

不同极化类型巨噬细胞外泌体对大鼠放射损伤骨髓间充质干细胞作用的初步研究

张维文¹ 宗春琳² 唐子豪¹ 赵路² 田磊² 关键¹ (通讯作者)

(1.佳木斯大学口腔医院)

(2.军事口腔医学国家重点实验室, 口腔疾病国家临床医学研究中心, 陕西省口腔疾病临床医学研究中心, 第四军医大学口腔医院口腔颌面外科)

摘要:目的 探索不同极化类型巨噬细胞来源外泌体对放射损伤后的骨髓间充质干细胞的作用。方法 培养并鉴定大鼠骨髓来源巨噬细胞(BMDMs)并诱导为不同极化类型(M1、M2型),收集不同极化类型巨噬细胞来源的外泌体(M1-exo、M2-exo),培养鉴定骨髓间充质干细胞(BMSCs)并分为对照组、放射组(irBMSCs)、M1-exo组(irBMSCs+M1-exo)、M2-exo组(irBMSCs+M2-exo)。采用CCK-8及Ki-67染色检测各组细胞增殖能力、TUNNEL染色检测各组细胞凋亡情况、茜素红染色检测各组成骨分化能力、Western blot检测ALP、RUNX2、 α -SMA的表达情况。结果 放射组BMSCs与对照组相比,增殖能力显著下降、TUNNEL阳性细胞数显著增多、成骨分化能力显著下降、RUNX2及ALP表达显著减低、 α -SMA表达显著升高;M2-exo组与放射组相比,增殖能力显著增高、TUNNEL阳性细胞数显著减少、成骨分化能力显著增高、RUNX2及ALP表达显著增加、 α -SMA表达显著降低。结论 X射线造成BMSCs细胞损伤、成骨分化能力受损,M2型巨噬细胞来源的外泌体能够显著改善放射造成的BMSCs损伤、提高成骨分化能力、降低纤维化分化能力。

关键词:骨髓间充质干细胞(BMSCs);放射损伤;巨噬细胞;外泌体;放射性颌骨骨坏死

放射性颌骨骨坏死(Osteoradionecrosis of the jaws,ORNJ)为头颈部恶性肿瘤放射治疗之后常见的严重并发症,发病率为8.2%~22%^[1],主要临床症状表现为死骨暴露、病理性骨折等,目前其发病机制不清,缺乏非常有效的预防和治疗措施^[2,3,4],因此对其的机制研究一直是国内外的热点。

文献报道及我们前期研究发现,成骨功能降低在ORNJ发病过程中发挥重要作用,而骨髓间充质干细胞(BMSCs)是机体骨形成的重要效应细胞^[5,6],而且放射损伤的大鼠BMSCs成骨能力严重受损^[7]。因此,BMSCs成骨功能受损与ORNJ的发病密切相关。

巨噬细胞在放射损伤、纤维化疾病的病理发展过程中均具有重要的作用^[8,9,10]。巨噬细胞主要分为两种极化类型:经典激活的巨噬细胞(M1)和替代激活的巨噬细胞(M2)^[11,12]。M1型巨噬细胞促进炎症细胞因子的表达,其造成的微环境削弱BMSCs的成骨能力^[13]。M2型巨噬细胞可以释放抗炎和营养细胞因子,提高BMSCs的成骨分化能力^[14]。多项研究表明,巨噬细胞通过外泌体对多种细胞发挥调控作用。但是不同极化类型巨噬细胞外泌体对放射性损伤BMSCs的生物学特性的研究尚不清晰,本研究拟在体外验证不同极化类型巨噬细胞来源的外泌体对放射损伤后的骨髓间充质干细胞的影响,为ORNJ的治疗方法提供新的思路与实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

本研究所用SPF级SD大鼠由空军军医大学实验动物中心购买,所有动物实验操作均符合动物实验伦理原则。MEM Alpha Modification(1X)、DMEM/HIGH GLUCOSE(Hyclone); Recombinant Rat M-CSF(PEPROTECH); α -SMA、RUNX2、CD86、CD68(GeneTex); ALP(abcam); CD206(arigo); F4/80(BioCell); 茜素红S染色液(Solarbio); CCK-8(七海生物); TUNNEL(碧云天生物)

1.2 细胞培养及鉴定

BMSCs取自2周龄雌性SD大鼠。脱颈处死后分离股骨和胫骨,去除骨表面软组织,剪断骨髓使用培养液冲出骨髓,充分吹打形成单细胞悬液,接种在细胞培养皿中,使用添加10%胎牛血清的 α -MEM培养基在37℃、5%CO₂的恒温孵箱中培养,3~4天换液,细胞密度达到70%~80%传代,P3代细胞用于本研究后续实验。光镜下观察细胞,流式细胞术检测CD34、CD90、CD45、CD29进行细胞鉴定。

大鼠骨髓来源巨噬细胞取自2周龄雌性SD大鼠,脱颈处死后分离股骨和胫骨,去除骨表面软组织,剪断骨髓使用无菌PBS冲出骨髓,充分吹打形成单细胞悬液,加入红细胞裂解液处理2分钟,800转离心5分钟,收集细胞,培养液重悬后加入M-CSF(10ng/ml)接种在细胞培养板中,诱导7天后用于后续实验。光镜下观察细胞形态,并用免疫荧光染色检测F4/80、CD68进行巨噬细胞鉴定。

LPS+IFN- γ 诱导M1型巨噬细胞,IL-4诱导M2型巨噬细胞。光镜下观察细胞形态,免疫荧光染色检测CD86、CD206进行鉴定。

1.3 外泌体提取和鉴定

大鼠巨噬细胞诱导极化分型24小时后弃培养基,加入不含血清和抗生素的高糖DMEM培养基培养24小时。收集上清液,4℃、1000g离心10分钟,吸取上清液,4℃、1000g离心30分钟,吸取上清并用0.22 μ m滤膜过滤后收集上清,4℃、120000g离心60分钟,去上清,PBS重悬,将两管样品合为一管,严格配平,4℃、120000g离心60分钟,弃上清收集沉淀,PBS重悬后-80℃冰箱储存待用。透射电镜(TEM)观察外泌体特征,Particle Metrix ZetaView检测进行粒径分析(NTA)。通过Western Blot法检测CD63、CD81、CD9、TSG101表达。

1.4 放射损伤BMSCs模型建立

根据实验组前期研究,将BMSCs以 2.5×10^6 个细胞接种于6孔板中接受放射处理,放射线来源于陕核工业第二一五医院放疗科CX5762型放射治疗机(VARIAN,美国),射线性质属高能X射线,剂量率为4Gy/min,单次放射剂量为4Gy。

1.5 共培养实验

通过阅读文献可知,外泌体共培养在48h时效果达到顶峰,本人预实验时24h、72h较48h效果不显。放射后BMSCs过夜后加入外泌体共培养48h,光镜下观察各组细胞形态、CCK-8及Ki-67染色检测细胞增殖能力、TUNNEL染色检测细胞凋亡情况、茜素红染色分析成骨能力、Western Blot检测各组细胞中ALP、RUNX2、 α -SMA的表达。

1.7 茜素红染色及定量分析

接种各组待测细胞共培养,以成骨诱导液诱导21d后,2.5%戊二醛固定15min后,用1%茜素红染液(pH4.3)染色,荧光显微镜下观察钙结节数量及密度。10%氯化十六烷基吡啶溶液洗脱30min,进行茜素红染色定量,用50 μ L洗脱液在540nm处测量光密度,由此评估细胞外基质矿化情况

1.8 Ki-67染色及分析

共培养48h后室温4%多聚甲醛固定45min,0.1%Triton-X通透10min,加入适量封闭液室温封闭60min,以1:200比例加入稀释后Anti-ki67 Rabbit antibody(Component A),4℃孵育过夜,每个样品加入50 μ L Cy3-conjugated Goat anti-Rabbit IgG(Component A),以1:100比例稀释)室温避光孵育60分钟,滴加80 μ L DAPI室温孵育5min,封片后在荧光显微镜下观察,ImageJ软件荧光定量分析。

1.9 统计学分析

对各组计量数据,使用SPSS 17.0软件进行one-way ANOVA分析, $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 和巨噬细胞的培养与鉴定

光镜下观察 BMSCs 呈长梭形成纤维细胞样形态, 贴壁较好(图 1A)。流式细胞术证明其表面高表达 CD90、CD29, 低表达 CD45、CD34(图 1B)。巨噬细胞光镜下呈短梭形, 免疫荧光表明其表面高表达 F4/80 和 CD68 分子(图 1C-D)。

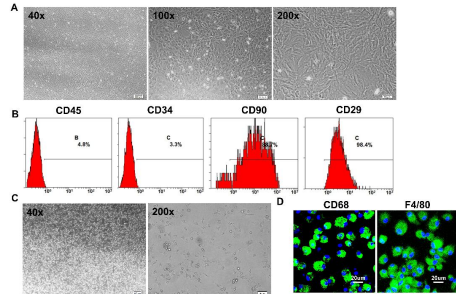


图 1 BMSCs 和巨噬细胞的培养与鉴定

A 光镜下 BMSCs 细胞形态; B BMSCs 表面标志物表达; C 光镜下骨髓巨噬细胞形态; D 骨髓巨噬细胞表面标志物表达

Fig 1 Cultivation and identification of rat BMSCs and macrophages

A The morphology of BMSCs under optical microscope; B The expression of surface markers of BMSCs; C The morphology of rat BMDMs under optical microscope; D The expression of surface markers of rat BMDMs

2.2 巨噬细胞极化诱导及外泌体提取与鉴定

使用 LPS+IFN- γ 诱导后, 光镜下表现为梭型, 免疫荧光染色显示高表达 CD86。使用 IL-4 诱导后, 光镜下表现为纺锤状, 免疫荧光染色显示高表达 CD206(图 2)。

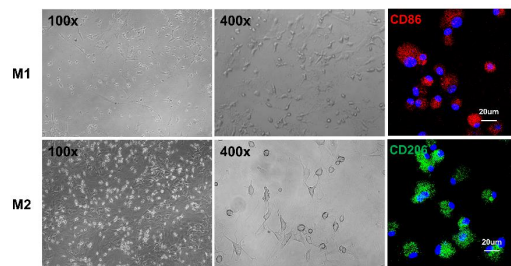


图 2 M1 和 M2 型巨噬细胞培养和鉴定

Fig 2 The culture and identification of M1 and M2 macrophages

2.3 外泌体鉴定

TEM 观察 M1-exo、M2-exo 均有典型的杯状结构, 粒径在 100nm(图 3A)。Western blot 发现其表达 CD63、CD81、CD9、TSG101 等标志分子(图 3B)。NTA 表明其主要分布在 80-200nm 左右(图 3C), 符合目前外泌体公认的鉴定标准。

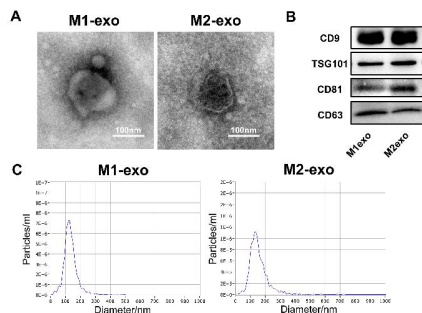


图 3 M1 和 M2 型巨噬细胞来源的外泌体提取和鉴定

A 透射电镜鉴定; B 外泌体的蛋白标志物分析; C 外泌体的粒径分析

Fig 3 The extraction and identification of exosomes derived from M1 and M2 macrophages

A TEM identification; B The protein marker analysis of exosomes; C NTA of exosomes

2.4 不同极化类型巨噬细胞外泌体与放射损伤 BMSCs 细胞模型共培养

光镜下观察正常 BMSCs 呈规则的长梭形细胞整齐排列, X 射线放射后 48 小时, 细胞形态发生不规则形变, 并出现大量死细胞, 细胞密度明显下降(图 4A), M2-exo 组相较于放射组与 M1-exo 组细胞密度有所上升。

CCK-8 检测发现, 放射组 BMSCs 细胞存活比例与对照组相比, 显著减少, 差异有统计学差异, M1-exo 组细胞存活比例与放射组无统计学差异, M2-exo 组细胞存活比例与放射组相比显著增加, 差异有统计学意义(图 4B)。

TUNNEL 染色结果显示, 放射组 BMSCs 发生大量凋亡, M2-exo 组阳性细胞数与放射组和 M1-exo 组相比显著下降(图 4C)。

Ki-67 免疫荧光染色结果显示, 放射组 BMSCs 与对照组相比 Ki-67 阳性细胞数显著下降, M1-exo 组与放射组相比无统计学差异, M2-exo 组较放射组相比显著增高(图 4D)。

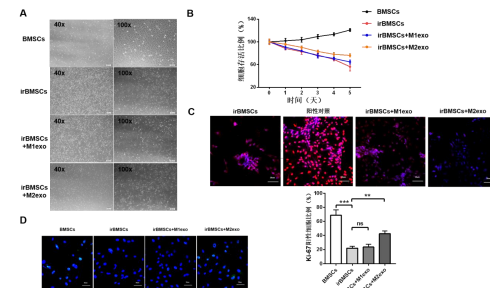


图 4 外泌体对放射后 BMSCs 增殖能力的影响

A 细胞形态的影响; B CCK-8 结果; C TUNNEL 染色结果; D Ki-67 染色结果和分析

Fig 4 The effect of exosomes on the proliferation of BMSCs after radiation A The influence of cell morphology; B The results of CCK-8; C The results of TUNNEL staining; D Ki-67 staining results and analysis

2.5 成骨和成纤维能力检测

茜素红染色结果显示, 放射组 BMSCs 吸光度值与对照组相比明显下降, M1-exo 组与放射组相比吸光度值无统计学差异, M2-exo 组与放射组相比吸光度值增高, 差异具有统计学意义(图 5A)。

Western blot 检测成骨相关蛋白及 α -SMA 结果显示, 放射组 BMSCs 成骨相关蛋白 ALP 和 RUNX2 的表达与对照组相比显著下降; M1-exo 组与放射组相比, ALP 的表达无统计学差异, RUNX2 的表达显著增高; M2-exo 组与放射组相比, ALP 和 RUNX2 的表达均显著增高。放射组 BMSCs 中 α -SMA 的表达与对照组相比显著增高, M1-exo 组与对照组相比 α -SMA 表达量明显下降, M2-exo 组与放射组相比 α -SMA 表达量显著下降(图 5B)。

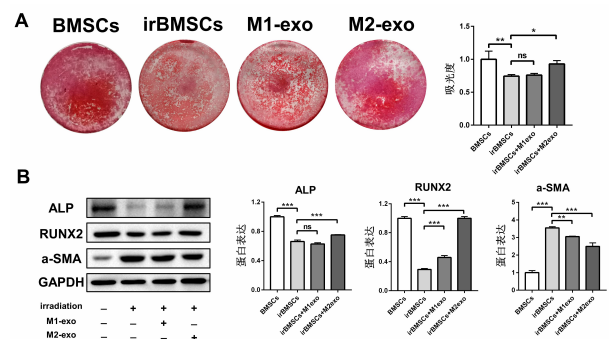


图 5 外泌体对放射后 BMSCs 成骨和成纤维能力的影响

A 茜素红染色结果; B ALP、RUNX2 和 ALP 的表达水平

Fig 5 The effect of exosomes on the osteogenesis and fibrogenesis of BMSCs after radiation

A Alizarin red staining results; B The expression levels of ALP, RUNX2 and ALP of BMSCs

讨论

放射性颌骨坏死(ORNJ)是头颈部肿瘤放疗后严重的并发症之一^[2,6,15]。骨髓间充质干细胞(BMSCs)作为机体维持骨稳态的重要效应细胞,在生理性骨形成和病理性骨坏死中扮演着重要的角色^[5,6,16]。前期大量文献表明,颌骨局部接收放射后颌骨骨髓间充质干细胞的成骨功能严重受损,影响了局部骨稳态,造成成骨能力下降,从而产生了骨坏死^[17,18],这可能是ORNJ重要的发病机制之一。

外源性给予BMSCs对于颌骨坏死具有一定的治疗作用^[9]。但是我们的前期研究及文献表明,在放射损伤的局部微环境下,BMSCs不仅可出现成骨能力的下降,还可向纤维化方向分化,这预示着直接使用外源性BMSCs治疗ORNJ具有促进局部纤维化进展的风险^[14,20]。

巨噬细胞是一种重要的免疫细胞,与放射性损伤、纤维化疾病及放射性纤维化疾病均密切相关。巨噬细胞的表型转换可直接参与炎症转归的调控^[9,10,21],进而对干细胞的功能进行调控^[10,22,23]。不同极化类型的巨噬细胞对BMSCs的生物学特性具有不同的调控作用,外泌体是细胞分泌的一种细胞外囊泡,可携带大量生物活性分子参与细胞间邻近、远程功能调控^[6],巨噬细胞通过外泌体对多种细胞发挥免疫调节作用已在多项研究中得到证实^[9,10],具有独特的优势。有文献表明,在ORNJ病变组织中存在大量的巨噬细胞聚集,但是具体的极化类型及其作用并不清楚。

为进一步明确不同极化类型的巨噬细胞外泌体在ORNJ中的作用,本研究设计体外实验,使用不同极化类型巨噬细胞外泌体作用于放射损伤的BMSCs,观察其具体的生物学调控作用。通过本研究发现,放射线可造成BMSCs细胞增殖损伤、凋亡增加、成骨分化能力受损、纤维化分化增加,M2型巨噬细胞来源的外泌体能够显著改善放射造成的BMSCs损伤、提高其成骨分化能力、降低纤维化分化能力。表明M2型巨噬细胞来源外泌体对于放射损伤BMSCs具有一定的保护作用,该发现为ORNJ的治疗提供了新的思路和实验依据。为进一步明确不同极化类型巨噬细胞外泌体在ORNJ中的作用,还需要进行进一步的研究。

参考文献

- [1] Kluth Edwin V., Jain Pushpa Rani, Stuchell Robert N., Frich John C.. A study of factors contributing to the development of osteoradionecrosis of the jaws[J]. Mosby, 1988, 59(2):194-201.
- [2] Aristeidis Chronopoulos, Theodora Zarra, Michael Ehrenfeld, Sven Otto. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review[J]. International Dental Journal, 2018, 68(1):22-30.
- [3] Robert B. Morrish, Eric Chan, Sol Silverman, John Meyer, Karen K. Fu, Deborah Greenspan. Osteonecrosis in patients irradiated for head and neck carcinoma[J]. John Wiley & Sons, Ltd, 1981, 47(8):1980-1983.
- [4] Nabil S, Samman N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a systematic review[J]. International journal of oral and maxillofacial surgery, 2011, 40(3):229-243.
- [5] Wen Biao Zhang, Li Wu Zheng, Denial Chua, Lim Kwong Cheung. Bone Regeneration After Radiotherapy in an Animal Model[J]. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2010, 68(11):2802-2809.
- [6] Liu Xiaoguang, Zheng Lifang, Zhou Yongzhan, Chen Yingjie, Chen Peijie, Xiao Weihua. BMSC Transplantation Aggravates Inflammation, Oxidative Stress, and Fibrosis and Impairs Skeletal Muscle Regeneration[J]. Frontiers in physiology, 2019, 10:87.
- [7] 赵路, 贾骏麟, 田磊, 靳丹, 宗春琳, 莫宏兵. 基于钴60的大鼠BMSCs细胞实验模型的建立[J]. 实用口腔医学杂志, 2020, 36(03):433-436.
- [8] Oishi Yumiko, Manabe Ichiro. Macrophages in inflammation, repair and regeneration[J]. International immunology, 2018, 30(11):511-528.

[9] Shapouri-Moghaddam Abbas, Mohammadian Saeed, Vazini Hossein, Taghadosi Mahdi, Esmaeili Seyed-Alireza, Mardani Fatemeh, Seifi Bit, Mohammadi Asadollah, Afshari Jalil T, Sahebkar Amirhossein. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. Journal of cellular physiology, 2018, 233(9):6425-6440.

[10] Gareth R. Willis, Angeles Fernandez-Gonzalez, Monica Reis, S. Alex Mitsialis, Stella Kourembanas. Macrophage Immunomodulation: The Gatekeeper for Mesenchymal Stem Cell Derived-Exosomes in Pulmonary Arterial Hypertension?[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(9).

[11] Fukui Shoichi, Iwamoto Naoki, Takatani Ayuko, Igawa Takashi, Shimizu Toshimasa, Umeda Masataka, Nishino Ayako, Horai Yoshiro, Hirai Yasuko, Koga Tomohiro, Kawashiri Shin-Ya, Tamai Mami, Ichinose Kunihiko, Nakamura Hideki, Origuchi Tomoki, Masuyama Ritsuko, Kosai Kosuke, Yanagihara Katsunori, Kawakami Atsushi. M1 and M2 Monocytes in Rheumatoid Arthritis: A Contribution of Imbalance of M1/M2 Monocytes to Osteoclastogenesis[J]. Frontiers in immunology, 2017, 8:1958.

[12] Kong Xiangyi, Gao Jun. Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury[J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2017, 21(5):941-954.

[13] Chen Liangjiao, Qiao Pengyan, Liu Hongchen, Shao Longquan. Amorphous Calcium Phosphate NPs Mediate the Macrophage Response and Modulate BMSC Osteogenesis[J]. Inflammation, 2020, :278-296.

[14] 赵路. M2型巨噬细胞抑制放射后BMSCs向肌成纤维细胞转化的实验研究[D]. 佳木斯大学, 2020.

[15] Herve Y Sroussi, Joel B. Epstein, Rene - Jean Bensadoun, Deborah P. Saunders, Rajesh V. Lalla, Cesar A. Migliorati, Natalie Heavilin, Zachary S. Zumsteg. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis[J]. John Wiley & Sons, Ltd, 2017, 6(12):2918-2931.

[16] Lu Guo Dong, Cheng Peng, Liu Ting, Wang Zhong. BMSC-Derived Exosomal miR-29a Promotes Angiogenesis and Osteogenesis[J]. Frontiers in cell and developmental biology, 2020, 8.

[17] 郭宇轩. 肌成纤维细胞在放射性颌骨坏死发生机制中作用的初步实验研究[D]. 第四军医大学, 2016.

[18] Chunlin Zong, Bolei Cai, Xinxin Wen, Syed Alam, Yuanli Chen, Yuxuan Guo, Yanpu Liu, Lei Tian. The role of myofibroblasts in the development of osteoradionecrosis in a newly established rabbit model[J]. Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2016, 44(6).

[19] Yuri Matsuura, Ikiru Atsuta, Yasunori Ayukawa, Takayoshi Yamaza, Ryosuke Kondo, Akira Takahashi, Nobuyuki Ueda, Wakana Oshiro, Yoshihiro Tsukiyama, Kiyoshi Koyano. Therapeutic interactions between mesenchymal stem cells for healing medication-related osteonecrosis of the jaw[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2016, 7(1).

[20] Xiu-mei Zhuang, Bin Zhou. Exosome secreted by human gingival fibroblasts in radiation therapy inhibits osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells by transferring miR-23a[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 131.

[21] Bénédicte Chazaud. Inflammation and Skeletal Muscle Regeneration: Leave It to the Macrophages![J]. Trends in Immunology, 2020, 41(6):481-492.

[22] Cooke John P. Inflammation and Its Role in Regeneration and Repair[J]. Circulation research, 2019, 124(8):1166-1168.

[23] Liu Zhaogang, Liu Ying, Liu Sai, Wang Dongxia, Jin Jian, Sun Lidong, Wang Qiang, Yi Zhe. The effects of TiO₂ nanotubes on the biocompatibility of 3D printed Cu-bearing TC4 alloy[J]. Materials & Design, 2021, 207.

基金项目: 国家自然科学基金会青年项目(编号: 81903249); 陕西省自然科学基金基础研究计划一般项目(编号: 2019JQ-701); 国家自然科学基金面上项目(编号: 81670964);

通信作者: 关键