

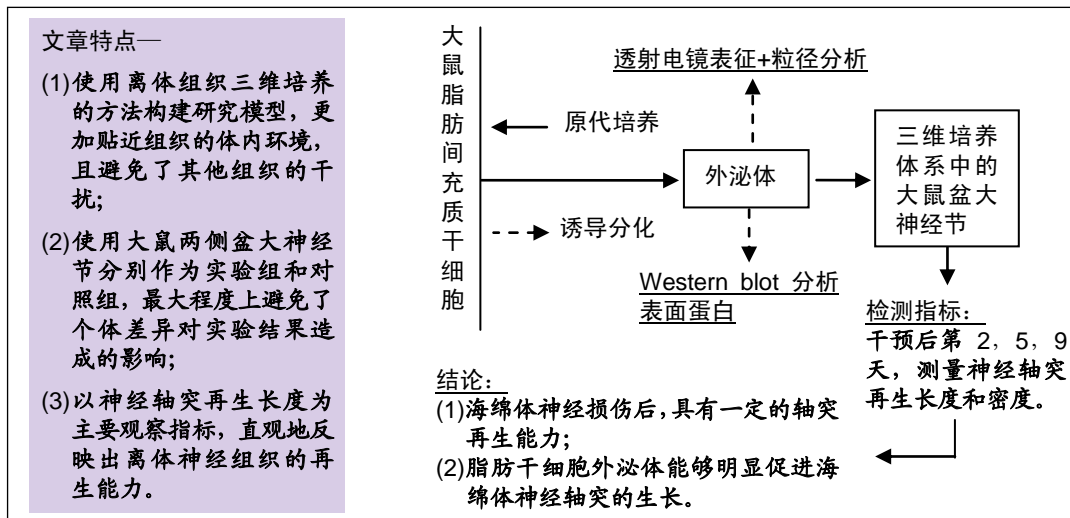
# 脂肪干细胞外泌体可促进大鼠海绵体神经再生

谷遇伯<sup>1</sup>, 张东亮<sup>1</sup>, 苑 炜<sup>1,2</sup>, 宋鲁杰<sup>1</sup> (<sup>1</sup>上海交通大学附属第六人民医院, 上海市 200233; <sup>2</sup>潍坊市人民医院, 山东省潍坊市 261000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2121

ORCID: 0000-0002-6271-3685(谷遇伯)

文章快速阅读:



谷遇伯, 男, 1990 年生, 山东省菏泽市人, 汉族, 上海交通大学医学院在读硕士, 医师, 主要从事组织工程与再生医学研究。

并列第一作者: 张东亮, 男, 1991 年生, 河南省驻马店市人, 汉族, 上海交通大学医学院在读博士, 主要从事干细胞组织工程修复重建研究。

通讯作者: 宋鲁杰, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 上海交通大学附属第六人民医院, 上海市 200233

文献标识码:A

投稿日期: 2019-09-23

送审日期: 2019-09-26

采用日期: 2019-10-15

在线日期: 2020-06-05



## 文题释义:

**外泌体:** 一种由细胞分泌的微小囊泡, 具有脂质双层膜结构, 直径范围为 20-150 nm。外泌体具有其母细胞的某些特性, 含有细胞特异的蛋白、脂质和核酸, 能携带信号分子传递给其他细胞从而改变靶细胞的功能状态。干细胞外泌体能在 4 °C 条件下临时保存, 也可在 -80 °C 长期保存。相较于干细胞, 其储存和运输更为方便, 且避免了冻存和复苏可能造成的细胞活力减弱和功能改变, 具有较高的临床转化价值。

**盆大神经节:** 雄性大鼠盆大神经节走行于前列腺背侧叶背部, 呈白色半透明星状或人字形, 接受盆神经和腹下神经支配, 其节后分支主要有支配膀胱的膀胱支和支配阴茎的海绵体神经。盆大神经节不仅含有副交感性胆碱能神经元, 也有去甲肾上腺素能神经元、交感性胆碱能神经元及多种肽能神经元。在结构功能上与其他种属动物的盆神经丛相似, 在盆腔脏器的功能活动中起重要作用。

## 摘要

**背景:** 海绵体神经是调控阴茎勃起的重要神经, 在盆腔手术或外伤中容易受到损伤, 导致阴茎勃起功能障碍。干细胞来源外泌体对于受损海绵体神经再生的直接影响目前尚无研究报道。

**目的:** 观察脂肪干细胞外泌体对海绵体神经再生的影响。

**方法:** 体外构建大鼠盆大神经节三维培养模型, 培养 24 h 后实验组换成含有青霉素-链霉素和脂肪干细胞来源外泌体的 RPMI-1640 培养基, 外泌体浓度为  $10^{15} \text{ L}^{-1}$ , 对照组仍使用含有青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基。干预开始后第 2, 5, 9 天观察两组海绵体神经断端再生情况, 并测量轴突生长长度, 用以评价海绵体神经再生能力。

**结果与结论:** ①从大鼠肾周脂肪组织获得的原代脂肪干细胞贴壁生长, 形态稳定, 能够诱导分化为脂肪、骨和软骨; ②提取自第 3 代脂肪干细胞的外泌体呈大小均一的囊泡结构, 直径集中在 85 nm 附近; ③三维培养体系中的海绵体神经自身具有一定的再生能力, 外泌体干预后 2, 5, 9 d 实验组海绵体神经再生情况均优于对照组, 轴突再生长度明显大于对照组; ④结果表明, 脂肪干细胞来源外泌体直接作用于海绵体神经, 对其再生具有显著的促进作用。

## 关键词:

脂肪干细胞; 外泌体; 海绵体神经; 盆大神经节; 轴突; 再生; 三维培养

中图分类号: R459.9; R394.2; R318.0

## 基金资助:

国家自然科学基金(81671451), 项目负责人: 宋鲁杰; 上海市自然科学基金(18ZR1429200), 项目负责人: 宋鲁杰; 上海交通大学-香港科技大学联合科研基金(WF610561702), 项目负责人: 宋鲁杰

## Exosomes from adipose-derived stem cells can promote cavernous nerve regeneration in rats

Gu Yubo<sup>1</sup>, Zhang Dongliang<sup>1</sup>, Yuan Wei<sup>1,2</sup>, Song Lujie<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China; <sup>2</sup>Weifang People's Hospital, Weifang 261000, Shandong Province, China)

Gu Yubo, Master candidate, Surgical resident, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Zhang Dongliang, Doctoral candidate, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

Gu Yubo and Zhang Dongliang contributed equally to this work.

Corresponding author: Song Lujie, MD, Associate chief surgeon, Master's supervisor, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Cavernous nerve is one of the main nerves regulating penile erection, which is easy to be damaged in pelvis surgery and due to trauma and induce erectile dysfunction. The direct effect of stem cell-derived exosome on the regeneration of injured cavernous nerve has not been reported yet.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of the exosomes from adipose-derived stem cells on the regeneration of cavernous nerve.

**METHODS:** Three-dimensional culture model of rat nerve tissue *in vitro* was constructed. After 24 hours of incubation, the experimental group was incubated in the RPMI-1640 medium containing penicillin-streptomycin and exosomes ( $10^{15}$ /L) from adipose-derived stem cells. The control group was incubated in the RPMI-1640 medium. The length of axon regeneration at the incisal edge of the cavernous nerve was measured to evaluate the regeneration ability of the cavernous nerve at 2, 5 and 9 days after intervention.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Adipose-derived stem cells extracted from rat perirenal adipose tissue adhered with stable morphology and could be induced to differentiate into adipose, bone and cartilage. The exosomes extracted from the passage 3 adipose-derived stem cells showed similar vesicle structure with a diameter near 85 nm. In the three-dimensional culture system, the regeneration ability of the cavernous nerve itself was certain. The axon regeneration length in the experimental group was significantly longer than that in the control group at 2, 5 and 9 days after intervention. The exosomes from adipose-derived stem cells directly act on the cavernous nerve and have a significant promoting effect on nerve regeneration.

**Key words:** adipose-derived stem cells; exosomes; cavernous nerve; major pelvic ganglion; axon; regeneration; three-dimensional culture

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81671451 (to SLJ); the Natural Science Foundation of Shanghai, No.

18ZR1429200 (to SLJ); the Shanghai Jiao Tong University- Hong Kong University of Science and Technology Joint Research Foundation, No. WF610561702 (to SLJ)

## 0 引言 Introduction

随着前列腺手术的广泛开展, 神经损伤性勃起功能障碍(erecile dysfunction, ED)也越来越受到关注。海绵体神经(cavernous nerves, CN)是起始于盆神经丛的自主神经, 是调控阴茎勃起的主要神经之一。在盆腔手术或创伤中, 海绵体神经容易受到顿挫或离断损伤<sup>[1]</sup>。虽然近年来外科医生不断改进手术方式, 但根治性前列腺切除术后12个月, 仍有超过70%的患者难以恢复术前的勃起功能, 而被诊断为勃起功能障碍<sup>[2]</sup>; 骨盆骨折尿道损伤也容易造成海绵体神经损伤, 高达95.12%的骨盆骨折尿道损伤患者并发勃起功能障碍<sup>[3]</sup>。

外泌体是一类来自细胞的脂质双分子层结构囊泡, 它们选择性地包裹脂质、蛋白质及RNA等多种生物活性物质, 参与细胞间的通讯<sup>[4]</sup>。间充质干细胞产生的外泌体作为干细胞旁分泌的重要物质, 在某些方面保持着与干细胞相似的生物活性<sup>[5]</sup>。越来越多的研究提示, 干细胞来源外泌体也能促进组织再生与修复, 可用作无细胞的“干细胞疗法”, 具有广泛的应用前景和临床转化价值<sup>[6-10]</sup>。

已有研究证实, 干细胞来源外泌体能够被神经元摄取, 并通过逆向轴浆运输抵达胞体<sup>[11]</sup>, 发挥神经营养和调节作用, 抑制神经损伤性疼痛<sup>[12]</sup>。然而外泌体用于神经损伤性勃起功能障碍治疗尚缺乏足够的基础研究证据, 且无研究关注外泌体对海绵体神经损伤修复的直接影响。脂肪干细胞取材方便, 被广泛用于再生医学研究, 因此该实验获取大鼠脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)来源外泌体, 体外观察其对海绵体神经轴突再生的作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 三维培养体系中的体外神经节组织观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年2月至8月在上海交通大学附属第六人民医院动物实验室、中心实验室和上海东方泌尿修复重建研究所完成。

## 1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性8周龄SPF级Sprague Dawley(SD)大鼠15只, 体质量273-291 g, 由上海市第六人民医院动物实验室提供。

1.3.2 实验用主要试剂 I型胶原酶(Gibco, 美国); DMEM/F12培养基(Hyclone, 美国); 胎牛血清(Gibco, 美国); 无外泌体胎牛血清(宇玫博生物科技有限公司, 中国); 油红O(赛业生物科技有限公司, 中国); 茜素红(赛业生物科技有限公司, 中国); 阿利新蓝8GX(Sigma, 美国); 0.25%胰蛋白酶(Gibco, 美国); SD大鼠脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基(赛业生物科技有限公司, 中国); 含胎牛血清、谷氨酰胺、双抗、抗坏血酸、 $\beta$ -甘油磷酸钠、地塞米松); SD大鼠脂肪间充质干细胞成软骨诱导分化完全培养基(赛业生物科技有限公司, 中国); 含地塞米松、抗坏血酸、ITS、丙酮酸钠、脯氨酸、转化生长因子 $\beta$ 3); SD大鼠脂肪间充质干细胞成脂诱导分化培养基(赛业生物科技有限公司, 中国); 含胎牛血清、谷氨酰胺、双抗、胰岛素、IBMX、罗格列酮、地塞米松); 抗CD63抗体(Abcam, 美国); 抗CD81抗体(Abcam, 美国); 外泌体提取纯化试剂盒(宇玫博生物科技有限公司, 中国); 低生长因子Matrigel基质胶(Corning, 美国)。

1.3.3 实验用主要仪器 恒温培养箱(Thermo, 美国); 离心机(湘仪, 中国); 低温超速离心机(Eppendorf, 德国); ZetaView PMX 110 纳米粒度仪(Particle Metrix, 德国)。

## 1.4 实验方法

1.4.1 大鼠脂肪干细胞提取和培养 取5只SD大鼠, 腹腔注射戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉后固定于大鼠固定板, 取腹中线切口打开腹腔。用刀柄轻柔拨开肠管, 显露肾周脂肪。使用无齿镊轻夹脂肪包膜, 持眼科剪小心分离脂肪组织, 注意避免损伤周围大血管。取出的脂肪组织经PBS冲洗后, 仔细剔除包膜和血管, 剪碎, 加入等体积0.075% I型胶原酶, 置于37 °C恒温振荡器消化50 min; 静置3 min吸除上

层油脂后200目滤网过滤; 1 000×g离心5 min, 去除悬浮物及上清液, 用含青霉素-链霉素和体积分数10%胎牛血清的低糖DMEM培养基重悬, 移入10 cm培养皿培养, 次日轻柔冲洗并全量换液后, 每3 d半量换液; 细胞融合生长至80%~90%时, 用0.25%胰蛋白酶消化传代。

取材后的大鼠注射过量戊巴比妥钠处死。

**1.4.2 脂肪干细胞诱导分化** 脂肪干细胞传至第3代时, 消化重悬后调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ , 接种于24孔板中, 24 h后换用SD大鼠脂肪间质干细胞成脂诱导分化培养基; 每3 d全量换液1次, 成脂诱导14 d后弃去24孔板中细胞培养基, 固定并使用油红O染色。

脂肪干细胞传至第3代时, 消化重悬后调整细胞浓度为 $2 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ , 接种于24孔板中, 24 h后全量换液为SD大鼠脂肪间充质干细胞成骨诱导分化培养基; 每3 d全量换液1次, 成骨诱导21 d后进行茜素红染色。

取第3代脂肪干细胞 $2 \times 10^5$ 个, 置入15 mL离心管中, 1 000×g离心5 min, 弃上清, 缓慢加入SD大鼠脂肪间充质干细胞成软骨诱导分化完全培养基; 每3 d全量换液1次, 成软骨诱导30 d后收集细胞团块, 清洗固定后石蜡包埋, 切片, 阿利新蓝染色。

#### 脂肪干细胞的培养及鉴定

<b>细胞来源:</b>	大鼠脂肪组织
<b>原代培养方法:</b>	酶消化法
<b>基础培养基:</b>	DMEM 低糖培养基
<b>添加材料:</b>	体积分数为10%无菌胎牛血清、青霉素-链霉素
<b>原代培养时间:</b>	原代细胞培养次日全量换液并轻柔冲洗, 之后两三天半量换液1次, 培养五六天即可传代
<b>细胞传代:</b>	细胞融合至80%用0.25%胰蛋白酶消化传至下1代, 按1:3比例传代, 五六天传1代, 共传3代
<b>细胞鉴定:</b>	成骨诱导分化、成脂诱导分化、成软骨诱导分化
<b>伦理学批准:</b>	该实验经过上海市第六人民医院动物福利伦理委员会批准

**1.4.3 外泌体提取** 待传至第3代的大鼠脂肪干细胞融合生长至80%左右时, 弃去全部培养基, 换用含青霉素-链霉素和体积分数10%无外泌体胎牛血清的低糖DMEM培养基继续培养, 每日观察生长状态不佳的细胞应整皿丢弃; 更换培养基并培养48 h后收集培养基上清液。将样品转移至离心管中, 于4 °C以3 000×g离心10 min, 去除样品中的细胞碎片; 在去除杂质的离心上清液中加入外泌体提取试剂, 振荡1 min使其充分混匀, 于4 °C环境下静置2 h后, 4 °C环境中10 000×g离心60 min, 弃去上清液, 取200 μL PBS重悬沉淀, 于4 °C以12 000×g离心2 min, 获得上清液, 即外泌体悬液。

**1.4.4 外泌体表征** 取约10 μg外泌体悬液滴于封口膜上, 用镊子取1个铜网盖在液滴上5 min, PBS清洗, 戊二醛固定5 min, 将铜网先后放在滴有草酸双氧水和甲基纤维

素液滴的封口膜上, 染色完成后透射电镜观察并拍照。

将外泌体悬液稀释后加样, 使用Zeta View PMX 110进行外泌体粒径检测。选取11个位置进行颗粒追踪分析, 即可获得外泌体粒径分布数据。

**Western blot法检测外泌体的标志性蛋白:** 取40 μg外泌体蛋白, 加5×SDS-PAGE上样缓冲液, 水浴煮沸15 min后冷却至室温; 上样并进行电泳, 湿转膜封闭2 h; 分别加入1:1 000稀释后的抗CD63和CD81一抗, 4 °C孵育过夜; 洗膜后加二抗室温孵育; 经显影设备曝光成像拍照。

**1.4.5 大鼠盆大神经节(major pelvic ganglion, MPG)三维培养体系的建立** 取10只SD大鼠, 腹腔注射戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉后固定于大鼠固定板, 取腹中线切口打开腹腔, 沿精囊向大鼠尾侧寻找并分离前列腺背侧叶, 可发现白色半透明状的盆大神经节贴附于前列腺表面, 并有明显分支, 不同个体盆大神经节形态略有差异, 呈星状或人字形, 其中延伸向阴茎的分支即为海绵体神经, 使用缝线标记后游离并离断盆大神经节各分支, 获取盆大神经节离体组织。将离体的盆大神经节使用PBS漂洗后置于解剖显微镜下剥除筋膜, 放入4 °C预冷DMEM/F12培养基待用。取材后, 注射过量戊巴比妥钠将大鼠处死。

取20 μL低生长因子Matrigel均匀涂布于边长为9 mm的正方形特制盖玻片表面, 室温静置60 min待其凝固成胶; 将离体盆大神经节放置于预处理后的盖玻片上, 展平, 注意海绵体神经残端朝向, 以便后续观察; 取30 μL低生长因子Matrigel覆盖于盆大神经节表面, 37 °C环境中静置15 min待其凝固成胶, 将带有盆大神经节的玻片放入24孔培养板中, 加入含有青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基, 放入37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。

**1.4.6 外泌体对海绵体神经轴突再生的影响** 将每只大鼠双侧盆大神经节分为实验组和对照组, 以进一步排除个体间差异对结果造成的影响。体外培养24 h后予以干预, 实验组换成含有青霉素-链霉素和脂肪干细胞来源外泌体的培养基, 外泌体浓度为 $10^{15} \text{ L}^{-1}$ ; 对照组仍使用含有青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基。两组均在37 °C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>环境下继续培养, 每2 d半量换液。干预开始后第2, 5, 9天使用倒置相差显微镜分别观察两组海绵体神经轴突生长情况, 并使用ImageJ软件进行轴突长度测量, 每个样本均由2人进行重复测量。每位测量者的操作如下: 目视选取轴突延伸较长的3个视野进行拍照后测量, 每个视野中轴突长度测量3次并取平均值; 对比3个视野所测得轴突长度, 取延伸最长的视野纳入统计。纳入长度统计的视野同时用来分析轴突生长密度, 即沿海绵体神经断端轮廓描记100 μm长度, 计数描记范围内轴突数量; 2人分别计数3次并各自取平均数纳入统计。

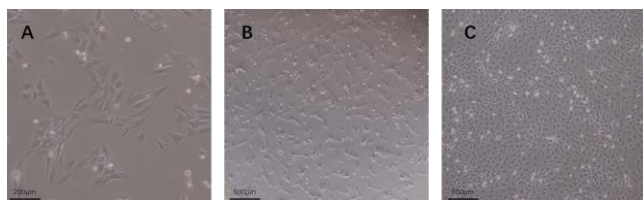
**1.5 主要观察指标** ①脂肪干细胞的形态; ②脂肪干细胞的成脂、成骨及成软骨分化能力; ③脂肪干细胞外泌体的

形态和大小; ④脂肪干细胞外泌体对海绵体神经轴突再生的影响, 并测量轴突长度。

**1.6 统计学分析** 采用SPSS 20.0进行统计学分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 的形式描述, 多时点重复测量资料使用重复测量方差分析, 组间比较使用LSD-*t* 检验, 不同时间两两比较采用差值*t* 检验, 按Bonferroni法调整检验水准,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 脂肪间充质干细胞的形态学变化** 接种后24 h可见细胞贴壁, 呈细小梭形, 冲洗后12 h内高倍视野可见细胞生长空间充足, 贴壁充分, 见图1A; 接种后第3天, 贴壁细胞数量明显增多, 细胞分布均匀, 但有聚集生长的趋势, 细胞呈梭形或多边形, 见图1B; 接种后第5天, 细胞生长较为紧密, 可达90%融合, 见图1C。传至第3代, 脂肪干细胞形态稳定。

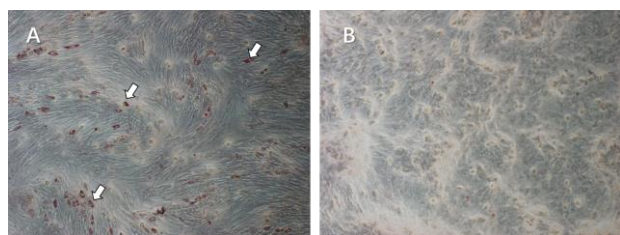


图注: 图中 A 为接种并冲洗后 12 h, 细胞贴壁, 充分伸展( $\times 100$ ); B 为培养第 3 天, 细胞呈梭形( $\times 40$ ); C 为培养第 5 天, 细胞排列紧密, 逐渐呈巢状分布( $\times 40$ )

图 1 SD 大鼠脂肪干细胞的形态

Figure 1 Morphology of Sprague-Dawley rat adipose-derived stem cells

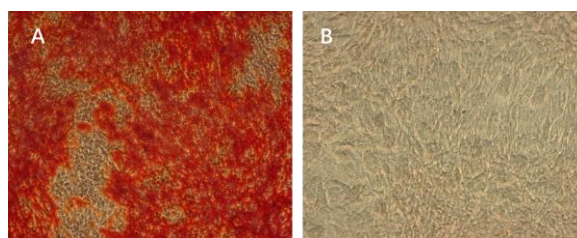
**2.2 脂肪干细胞的诱导分化能力** 大鼠脂肪干细胞经成脂诱导后体积增大, 胞浆中可见许多大小不等的透亮脂滴, 油红O染色后呈橙红色, 见图2。成骨诱导21 d后茜素红染色倒置显微镜下观察可见广泛分布的红色钙结节, 阴性对照组未见红染结节, 见图3。成软骨诱导后细胞团块胞内基质均匀蓝染, 表明诱导后细胞产生了软骨细胞基质糖胺聚糖, 见图4, 阴性对照组细胞团块消散, 未能获取可供切片的组织块。



图注: 图中 A 为成脂诱导 14 d, 脂肪空泡被油红 O 染色为橘红色(箭头); B 为未使用成脂诱导培养基, 油红 O 染色阴性

图 2 脂肪干细胞成脂诱导分化( $\times 100$ )

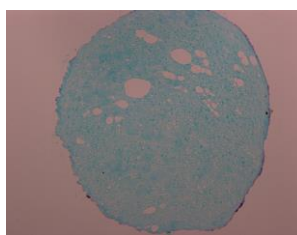
Figure 2 Adipogenic induction and differentiation of adipose-derived stem cells ( $\times 100$ )



图注: 图中 A 为成骨诱导 21 d 后进行茜素红染色, 可见广泛分布钙结节被染成红色(图中深色区域); B 为未使用成骨诱导培养基, 茜素红染色阴性

图 3 脂肪干细胞成骨诱导分化( $\times 100$ )

Figure 3 Osteogenic induction and differentiation of adipose-derived stem cells ( $\times 100$ )

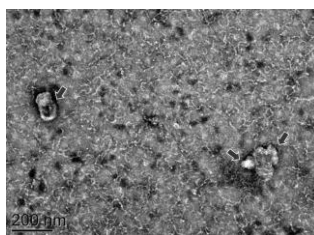


图注: 成软骨诱导 30 d 后可收集到团块, 切片后阿利新蓝染色可见软骨细胞基质糖胺聚糖蓝染

图 4 脂肪干细胞成软骨诱导分化( $\times 200$ )

Figure 4 Chondrogenic induction and differentiation of adipose-derived stem cells ( $\times 200$ )

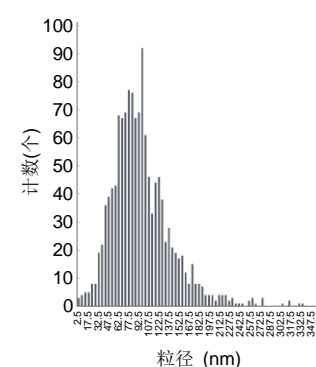
**2.3 外泌体表征** 透射电镜下观察超速离心法收集得到大鼠脂肪干细胞外泌体, 可见大小均一的椭圆形或杯口状囊泡结构, 见图5。颗粒粒度分析仪检测共追踪外泌体1 327 个, 见图6, 外泌体粒径主要分布在44-146 nm之间, 中位数为85 nm。Western blot检测结果显示CD63和CD81在脂肪干细胞来源外泌体中均有表达, 见图7。



图注: 箭头示外泌体, 草酸双氧铀负染后透射电镜下观察可见囊泡样结构

图 5 脂肪干细胞外泌体透射电镜下超微结构(标尺为 200 nm)

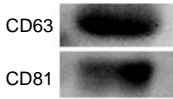
Figure 5 Ultrastructure of exosomes from adipose-derived stem cells under transmission electron microscope (scale bar: 200 nm)



图注: ZetaView PMX 110 追踪外泌体颗粒进行粒径测量, 以粒径为横坐标, 粒径范围( $\pm 2.5$  nm)内颗粒计数为纵坐标绘图, 可见样本直径主要分布在 44-146 nm 之间

图 6 脂肪干细胞外泌体粒径分布

Figure 6 Size distribution of exosomes from adipose-derived stem cells

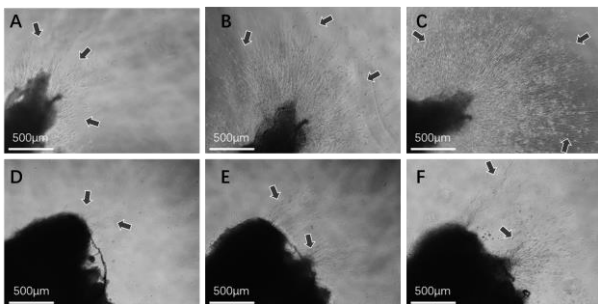


图注：可见 CD63 和 CD81 有明显表达

图 7 Western blot 检测脂肪干细胞外泌体标志性蛋白的表达

Figure 7 Western blot assay results of marked proteins of exosomes from adipose-derived stem cells

2.4 外泌体对海绵体神经轴突再生的影响 实施干预时，各组海绵体神经断端均未见轴突生长。干预后，随着培养时间的延长，两组均可见明显轴突再生，见图8。整体比较可知：以轴突再生长度为指标，组间、时间及交互作用均有显著性意义，见表1、图9。



图注：三维培养体系中的盆大神经节放于倒置显微镜下观察，可见神经轴突生长(箭头所示)。干预开始后第 2 天，实验组(A)和对照组(D)海绵体神经断端均可见轴突生长；干预第 5 天，实验组(B)轴突长度和密度均大于对照组(E)；干预第 9 天，实验组(C)轴突长度和密度明显优于对照组(F)

图 8 脂肪干细胞外泌体对海绵体神经轴突再生的影响

Figure 8 Effect of the exosomes from adipose-derived stem cells on the axonal regeneration of the cavernous nerve

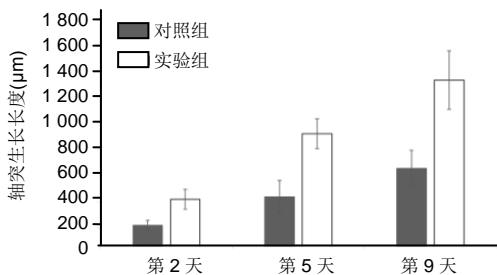


图 9 脂肪干细胞外泌体对海绵体神经轴突生长长度的影响

Figure 9 Effect of the exosomes from adipose-derived stem cells on the regenerated length of cavernous nerve axon

不同时间点实验组轴突再生均显著优于对照组。干预后第2天，实验组与对照组轴突再生长度差异有显著性意义，差值为204.03(95% CI: 173.01-235.05) μm,  $F_{(1, 19)}=189.56$ ,  $P < 0.01$ ；干预后第5天，实验组与对照组轴突再生长度差异有显著性意义，差值为497.92(95% CI: 432.56-563.28) μm,  $F_{(1, 19)}=254.23$ ,  $P < 0.01$ ；干预后第9天，实验组与对照组轴突再生长度差异有显著性意义，差值为699.42(95% CI: 589.96-808.88) μm,  $F_{(1, 19)}=178.87$ ,  $P < 0.01$ 。

表 1 脂肪干细胞来源外泌体对海绵体神经轴突再生长度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ , μm)

Table 1 Effect of the exosomes from adipose-derived stem cells on the regenerated length of cavernous nerve axon

组别	观测时间		
	第 2 天	第 5 天	第 9 天
实验组	372.91±76.86 <sup>a</sup>	890.10±117.35 <sup>ab</sup>	1 315.66±230.69 <sup>ab</sup>
对照组	168.88±36.14	392.19±129.57 <sup>b</sup>	616.25±145.55 <sup>b</sup>
整体分析	HF 系数	0.833	
组间比较	F 值, P 值	430.967, 0.000	
时间比较	F 值, P 值	360.693, 0.000	
交互作用	F 值, P 值	51.489, 0.000	

表注：整体分析为两因素重复测量方差分析，资料球形校正采用 HF 系数。组间精细比较为 LSD-t 检验，与对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。时间精细比较为差值 t 检验，与第 2 天比较，<sup>b</sup> $P < \alpha'$ ,  $\alpha'$  为 Bonferroni 校正后的检验水准=0.05/n, n 为时间维度上精细比较的次数

不论是实验组还是对照组，随着培养时间的延长，海绵体神经轴突均能明显生长。实验组  $F_{(1.623, 30.861)}=272.23$ ,  $P < 0.01$ ；第5天轴突长度与第2天轴突长度比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ )，差值为517.16(95% CI: 458.55-575.84) μm，第9天轴突长度与第5天轴突长度比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ )，差值为425.56(95% CI: 323.73-527.39) μm。对照组  $F_{(2, 38)}=110.08$ ,  $P < 0.01$ ；第5天轴突长度与第2天轴突长度比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ )，差值为223.31(95% CI: 167.72-278.90) μm，第9天轴突长度与第5天轴突长度比较差异有显著性意义( $P < 0.01$ )，差值为224.06(95% CI: 156.64-291.45) μm。

对轴突生长密度进行观察并对断端单位长度内轴突数量进行统计，实验组第2天轴突数量为(13.90±3.43)条，显著高于对照组(11.35±2.56)条， $P=0.01$ 。实验组第5天和第9天轴突生长密度过大，相差显微镜下难以精确计数，因此未获得有效数据用于比较。

### 3 讨论 Discussion

神经损伤性勃起功能障碍是长期困扰着医生和患者的难题，手术操作或创伤发生时的挤压、牵拉、切割、烧灼等均可能导致海绵体神经损伤<sup>[13-14]</sup>。诸多证据表明，神经轴突的再生和靶器官的神经再支配很大程度上影响着海绵体神经损伤后的修复过程<sup>[15]</sup>。尽管周围神经系统在损伤后可表现出一定的再生能力，但这种自身的修复能力是有限的，难以完全修复损伤导致的轴突退变和神经功能丧失<sup>[15-16]</sup>。海绵体神经损伤后，阴茎平滑肌细胞和内皮细胞凋亡，一氧化氮合酶阳性神经密度降低，转化生长因子β表达上调，导致海绵体平滑肌发生纤维化，进而损伤阴茎组织结构，难以实现勃起<sup>[15, 17-19]</sup>。海绵体神经损伤后阴茎长期处于疲软状态，也会进一步导致海绵状平滑肌结构退变，使神经再生和结构修复更为困难<sup>[20]</sup>。因此，损伤后早期促进海绵体

神经再生, 是改善勃起功能的关键。

当前促进海绵体神经再生的基础研究中, 干细胞治疗由于具有恢复勃起功能的潜力而备受青睐<sup>[21]</sup>。多种类型干细胞被用于勃起功能障碍相关研究, 包括间充质干细胞、胚胎干细胞、尿源性干细胞、神经嵴干细胞、内皮祖细胞和肌肉源性干细胞等。脂肪干细胞是间充质干细胞的一种, 其自体取材方便且取材创伤相对较小, 因而在动物实验和临床研究中使用较多, 有研究认为脂肪干细胞治疗勃起功能障碍的效果优于骨髓干细胞<sup>[22]</sup>, 进一步推动了脂肪干细胞的应用。虽然一些研究仍认为干细胞的定植和分化是促进勃起功能恢复的主要原因, 但目前越来越多的研究者相信干细胞的旁分泌作用更为重要<sup>[23]</sup>。勃起功能的改善似乎依赖于注射细胞通过旁分泌一些细胞保护、抗纤维化和抗凋亡分子<sup>[24]</sup>。尽管在动物实验中取得了较好的疗效, 但干细胞在注射部位的存留比例过低, 这不仅限制了其治疗潜力的发挥, 同时干细胞治疗仍存在许多问题: 同种异体细胞具有免疫原性, 而自体干细胞获取时会对患者造成损伤; 干细胞的最佳传代数目、注射的最佳细胞浓度、注射剂量和注射次数尚无定论<sup>[10, 25]</sup>。除此之外, 干细胞的污染风险、致癌风险和栓塞风险也需要更严谨的评估<sup>[26-27]</sup>。

干细胞来源外泌体的发现有望使上述问题得到更好的解决<sup>[28-30]</sup>。外泌体是一种由细胞主动释放的具有脂质双层分子结构的囊泡, 直径范围为20-150 nm<sup>[4]</sup>。作为细胞间信号传递的媒介, 外泌体能够运送蛋白质、核酸等生物活性分子, 以调节靶细胞基因表达和细胞功能。干细胞在治疗中所表现出的细胞保护作用 and 促血管化作用均能被其所释放的外泌体重现<sup>[31-32]</sup>。与干细胞相比, 外泌体易于储存和运输且致癌风险低和免疫原性弱, 安全性较好, 更利于临床转化应用。OUYANG等<sup>[29]</sup>使用骨髓间充质干细胞来源外泌体治疗海绵体神经损伤大鼠, 观察到了与骨髓间充质干细胞治疗相似的勃起功能恢复。LI等<sup>[30]</sup>也证实了脂肪间充质干细胞和骨髓间充质干细胞来源外泌体均能够对海绵体神经损伤性勃起功能障碍起到治疗作用。然而现有研究多局限于动物体内研究, 虽然能够从功能和组织学角度证实外泌体的治疗效果, 但难以精确阐述其促进勃起功能恢复的机制。ZHU等<sup>[28]</sup>发现脂肪间充质干细胞来源外泌体在体外实验中能够促进血管内皮细胞增殖和成管, 同时也能够增加阴茎组织中一氧化氮合酶阳性神经纤维密度, 但尚无研究关注干细胞来源外泌体对海绵体神经的再生是否具有直接促进作用。

大鼠的泌尿生殖器官均受到盆大神经节调控, 海绵体神经即由盆大神经节发出并最终支配阴茎, 并调控其实现勃起等功能<sup>[33]</sup>。大鼠勃起功能障碍模型构建的重要方法之一, 就是从盆大神经节延伸为海绵体神经处将其进行钳夹或灼烧损伤。不论从生理功能还是从模型构建的角度来说, 盆大神经节在勃起功能障碍相关研究中具有重要的意义。动物体内实验中, 周围组织纤维化、再血管化以及靶器官的神经营养作用等局部组织状态对神经再生的影响较大,

难以明确判断神经束再生的原因是干预措施的直接作用还是组织纤维化被抑制的间接作用, 因此该实验使用大鼠盆大神经节构建体外三维培养模型<sup>[34-35]</sup>, 排除局部其他组织因素对神经组织造成的影响, 更为直接地观察外泌体对海绵体神经再生的影响, 同时采用三维培养的方法使离体组织的生长环境更加贴近体内状态。加入外泌体进行干预后, 对海绵体神经轴突再生的长度和密度进行观察, 从神经再生的角度为外泌体对于勃起功能障碍的治疗作用提供了初步证据, 同时也为海绵体神经重建术等外科治疗后的功能康复提供了新的思路。

干细胞释放外泌体发挥细胞间信号转导的作用, 为损伤组织和细胞构建适于修复和再生的微环境<sup>[36]</sup>。干细胞来源外泌体中含有富集的miR148a、miR532-5p、miR378等具有促进神经再生功能的miRNA, 一些miRNA能够通过激活ERK信号通路和STAT3信号通路, 使神经生长因子等高表达<sup>[37-38]</sup>; 一些miRNA则能够通过激活PI3K/Akt信号通路提高神经元对损伤的耐受程度<sup>[39]</sup>。不同干细胞来源外泌体所含miRNA不尽相同, 因此对神经再生的促进作用也会有差别。还有研究指出, 干细胞来源外泌体可以调控炎症反应, 为组织修复提供合适的免疫环境<sup>[40]</sup>。由于该实验使用体外组织培养模型, 因此炎症调控发挥的作用可能较为有限。此外, 外泌体具有肌动蛋白和 $\beta$ -微管蛋白等细胞骨架成分<sup>[41]</sup>, 因此可能为体外神经组织的再生提供了更多的“原材料”。总之, 干细胞来源外泌体可通过多种途径促进海绵体神经再生, 具体机制仍需要继续进行探索。

考虑到大鼠的个体差异可能对其海绵体神经再生能力造成影响, 故在实验中将同一大鼠双侧盆大神经节分别分为实验组和对照组。未能设置不同外泌体浓度下的相互对照。在后续的实验中将通过扩大样本数量和随机分组的方法, 对照不同外泌体浓度对海绵体神经再生能力的影响。

综上所述, 通过脂肪干细胞培养获取外泌体并用于治疗是可行的。海绵体神经损伤后具有一定的轴突再生能力, 且加入浓度为 $10^{15} L^{-1}$ 的脂肪间充质干细胞来源外泌体能够显著促进海绵体神经轴突的生长。该实验使用离体盆大神经节组织作为模型进行研究, 排除了周围组织血管化条件等局部因素对神经再生造成的影响, 证明了脂肪间充质干细胞来源外泌体对损伤后海绵体神经再生的促进作用, 进一步探索脂肪干细胞来源外泌体对海绵体神经损伤后再生的作用, 将能够更好地推动外泌体治疗海绵体神经损伤性的机制研究, 为其临床转化奠定理论基础。

**作者贡献:** 实验指导、实验评估为宋鲁杰, 实验设计为谷遇伯、张东亮, 资料收集为苑炜, 实验实施为谷遇伯、张东亮。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金(81671451)”“上海市自然科学基金(18ZR1429200)”“上海交通大学-香港科技大学联合科研基金(WF610561702)”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:** 实验方案经上海市第六人民医院动物福利伦理委员会批准, 批准号为 2018-0289。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

**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上海交通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] 张新华, 胡礼泉, 陈坚. 海绵体神经损伤与阴茎勃起功能障碍[J]. 中华泌尿外科杂志, 2002, 23(11): 702-703.
- [2] HAGLIND E, CARLSSON S, STRANNE J, et al. Urinary Incontinence and Erectile Dysfunction After Robotic Versus Open Radical Prostatectomy: A Prospective, Controlled, Nonrandomised Trial. *Eur Urol*. 2015;68(2):216-225.
- [3] FU Q, SUN X, TANG C, et al. An assessment of the efficacy and safety of sildenafil administered to patients with erectile dysfunction referred for posterior urethroplasty: a single-center experience. *J Sex Med*. 2012;9(1):282-287.
- [4] BARILE L, VASSALLI G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther*. 2017;174:63-78.
- [5] SUZUKI E, FUJITA D, TAKAHASHI M, et al. Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Cardiovascular Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2017;998:179-185.
- [6] ZHANG B, WANG M, GONG A, et al. HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells*. 2015;33(7):2158-2168.
- [7] TOH WS, LAI RC, HUI JHP, et al. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;67:56-64.
- [8] WU P, ZHANG B, SHI H, et al. MSC-exosome: A novel cell-free therapy for cutaneous regeneration. *Cytotherapy*. 2018;20(3):291-301.
- [9] KESHTKAR S, AZARPIRA N, GHAHREMANI MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):63.
- [10] HONG P, YANG H, WU Y, et al. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):242.
- [11] REN R, TAN XH, ZHAO JH, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome uptake and retrograde transport can occur at peripheral nerve endings. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019; 47(1):2918-2929.
- [12] SHIUE SJ, RAU RH, SHIUE HS, et al. Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury-induced pain in rats. *Pain*. 2019;160(1):210-223.
- [13] BELLA AJ, LIN G, CAGIANNOS I, et al. Emerging neuromodulatory molecules for the treatment of neurogenic erectile dysfunction caused by cavernous nerve injury. *Asian J Androl*. 2008;10(1):54-59.
- [14] MULHALL JP, MORGENTALER A. Penile rehabilitation should become the norm for radical prostatectomy patients. *J Sex Med*. 2007; 4(3):538-543.
- [15] NANGLE MR, KEAST JR. Reduced efficacy of nitroergic neurotransmission exacerbates erectile dysfunction after penile nerve injury despite axonal regeneration. *Exp Neurol*. 2007;207(1):30-41.
- [16] LIN G, BELLA AJ, LUE TF, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) acts primarily via the JAK/STAT pathway to promote neurite growth in the major pelvic ganglion of the rat: part 2. *J Sex Med*. 2006;3(5):821-829.
- [17] PODLASEK CA, MEROZ CL, TANG Y, et al. Regulation of cavernous nerve injury-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Biol Reprod*. 2007; 76(1):19-28.
- [18] CANGUVEN O, BURNETT A. Cavernous nerve injury using rodent animal models. *J Sex Med*. 2008;5(8):1776-1785.
- [19] CHO MC, SONG WH, PAICK JS. Suppression of Cavernosal Fibrosis in a Rat Model. *Sex Med Rev*. 2018;6(4):572-582.
- [20] WANG R. Penile rehabilitation after radical prostatectomy: where do we stand and where are we going? *J Sex Med*. 2007;4(4 Pt 2): 1085-1097.
- [21] GUR S, ABDEL-MAGEED AB, SIKKA SC, et al. Advances in stem cell therapy for erectile dysfunction. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(11): 1137-1150.
- [22] CHEN S, ZHU J, WANG M, et al. Comparison of the therapeutic effects of adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells on erectile dysfunction in diabetic rats. *Int J Mol Med*. 2019;44(3): 1006-1014.
- [23] MATZ EL, TERLECKI R, ZHANG Y, et al. Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction. *Sex Med Rev*. 2019;7(2):321-328.
- [24] ALBERSEN M, KENDIRCI M, VAN DER AA F, et al. Multipotent stromal cell therapy for cavernous nerve injury-induced erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2012;9(2):385-403.
- [25] GÓMEZ-GUERRA LS, ROBLES-TORRES JI, GARZA-BEDOLLA A, et al. Erectile dysfunction treated with intracavernous stem cells: A promising new therapy? *Rev Int Androl*. 2018;16(3):119-127.
- [26] 郭子宽. 间充质干细胞及其临床应用中的几个问题[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(10):1-10.
- [27] VAKALOPOULOS I, MEMMOS D, MYKONIATIS I, et al. Stem cell therapy in erectile dysfunction: science fiction or realistic treatment option? *Hormones (Athens)*. 2018;17(3):315-320.
- [28] ZHU LL, HUANG X, YU W, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stem cell-derived exosomes ameliorates erectile function in diabetic rats. *Andrologia*. 2018;50(2):e12871.
- [29] OUYANG X, HAN X, CHEN Z, et al. MSC-derived exosomes ameliorate erectile dysfunction by alleviation of corpus cavernosum smooth muscle apoptosis in a rat model of cavernous nerve injury. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):246.
- [30] LI M, LEI H, XU Y, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells exert therapeutic effect in a rat model of cavernous nerves injury. *Andrology*. 2018;6(6):927-935.
- [31] NI J, LI H, ZHOU Y, et al. Therapeutic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cell Exosomes in Stress Urinary Incontinence - An in Vitro and in Vivo Study. *Cell Physiol Biochem*. 2018;48(4):1710-1722.
- [32] NEWTON WC, KIM JW, LUO JZQ, et al. Stem cell-derived exosomes: a novel vector for tissue repair and diabetic therapy. *J Mol Endocrinol*. 2017;59(4):R155-R165.
- [33] ANDERSSON KE, HEDLUND P, ALM P. Sympathetic pathways and adrenergic innervation of the penis. *Int J Impot Res*. 2000;12 Suppl 1:S5-12.
- [34] DOBBS R, CHOE S, KALMANEK E, et al. Peptide amphiphile delivery of sonic hedgehog protein promotes neurite formation in penile projecting neurons. *Nanomedicine*. 2018;14(7):2087-2094.
- [35] LIN G, CHEN KC, HSIEH PS, et al. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor and neurotrophins on cultured major pelvic ganglia. *BJU Int*. 2003;92(6):631-635.
- [36] PASHOUTAN SARVAR D, SHAMSASENJAN K, AKBARZADEHLALEH P. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: New Opportunity in Cell-Free Therapy. *Adv Pharm Bull*. 2016;6(3):293-299.
- [37] SHABBIR A, COX A, RODRIGUEZ-MENOCAL L, et al. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells Dev*. 2015;24(14):1635-1647.
- [38] BUCAN V, VASLAIATIS D, PECK CT, et al. Effect of Exosomes from Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Neurite Outgrowth and Sciatic Nerve Regeneration After Crush Injury. *Mol Neurobiol*. 2019; 56(3):1812-1824.
- [39] 魏俊吉, 陈云飞, 薛春玲, 等. 间充质干细胞来源的Exosome对神经损伤的保护作用[J]. 中国医学科学院学报, 2016, 38(1):33-36.
- [40] SHAO L, ZHANG Y, LAN B, et al. MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4150705.
- [41] KALRA H, SIMPSON RJ, JI H, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.