



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115252646 A

(43) 申请公布日 2022.11.01

(21) 申请号 202211044077.X

A61K 31/202 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.30

(71) 申请人 重庆医科大学附属第一医院

地址 400016 重庆市渝中区袁家岗友谊路1号

(72) 发明人 邵勇 黄孝美 冯帆 陈思羽

董静 李栋

(74) 专利代理机构 重庆鼎慧峰合知识产权代理

事务所(普通合伙) 50236

专利代理师 周维锋

(51) Int. Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 15/06 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

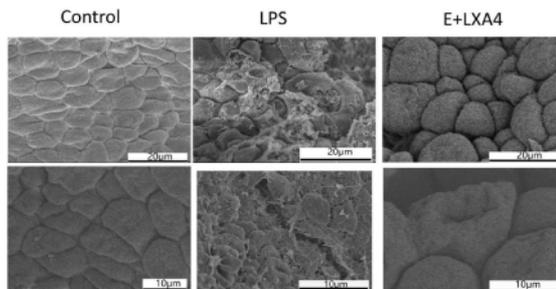
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在制备修复胎膜早破的药物中的应用,属于生物医药技术领域。本发明通过实验验证了脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4能够有效减少胎膜炎症,促进血管增生和胶原蛋白修复,进而实现对胎膜修复和改善胎膜炎症;并进一步探索发现了外泌体联合LXA4通过调节炎症因子IL-6和PNFKB的表达水平,进而实现人绒毛膜滋养层细胞(HTR8)的抗炎作用;本申请证实人脐带间充质干细胞来源的外泌体联合LXA4是一种有效修复胎膜早破的药物,其能够有效修复胎膜破口,同时改善胎膜的炎症,极大减少了感染的并发症,降低流产和早产发生率,可以作为胎膜早破修复的新型药物,有利于临床推广应用,为母胎医学的持续发展注入新活力。



1. 脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在制备修复胎膜早破的药物中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4的给药方式为腹腔给药。
3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述脐带间充质干细胞外泌体的剂量为15 $\mu$ g/Kg,LXA4的剂量为50 $\mu$ g/Kg。
4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述脐带间充质干细胞外泌体包括脐带间充质干细胞外泌体的其他药类及药学上可接受的载体和/或辅料。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述载体为吸收性明胶海绵。

## 脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中的应用。

### 背景技术

[0002] 胎膜早破(Preterm premature rupture of membranes,PPROM)是指妊娠期临产前发生的自发性胎膜破裂。妊娠满37周后的胎膜早破发生率为10%,妊娠不满37周的胎膜早破即未足月胎膜早破发生率为2.0%~3.5%,不满28周发生的中期胎膜早破发生率为0.4%-0.7%。尽管现如今医学条件下极早产儿存活率已有明显改善,但总体存活率仍较低,普遍伴有短期及远期身体发育异常,经济耗费极高。改善未足月胎膜早破孕妇妊娠结局是临床热点,修复胎膜破口更是世界难题。

[0003] 胎膜早破(Premature rupture fetal membrane, PROM)的病因主要包括感染,炎症,创伤和机械性刺激,胎膜发育不良,子宫颈机能不全,宫腔内压力异常等。研究发现,感染造成的炎症和无菌性炎症都是导致胎膜早破的最主要的原因,感染可刺激大量细胞因子产生,后者可促进特异性降解胎膜结构的酶合成、分泌增加,造成胎膜中的胶原代谢失衡而引发胎膜薄弱处破裂,并促进子宫收缩,导致胎膜早破,最终导致流产或早产。

[0004] 目前临床上的治疗措施主要以抗生素控制感染,保胎,促肺成熟为主,目前尚无明确的控制胎膜早破的方案。未足月胎膜早破更是成为临床上的治疗难点,治疗PROM的理想方法为羊膜腔封闭疗法,使羊膜腔重新处于封闭状态,既降低孕妇羊膜腔感染率,又可使羊水量逐渐增加并恢复正常,减少由于羊水过少而导致的婴儿发育迟缓与畸形。但目前存在许多问题:封闭材料的副反应,封闭材料作为一种异源性物质,纤维蛋白胶的化学成分及牛血清可增加宫内感染的几率;羊膜补片所采用的异体血小板存在异源性反应的危险,而自供体法程序繁杂,费用昂贵,限制了临床使用。此外包括纤维蛋白胶在内的封闭材料都存在被胎儿误吸,影响吞咽,造成胎儿发育不良的危险。目前,现有技术中急需一种修复胎膜早破及改善胎膜炎症的方法。

[0005] 甲酰肽受体2(FPR2)是G蛋白偶联受体(GPCRs)家族的成员之一,它参与防御反应、炎症以及葡萄糖和脂质代谢紊乱,主要表达于绒毛滋养层细胞中,与妊娠疾病密切相关。研究发现,FPR2与炎症配体脂氧素A4(LXA4)相互作用,对炎症消退具有重要作用。LXA4是重要的花生四烯酸代谢物之一,是哺乳动物中的主要脂氧素,是正常月经周期、胚胎植入、怀孕和分娩的重要组成部分,与FPR2结合后,可发挥强效抗炎作用。LXA4通过结合高亲和力G蛋白受体抑制中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的募集并刺激巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬作用以及下调NF- $\kappa$ B来发挥其抗炎作用。LXA4也可减少促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的产生,并上调抗炎细胞因子IL-10和TGF- $\beta$ 1的表达。LXA4作为一种有效的抗炎和新型抗氧化介质,已在众多疾病中得到广泛研究。

[0006] 外泌体是具有脂质双分子层的囊泡,内含丰富的蛋白质、核酸、mRNA和miRNA,直径40-100nm,不会阻塞微血管动脉。MSC-EXs具有内在免疫功能,可通过内分泌和旁分泌途径

分泌生物活性因子来靶向细胞和组织,促进成纤维细胞增殖、ECM合成和血管生成,是良好的炎症修复材料。另外,外泌体的生产也相对方便,国内已有非常成熟的技术来对外泌体的生产进行质量控制,相对于人脐带间充质干细胞,外泌体更加的安全,便宜,有效。

[0007] MSC-EXs(人脐带间充质干细胞来源的外泌体)的治疗作用在2010年被首次提出,目前,MSC(MSC=骨髓基质干细胞/间质干细胞)外泌体越来越多的应用到相关治疗研究中。通过将蛋白质和RNA运送到受体细胞来激发治疗活性,MSC-EXs减轻了肝炎和四氯化碳(CCL4)诱导的肝纤维化中的胶原蛋白的沉积,抑制上皮-间质转化(EMT)以此减轻了肝纤维化。MSC-EXs可以通过增强肌生成来促进骨骼肌再生。Tan等对MSC-EXs进行系统评价发现,MSC-EXs可以有效促进骨软骨修复和再生,减少骨关节炎(OA)。因此MSC-EXs有望成为一种新型治疗工具;但关于人脐带间充质干细胞来源的外泌体(MSC-EXs)在修复胎膜早破中的作用,目前还未见报道。

## 发明内容

[0008] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本发明的主要目的在于提供一种脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中的应用。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0010] 脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在制备修复胎膜早破的药物中的应用。

[0011] 在某些具体实施例中,所述脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4的给药方式为腹腔给药。

[0012] 在某些具体实施例中,所述脐带间充质干细胞外泌体的剂量为15 $\mu$ g/Kg,LXA4的剂量为50 $\mu$ g/Kg。

[0013] 在某些具体实施例中,所述脐带间充质干细胞外泌体包括脐带间充质干细胞外泌体的其他药类及药学上可接受的载体和/或辅料。

[0014] 进一步,所述载体为吸收性明胶海绵。

[0015] 与现有技术相比,本发明至少具有以下优点:

[0016] 1) 本发明提供了一种人脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4的新用途,人脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4用于修复胎膜早破,相比于以往的封闭材料,其具有原材料便宜、易得,使用方法简单,生物安全性好,能够在有效的时间里修复胎膜破口,同时改善胎膜的炎症,极大地减少了感染的并发症,降低流产和早产发生率,有利于临床推广应用,为母胎医学做出贡献。

[0017] 2) 本发明所提供的人脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中的应用,通过实验验证了人脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4能够通过降低炎症因子IL-6和PNFKB的表达水平,进而减少HTR8的炎症,即外泌体联合LXA4能够有效促进人绒毛膜滋养层细胞(HTR8)的抗炎作用;并通过苏木精伊红染色、电镜扫描、免疫荧光检测和Masson染色等方法验证了脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中能够有效减少胎膜炎症,促进血管增生和胶原蛋白修复,进而实现对胎膜修复和改善胎膜炎症。

## 附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式,下面将对具体实施方式或现有技术描述

中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0019] 图1为本发明中所述脐带间充质干细胞外泌体的扫描电镜图；

[0020] 图2为本发明所述脐带间充质干细胞外泌体的表面特征标志物；

[0021] 图3为所述脐带间充质干细胞外泌体的粒径分布图；

[0022] 图4为经过不同药物处理后的Control组、LPS组、LXA4组、E组和E+LXA4组，其HTR8细胞的PCR及WB结果；

[0023] 图5为经过不同药物处理后的Control组、LPS组、LXA4组、E组和E+LXA4组，其胎膜的H&E图；

[0024] 图6为经过不同药物处理后的Control组、LPS组、LXA4组、E组和E+LXA4组后，其胎膜的电镜扫描图；

[0025] 图7为经过不同的药物处理后的Control组、LPS组、LXA4组、E组和E+LXA4组后，其胎膜的荧光检测图；

[0026] 图8为经过不同的药物处理后的Control组、LPS组、LXA4组、E组和E+LXA4组后，其胎膜的Masson染色图。

### 具体实施方式

[0027] 为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解，下面结合具体实施例和附图，进一步阐述本发明，但下述实施例仅仅为本发明的优选实施例，并非全部。

[0028] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

[0029] 实施例1：脐带间充质干细胞外泌体的提取：

[0030] 本申请所提供的脐带间充质干细胞外泌体，其通过如下方法提取：

[0031] 1) 人脐带间充质干细胞(huMSC)的分离、纯化

[0032] a. 收集足月发育正常剖宫产孕妇的脐带，排除乙肝、丙肝、梅毒、艾滋、胎膜早破等合并症；

[0033] b. PBS冲洗去表面血液，除去动脉和静脉；

[0034] c. 将清洁的脐带切成1cm的小块，匀浆至1-2mm<sup>3</sup>的体积，放入含10%胎牛血清的DMEM-F12培养基；

[0035] d. 37℃下用5%CO<sub>2</sub>培养细胞，第一代传代培养后，每3天以1:3的比例传代细胞，将第二代细胞用于实验。

[0036] 2) 人脐带间充质干细胞外泌体的提取和鉴定

[0037] a. 二氧化碳培养箱内培养huMSC，待细胞融合至70-80%，弃去上清，用PBS冲洗两遍；

[0038] b. 换成无血清培养基(DMEM/F12)培养48h后，收集培养基上清；

[0039] c. 将一定量的上清以300×g离心10min去除完整细胞；

[0040] d. 再经2 000×g离心30min进一步去除死细胞和杂质；

[0041] e. 再经10 000×g离心45min去除细胞碎片；

[0042] f. 随后培养基通过过滤膜(0.45μm)，将过滤后的液体在4℃、100000g超速离心

70min,得到含有间充质干细胞分泌的外泌体沉淀,吹打均匀,BCA法测huMSC-EXs浓度,-80℃保存。

[0043] 将提取的脐带间充质干细胞外泌体通过扫描电镜(TEM)检测外泌体形态;NTA检测粒径;通过WB方法检测huMSC-EXs的表面特征标志物,结果如图1、图2和图3所示,从图1中可以清晰的看到该脐带间充质干细胞外泌体的形态为球形,从图2中可以看出huMSC-EXs的表面特征标志物为包括CD9、CD63和TSG101,从图3可以看出,该脐带间充质干细胞外泌体的粒径为50-150nm。

[0044] 实施例2脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在人体胎盘滋养细胞(HTR8)中的应用

[0045] 1)人绒毛膜滋养层细胞系(HTR-8/SVneo)购自美国典型培养物保藏中心(ATCC,美国),在含有L-谷氨酰胺(Thermo Fisher Scientific,USA)、10%胎牛血清(FBS,PAN-Biotech,德国)和1%青霉素-链霉素的Gibco™RPMI 1640培养基中培养。所有细胞均在标准培养条件下(37℃和5%CO<sub>2</sub>加湿空气)生长。

[0046] 细胞分为五组:(1)Control组:用PBS处理;(2)LPS组:用2μg/mL LPS处理;(3)LPS+LXA4组(LXA4组):2μg/mL LPS和100ng/mL LXA4联合处理;(4)LPS+外泌体组(E组):2μg/mL LPS和100μg/mL外泌体;LPS+LXA4+外泌体组(E+LXA4):2μg/mL LPS,100ng/mL LXA4和100μg/mL外泌体联合处理。24小时后,收集细胞用于定量PCR以及蛋白质印迹检测。

[0047] 2)效果鉴定

[0048] 根据制造商的方案,使用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA,使用Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean for qPCR合成cDNA,并使用SYBR Premix Ex Taq和LightCycler™96仪器进行qPCR。结果如图4(A),提示LPS组IL-6明显升高,外泌体联合LXA4治疗后炎症因子IL-6降低,说明外泌体联合LXA4可以减少HTR8的炎症;

[0049] 细胞直接在含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中裂解。通过BCA测定定量后,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离每个样品的20μg蛋白质并转移到PVDF膜上。蛋白印迹用快速封闭液(新赛美,WB4600)封闭10分钟,然后与特异性一抗(PNFKB,NFKB)在4℃下过夜。结果如图4(B)提示LPS组PNFKB明显升高,外泌体联合LXA4治疗后PNFKB降低,说明外泌体联合LXA4可以减少炎症。

[0050] 实施例3:脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在胎膜炎症小鼠中的应用

[0051] 1)胎膜早破炎症孕鼠模型的建立及治疗

[0052] 本申请中胎膜早破炎症孕鼠模型的建立和给药方式如下:

[0053] 妊娠13-15d的C57孕鼠25只随机分为五组,通过利用国外常用的炎症模型建立方法利用LPS诱发胎膜炎症;将上述五组孕鼠经过药物腹腔注射处理2d,具体如表1所示:

[0054] 表1炎症孕鼠模型建立及治疗

表 1: 炎症孕鼠模型建立及治疗

分组	药物处理(腹腔注射)×2d
Control 组	生理盐水
LPS 组	LPS(500μg/Kg)
[0055] LPS+LXA4 组 (LXA4 组)	LPS(500μg/Kg)+LXA4 (50μg/Kg)
LPS+外泌体组(E 组)	LPS(500μg/Kg)+外泌体 (15μg=3.4X10 <sup>9</sup> particles)
LPS+外泌体+LXA4 组 (E+LXA4 组)	LPS(500μg/Kg)+LXA4 (50μg/Kg) + 外泌体 (15μg=3.4X10 <sup>9</sup> particles)

[0056] 2) 效果鉴定

[0057] (1) 孕鼠妊娠15-17d时进行剖宫产收集胎膜,采集后放入无菌容器中的冰冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,并立即转移到实验室,PBS清洗,一部分液氮保存,其余部分用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,苏木精伊红染色(H&E),结果如图5所示,从图5可以看出,LPS组小鼠胎膜出现明显炎症细胞,排列紊乱,外泌体联合LXA4治疗后炎症细胞减少,说明外泌体联合LXA4可以减少胎膜炎症。

[0058] (2) 扫描电镜检测方法:胎膜组织在2.5%戊二醛中固定24小时,然后在含有0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)的1%OsO<sub>4</sub>固定1小时。将样品在分级系列乙醇(50%、70%、90%、99.5%和100%)中脱水,使用冷冻干燥装置用二氧化碳进行临界点干燥,安装在溅射镀膜机中并涂上金;最后,在扫描电镜下观察标本。

[0059] 结果如图6所示,从图6中可以看出,正常组见羊膜上皮细胞排列整齐;LPS组见上皮细胞凹陷和明显胎膜炎症微裂缝;LPS+外泌体+LXA4组见上皮细胞较充盈及炎症微裂缝修复,说明外泌体联合LXA4可以有效对胎膜进行修复。

[0060] (3) 免疫荧光检测方法:将5μm厚的石蜡包埋小鼠胎膜组织切片在60℃下烘烤2小时后染色。载玻片用一系列分级乙醇再水化成去离子水。在95℃,pH 6下进行20分钟抗原回收。随后,分别用CD31,α-SMA孵育,每个一抗孵育时间为60min。用DAPI观察细胞核。随后,使用抗兔/鼠多聚辣根过氧化物酶作为二次标记,孵育时间为10min;载玻片用抗褪色贴装介质进行贴装,4℃保存;切片于倒置荧光显微镜下观察并采集图像;采用Image软件,对不同组的荧光强度进行统计,每个背景观察3个随机视野。

[0061] 结果如图7所示,图7为胎膜早破炎症孕鼠模型中血管生成状态图;从图中可以看出,外泌体联合LXA4治疗组可促进胎膜血管显著增生。

[0062] (4) Masson染色:将石蜡切片在二甲苯中脱蜡并用梯度酒精(100-95-85-75%)脱水后,用30-40℃热水冲洗样品两次,每次60秒。按照Masson染色试剂盒的方案和说明,将切片进行染色。用ImageJ软件评估染成淡蓝色的纤维化区域。

[0063] 结果如图8所示,从图8中可以看出LPS组的胶原蛋白明显减少,上皮细胞排列紊乱;LPS+外泌体+LXA4组见上皮细胞较整齐胶原蛋白增多,说明外泌体联合LXA4可以促进胶原蛋白修复;

[0064] 综上,本申请所提供的脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中能够有效减少胎膜炎症,促进血管增生和胶原蛋白修复,以及实现了对胎膜的修复。

[0065] 本申请所提供的脐带间充质干细胞外泌体联合LXA4在修复胎膜早破中的应用,具体使用时,为将外泌体(15μg)+LXA4溶液(50μg/kg)与吸收性明胶海绵(1\*1cm<sup>2</sup>)结合,制

备成外泌体海绵。在内窥镜下,将外泌体海绵置入治疗人员的阴道中即可;将外泌体与LXA4溶液负载于吸收性明胶海绵上,外泌体与LXA4联合使用能够有效修复胎膜和减少胎膜炎症,而可吸收明胶海绵具有良好的组织相容性和可吸收性,是一种疏松、多孔的海绵状材料,具有较强的吸水能力,能封堵胎膜创口,同时在人体内10天左右可被吸收。即采用将外泌体与LXA4溶液负载于吸收性明胶海绵不仅能够有效封堵创口,修复胎膜和减少胎膜炎症,明胶海绵的主要结构为高分子生物材料,柔软透气,具有良好的创面附着能力以及组织相容性,无任何毒副作用,材料易得、生物安全性高等优点。对比其他生物补片,明胶海绵可塑性强,排斥反应小,有止血作用。

[0066] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围,其均应涵盖在本发明的权利要求和说明书的范围当中。

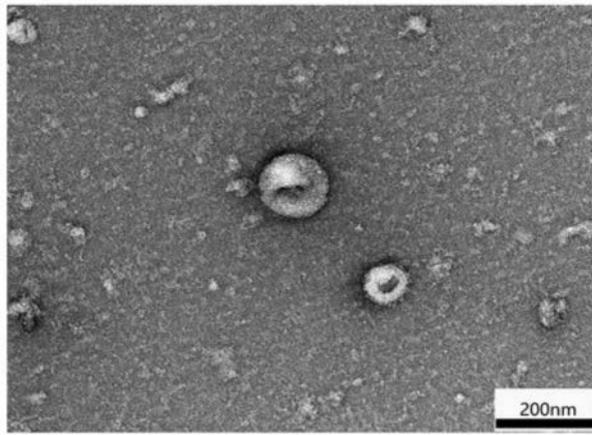


图1

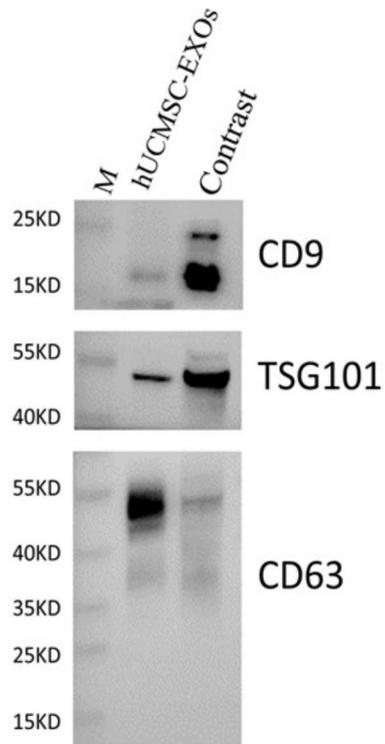


图2

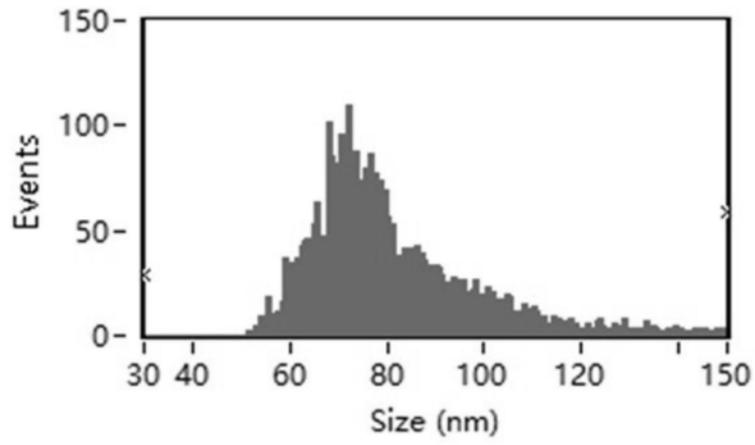


图3

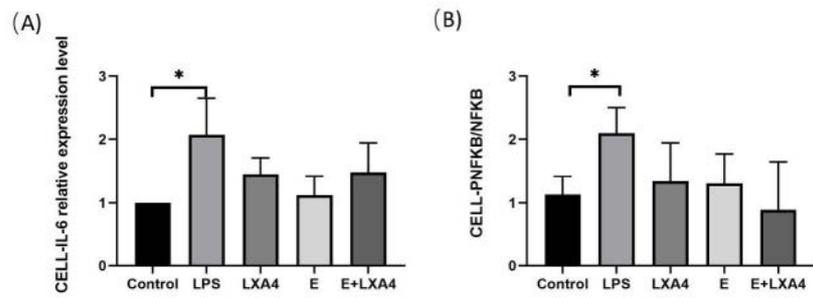


图4

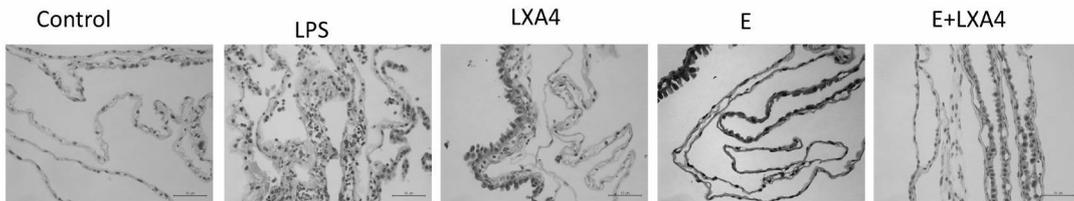


图5

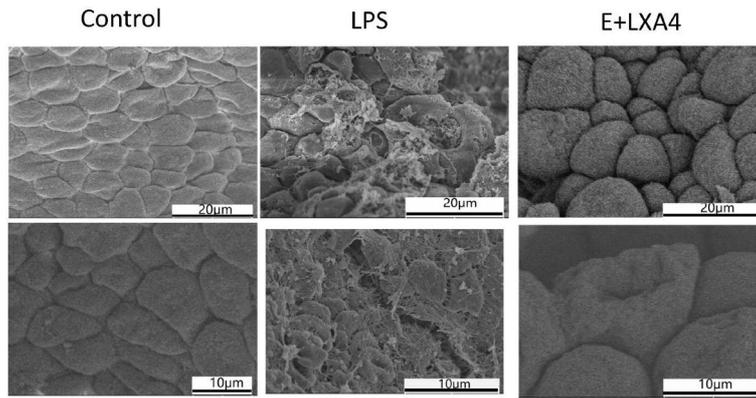


图6

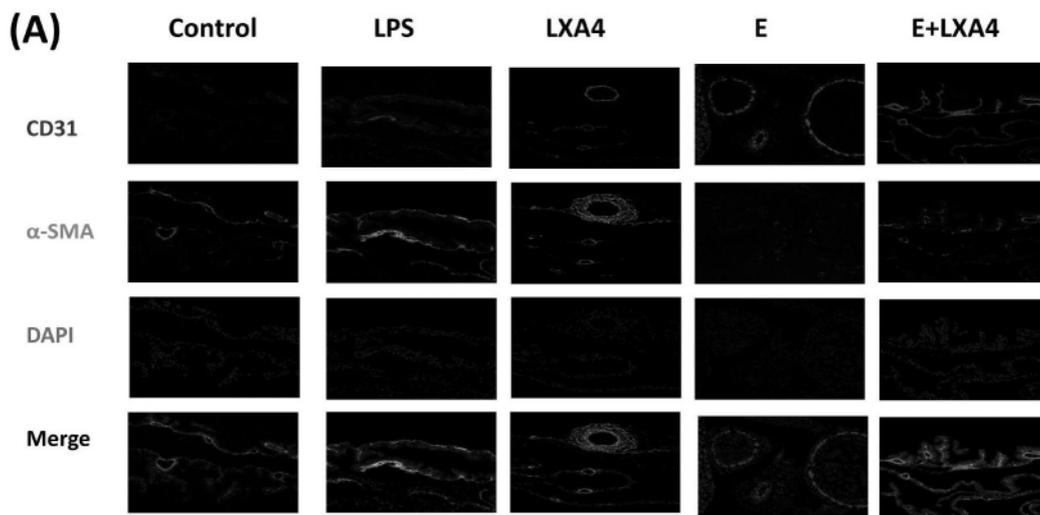


图7

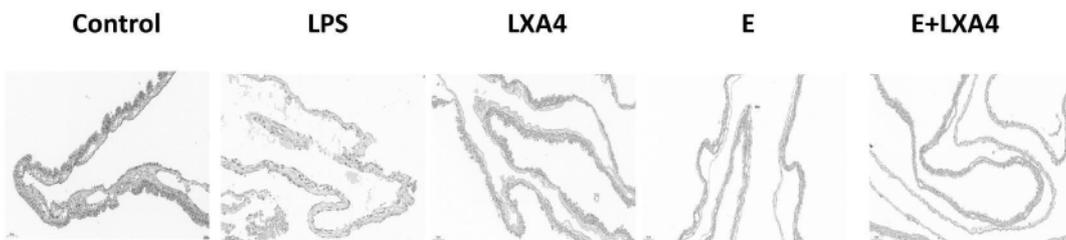


图8