

· 综述 ·

间充质干细胞外泌体对软骨修复作用的研究进展[△]

赖圳登, 张雷, 赵建宁*

(南京大学医学院附属金陵医院骨科, 江苏南京 210002)

摘要: 关节软骨缺损是骨科常见疾病, 治疗不佳往往会进一步加重发展成为骨关节炎。既往大量研究表明, 间充质干细胞在关节软骨缺损的修复中起重要作用, 但具体机制仍不完善。近年来研究发现多种由间充质干细胞分泌的外泌体在抗炎、免疫调节和细胞修复等方面起到重要作用。本文对不同间充质干细胞来源的外泌体对关节软骨缺损的修复作用及其临床转化相关的外泌体组织工程技术进行综述, 为后续研究提供参考。

关键词: 关节软骨缺损, 间充质干细胞, 外泌体

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2022) 14-1278-04

Research progress of mesenchymal stem cell derived exosomes on repairing articular cartilage defects // LAI Zhen-deng, ZHANG Lei, ZHAO Jian-ning. Department of Orthopaedics, Affiliated Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, China

Abstract: Articular cartilage defect is a common condition met in orthopedic practice, and improper treatment of it often further aggravates the development of osteoarthritis. A large number of previous studies have shown that mesenchymal stem cells play an important role in the repair of articular cartilage defects, but the specific mechanism remains incomplete. In recent years, studies have found that a variety of exosomes secreted by mesenchymal stem cells play an important role in anti-inflammatory, immune regulation and cell repair. This article reviews the repair effects of exosomes derived from different mesenchymal stem cells on articular cartilage defects and their clinical transformation-related exosome tissue engineering techniques to provide references for further research.

Key words: articular cartilage defects, mesenchymal stem cells, exosomes

关节软骨是构成膝关节的重要组成部分, 其主要功能是传导分布运动载荷, 维持和承受接触应力从而顺利完成膝关节功能活动^[1-3]。因关节软骨中无血管、淋巴和神经分布, 其自身修复能力较弱^[4-6]。一般认为关节软骨损伤的自我修复能力与损伤大小呈负相关性^[7]。根据国际软骨修复协会(International Cartilage Repair Society, ICRS)分级法, 直径3 mm以上的损伤又称关节软骨缺损(articular cartilage defects, ACD), 大多不能完全修复, 而由纤维软骨填充; 而当ACD直径>6 mm, 不但不能修复, 还会进一步损伤周围骨壁以及关节软骨, 形成更大的缺损空洞, 进而引起损伤周围的软骨下滑和关节软骨的塌陷, 造成膝关节骨关节炎(osteoarthritis, OA)^[8]。传统的软骨病变治疗方式包括微骨折手术及骨软骨移植术, 回顾性研究表明二者均能有效缓解疼痛, 而后者有更显著治疗效果^[9]。既往研究表明, 多种间充质干

细胞(mesenchymal stem cells, MSC)参与修复ACD, 且在组织工程技术中扮演细胞种子的重要角色^[10], 但具体机制仍不明确。近年来的研究表明间充质干细胞可能通过其分泌的外泌体(exosome, Exo)发挥不同生物学效应而起修复作用^[11, 12]。外泌体具有原细胞的遗传信息及大部分功能, 主要通过旁分泌、近分泌及内分泌来实现细胞通讯^[13-17]。

1 不同来源的间充质干细胞外泌体及其修复软骨缺损的机制

1.1 人胚胎干细胞源间充质干细胞(human embryonic stem cells MSC, hESC-MSC)来源的外泌体

Zhang等^[18]研究发现, 经hESCs-MSC-Exo处理的大鼠膝关节ACD显示出较PBS处理的关节软骨有更高的外观和组织学评分。到12周时, 经外泌体治疗的缺损显示出软骨和软骨下骨的完全恢复, 其特征包括具

DOI:10.3977/j.issn.1005-8478.2022.14.06

△基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:81702170、81772318、81972044);军委后勤保障课题项目(编号:21XLS18)

作者简介: 赖圳登, 博士生, 研究方向: 骨关节疾病、关节软骨再生、运动医学, (电话)15050550956, (电子信箱)anderson4455@163.com

* **通信作者:** 赵建宁, (电子信箱)zhaojianning.0207@163.com

有良好表面规则性的透明软骨,与相邻软骨的完全结合以及细胞外基质沉积,与同龄鼠的未手术对照非常相似。相反,在对侧 PBS 处理的缺损中仅发现纤维修复组织。这项研究首次证明了人类胚胎 MSC 外泌体在软骨修复中的功效,以及 MSC 外泌体作为基于细胞的 MSC 治疗的即用型和“无细胞”治疗替代品的实用性。

Zhang 等^[19]进一步研究发现 hESC-MSC-Exo 可促进软骨再生。在这项研究中,将外泌体注射到临界尺寸的骨软骨缺损(直径 1.5 mm,深度 1 mm)大鼠模型中,发现 hESC-MSC-Exo 治疗的大鼠在 12 周后 II 型胶原(Col II)的表达上调,而 I 型胶原(Col I)和 X 型胶原(Col X)下调。此研究还表明 hESC-MSC-Exo 可以通过 CD73/ecto-50 核苷酸酶活性诱导 AKT 和 ERK 的磷酸化并激活 AKT/ERK 的信号通路。而据此前的研究报道此信号通路是软骨组织修复和再生的关键途径^[3, 20-22]。

1.2 骨髓间充质干细胞(bone marrow MSCs, BMSC)来源的外泌体

关于 BMSC-Exo 对软骨修复的影响,目前的研究主要集中在探讨在 OA 中的软骨修复机制。Vonk 等^[23]研究发现, BMSC 来源的细胞外囊泡(BMSC-EV)具有一定的抗炎功效。通过抑制炎症因子 COX-2、抑制促炎性白介素和 TNF- α 达到抑制炎症介质对软骨稳态的不利影响。

Cosenza 等^[24]还发现 BMSC-Exo 有其他功能:在 OA 样软骨细胞中,源自 BMSC 的大囊泡(MP)和 Exo 可以重新诱导软骨细胞标志物(Col II, 聚集蛋白聚糖)的表达,同时抑制分解代谢(MMP-13, ADAMTS5)和炎症性标志物(iNOS)。还发现 Exo 和 MP 保护软骨细胞免于凋亡并抑制巨噬细胞活化。在体内,将 Exo 或 MP 注入胶原酶诱导的 OA(CIOA)模型中,并通过小动物 CT 和共聚焦激光显微镜对关节进行组织形态分析。BMSC, MP 和 Exo 同样使得小鼠的 ACD 得到修复。

BMSC-Exo 还可以通过递送关键 miRNA 发挥生物学效应。Mao 等^[25]研究指出, BMSC-Exo 包裹的 miR-92a-3p 通过直接靶向 WNT5A 来调节软骨发育和体内稳态。这表明外泌体 miR-92a-3p 可以充当 Wnt 抑制剂,并具有作为疾病缓解性 OA 药物的潜力。

1.3 脂肪间充质干细胞(adipose-derived MSC, AD-MSC)来源的外泌体

与 BMSC 类似, Tofiño-Vian 等^[26]研究发现 AD-MSC 来源的外泌体(AD-MSC-Exo)可以减少软骨细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的产生,从而减少 ACD,防止发展成 OA。转录因子活化蛋白 1(activator protein-1, AP-1)和 NF- κ B 转录因子参与了 IL-1 诱导软骨细胞生成金属蛋白酶(MMP)。对 IL-1 信号转导的抑制作用可用于减少关节炎中 MMP-3、MMP-13 的软骨吸收。而 Liacini 等^[27]研究发现 AD-MSCs-Exo 的治疗降低了 c-jun,进一步降低 AP-1 和 NF- κ B 的 DNA 结合亲和力。因此,可以推测这种介由 AD-MSC-Exo 引起转录因子 c-jun 介导的软骨细胞中的 MMP 转录也可能被下调,并降低 MMP-13 的表达。

1.4 滑膜间充质干细胞(synovial-derived MSC, SMSC)来源的外泌体

1.4 滑膜间充质干细胞(synovial-derived MSC, SMSC)来源的外泌体

Tao 等^[28]研究发现,外泌体携带的 Wnt5a 和 Wnt5b 经由替代的 Wnt 信号传导途径激活了转录共激活因子相关蛋白(yes-associated protein, YAP),并增强了关节软骨细胞的增殖和迁移,并伴有细胞外基质分泌明显减少的副作用。而高度表达的 miR-140-5p 通过 RalA 可以阻止这种副作用。即包装了 miR-140-5p 的 SMSC-Exo 在体外不损害细胞外基质分泌的情况下增强了关节软骨的增殖和迁移,并且成功地在小鼠模型中预防 ACD 发展形成 OA。

此外, Zhu 等^[29]在构建慢性 OA 大鼠后,注射 SMSC-Exo 至关节腔内,发现可促进软骨细胞迁移和增殖,减轻小鼠 OA 模型的软骨损伤程度。总结这两个研究结果,可以得出结论:ACD 的发展方向是 OA, SMSC-Exo 可以通过增强关节软骨细胞增殖和迁移来延缓疾病发展进程,工程化改造后的 SMSC-Exo 可以放大其生物学效应更好地预防 OA 的形成。

1.5 髌下脂肪垫间充质干细胞(infrapatellar fat pad-derived MSC, MSCIPFP)来源的外泌体

Wu 等^[30]研究发现, MSCIPFP 衍生的外泌体可通过抑制软骨细胞凋亡并平衡合成代谢和分解代谢过程来保护软骨免受 DMM 诱导的 OA 小鼠的伤害并改善步态模式。该机制可能与 miR-100-5p 介导的 mTOR 自噬途径的抑制有关。由于在临床上通过关节镜手术从 OA 患者中获得人源髌下脂肪垫是相对方便和可行的,因此该研究的发现提供了一个新的思路,即使用生物材料包裹 MSCIPFP-Exo 治疗 OA 的潜在策略。

2 组织工程技术与临床转化

2.1 脱细胞水凝胶外泌体贴片

Liu 等^[31]开发了一种光诱导的亚胺交联水凝胶,该胶具有优异的生物相容性,最重要的是作为外泌体支架整合了软骨,以制备用于软骨再生的无细胞组织贴片。这种脱细胞水凝胶贴片可以在体外保留干细胞外泌体并积极调节软骨细胞和 BMSC。

此外,这种脱细胞水凝胶贴片可以与天然软骨基质结合,并促进细胞在软骨缺损部位的沉积,最终促进了ACD的修复。

2.2 负载小细胞外囊泡的明胶/纳米粘土凝胶递送miRNA

Hu等^[32]研究发现hUC-MSC来源的hUC-MSC-sEV中丰富的miR-23a-3p可以促进软骨再生激活PTEN/AKT信号通路。该团队设计了负载hUC-MSC-sEV的甲基丙烯酸明胶(Gelma)/纳米粘土凝胶(Gel-nano),在大鼠实验中表现出理想的机械和生物力学性能,并实现了EV的持续释放。表明hUC-MSC-sEV通过运载miR-23a-3p关键因子起到的治疗作用显著,通过组织工程技术将Gelma/nanoclay/sEV结合形成的负载小细胞外囊泡的明胶纳米粘土凝胶具有出色的软骨缺损治疗潜能。

2.3 外泌体生物墨水

Chen等^[33]研究发现通过MSC-Exo补充线粒体相关蛋白,可以恢复变性软骨中的线粒体功能障碍和氧化应激损伤。该研究首先检查了正常和OA人软骨样品中的线粒体相关蛋白,并研究了MSC外泌体是否可以增强体外线粒体的生物发生。随后,设计了用于MSC外泌体递送的生物支架,并使用台式立体光刻技术制作3D打印的软骨细胞外基质(ECM)/甲基丙烯酸明胶(GelMA)/具有径向通道的外泌体支架。最后,使用兔子模型评估3D打印支架的骨软骨缺损修复能力。结果显示MSC-Exo可以使软骨的退化能量代谢失衡得到弥补,促进软骨再生。这种“外泌体生物墨水”,在植入体内后可有效恢复软骨线粒体功能障碍,增强软骨细胞迁移,并使滑膜巨噬细胞偏向M2表型,达到促进软骨再生的效果。

3 小结

在动物和临床研究中, MSC已经被证明对软骨修复有效^[19, 33-37]。但是,受困于细胞活力及生命力难以保存导致难以应用于临床。有研究指出MSC的治疗潜能来源于其分泌的能力^[16, 17, 37]。因此,其分泌的外泌体的研究价值得以显现, MSC-Exo在OA中的生物学效应逐渐明确,主要有抗炎、抗凋亡、减少细胞自噬、增强或维持细胞生长、减少线粒体功能障碍及抗氧化应激等多方面的作用,来达到修复软骨缺损的功能。外泌体本身作为细胞之间信息通讯的载体,有很好的运输能力。因此,外泌体可作为促进软骨修复的作用靶点,靶向递送筛选的miRNA或lncRNA以及特殊药物或蛋白参与软骨修复的机制。此

外,还有科学家对比了SMSC来源的外泌体和诱导性多功能干细胞(iPS cells)来源的外泌体对软骨修复的影响^[29],发现二者均有修复作用,而诱导多功能干细胞来源的外泌体效果更好。这提示从伦理层面来说间充质干细胞相对于诱导性多功能干细胞有更大的临床应用优势,而从生物学预期效果来说后者可能可以发挥更好的功能。值得注意的是,有研究表明外泌体在体外会随着温度的变化发生粒径改变,而粒径在一定范围内才可以正常发挥生物学功能^[38]。因此,体外保存外泌体一般有严格的温度要求,短期保存需要在4℃,而长期保存需要在-80℃。目前,外泌体相关组织工程技术有逐渐从“液相缓释系统”向“固相缓释系统”转换的趋势,例如Su等^[39]成功通过静电纺丝技术制备了能够缓慢释放外泌体并通过增强免疫应答来修复皮肤组织的聚己内酯支架。在外泌体修复ACD中的角色逐渐清晰的前提下,虽然外泌体固相缓释系统应用前景广泛,但是仍然要解决一系列问题才能最终应用于临床。迫切需要解决的问题包括验证外泌体在体外和体内修复ACD的有效浓度、提高外泌体产出、体外保存外泌体制剂的条件等。克服一系列困难后,将外泌体纯化、灭菌、改造并制备成注射剂或是利用组织工程技术制成外泌体缓释系统用于手术治疗将是未来研究热点。

参考文献

- [1] Yoon BS, Lyons KM. Multiple functions of BMPs in chondrogenesis [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 93 (1): 93-103.
- [2] Bobick BE, Kulyk WM. Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2008, 84 (2): 131-154.
- [3] Beier F, Loeser RF. Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 110 (3): 573-580.
- [4] Shi D, Xu X, Ye Y, et al. Photo-cross-linked scaffold with kartogenin-encapsulated nanoparticles for cartilage regeneration [J]. *ACS Nano*, 2016, 10 (1): 1292-1299.
- [5] Hardingham T. Proteoglycans: their structure, interactions and molecular organization in cartilage [J]. *Biochem Soc Trans*, 1981, 9 (6): 489-497.
- [6] Zhang L, Zhang P, Sun X, et al. Long non-coding RNA DANCR regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis via miR-216a-5p-JAK2-STAT3 axis [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38 (6): BSR20181228.
- [7] Flanigan DC, Carey JL, Brophy RH, et al. Interrater and intrarater reliability of arthroscopic measurements of articular cartilage defects in the knee [J]. *JBJS*, 2017, 99 (12): 979-988.
- [8] Sakata R, Iwakura T, Reddi AH. Regeneration of articular cartilage surface: morphogens, cells, and extracellular matrix scaffolds

- [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015, 21 (5): 461-473.
- [9] 马宏垒, 付炳金, 邓明明, 等. 微骨折与骨软骨移植治疗距骨骨软骨病变比较 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2021, 29 (24): 2224-2229.
- [10] 徐兴全, 史冬泉, 蒋青. 间充质干细胞的研究进展及其在软骨组织工程中的应用 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2013, 21 (1): 50-53.
- [11] Han C, Sun X, Liu L, et al. Exosomes and their therapeutic potentials of stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 7653489.
- [12] Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40 (1): 82-88.
- [13] Théry C, Amigorena S, Raposo G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids [J]. *CurrProtoc Cell Biol*, 2006, 30 (1): 1-29.
- [14] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. *Regen Med*, 2011, 6 (4): 481-492.
- [15] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. *Regen Med*, 2011, 6 (4): 481-492.
- [16] Toh WS, Foldager CB, Pei M, et al. Advances in mesenchymal stem cell-based strategies for cartilage repair and regeneration [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2014, 10 (5): 686-696.
- [17] da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20 (5-6): 419-427.
- [18] Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24 (12): 2135-2140.
- [19] 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 (1): 16-27.
- [20] Teixeira CC, Agoston H, Beier F. Nitric oxide, C-type natriuretic peptide and cGMP as regulators of endochondral ossification [J]. *Dev Biol*, 2008, 319 (2): 171-178.
- [21] Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ. Wnt signaling and osteoarthritis [J]. *Bone*, 2009, 44 (4): 522-527.
- [22] Yin W, Park JI, Loeser RF. Oxidative stress inhibits insulin-like growth factor-I induction of chondrocyte proteoglycan synthesis through differential regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt and MEK-ERK MAPK signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (46): 31972-31981.
- [23] Vonk LA, van Dooremalen SFJ, Liv N, et al. Mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles promote human cartilage regeneration in vitro [J]. *Theranostics*, 2018, 8 (4): 906-920.
- [24] 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): 1-12.
- [25] 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): 1-13.
- [26] Tofiño-Vian M, Guillén MI, Del Caz MDP, et al. Microvesicles from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new protective strategy in osteoarthritic chondrocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47 (1): 11-25.
- [27] Liacini A, Sylvester J, Li WQ, et al. Inhibition of interleukin-1-stimulated MAP kinases, activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-κB) transcription factors down-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes [J]. *Matrix Biol*, 2002, 21 (3): 251-262.
- [28] 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.
- [29] Zhu Y, Wang YC, Zhao BZ, 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.
- [30] 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 (1): 87-100.
- [31] 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.
- [32] Hu H, Dong L, Bu Z, et al. miR-23a-3p-abundant small extracellular vesicles released from Gelma/nanoclay hydrogel for cartilage regeneration [J]. *J Extracell Vesicles*, 2020, 9 (1): 1778883.
- [33] 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.
- [34] Tan SSH, Tjio CE, Wong JRY, et al. Mesenchymal stem cell exosomes for cartilage regeneration: a systematic review of preclinical in vivo studies [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2021, 27 (1): 1-13.
- [35] Kim YG, Choi J, Kim K. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for effective cartilage tissue repair and treatment of osteoarthritis [J]. *Biotechnol J*, 2020, 15 (12): e2000082.
- [36] Zhou QF, Cai YZ, Lin XJ. The dual character of exosomes in osteoarthritis: antagonists and therapeutic agents [J]. *Acta Biomater*, 2020, 105 (1): 15-25.
- [37] Zhang S, Teo KYW, Chuah SJ, et al. MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis [J]. *Biomaterials*, 2019, 200 (1): 35-47.
- [38] Maroto R, Zhao Y, Jamaluddin M, et al. Effects of storage temperature on airway exosome integrity for diagnostic and functional analyses [J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6 (1): 1359478.

(收稿:2021-07-01 修回:2021-11-15)

(本文编辑: 郭全义)

(本文编辑: 宁 桦)