

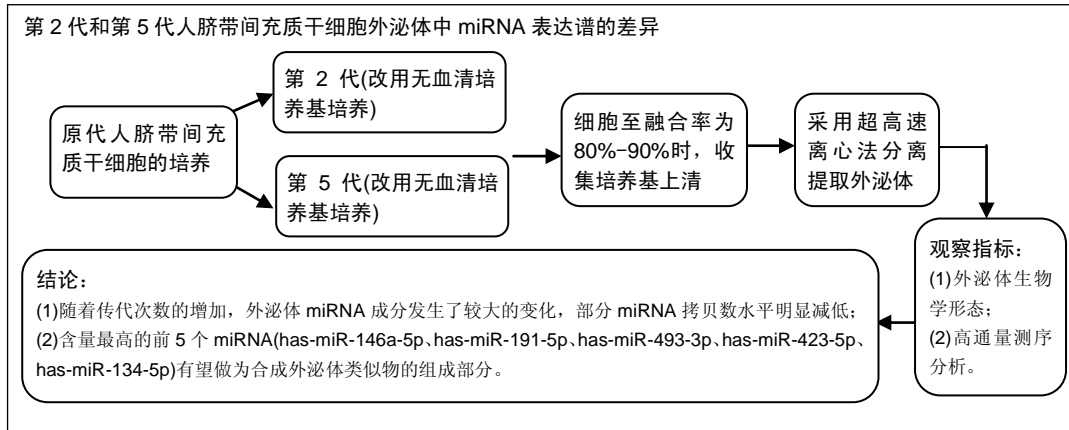
第2代和第5代人脐带间充质干细胞外泌体miRNA谱的比较

林庆铿^{1,2}, 尹德宏², 刘菊芬², 张学娟^{1,2}, 白盈盈^{1,2}, 宋乙甲^{1,2}, 潘兴华², 刘高米洋² (1昆明医科大学解放军昆明总医院临床学院, 云南省昆明市 650032; 2解放军昆明总医院细胞生物治疗中心, 干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室, 云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室, 云南省昆明市 650032)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0525

ORCID: 0000-0002-1883-560X(林庆铿)

文章快速阅读:



林庆铿,男,1986年生,福建省福州市连江县人,汉族,昆明医科大学在读硕士,主要从事人脐带间充质干细胞与衰老相关研究。

并列第一作者:尹德宏,主治医师,主要从事脊髓损伤及干细胞治疗方面的研究。

通讯作者:刘高米洋,硕士,解放军昆明总医院细胞生物治疗中心,干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室,云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室,云南省昆明市 650032

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受:2018-04-17

Lin Qing-keng, Master candidate, Kunming General Hospital Clinical College of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China; Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital of PLA, Cell Biological Medicine integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Yin De-hong, Attending physician, Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital of PLA, Cell Biological Medicine integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Lin Qing-keng and Yin De-hong contributed equally to this work.

文题释义:

外泌体: 是一类由某些细胞释放的细胞外囊泡。已有报道认为它们能够调节宿主-病原体的相互作用,参与传染性和炎症疾病、神经疾病和癌症等很多种疾病的病理过程,同时在正常的生理过程中也发挥着介导细胞间通讯等作用。另外细胞外囊泡含有丰富的生物标志物,可用于监测临床状态、治疗反应、疾病进展等,同时它们还有发展成临床药物递送载体的潜力。由于细胞外囊泡的组成成分并不是随机的,每一个细胞外囊泡都会携带特定的分子信息,如携带蛋白质、脂质、核酸和糖等生物活性分子在细胞间传递信号,其有一个复杂的分选系统来决定哪些分子能够进入细胞外囊泡,因而其有望成为进一步了解人体细胞层面调节过程的突破口。

聚类分析: 是通过建立各种不同的数学模型,把基于相似数据特征的变量或样本组合在一起。归为一个簇的 miRNA 在功能上可能相似或关联,从而找到 miRNA 的功能信息。聚类分析将表达模式相同或相近的 miRNA 或样本聚集成类,并使用不同颜色的区域代表不同的聚类分组信息,从而判断不同样品或不同实验条件下的聚类模式。由于同类的 miRNA 可能具有相似的功能,或是共同参与同一代谢过程或细胞通路,因此有助于筛选潜在的有协同作用或受同样调控的 miRNA,从而帮助发掘 miRNA 的功能。

摘要

背景: 研究发现外泌体具有部分间充质干细胞的功能,了解间充质干细胞外泌体中发挥代表性作用的物质,可以为进一步探索人工合成外泌体类似物提供线索。

目的: 研究第2代和第5代人脐带间充质干细胞来源外泌体中 miRNA 的表达谱差异。

方法: 采用超高速离心法提取第2代和第5代人脐带间充质干细胞培养上清液中的外泌体,并使用高通量测序技术,对建立的文库进行测序,再将结果进行分析,了解不同外泌体之间所表达的 miRNA,并做聚类分析。

结果与结论: ①第2代人脐带间充质干细胞来源外泌体能够检测出 427 657 种 miRNA,占检出总 miRNA 的 68.93%;第5代人脐带间充质干细胞来源外泌体能够检测出 119 283 种 miRNA,占检出总 miRNA 的 19.22%,其中二者共有的 miRNA 有 73 526 种,占检出总 miRNA 的 11.85%;②经生物信息学分析(聚类分析)表明这些 miRNA 可能参与了 161 种生物过程,包括细胞修复、免疫、抗衰老等;③随着传代次数的增加,外泌体 miRNA 成分发生了较大的变化,部分 miRNA 拷贝数水平明显减低,其中含量最高的前 5 个 miRNA(has-miR-146a-5p、has-miR-191-5p、has-miR-493-3p、has-miR-423-5p、has-miR-134-5p)有望做为合成外泌体类似物的组成部分。

关键词:

脐带间充质干细胞;外泌体;microRNA;高通量测序;聚类分析;干细胞

主题词:

脐带;间充质干细胞;外泌体;微RNAs;高通量筛选;组织工程

基金资助:

解放军动物专项(SYDW(2016)004);云南省重点实验室(2015DG034)

Corresponding author:
Liu-Gao Mi-yang, Master,
Cell Biological Therapy
Center of Kunming General
Hospital of PLA, Cell
Biological Medicine
integrated Engineering
Laboratory of State and
Region of Yunnan Province,
the Stem Cell Therapy Key
Laboratory of Yunnan
Province, Kunming 650032,
Yunnan Province, China

Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells at passage 2 and 5: a comparative study on microRNA profiles

Lin Qing-keng^{1,2}, Yin De-hong², Liu Ju-fen², Zhang Xue-juan^{1,2}, Bai Ying-ying^{1,2}, Song Yi-jia^{1,2}, Pan Xing-hua², Liu-Gao Mi-yang² (¹Kunming General Hospital Clinical College of Kunming Medical University, Kunming 650032, Yunnan Province, China; ²Cell Biological Therapy Center of Kunming General Hospital of PLA, Cell Biological Medicine integrated Engineering Laboratory of State and Region of Yunnan Province, the Stem Cell Therapy Key Laboratory of Yunnan Province, Kunming 650032, Yunnan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Exosomes have the function of some mesenchymal stem cells. Understanding the substance composition that plays a representative role in mesenchymal stem cell exosomes will provide clues for further exploration of synthetic exosome analogues.

OBJECTIVE: To investigate the difference of microRNA expression profiles in exosomes derived from passage 2 and 5 human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs).

METHODS: Exosomes in the supernatant of passage 2 and 5 hUC-MSCs were extracted by ultra-high speed centrifugation. The established library was sequenced by using high-throughput sequencing technology. Then we analyzed the sequence results so as to understand the microRNA expression between different groups, and finally did a cluster analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: 427 657 kinds of microRNAs were detected in the exosomes from passage 2 hUC-MSCs, accounting for 68.93% of the total microRNAs detected; and 119283 microRNAs were detected in the exosomes from passage 5 hUC-MSCs, accounting for 19.22% of the total microRNAs detected. There were 73 526 microRNAs shared between the exosomes from passage 2 and passage 5 hUC-MSCs, accounting for 11.85% of the total microRNAs detected. Bioinformatics analysis (cluster analysis) results showed that these miRNAs were likely to be involved in 161 biological processes, including cell repair, immune and anti-aging. The microRNAs in exosomes from passage 2 to passage 5 hUC-MSCs were largely different. Partial miRNAs exhibited significantly reduced copy numbers. The top five microRNAs with a higher amount, including has-miR-146a-5p, has-miR-191-5p, has-miR-493-3p, has-miR-423-5p, and has-miR-134-5p, have the potential to be the component of synthetic exosome analogues.

Subject headings: Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Exosomes; MicroRNAs; High-Throughput Screening Assays; Tissue Engineering

Funding: the Animal Special Fund of PLA, No. SYDW(2016)004; the Key Laboratory Project of Yunnan Province, No. 2015DG034

0 引言 Introduction

脐带间充质干细胞具有低免疫原性、多系分化等特点,并且在促进组织修复与再生等方面具有良好的治疗效果,是细胞移植治疗的理想种子细胞。但研究亦发现间充质干细胞植入体内后,存在免疫调节的不可控性、异常堆积、非治疗目的分化等缺点,都一定程度上限制了脐带间充质干细胞在临床应用的疗效及预后。研究证实脐带间充质干细胞生物学功能的发挥主要有两种途径:①脐带间充质干细胞进入机体后,定植于受损组织并分化为实质细胞替代受损细胞,或者将自身的部分线粒体转移到受损细胞起到促进损伤修复的作用;②分泌某些促细胞修复因子通过体液扩散作用到达受损部位,促进损伤修复。有研究表明,脐带间充质干细胞归巢到损伤部位的比例和分化为靶细胞的数量非常有限,不能充分解释所观察到的组织修复现象^[1-2]。现在越来越多的研究倾向于认为脐带间充质干细胞主要通过旁分泌机制分泌多种细胞因子作用于其他细胞来发挥促进组织修复作用^[3]。脐带间充质干细胞来源外泌体与靶细胞通过膜融合或者发生内吞作用后将其中的生物活性物质转运至靶细胞,从而影响靶细胞功能,在细胞间起信息交换的作用^[4]。与细胞治疗相比较,外泌体性质更稳定,保存运输方便,因此有望成为一种新的治疗策略。

由于外泌体成分多、种类复杂,若合成完整成分所付

出的代价和未来临床应用成本难以承受。因此,通过寻找部分有代表性的外泌体成分,筛选出有限的成分组合制作成外泌体类似物,以期能部分替代、模拟外泌体的功能。研究表明,第2代和第5代脐带间充质干细胞具有相似的生物学特性^[5-6]。另外前期研究显示随着培养代数增加,外泌体成分也会随之改变^[5-6]。

实验通过对比第2代和第5代人脐带间充质干细胞外泌体中含量最高的相似成分,筛选出几种具有代表性的物质,为下一步合成外泌体类似物提供参考依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分子水平比较分析实验。

1.2 时间及地点 于2017年7至12月在解放军昆明总医院细胞生物治疗中心完成。

1.3 材料 人脐带间充质干细胞由解放军昆明总医院临床实验科提供,经过细胞形态、免疫表型以及成脂、成骨、成软骨等分化能力鉴定,符合间充质干细胞的特征。DMEM/F12 培养基(美国BI公司);胎牛血清(美国BI公司);百万层级层流超净工作台(SW-CL-2F型,苏州佳宝净化工程设备有限公司);CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司);倒置相差显微镜(日本奥林巴斯公司);超高速离心机(日本日立公司);血清替代物AGS(美国Stembo公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞分离和培养 经产妇及家属知情同意并且通过医院伦理审查(编号: 2012009)后, 取无传染性疾病产妇足月剖腹产新生儿脐带, 反复生理盐水冲洗以去除脐带残留血液。将脐带剪碎后转移到培养瓶中, 用含体积分数为20%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养, 次日补液, 3 d后换液, 7 d后观察细胞生长状态, 达到80%融合后传代培养。

1.4.2 人脐带间充质干细胞的鉴定

人脐带间充质干细胞的免疫表型检测: 取同一批生长旺盛的第3代脐带间充质干细胞, 达到80%~90%融合后进行鉴定。经0.25%胰酶消化后, 用PBS重悬, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 取100 μL 细胞悬液, 第1管不加抗体做为空白对照, 其他管分别加入抗体: FITC同型对照、FITC-CD90、APC同型对照、APC-CD73、PerCP-Cy5.5同型对照、PerCP-Cy5.5-CD105、PE同型对照、PE-CD44、PE-CD56、PE-CD29、PE-CD34、FITC-CD45; 放于冰盒(4 $^{\circ}\text{C}$)避光孵育30 min, 用流式细胞仪检测, 重复3次, 实验结果相似, 取其中1次数据, 并用FlowJo 7.6.1软件分析结果。

人脐带间充质干细胞体外分化潜能检测: ①成脂诱导: 取同一批第5代脐带间充质干细胞, 达到80%~90%融合后, 以1 mL 0.25%胰酶消化后, 用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12重悬, 以 1×10^4 个/ cm^2 密度接种到12孔板, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 培养箱中培养, 达到60%融合度时, 吸弃完全培养基(含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12), 加入成脂诱导分化液(胎牛血清、青链霉素、谷氨酰胺、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、罗格列酮、地塞米松), 每3 d换液1次。培养14 d后, 40 g/L多聚甲醛固定后进行油红O染色观察; ②成骨诱导: 取生长旺盛的第5代脐带间充质干细胞, 达到80%~90%融合后, 以 2×10^4 个/ cm^2 密度接种到12孔板, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 培养箱中培养, 达到80%融合度时, 吸弃完全培养基(含体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12), 加入成骨诱导分化液(胎牛血清、青链霉素、谷氨酰胺、抗坏血酸、 β -甘油磷酸钠、地塞米松), 每3 d换液1次。培养21 d后, 40 g/L多聚甲醛固定后进行茜素红染色观察; ③成软骨诱导: 取生长旺盛的第5代脐带间充质干细胞, 达到80%~90%融合后, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种到12孔板, 每孔5 μL , 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为5% CO_2 培养箱中培养, 2 h后吸弃培养基, 加入预热的成软骨诱导分化液(地塞米松、抗坏血酸、ITS细胞培养添加剂、丙酮酸钠、脯氨酸、转化生长因子 β_3), 每3 d换液1次。培养14 d后, 40 g/L多聚甲醛固定、石蜡包埋、病理切片, 阿新蓝染色观察。

1.4.3 人脐带间充质干细胞来源外泌体的收集 无血清培养基(10%血清替代物AGS+90%DMEM/F12)培养第2代和第5代人脐带间充质干细胞至融合率为80%~90%时, 收

集培养上清4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.4.4 人脐带间充质干细胞来源外泌体分离提取 将上述培养上清于4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 $\times\text{g}$ 离心10 min取上清液; 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 $\times\text{g}$ 离心30 min取上清液; 4 $^{\circ}\text{C}$, 100 000 $\times\text{g}$ 离心120 min, 弃上清保留沉淀; 冷PBS重悬沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$, 100 000 $\times\text{g}$ 离心120 min; 弃上清, 0.5 mL预冷PBS重悬, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。

1.4.5 外泌体生物学形态观察 铜网上加入外泌体悬液10 μL , 吸附1.0~2.0 min, 滤纸条垂直于液面吸走液体, 干燥1 min, 加入染色剂醋酸双氧铀染色1 min, 干燥后透射电镜下观察形态并拍照。

1.4.6 高通量测序(Illumina HiSeqTM 2500测序) 总RNA分别连接5'接头和3'接头; 第一链cDNA合成; PCR扩增; 用凝胶电泳法获取插入片段在18~40 nt的cDNA文库; 上机测序。

1.4.7 miRNAs序列分析

信息分析: 采用高通量测序所得原始序列(raw reads)集, 去除测序数据中reads两端接头、去除测序数据中的低质量reads等步骤, 初步数据过滤后, 统计及样本间共有序列、长度分布情况。对clean reads进行分类注释, 可以获得样本中各类sRNA的组分及表达量信息。将sRNA片段注释后, 使用余下未注释片段进行miRNA的预测。

标准信息分析结果: 通过对不同样本的clean data进行比较, 分析样本之间共有的reads序列以及特有的reads序列。

序列比对: 使用BWA软件将测序数据中的clean reads与参考基因组进行比对。

miRNA表达聚类分析: 把相似数据特性的样本组合在一起归为一个簇。不同miRNA在功能上可能相似, 推测miRNA的功能。

1.5 主要观察指标 ①人脐带间充质干细胞的形态、表面抗原表达以及诱导分化能力; ②人脐带间充质干细胞来源外泌体的生物学形态; ③人脐带间充质干细胞来源外泌体中miRNA分析。

2 结果 Results

2.1 人脐带间充质干细胞的形态变化 采用组织块直接贴壁法培养, 接种次日即可看见少许细胞贴壁(图1A), 5~9 d后组织块周围可见间充质干细胞游出(图1B), 传至第3代后细胞呈纤维样(图1C), 第5代呈涡漩状生长(图1D)。

2.2 人脐带间充质干细胞的鉴定结果

2.2.1 人脐带间充质干细胞表面抗原表达 流式细胞术检测结果显示CD73, CD90, CD44, CD56, CD29和CD105抗体阳性率分别为99.6%, 93.0%, 81.8%, 97.7%、99.5%和97.6%, CD45和CD34抗体阳性率为10.1%和9.71%, 符合间充质干细胞的表型特征, 见图2。

2.2.2 人脐带间充质干细胞的诱导分化能力 第5代人脐带间充质干细胞进行体外诱导成骨、成脂、成软骨分化实验

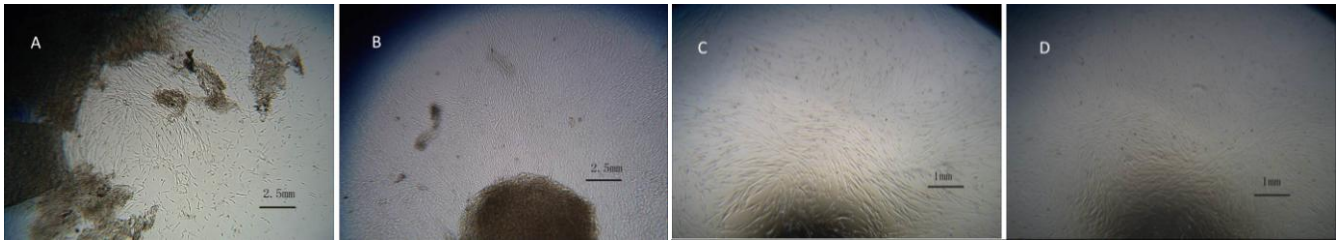


图 1 人脐带来源间充质干细胞的生长形态(倒置显微镜, ×40)

Figure 1 Human umbilical cord mesenchymal stem cell growth and morphology under inverted microscope (×40)

图注: 图中 A 为培养 24 h 有少许细胞贴壁; B 为培养 5-9 d 后可见细胞爬出; C 为第 3 代细胞形态呈纤维样; D 为第 5 代细胞呈涡漩状生长。

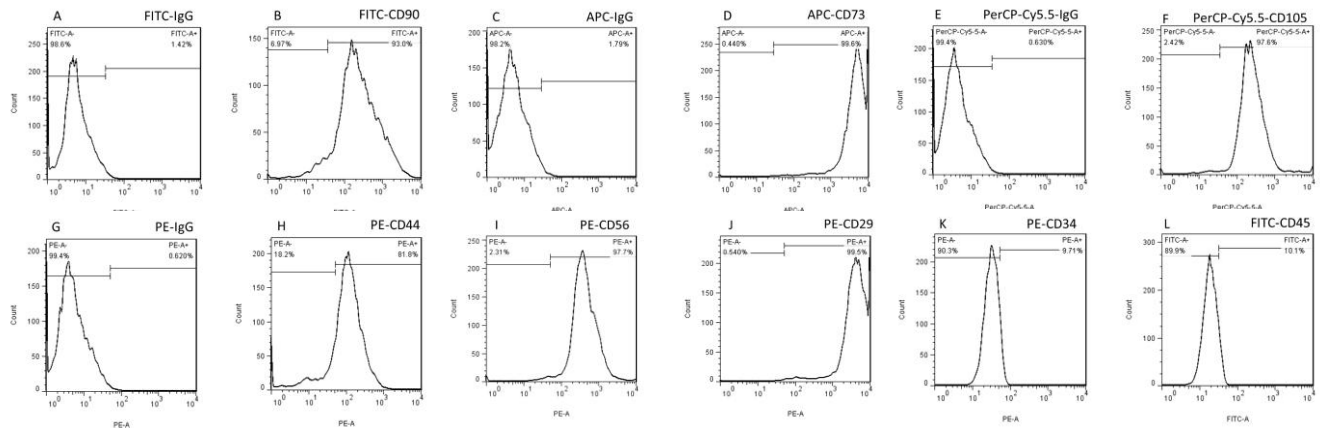


图 2 流式细胞术分析人脐带间充质干细胞的表面抗原

Figure 2 Flow cytometry detection of cell surface antigens of human umbilical cord mesenchymal stem cells

图注: 图中 A-L 依次为 FITC 同型对照、FITC-CD90、APC 同型对照、APC-CD73、PerCP-Cy5.5 同型对照、PerCP-Cy5.5-CD105、PE 同型对照、PE-CD44、PE-CD56、PE-CD29、PE-CD34、FITC-CD45 的流式分析结果。

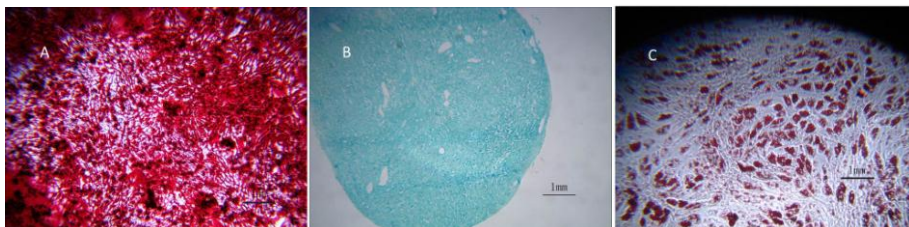


图 3 人脐带间充质干细胞成骨、成软骨和成脂诱导分化能力(×100)

Figure 3 Osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (×100)

图注: 图中 A 为第 5 代人脐带间充质干细胞成骨诱导分化后茜素红染色; B 为第 5 代人脐带间充质干细胞成软骨诱导分化后阿新蓝染色; C 为第 5 代人脐带间充质干细胞成脂诱导分化后油红 O 染色。

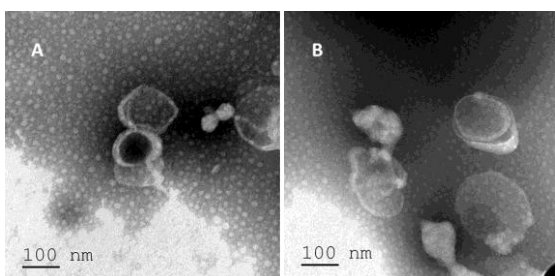


图 4 透射电镜下观察外泌体形态(×120 000)

Figure 4 Transmission electron microscopy observation of exosome morphology (×120 000)

图注: 图中 A, B 可见外泌体具有典型的杯状结构, 超速离心法分离所得外泌体直径为 30-200 nm。

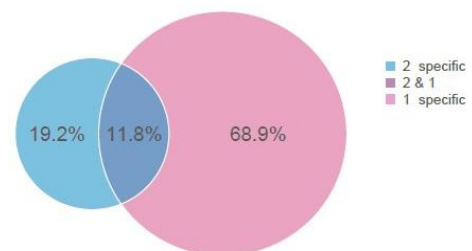


图 5 高通量测序分析外泌体的 miRNA(韦恩图)

Figure 5 High-throughput sequencing of exosome microRNAs (Wayne diagram)

图注: 1: 第 2 代人脐带间充质干细胞外泌体中 miRNA 所占比例; 2: 第 5 代人脐带间充质干细胞外泌体中 miRNA 所占比例; 2 & 1: 共有及特有序列所占比例。

(图3), 成骨诱导后进行茜素红染色, 出现红染钙结节。成软骨诱导后进行阿新蓝染色, 可见软骨细胞合成的蛋白多糖被染成蓝色。成脂诱导后进行油红O染色, 出现红染脂滴。

2.3 人脐带间充质干细胞来源外泌体生物学形态 为了不破坏外泌体原有形态并保持其典型双层膜结构, 将分离得到的外泌体30 μL分装存于4 °C备用(不超过3 d)。按照负

表1 第2代和第5代人脐带间充质干细胞外泌体中 miRNA 差异表达
Table 1 Differential expression of microRNAs in the exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells at passage 2 and 5

miRNA_ID	第5代	第2代	up/down	log2(foldchange)	P 值
hsa-miR-146a-3p	124.612 3	1.236 1	down	-6.655 5	7.45x10 ⁻⁵
hsa-miR-345-3p	27.691 6	0.309	down	-6.485 7	0.094 203
hsa-miR-5708	27.691 6	0.309	down	-6.485 7	0.094 203
hsa-miR-4443	27.691 6	0.618	down	-5.485 7	0.094 203
hsa-miR-9-3p	27.691 6	0.618	down	-5.485 7	0.094 203
hsa-miR-1226-5p	13.845 8	0.309	down	-5.485 7	0.285 714
hsa-miR-2276-5p	13.845 8	0.309	down	-5.485 7	0.285 714
hsa-miR-3198	13.845 8	0.309	down	-5.485 7	0.285 714
hsa-miR-3912-3p	13.845 8	0.309	down	-5.485 7	0.285 714
hsa-miR-4638-3p	13.845 8	0.309	down	-5.485 7	0.285 714
hsa-miR-4709-5p	13.845 8	0.309	down	-5.485 7	0.285 714
hsa-miR-6715a-3p	13.845 8	0.309	down	-5.485 7	0.285 714
hsa-miR-4664-3p	55.383 3	1.5451	down	-5.163 7	0.009 224
hsa-miR-937-3p	55.383 3	1.5451	down	-5.163 7	0.009 224
hsa-miR-1193	13.845 8	0.618	down	-4.485 7	0.285 714
hsa-miR-3148	13.845 8	0.618	down	-4.485 7	0.285 714
hsa-miR-4745-5p	13.845 8	0.618	down	-4.485 7	0.285 714
hsa-miR-5699-3p	13.845 8	0.618	down	-4.485 7	0.285 714
hsa-miR-642a-3p	13.845 8	0.618	down	-4.485 7	0.285 714
hsa-miR-6875-5p	13.845 8	0.618	down	-4.485 7	0.285 714

染法将超离法所得外泌体进行制样, 透射电镜下可见外泌体具有典型的杯状结构, 超速离心法分离所得外泌体直径为30-200 nm(图4)。

2.4 Solexa(Illumina HiSeq™ 2500)高通量测序技术对外泌体中 miRNA 进行测序分析 通过对不同样本的 clean data 进行比较, 分析样本之间共有的 reads 序列以及特有的 reads 序列。样本之间共有及特有序列的比例分析见图5, 样品间 unqi reads 的韦恩图(Venn diagram)见图5。序列比对结果见表1。

3 讨论 Discussion

外泌体做为纳米级的膜性结构, 它由体内多种活细胞分泌, 可携带脂类、蛋白质、信使RNAs(mRNAs)、microRNAs(miRNAs)、非编码RNAs(ncRNAs)等多种重要的生物功能分子。间充质干细胞来源外泌体与靶细胞通过膜融合或者发生内吞作用后将其中的生物活性物质转运至靶细胞, 从而影响靶细胞的功能, 在细胞间起信息交换的作用。

miRNAs 是一类非编码RNA分子, 含有18-22个核苷酸, 通过调节mRNA的降解、干扰蛋白质合成、抑制蛋白质翻译来调控细胞的凋亡、分化、增殖和生长^[7-8]。间充质干细胞来源外泌体中 miRNA 水平随传代次数的增加而有所改变。这些具有相对保守性的 miRNAs 有望成为研究外泌体功能的新的切入点。

目前外泌体的研究在国内尚处于起步阶段, 有研究表明细胞在不同状态分泌的外泌体中内含物不同^[9], 通过不同的分离方法得到的外泌体理化性质也不同^[10], 外泌体具

有部分替代间充质干细胞的作用。随着间充质干细胞培养代数的增加, 外泌体成分随之改变。这为研究外泌体不同组分所具有的功能, 提供了缩小研究范围的机会。

实验采用最经典的多步超速离心法对外泌体进行分离和鉴定, 为人脐带间充质干细胞源外泌体所含的 miRNA 成分进行研究提供数据。

实验首先通过组织块贴壁法获得原代人脐带间充质干细胞, 利用其贴壁生长特性多次传代培养获得纯化的人脐带间充质干细胞, 显微镜观察第2代到第5代的人脐带间充质干细胞, 可见典型的漩涡生长特征, 并进行表面抗原鉴定, 符合间充质来源干细胞的表型特征。为排除常规培养体系中胎牛血清中外泌体的影响, 待人脐带间充质干细胞贴壁生长进行传代时, 换为无血清培养基, 继续培养48 h 后收集无外源外泌体污染的培养上清。应用多步超速离心法提取外泌体, 透射电镜对其形态学观察可见具有典型的杯状结构, 采用 Solexa 高通量测序技术对外泌体中包含的 miRNA 进行测序分析, 比较两种不同代数细胞培养上清所得外泌体中 miRNA 组分的异同。

测序分析结果可见, 第2代和第5代人脐带间充质干细胞来源外泌体中 miRNAs 表达谱差异较大, 通过超离法分离纯化能够检测出 620 466 种 miRNA, 其中相同的基因 73 526 种。第2代人脐带间充质干细胞来源外泌体中独有的 427 657 种 miRNA 占总数的 68.93%。第5代人脐带间充质干细胞来源外泌体中独有的 119 283 种 miRNA 占总数的 19.22%。第2代人脐带间充质干细胞来源外泌体中所含的 miRNA 种类和数量远高于第5代人脐带间充质干细胞来源外泌体, 并且存在不同程度的独有 miRNA 的表达。由于第5代和第2代人脐带间充质干细胞均具有炎症修复、抗衰老等功能, 考虑其中具有相对保守性的 miRNA 可能是参与该过程的目标 miRNA, 值得进一步探索研究。

实验结果可见, 第2代人脐带间充质干细胞外泌体中 miRNA 不能涵盖第5代人脐带间充质干细胞外泌体中 miRNA。考虑外泌体中某些 miRNA 表达呈现动态上下调的情况, 其影响因素与细胞培养条件、细胞本身程序化表达、细胞来源个体情况相关, 具体尚待进一步实验明确。

人脐带间充质干细胞源外泌体通过超离法分离纯化能够检测出 620 466 种 miRNA。经生物信息学分析(聚类分析)表明这些 miRNA 可能参与了 161 种生物过程, 包括细胞修复和免疫, 抗衰老等。在这些 miRNA 中 hsa-miR-181c-3p、hsa-miR-181c-5p 具有减轻炎症反应作用。hsa-miR-125a-3p 在组织修复中发挥重要作用。hsa-miR-17-3p、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-24-2-5p、hsa-miR-24-1-5p、hsa-miR-210-3p、hsa-miR-210-5p、hsa-miR-146a-5p、hsa-miR-146a-3p、hsa-miR-126-5p、hsa-miR-326、hsa-miR-494-3p、hsa-miR-494-5p 有心脏功能保护作用。与治疗作用相关的含量最高的前5个 miRNA: ① has-miR-146a-5p: 在免疫学方面发挥重要的调节作用。

调节性T(Treg)细胞维持免疫内稳态是通过限制不同类型的炎症反应来实现的。Treg细胞抑制功能由一个单一的miRNA(miR-146a)控制,其对Treg介导的Th1反应和相关的自身免疫有重要意义^[11]; ②has-miR-191-5p: 应用生物信息学软件进行miRNA-191的靶基因预测,经3个软件均预测到有9个基因,它们是PLCD1(phospholipase C delta 1)、SOX4 (sex determining region Y-box 4)、RNF139、FZD5、GAP43、TJP1、TMOD2、NDST1 (N-deacetylase/N-sulfotransferase 1)和AMMECR1^[12],其中已被证实下游靶蛋白SOX4具有转录激活活性,主要参与胚胎发育和调控细胞命运。SOX4能被DNA损伤信号诱导并参与了p53的激活,起到DNA损伤传感器的作用,通过这种机制,SOX4促进p53依赖的细胞周期G₁期阻滞,细胞凋亡,并以p53依赖性方式抑制肿瘤发生^[13]; ③has-miR-493-3p: miR-493能在较小程度上抑制结肠癌肝脏转移,并且miR-493通过IGF1R保留肝实质细胞,诱导转移细胞死亡^[14]。miR-493减少FZD4(frizzled class receptor 4)和RhoC(Ras homolog gene family, member C)的荧光素酶活性和蛋白质表达,抑制肿瘤细胞活性^[15]; ④has-miR-423-5p: 研究表明6个miRNA在心力衰竭患者中升高,其中miR-4235p与心力衰竭有强烈的临床相关性^[16]; ⑤has-miR-134-5p: miR-134是抑制非小细胞肺癌细胞上皮-间质转化的关键调节剂。miR-134的一个直接靶目标是FOXM1 (Forkhead Box M1)。过表达miR-134能下调FOXM1逆转上皮-间质转化^[17]。综合上述结果,随着传代次数的增加,外泌体miRNA成分发生了较大的变化,部分miRNA拷贝数水平明显减低,其中相对保守的miRNA (has-miR-146a-5p、has-miR-191-5p、has-miR-493-3p、has-miR-423-5p、has-miR-134-5p)(含量最高的前5个miRNA)有望做为合成外泌体类似物的组成部分。

致谢: 感谢解放军昆明总医院临床实验科潘兴华教授以及各位老师给予的支持和帮助。

作者贡献: 实验设计为林庆铿和尹德宏,实验实施为林庆铿和尹德宏,实验评估为潘兴华和刘高米洋,资料收集为林庆铿、刘高米洋、尹德宏、刘菊芬。宋乙甲、张学娟、白盈盈审校。

经费支持: 该文章接受了“解放军动物专项(SYDW[2016]0004)”、“云南省重点实验室(2015DG034)”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: 文章中的培养和干预手段应用了DMEM/F12培养基、胎牛血清、血清替代物AGS等产品,但是所有作者声明没有接受相关的经费支持,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

伦理问题: 研究对象采用来自人体的细胞,符合相关伦理学要求,文章的撰写与编辑修改后文章遵守了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CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

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3.0”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] Katsha AM, Ohkouchi S, Xin H, et al. Paracrine factors of multipotent stromal cells ameliorate lung injury in an elastase-induced emphysema model. *Mol Ther*. 2011;19(1):196-203.
- [2] Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(5):2397-2402.
- [3] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-1084.
- [4] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010;78(9):838-848.
- [5] 刘雨思,王凤昌,夏海雄,等.不同代次人脐带间充质干细胞的生物学特性及分化[J].中国组织工程研究, 2017, 21(13): 2015-2022.
- [6] 苏晓霞,廖立,金岩,等.体外传代对人脐带间充质干细胞生物学特性的影响[J].口腔生物医学, 2015, 6(3): 143-149.
- [7] Shi S, Yu L, Zhang T, et al. Smad2-dependent downregulation of miR-30 is required for TGF- β -induced apoptosis in podocytes. *PLoS One*. 2013;8(9):e75572.
- [8] Lorenzen JM, Thum T. Circulating and urinary microRNAs in kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(9):1528-1533.
- [9] Kim HS, Choi DY, Yun SJ, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res*. 2012;11(2):839-849.
- [10] Paolini L, Zendrini A, Di Noto G, et al. Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity. *Sci Rep*. 2016;6:23550.
- [11] Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*. 2010;142(6):914-929.
- [12] 郭鹏辉,杜艳蕾,聂玉强. miRNA-191在胃癌组织中的表达[J].广东医学, 2012, 33(11): 1560-1562.
- [13] Elyakim E, Sitbon E, Faerman A, et al. hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy. *Cancer Res*. 2010;70(20):8077-8087.
- [14] Okamoto K, Ishiguro T, Midorikawa Y, et al. miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *EMBO J*. 2012;31(7):1752-1763.
- [15] Ueno K, Hirata H, Majid S, et al. Tumor suppressor microRNA-493 decreases cell motility and migration ability in human bladder cancer cells by downregulating RhoC and FZD4. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(1):244-253.
- [16] Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res*. 2010;106(6):1035-1039.
- [17] Li J, Wang Y, Luo J, et al. miR-134 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting FOXM1 in non-small cell lung cancer cells. *FEBS Lett*. 2012;586(20):3761-3765.