

· 综 述 ·

骨源性外泌体微小 RNA 对骨代谢的影响研究进展

郝 静, 邓润智

[摘要] 外泌体能够参与各种体内的细胞活动,与细胞间的通讯有关。研究显示骨骼相关细胞产生的外泌体,其中含有的微小 RNA 能够在调节骨代谢的过程中发挥重要的作用,作者就骨源性外泌体微小 RNA 在骨代谢中作用的研究进展进行综述。

[关键词] 骨代谢;外泌体;微小 RNA

[中图分类号] R336 [文献标志码] A [文章编号] 2095-3097(2020)04-0246-03

doi: 10.3969/j.issn.2095-3097.2020.04.014

Research progress on effect of microRNAs from bone-derived exosomes on bone metabolism

HAO Jing, DENG Runzhi

(Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing Jiangsu 210008, China)

[Abstract] Exosomes are involved in a variety of cellular activities in the body and are involved in cell-to-cell communication. Studies have shown that exosomes produced by bone-related cells, which contain microRNA, play an important role in regulating bone metabolism. This review summarizes the research progress in the role of microRNA from bone-derived exosomes in bone metabolism.

[Key words] Bone metabolism; Exosomes; MicroRNA

外泌体为一种类脂质膜结合的细胞外囊泡,最早是 20 世纪 70 年代通过研究绵羊红细胞而发现的,其特指直径为 40~150 nm,密度为 1.09~1.18 g/mL 的囊泡。外泌体参与各种体内的细胞活动,可以从包括唾液、尿液、精液、血浆、血清、母乳和羊水在内的多种体液中分离得到。在绝大多数哺乳动物细胞培养的培养基中也能够分离出外泌体,包括树突细胞、上皮细胞、肿瘤细胞、免疫细胞和干细胞等,其细胞产量每天约 0.5 μg/10⁶ 个。外泌体重要的生物学功能是与细胞间通讯有关,在细胞间传递蛋白质、mRNA 和微小 RNA(microRNA, miRNA) 等。与外泌体相关的特征性标志物包括 CD9、CD63、CD81、HSP70、HSP90、肌动蛋白和膜联蛋白等^[1-4]。

骨骼系统基于不同来源细胞之间的通讯维护自身的稳定。成骨细胞和破骨细胞,分别对应着骨形成和骨吸收,在骨重塑期间协调这 2 种细胞的功能对于骨稳态十分重要。已知成骨细胞与破骨细胞之间存在 3 种信息沟通方式,分别是直接接触、旁分泌途径和沉积在骨基质中的生长因子。在成骨细胞与破骨细胞信息沟通过程中 miRNA 发挥重要作用。已

经证明 miRNA 在骨细胞分化和功能中起关键作用,这些大量存在于成骨细胞和破骨细胞中的 miRNA 协调这 2 种类型的细胞在不同条件下维持骨稳态,从而影响骨发育。MiRNA 除了有成骨细胞和破骨细胞的细胞内发挥作用,同时也通过细胞间的通讯发挥作用。最近,一些研究显示骨骼相关细胞,如破骨细胞、成骨细胞、骨细胞和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 均能够释放外泌体。同时研究也证实了在 BMSCs 和成骨细胞成骨分化过程中,细胞分泌的外泌体中有 miRNA 的存在,并且 let-7a、miR-199b、miR-218、miR-148a、miR-135b、miR-203、miR-219、miR-299-5p 和 miR-302b 随着成骨分化显著增加,而 miR-221、miR-155、miR-885-5p、miR-181a 和 miR-320c 在外泌体中显著降低。MiR-31 在骨重塑的起始阶段对破骨细胞分化具有积极作用。此外,miR-146a 对成骨细胞功能起促进作用,而对破骨细胞功能起抑制作用。在老年女性的骨质疏松骨折患者和卵巢切除小鼠中均发现破骨细胞的 miR-214-3p 表达显著增加。目前骨缺损修复重建的临床研究中关于细胞移植治疗是研究热点之一,但细胞毒性和免疫原性一直是困扰研究者的问题。研究发现外泌体不表达细胞表面主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I 和 MHC-II,从而避免了细胞移植

[基金项目] 江苏省“六大人才”高峰项目(WSW-082);江苏省青年医学人才项目(QNRC2016122);南京市医学科技发展专项(YKK16161)
[作者单位] 210008 江苏 南京,南京大学医学院附属口腔医院(郝静,邓润智)
[通讯作者] 邓润智, E-mail: doctord@163.com

和治疗的缺点。同时,由于 miRNA 在细胞外空间中是不稳定的,外泌体可能为 miRNA 提供有效载荷,以保护它们免受 RNases 的降解、极端温度和细胞外环境中的 pH 值破坏,因此,miRNA 通过外泌体转移以旁分泌的形式发挥作用是一种理想的作用形式^[2,4-6]。作者主要围绕上述内容就骨衍生外泌体 miRNA 在骨重建中的作用作一综述。

1 外泌体 miRNA 对破骨细胞的调节作用

来源于 BMSCs 和成骨细胞前体的外泌体可以激活破骨细胞形成^[2],破骨细胞前体的外泌体具有促进破骨细胞分化成熟的能力。来自于破骨细胞的外泌体抑制破骨细胞生成,其机制在于来自破骨细胞的外泌体富集 NF- κ B 受体激活剂(receptor activator of nuclear factor-kappa B, RANK),而 RANK 能够抑制破骨细胞形成。RANK 水平在破骨细胞衍生的外泌体中更高,并且去除含有 RANK 的外泌体能够明显减轻破骨细胞生成的抑制作用。因此,富含 RANK 的外泌体可能通过与 NF- κ B 受体激活剂的配体(receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, RANKL)竞争性结合,从而抑制破骨细胞中 RANK 信号通路的变化。也有研究发现,破骨细胞来源的外泌体中含有的 miR-214 可以使骨髓基质细胞中的巨噬细胞通过 PI3K/Akt 途径促进破骨细胞生成,因而破骨细胞外泌体含有的 miR-214 具有导致病理性破坏性骨病的作用^[4,7]。

已证明来自成骨细胞的 miR-503-3p 外泌体可抑制 RANK 表达,同时也能够通过 RANKL 诱导的破骨细胞生成。有研究成骨细胞细胞系 UAMS-32P 释放的外泌体含有 RANKL,能够激活 RANK,从而诱导 RAW264.7 向破骨细胞分化。外泌体作为一种旁分泌调节剂发挥作用,介导成骨细胞和破骨细胞之间的通讯,这可能代表骨重建的一种新机制^[4,8-9]。此外,miR-148a 被发现在人 BMSCs 外泌体中上调,通过靶向 MAFB 基因促进破骨细胞分化,进而引起骨吸收^[4,6]。

2 外泌体 miRNA 对成骨细胞的调节作用

来自矿化成骨细胞,以及破骨细胞和成骨细胞前体的外泌体均能够通过促进骨生成或促进破骨细胞生成而参与骨重建。起源于破骨细胞前体的外泌体能够激活成骨细胞分化,而破骨细胞衍生的外泌体能够抑制成骨细胞形成^[7]。

矿化成骨细胞的条件培养基具有促成骨作用,早先认为其中可能是成骨细胞分泌的酶或生长因子发挥作用。进一步的研究表明,除了分泌的生长因

子和细胞因子,成骨细胞分泌的外泌体也可能发挥作用。成骨细胞前体和分化的成骨细胞的外泌体中可以检测到 let-7,具有增强骨生成的作用。破骨细胞来源外泌体中的 miR-214-3p 具有抑制成骨细胞骨形成的作用^[2,7,10]。MiR-214 被从破骨细胞外泌体中转移到了成骨细胞,它具有抑制成骨细胞体外分化和矿化活性的作用。破骨细胞特异性 miR-214 转基因小鼠的血清外泌体 miR-214 水平显著升高,能够通过 ephrinA2/EphA2 抑制成骨细胞活性^[6-8,11]。

MiR-30d-5p 和 miR-133b-3p 在成骨细胞衍生的外泌体中高度表达,通过靶向 RUNX2 基因来抑制成骨细胞分化。MiR-199b 也参与了 RUNX2 介导的成骨细胞分化的控制。成骨细胞衍生的外泌体高表达 miR-140-3p,通过抑制 BMP2 表达进而抑制成骨细胞的形成。此外,miR-335-3p, miR-378b 和 miR-677-3p 在矿化的 MC3T3-E1 细胞中表达上调,通过抑制其靶基因而增强成骨细胞分化^[6-7,11]。

3 外泌体 miRNA 对 MSCs 的调节作用

在 MSCs 成骨分化的过程中,细胞分泌的外泌体中 miR-31 表达显著减少,作为成骨的负调节因子发挥作用,其机制为 miR-31 通过下调 RUNX2 的下游因子成骨转录因子 Osterix 和 SATB2 来抑制成骨分化。而对 MSCs 中 miR-31 进行抑制,具有改善骨体积和骨密度的作用。MiR-21 作为成骨分化的正调节因子,在 MSCs 成骨分化过程中表达上调,一方面,miR-21 靶向成骨分化抑制剂 Spry1 和 Sox2 发挥作用,另一方面,miR-21 调节 PI3K-AKT-GSK3 β 途径,激活 RUNX2 的表达而增加 MSCs 的成骨^[12]。

BMSCs 成骨分化期间外泌体 let-7a、miR-199b 和 miR-135b 表达升高,miR-221 表达降低;其中 let-7 可通过调节 HMGA2 抑制 MSCs 的脂肪化,进而增强骨生成和骨形成;miR-199b 可能参与其中通过 RUNX2 控制干细胞的成骨分化。MiR-135b 具有调节干细胞的成骨分化的能力,miR-135b 的上调与多发性骨髓瘤患者 MSCs 成骨分化受损有关;miR-221 的下调能够触发人类无限制体细胞干细胞和 MSCs 的成骨分化^[13]。

4 外泌体 miRNA 的促血管生成作用

对于骨骼维持其骨量增长和发育时,必须通过形成新的血管或血管生成获得更多的氧和营养物质。MSCs 来源的外泌体的质谱分析显示含有可溶性生长因子如血管内皮生长因子、转化生长因子 β 1、白细胞介素-8,能够刺激内皮细胞的增殖和迁移来加速促血管生成活性。除此之外,MSCs 来源的外

泌体含有 miRNA, 包括 miR-210, miR-126, miR-132, miR-21 和 miR-6087, 具有参与血管生成和诱导内皮分化的作用。来源于骨髓瘤细胞的外泌体富含大量 miR-92a, 在正常氧和缺氧条件下均有增强血管生成的作用。在慢性缺氧的条件下, 多发性骨髓瘤细胞外泌体 miR-135b 也能通过靶向抑制低氧诱导因子-1 改善血管生成^[4,14]。

5 外泌体在骨相关疾病中的临床研究

在小鼠的骨折愈合模型中, MSCs 衍生的外泌体注射能够增强骨折愈合。这一治疗策略在修复骨质疏松症老鼠中的临界骨缺损中同样有效, 外泌体有效刺激 BMSCs 的增殖和成骨分化, 并且效果随着外泌体浓度增加而增强。最近, 也有学者将人胚胎 MSCs 衍生的外泌体用于治疗大鼠的软骨缺损, 结果显示外泌体处理的软骨缺陷显示出增强的整体外观并改善组织学评分, 到 12 周时软骨缺陷完全恢复^[2,4,15]。MSCs 分化晚期的外泌体 miR-21 表达显著上升, 而在体内研究模型中也证实了 miR-21 具有增强骨质疏松症骨形成和加速骨折愈合的作用^[12]。临床上, 在骨质疏松症患者的血清和骨组织中发现 miR-21、miR-23a、miR-24、miR-100 和 miR-125b 均上调, 表明这些 miRNA 可能是骨质疏松症诊断的生物标志物以及治疗靶标^[16]。以上结果均提示了外泌体 miRNAs 在骨质疏松症中的作用。

6 展望

外泌体是天然存在的具有细胞特异性的纳米球, 可以有效转运蛋白质的成分、miRNA、mRNA 和其他细胞物质至靠近和远离细胞。骨外泌体内的特定物质提供了一种特定于细胞的机制, 因此, 骨衍生的外泌体可能适合用于骨再生和修复, 具有调节成骨细胞、破骨细胞形成和分化的作用, 与 MSC 相比, 具有稳定性好、易保存、无免疫原性的特点, 易于临床收集和使用, 未来含有特定 miRNA 的骨衍生外泌体有望临床用于骨修复重建及骨代谢疾病的治疗^[17]。

【参考文献】

[1] Basu J, Ludlow JW. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(4): 489-506.

[2] Pethő A, Chen Y, George A. Exosomes in extracellular matrix bone biology [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2018, 16(1): 58-64.

[3] Hao ZC, Lu J, Wang SZ, et al. Stem cell-derived exosomes: a promising strategy for fracture healing [J]. *Cell Prolif*, 2017, 50(5): e12359.

[4] Behera J, Tyagi N. Exosomes: mediators of bone diseases, protection, and therapeutics potential [J]. *Oncoscience*, 2018, 5(5-6): 181-195.

[5] Alexander M, Hu R, Runtsch MC, et al. Exosome-delivered microRNAs modulate the inflammatory response to endotoxin [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7321.

[6] Yin P, Lv H, Li Y, et al. Exosome-mediated genetic information transfer, a missing piece of osteoblast-osteoclast communication puzzle [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2017, 8: 336.

[7] Xie Y, Chen Y, Zhang L, et al. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(5): 1033-1041.

[8] Holliday LS, McHugh KP, Zuo J, et al. Exosomes: novel regulators of bone remodelling and potential therapeutic agents for orthodontics [J]. *Orthod Craniofac Res*, 2017, 20 (Suppl): 95-99.

[9] Huynh N, VonMoss L, Smith D, et al. Characterization of regulatory extracellular vesicles from osteoclasts [J]. *J Dent Res*, 2016, 95(6): 673-679.

[10] Cui Y, Luan J, Li H, 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.

[11] Sun W, Zhao C, Li Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity [J]. *Cell Discov*, 2016, 2: 16015.

[12] Wang X, Omar O, Vazirisani F, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes have altered microRNA profiles and induce osteogenic differentiation depending on the stage of differentiation [J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0193059.

[13] 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.

[14] Chen B, Li Q, Zhao B, et al. Stem cell-derived extracellular vesicles as a novel potential therapeutic tool for tissue repair [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(9): 1753-1758.

[15] Zhang J, Liu X, Li H, et al. Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 136.

[16] Hadjiargyrou M, Komatsu DE. The therapeutic potential of microRNAs as orthobiologics for skeletal fractures [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(5): 797-809.

[17] Zhao P, Xiao L, Peng J, et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells improve osteoporosis through promoting osteoblast proliferation via MAPK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(12): 3962-3970.