

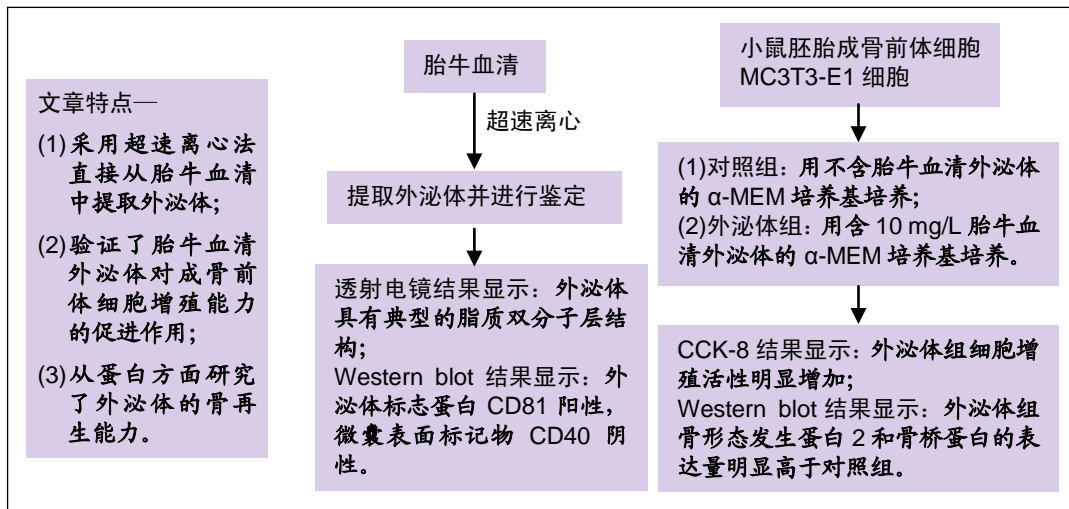
# 胎牛血清外泌体对成骨细胞增殖的作用

徐慧君, 张咪, 史东梅, 吴赛璇, 陆颖, 董明, 牛卫东(大连医科大学口腔医学院牙体牙髓教研室, 辽宁省大连市 116044)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2122

ORCID: 0000-0002-7601-4535(徐慧君)

文章快速阅读:



徐慧君, 女, 1994 年生, 安徽省亳州市人, 汉族, 大连医科大学在读硕士, 医师, 主要从事牙体牙髓研究。

共同第一作者: 张咪, 女, 1994 年生, 江苏省宿迁市人, 汉族, 大连医科大学在读硕士, 医师, 主要从事牙体牙髓研究。

通讯作者: 牛卫东, 博士, 教授, 博士生导师, 大连医科大学口腔医学院牙体牙髓教研室, 辽宁省大连市 116041

文献标识码:A

投稿日期: 2019-10-09

送审日期: 2019-10-10

采用日期: 2019-12-06

在线日期: 2020-06-05



## 文题释义:

**外泌体:** 是一种能被大多数细胞分泌的微小囊泡, 直径 30–150 nm, 形似杯状, 其主要结构是脂质双分子层膜结构。外泌体几乎存在于所有体液中, 如血液、尿液、泪液和乳汁等。外泌体是细胞间进行信息交流的重要媒介, 其内含有大量的蛋白质、脂质、mRNA、miRNA 和 DNA 等。

**成骨细胞:** 该细胞由多功能细胞骨髓间充质细胞分化而来, 主要参与骨形成过程, 其占骨总细胞量的 4%–6%。骨形态发生蛋白 2 和骨桥蛋白是成骨细胞的标志性因子。骨形态发生蛋白 2 属于骨形态发生蛋白家族, 已被证实是骨形成作用效果最强的调节因子; 骨桥蛋白由参与骨形态发生的细胞产生, 例如前成骨细胞、成骨细胞, 其参与骨基质组织的沉积, 是细胞外基质中的主要非胶原蛋白之一。

## 摘要

**背景:** 研究表明外泌体具有促进骨再生的能力, 但从胎牛血清中提取的外泌体是否可以促进骨形成仍存在争议。

**目的:** 观察胎牛血清外泌体对成骨细胞增殖能力的影响, 从而为临床治疗骨破坏提供新思路。

**方法:** 通过超速离心法从胎牛血清中提取外泌体, 采用透射电子显微镜和 Western blot 法验证外泌体是否提取成功; 然后用 10 mg/L 胎牛血清外泌体干预成骨前体细胞 MC3T3-E1, 通过 CCK-8 实验检测外泌体对成骨细胞增殖能力的影响, Western blot 检测外泌体对成骨细胞骨形态发生蛋白 2 和骨桥蛋白表达的影响。以不含外泌体的胎牛血清培养的 MC3T3-E1 细胞为对照组。

**结果与结论:** ①胎牛血清外泌体具有典型的脂质双层膜结构, 大小在 30–150 nm 之间, 外泌体表面标记因子 CD81 表达呈阳性, 而微囊表面标记物 CD40 表达呈阴性; ②外泌体组的增殖能力明显高于对照组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 外泌体组成骨标志性因子骨形态发生蛋白 2 和骨桥蛋白的表达水平明显高于对照组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); ③结果表明, 胎牛血清外泌体对成骨细胞的增殖起促进作用, 可为临床治疗骨破坏提供新思路。

## 关键词:

外泌体; 胎牛血清; 成骨前体细胞; 骨破坏; 骨形态发生蛋白 2; 骨桥蛋白; CD81; CD40

中图分类号: R459.9; R394.2; R781

## 基金资助:

国家自然科学基金项目(81700962), 项目负责人: 陆颖

Xu Huijun, Master candidate, Physician, Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Zhang Mi, Master candidate, Physician, Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Xu Huijun and Zhang Mi contributed equally to this work.

Corresponding author:  
Niu Weidong, MD, Professor, Doctoral supervisor, Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

## Fetal bovine serum exosomes promote the proliferation of osteoblasts

Xu Huijun, Zhang Mi, Shi Dongmei, Wu Saixuan, Lu Ying, Dong Ming, Niu Weidong (Department of Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Exosomes have been shown to promote bone regeneration, but whether extracting exosomes from fetal bovine serum can promote osteogenesis remains controversial.

**OBJECTIVE:** To observe the effect of fetal bovine serum exosomes on the proliferation of osteoblasts, so as to provide new ideas for treating bone destruction.

**METHODS:** Exosomes were extracted from fetal bovine serum by ultracentrifugation method. Electron transmission microscopy and western blot assay were used to verify whether the exosomes were successfully extracted. MC3T3-E1 cells were interfered with 10 mg/L fetal bovine serum. The effect of exosomes on the proliferation of osteoblasts was detected by cell counting kit-8 assay. The effects of exosomes on the expression of osteogenic markers bone morphogenetic protein-2 and osteopontin protein were detected by western blot assay. MC3T3-E1 cells cultured in the fetal bovine serum without exosomes were as control group.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The typical lipid bilayer membrane structure of exosomes was observed, and the size was between 30–150 nm. The exosome surface marker factor CD81 was positive, while the microcapsule surface marker CD40 was negative. The results of cell counting kit-8 assay showed that the proliferative capacity in the exosomes group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The expression levels of bone markers bone morphogenetic protein-2 and osteopontin in the exosome group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The exosomes extracted from fetal bovine serum can promote the proliferation of osteoblasts, providing a new idea for the clinical treatment of bone destruction.

**Key words:** exosomes; fetal bovine serum; osteogenic precursor cells; bone destruction; bone morphogenetic protein-2; osteopontin; CD81; CD40

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81700962 (to LY)

## 0 引言 Introduction

骨骼是个不断变化的器官,在整个生命周期中一直存在骨吸收和骨生成活动<sup>[1]</sup>。已知骨形成与骨改建主要由成骨细胞及破骨细胞两大细胞系参与,其中成骨细胞占骨总细胞量的4%–6%,该细胞主要由多功能骨髓间充质细胞分化而来,在骨形成过程中起主要作用,而破骨细胞主要参与骨破坏过程<sup>[2-3]</sup>。正常状态下,成骨细胞介导的骨形成和破骨细胞介导的骨吸收过程处于动态平衡,保持骨稳态,而当骨吸收过程大于骨形成过程时,骨稳态被破坏,即发生骨破坏。骨破坏是多种常见疾病的主要临床表现,如类风湿性关节炎<sup>[4]</sup>、骨质疏松症<sup>[5]</sup>、骨髓瘤等<sup>[6]</sup>。各种疾病导致炎症递质、细胞因子和相关酶在体内释放,从而抑制成骨细胞而促进破骨细胞的形成,导致骨稳态被破坏。

骨形成主要分为类骨质基质的形成、成熟和矿化3个连续阶段,其中成骨细胞主要参与骨基质的形成过程,该细胞在各种刺激下可产生生长因子,如胰岛素样生长因子、转化生长因子 $\beta$ 和骨形态发生蛋白等调节其活性<sup>[1]</sup>。骨形态发生蛋白2是骨形态发生蛋白家族中调节骨形成作用最强的因子<sup>[7]</sup>;骨桥蛋白参与骨基质组织的沉积,是细胞外基质中的主要非胶原蛋白之一<sup>[8]</sup>。因此骨形态发生蛋白2和骨桥蛋白可作为成骨细胞的标志性因子。

外泌体是一种脂质型微小囊泡,大小为30–150 nm,其典型结构是脂质双分子层膜结构,形态类似杯型<sup>[9-10]</sup>。最初报道,外泌体只能由特化细胞分泌,如树突细胞和网织红细胞,然而近期研究表明它可由大多数细胞分泌,包括正常细胞和癌细胞<sup>[11-15]</sup>。外泌体几乎存在于所有的体液<sup>[16]</sup>,包括血液、尿液、乳汁、脑脊髓<sup>[17-20]</sup>、泪液等<sup>[21]</sup>。外泌体内主要含有核酸(mRNA、miRNA、lncRNA和DNA)、蛋白质和脂质<sup>[15]</sup>,其中脂质和蛋白质是外泌体膜的主要成分<sup>[22]</sup>。

研究发现,外泌体可促进骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞,从而参与骨形成过程<sup>[23-24]</sup>。另有研究发现,骨髓间充质干细胞产生的外泌体可直接作用于成骨细胞,促进成骨细胞的增殖与分化<sup>[25-26]</sup>。这些研究结果表明外泌体具有促进骨再生的能力。但上述研究所用外泌体均由细胞分泌而来,具有含量少、耗时长且成本高等缺点。有文献表明胎牛血清中含有大量的外泌体<sup>[27]</sup>,包含生长因子、趋化

因子、蛋白酶等物质,参与调控细胞增殖、分化、凋亡、代谢、迁移等<sup>[28]</sup>。有学者将外泌体先以高质量浓度50 mg/L作用于敲除Rab27a的HT1080纤维肉瘤细胞,结果发现该浓度可明显增强细胞在体内的迁移速度、方向性和持久性,然后又以低质量浓度10 mg/L作用于HT1080纤维肉瘤细胞,也发挥同样的作用<sup>[29]</sup>。目前未曾有研究表明胎牛血清外泌体能直接作用于成骨细胞促进其增殖。因此,该实验从胎牛血清中提取外泌体,并以10 mg/L作为干预浓度,观察其对成骨前体细胞增殖的影响,为临床治疗骨破坏提供新的研究思路。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 体外细胞观察实验。

1.2 时间及地点 2018年12月至2019年9月在大连医科大学口腔医学院细胞实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验细胞 小鼠胚胎成骨前体细胞(MC3T3-E1)购于上海素尔生物科技有限公司。

1.3.2 实验仪器和试剂 低温离心机、二氧化碳培养箱(Thermo);超净工作台(Boxun);光学显微镜(OLYMPUS);电子显微镜(日本电子);凝胶成像系统(UVP); $\alpha$ -MEM培养基(Hyclone);胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco);CCK-8(APEXIBIO);RIPA(索莱宝);BCA试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(碧云天);超高敏显影液(Thermo)。

### 1.4 实验方法

1.4.1 外泌体提取 取15 mL胎牛血清通过差速离心500 $\times$ g、2 500 $\times$ g、13 000 $\times$ g,分别去除血清内的残留细胞、死细胞和细胞碎片,再通过超速离心100 000 $\times$ g得到外泌体及其他杂蛋白,通过0.22  $\mu$ m滤器过滤,PBS洗2遍,提纯外泌体,最终将外泌体溶于100  $\mu$ L PBS中,得到外泌体悬液,-80  $^{\circ}$ C储存。

1.4.2 透射电子显微镜观察 将新鲜分离的外泌体悬浮液(约20  $\mu$ L)垂直滴在培养皿上,水平放入铜网使其吸附5–10 min,然后用滤纸尖吸干;再将铜网放入磷钨酸中染色约5 min,最后用滤纸尖吸干,保证铜网完全干燥后,透射电子显微镜观察。

1.4.3 细胞培养 将小鼠胚胎成骨前体细胞MC3T3-E1细

胞以 $4 \times 10^5$ 的密度接种于T25透气培养瓶中,使用含体积分数为10%胎牛血清、1%双抗的 $\alpha$ -MEM培养液培养,置于 $37^\circ\text{C}$ 、体积分数为5% $\text{CO}_2$ 培养箱,隔天换液,待细胞长满至80%左右,胰酶消化,进行传代,选取状态良好的第3代细胞用于后续实验。

#### MC3T3-E1细胞的培养及鉴定

**细胞来源:** 购买于上海索尔生物科技有限公司

**基础培养基:**  $\alpha$ -MEM 培养基

**添加材料:** 体积分数为10%胎牛血清、1%双抗

**细胞传代:** 细胞复苏后贴壁生长达80%左右进行传代,取第3代细胞用于实验

**1.4.4 实验分组** 将第3代MC3T3-E1细胞分为对照组和外泌体组,对照组用去除外泌体的胎牛血清配置 $\alpha$ -MEM培养液,外泌体组在 $\alpha$ -MEM培养液中加入10 mg/L胎牛血清外泌体。

**1.4.5 Western blot检测相关蛋白表达量** 将第3代MC3T3-E1细胞接种于6孔板中, $1 \times 10^5$ /孔,待细胞贴壁后,对照组更换不含外泌体的胎牛血清配置的 $\alpha$ -MEM培养液,外泌体组在 $\alpha$ -MEM培养液中另加入10 mg/L胎牛血清外泌体进行培养,24 h后弃培养液,冷PBS洗2遍,每孔加入1 mL PBS,使用细胞刮刮取细胞,移至新Ep管中,2 000 r/min离心10 min,弃上清,每管加入100  $\mu\text{L}$ 裂解液,冰上静置30 min(每10 min振荡1次), $4^\circ\text{C}$  12 000 r/min离心10 min,取上清液,BCA试剂盒测定蛋白浓度,加入5xLoading Buffer,煮沸变性, $-20^\circ\text{C}$ 保存样本。根据蛋白浓度计算每个样本的上样量,进行蛋白分离,转膜,5%脱脂奶粉封闭3 h,加入一抗CD81(1:500, Abcam, 美国)、CD40(1:1 000, Bioss, 中国)、骨桥蛋白(1:1 000, Proteintech, 美国)、骨形态发生蛋白2(1:500, Bioworld, 美国)、GAPDH(1:5 000, Bioworld, 美国)孵育过夜, TBST洗3次,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗(1:4 000, 中杉金桥, 中国)孵育1 h, TBST洗3次,配置ECL发光液,使用Image J软件进行灰度分析。

**1.4.6 CCK-8实验** 将第3代MC3T3-E1细胞以每孔2 000的细胞密度接种于96孔板,待细胞贴壁后,对照组更换不含外泌体的胎牛血清配置的 $\alpha$ -MEM培养液,外泌体组在 $\alpha$ -MEM培养液中另加入10 mg/L胎牛血清外泌体,培养0, 24, 48 h弃培养液,根据CCK-8说明书配置反应液,每孔缓慢匀速加入100  $\mu\text{L}$  CCK-8反应液,整个过程避免气泡的产生,从而防止实验结果出现误差,放入 $\text{CO}_2$ 培养箱内孵育1 h, Bio-Rad酶标仪测定450 nm处的吸光度值。

**1.5 主要观察指标** ①透射电子显微镜观察外泌体的结构及大小;②Western blot法检测外泌体表面标记因子表达;③胎牛血清外泌体干预后MC3T3-E1细胞的增殖活性及骨形态发生蛋白2、骨桥蛋白的表达。

**1.6 统计学分析** 通过SPSS 17.0软件,运用one-way ANOVA分析各组实验结果。数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 透射电子显微镜观察外泌体结构** 通过超速离心提取的胎牛血清外泌体具有典型的脂质双分子层结构,且大小在30–150 nm之间,见图1。

**2.2 Western blot检测外泌体标记性因子CD81及CD40的表达** 外泌体标记蛋白CD81呈阳性,而微囊表面标志物CD40呈阴性,见图2。

**2.3 CCK-8法检测胎牛血清外泌体干预后成骨细胞的增殖情况** 胎牛血清外泌体按10 mg/L作用于MC3T3-E1细胞0, 24, 48 h后, CCK-8法检测细胞增殖情况,外泌体组细胞增殖明显高于对照组,且在24 h开始增殖明显,差异有显著性意义,见图3。

**2.4 Western blot检测胎牛血清外泌体干预后成骨细胞骨形态发生蛋白2和骨桥蛋白的表达水平** 10 mg/L胎牛血清外泌体作用于MC3T3-E1细胞24 h后,成骨标志因子骨形态发生蛋白2和骨桥蛋白的表达水平明显增高,见图4。

## 3 讨论 Discussion

已知外泌体的双层膜主要由磷脂酰胆碱、神经节苷脂、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、胆固醇和脂筏组成,其中脂筏是富含胆固醇的膜微区<sup>[30]</sup>,这种含多种脂质成分的膜结构,有助于保护外泌体内容物并有利于外泌体进行细胞间的信号传递<sup>[31]</sup>。

研究表明外泌体在细胞间进行交流时起重要作用<sup>[32]</sup>。外泌体通过进行细胞间通讯参与疾病的发展,例如心血管疾病中的动脉粥样硬化<sup>[33]</sup>。MILANE等<sup>[34]</sup>发现外泌体可参与肿瘤细胞之间的沟通,其通过受体的内吞作用、吞噬作用或与细胞膜融合等形式被受体细胞内化,从而使得外泌体在携带受体细胞遗传信息后再次释放到细胞外,由于其脂质双层膜结构的保护,使得受体信息能够较完整地保留下来。同时有研究表明,外泌体内含有许多可以促进细胞运动的基质,促进细胞运动,参与癌症转移<sup>[29]</sup>。

已知外泌体可通过超速离心法、密度梯度离心法、超滤和外泌体试剂盒等方法提取,其中超速离心法被公认为是提取外泌体的金标准,但该方法产量较低。HELWA等<sup>[35]</sup>通过比较超速离心法与市面上销售的3种外泌体提取试剂盒,结果发现使用3种外泌体试剂盒提取外泌体均能得到较好的实验结果,可有效替代超速离心法,但由于血清中含有较多种蛋白质,使用外泌体试剂盒提取外泌体时,很难区分大小相近的囊泡,主要包括源自质膜的微囊泡(50–1 000 nm)与来自凋亡细胞的凋亡小体(100–5 000 nm)<sup>[27]</sup>,因此为了提高外泌体浓度,该实验选择超速离心法进行分离提取外泌体。

近几年研究表明,外泌体在血管再生及骨再生等方面具有重大收获。SU等<sup>[32]</sup>发现外泌体中的miRNA在血管重塑过程中起正向调节作用,但具体机制及过程仍有待进一步研究。INDER等<sup>[36]</sup>发现前列腺癌细胞衍生的外泌体具有促进人成骨细胞增殖的能力,大约增加1.5倍;然而田笑等<sup>[37]</sup>发现前列腺癌细胞分泌的外泌体可抑制成骨细胞分化,因此目前对于外泌体在骨细胞增殖领域的研究仍存在争议。

骨破坏是发生于骨骼系统中被认为不可逆的临床症状, 它可随着多种疾病的发生发展而出现, 如类风湿性关节炎、骨质疏松症、骨髓瘤等。随着科技的发展, 骨再生问题也成为目前研究的热点。该实验讨论外泌体是否能促进成骨细胞的增殖, 这将为临床治疗骨破坏提供新的治疗思路。

已知外泌体可由大多数细胞分泌, 且几乎存在于所有的体液中。该实验选择从胎牛血清中提取外泌体, 观察其对成骨前体细胞增殖能力的影响。胎牛血清外泌体以10 mg/L的质量浓度作用于成骨前体细胞MC3T3-E1, 通过CCK-8实验及Western blot实验验证胎牛血清外泌体是否能够促进成骨细胞的增殖。

实验首先通过超速离心提取胎牛血清外泌体, 并通过透射电子显微镜观察其形态, 发现其显示出典型的双层脂质膜结构。外泌体膜富含特异性四跨膜蛋白(CD81、CD63、CD9)<sup>[38]</sup>, 但验证外泌体蛋白时不应只观察外泌体标记性蛋白的表达水平, 还应排除微囊表面标志物( $\beta$ -整联蛋白 $\beta$ 1、p-选择蛋白和CD40)和内质网标志物钙合蛋白的影响<sup>[39]</sup>。实验通过Western blot检测CD81及CD40蛋白的表达水平, 结果显示CD81蛋白有表达, 而CD40不表达。上述结果提示, 胎牛血清外泌体提取成功。

胎牛血清外泌体以10 mg/L的质量浓度作用于成骨前体细胞0, 24, 48 h, CCK-8结果显示外泌体组能明显促进成骨细胞增殖, 与对照组比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。Western blot检测外泌体作用24 h后成骨细胞标志因子骨形态发生蛋白2和骨桥蛋白的表达明显增高, 说明胎牛血清外泌体能够直接促进成骨细胞增殖, 促进骨形成。

BENINSON等<sup>[40]</sup>通过研究胎牛血清外泌体与巨噬细胞相关因子白细胞介素1 $\beta$ 之间的关系, 发现胎牛血清外泌体具有一定的免疫功能。SHELKE等<sup>[41]</sup>学者发现从胎牛血清中提取的外泌体可以被A549细胞迅速吸收内化, 提示不同物种间外泌体可以进行信息交流。EITAN等<sup>[27]</sup>学者研究发现使用去除外泌体的胎牛血清培养细胞, 大多数细胞的生长速率均降低, 提示血清中外泌体在细胞生长及存活方面起到一定的作用。

实验仍然存在许多不足, 如未讨论外泌体作用后成骨相关基因的表达水平及其在骨破坏中的具体作用机制等, 这将是后续研究的内容。通过该实验发现胎牛血清外泌体可促进成骨细胞的增殖, 从而可能促进骨再生。

**致谢:** 感谢课题在研究及撰写过程中老师和师姐师妹们的大力支持与鼓励。

**作者贡献:** 徐慧君负责实验设计, 徐慧君和张咪负责实验实施, 徐慧君编写成文, 牛卫东和董明负责论文修改。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81700962)”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:** 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求。

**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。

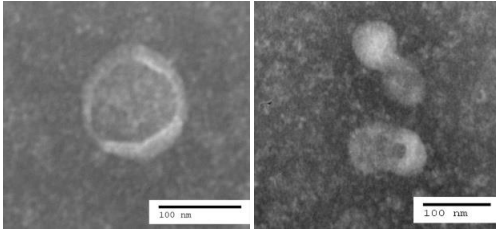
**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经通过大连医科大学生物统计学专家审核。

**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

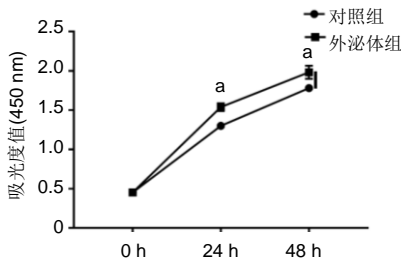
- [1] HADJIDAKIS DJ, ANDROULAKIS II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-396.
- [2] XIE Y, CHEN Y, ZHANG L, et al. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *J Cell Mol Med.* 2017;21(5):1033-1041.
- [3] QIN Y, SUN R, WU C, et al. Exosome: A Novel Approach to Stimulate Bone Regeneration through Regulation of Osteogenesis and Angiogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5): E712.
- [4] GRAVALLESE EM. Bone Wasn't Built in a Day: Destruction and Formation of Bone in the Rheumatic Diseases. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2017;128:24-43.
- [5] COUGHLAN T, DOCKERY F. Osteoporosis and fracture risk in older people. *Clin Med (Lond).* 2014;14(2):187-191.
- [6] DEVINE H, VERINA D. Young Adults with Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs.* 2017;33(3):316-331.
- [7] WANG T, GUO S, ZHANG H. Synergistic Effects of Controlled-Released BMP-2 and VEGF from nHAC/PLGAs Scaffold on Osteogenesis. *Biomed Res Int.* 2018;2018:3516463.
- [8] BAILEY S, KARSENTY G, GUNDBERG C, et al. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1409(1):79-84.
- [9] BATAGOV AO, KUROCHKIN IV. Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biol Direct.* 2013;8:12.
- [10] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-289.
- [11] HARDING C, HEUSER J, STAHL P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983;97(2):329-339.
- [12] PAN BT, JOHNSTONE RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983;33(3):967-978.
- [13] KHAN FM, SALEH E, ALAWADHI H, et al. Inhibition of exosome release by ketotifen enhances sensitivity of cancer cells to doxorubicin. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(1):25-33.
- [14] OH HJ, SHIN Y, CHUNG S, et al. Convective exosome-tracing microfluidics for analysis of cell-non-autonomous neurogenesis. *Biomaterials.* 2017;112:82-94.
- [15] KORITZINSKY EH, STREET JM, STAR RA, et al. Quantification of Exosomes. *J Cell Physiol.* 2017;232(7):1587-1590.
- [16] LI X, YANG Z. Regulatory effect of exosome on cell apoptosis. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2017;42(2):215-220.
- [17] HE C, ZHENG S, LUO Y, et al. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics.* 2018;8(1):237-255.
- [18] LI W, LI C, ZHOU T, et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer.* 2017;16(1):145.
- [19] LI Y, HAN C, WANG J, et al. Exosomes Mediate the Beneficial Effects of Exercise. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1000:333-353.
- [20] LAI A, KINHALL V, NUZHAT Z, et al. Proteomics Method to Identification of Protein Profiles in Exosomes. *Methods Mol Biol.* 2018;1710:139-153.



图注：超速离心提取的胎牛血清外泌体具有典型的脂质双分子层结构，且大小在 30-150 nm 之间

图 1 胎牛血清外泌体的形态及大小

Figure 1 Morphology and size of fetal bovine serum exosomes



图注：与对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 3 胎牛血清外泌体干预 MC3T3-E1 细胞不同时间的增殖情况

Figure 3 Proliferation of MC3T3-E1 cells interfered with fetal bovine serum exosomes at different time points

[21] MELO SA, MOUTINHO C, ROPERO S, et al. A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell*. 2010;18(4):303-315.

[22] ZHANG J, LI S, LI L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.

[23] POURAKBARI R, KHODADADI M, AGHEBATI-MALEKI A, et al. The potential of exosomes in the therapy of the cartilage and bone complications; emphasis on osteoarthritis. *Life Sci*. 2019; 236:116861.

[24] CUI Y, LUAN J, LI H, et al. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *FEBS Lett*. 2016;590(1): 185-192.

[25] KAWAKUBO A, MATSUNAGA T, ISHIZAKI H, et al. Zinc as an essential trace element in the acceleration of matrix vesicles-mediated mineral deposition. *Microsc Res Tech*. 2011;74(12): 1161-1165.

[26] QIN Y, WANG L, GAO Z, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Sci Rep*. 2016;6:21961.

[27] EITAN E, ZHANG S, WITWER KW, et al. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26373.

[28] SUNG BH, KETOVA T, HOSHINO D, et al. Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion. *Nat Commun*. 2015;6:7164.

[29] SUNG BH, WEAVER AM. Exosome secretion promotes chemotaxis of cancer cells. *Cell Adh Migr*. 2017;11(2):187-195.

[30] DE GASSART A, GEMINARD C, FEVRIER B, et al. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*. 2003;102(13): 4336-4344.

[31] SKOTLAND T, SANDVIG K, LLORENTE A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res*. 2017; 66:30-41.

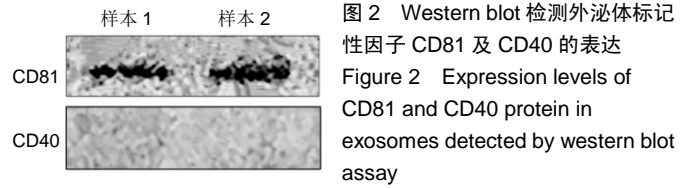
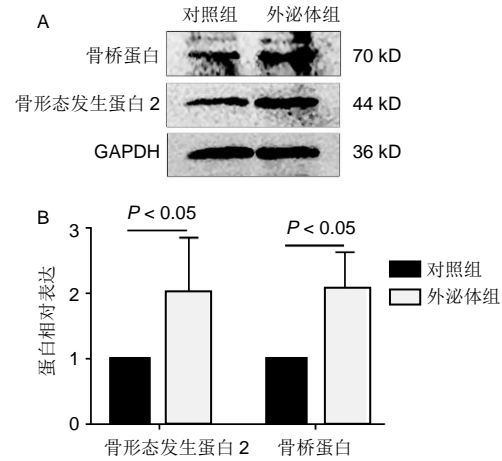


图 2 Western blot 检测外泌体标记性因子 CD81 及 CD40 的表达  
Figure 2 Expression levels of CD81 and CD40 protein in exosomes detected by western blot assay



图注：图中 A 为胎牛血清外泌体作用后骨形态发生蛋白 2 和骨桥蛋白的表达条带；B 为相应的统计分析结果

图 4 胎牛血清外泌体作用 24 h 后 MC3T3-E1 细胞中骨形态发生蛋白 2 和骨桥蛋白的表达水平

Figure 4 Expression levels of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin in MC3T3-E1 cells after 24 hours of culture with fetal bovine serum exosomes

[32] SU SA, XIE Y, FU Z, et al. Emerging role of exosome-mediated intercellular communication in vascular remodeling. *Oncotarget*. 2017;8(15):25700-25712.

[33] LU X. The Role of Exosomes and Exosome-derived microRNAs in Atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2017;23(40):6182-6193.

[34] MILANE L, SINGH A, MATTHEOLABAKIS G, et al. Exosome mediated communication within the tumor microenvironment. *J Control Release*. 2015;219:278-294.

[35] HELWA I, CAI J, DREWRY MD, et al. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLoS One*. 2017;12(1): e0170628.

[36] INDER KL, RUELCHE JE, PETELIN L, et al. Cavin-1/PTRF alters prostate cancer cell-derived extracellular vesicle content and internalization to attenuate extracellular vesicle-mediated osteoclastogenesis and osteoblast proliferation. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:23784.

[37] 田笑,金玉翠,马长艳. 前列腺癌细胞外泌体抑制成骨细胞分化[J]. 南京医科大学学报, 2019, 39(8): 1167-1171.

[38] KHUSHMAN M, BHARDWAJ A, PATEL GK, et al. Exosomal Markers (CD63 and CD9) Expression Pattern Using Immunohistochemistry in Resected Malignant and Nonmalignant Pancreatic Specimens. *Pancreas*. 2017;46(6):782-788.

[39] MUNAGALA R, AQIL F, JEYABALAN J, et al. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett*. 2016;371(1):48-61.

[40] BENINSON LA, FLESHNER M. Exosomes in fetal bovine serum dampen primary macrophage IL-1 $\beta$  response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Immunol Lett*. 2015;163(2):187-192.

[41] SHELKE GV, LÄSSER C, GHO YS, et al. Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:24783.