

# 骨髓间充质干细胞来源外泌体对盆腔炎模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响

罗娜 孙蔚林 宁静 李卫平

(解放军总医院海南分院妇产科, 海南 三亚 572013)

**【摘要】** 目的 研究骨髓间充质干细胞(BMSCs)源性外泌体(Exosomes)对盆腔炎(PID)模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响。方法 通过全骨髓粘附法体外分离,培养和纯化正常 SD 大鼠的骨髓组织中的 BMSCs。采用 Exo-Quick 试剂法从 BMSCs 上清液中分离提纯 Exosomes。按随机数字表法将 60 只雌性 SD 大鼠分为模型组、治疗组、左氧氟沙星组、对照组、空白组和假手术组 6 组,每组 10 只。对各组大鼠进行子宫组织 HE 染色,外周血白细胞测定,血清炎症因子检测,氧化应激状态评估。结果 分离培养大鼠 BMSCs,并成功提取了 BMSCs 源性 Exosomes。治疗组大鼠子宫组织 HE 染色显示炎症反应较模型组和对照组明显减轻。治疗组大鼠外周血白细胞数、中心粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞均较模型组出现降低;且治疗组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的浓度水平值也均较模型组出现降低( $P < 0.05$ )。氧化应激指标检测显示治疗组大鼠 SOD 和 T-AOC 表达水平均较模型组出现升高,而 MDA 表达水平则降低( $P < 0.05$ )。治疗组大鼠除中心粒细胞数和血清 IL-1 $\beta$  浓度水平值要高于左氧氟沙星组,其余外周血白细胞、血清炎症因子和氧化应激指标比较无统计学差异( $P > 0.05$ )。结论 BMSCs 源性 Exosomes 对盆腔炎模型大鼠子宫具有保护作用,其机制可能通过抑制氧化应激和炎症反应发挥作用。

**【关键词】** 骨髓间充质干细胞;外泌体;盆腔炎;氧化应激;炎症反应

**【中图分类号】** R711.3 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 05. 010

## Effects of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells on oxidative stress and inflammatory response in rats with pelvic inflammatory disease

LUO Na, SUN Weilin, NING Jing, LI Weipin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Hainan Branch of PLA General Hospital, Sanya 572013, Hainan, China)

**【Abstract】** **Objective** To study the effect of Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells on oxidative stress and inflammatory response in rats with pelvic inflammatory disease. **Methods** BMSCs from the bone marrow of normal SD rats were isolated, cultured and purified in vitro by total bone marrow adhesion. Exosomes were isolated from BMSCs supernatant by ExoQuick reagent method. According to the random number table method, 60 female SD rats were divided into 6 groups (10 rats in each group). Model group (PID model rats without any special treatment). Treatment group (1 ml of exosomes diluted solution (100  $\mu$ g/mL) was injected intraperitoneally on the third day after the operation for 3 consecutive days). Levofloxacin group (PID model rats were given levofloxacin 60mg/kg/day by gavage on the 3rd day after surgery for 3 consecutive days). Control group (PID model rats were injected with corresponding dose of normal saline). Blank group (normal feeding of rats without any treatment) and Sham operation group (rats were only been opened and closed the abdomen). HE staining of uterine tissues, determination of peripheral blood leukocytes, detection of serum inflammatory factors and assessment of oxidative stress status were performed in each group. **Results** BMSCs of rats were isolated and cultured, and Exosomes derived from BMSCs were successfully extracted. HE staining showed that the inflammatory response of uterus tissue in the treatment group was significantly less than that in the model group and the

通信作者:李卫平, E-mail: luona1981med@126. com

引用本文:罗娜,孙蔚林,宁静,等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体对盆腔炎模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 西部医学, 2022, 34(5): 681-687. DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 05. 010

control group. The number of white blood cells, central granulocytes, lymphocytes, monocytes and eosinophils in peripheral blood of rats in the treatment group were all decreased compared with those in the model group ( $P < 0.05$ ). The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 in the treatment group were also lower than those in the model group ( $P < 0.05$ ). The detection of oxidative stress index showed that the expression level of SOD and T-AOC in the treatment group was higher than that in the model group, while the expression level of MDA was lower ( $P < 0.05$ ). Except for the number of neutrophils and serum IL-1 $\beta$  concentration, there were no significant differences in peripheral blood leukocytes, serum inflammatory factors and oxidative stress indexes between the treatment group and Levofloxacin group ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion** Exosomes derived from BMSCs has a protective effect on the uterus of pelvic inflammatory model rats, and its mechanism may play a role by inhibiting oxidative stress and inflammatory response.

**【Key words】** Bone marrow mesenchymal stem cell; Exosome; Pelvic inflammatory disease; Oxidative stress; Inflammatory response

盆腔炎(Pelvic inflammatory disease, PID)<sup>[1]</sup>是指累及女性盆腔内生殖器官及其周围结缔组织、盆腔腹膜的炎症性疾病。PID 反复发作或迁延不愈,会导致患者出现疼痛不适、异位妊娠、不孕以及影响性生活等,对妇女的身心健康和生活造成严重影响。目前针对 PID 的内科治疗手段主要是运用抗生素消除/缓解炎症,以及物理疗法来活血化瘀,缓解疼痛不适,促进炎症消退。但是仍存在长期效果欠佳,复发率高的缺点<sup>[2-3]</sup>。骨髓间充质干细胞<sup>[4]</sup>(Bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs) 是一类具有自我更新能力的非造血干细胞。以往的研究表明<sup>[5-6]</sup>, BMSCs 有可能分化为间充质或非间充质细胞系,且具有向损伤部位迁移的能力,通过调节先天性和获得性免疫细胞的增殖和功能,促进伤口愈合和组织再生,抗炎和抑制免疫反应。Exosomes 是一类由细胞主动分泌的,直径在 30 nm~150 nm 的囊泡样小体<sup>[7]</sup>。在正常和病理条件下,Exosomes 通过穿梭蛋白质、mRNA 和 microRNAs 介导细胞间的通讯有助于遗传和生化信息在细胞间的传递。在肿瘤发生、炎症免疫反应等多个生理病理过程中发挥重要的调控作用。有研究显示<sup>[8-9]</sup>, BMSCs 能够分泌丰富的 Exosomes,在 BMSCs 与靶细胞之间交换蛋白质和遗传信息,发挥重要的介导作用。本研究通过构建大鼠 PID 模型,并观察 BMSCs 源性 Exosomes 对 PID 模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响,为临床上治疗 PID 提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料与试剂 清洁级雌性 SD 健康大鼠 60 只,质量 180~220 g,购于解放军总医院医学实验动物中心;左氧氟沙星片(可乐必妥)购于第一三共制药(北京)有限公司;DMEM F12 培养基、胎牛血清购于 Gibco 公司;ExoQuick TC 外泌体提取试剂盒购自美国 SBI 公司;TNF- $\alpha$ 、CRP、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 ELISA 试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;大鼠 SOD、MDA 和 T-AOC 检测试剂盒均购自南京建

成生物工程研究所;Centrifuge5424 离心机购自 Eppendorf 公司;1-15K 高速冷冻台式离心机购自 Sigma 公司;CyFlow<sup>®</sup> Counter 流式细胞仪购自德国 Partec 公司;MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 孵育箱购自日本 SANYO 公司;LH 750 全自动血细胞分析仪购自美国贝克曼库尔特;DYY-6C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂;IX-70 型倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;Multi-Image<sup>™</sup> 凝胶成像系统购自 Alpha Innotech 公司;NanoDrop 1000 超微量分光光度计购自美国 Nanodrop 公司。本研究通过医院伦理委员会审核批准。

## 1.2 方法

1.2.1 BMSCs 分离、培养和鉴定 ①BMSCs 分离和培养:采用贴壁法培养 BMSCs,3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉实验 SD 大鼠,颈部脱臼处死大鼠,75%乙醇浸泡 10 min 进行消毒。无菌条件下截取实验 SD 大鼠的股骨和胫骨的骨髓末端,PBS 溶液反复冲洗骨髓末端的骨髓腔,收集冲洗后 PBS 溶液。移液器反复吹打,筛网过滤,制作成单细胞悬液,以 1500 r/min 条件下离心 10 min,弃去上清液。将细胞的密度调整为  $(1\sim3)\times 10^6$  /mL,接种至含 LG-DMEM 完全培养液的细胞培养瓶中。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养。培养 48 h 后弃去培养液,去除掉非贴壁细胞。然后加入等量 LG-DMEM 完全培养液培养纯化细胞,每 3 天更换一次 LG-DMEM 培养液。待细胞长至 80%左右融合时,0.25%胰蛋白酶,以 1:3 的比例传代。取第 3 代生长良好的细胞进行实验研究。②BMSCs 的鉴定:0.25%胰蛋白酶消化 BMSCs,制作成细胞密度为  $1\times 10^6$  /ml 的单细胞悬液。分别加入荧光直标的 CD44 和 CD90 单克隆抗体。混和均匀后,黑暗条件下孵育 30 min,用 PBS 溶液洗涤 3 次,并为每组样品设立单独的阴性对照。采用流式细胞仪进行检测表面标志物;成脂和成骨诱导分化检测其分化能力。

1.2.2 BMSCs 源性 Exosomes 的提取和鉴定 BM-

SCs 培养待细胞融合度达到 90% 后, 更换无血清培养基培养 48 h 后, 收集培养基上清液。4℃ 的条件下以 300 g×10 min, 2000 g×20 min 离心去除细胞和细胞碎片形成的沉淀。离心后取上清液置于新的 EP 管, 每 500 μL 上清液加入 ExoQuick<sup>TC</sup> 试剂 50 μL; 颠倒 EP 管约 20 次混合, 置于 4℃ 冰箱静置约 12 h。然后在 4℃、3000 g 条件下离心 30 min, 去除上清液, 保留沉淀。使用移液枪取 400 μL 1×PBS 并反复均匀吹打离心沉淀物, 该重悬液中富含 Exosomes 颗粒, 将重悬液转移至新的 1.5 mL EP 中。透射电子显微镜观察提取的 Exosomes 形态。Western blot 检测 Exosomes 标志物表达。

1.2.3 PID 大鼠动物模型建立及分组 所有实验大鼠在术前 12 h 开始禁止进食, 自由饮水, 手术区域剃毛备皮。称重大鼠后, 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔内注射麻醉。待麻醉生效后, 橡皮筋固定大鼠于操作台上。下腹部备皮常规消毒, 取腹正中切口 1.5~2 cm, 开腹后暴露子宫。采用 1 mL 注射器针头进针入子宫腔内反复来回抽拉以造成子宫内膜组织机械损伤。向输卵管卵巢方向缓慢注射 0.1 mL 浓度为  $3 \times 10^{12}$ /L 的混合细菌悬液(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌三者比例为 2:1:1 混匀)。随手逐层缝合关腹, 碘伏消毒术区。假手术组手术操作步骤仅为开腹和关腹, 未对子宫腔进行机械损伤以及注射混合细菌悬液。将 40 只 PID 模型大鼠采用随机数字表法分为: 模型组(单纯构建 PID 模型大鼠未给与任何特殊处理); 治疗组(构建 PID 模型大鼠术后第 3 天开始腹腔注射 100 μg/mL 的 Exosomes 稀释液 1 mL, 连续注射 3 天); 左氧氟沙星组(构建 PID 模型大鼠第 3 天开始 60 mg/kg/天左氧氟沙星灌胃给药, 连续 3 天); 对照组(构建 PID 模型大鼠后腹腔注射相应剂量生理盐水)。另外设置空白组(正常饲养大鼠, 不给予任何处理)和假手术组。每组 10 只。

1.2.4 子宫组织苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色 取实验大鼠子宫组织用 10% 多聚甲醛溶液固定 24 h, 然后经梯度脱水、常规石蜡包埋、切片(厚 5 μm), HE 染色后制作成病理切片。显微镜下观察子宫组织病理学改变情况。

1.2.5 外周血白细胞测定 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉实验大鼠, 开腹用 10 mL 注射器抽取下腔静脉血约 2 mL, 采用全自动血细胞分析仪测定静脉血中白细胞数量、种类、比例等。

1.2.6 血清样本采集 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉实验大鼠, 开腹用 10 mL 注射器抽取下腔静脉血约 8 mL 置入微量离心管。室温下静置 1 h, 然后 2000 rpm

离心 20 min, 取上清置于新 1.5 mL 微量离心管。

1.2.7 血清炎症因子检测 采用 ELISA 试剂盒分别检测大鼠血清中炎症介质 TNF-α、CRP、IL-1β、IL-6 和 IL-8 的浓度水平。所有检测均严格按照检测试剂盒说明书步骤进行操作。

1.2.8 氧化应激状态评估 ①丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测: 采用南京建成生物工程研究所的 MDA 检测试剂盒, 实验按照试剂盒使用说明步骤进行操作。②超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性检测: 采用南京建成生物工程研究所的 SOD 检测试剂盒, 实验按照试剂盒说明书步骤进行操作。③总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)检测: 采用北京索莱宝科技有限公司的 T-AOC 检测试剂盒, 实验按照试剂盒说明书步骤进行操作。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间数据比较采用 *t* 检验和单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 BMSCs 的鉴定 光学显微镜下观察, 通过贴壁法获取并的培养 BMSCs 细胞形态呈多边形或不规则的梭形粘附生长, 两端具有长突起, 细胞核呈圆形或椭圆形, 见图 1A; 流式细胞仪检测结果显示, BMSCs 的重要标志物 CD44 和 CD90 的表达阳性率均大于 90%, 见图 1B。

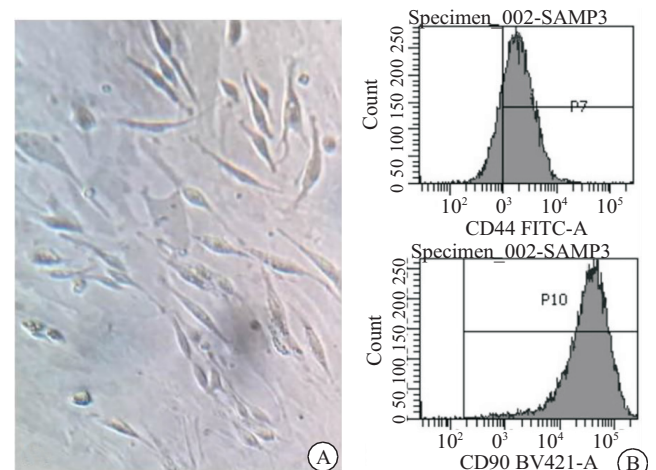


图 1 大鼠 BMSCs 鉴定

Figure 1 Identification of BMSCs in rats

2.2 BMSCs 源性 Exosomes 的鉴定 透射电镜下观察, 提取到的 Exosomes 形态呈圆形或椭圆形, 直径在 40~100 nm, 具有较为完整包膜的小囊泡, 见图 2A。Western blot 检测显示其表达 Exosomes 特异性蛋白 CD63 和 CD9, 见图 2B。

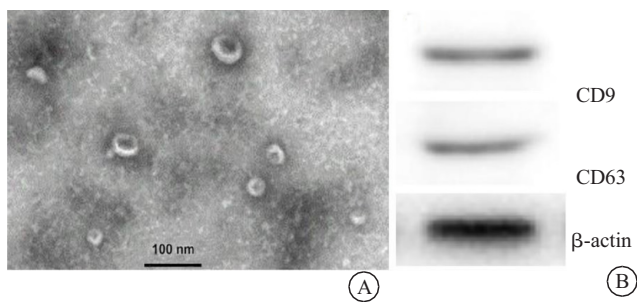


图 2 BMSCs 源性 Exosomes 的鉴定

Figure 2 Identification of exosomes derived from BMSCs

2.3 大鼠子宫 HE 染色 空白组和假手术组大鼠子宫结构正常,细胞排列规则,未见红细胞和炎细胞浸润。模型组和对照组大鼠子宫结构紊乱,细胞排列不

规则,腺体出现扩张或结构不清晰,可见红细胞和炎细胞浸润。治疗组和左氧氟沙星组大鼠子宫结构基本正常,细胞排列较规则,少许红细胞和炎细胞浸润,见图 3。

2.4 大鼠外周血白细胞检测结果 模型组大鼠外周血白细胞数、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞较空白组均明显升高( $P < 0.05$ )。治疗组大鼠外周血白细胞数、中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞均较模型组出现降低,两组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。治疗组大鼠除中心粒细胞数要高于左氧氟沙星组( $P < 0.05$ ),其余外周血白细胞检测指标相比差异无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

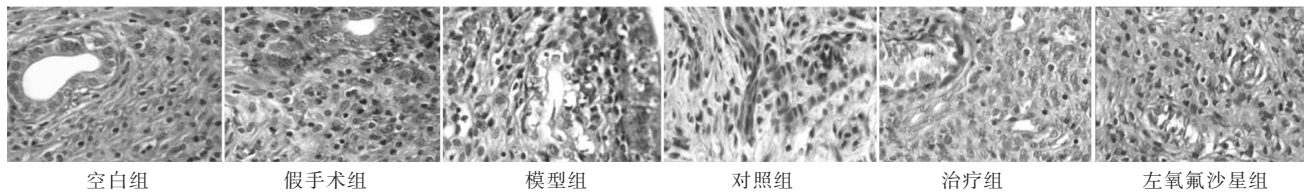


图 3 子宫组织 HE 染色(200×)

Figure 3 HE staining of uterine tissue

表 1 各组大鼠外周血白细胞检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Detection results of peripheral blood leukocytes in rats of each group

分组	n	白细胞( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞( $\times 10^{-2}$ )	单核细胞( $\times 10^{-2}$ )	嗜酸性粒细胞( $\times 10^{-2}$ )	淋巴细胞( $\times 10^{-2}$ )
空白组	10	10.26 ± 2.84	11.30 ± 1.19	2.49 ± 0.27	0.95 ± 0.17	62.87 ± 5.22
假手术组	10	11.86 ± 2.74	12.28 ± 1.24	2.75 ± 0.30	0.99 ± 0.19	64.16 ± 5.48
模型组	10	15.73 ± 3.85	24.67 ± 3.29	6.44 ± 0.38	2.11 ± 0.24	75.47 ± 6.26
对照组	10	15.12 ± 3.88	23.45 ± 3.39	6.16 ± 0.40	2.03 ± 0.21	74.58 ± 6.25
治疗组	10	12.92 ± 3.24	15.86 ± 2.97	4.47 ± 0.38	1.55 ± 0.24	67.86 ± 5.94
左氧氟沙星组	10	12.14 ± 2.89	13.79 ± 2.83	4.25 ± 0.36	1.52 ± 0.27	68.58 ± 5.80
$P_1$		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
$P_2$		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
$P_3$		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
$P_4$		>0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

注: $P_1$ . 空白组 vs 模型组; $P_2$ . 模型组 vs 治疗组; $P_3$ . 治疗组 vs 对照组; $P_4$ . 治疗组 vs 左氧氟沙星组

2.5 大鼠血清炎症因子检测结果 模型组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的浓度水平值均较空白组明显升高( $P < 0.05$ )。治疗组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 的浓度水平值均较模型组出现降低,两组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );治疗组大鼠除血清 IL-1 $\beta$  浓度水平值高于左氧氟沙星组( $P < 0.05$ ),其余炎症因子血清浓度水平值相比无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 2。

2.6 大鼠氧化应激状态评估结果 模型组大鼠 SOD 和 T-AOC 数值均较空白组明显降低,而 MDA 数值则明显升高( $P < 0.05$ )。治疗组大鼠 SOD 和 T-AOC 数值均较模型组出现升高,而 MDA 数值则出现降低,两组比较差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),同左氧氟沙星组相比,治疗组大鼠 SOD、T-AOC 和 MDA 数值比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 2 各组大鼠血清炎症因子检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum inflammatory factors in each group

分组	n	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	IL-6(ng/L)	IL-8(ng/L)
空白组	10	10.38 $\pm$ 3.17	118.45 $\pm$ 30.22	29.20 $\pm$ 4.64	74.25 $\pm$ 6.27
假手术组	10	12.82 $\pm$ 4.08	137.48 $\pm$ 37.57	31.68 $\pm$ 4.49	80.23 $\pm$ 9.55
模型组	10	24.36 $\pm$ 5.73	558.24 $\pm$ 57.46	94.08 $\pm$ 10.64	168.35 $\pm$ 20.51
对照组	10	22.15 $\pm$ 5.47	548.26 $\pm$ 54.94	89.20 $\pm$ 9.69	150.38 $\pm$ 18.92
治疗组	10	16.24 $\pm$ 4.69	314.66 $\pm$ 51.24	55.35 $\pm$ 7.18	118.27 $\pm$ 19.31
左氧氟沙星组	10	15.47 $\pm$ 4.35	252.70 $\pm$ 48.47	52.82 $\pm$ 6.77	112.86 $\pm$ 18.72
$P_1$		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
$P_2$		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
$P_3$		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
$P_4$		>0.05	<0.05	>0.05	>0.05

注: $P_1$ , 空白组 vs 模型组; $P_2$ , 模型组 vs 治疗组; $P_3$ , 治疗组 vs 对照组; $P_4$ , 治疗组 vs 左氧氟沙星组

表 3 各组大鼠氧化应激检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of the test results of oxidative stress in rats of each group

分组	n	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)	T-AOC (U/mL)
空白组	10	128.75 $\pm$ 7.45	4.58 $\pm$ 0.49	8.73 $\pm$ 0.67
假手术组	10	121.46 $\pm$ 7.27	4.72 $\pm$ 0.55	8.50 $\pm$ 0.64
模型组	10	90.83 $\pm$ 7.48	6.85 $\pm$ 0.77	6.12 $\pm$ 0.81
对照组	10	95.37 $\pm$ 8.04	6.44 $\pm$ 0.72	6.24 $\pm$ 0.75
治疗组	10	115.78 $\pm$ 8.53	5.62 $\pm$ 0.79	7.30 $\pm$ 0.81
左氧氟沙星组	10	117.36 $\pm$ 8.19	5.47 $\pm$ 0.76	7.53 $\pm$ 0.88
$P_1$		<0.05	<0.05	<0.05
$P_2$		<0.05	<0.05	<0.05
$P_3$		<0.05	<0.05	<0.05
$P_4$		>0.05	>0.05	>0.05

注: $P_1$ , 空白组 vs 模型组; $P_2$ , 模型组 vs 治疗组; $P_3$ , 治疗组 vs 对照组; $P_4$ , 治疗组 vs 左氧氟沙星组

### 3 讨论

BMSCs 是具有多向分化潜能和自我更新能力的多能干细胞。在合适的条件下, BMSCs 可以被诱导分化为多种组织细胞。与其他干细胞不同, BMSCs 在基因上更稳定, 在体外环境下存活时间更长, 且 BMSCs 还具有免疫调节作用。因而 BMSCs 成为多种疾病干细胞治疗的理想选择, 具有广阔的临床应用前景<sup>[10]</sup>。BMSCs 发挥治疗效应的机制非常复杂, 目前已知的是, 其除了能够移植到受损器官上并进行分化来发挥其治疗作用, 还可能通过以下方式发挥其生物学作用<sup>[11-12]</sup>: ①分泌可溶性因子(细胞因子、生长因子、激素)的旁分泌活性。②细胞与细胞相互作用, 在细胞之间形成纳米管隧道。③分泌含有蛋白质和 RNA 的囊泡。Exosomes 是大多数原核和真核细胞

(包括 T 细胞、B 细胞、树突状细胞、上皮细胞和肿瘤细胞等)释放的纳米级微泡(直径 30~100 nm), 将其功能效应物(如 mRNAs、miRNAs 和蛋白质)转移到受体细胞以调节生理和病理过程。Exosomes 是传递膜封闭信号分子和基因产物的关键载体, 直接参与细胞间的信号传递, 是机体旁分泌的重要组成部分<sup>[13]</sup>。BMSCs 来源的 Exosomes 具有抗凋亡、免疫调节、抗炎和促血管生成的特性。Jun 等<sup>[14]</sup>研究发现, BMSC 源性 Exosomes 能增强自噬相关蛋白 LC3IIB 和 Beclin-1 的表达, 促进自噬体的形成, 进而抑制脊髓损伤大鼠神经细胞凋亡, 促进其功能行为恢复。Jiang 等<sup>[15]</sup>通过体外研究发现, BMSC 源性 Exosomes 通过抑制 TGF-TGF/Smad 信号通路, 能够有效促进皮肤创面愈合。因此, Exosomes 可能是 BMSCs 发挥其生物学效能的重要工具和途径。

PID 的发病机制主要是由于免疫因素影响下病原体入侵感染, 导致机体炎性介质和自由基的异常分泌活化, 进而产生一系列病理生理改变。根据美国疾病控制和预防中心的指导方针<sup>[16]</sup>, 临床使用抗生素是 PID 治疗的首选。然而, 大多数患者经过长期治疗后往往发生细菌耐药性。因此, 开发具有良好疗效、低副作用的天然药物对预防 PID 具有重要意义。氧化应激和炎症反应是 PID 的最主要的病理生理机制<sup>[17]</sup>。PID 的发病过程中, 机体活性氧(ROS)的过度产生导致氧化与抗氧化失衡而引起氧化应激状态, 最终导致组织细胞损伤。氧化应激与炎症反应相辅相成, 炎症是白细胞对挑战组织内稳态的因素(包括氧化应激引起的因素)的反应, 过度的炎症反应会损伤组织细胞, 导致大量氧自由基产生及 NO 的合成释放

下降<sup>[18]</sup>。ROS 也被证实是多个炎症信号通路的启动者和调节者,通过激活 Nrf2、NF- $\kappa$ B、ASK1、AP-1、补体等炎症信号通路,进而增强炎症应答<sup>[19-20]</sup>。因此,有效对抗氧化应激,改善炎症反应已成为 PID 治疗领域的研究重点。

BMSCs 来源的 Exosomes 在对抗氧化应激和炎症反应方面具有良好的生物学特性。Campbell 等<sup>[21]</sup>研究发现在氧化应激损伤后, BMSCs 源性的 Exosomes 能显著降低了心脏干细胞(Cardiac stem cells, CSCs)的凋亡率和 ROS 的产生。Zheng 等<sup>[22]</sup>通过研究类风湿关节炎模型大鼠后发现, BMSCs 源性的 Exosomes 通过传递上调 miR-192-5p 的表达来抑制类风湿关节炎的炎症反应。因此,本次实验采用 BMSCs 来源的 Exosomes 来对 PID 模型大鼠进行干预研究。我们采用全骨髓贴壁筛选培养法分离和纯化大鼠骨髓组织中的 BMSCs,通过显微镜观察和干细胞表型分析获得的细胞是 BMSCs。然后通过 Exo-Quick-TC 法从大鼠 BMSCs 培养基上清中分离 Exosomes。通过透射电镜观察其形态以及 Western blot 检测其表达的外泌体特异性分子标记,证实了为 BMSCs 源性 Exosomes。随后我们经腹腔注射 BMSCs 源性 Exosomes 进行干预。HE 染色结果显示,治疗组大鼠子宫组织充血和炎症细胞浸润等病理变化与左氧氟沙星组大鼠相近,而较未经任何干预的模型组有明显改善。这一研究结果提示 BMSCs 源性 Exosomes 对于 PID 模型大鼠具有较好的治疗作用,能够改善子宫充血水肿和炎症反应。

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的检测可作为临床上判断炎症反应严重程度的生物学指标<sup>[23-24]</sup>。本研究中, PID 模型大鼠存在明显全身性炎症反应,而子宫是 PID 过程中最容易受累的靶器官,因而也会导致子宫发生比较明显的炎症反应。而治疗组大鼠外周血炎症细胞数量较未经任何干预的模型组出现降低,且血清中相关炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 的表达也发生明显降低。由于左氧氟沙星为广谱抗生素,是目前治疗 PID 的常用药,具有良好的抗感染炎症效能。同左氧氟沙星组相比,治疗组大鼠除中心粒细胞数和血清 IL-1 $\beta$  浓度水平值要高于左氧氟沙星组,其余外周血白细胞和血清炎症因子比较无统计学差异。这表明 BMSCs 源性 Exosomes 能有效减轻 PID 模型大鼠的全身性炎症反应。氧化应激方面, SOD 是清除氧自由基和抑制组织损伤的重要抗氧化酶, MDA 是脂质过氧化的最终产物, T-AOC 代表抗

氧化物质和抗氧化酶等构成总抗氧化水平,这三者反映机体清除氧自由基的能力和氧自由基对细胞的损伤程度,是反映机体对抗氧化应激损伤能力的生物学指标<sup>[25-26]</sup>。本研究中, PID 大鼠 SOD 和 T-AOC 数值均较空白组明显降低,而 MDA 数值则明显升高,表明 PID 模型大鼠存在明显的氧化应激。而经治疗组大鼠 SOD 和 T-AOC 数值均较模型组升高, MDA 数值则降低。提示 BMSCs 源性 Exosomes 能够增强 PID 大鼠体内的抗氧化能力,抑制 ROS 的过度产生,进而降低机体的氧化应激水平。

#### 4 结论

本研究结果显示, BMSCs 源性 Exosomes 对 PID 模型大鼠具有较好的治疗作用,其效能可能在于 Exosomes 能通过细胞间传递效应物质来抑制氧化应激反应和炎症反应。然而,目前关于 BMSCs 源性 Exosomes 疗效的证据是多种多样的,其具体作用机制尚待明确,随着对 Exosomes 功能和作用机制的不断研究深入,将为临床治疗 PID 提供新的策略。

#### 【参考文献】

- [1] MCKEE D L, HU Z, STAHLMAN S. Incidence and sequelae of acute pelvic inflammatory disease among active component females, U. S. Armed Forces, 1996-2016[J]. MSMR, 2018, 25(10):2-8.
- [2] ROSS J, GUASCHINO S, CUSINI M, *et al.* 2017 European guideline for the management of pelvic inflammatory disease [J]. Int J STD AIDS, 2018, 29(2):108-114.
- [3] 林卫平, 尚贤文, 徐建阳. 阿奇霉素联合盆腔炎制剂治疗支原体属感染性盆腔炎对患者子宫血流动力学指标影响的比较[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(9):2131-2133.
- [4] SALEM M, MIRZAPOUR T, BAYRAMI A, *et al.* Germ cell differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Andrologia, 2019, 51(4):e13229.
- [5] WANG J D, AN Y, ZHANG J S, *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cells for retinal vascular injury[J]. Acta Ophthalmol, 2017, 95(6):e453-e461.
- [6] 张贝莹, 罗冬章, 麦海涛, 等. 骨髓间充质干细胞移植修复皮肤创伤[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(29):4611-4616.
- [7] KORITZINSKY E H, STREET J M, STAR R A, *et al.* Quantification of Exosomes[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(7):1587-1590.
- [8] ZOU L, MA X, LIN S, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against myocardial infarction by promoting autophagy[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(4):2574-2582.
- [9] 李敏, 王梓豪, 严丹, 等. 过表达 GATA-4 基因的骨髓间充质干细胞外泌体对心肌梗死后心功能的影响[J]. 医学研究生学报, 2020, 33(7):678-683.

- [10] 李乔乔,吴振强,张丽君. 骨髓间充质干细胞的定向分化潜能[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(25):4082-4087.
- [11] CUI J, CUI C, CUI Y, *et al.* Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation Increases GAP-43 Expression via ERK1/2 and PI3K/Akt Pathways in Intracerebral Hemorrhage[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(1):137-144.
- [12] HE H, ZENG Q, HUANG G, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation exerts neuroprotective effects following cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt pathway[J]. Brain Res, 2019, 1707: 124-132.
- [13] XIAO D, BARRY S, KMETZ D, *et al.* Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial-mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment[J]. Cancer Lett, 2016, 376(2):318-327.
- [14] GU J, JIN Z S, WANG C M, *et al.* Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Improves Spinal Cord Function After Injury in Rats by Activating Autophagy[J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14:1621-1631.
- [15] JIANG T, WANG Z, SUN J. Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cutaneous wound healing mediates through TGF-beta/Smad signaling pathway[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1):198.
- [16] DUARTE R, FUHRICH D, ROSS J D. A review of antibiotic therapy for pelvic inflammatory disease[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 46(3):272-277.
- [17] CRUM-CIANFLONE N F. Pelvic Inflammatory Disease[J]. N Engl J Med, 2015, 373(7):686.
- [18] DEEB R S, HAJJAR D P. Repair Mechanisms in Oxidant-Driven Chronic Inflammatory Disease[J]. Am J Pathol, 2016, 186(7):1736-1749.
- [19] DENG X, HUANG W, PENG J, *et al.* Irisin Alleviates Advanced Glycation End Products-Induced Inflammation and Endothelial Dysfunction via Inhibiting ROS-NLRP3 Inflammasome Signaling[J]. Inflammation, 2018, 41(1):260-275.
- [20] SHO T, XU J. Role and mechanism of ROS scavengers in alleviating NLRP3-mediated inflammation[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2019, 66(1):4-13.
- [21] CAMPBELL C R, BERMAN A E, Weintraub N L, *et al.* Electrical stimulation to optimize cardioprotective exosomes from cardiac stem cells[J]. Med Hypotheses, 2016, 88:6-9.
- [22] ZHENG J, ZHU L, IOK I I, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomal microRNA-192-5p delays inflammatory response in rheumatoid arthritis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78:105985.
- [23] 陈建南, 丁毅鹏. 血浆脂联素 TNF- $\alpha$  和 IL-6 在脓毒症鉴别诊断中的意义[J]. 中国急救医学, 2016, 36(12):1145-1147.
- [24] KANY S, VOLLRATH J T, RELJA B. Cytokines in Inflammatory Disease[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23):108-114.
- [25] AL-RUBAEI Z M, MOHAMMAD T U, ALI L K. Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study[J]. Pak J Biol Sci, 2014, 17(12):1237-1241.
- [26] BARBATO O, CHIARADIA E, BARILE V L, *et al.* Investigation into homocysteine [corrected], vitamin E and malondialdehyde as indicators of successful artificial insemination in synchronized buffalo cows (*Bubalus bubalis*) [J]. Res Vet Sci, 2016, 104:100-105.

(收稿日期:2021-06-17;修回日期:2021-12-26;编辑:张翰林)