

中文摘要

背景与目的:

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的发病率在世界范围内急剧增加, 到 2030 年糖尿病将成为全球第七大死亡原因, 其中引起死亡最常见的血管并发症是糖尿病肾病 (DKD), 在我国大城市 2 型糖尿病 (type2 diabetes mellitus, T2DM) 流行病学调查中, 糖尿病肾病占糖尿病微血管病变的 39.7%。自噬 (autophagy) 作为一种细胞过程, 主要是通过从溶酶体中不断清除受损的细胞器和长寿蛋白质并回收代谢产物和营养物质以满足自身需求, 在细胞生理学中起着至关重要的作用。既往研究表明, 相比于其他肾脏固有细胞的自噬基础水平, 足细胞是明显增高的, 而且这种较高水平自噬是维持足细胞正常生理功能所需。研究表明 Bcl-2 不仅可以通过与含有 BH3 结构域的促凋亡蛋白结合抑制细胞凋亡, 还可以通过与 Beclin 1 的 BH3 结构域结合调控细胞自噬, 阻止 Beclin1 依赖的细胞自噬的发生。目前关于 Bcl-2/Beclin1 在 DKD 中对足细胞自噬的影响未见报道。间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 能够分化成多种细胞类型的能力以及强大的免疫调节活性, 在细胞治疗和再生医学领域具有关键作用。有研究发现, MSCs 治疗的有益效果可能是通过旁分泌机制起作用的, 其中外泌体 (exosome) 所发挥的作用备受关注, 它们促进细胞间通讯, 并通过传递蛋白质、miRNA 等调节受体细胞的功能。我们推测间充质干细胞外泌体 (MSC-Exos) 可能通过递送 miRNA 靶向调控 Bcl-2/Beclin1 诱导自噬减轻足细胞损伤。本研究在体外建立了高糖诱导足细胞损伤的模型, 通过观察 BMSC-Exos 是否是通过调控自噬而减轻足细胞损伤, 进而发挥肾脏保护作用, 继而探讨 BMSCs-Exo 可能通过 miR-143-3p/ Bcl-2/Beclin1 信号通路诱导足细胞自噬的作用机制。

方法:

1、原代培养 C57BL/6 小鼠 BMSCs, 采用流式细胞术检测 BMSCs 表面标记分子 CD73、CD90、CD105、CD19、CD31、HLA-DR 等分子的表达; 2、利用超速离心法提取 BMSC-exos, 电镜观察其形态特征, 纳米流式细胞仪鉴定 BMSC-exos 表面蛋白阳性率, Western blot 技术检测外泌体表面标志蛋白 CD63、

CD9; 3、建立体外高糖诱导足细胞损伤模型, 本课题组前期验证高糖为 50mM 时足细胞损伤最明显; 4、验证 BMSC-exos 对高糖诱导 MPC5 损伤后的治疗作用, 将实验分为以下 3 组: NC 组、HG 组、HG+exo 组; 5、检测 PKH67 染色后的 BMSC-exos 与高糖损伤后的 MPC5 的膜融合能力; 6、探索相关 miRNA: 分别提取 MPC5 培养上清来源的外泌体、高糖刺激 MPC5 培养上清来源的外泌体和 BMSC-Exos, 用 mirVanaTM miRNA Isolation Kit 提取总 miRNAs, 随后采用 Illumina HiSeq2500 测序仪, 50SE 进行高通量测序, 获得 miRNA 表达谱; 7、验证 BMSCs 通过外泌体递送 miR-143-3p 靶向调控 Beclin1/Bcl-2 通路诱导自噬, 将实验分为 4 组: HG 组、HG+BMSC-exos-NC 组、HG+BMSC-exos-miR-143-3p-inhibitor 组、HG+BMSC-exos-miR-143-3p-mimic 组; 8、双荧光素酶报告基因检测 miR-143-3p 与 BCL-2 3'UTR 区的相互作用。采用细胞免疫荧光检测经 BMSC-exos 治疗前后 MPC5 中 podocin 的表达含量, 采用 Western blot 技术检测相关蛋白 Beclin1、LC3II、Bcl-2 的表达水平, 采用 PCR 技术检测 Beclin1、Bcl-2 的 mRNA 表达水平。

结果:

1、原代细胞 BMSCs 形态呈长梭形, 呈极性排列, 其表面高表达 CD73、CD90、CD105 分子, 低表达 CD19、CD31、CD34、CD45、CD11、HLA-DR 分子。

2、分离得到的 BMSC-exos 在透射电子显微镜下呈球形, NTA 粒径分析平均粒径为 68.42nm, Western blot 显示, BMSC-exos 表面标记蛋白 CD9、CD63 的表达明显高于 BMSCs 裂解液;

3、高糖诱导 MPC5 后 podocin 的表达含量显著下降; Beclin1、LC3II 的表达含量在 BMSC-exos 治疗高糖诱导的 MPC5 后显著升高, 提示 BMSC-exos 上调了高糖诱导 MPC5 后的自噬水平;

4、通过高通量测序筛选差异 miRNA 表达找出与自噬相关的 miR-143-3p;

5、将 PKH67 染料成功染色后的外泌体与高糖损伤后的 MPC5 共孵育 48h, 激光共聚焦显微镜观察可见足细胞细胞质内绿色荧光, 提示超速离心后的外泌体可以被外源性摄入足细胞;

6、转染 BMSCs 后 HG+BMSC-exos-NC 组、BMSC-exos-miR-143-3p-mimic 组明显 Beclin1、LC3 表达上调, 高糖损伤的 MPC5 自噬水平上调, 而 Bcl-2 蛋白表达水平均下降;

7、荧光素酶报告基因检测 miR-143-3p 对 Bcl-2 基因有靶向抑制作用。

结论:

本研究结果提示, BMSC-exos 能明显改善足细胞损伤, 其潜在机制可能是通过递送 miR-143-3p 调控 Bcl-2/Beclin1 通路, 上调高糖损伤 MPC5 后的自噬水平, 减轻 MPC5 损伤, 从而起到延缓糖尿病肾脏疾病的进一步发展的作用。本研究为开发外泌体治疗糖尿病肾脏疾病提供了实验基础。

关键词: 间充质干细胞; 外泌体; 自噬; microRNA; Bcl-2/Beclin1 通路

ABSTRACT

Background and purpose :

The incidence of diabetes mellitus(DM) is increasing dramatically worldwide and will become the seventh leading cause of death worldwide by 2030, among which the most common vascular complication causing death is diabetic nephropathy. In the T2D epidemiological survey of large cities,diabetic nephropathy accounted for 39.7% of diabetic microangiopathy. Autophagy, as a cellular process, plays a crucial role in cellular physiology mainly through the continuous removal of damaged organelles and long-lived proteins from lysosomes and recovery of metabolites and nutrients to meet its own needs. Studies have shown that Bcl-2 not only inhibits apoptosis by binding to pro-apoptotic proteins containing the BH3 domain, but also regulates autophagy by binding to the BH3 domain of Beclin1 to prevent Beclin1-dependent autophagy.Bcl-2 is the most classical anti-apoptotic gene,and its role in regulating autophagy has attracted more and more attention in recent years.Bcl-2 can bind to Beclin1,an autophagy related protein,through the BH3 domain to prevent Beclin1-dependent autophagy.The effect of Bcl-2/Beclin1 on autophagy in DKD has not been reported.mesenchymal stem cells (MSCs) play a key role in the field of cell therapy and regenerative medicine because of their ability to differentiate into a variety of cell types and their strong immunomodulatory activities. Studies have found that the beneficial effects of MSCs therapy may be mediated by paracrine mechanisms, in which exosomes play a role that has attracted much attention, promoting intercellular communication and regulating the function of recipient cells through the delivery of proteins,miRNAs,etc.We hypothesize that mesenchymal stem cell exosomes(MSC-exos) may induce autophagy to reduce podocyte injury by targeting Bcl-2/Beclin1 through miRNA delivery. In this study, a model of high sugar-induced podocycytes injury was established in vitro. In this study, a model of high glucose induced podococyte injury was established in vitro. By observing whether BMSCs-exOs alleviates podococyte injury through regulation of autophagy, and thus plays a protective role in the kidney, BMSCs-Exo may be mediated by

miR-143-3p/ Bcl-2/Beclin1 Mechanism of autophagy induced by signaling pathway in podocytes.

Methods:

1.The expressions of CD73, CD90, CD105, CD19, CD31 and HLA-DR were detected by flow cytometry in primary C57BL/6 mouse BMSCs;2.BMSC-exos was extracted by overspeed centrifugal method, and its morphological characteristics were observed by projection electron microscopy. The positive rate of BMSC-exos surface protein was determined by nano-flow cytometry, and the surface marker protein CD63 CD9 of exosomes was detected by Western blot; 3.The model of podocyte injury induced by high glucose (50mM) in vitro was established;4.To verify the therapeutic effect of BMSC-exos on MPC5 injury induced by high sugar, the experiment was divided into the following 3 groups :NC group, HG group, HG+exo group; 5.The membrane fusion ability of BMSC-exos after PKH67 staining and MPC5 after high glucose injury was detected;6.To explore related miRNAs ,extractions of exosomes derived from MPC5 culture supernatant, exosomes derived from MPC5 culture supernatant stimulated by high sugar and BMSC-exos were respectively extracted,and total miRNAs were extracted using miRVana™ miRNA Isolation Kit. miRNA expression profiles were obtained by Illumina HiSeq 2500 sequencer and 50SE sequencing; 7.BMSCs were verified to regulate Bcl-2/Beclin1 pathway inducing autophagy through exosomal delivery of miR-143-3p targeting, the experiment was divided into four groups: HG group, HG + BMSC-exos-miR-143-3p-NCgroup,H + BMSC-exos-miR-143-3p-inhibitorgroup,HG + BMSC-exos-miR-143-3p-mimic group; 8. Dual luciferase reporter gene was used to detect the interaction between miR-143-3p and Bcl-3 UTR region. Cellular immunofluorescence was used to detect the expression of podocin in MPC5 before and after BMSC-exos treatment, and the related protein Beclin1 LC3 was detected by Western blot Beclin1 Bcl-2 mRNA expression level was detected by PCR.

Results:

1.The morphology of primary BMSCs showed long spindle shape and polar arrangement, CD73 、 CD90 、 CD105 molecules were highly expressed on the

surface, and CD19、CD31、CD34、CD45、CD11, and HLA-DR molecules were low expressed on the surface.

2. The isolated BMSC-exos was spherical under transmission electron microscopy, and the average particle size of the NTA particle size analysis was 68.42nm. Western blot showed that the expression of the surface labeled protein CD9 CD63 was significantly higher than that of the BMSCs lysate.

3. The expression of podocin in MPC5 decreased significantly after high glucose induction. The expression levels of Beclin1 and LC3II were significantly increased after BMSC-exos treatment of high-sugar-induced MPC5, suggesting that BMSC-exos up-regulated the autophagy level of high-sugar-induced MPC5.

4. The expression of differential miRNA was screened by high-throughput sequencing to identify the autophagy related miR-143-3p.

5. The exosomes stained with PKH67 dye were co-incubated with MPC5 after high glucose injury for 48h, and the green fluorescence in the cytoplasm of podocytes was observed by laser confocal microscopy, suggesting that exosomes could be extrinsic ingested into podocytes after hypercentrifugation

6. Beclin1 and LC3 expression were significantly up-regulated in HG + BMSC-exos-miR-143-3p-NC group and HG + BMSC-exos-miR-143-3p-mimic group, and the autophagy level of MPC5 after high glucose injury was up-regulated, while the expression level of Bcl-2 protein was decreased. There was no significant difference between HG + BMSC-exos-miR-143-3p-inhibitor group and HG group.

7. Luciferase reporter gene detected that miR-143-3p had targeted inhibition on Bcl-2 gene.

Conclusion:

The results of this study suggest that BMSC-exos can significantly improve podocyte injury, and its potential mechanism may be through the regulation of the Bcl-2/Beclin1 pathway through the delivery of miR-143-3p, up-regulating the autophagy level of MPC5 damaged by high glucose, alleviating the damage of MPC5, and thus delaying the further development of diabetic kidney disease. This study provides an experimental basis for the development of exosomes for the treatment of diabetic kidney disease.

Key Words: mesenchymal stem cells ; autophagy; exosome; microRNA; Bcl-2/Beclin1 pathway

目 录

第 1 章 前言	1
第 2 章 材料与方法	3
2.1 实验材料	3
2.1.1 细胞	3
2.1.2 主要试剂及来源	3
2.1.3 主要仪器和设备	5
2.1.4 主要试剂及液体配制	6
2.2 实验方法	7
2.2.1 细胞常规培养	7
2.2.2 蛋白印迹	8
2.2.3 实时荧光定量 PCR	10
2.2.4 细胞免疫荧光	13
2.2.5 BMSCs-exo 提取	13
2.2.6 BMSCs-exo 蛋白浓度测定	14
2.2.7 PKH67 荧光染色	14
2.2.8 双荧光素酶报告实验	15
2.2.9 流式细胞学检测	18
2.2.10 miR-143-3p 的转染	18
2.3 统计方法	18
第 3 章 结果	20
3.1 BMSCs 形态学特征及鉴定	20
3.2 BMSCs 衍生的外泌体的鉴定	21
3.3 BMSC-exos 对足细胞自噬的影响	22
3.4 高通量测序筛选差异 miRNA 表达	23
3.5 PKH67 染色实验检测外泌体与高糖损伤的足细胞	24
3.6 BMSCs 通过外泌体递送 miR-143-3p 靶向调控 Beclin1/Bcl-2 通路诱导自	

噬	24
3.7 利用在线网站预测 miR-143-3p 与靶基因 Bcl-2 可能的结合位点	27
3.8 荧光素酶报告基因检测 miR-143-3p 与 Bcl-2 的靶向抑制作用	27
第 4 章 讨论	28
4.1 足细胞自噬失调与糖尿病肾脏疾病	28
4.2 间充质干细胞外泌体可能通过 miR-143-3p/Bcl-2/Beclin1 诱导足细胞自噬	28
第 5 章 结论与展望	30
5.1 结论	30
5.2 创新点	30
5.3 展望与不足	30
致 谢	31
参考文献	32
攻读学位期间的研究成果	35
综 述	36

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
Gly	Glycine	甘氨酸
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
Tris	Trihydroxymethylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
BMSCs	Bone Mesenchymal Stem Cells	骨髓间充质干细胞
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	B 淋巴细胞瘤-2 基因
DN	Diabetic Nephropathy	糖尿病肾病
T2DM	Type1 diabetes mellitus	2 型糖尿病
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	杜尔伯科改良伊格尔培养基

第 1 章 前言

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)的特点是肾小球被破坏, 导致肾损害、蛋白尿和高血压。糖尿病肾病的发病率一直在快速增长, 有数据显示中国 2 型糖尿病患者中糖尿病肾病的总合并患病率为 21.8%^[1, 2]。现有的治疗方法很难阻止 DKD 的恶化, 并且关于 DKD 发生及进展的具体分子机制并不完全清楚, 所以深入探讨其发病机制并且寻找新的防治策略仍具有挑战性。

自噬是一个高度保守的细胞过程, 它将细胞质中的大分子物质和其他受损的细胞器运至溶酶体降解以维持细胞内稳态^[3]。既往研究表明, 足细胞具有高于其他肾脏固有细胞的基础自噬水平, 而且这种较高水平自噬是维持足细胞正常生理功能所需^[4]。在 STZ 诱导小鼠糖尿病后, 肾脏自噬减弱, 导致正常情况下被自噬分解的受损分子和细胞器积聚^[5]。此外, 在 II 型糖尿病患者的活组织检查中发现了表明自噬减少的受损分子的积累^[6]。多项体外研究表明, 高糖刺激下足细胞的自噬活性受到显著抑制, 且伴随着自噬底物蛋白 p62 水平升高、自噬相关基因微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 及 Beclin1 蛋白水平下降; 而使用自噬激活剂诱导足细胞自噬后, 可明显减轻高糖所致的足细胞损伤^[7]。因此, 增强自噬可能是一种潜在的治疗糖尿病肾病的方法。

近年来, 间充质干细胞在再生医学领域一直备受关注, 是一种理想的治疗各种疾病的细胞治疗方式。但是在不断地临床前研究中发现了一系列问题, 比如间充质干细胞的可变性, 可扩展性以及向临床转化过程中所面临的安全性及伦理问题等。有研究证明, MSCs 治疗的有益效果是通过旁分泌机制起作用的^[8], 这为无细胞治疗提供了一种可能性。MSCs 可分泌产生大量的外泌体, 是外泌体的理想来源。外泌体具有传递、交换细胞内化学信息以及与受体细胞相互作用的独特能力, 被用于治疗多种疾病^[8]。

已有研究显示, MSC-Exos 具有改善 DKD 肾脏病理损伤及延缓 DKD 进程的潜在作用。例如, Jiang 等^[9]在体内及体外研究发现, 尾静脉注射尿源性干细胞外泌体可以显著减少糖尿病大鼠尿量和尿微量白蛋白排泄、抑制足细胞和肾小管上皮细胞凋亡、以及促进肾小球内皮细胞增殖。Ebrahim^[10]等体内研究结果发现, 尾静脉注射骨髓 MSCs 来源的外泌体 (BMSCs-Exo) 通过提高自噬水平及抗纤维化作用显著改善 DKD 大鼠肾功能和促进肾脏损伤修复。

miRNA miRNAs 是表观遗传和基因表达的成熟调控因子。miRNA 通常与 mRNA 上的 3' UTR 调控元件或引起翻译抑制的 miRNA 反应元件(MRE)结合,从而抑制靶基因的表达,进而导致 mRNA 的降解或翻译抑制^[11]。在外泌体的内容物中,微小 RNA (microRNA, miRNA) 在自噬稳态的调节中发挥重要作用^[12]。Jin 等^[13]在体内及体外研究发现,脂肪来源 MSCs 外泌体携带的 miR-486 可转移至足细胞,并通过抑制 Smad1/mTOR 信号通路促进足细胞自噬并抑制其凋亡,从而延缓 DKD 病理进程。同样地,Duan 等^[14]研究发现脂肪来源 MSCs 外泌体富含 miR-26a-5p 能靶向调控 TLR4 并抑制 NF- κ B/VEGFA 通路,抑制足细胞凋亡,从而减轻 DKD 损伤。为此我们分离并鉴定了 BMSCs 来源的外泌体,利用 miRNA 高通量测序技术筛选 BMSCs-Exo、足细胞来源外泌体、高糖刺激下足细胞来源外泌体差异表达的 miRNAs,发现 miR-143-3p 在 BMSCs-Exo 表达显著增高,通过文献调研,目前 miR-143-3p 与自噬的关系研究甚少,而且报道的 miR-143-3p 对自噬发挥负向调控作用^[14, 15]。如 Yeo^[16]等人阐明了 miR-143-3p 通过降低 PC9/ER 细胞的自噬通量来增强对抗癌药物的敏感性;Chen^[17]等人验证了 MSC-exos 通过递送 miR-143-3p 调控 CHK2/Beclin 1 途径抑制大鼠心肌细胞凋亡和自噬,从而改善心肌 I/R。除此之外,我们通过生物信息学技术预测发现 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 是 miR-143-3p 潜在靶基因。

Bcl-2 和 Beclin1 之间的相互作用最早是在酵母双杂交实验中发现的^[18]。人 Bcl-2 和卡波西肉瘤相关疱疹病毒编码的 Bcl-2 都与 Beclin 1 相互作用。研究表明 Bcl-2 不仅可以通过与含有 BH3 结构域的促凋亡蛋白结合抑制细胞凋亡,还可以通过与 Beclin 1 的 BH3 结构域结合调控细胞自噬^[19]。目前关于 Bcl-2/Beclin1 对自噬的影响主要集中在肿瘤的发生机制和肿瘤耐药性的研究中,而在 DKD 中对足细胞自噬的影响未见报道。我们通过 miR-143-3p inhibitor 转染 BMSCs,发现其外泌体能显著升高足细胞 Bcl-2 蛋白表达水平,进而提示了 Bcl-2 可能是 miR-143-3p 下游调控的靶基因。因此,我们推测 BMSCs-Exo 可能通过 miR-143-3p/ Bcl-2/Beclin1 信号通路诱导足细胞自噬。

第 2 章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 细胞来源

小鼠足细胞(MPC5)购买于上海富衡生物科技有限公司(产品货号: FH1009); C57BL/6 小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)购买于中乔新舟(产品货号: ZQ0465)。

2.1.2 主要实验试剂

75%乙醇	江西健宝科技有限公司
Tris-base	北京索莱宝科技有限公司
磷酸氢二钠	西陇科学股份有限公司
1M Tris-HCLPH=6.8	北京索莱宝科技有限公司
磷酸二氢钾	西陇科学股份有限公司
甲醇	天津大茂化学试剂厂
氯化钠	西陇科学股份有限公司
Tween-20	武汉华美公司
PCR 引物	通用生物系统有限公司
DMEM 培养基 (高糖, 含双抗)	索莱宝公司
1.5M Tris-HCL PH=8.8	北京索莱宝科技有限公司
氯化钾	西陇科学股份有限公司
过硫酸铵	美国 Sigma 公司
DMEM 培养基 (低糖, 含双抗)	索莱宝公司
BSA	Servicebio
TEMED	武汉华美公司
Podocin(20384-1-AP)	Proteintech
LC3 antibody (14600-1-AP)	Proteintech
二抗: HRP 标记山羊抗兔	Servicebio
SDS 十二烷基硫酸钠	北京索莱宝科技有限公司
荧光二抗: Cy3 山羊抗兔	Servicebio

DAPI	Servicebio
30%丙烯酰胺 Acr/Bis(29:1)	北京索莱宝科技有限公司
抗荧光淬灭封片剂	Servicebio
十二烷基磺酸钠 (SDS)	美国 Sigma 公司
牛血清白蛋白(BSA)	Sigma 公司
氯仿	天津大茂化学试剂厂
一抗/二抗稀释液	博士德生物
4%多聚甲醛	Servicebio
Beclin-1 antibody (11306-1-AP)	Proteintech
二甲基亚砷(DMSO)	北京全式金生物公司
CD9 antibody (ab92726)	Abcam
CD63 antibody(ab217345)	Abcam
TransZol	北京全式金生物
Bcl-2 antibody(15071s)	CST
胎牛血清 (FBS)	北京全式金生物
蛋白酶抑制剂混合物	康为世纪
QuantiNova™ SYBR Green PCR	德国凯杰生物技术有限公司
无外泌体血清	HAKATA
0.25%胰蛋白酶	北京索莱宝有限公司
Lipofectamine 2000	赛默飞公司
无水乙醇	广东西陇化工股份有限公司
PBS 溶液	北京全式金生物公司
无血清培养基(Opti-MEM)	赛默飞公司
PCR 引物	通用生物系统有限公司
Phosphatase Inhibitor Cocktail	美国 GLPBIO 公司
异丙醇	天津大茂化学试剂厂
Easyscript Onestep gDNA Removal and cDNA Synthesis SurperMix	北京全式金生物公司
无核酶水	天根生化科技有限公司
Prestained Protein Marker	Thermo 公司
聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜)	美国 Millipore 公司

ExoQuick-TC	上海宇枚博生物科技有限公司
BCA 试剂盒	美国 GLPBIO 公司
6X 蛋白上样缓冲液	北京索莱宝科技公司
外泌体染色试剂盒	上海贝博生物
RIPA 裂解液	北京普利莱基因技术有限公司
iTrans® Transfection	南昌聚焦生物科技有限公司
DNA ligase	上海孚可思生物科技有限公司
Lipofectamine®RNAiMAX Reagent	Invitrogen 公司
脱脂奶粉	北京普利莱基因技术公司
双荧光素酶报告检测试剂盒	Promega 公司

2.1.3 实验仪器和设备

名称	生产公司
烤箱	天津市莱玻璃仪器设备有限公司
枪头	德国 Eppendorf 公司
载玻片	Servicebio
凝胶成像系统	美国 Bio-Rad 公司
移液枪	德国 Eppendorf 公司
离心管	广州洁特生物过滤股份有限公司
高压蒸汽灭菌锅	日本 TOMY 公司
细胞培养孵箱	赛默飞世纪科技
细胞计数板	上海求精生化试剂仪器公司
-80°C冰箱	赛默飞世纪科技
恒温水浴锅	上海博迅实业公司
成像系统	日本尼康
伯乐荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
正置光学显微镜	日本尼康
SDS-PAGE 蛋白电泳仪	北京六一仪器厂
超净台	上海培清科技有限公司
多功能酶标仪	赛默飞世尔科技

名称	生产公司
超高速冷冻离心机	美国贝克曼库尔特商贸有限公司
TIP 头	Axygen Biosciences
0.22 μ m 微孔滤过滤器	美国 Millipore 公司
伯乐荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
超微量分光光度计	Thermo
电子天平	常州幸运设备公司
标准试剂型纯水仪	力康
台式高速冷冻型微量离心机	Eppendorf
PCR 仪	Bio-RAD
离心管	Axygen Biosciences
双荧光素酶报告检测仪	PE

2.1.4 主要试剂及液体配制

(1) 蛋白印迹相关溶液

转膜液：分别称取甘氨酸 2.9g、Tris-base 5.8g，加甲醇 200ml，再加 dd·H₂O 至 1L，室温下磁力搅拌器搅拌 2h，储存 4℃以备用；

APS：按照 dd·H₂O：过硫酸铵（AP）=10:1 的比例称取相应的 AP 加入适量的 dd·H₂O 至棕色 EP 管中，上下颠倒混匀，储存在 4℃冰箱以备用；

5×电泳液：分别称取 SDS 5g、Tris-base 15.1 g，甘氨酸 94 g 于试剂瓶中，加 dd·H₂O 至 1 L，于磁力搅拌器搅拌 2h 后室温储存，每次使用时取 200ml，加 dd·H₂O 至 1 L 稀释为 1×；

5×PBS：称取 Nacl 40g，Kcl 1g，Na₂hpo₄·12h₂o 18.15g，加 dd·H₂O 至 1 L，磁力搅拌器搅拌 2h 左右，使用时稀释至 1×，室温储存；

PBST：吸取 0.5mL 的 Tween-20 加至 1L 的 PBS 中，吹打混匀后于磁力搅拌器搅拌 6h，置于室温以备用；

封闭液：电子秤称取脱脂奶粉 1.5g 至 50ml 离心管，再加 PBST30ml，用涡旋振荡器混匀后储存至 4℃；

(2) 用于培养细胞的溶液

完全培养基：以高糖/低糖 DMEM 基础培养基：FBS=9：1 的比例配制相应的完全培养基，完全混匀后放置 4℃冰箱保存以备用；

高糖溶液: 称取 0.45g D-无水葡萄糖至 10mlEP 管中, 再加入 5ml dd·H₂O (高糖溶液浓度为 500mM), 待充分混匀后过滤除菌 (0.22μm 过滤器) 置于 4°C 保存, 使用时稀释至所需浓度;

siRNA 溶液: 取 siRNA (冻干粉的形式) 瞬时高速离心后, 加入 RNase-free Water 充分混匀, 配制为 20μM 的储存液, 为了避免反复冻融分装为 50μl/管, 置于 -20°C 保存, 使用时根据所需浓度加入相应的储存液;

(3) 免疫荧光相关溶液

0.1% Triton X-100: 分别取 7.28mL PBS、2.82mL Triton X-100, 加 dd·H₂O 至 100ml, 水浴锅 40°C, 2h, 此为 30% Triton X-100 溶液, 使用时量取 0.3 mL 30% Triton X-100 溶液, 加入 PBS 至 90mL, 配制成 0.1% Triton X-100 溶液, 室温储存;

3%BSA: 加入 5mlPBS 至 EP 管中, 再加入称取好的 BSA 0.15g, 涡旋振荡器震荡使其完全溶解后储存在 4°C 冰箱以备后续实验使用;

(4) 细菌培养用液

10xLB 液体培养基: 向试剂瓶加入 NaCl 100g、蛋白胨 10g、酵母粉 5g, 去离子水 800ml, 充分溶解后用 NaOH (10mol/L) 调节 pH 至 7.4, 最后定容至 1L, 高压灭菌后 4°C 保存;

LB 固体培养基: 将琼脂粉加入到 LB 液体培养基中使其终浓度为 1.5%, 高压灭菌后倒板于细菌培养皿中, 冷却凝固后, 封存于 4°C;

2000×Ampillicin 储存液 (200 mg/mL): 称取 2g Ampillicin 粉末, 加入 8 mL 去离子水充分溶解定容至 10 mL, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装于 EP 管中, -20°C 保存。

(5). 琼脂糖电泳缓冲溶液配制:

10 × TBE: 540 g Tris 275 g 硼酸溶于 1000 mL 0.5 M EDTA 中

1.2 % Agarose: 取 Agarose 1.2 g, 溶于 1× TBE 50 mL 中, 微波加热沸腾后制胶。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞常规培养

1、MPC5/B-MSCs 的复苏

从-80℃冰箱中取出相应的 MPC5/B-MSCs 细胞冻存管，迅速置于预先升温至 37℃的水浴锅中并使之尽快融化。待完全融化后用 75%的乙醇对冻存管管口进行消毒，并放置于超净台中。将含有细胞的冻存液立即转移至提前准备好的装有 8ml 完全培养基的离心管中吹打混匀后进行离心（1000rpm，5min）。弃上清，可见离心管底部的白色细胞沉淀。向离心管中加入适量的完全培养基以重悬细胞，待充分吹打混匀后接种至培养瓶或培养皿中，用“8”字法混匀细胞，放入孵育箱中，次日待大部分细胞贴壁后更换新的培养基。

2、MPC5/B-MSCs 的传代

待细胞生长至覆盖培养瓶/培养皿 80%面积时弃培养液，用 PBS 清洗细胞 3 次；添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1ml，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5ml 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；弃上清，沉淀细胞用 3ml 完全培养基重悬，一般按照 1：3 的传代比例加入到新的培养瓶/培养皿中，并依次加入 3ml 完全培养基，进行“8”字混匀后镜下观察细胞大致数量及混匀程度，置于孵育箱中。

3、MPC5/B-MSCs 的冻存

待细胞密度≥90%，无需使用细胞时准备进行冻存。应先配制好冻存液，MPC5 冻存液比例为：低糖 DMEM:FBS:DMSO=5：4：1；B-MSCs 冻存液比例：FBS：DMSO=9：1。将原有的培养基吸出，PBS 洗 3 次后添加 0.25%胰蛋白酶消化液约 1ml，倒置显微镜下观察，待细胞回缩变圆后加入 5ml 完全培养液终止消化，再轻轻吹打细胞使之脱落，然后将悬液转移至 15ml 离心管中，1000rpm 离心 5min；弃上清，冻存液重悬细胞，混匀后加入冻存管中，将冻存管直接冻存于-80℃即可。

2.2.2 蛋白印迹

2.2.2.1 蛋白样品制备

（1）根据 250μl/孔提前计算出所需要裂解液的总体积并且多配 250μl 裂解液，提前将细胞刷泡于酒精大约 30min 并取出晾干。

（2）配制细胞裂解液应按照细胞裂解液：碱性磷酸酶抑制剂：蛋白磷酸酶

抑制剂=98: 1: 1 的比例, 混匀后置于冰上。

(3) 待细胞密度达到 80%-90%时取出, 用 PBS 洗 3 次后分别加入细胞裂解液 250 μ l/孔, 用晾干后的细胞刮刮取细胞, 应尽可能将细胞刮干净, 将六孔板放于冰上裂解约 30min 后分别将每孔的裂解液收集于 EP 管中, 并在 EP 管上做好标记。

(4) 提前预冷低温高速离心机至 4 $^{\circ}$ C , 离心 (12000 rpm, 5 min) 后可见 EP 管底部白色细胞碎片, 小心地将上清移至新的 EP 管, 记录所移上清液的体积;

(5) 分别加入 6X Protein Loading Buffer, 混匀后于电磁炉煮锅煮沸 10 min, 取出后置于冰上降温冷却, 可以继续取蛋白样品做 western blot 实验或者冻存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱以备用。

2.2.2.2 电泳

(1) 根据实验所需蛋白分子量配制不同比例的聚丙烯酰胺凝胶, 浓缩胶与分离胶配制表如下:

试剂名称	5%浓缩胶 (ml)	10%分离胶	15%分离胶
H ₂ O	5.5	4.0	2.3
30%Acr/bis	1.3	3.3	5.0
Tris-HCl pH6.8	1.0		
Tris-HCl pH8.8		2.5	2.5
10% AP	0.08	0.1	0.1
10% SDS	0.08	0.1	0.1
TEMED	0.008	0.004	0.004
总体积	8	10	10

(2) 准备样品: 从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出所需的蛋白样品以及 Marker 置于冰上溶解, 分别取出所需的蛋白上样量于新的 EP 管中并做好标记, 夹好防爆夹 100 $^{\circ}$ C 煮 5min, 取出置于冰上待冷却后进行瞬时离心后上样;

(3) 电泳: 待凝胶凝固后加入电泳液, 加入 Marker 以及蛋白样品, 将电泳槽与电泳仪正确连接“红对红, 黑对黑”, 调电压至 80V, 待蛋白跑到分离胶一部分时调压至 120V, 直到蛋白跑完;

(4) 转膜：根据实验所需的蛋白分子量裁胶，根据所裁胶的大小剪出合适的 PVDF 膜并用甲醇激活，在 PVDF 膜右上角剪切一小部分做标记，将转膜夹黑色的一侧放在底面，用滤纸和海绵制作“三明治”结构，注意要排除气泡，将夹子放到转膜槽中，夹子的黑面对转膜槽的黑面，夹子的白面对转膜槽的红面。倒入转膜液，用塑料盆接水 (2/3) 后放入 4 块冰袋，将转膜槽放入盆中进行转膜，电压为 120v，恒流 200mv，转膜 2h。

(5) 封闭：将 PVDF 膜置于孵育盒中，加入提前配好的 5% 脱脂牛奶封闭液，以完全盖住 PVDF 膜为宜，室温摇床孵育 1~2h；

(6) 一抗孵育：提前配好一抗，根据抗体说明书比例进行配制，如 1: 1000，即加 5ul 抗体，5ml 一/二抗稀释液。用 PBST 洗封闭后的 PVDF 膜，洗 3 次，每次 5min。根据一抗对应的蛋白分子量进行裁膜，并在每张膜右上角进行标记，将裁好的膜放到一抗中，以抗体量覆盖蛋白膜为准，置于摇床并放上冰袋至少 1h 后放到 4℃ 冰箱过夜；

(7) 二抗孵育：根据抗体说明书提前配制好所需的二抗，有的是抗兔有的抗鼠，配制二抗兔用 BSA 稀释，配制二抗鼠用 5% 脱脂牛奶稀释。取出一抗中的蛋白膜并清洗，3 次/5min，将蛋白膜放到二抗中，室温摇床孵育 1-2h；

(8) 发光显影：敷完二抗后在洗膜的同时准备好曝光的物品，枪头、纸巾、镊子、显影液 (A、B 液 1: 1)，一般一个蛋白膜需要 100ul 显影液，根据蛋白膜数配适量的显影液；先将薄膜放置于显影器上，再将蛋白膜置于薄膜上，将显影液均匀涂在蛋白膜上，显影并保存数据；

(9) 数据采集分析：用 Image Lab 软件进行数据分析。

2.2.3 实时荧光定量 PCR

2.2.3.1 总 RNA 提取：

(1) 待细胞密度达到 80% 及以上，先观察细胞形态及生长情况，观察细胞有无污染，若细胞形态正常且无污染则取出，若需要保留培养基则应快速吸取培养基并保存。用 PBS 洗细胞 3 次，洗的时候轻轻晃动，留最后一次 PBS，置于冰上；

(2) 提前对枪头、EP 管进行灭菌，用酒精喷洒桌面及实验台上方及周围。带好口罩、手套，穿好工作服。将六孔板中的 PBS 尽可能吸尽，先用 1ml 枪头吸取，再用 200ul 的枪头吸取，加入 TransZol 裂解液 (1ml/孔) 后用枪头进行快

速吹打，应尽量保证无贴壁生长的细胞，应尽量保证每个孔吹打的速度与时间一致，将裂解液转移至 EP 管中并做好分组标记，冰上静置 10min；

(3) 每管加入 200ul 氯仿，剧烈摇晃约 30 次，或者在涡旋振荡器上震荡，静置 3min，将所有 EP 管放到低温高速离心机中并配平，所有 EP 管尖头朝向内部以便观察 RNA 沉淀，12000 rpm 15 min；

(4) 小心取出离心后的 EP 管，用 200ul 枪头随着液面缓慢下移小心地吸取上清液，应尽量避免吸取到杂质，将吸出的上清液转移到新的 EP 管，1:1 加入异丙醇后上下颠倒混匀，静置 10min 后离心 15min 12000rpm，一次性倒掉上清液；

(5) 各加入 1ml 75% 乙醇，再次离心 10000 rpm 8min，倒掉上清液；

(6) 取适量卫生纸铺于桌面，将 EP 管倒扣于纸上以吸附管口的液体，而后用 10ul 枪头将管内的小液滴吸出，晾干；

(7) 加入 DEPC 水，用手拨动 EP 管，瞬时离心将液体收集在管底，直接测 RNA 浓度进行逆转录或者先保存在 -20℃ 以备后续实验；

2.2.3.2 反转录反应

(1) 根据总 RNA 浓度调整各体系中 RNA 体积，反转 40ul 录体系如下：

试剂	体积
RNA	(50ng~2.0ug/RNA 浓度) × 2
Oligo(dT)18	2.0μl
RT/RI Enzyme Mix	2.0 μl
gDNA Remover	2.0 μl
2xES Reaction Mix	20μl
无核酶水	To 40ul

42℃ 15min；85℃ 5s 结束后置于冰上待冷却后可进行后续实验或置于 -20℃ 保存。

2.2.3.3 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

(1) 引物序列：

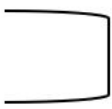
引物名称	序列
------	----

β -actin (F)	5' AACAGTCCGCCTAGAAGCAC 3'
β -actin (R)	5' CGTTGACATCCGTAAAGACC 3'
U6 (F)	5' CTCGCTTCGGCAGCACA 3'
U6 (R)	5' AACGCTTCACGAATTTGCGT 3'
miR-143-3p (F)	5' GGGGTGAGATGAAGCACTG 3'
miR-143-3p (R)	5' CAGTGCGTGTTCGTGGAGT 3'
LC3(F)	5' AGCGTCTCCACACCCATC 3'
LC3(R)	5' GACCAGAACTCCCAGCCA3'
Beclin1(F)	5' TGTCTTCAATGCCACCTTC3'
Beclin1(R)	5' TTTCATTCCACTCCACAGG3'
Bcl-2(F)	5' AAACCCTCCATCCTGTCC 3'
Bcl-2(R)	5' TCCTAAACCCTGCTTCCC 3'

(2) qRT-PCR 反应体系:

试剂	体积
2x QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix	10 μ l
Passive Reference Dye(50 $\times$)	0.4 μ l
Forward Primer(10 μ M)	0.4 μ l
Reverse Primer(10 μ M)	0.4 μ l
cDNA	1 μ l
无核酶水	To 20ul

注意: 根据实验所需体系配好总体积, 向八联管中先分别加入 19 μ l 的体系, 最后每个孔再加 1 μ lcDNA 混匀瞬时离心。实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增反应, 反应条件:

94 $^{\circ}$ C	30s		40-45cycles
94 $^{\circ}$ C	5s		
50-60 $^{\circ}$ C	15s		
72 $^{\circ}$ C	10s		

(3) 分析结果:

根据结果分别记录各组 CT 值 (注意复孔之间 CT 值小于 0.5, 各组之间 CT

值小于2), 根据CT值计算RQ和 $\Delta\Delta CT$ 值, 其中 $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$, 而 $\Delta\Delta CT=(CT_{目的}-CT_{内参})_{实验组}-(CT_{目的}-CT_{内参})_{对照组}$ 。

2.2.4 细胞免疫荧光

(1) 取出24孔板, 用镊子将所需的细胞爬片放于24孔板中, 将细胞种板, 待细胞贴壁后转染或加药处理, 收集时细胞密度达到60%左右即可;

(2) PBS冲洗细胞1mL/孔, 2min/次, 洗3次, 边洗细胞边轻轻晃动;

(3) 吸尽PBS后加入4%多聚甲醛固定剂, 室温固定20min;

(4) 再次用无菌PBS洗细胞1mL/孔, 5min/次, 洗3次;

(5) 加0.1% Triton X透化液透膜处理5min;

(6) 再次用无菌PBS洗细胞1mL/孔, 5min/次, 洗3次;

(7) 加入提前配好的3% BSA室温封闭30min;

(8) 每孔加入稀释好的一抗podocin, 将24孔板放入装有少量水的暗盒中, 4℃孵育过夜;

(9) 次日取出24孔板, 回收一抗后再次用无菌PBS洗细胞1mL/孔, 5min/次, 洗3次;

(10) 按照1:200的比例, 用1%BSA稀释二抗, 加30-50 μ L/孔, 在盒中避光孵育30min(注意: 此后步骤均避光操作);

(11) 用无菌PBS洗细胞1mL/孔, 5min/次, 洗3次;

(12) 每孔加入50 μ L DAPI, 室温孵育5min, 再次用PBS冲洗细胞1mL/孔, 5min/次, 洗5次

(13) 取干净的载玻片, 标记好正反面, 滴5 μ L防淬灭封片剂, 将爬片倒扣于载玻片上, 注意区分爬片的正反面, 不要有气泡。在爬片四周涂少量指甲油进行固定, 置于暗盒中拍照;

(14) 先用倒置荧光显微镜进行图像采集, 再用Image J软件进行数据分析。

2.2.5 BMSCs-exo 提取

待细胞长到70%-80%, PBS洗3遍后再换10%无外泌体的完全培养基, 继续培养24h后收集细胞上清。

超速离心法:

(1) 收集细胞上清。

- (2)将上清液移动至一个新的离心管内, 2000×g, 4 °C, 10 min 离心。
- (3)小心地在将上清液移至新的离心管中, 10000×g, 4 °C, 30 min 再次离心, 以去除较大的囊泡。
- (4)小心取上清液至新的离心管中, 选择超速转子, 4 °C, 110000 g 离心 70 min。
- (5)去除上清, 用预冷的 1×PBS 重悬后再次 4 °C, 110000 g, 70 min 超速离心。
- (6)离心结束后去除上清, 加 200ul 预冷的 PBS 进行重悬
- (7)最终的外泌体重悬液应立即检测或干预或者分装后冻存于-80 °C。

2.2.6 BMSCs-exo 蛋白浓度测定

- (1) 取浓度为 2mg/ml 的蛋白标准品, 用 dd·H₂O 按照 1.5、1.0、0.75、0.5、0.25、0.125、0.025 的浓度梯度进行稀释。
- (2) 依据待测样品和标准样品的总数量, 分别将 A、B 试剂按照 50 比 1 的配制, 提前准备适量的 BCA 工作液, 并且要充分混匀。
- (3) 取 96 孔板, 分别将 25μlBSA 标准样品、待测样品加入其中。
- (4) 每孔加入 200μlBCA 工作液, 并充分混匀。
- (5) 加盖, 37°C 孵育 30 min 后冷却至室温。
- (6) 在 10min 之内利用酶标仪检测其在 562nm 处的吸光度。
- (7) 根据 OD 值作出标准曲线并计算出样品中的蛋白浓度。

2.2.7 PKH67 荧光染色

- (1) 根据其说明书, 先配制染色工作液将 2μl PKH67 母液、20μl 稀释液、478μlPBS 加入 EP 管内。(避光操作) 再将 100μl BMSC-Exos 加入 EP 管内, 混匀静置 5min。(光条件下)
- (2) 加入 600μl 1% BSA(牛胎蛋白 0.01g/无菌 FBS 1ml)终止反应, 加入 200μlBMSCs-Exo 提取试剂上下颠倒以充分混匀, 于 4°C 静置 2h (避光) 后 4°C12000×g 离心 10min 。
- (3) 取出 EP 管倒掉上清液留沉淀, 用 PBS 重悬 BMSC-Exos 后移入新的 EP 管中, 全程避光操作。

后续步骤同 2.2.4

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/548055025111006027>