

载淫羊藿苷胞外囊泡促成骨作用的体外研究

王一凡¹ 张璇¹ 李军²

[摘要] **目的:**细胞外囊泡(EVs)可修饰性强,可携带多种生物活性因子,无免疫原性,分析其在干细胞膜载体研究中的潜力。**方法:**通过超声法制备一种载淫羊藿苷胞外囊泡纳米复合物,旨在检测其是否能有效地诱导骨髓间充质干细胞(BMSCs)的成骨分化。选取载药量最高的 ICA-EVs 复合物,以游离 ICA 为对照,检测其对 BMSCs 细胞矿化及成骨分化相关基因 ALP, β -catenin, Runx2 表达的影响。**结果:**ICA-EVs 在 14 d 时矿化作用显著,碱性磷酸酶活性增加,差异有统计学意义($P < 0.01$), β -catenin, Runx2 蛋白表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**ICA-EVs 能够促进 BMSCs 的矿化和成骨分化,有望取代直接干细胞移植用于骨缺损修复和再生。

[关键词] 淫羊藿苷;外泌体;促成骨;干细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)01-0006-05

Study on the Osteogenic Effect of Icariin Loaded Extracellular Vesicles in Vitro

WANG Yifan¹ ZHANG Xuan¹ LI Jun²

¹The First Clinical College of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China;

²Department of Osteoarthritis, Baoji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji 721000, Shaanxi China.

Abstract Objective: To explore the effect of icariin extracellular vesicles (ICA-EVs) for marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods:** Icariin loaded extracellular vesicle nanocomposites were prepared by ultrasonic method to detect whether it can effectively induce the osteogenic differentiation of BMSCs. The effects of ICA-EVs complex with the high-dose drug loading on the expression of ALP, β -catenin and Runx2 in BMSCs were detected with free ICA as control. **Results:** The mineralization of ICA-EVs was significant at 14 d, and alkaline phosphatase activity increased ($P < 0.01$), the expression of β -catenin and Runx2 protein were also increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** ICA-EVs can promote the mineralization and osteogenic differentiation of BMSCs, which is expected to replace direct stem cell transplantation for bone defect repair and regeneration.

Keywords: icariin; exosome; promoting bone; stem cell

淫羊藿苷(Icariin, ICA)是淫羊藿的主要提取物,具有加速细胞周期和促进骨髓干细胞成骨分化的作用^[1-5]。近年来,细胞外囊泡(Extracellular Vesicles, EVs)因其独特的生物化学性质备受关注^[6-7]。外泌体能负载蛋白质、脂类、核酸和植物提取物,并通过这些功能性物质的转运实现细胞间物质交换和信息传递^[8]。本研究选用具有归巢潜能的间充质干细胞作为母细胞,首次将淫羊藿苷负载于外泌体中来实现 ICA 的缓释,明确 ICA-EVs 对骨髓间充质干细胞

(BMSCs)的成骨分化作用,为 ICA 的成骨应用提供新思路。

1 材料及方法

1.1 材料

ICA 从美国马萨诸塞州沃本市 LC 实验室购买,小鼠购自广东省医学实验中心。亲脂性荧光染料 1, 1'-十八烷基-3, 3', 3'-四甲基吡啶碳菁高氯酸盐(DIL)和分子探针购于美国俄勒冈州尤金市。6-二氨基-2-苯基吡啶二盐酸盐(DAPI)和 Triton X-100 从 Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯市)获得。细胞培养基和胎牛血清(FBS)购自 Gibco 生命科技公司。荧光聚苯乙烯(荧光最大值 G100)来自赛默飞世

¹ 陕西中医药大学第一临床学院(西安, 712046)

² 宝鸡市中医医院骨关节科

尔科技公司(美国)。

1.2 EVs 分离

从小鼠成骨细胞中分离出 EVs。在成骨细胞第 6 天,更换培养基,并在第 7 天收集培养基。将培养基分别以 300g 离心 5 min 和 $2 \times 10^4 g$ 离心 20 min,去除细胞和较小的细胞碎片。收集的上清液通过聚醚砜膜过滤器(0.22 μm ,美国康宁)并以 $1 \times 10^5 g$ 离心 60 min。用 PBS 冲洗颗粒并重新离心($1 \times 10^5 g$ 离心 60 min)。悬浮在无菌 PBS 中的颗粒在 4℃ 下保存,直到进一步使用。

1.3 ICA-EVs 的制备

使用超声法将 ICA 装载到 EVs 中,将 ICA 和 EVs 混合物使用 505 型超声去膜器进行超声处理,设置如下:20%振幅,6 个周期 30 s 开/关,持续 3 min,每个周期之间有 2 min 的冷却期。超声处理后,ICA-EVs 溶液在 37℃ 下孵育 60 min,以恢复外体膜。使用 NAP-10 Sephadex G25 柱(通用电气医疗集团,英国)通过大小排阻色谱法从 ICA-EVs 分离多余的游离药物。

1.4 ICA-EVs 的透射电镜观察

为了进行电子显微镜研究,将 5 μL 等分的 ICA-EVs 制剂放置在碳涂层的 200 目铜网格上,在室温下放置 20 min。在 PBS 中用 1%戊二醛固定 5 min,用 2%磷钨酸水溶液复染。使用 JEOL-JEM-1400+电子显微镜,在 80 kV 下检查。

1.5 ICA 含量及释放曲线

用高效液相色谱(HPLC)法测定 EVs 中 ICA 的含量,即将微离心管中的 ICA-EVs(10 100 个/mL)放置在设定为 75℃ 的加热块上以蒸发溶剂。然后,加入等量乙腈,对混合物进行涡流、超声处理,然后以 $1.3 \times 10^4 r/min$ 离心 10 min。离心后取上清液,通过 2 μm 滤器过滤,转移到高效液相色谱自动进样瓶中。在高效液相色谱系统(安捷伦 1200,美国)中注入 20 μL 等份。所有分析均采用 C18 柱(Supelco Nucleosil C18,250 mm \times 4.6 mm,5 μm ,10 nm,Sigma-Aldrich)进行,流动相为 H₂O:乙腈(45:55),30℃ 下流速为 1 mL/min。在 270 nm 处测量吸光度以监测 ICA 的洗脱。

为了测量 ICA 释放量,将新制备的 ICA-EVs 放置于 PBS 中,在 RT 条件下进行洗涤并搅拌。在透析管内的时间点取样,并按上述方法用高效液相色谱法进行分析。从 ICA-EVs 释放的 ICA 量表示为总 ICA 的百分比,并绘制为时间的函数。

1.6 细胞培养

所有实验方案均经陕西中医药大学第一临床学院

动物护理与实验委员会批准。取 4 周龄 SD 大鼠股骨和胫骨的 BMSCs。简单地说,股骨中段和胫骨的骨髓被冲洗出来,悬浮在完全培养基中(CM, α -MEM,Gibco,美国),添加 10%胎牛血清(FBS,Gibco,美国)和 1%青霉素/链霉素(Gibco,美国)。48 h 后取出非贴壁细胞。第 2 代 BMSCs 用于以下实验。细胞在 37℃ 含 5%二氧化碳的加湿空气中培养。

1.7 ICA-EVs 的成骨作用

培养基中含有 20 $\mu mol/L$ 的 ICA 和 ICA-EVs。BMSCs 在室内接种,每 2 d 更换一次培养基,连续 4 周。诱导成骨后,用 ARS 测定钙沉积,证实分化。细胞经 ARS 染色 20 min,DW 洗涤,光学显微镜成像。随后,在 10 mmol/L 磷酸钠中加入 10%氯化十六烷基吡啶,将溶液在 25℃ 下孵育 15 min。在 562 nm 处用微孔板阅读器测量 ARS 提取。

1.8 ELISA 检测 Runx2 及 β -catenin 含量

将 ICA,EVs,ICA-EVs 分别接种于含有 MSCs 的 12 孔板中,细胞接种方法同上。12 孔板分别培育 3,7,14 d。应用 ELISA 检测试剂盒,酶标仪波长 480 nm 测定 A 值。根据标准品浓度及 A 值,计算实验样本待测蛋白浓度。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对研究数据进行统计分析。*P* 值为双侧,经 Bonferroni 校正,*P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICA-EVs 的制备和表征

TEM 检测结果显示 ICA-EVs 囊泡呈圆形,粒径分布较窄,平均粒径为(244.4 \pm 4.2)nm,见图 1。

2.2 ICA 载药量及释放曲线

用紫外可见吸收光谱法在 270 nm 波长处测量乙腈溶液中 ICA 的浓度,计算 ICA-EVs 中 ICA 的最大载药量为 27.83%。如图 2 所示,ICA-EVs 在生理盐水中浸泡 10 h 后,出现约 56.4%的快速释放,随后的 ICA-EVs 释放行为趋向于平衡。

2.3 ICA-EVs 上 BMSCs 的成骨分化作用

使用含有 20 $\mu mol/L$ 的 ICA 和 ICA-EVs 培养基诱导 BMSCs 成骨分化,并在 1,2,3 周进行 ARS 染色以评估在有无 ICA 的 EVs 上生长的 BMSCs 的成骨细胞分化。在最初的 7 d 中,成骨细胞矿化没有明显增加(见图 3)。但是在分化两周后,差异是明显的,尤其是在第 7 天和第 14 天之间(见图 3)。在第 14 天和第 21 天,ICA-EVs 中的 BMSCs 向成骨细胞的转化分别比 ICA 组高 120%和 160%。

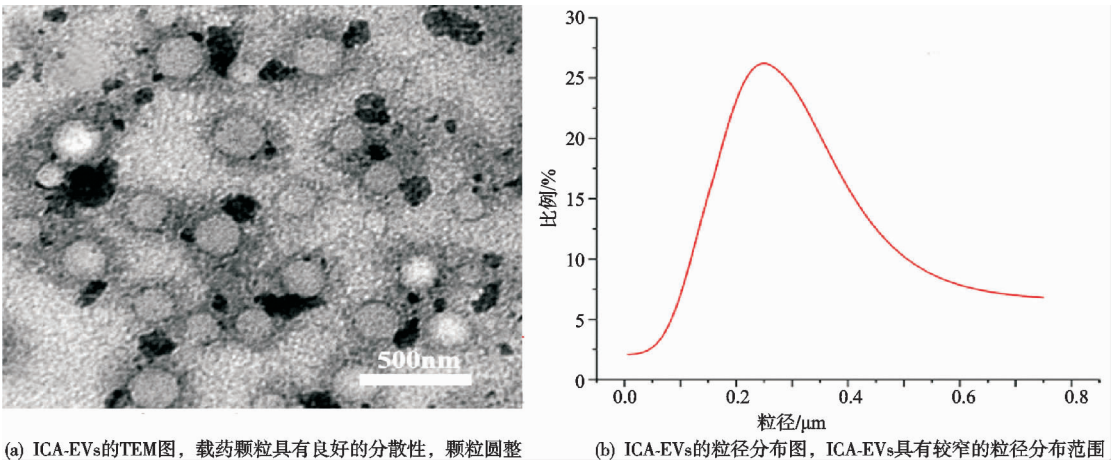


图 1 ICA-EVs 的 TEM 及粒径分布图

2.4 ICA-EVs 复合物对 ALP mRNA 表达量的影响

实验组与空白对照组对 ALP mRNA 表达的影响差异都有统计学意义($P<0.05$) (见表 1)。ALP 是 BMSCs 早期成骨分化的重要标志, 在细胞外基质矿化过程中具有重要的作用。本研究对 12 孔板中培养的 BMSCs 进行 ALP 染色, 成骨诱导第 3, 7, 14 天行 ALP 染色分析均为阳性。ICA 组和 ICA-EVs 在第 7 天和第 14 天显示出高于对照组的表达量, ICA-EVs 在第 7 天其 ALP 表达量显著高于 ICA, EVs 未显示出促进 ALP 表达水平提高的作用。

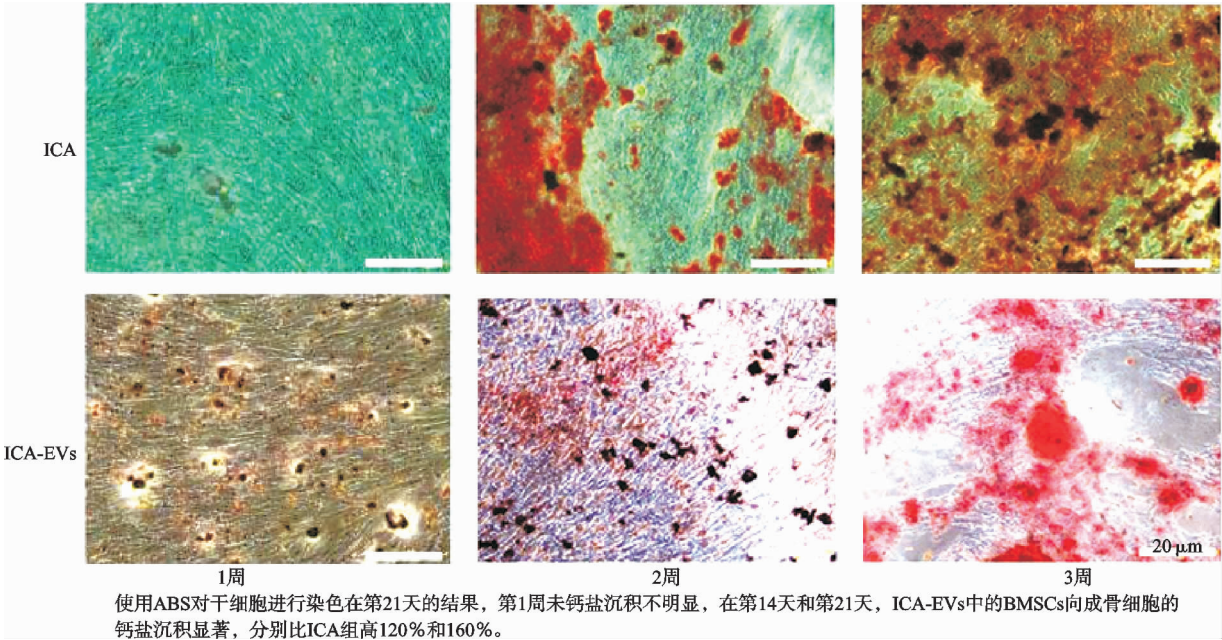
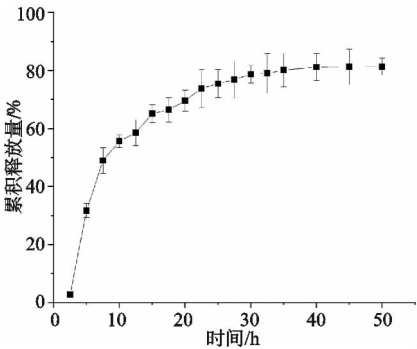


图 3 ICA-EVs 的促成骨分化作用

表 1 ICA-EVs 复合物对 BMSCs ALP 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	第 3 天	第 7 天	第 14 天
空白对照	0.33±0.27	1.10±0.13	1.35±0.06
EVs	0.37±0.15	1.04±0.28	1.21±0.52
ICA	1.19±0.31 ¹⁾	1.77±0.21 ¹⁾²⁾	2.48±0.11 ¹⁾²⁾
ICA-EVs	1.27±0.12 ¹⁾²⁾	2.49±0.28 ¹⁾²⁾³⁾	2.58±0.43 ¹⁾²⁾

注: 1)与空白对照组比, $P<0.05$; 2)与 EVs 组比, $P<0.05$; 3)与 ICA 组比, $P<0.05$ 。

2.5 ICA-EVs 复合物对 BMSCs 中 β -catenin 表达的影响

ICA 组仅在第 3 天时和对照组差异有统计学意义(见表 2),第 7 天和第 14 天时与空白对照组和 EVs 组

的差异无统计学意义。

ICA-EVs 在第 3,7,14 天,和对照组相比差异有统计学意义,但是在第 3 天其 β -catenin 活性和 ICA 组差异无统计学意义。

表 2 ICA-EVs 复合物对 BMSCs 中 β -catenin 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	第 3 天	第 7 天	第 14 天
空白对照组	5.10 \pm 0.32	4.74 \pm 0.18	4.35 \pm 0.41
EVs	5.41 \pm 0.73	4.52 \pm 0.37	4.25 \pm 0.12
ICA	6.39 \pm 0.11 ¹⁾	4.97 \pm 0.29	4.58 \pm 0.17
ICA-EVs	6.76 \pm 0.12 ¹⁾²⁾	6.47 \pm 0.28 ¹⁾²⁾³⁾	6.28 \pm 0.45 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)与空白对照组比, $P<0.05$;2)与 EVs 组比, $P<0.05$;3)与 ICA 组比, $P<0.05$ 。

2.6 ICA-EVs 复合物对 BMSCs 细胞 Runx2 表达的影响

ICA 组仅在第 3 天和第 7 天时与对照组差异有统计学意义(见表 3),第 14 天时均未显示出和空白对照

组及 EVs 组的显著差异。ICA-EVs 在第 3,7,14 天和空白对照组、EVs 组、ICA 组比较,差异均无统计学意义。在第 14 天其 Runx2 活性和 ICA 组差异无统计学意义。

表 3 ICA-EVs 复合物对 BMSCs 中 Runx2 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

分组	第 3 天	第 7 天	第 14 天
空白对照	4.16 \pm 0.27	4.05 \pm 0.31	3.93 \pm 0.24
EVs	4.37 \pm 0.51	4.04 \pm 0.38	4.21 \pm 0.32
ICA	5.81 \pm 0.39 ¹⁾²⁾	5.87 \pm 0.47 ¹⁾²⁾	4.60 \pm 0.19
ICA-EVs	7.17 \pm 0.13 ¹⁾²⁾³⁾	6.79 \pm 0.25 ¹⁾²⁾³⁾	6.53 \pm 0.33 ¹⁾²⁾³⁾

注:1)与空白对照组比, $P<0.05$;2)与 EVs 组比, $P<0.05$;3)与 ICA 组比, $P<0.05$ 。

3 讨论

外泌体兼具细胞基药物递送和纳米结构的优点,能有效突破各种生物屏障实现药物的高效转运^[9]。在本研究中,笔者利用温和的超声处理制备载药体系,得到载药量较高的纳米复合物。这可能由于超声处理降低了外体膜的刚性,从而允许 ICA 进入脂质双层,从而提高了载药量。虽然超声波能显著减低外体膜的微粘度^[10]。但不排除在外显体表面也有大量 ICA 黏附的可能,这是前 10 h 观察到 ICA 突释的原因。当外泌体膜与细胞或内体膜融合时,其管腔内的 ICA 可释放到靶细胞的胞浆中。其次,ICA-EVs 制剂的稳定性对其临床应用至关重要。本研究制备的 ICA-EVs 制剂可以在 25℃ 稳定存储超过 1 个月,和此前关于外泌体稳定性的研究相符^[11]。

在骨质疏松症患者中,由于 BMSCs 的增殖和成骨分化减少,骨形成和降解平衡被破坏,导致骨再生能力有限。植物中提取的黄酮类化合物,如淫羊藿苷、染料木素和大豆黄酮,被证明能刺激骨骼形成^[12]。由于淫羊藿苷在体外 24 h 对成骨细胞分化和矿化的促进作用强于染料木素,本研究选择淫羊藿苷作为骨修复剂,观察其骨修复作用。本研究制备的 ICA-EVs 制剂可以诱导 BMSCs 的成骨分化。在纳米制剂中生长的 BMSCs 在第 14~21 天之间显示出增加的成骨矿化能力,比游离 ICA 高 1.2 倍,显示加速干细胞成骨的潜力。

ALP 是 BMSCs 细胞外基质成熟的早期标志物,该酶的活性高低可以用来检测早期成骨细胞的含量及分化程度^[13], β -catenin 主要在骨细胞增殖期表达,二者的表达在一定程度上反映了骨形成进程,是 BMSCs 分化

成熟的重要标志。Runx2 基因位于人类常染色体 6p21 位点,属于 Runt 域基因家族的转录因子之一。研究证实,Runx2 能够激活骨钙素、骨桥蛋白等成骨相关基因的表达,诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[14],进一步的研究发现,在小鼠在胚胎发育期内可见颅骨、躯干骨和四肢骨的骨髓间充质干细胞存在 Runx2 表达,而在已分化的骨和软骨细胞中检测不到^[15]。故 Runx2 属于 Runx 蛋白家族,是一种能诱导骨髓间充质干细胞向成软骨细胞和成骨细胞分化、成熟的关键转录因子,在骨修复与重建中发挥重要作用^[16-17] 本实验通过检测 ALP 及 β -catenin,Runx2 的表达,研究 ICA-EVs 复合物对 BMSCs 分化的影响,与空白对照组相比,ICA-EVs 复合物在各检测时间点 ALP 活性增高, β -catenin 及 Runx2 表达增加,说明 ICA-EVs 复合物对 BMSCs 的成熟分化有促进作用并且这种作用可以维持到第 14 天甚至更长。ICA-EVs 复合物对 ALP, β -catenin,Runx2 的促进作用优于 ICA。

与空白对照组和 EVs 组相比,其余各组 ALP 表达均有增加,ICA-EVs 复合物在第 3,7,14 天,BMSCs,Runx2, β -catenin 的表达均显著高于对照组,促进 BMSCs 分化方面其效果显著优于 ICA 组。结果证明 ICA-EVs 在引导 BMSCs 成骨诱导方面的优越性,对于干细胞疗法及骨组织改建具有重要意义。

ICA-EVs 在干细胞研究中显示出巨大的发展前景,基于笔者的研究结果,EVs 还可以通过结合不同类型的纳米材料(如聚苯乙烯珠、玻璃珠)和肽(环 RGD 肽,iRGD 肽)来改善平台。其他类型的干细胞,如多能干细胞和脂肪干细胞,也可用于研究 ICA-EVs

的成骨诱导潜力。利用 EVs 复合物作为培养制剂,从不同的干细胞系中获得所需的细胞类型,将有助于临床研究,特别是用于人体器官/组织损伤部位的再生。综上所述,课题组制备的 ICA-EVs 有望在干细胞骨再生医学领域做出贡献。

参考文献

- [1] 肖亚平,曾杰,焦琳娜,等. 补肾中药对骨质疏松症的治疗及其信号通路调节作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018,43(1):21-30.
- [2] WU Y Q, CAO L Y, XIA L G, et al. Evaluation of osteogenesis and angiogenesis of icariin in local controlled release and systemic delivery for calvarial defect in ovariectomized rats[J]. Scientific Reports, 2017,7(1):5077.
- [3] QIAN W Q, SU Y, ZHANG Y J, et al. Secretome analysis of rat osteoblasts during icariin treatment induced osteogenesis[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 6515-6525.
- [4] ZHANG G Y, CHENG X F, ZHOU G S, et al. New pathway of icariin-induced MSC osteogenesis: transcriptional activation of TAZ/Runx2 by PI3K/Akt[J]. Open Life Sciences, 2017,12(1):228-236.
- [5] ZHANG S S, XUE R, HU R Z. The neuroprotective effect and action mechanism of polyphenols in diabetes mellitus-related cognitive dysfunction[J]. European Journal of Nutrition, 2020,59(4):1295-1311.
- [6] MAAS S L N, BREAKEFLELD X O, WEAVER A M. Extracellular vesicles: unique intercellular delivery vehicles[J]. Trends in Cell Biology, 2017,27(3):172-188.
- [7] VADER P, BREAKEFLELD X O, WOOD M J A. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy[J]. Trends in Molecular Medicine, 2014,20(7):385-393.
- [8] ANDALOUSSI S E L, MÄGER I, BREAKEFIELD X O, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2013,12(5):347-357.

- [9] ALVAREZ-ERVITI L, SEOW Y, YIN H F, et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(4):341-345.
- [10] ZHOU J Q, TAN X H, TAN Y H, et al. Mesenchymal stem cell derived exosomes in Cancer progression, metastasis and drug delivery: a comprehensive review[J]. Journal of Cancer, 2018,9(17):3129-3137.
- [11] AGI A, JUNIN R, YAHYA A, et al. Comparative study of continuous and intermittent ultrasonic ultrafiltration membrane for treatment of synthetic produced water containing emulsion[J]. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2018,132:137-147.
- [12] AGRAWAL A, AQIL F, JEYABALAN J, et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel[J]. Nanomedicine, 2017,13(5):1627-1636.
- [13] ZHENG D, PENG S L, YANG S H, et al. The beneficial effect of Icariin on bone is diminished in osteoprotegerin-deficient mice[J]. Bone, 2012,51(1):85-92.
- [14] 姜鸣, 李晓红, 饶国洲. BMP-2, BGP mRNA 表达量及 ALP 活性的变化对大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导成骨细胞的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2008,23(5):28-31.
- [15] DUCY P, SCHINKE T, KARSENTY G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance[J]. Science, 2000,289(5484):1501-1504.
- [16] LEE K S, KIM H J, LI Q L, et al. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12[J]. Mol Cell Biol, 2000,20(23):8783-8792.
- [17] VIMALRAJ S, ARUMUGAM B, MIRANDA P J, et al. Runx2: structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation[J]. Int J Biol Macromol, 2015,78:202-208.

(收稿日期:2020-06-17)

(上接第5页)

- [12] ZEHENTNER B K, DONY C, BURTSCHER H. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling[J]. J Bone Miner Res, 1999,14(10):1734-1741.
- [13] GAMER L W, PREGIZER S, GAMER J, et al. Role of BMP2 in the maturation and maintenance of the knee joint[J]. J Bone Miner Res, 2018,33(9):1708-1717.
- [14] VAN DER KRAAN P M, BLANEY DAVIDSON E N, VAN DEN BERG W B. Bone morphogenetic proteins and articular cartilage: to serve and protect or a wolf in sheep clothing's? [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, 18(6): 735-741.
- [15] NAKASE T, MIYAJI T, TOMITA T, et al. Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2003,11(4):278-284.

- [16] YIN W. Correlation of bone morphogenetic protein-2 levels in serum and synovial fluid with disease severity of knee osteoarthritis[J]. Med Sci Monit, 2015,21:363-370.
- [17] BLANEY DAVIDSON E N, VITTERS E L, BENNINK M B, et al. Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage[J]. Ann Rheum Dis, 2015,74(6): 1257-1264.
- [18] 刘艳,尹若峰,侯睿智. BMP-2 诱导软骨细胞凋亡及增殖的研究[J]. 中华骨与关节外科杂志, 2016,9(3):251-254.

(收稿日期:2020-07-08)