

间充质干细胞外泌体对 MPTP 诱导急性帕金森小鼠模型的治疗作用

柴源, 王宏康, 赵瑞婧, 苗宇

【摘要】 目的:本文探讨间充质干细胞外泌体(MSCs-Exo)对小鼠帕金森疾病(PD)模型的治疗作用,为帕金森的治疗以及 MSC-Exo 的应用提供实验依据。**方法:**超速离心法提取 MSC-Exo。将 45 只 C57BL/6 小鼠分为 3 组,分别为 Sham 组、PD 组和 PD+MSC-Exo 组,每组 15 只,Sham 组在造模时给予生理盐水,PD 组腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)诱导小鼠急性 PD 模型,PD+MSC-Exo 组在 PD 造模后尾静脉注射给予 MSC-Exo。在第 4、14 和 30 天通过旋转实验评价小鼠的行为学变化,第 30 天通过尼氏染色观察神经元的损失情况,第 4 天通过免疫印迹检测酪氨酸羟化酶(TH)、NFE2 相关因子 2(Nrf2)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(keap1)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)等的表达,分析 MSC-Exo 对炎症的调控作用。**结果:**在 4、14 和 30 天时,PD+MSC-Exo 组转圈数显著少于 PD 组($P<0.01$);在第 4 天时,与 Sham 组相比,PD 组的尼氏阳性细胞数显著减少,而 PD+MSC-Exo 组相比 PD 组尼氏细胞显著增多;免疫印迹结果显示,相比 Sham 组,PD 组的 TH 表达显著减少,Nrf2、keap1、TNF α 、IL-1 β 表达显著增加($P<0.01$),而 PD+MSC-Exo 组的 TH 相较于 PD 组明显增加,Nrf2、keap1、TNF α 、IL-1 β 则显著降低($P<0.01$)。**结论:**MSC-Exo 能够保护神经元,减少 PD 模型中的神经元失去,减少炎症的发生,对 PD 模型具有良好的治疗作用。

【关键词】 间充质干细胞;外泌体;帕金森疾病

【中图分类号】 R49;R741.044 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2022.09.001

Therapeutic effect of mesenchymal stem cell derived-exosomes on MPTP-induced acute Parkinson's model of mice

Chai Yuan, Wang Hongkang, Zhao Ruijing, et al. Xi'an Central Hospital, Xi'an 710000, China

【Abstract】 Objective: To explore the therapeutic effect of MSCs-derived exosomes (MSC-exo) on mouse Parkinson's disease(PD) model, so as to provide experimental basis for the treatment of PD and the application of MSC-exo. **Methods:** MSC-exo were extracted by ultracentrifugation, and identified by immunoblotting and transmission electron microscopy. C57BL/6 mice were divided into three groups: sham group, PD group and PD + MSC-exo group. C57BL/6 mice were injected intraperitoneally with MPTP to induce acute PD model. MSC-exo or PBS were injected into caudal vein. The behavioral changes of mice were analyzed by rotation experiment on the 4th, 14th and 30th days. Nissl staining and immunoblotting of Nrf2, HO1, TNF α and IL-1 β were used to observe the effect of MSC-exo on PD model. **Results:** At 4th, 14th and 30th day, the number of turns in PD + MSC-exo group was significantly less than that in PD group ($P<0.0001$). Compared with sham group, Nissl positive cells in PD group decreased significantly, while Nissl cells in PD + MSC-exo group increased significantly as compared with PD group. Western blot showed that as compared with sham group, TH expression in PD group decreased significantly, and Nrf2, keap1, TNF α and IL-1 β increased significantly. The expression of TH increased significantly in PD + MSC-exo, but that of Nrf2, keap1, TNF α and IL-1 β decreased significantly as compared with PD group. **Conclusion:** MSC-exo can protect neurons, decrease the loss of neurons in PD model and reduce the occurrence of inflammation. So, MSC-Exo have a satisfactory therapeutic effect on PD model.

【Key words】 mesenchymal stem cells; exosomes; Parkinson's disease

收稿日期:2022-01-26

作者单位:西安市中心医院,西安 710000

作者简介:柴源(1987-),男,主治医师,主要从事神经康复方面的研究。

通讯作者:苗宇, miaoyuvip@126.com

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中老年人常见的中枢神经系统变性疾病。其主要病理改变为中脑黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元进行性

变性丢失,纹状体区多巴胺含量减少,以及残存的多巴胺能神经元内形成以突触核蛋白(α -Synuclein, α -Syn)为主要成分的嗜酸性包涵体—路易小体(Lewy body, LB)。

帕金森疾病的治疗目前仍无显著有效的药物,干细胞治疗是诸多方法中很有前景的一种,尤其是间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。间充质干细胞是一种多功能性细胞,表现出低免疫原性,具有多向分化的同时,还具有免疫调节的生物学潜能,可以离体扩大培养^[1],根据文献,其对神经系统疾病有一定的治疗作用^[2]。现阶段研究发现,MSC的治疗作用主要来源于间充质干细胞旁分泌作用产生的外泌体(exosomes, Exo)和可溶性因子,其中外泌体中含有 miRNA、蛋白质在内的多种物质,可以发挥靶向调节作用^[3],其能够通过血脑屏障^[4],在治疗神经疾病方面更有优势。文献显示,间充质干细胞来源的外泌体(mesenchymal stem cells-derived exosomes, MSC-Exo)能够到达黑质,显著抑制 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)诱导的 PD 大鼠疾病模型^[5],能够抑制 PD 小鼠模型的氧化应激^[6]。本文探讨通过尾静脉注射 MSC-Exo 对 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的急性帕金森小鼠模型的治疗作用,从神经元损失到炎性变化以及氧化应激等多方面观察效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料 从西安交通大学实验动物中心购买 8~12 周的 C57BL/6 小鼠,适应性饲养一周后进行实验,期间自由饮食饮水,12h:12h 昼夜环境。

1.2 间充质干细胞外泌体的提取鉴定 取小鼠皮下脂肪,剪碎后,用 0.1% 胶原酶 I 37℃ 消化 40min,然后 200 目滤网过滤后,1000rpm,5min 离心,培养液悬浮后,接种培养瓶,培养液为改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)+10% 优级胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)^[7]。培养至 4 到 6 代时,在细胞长至融合后,更换为无血清 DMEM,继续培养 24h,收集上清提取外泌体。首先以 300g,10min 离心去除细胞以及碎片等,然后取上清 2000g,10min 离心去除较小的细胞碎片,接着以 10000g,30min 离心清除凋亡体,最后 100000g,70min 超速离心沉淀外泌体,所有离心步骤均为 4℃ 处理,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)重悬外泌体后-80℃ 保存。采用 BCA(bicinchoninic acid)法对外泌体进行定量,免疫印迹法检测外泌体标志分子

CD63 (1:1000, Abcam, California, USA) 和 CD81 (1:1000, Abcam, California, USA) 的表达。

1.3 MPTP 诱导小鼠帕金森模型 将 45 只小鼠分为 3 组,分别为 Sham 组、PD 组和 PD+MSC-Exo 组,每组 15 只,Sham 组在造模时给予生理盐水,PD 组腹腔注射 MPTP 诱导急性 PD 模型,PD+MSC-Exo 组在 PD 造模后尾静脉注射给予 MSC-Exo。用 MPTP (M2690, Tokyo Chemical Industry TCI, 日本)诱导小鼠急性帕金森模型,MPTP 用生理盐水溶解,配成 2mg/ml 试剂,小鼠连续腹腔注射 4 次 MPTP,间隔 2h,每次按照 20mg/kg 给药,总剂量是 80mg/kg^[8]。2h 后,尾静脉给予 MSC-Exo,每只 50ug/150ul^[7]。在第 4 天,14 天,30 天时取材。

1.4 评定指标 ①旋转实验:在第 4、14 和 30 天,进行阿扑吗啡诱导的旋转试验,每组 10 只,以评估受损纹状体的超敏反应。小鼠皮下注射阿扑吗啡(0.05 mg/kg)后,放到旋转仪中,观察旋转情况,同时使用视频跟踪系统测量 30min 内的旋转次数。②尼氏染色:在第 30 天用 4% 多聚甲醛全身灌注固定后,取大脑进行石蜡包埋,每组 5 只,切片到纹状体,依次过二甲苯、无水乙醇、95% 酒精、80% 酒精、70% 酒精和蒸馏水,然后 1% 焦油紫染色 30min,蒸馏水清洗,70% 酒精分色数秒至数分钟,依次经 70% 酒精、80% 酒精、95% 酒精,各 2min 脱水,无水乙醇 2 次,每次 5min,二甲苯 2 次,每次 10min,DPX 封片。显微镜下观察拍片分析。③免疫印迹:取第 4 天的纹状体,每组 5 只,RIPA(radio immunoprecipitation assay)裂解液超声(50w, 5min)提取蛋白,12000rpm,10min,4℃ 离心,取上清液,BCA 法进行定量。进行 SDS-PAGE,每孔蛋白 30ug,80V 30min,120V 1h;然后进行转膜,300 mA 恒定电流,120 min 将蛋白转至聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene Fluoride, PVDF) (Millipore, MA, USA) 膜;室温下将膜在封闭液中封闭 2 h,然后一抗孵育过夜核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) (1:1000)、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) (1:1000)、酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF α)、白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、 β -肌动蛋白(β -actin),三羟甲基氨基甲烷缓冲液(tris buffered saline with tween, TBST)洗涤后,室温下孵育二抗 2 h, TBST 洗涤 3 次。加上发光液后使用 Bio-Rad 成像系统(Bio-Rad, Hercules, California, USA)显示条带,Image Lab 软件分析灰度值。

1.5 统计学方法 使用 SPSS 19.0.0 进行统计分析,

GraphPad Prism 7 作图,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本间均数比较用两独立样本 t 检验。多个样本间的均数比较用单因素方差分析 LSD 检,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠行为学结果 实验发现,连续 4 次(间隔 2h)给 MPTP 后,成功诱发小鼠急性帕金森模型,行为学症状明显,在第 4、14、30 天,给予阿扑吗啡后,PD+MSC-Exo 组和 PD 组小鼠的转圈数显著高于 Sham 组 ($P < 0.01$),PD+MSC-Exo 组小鼠转圈数明显低于 PD 组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 3 组小鼠给予阿扑吗啡后的转圈数比较 次, $\bar{x} \pm s$				
组别	n	转圈数		
		第 4 天	第 14 天	第 30 天
Sham 组	15	9.6±2.1	10.4±2.4	11.2±1.9
PD 组	15	252.0±19.0 ^a	141.8±12.7 ^a	104.0±13.2 ^a
PD+MSC-Exo 组	15	168.4±13.4 ^{ab}	76.0±7.8 ^{ab}	36.8±6.1 ^{ab}

与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 PD 组比较,^b $P < 0.01$

2.2 尼氏染色结果 在第 30 天尼氏染色结果发现,与 Sham 组相比,PD 组小鼠的阳性染色显著减少,神经元损失严重,而与 PD 组相比,PD+MSC-Exo 组的神经元损失减少,数量增多,见图 1。

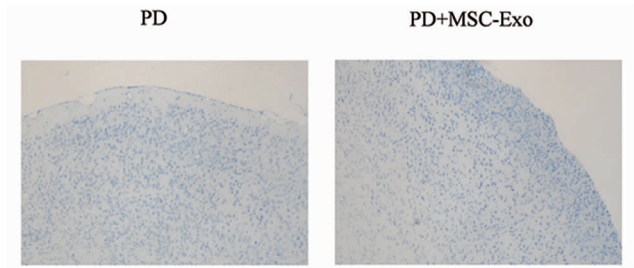


图 1 尼氏染色结果

2.3 免疫印迹结果 在第 4 天,PD 组小鼠纹状体的 TH 蛋白表达相比于 Sham 组显著降低 ($P < 0.05$),而与 PD 组相比,PD+MSC-Exo 组的 TH 表达量上升 ($P < 0.05$),见表 2,图 2。PD 组小鼠在第 4 天时,脑组织的炎症因子 $TNF\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 表达显著高于 Sham 组 ($P < 0.01$),而 PD+MSC-Exo 组的这两种炎症因子的表达明显低于 PD 组 ($P < 0.01$)。同时发现,第 4 天时,氧化应激通路分子 Nrf2 和 Keap1 相较于 Sham 组在 PD 组高表达 ($P < 0.01$),而与 PD 组相比在 PD+MSC-Exo 组显著下调 ($P < 0.01$)。见表 3,图 3。

表 2 3 组小鼠纹状体 TH 蛋白表达量比较 $\bar{x} \pm s$		
组别	n	表达量
Sham 组	5	0.85±0.07
PD 组	5	0.32±0.07 ^a
PD+MSC-Exo 组	5	0.72±0.09 ^b

与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 PD 组比较,^b $P < 0.01$

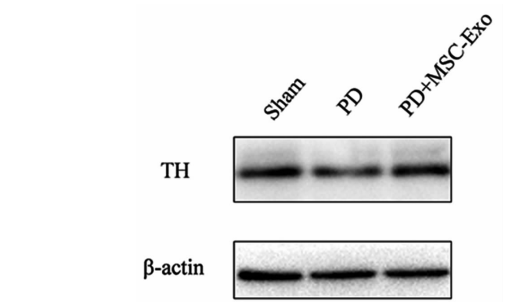


图 2 TH 免疫印迹结果

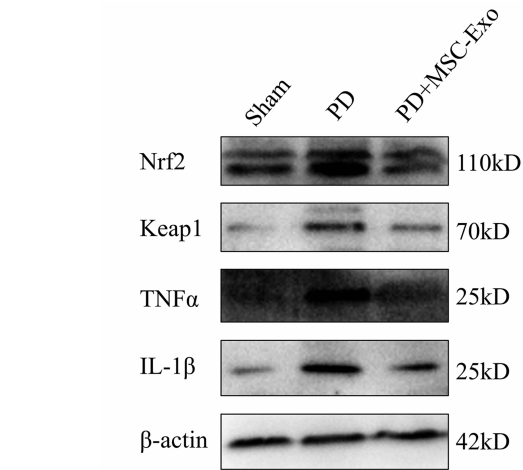


图 3 各指标免疫印迹结果

表 3 3 组小鼠纹状体的炎症和氧化因子蛋白相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	n	蛋白表达量			
		Nrf2	Keap1	$TNF\alpha$	$IL-1\beta$
Sham 组	5	0.75±0.09	0.23±0.06	0.38±0.14	0.65±0.09
PD 组	5	1.28±0.12 ^a	0.78±0.05 ^a	0.83±0.09 ^a	1.28±0.12 ^a
PD+MSC-Exo 组	5	0.79±0.09 ^b	0.41±0.08 ^b	0.42±0.07 ^b	0.79±0.09 ^b

与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 PD 组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

MSC 因其具有自我复制、多向分化、免疫调控、神经营养等生物学特性,目前已成为基础研究和临床试验应用最为广泛的干细胞之一,其来源的外泌体能够穿透血脑屏障,在神经系统疾病治疗以及靶向载药中有巨大的潜在价值。MPTP 具有多巴胺神经毒性,进入脑部后,能够进入多巴胺能神经末梢和胞体,破坏黑体多巴胺能神经元,导致纹状体神经末梢、多巴胺地址的大量减少,最后产生神经毒性,诱发帕金森疾病^[9]。MSC 衍生外泌体成分可对抗神经炎症,增强抗氧化能力和神经营养因子的表达^[10],因此 MSC-Exo 应该对帕金森也有良好的治疗效果。

本文实验中用 MPTP 成功诱发急性帕金森模型,实验发现,C57BL/6 小鼠给予 MPTP 连续 4 次后(2h 一次,每次 20mg/kg),小鼠的神经元显著减少,TH 表

达降低,给阿朴吗啡后,PD小鼠的转圈数达到200多以上,出现典型的帕金森症状,同时发现,PD小鼠给予MSC-Exo后症状显著缓解,转圈数相比PD组显著下降,并且神经元损失减少,TH的表达量也明显上升,表明MSC-Exo对帕金森的治疗具有显著作用,能够保护神经元,改善行为学特性。另外,我们还发现PD小鼠纹状体的炎症因子 $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和氧化应激分子Nrf2、Keap1的表达显著高于Sham组,给予MSC-Exo后小鼠的这些因子表达显著下降。我们的结果与文献报道的结果一致,有临床试验用自体脂肪MSC治疗帕金森病人,发现对运动障碍有一定的治疗效果^[11],给PD大鼠移植MSC同样能够显著减少转圈数,增加TH的表达^[12],关于MSC-Exo对PD治疗效果的研究目前较少,Chen等^[13]发现Exos在体内通过血脑屏障到达黑质,能够缓解PD小鼠中阿朴吗啡诱导的不对称旋转,减少黑质多巴胺能神经元的丢失和凋亡,并上调纹状体多巴胺水平,Ma等^[6]发现在PD小鼠中,骨髓间充质干细胞的Exo通过携带miR-181a-2-3p减轻多巴胺神经元的凋亡,并通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4, NOX4)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通过抑制氧化应激。表明在帕金森疾病状态下,整个纹状体脑区的细胞都处于炎症和应激状态, MSC-Exo通过整体调控这种失控状态而达到治疗作用,但是具体的作用分子有待进一步研究,后续研究中会用组学等方法确定MSC-Exo的具体作用物质,以及它的靶向分子,为MSC-Exo治疗帕金森提供更为具体的证据。

类似地, MSC-Exo对癫痫小鼠也具有治疗作用,能够提高其认知和学习记忆能力,降低炎症^[4],能够改善阿尔茨海默病小鼠的认知损伤,减少海马神经元丢失,抑制海马神经元氧化应激^[14],减轻小鼠缺血后的神经功能缺损、梗死体积、脑水肿和神经元损伤,降低中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞的浸润,具有神经保护作用^[15]。表明MSC-Exo确具有免疫调控和神经保护作用,在治疗帕金森疾病方面具有巨大的应用潜力。

在MPTP诱发的急性帕金森小鼠模型中,给予MSC-Exo后,神经元的损失减少、TH表达上升,炎症因子和氧化因子分子的表达也趋于正常,显示MSC-Exo在治疗帕金森以及其他神经疾病方面具有广泛的潜力。

【参考文献】

[1] Chen JM, Huang QY, Zhao YX, et al. The Latest Developments in Immunomodulation of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of

Intrauterine Adhesions, Both Allogeneic and Autologous [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021,12(1):785717.

[2] Yarygin KN, Namestnikova DD, Sukhinich KK, et al. Cell Therapy of Stroke: Do the Intra-Arterially Transplanted Mesenchymal Stem Cells Cross the Blood-Brain Barrier? [J]. *Cells*, 2021,10(11): 2997-3018.

[3] S ELA, Mager I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, 12(5): 347-357.

[4] Long Q, Upadhyay D, Hattiangady B, et al. Intranasal MSC-derived A1-exosomes ease inflammation, and prevent abnormal neurogenesis and memory dysfunction after status epilepticus [J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2017, 114(17): E3536-E3545.

[5] Chen HX, Liang FC, Gu P, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy [J]. *Cell Death & Disease*, 2020,11(4):288-305.

[6] Ma J, Shi X, Li M, et al. MicroRNA-181a-2-3p shuttled by mesenchymal stem cell-secreted extracellular vesicles inhibits oxidative stress in Parkinson's disease by inhibiting EGR1 and NOX4 [J]. *Cell Death Discovery*, 2022, 8(1):33-47.

[7] 曹胜军,王凌峰,巴特,等. 异体小鼠脂肪源性间充质干细胞-微孔化羊膜细胞真皮基质对小鼠全层皮肤缺损创面愈合的影响及相关机制[J]. *中华烧伤杂志*, 2018,34(12): 901-906.

[8] Tan X, Hu J, Ming F, et al. MicroRNA-409-3p Targeting at AT-XN3 Reduces the Apoptosis of Dopamine Neurons Based on the Profile of miRNAs in the Cerebrospinal Fluid of Early Parkinson's Disease [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9(1): 755254.

[9] Tillerson JL, Miller GW. Grid performance test to measure behavioral impairment in the MPTP-treated-mouse model of parkinsonism [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2003, 123(2): 189-200.

[10] d'Angelo M, Cimini A, Castelli V. Insights into the Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome in Parkinson's Disease [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(15): 5241-5260.

[11] Shigematsu K, Komori N, Tahara K, et al. Repeated infusion of autologous adipose tissue-derived stem cells for Parkinson's disease [J]. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2022, 145(1):119-122.

[12] Forouzandeh M, Bigdeli MR, Mostafavi H, et al. Therapeutic potentials of human microfluidic encapsulated conjunctival mesenchymal stem cells on the rat model of Parkinson's disease [J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2021, 123(1):104703.

[13] Chen HX, Liang FC, Gu P, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy [J]. *Cell Death & Disease* 2020,11(4):288-305.

[14] Wang H, Liu Y, Li J, et al. Tail-vein injection of MSC-derived small extracellular vesicles facilitates the restoration of hippocampal neuronal morphology and function in APP / PS1 mice [J]. *Cell Death Discovery*, 2021,7(1): 230-240.

[15] Wang C, Börgers V, Mohamud Yusuf A, et al. Postischemic Neuroprotection Associated With Anti-Inflammatory Effects by Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles in Aged Mice [J]. *Stroke*, 2022, 53(1): e14-e18.