

# 读书报告



汇报人：贾申宗



时间：2018年10月28日





Eur Rev Med Pharmacol Sci 2017; 21 (24): 5562-5570

DOI: 10.26355/eurrev\_201712\_13993

## Exosomes secreted by mice adipose-derived stem cells after low-level laser irradiation treatment reduce apoptosis of osteocyte induced by hypoxia

**C.-T. Zhu, T. Li, Y.-H. Hu, M. Zou, Q.-Guo, X.-W. Qu**

Laser Medical Center, The First People's Hospital of Yunnan Province, The Affiliated Hospital of Kunming University of Technology, Yunnan, China. quyishengtougao@126.com

# CONTENTS

## 目录

1

研究背景

2

研究方法

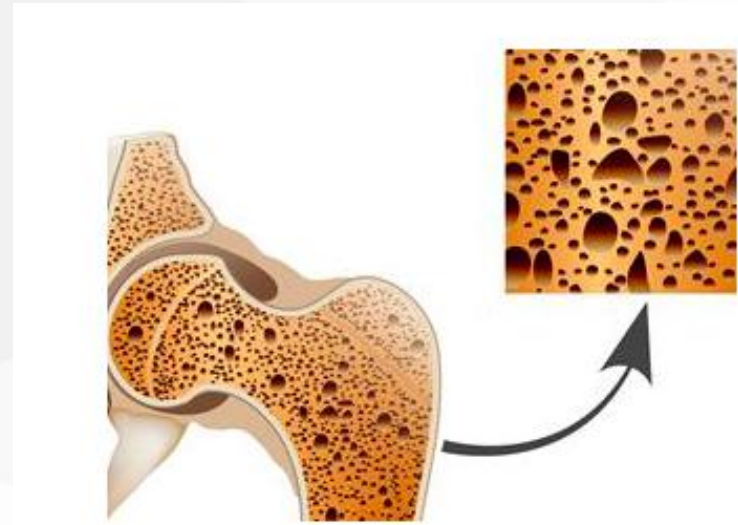
3

实验结果

4

结论分析

## ▶ 研究背景

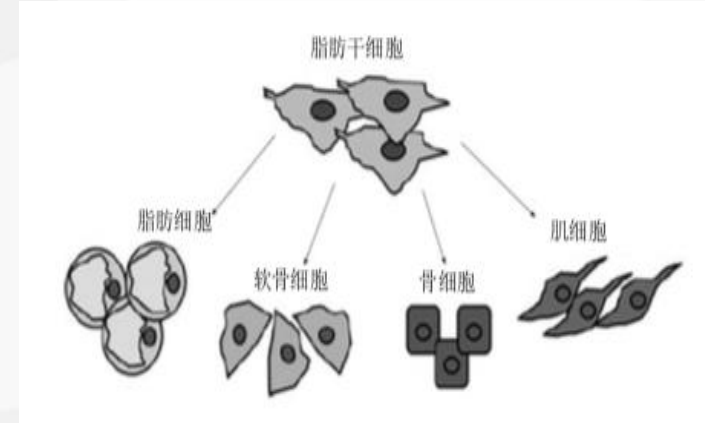


骨质疏松症（Osteoporosis）是由于多种原因导致的骨密度和骨质量下降，骨微结构破坏，造成骨脆性增加，从而容易发生骨折的全身性骨病。骨质疏松症分为原发性和继发性两大类。原发性骨质疏松症又分为 I 型（绝经后骨质疏松症）、II 型（老年性骨质疏松症）和 III 型（特发性骨质疏松症）三种。除了原发性骨质疏松外，还可能由多种疾病引起，称为继发性骨质疏松症。

随着骨细胞凋亡的概念被引入骨质疏松症研究领域，**骨细胞凋亡异常**在 I 型骨质疏松症发生中的作用逐渐被研究者所认识，骨细胞凋亡成为研究骨质疏松症的热点。

## ▶ 研究背景

脂肪干细胞从脂肪组织中分离得到的一种具有多向分化潜能的干细胞。因其来源丰富,取材方便,且组织中干细胞含量丰富,因而被认为是组织再生和修复的理想细胞来源,外泌体是直径在30-130nm的细胞外囊泡,其可以被各种类型的细胞释放并被靶细胞接收或到达远处靶标以调节受体细胞的生理功能。



低强度激光是指波长在600-1000nm,输出功率在1mW-500mW的激光器发出的红光柱或近红外光,它对细胞和组织具有一系列的生物调节作用。研究表明,低强度激光照射可以促进骨修复,增强围绝经期大鼠模型的骨结构,增加骨密度,可作为中老年女性骨质疏松症的有效预防措施之一。



此研究旨在探讨通过低强度激光照射后脂肪干细胞释放的外泌体对缺氧缺血条件下骨细胞凋亡的影响,为骨质疏松症的治疗提供新的思路和方法。

# 研究方法

1.

## 脂肪干细胞培养

4-6周龄SPF雄性小鼠取腹股沟皮下脂肪组织，用PBS洗涤后切碎。

3mg/mL I 型胶原酶37°C消化40min，用含10%胎牛血清的基础培养基终止消化，1000rpm离心5min，弃去上清液。加入含10%胎牛血清的基础培养基将细胞重悬，并用滤网过滤。

将所得细胞混匀接种于培养瓶中，置37°C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。24h后首次换液，以后3天换液1次。细胞生长至80%-90%融合时，用0.25%胰蛋白酶消化细胞，以1:3进行传代。

2.

## MLO-Y4细胞培养

将MLO-Y4细胞接种于 I 型胶原蛋白包被的培养皿上，用含2.5%胎牛血清和2.5%小牛血清的α-MEM培养基培养。

每3天更换一次培养基，细胞生长至70%-80%融合时，用0.25%胰蛋白酶消化细胞，以1:3进行传代。

缺血缺氧组使用无血清培养基，将细胞在1%O<sub>2</sub>和5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24h。

# 研究方法

3.

## 流式细胞仪检测

选择第2代脂肪干细胞，在100 $\mu$ L PBS中悬浮 $10^6$ 个细胞，加入抗体CD44、CD45、CD31孵育3min，使用PBS洗涤未标记抗体，复苏无抗体细胞作为对照。

将100 $\mu$ L MLO-Y4细胞悬液置于5mL的流动管中，加入5 $\mu$ L Annexin/FITC和10 $\mu$ L 20 $\mu$ g/mL碘化丙啶溶液，在室温暗处混合培养15min。

使用Beckman流式细胞仪检测混合液，并使用FlowJo软件对结果进行分析。

4.

## 脂肪干细胞集落形成实验

选择第3代脂肪干细胞，常规培养14天后除去培养基。

用PBS洗涤细胞两次，用4%多聚甲醛溶液固定15分钟，用0.1%结晶紫染色15分钟，再次用PBS洗涤

将具有超过50个细胞的集落标记为一个克隆，并且每个孔中的克隆数与接种细胞数的比率表明集落形成率。

# 研究方法

5.

脂肪干细胞多向分化能力检测

成骨分化能力检测

成脂分化能力检测

选择第3代脂肪干细胞在成骨诱导溶液中培养，每隔3天更换一次溶液。将细胞培养21天后，用PBS洗涤，再用4%多聚甲醛溶液固定15分钟后，用0.5%茜素红染色30分钟。

选择第3代脂肪干细胞，并用脂肪细胞形成诱导溶液A培养。诱导3天后，用脂肪细胞形成诱导溶液B代替溶液A培养。24小时后，再次用溶液A代替。用溶液A和B交替培养16天后，用溶液B连续培养细胞5天，固定30分钟后用油红O染色30分钟，然后在显微镜下观察染色效果。

6.

提取脂肪干细胞释放的外泌体

将胎牛血清离心12h后取上清液，制备无外泌体的胎牛血清

选择第4代小鼠脂肪干细胞并使用含有10%无外泌体胎牛血清的培养基培养48小时，收集上清液。

使用超速离心法提取小鼠脂肪干细胞释放的外泌体。在低强度激光照射治疗组中，将脂肪干细胞暴露于低强度激光照射24小时后，超速离心提取外泌体。



# 研究方法

## 7. 透射电镜观察外泌体

取10 $\mu$ L分离和纯化的外泌体，滴加到300目铜网上，在室温下静置2分钟。用滤纸从边缘轻轻吸出多余的液体；将外泌体在室温下用3% (w/v) 磷钨酸溶液再染色1分钟，干燥，在透射电镜下观察并拍照。

## 8. Western blotting

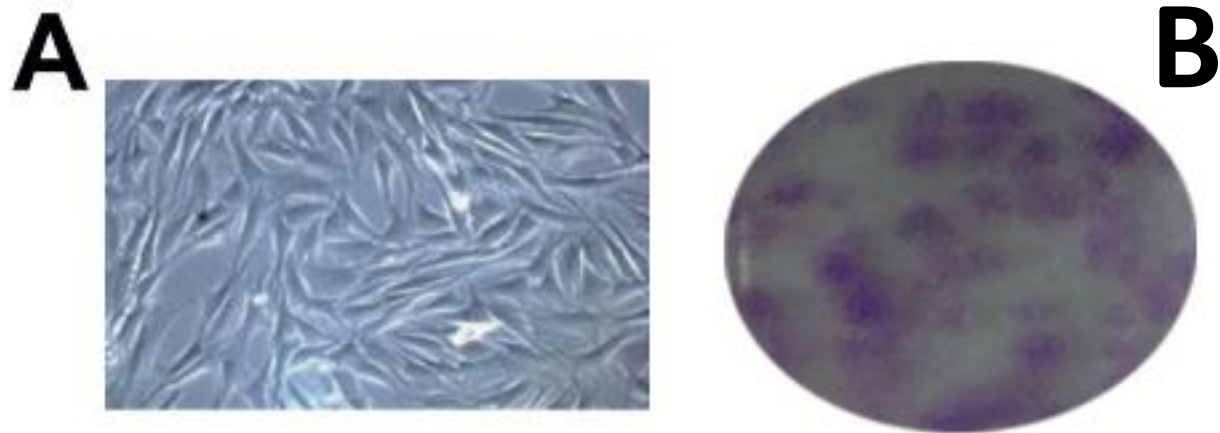
收集脂肪干细胞、脂肪干细胞分泌的外泌体和骨细胞蛋白。

- ①: BCA法检测蛋白浓度
- ②: SDS-PAGE凝胶电泳
- ③: 湿式电转印
- ④: 膜的封闭, 抗体杂交
- ⑤: 化学发光溶液显色

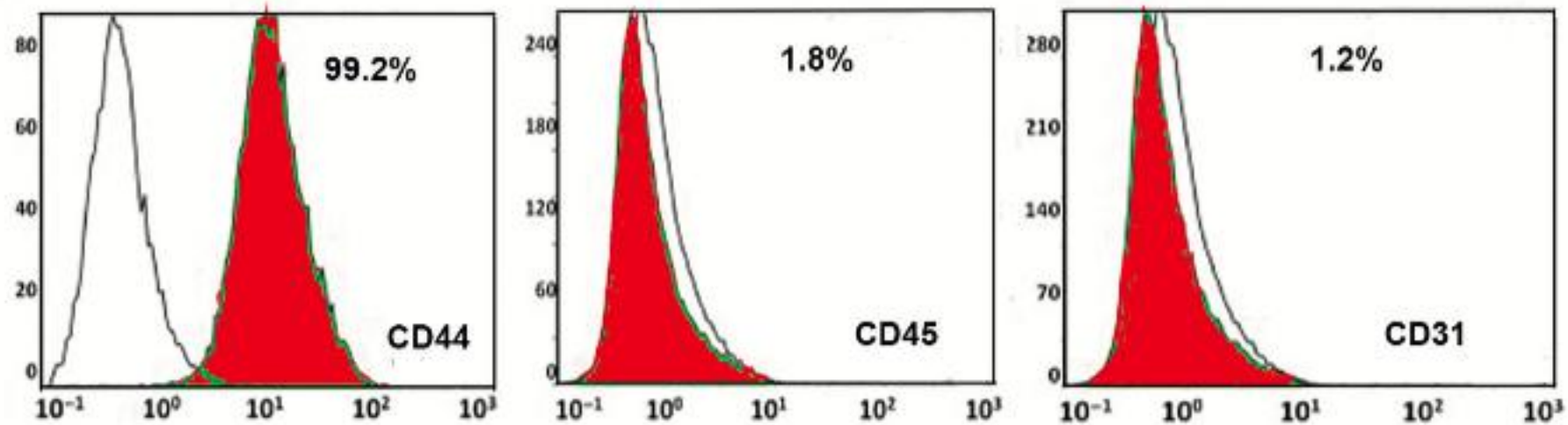
## 9. TUNEL法检测细胞凋亡

选择生长状态良好的MLO-Y4细胞接种于密度为 $5 \times 10^4$ /mL的48孔板中，培养24h，贴壁生长后弃上清。用4%多聚甲醛固定细胞1h后，根据TUNEL凋亡检测试剂盒的指示进行染色，在倒置荧光显微镜下观察。

# ▶ 实验结果



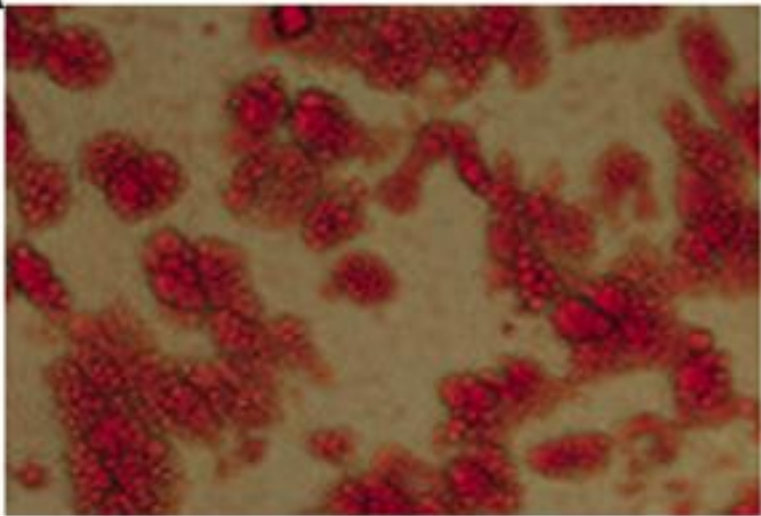
**C**



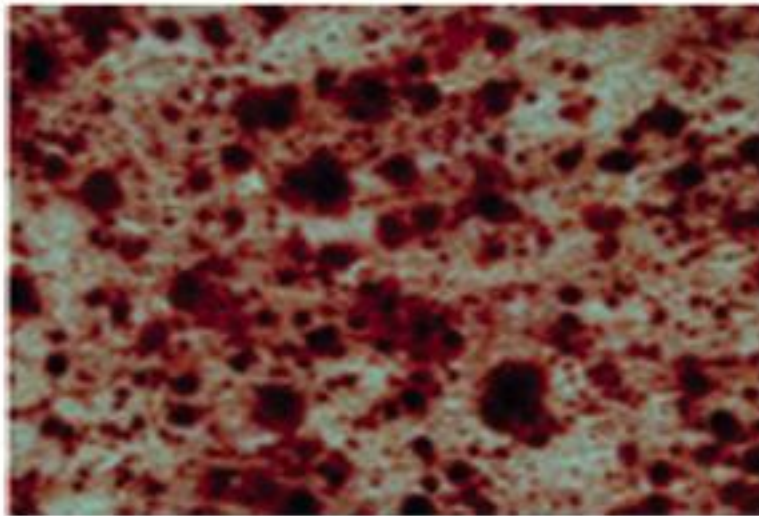
鉴定小鼠脂肪干细胞： A：脂肪干细胞培养图像 B：结晶紫染色后的脂肪干细胞集落  
C：流式细胞仪鉴定脂肪干细胞表面标志物

# ▶ 实验结果

**A**



**B**

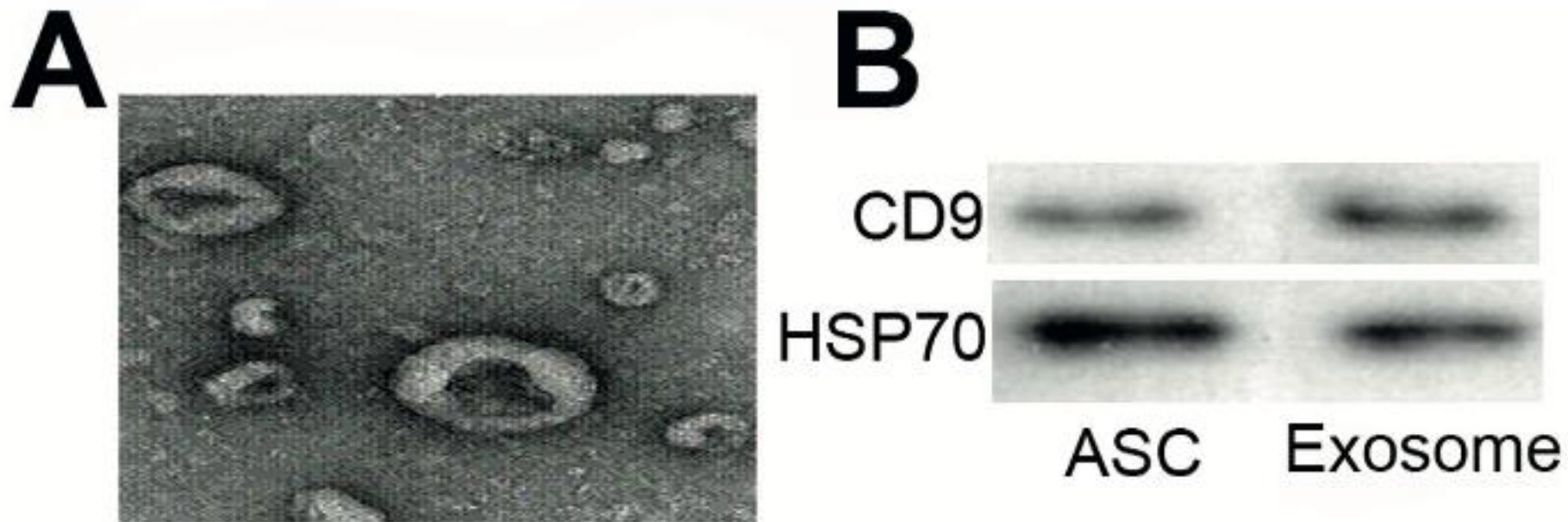


鉴定脂肪干细胞多向分化能力:

A: 油红O染色鉴定成脂分化能力

B: 茜素红染色鉴定成骨分化能力

# ▶ 实验结果

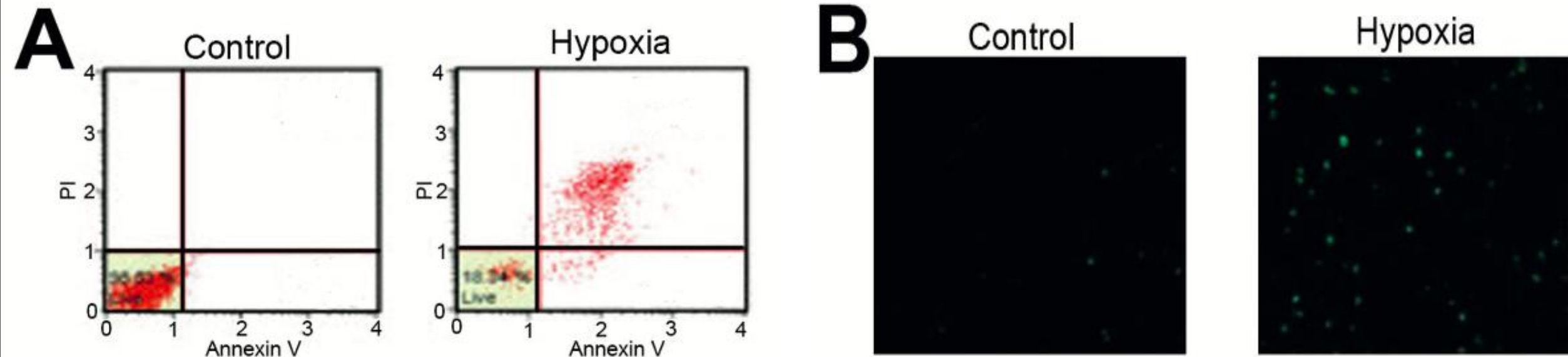


鉴定脂肪干细胞释放的外泌体：

A：通过透射电镜观察外泌体的形态

B：通过Western印迹检测脂肪干细胞及其释放的外泌体中CD9和HSP70蛋白的表达。

# ▶ 实验结果

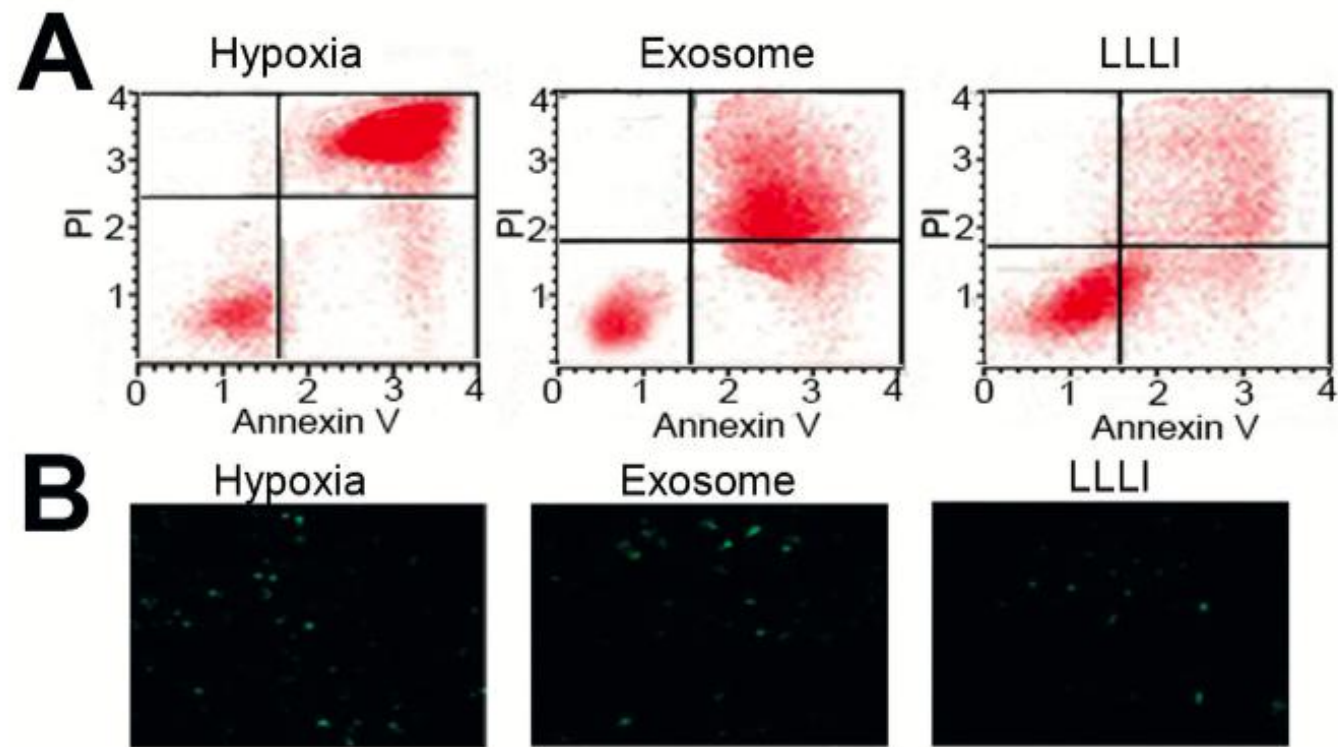


细胞凋亡模型建立:

A: 通过流式细胞仪检测缺血缺氧诱导的骨细胞凋亡

B: 通过TUNEL法检测缺血缺氧诱导的骨细胞凋亡

# 实验结果

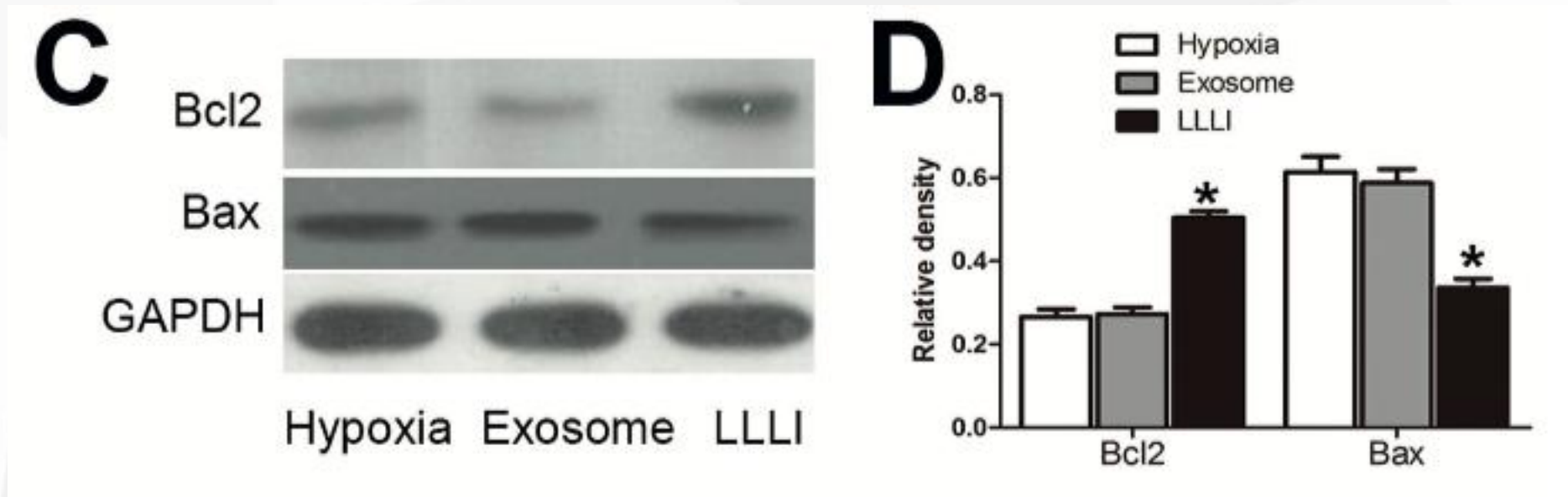


在低强度激光照射处理后，脂肪干细胞释放的外泌体抑制骨细胞凋亡：

A：使用流式细胞仪检测骨细胞凋亡率

B：TUNEL法检测骨细胞凋亡

# 实验结果



在低强度激光照射处理后，脂肪干细胞释放的外泌体抑制骨细胞凋亡：

C：Western blot检测凋亡相关蛋白的表达。

D：凋亡相关蛋白的半定量分析。

# 结论分析



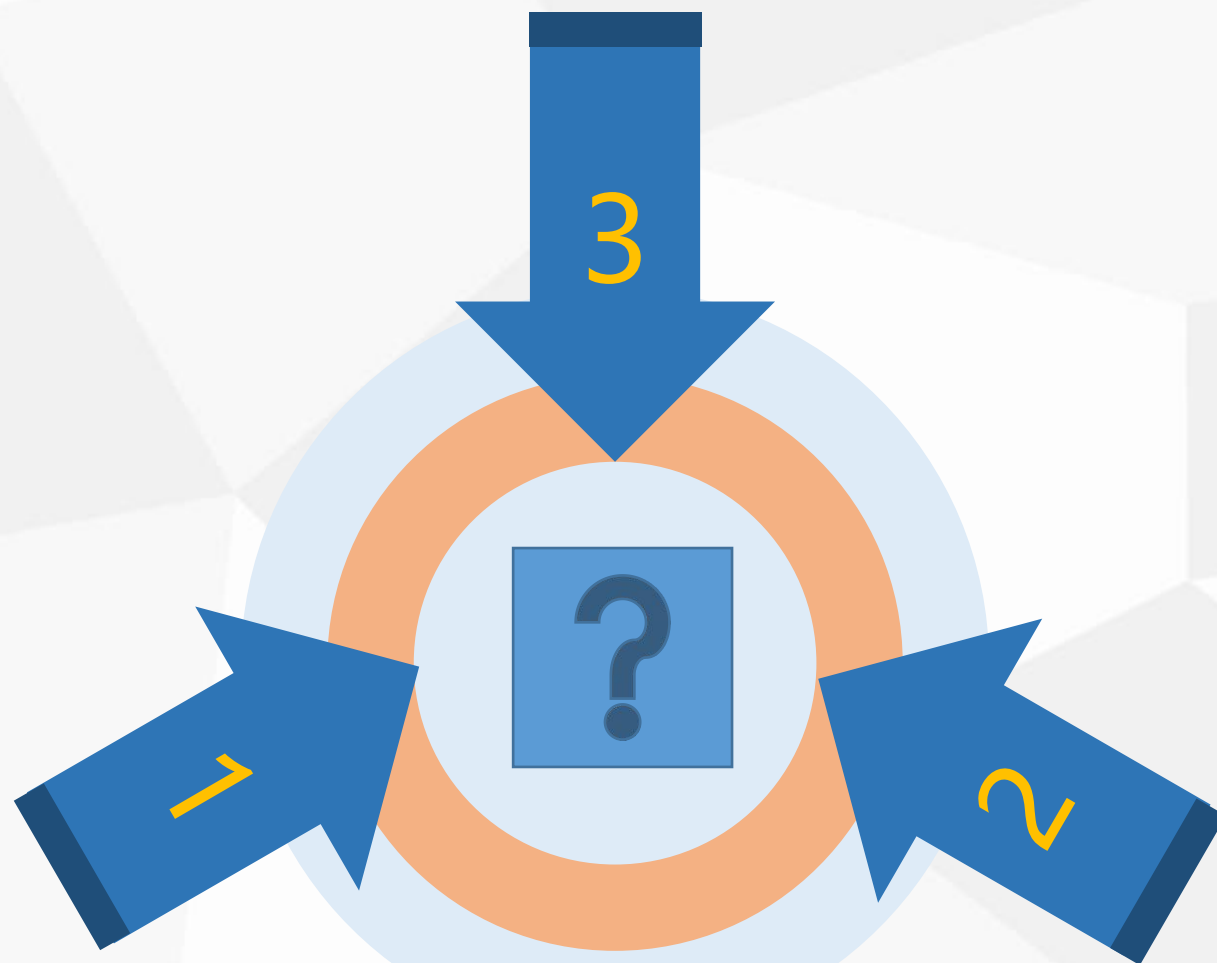
缺氧缺血**协同促进**骨细胞凋亡

低强度激光照射处理的脂肪干细胞产生的外泌体可**有效抑制**缺氧缺血环境诱导的骨细胞凋亡。



# 结论分析

低强度激光照射时间不同对外泌体是否有影响?



是否缺少一个有血清缺氧诱导组的对照实验?

缺氧程度不同照射效果是否也不同?

敬请大家批评指正

