

骨髓间充质干细胞来源的外泌体促进髁突软骨细胞再生的研究

邢超¹ 徐灵巧¹ 廖文婷² 孙养鹏² 叶钟泰¹ 张志光²

¹深圳市宝安区人民医院口腔科 518101; ²中山大学附属口腔医院, 光华口腔医学院, 广东省口腔医学重点实验室, 广州 510055

通信作者: 张志光, Email: drzhangzg@163.com

【摘要】 目的 探讨大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)外泌体(Exo)对髁突软骨细胞的细胞增殖、细胞周期及相关基因表达的影响。方法 获取大鼠BMSC和髁突软骨细胞。收集第三代BMSC培养72 h上清液, 采用超速离心法提取Exo。实验组使用外泌体(BMSC-Exo)进行髁突软骨细胞培养, 对照组使用低糖培养基进行髁突软骨细胞培养。细胞计数(CCK-8)法检测髁突软骨细胞的增殖情况, 流式细胞仪分析细胞周期改变情况, 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)分析第7天及第14天髁突软骨细胞I型胶原(Col I)、II型胶原(Col II)基因表达。采用独立样本 t 检验进行统计学分析。结果 CCK-8结果显示, 培养72 h后实验组细胞增殖活力(4.72 ± 0.58)高于对照组(2.91 ± 0.17), 差异有统计学意义($t = 16.13, P < 0.001$); 流式细胞仪显示, Exo促进髁突软骨细胞G1期转换为G2期; RT-PCR结果显示: 第7天实验组Col I表达增量(2.85 ± 0.14)高于对照组(1.00 ± 0.17), 差异有统计学意义($t = 13.41, P < 0.001$), 第14天实验组Col I表达增量(5.34 ± 0.17)高于对照组(3.14 ± 0.10), 差异有统计学意义($t = 14.25, P < 0.001$), 第14天实验组Col II表达增量(1.77 ± 0.13)高于对照组(1.35 ± 0.18), 差异有统计学意义($t = 3.52, P = 0.041$)。结论 大鼠骨髓间充质干细胞外泌体可以促进髁突软骨细胞增殖, 还能促进髁突软骨细胞的Col I、Col II表达。

【关键词】 大鼠; 骨髓细胞; 间充质干细胞; 下颌骨髁状突; 软骨细胞; 外泌体; 细胞增殖; 颞下颌关节; 骨关节病

基金项目: 深圳市宝安区医疗卫生基础研究项目(2020JD351)

引用著录格式: 邢超, 徐灵巧, 廖文婷, 等. 骨髓间充质干细胞来源的外泌体促进髁突软骨细胞再生的研究[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2021, 15(4): 207-214.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.04.003

Condyle chondrocytes regeneration promoted by exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells

Xing Chao¹, Xu Lingqiao¹, Liao Wenting², Sun Yangpeng², Ye Zhongtai¹, Zhang Zhiguang²

¹Department of Stomatology, People's Hospital of Shenzhen Baoan District, Shenzhen 518101, China;

²Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Stomatology, Guangzhou 510055, China

Corresponding author: Zhang Zhiguang, Email: drzhangzg@163.com

【Abstract】 **Objective** The aim of this study was to determine the effects of exosomes from rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) on condyle chondrocytes. **Methods** Exosomes (Exos) was extracted from rat BMSCs to culture rat condyle chondrocytes. Cell counting kit-8 (CCK-8) was applied to analyze cell proliferation of condyle chondrocytes of BMSC-Exos group and control group (L-DMEM). Cell cycle progression was analyzed by flow cytometry. RT-PCR was applied to measure chondrogenic gene expression levels [Collagen I (Col I) and Col II]. Comparisons between groups were performed with independent-samples T test. **Results** The results of CCK-8 showed that the cell proliferation activity of BMSC-Exos group was 4.72 ± 0.58 , which was significantly higher than that of the control group, 2.91 ± 0.17 ($t = 16.13, P < 0.001$). The results of flow cytometry showed that Exos could promote condyle

chondrocytes transformed from G1 to G2. The results of RT-PCR indicated that the expression increment of type *Col I* gene in BMSC-Exos group at day 7 was 2.85 ± 0.14 , which was higher than that in the control group 1.00 ± 0.17 ($t = 13.41, P < 0.001$). Besides, the increment of expression of *Col I* gene in BMSC-Exos group I on day 14 was 5.34 ± 0.17 , which was higher than that in the control group 3.14 ± 0.10 ($t = 14.25, P < 0.001$). Meanwhile, the increment of *Col II* gene expression in the experimental group was 1.77 ± 0.13 , which was higher than that in the control group 1.35 ± 0.18 at the 14th day ($t = 3.52, P = 0.041$).

Conclusions Exosomes from rat bone marrow mesenchymal stem cells can promote the condyle chondrocytes proliferation. Besides, it can upregulate the expression of *Col I* and *Col II* in condyle chondrocytes.

【Key words】 Rats; Bone marrow cells; Mesenchymal stem cell; Mandibular condyle; Chondrocytes; Exosomes; Cell proliferation; Temporomandibular joint; Osteoarthropathy

Fund program: Basic Research of Medical and Health Care Project of Bao'an District, Shenzhen (2020JD351)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2021.04.003

骨关节病是颞下颌关节紊乱综合征发展的终末阶段,其主要表现为关节软骨退化、关节结构破坏等一系列退行性改变^[1]。患者通常会出现关节疼痛、功能紊乱,严重者影响咀嚼、吞咽、言语等功能,导致生活质量下降^[2]。由于颞下颌关节病的病因尚不明确,目前多采用缓解疼痛、改善功能的对症治疗,如物理治疗、咬合导板、非甾体类抗炎药、关节腔冲洗及关节调压等^[3-5]。由于软骨的生理结构特殊,局部缺乏血供,因此关节软骨一旦发生表层缺损,通常难以自愈^[6]。临床常用的各种干预措施,不管是保守的对症治疗或手术治疗,都只能起到缓解疼痛症状、改善运动功能的作用,难以修复再生髁突的关节软骨。

间充质干细胞(mesenchyme stem cell, MSC)是一种具有多向分化潜能和自我更新能力的多能干细胞,治疗作用主要体现在以下几个方面:通过多向分化潜能替代病变组织,发挥免疫调节和营养调节作用,分泌细胞因子、生长因子等辅助组织修复^[7]。随着再生医学的发展,普遍认为MSC分泌细胞因子可以促进组织修复^[8]。外泌体(exosome, Exo)是MSC分泌物的主要因子,这是一类直径约40~100 nm的双脂膜囊,可以辅助组织修复再生、抑制细胞凋亡、发挥免疫调节和抗炎作用,其作用在多种器官损伤中得到证实^[9]。

本研究通过提取大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)来源的Exo与髁突软骨细胞进行体外研究,检测在Exo作用下,髁突软骨细胞增殖、细胞周期及特定的基因表达水平,对MSC治疗颞下颌关节骨关节病进行初步探索。

材料与方法

一、材料和试剂

实验用SPF级健康、雄性SD大鼠,约100 g,由中山大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(粤)2011-0029],动物实验方法符合动物伦理学要求。磷酸盐缓冲液(PBS)、L-MEM(Hyclone,美国);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶+0.02%乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA; Gibico,美国);二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO; MP,美国);细胞周期分析试剂盒(杭州联科生物公司);焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水(MP Biomedicals,美国);TRIzol[®] Reagent(Ambion,美国);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher Scientific,美国);反转录聚合酶链反应(RT-PCR)Primer(Invitrogen,美国);LightCycler[®] 480 SYBR Green Master(Roche,瑞士);甲醇、无水乙醇(广州化学试剂厂);TNE缓冲液(南京森贝伽生物科技有限公司);高速离心机、微型离心机(Heraeus,德国);梯度PCR仪(Eppendorf,德国);Real-time PCR仪(Roche,德国);流式细胞仪(Beckman Coulter FC500,美国);全自动酶标仪(Tecan Infinite200,瑞士)。

二、细胞的培养及鉴定

1. 大鼠骨髓间充质干细胞:无菌条件下手术分离大鼠双侧下肢股骨,放入盛有 α -MEM培养基的离心管中,转移至超净台中。去除骨头两侧的骨骺端,暴露骨髓腔,使用含10% FBS的 α -MEM冲洗骨髓腔,将冲洗出的液体置于无菌的25 cm²培养瓶中,48 h后换液将未贴壁的血细胞冲洗去掉。以后每隔3~4 d换液1次,1周左右细胞长满培养瓶的

80%后1:3传代^[10]。分别进行成骨、成脂和成软骨诱导,验证其干细胞多向分化特征。

2. 大鼠髌突软骨细胞:无菌条件下分离大鼠下颌分支,将髌突及其附着物取出,切取半透明的软骨中央部分,用眼科剪将分离出的髌突软骨剪至1 mm大小,放入0.25%的胰酶的培养瓶中消化30 min,1000 r/min离心5 min(离心半径10 cm)弃上清液,0.2% II型胶原(Collagen II, Col II)酶消3 h,每隔1 h收集消化下来的软骨细胞,将所有收集的细胞转移至25 cm下培养瓶中,含10% FBS的低糖型-DMEM(L-DMEM)培养,每隔3~4 d换液,待细胞长满培养瓶80%后传代。第一代髌突软骨细胞以 5×10^3 /皿接种于37 °C细胞培养箱内培养24 h,加入固定液(甲醇:丙酮=1:1)-20 °C冰箱内固定30 min,0.3% Triton 常温下透膜15 min,5%小牛血清37 °C水浴箱中封闭2 h,1%小牛血清1:200比例稀释Col II抗体,4 °C过夜(>16 h)孵一抗,绿色荧光标记的羊抗鼠二抗37 °C水浴箱避光1 h孵二抗,滴入一滴抗淬灭DAPI常温下染色5 min,免疫荧光显微镜下观察细胞形态。

三、外泌体的提取、鉴定及分组

取第三代BMSC无血清培养72 h,收集上清液。在4 °C条件下依次离心:2 000 $\times g$ 离心30 min收集上清液,20 000 $\times g$ 离心60 min收集上清液,100 000 $\times g$ 离心60 min。收集离心管底部沉淀,PBS稀释,100 000 $\times g$ 离心60 min,最后100 μL PBS重悬收集的沉淀物^[11]。

获取的Exo经透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察形态,纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)粒径,蛋白印迹(Western bolt)检测特异性标记蛋白。

取第一代髌突软骨细胞(如无特殊说明均为第一代细胞)置于不含FBS的L-DMEM培养24 h后,实验组加入100 μL 含有Exo的PBS,对照组加入100 μL PBS,分别置于含5%二氧化碳、95%空气饱和湿度、37 °C的细胞培养箱中培养,每周换液2~3次。

四、细胞计数试剂盒检测细胞增殖

收集髌突软骨细胞,按照 3×10^3 /孔接种至96孔板,每个样本设置3个平行对照组,另设3个调零对照组,约6 h细胞贴壁后,记此时时间为0。避光条件下每孔加入10 μL CCK-8试剂,放置37 °C细胞培养箱内培养1 h,酶标仪分别测定细胞接种0、24、48、72、96和120 h后450 nm波长下吸光度(A)值,绘制细胞生长曲线。

五、流式细胞仪细胞周期分析

收集培养72 h后的髌突软骨细胞(10^6 个/皿),胰酶消化离心弃上清液,1 mL PBS室温下重悬。转移细胞到3 mL预冷-20 °C无水乙醇中,缓慢加入后轻轻吹打混匀,4 °C固定过夜。离心收集细胞,加入2 mL PBS重悬,细胞水化15 min,离心弃上清液,3 mL PBS后400目滤网过滤打散,1000 r/min离心5 min(离心半径10 cm)弃上清液,加入1 mL碘化丙啶染色液,涡旋离心机混匀10 s,室温下避光孵育30 min。按照流式细胞仪说明书进行操作,结果采用MultiCycle细胞周期拟合软件分析,每组实验重复3次,分析细胞周期变化。

六、反转录聚合酶链反应

第一代髌突软骨细胞按 2×10^5 /瓶接种25 cm培养瓶,按实验设计分组,分别于7、14 d收集样本。Trizol提取RNA并测定浓度,RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行反转录合成cDNA。SYBR[®] Green QPCR Master Mix试剂盒在LightCycler[®] 480 (Roche)进行定量PCR。反应体系:2 μL 反应cDNA,1 μL 正向引物,1 μL 反向引物,6 μL DEPC水,10 μL SYBR。反应过程:95 °C 5 min预变性,95 °C 10 s、60 °C 20 s、72 °C 30 s扩增40个循环,95 °C 5 s、65 °C 60 s、97 °C持续,40 °C 30 s冷却。数据分析采用按照Livak等^[12]的方法计算与对照组相对CT值($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。采用GAPDH作为管家基因,每个样本重复3次,分析Col I、Col II基因表达情况,基因引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成(表1)。

表1 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)引物序列

目的基因	引物序列	产物长度(bp)	基因库登记号
Col I	F:5'-CTACAGCACGCTTGTGGATG-3'	195	Z_78279
	R:5'-CAGATTGGGATGGAGGGAGT-3'		
Col II	F:5'-AGAACTGGTGGAGCAGCAAGA-3'	124	NM_012929
	R:5'-ATCTGGACGTTAGCGGTGTTG-3'		
GAPDH	F:5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	143	NM_0170084
	R:5'-ATGGTGCTGAAGACGCCAGTA-3'		

七、统计学处理方法

用SPSS 17.0软件对实验结果进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用Shapiro-wilk检验各组数据的正态性,若方差齐、符合正态分布采用独立样本 t 检验,方差不齐或偏态分布采用非参数检验法Mann-Whitney test进行比较。每组实验至少重复3次,检验水准双侧 $\alpha=0.05$ 。

结 果

一、大鼠骨髓间充质干细胞的鉴定结果

低倍镜下观察,可见BMSC集落呈旋涡状生长,细胞呈类长梭形(图1A);BMSC成骨诱导21 d,茜素红染色可见红色钙化结节形成(图1B);BMSC成脂诱导21 d,苏丹黑染色可见大量脂滴分散在细胞周围(图1C);BMSC成软骨诱导21 d,可见有乳白色软骨块形成(图1D)。

二、大鼠髌突软骨细胞的鉴定

髌突软骨细胞形态多角形,胞核为圆形或椭圆形,随着细胞增殖逐渐融合形成“铺路石”样结构(图2A)。DAPI细胞核染色,可见胞核为圆形或椭圆形,位于胞体中心(图2B)。Col II免疫荧光染色,可见髌突软骨细胞内有绿色荧光表达(图2C)。荧

光显微镜下,可见细胞内表达Col II(图2D)。

三、外泌体的鉴定

1. 透射电子显微镜下BMSC-Exo形态和大小(图3A):获取的外泌体结构完整,呈圆形囊泡状,伴有“茶托样”外形特征。

2. 纳米颗粒追踪分析(图3B):BMSC-Exo粒子直径众数93 nm,平均直径100 nm,表明成功提取外泌体。

3. Western blot检测(图3C):BMSC-Exo表达CD9和TSG101特异性标记蛋白,不表达3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)。

四、细胞计数试剂盒细胞增殖活力检测

CCK-8检测结果显示,0、24和48 h实验组与对照组相比差异无统计学意义,72 h实验组A值(4.72 ± 0.58)高于对照组(2.91 ± 0.17),差异有统计学意义($t=16.13, P<0.001$),120 h实验组A值(8.65 ± 0.18)高于对照组(4.71 ± 0.33),差异有统计学意义($t=20.14, P<0.001$)。结果表明,72 h后实验组髌突软骨细胞增殖活力更高(图4)。

五、流式细胞仪细胞周期分析

大鼠髌突软骨细胞周期分析见图5。G1期实验组[(81.3 ± 0.15)%]略低于对照组[(83.5 ± 0.10)%],

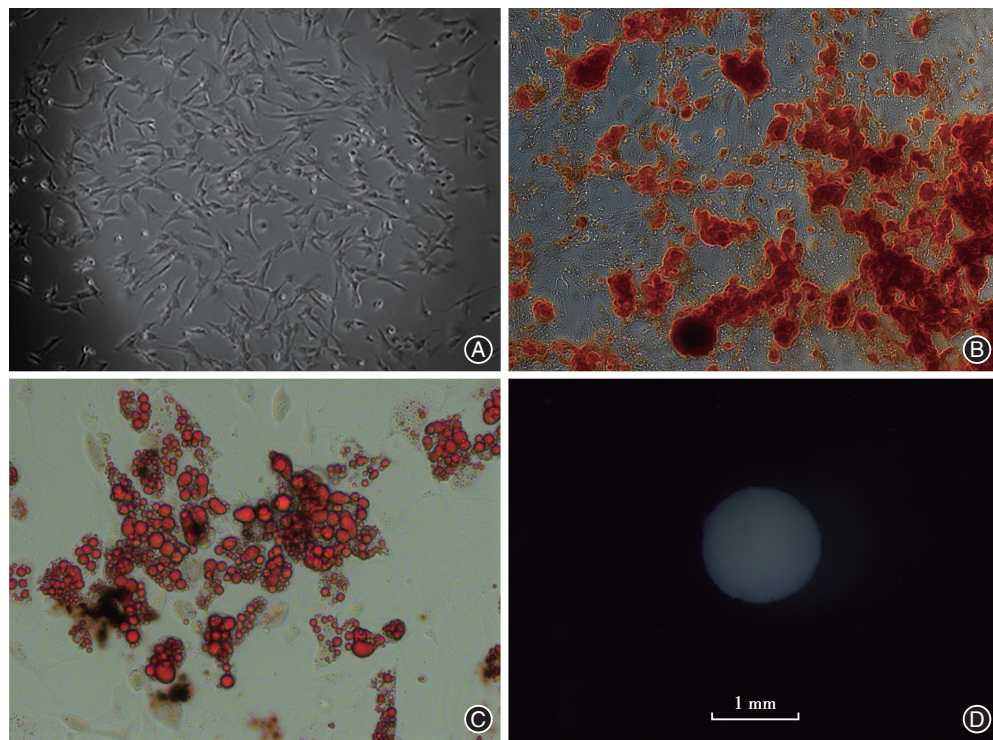


图1 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)形态学观察及三向分化诱导 A:显微镜下BMSC形态观察(低倍放大);B:成骨诱导21 d形成钙化结节(茜素红 低倍放大);C:成脂诱导21 d大量脂滴分散在细胞周围(苏丹黑 低倍放大);D:成软骨诱导21 d形成乳白色块状软骨

差异有统计学意义($t=9.56, P=0.003$), G2期实验组[(8.98±0.32)%]略高于对照组[(7.01±0.14)%], 差异有统计学意义($t=4.68, P=0.019$), S期两组差异无统计学意义($t=0.34, P>0.05$, 图5I)。

六、反转录聚合酶链反应检测细胞中软骨相关基因的表达水平

如图6A所示, 在第7天时, 实验组中的 *Col I* mRNA 表达水平(2.85±0.14)较对照组(1.00±0.17)

明显上升, 差异有统计学意义($t=13.41, P<0.001$); 第14天时, 实验组 *Col I* mRNA 表达水平(5.34±0.17)高于对照组(3.14±0.10), 差异有统计学意义($t=4.25, P<0.001$)。图6B显示, 第7天两组培养基的 *Col II* mRNA 表达差异无统计学意义, 第14天实验组中 *Col II* mRNA 的表达水平(1.77±0.13)高于对照组(1.35±0.18), 差异有统计学意义($t=3.52, P=0.041$)。

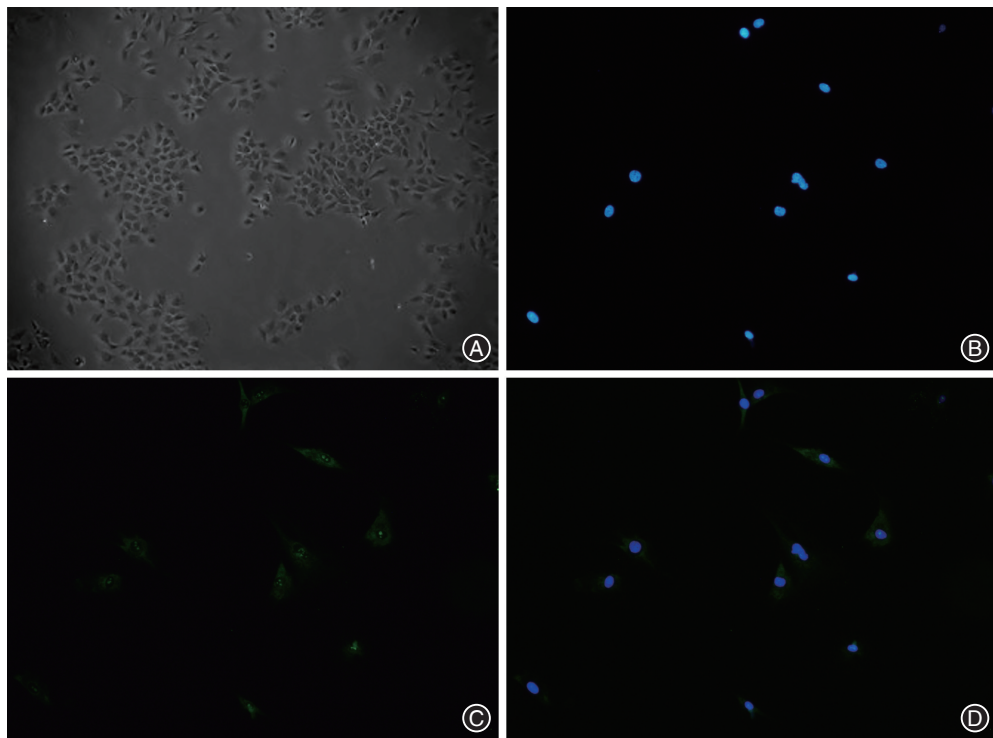


图2 大鼠髌突软骨细胞形态学观察及II型胶原(Col II)观测 A:大鼠髌突软骨细胞(低倍放大);B:DAPI细胞核染色(中倍放大);C:胞质内Col II免疫荧光(中倍放大);D:DAPI细胞核染色+胞质内Col II表达(中倍放大)

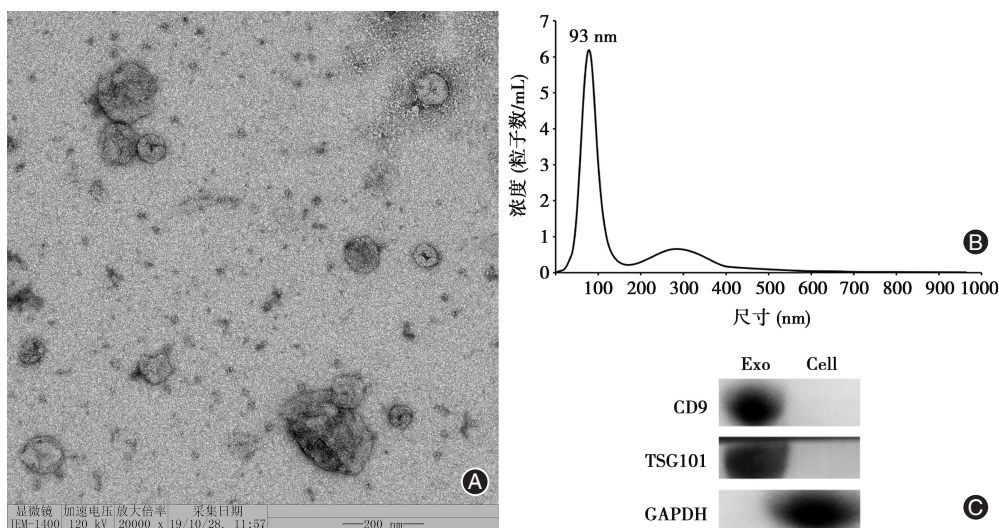


图3 大鼠骨髓间充质干细胞外泌体的鉴定 A:透射电子显微镜下外泌体形态;B:纳米颗粒追踪分析;C:Western blot 检测特异性标记蛋白

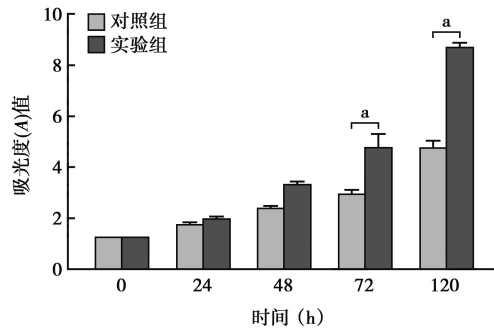


图4 细胞计数(CCK-8)检测SD大鼠髌突软骨细胞吸光度值 实验组与对照组相比差异有统计学意义(* $P < 0.001$)

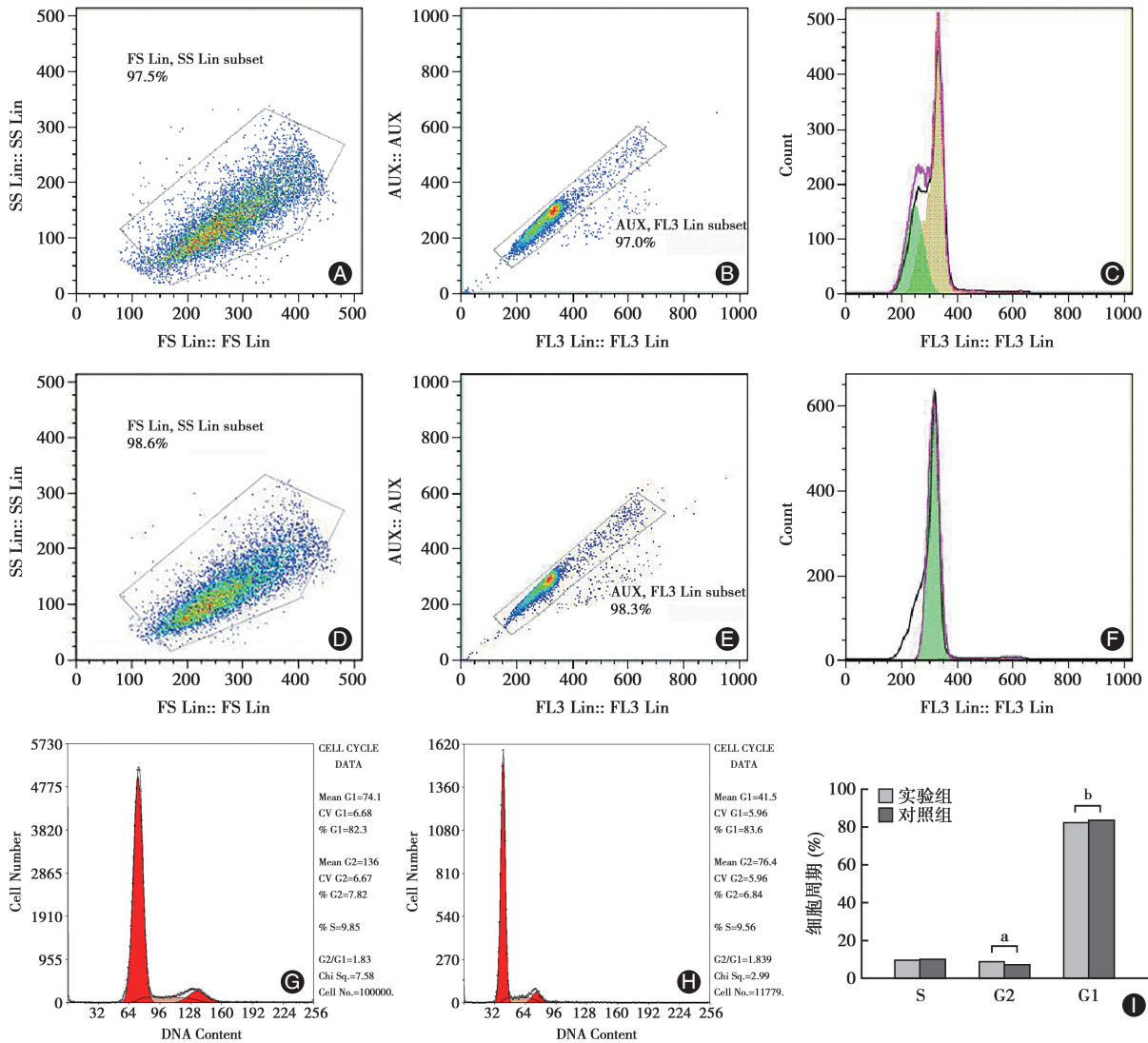


图5 大鼠髌突软骨细胞周期分析 A~C:实验组流式细胞仪检测;D~F:对照组流式细胞仪检测;G:实验组细胞周期分析;H:对照组细胞周期分析;I:细胞周期检测结果统计图,实验组与对照组相比,差异有统计学意义(* $P < 0.05$,^b $P < 0.001$)

讨论

软骨是一种起源于中胚层的特殊结缔组织,根据其组成和功能可分为:透明软骨、纤维软骨和弹

性软骨。髌突软骨是一种无血管的透明软骨,由致密的胶原纤维和细胞外蛋白聚糖组成,其胶原纤维主要为Col I和Col II,可以前后向抵抗剪切力^[13],保护关节在机械负荷过程中不受损伤。健康的软骨

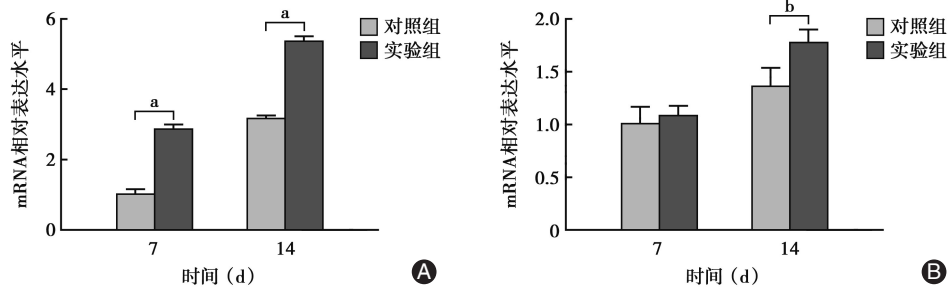


图6 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠髌突软骨细胞相关基因表达水平 A: I型胶原(*Col I*);B: II型胶原(*Col II*);实验组与对照组相比,差异有统计学意义(* $P < 0.001$,^b $P < 0.05$)

中,软骨细胞处于静止状态,合成代谢和分解代谢处于平衡中。随着骨关节炎的疾病进展,软骨细胞的合成代谢逐渐减少,肥大标记基因(*Col-X*)表达上调,分解代谢酶(MMP、ADAMTS)合成增加。关节软骨的退行性变引起软骨缺损是骨关节炎的主要特征,因此颞下颌关节骨关节炎治疗重点在于预防软骨和软骨下骨的破坏、减轻疼痛、恢复颞下颌关节功能^[14]。

Exo由双脂质膜构成,包含miRNA、mRNA和蛋白质,可在多种细胞(淋巴细胞、树突状细胞、肿瘤细胞等)中合成,存在于大多数体液中(血液、尿液和唾液)^[15]。本研究通过CCK-8检测了BMSC-Exo对髌突软骨细胞增殖的影响,结果显示,培养72 h后实验组的软骨细胞增殖活力较对照组明显上升,表明BMSC-Exo能够促进髌突软骨细胞增殖。Zhang等^[16]研究中提到,MSC能够提供细胞因子和生长因子等,促进细胞增殖,帮助修复受损组织。本实验表明,BMSC-Exo能促进髌突软骨细胞的增殖活性,该结果与机体其他器官作用结果一致。

为进一步探索细胞增殖机制,本研究对比了两组软骨细胞的细胞周期,结果显示外泌体组通过降低G1期,提高G2期占比,促进髌突软骨细胞从G1期向G2期转换,达到促进细胞增殖作用。有研究发现miR-140参与软骨细胞增殖^[17],但营养调节和修复机制尚不明确。目前,在软骨再生方面的研究成果有限,其对于髌突软骨细胞的作用机理仍需要更加深入的研究加以探索。

本研究通过RT-PCR检测软骨相关基因的表达水平,发现在第7天时,实验组中*Col I*含量明显高于对照组,可能是BMSC-Exo中含有促进细胞代谢的营养物质,导致细胞增殖速度加快,*Col I*分泌增加。第14天时,BMSC-Exo组的*Col I*含量仍然显著高于对照组,这提示BMSC-Exo对软骨细胞的促进

作用可维持较长时间。两组的*Col II*含量在第7天时无明显差异,到第14天时BMSC-Exo组的*Col II*含量显著升高,提示BMSC-Exo中的营养物质也能够促进*Col II*表达。研究表明,髌突软骨的细胞外基质中富含*Col I*、*Col II*,其含量与关节软骨的局部环境和细胞反应有关^[18]。但对于它们的含量变化规律,目前尚无明确结论。

综上所述,本研究初步表明,BMSC-Exo可以促进髌突软骨细胞增殖,促进*Col I*、*Col II*基因的表达,对髌突软骨的修复和再生提供积极作用,我们后续将进行更加深入的研究,为BMSC来源的外泌体治疗颞下颌骨关节炎提供更多的数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 马绪臣. 对颞下颌关节紊乱病关节盘移位的认识及治疗策略[J]. 中华口腔医学杂志, 2017, 52(3): 139-142. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2017.03.002.
- [2] 刘洪臣. 颞下颌紊乱病[J]. 口腔颌面修复学杂志, 2021, 22(2): 114. DOI: 10.19748/j.cn.kqxf.1009-3761.2021.02.008.
- [3] 张志光, 刘文静. 颞下颌关节紊乱病与关节内压[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(2): 69-74. DOI: 10.12016/j.issn.2096-1456.2018.02.001.
- [4] 蔡恒星, 柯金, 孟庆功, 等. 透明质酸注射联合咀嚼肌功能训练治疗老年性颞下颌关节骨关节炎患者的临床研究[J]. 口腔医学研究, 2019, 35(3): 262-265. DOI: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.03.017.
- [5] 袁沐, 沈佩, 杨驰. 关节镜下盘复位术对青少年髌突生长影响的回顾性队列研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2021, 56(2): 158-163. DOI: 10.3760/cma.j.cn112144-20200718-00427.
- [6] Murphy MP, Koepke LS, Lopez MT, et al. Articular cartilage regeneration by activated skeletal stem cells[J]. Nat Med, 2020, 26(10): 1583-1592. DOI: 10.1038/s41591-020-1013-2.
- [7] Le H, Xu W, Zhuang X, et al. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration[J]. J Tissue Eng, 2020, 11: 2041731420943839. DOI: 10.1177/2041731420943839.

- [8] Xu X, Liang Y, Li X, et al. Exosome - mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid - derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120539. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120539.
- [9] Cully M. Exosome-based candidates move into the clinic [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(1):6-7. DOI: 10.1038/d41573-020-00220-y.
- [10] 邢超, 孙养鹏, 郑育亮, 等. 骨髓间充质干细胞对关节盘细胞的作用研究[J/OL]. *中华口腔医学研究杂志(电子版)*, 2014, 8(5):370-375. DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2014.05.004.
- [11] Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research [J]. *J Extracell Vesicles*, 2013, 2: 20360. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [13] Morello R. Osteogenesis imperfecta and therapeutics [J]. *Matrix Biol*, 2018, 71-72:294-312. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.03.010.
- [14] Zhang J, Yan C, He W, et al. Inhibition against p38/MEF2C pathway by Pamapimod protects osteoarthritis chondrocytes hypertrophy [J]. *Pain Medicine*, 2020. DOI: 10.23736/S0031-0808.20.04170-1.
- [15] Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367 (6478) : eaa06977. DOI:10.1126/science.aau6977.
- [16] 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. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.11.028.
- [17] Won LG, Thangavelu M, Joung CM, et al. Exosome mediated transfer of miRNA - 140 promotes enhanced chondrogenic differentiation of bone marrow stem cells for enhanced cartilage repair and regeneration [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(7):3642-3652. DOI:10.1002/jcb.29657.
- [18] Song H, Zhao J, Cheng J, et al. Extracellular Vesicles in chondrogenesis and Cartilage regeneration [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(11):4883-4892. DOI: 10.1111/jcmm.16290.

(收稿日期:2021-04-06)

(本文编辑:王嫚)