

• 干细胞与组织工程 •

负载内皮祖细胞外泌体的改性钛对脂肪来源干细胞成骨及成血管分化作用的研究



王静, 唐亮, 刘洪利, 邱严力

沧州医学高等专科学校口腔系(河北沧州 061001)

【摘要】 目的 探讨经超声酸蚀/阳极氧化联合改性钛(titanium modified by ultrasonic acid etching/anodic oxidation, UAT)负载内皮祖细胞外泌体(endothelial progenitor cells-exosome, EPCs-exo)后,对脂肪来源干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)生长以及成骨、成血管分化的影响。方法 取10只SD大鼠脂肪组织及骨髓,分别采用胶原酶消化法和密度梯度离心法分离培养ADSCs及EPCs,并经流式细胞仪鉴定。取第3~5代EPCs采用试剂盒提取exo,并经Western blot检测CD9、CD81进行鉴定。采用超声酸蚀和阳极氧化方法对3D打印技术制备的钛片进行联合改性制备UAT,扫描电镜观察改性前后材料表面形貌;将UAT分别置于不同浓度(100、200 ng/mL)EPCs-exo溶液中,采用BCA法检测其体外吸附及释放EPCs-exo能力。然后,将UAT置于含不同浓度EPCs-exo(0、100、200 ng/mL)的DMEM培养液,并与第3代ADSCs复合培养,构建UAT-ADSCs-exo。通过激光共聚焦显微镜观察细胞形态、活/死细胞染色、细胞增殖检测,评价生物相容性;ALP染色及茜素红染色,RT-PCR检测成骨相关基因骨钙素(osteocalcin, OCN)、RUNT相关基因2(RUNT-related transcription factor 2, Runx2)、ALP、I型胶原蛋白(collagen type 1, COL-1)和成血管相关基因VEGF,免疫荧光染色观测成骨(OCN)及成血管(VEGF)相关蛋白表达,评价负载EPCs-exo的UAT对ADSCs成骨、成血管分化能力的影响。结果 扫描电镜观察示改性后UAT表面形成了微纳米多级复合结构;UAT 48 h内能吸附约77% EPCs-exo,而吸附在UAT表面的EPCs-exo在8 d内呈连续稳定释放,200 ng/mL组吸附及释放量明显优于100 ng/mL组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。生物相容性检测示,复合培养后各组细胞均生长良好,其中200 ng/mL组优于其他组,细胞完全铺展,有丰富伪足,活细胞数量及细胞活性均高于其他组($P<0.05$)。ADSCs成骨和成血管能力检测示,与其余两组比较,200 ng/mL组ADSCs的ALP活性和矿化能力增强,成骨和成血管基因OCN、Runx2、COL-1、ALP和VEGF表达均增高,OCN和VEGF蛋白亦增高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 EPCs-exo能有效促进UAT表面ADSCs的黏附、增殖及成骨、成血管分化,其中浓度为200 ng/mL时效果最显著。

【关键词】 改性钛;脂肪来源干细胞;内皮祖细胞;外泌体;成骨分化;成血管分化

Effect of modified titanium loaded with endothelial progenitor cells-exosomes on osteogenic and angiogenic differentiations of adipose-derived stem cells

WANG Jing, TANG Liang, LIU Hongli, QIU Yanli

Department of Stomatology, Cangzhou Medical College, Cangzhou Hebei, 061001, P. R. China

Corresponding author: QIU Yanli, Email: 1304175265@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of titanium modified by ultrasonic acid etching/anodic oxidation (UAT) loaded with endothelial progenitor cells-exosome (EPCs-exo) on proliferation and osteogenic and angiogenic differentiations of adipose-derived stem cells (ADSCs). **Methods** The adipose tissue and bone marrow of 10 Sprague Dawley rats were harvested. Then the ADSCs and EPCs were isolated and cultured by collagenase digestion method and density gradient centrifugation method, respectively, and identified by flow cytometry. Exo was extracted from the 3rd to 5th generation EPCs using extraction kit, and CD9 and CD81 were detected by Western blot for identification. The three-dimensional printed titanium was modified by ultrasonic acid etching and anodic oxidation to prepare the UAT. The surface characteristics of UAT before and after modification was observed by scanning electron microscopy; UAT was placed in EPCs-exo solutions of different concentrations (100, 200 ng/mL), and the *in vitro* absorption and release

DOI: 10.7507/1002-1892.202203132

基金项目:沧州市重点研发计划自筹项目(213107003)

通信作者:邱严力, Email: 1304175265@qq.com

capacity of EPCs-exo was detected by BCA method. Then, UAT was placed in DMEM medium containing different concentrations of EPCs-exo (0, 100, 200 ng/mL), and co-cultured with the 3rd generation ADSCs to construct UAT-ADSCs-exo. Cell morphology by laser confocal microscopy, live/dead cell staining, and cell proliferation were observed to evaluate biocompatibility; alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining, RT-PCR detection of osteogenesis-related genes [osteocalcin (OCN), RUNT-related transcription factor 2 (Runx2), ALP, collagen type 1 (COL-1)] and angiogenesis-related gene [vascular endothelial growth factor (VEGF)], immunofluorescence staining for osteogenesis (OCN)- and angiogenesis (VEGF)-related protein expression were detected to evaluate the effect on the osteogenic and angiogenic differentiation ability of ADSCs. **Results** Scanning electron microscopy showed that micro-nano multilevel composite structures were formed on the surface of UAT. About 77% EPCs-exo was absorbed by UAT within 48 hours, while EPCs-exo absorbed on the surface of UAT showed continuous and stable release within 8 days. The absorption and release amount of 200 ng/mL group were significantly higher than those of 100 ng/mL group ($P < 0.05$). Biocompatibility test showed that the cells in all concentration groups grew well after culture, and the 200 ng/mL group was better than the other groups, with fully spread cells and abundant pseudopodia, and the cell count and cell activity were significantly higher than those in the other groups ($P < 0.05$). Compared with the other groups, 200 ng/mL group showed enhanced ALP activity and mineralization ability, increased expressions of osteogenic and angiogenic genes (OCN, Runx2, COL-1, ALP, and VEGF), as well as increased expressions of OCN and VEGF proteins, with significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** EPCs-exo can effectively promote the adhesion, proliferation, and osteogenic and angiogenic differentiation of ADSCs on UAT surface, the effect is the most significant when the concentration is 200 ng/mL.

【Key words】 Modified titanium; adipose-derived stem cells; endothelial progenitor cells; exosome; osteogenic differentiation; angiogenic differentiation

Foundation item: Cangzhou Key Research and Development Plan Self-Funded Project (213107003)

金属钛是目前应用比较广泛的骨科替代材料^[1], 但该材料具有生物惰性, 难以与骨组织直接结合, 而骨结合不良是临床植入物松动、脱落以及周围组织发炎的主要原因^[2]。因此, 对金属钛进行改性, 提高其生物活性和骨结合能力具有重要意义^[3]。本课题组前期成功制备了超声酸蚀/阳极氧化联合改性钛 (titanium modified by ultrasonic acid etching/anodic oxidation, UAT), 体外实验证实改性后的材料生物活性和亲水性明显提高, 能促进细胞增殖、黏附和成骨分化, 但成血管能力并不理想^[4]。而材料植入体内后, 如果周围血管长入速度过慢或达不到内层, 会导致血液循环障碍, 使成骨效果不稳定, 因此需要对 UAT 进一步优化。

外泌体 (exosome, exo) 是细胞分泌的一种囊泡结构, 含有多种蛋白质、信使 RNA、微小 RNA 及细胞因子, 是细胞旁分泌的关键组分, 可参与细胞间的通信及调控^[5-6]。近期研究发现, 内皮祖细胞 exo (endothelial progenitor cells-exo, EPCs-exo) 可促进细胞增殖、迁移及血管生成, 有效提高血管密度, 进而加快骨再生进程^[7-8]。本研究旨在将 UAT 负载 EPCs-exo 进行进一步改性, 研究改性后材料对脂肪来源干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 成骨和成血管分化能力的影响。报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂、仪器

6~8 周龄雄性 SD 大鼠 10 只, 体质量约 250 g, 购于河北省实验动物中心。

DMEM、FBS、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、I 型胶原酶 (GIBCO 公司, 美国); 内皮细胞培养基 (endothelial cell medium, ECM; Science 公司, 美国); M199 (Therm 公司, 美国); Percoll 淋巴细胞分离液 (General Electric 公司, 美国); exo 提取试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒、ALP 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit 8, CCK-8; 武汉博士德生物工程有限公司); 单克隆抗体 CD29、CD90、CD34、CD133 (Abcam 公司, 美国); 活/死细胞染色试剂盒 (南京凯基生物科技股份有限公司); 茜素红染色试剂盒、鬼笔环肽 (北京索莱宝科技有限公司); RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒 (北京天根生化科技有限公司)。

扫描电镜 (ZEISS 公司, 德国); 激光共聚焦显微镜 (Andor 公司, 英国); 流式细胞仪 (Milipore 公司, 美国); 酶标仪 (Molecular Devices 公司, 美

国); 实时荧光定量 PCR 仪、CO₂ 培养箱 (Thermo 公司, 美国)。

1.2 ADSCs 培养及鉴定

采用颈椎脱臼法处死 10 只大鼠, 分离腹股沟及附睾周围脂肪组织, 加入达脂肪组织体积 2 倍的 0.1% I 型胶原酶, 37℃ 消化 60 min, 200 目筛网过滤; 以 1200×g 离心 10 min; 弃上清, DMEM 重悬细胞后, 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养并传代。取第 3 代 ADSCs, 胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10⁸ 个/mL。取 200 μL 细胞悬液加入 5 μL CD29、2 μL CD90 荧光抗体, 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

1.3 EPCs-exo 提取及鉴定

取 1.2 处死大鼠的胫骨和股骨, D-Hank 液反复冲洗骨髓腔并收集骨髓, 以 1500×g 离心 5 min, M199 重悬细胞, 加入等体积 Percoll 淋巴细胞分离液, 以 1500×g 离心 15 min; 吸取中间白膜层单核细胞, 调整细胞密度为 1×10⁹ 个/L, 接种于含 ECM 的培养瓶中, 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养并传代。取第 3 代 EPCs, 采用流式细胞仪检测 CD34、CD133 表达。

取第 3~5 代 EPCs 提取 exo, PBS 清洗细胞后更换无血清培养基培养 48 h。收集细胞上清液, 4℃ 以 3000×g 离心 20 min; 去除细胞和碎片, 将上清液转移至超速离心管中, 加入 1/2 体积的 exo 提取试剂, 混匀, 4℃ 孵育过夜。取出离心管, 于 4℃ 以 10000×g 离心 60 min; 弃上清, 无菌 PBS 重悬, 获得 EPCs-exo。取 EPCs-exo 行 Western blot 检测 CD9、CD81 表达。

1.4 UAT 制备及观察

1.4.1 UAT 制备 取本课题组前期采用 3D 打印技术制备的钛片^[4], 室温下置于蚀刻溶液 (2% 氢氟酸及 1.8% 盐酸混合液) 5 min。将酸蚀后的钛片作为阳极、铂片作为阴极, 两极以间距 40 mm 置于含 0.25% 氢氟酸、2% 去离子水的乙二醇溶液进行阳极氧化, 磁力搅拌器匀速搅拌; 氧化条件: 氧化电压为 15 V 恒定直流电压, 氧化时间 1 h^[4]; 获得 UAT。

1.4.2 观测指标 ① UAT 表征: 扫描电镜下观察经超声酸蚀和阳极氧化方法改性前后的样品表面形貌。

② UAT 体外吸附和释放 EPCs-exo 能力检测: 采用 PBS 溶液制备不同浓度 (100、200 ng/mL) EPCs-exo 溶液, 然后放置 UAT, 于 2、4、8、12、24、48 h 采用 BCA 法检测溶液中 EPCs-exo 含量, 评价 UAT 吸附 EPCs-exo 能力。

将上述步骤中放置 48 h 吸附 EPCs-exo 的 UAT 置于 24 孔板中, 加入 200 μL PBS 溶液, 于 0、2、4、6、8 d 收集培养液并更换 200 μL 新鲜 PBS 溶液, 采用 BCA 法检测各时间点培养液中 EPCs-exo 含量, 计算累积释放率 (%), 评价 UAT 释放 EPCs-exo 能力。

1.5 UAT-ADSCs-exo 构建及观测

1.5.1 UAT-ADSCs-exo 构建 将 UAT 置于 24 孔板中, 分别加入 1 mL 含不同浓度 EPCs-exo (0、100、200 ng/mL) 的 DMEM 培养液, 于 37℃、5%CO₂ 条件下孵育 48 h, 使 EPCs-exo 吸附于 UAT 表面后, 将其转至新 24 孔板内, 每孔 1 个。取 ADSCs 调整细胞密度为 2×10⁴ 个/mL, 按照每孔 1 mL 将细胞悬液滴至 UAT 表面, 开始复合培养 UAT-ADSCs-exo, 并在相应时间点进行后续观测。

1.5.2 生物相容性检测 ① 细胞形态观察: 复合培养 7 d, 各组取部分样品 PBS 清洗、多聚甲醛固定 15 min、含 0.5% Triton X-100 的 PBS 溶液室温下透膜处理 10 min, FITC 标记鬼笔环肽液室温染色 20 min, Hoechst 33258 复染 15 min, 激光共聚焦显微镜下观察细胞形态。

② 活/死细胞染色检测: 复合培养 7 d, 各组取部分样品 PBS 清洗后, 按照活/死细胞染色试剂盒说明书配制工作液并加入孔板中, 室温孵育 30 min, 激光共聚焦显微镜下观察活/死细胞情况, 绿色荧光为活细胞、红色荧光为死细胞。每个样品取 5 个视野, 用 Image J 软件计数活细胞。

③ 细胞增殖检测: 复合培养 1、3、5、7 d, 各组加入 10% CCK-8 溶液孵育 2 h, 使用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度 (A) 值。

1.5.3 ADSCs 成骨和成血管能力观测 ① ALP 染色及茜素红染色: 复合培养 7 d, 各组 4% 多聚甲醛固定 2 min, 加入 ALP 染色试剂室温避光孵育 15 min, 观察细胞染色情况; 另复合培养 7、14 d 时按 ALP 试剂盒说明书操作, 检测细胞 ALP 活性。复合培养 21 d 行茜素红染色, 用 10% 氯化十六烷基吡啶溶解后, 酶标仪测定 562 nm 波长处 A 值, 观察其矿化能力。各组均取 3 孔进行上述观测。

② 成骨及成血管相关基因检测: 复合培养 14 d, 用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 测定浓度, 按逆转录试剂盒与 RT-PCR 试剂盒进行逆转录与多聚酶联反应, 分析成骨相关基因骨钙素 (osteocalcin, OCN)、RUNT 相关基因 2 (RUNT-related transcription factor 2, Runx2)、ALP、I 型胶原蛋白 (collagen type 1, COL-1) 和成血管相关基因

VEGF 的表达。反应体系为 20 μ L。使用 β -actin 作为参考基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达量。基因引物序列见表 1。

③ 成骨及成血管相关蛋白检测: 复合培养 14 d, PBS 和多聚甲醛处理细胞后, 加入 OCN (1 : 100)、VEGF (1 : 100) 一抗孵育过夜; PBS 洗去一抗, 加入相应二抗避光染色 1 h, DAPI 染色 15 min, 激光共聚焦显微镜观察, Actin 染色呈红色, OCN、VEGF 染色呈绿色, 细胞核染色呈蓝色, Image J 软件对荧光强度进行定量分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS23.0 统计软件进行分析。数据以均值 \pm 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞与 exo 鉴定

流式细胞仪检测培养的两组细胞分别高表达 ADSCs 标记物 CD29、CD90 以及 EPCs 标记物 CD34、CD133, 符合 ADSCs、EPCs 表面抗原特征, 且纯度较高(图 1a、b)。Western blot 检测示 EPCs-exo 表面蛋白 CD9、CD81 呈强阳性表达(图 1c), 表明分离获得的白色沉淀物为 exo。

2.2 UAT 观测

2.2.1 UAT 表征 扫描电镜观察, 改性前样品表面不平整, 未见纳米级孔隙。改性后样品表面可见平缓峰-谷形沟壑形貌, 在沟底部有散在分布的突起状结构, 呈珊瑚状; 突起状结构是由 10 个左右直径为 70~80 nm 的纳米颗粒聚集而成, 突起状结构之间有较多相互连接的纳米级孔隙。见图 2。

2.2.2 UAT 体外吸附和释放 EPCs-exo 能力 UAT 在 48 h 内能吸附约 77% EPCs-exo, 而吸附在 UAT 表面的 EPCs-exo 在 8 d 内呈现连续稳定释放。两浓度组间吸附量及累及释放率比较, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3。

2.3 UAT-ADSCs-exo 观测

2.3.1 生物相容性检测 ① 细胞形态观察: 复合培养 7 d 后, 激光共聚焦显微镜下见各组 ADSCs 在 UAT 表面生长良好。其中, 0 ng/mL 组和 100 ng/mL 组细胞呈细长形状, 丝状伪足相对较少; 200 ng/mL 组细胞呈多边形, 完全铺展, 与材料表面呈接触生长, 且与邻近细胞建立了丰富丝状伪足接触。见图 4。

② 活/死细胞染色观察: 复合培养 7 d 后, 激

表 1 各基因引物序列 (5'→3')

Tab.1 Primer sequences of genes (5'→3')

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
OCN	上游 CAGACAAGTCCCACACAGCA Forward
	下游 CCAGCAGAGTGAGCAGAGAG Reverse
Runx2	上游 ATCATTTCAGTGACACCACCA Forward
	下游 GTAGGGGCTAAAGGCAAAAAG Reverse
ALP	上游 ATGCTCAGGACAGGATCAAA Forward
	下游 CGGGACATAAGCGAGTTTCT Reverse
COL-1	上游 AGCTCGATACACAATGGCCT Forward
	下游 CCTATGACTTCTGCGTCTGG Reverse
VEGF	上游 CTACCTCCACCATGCCAAGT Forward
	下游 CTCGATTGGATGGCAGTAGC Reverse
β -actin	上游 CCTCTATGACAACACAGT Forward
	下游 AGCCACCAATCCACACAG Reverse

光共聚焦显微镜下见各组 ADSCs 均在 UAT 表面生长良好, 未见明显红染死细胞。0 ng/mL 组、100 ng/mL 组、200 ng/mL 组活细胞数量分别为 (85.33 \pm 2.51)、(138.65 \pm 2.52)、(178.02 \pm 2.64) 个。组间差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 5。

③ 细胞增殖检测: 随培养时间延长, 各组 ADSCs 活性逐渐增加。培养前 3 d 各组细胞 A 值差异无统计学意义 ($P>0.05$); 5 d 后 200 ng/mL 组显著高于其余组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 6。

2.3.2 ADSCs 成骨和成血管能力检测 ① ALP 染色及茜素红染色: 随 EPCs-exo 浓度升高, ADSCs 成骨能力逐渐增强, 200 ng/mL 组 ALP 染色和茜素红染色程度较其他两组明显增强(图 7)。

定量分析结果显示, 各时间点 200 ng/mL 组 ADSCs 的 ALP 活性和矿化能力均高于其余两组, 100 ng/mL 组高于 0 ng/mL 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

② 成骨及成血管相关基因检测: 复合培养 14 d 后, 与 0 ng/mL 组相比, 100 ng/mL 组和 200 ng/mL 组 OCN、Runx2、COL-1、ALP 和 VEGF 基因表达均增强, 其中以 200 ng/mL 组最明显, 组间比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 8。

③ 成骨及成血管相关蛋白检测: 复合培养

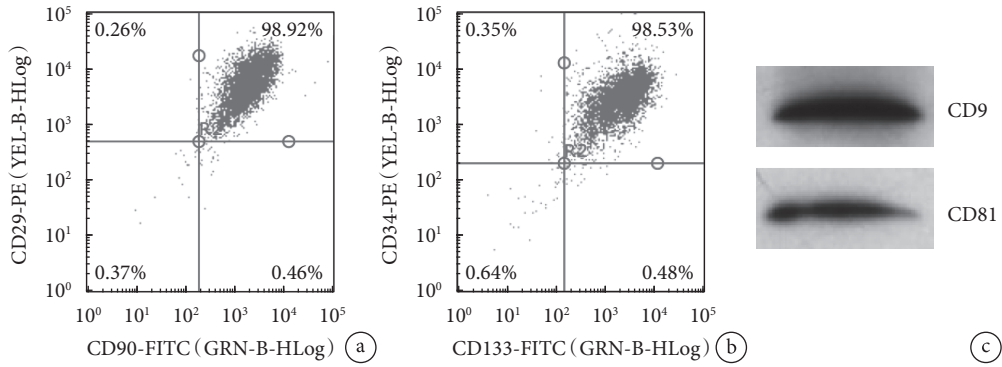


图1 细胞与 exo 鉴定 a. 流式细胞术鉴定 ADSCs; b. 流式细胞术鉴定 EPCs; c. Western blot 检测 EPCs-exo

Fig.1 Identification of cells and exo a. Identification of ADSCs by flow cytometry; b. Identification of EPCs by flow cytometry; c. Identification of EPCs-exo by Western blot

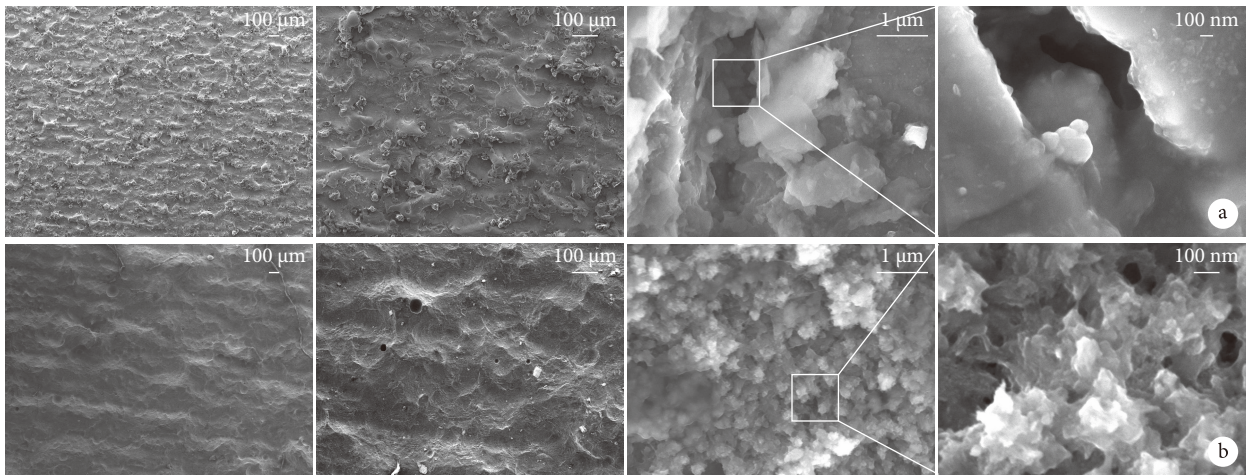


图2 扫描电镜观察 UAT 从左至右分别为放大 40、100、20 k、100 k 倍 a. 改性前; b. 改性后

Fig.2 Scanning electron microscopy observation of UAT The magnification from left to right for 40, 100, 20 k, and 100 k, respectively a. Before modification; b. After modification

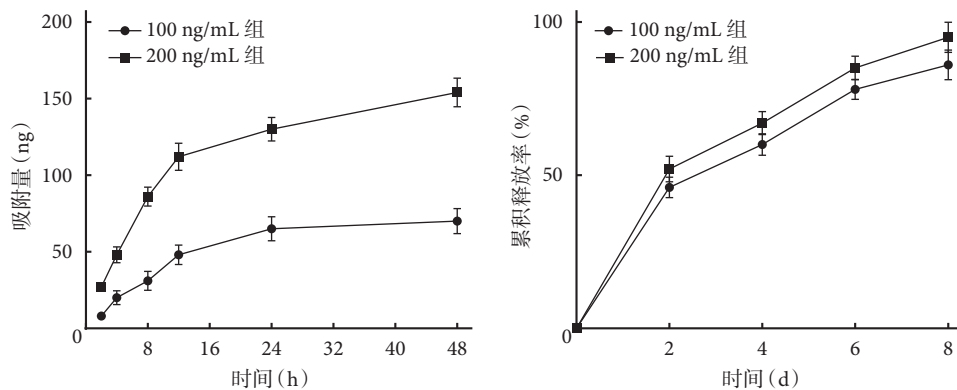


图3 UAT 体外吸附和释放 EPCs-exo 能力检测

Fig.3 The ability of UAT to absorb and release EPCs-exo in vitro

14 d, 随浓度增加, ADSCs 中 OCN 和 VEGF 蛋白表达呈递增趋势, 200 ng/mL 组表达水平高于其他组, 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 9 及表 3。

3 讨论

exo 是由细胞分泌的纳米级细胞外囊泡, 包含蛋白质、RNA 等多种生物活性物质, 具有介导细胞

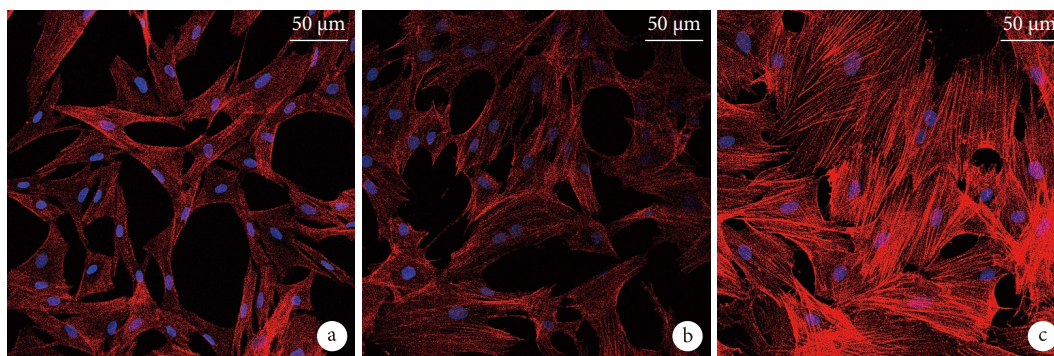


图 4 复合培养 7 d 激光共聚焦显微镜观察细胞形态 (×100) a. 0 ng/mL 组; b. 100 ng/mL 组; c. 200 ng/mL 组

Fig.4 Observation of cell morphology by laser confocal microscope at 7 days after co-culture (×100) a. 0 ng/mL group; b. 100 ng/mL group; c. 200 ng/mL group

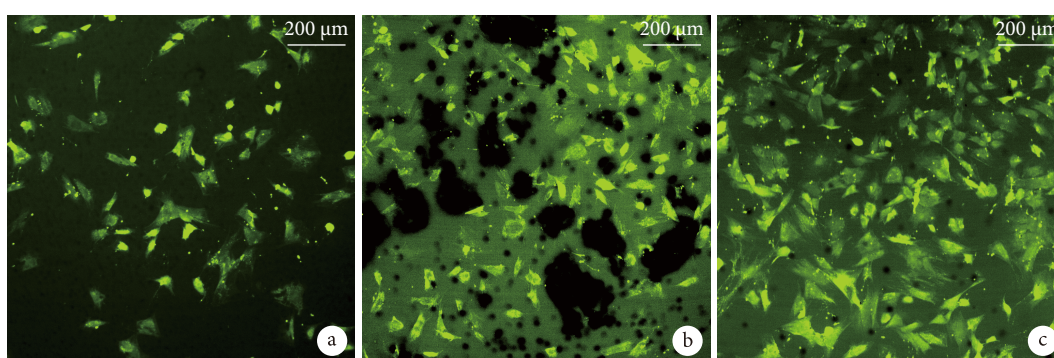


图 5 复合培养 7 d 激光共聚焦显微镜观察细胞成活情况 (×40) a. 0 ng/mL 组; b. 100 ng/mL 组; c. 200 ng/mL 组

Fig.5 Observation of cell viability by laser confocal microscope at 7 days after co-culture (×40) a. 0 ng/mL group; b. 100 ng/mL group; c. 200 ng/mL group

间通讯、促进抗原提呈等功能^[9],是骨组织工程领域中新兴的治疗手段,具有良好的骨修复作用^[10]。Geng 等^[11]将 miR-21 纳米胶囊负载至经酸处理的钛表面,发现钛促细胞成骨和成血管能力显著增强。Zhai 等^[12]提取经成骨诱导 10、15 d MSCs 的 exo,发现其能促进 MSCs 成骨分化,将其加载至 3D 打印纯钛支架后植入大鼠骨缺损处,发现有哈弗管结构的新骨和血管形成。以上研究表明 exo 具有同时促进细胞成骨及成血管的作用。本研究对负载 exo 的 UAT 生物相容性进行了观测。结果显示,复合培养后与 0 ng/mL 组相比,200 ng/mL 组 UAT 表面上生长的 ADSCs 铺展最充分;活/死细胞染色和 CCK-8 检测结果示随着 exo 浓度的增高,UAT 表面 ADSCs 的活性提高;表明 exo 呈浓度依赖性提高细胞活性,促进细胞黏附和增殖。

ALP 是成骨细胞分泌的一种酶,其表达活性常被作为成骨分化的一个重要指标^[13]。新骨形成需要成骨细胞分泌细胞外基质,之后继续矿化,产生钙结节^[14]。Runx2 是成骨分化过程中的重要转录因子。OCN 在骨形成过程中调节晶体生长^[15]。为了

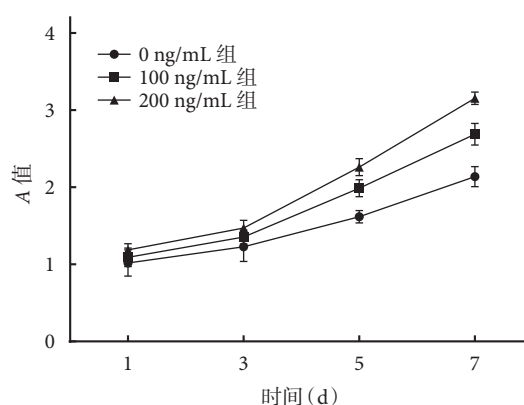


图 6 各组细胞生长曲线

Fig.6 Cell growth curve of each group

验证 UAT-ADSCs-exo 的成骨效果,本研究进行了 ALP 活性和细胞矿化能力检测,结果表明 exo 能促进 ADSCs 在 UAT 表面的成骨分化。RT-PCR 结果显示随着 exo 浓度增加,成骨相关基因 OCN、Runx2、ALP、COL-1 表达量显著提高,具有明显剂量依赖性。我们认为 UAT 的纳米多孔结构能促进 ADSCs 成骨分化,而加入 exo 后成骨效应显著提

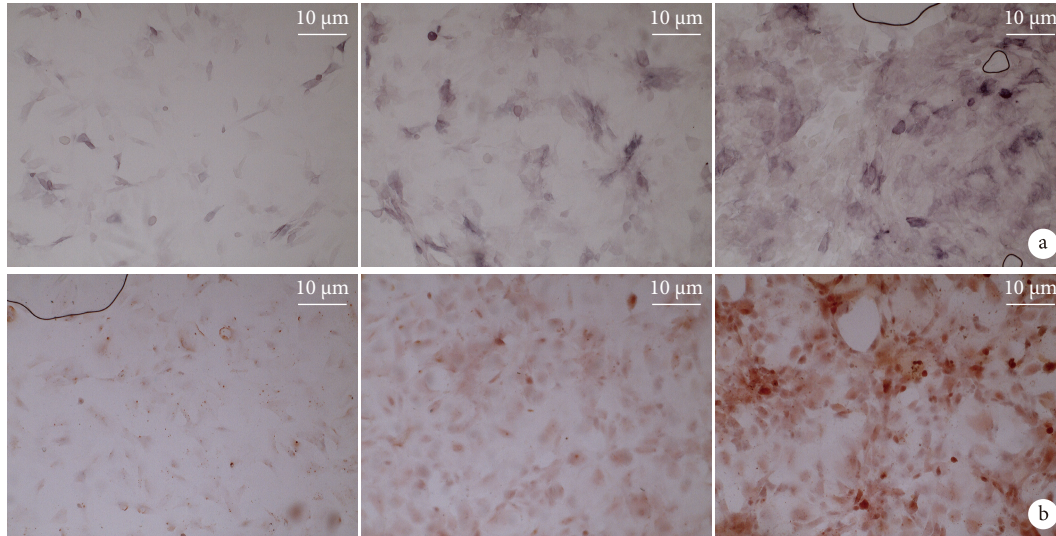


图7 各组复合培养 7 d ALP 染色和 21 d 茜素红染色观察 (×40) 从左至右依次为 0 ng/mL 组、100 ng/mL 组、200 ng/mL 组 a. ALP 染色; b. 茜素红染色

Fig.7 ALP staining at 7 days after co-culture and alizarin red staining at 21 days after co-culture (×40) From left to right for 0 ng/mL group, 100 ng/mL group, and 200 ng/mL group, respectively a. ALP staining; b. Alizarin red staining

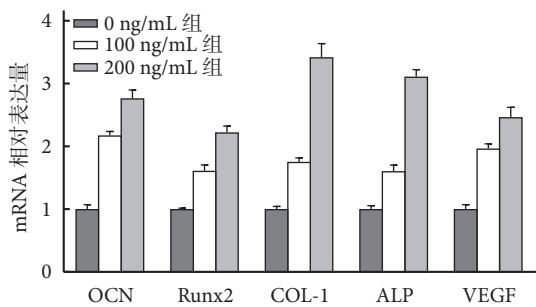


图8 复合培养 14 d RT-PCR 检测成骨及成血管相关基因表达
Fig.8 The expression of osteogenesis- and angiogenesis-related genes by RT-PCR at 14 days after co-culture

高,这可能与 exo 能良好诱导血管生成有关。

血管化是骨再生的关键,血管形成后可以输送营养物质、生长因子、矿物质和氧气,促进新陈代谢,利于组织修复^[16]。exo 可以通过其内含的蛋白质、mRNA、微小 RNA 对血管新生微环境进行调节,从而促进血管生成,使骨再生效应增强。Jia 等^[7]研究提示 EPCs-exo 能显著加速血管形成和成骨效应。然而 exo 是否能大量负载于 UAT 表面并保持恒定浓度,对血管生成至关重要。Zhai 等^[12]的研究表明 exo 可以很好地吸附在钛合金支架上,并逐渐释放到周围环境中。我们用 BCA 试剂盒评估了 UAT 对 exo 的加载和释放情况,结果显示约 77% exo 在 48 h 内被吸附,且释放比例均匀一致,分析这可能与阳极氧化后在钛表面生成的纳米级孔隙有关,该结构具有独特性能,可以增加材料表面积,提高材料亲水性,利于蛋白质的吸附和释放。

表2 各组细胞 ALP 活性及矿化能力比较 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Comparison of ALP activity and mineralization ability between groups (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	ALP 活性 ALP activity		矿化能力 Mineralization ability
	7 d	14 d	
0 ng/mL	0.183±0.005 [#]	0.301±0.003 [#]	0.234±0.004 [#]
100 ng/mL	0.213±0.006 [*]	0.331±0.003 [*]	0.392±0.003 [*]
200 ng/mL	0.353±0.004 ^{*#}	0.432±0.004 ^{*#}	0.467±0.005 ^{*#}
统计值 Statistic	F=1 060.770 P<0.001	F=1 412.912 P<0.001	F=2 857.284 P<0.001

*与 0 ng/mL 组比较 P<0.05, #与 100 ng/mL 组比较 P<0.05
*Compared with 0 ng/mL group, P<0.05; #compared with 100 ng/mL group, P<0.05

表3 各组细胞免疫荧光强度比较 (n=3, $\bar{x}\pm s$)

Tab.3 Comparison of immunofluorescence intensity between groups (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组别 Group	OCN	VEGF
0 ng/mL	94.880±0.456 [#]	86.837±1.062 [#]
100 ng/mL	104.990±0.235 [*]	97.493±0.755 [*]
200 ng/mL	144.780±0.310 ^{*#}	121.750±0.384 ^{*#}
统计值 Statistic	F=17 412.286 P<0.001	F=1 560.544 P<0.001

*与 0 ng/mL 组比较 P<0.05, #与 100 ng/mL 组比较 P<0.05
*Compared with 0 ng/mL group, P<0.05; #compared with 100 ng/mL group, P<0.05

VEGF 在趋化细胞、促进有丝分裂和血管生成中发挥作用,并能促进 ADSCs 的成骨分化,其表达水平可反映血管化程度。本研究中,VEGF 基因和蛋白表达都随着 exo 浓度升高逐渐增强。exo 可将

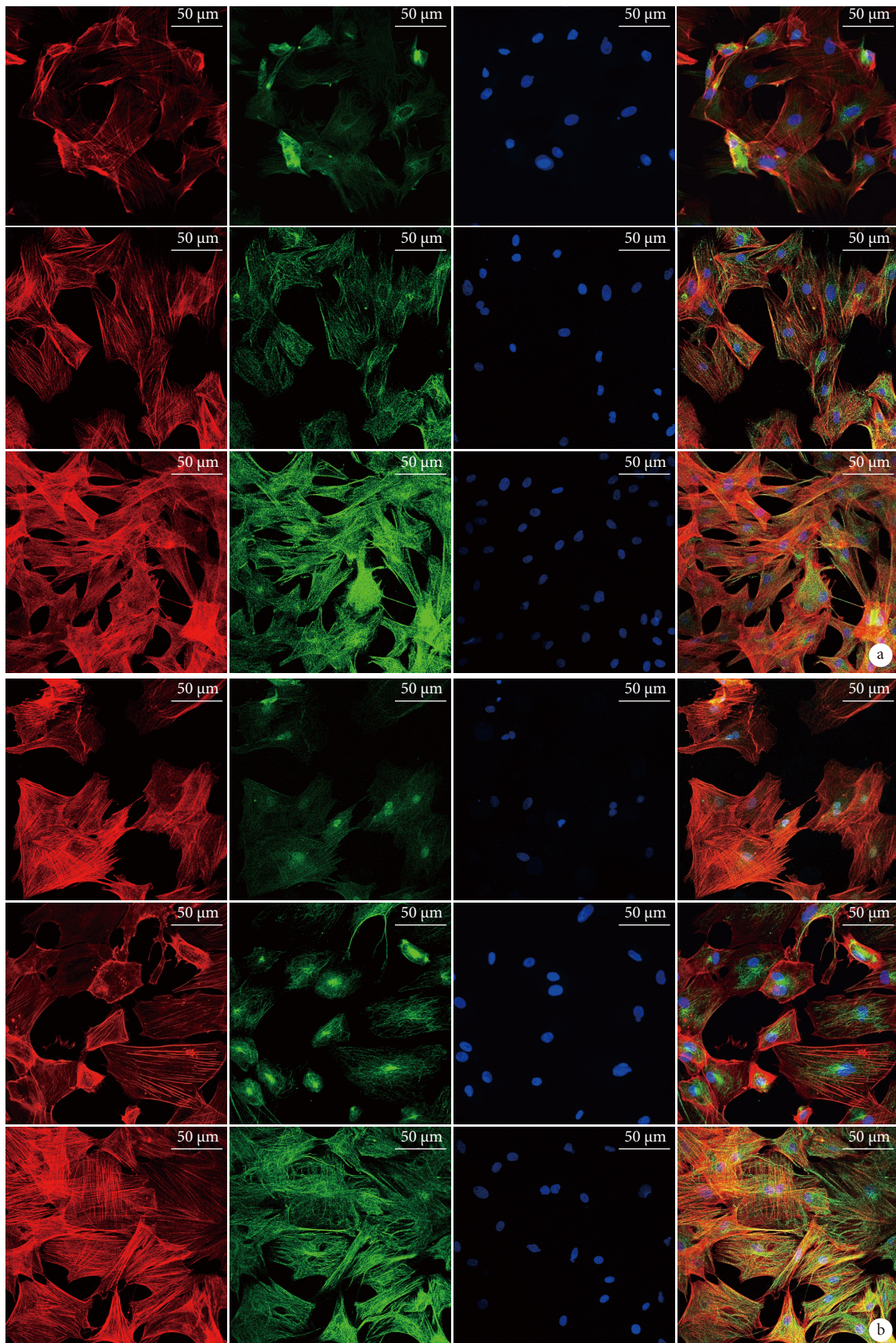


图 9 复合培养 14 d 各组免疫荧光染色观察 (荧光显微镜×100) 从左右依次为 Actin 染色、OCN/VEGF 染色、细胞核染色、三者合并图像 从上至下依次为 0 ng/mL 组、100 ng/mL 组、200 ng/mL 组 a. OCN; b. VEGF

Fig.9 Immunofluorescence staining at 14 days after co-culture (Fluorescence microscope×100) From left to right for Actin staining, OCN/VEGF staining, nucleus staining, and merge image, respectively From top to bottom for 0 ng/mL group, 100 ng/mL group, 200 ng/mL group, respectively a. OCN; b. VEGF

有促血管生成作用的 mRNA 转运至细胞中, 通过激活信号通路, 诱导细胞进入血管生成程序, 从而促进毛细血管样结构生成。有研究将间充质细胞来源 exo 注射至骨折大鼠体内, 发现 exo 可通过诱导缺氧诱导因子 1 α 促进 VEGF 的表达, 使骨再生能力增强^[17]。越来越多研究表明, 成骨细胞和 EPCs 通过信号分子相互联系, 相互促进。成骨细胞可释放 VEGF, 促进 EPCs 血管化; 新生血管一方面为骨组织形成输送氧气和营养成分, 另一方面还可以通过释放成骨相关因子, 如 BMP-2 或 BMP-4 促进成骨细胞分化成熟^[18]。

本研究成功制备了 UAT-ADSCs-exo, 体外研究表明其具有较好的生物安全性、较强的成骨及成血管诱导能力, 但体内成骨和成血管效果及相关分子机制有待进一步探索。

利益冲突 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突; 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

伦理声明 研究方案经沧州医学高等专科学校动物实验伦理委员会批准 (CY-SYDW-2019-01); 实验动物使用许可证号: SYXK (冀) 2019-006

作者贡献声明 王静: 实验实施、实验结果统计分析及文章撰写; 邱严力: 实验设计; 唐亮、刘洪利: 结果收集整理

参考文献

- Chouirfa H, Bouloussa H, Migonney V, *et al.* Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications. *Acta Biomater*, 2019, 83: 37-54.
- Spriano S, Yamaguchi S, Baino F, *et al.* A critical review of multifunctional titanium surfaces: New frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. *Acta Biomater*, 2018, 79: 1-22.
- Jiang H, Ma X, Zhou W, *et al.* The effects of hierarchical micro/nano-structured titanium surface on osteoblast proliferation and differentiation under diabetic conditions. *Implant Dent*, 2017, 26(2): 263-269.
- Ren B, Wan Y, Liu C, *et al.* Improved osseointegration of 3D printed Ti-6Al-4V implant with a hierarchical micro/nano surface topography: An *in vitro* and *in vivo* study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 118: 111505. doi: 10.1016/j.msec.2020.111505.
- Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232.
- Li X, Jiang C, Zhao J. Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(6): 986-992.
- Jia Y, Zhu Y, Qiu S, *et al.* Exosomes secreted by endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration during distraction osteogenesis by stimulating angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 12-25.
- 曹骑麟, 王婷, 熊伟, 等. Exos-ADSCs-nHAC/PLGA 组织工程骨对大鼠颅骨缺损修复的实验研究. *中国美容整形外科杂志*, 2021, 32(4): 234-237.
- Rodrigues M, Fan J, Lyon C, *et al.* Role of extracellular vesicles in viral and bacterial infections: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Theranostics*, 2018, 8(10): 2709-2721.
- Domvri K, Petanidis S, Anastakis D, *et al.* Exosomal lncRNA PCAT-1 promotes Kras-associated chemoresistance via immunosuppressive miR-182/miR-217 signaling and p27/CDK6 regulation. *Oncotarget*, 2020, 11(29): 2847-2862.
- Geng Z, Yu Y, Li Z, *et al.* miR-21 promotes osseointegration and mineralization through enhancing both osteogenic and osteoclastic expression. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 111: 110785. doi: 10.1016/j.msec.2020.110785.
- Zhai M, Zhu Y, Yang M, *et al.* Human mesenchymal stem cell derived exosomes enhance cell-free bone regeneration by altering their miRNAs profiles. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(19): 2001334. doi: 10.1002/adv.202001334.
- Ji Y, Wang M, Liu W, *et al.* Chitosan/nHAC/PLGA microsphere vehicle for sustained release of rhBMP-2 and its derived synthetic oligopeptide for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(6): 1593-1606.
- Sun T, Yao S, Liu M, *et al.* Composite scaffolds of mineralized natural extracellular matrix on true bone ceramic induce bone regeneration through Smad1/5/8 and ERK1/2 pathways. *Tissue Eng Part A*, 2018, 24(5-6): 502-515.
- Tsao YT, Huang YJ, Wu HH, *et al.* Osteocalcin mediates biomineralization during osteogenic maturation in human mesenchymal stromal cells. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 159. doi: 10.3390/ijms18010159.
- Diomedea F, Marconi GD, Fonticoli L, *et al.* Functional relationship between osteogenesis and angiogenesis in tissue regeneration. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3242. doi: 10.3390/ijms21093242.
- Zhang Y, Hao Z, Wang P, *et al.* Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. *Cell Prolif*, 2019, 52(2): e12570. doi: 10.1111/cpr.12570.
- Hu K, Olsen BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 509-526.

收稿日期: 2022-03-31 修回日期: 2022-05-25

本文编辑: 刘丹