

文章编号: 1001-6325(2019)08-1196-04

短篇综述

外泌体在骨再生领域的应用进展

周杨, 周苗*

(广州医科大学附属口腔医院 广州口腔病研究所 口腔医学重点实验室, 广东 广州 510140)

摘要:外泌体(Exosomes)是一种由细胞分泌的具有脂质双分子层结构的囊泡,形态似杯状,分子直径在30~140 nm。目前,外泌体在疾病的早期诊断、药物靶向运输、组织再生上已经表现出了强大的潜力。在骨组织工程中,外泌体能够传递特殊的蛋白、miRNAs、生物活性因子等促使间充质干细胞朝着成骨细胞分化,通过激活某些信号通路来上调成骨相关的基因,修复骨缺损和实现骨再生。

关键词:外泌体;骨组织工程;组织再生;成骨分化

中图分类号:R782.4 文献标志码:A

Advance in the study of exosomes in bone regeneration

ZHOU Yang, ZHOU Miao*

(Key Laboratory of Oral Medicine, Guangzhou Institute of Oral Disease,
Stomatology Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China)

Abstract: Exosomes are a type of extracellular vesicles secreted by cells, it shapes like a cup with a diameter of 30 to 140 nm. At present, exosomes show strong potential in early diagnosis, drug target transport and tissue regeneration. In bone tissue engineering, exosomes can transfer special proteins, miRNAs, biofactors to stimulate MSCs differentiate into osteoblasts as well as up-regulating the expression of related osteogenic genes for repairing bone defect and achieve bone regeneration.

Key words: exosomes; bone tissue engineering; tissue regeneration; osteogenic differentiation

外泌体(exosomes, Exos),是一种由细胞分泌的具有脂质双分子层结构的囊泡,始于细胞内陷然后形成早期胞内体(early endosome),随后在相关蛋白的调控下,出芽形成多泡体(multivesicular bodies, MVBs),随即多泡体离开溶酶体与细胞膜特定部位融合向外界分泌囊泡,称之为外泌体。形态似杯状,分子直径在30~140 nm^[1]。

起初它被认为是细胞的代谢废物,直到20世纪

末的研究发现外泌体可以改变细胞外的微环境,促进细胞增殖,这引起学者们的广泛关注^[2]。进一步的研究发现,在母乳、精液、唾液和尿液中均可分离出外泌体。有学者首次在外泌体中证明了RNA和miRNA的存在^[3]。外泌体富含多种蛋白质,其中四跨膜蛋白如CD9、CD63、CD81和CD82是外泌体所含有的高峰度蛋白,也是检测外泌体常用的分子标志物。除此外,外泌体还含有丰富的热休克蛋白如

收稿日期:2018-05-29 修回日期:2018-11-13

基金项目:国家自然科学基金(81671029);国家重点研发计划(2016YFC1102902);广州市科技计划项目(201611261204591, 201605091120566, 201704030024, 201803040008);广州市属高校科研项目(1201610458)

*通信作者(corresponding author): zhm1000@qq.com

HSP70、HSP90、整合素等物质。外泌体还可以传递各类的内容物,如 DNAs、RNAs 和蛋白质,并参与细胞交流、迁移、再生、免疫反应等过程。目前,外泌体在疾病的早期诊断、药物靶向运输、组织再生上已经表现出了强大的潜力。外泌体含有的 mRNA、miRNA 等生物活性内容物,在细胞内交流上能够调节受体细胞的基因表达和生理功能^[4]。它作为细胞间传递物质的“运输船”,在促进相关细胞尤其是间充质干细胞的分化,以及它在体内存在的广泛性和获取的便捷性,已经成为疾病诊断治疗的潜在有效方式。外泌体中所含有的 miRNA 和 lncRNA 可以作为肿瘤诊断的生物标志物^[5]。具有非常广阔的研究前景。

近年来,其在组织工程等相关研究和应用上已成为热点,本文将主要在骨再生、血管化和口腔领域上的进展做一综述。

1 外泌体在骨组织工程的应用

骨组织工程,是利用种子细胞、生物支架、生物活性因子来促进骨组织再生,修复缺损处骨形态和功能的一种治疗方法。种子细胞——间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),在骨组织再生修复中扮演了重要的角色。但随着研究的深入, MSCs 治疗也存在很多诸如伦理、安全性等问题,近期研究表明移植的 MSCs 并未直接参与到组织再生,而是通过旁分泌方式修复其作用。研究人员开始关注到细胞间的相互交流在很大程度影响骨再生。而外泌体作为细胞间交流的传递物,使得外泌体在骨组织工程中的应用成为可能。

脂肪干细胞分泌的外泌体(adipose-derived stem cells exos, ADSCs-Exos)能够有效的促进人的初代成骨细胞(human primary osteoblastic cells, HOBs)增殖和分化为成骨细胞的能力^[6],主要是通过增强成骨信号通路 Wnt-3a 的表达,从而诱导 HOBs 向成骨细胞分化,达到骨修复和再生的目的。还有人发现 ADSCs-Exos 在体外实验中能促进骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化,与 PLGA 支架复合后能够修复小鼠的颅骨缺损^[7]。通过大鼠体内实验证实,人诱导多功能干细胞衍生的间充质干细胞(human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells, hiPS-MSC-Exos)

分泌的外泌体能有效的促进鼠骨髓间充质干细胞(rat bone mesenchymal stem cells, rBMSCs)的增殖和分化,同时还论证了外泌体与成骨及其血管化方面存在着剂量依赖性的关系^[8]。在随后实验中,将 hiPS-MSC-Exos 复合到磷酸三钙(β -TCP)支架上,用来修复大鼠颅骨缺损,发现修复效果明显优于单纯的 β -TCP 支架直接修复。并且发现 hiPS-MSC-Exos 是通过激活 PI3K/Akt 信号通道,使得 HBMSCs 增殖、迁移,成骨分化,达到修复骨缺损的效果^[9]。有学者也从被突变的低氧诱导因子-1(mutant-type HIF-1 α)所调控的 HBMSCs 中提取外泌体(BMSCS-ExosMU),在体外培养上发现其能够促进成骨细胞相关基因表达。体内实验在股骨头坏死的兔模型中,注射 BMSC-Exos 术后 6 周与对照组(PBS)相比,外泌体组的 HE 染色切片中发现大量的骨小梁组织形成,大量的成骨细胞分布在骨小梁当中^[10]。同样将 HBMSCs-Exos 注射到股骨骨折的 CD9 $^{-/-}$ 小鼠体内,能够加快骨折愈合的速度^[11]。

在软骨的修复上,众所周知,软骨缺损的修复是临床治疗中的难题,其本身缺乏有效的先天自愈能力。而外泌体在软骨修复上同样发挥了强大的修复再生潜能。有学者采用人脐带间充质干细胞分泌的外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUCMScs-Exos)修复大鼠的软骨缺损,12 周后,与对照组(PBS)相比,肉眼观察缺损处几乎完全被组织覆盖,并且与周围组织密合。形态学观察新生的组织也完全由光滑的透明软骨组成^[12]。

从以上研究中不难发现,在细胞的交流中,外泌体能够传递特殊的蛋白、miRNAs、生物活性因子等促使 MSCs 朝着成骨细胞分化,也可以通过激活某些信号通路来上调成骨相关的基因,从而达到修复骨缺损和实现骨再生的目的。所以探究外泌体在组织再生中的内在作用机制、摸索外泌体与组织工程支架材料复合并制备缓释系统的方法^[7],是外泌体在骨组织工程中应用的研究热点。

2 外泌体在组织再生中血管化的应用

骨组织工程中,血管化是骨组织再生的重要阶段。良好的血管化在细胞代谢、营养物质运输上均有利于新骨的形成,很多研究也表明了内皮细胞在骨再生中的重要作用^[13-16]。目前,还没有直接的研

究表明,外泌体能够在骨组织工程中促进其构建物内部血管化,但是在其他的组织和器官中已有报道^[14]。

有学者证实了外泌体在体外能促进人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的迁移、增殖和管腔的形成^[10]。有研究发现缺血性的心肌细胞中分泌的外泌体,能够提高大鼠心脏的血管化能力,并证实外泌体的miR-222和miR-143在血管化上发挥了重要作用。在大鼠心肌梗死模型中还有学者用BMSCs-Exos提高了内皮细胞的管腔形成和血管新生能力,并修复了大鼠心脏的功能^[15]。研究人员利用ADSC-Exos在体外实验中也发现了其促血管化的能力,并通过TaqMan分析法进行miRNA分析发现,ADSC-Exos中包含了一些促血管化的miRNAs(miR-126、miR-130a和miR-132)^[16]。

以上研究中可以看到,外泌体在体内外实验中,都展现出了强大的促血管化功能。外泌体能够通过输送重要的功能性miRNAs到靶细胞中,以达到改善功能性恢复或激活内源性修复机制的目的。其中,MSCs-Exo在促进血管新生上,可能与NF-κB信号通路的激活和活性因子STAT3的转录有关^[17]。但是,并不是所有细胞来源的外泌体,都具有促进血管化的能力。一些内皮细胞、淋巴细胞分泌的外泌体在血管生成上就发挥了抑制作用^[17]。所以,在外泌体的选择和探索外泌体在骨组织再生过程中对其内部血管化的影响,可能会成为骨组织再生领域中的一个新的研究方向。

3 外泌体在口腔医学领域中的应用

口腔癌是发生在口腔内恶性肿瘤的总称,唾液里的外泌体中miRNA能够成为口腔鳞状细胞癌的标志物^[18]。这有利于早期发现异常但外观无明显异常的口腔病变。在口腔癌的治疗上,研究人员通过从口腔癌细胞提取外泌体,发现能促进NK细胞的生物学功能,包括增殖、穿孔素和颗粒酶M的释放和细胞毒性。这个发现为口腔鳞状细胞癌的免疫疗法提供新的方向^[19]。

在牙髓疾病的治疗上,通过从牙髓干细胞中提

取出外泌体(DPCs-Exos),体外能够促进DPSCs和BMSCs朝成牙本质方向分化。原因可能是外泌体激活了P38分裂源活化蛋白激酶通路(P38 mitogen activated protein kinase, MAPK)^[20]。在牙髓再生方面,实现牙齿髓腔内充分的血管化,是需要突破关键问题之一。有学者将DPCs-Exos作用于HUVECs,体外实验发现能促进其增殖、管腔形成、以及相关促血管基因(VEGF、bFGF、PDGF、MCP-1、FGF-2、IGF-1、MMP-9)的表达,同时使得P38MAPK磷酸化水平上调^[21]。以上发现暗示了DPCs-Exo也许能够应用在牙髓疾病中,为牙髓再生策略提供一个新的思路和方向。

4 外泌体的前景与展望

外泌体在组织工程中发挥作用主要是通过外泌体在细胞通讯中传递了关键的生物活性因子,但确切的机制仍然不明^[22]。综上所述,未来外泌体在组织工程中的研究,将围绕以下几个方面:

首先,不同细胞分泌的外泌体发挥的作用都不尽相同,这和其来源细胞携带的DNA和蛋白质密切相关。有学者就发现从唾液腺腺样囊性癌细胞中提取的外泌体,能够增强唾液腺腺样囊性癌细胞的迁移和侵袭能力,从而促进唾液腺腺样囊性癌的扩散^[23]。所以在外泌体的选择上,应该更多的考虑其安全性和有效性。干细胞来源的外泌体,运载了其来源干细胞的生物活性物质,发挥干细胞类似功能。而且还可进行人工修饰,作为药物及药物靶向递送载体^[24]。

其次在外泌体的提取上,目前的金标准依然是高速离心法。除此之外,还有沉淀法、色谱法、磁珠免疫法等,但现有的提取技术都有其各自的优缺点^[25]。高纯度、高产量、低成本的外泌体提取方法有待改良,使外泌体的应用能满足临床需要。

最后,外泌体所携带的基因信息及功能没有完全阐明。将来的研究方向将会集中于外泌体的分泌调控机制和靶向给药上。目前还尚未见外泌体在颌骨修复上的报道。随着对外泌体研究的不断深入,其在组织再生领域的应用将提升到一个新的台阶。

参考文献:

- [1] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200: 373-383.
- [2] Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med*, 1996, 183: 1161-1172.
- [3] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654-659.
- [4] Rezaie J, Ajezi S, Avci CB, et al. Exosomes and their application in biomedical field: difficulties and advantages [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 3372-3393.
- [5] Zhao R, Zhang Y, Zhang X, et al. Exosomal long non-coding RNA HOTTIP as potential novel diagnostic and prognostic biomarker test for gastric cancer [J]. *Mol Cancer*, 2018, 17: 68.
- [6] Lu Z, Chen Y, Dunstan C, et al. Priming adipose stem cells with tumor necrosis factor-Alpha preconditioning potentiates their exosome efficacy for bone regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2017, 23: 1212-1220.
- [7] Li W, Liu Y, Zhang P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 5240-5254.
- [8] Qi X, Zhang J, Yuan H, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells repair critical-sized bone defects through enhanced angiogenesis and osteogenesis in osteoporotic rats [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12: 836-849.
- [9] Zhang J, Liu X, Li H, et al. Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7: 136.
- [10] Li H, Liu D, Li C, et al. Exosomes secreted from mutant-HIF-1alpha-modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit [J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41: 1379-1390.
- [11] Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5: 1620-1630.
- [12] Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteo-chondral regeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24: 2135-2140.
- [13] 杨晓彬,周苗. 颌骨组织工程血管化的研究进展 [J]. 生物医学工程研究, 2017, 2: 187-190.
- [14] Bian S, Zhang L, Duan L, et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model [J]. *J Mol Med*, 2014, 92: 387-397.
- [15] Teng X, Chen L, Chen W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-Inflammation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37: 2415-2424.
- [16] Zhu LL, Huang X, Yu W, et al. Transplantation of adipose tissue-derived stem cell-derived exosomes ameliorates erectile function in diabetic rats [J]. *Andrologia*, 2018, 50. doi:10.1111/and.12871.
- [17] Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, et al. Extracellular vesicles in angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2017, 120: 1658-1673.
- [18] Zahran F, Ghawash D, Shaker O, et al. Salivary microRNAs in oral cancer [J]. *Oral Dis*, 2015, 21: 739-747.
- [19] Wang Y, Qin X, Zhu X, et al. Oral cancer-derived exosomal NAP1 enhances cytotoxicity of natural killer cells via the IRF-3 pathway [J]. *Oral Oncol*, 2018, 76: 34-41.
- [20] Huang CC, Narayanan R, Alapati S, et al. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2016, 111: 103-115.
- [21] Xian X, Gong Q, Li C, et al. Exosomes with highly angiogenic potential for possible use in pulp regeneration [J]. *J Endod*. 2018, 44: 751-758.
- [22] Hao ZC, Lu J, Wang SZ, et al. Stem cell-derived exosomes: a promising strategy for fracture healing [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50: 12359.
- [23] Hou J, Wang F, Liu X, et al. Tumor-derived exosomes enhance invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma cells [J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47: 144-151.
- [24] Riazifar M, Pone EJ, Lotvall J, et al. Stem cell extracellular vesicles: extended messages of regeneration [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57: 125-154.
- [25] Li P, Kaslan M, Lee SH, et al. Progress in exosome isolation techniques [J]. *Theranostics*, 2017, 7: 789-804.