物CD9和TSG101蛋白表达阳性，即ADSC-Exos提取成功。见图6。荧光显微镜下RAW264.7细胞核周围可检测到红色荧光信号，表明ADSC-Exos可以被巨噬细胞摄取。见图7。

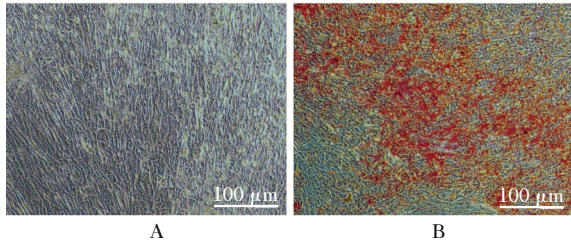


A: Lipogenic induction of ADSCs for 14 d; B: Oil red O staining of ADSCs.

图2 油红O染色观察ADSCs中脂滴形成情况

Fig. 2 Formation of lipid droplets in ADSCs observed by Oil red O staining

**2.4 各组EdU阳性细胞率** 与对照组( $21.05\% \pm 2.98\%$ )比较，10、20和40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ADSC-Exos组EdU阳性细胞率( $35.29\% \pm 1.72\%$ 、 $41.89\% \pm 3.67\%$ 和 $38.09\% \pm 0.23\%$ )均明显升高( $P < 0.05$ )；与10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ADSC-Exos组比较，20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ADSC-Exos组EdU阳性细胞率均明显升高( $P <$



A: Osteogenic induction of ADSCs for 32 d; B: Alizarin red staining of ADSCs.

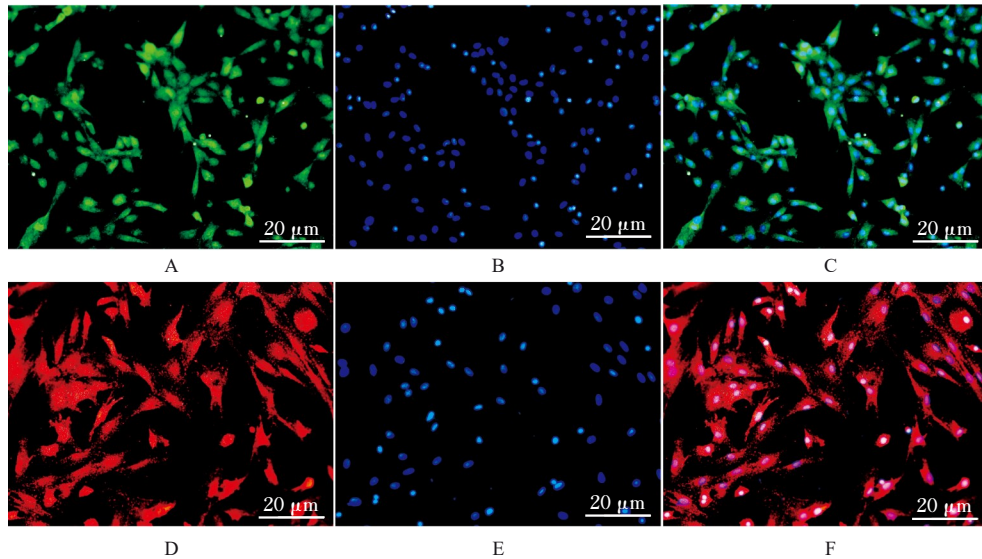
图3 茜素红染色观察ADSCs中矿化结节形成情况

Fig. 3 Formation of mineralized nodules in ADSCs observed by Alizarin red staining

0.05), 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组差异无统计学意义

( $P>0.05$ ); 与20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组比较, 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组EdU阳性细胞率差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图8。

**2.5 各组巨噬细胞迁移细胞数** 与对照组(67.33个±3.01个)比较, 10、20和40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组巨噬细胞迁移细胞数(165.00个±8.19个、267.00个±35.03个和232.67个±20.50个)均明显增加( $P<0.05$ )。与10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组比较, 20和40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组巨噬细胞迁移细胞数均明显增加( $P<0.05$ )。与20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组比较, 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组巨噬细胞迁移细胞数差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图9。



A—C: CD29; D—F: CD44; B, E: DAPI; C, F: Merge.

图4 免疫荧光法检测ADSCs中CD29和CD44蛋白阳性表达情况

Fig. 4 Positive expressions of CD29 and CD44 proteins in ADSCs detected by immunofluorescence assay

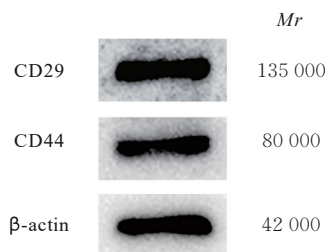
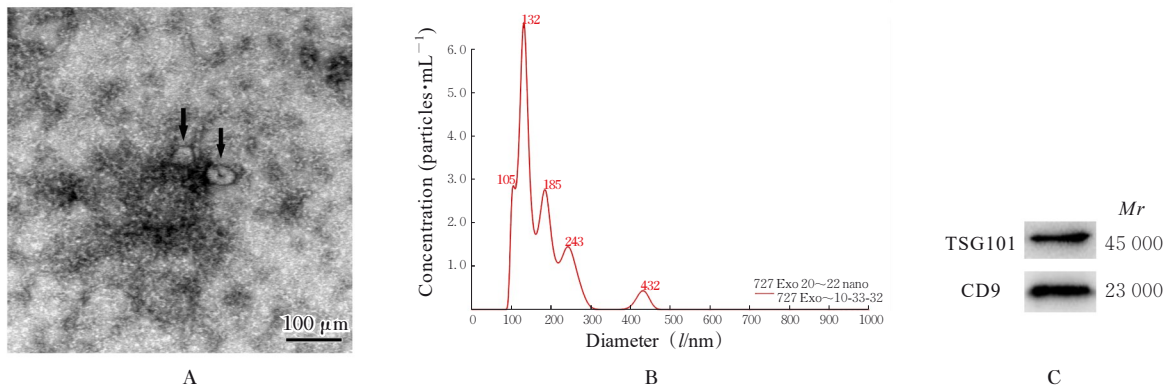


图5 Western blotting法检测ADSCs中CD29和CD44蛋白表达电泳图

Fig. 5 Electrophoregram of expressions of CD29 and CD44 proteins in ADSCs detected by Western blotting method

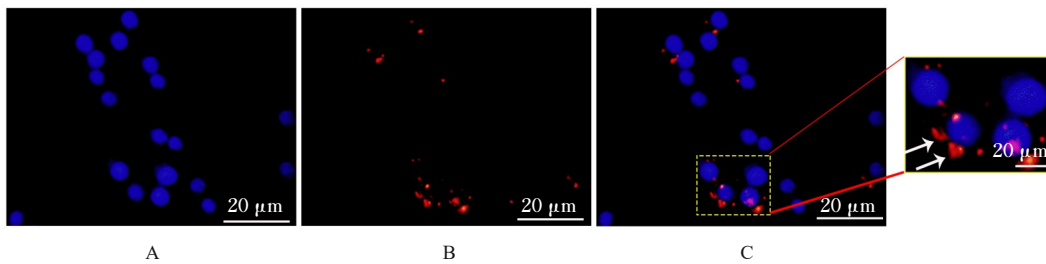
**2.6 各组巨噬细胞黏附细胞数** 与对照组(22.00个±7.21个)比较, 10、20和40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组巨噬细胞黏附细胞数(49.00个±3.00个、64.00个±7.00个和56.33个±1.53个)均明显增加( $P<0.05$ ); 与10 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组比较, 20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组巨噬细胞黏附细胞数均明显增加( $P<0.05$ ), 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 与20 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组比较, 40 mg·L<sup>-1</sup> ADSC-Exos组巨噬细胞黏附细胞数差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图10。



A: Morphology of ADSC-Exos observed by transmission electron microscope (Arrows indicated ADSC-Exos); B: Particle size of ADSC-Exos detected by nanoparticle tracking analyzer; C: Electrophoregram of expressions of CD9 and TSG101 proteins in ADSC-Exos detected by Western blotting method.

图6 ADSC-Exos鉴定结果

Fig. 6 Identification results of ADSC-Exos



Arrows indicated ADSC-Exos. A: DAPI; B: PKH26; C: Merge.

图7 荧光显微镜下观察巨噬细胞摄取ADSC-Exos情况(免疫荧光)

Fig. 7 Uptake of ADSC-Exos by macrophages observed under fluorescence microscope (Immunofluorescence)

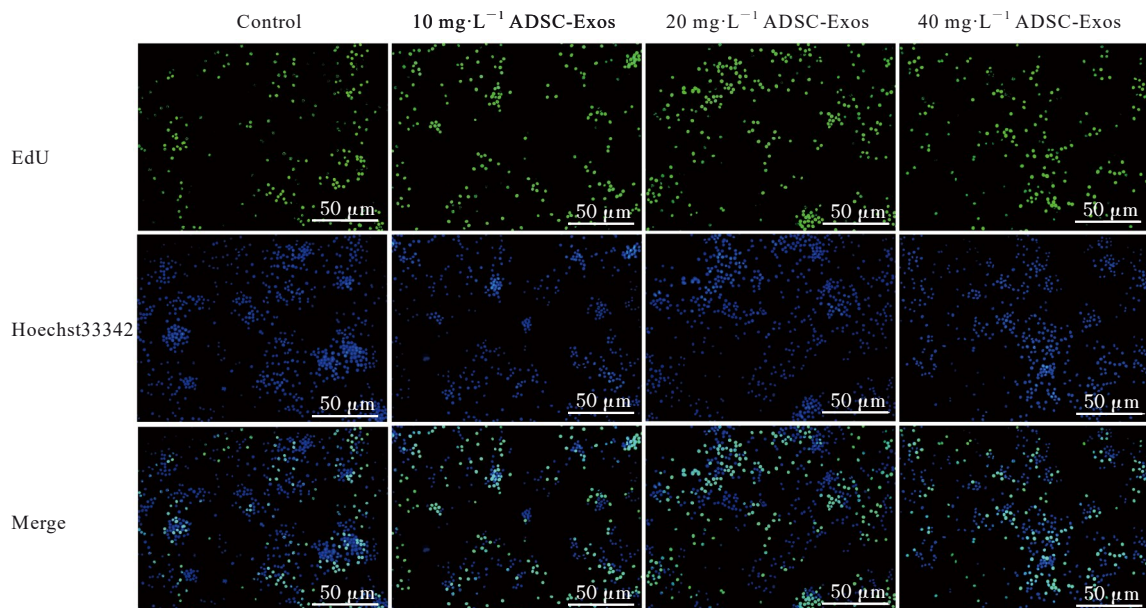
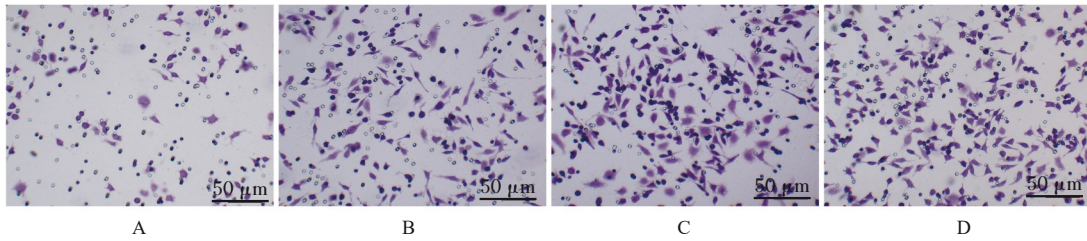


图8 荧光显微镜下观察RAW264.7细胞活性

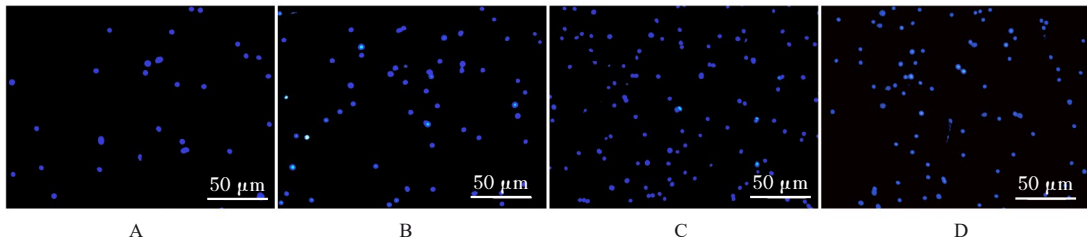
Fig. 8 Activities of RAW264.7 cells observed under fluorescence microscope



A: Control group; B:  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group; C:  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group; D:  $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group.

图9 ADSC-Exos作用后各组RAW264.7细胞迁移情况(结晶紫)

Fig. 9 Migration of RAW264.7 cells in various groups after treated with ADSC-Exos (Crystal violet)



A: Control group; B:  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group; C:  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group; D:  $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ADSC-Exos group.

图10 荧光显微镜观察ADSC-Exos作用后各组RAW264.7细胞黏附情况

Fig. 10 Adhesion of RAW264.7 cells in various groups after treated with ADSC-Exos observed by fluorescence microscope

### 3 讨论

ADSCs是一类来源广泛、分离操作简单易行且体外培养周期短的间充质干细胞<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13-15]</sup>显示:ADSCs在皮肤伤口愈合、延缓面部皮肤老化和周围神经损伤后修复等多领域均发挥重要作用。本研究结果显示:纯化的ADSCs形态均一,具有成脂和成骨分化特性,阳性表达CD29和CD44蛋白,与CHEN等<sup>[16]</sup>研究结果一致,表明ADSCs被成功分离。YIN等<sup>[17]</sup>认为:ADSCs的治疗作用是通过分泌Exos等生物活性物质来实现的,Exos凭借其安全性和稳定性等优势在机体的生理病理过程中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。但Exos体积微小,其高效快速地分离纯化是实验研究和蛋白组学分析的关键<sup>[19]</sup>。本研究结果显示:采用Exos分离试剂盒由ADSCs中提取ADSC-Exos,该方法获取的ADSC-Exos尺寸分布均一,粒径主峰分布于132 nm附近,呈茶碟状外观,CD9和TSG101蛋白表达阳性,提示本研究成功获取了ADSC-Exos,该方法操作简单、耗时短及灵敏度高。巨噬细胞具有较强的可塑性,其吞噬、极化和迁移等生理功能是体内平衡、免疫防御和组织修复的重要部分。FENG等<sup>[20]</sup>研究显示:采用ADSC-Exos处理的巨

噬细胞中炎症因子水平明显降低,ADSC-Exos通过抑制核因子 $\kappa\text{B}$ (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ )和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路抑制巨噬细胞的活化以缓解神经炎症。ZOU等<sup>[9]</sup>研究发现:SIRT6通过抑制巨噬细胞的吞噬和迁移等功能延缓神经再生。提示ADSC-Exos可以影响巨噬细胞的生理功能,当巨噬细胞功能改变时,会不同程度地影响机体的病理生理进程。迁移能力是巨噬细胞的重要生理功能之一,细胞迁移是活细胞发挥生理功能的基础,当机体的微环境发生改变时,巨噬细胞由血液中被募集到炎症部位的过程被称为巨噬细胞迁移<sup>[7, 21]</sup>。巨噬细胞迁移被认为是炎症性疾病、神经损伤后修复和动脉粥样硬化等病理进程的潜在治疗靶点<sup>[22-24]</sup>。本研究结果显示:ADSC-Exos可以被巨噬细胞特异性摄取至细胞核周围,且ADSC-Exos处理后巨噬细胞活性明显增强,迁移细胞数明显增加,提示ADSC-Exos提高了巨噬细胞的迁移能力。既往研究<sup>[25]</sup>显示:巨噬细胞迁移是一个动态过程,包括伸出伪足、细胞黏附、胞体收缩和黏附解离并向前移动,其中细胞黏附是由整合素与细胞外基质相应配体之间形成的牵引点,是细胞迁移的基础<sup>[26]</sup>。本研究结果显示:ADSC-Exos处理后黏附的巨

噬细胞数量明显增加,表明 ADSC-Exos 能够提高 RAW264.7 细胞的黏附能力,且作用趋势与 Transwell 小室实验结果一致,提示 ADSC-Exos 可通过影响巨噬细胞的黏附环节促进巨噬细胞迁移。

综上所述,ADSC-Exos 能够被巨噬细胞特异性摄取,并可增强巨噬细胞活性。通过促进巨噬细胞黏附提高 ADSC-Exos 的迁移能力,可为其治疗受损神经和相关炎症性疾病提供新的思路。本课题组未来将进一步从体外实验水平探讨 ADSC-Exos 促进巨噬细胞迁移的作用机制。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

袁博参与论文选题、实验设计和论文撰写,谢佳忆、江思瑜、孟亚军、朱清华和李晓飞参与实验数据获取及统计学分析,付秀美和谢利德参与实验设计指导及论文审校。

#### [参考文献]

- [1] BELLEI B, MIGLIANO E, PICARDO M. Research update of adipose tissue-based therapies in regenerative dermatology[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(6): 1956-1973.
- [2] ZHAO H B, CHEN W, CHEN J L, et al. ADSCs promote tenocyte proliferation by reducing the methylation level of lncRNA Morf4l1 in tendon injury[J]. *Front Chem*, 2022, 10: 908312.
- [3] LIU C Y, YIN G, SUN Y D, et al. Effect of exosomes from adipose-derived stem cells on the apoptosis of Schwann cells in peripheral nerve injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(2): 189-196.
- [4] ZHU H F, WU X Y, LIU R, et al. ECM-inspired hydrogels with ADSCs encapsulation for rheumatoid arthritis treatment[J]. *Adv Sci*, 2023, 10(9): e2206253.
- [5] RAU C S, KUO P J, WU S C, et al. Enhanced nerve regeneration by exosomes secreted by adipose-derived stem cells with or without FK506 stimulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8545.
- [6] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [7] GAO W J, LIU J X, LIU M N, et al. Macrophage 3D migration: a potential therapeutic target for inflammation and deleterious progression in diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 167: 105563.
- [8] LEY K, MILLER Y I, HEDRICK C C. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(7): 1506-1516.
- [9] ZOU Y, ZHANG J Q, XU J W, et al. SIRT6 inhibition delays peripheral nerve recovery by suppressing migration, phagocytosis and M2-polarization of macrophages[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 210.
- [10] ZHANG L, JIAO G J, REN S W, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 38.
- [11] WANG Y, SU J, FU D H, et al. The role of YB1 in renal cell carcinoma cell adhesion [J]. *Int J Med Sci*, 2018, 15(12): 1304-1311.
- [12] 李大伟, 张析哲, 周 琪. 雪旺细胞对周围神经损伤修复作用的研究进展[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(5): 197-198.
- [13] LI Y M, LI D Y, YOU L, et al. dCas9-based PDGFR- $\beta$  activation ADSCs accelerate wound healing in diabetic mice through angiogenesis and ECM remodeling[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(6): 5949.
- [14] ZAREI F, ABBASZADEH A. Application of cell therapy for anti-aging facial skin[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019, 14(3): 244-248.
- [15] 张雅群, 付 丽, 任译延, 等. 大鼠脂肪间充质干细胞的分离、培养及其向少突胶质前体细胞的诱导分化[J]. *解剖学报*, 2022, 53(5): 557-562.
- [16] CHEN J, REN S, DUSCHER D, et al. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote sciatic nerve regeneration via optimizing Schwann cell function[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23097-23110.
- [17] YIN G, YU B, LIU C Y, et al. Exosomes produced by adipose-derived stem cells inhibit schwann cells autophagy and promote the regeneration of the myelin sheath[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 132: 105921.
- [18] 汪文涛, 米旭光, 周 阳, 等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体诱导自噬对MPP<sup>+</sup>抑制SH-SY5Y细胞存活的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(3): 606-614.
- [19] 袁 博, 谢利德, 付秀美. 许旺细胞源性外泌体促进损伤周围神经的修复与再生[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(6): 935-940.
- [20] FENG N H, JIA Y J, HUANG X X. Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate neural injury caused by microglia activation via suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK pathway [J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 334: 576996.

- [21] SENGUPTA S, PARENT C A, BEAR J E. The principles of directed cell migration [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(8): 529-547.
- [22] ZHANG H, WANG Y F, ZHAO Y H, et al. PTX3 mediates the infiltration, migration, and inflammation-resolving-polarization of macrophages in glioblastoma [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(11): 1748-1766.
- [23] XU J W, FU L Y, DENG J Y, et al. MiR-301a deficiency attenuates the macrophage migration and phagocytosis through YY1/CXCR4 pathway [J]. *Cells*, 2022, 11(24): 3952.
- [24] CANFRÁN-DUQUE A, ROTLLAN N, ZHANG X B, et al. Macrophage-derived 25-hydroxycholesterol promotes vascular inflammation, atherogenesis, and lesion remodeling [J]. *Circulation*, 2023, 147(5): 388-408.
- [25] 汪 鹏, 仇建南, 王忠夏, 等. 肝癌微环境中肿瘤相关巨噬细胞的研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(5): 1212-1218.
- [26] STAHNKE S, DÖRING H, KUSCH C, et al. Loss of Hem1 disrupts macrophage function and impacts migration, phagocytosis, and integrin-mediated adhesion [J]. *Curr Biol*, 2021, 31(10): 2051-2064.