

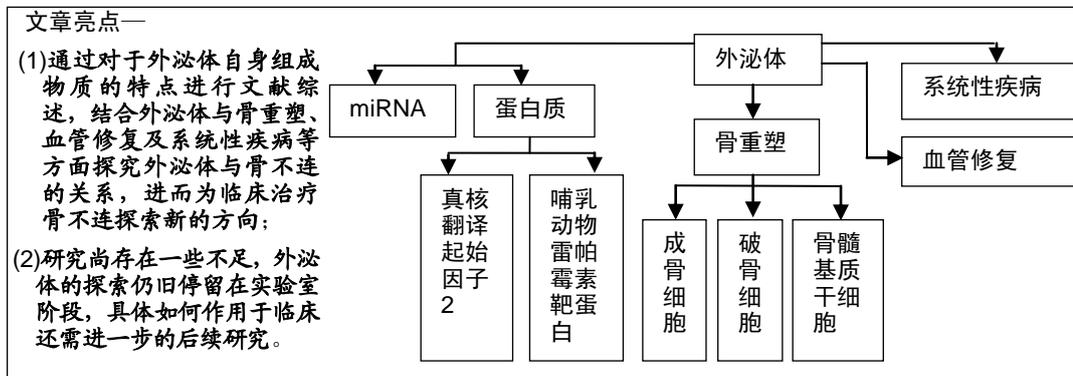
# 外泌体在骨不连治疗中的作用机制及进展

赖 渝<sup>1</sup>, 韩 杰<sup>2</sup> (1广西中医药大学附属瑞康医院, 广西壮族自治区南宁市 530011; 2广西中医药大学附属瑞康医院关节与运动医学科, 广西壮族自治区南宁市 530011)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2801

ORCID: 0000-0003-0172-7642(赖渝)

文章快速阅读:



赖渝, 男, 1996年生, 江西省赣州市人, 广西中医药大学在读硕士, 主要从事骨与关节疾病及运动损伤研究。

通讯作者: 韩杰, 副主任医师, 硕士生导师, 广西中医药大学附属瑞康医院关节与运动医学科, 广西壮族自治区南宁市 530011

文献标识码:A

投稿日期: 2019-12-30

送审日期: 2020-01-07

采用日期: 2020-02-26

在线日期: 2020-04-16



文题释义:

**外泌体:** 是细胞外囊泡小体, 由不同类型的细胞释放, 根据其自身各种特性, 可运用于损伤组织间药物的传递, 作为生物标志物, 介导细胞间信息交流等巨大作用。

**哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路:** 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种蛋白激酶, 其催化亚单位是2种生化上截然不同的复合物 mTORC1 和 mTORC2, 对骨形成的调节非常重要。

摘要

**背景:** 骨不连是骨折术后常见的并发症, 给患者带来了极大的困扰。随着外泌体技术的不断研发, 外泌体在骨不连的治疗中逐渐显露优势, 成为医疗工作新的研究方向。

**目的:** 从国内外研究中归纳总结, 探讨外泌体在骨不连治疗中的作用。

**方法:** 中文以“外泌体, 骨不连, 骨重塑, 骨再生, 血管损伤, 成骨细胞, 破骨细胞”检索万方、中国知网、维普文献数据 2003 至 2019 年的相关文献, 英文以“exosomes, nonunion, bone remodelling”, 检索 PubMed 数据库 2003 至 2019 年的相关文献, 根据纳入及排除标准摘选 50 篇文章。

**结果与结论:** ①近年来, 外泌体作用于骨不连的研究得到越来越多的重视, 外泌体中的 miRNA 及蛋白质可以通过影响骨细胞的分化作用于骨不连; ②随着进一步的研究发现, 外泌体可通过调节骨重塑, 促进血管修复, 改善系统性疾病等方面治疗骨不连; ③但是目前对于外泌体的研究仍处于实验阶段, 如何将其更好地应用于临床治疗还需进一步的探究。

**关键词:**

外泌体; 骨不连; miRNA; 骨重塑; 血管损伤

中图分类号: R459.9; R318; R687

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81760796, 81960803), 项目参与人: 韩杰; 广西高校青年教师基础能力提升项目(2019KY0352), 项目参与人: 韩杰; 广西中医药大学 2019 年校级科研课题(2019QN027), 项目参与人: 韩杰; 广西中医药大学一流学科课题(2019XK029), 项目参与人: 韩杰

缩略语:

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白: mammalian target of rapamycin, mTOR

## Mechanism and progress of exosomes in the treatment of nonunion

Lai Yu<sup>1</sup>, Han Jie<sup>2</sup> (1Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China; 2Department of Joint and Sports Medicine, Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

**Abstract**

**BACKGROUND:** Bone nonunion is a common complication after fracture, which brings great distress to patients. With the continuous development of exosomal technology, exosomes gradually show their advantages in the treatment of nonunion, which has become a new research direction in medical work.

**OBJECTIVE:** To summarize the researches in and outside China and explore the role of exosomes in the treatment of nonunion.

Lai Yu, Master candidate, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Han Jie, Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Joint and Sports Medicine, Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

**METHODS:** The authors retrieved related Chinese articles published from 2003 to 2019 in Wanfang database, CNKI and VIP database with the key words of “exosomes, nonunion, bone remodeling, bone regeneration, vascular injury, osteoblasts, osteoclasts” and related English articles published from 2003 to 2019 in PubMed with the key words of “exosomes, nonunion, bone remodeling”. Totally 50 articles were selected based on inclusion and exclusion criteria.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) In recent years, more and more attention has been paid to the study of exosomes on bone nonunion. MiRNAs and proteins in exosomes can affect bone nonunion by affecting the differentiation of osteocytes. (2) Studies have found that exosomes can treat bone nonunion by regulating bone remodeling, promoting vascular repair, and improving systemic diseases. (3) However, the current research on exosomes is still in the experimental stage. The specific method of how to better apply it to clinical treatment needs further exploration.

**Key words:** exosomes; bone nonunion; miRNA; bone remodeling; vascular injury

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81760796, 81960803 (to HJ); the Basic Ability Improvement Project of Young Teachers from Guangxi Universities, No. 2019KY0352 (to HJ); the School-Level Scientific Research Project of Guangxi University of Chinese medicine in 2019, No. 2019QN027 (to HJ); the First-Class Discipline Project of Guangxi University of Chinese medicine, No. 2019XK029 (to HJ)

## 0 引言 Introduction

骨不连是骨折术后的一种并发症, 常见于长骨骨折, 是一种常见且不易治愈的疾病。根据现今国际标准, 将骨折超过9个月未愈合, 且连续3个月没有明显的进展性愈合迹象, 认为是骨折不愈合<sup>[1]</sup>。骨不连患者可能会遭受更长时间的疼痛、承担更高的医疗费用。目前骨不连的具体致病分子机制尚不明确, 但在临床上发现了许多造成骨不连的影响因素, 大致上可分为局部、系统和治疗因素等。目前临床上对于骨不连的治疗方法有在骨缺损处进行自体骨、异体骨或人工合成骨的移植、强化钢板、髓内钉动力化、外固定等, 然而这些治疗方法大多需要二次手术, 容易增加失血感染的概率, 或发生免疫排斥等不良反应, 治疗效果差强人意。而近些年随着对外泌体技术的不断深入研究, 学者们发现外泌体可通过调节骨细胞和细胞因子来修复骨缺损, 从细胞、细胞因子等角度进行治疗, 从而达到治疗骨不连的目的, 这一发现为临床治疗骨不连提供了新的思路。

## 1 资料和方法 Data and methods

### 1.1 资料来源

1.1.1 检索人相关内容 第一作者。

1.1.2 检索文献时限 2003至2019年。

1.1.3 检索数据库 PubMed、中国知网、万方、维普数据库等数据库。

1.1.4 检索词 中文检索词为“外泌体, 骨不连, 骨重塑, 骨再生, 血管损伤, 成骨细胞, 破骨细胞”, 英文检索词为“exosomes, nonunion, bone remodelling”。

1.1.5 检索文献类型 包括研究原著、综述、病例报告等。

### 1.2 入选与排除标准

1.2.1 纳入标准 ①有关外泌体自身成分的相关研究; ②涉及外泌体与骨重塑方面相关研究; ③有关外泌体在血管修复的作用的相关研究; ④外泌体与系统性疾病治疗的相关研究。

1.2.2 排除标准 筛除重复性、时间跨度大的文献。

1.3 质量评估 计算机检索共得到214篇相关文献, 根

据标题及摘要进行初步筛选, 排除重复性研究和年代久远的文献。最终根据标准共纳入50篇文章。仔细阅读文章内容, 总结有效信息并严谨撰写文章。文献检索流程图见图1。

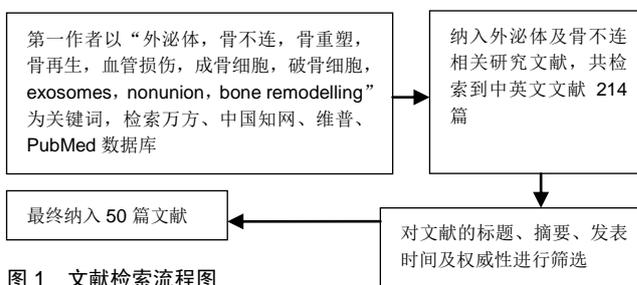


图1 文献检索流程图

## 2 结果 Results

2.1 骨不连 骨不连至今仍是临床工作者需要攻克的难关。此文就骨不连的发生机制系统探讨外泌体在骨不连治疗中可能存在的新治疗方法。

骨折愈合的过程就是一个“淤去、新生、骨合”的过程, 整个过程是持续的和渐进的。在骨折的愈合过程中存在一些危险因素, 通常分为局部、系统和治疗因素等, 这些因素阻碍骨折在各个阶段的愈合, 最终导致骨不连。局部因素中有血管的损伤, 其特征是由于缺乏血液供应导致细胞、骨痂、软骨极少; 另外还有一些包括骨折部位、骨折类型、感染等也是导致骨不连发生的局部因素。系统因素包括一些系统性疾病, 如临床上常见的糖尿病、痛风性关节炎等系统性疾病。而治疗因素源于目前的一些治疗方法上的缺陷。骨移植是目前临床上治疗骨不连的一种常规方法, 分为自体移植、异体移植及其他移植代替物。其中自体移植因为移植骨来源于患者自身, 所以较其他两种移植具有完全的组织相容性和强大的骨传导、骨诱导和成骨活性, 但是这种方法增加了失血、感染的概率, 并且加大了患者的疼痛。而同种异体骨移植的应用不能避免传染病或免疫排斥的风险, 此外, 骨移植替代物没有细胞成分, 其效果不如自体骨。另外, 骨不连的患者骨端不稳定, 不能给患者恢复提供一个稳定的机械环境。所以在临床上给予二次手术治疗来提高患者的机械稳定性。临床上一般选择钢板加压,

给予骨折端一个较为稳固的生长环境,但是其会给患者带来较大的创伤,给血液循环带来不良影响。另一种方法是使用髓内钉,其具有创伤小、出血少等优点,给予骨折端纵向压力,进而促进骨折端的愈合<sup>[2]</sup>。一些研究报告表明,采用髓内钉治疗骨不连能达到较高愈合率,但是没有提到骨不连伴有短畸形或成角畸形,所以髓内钉治疗仍然存在骨折不愈合的情况,同时伴有一些复杂的并发症,需要多次手术才能治疗<sup>[3]</sup>。而外泌体作为当下最为热门的研究方向,因其能作用于骨细胞等物质,使其为骨不连的治疗提供了新思路。

**2.2 外泌体的来源与功能** 外泌体在1981年被发现并被描述为外膜泡,到目前,对于外泌体的相关研究已成为生物医学领域较为热门的研究方向,其机制与功能一直处于研究中,并被不断开发应用于各个疾病领域当中,对于多种疾病的治疗都起到了一定的效果。

**2.2.1 外泌体的来源** 外泌体是细胞外囊泡小体,直径为40-100 nm<sup>[4]</sup>,由不同类型的细胞释放,如巨噬细胞、肿瘤细胞、神经细胞、T细胞等,同时最近研究表明,骨相关细胞,包括破骨细胞、成骨细胞、骨髓间充质干细胞等细胞也分泌外泌体<sup>[5]</sup>。除此之外,在体液如尿液、血液、羊水、恶性腹水、支气管肺泡灌洗液、滑液和母乳中也发现了外泌体<sup>[6]</sup>。外泌体的形成和传递是由供体细胞的质膜内化产生的内吞小体(Endosomes)开始,然后蛋白质和RNA(包括lncRNA、circRNA、mRNA和miRNA)通过转运所需的内体分选复合物依赖性或非依赖性机制选择性地被装入多泡体内。随后,多泡体或者融合到溶酶体上进行降解,或者通过与质膜融合释放到细胞外空间以产生外泌体。随后,外泌体通过特异性识别进入受体细胞,将转运物质释放,其具体传递过程见图2<sup>[7-8]</sup>。外泌体的成分中含有一些根据供体细胞类型而改变的生物活性分子,同时外泌体富含一些来自于分泌细胞的成分,如mRNAs、lncRNAs、circRNAs、脂质、蛋白质、DNA等,它们在信息传递过程中起到了重要作用。

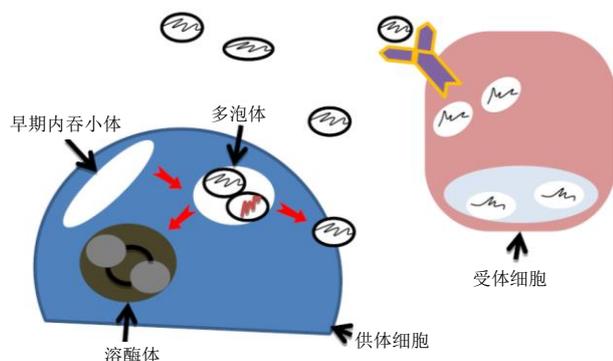


图2 外泌体衍生过程示意图

**2.2.2 外泌体的功能** 在过去的20年里,外泌体作为天然衍生的纳米粒子已经被证明具有各种应用。首先,作

为天然衍生的纳米粒子,因其自身的独特结构,在药物运载方面具有较大的作用,研究表明,外泌体可以作为载体,运用于损伤组织间药物的传递,或者在抗癌治疗中运载药物发挥功效<sup>[9]</sup>。其次,外泌体分布广泛,所以其具有作为生物标志物的作用,可用于帮助疾病诊断,判断疾病分期的作用研究<sup>[10]</sup>。另外,外泌体通过转运膜成分以及细胞质成分,如蛋白质、脂质和基因组材料,包括供体细胞和受体细胞之间的mRNA和miRNA,可起到细胞间通讯器的作用,介导细胞间信息交流<sup>[11]</sup>。如骨细胞中的成骨细胞、破骨细胞等分泌的外泌体就作用于骨微环境之间的细胞通讯<sup>[12]</sup>。

### 2.3 外泌体在骨不连作用的调节机制

**2.3.1 miRNA调节的外泌体对骨不连的作用** 近年来,研究者们发现外泌体中的miRNA在基因表达调控中发挥着关键作用,这使其成为研究热点<sup>[13]</sup>。众所周知,miRNA被称为信使RNA(mRNA)表达的转录后调节剂。在细胞质中,Dicer酶将前miRNA转化为miRNA,后者被载入RNA诱导的沉默复合物<sup>[14-15]</sup>。同时,运输所需的内吞小体复合物作为miRNAs和外泌体之间的连接,与RNA诱导的沉默复合物共同作用,将miRNAs加载到外泌体中<sup>[16]</sup>。miRNA是RNA诱导的沉默复合物的组成部分,该复合物介导miRNA向受体细胞中靶细胞转移。目前研究发现,外泌体中miRNA可通过调节骨细胞的分化过程来对作用于骨不连的治疗。例如,研究表明,许多外泌体miRNA参与骨重塑的调节,其中的miR-30d-5p和miR-133b-3p可参与RUNX2对成骨细胞分化的控制来抑制成骨细胞分化<sup>[17-18]</sup>,相反的是,let-7却可通过调节高迁移率基因AT-hook 2(HMGA2)和AXIN2来增强成骨细胞分化<sup>[19]</sup>。XU等<sup>[20]</sup>通过使用包含894个人类成熟miRNA探针的miRNA阵列对从骨髓间充质干细胞培养上清液中分离的外泌体进行了分析,结果揭示了14种外泌体miRNA在不同时间点的差异表达,其中5种miRNA(miR-199b、miR-218、miR-148a、miR-135b和miR-221)变化超过2倍。这表明在人骨髓间充质干细胞成骨分化过程中,外泌体miRNA可能表达差异。基于这些研究,外泌体miRNA在功能上被证实参与骨组织的调节重塑,而质膜融合和胞吞作用是当前确定的解释靶细胞摄取胞外体miRNAs的机制,在靶细胞中它们发挥生物学功能,而其对于骨细胞分化的调节可能是基于其在多种途径信号通路中的调节,如Wnt、转化生长因子 $\beta$ 和钙信号通路等<sup>[16]</sup>。

**2.3.2 蛋白质调节的外泌体对骨不连的作用** 基因肿瘤学分析表明,外泌体主要来源于质膜,主要参与蛋白质定位和细胞内信号传递,途径主要涉及外泌体生物发生、形成、吸收和成骨。根据一些对骨源性外泌体的蛋白质组学分析的研究,扩展了目前理解蛋白质在外泌体介导的细胞间通讯中作用的知识。根据研究发现,来源

于MC3T3小鼠成骨细胞的外泌体含有大量富含成骨信号途径的蛋白质,如真核翻译起始因子2(EIF2)信号和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号<sup>[21]</sup>。

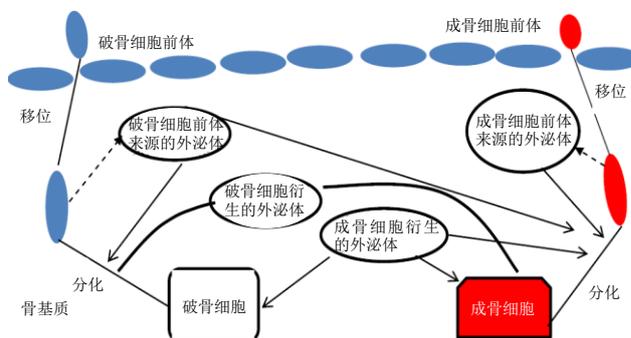
在真核翻译起始因子2途径中,鉴定出的蛋白质在翻译起始和翻译延伸过程中广泛分布,这表明MC3T3衍生的外泌体参与翻译起始和延伸过程。真核翻译起始因子2途径以tEIF2a为中心<sup>[22]</sup>,由于真核翻译起始因子2a的磷酸化,整体翻译率降低了<sup>[23]</sup>。真核翻译起始因子2a在成骨细胞分化过程中至关重要,其参与骨形态发生蛋白2诱导的成骨细胞分化,是骨骼系统发育所必需的。内质网应激可激活PERK-EIF2a-ATF4途径,从而刺激成骨所必需的基因表达<sup>[24-25]</sup>。在应激反应期间,内质网激酶使真核翻译起始因子2a磷酸化。磷酸化真核翻译起始因子2a介导所选mRNA的翻译上调,该mRNA编码促进成骨细胞分化的活化转录因子4(ATF4)<sup>[26]</sup>。

PERK-EIF2a-ATF4途径的特定激活可能代表了针对如成骨不全的治疗策略。这表明外泌体中磷酸化的真核翻译起始因子2a的水平可能具有评估骨病类型和程度的潜力。因此,含有疾病相关蛋白的外泌体也可能是诊断标记物的来源和新治疗方法的目标。

雷帕霉素的哺乳动物靶标是一种蛋白激酶,其是2个不同信号复合物,即mTORC1和mTORC2的催化亚基。mTORC1激活核糖体S6激酶(S6K),并使真核起始因子4E结合蛋白1失活,从而刺激蛋白质合成,细胞增殖和整个细胞周期的进程。当mTORC2激活Akt和PKC $\zeta$ 时,促进细胞存活和细胞骨架重组的作用也增强<sup>[27-28]</sup>。雷帕霉素作为mTOR抑制剂,在体外和体内抑制成骨作用<sup>[29]</sup>。进一步的研究中也证实mTOR对骨形成的贡献,在与载体处理的对照组相比,雷帕霉素处理的C57BL/6小鼠中观察到明显更少的骨形成和更低的小梁骨量<sup>[30]</sup>。另外,骨髓间充质干细胞核受体过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 是脂肪细胞分化的必要转录因子,对骨形成具有负调节作用<sup>[31]</sup>。有研究证明了Akt/mTOR/p70S6K途径在骨髓间充质干细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 敲除后被激活,或者在成骨细胞中被过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 拮抗剂激活,骨髓间充质干细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 的体外缺失显著提高了p70S6K(p-p70S6K)的磷酸化,这是mTOR信号的主要下游效应物<sup>[30]</sup>。与p-p70S6K的增加一致,AKT(p-AKT)的磷酸化也在Ad-Cre用于敲除过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 时得到增强,AKT是mTOR信号的上行激活剂之一。所以,内源性过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 的抑制增加了mTOR信号和成骨作用。这些结果清楚地表明mTOR途径对骨细胞成骨作用至关重要。

2.4 外泌体在骨重塑的调节作用 通过对骨不连的发生机制可以得出,骨折端不愈合的诱发因素之一就是骨折

端的骨代谢遭到破坏。所以,解决骨重塑在骨折恢复期的问题成为治疗骨不连的一个研究方向。而骨源性外泌体通过转移破骨细胞和成骨细胞分化和交流所需的分子,参与调节骨重塑,作用示意图见图3<sup>[32]</sup>。



图注:黑色虚线箭头指示分泌过程,黑色实线箭头表示促进细胞过程,黑色曲线表示抑制细胞过程

图3 外泌体调节骨重塑示意图

2.4.1 外泌体对于成骨细胞的调节 来源于骨髓间充质干细胞的成骨细胞,具有促进骨形成,对骨的矿化起到调节的作用。而成骨细胞分泌的外泌体可以通过调节多种信号途径来调节成骨分化,Wnt信号通路就是其中一种。Wnts是由19种分泌型糖蛋白组成的家族,可通过 $\beta$ -catenin依赖的经典和 $\beta$ -catenin依赖的非经典途径调节细胞的增殖,分化和凋亡过程,从而介导发育和发育后的生理过程<sup>[33]</sup>。根据下游介导的信号传导,Wnt被分为2个亚家族。Wnt1子家族(例如Wnt1、Wnt3a和Wnt8)激活经典Wnt/ $\beta$ -catenin途径,而Wnt5a子家族(例如Wnt5a和Wnt11)激活非经典途径。矿化MC3T3-E1外泌体改变了受体ST2细胞的miRNA表达,从而激活ST2细胞的Wnt/ $\beta$ -catenin途径,以促进受体ST2细胞的成骨细胞分化。这种外泌体介导的基因和途径网络集中在 $\beta$ -catenin编码基因Ctnnb1上,Ctnnb1是成骨细胞分化的必要转录因子,而激活Wnt信号通路就是其发生机制<sup>[34]</sup>。根据研究显示,miR-218/Wnt信号通路可以促进成骨细胞分化,miR-218通过在成骨过程中下调3种Wnt信号抑制剂来刺激Wnt通路:分别为硬化素、Dickkopf2(DKK2)和分泌的卷曲相关蛋白2<sup>[35]</sup>。而同时Wnt信号可诱导miR-218,进而miR-218可增加Wnt活性。因此,miR-218和Wnt信号通过前馈-正反馈回路耦合以形成生物调节回路。

2.4.2 外泌体对破骨细胞的调节 骨重塑是由破骨细胞和成骨细胞协同作用调节,突出了2种类型细胞之间的相互作用。越来越多的证据表明,除了对成骨细胞导向的破骨细胞骨吸收的调节机制之外,破骨细胞还通过直接细胞-细胞接触或通过细胞因子间接调节成骨细胞骨形成<sup>[36]</sup>。在破骨细胞特异性miR-214转基因小鼠中,外泌体分泌到血清中,miR-214和ephrinA2水平升高,而外泌体通过ephrinA2和EphA2的相互作用特异性识别成骨细胞。同时,成骨细胞中miR-214水平升高,成

骨细胞功能受到抑制,因此这些外泌体对成骨细胞活性有抑制作用<sup>[37]</sup>。在体外,这些外泌体也表现出对成骨细胞功能的抑制作用。来自骨质疏松症患者和去卵巢小鼠的外体含有较高水平的miR-214和ephrinA2蛋白,表明外泌体对成骨细胞活性具有显著的抑制作用。在去卵巢小鼠中,通过下调Rab27a来防止外泌体形成,以增加成骨细胞活性,所以破骨细胞分泌的外泌体可以选择性的调节成骨细胞的活性。同时,根据LI等<sup>[38]</sup>的实验研究也可以发现,对于破骨细胞衍生的外泌体miR-214-3p的抑制,可能是治疗涉及减少骨形成的骨骼疾病的策略。

另一方面,根据骨吸收因子如甲状旁腺激素(甲状旁腺激素相关蛋白是破骨细胞活化中研究最充分和最重要的信号分子之一)对核因子 $\kappa$ B-RANKL的诱导发现,核因子 $\kappa$ B-RANKL表达在甲状旁腺激素处理的成骨细胞分泌的外泌体中显著增加<sup>[39]</sup>。实验发现,在整个小鼠骨髓培养物中,1,25-二羟基维生素D3依赖性破骨细胞的形成可以被来源于破骨细胞前体的外泌体促进,但是被来源于成熟破骨细胞的外泌体抑制<sup>[40]</sup>。从机制上讲,这进一步证明了成熟破骨细胞衍生的外泌体含有核因子 $\kappa$ B,核因子 $\kappa$ B可能竞争性地抑制核因子 $\kappa$ B-RANKL对破骨细胞表面核因子 $\kappa$ B的刺激。这项研究表明破骨细胞衍生的外泌体是破骨细胞生成的旁分泌调节剂。

**2.4.3 外泌体对骨髓间充质干细胞的调节** 骨髓间充质干细胞衍生的外泌体具有骨再生的成骨能力。根据MARTINS等<sup>[41]</sup>的研究表明,人类骨髓间充质干细胞衍生的外泌体可以调节人类骨髓间充质干细胞的成骨谱系。QIN等<sup>[42]</sup>研究发现骨髓间充质干细胞来源的外泌体可以刺激成骨细胞分化。他们在骨髓间充质干细胞衍生的外泌体中鉴定了3种高度富集的成骨miRNA,即miR-196a, miR-27a和miR-206,它们参与了骨髓间充质干细胞衍生的外泌体介导的成骨细胞分化调控。在进一步的发现中,骨髓间充质干细胞衍生的外泌体可以增强具有临界大小颅骨缺损的大鼠模型的骨形成,表明骨髓间充质干细胞衍生的外泌体具有作为促进骨再生价值的潜力。在马丁等人的另一项研究中发现,人骨髓间充质干细胞衍生的ADI-POC细胞可以释放含有成脂性mRNA(PPAR $\gamma$ , leptin, CEBP $\alpha$ 和CEBP $\delta$ 转录物)和抗成骨性miRNAs(miR-138、miR30c、miR125a、miR-125b、miR-31)的外泌体,这些外泌体被转移到骨髓间充质干细胞衍生的成骨细胞中,表明外泌体在介导骨髓内脂肪细胞对成骨细胞驱动的脂肪细胞转换中发挥作用。所以,骨髓间充质干细胞来源的外泌体对于成骨细胞的增殖和分化具有促进作用,但是这种作用的具体机制还需做进一步的研究确认<sup>[43]</sup>。

**2.5 外泌体对于血管修复的调节** 尿源性干细胞的外泌体能够促进大鼠股骨骨不连的愈合,其修复作用可能与

促进骨不连周围血管再生有关<sup>[44]</sup>。在血管的形成过程中,外泌体具有重要作用,其机制是外泌体中含有丰富的miR-125a, miR-125a,可以减少PLL4的表达,促进血管形成,而在将miR-125a基因敲除后,外泌体的促血管新生作用则被明显抑制<sup>[45]</sup>。根据一些研究显示,内皮祖细胞促进内皮再生的作用不是通过直接分化成熟内皮细胞来促进的,而是通过旁分泌机制刺激组织内上皮细胞的增殖和迁移来促进的,而外泌体是旁分泌的关键成分。KUCCHARZEWSKA等<sup>[46]</sup>在高度恶性多形性胶质细胞瘤的研究中发现胶质细胞瘤细胞来源的外泌体能够通过周边内皮细胞中的PI3K/Akt信号通路加速新生血管生成。外泌体是人内皮祖细胞旁分泌的活性成分,并可通过上调内皮细胞功能促进球囊损伤大鼠模型的血管修复。所以外泌体对血管损伤的修复起到了重要作用,但如何更好的使其作用于临床还需要进一步的研究<sup>[47]</sup>。

**2.6 外泌体对于系统性疾病调节** 在骨不连的发生机制中已阐明,糖尿病也是骨不连诱发的其中一个因素,随着学者近年来对于外泌体与糖尿病之间关系的研究发现,外泌体在糖尿病的治疗中具有较好的前景。糖尿病的特征是胰腺 $\beta$ 细胞分泌胰岛素发生功能紊乱,不同程度的胰岛素抵抗合并胰岛素相对缺乏。根据对于糖尿病患者的检测发现,当患者发生代谢紊乱时其循环血里的外泌体数量增加<sup>[48]</sup>。有研究证明,脂肪细胞、肌细胞和肝细胞组成的老年小鼠骨髓间充质干细胞释放的外泌体可以在体内和体外产生胰岛素抵抗,miR-29b-3p的数量在骨髓间充质干细胞释放的外泌体中明显增加,下调miR-29b-3p可以显著改善胰岛素抵抗<sup>[49]</sup>。将间充质干细胞的条件培养基用于糖尿病大鼠,可以促进腓骨骨折缺损处组织生长和血管生成<sup>[50]</sup>。同时,间充质干细胞来源外泌体能够加速糖尿病大鼠骨缺损愈合,促进骨生成,增加缺损处骨痂形成和骨密度,增加骨小梁厚度和体积,其修复作用是多渠道的,其可以促进糖尿病骨生成,也能够促进高糖环境下间充质干细胞自身增殖,所以后续研究应从更多的角度出发。

### 3 结论 Conclusions

综上所述,骨不连的发生是一个多因素、多机制参与的复杂过程,而外泌体作用于骨不连这一领域在现今研究也有了许多的进展。根据研究发现,外泌体可以利用自身的纳米尺寸、高生物相容性等结构特性,调节细胞间的信息沟通。同时研究发现,外泌体自身miRNA、蛋白质等组成物质,可以调控包括成骨细胞、破骨细胞等骨细胞的分化。通过这一系列的功能,外泌体可在骨重塑过程中调控骨细胞平衡,改善骨折不愈合时的骨微环境;同时可通过作用于PI3K/Akt等信号通路改善血管情况,加强骨不连处血运的恢复;另外,外泌体可改善

某些可造成骨不连的系统性疾病,有助于减少骨不连的发生情况。但是目前对于外泌体的研究仍旧停留在实验阶段,特别是对于骨不连的研究还在早期,研究者只是发现其具有相应的作用,但是具体发生机制仍然处于研究中,所以更好地理解外泌体,阐释外泌体对于骨不连作用的机制,探讨外泌体在骨不连中的临床应用,仍是未来研究的方向。

**致谢:** 感谢导师陈跃平教授、广西中医药大学科技处及广西中医药大学附属瑞康医院科技科各位老师们在研究过程中的大力支持。

**作者贡献:** 赖渝负责文章的构思与设计、文献搜集、撰写论文,韩杰负责质量控制、审校及文章整体监督管理。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(81760796, 81960803)、广西高校青年教师基础能力提升项目(2019KY0352)、广西中医药大学2019年校级科研课题(2019QN027)、广西中医药大学一流学科课题(2019XK029)”的基金资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**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不存在利益冲突。

**写作指南:** 该研究遵守《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA指南)。

**文章查重:** 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。

**文章外审:** 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。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**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。

#### 4 参考文献 References

[1] CALORI GM. Non-unions. Clinical Cases in Mineral & Bone Metabolism the Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis Mineral Metabolism & Skeletal Diseases, 2017;14(2):186-188.

[2] 骆永锋,龚劲纯,吴俊,等.带锁髓内钉治疗四肢创伤骨折后骨不连的临床研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2017,38(2):193-195.

[3] WU KJ, LI SH, YE H KT, et al. The risk factors of nonunion after intramedullary nailing fixation of femur shaft fracture in middle age patients. Medicine(Baltimore). 2019;98:e16559.

[4] YANEZ-MO M, SIJANDER PR, ANDREU Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J Extracell Vesicles. 2015; 4(1):27066.

[5] 李晓晔,周潇逸,张子程,等.外泌体中miRNA对骨重建过程影响研究进展[J].中国矫形外科杂志,2019,27(18):1683-1686.

[6] 赵濛,刘志红,李金泉.外泌体组成特征及其作为细胞通讯和分子标记的生物学作用[J].中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(6):612-619.

[7] LU J,WANG QY,SHENG JG, et al. Exosomes in the repair of bone defects: next-generation therapeutic tools for the treatment of nonunion. Biomed Res Int. 2019;2019: 1983131.

[8] 寿崧,马宇航,虎力,等.外泌体在糖尿病及其并发症的发生、发展和诊治中的作用[J].生理学报,2019,71(6):917-934.

[9] LU Z, ZUO B, JING R, et al. Dendritic cell-derived exosomes elicit tumor regression in autochthonous hepatocellular carcinoma mouse models. J Hepatol. 2017;67: 739-748.

[10] EL-SAGHIR J, NASSAR F, TAWIL N, et al. ATL-derived exosomes modulate mesenchymal stem cells: potential role in leukemia progression. Retrovirology. 2016; 13: 73.

[11] BRAICU C, TOMULEASA C, MONROIG P, et al. Exosomes as divine messengers: are they the Hermes of modern molecular oncology? Cell Death Differ. 2015;22: 34-45.

[12] POURAKBARI R, KHODADADI M, AGHEBATI-MALEKI A, et al. The potential of exosomes in the therapy of the cartilage and bone complications; emphasis on osteoarthritis. Life Sci. 2019;236: 116861.

[13] YAN Z, GUO Y, WANG Y, et al. MicroRNA profiles of BMSCs induced into osteoblasts with osteoinductive medium. Exp Ther Med. 2018;15: 2589-2596.

[14] HAMMOND SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. FEBS Lett. 2005;579: 5822-5829.

[15] HUTVAGNER G. Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. Febs Lett. 2005;579(26): 5850-5857.

[16] WEILNER S, SCHRAML E, REDL H, et al. Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging. Exp Gerontol. 2013;48(7):626-633.

[17] ZHANG Y, XIE RL, CROCE CM, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(24):9863-9868.

[18] LI Z, HASSAN MQ, VOLINIA S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(37): 13906-13911.

[19] LIU Y, MA Y, ZHANG J, et al. Exosomes: a novel therapeutic agent for cartilage and bone tissue regeneration. Dose Response. 2019;17: 1559325819892702.

[20] 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.

[21] GE M, KE R, CAI T, et al. Identification and proteomic analysis of osteoblast-derived exosomes. Biochem Biophys Res Commun. 2015;467(1):27-32.

[22] SHRESTHA N, BAHNAN W, WILEY DJ, et al. Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. J Biol Chem. 2012; 287(34):28738-28744.

[23] AKTAS BH, BORDELOIS P, PEKER S, et al. Depletion of eIF2-GTP-Met-tRNAi translation initiation complex up-regulates BRCA1 expression in vitro and in vivo. Oncotarget. 2015;6:6902-6914.

[24] JOHNSON ME, DELIARD S, ZHU F, et al. A ChIP-seq-defined genome-wide map of MEF2C binding reveals inflammatory pathways associated with its role in bone density determination. Calcif Tissue Int. 2014;94(4):396-402.

- [25] TANAKA KI, KAJI H, YAMAGUCHI T, et al. Involvement of the Osteoinductive Factors, Tmem119 and BMP-2, and the ER Stress Response PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4 Pathway in the Commitment of Myoblastic into Osteoblastic Cells. *Calcif Tissue Int*. 2014;94(4):454-464.
- [26] YANG X, MATSUDA K, BIALEK P, et al. ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*. 2015;117(3):387-398.
- [27] NOJIMA H, TOKUNAGA C, EGUCHI S, et al. The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Partner, Raptor, Binds the mTOR Substrates p70 S6 Kinase and 4E-BP1 through Their TOR Signaling (TOS) Motif. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15461-15464.
- [28] JACINTO E, LOEWITH R, SCHMIDT A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*. 2004;6(11):1122-1128.
- [29] LI X, CHANG B, WANG B, et al. Rapamycin promotes osteogenesis under inflammatory conditions. *Mol Med Rep*. 2017; 16: 8923-8929.
- [30] SUN H, KIM JK, MORTENSEN RM, et al. Osteoblast-targeted Suppression of PPAR $\gamma$  Increases Osteogenesis through Activation of mTOR Signaling. *Stem Cells*. 2013;31:2183-2192.
- [31] LONG H, ZHU Y, LIN Z, et al. miR-381 modulates human bone mesenchymal stromal cells (BMSCs) osteogenesis via suppressing Wnt signaling pathway during atrophic nonunion development. *Cell Death Dis*. 2019;10: 470.
- [32] XIE Y, CHEN Y, ZHANG L, et al. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *J Cell Mol Med*. 2017;21: 1033-1041.
- [33] MOHAMMED MK, SHAO C, WANG J, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis*. 2016;3(1):11-40.
- [34] CUI Y, LUAN J, LI H, et al. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *FEBS Lett*. 2016; 590(1):185-192.
- [35] HASSAN MQ, MAEDA Y, TAIPALEENMAKI H, et al. miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells. *J Biol Chem*. 2012;287(50):42084-42092.
- [36] NEGISHI-KOGA T, SHINOHARA M, KOMATSU N, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature Med*. 2011;17(11):1473-1480.
- [37] SUN W, ZHAO C, LI Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity. *Cell Discov*. 2016; 2:16015.
- [38] LI D, LIU J, GUO B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nature Commun*. 2016;7:10872.
- [39] DI LEVA G, CHEUNG DG, BUZZETTI M. miRNAs in bone metastasis. *Exp Rev Endocrinol Metabol*. 2017: 17446651.2017.1383893.
- [40] HUYNH N, VONMOSS L, SMITH D, et al. Characterization of regulatory extracellular vesicles from osteoclasts. *J Dent Res*. 2016:0022034516633189.
- [41] MARTINS M, RIBEIRO D, MARTINS A, et al. Extracellular vesicles derived from osteogenically induced human bone marrow mesenchymal stem cells can modulate lineage commitment. *Stem Cell Rep*. 2016; 6(3):284-291.
- [42] 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; 6:21961.
- [43] 陈燕,姜胜军,彭友俭.骨髓间充质干细胞来源的外泌体对成骨细胞增殖和分化的影响[J].口腔医学研究,2019,35(4):401-404.
- [44] 刘一飞,王宇辰,朱昱,等.尿源性干细胞的外泌体修复骨不连的作用研究[J].上海医学,2019,42(7):411-417.
- [45] LIANG X, ZHANG L, WANG S, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *J Cell Sci*. 2016; 129(11):2182-2189.
- [46] KUCHARZEWSKA P, CHRISTIANSON HC, WELCH JE, et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(18):7312-7317.
- [47] LI XC, CHEN CY, WEI LM, et al. Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Cytotherapy*. 2016;18(2):253-262.
- [48] ABDELALI A, PIERRE-HENRI D, TAREK B, et al. Microparticles from patients with metabolic syndrome induce vascular hypo-reactivity via fas/fas-ligand pathway in mice. *PLoS ONE*. 2011; 6(11):e27809.
- [49] SU T, XIAO Y, XIAO Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomal mir-29b-3p regulates aging-associated insulin resistance. *ACS Nano*. 2019;13:2450-2462.
- [50] FURUTA T, MIYAKI S, ISHITOBI H, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(12):1620-1630.