

论著·基础研究

脐静脉内皮细胞外泌体对炎症因子刺激下前软骨细胞凋亡的影响

杨润泽*, 许文宁*, 郑火亮, 蒋盛旦

上海交通大学医学院附属新华医院脊柱中心, 上海 200092

[摘要] 目的·探讨脐静脉内皮细胞外泌体对炎症刺激下小鼠前软骨细胞 ATDC5 凋亡的影响。方法·采用试剂盒分离人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 外泌体, 采用 Western blotting 检测外泌体标志蛋白肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101, Tsg101)、白细胞分化抗原 9 (cluster differentiation 9, CD9)、凋亡相关基因 2 互作蛋白 X (apoptosis linked gene-2-interacting protein X, Alix) 的表达水平。透射电镜观察外泌体形态, 粒度检测鉴定外泌体大小。使用荧光显微镜观察外泌体被小鼠前软骨细胞 ATDC5 摄取过程和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成情况。TUNEL 染色和流式细胞术检测外泌体对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 刺激下的 ATDC5 细胞凋亡的影响。Western blotting 检测外泌体对于 ATDC5 细胞中凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、裂解的半胱天冬酶 3 (cleaved caspase-3, c-caspase-3) 和抗氧化应激相关蛋白核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf-2)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap-1)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶 1 (NADPH quinone oxidoreductase-like protein 1, NQO-1) 表达水平的影响。结果·透射电镜下观察到 HUVEC 来源的外泌体呈椭圆形, 中空, 双层膜, 并且阳性表达外泌体标志物 CD9、Alix、Tsg101。与 IL-1 β 刺激下的 ATDC5 细胞相比, 外泌体促进炎症因子作用下的 ATDC5 细胞内 ROS 的生成 ($P=0.000$) 和凋亡的发生 ($P=0.000$), Bax、c-caspase-3、Keap-1 表达升高, Bcl-2、Nrf-2、HO-1、NQO-1 表达降低。结论·HUVEC 来源的外泌体可能通过抑制 ATDC5 细胞抗氧化应激的能力, 促进 IL-1 β 刺激下 ATDC5 细胞凋亡的发生。

[关键词] 外泌体; 骨关节炎; 前软骨细胞; 脐静脉内皮细胞; 氧化应激; 凋亡

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.02.004 **[中图分类号]** R684.3 **[文献标志码]** A

Effects of exosomes derived from human umbilical vein endothelial cells on apoptosis of pre-chondrogenic cells stimulated by inflammatory factors

YANG Run-ze*, XU Wen-ning*, ZHENG Huo-liang, JIANG Sheng-dan

Department of Clinic of Spine Center, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of exosomes derived from umbilical vein endothelial cells (HUVECs) on apoptosis of murine pre-chondrogenic cell line ATDC5 cells under inflammatory stimulation. **Methods**·The exosomes derived from HUVECs were isolated by using an exosome isolation kit. Western blotting was used to detect the exosome marker proteins, including tumor susceptibility gene 101 (Tsg101), cluster differentiation 9 (CD9) and apoptosis linked gene-2-interacting protein X (Alix). The morphology of exosomes was observed by transmission electron microscope, and the size of exosomes was identified by particle size detection. Fluorescence microscope was used to observe the ATDC5 cell uptake of exosomes and the production of reactive oxygen species (ROS). TUNEL staining and flow cytometry were used to examine the effect of exosomes on ATDC5 cell apoptosis stimulated by interleukin-1 β (IL-1 β). Western blotting was used to detect the effect of exosomes on the expression levels of ATDC5 apoptosis-related proteins such as B-cell lymphoma/leukemia 2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), cleaved caspase-3 (c-caspase-3) and anti-oxidative stress-related proteins such as nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf-2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1), heme oxygenase 1 (HO-1) and NADPH quinone oxidoreductase-like protein 1 (NQO-1) under IL-1 β stimulation. **Results**·Under the transmission electron microscope, the HUVEC-derived exosomes were oval, hollow, double-layered, and positively expressed exosome markers CD9, Alix and Tsg101. Compared with the ATDC5 cells stimulated by IL-1 β , ATDC5 cells stimulated by IL-1 β incubated with exosomes had higher level of ROS ($P=0.000$) and higher apoptosis rate ($P=0.000$). The expression of Bax, c-caspase-3 and Keap-1 increased, and the expression of Bcl-2, Nrf-2, HO-1 and NQO-1 decreased in ATDC5 cells exposed to IL-1 β and exosomes compared to ATDC5 cells only exposed to IL-1 β . **Conclusion**·HUVEC-derived exosomes may promote ATDC5 cells apoptosis under the stimulation of IL-1 β by inhibiting the ability of ATDC5 cell to resist oxidative stress.

[Key words] exosome; osteoarthritis (OA); pre-chondrogenic cell; human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); oxidative stress; apoptosis

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81672206); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划 (20181809)。

[作者简介] 杨润泽 (1994—), 男, 硕士生; 电子信箱: Harry1994@sjtu.edu.cn。许文宁 (1991—), 男, 博士生; 电子信箱: xuwenningyu@163.com。*为共同第一作者。

[通信作者] 蒋盛旦, 电子信箱: jiangshengdan@xinhumed.com.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81672206); Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support (20181809)。

[Corresponding Author] JIANG Sheng-dan, E-mail: jiangshengdan@xinhumed.com.cn。



骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是全球较常见的关节疾病。据报道, 约 10% 的男性和 13% 的女性在 60 岁以上会发生膝关节 OA^[1]。由于人口老龄化和肥胖症的增多, OA 的发病率也不断增加^[2]。OA 患者常伴有关节软骨进行性破坏、关节积液、行动能力丧失等^[3]。软骨细胞是软骨中唯一的细胞类型, 在 OA 发病过程中会发生多种变化, 例如增殖和分泌能力的改变^[4]。软骨细胞的异常凋亡、炎症反应等与 OA 中软骨降解有关^[5-6]。因此, 探讨软骨细胞功能障碍的机制有助于 OA 的诊断和治疗。OA 常常伴随有不同程度炎症的发生, 在其炎症发展的过程中, 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 发挥着重要的作用, 可通过促进炎症介质前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 及一氧化氮 (nitric oxide, NO) 等的释放激活炎症反应^[7]。外泌体作为细胞内吞过程中主动分泌的直径为 50~100 nm 的囊泡, 具有脂质双层膜结构, 可以从不同的细胞类型中释放, 并已被证明在细胞通信中起到重要作用。外泌体可以在血液及关节滑液中稳定存在^[8]。越来越多的证据^[9]表明, 外泌体参与 OA、类风湿关节炎等关节疾病的发展。外泌体分泌或摄取失调可以导致急性慢性炎症, 继而引起软骨变性和关节破坏^[10]。血管内皮细胞在人体内广泛分布, 其分泌的外泌体对多种疾病的发生发展有重要作用, 例如骨质疏松、糖尿病等^[11-12], 但血管内皮细胞分泌的外泌体在 OA 中的作用未有详细报道。本研究利用 IL-1 β 刺激前软骨细胞建立 OA 体外模型, 探究血管内皮细胞分泌的外泌体对于 OA 的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 高糖细胞培养液购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, IL-1 β 购自上海达科为生物技术公司, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒购自上海翊圣生物科技公司, RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 显影试剂、4% 多聚甲醛固定液、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、C1090 一步法末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TdT mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒、羊抗兔二抗和羊抗鼠二抗购自上海碧云天生物技术公司, 白细胞分化抗原 9 (cluster differentiation 9, CD9; 20597-1-AP)、凋亡相关基因 2 互作蛋白 X (apoptosis linked gene-2-interacting protein X, Alix; 12422-1-AP)、肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene 101,

Tsg101; 14497-1-AP)、裂解的半胱天冬酶 3 (cleaved caspase-3, c-caspase-3; 19677-1-AP)、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2; 12789-1-AP)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax; 50599-2-Ig)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap-1; 10503-2-AP)、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf-2; 16396-1-AP)、 β -actin (66009-1-Ig) 抗体购自中国 Proteintech 公司, 血红素加氧酶 1 (heme oxygenase 1, HO-1; sc-390991)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸醌氧化还原酶 1 (NADPH quinone oxidoreductase-like protein 1, NQO-1; sc-32793) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 总外泌体分离试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养

人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、小鼠前软骨细胞株 ATDC5 购自 ATCC 公司。细胞培养于完全培养基 (DMEM 高糖培养液, 含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素) 中, 在 37 °C、5% CO₂ 环境下常规培养, 培养 2~3 d 根据细胞生长情况换液。其中 HUVEC 常规培养至细胞密度达 80% 以上时更换为无血清 DMEM 高糖培养基, 继续培养 48 h 后收集细胞培养液。

1.3 外泌体的分离与鉴定

1.3.1 外泌体分离方法 收集 2×10^7 个 HUVEC 的培养液, 按照试剂盒说明书分离外泌体。4 °C、500 \times g 离心 5 min 后收集上清液, 4 °C、2 000 \times g 离心 1 h 后, 丢弃沉淀, 吸取上清液后, 与一半体积的试剂盒中的外泌体提取液混匀后, 4 °C 过夜。第 2 日, 4 °C、10 000 \times g 离心 1 h 后, 去除上清液, 用 1 mL 无菌磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 重悬沉淀, 再次 4 °C、10 000 \times g 离心 70 min 后, 弃上清液, 用 200 μ L PBS 溶解沉淀即可获得外泌体。

1.3.2 透射电镜观察外泌体形态 取新鲜提取的外泌体悬液 10 μ L, 滴加到铜网上, 室温过夜干燥后, 使用乙酸双氧铀复染。随后透射电镜 (美国 DeLong 公司) 上机成像观察并拍照保存。

1.3.3 纳米颗粒跟踪分析 取 100 μ L 外泌体悬液, 用 1 \times PBS 稀释 10 倍后, 置于比色皿中后放入粒度仪 (新西兰 Izon Science 公司) 中检测外泌体粒径分布。

1.3.4 Western blotting 检测外泌体标志物 向 200 μ L 外泌体悬液中加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上

裂解30 min后,4℃、12 000×g离心10 min,取上清液。BCA法测定蛋白浓度后。取适量5×十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液,100℃煮10 min后,冷却到室温。按照每孔20 μg蛋白样品上样,设置80 V电压电泳约30 min,调整电压到120 V,待溴酚蓝进入到凝胶底部终止电泳。选用PVDF膜,湿转70 min,使用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,一抗CD9(1:1 000)、Alix(1:1 000)、Tsg101(1:1 000)4℃孵育过夜。二抗(1:2 000)室温孵育1 h,ECL反应后,曝光显影并保存图像。

1.4 外泌体摄取实验

使用稀释后的PKH26荧光染料(美国Sigma公司),在避光条件下对20 μL外泌体的磷脂双分子膜染色5 min后,加入等体积10%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)终止染色后重悬外泌体沉淀。将染色后的外泌体加入到ATDC5培养液中分别培养3 h和6 h。待共培养结束后,去除细胞培养上清液后,PBS清洗;加入4%多聚甲醛避光固定后,DAPI染细胞核,再次PBS清洗;加入抗荧光淬灭剂,荧光显微镜(德国Leica公司)观察拍照。

1.5 细胞分组及处理方法

将ATDC5细胞分为空白对照(NC)组、IL-1β组、IL-1β+50 μg外泌体组、IL-1β+100 μg外泌体组。除了NC组外,每组均加入10 ng/mL IL-1β,模拟OA体外模型;其中IL-1β+50 μg外泌体组和IL-1β+100 μg外泌体组,再分别加入50 μg及100 μg外泌体,作用24 h。

1.6 细胞内ROS水平检测

将ATDC5细胞培养于6孔板上,待细胞密度为60%~70%时,分别加入500 μL PBS、10 ng/mL IL-1β、10 ng/mL IL-1β+50 μg外泌体、10 ng/mL IL-1β+100 μg外泌体,作用24 h后,弃细胞培养液,PBS洗涤,加入2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate,DCFH-DA)荧光探针避光染色30 min,PBS洗涤后荧光显微镜检测橙色荧光。

1.7 细胞凋亡检测

1.7.1 TUNEL 检测 ATDC5 细胞凋亡 使用一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。ATDC5细胞按上述细胞处理方法处理完毕后,去除培养液,PBS洗涤1次,4%多聚甲醛固定细胞30 min,PBS洗涤1次后加

入免疫染色强力通透液室温孵育5 min。PBS洗涤2次,再加入配置好的TUNEL检测液37℃避光孵育60 min,孵育结束后PBS洗涤3次,并使用DAPI复染细胞核,荧光显微镜观察结果。

1.7.2 流式细胞术检测 ATDC5 细胞凋亡 ATDC5细胞按密度为 6×10^5 个/mL接种于6孔板,除空白对照(不进行处理)和Annexin V-FITC或碘化丙啶(propidium iodide,PI)单染外,细胞分为3组:正常对照组(Annexin V-FITC和PI双染)、10 ng/mL IL-1β组、10 ng/mL IL-1β+100 μg外泌体组。孵育24 h后,PBS洗涤2次,0.25%胰酶消化,终止消化后,300×g离心5 min,收集细胞;用预冷的PBS重悬后再次离心弃上清液,加入200 μL结合缓冲液悬浮细胞,加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI混匀,室温避光孵育15 min后,流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)检测细胞早期和晚期凋亡情况。

1.8 Western blotting 测定细胞中凋亡蛋白和抗氧化应激相关蛋白表达

按上述细胞处理方法分组干预24 h后收集细胞,PBS洗涤2次,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解30 min后,用细胞刮刀刮下裂解后的细胞,离心,提取细胞总蛋白,取10 μL蛋白样品,利用BCA法测蛋白浓度后,蛋白样品(20 μg总蛋白)于12% SDS-PAGE凝胶上分离蛋白组分。一抗HO-1(1:1 000)、NQO-1(1:1 000)、Nrf-2(1:1 000)、Keap-1(1:1 000)、c-caspase-3(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:1 000),4℃孵育过夜,次日TBST缓冲液漂洗后二抗(1:2 000)室温孵育1 h,ECL反应曝光显影后保存结果进行分析。

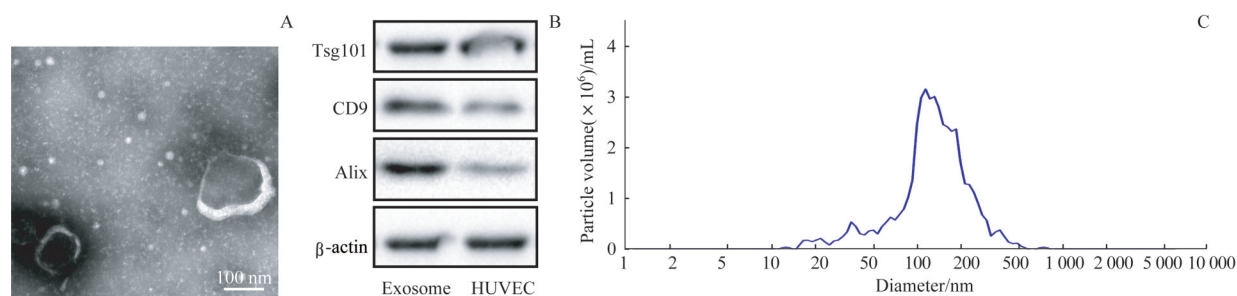
1.9 统计学分析

采用SPSS 20.0软件对数据进行处理。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVEC 来源外泌体的结构特征

透射电镜下可以观察到HUVEC分泌的外泌体呈现脂质双层膜包绕形成的典型茶托状形态特征(图1A)。利用Western blotting可检测到其蛋白标志物CD9、Alix和Tsg101的表达(图1B)。粒度分析检测表明,HUVEC来源的外泌体粒径主要分布在100~200 nm(图1C)。



Note: A. HUVEC-derived exosomes were observed by transmission electron microscopy. B. The expression of the exosome markers TSG101, CD9 and Alix was confirmed by Western blotting. C. The size distribution of HUVEC-derived exosomes.

图1 HUVEC来源外泌体的鉴定

Fig 1 Identification of HUVEC-derived exosomes

2.2 ATDC5细胞对HUVEC来源外泌体的摄取

荧光显微镜观察结果显示, 被PKH26荧光染料标记的

外泌体与ATDC5细胞共培养6 h后, 外泌体可被ATDC5细胞成功摄取至细胞质中, 并在细胞核周围聚集 (图2)。

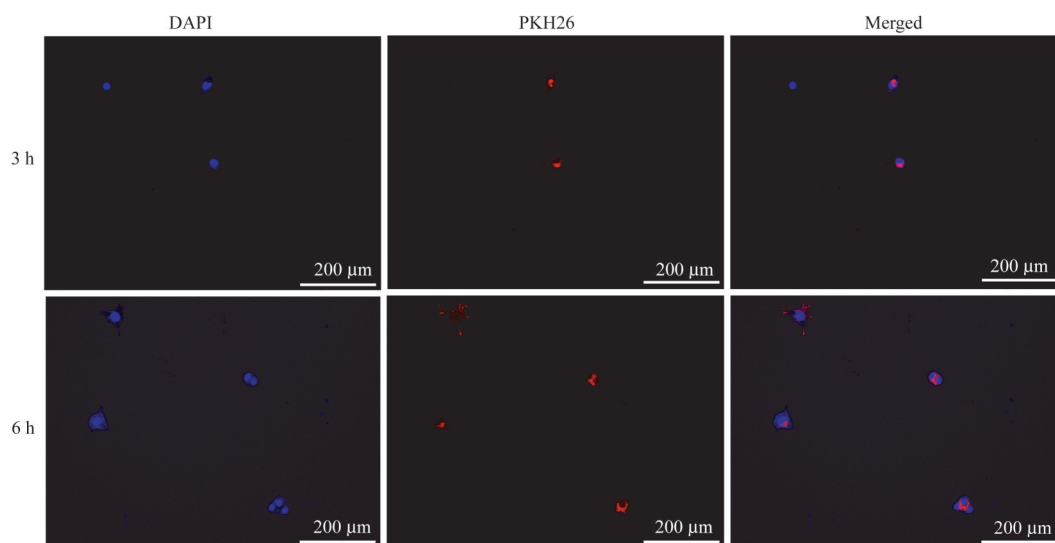


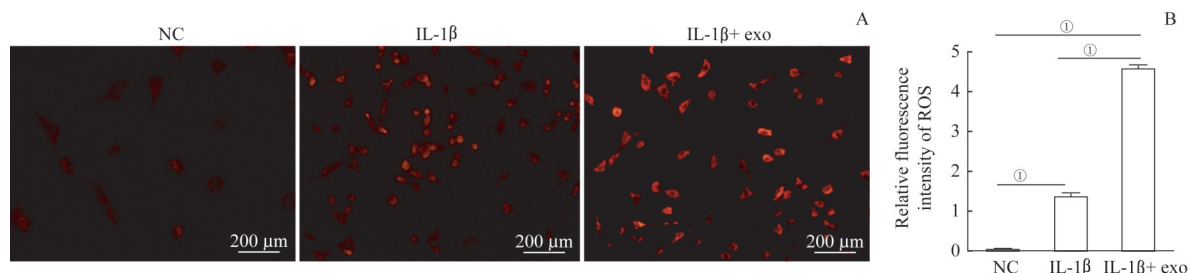
图2 荧光染料PKH26标记的外泌体与ATDC5细胞共培养3 h和6 h后的摄取情况

Fig 2 Uptaking of PKH26-labeled exosomes co-cultured with ATDC5 cells for 3 h and 6 h

2.3 HUVEC来源外泌体对于IL-1 β 刺激下的ATDC5细胞ROS生成的影响

与NC组相比, 10 ng/mL IL-1 β 作用ATDC5细胞24 h

后, 细胞内的ROS橙色荧光增强; 同时加入50 μ g外泌体和10 ng/mL IL-1 β 刺激24 h后, 与单纯IL-1 β 刺激相比, ATDC5细胞内ROS橙色荧光强度进一步增加 (图3)。



Note: A. Detection of ROS production by DCFH-DA assay. B. Quantitative analysis of the fluorescence intensity of ATDC5 cells under different treatment conditions. exo—exosomes. ^① $P=0.000$.

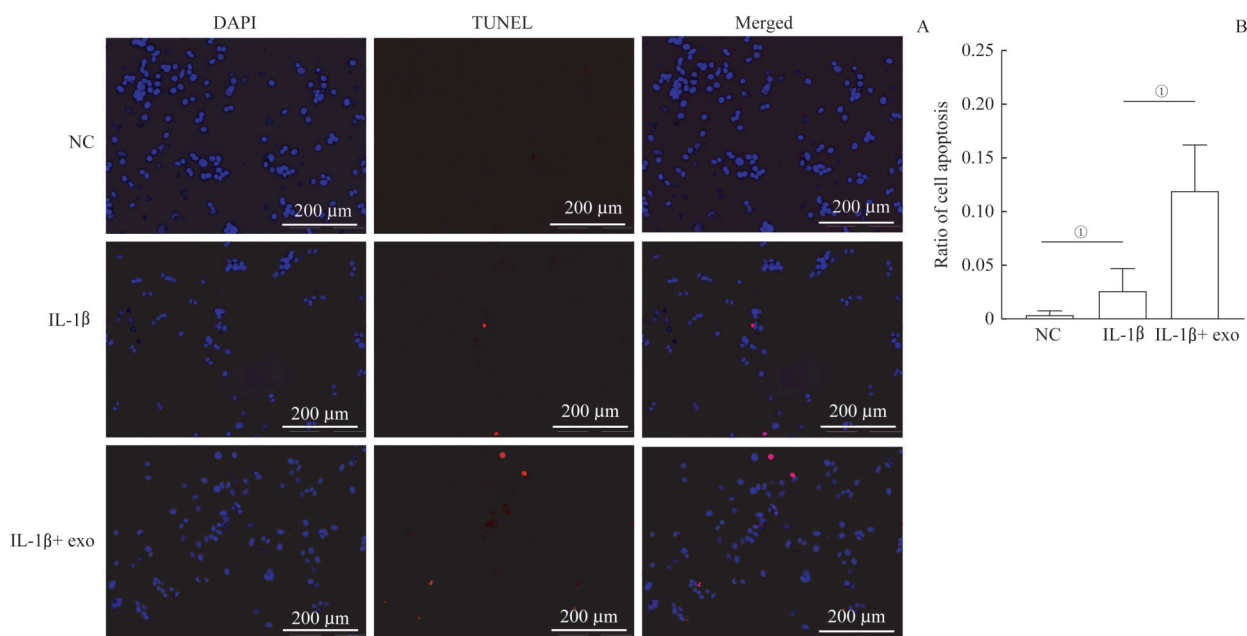
图3 ATDC5细胞内ROS检测

Fig 3 Detection of ROS in ATDC5 cells

2.4 HUVEC 来源外泌体对于 IL-1 β 刺激下 ATDC5 细胞凋亡的影响

利用 TUNEL 染色和流式细胞术检测 ATDC5 细胞凋亡, TUNEL 染色结果显示: 与 NC 组相比, 10 ng/mL IL-1 β 刺激 24 h 组细胞凋亡率升高, 同时加入 50 μ g 外泌体

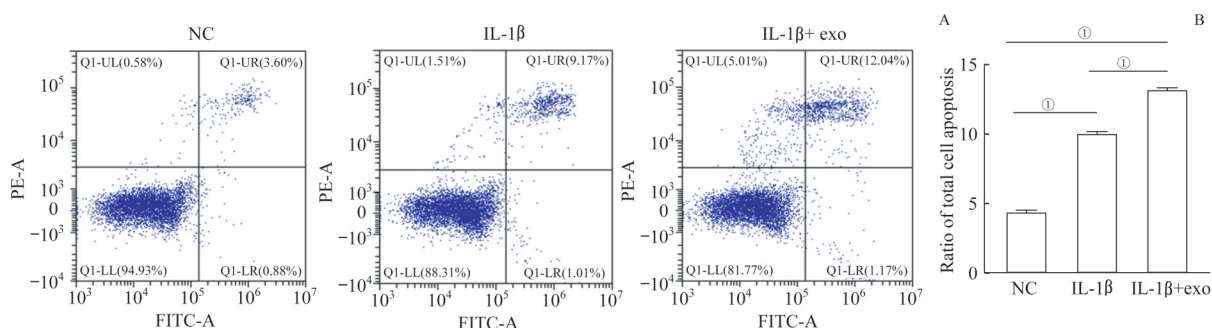
后, ATDC5 细胞凋亡率进一步升高 (图 4A、B)。流式细胞术检测结果也显示: 与 NC 组相比, 10 ng/mL IL-1 β 刺激 24 h 组 ATDC5 细胞总凋亡率升高, 同时加入 50 μ g 外泌体后, ATDC5 细胞总凋亡率进一步升高 (图 5A、B)



Note: A. TUNEL staining of ATDC5 cells. B. Comparison of cell apoptosis rate among NC group, IL-1 β group and IL-1 β +exo group. exo—exosomes. ^① $P=0.000$.

图4 TUNEL法检测ATDC5细胞凋亡

Fig 4 Detection of apoptosis of ATDC5 cells by TUNEL assay



Note: A. Analysis of cell apoptosis by Annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry analysis. B. Quantitative analysis of total cell apoptosis rate in NC group, IL-1 β group and IL-1 β +exo group. exo—exosomes. ^① $P=0.000$.

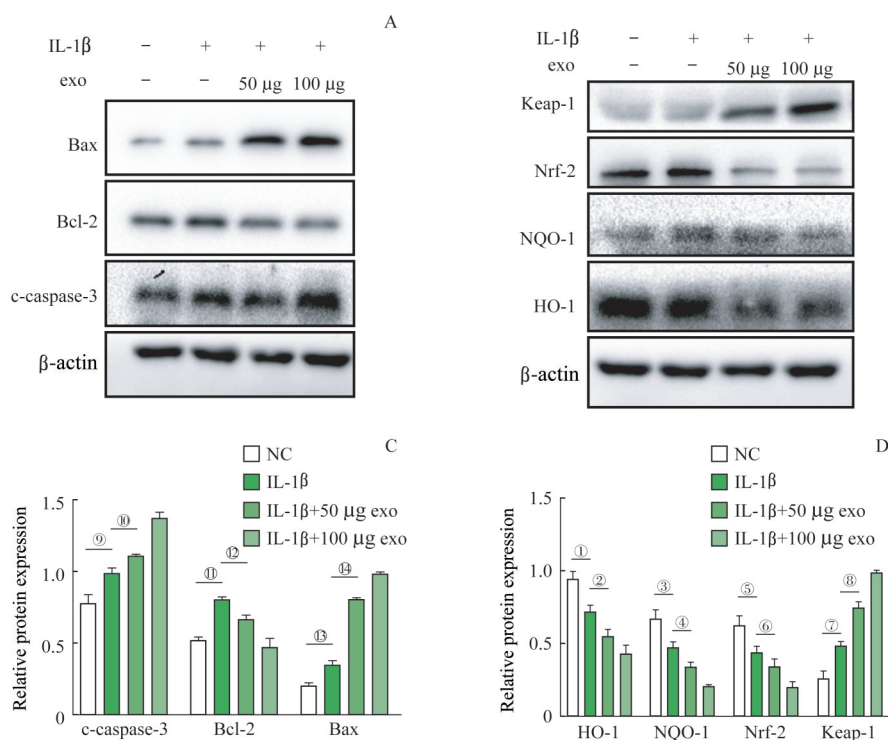
图5 流式细胞术检测ATDC5细胞凋亡

Fig 5 Detection of apoptosis of ATDC5 cells by flow cytometry

2.5 HUVEC 来源外泌体对 IL-1 β 刺激下 ATDC5 细胞凋亡和抗氧化应激相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示, 炎症因子 IL-1 β 处理 ATDC5 细胞 24 h 的 IL-1 β 组, 凋亡相关蛋白 Bax、c-caspase-3 表达量较 NC 组明显上升, Bcl-2 表达量较 NC

组下降; 而与 IL-1 β 组相比, IL-1 β +50 μ g 外泌体组和 IL-1 β +100 μ g 外泌体组的 Bax、c-caspase-3 表达量进一步上升, Bcl-2 的表达量逐渐下降 (图 6A)。按上述分组, 抗氧化应激相关蛋白 Nrf-2、HO-1、NQO-1 的表达量逐渐下降, Keap-1 表达量逐渐升高 (图 6B)。



Note: A. The expression of Bax, Bcl-2 and c-caspase-3 verified by Western blotting. B. The expression of Keap-1, Nrf-2, NQO-1 and HO-1 verified by Western blotting. C. Quantitative analysis of apoptosis-related protein expression changes in response to IL-1 β stimulation and after incubation of ATDC5 cells with exosomes. D. Quantitative analysis of anti-oxidative stress-related protein expression changes in response to IL-1 β stimulation and after incubation of ATDC5 cells with exosomes. ① $P=0.009$, ② $P=0.043$, ③ $P=0.005$, ④ $P=0.037$, ⑤ $P=0.003$, ⑥ $P=0.038$, ⑦ $P=0.002$, ⑧ $P=0.001$, ⑨ $P=0.009$, ⑩ $P=0.039$, ⑪ $P=0.001$, ⑫ $P=0.033$, ⑬ $P=0.017$, ⑭ $P=0.000$.

图6 Western blotting检测ATDC5细胞中凋亡及抗氧化应激相关蛋白的表达

Fig 6 Detection of the expression of apoptosis- and anti-oxidative stress-related proteins in ATDC5 cells by Western blotting

3 讨论

OA常见于中老年人群,疾病进展到后期可对患者的生活质量和身心健康产生较大影响。软骨细胞主要存在于软骨基质中,被认为是参与OA发生和发展的主要组分,其损伤和凋亡均会直接影响OA的进程^[13]。炎症因子IL-1 β 已被证实参与OA发病中软骨细胞的损伤变性^[14],故本研究使用IL-1 β 建立OA体外模型。

作为近年来研究热点之一的外泌体,起初被认为是细胞代谢的废弃物。后来研究^[15]发现,其内容物多种多样,对细胞间信号转导起重要作用。研究^[16]表明,多种细胞来源的外泌体对于骨缺损的修复有促进作用。作为体内分布广泛的血管内皮细胞,其分泌的外泌体对于OA是否有影响未见报道。

本研究拟探讨HUVEC分泌的外泌体对于OA是否有影响。使用试剂盒分离并鉴定外泌体后,通过荧光显微镜观察发现同时加入HUVEC来源的外泌体组比单独使用IL-1 β 作用24 h后的实验组,产生更多的ROS。既往研究^[17]表明,由过多自由基(如ROS)引发的氧化应激是软骨降解和导致OA的主要原因,且氧化应激增多会导致细胞凋亡增多^[18]。通过流式细胞术和TUNEL染色观察

发现NC组、IL-1 β 组、IL-1 β +50 μ g外泌体组的ATDC5细胞凋亡率逐渐升高,说明HUVEC来源外泌体对于IL-1 β 刺激的ATDC5细胞的凋亡有促进作用。据文献^[19]报道,细胞的一些氧化应激反应依赖于Keap-1/Nrf-2/HO-1信号通路;通常情况下Keap-1与Nrf-2在细胞质中结合,这时处于未激活状态,若其一直未被激活,Nrf-2会被泛素化进而被降解。在炎症、饥饿等条件刺激下,Keap-1与Nrf-2的结合变得不稳定,Nrf-2被释放出来,转移至细胞核,激活下游的过氧化物酶,从而起到抗氧化应激的作用^[20]。根据既往研究^[21-22],一些物质例如微RNA、糖蛋白等可以通过影响Keap-1/Nrf-2/HO-1通路以减轻氧化应激。因此,我们猜想HUVEC来源的外泌体可以通过影响Keap-1/Nrf-2/HO-1通路,以加重氧化应激从而导致ATDC5细胞凋亡。Western blotting、ROS含量检测及细胞凋亡检测结果发现:HUVEC来源的外泌体使得ROS含量进一步增加,加重IL-1 β 刺激ATDC5细胞引起的细胞凋亡,同时Keap-1表达升高,Nrf-2、HO-1、NQO-1表达下降,即细胞抗氧化应激能力下降。但HUVEC来源外泌体对ATDC5细胞的凋亡和抗氧化应激通路产生影响的机制,有待于更深入的研究。

综上所述, HUVEC来源的外泌体可能通过影响

Keap-1/Nrf-2/HO-1 抗氧化应激信号通路从而增加 IL-1 β 刺激下 ATDC5 细胞内的 ROS 产生, 使得 ATDC5 细胞凋亡增加。HUVEC 来源的外泌体对于 OA 不能起到治疗性作用, 且会加重软骨损伤程度, 这为 OA 的诊治提供了新的

思路。因此抑制 HUVEC 来源外泌体的作用可能对 OA 起到治疗性作用, 而若要抑制某种外泌体的作用, 需要进一步揭示其中发挥作用的具体分子, 并针对具体分子进行靶向抑制, 这为我们下一步的研究指明了方向。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Xia BJ, Chen D, Zhang JS, et al. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms[J]. *Calcif Tissue Int*, 2014, 95(6): 495-505.
- [2] Felson DT. Osteoarthritis: new insights. part 1: the disease and its risk factors[J]. *Ann Intern Med*, 2000, 133(8): 635.
- [3] Pereira D, Ramos E, Branco J. Osteoarthritis[J]. *Acta Med Port*, 2014, 28(1): 99.
- [4] Charlier E, Derooyer C, Ciregia F, et al. Chondrocyte dedifferentiation and osteoarthritis (OA)[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 165: 49-65.
- [5] Pap T, Korb-Pap A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: two unequal siblings[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(10): 606-615.
- [6] Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. The extracellular matrix as a multitasking player in disease[J]. *FEBS J*, 2019, 286(15): 2830-2869.
- [7] Liu HC, Liu YL, Chen B. Antagonism of GPR4 with NE 52-QQ57 and the suppression of AGE-induced degradation of type II collagen in human chondrocytes[J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(7): 1915-1921.
- [8] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, et al. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential[J]. *Expert Rev Proteom*, 2009, 6(3): 267-283.
- [9] Tran TH, Mattheolabakis G, Aldawsari H, et al. Exosomes as nanocarriers for immunotherapy of cancer and inflammatory diseases[J]. *Clin Immunol*, 2015, 160(1): 46-58.
- [10] Barile L, Vassalli G. Exosomes: therapy delivery tools and biomarkers of diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 63-78.
- [11] Song H, Li X, Zhao Z, et al. Reversal of osteoporotic activity by endothelial cell-secreted bone targeting and biocompatible exosomes[J]. *Nano Lett*, 2019, 19(5): 3040-3048.
- [12] Sáez T, de Vos P, Kuipers J, et al. Exosomes derived from monocytes and from endothelial cells mediate monocyte and endothelial cell activation under high d-glucose conditions[J]. *Immunobiology*, 2019, 224(2): 325-333.
- [13] Davies LC, Heldring N, Kadri N, et al. Mesenchymal stromal cell secretion of programmed death-1 ligands regulates T cell mediated immunosuppression[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(3): 766-776.
- [14] Jun Z, Xinmeng J, Yue L, et al. Jumonji domain containing-3 (JMJD3) inhibition attenuates IL-1 β -induced chondrocytes damage *in vitro* and protects osteoarthritis cartilage *in vivo*[J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(7): 657-666.
- [15] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581-593.
- [16] Ying C, Wang R, Wang Z, et al. BMSC-exosomes carry mutant HIF-1 α for improving angiogenesis and osteogenesis in critical-sized calvarial defects[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 565561.
- [17] Liang RM, Zhao JM, Li B, et al. Implantable and degradable antioxidant poly(ϵ -caprolactone)-lignin nanofiber membrane for effective osteoarthritis treatment[J]. *Biomaterials*, 2020, 230: 119601.
- [18] Kong N, Ji XY, Wang JQ, et al. ROS-mediated selective killing effect of black phosphorus: mechanistic understanding and its guidance for safe biomedical applications[J]. *Nano Lett*, 2020, 20(5): 3943-3955.
- [19] Osama A, Zhang J, Yao J, et al. Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 64: 101206.
- [20] Bollong MJ, Lee G, Coukos JS, et al. A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1-NRF2 signalling[J]. *Nature*, 2018, 562(7728): 600-604.
- [21] Hou RL, Liu X, Yan JJ, et al. Characterization of natural melanin from *Auricularia auricula* and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice[J]. *Food Funct*, 2019, 10(2): 1017-1027.
- [22] Wang P, Gao YM, Sun X, et al. Hepatoprotective effect of 2'-O-galloylhyperin against oxidative stress-induced liver damage through induction of Nrf2/ARE-mediated antioxidant pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 102: 129-142.

[收稿日期] 2020-05-28

[本文编辑] 崔黎明