

脐带间充质干细胞外泌体 LncRNA H19 修复软骨损伤的机制

王宪峰¹, 王 锐², 孙 晗², 孙晓亮², 言力韬²

<https://doi.org/10.12307/2023.917>

投稿日期: 2022-10-24

采用日期: 2023-01-29

修回日期: 2023-02-23

在线日期: 2023-03-04

中图分类号:

R459.9; R318; R684

文章编号:

2095-4344(2024)01-00020-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 脐带间充质干细胞来源外泌体 LncRNA H19 促进软骨损伤修复

体外实验	建立过表达 H19 脐带间充质干细胞系	分离提取外泌体
	生信分析和双荧光素酶实验明确 miR-29b-3p 靶向结合 TGF-β1/Smad3	
	软骨细胞体外转染 miR-29b mimic, miR-29b inhibitor	
体内实验	软骨细胞体外模拟骨关节炎微环境, 给予外泌体和 TGF-β/Smad 通路抑制剂进行干预	
	建立 SD 大鼠骨关节炎模型, 关节腔内注射外泌体和 TGF-β/Smad 通路抑制剂	
	苏木精-伊红染色、甲苯胺蓝染色、免疫组化染色、OARS1 评分	

结论:

(1) miR-29b-3p 靶向下调 TGF-β1/Smad3 通路;
(2) 脐带间充质干细胞来源外泌体中 LncRNA H19 通过 miR-29b-3p/TGF-β1/Smad3 轴发挥软骨再生修复活性。

文题释义:

外泌体: 是一类直径在50–150 nm的脂质双层囊泡, 能够从母体细胞运载脂质、蛋白质、mRNA和DNA等生物分子到靶细胞, 进而调节相应的生物反应。干细胞来源外泌体具有干细胞的一些特性, 但外泌体更加安全和稳定, 无伦理限制, 且具有规模化生产使用的优势。因此干细胞来源外泌体是未来生物医疗领域的新策略和新方法。

长链非编码RNA: 是一类真核生物中长度大于200个核苷酸的非蛋白编码转录RNA分子, 在转录水平和转录后水平参与多种生物过程, 如调控翻译、促进或者抑制mRNA、吸附miRNA。有研究证实长链非编码RNA可以在多种细胞中富集, 并且通过外泌体的形式释放。因此, 解析干细胞来源外泌体中关键的长链非编码RNA是进一步探明外泌体相关生物功能机制的重要方法。

摘要

背景: 脐带间充质干细胞已被证明对软骨损伤有治疗作用, 外泌体是脐带间充质干细胞在体内发挥治疗作用的主要载体。课题组前期发现 LncRNA H19 是介导脐带间充质干细胞外泌体调控软骨细胞活性的重要活性分子, LncRNA H19 可以吸附miR-29b-3p从而促进软骨细胞的增殖再生, 但是其下游机制仍未清楚。

目的: 从外泌体和LncRNAs角度揭示脐带间充质干细胞治疗软骨损伤的具体机制, 为软骨损伤的治疗提供新的靶点。

方法: 构建稳定过表达LncRNA H19的脐带间充质干细胞, 采用超速离心提取外泌体(H19-Exos); 采用透射电镜、纳米颗粒跟踪分析、Western blot和外泌体摄取实验鉴定外泌体; 通过Western blot、qPCR和双荧光素酶报告基因系统检测miR-29b-3p过表达和沉默对TGF-β1/Smad3通路的影响; 通过特异性TGF-β1/Smad3抑制剂在体内外反向验证H19-Exos对软骨再生的生物学作用。

结果与结论: ①H19-Exos在电镜下为典型的杯状, 粒径在130 nm左右, 均表达CD63、CD81和TSG1010特性蛋白; ②过表达miR-29b-3p可以同时下调TGF-β1、Smad3的mRNA和蛋白水平, 而沉默miR-29b-3p后, TGF-β1、Smad3的mRNA和蛋白水平上调; ③双荧光素酶报告基因系统检测发现miR-29b-3p对下游靶基因TGF-β1和Smad3活性影响有显著差异; ④膝关节腔内注射II型胶原酶成功建立大鼠骨关节炎模型, H19-Exos可显著促进软骨再生, 且特异性TGF-β1/Smad3抑制剂SB-431542在体内外均可阻断H19-Exos对软骨再生的生物学作用; ⑤该研究系统论证了高表达LncRNA H19 脐带间充质干细胞来源外泌体对软骨再生的促进作用, 具体机制为LncRNA H19通过靶向miR-29b-3p/TGF-β1/Smad3通路促进软骨再生。

关键词: 骨性关节炎; 间充质干细胞; 外泌体; 长链非编码RNA

Mechanism underlying exosomal lncRNA H19 derived from umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cartilage injury repair

Wang Xianfeng¹, Wang Kun², Sun Han², Sun Xiaoliang², Yan Litao²

¹Department of Sports Medicine, Beijing Jishuitan Hospital Guizhou Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China; ²Department of Articular Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China

Wang Xianfeng, Master, Attending physician, Department of Sports Medicine, Beijing Jishuitan Hospital Guizhou Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Yan Litao, PhD, Physician, Department of Articular Orthopedics, Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China

¹ 北京积水潭医院贵州医院运动医学科, 贵州省贵阳市 550000; ² 苏州大学附属第三医院骨关节科, 江苏省常州市 213000

第一作者: 王宪峰, 男, 1990年生, 山东省武城县人, 汉族, 2018年大连医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事骨关节疾病及运动医学相关基础与临床研究。

通讯作者: 言力韬, 博士, 医师, 苏州大学附属第三医院骨关节科, 江苏省常州市 213000

<https://orcid.org/0000-0002-1837-0670> (王宪峰); <https://orcid.org/0000-0002-6653-2865> (言力韬)

基金资助: 国家自然科学基金青年项目 (82202679), 项目负责人: 言力韬; 江苏省高校自然科学基金面上项目 (22KJB320008),

项目负责人: 言力韬; 常州市应用基础研究计划项目 (CJ20220109), 项目负责人: 言力韬; 常州市应用基础研究计划项目

(CJ20220070), 项目负责人: 王锐; 常州市应用基础研究计划项目 (CJ20220103), 项目负责人: 孙晗

引用本文: 王宪峰, 王锐, 孙晗, 孙晓亮, 言力韬. 脐带间充质干细胞外泌体 LncRNA H19 修复软骨损伤的机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(1):20-25.



Abstract

BACKGROUND: Umbilical cord mesenchymal stem cells (UMSCs) have been proven to have therapeutic effects on cartilage injury, and exosomes are the main carriers for UMSCs to exert therapeutic effects *in vivo*. Our research group previously found that lncRNA H19 is an important active molecule that mediates the activity of UMSCs-derived exosomes regulating chondrocytes. lncRNA H19 could adsorb miR-29b-3p to promote the proliferation and regeneration of chondrocytes, but its downstream mechanism is still unclear.

OBJECTIVE: To reveal the specific mechanism of UMSCs in the treatment of cartilage injury from the perspective of exosomes and lncRNAs, so as to provide a new target for the treatment of cartilage injury.

METHODS: UMSCs stably overexpressing lncRNA H19 were constructed. H19-Exos were extracted by ultra-centrifugation. The exosomes were identified by transmission electron microscopy, Nanosight, western blot assay and exosome uptake assay. The effect of miR-29b-3p overexpression and silencing on the TGF- β 1/Smad3 pathway was detected by western blot assay, qPCR and dual luciferase reporter gene system. The biological effect of H19-Exos on cartilage regeneration was verified by the specific TGF- β 1/Smad3 inhibitor *in vitro* and *in vivo*.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) H19-Exos showed a typical cup shape under an electron microscope, and the particle size was approximately 130 nm. H19-Exos expressed CD63, CD81 and TSG101. (2) Overexpression of miR-29b-3p could down-regulate the mRNA and protein levels of TGF- β 1 and Smad3, while silencing miR-29b-3p could up-regulate the mRNA and protein levels of TGF- β 1/Smad3. (3) Dual-luciferase reporter gene system showed that miR-29b-3p had significant differences in the activities of downstream target genes TGF- β 1 and Smad3. (4) The osteoarthritis models of rats were successfully established by injection of type II collagenase into the knee joint. H19-Exos significantly promoted cartilage regeneration. The specific TGF- β 1/Smad3 inhibitor SB-431542 could block the biological effect of H19-Exos on cartilage regeneration *in vitro* and *in vivo*. (5) This study systematically demonstrated the promotion effect of UMSCs-derived exosomes highly expressing lncRNA H19 on cartilage regeneration, and the specific mechanism is that lncRNA H19 promotes cartilage regeneration by targeting miR-29b-3p/TGF- β 1/Smad3 pathway.

Key words: osteoarthritis; mesenchymal stem cell; exosome; long non-coding RNA

Funding: Youth Program of National Natural Science Foundation of China, No. 82202679 (to YLT); General Project of Natural Science Research in Colleges and Universities in Jiangsu Province, No. 22KJB320008 (to YLT); Changzhou Applied Basic Research Program, No. CJ20220109 (to YLT); Changzhou Applied Basic Research Program, No. CJ20220070 (to WK); Changzhou Applied Basic Research Program, No. CJ20220103 (to SH)

How to cite this article: WANG XF, WANG K, SUN H, SUN XL, YAN LT. Mechanism underlying exosomal lncRNA H19 derived from umbilical cord mesenchymal stem cells promotes cartilage injury repair. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(1):20-25.

0 引言 Introduction

骨关节炎的主要特征是软骨退化、滑膜炎、软骨下骨硬化以及骨赘形成^[1-2],其典型症状包括持续性疼痛、肿胀以及关节僵硬。目前还未研发出能治愈骨关节炎的药物,大多数治疗仅能缓解疼痛症状。骨关节炎的病因复杂多变,其中主要病因是软骨损伤退变,因此逆转并恢复损伤软骨的正常生理功能是治疗骨关节炎的有效手段^[3]。近年来,间充质干细胞凭借其强大的自我更新和分化能力成为了治疗组织损伤的新兴细胞疗法。间充质干细胞发挥疗效的主要机制是通过外泌体传递多种信号分子来调控受体细胞的增殖、迁移、分化和代谢,并协调后续的再生过程^[4-5]。

课题组前期研究证实了人脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UMSCs)外泌体促进软骨损伤修复的有效作用^[6-7],并鉴定出外泌体中高表达的长链非编码RNA H19(long non-coding RNA H19, lncRNA H19)作为上游分子促进了软骨细胞的再生和修复^[8],但其下游靶分子以及相关信号通路仍不明确。lncRNAs可以发挥“分子海绵”的作用吸附某些miRNAs,而miRNA是转录后水平基因调控的主要参与者,它以负性调控方式结合到mRNA进而抑制靶基因的表达。目前,软骨细胞中已发现多种lncRNAs能发挥内源性竞争作用^[9-10]。课题组前期已经发现在软骨细胞中lncRNA H19可以吸附miR-29b-3p从而促进软骨细胞的增殖^[11],并且有其他文献报道在其他细胞系中miR-29b-3p可以直接抑制TGF- β 1/Smad3的表达,从而在lncRNA H19和TGF- β 1/Smad3通路间形成新的调控反馈回路^[12-13]。该研究旨在明确UMSCs外泌体中lncRNA H19通过miR-29b-3p/TGF- β 1/Smad3轴促进软骨细胞增殖和再生的分子机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞实验和体内动物实验,两组数据采用非配对t检验,多组数据采用单因素方差分析比较差异的显著性。

1.2 时间及地点 实验于2022年1-10月在贵州医科大学天

然产物化学重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 UMSCs 购买于北纳生物(lot.340316),人软骨细胞购买于北纳生物(lot.339995)。

1.3.2 实验试剂和仪器 DMEM/F12培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素溶液(美国Gibco公司);单克隆抗体CD63、CD81、TSG101和Calnexin(美国Abcam公司);单克隆抗体GAPDH、TGF- β 1、Smad3、COL2A1、Aggrecan、Cyclin D1、PCNA(美国Abcam公司);II型胶原酶(中国索莱宝);反转录试剂盒(日本TakaRa公司);Real-time PCR试剂盒(日本TakaRa公司);Trizol、异丙醇、DEPC、氯仿(上海生工);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗人IgG(中国ABClonal);免疫荧光二抗(美国Proteintech公司);苏木精-伊红染色试剂盒(武汉赛维尔公司);甲苯胺蓝染色试剂盒(上海生工);miR-29b-3p mimic和miR-29b-3p inhibitor(锐博生物,miR10000100-1-5);细胞孵育箱(美国Thermo公司);低温高速离心机(美国Eppendorf公司);PCR仪(美国Eppendorf公司);荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯);台式高速离心机(美国Beckman公司);纳米颗粒跟踪分析仪Zetaview(德国Particle metrix公司);切片机(上海莱卡仪器公司)。

1.3.3 实验动物 SD大鼠18只,6周龄,雌性,SPF级,体质量200 g左右,随机分为3组,每组6只,由贵州医科大学动物中心提供,生产许可证号:SCXK(黔)2018-0001;使用许可证号:SYXK(黔)2018-0001。

1.4 实验方法

1.4.1 构建过表达lncRNA H19的稳定UMSCs 根据NCBI数据库,设计lncRNA H19过表达序列,构建真核表达质粒;将待转染UMSCs(1×10^5 个)接种至6孔板,至细胞融合度为80%左右时进行转染,将含体积分数为10%胎牛血清的低糖完全培养基替换为含有lncRNA H19慢病毒的培养基,其中polybrene质量浓度为6 μ g/mL,12 h后更换新鲜含体积分数

为 10% 胎牛血清的低糖完全培养基, 48 h 后更换为最低筛选浓度嘌呤霉素的培养基筛选稳定细胞。

1.4.2 外泌体的分离 收集过表达 LncRNA H19 的 UMSCs 和普通 UMSCs 的培养上清, 4 °C 条件下 2 000×g 离心 30 min 收集上清, 20 000×g 离心 60 min 收集上清, 100 000×g 离心 60 min, 收集超离管底部沉淀至 EP 管中, 滴入数滴 PBS 将外泌体完全稀释, 100 000×g 离心 60 min, 最后将收集的沉淀以 100 μL PBS 重悬, 分装, -80 °C 保存, 即为 H19-Exos 和 UMSCs-Exos。

1.4.3 外泌体的鉴定 将外泌体样品用 PBS 稀释至 10⁷ particles/mL 后加入 ZetaView 仪器的样品孔内, 观察粒子的布朗运动。将 1 滴外泌体样品滴加到铜网上, 室温静置晾干后滴加 3% 磷钨酸溶液染色 2 h, 然后用 2% 醋酸铀负染 30 s, 将铜网置于透射电镜下观察并拍照。通过 BCA 方法蛋白定量后利用 Western blot 检测外泌体相关蛋白 TSG101、CD63、CD81 以及阴性蛋白 Calnexin 的表达量。

1.4.4 软骨细胞摄取外泌体的示踪 利用 Exo-Green 荧光示踪技术标记 UMSCs-Exos。首先用 500 μL 的 PBS 重悬外泌体, 加入 60 μL Exo-Green 混匀后在 37 °C 培养箱孵育 10 min, 加入 90 μL ExoQuick-TC 试剂终止反应; 置于冰上反应 30 min 后 12 000 r/min 离心留沉淀, 用 500 μL PBS 重悬后待用。将 Exo-Green 荧光标记的外泌体加入体外培养的软骨细胞中, 通过显微荧光成像系统观察软骨细胞对外泌体的摄取及摄取后的亚细胞定位。

1.4.5 双荧光素酶报告基因 运用基因工程方法, 预测 miR-29b-3p 和其靶通路 TGF-β1/Smad3 启动子的结合位点, 构建野生型 (TGF-β1 Wt、Smad3 Wt) 和突变型 (TGF-β1 Mut、Smad3 Mut) 各 2 种质粒, 将 miR-29b-3p mimics 和 miR-NC 分别与上述 2 种质粒以及海肾荧光素酶质粒 (psiCHECK2) 转入 293T 细胞内孵育 72 h, 采用双荧光报告载体分析系统检测萤火虫与海肾素荧光的比值。

1.4.6 细胞总 RNA 的提取 将软骨细胞分为对照组、H19-Exos 组和 H19-Exos+ 抑制剂组, 以每孔 1×10⁵ 个加入到 6 孔板中, 采用 10 ng/mL 白细胞介素 1β 预处理软骨细胞 24 h 模拟体外骨关节炎环境, 预处理完毕后加入 H19-Exos 和 TGF-β/Smad 通路抑制剂 SB-431542, 其中 H19-Exos (1×10⁸ particles/mL) 加入 3 mL TGF-β/Smad 通路抑制剂 SB-431542 (10 μmol/L) 加入 0.5 mL; 每 3 d 换液 1 次, 培养 6 d 后每孔加入 500 μL Trizol 充分摇匀, 用枪头将消化好的细胞裂解液转移到离心管中, 加入等体积 Trizol 后混匀, 室温下放置 5 min; 加入 200 μL 氯仿, 剧烈振荡 15 s, 室温下静置 5 min; 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min; 转移上清液至一新的离心管中, 加等体积异丙醇, 轻轻混匀, 静置 10 min; 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min; 弃上清液, 加 1 mL 无水乙醇, 轻弹管底充分洗涤; 4 °C 下 7 500 r/min 离心 5 min; 弃上清, 待 RNA 干燥后, 加入 20 μL 焦碳酸二乙酯水溶解沉淀, 测定浓度, 保存于 -80 °C。

1.4.7 实时荧光定量 PCR 根据 PrimeScript™ RT-PCR kit 说明书将 RNA 反转录合成 cDNA, 按照以下反应条件进行实时荧光定量 PCR 反应: 95 °C 3 min; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 以 GAPDH 作为内参, 根据 2^{-ΔΔCT} 值计算各基因表达情况。实验中各引物序列见表 1。

表 1 | 各基因引物序列
Table 1 | Primer sequences of each gene

基因	引物	序列 (5'-3')
LncRNA H19	Forward	GCA AGA AGC GGG TCT GTT T
	Reverse	GCT GGG TAG CAC CAT TTC TT
Aggrecan	Forward	ACC AGA CTG TCA GAT ACC CC
	Reverse	CAT AAA AGA CCT CAC CCT CC
COL2A1	Forward	ATT GCC TAT CTG GAC GAA GC
	Reverse	GCA GTG TAC GTG AAC CTG CT
PCNA	Forward	GCC GAG AAG CTG TGC ATC TA
	Reverse	GCA CTC TCC GAA GGG GAT CT
Cyclin D1	Forward	GCC GAG AAG CTG TGC ATC TA
	Reverse	GAA ATC GTG CGG GGT CAT TG
TGF-β1	Forward	CAG CTC CAC GGA GAA GAA CTG
	Reverse	GAT CCA CTT CCA GCC GAG GT
Smad3	Forward	GCA CCC TGT CCA GTC TAA CC
	Reverse	AGG CAG CAC CCA TAA CTG AC
GAPDH	Forward	ATC TGA GCA GGT TGC TCC AC
	Reverse	GGC CCT TTA CAC TGT GAG CC

1.4.8 siRNA 转染 将待转染软骨细胞接种至 6 孔板, 每孔 1×10⁵ 个, 细胞密度达 50%, 取 30 μL 稀释液和 1.25 μL 20 μmol/L miRNA mimic 或 inhibitor, 然后加入 3 μL ribo-FECTTMCP Reagent 室温孵育 15 min 形成转染复合物; 将转染复合物加入含体积分数为 10% 胎牛血清的低糖完全培养基 (无双抗) 与软骨细胞共培养 72 h 后换成常规含体积分数为 10% 胎牛血清的低糖培养基。转染完成后, 通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测 miR-29b-3p 的靶基因 TGF-β1、Smad3 的蛋白和 mRNA 水平变化。

1.4.9 大鼠骨关节炎模型的构建 该动物实验经过贵州省骨科医院医学伦理委员会批准。6 周龄雌性 SD 大鼠 18 只, 随机分为 3 组: PBS 组, H19-Exos 组, H19-Exos+ 抑制剂组, 每组 6 只。用 3% 戊巴比妥钠 (1 mg/kg) 腹腔麻醉大鼠, 关节腔内注射 0.5 mg II 型胶原酶构建大鼠骨关节炎模型。术后 1 周开始在各组大鼠关节腔内注射 10 μL 的 PBS、H19-Exos (1×10¹⁰ particles/mL)、H19-Exos+TGF-β/Smad 通路抑制剂 SB-431542 (1 μmol/L, 100 μL)。共注射 4 次, 每周 1 次, 在第 4 次注射后 1 周处死大鼠, 收集膝关节组织进行下一步实验。

1.4.10 组织学染色 膝关节标本经 100 g/L 多聚甲醛固定 48 h 后, 浸入 EDTA 慢脱液缓慢摇晃, 每 3 d 换液 1 次, 共脱钙 4 周; 将标本梯度脱水, 用石蜡包埋并切片, 行苏木精-伊红、甲苯胺蓝染色, 采用 II 型胶原抗体进行免疫组化染色; 由病理科医师对骨关节炎严重程度进行 OARS 评分 [14]。

1.5 主要观察指标 ①外泌体的鉴定结果; ② miR-29b-3p 对 TGF-β1 和 Smad3 的调控作用; ③抑制剂 SB-431542 对 H19-Exos 的阻断作用; ④ H19-Exos 对大鼠骨关节炎的治疗作用。

1.6 统计学分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 19.0 软件进行处理。采用非配对 t 检验比较两组数据间的差异, 采用

单因素方差分析比较多组数据间的差异。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过邱冰专家审核。

2 结果 Results

2.1 UMSCs 外泌体的提取和鉴定 通过慢病毒转染建立了高表达 LncRNA H19 的 UMSCs 系 (H19-UMSCs), 与未转染 UMSCs 在相同条件下培养并留取培养上清, 通过超速离心法成功提取其中的外泌体 (UMSCs-Exos 和 H19-Exos)。2 种外泌体在透射电镜下均呈现出典型的一侧凹陷半球形, 见图 1A。通过 Zetaview 仪器分析得出 2 种外泌体直径约 130 nm, 见图 1B。Western blot 检测 2 种外泌体表达特征蛋白 CD63、CD81 和 TSG1010, 不表达 Calnexin, 见图 1C。PCR 结果证明 H19-Exos 中的 LncRNA H19 水平远远超过对照组, 见图 1D, 这表明 UMSCs 中高表达的 LncRNA H19 可以在外泌体中富集并被分泌。通过 PKH67 绿色荧光染料标记外泌体后与软骨细胞共培养, 可以观察到软骨细胞中出现绿色荧光, 这表明软骨细胞可以成功摄取 2 种外泌体, 见图 1E。上述结果表明 H19-Exos 拥有和普通 Exos 一样的典型外泌体特征, 并且其中携带丰富的 LncRNA H19 分子, 可被软骨细胞摄取。

2.2 miR-29b-3p 对软骨细胞 TGF- β 1/Smad3 的调控作用 在课题组前期发表的成果中, 已经证明了外泌体 LncRNA H19 可以通过吸附 miR-29b-3p 对软骨细胞的下游通路产生作用, 因此该研究的重点为验证 miR-29b-3p 是通过靶向 TGF- β 1/Smad3 通路发挥下游作用。首先通过生物学信息软件预测发现 TGF- β 1 的编码区有 miR-29b-3p 的结合位点, 并且 TGF- β 1 的下游信号通路基因 Smad3 的 3'UTR 区域也有 miR-29b-3p 的结合位点, 见图 2A; 通过 Western blot 检测到在软骨细胞中过表达 miR-29b-3p 可以同时下调 TGF- β 1、Smad3 的 mRNA 和蛋白水平, 而沉默 miR-29b-3p 后, TGF- β 1、Smad3 的 mRNA 和蛋白水平上调, 见图 2B; 双荧光素酶报告基因系统检测发现 miR-29b-3p 对下游靶基因 TGF- β 1 和 Smad3 活性影响有显著差异, 见图 2C。上述结果表明软骨细胞中 miR-29b-3p 可以靶向抑制 TGF- β 1/Smad3 通路的表达。

2.3 TGF- β 1/Smad3 通路抑制剂阻断了 H19-Exos 对软骨再生的生物学作用 通过特异性的小分子抑制剂 SB-431542 阻断软骨细胞的 TGF- β 1/Smad3 通路, Western blot 检测证明了该抑制剂的作用, 见图 3A。通过 Western blot 和 PCR 检测了与软骨增殖和再生的相关基因, 发现 H19-Exos 组与其他组有显著差异, 见图 3B, C, 表明高表达 H19 的外泌体对软骨细胞有显著的生物学作用, H19-Exos+ 抑制剂组与 H19-Exos 组比较差异有显著性意义。上述结果表明 TGF- β 1/Smad3 通路被阻断后, H19 在软骨细胞中的下游通路被阻断, 影响了其促进软骨再生的作用, 反向验证了 H19-Exos 是通过 TGF- β 1/Smad3 通路促进软骨细胞的增殖和再生。

2.4 H19-Exos 对大鼠骨关节炎的治疗作用 如图 4A 所示, 大体观察发现骨关节炎造模组在 4 周后发生明显的骨关节炎

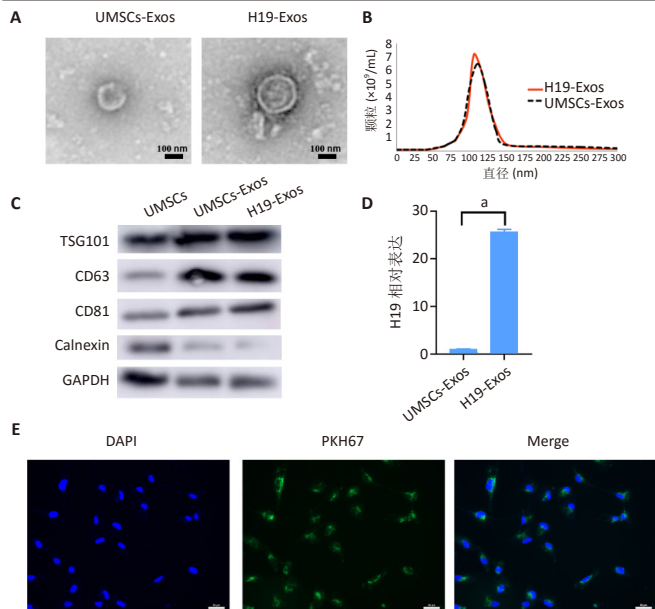
样表现, 以软骨剥脱、色泽变暗以及软骨下骨暴露为主要特征; H19-Exos 组的大体表现接近正常软骨, 仅有小部分软骨损伤; H19-Exos+ 抑制剂 SB-431542 组的严重程度介于前两组之间, 主要变现为软骨菲薄, 部分关节面损伤。如图 4B 所示, 苏木精-伊红染色可见骨关节炎组软骨细胞排列紊乱, 主要为纤维组织; H19-Exos 组软骨细胞排列整齐均匀; H19-Exos+SB-431542 组细胞排列较 H19-Exos 组紊乱, 且细胞数量较少。甲苯胺蓝和 COL2A1 染色可见 H19-Exos 组软骨细胞中多糖物质和 II 型胶原含量最高, H19-Exos+SB-431542 组软骨细胞中多糖物质和 II 型胶原含量高于骨关节炎组, 表明 SB-431542 部分阻断了 H19-Exos 对软骨损伤修复的作用。用 OARS1 评分将上述病理染色结果作半定量分析发现 H19-Exos 组的骨关节炎表现最轻, 与组织学染色结果一致, 见图 4C。

3 讨论 Discussion

关节软骨受到损伤时, 其自我再生修复能力往往有限^[15]。关节软骨损伤是骨关节炎的高危因素, 因此若能修复软骨损伤对于阻止或逆转骨关节炎有重要意义^[16]。对于早期骨关节炎的治疗, 临床治疗包括非类固醇抗炎药、透明质酸、镇痛药以及重组人成纤维细胞生长因子^[17-18], 这些治疗只能缓解症状, 减轻疼痛和肿胀, 不具备修复受损软骨的组织形态和恢复软骨代谢平衡的能力^[19]。晚期骨关节炎的治疗方法包括截骨、关节镜手术和关节置换, 然而费用高昂、材料寿命、二次手术等限制了这些手术方案的有效性^[20]。迄今为止, 仍没有根治骨关节炎的治疗方法, 因此迫切需要研发新的药物。

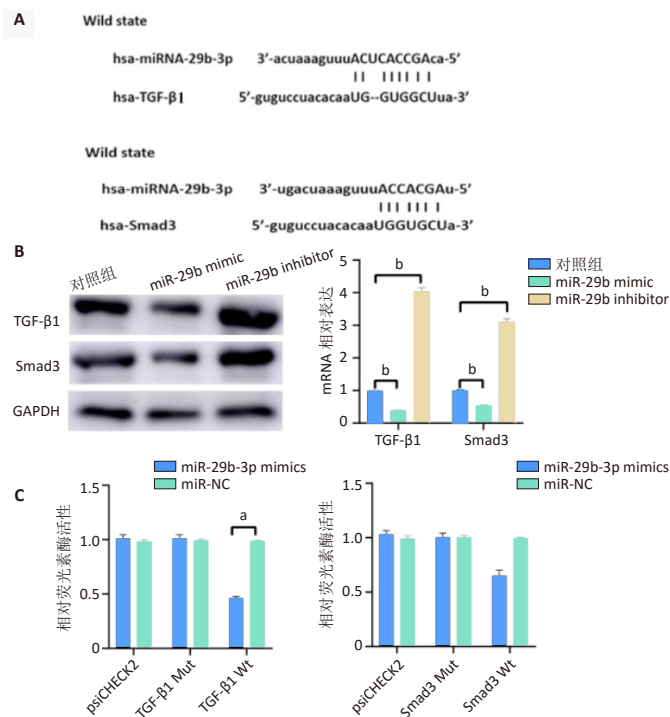
近年来, 间充质干细胞作为软骨组织工程的种子细胞, 有望成为一种治疗软骨病变和骨关节炎的新兴细胞疗法^[21-23]。2016 年 ZHANG 等^[24]首次提出间充质干细胞主要通过其外泌体参与了软骨损伤的修复治疗。采取外泌体替代间充质干细胞疗法是目前研究的趋势之一, 外泌体具有一系列的优势, 如体积小无肺栓塞风险、无代谢功能避免形成肿瘤等^[25-27]。课题组前期已经发现 UMSCs 外泌体可以促进软骨细胞的增殖和基质分泌, 并有效修复了动物膝关节软骨缺损模型, 但是 UMSCs 外泌体中发挥作用的分子物质仍然未知^[7]。进一步实验发现 UMSCs 外泌体中高表达的 LncRNA H19 作为上游分子促进了软骨细胞的再生和修复, 但其下游靶分子以及相关信号通路仍不明确^[8]。

目前, 软骨细胞中已发现多种 LncRNAs 能发挥内源性竞争作用。LncRNA H19 是一段母源表达的高度保守序列, 长度 2.3 kb, 主要参与细胞增殖分化、胚胎发育和肿瘤生长。H19 在正常组织中低表达, 但是在软骨细胞中高表达, H19 的缺失会导致发育不良性髋关节脱位^[28-29]。LncRNAs 可以发挥“分子海绵”的作用, 吸附某些 miRNAs, 而 miRNA 是转录后水平基因调控的主要参与者, 它以负性调控方式结合到 mRNA 进而抑制靶基因的表达。NING 等^[30]已经发现 LncRNA H19 可与 let-7 结合, 促进软骨细胞增殖。多种 miRNAs 均参



图注：图 A 为透射电镜下的外泌体形态（标尺：100 nm）；B 为 2 种外泌体的直径分布和浓度大小；C 为 Western blot 检测外泌体表面蛋白；D 为 2 种外泌体中 LncRNA H19 水平对比（ $^aP < 0.01$ ）；E 为软骨细胞摄取外泌体荧光图（标尺：50 nm）。UMSCs：脐带间充质干细胞；UMSCs-Exos：脐带间充质干细胞来源外泌体；H19-Exos：高表达 LncRNA H19 脐带间充质干细胞来源外泌体

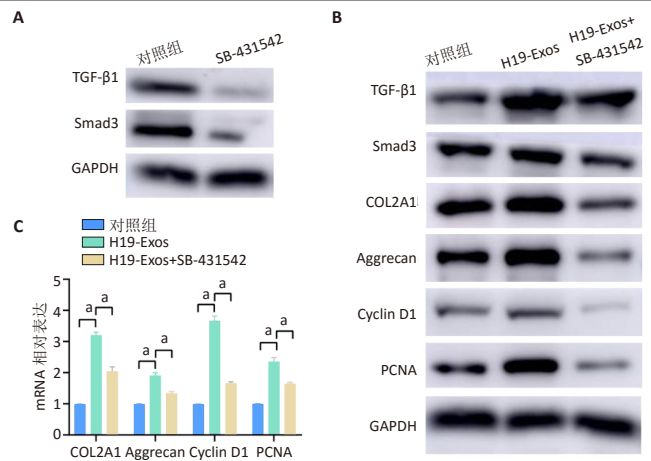
图 1 | 外泌体的鉴定结果
Figure 1 | Identification of exosomes



图注：图 A 为生物信息学预测 TGF-β1、Smad3 与 miR-29b-3p 的结合位点；B 为 miR-29b-3p 过表达可减少 TGF-β1、Smad3 基因的表达，抑制 miR-29b-3p 表达可增加 TGF-β1、Smad3 基因的表达；C 为 TGF-β1/Smad3 与 miR-29b-3p 荧光素酶活性检测。 $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$

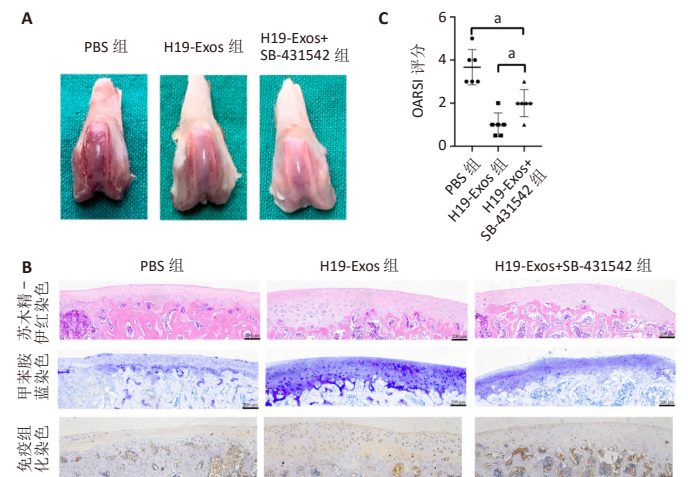
图 2 | miR-29b-3p 对软骨细胞 TGF-β1/Smad3 的调控作用
Figure 2 | Regulation of miR-29b-3p on TGF-β1/Smad3 in chondrocytes

与软骨的损伤与修复^[31]。CHEN 等^[32]发现软骨细胞中过表达 miR-29b-3p 会显著抑制增殖、诱导凋亡，并抑制细胞周期从 G₀/G₁ 进入 S 期。目前有多项研究表明 LncRNA H19 可以作



图注：图 A 为 SB-431542 阻断了软骨细胞中的 TGF-β1/Smad3 通路；B、C 为不同处理情况下软骨细胞增殖和再生相关基因的蛋白和 mRNA 表达。 $^aP < 0.05$ 。H19-Exos：高表达 LncRNA H19 脐带间充质干细胞来源外泌体

图 3 | TGF-β/Smad 通路抑制剂 SB-431542 阻断了 H19-Exos 对软骨再生的生物学作用
Figure 3 | TGF-β/Smad pathway inhibitor SB-431542 blocks the biological effect of LncRNA H19 umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes (H19-Exos) on cartilage regeneration



图注：图 A 为经过不同外泌体处理 4 周后骨关节炎大鼠膝关节大体观察；B 为各组苏木精-伊红染色、甲苯胺蓝和 COL2A1 染色表现（标尺 200 μm）；C 为病理染色结果半定量 OARSI 评分。 $^aP < 0.05$

图 4 | 高表达 LncRNA H19 的脐带间充质干细胞来源外泌体 (H19-Exos) 对大鼠骨关节炎的治疗作用

Figure 4 | Therapeutic effect of highly expressed LncRNA H19 umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes (H19-Exos) on osteoarthritis in rats

为海绵吸附 miR-29b-3p 发挥生物学功能^[33-36]。上述研究表明在软骨细胞中 LncRNA H19 可能通过吸附 miR-29b-3p 发挥软骨损伤修复的作用。

课题组前期实验证实了 UMSCs 外泌体中 LncRNA H19 可以竞争性结合软骨细胞中的 miR-29b-3p 来发挥生物学作用；当软骨细胞转染 miR-29b-3p mimics 后，LncRNA H19 的促软骨再生作用被抵消。该研究对 miR-29b-3p 的下游通路进一步解析，发现 TGF-β1 的编码区有 miR-29b-3p 的结合位点，并且 TGF-β1 的下游信号通路基因 Smad3 的 3'UTR 区域也有 miR-29b-3p 的结合位点；过表达 miR-29b-3p 可以同时下调 TGF-β1、Smad3 的 mRNA 和蛋白水平，而沉默 miR-29b-

3p 后, TGF- β 1、Smad3 的 mRNA 和蛋白水平上调; 双荧光素酶报告基因实验验证了 miR-29b-3p 对下游靶基因 TGF- β 1、Smad3 活性影响; 体内实验进一步验证了 H19-Exos 是通过激活 TGF- β 1/Smad3 通路发挥软骨损伤的修复作用, 见图 5。

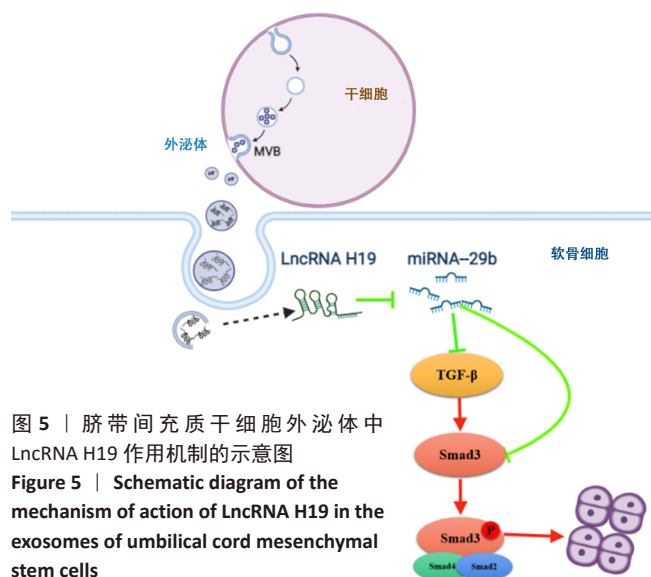


图 5 | 脐带间充质干细胞外泌体中 LncRNA H19 作用机制的示意图

Figure 5 | Schematic diagram of the mechanism of action of LncRNA H19 in the exosomes of umbilical cord mesenchymal stem cells

综上所述, 该研究通过体内和体外实验系统论证高表达 LncRNA H19 的 UMSCs 外泌体对软骨细胞再生修复的促进作用, 并详细解析 LncRNA H19 通过内源竞争 RNA 机制激活 TGF- β 1/Smad3 通路促进软骨再生的具体分子机制。这将为发现一个新的治疗靶点提供可能的研究基础, 为干细胞外泌体在软骨损伤中的运用提供可能的理论基础, 对于软骨修复的基础和临床研究具有重要意义。

作者贡献: 王宪峰负责实验实施、论文撰写, 王锐负责实验数据分析处理, 孙晗负责细胞培养、指标检测, 孙晓亮负责数据和文章的校对, 言力轲负责实验设计。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- [1] VINA ER, KWOH CK. Epidemiology of osteoarthritis: literature update. *Curr Opin Rheumatol*. 2018;30(2):160-167.
- [2] LOESER RF, GOLDRING SR, SCANZELLO CR, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1697-1707.
- [3] GAO SG, LI KH, ZENG KB, et al. Elevated osteopontin level of synovial fluid and articular cartilage is associated with disease severity in knee osteoarthritis patients. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):82-87.
- [4] MELDOLESI J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol*. 2018;28(8):R435-R444.
- [5] 王新伟, 赵英杰, 常艳, 等. 间充质干细胞治疗骨关节炎软骨损伤: 作用、应用与问题 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(31):5053-5058.
- [6] 王宪峰, 欧昕, 邓必勇. 不同来源间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎疗效的比较 [J]. *中国组织工程研究*, 2022,26(25):3980-3985.

- [7] YAN L, WU X. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity. *Cell Biol Toxicol*. 2020;36(2):165-178.
- [8] YAN L, LIU G, WU X. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells in mechanical environment show improved osteochondral activity via upregulation of LncRNA H19. *J Orthop Translat*. 2021;26:111.
- [9] WU F, AN Y, ZHOU L, et al. Whole-transcriptome sequencing and ceRNA interaction network of temporomandibular joint osteoarthritis. *Front Genet*. 2022;13:962574.
- [10] CHEN H, CHEN L. An integrated analysis of the competing endogenous RNA network and co-expression network revealed seven hub long non-coding RNAs in osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 2020;9(3):90-98.
- [11] YAN L, LIU G, WU X. The umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal lncRNA H19 improves osteochondral activity through miR-29b-3p/FoxO3 axis. *Clin Transl Med*. 2021;11(1):e255.
- [12] LIU YL, YANG WH, CHEN BY, et al. miR-29b suppresses proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma ascites H22 cells via regulating TGF- β 1 and p53 signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2021;48(2):157.
- [13] GUO J, LIN Q, SHAO Y, et al. miR-29b promotes skin wound healing and reduces excessive scar formation by inhibition of the TGF- β 1/Smad/CTGF signaling pathway. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017;95(4):437-442.
- [14] PRITZKER KP, GAY S, JIMENEZ SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(1):13-29.
- [15] SACITHARAN PK. Ageing and Osteoarthritis. *Subcell Biochem*. 2019;91:123-159.
- [16] FUJII Y, LIU L, YAGASAKI L, et al. Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11):6316.
- [17] 王琦, 易诚青. 膝关节骨关节炎治疗的研究进展 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2022, 49(5):765-770.
- [18] HUSSAIN SM, NEILLY DW, BALIGA S, et al. Knee osteoarthritis: a review of management options. *Scott Med J*. 2016;61(1):7-16.
- [19] KAN HS, CHAN PK, CHIU KY, et al. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis. *Hong Kong Med J*. 2019;25(2):127-133.
- [20] MAKRIIS EA, GOMOLL AH, MALIZOS KN, et al. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):21-34.
- [21] LEE KB, HUI JH, SONG IC, et al. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem Cells*. 2007;25(11):2964-2971.
- [22] NEJADNIK H, HUI JH, FENG CHOONG EP, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med*. 2010;38(6):1110-1116.
- [23] BACAKOVA L, ZARUBOVA J, TRAVNICKOVA M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells- a review. *Biotechnol Adv*. 2018;36(4):1111-1126.
- [24] ZHANG S, CHU WC, LAI RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(12):2135-2140.
- [25] 凌华军, 王其友, 林伟文, 等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体保护软骨细胞延缓骨关节炎的发生发展 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(31):4964-4969.
- [26] ZHANG Y, BI J, HUANG J, et al. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6917-6934.
- [27] BATRAKOVA EV, KIM MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release*. 2015;219:396-405.
- [28] DUDEK KA, LAFONT JE, MARTINEZ-SANCHEZ A, et al. Type II collagen expression is regulated by tissue-specific miR-675 in human articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24381-24387.
- [29] WANG CL, ZUO B, LI D, et al. The long noncoding RNA H19 attenuates force-driven cartilage degeneration via miR-483-5p/Dusp5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;529(2):210-217.
- [30] NING B, JIN R, WANG D, et al. The H19/let-7 feedback loop contributes to developmental dysplasia and dislocation of the hip. *Physiol Res*. 2019;68(2):275-284.
- [31] 王伟康, 刘晓冬, 周长林, 等. MiRNAs 在骨关节炎发生发展中的调控作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(35):5709-5715.
- [32] CHEN L, LI Q, WANG J, et al. MiR-29b-3p promotes chondrocyte apoptosis and facilitates the occurrence and development of osteoarthritis by targeting PGRN. *J Cell Mol Med*. 2017;21(12):3347-3359.
- [33] LV M, ZHONG Z, HUANG M, et al. lncRNA H19 regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(10):1887-1899.
- [34] DING D, LI C, ZHAO T, et al. LncRNA H19/miR-29b-3p/PGRN Axis Promoted Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer Cells by Acting on Wnt Signaling. *Mol Cells*. 2018;41(5):423-435.
- [35] TIAN X, ZUO X, HOU M, et al. LncRNA-H19 regulates chemoresistance to carboplatin in epithelial ovarian cancer through microRNA-29b-3p and STAT3. *J Cancer*. 2021;12(19):5712-5722.
- [36] CAO B, DAI X. Platelet lysate induces chondrogenic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by regulating the lncRNA H19/miR-29b-3p/SOX9 axis. *FEBS Open Bio*. 2020;10(12):2656-2665.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)