

补肾益髓胶囊修饰的BMSC外泌体调控miR-15b/Wnt通路促进OLN-93少突胶质细胞分化成熟的作用机制分析

刘思思, 李春雨, 李辰, 李海馨, 王蕾*
(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的:探讨补肾益髓胶囊(BSYS)含药血清修饰的骨髓间充质干细胞外泌体(BMSC-exos)调控miR-15b/Wnt通路促进OLN-93少突胶质细胞分化成熟的作用及分子机制。方法:将OLN-93细胞分为正常(NC)组、BMSC-exos组、BSYS-BMSC-exos组、BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p inhibitor-exos组、BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos组。运用DiR染色标记Exos,观察OLN-93细胞对其摄取;细胞增殖与活性检测法(CCK-8)确定BSYS-BMSC-exos作用于OLN-93细胞的有效剂量。建立BMSCs慢病毒转染稳定株抑制BMSCs及其Exos中miR-15b-5p的表达,利用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测miR-15b-5p表达验证其转染效率。细胞免疫荧光(ICC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测OLN-93细胞中2',3'-环核苷酸3'-磷酸二酯酶(CNPase)和髓鞘蛋白脂蛋白(PLP)的表达,Real-time PCR检测OLN-93细胞中miR-15b-5p和Wnt3a的mRNA表达,Western blot检测Wnt3a的蛋白表达。采用Real-time PCR和Western blot检测OLN-93细胞中Wnt/ β -catenin信号通路糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)、 β -连环蛋白(β -catenin)和T细胞特异性转录因子4/转录因子7类似物2(TCF4/TCF7L2)的表达水平。结果:DiR染色标记的Exos可被OLN-93细胞有效摄取。CCK-8检测结果显示,20 mg·L⁻¹的BSYS-BMSC-exos增强OLN-93细胞活力的效果最好($P<0.01$),作为后续给药剂量。对BMSCs慢病毒转染后,Real-time PCR结果显示BMSCs中miR-15b-5p被显著抑制($P<0.01$),且BSYS-BMSC-exos中miR-15b-5p也被显著抑制($P<0.01$)。ICC结果显示,BSYS-BMSC-exos可增加分化成熟CNPase和PLP的细胞数量($P<0.01$);Western blot结果显示,BSYS-BMSC-exos可升高CNPase和PLP的蛋白表达水平($P<0.01$)。BSYS-BMSC-exos还可升高OLN-93细胞中miR-15b-5p和磷酸化(p)- β -catenin蛋白的表达水平;降低Wnt3a的mRNA和蛋白表达水平, β -catenin和TCF4/TCF7L2的mRNA表达水平,以及p-GSK-3 β (Ser9)的蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$),BSYS-BMSC-exos中转染miR-15b-5p抑制物后,上述作用被明显减弱($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:BSYS-BMSC-exos发挥促进OLN-93少突胶质细胞分化成熟的作用,其作用机制与上调OLN-93细胞中的miR-15b-5p抑制Wnt3a表达,从而抑制Wnt信号通路有关。

[关键词] 多发性硬化; 补肾益髓胶囊; 骨髓间充质干细胞外泌体; OLN-93少突胶质细胞; 微小核糖核酸(microRNA); miR-15b/Wnt信号通路

[中图分类号] R242;R593.2;Q189 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2025)20-0115-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251867

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250804.1729.004>

[网络出版日期] 2025-08-04 17:47:57



Analysis of Mechanism of Exosomes of BMSC Modified with Bushen Yisui Capsules on Promoting Differentiation and Maturation of OLN-93 Oligodendrocytes via Regulating miR-15b/Wnt Signaling Pathway

LIU Sisi, LI Chunyu, LI Chen, LI Haixin, WANG Lei*

(School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and molecular mechanism of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC-exos) modified with Bushen Yisui capsule (BSYS)-containing serum on promoting the

[收稿日期] 2025-04-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274450)

[第一作者] 刘思思,在读博士,从事中医药防治脑病的研究,E-mail:liusisi@mail.ccmu.edu.cn

[通信作者] *王蕾,博士,教授,博士生导师,从事中医药防治脑病的研究,E-mail:tmwangl@ccmu.edu.cn

differentiation and maturation of OLN-93 oligodendrocytes by regulating miR-15b/Wnt signaling pathway. **Methods:** OLN-93 cells were divided into 5 groups, including the normal (NC) group, BMSC-exos group, BSYS-BMSC-exos group, BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p inhibitor-exos group, and BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos group. DiR staining was used to observe the uptake of Exos by OLN-93 cells. The effective dosage of BSYS-BMSC-exos on OLN-93 cells was assessed by cell proliferation and activity assay (CCK-8). Stable BMSCs lentiviral transfection strains were established to inhibit miR-15b-5p expression in both BMSCs and their exos, and transfection efficiency was verified by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) detection of miR-15b-5p. The expressions of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) and myelin proteolipid protein (PLP) in OLN-93 cells were detected by immunocytochemistry (ICC) and Western blot. The mRNA expressions of miR-15b-5p and Wnt3a in OLN-93 cells were detected by Real-time PCR, and the protein expression of Wnt3a was measured by Western blot. The expression levels of key molecules in the Wnt/ β -catenin signaling pathway of OLN-93 cells, including glycogen synthase kinase (GSK)-3 β , β -catenin, and T-cell specific transcription factor 4/transcription factor 7-like 2 (TCF4/TCF7L2), were measured by Real-time PCR and Western blot. **Results:** DiR-labeled Exos were efficiently taken up by OLN-93 cells. The CCK-8 assay results indicated that 20 mg·L⁻¹ of BSYS-BMSC-exos exhibited the most significant effect in enhancing OLN-93 cell viability ($P < 0.01$) and this dosage was selected for subsequent experiments. Following lentiviral transfection of BMSCs, Real-time PCR results revealed that miR-15b-5p was significantly suppressed in BMSCs ($P < 0.01$), and miR-15b-5p was also notably inhibited in BSYS-BMSC-exos ($P < 0.01$). ICC analysis further revealed an increase in the number of differentiated, mature CNPase and PLP-positive cells following BSYS-BMSC-exos treatment ($P < 0.01$). Western blot results demonstrated that the protein expression of CNPase and PLP was significantly enhanced with BSYS-BMSC-exos treatment ($P < 0.01$). Additionally, BSYS-BMSC-exos also increased the expression levels of miR-15b-5p and p- β -catenin proteins in OLN-93 cells, while decreased the mRNA and protein expressions of Wnt3a, as well as the mRNA expressions of β -catenin and TCF4/TCF7L2, and the protein expression level of p-GSK-3 β (Ser9) was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). After the transfection of miR-15b-5p inhibitor into BSYS-BMSC-exos, the above effects were significantly diminished ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** BSYS-BMSC-exos facilitate the differentiation and maturation of OLN-93 cells, and its mechanism is related to the upregulation of miR-15b-5p in OLN-93 cells, which inhibits the expression of Wnt3a and thereby suppresses the Wnt signaling pathway.

[Keywords] multiple sclerosis; Bushen Yisui capsules; bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes; OLN-93 oligodendrocytes; microRNA; miR-15b/Wnt signaling pathway

多发性硬化 (MS) 属于中枢神经系统 (CNS) 自身免疫性疾病, 以多发脱髓鞘、轴突损伤和神经退行性病变为主要病理特点^[1], 病变部位主要累及白质^[2]。目前全球约有 280 万人罹患本病^[3], 多发于中青年, 且发病率逐年上升^[4], 其高复发率和高致残率严重危害人类生命健康, 现临床治疗策略主要通过调节免疫反应以减轻神经炎症损伤, 但对促进髓鞘修复方面的疗效仍然有限^[5-6]。因此, 探索 MS 缓解期治疗的有效药物, 促进 MS 髓鞘修复和神经保护日益受到研究者的关注。CNS 中的髓鞘主要由少突胶质细胞 (OLs) 合成, 对神经信号的快速高效传导至关重要^[7], 然而, MS 病灶区域环境紊乱失衡导致少突胶质前体细胞 (OPCs) 分化阻滞^[8], 这是导致髓鞘再生失败的重要因素。因此, 促进 OPCs 分化成熟是髓鞘再生的关键环节。研究发现, 骨髓间充质干细胞外泌体 (BMSC-exos) 可以发挥免疫调节和促进神经再生等作用^[9-10], 且研究表明 Exos 中包含了大量调控 OPCs 分化的因子^[11], 其中, 微小核糖核酸 (miRs) 是最关键且有效的调节因子^[12-13]。

近年来中医学对 MS 的认识逐渐得到共识, 将其归为中医痿证之“骨痿”中, 治疗多以补肾活血化痰通路为主, 研究证实, 中医药在治疗 MS 中具有明

显的优势^[14-15]。补肾益髓胶囊 (BSYS) 是首都医科大学附属北京天坛医院樊永平教授创立的一首以补肾生髓法为主治疗 MS 的有效方剂^[16], 在 MS 的治疗中发挥神经保护和促进髓鞘再生的作用^[17-21]。本课题组近期研究发现 BSYS 修饰的 BMSC-exos (BSYS-BMSC-exos) 可以促进双环己酮草酰二胺 (CPZ) 诱导的脱髓鞘小鼠模型中大脑胼胝体区 OPCs 分化成熟和髓鞘再生, 其中, BSYS 修饰的 BMSC-exos 中有 80 余种 miRs 出现显著变化^[22], 而与神经前体细胞分化成熟及神经发生^[23]相关的 miR-15b 表达明显上调, 临床研究发现, MS 患者血清中 miR-15b 明显下降^[24], 因此推测 BSYS 治疗 MS 的作用与升高 BMSC-exos 中的 miR-15b 有关, 同时本课题组前期动物实验研究发现, miR-15b 通过靶向 Wnt3a 进而抑制 Wnt 通路发挥促进 CPZ 小鼠大脑胼胝体区 OPCs 分化成熟和髓鞘再生的潜在作用^[22]。同时, OLN-93 少突胶质细胞是目前常用的研究 OLs 分化的细胞系之一^[25]。通过改变 OLN-93 细胞的培养条件, 可以诱导其分化^[26], 且 OLN-93 细胞与 OPCs 细胞在分化后具有相似的表达特点, 均呈现出复杂性分支突起及膜样化形态^[27], 可用于脱髓鞘研究^[28]。基于此, 本研究利用体外 OLN-93 少

突胶质细胞系,深入研究BSYS-BMSC-exos促进OLN-93少突胶质细胞分化成熟的作用及分子机制,为中医药治疗MS提供新的研究思路。

1 材料

1855201型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测系统、PowerPac Universal型电泳仪和电转仪套装、ChemiDoc XRS+型化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),OSE-PRO型PCR低温加样工作台(中国天根生化科技有限公司),SpectraMax Plus型多功能酶标仪(美国MD公司),PRIMO VERT型倒置显微镜(德国Zeiss公司),XPN-100型台式超速离心机(美国Beckman公司),3-18KS型台式高速离心机(德国Sigma公司),TD-500型台式离心机(中国四川蜀科仪器有限公司)。

BSYS共由10味药物组成,分别为生地黄、熟地黄、制何首乌、酒大黄、浙贝母、水蛭、全蝎、天麻、连翘和益母草,按10:10:10:2:6:3:2:3:6:10比例配伍,上述药物原料及胶囊制剂生产全流程均由北京亚东生物制药有限公司负责质控,其简要的制备方法为将浙贝母研磨成细粉,其余药物按照比例加水煎煮2次,随后合并煎液,过滤药液,经减压浓缩成稠膏,然后将其烘干并打成粉末,得率为26.29%,最后加入浙贝母细粉混匀,装瓶备用。

2',3'-环核苷酸3'-磷酸二酯酶(CNPase)抗体(英国Abcam公司,批号ab6319),髓鞘蛋白脂蛋白(PLP)抗体(中国华安生物技术有限公司,批号为HA500202),Wnt3a抗体、糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)抗体、磷酸化(p)-GSK-3 β (Ser9)抗体、 β -连环蛋白(β -catenin)抗体、p- β -catenin抗体、T细胞特异性转录因子4/转录因子7类似物2(TCF4/TCF7L2)抗体(美国CST公司,批号分别为2721T、12456s、9323T、8480s、9561s、2569s),少突胶质细胞转录因子2(Olig2)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠免疫球蛋白(Ig)G抗体、羊抗兔IgG抗体、488标记羊抗兔IgG抗体、细胞增殖与活性检测法(CCK-8)试剂盒(中国武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为13999-1-AP、60004-1-Ig、SA00001-1、SA00001-2、SA00013-2、PF0004),594标记羊抗鼠IgG抗体(中国中杉金桥生物技术有限公司,批号ZF-0513),高糖培养基DMEM、DMEM/F-12培养基和胎牛血清(FBS)(美国康宁公司,批号分别为10-013-CVR、10-092-CVR和35-010-CV),青霉素链霉素混合双抗(P/S)溶液(中国新赛美生物技术有限公司,批号

C100C5),DiR染料试剂盒(中国宇枚博生物科技有限公司,批号UR21017),慢病毒miR-15b-5p抑制载体及空载miR阴性对照载体、嘌呤霉素由中国汉恒生物科技有限公司提供,RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒(中国普利莱基因技术有限公司,批号分别为C1053、P1511-1),蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型,50 \times)试剂(中国碧云天生物技术有限公司,批号P1045),mRNA逆转录试剂盒及Real-time PCR试剂盒、miRs逆转录试剂盒及Real-time PCR试剂盒(中国诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别R323-01、Q712-02、MR101-02、MQ102-02),TRIzol总RNA抽提试剂(美国Thermo Scientific公司,批号15596018)。

小鼠BMSC细胞(中国赛业生物技术有限公司,批号MUBMX-01001),OLN-93少突胶质细胞系(中国北纳创联生物技术有限公司,批号BNCC359390),细胞代数为P6~P10。

SPF级SD雄性大鼠,7~8周龄,体质量250~320 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2021-0006,所有动物饲养于首都医科大学实验动物中心SPF级国家标准实验室,实验许可证号SYXK(京)2021-0030。动物造模及实验过程严格遵守动物福利伦理原则,实验方案经首都医科大学动物实验及实验动物福利委员会审核批准,伦理号AEEI-2020-181。

2 方法

2.1 BSYS含药血清的制备 BSYS含药血清制备参考本课题组前期的实验方法^[29]。将SD大鼠随机分为空白血清组和BSYS含药血清组,每组25只动物。BSYS含药血清组大鼠每日分2次灌胃给予BSYS(11.7 g \cdot kg⁻¹),空白血清组大鼠以等量蒸馏水灌胃,连续7 d早晚各1次。末次给药后2 h,将大鼠进行异氟烷吸入麻醉,随后通过腹主动脉采血,静置4 h后离心(3 000 r \cdot min⁻¹,离心15 min,离心半径12.8 cm),收集合并同组血清,在生物安全柜内用0.22 μ m滤器过滤血清,置于-80 $^{\circ}$ C冰箱备用。

2.2 BMSC慢病毒转染稳定株构建 采用慢病毒技术搭载miR-15b-5p抑制物(LV-miR-15b-5p inhibitor)或空载miR阴性对照(LV-miR-15b-5p NC)的病毒,病毒滴度分别为5.0 \times 10⁸ TU \cdot mL⁻¹和3.0 \times 10⁸ TU \cdot mL⁻¹。根据前期实验确定的病毒感染复数(MOI)值及嘌呤霉素浓度,取对数生长的BMSC细胞,以3.0 \times 10⁵个/孔的密度播种到6孔板,BMSC细胞完全培养基培养(DMEM/F-12+10%FBS+1%P/S)

孵育细胞 12 h, 更换为 1 mL 的含病毒新鲜培养基 (以 40 MOI 值计算病毒体积) 转染 BMSC 细胞 4 h, 补加培养基 1 mL 继续转染 24 h 后弃掉含病毒的培养基, 换上新培养基培养 24 h, 观察病毒 GFP (LV.GFP) 荧光表达, 随后传代并加入 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 嘌呤霉素筛选培养 48 h, 观察 LV.GFP 荧光表达。

2.3 Exos 的提取 对 BMSC 慢病毒转染的稳定株进行传代并且应用 BMSC 细胞完全培养基培养 12 h, 更换为 10%BSYS 含药血清培养 48 h, 无外泌体血清培养基再培养 24 h, 收集细胞上清液, 参考课题组前期的方法^[22] 采用梯度超速离心法提取 Exos, 获得 BSYS-空载 miR 对照 exos (BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p NC-exos) 和 BSYS-miR-15b-5p 抑制 exos (BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos)。同样, 取对数生长期的 BMSC 细胞, 采用 10% 空白血清或 BSYS 含药血清培养细胞 48 h, 更换为无外泌体血清培养基再培养 24 h, 收集细胞上清液离心, 获得空白 BMSC-exos, BSYS 含药血清修饰的 BMSC-exos (BSYS-BMSC-exos), 保存至 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.4 染料标记 Exos 以 Exos 悬液体积与 DiR 染料工作液剂量比例为 10:1 加入染料工作液, 涡旋振荡后放入 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中孵育 30 min。孵育结束后加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 缓冲液, 离心提取 Exos 以去除多余染料, PBS 缓冲液重悬沉淀物, 得到 DiR 染色标记后的 Exos 溶液, $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存备用。

2.5 CCK-8 筛选 BSYS-BMSC-exos 的浓度 取对数生长期的 OLN-93 细胞, 以 1.0×10^4 个/孔的密度接种到 96 孔板中孵育 24 h。将细胞分为正常 (NC) 组和 BSYS-BMSC-exos 组 (2.5 、 5 、 10 、 20 、 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 除 NC 组外其余各组加入相应的 BSYS-BMSC-exos 孵育 48 h, 每组更换新鲜的培养基并加入 CCK-8 试剂 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 继续孵育 1 h, 随后放入酶标仪中, 在 450 nm 波长下测定每孔吸光度 A , 计算细胞活力, 细胞活力 = $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.6 Exos 干预 OLN-93 细胞及分组 将 OLN-93 细胞分为 NC 组、BMSC-exos 组、BSYS-BMSC-exos 组、BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p inhibitor-exos 组、BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos 组。取对数生长期的 OLN-93 细胞, 接种在培养板中, 放入 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中, 以 OLN-93 细胞完全培养基 (DMEM+10%FBS+1%P/S) 培养 24 h, 随后更换为 OLN-93 细胞分化培养基 (DMEM+1%P/S) 培养 72 h, 将上述各组 Exos 以 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量分别加到

OLN-93 细胞中培养 48 h。

2.7 细胞免疫荧光 (ICC) 实验检测 CNPase 和 PLP

取对数生长期的 OLN-93 细胞, 按照 2.6 实验分组进行给药, 干预结束后, 24 孔板中加入 4% 细胞固定液室温静置 20 min, PBS 清洗后加入 0.5% TritonX-100 溶液室温静置 20 min, 加入 5% BSA 封闭液室温孵育 1 h, 加入配制好的一抗 CNPase (1:400) 和 PLP (1:400), 放入 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。次日移除一抗稀释液, PBS 缓冲液清洗, 避光环境下加入配制好的二抗 (1:200), $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱内孵育 1 h, 移除二抗后 PBS 缓冲液清洗, 加入即用型 DAPI 溶液室温静置 5 min, 加入抗荧光衰减封片剂, 置于荧光显微镜下观察, 选取 3 个不同视野拍照, 并进行统计分析。

2.8 Real-time PCR 检测目的 mRNA 表达水平 取对数生长期的 OLN-93 细胞, 按照 2.6 实验分组给药后采用 TRIzol 法进行 RNA 提取。参照逆转录试剂盒说明书将样品 RNA 逆转录为 cDNA, 配制成 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 的反应体系, 进行 PCR 扩增, 条件为 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环。以 GAPDH 和 U6 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析比较目的 mRNA 表达量。引物由中国赛维尔生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测目的蛋白表达水平 取对数生长期的 OLN-93 细胞, 按照 2.6 项下分组进行给药后进行总蛋白提取。6 孔板内加入配制好的含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 吹打静置 20 min 后, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min (离心半径 10 cm) 得到上清液即为总蛋白。BCA 试剂盒进行定量, 加入蛋白上样缓冲液进行蛋白变性。制备 10% 的 PAGE 凝胶, 通过电泳和电转将样品转至 PVDF 膜上, 将 PVDF 膜放入含 5% 脱脂牛奶的玻璃皿中封闭 1 h。封闭结束后将膜与一抗 CNPase (1:4 000)、PLP (1:2 000)、Wnt3a (1:2 000)、p-GSK-3 β (Ser9) (1:2 000)、GSK-3 β (1:2 000)、p- β -catenin (1:2 000)、 β -catenin (1:2 000)、TCF4/TCF7L2 (1:2 000) 和 GAPDH (1:10 000) 进行 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。一抗孵育后, 条带在 TBST 中清洗, 与相应的羊抗兔 IgG 抗体 (1:10 000) 或羊抗鼠 IgG 抗体 (1:10 000) 室温孵育 1 h, 用 TBST 清洗后, 将增敏化学发光液滴加到条带上, 用化学发光成像系统对条带曝光并拍摄照片, 用 Image J 计算条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白 GAPDH 的比值表示各组的蛋白的相对表达量。

2.10 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 进行

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -catenin	上游 TGCCATCTGTGCTCTTCGTC	151
	下游 CAATCCAACAGTTGCCTTTATCAG	
TCF4/TCF7L2	上游 GGCTCAAATGTAGAAGACAGAAGTAG	108
	下游 GCTAGTCATGTGGTCATAGGGAGT	
Wnt3a	上游 CCCAAGAGCACAGAAGAGGAA	133
	下游 TTTGTCTAAATCCAGTGGTTAGTGG	
miR-15b-5p	逆转录 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGTAAA	66
	上游 CGCGTAGCAGCACATCATGG	
	下游 AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
U6	上游 CTCGCTTCGGCAGCACA	94
	下游 AACGCTTCACGAATTTGCGT	

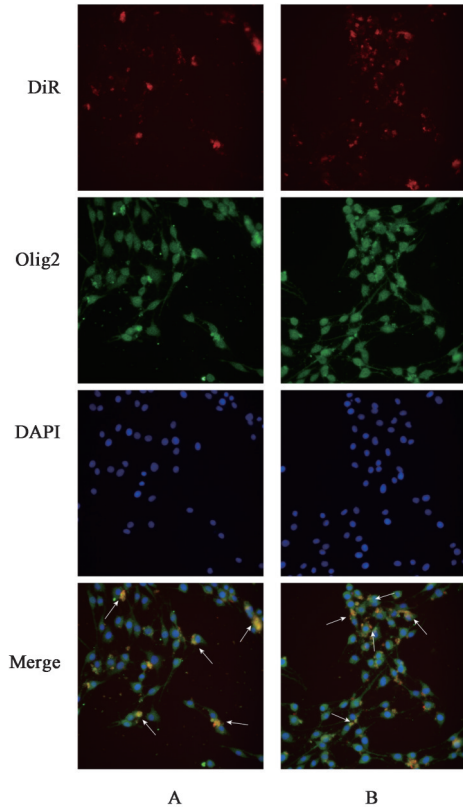
数据统计和绘图,数据符合正态分布时,采用单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Tukey's HSD 检验比较两组间差异;若不符合正态性,则采用秩和检验法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Exos被 OLN-93 细胞摄取 为了观察 BMSC-exos 和 BSYS-BMSC-exos 能有效作用于 OLN-93 细胞, DiR 染色标记 Exos, Olig2 染色标记 OLN-93 细胞。荧光观察发现, DiR 红色荧光标记的 BMSC-exos 和 BSYS-BMSC-exos 能被 OLN-93 细胞内吞,并在胞内累积。见图 1。

3.2 BSYS-BMSC-exos 的浓度筛选 CCK-8 检测结果显示,与 NC 组比较,高浓度组如 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞活力明显升高 ($P < 0.05$), $20, 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞活力显著升高 ($P < 0.01$)。与 $2.5, 5, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度组比较, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSYS-BMSC-exos 可明显提高 OLN-93 细胞的活力 ($P < 0.05, P < 0.01$), 与 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较则差异无统计学意义。因此采用 BSYS-BMSC-exos 为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质量浓度进行下一步实验。见表 2。

3.3 慢病毒转染的 BSYS-BMSC-exos 中 miR-15b-5p 的抑制 对 BMSC 慢病毒转染空载 miR 对照组 (BMSC+LV-miR-15b-5p NC) 和 BMSC 慢病毒转染 miR-15b-5p 抑制组 (BMSC+LV-miR-15b-5p inhibitor) 进行荧光观察,结果显示 LV.GFP 荧光阳性细胞稳定表达,细胞生长状态良好。Real-time PCR 检测 BMSC 细胞中病毒的转染效率,结果显示,与 BMSC+LV-miR-15b-5p NC 组比较, BMSC+LV-miR-15b-5p inhibitor 组中 miR-15b-5p 的表达被显著抑制



注: A. BMSC-exos 组; B. BSYS-BMSC-exos 组; 箭头指 Exos 在 OLN-93 细胞中聚集

图 1 OLN-93 细胞摄取 BMSC-exos 和 BSYS-BMSC-exos (ICC, $\times 400$)

Fig. 1 OLN-93 cells uptake of BMSC-exos and BSYS-BMSC-exos (ICC, $\times 400$)

($P < 0.01$), 表明成功建立了 BMSC 慢病毒转染稳定株。进一步 Real-time PCR 检测 BSYS-BMSC-exos 中的病毒转染效率。结果显示,与 BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p NC-exos 组比较, BSYS-BMSC+LV

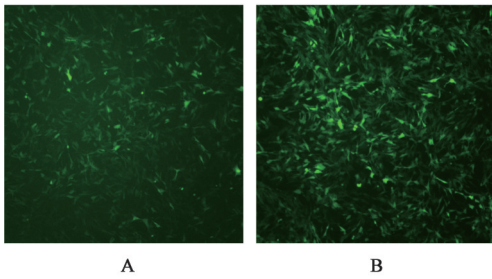
表2 各组 OLN-93 细胞的活力比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Comparison on OLN-93 cell viability in each group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力/%
NC组		100.00 \pm 5.04
BSYS-BMSC-exos组	2.5	102.60 \pm 8.44
	5	122.80 \pm 4.75
	10	136.60 \pm 7.10 ^{1,3)}
	20	171.50 \pm 22.20 ^{2,4,6,7)}
	40	160.40 \pm 25.82 ^{2,4,5)}

注:与NC组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与2.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSYS-BMSC-exos组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSYS-BMSC-exos组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BSYS-BMSC-exos组比较⁷⁾ $P < 0.05$

miR-15b-5p inhibitor-exos 中的 miR-15b-5p 表达被显著抑制 ($P < 0.01$),表明慢病毒转染后提取的 Exos 中的 miR-15b-5p 也可以被有效抑制。见图2、表3和表4。



注: A. BMSC+LV-miR-15b-5p NC组; B. BMSC+LV-miR-15b-5p inhibitor组

图2 LV-miR-15b-5p 转染 BMSC 的荧光表达 (ICC, $\times 40$)

Fig. 2 Fluorescent expression of LV-miR-15b-5p transfected BMSC (ICC, $\times 40$)

表5 各组 OLN-93 细胞中 CNPase 和 PLP 的阳性表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Positive expressions of CNPase and PLP in OLN-93 cells from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CNPase ⁺ 细胞	PLP ⁺ 细胞
NC组		13.67 \pm 2.08	15.33 \pm 4.51
BMSC-exos组	20	21.33 \pm 3.22 ¹⁾	25.33 \pm 1.53 ¹⁾
BSYS-BMSC-exos组	20	30.33 \pm 1.53 ^{2,3)}	36.33 \pm 3.06 ^{2,3)}
BSYS-BMSC+LVmiR-15b-5pinhibitor-exos组	20	20.00 \pm 2.00 ^{5,6)}	17.67 \pm 4.04 ^{5,6)}
BSYS-BMSC+LVmiR-15b-5pNC-exos组	20	31.67 \pm 4.16 ²⁾	34.00 \pm 2.65 ²⁾

注:与NC组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与BMSC-exos组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与BSYS-BMSC-exos组比较⁵⁾ $P < 0.01$;与BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos组比较⁶⁾ $P < 0.01$ (表6-表10同)

3.5 BSYS-BMSC-exos 对 OLN-93 细胞 CNPase 和 PLP 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与NC组比较,BMSC-exos组和BSYS-BMSC-exos组的 CNPase 和 PLP 表达显著增强 ($P < 0.01$)。与BMSC-exos组比较,BSYS-BMSC-exos组的 CNPase 表达明显上调 ($P < 0.05$),而慢病毒转染 miR-15b-5p

表3 LV-miR-15b-5p 转染 BMSC 的 miR-15b-5p 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Expression levels of miR-15b-5p in LV-miR-15b-5p transfected BMSC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	miR-15b-5p
BMSC+LV miR-15b-5p NC组	1.05 \pm 0.04
BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor组	0.52 \pm 0.04 ¹⁾

注:与BMSC+LV-miR-15b-5p NC组比较¹⁾ $P < 0.01$

表4 LV-miR-15b-5p 转染 BSYS-BMSC-exos 的 miR-15b-5p 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Expression levels of miR-15b-5p in LV-miR-15b-5p transfected BSYS-BMSC-exos ($\bar{x} \pm s, n=3$)

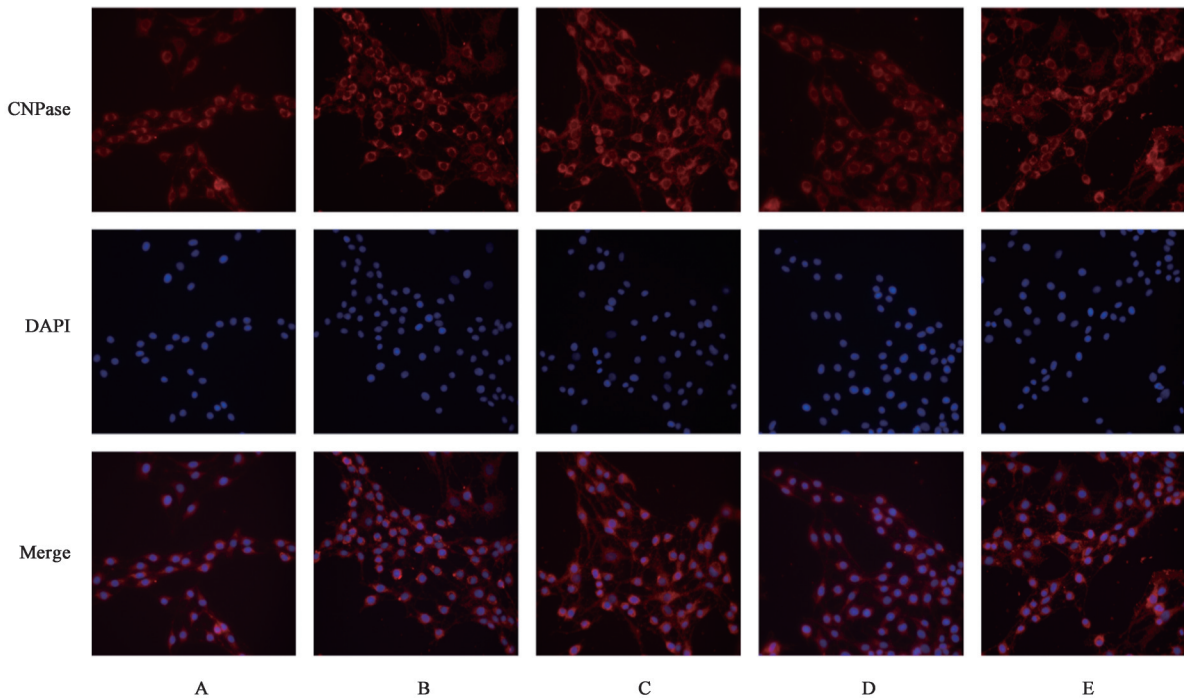
组别	miR-15b-5p
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p NC-exos组	1.02 \pm 0.03
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos组	0.22 \pm 0.09 ¹⁾

注:与BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos组比较¹⁾ $P < 0.01$

3.4 BSYS-BMSC-exos 对 OLN-93 细胞 CNPase 和 PLP 表达的影响 NC组中,OLN-93细胞主要呈现分支较少,分化成熟细胞数量较少。与NC组比较,在BMSC-exos和BSYS-BMSC-exos干预后,分化成熟的细胞胞体增大,呈膜状形态,分化程度较高。与NC组比较,BMSC-exos组和BSYS-BMSC-exos组中分化成熟的细胞数量增多 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与BMSC-exos组比较,BSYS-BMSC-exos组中分化成熟细胞的细胞数量明显增多 ($P < 0.05$)。而转染 miR-15b-5p 抑制物后,与BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos组比较,BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos组中分化成熟的细胞数量显著降低 ($P < 0.01$)。见表5、图3、图4。

抑制物后,与BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos组比较,CNPase和PLP的高表达被miR-15b-5p的抑制所消除,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表6和图5。

3.6 BSYS-BMSC-exos 对 OLN-93 细胞中 miR-15b-5p 和 Wnt3a 表达的影响 Real-time PCR 检测结果显



注: A.NC组;B.BMSC-exos组;C.BSYS-BMSC-exos组;D.BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos组;E.BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p NC-exos组(图4-图7同)

图3 各组 OLN-93 细胞中 CNPase 阳性表达情况 (ICC, ×400)

Fig. 3 Positive expression of CNPase in OLN-93 cells from each group (ICC, ×400)

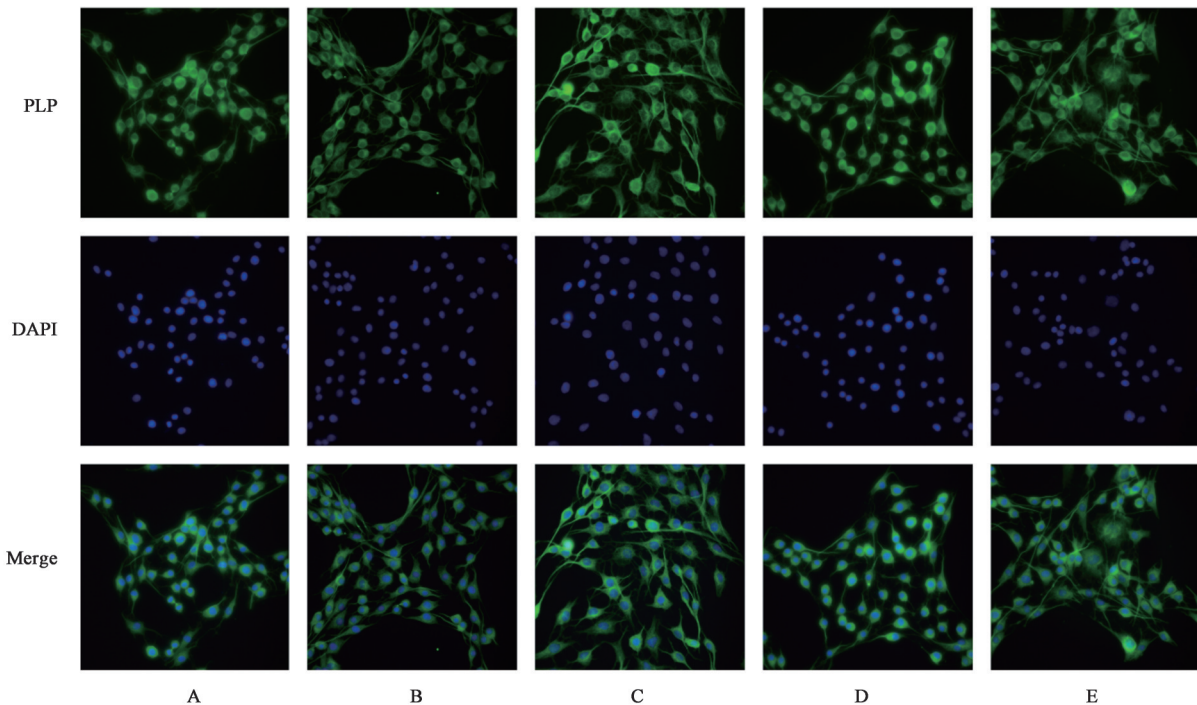


图4 各组 OLN-93 细胞中 PLP 阳性表达情况 (ICC, ×400)

Fig. 4 Positive expression of PLP in OLN-93 cells from each group (ICC, ×400)

示,与NC组比较,BSYS-BMSC-exos显著上调 miR-15b-5p 的表达($P<0.01$),且显著降低 Wnt3a 的表达($P<0.01$),而BMSC-exos仅降低了Wnt3a的表达($P<0.01$)。与BMSC-exos组比较,BSYS-BMSC-exos组

中 miR-15b-5p 的显著上调($P<0.01$)和 Wnt3a 明显降低($P<0.05$)。而转染 miR-15b-5p 抑制物后,与BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos 组比较,BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos 中这一

表6 各组 OLN-93 细胞中 CNPase 和 PLP 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Protein expressions of CNPase and PLP in OLN-93 cells from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	CNPase/GAPDH	PLP/GAPDH
NC组		1.00±0.23	1.00±0.08
BMSC-exos组	20	1.76±0.16 ²⁾	1.30±0.12 ²⁾
BSYS-BMSC-exos组	20	2.18±0.16 ^{2,3)}	1.44±0.09 ²⁾
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos组	20	1.17±0.16 ^{5,6)}	1.05±0.05 ^{5,6)}
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p NC-exos组	20	2.28±0.23 ²⁾	1.55±0.09 ²⁾

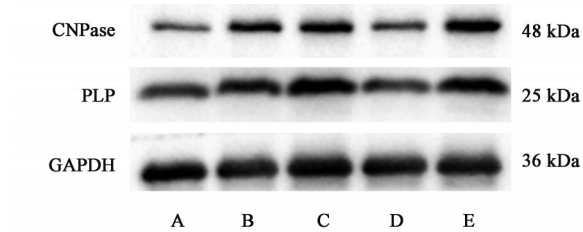


图5 各组 OLN-93 细胞中 CNPase 和 PLP 的蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of CNPase and PLP proteins in OLN-93 cells from each group

显著变化则被逆转 ($P<0.01$)。此外,各组 OLN-93 细胞中 Wnt3a 的蛋白表达结果趋势与 Real-time PCR 结果表现一致。见表7、表8和图6。

3.7 BSYS-BMSC-exos 对 OLN-93 细胞中 β -catenin 和 TCF4/TCF7L2 mRNA 表达的影响 Real-time PCR 检测结果显示,与 NC 组比较, BMSC-exos 和 BSYS-BMSC-exos 均明显降低 β -catenin mRNA 的表达水平 ($P<0.05, P<0.01$), BSYS-BMSC-exos 还可降低 TCF4/TCF7L2 mRNA 的表达水平 ($P<0.01$)。与 BMSC-exos 组比较, BSYS-BMSC-exos 可降低 TCF4/TCF7L2 mRNA 的表达水平 ($P<0.05$)。转染 miR-15b-5p 抑制后,与 BSYS-BMSC+LV-miR-15b-

表8 各组 OLN-93 细胞中 miR-15b-5p 和 Wnt3a mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 miR-15b-5p and Wnt3a gene expression levels in OLN-93 cells from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	miR-15b-5p	Wnt3a
NC组		1.00±0.00	1.07±0.07
BMSC-exos组	20	1.11±0.09	0.76±0.02 ²⁾
BSYS-BMSC-exos组	20	1.56±0.11 ^{2,4)}	0.52±0.03 ^{2,3)}
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos组	20	0.85±0.10 ^{5,6)}	0.95±0.17 ^{5,6)}
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p NC-exos组	20	1.35±0.10 ²⁾	0.56±0.04 ²⁾

3.8 BSYS-BMSC-exos 对 OLN-93 细胞中 GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与 NC 组比较, BSYS-BMSC-exos 中 p-GSK-3 β (Ser9) 表达降低 ($P<0.05$), p- β -catenin 的表达显著升高 ($P<0.01$)。与 BMSC-exos 组比较, BSYS-BMSC-exos 中的 p-GSK-3 β (Ser9) 表达降低和 p- β -catenin 的

表7 各组 OLN-93 细胞中 Wnt3a 蛋白的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Protein expression of Wnt3a in OLN-93 cells from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	Wnt3a/GAPDH
NC组		1.00±0.13
BMSC-exos组	20	0.72±0.05 ¹⁾
BSYS-BMSC-exos组	20	0.46±0.10 ^{2,3)}
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos组	20	0.91±0.09 ^{5,6)}
BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p NC-exos组	20	0.48±0.09 ²⁾

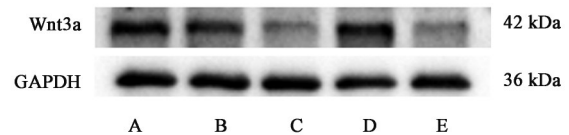


图6 各组 OLN-93 细胞中 Wnt3a 的蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of Wnt3a protein in OLN-93 cells from each group

5p NC-exos 组比较, BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos 组中 β -catenin 和 TCF4/TCF7L2 的表达水平均显著回升 ($P<0.01$)。见表9。

表达升高 ($P<0.05$)。然而,转染 miR-15b-5p 抑制后,与 BSYS-BMSC+LV-miR-15b-5p NC-exos 组比较, BSYS-BMSC+LV miR-15b-5p inhibitor-exos 组中 p-GSK-3 β (Ser9) 表达则显著回升 ($P<0.01$), p- β -catenin 的表达显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表10、图7。

表9 各组 OLN-93 细胞中 β -catenin 与 TCF4/TCF7L2 的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Protein expression levels of β -catenin and TCF4/TCF7L2 in OLN-93 cells from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	β -catenin	TCF4/TCF7L2
NC 组		1.00±0.00	1.01±0.01
BMSC-exos 组	20	0.72±0.09 ¹⁾	0.85±0.05
BSYS-BMSC-exos 组	20	0.49±0.06 ²⁾	0.58±0.13 ^{2,3)}
BSYS-BMSC+LVmiR-15b-5pinhibitor-exos 组	20	1.04±0.17 ^{5,6)}	1.03±0.05 ^{5,6)}
BSYS-BMSC+LVmiR-15b-5p NC-exos 组	20	0.55±0.10 ²⁾	0.62±0.14 ²⁾

表10 各组 OLN-93 细胞中 GSK-3 β 和 β -catenin 的蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Protein expression levels of GSK-3 β and β -catenin in OLN-93 cells from each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p-GSK-3 β (Ser9)/GSK-3 β	p- β -catenin/ β -catenin
NC 组		1.00±0.17	1.00±0.05
BMSC-exos 组	20	0.94±0.05	1.14±0.07
BSYS-BMSC-exos 组	20	0.64±0.05 ^{1,3)}	1.91±0.26 ^{2,3)}
BSYS-BMSC+LVmiR-15b-5pinhibitor-exos 组	20	1.05±0.12 ^{5,6)}	0.92±0.20 ^{5,6)}
BSYS-BMSC+LVmiR-15b-5p NC-exos 组	20	0.59±0.11 ²⁾	1.95±0.44 ²⁾

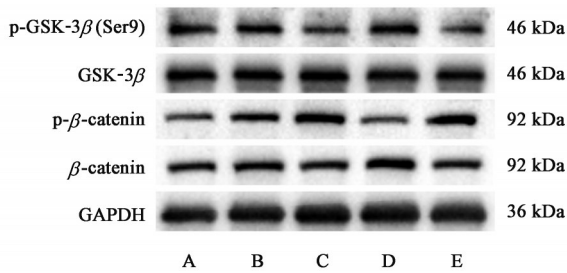


图7 各组 OLN-93 细胞中 GSK-3 β 和 β -catenin 的蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of GSK-3 β and β -catenin proteins in each group of OLN-93 cells

4 讨论

MS 作为一种全球发病率逐年攀升的 CNS 自身免疫性疾病,严重危害患者的生命健康。目前临床治疗 MS 缓解期多采用特立氟胺和芬戈莫德等药物,这类药物虽然能有效减少复发和延缓疾病进展,但仍面临较多不良反应等困境^[6]。近年来,中医学者根据 MS 患者临床症状表现,赋予了 MS 中医上的内涵^[30-31]。樊永平教授认为 MS 的核心病机是肾精亏虚,或兼痰夹瘀,结合多年临床治疗经验创立了 BSYS 治疗肝肾阴虚型 MS 患者,方中生地黄、熟地黄等滋补肝肾,填精益髓以治其本,辅以浙贝母、益母草、水蛭、全蝎等化痰活血通络以治其标,体现了标本兼治的治疗理念。临床研究和实验研究表明,BSYS 在治疗 MS 中具有显著疗效,对 BSYS 在促进髓鞘修复和再生方面的深入挖掘可为治疗 MS 提供新的治疗思路。

研究表明,BMSC-exos 可以减轻 MS 炎症反应^[32]和促进髓鞘再生^[33],这些发现为 Exos 在 MS 治

疗中的应用提供了依据,然而现有研究多关注于 Exos 的天然生物功能对 MS 的治疗修复作用,Exos 作为药物载体的应用潜力及药物修饰的 Exos 如何进一步发挥其有益疗效,仍值得深入研究。本研究通过体外细胞实验,采用 BMSC-exos 和 BSYS-BMSC-exos 干预 OLN-93 细胞,发现 Exos 不但可以被 OLN-93 细胞摄取,且 BSYS-BMSC-exos 可以有效提高 OLN-93 细胞活力。与之前研究发现相同,本研究发现 BMSC-exos 可以升高 OLs 分化成熟相关蛋白 CNPase 和 PLP 的表达,此外,经过 BSYS 干预后的 BSYS-BMSC-exos 则能进一步提高治疗效果,提示 BSYS-BMSC-exos 可增强 OLN-93 细胞的分化成熟。

miRs 作为一类内源性小非编码 RNA,在生理和病理过程中都发挥着调节基因表达中起重要作用^[34],目前大多数 MS 的研究主要关注 miRs 抑制炎症反应的功能,而 miRs 在 OPCs 分化成熟和髓鞘再生修复方面也发挥了重要调控作用^[35-36]。有研究发现,miR-219、miR-138 和 miR-338 是 OPCs 分化过程中具有代表性的 miRs^[37]。本研究结果发现 miR-15b-5p 在 BSYS-BMSC-exos 促进 OLN-93 细胞分化成熟中发挥关键作用,特异性抑制 miR-15b-5p 的表达后,BSYS-BMSC-exos 的促进作用则被大大削弱。此外,BSYS-BMSC-exos 干预 OLN-93 细胞后,OLN-93 细胞中 miR-15b-5p 表达升高进而抑制了 Wnt3a,而由于 BSYS-BMSC-exos 中 miR-15b-5p 的抑制,该作用被减弱,再次表明 BSYS-BMSC-exos 调控了 miR-15b-5p 及其靶基因 Wnt3a 的表达。

研究发现,Wnt信号通路参与了CNS中髓鞘再生^[38],Wnt/ β -catenin通路的激活会延迟或抑制OLs分化与成熟^[39]。同时,有研究发现,白芍总苷^[40]、白藜芦醇^[41]及总黄芪甲苷^[42]等中药有效成分通过抑制Wnt/ β -catenin通路来发挥促进OPCs分化成熟和神经保护作用。与之前研究相一致,本研究发现BSYS-BMSC-exos作用于OLN-93细胞后下调了Wnt3a的表达,且上调其下游通路分子p- β -catenin,下调p-GSK-3 β (Ser9)和TCF4/TCF7L2的表达,表明Wnt信号通路被抑制,而在对miR-15b-5p进行抑制后,这一趋势也被逆转。这些结果表明BSYS-BMSC-exos通过上调miR-15b-5p的水平进而抑制Wnt信号通路来调节OLN-93细胞的分化成熟。本研究目前的不足之处为仅使用了OLN-93细胞系进行敲低miR-15b来验证其靶向作用,未来可以补充Wnt信号通路激动剂来进一步明确其作用关系。

综上所述,本研究表明BSYS-BMSC-exos可以发挥促进OLN-93细胞分化成熟的作用,且BSYS-BMSC-exos通过调控miR-15b/Wnt信号通路来调节OLN-93细胞的分化成熟,本研究为BSYS治疗MS中提供了客观依据,也丰富了中医药治疗MS的研究思路。

[利益冲突] 王蕾为本刊编委,未参与本文的审校环节;本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] D'SOUZA M, PAPADOPOULOU A, GIRARDEY C, et al. Standardization and digitization of clinical data in multiple sclerosis[J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(2):119-125.

[2] GOODIN D S. The epidemiology, pathology and pathogenesis of MS: Therapeutic implications[J]. *Neurotherapeutics*, 2025: e00539.

[3] WALTON C, KING R, RECHTMAN L, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition[J]. *Mult Scler*, 2020, 26(14):1816-1821.

[4] GRAF J, AKMATOV M K, MEUTH S G, et al. Updated multiple sclerosis incidence, 2015-2022[J]. *JAMA Neurol*, 2024, 81(10):1100-1102.

[5] KLOTZ L, ANTEL J, KUHLMANN T. Inflammation in multiple sclerosis: Consequences for remyelination and disease progression [J]. *Nat Rev Neurol*, 2023, 19(5):305-320.

[6] GALLOWAY D A, GOWING E, SETAYESHGAR S, et al. Inhibitory milieu at the multiple sclerosis lesion site and the challenges for remyelination[J]. *Glia*, 2020, 68(5):859-877.

[7] AGGARWAL S, YURLOVA L, SIMONS M. Central nervous system myelin: Structure, synthesis and assembly[J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(10):585-593.

[8] GRUCHOT J, WEYERS V, GÖTTLE P, et al. The molecular basis for remyelination failure in multiple sclerosis[J]. *Cells*, 2019, 8(8):825.

[9] KRÅKENES T, SANDVIK C E, YTTERDAL M, et al. The therapeutic potential of exosomes from mesenchymal stem cells in multiple sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19):10292.

[10] TANG Y, ZHOU Y, LI H J. Advances in mesenchymal stem cell exosomes: A review[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):71.

[11] XIAO Y, WANG S K, ZHANG Y, et al. Role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases[J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 201:102022.

[12] MIRZAEI R, ZAMANI F, HAJIBABA M, et al. The pathogenic, therapeutic and diagnostic role of exosomal microRNA in the autoimmune diseases[J]. *J Neuroimmunol*, 2021, 358:577640.

[13] MOHAMMADINASR M, MONTAZERSAHEB S, AYROMLOU H, et al. Exosome content-mediated signaling pathways in multiple sclerosis[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(8):5404-5417.

[14] ZHAI S, CHEN Y, JIANG T, et al. Traditional Chinese medicine provides candidates for multiple sclerosis: A review based on the progress of MS and potent treatment medicine[J]. *Mult Scler Relat Disord*, 2025, 95:106319.

[15] SONG L, ZHOU Q H, WANG H L, et al. Chinese herbal medicine adjunct therapy in patients with acute relapse of multiple sclerosis: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Complement Ther Med*, 2017, 31:71-81.

[16] 樊永平. 中医药辨证治疗多发性硬化的优势与不足[J]. *北京中医*, 2005, 24(4):209-211.

FAN Y P. The advantages and limitations of traditional Chinese medicine in syndrome differentiation and treatment of multiple sclerosis[J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2005, 24(4):209-211.

[17] FANG L, ZHENG Q, YANG T, et al. Bushen Yisui capsule ameliorates axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(35):3306-3315.

[18] ZHAO P, WANG Y, LIU X, et al. Bushen Yisui capsule promotes remyelination correlating with Sema3A/NRP-1, LIF/LIFR and Nkx6.2 in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 217:36-48.

[19] SUN Y, JI J, ZHA Z, et al. Effect and mechanism of catalpol on remyelination via regulation of the NOTCH1 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:628209.

[20] 赵雪松,樊永平,杨涛,等. 补肾益髓方对复发缓解型多发性硬化患者睡眠及生活质量的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(12):1762-1765.

ZHAO X S, FAN Y P, YANG T, et al. Effects of Bushen Yisui formula on sleep and quality of life in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis[J]. *World Chin Med*, 2020, 15(12):1762-1765.

[21] 赵雪松,樊永平,杨涛,等. 补肾益髓方对复发缓解型多发性硬化患者认知功能的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(11):4903-4905.

- ZHAO X S, FAN Y P, YANG T, et al. Effects of tonifying kidney and nourishing marrow on cognitive function with relapsing-remitting multiple sclerosis[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33(11):4903-4905.
- [22] LIU S, ZHA Z, LI C, et al. The mechanism of exosomes of BMSCs modified with Bushen Yisui capsule in promoting remyelination via regulating miR-15b/Wnt signaling pathway-mediated differentiation of oligodendrocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 340.
- [23] ZHAO C G, QIN J, LI J, et al. LINGO-1 regulates Wnt5a signaling during neural stem and progenitor cell differentiation by modulating miR-15b-3p levels[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):372.
- [24] FENOGLIO C, RIDOLFI E, GALIMBERTI D, et al. MicroRNAs as active players in the pathogenesis of multiple sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(10):13227-13239.
- [25] RICHTERLANDSBERG C, HEINRICH M. OLN-93: A new permanent oligodendroglia cell line derived from primary rat brain glial cultures[J]. *J Neurosci Res*, 1996, 45(2):161-173.
- [26] 周颖, 苏敏, 杰吉甫, 等. OLN-93细胞系分化条件探讨[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2020, 29(2):125-130.
- ZHOU Y, SU M, JIE J F, et al. Study on the optimal differentiation culture media for OLN-93 cell culture[J]. *Chin J Histochem Cytochem*, 2020, 29(2):125-130.
- [27] 杜聪. Septin7在OPC增殖、迁移和分化过程中的作用和机制[D]. 大连:大连医科大学, 2021.
- DU C. The role and the mechanism of septin7 in proliferation, migration and differentiation of oligodendrocyte precursor cells [D]. Dalian:Dalian Medical University, 2021.
- [28] DUAN C, LIU Y, LI Y, et al. Sulfasalazine alters microglia phenotype by competing endogenous RNA effect of miR-136-5p and long non-coding RNA HOTAIR in cuprizone-induced demyelination[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 155:110-123.
- [29] ZHENG Q, LIU L, LIU H, et al. The Bushen Yisui formula promotes axonal regeneration via regulating the neurotrophic factor BDNF/TrkB and the downstream PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:796.
- [30] 马运华, 武继涛, 徐云生. 多发性硬化的中医研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(2):55-57.
- MA Y H, WU J T, XU Y S. Traditional Chinese medicine research progress of multiple sclerosis[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39(2):55-57.
- [31] 徐佳琴, 熊英琼. 多发性硬化发病机制和中西医疗研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2024, 27(11):1439-1443.
- XU J Q, XIONG Y Q. Research progress on the pathogenesis of multiple sclerosis and the treatment of traditional Chinese and Western medicine[J]. *Chin J Pract Nerv Dis*, 2024, 27(11):1439-1443.
- [32] LI Z, LIU F, HE X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate inflammation and demyelination of the central nervous system in EAE rats by regulating the polarization of microglia[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67:268-280.
- [33] ZHANG J, BULLER B A, ZHANG Z G, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stromal cells promote remyelination and reduce neuroinflammation in the demyelinating central nervous system[J]. *Exp Neurol*, 2022, 347:113895.
- [34] SALIMINEJAD K, KHORRAM K H R, SOLEYMANI F S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5):5451-5465.
- [35] SIVALINGAM A M, SURESHKUMAR D D. Exosomes in regulating miRNAs for biomarkers of neurodegenerative disorders[J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(6):7576-7596.
- [36] SATAER X, ZHU Q F, ZHANG Y Y, et al. Exosomal microRNAs as diagnostic biomarkers and therapeutic applications in neurodegenerative diseases [J]. *Neurol Res*, 2023, 45(3):191-199.
- [37] FITZPATRICK J M, ANDERSON R C, MCDERMOTT K W. MicroRNA: Key regulators of oligodendrocyte development and pathobiology[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 65:134-138.
- [38] GAESSER J M, FYFFE-MARICICH S L. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS [J]. *Exp Neurol*, 2016, 283(Pt B):501-511.
- [39] FEIGENSON K, REID M, SEE J, et al. Wnt signaling is sufficient to perturb oligodendrocyte maturation[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2009, 42(3):255-265.
- [40] 谢璟璐, 伍雪英, 李倩, 等. 基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨白芍总苷对多发性硬化模型大鼠神经系统的保护作用[J]. *卒中与神经疾病*, 2021, 28(1):78-82.
- XIE J L, WU X Y, LI Q, et al. The protective effect of resveratrol on the nervous system of multiple sclerosis rats based on Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Stroke Nerv Dis*, 2021, 28(1):78-82.
- [41] 何晓非, 喻明, 青绍华, 等. 白藜芦醇对多发性硬化大鼠神经系统的保护作用与Wnt/ β -catenin信号通路相关[J]. *解剖科学进展*, 2020, 26(5):550-554.
- HE X F, YU M, QING S H, et al. The protective effect of resveratrol on nervous system of multiple sclerosis rats via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Prog Anat Sci*, 2020, 26(5):550-554.
- [42] YUAN J, XU N, TAO Y, et al. Total astragalosides promote oligodendrocyte precursor cell differentiation and enhance remyelination in cuprizone-induced mice through suppression of Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298:115622.

[责任编辑 李嘉麟]