

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2025.05.005
文章编号: 1005-8982 (2025) 05-0024-08

实验研究·论著

低氧条件下M2型巨噬细胞外泌体对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响机制*

吕梦姣¹, 杨毅², 田晓寒¹, 廖礼彬¹, 阿不都热西提·库提彼丁²,
王梦慈¹, 周晓丹¹, 袁孙强¹, 白生宾¹

[1. 新疆医科大学基础医学院 组织学与胚胎学教研室(新疆地方病分子生物学重点实验室),
新疆 乌鲁木齐, 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院 骨科,
新疆 乌鲁木齐, 830011]

摘要: **目的** 探究低氧条件下M2型巨噬细胞外泌体对骨髓间充质干细胞(BMSCs)成骨分化的影响机制。**方法** 将鼠源性巨噬细胞系(RAW264.7)与鼠源性BMSCs系CP-M131细胞培养至第3代,用白细胞介素-4诱导巨噬细胞极化为M2型巨噬细胞,提取并鉴定常氧与低氧培养条件下M2型巨噬细胞的外泌体。将CP-M131细胞分为PBS组、N-M2 exo组与H-M2 exo组,分别与PBS、90 ng/mL N-M2 exo及90 ng/mL H-M2 exo共孵育72 h。孵育结束后,通过免疫荧光观察BMSCs系CP-M131细胞对不同氧气条件下M2型巨噬细胞外泌体的摄取情况。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)与Western blotting检测BMSCs中摄取不同实验组外泌体后骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、碱性磷酸酶(ALP)、成骨特异性转录因子(Runx)基因和蛋白表达,以及细胞外调节蛋白激酶(ERK)、磷酸化ERK(p-ERK)的蛋白表达。采用ALP染色评估不同氧气条件下M2型巨噬细胞外泌体对BMSCs成骨能力的影响。**结果** 成功诱导巨噬细胞极化为M2型巨噬细胞,且提取到不同处理组的外泌体。qRT-PCR和Western blotting结果表明,与N-M2 exo组比较,H-M2 exo组的CP-M131细胞BMP-2、ALP、Runx基因和蛋白表达均上调($P < 0.05$);H-M2 exo组的ERK与p-ERK蛋白表达均上调($P < 0.05$)。ALP染色观察到低氧条件下M2型巨噬细胞外泌体促进CP-M131细胞成骨分化。**结论** 低氧条件下M2型巨噬细胞外泌体可以促进BMSCs成骨分化。

关键词: 骨髓间充质干细胞; M2型巨噬细胞; 外泌体; 骨分化; 氧条件

中图分类号: R683

文献标识码: A

Mechanism of M2 macrophage-derived exosomes on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxic conditions*

Lü Meng-jiao¹, Yang Yi², Tian Xiao-han¹, Liao Li-bin¹, Kutibiding·Abudurexiti²,
Wang Meng-ci¹, Zhou Xiao-dan¹, Yuan Sun-qiang¹, Bai Sheng-bin¹

[1. Department of Histology and Embryology, Xinjiang Medical University School of Basic Medical Sciences
(Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases), Urumqi, Xinjiang 830011, China;
2. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,
Urumqi, Xinjiang 830011, China]

收稿日期: 2024-10-21

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82160356, No: 82160218); 青年科技拔尖人才项目(No: 2022TSYCCX0100); 省部共建中亚高发
病成因与防治国家重点实验室项目(No: SKL-HIDCA-2024-GX1)

[通信作者] 白生宾, E-mail: bsbxx@126.com; Tel: 15199131718

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which exosomes derived from M2 macrophages under hypoxic conditions regulate the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Murine macrophage line RAW264.7 and murine BMSC line CP-M131 were cultured to the third passage. Macrophages were polarized to M2 phenotype using interleukin-4. Exosomes from M2 macrophages cultured under normoxic (N-M2 exo) and hypoxic (H-M2 exo) conditions were extracted and characterized. CP-M131 cells were divided into PBS group, N-M2 exo group (treated with 90 ng/mL N-M2 exo), and H-M2 exo group (treated with 90 ng/mL H-M2 exo) for 72 hours. Exosome uptake by BMSCs was observed via immunofluorescence. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect mRNA and protein expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), Alkaline phosphatase (ALP), Runt-related transcription factor (Runx), extracellular signal-regulated kinase (ERK), and phosphorylated ERK (p-ERK). ALP staining was performed to assess osteogenic differentiation. **Results** M2 macrophage polarization and exosome isolation were successfully achieved. Compared to the N-M2 exo group, the H-M2 exo group exhibited significantly upregulated mRNA and protein expression of BMP-2, ALP, and Runx in CP-M131 cells ($P < 0.05$). ERK and p-ERK protein expression were also elevated in the H-M2 exo group ($P < 0.05$). ALP staining confirmed enhanced osteogenic differentiation in the H-M2 exo group. **Conclusion** Hypoxic M2 macrophage-derived exosomes promote osteogenic differentiation of BMSCs through ERK pathway activation.

Keywords: bone marrow mesenchymal stem cell; M2 macrophages; exosomes; osteogenesis; hypoxia

骨折是最常见的创伤类型之一,大约10%的骨折损伤无法正常愈合。作为对骨损伤做出反应的再生过程,骨折愈合包括了胚胎骨骼发育过程中的许多生物事件,涉及多种细胞类型和分子信号的相互作用,每个过程协调有序完成,恢复骨骼的正常生理结构与功能。其中,骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)和M2型巨噬细胞在这一过程中扮演着关键角色^[1]。BMSCs能够分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等,是骨缺损修复和骨再生治疗的关键细胞类型^[1]。与此同时,M2型巨噬细胞也具有促进细胞增殖和组织修复的作用,其可以分泌转化生长因子(transforming growth factor, TGF)诱导BMSCs迁移、增殖,并且M2型巨噬细胞外泌体可以通过传递microRNA-22-3p促进BMSCs成骨分化。

BMSCs的成骨分化能力受多种因素的影响,包括细胞外环境、细胞通信及与免疫系统的相互作用。有研究发现,BMSCs的迁移和分化能力受到氧浓度的调节^[2]。BMSCs在低氧条件下可能会改变其分化方向,更倾向于向软骨细胞而非成骨细胞分化^[3]。此外,在骨折损伤的低氧微环境下,骨折损伤修复会通过BMSCs成骨分化来实现,且巨噬细胞的调节作用加速了这一进程^[3-4]。巨噬细胞是免疫系统的关键调节者,其通过极化为不同的表型参与组织修复和炎症反应。特别是M2型巨噬细胞,已被证明在促进组织修复和抑制炎症中发挥作用^[4]。

外泌体是细胞通信的重要介质,其携带蛋白质、脂质、mRNA和microRNA等生物分子,能够调节受体细胞的功能^[3,5]。研究表明,M2型巨噬细胞能够通过分泌细胞因子和外泌体等介质影响邻近细胞的行为,包括BMSCs的成骨分化^[5]。

低氧环境是许多病理状态下的共同特征,如肿瘤生长、缺血和炎症。在这些条件下,细胞的代谢和功能会发生显著变化,包括细胞分化和增殖。尽管已有研究表明低氧条件可以影响BMSCs的成骨分化,但低氧环境下M2型巨噬细胞外泌体对BMSCs成骨分化的具体作用尚不清楚。低氧条件可能通过改变外泌体的组成和功能,进而影响BMSCs的生物学行为。因此,本研究探讨不同氧气条件下M2型巨噬细胞外泌体对BMSCs成骨分化的影响,为深入了解骨折愈合的生物学机制及其治疗提供新的策略和靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鼠源性的巨噬细胞系RAW264.7细胞(武汉博士德生物工程有限公司),鼠源性的BMSCs系CP-M131细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司)。胎牛血清、青霉素、链霉素混合液(100 u/mL)(武汉普诺赛生命科技有限公司),DMEM培养基(上海达特希尔生物科技有限公司),高效RIPA裂解液、PMSF试剂(蛋白酶抑制剂)(北京索莱宝科技有限公司),

TransZol U 强化 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司),兔抗 Tsg101 单克隆抗体、兔抗 CD63 单克隆抗体(A25326、A222343,武汉爱博泰克生物科技有限公司),碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、成骨特异性转录因子(runt-related transcription factor, Runx)单克隆抗体(ab307726、ab214821、ab236639,英国 Abcam 公司),Actin 单克隆抗体(GB15001-100,武汉赛维尔生物科技有限公司),细胞质染色试剂盒[和元李记(上海)生物技术有限公司],DiI 染色剂、白细胞介素-4(Interleukin-4, IL-4)试剂[赛默飞世尔科技(中国)有限公司],ALP 染色试剂盒(改良 Gomori 钙钴法)(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及 M2 型巨噬细胞极化 首先复苏 CP-M131 细胞与 RAW264.7 细胞,培养于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中,待细胞融合度达 75%~95% 进行传代或冻存。RAW264.7 细胞分为 PBS 组、10 ng/mL IL-4 共培养组。RAW264.7 细胞中加入 10 ng/mL IL-4 极化为 M2 型巨噬细胞,共孵育 12 h。

1.2.2 细胞染色 取 1×10^4 个 CP-M131 和 RAW264.7 细胞分别放入专用激光共聚焦皿中,置恒温培养箱中培养 24 h,细胞置于 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗,鬼笔环肽 150 μ L 避光孵育 1 h,清洗后置于黑色避光孵育盒中避免光照,滴加细胞核染色试剂,室温 5 min,清洗后用共聚焦显微镜观察细胞形态并进行描述。

1.2.3 细胞分组及干预 将培养的 CP-M131 细胞分为 PBS 组、常氧 M2 型巨噬细胞外泌体组(N-M2 exo 组)、低氧 M2 型巨噬细胞外泌体组(H-M2 exo 组)。N-M2 exo 组、H-M2 exo 组细胞分别与 90 ng/mL 的 N-M2 exo 和 90 ng/mL 的 H-M2 exo 共孵育 72 h, PBS 组则与相同浓度的 PBS 共孵育 72 h。N-M2 exo 组细胞培养于常规条件(37 °C、5% CO₂), H-M2 exo 组细胞培养于缺氧条件(约 95% N₂ 和 5% CO₂)。

1.2.4 外泌体的分离及收集 置于 37 °C 5% CO₂ 和 37 °C 1% O₂ 的环境下培养 RAW264.7 细胞 24 h,收集并提取不同培养环境下来源的细胞上清液中的外泌体;样本放置于 50 mL 离心管,于高速冷冻离心机上离心 30 min(4 °C, 14 000 r/min),收集上清液;采

用 0.22 μ m 针式滤器用 PBS 润湿后,过滤之前离心的样本上清液;将过滤后的样本,转移到 Himac 超速离心机专用超离管中,4 °C,离心 90 min,去除上清液,用 PBS 重悬沉淀;再采用 Himac 超速离心机离心 90 min,置于 4 °C 环境,收集 200 μ L 上清液作为阴性对照,去除并吸尽多余部分上清液;用 160 μ L PBS 重悬底部沉淀,获得外泌体悬液。

1.2.5 外泌体拍照 取 10 μ L 外泌体沉淀滴加于碳膜铜网上,样本呈水滴样,样品静置 20 min,吸附于碳膜铜网,缓慢用滤纸吸去多余样品沉淀液体,晾干,滴加 10 μ L 蒸馏水清洗 3 次碳膜铜网,取 10 μ L 磷钨酸染色液滴加于铜网,避光 30 s 条件下染色,用滤纸吸去多余液体,晾干,透射电子显微镜下观察并留取照片。

1.2.6 外泌体摄取染色 分别取常氧与低氧来源 M2 型巨噬细胞来源外泌体各 100 μ L,根据 DiI 试剂说明书进行标记外泌体,并在激光共聚焦专用皿中与 1×10^5 个/孔 BMSCs 共培养 24 h,加入 4% 多聚甲醛 30 min,固定 BMSCs,共培养后 BMSCs 用鬼笔环肽(F-actin)及 DAPI 染色,观察形态并留取照片。

1.2.7 实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 按照 TRIzol 法提取各细胞中的总 RNA,检测 RNA 纯度与浓度采用分光光度计。按照 EasyScript One-Step gDNA Removal 逆转录试剂盒中说明书步骤进行操作,将细胞中总 RNA 逆转录为 cDNA。反应体系: Anchored Oligo (dT)₁₈ Primer 1 μ L, 2 \times ES Reaction Mix 10 μ L, EasyScript RT/RI Enzyme Mix 1 μ L, gDNA Remover 1 μ L。反应条件:42 °C、15 min,85 °C、5 s,4 °C 保持。qRT-PCR 反应体系:2 \times PerfectStart Green qPCR SuperMix 5 μ L, Passive Reference Dye 0.2 μ L, Forward Primer 0.2 μ L, Reverse Primer 0.2 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 3.4 μ L;反应条件:保温阶段 95 °C、2 min,PCR 阶段 95 °C、5 s,60 °C、30 s,共 40 个循环,溶解曲线阶段 95 °C、15 s,60 °C、1 min,95 °C、15 s。以 GAPDH 作为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.2.8 Western blotting 取 200 μ L M2 型巨噬细胞外泌体中加入事先混合的 2 μ L 蛋白酶抑制剂与 200 μ L 蛋白裂解液混合物,不断吹打混匀,4 °C 振荡器混匀 30 min,4 °C 下高速离心机 12 000 r/min 离心 15 min,获取上清液于新 EP 管内,使用十二烷基硫

表 1 qRT-PCR引物

| 基因 | 引物序列 | 长度/ bp |
|-------|------------------------------------|-----------|
| CD206 | 正向: 5'-GTTACCTGGAGTGATGG TTTC-3' | 22 |
| | 反向: 5'-AGGACATGCCAGGGTCACCTTT-3' | 22 |
| Arg-1 | 正向: 5'-CAA GACAGGGCTCCTTTTCAG-3' | 20 |
| | 反向: 5'-GTAGTCAGT CCC TGGCTTATGG-3' | 22 |
| ALP | 正向: 5'-TGACTACCACTCGGGTGAACC-3' | 21 |
| | 反向: 5'-TGATATGCGATGTCCTTGCAG-3' | 21 |
| BMP-2 | 正向: 5'-AGTAGTTTCCAGCACCGAATTA-3' | 22 |
| | 反向: 5'-CACTAACCTGGTGTCCAATACT-3' | 22 |
| Runx | 正向: 5'-CCTTCAAGTTGTAGCCCTC-3' | 20 |
| | 反向: 5'-GGAGTAGTTCTCATGATTCCTCG-3' | 22 |
| GAPDH | 正向: 5'-CAACTGGGACGATATGGAGAAG-3' | 21 |
| | 反向: 5'-CTCGAAGTCTAGGGCAACATAG-3' | 22 |

酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离不同电荷蛋白, 将分离的不同电荷蛋白通过电转方式印于聚偏二氯乙烯膜, 室温 1 h 封闭, 洗膜, 一抗 4 °C 过夜孵育, 洗膜, 二抗室温 1 h 孵育, 洗膜, ECL 发光试剂显影, 凝胶成像系统曝光保留图像。同样, PBS 组、90 ng/mL N-M2 exo 组、90 ng/mL H-M2 exo 组与 CP-M131 细胞共培养 72 h 后, 按上述方法提取细胞蛋白后, 检测 ALP、BMP-2、Runx 的蛋白相对表达量。

1.2.9 ALP 染色 去掉各组细胞中旧培养基, PBS 清洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 2 次。加入 ALP 孵育液, 37 °C, 孵育 2 h, PBS 清洗 2 次。加入试剂 B, 37 °C 孵育 5 min, PBS 润洗 2 次。取试剂 C 配置硫化工作液, 孵育 2 min, PBS 润洗 2 次。显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学方法

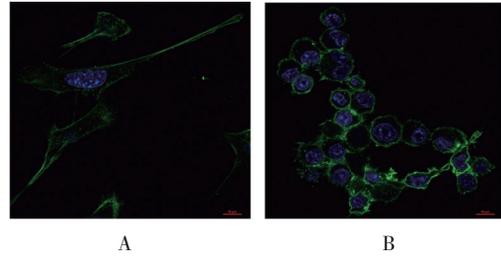
数据分析采用 Graphpad prism 8.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 *t* 检验或方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAW264.7、CP-M131 细胞形态观察

CP-M131 细胞复苏培养 24 h 后均转为贴壁细胞, 呈现梭状或纤维状 (见图 1A); RAW264.7 细胞复苏后细胞形态为椭圆形、圆形或不规则形态, 并且 24 h 后转为半贴壁半悬浮性细胞。两种细胞的骨架轮廓清晰呈绿色荧光, 细胞核居细胞体中央

呈蓝色荧光 (见图 1B)。



A: CP-M131 为 BMSCs; B: RAW264.7 为巨噬细胞 (绿色荧光: 细胞骨架, 蓝色荧光: 细胞核)。

图 1 CPM131、RAW264.7 细胞形态观察 (× 100)

2.2 极化后的 M2 型巨噬细胞 Arg-1、CD206 基因相对表达量比较

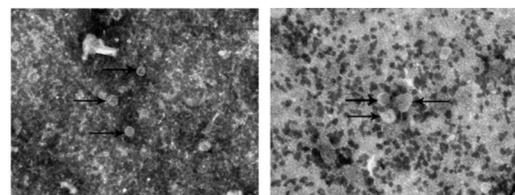
采用 10 ng/mL IL-4 共培养 RAW264.7 细胞后, 收集细胞样品, 检测 Arg-1 和 CD206 基因的相对表达量。qRT-PCR 实验结果表明, 与 PBS 组相比, 10 ng/mL IL-4 共培养组 Arg-1 基因和 CD206 基因相对表达量上调 (P < 0.05)。见表 2。

表 2 两组 M2 型巨噬细胞 Arg-1、CD206 基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Arg-1 基因 | CD206 基因 |
|--------------------|--------------|--------------|
| PBS 组 | 0.99 ± 0.12 | 1.00 ± 0.03 |
| 10 ng/mL IL-4 共培养组 | 67.41 ± 3.98 | 17.69 ± 3.01 |
| <i>t</i> 值 | 17.576 | 5.432 |
| <i>P</i> 值 | 0.010 | 0.020 |

2.3 外泌体的鉴定

提取不同条件下培养的巨噬细胞外泌体后, 透射电镜下观察发现 N-M2 exo 和 H-M2 exo 组外泌体粒径 30 ~ 150 nm, 呈典型“杯状”膜性结构 (见图 2); Western blotting 进一步分析外泌体表面蛋白标志物, 结果显示, N-M2 exo 与 H-M2 exo 实验组的外泌体表面 CD63 和 Tsg101 的蛋白表达呈阳性。见图 3。



N-M2 exo 组 H-M2 exo 组
黑色箭头为透射电镜下外泌体形态。

图 2 外泌体的形态 (比例尺: 200 μm)

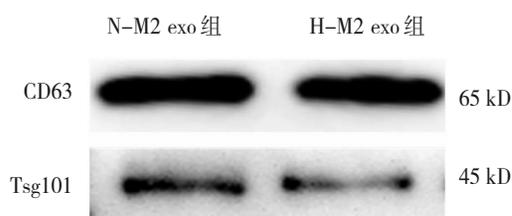
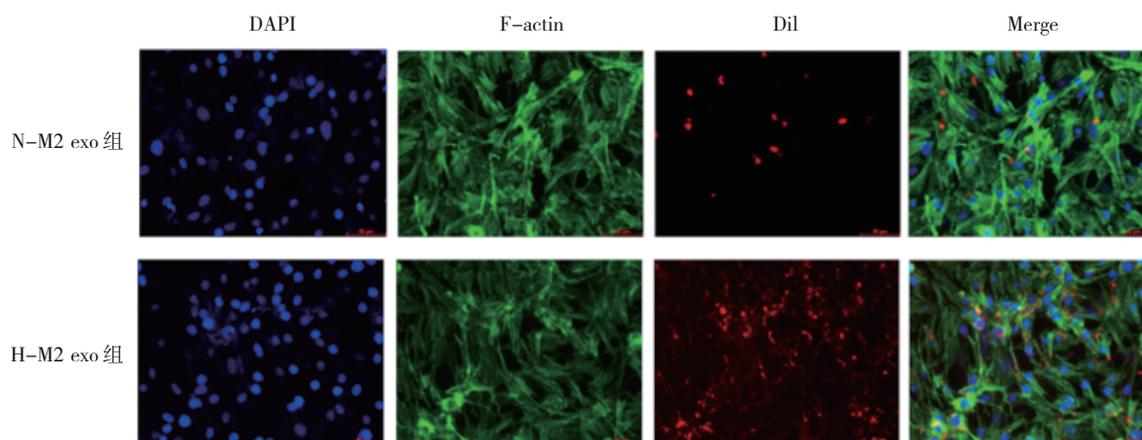


图3 外泌体表面标志蛋白表达

2.4 BMSCs(CP-M131)对不同氧气条件下M2型巨噬细胞外泌体的摄取

首先,从常氧和低氧环境中培养的M2型巨噬细胞中提取外泌体,并使用Dil试剂对这些不同处理

组的外泌体进行标记,用F-actin对骨髓间充质干细胞细胞骨架进行染色。随后,将这些不同条件下收集的外泌体与BMSCs共培养。荧光显微镜下观察外泌体在细胞内的定位和分布,结果显示,Dil标记的外泌体在细胞核周围或细胞质中累积(见图4),由此可见外泌体被BMSCs所摄取。半定量分析表明,N-M2 exo组荧光强度为(1.012 ± 0.115),H-M2 exo组荧光强度为(1.69 ± 0.07),两组比较,差异有统计学意义($t=8.834, P=0.000$);H-M2 exo组BMSCs的摄取效率较N-M2 exo组升高($P<0.05$)。



蓝色为细胞核;绿色为细胞骨架;红色荧光为Dil标记的外泌体。

图4 BMSCs摄取M2型巨噬细胞外泌体的荧光图片

2.5 不同氧气条件的M2型巨噬细胞外泌体对BMSCs成骨分化的影响

qRT-PCR实验结果显示,3组ALP、BMP-2、Runx基因相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P<0.05$),与PBS对照组比较,H-M2 exo组CP-M131细胞ALP、BMP-2、Runx基因相对表达量上升($P<0.05$)。此外,与N-M2 exo组比较,H-M2 exo组CP-M131细胞ALP、BMP-2、Runx基因相对表达量上升($P<0.05$)(见表3)。表明无论是N-M2 exo组还是H-M2 exo组,均能促进BMSCs成骨分化,尤其是H-M2 exo组,其促进能力更加显著。

Western blotting检测结果显示,3组ALP、BMP-2、Runx蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P<0.05$),与PBS组比较,N-M2 exo组与H-M2 exo组CP-M131细胞ALP、BMP-2、

表3 各组ALP、BMP-2、Runx基因相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

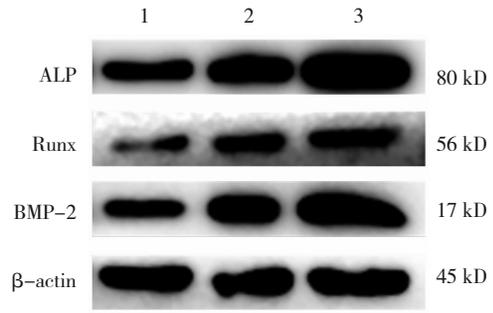
| 组别 | ALP基因 | BMP-2基因 | Runx基因 |
|-----------|-------------|--------------|-------------|
| PBS组 | 1.00 ± 0.39 | 1.00 ± 0.07 | 1.00 ± 0.20 |
| N-M2 exo组 | 2.09 ± 0.25 | 2.45 ± 1.03 | 0.78 ± 0.27 |
| H-M2 exo组 | 6.48 ± 1.13 | 10.95 ± 0.52 | 2.74 ± 0.06 |
| F值 | 50.818 | 100.401 | 89.104 |
| P值 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

Runx蛋白相对表达量上升($P<0.05$),说明不同氧气条件来源的M2型巨噬细胞的外泌体均可以促进BMSCs成骨分化。此外,与N-M2 exo组比较,H-M2 exo组CP-M131细胞的ALP、BMP-2、Runx蛋白相对表达量均上升($P<0.05$),表明低氧环境下M2型巨噬细胞的外泌体可进一步增强BMSCs成骨分化能力。见表4和图5。

表 4 各组 ALP、BMP-2、Runx 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | ALP 蛋白 | BMP-2 蛋白 | Runx 蛋白 |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| PBS 组 | 0.52 ± 0.12 | 0.52 ± 0.06 | 0.58 ± 0.09 |
| N-M2 exo 组 | 0.79 ± 0.06 | 0.69 ± 0.07 | 0.73 ± 0.04 |
| H-M2 exo 组 | 1.21 ± 0.03 | 1.10 ± 0.13 | 1.11 ± 0.09 |
| F 值 | 6.545 | 6.243 | 38.882 |
| P 值 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |

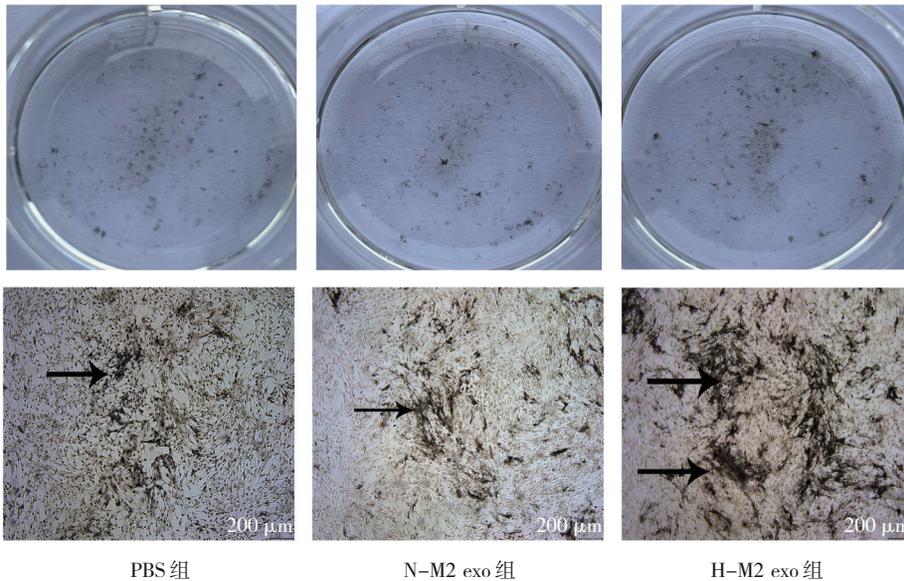
ALP 染色结果显示,与 PBS 组比较,N-M2 exo 组与 H-M2 exo 组可以促进 CP-M131 细胞中 ALP 增多,所形成的钙结节增多。进一步研究结果发现,与 N-M2 exo 组相比,H-M2 exo 组促进 CP-M131 细胞



1:PBS 组; 2:N-M2 exo 组; 3:H-M2 exo 组。

图 5 各组 ALP、Runx2 与 BMP-2 蛋白表达

中 ALP 增多更明显,从而发挥更显著促进成骨分化的影响。见图 6。



黑色箭头为钙结节。

图 6 各组形成的钙结节

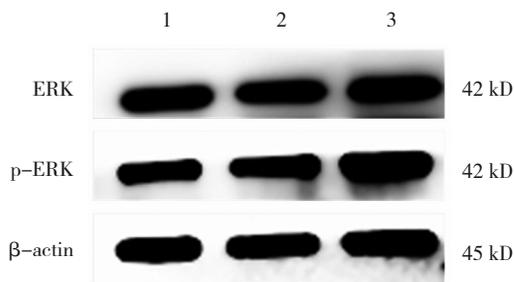
2.6 低氧来源 M2 型巨噬细胞外泌体通过 ERK 信号通路调控 BMSCs 成骨分化

Western blotting 结果显示,3 组 ERK 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 3 组 p-ERK 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),与 PBS 组比较,N-M2 exo 组与 H-M2 exo 组均可以使 CP-M131 细胞中 p-ERK 蛋白相对表达量上调 ($P < 0.05$),说明不同氧气条件 M2 型巨噬细胞的外泌体均可通过 ERK 信号通路促进 BMSCs 成骨分化。此外,与 N-M2 exo 组比较,H-M2 exo 组 CP-M131 细胞 p-ERK

蛋白相对表达量进一步升高 ($P < 0.05$),表明 H-M2 exo 可诱导 ERK 信号通路进一步激活并促进 BMSCs 成骨分化。见表 5 和图 7。

表 5 各组 ERK 与 P-ERK 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | ERK 蛋白 | p-ERK 蛋白 |
|------------|-------------|-------------|
| PBS 组 | 0.82 ± 0.11 | 0.96 ± 0.05 |
| N-M2 exo 组 | 0.84 ± 0.11 | 1.00 ± 0.01 |
| H-M2 exo 组 | 0.88 ± 0.13 | 1.19 ± 0.06 |
| F 值 | 0.121 | 29.234 |
| P 值 | 0.891 | 0.010 |



1:PBS组; 2:N-M2 exo组; 3:H-M2 exo组。

图7 各组ERK、p-ERK蛋白表达

3 讨论

骨折损伤后的修复是涉及多个复杂阶段的重建过程,这一愈合过程并非静态,而是一个动态且持续演变的生理现象^[6]。骨折损伤的修复依赖于巨噬细胞与BMSCs之间的密切协作^[7]。巨噬细胞的极化状态在调节BMSCs成骨分化中扮演着至关重要的角色。NATHAN等^[8]发现,M1型巨噬细胞向M2型巨噬细胞的转化可以精准地进行免疫调节,促进骨折愈合过程中BMSCs成骨分化,并在愈合过程中增强和加速骨再生反应,达到骨折愈合的效果。ZHAO等^[9]发现,巨噬细胞MSR1通过激活PI3K/Akt信号通路促进BMSCs成骨分化,并促进巨噬细胞向M2型巨噬细胞极化。众多研究揭示了巨噬细胞在调控BMSCs成骨分化中发挥关键作用^[10-11]。作为骨骼内环境中的常驻免疫细胞,巨噬细胞的不同亚群对骨折损伤的修复至关重要^[12]。特别是M2型巨噬细胞,其作为抗炎细胞,能够启动抗炎反应,分泌促进组织修复的信号分子,招募BMSCs,刺激血管生成,促进骨损伤愈合过程。本实验通过IL-4诱导巨噬细胞转化为M2型巨噬细胞,通过对M2型巨噬细胞特异性标志物Arg-1、CD206的检测,成功诱导M2型巨噬细胞极化。

外泌体是通过细胞膜内陷形成内体,再由细胞通过胞吐方式释放的小囊泡^[13]。外泌体扮演着连接来源细胞与目标细胞的桥梁角色^[14]。由于外泌体具有显著的生物学功能和较低的细胞毒性,在骨折损伤愈合领域成为了一个新兴的研究热点^[15]。ZHANG等^[16]、BEI等^[17]研究发现,M2型巨噬细胞外泌体来源microRNA-26a-5p可以诱导BMSCs成骨分化并促进骨折愈合。LI等^[18]研究发现,M2外泌体富含microRNA-690,而靶向胰岛素受体底物1促进

BMSCs成骨分化。与此同时,本研究结果证明,提取的M2型巨噬细胞外泌体与BMSCs共培养能够促进BMSCs成骨分化,为患者治疗提供新的治疗思路。

在骨折损伤修复过程中,氧参与细胞代谢对骨折愈合非常重要^[19-20]。骨折损伤部位氧水平可以参与维持、动员BMSCs,并向损伤部位招募BMSCs,从而调控BMSCs成骨分化^[21-22]。LIU等^[23]研究发现,低氧诱导HIF-1表达可促进成骨细胞中转移相关基因(MTA1)表达,从而促进成骨生长。缺氧条件下多形核髓源性抑制细胞来源外泌体中microRNA-29a-3p和microRNA-93-5p过表达,缓解关节炎发病。本研究结果显示,低氧条件下M2型巨噬细胞外泌体对BMSCs成骨分化具有调控作用,低氧条件下的M2型巨噬细胞外泌体可以促进BMSCs的成骨分化。

为进一步探讨低氧来源M2型巨噬细胞外泌体对BMSCs成骨分化的作用机制。FU等^[24]研究发现,阿仑膦酸钠通过激活ERK和JNK信号通路以剂量依赖性方式作用于BMSC来刺激成骨分化并抑制成脂分化。JIANG等^[25]研究发现,BMSCs来源外泌体内microRNA-136-5p通过作用于GNAS/PI3K/ERK/STAT3信号通路抑制M1型巨噬细胞极化,减轻肝脏炎症。本研究结果发现低氧条件的M2型巨噬细胞外泌体可激活ERK信号通路。

综上所述,低氧条件下M2型巨噬细胞释放的外泌体能够显著促进BMSCs的成骨分化,从而加速骨折损伤的修复过程。其机制可能通过激活ERK信号通路促进BMSCs成骨分化。然而,本研究仍存在局限性,在对外泌体成分的深入探究方面尚显不足。因此,后续会进一步对外泌体成分进行研究,意在找出确定的靶点分子,从而进一步深入探究其对BMSCs成骨分化的作用,为骨折损伤修复提供新的治疗方案和靶点。

参 考 文 献 :

- [1] 黄霞,魏津细,苏琪,等. 干细胞源性细胞外囊泡经RANKL/RANK/OPG通路促进牙槽骨成骨的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(20): 60-64.
- [2] JIN Y X, WU O Q, CHEN Q Z, et al. Hypoxia-preconditioned BMSC-derived exosomes induce mitophagy via the BNIP3-ANAX2 axis to alleviate intervertebral disc degeneration[J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(34): e2404275.
- [3] MA S Y, LI S J, ZHANG Y C, et al. BMSC-derived exosomal CircHIPK3 promotes osteogenic differentiation of MC3T3-E1

- cells via mitophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2785.
- [4] LI B B, SHEN E P, WU Z W, et al. BMSC-derived exosomes attenuate rat osteoarthritis by regulating macrophage polarization through PINK1/parkin signaling pathway[J]. *Cartilage*. (2024-04-20)[2024-10-08]. <https://doi.org/10.1177/19476035241245805>.
- [5] GUO J W, WANG F X, HU Y, et al. Exosome-based bone-targeting drug delivery alleviates impaired osteoblastic bone formation and bone loss in inflammatory bowel diseases[J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(1): 100881.
- [6] ABBAS M, ALQAHTANI M S, ALHIFZI R. Recent developments in polymer nanocomposites for bone regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3312.
- [7] 杨允尚,肖龙,陈双双,等.基于骨免疫微环境探讨补肾活血方防治绝经后骨质疏松症的研究进展[J].*中国现代医学杂志*, 2023, 33(14): 51-56.
- [8] NATHAN K, LU L Y, LIN T, et al. Precise immunomodulation of the M1 to M2 macrophage transition enhances mesenchymal stem cell osteogenesis and differs by sex[J]. *Bone Joint Res*, 2019, 8(10): 481-488.
- [9] ZHAO S J, KONG F Q, JIE J, et al. Macrophage MSR1 promotes BMSC osteogenic differentiation and M2-like polarization by activating PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin pathway[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 17-35.
- [10] SHOU J L, LI S Y, SHI W Z, et al. 3WJ RNA nanoparticles-aptamer functionalized exosomes from M2 macrophages target BMSCs to promote the healing of bone fractures[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2023, 12(11): 758-774.
- [11] ZHA K K, TAN M J, HU Y Q, et al. Regulation of metabolic microenvironment with a nanocomposite hydrogel for improved bone fracture healing[J]. *Bioact Mater*, 2024, 37: 424-438.
- [12] 高维松,陈荣,吴国志,等.塞来昔布对离体人膝关节炎细胞凋亡及EGFR/MAPK信号通路的影响[J].*中国现代医学杂志*, 2022, 32(14): 48-52.
- [13] ABELS E R, BREAKFIELD X O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(3): 301-312.
- [14] AAFREEN S, FENG J, WANG W S, et al. Theranostic extracellular vesicles: a concise review of current imaging technologies and labeling strategies[J]. *Extracell Vesicles Circ Nucl Acids*, 2023, 4(1): 107-132.
- [15] HE C J, ZHENG S, LUO Y, et al. Exosome theranostics: biology and translational medicine[J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 237-255.
- [16] ZHANG B B, ZHA X D W, LI C, et al. M2 macrophagy-derived exosomal miRNA-26a-5p induces osteogenic differentiation of bonemesenchymalstemcells[J].*JOrthopSurgRes*,2022,17(1): 137.
- [17] BEI H P, HUNG P M, YEUNG H L, et al. Bone-a-petite: engineering exosomes towards bone, osteochondral, and cartilage repair[J]. *Small*, 2021, 17(50): e2101741.
- [18] LI Z Y, WANG Y F, LI S L, et al. Exosomes derived from M2 macrophages facilitate osteogenesis and reduce adipogenesis of BMSCs[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 680328.
- [19] TIAN Y Y, SHAO Q, TANG Y, et al. HIF-1 α regulates osteoclast activation and mediates osteogenesis during mandibular bone repair via CT-1[J]. *Oral Dis*, 2022, 28(2): 428-441.
- [20] WANG D, LIU Y, DIAO S, et al. Long non-coding RNAs within macrophage-derived exosomes promote BMSC osteogenesis in a bone fracture rat model[J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 1063-1083.
- [21] LI M, ZHAI P T, MU X D, et al. Hypoxic BMSC-derived exosomal miR-652-3p promotes proliferation and metastasis of hepatocarcinoma cancer cells via targeting TNRC6A[J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15(22): 12780-12793.
- [22] ZHANG X N, SAI B Q, WANG F, et al. Hypoxic BMSC-derived exosomal miRNAs promote metastasis of lung cancer cells via STAT3-induced EMT[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 40.
- [23] LIU T L, ZOU W W, SHI G D, et al. Hypoxia-induced MTA1 promotes MC3T3 osteoblast growth but suppresses MC3T3 osteoblast differentiation[J]. *Eur J Med Res*, 2015, 20(1): 10.
- [24] FU L J, TANG T T, MIAO Y Y, et al. Stimulation of osteogenic differentiation and inhibition of adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells by alendronate via ERK and JNK activation[J]. *Bone*, 2008, 43(1): 40-47.
- [25] JIANG X D, LIU Z J, YOU H J, et al. Quercetin-primed BMSC-derived extracellular vesicles ameliorate chronic liver damage through miR-136-5p and GNAS/STAT3 signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142(Pt B): 113162.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 吕梦姣, 杨毅, 田晓寒, 等. 低氧条件下M2型巨噬细胞外泌体对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响机制[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(5): 24-31.

Cite this article as: LÜ M J, YANG Y, TIAN X H, et al. Mechanism of M2 macrophage-derived exosomes on osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells under hypoxic conditions[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2025, 35(5): 24-31.