

骨组织细胞外泌体对骨代谢作用的研究现状

吴石磊 刘勇 邵增务 田青

【摘要】 骨质疏松症是老年人的常见病和多发病,骨组织来源细胞可分泌外泌体,包装和运载多种活性物质,如蛋白质、miRNAs、各种活性因子等,进行细胞间物质交换和信息交流,根据骨组织来源细胞外泌体和内容物的特点,利用其调节骨形成和骨吸收平衡的作用,甚至作为生物或基因治疗的载体,为老年骨质疏松症的防治提供全新的思路。

【关键词】 骨质疏松症; 外泌体; 骨生成; 骨吸收

Research status of bone tissue-derived exosomes on bone metabolism Wu Shilei, Liu Yong, Shao Zengwu, Tian Qing. Department of Orthopedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Corresponding author: Liu Yong, Email: lw7812@126.com

【Abstract】 Osteoporosis is a common and frequently occurring disease in the elderly. Studies found that the bone derived cells can also secrete the exosomes packaging and delivering a variety of active substances, such as protein, miRNAs, various active factors, carrying out the exchange of material and information between cells. According to the characteristics and contents of bone-derived exosomes, they can be used to regulate bone formation and bone resorption balance, even as carrier of biological or gene therapy, this kind of research may provide a new idea for the prevention and treatment of osteoporosis in the elderly.

【Key words】 Osteoporosis; Exosomes; Osteogenesis; Bone resorption

骨质疏松症是一种老年人常见病和多发病,其随着人口老龄化日益凸显,目前已成为仅次于心脑血管疾病之后的第二大高发疾病^[1],造成了极大的社会经济负担^[2]。美国开展的一项调查发现,80岁以上老年人中超过30%患有骨质疏松症,60~64岁人群骨质疏松症的患病率为18.5%^[3]。骨质疏松症的主要特征为是成骨细胞和破骨细胞平衡失调,造成骨密度和骨质量下降、骨微结构破坏、脆性增加,进而容易诱发骨折。外泌体(exosome)是细胞外大小均一的囊泡样小体,细胞膜出芽的方式为主动分泌^[4],外泌体内包含多种物质,如蛋白质、信号通路因子、信使RNA、miRNAs等,外泌体通过包含物参与细胞间信息交流,调节组织功能和细胞代谢^[5]。最近研究发现骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)、成骨细胞、破骨细胞前体细胞、破骨细胞和骨细胞同样可以分泌外泌体^[6],并且有研究证明骨组织来源相关细胞分泌的外泌体中包含有对骨重塑有重要作用的关键因子,如蛋白质、miRNAs、各种活性因子等^[7]。本文通过检索骨组织细胞来源外泌体的特点及其骨形成和骨吸收方面的文献,探讨其在老年骨质疏松症发生发展中的作用,为老年骨

质疏松症的治疗提供新的思路。

一、骨组织细胞来源外泌体特点和包含物

虽然外泌体内的活性分子被包裹的机制研究尚不清楚,但是其特点和控制机制已经相对清楚^[8],研究发现外泌体作用于靶细胞的方式主要有三种^[9]:一是直接与靶细胞的胞膜融合,同时释放 mRNA、miRNA 进入细胞质;二是通过内吞作用被靶细胞摄取;三是识别细胞表面的特异性受体。成熟的破骨细胞和其前体细胞分离的外泌体大小、形态和标记相似,如上皮细胞粘附分子和 CD63^[10-11]。有实验证实破骨细胞来源的外泌体内含有丰富的 ephrinA2 蛋白^[12],能够促进破骨细胞的生成。破骨细胞前体细胞外泌体中,核因子 κ B 受体活化因子(receptor activator of NF- κ B, RANK)水平较低,而成熟的破骨细胞分泌的外泌体中 RANK 水平较高^[7]。Li 等^[13]发现血清外泌体包含的 miR-214-3p 和切除卵巢小鼠的骨形成减少相关。成骨细胞分泌的外泌体中含有 RANKL,而当在成骨细胞培养中加入甲状旁腺激素(Parathyroid hormone, PTH),其外泌体中 RANKL 明显增加^[14],另外加入 PTH 培养出的外泌体中包含成骨细胞膜蛋白和外泌体标记 flotillin-2^[15]。miRNA 是一类由内源基因编码的,长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它参与转录后基因表达调控,骨组织细胞来源的外泌体中包含多种 miRNAs^[16](表 1)。外泌体内的 miRNA 具有更好的耐受核糖核酸酶高温、低温变化和 PH 值变化的特点。

表1 四种骨组织细胞来源外泌体标记及包含物特点

细胞来源	外泌体标记	外泌体包含物
成骨细胞前体细胞	EpCAM, CD63	低含量RANK
成骨细胞	EpCAM, CD63	高含量RANK, EphrinA2
破骨细胞前体细胞	flotillin2	蛋白质: EIFfamily, PP1C, OPG, PABP, RANKL, TRAP; mRNA: AC1N1, DDX6, DGKA, DDK2, Lsm2, RPS2, Xsox17; miRNA: let-7, miR-30d-5p, miR-133b-3p, miR-140-3p, miR-335-3p, miR-677-3p, miR-378b, miR-503-3p
破骨细胞	CD13, CD29, CD44	蛋白质: ADAM17, NFκB1, BMP9, TGFβ1; CD73, CD105; miRNA: let-7, miR-135b, miR-148a, miR-181a, miR-196a, miR-199b, miR-218, miR-221, miR-885-5p

二、骨组织细胞来源外泌体对骨形成的影响

研究证明MSC来源的外泌体可以直接调节成骨细胞的增殖和活性^[17], MSC来源外泌体可以上调生长因子, 如骨形成蛋白-9(BMP-9)和转录生长因子-β1(TGF-β1)^[18], 均可促进MSC向成骨细胞转化^[19]。MSC来源的外泌体可以黏附于I型胶原蛋白、纤维连接蛋白等细胞外基质蛋白, 使其附着于骨表面, 以诱导MSC向成骨分化^[20], 这一功能有助于其作为仿生材料工具。另外, 成骨细胞来源的外泌体可以通过正反馈作用促进骨生长。研究发现, 来源于矿化阶段MC3T3-E1细胞的外泌体可以增加ST2的成骨分化能力, 通过上调RUNX2和碱性磷酸酶同样可以促进基质的矿化^[21]。Ekstrom等^[22]和Omar等^[23]的研究表明, 单核细胞和破骨细胞具有相同的前体细胞来源, 其分泌的外泌体能够刺激MSC成骨分化。在矿化的MC3T3-E1细胞外泌体中多种miRNAs水平升高, 例如, miR-30d-5p、miR-133b-3p和miR-140-3, 它们可能通过多种途径(如Wnt, insulin, TGF-β, 钙离子信号通路)影响成骨细胞的分化和功能。AXIN1可以抑制Wnt信号通路中影响成骨细胞分化的β-catenin, 矿化的成骨细胞外泌体转入细胞后AXIN1表达受到抑制, β-catenin表达增加, 由此促进成骨细胞前体细胞成骨性转化^[21]。Let-7存在于矿化的成骨细胞和成骨细胞前体细胞, 可以通过调节HMGA2和AXIN2来提高成骨^[24-25]。多种骨组织来源外泌体miRNAs(如miR-30d-5p、miR-133b-3p、miR-199b、miR-221和miR-885-5p)通过RUNX2来调节成骨细胞的分化, 在成骨细胞来源的外泌体中miR-30d-5p、miR-133b-3p高表达, 通过作用于RUNX2基因抑制成骨细胞的分化^[26-27]。与其形成对比的是miR-221和miR-885-5p, 其在人MSC来源的外泌体中较少, 而二者的作用机制是通过抑制RUNX2作为负性调节调控骨的生成^[28-29]。在成骨细胞来源的外泌体中高表达的miR-140-3p, 可以通过抑制BMP2的表达抑制成骨细胞的形成^[30]。miR-196a和miR-218在MSC外泌体中表达增多, 其中miR-196a是影响成骨细胞活性、促进成骨细胞增殖的关键因子^[31-32], miR-218/Wnt信号通路可以通过抑制硬壳蛋白促进成骨

细胞的分化和活性^[33]。因此可以通过调节骨组织细胞来源的外泌体来调节骨形成, 增加骨形成方面防治老年骨质疏松症。

三、骨组织细胞来源外泌体对骨吸收的影响

外泌体对骨代谢的影响, 为研究骨如何通过骨形成和骨吸收最终成为管状结构提供线索^[7]。研究证明, 破骨细胞前体细胞来源的外泌体可以明显刺激破骨细胞的形成。破骨细胞来源的外泌体内RANK的水平很高, 去除含有RANK的外泌体可以明显缓解对破骨细胞的抑制作用^[7], RANK含量丰富的外泌体, 可以作为新的抑制剂与RANKL结合, 阻止激活破骨细胞上RANK信号通路^[32]。成骨细胞来源包含OPG的外泌体可以抑制破骨细胞的分化。成骨细胞外泌体中包含的miRNAs可以靶向破骨细胞。矿化的成骨细胞外泌体中的miR-503-3p可以通过调节RANK的表达来抑制RANKL诱导的破骨细胞的分化^[34]。HBMSC外泌体包含物中miR-148a上调, 其可以通过靶向MAFB基因来提高破骨细胞的生成^[35-36], 破骨细胞外泌体中丰富的miR-214可以转移到成骨细胞内, 通过ephrinA2/EphA2抑制其活性。Wang等^[37]发现miR-214可以通过靶向ATF4抑制成骨细胞的功能, 然而他们进一步的实验发现, 可以通过PI3K/Akt信号通路提高破骨细胞的生成^[38], 包含miR-214的破骨细胞外泌体可能对骨吸收具有多方面作用, 因此可以通过骨组织细胞来源的外泌体调节骨吸收, 在减少骨吸收方面防治老年骨质疏松症。

四、总结与展望

外泌体作为细胞主动分泌的囊泡状结构在细胞交流方面具有重要的作用, 骨组织来源的外泌体能运载多种蛋白质、miRNAs、信号通路因子, 在骨形成和骨吸收的过程中具有重要的调节作用, 目前针对老年骨质疏松的治疗主要包括雌激素类、钙制剂和维生素D类、氟化剂等药物治疗, 虽然有一定的效果但副反应严重^[39]。外泌体作为细胞间交流的重要参与者, 可以通过实验研究找到具有促进骨形成、抑制骨吸收作用的外泌体, 将其注入体内, 从根本上对老年性骨质疏松症进行防治。未来的研究还可将具有促进骨形成及抑制骨吸收的蛋白质、miRNAs和

活性因子转移到特定的外泌体内,靶向细胞和组织转运药物,使外泌体作为生物或基因治疗的载体对骨质疏松症进行靶向治疗,利用外泌体可以被修饰、改造的潜能,为骨质疏松症的治疗提供全新的思路。

参 考 文 献

- North American Menopause Society. Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause [J]. *Menopause*, 2010, 17(2): 242-255.
- Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025 [J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(3): 465-475.
- Gehlbach SH, Avrunin JS, Puleo E, et al. Fracture risk and antiresorptive medication use in older women in the USA [J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18(6): 805-810.
- Soekmadji C, Russell PJ, Nelson CC. Exosomes in prostate cancer: putting together the pieces of a puzzle [J]. *Cancers (Basel)*, 2013, 5(4): 1522-1544.
- Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, et al. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820(7): 940-948.
- Deng LL, Wang YP, Peng Y, et al. Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts [J]. *Bone*, 2015, 79: 37-42.
- Huynh N, Vonmoss L, Smith D, et al. Characterization of regulatory extracellular vesicles from osteoclasts [J]. *J Dent Res*, 2016, 95(6): 673-679.
- Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 373-383.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(2): 43-51.
- Runz S, Keller S, Rupp C, et al. Malignant ascites-derived exosomes of ovarian carcinoma patients contain CD24 and EpCAM [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 107(3): 563-571.
- Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(9): 1584-1592.
- Sun W, Zhao C, Li Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity [J]. *Cell Discov*, 2016, 2(2): 16015.
- Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation [J]. *Nat Commun*, 2016, 7(7): 10872.
- Deng L, Wang Y, Peng Y, et al. Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts [J]. *Bone*, 2015, 79: 37-42.
- Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(12): 4852-4857.
- Xie Y, Chen Y, Zhang L, et al. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodeling [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(5): 1033-1041.
- Qin YH, Wang L, Gao ZL, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(6): 21961.
- Zhao LM, Jiang S, Hantash BM. Transforming growth factor beta 1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells [J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(2): 725-733.
- Luther G, Wagner ER, Zhu GH, et al. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential [J]. *Curr Gene Ther*, 2011, 11(3): 229-240.
- Narayanan R, Huang CC, Ravindran S. Hijacking the cellular mail: exosome mediated differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2016: 3808674.
- Cui YZ, Luan J, Li HY, et al. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression [J]. *FEBS Lett*, 2016, 590(1): 185-192.
- Ekstrom K, Omar O, Graneli C, et al. Monocyte exosomes stimulate the osteogenic gene expression of mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): 75227.
- Omar MO, Graneli C, Ekstrom K, et al. The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(32): 8190-8204.
- Egea V, Zahler S, Rieth N, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(6): E309-E316.
- Wei J, Li H, Wang S, et al. let-7 enhances osteogenesis and bone formation while repressing adipogenesis of human stromal/mesenchymal stem cells by regulating HMGA2 [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(13): 1452-1463.
- Zhang Y, Xie RL, Croce CM, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(24): 9863-9868.
- Li Z, Hassan MQ, Volinia S, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(37): 13906-13911.
- Xu JF, Yang GH, Pan XH, et al. Altered MicroRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114627.
- Huang J, Zhao L, Xing LP, et al. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2): 357-364.
- Hwang S, Park SK, Lee HY, et al. miR-140-5p suppresses BMP2-mediated osteogenesis in undifferentiated human mesenchymal stem cells [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17): 2957-2963.
- Qin Y, Sun R, Wu C, et al. Exosome: A novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 712.
- Kim YJ, Bae SW, Yu SS, et al. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue [J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(5): 816-825.
- Hassan MQ, Maeda Y, Taipaleenmaki H, et al. miR-218 directs a Wnt signaling circuit to promote differentiation of osteoblasts and osteomimicry of metastatic cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(50): 42084-42092.
- Chen C, Cheng P, Xie H, et al. MiR-503 regulates osteoclastogenesis

- via targeting RANK [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(2): 338-347.
- 35 James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation [J]. *Scientifica (Cairo)*, 2013: 684736.
- 36 Cheng P, Chen C, He HB, et al. miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(5): 1180-1190.
- 37 Wang X, Guo B, Li Q, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation [J]. *Nat Med*, 2013, 19(1): 93-100.
- 38 Zhao C, Sun W, Zhang P, et al. miR-214 promotes osteoclastogenesis by targeting Pten/PI3k/Akt pathway [J]. *RNA Biol*, 2015, 12(3): 343-353.
- 39 渠海波, 张朝, 吴刚. 骨质疏松的研究进展 [J]. *包头医学院学报*, 2013, 29(3): 119-121.
- (收稿日期: 2017-10-09)
- (本文编辑: 吕红芝)

吴石磊, 刘勇, 邵增务, 等. 骨组织细胞外泌体对骨代谢作用的研究现状 [J/CD]. *中华老年骨科与康复电子杂志*, 2018, 4(5): 308-311.

“中国骨折发病率流行病学调查”由中国 CDC 著名流行病学专家指导设计, 采用多阶段分层整群随机抽样方法, 并由流行病学、骨科学、放射学、统计学专家及培训合格的调查员 236 人直接到全国 8 个省市 335 个居委会/行政村调查了 512 187 人, 获得了样本量大、覆盖面广、抽样设计严谨、具有全国代表性的准确数据, 文章发表在柳叶刀子刊 *Lancet Global Health*, 文章题目: National incidence of traumatic fractures in China: a retrospective survey of 512 187 individuals, 影响因子 18.705。作为中国第一篇全国骨折发病率调查文章, 是世界上样本量最大的骨折数据, 也是中国人自己的数据。