

外泌体在骨关节炎发病及治疗中的作用研究进展

王若欣 张 勉

摘 要 骨关节炎(osteoarthritis, OA)是中老年人群较为常见的可在多部位关节发生的退行性疾病,对患者生活质量有较大的影响,但目前 OA 的致病机制暂不明。外泌体是大多数类型的细胞均能够产生的一种膜性囊泡,其内容物种类繁多,除能够反映出来源细胞的生理特性外,同时也可参与细胞间的信息传递进而影响细胞活动。相关研究指出,外泌体在 OA 病程发展等诸多方面发挥较为重要的作用。外泌体的深入研究对寻找 OA 诊断新标志物和治疗新方法具有重要的意义。本文主要综述 OA 的主要病理改变、外泌体基本结构以及其分别在骨关节炎发展和治疗中的作用。

关键词 骨关节炎 外泌体 软骨细胞 基质

中图分类号 R684

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.05.002

骨关节炎(osteoarthritis, OA)又称退行性关节炎,主要表现为关节软骨破坏、软骨面出现垂直裂隙且伴有软骨细胞/滑膜细胞反应性增殖、关节囊中有骨及软骨碎片等,但 OA 的具体发病机制仍不明确。目前对于 OA 的早期治疗以非甾体类药物治疗为主,但药物治疗不良反应明显且最终仍无法避免关节软骨的退变。晚期以手术治疗为主,但是手术创伤大且费用高昂^[1,2]。近年来,以外泌体为对象的基础及临床应用研究逐渐兴起,越来越多的研究表明,外泌体在 OA 的发展和治療中都有着极其特殊的作用,对外泌体的深入研究为明确 OA 的发病机制以及创新治疗方式提供了新的前景。

一、骨关节炎定义及组织改变

一般而言,软骨承受超负荷后会引引起表面部位的变薄与结构破坏,随着时间的推移关节软骨会进一步凹陷破损,脱落的软骨碎片进入关节腔内,引起后续的一系列恶性反应最终形成骨关节炎。正常软骨由软骨细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)组成^[3]。在发生 OA 的关节软骨中,软骨细胞损伤和修复失衡引起 ECM 结构破坏。在溶酶体蛋白酶以及胶原酶的作用下,软骨基质内的蛋白多糖成分急剧减少、胶原纤维变性,同时软骨细胞退化且功能受损失去合成 ECM 的能力。随着关节软骨的病变,软骨承

载和缓冲力量的能力下降,软骨下骨逐渐暴露并承受较大应力和摩擦力,进而出现局部骨折、骨坏死,而关节面和周围的骨质代偿性增生形成骨赘,同时可能会伴随骨囊性病变发生^[4]。

二、外泌体的基本结构与功能

外泌体(exosomes, EX)是一种由磷脂双分子层膜包裹的囊泡,直径通常在 30~120nm 左右,几乎所有细胞都能够分泌^[5]。外泌体膜上富含胆固醇和鞘磷脂。此外,膜上还富含具有交换以及融合作用的膜联蛋白、参与外泌体运输的四跨膜蛋白家族(CD63、CD81、CD9 等)、热休克蛋白家族以及一些细胞特异性蛋白质。外泌体内则含有众多代谢相关酶类、核糖体蛋白、信号转导因子等蛋白质,以及 mRNA 和 miRNA,这些生物活性物质分别对不同的细胞发挥不同的生理作用。外泌体由宿主细胞释放,作用于各种受体细胞,在免疫应答、肿瘤发展、代谢调节等众多生理、病理过程中均起到重要作用。通过外泌体进行细胞间信息交流无需细胞直接接触,外泌体同靶细胞上的膜受体结合,激活胞内信号转导通路进而改变受体细胞的活动与功能。此外部分外泌体膜能同靶细胞膜融合使外泌体内的生物活性物质直接进入受体细胞内发挥作用^[6]。

三、外泌体在骨关节炎进展中的作用

OA 的发生、发展受到多种因素的影响,目前外泌体作为热门研究方向,为骨关节炎的发展机制提供了新的研究方向。

1. 外泌体对关节软骨的影响:关节内存在促炎性细胞因子、抗炎性细胞因子和双向作用因子,三者的动态平衡维持着关节软骨正常的生理代谢。当此动

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81700995)

作者单位:1710032 西安,第四军医大学口腔医院口腔解剖生理学教研室(王若欣、张勉);2450052 郑州大学口腔医学院 2018 级 1 班(王若欣)

通讯作者:张勉,副教授,副主任医师,硕士生导师,电子信箱:zhangmian1986@aliyun.com

态平衡失调后,将会引起软骨细胞代谢异常,诱发和促进 OA。实验证实,在关节腔中存在外泌体参与的成纤维细胞与软骨细胞之间的正反馈通路,促进炎症的发生^[7]。当用白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 处理滑膜成纤维细胞分泌的外泌体刺激 OA 软骨细胞,能够显著上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-13 和结合蛋白序列的解聚蛋白样金属蛋白酶(adisintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs, ADAMTS)-5 的表达,同时减少 II 型胶原的分泌。此外,IL-1 β 处理后成纤维细胞分泌的外泌体中含有较丰富的 IL-6、MMP-3、血管内皮生长因子,这些细胞因子在 OA 早期发挥重要的促进病变发展作用。

此外,IL-1 β 刺激成纤维细胞后有 340 个 miRNA 被上调,24 个被下调,在其产生的外泌体中有 11 个 miRNA 被上调,39 个被下调,在细胞和外泌体内均被上调的 miRNA 有 5 个,这说明外泌体中的 miRNA 种类是细胞选择性的结果。目前研究最广的 miR-4454 受肿瘤坏死因子 α 刺激增多,miR-720 在促进细胞迁移中发挥作用^[8,9]。成纤维样滑膜细胞分泌的外泌体可影响软骨细胞的增殖、分化、迁移及分泌活动,在促进软骨细胞凋亡的同时减少蛋白聚糖的产生,增加细胞外基质成分的降解。以上研究表明,外泌体可减少正常软骨细胞数目、降解细胞外基质,影响关节软骨的正常形态以及功能。

2. 外泌体可作为 OA 潜在生物学标志物:骨关节炎是渐进性退行性疾病,目前主要检测依靠患者自身感觉、影像学诊断和临床特征性症状,仍缺乏统一的诊断学标准。现有的临床诊断以及影像学检查对于患者早期病症缺乏敏感度,因此能够明确的便于检测的早期生物学改变,对于 OA 的诊断有重要意义。

细胞产生并释放到体液的外泌体能够反映细胞的生理情况,故其有望作为部分疾病的发生、发展的生物学标志物^[10]。在关节退行性病变早期,滑液中的 II 型前胶原 C 端前肽表达增加,浓度升高,可预测早期的 OA 发生。而血清 II 型胶原 C 末端肽和 C 端前肽浓度的动态联合检测对于 OA 的早期诊断以及严重程度预判有参考价值^[11]。此外,ADAMTs 与 OA 发展有关,早期 OA 患者中 ADAMTs4 水平高于中晚期患者,与 ADAMTs1、3、5 正好相反。滑液中提取的外泌体内高于正常浓度水平的 miR-200c 以及滑液中的相关促炎性细胞因子都可以作为标志,而根据最新研究显示,滑液中提取出的外泌体内 lncRNA PC-

GEM1 可能是 OA 发展早期和晚期的区分标识^[12,13]。虽然外泌体具有作为生物学标志物的潜力,但是到目前为止仅有少数因子有应用价值。此外,软骨组织、滑膜组织以及软骨下骨产生的外泌体之间也会相互影响,再考虑到性别、年龄、种族、发病部位等因素,以及数量庞大的不同因子,还需要进行更多的检测与实验。

四、外泌体在骨关节炎治疗中的作用

1. 干细胞外泌体对 OA 治疗的积极作用:目前很多研究表明间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs)来源的外泌体(MSCs-EX)对治疗 OA 有积极作用^[14]。Zhang 等^[15]研究证实 MSCs-EX 能够从多个方面缓解 OA 的发展。间充质干细胞外泌体通过介导动态修复进程加快软骨修复,在大鼠骨软骨缺损处加入 MSCs-EX 处理后新软骨组织形成显著增多,s-GAG 和 II 型胶原蛋白的表达显著提升,同时 I 型胶原蛋白表达下降,软骨深层组织中可观察到有增大间隙的肥大软骨细胞,软骨下骨完全恢复,新生软骨组织同原组织结构整合良好。MSCs-EX 增强细胞增殖并减少细胞凋亡,MSCs-EX 处理后软骨组织和上覆滑膜组织中 PCNA 阳性细胞显著增加,同时凋亡软骨细胞数量明显减少。Liu 等^[16]也研究发现在小鼠 OA 模型中,MSCs-EX 通过 In-cRNA-KLF3-AS1/miR-206/GIT1 轴促进 OA 中软骨细胞的增殖并且抑制其凋亡。MSCs-EX 促进 M2 型巨噬细胞分化且同时减少 M1 型巨噬细胞和炎性细胞因子分泌。

MSCs-EX 主要通过腺苷介导的 AKT 和 ERK 信号通路调节软骨细胞的生存、增殖以及基质合成^[17]。当外泌体作用于软骨细胞时,AKT 和 ERK 信号通路在 1h 内开始磷酸化并在 6h 达到巅峰,说明 MSCs-EX 能够很快地激活软骨细胞,促进软骨细胞代谢活动快速增加和相关基因表达。此外,软骨细胞通过摄取外泌体还可以对自身活动产生影响。Zhang 等^[15]研究发现,软骨细胞在遇到 MSCs-EX 后会快速将其吞入胞内,并且大部分吞入的外泌体会较长时间集中存在于胞质内,同时细胞增殖相关的基因如生存素、Bcl-2、FGF-2 等的 mRNA 水平会在细胞同 MSCs-EX 直接接触 24h 后明显上升。同时与细胞迁移、分化、基质合成等活动相关的基因表达在 4h 后也有显著提高。还有研究发现 MSCs-EX 可抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎性细胞因子的表达,同时促进 IL-10 等抗炎性细胞因子的表达,因此 MSCs-EX 也具有一定的抗炎潜能。

2. 外泌体 miRNA 对 OA 治疗的作用: 外泌体中含有大量的 miRNA, miRNA 通过调节组织中各种细胞的基因表达影响细胞的各项活动。外泌体 miRNA 除了作为 OA 早期生物学标志物的潜在价值外, 还有治疗的潜在可能。

在 MSCs - EX 内含有大量的 miRNAs, 可调节多种重要的细胞信号转导通路, 较为主要的有 ATK、ERK、SMAD 等^[18]。miR - 125b 和 miR - 320 能够通过下调 ADAMTs 而减轻 OA 的发展^[19]。有关研究表明 miR - 23b 是人间充质干细胞向软骨细胞分化过程中有重要调节作用, miR - 221 和 miR - 92a 则有可能在促进软骨细胞增殖和分化方面发挥作用^[20]。此外, miR - 140、miR - 30a、miR - 558、miR - 476b 和 miR - 142 - 3p 也可以在抑制 IL - 1 β 和 TNF - α 这两个促炎性细胞因子的表达, 同时抑制它们下游的信号转导通路。

对外泌体进行人工修饰或干预后治疗 OA 目前也备受关注。Jones 研究显示滑膜间充质干细胞具有使软骨再生的组织特异性, 对于软骨再生具有重要的潜力。外泌体是 Wnt 信号通路中的一种潜在的细胞外运输载体, 外泌体中的 Wnt5a/b 通过激活 Hippo - YAP 信号通路中的 YAP (yes - associated protein), 对抗经典的 Wnt/ β - catenin 信号, 减少包括转录因子 SOX9 在内的主链 β - catenin 的基因表达, 由此调控 ECM 的基因表达和软骨形成^[21, 22]。Tao 等^[23]实验发现, 滑膜间充质干细胞分泌的外泌体中 Wnt5a/b 含量较高, 会激活 YAP 引起软骨细胞的增殖和迁移, 但是会引起 SOX9 表达降低以及 ECM 蛋白合成成分减少。而 miR - 140 - 5p 能够通过增强 SOX9 以及蛋白聚糖的表达维持软骨内细胞稳态进而缓解 OA 的进程, 利用添加核酸的方法在滑膜间充质干细胞 (synovial membrane - derived MSCs, SMMSCs) 以及其外泌体中过表达 miR - 140 - 5p, 能够促进软骨细胞的增殖和迁移的同时促进软骨细胞合成 ECM 蛋白, 滑膜间充质干细胞分泌的高表达 miR - 140 - 5p 的外泌体具有治疗 OA 的潜力^[24]。因此, 外泌体内 miRNA 为 OA 的治疗提供了研究方向以及新策略。

3. 抑制 OA 中炎性细胞外泌体对 OA 的治疗作用: 已有实验证明在 OA 中关节软骨和滑膜细胞产生的外泌体及其内容物起着促进 OA 发展的作用, 如果抑制了相关外泌体的作用就可能缓解 OA 的进展。目前的研究主要集中在通过相关 miRNA 抑制物或者类似物 (模拟物) 抑制炎性细胞外泌体内 miRNA 及

炎性细胞因子作用减缓 OA, 例如通过向关节腔内注射 miR - 34a 的抑制物, 增加 Col2a1 降低 iNOS, 进而缓解 OA 发展过程^[25]。滑膜也是目前研究可能的治疗靶点之一, IL - 6 作为一种炎性介质在 OA 中起调控作用, Chen 等^[26]研究数据显示, 通过抑制滑膜组织外泌体中 IL - 6 含量对于治疗滑膜炎以及 OA 可能有着较好疗效。也有部分研究者在研究干扰特定靶点的新治疗方法, 包括抗纤维素抗体、TNF 单克隆抗体、抗神经生长因子抗体、抗蛋白酶 (ADAMTs 和 MMPs) 和缓激肽抗体等, 用以对抗外泌体中相对应的成分, 从而发挥治疗作用。此外还可以利用外泌体进行基因治疗, 在关节局部导入含有高表达细胞因子基因或者细胞因子抑制剂基因的外泌体, 使它们能够缓慢且持续地在 OA 关节中发挥疗效。

五、展 望

外泌体的发现为研究 OA 的发病机制、诊断与治疗打开了新的大门。外泌体的内容物会随着 OA 病程的发展而改变, 也有相关实验显示在 OA 的早、中、晚期会有特定的细胞因子或 miRNA 等发生特定的上调或下降, 故外泌体有可能在未来作为检验 OA 的生物学标志物。同时外泌体作为软骨组织、滑膜组织、软骨下骨等组织的枢纽, 可激活不同的信号通路起传递信息的作用, 进而影响 OA 的进展。而 MSC - EX 可通过增加软骨细胞增殖、减少软骨细胞凋亡以及抑制炎症等对损伤关节进行修复, 延缓疾病的发展。综上所述, 不同细胞来源的外泌体对于 OA 的发展和诊疗作用已经表现出显著的影响, 今后有必要对其进行深入研究。

参考文献

- 1 Barnett R. Osteoarthritis [J]. Lancet, 2018, 391 (10134): 1985
- 2 Mandl LA. Osteoarthritis year in review 2018: clinical [J]. Osteoarthritis Cartil, 2019, 27 (3): 359 - 364
- 3 Lee HP, Gu L, Mooney DJ, et al. Mechanical confinement regulates cartilage matrix formation by chondrocytes [J]. Nat Mater, 2017, 16 (12): 1243 - 1251
- 4 Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage - bone crosstalk [J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12 (11): 632 - 644
- 5 Xu L, Wu LF, Deng FY. Exosome: an emerging source of biomarkers for human diseases [J]. Curr Mol Med, 2019, 19 (6): 387 - 394
- 6 Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication [J]. Curr Biol, 2018, 28 (8): R435 - R444
- 7 Murphy C, Withrow J, Hunter M, et al. Emerging role of extracellular vesicles in musculoskeletal diseases [J]. Mol Aspects Med, 2018, 60: 123 - 128
- 8 Nakamura A, Rampersaud YR, Sharma A, et al. Identification of mi-

- croRNA - 181a - 5p and microRNA - 4454 as mediators of facet cartilage degeneration[J]. JCI Insight, 2016, 1(12): e86820
- 9 Das SG, Romagnoli M, Mineva ND, *et al.* miR - 720 is a downstream target of an ADAM8 - induced ERK signaling cascade that promotes the migratory and invasive phenotype of triple - negative breast cancer cells[J]. Breast Cancer Res, 2016, 18(1): 40
- 10 Barile L, Vassalli G. Exosomes; therapy delivery tools and biomarkers of diseases[J]. Pharmacol Ther, 2017, 174: 63 - 78
- 11 焦强, 魏垒, 卫小春, 等. 血清中骨关节炎生物标记物与关节软骨早期损伤关系[J]. 中华风湿病学杂志, 2016, 20(7): 453 - 458
- 12 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
- 13 Zhao Y, Xu J. Synovial fluid - derived exosomal lncRNA PCGEM1 as biomarker for the different stages of osteoarthritis[J]. Int Orthop, 2018, 42(12): 2865 - 2872
- 14 Venugopal C, Shamir C, Senthilkumar S, *et al.* Dosage and passage dependent neuroprotective effects of exosomes derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells: an in vitro analysis[J]. Curr Gene Ther, 2017, 17(5): 379 - 390
- 15 Zhang S, Chuah SJ, Lai RC, *et al.* MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity[J]. Biomaterials, 2018, 156: 16 - 27
- 16 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[J]. Cell Cycle, 2018, 17(21 - 22): 2411 - 2422
- 17 Ma D, Kou X, Jin J, *et al.* Hydrostatic compress force enhances the viability and decreases the apoptosis of condylar chondrocytes through integrin - FAK - ERK/PI3K pathway[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): 1847
- 18 Toh WS, Lai RC, Hui JHP, *et al.* MSC exosome as a cell - free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 67: 56 - 64
- 19 朱海, 刘璠. 间充质干细胞来源外泌体在骨性关节炎中的应用[J]. 江苏医药, 2017, 43(16): 1181 - 1185
- 20 Tofiño - Vian M, Guillén MI, Alcaraz MJ. Extracellular vesicles: a new therapeutic strategy for joint conditions[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 153: 134 - 146
- 21 张军, 张耀明, 王正辉, 等. Sox9 诱导人脐血干细胞向软骨细胞分化的实验研究[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2015, 11(4): 221 - 224
- 22 Park HW, Kim YC, Yu B, *et al.* Alternative wnt signaling activates YAP/TAZ[J]. Cell, 2015, 162(4): 780 - 794
- 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[J]. Theranostics, 2017, 7(1): 180 - 195
- 24 徐进, 罗超, 朱振国, 等. MSC 来源的外泌体在 OA 中潜在的免疫调节及抗炎作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(6): 1158 - 1164
- 25 刘宁, 谭文成, 夏吉生, 等. miR - 34a 靶向 MMP - 13 调控大鼠软骨细胞凋亡的机制[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2016, 37(2): 139 - 145
- 26 Chen L, Li DQ, Zhong J, *et al.* IL - 17RA aptamer - mediated repression of IL - 6 inhibits synovium inflammation in a murine model of osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartil, 2011, 19(6): 711 - 718

(收稿日期: 2020 - 10 - 16)

(修回日期: 2020 - 10 - 25)

生物制剂治疗类风湿关节炎对心血管风险影响的研究进展

胡娣萍 黎艳红 刘 毅

摘 要 类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种常见的自身免疫性疾病,生物类改善病情抗风湿药(disease - modifying antirheumatic drugs, DMARD)在该患者中的应用极大改善了疾病预后并提高了缓解度。RA 患者并发心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)的风险较正常人群显著增加, CVD 成为增加 RA 死亡风险的高危因素。因此,在治疗 RA 过程中,临床药物的选择是否增加心血管风险成为关注的热点。本文就目前 RA 常用的几种生物 DMARDs 在影响心血管风险方面进行论述。

关键词 生物制剂 类风湿关节炎 心血管风险 药物安全

中图分类号 R593.22

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.05.003

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC0906201);中国博士后科学基金资助项目(2019M663522);四川大学华西医院学科卓越发展 1·3·5 工程项目(ZYGD18015)

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院风湿免疫科

通讯作者:刘毅,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:yi2006liu@163.com