

外泌体在骨科疾病治疗中的作用

王鑫 付海亮

摘要 外泌体是一种由各种类型细胞分泌的囊泡,它经由脂质膜包裹着各种核酸、蛋白质、脂质等生物活性物质。基础研究显示,各种来源的外泌体治疗骨关节炎、骨质疏松、糖皮质激素性股骨头坏死、骨缺损、骨折等骨科疾病取得良好效果。其作用机制涉及各种基因表达调控及各种信号转导通路激活,从而调控软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、血管内皮细胞等生理活动。该文就外泌体在骨科疾病治疗中的作用作一综述。

关键词 外泌体;骨关节炎;骨质疏松;股骨头坏死;骨折;骨缺损

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2021.02.009

运用各种间充质干细胞、生长因子、支架的干细胞疗法是较有前景的组织再生策略之一。越来越多的研究表明,间充质干细胞的生物学效应来源于其分泌的外泌体。外泌体能展现出与其来源细胞相似的生物学特性,且直接应用外泌体治疗无明显不良反应,还能显著降低免疫原性、致癌性、血管堵塞等风险^[1]。

1 外泌体构成及特点

外泌体是由细胞分泌的细胞外囊泡,直径为 40~100 nm。外泌体膜表面具有标志性膜蛋白如 CD9、CD63、CD81 等,膜内包裹着蛋白、核酸、脂质等活性物质。外泌体的脂膜能很好地保护其含有的生物活性物质使其不被降解,并将蛋白质、DNA、RNA 等物质从母细胞转移到靶细胞中。外泌体作为重要的旁分泌效应因子在细胞信息交流中发挥着重要的作用^[2]。外泌体特性随着细胞来源不同而不同,且同一细胞不同时间段、不同生理病理状态下产生的外泌体也具有不同的特点。

2 外泌体治疗骨科疾病

2.1 骨关节炎

骨关节炎(OA)是常见关节炎之一,其病理特征包括软骨退化、软骨下骨硬化、形成骨赘、发生滑膜炎和韧带钙化等。目前临床上 OA 主要治疗方式仍是口服非甾体类抗炎药,然而其治标不治本,所以学者们仍在寻找新的治疗策略。过往研究集中在干细胞治疗,如关节内间充质干细胞可以阻止软骨退化,延缓骨关节炎进程。后续研究表明,干细胞治疗

功能来自于其旁分泌作用,包括其分泌的外泌体和微粒等。

2.1.1 滑膜间充质干细胞来源外泌体

Tao 等^[3]研究发现,滑膜间充质干细胞(SMSC)来源外泌体含有 Wnt5a 和 Wnt5b 且能激活 Yes 相关蛋白(YAP)信号转导通路,从而促进软骨细胞增殖和迁移,但 Wnt5a 和 Wnt5b 激活 YAP 信号转导通路会抑制 SOX9 的表达,同时使得软骨细胞外基质分泌明显减少。而经改造后高表达 miR-140-5p 的 SMSC 来源外泌体消除了这一不足,可使外泌体在不影响软骨细胞外基质分泌的情况下促进关节软骨细胞增殖和迁移,且可阻止大鼠 OA 发生。

Wnt5a 是一种非典型的 Wnt 蛋白,关节包括软骨、骨和关节腔等发育都高度依赖于 Wnt 信号转导通路^[4]。Wnt5a 具有双重功能:在软骨形成早期,能激活软骨细胞增殖,抑制软骨细胞分化;在软骨形成后期,能激活基质金属蛋白酶(MMP),减少软骨形成和成熟软骨细胞中软骨细胞外基质合成。

2.1.2 骨髓间充质干细胞来源外泌体

Mao 等^[5]研究发现,高表达 miR-92a-3p 的骨髓间充质干细胞(BMSC)来源外泌体可靶向作用于 Wnt5a mRNA 的 3'端非翻译序列,抑制 Wnt5a 活性,从而抑制 OA 小鼠软骨降解。在这项研究中 Wnt5a 的生物学作用与 Tao 等^[3]的 SMSC 来源外泌体研究结果类似,区别在于后者通过 miR-140-5p 抑制了 Wnt5a 降解软骨的负面作用,同时还保留了 Wnt5b 对软骨的保护作用。

Liu 等^[6]研究发现,人 BMSC 来源外泌体含有

长链非编码 RNA (lncRNA) KLF3-AS1, 它能作为内源竞争性 RNA 与 miR-206 基因进行结合, 从而抑制 miR-206 基因调控作用, 继而进一步提高 G 蛋白偶联受体激酶相互作用蛋白-1 (GIT-1) 表达。研究表明, GIT-1 能促进软骨细胞增殖, 抑制软骨细胞凋亡^[7]。Zhao 等^[8]研究发现, 血小板衍生生长因子 (PDGF) 通过上调 GIT-1 表达促进软骨细胞增殖并抑制软骨细胞凋亡。而 miR-206 过表达和 GIT-1 基因敲除能逆转 BMSC 来源外泌体对 OA 的治疗效果, 说明 BMSC 来源外泌体通过 KLF3-AS1 调控 miR-206/GIT-1 介导的软骨细胞增殖、凋亡并促进软骨修复^[9]。

还有研究比较 BMSC 来源外泌体与微粒对 OA 的治疗作用, 结果表明 BMSC 来源外泌体与微粒具有类似的功能, 即两者皆可重建软骨细胞稳态, 抑制软骨细胞凋亡, 刺激巨噬细胞向抗炎表型方向极化, 且两者都可抑制软骨降解, 阻断小鼠 OA 发生^[10]。

2.1.3 诱导性多功能干细胞来源外泌体

Zhu 等^[11]比较诱导性多功能干细胞来源外泌体与 SMSC 来源外泌体对小鼠 OA 的治疗效果, 结果显示诱导性多功能干细胞来源外泌体治疗效果更好。

2.1.4 胚胎干细胞诱导的间充质干细胞来源外泌体

胚胎干细胞诱导的间充质干细胞来源外泌体对 OA 具有良好的治疗作用^[12]。它通过增加 II 型胶原合成和降低聚蛋白多糖酶降解酶-5 表达维持软骨细胞表型, 并平衡软骨细胞外基质合成与降解, 阻止软骨破坏。

2.2 糖皮质激素性股骨头坏死

糖皮质激素性股骨头坏死是一种进展性、致残性关节疾病, 常由长期口服类固醇激素引起。骨髓基质细胞、成骨细胞、血管内皮细胞凋亡, 以及 BMSC 向脂肪细胞分化增加和骨形成畸形在这一病理过程中起着关键作用。因此, 早期预防骨髓基质细胞凋亡, 促进骨髓基质细胞增殖, 预防 BMSC 向脂肪细胞分化可能可阻止糖皮质激素性股骨头坏死进展。

2.2.1 SMSC 来源外泌体

Guo 等^[13]通过静脉注射 SMSC 来源外泌体治疗大鼠糖皮质激素性股骨头坏死, 结果显示治疗组大鼠股骨头软骨下骨小梁完整且分布均匀, 仅有 20% 的大鼠有非常轻微的骨坏死改变, 对照组大鼠骨小梁厚度、骨体积 (组织体积)、骨小梁数量明显降

低, 出现明显骨坏死, 股骨头松质骨稀疏甚至消失。这表明促进骨髓基质细胞增殖活性、抑制糖皮质激素引起的骨髓基质细胞凋亡可能是 SMSC 来源外泌体预防大鼠糖皮质激素性股骨头坏死的潜在机制。

2.2.2 其他类型外泌体

多项研究分别应用了各种不同的外泌体包括突变型低氧诱导因子 (HIF)-1 α 修饰的 BMSC 来源外泌体^[14]、诱导性多功能干细胞来源外泌体^[15]、富血小板血浆来源外泌体^[16]、BMSC 来源外泌体^[17]治疗糖皮质激素性股骨头坏死, 取得了相似且良好的效果。其原理为促进 BMSC、成骨细胞、血管内皮细胞增殖, 促进 BMSC 成骨分化及内皮祖细胞成血管分化, 抵抗高糖皮质激素引起的细胞凋亡, 激活细胞蛋白激酶 B (Akt)/Bad/Bcl-2 信号转导通路和磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 信号转导通路。这些不同的外泌体通过促进血管生成及骨生成方式有效阻止糖皮质激素性股骨头坏死发生和进展。

2.3 骨缺损与骨折

目前骨缺损治疗金标准是自体或异体骨移植, 然而自体骨移植有创、来源有限, 异体骨来源受限且有传染疾病的风险。骨折和骨缺损常迫使患者长期卧床、活动受限, 可能带来一系列致死的并发症如深静脉血栓形成、肺栓塞等。

2.3.1 诱导性多功能干细胞来源外泌体

Qi 等^[18]研究发现, 诱导性多功能干细胞来源外泌体可促进去卵巢大鼠 BMSC 增殖及增加碱性磷酸酶 (ALP) 活性, 上调成骨细胞相关基因 RUNX-2、COL1 和 ALP mRNA 和蛋白表达, 以促进成骨细胞分化。外泌体复合 β -磷酸三钙 (β -TCP) 支架, 可通过促进骨缺损区域血管生成和成骨加速骨缺损修复。外泌体体内外生物学效应随着其作用浓度增加而增强。

2.3.2 脂肪干细胞来源外泌体

Chen 等^[19]通过慢病毒转染使脂肪干细胞高表达 miR-375 并产生富含 miR-375 的外泌体, 将该外泌体装载在水凝胶中促进颅骨缺损模型大鼠骨再生, 结果显示 miR-375 能与胰岛素样生长因子结合蛋白 (IGFBP)-3 的 3' 端非翻译区结合, 抑制 IGFBP-3 表达, 从而促进骨再生。胰岛素样生长因子 (IGF) 是具有促生长作用的多肽类物质, 广泛分布于人体各种组织, IGF 发挥生物学效应须先与 IGFBP-3 解离。

2.3.3 脐带间充质干细胞来源外泌体

向大鼠股骨骨折区域植入结合脐带间充质干细胞来源外泌体的水凝胶能促进血管生成和骨折愈合^[20]。它不仅能增强成骨分化,还能增加血管内皮生长因子(VEGF)和 HIF-1 α 表达,促进内皮细胞生成血管。HIF-1 α 能在低氧条件下调控细胞增殖、分化,如使软骨细胞适应骨骼生长板的低氧环境,对胚胎发育、肿瘤血管生成、伤口上皮组织修复等具有重要作用。以往研究表明,HIF-1 α 可促进 BMSC 向成骨细胞分化,改善病变部位血管生成功能,从而促进成骨和血管生成。

2.4 骨质疏松

骨质疏松的特点之一是骨量减少,其病因包括制动、服用类固醇激素、衰老、自身免疫疾病等,主要病理生理过程包括骨形成与骨吸收失衡、血管生成减少等。骨质疏松极易导致老年患者骨折并产生一系列并发症,严重者可导致死亡。

2.4.1 BMSC 来源外泌体

哺乳动物细胞中存在丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路,其参与细胞存活、增殖和分化。成骨细胞基因表达和功能与 MAPK 信号转导通路激活有关。这一通路受阻可导致骨密度下降,骨小梁体积减少,长骨皮质厚度减少,表现为骨质疏松。这些异常与内皮细胞减少、骨小梁形成率降低及 I 型胶原、ALP、骨桥蛋白和骨钙素-23 表达减少有关。总之,MAPK 信号转导通路是调节成骨细胞生理活动的重要通路。

Zhao 等^[21]研究发现,经 BMSC 来源外泌体处理的成骨细胞增殖增加,细胞周期 S 期比例增加,同时 MAPK 信号转导通路相关蛋白表达也增加,说明 BMSC 来源外泌体可通过激活 MAPK 信号转导通路促进成骨细胞增殖,BMSC 来源外泌体或可用于骨质疏松的治疗。

系统性硬化病(SSC)是一种自身免疫性疾病,这类患者除了皮肤进行性纤维化、内脏功能障碍、血管病变外,还常存在脊椎及其他骨骼骨量减少。SSC 发生骨质疏松的病理生理机制尚不清楚。研究发现,在 TSK/+ 小鼠(一种伴有股骨骨密度显著降低和松质骨微结构异常的 SSC 小鼠)中下调白细胞介素-4(IL-4)/白细胞介素-4 受体 α (IL-4R α)信号转导通路可改变小鼠骨量减少情况,说明 IL-4 参与骨质疏松的病理生理过程^[22]。Chen 等^[23]研究发现,BMSC 来源外泌体能将 miR-151-5p 转移到 TSK/+

小鼠 BMSC 内,提高 BMSC 内 miR-151-5p 表达,继而抑制 IL-4/IL-4R α 信号转导通路,促进 BMSC 成骨分化,增加矿化结节形成,上调 Runx2、ALP 和骨钙素(OCN)等成骨相关蛋白表达,增加体内骨形成。

2.4.2 内皮细胞来源外泌体

内皮细胞来源外泌体较 BMSC 来源外泌体更具有骨靶向性和抗骨质疏松效应,内皮细胞来源外泌体可被骨髓来源的巨噬细胞内化吸收并改变其形态,并抑制破骨细胞分化和活性,降低骨吸收,从而抑制骨质疏松发生。内皮细胞来源外泌体通过其表面高表达的妊娠带蛋白(PZP)靶向作用于骨组织,产生抗骨质疏松效应^[24]。

3 展望

应用各种来源的外泌体治疗 OA、骨质疏松、糖皮质激素性股骨头坏死、骨缺损、骨折等骨科常见病已取得了良好的成果。外泌体来源丰富,可来源于 BMSC、脂肪间充质干细胞、SMSC、内皮细胞、胚胎干细胞、诱导多功能干细胞、富血小板血浆、树突状细胞、牛乳等。它的治疗方式包括局部注射、全身注射、口服等。其作用机制涉及各种基因表达调控及各种信号转导通路激活,从而调控软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、血管内皮细胞等生理活动。

值得注意的是,学者们能控制和提高各种细胞中目标 miRNA 表达水平,继而将大量的目标 miRNA 装载在外泌体中达到治疗疾病模型的效果,充分说明外泌体的可改造性及作为基因治疗药物载体的潜力。未来外泌体研究方向可着重于提高外泌体作用的靶向性,包括利用不同外泌体表面不同膜蛋白使其靶向作用于特定组织。外泌体基础研究尚需解决的问题包括治疗效率、具体机制、安全性、治疗剂量、来源及统一性等。

参考文献

- [1] Burger D, Vinas JL, Akbari S, et al. Human endothelial colony-forming cells protect against acute kidney injury: role of exosomes[J]. Am J Pathol, 2015, 185(8): 2309-2323.
- [2] de Jong OG, van Balkom BW, Schiffelers RM, et al. Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine[J]. Front Immunol, 2014, 5: 608.
- [3] Tao SC, Yuan T, Zhang YL, et al. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model[J]. Theranostics, 2017, 7(1): 180-195.

- [4] Ge X, Shi R, Ma X. The secreted protein WNT5A regulates condylar chondrocyte proliferation, hypertrophy and migration[J]. Arch Oral Biol, 2017, 82: 171-179.
- [5] 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.
- [6] Liu Y, Lin L, Zou R, et al. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis[J]. Cell Cycle, 2018, 17(21-22): 2411-2422.
- [7] Zhang LQ, Zhao GZ, Xu XY, et al. Integrin-beta1 regulates chondrocyte proliferation and apoptosis through the upregulation of GIT1 expression[J]. Int J Mol Med, 2015, 35(4): 1074-1080.
- [8] Zhao GZ, Zhang LQ, Liu Y, et al. Effects of platelet-derived growth factor on chondrocyte proliferation, migration and apoptosis via regulation of GIT1 expression[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 897-903.
- [9] Liu Y, Zou R, Wang Z, et al. Exosomal KLF3-AS1 from hMSCs promoted cartilage repair and chondrocyte proliferation in osteoarthritis[J]. Biochem J, 2018, 475(22): 3629-3638.
- [10] 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.
- [11] Zhu Y, Wang Y, Zhao B, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 64.
- [12] Wang Y, Yu D, Liu Z, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8: 189.
- [13] 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.
- [14] Li H, Liu D, Li C, et al. Exosomes secreted from mutant-HIF-1alpha-modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(12): 1379-1390.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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, 2018, 13: 45-55.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Chen C, Akiyama K, Wang D, et al. mTOR inhibition rescues osteopenia in mice with systemic sclerosis[J]. J Exp Med, 2015, 212(1): 73-91.
- [23] Chen C, Wang D, Moshaverinia A, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in tight-skin mice identifies miR-151-5p as a therapeutic target for systemic sclerosis[J]. Cell Res, 2017, 27(4): 559-577.
- [24] 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.

(收稿日期:2020-11-14)

(本文编辑:卢千语)