

# 人脐带间充质干细胞外泌体抑制草酸及草酸钙诱导的HK-2细胞上皮间质转化

李典 何大维\* 唐波 郭文浩 张丹 沈炼桔 魏光辉\*

(重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 儿童泌尿生殖发育与组织工程重点实验室, 重庆 400014)

**摘要** 采用草酸及一水草酸钙(calcium oxalate monohydrate, COM)晶体诱导人近端肾小管上皮细胞(HK-2)发生上皮间质转化, 同时采用超速离心法提取人脐带间充质干细胞外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cells exosome, hucMSC-Ex)用于干预间质化的HK-2细胞, 探究外泌体对其纤维化的缓解作用。采用Western blot、透射电镜及NTA(nanoparticle tracking analysis)鉴定外泌体表面标志物及形态, 采用MTT法观察外泌体对细胞活性的影响; 免疫荧光双标法检测ZO-1及N-cadherin的表达; Western blot检测细胞上皮标志物E-cadherin和ZO-1、间质标志物N-Cadherin和 $\alpha$ -SMA及相关信号通路蛋白TGF- $\beta$ 和Smad2的表达水平。结果显示, 草酸和COM晶体可使HK-2细胞形态发生上皮间质转化, 并降低上皮细胞标志物E-cadherin和ZO-1的表达, 同时使HK-2细胞高表达间质标志物N-Cadherin和 $\alpha$ -SMA并上调信号通路蛋白TGF- $\beta$ 和Smad2的表达。电镜下可观察到hucMSC-Ex形态呈双层膜, 中空, 圆形或椭圆形, 并且阳性表达外泌体标志物Alix、CD63和TSG101蛋白, 其粒径分布在80~300 nm之间。hucMSC-Ex预处理可显著提高暴露于草酸及COM晶体的HK-2细胞活性。降低HK-2细胞中N-Cadherin和 $\alpha$ -SMA及信号通路蛋白TGF- $\beta$ 和Smad2的表达, 恢复其上皮标志物E-cadherin和ZO-1蛋白的表达。该研究结果表明, hucMSC-Ex能够缓解草酸及COM晶体诱导的HK-2细胞损伤, 同时抑制其上皮间质转化。

**关键词** 人脐带间充质干细胞; 外泌体; 肾小管上皮细胞; 上皮间质转化; 一水草酸钙

## Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviates Oxalate and Calcium Oxalate Monohydrate-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in HK-2 Cells

Li Dian, He Dawei\*, Tang Bo, Guo Wenhao, Zhang Dan, Shen Lianju, Wei Guanghui\*

(Department of Urology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing Key Laboratory of Children Urogenital Development and Tissue Engineerin, Chongqing 400014, China)

**Abstract** Oxalate and calcium oxalate monohydrate (COM) was used to induce epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human proximal renal tubular epithelial cells (HK-2), meanwhile exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells (hucMSC-Ex) were isolated by ultracentrifugation and applied into the induced HK-2 cells to study its relieving effects on fibrosis. Then Western blot, transmission electron

收稿日期: 2017-11-21 接受日期: 2018-03-13

国家自然科学基金(批准号: 81370701)和重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(批准号: cstc2017shmsA130103)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-63633264, E-mail: dw.he@163.com; E-mail: u806806@cqmu.edu.cn

Received: November 21, 2017 Accepted: March 13, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81370701) and the Special Project of Science and Technology Innovation for Social Undertakings and Livelihood Guarantee of Chongqing (Grant No.cstc2017shmsA130103)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-63633264, E-mail: dw.he@163.com; E-mail: u806806@cqmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-05-21 17:27:55 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180521.1727.020.html>

microscope and nanoparticle tracking analysis (NTA) were used to identify the markers and morphology of exosomes. The effect of hucMSC-Ex on cell viability was observed by MTT. Elements in TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway, including TGF- $\beta$  and Smad2, epithelial markers, including ZO-1 and E-cadherin, and mesenchymal markers, including N-cadherin and  $\alpha$ -SMA changes, were evaluated by immunofluorescence and Western blot, respectively. The results showed that, after incubated with oxalate and COM crystals, the cell morphology was changed, the expression of E-cadherin and ZO-1 was down-regulated, while the expressions of N-cadherin,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ , Smad2 were increased. The morphology of hucMSC-Ex showed a double-layer membrane, hollow, circular or elliptical. Alix, CD63 and TSG101 were positively expressed in hucMSC-Ex, their diameters were distributed between 80 nm and 300 nm. And hucMSC-Ex pretreatment can significantly improve the viability of HK-2 cells exposed to oxalate and COM crystals. Then, the expressions of N-cadherin,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ , Smad2 in HK-2 cells were reduced, and the expressions of E-cadherin and ZO-1 were up-regulated. We conclude that hucMSC-Ex could alleviate EMT and reduce the injury of HK-2 cells induced by oxalate and COM crystals.

**Keywords** human umbilical cord mesenchymal stem cell; exosome; epithelial mesenchymal transition; human renal epithelial cell; calcium oxalate monohydrate

泌尿系结石是泌尿外科最常见的疾病之一,在北美国家发病率高达13%<sup>[1]</sup>,在我国泌尿系结石发病率南方高于北方<sup>[2]</sup>,儿童可占2%~4.3%<sup>[3]</sup>。泌尿系结石是一种发病率和复发率均较高的疾病,其形成受多种因素影响。草酸钙是最为常见的结石成分,泌尿系结石形成与高草酸尿症关系密切,当草酸达到一定浓度时,会引起肾小管上皮细胞损伤<sup>[4-5]</sup>,结石造成的肾小管上皮细胞损伤过程常常伴有脂质过氧化反应<sup>[6]</sup>,脂质过氧化可导致上皮细胞氧化损伤,从而进一步促进其上皮间质转化<sup>[7]</sup>,导致肾小管功能受损。因此,抑制草酸钙所致的肾小管上皮细胞间质转化有利于保护肾小管功能。

间充质干细胞是被公认的具有多能分化能力的细胞,并广泛用于细胞治疗<sup>[8]</sup>。有研究发现,间充质干细胞修复组织损伤的机制与其分泌作用有关,而并不是通过细胞分化完成<sup>[9-10]</sup>。细胞外泌体作为一种新的细胞通信机制,可能参与其修复损伤过程<sup>[11]</sup>。间充质干细胞外泌体可治疗急性血管损伤和慢性肾损伤的模型<sup>[12-13]</sup>,并能缓解肝纤维化损伤<sup>[14]</sup>。本实验室的前期研究已经发现,人脐带间充质干细胞条件培养基在修复肾损伤中的潜在作用<sup>[15]</sup>,然而,人脐带间充质干细胞外泌体能否减少草酸和COM晶体诱导的肾小管上皮细胞纤维化仍然是未知数。本研究中,我们观察到草酸和COM晶体可诱导HK-2细胞发生上皮间质转化,并探究人脐带间充质干细胞外泌体是否能抑制肾小管上皮间质转化,从而为临床保护草酸钙结石所致的肾小管上皮间质转化提供实验室依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

HK-2细胞购自中国典型培养物馆藏中心。人脐带间充质干细胞由重庆医科大学附属儿童医院干细胞中心实验室分离并鉴定。

### 1.2 试剂及仪器

DMEM/F12培养基、胎牛血清购自Gibco公司;COM晶体、草酸、重水及PKH26红色荧光细胞连接试剂盒购自Sigma公司;MTT试剂盒、BCA蛋白质浓度测定试剂盒及DAPI染色液购自碧云天生物技术有限公司;CD63、Alix、E-cadherin、Smad2抗体购自Abcam公司;TSG101抗体购自Cell Signaling Technology公司;ZO-1、N-cadherin抗体购自Invitrogen公司;Cy3和Alexa Fluor<sup>®</sup> 488荧光二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

24孔和96孔细胞培养板购自美国Corning公司;CO<sub>2</sub>细胞培养箱购自美国Thermo Scientific公司;超高速离心机购自美国Beckman coulter公司;粒度分析仪购自英国Malvern公司;倒置显微镜和荧光显微镜购自日本Nikon公司;电子显微镜购自日本Hitachi公司。

### 1.3 草酸和COM晶体诱导HK-2细胞上皮间质转化

文献报道草酸及COM晶体对HK-2细胞有损伤作用<sup>[16]</sup>,故将COM晶体紫外过夜消毒,用10% FBS DMEM/F12配置草酸2 mmol/L与COM晶体0.2 g/L悬浊液<sup>[17]</sup>,作为诱导培养基。

HK-2细胞融汇至70%~80%时,更换诱导培养

基, 对照组HK-2细胞采用10% FBS DMEM/F12, 放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养, 48 h后拍照并保存图像。

#### 1.4 hucMSC细胞培养

hucMSC培养基为10%无外泌体胎牛血清(exo-free FBS)DMEM/F12, exo-free FBS制备方法为FBS超速离心法。于4 °C下120 000 ×g离心15 h, 保留上层90%<sup>[18]</sup>, 作为exo-free FBS。细胞放入37 °C、5% CO<sub>2</sub>孵箱中培养, 生长到80%后收集培养基, 放入-80 °C冰箱备用。

#### 1.5 hucMSC-Ex提取与鉴定

1.5.1 外泌体提取 本实验采用差速离心-重水蔗糖点法提取外泌体。细胞条件培养基在4 °C条件下依次按照500 ×g离心30 min、3 000 ×g离心30 min、5 000 ×g离心30 min的顺序进行差速离心, 保留上清液, 将上清液置于超离管中的30%重水蔗糖垫中, 在4 °C条件下进行120 000 ×g 70 min的超速离心。用PBS在120 000 ×g 70 min离心条件下清洗重水蔗糖垫层2次。DMEM/F12培养基重悬管壁所用沉淀, 再经0.22 μm无菌滤器过滤后用于后续实验。

1.5.2 透射电镜鉴定外泌体形态 取外泌体悬液10 μL, 20倍体积1×PBS稀释后, 吸取20 μL滴加于2 nm电镜铜网状栅中, 室温过夜干燥后醋酸双氧铀负染30 s, 然后用透射电镜拍照并保存图像。

1.5.3 Western blot测定外泌体表面标记物 将1 μL PMSF加入100 μL蛋白裂解液RIPA, 取200 μL外泌体悬液加入RIPA, 4 °C超声裂解15 min, 12 000 ×g离心10 min, 取上清。BCA法测定蛋白浓度。灌制SDS-PAGE凝胶。吸取6 μg总蛋白。半干电转将蛋白从SDS-PAGE凝胶转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭。一抗CD63(1:2 000)、Alix(1:500)、TSG101(1:500)于4 °C孵育过夜。1:5 000稀释二抗, 室温孵育2 h, 显影后保存图像。

1.5.4 外泌体粒径分析(nanoparticle tracking analysis, NTA) 取用1×PBS重悬的外泌体悬液0.1 mL, 在4 °C条件下用PBS稀释10倍后加入比色皿中, 放入粒度仪样品池中测量其粒径大小。

#### 1.6 外泌体摄入实验

在24孔板内预先放入细胞爬片, 将HK-2细胞按每孔3×10<sup>4</sup>个种于24孔板中, 贴壁后按照蛋白浓度80 μg/mL将PKH26预染的hucMSC-Ex加入孔板中<sup>[19]</sup>, 共培养6 h、12 h、24 h和48 h后将细胞爬片置于4%多聚甲醛中固定20 min, PBS清洗3次, DAPI室温染

色1 h, PBS清洗3次, 抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下拍照。

#### 1.7 HK-2细胞分组

本实验分为对照组(只加入HK-2细胞)、外泌体组(HK-2细胞中加入160 μg/mL hucMSC-Ex)、草酸+COM组[草酸(2 mmol/L)+COM晶体(0.2 g/L)与HK-2细胞共培养]; 根据文献<sup>[13]</sup>及前期实验结果将外泌体干预组分为外泌体低剂量干预组(草酸+COM组细胞中加入80 μg/mL hucMSC-Ex)和外泌体高剂量干预组(草酸+COM组细胞中加入160 μg/mL hucMSC-Ex)。将外泌体加入培养基中6 h后加入COM晶体和草酸悬浊液培养液。

#### 1.8 MTT法检测各组细胞活性

待HK-2细胞融汇至80%时加入外泌体, 6 h后更换各组实验液, 孵箱内培养24 h、48 h、72 h后吸出培养基, 将80 μL无血清培养基及20 μL MTT工作液加入96孔板中, 放入孵箱内继续培养4 h。吸出工作液, 每孔加入DMSO 100 μL摇床上充分溶解结晶紫10 min, 酶标仪于492 nm波长处测定细胞的吸光度值。

#### 1.9 细胞荧光双标检测ZO-1及N-Cadherin的表达

在24孔板内预先放入细胞爬片, 按5×10<sup>4</sup>个/孔接种HK-2细胞, 待细胞铺满70%~80%时, 外泌体组、外泌体低剂量干预组及外泌体高剂量干预组细胞加入相应剂量外泌体, 6 h后吸出培养基, 加入每组对应的实验液及外泌体, 放入孵箱培养48 h后将各组细胞爬片置于4%多聚甲醛中固定20 min, PBS清洗3次, 加入含有0.1% Triton X-100的0.5% BSA封闭1 h。一抗ZO-1(1:50)、N-cadherin(1:100)于4 °C孵育过夜, PBS清洗3次, 加入Cy3和Alexa Fluor® 488二抗, 室温孵育1 h, DAPI染色1 h, 然后抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下拍照。

#### 1.10 Western blot检测HK-2细胞上皮及间质标志物表达情况

将PMSF 2 μL加入200 μL蛋白裂解液RIPA, 其余方法同1.5.3。一抗ZO-1(1:500)、E-cadherin (1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、α-SMA(1:1 000)、TGF-β(1:2 000)、Smad2(1:1 000)于4 °C孵育过夜。1:5 000稀释二抗, 室温孵育2 h, 显影后保存图像。Image J软件分析条带灰度值。

#### 1.11 数据统计

实验数据以mean±S.D.形式表示, 显著性差异分析用GraphPad prism 6.0软件软件进行, 多组间均

数比较采用方差分析检验, 两组间均数比较采用 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 hucMSC与HK-2细胞镜下形态良好, 草酸及COM晶体诱导HK-2细胞发生EMT

采用10% exo-free FBS DMEM/F12培养的hucMSC, 贴壁后镜下形态良好, 细胞形态呈较均一的长梭形, 类似成纤维细胞, 呈漩涡状生长, 胞质丰富, 细胞核明显(图1A和图1B)。常规培养的HK-2细胞形态呈铺路石样, 细胞间连接紧密(图1C和图1D)。而HK-2细胞暴露于10% FBS DMEM/F12配制的COM晶体(0.2 g/L)与草酸(2 mmol/L)诱导培养基48 h后, 细胞形态呈多角形、长梭形, 细胞间隙增加, 黏附性降低(图1G和图1H)。

### 2.2 外泌体形态及表面标志物鉴定

将提取的hucMSC-Ex悬液用20倍体积 $1 \times$  PBS稀释后, 于透射电镜下可见视野内散在分布圆形或椭圆形的膜性小囊泡, 具有较明显异质性, 直径介于30~200 nm之间, 囊泡外周可见其膜性结构, 内含低密度物质。Western blot检测到其表达外泌体表面标志物Alix、CD63和TSG101。粒径分析(NTA)结果显示, 外泌体直径介于80~300 nm之间, 主要集中在100 nm及300 nm处(图2)。

### 2.3 HK-2细胞摄入外泌体

为观察hucMSCs-Ex是否能进入HK-2细胞, 以便于发生进一步作用, 我们将HK-2细胞与80  $\mu$ g/mL PKH26预染的hucMSCs-Ex于24孔板内共培养6 h、

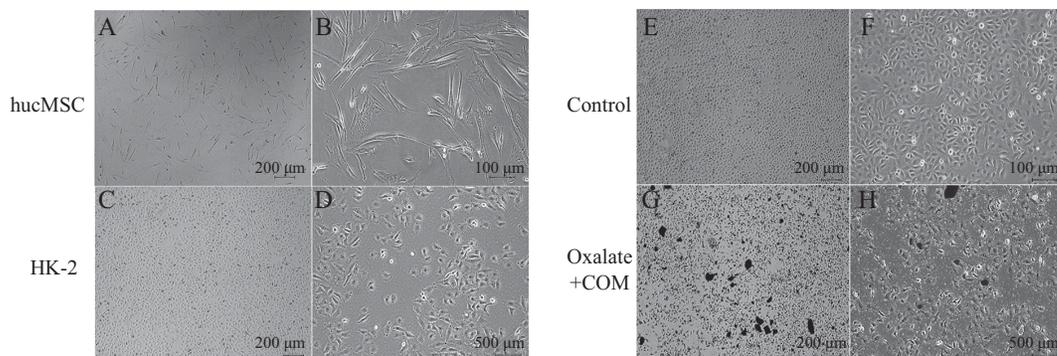
12 h、24 h和48 h后, 荧光显微镜下观察。结果发现, 共培养6 h及12 h后外泌体已进入细胞并在胞质中分布, 24 h时外泌体开始沿核膜聚集, 48 h时细胞核周围依然可见红色荧光聚集(图3)。

### 2.4 hucMSC-Ex提高草酸及COM晶体处理的HK-2细胞活性

为了进一步了解hucMSC-Ex对HK-2细胞活性的影响, 于24 h、48 h和72 h采用MTT法检测各组细胞活性。结果显示, 24 h时各组细胞活性无明显差异; 在48 h和72 h两个时间点, 对照组( $1.47 \pm 0.13$ 、 $3.11 \pm 0.26$ )、外泌体组( $1.61 \pm 0.11$ 、 $3.87 \pm 0.25$ )、外泌体低剂量干预组( $0.87 \pm 0.01$ 、 $1.59 \pm 0.09$ )及外泌体高剂量干预组( $1.58 \pm 0.16$ 、 $3.46 \pm 0.24$ )的细胞活性均高于草酸+COM组( $0.79 \pm 0.02$ 、 $1.28 \pm 0.09$ )( $P < 0.05$ ); 外泌体组( $1.61 \pm 0.11$ 、 $3.87 \pm 0.25$ )及外泌体高剂量干预组( $1.58 \pm 0.16$ 、 $3.46 \pm 0.24$ )细胞活性均高于对照组( $1.47 \pm 0.13$ 、 $3.11 \pm 0.26$ )( $P < 0.05$ )(图4)。

### 2.5 hucMSC-Ex抑制草酸及COM晶体诱导的HK-2细胞纤维化

2.5.1 hucMSC-Ex改变草酸及COM晶体诱导的HK-2细胞ZO-1, N-Cadherin蛋白表达 各组细胞培养48 h后, 我们采用免疫荧光法检测各组细胞ZO-1和N-cadherin的表达, 并在白光下观察细胞形态。结果显示, 对照组与外泌体组细胞连接紧密, 呈小圆颗粒、铺路石样结构, 细胞连接处ZO-1表达明显, 草酸+COM组细胞数明显少于前两组, 细胞间隙增加, 黏附性降低, 呈多角形或长梭形, 胞质与胞核内大量表达N-cadherin, 胞质内ZO-1表达减弱。同一时间

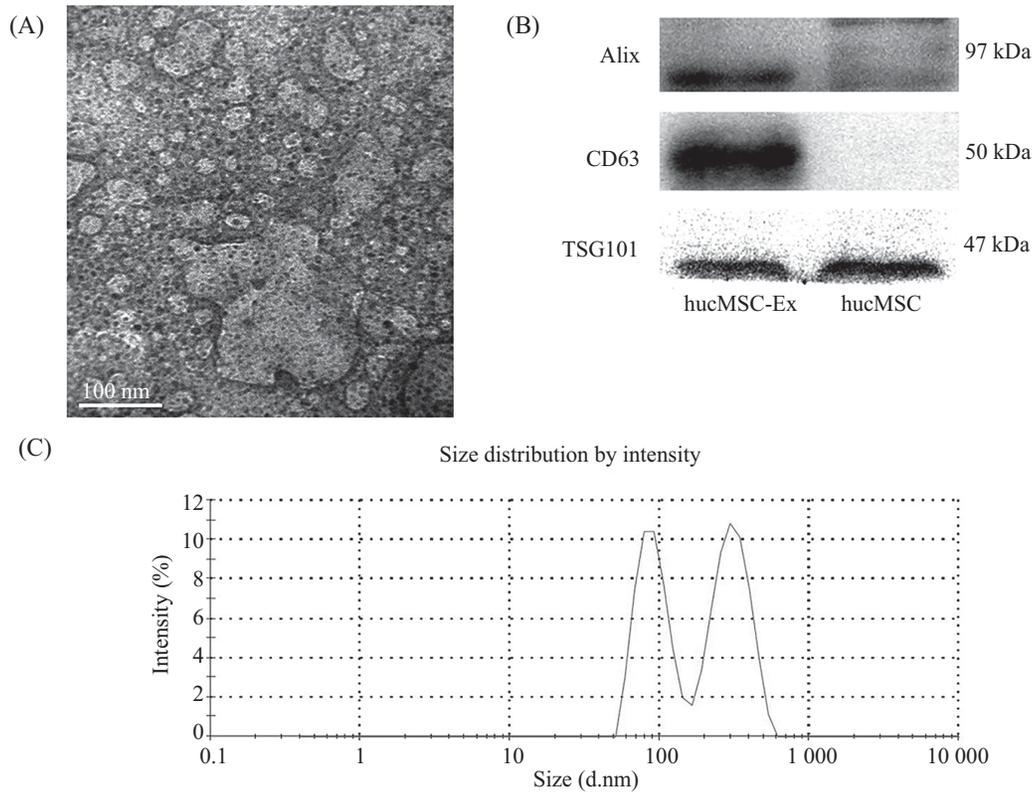


A, B: 10% exo-free FBS DMEM/F12培养hucMSC 24 h; C, D: 常规培养HK-2细胞24 h; E, F: 常规培养HK-2细胞48 h; G, H: 草酸(2 mmol/L)与COM晶体(0.2 g/L)诱导培养HK-2细胞48 h。hucMSC: 人脐带间充质干细胞; COM: 一水草酸钙。

A, B: hucMSCs were incubated with 10% exo-free FBS DMEM/F12 for 24 h; C, D: HK-2 cells were incubated with conventional medium for 24 h; E, F: HK-2 cells were incubated with conventional medium for 48 h; G, H: HK-2 cells were exposed to oxalate (2 mmol/L) and COM (0.2 g/L) crystals for 48 h. hucMSC: human umbilical cord mesenchymal stem cell; COM: calcium oxalate monohydrate.

图1 exo-free FBS培养的hucMSC、正常HK-2细胞及草酸和COM晶体诱导后的HK-2细胞形态

Fig.1 Morphology of hucMSCs in exo-free medium, normal HK-2 cells and HK-2 cells induced by oxalate and COM crystals



A: hucMSC-Ex透射电镜下形态; B: hucMSC-Ex与hucMSC中外泌体表面标志物蛋白表达结果; C: hucMSC-Ex粒径分析(NTA)结果。hucMSC-Ex: 人脐带间充质干细胞外泌体; hucMSC: 人脐带间充质干细胞。

A: morphology of hucMSC-Ex under transmission electron microscope; B: Western blot analysis for exosome markers of hucMSC-Ex and hucMSCs; C: NTA result of hucMSC-Ex. hucMSC-Ex: exosome from human umbilical cord mesenchymal stem cell; hucMSC: human umbilical cord mesenchymal stem cell.

图2 人脐带间充质干细胞外泌体提取及鉴定结果

Fig.2 Characterization of exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cell

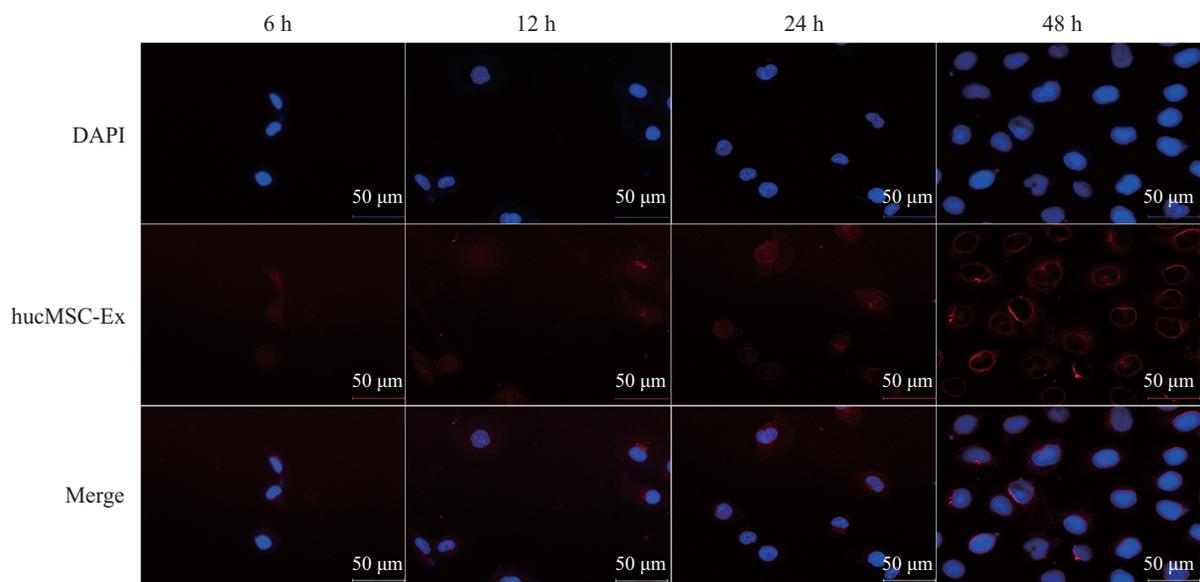


图3 HK-2细胞与PKH26预染的hucMSC-Ex共培养6 h、12 h、24 h和48 h后的荧光结果

Fig.3 HK-2 cells after incubated with hucMSC-Ex for 6 h, 12 h, 24 h and 48 h under fluorescence microscopy

点外泌体低剂量(80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )干预组和外泌体高剂量(160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )干预组细胞结构异常改变较草酸+COM

组轻微, 外泌体高剂量(160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )干预组细胞链接紧密, 镜下不易观察到细胞间隙, 细胞ZO-1蛋白表

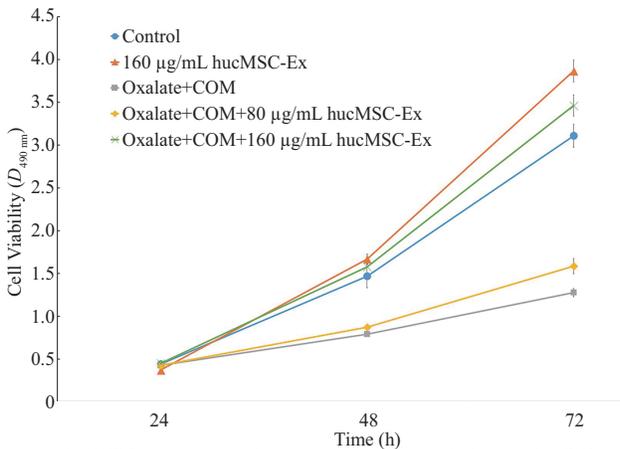


图4 人脐带间充质干细胞外泌体对HK-2细胞生长的促进作用

Fig.4 Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells prompted proliferation of HK-2 cells

达增加,部分细胞连接处可看到ZO-1蛋白表达(图5)。

2.5.2 hucMSC-Ex提高草酸及COM晶体诱导的HK-2细胞E-cadherin和ZO-1的蛋白表达,降低其 $\alpha$ -SMA和N-cadherin及相关信号通路蛋白TGF- $\beta$ 、Smad2的蛋白表达水平 各组细胞分别暴露于相应培养基48 h后,采用Western blot法检测其E-cadherin、ZO-1、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin以及相关信号通路蛋白TGF- $\beta$ 和Smad2的表达水平。结果发现,与对照组和外泌体组相比,草酸+COM组 $\alpha$ -SMA和N-cadherin以及TGF- $\beta$ 、Smad2蛋白表达增强,E-cadherin和ZO-1表达减弱。加入外泌体后外泌体低剂量(80  $\mu$ g/mL)干预组和外泌体高剂量(160  $\mu$ g/mL)干预组中 $\alpha$ -SMA和N-cadherin蛋白表达减弱,E-cadherin和ZO-1表达增强。TGF- $\beta$ 和Smad2蛋白与 $\alpha$ -SMA和N-Cadherin蛋白有相同的表达趋势(图6)。

### 3 讨论

草酸钙是泌尿系结石最为常见的结石成分,在COM晶体及草酸诱导的HK-2细胞损伤过程中常常伴有脂质过氧化反应的存在<sup>[6]</sup>。研究发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>介导的慢性氧化应激过程以及晚期蛋白氧化产物(AOPP)可导致HK-2细胞EMT发生<sup>[7,20]</sup>。有文献报道,草酸及草酸钙可直接导致HK-2细胞发生纤维化<sup>[24]</sup>。本实验采用COM晶体和草酸诱导HK-2细胞上皮间质转化,镜下可观察到细胞形态由典型的上皮细胞铺路石样形态转变为长梭形或多角形结构,细胞间隙增加,细胞间链接消失,并且上皮标志物蛋白的表达降低、间质标志物表达增高。这一现象与文献报

道一致,说明我们已成功诱导HK-2细胞发生间质转化,模拟出肾脏的纤维化的病理改变之一,为进一步实验提供基础。

近年来,干细胞治疗研究逐渐发现,间充质干细胞修复组织损伤的机制与其分泌作用有关,而不是通过细胞分化完成<sup>[9-10]</sup>。细胞外泌体作为一种新的细胞通信机制,可能参与其修复损伤过程<sup>[11,19]</sup>。因此,我们探索了hucMSC-Ex是否对HK-2细胞上皮间质转化这一病理损伤具有保护作用,从而寻找临床预防肾脏纤维化的新思路。

首先,本实验采用了差速离心-重水蔗糖垫法提取hucMSC-Ex,所提外泌体电镜下结构、标志蛋白表达以及NTA分析结果均与文献一致,说明本实验成功提取hucMSC-Ex,可进一步探索其对细胞的修复作用<sup>[22]</sup>。

我们观察到草酸及COM晶体诱导的HK-2细胞,在培养48 h后细胞数量较对照组明显减少,细胞形态发生了间质化改变。而hucMSC-Ex与间质化的HK-2细胞共培养后,HK-2细胞活性较干预前明显提升,细胞形态变化也较未加入外泌体组轻微,更接近于正常的HK-2细胞。相较于造模组细胞,外泌体干预组间质标志蛋白表达下降,上皮标志蛋白表达增加。由此可得出结论:hucMSC-Ex可以缓解草酸及COM晶体诱导的HK-2细胞上皮间质转化,对细胞纤维化损伤有一定的保护作用。

在前期实验中发现,160  $\mu$ g/mL hucMSC-Ex相较于80  $\mu$ g/mL hucMSC-Ex可更好的保持细胞活性<sup>[13]</sup>。故我们选择了这两个剂量进一步探索外泌体对细胞的保护作用。虽然可以明显观察到在细胞活性方面存在明显的量效关系,但在缓解纤维化的作用上未见明显量效关系。E-cadherin和ZO-1在EMT的研究中被广泛提及,他们被认为是上皮细胞标志物<sup>[21]</sup>。hucMSC-Ex预处理的HK-2细胞,在草酸及COM晶体诱导后,细胞E-cadherin和ZO-1蛋白表达虽与对照组相比部分仍有差异,但已经明显优于草酸+COM组。N-cadherin和 $\alpha$ -SMA在EMT的相关研究中被认为是重要的间质标志物,草酸及COM晶体干预后,HK-2细胞高表达这两种蛋白,说明细胞已经出现了间质转化。而在加入外泌体后,蛋白表达异常的情况有明显缓解。

同时,我们检测了经典的EMT信号通路TGF- $\beta$ /Smad2表达情况,发现TGF- $\beta$ /Smad2蛋白在草酸及COM晶体诱导后的HK-2细胞中高表达,说明草酸

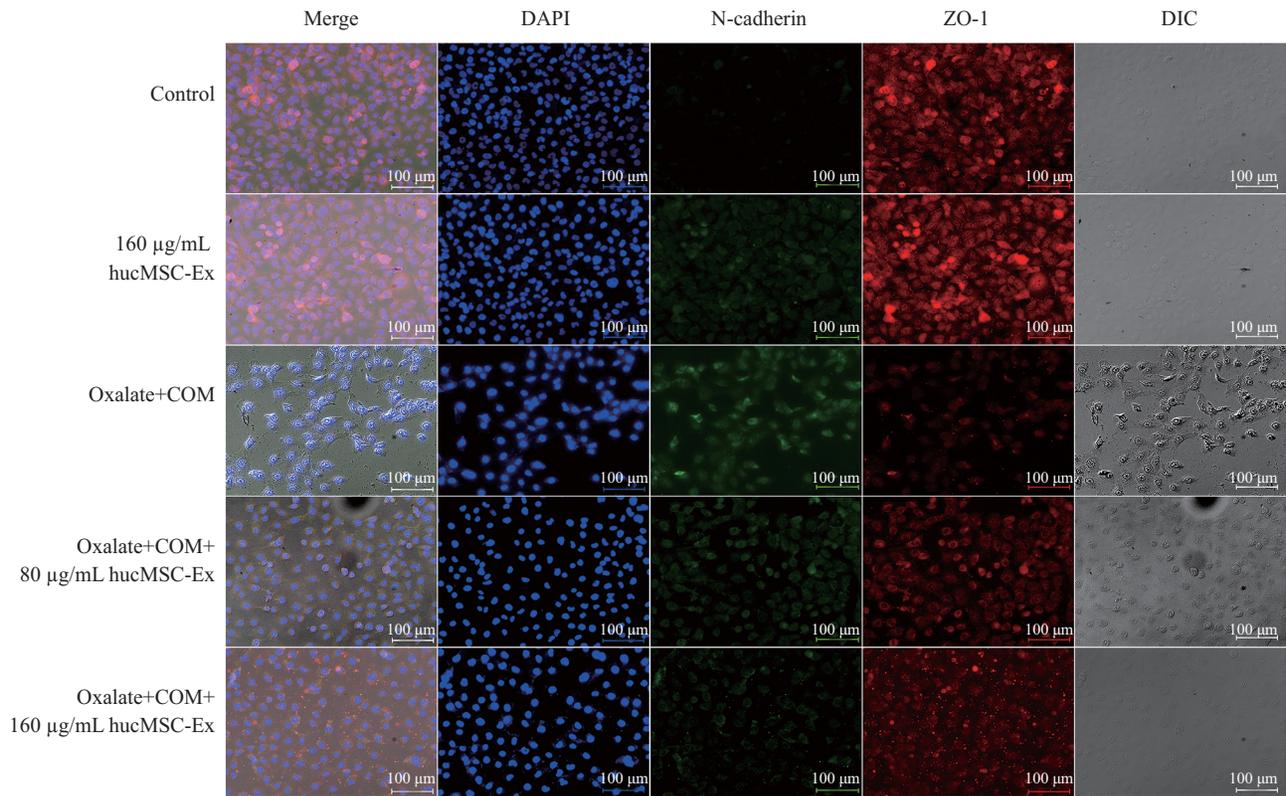
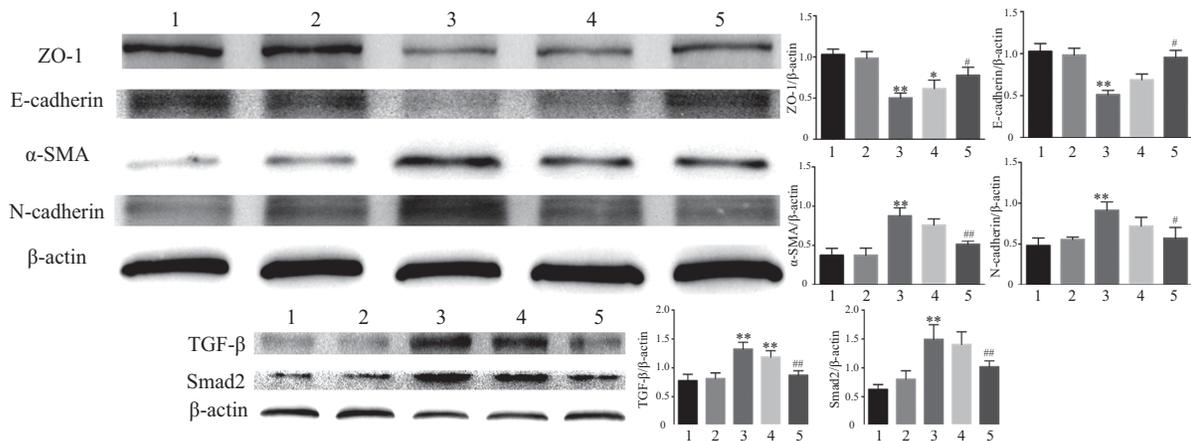


图5 各组HK-2细胞培养48 h后细胞形态及ZO-1和N-Cadherin蛋白的定位表达

Fig.5 Morphology of HK-2 cells and expression of ZO-1 and N-cadherin in each group



1: 对照组; 2: 外泌体组; 3: 草酸+COM组; 4: 外泌体低剂量(80 µg/mL)干预组; 5: 外泌体高剂量(160 µg/mL)干预组。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与草酸+COM组相比。

1: control; 2: 160 µg/mL hucMSC-Ex; 3: oxalate+COM; 4: oxalate+COM+80 µg/mL hucMSC-Ex; 5: oxalate+COM+160 µg/mL hucMSC-Ex. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  compared with oxalate+COM group.

图6 各组HK-2细胞中ZO-1、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA、N-cadherin、TGF- $\beta$ 和Smad2蛋白的表达水平Fig.6 Expression of ZO-1, E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, N-cadherin, TGF- $\beta$  and Smad2 in HK-2 cells

及COM晶体可能是通过激活此通路诱导细胞发生上皮间质转化。而外泌体干预可在一定程度上缓解这一现象。我们推测这一现象可能与以下的生物过程相关, TGF- $\beta$ 以及其下游的Smad2蛋白是EMT过程中起重要作用的细胞因子, TGF- $\beta$ /Smad是细

胞和组织EMT研究中的经典信号通路。本实验室在前期研究中发现, hucMSC条件培养基可以通过降低肾脏组织TGF- $\beta$ 蛋白表达来缓解肾脏EMT<sup>[15]</sup>, 这种保护作用可能与外泌体有关, 因此我们通过本实验进一步验证了此假设。另外有文献报道, 人尿

源干细胞外泌体内可高表达BMP-7<sup>[23]</sup>。而又有研究指出,通过抑制细胞BMP-7的表达可以促进草酸及COM晶体诱导的HK-2细胞纤维化<sup>[24]</sup>。BMP-7蛋白属于TGF- $\beta$ 超家族,具有拮抗TGF- $\beta$ 、减少细胞凋亡、缓解EMT等抗纤维化作用<sup>[25]</sup>。因此我们推测, hucMSC-Ex可能是通过传递BMP-7蛋白对细胞进行保护。但在本实验中,我们还未深入探究hucMSC-Ex保护细胞损伤和缓解上皮细胞纤维化的具体机制,并且实验结果仍需进一步动物实验证实,从而更好地为保护结石肾脏、慢性肾病肾脏提供更确切的治疗新思路。

综上所述,本实验证实,在体外培养细胞中, hucMSC-Ex干预可以缓解草酸及COM晶体诱导HK-2细胞发生的上皮间质转化,其机制可能是通过干细胞外泌体包含的蛋白拮抗TGF- $\beta$ 表达完成,具体机制还需进一步研究证实。

### 参考文献 (References)

- Serio A, Fraioli A. Epidemiology of nephrolithiasis. *Nephron* 1999; 81 Suppl1: 26-30.
- 严春寅, 王亮良. 尿路结石的流行病学特点及其预防. *临床外科杂志* (Yan Chunyin, Wang Liangliang. Epidemiology and prevention of Urolithiasis. *Journal of Clinical Surgery*) 2008, 16(11): 733-4.
- López M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2010; 25(1): 49-59.
- Schubert G. Stone analysis. *Urol Res* 2006; 34(2): 146-50.
- Krautschick A, Esen T. The role of the papilla in idiopathic calcium oxalate nephrolithiasis. *World J Urol* 1997; 15(4): 213-8.
- Thamilselvan S, Byer KJ, Hackett RL, Khan SR. Free radical scavengers, catalase and superoxide dismutase provide protection from oxalate-associated injury to LLC-PK1 and MDCK cells. *J Urol* 2000; 164(1): 224-9.
- Mahalingaiah PK, Ponnusamy L, Singh KP. Chronic oxidative stress leads to malignant transformation along with acquisition of stem cell characteristics, and epithelial to mesenchymal transition in human renal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2015; 230(8): 1916-28.
- Xu H, Qian H, Zhu W, Zhang X, Yan Y, Mao F, *et al.* Mesenchymal stem cells relieve fibrosis of *Schistosoma japonicum*-induced mouse liver injury. *Exp Biol Med* 2012; 237(5): 585-92.
- Tögel F, Weiss K, Yang Y, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(5): F1626-35.
- Camussi G, Deregibus MC, Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19(1): 7-12.
- Edgar JR. Q&A: What are exosomes, exactly? *Bmc Biol* 2016; 14: 46.
- Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, *et al.* Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(5): 1474-83.
- Zhang B, Wu X, Zhang X, Sun Y, Yan Y, Shi H, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/ $\beta$ -catenin pathway. *Stem Cells Transl Med* 2015; 4(5): 513-22.
- Li T, Yan Y, Wang B, Qian H, Zhang X, Shen L, *et al.* Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells Dev* 2013; 22(6): 845-54.
- Liu B, Ding FX, Liu Y, Xiong G, Lin T, He DW, *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells conditioned medium attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells in an irreversible model of unilateral ureteral obstruction. *Nephrology* 2017; doi: 10.1111/nep.13099.
- Wang B, Wu B, Liu J, Yao W, Xia D, Li L, *et al.* Analysis of altered microRNA expression profiles in proximal renal tubular cells in response to calcium oxalate monohydrate crystal adhesion: implications for kidney stone disease. *PLoS One* 2014; 9(7): e101306.
- Chen S, Gao X, Sun Y, Xu C, Wang L, Zhou T. Analysis of HK-2 cells exposed to oxalate and calcium oxalate crystals: proteomic insights into the molecular mechanisms of renal injury and stone formation. *Urol Res* 2010; 38(1): 7-15.
- Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015; 523(7559): 177-82.
- Fang S, Xu C, Zhang Y, Xue C, Yang C, Bi H, *et al.* Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNAs suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- $\beta$ /SMAD2 pathway during wound healing. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(10): 1425-39.
- 章俊, 邱敏姿, 马亚琼, 卜阳, 杨蕾, 汤珣. 晚期蛋白氧化产物通过氧化应激诱导肾小管上皮细胞转分化. *南方医科大学学报* (Zhang Jun, Qiu Minzi, Ma Yaqiong, Bu Yang, Yang Lei, Tang Xun. Advanced oxidation protein products induce epithelial-to-mesenchymal transition in cultured human proximal tubular epithelial cells via oxidative stress. *Journal of Southern Medical University*) 2014; 34(5): 659-63.
- Gheldof A, Berx G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Molecular Biol Transl Sci* 2013; 116: 317-36.
- Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, Popov VL, Wang H, Kalubowilage M, *et al.* Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses. *J Extracell Vesicles* 2017; 6(1): 1359478.
- Jiang ZZ, Liu YM, Niu X, Yin JY, Hu B, Guo SC, *et al.* Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7: 24.
- Convento MB, Pessoa EA, Cruz E, da Glória MA, Schor N, Borges FT. Calcium oxalate crystals and oxalate induce an epithelial-to-mesenchymal transition in the proximal tubular epithelial cells: Contribution to oxalate kidney injury. *Sci Rep* 2017; 7: 45740.
- Li RX, Yiu WH, Tang SC. Role of bone morphogenetic protein-7 in renal fibrosis. *Front Physiol* 2015; 6: 114.