



Effect of exosomes derived from rabbit bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of collagen, aggrecan, and tumor necrosis factor-alpha genes in nucleus pulposus cells

Sheikhi F^a, Baharara J^{b*}, Nejad Shahrokhbabadi KH^a, Lotfi M^b

^a Department of biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

^b Department of Biology and Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article o



Citation: Sheikhi F, Baharara J, Nejad Shahrokhbabadi KH, Lotfi M. Effect of exosomes derived from rabbit bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of collagen, aggrecan, and tumor necrosis factor-alpha genes in nucleus pulposus cells. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(4): 277-292.

 <https://10.61186/JCT.14.4.277>

KEYWORDS

Nucleus pulposus cells,
Exosomes derived from mesenchymal stem cells,
Collagen,
Aggrecan,
Tumor necrosis factor-alpha.

ABSTRACT

Aim: Low back pain (LBP) is one of the most common musculoskeletal diseases in the world. Apoptosis of nucleus pulposus (NP) cells and structural changes in the intervertebral disc (IVD) matrix cause its degeneration and are directly related to LBP. Because of exosomes derived from mesenchymal stem cells (MSC-Exo) are high therapeutic potential and may be valuable options for decreasing intervertebral disc degeneration (IDD).

The present study evaluates changes in the expression level of genes responsible for repairing NP cells (collagen and aggrecan) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene and the effectiveness of exosomes in inhibiting excessive apoptosis of NP cells under inflammation.

Material and Methods: Exosomes were separated by ultracentrifuge. They were identified with the help of transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscope (AFM), and dynamic light scattering (DLS). Cell viability was evaluated by MTT assay and DAPI staining. Real-time PCR measured the expression of collagen, aggrecan, and TNF- α genes.

Results: Exosomes are vesicles with a diameter of about 35.5 to 100 nm. Based on the findings of the MTT assay, the survival rate of the inflammatory cells treated with exosomes was significantly different from the inflammation group without treatment (*P<0.05 at the dose of 100 μ g/ml, **P<0.01 at the doses of 25 and 50 μ g/ml). DAPI results showed a decrease in cell death in the exosome-treated group. Real-time PCR results showed increased expression of collagen (*P<0.05) and aggrecan (**P<0.001) genes and decreased the TNF- α (**P<0.01) gene in inflammatory cells treated with exosomes.

* Corresponding author. Tel.: 05138437092

E-mail address: baharara78@gmail.com

DOI: <https://10.61186/JCT.14.4.277>

Received: 7May. 2023; Received in revised form: 29 Nov. 2023; Accepted: 18 Dec. 2023

Original Article

©Author



Conclusion: Exosomes derived from mesenchymal stem cells can increase collagen and aggrecan gene expression and decrease TNF- α gene expression in treated cells.



اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش بر بیان ژن‌های کلاژن، اگریکان و فاکتور نکروز دهنده تومور- آلفا در سلول‌های نوکلئوس پولپوزوس

فرزانه شیخی^۱، جواد بهارآرا^{۲*}، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۳، مریم لطفی^۴

^۱ کارشناسی ارشد، ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران farzaneh_sheikhi@yahoo.com
^۲ استاد، زیست‌شناسی-سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران baharara78@gmail.com
^۳ استادیار، ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران Shahrokhahady@yahoo.com

^۴ دانشجوی دکتری، زیست‌شناسی-سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران Maryam.lotfi74@yahoo.com

چکیده	واژگان کلیدی
<p>هدف: در مطالعه حاضر، تغییرات سطح بیان ژن‌های کلاژن، اگریکان و فاکتور نکروز دهنده تومور- آلفا در سلول‌های NP التهابی تیمار شده با اگزوزوم و اثربخشی اگزوزوم بر کاهش آپوپتوزیس سلول‌های NP ملتهب بررسی شد. مواد و روش‌ها: اگزوزوم‌ها با روش اولتراسانتریفیوژ جدا سازی و با کمک میکرو سکوپ الکترونی عبوری، میکرو سکوپ نیروی اتمی و روش پراکندگی نور پویا شنا سایی شدند. زیستایی سلول‌ها با آزمون MTT و رنگ‌آمیزی DAPI مورد بررسی قرار گرفت. سنجش بیان ژن‌های کلاژن، اگریکان و TNF-α با روش Real-time PCR صورت گرفت. نتایج: MSC-Exo، وزیکول‌هایی با قطر ۳۵/۵ تا ۱۰۰ نانومتر می‌باشند. بر اساس آزمون MTT، میزان زیستایی سلول‌های ملتهب تیمار شده با اگزوزوم تفاوت معناداری نسبت به گروه التهابی بدون تیمار داشت ($P < 0/05$) در دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، $P < 0/01$ در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). نتایج DAPI نشان‌دهنده کاهش آپوپتوزیس در گروه تیمار شده با اگزوزوم بود. نتایج Real time PCR، افزایش بیان ژن‌های کلاژن ($P < 0/05$) و اگریکان ($P < 0/001$) و کاهش بیان ژن TNF-α ($P < 0/01$) در سلول‌های التهابی تیمار شده با اگزوزوم را نشان داد. نتیجه‌گیری: اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند باعث افزایش بیان ژن‌های کلاژن و اگریکان و کاهش بیان ژن TNF-α در سلول‌های تیمار شده شوند و لذا ضرورت مطالعات کلینیکی کم‌درد کاملاً محسوس و پیشنهاد می‌شود.</p>	<p>سلول‌های نوکلئوس پولپوزوس، اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کلاژن، اگریکان، فلکتور نکروز دهنده تومور- آلفا.</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۷</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۷</p>

۱- مقدمه

کم‌درد (LBP) یک مشکل بالینی شایع و یکی از علل اصلی ناتوانی جسمی است که هزینه‌های اجتماعی و اقتصادی زیادی را بر خانواده و جامعه تحمیل می‌کند. بر اساس مطالعات، ۸۰ درصد از بزرگسالان LBP را در مقطعی از زندگی خود تجربه می‌کنند (۱-۲). سازمان بهداشت جهان (WHO)، LBP را به‌عنوان ششمین بیماری سنگین در جهان معرفی کرده است (۳).

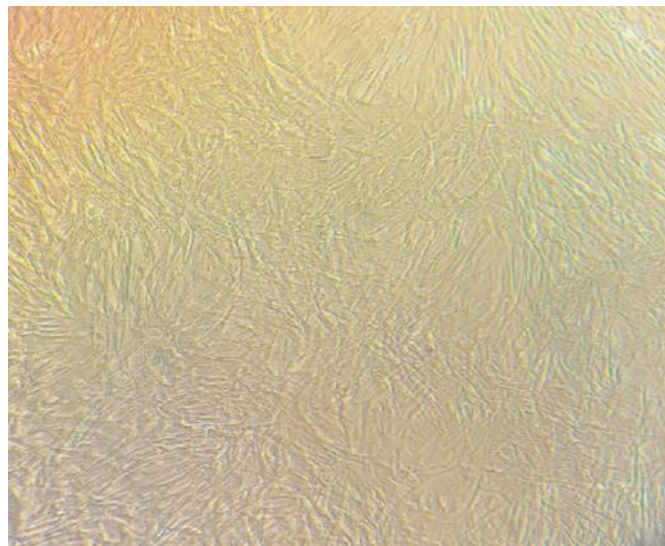
یکی از مهم ترین علل LBP، دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای (IDD) است که عوامل متعددی از جمله تغییر بار مکانیکی، انحطاط ماتریکس خارج سلولی (ECM)، استرس اکسیداتیو، پیری بیش از حد، آپوپتوزیس سلول های نوکلئوس پولپوزوس (NP) و التهاب، به پیشرفت آن کمک می‌کنند (۴-۵). IDD یک فرآیند پیچیده با واسطه سلولی است که منجر به تغییرات در ساختار و عملکرد دیسک بین مهره‌ای (IVD) می‌شود (۶). از نظر بالینی، IDD یک بیماری پیشرونده و مزمن است که باعث درد پا، بی حسی و ناراحتی در ناحیه کمر می‌شود (۷). کاهش کلاژن نوع II و پروتئوگلیکان‌ها در سلول های NP از عوامل ایجاد IDD می‌باشد (۸). IVD از سه بخش متمایز سلول های NP، آنولوس فیبروزوس (AF) (و صفحات انتهایی غضروفی هیالین (CEP)) تشکیل شده است (۹). بافت NP یک بافت ژل مانند و هیدراته غنی از پروتئوگلیکان و کلاژن نوع II است که دارای خواص هیدرواستاتیکی برای خنثی کردن بار مکانیکی روی ستون فقرات است. NP در فرآیند دژنراتیو IVD نقش دارد؛ همچنین توانایی بازسازی NP حداقل است (۱۰-۱۱). AF که از ۱۵ تا ۲۵ لاملا متحدالمرکز حاوی رشته های کلاژن نوع I و II و فیبرهای الاستین تشکیل شده است، سلول های NP را احاطه می‌کند. همچنین سلول های NP و AF در IVD توسط صفحات CEP از بالا و پایین محصور می‌شوند (۱۲). اگریکان و کلاژن در سلول های NP، ماتریکس خارج سلولی (ECM) پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند. هموستاز مناسب ECM در سالم نگه داشتن دیسک نقش دارد (۱۳). تغییرات دژنراتیو اولیه در سلول های NP با تخریب کلاژن نوع II و اگریکان توسط متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs) (و دیس اینتگرین‌ها همراه است. علاوه بر این، سنتز و هیدراتاسیون ECM کاهش می‌یابد و تخریب سلول های NP را تشدید می‌کند (۱۴). یکی از دلایل اصلی بروز IDD، فرآیندهای التهابی است که توسط سایتوکین‌هایی مانند فاکتور نکروز تومور-آلفا (TNF- α) (و اینترلوکین-1) IL-1 (ایجاد می‌شود (۱۵). TNF- α در IVD دژنره شده به شدت بیان شده و باعث افزایش پاسخ‌های التهابی می‌شود. بیان بیش از حد آن ممکن است یک عامل ایجاد کننده IDD باشد. TNF- α تخریب ECM را افزایش می‌دهد، پیری سلول را تسریع می‌کند و باعث آپوپتوزیس و پیروپتوز سلول های IVD می‌شود (۱۶). الگوهای درمانی فعلی در پزشکی استفاده از سلول های بنیادی از جمله سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) می‌باشد که از مغز استخوان جدا می‌شوند. این سلول‌ها جمعیتی از سلول های پیش‌ساز چند توان هستند که می‌توانند بافت‌های مختلف را بازسازی کنند (۱۷). ارتباط بین سلولی سلول های بنیادی و سلول های آسیب دیده از طریق آزاد شدن وزیکول‌ها از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تنظیم می‌شود که سیگنال‌های سلولی را منتقل می‌کنند (۱۸). سلول های بنیادی مزانشیمی می‌توانند از طریق عوامل پاراکرین خود مانند اگزوزوم‌ها در برابر مرگ سلولی در IVD محافظت کنند. به همین دلیل، اگزوزوم‌ها می‌توانند جایگزینی برای درمان‌های مبتنی بر سلول های بنیادی باشند (۱۹). اگزوزوم‌ها دارای ساختار وزیکولی بین ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر هستند که توسط اکثر سلول‌ها به مایعات بدن آزاد می‌شوند. اگزوزوم‌ها شامل پروتئین‌ها، DNA، mRNA، microRNA و RNA طولانی غیر کدکننده هستند (۲۰). اگزوزوم‌ها با تعدیل سیستم ایمنی، تحریک تکثیر سلولی، افزایش رگ‌زایی، جلوگیری از آپوپتوزیس و سرکوب استرس اکسیداتیو اثرات درمانی دارند و با انتقال آنزیم‌های فعال به بازگرداندن فعالیت طبیعی سلول به هموستازی و ترمیم سلول کمک می‌کنند (۲۱). استفاده از اگزوزوم‌ها یکی از درمان‌های مفیدی است که می‌تواند IDD را کاهش و یا از ایجاد آن جلوگیری کند، بازسازی سلول های NP را تسریع و استرس شبکه آندوپلاسمی و مرگ سلول های نوکلئوس پولپوزوس را کنترل کند (۲۲). با توجه به اثر مثبت اگزوزوم در ترمیم و بازسازی بافت‌ها، در مطالعه حاضر اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش بر تغییرات سطح بیان ژن‌های مسئول ترمیم سلول های NP (کلاژن و اگریکان) و ژن التهابی TNF- α در سلول های التهابی تیمار شده با اگزوزوم و سلول های التهابی بدون تیمار بررسی و نقش محافظتی اگزوزوم‌ها بر کاهش آپوپتوزیس سلول های NP تحت التهاب ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

کلیه روش‌های مورد استفاده در این پژوهش بر طبق مصوبات کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با شناسه اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1401.149 انجام شد.

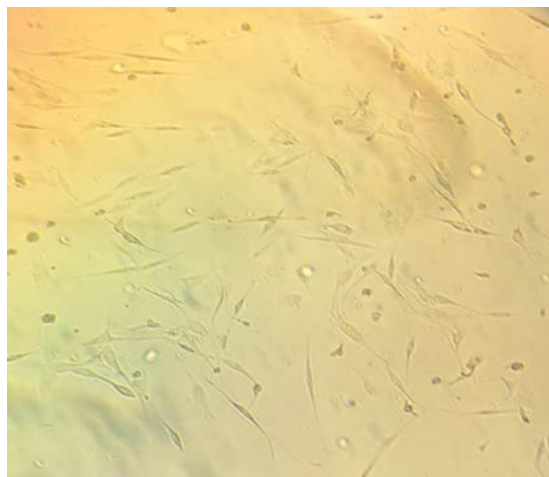
روش تحقیق: این تحقیق در سال ۱۴۰۱ در مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد جهت "بررسی بیان ژن‌های کلاژن، اگریکان و فاکتور نکروز دهنده تومور- آلفا در سلول‌های نوکلئوس پولپوزوس تیمار شده توسط آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش" انجام شد.

استخراج سلول‌های نوکلئوس پولپوزوس: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از خرگوش نژاد سفید نیوزلندی استفاده شده است. خرگوش با تزریق عضلانی کتامین و زایلازین کشته شد. ستون فقرات تحت شرایط استریل خارج شد و عضلات از دیسک جدا شدند. آنولوس فیبروزوس دیسک بین مهره‌ای برش داده شد و بافت ژلاتینی داخل دیسک به طور کامل جمع‌آوری شد. پس از برش به قطعات، بافت مورد نظر در ۰/۲ درصد کلاژناز II به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار هضم شد. سوسپانسیون در ۱۲۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلیت سلولی در محیط کشت DMEM-LG به همراه ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند (شکل ۱) (۲۳).



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی سلول‌های NP - درشت نمایی $\times 100$

استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان: استخوان ران بدون بافت اضافی جدا شد، انتهای استخوان‌ها بریده شد و با استفاده از سرنگ، مغز استخوان از استخوان ران خرگوش آسپیره و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ g سانتریفیوژ شد. پلیت سلولی در محیط DMEM-LG، ۱۵ درصد FBS و ۱۰ درصد آنتی بیوتیک کشت داده شدند (شکل ۲) (۲۴).



شکل ۲: تصویر میکروسکوپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان - درشت‌نمایی $\times 100$

استخراج اگزوزوم از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با روش اولتراسانتریفیوژ: برای جداسازی اگزوزوم‌ها، بعد از ۳ تا ۵ پاساژ، محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد. سپس سه دور سانتریفیوژ متوالی به ترتیب با دور g ۳۰۰، g ۲۰۰۰ و g ۱۰۰۰۰ انجام شد. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی نهایی از فیلتر 0.2 میکرون عبور داده شد و در نهایت اولتراسانتریفیوژ به مدت ۶۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰۰ انجام شد تا اگزوزوم‌ها رسوب کنند. سپس اگزوزوم‌ها در 500 میلی‌لیتر PBS سرد، معلق شد و غلظت کل پروتئین توسط کیت سنجش پروتئین BCA تشخیص داده شد و سپس تا زمان استفاده در دمای 20 - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۵).

شناسایی اگزوزوم مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی

شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) (شرکت TESCAN BRNO- Mira3 LMU، آمریکا) برای تعیین مورفولوژی اگزوزوم‌ها استفاده شد. اگزوزوم‌ها با استفاده از پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شده و مخلوط روی صفحه‌ی پوشیده شده از مس قرار گرفت و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شد. سپس محلول خشک شده توسط ۱ درصد اورانیل استات، لکه دار شده و در نهایت توسط میکروسکوپ TEM بررسی شد.

شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): ساختار سه بعدی اگزوزوم با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) (شرکت JPK، آلمان) مورد مطالعه قرار گرفت. برای آماده‌سازی، نمونه‌ها در دستگاه سونیکاتور قرار گرفتند. پس از خروج از دستگاه سونیکاتور نمونه‌ها فیکس شدند سپس یک قطره کوچک روی لام قرار داده شد و پس از حدود ۱۵ دقیقه، زمانی که نمونه‌ها خشک گردید بررسی توسط میکروسکوپ نیروی اتمی صورت گرفت.

شناسایی اگزوزوم توسط روش پراکندگی نور پویا (DLS): از پراکندگی نور پویا (DLS) برای اندازه‌گیری قطر ذرات استخراج شده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده شد. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Zetasizer Nano (شرکت HORIBA، فرانسه) و تکنیک DLS بررسی شدند.

گروه های آزمون

سلول‌ها در گروه‌های شاهد و تجربی زیر بررسی شدند:

گروه شاهد: سلول‌های NP سالم (شرایط طبیعی کشت و فاقد تیمار). گروه شاهد آزمایشگاهی: سلول‌های NP التهابی بدون تیمار (برای ایجاد التهاب در سلول‌های NP، سلول‌ها تحت تأثیر عامل التهابی LPS قرار گرفتند). گروه تجربی ۱: تیمار سلول‌های NP التهابی با غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم. گروه تجربی ۲: تیمار سلول‌های NP التهابی با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم. گروه تجربی ۳: تیمار سلول‌های NP التهابی با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم. گروه تجربی ۴: تیمار سلول‌های NP التهابی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم.

بررسی زیستایی سلول‌ها با MTT: اثر آگزوزوم‌ها بر زیستایی سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌ها، گروه‌های شاهد آزمایشگاهی، تجربی ۱، تجربی ۲، تجربی ۳ و تجربی ۴، با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS ملتهب شدند. پس از ۲۴ ساعت، به گروه‌های تجربی به ترتیب غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار، میزان زیستایی سلول‌ها با روش MTT بررسی شد. برای بررسی اثر آگزوزوم، محلول MTT به محیط کشت سلول‌ها اضافه و به مدت چهار ساعت انکوبه شدند. سپس محیط رویی خارج و DMSO به سلول‌ها اضافه شد. جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکترومتر خوانده شد (۲۶).

ارزیابی زیستایی سلول‌ها توسط رنگ آمیزی DAPI: رنگ آمیزی DAPI برای مشاهده هسته سلول‌ها و بررسی مرگ سلولی استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در یک پلیت ۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس دو گروه سلولی به مدت ۲۴ ساعت با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS تحت التهاب قرار گرفتند. پس از گذشت زمان، یک گروه سلول‌های التهابی به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با آگزوزوم قرار گرفت. سپس سلول‌ها با رنگ DAPI به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند. در نهایت سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند (۲۷).

بررسی بیان ژن‌های کلژن، اگریکان و TNF- α : پس از تیمار سلول‌ها، استخراج RNA در شرایط عاری از DNase و RNase طبق پروتکل کیت شرکت pars tous انجام شد. غلظت کمی RNA به روش نانودراپ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. سنتز cDNA، بر اساس پروتکل کیت سنتز شرکت pars tous و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. همچنین یک جفت پرایمر برای هر یک از ژن‌های مورد مطالعه و ژن کنترل داخلی (GAPDH) طراحی شد. در نهایت، بیان ژن‌های کلژن، اگریکان و TNF- α در پاسخ به تیمار آگزوزوم در سلول‌های التهابی با استفاده از تکنیک Real-time PCR با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین و پرایمرهای اختصاصی تعیین شد (۲۸). توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در زیر فهرست شده اند (جدول ۱).

Genes	Sequence (5' - 3')	Tm
TNF Forward primer	5'-CCTCTTCTCTTCCTGCTC-3'	60
TNF Reverse primer	5'-GCGGGTTTGCTACTACG-3'	60
ACAN Forward primer	5'-CAACAACAACGCTCAGGA-3'	60
ACAN Reverse primer	5'-AGGTGAAGGGTAGGTGGTAA-3'	60
COL2A1 Forward primer	5'-TGCGACGACATAATCTGTG-3'	60
COL2A1 Reverse primer	5'-TCCTTTCTGCCCCTTTG-3'	60

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

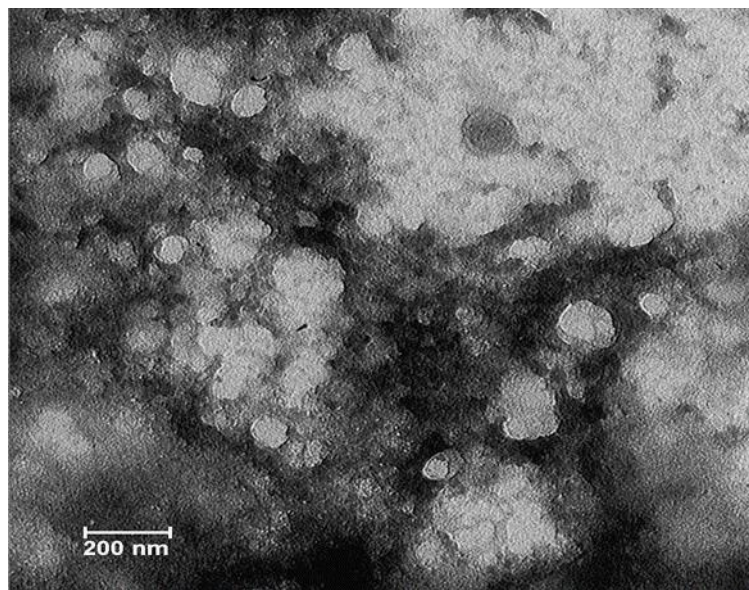
۳- آنالیز آماری

آنالیز آماری توسط نرم افزار Prism نسخه ۸، آزمون One-way ANOVA به منظور مقایسه‌ی داده‌ها صورت گرفته و سطح معناداری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. کلیه‌ی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم شده‌اند.

۴- نتایج

شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

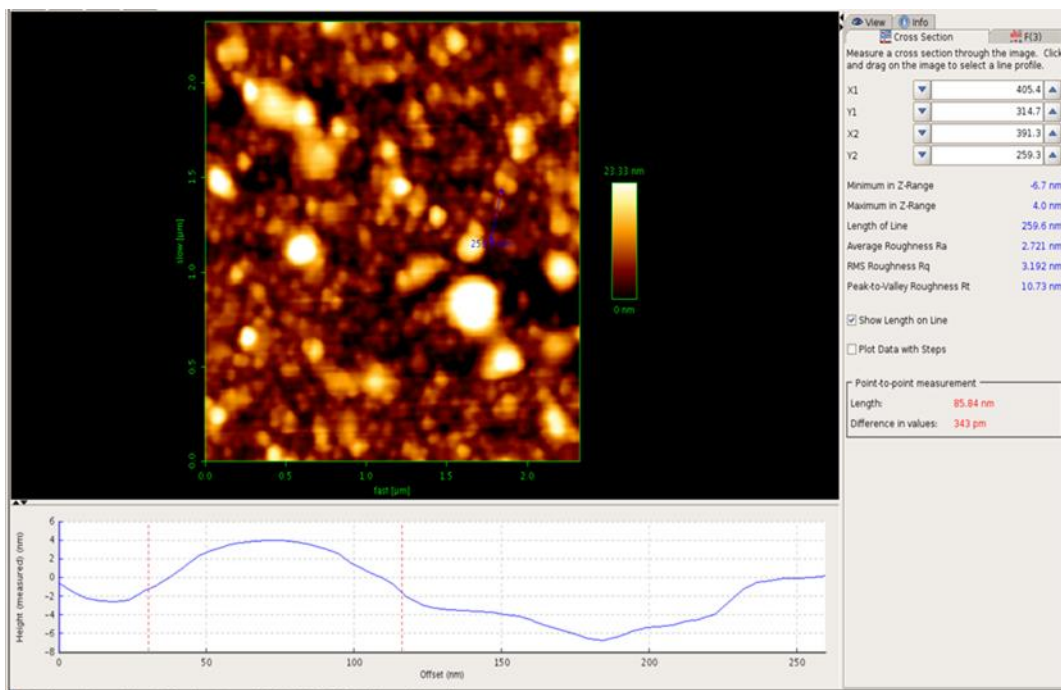
از میکروسکوپ TEM برای مشاهده مورفولوژی اگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. وزیکول‌های کوچک با مورفولوژی دایره‌ای، ساختار غشایی دو لایه و اندازه حدود ۱۰۰ نانومتر با میکروسکوپ TEM قابل مشاهده بودند (شکل ۳).



شکل ۳: مورفولوژی اگزوزوم با میکروسکوپ TEM

شناسایی اگزوزوم توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)

ساختار اگزوزوم در توپوگرافی سه بعدی با استفاده از میکروسکوپ AFM مشاهده شد. نتایج تجزیه و تحلیل AFM وزیکول‌های گرد با ابعاد ۸۵/۸۴ نانومتر را نشان داد که مشخصه اگزوزوم‌ها هستند (شکل ۴).



شکل ۴: ساختار آگزوزوم با میکروسکوپ AFM

شناسایی آگزوزوم توسط روش پراکندگی نور پویا (DLS)

نتایج به دست آمده از DLS نشان داد که قطر ذرات استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بین ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر، با پیک ذرات در ۳۵/۵ نانومتر است که دقت جداسازی آگزوزوم را نشان می‌دهد (شکل ۵).

Calculation Results

Peak No.	S.P.Area Ratio	Mean	S. D.	Mode
1	1.00	35.5 nm	5.4 nm	33.2 nm
2	---	--- nm	--- nm	--- nm
3	---	--- nm	--- nm	--- nm
Total	1.00	35.5 nm	5.4 nm	33.2 nm

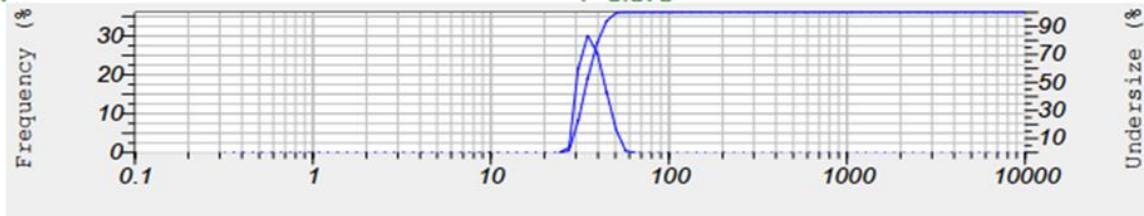
Cumulant Operations

Z-Average

: 126.1 nm

PI

: 0.679



شکل ۵: توزیع اندازه آگزوزوم‌ها توسط DLS

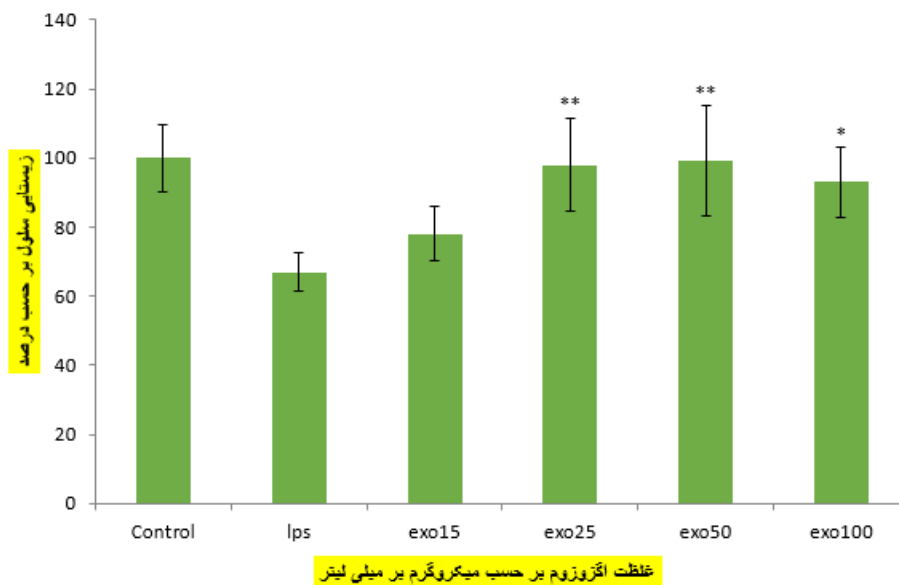
نتایج حاصل از روش BCA

محلول تهیه شده از اگزوزوم های جدا شده از مایع رویی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان حاوی ۷۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر پروتئین بود که با استفاده از روش BCA تایید شد.

بررسی اثر اگزوزوم بر بهبود التهاب ناشی از LPS

نتایج آزمون MTT

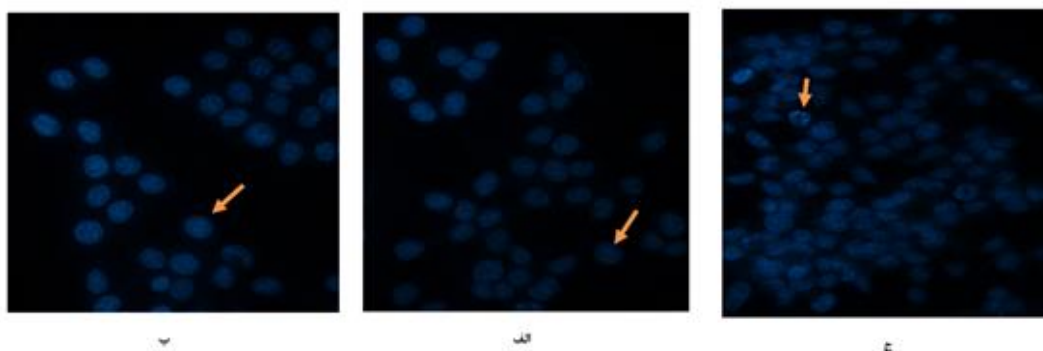
بررسی اثر درمانی دوزهای مختلف اگزوزوم بر روی سلول های NP التهابی با آزمون MTT انجام شد. طبق نتایج، تفاوت معناداری در زیستایی سلول های التهابی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اگزوزوم، در مقایسه با سلول های التهابی با LPS بدون تیمار مشاهده شد ($P < 0.05$ *) در دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، ($P < 0.01$ **) دوزهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر). نتایج آزمون MTT نشان می دهد که ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر دوز بهینه برای تیمار سلول های NP التهابی است (نمودار ۱).



نمودار ۱: بررسی اثر LPS و درمان با دوزهای مختلف اگزوزوم بر زیستایی سلول های NP با آزمون سمیت سلولی (MTT). مقدار $P < 0.05$ * در دوز ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و $P < 0.01$ ** در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر، اختلاف معناداری را در مقایسه با گروه سلول های التهابی با LPS بدون تیمار نشان می دهد.

نتایج رنگ آمیزی DAPI

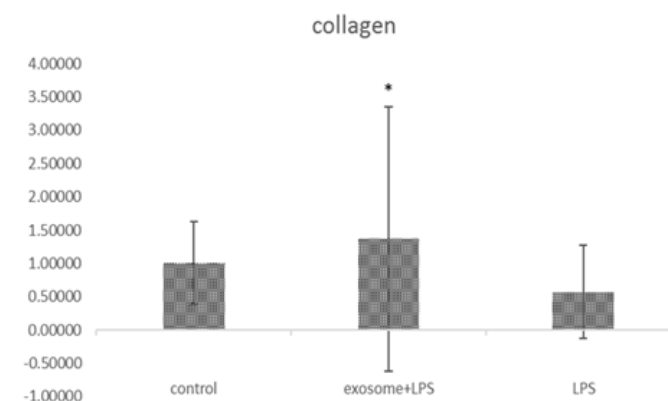
در این مطالعه به منظور بررسی اثر اگزوزوم‌ها بر هسته سلول‌های NP، رنگ‌آمیزی DAPI انجام شد. با توجه به تصاویر رنگ آمیزی DAPI، اگزوزوم‌ها التهاب ناشی از LPS را کاهش و زیستایی سلول‌های التهابی در گروه سلول‌های تحت تیمار با اگزوزوم در مقایسه با گروه سلول‌های التهابی بدون تیمار افزایش داده‌اند. همچنین مشاهده شد که زیستایی سلول‌های التهابی تیمار شده با اگزوزوم نزدیک به زیستایی سلول‌های گروه شاهد می‌باشد (شکل ۶).



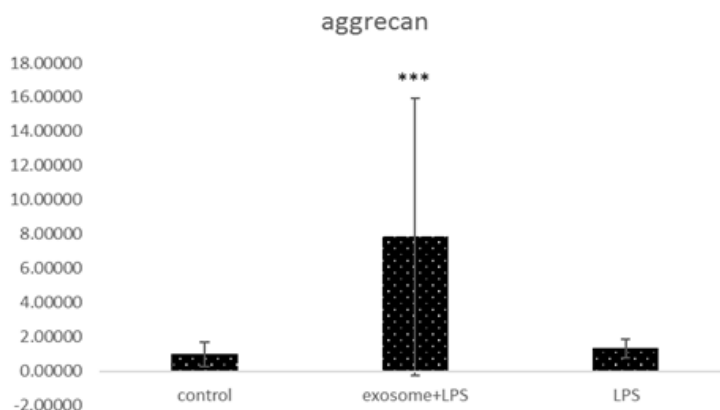
شکل ۶: رنگ‌آمیزی DAPI. (الف) گروه شاهد با هسته‌های کروی (ب) گروه التهابی تحت تیمار با اگزوزوم با هسته‌های کروی (ج) گروه التهابی بدون تیمار با اگزوزوم با هسته‌های تخریب شده. (فلش نارنجی، هسته‌ها را نشان می‌دهد)

اثرات اگزوزوم‌ها بر بیان ژن‌های کلاژن، اگریکان و $TNF-\alpha$ در سلول‌های NP

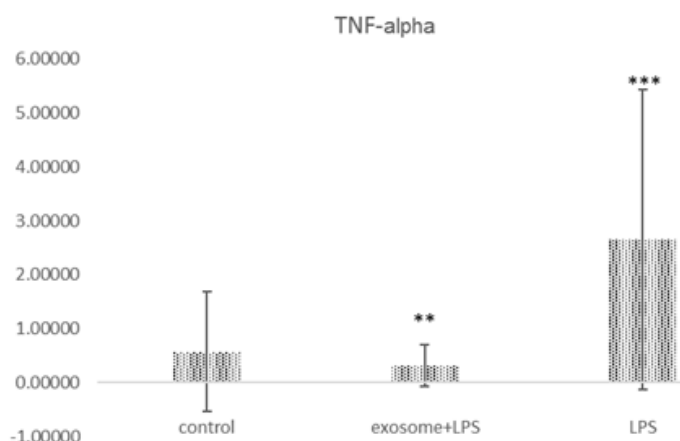
بیان ژن‌های کلاژن، اگریکان و $TNF-\alpha$ در پاسخ به تیمار اگزوزوم در سلول‌های NP التهابی با Real-Time PCR تعیین شد. تغییرات در سطح بیان ژن‌های کلاژن، اگریکان و $TNF-\alpha$ در گروه التهابی بدون تیمار و گروه التهابی تحت تیمار با اگزوزوم مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، بیان ژن‌های کلاژن و اگریکان در گروه تحت تیمار با اگزوزوم نسبت به گروه التهابی بدون تیمار با اگزوزوم افزایش داشته است (نمودار ۳و۲). همچنین مشاهده شد، سطح بیان ژن $TNF-\alpha$ در گروه تحت تیمار با اگزوزوم به طور معناداری کاهش یافت. در گروه التهابی بدون تیمار با اگزوزوم نیز افزایش بیان ژن $TNF-\alpha$ مشاهده شد (نمودار ۴).



نمودار ۲: تغییرات بیان ژن کلاژن در گروه شاهد، گروه التهابی با LPS و گروه التهابی تیمار شده با اگزوزوم (کلیه داده‌ها بر مبنای fold change ($\Delta\Delta Cq$) به دست آمده است و نرم‌افزار دستگاه Real-Time PCR (Bio-Rad). کلیه داده‌ها را بر مبنای $\Delta\Delta Cq$ آنالیز کرده است. در ضمن کلیه اعداد relative normalized expression می‌باشند.)



نمودار ۳: تغییرات بیان ژن اگریکان در گروه شاهد، گروه التهابی با LPS و گروه التهابی تیمار شده با آگزوزوم (کلیه داده‌ها بر مبنای fold change ($\Delta\Delta Cq$) بدست آمده است و نرم‌افزار دستگاه (Bio-Rad) Real-Time PCR. کلیه داده‌ها را بر مبنای $\Delta\Delta Cq$ آنالیز کرده است. در ضمن کلیه اعداد relative normalized expression می‌باشند).



نمودار ۴: تغییرات بیان ژن TNF- α در گروه شاهد، گروه التهابی با LPS و گروه التهابی تیمار شده با آگزوزوم (کلیه داده‌ها بر مبنای fold change ($\Delta\Delta Cq$) به‌دست آمده است و نرم‌افزار دستگاه (Bio-Rad) Real-Time PCR. کلیه داده‌ها را بر مبنای $\Delta\Delta Cq$ آنالیز کرده است. در ضمن کلیه اعداد relative normalized expression می‌باشند).

۵- بحث

بر اساس مطالعات، ۸۰ درصد از افراد در مقطعی از زندگی کمردرد را تجربه می‌کنند (۲۹). IDD با درد کمر و گردن همراه است و کیفیت زندگی را کاهش می‌دهد (۳۰). سلول‌های دیسک بین مهره‌ای به دلیل تغییر ترکیب ماتریکس در طول فرآیند دژنراتیو و از بین رفتن تدریجی کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها، دچار افزایش آپوپتوزیس می‌شوند (۳۱). IDD با مرگ سلولی NP عمدتاً ناشی از TNF- α مرتبط است (۳۲). در حال حاضر، تمرکز تحقیقات بر کاهش یا معکوس کردن آبشار دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به دلیل دسترسی آسان، پایداری ژنتیکی و پتانسیل درمانی برای ترمیم بافت و تنظیم ایمنی، برای کاربردهای درمانی مفید هستند. تحقیقات زیادی نشان داده‌اند که آگزوزوم‌های ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک راه جایگزین برای درمان IDD عمل می‌کنند (۳۳-۳۴). آگزوزوم‌ها و زیکول‌های خارج سلولی

هستند که در ارتباطات بین سلولی شرکت می‌کنند و معمولاً در درمان بیماری‌های متعدد استفاده می‌شوند (۳۵). MSC-Exo حاوی انواع فاکتورهای تنظیمی است که می‌تواند با مهار آپوپتوزیس و افزایش تکثیر سلول‌های NP، مهار تخریب ECM و کاهش پاسخ التهابی و استرس اکسیداتیو از پیشرفت IDD جلوگیری کند (۳۶). Wang و همکاران (۳۷)، آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با ساختار گرد و فنجانی و قطر تقریباً ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر توسط میکروسکوپ TEM شناسایی کردند. در مطالعه ما، با کمک میکروسکوپ TEM، وزیکول‌های دایره‌ای به قطر حدود ۱۰۰ نانومتر مشاهده شد. نتیجه میکروسکوپ AFM در مطالعه باقری و همکاران (۳۸)، شکل کروی همگن از آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با محدوده اندازه ۴۰ تا ۸۰ نانومتر را نشان داد همچنین تصویربرداری AFM در این مطالعه انجام شد و نتایج، نانوذرات کروی در حدود ۸۵ نانومتر را نشان داد. اندازه‌گیری آگزوزوم‌ها با تکنیک DLS در مطالعه Zhu و همکاران (۳۹) نشان داد که قطر این ذرات عمدتاً بین ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر و پیک آن ۵۱ نانومتر است. در بررسی ساختار آگزوزوم‌ها با دستگاه DLS، ذرات بین ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر با پیک ذرات ۳۵/۵ نانومتر مشاهده شد. نتیجه DLS در مطالعه ما با مطالعه Zhu و همکاران (۳۳) مطابقت دارد. در مطالعه Zhu و همکاران (۳۳)، اثر MSC-Exo بر آپوپتوزیس سلولی با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج، سلول‌های NP التهابی شده با IL-1 β سطح آپوپتوزیس بالاتر و سطح پایین‌تری از زیستایی سلولی را نشان دادند. آگزوزوم‌ها باعث کاهش آپوپتوزیس ناشی از IL-1 β و افزایش زیستایی در سلول‌های NP شده‌اند. در این مطالعه، اثر التهاب ناشی از LPS بر سلول‌های NP و نتایج تیمار سلول‌های التهابی با دوزهای مختلف آگزوزوم با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که زیستایی سلول‌های التهابی تحت تیمار با دوزهای مختلف آگزوزوم در مقایسه با سلول‌های التهابی بدون تیمار افزایش یافته است. سیتوکین‌های التهابی تولید شده توسط ماکروفاژها یا سلول‌های دیسک در انحطاط دیسک نقش دارند. واسطه‌های التهابی مختلف، از جمله TNF- α ، نقش مهمی در فرآیندهای کاتابولیک در IVD انسان ایجاد می‌کنند و بیان آن‌ها را در دژنراسیون IVD افزایش می‌دهند (۴۰). آگزوزوم‌های مشتق شده از MCS می‌توانند از سلول‌های NP در برابر آپوپتوزیس و التهاب ناشی از TNF- α محافظت کنند (۴۱). برخلاف گروه شاهد و گروه سلول‌های التهابی بدون تیمار، مطالعه حاضر کاهش قابل توجهی را در بیان ژن مرتبط با التهاب (TNF- α) در سلول‌های التهابی تیمار شده با آگزوزوم نشان می‌دهد. در نتیجه، آگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، التهاب ناشی از IDD را با کاهش بیان ژن TNF- α کاهش می‌دهند. یکی از ویژگی‌های مهم انحطاط IVD کاهش سلول‌های زنده و فعال است. هدف از درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی برای ترمیم دژنراتیو IVD، تقویت سلول‌های زنده با توانایی تولید ماتریکس مناسب و مفید می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که با بهبود فعالیت تکثیر سلول‌های NP توسط آگزوزوم‌ها، تولید ECM سالم‌تر بهبود می‌یابد (۴۲). در مطالعه Zhu و همکاران (۴۳)، مشخص شد که در سلول‌های NP تیمار شده با TNF- α ، افزایش سطح بیان پروتئین‌های ECM کاتابولیک و کاهش پروتئین‌های آنابولیک ECM (کلاژن II و اگریکان) توسط TNF- α ایجاد شد. بر اساس یافته‌ها، MSC-Exo می‌تواند با افزایش miR-532-5p در بافت NP از افزایش آپوپتوزیس ناشی از TNF- α ، فعال شدن پروتئین‌های آپوپتوزیس، عدم تعادل سطوح آنابولیک و کاتابولیک و تخریب سلول‌های NP جلوگیری کند. تجزیه و تحلیل ما نشان داد که آگزوزوم‌ها به طور قابل توجهی بیان ژن‌های اگریکان و کلاژن را در سلول‌های التهابی تحت تیمار با آگزوزوم در مقایسه با سلول‌های شاهد و سلول‌های التهابی بدون تیمار، افزایش می‌دهند. همچنین این نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های NP ملتهب تحت تیمار با MSC-Exo می‌توانند ماتریکس خارج سلولی سالم‌تری تولید کنند و ترمیم سلول‌های التهابی را بهبود بخشند.

۶- نتیجه گیری

در این مطالعه بیان ژن های کلاژن، اگریکان و فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا در سلول های نوکلئوس پولپوزوس تیمار شده توسط اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بررسی شد. نتایج ما نشان داد که اگزوزوم های مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی، التهاب ایجاد شده توسط LPS در سلول های NP را با کاهش بیان ژن التهابی TNF- α ، کاهش می دهند. همچنین اگزوزوم ها با افزایش بیان ژن های کلاژن و اگریکان، سنتز ماتریکس خارج سلولی را افزایش داده که به بهبود زیستایی سلول های NP کمک می کند. بر اساس یافته های این تحقیق، MSC-Exo می تواند دژنراسیون IVD را معکوس کرده و به عنوان یک کاندید مناسب برای مطالعه بیشتر کلینیکی IDD مورد استفاده قرار گیرد.

۷- تشکر و قدردانی

از همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد واحد مشهد، صمیمانه سپاسگزاری می شود.

۸- منابع

1. Zhang C, Tong T, Miao D, Wang L, Feng L. Vitamin D inhibits TNF- α induced apoptosis of human nucleus pulposus cells through regulation of NF- κ B signaling pathway. *J Orthop Surg Res*. 2021;16(1):1-8.
2. Zhang F, Wang S, Li B, Tian W, Zhou Z, Liu S. Intradiscal injection for the management of low back pain. *JOR Spine* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 May 26];5(1):e1186. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsp2.1186>.
3. Varrassi G, Moretti B, Pace MC, Evangelista P, Iolascon G. Common Clinical Practice for Low Back Pain Treatment: A Modified Delphi Study. *Pain Ther*. 2021 Jun 1;10(1):589-604.
4. Zhu H, Chen G, Wang Y, Lin X, Zhou J, Wang Z, et al. Dimethyl fumarate protects nucleus pulposus cells from inflammation and oxidative stress and delays the intervertebral disc degeneration. *Exp Ther Med*. 2020;20(6):1-1.
5. Liu H, Kang H, Song C, Lei Z, Li L, Guo J, et al. Urolithin A inhibits the catabolic effect of TNF α on nucleus pulposus cell and alleviates intervertebral disc degeneration in vivo. *Front Pharmacol*. 2018;9(SEP):1-11.
6. Zhang GZ, Liu MQ, Chen HW, Wu ZL, Gao YC, Ma ZJ, et al. NF- κ B signalling pathways in nucleus pulposus cell function and intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif*. 2021;54(7):1-15.
7. Sun Z, Zhao H, Liu B, Gao Y, Tang WH, Liu ZH, et al. AF cell derived exosomes regulate endothelial cell migration and inflammation: Implications for vascularization in intervertebral disc degeneration. *Life Sci* [Internet]. 2021;265:118778. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118778>.
8. Wang X, Meng J, Zhang T, Lv WW, Liang Z, Shi Q, et al. Identifying compositional and structural changes in the nucleus pulposus from patients with lumbar disc herniation using Raman spectroscopy. *Exp Ther Med*. 2020;20(1):447-53.
9. Harmon MD, Ramos DM, Nithyadevi D, Bordett R, Rudraiah S, Nukavarapu SP, et al. Growing a backbone-functional biomaterials and structures for intervertebral disc (IVD) repair and regeneration: Challenges, innovations, and future directions. *Biomater Sci*. 2020;8(5):1216-39.
10. Ashinsky BG, Gullbrand SE, Wang C, Bonnevie ED, Han L, Mauck RL, et al. Degeneration alters structure-function relationships at multiple length-scales and across interfaces in human intervertebral discs. *J Anat*. 2021;238(4):986-98.
11. Xu M, Huang J, Jin M, Jiang W, Luo F, Tan Q, et al. Expansion of FGFR3 - positive nucleus pulposus cells plays important roles in postnatal nucleus pulposus growth and regeneration. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022;1-14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02903-2>.

12. Croft AS, Guerrero J, Oswald KAC, Häckel S, Albers CE, Gantenbein B. Effect of different cryopreservation media on human nucleus pulposus cells' viability and trilineage potential. *JOR Spine*. 2021;4(1).
13. Sun J, Zheng B, Sun R, Meng Y, Wang S. Biomedicine & Pharmacotherapy MiR-499a-5p suppresses apoptosis of human nucleus pulposus cells and degradation of their extracellular matrix by targeting SOX4. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;113(February):108652. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108652>.
14. Zhang Z, Huang Y, Xu N, Wang J, Yao T, Xu Y, et al. PLK1 Mitigates Intervertebral Disc Degeneration by Delaying Senescence of Nucleus Pulposus Cells. *Front cell Dev Biol* [Internet]. 2022 Mar 14 [cited 2022 Jul 3];10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35372354/>
15. Huang L, Chen J, Wu D, Wang K, Lou W, Wu J. Berberine Attenuates IL-1 β -Induced Damage of Nucleus Pulposus Cells via Activating the AMPK/mTOR/Ulk1 Pathway. *Biomed Res Int*. 2022;2022.
16. Wang Y, Che M, Xin J, Zheng Z, Li J, Zhang S. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020;131(August):110660. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110660>.
17. Babenko VA, Silachev DN, Danilina TI, Goryunov K V., Pevzner IB, Zorova LD, et al. Age-related changes in bone-marrow mesenchymal stem cells. *Cells*. 2021;10(6):1–19.
18. Otero-ortega L, Laso-garcía F, Frutos MG, Fuentes B, Diekhorst L. Role of Exosomes as a Treatment and Potential Biomarker for Stroke. 2018;
19. Liao Z, Luo R, Li G, Song Y, Zhan S, Zhao K, et al. Exosomes from mesenchymal stem cells modulate endoplasmic reticulum stress to protect against nucleus pulposus cell death and ameliorate intervertebral disc degeneration in vivo. *Theranostics*. 2019;9(14):4084–100.
20. Zhang J, Rong Y, Luo C, Cui W. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2020 Dec 12 [cited 2022 Jul 30];12(24):25138. Available from: [/pmc/articles/PMC7803581/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35372354/)
21. Malekpour K, Hazrati A, Zahar M, Markov A, Olegovna A. The Potential Use of Mesenchymal Stem Cells and Their Derived Exosomes for Orthopedic Diseases Treatment. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2022;933–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10185-z>
22. Álvarez-Viejo M. “Mesenchymal stem cells from different sources and their derived exosomes: A pre-clinical perspective,” *World J. Stem Cells*, vol. 12, no. 2, pp. 100–109, 2020, doi: 10.4252/wjsc.v12.i2.100.
23. Ukeba D, Sudo H, Tsujimoto T, Ura K, Yamada K, Iwasaki N. “Bone marrow mesenchymal stem cells combined with ultra-purified alginate gel as a regenerative therapeutic strategy after discectomy for degenerated intervertebral discs,” *EBioMedicine*, vol. 53, p. 102698, 2020, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102698.
24. Safitri E. Effect of low oxygen tension on transcriptional factor OCT4 and SOX2 expression in New Zealand rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vet World*. 2020;13(11):2469–76.
25. Xiang HF, Su WL, Wu XL, Chen WJ, Cong W Bin, Yang S, et al., “Exosomes Derived from Human Urine-Derived Stem Cells Inhibit Intervertebral Disc Degeneration by Ameliorating Endoplasmic Reticulum Stress,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/6697577.
26. Dong J, Li L, Fang X, Zang M. Exosome-Encapsulated microRNA-127-3p Released from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviates Osteoarthritis Through Regulating CDH11-Mediated Wnt / β -Catenin Pathway. 2021;297–310.
27. Zhang N, Li L, Luo J, Tan J, Hu W, Li Z, et al. “Inhibiting microRNA-424 in bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes suppresses tumor growth in colorectal cancer by upregulating TGFBR3,” *Arch. Biochem. Biophys.*, p. 108965, 2021, doi: 10.1016/j.abb.2021.108965.

28. Luo Z, Wu F, Xue E, Huang L, Yan P, Pan X, et al. "Hypoxia preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells survival by inducing HIF-1 α in injured neuronal cells derived exosomes culture system," *Cell Death Dis.*, 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1410-y.
29. Liu C, Liang G, Deng Z, Tan J, Zheng Q, Lyu FJ. "The Upregulation of COX2 in Human Degenerated Nucleus Pulposus: The Association of Inflammation with Intervertebral Disc Degeneration," *Mediators Inflamm.*, vol. 2021, 2021, doi: 10.1155/2021/2933199.
30. Croft AS, Illien-Jünger S, Grad S, Guerrero J, Wangler S, Gantenbein B. The application of mesenchymal stromal cells and their homing capabilities to regenerate the intervertebral disc. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7).
31. Dai X, Guan Y, Zhang Z, Xiong Y, Liu C, Li H, et al. Comparison of the differentiation abilities of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells toward nucleus pulposus-like cells in three-dimensional culture. *Exp Ther Med.* 2021;22(3).
32. Zhang Y, Yang J, Zhou X, Wang N, Li Z, Zhou Y, et al. Knockdown of miR-222 inhibits inflammation and the apoptosis of LPS-stimulated human intervertebral disc nucleus pulposus cells. *Int J Mol Med.* 2019;44(4):1357–65.
33. Zhu L, Shi Y, Liu L, Wang H, Shen P, Yang H. Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate nucleus pulposus cells apoptosis via delivering miR-142-3p: therapeutic potential for intervertebral disc degenerative diseases. *Cell Cycle.* 2020 Jul 17;19(14):1727–39.
34. Naji A, Eitoku M, Favier B, Deschaseaux F, Rouas-Freiss N, Suganuma N. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(17):3323–48. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>.
35. Luo L, Jian X, Sun H, Qin J, Wang Y, Zhang J, et al. Cartilage endplate stem cells inhibit intervertebral disc degeneration by releasing exosomes to nucleus pulposus cells to activate Akt/autophagy. *Stem Cells.* 2021;39(4):467–81.
36. Liang W, Han B, Hai Y, Sun D, Yin P. Mechanism of Action of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in the Intervertebral Disc Degeneration Treatment and Bone Repair and Regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9(January):1–10.
37. Wang Y, Zhao R, Liu D, Deng W, Xu G, Liu W, et al. Exosomes Derived from miR-214-Enriched Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Regulate Oxidative Damage in Cardiac Stem Cells by Targeting CaMKII. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018.
38. Bagheri E, Abnous K, Farzad SA, Taghdisi SM, Ramezani M, Alibolandi M. Targeted doxorubicin-loaded mesenchymal stem cells-derived exosomes as a versatile platform for fighting against colorectal cancer. *Life Sci* [Internet]. 2020;261(July):118369. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118369>.
39. Zhu J, Liu B, Wang Z, Wang D, Ni H, Zhang L, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation. *Theranostics.* 2019;9(23):6901–19.
40. Miguélez-Rivera L, Pérez-Castrillo S, González-Fernández ML, Prieto-Fernández JG, López-González ME, García-Cosamalón J, et al. Immunomodulation of mesenchymal stem cells in discogenic pain. *Spine J* [Internet]. 2018;18(2):330–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2017.09.002>.
41. Lu L, Xu A, Gao F, Tian C, Wang H, Zhang J, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a Novel Strategy for the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9(January):1–22.
42. Lu K, Li H yin, Yang K, Wu J long, Cai X wei, Zhou Y, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1–11.
43. Zhu G, Yang X, Peng C, Yu L, Hao Y. Exosomal miR-532–5p from bone marrow mesenchymal stem cells reduce intervertebral disc degeneration by targeting RASSF5. *Exp Cell Res* [Internet]. 2020;393(2):112109. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112109>.