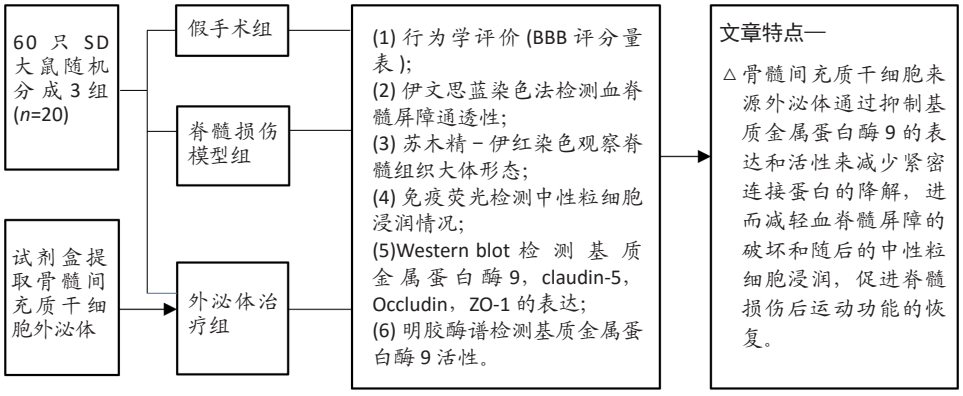
骨髓间充质干细胞来源外泌体改善脊髓损伤后血脊髓屏障的完整性

https://doi.org/10.12307/2022.134
投稿日期：2021-02-09
送审日期：2021-02-20
采用日期：2021-03-24
在线日期：2021-04-22
中图分类号：
R459.9；R338.2；R683.2
文章编号：
2095-4344(2022)07-00992-07
文献标识码：A

胡 伟，谢兴奇，屠冠军

文章快速阅读：



文题释义：

血脊髓屏障：在功能上等同于血脑屏障，由毛细血管内皮细胞、基底膜、周细胞和星形胶质细胞足突组成，主要作用是限制不同的物质从血液渗透入脊髓，是维持中枢神经系统稳态和生理环境的必要条件。

外泌体：是大多数细胞分泌的直径30−150 nm的纳米级囊泡，被脂质双层包裹，并携带蛋白质、RNA、DNA等多种生物分子。外泌体通过影响受体细胞的存活、增殖、迁移和基因表达来调节生理及病理进程。

摘要

背景：研究发现，干细胞衍生的外泌体可通过多种途径促进脊髓损伤后运动功能的恢复。

目的：研究骨髓间充质干细胞来源外泌体是否通过减轻血脊髓屏障的破坏来促进脊髓损伤后运动功能的恢复。

方法：60只SD大鼠随机分成假手术组、模型组和外泌体组(*n*=20)，采用改良Allen's法建立大鼠脊髓损伤模型，外泌体组在损伤后30 min，1 d分别经尾静脉注射200 μL骨髓间充质干细胞来源外泌体，在损伤后第3天，通过伊文思蓝染色观察血脊髓屏障通透性，Western blot检测基质金属蛋白酶9及紧密连接蛋白claudin-5，Occludin，ZO-1的表达，明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶9的活性，免疫荧光检测中性粒细胞浸润情况，苏木精−伊红染色观察脊髓损伤形态学变化；在损伤后第1，3，5，7，10，14，21天，采用BBB评分量表评价运动功能恢复情况。

结果与结论：①外泌体组大鼠的BBB评分在第10，14，21天显著高于模型组($P < 0.05$)，苏木精−伊红染色结果显示外泌体组相比于模型组损伤区明显缩小($P < 0.05$)；②外泌体治疗后血脊髓屏障染料渗出量显著减少($P < 0.05$)，紧密连接蛋白claudin-5、Occludin、ZO-1的表达相比于模型组显著增加($P < 0.05$)；③外泌体抑制基质金属蛋白酶9的表达和活性($P < 0.05$)；④损伤后第3天于病变部位观察到髓过氧化物酶阳性的中性粒细胞浸润，外泌体治疗能显著减少中性粒细胞的浸润($P < 0.05$)；⑤结果表明，骨髓间充质干细胞来源外泌体通过下调基质金属蛋白酶9的表达和活性来减少紧密连接蛋白的降解，从而减轻血脊髓屏障的破坏和随后的中性粒细胞浸润，进而促进脊髓损伤后运动功能的恢复。

关键词：干细胞；骨髓间充质干细胞；外泌体；脊髓损伤；血脊髓屏障；基质金属蛋白酶9；紧密连接蛋白；中性粒细胞

Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells improve the integrity of the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury

Hu Wei, Xie Xingqi, Tu Guanjun

Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Hu Wei, Master candidate, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Corresponding author: Tu Guanjun, MD, Professor, Chief physician, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Abstract

BACKGROUND: The studies reveal that stem cells-derived exosomes promote locomotor recovery after spinal cord injury.

OBJECTIVE: To investigate whether the bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes promote locomotor recovery via inhibiting the damage of the blood-spinal cord barrier.

中国医科大学附属第一医院骨科，辽宁省沈阳市 110001

第一作者：胡伟，男，1994 年生，江苏省徐州市人，汉族，中国医科大学在读硕士，主要从事干细胞治疗脊髓损伤的研究。

通讯作者：屠冠军，博士，教授，主任医师，中国医科大学附属第一医院骨科，辽宁省沈阳市 110001

https://orcid.org/0000-0003-2308-7228(胡伟)

基金资助：辽宁省自然科学基金指导计划项目 (201602857)，项目负责人：屠冠军

引用本文：胡伟，谢兴奇，屠冠军 . 骨髓间充质干细胞来源外泌体改善脊髓损伤后血脊髓屏障的完整性 [J]. 中国组织工程研究，2022，26(7):992-998.

METHODS: Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, and exosome group (*n*=20). The rat models of spinal cord injury were established by modified Allen's method. In the exosome group, 200 μL of bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes were injected through the tail vein at 30 minutes and 1 day after injury. On the third day after injury, the permeability of the blood-spinal cord barrier was observed. Western blot assay was used to detect the expression of matrix metalloproteinase-9 and claudin-5, Occludin and ZO-1. Gelatin zymography was used to detect the activity of matrix metalloproteinase-9. Immunofluorescence was used to detect the infiltration of neutrophils. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the morphological changes of spinal cord injury. At 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 21 days after injury, the Basso-Beattie-Bresnahan rating scale was used to evaluate the recovery of motor function.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The Basso-Beattie-Bresnahan scores of rats treated with exosome were significantly higher than these spinal cord injury rats at 10, 14, and 21 days after spinal cord injury ($P < 0.05$). The results of hematoxylin-eosin staining showed that the damage area in the exosome group was significantly reduced compared to the model group ($P < 0.05$). (2) Exosome treatment significantly reduced the amount of Evans Blue dye extravasation ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression levels of tight junction protein, including claudin-5, Occludin and ZO-1, were significantly increased in the exosome group ($P < 0.05$). (3) Exosome inhibited matrix metalloproteinase-9 expression and activity ($P < 0.05$). (4) Infiltrated myeloperoxidase-positive neutrophils were observed at the lesion site of injured spinal cord at 3 days after spinal cord injury. The exosome treatment significantly inhibited the infiltration of neutrophils ($P < 0.05$). (5) The results suggested that bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosome improved functional recovery after spinal cord injury in part by inhibiting blood-spinal cord barrier disruption and the subsequent infiltration of neutrophils through reducing the degradation of tight junction proteins by inhibiting the expression and activity of matrix metalloproteinase-9.

Key words: stem cell; bone marrow mesenchymal stem cell; exosome; spinal cord injury; blood-spinal cord barrier; matrix metalloprotease-9; tight junction protein; neutrophil

Funding: *the Guidance Program of the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 201602857 (to TGJ)*
How to cite this article: *HU W, XIE XQ, TU GJ. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells improve the integrity of the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2022;26(7):992-998.*

0 引言 Introduction

脊髓损伤是临床上常见的创伤性疾病，可导致暂时或永久性的感觉丧失和运动功能障碍。脊髓损伤的病理生理学进程十分复杂，包括直接暴力引起的原发性损伤以及随后的继发性损伤，导致微血管损伤、缺血、血脊髓屏障破坏、细胞凋亡及死亡[1-2]。血脊髓屏障由无窗孔的血管内皮细胞、基底膜、周细胞及星形胶质细胞足突组成[3]，细胞间高度发达的紧密连接蛋白和黏附连接蛋白可以阻止外周循环中的物质进入脊髓，为脊髓组织提供特殊的微环境[4]。血脊髓屏障在脊髓损伤后被破坏，使血细胞 (如中性粒细胞和巨噬细胞) 进入脊髓实质，并进一步产生炎症递质 (如促炎细胞因子和趋化因子)，加重脊髓损伤，诱导神经元和胶质细胞的凋亡和死亡，导致永久性神经功能缺损[5-7]。基质金属蛋白酶降解紧密连接蛋白在脊髓损伤急性期血脊髓屏障破坏中发挥关键作用，而血脊髓屏障破坏是导致继发性损伤的重要因素[8]。因此，通过抑制血脊髓屏障的破坏可能是减轻脊髓损伤、促进神经功能恢复的重要策略。

间充质干细胞移植在脊髓损伤中已经显示出极大的治疗效果[9]，但间充质干细胞静脉移植后不能到达病变部位，大部分在肺、肝脏和脾中积聚[10]，而且还存在免疫排斥、细胞去分化和恶性肿瘤形成等风险[11-12]。最近的研究表明，间充质干细胞通过分泌细胞因子发挥作用，而不是植入损伤部位[13]。外泌体作为间充质干细胞旁分泌机制的重要组成部分，是干细胞内部起源的直径 30–150 nm 的膜囊泡，包含功能性的 DNA、mRNA、miRNA 和蛋白质[14]，并通过转移这些物质至靶细胞而发挥功能，包括减轻或诱发免疫反应、减轻炎症、抑制细胞凋亡、促进伤口修复和血管生成[15]。外泌体与免疫反应、病毒致病性、妊娠、心血管疾病、中枢神经系统相关疾病和癌症进展有关，因其参与调节细胞内复杂的信号转导通路，外泌体在诸多疾病治疗中具有潜在的实用性，包括神经退行性疾病和癌症[16-18]。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs) 来源外泌体已经应用于心血管、肝脏及肾脏疾病的治疗，但在脊髓损伤中的应用还很少，而外泌体对血脊髓屏障紧密连接蛋白的影响目前还没有报道。该研究将骨髓间充质干细胞来源外泌体植入脊髓损伤大鼠体内，以研究其对血脊髓屏障的影响并探讨其潜在机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 构建脊髓损伤大鼠模型，移植外泌体；BBB 评分采用重复测量方差分析，其他指标采用单因素方差分析，多重比较采用 LSD 法。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 12 月至 2021 年 1 月在中国医科大学基础医学院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 骨髓间充质干细胞购买于广州赛业生物科技有限公司 (货号：RASMX-01001)，取自 SD 大鼠股骨骨髓。

1.3.2 实验动物 60 只 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 (体质量 200–220 g) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司，该研究得到中国医科大学伦理委员会的批准 (批准文号：2019152)，所有手术干预和术后护理均符合动物实验伦理委员会的实验指导原则。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞培养 骨髓间充质干细胞复苏后，用含体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青 – 链霉素的 DMEM/F12 完全培养基培养，并于 1 d 后更换新鲜完全培养基，在细胞达到 80%–90% 融合时，用 0.25% 胰酶消化，并按 1 ∶ 4 比例进行传代。

1.4.2 外泌体提取及鉴定 从生长良好的第 3–6 代骨髓间充质干细胞培养上清液中提取外泌体，首先使用超滤离心管 (15 mL/100 kD，Millipore) 将常规胎牛血清以 3 000×*g* 离心 55 min，获得去外泌体胎牛血清[19]。当骨髓间充质干细胞融合率达到 70% 左右时，更换含体积分数为 10% 去外泌体胎牛血清的 DMEM/F12 培养基，继续培养 36 h，收集细胞培养上清，按外泌体提取纯化试剂盒说明书提取外泌体：40 mL

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定	
细胞来源：	SD 大鼠骨髓
原代培养方法：	贴壁培养
基础培养基：	DMEM/F12 培养基
添加材料：	体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青－链霉素
原代培养时间：	原代细胞培养 24 h 后换液 1 次，培养 2 d 后可传代
细胞传代：	细胞融合率达 80% 时，用 0.25% 胰酶消化，按 1 ： 4 传代
细胞鉴定：	实验所用细胞购买于广州赛业生物科技有限公司，公司提供鉴定合格证明

细胞培养上清于 4 ℃以 3 000×*g* 离心 10 min，去除样品中的细胞碎片，取上清按 4 ： 1 比例加入外泌体提取试剂，充分混匀后 4 ℃静置 2 h，于 4 ℃以 10 000×*g* 离心 60 min，小心弃去上清，用 1×PBS 重悬沉淀，重悬液于 4 ℃以 12 000×*g* 离心 2 min，取上清转入外泌体纯化柱于 4 ℃以 3 000×*g* 离心 10 min，EPF 柱管底的液体即为纯化后的外泌体并保存于 −80℃低温冰箱。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测外泌体蛋白含量，通过透射电镜观察所获得的外泌体形态，Western blot 法检测外泌体特异表面标志物 CD63 和 Alix 的表达。

1.4.3 脊髓损伤模型建立及外泌体注射 实验开始前将大鼠于 20−24 ℃动物房中饲养 2 周以适应实验环境，60 只 SD 大鼠随机分成 3 组：假手术组、模型组、外泌体组，每组 20 只。采用改良 Allen's 法建立大鼠脊髓损伤模型 [20]，1% 戊巴比妥钠 (3 mL/kg) 腹腔注射麻醉大鼠，以 T_{10} 棘突为中心作正中切口，逐层分离肌肉及筋膜，切除 T_9–T_{10} 椎板，充分暴露 T_9–T_{10} 节段脊髓，使用脊髓打击器在 T_{10} 水平造成急性中度损伤 (10 g×50 mm)，术后生理盐水冲洗，逐层缝合切口，连续 3 d 给予抗生素治疗，每天手动排空膀胱两三次，直至自主排尿功能恢复。

假手术组大鼠只行 T_{10} 椎板切除术，无脊髓打击损伤。外泌体组在脊髓损伤后 30 min 经尾静脉注射 200 μL 外泌体 (200 mg/L)，随后以相同的方式在损伤后 1 d 注射 200 μL 外泌体 [21]。模型组在上述时间点以相同的方式注射 200 μL PBS。

1.4.4 运动功能评价 使用 BBB 运动评定量表进行运动评估 [22]。将大鼠置于平坦的、防滑的塑料板上，可自由移动，观察时间为 5 min，每只大鼠的 BBB 评分为 0 分 (无后肢自主运动) 至 21 分 (正常运动，步态协调)。在造模前及造模后 1，3，5，7，10，14，21 d，由 2 位熟练掌握 BBB 评分标准的研究人员在双盲条件下对大鼠进行测试评分 (*n*=6)。

1.4.5 伊文思蓝实验 每组取 4 只大鼠，使用伊文思蓝染料渗出法检测血脊髓屏障的完整性。在脊髓损伤后第 3 天，经尾静脉注射 2% 伊文思蓝溶液 (2 mL/kg)，体内循环 2 h 后，1% 戊巴比妥钠麻醉大鼠并用生理盐水灌注心脏，直至右心房流出清亮液体，取出损伤节段脊髓，在 50% 三氯乙酸溶液中匀浆，匀浆完成后以 10 000×*g* 离心 10 min，收集上清液并用分光光度计在激发波长 620 nm 和发射波长 680 nm 下检测每个样品的吸光度值。根据已知量染料绘制的标准曲线，将样品的吸光度转变为每克组织中所含染料的微克数。

1.4.6 组织准备 每组取 10 只大鼠，在脊髓损伤后第 3 天，用生理盐水经心脏灌注，直至肝脏变白，右心房流出清亮液体，然后用预冷的 40 g/L 多聚甲醛继续灌注 5−10 min，以损伤部位为中心取 10 mm 脊髓节段，于 4 ℃用 40 g/L 多聚甲醛固定 24 h，梯度脱水后包埋于石蜡中，制作成 4 μm 厚的横向切片，用于免疫荧光和苏木精－伊红染色。对于分子研究 (Western blot 和明胶酶谱)，生理盐水灌流大鼠后，分离的脊髓段在 −80 ℃下冷冻备用。

1.4.7 免疫荧光 石蜡切片脱蜡后，PBS 洗涤 3 次，微波修复抗原，在含 0.25% Triton X-100 的 PBS 溶液中透化 10 min，用 5% 牛血清白蛋白溶液封闭 30 min，加入兔抗大鼠髓过氧化物酶抗体 (1 ： 100，Proteintech) 于 4 ℃孵育过夜，PBS 洗涤 3 次，加入 FITC 标记的二抗室温孵育 1 h，PBS 充分洗涤，DAPI 标记细胞核，抗荧光淬灭剂封固，共聚焦显微镜拍照。

1.4.8 苏木精－伊红染色 使用苏木精－伊红染色法对脊髓组织进行形态学分析。石蜡切片脱蜡，双蒸水洗涤 3 次，苏木精染色 7 min，水洗 2 次，盐酸乙醇分化 3 s，流水冲洗 20 min，伊红染色 30 s，水洗 3 次，梯度乙醇脱水，中性树胶封固并用光学显微镜拍照。使用 ImageJ 进行损伤区域分析，结果用损伤面积与脊髓整个横断面面积之比即损伤百分比表示。

1.4.9 Western blot 实验 脊髓组织放入 RIPA 裂解液中，匀浆后冰上裂解 30 min，于 4 ℃，12 000×*g* 离心 10 min，取上清液，用 BCA 法测定样品总蛋白含量。蛋白样品 (30 μg) 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，并将蛋白转移至 PVDF 膜上，用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，然后加入 ZO-1、Occludin、claudin-5、基质金属蛋白酶 9 一抗于 4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h，通过化学发光法显示免疫反应条带。以 β-actin 作为内参，用 ImageJ 获得条带的灰度值，蛋白表达水平用目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值来表示。

1.4.10 明胶酶谱 采用明胶酶谱法检测脊髓组织中基质金属蛋白酶 9 的活性。取包含损伤区域的脊髓节段或假手术组相应的节段，在含有 10 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、20 mmol/L $CaCl_2$、1 mmol/L $ZnCl_2$、0.01%Triton X-100，pH 7.5 的裂解缓冲液中匀浆，离心后取上清液，BCA 法测定蛋白含量，与 5× 非变性蛋白上样缓冲液混匀，等蛋白量上样至含 0.1% 明胶的 SDS-PAGE 凝胶中，4 ℃ 100 V 电泳，在含有 2.5%Triton X-100 的溶液中洗脱变性，漂洗液漂洗 40 min，置于孵育液 (50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L $CaCl_2$、1 μmol/L $ZnCl_2$、0.02%Brij-35，pH 7.5)37 ℃孵育 48 h，用 0.5% 考马斯亮蓝染色 2 h，然后用脱色液 (40% 甲醇、10% 乙酸) 脱色至蓝色背景上出现透亮条带，用凝胶成像系统拍照分析。

1.5 主要观察指标 ①外泌体鉴定结果；②各组大鼠在相应

时间点的运动功能评价即 BBB 评分；③各组大鼠伊文思蓝染料渗出量；④各组大鼠脊髓组织中紧密连接蛋白 claudin-5、Occludin、ZO-1 的表达；⑤各组大鼠脊髓组织中基质金属蛋白酶 9 的表达及活性；⑥各组大鼠脊髓组织的形态学改变；⑦各组大鼠脊髓组织中性粒细胞浸润情况。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 26.0 软件进行分析，所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 来表示。BBB 评分采用重复测量方差分析，其他指标采用单因素方差分析，多重比较采用 LSD 法。$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞来源外泌体的鉴定结果 根据外泌体的大小、形状和特定的蛋白质对其进行鉴定，见**图 1**。透射电镜下外泌体结构完整，呈圆形囊泡，具有完整的脂质双层膜结构。Western blot 检测到提取颗粒中 CD63 和 Alix 蛋白的表达。结果表明，提取的外泌体符合广泛接受的标准特征。

2.2 外泌体减轻脊髓病理损伤并促进运动功能恢复 脊髓损伤第 3 天，苏木精－伊红染色显示模型组损伤部位组织破裂、脊髓少量残留、红细胞及炎性细胞浸润、神经元丢失，可见损伤中心正常结构完全被破坏并伴有囊性腔及空洞。外泌体显著促进脊髓组织的修复，减少神经细胞丢失，见**图 2A**。外泌体组和模型组的损伤百分比 (%) 分别为 38.17±3.96，22.02±1.86 ($P < 0.05$)，表明外泌体组表现出更好的完整性，见**图 2C**。脊髓纵切面苏木精－伊红染色结果表明，模型组脊髓明显损伤，并且损伤沿脊髓长轴向外扩散；外泌体治疗后损伤面积明显缩小，并抑制损伤的扩散，见**图 2B**。脊髓损伤后大鼠运动功能均受损，与模型组相比，外泌体组在损伤第 10 天后显著促进了运动功能恢复，术后第 10 天模型组与外泌体组的 BBB 评分分别为 5.16±0.61，8.33±0.51($P < 0.05$)，见**图 2D**。

2.3 外泌体减少紧密连接蛋白的降解并减轻脊髓损伤后血脊髓屏障的破坏 在治疗后的第 3 天，使用伊文思蓝染料来评估血脊髓屏障的通透性。与假手术组相比，脊髓损伤导致伊文思蓝染料外渗量增加，见**图 3A，B**，表明造模后血脊髓屏障被破坏。外泌体治疗可显著减少染料的渗出量，表明外泌体可减轻血脊髓屏障的破坏 [模型组：(58.59±6.05) μg/g，外泌体组：(37.06±2.12) μg/g，$P < 0.05$]。血管内皮细胞中的紧密连接与血脊髓屏障的完整性密切相关，通过 Western blot 检测脊髓节段中紧密连接相关蛋白 claudin-5、Occludin 和 ZO-1 的表达。如**图 3C，D** 所示，相比于假手术组，脊髓损伤后紧密连接相关蛋白表达明显下降，外泌体治疗后紧密连接蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$)。结果表明，外泌体通过减少紧密连接蛋白的降解来保持血脊髓屏障的完整性。

2.4 外泌体抑制基质金属蛋白酶 9 的表达和活性 Western blot 检测结果表明脊髓损伤后基质金属蛋白酶 9 的表达明显增加，而外泌体显著抑制了基质金属蛋白酶 9 的表达 (模型组：1.74±0.12，外泌体组：1.23±0.10，$P < 0.05$)。使用明胶酶谱法观察到脊髓损伤第 3 天基质金属蛋白酶 9 活性增加，外泌体显著抑制基质金属蛋白酶 9 活性的增加 (模型组：11.59±1.45，外泌体组：4.62±0.85，$P < 0.05$)，见**图 4**。结果表明，外泌体通过抑制基质金属蛋白酶 9 的表达和活性来减轻血脊髓屏障的破坏。

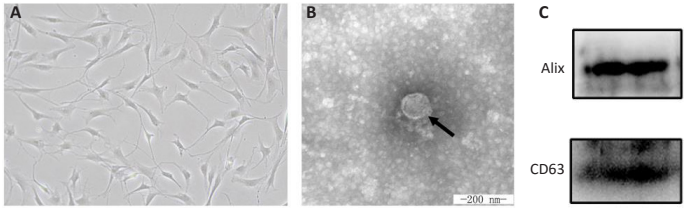
2.5 外泌体减少中性粒细胞浸润 如**图 5** 所示，脊髓损伤后第 3 天，在脊髓病变部位观察到髓过氧化物酶阳性中性粒细胞，与模型组相比，外泌体组大鼠脊髓组织中的中性粒细胞数量显著减少 ($P < 0.05$)，表明外泌体通过防止脊髓损伤后血脊髓屏障的破坏来抑制中性粒细胞浸润。

2.6 生物相容性 外泌体是细胞内部起源的纳米级膜囊泡，因其天然的生物合成过程而具有极高的生物相容性，并具有良好的稳定性和极低的免疫原性，且毒副作用低 [23-24]。该研究将提取到的骨髓间充质干细胞来源外泌体经尾静脉移植到脊髓损伤大鼠体内，均未出现皮肤溃疡、腹泻、体质量下降等表现，未见明显的移植物抗宿主反应，与其他研究报道一致。

3 讨论 Discussion

脊髓损伤影响着全球数以百万计的人，除了运动、感觉和自主神经功能丧失引起的直接结果外，还会留下肌肉萎缩、慢性疼痛和尿路感染等继发问题 [25]。正常的脊髓微环境对维持中枢神经系统神经元的正常功能至关重要，血脊髓屏障调节进入脊髓组织及血液与脊髓之间交换的分子，从而严格限制微环境的变化 [26]。血脊髓屏障在形态和功能上与血脑屏障相似，主要由无窗孔内皮细胞及其附属的特殊结构系统组成，内皮细胞通过紧密连接、缝隙连接和黏附连接，严格限制血脊髓屏障的渗透性，维持脊髓内环境的稳定 [27]。在临床以及动物模型中，脊髓损伤都会导致血管损伤和血脊髓屏障的分解，许多研究表明，血脊髓屏障的破坏在脊髓损伤后 5 min 内开始发生，持续长达 28 d，但在脊髓损伤后 56 d 仍能检测到血脊髓屏障的损害 [28]。除了损伤时对脊髓实质、血源性分子和血脊髓屏障的机械性破坏，继发的病理生理级联反应进一步促进脊髓实质和血脊髓屏障的损伤，并且将损伤向四周扩展到未受损的脊髓节段 [3]，基质金属蛋白酶、血红素加氧酶 1、肿瘤坏死因子 α、缓激肽、内皮素等均参与脊髓损伤后血脊髓屏障的破坏过程 [28-29]。

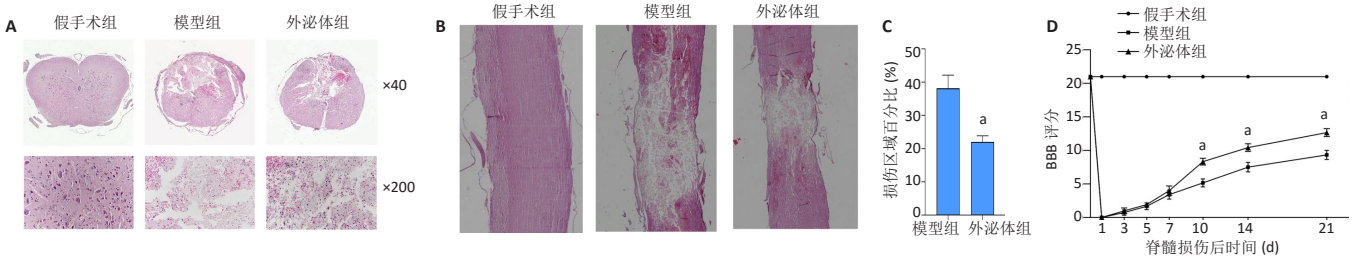
在脊髓损伤的治疗中，干细胞显示出良好的治疗潜力，骨髓间充质干细胞具有很高的生物安全性和免疫调节特性，成为刺激神经再生的重要种子细胞。研究表明，通过鞘内、髓内、静脉内或动脉内途径移植骨髓间充质干细胞均可促进脊髓损伤后神经功能的修复 [30-32]。骨髓间充质干细胞具有归巢的特性，但静脉移植后能到达损伤部位的数量很少，新的证据显示进入损伤部位的骨髓间充质干细胞并未分化成神经元或神经胶质细胞 [33]，而是通过旁分泌机制发挥作用。外泌体是骨髓间充质干细胞分泌的细胞外囊泡的重要组成部分之一，携带了一些重要的活性物质，如 miRNA、蛋白质等。



图注：图中 A 为第 3 代骨髓间充质干细胞，可见细胞形态均匀一致，呈长梭形 (×100)；B 为透射电镜观察外泌体大体形态，比例尺 =200 nm；C 为 Western blot 检测外泌体表面标志物 Alix、CD63 的表达

图 1 | 骨髓间充质干细胞来源外泌体的鉴定

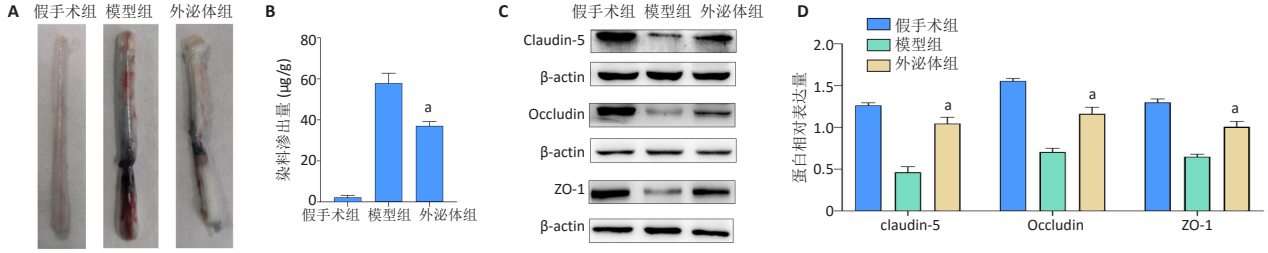
Figure 1 | Identification of the exosome derived from bone marrow mesenchymal stem cell



图注：图中 A 为建模 3 d 后苏木精－伊红染色观察各组脊髓横切面；B 为建模 3 d 后苏木精－伊红染色观察各组脊髓纵切面 (×40)；C 为损伤区域百分比，即损伤区面积与脊髓横断面积的比值，外泌体明显减小损伤面积；D 为各组大鼠在不同时间点的 BBB 评分。外泌体组与模型组相比，$^aP < 0.05$

图 2 | 脊髓损伤后形态学观察及运动功能评价

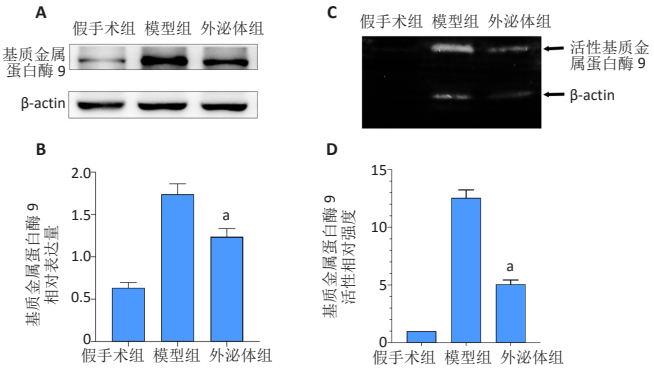
Figure 2 | Morphological observation of the injured spinal cord and locomotor functional assessment



图注：图中 A 为伊文思蓝染料在脊髓损伤 3 d 后渗出程度的大体形态；B 为通过分光光度计量化伊文思蓝染料的外渗，结果用渗出染料量 (μg) 与组织质量 (g) 比值表示；C，D 为在损伤后第 3 天 Western blot 检测紧密连接蛋白 claudin-5、Occludin、ZO-1 的表达。外泌体组与模型组相比，$^aP < 0.05$

图 3 | 外泌体减轻脊髓损伤后血脊髓屏障的破裂和紧密连接蛋白的降解

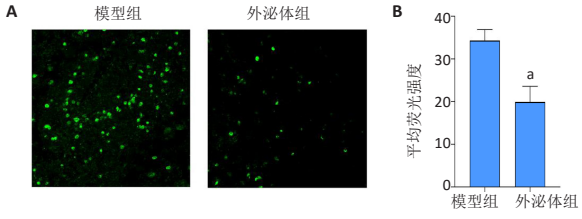
Figure 3 | Exosome alleviates blood-spinal cord barrier disruption and the degradation of tight junction protein after spinal cord injury



图注：图中 A，B 为 Western blot 检测基质金属蛋白酶 9 表达；C，D 为明胶酶谱检测基质金属蛋白酶 9 的活性。外泌体组与模型组相比，$^aP < 0.05$

图 4 | 外泌体抑制脊髓损伤后基质金属蛋白酶 9 的表达和激活

Figure 4 | Exosome inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and activation after spinal cord injury



图注：图中 A 为模型组和外泌体组髓过氧化物酶标记的中性粒细胞代表性图片 (×400)；B 为髓过氧化物酶阳性细胞免疫荧光的定量分析，外泌体组与模型组相比，$^aP < 0.05$

图 5 | 外泌体减少脊髓损伤后中性粒细胞的浸润

Figure 5 | Exosome attenuates neutrophil infiltration after spinal cord injury

外泌体具有脂质双层膜结构，这能保护其内容物不被降解和消化，并能够自由通过血脊髓屏障到达损伤部位[34]。骨髓间充质干细胞来源外泌体能够抑制神经元的凋亡、抗炎和抗瘢痕形成来促进脊髓损伤后功能的恢复[35-36]，还能够抑制小胶质细胞和星形胶质细胞活化[37-38]，同时可以促进损伤后的血管生成和神经发生[39]。LU 等[40]研究表明骨髓间充质干细胞来源外泌体能够下调 NF-κB p65 信号传导减少周细胞的迁移，增加周细胞覆盖率来降低血脊髓屏障的通透性。紧密连接在脊髓损伤后破裂导致血脊髓屏障渗透性增加，外泌体是否能够减少紧密连接蛋白的降解及其相关机制还没有报道，该研究补充了这一点，结果表明，外泌体可以通过减少紧密连接蛋白的降解来降低血脊髓屏障的通透性。

基质金属蛋白酶属于锌内肽酶家族，在细胞外基质的降解重塑、细胞表面蛋白水解、组织形态发生中发挥作用[41]。虽然基质金属蛋白酶在一些情况下是有益的，但基质金属蛋白酶过度的蛋白水解活性是有害的，可导致诸多病理状况，包括缺血性脑损伤和脊髓损伤后血脊髓屏障的破坏[42]。基质金属蛋白酶 9 上调后通过降解紧密连接相关蛋白来介导血脊髓屏障的破坏，从而促进免疫细胞的浸润并引起继发性损伤[43]。许多药物，如原儿茶酸[2]、生长素释放肽等[44]，通过抑制基质金属蛋白酶 9 诱导的紧密连接蛋白的降解来减轻血脊髓屏障的破坏。该研究结果表明骨髓间充质干细胞来源外泌体通过抑制基质金属蛋白酶 9 的表达和活性来减少紧密连接蛋白 claudin-5、Occludin 和 ZO-1 的降解，促进血脊髓屏障的修复。

血脊髓屏障的破坏和出血导致免疫细胞、趋化因子和多种有毒分子的浸润，进一步加重继发性损伤，包括神经元丢失、病变扩张、空洞形成和脱髓鞘[45-46]，浸润的中性粒细胞产生炎症因子，诱导损伤区细胞死亡。研究表明，用白三烯 B4 抑制脊髓损伤后中性粒细胞和巨噬细胞的浸润，从而减轻炎症反应，减少神经细胞凋亡，促进运动功能恢复[47]。因此，该研究表明外泌体的神经保护作用可能部分来自于减少血脊髓屏障破坏后中性粒细胞的浸润，而且该研究观察到外泌体治疗后脊髓损伤区域明显减小，神经元丢失减少。

综上所述，骨髓间充质干细胞来源外泌体的神经保护作用是通过抑制基质金属蛋白酶 9 的表达和活性，进而减少血脊髓屏障的破坏以及随后的免疫细胞浸润和炎症反应，从而减少继发性损伤。外泌体作为纳米级颗粒，具有低免疫原性且能够自由通过血脊髓屏障的优点，在中枢神经系统损伤治疗中具有巨大潜力。但外泌体在脊髓损伤治疗中的研究很少，对血脊髓屏障影响的研究更少，而外泌体治疗血脊髓屏障的具体机制尚不明确，还需要进一步的探讨。该研究发现在脊髓损伤早期经静脉注入骨髓间充质干细胞来源外泌体能够显著减轻血脊髓屏障破坏并促进大鼠运动功能的恢复，这表明外泌体有可能成为脊髓损伤的一种极有前途的治疗策略。

致谢：感谢中国医科大学附属第一医院骨科屠冠军教授提供的支持与帮助；感谢中国医科大学基础医学院组织胚胎学教研室提供的形态学技术支持。

作者贡献：实验设计由第一作者和通讯作者共同完成，实验实施由第一、二作者完成，论文写作由第一作者完成，论文修改由通讯作者负责。

经费支持：该文章接受了“辽宁省自然科学基金指导计划项目(201602857)”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：实验方案经中国医科大学动物实验伦理委员会批准，批准号为 2019152。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。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

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：文章统计分析由 SPSS 26.0 软件完成，并经过通讯作者审核。

4 参考文献 References

[1] YILMAZ T, KAPTANOĞLU E. Current and future medical therapeutic strategies for the functional repair of spinal cord injury. World J Orthop. 2015;6(1):42-55.

[2] PARK CS, LEE JY, CHOI HY, et al. Protocatechuic acid improves functional recovery after spinal cord injury by attenuating blood-spinal cord barrier disruption and hemorrhage in rats. Neurochem Int. 2019;124:181-192.

[3] BARTANUSZ V, JEZOVA D, ALAJAJIAN B, et al. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. Ann Neurol. 2011;70(2):194-206.

[4] FAN B, WEI Z, YAO X, et al. Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury. Cell Transplant. 2018;27(6):853-866.

[5] FIGLEY SA, KHOSRAVI R, LEGASTO JM, et al. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury. J Neurotrauma. 2014;31(6):541-552.

[6] ZLOKOVIC BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. Neuron. 2008;57(2):178-201.

[7] LEE JY, CHOI HY, YUNE TY. Fluoxetine and vitamin C synergistically inhibits blood-spinal cord barrier disruption and improves functional recovery after spinal cord injury. Neuropharmacology. 2016;109:78-87.

[8] MARTINS T, BAPTISTA S, GONÇALVES J, et al. Methamphetamine transiently increases the blood-brain barrier permeability in the hippocampus: role of tight junction proteins and matrix metalloproteinase-9. Brain Res. 2011;1411:28-40.

[9] GONG Z, XIA K, XU A, et al. Stem Cell Transplantation: A Promising Therapy for Spinal Cord Injury. Curr Stem Cell Res Ther. 2020;15(4):321-331.

[10] ROMANELLI P, BIELER L, SCHARLER C, et al. Extracellular Vesicles Can Deliver Anti-inflammatory and Anti-scarring Activities of Mesenchymal Stromal Cells After Spinal Cord Injury. Front Neurol. 2019;10:1225.

[11] JEONG JO, HAN JW, KIM JM, et al. Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. Circ Res. 2011;108(11):1340-1347.
[12] YUAN X, WU Q, WANG P, et al. Exosomes Derived From Pericytes Improve Microcirculation and Protect Blood-Spinal Cord Barrier After Spinal Cord Injury in Mice. Front Neurosci. 2019;13:319.
[13] KYURKCHIEV D, BOCHEV I, IVANOVA-TODOROVA E, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. World J Stem Cells. 2014;6(5):552-570.
[14] MAROTE A, TEIXEIRA FG, MENDES-PINHEIRO B, et al. MSCs-Derived Exosomes: Cell-Secreted Nanovesicles with Regenerative Potential. Front Pharmacol. 2016;7:231.
[15] WIKLANDER OPB, BRENNAN MÁ, LÖTVALL J, et al. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. Sci Transl Med. 2019;11(492):eaav8521.
[16] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science. 2020;367(6478):eaau6977.
[17] SHAO J, ZARO J, SHEN Y. Advances in Exosome-Based Drug Delivery and Tumor Targeting: From Tissue Distribution to Intracellular Fate. Int J Nanomedicine. 2020;15:9355-9371.
[18] GURUNATHAN S, KANG MH, JEYARAJ M, et al. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. Cells. 2019;8(4):307.
[19] KORNILOV R, PUHKA M, MANNERSTRÖM B, et al. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum. J Extracell Vesicles. 2018;7(1):1422674.
[20] RONG Y, LIU W, LV C, et al. Neural stem cell small extracellular vesicle-based delivery of 14-3-3t reduces apoptosis and neuroinflammation following traumatic spinal cord injury by enhancing autophagy by targeting Beclin-1. Aging (Albany NY). 2019;11(18):7723-7745.
[21] WANG L, PEI S, HAN L, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Reduce A1 Astrocytes via Downregulation of Phosphorylated NFκB P65 Subunit in Spinal Cord Injury. Cell Physiol Biochem. 2018;50(4): 1535-1559.
[22] BASSO DM, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J Neurotrauma. 1995;12(1):1-21.
[23] WU P, ZHANG B, OCANSEY DKW, et al. Extracellular vesicles: A bright star of nanomedicine. Biomaterials. 2021;269:120467.
[24] MENG W, HE C, HAO Y, et al. Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. Drug Deliv. 2020; 27(1):585-598.
[25] KJELL J, OLSON L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. Dis Model Mech. 2016;9(10):1125-1137.
[26] YU D, SUN R, SHEN D, et al. Nuclear heme oxygenase-1 improved the hypoxia-mediated dysfunction of blood-spinal cord barrier via the miR-181c-5p/SOX5 signaling pathway. Neuroreport. 2021;32(2):112-120.
[27] REINHOLD AK, RITTNER HL. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review. Pflugers Arch. 2017;469(1):123-134.
[28] KUMAR H, ROPPER AE, LEE SH, et al. Propitious Therapeutic Modulators to Prevent Blood-Spinal Cord Barrier Disruption in Spinal Cord Injury. Mol Neurobiol. 2017;54(5):3578-3590.
[29] KUMAR H, JO MJ, CHOI H, et al. Matrix Metalloproteinase-8 Inhibition Prevents Disruption of Blood-Spinal Cord Barrier and Attenuates Inflammation in Rat Model of Spinal Cord Injury. Mol Neurobiol. 2018; 55(3):2577-2590.
[30] SHENDE P, SUBEDI M. Pathophysiology, mechanisms and applications of mesenchymal stem cells for the treatment of spinal cord injury. Biomed Pharmacother. 2017;91:693-706.
[31] MUKHAMEDSHINA YO, GRACHEVA OA, MUKHUTDINOVA DM, et al. Mesenchymal stem cells and the neuronal microenvironment in the area of spinal cord injury. Neural Regen Res. 2019;14(2):227-237.
[32] HA XQ, YANG B, HOU HJ, et al. Protective effect of rhodioloside and bone marrow mesenchymal stem cells infected with HIF-1-expressing adenovirus on acute spinal cord injury. Neural Regen Res. 2020;15(4):690-696.
[33] ZHOU Z, CHEN Y, ZHANG H, et al. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. Cytotherapy. 2013;15(4):434-448.
[34] YANG Y, YE Y, SU X, et al. MSCs-Derived Exosomes and Neuroinflammation, Neurogenesis and Therapy of Traumatic Brain Injury. Front Cell Neurosci. 2017;11:55.
[35] XU G, AO R, ZHI Z, et al. miR-21 and miR-19b delivered by hMSC-derived EVs regulate the apoptosis and differentiation of neurons in patients with spinal cord injury. J Cell Physiol. 2019;234(7):10205-10217.
[36] HUANG JH, YIN XM, XU Y, et al. Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Attenuates Apoptosis, Inflammation, and Promotes Angiogenesis after Spinal Cord Injury in Rats. J Neurotrauma. 2017;34(24):3388-3396.
[37] JIANG D, GONG F, GE X, et al. Neuron-derived exosomes-transmitted miR-124-3p protect traumatically injured spinal cord by suppressing the activation of neurotoxic microglia and astrocytes. J Nanobiotechnology. 2020;18(1):105.
[38] RUPPERT KA, NGUYEN TT, PRABHAKARA KS, et al. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Modify Microglial Response and Improve Clinical Outcomes in Experimental Spinal Cord Injury. Sci Rep. 2018;8(1):480.
[39] HUANG JH, XU Y, YIN XM, et al. Exosomes Derived from miR-126-modified MSCs Promote Angiogenesis and Neurogenesis and Attenuate Apoptosis after Spinal Cord Injury in Rats. Neuroscience. 2020;424: 133-145.
[40] LU Y, ZHOU Y, ZHANG R, et al. Bone Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Recovery Following Spinal Cord Injury via Improvement of the Integrity of the Blood-Spinal Cord Barrier. Front Neurosci. 2019;13:209.
[41] STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.
[42] LEE JY, CHOI HY, PARK CS, et al. Mithramycin A Improves Functional Recovery by Inhibiting BSCB Disruption and Hemorrhage after Spinal Cord Injury. J Neurotrauma. 2018;35(3):508-520.
[43] NOBLE LJ, DONOVAN F, IGARASHI T, et al. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. J Neurosci. 2002;22(17):7526-7535.
[44] LEE JY, CHOI HY, NA WH, et al. Ghrelin inhibits BSCB disruption/hemorrhage by attenuating MMP-9 and SUR1/TrpM4 expression and activation after spinal cord injury. Biochim Biophys Acta. 2014;1842 (12 Pt A):2403-2412.
[45] BECK KD, NGUYEN HX, GALVAN MD, et al. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. Brain. 2010;133(Pt 2):433-447.
[46] YAO Y, XU J, YU T, et al. Flufenamic acid inhibits secondary hemorrhage and BSCB disruption after spinal cord injury. Theranostics. 2018;8(15): 4181-4198.
[47] SAIWAI H, OHKAWA Y, YAMADA H, et al. The LTB4-BLT1 axis mediates neutrophil infiltration and secondary injury in experimental spinal cord injury. Am J Pathol. 2010;176(5):2352-2366.

(责任编辑：MZH，ZN，JY)