

携载 microRNA-140 外泌体 / 海藻酸钠 / 胶原水凝胶修复关节软骨损伤

陈明伟¹, 余雯莉², 夏苏杭¹, 陈宾¹, 陈文忠¹, 李锋侦¹, 周宇¹, 司文腾¹

<https://doi.org/10.12307/2025.444>

投稿日期: 2024-03-25

采用日期: 2024-05-10

修回日期: 2024-06-26

在线日期: 2024-07-15

中图分类号:

R459.9; R318.08; R684.3

文章编号:

2095-4344(2025)16-03326-09

文献标识码: A

文章快速阅读: 海藻酸钠 / 胶原水凝胶负载过表达 microRNA-140 的外泌体修复软骨损伤

骨髓间充质干细胞转染慢病毒
过表达 microRNA-140

差速离心法分离外泌体,
并进行鉴定

负载于海藻酸钠 /
胶原水凝胶中

骨
关
节
炎
造
模



膝关节腔注射治疗

- ◆ 机械刺激缩足反应阈值
- ◆ 滑膜液炎症因子浓度
- ◆ 软骨相关基因表达
- ◆ 膝关节软骨组织病理形态与凋亡相关蛋白表达

文题释义:

骨关节炎: 是一种由多因素共同作用导致的关节退行性疾病, 以关节软骨破坏、滑膜炎、软骨下骨硬化或囊性变、关节边缘骨质增生及骨赘形成为主要病理特征。骨关节炎的发病与年龄、创伤、炎症、肥胖及劳损等因素相关。目前的治疗方式主要是早期口服药物或关节腔内注射玻璃酸钠来短期内缓解症状, 晚期多进行微骨折术、软骨移植术、关节置换术等。

外泌体: 是多囊泡体与质膜的胞质融合后释放到细胞外基质中的小囊泡, 呈圆盘状, 直径在30-150 nm之间, 包含多种具有重要功能的蛋白质、脂质与核酸, 可转移至其他细胞中进而影响受体细胞功能。

摘要

背景: 研究已证实, 上调microRNA-140表达可部分抑制膝关节软骨组织与细胞的骨关节炎样改变, 延缓骨关节炎进程, 提示microRNA-140参与了骨关节炎的发病机制。

目的: 采用海藻酸钠/胶原水凝胶负载过表达microRNA-140的外泌体, 进一步分析microRNA-140参与骨关节炎的相关机制。

方法: 利用慢病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞使其过表达microRNA-140, 随后分离提取外泌体, 得到过表达microRNA-140的外泌体。制备负载外泌体的海藻酸钠/胶原水凝胶。采用随机数字表法将32只SD大鼠随机分为4组, 每组8只: 正常对照组不进行任何处理, 骨关节炎组、未转染外泌体组、转染外泌体组均通过膝关节腔内注射碘乙酸钠的方式建立骨关节炎模型, 造模2周后, 骨关节炎组膝关节腔内注射PBS, 未转染外泌体组、转染外泌体组膝关节腔内分别注射负载未过表达microRNA-140与过表达microRNA-140外泌体的海藻酸钠/胶原水凝胶。造模后第6周, 检测大鼠机械刺激缩足反应阈值、滑膜液炎症因子浓度、软骨相关基因表达、膝关节软骨组织的组织学变化与凋亡相关蛋白表达。

结果与结论: ①与正常对照组比较, 骨关节炎组机械刺激缩足反应阈值、II型胶原及SOX9 mRNA表达、II型胶原免疫荧光强度均减少($P < 0.05$), 滑膜液中促炎症因子水平增加($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶13、血小板反应蛋白解整合素金属蛋白酶5(ADAMTS5)mRNA表达增加($P < 0.05$), NLRP3、ASC、GSDMD p30、caspase-1 p20、白细胞介素1 β 、白细胞介素18蛋白表达均增加($P < 0.05$), GSDMD、cleaved caspase-1免疫荧光强度增强($P < 0.05$), 软骨组织损伤严重。②与骨关节炎组比较, 两外泌体组机械刺激缩足反应阈值、II型胶原及SOX9 mRNA表达、II型胶原免疫荧光强度均增加($P < 0.05$), 滑膜液中促炎症因子水平减少($P < 0.05$), 基质金属蛋白酶13 mRNA表达减少($P < 0.05$), NLRP3、ASC、GSDMD p30、caspase-1 p20、白细胞介素1 β 、白细胞介素18的蛋白表达均减少($P < 0.05$), GSDMD、cleaved caspase-1的免疫荧光强度减弱($P < 0.05$), 软骨组织损伤减轻($P < 0.05$), 并且转染外泌体组的作用更强。③结果表明, microRNA-140可通过抑制炎症、维持软骨稳态、抑制软骨凋亡来减轻骨关节炎大鼠的疼痛反应, 降低软骨损伤, 发挥骨关节炎治疗作用。

关键词: 骨关节炎; 软骨损伤; 外泌体; microRNA-140; 海藻酸钠/胶原水凝胶; 凋亡

缩略语: 血小板反应蛋白解整合素金属蛋白酶5: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5

Articular cartilage injury repaired with microRNA-140 exosomes/sodium alginate/collagen hydrogel

Chen Mingwei¹, Yu Wenli², Xia Suhang¹, Chen Bin¹, Chen Wenzhong¹, Li Fengzhen¹, Zhou Yu¹, Si Wenteng¹

¹Department I of Joint Disease, Zhengzhou Orthopedic Hospital (Zhengzhou Orthopedic Hospital Affiliated to Henan University), Zhengzhou 450000, Henan Province, China; ²Intravenous Medication Dispensing Center of First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China
Chen Mingwei, MD, Associate chief physician, Department I of Joint Disease, Zhengzhou Orthopedic Hospital (Zhengzhou Orthopedic Hospital Affiliated to Henan University), Zhengzhou 450000, Henan Province, China

¹郑州市骨科医院(河南大学附属郑州市骨科医院)关节病科I, 河南省郑州市 450000; ²郑州大学第一附属医院静脉用药调配中心, 河南省郑州市 450000

第一作者: 陈明伟, 男, 1983年生, 河南省项城市人, 汉族, 博士, 副主任医师, 主要从事骨关节外科基础与临床方面的研究。

通讯作者: 司文腾, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 郑州市骨科医院(河南大学附属郑州市骨科医院)关节病科I, 河南省郑州市 450000

<https://orcid.org/0009-0002-5441-9918> (陈明伟)

基金资助: 河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20230769), 项目负责人: 陈明伟

引用本文: 陈明伟, 余雯莉, 夏苏杭, 陈宾, 陈文忠, 李锋侦, 周宇, 司文腾. 携载 microRNA-140 外泌体 / 海藻酸钠 / 胶原水凝胶修复关节软骨损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(16):3326-3334.



Corresponding author: Si Wenteng, Master, Chief physician, Master's supervisor, Department I of Joint Disease, Zhengzhou Orthopedic Hospital (Zhengzhou Orthopedic Hospital Affiliated to Henan University), Zhengzhou 450000, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have confirmed that up-regulation of microRNA-140 expression can partially inhibit osteoarthritis-like changes in knee cartilage tissues and cells and delay the progression of osteoarthritis, suggesting that microRNA-140 is involved in the pathogenesis of osteoarthritis.

OBJECTIVE: To further analyze the mechanism of microRNA-140 involvement in osteoarthritis by loading exosomes overexpressing microRNA-140 with sodium alginate/collagen hydrogel.

METHODS: Lentivirus was used to infect rat bone marrow mesenchymal stem cells to overexpress microRNA-140, then exosomes were isolated and exosomes overexpressing microRNA-140 were obtained. Sodium alginate/collagen hydrogels loaded with exosomes were prepared. Thirty-two SD rats were randomly divided into four groups, with 8 rats in each group. Normal control group did not receive any treatment. The osteoarthritis model was established by injecting sodium iodoacetate into the knee cavity in the osteoarthritis group, the non-transfected exosome group and the transfected exosome group. Two weeks later, PBS was injected into the knee cavity in the osteoarthritis group. Sodium alginate/collagen hydrogel carrying non-overexpressing microRNA-140 and overexpressing microRNA-140 exosomes were injected into the knee cavity of the non-transfected exosome group and transfected exosome group. At 6 weeks after modeling, the threshold of mechanical foot withdrawal response, the concentration of inflammatory factors in synovial fluid, the expression of chondrogen-related genes, the histological changes of knee cartilage and the expression of pyroptosis related proteins were detected in rats.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with normal control group, the threshold value of mechanical stimulation foot contraction response, type II collagen, SOX9 mRNA expression levels, and Type II collagen immunofluorescence intensity were decreased in the osteoarthritis group ($P < 0.05$), and proinflammatory cytokine levels were increased in synovial fluid ($P < 0.05$). The mRNA expressions of matrix metalloproteinase 13 and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5) were increased ($P < 0.05$), and the protein expression levels of NLRP3, ASC, GSDMD p30, caspase-1 p20, interleukin-1 β , and interleukin-18 were increased ($P < 0.05$). Immunofluorescence intensity of GSDMD and cleaved caspase-1 was increased ($P < 0.05$), and cartilage tissue was severely damaged. (2) Compared with osteoarthritis group, the threshold value of mechanical stimulation foot contraction response, type II collagen, SOX9 mRNA expression levels, and type II collagen immunofluorescence intensity in the non-transfected and transfected exosome groups were increased ($P < 0.05$); proinflammatory cytokine levels were decreased in synovial fluid ($P < 0.05$). The mRNA expression of matrix metalloproteinase 13 was decreased ($P < 0.05$), and the protein expression levels of NLRP3, ASC, GSDMD p30, caspase-1 p20, interleukin-1 β , and interleukin-18 were decreased ($P < 0.05$). The immunofluorescence intensity of GSDMD and cleaved caspase-1 decreased ($P < 0.05$), and the cartilage tissue damage was reduced ($P < 0.05$), and the effect was stronger in the transfected exosome group. (3) These results conclude that microRNA-140 can reduce the pain response of rats with osteoarthritis by inhibiting inflammation, maintaining cartilage homeostasis, and inhibiting cartilaginous pyroptosis, thereby reducing cartilage damage and playing a therapeutic role in osteoarthritis.

Key words: osteoarthritis; cartilage injury; exosomes; microRNA-140; sodium alginate/collagen hydrogel; pyroptosis

Funding: Henan Province Medical Science and Technology Research Program Project, No. LHGJ20230769 (to CMW)

How to cite this article: CHEN MW, YU WL, XIA SH, CHEN B, CHEN WZ, LI FZ, ZHOU Y, SI WT. Articular cartilage injury repaired with microRNA-140 exosomes/sodium alginate/collagen hydrogel. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(16):3326-3334.

0 引言 Introduction

骨关节炎是一种由多因素共同作用导致的关节退行性疾病，以关节软骨破坏、滑膜炎、软骨下骨硬化或囊性变、关节边缘骨质增生及骨赘形成为主要病理特征^[1]。骨关节炎的发病与年龄、创伤、炎症、肥胖及劳损等因素相关，目前的治疗方式主要是早期口服药物或关节腔内注射玻璃酸钠来短期内缓解症状，晚期多进行微骨手术、软骨移植术、关节置换等手术治疗^[2-3]，但存在软骨来源有限、软骨再生能力差及术后活动受限等缺点，因此探索骨关节炎的有效治疗方法一直是临床研究的热点课题。

近些年来，随着干细胞再生医学研究的深入，干细胞治疗骨关节炎表现出了潜在的优势以及良好的效果^[4-5]，但也存在很多的问题，例如：定向诱导分化的信号通路与机制还不明确、干细胞移植后的存活率较低、只有极少数细胞分化为软骨细胞、长期移植后的细胞状态难以预测等。目前的研究发现，外泌体具有与干细胞类似的治疗效果，并且具有稳定性高、靶向作用强等优势，其可携带 microRNA 介导关节软骨细胞间通讯并调节受体细胞的生物活性，控制疾病的发展^[6-8]，为骨关节炎治疗开拓了新视野。外泌体作为组织工程的信号分子需要一定的载体，使其在局部缓慢释放而发挥作用。海藻酸钠基可注射水凝胶的结构与天然细胞外基质相似，并且具有良好的孔隙率与生物降解性，在组织工程中应用广泛^[9]。

胶原蛋白为骨与软骨组织细胞外基质的主要成分，将其与海藻酸钠结合可复制软骨细胞微环境，是关节腔内注射用药的良好载体^[10]。

microRNA-140 具有软骨特异性，在正常软骨组织中稳定表达，并且在软骨细胞发育、稳态维持与损伤修复中发挥着重要的调控作用^[11]。研究已证实，上调 microRNA-140 表达可部分抑制膝关节软骨组织与细胞的骨关节炎样改变，延缓骨关节炎进程^[12-13]，提示 microRNA-140 参与了骨关节炎的发病机制。综合以上，此次实验采用海藻酸钠/胶原水凝胶负载过表达 microRNA-140 的外泌体，进一步分析 microRNA-140 参与骨关节炎的相关机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机分组动物实验，进行多样本均数比较的方差分析及多组间两两比较的方差分析 (q 检验)。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 6 月至 2023 年 3 月在郑州市骨科医院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选择 8 周龄雄性 SD 大鼠为实验对象，共 32 只，体质量 250–300 g，购自河南远大生物制药有限公司，使用许可证号：SYXK(豫)2022-0010。采用随机数字表法将 32 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、骨关节炎组、未转染外泌体组、转染外泌体组，每组 8 只。实验方案

已通过郑州市骨科医院伦理委员会批准 [2022 医院伦审第 (021) 号]。

1.3.2 细胞与试剂、仪器 SD 大鼠骨髓间充质干细胞购自上海雅吉生物科技有限公司；pLeno-DCE-Puro-microRNA-140 慢病毒与 pLeno-DCE-Puro 空病毒购自北京启研生物科技有限公司；碘乙酸钠购自武汉克米克生物医药技术有限公司；DMEM 培养液、胎牛血清购自北京索莱宝科技有限公司；透射电镜购自北京欧波同光学技术有限公司；荧光显微镜购自上海兆仪光电科技有限公司；激光粒度分析仪购自珠海真理光学仪器有限公司；海藻酸钠购自上海源叶生物科技有限公司；I 型胶原购自江苏久佳生物科技有限公司；CD9、CD63 抗体购自北京智杰方远科技有限公司；NLRP3、ASC、GSDMD、GSDMD p30、pro-caspase-1、caspase-1 p20、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 抗体购自艾维缔科技怀来有限公司；II 型胶原抗体购自江苏雨桐生物科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞转染慢病毒 选择生长状态良好的第 3 代 SD 大鼠骨髓间充质干细胞接种于 6 孔板中，细胞密度为 1×10^5 /孔，培养过夜，第 2 天更换培养液，按照 MOI=20 加入病毒，转染组每孔加入 10 μ L pLenO-DCE-Puro-microRNA-140 慢病毒，阴性对照组每孔加入 10 μ L pLenO-DCE-Puro 慢病毒，同时每孔加入 Polybrene 储液，使其终质量浓度为 8 μ g/ μ L，加入含体积分数 10% 胎牛血清 (无外泌体)、1% 青-链霉素的 DMEM 培养液。24 h 后更换培养液，再次转染细胞。48 h 后荧光显微镜下观察细胞变化，72 h 后收集细胞用于后续检测。

1.4.2 外泌体的分离提取与鉴定 采用差速离心法分离提取外泌体。取未转染与转染空病毒、慢病毒的骨髓间充质干细胞，分别培养于含体积分数 10% 胎牛血清 (无外泌体)、1% 青-链霉素的 DMEM 培养液中，置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO₂ 培养箱中孵育。孵育 48 h 后，收集培养上清，在 4 $^{\circ}$ C 条件下 300 \times g 离心 10 min，去除完整细胞；4 $^{\circ}$ C 条件下 2 000 \times g 离心 10 min，去除细胞碎片；在 4 $^{\circ}$ C 条件下 10 000 \times g 离心 30 min，去除凋亡小体；收集离心后的上清液通过 0.22 μ m 滤膜过滤，在 4 $^{\circ}$ C 条件下 100 000 \times g 离心 70 min，弃去上清，用 10 倍体积的 PBS(pH=7.4) 洗涤沉淀，在 4 $^{\circ}$ C 条件下 100 000 \times g 离心 70 min，弃去上清，收集沉淀，以 500 μ L PBS 复悬。以 BCA 蛋白定量试剂盒定量测定后，保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

取未转染与转染慢病毒的外泌体 50 μ L，以去离子水清洗样品池，仪器以聚苯乙烯微球校准，以 1 \times PBS buffer 清洗样本池，将样本以 1 \times PBS buffer 稀释后进样，上激光粒度分析仪检测外泌体的粒径。取 50 μ L 未转染与转染慢病毒的外泌体悬液滴于铜网上室温静置 5 min，在铜网

的另一侧用滤纸吸干 PBS，在铜网上滴加 20 mmol/L 磷酸溶液 50 μ L 室温下染色 5 min，在铜网的另一侧用滤纸吸干磷酸溶液，透射电镜下观察并拍片。利用 Western blot 检测未转染与转染慢病毒的外泌体、PBS 中 CD9 与 CD63 的蛋白表达量，以 GAPDH 为内参 (具体的实验步骤将在后续统一介绍)。

1.4.3 转染慢病毒骨髓间充质干细胞与外泌体的 microRNA-140 表达检测 取未转染与转染空病毒、慢病毒的骨髓间充质干细胞，未转染与转染空病毒、慢病毒的外泌体，采用 RT-qPCR 法检测 microRNA-140 的表达，以 U6 为内参 (具体的实验步骤将在后续统一介绍)。

1.4.4 海藻酸钠 / 胶原水凝胶的制备 参考苏坤阳等^[9] 研究中的方法制备海藻酸钠 / 胶原水凝胶。称取一定量的海藻酸钠投入去离子水中，得到质量浓度为 20 g/L 的海藻酸钠溶液；称取一定量的 I 型胶原投入醋酸缓冲液中，得到质量浓度 5 g/L 的 I 型胶原溶液，调节溶液的 pH 值为 7.2。将上述两种溶液按照 2 : 1 的体积比混合均匀，将未转染或转染慢病毒的外泌体分别加入混合溶液中，外泌体的最终质量浓度为 2 μ g/ μ L^[14]；向混合溶液中缓慢滴加 CaCl₂ 溶液 (0.4 mol/L)，最终溶液交联形成凝胶。扫描电镜下观察水凝胶的微观形貌。

1.4.5 骨关节炎大鼠模型的构建与分组干预 使用生理盐水配制质量浓度为 20 mg/mL 的碘乙酸钠溶液，使用 0.22 μ m 过滤器过滤溶液。异氟烷吸入麻醉 4 组大鼠后，向骨关节炎组、未转染外泌体组、转染外泌体组大鼠左后肢膝关节腔内注射碘乙酸钠溶液 50 μ L，正常对照组大鼠左后肢膝关节腔内注射生理盐水 50 μ L。碘乙酸钠溶液注射 2 周后检测机械刺激缩足反应阈值，如果造模大鼠机械刺激缩足反应阈值显著低于正常对照组，说明造模成功。

证明造模成功后，再次麻醉大鼠进行治疗，正常对照组与骨关节炎组大鼠左后肢膝关节腔内注射 PBS 50 μ L，未转染外泌体组大鼠左后肢膝关节腔内注射负载未转染慢病毒外泌体的海藻酸钠 / 胶原水凝胶 50 μ L，转染外泌体组大鼠左后肢膝关节腔内注射负载转染慢病毒外泌体的海藻酸钠 / 胶原水凝胶 50 μ L。造模后的第 6 周，测试机械刺激缩足反应阈值后，麻醉状态下处死所有大鼠，取出膝关节并收集滑膜液，备用。

1.4.6 机械刺激缩足反应阈值测试 造模前及造模后的 2, 3, 4, 5, 6 周，使用 Von Frey 纤维丝对各组大鼠进行疼痛行为测试，测试机械刺激缩足反应阈值，机械刺激缩足反应阈值越低说明疼痛越严重。将大鼠放到金属笼中，记录并编号，等待 15-30 min，直到大鼠适应环境、保持安静，用中间值为 6.0 g 的纤维丝作用于大鼠后足掌心，纤维丝弯曲作用 6-8 s，如大鼠出现抬足或舔舐现象 (阳

性), 则更换为更高级的纤维丝刺激。如此循环, 直到出现第一次交叉后再测 4 次^[15]。

1.4.7 膝关节软骨组织病理形态 将膝关节置于 40 g/L 多聚甲醛中固定 24 h, 随后依次进行脱钙、组织脱水、透明、浸蜡与包埋石蜡块操作, 切片 (5 μm), 分别进行苏木精-伊红染色、番红 O 染色, 脱水、透明、封固, 光学显微镜下观察并拍片。根据苏木精-伊红染色、番红 O 染色, 利用 Image J 软件测量关节软骨厚度, 同时进行改良 Mankin 组织学评分, 评分范围 0-15 分, 分数越高说明软骨损伤越严重。

1.4.8 膝关节软骨免疫荧光染色 取关节软骨样本, 置于 40 g/L 多聚甲醛中固定 10 min, 用 PBS 洗涤, 加入 0.5% TritonX-100 室温孵育 30 min; 用稀释 20 倍的山羊血清封闭 20 min, 用 PBS 洗涤; 加入对应稀释比例的一抗 (GSDMD、cleaved caspase-1、II 型胶原, 稀释比例均为 1 : 1 000) 4 °C 下孵育过夜, 用 TBST 洗涤, 加入对应稀释比例的二抗室温下避光孵育 1 h, 用 TBST 洗涤; 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 用 TBST 洗涤, 封片液封固, 荧光显微镜下观察并拍片, 分析 GSDMD、cleaved caspase-1、II 型胶原的蛋白表达。利用 Image J 软件进行荧光强度定量分析。

1.4.9 滑膜液炎症因子浓度测量 取大鼠滑膜液, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行相关操作, 检测白细胞介素 6、白细胞介素 1β 与肿瘤坏死因子 α 水平。

1.4.10 RT-qPCR 检测 取骨髓间充质干细胞、外泌体或大鼠膝关节软骨样本, 加入对应的裂解液裂解, 采用 Trizol 法提取 RNA 并反转录为 cDNA, 然后进行实时荧光定量 PCR 反应, 预变性, 85 °C 10 min, 1 个循环; 变性, 95 °C 15 s, 退火延伸 60 °C 60 s、95 °C 15 s, 40 个循环; 熔解曲线 60 °C 60 s、95 °C 15 s。引物序列如表 1。检测软骨组织中 II 型胶原、SOX9、基质金属蛋白酶 13 及血小板反应蛋白解整合素金属肽酶 5 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5) mRNA 的表达, 以 GAPDH 为内参。

表 1 | RT-qPCR 检测引物序列
Table 1 | Primer sequences for RT-qPCR

基因	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
microRNA-140	ACT GTC CTT CCC TCT GGG C	AAT GGT TGT TCT CCA CTC TCT CTC
II 型胶原	AAC ACT CCC AGA ACA GTT CA	ACC GCA TTG TGC TCA GTA TC
SOX9	ACA GGA AGG ATG GTG CGA TC	TCA GAC CGT ACA GGT CTG G
基质金属蛋白酶 13	GTA CCC CAC TTG TCG ACC GAA	CCA CAC CAC AGT TAA GGG C
ADAMTS-5	CTG TGT ATA CGT GGG ATC CAA CC	GAC ATC AAG CAC ACT GGC ACA
GAPDH	ACT CCC CTA GAT CGC AAT AC	AGC GAT AGT TCG TTT GAT GAG C
U6	CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT	ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C

表注: ADAMTS-5 为血小板反应蛋白解整合素金属肽酶 5。

1.4.11 Western blot 检测 取外泌体样本与大鼠膝关节软骨样本, 加入对应的裂解液, 提取蛋白, 加入 5× 蛋白

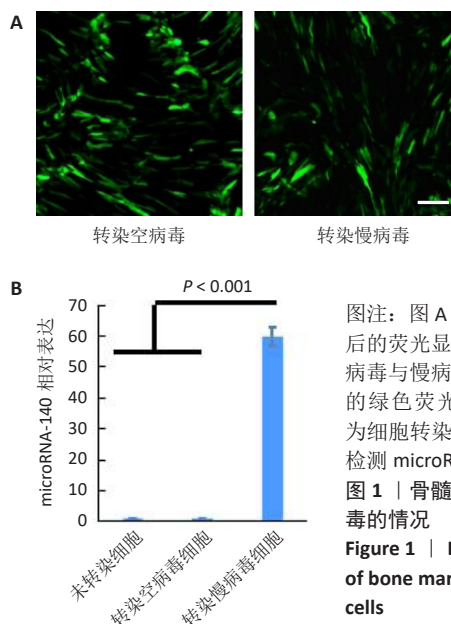
上样缓冲液稀释 5 倍加入蛋白中混合均匀, 置于 100 °C 金属浴中 10 min 蛋白变性。将蛋白样品加入电泳槽孔中, 进行 60 V 30 min、120 V 60 min 电泳, 冰浴条件下以 200 mV 恒流电泳 120 min 进行转膜, 取出膜, 进行洗涤、封闭后, 加入对应稀释比例的一抗 (CD9、CD63、NLRP3、ASC、GSDMD、GSDMD p30、pro-caspase-1、caspase-1 p20、白细胞介素 1β、pro- 白细胞介素 1β、白细胞介素 18、pro- 白细胞介素 18、GAPDH, 稀释比例均为 1 : 1 000) 4 °C 下孵育过夜, 用 TBST 洗涤膜, 加入对应稀释比例的二抗室温避光孵育 1 h, 用 TBST 洗涤膜, ECL 显影。

1.5 主要观察指标 各组大鼠机械刺激缩足反应阈值、滑膜液炎症因子浓度、软骨相关基因表达、膝关节软骨组织的组织学变化与凋亡相关蛋白表达。

1.6 统计学分析 所有的实验均独立重复 3 次, 定量数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 Graphpad Prism 8.0 软件进行数据统计及分析, 进行多样本均数比较的方差分析及多组间两两比较的方差分析 (*q* 检验), 以 *P* < 0.05 表示差异有显著性意义。该文统计学方法已经郑州市骨科医院 (河南大学附属郑州市骨科医院) 生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 慢病毒转染情况 慢病毒转染 48 h 后, 荧光显微镜下可见转染空病毒与慢病毒后的骨髓间充质干细胞表达非常强的绿色荧光, 见图 1A; RT-qPCR 检测结果显示, 相较于转染空病毒与未转染慢病毒的骨髓间充质干细胞, 转染 pLenO-DCE-Puro-microRNA-140 慢病毒后的骨髓间充质干细胞 microRNA-140 表达显著升高 (*P* < 0.001), 前两组之间 microRNA-140 表达比较差异无显著性意义 (*P* > 0.05), 见图 1B。

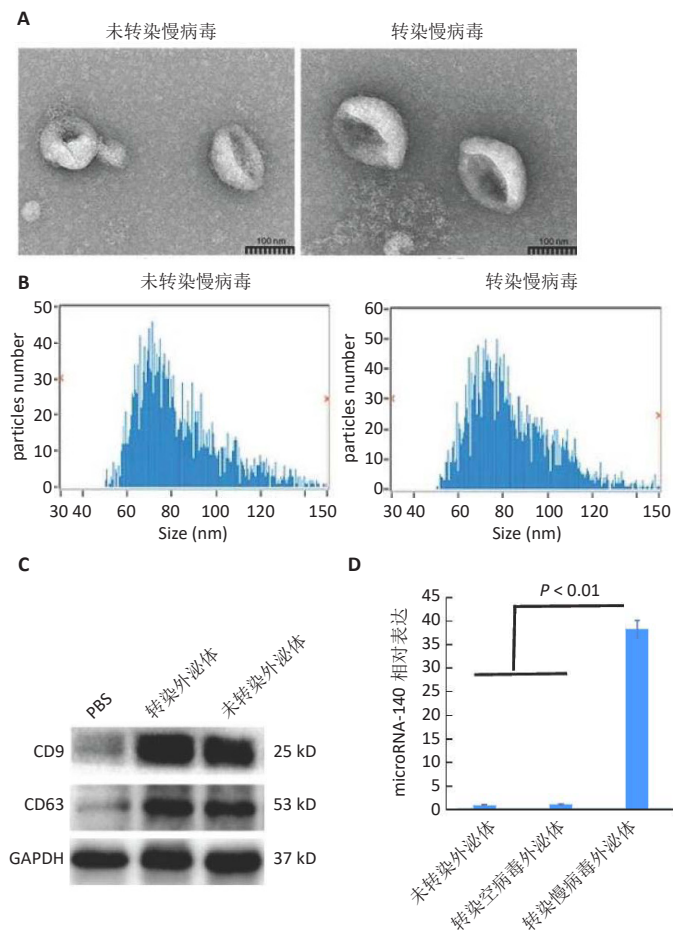


图注: 图 A 为细胞转染慢病毒 48 h 后的荧光显微镜拍摄图像, 转染空病毒与慢病毒后的细胞表达非常强的绿色荧光, 比例尺 = 100 μm; B 为细胞转染慢病毒 72 h 后 RT-qPCR 检测 microRNA-140 相对表达。图 1 | 骨髓间充质干细胞转染慢病毒的情况

Figure 1 | Lentivirus transfection of bone marrow mesenchymal stem cells

2.2 外泌体的分离提取与鉴定 采用差速离心法分离提取外泌体,透射电镜下可见两种提取物呈现中空凹陷的椭圆或圆形的囊泡结构(图2A),这与以往研究描述的外泌体形态一致;粒径检测结果显示,两种囊泡结构的粒径分布在50~150 nm之间(图2B),在外泌体的粒径范围之内。

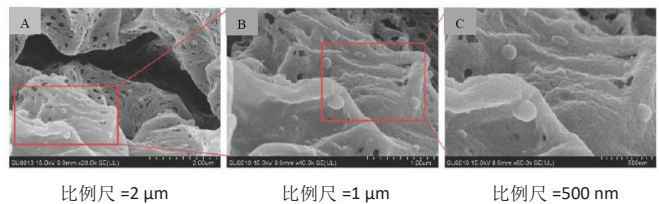
Western blot 检测结果显示, PBS 未检测出 CD9 与 CD63 蛋白表达,而两种外泌体中均检测出了较强的 CD9 与 CD63 蛋白表达(图2C)。RT-qPCR 检测结果显示,相较于未转染慢病毒与转染空病毒的外泌体,转染 pLenO-DCE-Puro-microRNA-140 慢病毒后的外泌体内 microRNA-140 表达升高 ($P < 0.01$),见图2D,前两种外泌体中的 microRNA-140 表达比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。



图注:图A为两种外泌体的透射电镜图像,均呈现中空凹陷的椭圆或圆形的囊泡结构,比例尺=100 nm;B为两种外泌体的粒径分布,粒径均分布在50~150 nm之间;C为两种外泌体的标志蛋白表达,PBS未检测出CD9与CD63蛋白表达,两种外泌体中均检测出了较强的CD9与CD63蛋白表达;D为外泌体中的microRNA-140表达。

图2 | 未转染与转染慢病毒外泌体的分离提取与鉴定
Figure 2 | Isolation, extraction, and identification of non-transfected and transfected exosomes

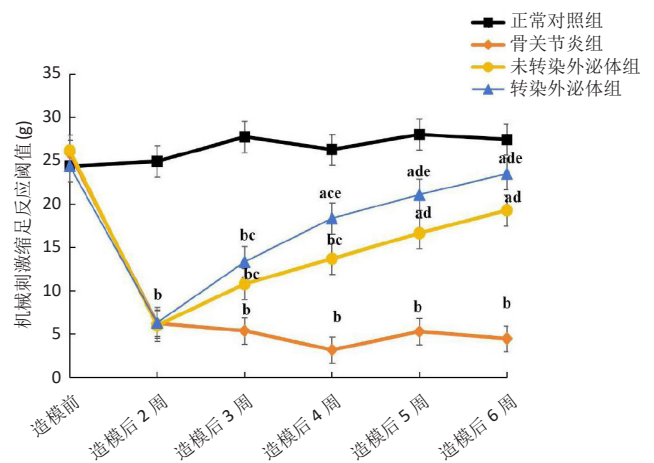
2.3 负载外泌体水凝胶的微观形貌 扫描电镜下可见海藻酸钠/胶原水凝胶呈疏松多孔的网格状结构,结构较均匀一致,外泌体呈球状附着在水凝胶表面,并且分布较均匀,见图3。



图注:水凝胶呈疏松多孔的网格状结构,结构较均匀一致,外泌体呈球状附着在水凝胶表面,并且分布较均匀,B为A中红色方框的放大观,C为B中红色方框的放大观。
图3 | 负载外泌体海藻酸钠/胶原水凝胶的微观形貌

Figure 3 | Micromorphology of exosome-loaded sodium alginate/collagen hydrogel

2.4 实验动物数量分析 32只大鼠全部进入结果分析。
2.5 各组大鼠机械刺激缩足反应阈值测试结果 见图4。



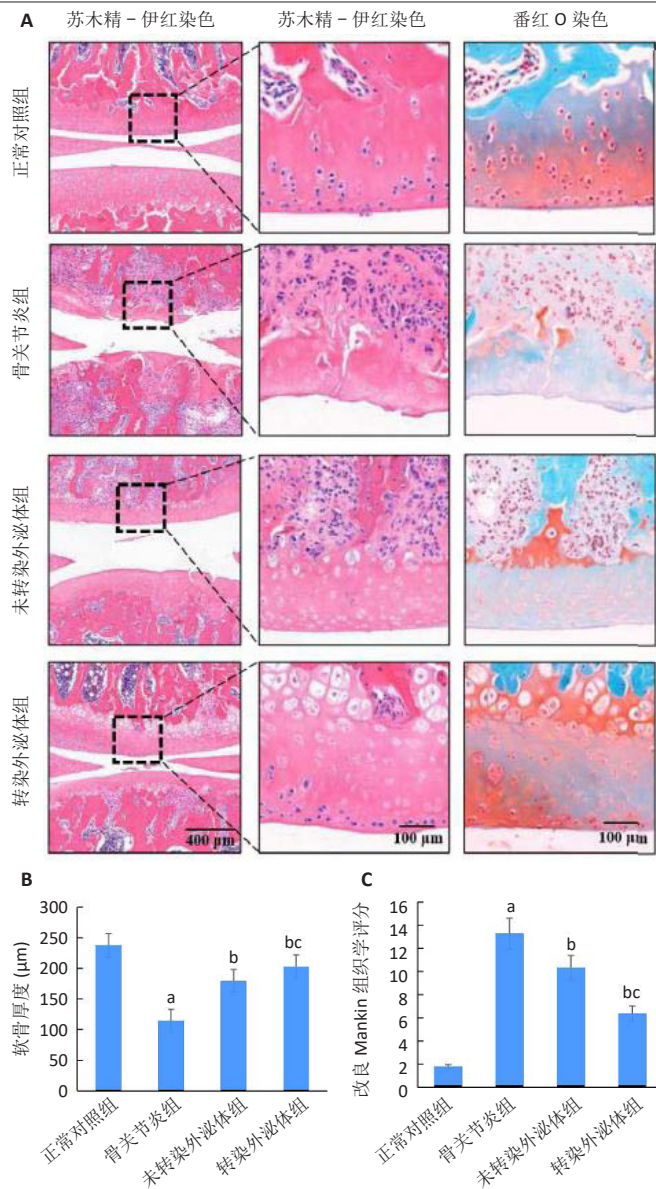
图注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与骨关节炎组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与未转染外泌体组比较,^e $P < 0.05$ 。

图4 | 造模前后各组大鼠机械刺激缩足反应阈值的变化
Figure 4 | Changes of the threshold of mechanical foot withdrawal response in rats of each group before and after modeling

造模前,4组大鼠的机械刺激缩足反应阈值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。造模后2~6周,正常对照组大鼠的机械刺激缩足反应阈值均维持在较高的水平,并且明显高于其他3组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。造模后2周,造模3组大鼠的机械刺激缩足反应阈值均较造模前显著降低 ($P < 0.01$),造模3组间机械刺激缩足反应阈值比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。造模后3~6周,骨关节炎组大鼠机械刺激缩足反应阈值整体呈降低趋势,未转染外泌体组与转染外泌体组大鼠机械刺激缩足反应阈值逐渐升高,未转染外泌体组与转染外泌体组造模后3~6周的机械刺激缩足反应阈值均高于骨关节炎组 ($P < 0.05$ 或者 $P < 0.01$),转染外泌体组造模后4~6周的机械刺激缩足反应阈值高于未转染外泌体组 ($P < 0.05$)。

2.6 各组大鼠膝关节软骨组织病理形态分析结果 见图5。

苏木精-伊红染色结果显示,正常对照组软骨表面平整,细胞形态与数量正常,软骨陷窝结构明显;骨关



图注：图A为软骨组织苏木精-伊红与番红O染色的代表性图像，骨关节炎组软骨损伤严重，两外泌体组软骨损伤明显减轻；B为苏木精-伊红与番红O染色中软骨厚度定量分析；C为软骨改良Mankin组织学评分。与正常对照组比较，^a $P < 0.01$ ；与骨关节炎组比较，^b $P < 0.05$ ；与未转染外泌体组比较，^c $P < 0.05$ 。

图5 | 造模后6周各组大鼠软骨组织病理形态观察

Figure 5 | Observation of cartilage histopathological morphology in rats of each group 6 weeks after modeling

节炎组软骨平面粗糙不平整，软骨细胞数量明显减少，软骨陷窝结构不明显；未转染外泌体组、转染外泌体组软骨表面较光滑、平整，软骨细胞数量增加，软骨陷窝结构较清晰。

番红O染色结果显示，正常对照组软骨组织呈红色，说明含有的蛋白聚糖非常多；骨关节炎组几乎不可见红色着色，未转染外泌体组红色着色较骨关节炎组增强，转染外泌体组红色着色较未转染外泌体组进一步增强。

组织学切片定量分析结果显示，与正常对照组比较，骨关节炎组软骨厚度显著减少 ($P < 0.01$)、改良 Mankin 组

织学评分增加 ($P < 0.01$)；与骨关节炎组比较，未转染外泌体组软骨厚度增加 ($P < 0.05$)、改良 Mankin 组织学评分减少 ($P < 0.05$)；与未转染外泌体组比较，转染外泌体组软骨厚度增加 ($P < 0.05$)、改良 Mankin 组织学评分减少 ($P < 0.05$)。

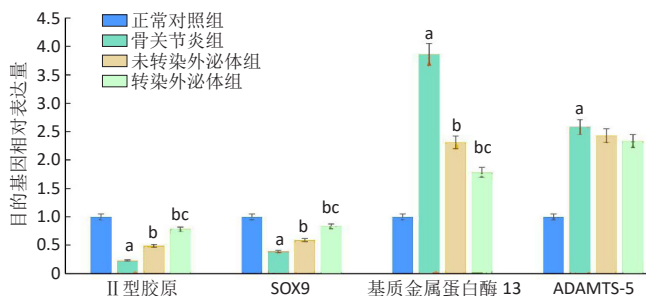
2.7 各组大鼠滑膜液炎症因子水平检测结果 与正常对照组比较，骨关节炎组大鼠滑膜液中白细胞介素6、白细胞介素1β与肿瘤坏死因子α水平平均增加 ($P < 0.01$)；与骨关节炎组比较，未转染外泌体组、转染外泌体组大鼠滑膜液中白细胞介素6、白细胞介素1β与肿瘤坏死因子α水平平均减少 ($P < 0.05$)；与未转染外泌体组比较，转染外泌体组大鼠滑膜液中白细胞介素6、肿瘤坏死因子α水平平均减少 ($P < 0.05$)，白细胞介素1β水平无明显变化 ($P > 0.05$)，见表2。

表2 | 造模后6周各组大鼠滑膜液中炎症因子的质量浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	白细胞介素6	白细胞介素1β	肿瘤坏死因子α
正常对照组	145.21±22.08	196.03±16.74	19.78±3.56
骨关节炎组	296.72±14.62 ^a	312.39±20.52 ^a	73.64±6.98 ^a
未转染外泌体组	223.58±20.14 ^b	239.28±16.49 ^b	56.88±9.01 ^b
转染外泌体组	183.89±11.68 ^{bc}	220.17±18.09 ^b	32.33±5.71 ^{bc}

表注：与正常对照组比较，^a $P < 0.01$ ；与骨关节炎组比较，^b $P < 0.05$ ；与未转染外泌体组比较，^c $P < 0.05$ 。

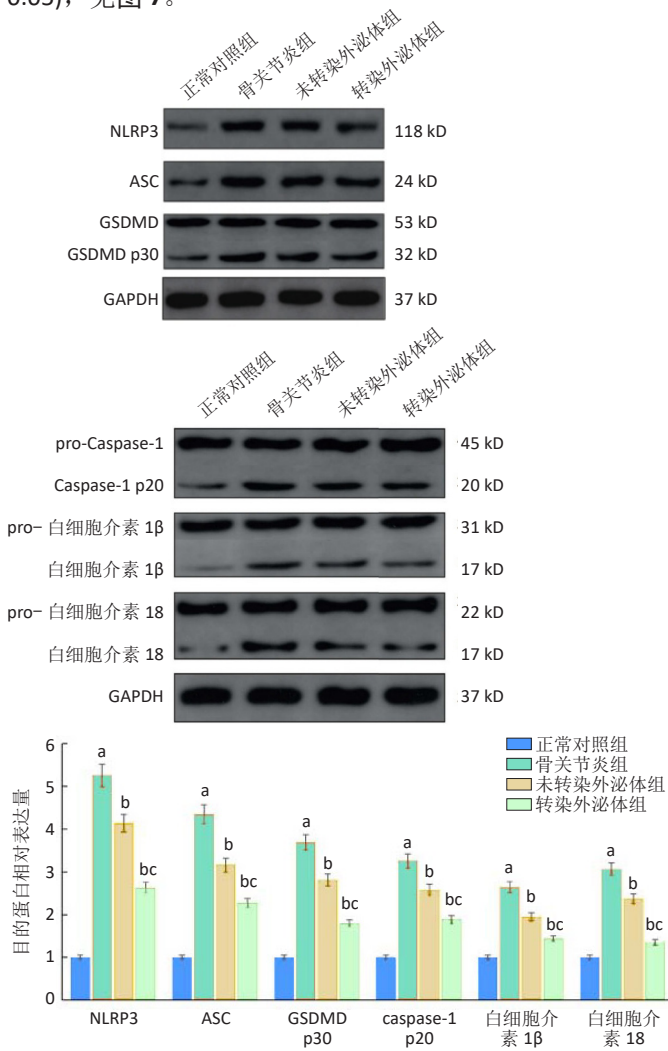
2.8 各组大鼠软骨中相关基因表达检测结果 与正常对照组比较，骨关节炎组II型胶原、SOX9 mRNA表达显著减少 ($P < 0.01$)，基质金属蛋白酶13、ADAMTS-5 mRNA表达显著增加 ($P < 0.01$)；与骨关节炎组比较，未转染外泌体组、转染外泌体组II型胶原、SOX9 mRNA表达增加 ($P < 0.05$)，基质金属蛋白酶13 mRNA表达减少 ($P < 0.05$)；与未转染外泌体组比较，转染外泌体组II型胶原、SOX9 mRNA表达增加 ($P < 0.05$)，基质金属蛋白酶13 mRNA表达减少 ($P < 0.05$)，见图6。



图注：ADAMTS-5为血小板反应蛋白整合素金属肽酶5。与正常对照组比较，^a $P < 0.01$ ；与骨关节炎组比较，^b $P < 0.05$ ；与未转染外泌体组比较，^c $P < 0.05$ 。

图6 | 造模后6周各组大鼠软骨相关基因的表达
Figure 6 | Expression of cartilage specific genes in rats of each group 6 weeks after modeling

2.9 各组大鼠软骨中焦亡相关蛋白表达检测结果 Western blot 检测结果显示, 4 组间 GSDMD、pro-caspase-1、pro-白细胞介素 1 β 、pro-白细胞介素 18 的蛋白表达比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 与正常对照组比较, 骨关节炎组 NLRP3、ASC、GSDMD p30、caspase-1 p20、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 的蛋白表达均增加 ($P < 0.01$); 与骨关节炎组比较, 未转染外泌体组 NLRP3、ASC、GSDMD p30、caspase-1 p20、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 的蛋白表达均减少 ($P < 0.05$); 与未转染外泌体组比较, 转染外泌体组 NLRP3、ASC、GSDMD p30、caspase-1 p20、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 的蛋白表达均减少 ($P < 0.05$), 见图 7。



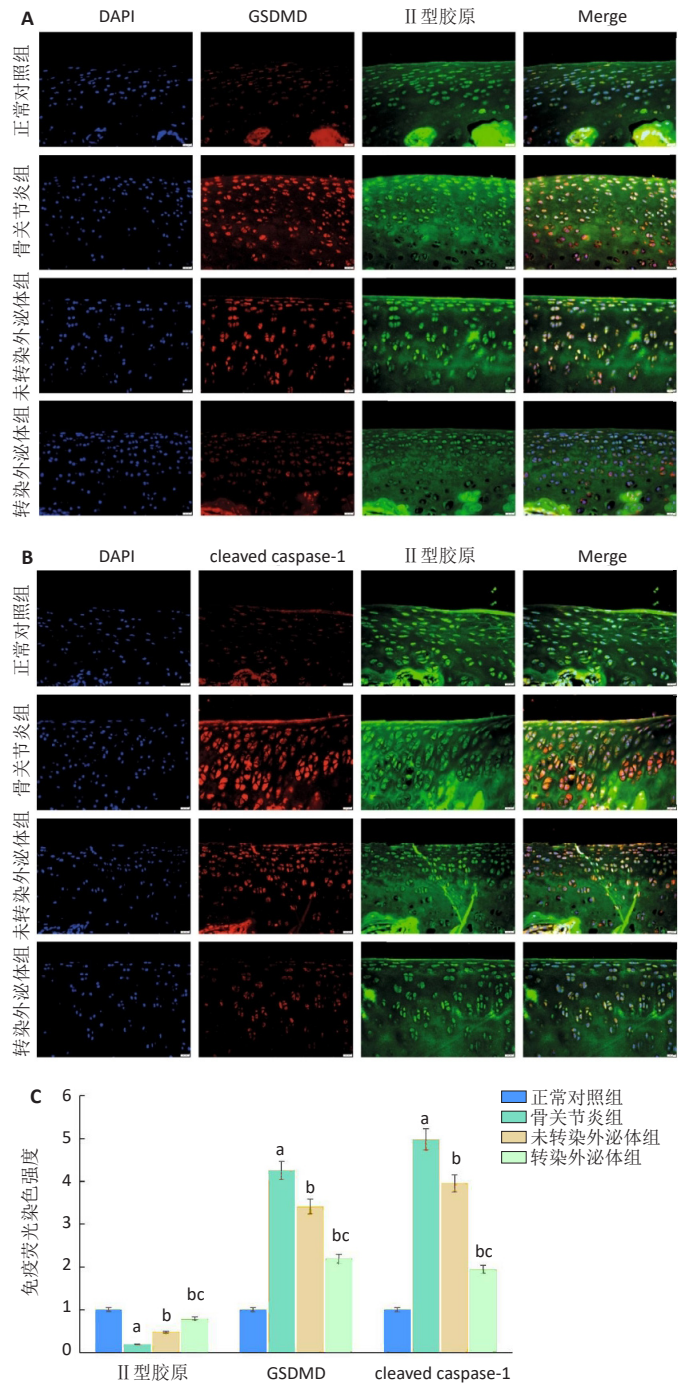
图注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与骨关节炎组比较, ^b $P < 0.05$; 与未转染外泌体组比较, ^c $P < 0.05$ 。

图 7 | 造模后 6 周各组大鼠软骨内焦亡相关蛋白的表达

Figure 7 | Expression of intrachondral pyroptosis related proteins in rats of each group 6 weeks after modeling

免疫荧光染色结果显示, 4 组软骨组织内均可见不同程度的 GSDMD、cleaved caspase-1、II 型胶原表达, 正常对照组软骨组织内的 II 型胶原表达荧光强度最强, GSDMD、cleaved caspase-1 表达荧光强度最弱; 骨关节炎

组软骨组织内的 II 型胶原表达荧光强度最弱, GSDMD、cleaved caspase-1 表达荧光强度最强; 相较于未转染外泌体组, 转染外泌体组软骨组织内的 II 型胶原表达荧光强度增强, GSDMD、cleaved caspase-1 表达荧光强度减弱, 见图 8。



图注: 图 A 为 GSDMD 与 II 型胶原免疫荧光染色的代表性图像, 比例尺 =100 μ m; B 为 cleaved caspase-1 与 II 型胶原免疫荧光染色的代表性图像, 比例尺 =100 μ m; C 为 II 型胶原、GSDMD 与 cleaved caspase-1 与免疫荧光染色的定量分析。与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与骨关节炎组比较, ^b $P < 0.05$; 与未转染外泌体组比较, ^c $P < 0.05$ 。

图 8 | 造模后 6 周各组大鼠软骨内 GSDMD、cleaved caspase-1、II 型胶原免疫荧光染色结果

Figure 8 | Immunofluorescence staining results of GSDMD, cleaved caspase-1, and type II collagen in cartilage of rats of each group 6 weeks after modeling

3 讨论 Discussion

在生物力学的相互作用下, 关节软骨细胞与细胞外基质之间的平衡遭到破坏是导致骨关节炎的重要原因。目前的药物治疗、物理治疗与手术治疗均无法从根本上治疗骨关节炎的软骨损伤。近些年来, 间充质干细胞移植治疗骨关节炎引起了研究者的关注, 并且研究已证实骨髓间充质干细胞可从多方面有效治疗骨关节炎^[16-17], 可修复软骨损伤, 但存在肿瘤形成、伦理问题与免疫排斥反应的不足, 限制了骨髓间充质干细胞的临床应用。外泌体是多囊泡体与质膜的胞质融合后释放到细胞外基质中的小囊泡, 呈圆盘状, 直径在 30-150 nm 之间, 其包含多种具有重要功能的蛋白质、脂质与核酸, 可转移至其他细胞中, 进而影响受体细胞功能。研究报道, 骨髓间充质干细胞来源外泌体可以平衡软骨细胞外基质的合成与降解, 提高软骨细胞活力, 增强软骨形成, 抑制软骨降解与炎症反应, 促进软骨修复, 减轻骨关节炎大鼠的疼痛, 抑制骨关节炎的进展^[18-20], 但骨髓间充质干细胞来源外泌体治疗骨关节炎的具体机制仍需要深入的研究。

在正常情况下, 环境、信号通路与 microRNA 等多种因素共同调控软骨组织的合成与分解代谢。microRNA-140 已被报道在人类正常软骨组织中稳定表达, 在骨关节炎软骨组织与软骨细胞中表达降低, 证实其在关节软骨发育、稳态维持与功能发挥中具有重要作用^[21-22]。因此, 此次实验将 microRNA-140 携载体于骨髓间充质干细胞来源外泌体中, 进一步探讨其在骨关节炎中的作用。

SOX9 是软骨生成与软骨细胞分化的重要早期转录因子, 是关节软骨组织工程的敏感因子, 在软骨生成中具有重要作用^[23-24]。II 型胶原是 SOX9 的下游靶蛋白, 是软骨基质的重要组成成分^[25-26]。基质金属蛋白酶 13 与 ADAMTS-5 均为胶原水解酶, 其过量表达可降解软骨基质, 对关节软骨具有破坏作用^[27]。此次实验结果显示, 骨髓间充质干细胞来源外泌体可部分逆转骨关节炎导致的 II 型胶原、SOX9 表达降低与基质金属蛋白酶 13、ADAMTS-5 表达的升高, 证实骨髓间充质干细胞来源外泌体可通过促进软骨生成、抑制软骨细胞外基质降解来维持软骨稳态, 减轻骨关节炎的损害, 与以往的相关研究结论基本一致。相较于单纯的骨髓间充质干细胞来源外泌体, 过表达 microRNA-140 的外泌体进一步促进了软骨生成、抑制了软骨细胞外基质降解, 证实外源性的 microRNA-140 可通过维持软骨稳态来降低软骨损伤, 发挥骨关节炎治疗作用。研究已证实, 白细胞介素 1 β 、白细胞介素 8、肿瘤坏死因子 α 与转化生长因子 β 等的促炎症因子广泛参与了骨关节炎的发生与发展, 这些促炎症因子通过调节软骨细胞的微环境, 促进软骨细胞产生过量的基质金属蛋白酶与 ADAMTS-5, 进而导致细胞外基质中 II 型胶原蛋白

等的降解, 引发关节疼痛^[28]。此次实验选择白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 与肿瘤坏死因子 α 促炎症因子进一步评估骨关节炎的软骨损伤程度, 结果显示骨髓间充质干细胞来源外泌体降低了骨关节炎导致的软骨炎症反应, 其联合 microRNA-140 可进一步抑制炎症反应, 减轻关节疼痛, 发挥关节软骨保护作用。软骨病理形态分析结果进一步验证了骨髓间充质干细胞来源外泌体与 microRNA-140 对骨关节炎的治疗作用。

焦亡是伴随炎症反应的细胞死亡方式, 近年来作为一种特殊的细胞程序性死亡方式成为研究的热点之一。焦亡的经典途径是炎性小体 NLRP3 激活 caspase-1 并作用于 GSDMD, 通过释放裂解的 GSDMD N 端结构域并形成孔道, 进而导致细胞因子和各种细胞质内容物的释放, 最终导致细胞膜破裂而引起细胞死亡^[29-30]。近期的研究显示, 焦亡也参与了骨关节炎的进展, 抑制 NLRP3 介导的细胞焦亡可减轻骨关节炎损伤^[31]。吕佳等^[32]的研究报道, 骨髓间充质干细胞来源外泌体可降低乳酸脱氢酶、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 18 的分泌, 抑制高血糖诱导的人肾近端小管细胞 (HK-2) 焦亡。BAI 等^[33]的研究报道, 骨髓间充质干细胞来源外泌体可通过抑制焦亡通路中的 NLRP3/caspase-1/GSDMD 减轻炎症, 减缓动脉粥样硬化的进展。以上研究结果提示, 骨髓间充质干细胞来源外泌体具有抑制焦亡的作用, 但是该作用在骨关节炎治疗中的影响还不明确, 因此该实验进行了相关检测。此次研究结果显示, 在骨关节炎大鼠模型中检测到了软骨焦亡相关蛋白 NLRP3、ASC、GSDMD p30、caspase-1 p20、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 表达的升高, 说明焦亡在骨关节炎进展中具有重要作用; 而经过骨髓间充质干细胞来源外泌体与过表达 microRNA-140 的骨髓间充质干细胞来源外泌体治疗后, 骨关节炎模型大鼠软骨中的 NLRP3、ASC、GSDMD p30、caspase-1 p20、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 18 表达显著降低, 说明两种外泌体均具有抑制软骨焦亡的作用, 并且过表达 microRNA-140 的骨髓间充质干细胞来源外泌体的抑制作用更显著。同时通过免疫荧光染色进一步分析了 4 组软骨组织内的 GSDMD、cleaved caspase-1、II 型胶原表达, 结果显示骨关节炎大鼠软骨组织内的 II 型胶原表达减少, GSDMD、cleaved caspase-1 表达增加, 说明软骨损伤严重; 经过两种外泌体治疗后骨关节炎大鼠软骨中的 II 型胶原表达增加, GSDMD、cleaved caspase-1 表达减少, 说明软骨损伤程度明显减轻, 并且以转染外泌体组治疗效果更明显, 进一步证实过表达 microRNA-140 的骨髓间充质干细胞来源外泌体对骨关节炎软骨的保护作用。有研究报道, 下调 p38 MAPK 信号通路抑制 NLRP3 炎性小体介导的软骨细胞焦亡, 可有效降低软骨细胞外基质的降解, 发挥保护软骨作用^[34]。作者推测 p38 MAPK 信号通路在骨髓间充质干细

胞来源外泌体与 microRNA-140 抑制软骨焦亡中发挥了重要作用，接下来将验证该通路在其中的作用。

该研究存在一定的不足：未设计低表达 microRNA-140 一组，因此 microRNA-140 在骨关节炎中具体作用有待进一步研究证实；未进行软骨中软骨细胞焦亡形态检测，无法分析软骨细胞焦亡形态变化；实验周期较短，长期治疗作用还有待验证；未进行具体的靶基因与信号通路实验，骨髓间充质干细胞来源外泌体与 microRNA-140 抑制软骨焦亡的分子机制有待探讨。

综合以上实验结果，microRNA-140 可通过抑制炎症、维持软骨稳态、抑制软骨焦亡来减轻骨关节炎大鼠的疼痛反应，降低软骨损伤，发挥骨关节炎治疗作用。

作者贡献：陈明伟进行文章设计，文章实施为陈明伟、余雯莉、夏苏杭、陈宾，资料收集为陈文忠、李锋、周宇，陈明伟成文，司文腾审核。

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。

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。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守了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。

4 参考文献 References

- ABRAMOFF B, CALDERA FE. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am.* 2020;104(2):293-311.
- WANG Z, WANG S, WANG K, et al. Stimuli-Sensitive Nanotherapies for the Treatment of Osteoarthritis. *Macromol Biosci.* 2021;21(11):e2100280.
- FOURNIER J, FINESTONE H, LAUZON J, et al. Prevalence, Impact, and Treatment of Co-Occurring Osteoarthritis in Patients With Stroke Undergoing Rehabilitation: A Review. *Stroke.* 2021;52(10):e618-e621.
- GIORGINO R, ALBANO D, FUSCO S, et al. Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7):6405.
- BHATTACHARJEE M, ESCOBAR IVIRICO JL, KAN HM, et al. Injectable amnion hydrogel-mediated delivery of adipose-derived stem cells for osteoarthritis treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(4):e2120968119.
- HE L, HE T, XING J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):276.
- JIN Y, XU M, ZHU H, et al. Therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes on osteoarthritis. *J Cell Mol Med.* 2021;25(19):9281-9294.
- ZHANG J, RONG Y, LUO C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization. *Aging (Albany NY).* 2020;12(24):25138-25152.
- 苏坤阳, 陈毕能, 陈益樑, 等. 载雷奈酸锶海藻酸钠/胶原水凝胶促进骨性关节炎骨缺损的修复[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(10):1568-1574
- MA S, ZHOU J, HUANG T, et al. Sodium alginate/collagen/stromal cell-derived factor-1 neural scaffold loaded with BMSCs promotes neurological function recovery after traumatic brain injury. *Acta Biomater.* 2021;131:185-197.
- 斯海波, 梁明玮, 程惊秋, 等. 软骨前体细胞及微小 RNA-140 在骨关节炎软骨损伤修复中的作用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2019, 33(5):650-656.
- ZHANG Y, LIN J, ZHOU X, et al. Melatonin Prevents Osteoarthritis-Induced Cartilage Degradation via Targeting MicroRNA-140. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:9705929.
- HE K, HUANG X, SHAN R, et al. Intra-articular Injection of Lornoxicam and MicroRNA-140 Co-loaded Cationic Liposomes Enhanced the Therapeutic Treatment of Experimental Osteoarthritis. *AAPS PharmSciTech.* 2021;23(1):9.
- 凌华军, 王其友, 林伟文, 等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体保护软骨细胞延缓骨关节炎的发生发展[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(31):4964-4969.
- 徐昌顺, 林春, 蔡振宇. 鞘内注射干扰素调节因子 8 小干扰 RNA 对术后持续性疼痛大鼠痛阈及脊髓小胶质细胞活化的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2022, 38(2):113-118.
- ZHEN G, WEN C, JIA X, et al. Inhibition of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med.* 2013;19(6):704-712.
- DING N, LI E, OUYANG X, et al. The Therapeutic Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Articular Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2021;16(7):840-847.
- PANG L, JIN H, LU Z, et al. Treatment with Mesenchymal Stem Cell-Derived Nanovesicle-Containing Gelatin Methacryloyl Hydrogels Alleviates Osteoarthritis by Modulating Chondrogenesis and Macrophage Polarization. *Adv Healthc Mater.* 2023;12(17):e2300315.
- HUANG Y, ZHANG X, ZHAN J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-206 promotes osteoblast proliferation and differentiation in osteoarthritis by reducing Elf3. *J Cell Mol Med.* 2021;25(16):7734-7745.
- TANG S, TANG T, GAO G, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit chondrocyte apoptosis and the expression of MMPs by regulating Drp1-mediated mitophagy. *Acta Histochem.* 2021;123(8):151796.
- MIYAKI S, SATO T, INOUE A, et al. MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. *Genes Dev.* 2010;24(11):1173-85.
- SI H, LIANG M, CHENG J, et al. Effects of cartilage progenitor cells and microRNA-140 on repair of osteoarthritic cartilage injury. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2019;33(5):650-658
- HASEEB A, KC R, ANGELOZZI M, et al. SOX9 keeps growth plates and articular cartilage healthy by inhibiting chondrocyte dedifferentiation/osteoblastic redifferentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(8):e2019152118.
- FUJII Y, LIU L, YAGASAKI L, et al. Cartilage Homeostasis and Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):6316.
- BAY-JENSEN AC, MOBASHERI A, THUDIUM CS, et al. Blood and urine biomarkers in osteoarthritis- an update on cartilage associated type II collagen and aggrecan markers. *Curr Opin Rheumatol.* 2022;34(1):54-60.
- AO Y, TANG W, TAN H, et al. Hydrogel composed of type II collagen, chondroitin sulfate and hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater Eng.* 2022;33(6):515-523.
- BAGHERI VARZANEH M, ZHAO Y, ROZYNEK J, et al. Disrupting mechanical homeostasis promotes matrix metalloproteinase-13 mediated processing of neuron glial antigen 2 in mandibular condylar cartilage. *Eur Cell Mater.* 2023;45:113-130.
- NEDUNCHEZHIAN U, VARUGHESE I, SUN AR, et al. Obesity, Inflammation, and Immune System in Osteoarthritis. *Front Immunol.* 2022;13:907750
- RAO Z, ZHU Y, YANG P, et al. Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer. *Theranostics.* 2022;12(9):4310-4329.
- COLL RC, SCHRODER K, PELEGRÍN P. NLRP3 and pyroptosis blockers for treating inflammatory diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2022;43(8):653-668.
- AN S, HU H, LI Y, et al. Pyroptosis Plays a Role in Osteoarthritis. *Aging Dis.* 2020;11(5):1146-1157.
- 吕佳, 郝亚宁, 王晓, 等. 骨髓间充质干细胞来源外泌体 miR-30e-5p 改善高血糖诱发的肾小管上皮细胞的焦亡[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2023, 44(6):859-865.
- BAI Z, HU H, HU F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells derived exosomes stabilize atherosclerosis through inhibiting pyroptosis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2023;23(1):441.
- WANG XP, XIE WP, BI YF, et al. Quercetin suppresses apoptosis of chondrocytes induced by IL-1beta via inactivation of p38 MAPK signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2021;21(5):468.

(责任编辑: GW, ZN, QY, LWJ)