

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：缺氧处理的间充质干细胞外泌体荷载姜黄素联合用药减轻小胶质细胞的炎症反应

作者：黄孝彬，李纤纤，张鹏，周艳华，范安然

收稿日期：2025-10-04

网络首发日期：2025-12-18

引用格式：黄孝彬，李纤纤，张鹏，周艳华，范安然. 缺氧处理的间充质干细胞外泌体荷载姜黄素联合用药减轻小胶质细胞的炎症反应[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251217.1830.004>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

缺氧处理的间充质干细胞外泌体荷载姜黄素联合用药减轻小胶质细胞的炎症反应

黄孝彬^{1,2}, 李纤纤², 张 鹏^{2,3}, 周艳华^{2,3}, 范安然^{2,3}

(¹ 贵州医科大学基础医学院生物学教研室、² 贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心、³ 贵州省功能核酸药物研究重点实验室, 贵阳 550004)

摘要 目的 研究缺氧处理的间充质干细胞 (MSCs) 外泌体 (Exo) 及其荷载姜黄素后对小胶质细胞炎症反应的影响, 探讨缺氧处理对间充质干细胞外泌体 (MSCs-Exo) 功能的增强作用。**方法** 收集培养在正常和缺氧条件下的人脐带间充质干细胞 (hUC-MSCs) 的上清液, 使用超高速离心法分离 Exo; 通过透射电镜及 Western blot 鉴定后使用共孵育法荷载姜黄素。分别使用二甲基亚砜 (DMSO)、姜黄素、常氧外泌体、缺氧外泌体、荷载姜黄素的常氧外泌体、荷载姜黄素的缺氧外泌体处理脂多糖 (LPS) 诱导的小胶质细胞炎症模型, 通过免疫荧光 (IF) 检测 BV2 细胞 M1 型标志物诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达情况; Western blot 和 ELISA 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 及白细胞介素-6 (IL-6) 在细胞及其培养液中的表达与分泌量。**结果** 常氧外泌体、缺氧外泌体、荷载姜黄素的常氧外泌体、荷载姜黄素的缺氧外泌体均呈直径 30~150 nm 的“茶托状”, 且外泌体标记物 CD9、CD81 和 TSG101 的表达呈阳性。对 BV2 细胞炎症模型处理后, IF 检测结果表明, 与常氧外泌体组相比, 缺氧外泌体处理可显著减少 iNOS 的表达; 而与姜黄素组和荷载姜黄素的常氧外泌体组相比, 荷载姜黄素的缺氧外泌体处理后 iNOS 的表达量显著减少。Western blot 和 ELISA 检测结果表明, 与常氧外泌体组相比, 缺氧外泌体处理可显著减少炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的表达与分泌; 而与姜黄素组和荷载姜黄素的常氧外泌体组相比, 荷载姜黄素的缺氧外泌体处理后 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的表达与分泌均显著减少。**结论** 缺氧处理能够增强人脐带间充质干细胞外泌体 (hUC-MSCs-Exo) 抑制小胶质细胞极化和分泌炎症因子的能力。此外, 缺氧处理的间充质干细胞外泌体 (Hypoxia-MSCs-Exo) 可以作为药物递送载体, 在荷载姜黄素后可以提高其溶解性、稳定性, 有利于姜黄素被细胞摄取并与 Hypoxia-MSCs-Exo 发挥联合用药的治疗效果。

关键词 缺氧; 间充质干细胞; 外泌体; 姜黄素; 小胶质细胞; 炎症

中图分类号 R 741.05

2025-10-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82260261); 贵州省教育厅创新团队资助基金项目 (编号: 黔教计[2023]068 号)

作者简介: 黄孝彬, 男, 硕士研究生;

周艳华, 男, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: zhouyanhua@gmc.edu.cn

Curcumin-loaded exosomes from hypoxia-treated mesenchymal stem cells alleviate microglial inflammatory response in a combined therapy approach

Huang Xiaobin^{1,2}, Li Qianqian², Zhang Peng^{2,3}, Zhou Yanhua^{2,3*}, Fan Anran^{2,3}

(¹*Department of Biology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University,* ²*Guizhou Provincial Key Laboratory for Regenerative Medicine, Stem Cell and Tissue Engineering Research Center,* ³*Key Laboratory of Functional Nucleic Acids-Based Biopharmaceutical Research, Guizhou Medical University, Guiyang 550004*)

Abstract Objective To investigate the effects of hypoxia-treated mesenchymal stem cell (MSCs) exosomes (Exo) and their loading with curcumin on microglial inflammatory responses, and to explore the enhancing effect of hypoxia treatment on the function of MSCs Exo. **Methods** The supernatants of hUC-MSCs cultured under normal and hypoxic conditions were collected, and Exo were isolated using ultracentrifugation. After identification by transmission electron microscopy and Western blot, curcumin was loaded using the co-incubation method. The lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial inflammation model was treated with dimethyl sulfoxide (DMSO), curcumin, normoxia Exo, hypoxia Exo, normoxic Exo loaded with curcumin, and hypoxic Exo loaded with curcumin, respectively. The expression of the M1-type marker inducible nitric oxide synthase (iNOS) in BV2 cells was detected by immunofluorescence (IF). Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to measure the expression and secretion levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6 in the cells and their culture supernatants. **Results** Normoxia Exo, hypoxia Exo, normoxic Exo loaded with curcumin, and hypoxic Exo loaded with curcumin exhibited a "saucer-like" shape with a diameter ranging from 30~150 nm, and the expression of exosomal markers CD9, CD81, and TSG101 were positive. After treating the BV2 cell inflammation model, IF results showed that, compared with the normoxia Exo group, treatment with hypoxic Exo significantly reduced the expression of iNOS. Moreover, when compared with the curcumin group and the normoxic Exo loaded with curcumin group, the expression level of iNOS significantly decreased after treatment with hypoxic Exo loaded with curcumin. The results of Western blot and ELISA indicated that, in comparison with the normoxia Exo group, treatment with hypoxic Exo significantly reduced the

expression and secretion of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6. Additionally, when compared with the curcumin group and the normoxic Exo loaded with curcumin group, both the expression and secretion of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 significantly decreased after treatment with hypoxic Exo loaded with curcumin. **Conclusion** Hypoxia preconditioning can enhance the ability of hUC-MSCs-Exo in the inhibition of microglial polarization and inflammatory factors' secretion. Additionally, using Hypoxia-MSCs-Exo as a drug-delivery carrier of curcumin can improve its solubility and stability, facilitating its absorption by cells and exerting the therapeutic effect of combination therapy.

Key words hypoxia; mesenchymal stem cells; exosomes; curcumin; microglia; inflammatory

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82260261); Science and Technology Innovation Team Foundation of Guizhou Provincial Department of Education (No. Qianjiaojia [2023] 068)

Corresponding author Zhou Yanhua, E-mail: zhouyanhua@gmc.edu.cn

小胶质细胞是中枢神经系统的天然免疫细胞,与多种神经炎症相关疾病的发病机制有关,通过调控小胶质细胞表型和功能,可以成为治疗相关疾病的有效方式^[1]。近年来,人脐带间充质干细胞外泌体(hUC-MSCs-Exo)在调节小胶质细胞功能方面显示出巨大潜力。然而体外培养时,hUC-MSCs通常暴露于常氧环境,与自然生理条件下体内的氧浓度不同,这可能会影响其外泌体的生物学功能^[2]。有研究^[3]显示缺氧处理后,hUC-MSCs-Exo中含有更丰富的功能性生物分子,大大提升其活性和生物学功能。除此之外,由于外泌体具有低免疫原性、保护药物免受降解等独特的优势,可以作为优良的药物递送载体^[4]。因此,该研究旨在探讨缺氧处理人脐带间充质干细胞后,其外泌体是否比常氧 hUC-MSCs-Exo 对小胶质细胞具有更强的调节作用;并进一步研究使用缺氧处理的间充质干细胞外泌体(Hypoxia-MSCs-Exo)作为递送载体荷载姜黄素后能否发挥联合用药的效果,增强对小胶质细胞炎症反应的调节作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

人脐带取自贵州医科大学附属医院妇产科(经贵州医科大学附属医院人体伦理委员会批准,批件号:2022 伦审第 18 号);小鼠 BV2 细胞系购自长沙丰晖生物科技有限公司;白细胞分化抗原 9 蛋白(CD9)抗体、CD81 抗体、肿瘤易感基因 101 蛋白(TSG101)抗体以

及姜黄素 (curcumin) 购自美国 MedChemExpress 公司; 脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司; BCA 试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司; CD34-APC、CD73-FITC、CD90-FITC、CD105-PE 和肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 及 IL-6 的 ELISA 试剂盒购自苏州四正柏生物科技有限公司; TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 抗体及相应二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司; ChemiDoc MP 化学发光凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; CP100NX 超速离心机购自日本日立公司; Operetta CLS 高内涵成像分析系统购自美国珀金埃尔默股份有限公司; BD LSRFortessa 流式细胞仪购自美国 BD 公司; Nikon-AXR 共聚焦显微镜购自日本尼康公司。

1.2 方法

1.2.1 hUC-MSCs 分离与培养

无菌条件下将脐带剪成小段, 剥离掉动脉和静脉后将华通胶剪碎成约 1 mm³ 的组织块, 转至培养皿中, 加入少量含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基, 放入含 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱中培养。待细胞从组织块中爬出后, 小心将组织块移出并换液。细胞汇合度达到 80% 时进行传代培养。① 常氧的 hUC-MSCs 培养: hUC-MSCs 培养于含 10% FBS、1% 谷氨酰胺的 DMEM/F-12 培养基中, 放入含有 21% O₂, 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱中培养, 细胞汇合度 90% 时收集上清液提取外泌体。② 缺氧诱导的 hUC-MSCs 培养: hUC-MSCs 培养于含 10% FBS、1% 谷氨酰胺的 DMEM/F-12 培养基中, 放入含有 1% O₂, 5% CO₂ 的 37 °C 细胞培养箱中培养, 细胞汇合度 90% 时收集上清液提取外泌体。

1.2.2 hUC-MSCs 诱导分化实验

根据成软骨诱导试剂盒说明书进行操作, 取 P4 代 hUC-MSCs, 细胞计数后以 3×10⁵ 个置于 15 mL 离心管中 1 000 r/min 低速离心 8 min, 使细胞形成微团。用成软骨诱导液+TGF- β 3 在离心管中培养 hUC-MSCs, 每 3~4 d 换液, 诱导 5 周, 4% 多聚甲醛固定, 常规制作石蜡切片。切片经二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 蒸馏水洗后进行阿利新蓝染色。根据成脂诱导试剂盒说明书进行操作, 取 P4 代 hUC-MSCs, 细胞计数后以 1×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 常规培养基培养 24 h 后更换为脂肪诱导液 A 开始诱导, 3 d 后更换成脂诱导液 B 维持, 24 h 后再更换为成脂诱导液 A 诱导, 循环诱导 3 周后进行油红 O 染色。根据成骨诱导试剂盒说明书进行操作, 取 P4 代 hUC-MSCs, 细胞计数后分别以 6×10⁴ 个/孔的密度接种于 6 孔培养板中, 24 h 后换用成骨诱导液, 每 3 d 换液, 诱导 2 周后进行茜素红染色。

1.2.3 流式细胞术鉴定 hUC-MSCs 表面标志物

取出培养的 hUC-MSCs, 用胰蛋白酶溶液消化后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。

将细胞重悬于 PBS 中，调整细胞密度为 1×10^7 个/mL，每管 100 μ L，加入 CD34-APC、CD73-FITC、CD90-FITC、CD105-PE 抗体，同时设阴性对照，室温孵育 30 min，在流式细胞仪中进行检测。

1.2.4 hUC-MSCs 外泌体提取与鉴定

取状态良好的 hUC-MSCs 接种于 175 cm^2 培养瓶中，置于常氧和低氧培养箱中培养，细胞密度达到 80% 时，更换为无外泌体血清培养基继续培养 48 h，收集上清液立即置于 4 $^{\circ}\text{C}$ ，1 655 r/min 离心 10 min；4 272 r/min 离心 20 min；9 554 r/min 离心 30 min 去除死细胞、细胞碎片及大囊泡等，然后使用超速离心法经两次 40 400 r/min 离心 70 min 提取并纯化外泌体，通过透射电镜检测外泌体形态，通过 BCA 定量外泌体浓度后使用 Western blot 检测外泌体表面标志蛋白 CD9、CD81 和 TSG101 的表达情况。

1.2.5 荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体的制备与表征

将姜黄素 (36.8 μg) 分别与常氧外泌体 (36.8 μg) 和缺氧外泌体 (36.8 μg) 混合于 1 mL PBS 中，在黑暗室温环境下孵育 15 min，将混合物通过超高速离心法以 40 400 r/min 离心 70 min 进行纯化；离心完成后收集沉淀，洗涤并重悬于 PBS 中，即为荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体。使用多功能酶标仪在 450 nm 处测量经超高速离心后的 PBS 溶液中剩余姜黄素的吸光度 (absorbance, A)，通过标曲计算得出剩余姜黄素的含量，然后通过公式计算包封率：包封率 = (总姜黄素量 - 游离姜黄素量) / 总姜黄素量 $\times 100\%$ 。将单独姜黄素和外泌体姜黄素加入 PBS 中，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中避光孵育，在 30、60、90、120、150 min 时，每个样品取 100 μL ，使用多功能酶标仪测定姜黄素浓度，从而计算得出稳定性。

1.2.6 BV2 细胞培养和实验分组处理

将 BV2 细胞置于含有 5% CO_2 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中，采用含 10% FBS 的 H-DMEM 培养基培养。实验分组：正常组 (Con)、LPS 组 (LPS)、DMSO 组 (DMSO)、单独姜黄素组 (Curcumin)、常氧外泌体组 (Normoxia-Exo)、缺氧外泌体组 (Hypoxia-Exo)、荷载姜黄素的常氧外泌体组 (Normoxia-Exo-Cur) 和荷载姜黄素的缺氧外泌体组 (Hypoxia-Exo-Cur)。取对数生长期 BV2 细胞均匀接种于 6 孔板中，除 Con 组外的各组 BV2 细胞预先给予对应药物处理 12 h 后再给予终浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 刺激 12 h。其中姜黄素终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ，常氧外泌体和缺氧外泌体用量均为 10 μg ，荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体用量均包含终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的姜黄素以及 10 μg 的外泌体。

1.2.7 BV2 细胞摄取 hUC-MSCs-Exo

按照 PKH26 红色荧光标记试剂盒说明书步骤，对外泌体进行荧光标记。将红色荧光染

料 PKH26 加入到外泌体悬液中, 室温孵育 5 min 后用等体积的无外泌体血清进行封闭, PBS 洗涤 2 次, 去除未结合的染料。将 10 μ g 标记后的外泌体加入到底部铺有细胞爬片的 BV2 细胞培养皿中, 6 h 后取出爬片, 使用溶酶体绿色荧光探针 (Lyso-Tracker Green) 对 BV2 细胞的溶酶体进行染色并使用 DAPI 对 BV2 细胞的细胞核进行染色, 激光共聚焦显微镜下拍照观察共定位情况; 将 PKH26 标记的外泌体加入到 BV2 细胞培养基中, 同时加入 Hoechst 33342 对 BV2 细胞进行核染, 将细胞培养板放入高内涵成像系统中培养 1~6 h, 实时拍照观察 BV2 细胞 1~6 h 摄取外泌体情况。

1.2.8 IF 检测 BV2 细胞 M1 标志物 iNOS 的表达

取出不同处理组的 BV2 细胞爬片, 用 PBS 清洗后, 4% 多聚甲醛固定 30 min; 5% Triton 室温破膜 15 min; 滤纸吸干多余液体, 滴加 5% BSA, 室温封闭 1 h; 去封闭液, 直接滴加 iNOS (1:200) 抗体后放入湿盒, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 清洗; 滴加稀释好的荧光二抗, 于湿盒中室温孵育 1 h, TBST 清洗; DAPI 染核, 避光孵育 10 min, TBST 清洗; 封片固定, 荧光显微镜下观察染色情况并拍照。

1.2.9 Western blot 检测 BV2 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的蛋白表达

收集不同处理组的 BV2 细胞提取总蛋白并定量, 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 样品到达凝胶底部后终止电泳, 并将蛋白转移(260 mA、1 h)至 NC 膜上。随后, 室温下使用 5% 脱脂奶粉将膜封闭 1 h, 一抗 TNF- α (1:1 000)、IL-1 β (1:1 000) 和 IL-6 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 使用对应二抗室温孵育 1 h。用通过化学发光成像系统曝光, 并使用 ImageJ 软件分析灰度值。

1.2.10 ELISA 检测 BV2 细胞上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌量

收集不同处理组的 BV2 细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤, 分别检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌水平。

1.2.11 统计学处理

数据使用 ImageJ 进行统计分析, 统计图使用 GraphPad Prism9.5 版绘制; 当方差齐时, 用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析进行多组数据间的比较, 方差不齐时用非参数检验法进行分析, 两样本比较时使用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hUC-MSCs 的分离与鉴定

为了分离出 hUC-MSCs, 将脐带华通氏胶接种于培养皿中, 显微镜下观察, 7 d 后细胞从组织块边缘爬出, 呈多角形, 折光性良好; 14 d 后, 细胞胞体变大并呈典型成纤维细胞样,

大量细胞向外放射状生长，细胞排列整齐呈长梭形，并平铺于瓶底（图 1A）；为证明获得细胞为 hUC-MSCs，流式细胞术分析其细胞表面标志物，结果表明细胞高表达 hUC-MSCs 阳性标记物 CD73、CD90、CD105，同时低表达其阴性标记物 CD34（图 1B）；通过分化实验进一步验证其发育潜能，成软骨诱导后的细胞其阿利新蓝染色呈阳性，成脂诱导后，细胞油红 O 染色显现出位于细胞内部的脂滴，成骨诱导分化后细胞中可见与茜素红形成复合物而显现出的钙质沉积（图 1C），证明分离的 hUC-MSCs 具有成骨、成脂、成软骨分化的潜能。

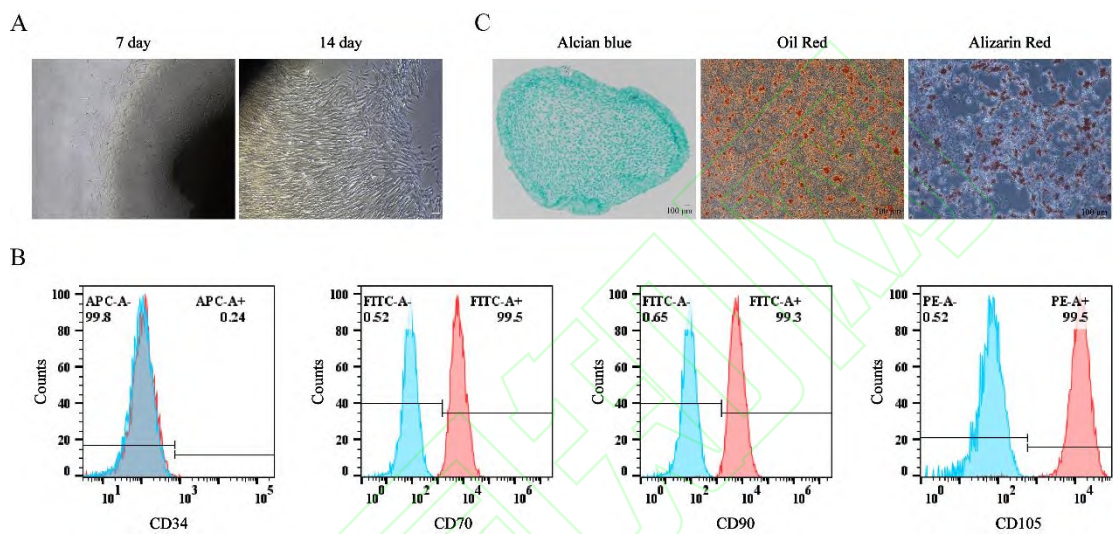


图 1 hUC-MSCs 分离与鉴定

Fig. 1 Isolation and identification of hUC-MSCs

注：A: The primary cells grown from the umbilical cord Wharton 's jelly tissue block. The cells were then cultured to the fourth generation $\times 40$; B: Flow cytometry showed that hUC-MSCs highly expressed CD90, CD105, CD73, and lowly expressed negative molecule CD34; C: Identification of osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of hUC-MSCs $\times 40$.

2.2 常氧外泌体和缺氧外泌体的分离与鉴定

为了获得常氧外泌体和缺氧外泌体，将 hUC-MSCs 置于常氧和缺氧培养箱中培养，显微镜下观察显示两组细胞均排列整齐呈长梭形，无明显形态学差异（图 2A）；使用超速离心法分别从常氧和缺氧培养的 hUC-MSCs 中分离出常氧外泌体和缺氧外泌体，透射电镜观察显示常氧外泌体和缺氧外泌体都呈直径 30~150 nm 的“茶托状”，符合典型的外泌体形态特征（图 2B）；为了比较两组方式处理对外泌体的产量影响，取等量细胞上清液提取外泌体后进行浓度检测，结果发现缺氧处理后外泌体的产量更高，同时为了比较两组外泌体的蛋白丰富度，通过 Western blot 检测等量常氧外泌体和缺氧外泌体的表面标志蛋白，结果显示与

常氧外泌体相比，缺氧外泌体的 CD9、CD81 和 TSG101 蛋白的含量也更加丰富（图 2C、2D）。

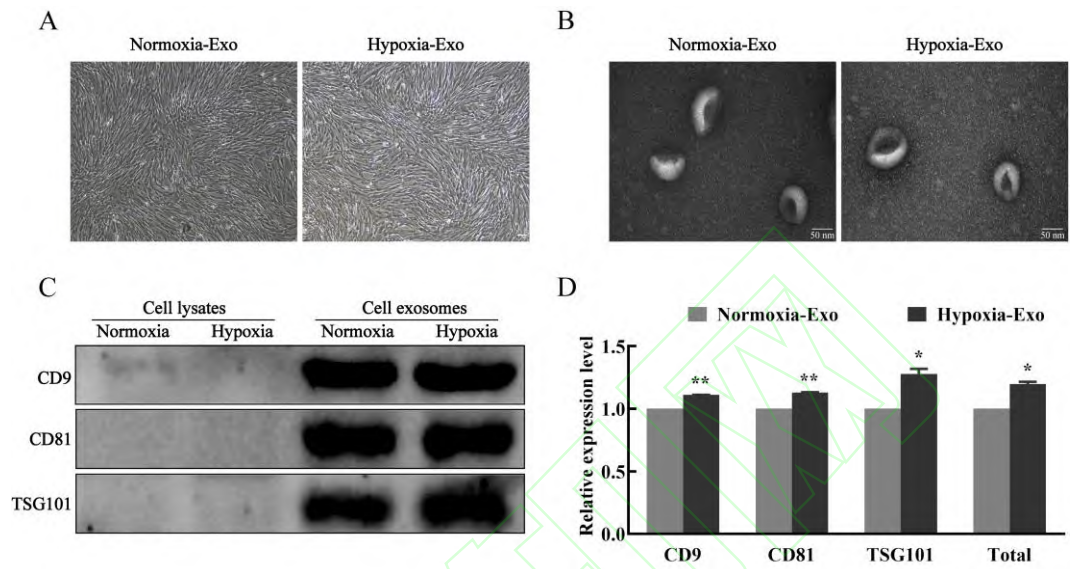


图 2 hUC-MSCs-Exos 提取与鉴定

Fig. 2 Extraction and identification of hUC-MSCs-Exos

注：A: The morphology of hUC-MSCs cultured under normoxia and hypoxia $\times 40$; B: Morphological characterization of Normoxia-Exo and Hypoxia-Exo by transmission electron microscopy $\times 80\,000$; C: Identification of Normoxia-Exo and Hypoxia-Exo markers CD9, CD81, TSG101; D: Statistics of CD9, CD81, TSG101 and total protein; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normoxia-Exo.

2.3 缺氧处理增强 hUC-MSCs-Exo 对 BV2 细胞的倾向性

为了分析两组外泌体被小胶质细胞所摄取的途径及摄取情况，PKH26 标记外泌体后与 BV2 共孵育，并使用 LysoTracker 标记溶酶体，共聚焦显微镜拍照结果显示常氧外泌体和缺氧外泌体在 BV2 细胞中与溶酶体高度共定位，说明两组外泌体均通过内吞途径进入细胞（图 3A）；通过高内涵细胞成像系统实时跟踪，结果显示与常氧外泌体相比，在 1~6 h 内缺氧外泌体在 BV2 细胞中的荧光信号都更加强烈，说明缺氧处理的 hUC-MSCs-Exo 更易被 BV2 细胞摄取（图 3B、3C）。

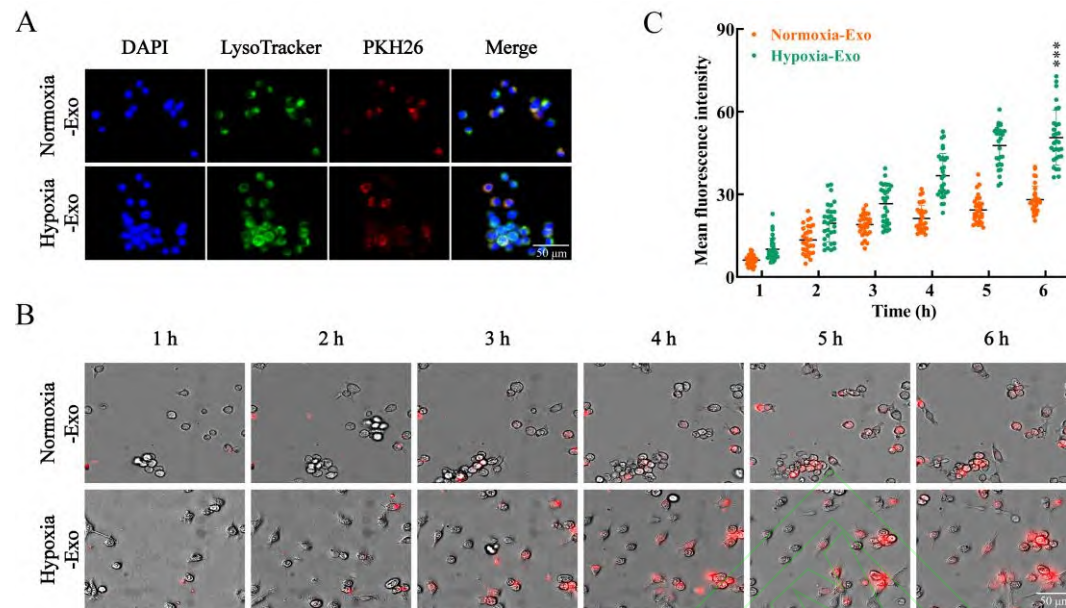


图3 小胶质细胞摄取外泌体

Fig. 3 The uptake of exosomes by microglial cells

注：A: Confocal imaging showing the uptake of Normoxia-Exo and Hypoxia-Exo by BV2 cells $\times 200$; B: The uptake of Normoxia-Exo and Hypoxia-Exo by BV2 cells in 1~6 hours detected by high content imaging system $\times 200$; C: Statistics of the uptake of Normoxia-Exo and Hypoxia-Exo by BV2 cells in 1~6 hours; *** $P < 0.001$ vs Normoxia-Exo.

2.4 缺氧处理增强 hUC-MSCs-Exo 对 BV2 细胞炎症反应的调节

为了对比常氧外泌体和缺氧外泌体对 BV2 细胞极化及炎症因子分泌的影响，通过 IF 检测 BV2 细胞 iNOS 的表达，结果显示与 Con 组相比，LPS 诱导会导致小胶质细胞 iNOS 表达上调，而常氧外泌体和缺氧外泌体能够降低 LPS 导致的上调，其中缺氧外泌体效果更显著（图 4A）；同时，通过 Western blot 检测 BV2 细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的蛋白表达情况，结果显示与 Con 组相比，LPS 组 LPS 诱导也会导致 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达上调，而常氧外泌体和缺氧外泌体同样能够降低 LPS 导致的上调，其中缺氧外泌体效果显著（图 4B、4C）；而通过 ELISA 检测 BV2 细胞上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌情况，结果同样证实，经过 LPS 诱导的 BV2 细胞上清液中，促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌量显著升高，而常氧外泌体和缺氧外泌体能够减少 LPS 导致的升高，其中缺氧外泌体效果更显著（图 4D）。

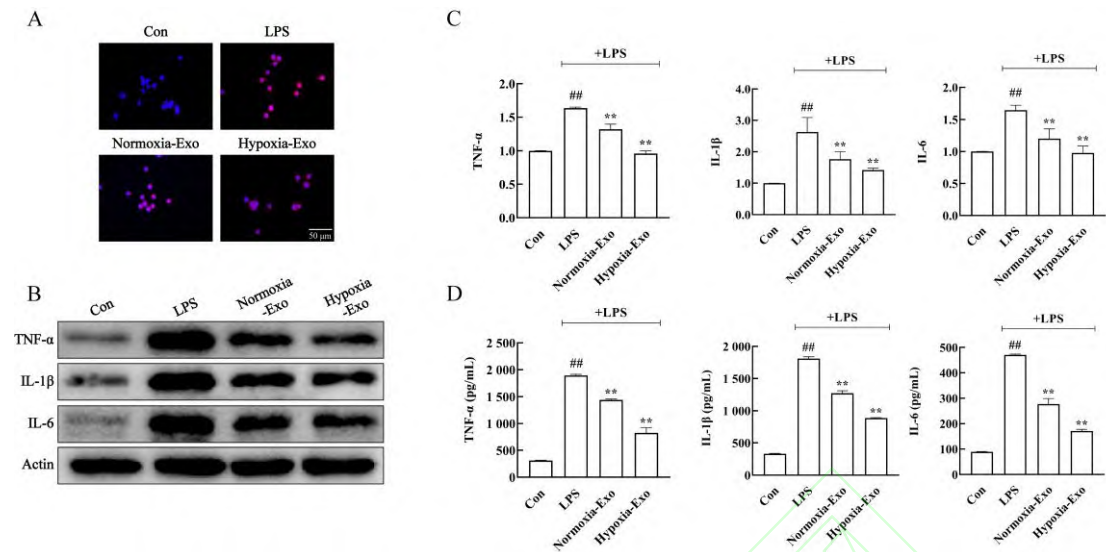


图 4 外泌体抑制小胶质细胞 M1 极化与炎症因子释放

Fig. 4 Exosomes inhibited the polarization of microglia to M1 and released inflammatory factors

注: A: The expression of iNOS detected by immunofluorescence $\times 200$; B: The expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 protein detected by Western blot; C: Statistics of the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 protein; D: The secretion of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and IL-6 detected by Elisa; ^{##} $P < 0.01$ vs Con group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs LPS group.

2.5 荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体的制备与表征

测定外泌体对姜黄素的包封率, 其中常氧外泌体: 36.25%, 缺氧外泌体: 36.38%。为了评估单独姜黄素和外泌体姜黄素的稳定性, 将单独姜黄素和外泌体姜黄素加入到 PBS 中, 测定不同时间点的姜黄素浓度, 结果表明游离在 PBS 中的姜黄素迅速降解, 与 0 min 样品 (设置为 1.0) 相比, 孵育 150 min 后只剩下 35%, 而外泌体中的姜黄素被保护免于降解, 剩余 70% 以上 (图 5A); 为了检测荷载姜黄素后外泌体的形态变化, 通过透射电镜对其进行观察, 结果显示荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体与天然外泌体一样, 均呈现出双层膜结构, 形态呈“杯托状”, 但直径均稍有增大 (图 5B)。

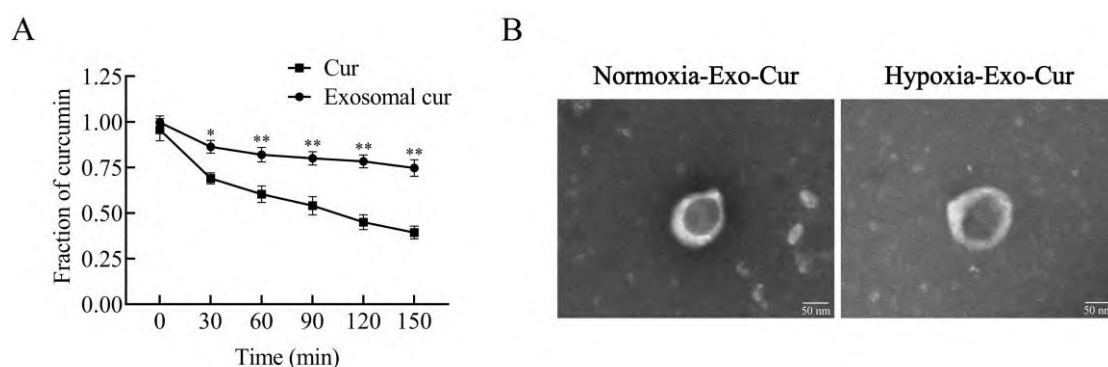


图 5 外泌体荷载姜黄素与表征

Fig. 5 Characterization of exosomes loaded with curcumin

A: The stability of curcumin and exosome-loaded curcumin within 150 min; B: Morphological characterization of Normoxia-Exo-Cur and Hypoxia-Exo-Cur by transmission electron microscopy $\times 80\,000$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Cur group.

2.6 缺氧处理的外泌体和姜黄素联合用药减轻 BV2 细胞的炎症反应

为了对比荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体对 BV2 细胞极化及炎症因子分泌的影响，通过 IF 检测 BV2 细胞 iNOS 的表达，结果显示荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体组 BV2 细胞中 iNOS 的表达较姜黄素组均降低，但荷载姜黄素的缺氧外泌体组降低更显著（图 6A）；通过 Western blot 检测 BV2 细胞中促炎因子的表达情况，结果显示荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体组细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达较姜黄素组降低，且荷载姜黄素的缺氧外泌体组降低更显著（图 6B、C）；通过 ELISA 检测 BV2 细胞上清液中促炎因子的分泌情况，结果证实荷载姜黄素的常氧外泌体和荷载姜黄素的缺氧外泌体组细胞上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌量较姜黄素组显著减少，且荷载姜黄素的缺氧外泌体组减少更显著（图 6D）。

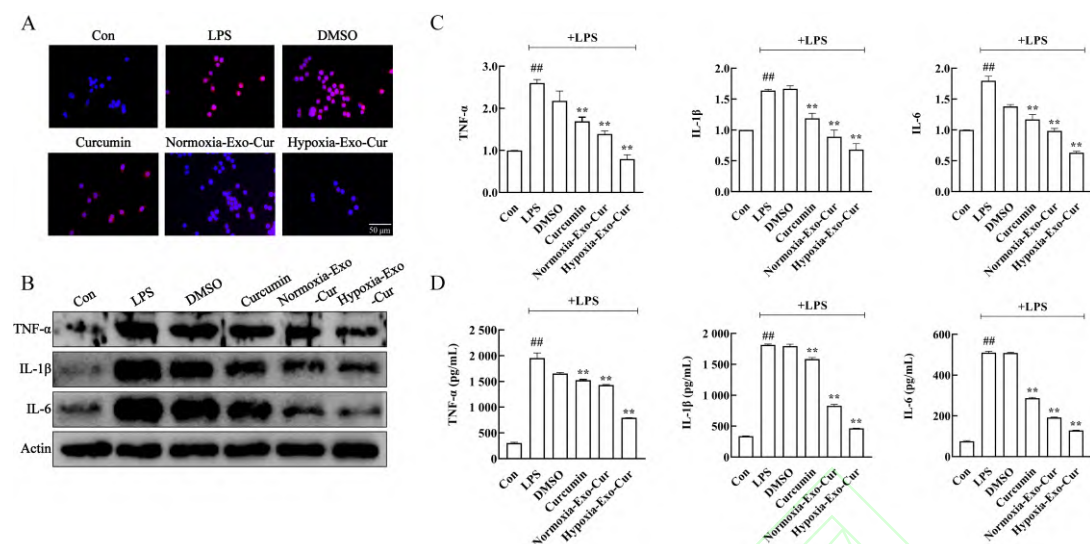


图6 姜黄素外泌体抑制小胶质细胞 M1 极化与炎症因子释放

Fig. 6 Curcumin-loaded exosomes inhibited the polarization of microglia to M1 and released inflammatory factor

注: A: The expression of iNOS detected by immunofluorescence $\times 200$; B: The expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 protein detected by Western blot; C: Statistics of the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 protein; D: The secretion of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and IL-6 detected by Elisa; ## $P < 0.01$ vs Con group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs LPS group.

3 讨论

MSCs 是具有自我更新和分化特性的多能干细胞, 分布在人体的许多部位, 包括骨髓、脂肪和脐带等^[5]。MSCs 的疗效已在许多临床前研究中充分证明, 但低植入率和不良反应等缺陷仍需改进^[6]。研究^[7]显示 MSCs 分泌的外泌体不仅可以继承其疗效, 且具有低毒性、高稳定性、低免疫原性等特点, 是确定优化 MSCs 疗法的一种新途径。有研究^[8]表明, MSCs 的特性受环境变化的影响, 其在体内处于缺氧生态位, 多存在于氧含量为 2%~8% 的环境中。因此, 对比体外培养于 21% O₂ 环境中, 低氧培养将更符合 MSCs 的体内环境, 有助于保持其生理特性。本研究结果证明, hUC-MSCs 在缺氧条件下培养时表现出了更好的细胞活性, 能分泌更多内容物丰富的外泌体, 有利于其被细胞摄取并发挥作用。

除此之外, 与常氧间充质干细胞外泌体相比, 缺氧处理的间充质干细胞外泌体已被证明在调节炎症方面具有更积极的治疗效果。如: Wang et al^[9]发现脐带来源的缺氧处理的间充质

干细胞外泌体可以增加神经元活力，并抑制细胞死亡和炎症。除此之外，也有研究证明缺氧处理的间充质干细胞外泌体在小胶质细胞的极化转变中发挥有效作用。如：Qian et al^[10]发现脂肪来源的缺氧处理的间充质干细胞外泌体减轻结肠炎中的过度炎症，促进巨噬细胞 M2 型极化。本研究的实验结果也表明，与常氧间充质干细胞外泌体相比，缺氧处理的间充质干细胞外泌体能够更精准地靶向小胶质细胞，减少其炎症因子的表达与分泌。这些研究进一步表明，缺氧培养是一种有效增强 hUC-MSCs-Exo 治疗潜能的策略，为神经炎症相关疾病的治疗提供了新的见解。

姜黄素是一种天然疏水性多酚，因其强大的抗炎作用，可以改善小胶质细胞异常功能导致的神经炎症^[11]。例如，Gao et al^[12]发现姜黄素可以通过调控小胶质细胞功能来减轻 LPS 诱导的神经炎症；Zhang et al^[13]发现姜黄素可以通过调节小胶质细胞（M1/M2）极化，从而显著缓解 LPS 诱导的炎症。我们的结果也显示姜黄素具有一定的抗炎效果，但同时也发现其溶解性弱、稳定性差，这可能导致其在临床应用中的生物利用度较低。因此，我们设想通过外泌体荷载的方式来改善姜黄素的缺陷。

在多种药物递送载体中，外泌体因其良好的生物相容性和极低的免疫原性，是一种更为安全、可靠的药物递送载体^[4]。Liu et al^[14]发现荷载 miR-29b 的 BM-MSCs-Exo 可以通过激活自噬，从而改善角膜炎症。Yan et al^[15]发现使用 ADSCs-Exo 荷载淫羊藿苷可以调节巨噬细胞从 M1 到 M2 的极化来抑制关节炎。但上述例子都是使用常氧间充质干细胞外泌体作为递送载体，而本研究进一步探究了缺氧处理的间充质干细胞外泌体作为递送载体的治疗价值。实验结果证明，通过缺氧外泌体荷载姜黄素明显对 BV2 细胞向 M1 型极化及炎症因子的表达与分泌具有更显著的抑制作用。这说明了缺氧处理的间充质干细胞外泌体是更好的递送载体，在改善姜黄素缺陷的同时，也通过与姜黄素联合用药，双管齐下，发挥了更强的抗炎作用。综上所述，未来缺氧处理的间充质干细胞外泌体可能会成为一种与其他药物联合用药治疗神经炎症相关疾病的更优选择。

然而，缺氧环境如何调节 hUC-MSCs-Exo 的分泌并影响其功能，以及缺氧处理的间充质干细胞外泌体和姜黄素联合作用的机制仍需继续进行实验探究。所以，本研究后续工作将进一步对缺氧处理的间充质干细胞外泌体的活性蛋白深入研究，以发掘其新的治疗功能。同时，进一步完善缺氧处理的间充质干细胞外泌体在相关动物模型中的治疗效果验证，为缺氧处理的间充质干细胞外泌体工程化及其未来的临床转化和应用提供理论基础。

参考文献

- [1] Long Y, Li X Q, Deng J, et al. Modulating the polarization phenotype of microglia – A valuable strategy for central nervous system diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 93: 102160. doi:10.1016/j.arr.2023.102160.
- [2] Liu W, Li L, Rong Y, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126[J]. *Acta Biomater*, 2020, 103: 196-212. doi:10.1016/j.actbio.2019.12.020.
- [3] Huang Q M, Zhuo Y Q, Duan Z X, et al. Long-term hypoxic atmosphere enhances the stemness, immunoregulatory functions, and therapeutic application of human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Bone Joint Res*, 2024, 13(12): 764-78. doi:10.1302/2046-3758.1312.BJR-2024-0136.R2.
- [4] Sohrabi B, Dayeri B, Zahedi E, et al. Mesenchymal stem cell (MSC)-derived exosomes as novel vehicles for delivery of miRNAs in cancer therapy[J]. *Cancer Gene Ther*, 2022, 29(8-9): 1105-16. doi:10.1038/s41417-022-00427-8.
- [5] Liu P, An Y, Zhu T, et al. Mesenchymal stem cells: emerging concepts and recent advances in their roles in organismal homeostasis and therapy[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1131218. doi:10.3389/fcimb.2023.1131218.
- [6] Kahrizi M S, Mousavi E, Khosravi A, et al. Recent advances in pre-conditioned mesenchymal stem/stromal cell (MSCs) therapy in organ failure; a comprehensive review of preclinical studies[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 155. doi:10.1186/s13287-023-03374-9.
- [7] Padinharayil H, Varghese J, Wilson C, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: characteristics and applications in disease pathology and management[J]. *Life Sci*, 2024, 342: 122542. doi:10.1016/j.lfs.2024.122542.
- [8] Aref M, Sisakhtnezhad S, Fallahi H. Investigating the effect of Quercetin in the presence of CoCl₂ as an inducing hypoxia agent on the biological characteristics of human telomerase reverse transcription-immortalized adipose tissue-derived MSCs[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 288: 117389. doi:10.1016/j.ecoenv.2024.117389.
- [9] Wang X, Li W, Hao M, et al. Hypoxia-treated umbilical mesenchymal stem cell alleviates spinal cord ischemia-reperfusion injury in SCI by circular RNA

circOXNAD1/miR-29a-3p/FOXO3a axis[J]. Biochem Biophys Rep, 2023, 34: 101458.

doi:10.1016/j.bbrep.2023.101458.

[10] Qian W, Huang L, Xu Y, et al. Hypoxic ASCs-derived exosomes attenuate colitis by regulating macrophage polarization *via* miR-216a-5p/HMGB1 axis[J]. Inflamm Bowel Dis, 2023, 29(4): 602-19. doi:10.1093/ibd/izac225.

[11] 宋 飞, 范学菲, 刘楠楠, 等. 姜黄素通过调控 DUSP1/p38 MAPK 通路减轻 IL-1 β 诱导的软骨细胞损伤 [J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(11): 1903-10. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.003.

[11] Song F, Fan X F, Liu N N, et al. Curcumin attenuates IL-1 β -induced chondrocyte damage by modulating the DUSP1/p38 MAPK pathway[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(11): 1903-10. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.003.

[12] Gao F, Shen J, Zhao L, et al. Curcumin alleviates lipopolysaccharide (LPS)-activated neuroinflammation *via* modulation of miR-199b-5p/I κ B kinase β (IKK β)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway in microglia[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 9801-10. doi:10.12659/MSM.918237.

[13] Zhang J, Zheng Y, Luo Y, et al. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization *via* TREM2/TLR4/NF- κ B pathways in BV2 cells[J]. Mol Immunol, 2019, 116: 29-37. doi:10.1016/j.molimm.2019.09.020.

[14] Liu J, Gao J, Lu P, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as drug carriers for delivering miRNA-29b to ameliorate inflammation in corneal injury *via* activating autophagy[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2024, 65(6): 16. doi:10.1167/iovs.65.6.16.

[15] Yan Q, Liu H, Sun S, et al. Adipose-derived stem cell exosomes loaded with icariin alleviates rheumatoid arthritis by modulating macrophage polarization in rats[J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 423. doi:10.1186/s12951-024-02711-1.