

外泌体在骨科疾病治疗中的作用

彭堃 徐丛*

(承德医学院 河北 承德 067000)

【摘要】骨髓间充质干细胞具有较强的旁分泌、抗炎、免疫调节和血管生成潜能。最近的研究表明,骨髓间充质干细胞通过外泌体实现了多种调节功能。外泌体是一种直径40–100nm,密度1.13–1.19g/mL,包含蛋白质、RNA和DNA的细胞外囊泡。外泌体可以传递生物因子从而改变受体细胞的生化特征,并在细胞通信中发挥作用。有证据表明,间充质干细胞来源的外泌体具有与间充质干细胞相似的功能,同时具有低免疫原性和无肿瘤化的优点。外泌体也以从多种来源的细胞中分离出来,而且具有较高的增殖能力和较低的免疫原性,已被广泛用于再生医学和骨科疾病的治疗。然而目前人们对外泌体的提取及鉴定的最佳方法仍未达成共识,同时对于外泌体治疗骨科疾病的机制仍有很大的探索空间。本文旨在对目前外泌体的提取和鉴定方法、目前外泌体治疗骨科疾病的机制进行综述。

【关键词】外泌体;肩袖;骨关节炎

1 间充质干细胞

间充质干细胞(MSC)作为多能干细胞,它具有与其他干细胞相同的自我更新和多向分化能力。间充质干细胞主要存在于结缔组织和器官间质中,包括:骨髓、脐带、脂肪、粘膜、骨骼、肌肉、肺、肝、胰腺等。在适宜条件下间充质干细胞可分化为脂肪、骨、软骨等细胞。同时骨髓间充质干细胞具有以下特性:(1)增殖能力较强和且具备多向分化潜能;(2)免疫调节功能;(3)来源方便,易于分离、培养、扩增和纯化。(4)表面抗原不明显,异体移植排异反应较轻。由于这些特性,间充质干细胞在多种疾病的治疗中具有广阔的临床应用前景。目前间充质干细胞已被应用于血液系统疾病,心血管疾病,肝硬化,骨关节炎,神经系统疾病,膝关节半月板部分切除损伤修复,肩袖损伤的修复,自身免疫性疾病等方面的治疗。然而由于其是一种细胞治疗,间充质干细胞在治疗多种疾病方面在国际上仍存在伦理学上的争议;同时,间充质细胞的促肿瘤特性也限制了间充质干细胞的应用;最后,由于不同个体生理特点的不同,间充质干细胞的疗效仍未在目前研究中均获得令人满意的效果。因此,一种新的机制明确的非细胞治疗方式是当前再生医学研究中的一大热点。

2 外泌体

外泌体是一个直径为50–100nm的胞外囊泡,可以通过一些生物物理和生化参数与其他胞外囊泡区分。外泌体在1983年首次被报道由绵羊网织红细胞分泌,作为一种排出多余蛋白的一种手段。外泌体目前已知由多种细胞类型分泌,并发挥广泛的功能活动,涉及治疗和病理过程。骨髓间充质干细胞的心脏保护活性是由外泌体介导的,该发现为目前的骨髓间充质干细胞治疗提供

了一个新的视角,并为无细胞组织修复的发展提供了新的方法。基于外泌体的治疗比基于细胞的治疗具有巨大的优势。它更安全、更容易存储、运输和管理。

许多研究表明,外泌体可在多种疾病的治疗中发挥重要作用,包括癌症、心血管疾病、神经退行性疾病、组织损伤、急性肾损伤、骨关节炎等。事实上,越来越多的证据表明,成体干细胞的治疗活性部分是通过旁分泌作用发生的,这就产生了“无细胞”干细胞治疗的新概念。值得强调的是,干细胞来源的外泌体是治疗性干细胞的良好替代品,因为它们与致瘤性的临床关注无关。今天我们将对外泌体在骨科疾病治疗中的作用进行综述。

2.1 外泌体与肩袖损伤

肩袖损伤(rotator cuff injury)是引起肩周疼痛、肩关节功能障碍最常见的疾病之一。本病常发生在需要肩关节极度外展的反复运动中(如自由泳、仰泳、蝶泳、棒球、举重、排球运动等),不及时治疗者,可能出现肩关节不稳或继发性关节挛缩症,导致关节功能障碍。肩袖由肩胛下肌、冈上肌、冈下肌、小圆肌的肌腱组成,形似“袖口”包裹于肩关节前方、上方以及后方。这四条肌肉的肌腱围绕着肩关节,形成像套袖一样的结构,被形象地称为肩袖。当这些肌腱软组织受损时,即为肩袖损伤。无论是非手术还是手术,肩袖疾病的成功治疗取决于适当的康复。如果保守治疗不足,通常需要手术修复,从而达到缓解疼痛,改善关节功能的效果。然而即使手术修复成功后,退行性改变,如肌肉萎缩和脂肪浸润,继续进展,修复后的最佳结果只是保留术前状态。本文将讨论外泌体在肩袖损伤中的治疗效果。

首先,外泌体可以通过介导巨噬细胞极化来促进肩袖损伤的愈合。外泌体将 IL-1 β 的合成下调。IL-1 β 也是抑制 M1 巨噬细胞表型向 M2 表型转移的关键细胞因子,前者加重炎症反应和组织损伤,而后者减弱炎症反应,调节干细胞分化,促进组织修复和再生。同时,外泌体可以使细胞表面标记物 CD206 和 Arg-1 和 IL-10 的 mRNA 水平增加,从而降低巨噬细胞产生促炎介质的能力,下调炎症反应。

此外,外泌体可以通过维持组织稳态恢复损伤肩袖的基质代谢,从而达到促进损伤肩袖愈合的效果。首先,外泌体可以通过激活 AMPK 信号来维持撕裂的人肩袖肌腱的内稳态。AMPK 信号可以抑制 Wnt/ β -连环蛋白的活性来增加胶原蛋白的合成,从而减少促炎细胞因子的合成。AMPK 信号作为一个“中枢调节器”来控制下游基因的表达来调节生理活动。AMPK 的激活可以减少炎症并诱导体内再生。相反, β -连环蛋白,典型的 Wnt 信号的效应物,被认为可以激活分解代谢,加速炎症和细胞外基质变性。同时,外泌体可以增加 I/III 型胶原蛋白基因表达比例,从而改善撕裂的肩袖肌腱的组织学特性。I/III 胶原比例的增加可以抑制粘连和挛缩,并可能使肌腱抵抗应力和破裂的能力更强。外泌体抑制分解代谢细胞因子(IL-1 β 、IL-6 和 MMP-9)的合成和分解代谢基因(MMP-9 和 MMP-13)的表达,增加 I/III 型胶原蛋白基因表达比例:增强了 I 型胶原的表达,降低 III 型胶原的表达。其次,基质金属蛋白酶负责细胞外基质的降解,而 TIMPs 是其拮抗剂。

因此,外泌体可以通过调节组织稳态,维持损伤肩袖的基质代谢,从而达到增强愈合、提高组织学特性及生物力学特性的效果,这将成为肩袖损伤治疗的新策略。

2.2 外泌体与骨关节炎

骨关节炎(OA)是最常见的慢性关节疾病,其特征是关节软骨破坏、半月板和韧带破坏、软骨下骨增厚和骨赘的形成。大多数 OA 的治疗都是为了控制疼痛、肿胀的症状,目前还没有治愈 OA 的方法。由于关节软骨损伤对骨关节炎的病理尤为重要,因此恢复关节软骨的完整性和功能对阻止或逆转骨关节炎的进展至关重要。研究表明,间充质干细胞可以延缓软骨退行性变进展,缓解骨关节炎和类风湿关节炎患者的疼痛并改善其关节功能。本文将讨论外泌体对骨关节炎的治疗作用。

外泌体可以缓解骨关节炎。外泌体可以通过抑制 syndecan-1 来缓解骨关节炎,通过抑制 syndecan-1,减轻软骨损伤,减少骨赘形成和滑膜巨噬细胞浸润,抑制 M1 巨噬细胞的产生,促进 M2 巨噬细胞的生成。在滑膜液中,促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α

的表达水平降低,抗炎细胞因子 IL-10 的释放增加。在体外,经外泌体处理的巨噬细胞维持软骨细胞的软骨生成特性并抑制细胞肥大。同时,外泌体通过平衡软骨细胞外基质的合成和降解来缓解骨关节炎。关节内注射外泌体可以缓解 DMM 模型中的软骨破坏和基质降解。在 IL-1 β 存在时,这些外泌体通过增加 II 型胶原的合成和降低 ADAMTS5 的表达来维持软骨细胞的表型。外泌体通过平衡软骨细胞外基质(ECM)的合成和降解,对 OA 具有有益的治疗作用,为 OA 药物和给药系统的开发提供了新的靶点。外泌体减轻了 OA 大鼠模型的软骨破坏和软骨下骨重塑。给予外泌体可减少关节损伤,恢复 OA 大鼠的骨小梁体积分数、骨小梁数量和连接密度。此外,外泌体可以通过增加 II 型胶原合成和抑制 iL-1 β 诱导的衰老和凋亡来维持软骨细胞表型。此外,外泌体 lncRNAMEG-3 也能降低了 IL-1 β 诱导的软骨细胞的衰老和凋亡,说明 lncRNAMEG-3 可能部分解释了外泌体的抗 OA 作用。外泌体通过减少软骨细胞的衰老和凋亡,对 OA 具有有益的治疗作用⁹。

外泌体可以促进软骨修复和再生。随着时间的推移,各种研究已经证明了外泌体在治疗和恢复软骨组织中的治疗效果。MSC 外泌体可调节免疫微环境,减少促炎症细胞表型,为组织修复创造再生环境。外泌体通过各种机制发挥软骨再生的治疗功能,包括生物介质的传递、刺激细胞增殖、增加细胞外基质合成和免疫调节特性。通常,在软骨细胞线粒体的衰老过程中,与电子传递链和 ATP 产生相关的蛋白质减少,线粒体功能的受损。在这种情况下,软骨细胞的修复能力显著降低。骨髓间充质干细胞外泌体含有非活性糖酵解酶,如磷酸葡萄糖激酶和丙酮酸激酶,ATP 产生酶,如腺苷酸激酶和核苷二磷酸酶激酶。外泌体通过转移这些酶可以弥补软骨细胞中 ATP 产生的减少。为了再生软骨组织,恢复细胞计数、组织结构和功能都是至关重要的。外泌体通过腺苷催化酶、ERK1/2 和 AKT 的磷酸化来增加各种细胞的增殖。此外,外泌体催化腺苷的产生从受损组织释放的细胞外 ATP。在 OA 病理中,促炎性细胞因子和基质金属蛋白酶主要由滑膜和免疫细胞产生,并在 OA 的发生和发展中发挥作用。因此,调节受损软骨或骨性关节炎的促炎环境对软骨再生具有重要意义。在与外泌体治疗 OA 相关的各种研究中,IL-1 β 和 TNF- α 、IL-6、MMPs 和 NO 的浓度显著降低,而 IL-10 和 TGF- β 的分泌增加。这些外泌体传递抗炎因子,如肝生长因子(HGF)、血红素加氧酶-1、TGF- β 1,并刺激炎症区域的抑制细胞,减少软骨损伤,刺激组织再生。遗传学研究表明,WNT3a 可能有助于软骨的再生,然而,软骨细胞外基质限制了其对

软骨细胞的穿透和信号传递。细胞外囊泡可以穿透完整的软骨。外泌体可以作为载体,将 WNT3a 输送到体内,使 WNT3a 被有效地传递到软骨中,有助于骨软骨缺损的愈合^{[5][6][7][8]}。

外泌体可以对骨关节炎起到明显的缓解作用,促进了软骨的修复与再生,同时应用外泌体相关药物也可以抑制骨关节炎中滑膜炎的进展,这将成为未来骨关节治疗有效的治疗手段。

3 结论

综上所述,随着人们对外泌体的研究,外泌体的提取及鉴定方法已经逐渐成熟,超速离心法及试剂盒提取法已被广泛应用于外泌体的提取,外泌体的形态、大小以及外泌体表面蛋白标记的鉴定也是目前科学研究中主流的鉴定方法。

同时,外泌体在骨科疾病的治疗中的作用也显示出相比既往治疗法的显著优势,外泌体通过抑制炎症,促进细胞再生,调节机制稳态等方式使肩袖、软骨、肌腱以及腱骨界面的组织学特性及生物力学特性得到明显的改善。因此,基于外泌体的治疗作为一种干细胞治疗具有相当大的潜力。

然而,目前的研究大多是通过建立动物模型探究来阐述外泌体在动物模型中的治疗效果,即使动物模型与人体疾病进展中的组织学特性及病理学特性相似,仍无法完全模拟人体在各种疾病中的体内环境。同时,外泌体治疗各种疾病的潜在机制在治疗策略在应用于临床治疗前还需要进一步的研究。因此,需要进一步研究来阐述外泌体在各种疾病中的治疗机制,探究外泌体在人体患病部位注射的可行性,从而最终应用于人体各疾病的治疗。

在未来,研究人员将进一步探索外泌体提取及鉴定的最佳方法,使外泌体真正成为可量产、无明显副作用的无细胞治疗手段。同时,外泌体在骨科疾病中的治疗机制也将进一步倍阐述,基于间充质干细胞治疗骨科疾病是否通过外泌体来达到其治疗效果也将进一步被探索。

总之,基于外泌体的治疗可能是治疗骨科疾病的新策略。

参考文献:

- [1]Yi Zhang, Jiayao Bi, Jiayi Huang. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine* 2020;15: 6917 - 6934. DOI: 10.2147/IJN.S264498
- [2]Yao Huang, Bing He, Lei Wang, Bin Yuan.

Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote rotator cuff tendon-bone healing by promoting angiogenesis and regulating M1 macrophages in rats. *Research & Therapy* (2020) 11:496 DOI: 10.1186/s13287-020-02005-x

[3]Xuancheng Zhang,* MD, Zhuochang Cai, Adipose Stem Cell - Derived Exosomes Recover Impaired Matrix Metabolism of Torn Human Rotator Cuff Tendons by Maintaining Tissue Homeostasis. *The American Journal of Sports Medicine* 2021;49(4):899 - 908 DOI: 10.1177/0363546521992469

[4]Finosh G Thankam and Devendra K Agrawal. Hypoxia-driven secretion of extracellular matrix proteins in the exosomes reflects the asymptomatic pathology of rotator cuff tendinopathies. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* • 15 August 2020 • DOI: 10.1139/cjpp-2020-0314

[5]Qi Li, Huilei Yu, Muyang Sun, The tissue origin effect of extracellular vesicles on cartilage and bone regeneration. *Acta Biomaterialia* 125 (2021) 253 - 266 DOI: 10.1016/j.actbio.2021.02.039

[6]Thomas, B. L., Eldridge, S. E., Nosrati, B., Alvarez, M., Thorup, A.-S., Nalesso, G., Caxaria, S., Barawi, A., Nicholson, J. G., Perretti, M., Gaston-Massuet, C., Pitzalis, C., Maloney, A., Moore, A., Jupp, R., & Dell'Accio, F. (2021). WNT3A-loaded exosomes enable cartilage repair. *J Extracell Vesicles*, e12088. Doi:10.1002/jev2.12088

[7]Jin Y, Xu M, Zhu H, et al. Therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes on osteoarthritis. *J Cell Mol Med*. 2021;00:1 - 14. DOI: 10.1111/jcmm.16860

[8]Jian Wang, Xuanxuan Guo, Zhanrong Kang, Lingbin Qi, Ying Yang, Juan Wang, Jun Xu, and Shane Gao. Roles of Exosomes from Mesenchymal Stem Cells in Treating Osteoarthritis. *CELLULAR REPROGRAMMING* Volume 22, Number 3, 2020 Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/cell.2019.0098

作者简介:

彭堃 (1998.2-) 男, 河北省承德市, 满族, 硕士研究生, 研究方向: 骨科学。

通讯作者: 徐丛 (1975.06-), 男, 河北省唐山市, 汉族, 硕士, 主任医师, 主任, 研究方向: 肩、膝关节微创化治疗。