

不同来源的外泌体对软骨细胞修复的作用

李家宇^{1,2}, 李梦佳^{1,2}, 龚忠诚^{1,2*}

¹新疆医科大学第一附属医院(附属口腔医院)口腔颌面肿瘤外科, 新疆 乌鲁木齐

²新疆维吾尔自治区口腔医学研究所, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2024年1月7日; 录用日期: 2024年2月1日; 发布日期: 2024年2月7日

摘要

颞下颌关节骨关节炎(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJOA)是最常见的慢性退行性骨关节疾病, 其病理特点是滑膜慢性炎症、软骨退变及软骨下骨吸收或硬化等。由于软骨的自愈能力有限, 但目前对于完全缓解的治疗尚无共识。近年来, 外泌体作为细胞间的通讯载体, 能在细胞间传递生物活性脂质、核酸以及蛋白质等生物活性分子对软骨细胞产生一定影响, 进而影响TMJOA的进展。本文就探讨不同来源的外泌体对软骨细胞的作用机制与可行性做出综述。讨论不同来源的外泌体对软骨细胞的修复的作用, 为骨关节炎的治疗提供新思路。

关键词

外泌体, 软骨细胞, 细胞修复

The Role of Exosomes from Different Sources on Chondrocyte Repair

Jiayu Li^{1,2}, Mengjia Li^{1,2}, Zhongcheng Gong^{1,2*}

¹Department of Oral and Maxillofacial Oncology & Surgery, The First Affiliated Hospital (Hospital of Stomatology) of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

²Stomatological Research Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi Xinjiang

Received: Jan. 7th, 2024; accepted: Feb. 1st, 2024; published: Feb. 7th, 2024

Abstract

Temporomandibular joint osteoarthritis is the most common chronic degenerative osteoarthritic disease, and its pathology is characterized by chronic inflammation of the synovium, degeneration of

*通讯作者。

the cartilage, and resorption or sclerosis of the subchondral bone. Due to the limited self-healing ability of cartilage, however, there is no consensus on the treatment for complete remission. In recent years, exosomes, as intercellular communication carriers, can deliver bioactive lipids, nucleic acids, and proteins and other biologically active molecules between cells to have a certain impact on chondrocytes, which in turn affects the progression of TMJOA. In this paper, we review the mechanism of action and feasibility of exploring the effects of exosomes from different sources on chondrocytes. The role of exosomes from different sources on chondrocyte repair is discussed to provide new ideas for the treatment of osteoarthritis.

Keywords

Exosomes, Chondrocytes, Cellular Repair

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

颞下颌关节骨关节炎(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJOA)属于颞下颌关节紊乱病的终末期病变,其病理特点是滑膜慢性炎症、软骨退变及软骨下骨吸收或硬化等,软骨损伤被认为是 TMJOA 发病的核心环节[1]。已发现多种因素与 OA 关节的病理变化有关,包括衰老、创伤、机械负荷以及遗传和代谢紊乱[2]。当下 OA 治疗策略主要旨在缓解疼痛、改善关节功能,虽然传统的临床治疗方法可以在一定程度上防止疾病的发展,但是它们不能完全恢复退化的软骨或软骨下骨损伤[3]。与身体其他关节相比,颞下颌关节的解剖结构及运动模式具有其特殊性。颞下颌关节的髁突表面覆盖纤维软骨,较膝关节表面的透明软骨含有更多的胶原纤维,光镜下观察,成人关节软骨组织的结构成分主要由软骨细胞及胞外基质(extra cellular matrix, ECM)构成,ECM 中含有水、胶原、蛋白多糖、结构糖蛋白等基质,缺乏血管、淋巴管和神经。而纤维软骨中胶原的主要成分是 I 型胶原蛋白, I 型胶原蛋白形成三维网络,影响着关节软骨的形态、稳定性、抗拉强度和抗剪切力[4]。

外泌体是指包含了复杂 RNA 和蛋白质的小膜泡(直径 30~150 nm),几乎所有类型的活细胞都可以产生外泌体,不同来源的外泌体在产量、含量、功能、载药量等方面存在一定差异,细胞类型和环境决定外泌体的组成和分泌。外泌体对于细胞通讯和功能调节至关重要,通过从供体细胞传递蛋白质、脂质和核酸(mRNA 和 miRNA)来诱导受体细胞的生物反应[5]。本文就不同细胞来源的外泌体在软骨损伤退变性疾病修复与再生中发挥的作用作一综述。

2. 外泌体

外泌体最早由澳大利亚学者 Johnstone 等(1987)发现, Charles 等(2001)首次在培养的绵羊红细胞上清液中检测到外泌体,最初外泌体分泌被认为是消除无用蛋白质的一种机制,因此未引起学者们的注意,之后一些学者陆续在外泌体中发现 mRNA 及 microRNAs 等物质,外泌体的研究逐渐成为科研领域的一大热点[6]。外泌体具有磷脂双分子层结构,形态呈膜性扁平杯碟状,包含丰富的生物活性物质,包括蛋白质、脂质和核酸。传统的外泌体纯化方法涉及收集细胞培养基进行梯度离心。一般取低速离心(300 × g)后的上清液。在此步骤中,去除细胞和碎片,并收集进一步离心循环后的上清液,丢弃细胞碎片(2000 g)和大囊泡(10,000 × g)。将该上清液进行超速离心(100,000 × g)以获得外泌体[7]。为了进一步纯化,外泌体

在磷酸盐缓冲盐水中洗涤,进行另一个超速离心循环,收集并储存在 -80°C 。该方法广泛用于从各种生物样品(例如细胞培养基、尿液)中纯化外泌体和脑脊液。然而,使用超速离心耗时长、纯化次数有限、效率低,限制了其在外泌体纯化中的广泛应用。近年来,外泌体的超滤、沉淀、免疫分析、快速纯化试剂盒等逐渐被推出。但它们的效率均较低,外泌体制剂中存在杂质,难以推广。目前,外泌体的分离方法尚未达成共识,不同的纯化方法会导致外泌体蛋白质及其所含生物活性物质的变化[8]。从细胞培养基中纯化后的外泌体不能长期保存。保护技术主要包括低温保存、冷冻干燥和喷雾干燥[9]。外泌体的检测主要通过标记蛋白的评估以及透射电镜下外泌体粒径和形态的观察。蛋白电泳是用来确认从细胞外体液和培养基中提取的物质是否为外泌体的方法之一。结合透射电镜观察,当提取的物质具有双层膜和杯状形貌,尺寸约为 30~150 nm 时,证实外泌体纯化。纳米颗粒跟踪分析(NTA)是一种光学颗粒跟踪方法,可以根据布朗运动计算外泌体的浓度和大小。通过颗粒在液体中的运动来分析颗粒的速度,最后计算出颗粒的尺寸和浓度。

3. 不同来源外泌体对软骨损伤的修复作用

3.1. 骨髓间充质干细胞

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是来源于中胚层的多能干细胞,最初在骨髓中发现且以骨髓组织中含量最为丰富,骨髓来源的 MSC 又称为骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs),因其具有多向分化潜能、促进细胞增值、免疫调控等特点,现常用于研究软骨损伤的修复,BMMSCs 体外培养下可诱导软骨细胞增殖,提示其在软骨修复的过程中具有积极作用[10]。OA 的发生与发展和软骨细胞破坏及软骨下改建密切相关,关节软骨是 TMJ 重要的组成部分,由软骨细胞和基质(主要为II型胶原)构成,是骨关节行使正常功能的关键。而发生骨关节炎时常伴随着关节软骨细胞破坏及软骨下改建,此时往往不能自然逆转,而现有的临床诊疗技术只能缓解临床症状和延缓疾病进展,并不能治愈[11]。Wong 在研究中发现 BMMSCs-Exo 可以促进II型胶原蛋白(collagen typeII, ColII)和硫酸化糖胺聚糖的合成,加速软骨缺损区域的细胞基质修复。有实验中也发现小鼠 BMMSCs 提取的 Exo 通过重建软骨细胞稳态、降低软骨细胞凋亡和促进巨噬细胞的功能作用,在体外发挥了相似的功能作用[12]。Cosenza 等[13]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, AD-AMTS5)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。

3.2. 滑膜间充质干细胞

滑膜 MSC(synovial mesenchymal stem cell, SMSC)的关节内注射对 OA 动物模型具有治疗效果, Li 等的实验中证明 SMSC-EXO 治疗显著上调 OA 大鼠软骨组织中的 COL2A1 蛋白和下调 MMP13 蛋白[14]。SMSC 分泌的 EXO 与 OA 密切相关,可促进软骨细胞再生、抑制细胞凋亡、改善细胞外基质(extracellular matrix, ECM)平衡,从而影响细胞或组织的命运[15]。Zhu 等[16]研究发现在 CIOA 小鼠模型中,滑膜间充质干细胞来源的外泌体(SMSC-Exo)可以通过增强软骨细胞的增殖和迁移延缓 OA 进展,但没有完全修复软骨损伤,软骨表面仍然存在少许不规则瘢痕。陶等人[17]发现滑膜间充质干细胞(SMSC)的分泌物中含有 Wnt5a 和 Wnt5b,它们可以激活 Yes 相关蛋白信号转导通路,从而促进软骨细胞的增殖和迁移。然而,Wnt5a 和 Wnt5b 激活 Yes 相关蛋白信号转导通路可抑制 Sox9 的表达,显着减少软骨细胞细胞外基质的分泌,高表达 miR-140-5p 的修饰 SMSC 衍生的外泌体可以消除这种缺陷,促进关节软骨细胞的增殖

和迁移而不影响软骨细胞细胞外基质的分泌, 预防大鼠 OA 的发生。此外也有学者将 miR-31 经 SMSCs 源性 exo 包装、携带, 传递至软骨细胞, 通过调控 KDM2A 基因促进软骨细胞增殖、迁移及软骨形成, 有效改善了 OA 导致的软骨损伤和炎症[18]。

3.3. 成纤维细胞样滑膜细胞

在健康的关节中, 滑膜主要由两种类型的滑膜细胞组成。A 型巨噬细胞样滑膜细胞相对较小, 主要具有吞噬功能并产生促炎细胞因子。同时, B 型成纤维细胞样滑膜细胞(synovial fibroblast cells, SFC)提供结构、营养和润滑, 约占滑膜细胞的 75% [19]。此外, 成纤维细胞样滑膜细胞可以迁移到组织重塑部位, 并通过特定的表面受体与 ECM 分子相互作用。它们可以通过调整与 ECM 成分的相互作用和产生来感知周围滑膜组织的组成和结构的变化并做出反应[20]。Kato 等人[21]利用 IL-1b 刺激正常 SFC, 分离分泌的外泌体, 并将其与软骨细胞共培养。他们发现, MMP13 和 ADAMTS-5 等分解代谢相关基因的表达显著增加, 而 COL2A1 和 ACAN 等合成代谢相关基因的表达显著减少。此外, 这些外泌体促进了软骨外植体中蛋白多糖的产生。Zhou 等人[22]的一项体内研究表明, SFCs-miRNA-126-3p-Exos 在 OA 模型大鼠中维持软骨下骨结构并抑制滑膜炎炎症介导的软骨变性以及关节软骨细胞凋亡和炎症。

3.4. 软骨细胞

骨关节炎软骨细胞释放直径为 100 nm 的细胞外关节软骨基质囊泡, 参与关节软骨的病理矿化[23]。源自正常原代软骨细胞的外泌体可以通过增加 M2/M1 巨噬细胞的比例来恢复线粒体功能并增强免疫浸润。关节内注射正常原代软骨细胞的外泌体有效抑制 OA 的发生和发展[24]。OA 软骨细胞来源的外泌体刺激巨噬细胞中炎症小体的激活, 并通过 miR-449a-5p/ATG4B/自噬途径释放成熟的 IL-1b, 从而诱发滑膜炎并加剧 OA [25]。此外, 源自软骨细胞的外泌体可以实现软骨祖细胞(CPC)构建体的有效异位软骨形成, 代表了一种新颖的软骨再生无细胞治疗方法[26]。

4. 小结

OA 和软骨损伤的治疗一直是再生医学的热点和难点问题, 在未来的几十年里, 也许 OA 的患病人数还会继续上升。外泌体作为 OA 发展过程中细胞相互作用的重要介质, 具有巨大的治疗潜力。然而, 这个研究领域面临一些挑战。目前, 尚无直接证据证明内源性外泌体在细胞间的传递和转移, 这使得识别外泌体的受体细胞变得困难。关节中外泌体产生和释放的机制仍不清楚, 限制了针对外泌体的细胞疗法的发展。由于早期 OA 中软骨破坏并不严重, 外泌体无法有效穿透软骨基质与软骨细胞相互作用。因此, 目前 MSCExos 细胞工程的研究主要集中在表面软骨细胞、软骨基质、滑膜细胞以及其他易于与外泌体通讯的关节细胞上。未来对外泌体的研究应探索其细胞来源、生产外泌体的优化条件、其在关节中的含量和生物分布、受体细胞或组织的类型以及其在 OA 中的治疗机制。最后, 它可以代表一个相对完整的治疗策略, 减轻 OA 患者的负担。更好地了解 OA 发病机制中关节细胞和组织之间的各种相互作用, 为未来基于细胞的 OA 治疗疗法的发展铺平道路。

参考文献

- [1] Han, B., Chao, J. and Yao, H. (2018) Circular RNA and Its Mechanisms in Disease: From the Bench to the Clinic. *Pharmacology & Therapeutics*, **187**, 31-44. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.010>
- [2] Ni, Z., Zhou, S., Li, S., et al. (2020) Exosomes: Roles and Therapeutic Potential in Osteoarthritis. *Bone Research*, **8**, Article No. 25. <https://doi.org/10.1038/s41413-020-0100-9>
- [3] Toh, W.S., Lai, R.C., Hui, J.H.P., et al. (2017) MSC Exosome as a Cell-Free MSC Therapy for Cartilage Regeneration: Implications for Osteoarthritis Treatment. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **67**, 56-64.

- <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.11.008>
- [4] Wu, Y., Kadota-Watanabe, C., Ogawa, T., *et al.* (2019) Combination of Estrogen Deficiency and Excessive Mechanical Stress Aggravates Temporomandibular Joint Osteoarthritis *in Vivo*. *Archives of Oral Biology*, **102**, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.012>
- [5] Mianehsaz, E., Mirzaei, H.R., Mahjoubin-Tehran, M., *et al.* (2019) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: A New Therapeutic Approach to Osteoarthritis? *Stem Cell Research & Therapy*, **10**, Article No. 340. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1445-0>
- [6] Baghaei, K., Tokhanbigli, S., Asadzadeh, H., *et al.* (2019) Exosomes as a Novel Cell-Free Therapeutic Approach in Gastrointestinal Diseases. *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 9910-9926. <https://doi.org/10.1002/jcp.27934>
- [7] Zhang, J., Li, S., Li, L., *et al.* (2015) Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **13**, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
- [8] Liu, Q., Piao, H., Wang, Y., *et al.* (2021) Circulating Exosomes in Cardiovascular Disease: Novel Carriers of Biological Information. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **135**, Article ID: 111148. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111148>
- [9] Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., *et al.* (2020) Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine*, **15**, 6917-6934. <https://doi.org/10.2147/IJN.S264498>
- [10] Zhang, S., Teo, K.Y.W., Chuah, S.J., *et al.* (2019) MSC Exosomes Alleviate Temporomandibular Joint Osteoarthritis by Attenuating Inflammation and Restoring Matrix Homeostasis. *Biomaterials*, **200**, 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.006>
- [11] Li, B., Guan, G., Mei, L., *et al.* (2021) Pathological Mechanism of Chondrocytes and the Surrounding Environment during Osteoarthritis of Temporomandibular Joint. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **25**, 4902-4911. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16514>
- [12] Wong, K.L., Zhang, S., Wang, M., *et al.* (2020) Intra-Articular Injections of Mesenchymal Stem Cell Exosomes and Hyaluronic Acid Improve Structural and Mechanical Properties of Repaired Cartilage in a Rabbit Model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery: Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, **36**, 2215-2228.E2. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2020.03.031>
- [13] Cosenza, S., Ruiz, M., Toupet, K., *et al.* (2017) Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes and Microparticles Protect Cartilage and Bone from Degradation in Osteoarthritis. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 16214. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15376-8>
- [14] 李明, 贾丙申, 李君, 等. SMSC-EXO 来源 LncRNA-SNHG14 对 OA 大鼠软骨细胞损伤及炎症痛的调节作用和机制研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2023, 42(1): 22-31.
- [15] Reisbig, N.A., Pinnell, E., Scheuerman, L., *et al.* (2019) Synovium Extra Cellular Matrices Seeded with Transduced Mesenchymal Stem Cells Stimulate Chondrocyte Maturation *in Vitro* and Cartilage Healing in Clinically-Induced Rat-Knee Lesions *in Vivo*. *PLOS ONE*, **14**, e0212664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212664>
- [16] Zhu, Y., Wang, Y., Zhao, B., *et al.* (2017) 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. *Stem Cell Research & Therapy*, **8**, Article No. 64. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0510-9>
- [17] Tao, S.C., Yuan, T., Zhang, Y.L., *et al.* (2017) 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. *Theranostics*, **7**, 180-195. <https://doi.org/10.7150/thno.17133>
- [18] Wang, K., Li, F., Yuan, Y., *et al.* (2020) Synovial Mesenchymal Stem Cell-Derived EV-Packaged MiR-31 Downregulates Histone Demethylase KDM2A to Prevent Knee Osteoarthritis. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **22**, 1078-1091. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.09.014>
- [19] Firestein, G.S. and McInnes, I.B. (2017) Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, **46**, 183-196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
- [20] Culemann, S., Grüneboom, A., Nicolás-Ávila, J., *et al.* (2019) Locally Renewing Resident Synovial Macrophages Provide a Protective Barrier for the Joint. *Nature*, **572**, 670-675. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1471-1>
- [21] Kato, T., Miyaki, S., Ishitobi, H., *et al.* (2014) Exosomes from IL-1 β Stimulated Synovial Fibroblasts Induce Osteoarthritic Changes in Articular Chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*, **16**, R163. <https://doi.org/10.1186/ar4679>
- [22] Zhou, Y., Ming, J., Li, Y., *et al.* (2021) Exosomes Derived from MiR-126-3p-Overexpressing Synovial Fibroblasts Suppress Chondrocyte Inflammation and Cartilage Degradation in a Rat Model of Osteoarthritis. *Cell Death Discovery*, **7**, Article No. 37. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00418-y>

- [23] Jubeck, B., Gohr, C., Fahey, M., *et al.* (2008) Promotion of Articular Cartilage Matrix Vesicle Mineralization by Type I Collagen. *Arthritis and Rheumatism*, **58**, 2809-2817. <https://doi.org/10.1002/art.23762>
- [24] Shapiro, I.M., Landis, W.J. and Risbud, M.V. (2015) Matrix Vesicles: Are They Anchored Exosomes? *Bone*, **79**, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.013>
- [25] Ni, Z., Kuang, L., Chen, H., *et al.* (2019) The Exosome-Like Vesicles from Osteoarthritic Chondrocyte Enhanced Mature IL-1 β Production of Macrophages and Aggravated Synovitis in Osteoarthritis. *Cell Death & Disease*, **10**, Article No. 522. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1739-2>
- [26] Zheng, L., Wang, Y., Qiu, P., *et al.* (2019) Primary Chondrocyte Exosomes Mediate Osteoarthritis Progression by Regulating Mitochondrion and Immune Reactivity. *Nanomedicine (London, England)*, **14**, 3193-3212. <https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0498>