

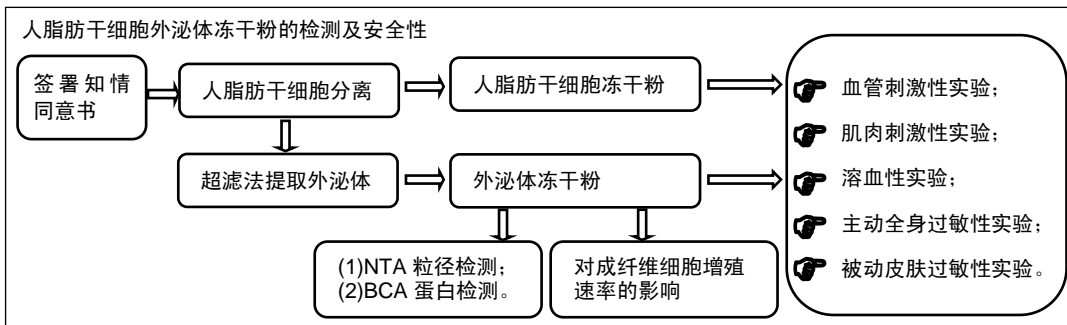
人脂肪干细胞及外泌体冻干粉的安全性

李洪超, 金银鹏, 王 哲, 李 莉, 傅青春(上海市复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海市 201508)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0994

ORCID: 0000-0002-7141-8135(李洪超)

文章快速阅读:



李洪超, 男, 1991 年生, 山东省菏泽市人, 汉族, 硕士, 主要从事干细胞研究。

并列第一作者: 金银鹏, 男, 1988 年生, 重庆市人, 汉族, 硕士, 主要从事干细胞研究。

通讯作者: 傅青春, 硕士, 主任医师, 上海市复旦大学附属公共卫生临床中心, 上海市 201508

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

稿件接受: 2018-06-12



文题释义:

外泌体: 是一种细胞主动分泌的大小均一、直径为 50–150 nm 的脂质双分子层结构囊泡, 可由树突细胞、淋巴细胞、成纤维细胞、间充质干细胞和肿瘤细胞等多种不同类型细胞释放。外泌体含有多种 RNA、蛋白质、脂质、DNA 等物质, 具有多种生物学作用, 近年来引起科研界的广泛关注。

超滤法: 是一种膜滤法, 它以多孔薄膜作为分离介质, 依靠薄膜两侧压力差作为推动力来分离溶液中不同分子质量的物质。外泌体的提取方法有多种, 比如超滤法、试剂盒沉淀法、蔗糖梯度离心法、超速离心法等。超滤法具有可重复利用、经济实惠、低损伤、简单易行、设备要求低等多种优势, 在外泌体的提取过程中较其他几种方法更为常用。

摘要

背景: 随着外泌体研究的深入, 越来越多的实验证实外泌体用于疾病治疗的有效性, 如何稳定保存外泌体、不丧失其功能显得尤为重要。

目的: 探索冻干技术与常规冻存方法保存脂肪干细胞外泌体的形态学差异, 探索外泌体冻干粉用于机体注射的安全性。

方法: 分离培养人脂肪干细胞并提取外泌体, 将预处理的细胞及外泌体进行冻干处理, 显微镜观察细胞的形态, BCA 检测外泌体冻干粉的蛋白含量。血管刺激性实验、肌肉刺激性实验、溶血性实验、主动全身过敏性实验、被动皮肤过敏性实验检测外泌体冻干粉的安全性。

结果与结论: 外泌体经冻干、再水化处理后仍保持膜完整性, 外泌体蛋白测得量恒定; 外泌体冻干粉、外泌体、脂肪干细胞冻干粉、脂肪干细胞的 5 种安全性实验均阴性, 不存在排斥反应, 机体注射安全性可靠。

关键词:

脂肪干细胞; 外泌体; 冻干粉; 安全性; 干细胞

主题词:

脂肪组织; 干细胞; 外泌体; 冷冻干燥法; 组织工程

基金资助:

南京军区医学创新重大课题(14ZX01); 中国肝炎防治基金会-天晴肝病研究基金资助课题(TQGB20150104)

Li Hong-chao, Master, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China

Jin Yin-peng, Master, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China

Li Hong-chao and Jin Yin-peng contributed equally to this work.

Corresponding author: Fu Qing-chun, Master, Chief physician, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China

Safety of freeze-dried powder of human adipose-derived stem cells and its exosomes

Li Hong-chao, Jin Yin-peng, Wang Xi, Li Li, Fu Qing-chun (Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China)

Abstract

BACKGROUND: With the in-depth study of exosomes, increasing studies have confirmed the effectiveness of exosomes in the treatment of diseases. It is of great importance to stabilize the exosomes and not lose their functions.

OBJECTIVE: To explore the morphological differences in the exosomes of adipose-derived stem cells stored by freeze-drying technology and conventional cryopreservation and to explore the safety of exosomes for injection.

METHODS: Human adipose-derived stem cells were isolated and cultured to extract the exosomes. Then, pretreated cells and exosomes were lyophilized. Cell morphology was observed under microscope and the protein content of freeze-dried exosome powder was detected by BCA. The safety of freeze-dried exosome powder was detected through vascular stimulation test, muscle stimulation test, hemolytic test, active systemic anaphylactic test, and passive skin allergy test.

RESULTS AND CONCLUSION: The exosomes still had an intact membrane after freeze-drying and rehydration. The content of exosomal proteins was in constancy. Freeze-dried exosome powder, exosomes, freeze-dried powder of adipose-derived stem cells, and adipose-derived stem cells were all negative for five safety tests, all of which are safe and reliable for body injection and cause no rejection. **Subject headings:** Adipose Tissue; Stem Cells; Exosomes; Freeze Drying; Tissue Engineering **Funding:** the Major Medical Innovation Project of the Nanjing Military Region, No. 14ZX01; the Chinese Foundation for Hepatitis Prevention and Control—the Tianqing Foundation for Liver Diseases, No. TQGB20150104

0 引言 Introduction

脂肪干细胞(human adipose-derived stem cells, hASCs)是一类具有自我复制能力和多向分化潜能的成体干细胞,具有免疫抑制、抗炎及促进细胞增殖等多种作用,在心脏、肝脏、肾脏、大脑等多种疾病模型中展现出显著的疗效^[1-3]。脂肪干细胞可通过旁分泌途径分泌外泌体(exosomes),在多种组织间起到信息传递作用^[4-7]。

外泌体是一种细胞主动分泌的大小均一、直径为50-200 nm的脂质双分子层结构囊泡,可由间充质干细胞、肿瘤细胞、树突细胞、成纤维细胞等多种不同类型细胞释放^[8-11]。外泌体中包含大量蛋白质、RNA以及DNA等物质,对细胞间信息交流起到重要作用^[12-15]。脂肪干细胞外泌体拥有与脂肪干细胞相似的免疫抑制、抗炎等生物学效应^[16-19]。由于外泌体具有体积小、安全性高等优势,在心脏、肝脏、肾脏、大脑等多种组织领域拥有更大潜力。

随着外泌体领域的发展,外泌体的安全保存非常重要。目前传统的外泌体保存方法是冻存于-80 °C条件下^[20-23]。外泌体在冷冻状态下可短暂保存,但随着保存时间的延长,外泌体的双分子膜逐渐破碎,活性大幅度丧失,难以用于实验及临床应用。因此寻求一种新的、稳定的保存方式尤为重要。

冻干粉(freeze-dried powder)为固体干粉剂,能在常温下长期保存,性能稳定,输注方便,保存费用低廉,故课题组拟将冻干技术应用于外泌体的保存^[24-26]。保持生物膜的完整性是外泌体冻干技术的最大障碍,由于低温和干燥对生物膜有较大损伤,外泌体在冻干过程中难免存在严重的膜破碎现象,导致活性下降^[27-29]。科学家发现,一些耐低温和干旱的微生物在脱水时,体内可分泌大量的海藻糖,可占其干燥体质量的20%。海藻糖是一种非还原性糖,具有独特的生物学效应^[30-32]。海藻糖在低温、干燥状态下对生物材料有保护作用,能稳定生物膜结构,是低温生物领域的最佳保护剂^[33-34]。海藻糖分布于外泌体内外两侧,且达到一定的浓度,可形成玻璃态,稳固外泌体的空间结构,减轻低温干燥对外泌体双分子膜的损伤^[35]。同样,海藻糖附着于蛋白质表面,保护其分子天然结构,防止蛋白质在冷冻、干燥时变性,显著保护了膜表面蛋白的活性^[36-38]。冻干后的外泌体大部分仍保持其完整性,其脂质双层膜可以避免外泌体被蛋白酶及核糖核酸酶降解,同时表面蛋白的活性也能促进目的细胞表面受体与膜的相互作用,保持其信息的传递^[39-43]。

课题组不仅对脂肪干细胞及外泌体(此处及以下外泌体均指脂肪干细胞外泌体)冻干粉进行了形态学检测,而且

也进行了血管刺激性实验、肌肉刺激性实验、体外溶血实验、主动全身过敏反应实验、被动皮肤过敏反应实验等,以鉴定其应用于机体的安全性。将冻干技术应用于外泌体领域,为今后外泌体的保存与应用提供了极大的方便。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察及安全性研究。

1.2 时间及地点 实验于2017年1至12月在上海市同济大学再生医学系干细胞生理及疾病治疗研究组重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验试剂 0.15%胶原酶 I (Gibco, 美国); DMEM/F12培养基(Hyclone, 美国); 胎牛血清(Gibco, 美国); 0.25%胰蛋白酶(Gibco, 美国); BCA试剂盒(Solarbio, 中国); 海藻糖(国药, 中国); 羟乙基淀粉(阿拉丁, 中国); 人血白蛋白(安博灵, 中国); 人成纤维细胞(HUM-iCell-d021)。

1.3.2 实验仪器 恒温培养箱(Thermo, 美国); 离心机(TD25-WS, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司); 低温超速离心机(Eppendorf, 德国); 粒度仪(NS300, 英国); 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); 超滤浓缩离心管(Merk, 爱尔兰); 冻干机(CHRIST)。

1.3.3 实验动物 健康雄性SD大鼠及雌性家兔均由上海必凯实验动物有限公司提供,于同济大学实验动物中心喂养,自由进食和饮水。

1.4 实验方法

1.4.1 人脂肪干细胞的分离与培养 抽脂术取健康人体颈部脂肪组织(已签署知情同意协议书),PBS清洗3遍,加入0.1%胶原酶 I 于37 °C水浴消化30 min后置于离心机中,1 200 r/min离心5 min后留取细胞沉淀,用适量PBS重悬后再次以上述条件离心,弃上清,加入含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基,接种于10 cm培养皿,细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$,置于37 °C、体积分数为5%CO₂饱和湿度培养箱中,48 h后换液,观察细胞生长至80%时,加入0.25%胰酶消化后按1:3传代培养,培养至第3代留取后续实验使用。

1.4.2 人脂肪干细胞外泌体的提取 取第3代人脂肪干细胞,首先用含有体积分数为10%胎牛血清的DMEM/F12培养基培养,待其生长至80%以上时换用无血清的基础培养基,继续在37 °C,体积分数为5% CO₂的恒温温箱中培养24 h;收集上清至离心管中,0.22 μm的过滤器过滤后转移到100 ku的超滤浓缩离心管中,4 °C条件下以4 000×g离

心40 min, 得到富含外泌体的浓缩液, 置于-80 °C冰箱中储存备用。

1.4.3 人脂肪干细胞及外泌体冻干及再水化

人脂肪干细胞冻干及再水化: 将人脂肪干细胞消化离心, 细胞沉淀与0.8 mol/L海藻糖水溶液以体积比1:3制成细胞悬液, 于37 °C孵育6 h, 细胞悬液与冻干保护剂(20%人血白蛋白)等体积混匀, 37 °C平衡30 min, 置于冻存盒中于-80 °C预冻24 h然后置于冻干机处理。冻干机冷阱温度-50 °C, 真空压力小于20 Pa, 冷冻干燥处理24 h, 储存于4 °C冰箱。再水化用温度为37 °C的6%羟乙基淀粉溶液快速振荡溶解冻干粉^[35]。

外泌体冻干及再水化: 外泌体溶液与海藻糖溶液等体积混匀, 使海藻糖终浓度为10%, 37 °C平衡30 min, 于-80 °C预冻12 h后置于冻干机处理。冻干机冷阱温度-50 °C, 真空压力小于20 Pa, 冷冻干燥处理24 h, 储存于4 °C冰箱。再水化用温度为37 °C的6%羟乙基淀粉溶液快速振荡溶解冻干粉。

1.4.4 人脂肪干细胞冻干粉形态学 将冻存脂肪干细胞复苏、脂肪干细胞冻干粉再水化, 显微镜下观察两组细胞数量及形态学差异。

1.4.5 外泌体冻干粉检测

外泌体冻干粉BCA蛋白检测: 将外泌体分为等量2组, 一组经冻干再水化, 另一组常规冻存复苏, 进行BCA蛋白含量检测, 探索外泌体蛋白含量差异。

外泌体冻干粉NTA检测: 将外泌体与外泌体冻干粉分别制成1 mL合适浓度溶液, 利用Nanosight(NTA) NS300颗粒粒度分析仪检测外泌体样粉, 将样品注入样粉槽, 注满为止, 调整软件参数使视频清晰, 点开软件中的RUN键, 收集数据。

1.4.6 人脂肪干细胞及外泌体冻干粉安全性检测

血管刺激性实验: 取2 kg雄性家兔18只, 随机分成6组, 每组3只, 分别为外泌体冻干粉(100 μg)组、外泌体(100 μg)组、人脂肪干细胞冻干粉(5×10^5)组、人脂肪干细胞(5×10^5)组、生理盐水组、BSA阳性对照组(5 mg BSA)(以下实验分组相同、剂量相同)。外泌体冻干粉、人脂肪干细胞冻干粉进行再水化(方法同1.4.3脂肪干细胞再水化以及外泌体再水化), 然后以生理盐水稀释至10 mL; 外泌体、人脂肪干细胞直接以生理盐水稀释。兔两侧耳静脉滴注给药10 mL, 1次/d, 连续3 d, 观察注射处附近有无红肿、血痂等。于末次给药24 h后将兔放血处死, 取双耳, 用40 g/L多聚甲醛溶液浸泡12 h, 距注射部位近心端1 cm处, 解剖取出静脉血管组织, 纵向做病理切片, 苏木精-伊红染色。

家兔血管过敏性评价标准为: 0级, 给药部位无明显反应; 1级, 给药部位静脉血管轻度瘀血、红肿; 2级, 给药部位静脉血管中度瘀血、红肿; 3级, 给药部位静脉血管重度瘀血, 周围组织严重红肿。

病理学检查指标: 静脉血管内皮细胞的完整度, 有无

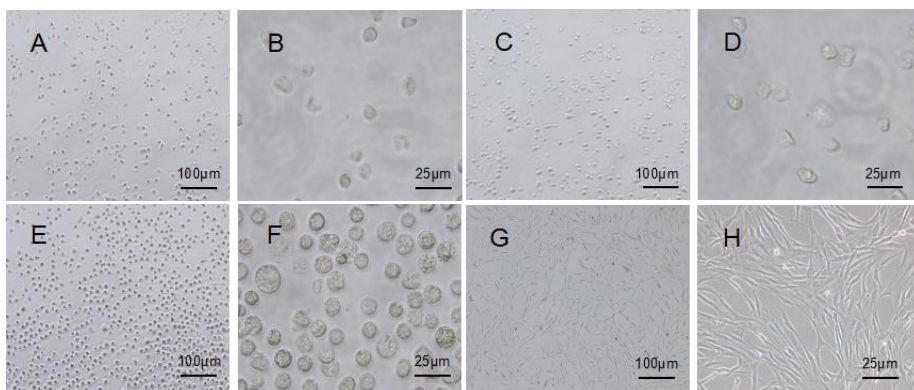
充血、变性、坏死改变, 基底膜是否完整, 管壁及管周组织的完整情况等。

肌肉刺激性实验: 取2 kg雄性家兔18只, 随机分成6组, 每组3只, 分别为外泌体冻干粉组、外泌体组、人脂肪干细胞冻干粉组、人脂肪干细胞组、生理盐水组、BSA阳性对照组。兔两侧股四头肌注射给药1 mL, 1次/d, 连续3 d, 最后1次给药24 h后大体观察注射部位及附近肌肉情况, 再剪取肌肉组织(离注射点1 cm)做病理切片苏木精-伊红染色。肌肉刺激反应分级标准: 0级, 无明显变化; 1级, 轻度充血, 范围在0.5 cm×1.0 cm以下; 2级, 中度充血, 范围在0.5 cm×1.0 cm以上; 3级, 重度充血伴有肌肉变性; 4级, 出现坏死, 有褐色变性; 5级, 出现广泛性坏死。

体外溶血实验: 取2 kg雄性家兔1只, 饲养3 d后, 颈总动脉取血(约20 mL), 用缠有脱脂棉的木棒不断搅动血液, 除去纤维蛋白原, 使之成为脱纤血液, 加入生理盐水约10倍量, 摇匀, 离心(1 500 r/min, 15 min), 除去上清液, 沉淀的红细胞用生理盐水按上述方法洗涤2次, 至上清液不显红色为止。将所得红细胞用生理盐水配成体积分数为2%的混悬液, 分为每管2.5 mL。将外泌体冻干粉、外泌体、人脂肪干细胞冻干粉、人脂肪干细胞、生理盐水、蒸馏水分别加入到试管中, 37 °C温育, 大体观察溶血与红细胞凝聚现象, 3 h后离心(1 500 r/min, 15 min), 细胞沉淀重悬计数红细胞数, 取上清液于545 nm下测定吸光度值。

主动全身过敏实验: 取雄性SD大鼠36只(200 g), 随机分为12组, 每组3只, 分别为外泌体冻干粉高剂量(300 μg)组、外泌体冻干粉低剂量(100 μg)组、外泌体高剂量(300 μg)组、外泌体低剂量(100 μg)组、人脂肪干细胞高剂量(1.5×10^6)组、人脂肪干细胞低剂量(5×10^5)组、人脂肪干细胞冻干粉高剂量组(1.5×10^6)组、人脂肪干细胞冻干粉低剂量(5×10^5)组、生理盐水组、BSA阳性对照组(1 mg)、BSA阳性对照组(5 mg)、BSA阳性对照组(2.5 mg)^[44]。各组受试物与弗氏完全佐剂等体积混为悬浊液。致敏: 隔日腹腔注射各组悬浊液1 mL, 共3次。激发: 首次注射后的第14天, 每组取1只大鼠, 静脉注射各组受试液1 mL, 观察半小时内大鼠的表现^[44]。表现: -无症状; +不安、哆嗦、搔鼻、喷嚏、排尿、呼吸急促等; ++除上述症状外, 呼吸困难和运动障碍; +++除上述症状外, 呼吸衰竭直至痉挛, 但可恢复; ++++死亡。

皮肤被动过敏实验: 取雄性SD大鼠36只(200 g), 随机分为12组(同上段分组, 每组3只), 各组受试物与弗氏完全佐剂等体积混为悬浊液。致敏: 隔日腹腔注射各组悬浊液1 mL, 共3次。首次致敏14 d后采血, 制备抗血清。取雄性SD大鼠12只, 将各组抗血清原液在动物背部脊柱两侧脱毛区皮内注射0.1 mL/点, 2 d后各组动物进行抗原攻击: 尾静脉注射1 mL(0.5 mL抗原+0.5 mL 10%伊文斯蓝溶液)激发抗原, 30 min后将动物处死, 取背部皮肤, 拍照并测量皮肤内侧的蓝色反应斑直径。



图注: 图 A, B 为人脂肪干细胞冻干粉再水化后培养 0 h 的细胞形态; C, D 为人脂肪干细胞冻干粉再水化后培养 24 h 后的细胞形态; E, F 为常规冻存人脂肪干细胞复苏后培养 0 h 的细胞形态; G, H 为常规冻存人脂肪干细胞复苏后培养 24 h 的细胞形态, 呈梭形紧密生长。

图 1 冻存人脂肪干细胞复苏后、人脂肪干细胞冻干粉再水化后的细胞形态

Figure 1 Morphology of cryopreserved human adipose-derived stem cells after resuscitation and freeze-dried powder of human adipose-derived stem cells after rehydration

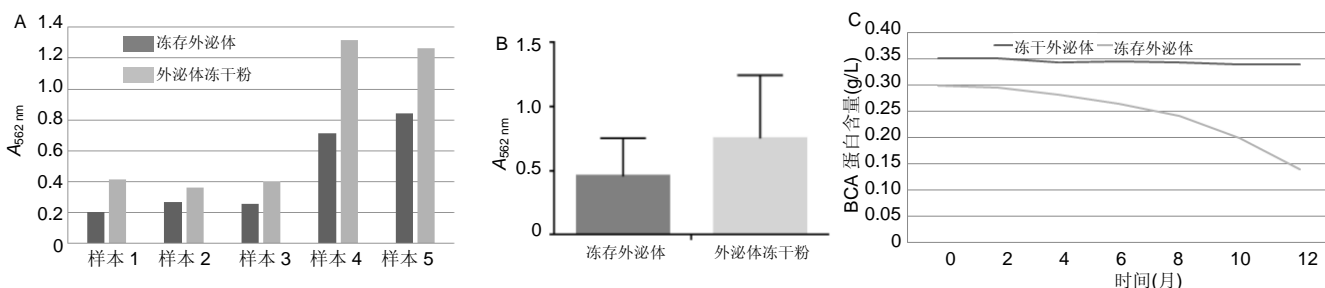


图 2 冻存外泌体及外泌体冻干粉的 BCA 蛋白含量比较

Figure 2 BCA detection of cryopreserved exosomes and freeze-dried exosomes

图注: 图中 A 为冻存外泌体及外泌体冻干粉的 BCA 吸光度值比较, 每组样品初始外泌体等量; B 为冻存外泌体及外泌体冻干粉的 BCA 吸光度值统计图; C 为外泌体冻干粉与外泌体冻存液在不同储存时间所测的 BCA 蛋白含量。

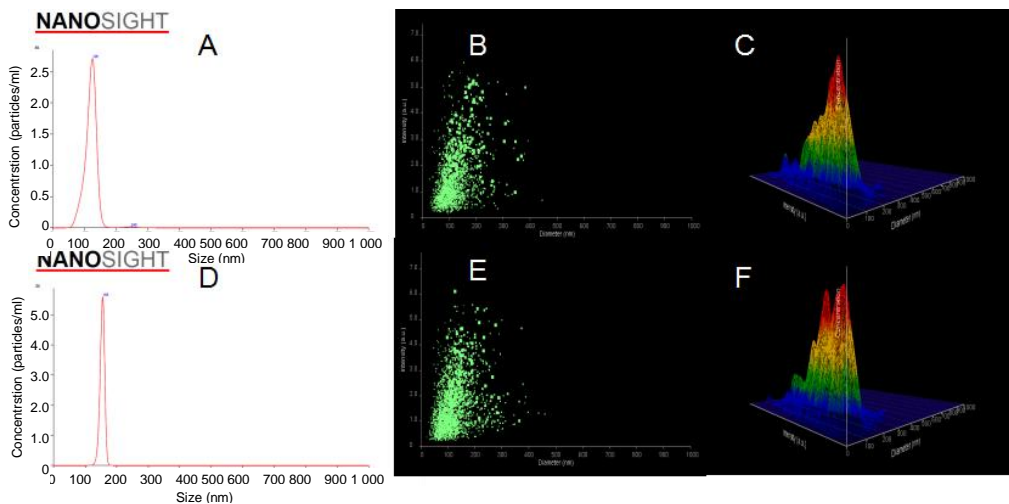


图 3 外泌体及外泌体冻干粉的 NTA 粒径分布

Figure 3 The size distribution of exosomes and freeze-dried exosomes

图注: 图中 A-C 为外泌体的 NTA 数据; D-F 为外泌体冻干粉再水化的 NTA 数据。

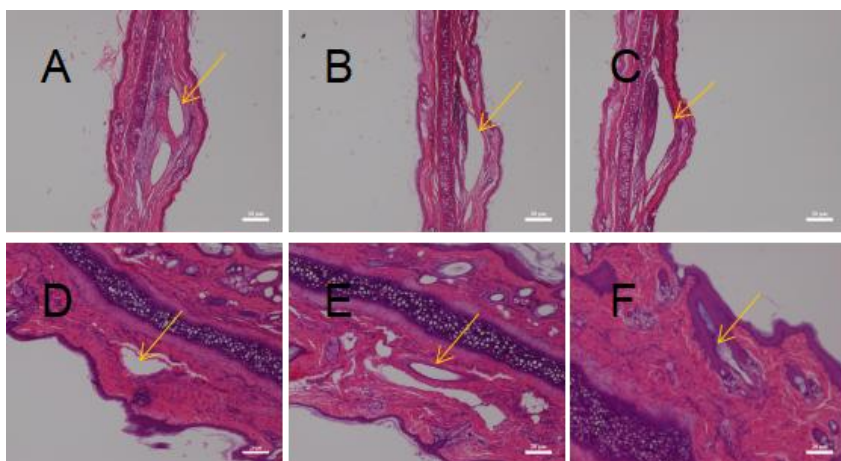


图 4 各组家兔血管组织横断面苏木精-伊红染色 ($\times 100$)

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of the cross-section of the rabbit ear vein ($\times 100$)

图注: 图片 A-F 依次为外泌体冻干粉组、外泌体组、人脂肪干细胞冻干粉组、人脂肪干细胞组、生理盐水组、BSA 阳性对照组, 该实验说明外泌体冻干粉、外泌体、人脂肪干细胞冻干粉、人脂肪干细胞均无明显血管刺激性。箭头所示为兔耳缘静脉。

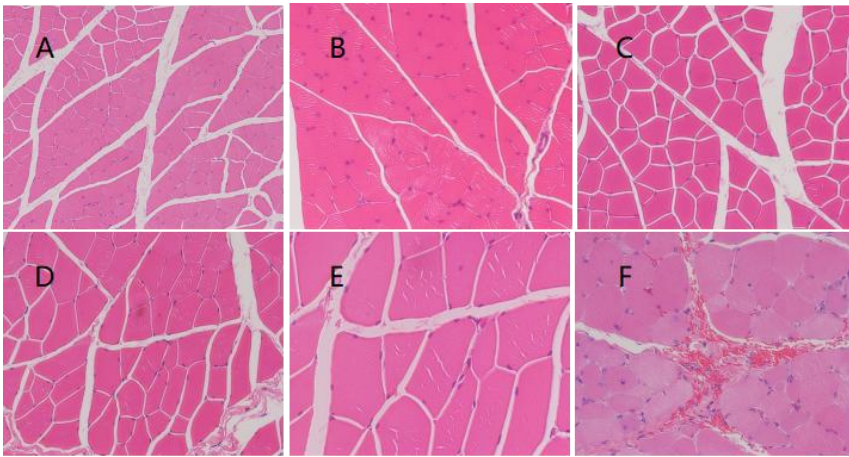


图5 各组家兔肌肉组织苏木精-伊红染色(x100)
Figure 5 Hematoxylin-eosin staining of the rabbit muscle tissues (x100)

图注: 图片 A-F 依次为外泌体冻干粉组、外泌体组、人脂肪干细胞冻干粉组、人脂肪干细胞组、生理盐水组、BSA 阳性对照组, 由图可见外泌体冻干粉、外泌体、人脂肪干细胞冻干粉、人脂肪干细胞均无明显肌肉刺激性。

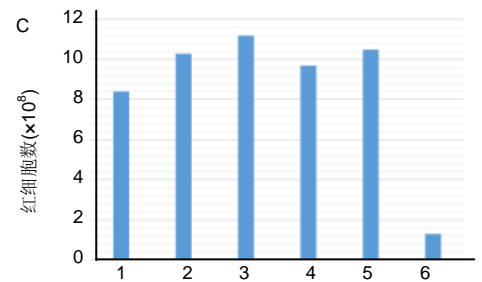
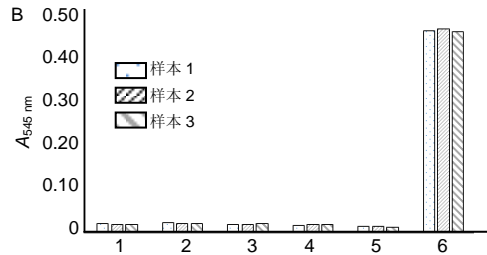
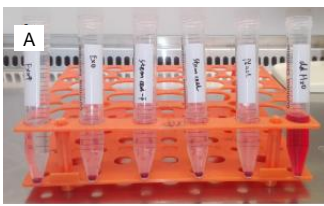


图6 各组体外溶血性实验数据

Figure 6 Results of the hemolytic test in each group

图注: 图中 A 为大体观察结果, 各试管依次为外泌体冻干粉组(1)、外泌体组(2)、人脂肪干细胞冻干粉组(3)、人脂肪干细胞组(4)、生理盐水组(5)、蒸馏水组(6); B 为离心后各组上清的 545 nm 吸光度值, 每组 3 个样品; C 为细胞沉淀重悬后红细胞计数。

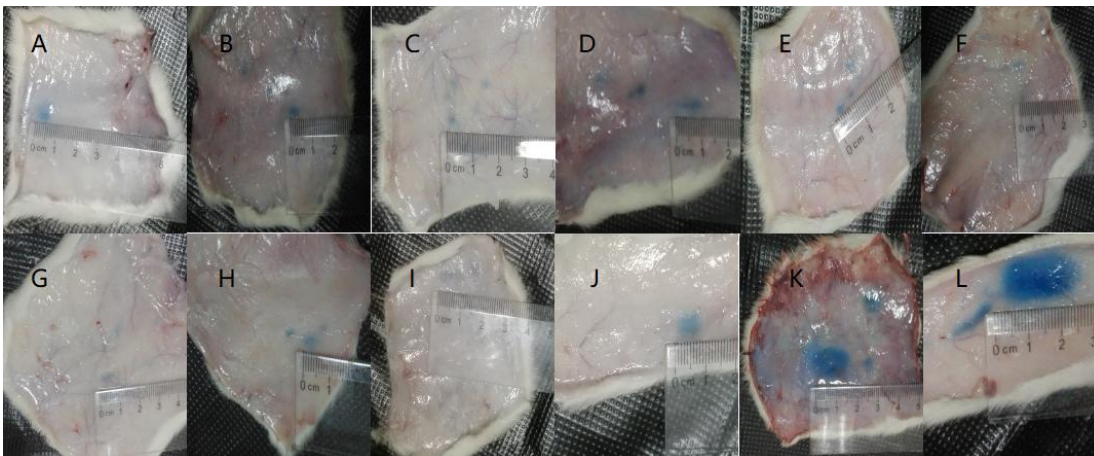


图7 各组大鼠被动皮肤过敏性实验

Figure 7 Passive cutaneous anaphylaxis test in rats

图注: 图中 A-L 分别为外泌体冻干粉高、低剂量组, 外泌体冻干粉液高、低剂量组, 人脂肪干细胞高、低剂量组, 人脂肪干细胞冻干粉高、低剂量组, 生理盐水组(阴性对照), BSA 阳性对照组(1 mg)、BSA 阳性对照组(2.5 mg)、BSA 阳性对照组(5 mg), 尺子所测量为皮肤内最大蓝斑的最大直径。

1.4.7 成纤维细胞增殖曲线 将人成纤维细胞以2 000/孔接种到96孔板, 分为人脂肪干细胞外泌体组、人脂肪干细胞外泌体冻干粉组、PBS对照组。培养24 h后分别加入人脂肪干细胞外泌体、人脂肪干细胞外泌体冻干粉、PBS, 使终质量浓度为10 mg/L, 分别于6, 24, 48, 72, 96 h加入10 μ L CCK8, 37 $^{\circ}$ C孵育1 h, 使用多功能酶标仪检测450 nm吸光度值。

1.5 主要观察指标 ①冻干技术与常规冻存方法保存脂

肪干细胞外泌体的形态学差异; ②外泌体冻干粉用于机体注射的安全性。

2 结果 Results

2.1 冻存人脂肪干细胞及人脂肪干细胞冻干粉的形态见图1。普通冻存的人脂肪干细胞复苏时, 细胞饱满、呈圆球形, 37 $^{\circ}$ C培养24 h后呈梭形贴壁生长。与普通冻存相比, 冻干再水化人脂肪干细胞形态较不规则, 数量较少, 部分

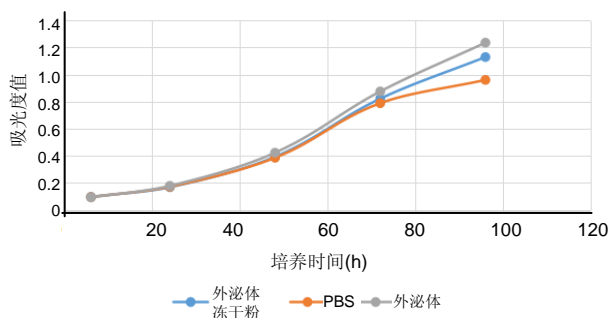


图8 各组成纤维细胞CCK8增殖曲线

Figure 8 Cell counting kit-8 proliferation curve of fibroblasts in each group

图注: 外泌体组、外泌体冻干粉组、PBS 对照组成纤维细胞生长速率依次降低, 说明外泌体经冻干处理之后, 促细胞增殖活性有所降低, 但仍具有一定活性。

细胞成为碎片。培养24 h, 冻干再水化人脂肪干细胞均不贴壁, 丧失细胞活性。

2.2 冻存外泌体及外泌体冻干粉的BCA蛋白含量比较 图2A所示, 外泌体冻干粉的562 nm吸光度值均略高于冻存外泌体, 即蛋白测得量较高, 考虑为外泌体在冻干过程中有部分外泌体双分子膜破碎, 导致其中蛋白溢出, 蛋白测得值升高。图2B为外泌体与外泌体冻干粉的BCA蛋白含量统计图, 两组562 nm吸光度值差异无显著性意义。图2C为外泌体的蛋白含量变化, 可以看出外泌体冻干粉的蛋白含量随时间延长减少不显著, 而外泌体冻存液蛋白含量随时间变化大幅度下降, 考虑为外泌体蛋白裂解所致。

2.3 人脂肪干细胞外泌体及冻干粉大小分布 由图3可见, 外泌体的粒径多集中在130 nm左右, 外泌体冻干粉的粒径多集中在150 nm左右。外泌体冻干粉的粒径较外泌体稍大, 考虑为外泌体双分子膜在冻干的过程中可能丧失部分弹性, 导致膜松弛, 粒径变大。

2.4 人脂肪干细胞外泌体及冻干粉血管刺激实验结果 见图4。外泌体冻干粉组、外泌体组、人脂肪干细胞冻干粉组、人脂肪干细胞组与阴性对照生理盐水组给药部位均无明显反应, 肉眼评价均为0级。从病理结果可以看出, 外泌体冻干粉组、外泌体组、人脂肪干细胞冻干粉组、人脂肪干细胞组、生理盐水组以及BSA阳性对照组内皮完整, 均无明显充血、变性、坏死等。BSA阳性对照组无明显充血、变性等改变可能因为该浓度的BSA血管刺激性不强。该实验可说明外泌体冻干粉、外泌体、人脂肪干细胞冻干粉、人脂肪干细胞均无明显血管刺激性。

2.5 人脂肪干细胞外泌体及冻干粉肌肉刺激实验结果 见图5。外泌体冻干粉组、外泌体组、人脂肪干细胞冻干粉组、人脂肪干细胞组与阴性对照生理盐水组内皮均完整, 均无充血、变性、坏死等, 评为0级, BSA阳性对照组有中度充血, 评为2级。该实验说明外泌体冻干粉、外泌体、人脂肪干细胞冻干粉、人脂肪干细胞均无肌肉刺激性。

表1 各组大鼠主动全身过敏性实验结果

Table 1 Results of the active systemic anaphylactic test in rats

大鼠	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++++
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++++
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	++++

表注: A-L 分别为外泌体冻干粉高、低剂量组, 外泌体冻存液高、低剂量组, 人脂肪干细胞高、低剂量组, 人脂肪干细胞冻干粉高、低剂量组, 生理盐水组(阴性对照), BSA 阳性对照组(1 mg)、BSA 阳性对照组(2.5 mg)、BSA 阳性对照组(5 mg), 每组 3 只大鼠。

2.6 人脂肪干细胞外泌体及冻干粉体外溶血实验结果 由图6A可见, 前5管上清清亮, 细胞沉淀较多, 第6管上清红染, 沉淀较少, 说明蒸馏水组有明显溶血现象, 其他各组溶血均不明显。各组离心后取上清测545 nm吸光度值, 蒸馏水阳性组吸光度值较高, 有明显溶血, 其他组吸光度值均较低, 溶血不明显(图6B)。细胞沉淀重悬后显微镜下进行红细胞计数, 蒸馏水阳性组红细胞最少, 其他组红细胞均明显高于蒸馏水组(图6C)。以上结果均提示, 外泌体、外泌体冻干粉、人脂肪干细胞、人脂肪干细胞冻干粉均不会造成大规模溶血。

2.7 人脂肪干细胞外泌体及冻干粉主动全身过敏实验结果 如表1所示, 外泌体冻干粉高、低剂量组, 外泌体冻存液高、低剂量组, 人脂肪干细胞高、低剂量组, 人脂肪干细胞冻干粉高、低剂量组, 生理盐水组(阴性对照)均呈阴性, BSA(1.0, 2.5, 5.0 mg)阳性对照组呈阳性。外泌体、外泌体冻干粉、人脂肪干细胞、人脂肪干细胞冻干粉主动全身过敏实验均呈阴性, 未引起I型超敏反应, 安全性可靠。

2.8 人脂肪干细胞外泌体及冻干粉被动皮肤过敏实验结果 如图7所示, 外泌体冻干粉高、低剂量组, 外泌体高、低剂量组, 人脂肪干细胞高、低剂量组, 人脂肪干细胞冻干粉高、低剂量组, 生理盐水组的皮肤蓝斑最大直径分别为4, 3, 2, 4, 3, 2, 3, 4, 2, 10, 15, 25 mm, 均小于BSA(1.0, 2.5, 5.0 mg)阳性对照组, 说明外泌体、外泌体冻干粉、人脂肪干细胞、人脂肪干细胞冻干粉主动全身过敏实验均呈阴性, 不会引起明显皮肤反应。

2.9 人成纤维细胞的增殖曲线 图8为成纤维细胞的CCK8生长曲线, 外泌体组、外泌体冻干粉组、PBS对照组成纤维细胞生长速率依次降低, 说明外泌体经冻干处理之后, 促细胞增殖活性有所降低, 但仍具有一定活性。

3 讨论 Discussion

随着干细胞外泌体研究的深入, 外泌体的稳定储存也成了亟待解决的技术问题。目前外泌体多于-80 °C条件下保存, 但随着保存时间的延长, 大部分外泌体会逐渐破碎, 活性大幅度下降, 严重影响实验及临床应用, 因此寻求一种新的稳定的外泌体保存方式尤为重要。冻干粉作为一种粉剂, 可长时间保存且稳定性可靠^[45]。该研究将冻干技术

应用于脂肪干细胞及外泌体,并对脂肪干细胞及外泌体冻干前后的形态、数量以及安全性进行了探索。

实验观察了冻干技术用于脂肪干细胞的效果。有研究将冻干技术应用于红细胞的保存,发现在海藻及人血白蛋白的保护下,人红细胞在冻干及再水化后大部分仍可保持膜完整性^[35]。该研究将红细胞冻干再水化条件用于脂肪干细胞的保存,探索脂肪干细胞冻干的效果。结果显示,在海藻糖及人血白蛋白的保护下,脂肪干细胞经冻干再水化过程后,细胞部分破碎,但仍有部分细胞具有细胞结构,形态大小不规则,胞体欠丰满。经常规培养过夜之后,冻干再水化细胞均无贴壁现象。说明该条件下,脂肪干细胞经冻干再水化之后,虽可保持细胞形态,但丧失细胞活性,不适于细胞储存。

外泌体表面及囊泡内富含大量蛋白质及RNA等物质,并通过这些蛋白及RNA发挥生物学效应,实验室可通过蛋白质含量检测外泌体的含量^[46-48]。外泌体及外泌体冻干粉BCA蛋白检测结果显示,同等数量外泌体经冻干保存比常规冻存蛋白含量测得值高。BCA所测外泌体蛋白含量为外泌体表面所暴露的蛋白。冻干保存蛋白测得值较高,疑为外泌体经冻干再水化处理之后,部分破裂,致囊泡内蛋白溢出,使BCA测得值升高。NTA结果显示外泌体经冻干再水化之后粒径稍大,但直径仍在50-200 nm之内,考虑为外泌体受冻干再水化影响,磷脂双分子膜原有结构及弹性丧失,致使外泌体形态不规则,较冻干前体积增大,但囊泡仍完整未破碎。以上结果均提示就短期保存来讲,冻干技术略逊于常规冻存技术,但仍有应用潜力。该研究增加保存时间对两种方法进行探索,分别于0, 2, 4, 6, 8, 10, 12个月7个时间点对外泌体冻干粉及外泌体冻存液进行BCA蛋白含量测定,发现冻干技术储存的外泌体蛋白测得量恒定,而常规冻存储存的外泌体从2个月开始蛋白测得量逐渐下降,考虑为蛋白降解所致。外泌体的生物效能主要基于外泌体中蛋白及RNA的作用,冻干处理后,外泌体蛋白并无大量降解,生物效能仍然存在。CCK8细胞增殖实验结果表明,外泌体经冻干再水化处理之后,生物效能虽有部分降低,但仍可促进成纤维细胞增殖。综合来看,外泌体冻干技术更适于长期保存。

由于冻干再水化过程加入海藻糖、羟乙基淀粉等物质,且外泌体经冻干再水化之后部分破碎,形态也有变化,所以外泌体经冻干之后的安全性需要评估。该研究对外泌体冻干粉、外泌体、脂肪干细胞冻干粉、脂肪干细胞分别进行了血管刺激性实验、肌肉刺激性实验、溶血性实验、主动全身过敏性实验、被动皮肤过敏性实验。结果显示,外泌体冻干粉、外泌体、脂肪干细胞冻干粉、脂肪干细胞均未引起阳性反应。脂肪干细胞及外泌体免疫原性低,不易引起免疫排斥反应,经冻干之后,脂肪干细胞及外泌体冻干粉的免疫原性未发现有升高现象。外泌体冻干粉、外泌体、脂肪干细胞冻干粉、脂肪干细胞均无血管、肌肉刺激

性,不会引起溶血,可用于机体注射,主动全身过敏实验、被动皮肤过敏实验阴性说明未引起I型超敏反应,免疫原性低,安全性可靠。

实验所得外泌体冻干粉虽可引起外泌体部分破碎,形态也发生变化,但仍可保持大量外泌体的完整性,可长期保存,安全可靠,说明外泌体冻干技术有进一步探索利用的价值,或可通过改变冻干预处理条件达到更好的效果。

作者贡献: 实验设计为金银鹏、李洪超,实验实施为李洪超,实验评估为傅青春、金银鹏,资料收集为李洪超、王哲、李莉。李洪超成文,傅青春、金银鹏审核。

经费支持: 该文章接受了“南京军区医学创新重大课题(14ZX01)”、“中国肝炎防治基金-天晴肝病研究基金项目(TQGB20150104)”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: 该研究的实施符合解放军第八五医院的相关伦理要求,伦理批号为【2013】伦理第18号。试验在北美临床试验注册中心注册,注册号为NCT01342250。

知情同意问题: 实验所用脂肪组织来源于解放军第八五医院,已签署知情同意书。

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。

生物统计学声明: 文章未使用到统计方法进行对比分析。

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] Chen G, Jin Y, Shi X, et al. Adipose-derived stem cell-based treatment for acute liver failure. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:40.
- [2] 罗永慧,刘漪沁.脂肪间充质干细胞研究应用进展[J].成都医学院学报, 2015,10(3):360-362.
- [3] Shi R, Jin Y, Cao C, et al. Localization of human adipose-derived stem cells and their effect in repair of diabetic foot ulcers in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):155.
- [4] Zhu F, Chong Lee Shin OLS, Pei G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells employed exosomes to attenuate AKI-CKD transition through tubular epithelial cell dependent Sox9 activation. *Oncotarget*. 2017;8(41):70707-70726.
- [5] Zhu CT, Li T, Hu YH, et al. Exosomes secreted by mice adipose-derived stem cells after low-level laser irradiation treatment reduce apoptosis of osteocyte induced by hypoxia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(24):5562-5570.
- [6] Patel RS, Carter G, El Bassit G, et al. Adipose-derived stem cells from lean and obese humans show depot specific differences in their stem cell markers, exosome contents and senescence: role of protein kinase C delta (PKCδ) in adipose stem cell niche. *Stem Cell Investig*. 2016;3:2.
- [7] García-Contreras M, Vera-Donoso CD, Hernández-Andreu JM, et al. Therapeutic potential of human adipose-derived stem cells (ADSCs) from cancer patients: a pilot study. *PLoS One*. 2014;9(11):e113288.

- [8] 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.
- [9] Gauthier SA, Pérez-González R, Sharma A, et al. Enhanced exosome secretion in Down syndrome brain - a protective mechanism to alleviate neuronal endosomal abnormalities. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5(1):65.
- [10] Zhou Y, Zhou G, Tian C, et al. Exosome-mediated small RNA delivery for gene therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2016; 7(6): 758-771.
- [11] Xu AT, Lu JT, Ran ZH, et al. Exosome in intestinal mucosal immunity. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(10):1694-1699.
- [12] Jia Y, Chen Y, Wang Q, et al. Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(25):41717-41733.
- [13] Whiteside TL. Exosomes in Cancer: Another Mechanism of Tumor-Induced Immune Suppression. *Adv Exp Med Biol.* 2017; 1036:81-89.
- [14] Tatsumi K, Okano T. Hepatocyte Transplantation: Cell Sheet Technology for Liver Cell Transplantation. *Curr Transplant Rep.* 2017;4(3):184-192.
- [15] Wang J, Zheng Y, Zhao M. Exosome-Based Cancer Therapy: Implication for Targeting Cancer Stem Cells. *Front Pharmacol.* 2017;7:533.
- [16] Oishi Y, Manabe I. Adipose stem cell system. *Clin Calcium.* 2017; 27(6):795-801.
- [17] Kim SC, Im W. Adipose stem cell neurospheres for Huntington's disease. *Cytotherapy.* 2017;19(12):1546-1547.
- [18] Ben Nasr M, Frumento D, Fiorina P. Adipose Stem Cell Therapy for Chronic Pancreatitis. *Mol Ther.* 2017;25(11):2438-2439.
- [19] Sun Z, Gou W, Kim DS, et al. Adipose Stem Cell Therapy Mitigates Chronic Pancreatitis via Differentiation into Acinar-like Cells in Mice. *Mol Ther.* 2017;25(11):2490-2501.
- [20] Anticoli S, Aricò E, Arenaccio C, et al. Engineered exosomes emerging from muscle cells break immune tolerance to HER2 in transgenic mice and induce antigen-specific CTLs upon challenge by human dendritic cells. *J Mol Med (Berl).* 2018;96(2):211-221.
- [21] Figueroa J, Phillips LM, Shahar T, et al. Exosomes from Glioma-Associated Mesenchymal Stem Cells Increase the Tumorigenicity of Glioma Stem-like Cells via Transfer of miR-1587. *Cancer Res.* 2017;77(21):5808-5819.
- [22] Liu L, Jin X, Hu CF, et al. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(1):52-68.
- [23] Xu QQ, Ge RL, Sun HY, et al. Research Advance on Promoting Angiogenesis of Mesenchymal Stem Cells-Review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2017;25(4):1267-1270.
- [24] Thakral S, Wolf A, Beilman GJ, et al. Development and in vivo evaluation of a novel lyophilized formulation for the treatment of hemorrhagic shock. *Int J Pharm.* 2018;537(1-2):162-171.
- [25] Vígvári S, Sipos D, Solt J, et al. Faecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection using a lyophilized inoculum from non-related donors: A case series involving 19 patients. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2017:1-10.
- [26] Yang YZ, Zhang XY, Fang LJ, et al. Role of Exosomes in the Cross-Talk between Leukemia Cells and Mesenchymal Stem Cells -Review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2017;25(4): 1255-1258.
- [27] Maitani Y, Aso Y, Yamada A, et al. Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/DNA complexes with high transfection efficiency. *Int J Pharm.* 2008;356(1-2):69-75.
- [28] Jizomoto H, Hirano K. Encapsulation of drugs by lyophilized empty dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: effect of calcium ion. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1989;37(11):3066-3069.
- [29] Huang X, Karabudak A, Comber JD, et al. A novel immunization approach for dengue infection based on conserved T cell epitopes formulated in calcium phosphate nanoparticles. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(11):2612-2625.
- [30] Lin LS, Kayasuga-Kariya Y, Nakamura S, et al. Co-lyophilized Aspirin with Trehalose Causes Less Injury to Human Gastric Cells and Gastric Mucosa of Rats. *Dig Dis Sci.* 2016;61(8):2242-2251.
- [31] Kayasuga-Kariya Y, Iwanaga S, Fujisawa A, et al. Dermal cell damage induced by topical application of non-steroidal anti-inflammatory drugs is suppressed by trehalose co-lyophilization in ex vivo analysis. *J Vet Med Sci.* 2013;75(12): 1619-1622.
- [32] Zhou C, Cleland D, Snell J, et al. Formation of Stable Nanobubbles on Reconstituting Lyophilized Formulations Containing Trehalose. *J Pharm Sci.* 2016;105(7):2249-2253.
- [33] Lee J, Lin EW, Lau UY, et al. Trehalose glycopolymers as excipients for protein stabilization. *Biomacromolecules.* 2013;14(8): 2561-2569.
- [34] Zhao J, Wang S, Bao J, et al. Trehalose maintains bioactivity and promotes sustained release of BMP-2 from lyophilized CDHA scaffolds for enhanced osteogenesis in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013;8(1):e54645.
- [35] 权国波, 章金刚, 韩颖. 人红细胞冰冻干燥保存研究的进展[J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(1): 191-196.
- [36] Smith JL, Lepping MD, Rule DM, et al. Evidence for Field-Evolved Resistance of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F *Bacillus thuringiensis* Protein and Transgenic Corn Hybrids in Ontario, Canada. *J Econ Entomol.* 2017;110(5):2217-2228.
- [37] Mensink MA, Šibík J, Frijlink HW, et al. Thermal Gradient Mid- and Far-Infrared Spectroscopy as Tools for Characterization of Protein Carbohydrate Lyophilizates. *Mol Pharm.* 2017;14(10):3550-3557.
- [38] Dégardin K, Desponds A, Roggo Y. Protein-based medicines analysis by Raman spectroscopy for the detection of counterfeits. *Forensic Sci Int.* 2017;278:313-325.
- [39] Pérez-Boza J, Lion M, Struman I. Exploring the RNA landscape of endothelial exosomes. *RNA.* 2018;24(3):423-435.
- [40] Qi J, Zhou Y, Jiao Z, et al. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42(6): 2242-2254.
- [41] Zheng T, Wu X, Wei X, et al. The release and transmission of amyloid precursor protein via exosomes. *Neurochem Int.* 2018;114: 18-25.
- [42] Munson P, Shukla A. Exosomes: Potential in Cancer Diagnosis and Therapy. *Medicines (Basel).* 2015;2(4):310-327.
- [43] Silva M, Melo SA. Non-coding RNAs in Exosomes: New Players in Cancer Biology. *Curr Genomics.* 2015;16(5):295-303.
- [44] 中药、天然药物免疫毒性(过敏性、光变态反应)研究的技术指导原则 [DB/OL]. <https://wenku.baidu.com/view/ef76d775aeaad1f347933f45.html>, 2015-10-14/2018-02-12.
- [45] Almeida EV, De Brito SL. Alkaline degradation of lyophilized DMSA prior to labeling with ^{99m}Tc: Identification and development of the degradation pathway by HPLC and MS. *Nucl Med Biol.* 2018;57: 20-27.
- [46] Ventimiglia LN, Alonso MA. Biogenesis and Function of T Cell-Derived Exosomes. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:84.
- [47] Shenoda BB, Ajit SK. Modulation of Immune Responses by Exosomes Derived from Antigen-Presenting Cells. *Clin Med Insights Pathol.* 2016;9(Suppl 1):1-8.
- [48] Chen Y, Tang Y, Long W, et al. Stem Cell-Released Microvesicles and Exosomes as Novel Biomarkers and Treatments of Diseases. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2417268.