

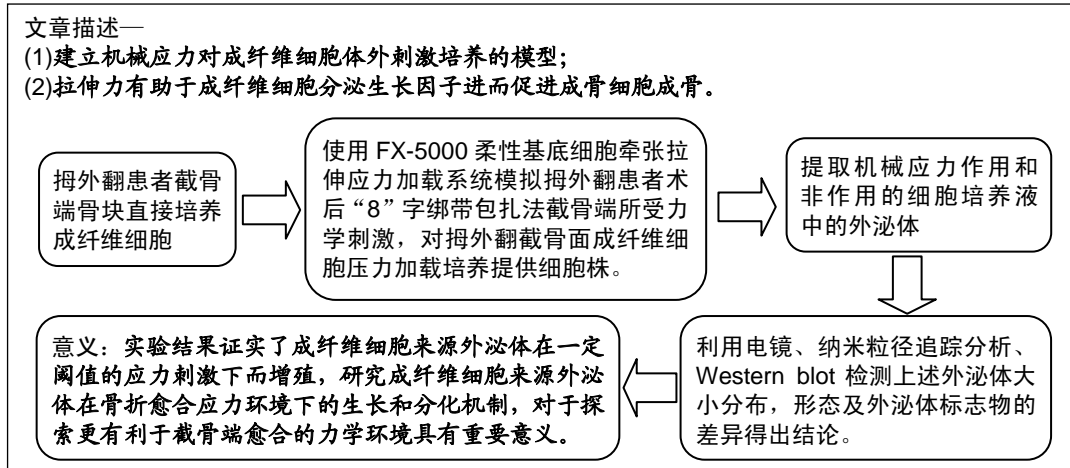
# 机械应力对拇外翻足截骨端成纤维细胞外泌体的调控机制

谢飞, 李晏乐, 林新晓, 胡海威, 桑志成, 孙永生, 蒋科卫, 程程, 温冠楠, 温建民, 孙卫东(中国中医科学院望京医院骨关节二科, 北京市 100102)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1847

ORCID: 0000-0001-9331-2617(谢飞)

文章快速阅读:



谢飞, 男, 1986 年生, 山东省潍坊市人, 汉族, 博士, 主要从事骨科相关疾病的临床诊治与基础研究。

通讯作者: 孙卫东, 主任医师, 教授, 中国中医科学院望京医院关节二科, 北京市 100102

通讯作者: 温建民, 主任医师, 教授, 中国中医科学院望京医院关节二科, 北京市 100102

文献标识码: B

来稿日期: 2019-01-30

送审日期: 2019-02-15

采用日期: 2019-04-30

在线日期: 2019-09-30



文题释义:

拇外翻微创截骨: 利用削磨钻对拇外翻患者第一跖骨头颈部进行楔形截骨后行整复手法矫正畸形, 后使用“8”字绷带外固定并配合康复锻炼达到治疗效果。

外泌体: 特指直径为 50-120 nm 的外囊泡, 由 Trams 在 1981 年首次描述, 1987 年 Johnstone 正式定义为外泌体。人体几乎所有的细胞均能产生外泌体, 其可携带内容物包含蛋白质、DNA、mRNA、微小 RNA 等, 这种特异性分泌的囊泡广泛参与细胞间的通讯。

摘要

背景: 微创治疗拇外翻术后“裹帘”外固定(通过趾蹠间夹垫“8”字绷带弹性外固定实现), 为截骨端愈合提供适宜的力学环境。可见应力刺激对截骨端愈合至关重要, 但其机制尚未明确。

目的: 探索机械应力对成纤维细胞来源外泌体的调控机制。

方法: 取拇外翻手术取得的第 1 跖骨头内侧骨组织, 采用组织直接贴壁培养的方法进行成纤维细胞体外培养获取传代细胞, 模拟拇外翻患者术后“8”字绷带包扎法截骨端所受力学刺激, 提取外泌体。利用电镜、纳米粒径追踪分析、Western blot 检测外泌体大小分布、形态及外泌体标志物的差异。研究方案于 2013-03-21 经中国中医科学院望京医院伦理委员会批准, 批准编号为 2013-03-21。

结果与结论: 拇外翻足截骨块培养的成纤维细胞加载 15% 的静态拉伸作用后, 分泌的外泌体增加, 且外泌体中均存在 CD9 和 CD81。2 组外泌体的粒径分布范围相符, 且 15% 的静态拉伸作用使得外泌体的浓度增高。

说明 15% 的拉伸力有助于成纤维细胞分泌生长因子, 进而有助于促进成骨细胞成骨。

关键词:

成纤维细胞来源外泌体; 拇外翻; 微创截骨; 机械应力; 外泌体; 机械应力; 组织工程

中图分类号: R459.9; R363; R68

基金资助:

国家自然科学基金项目(81573800, 81273984), 项目负责人: 温建民

## Mechanism underlying mechanical stress regulating fibroblasts-derived exosomes at the osteotomized end following hallux valgus correction

Xie Fei, Li Yanle, Lin Xinxiao, Hu Haiwei, Sang Zhicheng, Sun Yongsheng, Jiang Kewei, Cheng Ying, Wen Guannan, Wen Jianmin, Sun Weidong (Second Department of Bone and Joints, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

Abstract

**BACKGROUND:** Bandage internal fixation (defined as the interphalangeal insertion of “8”-shaped bandage for elastic external fixation) produces a suitable mechanical environment for bone healing after minimally invasive treatment of hallux valgus. Stress stimulation is essential for bone healing after osteotomy, but the mechanism is still unclear.

Xie Fei, MD, Second Department of Bone and Joints, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

Corresponding author: Sun Weidong, Chief physician, Professor, Second Department of Bone and Joints, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

Corresponding author: Wen Jianmin, Chief physician, Professor, Second Department of Bone and Joints, Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China

**OBJECTIVE:** To study the regulatory mechanism of mechanical stress on fibroblasts-derived exosomes.

**METHODS:** The medial bone tissue of the first metatarsal bone obtained in the surgery for hallux valgus was taken as a specimen. The fibroblasts were passaged *in vitro* via direct tissue adherent culture. The loading system provided a cell strain simulating external fixation using "8"-shaped bandage for the pressure-loading culture of hallux valgus fibroblasts, and then exosomes were extracted. Size distribution, morphology and markers of exosomes were detected by electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and western blot assay. The study protocol was approved by the Ethics Committee of Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences with approval No. 2013-03-21 on March 21, 2013.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Static stretching (15%) could promote the secretion of exosomes from fibroblasts. The expression of CD9 and CD81 was detected in the fibroblasts-derived exosomes of the control group and the experimental group. Range of exosome particle size distribution was consistent in the two groups of exosomes, and 15% static stretching increased the concentration of exosomes. This indicates that 15% static stretching helps fibroblasts secrete growth factors, which in turn contribute to osteoblast osteogenesis.

**Key words:** fibroblast-derived exosomes; hallux valgus; minimally invasive osteotomy; mechanical stress; exosomes; mechanical stress; tissue engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81573800 and 81273984 (both to WJM)

## 0 引言 Introduction

成纤维细胞又称纤维母细胞, 是人体组织对应力作用的主要感受细胞之一, 也是组织创伤修复过程中的主要效应细胞, 其对组织的重建和修复有着不可或缺的作用<sup>[1-2]</sup>, 但机械应力对成纤维细胞外泌体具有何种调控机制, 相关研究尚为空白。

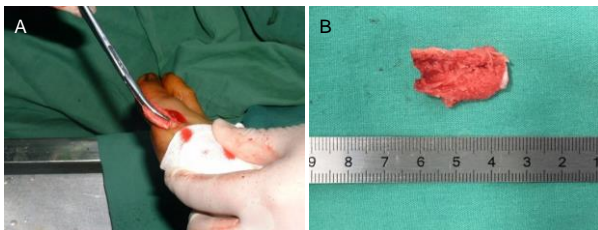
中西医结合微创治疗拇外翻后通过使用趾蹼间夹垫及“8”字绷带的弹性外固定, 可为截骨端愈合提供适宜的力学环境<sup>[3-4]</sup>。实验拟建立机械应力对成纤维细胞体外刺激培养模型, 以确定机械应力对成纤维细胞及其来源外泌体的影响。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学研究。

1.2 时间及地点 于2018年10月在中国中医科学院望京医院骨关节二科手术室及生物实验室完成。

1.3 材料 选取在中国中医科学院望京医院接受拇外翻微创截骨手法整复治疗的患者12例, 取手术中截取的第1跖骨头内侧骨组织留作标本, 见图1。整个研究方案于2013-03-21经中国中医科学院望京医院伦理委员会批准(批准编号为2013-03-21), 标本采集前患者签署知情同意书。患者均为女性, 年龄21-45岁, 身高150-175 cm, 体重40-80 kg, 右足拇外翻角 $< 35^\circ$ , 第1, 2跖骨间角 $< 16^\circ$ <sup>[5-7]</sup>, 无足部畸形及足部外伤史及手术史。



图注: 图中 A 为拇外翻微创截骨手术; B 为截取的骨组织, 长约 2.0 cm

图 1 拇外翻微创截骨手术中截取的骨组织

Figure 1 Bone tissues obtained from minimally invasive osteotomy for hallux valgus

**试验用主要仪器和试剂:** 气体恒温培养箱购自美国 Forma 公司; 离心机购自美国 Falcon 公司; H •SWX-600BS

电热恒温水浴箱购自上海圣科公司; 超净工作台购自无锡易纯公司; TE2000-S 型倒置相差显微镜购自日本 NIKON 公司; 液氮罐购自河南天驰公司; FX-5000 柔性基底细胞牵张拉伸应力加载系统购自美国 Tension System 公司; 自动 CO<sub>2</sub> 培养箱购自德国 HERA Cell 公司; 扫描电镜购自日本 Hitachi 公司; 酶联免疫检测仪购自美国 Bio-TEK Instruments 公司; 培养瓶、6 孔培养板购自美国 Falcon 公司; DMEM 低糖培养液、活性炭处理胎牛血清购自 GIBCO 公司; 胰蛋白酶、二甲基亚砷购自 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒购自美国 Solarbio 公司; PBS、生理盐水、苏木精及伊红染液购自杭州化学试剂厂; 青-链霉素双抗购自上海复申公司; ExoQuick Precipitation 购自美国 SBI 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Thermo 公司; CD9、CD81 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自美国 System Biosciences 公司; 透射电镜购自日本 Hitachi 公司。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 拇外翻截骨端成纤维细胞的培养

##### 拇外翻截骨端成纤维细胞的培养

**细胞来源:** 拇外翻手术截下的第 1 跖骨头截骨块

**原代培养方法:** 第 1 跖骨头截骨块立即放入 DMEM 培养基中<sup>[8-9]</sup>, PBS 漂洗 3 次, 将骨组织标本平放于 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中<sup>[10]</sup>, 加入含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养液 10 mL, 静置于体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 细胞培养箱内培养<sup>[11]</sup>。待组织块周围细胞爬出后, 将骨组织取出

**基础培养基:** DMEM 培养基

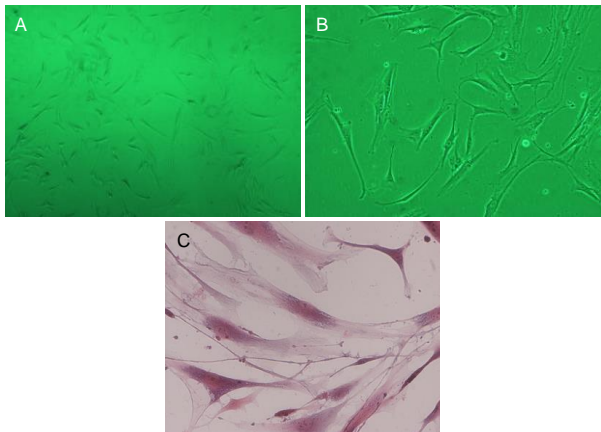
**添加材料:** 体积分数 10% 胎牛血清

**细胞传代:** 每三四天更换一次培养液, 随细胞的生长逐渐缩短更换培养液的间隔时间, 待细胞铺满瓶底的 80% 左右后对细胞进行传代培养备用, 细胞融合度至 80% 左右时冻存<sup>[12]</sup>

**伦理学批准:** 于 2013-03-21 经中国中医科学院望京医院伦理委员会批准(批准编号为 2013-03-21)

1.4.2 成纤维细胞加载机械应力的培养 实验采用 FX-5000 柔性基底细胞牵张拉伸应力加载系统, 该系统采用的负压交换原理, 在培养基基底膜和底座之间密闭的腔体中注入气体而产生的负压从而达到基底的形变<sup>[13]</sup>, 效应细胞可受到来自各个方向的应力刺激, 其可通过计算机精

准控制气压的大小从而控制细胞受力的大小,系可使基底变形类及较为先进的细胞力学干预加载系统<sup>[14-15]</sup>。对生长在三维状态下的细胞进行静态的牵拉应力刺激加载和弧矩形加载平台对生长在三维环境下的第3代成纤维细胞(图2)进行单轴向的静态的应力加载刺激培养(使用弹性基底6孔板培养细胞),加载应变0%, 5%, 10%, 15%及20%的静态拉伸,作用24或48 h后,选择合适的静态拉伸参数,分为2组进行对照,采用CCK-8检测成纤维细胞的增殖情况<sup>[16-17]</sup>。选择合适的应力参数K进行后续实验。



图注:图中A, B均为培养第3代的成纤维细胞(A,  $\times 40$ ; B,  $\times 100$ ), C为苏木精-伊红染色显示的细胞形态( $\times 200$ )

图2 成纤维细胞传代培养

Figure 2 Fibroblasts subculture

1.4.3 成纤维细胞外泌体的提取 在限制性培养基(离心去除细胞后的纯培养基)中将无应力刺激和有应力刺激的2组细胞置入CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养24 h,更换培养液后继续培养48 h, 90 000 $\times g$  4 °C离心30 min,留上清液,按照500:120加入Exoquick试剂充分混匀,4 °C静置过夜后2 000 $\times g$ 离心30 min,取沉淀后,即为外泌体,-80 °C保存备用。

1.4.4 成纤维细胞外泌体及蛋白的鉴定 取骨组织的第3代细胞,按 $1 \times 10^4$ /孔的密度将其接种在6孔培养板内的3个盖玻片上,细胞接种完成后继续置入5%CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱内过夜,待细胞贴壁。次日取出玻片,用苏木精染色2 min,水洗,盐酸乙醇分色,水中返蓝5 min,用伊红染色30 s,水洗后放在倒置相差显微镜下观察其形态学特点,并拍照记录。使用透射电镜观察外泌体的形态。将成纤维细胞外泌体加入体积分数4%戊二醛固定,3 500 $\times g$  4 °C离心30 min,1 $\times$ PBS清洗3或4次,固定3 h后,梯度乙醇脱水。采用Western blot检测成纤维细胞来源外泌体表面标志蛋白。取培养的成纤维细胞,PBS洗3次,加入适量裂解液置于冰上裂解30 min,12 000 $\times g$  4 °C离心15 min,取上清。使用BCA蛋白定量试剂盒测量蛋白浓度。电泳,转膜,5%脱脂奶粉抗原封闭2 h,TBST缓冲液洗5次,每次5 min。加入CD9和CD81抗体(1:1 000),4 °C摇床孵育过夜。辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG培育50 min,TBST缓冲液洗

5次,每次5 min。显影液显色,Image Lab成像系统分析图像。

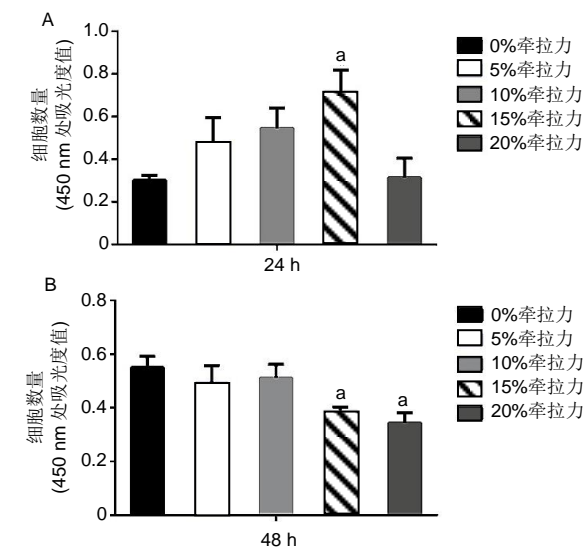
1.5 主要观察指标 机械应力刺激下成纤维细胞及其来源外泌体的变化。

1.6 统计学分析 应用SPSS 11.0统计软件对数据进行单因素方差分析,两两比较采用SNK法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果 Results

2.1 培养的成纤维细胞的形态 细胞大多呈长梭形、扁平星形,部分呈三角形,生长旺盛时代谢物增多,在倒置显微镜下细胞排列成簇状,见图2。

2.2 机械应力对于成纤维细胞增殖的影响 结果显示,牵拉力为15%时对成纤维细胞的增殖促进作用最明显;而24 h的应力作用时间对成纤维细胞是更合适的,见图3。因此后续实验使用15%的静态拉伸作用于成纤维细胞24 h时。



图注:图中A为24 h时的成纤维细胞增殖,B为48 h时的成纤维细胞增殖。与对照组(0%)相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$

图3 机械应力对于成纤维细胞增殖的影响。

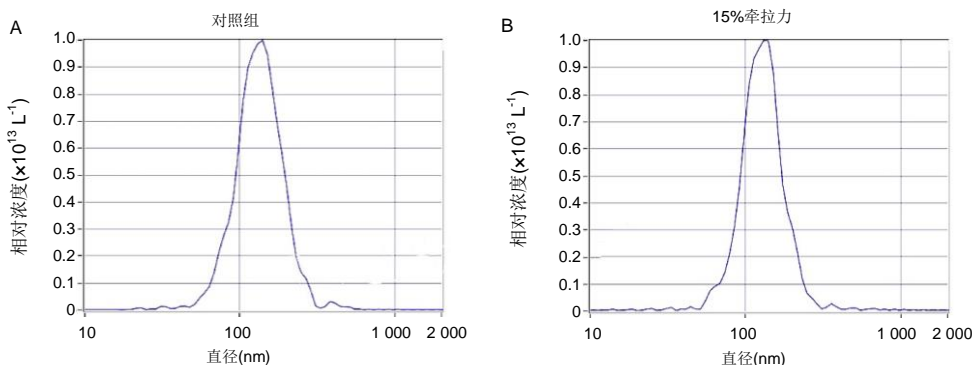
Figure 3 The effects of mechanical stress on fibroblast proliferation

2.3 纳米粒子追踪分析技术检测分离的外泌体直径分布和数量 结果显示,2组外泌体的粒径分布范围相近,见图4,但15%的静态拉伸会促进成纤维细胞分泌外泌体,使得外泌体的浓度增高。

2.4 成纤维细胞来源外泌体表面标志蛋白的表达情况 Western blot结果显示,对照组及加载15%静态拉伸组的成纤维细胞外泌体中均表达CD9及CD81,见图5,而CD9和CD81是外泌体标志性蛋白<sup>[18]</sup>,表明外泌体提取成功。

## 3 讨论 Discussion

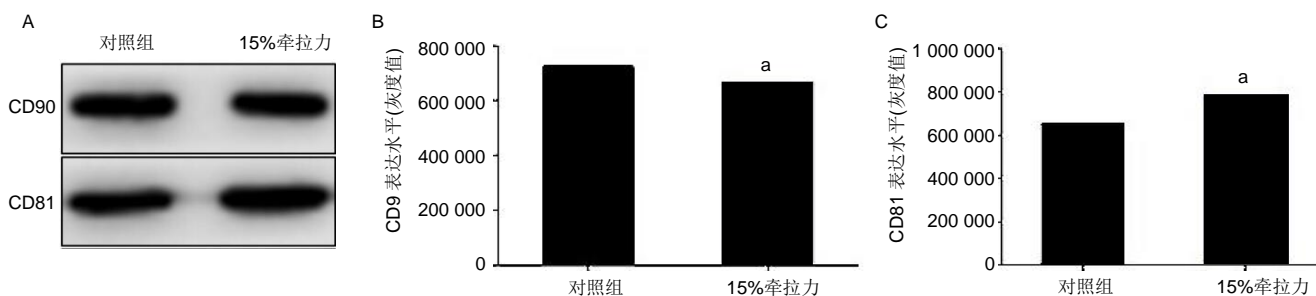
中西医结合微创截骨手法整复术治疗拇外翻,截骨后需采用中医正骨手法纠正拇外翻畸形及第一跖趾关节半脱位,遵循中医正骨理论基础筋束骨、骨张筋、筋归槽、骨



图注: 图 A 为对照组外泌体浓度  $1.1 \times 10^{13} \text{ L}^{-1}$ , 粒径峰值为 128.4 nm, 粒径 20-200 nm 的外泌体占 92%; 图 B 为 15% 静态拉伸组, 外泌体浓度为  $2.8 \times 10^{13} \text{ L}^{-1}$ , 粒径峰值为 128.4 nm, 粒径 20-200 nm 的外泌体占 94%

图 4 机械应力对成纤维细胞外泌体粒径-浓度分布的影响。

Figure 4 Effect of mechanical stress on particle size-concentration distribution of fibroblasts-derived exosomes



图注: 图中 A 为 CD9 及 CD81 蛋白的条带; B, C 为 CD9 及 CD81 的蛋白表达水平。与对照组相比,  $^a P < 0.05$

图 5 机械应力对成纤维细胞外泌体标志物 CD9 及 CD81 蛋白表达的影响。

Figure 5 Effect of mechanical stress on CD9 and CD81 protein expression in fibroblasts-derived exosomes

合缝的原理, 使偏离的肌腱(筋)与错位的骨节得以矫正。术后采用“8”字绷带结合分趾垫的方式对截骨端进行外固定, 采用第1、第2趾蹼间放置分趾垫、“8”字绷带及宽胶布弹性外固定的方法代替传统的石膏固定和内固定, 以维持截骨端的弹性稳定<sup>[19-21]</sup>。包扎固定的截骨端形成骨折二期愈合模型,

成纤维细胞作为骨折创伤修复过程中主要的应力感受及效应细胞, 在其截骨端的愈合过程中起到重要作用。近些年大量研究表明, 骨愈合的过程中都有外泌体参与, 并发挥了必不可少的积极作用<sup>[22-24]</sup>。

外泌体是细胞经过“内吞-融合-外排”等一系列调控过程而形成的细胞外纳米级小囊泡, 能够被细胞分泌到细胞, 可运输RNA(主要是微小RNA), 携带蛋白, 进行细胞间的物质与信息传递, 调控细胞功能, 从而参与机体的免疫反应、组织损伤及骨组织损伤修复过程<sup>[25-26]</sup>。尽管外泌体参与细胞间通讯的方式还未完全清楚, 但现有研究表明配体-受体的相互作用在这一过程中起到重要的作用<sup>[27-31]</sup>。

文章表明, 对拇外翻足截骨块培养成纤维细胞加载 15% 的静态拉伸力刺激后, 会促进成纤维细胞分泌外泌体。其对照组和实验组提取成纤维细胞外泌体中均有 CD9、CD81 外泌体标志性蛋白的表达。两组外泌体的电镜及纳米粒径追踪分析检测结果与外泌体粒径分布范围相符, 且 15% 的静态拉伸作用使得外泌体的浓度增高。实验结果, 这证实了成纤维细胞来源外泌体在一定阈值的应力刺激下而增殖。研究成纤维细胞来源外泌体在骨折愈合应力环境

下的生长和分化机制, 对于探索更有利于截骨端愈合的力学环境具有重要意义。

**作者贡献:** 孙卫东、温建民进行课题设计, 实验实施为李晏乐、林新晓、胡海威、桑志成、孙永生、蒋科卫、温冠楠以及程程, 材料整理为李晏乐, 试验评估为孙卫东和温建民, 谢飞成文。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81573800, 81273984)”的资助。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:** 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

**伦理问题:** 临床试验研究的实施符合《赫尔辛基宣言》和医院对人体研究的相关伦理要求。实验于 2013-03-21 获得望京医院伦理委员会批准, 批准号为 2013-03-21。试验方案已经患者知情同意并签订知情同意书。实施手术或者治疗的医生符合拇外翻截骨手术的资质要求。

**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。

**生物统计学声明:** 文章统计学方法已经中国中医科学院望京医院生物统计学专家审核。

**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] BREEN EC. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. *J Appl Physiol* (1985).2000;88(1):203-209.

- [2] 杨力,郭树忠.成纤维细胞与创伤修复的生物学过程[J].中国组织工程研究,2002,6(4):470-471.
- [3] 孙卫东.中西医结合治疗拇趾外翻生物力学机制的有限元分析[D].北京:中国中医科学院,2010.
- [4] 毕春强,温建民,孙卫东,等.静态有限元法分析基于“裹帘”法外固定拇外翻术后截骨端的稳定性[J].中国组织工程研究, 2016, 20(22):3294-3300.
- [5] 孙卫东,温建民,胡海威,等.拇外翻第1跖骨颈部不同截骨角度截骨端稳定性有限元分析[J].中华损伤与修复杂志(电子版), 2012, 7(5):492-496.
- [6] EPARI DR, DUDA GN, THOMPSON MS. Mechanobiology of bone healing and regeneration: in vivo models. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010;224(12):1543-1553.
- [7] BOTTLANG M, FITZPATRICK DC, SHEERIN D, et al. Dynamic fixation of distal femur fractures using far cortical locking screws: a prospective observational study. *J Orthop Trauma*. 2014;28(4):181-188.
- [8] WILSON E, SUDHIR K, IVES HE. Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions. *J Clin Invest*. 1995; 96(5):2364-2372.
- [9] GIANNINI S, FALDINI C, NANNI M, et al. A minimally invasive technique for surgical treatment of hallux valgus: simple, effective, rapid, inexpensive (SERI). *Int Orthop*. 2013;37(9): 1805-1813
- [10] 赵桂芝,吴军正,陈建元,等.人牙周膜成纤维细胞的分离培养及其生物学特性的探讨[J].实用口腔医学杂志,1994(3):189-191.
- [11] 汤楚华,施生根,牛忠英,等.酶消化组织块法原代培养人牙周膜成纤维细胞的初步研究[J].中华医学杂志,2004,84(8):44-46.
- [12] 高杰,张吉霞.人牙周膜成纤维细胞原代培养成功率的相关性研究[J].现代口腔医学杂志,2015,29(4):209-212.
- [13] BANES AJ, GILBERT J, TAYLOR D, et al. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. *J Cell Sci*. 1985;75:35-42.
- [14] ZHANG H, LIU H, LIN Q, et al. Effects of intermittent pressure imitating rolling manipulation on calcium ion homeostasis in human skeletal muscle cells. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):314.
- [15] 白明海,吴汉江.体外培养细胞机械力加载装置研究进展[J].国外医学口腔医学分册,2004,31(5):331-334.
- [16] 周敏.Flexcell系统加载周期性张应变对不同细胞增殖凋亡活性的影响[J].现代生物医学进展,2015,15(13):2535-2539.
- [17] GRUDEN G, ZONCA S, HAYWARD A, et al. Mechanical stretch-induced fibronectin and transforming growth factor-beta1 production in human mesangial cells is p38 mitogen-activated protein kinase-dependent. *Diabetes*. 2000;49(4):655-661.
- [18] ADMYRE C, JOHANSSON SM, QAZI KR, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*. 2007;179(3):1969-1978.
- [19] 李晏乐,常程,岳肖华,等.拇外翻微创截骨联合“8”字绷带外固定的生物力学分析[J].中国组织工程研究, 2018,22(23): 3659-3664.
- [20] 常程,乔治,温冠楠,等.拇外翻术后行“裹帘法”外固定对截骨端稳定性的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(5):2325-2328.
- [21] 孙卫东,温建民,胡海威,等.微创截骨治疗拇外翻的远期疗效分析[J].中华骨科杂志,2010,30(11):1133-1137.
- [22] SUN WD, WEN JM, HU HW, et al. Long term efficacy of minimal incision osteotomy for hallux abducto valgus. *Orthop Surg*. 2010;2(3):223-228.
- [23] COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30: 255-289.
- [24] WEILNER S, KEIDER V, WINTER M, et al. Vesicular Galectin-3 levels decrease with donor age and contribute to the reduced osteo-inductive potential of human plasma derived extracellular vesicles. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8(1):16-33.
- [25] YAMAGUCHI T, IZUMI Y, NAKAMURA Y, et al. Repeated remote ischemic conditioning attenuates left ventricular remodeling via exosome-mediated intercellular communication on chronic heart failure after myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2015;178:239-246.
- [26] 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. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(21-22):1212-1220.
- [27] KHATUN Z, BHAT A, SHARMA S, et al. Elucidating diversity of exosomes: biophysical and molecular characterization methods. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(17):2359-2377.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] GE M, WU Y, KE R, et al. Value of Osteoblast-Derived Exosomes in Bone Diseases. *J Craniofac Surg*. 2017;28(4): 866-870.
- [31] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3: Unit 3.22.