

· 综述 ·

外泌体非编码 RNA 调控骨折愈合机理的研究进展[△]

苏友祥^{1,3}, 李志超¹, 管华鹏², 李念虎^{2*}

(1. 山东中医药大学, 山东济南 250014; 2. 山东中医药大学附属医院, 山东济南 250014;
3. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

摘要: 外泌体是细胞旁分泌的重要组成部分, 它们参与细胞因子、mRNAs、miRNAs 和蛋白质等生物物质的转运, 并通过遗传物质的转移在细胞间通讯中发挥重要作用。非编码 RNA 主要包括微小 RNA、长链非编码 RNA 和环状 RNA, 可以被外泌体选择性的摄取并递送到受体细胞, 从而调节受体细胞的生理活动和功能。骨折是人类常见的器官创伤性损伤, 其愈合过程由早期炎症反应驱动, 伴随着各种生物活动, 利用内源性再生潜力恢复原始骨结构。近年来, 越来越多的研究开始关注外泌体 ncRNA 在骨折愈合过程中的调控机理, 本文通过回顾相关研究成果, 探索外泌体 ncRNA 在骨折愈合中的详细作用机制。

关键词: 骨折愈合, 外泌体, 非编码 RNAs, 骨折不愈合, 调控机制

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2023) 24-2260-05

Research progress on exosome non-coding RNA in regulation mechanism of fracture healing // SU You-xiang^{1,3}, LI Zhi-chao¹, GUAN Hua-peng², LI Nian-hu². 1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 2. Affiliated Hospital, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 3. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Abstract: Exosome, as an important component of paracellular secretion, are involved in the transport of biochemical substances such as cytokines, mRNAs, miRNAs, and protein, and play an important role in intercellular communication through the transfer of genetic material. Non-coding RNA (ncRNA), mainly including microRNA, long-chain non-coding RNA and cyclic RNA, which can be selectively ingested and delivered by the exosome to the receptor cells, thereby regulating the physiological activities and functions of the receptor cells. Fracture is a common traumatic consequence in humans, and its fracture healing process is driven by the early inflammatory response, accompanied by a variety of biological activities, using the endogenous regeneration potential to restore the original bone structure. In recent years, more and more attention has been paid to the regulatory mechanism of exosome ncRNA in fracture healing. By reviewing the research results in this field, we explored the detailed mechanism of exosome ncRNA in fracture healing.

Keywords: fracture healing, exosome, non-coding RNA, fracture nonunion, regulation mechanism

骨折是由外力或累积应变引起的骨结构完全或部分断裂^[1]。骨折愈合由数千个基因进行调控, 并受到细胞因子、生长因子等分子的显著影响^[2]。骨髓间充质干细胞成骨分化^[3], 成骨细胞的分化、增殖和迁移^[4], 破骨细胞的骨吸收及血管生成与骨折的愈合有着密切关系^[5-7]。据统计, 有 5%~10% 的患者会出现愈合困难^[8, 9]。因此, 促进骨折的快速修复和愈合在临床中具有重要意义^[10, 11]。外泌体是直径为 40~100 nm 的囊泡状体^[12, 13], 在组织稳态、细胞间通讯及组

织和器官的再生修复过程中发挥重要作用^[14-17]。外泌体中含有的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 参与骨折的愈合过程, 并对愈合过程中骨髓间充质干细胞成骨分化, 成骨细胞的分化、增殖和迁移, 破骨细胞的骨吸收及血管生成等方面起调控作用。本文旨在综述近年来外泌体 ncRNA 在骨折愈合中的调控机理及外泌体 ncRNA 在骨折愈合中的潜在应用。

1 外泌体 ncRNA 调控骨髓间充质干细胞成骨分化

DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2023.24.10

[△]基金项目: 山东省自然科学基金项目(编号: ZR2019MH044); 徐展望山东省名老中医药专家传承工作室建设项目(编号: 山东省卫生健康委员会鲁卫函[2019]92号)

作者简介: 苏友祥, 硕士研究生, 研究方向: 脊柱脊髓损伤、骨质疏松、脊柱退行性疾病相关研究, (电话)13708939703, (电子信箱)540115112@qq.com

* 通信作者: 李念虎, (电话)0531-68617089, (电子信箱)tigerlee073@126.com

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是骨修复中的最佳祖细胞来源, 其分化能力较强, 可分化为成骨细胞、造血细胞、神经细胞等; 近年来, 许多研究者通过局部注射或血管介入 BMSCs 的方法对骨折进行治疗并取得良好的实验结果^[18]。郑光磊等^[18]在兔的骨折不愈合模型中采用上述办法, 并通过监测外周血中碱性磷酸酶、骨钙素水平的变化, 骨折端影像学表现及病理组织学改变来评价效果, 结果显示 BMSCs 能够提高骨骼代谢水平, 加快骨痂生成, 促进 BMSCs 的成骨分化, 进而促进骨折愈合。

外泌体 ncRNA 也可以有效调控 BMSCs 的成骨分化, 从而促进骨折愈合。Huang 等^[19]在 BMSCs 和小鼠的成骨细胞中通过模拟物/抑制剂调节 miR-19b 的表达, 研究这些变化对成骨因子、骨细胞矿化和骨折愈合的影响。他们通过功能得失分析, 鉴定出了 miR-19b 与含 WW 域 E3 泛素蛋白连接酶 1/SMAD 特异 E3 泛素蛋白连接酶 2 (WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1/SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2, WWP1/SMURF2) 的靶向关系, 并发现 miR-19b 通过靶向 WWP1 和 SMURF2 促进人 BMSCs 向成骨细胞分化。WWP1 或 SMURF2 的过表达降解了 BMSCs 中的靶蛋白 KRUPPEL 样因子 5 (Kruppel like factor 5, KLF5), 抑制骨折愈合; KLF5 基因敲除通过调节 Wnt/ β -Catenin 信号通路延缓骨折愈合。此外, miR-19b 靶向 WWP1 或 SMURF2, 通过 KLF5/ β -Catenin 信号通路可促进骨折愈合。综上, BMSCs 来源的外泌体 miR-19b 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制 WWP1 或 SMURF2 的表达, 上调 KLF5 的表达, 从而促进骨折愈合。Xiong 等^[20]发现从 M2 巨噬细胞分离的外泌体 (M2 macrophage-derived exosome, M2D-Exos) 能够通过干扰 BMSCs 的体外和体内分化而加速骨折愈合, 其主要机制为 M2D-Exos 携带的 miR-5106 抑制盐诱导蛋白 2 和 3 (salt inducible kinase 2 and 3, SIK2 和 SIK3) 的表达促进 BMSCs 的成骨分化。

人脂肪间充质干细胞 (human adipose mesenchymal stem cells, hASCs) 由于其快速增殖和在人体内广泛分布的优势, 是产生大量外泌体的理想间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 类型。Chen 等^[21]通过对 hASC 进行遗传修饰, 将 miR-375 加载到 hASC 衍生的外泌体中, miR-375 可以通过过度表达在 hASC 衍生的外泌体中富集, 其从亲代细胞中释放出来后转移到受体细胞中发挥相关作用。胰岛素样

生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 信号通路是介导骨骼生长的重要途径, 受 IGF 结合蛋白 1-6 (IGF binding protein 1-6, IGFBP1-6) 的调节, IGFBP1-6 可以局部激活或抑制 IGF 的作用。Chen 等^[21]证明 IGFBP3 是成骨分化的负调节因子, 外泌体 miR-375 可在递送至 hBMSCs 后抑制 IGFBP3 的表达以发挥成骨作用。调控机制见图 1。

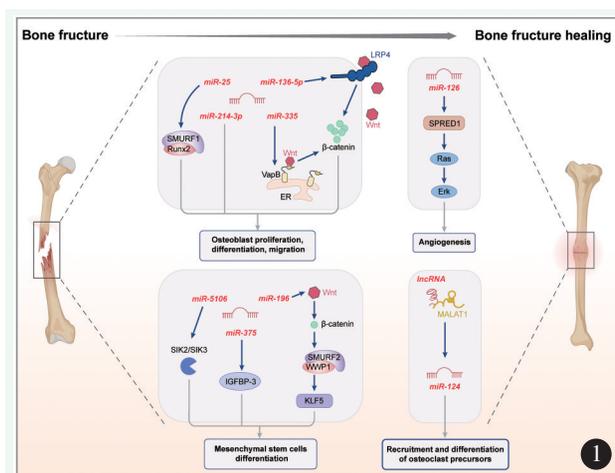


图 1 外泌体 ncRNA 在骨折愈合中的调控机制。

2 外泌体 ncRNA 调控成骨细胞分化、增殖和迁移

成骨细胞是主要的骨形成细胞, 是骨重塑和愈合不可缺少的细胞, 成骨细胞活性的适当增强对于骨愈合起着良好的促进作用^[22]。WNT/ β -catenin 信号通路在骨发育的各种生理过程及在骨损伤后的愈合和再生过程中有重要作用^[23]。脂蛋白相关蛋白 4 (lipoprotein receptor related protein 4, LRP4) 可通过 Wnt 信号通路在骨的生理学中发挥作用^[24]。Yu 等^[25]通过体内外实验发现, 携带 miR-136-5p 的 BMSC 衍生的外泌体 (BMSC-exosome, BMSC-Exo) 能够抑制 LRP4 并激活 Wnt/ β -catenin 通路, 增强成骨细胞的增殖和分化, 从而促进骨折愈合。Hu 等^[26]发现 BMSC-Exo 分泌的 miR-335 进入成骨细胞样细胞上调 miR-335 的表达并抑制囊泡关联膜蛋白关联蛋白 B (vesicle associated membrane protein associated protein B, VapB) 的表达, VapB 的低表达促进 Wnt/ β -catenin 通路的激活, 促进成骨细胞的分化、增殖, 从而促进骨折愈合。

SMAD 泛素化调节因子-1 (SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1, SMURF1) 是 E3 泛素连接酶, 位于其下游泛素化靶点 Smad1/5 和 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2,

Runx2)^[27], 是骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein type 2, BMP2)^[28] 诱导成骨细胞分化的关键转录因子^[29], Runx 缺失会导致成骨细胞的缺失。Jiang 等^[30] 通过免疫沉淀和蛋白稳定性分析, 分别检测 Runx2 的泛素化和 SMURF1 对 Runx2 泛素化的影响, 验证了 SMURF1 通过促进泛素化来降解 Runx2; 同时, 他们还通过免疫荧光验证了 miR-25 在外泌体中的转移, 采用双荧光素酶报告基因法预测并验证 miR-25 与 SMURF1 的靶向关系, 使用 X 射线成像评估 BMSC-Exo 中 miR-25 对小鼠骨折愈合的影响, 发现成骨细胞在接受 BMSC-Exo 转移的 miR-25 后, 降低了 SMURF1 的表达, 增加了 Runx2, 导致其分化加速, 增殖率增加, 迁移增加; 证实 BMSC-Exo 分泌的 miR-25 可通过 SMURF1/Runx2 轴加速成骨细胞的成骨分化、增殖和迁移, 促进小鼠骨折愈合。

外泌体 ncRNA 不仅可以正向调控成骨细胞分化、增殖和迁移以促进骨折愈合, 相反地, 破骨细胞来源的外泌体 ncRNA 能负向抑制成骨细胞活性, 减少骨形成。据报道, miR-214-3p 可以通过靶向 Pten/PI3k/Akt 通路促进破骨细胞分化; Li 等^[31] 通过体外实验发现破骨细胞中 miR-214-3p 的升高会抑制成骨细胞的活性, 与 miR-214-3p 过表达的破骨细胞共培养的成骨细胞中成骨细胞活性相关标记基因的 mRNA 水平显著下调; 他们还通过自主研发的破骨细胞靶向递送系统, 提供的使用 antagomiR-214-3p 评估破骨细胞靶向 miR-214-3p 抑制的治疗效果, 发现 antagomiR-214-3p 治疗显著促进了去卵巢老龄小鼠的骨形成, 而这种有益作用在破骨细胞靶向递送机制中断后被阻断, 由此证实抑制破骨细胞 miR-214-3p 可促进去卵巢老龄小鼠的骨形成, 增加骨量。

3 外泌体 ncRNA 调控破骨细胞介导的骨吸收

骨形成的过程是骨骼中成骨细胞和破骨细胞活动相平衡的过程。破骨细胞是由来自单核细胞/巨噬细胞的前体细胞融合而成的骨吸收细胞, 它与成骨细胞、造血细胞、免疫细胞, 甚至是肿瘤细胞都有着密切的联系, 共同调控着骨微环境的稳态^[32, 33]。破骨细胞在骨折修复的炎症期和骨痂重塑期都通过适当的骨吸收对骨折的愈合修复发挥着作用。在炎症阶段, 破骨细胞前体细胞首先从血液循环中被招募, 并通过核因子 κ B 受体活化因子配体 (NF- κ B ligand, RANKL) 的刺激及分化因子的诱导分化、增殖融

合, 形成破骨细胞, 发挥骨吸收的作用。Cui 等^[34] 研究发现, miR-124 的过表达可以逆转由内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 衍生的外泌体诱导的骨髓巨噬细胞 (bone marrow macrophages, BMMs) 的迁移和破骨分化, LncRNA-MALAT1 可直接与 miR-124 结合, 负向控制 miR-124 活性, EPC 衍生的外泌体可以通过 LncRNA-MALAT1 增强破骨细胞前体的招募和分化, 促进骨折的愈合修复。

4 外泌体 ncRNA 调控血管生成

众多研究表明, 良好的血运是骨折愈合的前提条件, 血管的生成保证了骨折愈合所需要的营养供给和成骨前体细胞、成软骨细胞及破骨细胞的补充^[5]; 骨形成与血管形成在空间和时间上的紧密联系被称为“血管生成-成骨耦合”^[35]。血管生成涉及包括内皮细胞的增殖和迁移^[36]、毛细血管的形成和 MSCs 的稳定等过程, 还由一系列多种因子控制^[37], 这些因子的平衡决定了血管的形成和稳定性^[38]。外泌体 ncRNA 也可以调控骨折愈合时的血管生成。Liu 等^[39] 采用体内骨折模型和通过细胞增殖实验、细胞迁移实验等体外实验证实, 低氧条件下的外泌体 (hypoxic-exosome, Hypo-Exo) 给药与常氧下的 Exos 相比更能促进血管生成、增殖和迁移。其主要机制为 Hypo-Exo 携带的 miR-126 通过抑制萌芽相关的含 EVH1 结构域蛋白 1 (sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1, SPRED1) 的表达, 激活 Ras/Erk 通路并转移至内皮细胞, 产生显著的促血管生成作用。

5 小结与展望

随着现在基因组测序技术的进步, 越来越多的研究表明, 外泌体 ncRNA 能够调控骨折愈合过程中骨髓间充质干细胞成骨分化, 成骨细胞的分化、增殖和迁移, 破骨细胞的骨吸收及血管生成等; 外泌体 ncRNA 通过相关通路调控靶基因的表达和 mRNA 的稳定, 影响着骨代谢过程中关键基因表达, 在骨折愈合过程中发挥着举足轻重的作用; 随着不同来源的外泌体携带的 ncRNA 不断被发现和研究^[40], 已经有一部分外泌体 ncRNA 作为治疗靶点在临床实验中用于骨折愈合的治疗并取得了良好的疗效, 但由于技术的局限性和生物安全性, 外泌体 ncRNA 的应用和研究也不可避免地存在一些不足, 主要有: (1) 在外泌体 ncRNA 调控骨折愈合的研究主要集中在 miRNA 上,

而对于 lncRNA、circRNA 的研究少之又少，尤其是对于 circRNA 的研究需要新的突破，这也是未来研究的热点；(2) 目前的研究缺乏骨痂重塑期外泌体 ncRNA 对于破骨细胞调控的研究；(3) 对于外泌体 ncRNA 来源的研究主要局限在 BMSCs，未来是否会有更多来源的外泌体 ncRNA 调控骨折愈合值得深入探讨；(4) 促进骨折愈合本质上是一种激活细胞和组织生长的过程，应对肿瘤产生的风险是未来面临的一个难题。总之，外泌体 ncRNA 的研究为骨折愈合的研究提供了新思路、新观点，但将其转化为临床应用还存在着诸多挑战。相信在不久的将来，随着深入地研究和难题的解决，不同来源的外泌体 ncRNA 将在骨折愈合机制的研究中取得更大的进步，并对防治骨折愈合有更重大的意义。

参考文献

- [1] Zhou J, Liu HX, Li SH, et al. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes on fracture healing in rats through the Wnt signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (11): 4954-4960.
- [2] 杨奇昌, 钱宇, 韩维奇. Hippo 信号通路调控骨折愈合的研究进展 [J]. *中华骨科杂志*, 2021, 41 (10): 660-667.
- [3] 李强强, 谢亚东, 杨国清, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化的研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28 (3): 434-438.
- [4] 段嘉豪, 谭旭仪, 卢敏, 等. 三花接骨散对成骨细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27 (20): 3230-3235.
- [5] 廉檬檬, 聂云飞, 李放, 等. 微小 RNA-126 对大鼠骨痂组织血管生成的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2022, 39 (4): 697-700.
- [6] 杨楠, 陈跃平, 章晓云. 分子信号通路及细胞层面的骨折愈合机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23 (20): 3188-3194.
- [7] 滕飞, 路凡, 何良志, 等. 低强度脉冲超声对骨细胞及骨折愈合作用 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28 (18): 1673-1676.
- [8] 党胜利, 王航辉, 崔玉婷. 骨折愈合过程成骨细胞特异性表达补体受体 C5AR1 的表达 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2019, 27 (14): 1297-1301.
- [9] 袁毅, 傅裕, 许东, 等. 柚皮苷联合脉冲电磁场对大鼠股骨骨折愈合的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26 (6): 543-547.
- [10] Zhang N, Zhang RF, Zhang AN, et al. Mir-204 promotes fracture healing via enhancing cell viability of osteoblasts [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (1 Suppl): 29-35.
- [11] Antonova E, Le TK, Burge R, et al. Tibia shaft fractures: Costly burden of nonunions [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2013, 14: 42.
- [12] 赵越, 王超, 陈和忠. 外泌体生成和分泌机制的研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2017, 42 (12): 1106-1109.
- [13] Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, et al. Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645 (1): 63-70.
- [14] Kalluri R, Le Bleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367 (6478): eaau6977.
- [15] Isaac R, Reis FCG, Ying W, et al. Exosomes as mediators of intercellular crosstalk in metabolism [J]. *Cell Metab*, 2021, 33 (9): 1744-1762.
- [16] Hade MD, Suire CN, Suo Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Applications in regenerative medicine [J]. *Cells*, 2021, 10 (8): 1959.
- [17] Beit-Yannai E, Tabak S, Stamer WD. Physical exosome: Exosome interactions [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22 (3): 2001-2006.
- [18] 郑光磊, 沈晓强, 谢亚明, 等. 骨髓间充质干细胞治疗骨折不愈合的实验研究 [J]. *医学研究杂志*, 2019, 48 (10): 80-85, 90.
- [19] Huang Y, Xu Y, Feng S, et al. Mir-19b enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes fracture healing through the WWP1/SMURF2-mediated KLF5/ β -catenin signaling pathway [J]. *Exp Mol Med*, 2021, 53 (5): 973-985.
- [20] Xiong Y, Chen L, Yan C, et al. M2 macrophage-derived exosomal MIRNA-5106 induces bone mesenchymal stem cells towards osteoblastic fate by targeting salt-inducible kinase 2 and 3 [J]. *J Nanobiotech*, 2020, 18 (1): 66.
- [21] 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.
- [22] Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: Mechanisms and interventions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11 (1): 45-54.
- [23] 徐玉德, 徐玉娥, 周明旺, 等. 手风琴技术治疗骨不愈合的分子机制研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2020, 28 (14): 1288-1292.
- [24] Kumar J, Swanberg M, McGuigan F, et al. LRP4 association to bone properties and fracture and interaction with genes in the WNT- and BMP signaling pathways [J]. *Bone*, 2011, 49 (3): 343-348.
- [25] Yu H, Zhang J, Liu X, et al. MicroRNA-136-5p from bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates fracture healing by targeting LRP4 to activate the WNT/ β -catenin pathway [J]. *Bone Joint Res*, 2021, 10 (12): 744-758.
- [26] Hu H, Wang D, Li L, et al. Role of microRNA-335 carried by bone marrow mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles in bone fracture recovery [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (2): 156.
- [27] 吴钰坤, 韩杰, 温帅波. 骨折愈合过程中 runx2 基因的作用机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25 (14): 2274-1179.
- [28] 刘羽, 王国旗, 李鹏. 环状 RNA_0016624 调控骨质疏松性骨折愈合的分子机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2022, 39 (6): 1132-1135.
- [29] Shimazu J, Wei J, Karsenty G. SMURF1 inhibits osteoblast differentiation, bone formation, and glucose homeostasis through serine 148 [J]. *Cell Rep*, 2016, 15 (1): 27-35.
- [30] Jiang Y, Zhang J, Li Z, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal MIR-25 regulates the ubiquitination and degradation of RUNX2 by SMURF1 to promote fracture healing in mice [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2020, 7: 577578. (下转 2269 页)