

干细胞外泌体在骨科创伤中的修复机制及研究进展

徐再鸿¹, 赵振群^{2*}

(1. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010110;

2. 内蒙古医科大学第二附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010090)

【摘要】创伤是骨科常见的受伤机制, 伤口、软组织及骨组织愈合慢、延迟愈合甚至不愈合给患者及家属带来巨大的心理和经济负担, 也使临床医生的工作增加了难度。创面和软组织愈合不良, 不仅对患者的外观造成影响, 而且对患者的生理功能和生活质量造成直接影响, 创伤后骨组织愈合延迟和不愈合的风险也会大大增加, 甚至导致坏死风险的提高。故而在既往治疗骨科创伤的基础之上, 早期干预、促进修复会取得更好的治疗效果。外泌体(exosomes, Exos)是间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)分泌的多泡体, 是一种可作为细胞间媒介参与细胞通信、细胞迁移、细胞免疫和肿瘤细胞生长等过程的载体, 含有多种调控细胞代谢因子。近年来, 随着干细胞外泌体研究的逐步深入, 人们发现MSC-exos可以作为一种非细胞手段参与组织修复, 而MSC-exos强大的非细胞治疗潜能为创伤修复提供了新的研究方向。

【关键词】创伤; 外泌体; 成骨; 修复

中图分类号: R64

文献标识码: A

文章编号: 1673-9388(2023)02-0158-05

DOI: 10.19891/j.issn1673-9388.(2023)02-0158-05

REPAIR MECHANISM AND RESEARCH PROGRESS OF STEM CELL EXOSOMES IN ORTHOPAEDIC TRAUMA

XU Zaihong¹, ZHAO Zhenqun^{2*}

(1 Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia, Hohhot 010110, China;

2 The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia, Hohhot 010090, China)

【Abstract】Trauma is a common injury mechanism in orthopedics. The slow, delayed and even non-healing of wounds, soft tissue and bone tissue bring huge psychological and economic burden to patients and their families, and also add difficulties to the work of clinicians. Poor wound and soft tissue healing will not only affect the appearance of the patient, but also directly affect the function and quality of life of the patient, and the risk of delayed and non-union of bone tissue after trauma will also be greatly increased, and even the probability of necrosis will also be greatly increased. Therefore, on the basis of previous treatment of orthopedic trauma, early intervention and promotion of repair will achieve better therapeutic effect. Exosomes (exos) are the polyvesicles secreted by mesenchymal stem cell (MSC). They are carriers that can participate in the processes of cell communication, cell migration, cell immunity and tumor cell growth as intercellular mediators, and contain a variety of regulatory factors for cell metabolism. In recent years, with the gradual deepening of the research on stem cell exosomes, people have found that MSC-EXOS can participate in tissue repair as a non-cellular means, and the strong non-cellular therapeutic potential of MSC-EXOS provides a new research direction for the treatment of wound repair. This article reviews the mechanism of MSC-exos in wound repair.

【Keywords】Trauma; Exosomes; Osteogenesis; Repair

收稿日期: 2022-10-15; 修回日期: 2023-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(8216090109)

第一作者: 徐再鸿(1995—), 男, 2020级在读硕士研究生。E-mail: 875083365@qq.com

*通信作者: 赵振群, 男, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师。研究方向: 激素性股骨头坏死的发病机制及治疗方法。

E-mail: 875083365@qq.com

1 概述

外泌体(exosomes, Exos)是细胞外囊泡的主要亚类之一,几乎所有类型的细胞都可以分泌外泌体。外泌体是由晚期内泌体产生的,后者又由多泡体向内萌芽形成,其富含胆固醇和鞘磷脂,具有脂质双分子层结构,广泛存在于各种体液如尿液、唾液、血液之中^[1]。外泌体的直径小于150 nm,可以携带蛋白质、mRNA、microRNA等,可以通过胞吐作用释放到细胞外空间,在细胞间通讯中发挥着重要的作用^[2]。外泌体的分泌途径自发现以来已被广泛研究,来自不同细胞的外泌体与其亲本细胞具有相似的作用。外泌体参与许多生理和病理过程,包括组织损伤和修复反应协调不同细胞类型之间的通信作用等^[3]。现有研究证实MSC-exos具有其来源细胞的修复功能,并避免了诸如血管栓塞、免疫排斥等不良反应。并且有研究发现MSC-exos可以修复肌肉损伤、促进软骨修复和骨再生^[4]。

综上所述,不同来源的干细胞和祖细胞的外泌体可以激活参与骨再生过程的不同信号通路,例如Bmp-2/Smad/Runx2、P38 MAPK、Ras/ERK、HIF-1 α /VEGF、AKT/mTOR、JAK-STAT和 β -连环蛋白。激活机制有助于增强骨髓间充质干细胞、内皮细胞和破骨细胞的细胞特性,促进成骨细胞增殖和分化,增强血管生成,并调节破骨细胞活性。根据之前的研究,外泌体的提取与纯化可以归纳为:超速离心法、蔗糖密度梯度离心法、超滤法、聚乙二醇沉淀法、色谱法、免疫磁珠法及试剂盒提取法等^[5]。人们用以上方法提取获得外泌体后研究其特性,通过离体及在体多个实验寻找MSC-exos促进创伤修复的机制。

2 外泌体在骨科创伤中的修复机制

2.1 促伤口愈合

伤口愈合是一个复杂的生理过程,依赖于各种细胞类型及其衍生分子的合作。伤口修复过程分为四个主要阶段,包括止血期、炎症期、增殖期和重塑期(或成熟期)^[6]。良好的血供是促进愈合的重要因素之一,而创伤恰恰导致微血管病变、减少促血管生成因子产生。MSC-exos可以通过促进血管形成,加速皮肤细胞增殖和迁移,抑制过度炎症反应和瘢痕形成,进而促进创面愈合。Yu等^[7]的实验研究表明:用阿托伐他汀预处理的人骨髓间充质干细胞外泌体可以通过蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)/内

皮型一氧化氮合酶(AKT)信号通路即PKB/AKT通路上调miR-211-3p的表达,增强内皮细胞的血管生成,从而加速创面组织再生。另有研究表明,经去铁胺预处理的骨髓间充质干细胞衍生的外泌体在伤口修复中表现出更明显的促血管生成潜力^[8]。这些外泌体通过miR-126介导的磷酸酶和张力蛋白同系物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)的下调激活PI3K/AKT信号通路,从而在体外促进静脉内皮细胞的增殖^[9]。此研究进一步证明了MSC-exos的促血管作用,可以为治疗提供新的角度和方向,至于其长期治疗效果有待进一步验证。

皮肤伤口愈合不仅与血供有关,也与细胞的增殖填充息息相关。人类骨髓间充质干细胞在很大程度上可以增殖和分化为皮肤细胞,以修复受损或死亡的细胞,但也通过自分泌和旁分泌途径发挥作用^[10]。皮肤有伤口时,成纤维细胞和角质细胞可以分泌胶原蛋白来填补伤口。伤口愈合慢往往是因为创伤导致成纤维细胞及角质细胞增殖减少,所以研究MSC-exos与细胞增殖的关系至关重要。Ma等^[10]研究发现,脂肪干细胞来源的外泌体(adipose stem cell-derived exosomes, ADSC-exo)可以促进人永生角质形成细胞(HaCaT细胞)增殖和迁移,抑制过氧化氢引起的细胞凋亡,表明ADSC-exo在伤口愈合中具有积极作用,ADSC-exo通过激活Wnt/ β 联蛋白信号通路促进皮肤伤口愈合。另外也有明确证据表明,用炎症细胞因子(如IL-1 β 、IFN- γ 和TNF- α)预处理骨髓间充质干细胞可能引起伤口愈合倾向^[11]。在炎症过程中有巨噬细胞与单核细胞的参与,其中巨噬细胞起到了重要作用。炎症的发生主要取决于中性粒细胞和巨噬细胞的激活,中性粒细胞和巨噬细胞通过直接功能或释放多种可溶性介质来调节出血并抑制感染^[12]。巨噬细胞可以调节人体免疫系统和内环境,还可以清理异物,最终达到缓解炎症和组织修复的效果。根据外泌体的媒介作用,如果可以将MSC-exos与巨噬细胞的功能建立起联系,对无细胞治疗炎症是一个好的研究角度。这说明MSC-exos可以通过促进细胞增生的方式对伤口进行修复。当伤口愈合不佳演变为慢性创面时考虑利用MSC-exos治疗,也可以达到理想的效果。基于此,未来是否可以将外泌体应用于皮肤再生需要更进一步的研究与验证。

2.2 促进骨修复

骨愈合是一个复杂的过程,如何有效地促进骨

再生是人们多年来研究的一个课题,促进骨修复是利用外泌体治疗骨病的另一个新靶点。之前的研究表明间充质细胞外泌体具有促血管生成的潜力,可以进一步促进骨再生。而促血管生成只是外泌体的一方面作用,干细胞外泌体还可以通过以下三种机制促进成骨:减少细胞凋亡;招募间充质干细胞,促进其增殖;创造骨诱导环境,促进干细胞的成骨分化^[13]。在骨骼系统中,炎症因子会使骨溶解并且抑制骨形成,最终导致炎症性骨病的发生。而外泌体在炎症性骨病的治疗中有三个主要用途:调节免疫反应、抑制骨吸收和启动骨修复,或作为治疗剂的载体。炎症性骨病的进展与结局取决于巨噬细胞的两种表型分化。活化巨噬细胞可分为M1表型(典型活化巨噬细胞表型)和M2表型(替代活化巨噬细胞表型)^[14]。巨噬细胞的炎症表型有助于炎症阶段促进血管生成,最终促进肉芽组织、皮肤细胞和细胞外基质的构建^[15]。有研究发现核因子NF- κ B信号通路的外泌体调节影响巨噬细胞极化并调节炎症反应,炎症反应进一步导致细胞因子和外泌体分泌的改变,并且外泌体可以通过刺激NF- κ B信号通路改变巨噬细胞的极化表型^[4]。由此可见NF- κ B信号通路与巨噬细胞分化息息相关,二者通过外泌体相互作用,关于这一点也有相关研究。研究称巨噬细胞来源的外泌体具有高水平的miR-223^[16]。miR-223通过抑制巨噬细胞分化过程中的非经典NF- κ B信号通路来抑制炎症反应^[17,18]。类似的,巨噬细胞可以分泌几种miRNA抑制炎症反应,MSC-exos则通过诱导巨噬细胞M1表型转变为M2表型进而抑制炎症反应^[4]。值得注意的是,巨噬细胞来源的外泌体在炎症发生后,可以同时携带消炎和消炎的物质,如果能够加强消炎物质的功能,抑制消炎物质的作用,就会更加有的放矢地进行消炎治疗,也会有更好的治疗效果。

骨愈合与新骨形成过程中的血管生成密切相关。研究发现,在大鼠股骨骨不连模型中,骨髓间充质干细胞的外泌体增强了骨形成,增加了成骨相关基因(BMP-2、Smad1、Runx2、骨甘氨酸和骨保护素)和血管生成相关基因如VEGF和HIF-1 α 的表达^[18]。当体外与BMMSC-Exos在BMP-2抑制剂存在下孵育时,小鼠胚胎成骨细胞前体细胞中Smad和Runx2的表达显著降低。上述结果表明,BMMSC-Exos可以通过BMP-2/Smad1/Runx2信号通路激活成骨分化,从而促进骨折愈合。并且BMMSC-Exos还可以通过HIF-1 α /VEGF途径改善

血管生成^[14]。与上述研究一致,Takeuchi等^[19]证明BMMSC-Exos能够通过增强血管生成来促进骨再生。在体外,BMMSC-Exos增强了MSC中的成骨和血管生成基因表达。此外,研究人员发现BMMSC-Exos含有VEGF促血管生成蛋白,并且能够诱导受体细胞分泌VEGF。BMMSC-Exos促进了体内更大的骨形成和更多的血管生成。有研究也报道了通过诱导血管生成来增强骨再生。他们评估了用低剂量二甲基草酰甘氨酸(Dimethyloxallyl Glycine, DMOG)预处理的骨髓间充质干细胞衍生的外泌体,DMOG是一种低氧模拟剂,DMOG-MS-Exos能够显著下调PTEN,PTEN是PI3激酶信号通路的内源性负调节因子,激活AKT/mTOR(雷帕霉素的哺乳动物靶点)通路,刺激体外人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中的血管生成。这有助于新骨获得更大的血管面积,例如在临界大小的颅骨缺损大鼠体内模型中增强血管面积。研究发现,MS-Exos和DMOG-MS-Exos组均显著增强了对HUVEC增殖和迁移至关重要的分子的表达,包括p65、Hippo-YAP、JAK-STAT和 β -catenin。然而,PTEN表现出最显著的变化,表明不同的机制可能参与促进血管生成^[19]。此外,愈合骨中新血管的生成对于提供营养、气体交换和全身循环因子至关重要。来自SCs和祖细胞的外泌体已被证明有助于血管生成诱导,Jia等^[20]发现在内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)衍生的外泌体(EPCs-Exos)中有miR-126的显著表达,其能够在体外下调SPRED-1(一种Ras/ERK抑制剂)并激活HUVEC上的Ras/ERK信号通路。因此SPRED1和miR-124可被MS-Exos下调,以激活组织再生相关机制^[20-22]。

骨重塑是骨愈合的最后阶段,是通过破骨细胞先吸收初始硬骨痂,随后通过成骨细胞形成骨基质,最后成骨。研究表明^[23]EPCs-Exos通过长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNA)/肺腺癌转移相关转录本1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)/miR-124途径促进破骨细胞生成。EPC的外泌体高度表达lncRNA-MALAT1,当分析它们在骨髓源性巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMM)中的作用时,外泌体负性控制miR-124活性并上调整合素 β 1(ITGB1)的表达。ITGB1是一种参与破骨细胞分化过程的蛋白质,而miR-124则通过抑制活化T细胞的核因子表达来下调破骨细胞的生成^[21]。故得出结论,EPCs-Exos可通过lncRNA-MALAT1增强破骨细胞

前体的募集和分化,从而促进骨修复^[23]。有实验表明^[24],在大鼠骨软骨缺损模型中,关节内给药人胚胎MSC-Exos可增强其功能并改善组织学评分;经过12周的治疗,软骨和软骨下骨完全恢复。骨重塑是一个持久且漫长的过程,干细胞外泌体在这个过程中发挥着关键的调节作用。

外泌体还可以调节组织微环境,伴随着炎症性骨病的发生,组织内蛋白质、各种RNA以及外泌体的含量跟健康者也会不同。使用MSC衍生的外泌体来抑制炎症反应体现了外泌体作为调节剂介导免疫的作用,这在之前的研究中取得了很好的实验结果。由此可见,外泌体可以作为一种检测指标来评估炎症性骨病是否发生以及进展如何,而外泌体是否可以作为特异性指标有待进一步的研究论证。

外泌体的机制随着研究的深入逐渐清晰,给临床骨科医生带来了机遇,也带来了研究的挑战。

3 总结

骨骼健康是人们日益关注的问题,其中创伤修复占有举足轻重的地位,伤口愈合慢一直是临床医生和研究人员难以解决的医学问题,也增加了患者身体和经济负担。外泌体已被证实具有强大的调节潜力,并在多种生物过程中发挥关键作用。其可以作为个体化治疗策略来促进骨组织修复。其中最主要的是MSC-Exos,它通过microRNA调节在诱导骨分化活性方面发挥着重要作用。肌肉减少症以及老年性骨骼减少症会导致老年人患骨质疏松及心脑血管疾病^[25],大大增加了老年人骨折损伤的风险,因此研究探讨外泌体在肌组织中的作用机制是很有必要的。

尽管此前许多的研究证实外泌体有促进创伤修复的潜力,但利用外泌体进行无细胞治疗的研究仍处于初始阶段。总的来说,在组织修复,甚至是无细胞治疗上,不同来源的外泌体都是大有作为的。所以如何根据外泌体的生理特性进行更高纯度的提取和更高效的使用也需要我们进一步的研究与探索。

参考文献

[1] Van NG, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213-228

[2] Gurung, Perocheau, Touramanidou, et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 47

[3] Hu Yingkun, Wang Yi, Chen Tianhong, et al. Exosome: Function and Application in Inflammatory Bone Diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021: 6324912

[4] Chen R, Xu X, Tao Y, et al. Exosomes in hepatocellular carcinoma: a new horizon [J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1): 1

[5] Yuan L. Novel strategies for gene therapy-Recent advances in the use of exosomes for disease treatment [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(42): 4463

[6] Stephens P, Thomas DW. The cellular proliferative phase of the wound repair process [J]. *J Wound Care*, 2002, 11(7): 253-261

[7] Yu M, Liu W, Li J, et al. Exosomes derived from atorvastatin-pretreated MSC accelerate diabetic wound repair by enhancing angiogenesis via AKT/eNOS pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 350

[8] Ding J, Wang X, Chen B, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by deferoxamine accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis [J]. *Biomed Res Int*, 2019: 9742765

[9] Mazini L, Rochette L, Admou B, et al. Hopes and limits of adipose-derived stem cells (ADSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in wound healing [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1306

[10] Ma T, Fu B, Yang X, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote cell proliferation, migration, and inhibit cell apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling in cutaneous wound healing [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 10847-10854

[11] Magne B, Dedier M, Nivet M, et al. IL-1 β Primed mesenchymal stromal cells improve epidermal substitute engraftment and wound healing via matrix metalloproteinases and transforming growth factor- β 1 [J]. *J Invest Dermatol*, 2020, 140: 688-698

[12] Flanagan M. The physiology of wound healing [J]. *J Wound Care*, 2000, 9(6): 299-300

[13] Girón J, Maurmann N, Pranke Patricia. The role of stem cell-derived exosomes in the repair of cutaneous and bone tissue [J]. *J Cell Biochem*, 2021, 123(2): 183-201

[14] Bijukumar DR, Salunkhe S, Zheng G, et al. Wear particles induce a new macrophage phenotype with the potential to accelerate material corrosion within total hip replacement interfaces [J]. *Acta Biomater*, 2020, 101(C): 586-597

[15] Ismail N, Wang Y, Dakhallah D, et al. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer [J]. *Blood*, 2013, 121(6): 984-995

[16] Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, et al. miR-223: infection, inflammation and cancer [J]. *J Intern Med*, 2013, 274(3): 215-226

- [17]Valmiki S, Ahuja V, Puri N, et al. miR-125b and miR-223 contribute to inflammation by targeting the key molecules of NFκB pathway [J]. Front Med (Lausanne), 2019, 6: 313
- [18]Zhang L, Jiao GJ, Ren SW 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
- [19]Takeuchi R, Katagiri W, Endo S et al. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis [J]. PLoS One, 2019, 14(11): e0225472
- [20]Jia YC, 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
- [21]Lee YK, Kim HJ, Park CK et al. MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation [J]. Bone, 2013, 56(2): 383-389
- [22]Qiu XY, Liu J, Zheng C, et al. Exosomes released from educated mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing via promoting angiogenesis [J]. Cell Prolif, 2020, 53(8): e12830
- [23]Cui YG, Fu SL, Sun D, et al. EPC-derived exosomes promote osteoclastogenesis through LncRNA-MALAT1 [J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(6): 3843-3854
- [24]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
- [25]唐月颖, 王静, 赵娜, 等. 老年人肌肉减少症的研究现状及应对 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2020, 42(1): 96-99

(上接第 157 页)

- rosience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia. 2020, 78: 67-72.
- [7]Ji XS Wang , Oner FC, et al. Surgical Management of Enneking Stage 3 Aggressive Vertebral Hemangiomas With Neurological Deficit by One-stage Posterior Total En Bloc Spondylectomy: A Review of 23 Cases [J]. Spine. 2020, 45(2): E67-E75
- [8]Huang Y, Xu W, Chen Q, et al. Treatment of Typical Enneking Stage 3 Thoracic Aggressive Vertebral Hemangiomas with Pain and Neurologic Deficits: Results After at Least 36 Months of Follow-Up [J]. World Neurosurgery. 2020, 134: e642-e648
- [9]连媛媛, 徐琦, 杨志涛, 等. 脊柱侵袭性血管瘤典型影像表现 [J]. 医学影像学杂志, 2022, 32(9): 1564-1566
- [10]Zaretskov VV, Arsenievich VB, Likhatchev SV, et al. Surgical treatment of aggressive hemangiomas of the transitional cervical-thoracic spine in children (clinical observations, preliminary results) [J]. Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery. 2019, 7(2): 79-86
- [11]杨欢, 高剑波, 梁盼. 脊柱侵袭性血管瘤的 CT 和 MRI 影像学特点分析 [J]. 中国实用医刊, 2019, 46(2): 36-39
- [12]刘孝萍, 吴春根, 李明华, 等. 脊柱血管瘤的病理、临床及影像学分型与 PVP 的应用 [J]. 中国医学计算机成像杂志, 2011, 17(6): 565-568
- [13]兰晓飞, 樊成虎. 5 例脊柱孤立性浆细胞瘤的诊疗体会 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(99): 201-202+206
- [14]Mohammad S, Farzad MS, Hooman BM, et al. Osteoblastoma of C2 vertebrae presented with lymphadenopathy and torticollis: Case report and review of literature [J]. Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management. 2022.29: 101557
- [15]姬少绯, 杨黎, 牛军杰, 等. MRI 在脊柱血管瘤临床诊断中的应用 [J]. 中国医药科学, 2013, 3(4): 107-108+114