

# 间充质干细胞外泌体促进软骨再生的潜在机制研究

姜博庸<sup>1</sup> 韩长旭<sup>2</sup>

**【摘要】** 在目前的动物学研究和临床医学研究中已经得以证实,间充质干细胞(MSC)在软骨损伤后修复的过程中具有一定程度的有效性。研究人员过去普遍认为 MSC 的治疗功效主要是源于其所具备的特有软骨分化潜能,而现如今的大量研究认为其治疗的功效主要来源于其旁分泌过程,特别是外泌体在其中的参与具有十分重要的作用。本文探究 MSC 的外泌体在通过免疫调节与激发再生潜能的方式修复软骨损伤过程中的可能机制。

**【关键词】** 间质干细胞; 外泌体; 软骨; 关节炎; 综述

**Potential mechanism of mesenchymal stem cell exosomes promoting cartilage regeneration** Jiang

Boyong<sup>1</sup>, Han Changxu<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Department of Pediatric Orthopedics, <sup>2</sup>Department of Sports Medicine, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China

Corresponding author: Han Changxu, Email: 17704720645@163.com

**【Abstract】** Current animal and clinical studies have demonstrated the effectiveness of mesenchymal stem cells (MSC) in repairing cartilage damage. Previous researchers believe that the therapeutic effect of MSC is mainly based on the chondrogenic differentiation potential of MSC. Now more and more studies have attributed the therapeutic effect to paracrine, especially the role of exosomes. This review aimed to investigate the potential mechanism of mesenchymal stem cell (MSC) exosomes in repair of cartilage damage through immune regulation and regeneration potential.

**【Key words】** Mesenchymal stem cells; Exosomes; Cartilage; Arthritis; Review

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种全世界范围内最为常见的慢性关节疾病,据统计全世界范围内大约有 2.5 亿人罹患此病。伴随着人口老龄化的日趋严重的和肥胖率的与日俱增,到 2020 年,OA 预计将成为全球致残原因中的第 4 大原因<sup>[1]</sup>。并且 OA 的病理过程往往又是十分复杂的,其病理演变过程会涉及多种不同人体组织的不同时期。因而 OA 的典型特征通常体现为关节软骨的退化、半月板与韧带的退化、软骨下骨的增厚和骨赘形成<sup>[2]</sup>。研究认

为 OA 通常是由于进行运动活动和逐渐衰老而引起的关节软骨损伤所致<sup>[3-4]</sup>,而关节软骨损伤经常会导致一些潜在的致残性症状,比如说与活动相关的疼痛、肿胀及行动能力受损,因此关节软骨的损伤通常被视为 OA 进一步发展恶化的主要危险因素<sup>[5]</sup>。

在大量的干细胞治疗方法中,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)治疗方法如今被视为一种替代细胞治疗方法,这种治疗方法能够克服过去的治疗中的一些缺点。MSCs 作为多能祖细胞,能够被分化为众多谱系,这其中包括了成骨细胞,脂肪细胞与软骨细胞<sup>[6]</sup>,在动物研究中,自体以及异体 MSCs 在软骨修复过程中的有效性目前已经得以证实<sup>[7-8]</sup>,而且在最近人类临床试验中,其有效性也得到了进一步证实<sup>[9-10]</sup>。但是 MSCs 能够具有修复

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-134X.2023.01.006

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2017MS0851, 2017MS0815)

作者单位: 010030 呼和浩特,内蒙古医科大学第二附属医院小儿骨科<sup>1</sup>,运动医学外科<sup>2</sup>

通信作者: 韩长旭, Email: 17704720645@163.com

软骨组织的功效,这都是基于这些细胞能够进一步分化成软骨细胞从而来替换受损组织的这种假设。

根据目前最新的研究证据的证明, MSCs 能够分泌大量种类多样的营养因子来进一步调节受损伤软骨组织周围的环境,并进一步调节其后的再生过程,这其中包括了细胞的迁移、增殖、分化和基质合成等过程<sup>[11]</sup>。在 2010 年, Lai 等<sup>[12]</sup>首次报道了外泌体是由 MSCs 所分泌的一种具有抗心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤功效的生物活性物质,在此后的研究人员陆续发现: MSCs 外泌体能够有效地去对抗 MSCs 的许多疾病靶点。并且于最近报道了 MSCs 外泌体能够介导软骨修复和再生<sup>[13-14]</sup>。本文综述了 MSCs 的特征和特性,并且讨论了 MSCs 外泌体在软骨修复过程和再生过程中的新作用。

### 一、MSCs 在软骨修复和再生中的作用(表 1)

目前骨髓 MSCs 已经能够从脂肪组织、骨髓、外周血和滑膜等成体组织中成功地分离出来,而骨髓 MSCs 能够在临床试验中得以广泛应用主要还是要源于其具有体外扩增能力、易获得性及能够从成人组织中分离出来的优良特性<sup>[6]</sup>。Koh 等<sup>[9]</sup>将 III/IV 级股骨髁软骨局限性损伤 80 例患者进行随机分配,然后进一步接受脂肪 MSCs + 微骨折治疗( $n = 40$ )或单纯微骨折治疗( $n = 40$ )。随访 2 年后的结果表明:同进行单独微骨折治疗的治疗组相比,脂肪 MSCs 结合微骨折治疗的治疗组在膝关节损伤与骨关节炎评分(knee injury and osteoarthritis outcome score, KOOS)疼痛和症状评分与影像学这两个方面均具有十分显著的改善,然而在运动水平、活动能力或生活质量的评分上,两个治疗组的治疗效果并没有产生十分显著的差异。Lee 等<sup>[15]</sup>在猪股骨外侧髁所制作的部分软骨损伤模型(未伤及至软骨下骨),均取自于同一头猪髁骨的骨髓原代培养 MSCs。他们将所培养的 MSCs 悬浮于透明质酸中,继而注入软骨损伤模型,在移植后 6 周和 12 周时,分别同对照组比较后发现: MSCs 所在的移植组在组织学与形态学上均能显示出生成了全新的软骨组织。Xie 等<sup>[16]</sup>经实验研究发现在受损部位植入脂肪 MSCs、骨髓 MSCs 及复合富血小板血浆可吸收支架后,会对关节软骨损伤产生修复功效,这一结果表明富血小板血浆生物活性支架能够通过释放内源性生长因子和基质的方式来促进骨髓 MSCs 和脂肪 MSCs 向软骨细胞方向分化,从而一定程度上修复局限性软骨损伤。近年来,来源于脂肪和骨髓的 MSCs 等已经作为一种组织工程的种子细胞或细胞疗法得

到了广泛而深入地研究,用以治疗动物和人类的 OA 和软骨损伤<sup>[17-19]</sup>。内源性 MSCs 来源十分有限, MSCs 通常从自体或异体的骨髓和脂肪组织中获得,在体外扩增后产生大量的细胞用于移植。在多数研究中多因其免疫排斥风险最小而大多使用自体骨髓 MSCs,但同种异体的骨髓 MSCs 同样也被证实安全有效<sup>[20-21]</sup>。

表 1 MSCs 在软骨修复和再生中的作用相关研究汇总表

研究者	研究成果
Lee 等 <sup>[15]</sup>	在猪股骨软骨损伤模型注入 MSCs 后,同对照组相比 MSCs 所在的移植组生成了全新的软骨组织
Xie 等 <sup>[16]</sup>	在受损部位植入脂肪 MSCs、骨髓 MSCs 及复合富含血小板血浆可吸收支架对于局限性的软骨损伤有一定程度上的修复作用
Koh 等 <sup>[9]</sup>	在股骨髁软骨局限性损伤患者中,同进行单独微骨折治疗的治疗组相比,脂肪 MSCs 结合微骨折治疗的治疗方案在 KOOS 疼痛和症状评分与影像学两方面具有显著改善
Zhang 等 <sup>[13]</sup>	MSCs 外泌体能够通过促进并加强硫酸糖胺聚糖和 II 型胶原等基质的方式来加速对于缺损区域的填充
Lai 等 <sup>[33]</sup>	MSCs 对于维持组织稳态至关重要,其主要功能是为了充分发挥组织功能而维持一种最佳微环境

注: MSCs-间充质干细胞; KOOS-膝关节损伤与骨关节炎评分

### 二、MSCs 外泌体相关研究进展(表 2)

日益增多的动物研究和人体研究证实 MSCs 能够调节组织的修复过程。Wu 等<sup>[23-24]</sup>报道了 MSCs 对于软骨细胞的营养作用,他们在实验过程中发现人体的 MSCs 通过分泌营养因子促进细胞外基质的合成与软骨细胞增殖。他们发现来源不同的 MSCs,例如滑膜、脂肪组织和骨髓,在不同培养条件之下,会具有相似的营养作用。随着蛋白质组学的发展,研究者逐步识别了大量的活性因子,包括细胞因子和生长因子以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)分子<sup>[25]</sup>。MSCs 是一种能对环境有特定反应的细胞,它们会通过分泌生物活性因子的方式进一步响应局部微环境信号<sup>[26]</sup>。Lee 等<sup>[27]</sup>研究表明,在肿瘤坏死因子- $\alpha$  的作用下,人体脂肪组织的 MSCs 会通过过表达白介素(interleukin, IL)-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)-1 引发单核细胞迁移得以达到应对炎症的目的。但尚没有研究能够充分地阐明 MSCs 所分泌的活性因子具有的疗效。2009 年 Bruno 等人<sup>[28]</sup>研究证实 MSCs 分泌的微泡对由甘油所诱导的急性肾小泡损伤具有修复作用,根据测量这些微泡的大小范围在 80 ~ 1  $\mu\text{m}$  之间。Lai 等人<sup>[12]</sup>的研究认为外泌

体会使 MSCs 分泌具有保护心脏作用的微泡,根据测量是一类直径范围 50 ~ 100 nm 的膜囊泡,它来源于内泌体并且其拥有与外泌体相关的蛋白,例如四聚体(跨膜)蛋白家族(tetraspanins)[细胞分化抗原(cluster of differentiation, CD)9、CD63 和 CD81]等,且微囊泡和外泌体都属于细胞外囊泡。

在区分外泌体和微囊泡时,主要通过其释放方式与大小来辨别。外泌体是通过多泡体与质膜融合的途径进行释放,其直径大小约为 30 ~ 150 nm,而微囊泡则会从质膜上脱落,其直径大小约为 100 ~ 1 000 nm。近年来,外泌体方面相关的研究数量呈现指数型增长,其数量远远地超过了与微囊泡相关的研究<sup>[29]</sup>。外泌体能够被多种类型不同的细胞所分泌,如 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞、肿瘤细胞、血小板、肥大细胞和树突状细胞等,并且能够在大多数的体液中发现其存在,例如尿液、脑脊液、母乳、血液和唾液等<sup>[30]</sup>。目前研究发现,病变后的细胞同样能使用外泌体来作为其传播有害信号的载体<sup>[31]</sup>。2014 年,Kato 等人<sup>[32]</sup>发现外泌体会通过 IL-1 $\beta$  来进一步刺激滑膜成纤维细胞,同时促进软骨细胞与其基质中的金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13 释放从而诱导 OA 病程进展。外泌体蛋白的功能十分复杂,涉及了多种多样的生化反应和细胞进程,例如炎症反应、细胞的结构和力学、细胞间通信、组织修复与再生过程以及新陈代谢过程<sup>[33]</sup>。正是由于这种十分广泛的生物活性,使 MSCs 外泌体具有诱发多种细胞反应的特性,并且可以与多种不同类型的细胞相互作用<sup>[34-35]</sup>。

表 2 MSCs 外泌体相关研究进展汇总表

研究作者	研究成果
Lai 等 <sup>[12]</sup>	外泌体会导致 MSCs 分泌能够具有保护心脏作用的微泡
Lee 等 <sup>[27]</sup>	MSCs 会通过过表达 IL-6, IL-8 和 MCP-1 的方式,引发单核细胞迁移得以达到应对炎症的目的
Bruno 等 <sup>[28]</sup>	MSCs 分泌的微泡在对由甘油所诱导的急性肾小泡损伤能够具有修复作用
Wu 等 <sup>[23-24]</sup>	人体的 MSCs 通过分泌营养因子这一途径促进细胞外基质的合成过程与软骨细胞的增殖过程
Kato 等 <sup>[32]</sup>	外泌体会通过 IL-1 $\beta$ 来刺激滑膜成纤维细胞,同时促进软骨细胞和基质中的, MMP-13 释放,从而加速促进 OA 的发展

注:MSCs-间充质干细胞;MMP-金属蛋白酶;IL-白介素;MCP-单核细胞趋化蛋白

### 三、MSCs 外泌体的临床应用

已经有研究证实人 MSCs 外泌体能够预防心肌 I / R 损伤<sup>[12]</sup>,并且还能够缓解肢体的缺血以及促进伤口愈合<sup>[36-37]</sup>。同时在改善移植植物抗宿主病(graft versus-host disease, GVHD)<sup>[38]</sup>、减轻视网膜的损伤<sup>[41]</sup>、促进肝再生<sup>[39]</sup>和抑制肺动脉高压<sup>[40]</sup>,以及改善软骨<sup>[12]</sup>与骨再生<sup>[42]</sup>等方面也具有一定的疗效。Zhang 等<sup>[13]</sup>将人 MSCs 外泌体注入了具有免疫能力的大鼠骨软骨缺损模型之中,12 周后观察到大鼠的软骨和软骨下骨能够得以完全恢复,并且发现注射外泌体大鼠模型具有表面良好且规整的透明软骨,与邻近软骨可完全结合;而注射生理盐水的对照组大鼠仅仅只有纤维组织修复缺损。这一实验结果表明 MSCs 外泌体能够促进并加强硫酸糖胺聚糖和 II 型胶原等基质合成来加速填充缺损区域。2015 年,Lai 等人<sup>[33]</sup>的研究提出,作为基质支持细胞,基质干细胞的主要功能是充分发挥组织功能以维持一种最佳微环境,因而它们必须能够敏锐地感知微环境所发生的变化,同时做出及时有效的反应,以达到恢复体内平衡的目的。因为 MSCs 外泌体的双脂膜所具有的多功能性,例如其既可以通过胞吞作用或膜融合与多种细胞类型相互作用,也可以通过膜受体-配体相互作用与细胞外细胞相互作用,所以其非常适合作为细胞之间的通信载体。

### 四、MSCs 外泌体在软骨再生中可能存在的潜在机制

#### (一)生物能学

MSCs 外泌体之中含有大量的酶与细胞外基质蛋白,可以调节并恢复细胞外基质的稳态。之前有研究人员曾经提出,由于 MSCs 外泌体含有大量的酶蛋白,因而其内在具有一定能力恢复体内平衡<sup>[43]</sup>。酶所介导的反应是一种催化过程,酶的活性会随着底物和产物达到平衡而逐渐丧失。受到损伤后或是在某些疾病发展过程中,体内平衡被打破会激活外泌体内的酶来恢复平衡,促进组织功能的修复和再生。损伤被修复后,体内平衡重新恢复,外泌体内的酶活性也会随着损伤的修复逐渐降低。因此,虽然外泌体的治疗可能在应答反应方面十分灵敏,但其发挥作用会受到受损部位局部微环境的限制<sup>[44]</sup>。在衰老的过程中,线粒体的功能障碍与 OA 的病理发展过程密切相关。当 OA 病变部位的软骨细胞发生了线粒体功能障碍后,线粒体电子传递链(electronic transport chain, ETC)的相关蛋白就会减少<sup>[45]</sup>,而 ETC 作为一种线粒体内进行氧化磷酸化产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的重

要物质,其功能的丧失与线粒体数量的减少会共同导致 ATP 产生减少以及生物能量平衡的逐步丧失。OA 中常见的细胞活动受损可以用这种方式来解释其机制,例如软骨基质在生物合成时的缺陷以及生长因子的反应、氧化应激反应的增加、细胞因子所诱导的软骨细胞炎症反应和基质分解代谢增加、软骨基质钙化和软骨细胞凋亡数量增加等<sup>[46-47]</sup>。在这种情况下,OA 受损部位的软骨细胞修复能力会受到严重地损害,那么恢复 OA 受损部位组织生物能量的稳态将成为开启 OA 受损部位软骨细胞进行修复和再生活动之基础。MSCs 外泌体能够携带大量具有糖酵解活性的 ATP 生成酶,例如丙酮酸激酶与磷酸葡萄糖激酶,以及一些其他的 ATP 生成酶,例如腺苷酸激酶和核苷二磷酸激酶。过去的研究表明此类 ATP 生成酶进一步促进了在再灌注的缺血心肌中 ATP 水平的升高<sup>[48]</sup>,同时这些酶也可能在一定程度上弥补 OA 病程中软骨细胞线粒体的 ATP 产生减少,这将会有助于 OA 软骨的修复过程。Chen 等<sup>[49]</sup>的研究发现退行性软骨中的线粒体功能障碍和氧化应激损伤可以通过补充线粒体相关蛋白来恢复 MSCs 外泌体。通过将 MSCs 衍生的外泌体应用于退行性软骨,调节了能量代谢的不平衡,促进了软骨再生。他们的实验所设计的径向定向 ECM/甲基丙烯酸酐化明胶/外泌体支架可以有效恢复软骨线粒体功能障碍,增强软骨细胞迁移,并使滑膜巨噬细胞对 M2 表型的反应极化,在骨软骨缺陷模型中证实了 3D 打印的径向支架有潜力修复骨软骨缺陷。

## (二)细胞数量

在发生 OA 后,受到损伤或发生病变后的软骨组织经常会因为其炎症反应而导致情况的进一步恶化,这往往会继发细胞死亡并伴有基质的降解,最终使损伤部位的结构破坏以及功能丧失。当发生炎症反应、氧化应激反应和线粒体功能障碍时都会使细胞发生凋亡。而启动软骨组织的修复往往需要细胞的生成与减少的数量处在稳定平衡的状态,只有维持这种稳态才能在受损的区域产生基质沉积和进一步形成组织<sup>[50]</sup>。在受损伤的组织中,MSCs 外泌体通过腺苷介导的生存激酶——细胞外蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK) 1/2 及蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB 或 AKT) 磷酸化这两种途径来进一步诱导增殖过程,在组织受到损伤时(如剪切或机械应力、化疗或缺氧),会释放 ATP 等一系列危险相关信号<sup>[51]</sup>。细胞外 ATP 会刺激免疫原细胞来清除损伤的细胞以及死亡细胞<sup>[52]</sup>,

但持续的损伤可能会使 ATP 过度释放,进而诱导细胞过量死亡并对邻近健康的细胞产生“旁观者效应”,从而使细胞数量的净损失增加以及组织功能受损。因而,要想修复受损组织,就一定要缓解细胞外 ATP 发出的死亡信号,并同时启动细胞增殖。CD73 是一种唯一已知的胞外 5' 核苷酸酶,同时还是一种具有高度调控功效的酶<sup>[53]</sup>,因而,在高度不稳定的细胞外,ATP 表达的促死亡信号就可以通过 CD73 十分容易地转化为腺苷 A 促生存信号,并且 CD73 还是 MSCs 外泌体及大多数外泌体的标志特征。在 AMP 存在时,MSCs 外泌体通过茶碱敏感的腺苷受体来激活生存激酶 ERK 以及 AKT 的磷酸化,这一现象表明 MSCs 外泌体 CD73 能够使促死亡与促生存信号通路恢复到平衡状态<sup>[54]</sup>。因而,MSCs 外泌体通过 CD73 能够将损伤组织的死亡信号、ATP 转化成为促生存信号,同时促使腺苷启动细胞增殖来进一步进行组织的修复与再生。Kimura 等人<sup>[55]</sup>将 CD73(+) MSCs 移植到急性骨损伤处,实验结果显示其在体内可分化为软骨细胞及骨细胞,同时有助于骨折愈合再生过程中骨痂的形成。因此,在体外和体内,CD73(+) MSCs 充分显示出干细胞和成骨分化潜能,说明 CD73(+) MSCs 亚群在促进软骨修复中的突出作用。

## (三)免疫调节

在传统的认知上,免疫系统主要被视为身体防御系统的一部分,用以抵抗外部有害环境及病原体,但目前越来越多的研究已表明免疫系统在组织的修复方面能够发挥十分重要的作用。目前,有报道称在 OA 滑膜组织中,M1 极化的巨噬细胞能够在体外通过白介素-6 抑制 MSCs 的软骨分化过程,而 M2 极化的巨噬细胞能够通过产生抗炎 IL-10 抑制不良炎症反应进而促进移植软骨的存活<sup>[56]</sup>,这在调节软骨损伤及在利用再生软骨治疗 OA 方面具有重要意义<sup>[57]</sup>。MSCs 的免疫调节主要通过旁分泌途径分泌干扰素- $\gamma$ 、转化生长因子- $\beta$ 1,肝细胞生长因子,血红素加氧酶-1、IL-6 及前列腺素 E2<sup>[58-59]</sup>。然而,上述的任何一种因子都不能充分阐明 MSCs 的免疫调节活性<sup>[60]</sup>,这表明 MSCs 的免疫调节活性是需要靠多种因子来协同完成的。这使得含有 200 种以上免疫调节蛋白组的 MSCs 外泌体成为了达成这种协同作用的理想载体<sup>[61]</sup>。MSCs 外泌体能够诱导抗炎因子 IL-10 和转化生长因子- $\beta$ 1 的高度表达,从而减少体外单核细胞促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$  及 IL-12P40 的表达。Zhang 等<sup>[37]</sup>通过研究发现 MSCs 外泌体在同种异体皮肤移植诱导的免疫反应

活跃的小鼠中会诱导调节性 T 细胞,而在未移植的对照组小鼠中则没有,这表明 MSCs 外泌体具有的是免疫调节作用,而不是免疫抑制作用。同时在其他研究中还报道了 MSCs 外泌体可调节低氧性肺动脉高压,在低氧性肺动脉高压小鼠模型中, MSCs 外泌体能够得以抑制巨噬细胞的流入并同时诱导促炎 MCP-1,从而改善疾病进展<sup>[40]</sup>。MSCs 的免疫调节作用在 OA 中的作用机制尚未解决,最近 Zhang 等<sup>[62]</sup>研究人员通过制备骨髓 MSCs 衍生的外泌体,然后将其注射进大鼠 OA 模型的关节内,发现该方法可有效改善大鼠的软骨损伤,同时可减少骨赘形成并减少滑膜巨噬细胞浸润。同时该研究的体外实验结果进一步验证了骨髓 MSCs 来源的外泌体通过促进滑膜巨噬细胞从 M1 向 M2 的转化,维持了软骨细胞的成软骨特性,抑制了软骨细胞的肥大。

#### (四)外泌体微小 RNA(microRNA, miRNA)

MSCs 外泌体包含约 150 种 miRNA<sup>[63]</sup>,这其中大部分可作为重要信号转导通路的有效调控因子,例如果蝇属母亲抗去头蛋白同源物蛋白(small drosophila mothers against DPP, Smad)、ERK 和 AKT 通路。因而,这些 miRNA 很可能在 MSCs 外泌体积极干预 OA 等损伤和疾病过程中起到关键的介导作用,例如,在 MSCs 外泌体中的一些 miRNA,如 miR-23b 和 miR-92a,它们可以通过其在增殖过程和软骨形成过程中的调节作用来治疗 OA,而另一些如 miR-125b 和 miR320,它们则可以通过其在调节基质合成中的作用来治疗 OA<sup>[65-70]</sup>。MSCs 外泌体的 miR-92 A 能够通过哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/磷脂酰肌醇激酶/AKT 通路表达头蛋白(noggin)3,从而促进移植软骨细胞大量增殖并加速基质合成过程进而达到缓解 OA 的目的<sup>[66,71]</sup>。miR-23b 还可以抑制蛋白激酶 A 通路,促进人 MSCs 向软骨细胞分化<sup>[64]</sup>。另一方面,miR-320 与 miR-125b 可通过下调 OA 软骨细胞中蛋白聚糖酶-1 和 MMP-13 来加速 ECM 蛋白酶的表达,通过减弱 ECM 的破坏过程继而来缓解 OA 的发展<sup>[76]</sup>。

#### (五)外泌体治疗 OA 面临的挑战

目前,将 MSCs 外泌体转化成为 OA 的治疗方案仍面临着几个挑战。外泌体代表了一类药物,因而其最主要的问题是它的安全性和毒性。由于 MSCs 已经过了 600 多项临床试验的检测,所以总体上来看,其安全性还是十分可靠的,已经证实 MSCs 外泌体有良好的耐受性,同时其具备最低限度的免疫原性与毒性风险<sup>[38]</sup>。但作为软骨修复的一种治疗方案,其本身仍然存在生物活性、生物安全性、治疗效

果与动力学等多方面问题。而且 MSCs 外泌体的分布仍旧需要在大型动物的研究中得到解答,例如,在符合关节环境(关节软骨、滑膜和滑液)的关节内注射 MSCs 外泌体,其生物分布和清除仍旧需要进行进一步评估,从而得以更好地把握 MSCs 外泌体的生物安全性和治疗可靠性。

#### 五、MSCs 外泌体治疗 OA 的前景展望

使用 MSCs 治疗 OA 目前仍处在临床试验之中。虽然 MSCs 目前尚未被批准用于 OA,但 MSCs 已经被广泛应用于治疗宠物和其他动物的 OA<sup>[69,72-73,75]</sup>,这为下一步人类使用 MSCs 治疗 OA 提供了可靠的理论基础。基于 MSCs 外泌体介导 MSCs 治疗活性这一发现,能够消除与使用活细胞治疗相关的许多困难,而这一点会从根本上改变 MSCs 治疗方案。细胞治疗的长期风险,是移植后的细胞在发生不良活动或是疾病消退时不能够被移除。同时细胞治疗过程中其本身的生产到交付给病人也是一个难题,因为细胞的活力、效力和转化在整个生产过程中必须进行严格的监测、维护与储存。而用外泌体替代细胞则消除了这一系列过程中的大量风险。同细胞治疗不同,外泌体治疗并不是一种永久性治疗方法,当发生不良反应或是疾病消退时,可以很容易地暂停治疗过程。并且外泌体的生产更易于进行工艺上的优化,例如,用于生产外泌体的细胞可以自主选择或是通过基因操作产生高外泌体,从而产生具有无限扩展潜力的克隆细胞系,得以保证外泌体经济有效的再生产。综上所述, MSCs 外泌体治疗 OA 可能比 MSC 细胞治疗更安全、更经济、更有效。

#### 参 考 文 献

- [1] Fransen M, Bridgett L, March L, et al. The epidemiology of osteoarthritis in Asia[J]. Int J Rheum Dis, 2011, 14(2): 113 - 121.
- [2] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1697 - 1707.
- [3] Marcacci M, Filardo G, Kon E. Treatment of cartilage lesions: what works and why? [J]. Injury, 2013, 44 Suppl 1: S11 - S15.
- [4] Toh WS, Brittberg M, Farr J, et al. Cellular senescence in aging and osteoarthritis[J]. Acta Orthop, 2016, 87(sup363): 6 - 14.
- [5] Ge Z, Hu Y, Heng BC, et al. Osteoarthritis and therapy[J]. Arthritis Rheum, 2006, 55(3): 493 - 500.
- [6] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143 - 147.
- [7] 罗欣,余丽梅. 外泌体在间充质干细胞治疗骨关节炎中的作

- 用:新策略与新思路[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(1): 140 - 145.
- [8] 高坤,朱文秀,曹亚飞. 类风湿关节炎和骨关节炎发病及治疗中的外泌体[J]. 中国组织工程研究, 2018, 857(36): 124 - 130.
- [9] Koh YG, Kwon OR, Kim YS, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells with microfracture versus microfracture alone: 2-year follow-up of a prospective randomized trial [J]. *Arthroscopy*, 2016, 32(1): 97 - 109.
- [10] Windt TS, Vonk LA, Slapercortenbach I, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells stimulate cartilage regeneration and are safe for single-stage cartilage repair in humans upon mixture with recycled autologous chondrons[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(1): 256 - 264.
- [11] Toh WS, Foldager CB, Pei M, et al. Advances in mesenchymal stem cell-based strategies for cartilage repair and regeneration[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2014, 10(5): 686 - 696.
- [12] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Res*, 2010, 4(3): 214 - 222.
- [13] Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(12): 2135 - 2140.
- [14] Zhang S, Chu W, Lai R, et al. Human Mesenchymal stem cell derived exosomes promote orderly cartilage regeneration in an immunocompetent rat osteochondral defect model [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(6S Suppl): S13 - S13.
- [15] Lee K, Hui J, Song IC, et al. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects-a porcine model [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2964 - 2971.
- [16] Xie X, Wang Y, Zhao C, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(29): 7008 - 7018.
- [17] Lim CT, Ren X, Afizah MH, et al. Repair of osteochondral defects with rehydrated freeze-dried oligo[poly(ethylene glycol) fumarate] hydrogels seeded with bone marrow mesenchymal stem cells in a porcine model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(15/16): 1852 - 1861.
- [18] Gobbi A, Karnatzikos G, Sankineani SR. One-step surgery with multipotent stem cells for the treatment of large full-thickness chondral defects of the knee[J]. *Am J Sports Med*, 2014, 42(3): 648 - 657.
- [19] Gobbi A, Scotti C, Karnatzikos G, et al. One-step surgery with multipotent stem cells and hyaluronan-based scaffold for the treatment of full-thickness chondral defects of the knee in patients older than 45 years [J]. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2017, 25(8): 2494 - 2501.
- [20] Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow - derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the Poseidon randomized trial [J]. *JAMA*, 2012, 308(22): 2369 - 2379.
- [21] 陈松,符培亮,吴海山,等. 滑膜间充质干细胞在软骨修复组织工程中的研究进展[J/CD]. 中华关节外科杂志(电子版), 2013, 7(5): 707 - 710.
- [22] Nejadnik H, Hui JH, Feng CE, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study [J]. *Am J Sports Med*, 2010, 38(6): 1110 - 1116.
- [23] Wu L, Leijten J, Georgi N, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells increase chondrocyte proliferation and matrix formation [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(9/10): 1425 - 1436.
- [24] Wu L, Prins HJ, Helder MN, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources [J]. *Tissue Eng Part A*, 2012, 18(15/16): 1542 - 1551.
- [25] Sze SK, De Kleijn D, Lai RC, et al. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(10): 1680 - 1689.
- [26] Murphy MB, Moncivais K, Caplan A. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine [J/OL]. *Exp Mol Med*, 2013, 45(11): e54. DOI: 10.1038/emmm.2013.94.
- [27] Lee MJ, Kim J, Kim MY, et al. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced secretome of human adipose tissue-Derived mesenchymal stem cells [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(4): 1754 - 1762.
- [28] Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(5): 1053 - 1067.
- [29] Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, et al. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease [J]. *J Endocrinol*, 2016, 228(2): R57 - R71.
- [30] Thompson AG, Gray E, Heman-Ackah SM, et al. Extracellular vesicles in neurodegenerative disease [mdash] pathogenesis to biomarkers [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12(6): 346 - 357.
- [31] Bank I, Timmers L, Gijbels CM, et al. The diagnostic and prognostic potential of plasma extracellular vesicles for cardiovascular disease [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015, 15(12): 1577 - 1588.
- [32] Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Exosomes from IL-1 $\beta$  stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes [J/OL]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4): R163. DOI: 10.1186/ar4679.
- [33] Lai RC, Tan SS, Teh BJ, et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome [J/OL]. *Int J Proteomics*, 2012, 2012: 971907. DOI: 10.1155/2012/971907.
- [34] 吴超超, 尚曼等. 外泌体对不同细胞的调控修复作用研究进展 [J]. *山东医学*, 2017, 44(57): 104 - 106.
- [35] Zhang B, Yeo RW, Tan KH, et al. Focus on extracellular vesicles: therapeutic potential of stem Cell-Derived extracellular vesicles [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 174. DOI: 10.3390/ijms17020174.

- [36] Zhang JY, Guan JJ, Niu X, et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis [J/OL]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 49. DOI: 10.1186/s12967-015-0417-0.
- [37] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing[J]. *Stem Cells*, 2015, 33(7): 2158-2168.
- [38] 陈晨, 黄辉, 胡文佳, 等. 间充质干细胞源性外泌体治疗神经退行性疾病: 应用中的问题及未来前景[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(9): 135-141.
- [39] Tan CY, Lai RC, Wong W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models[J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(3): 76. DOI: 10.1186/scri465.
- [40] Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2012, 126(22): 2601-2611.
- [41] Bo Y, Hui S, Chang S, et al. Exosomes derived from MSCs ameliorate retinal laser injury partially by inhibition of MCP-1 [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 34562. DOI: 10.1038/srep34562.
- [42] 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(7): 836-849.
- [43] Lai RC, Yeo RW, Tan KH, et al. Mesenchymal stem cell exosome ameliorates reperfusion injury through proteomic complementation[J]. *Regen Med*, 2013, 8(2): 197-209.
- [44] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. *Regen Med*, 2011, 6(4): 481-492.
- [45] Wang Y, Zhao X, Lotz M, et al. Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritic chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(8): 2141-2153.
- [46] Vaamonde GC, Riveiro-Naveira RR, Valcúrcel-Ares MN, et al. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2012, 64(9): 2927-2936.
- [47] Loeser RF. Aging and osteoarthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2011, 23(5): 492-496.
- [48] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Cell Res*, 2013, 10(3): 301-312.
- [49] Chen PF, Lin Z, Wang YY, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration[J]. *Theranostics*, 2019, 9(9): 2439-2459.
- [50] Chuma H, Mizuta H, Kudo S, et al. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(10): 834-842.
- [51] Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(21): 5441-5447.
- [52] Vitiello L, Gorini S, Rosano G, et al. Immunoregulation through extracellular nucleotides [J]. *Blood*, 2012, 120(3): 511-518.
- [53] Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73) [J]. *Purinergic Signal*, 2006, 2(2): 351-360.
- [54] Lai CR, Yeo RWY, Tan SS, et al. Mesenchymal stem cell exosomes: the future MSC-based therapy? [M/OL]// Chase LG, Vemuri MC. *Mesenchymal Stem Cell Therapy. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Totowa: Humana Press, 2013: 39-61. DOI: 10.1007/978-1-62703-200-1\_3
- [55] Kimura K, Breitbach M, Schildberg FA, et al. Bone marrow CD73+ mesenchymal stem cells display increased stemness in vitro and promote fracture healing in vivo [J/OL]. *Bone Rep*, 2021, 15: 101133. DOI: 10.1016/j.bonr.2021.101133.
- [56] Ding J, Chen B, Lv T, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-based engineered cartilage ameliorates polyglycolic acid/poly lactic acid scaffold? Induced inflammation through M2 polarization of macrophages in a pig model [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(8): 1079-1089.
- [57] Utomo L, Van Osch GJ, Bayon Y, et al. Guiding synovial inflammation by macrophage phenotype modulation: an in vitro study towards a therapy for osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(9): 1629-1638.
- [58] Liu H, Lu K, Macary PA, et al. Soluble molecules are key in maintaining the immunomodulatory activity of murine mesenchymal stromal cells [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 1): 200-208.
- [59] Chen PM, Liu KJ, Hsu PJ, et al. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2 [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96(2): 295-303.
- [60] Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications [J/OL]. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1(1): 2. DOI: 10.1186/scri2.
- [61] Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 40: 82-88.
- [62] Zhang J, Rong Y, Luo C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24): 25138-25152.
- [63] Chen TS, Lai RC, Lee MM, et al. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(1): 215-224.
- [64] Ham O, Song BW, Lee SY, et al. The role of microRNA-23b in the differentiation of MSC into chondrocyte by targeting protein kinase A signaling [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4500-4507.
- [65] Meng F, Zhang Z, Chen W, et al. MicroRNA-320 regulates matrix metalloproteinase-13 expression in chondrogenesis and

- interleukin-1 $\beta$ -induced chondrocyte responses [J]. *Osteoarthritis Cartilage* 2016, 24(5): 932-941.
- [66] Ning G, Liu X, Dai M, et al. MicroRNA-92a upholds Bmp signaling by targeting noggin3 during pharyngeal cartilage formation [J]. *Dev Cell*, 2013, 24(3): 283-295.
- [67] Kim D, Song J, Jin EJ. MicroRNA-221 regulates chondrogenic differentiation through promoting proteosomal degradation of slug by targeting Mdm2[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(35): 26900-26907.
- [68] Yang B, Guo H, Zhang Y, et al. MicroRNA-145 regulates chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by targeting Sox9[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21679. DOI: 10.1371/journal.pone.0021679.
- [69] 严广斌,钱东阳,卢永辉等. 兔骨髓间充质干细胞修复膝关节软骨缺损的实验研究[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2010,4(3):48-51
- [70] Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, et al. Integrative MicroRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks [J/OL]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3740. DOI: 10.1371/journal.pone.0003740.
- [71] Hou C, Zhang Z, Zhang Z, et al. Presence and function of microRNA-92a in chondrogenic ATDC5 and adipose-derived mesenchymal stem cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 4877-4886.
- [72] Yang W, Lee S, Yoon J, et al. Stem cell therapy status in veterinary medicine[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2015, 12(2): 67-77.
- [73] 李嘉,王智慧,吴迪,等. 间充质干细胞源性外泌体在骨科疾病治疗中的作用与应用前景[J]. *中国组织工程研究*,2020,024(025):4068-4072.
- [74] Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, et al. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(5/6): 419-427.
- [75] 同志超,王坤正,同志勤,等. 聚磷酸钙纤维和左旋聚乳酸软骨支架复合自体骨髓间充质干细胞构建组织工程化人工关节软骨[J/CD]. *中华关节外科杂志(电子版)*,2007,1(2):104-107
- [76] Matsukawa T, Sakai T, Yonezawa T, et al. MicroRNA-125b regulates the expression of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) in human osteoarthritic chondrocytes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(1): 1-11.

(收稿日期:2021-10-20)

(本文编辑:张姝江、林敏颖)

姜博庸,韩长旭. 间充质干细胞外泌体促进软骨再生的潜在机制研究[J/OL]. *中华关节外科杂志(电子版)*,2023, 17(1): 44-51.

1915  
CHINESE MEDICAL ASSOCIATION  
中华医学学会