

# 不同来源间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎疗效的比较

https://doi.org/10.12307/2022.402

王宪峰, 欧昕, 邓必勇

投稿日期: 2021-01-13

采用日期: 2021-03-12

修回日期: 2021-08-09

在线日期: 2021-08-24

中图分类号:

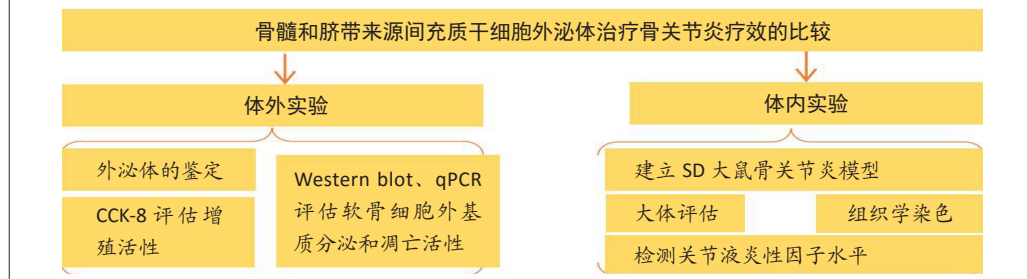
R459.9; R318; R684

文章编号:

2095-4344(2022)25-03980-06

文献标识码: B

## 文章快速阅读:



## 文题释义:

**外泌体:** 是一类50–150 nm大小的脂质囊泡, 是细胞旁分泌中重要的组成部分, 被认为是细胞间的通讯载体, 其功能是在细胞间传递脂质、核酸(mRNA和miRNA)和蛋白质, 从而在受体细胞中引发相应的生物反应。

**骨关节炎:** 是最常见的疾病之一, 也是目前患病率增长最快的疾病。骨关节炎是关节进行性退行疾病, 以软骨和半月板退化、滑膜炎、软骨下骨硬化和骨赘形成为主要特征。

## 摘要

**背景:** 在过去的数十年中, 间充质干细胞作为组织工程种子细胞, 在骨关节炎治疗中展现出了强大的疗效, 在国内已开展了多项临床注册试验。研究表明, 间充质干细胞主要依靠旁分泌效应释放外泌体等载体在体内发挥治疗作用。

**目的:** 比较骨髓间充质干细胞来源外泌体和脐带间充质干细胞来源外泌体治疗骨关节炎的效果。

**方法:** 采用超速离心法提取骨髓间充质干细胞来源外泌体和脐带间充质干细胞来源外泌体, 采用透射电镜、Nanosight和Western blot鉴定两种外泌体; 采用白细胞介素1 $\beta$ 与软骨细胞共培养体外模拟骨关节炎环境, 通过CCK-8、Western blot、qPCR评估两种外泌体对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡和细胞外基质分泌的影响; 建立II型胶原酶诱导的大鼠骨关节炎模型, 通过大体和组织学染色评估体内注射两种外泌体治疗骨关节炎的疗效, ELISA检测关节液中白细胞介素1 $\beta$ 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 水平。

**结果与结论:** ①两种外泌体在透射电镜下均为典型的圆形或杯状, 粒径在105–120 nm之间, 均表达CD63、CD81和TSG101特征性蛋白; ②脐带间充质干细胞来源外泌体的产量和纯度均高于骨髓间充质干细胞来源外泌体; ③两种外泌体均能缓解白细胞介素1 $\beta$ 对软骨细胞的炎症作用, 主要表现在促进增殖、抑制凋亡和增加细胞外基质的分泌, 其中脐带间充质干细胞来源外泌体的促软骨修复活性更强; ④两种外泌体治疗后, 骨关节炎大鼠关节软骨的宏观表现和OARSI评分均高于对照组, 且关节液中炎症因子水平下降, 其中脐带间充质干细胞来源外泌体的疗效更优; ⑤结果表明: 脐带间充质干细胞来源外泌体的产量和纯度均高于骨髓间充质干细胞来源外泌体, 且脐带间充质干细胞来源外泌体对骨关节炎的治疗效果优于骨髓间充质干细胞来源外泌体, 因此脐带间充质干细胞来源外泌体更适合作为治疗骨关节炎的新疗法。

**关键词:** 干细胞; 骨性关节炎; 间充质干细胞; 骨髓间充质干细胞; 脐带间充质干细胞; 外泌体; 软骨; 再生

**缩略语:** 骨髓间充质干细胞来源外泌体: exosomes from bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC-Exos; 脐带间充质干细胞来源外泌体: exosomes from umbilical cord mesenchymal stem cell, UMSC-Exos

## Comparison of effects of exosomes secreted by different mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis

Wang Xianfeng, Ou Xin, Deng Biyong

Department of Orthopedics, Guizhou Orthopedic Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

Wang Xianfeng, Master, Physician, Department of Orthopedics, Guizhou Orthopedic Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

**Corresponding author:** Deng Biyong, MD, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Guizhou Orthopedic Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Mesenchymal stem cells, as seed cells in tissue engineering, have shown powerful curative effect for the treatment of osteoarthritis in the past few decades, and many registered clinical experiments have been carried out in China. More studies have shown that mesenchymal stem cells that play a therapeutic role *in vivo* release exosomes through paracrine function.

**OBJECTIVE:** To compare the effect of bone marrow mesenchymal stem cell exosomes and umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes on the treatment of osteoarthritis.

贵州省骨科医院骨外科, 贵州省贵阳市 550000

**第一作者:** 王宪峰, 男, 1990年生, 山东省武城县人, 汉族, 2018年大连医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨关节疾病及运动医学相关基础与临床研究。

**通讯作者:** 邓必勇, 博士, 副主任医师, 贵州省骨科医院骨外科, 贵州省贵阳市 550000

https://orcid.org/0000-0002-1837-0670 (王宪峰)

**基金资助:** 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2017]1093), 项目负责人: 邓必勇

**引用本文:** 王宪峰, 欧昕, 邓必勇. 不同来源间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎疗效的比较 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(25):3980-3985.



**METHODS:** Bone marrow mesenchymal stem cell exosomes and umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes were isolated by ultra-centrifugation. Nanosight, transmission electron microscopy, and western blot assay were used to identify exosomes. Chondrocytes were co-cultured with interleukin-1 $\beta$  to simulate osteoarthritis *in vitro*. The effects of bone marrow mesenchymal stem cell exosomes and umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes on the proliferation, apoptosis and extracellular matrix secretion of chondrocytes were evaluated by CCK-8 assay, western blot assay, and qPCR. Collagen II collagenase was injected to induce rat osteoarthritis model and the efficacy of *in vivo* injection of exosomes was evaluated by macroscopic evaluation and histological staining. The concentrations of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  of joint fluid were examined by ELISA.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Both kinds of exosomes were cup-shaped or round-shaped with particle size of 105–120 nm, and expressed characteristic proteins CD63, CD81, and TSG101. (2) The yield and purity of umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes were higher than those of bone marrow mesenchymal stem cell exosomes. (3) Both exosomes could alleviate the inflammatory effect of interleukin-1 $\beta$  on chondrocytes, which was mainly manifested in promoting proliferation, inhibiting apoptosis, and increasing the secretion of extracellular matrix. Among them, umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes had stronger cartilage repair activity. (4) After the treatment of both exosomes, the macroscopic performance and OARSI score of articular cartilage were better than those of the control group, and the inflammatory factors in the joint fluid were decreased, among which the efficacy of umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes was better than that of bone marrow mesenchymal stem cell exosomes. (5) Results suggest that the yield and purity of umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes are higher than that of bone marrow mesenchymal stem cell exosomes, and the therapeutic effect of umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes on the treatment of osteoarthritis is better than that of bone marrow mesenchymal stem cell exosomes. Therefore, umbilical cord mesenchymal stem cell exosome is more suitable as a new strategy for osteoarthritis.

**Key words:** stem cells; osteoarthritis; mesenchymal stem cells; bone marrow mesenchymal stem cell exosomes; umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes; exosomes; cartilage; regeneration

**Funding:** the Science and Technology Plan Project of Guizhou Province, No. [2017]1093 (to DBY)

**How to cite this article:** WANG XF, OU X, DENG BY. Comparison of effects of exosomes secreted by different mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(25):3980-3985.

## 0 引言 Introduction

骨关节炎是中老年人群最常见的关节退行性疾病，主要表现为关节软骨变性、破坏以及骨质增生<sup>[1]</sup>。由于关节软骨缺乏血液供应，其再生和分化能力较弱，因此一旦损伤就无法自我修复<sup>[2]</sup>。目前传统的药物或手术治疗只能缓解症状，无法使关节软骨得到有效的再生修复<sup>[3]</sup>。随着再生医学的发展，间充质干细胞被认为是一种有希望治疗骨关节炎的细胞疗法<sup>[4-5]</sup>。

间充质干细胞是一类从骨髓、脂肪、滑膜、脐带等多种组织或器官中分离出的具有干细胞特征的多能成体干细胞，其最主要特征是高增殖活性、多向分化能力、免疫活性低等<sup>[6-7]</sup>。有学者认为干细胞治疗骨关节炎的机制是间充质干细胞增殖和分化为新的关节软骨，但是最新研究表明关节腔内注射的间充质干细胞只有小部分存活<sup>[8]</sup>。越来越多的研究认为间充质干细胞是通过分泌多种营养因子来改善关节腔的微环境，协调细胞的迁移和增生<sup>[9]</sup>，在这些旁分泌因子中，外泌体被认为是最具生物学效应的物质<sup>[10]</sup>。

外泌体是一类直径 60–150 nm 大小的双层脂质囊泡，其中含有来自母细胞的 DNA、mRNA、microRNA 和蛋白质等。目前很多研究证明间充质干细胞来源外泌体可以修复多种组织损伤，包括皮肤损伤、心肌坏死、肝纤维化等<sup>[11-13]</sup>。不同组织来源间充质干细胞在治疗骨关节炎方面存在差异，目前以骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC) 和脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cell, UMSC) 的研究报道最多，然而它们各自分泌的外泌体在治疗骨关节炎方面是否存在差异尚未见报道<sup>[14-16]</sup>。

该研究目的主要是比较骨髓间充质干细胞来源外泌体 (exosomes from bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC-Exos) 和脐带间充质干细胞来源外泌体 (exosomes from umbilical cord mesenchymal stem cell, UMSC-Exos) 对骨关节炎的治疗效果。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 体外细胞学实验和动物体内实验，两组数据间的差异比较采用非配对 *t* 检验，多组数据间的差异比较采用单因素方差分析。

**1.2 时间及地点** 实验于 2020 年 6–12 月在贵州医科大学天

然产物化学重点实验室完成。

### 1.3 材料

**1.3.1 细胞** 人骨髓间充质干细胞 (BNCC100385)、人脐带间充质干细胞 (BNCC100383) 和人软骨细胞 (BNCC339995) 均购自北纳生物，已有质检报告。

**1.3.2 实验试剂和仪器** DMEM/F12 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶 (美国 Gibco 公司); RIPA 裂解液、RNase A、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒、CCK-8 试剂盒 (中国碧云天); 单克隆抗体 CD63、CD81、TSG101、Calnexin、MMP-13、ADAMTS5、Sox9、Bax、Bcl-2 (美国 Abcam 公司); 单克隆抗体 COL II、Aggrecan、GAPDH (美国 Novus 公司); II 型胶原酶 (中国索莱宝); 蛋白电泳仪、转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); 红外激光成像系统 (美国 Odyssey 公司); 台式高速离心机 (美国 Beckman 公司); 纳米颗粒跟踪分析仪 Zetaview (德国 Particle Metrix 公司)。

**1.3.3 实验动物** SD 大鼠 12 只，雌性，体质量 (200 $\pm$ 10) g，随机分为 3 组，每组 4 只，由贵州医科大学实验动物中心提供，生产许可证号: SCXK (黔)2018-0001; 使用许可证号: SYXK (黔)2018-0001。该动物实验已经通过贵州省骨科医院动物研究委员会的批准。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 外泌体的提取** 两种细胞的培养液均为含体积分数为 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 DMEM/F12，细胞培养环境为 37  $^{\circ}$ C，体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 孵育箱。

第 3 代 UMSC 和 BMSC 融合度约 80%，培养 48 h 后收集上清液 200 mL，4  $^{\circ}$ C 环境 2 000 $\times$ g 离心 30 min 后去除沉淀，收集上清; 20 000 $\times$ g 离心 60 min 后去除沉淀，收集上清; 100 000 $\times$ g 离心 60 min，轻轻倒去上清，收集底部沉淀; 沉淀用 PBS 稀释，100 000 $\times$ g 离心 60 min，轻轻倒去上清，最后将收集的沉淀以 100  $\mu$ L PBS 重悬，分装，-80  $^{\circ}$ C 保存。

### 1.4.2 外泌体的鉴定

(1) Nanosight 检测外泌体的粒径和浓度: 将 PBS 稀释好的外泌体吸入注射器中，再缓慢放入 Nanosight 分析仪，观察粒子的布朗运动，利用纳米粒子跟踪分析软件进行分析，测量出微粒的大小及浓度。

(2) 透射电镜观察外泌体的形态: 将 2 mL PBS 加入含外

泌体的离心管中混匀,按照 1 : 50 倍稀释后取外泌体稀释液 10  $\mu$ L,滴加于 2 mm 含碳载样铜网上,在室温下静置 5 min 后用滤纸将多余液体轻轻吸去,滴加 3% 磷钨酸钠溶液后室温晾干,透射电镜观察并照相。

(3) Western blot 检测外泌体表面蛋白的表达:在外泌体中加入相同体积的细胞裂解液,在冰上静置 10 min,4  $^{\circ}$ C 环境下 12 000 $\times$ g 离心 10 min,上层清液即为外泌体总蛋白。配制 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶及浓缩胶,上样量为每孔 100  $\mu$ g,80 V 电泳 2 h,200 mA 转膜 1 h,取出 PVDF 膜浸润在 5% 牛奶中封闭 1 h,4  $^{\circ}$ C 湿盒中孵育一抗 CD63、CD81、TSG101 和 Calnexin 过夜,PBST 洗涤 3 次后 37  $^{\circ}$ C 孵育二抗 1 h,再用 PBST 洗涤 3 次,最后利用 ECL 化学发光系统进行拍照。

1.4.3 软骨细胞增殖实验 (CCK-8) 软骨细胞以 3 000 个 / 孔的密度接种于 96 孔板,用 10  $\mu$ g/L 白细胞介素 1 $\beta$ (P6470,碧云天,中国)预处理 24 h 模仿骨关节炎环境,然后分别加入  $1 \times 10^8$  颗粒 / mL 的两种外泌体,每天换液 1 次,分别在第 1,2,3,4 天进行细胞增殖活性检测,每孔加入 20  $\mu$ L CCK-8 溶液 (C0037,碧云天,中国),继续孵育 2 h,用酶标仪检测各孔在 450 nm 波长处的吸光度值并绘制标准曲线。

1.4.4 细胞总 RNA 的提取 软骨细胞以  $1 \times 10^6$  个 / 孔密度接种于 6 孔板,用 10  $\mu$ g/L 白细胞介素 1 $\beta$  预处理 24 h,然后分别加入  $1 \times 10^8$  颗粒 / mL 的两种外泌体培养 3 d,弃去培养基,PBS 洗涤 3 次,按每  $5 \times 10^6$  个细胞加入 1 mL Trizol,反复吹打均匀,转移到 EP 管中,按比例加入 200  $\mu$ L 氯仿 / 1 mL Trizol 剧烈振荡 15 s,静置 3 min 后 12 000 r/min 离心 15 min;取上层水相加入等体积异丙醇,混合均匀,4  $^{\circ}$ C 环境下 12 000 r/min 离心 10 min;沉淀中加入等体积的无水乙醇和 Trizol 洗涤沉淀,7 600 r/min 离心 5 min;去除上清,待 RNA 干燥后,加入 20  $\mu$ L DEPC 水溶解沉淀备用。

1.4.5 实时荧光定量 PCR 根据 PrimeScript<sup>TM</sup> RT-PCR kit (TaKaRa,中国)说明书将 RNA 反转录合成 cDNA,按照以下反应条件进行实时荧光定量 PCR 反应:95  $^{\circ}$ C 3 min;95  $^{\circ}$ C 3 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;以 GAPDH 作为内参,根据  $2^{-\Delta\Delta CT}$  值计算各基因表达。各基因引物序列见表 1。

表 1 | 各基因引物序列  
Table 1 | Primer sequences of each gene

基因	序列 (5'-3')
Aggrecan	Forward: ACC AGA CTG TCA GAT ACC CC Reverse: CAT AAA AGA CCT CAC CCT CC
Sox9	Forward: GCC TCT ACT CCA CCT TCA CC Reverse: GTA GAC GGG TTG TTC CCA GT
COL II	Forward: ATT GCC TAT CTG GAC GAA GC Reverse: GCA GTG TAC GTG AAC CTG CT
MMP-13	Forward: GCA TTG GCT GAG TGA AAG AGA C Reverse: ATG ATG AAC GAT GGA CAG ATG A
ADAMTS5	Forward: ATG ATT CGC CTC GGG GCT C Reverse: GCA CTC TCC GAA GGG GAT CT
Bcl-2	Forward: TCT CAT GCC AAG GGG GAA AC Reverse: CAA TCC TCC CCC AGT TCA CC
Bax	Forward: TCA AAC CCT GCC CGA AAC TT Reverse: TCA GAT GCC GAA GTG TGT CC
GAPDH	Forward: ATC TGA GCA GGT TGC TCC AC Reverse: GGC CCT TTA CAC TGT GAG CC

1.4.6 SD 大鼠骨关节炎模型的建立 将 12 只 SD 大鼠随机分为 3 组:对照组 ( $n=4$ )、BMSC-Exos 组 ( $n=4$ )、UMSC-Exos 组 ( $n=4$ )。以 20 mg/kg 剂量的戊巴比妥钠腹腔麻醉大鼠,关节腔内注射 0.5 mg II 型胶原酶 (C8000,索莱宝,中国)构建骨关节炎模型,术后每周 1 次分别注射 10  $\mu$ L 的 PBS、BMSC-Exos( $1 \times 10^{10}$  颗粒 / mL) 和 UMSC-Exos( $1 \times 10^{10}$  颗粒 / mL)。

在第 4 周注射后 3 d 处死大鼠,收集关节液和关节软组织进行下一步分析。

1.4.7 关节液中白细胞介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平 每只大鼠收集 200  $\mu$ L 关节液,2 000 $\times$ g 离心 10 min 后取上清,然后通过 Rat IL-1 $\beta$  ELISA Kit (PI303,碧云天,中国)和 Rat TNF- $\alpha$  ELISA Kit (PT516,碧云天,中国)试剂盒检测关节液中白细胞介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平。

1.4.8 组织学染色 大鼠软骨组织标本用 100 g/L 多聚甲醛固定 24 h,用 EDTA 慢脱液脱钙 4 周,经过梯度脱水后,包埋于石蜡,切成 5  $\mu$ m 放于载玻片上,分别进行苏木精 - 伊红染色 (E607318,上海生工,中国)和甲苯胺蓝染色 (E670105,上海生工,中国)。每个样本由 2 名观察者采用盲法进行 OARSI 评分。

OARSI 评分是国际骨关节炎研究学会定制的评估骨关节炎严重程度的半定量指标,评分越高骨关节炎越严重<sup>[27]</sup>。0 级:软骨表面平整,软骨完整;1 级:软骨表面浅层纤维形成,且不均匀;2 级:软骨表面不连续,伴有细胞增殖,在 II - III 层异染物质增加或减少;3 级:软骨破裂扩散至 III 层或出现侵蚀;4 级:软骨侵蚀加重,关节软骨出现了损害;5 级:关节软骨剥脱;6 级:关节变形。

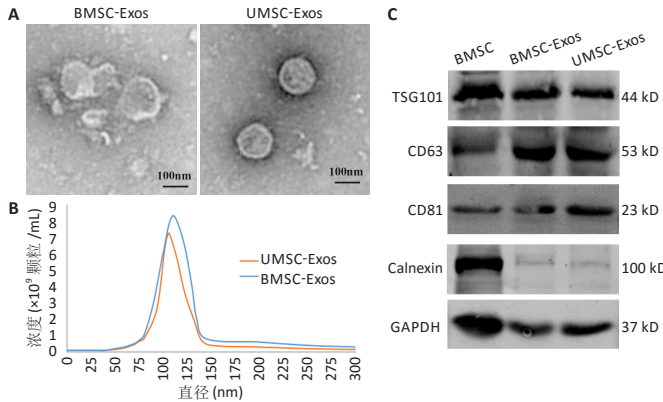
1.5 主要观察指标 ①外泌体的鉴定结果;②外泌体的产量和纯度;③外泌体对软骨细胞活性的影响;④外泌体对骨关节炎大鼠的治疗作用。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 19.0 软件处理各项数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用非配对  $t$  检验比较两组数据间的差异,采用单因素方差分析比较多组数据间的差异, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 外泌体的鉴定结果 BMSC-Exos 和 UMSC-Exos 在透射电镜下均显示出典型的圆形或杯状,见图 1A; Nanosight 显示两种外泌体的直径均在 60-150 nm 之间,UMSC-Exos 比 BMSC-Exos 的直径略小,见图 1B; Western blot 检测显示 BMSC-Exos 和 UMSC-Exos 均表达外泌体特征蛋白: TSG1010、CD63 和 CD81,不表达 Calnexin 蛋白,见图 1C; 上述结果表明外泌体提取成功。

2.2 外泌体产量和纯度的比较 外泌体产量 = 外泌体颗粒总数 / 细胞总数, BMSC-Exos 产量为 (2 488 $\pm$ 63) 颗粒 / 细胞,而 UMSC-Exos 产量为 (3 539 $\pm$ 125) 颗粒 / 细胞,UMSC 单细胞分泌外泌体的能力强于 BMSC ( $P < 0.01$ ),见图 2A; 外泌体纯度 = 外泌体颗粒总数 / 外泌体蛋白总量, BMSC-Exos 纯度为 (2.6 $\pm$ 0.13) $\times 10^7$  颗粒 /  $\mu$ g,而 UMSC-Exos 纯度为 (3.5 $\pm$ 0.11) $\times 10^7$  颗粒 /  $\mu$ g,UMSC 外泌体的纯度高于 BMSC ( $P < 0.01$ ),见图 2B; 上述结果表明 UMSC 在外泌体的产量和纯度方面均强于 BMSC。



图注：图 A 为 BMSC-Exos 和 UMSC-Exos 透射电镜图，均为典型的圆形或杯状；B 为 BMSC-Exos 和 UMSC-Exos 的直径分布和浓度大小；C 为 Western blot 检测外泌体表达 TSG101、CD63 和 CD81，且不表达 Calnexin。BMSC-Exos：骨髓间充质干细胞来源外泌体；UMSC-Exos：脐带间充质干细胞来源外泌体

图 1 | 外泌体的鉴定结果

Figure 1 | Identifications of exosomes

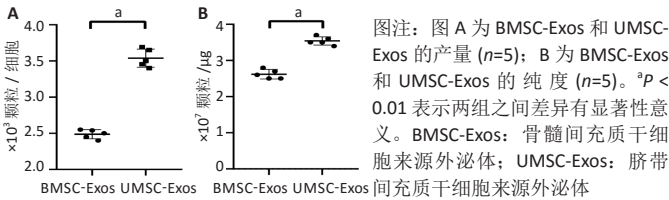
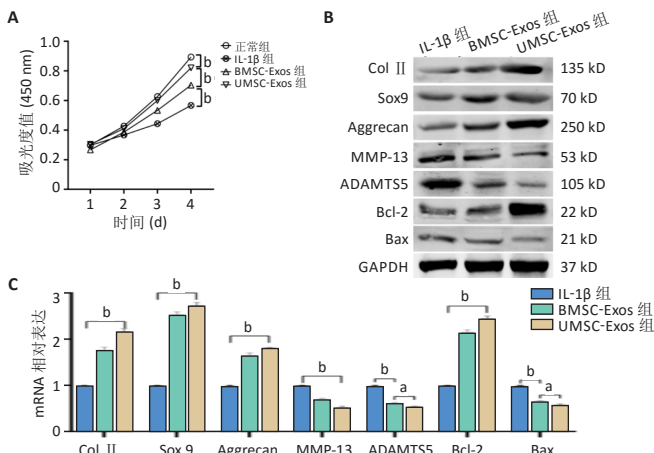


图 2 | 两种外泌体的产量和纯度

Figure 2 | Yield and purity of both exosomes

2.3 外泌体对软骨细胞活性的影响 通过白细胞介素 1 $\beta$  预处理模拟骨关节炎环境，发现软骨细胞的增殖活性明显下降 ( $P < 0.01$ )；在加入外泌体共培养后，软骨细胞的增殖活性得到恢复，UMSC-Exos 组的恢复作用强于 BMSC-Exos 组 ( $P < 0.01$ )，见图 3A。采用 Western blot 实验检测了与软骨细胞基质合成 (Col II、Sox9 和 Aggrecan)、基质降解 (MMP-13 和 ADAMTSS) 以及凋亡 (Bcl-2 和 Bax) 相关基因的蛋白表达，发现软骨细胞与外泌体共培养后其基质合成增加、分解降低并且凋亡活性被抑制，且 UMSC-Exos 组生物活性强于 BMSC-Exos 组，见图 3B；实时荧光定量 PCR 结果进一步证实了 Western blot 的结果，见图 3C。



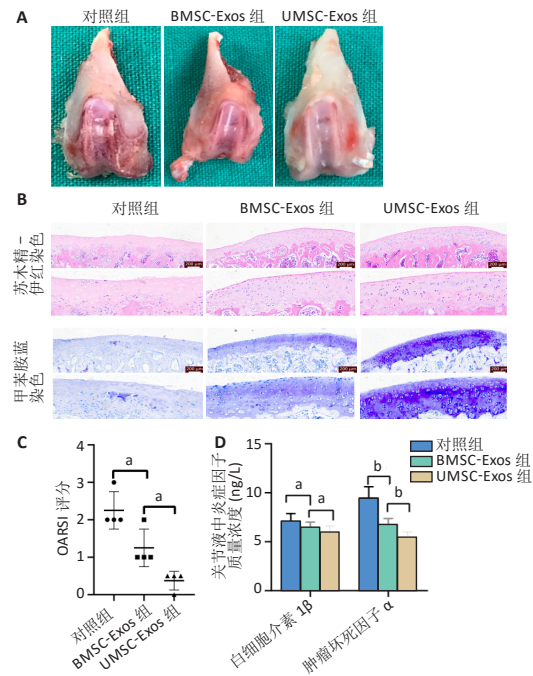
图注：图 A 为软骨细胞的生长曲线；B、C 为软骨细胞基质合成 (Col II、Sox9 和 Aggrecan)、基质降解 (MMP-13 和 ADAMTSS) 以及凋亡 (Bcl-2 和 Bax) 相关基因的蛋白和 mRNA 表达。 $^aP < 0.05$  或  $^bP < 0.01$  表示两组之间差异有显著性意义。IL-1 $\beta$ ：白细胞介素 1 $\beta$ ；BMSC-Exos：骨髓间充质干细胞来源外泌体；UMSC-Exos：脐带间充质干细胞来源外泌体

图 3 | 两种外泌体对软骨细胞活性的影响

Figure 3 | Effects of both exosomes on chondrocyte activity

2.4 外泌体对骨关节炎大鼠的治疗作用 12 只 SD 大鼠均进入结果分析。如图 4A 所示，大体观察可见对照组关节软骨表面粗糙、色泽变暗，软骨细胞纤维化，软骨下骨质暴露，出现严重的骨关节炎表现；BMSC-Exos 组骨关节炎症状较对照组有所改善，部分关节面出现骨关节炎特征表现；UMSC-Exos 组大体观最接近正常软骨，大部分关节表面未见明显破坏，仅有小部分软骨菲薄。

如图 4B 所示，苏木精 - 伊红染色可见对照组软骨细胞排列紊乱，成簇分布，潮线漂移中断；而外泌体组软骨细胞排列整齐，细胞分布均匀，潮线光滑平整，但 BMSC-Exos 组的软骨表面偶见不规则裂隙且细胞数小于 UMSC-Exos 组。甲苯胺蓝染色可见对照组染色呈阴性，表明软骨细胞结构改变伴随软骨特异性蛋白多糖的大量丢失；而外泌体组染色呈阳性，UMSC-Exos 组的染色强度大于 BMSC-Exos 组。用 OARSI 评分将上述病理染色结果作半定量分析，发现 UMSC-Exos 组的骨关节炎表现最轻，见图 4C。采用 ELISA 检测关节液中的炎症因子水平，发现外泌体组白细胞介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平降低，且 UMSC-Exos 组的下降趋势最强 ( $P < 0.05$ )，见图 4D。



图注：图 A 为术后 4 周膝关节大体观察；B 为各组关节软骨组织苏木精 - 伊红染色、甲苯胺蓝染色表现 (标尺 200  $\mu$ m)；C 为病理染色结果半定量 OARSI 评分；D 为 ELISA 检测各组关节液中白细胞介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平。 $^aP < 0.05$  或  $^bP < 0.01$  表示两组之间差异有显著性意义。BMSC-Exos：骨髓间充质干细胞来源外泌体；UMSC-Exos：脐带间充质干细胞来源外泌体

图 4 | 两种外泌体对骨关节炎大鼠的治疗作用

Figure 4 | Therapeutic effect of both exosomes on osteoarthritis in rats

2.5 生物相容性 外泌体是干细胞分泌的囊泡，属于细胞产物，因此具有和亲本细胞相似的生物学性质。干细胞被公认为高生物相容性、无毒性 and 低免疫原性，因此外泌体也应具有这些特性。在体内实验中，外泌体被注射至大鼠膝关节腔内，均未出现如腹泻、体质量下降、溶血等明显的不良反应，

也未出现坐立不安和寒战等全身性过敏反应，且在处死取标本时未见关节腔内有异物生长，在解剖内脏时未发现治疗组大鼠的肝、肾、肺和小肠组织与正常小鼠有明显差异。因此，可以认为外泌体具有极好的生物相容性，是适合应用于临床治疗的分子和载体。

### 3 讨论 Discussion

目前已有多项临床注册试验研究间充质干细胞对人体多种器官组织的治疗效果，然而作为细胞治疗方法，它仍存在较多的争议，包括活体细胞来源的伦理问题，细胞制备、存储、运输的后勤保障问题，以及细胞注射到人体后的生物安全性和有效性问题等<sup>[18]</sup>。因此，如果间充质干细胞的衍生物——外泌体，能达到和细胞本身一样的治疗效果，则这种非细胞治疗将更加安全和经济<sup>[19]</sup>。

UMSC 是从废弃的脐带中提取，不存在伦理问题，与 BMSC 的提取相比，它是无创性的。一条脐带大约可提取 1 000 万个细胞，其来源比 BMSC 更加广泛；在免疫原性方面，UMSC 不表达与移植排斥相关的抗原，适用于不同个体间的移植<sup>[20]</sup>；BMSC 所需的骨髓可能来自于不同年龄的个体，其年龄大小对其生物活性有较大的影响，而 UMSC 不存在这方面的问题。有研究表明 UMSC 的增殖和分化潜能是 BMSC 数 10 倍，因此 UMSC 是比 BMSC 更好的母细胞来源。

目前关于间充质干细胞外泌体治疗骨关节炎的机制仍未达成定论<sup>[21-22]</sup>，可以主要归纳为以下几点：①促进细胞外基质的合成：TAO 等<sup>[23]</sup>发现从滑膜间充质干细胞中提取的外泌体在骨关节炎大鼠模型中保护软骨免于降解，体外实验发现其外泌体促进了软骨细胞的增殖和迁移，但减少了细胞外基质的分泌；WANG 等<sup>[24]</sup>则发现来自人胚胎干细胞诱导的间充质干细胞外泌体可以缓解小鼠内侧半月板失稳术后引起的骨关节炎症状，其主要机制是平衡软骨细胞外基质的合成和降解。上述实验结果与该实验结果符合，作者发现外泌体可以增加与软骨细胞基质合成相关基因的表达，包括 Col II、Sox 9 和 Aggrecan，并降低基质降解相关基因的表达，包括 MMP-13 和 ADAMTS5。②免疫调节作用：间充质干细胞外泌体中含有多种免疫调节蛋白<sup>[25]</sup>，ZHANG 等<sup>[26]</sup>发现间充质干细胞外泌体可以诱导白细胞介素 10 表达，降低免疫活性；ZHANG 等<sup>[27]</sup>则发现间充质干细胞外泌体治疗软骨损伤后，修复组织中 M2 巨噬细胞增多，M1 巨噬细胞减少。这与该实验结果符合，在动物实验中，ELISA 检测发现关节液中炎症相关的白细胞介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平降低，表明外泌体可以有效调节免疫反应。③恢复线粒体功能：CHEN 等<sup>[28]</sup>发现间充质干细胞外泌体中含有线粒体蛋白，并可以传递到软骨细胞中，从而恢复骨关节炎软骨细胞中线粒体功能和形态。④外泌体中 miRNAs 的作用：间充质干细胞外泌体中含有大量 miRNAs，这些 miRNAs 可以有效介导软骨细胞的基因调控。目前有 miR-92a-3p<sup>[29]</sup>、miR-320c、miR-140-5p<sup>[23, 30]</sup>、miR-100-5p<sup>[31]</sup>、miR-95-5p<sup>[15]</sup>、lncRNA-KLF3-AS1<sup>[32-33]</sup>、lncRNA-H19 等非编码 RNA 都被发现是外泌体治疗骨关节炎的潜在分子<sup>[34-35]</sup>。

该实验首次比较了 BMSC-Exos 和 UMSC-Exos 在骨关节炎中的治疗作用，发现无论在体外白细胞介素 1 $\beta$  诱导的骨关节炎软骨细胞实验中还是在体内 II 型胶原酶诱导的骨关节炎大鼠模型中，两种外泌体均能有效减轻骨关节炎症状，且 UMSC-Exos 的治疗效果优于 BMSC-Exos。此外还发现 UMSC-Exos 的产量和纯度较高，这与 HARASZTI 等<sup>[36]</sup>的研究结果一致，因此 UMSC 作为外泌体治疗骨关节炎的母细胞可能更加合适。

下一步将多种来源间充质干细胞的外泌体做统一的疗效比较研究，以消除来自不同研究的差异，为骨关节炎的治疗指明最合适间充质干细胞种类。外泌体治疗骨关节炎的具体机制仍不清楚，作者推测外泌体中多种生物活性成分起着关键的作用，因此未来的工作还需要关注外泌体中参与软骨修复再生的具体成分和作用机制。

**作者贡献：**实验设计为王宪峰、邓必勇，实验实施为王宪峰，实验评估为邓必勇，资料收集为王宪峰、欧昕。

**经费支持：**该文章接受了“贵州省科技计划项目(黔科合基础[2017]1093)”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：**文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**机构伦理问题：**实验方案经贵州省骨科医院动物实验伦理委员会批准，批准号为 LW2020122301。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

**写作指南：**该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**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：**文章统计学已经通过邓必勇专家审核。

**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] PORTAL-NÚÑEZ S, ESBRI T, ALCARAZ MJ, et al. Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2016;108:1-10.
- [2] HUNTER DJ. Imaging insights on the epidemiology and pathophysiology of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009;35(3):447-463.
- [3] SHAMOON M, HOCHBERG MC. Treatment of osteoarthritis with acetaminophen: efficacy, safety, and comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Rheumatol Rep.* 2000;2(6):454-458.
- [4] PLATAS J, GUILLÉN MI, PÉREZ DEL CAZ MD, et al. Paracrine effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells in inflammatory stress-induced senescence features of osteoarthritic chondrocytes. *Aging (Albany NY).* 2016;8(8):1703-1717.
- [5] KIM YG, CHOI J, KIM K. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for Effective Cartilage Tissue Repair and Treatment of Osteoarthritis. *Biotechnol J.* 2020;15(12):e2000082.

- [6] COSENZA S, TOUPET K, MAUMUS M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics*. 2018;8(5):1399-1410.
- [7] CASADO JG, BLÁZQUEZ R, VELA FJ, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Immunomodulatory Evaluation in an Antigen-Induced Synovitis Porcine Model. *Front Vet Sci*. 2017;4:39.
- [8] WU X, LI SH, LOU LM, et al. The effect of the microgravity rotating culture system on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Biotechnol*. 2013;54(2):331-336.
- [9] MURPHY C, WITHROW J, HUNTER M, et al. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases. *Mol Aspects Med*. 2018;60:123-128.
- [10] BURKE J, KOLHE R, HUNTER M, et al. Stem Cell-Derived Exosomes: A Potential Alternative Therapeutic Agent in Orthopaedics. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5802529.
- [11] HARRELL CR, JOVICIC N, DJONOV V, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes and Other Extracellular Vesicles as New Remedies in the Therapy of Inflammatory Diseases. *Cells*. 2019;8(12):1605.
- [12] VIZOSO FJ, EIRO N, COSTA L, et al. Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15):3738.
- [13] YAGHOUBI Y, MOVASSAGHPOUR A, ZAMANI M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived-exosomes in diseases treatment. *Life Sci*. 2019;233:116733.
- [14] LIU X, YANG Y, LI Y, et al. Integration of stem cell-derived exosomes with in situ hydrogel glue as a promising tissue patch for articular cartilage regeneration. *Nanoscale*. 2017;9(13):4430-4438.
- [15] MAO G, HU S, ZHANG Z, et al. Exosomal miR-95-5p regulates chondrogenesis and cartilage degradation via histone deacetylase 2/8. *J Cell Mol Med*. 2018;22(11):5354-5366.
- [16] PATEL DB, SANTORO M, BORN LJ, et al. Towards rationally designed biomanufacturing of therapeutic extracellular vesicles: impact of the bioproduction microenvironment. *Biotechnol Adv*. 2018;36(8):2051-2059.
- [17] PRITZKER KP, GAY S, JIMENEZ SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(1):13-29.
- [18] NAM Y, RIM YA, LEE J, et al. Current Therapeutic Strategies for Stem Cell-Based Cartilage Regeneration. *Stem Cells Int*. 2018;2018:8490489.
- [19] TOH WS, LAI RC, HUI JHP, et al. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;67:56-64.
- [20] SUN L, XU R, SUN X, et al. Safety evaluation of exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cell. *Cytotherapy*. 2016;18(3):413-422.
- [21] MIANEHSAZ E, MIRZAEI HR, MAHJUBIN-TEHRAN M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: a new therapeutic approach to osteoarthritis? *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):340.
- [22] ZHANG R, MA J, HAN J, et al. Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. *Am J Transl Res*. 2019;11(10):6275-6289.
- [23] TAO SC, YUAN T, ZHANG YL, et al. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*. 2017;7(1):180-195.
- [24] WANG Y, YU D, LIU Z, et al. Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):189.
- [25] ZHANG B, YIN Y, LAI RC, et al. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol*. 2014;5:518.
- [26] ZHANG B, YIN Y, LAI RC, et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev*. 2014;23(11):1233-1244.
- [27] ZHANG S, CHUAH SJ, LAI RC, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*. 2018;156:16-27.
- [28] CHEN P, ZHENG L, WANG Y, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration. *Theranostics*. 2019;9(9):2439-2459.
- [29] MAO G, ZHANG Z, HU S, et al. Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):247.
- [30] WON LEE G, THANGAVELU M, JOUNG CHOI M, et al. Exosome mediated transfer of miRNA-140 promotes enhanced chondrogenic differentiation of bone marrow stem cells for enhanced cartilage repair and regeneration. *J Cell Biochem*. 2020;121(7):3642-3652.
- [31] WU J, KUANG L, CHEN C, et al. miR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities via inhibition of mTOR in osteoarthritis. *Biomaterials*. 2019;206:87-100.
- [32] LIU Y, ZOU R, WANG Z, et al. Exosomal KLF3-AS1 from hMSCs promoted cartilage repair and chondrocyte proliferation in osteoarthritis. *Biochem J*. 2018;475(22):3629-3638.
- [33] LIU Y, LIN L, ZOU R, et al. MSC-derived exosomes promote proliferation and inhibit apoptosis of chondrocytes via lncRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 axis in osteoarthritis. *Cell Cycle*. 2018;17(21-22):2411-2422.
- [34] YAN L, LIU G, WU X. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells in mechanical environment show improved osteochondral activity via upregulation of lncRNA H19. *J Orthop Translat*. 2020;26:111-120.
- [35] YAN L, LIU G, WU X. The umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal lncRNA H19 improves osteochondral activity through miR-29b-3p/FoxO3 axis. *Clin Transl Med*. 2021;11(1):e255.
- [36] HARASZTI RA, MILLER R, STOPPATO M, et al. Exosomes Produced from 3D Cultures of MSCs by Tangential Flow Filtration Show Higher Yield and Improved Activity. *Mol Ther*. 2018;26(12):2838-2847.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)