

炎症环境下巨噬细胞摄取软骨细胞来源外泌体的作用研究

刘昱江¹ 林才渊¹ 刘金柱¹ 李志鹏¹ 夏天卫^{1△} 沈计荣^{1△}

[摘要] 目的:在炎症环境下,探究巨噬细胞对软骨细胞分泌携带 lncRNA PVT1 的外泌体的摄取情况。方法:提取、培养大鼠软骨细胞和巨噬细胞,分别进行体外培养,通过透射电镜观察软骨细胞分泌的外泌体形态,通过 Western Blot 检测外泌体特异性蛋白 CD9 和 CD63 的表达。进而实验分为 3 组,对照组、低浓度软骨细胞分泌的外泌体+单核细胞培养组、高浓度软骨细胞分泌的外泌体+单核细胞培养组,通过 RT-qPCR 检测外泌体中 lncRNA PVT1 的表达情况,通过免疫荧光法检测巨噬细胞对软骨细胞分泌的外泌体的摄取情况。结果:在炎症环境下,软骨细胞能够分泌携带 lncRNA PVT1 的外泌体,外泌体特异性蛋白 CD63 和 CD9 的表达为阳性。免疫荧光法证实巨噬细胞可摄取该外泌体,且高浓度外泌体组细胞摄取外泌体的量较低浓度外泌体组多。结论:在膝骨关节炎的炎症环境下,巨噬细胞可摄取软骨细胞来源的携带 lncRNA PVT1 的外泌体。

[关键词] 膝关节炎;炎症;巨噬细胞;外泌体;长链非编码 RNA

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2022)04-0001-04

Study on Uptake of Exosomes Secreted by Chondrocytes by Macrophages in an Inflammatory Environment

LIU Yujiang¹ LIN Caiyuan¹ LIU Jinzhu¹ LI Zhipeng¹ XIA Tianwei^{1△} SHEN Jirong^{1△}

¹Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China.

Abstract Objective: To investigate the uptake of exosomes carrying lncRNA PVT1 secreted by chondrocytes in macrophages in inflammatory environment. **Methods:** Rat chondrocytes and macrophages were isolated and cultured in vitro. The exocrine morphology of chondrocytes was observed by transmission electron microscope, and the expression of CD9 and CD63 were detected by Western Blot. Further experiments were divided into three groups: control group, low concentration chondrocytes + monocytes culture group and high concentration chondrocytes + monocytes culture group. The expression of lncRNA PVT1 in exosomes was detected by RT-qPCR, and the uptake of exosomes secreted by chondrocytes by macrophages was detected by immunofluorescence. **Results:** Chondrocytes could secrete the exosomes carrying lncRNA PVT1 in inflammatory environment, and the expression of exosome specific protein CD9 and CD63 was positive. Macrophages could ingest the exosomes in inflammatory environment, and the cells in the high concentration group ingested more exosomes than those in the low concentration group. **Conclusion:** Macrophages can ingest the exosomes containing lncRNA PVT1 secreted by chondrocytes in inflammatory environment.

Keywords: knee osteoarthritis; inflammation; macrophages; exosome; lncRNA PVT1

膝骨关节炎是骨科常见病,其发病机制仍不明确,且无特效的治疗手段^[1]。软骨细胞的衰老、损伤贯穿于膝骨关节炎的整个病理过程中,同时与巨噬细胞极

化也密切相关^[2-3]。笔者在前期研究中发现,骨性关节炎(OA)中浆细胞瘤变异型易位 1 长链非编码 RNA (lncRNA PVT1)表达升高,而 lncRNA PVT1 与巨噬细胞的相关性在部分研究中已有报道^[4],因此笔者推测在炎症环境下,软骨细胞可分泌携带 lncRNA PVT1 的外泌体,且巨噬细胞可摄取软骨细胞分泌的该类外泌体。本实验针对上述假设开展进一步的探索和验证。

¹ 南京中医药大学附属医院骨伤科(南京,210029)

[△]通信作者 E-mail:1263638610@qq.com(夏天卫)

joint66118@sina.com(沈计荣)

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠(200~220 g)2只,上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物许可证批号为SCXK(沪)-2018-0006。

1.2 实验药物及试剂

CD9抗体(Abcam, Ab33697), CD63抗体(Abcam, Ab108950), PKH26工作液(贝博公司, BB-4212), 鬼笔环肽染液(Yeasen, 40735ES75), 细胞固定液(碧云天, P0099), 细胞通透液(碧云天, P0095), 1%BSA(碧云天, ST023), IL-1 β 蛋白(Peprotech, 400-01B), 纯净水(LA0727, 飞净生物科技有限公司, 中国), 0.9%生理盐水(H37022337, 辰兴药业股份有限公司, 中国)。

1.3 实验仪器

生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司, BHC-1300 II A/B3, 中国), 电泳系统(天能公司, 1658004, 1658000), HERAcell 150i型CO₂培养箱(Thermo), L-90K型超速离心机(Optima), PCR仪(AB), 1400型透射电子显微镜(JEM), Enspire酶标仪(PE), 3000B型荧光倒置显微镜(DMI), FC500 MPL型流式细胞仪(Beckman)。

1.4 方法

1.4.1 大鼠软骨细胞和巨噬细胞的提取 以SD大鼠原代单核细胞、大鼠原代软骨细胞作为本次实验的研究对象,两种细胞均采用DMEM细胞培养基,添加1%青霉素和链霉素、10%胎牛血清,每间隔1~2 d换液一次,培养时补充5% CO₂,温度控制为37℃。

原代软骨细胞的分离纯化:1)SD大鼠软骨组织提取:大鼠安乐死后,术区精细备皮、反复消毒,取双下肢股骨外侧正中入路,充分暴露、游离双侧股骨,彻底清除所附着肌肉、韧带、关节囊等软组织,剥离出双侧股骨两端(股骨头及股骨髁)的软骨组织,弯头镊子取出组织块放于培养皿中,PBS反复清洗,洗去杂质、血液及骨组织残渣;将漂洗后的软骨组织切成约为1 mm³小碎块后再用PBS清洗1次。2)软骨组织的分离、培养和传代:将分离后的软骨组织块置于离心管加入5 mL 0.02% II型胶原酶、500 μ L双抗,置于培养箱过夜,吹打均匀,经150目过滤网过滤,收集细胞,1 000 r/min离心8 min,吸取上清继续培养。通过显微镜能够观察到细胞的形态及生长情况。

原代单核细胞的分离纯化:采用Ficoll浓度梯度离心分离大鼠外周血单核细胞(PBMCs),通过免疫磁珠从外周血样品中分离CD14⁺CD11b⁺单核细胞,并通过流式细胞仪测定分离物纯度(>95%);选择对数生长期的单核细胞,将其接种于孔板用于后续

实验。

1.4.2 软骨细胞分泌的外泌体的提取与检测 检测软骨细胞外泌体:1)提取外泌体,取20 mL软骨细胞上清液,首先以2 000g离心力离心20 min以去除软骨细胞及细胞碎片,再收集上清液以1.8 \times 10⁵g离心力离心2 h以去除细胞囊泡,再次保留上清液以1 \times 10⁵g离心力离心2 h,小心吸除上清液,重新加入20 mL PBS后重复上一步离心操作,最后除去上清液,加入100 μ L PBS重悬(以20 mL的细胞上清液提取的外泌体配成100 μ L PBS外泌体悬液作为本研究的外泌体常规的使用浓度)。2)检测外泌体,采用透射显微镜观察外泌体形态与数量,将通过CD63免疫磁珠分离方法纯化的外泌体重新悬浮在PBS中,并放置在聚醋酸甲基乙烯酯(Formvar)包被的铜网格内,静置30 min。用PBS洗涤网格,使用吸水纸从侧边吸干。随后选用2%多聚甲醛固定样品10 min,再使用去离子水洗涤3次。然后,加入2%乙酸铀酰,负染15 min,再加入1滴0.4%乙酸铀酰和0.13%甲基纤维素10 min以包埋样品。最后,在Philips CM10透射电子显微镜中检查网格,并使用Gatan CCD数码相机拍摄图像。3)外泌体鉴定,采用Western Blot检测外泌体标志物CD9、CD63的蛋白水平。

1.4.3 巨噬细胞对软骨细胞外泌体的摄取情况

1.4.3.1 实验分组与软骨细胞分泌的外泌体染色

将单核细胞接种于6孔板中(5 \times 10⁴/mL),加入10 ng/mL的IL-1 β 诱导后,在37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h。取软骨细胞的外泌体悬液200 μ L于1 mL离心管中,加入稀释的PKH26工作液200 μ L,避光孵育30 min,加入等体积的1%BSA终止染色。接着分为3组(每组2孔):对照组(即第①组,PBS溶液+单核细胞组)每孔加入100 μ L PBS;低浓度外泌体组(即第②组,低浓度软骨细胞分泌的外泌体+单核细胞组)每孔加入25 μ L外泌体悬液和75 μ L PBS;高浓度外泌体组(即第③组,高浓度软骨细胞分泌的外泌体+单核细胞组)每孔加入50 μ L外泌体悬液和50 μ L PBS。

1.4.3.2 免疫荧光检测巨噬细胞对外泌体的摄取情况 3组细胞自行培养或摄取6 h后吸弃培养液,以37℃ PBS洗2~3遍,分别加入细胞固定液、细胞通透液、鬼笔环肽染液。最终加入DAPI染液避光孵育5 min,以PBS清洗2次,每次5 min,最后加入250 μ L PBS,荧光显微镜下进行免疫荧光检测。

1.4.3.3 RT-qPCR检测外泌体中lncRNA PVT1表达情况 使用TRIzol试剂提取总RNA并进行逆转录,以cDNA为模板进行RT-PCR扩增,以GAPDH作为内参,2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算相对表达量。

2 结果

2.1 透射电镜观察外泌体形态

2%乙酸铀酰染色后,电镜下放大 5×10^4 倍观察,可见一群呈类圆形、大小不均匀、直径约 30~110 nm、周边有明显的膜样结构的易质体,即软骨细胞分泌的外泌体(见图 1)。

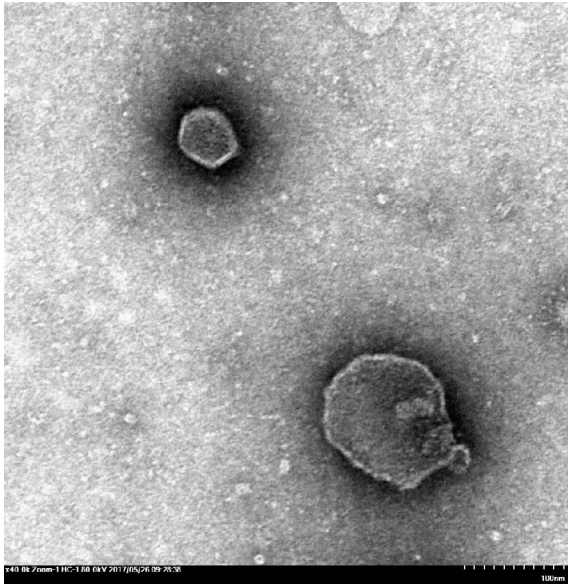


图 1 软骨细胞分泌的外泌体电镜图($\times 5\times 10^4$ 倍)

2.2 Western Blot 检测外泌体特异性蛋白 CD63 和 CD9 的表达

对提取的外泌体进行外泌体特异性蛋白 CD9 和 CD63 蛋白的 Western Blot 检测,结果呈阳性,进一步提示检测结果为外泌体(见图 2)。

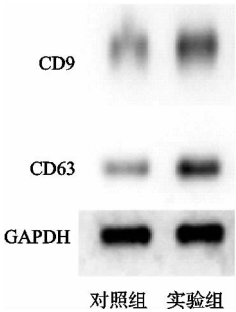


图 2 Western Blot 检测外泌体特异性蛋白 CD9 和 CD63 的表达

2.3 RT-qPCR 检测外泌体中 lncRNA PVT1 表达情况

与对照组比较,外泌体低浓度组和高浓度组所含 lncRNA PVT1 相对表达量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),且外泌体高浓度组所含 lncRNA PVT1 相对表达量较低浓度组显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 3。

2.4 免疫荧光检测细胞外泌体摄取情况

用荧光物质将外泌体标记后,加入细胞培养液中,观察到外泌体进入巨噬细胞,并且可以看到荧光分布高浓度外泌体组巨噬细胞摄取外泌体的量较低浓度外

泌体组摄取多(见图 4)。

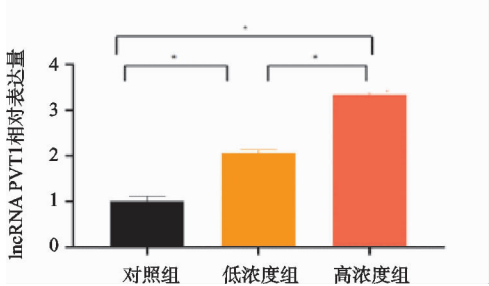


图 3 lncRNA PVT1 的相对表达情况

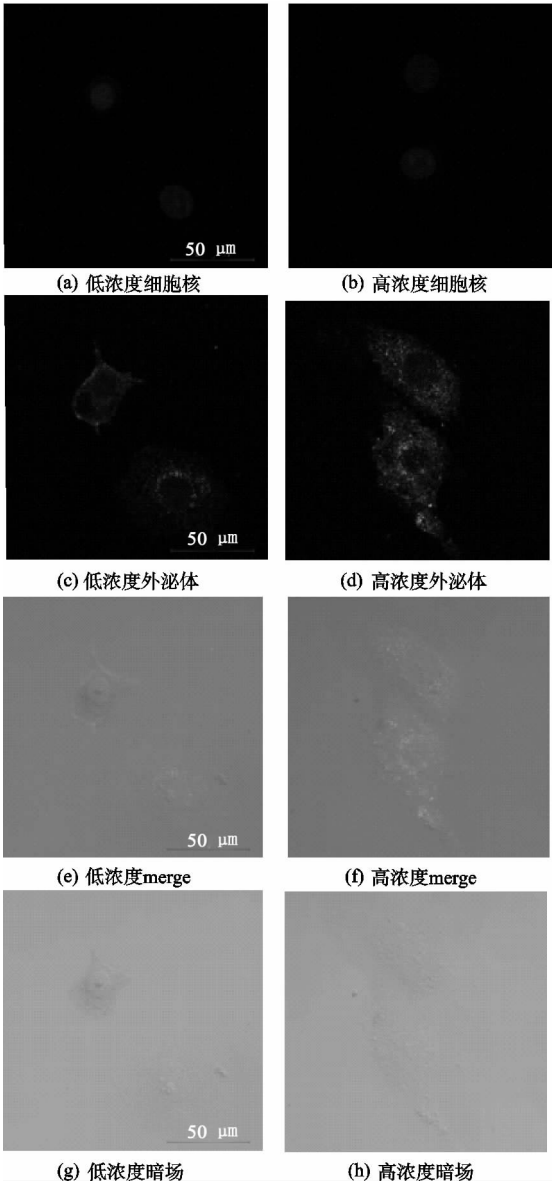


图 4 免疫荧光显微镜下检测外泌体摄取情况($\times 400$ 倍)

3 讨论

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis,KOA)具有很高的发病率,患者面临着很差的远期预后,诸如长期的慢性疼痛、致残等,但治疗往往只能选择口服非甾体类药物或是在疾病的后期采用手术治疗,因其发病机制仍不明确,尚有一定的研究空间。如前所述,lncRNA PVT1 与骨性关节炎发病密切相关,长链非编码 RNA

PVT1(lncRNA PVT1)能作为 miR-488-3p 的海绵调节软骨细胞凋亡^[5],且 lncRNA PVT1 敲除可通过调控 miR-27b-3p/TRAF3 轴抑制 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤^[6]。更重要的是研究发现在软骨细胞损伤模型中,lncRNA PVT1 敲除则逆转细胞低存活率和细胞凋亡、炎症反应^[7],故 lncRNA PVT1 在骨性关节炎中发挥重要作用^[8]。近年来,外泌体在组织、细胞间通信中的作用愈发受到研究者的关注,已有多位研究者证实部分细胞来源的外泌体对 KOA 软骨细胞产生影响。如 Wu 等^[9]发现来源于髌下脂肪的间充质干细胞的外泌体能下调 KOA 软骨细胞 MMP13 及 ADMTS5 的表达,从而发挥软骨保护效应;Qi 等^[10]证实间充质干细胞分泌外泌体能提高 KOA 软骨细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶的磷酸化水平,减少线粒体功能障碍,进而减少细胞凋亡。但前人对 lncRNA PVT1 是否源自软骨细胞分泌的外泌体缺乏研究,因此本实验借助 Western Blot 检测外泌体标志物 CD63 及 CD9 的蛋白水平,使用透射电子显微镜进行形态学观察,并采用 RT-qPCR 检测外泌体中 lncRNA PVT1 的水平,发现在炎症环境下,软骨细胞能够分泌携带 lncRNA PVT1 的外泌体,且 lncRNA PVT1 与外泌体浓度正相关。

巨噬细胞与骨性关节炎的炎症反应密切相关^[11],骨性关节炎中的巨噬细胞具有高度可塑性和异质性,通过响应微环境信号进行表型/功能动态转换。活化的巨噬细胞存在于大部分 OA 膝关节组织微环境(76%)内,与疼痛和影像学 OA 进展程度显著相关^[12],而且巨噬细胞的两种亚型 M1/M2 的比例失衡能够反映 KOA 的严重程度^[13]。lncRNA 在炎症与肿瘤中参与调控巨噬细胞 M1 极化^[14-15],如 Wu 等^[4]发现 M2 型巨噬细胞外泌体中的 lncRNA PVT1 能够竞争性地与 miR-21-5p 结合,上调 SOCS5 表达,抑制 jak/STAT3 通路,从而减轻了自身免疫性脑脊髓炎小鼠 Th17 细胞诱导的炎症反应,Zheng 等^[16]研究发现阻断 p38/MAPK 信号通路后能够起到明显的抗炎作用,证实脂多糖通过上调 lncRNA PVT1 表达,以加重巨噬细胞炎症反应,尽管 lncRNA PVT1 与巨噬细胞关系密切,但目前关于 KOA 中巨噬细胞与 lncRNA PVT1 的关系鲜有报道,通过本研究,笔者观察到巨噬细胞可摄取软骨细胞分泌的携带 lncRNA PVT1 的外泌体,且高浓度外泌体组细胞摄取外泌体的量较低浓度外泌体组多。

综上所述,笔者发现在炎症环境下,软骨细胞能够分泌携带 lncRNA PVT1 的外泌体,并且巨噬细胞可摄取这些携带 lncRNA 的外泌体,且无论 lncRNA 的水平还是巨噬细胞的摄取量都与外泌体浓度正相关。

下一步笔者将进一步探究巨噬细胞摄取该外泌体后的生物学相关改变,如是否促进巨噬细胞极化,激活 NF- κ B 信号通路^[17-18],以及与 miR-146 潜在的相互作用等^[8,19-22]。

参考文献

- [1] 袁普卫,康武林,李小群,等. 骨性关节炎发病机制及相关细胞因子的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志,2016,24(11):1010-1015.
- [2] LU Y, LIU L, PAN J, et al. MFG-E8 regulated by miR-99b-5p protects against osteoarthritis by targeting chondrocyte senescence and macrophage reprogramming via the NF- κ B pathway[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(6):533.
- [3] LV Z, XU X, SUN Z, et al. TRPV1 alleviates osteoarthritis by inhibiting M1 macrophage polarization via Ca(2⁺)/CaMKII/Nrf2 signaling pathway [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(6):504.
- [4] WU L, XIA J J, LI D H, et al. Mechanisms of M2 macrophage-derived exosomal long non-coding RNA PVT1 in regulating Th17 cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1934.
- [5] LI Y F, LI S H, LUO Y T, et al. LncRNA PVT1 regulates chondrocyte apoptosis in osteoarthritis by acting as a sponge for miR-488-3p[J]. DNA and Cell Biology, 2017, 36(7):571-580.
- [6] LU X Y, YU Y H, YIN F X, et al. Knockdown of PVT1 inhibits IL-1 β -induced injury in chondrocytes by regulating miR-27b-3p/TRAF3 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 79:106052.
- [7] MENG Y, QIU S Q, SUN L, et al. Knockdown of exosome mediated lnc PVT1 alleviates lipopolysaccharide induced osteoarthritis progression by mediating the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway via miR-93-5p[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6):5313-5325.
- [8] ZHENG L, WANG Y Y, QIU P C, et al. Primary chondrocyte exosomes mediate osteoarthritis progression by regulating mitochondrion and immune reactivity[J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14(24):3193-3212.
- [9] WU J Y, 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[J]. Biomaterials, 2019, 206:87-100.
- [10] QI H, LIU D P, XIAO D W, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells inhibit mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of chondrocytes via p38, ERK, and Akt pathways[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2019, 55(3):203-210.

- [11] ZHANG H Y, LIN C X, ZENG C, et al. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2[J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(10):1524-1534.
- [12] NI Z H, KUANG L, CHEN H G, et al. The exosome-like vesicles from osteoarthritic chondrocyte enhanced mature IL-1 β production of macrophages and aggravated synovitis in osteoarthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7):522.
- [13] LIU B L, ZHANG M Q, ZHAO J M, et al. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 16(6):5009-5014.
- [14] LIANG Y R, SONG X J, LI Y M, et al. LncRNA BCRT1 promotes breast cancer progression by targeting miR-1303/PTBP3 axis[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):85.
- [15] MA M G, PEI Y F, WANG X X, et al. LncRNA XIST mediates bovine mammary epithelial cell inflammatory response via NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(1):e12525.
- [16] ZHENG S C, LI W C, LIAO W H, et al. Silencing of lncRNA-PVT1 ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammation in THP-1-derived macrophages via inhibition of the p38 MAPK signaling pathway[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(6):6410-6418.
- [17] ZHANG A, WANG G, JIA L, et al. Exosome-mediated microRNA-138 and vascular endothelial growth factor in endometriosis through inflammation and apoptosis via the nuclear factor-B signaling pathway[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43(1):358-370.
- [18] CONSOLE L, SCALISE M, INDIVERI C. Exosomes in inflammation and role as biomarkers[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2019, 488:165-171.
- [19] FUNAHASHI Y, KATO N, MASUDA T, et al. miR-146a targeted to splenic macrophages prevents sepsis-induced multiple organ injury[J]. *Lab Invest*, 2019, 99(8):1130-1142.
- [20] WANG J, CUI Z Q, LIU L, et al. MiR-146a mimics attenuates murine allergic rhinitis by downregulating TLR4/TRAF6/NF- κ B pathway[J]. *Immunotherapy*, 2019, 11(13):1095-1105.
- [21] ZHANG J, ZHANG Z G, LU M, et al. MiR-146a promotes oligodendrocyte progenitor cell differentiation and enhances remyelination in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 125:154-162.
- [22] LI D, DUAN M Y, FENG Y, et al. MiR-146a modulates macrophage polarization in systemic juvenile idiopathic arthritis by targeting INHBA[J]. *Mol Immunol*, 2016, 77:205-212.