(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114480260 A
(43)申请公布日 2022.05.13

(21)申请号 202210080879.X

(22)申请日 2022.01.24

(71)申请人 同济大学
地址 200092 上海市杨浦区四平路1239号
申请人 苏州吉美瑞生医学科技有限公司

(72)发明人 左为 张婷

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225
专利代理师 林君如

(51)Int.Cl.
C12N 5/074(2010.01)
A61K 35/42(2015.01)
A61P 11/00(2006.01)

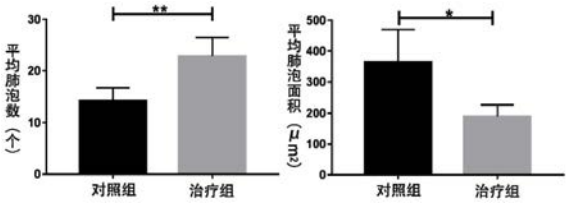
权利要求书2页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种成体肺干细胞外泌体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种干细胞外泌体，具体涉及一种成体肺干细胞外泌体及其制备方法和应用，包括如下步骤：S1：将肺干细胞接种并进行培养，至密度达50-90％融合时，收集肺干细胞；S2：将收集到的肺干细胞进行传代培养，待细胞生长至密度达60-100％融合时，弃去培养基并洗涤，加入外泌体收集液培养；S3：收集培养得到的含外泌体的收集液并过滤；S4：混合过滤后的收集液和PEG溶液，静置过夜；S5：将外泌体-PEG混合液离心，弃去上清液，经重悬后，得到成体肺干细胞外泌体。与现有技术相比，本发明制备了一种能够有效治疗慢性阻塞性肺病的成体肺干细胞外泌体，并通过结合雾化治疗的方式，得到了良好的治疗效果。



CN 114480260 A

1.一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1:将肺干细胞接种于第一培养器皿中进行培养,待细胞生长至密度达50-90%融合时,收集肺干细胞;

S2:将步骤S1收集到的肺干细胞于第二培养器皿中进行传代培养,待细胞生长至密度达到60-100%融合时,弃去培养基并洗涤,随后加入外泌体收集液继续进行培养;

S3:收集步骤S2培养得到的含有外泌体的收集液并进行过滤;

S4:将步骤S3过滤后的收集液与PEG溶液混合后静置过夜,得到外泌体-PEG混合液;

S5:将步骤S4得到的外泌体-PEG混合液离心,弃去上清液,经重悬后,得到所述的成体肺干细胞外泌体。

2.根据权利要求1所述的一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,其特征在于,步骤S1包括如下一项或多项:

(i)培养使用的培养基为肺干细胞培养基;接种密度为0.5-10×10^4个细胞/cm^2;

(ii)所述的第一培养器皿中预先铺被有滋养层细胞;所述的滋养层细胞的接种密度为0.5-5×10^4个细胞/cm^2;

(iii)所述的第一培养器皿中预先铺被有基底胶,所述的基底胶为蛋白浓度不低于1mg/mL的Matrigel Matrix。

3.根据权利要求1所述的一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,其特征在于,步骤S1中所述的收集肺干细胞的步骤为:弃去培养基并用PBS缓冲液洗涤一次,随后按照0.075-0.2mL/cm^2加入0.05-0.25%胰酶并在37℃下孵育0.5-15min,重复至少一次,直至肺干细胞全部脱落,终止消化,随后在1100-1200rpm转速下离心3-5min得到肺干细胞沉淀。

4.根据权利要求1所述的一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,其特征在于,步骤S2包括如下一项或多项:

(i)传代培养使用的培养基为肺干细胞培养基,接种密度为0.5-10×10^4个细胞/cm^2;

(ii)所述的第二培养器皿中还预先铺被有1.8-3mg/mL的基底胶,所述的基底胶为蛋白浓度不低于1mg/mL的Matrigel Matrix;

(iii)所述的洗涤为用PBS缓冲液冲洗细胞若干次;

(iv)所述的外泌体收集液为DMEM培养基、MEM培养基、F12培养基、PBS缓冲液、生理盐水和复方电解质注射液中的一种或多种,按照0.1-0.4mL/cm^2加入外泌体收集液;所述的继续进行培养的时间为12-36h。

5.根据权利要求1所述的一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,其特征在于,步骤S3中所述的过滤为采用0.22-0.45μm的过滤器进行过滤。

6.根据权利要求1所述的一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,其特征在于,步骤S4中所述的PEG溶液由160g/L PEG 6000、58.5g/L NaCl和纯水配置而成;所述的收集液与PEG溶液的体积比为0.8-1.2:1;所述的静置过夜的温度为2-8℃。

7.根据权利要求1所述的一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,其特征在于,步骤S5包括如下一项或多项:

(i)所述的离心为在2-8℃、3000-15000g的条件下离心0.5-2h;

(ii)所述的重悬为使用PBS缓冲液、生理盐水或复方电解质注射液使外泌体细胞重新溶解。

8.一种成体肺干细胞外泌体，其特征在于，由如权利要求1-7任一所述的制备方法制备得到。

9.一种如权利要求8所述的成体肺干细胞外泌体在制备用于预防或治疗以肺损伤为病理特征的慢性呼吸系统疾病的药物中的应用。

10.根据权利要求9所述的一种成体肺干细胞外泌体的应用，其特征在于，将所述的药物稀释雾化后使用。

一种成体肺干细胞外泌体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种干细胞外泌体，具体涉及一种成体肺干细胞外泌体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 以慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease，COPD，简称慢阻肺)为代表的一系列重大呼吸系统疾病已成为全球第三大死亡原因。其共同病理特征为肺实质和小气道损伤导致慢性气道阻塞、肺部纤维化、呼吸阻力增加和肺功能不全，通常与直接暴露于有害颗粒或气体环境中有关。世界卫生组织预测，仅慢阻肺一项疾病，到2030年将影响全球近4亿人。此类患者会因肺损伤导致肺功能进行性减退，进而严重影响病人的劳动力和生活质量，造成巨大的经济负担。在我国，慢阻肺是导致慢性呼吸衰竭和慢性肺源性心脏病最常见的病因，约占全部病例的80％。

[0003] 目前针对此类肺损伤性疾病的治疗方法无法直接阻止其发展，主要在于减轻症状以及改善生活质量。肺移植是终末期的唯一治疗方法，然而，器官移植本身就存在潜在的手术风险，合适的供体肺也十分缺乏，并且移植治疗后患者需要终身服用免疫抑制剂，种种原因的叠加导致肺移植后患者的死亡率仍较高(5年生存率约为50％)。

[0004] 干细胞的研究在过去的几十年里引起了广泛关注，特别是在器官损伤和病变组织再生方面有着巨大的治疗潜力。干细胞具有自我更新和多向分化的能力，以干/祖细胞为基础的再生治疗逐步成为实现各类退行性疾病治愈的希望。针对呼吸系统疾病，干细胞的治疗作用主要受三种机制的调节：(1)归巢，即通过多种给药途径进入患者体内的干细胞可直接迁移至肺部损伤位置发挥作用；(2)分化成各种类型的细胞，对受损组织结构进行修复；(3)分泌各种生物活性因子以及外泌体等细胞外囊泡，在免疫调节、保护肺泡上皮细胞、抵抗肺纤维化、改善肺功能等方面发挥重要作用，对肺部疾病的治疗大有裨益。然而，尽管干细胞在组织修复中的应用前景广阔，但其实际应用方面仍面临重重困境，包括细胞长时间在体外培养中容易发生转化的可能，细胞的不稳定性增加了其在体内致瘤和免疫的风险，以及大规模生产所带来的高昂成本问题等。

[0005] 细胞外囊泡(Extracellular Vesicles，EVs)由脂质、核酸和蛋白质组成，不包含细胞核，不能复制，是一类从细胞中自然释放的颗粒，这些颗粒由脂质双分子层包裹与外界环境分隔开。外泌体(Exosomes)是EVs的一种亚型，经内泌体途径形成，直径通常为30-150nm。外泌体最初被认为是细胞排出废物的一种方式，然而，越来越多的研究发现外泌体可参与细胞-细胞通信、细胞维护和肿瘤进展等过程。最近的多项研究表明，间充质干细胞所分泌的细胞外囊泡可以模拟许多间充质干细胞的临床治疗功能，多项临床前动物模型研究也提出干细胞来源的EVs治疗可能是预防或逆转各种肺部疾病的可行选择。多种来源的EVs能够修复肺损伤，改善呼吸功能，在某些情况下还能提高实验动物的存活率。目前认为这些有益效果的实现是通过EVs内miRNA、RNA和蛋白质等物质通过多种转移机制，包括配体-受体相互作用、直接膜融合、内吞作用或吞噬作用，从而激活相应受体细胞内的信号通

路以调控各种生物反应,其中常见的有益成分包括miRs-126、30b-3p、145、27a-3p、粘结合蛋白多糖-1(Syn-1)、肝细胞生长因子和血管生成素-1(ANG-1)等。

[0006] 目前的数据表明,外泌体可以有效模拟其来源细胞在肺损伤临床前模型中的治疗效果,并且它的免疫原性更低,可以避免许多与使用活细胞相关的安全问题,如血栓形成;此外,与细胞不同,EVs在给药后不能增殖或重新编程,这降低了致瘤风险,因此EVs被认为是干细胞的一种更安全的替代品,这种细胞衍生产品为大量肺部疾病患者提供了另一种选择,已成为一种潜在的治疗药物。然而,要真正将其应用到临床上还要考虑到外泌体生产的标准化。

发明内容

[0007] 本发明的目的就是为了解决上述问题至少其一而提供一种成体肺干细胞外泌体及其制备方法和应用,实现了一种能够有效治疗COPD的成体肺干细胞外泌体的制备,并通过采用雾化治疗的方式修复肺损伤,得到了良好的治疗效果。

[0008] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

[0009] 本发明第一方面公开了一种成体肺干细胞外泌体的制备方法,包括如下步骤:

[0010] S1:将肺干细胞接种于第一培养器皿中进行培养,待细胞生长至密度达50-90%融合时,收集肺干细胞;

[0011] S2:将步骤S1收集到的肺干细胞于第二培养器皿中进行传代培养,待细胞生长至密度达到60-100%融合时,弃去培养基并洗涤,随后加入外泌体收集液继续进行培养;

[0012] S3:收集步骤S2培养得到的含有外泌体的收集液并进行过滤;

[0013] S4:将步骤S3过滤后的收集液与PEG溶液混合后静置过夜,得到外泌体-PEG混合液;

[0014] S5:将步骤S4得到的外泌体-PEG混合液离心,并弃去上清液,经重悬后,得到所述的成体肺干细胞外泌体。

[0015] 其中,肺干细胞为支气管基底层细胞(Bronchial basal cells),支气管基底层细胞可以通过纤维支气管镜等无创或微创的方式获取,同时,其在一定培养条件下能够稳定地实现分离和扩增,进而能够达到符合临床治疗使用的数量和质量。

[0016] 优选地,步骤S1中培养使用的培养基为肺干细胞培养基;接种密度为0.5-10×10^4个细胞/cm^2。

[0017] 其中,肺干细胞培养基包括DMEM/F12基础培养基、10vol%胎牛血清、1mM L-谷氨酰胺、5ng/mL胰岛素、0.1ng/mL表皮生长因子、5ug/mL腺嘌呤和5ug/mL氢化可的松。该肺干细胞培养基可以对极微量的肺干细胞进行扩增和长期传代,并能够维持肺干细胞的特性。

[0018] 优选地,步骤S1中所述的第一培养器皿中预先铺被有滋养层细胞;所述的滋养层细胞的接种密度为0.5-10×10^4个细胞/cm^2。

[0019] 优选地,所述的第一培养器皿中预先铺被有基底胶,所述的基底胶为蛋白浓度不低于1mg/mL的Matrigel Matrix。其中,基底胶选用的Matrigel Matrix通常为蛋白浓度在8-12mg/mL的浓稠胶状液体,铺被前需将其稀释至蛋白浓度为1.8-3mg/mL后,加入培养皿在37℃条件下进行铺被,此时的铺被量控制在0.05mL/cm^2左右。

[0020] 也就是说,在将肺干细胞接种于第一培养器皿中时,第一培养器皿可以不做铺被

处理，也可以仅铺被滋养层细胞或基底胶，也可以同时铺被滋养层细胞和基底胶。滋养层细胞能够为细胞培养提供一定的营养和支持；再加入基底胶可以进一步有利于细胞的贴壁生长，得到的细胞形态会更优。

[0021] 优选地，所述的滋养层细胞为经γ射线辐照灭活的3T3-J2小鼠胚胎成纤维细胞。

[0022] 优选地，步骤S1中所述的收集肺干细胞的步骤为：弃去培养基并用PBS缓冲液洗涤一次，随后按照0.075-0.2mL/cm^2加入0.05-0.25％胰酶并在37℃下孵育0.5-15min，重复至少一次，直至肺干细胞全部脱落，终止消化，随后在1100-1200rpm转速下离心3-5min得到肺干细胞沉淀。

[0023] 具体来说，

[0024] 当培养器皿中铺被有滋养层细胞时，收集肺干细胞的步骤为：在弃去培养基并用PBS缓冲液洗涤一次后，按照0.075-0.2mL/cm^2加入0.05％胰酶并在37℃下孵育0.5-5min，直至滋养层细胞全部脱落，弃去液体；再向固体中按照0.075-0.2mL/cm^2加入0.25％胰酶并在37℃下孵育3-15min，直至肺干细胞全部脱落，终止消化，随后在1100-1200rpm转速下离心3-5min得到肺干细胞沉淀。

[0025] 当培养器皿中不铺被有滋养层细胞时，收集肺干细胞的步骤为：按照0.075-0.2mL/cm^2加入0.25％胰酶并在37℃下孵育3-15min，直至肺干细胞全部脱落，终止消化，随后在1100-1200rpm转速下离心3-5min得到肺干细胞沉淀。

[0026] 优选地，步骤S2中传代培养使用的培养基为肺干细胞培养基，接种密度为0.5-10×10^4个细胞/cm^2。

[0027] 其中，肺干细胞培养基包括DMEM/F12基础培养基、10vol％胎牛血清、1mM L-谷氨酰胺、5ng/mL胰岛素、0.1ng/mL表皮生长因子、5ug/mL腺嘌呤和5ug/mL氢化可的松。

[0028] 优选地，步骤S2中所述的第二培养器皿中还预先铺被有1.8-3mg/mL的基底胶，所述的基底胶为蛋白浓度不低于1mg/mL的Matrigel Matrix。

[0029] 优选地，步骤S2中所述的洗涤为用PBS缓冲液冲洗细胞若干次。

[0030] 优选地，步骤S2中所述的外泌体收集液为DMEM培养基、MEM培养基、F12培养基、PBS缓冲液、生理盐水和复方电解质注射液中的一种或多种，按照0.1-0.4mL/cm^2加入外泌体收集液使用；所述的继续进行培养的时间为12-36h。外泌体收集液的加入可以提供无外泌体的液体环境来富集肺干细胞外泌体。

[0031] 优选地，步骤S3中所述的过滤为采用0.22-0.45μm的过滤器进行过滤；进一步优选采用0.22μm的过滤器进行过滤。过滤主要用以去除细胞碎片等少量悬浮于上清液中的物质，以得到纯净的上清液。通过过滤去除细胞碎片和尺寸较大的细胞外囊泡，避免其他类型细胞外囊泡(微囊泡和凋亡小体等)的混入，提高外泌体纯度。

[0032] 优选地，步骤S4中所述的PEG溶液由160g/L PEG 6000、58.5g/L NaCl和纯水配置而成；所述的收集液与PEG溶液的体积比为0.8-1.2:1；所述的静置过夜的温度为2-8℃。需要说明的是，PEG溶液需要经高温、高压和灭菌后使用。PEG溶液的加入会进一步将上清液中的外泌体进行沉淀，有利于后续的分离。

[0033] 优选地，步骤S5中所述的离心为在2-8℃、3000-15000g的条件下离心0.5-2h。

[0034] 优选地，步骤S5中所述的重悬为使用PBS缓冲液、生理盐水或复方电解质注射液使外泌体细胞重新溶解。

[0035] 本发明第二方面公开了一种成体肺干细胞外泌体，由如上任一所述的制备方法制备得到。

[0036] 本发明第三方面公开了一种如上所述的成体肺干细胞外泌体在制备用于预防或治疗以肺损伤为病理特征的慢性呼吸系统疾病的药物中的应用。

[0037] 优选地，将所述的药物稀释雾化后使用。其中，稀释雾化可以采用市售的雾化器实现。

[0038] 与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

[0039] 1、本发明的成体肺干细胞外泌体在小鼠实验中，表现出良好的性能：未使用本发明的小鼠(对照组)氧饱和度处于较低水平，肺体积膨大，颜色苍白，边缘钝圆，可见肺大疱、肺泡有所扩张，肺泡间隔变窄或断裂、平均肺泡数变少，平均肺泡面积较大且上皮细胞区发生的增殖较少，且血气分析结果显示其肺功能低下，说明其肺病理损伤严重；而使用本发明方法得到的外泌体进行治疗的小鼠(治疗组)在肺功能和病理损伤改善程度上均表现出了更优结果，说明采用本发明涉及的方法得到的外泌体具有良好的的治疗效果，可以修复肺结构和功能。

[0040] 2、本发明的制备方法与其他外泌体制备方法相比，能在短时间内处理更大量的原液，操作简便，成本较低，无需高速离心设备(离心力>60000g)，回收率更高，外泌体尺寸分布更加集中，且外泌体的形态与其他方法所得相似，表明其质量较佳。本发明通过过滤去除了细胞碎片和尺寸较大的细胞外囊泡，有效避免了其他类型细胞外囊泡(微囊泡和凋亡小体等)的混入，进而能够提高最终成体肺干细胞外泌体的纯度。此外，本发明的制备方法简单易行，原料易取得，培养条件温和，可以作为批量制备成体肺干细胞外泌体的方法，为进一步深入研究提供物质基础。

[0041] 3、本发明的成体肺干细胞外泌体可以通过简单的稀释雾化后使用，操作简单易行，且可以搭配市售的雾化器使用，有利于成体肺干细胞外泌体的广泛应用；或者，本发明的成体肺干细胞外泌体还可以进一步制备成药物使用，可以形成大批量的生产使用。

附图说明

[0042] 图1为实施例1培养得到的成体肺干细胞外泌体的镜下形态图(放大倍数100×)；

[0043] 图2为实施例2培养得到的成体肺干细胞外泌体的镜下形态图(放大倍数100×)；

[0044] 图3为实施例3中重悬后的成体肺干细胞外泌体的粒径分布示意图；

[0045] 图4为实施例3中重悬后的成体肺干细胞外泌体的透射电镜图；

[0046] 图5为实施例4中治疗组与对照组的小鼠血气分析示意图；

[0047] 图6为实施例4中治疗组与对照组的小鼠的肺脏的大体观察图；

[0048] 图7为实施例4中治疗组与对照组的小鼠的肺脏石蜡切片的H&E病理染色图(放大倍数40×)；

[0049] 图8为实施例4中治疗组与对照组的小鼠的肺脏的平均肺泡数和平均肺泡面积的定量统计示意图；

[0050] 图9为实施例4中治疗组与对照组的小鼠的肺脏石蜡切片的免疫荧光染色图(放大倍数200×)；

[0051] 图10为实施例4中治疗组与对照组的小鼠的增殖和修复标志物定量统计示意图。

具体实施方式

[0052] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。

[0053] 以下实施例中所使用的各原料未作特别说明，均可采用本领域技术人员能够常规获得的市售产品。

[0054] 实施例1

[0055] 将成体肺干细胞复苏接种于铺被有1.8mg/mL Matrigel Matrix和4.5×10^5个细胞滋养层细胞的10cm培养皿中进行培养，培养所使用的培养基为肺干细胞培养基，接种密度为1×10^4个细胞/cm^2。接种5天后，成体肺干细胞呈细胞克隆状生长，为典型的上皮干细胞生长形态。其镜下形态如图1所示，可见肺干细胞体积较小，形态规则，排列紧密，克隆边缘清晰。当细胞继续生长至密度达到80％融合时，弃去原有培养基，并使用PBS洗涤1次，加入5mL 0.05％胰酶后在37℃条件下孵育2.5min，直到在显微镜下观察发现滋养层细胞全部脱落，弃去液体，加入5mL 0.25％胰酶，继续在37℃条件下孵育8min，观察到在显微镜下观察发现肺干细胞全部脱落，加入5mL肺干细胞培养基终止消化，将细胞悬液全部收集于15mL离心管，1100rpm条件下离心5min后弃去上清，得到肺干细胞沉淀。

[0056] 将肺干细胞用2mL肺干细胞培养基重悬，充分吹打混匀后用细胞计数板进行细胞计数，根据计数结果，按3.5×10^4个/cm^2的接种密度接种于铺被有1.8mg/mL Matrigel Matrix的4个15cm培养皿中进行传代培养，培养所使用的培养基为肺干细胞培养基。当细胞生长至密度达到100％融合时，弃去原有的培养基，用PBS缓冲液洗涤3次，随后向每个15cm培养皿中加入25mL DMEM并在37℃继续培养24小时，最终得到含有外泌体的外泌体收集液。收集全部外泌体收集液，用0.22μm过滤器进行过滤，以去除细胞碎片等悬浮物。

[0057] 将过滤后的外泌体收集液与预先配置完成的PEG溶液以1:1的体积比进行混合，并在4℃下静置过夜。此处采用的PEG溶液为将64g PEG 6000和23.4g NaCl溶解于400mL纯水中，并进行高温高压灭菌后得到。将静置过夜的混合液在4℃、10000g条件下离心1h，弃去离心后的上清液，得到外泌体沉淀。

[0058] 实施例2

[0059] 将成体肺干细胞复苏接种于铺有3mg/mL Matrigel Matrix的T75培养瓶中进行培养，培养所使用的培养基为肺干细胞培养基，接种密度为3×10^4个细胞/cm^2。接种3天后，成体肺干细胞在显微镜下的生长形态如图2所示。当细胞生长至约80％时，弃去原有培养基，并使用PBS洗涤1次，加入8mL 0.25％胰酶，在37℃条件下孵育5min，观察到在显微镜下观察发现肺干细胞全部脱落，加入8mL肺干细胞培养基终止消化，将细胞悬液全部收集于50mL离心管，1200rpm条件下离心3min后弃去上清，得到肺干细胞沉淀。

[0060] 将肺干细胞用1mL肺干细胞培养基重悬，充分吹打混匀后用细胞计数板进行细胞计数，根据计数结果，将肺干细胞按8×10^4个/cm^2的接种量接种于铺有3mg/mL Matrigel Matrix的1个T75培养瓶中进行传代培养，培养所使用的培养基为肺干细胞培养基。当细胞生长至密度达到90％融合时，弃去原有培养基，用PBS缓冲液冲洗细胞3次，随后向培养瓶中加入20mL DMEM/F12并在37℃继续培养12h。培养结束后收集全部液体，并用0.45μm的过滤器进行过滤，以去除细胞碎片等悬浮物。

[0061] 将过滤后的外泌体收集液与预先配置完成的PEG溶液以1:1的体积比进行混合，并在4℃下静置24h。将静置过夜的混合液在4℃、14500g的离心力下进行离心1h，弃去离心后

的上清液，并使用1mL生理盐水对离心得到的外泌体沉淀进行重悬，随后分装并置于-80℃冻存。

[0062] 实施例3

[0063] 使用纳米流式仪对实施例1得到的外泌体进行粒径和浓度检测，100mL外泌体上清液所收集得到的外泌体沉淀用1mL PBS缓冲液进行重悬，随后进行外泌体性状检测。经测定，外泌体的粒径分布如图3所示，大部分集中在60-80nm的范围内，符合细胞外泌体的一般特征和尺寸范围，浓度为2.10×10^{9}particles/mL。其透射电镜如图4所示，呈典型的外泌体样结构，即为茶托型或一侧凹陷的半球形。以上检测结果证实经过本发明中说明的方法制备的非干细胞外泌体性状均一，形态典型。

[0064] 实施例4

[0065] 将实施例1得到的成体肺干细胞外泌体作为治疗COPD小鼠模型的治疗组；不含外泌体的外泌体收集液(此实施例中为DMEM)经过滤、PEG混合、静置、离心和重悬步骤后，作为对照组进行外泌体治疗COPD效果的测定：

[0066] 治疗组：取500μL-80℃冻存的外泌体悬液并解冻，用10mL DMEM稀释，加入雾化器中，对5只COPD小鼠同时进行雾化治疗。给药周期为每天1次，每次30min，连续治疗7天。

[0067] 对照组：取500μL对照组并解冻，用10mL DMEM稀释后，加入雾化器中，对5只COPD小鼠同时进行雾化治疗。给药周期为每天1次，每次30min，连续治疗7天。

[0068] COPD小鼠造模方法为：取6-8周龄的C57BL/6小鼠，采用异氟醚将其麻醉后，向气管内灌注含有20μg/mL脂多糖和8U/mL猪胰蛋白酶的生理盐水溶液，构建COPD肺损伤，每只小鼠灌注体积为50μL，连续灌注3天，随后2天不做任何处理。在第5天后COPD小鼠造模完成，可以进行雾化治疗。

[0069] 连续治疗7天后，将小鼠麻醉后取颈动脉血进行血气分析，分析结果如图5所示，其中治疗组氧饱和度相较对照组有所回升，且具有统计学意义，表明COPD小鼠的肺功能有所改善。

[0070] 在治疗过程中，对照组有1只小鼠出现死亡。经过解剖判断是由于肺损伤严重导致肺大疱形成造成小鼠死亡。在治疗7天后，对剩余存活小鼠肺脏进行大体观察，结果如图6所示，上排为对照组的全肺组织照片，下排为治疗组的全肺组织照片，可见对照组小鼠的肺体积膨大，颜色苍白，边缘钝圆，可见肺大疱，说明其出现严重的肺水肿和肺实质损伤。相对的，治疗组小鼠肺脏损伤程度更轻，其形态更接近于正常小鼠肺脏。

[0071] 对小鼠肺脏进行石蜡包埋、切片和H&E病理染色，图7所示为治疗组和对照组的H&E病理染色结果。上排为对照组，下排为治疗组。可见对照组小鼠肺脏的肺泡有所扩张，肺泡间隔变窄或断裂，肺实质部分炎症反应强烈，以上特征均与COPD临床病理表现相似；而治疗组小鼠肺脏的肺泡损伤得到控制，炎症反应有所缓解。对H&E病理染色进行平均肺泡数和平均肺泡面积的定量统计分析，如图8所示，外泌体治疗后平均肺泡数变多，平均肺泡面积变小，肺脏结构得到恢复。

[0072] 对两组小鼠肺脏的石蜡切片进行免疫荧光染色，以反映小鼠肺部的细胞增殖情况，如图9所示，上排为对照组，下排为治疗组。可见使用外泌体进行雾化治疗的治疗组小鼠肺脏中，其上皮细胞区域存在更广泛地增殖细胞标志物Ki67蛋白表达，说明其原有的上皮细胞大量进入细胞周期进行增殖。结合图10所示的定量分析(采用Image J软件进行)，可以

证明治疗组的增殖比相对于对照组更高,说明外泌体雾化治疗能够激活小鼠肺脏上皮层细胞增殖,促进其损伤后修复,表明治疗具有一定效果

[0073] 综合上述的实验结果可见,本发明所提供的成体肺干细胞外泌体在对COPD小鼠连续治疗7天后,即产生明显的治疗效果,使COPD小鼠的症状有所缓解,说明成体肺干细胞外泌体对于COPD具有一定的治疗效果,可以应用于潜在的治疗肺脏损伤的药物制备中。

[0074] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

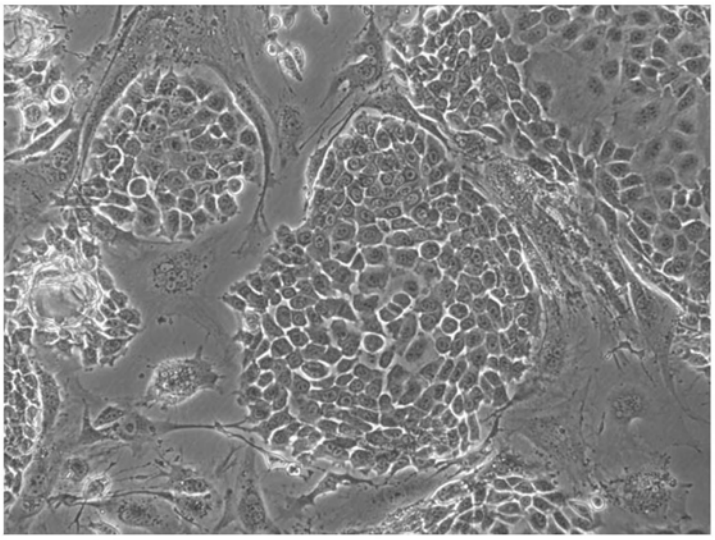


图1

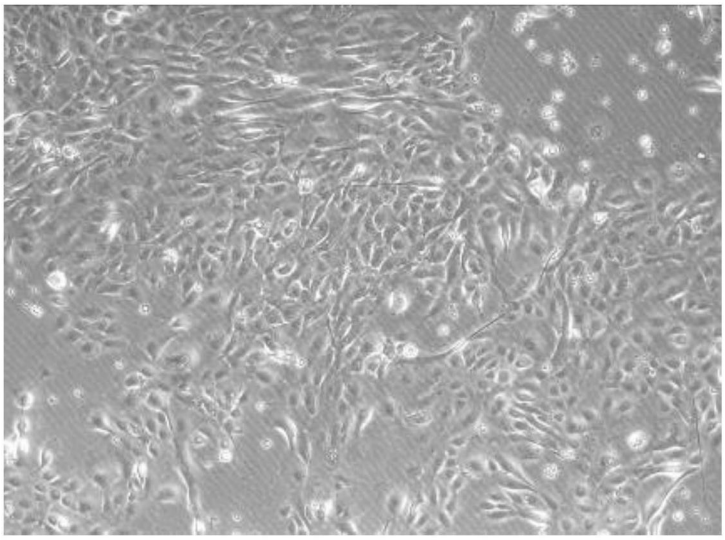


图2

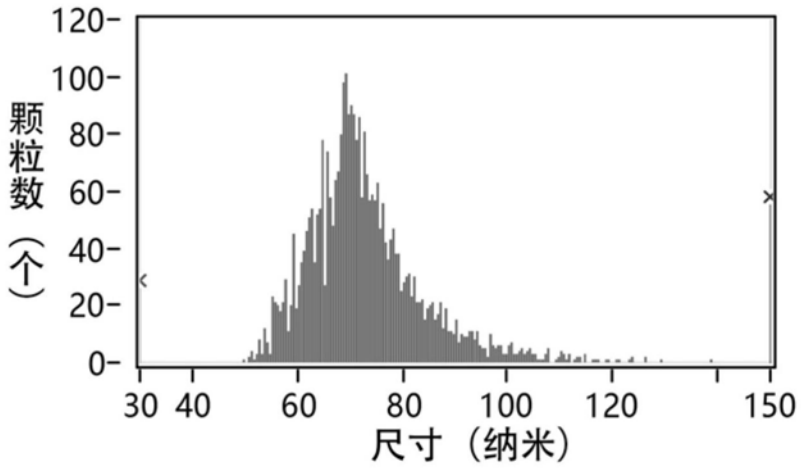

120
100
80
60
40
20
0
颗粒数（个）
30 40 60 80 100 120 150
尺寸（纳米）

图3

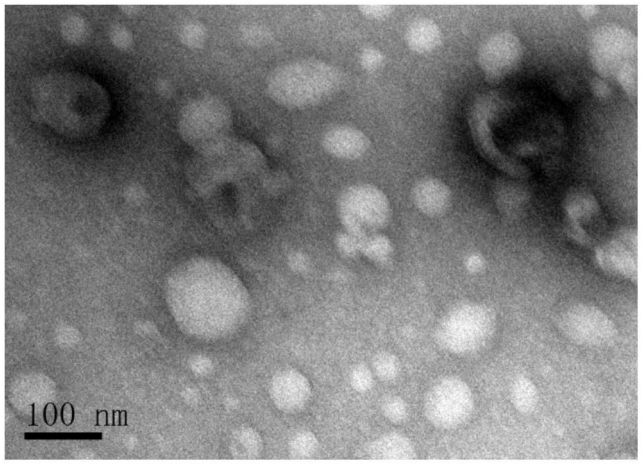

100 nm

图4

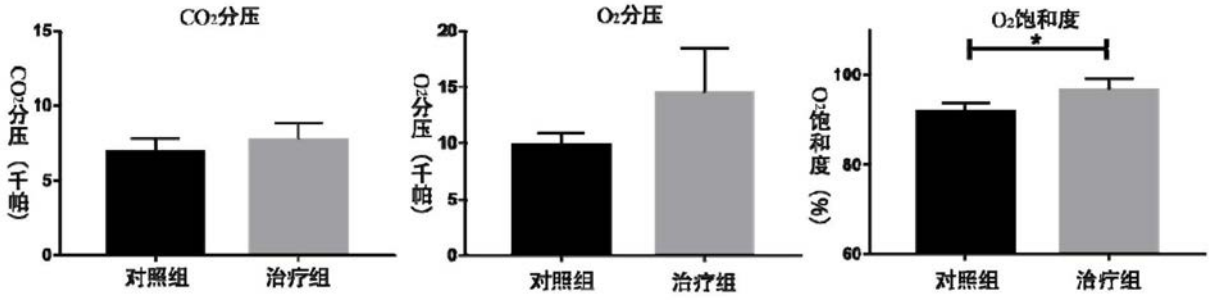

CO2分压
CO2分压（千帕）
15
10
5
0
对照组
治疗组
O2分压
O2分压（千帕）
20
15
10
5
0
对照组
治疗组
O2饱和度
*
O2饱和度（%）
100
80
60
对照组
治疗组

图5

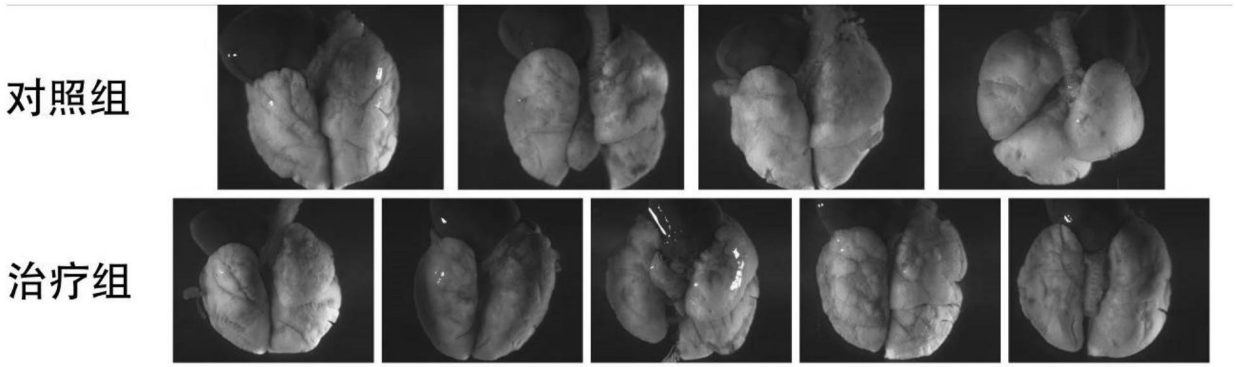

对照组
治疗组

图6

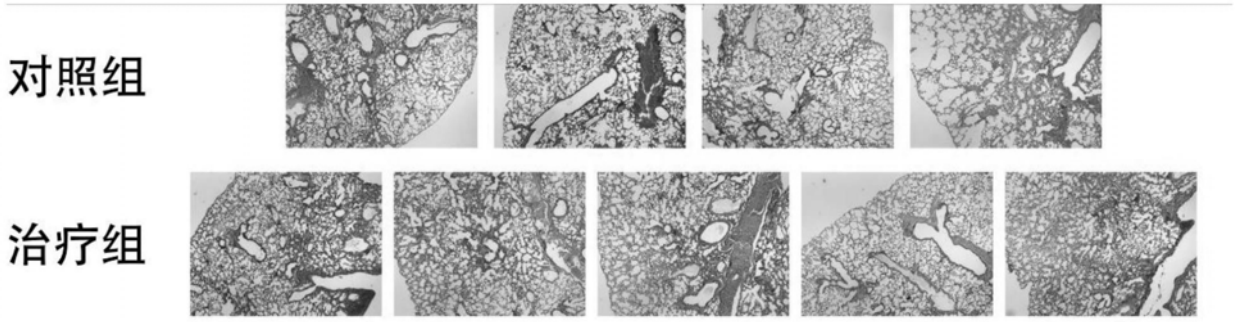

对照组
治疗组

图7

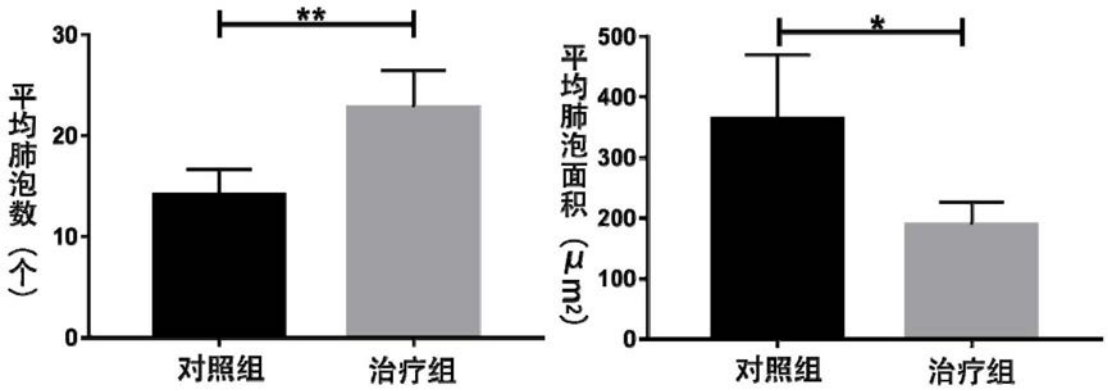

平均肺泡数（个）
30
20
10
0
**
对照组
治疗组
平均肺泡面积（μm2）
500
400
300
200
100
0
*
对照组
治疗组

图8

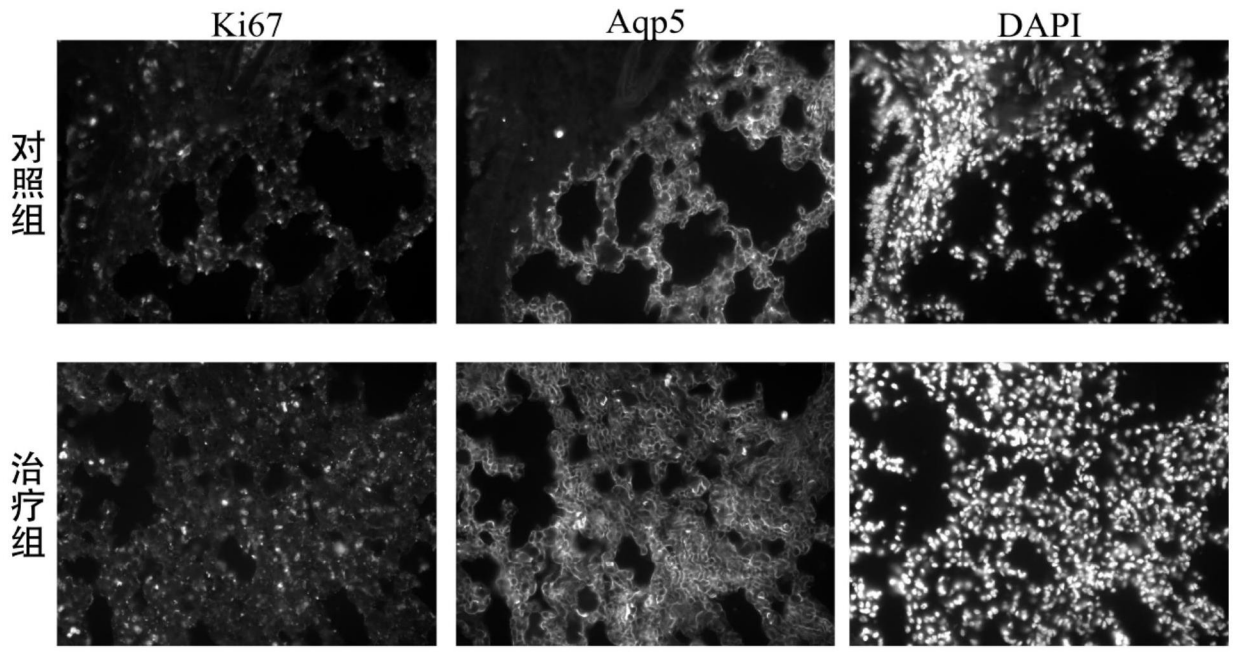


图9

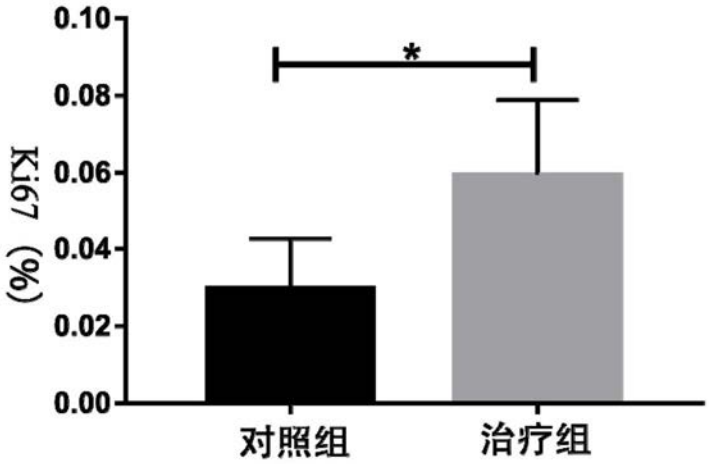


图10