

骨细胞及干细胞分泌的外泌体在骨重塑中的作用

陈德龙¹ 陈鹏^{2*} 邓章荣¹ 姜山¹ 王粤淇¹ 王海彬²

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2018) 04-0534-04

摘要: 外泌体是由多泡体与细胞膜融合后, 以外分泌的形式释放到细胞外的直径为 30 ~ 100 nm 的细胞外囊泡, 目前大量研究发现其广泛参与骨相关疾病及骨重塑过程, 具有较好的生物学活性。由于成骨细胞和破骨细胞之间的动态平衡在骨重塑过程中起关键作用, 而且干细胞在骨重塑方面已显示了巨大的前景, 因此, 本文就骨细胞及干细胞分泌的外泌体在骨重塑中的作用进行综述, 希望能为骨科相关疾病的防治提供研究思路。

关键词: 外泌体; 骨细胞; 干细胞; 骨重塑

The role of bone cells and stem cells secreted exosomes in bone remodeling

CHEN Delong¹, CHEN Peng^{2*}, DENG Zhangrong¹, JIANG Shan¹, WANG Yueqi¹, WANG Haibin²

1. First Clinical Medicine School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405

2. Orthopedics Department, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

* Corresponding author: CHEN Peng, Email: docchen777@ gmail. com

Abstract: Exosomes are derived from endosomal membranes after the fusion of multivesicular bodies to the plasma membrane, nano-sized vesicles of about 30 – 100 nm. A large number of studies have found that exosome is widely involved in bone related diseases and bone remodeling process, and has good biological activity. The dynamic equilibrium between osteoblast and osteoclast plays a key role in bone remodeling. What's more, stem cells have been shown to have a great promise in terms of bone remodeling. Therefore, this review summarizes the roles of bone cells and stem cells secreted exosomes in bone remodeling. We hope to provide research ideas for the prevention and treatment of orthopedic related diseases.

Key words: Exosome; Bone cell; Stem cell; Bone remodeling

近年来, 组织工程学应用于骨组织再生和修复方面显示了巨大的前景, 而成骨细胞、破骨细胞及干细胞在其中发挥着重要的作用。正常骨组织由骨细胞和骨基质共同组成, 通过骨重塑来维持内稳态的平衡及自身结构的完整, 其中成骨细胞(骨形成功能)和破骨细胞(骨吸收功能)之间的动态平衡是骨重塑过程中最关键的环节。2007 年, Valadi 等发现细胞分泌的外泌体中含有生物活性 mRNAs、microRNAs(miRNAs)、脂质和蛋白质, 这使得研究人员对外泌体的研究热情激增。随着研究的进展, 科学家发现外泌体在细胞间通讯及局部微环境的调节中发挥着特殊作用, 因此本文对成骨细胞、破骨细

胞及干细胞分泌的外泌体在骨重塑中的作用作一综述。

1 外泌体的内容与功能

1.1 形态与来源

外泌体是由细胞内吞系统的多泡体(multivesicular body, MVB)与细胞膜融合后以外分泌的形式释放到细胞外, 直径为 30 ~ 100 nm 的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)^[1,2]。透射电子显微镜下外泌体呈扁平状或球状^[3], 在蔗糖溶液中的密度为 1.13 ~ 1.19 g/mL, 其密度与细胞来源相关, 并随蛋白含量而改变^[4]。外泌体最早由 Johnstone 等^[5]在研究网织红细胞向成熟红细胞转变过程中发现。后来研究发现, 不仅网织红细胞能释放这种小囊泡, 几乎所有类型的活细胞都能分泌, 例如 T 细胞^[6]、巨噬细胞^[7]、肥大细胞^[8]、内皮细

基金项目: 2017 年国家自然科学基金青年科学基金项目 (81603641)

* 通讯作者: 陈鹏, Email: docchen777@ gmail. com

胞^[9]、施旺细胞^[10]、神经细胞^[11]、肿瘤细胞^[12]等。

1.2 外泌体的内容

外泌体含有蛋白质和核酸, Valadi 等在 2007 年发现外泌体中含有 RNA。同时, 外泌体中包含了多种多样来源于其分泌细胞的成分, 包括蛋白、脂质 (lipids)、mRNAs 和 microRNAs (miRNAs)。多种细胞来源的 exosomes 内均包含 mRNA 和 miRNA, 并且诸多研究已证实它们在 exosomes 参与细胞之间信息传递的作用机制中确实起到重要作用。根据一个专门收录与 exosomes 研究相关的数据库 ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>) 中的信息, 现已发现的 exosomes 相关蛋白质有 41 860 种, RNA 的种类超过 7540 和有 1 116 种脂质分子^[13]。外泌体的组成与细胞来源相关, 不同种类的细胞外泌体的组成不尽相同^[14]。外泌体蛋白质的组成与细胞类型和组织特征相关, 已通过 Western 印迹、荧光激活细胞和电子显微镜进行了广泛的分析。外泌体富含热休克蛋白 (HSP70, HSP90)^[15] 和膜联蛋白 (膜联蛋白 I, II, IV, V, VI, VII 和 XI), 有助于膜运输和融合^[16]。外泌体也富含运输蛋白, 如微管蛋白、肌动蛋白和肌动蛋白结合分子^[17] 以及与分泌细胞特定功能相关的几种蛋白质^[15], 如 MHC II (抗原呈递细胞分泌的)^[18] 和 CD86 (抗原呈递细胞)^[19]。此外, 外泌体含有高浓度的跨膜 4 蛋白家族 (CD9、CD63、CD81) 和肿瘤易感基因 101 (TSG101)^[20]。在体外研究发现, CD9 和 CD82 能抑制肿瘤细胞迁移和侵袭^[21]。

除了蛋白质, 外泌体还含有脂质, DNA, mRNA, miRNA 和 lncRNA, 参与细胞间信息交流^[22]。MiRNAs 是非编码 RNA (non-coding RNAs) 家族中的重要一员, 大约有 17 ~ 24 个核苷酸长度, 通过与目标 mRNA 上的 3' 非翻译区 (3' UTR) 结合来调控翻译后的基因沉默, 进而抑制相关基因的表达^[23]。miRNAs 是外泌体中的主要小 RNA, 当其他细胞“吞入”这些含有 RNA 的外泌体后, mRNA 可以在受体细胞中翻译出相应的蛋白质, microRNA 通过降解 mRNA 或者抑制 mRNA 的翻译来调控蛋白质在目标细胞中的表达, 而 siRNA 可以敲除受体细胞中的目标基因达到基因沉默的作用。这种运输模式使外泌体中的 miRNA 可抵抗来自 RNAase 的降解作用^[24]。外泌体第二主要 RNA 为 lncRNAs (长非编码 RNA, >200 bp), 通过用基因组 DNA 退火或修饰组蛋白复合物干扰基因表达^[25]。在微环境中, 外泌体表现为介导 RNA 的载体并递送其内容物和调节受体细胞蛋白的产生。

1.3 生物学功能与作用

外泌体为细胞间通讯的载体, 并且在细胞之间运输脂质、核酸 (mRNA 和 miRNA) 和蛋白质, 可以在受体细胞中引起生物学反应和表达内容物生物学效应^[26]。外泌体和其他生物囊泡之间的主要特征之一是存在大量的核苷酸。外泌体 miRNA 在双重脂质膜保护下可以避免 RNA 酶降解, 保持其生物活性, 并稳定存在于体液 (血液, 唾液, 尿液) 中^[27-29], 可作为早期发现疾病的生物标志物。此外, 外泌体通过无创的方式获得, 有利于临床的推广与运用。

近年来, 越来越多地报道间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 分泌的外泌体作为主要的治疗剂, 但是, 目前干细胞分泌的外泌体缺乏临床运用的报道, 却在再生医学中已经表现出未来的潜力。

2 外泌体与骨重塑

2.1 促进成骨及血管化

体细胞 (间充质干细胞及骨细胞) 来源的外泌体在骨重塑中起着重要的作用。Xu 等^[30] 发现人骨髓间充质干细胞 (hMSCs) 分泌的外泌体 miRNAs 在骨重塑的过程中存在明显表达差异 (let-7 a, miR-135b, miR-148 a, miR-199b, miR-203, miR-218, miR-219, miR-299-5p 和 miR-302b), 从另一方面表明了干细胞调控骨重塑的机制。其中外泌体 miR-196 a 通过调控成骨基因 ALP, OCN, OPN 和 Runx2 的表达促进成骨分化进而促进骨折愈合。而且, 人脐带来源间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells hUCMSCs) 分泌的外泌体可以启动 hBMSCs 的成骨分化, 并且上调骨形成相关基因的表达, 包括 ALP, BMP2, OCN, Osterix, Col1 α 和 Runx2^[31]。更令人欣慰的是, 外泌体还能促进生物材料的成骨作用^[32]。Zhang 等^[33] 报道外泌体通过 PI3K/AKT 通路增加 β 磷酸三钙 (β -TCP) 的成骨诱导能力。不仅如此, 外泌体还能促进血管生成进一步促进骨形成。人类诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 来源的间充质干细胞分泌的外泌体具有显著促进血管生成的能力, 进一步增加细胞的增殖能力、上调成骨相关基因 OPN, RUNX-2 和 COL1 在基因和蛋白水平的表达^[34]。而且, 在体内颅骨骨缺损大鼠模型中, hiPSC-MSC-Exos + β -TCP 复合支架通过增强血管的新生达到促进颅骨缺损的骨再生^[33]。

2.2 抑制骨形成

作为细胞间通讯的介质,外泌体在抑制骨形成中的作用表现为降低成骨细胞功能和促进破骨细胞活性两方面。文献报道^[35],骨质疏松患者的血清中,外泌体中 MiR-214 和 ephrinA2 水平呈高表达状态,这有可能显著抑制了成骨细胞活性加重病情;在骨性关节炎的病理变化中,炎症细胞通过促进破骨细胞衍生的外泌体 miR-214-3p 的转移,来抑制成骨细胞的功能,进一步促进关节下骨的侵蚀^[36]。外泌体对破骨细胞的影响同样受到广泛重视。破骨细胞分泌的细胞外囊泡含有 let-7e, miR-21, miR-155, miR-210, miR-223 和 miR-378^[37]。MiR-223 抑制核因子 I-A(NFI-A)的表达并控制破骨细胞分化。NFI-A 水平的下调影响 M-CSFR 的表达,这对于破骨细胞分化和功能至关重要^[38]。MiR-210 通过抑制 TGF-β /activin 信号通路和靶向 AcvR1b 受体调节成骨细胞分化^[39]。MiR-155,干扰素-β 诱导的 miRNA,通过靶向 SOCS1 和 MITF 两个破骨细胞形成的基本调节因子,抑制破骨细胞分化^[40]。在 MSC 成骨分化过程中,MiR-21 表达会被 TNF-α 抑制,而阻断 TNF-α 可以显著增强 miR-21 的表达和增加骨形成,并且抑制了 Spry1 的表达,这是 FGF 和 ERK-MAPK 信号通路的负调节因子^[41]。

3 总结

外泌体作为机体内普遍存在的纳米级、扁平状、双层脂膜结构,广泛参与细胞间的交流。成骨细胞、破骨细胞及干细胞分泌的外泌体在骨重塑过程的动态耦联平衡起着至关重要的作用,可为临床治疗骨缺损、骨不连、骨质疏松等疾病和骨修复材料的设计提供新的方向。但目前外泌体的研究尚停留在体外试验及动物实验中,缺乏临床运用的报道。随着研究的深入,外泌体作为基因分子治疗骨科疾病将会成为新的里程碑。

【 参 考 文 献 】

[1] Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 2008, 8 (19) : 4083-4099.

[2] Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, et al. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 1987, 262 (19) : 9412-9420.

[3] Simons M, Raposo G. Exosomes --vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21 (4) : 575-581.

[4] Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, et al. Exosomes as

intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81 (10) : 1171-1182.

[5] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 1983, 33 (3) : 967-978.

[6] Shenoda BB, Ajit SK. Modulation of Immune Responses by Exosomes Derived from Antigen-Presenting Cells. *Clin Med Insights Pathol*, 2016, 9 (Suppl 1) : 1-8.

[7] Wei G, Jie Y, Haibo L, et al. Dendritic cells derived exosomes migration to spleen and induction of inflammation are regulated by CCR7. *Sci Rep*, 2017, 7 : 42996.

[8] Li F, Wang Y, Lin L, et al. Mast Cell-Derived Exosomes Promote Th2 Cell Differentiation via OX40L-OX40 Ligation. *J Immunol Res*, 2016, 2016 : 3623898.

[9] Zhang J, Chen C, Hu B, et al. Exosomes Derived from Human Endothelial Progenitor Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis Through Erk1/2 Signaling. *Int J Biol Sci*, 2016, 12 (12) : 1472-1487.

[10] Lopez-Leal R, Court FA. Schwann Cell Exosomes Mediate Neuron-Glia Communication and Enhance Axonal Regeneration. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36 (3) : 429-436.

[11] Takeda YS, Xu Q. Neuronal Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Using Exosomes Derived from Differentiating Neuronal Cells. *PLoS One*, 2015, 10 (8) : e135111.

[12] Wu L, Zhang X, Zhang B, et al. Exosomes derived from gastric cancer cells activate NF-kappaB pathway in macrophages to promote cancer progression. *Tumour Biol*, 2016, 37 (9) : 12169-12180.

[13] Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*, 2016, 428 (4) : 688-692.

[14] Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, et al. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9 (2) : 197-208.

[15] Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2 (8) : 569-579.

[16] Futter CE, White IJ. Annexins and endocytosis. *Traffic*, 2007, 8 (8) : 951-958.

[17] Thery C, Boussac M, Veron P, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*, 2001, 166 (12) : 7309-7318.

[18] Vella LJ. The emerging role of exosomes in epithelial-mesenchymal-transition in cancer. *Front Oncol*, 2014, 4 : 361.

[19] Liu D, Li C, Trojanowicz B, et al. CD97 promotion of gastric carcinoma lymphatic metastasis is exosome dependent. *Gastric Cancer*, 2016, 19 (3) : 754-766.

[20] Choi DS, Yang JS, Choi EJ, et al. The protein interaction network of extracellular vesicles derived from human colorectal

- cancer cells. *J Proteome Res*, 2012, 11 (2): 1144-1151.
- [21] Zoller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9 (1): 40-55.
- [22] Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*, 2003, 278 (13): 10963-10972.
- [23] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (6): 654-659.
- [24] Shurtleff MJ, Temoche-Diaz MM, Karfilis KV, et al. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *Elife*, 2016, 5 (8): e19276.
- [25] Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*, 2009, 23 (13): 1494-1504.
- [26] Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4 (1): 27066.
- [27] Sohn W, Kim J, Kang SH, et al. Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Med*, 2015, 47: e184.
- [28] Machida T, Tomofuji T, Maruyama T, et al. miR1246 and miR4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreaticobiliary tract cancer. *Oncol Rep*, 2016, 36 (4): 2375-2381.
- [29] Lin SY, Chang CH, Wu HC, et al. Proteome Profiling of Urinary Exosomes Identifies Alpha 1-Antitrypsin and H2B1K as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Urothelial Carcinoma. *Sci Rep*, 2016, 6 (9): 34446.
- [30] Xu JF, Yang GH, Pan XH, et al. Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e114627.
- [31] Wang KX, Xu LL, Rui YF, et al. The effects of secretion factors from umbilical cord derived mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2015, 10 (3): e120593.
- [32] Qin Y, Wang L, Gao Z, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Sci Rep*, 2016, 6 (2): 21961.
- [33] Zhang J, Liu X, Li H, et al. Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7 (1): 136.
- [34] 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. *Int J Biol Sci*, 2016, 12 (7): 836-849.
- [35] Sun W, Zhao C, Li Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity. *Cell Discov*, 2016, 2: 16015.
- [36] Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nat Commun*, 2016, 7: 10872.
- [37] Kagiya T, Taira M. Expression of MicroRNAs in the Extracellular Microvesicles of Murine Osteoclasts. *Okayama*; 2012, 3 (10): 142-150.
- [38] Sugatani T, Hruska KA. Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem*, 2009, 284 (7): 4667-4678.
- [39] Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, et al. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of Aevr1b. *FEBS Lett*, 2009, 583 (13): 2263-2268.
- [40] Zhang J, Zhao H, Chen J, et al. Interferon-beta-induced miR-155 inhibits osteoclast differentiation by targeting SOCS1 and MITF. *FEBS Lett*, 2012, 586 (19): 3255-3262.
- [41] Yang N, Wang G, Hu C, et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2013, 28 (3): 559-573.

(收稿日期: 2017-09-10;修回日期: 2017-10-03)