

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.19.005

文章编号: 1005-8982 (2026) 19-0029-09

实验研究·论著

人脐带间充质干细胞外泌体通过 microRNA-34c-5p/RUNX2 轴调控骨再生的作用研究*

刘斌^{1,2}, 王华富³, 甘维⁴

(1. 丽水市人民医院 脊柱外科, 浙江 丽水 323000; 2. 温州医科大学附属第五医院 脊柱外科, 浙江 丽水 323000; 3. 丽水市人民医院 药学部, 浙江 丽水 323000; 4. 丽水学院附属第一医院 脊柱外科, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 探讨人脐带间充质干细胞来源的外泌体(hUC-MSC-Exos)通过 microRNA-34c-5p(miR-34c-5p/RUNX2 信号轴调控成骨分化的分子机制,并评估硫酸软骨素水凝胶递送系统的治疗效果。**方法** 采用差速离心法分离 hUC-MSC-Exos,并通过 Western blotting 检测外泌体标志物 CD63 及 CD81。构建 miR-34c-5p 过表达载体并合成其抑制剂,采用双荧光素酶报告基因系统验证 miR-34c-5p 与 RUNX2 的 3'-非翻译区(3'-UTR)的靶向结合关系。制备硫酸软骨素水凝胶负载的外泌体复合物(Exos@Gel),复制 SD 大鼠胫骨缺损模型,通过微型计算机断层扫描和组织学分析评估骨修复效果。**结果** Western blotting 检测结果证实成功分离 hUC-MSC-Exos。与细胞裂解液相比,hUC-MSC-Exos 中 miR-34c-5p 表达水平显著升高($P < 0.05$)。双荧光素酶报告结果显示,miR-34c-5p 可直接结合 RUNX2 的 3'-UTR,并使其相对荧光素酶活性显著降低($P < 0.05$)。功能实验结果显示,过表达 miR-34c-5p 可抑制 RUNX2 蛋白表达水平($P < 0.05$),而敲低 miR-34c-5p 则促进 RUNX2 表达水平($P < 0.05$)。动物实验显示,水凝胶复合外泌体组的骨矿物质含量和新生骨体积均高于水凝胶治疗组($P < 0.05$)。**结论** hUC-MSC-Exos 通过递送 miR-34c-5p 抑制 RUNX2 表达,从而促进骨再生。结合 RUNX2 在成骨分化中的“双相调控”理论,提示在骨折愈合过程中抑制 RUNX2 可能促进骨形成。此外,硫酸软骨素水凝胶可进一步增强该策略的治疗效果。

关键词: 人脐带间充质干细胞; 外泌体; microRNA-34c-5p; RUNX2; 骨再生; 水凝胶

中图分类号: R318.08;R683

文献标识码: A

Role of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes in regulating bone regeneration via the microRNA-34c-5p/RUNX2 axis*

Liu Bin^{1,2}, Wang Hua-fu³, Gan Wei⁴

(1. Department of Spinal Surgery, Lishui People's Hospital, Lishui, Zhejiang 323000, China; 2. Department of Spinal Surgery, The Fifth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Lishui, Zhejiang 323000, China; 3. Department of Pharmacy, Lishui People's Hospital, Lishui, Zhejiang 323000, China; 4. Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Lishui University, Lishui, Zhejiang 323000, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism by which human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes (hUC-MSC-Exos) regulate osteogenic differentiation through the miR-34c-5p/Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) signaling axis and, to evaluate the therapeutic effect of a chondroitin sulfate hydrogel

收稿日期: 2026-04-04

* 基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF22H060021)

delivery system. **Methods** hUC-MSC-Exos were isolated using differential centrifugation, and exosome markers CD63 and CD81 were detected by Western blotting. An miR-34c-5p overexpression vector and an inhibitor were prepared, and their targeting relationship with the RUNX2 3'-untranslated region (UTR) was verified using a dual-luciferase reporter assay. A chondroitin sulfate hydrogel-exosome complex (Exos@Gel) was prepared. A tibial bone defect model was established in Sprague-Dawley (SD) rats, and bone repair efficacy was assessed by micro-computed tomography (Micro-CT) and histological analysis. **Results** Western blotting confirmed the successful isolation of hUC-MSC-Exos. Compared with cell lysates, miR-34c-5p expression was significantly higher in hUC-MSC-Exos ($P < 0.05$). The dual-luciferase reporter assay showed that miR-34c-5p directly bound to the RUNX2 3'-UTR, and significantly decreased its relative luciferase activity. Functional experiments demonstrated that overexpression of miR-34c-5p inhibited RUNX2 protein expression ($P < 0.05$), while knockdown of miR-34c-5p promoted RUNX2 protein expression ($P < 0.05$). Animal experiments revealed that the Exos@Gel group was significantly superior to the hydrogel-only treatment group in terms of bone mineral content and new bone volume ($P < 0.05$). **Conclusion** hUC-MSC-Exos promote bone regeneration by delivering miR-34c-5p, which inhibits RUNX2 expression. Consistent with the established theory of biphasic regulation of RUNX2 in osteogenic differentiation, this finding suggests the possibility that its inhibition during fracture healing could promote bone formation. The chondroitin sulfate hydrogel significantly enhances the efficacy of this therapeutic strategy.

Keywords: human umbilical cord mesenchymal stem cells; exosomes; microRNA-34c-5p; RUNX2; bone regeneration; hydrogel

骨组织是人体的重要结构框架,在支撑机械载荷及为肌肉附着提供运动支点方面发挥关键作用^[1]。创伤、先天性畸形、感染及手术等所致的骨缺损与骨折,其临床治疗仍面临诸多挑战^[2]。尽管骨组织具备内在再生能力,但大范围骨折和临界尺寸骨缺损会显著阻碍其再生过程,常需借助骨移植或骨替代物进行治疗。自体骨移植等传统方法受限于供体来源不足及免疫排斥风险^[3],因此,探寻有效促进骨缺损修复的策略并阐明其作用机制,已成为研究焦点。

外泌体是一类直径 30 ~ 150 nm、源自多泡体的细胞外囊泡,其来源广泛、释放机制多样^[4]。外泌体携带的蛋白质、脂质、mRNA、miRNA 及长链非编码 RNA 等物质可通过内吞或膜融合途径进入靶细胞,将其内容物递送至胞浆,进而触发信号级联反应与表观遗传重编程,实现跨细胞信息转导与功能重塑^[5]。在再生医学领域中,干细胞源性外泌体展现出显著的组织修复潜力^[6]。近年来,针对干细胞外泌体的研究多集中于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC),如脂肪组织来源的间充质干细胞外泌体(mesenchymal stem cell exosomes, MSC-Exos)已被证实可促进伤口愈合和组织再生^[7]。目前研究表明,MSC-Exos 具有无致瘤性、易存储等特点,已成为骨再生研究的新兴方向^[8]。MicroRNA(miRNA)是一类长度为 18 ~ 24 nt

的内源性非编码 RNA,主要通过结合靶基因的 3'-非翻译区(3'-UTR),介导靶 mRNA 的降解或翻译抑制,从而诱导转录后基因沉默^[5,9]。其精密调控网络贯穿骨发育与代谢全过程,对维持骨骼稳态至关重要^[10]。研究表明,人脐带间充质干细胞外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes, hUC-MSC-Exos)富含成骨活性 miRNA^[11-13],其中 microRNA-34c-5p(miR-34c-5p)被证实参与骨形成调控^[14-15]。由于外泌体在体内易被快速清除,限制了其疗效,而新型递送系统有望克服这一局限性。硫酸软骨素作为人体最丰富的糖胺聚糖及软骨基质核心成分,兼具抗炎、抗氧化、免疫调节与组织修复功能^[16],其优异的生物相容性、活性及可降解性使其成为医学组织工程的理想材料^[17-18]。吴炯妍等^[19]制备的硫酸软骨素水凝胶更被证实具有促进创面修复的潜力,提示其可作为构建外泌体的递送体系的材料。因此,本研究创新性构建 hUC-MSC-Exos/硫酸软骨素水凝胶复合体系,系统探究其协同促骨再生机制,为骨缺损“无细胞治疗”提供新策略。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物

人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)取自健康足月产

妇脐带,采用Ⅱ型胶原酶(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 美国,货号:C6885)降解组织,并使用DMEM/F12添加10%胎牛血清(美国赛默飞世尔科技公司)进行培养。人成骨细胞hFOB1.19购自美国模式培养物保藏中心(货号:CRL-11372)。实验所用SD大鼠为雄性,8~12周龄,体重(200 ± 20)g,由杭州医学院提供。实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2024-0002;实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2023-0318。本实验经广州辉园苑医药科技有限公司实验动物伦理委员会批准(IAEC-K-240517-06)。所有操作均遵循《实验动物福利伦理审查指南》及3R原则。

1.2 设备和试剂

1.2.1 主要检测设备 实时荧光PCR仪(美国赛默飞世尔科技公司,型号:QuantStudio 3),微型计算机断层扫描(micro-computed tomography, Micro-CT)(美国珀金埃尔默公司,型号:Quantum GX2),化学发光成像仪(上海天能科技有限公司,型号:Tanon 5200),高速冷冻离心机(德国艾本德公司,型号:Centrifuge 5425 R),超速离心机(美国贝克曼库尔特公司,型号:Optima XE-90)。

1.2.2 主要检测试剂 外泌体分离试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司,货号:4478359),CD63抗体(英国Abcam公司,货号:ab217345),CD81抗体(英国Abcam公司,货号:ab109201),RUNX2抗体(英国Abcam公司,货号:ab23981), β -actin抗体(英国Abcam公司,货号:ab8226),山羊抗小鼠IgG二抗(美国Cell Signaling Technology公司,货号:7076),Lipofectamine™ 3000转染试剂(美国赛默飞世尔科技公司,货号:L3000001),miRNA第一链cDNA合成试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:MR101-01),SYBR Green qPCR预混液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,货号:Q711-02),硫酸软骨素(美国西格玛奥德里奇公司,货号:C4384),高碘酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号:S112208),双荧光素酶报告基因载体pmiRGLO(美国普洛麦格公司,货号:E1330),慢病毒包装所需pLV、pLV-shRNA及辅助包装质粒pSPAX2和pMD2.G(上海吉玛制药技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 hUC-MSC-Exos的分离与鉴定 外泌体分离: hUC-MSCs培养至第3~5代,更换为无血清培养基继续培养48 h。收集细胞上清液,参照Thermo Fisher外泌体分离试剂盒说明书,采用差速离心法分离外泌体:4℃,1 500 r/min离心10 min,弃沉淀去除细胞及大碎片;4 000 r/min离心30 min,弃沉淀去除死细胞;10 000 r/min离心45 min,弃沉淀去除细胞碎片。最后,取上清液于32 000 r/min超速离心70 min,所得沉淀即为粗提外泌体。沉淀用预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬,再次32 000 r/min离心70 min进行洗涤,最终沉淀用适量PBS重悬,-80℃保存备用。外泌体鉴定:采用Western blotting检测外泌体特异性标志蛋白。取20 μ g外泌体蛋白样品,进行SDS-PAGE电泳分离后转至PVDF膜。用5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,分别加入CD63和CD81一抗(1:1 000稀释),4℃孵育过夜。TBST缓冲液洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG二抗(1:5 000稀释),室温孵育1 h。使用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)化学发光试剂盒显影,在化学发光成像仪上采集图像。以细胞总蛋白裂解液作为对照。

1.3.2 miR-34c-5p过表达与敲低慢病毒载体的构建及功能验证 慢病毒载体构建与细胞转染:构建携带miR-34c-5p序列的过表达慢病毒载体(pLV-miR-34c-5p)和表达miR-34c-5p短发夹RNA的敲低慢病毒载体(pLV-shRNA-miR-34c-5p)。将人成骨细胞hFOB1.19以 1×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,培养至70%融合度时,使用Lipofectamine 3000转染试剂将目的基因片段转染至细胞中。转染8 h后更换为新鲜完全培养基,继续培养72 h用于后续实验。采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测转染效率:细胞样本按 1×10^6 细胞加入1 mL Trizol的比例进行裂解。充分裂解后,加入氯仿(Trizol体积的1/5),剧烈震荡15秒,室温静置3 min。随后离心分层(11 000 r/min, 15 min, 4℃),转移水相至新离心管,加入等体积异丙醇沉淀RNA,75%乙醇洗涤沉淀后溶于DEPC水。使用miRNA专用逆转录试剂盒,按说明书配制反应体

系。反应程序为: 16 ℃ 孵育 30 min (引物退火), 42 ℃ 孵育 60 min (逆转录合成), 85 ℃ 加热 5 min (酶失活), 反应结束后于 4 ℃ 保存待用。采用 SYBR Green I 荧光染料法进行 qPCR 扩增。反应在实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500、Bio-Rad CFX96) 上运行。反应程序: 95 ℃ 初始变性 30 s, 循环 1 次, 95 ℃ 变性 5 s, 循环 40 次, 60 ℃ 退火 30 s, 循环 40 次, 采集荧光信号, 最后进行溶解曲线分析以验证扩增特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-34c-5p 的相对表达量, 检测人成骨细胞 hFOB1.19 中 miR-34c-5p 过表达与敲低的表达水平变化。引物序列见表 1。

表 1 引物序列信息

引物	序列	长度/ bp
miR-34c-5p	正向: 5'-AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTC-3'	23
	反向: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	16
U6	正向: 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'	20
	反向: 5'-AAATATGGAACGCTTCACGA-3'	20

采用 Western blotting 检测 RUNX2 蛋白相对表达量。为探究 miR-34c-5p 对下游靶蛋白 RUNX2 的影响, 将细胞分为 5 组进行蛋白表达水平检测。①空白对照组: 正常 hFOB1.19 细胞组; ②过表达对照组 (pLV-NC): 转染空载体对照组; ③miR-34c-5p 过表达组 (pLV-miR-34c-5p): 转导 pLV-miR-34c-5p 过表达载体组; ④敲低对照组 (pLV-sh-NC): 转染 pLV-sh 随机序列载体对照组; ⑤miR-34c-5p 敲低组 (pLV-sh-miR-34c-5p): 转染 pLV-sh-miR-34c-5p 敲低载体组。转染 72 h 后, 收集各组细胞, 提取总蛋白。经 BCA 法定量后, 取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭。随后用小鼠抗人 RUNX2 抗体 (1:1 000) 及 β -actin 内参抗体 (1:5 000) 4 ℃ 孵育过夜。TBST 缓冲液洗膜后, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:5 000 稀释), 室温孵育 1 h, ECL 化学发光显影。以 β -actin 作为内参, 使用 Image J 软件分析 RUNX2 蛋白相对表达量。

1.3.3 miR-34c-5p 与 RUNX2 靶向关系的验证
质粒与报告载体的构建: miR-34c-5p 过表达载体通过化学合成其前体序列 (5'-AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC-3'), 并将其克隆至 pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro 慢病毒载体中。用于敲低 miR-34c-

5p 的 RNA 干扰载体, 则通过设计特异性 shRNA 靶序列 (5'-GCAGUAAGUACUGCCU-3'), 并构建至 pLV-RNAi 慢病毒载体。同时, 合成包含 RUNX2 基因 3'-UTR 潜在结合位点的野生型 (WT) 序列, 并将其插入 psiCHECK-2 载体多克隆位点, 构建 psiCHECK2-RUNX2-WT 报告载体; 利用定点突变技术将该结合位点进行突变, 构建相应的突变型 (Mut) 报告载体作为对照。稳转细胞系的建立: 人成骨细胞 hFOB1.19 接种于 6 孔板中, 分别用重组慢病毒 pLV-miR-34c-5p (过表达病毒)、pLV-sh-miR-34c-5p (敲低病毒) 及相应的阴性对照空载体病毒 (pLV-NC, pLV-sh-NC) 进行感染, 感染复数为 3。感染 72 h 后, 更换为含 2 μ g/mL 嘌呤霉素的完全培养基进行持续筛选 5~7 d, 以获得稳转细胞株。

双荧光素酶报告基因检测: 采用双荧光素酶报告系统, 将人成骨细胞 hFOB1.19 接种于 24 孔板中, 采用 Lipofectamine 3000 转染试剂进行共转染。实验分为 WT 组: 共转染 pmirGLO-RUNX2-WT 报告载体与 miR-34c-5p mimics; Mut 组: 共转染 pmirGLO-RUNX2-Mut 报告载体与 miR-34c-5p mimics; 阴性对照组: 共转染 pmirGLO-RUNX2-WT 报告载体与阴性对照 mimics NC。转染 48 h 后收集细胞, 按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作: 加入 Luciferase Assay Reagent II 裂解细胞并测定萤火虫荧光素酶 (Fluc) 活性; 随后加入 Stop & Glo[®] Reagent, 淬灭 Fluc 反应并同时启动海肾荧光素酶 (Rluc) 反应。于化学发光检测仪上自动读取各孔的化学发光信号值。以 Rluc 活性值与 Fluc 活性值的比值 (Rluc/Fluc) 表示报告基因的相对活性。

1.4 硫酸软骨素水凝胶制备

称取 5 g 硫酸软骨素溶于 50 mL 0.05 mol/L 高碘酸钠溶液中, 于 4 ℃ 避光反应 24 h。加入乙二醇 (1 mL) 终止反应, 继续搅拌 30 min。将混合液转移至截留分子量为 3.5 kD 的透析袋中, 以去离子水透析 72 h, 期间换水多次。透析产物经冷冻干燥, 得到氧化硫酸软骨素 (oxidized chondroitin sulfate, OChs); OChs 与壳聚糖按质量比 2:1 溶解于磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4), 加入 0.1% 三乙氧基硼氢化钠作为交联剂, 于 37 ℃ 静置交联 30 min 形成水凝胶^[19]; 外泌体 (100 μ g) 与 OChs 溶液 (10 mg/mL) 混合, 交联后得 Exos@Gel 复合物。

1.5 动物骨缺损模型复制及外泌体干预治疗

SD 大鼠麻醉后,于右侧胫骨中段复制直径 2 mm 的临界尺寸骨缺损模型,并采用微型外固定器固定。分组(每组 5 只)与干预:①假手术组(切开皮肤,不造缺损);②对照组(缺损,生理盐水注射 200 μ L/次/周);③水凝胶组(缺损,注射 1 次/周),总周期:持续 4 周(至取材前结束),总注射次数:4 次,局部注射 OChs 凝胶,100 μ L/次;④水凝胶复合外泌体组(骨缺损,注射 1 次/周),总周期:持续 4 周(至取材前结束),总注射次数:4 次,注射水凝胶外泌体(含 100 μ g 外泌体的复合物),100 μ L/次。

术后 4 周处死动物,取胫骨标本行微型计算机断层扫描,扫描参数:电压 80 kV,电流 500 μ A,分辨率 10 μ m。使用仪器自带分析软件对骨缺损区域进行三维重建,通过阈值分割法(阈值范围设定为 250~2 000 HU)区分骨组织与软组织,自动计算骨矿物质密度、骨缺损区域总体积(即新生骨组织体积)及骨矿物质含量,以骨矿物密度和骨矿物质含量作为骨愈合评价指标。剔除无效数据后,对各组的骨矿物质密度、骨缺损区域总体积及骨矿物质含量进行统计分析,每组有效样本数为 3 只大鼠。

1.6 数据筛选

在数据整理阶段,对所有采集的样本数据进行有效性评估。剔除标准:实验过程中因非处理因素导致的动物死亡样本;经 Grubbs 检验识别出的统计学异常值。最终纳入分析的样本数量见相应结果部分。

1.7 统计学方法

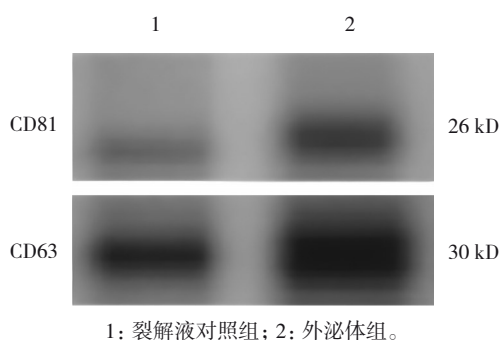
数据分析采用 GraphPad Prism 7 统计软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较采用 t 检验;多组比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-34c-5p 在 hUC-MSC-Exos 中富集

Western blotting 检测结果显示,与细胞裂解液相比,提取物中外泌体标志蛋白 CD81 和 CD63 的表达水平更高(见图 1)。CD81:外泌体组的原始灰度值为 (163.04 ± 5.60) ,显著高于对照组的 (122.36 ± 9.41) ;以对照组灰度值标准化后,外泌

体组的相对表达量为 (1.33 ± 0.05) ,对照组为 (1.00 ± 0.08) ,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 6.435$, $P = 0.003$),外泌体组 CD81 蛋白相对表达量显著高于对照组。CD63:外泌体组的原始灰度值为 (82.75 ± 6.95) ,显著高于对照组的 (50.26 ± 7.07) ;标准化后,外泌体组的相对表达量为 (1.65 ± 0.138) ,对照组为 (1.00 ± 0.141) ,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 5.675$, $P = 0.005$),外泌体组 CD63 蛋白相对表达量显著高于对照组。



1: 裂解液对照组; 2: 外泌体组。

图 1 外泌体标志物 CD81 和 CD63 的蛋白表达

qRT-PCR 检测结果显示,与细胞裂解液相比,miR-34c-5p 在 hUC-MSC-Exos 中呈现显著富集。hUC-MSC-Exos 组 miR-34c-5p 基因相对表达量为 (16.40 ± 6.69) ,细胞裂解液对照组 miR-34c-5p 基因相对表达量为 (1.00 ± 0.71) ,经 t 检验,差异有统计学意义($t = 3.965$, $P = 0.016$),hUC-MSC-Exos 组 miR-34c-5p 基因相对表达量显著高于细胞裂解液对照组。

2.2 miR-34c-5p 对 RUNX2 表达的调控作用

qRT-PCR 检测结果显示,miR-34c-5p 过表达 3 组 miR-34c-5p 基因相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白对照组相比,miR-34c-5p 过表达组 miR-34c-5p 基因相对表达量显著升高($P < 0.05$)。miR-34c-5p 敲低 3 组 miR-34c-5p 基因相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白对照组相比,miR-34c-5p 敲低组 miR-34c-5p 基因相对表达量显著降低($P < 0.05$)。空白对照组与过表达对照组比较,经 t 检验,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

Western blotting 检测结果显示,miR-34c-5p 过表达 3 组 RUNX2 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);miR-34c-5p 过表达组 RUNX2 蛋白表达水平均显著低于空白对照组

和过表达对照组 ($P < 0.05$)。miR-34c-5p 敲低 3 组 RUNX2 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);miR-34c-5p 敲低组 RUNX2 蛋白表达水平显著高于空白对照组和敲低对照组 ($P < 0.05$)。空白对照组与敲低对照组比较,经 LSD- t 检验,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2、3 和图 2。

表 2 miR-34c-5p 过表达对 miR-34c-5p 基因和 RUNX2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

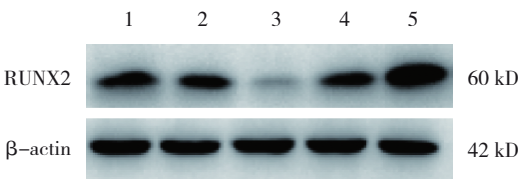
组别	miR-34c-5p 基因	RUNX2 蛋白
空白对照组	1.00 $\pm$ 0.13	107.94 $\pm$ 4.18
过表达对照组	1.00 $\pm$ 0.10	106.99 $\pm$ 2.16
miR-34c-5p 过表达组	2.02 $\pm$ 0.41	73.20 $\pm$ 3.30
F 值	53.8	152.894
P 值	0.000	0.000

表 3 miR-34c-5p 敲低对 miR-34c-5p 基因和 RUNX2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-34c-5p 基因	RUNX2 蛋白
空白对照组	1.00 $\pm$ 0.69	107.94 $\pm$ 4.18
敲低对照组	0.72 $\pm$ 0.46	108.24 $\pm$ 5.99
miR-34c-5p 敲低组	0.23 $\pm$ 0.16	173.74 $\pm$ 1.29
F 值	185.463	289.561
P 值	0.000	0.000

2.3 miR-34c-5p 对 RUNX2 3'-UTR 活性的靶向作用

双荧光素酶报告基因实验结果显示,共转染 miR-34c-5p mimics 与野生型 RUNX2 3'-UTR 报告载体 (WT+miR-34c-5p 组)、共转染 miR-34c-5p mimics 与突变型 RUNX2 3'-UTR 报告载体 (Mut+miR-34c-5p 组)、共转染阴性对照 mimics 与野生型



1: 空白对照组; 2: 过表达对照组; 3: miR-34c-5p 过表达组; 4: 敲低对照组; 5: miR-34c-5p 敲低组。

图 2 成骨细胞 hFOB1.19 中分别过表达、敲低 miR-34c-5p 后 RUNX2 蛋白表达

RUNX2 3'-UTR 报告载体 (WT+NC 组) 的荧光素酶相对活性分别为 (81.8 $\pm$ 3.4) %、(116.0 $\pm$ 4.4) %、(100.0 $\pm$ 4.7) %,经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 125.736, P = 0.000$);进一步两两比较,经 LSD- t 检验,WT+miR-34c-5p 组的荧光素酶活性显著低于 WT+NC 组 ($P < 0.05$),而 Mut+miR-34c-5p 组与 WT+NC 组比较,经 LSD- t 检验,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)

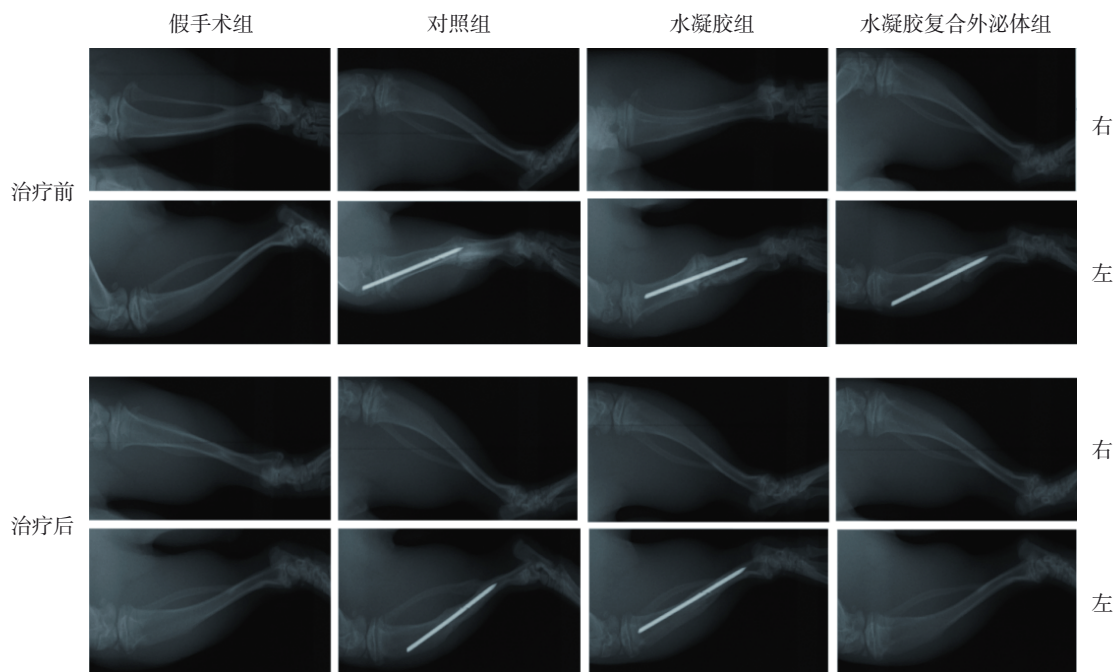
2.4 Exos@Gel 复合物对大鼠胫骨缺损修复的影响

对照组、水凝胶复合外泌体组、水凝胶组的骨矿物质密度、骨缺损区域总体积及骨矿物质含量比较,经方差分析,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。水凝胶复合外泌体组的骨矿物质密度均显著高于对照组和水凝胶组 ($P < 0.05$);而对照组分别与水凝胶复合外泌体组、水凝胶组比较,经 LSD- t 检验,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。水凝胶复合外泌体组的骨缺损区域总体积均显著大于对照组和水凝胶组 ($P < 0.05$);对照组与水凝胶组比较,经 LSD- t 检验,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。水凝胶复合外泌体组的骨矿物质含量均显著高于对照组和水凝胶组 ($P < 0.05$);对照组与水凝胶组比较,经 LSD- t 检验,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 各组骨矿物质密度、骨缺损区域总体积及骨矿物质含量比较 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	骨矿物质密度/(mg/cm ³)	骨缺损区域总体积/cm ³	骨矿物质含量/mg
对照组	504.7 $\pm$ 9.2	0.6 $\pm$ 0.07	287.1 $\pm$ 15.3
水凝胶复合外泌体组	550.0 $\pm$ 12.0	0.8 $\pm$ 0.02	464.6 $\pm$ 12.7
水凝胶组	487.5 $\pm$ 7.8	0.5 $\pm$ 0.04	226.9 $\pm$ 22.8
F 值	56.347	45.892	182.515
P 值	0.000	0.000	0.000

术后 4 周,通过微型计算机断层扫描进行三维重建和骨形态计量学分析。见图 3。



图中白色线表示骨缺损边界。

图3 大鼠骨缺损修复效果微型计算机断层扫描三维重建

3 讨论

本研究证实 hUC-MSC-Exos 特异性富集 miR-34c-5p, 该结果与 Hu 等^[20]报道的间充质干细胞外泌体 miRNA 谱特征相符。通过基因过表达和敲低实验发现, miR-34c-5p 负向调控下游 RUNX2 的表达。进一步的双荧光素酶报告基因实验证实, miR-34c-5p 可直接靶向结合 RUNX2 mRNA 的 3'-UTR。RUNX2 作为一种骨特异性转录因子, 在调控成骨细胞分化、软骨细胞成熟、骨基质基因表达及矿化等过程中发挥关键作用^[21-22]。研究创新性地开发了一种硫酸软骨素水凝胶, 用于递送富含 miR-34c-5p 的 hUC-MSC-Exos (Exos@Gel)。动物实验结果显示, 水凝胶复合外泌体组的骨矿物质密度、骨缺损区域总体积、骨矿物质含量均显著高于对照组和水凝胶组。结果表明, 水凝胶复合外泌体干预可显著提升骨密度和骨矿物质含量, 并增加新生骨体积, 其效果优于水凝胶治疗。这证明 hUC-MSC-Exos 可通过递送 miR-34c-5p 并抑制 RUNX2 表达, 进而促进骨再生。

本研究结果显示, miR-34c-5p 介导的 RUNX2 下调可在体内促进骨再生。特别是, RUNX2 在成

骨细胞分化过程中表现出双重调控作用及时空特异性, 这些特性在本研究中对促进骨再生的效应起到关键作用。Komori 等^[23]研究指出, RUNX2 虽被视为成骨细胞分化的“主要调控因子”, 但其功能具有明确的阶段特异性: 在分化早期驱动间充质干细胞向成骨谱系定向 (抑制脂肪/软骨分化), 而在晚期则会阻碍成骨细胞成熟及矿化。易知非等^[24]研究报道, RUNX2 是胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 调节成骨细胞分化和成熟的重要靶点, IGF-1 可通过抑制 RUNX2 表达显著加速骨折愈合, 这是由于在骨再生的特定阶段, 下调 RUNX2 可能解除其对成骨细胞成熟的抑制作用, 促进骨基质矿化及成熟骨组织形成。miR-34c-5p 介导的 RUNX2 下调在体内促进骨再生, 结果表明 RUNX2 的适时下调是启动骨折愈合后期矿化的关键触发因素。

有研究发现, 外泌体具有显著的成骨活性, 但其临床应用面临体内快速清除的挑战^[25]。为此, 本研究创新性地开发了一种硫酸软骨素水凝胶用于递送 hUC-MSC-Exos 的药物体系 Exos@Gel。有研究表明, 基于硫酸软骨素水凝胶的药物递送系统

具有以下特点：①缓释特性：亚胺键交联形成的三维网络使外泌体释放周期延长^[19]；②局部滞留：注射后形成物理屏障，防止外泌体扩散^[26]；③协同增效：硫酸软骨素本身的抗氧化作用^[27-28]可改善损伤区微环境，与外泌体形成协同效应。这种“缓释-滞留-微环境调节”的多重协同机制，在动物模型中表现出了比单用外泌体更显著的骨密度恢复与骨缺损修复效果。

本研究揭示了 hUC-MSC-Exos 通过递送 miR-34c-5p 靶向 RUNX2 的 3'-UTR，并抑制其表达，从而促进骨再生的分子机制。这一发现为后续开发靶向该通路的小分子药物提供了思路 and 方向。同时，利用硫酸软骨素水凝胶递送外泌体 miR-34c-5p 的“无细胞”治疗策略，降低了干细胞移植潜在的致癌风险，具有更好的安全性、简便性和微创性，在骨不连、骨质疏松性骨折等领域具有一定的应用潜力。本研究存在以下局限性：①需引入其他类型的体内模型以多模型验证体内效果；②miR-34c-5p 对破骨细胞活性的影响尚未阐明；③水凝胶降解速率与骨再生时序的匹配性有待优化。

综上所述，本研究系统揭示了外泌体/硫酸软骨素水凝胶系统 (Exos@Gel) 通过 miR-34c-5p/RUNX2 信号轴促进骨再生的机制。基于硫酸软骨素构建的创新递送系统展现出巨大的临床转化潜力。

参 考 文 献：

- [1] Santoro A, Voto A, Fortino L, et al. Bone defect treatment in regenerative medicine: exploring natural and synthetic bone substitutes[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(7): 3085.
- [2] Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 2937-2948.
- [3] Hu Z Q, Jiang Z L, Meng S Z, et al. Research progress on the osteogenesis-related regulatory mechanisms of human umbilical cord mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2023, 19(5): 1252-1267.
- [4] Zhang Y, Bi J Y, Huang J Y, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 6917-6934.
- [5] Liang R Z, Abudurexiti N, Wu J X, et al. Exosomes and miRNAs in cardiovascular diseases and transcatheter pulmonary valve replacement: advancements, gaps and perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(24): 13686.
- [6] Lee K W A, Chan L K W, Hung L C, et al. Clinical applications of exosomes: a critical review[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(14): 7794.
- [7] Lee J H, Won Y J, Kim H, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes promote wound healing and tissue regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(13): 10434.
- [8] Hade M D, Suire C N, Suo Z C. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: applications in regenerative medicine[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1959.
- [9] Yu X J, Odenthal M, Fries J W U. Exosomes as miRNA carriers: formation-function-future[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2028.
- [10] Fang S J, Deng Y, Gu P, et al. MicroRNAs regulate bone development and regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 8227-8253.
- [11] Zhang Y T, Xie Y, Hao Z C, et al. Umbilical mesenchymal stem cell-derived exosome-encapsulated hydrogels accelerate bone repair by enhancing angiogenesis[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(16): 18472-18487.
- [12] Yang B C, Kuang M J, Kang J Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes act via the miR-1263/Mob1/hippo signaling pathway to prevent apoptosis in disuse osteoporosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(4): 883-889.
- [13] Ge Y H, Wang X J. The role and mechanism of exosomes from umbilical cord mesenchymal stem cells in inducing osteogenesis and preventing osteoporosis[J]. *Cell Transplant*, 2021, 30: 9636897211057465.
- [14] Wang S N, Zhang S, Xu H C, et al. Ano5 deficiency leads to abnormal bone formation via miR-34c-5p/KLF4/ β -catenin in gnathodiaphyseal dysplasia[J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(11): 5267.
- [15] Lin C, Bai X Y, Zhang L K. Chitosan/sodium tripolyphosphate/sodium alginate/miRNA-34c-5p antagomir scaffolds promote the functionality of rabbit cranial parietal repair[J]. *Int J Nanomedicine*, 2024, 19: 12939-12956.
- [16] Govers B M, Bakker B, de Bruijne M J, et al. Chondroitin sulfate and hyaluronan in the vitreous of patients with rhegmatogenous retinal detachment[J]. *Exp Eye Res*, 2025, 261: 110672.
- [17] Shin J, Kang E H, Choi S, et al. Tissue-adhesive chondroitin sulfate hydrogel for cartilage reconstruction[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7(9): 4230-4243.
- [18] Rajesh A, Sajeev D, Nethish Kumar R, et al. Chondroitin sulfate: from bioactive molecule to versatile drug delivery system for advancing regenerative medicine[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 311(Pt 2): 143746.
- [19] 吴垠妍. 硫酸软骨素及其微球复配型胶原蛋白基水凝胶的制备及性能初步研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [20] Hu X M, Shen N, Liu A Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-34c-5p ameliorates RIF by inhibiting the core fucosylation of multiple proteins[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(2): 763-781.
- [21] An J H, Kim C C, Lee J, et al. Tension force stress downregulates the expression of osteogenic markers and

- mineralization in embryonic stem-cell-derived embryoid bodies[J]. *Cells*, 2025, 14(13): 991.
- [22] 喜天娇, 丁蓓. miR-338-5p 靶向 Runx2 对牙槽骨成骨细胞增殖、凋亡及成骨分化的影响[J]. *中国美容医学*, 2025, 34(5): 6-11.
- [23] Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(5): 1233-1239.
- [24] 易知非, 周芳, 谢增如. 胰岛素样生长因子 1(IGF-1)通过抑制 RUNX2 促进骨折愈合的机制研究[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(10): 27-31.
- [25] Riau A K, Ong H S, Yam G H F, et al. Sustained delivery system for stem cell-derived exosomes[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1368.
- [26] Nikhil A, Kumar A. Evaluating potential of tissue-engineered cryogels and chondrocyte derived exosomes in articular cartilage repair[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 119(2): 605-625.
- [27] Dan A, Sharma D, Singh H, et al. A dynamically crosslinked, self-adapting, injectable gelatin-chondroitin sulfate hydrogel with antibacterial and antioxidant properties for treatment of deep and irregular wounds[J]. *J Mater Chem B*, 2025, 13(25): 7293-7310.
- [28] Nguyen M, Battistoni C M, Babiak P M, et al. Chondroitin sulfate/hyaluronic acid-blended hydrogels suppress chondrocyte inflammation under pro-inflammatory conditions[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2024, 10(5): 3242-3254.
- (张西倩 编辑)
- 本文引用格式:** 刘斌, 王华富, 甘维. 人脐带间充质干细胞外泌体通过 microRNA-34c-5p/RUNX2 轴调控骨再生的作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2026, 36(19): 29-37.
- Cite this article as:** Liu B, Wang H F, Gan W. Role of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes in regulating bone regeneration via the microRNA-34c-5p/RUNX2 axis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2026, 36(19): 29-37.