河北大学
HEBEI UNIVERSITY

密　　级：

分 类 号：

学校代码：10075

学　　号：20207017045

硕士学位论文

间充质干细胞胞外囊泡在缓解阿尔茨海默症中的应用

学位申请人：古增

指 导 教 师：钟 理 教授

许 峰 高级工程师

专业学位类别：工程硕士

专业学位领域：生物与医药

院 系 名 称：生命科学学院

答 辩 日 期：二〇二三年五月

中国知网 https://www.cnki.net

Classified Index: CODE: 10075

U.D.C.: NO. 20207017045

Thesis for the Degree of Master

Application of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells in the alleviation of Alzheimer's disease

Candidate: Zeng Gu

Supervisor: Prof. Li Zhong

Senior Engineer. Feng Xu

Category of Professional Degree : Master of Engineering

Field of Professional Defree: Biology and Medicine

College: College of Life Sciences

Date of Oral Defense: May, 2023

中国知网 https://www.cnki.net

摘 要

背景：阿尔茨海默症（Alzheimer’s disease, AD）是一种神经退行性疾病，也是痴呆症的最常见形式，其特征是进行性记忆丧失和认知障碍。家族性、早发性（<60 岁）、常染色体显性遗传型 AD （FAD） 可由淀粉样前体蛋白（*APP*）、早老素 1（*PSEN1*）和早老素 2（*PSEN2*）基因突变引起。β-和γ-分泌酶连续酶解 APP 产生淀粉样β（Aβ）肽斑块以及高磷酸化 tau（p-tau）的丝状聚集组成的斑块是 AD 主要的两个病理标志。间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cells, MSCs）是一种能够分化为间充质谱系的多能干细胞，它的再生潜力非常大，对多种损伤组织具有保护和修复作用，包括神经、心肌、软骨、肝等组织。有研究证明，利用 MSCs 对 AD 进行治疗可以减少 Aβ 沉积以及改善病症。目前将 MSCs 应用于治疗神经疾病的研究主要是通过 MSCs 直接移植注射的方式，因为 MSCs 无法在小鼠模型体内穿过血脑屏障，MSCs 直接移植作用属于细胞疗法，这可能会有肿瘤形成、免疫排斥和输注毒性的风险。MSCs 旁分泌产生的细胞外囊泡（Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicles, MSC-EVs）作为一种无细胞疗法与 MSCs 能发挥同样的治疗效果，MSCs-EVs 在小鼠模型体内可以通过尾静脉注射穿过血脑屏障，减少了 MSCs 直接移植的风险且 MSC-EVs 更容易生产和储存。

本研究以构建的体外 AD 细胞模型以及 AD 体内小鼠模型作为研究对象，探究 MSC-EVs 对 AD 疾病模型的作用效果，为 AD 的研究提供新的思路。

方法：本研究以 AD 疾病模型为研究对象，将从人脐带来源的间充质干细胞（Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, HUC-MSCs）以及人脂肪来源的间充质干细胞（Human adipose-derived stem cells, HAD-MSCs）的条件培养基中分离的人脐带来源的间充质干细胞分泌的细胞外囊泡（HUC-MSC-Derived Extracellular Vesicles, HUC-MSC-EVs）以及人脂肪来源的间充质干细胞分泌的细胞外囊泡（HAD-MSC-Derived Extracellular Vesicles, HAD-MSC-EVs）处理 AD 疾病模型，探究 AD 疾病模型被处理后致病基因以及炎性基因表达的变化。研究内容包括以下方面：（1）

中国知网 https://www.cnki.net

探究 HAD-MSC-EVs 以及 HUC-MSC-EVs 对 AD 体外细胞模型和 AD 体内小鼠模型的主要致病蛋白淀粉样前体蛋白（APP）的影响以及机制；（2）探究 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 对 AD 体外细胞模型以及 AD 体内小鼠模型的炎性基因表达的影响（3）探究 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能否改善 AD 小鼠模型的空间学习记忆能力。

结果：1. 从人脐带组织成功分离出了 HUC-MSCs；2. 通过超速离心法从 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 的条件培养基中成功分离出 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs；3. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 体外细胞模型以及 AD 体内小鼠模型后通过显著上调 α-分泌酶，显著下调 β-分泌酶从而显著减少 AD 致病蛋白 APP 的表达；4. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 体外细胞模型以及 AD 体内小鼠模型后可以显著下调 *IL-6, TNF-α, IL-1β* 以及 *HO-1* 炎性基因的表达；5. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 通过尾静脉注射处理 AD 体内小鼠模型后可以显著提高其空间学习记忆能力。

结论：1. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 疾病模型后可以通过上调 α-分泌酶下调 β-分泌酶减少 AD 疾病模型中病理蛋白 APP 的表达；2. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 疾病模型后可以减少 AD 疾病模型中 *IL-6, TNF-α, IL-1β* 以及 *HO-1* 炎性基因的表达；3. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 小鼠后可以改善其空间学习记忆能力。

关键词　阿尔茨海默症　间充质干细胞　细胞外囊泡　淀粉样前体蛋白

中国知网　https://www.cnki.net

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease and the most common form of dementia, characterized by progressive memory loss and cognitive impairment. Familial, early-onset (<60 years), autosomal-dominant forms of AD (FAD) can be caused by mutations in the genes amyloid precursor protein (*APP*), presenilin 1 (*PSEN1*), and presenilin 2 (*PSEN2*). β- and γ-secretase continuously enzymatically hydrolyze APP to produce amyloid β (Aβ) peptide plaques and plaques composed of filamentous aggregation of hyperphosphorylated tau (p-tau) are the two main pathological signs of AD. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are pluripotent stem cells that can differentiate into mesenchymal mass spectrometry lines. They have great regenerative potential and can protect and repair a variety of damaged tissues, including nerves, myocardium, and cartilage. , Liver and other tissues. Researches have shown that the use of MSCs to treat AD can reduce Aβ deposition and improve disease. At present, the research on the application of MSCs to the treatment of neurological diseases is mainly through direct transplantation and injection of MSCs, because MSCs cannot cross the blood-brain barrier in mouse models, and direct transplantation of MSCs belongs to cell therapy, which may have the risk of tumor formation, immune rejection and infusion toxicity. Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicles (MSC-EVs) as a cell-free therapy can exert the same therapeutic effect as MSCs, and MSCs-EVs can cross the blood-brain barrier through tail vein injection in mouse models, reducing the risk of direct transplantation of MSCs and making MSC-EVs easier to produce and store.

In this research, the constructed in vitro AD cell model and in vivo mice model of AD were used as research objects to explore the effect of MSC-EVs on AD disease models, and provide new ideas for AD research.

Methods: In this research, AD disease models were studied from human umbilical

中国知网 https://www.cnki.net

cord-derived mesenchymal stem cells (HUC-MSCs) and human adipose-derived stem cells (HAD-MSCs) in the conditioned medium of human umbilical cord-derived extracellular vesicles (HUC-MSC-EVs) and HAD-MSC-derived extracellular vesicles (HAD-MSC-EVs) to explore the changes in the expression of pathogenic genes and inflammatory genes after the treatment of the AD disease model.

Results: 1. HUC-MSCs were successfully isolated from human umbilical cord tissue. 2. HAD-MSC-EVs and HUC-MSC-EVs were successfully isolated from conditioned medium of HAD-MSCs and HUC-MSCs by ultracentrifugation. 3. After treatment of HAD-MSC-EVs and HUC-MSC-EVs in vitro cell models and in vivo mouse models of AD, the expression of AD pathogenic protein APP was significantly upregulated by significantly upregulating α-secretase and significantly downregulating β-secretase. 4. HAD-MSC-EVs and HUC-MSC-EVs could significantly downregulate the expression of *IL-6, TNF-α, IL-1β* and *HO-1* inflammatory genes after treatment of AD in vitro cell models and in vivo mouse models of AD. 5. HAD-MSC-EVs and HUC-MSC-EVs were treated with in vivo mouse models of AD by tail vein injection, which significantly improved their spatial learning and memory ability.

Conclusion: 1. After HAD-MSC-EVs and HUC-MSC-EVs are treated in AD disease models, the expression of pathological protein APP in AD disease models can be reduced by up-regulating α-secretases down-regulating β-secretases. 2. HAD-MSC-EVs and HUC-MSC-EVs can reduce the expression of *IL-6, TNF-α, IL-1β* and *HO-1* inflammatory genes in AD disease models after treatment of AD disease models. 3. HAD-MSC-EVs and HUC-MSC-EVs can improve the spatial learning and memory ability of AD mice after treatment.

Keywords Alzheimer's disease Mesenchymal stem cells Extracellular vesicles Amyloid precursor proteins

中国知网 https://www.cnki.net

目 录

第一章 绪论.....1
1.1 阿尔茨海默症概述.....1
1.1.1 阿尔茨海默症的简介.....1
1.1.2 阿尔茨海默症的危害.....1
1.1.3 阿尔茨海默症的治疗方法及药物.....1
1.2 间充质干细胞概述.....2
1.2.1 间充质干细胞的简介.....2
1.2.2 间充质干细胞的治疗潜力.....2
1.3 细胞外囊泡概述.....3
1.3.1 细胞外囊泡简介.....3
1.3.2 细胞外囊泡的分离方法.....4
1.3.3 间充质干细胞分泌的细胞外囊泡.....6
1.4 研究目的及意义.....6
第二章 实验材料、仪器和方法.....7
2.1 实验材料.....7
2.1.1 细胞及菌株.....7
2.1.2 实验试剂.....8
2.1.3 实验试剂配制.....10
2.2 实验仪器.....12
2.3 实验方法与步骤.....13
2.3.1 细胞培养.....13
2.3.2 细胞总 RNA 的提取.....14
2.3.3 小鼠海马组织总 RNA 提取.....15
2.3.4 RNA 反转录成 cDNA.....16
2.3.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR).....16
2.3.6 pCIG3-APP 重组质粒的构建与鉴定.....18
2.3.7 细胞转染.....20
2.3.8 MSC-EVs 的分离.....20
2.3.9 Western Blot.....21
2.3.10 HUC-MSCs 的分离.....23
2.3.11 流式细胞仪鉴定 MSCs 表面标志物.....23
2.3.12 MSCs 成骨成脂分化诱导检测.....24
2.3.13 透射电子显微镜观察 MSC-EVs.....24
2.3.14 纳米颗粒追踪分析技术检测 MSC-EVs.....25

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.15 莫里斯水迷宫行为学检测.....25
2.3.16 统计分析.....26
第三章 实验结果与讨论.....27
3.1 人脐带来源间充质干细胞的分离以及间充质干细胞的鉴定....27
3.1.1 人脐带来源的间充质干细胞的分离.....27
3.1.2 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 表面标志物的鉴定.....27
3.1.3 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 多向分化潜能的鉴定.....28
3.2 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的分离以及鉴定.....30
3.3 AD 细胞模型的构建以及鉴定.....32
3.3.1 pCIG3-APP 重组质粒的构建以及鉴定.....32
3.3.2 AD 细胞模型构建以及鉴定.....33
3.4 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能通过调节 α-分泌酶以及 β-分泌酶减少 AD 细胞模型中 APP 的表达.....34
3.4.1 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 对 AD 体外细胞模型共培养处理后 APP 表达的变化.....35
3.4.2 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型后 APP 表达的变化.....36
3.5 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型后可以减少炎性基因的表达.....38
3.6 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 APP/PSEN 小鼠后可以改善其空间记忆能力.....39
3.7 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 APP/PSEN 小鼠后可以通过调节 α-分泌酶以及 β-分泌酶减少 APP 的表达.....41
3.8 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 APP/PSEN 小鼠后可以减少大脑内炎性基因的表达.....43
3.9 讨论.....44
第四章 结论.....47
参考文献.....48

中国知网 https://www.cnki.net

第一章 绪论

1.1 阿尔茨海默症概述

1.1.1 阿尔茨海默症的简介

阿尔茨海默症（Alzheimer's disease, AD）是以德国精神病学家 Alois Alzheimer 命名的最常见的痴呆症类型，其病理特征主要是在脑内 Aβ 斑块的沉积和神经原纤维缠结[1]。Alois Alzheimer 在检查一个病人的大脑时注意到淀粉样蛋白斑块的存在以及神经元的缺失，且该病人在死亡前有记忆丧失以及性格改变的情况出现，他将这种情况描述为大脑皮层的严重疾病[2]，后来 Emil Kraepelin 在其第 8 版精神病学手册中首次将这种疾病命名为阿尔茨海默症[3]。目前对于 AD 特征的描述为进行性记忆丧失和认知障碍[4]，根据发病原因可将 AD 分为以下两类：（1）家族性、早发性（<60 岁）、常染色体显性遗传型 AD（FAD），由淀粉样前体蛋白（*APP*）、早老素 1（*PSEN1*）和早老素 2（*PSEN2*）基因突变引起；（2）散发性 AD，由多因素遗传和环境风险因素所致，发病通常较晚[5]。

1.1.2 阿尔茨海默症的危害

AD 作为一种与年龄具有密切相关性的神经退行性疾病，其发病群体大多聚集在老年人群体，患者会出现神经元丢失和认知下降的现象并且脑内发生病变，伴随记忆丧失和认知功能障碍继而导致行为也出现障碍，逐渐丧失社会生活能力[6]。AD 早期的症状并不明显，因此容易被忽视，目前 AD 已经成为了自心脑血管疾病和恶性肿瘤之后老年人的第三大致残致死疾病，这不仅给家庭带来巨大的经济负担，也给社会带来了社会负担[7]。目前在我国已经约有 1000 万 AD 患者，并且随着我国人口老龄化的趋势，AD 的发病率也将会随之而增加[8]。

1.1.3 阿尔茨海默症的治疗方法及药物

尽管目前 AD 给社会带来了严重的公共安全卫生问题，但是只有 3 种医学治疗方法被批准用于 AD，这 3 种方法分别是胆碱酯酶抑制剂，N-甲基 D-天冬氨酸（NMDA）

中国知网 https://www.cnki.net

受体拮抗剂以及联合疗法[9]。

胆碱酯酶是 AD 的重要治疗靶点之一[10]。AD 患者认知功能下降的主要原因是大脑中胆碱能神经元的恶化和神经递质的丧失[11]，根据胆碱能假说，AD 的主要原因是乙酰胆碱合成的减少，因此通过抑制乙酰胆碱酯酶的生物活性从而增加大脑中的胆碱能水平是潜在的治疗策略之一[12]。他克林是第一代胆碱酯酶抑制剂药物，但是他克林会造成明确的急性肝损伤，受到肝毒性副作用的限制他克林很快就被淘汰，随后还出现了多奈哌齐、卡巴拉汀以及加兰他敏，这些不同药物有着相似的疗效，因此应该根据成本、个体患者耐受性和医生的经验进行选择[13]。

在人体正常情况下，NMDA 受体通过允许钙离子进入神经从而发挥作用；然而 AD 患者的 NMDA 受体表现出高活性，因此钙离子过量进入神经从而导致兴奋性毒性和细胞死亡。美金刚是 NMDA 受体拮抗剂的药物，该药物能够与 NMDA 受体的开放状态结合作为非竞争性拮抗剂起作用，因此能够作为用于治疗 AD 的药物之一[14]。美金刚已经被证明可以对中度至重度的 AD 患者有一定的治疗效果，但是对轻度的 AD 患者并没有明显的治疗效果[15]。

在联合治疗中，美金刚和多奈哌齐的联合使用治疗中度至重度的 AD 患者后，AD 患者的认知判断，语言和行为障碍可以有效改善，但是对于轻度患者却没有明显的效果[16]。

1.2 间充质干细胞概述

1.2.1 间充质干细胞的简介

间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cells, MSCs）是一种具有分化为间充质谱系能力的多能干细胞，可以从骨髓、脐带、脂肪等组织中分离并且易于在体外培养[17]。MSCs 没有明确的标记，因此国际细胞治疗协会建立了一个 MSCs 的标准：MSCs 必须表达高水平的 CD105，CD73 以及 CD90，表达低水平的 MHC-I，MHC-II，CD11b，CD14，CD34，CD45 以及 CD31[18]。

1.2.2 间充质干细胞的治疗潜力

MSCs 具有免疫抑制潜力因此对免疫疾病有治疗作用，有研究表明 MSCs 通过与

中国知网 https://www.cnki.net

自然杀伤细胞、B 淋巴细胞、树突状细胞以及 T 细胞相互作用从而在免疫应答的过程产生影响[19]。MSCs 因其分化潜能而拥有再生潜力，MSCs 的再生潜力表现在对多种损伤模型具有保护作用，其中包括了骨骼受损，软骨，肝，心肌，心脏和神经等组织损伤模型[20-24]。以往 MSCs 在再生医学领域的应用中通过将 MSCs 移植分化从而发挥作用，但是会具有致癌性和免疫原性[25]。目前研究发现，MSCs 发挥功能与其旁分泌作用密切相关[26-28]。MSCs 可以通过旁分泌功能分泌多种因子进行免疫调节，从而促进血管生成，抗凋亡和抗氧化作用[29, 30]。MSCs 还可以释放含有蛋白质，mRNA 以及 microRNA 的细胞外囊泡减少组织修复过程中出现的炎症反应并且能够促进细胞的增殖[31-33]。综上所述，MSCs 主要通过三种方式发挥治疗潜力：（1）通过分化成各种细胞谱系来替换受损的组织；（2）通过免疫调节功能调节免疫应答；（3）通过旁分泌功能分泌出细胞外囊泡转入受体细胞进行作用。图 1 为 MSCs 发挥治疗潜力示意图[34]。

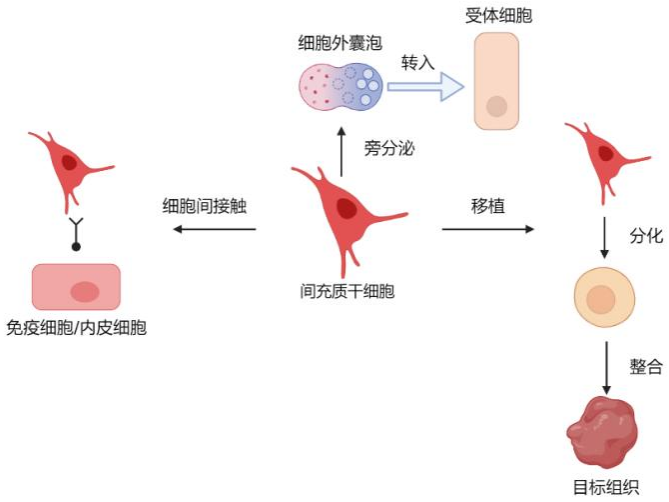


图 1 MSCs 发挥治疗潜力的示意图

1.3 细胞外囊泡概述

1.3.1 细胞外囊泡简介

根据国际细胞外囊泡协会的建议，细胞外囊泡（Extracellular Vesicles, EVs）包括外泌体（exosomes），微泡颗粒（microvesicles）和凋亡小体（apoptotic bodies）[35]，其中发挥主要作用的成分为外泌体成分。EVs 各个组分的起源，尺寸，功能，标记物以及组成成分如表 1-1 所示。EVs 发挥的功能是由其来源细胞所决定的，EVs 内部包

中国知网 https://www.cnki.net

含了其来源细胞的特异性蛋白，mRNA 以及 microRNA 等物质，不同细胞来源的 EVs 可以行使其特定功能，通过转移至受体细胞中激活细胞特定的信号传导从而影响细胞命运，是细胞间通讯的重要介质[36]。细胞分泌的 EVs 均具有靶向受体细胞的表面分子，EVs 被靶细胞吸收后，通过以下三种机制进行诱导信号传导：（1）内吞区室内化；（2）与细胞膜融合；（3）识别特异性受体诱导细胞内信号通路[37]。

表 1-1　EVs 各个组分的起源，尺寸，功能，标记物和组成

	外泌体	微泡颗粒	凋亡小体
起源	内吞途径	质膜	质膜
尺寸	40-120nm	50-1000nm	500-2000nm
功能	细胞间通讯	细胞间通讯	促进吞噬作用
标记物	Alix, Tsg101, CD81, CD63, CD9, flotillin	Integrins, selectins, CD40	Annexin Ⅴ
组成	蛋白质和核酸（mRNA，miRNA 和其他非编码 RNA）	蛋白质和核酸（mRNA，miRNA 和其他非编码 RNA）	细胞器，核成分

1.3.2　细胞外囊泡的分离方法

EVs 因其内部包含细胞来源的特异性蛋白，mRNA 以及 microRNA 等物质，在临床疾病治疗方面具有应用前景，但是分离 EVs 是目前的难点之一，从细胞中分离出具有生物活性和功能的 EVs 需要去除杂蛋白和其他可能存在的基质污染物等，目前用于分离 EVs 的常用方法有五种，分别是超速离心法、密度梯度离心法、尺寸排阻色谱法、基于免疫亲和力的分离法以及使用商业试剂盒进行分离。这五种方法的分离原理以及优缺点如表 1-2 所示。

超速离心法是目前分离 EVs 的黄金标准[38, 39]，分离原理是根据 EVs 的密度将其从细胞条件培养基中与其他样品组分和浓缩物分离[40, 41]。超速离心法分离 EVs 无法将 EVs 与细胞外空间的其他成分完全分离[42]，会分离出其他的微粒，包括病毒、脂蛋白颗粒以及蛋白复合物等[43]。超速离心法需要使用到超高速离心机仪器，该仪器价格昂贵，但是长期使用性价比相比于其他四种方法更高。密度梯度离心法是基于超高速离心法的分离方法，原理与超高速离心法相似，需要预先构造密度梯度，蔗糖梯度以及

中国知网 https://www.cnki.net

OptiPrep 梯度是目前应用于 EVs 分离常用的两种介质[44]，适用于从蛋白聚集体、非膜颗粒以及体液中分离[45]。相较于超速离心法，密度梯度离心法具有提高 EVs 纯度的优势，但是需要进行梯度制备以及护理，防止使用过程中梯度发生变化。尺寸排阻色谱法是根据流体动力学体积分离样品成分的方法，这种方法不需要昂贵设备并且可以在温和条件下洗脱使用[46]。相较于超高速离心法，尺寸排阻色谱法可以分离出 EVs 中更多的蛋白[47]，但是会受到脂蛋白颗粒、病毒颗粒、游离蛋白以及蛋白复合物等物质的污染[48]。基于免疫亲和力的分离方法是根据抗原-抗体高度特异性相互结合作用而进行分离，基于免疫亲和力的分离方法通过抗原-抗体特异性结合作用靶向特定的 EVs, 从而减少其他颗粒物质的污染, 许多研究已经使用抗体对 EVs 进行分离[49]。基于免疫亲和力的分离方法减少了分离时间并且提高了纯化特异性, 但是成本非常高, 并且会受到抗体的非特异性结合、竞争性抑制和交叉反应的问题, 而且抗体的使用次数有限, 从固定相中分离 EVs 也可能会带来问题[50]。目前在市场上已经出现了以下几种商业化的试剂盒用于分离 EVs：（1）ExoQuick™ Exosome Precipitation Solution (Systems Bioscience)；（2）miRCURY™ (Exiqon)；（3）Total Exosome Isolation Reagent (Invitrogen)[51-53]，使用试剂盒分离 EVs 不需要任何专用的设备仪器并且产量与超速离心法相差不多。使用商业试剂盒分离 EVs 可能会导致高水平的蛋白质污染并且价格也非常昂贵，此外试剂盒的专有配方可能会干扰 EVs 的下游实验。

表 1-2 EVs 各分离方法的优点与缺点

方法	原理	优点	缺点
超速离心法	EVs 密度与其他组分不同	蛋白污染程度低	会分离出大小相似的颗粒物
密度梯度离心法	EVs 密度与其他组分不同	EVs 纯度高	需要额外时间进行制备和护理
尺寸排阻色谱法	流体动力学体积分离	蛋白污染程度低，分离条件温和	EVs 分离物低分辨率和低稀释度
基于免疫亲和力的分离方法	抗原-抗体特异性结合	纯化效率高	成本高
商业试剂盒	聚合物沉淀	EVs 产量高，流程简单	蛋白污染高，成本高

中国知网 https://www.cnki.net

1.3.3 间充质干细胞分泌的细胞外囊泡

间充质干细胞分泌的细胞外囊泡（Mesenchymal Stem Cells-Derived Extracellular Vesicles, MSC-EVs）目前被广泛应用于疾病治疗的探究中。Haynesworth 等人首次鉴定出 MSC-EVs, 表明 MSC-EVs 内部包含有生长因子、趋化因子和细胞因子[54]。MSC-EVs 内部包含的因子可促进血管生成, 减少细胞凋亡和纤维化, 增强神经元存活, 刺激细胞外基质重塑, 限制局部炎症并调节免疫反应，因此 MSC-EVs 可以应用于治疗损伤的细胞, 减少组织损伤以及加速器官修复[55-57]。MSC-EVs 在目前的研究中被着 重探究的功能主要有两个：（1）促进损伤组织的结构和功能恢复[58]；（2）通过 MSC-EVs 表达特定的 microRNA 并转移至受体细胞的特点, 将 MSC-EVs 应用到 microRNA 表达失控的细胞中发挥作用[59]。在目前对于 MSC-EVs 的研究中, MSCs 的来源主要是骨髓、脐带血、脂肪组织, 研究表明, 不同组织来源的 MSC-EVs 所携带的蛋白质有所不同，但基本都包含了血管生成、炎症、凝血、细胞凋亡等与 MSC-EVs 治疗作用密切相关的蛋白[60]。

1.4 研究目的及意义

长期以来，AD 对人类的生命健康和生活造成了严重威胁，针对 AD 的治疗目前在临床上没有统一的标准，目前用于治疗 AD 的药物的治疗效果也不佳，因此探索 AD 的治疗方式至关重要。利用 MSCs 治疗 AD 是治疗 AD 的新兴领域，近年来 MSCs 在治疗癌症、血液相关疾病以及神经退行性疾病方面受到广泛关注[61, 62]，目前 MSCs 在 AD 领域的应用已在 AD 患者中进行了几项临床试验，涉及 HAD-MSCs 以及 HUC-MSCs[63, 64]。本课题通过从 MSCs 的条件培养基中分离出 MSC-EVs，以 AD 体外细胞模型和 AD 体内小鼠模型为研究对象：（1）探究 MSC-EVs 对 AD 疾病模型中淀粉样前体蛋白（APP）表达的影响以及机制；（2）探究 MSC-EVs 在 AD 疾病模型中能否减轻因淀粉样前体蛋白被酶解导致 Aβ斑块沉积而产生的炎症反应；（3）探究 MSC-EVs 能否改善 AD 小鼠模型的学习记忆能力表型。研究 MSC-EVs 对 AD 疾病模型的作用效果，进而了解 MSC-EVs 能否对 AD 疾病模型产生治疗作用，为探究针对 AD 的治疗方式提供一个新的思路。

中国知网 https://www.cnki.net

第二章　实验材料、仪器和方法

2.1　实验材料

2.1.1　细胞及菌株

人脂肪来源的间充质干细胞（HAD-MSCs）从湖南丰晖生物科技有限公司购买所得，由湘雅医院实验室分离得到；人脐带来源的间充质干细胞（HUC-MSCs）由本实验室从人脐带组织分离得到；人神经母细胞瘤细胞（SH-SY5Y）从上海青旗生物技术发展有限公司购买所得；以上细胞均置于 37℃，5%CO_2 的无菌培养箱中培养。细胞的基本信息如表 2-1 所示，培养基配方如表 2-2 所示。pCIG3 质粒从 Addgen 购买所得，*APP* 基因（基因序列号：NM_201414.3）由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表 2-1　细胞简介

细胞名称	细胞简介
HAD-MSCs	人脂肪来源的间充质干细胞，分离自人脂肪组织，属于成体干细胞，具有自我更新和多向分化的能力。
HUC-MSCs	人脐带来源的间充质干细胞，分离自人脐带组织，属于多能干细胞，可诱导分化成多种细胞。
SH-SY5Y	人神经母细胞瘤细胞，于 1970 年建自骨瘤转移灶的神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞系经 3 次克隆后的亚系。具有中等水平的多巴胺-β-羟基酶活性，常用于构建体外神经疾病模型。

表 2-2　培养基配方

培养基类型	适用细胞	配方
DMEM 完全培养基	HAD-MSCs, SH-SY5Y	1%链霉素-青霉素、10%胎牛血清、89%DMEM 基础培养基
人脐带来源的间充质干细胞专用无血清完全培养基	HUC-MSCs	1%间充质干细胞无血清培养基添加剂、99%间充质干细胞无血清培养基

中国知网 https://www.cnki.net

2.1.2 实验试剂

本课题实验所用到的主要试剂及其生产厂家见表 2-3。

表 2-3 实验试剂

试剂	生产厂家
DMEM 基础培养基	Gibco
间充质干细胞无血清基础培养基	友康恒业生物科技有限公司
间充质干细胞无血清培养基添加剂	友康恒业生物科技有限公司
干细胞温和消化酶	友康恒业生物科技有限公司
无血清细胞冻存液	友康恒业生物科技有限公司
PBS 缓冲液	生工生物工程股份有限公司
胰酶	维森特
胎牛血清	GEMINI
双抗（青霉素-链霉素）	博奥龙
DMSO	索莱宝生物科技公司
Trizol	天根生化公司
氯仿	天津市北辰方正试剂厂
异丙醇	天津市北辰方正试剂厂
无水乙醇	Sigma
95%酒精	石家庄新宇三阳公司
RNase Free Water	Takara
6×Super GelRed Prestain Loading Buffer	US EVERBRIGHT
琼脂糖	BIOLAB
FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒	天根生化公司
2×SYBR Green	康为世纪
Xba I 内切酶	NEB
Bmt I 内切酶	NEB
10×rCutSmart^{TM} Buffer	NEB
Endo-free Plasmid Mini Kit	Omega
TIANgel Midi Purification Kit	天根生化公司
10×ligation Buffer	Takara
T4 DNA ligation	Takara
TOP10 感受态细胞	Biomed
Lipofectamine TM 3000 Reagent	Invitrogen
PMSF（蛋白酶抑制剂）	索莱宝生物科技公司
RIPA 裂解液	康为世纪
BCA 蛋白定量试剂盒	索莱宝生物科技公司
5×SDS-PAGE Loading Buffer	Gibco
GAPDH 抗体	Abcam

中国知网 https://www.cnki.net

表 2-3 实验试剂（续）

试剂	生产厂家
BACE1 抗体	Abcam
β-actin 抗体	Abcam
ADAM10 抗体	Abcam
APP 抗体	ABclonal
HRP-羊抗兔二抗	Cell Signaling Technology
ECL 超敏发光液	索莱宝生物科技公司
D-Hanks 溶液	Sigma
BSA	Sigma
CD45-FITC	BD
CD105-PE	BD
CD14-APC	BD
CD34-FITC	BD
CD73-PE	BD
CD19-Perp-Cy5.5	BD
CD90- PerCP-Cy5.5	BD
HLA-APC	BD
PE Mouse IgG1	BD
PE Mouse Anti-Human CD73	BD
Anti-Human CD90	Invitrogen
Anti-Human CD105	Invitrogen
Human CD34 R-PE	Invitrogen
CD45-PE	Cell Signaling Technology
4%多聚甲醛细胞组织固定液	Biosharp
抗坏血酸钠	aladdin
地塞米松	aladdin
β-甘油磷酸盐	Sigma
3-异丁基-1-甲基黄嘌呤	Sigma
胰岛素	Sigma
吲哚美辛	MCE
茜红素 S 染色液	索莱宝生物科技公司
油红素 O 染色液	Sigma
4%PFA	Sigma
Formvar-carbon 载样铜网	PELCO
1%戊二醛	Ted-pella
草酸双氧铀	Sigma
甲基纤维素	Sigma
聚苯乙烯微球	Microtrac
酵母粉	Amresco

中国知网 https://www.cnki.net

表 2-3　实验试剂（续）

试剂	生产厂家
蛋白胨	Amresco
NaCl	Amresco
Tris	Amresco
SDS	Biotopped
Tween 20	索莱宝生物科技有限公司
脱脂奶粉	Bio Froxx
盐酸	天津市大茂化学试剂厂
TEMED	索莱宝生物科技有限公司

2.1.3　实验试剂配制

（1）LB/Amp 液体培养基（无菌）：将 0.5 g 酵母粉、1 g 蛋白胨、1 g NaCl 以及 100 mL 超纯水添加至 200 mL 干净的烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至无明显固体颗粒，搅拌完成后转移至储液瓶中，放入灭菌锅中进行高温高压灭菌后拿进通风橱冷却，待温度降到 50-60℃时加入 0.1 mL 浓度为 100 mg/mL 的氨苄青霉素（Amp），摇晃混匀后贴上封口膜，写好标签放至 4℃冰箱储存备用。

(2) LB/Amp 固体培养基（无菌）：将 0.5 g 酵母粉、1 g 蛋白胨、1 g NaCl、1.5 g 琼脂糖以及 100 mL 超纯水添加至干净的锥形瓶中，用玻璃棒搅拌后贴上透气的封口膜，放入灭菌锅中进行高温高压灭菌，灭菌完成后拿进通风橱冷却，待温度降到 50-60℃时加入 0.1 mL 浓度为 100 mg/mL 的氨苄青霉素（Amp），摇晃混匀后快速且均匀地倒入 5 个无菌的 10 cm 培养皿中，待培养基凝固后贴上封口膜，写好标签放至 4℃冰箱保存备用。

（3）50×TAE：将 37.2 g $Na_2EDTA·H_2O$ 、242 g Tris、以及 400 mL 超纯水添加至干净的烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至无明显固体颗粒后转移至 500 mL 容量瓶进行定容，倒至密封瓶中，写好标签后在常温环境储存备用。

（4）1×TAE：用量筒取 20 mL 50×TAE 以及 980 mL 超纯水倒至密封瓶中，上下颠倒混匀，写好标签后在常温环境储存备用。

（5）1%琼脂糖凝胶：取 0.3 g 琼脂糖以及 30 mL 1×TAE 添加至干净的三角瓶中，放入微波炉设置 200℃加热 2 min，加热完成后倒至准备好的胶槽中，室温静置 30 min 后使用。

中国知网 https://www.cnki.net

（6）10% SDS：将 10 g SDS 以及 80 mL 超纯水添加至烧杯中，加热至 68℃，期间用玻璃棒搅拌至无明显固体颗粒，用浓盐酸调 pH 值至 7.2，再用 100 mL 容量瓶定容，倒至密封瓶中，写好标签后在常温环境下储存备用。

（7）10% 过硫酸铵（AP）：将 0.5 g AP 以及 5 mL 超纯水添加至烧杯中，用玻璃棒搅拌至无明显固体颗粒，倒至 15 mL 无菌的离心管中，写好标签后放至 4℃冰箱保存备用。

（8）5×Running Buffer：将 5 g SDS、15 g Tris、72 g Glycine 以及 700 mL 超纯水添加至烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至无明显固体颗粒后转移至 1 L 容量瓶进行定容，倒至密封瓶中，写好标签后在常温环境下储存备用。

（9）1×Running Buffer：将 200 mL 5×Running Buffer 以及 800 mL 超纯水添加至密封瓶中，上下颠倒混匀，写好标签后在常温环境下储存备用。

（10）10×Transfer Buffer：将 30.3 g Tris、144 g Glycine 以及 800 mL 超纯水添加至烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至无明显固体颗粒后转移至 1 L 容量瓶进行定容，倒至密封瓶中，写好标签后在常温环境下储存备用。

（11）1×Transfer Buffer：将 100 mL 10×Transfer Buffer、200 mL 95%乙醇以及 700 mL 超纯水添加至密封瓶中，上下颠倒混匀，写好标签后在常温环境下储存备用。

（12）TBST Buffer：将 4.4 g NaCl、10 mL 1 M Tris-HCL（pH 8.0）、400 mL 超纯水以及 250 μL Tween 20 添加至烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至无明显固体颗粒后转移至 500 mL 容量瓶进行定容，倒至密封瓶中，写好标签后放至 4℃冰箱储存备用。

（13）蛋白封闭缓冲液（5%）：将 2.5 g 脱脂奶粉以及 50 mL TBST Buffer 添加至烧杯中，用玻璃棒搅拌至无明显固体颗粒，现用现配。

（14）DEPC 水：将 200 mL 超纯水以及 0.2 mL DEPC 添加至密封瓶中，放至转速为 180 rpm 的摇床上，振荡至少 16 h；振荡后放至灭菌锅进行高温高压灭菌，写好标签后放至 4℃冰箱保存备用。

（15）1M Tris-HCl（pH 6.8）：将 60.55 g Tris 以及 400 mL 超纯水添加至烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至无明显固体颗粒后用浓盐酸调 pH 值至 6.8，转移至 500 mL 容量瓶定容，定容后倒至密封瓶中，放至灭菌锅进行高温高压灭菌，写好标签后在常温环

中国知网 https://www.cnki.net

境下储存备用。

（16）1M Tris-HCl（pH 7.4）：配方、配置过程以及储存环境与（15）一致，但是将 pH 值用浓盐酸调至 7.4。

（17）1M Tris-HCl（pH 8.0）：配方、配置过程以及储存环境与（15）一致，但是将 pH 值用浓盐酸调至 8.0。

（18）1M Tris-HCl（PH 8.8）：配方、配置过程以及储存环境与（15）一致，但是将 pH 值用浓盐酸调至 8.8。

（19）12% SDS-PAGE 分离凝胶：将 3.3 mL 30% Acrylamide、2.5 mL 1.5M Tris-HCl（PH 为 8.8）、4 mL 超纯水以及 10%的 SDS 和 10%的 AP 各 100 μL 添加至烧杯中，摇晃混匀后再添加 6 μL TEMED，用玻璃棒快速搅拌均匀后倒入组装好的胶板中。

（20）5% SDS-PAGE 浓缩胶：将 0.83 mL 30% Acrylamide、0.32 mL 1.0M Tris-HCl（PH 为 6.8）、1.7 mL 超纯水以及 10%的 SDS 和 10%的 AP 各 25 μL 添加至烧杯中，摇晃混匀后再添加 2.5 μL TEMED，用玻璃棒快速搅拌均匀后倒入含有 12% SDS-PAGE 分离凝胶的胶板中。

2.2 实验仪器

本课题实验所用的主要仪器见表 2-4。

表 2-4 实验仪器

仪器	生产厂家
超净工作台	Airtech
凝胶成像仪	Bio-Rad
SDS-PAGE 凝胶电泳相关设备	Bio-Rad
琼脂糖凝胶电泳相关设备	Bio-Rad
PCR 仪	Applied Biosystems
荧光定量 PCR 仪	Bio-Rad
酶标仪	MOLECULAR
涡旋震荡仪	杭州米欧仪器有限公司
瞬时离心机	Andy Bio
金属浴	BIOER
恒温摇床	哈尔滨市东联电子有限公司
CO_2 恒温培养箱	YAMATO
倒置荧光显微镜	奥林巴斯公司

中国知网 https://www.cnki.net

表 2-4 实验仪器（续）

仪器	生产厂家
低速离心机	BECKMAN
高速离心机	BECKMAN
超高速离心机	Himac
高压蒸汽灭菌锅	TOMY
干燥箱	上海飞越科学仪器有限公司
分析天平	奥豪斯公司
冰箱	Hair
烘箱	上海飞越实验仪器有限公司
微波炉	格兰仕
荧光共聚焦显微镜	OLYMPUS
制冰机	北京长流科学仪器有限公司
超纯水机	Heal Force
流式细胞仪	BECKMAN COULTER
透射电子显微镜	JEOL
纳米颗粒追踪分析仪	Particle Metrix

2.3 实验方法与步骤

2.3.1 细胞培养

2.3.1.1 细胞复苏

（1）实验开始前，开启紫外照射超净工作台 30 min，开启水浴锅，设置为 37℃，提前预热，在超净工作台内往 15 mL 离心管内放入 3 mL 完全培养基；

（2）戴上专业护目镜及手套，从液氮罐里取出冻存的细胞并将其放入透明无酶 EP 手套内，喷 75% 酒精消毒后拿入工作台内快速拧松放气，再贴好封口膜，迅速放入水浴锅中进行摇晃解冻；

（3）待细胞解冻至黄豆粒大小时，从水浴锅取出，喷 75% 酒精消毒后快速拿进超净台，将细胞移至（1）中准备好的 15 mL 离心管内，放入离心机，配平，以 800 rpm 转速离心 3 min；

（4）离心完成后，吸弃上清液，用 1 mL 完全培养基重悬细胞沉淀，重悬均匀后转移至含有完全培养基的培养皿或培养瓶中，上下左右摇晃使细胞均匀分布在培养皿或培养瓶中，然后放置在 37℃，5% CO_2 的培养箱中进行培养。

中国知网 https://www.cnki.net

2.3.1.2 细胞传代

（1）用显微镜观察细胞长至对数生长期时，吸弃培养皿或培养瓶里的旧培养基，用 PBS 缓冲液轻柔洗涤两次；

（2）视培养皿或培养瓶的规格加入适量胰酶消化细胞（HUC-MSCs 的消化加入干细胞温和消化酶）；

（3）放在倒置显微镜载物台上查看细胞的形态，当大约有 75%的细胞变圆悬浮后，快速放回超净工作台并向内添加完全培养基（以 3：1 胰酶或消化酶比例）结束消化过程；轻柔吹打培养皿或培养瓶底壁，待细胞完全离壁后移至 15 mL 无菌离心管，以 800 rpm 转速离心 3 min；

（4）离心后在工作台内吸弃上清液，加入 1 mL 完全培养基重悬细胞后按比例转移至含有完全培养基的培养皿或培养瓶中，上下左右摇晃使细胞均匀分布在培养皿或培养瓶中，然后放置在 37℃，5% CO_2 的培养箱中进行培养。

2.3.1.3 细胞冻存

（1）以 DMSO：血清：基础培养基 ＝1：4：5 配置细胞冻存缓冲液（HUC-MSCs 使用无血清细胞冻存液），放入 4℃冰箱里避光保存；

（2）同细胞传代（2）（3）步骤一致；

（3）离心后在工作台内吸弃上清液，按冻存比例加入（1）中配置好的细胞冻存液，重悬细胞后转移至细胞冻存管中，贴好封口膜，在冻存管上标记好细胞名称，代数以及冻存日期；

（4）将标记好的冻存管放入事先准备好的冻存盒中并放入-80℃冰箱中进行梯度降温，过夜后转移至液氮罐内长久保存。

2.3.2 细胞总 RNA 的提取

（1）从细胞培养箱中取出需要提取 RNA 的细胞，吸弃培养基，用 PBS 洗涤两遍；

（2）加入适量 Trizol 裂解细胞（视细胞量多少用 500 μl 或 1 mL），使劲吹打细胞进行裂解，裂解后转移至无 RNAase 1.5 mL EP 管中，若不立即提取放入-80℃冰箱中保存；

中国知网 https://www.cnki.net

（3）开启离心机，4℃遇冷；将样品从-80℃冰箱中取出，放于室温环境下自然溶解，溶解后加入氯仿（与 Trizol 比例为 1：5），用力颠倒混匀 15 s，置于室温放置 2 min，可见分层；重复此步骤 4 次，使其分层更充分；

（4）以 4℃，14000 rpm 条件离心 15 min，离心后溶液分为有机相和水相，中间有蛋白质层，RNA 在上层水相中；

（5）分装异丙醇（与 Trizol 比例为 2：5）至无 RNAase 1.5 mL EP 管中，放置于冰上遇冷；

（6）吸取（4）中的上层水相至遇冷好的异丙醇中，轻柔地颠倒混匀，置于冰上静置 5-10 min，以 4℃，14000rpm 条件离心 10min；配置新鲜的 75%乙醇（用 RNAase 水配置）；

（7）弃上清，加入 750 μl 新鲜配置的 75%乙醇，轻柔地弹起沉淀，以 4℃，14000rpm 条件离心 5 min；

（8）吸弃上清，在工作台内晾干至沉淀由白色变成透明；

（9）视 RNA 沉淀多少用无 RNAase 水溶解，60℃金属浴 10min；

（10）取出后轻轻混匀，简短离心后放置于冰上，取 2 μl 用 Nanodrop 2000 仪器进行 RNA 浓度的检测，取 5 μl 混合到 1 μL 6×Super GelRed Prestain Loading Buffer 中，吹吸混匀，进行琼脂糖凝胶电泳，检测 RNA 样品的完整度。

※ 实验过程必须防止 RNAase 的污染，整个提取过程要使用无 RNAase 的试剂耗材，要在干净的通风橱内进行操作。

2.3.3 小鼠海马组织总 RNA 提取

（1）将小鼠脱颈处死，剪开小鼠头皮暴露出头部；

（2）用直镊将小鼠脑壳拨开，再小心地将大脑皮层拨开，海马组织位于大脑皮层的底部，暴露出海马组织；

（3）将海马组织与大脑皮层及周围的脑组织分离，小心取出海马组织后放入 RNAlater 试剂中保存；

（4）将（3）中所得的组织液氮条件下研磨成粉末，以每 100 mg 的海马组织加

中国知网 https://www.cnki.net

入 1 mL Trizol 试剂，使劲吹打，然后移至无 RNAase 的 1.5 mL EP 管中，若不立即提取可放-80℃冰箱保存；

（5）后续实验步骤以及注意事项与实验方法 2.3.2 中（3）-（10）相同。

2.3.4 RNA 反转录成 cDNA

（1）本实验使用 FastQuant RT Kit 第一链合成试剂盒；

（2）将待反转录的 RNA 样品以及反转录试剂都放在冰上溶解；

（3）溶解后，根据表 2-5 在 200 μL 无 RNAase 的 EP 管内配制体系 1，其中 RNA 加入总量为 1 μg；将 EP 管放入 PCR 仪，42℃条件下运行 3 min；运行结束后迅速取出放在冰上；

表 2-5 gDNA 去除反应体系

组成成分	使用量
5×gDNA Buffer	2 μL
Total RNA	-
RNase-Free ddH2O	补足到 10 μL

（4）根据表 2-6 配置体系 2；

表 2-6 反转录反应体系

组成成分	使用量
10×Fast RT Buffer	2 μL
RT Enzyme Mix	1 μL
RQ-RT Primer Mix	2 μL
RNase-Free ddH2O	补足到 10 μL

（5）将配置好的体系 2 放在涡旋振荡器上震荡混匀；再将体系 2 按照每管 10 μL 的量加入到体系 1 的各管中，放在涡旋振荡器上震荡混匀；

（6）将步骤（5）得到的装有混合液的 EP 管放入 PCR 仪，连续运行 42℃，15 min 和 95℃，3 min；得到的产物用 DEPC 水稀释后可以直接用作下一步实验或放在-20℃冰箱存储。

2.3.5 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）

(1) 本课题中使用 NCBI 网站中的 Primer blast 程序设计 qRT-PCR 实验过程中所需用到的引物，引物序列如表 2-7 所示；

中国知网 https://www.cnki.net

表 2-7 qRT-PCR 引物序列

基因(human)	引物序列（5’－3’）
h-APP-F	TCAGTCTCTCTCCCTGCTCT
h-APP-R	GGTGGTTTTCGTTTCGGTCA
h-ADAM10-F	TGGTGGCACATTTTATGTTGAGC
h-ADAM10-R	AAGTTCTGGACCATTAGCAGC
h-BACE1-F	ATGGTTTCTGGCTAGGAGAGC
h-BACE1-R	TTGGTAACCTCACCCATTAGGTA
h-GAPDH-F	CGAGATCCCTCCAAAATCAA
h-GAPDH-R	TTCACACCCATGACGAACAT
h-IL-6-F	ATGTAGCCGCCCCACACA
h-IL-6-R	CCGTGCAGGATGTACCGAATT
h-TNF-α-F	AAGTGGACCTTAGGCCTTCC
h-TNF-α-R	AGCCTATTGTTCAGCTCCGT
h-IL-1β-F	TCTTCGACACATGGGATAACGA
h-IL-1β-R	TCCCGGAGCGTGCAGTT
h-HO-1-F	AGTCTTCGCCCCTGTCTACT
h-HO-1-R	CTTCACATAGCGCTGCATGG
m-APP-F	ACTCTGTGCCAGCCAATACC
m-APP-R	GAACCTGGTCGAGTGGTCAG
m-ADAM10-F	ATGGTGTTGCCGACAGTGTTA
m-ADAM10-R	GTTTGGCACGCTGGTGTTTTT
m-BACE1-F	GGAACCCATCTCGGCATCC
m-BACE1-R	TCCGATTCCTCGTCGGTCTC
m-GAPDH-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
m-GAPDH-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
m-IL-6-F	TGGTCTTCTGGAGTACCATAGC
m-IL-6-R	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
m-TNF-α-F	GATCGGTCCCCAAAGGGATG
m-TNF-α-R	CCACTTGGTGGTTTGTGAGTG
m-IL-1β-F	GCAACTGTTCCTGAACTCAACT
m-IL-1β-R	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
m-HO-1-F	AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA
m-HO-1-R	GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA

※ h: human, m: mouse.

（2）实验按表 2-8 中的用量体系加入至无 RNAase 200μL EP 管中；

中国知网 https://www.cnki.net

表 2-8　qRT-PCR 的反应体系

试剂	体积
DNA 模板	2.5 μL
2×SYBR Green	5 μL
正向引物（10μM）	0.4 μL
反向引物（10μM）	0.4 μL
RNase-Free ddH2O	1.7 μL
总体系	10 μL

（3）将步骤（2）所上样的 EP 管混匀后放入荧光定量 PCR 仪器中，按表 2-9 设置反应条件。

表 2-9　qRT-PCR 的反应条件

阶段	循环	温度	时间
预变性	1×	95℃	10 min
RCR 反应	40×	95℃	10 s
		55℃	20 s
		72℃	30 s
	Mert Curve		

2.3.6　pCIG3-APP 重组质粒的构建与鉴定

2.3.6.1　基因合成

从NCBI的GeneBank中检索出*APP*基因序列（基因序列号：NM_201414.3），精确查找实验需要的基因的CDS区序列，并在两端分别加入*Xba* I和*Bmt* I酶切位点，由苏州金唯智生物科技有限公司合成，公司合成后连接在空白载体交付。

2.3.6.2　pCIG3 与含有 *APP* 目的基因的空白载体的质粒提取

本实验使用 Omega 公司生产的 Endo-free Plasmid Mini Kit 试剂盒，实验步骤参照试剂盒说明书。

2.3.6.3　双酶切以及胶回收

（1）将 2.3.6.2 中所得的质粒 DNA 用 Nanodrop 2000 仪器进行 DNA 浓度的检测，检测后按表 2-10 配置 100 μL 体系加入置无菌的 200 μL EP 管中，其中质粒 DNA 总量为 2 μg，吸打混匀后进行简短离心；

中国知网　https://www.cnki.net

表 2-10 双酶切体系

试剂	体积
10×rCutSmart™ Buffer	10 μL
Xba I	1 μL
Bmt I	1 μL
质粒 DNA	-
ddH_2O	补足至 100 μL

（2）放入 PCR 仪中，连续运行 37℃ 30 min，65℃ 2.5 h，运行结束后将所得的产物进行 DNA 电泳，若不立即进行可放置-20℃冰箱保存；

（3）配置 1%的琼脂糖凝胶，是用微波炉加热至液体变成透明后取出，待温度降到 50℃左右后倒入胶板，插上梳子，注意防止气泡产生，待凝胶凝固后放入电泳槽，添加 1×TAE 电泳液，准备上样；

（4）取（1）中所得的产物并与 6×GelRed 试剂吹打混合（产物：6×GelRed = 5：1）后加入胶孔中，以 100 V 恒压条件下运行，待指示条带跑至胶块的三分之二位置时停止运行；

（5）取出胶块放置凝胶成像仪中进行显影成像，用 Image Lab 软件处理分析条带，查看双酶切后条带是否符合预期大小；

（6）条带符合预期大小后将胶块拿至紫外灯下，用无菌的刀片切割所需条带的胶块进行胶回收；

（7）本实验胶回收所用试剂盒为天根生化公司生产的 TIANgel Midi Purification Kit 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒，详细实验步骤可参照试剂盒使用说明书；

2.3.6.4 连接转化以及鉴定

（1）胶回收后进行浓度的检测，然后按表 2-11 连接体系加入置无菌的 200 μL EP 管中，其中载体与 DNA 片段总量均为 50 ng；

表 2-11 连接体系

试剂	体积
10×ligation Buffer	2 μL
质粒载体	-
DNA 片段	-
T4 DNA ligation	1 μL
ddH_2O	补足至 20 μL

中国知网 https://www.cnki.net

（2）将连接后的产物进行 DNA 凝胶电泳，检测条带是否符合连接成功后的大小，实验步骤与 2.6.3.3 中（3）-（5）一致；

（3）检测连接成功后将连接产物转化至 TOP10 感受态细胞中，本实验所用的 TOP10 感受态细胞由 Biomed 公司生产，详细实验步骤可参照试剂使用说明书；

（4）将转化后的菌液在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上均匀涂布，待液体吸干后倒置平板，放入 37℃培养箱培养 16 h；

（5）挑单菌落至含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中，180 rpm 震荡 16 h，取菌液送生工生物工程公司测序，将公司所测得的结果通过 Snap Gene 软件与 *APP* 基因的 CDS 序列进行比对，分析两者是否一致。

2.3.7 细胞转染

本实验所用试剂为 Invitrogen 公司生产的 Lipofectamine TM 3000 Reagent 试剂，详细实验步骤可参照试剂说明书；

（1）配制转染体系：①A 液：取无菌 1.5 mL EP 管，按试剂说明书分别加入质粒 DNA、P3000^{TM} Reagent 试剂以及 DMEM 基础培养基进行混合；②B 液：取无菌 1.5 mL EP 管，按试剂说明书加入 LipofectamineTM3000 试剂以及 DMEM 基础培养基进行混合；③将 A 液与 B 液混合，轻柔吹打，室温孵育约 15 min；

（2）孵育期间，将密度至 70%-80%的细胞从培养箱取出，用 PBS 清洗两遍，加入 DMEM 基础培养基；

（3）将（1）中配置的混合液加入至细胞中，上下左右摇晃使混合液均匀分布，放回培养箱中孵育 6 h，孵育完成后弃旧培养基，用 DMEM 基础培养基洗涤两遍后加入不含双抗的 DMEM 完全培养基，放回培养箱中进行培养；

（4）培养 24 h 后，用倒置荧光显微镜观察 GFP 荧光信号检测是否转染成功。

2.3.8 MSC-EVs 的分离

本实验 MSC-EVs 的分离通过使用超高速离心机进行超高速离心法进行分离。具体实验步骤如下：

（1）待 MSCs 密度生长至 80%-90%时，弃旧培养基，更换为不含细胞外囊泡血

中国知网 https://www.cnki.net

清的完全培养基（HAD-MSCs 所用的完全培养基内包含血清，血清中也有细胞外囊泡的成分存在，因此需要将血清中的细胞外囊泡按此实验方法的步骤，HUC-MSCs 所用的完全培养基为无血清完全培养基），放入细胞培养箱中培养 48 h，培养 48 h 后收集培养基，若不立即进行后续分离实验放入-80℃冰箱保存；

（2）离心前一天需将超速离心机的转子以及配套离心管设备放入 4℃冰箱预冷；

（3）将（1）中收集的条件培养基以 4℃，300×g 10 min, 2000×g 10 min, 10000×g 1 h 条件进行连续离心，离心完成后弃沉淀，将上清收集；（此步骤去除条件培养基中含有的死细胞碎片、细胞碎片以及其他小颗粒碎片）

（4）取出（2）中提前遇冷好的转子以及设备，将（3）中所得的上清液吸至离心管中，以 4℃，150000×g 离心 2 h，离心完成后尽快取出离心管，吸弃大部分上清，再加入 PBS 重悬沉淀后同样以 4℃，150000×g 离心 2 h，离心完成后尽快取出离心管，吸弃上清，视沉淀量加入 PBS 重悬溶解，放入-80℃冰箱保存备用。

2.3.9 Western Blot

2.3.9.1 提取细胞蛋白

（1）提前打开离心机，4℃预冷，以蛋白酶抑制剂（PMSF）：RIPA 裂解液=1：100 的比例配置蛋白裂解液，放入 4℃冰箱保存；

（2）从细胞培养箱中取出细胞，PBS 洗涤两遍，将步骤（1）中配置的蛋白裂解液按 RIPA 蛋白裂解液说明书用量加入至培养皿中，放入 4℃低速摇床上，摇晃 10 min；

（3）用细胞刮板将细胞刮下，移至无菌的 1.5 mL EP 管中，放置于冰上；

（4）用超声破碎仪进行超声瞬时破碎；

（5）放入（1）预冷好的离心机，以 10000×g 转速离心 10 min，将上清转移至无菌的 1.5 mL EP 管中。

2.3.9.2 提取小鼠海马体组织蛋白

（1）提前打开离心机，4℃预冷，以蛋白酶抑制剂（PMSF）：RIPA 裂解液=1：100 的比例配置蛋白裂解液，放入 4℃冰箱保存；

（2）海马体组织提取在实验方法 2.3.3 中已阐述；

（3）将（2）中所得的组织液氮条件下研磨成粉末，按 RIPA 蛋白裂解液说明书

中国知网 https://www.cnki.net

用量溶解组织粉末转移至无菌的 1.5 mL EP 管中，放置于冰上；

（4）后续步骤与实验方法 2.3.9.1 的（4）（5）步骤一致。

2.3.9.3 BCA 法测定蛋白浓度

本实验使用由索莱宝生物科技有限公司生产的BCA蛋白定量试剂盒进行测定，详细实验步骤可参考试剂盒使用说明书。

2.3.9.4 Western Blot

（1）将胶板组装好，加水静置10 min，看是否会侧漏，若有侧漏需重新组装直至水无侧漏；

（2）配置12%浓度的分离胶，混匀后倒入组装好的胶板并迅速加入2 mL超纯水进行液封，静置30 min，静置期间配置5%浓度的浓缩胶，静置后将液封的超纯水倒出，将配置好的浓缩胶倒入，迅速将梳子插入胶里，注意勿产生气泡，静置1 h后用浸湿的纱布包裹胶板放入无酶的一次性EP手套中封好后平放至4℃冰箱保存备用；

（3）打开金属浴设置温度为100℃预热，在无菌的1.5 mL EP管中加入已测完浓度的蛋白质、PBS以及5×SDS-PAGE Loading Buffer，配置成浓度为200 μg/250 μL的蛋白上样液，配置完成后放置在100℃预热好的金属浴中，加热10 min，加热完成后取出放置于冰上，准备上样；

（4）在电泳槽内插入（2）中配置好的胶板，添加1×Running Buffer没过胶板顶部，将梳子拔出，将（3）中处理好的蛋白上样液在涡旋振荡器上震荡混匀，每个胶孔加入20 μL的量后，开启电泳仪以100V恒压运行电泳，待蛋白marker完全跑开后停止运行；

（5）转膜：将PVDF膜用甲醇激活1 min，取出（4）中电泳后的蛋白凝胶，将海绵垫、滤纸、蛋白凝胶、PVDF膜、滤纸、海绵垫从下到上分别放入转膜夹中，切勿产生气泡，放入转膜槽中，添加1×Transfer Buffer，开启电泳仪以100V恒压运行1 h；

（6）转膜运行结束后，取出PVDF膜，放入装有1×TBST的盒子中，将盒子放至低速摇床上，以60 rpm的转速洗涤5 min，重复三次；

（7）将PVDF膜放入现配的封闭液中，放至低速摇床上，以60 rpm的转速封闭1 h；封闭完成后，用1×TBST在低速摇床上以60 rpm的转速洗涤5 min，洗涤三次；

（8）将PVDF膜洗涤后用实验所需的稀释后的一抗进行孵育，放至4℃摇床进行过

中国知网 https://www.cnki.net

夜孵育，孵育完成后用1×TBST在低速摇床上以60 rpm的转速洗涤7 min，洗涤三次；

（9）将PVDF膜洗涤后用稀释后的二抗进行孵育，放至低速摇床以60 rpm孵育1 h，孵育后用1×TBST在低速摇床上以60 rpm的转速洗涤5 min，洗涤三次；

（10）将PVDF膜洗涤后置于避光的盒子里，添加显影液，浸泡2 min后用凝胶成像仪进行显影成像，用Image Lab软件对条带处理分析，用Image J软件进行条带的量化处理。

2.3.10 HUC-MSCs 的分离

（1）取 20 cm 左右的脐带，两头结扎，放入无菌瓶里，放入冰盒；

（2）放入含有 1%双抗的 PBS 中，清洗两遍；

（3）将结扎处 2 cm 剪去，放入含有 1%双抗的 PBS 里，清洗两遍；

（4）将脐带剪成 2-3 cm 的小段，放入含有 1%双抗的 D-Hanks 溶液中清洗；

（5）沿着静脉血管剪开，去除血管内皮；

（6）沿动脉血管纵向撕开华通氏胶，收集华通氏胶；

（7）将华通氏胶组织剪碎，放入培养瓶中进行培养；

（8）4 h 后补液，静置 72 h 后换液；

（9）每 3 天换液一次，并用倒置显微镜观察细胞爬出情况。

2.3.11 流式细胞仪鉴定 MSCs 表面标志物

（1）取第三代的 MSCs，吸弃培养基，用 PBS 清洗并用胰酶消化后，离心弃上清，用 5%BSA 溶液重悬，用血球计数板进行细胞计数；

（2）用 5%BSA 溶液稀释细胞悬液后分装 100 μL 至无菌的 1.5 mL EP 管中，使每个 EP 管中含有 5×10^5-5×10^6 个细胞；

（3）4℃，5000rpm 转速条件下离心 3 min，离心完成后吸弃上清，加入 100μL 5%BSA 溶液重悬细胞沉淀，按表面标志物抗体使用说明书加入抗体；

（4）置于避光的 4℃冰箱中孵育 1 h，孵育完成后以 4℃，5000rpm 转速条件下离心 3 min，吸弃上清；

（5）用 200 μL 5%BSA 溶液重悬洗涤细胞沉淀，以 4℃，5000rpm 转速条件下离

中国知网 https://www.cnki.net

心 3 min，吸弃上清；

（6）用 300 μL 5%BSA 溶液重悬混匀细胞沉淀，放至流式细胞仪进行上机检测；

（7）检测完成后用 CytExpert 软件分析表面标志物抗体的表达量。

2.3.12 MSCs 成骨成脂分化诱导检测

（1）取第四代的MSCs，细胞密度生长至90%时，吸弃旧培养基，更换为成骨成脂分化培养基；

（2）每两天更换一次成骨成脂分化培养基，分化培养21 day；

（3）分化培养结束后，吸弃培养基，用PBS洗涤细胞两次，加入4%中性多聚甲醛溶液固定细胞20 min；

（4）固定结束后，吸弃固定液，用PBS洗涤细胞两次；成脂分化诱导检测：加入油红O染色试剂染色15 min，吸弃油红O染色试剂，用PBS洗涤细胞三次，在倒置显微镜下观察成脂分化结果并拍照记录；成骨分化诱导检测：加入茜素红S染色试剂染色15 min，吸弃茜素红S染色试剂，用PBS洗涤细胞三次，在倒置显微镜下观察成骨分化结果并拍照记录。

2.3.13 透射电子显微镜观察 MSC-EVs

（1）将重悬于PBS的MSC-EVs悬液与4%PFA试剂等量混合；

（2）将（1）中混合好的悬液取10 μL滴加至封口膜上，将Formvar-carbon载样铜网的Formvar膜面朝下放在悬液上孵育5 min；

（3）吸取100 μL PBS加至封口膜上，将（2）中孵育有MSC-EVs悬液的载样铜网的Formvar膜面放在PBS液滴上清洗1 min，洗涤三次；

（4）吸取50 μL 1%戊二醛加至封口膜上，将（3）中洗涤后的载样铜网的Formvar膜面放在1% 戊二醛上孵育5 min；

（5）吸取100 μL ddH_2O加至封口膜上，将（4）中孵育后的载样铜网的Formvar膜面放在ddH_2O上清洗2 min，洗涤8次；

（6）将（5）中洗涤后的载样铜网的Formvar膜面放在50 μL草酸双氧铀上孵育75 min；

（7）将（6）中孵育后的载样铜网的Formvar膜面放在50 μL甲基纤维素上孵育10 min，

中国知网 https://www.cnki.net

此步骤需要在冰上操作；

（8）将（7）中孵育后的载样铜网放至样品台顶端的不锈钢环上，用滤纸吸去多余液体，在空气中干燥10 min；

（9）将载样铜网放至透射电子显微镜的样品口中，在80KV恒压条件下进行观察并拍照记录。

2.3.14 纳米颗粒追踪分析技术检测 MSC-EVs

（1）用超纯水清洗纳米颗粒追踪分析仪的样本池；

（2）使用纳米颗粒追踪分析仪以聚苯乙烯微球（110 nm）进行校准；

（3）用PBS清洗样本池；

（4）将重悬于PBS的MSC-EVs吸至样本池，进样检测；

（5）检测结果用ZetaView软件分析处理结果。

2.3.15 莫里斯水迷宫行为学检测

（1）莫里斯水迷宫仪器中加入适量的水，将水温控制在25±1℃；

（2）实验前将小鼠带入莫里斯水迷宫仪器所在的实验室中熟悉环境；

（3）实验开始前设置好与莫里斯水迷宫仪器连接的自动采集和软件分析系统，该系统主要部件包含摄像机、计算机和图像采集卡等，摄像机能够采集小鼠在莫里斯水迷宫仪器中的游泳图像轨迹输入到计算机中的图像采集卡进行模/数转换储存于硬盘中，软件分析系统能自动采集动物的入水位置、游泳速率、寻找隐藏平台的时间、游泳轨迹等参数；

（4）定位巡航实验：该实验将小鼠头部朝着墙壁依次放入莫里斯水迷宫仪器的四个象限，记录小鼠寻找隐藏站台的时间（潜伏期）以及行动轨迹，若动物在60 s内登上隐藏站台，则结束并将时间记录为潜伏期时间，若小鼠在60 s内未登上隐藏站台，则用木棍引导小鼠登上隐藏站台并停留30 s，每只小鼠每天训练4次，训练天数为5天，记录每次实验小鼠的潜伏期以及游泳轨迹；

（5）小鼠实验结束后需用干毛巾擦拭，必要时使用电吹风吹干；

（6）空间探索实验：定位巡航实验结束24 h后，将隐藏站台撤除，任选一相同入水

中国知网 https://www.cnki.net

点将小鼠头部朝着墙壁放入莫里斯水迷宫仪器中，记录每只小鼠60 s内的游泳轨迹、穿越原站台的次数、在原站台象限停留的时间、在原站台象限的游泳路程。

2.3.16 统计分析

利用GraphPad Prism 5.0软件对实验结果数据进行统计学分析汇总，实验所得数据以平均数±标准误（Mean±SEM）的形式表示。设定$p < 0.05$具有显著统计学差异；$p < 0.01$具有非常显著统计学差异；$p < 0.001$具有极显著统计学差异。

中国知网 https://www.cnki.net

第三章　实验结果与讨论

3.1　人脐带来源间充质干细胞的分离以及间充质干细胞的鉴定

本实验通过从人脐带组织分离人脐带来源的间充质干细胞，具体分离步骤在实验方法中已阐述，并且从湖南丰晖生物科技有限公司购买由湘雅医院实验室分离得到的人脂肪来源的间充质干细胞。使用流式细胞仪鉴定两种间充质干细胞的表面标志物以及使用成骨成脂分化培养鉴定两种间充质干细胞的多向分化潜能，通过流式细胞仪以及成骨成脂分化鉴定这两种细胞是否符合间充质干细胞的标准。

3.1.1　人脐带来源的间充质干细胞的分离

将人脐带组织剪碎后，放入含有培养基的培养瓶中进行贴壁处理，4h 后进行补液，静置 72h 后更换培养基，之后每 2-3 天进行更换培养基。HUC-MSCs 的分离结果如图 3-1 所示，图（a）是人脐带组织贴壁 10-14 天后开始有 HUC-MSCs 爬出；图（b）是人脐带组织贴壁 20 天后爬出较多的 HUC-MSCs；图（c）是将爬出的细胞进行消化传代后的细胞状态图。间充质干细胞的细胞形态与成纤维细胞形态相似，细胞中央有卵圆形核，呈螺旋状生长，从人脐带组织分离的 HUC-MSCs 符合间充质干细胞的形态。

a　　b　　c

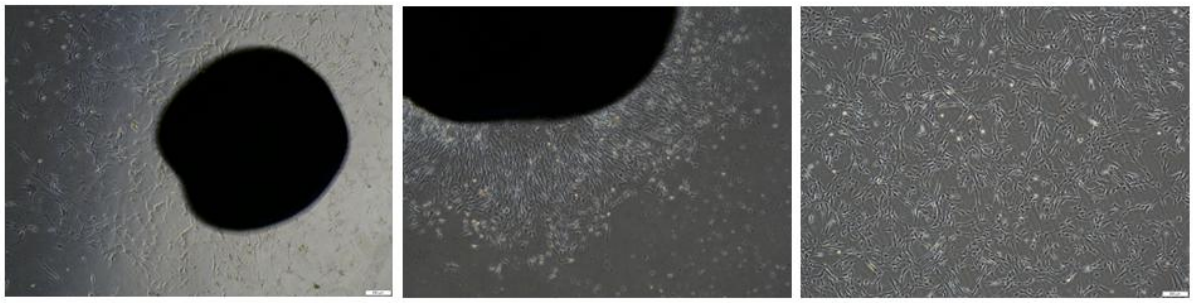


图 3-1　HUC-MSCs 的分离

（a）脐带组织贴壁 10-14 天后 HUC-MSCs 开始爬出（b）脐带组织贴壁 20 天后爬出较多的 HUC-MSCs（c）将爬出的细胞进行消化传代后的细胞状态图

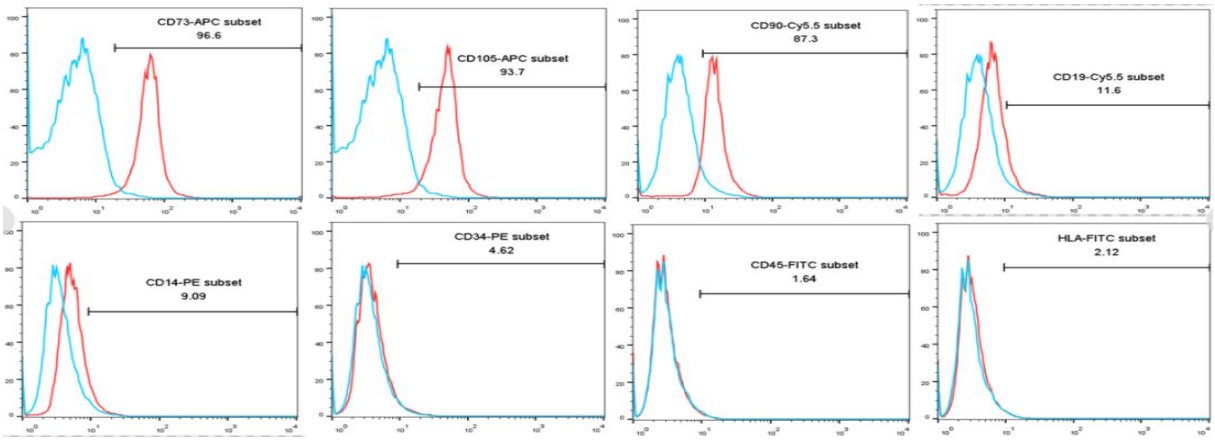
3.1.2　HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 表面标志物的鉴定

用流式细胞仪对 HAD-MSCs 以及 HUC-MSCs 进行细胞表型的检测，FlowJo 结果分析如图 3-2 所示，图(a)的结果表明，以 IGg 为对照，HAD-MSCs 高表达 CD73（96.6%）、

中国知网 https://www.cnki.net

CD105（93.7%）以及 CD90（87.3%），低表达 CD19（11.6%）、CD14（9.09%）、CD34（4.62%）、CD45（1.64%）以及 HLA（2.12%），结果符合 HAD-MSCs 的表型特征；图(b)的结果表明，以 IGg 为对照，HUC-MSCs 高表达 CD105（98.62%）、CD90（81.82%）以及 CD73（94.59%），低表达 CD45（0.06%）以及 CD34（0.20%），结果符合 HUC-MSCs 的表型特征。

a



b

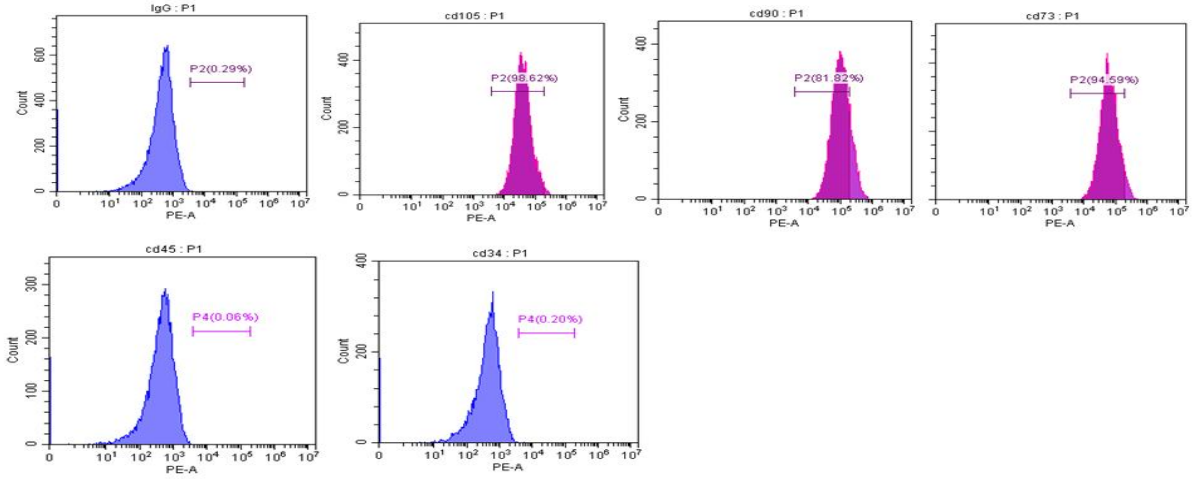


图 3-2　流式细胞仪鉴定 HAD-MSCs 以及 HUC-MSCs

（a）HAD-MSCs 流式鉴定结果，图中蓝色峰为 IGg 对照组，红色峰为实验组，图中百分比代表检测分子的阳性表达率　（b）HUC-MSCs 流式鉴定结果，以 IGg 设置对照后检测目的分子的阳性表达，图中百分比代表检测分子的阳性表达率

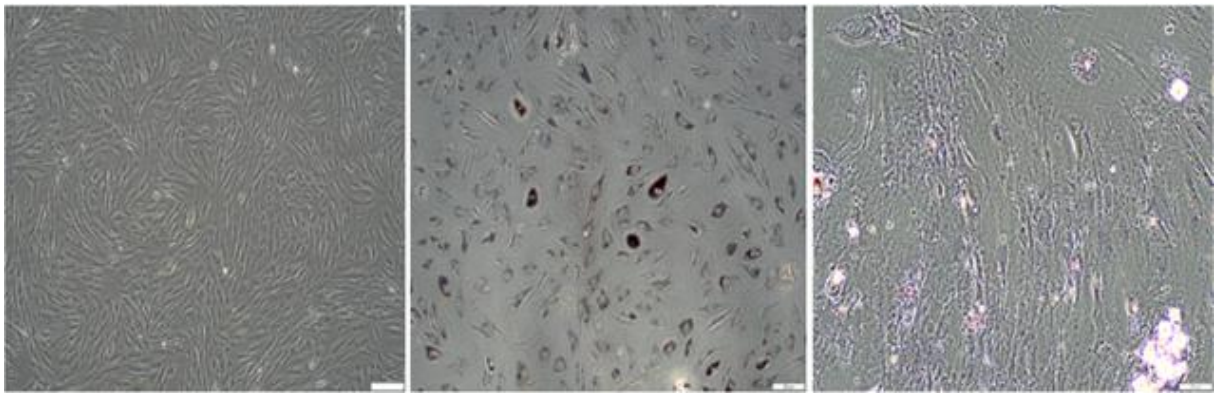
3.1.3　HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 多向分化潜能的鉴定

将第三代的 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 培养至细胞密度达到 80%-90%时，将完全

中国知网　https://www.cnki.net

培养基更换成成骨成脂诱导分化培养基，后续每两天更换一次成骨成脂分化培养基，诱导 3 周后将细胞进行染色，在显微镜下观察拍照记录，结果图 3-3 所示，图（a）从左往右依次为未分化的 HAD-MSCs，HAD-MSCs 成脂诱导 3 周后油红 O 试剂染色，HAD-MSCs 成骨诱导 3 周后茜素红 S 试剂染色。图（b）从左往右依次为未分化的 HUC-MSCs，HUC-MSCs 成脂诱导 3 周后油红 O 试剂染色，HUC-MSCs 成骨诱导 3 周后茜素红 S 试剂染色。在显微镜观察下，经成脂诱导分化培养基诱导后，MSCs 的细胞形态会由长梭形逐渐变成扁圆形，油红 O 试剂染色后，细胞内会出现较小的多个橘红色脂滴；经成骨诱导分化培养基诱导后，在茜素红 S 试剂染色后，细胞中会出现钙结节着色，出现成骨细胞的典型形态，图 3-3 的结果显示，HAD-MSCs 和 HUC-MSCs 均具有分化成脂肪细胞以及骨细胞的潜力。

a



b

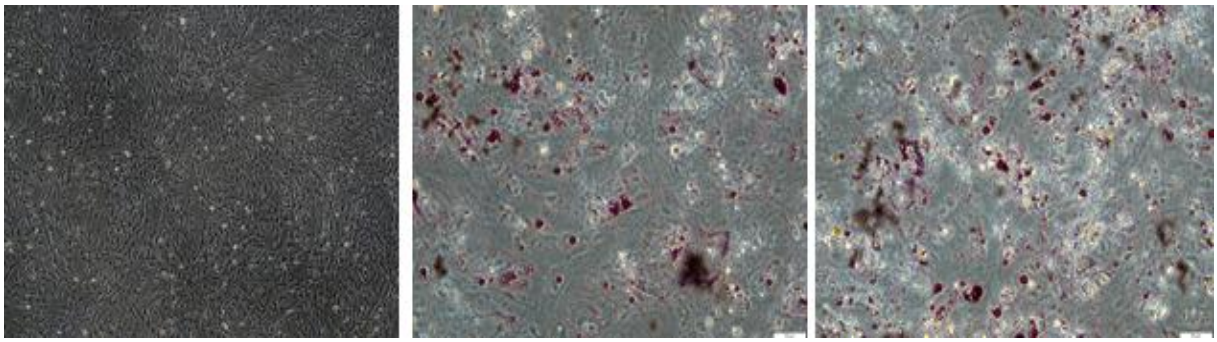


图 3-3　成骨成脂诱导分化结果

（a）从左往右依次为未诱导分化的 HAD-MSCs，HAD-MSCs 成脂诱导 3 周后油红 O 试剂染色图，HAD-MSCs 成骨诱导 3 周后茜素红 S 试剂染色图（b）从左往右依次为未诱导分化的 HUC-MSCs，HUC-MSCs 成脂诱导 3 周后油红 O 试剂染色图，HUC-MSCs 成骨诱导 3 周后茜素红 S 试剂染色图

综上所述，对 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 的流式细胞仪鉴定和成骨成脂分化多向

中国知网 https://www.cnki.net

分化潜能的鉴定的结果表明，本课题使用的 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 符合国际细胞治疗协会制定的关于间充质干细胞应用在基础和临床前研究满足的基本条件，HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 在 3-10 代细胞状态稳定，证明本课题的 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 可以用于研究的后续开展。

3.2 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的分离以及鉴定

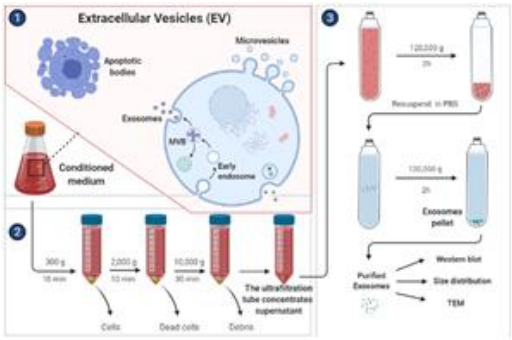
本研究中采用的分离 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的方法是从 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 的条件培养基中通过超高速离心机超高速离心的方法进行分离提取，如图 3-4（a）所示，具体实验步骤在实验方法中已阐述。

根据国际细胞外囊泡协会的规定，细胞外囊泡应分别从蛋白标志物、形态学以及纳米颗粒大小进行鉴定。本课题提取的 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的蛋白标志物鉴定结果如图 3-4（b）所示，通过 Western Blot 方法进行鉴定，以 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 蛋白作为对照，结果显示本课题分离的 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 均能表达 ALIX 与 CD63 这两种细胞外囊泡的标志蛋白。本课题提取的 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的形态学鉴定如图 3-4（c）（d）所示，通过透射电子显微镜进行观察，观察结果显示 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 呈现类圆形，典型的“杯口”状结构，大小主要在 30-150nm 之间，鉴定结果符合细胞外囊泡的形态学鉴定范围。本课题提取的 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的纳米颗粒大小鉴定如图 3-4（e）（f）所示，通过纳米颗粒追踪分析技术显示，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的颗粒大小均约为 100nm，分析结果符合细胞外囊泡的纳米颗粒大小的鉴定范围。

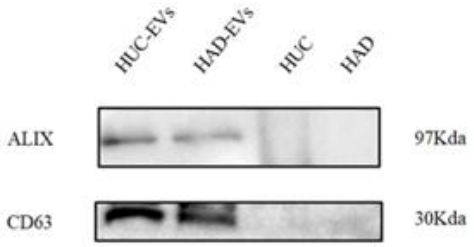
综上所述，通过 Wetern Blot，透射电子显微镜观察以及纳米颗粒追踪技术的鉴定显示，本课题所提取的 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 符合细胞外囊泡的鉴定，可以用于本课题的后续实验研究。

中国知网 https://www.cnki.net

a



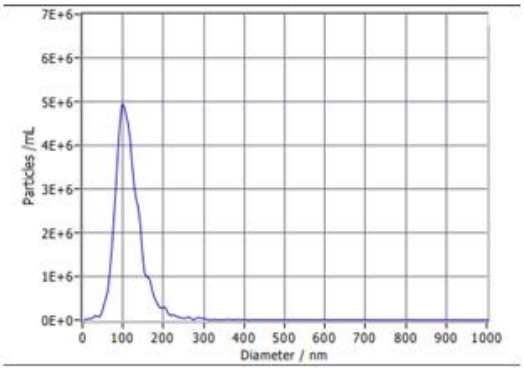
b



c

d

e



f

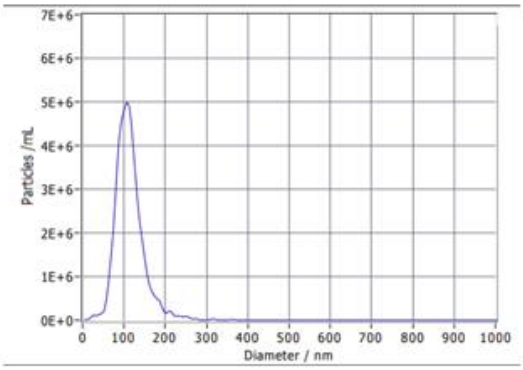


图 3-4 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的分离方法以及鉴定

（a）HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 的分离方法 （b）Western Blot 鉴定 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 标志蛋白 ALIX 和 CD63 （c）透射电子显微镜观察 HAD-MSC-EVs （d）透射电子显微镜观察 HUC-MSC-EVs（e)HAD-MSC-EVs 的纳米颗粒追踪分析结果（f)HUC-MSC-EVs 的纳米颗粒追踪分析结果

中国知网 https://www.cnki.net

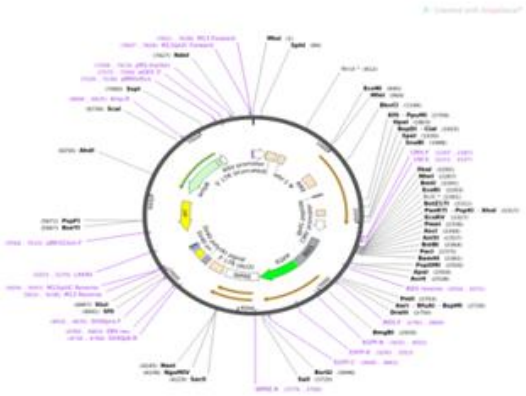
3.3 AD 细胞模型的构建以及鉴定

本课题为研究 MSC-EVs 对 AD 疾病模型的作用效果，因此本课题通过构建体外 AD 细胞模型作为研究对象之一。本课题选择将 AD 主要的致病基因淀粉样前体蛋白（*APP*）转染至 SH-SY5Y 细胞进行过表达处理从而构建体外 AD 细胞模型。

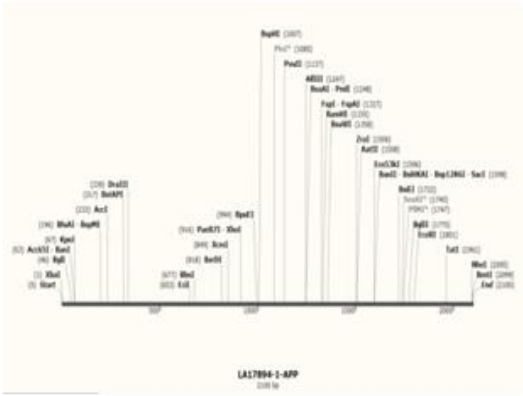
3.3.1 pCIG3-APP 重组质粒的构建以及鉴定

本课题选择 pCIG3 质粒作为连接 *APP* 的载体，pCIG3 质粒自身携带有 GFP 荧光蛋白，方便后续通过荧光显微镜观察重组质粒的转染效率，*APP* 由公司合成，并在两端分别加上 *Xba* I 和 *Bmt*I 酶切位点。实验所选用的 pCIG3 以及 *APP* 基因图谱如图 3-5（a）（b）所示，实验中选择 *Xba* I 和 *Bmt* I 为酶切位点进行双酶切，双酶切后进行 DNA 电泳验证是否酶切成功，电泳结果如图 3-5（c）所示，电泳条带显示双酶切后 pCIG3 以及 *APP* 条带大小符合，证明双酶切成功。双酶切后将 pCIG3 和 *APP* 的目的条带进行胶回收后利用 DNA 连接酶进行连接，连接完成后进行转化至感受态细胞，转化后进行涂板、挑菌、摇菌，收集菌液送往公司进行基因测序，利用 Snap Gene 软件将公司测序结果与 *APP* 基因的 CDS 序列进行比对分析，如图 3-5（d）所示，*APP* 基因的 CDS 序列与 pCIG3-APP 重组质粒上的 *APP* 基因序列完全吻合。上述数据证明 pCIG3-APP 重组质粒构建成功，可用于后续实验。

a



b



中国知网 https://www.cnki.net

c　　d

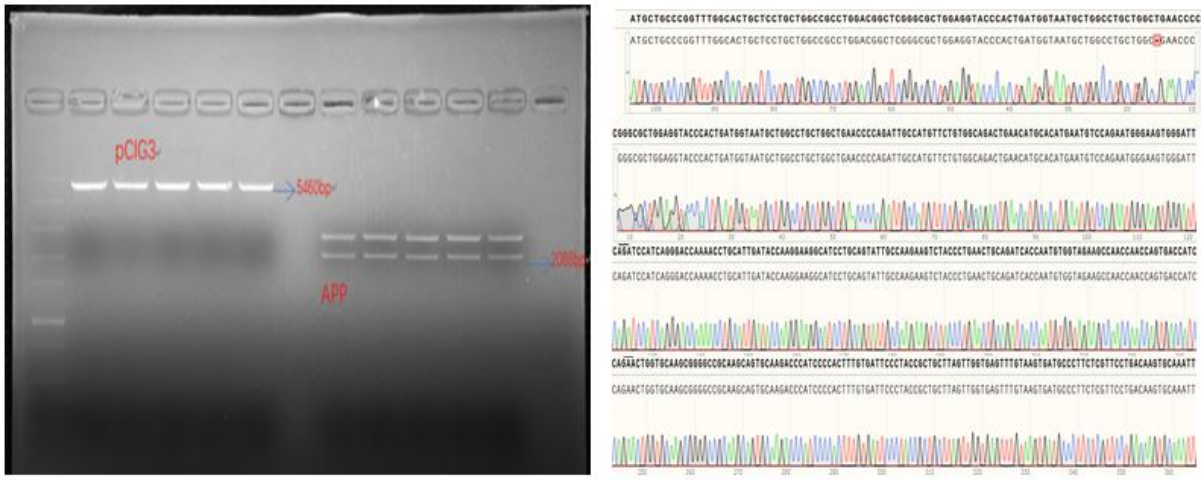


图 3-5　pCIG3-APP 重组质粒的构建

（a）pCIG3 质粒图谱　（b）*APP* 基因图谱　（c）pCIG3 与 *APP* 双酶切后 DNA 电泳图　（d）*APP* 基因的 CDS 序列与 pCIG3-APP 重组质粒比对结果

3.3.2　AD 细胞模型构建以及鉴定

本课题通过脂质体转染法将上述构建好的 pCIG3-APP 重组质粒转染至 SH-SY5Y 细胞系作为实验组（App），并且将未作转染处理的 SH-SY5Y 细胞系作为 Control 组对照，将 pCIG3 质粒载体转染至 SH-SY5Y 细胞系作为空载组（Empty）组对照，转染 24h 后通过荧光显微镜、qRT-PCR 以及 Western Blot 实验方法进行鉴定，结果如图 3-6 所示，图（a）为转染 24h 后 Empty 组与 App 组的荧光显微镜观察图，结果显示 pCIG3 与 pCIG3-APP 重组质粒均能成功转染至 SH-SY5Y 细胞系并且表达。图（b）为通过 qRT-PCR 实验方法检测 *APP* 的基因表达，结果显示 App 组相较于 Control 组和 Empty 组其 *APP* 基因的表达显著上调（$p<0.01$），结果表明 pCIG3-APP 重组质粒转染至 SH-SY5Y 细胞系后 *APP* 基因表达能够显著上调。图（c）为通过 Western Blot 实验方法检测 APP 的蛋白表达的条带图以及量化图，结果显示 App 组相较于 Control 组和 Empty 组其 APP 蛋白的表达显著上调（$p<0.05$）。

综上所述，将构建好的 pCIG3-APP 重组质粒转染至 SH-SY5Y 细胞系后能够使 SH-SY5Y 细胞系在基因以及蛋白水平上高表达 AD 最为显著的致病基因 *APP*，从而达到构建了体外 AD 细胞模型用于后续实验研究。

中国知网　https://www.cnki.net

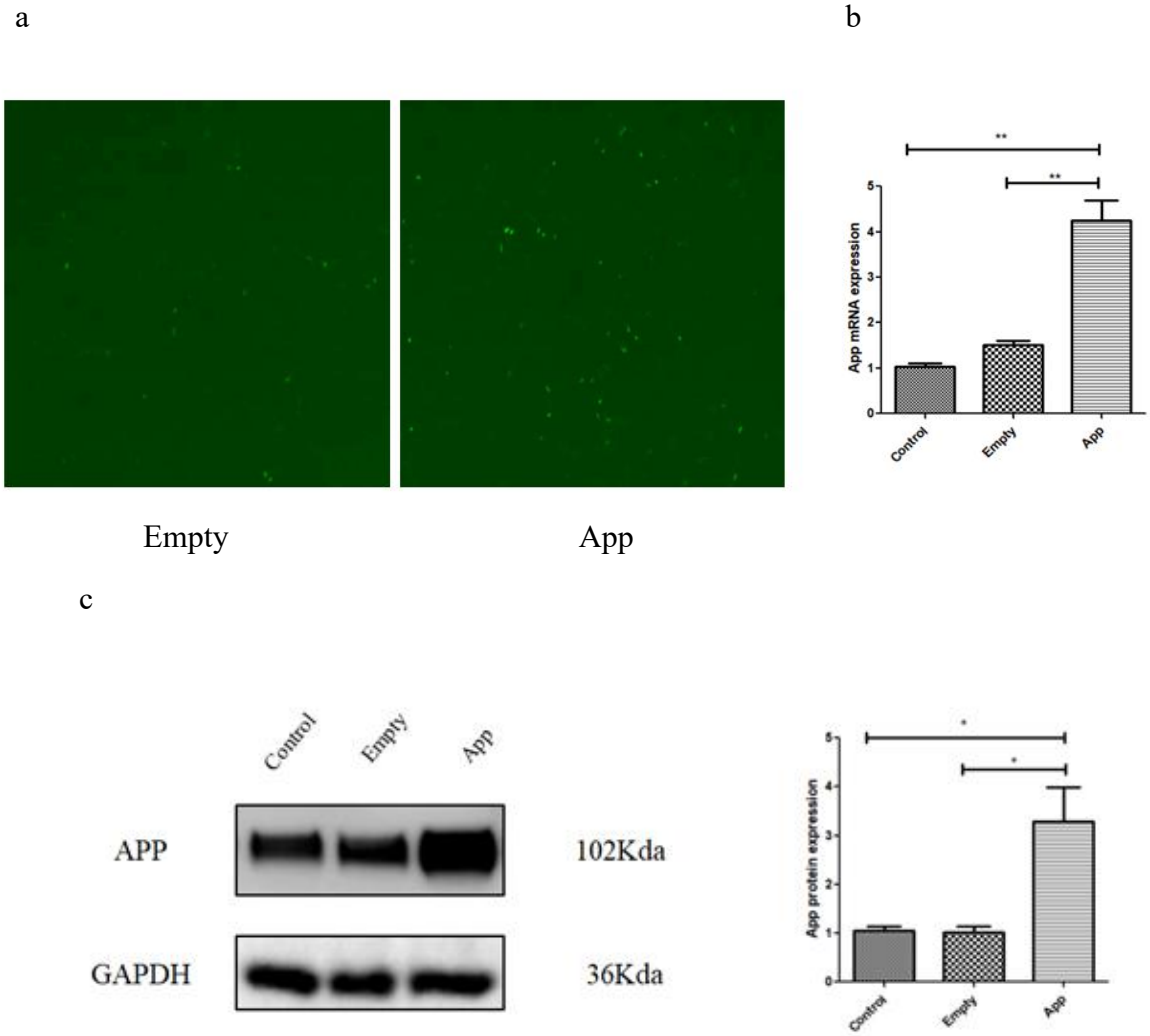


图 3-6　AD 细胞模型的构建以及鉴定

（a）Empty 组与 App 组转染 24h 后荧光显微镜观察图 （b）qRT-PCR 实验检测 *APP* 基因表达的变化 （c）Western Blot 实验检测 *APP* 蛋白表达变化的条带图以及量化图

（Mean±SEM，n=3，$*p < 0.05$，$**p < 0.01$）

3.4　HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能通过调节 α-分泌酶以及 β-分泌酶减少 AD 细胞模型中 *APP* 的表达

AD 的主要病理标志是 Aβ 斑块在脑内沉积，Aβ 斑块的沉积会导致患者脑部损伤，并引起一系列炎症反应导致细胞死亡。患者脑部 α-分泌酶表达下调， β-分泌酶上调从而导致 *APP* 蛋白被连续酶解从而导致 Aβ 斑块的产生以及沉积，ADAM10 和 BACE1 分别为 α-分泌酶和 β-分泌酶的标志基因。为了探究 MSCs 能否通过调节 α-分泌酶以

中国知网 https://www.cnki.net

及β-分泌酶减少AD体外细胞模型*APP*的表达，本课题利用HAD-MSCs与HUC-MSCs对AD体外细胞模型进行共培养处理，利用HAD-MSC-EVs与HUC-MSC-EVs对AD体外细胞模型进行处理进行实验研究。

3.4.1 HAD-MSCs与HUC-MSCs对AD体外细胞模型共培养处理后*APP*表达的变化

采用细胞小室将HAD-MSCs和HUC-MSCs与AD细胞模型进行共培养处理，小室内称为上室，培养皿内称为下室，上下层培养基以聚碳酸酯膜相隔，将HAD-MSCs和HUC-MSCs铺在上室培养，将AD细胞模型铺在下室培养，由于聚碳酸酯膜具有通透性，上室培养基的成分可以影响下室内的细胞，因此HAD-MSCs与HUC-MSCs分泌的成分可以影响下室内的AD细胞模型。将与HAD-MSCs共培养处理24 h后的AD细胞模型作为HAD-co-culture处理组，与HUC-MSCs共培养处理24 h后的AD细胞模型作为HUC-co-culture处理组，将未处理的AD细胞模型作为Control组，分别提取Control组、HAD-co-culture处理组、HUC-co-culture处理组细胞的RNA以及蛋白质，利用qRT-PCR和Western Blot方法检测α-分泌酶和β-分泌酶标志基因和蛋白的表达量变化以及*APP*基因和蛋白的表达量变化，结果如图3-7所示，图（a）结果为通过qRT-PCR实验检测Control组、HAD-co-culture处理组、HUC-co-culture处理组细胞中*ADAM10*，*BACE1*以及*APP*基因在mRNA水平上的表达，结果显示与Control组相比HAD-co-culture处理组、HUC-co-culture处理组细胞中的*ADAM10*在mRNA水平上有上调的趋势，*BACE1*在mRNA水平上有下调的趋势，*APP*在mRNA水平上有下调的趋势，但均无显著性差异。图（b）结果为通过Western Blot 实验检测Control组、HAD-co-culture处理组、HUC-co-culture处理组细胞中ADAM10蛋白表达量的变化，结果显示与Control组相比，HAD-co-culture处理组和HUC-co-culture处理组细胞中的ADAM10蛋白的表达有上调的趋势，但无显著性差异。图（c）结果为通过Western Blot实验检测Control组、HAD-co-culture处理组、HUC-co-culture处理组细胞中BACE1蛋白表达量的变化，结果显示与Control组相比，HAD-co-culture处理组和HUC-co-culture处理组细胞中的BACE1蛋白的表达有下调的趋势，但无显著性差异。图（d）的结果为通过Western Blot 实验检测Control组、HAD-co-culture处理组、

中国知网 https://www.cnki.net

HUC-co-culture 处理组细胞中 APP 蛋白表达量的变化，结果显示与 Control 组相比，HAD-co-culture 处理组和 HUC-co-culture 处理组细胞中的 APP 蛋白的表达有下调的趋势，但无显著性差异。

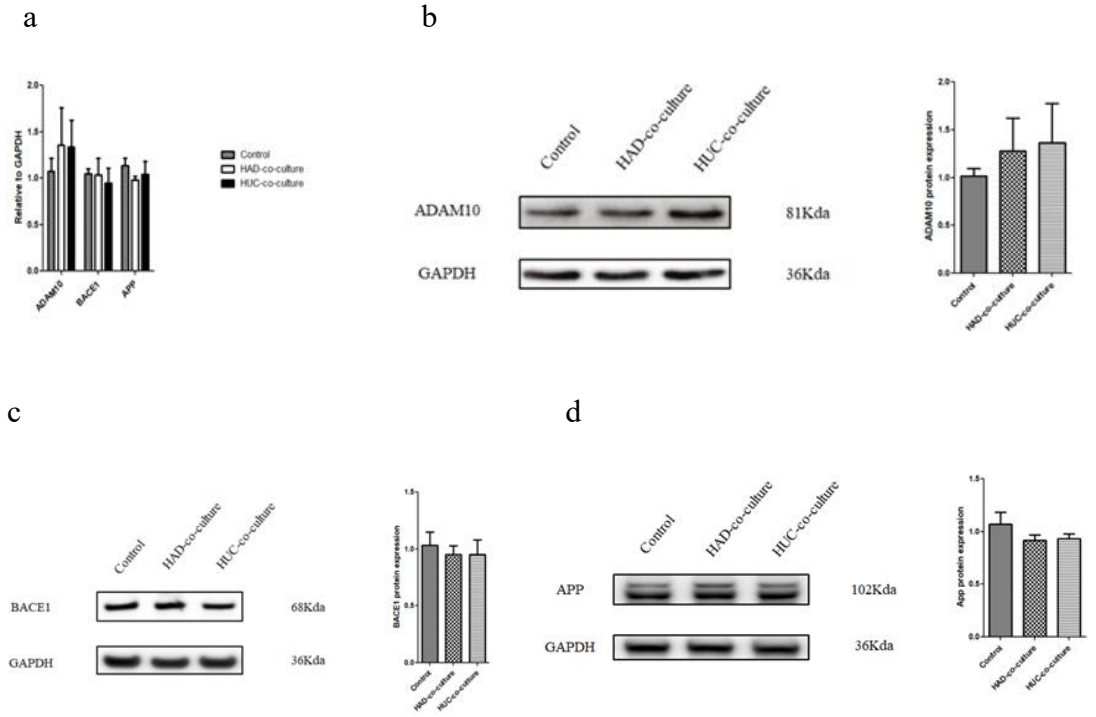


图 3-7　HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 对 AD 细胞模型共培养处理后 ADAM10、BACE1 以及 APP 基因和蛋白表达的变化

（a）qRT-PCR 实验检测 *ADAM10*、*BACE1*、*APP* 在 mRNA 水平的表达量 （b）Western Blot 检测 ADAM10 的蛋白水平表达的条带图以及量化图 （c）Western Blot 检测 BACE1 的蛋白水平表达的条带图以及量化图 （d）Western Blot 检测 APP 的蛋白水平表达的条带图以及量化图（Mean±SEM，n=3）

3.4.2　HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型后 *APP* 表达的变化

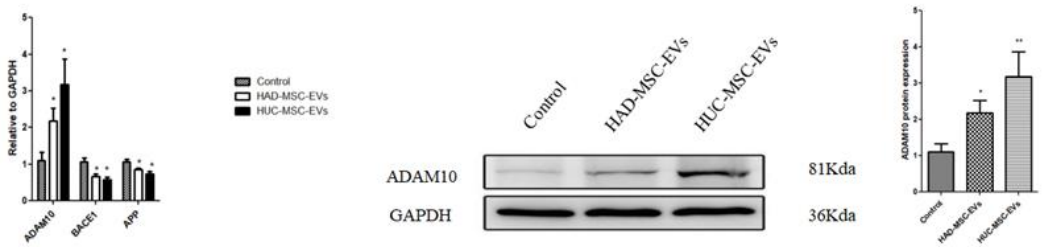
为了探究 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能否通过调节 α -分泌酶以及 β -分泌酶减少 AD 细胞模型中 APP 的表达，通过超速离心法分离出 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 后通过 BCA 法进行对 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 浓度测定，分别取定量 10 μg HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理铺在 6 孔板上的 AD 细胞模型，将 HAD-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型 24h 后作为 HAD-MSC-EVs 实验组，将 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型 24h 后作为 HUC-MSC-EVs 实验组，将未作处理的

中国知网 https://www.cnki.net

AD 细胞模型作为 Control 对照组，分别提取 Control 组、HAD-MSC-EVs 实验组以及 HUC-MSC-EVs 实验组细胞的 RNA 和蛋白质，利用 qRT-PCR 和 Western Blot 方法检测 α-分泌酶和 β-分泌酶标志基因和蛋白的表达量变化以及 *APP* 基因和蛋白的表达量变化，结果如图 3-8 所示，图（a）结果为通过 qRT-PCR 实验检测 Control 组、HAD-MSC-EVs 实验组以及 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中 *ADAM10*，*BACE1* 以及 *APP* 基因在 mRNA 水平上的表达，结果显示与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 *ADAM10* 在 mRNA 水平上显著上调（$p<0.05$），*BACE1* 在 mRNA 水平上显著下调（$p<0.05$），*APP* 在 mRNA 水平上显著下调（$p<0.05$）。图（b）结果为通过 Western Blot 实验检测 Control 组、HAD-MSC-EVs 实验组、HUC-MSC-EVs 实验组细胞中 ADAM10 蛋白表达量的变化，结果显示与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 ADAM10 蛋白的表达量显著上调（$p<0.05$）。图（c）为通过 Western Blot 实验检测 Control 组、HAD-MSC-EVs 实验组、HUC-MSC-EVs 实验组细胞中 BACE1 蛋白表达量的变化，结果显示与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 BACE1 蛋白的表达量显著下调（$p<0.05$）。图（d）为通过 Western Blot 实验检测 Control 组、HAD-MSC-EVs 实验组、HUC-MSC-EVs 实验组细胞中 APP 蛋白表达量的变化，结果显示与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 APP 蛋白的表达量显著下调（$p<0.05$）。

综上所述，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能通过上调 α-分泌酶的表达以及下调 β-分泌酶的表达从而减少 AD 细胞模型中 APP 的表达。

a b



中国知网 https://www.cnki.net

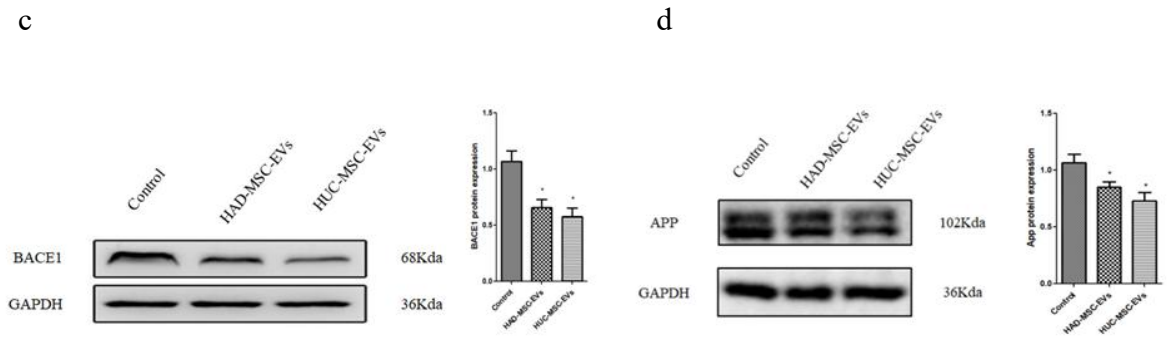


图 3-8　HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型后 ADAM10、BACE1 以及 APP 基因和蛋白表达的变化

（a）qRT-PCR 实验检测 *ADAM10*、*BACE1*、*APP* 在 mRNA 水平的表达量 （b）Western Blot 检测 ADAM10 的蛋白水平表达的条带图以及量化图 （c）Western Blot 检测 BACE1 的蛋白水平表达的条带图以及量化图 （d）Western Blot 检测 APP 的蛋白水平表达的条带图以及量化图

（Mean±SEM，n=3，$*p < 0.05$，$**p < 0.01$）

3.5　HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型后可以减少炎性基因的表达

AD 患者脑部 Aβ 斑块沉积会导致一系列炎症反应，炎性基因的表达会升高，从而导致患者脑部细胞的死亡。为了探究 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能否减少 AD 细胞模型中炎性基因的表达从而达到减少炎症反应，本课题筛选了 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 *HO-1* 四个在 AD 患者脑部中表达较高的炎性基因，将 HAD-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型 24h 后作为 HAD-MSC-EVs 实验组，将 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型 24h 后作为 HUC-MSC-EVs 实验组，将未作处理的 AD 细胞模型作为 Control 对照组，分别提取 Control 组、HAD-MSC-EVs 实验组以及 HUC-MSC-EVs 实验组细胞的 RNA，利用 qRT-PCR 实验方法检测 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 *HO-1* 四个炎性基因表达的变化，结果如图 3-9 所示，图（a）结果为与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs 实验组中细胞的 IL-6 基因表达水平显著下调（$p<0.001$）。图（b）结果为与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs 实验组中细胞的 TNF-α 基因表达水平显著下调（$p<0.05$）。图（c）结果为与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs 实验组中细胞的 IL-1β 基因表达水平显著下调（$p<0.05$）。图（d）结果为与 Control 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs

中国知网 https://www.cnki.net

实验组中细胞的 HO-1 基因表达水平显著下调（$p<0.01$）。

综上所述，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型后能减少炎性基因 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 *HO-1* 的表达。

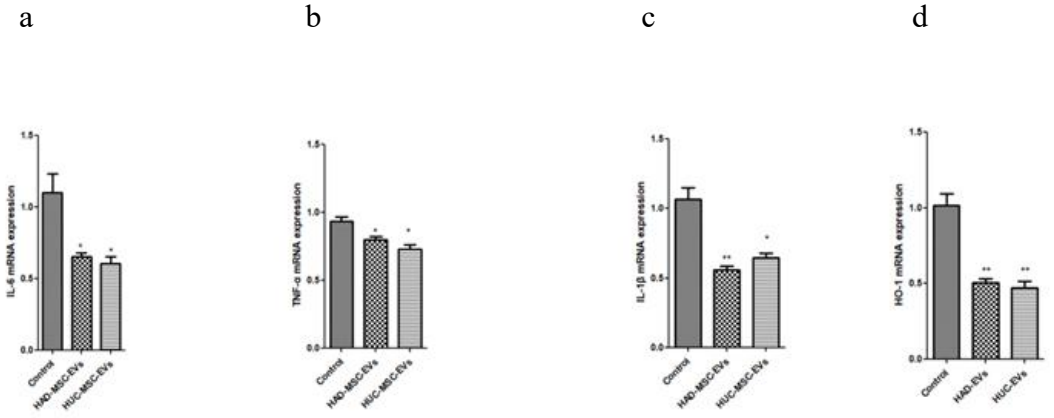


图 3-9 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型后炎性基因表达的变化（a）qRT-PCR 实验检测 *IL-6* 基因表达水平 （b）qRT-PCR 实验检测 *TNF-α* 基因表达水平 （c）qRT-PCR 实验检测 *IL-1β* 基因表达水平 （d）qRT-PCR 实验检测 *HO-1* 基因表达水平（Mean±SEM，n=3，$*p<0.05$，$**p<0.01$）

3.6 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 *APP/PSEN* 小鼠后可以改善其空间记忆能力

本课题为了探究 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能否改善 AD 小鼠模型空间记忆能力，从南京君科生物公司购买了 *APP/PSEN* 小鼠，*APP/PSEN* 小鼠是可以表达突变的人类早老素（*PSEN*）和淀粉样前体蛋白（*APP*）的双转基因小鼠，在 6 个月大时脑内开始出现 Aβ 斑块，因此 *APP/PSEN* 小鼠可用来作为 AD 小鼠疾病模型作为研究。

莫里斯水迷宫实验是强迫小鼠游泳去寻找隐藏在水中平台的实验，主要应用于测试实验动物空间记忆能力的研究，在 AD 研究中的应用非常普遍，本课题通过尾静脉注射方式将 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 分别注射至 9 个月大的 *APP/PSEN* 小鼠，分别作为 HAD-MSC-EVs 实验组以及 HUC-MSC-EVs 实验组，以相同背景的 9 个月大的 C57BL/6J 野生型正常小鼠作为 WT 组进行对照，以通过尾静脉注射方式注射生理盐水至 9 个月大的 *APP/PSEN* 小鼠作为 NS 组进行对照。莫里斯水迷宫实验的具体实验步骤在实验方法中已经阐述。实验结果如图 3-10 所示，图（a）结果为 WT 组、NS 组、HAD-MSC-EVs 组、HUC-MSC-EVs 组小鼠莫里斯水迷宫实验的代表性游泳路径。

中国知网 https://www.cnki.net

图（b）的结果为 WT 组、NS 组、HAD-MSC-EVs 组、HUC-MSC-EVs 组连续五天莫里斯水迷宫实验的潜伏期数据，潜伏期是指小鼠在水中寻找到隐藏平台的时间并且是莫里斯水迷宫实验的一个重要参照指标，潜伏期的时间长短代表着小鼠空间学习记忆能力的好坏，潜伏期越短预示着小鼠的学习记忆能力越好。从图（b）结果可以看出，相较于 NS 组，HUC-MSC-EVs 实验组的潜伏期在第 3 天开始下降，并且有显著性差异（$p < 0.05$），HAD-MSC-EVs 实验组的潜伏期在第 4 天开始下降，并且有显著性差异（$p < 0.05$）。图（c）的结果为寻找隐藏平台实验结束后将隐藏平台撤离，观察 WT 组、NS 组、HAD-MSC-EVs 组、HUC-MSC-EVs 组小鼠在 60s 内穿越原隐藏平台所在位置的次数，穿越平台次数越多说明小鼠对于隐藏平台位置记忆能力越好，也说明其空间学习记忆能力越好。图（c）的结果可以看出，相较于 NS 组，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 穿越平台次数更多，并且有显著性差异（$p < 0.05$）。图（d）的结果为寻找隐藏平台实验结束后将隐藏平台撤离，观察 WT 组、NS 组、HAD-MSC-EVs 组、HUC-MSC-EVs 组小鼠在 60s 内在原隐藏平台所在位置以及附近的时间占比，小鼠游泳有绕边性和边缘性，原隐藏站台是远离周边靠近水池中心的，因此小鼠在水池中心的活动时间占比越长其空间记忆能力越好。图（d）的结果可以看出，相较于 NS 组，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 组小鼠在平台及附近的活动时间占比更长，并且具有显著性差异（$p < 0.05$）。图（e）的结果为寻找隐藏平台实验结束后将隐藏平台撤离，观察 WT 组、NS 组、HAD-MSC-EVs 组、HUC-MSC-EVs 组小鼠在 60s 内在原平台及附近活动距离与总路程距离的占比，小鼠的在原平台及附近的活动距离占比越大其空间记忆能力越好。图（e）的结果可以看出，相较于 NS 组，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 组小鼠在平台及附近的活动距离占比更长，并且具有显著性差异（$p < 0.05$）。

综上所述，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 通过尾静脉注射方式注射至 AD 小鼠模型体内后，可以改善 AD 小鼠模型的空间学习记忆能力。

中国知网 https://www.cnki.net

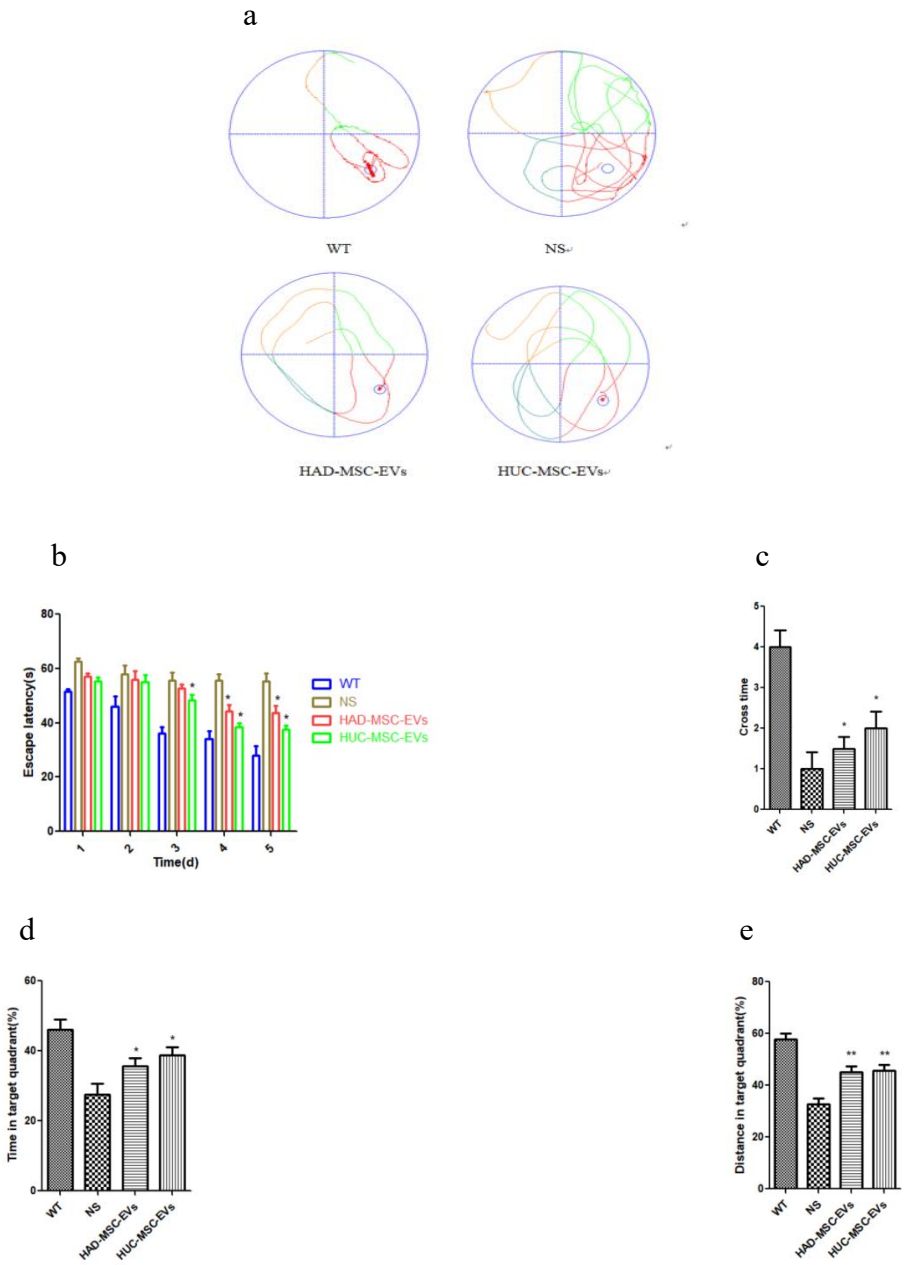


图 3-10 莫里斯水迷宫实验检测 WT 组、NS 组、HAD-MSC-EVs 组、HUC-MSC-EVs 组的空间学习记忆能力

（a）小鼠莫里斯水迷宫实验的代表性游泳路径 （b）小鼠潜伏期数据 （c）撤离隐藏平台后小鼠穿越原平台的次数 （d）撤离隐藏平台后小鼠在原平台象限的时间占比 （e）撤离隐藏平台后小鼠在原平台及附近的活动距离占比

（Mean±SEM，n=5，$*p<0.05$，$**p<0.01$）

3.7 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 *APP/PSEN* 小鼠后可以通过调节 α-分泌酶以及 β-分泌酶减少 *APP* 的表达

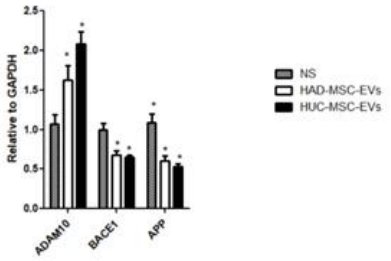
本课题将上述完成莫里斯水迷宫行为学检测实验后的小鼠处死并且提取小鼠脑部

中国知网 https://www.cnki.net

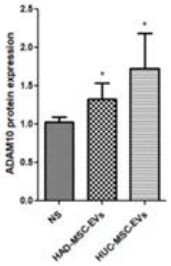
海马体的 RNA 以及蛋白质，利用 qRT-PCR 和 Western Blot 方法检测α-分泌酶和β-分泌酶标志基因和蛋白的表达量变化以及 *APP* 基因和蛋白的表达量变化。结果如图 3-11 所示，图（a）结果为通过 qRT-PCR 实验检测 NS 组、HAD-MSC-EVs 实验组以及 HUC-MSC-EVs 实验组小鼠海马体中 *ADAM10*，*BACE1* 以及 *APP* 基因在 mRNA 水平上的表达，结果显示与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 *ADAM10* 在 mRNA 水平上显著上调（$p<0.05$），*BACE1* 在 mRNA 水平上显著下调（$p<0.05$），*APP* 在 mRNA 水平上显著下调（$p<0.05$）。图（b）结果为通过 Western Blot 实验检测 NS 组、HAD-MSC-EVs 实验组、HUC-MSC-EVs 实验组细胞中 ADAM10 蛋白表达量的变化，结果显示与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 ADAM10 蛋白的表达量显著上调（$p<0.05$）。图（c）结果为通过 Western Blot 实验检测 NS 组、HAD-MSC-EVs 实验组、HUC-MSC-EVs 实验组细胞中 BACE1 蛋白表达量的变化，结果显示与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 BACE1 蛋白的表达量显著下调（$p<0.05$）。图（d）结果为通过 Western Blot 实验检测 NS 组、HAD-MSC-EVs 实验组、HUC-MSC-EVs 实验组细胞中 APP 蛋白表达量的变化，结果显示与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组和 HUC-MSC-EVs 实验组细胞中的 APP 蛋白的表达量显著下调（$p<0.05$）。

综上所述，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 能通过上调α-分泌酶的表达以及下调β-分泌酶的表达从而减少 AD 小鼠模型大脑海马体中 APP 的表达。

a



b



中国知网 https://www.cnki.net

c d

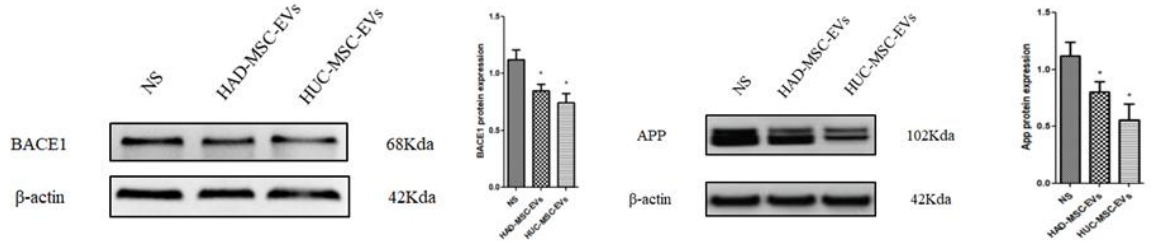


图 3-11 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞小鼠模型后大脑海马体内的 ADAM10、BACE1 以及 APP 基因和蛋白表达的变化

（a）qRT-PCR 实验检测 *ADAM10*、*BACE1*、*APP* 在 mRNA 水平的表达量 （b）Western Blot 检测 ADAM10 的蛋白水平表达的条带图以及量化图 （c）Western Blot 检测 BACE1 的蛋白水平表达的条带图以及量化图 （d）Western Blot 检测 APP 的蛋白水平表达的条带图以及量化图

（Mean±SEM，n=3，$*p < 0.05$，$**p < 0.01$）

3.8 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 *APP/PSEN* 小鼠后可以减少大脑内炎性基因的表达

本课题已经探究了 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 体外细胞模型后可以减少 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 *HO-1* 炎性基因的表达，为探究体内小鼠模型的实验结果是否一致，利用 qRT-PCR 实验方法检测 NS 组、HAD-MSC-EVs 组、HUC-MSC-EVs 组小鼠大脑海马体内 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 *HO-1* 四个炎性基因表达的变化。结果如图 3-12 所示，图（a）结果为与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs 实验组中小鼠大脑海马体内的 *IL-6* 基因表达水平显著下调（$p<0.01$）。图（b）结果为与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs 实验组中小鼠大脑海马体内的 *TNF-α* 基因表达水平显著下调（$p<0.01$）。图（c）结果为与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs 实验组中小鼠大脑海马体内的 *IL-1β* 基因表达水平显著下调（$p<0.01$）。图（d）结果为与 NS 组相比，HAD-MSC-EVs 实验组与 HUC-MSC-EVs 实验组中小鼠大脑海马体内的 *HO-1* 基因表达水平显著下调（$p<0.01$）。

综上所述，HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 小鼠模型后能减少炎性基因 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 HO-1 的表达。

中国知网 https://www.cnki.net

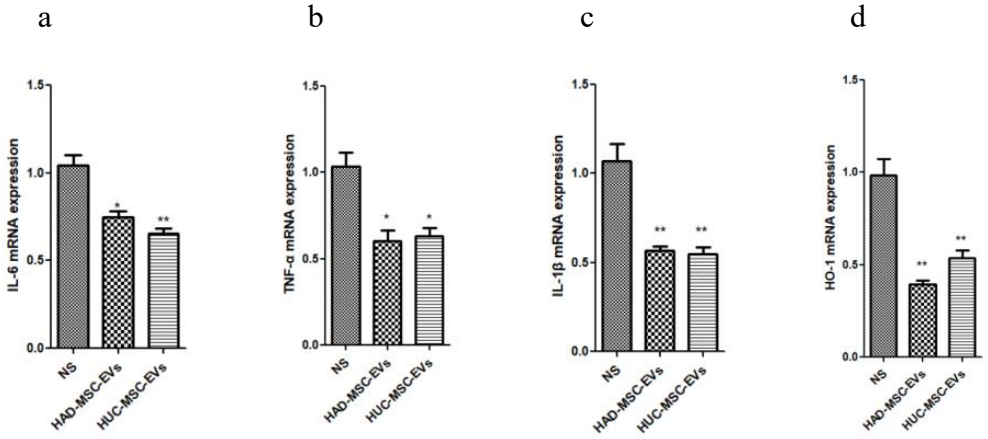


图 3-12　HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 小鼠模型后大脑海马体内炎性基因表达的变化

（a）qRT-PCR 实验检测 *IL-6* 基因表达水平　（b）qRT-PCR 实验检测 *TNF-α* 基因表达水平　（c）qRT-PCR 实验检测 *IL-1β* 基因表达水平　（d）qRT-PCR 实验检测 *HO-1* 基因表达水平

（Mean±SEM，n=3，$*p < 0.05$，$**p < 0.01$）

3.9　讨论

目前对于 AD 的研究已取得了很大的进展，但是 AD 的治疗方法以及治疗药物在临床上仍旧没有统一的标准，目前用于治疗 AD 的药物的治疗效果也不佳，因此探索 AD 的治疗方式至关重要。APP 是 AD 的病理蛋白，其受到 α-分泌酶以及 β-分泌酶的调控[65]，在 AD 患者的脑中，α-分泌酶以及 β-分泌酶失调致使 APP 过度表达导致 Aβ 斑块在脑内沉积，从而引起一系列病理反应，针对调控 α-分泌酶以及 β-分泌酶表达的方式是目前比较可行的一种治疗方法[66]。

MSCs 因其旁分泌功能以及免疫调节潜力大并且容易从各种来源获得（例如骨髓、脂肪、脐带组织等）而被用于疾病治疗方面的研究[67]。在目前的研究中，基于 MSCs 的治疗在神经系统疾病的不同动物模型中显示出有益的作用效果，并且在制定临床接受的交付和检测方案方面取得了重大的进展，迄今为止，已经有 125 项应用 MSCs 治疗神经系统疾病的临床试验进行了注册[68]。将 MSCs 治疗应用于 AD 的研究以及临床试验是目前的热点方向之一，有临床前研究表明，MSCs 在 AD 动物模型中可以通过减少 Aβ 沉积而挽救记忆缺陷，也可以通过增强 AD 小鼠模型中病理神经元的自噬从而降低 Aβ 的水平[69, 70]。也有研究数据表明，经过 MSCs 移植处理后的 AD 小鼠的脑源性神经营养因子、神经生长因子以及血管内皮生长因子上调从而可以达到保护神经元和神经元完整性的作用[71-74]。MSCs 也可以通过降低小胶质细胞活化水平以及降低

中国知网　https://www.cnki.net

促炎因子的表达从而改变 AD 动物模型的炎症反应[75, 76]。根据 MSCs 在临床前研究结果，目前也有注册了将 MSCs 应用于 AD 患者的临床试验，但是目前并没有观察到经过 MSCs 治疗后的 AD 患者的临床状态有显著改善[77]。目前将 MSCs 应用于治疗疾病主要是通过 MSCs 的直接移植，但是 MSCs 移植属于细胞疗法，会伴随有细胞排斥反应、免疫应答、毒性输注、肿瘤形成、病毒污染以及移植前细胞运输和储存问题的风险[78-84]，为了减少与 MSCs 细胞性质相关的潜在危险因素，许多与 MSCs 相关的无细胞疗法逐渐出现[85]，有研究证据表明，MSCs 的治疗效果与其通过旁分泌作用分泌的 EVs 相关[32]。目前，MSC-EVs 在 AD 疾病治疗研究方面也有着较大的进展，有研究表明 MSC-EVs 可以通过上调脑啡肽酶和胰岛素降解酶的表达而使 Aβ 降解，还可以通过升高 *IL-10* 和 *TGF-β* 的表达水平以及降低 *TNF-α* 和 *IL-1β* 的表达水平来调节神经炎症[86]。总而言之，研究 MSC-EVs 对 AD 疾病模型的作用效果，进而了解 MSC-EVs 能否对 AD 疾病模型产生治疗作用，为探究针对 AD 的治疗方式提供一个新的思路。

因此，本课题选用 HAD-MSCs 和 HUC-MSCs 处理构建的 AD 体外细胞模型以及体内小鼠模型，探索 MSCs 能否通过共培养的作用方式对 AD 疾病模型产生效果。将从公司购买的 HAD-MSCs 以及本实验室自己分离的 HUC-MSCs 进行表面标志物鉴定以及成骨成脂分化能力鉴定后，将 HAD-MSCs 与 HUC-MSCs 与 AD 体外细胞模型共培养处理后，发现这种处理方式不能调控 AD 细胞模型中 α -分泌酶以及 β -分泌酶的表达，也不能减少 APP 的表达，这可能是因为共培养处理时小室的隔膜不能完全将 MSCs 分泌的物质完全透过从而作用于 AD 细胞模型。直接使用 MSCs 与 AD 细胞模型作用也并不是一个好的选择，因为这种处理方式属于细胞直接移植作用，这会具有肿瘤形成、免疫排斥、输注毒性的风险，因此我们需要用 MSCs 发挥潜力的其他作用方式进行研究。MSC-EVs 是 MSCs 通过旁分泌作用而分泌出的物质，其内部包含了 MSCs 的特异性蛋白、mRNA、microRNA 等物质，通过 MSC-EVs 进行作用属于无细胞治疗方式，因此可以消除 MSCs 直接作用而产生的致癌性和免疫原性的风险[87]。本课题通过使用超速离心法将 MSC-EVs 从 MSCs 的条件培养基中分离得到，通过 Western Blot、透射电子显微镜、纳米颗粒追踪分析技术对 MSC-EVs 进行鉴定，鉴定成功后进行后续实验。将 HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 处理 AD 细胞模型和小鼠模型后，通过 qRT-PCR 以及 Western Blot 实验检测，本课题发现 AD 细胞模型与小鼠

中国知网 https://www.cnki.net

模型中α-分泌酶会上调，β-分泌酶会下调从而致使 APP 的表达也呈现下调，这证明了 MSCs 可以通过分泌的 MSC-EVs 作用于 AD 疾病模型减少致病蛋白 APP 的表达。

AD 患者脑内因其 APP 过度表达沉积会产生一系列炎症反应，炎性基因的表达会升高，为了进一步研究 MSC-EVs 能否减少炎性基因的表达从而减少炎症反应，本课题用 MSC-EVs 处理 AD 疾病模型后通过 qRT-PCR 实验检测了 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 *HO-1* 这四个炎性基因表达的变化，研究数据表明，MSC-EVs 可以减少 AD 细胞模型以及小鼠模型中 *IL-6*，*TNF-α*，*IL-1β* 以及 *HO-1* 的表达。

AD 患者会产生有进行性记忆丧失以及认知障碍的特征，为了研究 MSC-EVs 能否改善这种病理特征，本研究以 AD 小鼠模型的空间学习记忆能力为研究目标，将 MSC-EVs 通过尾静脉注射的方式注射至小鼠体内，然后进行了莫里斯水迷宫实验的行为学检测，检测结果显示，MSC-EVs 注射至 AD 小鼠体内作用后，小鼠的空间学习记忆能力得到了改善。

综上所述，我们用 MSC-EVs 处理了 AD 细胞模型以及小鼠模型后，可以通过上调α-分泌酶以及下调β-分泌酶从而减少 APP 的表达，*IL-6*、*TNF-α*、*IL-1β* 以及 *HO-1* 炎性基因表达下调，MSC-EVs 也能改善 AD 小鼠模型的空间学习记忆能力。

中国知网 https://www.cnki.net

第四章　结论

1. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 在 AD 疾病模型中可以通过调节 α -分泌酶以及 β -分泌酶减少 AD 病理蛋白 APP 的表达；

2. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 在 AD 疾病模型中可以下调 *IL-6, TNF-α, IL-1β*以及 *HO-1* 炎性基因的表达；

3. HAD-MSC-EVs 与 HUC-MSC-EVs 通过尾静脉注射方式注射至 AD 小鼠模型体内后，可以改善其空间学习记忆能力。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] DE-PAULA V J, RADANOVIC M, DINIZ B S, et al. Alzheimer's disease [J]. Sub-cellular biochemistry, 2012, 65: 329-52.

[2] CIPRIANI G, DOLCIOTTI C, PICCHI L, et al. Alzheimer and his disease: a brief history [J]. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology, 2011, 32(2): 275-9.

[3] BONDI M W, EDMONDS E C, SALMON D P. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future [J]. Journal of the International Neuropsychological Society : JINS, 2017, 23(9-10): 818-31.

[4] CUMMINGS J, LEE G, MORTSDORF T, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017 [J]. Alzheimer's & dementia, 2017, 3(3): 367-84.

[5] TANZI R E, BERTRAM L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective [J]. Cell, 2005, 120(4): 545-55.

[6] SERRANO-POZO A, GROWDON J H. Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable? [J]. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2019, 67(3): 795-819.

[7] CROUS-BOU M, MINGUILLON C, GRAMUNT N, et al. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention [J]. Alzheimer's research & therapy, 2017, 9(1): 71.

[8] JIA J, WEI C, CHEN S, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 2018, 14(4): 483-91.

[9] BRIGGS R, KENNELLY S P, O'NEILL D. Drug treatments in Alzheimer's disease [J]. Clinical medicine, 2016, 16(3): 247-53.

[10] SILMAN I, SUSSMAN J L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology [J]. Current opinion in pharmacology, 2005, 5(3): 293-302.

[11] BARTUS R T, DEAN R L, 3RD, BEER B, et al. The cholinergic hypothesis of geriatric

中国知网 https://www.cnki.net

memory dysfunction [J]. Science, 1982, 217(4558): 408-14.

[12] TABET N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! [J]. Age and ageing, 2006, 35(4): 336-8.

[13] SHARMA K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review) [J]. Molecular medicine reports, 2019, 20(2): 1479-87.

[14] ROBINSON D M, KEATING G M. Memantine: a review of its use in Alzheimer's disease [J]. Drugs, 2006, 66(11): 1515-34.

[15] AREOSA S A, SHERRIFF F. Memantine for dementia [J]. 2003.

[16] HOWARD R, MCSHANE R, LINDESAY J, et al. Donepezil and memantine for moderate-to-severe Alzheimer's disease [J]. The New England journal of medicine, 2012, 366(10): 893-903.

[17] ULLAH I, SUBBARAO R B, RHO G J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective [J]. Bioscience reports, 2015, 35(2).

[18] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-7.

[19] CASTRO-MANRREZA M E, MONTESINOS J J. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications [J]. Journal of immunology research, 2015, 2015: 394917.

[20] PEREIRA R F, HALFORD K W, O'HARA M D, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(11): 4857-61.

[21] SCHWARTZ R E, REYES M, KOODIE L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells [J]. The Journal of clinical investigation, 2002, 109(10): 1291-302.

[22] DAI W, HALE S L, MARTIN B J, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects [J]. Circulation,

中国知网 https://www.cnki.net

2005, 112(2): 214-23.

[23] GOLPANIAN S, WOLF A, HATZISTERGOS K E, et al. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue [J]. Physiological reviews, 2016, 96(3): 1127-68.

[24] BAE J S, HAN H S, YOUN D H, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration [J]. Stem cells, 2007, 25(5): 1307-16.

[25] TAN K, ZHENG K, LI D, et al. Impact of adipose tissue or umbilical cord derived mesenchymal stem cells on the immunogenicity of human cord blood derived endothelial progenitor cells [J]. PloS one, 2017, 12(5): e0178624.

[26] ULIVI V, TASSO R, CANCEDDA R, et al. Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype [J]. Stem cells and development, 2014, 23(16): 1858-69.

[27] BOLLINI S, GENTILI C, TASSO R, et al. The Regenerative Role of the Fetal and Adult Stem Cell Secretome [J]. Journal of clinical medicine, 2013, 2(4): 302-27.

[28] RATAJCZAK M Z, KUCIA M, JADCZYK T, et al. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? [J]. Leukemia, 2012, 26(6): 1166-73.

[29] LIANG X, DING Y, ZHANG Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives [J]. Cell transplantation, 2014, 23(9): 1045-59.

[30] GNECCHI M, HE H, LIANG O D, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells [J]. Nature medicine, 2005, 11(4): 367-8.

[31] LEE C, MITSIALIS S A, ASLAM M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. Circulation, 2012, 126(22): 2601-11.

中国知网 https://www.cnki.net

[32] ZHANG B, YIN Y, LAI R C, et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes [J]. Stem cells and development, 2014, 23(11): 1233-44.

[33] FAN X L, ZHANG Y, LI X, et al. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy [J]. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2020, 77(14): 2771-94.

[34] GU Z, LIANG S, LIU D, et al. Novel development of mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles in regenerative medicine and disease therapeutics [J]. SCIENTIA SINICA Vitae, 2021, 51(9): 1229-40.

[35] LOTVALL J, HILL A F, HOCHBERG F, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles [J]. Journal of extracellular vesicles, 2014, 3: 26913.

[36] RANI S, RYAN A E, GRIFFIN M D, et al. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications [J]. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2015, 23(5): 812-23.

[37] QUESENBERRY P J, GOLDBERG L R, ALIOTTA J M, et al. Cellular phenotype and extracellular vesicles: basic and clinical considerations [J]. Stem cells and development, 2014, 23(13): 1429-36.

[38] MULLER L, HONG C S, STOLZ D B, et al. Isolation of biologically-active exosomes from human plasma [J]. Journal of immunological methods, 2014, 411: 55-65.

[39] HIEMSTRA T F, CHARLES P D, GRACIA T, et al. Human urinary exosomes as innate immune effectors [J]. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2014, 25(9): 2017-27.

[40] THERY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. Current protocols in cell biology, 2006, Chapter 3: Unit 3 22.

[41] LASSER C, ELDH M, LOTVALL J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes [J]. Journal of visualized experiments : JoVE, 2012, (59): e3037.

中国知网 https://www.cnki.net

[42] ZABOROWSKI M P, BALAJ L, BREAKEFIELD X O, et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study [J]. Bioscience, 2015, 65(8): 783-97.

[43] LIGA A, VLIEGENTHART A D, OOSTHUYZEN W, et al. Exosome isolation: a microfluidic road-map [J]. Lab on a chip, 2015, 15(11): 2388-94.

[44] TAURO B J, GREENING D W, MATHIAS R A, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes [J]. Methods, 2012, 56(2): 293-304.

[45] LI P, KASLAN M, LEE S H, et al. Progress in Exosome Isolation Techniques [J]. Theranostics, 2017, 7(3): 789-804.

[46] BOING A N, VAN DER POL E, GROOTEMAAT A E, et al. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography [J]. Journal of extracellular vesicles, 2014, 3.

[47] LOZANO-RAMOS I, BANCU I, OLIVEIRA-TERCERO A, et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples [J]. Journal of extracellular vesicles, 2015, 4: 27369.

[48] SODAR B W, KITTEL A, PALOCZI K, et al. Low-density lipoprotein mimics blood plasma-derived exosomes and microvesicles during isolation and detection [J]. Scientific reports, 2016, 6: 24316.

[49] UEDA K, ISHIKAWA N, TATSUGUCHI A, et al. Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes [J]. Scientific reports, 2014, 4: 6232.

[50] KONOSHENKO M Y, LEKCHNOV E A, VLASSOV A V, et al. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends [J]. BioMed research international, 2018, 2018: 8545347.

[51] HELWA I, CAI J, DREWRY M D, et al. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents [J]. PloS one, 2017, 12(1): e0170628.

[52] REKKER K, SAARE M, ROOST A M, et al. Comparison of serum exosome isolation

中国知网 https://www.cnki.net

methods for microRNA profiling [J]. Clinical biochemistry, 2014, 47(1-2): 135-8.

[53] SCHAGEMAN J, ZERINGER E, LI M, et al. The complete exosome workflow solution: from isolation to characterization of RNA cargo [J]. BioMed research international, 2013, 2013: 253957.

[54] HAYNESWORTH S E, BABER M A, CAPLAN A I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1α [J]. Journal of Cellular Physiology, 1996, 166(3): 585-92.

[55] CAPLAN A I, DENNIS J E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators [J]. Journal of cellular biochemistry, 2006, 98(5): 1076-84.

[56] TEIXEIRA F G, CARVALHO M M, SOUSA N, et al. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? [J]. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2013, 70(20): 3871-82.

[57] MORAVEJ A, KARIMI M H, GERAMIZADEH B, et al. Mesenchymal Stem Cells Upregulate the Expression of PD-L1 But Not VDR in Dendritic Cells [J]. Immunological investigations, 2017, 46(1): 80-96.

[58] GOICHBERG P. Current Understanding of the Pathways Involved in Adult Stem and Progenitor Cell Migration for Tissue Homeostasis and Repair [J]. Stem cell reviews and reports, 2016, 12(4): 421-37.

[59] REN W, HOU J, YANG C, et al. Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery [J]. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2019, 38(1): 62.

[60] QIU G, ZHENG G, GE M, et al. Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles [J]. Stem cell research & therapy, 2019, 10(1): 359.

[61] MAHLA R S. Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics [J]. International journal of cell biology, 2016, 2016: 6940283.

[62] LYON L. Stem cell therapies in neurology: the good, the bad and the unknown [J]. Brain : a journal of neurology, 2018, 141(10): e77.

中国知网 https://www.cnki.net

[63] LIU X Y, YANG L P, ZHAO L. Stem cell therapy for Alzheimer's disease [J]. World journal of stem cells, 2020, 12(8): 787-802.

[64] SI Z, WANG X. Stem Cell Therapies in Alzheimer's Disease: Applications for Disease Modeling [J]. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2021, 377(2): 207-17.

[65] YUAN X Z, SUN S, TAN C C, et al. The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease [J]. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2017, 58(2): 303-22.

[66] REISS A B, ARAIN H A, STECKER M M, et al. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease [J]. Reviews in the neurosciences, 2018, 29(6): 613-27.

[67] ANDRZEJEWSKA A, LUKOMSKA B, JANOWSKI M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost [J]. Stem cells, 2019, 37(7): 855-64.

[68] ANDRZEJEWSKA A, DABROWSKA S, LUKOMSKA B, et al. Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disorders [J]. Advanced science, 2021, 8(7): 2002944.

[69] HARACH T, JAMMES F, MULLER C, et al. Administrations of human adult ischemia-tolerant mesenchymal stem cells and factors reduce amyloid beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neurobiology of aging, 2017, 51: 83-96.

[70] BAE J-S, JIN H K, LEE J K, et al. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Contribute to the Reduction of Amyloid-β Deposits and the Improvement of Synaptic Transmission in a Mouse Model of Pre-Dementia Alzheimer’s Disease [J]. Current Alzheimer Research, 2013, 10(5): 524-31.

[71] LEE J K, JIN H K, BAE J S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate amyloid beta-induced memory impairment and apoptosis by inhibiting neuronal cell death [J]. Curr Alzheimer Res, 2010, 7(6): 540-8.

[72] MU Y, GAGE F H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease [J]. Molecular neurodegeneration, 2011, 6: 85.

[73] OH S H, KIM H N, PARK H J, et al. Mesenchymal Stem Cells Increase Hippocampal Neurogenesis and Neuronal Differentiation by Enhancing the Wnt Signaling Pathway in an Alzheimer's Disease Model [J]. Cell transplantation, 2015, 24(6): 1097-109.

中国知网 https://www.cnki.net

[74] ABSHENAS R, ARTIMANI T, SHAHIDI S, et al. Treadmill exercise enhances the promoting effects of preconditioned stem cells on memory and neurogenesis in Abeta-induced neurotoxicity in the rats [J]. Life sciences, 2020, 249: 117482.

[75] LEE H J, LEE J K, LEE H, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation [J]. Neurobiology of aging, 2012, 33(3): 588-602.

[76] NAALDIJK Y, JAGER C, FABIAN C, et al. Effect of systemic transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice [J]. Neuropathology and applied neurobiology, 2017, 43(4): 299-314.

[77] ZHANG L, DONG Z F, ZHANG J Y. Immunomodulatory role of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease [J]. Life sciences, 2020, 246: 117405.

[78] NING H, YANG F, JIANG M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study [J]. Leukemia, 2008, 22(3): 593-9.

[79] RUBIO D, GARCIA-CASTRO J, MARTIN M C, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. Cancer research, 2005, 65(8): 3035-9.

[80] KARNOUB A E, DASH A B, VO A P, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis [J]. Nature, 2007, 449(7162): 557-63.

[81] SUNDIN M, ORVELL C, RASMUSSON I, et al. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual [J]. Bone marrow transplantation, 2006, 37(11): 1051-9.

[82] HERBERTS C A, KWA M S, HERMSEN H P. Risk factors in the development of stem cell therapy [J]. Journal of translational medicine, 2011, 9: 29.

[83] LUKOMSKA B, STANASZEK L, ZUBA-SURMA E, et al. Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy [J]. Stem cells international, 2019, 2019: 9628536.

[84] CELIKKAN F T, MUNGAN C, SUCU M, et al. Optimizing the transport and storage conditions of current Good Manufacturing Practice -grade human umbilical cord mesenchymal stromal cells for transplantation (HUC-HEART Trial) [J]. Cytotherapy, 2019, 21(1): 64-75.

中国知网 https://www.cnki.net

[85] RAIK S, KUMAR A, BHATTACHARYYA S. Insights into cell-free therapeutic approach: Role of stem cell "soup-ernatant" [J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2018, 65(2): 104-18.

[86] DING M, SHEN Y, WANG P, et al. Exosomes Isolated From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Neuroinflammation and Reduce Amyloid-Beta Deposition by Modulating Microglial Activation in Alzheimer's Disease [J]. Neurochemical research, 2018, 43(11): 2165-77.

[87] TAN T T, TOH W S, LAI R C, et al. Practical considerations in transforming MSC therapy for neurological diseases from cell to EV [J]. Experimental neurology, 2022, 349: 113953.

中国知网 https://www.cnki.net