

源于间充质干细胞的外泌体在骨组织修复中的应用

梁家铭 徐建广

摘要 外泌体作为间充质干细胞旁分泌途径的重要介质,在间充质干细胞介导的骨组织修复中发挥重要作用。间充质干细胞分泌的外泌体可通过诱导间充质干细胞成骨分化、调节成骨细胞和破骨细胞功能、促进血管新生及加强生物材料活性等途径促进骨组织修复。该文就近年来间充质干细胞分泌的外泌体在骨组织修复中的应用研究进展作一综述。

关键词 间充质干细胞;外泌体;骨组织修复

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2020.03.002

基于间充质干细胞(MSC)的骨组织工程技术是骨组织缺损修复极具发展前途的治疗策略之一。外泌体是细胞分泌的细胞外囊泡,作为 MSC 的旁分泌介质,它是 MSC 发挥组织修复功能的重要原因,外泌体治疗作为替代细胞治疗的新方案,可避免细胞治疗带来免疫排斥反应、潜在致癌等并发症,也规避了伦理问题^[1]。外泌体携带 mRNA、miRNA、蛋白质、细胞因子和生长因子等生物活性物质,其通过影响细胞功能成为骨组织缺损修复的新治疗策略^[2]。

1 调节 MSC 成骨分化

外泌体可调节并诱导 MSC 进行成骨分化。研究表明,MSC 分泌的外泌体作为一种细胞工具,在体内外都能诱导幼稚 MSC 特异性分化,同时还可与基质蛋白(如 I 型胶原蛋白、纤维蛋白等)结合,从而诱导成骨细胞分化^[3]。Xu 等^[4]对人骨髓 MSC 培养并分离的外泌体 miRNA 进行分析,发现在 MSC 成骨细胞分化过程中有 9 种 miRNA 表达上调,4 种 miRNA 表达下调,这种表达差异在成骨分化早期最为显著,这为进一步研究 MSC 分泌的外泌体提供了前提条件。Narayanan 等^[5]研究表明,成骨细胞分泌的外泌体和脂肪细胞分泌的外泌体都能增强细胞外基质介导的 MSC 向各自谱系分化,同时在含有成骨细胞分泌外泌体的成脂肪细胞基质中培养的人骨髓 MSC 有成骨基因表达,认为外泌体对人骨髓 MSC 分化方向起着主导作用,其影响

超过了细胞外基质介导的细胞分化信号。

成骨分化阶段的细胞分泌外泌体,在分化过程中形成正反馈作用,进一步促进 MSC 成骨分化和生长。Yang 等^[6]对比成骨分化的人类脂肪干细胞分泌的外泌体和未分化的脂肪干细胞分泌的外泌体中 miRNA 表达谱,发现其中 201 个 miRNA 表达上调,33 个 miRNA 表达下调,这些差异化表达的外泌体 miRNA 参与基因表达、细胞发育和分化及信号转导等多种生物学过程;这些 miRNA 将成骨分化与轴突引导和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路、Wnt 信号转导通路相联系以促进脂肪干细胞成骨分化。MSC 在成骨分化时分泌的外泌体功能也随着分化阶段的变化而变化,以调节不同分化阶段的细胞功能。Wang 等^[7]研究表明,不同成骨分化阶段 MSC 分泌的外泌体都能促进同型干细胞向成骨细胞分化,但只有处于成骨分化后期 MSC 分泌的外泌体中含有差异表达的 miRNA 可以促进细胞外基质矿化,这些 miRNA 进一步丰富调控成骨分化的信号转导通路(如 Wnt 信号转导通路等),加强细胞内吞作用,以调整不同阶段细胞功能。

2 调节成骨细胞增殖和活性

成骨细胞广泛存在于骨、骨膜、骨髓等骨组织中,它是骨形成的主要功能细胞,是骨基质合成、分泌和矿化的基石^[8]。外泌体可通过直接调节成骨细胞增殖和活性来促进骨组织再生。Zhao 等^[9]研究发现,将 MSC 分泌的外泌体与成骨细胞共培养后,葡萄糖转运蛋白 3(GLUT3)、MAPK 相关蛋白及其

mRNA 在细胞中含量增加,并加快细胞周期,促进成骨细胞增殖。前列腺癌细胞分泌的外泌体具有极好的骨亲和性,在其作用下成骨细胞增殖速度可以达到原来的 1.5 倍。Yang 等^[10]研究表明,将人骨髓 MSC 分泌的含有肺腺癌转移相关转录本 1 (MALAT1)的外泌体与原代成骨细胞共培养,结果表明其通过介导 miR-34c/SATB2 轴增强成骨细胞活性。

Qin 等^[11]研究表明,骨髓 MSC 分泌的外泌体在体外通过 miR-196a 促进成骨细胞分化和增殖及成骨基因表达,同时促进颅骨缺损 SD 大鼠骨形成。Liao 等^[12]探究携带 miRNA-122-5p 的骨髓 MSC 分泌的外泌体在股骨头坏死兔模型中的作用,发现携带过表达 miR-122-5p 的外泌体通过提高受体酪氨酸激酶(RTK)活性,经由 RTK/Ras/MAPK 信号转导通路下调 Sprouty2 表达,促进成骨细胞分化和增殖,从而抑制股骨头坏死进展。而在调节成骨细胞活性的同时,外泌体也直接参与成骨细胞成骨。研究发现,外泌体在为矿化成骨细胞运输磷酸钙中起着重要作用^[13]。

3 影响破骨细胞分化和功能

骨重建是修复和替换受损骨组织的过程,由破骨细胞介导骨吸收、招募成骨前体细胞、激活分化形成新的骨组织来完成,破骨细胞与成骨细胞的相互作用和协调是骨组织修复的关键,破骨细胞的作用在骨组织修复中尤为重要^[14]。Cui 等^[15]研究发现,内皮祖细胞分泌的外泌体通过高表达的 LncRNA-MALAT1 与 miRNA-124 结合,抑制 miRNA-124 活性,诱导骨髓基质细胞迁移和破骨细胞分化;在小鼠体内实验中,将内皮祖细胞分泌的外泌体与原代小鼠骨髓来源巨噬细胞移植入骨折处,能显著促进骨折部位骨组织修复。Xu 等^[16]则发现,老年大鼠骨髓 MSC 分泌的外泌体中 miRNA-31a-5p 含量也明显高于年轻大鼠,当抑制外泌体中 miR-31a-5p 功能时,破骨细胞分化及功能也受到抑制,骨髓微环境中 miR-31a-5p 受抑制减少了老年大鼠骨丢失,并减弱了破骨细胞活性,这为年龄相关的骨质疏松提供了潜在的治疗靶点。

肿瘤骨转移与破骨细胞异常激活密切相关。Taverna 等^[17]研究发现,非小细胞肺癌分泌的外泌体中携带双向调节蛋白(AREG),其能诱导破骨前体细胞表皮生长因子受体(EGFR)途径激活而过表达核因子- κ B 受体活化因子配体(RANKL),从而

促进破骨细胞形成与分化。Xu 等^[18]在肺腺癌细胞分泌的外泌体中也发现了相似途径,外泌体通过过表达 miR-21 促进破骨细胞形成。而破骨细胞本身也可通过分泌外泌体调节自身功能,从而形成自身正负反馈作用。Huynh 等^[19]收集了早期破骨细胞分化为破骨细胞时分泌的外泌体,其在整个分化过程中可促进破骨细胞分化,同时成熟的破骨细胞分泌的部分外泌体中富集核因子- κ B 受体活化因子(RANK),它可能通过竞争性结合破骨细胞 RANKL 阻止其促进破骨细胞分化,以免过度分化的破骨细胞进一步破坏骨组织。

4 促进血管新生

骨组织修复是多步骤的复杂过程,由炎症引发各种细胞因子和生长因子释放,募集干细胞,促进血管形成,从而促进功能性骨形成,新生血管作为骨组织修复中的重要一员,在运送养料的同时还能促进细胞增殖和基质矿化^[20]。外泌体促进组织和器官血管生成已得到许多研究的证实^[21],它可能通过促进骨缺损中血管新生刺激骨骼再生。Zhang 等^[22]在大鼠股骨骨不连的体内研究中发现,将骨髓 MSC 分泌的外泌体植入骨折处,术后 20 周移植的骨髓 MSC 分泌的外泌体可明显促进大鼠骨不连成骨、血管生成和骨愈合;体外培养的人脐静脉内皮细胞和小鼠胚胎成骨前体细胞中能摄取骨髓 MSC 分泌的外泌体,它通过激活低氧诱导因子(HIF)-1 α /血管内皮生长因子(VEGF)信号转导通路和骨形态发生蛋白(BMP)-2/Smad1/RUNX2 信号转导通路增强细胞增殖、迁移和成骨分化能力。Zhang 等^[23]研究发现,脐带 MSC 分泌的外泌体可促进 VEGF 和 HIF-1 α 表达,显著增强内皮细胞血管生成活力,但其 Osx、骨钙蛋白(OCN)、COL1A1 和碱性磷酸酶(ALP)等成骨相关基因 mRNA 表达水平并没有显著提升,然而体内实验中脐带 MSC 分泌的外泌体可显著促进小鼠骨折模型血管生成和骨组织愈合,因此推测该外泌体促进骨折愈合机制可能并不依赖于促进成骨分化,而是通过促进血管新生加强骨组织修复。

Jia 等^[24]研究证实,内皮祖细胞分泌的外泌体可通过 miRNA-126 增强内皮细胞血管生成能力,miRNA-126 下调了 Spred1 并激活 Ras/细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号转导通路,在体外牵张成骨模型中,经内皮祖细胞分泌的外泌体处理的胫骨新生骨组织中血管密度较高,同时新生骨组织具有较

高的载荷极限和失效能。Tao 等^[25]研究发现,由富血小板血浆 (PRP) 分泌的外泌体富集了 PRP 中的生长因子,通过激活 Akt 和 ERK 信号转导通路拮抗地塞米松对内皮细胞 VEGF-A 表达的抑制作用而促进血管生成,同时 PRP 分泌的外泌体通过 Wnt/ β -catenin 信号转导通路拮抗地塞米松对小鼠胚胎成骨前体细胞体外成骨的抑制作用,维持细胞成骨分化能力;在体内实验中,改善股骨头血供和促进成骨可逆转甲强龙导致的骨小梁厚度降低、骨量减少和骨小梁数量减少等,缓解甲强龙诱导的股骨头坏死。

5 与生物材料联合应用

对于超过临界大小的骨缺损,生物材料的应用克服了骨移植物有限的难题,但生物材料也存在着局限性,因此有学者将外泌体与生物材料联合应用以提升其生物活性和功能。Zhang 等^[26]将人诱导多能干细胞源性 MSC 分泌的外泌体与磷酸三钙(β -TCP)支架复合,发现其能从 β -TCP 支架中释放,促进骨髓 MSC 增殖、迁移和成骨分化,同时可通过激活骨髓 MSC 的磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/Akt 信号转导通路增强 β -TCP 的成骨活性,从而促进骨缺损修复。Li 等^[27]将人脂肪干细胞分泌的外泌体固定在聚多巴胺包裹的聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 支架上,发现其可缓慢而持续地从 PLGA 支架上释放并与 PLGA 支架结合发挥诱导成骨作用,促进骨髓 MSC 在新生骨组织中迁移和归巢以促进骨组织再生。Wei 等^[28]将经 BMP-2 预处理巨噬细胞来源的外泌体与钛纳米管相结合,发现其通过促进自噬途径来促进骨髓 MSC 成骨分化,显著促进早期成骨分化标志物 ALP 和 BMP-2 的表达,从而促进缺损骨组织修复。

生物材料在形状上可填充骨缺损区域,同时代替原有骨组织承担部分机械支撑作用,为细胞提供生长环境,而外泌体的加入则提升了支架生物活性和成骨诱导能力,将两者有效结合应用可为骨组织修复提供可靠的“后勤保障”。

6 展望

与细胞治疗相比,外泌体治疗具有安全性高、便于运输和储存、免疫原性低、可作为药物载体和治疗效率高等优势^[29]。然而,外泌体大规模应用也面临产量低、提取和分离方式存有争议、携带的遗传信息确切功能尚未阐明、注射分布不可控等局限性^[30-32]。因此,开发一种可靠、低成本、高产量、高可重复性的

外泌体分离方式将极大地助力于外泌体研究。而认识和了解外泌体确切功能,掌握外泌体剂量、体内分布和清除效率可为外泌体进一步临床应用提供安全性保障。通过预处理等方式提高外泌体的作用效率及靶向运输能力将有助于提高外泌体疗法的治疗效果。

参考文献

- [1] Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(5): 812-823.
- [2] Xia J, Minamino S, Kuwabara K, et al. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine [J]. *Biosci Trends*, 2019, 13(4): 299-307.
- [3] Narayanan R, Huang CC, Ravindran S. Hijacking the cellular mail: exosome mediated differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 3808674.
- [4] Xu JF, Yang GH, Pan XH, et al. Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114627.
- [5] Narayanan K, Kumar S, Padmanabhan P, et al. Lineage-specific exosomes could override extracellular matrix mediated human mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Biomaterials*, 2018, 182: 312-322.
- [6] Yang S, Guo S, Tong S, et al. Promoting osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by altering the expression of exosomal miRNA [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 1351860.
- [7] Wang X, Omar O, Vazirani F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes have altered microRNA profiles and induce osteogenic differentiation depending on the stage of differentiation[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193059.
- [8] Dirckx N, Moorer MC, Clemens TL, et al. The role of osteoblasts in energy homeostasis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(11): 651-665.
- [9] 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.
- [10] Yang X, Yang J, Lei P, et al. LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(20): 8777-8791.
- [11] Qin Y, Wang L, Gao Z, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in

- vivo[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21961.
- [12] 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.
- [13] Iwayama T, Okada T, Ueda T, et al. Osteoblastic lysosome plays a central role in mineralization[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(7): eaax0672.
- [14] Sims NA, Martin TJ. Osteoclasts provide coupling signals to osteoblast lineage cells through multiple mechanisms [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82: 507-529.
- [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] Xu R, Shen X, Si Y, et al. MicroRNA-31a-5p from aging BMSCs links bone formation and resorption in the aged bone marrow microenvironment[J]. *Aging Cell*, 2018, 17(4): e12794.
- [17] Taverna S, Pucci M, Giallombardo M, et al. Amphiregulin contained in NSCLC-exosomes induces osteoclast differentiation through the activation of EGFR pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 3170.
- [18] Xu Z, Liu X, Wang H, et al. Lung adenocarcinoma cell-derived exosomal miR-21 facilitates osteoclastogenesis[J]. *Gene*, 2018, 666: 116-122.
- [19] Huynh N, Von Moss L, Smith D, et al. Characterization of regulatory extracellular vesicles from osteoclasts[J]. *J Dent Res*, 2016, 95(6): 673-679.
- [20] Rather HA, Jhala D, Vasita R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 103: 109761.
- [21] Baruah J, Wary KK. Exosomes in the regulation of vascular endothelial cell regeneration[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 353.
- [22] 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.
- [23] Zhang Y, Hao Z, Wang P, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1alpha-mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture[J]. *Cell Prolif*, 2019, 52(2): e12570.
- [24] Jia Y, Zhu Y, Qiu S, et al. Exosomes secreted by endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration during distraction osteogenesis by stimulating angiogenesis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 12.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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 Inter*, 2018, 10(6): 5240-5254.
- [28] Wei F, Li M, Crawford R, et al. Exosome-integrated titanium oxide nanotubes for targeted bone regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2019, 86: 480-492.
- [29] Joo HS, Suh JH, Lee HJ, et al. Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): E727.
- [30] Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques[J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 789-804.
- [31] Hao ZC, Lu J, Wang SZ, et al. Stem cell-derived exosomes: a promising strategy for fracture healing [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(5): e12359.
- [32] Marote A, Teixeira FG, Mendes-Pinheiro B, et al. MSCs-derived exosomes: cell-secreted nanovesicles with regenerative potential[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 231.

(收稿:2020-03-08)

(本文编辑:卢千语)