

间充质干细胞来源的细胞外囊泡修复骨缺损的作用机制

曾锦全¹, 柯俊杰^{2,3*}

(¹武汉城市职业学院职业网球学院, 武汉 430070; ²四川省骨科医院康复医学科, 成都 610041;

³成都体育学院运动医学与健康学院, 成都 610041)

摘要: 临界骨缺损的再生修复是骨科研究的热点之一。在骨组织工程研究中, 常通过调控间充质干细胞的基因表达改变细胞外囊泡的内部活性分子表达谱, 从而增强细胞外囊泡的成骨活性, 促进骨缺损的再生修复。然而, 目前对于间充质干细胞来源的细胞外囊泡(mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, MSC-EVs)促进骨缺损修复的具体机制尚不清晰。因此, 本文通过查阅近年来MSC-EVs在骨缺损修复中的相关研究, 阐述了MSC-EVs通过其内部活性物质促进骨缺损修复的作用机制, 为科学合理应用MSC-EVs进行骨缺损的临床修复提供理论依据。

关键词: 骨缺损; 细胞外囊泡; 间充质干细胞; 外泌体; 骨再生

Mechanism of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in repairing bone defects

ZENG Jinquan¹, KE Junjie^{2,3*}

(¹Professional Tennis College, Wuhan City Vocational College, Wuhan 430070, China;

²Department of Rehabilitation, Sichuan Orthopaedic Hospital, Chengdu 610041, China;

³Sports Medicine and Health Institute, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The regeneration and repair of critical bone defects is one of the hotspots in orthopaedic research. In bone tissue engineering, the expression profile of active molecules inside extracellular vesicles is often changed by regulating the gene expression of mesenchymal stem cells, thereby enhancing the osteogenic activity of extracellular vesicles and promoting the regeneration and repair of bone defects. However, the specific mechanism by which mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles (MSC-EVs)-promoted bone defect repair is still unclear. Therefore, by reviewing the related research of MSC-EVs in bone defect repair in recent years, this paper expounds the mechanism of MSC-EVs promoting bone defect repair through its internal active substances, which providing a theoretical basis for the scientific and rational application of MSC-EVs for clinical repair of bone defects.

Key Words: bone defects; extracellular vesicles; mesenchymal stem cells; exosomes; bone regeneration

创伤、骨肿瘤和感染等因素引起的临界骨缺损的修复与重建是骨科治疗领域的难点^[1]。目前, 临床修复骨缺损的方法主要包括自体骨移植、异

体骨移植以及合成生物材料移植^[2,3]。自体骨移植通常被认为是修复骨缺损的金标准, 但其使用存在许多局限性, 包括供体骨区发病率高、可用性

收稿日期: 2022-07-06

第一作者: E-mail: 89800595@qq.com

*通信作者: E-mail: 1448278929@qq.com

有限以及不可预测的自体吸收等^[4]。异体骨移植因易发生免疫排斥反应而限制了其临床应用^[5]。1993年, Langer等^[6]首次提出将组织工程应用于再生医学的潜在策略。骨组织工程(bone tissue engineering, BTE)作为一种骨缺损修复技术, 主要包括三个基本成分: 生物支架、种子细胞和骨诱导因子^[7]。近年来, BTE在骨再生的治疗中取得了很大的进展, 支架等生物活性材料与间充质干细胞(mesenchymal stromal cells, MSCs)及其分泌因子的结合在骨缺损修复中得到广泛应用^[8]。MSCs是一种异质性的间充质干细胞亚群, 包括骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)、脂肪来源的干细胞(adipose mesenchymal stem cells, ADSCs)、脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)以及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)等多种类型, 具有成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等多向分化潜能^[9]。因此, 干细胞移植疗法被认为是骨缺损再生和修复的一种有效的潜在治疗策略^[10-12]。然而, 在细胞的培养和传代过程中, MSCs的表型改变、移植细胞的归巢效率低、局部注射细胞的存活率低等因素限制了其在骨缺损修复中的应用, 因此, 不需要体外植入干细胞的无细胞疗法逐渐被应用于再生医学^[13,14]。越来越多的证据表明, MSCs对组织修复的积极作用不是通过直接分化为修复和替代受损组织的实质细胞, 而是通过旁分泌机制刺激组织驻留受体细胞的活性^[15,16]。细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)作为一种MSCs旁分泌作用的主要介质受到广泛关注。EVs是一种几乎所有细胞都能分泌的纳米磷脂双分子层囊泡, 由质膜直接向外“出芽”形成。根据EVs的直径、成分和来源可以将它们分为外泌体、细胞微泡和凋亡小体三种类型^[17]。其中, 外泌体的研究最为热门, 是最引人注目的一种EVs类别。外泌体能够作为一种纳米载体被释放到细胞外, 可通过配体-受体相互作用、内吞作用或直接膜融合转移到靶细胞, 将其内部包含的蛋白质和遗传信息等生物活性物质递送到目标细胞, 是细胞间通信的重要媒介^[18]。外泌体常在各种培养条件下的MSCs中获取, 被认为是MSCs治疗功能的主要媒介因子, 且不具有MSCs治疗的局限性^[19-21]。

大量研究证明, 间充质干细胞来源的细胞外囊泡(mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles, MSC-EVs)能够通过直接转移其内部生物活性分子, 调控靶细胞中的下游信号级联, 进而诱导MSCs成骨分化、抑制破骨吸收、改善血管生成、促进骨缺损的修复^[22,23]。研究报道, MSC-EVs内部包括大量核酸、蛋白质以及脂质等生物活性分子, 其中, miRNAs是近年来研究最为广泛的物质^[24]。MiRNAs是一种内源性非编码小RNA, 常通过转录后修饰发挥作用, 在细胞通信中发挥关键作用, 能够广泛参与骨代谢调控^[25-27]。研究显示, 外泌体加速成骨细胞分化的过程中, 其内部miRNAs是主要的调控因子^[28]。此外, 还有研究发现, MSC-EVs内部miRNAs能够诱导促血管生成相关基因的表达, 促进血管生成, 参与免疫调节以及抑制破骨细胞活性从而促进骨缺损修复^[29]。然而, 目前对MSC-EVs促进骨形成的机制研究仍存在许多不足, 例如EVs中活性分子种类和数目较多, 除miRNAs的调控作用外, 蛋白质等其他物质是否也发挥关键作用还未可知。因此, MSC-EVs修复骨缺损的具体机制尚需深入探索。本文通过查阅近些年BTE中应用MSC-EVs促进骨缺损修复的相关文献, 阐述MSC-EVs通过内部miRNAs等活性物质促进骨生成和血管生成, 抑制破骨及参与免疫调节, 最终促进骨缺损修复的作用机制, 为未来进一步应用MSC-EVs促进骨缺损修复提供理论依据。

1 MSC-EVs亲本细胞的来源

作为一种细胞通讯的关键媒介, 外泌体能够广泛参与调节免疫反应^[30]、促进外伤性脑损伤的修复^[31]以及刺激骨组织再生^[32]等。研究显示, 在骨组织再生治疗中, 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源的外泌体主要通过递送内源性货物刺激成骨细胞增殖、血管生成以及抑制破骨细胞活性来发挥骨修复作用^[33]。由于外泌体通常具有与亲本细胞相似的治疗特性, 来源于不同MSCs的外泌体的骨再生修复效果也有所差异^[34,35]。因此, 在应用MSCs来源的外泌体时, 对其亲本细胞来源的选择是非常重要的^[36]。目前报道的用于提取外泌体的MSCs来源主要包括BMSCs、ADSCs、UCMSCs、iPSCs等^[9,10,37-39]。其

中, BMSCs主要通过刺激成骨分化来促进骨再生, 并且比较容易获得, 是骨组织工程中最常用的细胞来源^[40]。已有大量研究表明, 骨髓间充质干细胞来源的外泌体可以刺激BMSCs增殖和成骨分化, 从而促进骨缺损内的血管生成、骨生成以及骨基质矿化^[41]。与BMSCs相比, 人脂肪间充质干细胞(human adipose mesenchymal stem cells, hADSCs)更容易获得, 并且在人体分布最广泛, 增殖迅速, 是提高外泌体产量理想的MSCs类型^[42]。然而, 与骨髓间充质干细胞相比, hADSCs的成骨分化潜能可能更低^[43]。有研究比较了成骨诱导分化培养(osteogenesis induced, OI)条件下大鼠BMSCs来源的外泌体和脂肪干细胞来源的外泌体的成骨分化潜能。结果显示, BMSC-OI来源的外泌体显著上调成骨相关基因和蛋白质的表达, 包括Col I、Runx2相关转录因子2(runt related transcription factor 2, Runx2)、骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、BMPR- I A和BMPR- II, 而ADSC-OI来源的外泌体仅上调BSP、BMPR- I A和BMPR- II, 上述结果提示ADSC-OI来源的外泌体的成骨诱导能力可能低于BMSC-OI来源的外泌体^[43]。此外, 人脂肪间充质干细胞(human adipose mesenchymal stem cells, hADSCs)来源的外泌体在缺血性疾病的治疗中显示出巨大的治疗潜力, 表明hADSC来源的外泌体也可能通过促进血管生成在骨再生中发挥潜在的作用^[44]。在通过诱导血管生成促进骨再生的MSCs的研究中, 人脐带间充质干细胞(human umbilical cord derived mesenchymal stem cells, hUCMSCs)在BTE中引起了广泛关注。hUCMSCs是一种从人类脐带基质的主要成分Wharton's jelly中获得的原始的MSCs群体^[45]。hUCMSCs可以通过诱导血管生成间接促进骨再生, 而不是直接促进成骨或软骨分化。hUCMSCs相较于骨髓或脂肪等其他来源的MSCs具有更强的促血管生成特性^[46]。此外, hUCMSCs来源于人类出生后的废物组织, 来源丰富且无伦理道德争议, 具有更大的临床潜力^[47]。与hUCMSCs类似, iPSCs同样能够无限生长且不存在免疫排斥或使用伦理问题, 但iPSCs却有潜在的致癌风险^[48]。近年来的研究表明, 诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(induced pluripotent stem cells-derived mesenchymal stem cells, iPS-

MSCs)同时具有iPSCs和MSCs的优点, 其经40次传代后仍能产生丰富的MSCs, 并保持MSCs的自我更新能力, 而且不再具有致瘤性^[49]。在促进骨缺损治疗中, iPS-MSCs具有更强的增殖能力和免疫调节功能, 能够显著促进骨再生^[9]。这些特征使iPS-MSCs成为极佳的外泌体细胞来源^[16]。除上述常用的MSCs来源外, 部分组织来源的MSCs来源的外泌体也有较好的应用潜力。如乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs)是一种具有多重分化潜能和高增殖能力的未成熟MSCs群体, 能够以非侵入性的方式轻易获得, 同样不存在伦理问题^[50]。与BMSCs相比, SHEDs富含生长因子, 包括成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factors 2, FGF2)和转化生长因子 β 2(transforming growth factor- β 2, TGF- β 2)等, 具有更强的增殖能力^[51]; 与牙髓干细胞相比, SHEDs具有更强的矿化能力^[52]。有研究证明, SHEDs来源的外泌体与 β -磷酸三钙(β -TCP)联合使用可以通过促进血管生成和骨生成来促进牙槽骨再生, 从而治疗骨缺损^[53]。除考虑MSCs来源外, 外泌体的治疗效果也会受到供体某些潜在疾病的影响。一项研究表明, 从I型糖尿病大鼠模型中获得的BMSCs来源的外泌体促进BMSCs的成骨分化和内皮细胞的血管生成的效果明显低于从正常大鼠中获得的BMSCs来源的外泌体^[35], 提示来自慢性基础疾病供体的自体外泌体移植可能不适合用于再生治疗^[54]。

综上, 不同类型的外泌体亲本细胞显示出不同特性(表1), 其中BMSCs可能是最理想的成骨分化的细胞来源; ADSCs分布最广泛且获取方便, 但成骨分化能力较BMSCs弱; hUCMSCs主要通过促进血管生成间接促进骨再生; iPS-MSCs具有iPSCs和MSCs的优点, 表现出更强的促增殖能力和免疫调节功能, 且与hUCMSCs一样不存在伦理问题; 而局部来源的SHEDs可以通过非侵入性的方式获得, 并且富含生长因子, 促进骨再生的效果优于多种MSCs。此外, 对于存在慢性基础疾病等问题的供体来源的MSCs, BMSCs来源的外泌体各方面性能均有所下降甚至出现相反的作用, 不宜用作损伤修复。因此, 在BTE中应用外泌体进行治疗时, 对不同亲本及供体来源的MSCs应加以区别, 以更好地发挥外泌体的作用效果。

表1 不同类型外泌体的特点

外泌体类型	特点	主要成骨机制
BMSCs来源的外泌体	成骨效果好, 易获得, 应用最广泛	成骨分化
hASCs来源的外泌体	成骨能力相对较差; 在人体分布最广泛, 最易获得; 增殖速度快, 提高产量的最佳选择	成骨分化
hUCMSCs来源的外泌体	更高的多能性; 较强的促血管生成成骨特性; 来源废物组织, 来源丰富; 没有伦理和道德争议; 临床应用潜力高	促血管生成
iPS-MSCs来源的外泌体	具有iPSCs和MSCs的优点, 无限生长和自我更新能力; 不再具有致瘤性, 没有伦理和道德争议, 更强的增殖能力和免疫调节功能	成骨分化及血管生成
SHEDs来源的外泌体	多重分化潜能, 非侵入性的方式获取方便且不存在伦理问题, 富含FGF2、TGF- β 2等生长因子, 更强的增殖能力和矿化能力	成骨分化及血管生成

2 MSC-EVs通过促进成骨分化修复骨缺损

骨缺损修复的关键是增强成骨细胞活性并抑制破骨细胞活性。MSC-EVs可促进内源性MSCs向骨缺损部位募集, 从而激活和促进MSCs增殖和分化, 最终加速骨形成。MSC-EVs促进MSCs成骨分化的过程涉及多种信号通路, 如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)/Smad、Wnt/ β -catenin、磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)等^[55]。

2.1 MSC-EVs通过增强BMP/Smad信号通路促进成骨分化

BMPs是TGF- β 超家族的成员, 是骨骼发育的重要生长因子, 具有增强BMSCs向成骨细胞分化的能力, 从而促进骨骼的生长发育^[56]。在已发现的20余种亚型中, BMP2的研究备受关注, 它不仅能够直接诱导MSCs的增殖、迁移以及成骨分化, 而且能够协同其他成骨因子共同发挥成骨作用^[57]。BMP/Smad信号通路由BMPs及其受体、Smads蛋白和相关转录因子组成^[58]。BMP2通过自分泌或旁分泌形式释放后, 其单体可通过二硫键连接形成二聚体, 再结合BMPs受体^[59]。BMPs受体是丝氨酸/苏氨酸激酶受体, 包括I型受体(BMPR-I A、BMPR-I B和ACVR-I)和II型受体(BMPR-II、ActR-II A和ActR-II)^[60,61]。BMP2先结合BMPR-II, 发生自身磷酸化而被激活, 继而磷酸化BMPR-I, 使BMPR-I激活, Smad1/5/8等下游Smads信号被BMPR-I受体激活并和受体形成短暂复合物, 使其与Smad4结合, 转移至核内, 转录激活成骨分化基因, 如Runx2和成骨细胞特异性转录因子Osterix等, 促进成骨细胞分化^[59]。BMP/

Smad信号通路对成骨分化具有重要意义。近些年, 多项研究显示MSC-EVs促进成骨分化主要通过激活BMP/Smad信号通路, 且该过程是多个miRNAs共同作用的累积效应。Liu等^[43]发现, BMSC-OI来源的外泌体在促进大鼠颅骨缺损模型成骨分化的过程中, 有包括miR-877在内的8个miRNAs下调, 16个miRNAs上调(如miR-328a-5p、miR-31a-5p、let-7a-5p和let-7c-5p等)。抑制miR-877可上调BMP/Smad信号通路中靶基因的表达, 如BMPR-I A、BMPR-I B和Smad1。过表达miR-328a-5p、miR-31a-5p、let-7a-5p和let-7c-5p能够下调抑制BMP/Smad信号通路的靶向基因ACVR-I和ACVR-II B^[62]。生物信息学分析显示, ACVR-II B可能是BMPR-II的拮抗剂, 并且BMPR-II与ACVR-II B之间存在竞争和协同的受体激活网络, 而不是简单的竞争关系。以上结果表明, BMSC-Exo-miRNAs主要靶向ACVR-II B/ACVR-I, 调控BMPR-II/ACVR-II B对BMPR诱导的Smad1/5/9磷酸化的竞争性平衡, 从而促进成骨分化^[43]。此外, 不同条件下获得的EVs可能通过不同途径调控BMP/Smad信号通路。Huang等^[63]制备了可持续表达BMP2的hBMSC-EVs, 这些EVs在体外和体内实验中均显示出强化的成骨诱导性能。研究结果发现, hBMSC-EVs中BMP信号通路抑制因子SMURF1和Smad7的表达显著降低^[64]。进一步研究表明, 靶向SMURF1的miR-424在EVs中的表达明显增加^[65]。因此, hBMSC-EVs可能通过递送miR-424, 靶向抑制SMURF1, 从而增强BMP2信号, 最终促进成骨分化。此外, 另一项研究表明, 人骨髓间充质干细胞来源的外泌体模拟物(human bone mesenchymal stem cell-derived exosome

mimics, hBMSC-EMs)中noggin的表达下调可以增强hBMSC-EMs的成骨特性。该研究发现,与对照组相比,noggin抑制的hBMSC-EMs中miR-29a的表达显著降低,而BMPR-1A、磷酸化Smad1/5/8和ID1(BMP信号的关键下游靶点)的表达显著增加^[66]。先前的研究表明,noggin是天然BMP拮抗剂,抑制MSCs中的noggin蛋白表达能够触发BMP信号的关键介质(Smad1/5/8)和成骨分子(Runx2和OCN)^[67]。因此,noggin抑制的hBMSC-EMs可能通过抑制内部miR-29a的表达来刺激BMP/Smad信号通路,进而介导成骨分化增强^[66]。

综上,多项研究证明,BMP/Smad是成骨细胞分化过程中的关键信号通路。在BTE中,常通过改变MSC-EVs内部miR-877、miR-424等多种miRNAs水平,调控BMP信号的关键下游靶点,促进Smad1/5/8磷酸化,进而上调成骨相关基因,加速MSCs成骨分化。通过正向或负向调控BMP/Smad信号通路进而促进MSCs成骨分化的过程是多个miRNAs共同作用的累积效应,但目前对于调节过程的miRNAs探索仍不够全面,未来需进一步研究。此外,EVs内其它的遗传物质、蛋白质和脂质等生物活性分子也有可能参与调控靶细胞的BMP/Smad信号,除关注miRNAs外,未来也应加强探索EVs内部能够有效调控BMP/Smad信号的其他关键的生物活性分子,从而更好地应用EVs。

2.2 MSC-EVs通过调节经典Wnt/ β -catenin信号通路促进成骨分化

骨形成和骨吸收之间的平衡是骨稳态的保证。过去大量的证据表明,Wnt信号通路在调节这种平衡中发挥着关键作用,根据是否依赖 β -catenin,可以将其分为经典和非经典Wnt通路^[68]。经典Wnt/ β -catenin主要通过Wnt1和Wnt3a等介导,并由 β -catenin作为中间传递信号。其介导过程主要由配体Wnt与7次穿膜蛋白Frizzled及其共同受体LRP-5/6结合后激活胞内蓬乱蛋白(disheveled, Dsh),从而释放信号抑制糖原合成激酶3(glycogen synthase kinase 3, GSK-3)的激活,抑制 β -catenin磷酸化,使 β -catenin在胞质中稳定积累,并进入细胞核与T淋巴细胞因子(T-cell factor, TCF)形成复合物,从而启动下游靶基因转录^[69]。Heo等^[70]证实,Wnt通路可以通过激活Runx2等成骨转录因子促进

牙周韧带干细胞(periodontal ligament stem cells, PDLSCs)成骨分化。然而,目前的研究表明,Wnt信号通路对于MSCs成骨分化的影响存在两面性:具有促进和抑制MSCs成骨分化的双重功能^[71]。有研究显示,低剂量的Wnt3a可以促进成骨分化,高剂量则部分抑制成骨分化^[71]。Liu等^[72]证明,炎症环境能够导致经典的Wnt/ β -catenin信号通路被过度激活,而抑制非经典Wnt/ Ca^{2+} 通路能促进PDLSCs增殖但是抑制其成骨分化,提示过度激活的经典Wnt信号可能抑制成骨分化^[73]。进一步研究表明,人牙周韧带干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)源性的外泌体能够促进牙槽骨缺损修复。经hPDLSCs来源的外泌体治疗后,Wnt1、Wnt3a和Wnt10a的表达显著降低,导致 β -catenin水平降低,磷酸化GSK3 β (p-GSK3 β)水平升高^[73]。p-GSK3 β 是Wnt信号通路中最重要的负调控因子。这些结果提示,外泌体可能通过抑制Wnt/ β -catenin通路的激活,促进PDLSCs成骨分化和大鼠牙槽骨缺损的修复^[74]。虽然上述研究表明,外泌体通过抑制Wnt/ β -catenin通路促进成骨分化,但是也有一些研究得出相反的结论。Ying等^[75]发现,携带突变型缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的BMSCs来源的外泌体可以通过激活Wnt/ β -catenin信号通路促进新骨形成。因此,MSC-EVs通过Wnt/ β -catenin信号通路调控MSCs成骨分化的作用机制还有待进一步探讨。

综上, MSC-EVs能够通过经典的Wnt/ β -catenin通路调控MSCs成骨分化,但该通路对MSCs成骨分化的影响存在两面性。Wnt/ β -catenin信号的过度激活或抑制都会导致MSCs的成骨分化能力减弱。损伤区的炎症环境能够导致经典Wnt/ β -catenin通路被过度激活,抑制成骨,而MSC-EVs可以通过抑制其激活进行负向调控,从而促进成骨;另有研究证明, MSC-EVs可以通过激活经典Wnt信号通路促进成骨。此外, MSC-EVs通过抑制经典Wnt通路缓解炎症并促进骨再生。提示EVs可能通过参与免疫调节促进成骨分化,但目前针对此方向的研究较少,且多是牙周骨缺损的修复。虽然关于EVs介导的Wnt通路促进骨再生的研究取得了一定成效,但目前仍有很多问题亟待解决,如外泌体调控Wnt通路来促进骨再生的最佳应用浓度等尚不

明确, 未来需要进一步探索。

2.3 MSC-EVs通过激活PI3K/AKT信号通路促进成骨分化

PI3K/AKT信号通路是影响BMSCs成骨和成脂分化的关键信号通路^[76]。PI3K是一种位于胞质的脂类激酶, 在受到上游生长因子刺激后, PI3K被激活, 激活后的PI3K产物磷脂酰肌醇三磷酸(phosphatidylinositol trisphosphate, PIP3)能够结合于丝氨酸/苏氨酸激酶AKT, 继而使AKT由细胞质转位到细胞膜, 同时构象发生变化, 随后引起AKT丝氨酸和苏氨酸位点发生磷酸化, 活化后的AKT能够进一步激活下游靶蛋白, 参与MSCs等细胞的生长、分化等过程^[77,78]。Zhang等^[16]在iPS-MSCs来源的外泌体与 β -TCP联用促进大鼠颅骨缺损模型修复中发现, hBMSCs中PI3K/AKT通路阳性效应基因的表达显著增加, 包括血小板衍生生长因子A(platelet-derived growth factor A, PDGFA)、FGF1/2、FGFR1、I型胶原 α 2链(collagen type 1 alpha 2, COL1A2)和BCL2L1, 这些基因能正向调节MSCs的存活、增殖、迁移、成骨分化或抑制凋亡; 而PI3K/AKT信号的典型负调控因子GSK3 β 和人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten gene, PTEN)水平显著降低^[16]。提示外泌体内化后能够激活hBMSCs中的PI3K/AKT信号通路, 进而刺激hBMSCs增殖分化, 促进骨再生。此外, 有研究显示, hBMSCs来源的外泌体可能通过CD73介导的腺苷受体激活AKT和ERK信号^[55]。成骨细胞增殖、分化和凋亡与多种信号通路相关, 原活化的蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)为信号转导过程中的主要信号分子, ERK为MAPK信号通路的核心成员, 在成骨细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用^[79]。骨损伤区由于细胞应激导致ATP释放增多, 在较短时间内被降解为二磷酸腺苷和腺苷磷酸(adenosine monophosphate, AMP)^[80]。Chew等^[55]将MSCs来源的外泌体与胶原海绵结合修复大鼠牙周缺损模型的研究显示, AMP在CD73介导下水解为腺苷, 通过腺苷受体相互作用激活AKT和ERK磷酸化, 促进IGF-1、骨膜蛋白(periostrin, POSTN)及成骨相关基因表达的增加, 进而促进PDLSCs迁

移、增殖及成骨分化。并且与ERK相比, AKT磷酸化的衰减导致PDLSCs迁移和增殖的更大降低, AKT似乎是MSCs来源的外泌体更关键的靶点^[55]。

综上, MSC-EVs可以通过内化入MSCs后激活PI3K/AKT和MAPK/ERK信号通路促进成骨分化, 且该过程可能与细胞应激时CD73介导的腺苷受体作用有关。EVs通过CD73介导AMP水解为腺苷, 进而激活AKT和ERK磷酸化, 促进成骨分化, 而AKT在其中发挥主要作用。然而, 由于MSC-EVs内部货物十分复杂并且高度多样, 其中的FGF等生长因子也可能会激活牙周细胞中的AKT和ERK信号通路。因此, CD73介导的腺苷受体激活促进生存AKT和ERK信号通路的贡献率以及其他介导通路是否也有关键作用等问题有待进一步研究。

3 MSC-EVs通过促进血管生成修复骨缺损

骨骼是血管丰富的组织, 脉管系统能够为骨骼提供氧气和营养, 去除代谢产物, 同时也是激素和生长因子向骨骼系统传递的主要途径, 对骨骼的发育和再生至关重要^[81,82]。此外, 血液供应能够诱导成骨细胞的迁移和骨组织的矿化, 加速骨缺损的再生, 是骨再生的关键。据报道, 骨缺损治疗中移植植物植入后成活的关键在于维持其核心的细胞活力, 而移植植物核心细胞活力的维持取决于组织工程移植植物内血管的快速生成^[82]。研究表明, MSC-EVs可以刺激骨内血管生成, 是促进骨再生的重要机制^[83]。有研究显示, 低剂量二甲基乙二酰基甘氨酸(dimethylolxalylglycine, DMOG)预处理获得的MSC(DMOG-MSCs)来源的外泌体可以改善骨再生, 增加血液灌注和微血管数量, 在治疗临界颅骨缺损大鼠模型时, 效果显著优于对照组^[84]。基因分析发现, 与对照组相比, DMOG-MSCs来源的外泌体组人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中血管生成分化相关的经典通路关键成分的表达显著提高, PTEN和p53、p21等调控细胞凋亡的关键因子表达显著下调^[84]。PTEN是PI3K激酶信号通路的内源性负调控因子, 可诱导AKT激酶和磷酸肌醇激酶家族中的保守蛋白激酶mTOR的抑制, 从而抑制内皮细胞的血管增殖^[85]。PI3K/AKT信号通路是磷酸化mTOR发挥调控自噬作用的重要生物信号之

一, AKT激酶活化后进而激活其下游mTOR^[85]。mTOR的激活会导致PTEN的下调, 从而进一步减弱其对AKT/mTOR通路的抑制作用, 形成正反馈回路, 促进通路的激活^[85]。研究显示, DMOG-MSCs来源的外泌体显著提高了PTEN的下游靶点HUVECs中p-AKT、mTOR和p-mTOR的表达水平, 而当AKT/mTOR通路被AKT激酶抑制剂MK2206阻断后, DMOG-MSCs来源的外泌体不具有优越的促血管生成能力^[84]。因此, 可以证明DMOG刺激的BMSCs来源的外泌体主要通过靶向AKT/mTOR通路来促进骨血管生成, 从而促进大鼠临界骨缺损的骨再生。此外, Wu等^[53]研究显示, SHEDs来源的外泌体可以使血管生成相关基因血管内皮生长因子-A(vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A)、VEGF受体KDR(kinase insert domain receptor)、FGF2和基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)等表达上调, 并促进HUVECs的血管生成和BMSCs的成骨, 有助于牙槽骨缺损的修复。研究发现, 经SHEDs来源的外泌体处理过的细胞中, 腺苷-磷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, p-AMPK)表达上调明显, 而经p-AMPK抑制剂处理后, 外泌体促进HUVECs血管形成的能力降低, 此外, p-AMPK、血管生成相关基因(*KDR* *SDF-1*)和成骨相关基因(*RUNX2*和*OPN*)的表达均下调^[53]。AMPK信号通路与细胞的能量代谢密切相关, 影响血管形成。因此, 上述结果提示, SHEDs来源的外泌体可能通过AMPK信号通路促进血管新生, 从而加速牙周骨再生。

综上, MSC-EVs可以刺激骨缺损区血管生成, 这是促进骨再生修复的重要机制。MSC-EVs能够通过递送内部活性物质到靶细胞, 从而调控PTEN、VEGF-A和FGF2等下游靶基因达到促进骨血管生成的作用, 上述过程可能跟AKT/mTOR信号通路或AMPK信号通路的激活有关。然而, 在BTE中, 诱导MSC-EVs发挥促血管生成的内在机制及其应用研究尚不成熟, 仍存在多项问题亟待解决: (1)何种剂量的DMOG处理才能使MSC-EVs更好地发挥其促血管生成作用?(2) DMOG等因子处理后, MSC-EVs促进血管生成的具体机制是什么?(3)通过影响EVs内部货物的表达谱提升其促血管生

成能力的低成本的、最佳的方式是什么?

4 MSC-EVs通过调控免疫反应修复骨缺损

外伤和肿瘤引起的骨缺损通常伴有外周炎症和免疫紊乱的特征。目前广泛应用于骨组织修复的生物材料也常诱发免疫反应和炎症, 导致失败的植入^[86,87]。以往研究显示, 免疫细胞及其代谢物形成的免疫微环境在骨再生过程中发挥关键的作用, 能够参与调节生长因子、趋化因子和炎症因子等分子的表达, 从而影响成骨细胞和破骨细胞的活性^[88,89]。炎症刺激能够募集MSCs到损伤部位增殖和分化, 最终促进组织愈合, 这可能与MSC-EVs介导的免疫反应和对巨噬细胞极化的调控有关^[90]。巨噬细胞作为天然免疫的防御细胞, 在清除病原体和调节炎症反应方面发挥着重要作用^[91]。M1型巨噬细胞主要分泌促炎因子, 发挥促炎和免疫清除的作用, 杀死病原体和肿瘤细胞, 但M1的过度激活会造成免疫损伤; 而M2型巨噬细胞主要分泌抗炎和生长因子, 广泛参与抗炎和组织愈合, 促进M2巨噬细胞表型极化可有效促进骨血管生成和骨愈合^[92,93]。多项研究显示, 在体内复杂的环境下, EVs不仅作用于干细胞, 还能影响免疫细胞的活性, 促进巨噬细胞等非MSCs分泌成骨生长因子BMP2, 加速损伤骨组织愈合^[94,95], 此外, 通过减轻炎症反应来促进成骨分化也已经得到广泛认可^[96]。Wang等^[97]通过聚多巴胺表面修饰后的PCL支架结合s-亚硝基谷胱甘肽衍生物(S-nitrosoglutathione, GSNO)和MSCs来源的外泌体构建了具有免疫调节潜能的PCL支架。结果显示, 外泌体能够内化入巨噬细胞, 与对照组相比, 外泌体联合GSNO组炎症基因表达显著降低, 可以有效减轻炎症反应, 促进愈合过程。由于GSNO能够通过持续释放一氧化氮调节免疫应答, 该结果可能是MSCs来源的外泌体内部货物的调节作用, 也可能是GSNO与MSCs来源的外泌体的协同作用^[98]。为了进一步证明MSCs来源的外泌体内的生物活性分子对MSCs来源的外泌体的抗炎潜能是否发挥关键作用, 促进调节免疫反应, Li等^[29]对骨缺损修复中ADSCs来源的外泌体内高表达的miR-451a进行了进一步分析。研究通过将miR-451a类似物和miR-451a抑制剂转染到巨噬细胞中, 发现miR-

451a能够特异性结合巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)mRNA的3'UTR, 从而促进巨噬细胞M1-to-M2极化^[29]。MIF是一种多因子促炎介质, 能够参与免疫调节, MIF抑制剂可以抑制巨噬细胞的激活和炎症因子的表达^[99]。因此, 上述结果证明MSCs来源的外泌体中miR-451a是一种有效的抗炎因子, 这也证明了MSCs来源的外泌体内的生物活性分子在MSCs来源的外泌体的抗炎潜能中发挥关键作用, 有助于促进组织修复和再生^[97,100]。先前也有研究显示, 经脂多糖预处理的MSCs来源的外泌体能够促进炎症减轻和损伤愈合, 而MSCs来源的外泌体内部let-7b和蛋白质是发挥该作用的关键物质^[101]。进一步研究证明, MSCs来源的外泌体可能通过激活骨免疫调节通路骨保护素(osteoprotegerin, OPG)/核因子- κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)/核因子- κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)信号通路促进骨缺损修复^[95,102]。骨免疫调节通路OPG/RANK/RANKL通过其在破骨细胞激活、抑制和炎症反应中的关键功能参与骨吸收^[103]。成骨细胞分泌的RANKL能够与RANK结合激活破骨细胞。OPG可竞争性结合RANKL, 阻断RANKL-RANK结合, 从而抑制破骨细胞活性激活破骨细胞^[103]。因此, 骨代谢的平衡取决于OPG与RANKL

的表达比。Shi等^[101]研究显示, 水凝胶联合BMSC-EVs应用促进牙周骨再生时, BMSC-EVs通过调节OPG和RANKL的表达抑制破骨细胞活性, 抑制牙周炎大鼠的骨吸收, 促进骨组织修复。

综上, MSC-EVs主要通过递送其内部货物, 例如miR-451a和let-7b等, 促进巨噬细胞M1向M2极化, 从而参与骨免疫调节, 最终促进骨组织再生。研究显示, 在炎症导致的骨损伤修复中, MSC-EVs可能主要通过激活骨免疫调节通路OPG/RANK/RANKL, 抑制破骨活性, 减少骨吸收来促进骨再生。多项研究均肯定了MSC-EVs参与免疫调节, 有效促进损伤修复的作用。但目前对于BMSC-EVs参与免疫调节研究尚不全面, 且多集中于牙周损伤方面。此外, MSC-EVs参与免疫调控以及抑制破骨的具体机制研究仍不清晰, 需要进一步实验验证。

5 小结与展望

MSC-EVs介导的BTE中, 常通过支架和水凝胶等骨移植材料联合或单独使用作为桥接结构, 通过选择合适的供体及亲本细胞, 获得具有较好成骨诱导潜能的EVs, 进而促进缺损处骨组织再生。MSC-EVs内部活性物质, 尤其是miRNAs, 在成骨分化、血管生成、免疫调节和破骨细胞活性抑制等方面均展现出重要的调控作用(图1)。在BTE中, 常通过影响EVs内部的miRNAs等活性分

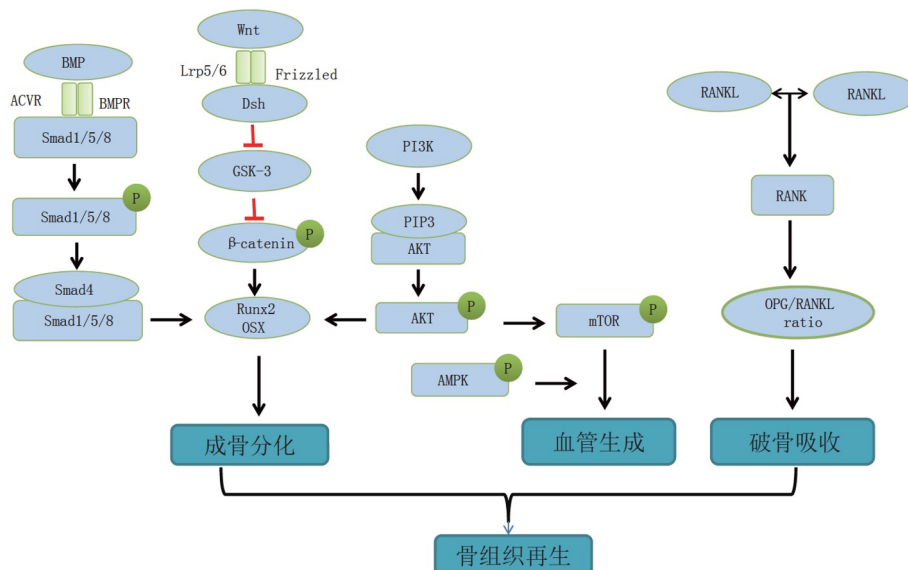


图1 MSC-EVs修复骨缺损作用机制示意图

子的表达谱, 激活或抑制BMP/Smad、Wnt/ β -catenin和PI3K/AKT等骨代谢相关的关键信号通路来促进骨形成, 或者通过激活AKT/mTOR信号通路和/或AMPK信号通路强化骨血管生成间接促进成骨, 最终改善骨缺损修复。此外, 多项研究显示, EVs可以参与免疫调节, 通过促进巨噬细胞M1向M2极化, 减轻炎症反应。EVs可能主要通过调控OPG/RANK/RANKL通路, 抑制破骨细胞活性, 减少骨吸收, 进而加速骨再生。作为无细胞骨缺损修复的有效媒介, EVs能够避免MSCs移植可能出现的免疫排斥、伦理问题以及肿瘤发生等风险, 展现出无限的应用潜能。但不可否认的是, 目前有关EVs的应用方式以及其对骨再生影响的研究尚不够深入。研究显示, MSCs来源的外泌体内包含丰富的核酸、蛋白质和脂质, 理论上, EVs的作用很有可能是多种成分的结合, 但目前研究局限于常见的miRNAs, 对EVs作用机制的探究远远不够。因此, EVs在各种细胞环境下促进血管生成、细胞迁移和骨再生的有效活性分子有待进一步研究证实, 除miRNAs外的其他物质是否也参与调控常见的成骨、破骨及血管生成相关信号通路等问题还需要进一步研究。毫无疑问, EVs对骨缺损修复的更安全有效的应用和机制研究将是未来一段时间的重要热点之一。

参考文献

- [1] Shang F, Yu Y, Liu S, et al. Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioact Mater*, 2021, 6(3): 666-683
- [2] Baldwin P, Li DJ, Auston DA, et al. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. *J Orthop Trauma*, 2019, 33(4): 203-213
- [3] Yu W, Li S, Guan X, et al. Higher yield and enhanced therapeutic effects of exosomes derived from MSCs in hydrogel-assisted 3D culture system for bone regeneration. *Biomater Adv*, 2022, 133: 112646
- [4] Stahl A, Yang YP. Regenerative approaches for the treatment of large bone defects. *Tissue Eng Part B Rev*, 2021, 27(6): 539-547
- [5] Behrend C, Carmouche J, Millhouse PW, et al. Allogeneic and autogenous bone grafts are affected by historical donor environmental exposure. *Clin Orthopaedics Relat Res*, 2016, 474(6): 1405-1409
- [6] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*, 1993, 260(5110): 920-926
- [7] Roseti L, Parisi V, Petretta M, et al. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 78: 1246-1262
- [8] Wu D, Chang X, Tian J, et al. Bone mesenchymal stem cells stimulation by magnetic nanoparticles and a static magnetic field: release of exosomal miR-1260a improves osteogenesis and angiogenesis. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 209
- [9] Fu QL, Chow YY, Sun SJ, et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells modulate T-cell phenotypes in allergic rhinitis. *Allergy*, 2012, 67(10): 1215-1222
- [10] Qin Y, Wang L, Gao Z, et al. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation *in vitro* and promote bone regeneration *in vivo*. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 21961
- [11] Silva DD, Paz AHR, Portinho CP, et al. Reconstruction of parietal bone defects with adiposederived mesenchymal stem cells. Experimental study. *Acta Cir Bras*, 2021, 35(12): e351201
- [12] Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, et al. Tissue engineering and cell-based therapies for fractures and bone defects. *Front Bioeng Biotechnol*, 2018, 6: 105
- [13] Kang Y, Xu C, Meng L, et al. Exosome-functionalized magnesium-organic framework-based scaffolds with osteogenic, angiogenic and anti-inflammatory properties for accelerated bone regeneration. *Bioactive Mater*, 2022, 18: 26-41
- [14] Konala VBR, Mamidi MK, Bhonde R, et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*, 2016, 18(1): 13-24
- [15] Liang X, Ding Y, Zhang Y, et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant*, 2014, 23(9): 1045-1059
- [16] Zhang J, Liu X, Li H, et al. Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 136
- [17] Zhou X, Cao H, Guo J, et al. Effects of BMSC-derived EVs on bone metabolism. *Pharmaceutics*, 2022, 14(5): 1012
- [18] Li QC, Li C, Zhang W, et al. Potential effects of exosomes and their microRNA carrier on osteoporosis. *Curr Pharm Des*, 2022, 28(11): 899-909
- [19] Witwer KW, Van Balkom BWM, Bruno S, et al. Defining mesenchymal stromal cell (MSC)-derived small extracellular vesicles for therapeutic applications.

- J Extracell Vesicles*, 2019, 8(1): 1609206
- [20] Malekpour K, Hazrati A, Zahar M, et al. The potential use of mesenchymal stem cells and their derived exosomes for orthopedic diseases treatment. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(3): 933-951
- [21] Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of exosome composition. *Cell*, 2019, 177(2): 428-445.e18
- [22] Xie Y, Chen Y, Zhang L, et al. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(5): 1033-1041
- [23] Gao M, Gao W, Papadimitriou JM, et al. Exosomes—the enigmatic regulators of bone homeostasis. *Bone Res*, 2018, 6(1): 36
- [24] Toh WS, Lai RC, Hui JHP, et al. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 67: 56-64
- [25] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(8): 509-524
- [26] Feng Q, Zheng S, Zheng J. The emerging role of microRNAs in bone remodeling and its therapeutic implications for osteoporosis. *Biosci Rep*, 2018, 38(3): BSR20180453
- [27] Zhou X, Cao H, Wang M, et al. Moderate-intensity treadmill running relieves motion-induced post-traumatic osteoarthritis mice by up-regulating the expression of lncRNA H19. *Biomed Eng Online*, 2021, 20(1): 111
- [28] Xu JF, Yang G, Pan XH, et al. Altered microRNA expression profile in exosomes during osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114627
- [29] Li R, Li D, Wang H, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells regulate M1/M2 macrophage phenotypic polarization to promote bone healing via miR-451a/MIF. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 149
- [30] Rahman MJ, Regn D, Bashratyan R, et al. Exosomes released by islet-derived mesenchymal stem cells trigger autoimmune responses in NOD mice. *Diabetes*, 2014, 63(3): 1008-1020
- [31] Zhang Y, Chopp M, Meng Y, et al. Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 2015, 122(4): 856-867
- [32] Yang X, Yang J, Lei P, et al. LncRNA MALAT1 shuttled by bone marrow-derived mesenchymal stem cells-secreted exosomes alleviates osteoporosis through mediating microRNA-34c/SATB2 axis. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(20): 8777-8791
- [33] Qin Y, Sun R, Wu C, et al. Exosome: a novel approach to stimulate bone regeneration through regulation of osteogenesis and angiogenesis. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 712
- [34] Tan SSH, Tjio CKE, Wong JRY, et al. Mesenchymal stem cell exosomes for cartilage regeneration: a systematic review of preclinical *in vivo* studies. *Tissue Eng Part B Rev*, 2021, 27(1): 1-13
- [35] Zhu Y, Jia Y, Wang Y, et al. Impaired bone regenerative effect of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells in type 1 diabetes. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(6): 593-605
- [36] Behera J, Tyagi N. Exosomes: mediators of bone diseases, protection, and therapeutics potential. *Oncoscience*, 2018, 5(5-6): 181-195
- [37] Li W, Liu Y, Zhang P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(6): 5240-5254
- [38] Zhang Y, Xie Y, Hao Z, et al. Umbilical mesenchymal stem cell-derived exosome-encapsulated hydrogels accelerate bone repair by enhancing angiogenesis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(16): 18472-18487
- [39] Wang D, Cao H, Hua W, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for bone defect repair. *Membranes (Basel)*, 2022, 12(7): 716
- [40] Garza JR, Campbell RE, Tjoumakaris FP, et al. Clinical efficacy of intra-articular mesenchymal stromal cells for the treatment of knee osteoarthritis: a double-blinded prospective randomized controlled clinical trial. *Am J Sports Med*, 2020, 48(3): 588-598
- [41] Zhang S, Wong KL, Ren X, et al. Mesenchymal stem cell exosomes promote functional osteochondral repair in a clinically relevant porcine model. *Am J Sports Med*, 2022, 50(3): 788-800
- [42] McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 2006, 24(5): 1246-1253
- [43] Liu A, Lin D, Zhao H, et al. Optimized BMSC-derived osteoinductive exosomes immobilized in hierarchical scaffold via lyophilization for bone repair through Bmpr2/Acvr2b competitive receptor-activated Smad pathway. *Biomaterials*, 2021, 272: 120718
- [44] Hu G, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 10
- [45] Hendijani F, Sadeghi-Aliabadi H, Haghjooy Javanmard S. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical

- cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Bank*, 2014, 15(4): 555-565
- [46] Ando Y, Matsubara K, Ishikawa J, et al. Stem cell-conditioned medium accelerates distraction osteogenesis through multiple regenerative mechanisms. *Bone*, 2014, 61: 82-90
- [47] Wang L, Wang J, Zhou X, et al. A new self-healing hydrogel containing hucMSC-derived exosomes promotes bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 564731
- [48] Jiang Z, Liu Y, Niu X, et al. Exosomes secreted by human urine-derived stem cells could prevent kidney complications from type I diabetes in rats. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 24
- [49] Lian Q, Zhang Y, Zhang J, et al. Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*, 2010, 121(9): 1113-1123
- [50] Martinez Saez D, Sasaki RT, Neves AC, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth: a growing literature. *Cells Tissues Organs*, 2016, 202(5-6): 269-280
- [51] Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, et al. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endods*, 2009, 35(11): 1536-1542
- [52] Wang L, Zhao Y, Shi S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes. *J Dent Res*, 2012, 91(11): 1003-1010
- [53] Wu J, Chen L, Wang R, et al. Exosomes secreted by stem cells from human exfoliated deciduous teeth promote alveolar bone defect repair through the regulation of angiogenesis and osteogenesis. *ACS Biomater Sci Eng*, 2019, 5(7): 3561-3571
- [54] Gómez-Barrena E, Rosset P, Gebhard F, et al. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials*, 2019, 196: 100-108
- [55] Chew JRJ, Chuah SJ, Teo KYW, et al. Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration. *Acta Biomater*, 2019, 89: 252-264
- [56] Tang Z, Wang Z, Qing F, et al. Bone morphogenetic protein Smads signaling in mesenchymal stem cells affected by osteoinductive calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res A*, 2015, 103(3): 1001-1010
- [57] Mi M, Jin H, Wang B, et al. Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing. *Gene*, 2013, 512(2): 211-218
- [58] Zhou X, Cao H, Yuan Y, et al. Biochemical signals mediate the crosstalk between cartilage and bone in osteoarthritis. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1-8
- [59] Kawabata M. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1998, 9(1): 49-61
- [60] Gamer LW, Tsuji K, Cox K, et al. BMPR-II is dispensable for formation of the limb skeleton. *genesis*, 2011, 49(9): 719-724
- [61] Watanabe H, Shionyu M, Kimura T, et al. Splicing factor 3b subunit 4 binds BMPR-IA and inhibits osteochondral cell differentiation. *J Biol Chem*, 2007, 282(28): 20728-20738
- [62] Olsen OE, Wader KF, Hella H, et al. Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Commun Signal*, 2015, 13(1): 27
- [63] Huang CC, Kang M, Lu Y, et al. Functionally engineered extracellular vesicles improve bone regeneration. *Acta Biomater*, 2020, 109: 182-194
- [64] Murakami G, Watabe T, Takaoka K, et al. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(7): 2809-2817
- [65] Lu L, Wu M, Lu Y, et al. MicroRNA-424 regulates cisplatin resistance of gastric cancer by targeting SMURF1 based on GEO database and primary validation in human gastric cancer tissues. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 7623-7636
- [66] Fan J, Lee CS, Kim S, et al. Generation of small RNA-modulated exosome mimetics for bone regeneration. *ACS Nano*, 2020, 14(9): 11973-11984
- [67] Fan J, Im CS, Guo M, et al. Enhanced osteogenesis of adipose-derived stem cells by regulating bone morphogenetic protein signaling antagonists and agonists. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(4): 539-551
- [68] Zhong Z, Ethen NJ, Williams BO. WNT signaling in bone development and homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2014, 3(6): 489-500
- [69] Bejsovec A. Wnt pathway activation. *Cell*, 2005, 120(1): 11-14
- [70] Heo JS, Lee SY, Lee JC. Wnt/ β -catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cells*, 2010, 30(5): 449-454
- [71] Liu G, Vijayakumar S, Grumolato L, et al. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *J Cell Biol*, 2009, 185(1): 67-75

- [72] Liu N, Shi S, Deng M, et al. High levels of β -catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(9): 2082-2095
- [73] Tomokiyo A, Wada N, Maeda H. Periodontal ligament stem cells: regenerative potency in periodontium. *Stem Cells Dev*, 2019, 28(15): 974-985
- [74] Lei F, Li M, Lin T, et al. Treatment of inflammatory bone loss in periodontitis by stem cell-derived exosomes. *Acta Biomater*, 2022, 141: 333-343
- [75] Ying C, Wang R, Wang Z, et al. BMSC-Exosomes carry mutant HIF-1 α for improving angiogenesis and osteogenesis in critical-sized calvarial defects. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 565561
- [76] Huang X, Huang D, Zhu T, et al. Sustained zinc release in cooperation with CaP scaffold promoted bone regeneration via directing stem cell fate and triggering a pro-healing immune stimuli. *J Nanobiotechnol*, 2021, 19(1): 207
- [77] Fu H, Jin C, Zhu Q, et al. Dysregulated expressions of PTEN, NF- κ B, WWP2, p53 and c-Myc in different subtypes of B cell lymphoma and reactive follicular hyperplasia. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 1092-1101
- [78] Sandova V, Pavlasova GM, Seda V, et al. IL4-STAT6 signaling induces CD20 in chronic lymphocytic leukemia and this axis is repressed by PI3K δ inhibitor idelalisib. *Haematologica*, 2021, 106(11): 2995-2999
- [79] Liu H, Zheng X, Chen L, et al. Negative pressure wound therapy promotes muscle-derived stem cell osteogenic differentiation through MAPK pathway. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(1): 511-520
- [80] 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. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 301-312
- [81] Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedwiedzki, et al. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*, 2017, 20(3): 291-302
- [82] Grosso A, Burger MG, Lunger A, et al. It takes two to tango: coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, 2017, 5: 68
- [83] Liu X, Li Q, Niu X, et al. Exosomes secreted from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(2): 232-244
- [84] Liang B, Liang JM, Ding JN, et al. Dimethylxaloylglycine-stimulated human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes enhance bone regeneration through angiogenesis by targeting the AKT/mTOR pathway. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 335
- [85] Maity S, Das F, Ghosh-Choudhury N, et al. High glucose increases miR-214 to power a feedback loop involving PTEN and the Akt/mTORC1 signaling axis. *FEBS Lett*, 2019, 593(16): 2261-2272
- [86] Terashima A, Takayanagi H. The role of bone cells in immune regulation during the course of infection. *Semin Immunopathol*, 2019, 41(5): 619-626
- [87] Guder C, Gravius S, Burger C, et al. Osteoimmunology: a current update of the interplay between bone and the Immune system. *Front Immunol*, 2020, 11: 58
- [88] Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, et al. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 2016, 86: 119-130
- [89] Chen Z, Chen L, Liu R, et al. The osteoimmunomodulatory property of a barrier collagen membrane and its manipulation via coating nanometer-sized bioactive glass to improve guided bone regeneration. *Biomater Sci*, 2018, 6(5): 1007-1019
- [90] Liu H, Li D, Zhang Y, et al. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4): 393-404
- [91] Bozec A, Soulat D. Latest perspectives on macrophages in bone homeostasis. *Pflugers Arch*, 2017, 469(3-4): 517-525
- [92] Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials*, 2015, 37: 194-207
- [93] Wasnik S, Rundle CH, Baylink DJ, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D suppresses M1 macrophages and promotes M2 differentiation at bone injury sites. *JCI Insight*, 2018, 3(17): e98773
- [94] Wang X, Thomsen P. Mesenchymal stem cell—derived small extracellular vesicles and bone regeneration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2021, 128(1): 18-36
- [95] Liu L, Guo S, Shi W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles promote periodontal regeneration. *Tissue Eng Part A*, 2021, 27(13-14): 962-976
- [96] Sadowska JM, Ginebra MP. Inflammation and biomaterials: role of the immune response in bone regeneration by inorganic scaffolds. *J Mater Chem B*, 2020, 8(41): 9404-9427
- [97] Wang X, Ao J, Lu H, et al. Osteoimmune modulation and guided osteogenesis promoted by barrier membranes

- incorporated with S-nitrosoglutathione (GSNO) and mesenchymal stem cell-derived exosomes. [Int J Nanomedicine](#), 2020, 15: 3483-3496
- [98] Ferguson SW, Wang J, Lee CJ, et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view. [Sci Rep](#), 2018, 8(1): 1419
- [99] Barbosa de Souza Rizzo M, Brasilino de Carvalho M, Kim EJ, et al. Oral squamous carcinoma cells promote macrophage polarization in an MIF-dependent manner. [QJM](#), 2018, 111(11): 769-778
- [100] Phinney DG, Pittenger MF. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. [Stem Cells](#), 2017, 35(4): 851-858
- [101] Shi W, Guo S, Liu L, et al. Small extracellular vesicles from lipopolysaccharide-preconditioned dental follicle cells promote periodontal regeneration in an inflammatory microenvironment. [ACS Biomater Sci Eng](#), 2020, 6(10): 5797-5810
- [102] Zhang Y, Xiong Y, Chen X, et al. Therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells pretreated with acetylsalicylic acid on experimental periodontitis in rats. [Int Immunopharmacol](#), 2018, 54: 320-328
- [103] Liu Y, Zhang X, Sun X, et al. Abnormal bone remodelling activity of dental follicle cells from a cleidocranial dysplasia patient. [Oral Dis](#), 2018, 24(7): 1270-1281