

综 述

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002695

外泌体在骨代谢及骨、关节疾病诊治中的研究进展

陈长军, 赵 鑫, 陈李毅乐, 王秋入, 康鹏德

(四川大学华西医院骨外科, 成都 610041)

【摘 要】本文就外泌体构成、分泌及摄取相关理论, 外泌体在骨代谢的调控、骨与关节疾病的发病机制及诊疗方面的相关作用, 以及在再生医学领域中的应用进展进行重点介绍, 以进一步发掘外泌体潜在的研究及应用空间。

【关键词】外泌体; 骨、关节疾病; 骨代谢; 再生医学

【中图分类号】R68

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-12-20

Progress of exosomes in bone metabolism, and diagnosis and treatment of bone and joint diseases

Chen Changjun, Zhao Xin, Chen Liyile, Wang Qiuru, Kang Pengde

(Department of Orthopaedics, West China Hospital, Sichuan University)

【Abstract】This paper focuses on the research progress of exosomes, including the theory of exosome composition, secretion and uptake, the regulation role of exosomes in bone metabolism, the associated action of exosome in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bone and joint diseases, and the application of exosome in the field of regenerative medicine, so as to further explore the potential research and application space of exosomes.

【Key words】exosome; bone and joint diseases; bone metabolism; regenerative medicine

外泌体(exosome, Exo)也称细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV),是由一系列细胞产生的可与膜结合的分泌囊泡,直径 40~150 nm,是可以介导细胞间信息交流的膜性结构。外泌体自身携带的蛋白质、脂质、核酸等生物活性物质决定了其特定的功能和生物学特性。近年来,外泌体在骨代谢中的作用变得越来越重要,与骨、关节疾病的联系越来越密切,在各类骨科疾病如类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、骨关节炎(osteoarthritis, OA)、股骨头坏死、骨质疏松症(osteoporosis)等的发病机制、诊断和治疗中均扮演重要角色。此外,骨重塑是一个持续终生的过程,其功能主要是修复骨损伤和更新老化骨组织。在骨重塑过程中,各类骨细胞均可自发分泌外泌体,进而调控破骨细胞介导的骨吸收、成骨细胞介导的骨形成及内皮细胞介导的血管新生等过程。一般而

言,在病理状态下,细胞释放的外泌体能加速疾病的进程,而修复细胞特别是间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC),其释放的外泌体可能有助于疾病的治疗,其作用于靶细胞的方式主要包括自分泌、旁分泌和远距分泌,可在局灶或全身微环境调节中发挥作用。随着再生医学的不断进步,基于外泌体的修复策略也逐渐发展。本文主要介绍外泌体构成、分泌和摄取的过程,外泌体对骨代谢的调节,外泌体在多种骨与关节疾病发病、诊断、治疗中的作用,以及外泌体在骨组织工程领域的应用。

1 外泌体的构成、分泌及摄取

外泌体由脂质双分子层包裹无细胞器的胞质构成,胞质内含蛋白质、RNA、DNA 及脂质衍生物,如神经酰胺、胆固醇、磷脂酰丝氨酸和鞘磷脂等^[1]。脂质是外泌体膜的基本成分,特定的脂质(如胆固醇、鞘磷脂、磷酸甘油酯、神经酰胺和短、长链饱和脂肪酸链)和脂质代谢酶(如中性鞘磷脂酶、磷脂酶 D2、二酰基甘油激酶 α 等)参与外泌体的形成和释放,完成脂类从细胞向外泌体的富集^[2-3]。大部分外泌体携带微管蛋白和肌动蛋白等细胞骨架蛋白、四次跨膜蛋白超家族(tetraspanins)成员(CD9、CD63、CD81、CD82 等)、热休克蛋白

作者介绍:陈长军, Email: chenchangjun888@sina.com,

研究方向:骨科基础与临床研究。

通信作者:康鹏德, Email: Kangpengde1969@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81974333);四川省科技计划资助项目(编号:2019YFS0123);四川省国际合作资助项目(编号:2016HH0071);四川大学华西医院学科卓越发展 1.3.5 工程资助项目增加项目(编号:ZYJC18040)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20201106.1616.031.html>
(2020-11-09)

(HSP70、HSP90)、囊泡相关蛋白 (Alix、TSG101) 及膜转运融合相关蛋白 (Rab 家族、annexins、flotillin)。此外,外泌体也含有反映细胞来源的组织/细胞特异性蛋白^[1]。典型外泌体的蛋白质组成如图 1 所示^[4]。

外泌体起源于真核细胞内的多泡体 (multivesicle body, MVB), 即细胞的核内体间室向内出芽形成的腔内囊泡 (intraluminal vesicles, ILV)。此后, MVB 逐渐向质膜转运, 当与质膜融合后便由细胞释放, 经历内吞、整合和外排一系列过程。其中, 内体蛋白分选转运复合体 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 装置参与 ILV 的形成。ESCRT 由 4 种复合物 (ESCRT 0、I、II 和 III) 和相关蛋白组成, 其中 ESCRT 0 以泛素依赖的方式负责内容物聚集, ESCRT I 和 ESCRT II 诱导出芽, ESCRT III 驱动囊泡分离, 辅助蛋白 (尤其是 VPS4 ATPase) 负责 ESCRT 装置的游离和循环, ESCRT 家族成员主要有 HRS、ALIX 和 TSG101。学者们还发现独立于 ESCRT 机制也参与了 ILV 的形成和外泌体的生物发生, 如脂质 [如蛋白脂蛋白 (proteolipid protein, PLP)、胆固醇、磷脂酶 D2 (phospholipase D2, PLD2) 等、四次跨膜蛋白 (CD63、CD81 等) 或热休克蛋白等, 这类分子可以在缺乏关键 ESCRT 元件时参与形成 MVBs^[5]。此外, 参与外泌体释放过程的分子元件仍不是特别清楚, 目前已知的有细胞骨架 (微管和肌动蛋白及相关的驱动蛋白 (kinesin) 和肌球蛋白 (myosins) 作为分子马达、代表分子开关的 Rab GTPases 以及其他驱动 MVB 与细胞膜融合分子 (如 SNARE 复合体) 等^[6]。图 2 展示了外

泌体的生物发生和释放的过程及其影响分子^[7]。

外泌体从细胞释放出来后必须与受体细胞相互作用, 才能运输它们的内容物, 进而发挥信息传递作用。外泌体由多种与膜结合的激活或抑制分子组成, 可通过与靶细胞相关受体直接结合、直接激活或抑制靶细胞。另外, 外泌体可以通过胞吞/吞噬或胞膜融合而被受体细胞内化, 转移一系列诸如核酸等的生物活性分子, 从而改变细胞的功能。此外, 外泌体可以将功能性表面受体或胞外酶从一个细胞传递到另一个细胞, 从而恢复或增强其缺失的功能。外泌体携带的各种 mRNA 和 miRNA 也可以被转移和翻译成功能蛋白^[6]。

2 外泌体对骨代谢的调控作用

骨骼系统需要通过不断的代谢更新来维持其正常的形态和生理功能。许多骨代谢相关细胞均可以以分泌外泌体或微囊泡的形式参与骨形成、血管生成, 诱导成骨或破骨作用, 共同在骨的生理病理过程中发挥重要作用。

2.1 外泌体的成骨及成软骨作用

MSC 广泛分布于骨髓、骨膜、血管壁、肌肉、血液循环等处, 可迁移至骨损伤部位参与骨再生。MSC 具有多向分化潜能, 其产生的外泌体也有促进分化的作用。Liao W 等^[8]发现, 过表达 microRNA-122-5p 骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 产生的外泌体可以负性调控 SPRY2, 升高受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK)

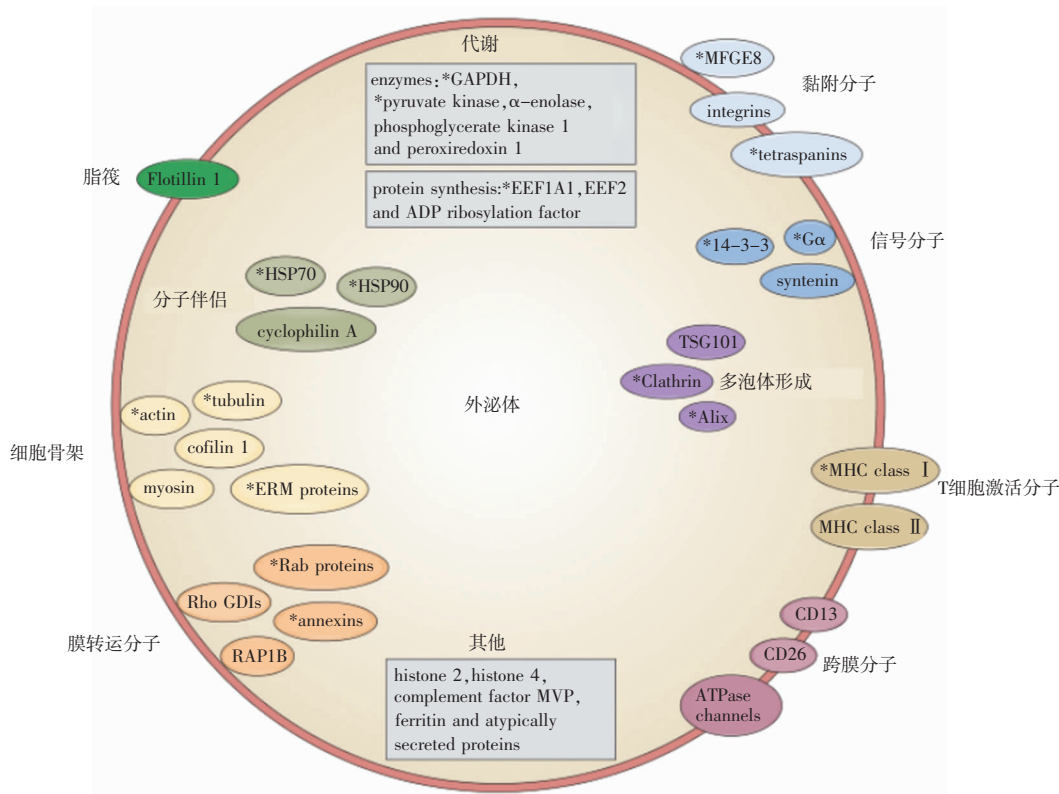


图 1 典型外泌体的蛋白质组成

活性,促进成骨细胞的增殖和分化。正常软骨细胞产生的外泌体也具有成软骨作用。Chen Y 等^[9]设计了一种基于软骨祖细胞(cartilage progenitor cell,CPC)的海藻酸盐结构,软骨细胞产生的外泌体可以增加结构内胶原沉积并减少血管的长入,促进其形成表型稳定的软骨结构,直至 12 周仍保持轻微的肥大及血管长入,促进软骨再生。

MSC 可通过外泌体调节炎症反应,消除骨组织慢性炎症,促进骨组织再生^[10]。Wei F 等^[11]发现,成骨分化状态的 BMSC 产生的外泌体可以明显降低促炎基因的表达,降低巨噬细胞(macrophage,M)炎性细胞因子[白介素(interleukin,IL)-1 β 、IL-6]及 M1 型巨噬细胞的标记水平,同时促进 MSC/间质细胞(stromal cell,SC)迁移,并且 BMSC 成骨诱导首日分泌的外泌体成骨作用更强,可显著促进骨生成标志物如 ALP 和 BMP2 的表达。还有研究发现,MSC 产生的外泌体能激活 AKT 和 ERK 信号通路,通过促进软骨细胞迁移、增殖和浸润,减少其凋亡,增强基质合成。同时,MSC 产生的外泌体还能增加抗炎修复 M2 型巨噬细胞浸润,同时降低促炎 M1 型巨噬细胞比例,以及 M1 型巨噬细胞相关的炎性细胞因子 IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的水平,促进软骨修复^[12]。

骨骼和肌肉也可通过外泌体进行通讯,肌源性外泌体也能够促进成骨。Xu Q 等^[13]研究发现,成肌细胞来源的携带 miR-27a-3p 的外泌体可以进入成骨细胞前体细胞,显著抑制 APC 的表达,增加 β -catenin 的表达和激活,促进成骨细胞的分化。其中,Wnt/ β -catenin 通路在成骨细胞分化中起关键作用,而 APC 为该通路的负调控因子同时也是 miR-27a-3p 的直接靶点,当外泌体丧失 miR-27a-3p 表达后则无法影响 APC-

β -catenin 通路。

2.2 外泌体调节骨重塑过程

骨重塑过程主要包括骨形成和骨吸收 2 个阶段,以及连续的静止期、活化期、破骨细胞聚集吸收期、成骨细胞聚集介导的逆转期、骨形成期、矿化期和终止期 7 个时期,可以更新或修复老化和损伤的骨骼,维持成人骨组织平衡^[14]。骨骼系统随着年龄的增长,其骨组织更新会出现进行性衰退,导致年龄相关性骨骼疾病如骨质疏松症的发生,此类疾病发生与不平衡的骨重塑密切相关。外泌体作为一种重要的信号分子,在骨重塑过程中发挥重要作用。

2.2.1 外泌体调节破骨的作用 破骨细胞起源于巨噬细胞/单核细胞谱系的前体细胞,可以去除骨的有机和无机成分,对骨的正常功能至关重要。在骨痂重塑、骨修复过程中,破骨细胞介导的骨吸收占主导,随后内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPC)通过促进新血管的形成来间接促进新骨的形成,完成修复的过程。但是外泌体对巨噬细胞破骨分化的影响较为复杂。Cui Y 等^[15]研究发现,EPC 来源的外泌体可以促进骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages,BMM)迁移,增加 LncRNA-MALAT1(LncRNA-MALAT1 可竞争性结合并调控 miR-124)水平,抑制 miR-124 表达,诱导破骨细胞分化。体内实验发现,该外泌体还能促进 BMM 在骨折部位归巢,并增加新血管形成,加速骨愈合。其他研究也发现外泌体可以抑制巨噬细胞的破骨分化。Song H 等^[16]发现,血管内皮细胞(endothelial cell,EC)分泌的外泌体(EC-Exos)比成骨细胞来源或骨髓间充质干细胞来源的外泌体有更好的骨靶向性,EC-Exos 可以显著抑制巨噬细胞的破骨细胞分化及破骨细胞形成,并降低破骨细胞的活化及骨吸收能力,抑制

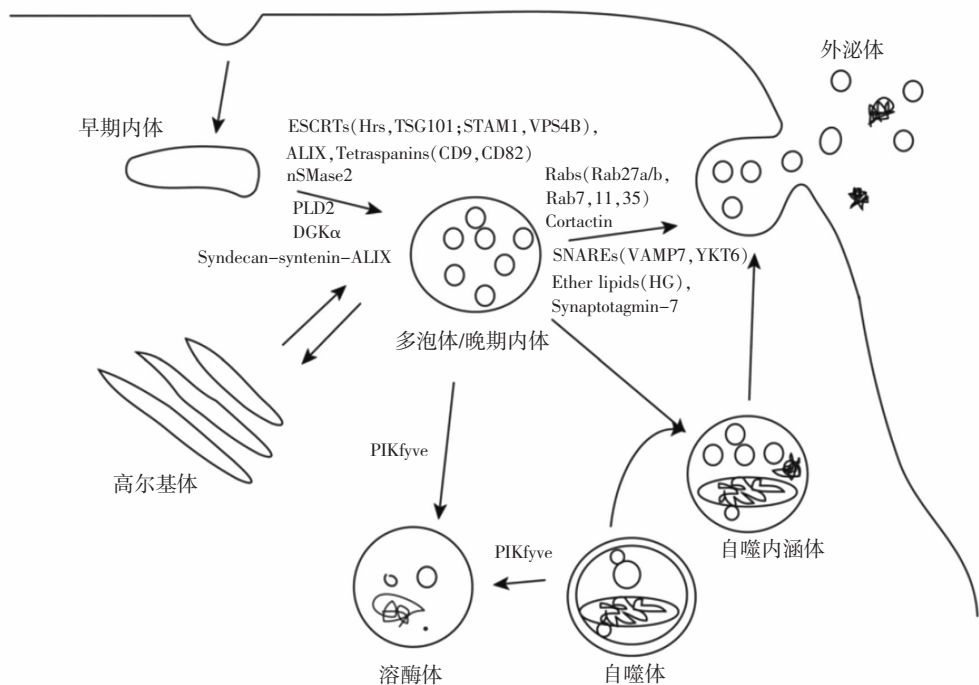


图 2 参与外泌体生物发生和释放过程的分子

卵巢切除所致的促炎细胞因子分泌,抑制骨丢失。其机制与增加 miR-155 表达有关。

2.2.2 外泌体平衡成骨作用 成骨细胞与破骨细胞之间可进行细胞间通讯,共同维持体内骨组织稳态。外泌体在此过程发挥关键作用。核因子 κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)的受体激活因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand,RANKL)由成骨细胞产生,而 NF- κ B 的受体激活因子(receptor activator of nuclear factor- κ B,RANK)则在破骨细胞中表达,成骨细胞对破骨细胞的调节主要由 RANKL 和护骨因子(osteoprotegerin,OPG)所介导,RANKL 与其受体 RANK 相互作用可激活破骨细胞,而 OPG 则与 RANKL 结合抑制破骨作用^[7]。此外,外泌体也参与了骨重塑的建立和维持。Sun W 等^[8]研究发现,破骨细胞来源的外泌体可将 miR-214 转入成骨细胞以抑制其活性,而抑制破骨细胞外泌体的形成和分泌可减弱破骨细胞对成骨细胞的抑制作用。体内实验证实,抑制外泌体释放增加了成骨细胞的活性。Li D 等^[9]发现,破骨细胞产生的外泌体 miR-214-3p 可转移至成骨细胞,进而抑制成骨细胞活性,干扰成骨细胞骨形成。

3 外泌体与骨关节疾病的关系

3.1 外泌体与类风湿性关节炎

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种常见的自身免疫性疾病,其特点是滑膜组织炎症、关节内白细胞浸润与血管生成的激活,破坏软骨和骨骼,导致全身关节的疼痛和损害。由于外泌体可携带如 microRNAs(miRNAs)、长链非编码 RNAs(long non-coding RNA,lncRNA)等信号分子,miRNAs 及其调控网络及外泌体在 RA 发病中发挥关键作用。常见的致病 miRNAs 有 MiR-146、miR-155、miR-126、miR-22、miR-573、miR-346 等^[20]。间充质干细胞通过纠正异常的 miRNAs 改变,对 RA 的治疗表现不凡。Chen Z 等^[21]研究发现,与 OA 相比,RA 患者血清中基质金属蛋白酶 14(matrix metalloproteinase 14,MMP-14)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)表达更高,血管新生增强,但其血清和滑膜组织中 miR-150-5p 的表达降低;而过表达 miR-150-5p 的 MSC 产生的外泌体可显著下调 RA 标志物 MMP-14 和 VEGF 在滑膜组织中的表达,抑制滑膜细胞的迁移侵袭能力,抑制血管新生,减轻关节炎的严重程度。同样的,RA 患者的 miR-192-5p 表达也降低,BMSC 产生的过表达 miR-192-5p 的外泌体可以抑制 RA 关节的炎症反应及破坏^[22]。此外,RA 发病的另一重要原因是调节性 T 细胞(regulatory T cells,Tregs)的数量缺陷。Wang L 等^[23]发现 RA 患者外泌体中 miR-17 升高,导致 Tregs 在外周血中所占比率降低,而 miR-17 可以靶向转化生长因子受体 II(transforming growth factor beta receptor II,TGFBR II),抑制 Tregs 分化,进而导致 RA 发病。

3.2 外泌体与骨关节炎

骨关节炎(osteoarthritis,OA)是最常见的慢性关节疾病,发病率随年龄的增长而增加,影响大多数 65 岁以上的人。OA

的特点是软骨破坏,细胞外基质(extracellular matrix,ECM)丢失,具有滑膜炎。诸多分子参与 OA 的病理生理进程,如转化生长因子- β (transforming growth factor- β ,TGF- β)参与软骨细胞的分化和成熟,基质金属蛋白酶 MMP-13 和含 I 型血小板反应蛋白的解聚蛋白样金属蛋白酶(a disintegrin-like and metalloprotease domain with thrombospondin type 1 motifs,ADAMTS)参与胶原蛋白的降解、关节软骨的破坏^[24]。对 OA 而言,外泌体作为一种参与细胞的交互作用信号分子,表现出既可促进 OA 进展又可促进关节软骨修复、对抗 OA 进展的双重特性。Kolhe R 等^[25]发现,OA 患者滑膜液分离的外泌体或细胞外囊泡中 miRNA 表达出现显著改变,并具有性别差异。此类外泌体可以显著抑制软骨细胞存活,增加 MMP-2 和 MMP-9 活性,降低细胞外基质合成基因蛋白聚糖(aggrecan,ACAN)和 II 型胶原(COL- II)的表达,并增加炎症基因 TNF- α 、IL-6 的表达,减少合成代谢基因表达,增加分解代谢基因表达,降低软骨细胞存活率。在骨关节炎的受累关节中,致病分子可通过外泌体进行传递。Kato T 等^[26]发现,IL-1 β 刺激滑膜成纤维细胞产生的外泌体可显著上调关节软骨细胞中 MMP-13 和 ADAMTS-5 表达,下调 II 型胶原纤维 α 1(COL2A1)和 ACAN 的基因表达,显著增高内皮细胞的迁移和成管活性,诱导关节软骨细胞出现骨关节炎改变,并且此类外泌体中发现 50 个 miRNAs 水平出现差异性表达。间充质干细胞外泌体在骨关节炎治疗方面表现良好。Cosenza S 等^[27]发现,间充质干细胞产生的外泌体可以逆转 IL-1 β 所致的软骨细胞合成代谢的标记基因 COL2B、COL1 和 ACAN 下调,以及分解代谢标记基因 MMP-13、ADAMTS5 和炎症一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)上调。此外,该外泌体可以抑制软骨细胞凋亡,并抑制巨噬细胞激活,抑制关节破坏。Qi H 等^[28]也发现软骨细胞摄取间充质干细胞产生的外泌体后,有助于维持软骨细胞的活力,在炎症条件下通过升高 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases,p38MAPKs)和细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)的磷酸化水平,降低丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Ser/Thr protein kinase,Akt)的磷酸化水平,抑制线粒体功能障碍,抑制软骨细胞凋亡。Wu J 等^[29]发现,来自髌下脂肪垫 MSC 的外泌体可进入被破坏的关节软骨,逆转软骨细胞中 II 型胶原的减少,下调软骨降解酶 ADAMTS5 和 MMP13 的表达,抑制其分解代谢,促进软骨细胞合成代谢,并且此外泌体可逆转炎症因子 IL-1 β 所致的软骨细胞凋亡,促进细胞迁移。此外,其还可抑制雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)信号通路,显著增强保护性自噬水平,通过对间充质干细胞进行修饰可以利用外泌体纠正异常的基因表达。Sun H 等^[30]发现,OA 患者软骨细胞出现异常基因表达,SRY 盒转录因子 9(SRY-box transcription factor 9,SOX9)表达减少,MMP-13 表达增加,而过表达 miR-320c 的 BMSC 可产生表达 miR-320c 的外泌体。该外泌体下调软骨细胞 MMP-13 的表达并上调 SOX9 和 COL2A1 表达,有

效增加软骨细胞增殖及迁移,增强 BMSCs 软骨形成能力。Mao G 等^[30]也发现,与正常者相比,OA 患者软骨外泌体中 miR-92a-3p 表达明显减少,而 WNT5A 表达水平升高,过表达 miR-92a-3p 间充质干细胞产生的外泌体内 miR-92a-3p 的表达也升高,这种改变可干扰 WNT5A 表达,显著上调 aggrecan、COL2A1、COL9A1、软骨寡聚基质蛋白(cartilage oligomeric matrix protein,COMP)、SOX9 的表达水平,降低 COL10A1、Runx2 相关转录因子 2(Runt-related transcription factor 2,Runx2)、MMP-13 的表达水平,促进软骨生成,并抑制软骨的降解,进而抑制早期 OA 的进展。

3.3 外泌体与股骨头坏死

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head,ONFH)是多种病因所致的骨代谢紊乱,其中局部缺血是股骨头坏死的主要病理表现,最终导致关节内部结构改变、股骨头塌陷、髋关节功能障碍。糖皮质激素(glucocorticoids,GC)可通过调节内质网应激诱导骨细胞凋亡,过多的 GC 所致的骨细胞死亡、血运受损或骨质修复不足导致股骨头坏死发生,而间充质干细胞外泌体却能延缓或阻止上述改变。Kuang MJ 等^[32]发现,地塞米松(dexamethasone,Dex)可以降低骨细胞的增殖能力,而来源于人脐带间充质干细胞 Wharton's jelly 的外泌体可以抑制 Dex 所致的骨细胞增殖能力下降及骨细胞凋亡的增加,并且该作用与 miR-21 的表达密切相关。此外,增加外泌体内 miR-21 表达可抑制人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10,PTEN)的表达,而 PTEN 是 Akt 信号通路的抑制剂,进而上调骨细胞 Akt 信号通路抑制骨细胞的凋亡,动物实验也证实上述观点。也有研究发现,人富血小板血浆来源的外泌体可通过 Akt/Bad/Bcl-2 信号通路,增强血管内皮细胞、成骨细胞、骨髓间充质干细胞的增殖、迁移能力,并抑制 caspase-3 的激活而抑制细胞凋亡。此外,其还可通过激活 Akt 和 Erk 通路,增加 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)和血小板衍生生长因子 BB(platelet-derived growth factor BB,PDGFBB)表达,促进血管新生,并通过提高碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)和骨钙蛋白(osteocalcin,OCN)表达水平增加成骨细胞、骨髓间充质干细胞介导的骨生成,从而抑制糖皮质激素所致的骨坏死^[33]。脂肪生成可以破坏成骨能力,Fang S 等^[34]发现 BMSC 产生的外泌体通过减少其脂肪形成来促进骨生成,逆转 Dex 所致的成骨分化下降,并上调 MMP-9、SOX-9 的表达,促进软骨细胞分化,增加 BMSC 的成骨。Guo SC 等^[35]发现,人滑膜间充质干细胞(synovial mesenchymal stem cells,SMSC)来源的外泌体可以促进股骨头成骨反应,抑制股骨头细胞凋亡,改善其增殖能力,促进骨组织的再生,减少股骨头的坏死。此外,BMSC 可以摄取 SMSC 产生的外泌体,SMSC-Exos 可明显增加 BMSC 增殖能力,逆转地塞米松所致的 BMSC 增殖能力下降,降低 Dex 诱导的 BMSC 凋亡。Liu X 等^[36]发现,在股骨头坏死模型中,MSC 分泌的外泌体可以明显抑制骨

质流失,增加股骨头 VEGFR2 和 CD31 的表达,促进股骨头的血管生成。此外,该外泌体可以被脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)摄取,激活磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 通路,进而增强其增殖、迁移和成管能力,促进血管生成。

3.4 外泌体与骨折愈合

骨折延迟愈合或不愈合是骨折发生后出现的一种并不少见的并发症,其治疗也变得更为困难。外泌体参与了生理和病理条件下的细胞间通讯,在促进组织修复方面,外泌体及其 miRNAs 似乎已经成为一种促进生理骨折、骨质疏松性骨折和骨缺损修复的新的治疗工具。Qi X 等^[37]发现,人诱导多能干细胞分泌的外泌体可以在成骨诱导培养基中,上调成骨相关基因如 RUNX2、COL1 和 ALP 的表达,上调成骨相关蛋白如骨桥蛋白(osteopontin,OPN)、RUNX2、COL1 的表达,改善骨质疏松状态下 BMSC 的成骨细胞增殖及分化,促进骨缺损部位的骨再生及血管生成,其作用强度随外泌体浓度的增大而增加。Zhang L 等^[38]发现,BMSC 产生的外泌体可以被成骨细胞前体细胞、HUVEC 摄取,并增强其增殖和迁移能力,促进成骨分化、血管新生,将 BMSC 产生的外泌体移植到骨折不愈合的部位后,也可通过促进骨形成、血管生成,加速骨愈合。Liu W 等^[39]发现,缺氧 MSC 产生的外泌体可通过转移 miR-126 来促进骨折愈合,其机制可能与低氧处理通过激活缺氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α ,HIF-1 α)来增加外泌体 miR-126 的产生有关。而 Chen S 等^[40]发现,过表达 mir-375 的人脂肪间充质干细胞也可以将 mir-375 在外泌体中富集,这种外泌体能促进 hBMSC 的成骨分化,促进骨的再生修复。

3.5 外泌体与骨质疏松症

骨组织稳态失衡常导致骨量减少或骨质疏松发生,外泌体介导的成骨分化功能障碍起重要作用,干细胞来源的外泌体也有助于骨质疏松症的治疗。Jiang LB 等^[41]研究发现,骨质疏松症患者的体内间充质干细胞来源的外泌体中 microRNA-21 的表达较健康成年人高,而与 microRNA-21 结合的 SMAD7 的表达较低,这种改变可显著降低 MSC 成骨相关基因如 ALP 和 Runx2 的表达,明显抑制间充质干细胞介导的骨生成。Xie Y 等^[42]发现,骨质疏松或骨质减少患者血清来源的外泌体能够明显增强破骨细胞介导的骨吸收;与正常年轻人相比,正常老年人产生的血清外泌体促进破骨细胞吸收能力更强;同时,骨量减少患者和正常老年人产生的血清外泌体可代偿性升高成骨分化水平,促进成骨细胞骨形成,但是骨质疏松患者的血清外泌体则抑制成骨细胞介导的骨形成。另一方面,骨质疏松患者的外泌体中整合素 β 1、 β 3 和 CD34 的蛋白表达均出现下调且 TGF- β 表达水平也降低,导致成骨分化降低,干扰骨形成。骨细胞的坏死、凋亡,破骨细胞激活常导致骨吸收增加,造成各类骨病特别是年龄相关性骨病的发生,而干细胞外泌体也表现出良好治疗前景。Ren L 等^[17]研究发现,脂肪间充质干细胞来源的外泌体可通过上调 Bcl-2/Bax 比

率,减少活性氧和细胞色素 c 的产生及 caspase-9 和 caspase-3 激活来改善缺氧/血清剥夺诱导的骨细胞凋亡。此外,其还可以降低 RANKL 的表达及 RANKL/OPG 比率,进而抑制破骨作用。Zhao P 等^[43]发现,来自骨髓间充质干细胞的外泌体可激活 MAPK 通路,上调 p-p38 和 p-JNK 水平,显著提高成骨细胞存活率,促进成骨细胞增殖,从而改善骨质疏松症。

4 外泌体作为骨关节疾病的生物标志物

细胞产生的外泌体可被释放到细胞外空间中,如血液或体液当中。目前已经发现,血液和体液中的外泌体已成为多种疾病如 RA、OA、股骨头坏死、骨质疏松的生物标志物,可用于疾病的诊断。Yoo J 等^[44]研究 60 例 RA 患者的血清外泌体时发现,临床缓解者与临床未缓解患者外泌体内淀粉样蛋白 A (amyloid A, AA) 和淋巴管内皮透明质酸受体 1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1, LYVE-1) 有显著差异,未缓解组较缓解组 AA 水平显著升高,而 LYVE-1 水平降低,其中外泌体 AA 与 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 呈正相关,而外泌体 LYVE-1 仅在未缓解组与 CRP 正相关,提示其潜在的作为 RA 活动度的标志物。对于 OA,除了上述 MiR 表达差异之外,Zhao Y 等^[45]发现血浆中外泌体在早、晚期 OA 及健康对照中的表达无明显差异,但是在滑膜液中早、晚期 OA 的外泌体表达上无明显差异但均较健康对照含量明显升高。此外,作者还发现血浆中早、晚期 OA 及健康对照者的外泌体中 lncRNA PCGEM1 表达无明显差异,但是晚期 OA 滑液中外泌体 lncRNA PCGEM1 表达较早期 OA 显著增高,而早期 OA 外泌体中 lncRNA PCGEM1 表达较健康对照显著增高,并且外泌体中 lncRNA PCGEM1 的量与 WOMAC 指数呈正相关,提示 lncRNA PCGEM1 可成为区分早晚期 OA 的有力指标。Zhu HY 等^[46]研究发现,循环外泌体水平可用于诊断激素性股骨头坏死。与健康供体相比,激素诱导的股骨头坏死患者循环外泌体水平显著降低,循环外泌体的水平对激素性股骨头坏死有良好的诊断准确性,但不能预测其分期。Zhang Y 等^[47]分析了健康人群和骨质疏松患者血浆外泌体转移 RNA 衍生片段 (plasma exosomal transfer RNA-derived fragments, tRFs) 并确认了血浆 tRF-25、tRF-38 和 tRF-18 可反映骨质疏松的动态变化,可作为监测骨质疏松的新的生物标志物。

5 外泌体与骨骼肌肉组织工程

组织工程是利用种子细胞、生物支架、生物活性因子来促进组织再生,修复缺损的形态和功能的一种治疗方法。外泌体作为细胞天然分泌的纳米载体,可以对多种疾病中发挥治疗作用。外泌体所携带蛋白、脂质、核酸、信号分子等生物活性物质可能通过激活某些信号通路来修复骨骼肌肉的缺损实现组织再生。目前的研究多集中于利用生物材料嵌合外

泌体促进成骨及骨组织修复方面。其常用的策略有 3D 培养技术 (调节外泌体的生物学特性)、纳米粒子技术 (利用纳米粒改变外泌体内容物、特性或调节外泌体释放或嵌合外泌体与纳米粒以改善外泌体自身缺陷)、生物支架技术 (实现对外泌体的保存和缓释功能)、3D 打印技术 (设计更优化的 3D 培养微环境或几何结构支架)^[48]。

OA 发病常伴随线粒体功能障碍和氧化应激损伤,进而导致关节软骨损伤,外泌体对于骨及软骨缺损修复方面作用良好。Chen P 等^[49]研究发现, MSC 外泌体可以补充线粒体相关蛋白,修复受损的线粒体,改善退行性软骨线粒体功能障碍和氧化应激损伤,平衡能量代谢,促进软骨再生;使用 3D 打印技术,设计具有径向导向通道的软骨细胞外基质/甲基丙烯酸明胶 (GelMA)/外泌体支架可有效恢复软骨线粒体功能障碍,增强软骨细胞迁移,促进巨噬细胞向 M2 表型极化,增强软骨及软骨下骨再生,促进骨修复。Zhang J 等^[50]研究发现,间充质干细胞产生的外泌体通过激活 PI3K/Akt 信号通路,明显提高 BMC 的迁移能力,促进 MSC 向损伤部位迁移,并增加骨生成的标志物 ALP 的活性,促进成骨分化及损伤的修复。此外,外泌体能激活骨骼再生过程,外泌体从磷酸三钙复合支架内释放,可被骨髓间充质干细胞摄取,增加骨缺损区磷酸三钙复合支架内骨组织形成并促进其骨化,促进骨缺损修复。随着外泌体作用浓度提高,骨髓间充质干细胞增殖能力越强。

Liu X 等^[51]发现,外泌体水凝胶支架对外泌体有良好的保留能力并实现缓慢释放,释放的外泌体可以促进细胞增殖和相应的基质分泌,还可以促进软骨细胞和 hBMSC 迁移和增殖。这种外泌体水凝胶组织补片能准确贴合软骨缺损,促进细胞迁移进入支架,实现对软骨缺损修复和重建。Li W 等^[52]发现,人脂肪干细胞来源的外泌体可以被 hBMSC 摄取。随着作用时间延长, hBMSC 的增殖、迁移和成骨分化能力逐渐提高, hBMSC 成骨过程中一系列成骨发生相关的基因如 RUNX2、ALP 和 COL1A1 均出现显著上调,将这些外泌体固定在支架表面后发现,聚多巴胺包裹的聚乙二醇乳酸乙醇酸 (polydopamine-coating PLGA) (PLGA/pDA) 支架较聚乙二醇乳酸乙醇酸 [poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA] 支架能够更为缓慢持续地释放外泌体,从而形成更多成熟胶原蛋白及新骨,并促进间充质干细胞在损伤部位归巢,促进骨再生。Chen S 等^[40]发现,过表达 miR-375 人脂肪间充质干细胞 (human adipose mesenchymal stem cells, hASCs) 的外泌体可以被 hBMSC 缓慢摄取,尽管无法促进 BMSC 增殖,但是诱导 hBMSC 在成骨分化的第 7 天, miR-375 外泌体可以显著提高 ALP 活性,第 14 天可明显提高细胞外基质矿化率。同样,成骨相关基因 RUNX2、ALP、COL1A1、OCN 的表达也显著上调,进而促进骨再生;体内实验证实过表达 miR-375 的外泌体嵌入水凝

胶后对颅骨缺损有更好的治疗作用,更好地促进新骨形成。

6 结论与展望

外泌体在骨关节炎、股骨头坏死等疾病的诊断和治疗中发挥广泛的作用,不同来源外泌体可对骨代谢过程的成骨细胞及破骨细胞功能的调节起到促进或延缓疾病进展的作用。随着近年来技术的进步,外泌体与许多生物材料相结合发挥更为重要的治疗作用,可以缓慢释放、持久作用,能更好地促进成骨分化、骨形成及细胞外基质的形成,对骨缺损、软骨损伤等的修复发挥更好的修复作用,在不久的将来有可能延缓甚至减少手术的作用,促进患者的恢复。但是目前也有许多不足,外泌体的作用机制较为复杂,外泌体所携带的大量信号分子如非编码 RNA 的存在使得寻找作用靶点更为困难。此外,许多复合新材料的出现使得外泌体有了更为广阔的用武之地,但是相关的研究也亟需进一步深入。总之,外泌体在研究骨与关节疾病的机制、帮助诊断及治疗方面的作用已经凸显,深入研究将对骨科疾病的诊疗产生深远影响。

参 考 文 献

- [1] Arenaccio C, Federico M. The multifaceted functions of exosomes in health and disease; an overview[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 998: 3–19.
- [2] Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes; current knowledge and the way forward[J]. *Prog Lipid Res*, 2017, 66: 30–41.
- [3] Qin J, Xu Q. Functions and application of exosomes[J]. *Acta Pol Pharm*, 2014, 71(4): 537–543.
- [4] Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 581–593.
- [5] Kowal J, Tkach M, Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29: 116–125.
- [6] Boyiadzis M, Whiteside TL. Information transfer by exosomes; a new frontier in hematologic malignancies[J]. *Blood Rev*, 2015, 29(5): 281–290.
- [7] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 193–208.
- [8] Liao W, Ning Y, Xu HJ, et al. BMSC-derived exosomes carrying microRNA-122-5p promote proliferation of osteoblasts in osteonecrosis of the femoral head[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(18): 1955–1975.
- [9] Chen Y, Xue K, Zhang X, et al. Exosomes derived from mature chondrocytes facilitate subcutaneous stable ectopic chondrogenesis of cartilage progenitor cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 318.
- [10] Reddy LK, Murugan D, Mullick M, et al. Recent approaches for angiogenesis in search of successful tissue engineering and regeneration[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2019[Epub ahead of print]. DOI: 10.2174/1574888X14666191104151928.
- [11] Wei F, Li Z, Crawford R, et al. Immunoregulatory role of exosomes derived from differentiating mesenchymal stromal cells on inflammation and osteogenesis[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(11): 1978–1991.
- [12] Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity[J]. *Biomaterials*, 2018, 156: 16–27.
- [13] Xu Q, Cui Y, Luan J, et al. Exosomes from C2C12 myoblasts enhance osteogenic differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts by delivering miR-27a-3p[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(1): 32–37.
- [14] Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological bone remodeling; systemic regulation and growth factor involvement[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2016, 31(3): 233–245.
- [15] Cui Y, Fu S, Sun D, et al. EPC-derived exosomes promote osteoclastogenesis through LncRNA-MALAT1[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(6): 3843–3854.
- [16] Song H, Li X, Zhao Z, et al. Reversal of osteoporotic activity by endothelial cell-secreted bone targeting and biocompatible exosomes[J]. *Nano Lett*, 2019, 19(5): 3040–3048.
- [17] Ren L, Song ZJ, Cai QW, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate hypoxia/serum deprivation-induced osteocyte apoptosis and osteocyte-mediated osteoclastogenesis *in vitro*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 508(1): 138–144.
- [18] Sun W, Zhao C, Li Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity[J]. *Cell Discov*, 2016, 2: 16015.
- [19] Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10872.
- [20] Zakeri Z, Salmaninejad A, Hosseini N, et al. MicroRNA and exosome; key players in rheumatoid arthritis[J]. *J Cell Biochem*, 2019[Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/jcb.28499.
- [21] Chen Z, Wang H, Xia Y, et al. Therapeutic potential of mesenchymal cell-derived miRNA-150-5p-expressing exosomes in rheumatoid arthritis mediated by the modulation of MMP14 and VEGF[J]. *J Immunol*, 2018, 201(8): 2472–2482.
- [22] Zheng J, Zhu L, Lok In I, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomal microRNA-192-5p delays inflammatory response in rheumatoid arthritis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 78: 105985.
- [23] Wang L, Wang C, Jia X, et al. Circulating exosomal miR-17 inhibits the induction of regulatory T cells via suppressing TGFBR II expression in rheumatoid arthritis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5): 1754–1763.
- [24] Xia B, Di C, Zhang J, et al. Osteoarthritis pathogenesis; a review of molecular mechanisms[J]. *Calcif Tissue Int*, 2014, 95(6): 495–505.
- [25] Kolhe R, Hunter M, Liu S, et al. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2029.
- [26] Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Exosomes from IL-1 β stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular

- chondrocytes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4):R163.
- [27] Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):16214.
- [28] Qi H, Liu DP, Xiao DW, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells inhibit mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of chondrocytes via p38, ERK, and Akt pathways[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2019, 55(3):203–210.
- [29] Wu J, Kuang L, Chen C, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis[J]. *Biomaterials*, 2019, 206:87–100.
- [30] Sun H, Hu S, Zhang Z, et al. Expression of exosomal microRNAs during chondrogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1):171–181.
- [31] Mao G, Zhang Z, Hu S, et al. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):247.
- [32] Kuang MJ, Huang Y, Zhao XG, et al. Exosomes derived from Wharton's jelly of human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce osteocyte apoptosis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats via the miR-21-PTEN-AKT signalling pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(9):1861–1871.
- [33] Tao SC, Yuan T, Rui BY, et al. Exosomes derived from human platelet-rich plasma prevent apoptosis induced by glucocorticoid-associated endoplasmic reticulum stress in rat osteonecrosis of the femoral head via the Akt/Bad/Bcl-2 signal pathway[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3):733–750.
- [34] Fang S, Li Y, Chen P. Osteogenic effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes on steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13:45–55.
- [35] Guo SC, Tao SC, Yin WJ, et al. Exosomes from human synovial-derived mesenchymal stem cells prevent glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in the rat[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(10):1262–1272.
- [36] Liu X, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(2):232–244.
- [37] Qi X, Zhang J, Yuan H, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(7):836–849.
- [38] Zhang L, Jiao G, Ren S, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells enhance fracture healing through the promotion of osteogenesis and angiogenesis in a rat model of nonunion[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):38.
- [39] Liu W, Li L, Rong Y, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126[J]. *Acta Biomater*, 2020, 103:196–212.
- [40] Chen S, Tang Y, Liu Y, et al. Exosomes derived from miR-375-overexpressing human adipose mesenchymal stem cells promote bone regeneration[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(5):e12669.
- [41] Jiang LB, Tian L, Zhang CG. Bone marrow stem cells-derived exosomes extracted from osteoporosis patients inhibit osteogenesis via miRNA-21/Smad7[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(19):6221–6229.
- [42] Xie Y, Gao Y, Zhang L, et al. Involvement of serum-derived exosomes of elderly patients with bone loss in failure of bone remodeling via alteration of exosomal bone-related proteins[J]. *Aging Cell*, 2018, 17(3):e12758.
- [43] Zhao P, Xiao L, Peng J, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells improve osteoporosis through promoting osteoblast proliferation via MAPK pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12):3962–3970.
- [44] Yoo J, Lee SK, Lim M, et al. Exosomal amyloid A and lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor-1 proteins are associated with disease activity in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2017, 19(1):119.
- [45] Zhao Y, Xu J. Synovial fluid-derived exosomal lncRNA PCGEM1 as biomarker for the different stages of osteoarthritis[J]. *Int Orthop*, 2018, 42(12):2865–2872.
- [46] Zhu HY, Gao YC, Wang Y, et al. Circulating exosome levels in the diagnosis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Bone Joint Res*, 2016, 5(6):276–279.
- [47] Zhang Y, Cai F, Liu J, et al. Transfer RNA-derived fragments as potential exosome tRNA-derived fragment biomarkers for osteoporosis[J]. *Int J Rheum Dis*, 2018, 21(9):1659–1669.
- [48] Zhou QF, Cai YZ, Lin XJ. The dual character of exosomes in osteoarthritis: antagonists and therapeutic agents[J]. *Acta Biomater*, 2020 [Epub ahead of print]. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.01.040.
- [49] Chen P, Zheng L, Wang Y, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration[J]. *Theranostics*, 2019, 9(9):2439–2459.
- [50] Zhang J, Liu X, Li H, et al. Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1):136.
- [51] Liu X, Yang Y, Li Y, et al. Integration of stem cell-derived exosomes with in situ hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(13):4430–4438.
- [52] Li W, Liu Y, Zhang P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(6):5240–5254.

(责任编辑:张学颖)