

# 人羊膜上皮干细胞来源的外泌体促进小鼠神经干细胞向神经元方向分化

张姣飞<sup>1</sup> 林健华<sup>2</sup> 王酉<sup>2</sup> 徐辉明<sup>3\*</sup> 张前军<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>中南大学基础医学院, 生殖与干细胞工程研究所, 长沙 410078; <sup>2</sup>上海交通大学医学院附属仁济医院妇产科, 上海 200127; <sup>3</sup>上海交通大学医学院附属仁济医院临床干细胞中心, 上海 200127; <sup>4</sup>人类干细胞国家工程研究中心, 长沙 410205)

**摘要** 人羊膜上皮干细胞(human amniotic epithelial stem cells, hAECs)能促进损伤神经元的修复和再生, 但是否影响神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的分化却很少报道。该研究首次发现hAECs能促进小鼠NSCs(mouse NSCs, mNSCs)向神经元方向分化。干细胞来源的外泌体(Exos)仍保留着干细胞的许多特性, 因此, 该研究探讨了hAECs来源的外泌体(hAECs-Exos)对mNSCs分化的影响。首先, 采用超速离心的方法得到了纯度较高的hAECs-Exos, 然后将不同浓度的hAECs-Exos与mNSCs共培养。结果发现, 与没有hAECs-Exos的对照组相比, 200 ng/mL hAECs-Exos能明显促进mNSCs向成熟神经元分化, 主要表现在NeuN阳性细胞所占比例明显增高。研究者推测, hAECs-Exos保留了hAECs的一些特性, 其含有的神经营养因子、生长因子、miRNAs等活性物质可能参与了微环境的调控, 从而促进mNSCs向神经元方向分化。因此, hAECs-Exos可能促进内源或外源NSCs的神经分化, 从而促进损伤或退化神经元的再生, 这也为将来hAECs-Exos的临床应用提供研究基础。

**关键词** 人羊膜上皮干细胞; 外泌体; 神经干细胞; 神经分化

## Human Amniotic Epithelial Stem Cells-Derived Exosomes Promote Neuronal Differentiation of Mouse Neural Stem Cells

Zhang Jiaofei<sup>1</sup>, Lin Jianhua<sup>2</sup>, Wang You<sup>2</sup>, Xu Huiming<sup>3\*</sup>, Zhang Qianjun<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410078, China; <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China; <sup>3</sup>Clinical Stem Cell Research Center, Ren Ji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China; <sup>4</sup>National Engineering Research Center of Human Stem Cells, Changsha 410205, China)

**Abstract** Human amniotic epithelial stem cells (hAECs) have been reported to promote the regeneration of damaged neurons and the restoration of neurologic function, but whether hAECs can promote the neuronal differentiation of neural stem cells (NSCs) is rarely mentioned. In this present study, they found that hAECs could promote the neuronal differentiation of mouse NSCs (mNSCs). Additionally, stem cells-derived exosomes (Exos) can remain some characteristics of stem cells. They determined to investigate the effect of hAECs-derived exosomes (hAECs-Exos) on the neuronal differentiation of mNSCs. Firstly, hAECs-Exos were extracted by

收稿日期: 2017-12-23 接受日期: 2018-04-27

国家自然科学基金(批准号: 31571399)和上海交通大学医工交叉基金(批准号: YG2016MS52)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13873167752, E-mail: 1104365800@qq.com; Tel: 13817542389, E-mail: quxuhm123@163.com

Received: December 23, 2017 Accepted: April 27, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31571399) and Shanghai Jiao Tong University Med-X Fund (Grant No.YG2016MS52)

\*Corresponding authors. Tel: +86-13873167752, E-mail: 1104365800@qq.com; Tel: +86-13817542389, E-mail: quxuhm123@163.com

网络出版时间: 2018-07-27 12:39:40 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180727.1239.006.html>

ultracentrifugation. Then, hAECs-Exos at various concentrate were cocultured with mNSCs. The results suggested that the group with 200 ng/mL hAECs-Exos could significantly promote the neuronal differentiation of mNSCs compared with the control group with no hAECs-Exos, as demonstrated by the higher percentages of NeuN positive neurons derived from mNSCs. We hypothesized that the hAECs-Exos might retain some characteristics of hAECs. It provided a suitable microenvironment for the neuronal differentiation of mNSCs attributing to neurotrophic factors, growth factors, miRNAs and other active components. This could facilitate the neuronal differentiation of endogenous or exogenous NSCs, and thus contributed to the regeneration of damaged or degenerated neurons. This study will provide a preclinical study for the hAECs-Exos in regenerative medicine.

**Keywords** human amniotic epithelial stem cells; exosome; neural stem cells; neuronal differentiation

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)可分化成神经系统中的各类神经细胞,特别是各种特异的神经元,NSCs有望成为神经系统疾病特别是神经退行性疾病的细胞及基因治疗的理想细胞材料<sup>[1-2]</sup>。但是,如何促进NSCs分化为各种特异的神经元,从而替代受损或老化的神经元、修复神经系统的功能还是不太清楚。研究表明,人羊膜上皮干细胞(human amniotic epithelial stem cells, hAECs)可分泌多种神经营养因子,促进神经元的存活及轴突生长<sup>[3]</sup>。随后,孟晓婷等<sup>[4-5]</sup>将大鼠羊膜上皮细胞(rat-AECs, rAECs)与mNSCs共培养,结果发现,rAECs能促进mNSCs向神经元方向分化,同时促进神经突(neurites)的延伸。有意思的是,我们在研究中发现,hAECs也可以促进mNSCs向神经元方向分化,为hAECs的临床应用提供实验依据。

近十年来,随着基因组学和蛋白质组学技术的发展,外泌体(exosomes, Exos)的特性和应用也受到越来越多的关注。Exos是一种直径为30~150 nm的膜性囊泡,是由细胞内的多泡体与胞膜融合后分泌到胞外环境的,它参与受体、mRNA、miRNAs、蛋白质等物质的运输<sup>[6]</sup>,可以作为一种信息交流的新载体<sup>[7]</sup>。在肿瘤的发生和发展中,Exos也起着重要的作用。肿瘤来源的Exos可以作为肿瘤标记物,不同功能的Exos可作为肿瘤的治疗载体从而成为这个领域的热点<sup>[8-11]</sup>。目前干细胞在治疗神经损伤和神经退行性疾病方面很有前景,但干细胞作为细胞材料,却有着致癌性、免疫排斥、来源不足、伦理争议等问题,在临床应用中受到限制。有趣的是,干细胞来源的Exos作为治疗载体在中枢神经系统疾病方面受到越来越多的关注<sup>[12-15]</sup>,它不仅含有来源于干细胞的活性成分,而且具有靶向性强、化学性质稳定、保存容易等优点。本研究将不同浓度的hAECs来源的

外泌体(exosomes derived from hAECs, hAECs-Exos)与mNSCs共培养,探讨hAECs-Exos对mNSCs分化的影响。结果发现,200 ng/mL hAECs-Exos能明显促进mNSCs向成熟神经元分化。hAECs-Exos可能促进内源或外源NSCs的神经分化,从而促进损伤或退化神经元的再生,为将来hAECs-Exos在神经系统疾病中的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要试剂

人的羊膜取自上海交通大学医学院附属仁济医院妇产科正常妊娠产妇剖宫产术的胎盘,征得产妇的同意,也通过了上海交通大学医学院附属仁济医院伦理协会的许可。C57BL/6孕鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

胰酶(trypsin)、胶原酶、多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)、DAPI、PBS、青霉素-链霉素(P/S)、4%多聚甲醛(PFA)、谷氨酰胺(glutamine, Glu)购自Sigma-Aldrich公司;细胞爬片购自VWR公司;DNase I购自Roche公司;DMEM/F12基础培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、N<sub>2</sub>添加剂、Neurobasal基础培养基、B27添加剂、驴抗兔及山羊抗鼠二抗购自Life Technology公司;流式直标抗体(CD105、CD45、CD29、HLA-DR、Epcam)购自eBioscience公司;Nestin、SOX2、Tuj-1、NeuN一抗购自Abcam公司;GFAP一抗购自DAKO公司;bFGF、EGF购自PeproTech公司;RIPA、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自Thermo公司。

### 1.2 hAECs的分离、培养

无菌条件下取足月正常妊娠产妇剖宫产手术的胎盘组织,立即剥离羊膜,用PBS缓冲液冲洗,以去除碎片和血液。用组织镊子分离最靠近胎儿的一

层膜, 再将这层膜剪碎成约 $1\text{ mm}^3$ 大小。接着加入 $0.25\%$  Trypsin(无 $\text{Ca}^{2+}$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ )于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 $30\text{ min}$ , 重复1次, 然后加入胰酶抑制剂,  $1\ 500\text{ r/min}$ 离心 $5\text{ min}$ 。余下的组织块继续用胶原酶( $0.1\text{ mg/mL}$ )于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 $1\text{ h}$ , 然后加DNase I( $0.1\text{ mg/mL}$ )于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 $10\text{ min}$ 。将上述混合液过滤后离心, 弃上清, 收集细胞沉淀, 用羊膜细胞培养液(DMEM/F12中添加 $10\%$  FBS、 $1\%$  P/S)培养, 每2~3天换液1次。当细胞长到 $90\%$ 融合时, 进行传代培养。

### 1.3 hAECs的鉴定

用胰酶消化hAECs, 离心并用含 $1\%$  FBS的PBS重悬, 然后加入带有异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD45、CD29、HLA-DR; 藻红蛋白(PE)标记的Epcam及别藻青蛋白(APC)标记的CD105流式抗体,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育 $40\text{ min}$ 。对照组为加同型对照的小鼠一抗。反应结束后, 用含 $1\%$  FBS的PBS清洗, 经 $40\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛过滤后, 在BD Accuri C6流式细胞仪上分析。

### 1.4 mNSCs的分离培养及鉴定

取胚胎(E)13.5~14.5天C57BL/6小鼠的大脑皮层, 去掉脑膜, 并尽可能剪碎, 加 $0.25\%$  Trypsin  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 $20\text{ min}$ , 而后加入DNase I( $0.1\text{ mg/mL}$ ), 轻轻吹打混匀, 并过滤成单细胞悬液, 以 $1\times 10^6/\text{mL}$ 的浓度接种于培养瓶中, 加入含有 $\text{N}_2(1\times)$ 、bFGF( $10\text{ ng/mL}$ )、EGF( $10\text{ ng/mL}$ )、 $1\%$  P/S的DMEM/F12培养液, 于 $5.0\%$   $\text{CO}_2$ 、 $95\%$ 饱和湿度的 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 每2~3天换液1次。培养3天后, 将神经干细胞球移至离心管中,  $600\text{ r/min}$ 离心 $5\text{ min}$ , 弃上清, 将神经干细胞球铺到PLL处理过的细胞爬片上, 待贴壁后 $4\%$  PFA固定, 用干细胞标记物(Nestin、SOX2)染色鉴定。

### 1.5 hAECs对mNSCs分化的影响

复苏hAECs、人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUMSCs), 先将mNSCs铺在PLL处理过的6孔板或细胞爬片上, 待贴壁后换成诱导分化液(Neurobasal中添加 $1\times\text{ B27}$ 、 $2\text{ }\mu\text{mol/L RA}$ 、 $1\%$  Glu、 $1\%$  P/S), 然后将hUMSCs或hAECs以 $3\times 10^3/\text{孔}$ 均匀铺在孔板或细胞爬片上, 实验分为3组: mNSCs单独培养组、hUMSCs与mNSCs共培养组、hAECs与mNSCs共培养组, 每组至少3个平行孔。以后每2~3天换液1次, 培养14天后, 将分化的细胞用 $4\%$  PFA固定, 进行神经元标记物(Tuj-1、NeuN)免疫荧光染色。

### 1.6 hAECs-Exos的提取及形态观察

复苏hAECs, 用羊膜细胞培养液(DMEM/F12中添加 $10\%$  FBS、 $1\%$  P/S)进行常规培养, 待细胞生长的融合度达到约 $90\%$ 时, 用PBS漂洗1遍, 换成Neurobasal基础培养基,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 $24\text{ h}$ 后无菌收集细胞培养上清, 以超速离心法提取hAECs-Exos。具体步骤如下: 将收集好的细胞培养上清 $250\text{ mL}$ , 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 的环境下,  $1\ 700\text{ r/min}$ 离心 $10\text{ min}$ ,  $5\ 000\text{ r/min}$ 离心 $20\text{ min}$ , 弃沉淀, 去除残留细胞; 然后所得上清经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤,  $30\ 000\text{ r/min}$ 离心 $30\text{ min}$ , 弃沉淀, 去除亚细胞组分; 再用 $250\ 000\text{ r/min}$ 离心 $70\text{ min}$ , 弃上清液, 所得沉淀即为hAECs-Exos。最后用PBS重新悬浮沉淀物, 混匀后再以 $250\ 000\text{ r/min}$ 离心 $70\text{ min}$ , 用 $1\text{ mL PBS}$ 重悬hAECs-Exos并分装, 置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , 备用。取少量悬液用于粒径测量、电镜观察, 同时裂解足量hAECs-Exos进行浓度测定。

### 1.7 hAECs-Exos对mNSCs分化的影响

先将神经干细胞球铺在PLL处理过的孔板或细胞爬片上, 贴壁后换成诱导分化液, 其中不同浓度hAECs-Exos( $100\text{ ng/mL}$ 、 $200\text{ ng/mL}$ 、 $400\text{ ng/mL}$ )与mNSCs共培养为实验组, mNSCs单独培养为对照组, 对照组加入等体积诱导分化液。以后每2~3天换液1次, 培养14天后, 进行NeuN免疫荧光染色。

### 1.8 免疫荧光染色

细胞经 $4\%$  PFA固定后, 用PBS漂洗2遍,  $0.2\%$  Triton X-100通透 $10\text{ min}$ ,  $10\%$  驴血清封闭至少 $30\text{ min}$ , 然后加入稀释好的一抗[Nestin(mouse)、SOX2(rabbit)、Tuj-1(mouse)、NeuN(rabbit)、GFAP(rabbit)], 湿盒内 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。随后用PBS漂洗, 然后加上相对应的二抗, 室温避光孵育 $1.5\text{ h}$ , PBS漂洗3遍, DAPI复染核, 封片剂封片, 最后在荧光显微镜下观察拍照。

### 1.9 数据统计

实验数据以 $\text{mean}\pm\text{S.E.M.}$ 形式表示, 显著性差异分析采用SPSS 13.0软件进行,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hAECs的分离培养及鉴定

从产妇剖宫产手术的胎盘上剥离羊膜, 剪碎成约 $1\text{ mm}^3$ 大小, 加入 $0.25\%$  Trypsin和胶原酶消化, 分离得到hAECs。培养3天后, 细胞呈扁平的上皮样

形态, 并呈集落生长(图1A)。流式检测结果显示, hAECs高表达Epcam、CD29, 少量表达CD105, 不表达CD45、HLA-DR(图1B)。

## 2.2 mNSCs的分离培养与鉴定

取胚胎(E)13.5~14.5天C57BL/6小鼠的大脑皮层, 剪碎, 加0.25% Trypsin、DNase I消化, 吹打混匀, 并过滤成单细胞悬液, 然后在含有N<sub>2</sub>、bFGF和EGF的DMEM/F12培养液中培养。2~3天后, 可获得大量悬浮生长、大小不一、折光性强的神经干细胞球, 且未见明显的细胞突起(图2A)。经Nestin、SOX2免疫荧光染色, 结果显示, 细胞基本为阳性(图2B), 表明分离获得的神经干细胞球基本上都是NSCs。

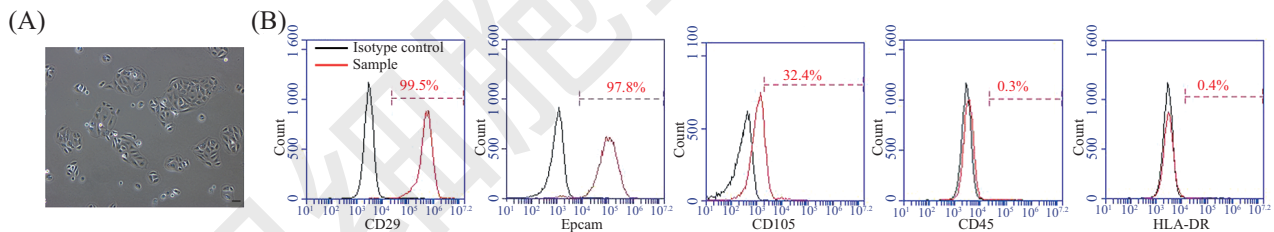
## 2.3 hAECs对共培养mNSCs分化的影响

将神经干细胞球加入预先铺有hAECs或hUMSCs的培养板中, 待贴壁后换成诱导分化液, 研究发现, hAECs与mNSCs共培养组, mNSCs分化较快, 3天后就能看到明显神经样前体细胞出现, 到第14天细胞状态良好, hAECs周围可见许多神经元样的胞体和向外延伸的神经突, 且突起之间相互形成网络。而hUMSCs与mNSCs共培养组、mNSCs单独培养组的mNSCs则分化较慢, 神经样的胞体较少且向外延长的神经突起短, 到第14天, 许多分化的细胞

出现死亡现象。mNSCs共培养14天后, 将分化的细胞用4% PFA固定, 然后进行Tuj-1和NeuN免疫荧光染色。如图3A所示, 在相同的条件下诱导分化14天, hAECs共培养组呈现神经样形态的细胞显著增多, 通过染色结果分析发现, 相比于hUMSCs与mNSCs共培养组(27.33%±1.67%、39.33%±2.33%)及mNSCs单独培养组(7.12%±1.46%、57.60%±3.98%), hAECs与mNSCs共培养组Tuj-1阳性细胞、NeuN阳性细胞均显著增多(54.33%±0.88%、97.10%±1.20%), 具有统计学意义(图3A和图3B)。这表明, hAECs能发挥促进mNSCs向神经元分化的显著作用, 且分化为成熟的神经元。与此同时, 为了探究分化过程中的其他细胞类型, mNSCs培养14天后, 通过Tuj-1与GFAP(星形胶质标记)的共染我们发现, mNSCs单独培养组约5%的Tuj-1阳性, 65%的GFAP阳性, 而与hAECs共培养组分化的细胞约60%的Tuj-1阳性, GFAP阳性细胞约只占35%(图3C)。这表明, hAECs促进mNSCs向胶质分化减少, 进一步证明了hAECs的促神经分化作用。

## 2.4 hAECs-Exos的鉴定及对mNSCs分化的影响

hAECs-Exos是直径为80~150 nm的微型囊泡, 电镜观察到该外泌体呈典型的膜性囊泡结构(图

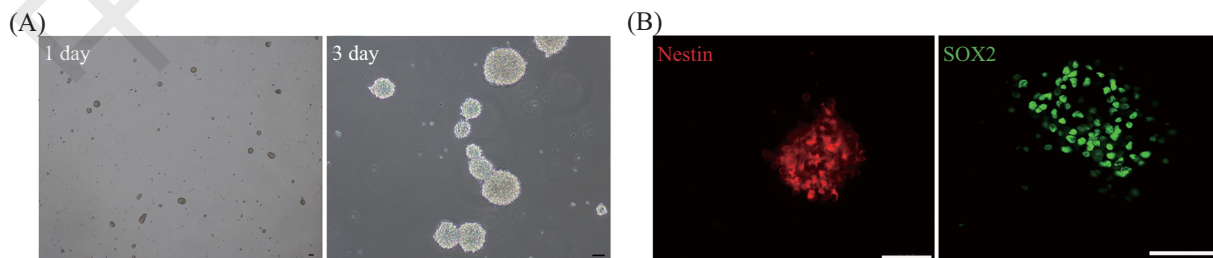


A: 原代培养3天后hAECs形态特征, 标尺=50 μm; B: hAECs的流式鉴定: CD29-FITC、Epcam-PE、CD105-APC、CD45-FITC、HLA-DR-FITC。

A: the morphology of primary hAECs, bar=50 μm; B: flow cytometry analysis of hAECs with CD29-FITC, Epcam-PE, CD105-APC, CD45-FITC, HLA-DR-FITC.

图1 hAECs的培养及鉴定

Fig.1 The culture and characterization of hAECs

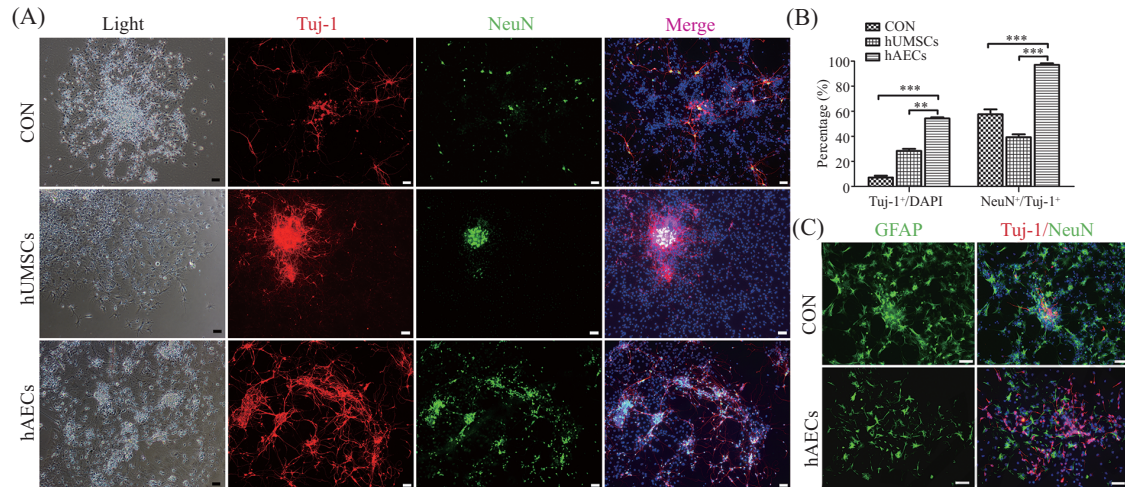


A: mNSCs原代培养1天和3天的形态特征; B: mNSCs的鉴定(Nestin、SOX2)。标尺=50 μm。

A: the morphology of mNSCs after 1 day and 3 days cultures; B: identification of mNSCs by immunostaining with Nestin and SOX2. Bars=50 μm.

图2 mNSCs的培养及鉴定

Fig.2 The culture and characterization of mNSCs

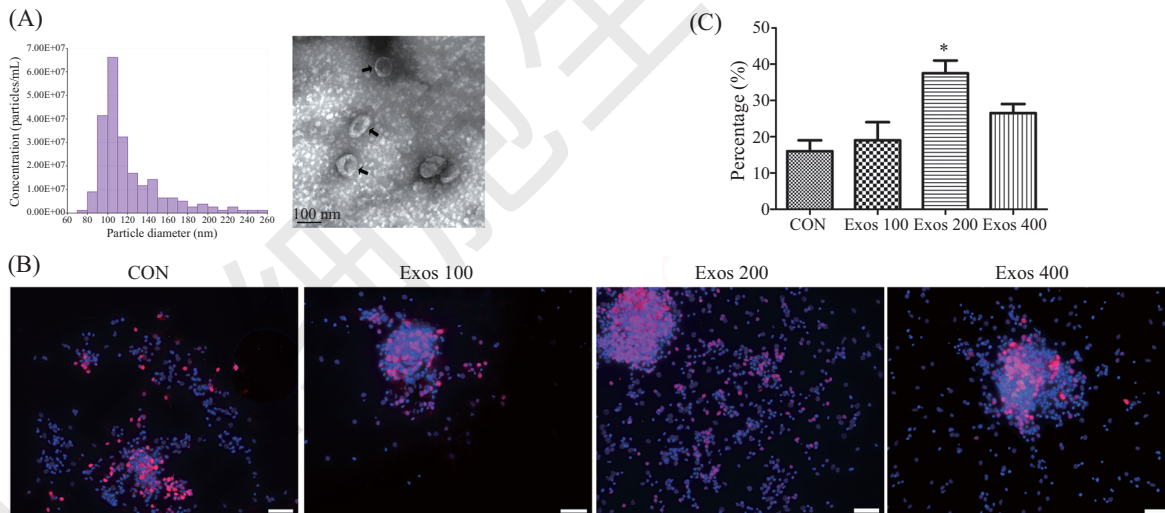


A: mNSCs单独培养组(CON)、hUMSCs与mNSCs共培养组(hUMSCs)、hAECs与mNSCs共培养组(hAECs)中mNSCs分化14天后分别进行相差和Tuj-1、NeuN免疫荧光染色分析; B: Tuj-1阳性细胞、NeuN阳性细胞的定量分析; Tuj-1<sup>+</sup>/DAPI: Tuj-1阳性细胞数/总的细胞数, NeuN<sup>+</sup>/Tuj-1<sup>+</sup>: NeuN阳性细胞数/Tuj-1阳性细胞数; C: CON组、hAECs组中mNSCs分化14天后Tuj-1、GFAP免疫荧光共染。每组中选取5~6个视野进行计数, 标尺=50 μm。 \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: phase-contrast microscopic images and immunostaining with Tuj-1 and NeuN antibodies of the differentiated cells derived from mNSCs in the mNSCs alone group (CON), hUMSCs and mNSCs group (hUMSCs), hAECs and mNSCs group (hAECs) at 14 days post-induction. B: quantification of the percentage of Tuj-1 positive cells versus total cells (Tuj-1<sup>+</sup>/DAPI) and NeuN positive cells over Tuj-1 positive cell (NeuN<sup>+</sup>/Tuj-1<sup>+</sup>), respectively. C: double-immunostaining of the differentiated cells derived from mNSCs in CON group and hAECs group with Tuj-1 and GFAP at 14 days post-induction.  $n = 5/6$ , bars=50 μm. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 hAECs促进mNSCs的神经分化

Fig.3 Neuronal differentiation of mNSCs induced by hAECs



A: 外泌体的粒径测定及电镜扫描, 其中箭头代表典型的囊泡结构。 B: mNSCs单独培养组(CON)、不同浓度(100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL)外泌体共培养组中mNSCs分化14天后的NeuN免疫荧光染色分析, 标尺=50 μm。 C: NeuN阳性细胞的定量分析结果为NeuN阳性细胞数/总的细胞数。每组中选取5~6个视野进行计数, \* $P < 0.05$ , 与CON组比较。

A: size determination and electron microscopy of hAECs-Exos. The black arrows represent a typical vesicle structure. B: immunostaining with NeuN antibody of the mNSCs-derived cells in the CON group, (100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL) hAECs-Exos and mNSCs groups at 14 days post-induction, bars=50 μm. C: quantification of the NeuN positive cells is the percentage of NeuN positive cells over total cells.  $n = 5/6$ , \* $P < 0.05$  vs CON group.

图4 hAECs-Exos的鉴定及促进mNSCs的神经分化

Fig.4 Identification of hAECs-Exos and neuronal differentiation of mNSCs induced by hAECs-Exos

4A), 通过BCA蛋白浓度测定试剂盒得到其浓度为18 ng/μL。随后分别将100 ng/mL、200 ng/mL、400 ng/mL hAECs-Exos与mNSCs共培养, 14天后, 我

们通过对分化的细胞进行NeuN免疫荧光染色分析发现, 相比于没有添加Exos组(16.0±3.0), 200 ng/mL hAECs-Exos组NeuN阳性细胞率升高且具有统计

学意义( $37.5 \pm 3.5$ ,  $P < 0.05$ )。这表明, hAECs-Exos能显著促进mNSCs向成熟神经元分化, 且200 ng/mL hAECs-Exos能达到较优的效果(图4B~图4D)。

### 3 讨论

中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤包括颅脑和脊髓损伤, 此类疾病发病快、病情重、致残率和病死率高, 而神经元的伤害是不可逆的, 因为大脑和脊髓的神经元不能再生<sup>[16]</sup>, 从而导致CNS损伤后功能不能恢复。研究证实, 胎脑和成年脑内均存在具有自我更新和多向分化潜能的NSCs, 但损伤发生后完全依靠自身的NSCs自发的增殖分化来进行神经修复还是不够的<sup>[1-2]</sup>。因此, 移植NSCs为神经系统疾病的治疗及神经功能的修复开辟了新的途径。迄今为止, 帕金森病、阿尔茨海默症和肌萎缩性脊髓侧索硬化症等动物模型实验证明了移植的NSCs替代受损的神经和神经回路的部分重建是可能实现的<sup>[1,17]</sup>。但是, NSCs分化的多向性和不确定性给其移植治疗神经系统疾病造成很大障碍。因此, 促进NSCs向神经元方向分化, 进一步提供持续的营养因子支持再生的神经元, 并行使神经功能显得尤为重要。hAECs为一种来源于羊膜的成体干细胞, 具有来源充足、免疫原性低、无致瘤性、无伦理争议等优势<sup>[18]</sup>。此外, 它们能分泌神经营养因子、生长因子及神经递质等<sup>[3,19-20]</sup>, 这都有利于神经元的存活及再生, 但hAECs对NSCs分化的影响报道很少。我们的研究发现, 相比于mNSCs单独培养组和hUMSCs与mNSCs共培养组, hAECs与mNSCs共培养组表现为Tuj-1阳性细胞、NeuN阳性细胞显著增多(图3A~图3B), 这表明与其他干细胞相比, hAECs具有其独特的优势, 有促进mNSCs向成熟的神经元分化的显著作用。随后, 我们还进行了酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH; 一种多巴胺能神经元标记物)的免疫荧光染色, 结果显示为阴性(实验数据未显示), 表明hAECs促进mNSCs向神经元分化, 但向哪种特异的神经元分化还需进一步的探究。

Exos是一种纳米级颗粒, 能自由通过血管壁、血脑屏障, 具有低免疫排斥、较长半衰期及能进行长时间、远距离运输等优点<sup>[10]</sup>。它也可以作为一种信息载体, 在神经元间、神经元和胶质细胞间进行信息交流<sup>[21]</sup>。由于干细胞存在移植后的存活及生物安全性等问题, 故干细胞来源的Exos受到研究

者们的极大关注。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是间充质干细胞中临床研究较为广泛的一类, 已有研究证实, BMSCs来源的外泌体(exosomes derived from BMSCs, BMSCs-Exos)在不同临床环境设施中的治疗潜能, 如BMSCs-Exos已成功用于治疗顽固性移植物抗宿主病<sup>[22]</sup>。BMSCs能通过其Exos转移miRNA-133b到神经细胞, 从而促进神经元突起的向外延伸及神经功能的恢复<sup>[13]</sup>。另外, 脂肪组织来源的干细胞(adipose tissue derived stem cells, AdSC)通过其Exos中释放的脑啡肽酶降解阿尔兹海默症患者脑部的 $\beta$ -淀粉样蛋白, 促进受损神经元突起的生长<sup>[21,23]</sup>。AdSC-Exos能调节肌萎缩侧索硬化症的细胞表型, 包括超氧化物歧化酶1的聚集、线粒体功能障碍等<sup>[24]</sup>。这些研究都表明, Exos参与了神经系统中的重要过程, 在神经保护、神经再生、突触可塑性等方面都扮演着重要的角色, Exos疗法将可能是治疗阿尔兹海默症、肌萎缩侧索硬化症等神经系统疾病的有效途径, 具有很大的临床应用价值。hAECs是一种来源于羊膜的成体干细胞, 有研究表明, hAEC-Exos在博莱霉素诱导的肺损伤中可以发挥强效的抗纤维化、免疫调节及再生效应<sup>[25]</sup>。hAEC-Exos还能加速伤口愈合、抑制疤痕形成<sup>[26]</sup>, 表明hAECs-Exos有望成为替代细胞疗法的新手段, 但近几年还没有关于hAEC-Exos在促神经分化等方面的报道。本研究将超速离心得到的hAECs-Exos与mNSCs共培养发现, 200 ng/mL hAECs-Exos组NeuN阳性细胞明显比未添加Exos组多(图4B~图4C), 这表明hAECs-Exos能促进mNSCs向神经元方向分化, 且200 ng/mL能达到较好效果, 但是否向特异的神经元分化以及分化的神经元是否有功能还需进一步的探究和验证。重要的是, Exos中含有许多营养因子、生长因子等蛋白质以及脂质、编码或非编码RNA、双链DNA<sup>[27-28]</sup>等多种生物活性物质, 因此, 我们推测, hAECs-Exos仍保留着hAECs的一些特性, 可能通过其含有的生物活性物质参与微环境的调控, 从而促进mNSCs向神经元分化。因此, 我们下一步通过全面的RNA芯片分析找出hAECs-Exos中存在的功能miRNAs显得尤为重要。令人意外的是, Exos与mNSCs共培养组及hAECs与mNSCs共培养组两者NeuN阳性细胞率有一定差异(图3和图4), 这可能是因为hAECs-Exos能够提供的营养因子、生长因子等不如hAECs丰富, 且共培养

组细胞与细胞之间的联系更加紧密, 因此能促进神经前体细胞更快向成熟神经元转变。

总的说来, 本研究为将来hAECs-Exos治疗神经系统疾病奠定基础, 同时也为hAECs-Exos促进内源或外源NSCs的神经分化, 从而参与损伤或老化神经元的再生, 为将来hAECs-Exos的临床应用提供基础。

### 参考文献 (Reference)

- 1 Tang Y, Yu P, Cheng L. Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis* 2017; 8(10): e3108.
- 2 Takagi Y. History of neural stem cell research and its clinical application. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2016; 56(3): 110-24.
- 3 Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, Hurukawa S, Araie M, Sakuragawa N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. *J Neurosci Res* 2000; 62(4): 585-90.
- 4 孟晓婷, 陈东, 刘佳梅, 路来金. 羊膜上皮细胞促进共培养神经干细胞存活及分化. *吉林大学学报(医学版)*[Meng Xiaoting, Chen Dong, Liu Jiamei, Lu Jinlai. Enhanced viability and neural differentiation of neural stem cells co-cultured with amniotic epithelial cells. *Journal of Jilin University (Medicine Edition)*] 2004; 2: 184-7.
- 5 Meng X, Chen D, Dong Z, Liu J. Enhanced neural differentiation of neural stem cells and neurite growth by amniotic epithelial cell co-culture. *Cell Biol Int* 2007; 31(7): 691-8.
- 6 Kourembanas S. Exosomes: Vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu Rev Physiol* 2015; 77(1): 13-27.
- 7 Zhang X, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol* 2015, 8(1): 83.
- 8 吴金恩, 丁军涛. 外泌体生物学功能及应用研究进展. *动物医学进展*(Wu Jinen, Ding Juntao. Progress on biologic function and application of exosomes. *Progress in Veterinary Medicine*) 2016; 12: 90-4.
- 9 Ma J, Zhang Y, Tang K, Zhang H, Yin X, Li Y, *et al.* Reversing drug resistance of soft tumor-repopulating cells by tumor cell-derived chemotherapeutic microparticles. *Cell Res* 2016; 26(6): 713-27.
- 10 苏静, 宋世平. 外泌体定量检测的研究进展及其在疾病诊疗中的应用. *辐射研究与辐射工艺学报*(Su Jing, Song Shiping. A review of the quantitative detection and diagnostic and therapeutic applications of exosomes. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*) 2017; 3: 3-12.
- 11 Kim Y, Ahn J, Kim S, Kim H, Kim S, Kang J. The potential theragnostic (diagnostic+therapeutic) application of exosomes in diverse biomedical fields. *Korean J Physiol Pharmacol* 2018; 22(2): 113.
- 12 Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, *et al.* Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 2011; 19(10): 1769-79.
- 13 Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, *et al.* Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells* 2012; 30(7): 1556-64.
- 14 de Rivero Vaccari JP, Brand F, Adamczak S, Lee SW, Perez-Barcelona J, Wang MY, *et al.* Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. *J Neurochem* 2016; 136: 39-48.
- 15 Braccioli L, van Velthoven C, Heijnen C J. Exosomes: A new weapon to treat the central nervous system. *Mol Neurobiol* 2014, 49(1): 113-9.
- 16 Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, Poulatsidou KN, Simeonidou C. Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res* 2013; 8(24): 2275-83.
- 17 刘冰, 管英俊. 神经干细胞治疗退行性神经系统疾病研究进展. *济宁医学院学报*(Liu Bing, Guan Yingjun. Advances in neural stem cells for the treatment of degenerative nervous system diseases. *Journal of Jining Medical University*) 2014; 5: 376-8.
- 18 Sean Murphy, Rosli Sharina, Rutu Acharya, Louisa Mathias, Rebecca Lim, Euan Wallace, *et al.* Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2010; 6(1): 1-25.
- 19 Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000; 165(1): 27-34.
- 20 Venkatachalam S, Palaniappan T, Jayapal PK, Neelamegan S, Rajan SS, Muthiah VP. Novel neurotrophic factor secreted by amniotic epithelial cells. *Biocell* 2009; 33(2): 81-9.
- 21 Sarko DK, Mckinney CE. Exosomes: Origins and therapeutic potential for neurodegenerative disease. *Front Neurosci* 2017; 11: 28.
- 22 Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, *et al.* MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* 2014; 28(4): 970-3.
- 23 Lee M, Ban JJ, Yang S, Im W, Kim M. The exosome of adipose-derived stem cells reduces beta-amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2018; 1691: 87-93.
- 24 Lee M, Ban JJ, Kim KY, Jeon GS, Im W, Sung JJ, *et al.* Adipose-derived stem cell exosomes alleviate pathology of amyotrophic lateral sclerosis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 479(3): 434-9.
- 25 Tan JL, Lau SN, Leaw B, Nguyen HPT, Salamonsen LA, Saad MI, *et al.* Amnion epithelial cell-derived exosomes restrict lung injury and enhance endogenous lung repair. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7(2): 180-96.
- 26 Zhao B, Zhang Y, Han S, Zhang W, Zhou Q, Guan H, *et al.* Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. *J Mol Histol* 2017; 48(2): 121-32.
- 27 Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, *et al.* Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014; 24(6): 766-9.
- 28 Aryani A, Denecke B. Exosomes as a nanodelivery system: a key to the future of neuromedicine? *Mol Neurobiol* 2016; 53(2): 818-34.