

## 年轻大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体逆转老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老

张熊劲夫, 陈奕达, 程歆怡, 刘岱琿, 施勤

<https://doi.org/10.12307/2025.535>

投稿日期: 2024-04-15

采用日期: 2024-06-21

修回日期: 2024-09-06

在线日期: 2024-09-28

中图分类号:

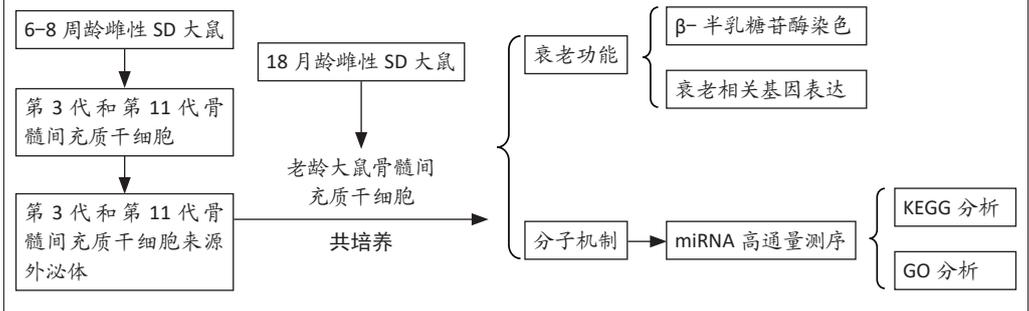
R459.9; R310.17; R180.21

文章编号:

2095-4344(2025)36-07709-10

文献标识码: A

文章快速阅读: 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体对老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老的作用



文题释义:

细胞衰老: 是指细胞在执行生命活动过程中, 随着时间的推移, 细胞增殖与分化能力和生理功能逐渐发生衰退的变化过程。

微小RNA: 外泌体内包含多种来自分泌细胞的微小RNA, 微小RNA与靶细胞基因组结合, 影响靶细胞相关基因转录和蛋白表达。

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞是骨形成的主要效应细胞, 随着年龄的增加, 骨髓间充质干细胞的再生能力减弱、分化功能受损, 导致骨质疏松。因此, 恢复老龄骨髓间充质干细胞的再生能力和细胞功能对骨质疏松的有效治疗至关重要。

目的: 探究年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体对老年大鼠骨髓间充质干细胞衰老的影响。

方法: 分离培养6-8周龄雌性SD大鼠骨髓间充质干细胞, 分别传代至第3代和第11代, 随后提取第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体。分离培养18月龄雌性SD大鼠骨髓间充质干细胞, 传代至第3代, 分为3组: 对照组为常规培养, 其他2组用第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体干预。外泌体干预48 h后, 利用β-半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞核内β-半乳糖苷酶的表达, qRT-PCR检测衰老相关基因的表达。通过Small RNA测序, 比较第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体内 miRNA 的表达差异。

结果与结论: ①与对照组和第11代骨髓间充质干细胞来源外泌体组相比, 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体组老龄大鼠骨髓间充质干细胞的β-半乳糖苷酶活性显著降低; ②与对照组相比, 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体组衰老相关基因p21和p16的表达显著降低(P &lt; 0.05), 而第11代骨髓间充质干细胞来源外泌体组衰老相关基因p21和p16的表达无显著差异; ③测序结果表明, 两种外泌体内miRNA的表达存在显著差异, 其中表达差异最显著的miRNA是let-7c-5p、let-7b-5p、miR-320-3p和miR-26a-5p, KEGG分析结果显示显著性差异miRNA富集通路包含mTOR、AMPK等衰老相关信号通路。上述结果表明, 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体具有逆转老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老的能力。

关键词: 骨质疏松; 外泌体; 骨髓间充质干细胞; miRNA; 衰老; 工程化细胞外囊泡

## Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells of young rats to reverse senescence in aged rat bone marrow mesenchymal stem cells

Zhang Xiongjin, Chen Yida, Cheng Xinyi, Liu Daihui, Shi Qin

Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Institute of Orthopedics of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Zhang Xiongjin, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Institute of Orthopedics of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Shi Qin, MD, Professor, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Soochow University, Institute of Orthopedics of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells are the main effector cells for bone formation. With the increase of age, the regenerative ability of bone marrow mesenchymal stem cells is weakened and the differentiation function is impaired, leading to poor osteoporosis. Therefore, restoring the regenerative capacity and cellular function of aged bone marrow mesenchymal stem cells is essential for the effective treatment of osteoporosis.

OBJECTIVE: To investigate the effects of passage 3 and passage 11 bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes of young rats on the aging of bone marrow mesenchymal stem cells derived from elderly rats.

苏州大学附属第一医院骨科, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006

第一作者: 张熊劲夫, 女, 1998年生, 云南省昆明市人, 纳西族, 2021年苏州大学毕业, 主要从事骨质疏松研究。

通讯作者: 施勤, 博士, 教授, 苏州大学附属第一医院骨科, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215006

<https://orcid.org/0009-0002-2971-8780> (张熊劲夫)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(82172485), 项目负责人: 施勤

引用本文: 张熊劲夫, 陈奕达, 程歆怡, 刘岱琿, 施勤. 年轻大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体逆转老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7709-7718.



**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cells from 6–8-week-old female SD rats were isolated and cultured, and passed to the passages 3 and 11, respectively. Then, exosomes from passages 3 and 11 bone marrow mesenchymal stem cells were extracted. Bone marrow mesenchymal stem cells from 18-month-old female SD rats were isolated and cultured, passed to passage 3, and divided into 3 groups. The control group was routinely cultured, and the other two groups were intervened with exosomes from passages 3 and 11 bone marrow mesenchymal stem cells. After 48 hours of exosome intervention, the expression of  $\beta$ -galactosidase in the nucleus was detected by  $\beta$ -galactosidase staining kit. The expression of aging-related genes was detected by qRT-PCR. The expression differences of miRNA in exosomes from passages 3 and 11 bone marrow mesenchymal stem cells were compared by Small RNA sequencing.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Compared with the control group and passage 11 bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes group, the  $\beta$ -galactosidase activity of bone marrow mesenchymal stem cells of aged rats was significantly lower in the passage 3 bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes group. (2) Compared with the control group, the expression of aging-related genes p21 and p16 was significantly reduced in the passage 3 bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome group ( $P < 0.05$ ), while there was no significant difference in the expression of aging-related genes p21 and p16 in the passage 11 bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome group. (3) Sequencing results showed that there was a significant difference in the expression of miRNAs in the two exosomes, among which the miRNAs with the most significant expression differences were let-7c-5p, let-7b-5p, miR-320-3p, and miR-26a-5p. KEGG analysis results showed that significantly different miRNA enrichment pathways include mTOR, AMPK and other aging-related signaling pathways. The above results indicate that passage 3 bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes have the ability to reverse the aging of bone marrow mesenchymal stem cells in aged rats.

**Key words:** osteoporosis; exosomes; bone marrow mesenchymal stem cell; miRNA; aging; engineered extracellular vesicles

**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 82172485 (to SQ)

**How to cite this article:** ZHANG XJ, CHEN YD, CHENG XY, LIU DH, SHI Q. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells of young rats to reverse senescence in aged rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7709-7718.

## 0 引言 Introduction

骨质疏松症是一种与骨密度下降、骨量减少和骨脆性增加相关的疾病，与衰老密切相关的原发性骨质疏松症好发于绝经后妇女和老年人<sup>[1-3]</sup>。衰老常造成机体组织功能受损，同时也是很多慢性疾病加重的危险因素，影响患者生活质量<sup>[4-5]</sup>。个体衰老虽然与细胞衰老不同步，但是细胞衰老是机体衰老的基础，衰老细胞再生能力减弱、分化功能下降，进一步导致机体组织功能下降，因此，如何最大限度地逆转老龄机体的细胞衰老，恢复衰老细胞的再生能力和细胞功能至关重要<sup>[6]</sup>。

大量研究表明，骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有自我更新和成骨分化潜能<sup>[7]</sup>，在骨质疏松治疗过程中发挥重要作用，但存在许多问题有待解决<sup>[8-9]</sup>。在老龄状态下，骨髓间充质干细胞会发生明显的细胞和分子水平变化，主要表现为成骨、成脂分化失衡，成骨能力下降。老龄大鼠骨髓间充质干细胞会分泌衰老相关分泌表型，对其他细胞产生不利影响，促进炎症环境发展<sup>[10]</sup>。WANG 等<sup>[11]</sup>研究表明与对照组大鼠骨髓间充质干细胞相比，卵巢切除大鼠骨髓间充质干细胞成骨基因表达降低，成骨分化能力减弱。研究发现移植外源性骨髓间充质干细胞能够促进骨形成，为骨质疏松治疗提供新的研究方向。KIERNAN 等<sup>[10]</sup>通过微创注射外源性骨髓间充质干细胞到骨质疏松小鼠模型中，发现长期移植骨髓间充质干细胞能够防止骨量下降，促进骨形成。HAN 等<sup>[12]</sup>研究表明注射负载骨髓间充质干细胞的聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球可以有效提高骨质疏松大鼠的骨密度。但目前已有动物实验显示骨髓间充质干细胞移植增加了肿瘤的发生率<sup>[13]</sup>，并且移植后骨髓间充质干细胞的归巢能力降低，治疗作用有限，因此需要开发出能够降低干细胞移植复杂性和风险的治疗方案。外泌体具有免疫原性低、稳定性好的特点，利用外泌体在一定程度上避免直接细胞移植带来的不良反应，不同

细胞分泌携带不同组分的外泌体，发挥不同的生物学作用<sup>[14-15]</sup>。研究发现，与移植外源性骨髓间充质干细胞对骨质疏松的治疗作用相似，骨髓间充质干细胞来源外泌体 (BMSCs derived exosomes, BMSCs-Exo) 通过 mRNA、蛋白、miRNA 等参与骨细胞间通讯，促进骨髓间充质干细胞成骨分化，完成缺损部位的骨组织再生<sup>[16]</sup>。YING 等<sup>[17]</sup>发现骨髓间充质干细胞来源外泌体通过调节缺氧诱导因子 1 $\alpha$  刺激骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化。

外泌体是由活细胞分泌的带有脂质双层的小囊泡，可通过转移 mRNA、miRNA、脂质和蛋白质来调节细胞信号和改变靶细胞生物活性<sup>[18]</sup>，其内部的多种生物分子是调节细胞功能和生物学行为的重要递质<sup>[19-20]</sup>。当外泌体进入靶细胞后，miRNA 能够与 mRNA 上的部分互补位点结合，导致 mRNA 部分或全部降解，从而影响靶细胞的基因转录和翻译，发挥转录后抑制因子的作用。由于外泌体具有免疫原性低、与亲本细胞相似的生理功能，因此采用外泌体作为治疗载体，可以避免恶性表型转化、排斥反应等问题<sup>[21]</sup>。基于以上特性，外泌体成为一种无细胞替代疗法，受到广泛研究关注<sup>[22-23]</sup>。骨髓间充质干细胞来源外泌体能够参与骨细胞间通讯，同时利用其内部蛋白或核酸促进成骨分化，完成骨缺损部位的修复重建，加快局部功能恢复<sup>[16, 24]</sup>。研究显示，骨髓间充质干细胞来源外泌体可通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来治疗辐射引起的骨质流失，对骨质疏松症有治疗潜力<sup>[25]</sup>。但衰老细胞分泌的外泌体内部成分和生物学作用会有衰老相关改变，研究发现衰老细胞来源外泌体较年轻细胞来源外泌体缺少抗氧化相关蛋白，谷胱甘肽代谢通路受到抑制<sup>[26]</sup>。研究表明，年轻骨髓间充质干细胞来源外泌体能够延长 Ercc1 小鼠的寿命<sup>[27]</sup>。JIN 等<sup>[28]</sup>研究表明，年轻的人类脱落乳牙干细胞分泌的外泌体可以减轻肌腱干/祖细胞的老化，并保持其生肌能力。基于上述研究，年轻细胞来源外泌体具有逆转衰老、治疗骨质疏松的潜在作用。因此

该研究探讨年轻大鼠不同代数骨髓间充质干细胞来源外泌体对老龄大鼠骨髓间充质干细胞生物学功能的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于2022年11月至2023年12月在苏州大学骨科研究所完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 18月龄雌性SD大鼠20只,体质量(330.0±3.1)g,6-8周龄雌性SD大鼠20只,体质量(262.0±4.9)g,均购自苏州昭衍动物公司,动物质量合格证号:SYXK(苏)2017-0043。所有SD大鼠均饲养在苏州大学实验动物中心无病原体的环境中,保证大鼠能够自由获取所需饮食,22-24℃恒温,50%-60%湿度,12h光照/12h黑暗交替循环。

所有动物实验遵循苏州大学实验管理条例规定并得到苏州大学动物实验伦理委员会的批准(SUDA20230619A03),严格遵守实验室动物护理和使用的指导方针。

1.3.2 实验试剂和仪器 胰酶、胎牛血清、PBS(Hyclone,美国);DMEM/F-12培养基(Thermo Fisher Scientific,美国);反转录试剂、qRT-PCR试剂盒(Takara,日本);抗坏血酸、地塞米松、 $\beta$ -甘油磷酸钠(Sigma,美国);衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天,中国);戊巴比妥钠(麦克林,中国);40g/L多聚甲醛(Biosharp,中国);光学显微镜(Leica,德国);倒置荧光显微镜(Zeiss Axiovert,德国);扫描电子显微镜(Hitachi S-4800,日本);磁力搅拌器(司乐仪器有限公司,中国);全波长酶标仪(BioTek,美国);培养皿、培养孔板(Corning,美国);CO<sub>2</sub>细胞培养箱、生物超净台(Thermo Fisher Scientific,美国);高速离心机(Eppendorf,德国);Nanodrop 2000光谱仪(Thermo Fisher Scientific,美国);4℃冰箱(无锡松下冷机有限公司,中国);-80℃电冰箱(青岛海尔股份有限公司,中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠骨髓间充质干细胞的提取和培养 采用过量3%戊巴比妥钠腹腔注射处死6-8周龄雌性SD大鼠20只,用5mL注射器冲出股骨和胫骨内骨髓,将冲出的骨髓吹散,培养于含体积分数10%胎牛血清、100U/mL青霉素和100mg/mL链霉素的DMEM/F-12培养基中,每3d换1次培养基,待细胞融合度达到95%时进行细胞传代,传代时细胞用0.25%不含EDTA的胰酶在37℃消化30s,用DMEM/F-12完全培养基终止消化,1200r/min离心10min,随后将细胞均匀分至3个10cm<sup>2</sup>培养皿中即为第1代,按此方法继续传代至第3代和第11代。18月龄雌性SD大鼠骨髓间充质干细胞培养方法同上,培养到第3代进行后续实验。

1.4.2 流式细胞术鉴定骨髓间充质干细胞 按照前述方法提取出的6-8周龄雌性SD大鼠骨髓间充质干细胞传至第3代和第11代,18月龄雌性SD大鼠骨髓间充质干细胞传到第3代,进行鉴定。取 $9 \times 10^6$ 个骨髓间充质干细胞,800 $\times$ g离心10min,弃去上清后加入PBS均匀吹打细胞,洗去细胞表面残留培养基,再次离心,离心结束后去除上清制成单细胞悬液。每个EP管加入 $1 \times 10^6$ 个细胞,将配制好的CD45、CD34、CD29、CD90抗体加至上述含细胞的1.5mLEP管中,置于4℃条件下避光孵育30min,孵育结束后,每管加入500 $\mu$ L含胎牛血清的PBS,均匀吹打,800 $\times$ g离心10min,去除上清,再向每管样品中加入400 $\mu$ L PBS重悬,重悬结束所有样品上机检测。

1.4.3 年轻大鼠第3,11代骨髓间充质干细胞来源外泌体分离提取 上述6-8周龄雌性SD大鼠的骨髓间充质干细胞分别传代至第3代和第11代,当细胞融合度到70%时,弃去DMEM/F-12完全培养基,PBS洗3次,更换为无外泌体血清配置的DMEM/F-12完全培养基,培养48h后收集上清,提取外泌体,即收取上清300 $\times$ g离心10min,去除细胞和大体积细胞碎片,2000 $\times$ g离心10min,去除细胞碎片,10000 $\times$ g离心30min,收集上清,所有上清经0.22 $\mu$ m滤器过滤,100000 $\times$ g离心70min,弃去上清,沉淀即为外泌体,无菌PBS重悬后,再次100000 $\times$ g离心70min,弃上清,1mL无菌PBS重悬外泌体,分装后-80℃保存。

1.4.4 外泌体的表征

(1) 外泌体的形态:利用透射电镜观察第3,11代骨髓间充质干细胞来源外泌体的形态。

(2) 外泌体的纳米粒径分布:将提取的外泌体样本从-80℃冰箱取出后放于冰盒中,融化后离心,取20 $\mu$ L加入至1.5mLEP管中,再加入980 $\mu$ L PBS稀释50倍,用1mL注射器完成仪器上样,观察屏幕中颗粒画面,调整焦距及各项测量参数,依照提示完成测试,分析检测结果及处理数据。

(3) 外泌体标志蛋白表达:利用Western blot检测外泌体表面蛋白CD63和TSG101的表达。

1.4.5 年轻大鼠第3,11代骨髓间充质干细胞和老龄大鼠第3代骨髓间充质干细胞的 $\beta$ -半乳糖苷酶染色 将骨髓间充质干细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔的密度种植在24孔板内,待细胞贴壁并且融合度达到80%时,使用衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒进行染色,倒置光学显微镜观察。

1.4.6 老龄大鼠骨髓间充质干细胞内化年轻大鼠第3,11代骨髓间充质干细胞来源外泌体验证 取50 $\mu$ L质量浓度为50 $\mu$ g/mL的年轻大鼠第3,11代骨髓间充质干细胞来源外泌体,用DiI染料标记(外泌体和DiI染料的体积比为300:1),室温避光孵育30min。将老龄大鼠第3代骨髓

间充质干细胞以  $3 \times 10^4$  / 孔接种到 24 孔板内, 每组 4 个孔 (孔板内已提前放置无菌细胞爬片), 将完成标记的年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体与老龄大鼠骨髓间充质干细胞于 24 孔板内共孵育 12 h。孵育结束后, 弃去培养皿中细胞上清, PBS 洗 3 次后使用 40 g/L 多聚甲醛室温固定 20 min, 使用免疫染色通透液室温下通透 10 min 完成细胞打孔, PBS 洗 3 次, 使用免疫荧光染色封闭液室温下封闭 1 h 保证后续实验结果的准确性, 封闭结束后无需用 PBS 洗涤, 使用鬼笔环肽染料室温下染色 1 h, 完成老龄大鼠骨髓间充质干细胞的细胞骨架染色, 使用 DAPI 染色液室温下染色 10 min 完成细胞核染色, 吸除 DAPI 染色液, PBS 洗 3 次, 使用抗荧光淬灭封片剂完成封固, 倒置荧光显微镜观察。

1.4.7 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体处理后老龄大鼠骨髓间充质干细胞的增殖能力 将老龄大鼠第 3 代骨髓间充质干细胞按  $3 \times 10^3$  个 / 孔密度接种至 96 孔板内, 分为对照组、第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体组、第 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体组, 每组 3 个复孔, 待各孔细胞融合度达到 40% 时, 将 DMEM/F-12 完全培养基更换为无外泌体血清配置的 DMEM/F-12 完全培养基、第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体, 外泌体质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 1, 3, 5 d, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  CCK-8 工作液, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h, 孵育结束后酶标仪在 450 nm 波长处检测各孔吸光度值。

1.4.8 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体处理后老龄大鼠骨髓间充质干细胞的成骨诱导分化能力 老龄大鼠第 3 代骨髓间充质干细胞消化离心后接种于 6 孔板 ( $5 \times 10^4$  个 / 孔) 和 24 孔板 ( $3 \times 10^4$  个 / 孔), 分别用于后续成骨相关分化基因的检测和碱性磷酸酶染色。分组如下: 对照组、成骨分化组、第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体组、第 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体组, 待各孔细胞融合度达到 70% 时, 更换 DMEM/F-12 完全培养基、成骨诱导培养基 (DMEM/F-12 培养基内添加体积分数 10% 胎牛血清、1% 青 / 链霉素、10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠、50 mg/L 抗坏血酸、10 nmol/L 地塞米松)、含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体的成骨诱导培养基, 每 3 d 换液 1 次。

1.4.9 qRT-PCR 检测老龄大鼠骨髓间充质干细胞中成骨相关基因的 mRNA 表达 成骨诱导 7 d 后, 收集 6 孔板中各组细胞至 1.5 mL 无酶离心管中, 加入 1 mL Trizol, 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 10 min 后, 反复吹打至细胞充分裂解; 每管加入 200  $\mu\text{L}$  三氯甲烷, 剧烈上下晃动 1 min, 充分萃取 RNA 后 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 10 min 至分层, 随后 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。提前准备无酶 1.5 mL EP 管。离心结束小心吸取

上层水相液体, 不要吸到蛋白层, 将水相液体转移至提前准备好的无酶离心管中, 加入与水相等体积异丙醇, 上下颠倒 10-15 次, 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 10 min, 随后 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清, 底部浅白色沉淀即为 RNA, 加入 1 mL 体积分数 75% 无水乙醇, 移液枪轻轻吹起白色沉淀, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 重复上述步骤, 弃上清, 待管底液体挥发完全, 沉淀由白色变为透明状后, 根据 RNA 沉淀量加入适量 DEPC 水, 使用超微量紫外分光光度计检测样本 RNA 浓度。将上述 RNA 反转录为 cDNA, 反转录体系为提取的 RNA、5 $\times$  All-In-One RT Mastermix、Nuclease-free  $\text{H}_2\text{O}$ , 先加入 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  All-In-One RT Mastermix, 计算每组需要加入的 RNA 体积, 然后用 Nuclease-free  $\text{H}_2\text{O}$  补齐液量至 20  $\mu\text{L}$ , 各成分混匀后, 上机完成反转录。反转录结束后进行 qRT-PCR, 首先按照 DEPC 水 (2  $\mu\text{L}$ )、Forward Primer (0.5  $\mu\text{L}$ )、Reverse Primer (0.5  $\mu\text{L}$ ) 和 SYBR Green (5  $\mu\text{L}$ ) 的顺序配制每个目的基因的 qRT-PCR 体系, 混合均匀后, 每孔贴壁加入 8  $\mu\text{L}$  预混液, 然后以反转录得到的 cDNA 为模板, 每孔再加入 2  $\mu\text{L}$  对应组别的 cDNA。qRT-PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s 预变性; 95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 s; 60  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s, 40 个循环扩增; 95  $^{\circ}\text{C}$  熔解曲线。内参基因是 GAPDH, qRT-PCR 结束后, 采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算数据。表 1 为各基因引物序列。

表 1 | 基因引物序列  
Table 1 | Gene primer sequences

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
Runx2	CAA GAA GGC TCT GGC GTT	TGC AGC CTT AAA TGA CTC
Spp1	CAG TCG ATG TCC CTG ACG	GTC CTG ATC AGA GGG CAC
Bmp2	CGG GAT CCA TGG TGG CCG	GGA ATT CTG CTG TAC TAG
p21	ATG ACT GAG TAT AAA CTT	AAG TTT ATA CTC AGT CAT
p16	ATG GAG TCC TCT GCA GAT	ATC TGC AGA GGA CTC CAT
Gapdh	GGT CGG TGT GAA CGG ATT	GTA ACA CCT TCC CGA GTA

1.4.10 老龄大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化后碱性磷酸酶染色 成骨诱导 7 d 后用 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒按照试剂盒说明书完成碱性磷酸酶染色, 染色结束使用 Image J 进行碱性磷酸酶染色定量分析。

1.4.11 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体处理后老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老相关基因 p21 和 p16 的 mRNA 表达 老龄大鼠第 3 代骨髓间充质干细胞以  $5 \times 10^4$  个 / 孔的密度接种在 6 孔板内, 分为对照组、第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体组、第 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体组, 每组 3 个复孔, 待细胞贴壁 50%-60% 时, 将 DMEM/F-12 完全培养基更换为无外泌体血清配置的 DMEM/F-12 完全培养基、第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体, 外泌体质量浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 待细胞长至 95%-100% 融合度时收取细胞, 采用 qRT-PCR 检测老龄大鼠骨髓间充质干细胞中衰老相关基因 p21 和 p16 的 mRNA 表达, 引物序列见表 1。

1.4.12 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体处理后老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老情况 将老龄大鼠第3代骨髓间充质干细胞以 $5 \times 10^4$ 个/孔的密度种植在6孔板内, 分为对照组、第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体组、第11代骨髓间充质干细胞来源外泌体组, 每组3个复孔, 待细胞贴壁后融合度达到50%时, 将DMEM/F-12完全培养基更换为无外泌体血清配置的DMEM/F-12完全培养基、第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体, 外泌体质量浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 干预48 h后, 使用衰老相关 $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒进行染色, 倒置光学显微镜观察。

1.4.13 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体的miRNA差异表达 以第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体作为实验组, 第11代骨髓间充质干细胞来源外泌体作为对照组, 测序比较两种外泌体内miRNA表达差异。使用无菌PBS调整外泌体浓度, 保证每一重复样本内外泌体含量均为1 mg, 所有样本通过干冰保存于 $-20^\circ\text{C}$ 运送至测序公司。外泌体质检、Small RNA测序和后续实验结果均由广州市锐博生物科技有限公司完成。测序完成后, 分析测序结果筛选出具有显著性差异的miRNA, 通过Targetscan 8.0进一步预测其靶基因, 探究第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体对老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老影响的机制。

1.5 主要观察指标 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体对老龄大鼠骨髓间充质干细胞增殖、成骨分化能力、衰老的影响, 以及年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体内miRNA的表达差异。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0软件进行统计分析, 各项数据以均值 $\pm$ 标准误表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过苏州大学生物统计学专家审核。

## 2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的鉴定结果 流式细胞术结果显示, 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞、老龄大鼠骨髓间充质干细胞阳性指标CD90的阳性百分比分别为 $(99.50 \pm 0.01)\%$ ,  $(99.400 \pm 0.003)\%$ ,  $(99.900 \pm 0.006)\%$ , CD29的阳性百分比分别为 $(94.40 \pm 0.06)\%$ ,  $(94.00 \pm 0.05)\%$ ,  $(99.40 \pm 0.01)\%$ ; 阴性指标CD34的阳性百分比分别为 $(0.030 \pm 0.007)\%$ ,  $(0.93 \pm 0.08)\%$ ,  $(0.004 \pm 0.002)\%$ , CD45的阳性百分比分别为 $(1.43 \pm 0.20)\%$ ,  $(4.55 \pm 0.01)\%$ ,  $(0.46 \pm 0.01)\%$ , 均小于5%。该鉴定结果说明提取培养的骨髓间充质干细胞纯度达到90%以上, 见图1。

2.2 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞和老龄大鼠第3代骨髓间充质干细胞的 $\beta$ -半乳糖苷酶染色结果 低倍镜下可见第11代骨髓间充质干细胞的细胞核蓝染细胞数量多于第3代骨髓间充质干细胞, 高倍镜下可见第11代骨

髓间充质干细胞的细胞核着色明显深于第3代骨髓间充质干细胞, 见图2。

2.3 第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体形貌 透射电镜观察显示, 第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体具有非常明显的膜边界、直径150 nm左右的杯状结构, 也有部分在200 nm以下、较难鉴别的其他形状外泌体。两种外泌体的形貌无明显差别, 可排除大小、形态对后续实验的干扰, 见图3。

2.4 第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体的粒径分布 纳米颗粒分析结果显示, 第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体的粒径大小主要分布在150 nm左右, 检测结果呈现单峰, 说明提取出的外泌体纯度较高, 见图4。

2.5 第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体的标志蛋白表达 第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体均表达CD63和TSG101, 符合外泌体的表征验证, 见图5。

2.6 老龄大鼠骨髓间充质干细胞对年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体的内化 倒置荧光显微镜观察结果显示, 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体均能被老龄大鼠骨髓间充质干细胞摄取, 二者内化情况一致, 无明显差别, 外泌体均聚集在老龄大鼠骨髓间充质干细胞的细胞质和细胞核周围, 进一步表明老龄大鼠骨髓间充质干细胞能够内化年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体, 被摄取的外泌体能够进一步进入细胞核内发挥生物学作用, 见图6。

2.7 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体促进老龄大鼠骨髓间充质干细胞的增殖 老龄大鼠骨髓间充质干细胞接种培养1, 3, 5 d后, 能够正常增殖, 并且加入第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体处理后老龄大鼠骨髓间充质干细胞的增殖速度增加, 加入第11代骨髓间充质干细胞来源外泌体后老龄大鼠骨髓间充质干细胞的增殖速度下降。上述结果表明第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体能够促进老龄大鼠骨髓间充质干细胞的增殖, 见图7。

2.8 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体促进老龄大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化相关基因的表达 与第11代骨髓间充质干细胞来源外泌体组相比, 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体组Bmp2、Spp1和Runx2的mRNA表达均上调, 见图8。

2.9 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体提高老龄大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化后的碱性磷酸酶活性 碱性磷酸酶染色结果表明, 加入第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体后, 老龄大鼠骨髓间充质干细胞的碱性磷酸酶表达量显著增加, 见图9。

2.10 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体降低老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老相关基因表达 与第11代骨髓间充质干细胞来源外泌体组相比, 第3代骨髓间充质干细

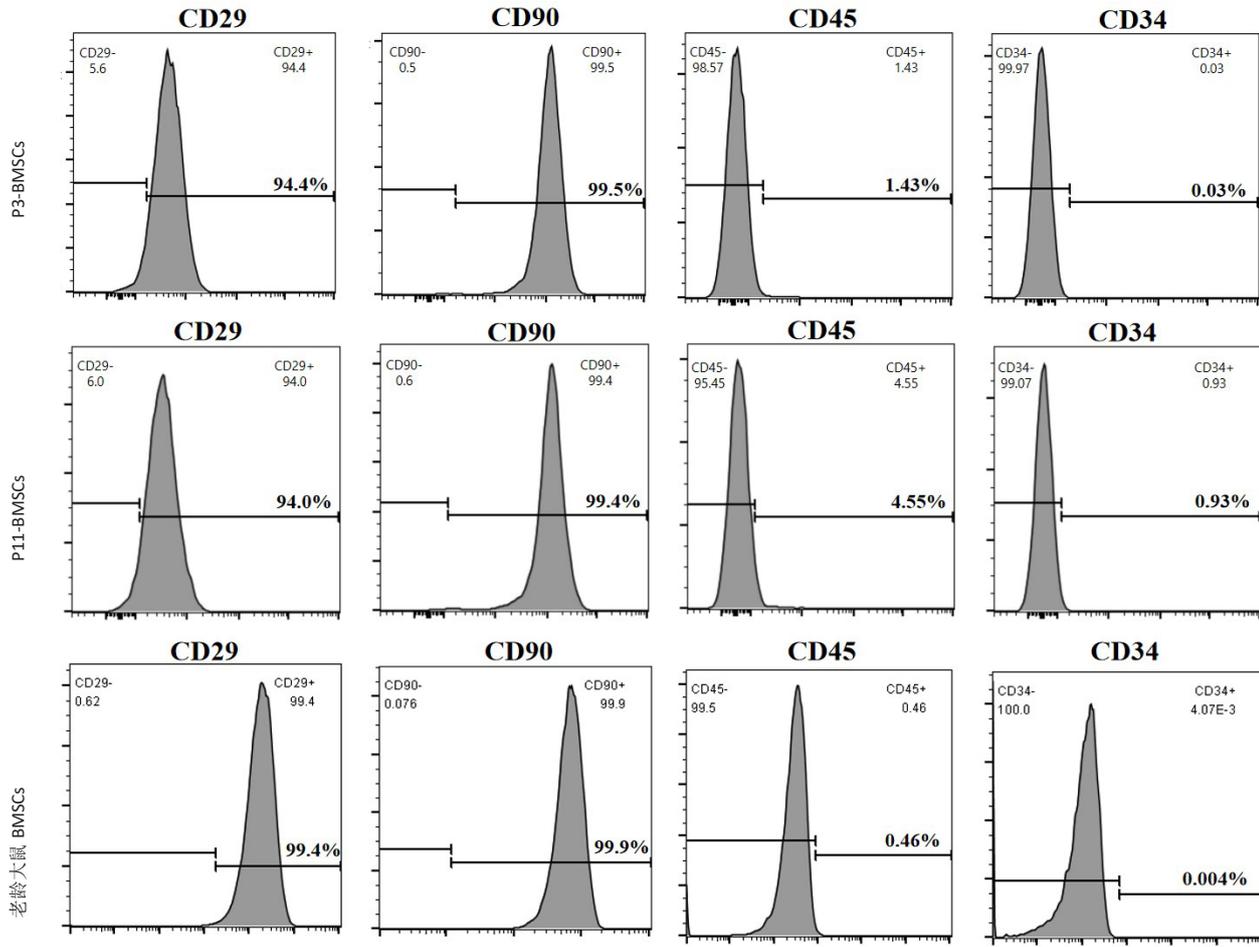


图1 | 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞 (P3-BMSCs, P11-BMSCs) 和老龄大鼠第3代骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的流式细胞术鉴定  
Figure 1 | Flow cytometry identification of bone marrow mesenchymal stem cells of young rats at passages 3 and 11 and bone marrow mesenchymal stem cells of aged rats at passage 3

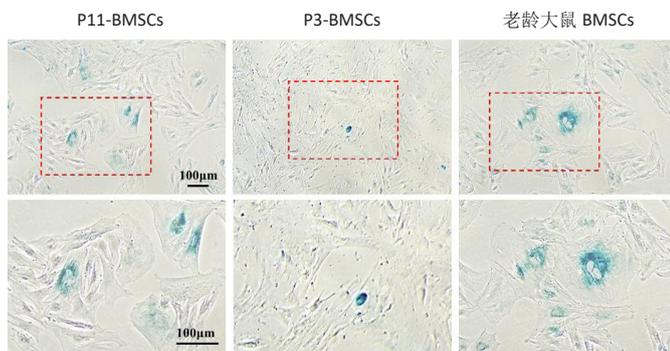
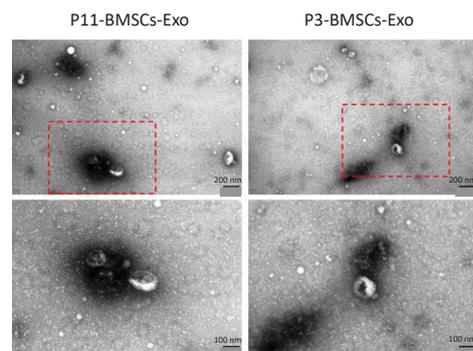


图2 | 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞 (P3-BMSCs, P11-BMSCs) 和老龄大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 的β-半乳糖苷酶染色  
Figure 2 | Galactosidase staining of bone marrow mesenchymal stem cells of young rats at passages 3 and 11 and bone marrow mesenchymal stem cells of aged rats

图注: 低倍镜下可见 P11-BMSCs 的细胞核蓝染细胞数量多于 P3-BMSCs, 高倍镜下可见 P11-BMSCs 和老龄大鼠 BMSCs 的细胞核着色明显深于 P3-BMSCs。下图为红色虚线框的高倍镜图。

胞来源外泌体组 p21 的 mRNA 表达下调了约 48%, p16 的 mRNA 表达下调了约 30% ( $P < 0.05$ ), 见图 10。

2.11 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体减弱老龄大鼠骨髓间充质干细胞内 β-半乳糖苷酶活性 β-半乳糖苷酶染色结果显示, 加入第3代骨髓间充质干细胞来源外泌

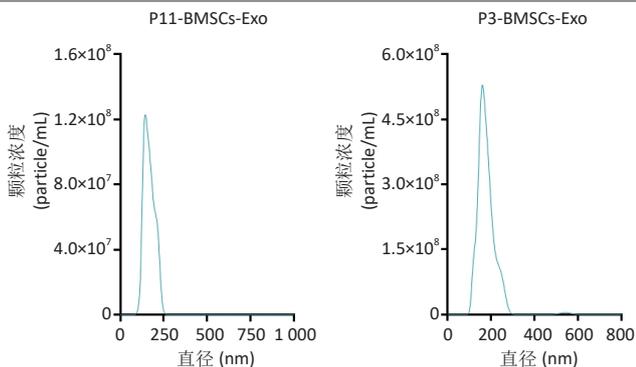


图注: 两种外泌体形态无明显差别, 均可见杯状结构, 平均直径为 100-200 nm。下图为红色虚线框的高倍镜图。

图3 | 年轻大鼠第3, 11代骨髓间充质干细胞来源外泌体 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo) 的透射电镜图像  
Figure 3 | Transmission electron microscopy images of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells of young rats at passages 3 and 11 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo)

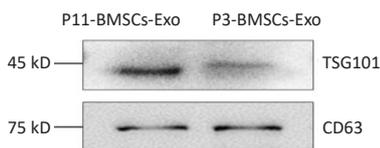
体干预后, 老龄大鼠骨髓间充质干细胞内 β-半乳糖苷酶活性明显降低, 视野中阳性细胞数明显减少, 阳性细胞的细胞核颜色较浅, 见图 11。

2.12 第3代骨髓间充质干细胞来源外泌体逆转老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老相关信号 利用 Small RNA 测序比较两种外泌体处理后老龄大鼠骨髓间充质干细胞内 miRNA 表达的差异, 在 Fold Change  $\geq 2$ ,  $P < 0.05$  的条



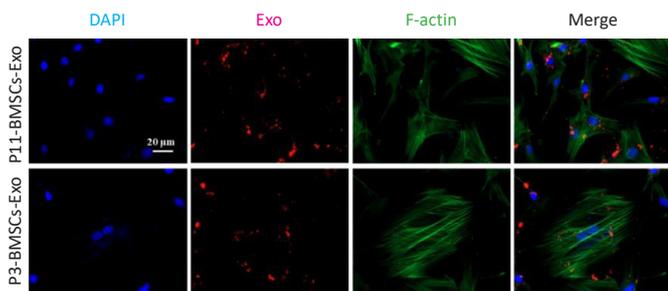
图注: 两种外泌体的粒径均主要分布在 150 nm 左右, 检测结果呈现单峰。  
图 4 | 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo) 的粒径大小

Figure 4 | Particle size of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells of young rats at passages 3 and 11 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo)



图注: 两种外泌体均表达 CD63 和 TSG101。  
图 5 | 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo) 的标志蛋白表达

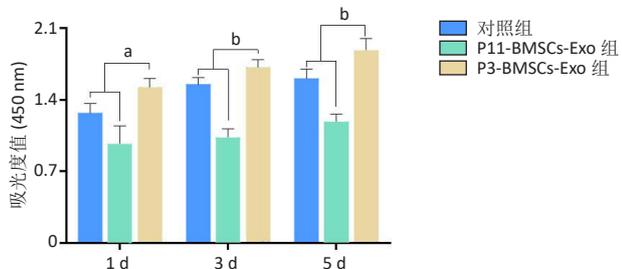
Figure 5 | Expression of marker proteins in exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells of young rats at passages 3 and 11 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo)



图注: 共孵育 12 h 后, 两种外泌体均被老龄大鼠骨髓间充质干细胞摄取, 并且在细胞内和细胞核周围聚集。

图 6 | 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo) 能够被老龄大鼠骨髓间充质干细胞内化

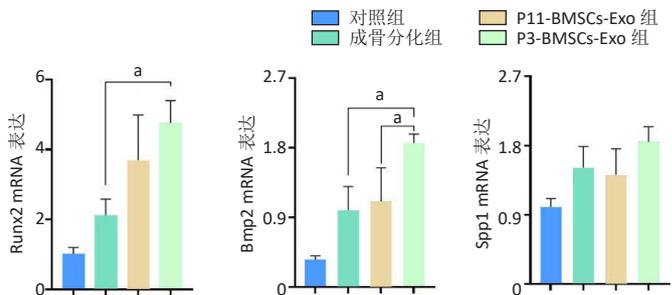
Figure 6 | Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells of young rats at passages 3 and 11 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo) are able to be internalized by aged rat bone marrow mesenchymal stem cells



图注: <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01。P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo: 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体。

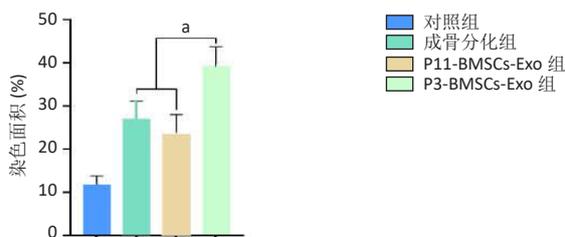
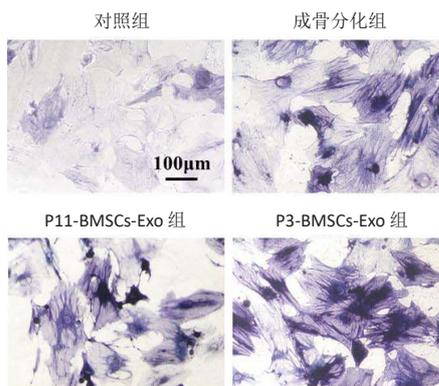
图 7 | 各组老龄大鼠骨髓间充质干细胞增殖情况

Figure 7 | Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in aged rats in each group



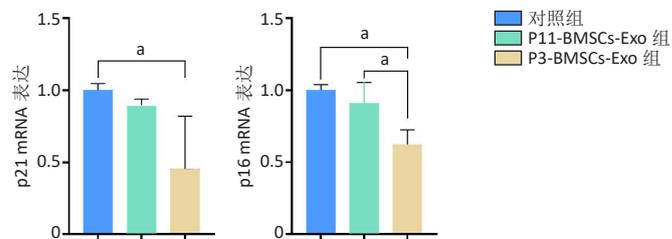
图注: 与成骨分化组和 P11-BMSCs-Exo 组相比, P3-BMSCs-Exo 组成骨相关基因 Runx2、Bmp2 和 Spp1 的表达均上调。<sup>a</sup>P < 0.05。P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo: 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体。

图 8 | 各组老龄大鼠骨髓间充质干细胞中成骨相关基因 Runx2、Bmp2 和 Spp1 的表达  
Figure 8 | Expression of osteogenesis-related genes Runx2, Bmp2, and Spp1 in bone marrow mesenchymal stem cells-derived osteoblasts of aged rats from various groups



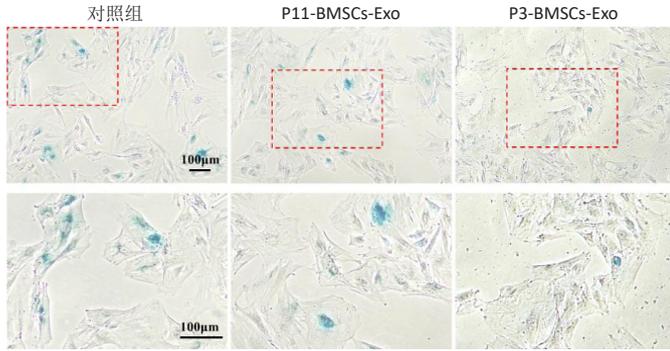
图注: 与成骨分化组和 P11-BMSCs-Exo 组相比, P3-BMSCs-Exo 组老龄大鼠骨髓间充质干细胞内碱性磷酸酶的表达上调。<sup>a</sup>P < 0.05。P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo: 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体。

图 9 | 各组老龄大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化后的碱性磷酸酶染色  
Figure 9 | Alkaline phosphatase staining of bone marrow mesenchymal stem cells from aged rats in each group after osteogenic differentiation



图注: <sup>a</sup>P < 0.05。P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo: 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体。

图 10 | 各组老龄大鼠骨髓间充质干细胞内衰老相关基因 p21、p16 的表达  
Figure 10 | Expression of aging-related genes p21 and p16 in bone marrow mesenchymal stem cells of aged rats in each group



图注：加入 P3-BMSCs-Exo 干预后，视野中阳性细胞数明显减少，阳性细胞的细胞核颜色较浅，说明老龄大鼠骨髓间充质干细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性明显降低。下图为红色虚线框的高倍镜图。P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo: 年轻大鼠第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体。

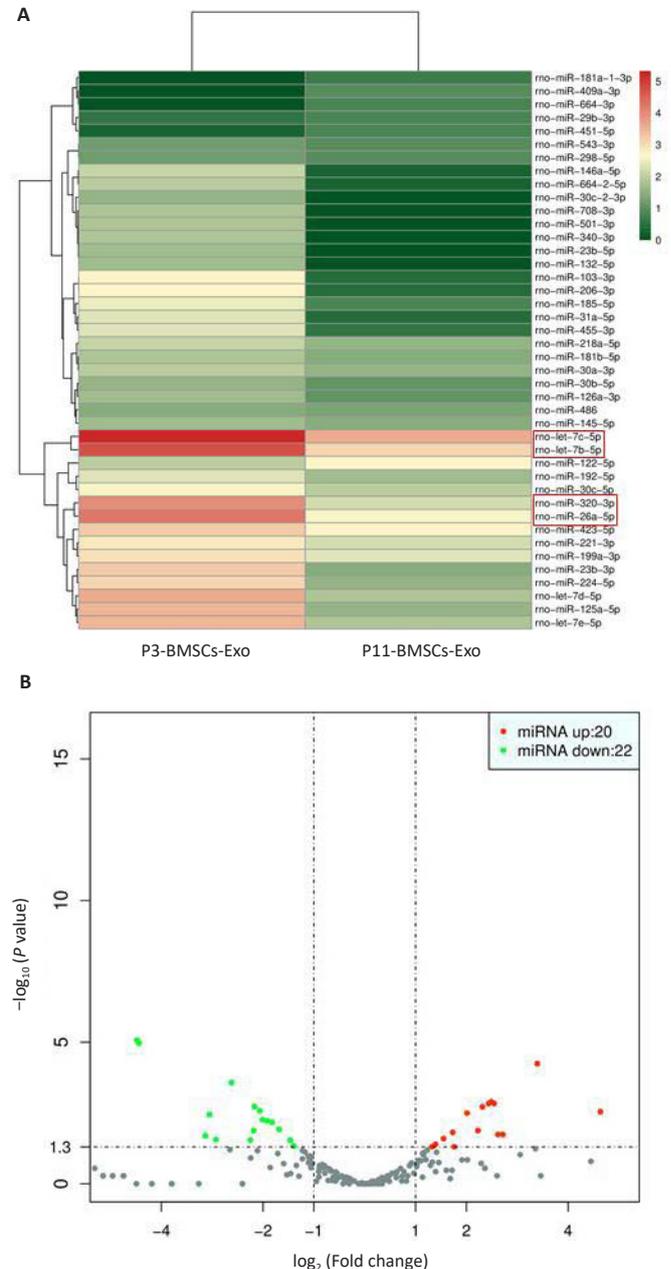
图 11 | 各组老龄大鼠骨髓间充质干细胞内  $\beta$ -半乳糖苷酶活性

Figure 11 |  $\beta$ -Galactosidase activity in bone marrow mesenchymal stem cells of aged rats in each group

件下，筛选具有显著性差异的 miRNA，通过 Targetscan 8.0 寻找具有显著性表达差异的 miRNA 的靶基因，筛选靶基因中与细胞衰老调控相关的基因，结合 KEGG 分析结果，将靶基因所在细胞通路 KEGG 分析结果对应，结果显示 mTOR、AMPK 等衰老相关信号通路均有显著性差异 miRNA 富集，这表明第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体内部存在衰老调控相关的 miRNA，见图 12A。火山图显示，与第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体相比，第 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体中表达上调的 miRNA 有 20 个，表达下调的 miRNA 有 22 个，见图 12B。热图显示第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体中显著上调的 miRNA 是 let-7c-5p、let-7b-5p、miR-320-3p 和 miR-26a-5p，进一步寻找上述 miRNA 的靶基因，分析其所在信号通路。通过 GO 分析结果表明，两种外泌体内的差异性 miRNA 与细胞膜运动、生长因子运输、DNA 结合及转录等重要细胞学作用相关，见图 13。

### 3 讨论 Discussion

伴随老龄化程度加剧，衰老所致的老龄化骨缺损更难自然愈合，引起一系列并发症<sup>[2, 29]</sup>。目前针对老龄化骨缺损的治疗方案存在手术预后差、治疗效率低等问题，同时原发性骨质疏松常伴有骨髓间充质干细胞衰老、再生能力和成骨分化能力减弱<sup>[30-31]</sup>，体外移植骨髓间充质干细胞疗法存在排斥反应、恶性表型转化、肿瘤风险增加等问题，治疗效果不理想。而外泌体作为无细胞疗法之一具有免疫原性低等特点，已有研究表明体外注射外泌体能够避免体外移植骨髓间充质干细胞存在的系列问题，有效治疗骨质疏松，在此研究基础上该实验探究年轻骨髓间充质干细胞来源外泌体对老龄大鼠骨髓间充质干细胞生物学特性的影响及其分子机制<sup>[3, 32-33]</sup>。实验提取第 3 代和第 11 代大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体，与老龄大

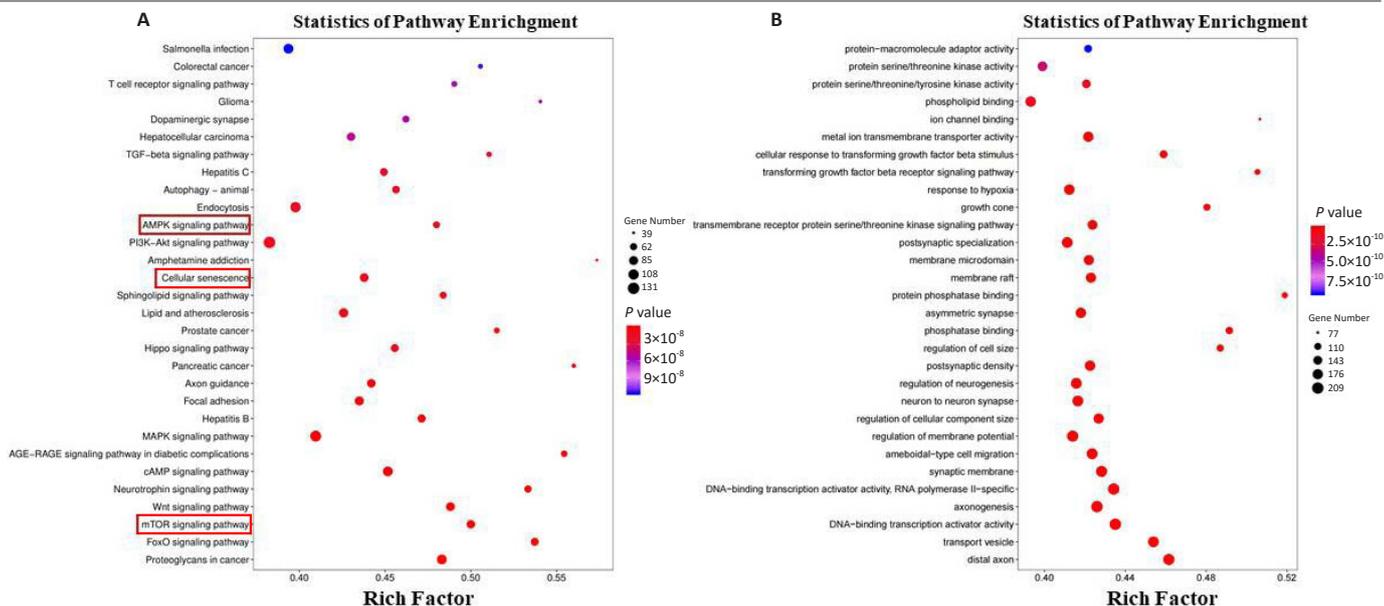


图注：热图和火山图显示具有显著性差异的 miRNA。图 A 热图结果显示两种外泌体内具有显著性差异的 miRNA；B 火山图显示两种外泌体内具有显著性差异的 miRNA。

图 12 | 第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo) 内差异表达的 miRNA

Figure 12 | Differentially expressed microRNAs within exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells at passages 3 and 11 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo)

鼠骨髓间充质干细胞共培养后观察其衰老情况，同时利用 Small RNA 测序比较两种外泌体内 miRNA 的表达差异。利用外泌体作为治疗主体，采用无细胞疗法，很大程度上避免了干细胞治疗带来的恶性表型转化、排斥反应等问题，与 PEG4000 共沉淀法相比，采用超高速离心的方法提取出来的外泌体，杂蛋白少，纯度更高，提高后续实验的准确性<sup>[34]</sup>。通过透射电镜、纳米颗粒分析技术和 Western blot 完成了两种外泌体外表征，符合 2014 年和 2018 年国际细胞外囊泡学会 (MISEV2018) 提出的外泌体应满足的



图注：图 A 为 KEGG 分析显示两种外泌体内 Cellular Senescence、mTOR、AMPK 等衰老相关信号通路存在显著差异；B 为 GO 分析筛选出两种外泌体内差异 miRNA 靶基因的生物学功能富集结果。

图 13 | 第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo) 内具有显著性差异的信号通路和生物功能  
Figure 13 | Signaling pathways and biological functions with significant differences within exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells of young rats at passages 3 and 11 (P3-BMSCs-Exo, P11-BMSCs-Exo)

基本要求指南<sup>[35-36]</sup>。外泌体作为细胞间信号传递载体，其内部含有分泌细胞的 mRNA、miRNA、脂质和蛋白质，能够通过运输上述物质实现细胞信号调节<sup>[33, 37]</sup>，改变靶细胞的生物活性，因此其内部的 RNA、蛋白质等活性分子是调节靶细胞生物学行为的重要信号<sup>[38-39]</sup>。有研究使用蛋白质组学分析证明年轻与老龄骨细胞来源外泌体内蛋白差异显著，年轻骨细胞来源外泌体能够在骨脑轴上转移保护因子来拯救脑损伤<sup>[40]</sup>。而骨髓间充质干细胞来源外泌体已在各种损伤模型中显示出再生潜力，例如心肌梗死和急性肾损伤<sup>[31]</sup>。在骨组织中，骨髓间充质干细胞来源外泌体可以通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路，治疗辐射所致的骨质流失<sup>[25]</sup>。因此该实验采用年轻大鼠不同代数骨髓间充质干细胞来源外泌体作为治疗载体，探究其逆转衰老的能力。

该研究采用第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体与老龄大鼠骨髓间充质干细胞共培养后，观察两种外泌体对老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老的影响。老龄大鼠骨髓间充质干细胞呈现出增殖活性下降、成骨分化受损、骨生成速度减缓等衰老细胞特征<sup>[41-42]</sup>。YANG 等<sup>[43]</sup>研究表明人骨髓间充质干细胞体外多次传代后，p16 基因表达上调， $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞数量增加。该实验通过  $\beta$ -半乳糖苷酶染色发现，第 11 代骨髓间充质干细胞的  $\beta$ -半乳糖苷酶阳性细胞数量较多，细胞核蓝染程度与第 3 代骨髓间充质干细胞相比明显加深，说明第 11 代骨髓间充质干细胞处于衰老状态，因此提取第 3, 11 代骨髓间充质干细胞来源外泌体用于后续实验。

miRNA 是内源性小非编码 RNA，通过与靶信使 RNA(mRNA) 上的部分互补位点结合而发挥转录后抑制因子的作用。外泌体作为 miRNA 的载体，利用其表面分子、内吞体分类复合物以及 miRNA 本身的特定结合基序，能够在不同细胞间运输转移，实现自身基因调控作用<sup>[44]</sup>。目前，针对外泌体逆转骨髓间充质干细胞衰老的机制研究主要集中在 miRNA 和蛋白表达差异，QIU 等<sup>[45]</sup>对卵巢切除大鼠的体内外实验表明，骨髓间充质干细胞来源外泌体内的 miR-150-3p 能促进成骨细胞增殖和分化，为骨质疏松患者的治疗提供新的线索。同时有研究发现骨髓间充质干细胞来源外泌体内的 MALAT1 通过上调 SATB2 表达增强骨质疏松小鼠成骨细胞的活性，提示了外泌体在骨质疏松症中的治疗潜力<sup>[46]</sup>。该研究的一系列体外实验证明第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体能够逆转老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老，采用 Small RNA 测序比较两种外泌体内 miRNA 表达差异，最终测序结果显示，第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体中具备显著性差异的 miRNA 是 let-7c-5p、let-7b-5p、rno-miR-320-3p 和 miR-26a-5p。KEGG 分析显示差异靶基因富集的信号通路包含 Cellular Senescence、mTOR、AMPK 等衰老相关信号通路，其中 mTOR 信号和 AMPK 信号之间在相互抑制的情况下，共同形成细胞衰老和进化的调节网络<sup>[47]</sup>。

该研究仍存在很多不足之处：①尚未完善第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体发挥逆转老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老的分子机制研究；②第 3 代骨髓间充质干细胞来源外泌体在体外发挥了稳定的逆转老龄大鼠骨髓

间充质干细胞衰老的效果, 该治疗效果需要进一步在体内验证, 但外泌体体内应用存在无法缓释、易被清除的问题, 需要设计相关生物材料为其提供缓释载体, 将会在后续实验中进一步补充说明。

**作者贡献:** 张熊劲夫负责实验实施、实验数据分析处理、论文撰写, 张熊劲夫、陈奕达、程歆怡负责细胞培养、指标检测, 张熊劲夫、刘岱琿负责数据和文章的校对, 张熊劲夫、程歆怡负责实验设计。

**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。

**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。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写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》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

## 4 参考文献 References

[1] CAO Y, RUAN J, KANG J, et al. Extracellular Vesicles in Infrapatellar Fat Pad from Osteoarthritis Patients Impair Cartilage Metabolism and Induce Senescence. *Adv Sci (Weinh)*. 2024;11(3):e2303614.

[2] PARTRIDGE L, DEELEN J, SLAGBOOM PE. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*. 2018;561(7721):45-56.

[3] BEHR LC, SIMM A, KLUTTIG A, et al. 60 years of healthy aging: On definitions, biomarkers, scores and challenges. *Ageing Res Rev*. 2023;88:101934.

[4] REID IR. A broader strategy for osteoporosis interventions. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(6):333-339.

[5] BONE HG, WAGMAN RB, BRANDI ML, et al. 10 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the phase 3 randomised FREEDOM trial and open-label extension. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(7):513-523.

[6] BLACK DM, ROSEN CJ. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2016;374(3):254-262.

[7] AREECKAL AS, KOCHER M, S SD. Current and Emerging Diagnostic Imaging-Based Techniques for Assessment of Osteoporosis and Fracture Risk. *IEEE Rev Biomed Eng*. 2019;12:254-268.

[8] QIN L, LIU W, CAO H, et al. Molecular mechanosensors in osteocytes. *Bone Res*. 2020;8:23.

[9] BUNPETCH V, ZHANG ZY, ZHANG X, et al. Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration. *Biomaterials*. 2019;196:67-79.

[10] KIERNAN J, DAVIES JE, STANFORD WL. Concise Review: Musculoskeletal Stem Cells to Treat Age-Related Osteoporosis. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(10):1930-1939.

[11] WANG Z, GOH J, DAS DE S, et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng*. 2006;12(7):1753-1761.

[12] HAN W, YU Y, LIU XY. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell Res*. 2006;16(2):189-195.

[13] LI F, ZHOU C, XU L, et al. Effect of Stem Cell Therapy on Bone Mineral Density: A Meta-Analysis of Preclinical Studies in Animal Models of Osteoporosis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149400.

[14] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478):eaau6977.

[15] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17.

[16] REN R, TAN XH, ZHAO JH, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome uptake and retrograde transport can occur at peripheral nerve endings. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):2918-2929.

[17] YING C, WANG R, WANG Z, et al. BMSC-Exosomes Carry Mutant HIF-1 $\alpha$  for Improving Angiogenesis and Osteogenesis in Critical-Sized Calvarial Defects. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:565561.

[18] BEI HP, HUNG PM, YEUNG HL, et al. Bone-a-Petite: Engineering Exosomes towards Bone, Osteochondral, and Cartilage Repair. *Small*. 2021;17(50):e2101741.

[19] YANG D, ZHANG W, ZHANG H, et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation- efforts for efficient exosome-based therapeutics. *Theranostics*. 2020;10(8):3684-3707.

[20] YU W, HURLEY J, ROBERTS D, et al. Exosome-based liquid biopsies in cancer: opportunities and challenges. *Ann Oncol*. 2021;32(4):466-477.

[21] FAFIÁN-LABORA JA, RODRÍGUEZ-NAVARRO JA, O'LOGHLEN A. Small Extracellular Vesicles Have GST Activity and Ameliorate Senescence-Related Tissue Damage. *Cell Metab*. 2020;32(1):71-86.e5.

[22] ZHANG S, CHUAH SJ, LAI RC, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*. 2018;156:16-27.

[23] ZHOU B, XU K, ZHENG X, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):144.

[24] HU N, CAI Z, JIANG X, et al. Hypoxia-pretreated ADSC-derived exosome-embedded hydrogels promote angiogenesis and accelerate diabetic wound healing. *Acta Biomater*. 2023;157:175-186.

[25] RUAN Y, KATO H, TAGUCHI Y, et al. Irradiation by high-intensity red light-emitting diode enhances human bone marrow mesenchymal stem cells osteogenic differentiation and mineralization through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Lasers Med Sci*. 2021;36(1):55-65.

[26] BHUJEL B, SHIN HE, CHOI DJ, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Intervertebral Disc Regeneration: Review. *Int J Mol Sci*. 2022;23(13):7306.

[27] AGUAYO-MAZZUCATO C, ANDLE J, LEE TB JR, et al. Acceleration of  $\beta$  Cell Aging Determines Diabetes and Senolysis Improves Disease Outcomes. *Cell Metab*. 2019;30(1):129-142.e4.

[28] JIN S, WANG Y, WU X, et al. Young Exosome Bio-Nanoparticles Restore Aging-Impaired Tendon Stem/Progenitor Cell Function and Reparative Capacity. *Adv Mater*. 2023;35(18):e2211602.

[29] XIAO Y, XIE X, CHEN Z, et al. Advances in the roles of ATF4 in osteoporosis. *Biomed Pharmacother*. 2023;169:115864.

[30] MORA-RAIMUNDO P, LOZANO D, MANZANO M, et al. Nanoparticles to Knockdown Osteoporosis-Related Gene and Promote Osteogenic Marker Expression for Osteoporosis Treatment. *ACS Nano*. 2019;13(5):5451-5464.

[31] HU Y, TIAN H, CHEN W, et al. The Critical Role of The Piezo1/ $\beta$ -catenin/ATF4 Axis on The Stemness of Gli1+ BMSCs During Simulated Microgravity-Induced Bone Loss. *Adv Sci (Weinh)*. 2023;10(32):e2303375.

[32] ANKRUM JA, ONG JF, KARP JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol*. 2014;32(3):252-260.

[33] ROMBOUTS WJ, PLOEMACHER RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. 2003;17(1):160-170.

[34] YÁÑEZ-MÓ M, SILJANDER PR, ANDREU Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.

[35] THÉRY C, WITWER KW, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):153750.

[36] WITWER KW, THÉRY C. Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1648167.

[37] ZHA Y, LI Y, LIN T, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects. *Theranostics*. 2021;11(1):397-409.

[38] HAN C, SUN X, LIU L, et al. Exosomes and Their Therapeutic Potentials of Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7653489.

[39] WU J, KUANG L, CHEN C, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis. *Biomaterials*. 2019;206:87-100.

[40] JIANG YL, WANG ZX, LIU XX, et al. The Protective Effects of Osteocyte-Derived Extracellular Vesicles Against Alzheimer's Disease Diminished with Aging. *Adv Sci (Weinh)*. 2022;9(17):e2105316.

[41] PLAKHOVA N, PANAGOPOULOS V, VANDYKE K, et al. Mesenchymal stromal cell senescence in haematological malignancies. *Cancer Metastasis Rev*. 2023;42(1):277-296.

[42] BRUDER SP, JAISWAL N, HAYNESWORTH SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997;64(2):278-294.

[43] YANG YK, OGANDO CR, WANG SEE C, et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):131.

[44] THIND A, WILSON C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:31292.

[45] QIU M, ZHAI S, FU Q, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomal MicroRNA-150-3p Promotes Osteoblast Proliferation and Differentiation in Osteoporosis. *Hum Gene Ther*. 2021;32(13-14):717-729.

[46] YANG X, YANG J, LEI P, et al. LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis. *Ageing (Albany NY)*. 2019;11(20):8777-8791.

[47] GONZÁLEZ A, HALL MN, LIN SC, et al. AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metab*. 2020;31(3):472-492.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)

## 年轻大鼠骨髓间充质干细胞来源外泌体逆转老龄大鼠骨髓间充质干细胞衰老 文章特色分析

### 一、文章重要性

#### 1. 科学问题聚焦明确：

- 文章聚焦于骨质疏松这一与衰老密切相关的重大健康问题，特别是骨髓间充质干细胞衰老在其中的关键作用。

- 揭示了年轻 BMSCs 来源的外泌体具有逆转老龄 BMSCs 衰老的潜力，为抗衰老治疗和骨质疏松的无细胞治疗策略提供了新思路。

#### 2. 临床转化潜力：

- 外泌体作为无细胞治疗工具，具有低免疫原性、高稳定性、易储存运输等优势，有望规避干细胞移植的肿瘤风险、排斥反应等问题，具有较高的临床应用前景。

### 二、文章创新性特色

#### 1. 研究视角新颖：

- 不仅比较了年轻与老龄 BMSCs 的差异，还进一步比较了不同传代次数（P3 vs P11）的年轻 BMSCs 来源外泌体的功能差异，突出了细胞“年轻态”对外泌体功能的影响。

#### 2. 方法系统、机制初探：

- 结合了细胞功能实验（增殖、成骨分化、衰老染色）与分子生物学手段（Small RNA 测序、KEGG/GO 分析），系统评估外泌体功能并初步探索其作用机制。

- 发现 P3-BMSCs-Exo 中高表达的 let-7c-5p、let-7b-5p、miR-320-3p、miR-26a-5p 等 miRNA，及其富集的 mTOR、AMPK 等衰老相关通路，为后续机制研究提供了靶点。

#### 3. 提出“外泌体作为衰老逆转载体”的概念：

- 明确了年轻 BMSCs-Exo 可作为生物学信息载体，传递“年轻信号”至衰老细胞，逆转其衰老表型。

### 三、对学科的启示

#### 1. 拓展了外泌体在骨代谢与衰老研究中的应用：

- 强化了外泌体作为细胞间通讯媒介在骨组织工程与再生医学中的地位。

- 提示未来可基于外泌体 miRNA 谱开发衰老相关疾病的生物标志物或治疗靶点。

#### 2. 推动“无细胞治疗”策略发展：

- 为开发基于外泌体的抗衰老、抗骨质疏松治疗产品提供了实验依据。

- 启示研究者关注细胞来源、状态、传代次数对外泌体功能的影响，优化外泌体治疗策略。

#### 3. 促进多学科交叉研究：

- 结合细胞生物学、分子生物学、生物信息学、材料学（如外泌体递送系统），推动骨衰老研究的深入与转化。

### 总结

该文章通过系统实验证明：年轻、低代次的 BMSCs 来源外泌体具有逆转老龄 BMSCs 衰老的能力，其作用机制可能与特定 miRNA 及其调控的衰老相关信号通路（如 mTOR、AMPK）有关。研究不仅具有重要的理论价值，也为骨质疏松及其他衰老相关疾病的治疗提供了新的无细胞策略，具有显著的创新性和学科引领性。