

调整细胞培养条件提高间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎的潜能

钱燕, 刘启颂

<https://doi.org/10.12307/2024.745>

投稿日期: 2023-10-30

采用日期: 2023-12-08

修回日期: 2023-12-26

在线日期: 2024-01-22

中图分类号:

R459.9; R363; R364

文章编号:

2095-4344(2025)01-00164-11

文献标识码: A

文章快速阅读: 细胞培养条件对外泌体活性的影响



文题释义:

骨关节炎: 是一种慢性关节疾病, 主要病理特征是关节软骨破坏、骨质增生以及关节边缘的骨质增生(骨刺)。在全球范围内, 骨关节炎是最常见的关节疾病之一, 是关节疼痛和残疾的主要原因, 然而现有临床策略仅能缓解骨关节炎的症状, 不能实现疾病的修正治疗。

间充质干细胞外泌体: 具有治疗骨关节炎的潜能, 其能减轻炎症反应, 促进软骨细胞的增殖和软骨基质的合成, 抑制软骨细胞的凋亡和软骨基质的降解, 实现软骨组织的修复和再生, 具有临床转化潜能。

摘要

背景: 间充质干细胞外泌体有望发展成为治疗骨关节炎的无细胞疗法, 而通过调整细胞培养条件, 可以进一步提高其治疗活性和临床转化潜能。

目的: 综述分析细胞培养条件对外泌体活性的影响, 分析其临床转化潜力。

方法: 查阅国内外有关骨关节炎/软骨损伤修复与间充质干细胞来源外泌体的文献。检索词分别为“外泌体, 间充质干细胞, 骨关节炎, 软骨修复”和“exosomes, extracellular vesicles, mesenchymal stem cells, osteoarthritis, cartilage repair”, 检索数据库分别为PubMed和中国知网数据库, 检索时限为2010-2023年, 最后纳入100篇文献进行总结和分析。

结果与结论: ①在间充质干细胞的培养过程中, 提供有利于软骨细胞生长的物理环境, 或添加软骨保护小分子、成软骨诱导因子和炎症因子等刺激细胞, 可以进一步提高间充质干细胞外泌体在维持软骨细胞表型、促进软骨再生和免疫抑制等方面的调控活性; 因此, 其他具有相似特征的物理或化学因素, 也有可能提升间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎的疗效。②低氧诱导、脉冲电磁场刺激、生物反应器及软骨保护分子(如人甲状旁腺素1-34)刺激等细胞培养方案具有安全、可规模化生产等优点, 可用于制备临床用途的、疗效好的间充质干细胞外泌体。③间充质干细胞外泌体有望实现骨关节炎的修正治疗, 通过调整细胞培养方案提升治疗活性, 可进一步提高其临床转化的可行性。

关键词: 间充质干细胞; 外泌体; 骨关节炎; 软骨修复; 细胞培养; 低氧诱导; 预处理; 三维培养; 软骨保护因子; 炎症因子

Enhancing potential of mesenchymal stem cell exosomes for osteoarthritis by adjusting cell culture condition

Qian Yan, Liu Qisong

National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518112, Guangdong Province, China

Qian Yan, Master, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518112, Guangdong Province, China

Corresponding author: Liu Qisong, MD, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Shenzhen Third People's Hospital, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518112, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Exosomes derived from mesenchymal stem cells are prospective cell-free alternatives for treating osteoarthritis. Their therapeutic activity and clinical transformation potential can be further improved by adjusting cell culture condition.

OBJECTIVE: To review the effect of cell culture conditions on exosome activity and to analyze its clinical transformation potential.

METHODS: Articles concerning osteoarthritis/cartilage repair and mesenchymal stem cell-derived exosomes were retrieved on CNKI and PubMed using "exosomes, mesenchymal stem cells, osteoarthritis or cartilage repair" as Chinese search terms and "exosomes or extracellular vesicles, mesenchymal stem cells, osteoarthritis or cartilage repair" as English search terms. The search time was from 2010 to 2023. Finally, 100 articles were included for summary and analysis.

深圳国家感染性疾病临床医学研究中心, 南方科技大学深圳市第三人民医院, 广东省深圳市 518112

第一作者: 钱燕, 女, 1989年生, 江苏省南京市人, 汉族, 2015年华中农业大学毕业, 硕士, 主要从事科研以及样本库管理工作。

通讯作者: 刘启颂, 博士, 深圳国家感染性疾病临床医学研究中心, 南方科技大学深圳市第三人民医院, 广东省深圳市 518112

<https://orcid.org/0000-0003-3379-5308> (刘启颂)

基金资助: 深圳市科创委基础研究专项(自然科学基金)(JCY20210324113401003), 项目负责人: 刘启颂

引用本文: 钱燕, 刘启颂. 调整细胞培养条件提高间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎的潜能 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(1):164-174.



RESULTS AND CONCLUSION: (1) During cell culture, providing a physical environment favorable for chondrocyte growth or adding chondroprotective small molecules, chondrogenic factors, or inflammatory factors, can further improve the regulatory activity of exosomes secreted by mesenchymal stem cells in maintaining chondrocyte phenotype, promoting cartilage regeneration, and immunosuppression. Therefore, other physical or chemical factors with similar characteristics may also improve the effects of exosomes secreted by mesenchymal stem cells for treating osteoarthritis. (2) Some treatments during cell culture, such as hypoxia induction, pulsed electromagnetic field stimulation, bioreactor, and chondroprotective molecule (e.g., human parathyroid hormone 1-34) stimulation are safe and scalable, which allows for the production of clinical-grade exosomes secreted by mesenchymal stem cells for osteoarthritis treatment. (3) Mesenchymal stem cell exosomes are expected to achieve modified treatment of osteoarthritis, and the feasibility of clinical transformation can be further improved by adjusting the cell culture regimen to enhance the therapeutic activity.
Key words: mesenchymal stem cell; exosome; osteoarthritis; cartilage repair; cell culture; hypoxia induction; pretreatment; three-dimensional culture; chondroprotective molecule; inflammatory factor

Funding: Shenzhen Science and Technology Plan Project, No. JCYJ20210324113401003 (to LQS)
How to cite this article: QIAN Y, LIU QS. Enhancing potential of mesenchymal stem cell exosomes for osteoarthritis by adjusting cell culture condition. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2025;29(1):164-174.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种慢性退行性疾病，是关节疼痛和残疾的主要原因，严重影响患者的生活质量。目前临床常用的传统骨关节炎治疗药物，如非类固醇抗炎药等，仅能控制症状和延缓疼痛，无法阻止或逆转骨关节炎的发展。而晚期骨关节炎患者可能需要进行人工关节置换和截骨手术来缓解疼痛等症状，这些手术可能导致术后僵硬、疼痛、血栓栓塞和假体感染等严重并发症^[1]。总之，目前的临床骨关节炎治疗方案仅能缓解症状，不能有效抑制或逆转关节的退化，因此亟需开发新型的骨关节炎治疗策略。

过去几十年来，用于治疗各种疾病和促进组织再生的细胞疗法发展迅速，为治疗骨关节炎提供了新的途径。间充质干细胞是一种可自我更新的多能干细胞，可定向分化成软骨细胞实现软骨再生，而且间充质干细胞可以对关节腔微环境进行调控实现透明软骨再生，是治疗骨关节炎的理想种子细胞^[2]。而随着该研究领域的发展，更多的证据表明，间充质干细胞的调控功能在其促修复中起关键作用，间充质干细胞通过分泌旁分泌因子调节关节微环境，抑制炎症反应，促进组织再生^[3]。

在间充质干细胞的旁分泌因子中，含有蛋白质、核酸和脂质的外泌体在不同疾病中显示出应用前景。外泌体是由细胞分泌而来的微小囊泡，粒径为 30–150 nm，外泌体通过将核酸、蛋白质等从母细胞递送至受体细胞，在细胞间通讯中发挥重要作用^[4]。由间充质干细胞分泌的外泌体具有与其母细胞相似的调控功能，可通过调控免疫微环境、启动修复和再生来恢复关键细胞的功能，实现疾病的治疗，有望发展为可替代间充质干细胞疗法的无细胞治疗方案^[5]。

在 2016 年，ZHANG 等^[6]首次报道了胚胎干细胞来源的间充质干细胞分泌的外泌体具有促进软骨缺损修复的功能。之后大量研究证实多种不同组织来源的间充质干细胞分泌的外泌体均具有治疗骨关节炎的潜能^[5]。但间充质干细胞分泌的外泌体并不总是有效，如 TAO 等^[7]和 WANG 等^[8]发现，来源于滑膜的间充质干细胞分泌的外泌体虽然能提高软骨细胞的增殖和迁移，但抑制或不促进其软骨细胞外基质的合成。而同样是滑膜液来源的间充质干细胞分泌的外泌体，DUAN 等^[9]的结果表明其不仅能促进软骨细胞的增殖和迁移，也能促进细胞外基质 II 型胶原和蛋白聚糖的表达，并抑制分解代谢相关蛋白血小板反应蛋白分解整合素金属肽酶的表达。由此说明，间充质干细胞分泌的外泌体的活性在一定范围内，受细

胞培养条件、外泌体纯化方法等影响。
因此，为了最大程度地提高间充质干细胞分泌的外泌体的活性，优化其制备过程中的细胞培养和外泌体纯化储存等方案至关重要。而目前尚未有文章综述细胞培养方案对间充质干细胞分泌的外泌体活性的影响，该文将首次总结和讨论细胞培养条件对间充质干细胞分泌的外泌体活性的影响。通过总结分析发现，在间充质干细胞培养过程中，提供有利于软骨细胞生长的物理环境，或添加软骨保护小分子、成软骨诱导因子、炎症因子等刺激细胞，可以实现间充质干细胞分泌的外泌体调控功能的提升。通过理解细胞培养过程中的各种因素对间充质干细胞分泌的外泌体活性的影响，可为开发新型的细胞培养方案打下基础，同时也为临床用途间充质干细胞分泌外泌体的制备提供参考。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

- 1.1.1 检索人及检索时间 第一作者于 2023 年 8 月进行检索。
- 1.1.2 检索文献时限 2010 年 1 月至 2023 年 8 月。
- 1.1.3 检索数据库 PubMed 和中国知网数据库。
- 1.1.4 检索词 英文检索词为“exosomes, extracellular vesicles, mesenchymal stem cells, osteoarthritis, cartilage repair”；中文检索词为“外泌体，间充质干细胞，骨性关节炎，软骨修复”。
- 1.1.5 检索文献类型 研究原著和综述。
- 1.1.6 检索策略 以 PubMed 及中国知网数据库检索策略为例，见图 1。

PubMed 数据库	中国知网数据库
#1 mesenchymal stem cells [MeSH] #2 extracellular vesicles [MeSH] #3 exosomes [MeSH] #4 osteoarthritis [MeSH] #5 cartilage repair [MeSH] #6 #1 AND #2 AND #4 #7 #1 AND #2 AND #5 #8 #1 AND #3 AND #4 #9 #1 AND #3 AND #5	#1 间充质干细胞 [主题词] #2 外泌体 [主题词] #3 骨关节炎 [主题词] #4 软骨修复 [主题词] #5 #1 AND #2 AND #3 #6 #1 AND #2 AND #4

图 1 | PubMed 及中国知网数据库文献检索策略图

- 1.1.7 检索文献量 初步共检索到文献 386 篇，包括中文文献 47 篇 (中国知网数据库)，英文文献 339 篇 (PubMed 数据库)，最后纳入 100 篇，均为英文文献 (PubMed 数据库)。

1.2 入组标准

1.2.1 纳入标准 通过文章标题与摘要进行初步筛选,通过精读与泛读筛选出与研究相关的文献。

1.2.2 排除标准 研究内容与此综述无关的文章和重复性研究。

1.3 文献质量评估和数据提取 对 386 篇文献阅读标题和摘要内容进行初步筛选,最终通过全文阅读,共选择 100 篇相关文献进行总结和讨论,具体流程见图 2。

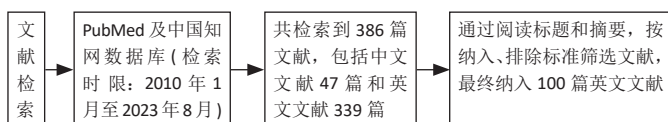


图 2 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 骨关节炎治疗中存在的 key 问题 骨关节炎是临床骨科常见疾病,其临床症状包括关节疼痛、活动障碍、炎症、关节变形、肌肉萎缩和残疾等。据统计,全球有超过 5 亿人受到骨关节炎影响,约 9.6% 的 60 岁以上男性和 18% 的 60 岁以上女性有骨关节炎症状^[10]。因此,亟需开发新型治疗方案,以满足临床骨关节炎治疗需求。

引起骨关节炎的因素很多,包括衰老、肥胖、损伤及使用过度等,这些因素导致软骨损伤、软骨下骨重塑、滑膜炎症激活、关节周围组织(结缔组织和肌肉组织)和软组织(韧带、肌腱和半月板)退化,最终引起全关节损伤和功能障碍^[11]。骨关节炎的发病分子机制涉及多种细胞和调控通路,如软骨细胞凋亡、软骨下骨的机械改变或旁分泌、炎性滑膜成纤维细胞和皮下脂肪垫分泌的细胞因子等均能造成软骨组织的退化,相关的调控分子如蛋白质水解/代谢酶、炎性细胞因子、转化生长因子 β 和 miRNA 等,都能促进骨关节炎的发展^[11]。

软骨组织退化后,软骨细胞受限于细胞外基质,不能迁移到破损位置实现修复;同时软骨组织没有血供,导致软骨细胞的增殖能力也有限。因此一旦发生退化,软骨组织无法自行修复,这导致骨关节炎成为了一种难以治愈的疾病。目前临床上没有治愈骨关节炎的方法,主要通过全关节置换、透明质酸及非类固醇抗炎药等缓解疼痛等症状。随着细胞治疗的兴起,自体软骨细胞移植和基质辅助的自体细胞移植方法被用于软骨缺损等骨关节炎的治疗,这些方法通过将体外扩增的自体软骨细胞植入关节腔内,以期通过补充软骨细胞来实现组织再生,但该方法存在软骨细胞来源有限、需二次手术、体外扩增软骨细胞易去分化等缺点,此外治疗后新生的组织是纤维软骨,不具备透明软骨的相应特征。因此,以软骨细胞为基础的治疗方案逐渐被间充质干细胞疗法所取代^[12]。

2.2 间充质干细胞治疗骨关节炎概述 间充质干细胞可以定向分化为软骨细胞,具有增殖能力强及来源广泛等优点,研究证明关节腔注射间充质干细胞可以在缺损部位再生出透明软骨,因此间充质干细胞成为了治疗骨关节炎的理想种子细胞。多种不同来源的间充质干细胞已成功进入治疗骨关节炎的临床试验阶段,随访结果显示间充质干细胞具有积极的骨关节炎治疗效果^[13]。此外,

2012 年韩国开发了以脐血间充质干细胞为种子细胞的软骨修复产品 Cartistem,该产品展现了良好的临床骨关节炎治疗效果^[14-15]。

基础研究表明,间充质干细胞在体内外特定条件下被诱导分化为软骨细胞,可在软骨缺损部位发挥修复作用,并增殖分化为功能性软骨或软骨样组织,如 XU 等^[16]通过使用外泌体靶向递送 Kartogenin 进入滑膜液间充质干细胞,促进其体内外成软骨分化,实现骨关节炎治疗。除分化潜能外,间充质干细胞的旁分泌调控功能也在软骨修复中发挥着关键的作用,如 JIA 等^[17]发现,未分化的间充质干细胞比体外预成软骨分化的间充质干细胞具有更好的透明软骨再生效果,关节腔注射的间充质干细胞通过向周围环境分泌可溶性因子和外泌体,可以调控免疫微环境,并促进细胞的增殖、迁移及合成代谢等,从而实现软骨组织的再生。

2.3 间充质干细胞分泌的外泌体治疗骨关节炎概述 间充质干细胞分泌的外泌体是间充质干细胞旁分泌调控中研究最为广泛的因子,与间充质干细胞相比,间充质干细胞分泌的外泌体更稳定,且易于制备、储存和运输,并有免疫原性低、非致瘤性、临床安全性高和伦理风险低等优势。无论是基础研究还是临床应用,间充质干细胞分泌的外泌体相对来说都更有优势。

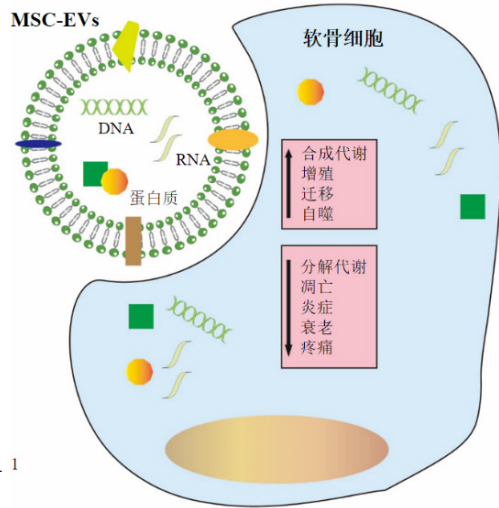
在间充质干细胞分泌的外泌体的基础研究领域中,ZHANG 等^[6]于 2016 年首次发表了胚胎干细胞来源的间充质干细胞分泌的外泌体具有促进软骨缺损修复功能的研究结果,随后,大量研究表明多种不同组织来源的间充质干细胞分泌的外泌体均具有治疗骨关节炎或软骨缺损的潜能^[18]。而一些相关的临床试验目前也在进行当中,如智利安第斯大学正在开展一项临床 I 期研究,探讨关节腔注射同种异体来源间充质干细胞对轻度到中度骨关节炎患者的治疗效果。

在关节腔中,间充质干细胞分泌的外泌体可以通过其携带的蛋白和核酸分子,实现对软骨细胞、巨噬细胞、滑膜细胞等的调控,见图 3。总之,目前在不同间充质干细胞分泌的外泌体中发现的骨关节炎治疗活性蛋白分子包括 Wnt5a/b^[7]、CD73^[19]、Annexin A1^[20]、Peroxiredoxin 6^[21]、活性 RNA 分子有 miR-136-5p^[22]、miR-125a-5p^[23]、miR-326^[24]、miR-127-3p^[25]、miR-3960^[26]、miR-100-5p^[27]、miR-376c-3p^[28]、miR-155-5p^[8]、miR-31^[29]、miR-129-5p^[30]、miR-26a-5p^[31]、miR-23a-3p^[32]、miR1208^[33]、miR-181c-5p^[34]、Let-5e-7p^[35]、LncRNA-KLF3-AS1^[36-38]、LncRNA MEG-3^[39]、LncRNA Malat-1 等^[40],这些分子可以调控软骨细胞中的重要通路,如 YAP^[7]、AKT/ERK^[19]、mTOR 等^[27],来提高软骨细胞增殖、合成、迁移及自噬水平,或降低软骨细胞凋亡、衰老及分解等,或调控巨噬细胞的炎症响应情况等,最终实现骨关节炎的抑制或逆转,除此以外,间充质干细胞分泌的外泌体也可通过调控周围感觉神经元过度兴奋来缓解骨关节炎的疼痛^[41]。

尽管间充质干细胞分泌的外泌体在骨关节炎动物模型中广泛显示出了有效性,但也有部分研究数据表明有些间充质干细胞分泌的外泌体并无骨关节炎治疗效果,

蛋白质:
Wnt5a/b
CD73
Annexin A1
Peroxiredoxin 6

RNA:
miR-136-5p
miR-125a-5p
miR-326
miR-127-3p
miR-3960
miR-100-5p
miR-376c-3p
miR-155-5p
miR-31
miR-129-5p
miR-26a-5p
miR-23a-3p
miR1208
miR-181c-5p
Let-5e-7p
LncRNA-KLF3-AS1
LncRNA MEG-3
LncRNA Malat-1



图注: 间充质干细胞分泌的外泌体进入软骨细胞后, 其携带的蛋白、核酸分子可以上调软骨细胞的合成代谢、增殖、迁移、自噬, 还可下调软骨细胞的分解代谢、凋亡、炎症、衰老和疼痛。目前在不同间充质干细胞分泌的外泌体中发现的骨关节炎治疗活性蛋白分子包括 Wnt5a/b^[7]、CD73^[19]、Annexin A1^[20]、Peroxiredoxin 6^[21], 活性 RNA 分子有 miR-136-5p^[22]、miR-125a-5p^[23]、miR-326^[24]、miR-127-3p^[25]、miR-3960^[26]、miR-100-5p^[27]、miR-376c-3p^[28]、miR-155-5p^[8]、miR-31^[29]、miR-129-5p^[30]、miR-26a-5p^[31]、miR-23a-3p^[32]、miR1208^[33]、miR-181c-5p^[34]、Let-5e-7p^[35]、LncRNA-KLF3-AS1^[36-38]、LncRNA MEG-3^[39]、LncRNA Malat-1^[40]。Wnt5a/b 为 Wnt 家族成员 5a/b; Annexin A1 为膜黏连蛋白 A1 抗体; Peroxiredoxin 6 为过氧化物酶。

图 3 | 间充质干细胞分泌的外泌体通过携带的活性蛋白、RNA 分子实现对软骨细胞的调控

或者疗效不显著。如 ARÉVALO-TURRUBIARTE 等^[42]发现来源于马滑膜液间充质干细胞分泌的外泌体并不能有效抑制软骨细胞中由白细胞介素 1 β 刺激产生的金属基质蛋白酶 13。由于外泌体是细胞的分泌产物, 其活性受细胞来源、细胞培养条件、纯化方法等影响, 而合理调整细胞培养条件能有效提高间充质干细胞分泌的外泌体治疗活性。

2.4 细胞培养条件对间充质干细胞分泌的外泌体治疗骨关节炎潜能的影响 外泌体是细胞分泌的具有膜结构的小囊泡, 其特征由母细胞的特征和状态所决定, 而细胞培养条件能够显著影响细胞的状态。因此, 在制备间充质干细胞或间充质干细胞分泌的外泌体用于骨关节炎治疗时, 可以在细胞培养过程中, 引入一些有利于软骨细胞的因素, 来提高其治疗活性。图 4 归纳了通过调整细胞培养方案提升间充质干细胞分泌的外泌体治疗骨关节炎潜能的相关研究^[43-58]。在培养基中加入一些具有关节软骨保护功能的分子, 可以提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性; 同时, 成软骨分化后的间充质干细胞也能分泌有利于软骨修复的外泌体; 此外, 在体内软骨细胞处于无血管的低氧环境中, 同时软骨细胞生长在致密的细胞外基质中, 因此支架辅助/三维培养和低氧等的培养环境有利于软骨细胞的基质合成, 也有利于间充质干细胞的成软骨分化; 间充质干细胞的免疫调控功能还会受到炎症因子的激活。

2.4.1 软骨保护因子刺激 软骨保护因子可以通过调节细胞信号通路, 来促进软骨细胞的增殖和基质合成, 或者抑制炎症软骨细胞的凋亡和基质代谢。相应的信号通路



图注: 调整细胞培养条件可以提高间充质干细胞分泌的外泌体的调控功能, 目前已有的报道表明, 通过使用软骨保护因子刺激 (从 2017 年开始)、成软骨诱导分化 (从 2018 年开始)、使用生物支架材料培养 (从 2019 年开始)、改变物理环境培养 (从 2020 年开始)、炎症因子刺激 (从 2020 年开始) 间充质干细胞能够提高其分泌外泌体的骨关节炎治疗活性。PTH(1-34) 为人甲状旁腺素 (1-34); IFN- γ 为 γ 干扰素; IL-1 β 为白细胞介素 1 β ; TNF- α 为肿瘤坏死因子 α ; TGF 为转化生长因子。

图 4 | “调整细胞培养条件以提升间充质干细胞分泌的外泌体骨关节炎治疗潜能”相关研究的时间脉络图

也可能在间充质干细胞被激活或抑制, 最终改变间充质干细胞分泌的外泌体的活性成分。

转化生长因子 β 家族蛋白在软骨细胞中发挥重要的调控功能, 能够有效促进软骨细胞的生长和基质合成, 临床试验表明高表达转化生长因子 β 1 的软骨细胞可用于骨关节炎治疗^[59]。使用转化生长因子 β 刺激间充质干细胞, 可以显著提高其分泌外泌体的调控功能^[43-44, 60-62]。WANG 等^[44, 60-61]使用转化生长因子 β 1 刺激间充质干细胞, 所得的间充质干细胞分泌的外泌体高表达 miR-135b, 能够下调软骨细胞中特异性蛋白 1, 促进软骨细胞增殖; 能够靶向滑膜巨噬细胞中的 MAPK6, 抑制炎症; 抑制破骨细胞中的 MAPK 通路, 抑制破骨细胞形成, 从而阻止软骨退化、阻止异常的血管生成、缓解疼痛, 最终促进软骨修复。

Kartogenin (KGN) 是 2012 年科学家筛选出的具有软骨保护功能的小分子, 它能通过调控 CBF β -RUNX1 通路诱导间充质干细胞的成软骨分化^[63], 因此 KGN 处理也能提升间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性^[45, 64-65]。LIU 等^[45]使用 KGN 处理细胞 48 h, 发现处理组间充质干细胞分泌的外泌体能更好地维持软骨细胞的表型, 相较于对照间充质干细胞分泌的外泌体, 处理组间充质干细胞分泌的外泌体不抑制 RUNX1, 这可能是 KGN 处理提升间充质干细胞分泌的外泌体治疗活性的内在分子机制; 同时处理组间充质干细胞分泌的外泌体还能有效降低骨关节炎软骨组织中 I 型胶原的表达。

姜黄素是一种多酚类化合物, 具有抗氧化作用, 可抑制骨关节炎的发生和发展。有研究指出, 骨关节炎患者每日摄取姜黄素, 可有效缓解疼痛、改善行动能力^[66]。由姜黄素处理间充质干细胞后分泌的外泌体可以促进软

骨细胞的增殖、抑制凋亡，并有效缓解骨关节炎病变^[46]，机制研究发现姜黄素处理间充质干细胞后分泌的外泌体高表达 miR-124 和 miR-143，分别靶向抑制核因子激活的 B 细胞的 κ -轻链增强和 ROCK1/TLR9 信号通路，从而抑制软骨降解。

人甲状旁腺素 1-34[parathyroid hormone (1-34), PTH (1-34)] 是一种治疗骨质疏松症的多肽类激素，研究表明 PTH (1-34) 通过调节 PI3K/AKT 信号通路，促进软骨细胞增殖和基质合成，抑制软骨降解，具有骨关节炎治疗潜力^[67]。使用 PTH (1-34) 预处理的间充质干细胞所分泌的外泌体通过抑制炎症因子的产生，显现出了更强的抑炎活性，并促进软骨细胞的增殖、迁移和基质合成^[47]。

软骨保护因子刺激的方法通过使用活性分子刺激间充质干细胞，其细胞培养液的成分相对简单，处理时间较短。使用的活性分子中，PTH(1-34) 是临床药物，姜黄素是食物提取物，安全性好，可用于制备临床用途的间充质干细胞分泌的外泌体。此外，褪黑素、淫羊藿苷和二甲基胍等也被报道具有骨关节炎治疗活性^[68-70]。因此，在间充质干细胞细胞培养过程中，加入软骨保护因子进行刺激，可有效提升间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎疗效^[71-75]，具体相关研究进展见表 1。

2.4.2 成软骨诱导间充质干细胞 在特定培养条件下，间充质干细胞可以定向诱导分化为脂肪、骨及软骨等细胞，在细胞定向分化过程中，其分泌的外泌体性质也会发生变化。WANG 等^[71]发现，不同分化阶段间充质干细胞产生的外泌体具有不同的生物学特征，分化阶段末期分泌的外泌体具有分化诱导功能。因此，对间充质干细胞进行成软骨诱导，也是一种提高间充质干细胞分泌的外泌体骨关节炎治疗活性的有效方法^[72-78]，见表 2。

与软骨细胞共培养，是一种有效的间充质干细胞成软骨诱导方案，在共培养体系中，软骨细胞与间充质干细胞互相调控，诱导效率高，并能有效抑制肥大化^[72]。因此，与软骨细胞共培养也是一种提高间充质干细胞分泌的外泌体骨关节炎治疗活性的策略。HOSSEINZADEH 等^[73]将不同比例的间充质干细胞和软骨细胞共培养，所得的间充质干细胞分泌的外泌体能促进间充质干细胞的成软骨分化，提高共培养体系中软骨细胞的比例 (4 : 1) 可进一步提高促软骨分化能力和骨关节炎治疗活性。ESMAEILI 等^[49]使用三维生物反应器共培养软骨细胞和间充质干细胞，提高了间充质干细胞分泌的外泌体的产量，还进一步加强了其骨关节炎治疗活性。

除与软骨细胞共培养外，转化生长因子 β 3 也是一种常用的成软骨诱导因子，转化生长因子 β 3 可以通过 Smad 通路上调 SOX9 的表达，从而促进细胞外基质 II 型胶原等的表达^[74]。MAO 等^[48]使用含转化生长因子 β 3 的成软骨诱导培养基诱导间充质干细胞，所得的间充质干细胞分泌的外泌体高表达 miR-92a-3p，而 miR-92a-3p 可以通过靶向软骨细胞中的 Wnt5a 促进间充质干细胞增殖、促进软骨细胞的基质合成、抑制动物模型中的骨关节炎进展。此外，成软骨诱导也能使间充质干细胞分泌的外泌体中高表达 miR-320c、circRNA_0001236 和 miR-455 等具有软骨保

表 1 | 使用具有软骨保护功能的分子刺激间充质干细胞以提高其分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性相关研究汇总

第一作者	发表年份	细胞培养方案	对间充质干细胞分泌的外泌体骨关节炎治疗活性的改变	相关分子机制
COSENZA ^[43]	2017	使用转化生长因子 β 3 (10 ng/mL) 预处理 24 h，然后更换培养基用于外泌体收集	使软骨细胞中的合成代谢基因上调、分解代谢基因下调	未描述
WANG ^[44, 60-61]	2018, 2021, 2022	使用转化生长因子 β 1 (10 ng/mL) 处理 24 h	促进软骨细胞增殖、抑制滑膜巨噬细胞炎症、抑制破骨细胞生成；在骨关节炎动物模型中，防止软骨退化、阻止异常的血管生成、缓解疼痛、促进软骨组织的修复	高表达 miR-135b，下调软骨细胞中的 Sp1、靶向滑膜巨噬细胞中的 MAPK6、抑制破骨细胞中的 MAPK 通路
LIU ^[45]	2020	使用 1 μ mol/L KGN 处理细胞 48 h，然后收集培养基用于外泌体纯化	能更好地提升软骨细胞的软骨表型、不会抑制 RunX1(未处理组外泌体抑制 RunX1)；在大鼠软骨缺损模型中显示出了更好的修复效果，并降低了 I 型胶原的表达	未描述
QIU ^[46]	2020	姜黄素：无详细实验方案	在软骨细胞中，促进增殖，抑制凋亡；在骨关节炎小鼠模型中，能更有效地缓解骨关节炎炎症	调控 miR-124/核转录因子 κ B 和 miR-143/ROCK1/TLR9 信号通路
SHAO ^[47]	2022	使用 PTH(1-34) 预处理 6 h，然后更换培养基用于外泌体收集	在白细胞介素 1 β 诱导的骨关节炎软骨细胞中，显示出了更强的抑炎活性，能更有效地促进增殖、迁移和基质合成	可能通过抑制炎症因子的产生
SHAO ^[64]	2021	使用 10 μ mol/L KGN 处理细胞 72 h，然后收集培养基用于外泌体纯化	能更好地促进间充质干细胞的成软骨分化、提高软骨细胞的增殖能力和基质合成；在兔软骨缺损模型中能更有效地促进软骨修复	未描述
XIE ^[65]	2022	使用 5 μ mol/L KGN 处理细胞 72 h，然后收集培养基用于外泌体纯化	能更有效地促进间充质干细胞的增殖、迁移和成软骨分化，更能抑制间充质干细胞的凋亡和软骨溶解	未描述
NGUYEN ^[62]	2022	使用 10 ng/mL 转化生长因子 β 培养细胞 48 h，收集培养基上清用于外泌体纯化	处理后的外泌体不能促进软骨细胞增殖；促进软骨细胞迁移水平与未处理组相当；在软骨细胞中，上调 II 型胶原和蛋白聚糖，下调 I 型胶原和 Runx2	下调 miR-320-3p、miR-181-3p (软骨再生的负调控因子)

表注：Sp1 为特异性蛋白 1；MAPK6 为丝裂原激活蛋白激酶；PTH(1-34) 为人甲状旁腺素 (1-34)；Runx 为 Runt 相关转录因子。

护功能的 RNA 分子^[75-77]。CASANOVA 等^[78]还发现，成软骨诱导会改变间充质干细胞分泌的外泌体的蛋白表达谱，从而提高其成软骨诱导能力。

原弹性蛋白是一种可变剪切的细胞外基质蛋白，它可以促进间充质干细胞的黏附、增殖、表型维持、成软骨分化，还可以通过促进间充质干细胞的关节腔黏附和迁移来抑制骨关节炎的进展^[79]。MENG 等^[50]发现使用原弹性蛋白处理间充质干细胞，可以提高间充质干细胞分泌的外泌体中 miR-451-5p 的表达水平，并提高软骨细胞的基质合成水平和骨关节炎治疗活性。

综上所述，对间充质干细胞进行成软骨诱导，可以显著提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活

表 2 | 对间充质干细胞进行成软骨诱导以提高其分泌外泌体的骨关节炎治疗活性相关研究汇总

第一作者	发表年份	细胞培养方案	对间充质干细胞分泌的外泌体骨关节炎治疗活性的改变	相关分子机制
MAO ^[48]	2018	成软骨分化：细胞微团培养，使用成软骨诱导培养基（含转化生长因子β3）诱导	使得外泌体中 miR-92a-3p 表达水平升高，可促进间充质干细胞增殖、促进软骨细胞中的基质合成基因表达、抑制骨关节炎进展和软骨组织的严重损伤	高表达 miR-92a-3p，靶向软骨细胞中的 Wnt5a
ESMAELI ^[49]	2022	与软骨细胞共集落培养：3 : 1 的比例与软骨细胞共集落培养于旋转反应器，培养 8 d	提高外泌体产量；相较于集落培养的间充质干细胞或软骨细胞，共培养产生的外泌体能更有效地抑制骨关节炎进展	未描述
MENG ^[50]	2023	原弹性蛋白预处理：使用原弹性蛋白处理细胞 48 h	促进软骨细胞的基质合成，提升骨关节炎治疗活性	高表达 miR-451-5p
HOSSEINZADEH ^[73]	2023	与软骨细胞共培养：按不同比例与软骨细胞共微团培养于成软骨诱导培养基中 21 d	促进间充质干细胞的成软骨分化，高软骨细胞比例（4 : 1）能更有效地促进间充质干细胞成软骨分化，在大鼠骨关节炎模型中也显示除了更优的治疗活性	未描述
SUN ^[75]	2019	成软骨分化：细胞微团培养，使用成软骨诱导培养基（含转化生长因子β3）诱导 14 d	使得外泌体中 miR-320c 表达水平升高，对骨关节炎软骨细胞具有软骨保护作用，并能促进间充质干细胞的成软骨分化	141miRNAs 差异表达，其中 miR-320c 显著上调
MAO ^[76]	2021	成软骨分化：细胞微团培养，使用成软骨诱导培养基（含转化生长因子β3）诱导 21 d	使得外泌体中 circRNA_0001236 表达水平升高，能更好地促进成软骨分化间充质干细胞的合成、抑制其分解代谢，也能减缓骨关节炎进展	高表达 circRNA_0001236 阻断软骨细胞的 miR-3677-3p 从而激活 Sox9
SUN ^[77]	2022	转化生长因子β3：使用转化生长因子β3(50 ng/mL) 诱导 7 d 后，更换培养基用于收集外泌体	能更有效地促进间充质干细胞成软骨分化；能更有效地促进软骨修复，并逆转骨关节炎进展	高表达 miR-455，从而激活软骨细胞中的 SOX11/FOXO 信号通路
CASANOVA ^[78]	2021	成软骨分化：细胞集落培养，使用成软骨诱导培养基（含转化生长因子β3）诱导 21，24，28 d 后，收集培养基用于外泌体纯化	固定在纳米纤维上后能够诱导间充质干细胞成软骨分化	蛋白表达谱发生改变

表注：Wnt5a 为 Wnt 家族成员 5a；SOX11/FOXO 为 Sox 家族蛋白 11/ 叉头框蛋白 O3。

性。但成软骨诱导过程需使用复杂的诱导条件，且诱导时间较长，不利于临床转化。

2.4.3 应用生物支架材料 在生理状态下，软骨细胞生长在细胞外基质中，与细胞外基质之间的相互作用有利于维持其表型^[80]。由软骨细胞外基质构成的支架材料还能诱导间充质干细胞成软骨分化，ZHENG 等^[81]发现，基于胶原蛋白的水凝胶可以诱导间充质干细胞的体内成软骨分化。因此，将间充质干细胞培养在生物材料支架上，也可提高其间充质干细胞分泌的外泌体的调控功能^[51-52]，见表 3。

表 3 | 使用新型生物支架材料培养间充质干细胞以提高其分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性相关研究汇总

第一作者	发表年份	细胞培养方案	对间充质干细胞分泌的外泌体骨关节炎治疗活性的改变	相关分子机制
RAGNI ^[51]	2019	细胞培养在透明质酸涂层后的培养皿上，24 h 后，收集培养液用于外泌体纯化	提高外泌体产量，促进成纤维样膜细胞的外泌体摄取	上调 CD44，以提高细胞对外泌体的摄取
ZHANG ^[52]	2023	细胞一直培养在脱细胞细胞外基质涂布的培养皿上	在白细胞介素 1β 诱导的软骨细胞中，能更好地促进增殖、合成、迁移和凋亡抑制；在 DMM 诱导的骨关节炎小鼠模型中，有更好的软骨再生效果	上调 miR-3473b，以靶向 PTEN 来激活 PTEN/AKT 信号通路

生物支架材料培养间充质干细胞可以通过提高间充质干细胞分泌的外泌体表面特定受体的表达，来提高受体细胞对间充质干细胞分泌的外泌体的吸收^[51]。RAGNI 等^[51]使用透明质酸涂层的培养皿培养间充质干细胞，得到的间充质干细胞分泌的外泌体高表达 CD44(透明质酸受体)，间充质干细胞分泌的外泌体上的 CD44 可以通过与成纤维样滑膜细胞表面自然分泌的透明质酸识别，从而提高细胞对间充质干细胞分泌的外泌体的摄取，最终实现骨关节炎治疗。

脱细胞细胞外基质是由胶原和非胶原蛋白构成的纤维网状支架，它通过模拟细胞外基质环境可以促进间充质干细胞增殖和成软骨分化，因此受到软骨组织工程领域的瞩目^[82]。脱细胞细胞外基质也可以提高间充质干细胞的旁分泌功能，ZHANG 等^[52]发现使用脱细胞细胞外基质支架培养的间充质干细胞分泌的外泌体，可以更有效地促进骨关节炎样软骨细胞的增殖、合成、迁移和凋亡抑制，并促进骨关节炎小鼠模型中的软骨再生，机制研究发现脱细胞细胞外基质培养可以提高间充质干细胞分泌的外泌体中的 miR-3473b，实现软骨细胞中 PTEN/AKT 信号通路激活。

生物材料支架通过模拟细胞微环境，可以提高间充质干细胞的增殖和定向分化能力，是软骨组织工程的三要素之一。而上述研究结果表明，支架材料还可用于制备高骨关节炎治疗潜能的间充质干细胞分泌的外泌体，这进一步拓宽了生物支架材料的应用范围。不过，目前用于临床骨关节炎或软骨缺损治疗的支架材料造价高，不利于大规模制备和成本控制，因此临床转化潜能有限。

2.4.4 不同的物理培养条件对间充质干细胞分泌的外泌体活性的影响 软骨细胞生长在致密无血管的软骨组织中，因此，在体外培养时使用细胞微团及低氧等方式培养的软骨细胞更能维持正常活性和功能^[83-84]。此外，正常的软骨组织在关节活动中，会遭受到各种应力的作用，如剪切力、压力等，因此适当的力学刺激也能促进软骨细胞的机制合成^[85]。此外，脉冲磁场等物理刺激被发现具有促进骨、软骨再生的潜能^[86]。而相应地，这些物理刺激作用于间充质干细胞，也能促进其成软骨分化^[85, 87]，提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性。

研究表明，通过低氧(1%-5%O₂)刺激间充质干细胞，能提高间充质干细胞的增殖潜能和旁分泌功能，而对于软骨细胞来说，低氧刺激可以诱导表达缺氧诱导因子 1，调

控自噬等通路抑制软骨细胞的退化^[84]。使用低氧刺激间充质干细胞，能够有效提高间充质干细胞分泌的外泌体的治疗活性，包括心肌损伤^[2]、脊髓损伤^[88]、骨关节炎等^[54, 89-91]。多项研究表明，低氧培养条件下制备所得的间充质干细胞分泌的外泌体能更有效地促进软骨细胞的增殖和合成、抑制凋亡和分解^[54, 89-91]。一些活性 miRNA 分子被认为是低氧间充质干细胞分泌的外泌体活性提高的原因，如 RONG 等^[89]发现低氧刺激下，间充质干细胞高表达缺氧诱导因子 1 α ，促使其分泌的外泌体高表达 miR-216a-5p，miR-216a-5p 靶向抑制 JAK2，从而调控 JAK2/STAT3 信号通路实现其对软骨细胞的调控作用。YANG 等^[90]证实低氧条件下，间充质干细胞的旁分泌调控功能显著提高，而间充质干细胞分泌的外泌体在其中发生关键作用。

生理状态下，软骨细胞生长在有细胞外基质构成的三维支架中，而关节处于持续活动中，因此 3D 培养、支架材料、适当的应力刺激等对软骨细胞维持正常功能和间充质干细胞成软骨分化都是有利因素。3D 细胞培养生物反应器通过使用支架载体实现 3D 培养，并通过搅拌和旋转等对细胞产生应力刺激^[92-93]，相比二维培养可以更准确地模拟细胞在体内的生理环境，不仅能满足规模化生产的需求，还能提高细胞或细胞产物的治疗活性。3D 生物反应器也可用于提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性，如 YAN 等^[53]使用中空纤维支持生物反应器培养间充质干细胞，其分泌外泌体的产量提高了 7.5 倍，其软骨调控活性也显著增加，在兔软骨缺损模型中也显现出了更有效的修复效果，进一步的机制研究表明，3D 生物反应器培养所得的间充质干细胞分泌的外泌体可以激活转化生长因子 β 1 和 Smad2/3 信号通路，实现其调控功能的提升。PHELPS 等^[92]使用搅拌悬浮生物反应器培养间充质干细胞，所得的间充质干细胞分泌的外泌体可促进间充质干细胞中软骨相关基因的表达；通过模拟微重力而开发的旋转细胞培养系统 (Rotatory cell culture system, RCCS) 通过细胞产生应力刺激来改变细胞的状态，使用 RCCS 培养间充质干细胞，不仅能提高间充质干细胞分泌的外泌体的产量，还能提高其对骨关节炎软骨细胞的调控活性，进一步的机制研究发现，RCCS 能够上调间充质干细胞分泌的外泌体中的 LncH19 的表达水平，通过阻断骨关节炎软骨细胞中的 miR-29b-3p 使 FoxO3 上调，从而实现功能提升。

除模拟软骨细胞生理状态的物理刺激外，脉冲式磁场刺激可用于临床骨关节炎治疗，刺激软骨组织再生^[86]。因此，当使用脉冲式磁场刺激间充质干细胞时，所得的间充质干细胞分泌的外泌体能更有效地抑制软骨细胞和软骨组织的退化。

使用低氧、生物反应器、应力或磁场刺激能提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性；与使用化学分子或细胞因子刺激相比，改变这些物理条件不会在最终的间充质干细胞分泌的外泌体产物中引入额外的因子，相对来说是一种更为清洁的、可提升间充质干细胞分泌的外泌体活性的方法；同时生物反应器是规模化生产间充质干细胞分泌的外泌体的一种培养方式，因此，上述

方法均具有巨大的临床应用前景。相关的细胞培养方案也被用于制备临床用途的间充质干细胞^[94-95]，FREITAG 等^[95]使用低氧的方法培养间充质干细胞，用于骨关节炎治疗，通过 30 例临床患者验证了间充质干细胞治疗骨关节炎的有效性。

因此，通过改变细胞培养的物理条件提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性，见表 4。

表 4 | 通过改变细胞培养的物理条件提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性相关研究汇总

第一作者	发表年份	细胞培养方案	对间充质干细胞分泌的外泌体骨关节炎治疗活性的改变	相关分子机制
YAN ^[53]	2021	3D 培养 (中空纤维生物反应器)：每隔 2 d 收集 1 次条件培养基 (细胞培养过程中使用无外泌体血清)	外泌体产量提高 7.5 倍；在软骨细胞中，促进增殖、迁移、基质合成和抑制凋亡的活性提高；在兔软骨缺损模型中，展现出了更高的疗效	部分原因是激活了转化生长因子 β 1 和 Smad2/3 信号通路
XUE ^[54]	2021	低氧：1% O ₂ ，培养 24 h	促进软骨祖细胞的迁移和增殖，能更有效地提高基质合成	未描述
XU ^[55]	2022	脉冲电磁场：细胞在磁场 (脉冲持续时间 300 μ s，强度为 1 mT，频率为 75Hz) 中刺激 30 min，无血清培养基中培养 24 h	在白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞中，更有效地抑制炎症和基质降解；在骨关节炎大鼠模型中，能更有效地抑制软骨退化	未描述
RONG ^[89]	2021	低氧：1% O ₂ ，无血清培养基中培养 48 h	提升外泌体产量；促进软骨细胞吸收；更有效地促进软骨细胞的增殖和迁移，其凋亡；在大鼠骨关节炎模型中，更有效地抑制了骨刺的形成和软骨降解	促进 miR-216a-5p 的表达，以靶向 JAK2/STAT3 信号通路
YANG ^[90]	2023	低氧：5% 和 1% O ₂ ，培养 24 h	使用低剂量即可实现大鼠软骨缺损修复，并减缓关节炎症；促进软骨细胞的增殖、迁移和基质合成，抑制软骨细胞中白细胞介素 1 β 诱导的衰老、炎症、基质降解；抑制促炎巨噬细胞的活性	未描述
CHANG ^[91]	2023	低氧：1% O ₂ ，培养 48 h	能更有效地促进正常软骨细胞中的 GAG 合成；促进骨关节炎样软骨细胞的 GAG 和 II 型胶原表达，抑制纤维化、退化、基质降解、炎症相关蛋白表达；在大鼠骨关节炎模型中，抑制骨关节炎的进展	活性 miRNA 分子
PHELPS ^[92]	2022	搅拌悬浮生物反应器：微载体 (Cytodex 3)，搅拌速度 80 r/min，无血清培养基中培养 72 h	促进间充质干细胞中软骨相关基因的表达	未描述
YAN ^[93]	2021	剪切力：微载体 (Cytodex 3)，RCCS，36 r/min，无血清培养基中培养 48 h	提高了外泌体的产量；在软骨细胞和大鼠软骨缺损模型中展现出了更好的调控活性	促进外泌体中 LncRNA H19 的表达，进而阻断 miR-29b-3p 使 FoxO3 上调

表注：GAG 为糖胺聚糖；RCCS 为旋转式细胞培养系统。

2.4.5 炎症因子刺激 间充质干细胞的调控功能受到组织来源和炎性环境的影响，如肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 和 γ 干扰素等促炎因子可以激活间充质干细胞的免疫抑制表型，参与组织再生^[96-97]。同样，间充质干细胞的旁分泌潜能也会受到炎性环境的影响，炎症因子刺激间充质干细胞分泌的外泌体中，蛋白和 RNA 组成发生了显著的改变；同时，炎症刺激还会促进外泌体的分泌^[98]。



在骨关节炎生理状态下，关节腔内的间充质干细胞在炎症环境的刺激下，可以释放一些与合成代谢、抗纤维化、抗凋亡、免疫抑制等相关的因子，从而减缓关节退化^[99]，因此，使用骨关节炎滑膜液培养间充质干细胞，可以刺激产生促修复效果更好的外泌体。RAGNI 等^[57]使用含 50% 骨关节炎滑膜液的培养液培养间充质干细胞，所获的外泌体较未处理组差异表达 223 个 miRNAs，这些 miRNAs 与 M2 巨噬细胞极化、T 细胞增殖抑制、Treg 增殖促进、软骨保护及免疫细胞趋化相关，显现出治疗骨关节炎的潜力。

使用炎症因子刺激间充质干细胞，可以提高间充质干细胞的产量^[56]，也可以通过改变间充质干细胞分泌的外泌体的蛋白、RNA 组成提高其抑制免疫和促进再生的功能^[56, 58, 100]。干扰素 γ 是一种多效细胞因子，具有免疫调节、抗病毒及抗肿瘤活性，使用干扰素 γ 处理间充质干细胞，可以提高间充质干细胞分泌的外泌体的产量，并提高外泌体中与免疫调控、软骨保护相关 miRNAs 的表达水平^[56]。除干扰素 γ 外，白细胞介素 1 β 及肿瘤坏死因子 α 也被用于刺激间充质干细胞，提高间充质干细胞分泌的外泌体调控活性^[58, 100]。如 KIM 等^[58]分别使用白细胞介素 1 β 、干扰素 γ 及肿瘤坏死因子 α 刺激间充质干细胞，产生的间充质干细胞分泌的外泌体具有显著提高的抑炎活性，机制研究炎症因子的刺激可以上调间充质干细胞分泌的外泌体中的 miR-147b，从而靶向软骨细胞中的核转录因子 κ B 信号通路，实现炎症抑制；动物实验证明，由白细胞介素 1 β 及干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 α 刺激产生的间充质干细胞分泌的外泌体可再生透明软骨^[100]。但炎症因子刺激并不一定会提高间充质干细胞分泌的外泌体的调控功能，如 NGUYEN 等^[62]发现干扰素 α 、肿瘤坏死因子 α 刺激产生的间充质干细胞分泌的外泌体虽然能下调间充质干细胞分泌的外泌体中的软骨负调控因子 miR-181-3p，但细胞实验表明，该间充质干细胞分泌的外泌体并不能有效促进软骨细胞的增殖、迁移和基质合成。

除炎症因子外，脂多糖、poly I: C 等免疫激活因子，也能刺激间充质干细胞，提高间充质干细胞分泌的外泌体的治疗活性。KIM 等^[58]发现，poly I: C 与白细胞介素 1 β 、干扰素 γ 及肿瘤坏死因子 α 等因子的刺激效果类似，可以上调间充质干细胞分泌的外泌体中的 miR-147b，从而通靶向软骨细胞中的核转录因子 κ B 信号通路抑制炎症。使用脂多糖刺激间充质干细胞后分泌的外泌体能更有效地促进软骨细胞增殖和基质合成、抑制其凋亡和分解代谢，抑制骨关节炎进展^[9]。

炎症因子等的刺激，可以提高间充质干细胞分泌的外泌体的免疫调节和促修复作用，但这些方法进行临床转化存在一定困难：炎症因子价格较为昂贵，增加生产成本；受现有外泌体纯化方案的限制，引入培养液的炎症因子等，可能会残留于最终的间充质干细胞分泌的外泌体中，引起副反应；从相关文献总结可以看出，炎症因子刺激不一定能提高间充质干细胞分泌外泌体的调控活性，说明这种刺激产生的活性提升效果并不稳定，于临床转化不利。

因此，由炎症因子刺激产生的间充质干细胞分泌的外泌体也展现出了更高的骨关节炎治疗活性，见表 5。

表 5 | 炎症因子刺激可以提高间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗活性

第一作者	发表年份	细胞培养方案	对间充质干细胞分泌的外泌体 骨关节炎治疗活性的改变	相关分子机制
DUAN ^[9]	2021	使用 100 ng/mL 脂多糖处理细胞 48 h 后，收集培养基上清用于外泌体纯化	在软骨细胞中，能更好地促进细胞增殖、抑制凋亡；在白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞中，能更好地促进基质合成相关蛋白表达，抑制 ADAMTS5；在小鼠模型中，抑制骨关节炎进展	上调 let-7b，通过靶向 ADAMTS5 来抑制 II 型胶原和蛋白聚糖的降解
RAGNI ^[56]	2020	使用 10 ng/mL 干扰素 γ 预处理 48 h，然后更换培养基用于外泌体收集	提高外泌体产量，提高其激活细胞、调控炎症和退化的能力	高表达 240 多种 miRNAs，生物信息学分析显示这些 miRNAs 与软骨保护、免疫调控相关
RAGNI ^[57]	2021	使用 50% 骨关节炎患者滑膜液培养 48 h，收集培养基上清用于外泌体纯化	未描述	通过生物信息学发现 223 个差异表达 miRNAs，这些 miRNAs 与 M2 巨噬细胞极化、T 细胞增殖抑制、Treg 增殖促进、软骨保护、免疫细胞趋化相关
KIM ^[58]	2021	白细胞介素 1 β 、poly I: C、干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 α ：分别使用上述炎症因子处理细胞 24 h，然后收集培养基用于外泌体纯化	在骨关节炎样的 SW982 细胞中，显示出显著的抑炎活性，其中白细胞介素 1 β 处理后的外泌体活性高于其他炎症因子处理后的外泌体	上调 miR-147b，以抑制核转录因子 κ B 信号通路
NGUYEN ^[62]	2022	分别使用 20 ng/mL 干扰素 α 、20 ng/mL 肿瘤坏死因子 α ：培养细胞 48 h，收集培养基上清用于外泌体纯化	处理后的外泌体不能促进软骨细胞增殖；促进软骨细胞迁移水平与未处理组相当	下调 miR-181-3p（软骨再生的负调控因子）
JAMMES ^[100]	2023	分别使用白细胞介素 1 β (20 ng/mL)、肿瘤坏死因子 α (10 ng/mL)、干扰素 γ (100 ng/mL) 处理细胞 24 h，更换培养基用于收集外泌体	能改善马软骨细胞的透明软骨型态，其中白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 效果更好	未描述

标注：ADAMTS5 为血小板反应蛋白整合素金属蛋白酶 5。

3 讨论 Discussion

3.1 既往他人在该领域研究的贡献和存在的问题 尽管已有大量的研究证明了间充质干细胞分泌的外泌体的骨关节炎治疗潜力，但如何进一步提高其治疗活性仍然是该领域的研究热点。目前，已有学者综述了提高间充质干细胞分泌外泌体的骨关节炎治疗活性的策略，包括调整细胞培养条件、使用支架材料、靶向输送和递送活性分子等，但并未有单独就某一个策略进行全面而系统的总结和分析。

文章选择“调整细胞培养条件对间充质干细胞分泌的外泌体活性影响”这一主题进行总结，通过讨论发现，模拟软骨细胞体内微环境、软骨有利因子、间充质干细胞免疫抑制刺激因子等，均能诱导间充质干细胞分泌有利于软骨细胞维持表型、促进软骨组织再生的活性因子于间充质干细胞分泌的外泌体中，进而提高其骨关节炎治疗活性。

3.2 作者综述区别于他人他篇的特点 文章全面概述了调整细胞培养条件对提高间充质干细胞分泌的外泌体治疗

骨关节炎潜能的影响,而相关领域的其他综述文章主要是分析间充质干细胞或间充质干细胞分泌的外泌体在骨关节炎治疗中的应用。文章中,详细讨论了多种可调整的细胞培养条件,包括低氧、生物反应器、应力或磁场刺激、成软骨诱导、软骨保护分子和炎症因子刺激、以及生物支架材料细胞培养等,可以为读者提供全面的视角和深入的理解。此外,文章还针对不同的细胞培养方案进行了深入的分析和讨论,探讨其可能的机制和临床转化的潜力,可以为相关领域的研究者提供参考。

3.3 综述的局限性 该综述存在一定的局限性,仅分析了改变细胞培养条件对间充质干细胞分泌的外泌体活性的影响。此外,文章的讨论主要集中在实验室基础研究上,临床实践数据较少。

3.4 综述的重要意义 文章对于理解细胞培养条件对间充质干细胞分泌的外泌体活性的影响,以及如何通过调整细胞培养条件来提高其治疗活性,具有重要的意义。常规的细胞培养条件与体内微环境存在差异,低氧、生物反应器及生物支架材料等培养条件可以模拟体内微环境,使得间充质干细胞分泌出更有利于软骨细胞维持表型、软骨组织再生的因子,从而提高其骨关节炎治疗活性;除物理微环境外,成软骨诱导因子或软骨保护分子的使用,能够激发间充质干细胞分泌有利于软骨细胞增殖、合成的因子,从而协同间充质干细胞的调控功能,实现骨关节炎软骨的再生;使用炎症因子预处理间充质干细胞,可以激活间充质干细胞的免疫抑制表型,从而调控骨关节炎关节腔内的免疫微环境,促进组织再生。

此外,文章还分析了上述不同方法的临床转化潜能。低氧、生物反应器、脉冲电磁场等物理刺激,以及姜黄素等软骨保护小分子的使用,具有清洁及造价低的优点,可用于制备临床使用的间充质干细胞分泌的外泌体,有广阔的应用前景。

3.5 课题组专家的意见和建议 通过总结和分析细胞培养方案对间充质干细胞分泌的外泌体活性的影响,不仅可以开发新型的细胞培养方案用于提升间充质干细胞分泌外泌体的骨关节炎治疗活性,也能为临床转化提供参考。除骨关节炎外,间充质干细胞分泌的外泌体在其他疾病中也展现出了巨大的应用前景,如皮肤损伤修复等。通过文献调研可以发现,低氧诱导下产生的间充质干细胞分泌外泌体的皮肤修复功能也得到了提升,这说明细胞培养方案对间充质干细胞分泌外泌体活性的影响具有通用性,而非局限于骨关节炎治疗,因此,文章也可为开发新型的细胞培养方案以提高间充质干细胞分泌的外泌体疾病治疗活性提供参考。

致谢:感谢深圳市自然科学基金给予的研究资金支持。感谢深圳国家感染性疾病临床医学研究中心给予的研究平台支持。

作者贡献:文章设计、资料收集及数据分析者均为钱燕和刘启硕。钱燕完成论文撰写及审核。

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:该研究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》,并遵守解读《非随机对照研究 TREND 报告规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LOHMANDER LS, ROOS EM. Clinical update: treating osteoarthritis. *Lancet*. 2007;370(9605):2082-2084.
- [2] SONG Y, WANG B, ZHU X, et al. Human umbilical cord blood-derived MSCs exosome attenuate myocardial injury by inhibiting ferroptosis in acute myocardial infarction mice. *Cell Biol Toxicol*. 2021;37(1):51-64.
- [3] MIANEHSAZ E, MIRZAEI HR, MAHJUBIN-TEHRAN M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a new therapeutic approach to osteoarthritis? *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):340.
- [4] MATHIEU M, MARTIN-JAULAR L, LAVIEU G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17.
- [5] XIANG XN, ZHU SY, HE HC, et al. Mesenchymal stromal cell-based therapy for cartilage regeneration in knee osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):14.
- [6] 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.
- [7] TAO SC, YUAN T, ZHANG YL, et al. 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*. 2017;7(1):180-95.
- [8] WANG Z, YAN K, GE G, et al. Exosomes derived from miR-155-5p-overexpressing synovial mesenchymal stem cells prevent osteoarthritis via enhancing proliferation and migration, attenuating apoptosis, and modulating extracellular matrix secretion in chondrocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2021;37(1):85-96.
- [9] DUAN A, SHEN K, LI B, et al. Extracellular vesicles derived from LPS-preconditioned human synovial mesenchymal stem cells inhibit extracellular matrix degradation and prevent osteoarthritis of the knee in a mouse model. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):427.
- [10] QUICKE JG, CONAGHAN PG, CORP N, et al. Osteoarthritis year in review 2021: epidemiology & therapy. *Osteoarthritis Cartilage*. 2022;30(2):196-206.
- [11] ABRAMOFF B, CALDERA FE. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options. *Med Clin North Am*. 2020;104(2):293-311.
- [12] FOLDAGER CB. Advances in autologous chondrocyte implantation and related techniques for cartilage repair. *Dan Med J*. 2013;60(4):B4600.
- [13] MATAS J, ORREGO M, AMENABAR D, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (MSCs) for knee osteoarthritis: repeated MSC dosing is superior to a single MSC dose and to hyaluronic acid in a controlled randomized phase I/II trial. *Stem Cell Transl Med*. 2019;8(3):215-224.
- [14] PARK YB, HA CW, LEE CH, et al. Cartilage regeneration in osteoarthritic patients by a composite of allogeneic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronate hydrogel: results from a clinical trial for safety and proof-of-concept with 7 years of extended follow-up. *Stem Cell Transl Med*. 2017;6(2):613-621.
- [15] LIM HC, PARK YB, HA CW, et al. Allogeneic umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell implantation versus microfracture for large, full-thickness cartilage defects in older patients: a multicenter randomized clinical trial and extended 5-year clinical follow-up. *Orthop J Sports Med*. 2021;9(1):2325967120973052.
- [16] XU X, LIANG Y, LI X, et al. Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials*. 2021;269:120539.
- [17] JIA Z, LIU Q, LIANG Y, et al. Repair of articular cartilage defects with intra-articular injection of autologous rabbit synovial fluid-derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2018;16(1):123.
- [18] KIM YG, CHOI J, KIM K. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for effective cartilage tissue repair and treatment of osteoarthritis. *Biotechnol J*. 2020;15(12):e2000082.

- [19] ZHANG S, CHUAH SJ, LAI RC, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*. 2018;156:16-27.
- [20] TOFIÑO-VIAN M, GUILLÉN MI, PÉREZ DEL CAZ MD, et al. Microvesicles from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new protective strategy in osteoarthritic chondrocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(1):11-25.
- [21] GUILLÉN MI, TOFIÑO-VIAN M, SILVESTRE A, et al. Role of peroxiredoxin 6 in the chondroprotective effects of microvesicles from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Transl*. 2021; 30:61-69.
- [22] CHEN X, SHI Y, XUE P, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-136-5p inhibits chondrocyte degeneration in traumatic osteoarthritis by targeting ELF3. *Arthritis Res Ther*. 2020;22(1):256.
- [23] XIA Q, WANG Q, LIN F, et al. miR-125a-5p-abundant exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress chondrocyte degeneration via targeting E2F2 in traumatic osteoarthritis. *Bioengineered*. 2021; 12(2):11225-11238.
- [24] XU H, XU B. BMSC-derived exosomes ameliorate osteoarthritis by inhibiting pyroptosis of cartilage via delivering miR-326 targeting HDAC3 and STAT1/NF-κB p65 to chondrocytes. *Mediat Inflamm*. 2021; 2021:9972805.
- [25] DONG J, LI L, FANG X, et al. Exosome-encapsulated microRNA-127-3p released from bone marrow-derived mesenchymal stem cells alleviates osteoarthritis through regulating CDH11-mediated Wnt/β-catenin pathway. *J Pain Res*. 2021;14:297-310.
- [26] YE P, MI Z, WEI D, et al. miR-3960 from mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles inactivates SDC1/Wnt/β-catenin axis to relieve chondrocyte injury in osteoarthritis by targeting PHLDA2. *Stem Cells Int*. 2022;2022:9455152.
- [27] WU J, KUANG L, CHEN C, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis. *Biomaterials*. 2019;206:87-100.
- [28] LI F, XU Z, XIE Z, et al. Adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate osteoarthritis by transporting microRNA-376c-3p and targeting the WNT-beta-catenin signaling axis. *Apoptosis*. 2023; 28(3-4):362-378.
- [29] WANG K, LI F, YUAN Y, et al. Synovial mesenchymal stem cell-derived EV-packaged miR-31 downregulates histone demethylase KDM2A to prevent knee osteoarthritis. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;22:1078-1091.
- [30] QIU M, LIU D, FU Q. MiR-129-5p shuttled by human synovial mesenchymal stem cell-derived exosomes relieves IL-1β induced osteoarthritis via targeting HMGB1. *Life Sci*. 2021;269:118987.
- [31] LU L, WANG J, FAN A, et al. Synovial mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles containing microRN555A-26a-5p ameliorate cartilage damage of osteoarthritis. *J Gene Med*. 2021;23(11):e3379.
- [32] HU H, DONG L, BU Z, et al. miR-23a-3p-abundant small extracellular vesicles released from Gelma/nanoclay hydrogel for cartilage regeneration. *J Extracell Vesicles*. 2020;9(1):1778883.
- [33] ZHOU H, SHEN X, YAN C, et al. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis of the knee in mice model by interacting with METTL3 to reduce m6A of NLRP3 in macrophage. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):322.
- [34] ZHANG Q, CAO L, ZOU S, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles carrying microRNA-181c-5p promote BMP2-induced repair of cartilage injury through inhibition of SMAD7 expression. *Stem Cells Int*. 2022;2022:1157498.
- [35] CHEN P, TANG S, GAO H, et al. Wharton's jelly mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles as natural nanoparticles to attenuate cartilage injury via microRNA regulation. *Int J pharmaceut*. 2022;623:121952.
- [36] LIU Y, ZOU R, WANG Z, et al. Exosomal KLF3-AS1 from hMSCs promoted cartilage repair and chondrocyte proliferation in osteoarthritis. *Biochem J*. 2018;475(22):3629-3638.
- [37] LIU Y, LIN L, ZOU R, et al. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2018;17(21-22): 2411-2422.
- [38] WEN C, LIN L, ZOU R, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome mediated long non-coding RNA KLF3-AS1 represses autophagy and apoptosis of chondrocytes in osteoarthritis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2022;21(3):289-303.
- [39] 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;25(19):9281-9294.
- [40] PAN C, HUANG W, CHEN Q, et al. LncRNA malat-1 from MSCs-derived extracellular vesicles suppresses inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis. *Front Bioeng Biotech*. 2021;9:772002.
- [41] AI M, HOTHAM WE, PATTISON LA, et al. Role of human mesenchymal stem cells and derived extracellular vesicles in reducing sensory neuron hyperexcitability and pain behaviors in murine osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2023;75(3):352-363.
- [42] ARÉVALO-TURRUBIARTE M, BARATTA M, PONTI G, et al. Extracellular vesicles from equine mesenchymal stem cells decrease inflammation markers in chondrocytes in vitro. *Equine Vet J*. 2022;54(6):1133-1143.
- [43] COSENZA S, RUIZ M, TOUPET K, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16214.
- [44] WANG R, XU B, XU H. TGF-β1 promoted chondrocyte proliferation by regulating Sp1 through MSC-exosomes derived miR-135b. *Cell Cycle*. 2018;17(24):2756-2765.
- [45] LIU C, LI Y, YANG Z, et al. Kartogenin enhances the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells derived exosomes in cartilage repair. *Nanomedicine (London, England)*. 2020;15(3):273-288.
- [46] QIU B, XU X, YI P, et al. Curcumin reinforces MSC-derived exosomes in attenuating osteoarthritis via modulating the miR-124/NF-κB and miR-143/ROCK1/TLR9 signalling pathways. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(18):10855-10865.
- [47] SHAO LT, LUO L, QIU JH, et al. PTH (1-34) enhances the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes by inhibiting proinflammatory cytokines expression on OA chondrocyte repair in vitro. *Arthritis Res Ther*. 2022;24(1):96.
- [48] MAO G, ZHANG Z, HU S, et al. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):247.
- [49] ESMAEILI A, HOSSEINI S, KAMALI A, et al. Co-aggregation of MSC/ chondrocyte in a dynamic 3D culture elevates the therapeutic effect of secreted extracellular vesicles on osteoarthritis in a rat model. *Sci Rep*. 2022;12(1):19827.
- [50] MENG S, TANG C, DENG M, et al. Tropoelastin-pretreated exosomes from adipose-derived stem cells improve the synthesis of cartilage matrix and alleviate osteoarthritis. *J Funct Biomater*. 2023;14(4):203.
- [51] RAGNI E, PERUCCA ORFELI C, DE LUCA P, et al. Interaction with hyaluronan matrix and miRNA cargo as contributors for in vitro potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of human osteoarthritic synoviocytes. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):109.
- [52] ZHANG Y, QI G, YAN Y, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells pretreated with decellularized extracellular matrix enhance the alleviation of osteoarthritis through miR-3473b/ phosphatase and tensin homolog axis. *J Gene Med*. 2023;25(8):e3510.
- [53] 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.
- [54] XUE K, JIANG Y, ZHANG X, et al. Hypoxic ADSCs-derived EVs promote the proliferation and chondrogenic differentiation of cartilage stem/progenitor cells. *Adipocyte*. 2021;10(1):322-337.
- [55] XU Y, WANG Q, WANG XX, et al. The effect of different frequencies of pulsed electromagnetic fields on cartilage repair of adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes in osteoarthritis. *Cartilage*. 2022;13(4):200-212.
- [56] RAGNI E, PERUCCA ORFELI C, DE LUCA P, et al. Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):165.
- [57] RAGNI E, COLOMBINI A, VIGANÒ M, et al. Cartilage protective and immunomodulatory features of osteoarthritis synovial fluid-treated adipose-derived mesenchymal stem cells secreted factors and extracellular vesicles-embedded miRNAs. *Cells*. 2021;10(5):1072.
- [58] KIM M, SHIN DI, CHOI BH, et al. Exosomes from IL-1β-primed mesenchymal stem cells inhibited IL-1β- and TNF-α-mediated inflammatory responses in osteoarthritic SW982 cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2021;18(4):525-536.

- [59] HA CW, NOH MJ, CHOI KB, et al. Initial phase I safety of retrovirally transduced human chondrocytes expressing transforming growth factor-beta-1 in degenerative arthritis patients. *Cytherapy*. 2012; 14(2):247-256.
- [60] WANG R, XU B. TGF- β 1-modified MSC-derived exosomal miR-135b attenuates cartilage injury via promoting M2 synovial macrophage polarization by targeting MAPK6. *Cell Tissue Res*. 2021;384(1):113-127.
- [61] WANG R, XU B. TGF β 1-modified MSC-derived exosome attenuates osteoarthritis by inhibiting PDGF-BB secretion and H-type vessel activity in the subchondral bone. *Acta Histochem*. 2022;124(7):151933.
- [62] NGUYEN TH, DAO HH, DUONG CM, et al. Cytokine-primed umbilical cord mesenchymal stem cells enhanced therapeutic effects of extracellular vesicles on osteoarthritic chondrocytes. *Front Immunol*. 2022;13:1041592.
- [63] JOHNSON K, ZHU S, TREMBLAY MS, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science*. 2012;336(6082):717-721.
- [64] SHAO J, ZHU J, CHEN Y, et al. Exosomes from kartogenin-pretreated infrapatellar fat pad mesenchymal stem cells enhance chondrocyte anabolism and articular cartilage regeneration. *Stem Cells Int*. 2021; 2021:6624874.
- [65] XIE A, XUE J, WANG Y, et al. Kartogenin induced adipose-derived stem cell exosomes enhance the chondrogenic differentiation ability of adipose-derived stem cells. *Dis Markers*. 2022;2022:6943630.
- [66] ZENG L, YU G, HAO W, et al. The efficacy and safety of Curcuma longa extract and curcumin supplements on osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Biosci Rep*. 2021;41(6):BSR20210817.
- [67] LI G, LIU S, CHEN Y, et al. An injectable liposome-anchored teriparatide incorporated gallic acid-grafted gelatin hydrogel for osteoarthritis treatment. *Nat Commun*. 2023;14(1):3159.
- [68] ZHANG Y, LIU T, YANG H, et al. Melatonin: a novel candidate for the treatment of osteoarthritis. *Ageing Res Rev*. 2022;78:101635.
- [69] ZHANG J, FAN F, LIU A, et al. Icaritin: a potential molecule for treatment of knee osteoarthritis. *Front Pharmacol*. 2022;13:811808.
- [70] LI J, ZHANG B, LIU WX, et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(5):635-645.
- [71] WANG X, OMAR O, VAZIRISANI F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes have altered microRNA profiles and induce osteogenic differentiation depending on the stage of differentiation. *PLoS One*. 2018;13(2):e0193059.
- [72] BIAN L, ZHAI DY, MAUCK RL, et al. Coculture of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(7-8):1137-1145.
- [73] HOSSEINZADEH M, KAMALI A, BAGHABAN ESLAMINEJAD M, et al. Higher ratios of chondrocyte to mesenchymal stem cells elevate the therapeutic effects of extracellular vesicles harvested from chondrocyte/mesenchymal stem cell co-culture on osteoarthritis in a rat model. *Cell Tissue Res*. 2023;394(1):145-162.
- [74] DU X, CAI L, XIE J, et al. The role of TGF- β 3 in cartilage development and osteoarthritis. *Bone Res*. 2023;11(1):2.
- [75] SUN H, HU S, ZHANG Z, et al. Expression of exosomal microRNAs during chondrogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2019;120(1):171-181.
- [76] MAO G, XU Y, LONG D, et al. Exosome-transported circRNA_0001236 enhances chondrogenesis and suppress cartilage degradation via the miR-3677-3p/Sox9 axis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):389.
- [77] SUN Y, ZHAO J, WU Q, et al. Chondrogenic primed extracellular vesicles activate miR-455/SOX11/FOXO axis for cartilage regeneration and osteoarthritis treatment. *NPJ Regen Med*. 2022;7(1):53.
- [78] CASANOVA MR, OSÓRIO H, REIS RL, et al. Chondrogenic differentiation induced by extracellular vesicles bound to a nanofibrous substrate. *NPJ Regen Med*. 2021;6(1):79.
- [79] YANG J, WANG X, FAN Y, et al. Tropoelastin improves adhesion and migration of intra-articular injected infrapatellar fat pad MSCs and reduces osteoarthritis progression. *Bioact Mater*. 2022;10:443-459.
- [80] SVOBODA KK. Chondrocyte-matrix attachment complexes mediate survival and differentiation. *Microsc Res Tech*. 1998;43(2):111-122.
- [81] ZHENG L, FAN HS, SUN J, et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based hydrogel: an in vivo study. *J Biomed Mater Res A*. 2010;93(2):783-792.
- [82] PEI M, HE F, KISH VL. Expansion on extracellular matrix deposited by human bone marrow stromal cells facilitates stem cell proliferation and tissue-specific lineage potential. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(23-24): 3067-3076.
- [83] GRECO KV, IQBAL AJ, RATTAZZI L, et al. High density micromass cultures of a human chondrocyte cell line: a reliable assay system to reveal the modulatory functions of pharmacological agents. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(12):1919-1929.
- [84] MURPHY CL, THOMS BL, VAGHJIANI RJ, et al. Hypoxia. HIF-mediated articular chondrocyte function: prospects for cartilage repair. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):213.
- [85] WEISS WM, MULET-SIERRA A, KUNZE M, et al. Coculture of meniscus cells and mesenchymal stem cells in simulated microgravity. *NPJ Microgravity*. 2017;3:28.
- [86] YANG X, HE H, YE W, et al. Effects of pulsed electromagnetic field therapy on pain, stiffness, physical function, and quality of life in patients with osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Phys Ther*. 2020;100(7):1118-1131.
- [87] GÓMEZ-LEDUC T, DESANCÉ M, HERVIEU M, et al. Hypoxia is a critical parameter for chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in type I/III collagen sponges. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1933.
- [88] LIU W, RONG Y, WANG J, et al. Exosome-shuttled miR-216a-5p from hypoxic preconditioned mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by shifting microglial M1/M2 polarization. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):47.
- [89] RONG Y, ZHANG J, JIANG D, et al. Hypoxic pretreatment of small extracellular vesicles mediates cartilage repair in osteoarthritis by delivering miR-216a-5p. *Acta Biomater*. 2021;122:325-342.
- [90] YANG Y, WU Y, YANG D, et al. Secretive derived from hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells promote cartilage regeneration and mitigate joint inflammation via extracellular vesicles. *Bioact Mater*. 2023;27:98-112.
- [91] CHANG LH, WU SC, CHEN CH, et al. Exosomes derived from hypoxia-cultured human adipose stem cells alleviate articular chondrocyte inflammaging and post-traumatic osteoarthritis progression. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13414.
- [92] PHELPS J, LEONARD C, SHAH S, et al. Production of mesenchymal progenitor cell-derived extracellular vesicles in suspension bioreactors for use in articular cartilage repair. *Stem Cells Transl Med*. 2022;11(1):73-87.
- [93] 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;26:111-120.
- [94] DOS SANTOS F, CAMPBELL A, FERNANDES-PLATZGUMMER A, et al. A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnol Bioeng*. 2014; 111(6):1116-1127.
- [95] FREITAG J, BATES D, WICKHAM J, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Regen Med*. 2019;14(3):213-230.
- [96] WATERMAN RS, TOMCHUCK SL, HENKLE SL, et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4): e10088.
- [97] BARRACHINA L, REMACHA AR, ROMERO A, et al. Assessment of effectiveness and safety of repeat administration of proinflammatory primed allogeneic mesenchymal stem cells in an equine model of chemically induced osteoarthritis. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):241.
- [98] WOZNIAK AL, ADAMS A, KING KE, et al. The RNA binding protein FMR1 controls selective exosomal miRNA cargo loading during inflammation. *J Cell Biol*. 2020;219(10):e201912074.
- [99] MCGONAGLE D, BABOOLAL TG, JONES E. Native joint-resident mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(12):719-730.
- [100] JAMMES M, CASSÉ F, VELOT E, et al. Pro-inflammatory cytokine priming and purification method modulate the impact of exosomes derived from equine bone marrow mesenchymal stromal cells on equine articular chondrocytes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(18):14169.

(责任编辑: WJ, ZN, QY, ZM)