

# 胞外膜泡在膝骨关节炎发病机制及组织修复中的研究进展

徐波<sup>1</sup> 黄正泉<sup>1</sup> 张立<sup>1</sup> 茆军<sup>1</sup> 张农山<sup>1</sup> 王培民<sup>1</sup> 邢润麟<sup>1△</sup>

【关键词】 胞外膜泡;膝骨关节炎;发病机制;研究进展

【中图分类号】 R684.3 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-0205(2018)12-0082-03

膝骨关节炎(Knee Osteoarthritis, KOA)是引起肢体功能障碍、甚至残疾的重要诱因之一,累及全球约 3.8%的人口<sup>[1-3]</sup>。尽管已经有很多临床和基础研究,但人们对 KOA 复杂的发病机制仍知之较少。近期研究表明,在 KOA 的病理进程中膝关节中胞外膜泡(extracellular vesicles, EVs)的数量及内容物发生显著改变,滑膜细胞、软骨细胞分泌的 EVs 在疾病的发展中扮演重要角色。间充质干细胞(MSC)在软骨等组织中的修复作用已得到充分肯定,近期的研究发现 MSC 来源的 EVs 在 KOA 组织修复中也具有良好的效果<sup>[4]</sup>。本文将从 EVs 的简介和不同细胞来源的 EVs 在 KOA 发病机制及组织修复中的研究进展进行综述。

## 1 EVs 的简介

EVs 是细胞分泌的由磷脂双分子层包裹的微粒,在细胞间,以及细胞与周围微环境的相互作用中发挥重要的信使作用,能将其内容物转运至靶细胞,改变靶细胞内的转录和翻译,影响细胞的增殖分化<sup>[5-7]</sup>。最早关于 EVs 的研究可以追溯到 1946 年,对于 EVs 的生物学研究正迅速成为热点领域之一,引起了越来越多的关注<sup>[8]</sup>。EVs 最初被认为是细胞排泄代谢废物的垃圾桶,后来研究逐渐发现其在正常的生理活动和多种病理状态中均发挥重要作用。所有的体液,如乳汁、唾液、尿液、血液和关节液等均可以检测出 EVs 的存在<sup>[9]</sup>,它可以避免其中的内容物在细胞外环境中被降解,保持 RNA、DNA、蛋白质等物质结构和功能的完整性。EVs 与靶细胞表面的受体相结合,可直接与细胞膜相融合或者通过细胞内存吞作用,将内容物转运至靶细胞<sup>[10]</sup>。目前,根据生物学来源的不同可将 EVs 分为三大类:外泌体(直径为 30~250 nm)、细胞膜微

粒(直径为 100~1 000 nm)、凋亡小体(直径为 1~5 μm)<sup>[11]</sup>。细胞膜微粒通过质膜的向外出芽和分裂产生;外泌体来源于细胞的内吞体网络,通过多泡体与质膜的融合而释放;细胞发生凋亡后,细胞内容物以凋亡小体为载体释放出去<sup>[12]</sup>。EVs 的命名一直存在争议,而且三个亚群的直径存在重叠,这使得简便区分他们变得困难。因此,本次综述以 EVs 作为通用术语涵盖上述所提及的不同分类。

## 2 不同来源 EVs 在 KOA 中的研究概述

### 2.1 软骨细胞、滑膜细胞来源的 EVs

KOA 发病机制非常复杂,与年龄,环境和遗传等因素密切相关。细胞外基质合成与降解平衡的维持对于关节健康非常重要,当这个平衡被打破后就会增加患 KOA 的风险。关节内的软骨细胞和滑膜细胞对细胞外基质的维持起关键作用,软骨细胞可以促进细胞外基质的合成,滑膜细胞能分泌关节液营养润滑软骨组织<sup>[13,14]</sup>。

EVs 是不同组织和不同细胞间沟通的重要桥梁之一,研究已证实软骨细胞、滑膜细胞分泌的 EVs 在 KOA 的发病过程中具有重要的调节作用<sup>[15]</sup>。Kolhe 等对关节液中的 EVs 进行基因测序,并通过 GO 分析和 KEGG 通路分析发现其与多条 KOA 发病相关的信号通路关联密切,如 AKT/SMAD/ERK 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路<sup>[16]</sup>。金属基质蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)由软骨细胞和滑膜细胞分泌,尤其是 MMP-3、MMP-13 被认为是引起细胞外基质破坏的主要因素,该酶可被关节中的炎症因子诱导产生,如 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ <sup>[17]</sup>。Nakasa 等用 IL-1 $\beta$  刺激软骨细胞,提取其分泌的 EVs 培养滑膜细胞,发现 MMP-13 的分泌量是对照组的 3 倍,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 COX-2 也均较对照组显著增加,这表明 EVs 在 KOA 的炎症过程中发挥重要作用。Kato 等用经 IL-1 $\beta$  处理的滑膜细胞所分泌的 EVs 培养软骨细胞,发现 MMP-13、聚蛋白多糖酶-5 的表达上调,而 II 型胶原的表达下调<sup>[18]</sup>。这些研究表明 KOA 关节腔中的软骨细胞与滑膜细胞之间可能存在正反馈循环,该循环能放大 KOA 局部炎症反应,加重病情。另外,IL-1 $\beta$  刺激

基金项目:国家自然科学基金(81573993,81774334)

江苏省科技厅社会发展重点项目(BE2017774)

江苏省基础研究计划(BK20151598)

国家自然科学基金青年基金(81804123)

<sup>1</sup> 南京中医药大学附属医院(江苏 南京,210000)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: xingrunlin@126.com

滑膜细胞后,其所分泌的 EVs 中 IL-6、MMP-3 和 VEGF 的含量均增加,将此种 EVs 注射至小鼠关节腔中,发现关节腔中产生了更多的聚蛋白多糖酶,同时出现了更多的毛细血管<sup>[18]</sup>。Kirsch 等发现 KOA 患者软骨细胞所分泌的 EVs 包含有更多的 II、IV 型膜联蛋白,该蛋白家族在 KOA 病理矿化和软骨组织破坏的过程中具有重要作用<sup>[19]</sup>。

miRNA 调节着人类三分之一的基因,对靶细胞具有多种重要的调节作用,但目前针对关节 EVs 中 miRNA 功能的研究较少。Zhao 等运用基因芯片方法检测软骨细胞来源 EVs 中的 miRNA,发现其中编码与非编码 RNA 的比例与软骨细胞存在差异,且 EVs 中存在着特异性的 miRNA<sup>[20]</sup>,表明 EVs 是有选择性的包裹 miRNA,在软骨组织的形成过程中发挥重要的作用。研究发现滑膜细胞经过 IL-1 $\beta$  处理后,所产生的 EVs 里 miRNA 种类和数量均发生了明显的改变,11 种 miRNA 的表达上调,39 种 miRNA 的表达下降,但在母细胞中有 364 种 miRNA 的表达发生了变化,这表明滑膜细胞在受到炎症刺激后有选择性的将 miRNA 装载到 EVs 中。目前需要对 miRNA 展开更多更深入的研究。

## 2.2 MSC 来源的 EVs

自体 and 同种异体间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 在软骨修复中的功效已在动物研究和临床试验中得到证实<sup>[21]</sup>。越来越多的证据表明 MSC 通过分泌 EVs 转运多种营养因子调节受损组织环境和协调随后的再生因子过程,包括细胞的增殖、分化和基质合成<sup>[22-25]</sup>。

MSC 来源的 EVs 被证明可以有效降低关节内的炎症因子,保护软骨组织,纠正局部微环境失衡,延缓 KOA 发展。Zhu 等<sup>[26]</sup>通过关节腔注射滑膜间充质干细胞来源 EVs,发现其能够有效降低大鼠 OA 评分,改善关节活动。Zhang 等<sup>[27]</sup>发现 MSC 来源的 EVs 可促进缺损组织的填充,增加硫酸化糖胺聚糖和 II 型胶原的合成,认为 EVs 可促进受损软骨组织内稳态的恢复。KOA 模型大鼠经 EVs 处理 12 周后,受损软骨和软骨下骨得到完全的修复,软骨组织透明,表明光滑,修复部分与周围组织紧密连接,而以注射生理盐水作为对照的另一侧关节仅表现出纤维性修复。Zhang 等进行的体外实验表明 MSC 来源的 EVs 可以提高滑膜细胞分泌抗炎因子 IL-10 和 TGF- $\beta$ 1 的数量,有效降低促炎因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-12P40 的表达,同时能够增加调节 T 细胞的数量,正向调节免疫,改善关节局部的炎症微环境<sup>[28,29]</sup>,这对于延缓 KOA 病程的进展具有重要作用。线粒体功能的紊乱和破坏被认为与 KOA 的发病密切相关,其中软骨细胞里线粒体的数量和内部呼吸链蛋白的表达均减少,这可导致 ATP 产生不足、内稳态被破坏,表现为氧化应激增强、基质合成减少、软骨细胞凋亡和炎症因子增加等

等<sup>[30]</sup>。因此,生物能量学内稳态的恢复是软骨组织修复的根本。Arslan 等发现 MSC 来源的 EVs 中含有大量的糖分解和 ATP 产生酶,如腺苷酸激酶、磷酸葡萄糖激酶和丙酮酸激酶,这些酶可提升受损软骨细胞线粒体内 ATP 的数量,促进能量内稳态平衡的恢复<sup>[31,32]</sup>。Mguel 等<sup>[33]</sup>证明来自脂肪来源间充质干细胞 (ASC) 的 EVs 可以下调 OA 中成骨细胞的炎症反应和氧化应激,从而介导 OA 成骨细胞的抗衰老作用。同时发现 ASC 的 EVs 能够部分控制这些细胞的旁分泌作用,这些结果提示 EVs 可通过纠正成骨细胞的代谢发挥对关节的保护作用。

MSC 来源的 EVs 中大约有 150 中 miRNAs<sup>[34]</sup>,其中很多是重要信号传导通路的调节因子,如 AKT、SMAD 和 ERK 等通路。因此,miRNA 很可能是 MSC 发挥组织修复功能的重要物质之一。例如,Meng 等发现 miRNA-23b 和 miRNA-92a 可以作用于头蛋白-3 调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路从而促进软骨细胞增殖和基质合成;miRNA-125b 和 miRNA-320 能通过下调 ADAMTS-4 和 MMP-13 的表达,减少软骨基质降解,延缓 KOA 的进展<sup>[35,36]</sup>。Tao 等通过体内和体外试验证明 MSC 来源 EVs 中,miRNA-140 能够促进软骨细胞的增至和迁移,修复软骨缺损<sup>[37]</sup>。以上结果表明 MSC 来源的 EVs 很可能是通过其中包裹的 miRNA 发挥保护关节的作用<sup>[38]</sup>。

## 3 小结

目前,KOA 的治疗方法主要有 NSAIDs 药物、体重控制、行为学控制和最终的关节置换等,上述治疗方法主要在于控制临床症状,均不能有效的阻止 KOA 病程的发展。在 KOA 领域对于 EVs 研究结果表明,EVs 与 KOA 相关信号通路密切相关,EVs 在关节各细胞间的信息交流过程中扮演重要的角色。但目前对于 EVs 在组织内稳态和病理生理条件下的信使作用仍处于探索的初始阶段,此外,不同类型的 EVs 的确切贡献尚不清楚,影响其合成和释放的因素也尚未明确。与此同时,很多研究正在评估不同细胞来源 EVs 治疗 OA 的有效性,关节腔在人体中是一个相对的封闭空间,可以有效的限制其中物质的转移,这种特殊环境也为实施 EVs 等小分子治疗提供了客观的条件。更科学的分类方法和更标准的提取分离技术将有助于进一步研究 EVs 在正常和病理条件下的生物学效应。尽管 EVs 在 KOA 病程的发展和软骨组织修复中已得到很多证实,但临床的最终运用仍需要在更合适的动物模型和严格的临床对照实验中得到证实。

## 参考文献

- [1] Cross M, Smith E, Hoy D, et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study[J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(7): 1323-1330.
- [2] Bingham CR, Buckland-Wright JC, Garner P, et al. Risedronate decreases biochemical markers of cartilage degra-

- dation but does not decrease symptoms or slow radiographic progression in patients with medial compartment osteoarthritis of the knee; results of the two-year multinational knee osteoarthritis structural arthritis study [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(11):3494-3507.
- [3] Chughtai M, Bhav A, Khan SZ, et al. Clinical outcomes of a pneumatic unloader brace for kellgren-lawrence grades 3 to 4 osteoarthritis; a minimum 1-year follow-up study [J]. *J Knee Surg*, 2016, 29(8):634-638.
  - [4] Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Exosomes from IL-1 $\beta$  stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4):163.
  - [5] Neviani P, Fabbri M. Exosomal microRNAs in the tumor microenvironment [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2:47-52.
  - [6] Squadrito ML, Baer C, Burdet F, et al. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells [J]. *Cell Rep*, 2014, 8(5):1432-1446.
  - [7] Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 2013, 119(6):1159-1167.
  - [8] Rilla K, Mustonen AM, Arasu UT, et al. Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix [J]. *Matrix Biol*, 2017, (17): 30328-30331.
  - [9] Morello M, Minciacchi VR, de Candia P, et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional micro RNA [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(22):3526-3536.
  - [10] Mustonen AM, Nieminen P, Joukainen A, et al. First in vivo detection and characterization of hyaluronan-coated extracellular vesicles in human synovial fluid [J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(11):1960-1968.
  - [11] Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages [J]. *J Transl Med*, 2011, (9):9-15.
  - [12] Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, (4):27066.
  - [13] Withrow J, Murphy C, Liu Y, et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1):286-292.
  - [14] Murphy C, Withrow J, Hunter M, et al. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases [J]. *Mol Aspects Med*, 2018, 60:123-128.
  - [15] Herrera M B, Fonsato V, Gatti S, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(6B):1605-1618.
  - [16] Kolhe R, Hunter M, Liu S, et al. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):2029-2035.
  - [17] Goldring MB, Otero M, Plumb DA, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism; signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21:202-220.
  - [18] Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, et al. Exosomes from IL-1 $\beta$  stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4):R163.
  - [19] Kirsch T, Swoboda B, Nah H. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(4):294-302.
  - [20] Lin Z, Rodriguez NE, Zhao J, et al. Selective enrichment of microRNAs in extracellular matrix vesicles produced by growth plate chondrocytes [J]. *Bone*, 2016, 88:47-55.
  - [21] Chiang ER, Ma HL, Wang JP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells in combination with hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis in rabbits [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e149835.
  - [22] Toh WS, Foldager CB, Pei M, et al. Advances in mesenchymal stem cell-based strategies for cartilage repair and regeneration [J]. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(5):686-696.
  - [23] Lasser C. Exosomes in diagnostic and therapeutic applications; biomarker, vaccine and RNA interference delivery vehicle [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(1):103-117.
  - [24] Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles; toward cell-free therapeutic applications [J]. *Mol Ther*, 2015, 23(5):812-823.
  - [25] Gyorgy B, Hung ME, Breakefield XO, et al. Therapeutic applications of extracellular vesicles; clinical promise and open questions [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2015, 55:439-464.
  - [26] Zhu Y, Wang Y, Zhao B, et al. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):64-70.
  - [27] Zhang S, Chu WC, Lai RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(12):2135-2140.
  - [28] Zhang B, Wang M, Gong A, et al. HucMSC-exosome mediated-wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(7):2158-2168.
  - [29] Zhang B, Yin Y, Lai RC, et al. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(11):1233-1244.
  - [30] Wang Y, Zhao X, Lotz M, et al. Mitochondrial biogenesis is impaired in osteoarthritis chondrocytes but reversible via peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(8):2141-2153.

(上接第 84 页)

- [31] Arslan F, Lai RC, Smeets MB, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Stem Cell Res, 2013, 10(3):301-312.
- [32] Loeser RF. Aging processes and the development of osteoarthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2013, 25(1):108-113.
- [33] Tofino-Vian M, Guillen MI, Perez DCM, et al. Extracellular vesicles from adipose-derived mesenchymal stem cells downregulate senescence features in osteoarthritic osteoblasts[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017;7197598.
- [34] Chen TS, Lai RC, Lee MM, et al. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(1):215-224.
- [35] Meng F, Zhang Z, Chen W, et al. MicroRNA-320 regulates matrix metalloproteinase-13 expression in chondrogenesis and interleukin-1 $\beta$ -induced chondrocyte responses[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(5):932-941.
- [36] Ning G, Liu X, Dai M, et al. MicroRNA-92a upholds Bmp signaling by targeting noggin3 during pharyngeal cartilage formation[J]. Dev Cell, 2013, 24(3):283-295.
- [37] 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[J]. Theranostics, 2017, 7(1):180-195.
- [38] Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, et al. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood[J]. J Extracell Vesicles, 2014, 3.

(收稿日期:2018-08-02)