

· 基础研究 ·

# 负载 microRNA - 27b - 骨髓间充质干细胞来源外泌体的软骨细胞 - 聚乳酸羟基乙酸共聚物骨软骨复合体移植治疗软骨缺损的实验研究

孙晓辉, 赵斌, 刘洋, 崔明星

(新乡医学院第一附属医院, 河南 卫辉 453100)

**摘 要** 目的:探讨负载 microRNA - 27b(miR - 27b) - 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)来源外泌体(exosomes, exo)的软骨细胞(chondrocytes, chon) - 聚乳酸羟基乙酸共聚物[poly(lactic - co - glycolic acid), PLGA]骨软骨复合体移植治疗软骨缺损的效果及作用机制。方法:①培养 BMSC 并制备 BMSC 来源 exo(BMSC - exo),观察 BMSC - exo 的形态,测定 BMSC - exo 的粒径和 Zeta 电位,并采用蛋白质印迹法(Western Blot)检测 BMSC - exo 表面标记蛋白 CD9 和 CD63。②将培养至第 2 或第 3 代的 BMSC 分为 2 组,BMSC 组于 RPMI - 1640 培养基中培养,不进行干预,miR - 27b - BMSC 组采用 miR - 27b 过表达的重组腺病毒感染;培养 24 h 后,制备 BMSC - exo 和 miRNA - 27b - BMSC - exo,并分别提取 BMSC、BMSC - exo、miRNA - 27b - BMSC、miRNA - 27b - BMSC - exo 的 RNA,采用实时定量 PCR 检测 miR - 27b 的表达。③分别采用 Dil 细胞膜红色荧光探针和 Hoechst33258 染色试剂给 miR - 27b - BMSC - exo 和大鼠软骨细胞染色,于荧光显微镜下观察大鼠软骨细胞对 miR - 27b - BMSC - exo 的摄取情况。④将大鼠软骨细胞分为 2 组,BMSC - exo 组接种于 BMSC - exo 终浓度为  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI - 1640 培养基中,miR - 27b - BMSC - exo 组接种于 miR - 27b - BMSC - exo 终浓度为  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI - 1640 培养基中;培养 4 h 后,采用实时定量 PCR 检测 miR - 27b 的表达。⑤将大鼠软骨细胞分为 4 组,对照组于 RPMI - 1640 培养基中培养,不进行干预,白细胞介素(interleukin, IL) - 1 $\beta$  组在 IL - 1 $\beta$  终浓度为  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI - 1640 培养基中培养,miR - 27b - BMSC - exo 组在 IL - 1 $\beta$  终浓度为  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、miR - 27b - BMSC - exo 终浓度为  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI - 1640 培养基中培养,BMSC - exo 组在 IL - 1 $\beta$  终浓度为  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、BMSC - exo 终浓度为  $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI - 1640 培养基中培养;分别于培养 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h 和 8 h,采用 MTT 法测定各组大鼠软骨细胞活力;培养 24 h 后,提取各组大鼠软骨细胞总蛋白,采用 Western Blot 检测软骨损伤相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, caspase) - 3、caspase - 9、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) - 13 的表达。⑥取 18 只 8 周龄 SD 雌性大鼠,于 SD 大鼠的左后肢股骨远端滑车沟槽制造直径 4.5 mm、深度 1 mm 的软骨缺损,建立软骨缺损 SD 大鼠模型;将 18 只软骨缺损 SD 大鼠模型随机分为 3 组,对照组植入 chon - PLGA 骨软骨复合体,miR - 27b - BMSC - exo 组植入 miR - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA 骨软骨复合体,BMSC - exo 组植入 BMSC - exo - chon - PLGA 骨软骨复合体;饲养 12 周后处死 SD 大鼠,观察软骨修复效果,免疫组织化学染色检测软骨损伤修复标志蛋白 II 型胶原蛋白、MMP - 13 的表达;提取 SD 大鼠软骨组织总蛋白,采用 Western Blot 检测软骨损伤相关蛋白 caspase - 3、caspase - 9、MMP - 13 的表达。结果:①BMSC - exo 的鉴定结果。BMSC - exo 为圆盘形囊泡状膜结构,粒径 92 ~ 115 nm,数量占比最高的 BMSC - exo 的粒径为 106 nm;BMSC - exo 的 Zeta 电位为  $(-22.13 \pm 2.1) \text{ mV}$ 。BMSC - exo 表面标记物 CD9 和 CD63 在 BMSC - exo 组的表达量显著高于 BMSC 组(相对灰度值: $6.513 \pm 0.714$ ,  $1.001 \pm 0.021$ ,  $t = 18.902$ ,  $P = 0.000$ ;  $7.564 \pm 0.636$ ,  $1.026 \pm 0.027$ ,  $t = 25.158$ ,  $P = 0.000$ )。②miR - 27b 表达的检测结果。miR - 27b 在 miR - 27b - BMSC 组 BMSC 中的表达量高于 BMSC 组(相对表达量: $46.785 \pm 8.153$ ,  $1.000 \pm 0.280$ ,  $t = 13.748$ ,  $P = 0.000$ );miR - 27b 在 miR - 27b - BMSC 组 exo 中的表达量高于 BMSC 组(相对表达量: $34.825 \pm 8.612$ ,  $1.000 \pm 0.325$ ,  $t = 9.621$ ,  $P = 0.000$ )。③miR - 27b - BMSC - exo 的摄取情况。大鼠软骨细胞和 miR - 27b - BMSC - exo 共培养 4 h,miR - 27b - BMSC - exo 被大鼠软骨细胞摄取。④共培养后大鼠软骨细胞中 miR - 27b 表达的检测结果。miR - 27b 在 miR - 27b - BMSC - exo 组大鼠软骨细胞中的表达量高于 BMSC - exo 组(相对表达量: $3.315 \pm 0.523$ ,  $1.000 \pm 0.244$ ,  $t = 9.826$ ,  $P = 0.000$ )。⑤大鼠软骨细胞活力测定结果。时间因素与分组因素存在交互效应( $F = 2.836$ ,  $P = 0.049$ )。4 组大鼠软骨细胞活力总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应( $F = 11.345$ ,  $P = 0.049$ )。培养前及培养 1 h、2 h,大鼠软骨细胞活力的组间差异无统计学意义( $F = 0.047$ ,  $P = 0.406$ ;  $F = 0.765$ ,  $P = 0.189$ ;  $F = 2.095$ ,  $P = 0.063$ );培养 3 h、4 h、8 h,大鼠软骨细胞活力的组间差异有统计学意义( $F = 4.720$ ,  $P = 0.039$ ;  $F = 7.421$ ,  $P = 0.021$ ;  $F = 95.348$ ,  $P = 0.000$ ),IL - 1 $\beta$  组的大鼠软骨细胞活力小于对照组、miR -

基金项目:河南省医学科技攻关计划项目(201602150)

通讯作者:刘洋 E-mail:450584560@qq.com

27b - BMSC - exo 组、BMSC - exo 组(3 h:  $P=0.002$ ,  $P=0.011$ ,  $P=0.026$ ; 4 h:  $P=0.002$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.006$ ; 8 h:  $P=0.004$ ,  $P=0.004$ ,  $P=0.011$ ), miR - 27b - BMSC - exo 组的大鼠软骨细胞活力大于对照组和 BMSC - exo 组(3 h:  $P=0.019$ ,  $P=0.023$ ; 4 h:  $P=0.015$ ,  $P=0.002$ ; 8 h:  $P=0.003$ ,  $P=0.029$ )。不同时间点大鼠软骨细胞活力总体比较,差异无统计学意义,即不存在时间效应( $F=0.258$ ,  $P=0.083$ )。⑥大鼠软骨细胞中软骨损伤相关蛋白表达的检测结果。切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 的表达量组间比较,差异有统计学意义( $F=15.691$ ,  $P=0.024$ ;  $F=98.021$ ,  $P=0.002$ ;  $F=76.312$ ,  $P=0.004$ ), IL - 1 $\beta$  组大鼠软骨细胞中切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 的表达量均高于对照组、miR - 27b - BMSC - exo 组、BMSC - exo 组(切割 - caspase - 3:  $P=0.025$ ,  $P=0.020$ ,  $P=0.006$ ; 切割 - caspase - 9:  $P=0.011$ ,  $P=0.008$ ,  $P=0.036$ ; MMP - 13:  $P=0.034$ ,  $P=0.003$ ,  $P=0.009$ ); miR - 27b - BMSC - exo 组大鼠软骨细胞中切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 的表达量均低于 BMSC - exo 组( $P=0.023$ ,  $P=0.010$ ,  $P=0.007$ )。⑦SD 大鼠软骨缺损修复效果。直视下观察,miR - 27b - BMSC - exo 组 SD 大鼠软骨缺损修复效果优于对照组和 BMSC - exo 组。病理染色结果显示,对照组软骨层较薄,边缘不规则,软骨下骨和软骨无界限; miR - 27b - BMSC - exo 组和 BMSC - exo 组软骨层较厚,边缘光滑,软骨下骨和软骨界限清晰,且 miR - 27b - BMSC - exo 组透明软骨修复效果优于 BMSC - exo 组。⑧软骨损伤修复标志蛋白表达的检测结果。免疫组织化学染色显示,对照组和 BMSC - exo 组 SD 大鼠软骨组织中 MMP - 13 高表达,miR - 27b - BMSC - exo 组 SD 大鼠软骨组织中 MMP - 13 低表达;对照组 SD 大鼠软骨组织中 II 型胶原蛋白低表达,BMSC - exo 组和 miR - 27b - BMSC - exo 组 SD 大鼠软骨组织中 II 型胶原蛋白高表达。MMP - 13、II 型胶原蛋白表达阳性率的组间比较,差异有统计学意义( $F=126.178$ ,  $P=0.002$ ;  $F=209.24$ ,  $P=0.001$ )。miR - 27b - BMSC - exo 组 SD 大鼠软骨组织中 II 型胶原蛋白表达量高于对照组和 BMSC - exo 组( $P=0.005$ ,  $P=0.012$ ),MMP - 13 的表达量低于对照组和 BMSC - exo 组( $P=0.029$ ,  $P=0.014$ )。⑨SD 大鼠软骨组织中软骨损伤相关蛋白表达的检测结果。切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 表达量的组间比较,差异有统计学意义( $F=15.126$ ,  $P=0.026$ ;  $F=33.151$ ,  $P=0.019$ ;  $F=53.522$ ,  $P=0.016$ ), miR - 27b - BMSC - exo 组切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 的表达量均低于对照组和 BMSC - exo 组(切割 - caspase - 3:  $P=0.003$ ,  $P=0.006$ ; 切割 - caspase - 9:  $P=0.001$ ,  $P=0.019$ ; MMP - 13:  $P=0.007$ ,  $P=0.008$ )。结论:miR - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA 骨软骨复合体移植治疗软骨缺损,治疗效果显著,其作用机制可能与抑制 caspase - 3、caspase - 9 以及 MMP - 13 的表达、促进 II 型胶原蛋白的表达有关。

**关键词** 软骨;软骨细胞;骨髓;间质干细胞;外泌体;微 RNAs;大鼠;动物实验

## MicroRNA - 27b - bone marrow mesenchymal stem cell derived exosomes - laden chondrocytes - poly(lactic - co - glycolic acid) osteochondral complex transplantation for treatment of osteochondral defects: an experimental study

SUN Xiaohui, ZHAO Bin, LIU Yang, CUI Mingxing

The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the curative effects and mechanisms of action of microRNA - 27b(miR - 27b) - bone marrow mesenchymal stem cell(BMSC)derived exosomes(exo) - laden chondrocytes(chon) - poly(lactic - co - glycolic acid)(PLGA) osteochondral complex transplantation for treatment of osteochondral defects. **Methods:** ①The BMSC - derived exosomes(BMSC - exo) were prepared by using the cultured BMSC, and their morphologies were observed. The particle size and Zeta potential of BMSC - exo were measured, and the surface marker proteins CD9 and CD63 of BMSC - exo were detected by using Western Blot. ②The 2nd and 3rd - generation BMSCs were divided into BMSC group and miR - 27b - BMSC group. The BMSCs in BMSC group were cultured in RPMI - 1640 medium without any intervention, while the BMSCs in miR - 27b - BMSC group were infected with miR - 27b - overexpressed recombinant adenovirus. After 24 - hour cell cultivation, BMSC - exo and miRNA - 27b - BMSC - exo were prepared; and the RNA were extracted from BMSC, BMSC - exo, miRNA - 27b - BMSC and miRNA - 27b - BMSC - exo respectively; and the expression of miR - 27b was detected by using real - time quantitative PCR(RT - qPCR). ③The miR - 27b - BMSC - exo and chondrocytes of rats were stained with Dil and Hoechst33258 staining reagent respectively, and the uptake of miR - 27b - BMSC - exo by chondrocytes of rats was observed under fluorescence microscope. ④The rat chondrocytes were divided into BMSC - exo group and miR - 27b - BMSC - exo group, and were inoculated into RPMI - 1640 medium supplemented with BMSC - exo with final concentration of 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and RPMI - 1640 medium supplemented with miR - 27b - BMSC - exo with final concentration of 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. The expression of miR - 27b was detected by using RT - qPCR after 4 - hour cell cultivation. ⑤The rat chondrocytes were divided into control group, interleukin(IL) - 1 $\beta$  group, miR - 27b - BMSC - exo group and

BMSC - exo group. The chondrocytes in control group were cultured in RPMI - 1640 medium without any intervention, the chondrocytes in IL - 1 $\beta$  group were cultured in RPMI - 1640 medium supplemented with IL - 1 $\beta$  with final concentration of 10 ng/mL, the chondrocytes in miR - 27b - BMSC - exo group were cultured in RPMI - 1640 medium supplemented with IL - 1 $\beta$  with final concentration of 10 ng/mL and miR - 27b - BMSC - exo with final concentration of 80  $\mu$ g/mL, and the chondrocytes in BMSC - exo group were cultured in RPMI - 1640 medium supplemented with IL - 1 $\beta$  with final concentration of 10 ng/mL and BMSC - exo with final concentration of 80  $\mu$ g/mL. After cultured for continuous 0, 1, 2, 3, 4 and 8 hours, the well - grown rat chondrocytes were fetched out from each group respectively, and their cytoactive were detected by using MTT assay. After 24 - hour cell cultivation, the total proteins of rat chondrocytes were extracted and the expressions of cartilage injury - related proteins including cysteine aspartic acid specific protease (caspase) - 3, caspase - 9 and matrix metalloproteinase (MMP) - 13 were detected by using Western Blot method. ⑥Eighteen 8 - week - old female SD rats were obtained, and their left hind limb were fetched out. The 4.5 - mm diameter and 1 - mm depth cartilage defects on femoral trochlear grooves were created for building cartilage defect SD rat models. The 18 cartilage defect SD rat models were randomly divided into control group, miR - 27b - BMSC - exo group and BMSC - exo group, and were implanted with chon - PLGA, miR - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA and BMSC - exo - chon - PLGA osteochondral complexes respectively. The SD rats were sacrificed after breeding for 12 weeks. The effects of osteochondral complexes in repairing cartilage defects were observed, and the expressions of type II collagen and MMP - 13 were detected by using immunohistochemical staining. The total proteins were extracted from cartilage tissues of SD rats, and the expressions of caspase - 3, caspase - 9 and MMP - 13 were detected by using Western Blot method. **Results:** ①The disc - shaped vesicle - like membrane structure was found in BMSC - exo, and its particle size and Zeta potential was 92 - 115 nm and  $-22.13 \pm 2.1$  mV respectively. The particle size of BMSC - exo with the highest proportion was 106 nm. The expression levels of CD9 and CD63 were significantly higher in BMSC - exo group compared to BMSC group (relative gray - scale value (GSV):  $6.513 \pm 0.714$  vs  $1.001 \pm 0.021$ ,  $t = 18.902$ ,  $P = 0.000$ ;  $7.564 \pm 0.636$  vs  $1.026 \pm 0.027$ ,  $t = 25.158$ ,  $P = 0.000$ ). ②The expression levels of miR - 27b in BMSC and exo were higher in miR - 27b - BMSC group compared to BMSC group (relative expression level:  $46.785 \pm 8.153$  vs  $1.000 \pm 0.280$ ,  $t = 13.748$ ,  $P = 0.000$ ;  $34.825 \pm 8.612$  vs  $1.000 \pm 0.325$ ,  $t = 9.621$ ,  $P = 0.000$ ). ③The rat chondrocytes were co - cultured with miR - 27b - BMSC - exo for continuous 4 hours, and the miR - 27b - BMSC - exo was taken by rat chondrocytes. ④The expression level of miR - 27b in rat chondrocytes was higher in miR - 27b - BMSC - exo group compared to BMSC - exo group (relative expression level:  $3.315 \pm 0.523$  vs  $1.000 \pm 0.244$ ,  $t = 9.826$ ,  $P = 0.000$ ). ⑤There was interaction between time factor and group factor in rat chondrocytes activity ( $F = 2.836$ ,  $P = 0.049$ ). There was statistical difference in rat chondrocytes activity between the 4 groups in general, in other words, there was group effect ( $F = 11.345$ ,  $P = 0.049$ ). There was no statistical difference in rat chondrocytes activity between the 4 groups before the culture and after cultured for 1 and 2 hours ( $F = 0.047$ ,  $P = 0.406$ ;  $F = 0.765$ ,  $P = 0.189$ ;  $F = 2.095$ ,  $P = 0.063$ ). There was statistical difference in rat chondrocytes activity between the 4 groups after 3 - , 4 - and 8 - hour culture ( $F = 4.720$ ,  $P = 0.039$ ;  $F = 7.421$ ,  $P = 0.021$ ;  $F = 95.348$ ,  $P = 0.000$ ). The rat chondrocytes activity was lower in IL - 1 $\beta$  group compared to control group, miR - 27b - BMSC - exo group and BMSC - exo group (3 hours:  $P = 0.002$ ,  $P = 0.011$ ,  $P = 0.026$ ; 4 hours:  $P = 0.002$ ,  $P = 0.002$ ,  $P = 0.006$ ; 8 hours:  $P = 0.004$ ,  $P = 0.004$ ,  $P = 0.011$ ), and was higher in miR - 27b - BMSC - exo group compared to control group and BMSC - exo group (3 hours:  $P = 0.019$ ,  $P = 0.023$ ; 4 hours:  $P = 0.015$ ,  $P = 0.002$ ; 8 hours:  $P = 0.003$ ,  $P = 0.029$ ). There was no statistical difference in rat chondrocytes activity between different timepoints, in other words, there was no time effect ( $F = 0.258$ ,  $P = 0.083$ ). ⑥There was statistical difference in expression levels of cleaved - caspase - 3, cleaved - caspase - 9 and MMP - 13 between the 4 groups ( $F = 15.691$ ,  $P = 0.024$ ;  $F = 98.021$ ,  $P = 0.002$ ;  $F = 76.312$ ,  $P = 0.004$ ). The expression levels of cleaved - caspase - 3, cleaved - caspase - 9 and MMP - 13 in rat chondrocytes were higher in IL - 1 $\beta$  group compared to control group, miR - 27b - BMSC - exo group and BMSC - exo group (cleaved - caspase - 3:  $P = 0.025$ ,  $P = 0.020$ ,  $P = 0.006$ ; cleaved - caspase - 9:  $P = 0.011$ ,  $P = 0.008$ ,  $P = 0.036$ ; MMP - 13:  $P = 0.034$ ,  $P = 0.003$ ,  $P = 0.009$ ), and were lower in miR - 27b - BMSC - exo group compared to BMSC - exo group ( $P = 0.023$ ,  $P = 0.010$ ,  $P = 0.007$ ). ⑦The cartilage defect remediation effectiveness of SD rats were better in miR - 27b - BMSC - exo group compared to control group and BMSC - exo group under direct vision. The thin cartilage layer with irregular edge were found in rats of control group, and there was no boundary between subchondral bone and cartilage. While the thick cartilage layer with smooth edge were found in rats of miR - 27b - BMSC - exo group and BMSC - exo group, and there was clear boundary between subchondral bone and cartilage, and the hyaline cartilage remediation effectiveness were better in miR - 27b - BMSC - exo group compared to BMSC - exo group. ⑧The results of immunohistochemical staining showed that the MMP - 13 were high expressed in cartilage tissues of SD rats in control group and BMSC - exo group and low expressed in cartilage tissues of SD rats in miR - 27b - BMSC - exo group, and the

type II collagen were high expressed in cartilage tissues of SD rats in BMSC - exo group and miR - 27b - BMSC - exo group and low expressed in cartilage tissues of SD rats in control group. There was statistical difference in positive rate of the expression of MMP - 13 and type II collagen between the 3 groups ( $F = 126.178, P = 0.002; F = 209.24, P = 0.001$ ). The expression level of type II collagen was higher and the expression level of MMP - 13 was lower in chondrocytes of SD rats of miR - 27b - BMSC - exo group compared to control group and BMSC - exo group ( $P = 0.005, P = 0.012; P = 0.029, P = 0.014$ ). ⑨ There was statistical difference in expression levels of cleaved - caspase - 3, cleaved - caspase - 9 and MMP - 13 between the 3 groups ( $F = 15.126, P = 0.026; F = 33.151, P = 0.019; F = 53.522, P = 0.016$ ). The expression levels of cleaved - caspase - 3, cleaved - caspase - 9 and MMP - 13 were lower in miR - 27b - BMSC - exo group compared to control group and BMSC - exo group (cleaved - caspase - 3:  $P = 0.003, P = 0.006$ ; cleaved - caspase - 9:  $P = 0.001, P = 0.019$ ; MMP - 13:  $P = 0.007, P = 0.008$ ). **Conclusion:** The miR - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA osteochondral complex transplantation has significant clinical benefit in treatment of osteochondral defects, and its mechanisms of action may be that it can inhibit the expression of caspase - 3, caspase - 9 and MMP - 13 and promote the expression of type II collagen.

**Keywords** cartilage; chondrocytes; bone marrow; mesenchymal stem cells; exosomes; microRNAs; rats; animal experimentation

软骨损伤在骨科临床较为常见,由于软骨组织缺乏血管、神经和淋巴系统,自我修复能力非常有限<sup>[1]</sup>。目前,主要采用骨软骨移植等方法修复软骨损伤,但存在修复后软骨结构差、承重能力下降及易磨损等缺点<sup>[2]</sup>。研究表明,软骨细胞(chondrocytes, chon)与聚乳酸羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]构建的组织工程骨软骨复合体,可以促进软骨细胞分泌软骨基质,增强对软骨的保护作用,且在软骨组织中具有较好的亲和力<sup>[3]</sup>。因此,利用组织工程骨软骨复合体治疗软骨缺损具有较大的潜力和优势。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)能够促进组织再生,且无需诱导细胞分化即可直接植入<sup>[4-5]</sup>。目前,负载 BMSC 的骨软骨复合体已在实验室和临床研究中用于软骨修复。然而, BMSC 用于软骨修复对供体年龄有严格的要求,大龄供体的 BMSC 的增殖和分化能力均显著下降,导致修复效果不佳。因此,采用负载 BMSC 的骨软骨复合体进行软骨修复并不是最佳方法<sup>[6-7]</sup>。

研究发现, BMSC 通过旁分泌效应发挥对软骨的修复作用,而外泌体(exosomes, exo)在修复过程中发挥了重要作用<sup>[8]</sup>。外泌体是细胞分泌的具有单层膜结构的囊泡,直径 50 ~ 100 nm,存在于 BMSC 旁分泌介质中。研究表明, BMSC 来源外泌体(BMSC - exo)具有促进心脏、肝脏、皮肤、软骨等组织修复的作用<sup>[6]</sup>。与植入 BMSC 相比,植入 BMSC - exo 具有无细胞、易于操作、支持多途径使用等优势。microRNA(miRNA)是一类由内源基因编码的长度为 18 ~ 36 bp 的非编码单链 RNA 分子,其在动植物中参与转录后基因的表达调控。研究表明, miRNA - 27b(miR -

27b)具有促进软骨细胞增殖并加速软骨细胞再生的作用<sup>[9-13]</sup>,但目前仍缺乏关于负载 miR - 27b - BMSC 来源外泌体的软骨细胞 - PLGA(miR - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA)骨软骨复合体移植治疗软骨缺损的实验研究。为了进一步观察负载 miR - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA 骨软骨复合体移植治疗软骨缺损的效果并探究其作用机制,我们围绕 miR - 27b - BMSC - exo 开展了相关的实验研究,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验材料** BMSC(广州赛业生物科技有限公司),大鼠软骨细胞(美国典型培养物保藏中心),miR - 27b 过表达的重组腺病毒载体(上海吉凯基因科技有限公司),引物由北京天根生物化学有限公司合成,PLGA(北京奥京生物科技有限公司),Sprague - Dawley(SD)雌性大鼠(新乡医学院动物实验中心)。实验方案通过新乡医学院第一附属医院伦理委员会批准。

**1.2 实验试剂** 醋酸双氧乙砷溶液(青岛捷世康生物科技有限公司),蛋白抽提试剂盒、化学发光试剂盒(美国赛默飞公司),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),兔抗鼠 CD9、CD63、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, caspase) - 3 前体、切割 - caspase - 3、caspase - 9 前体、切割 - caspase - 9、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) - 13、 $\beta$  - 肌动蛋白( $\beta$  - actin)、甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH)、II 型胶原蛋白一抗及辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) G 二抗、生物素标记山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Abcam 公司),胎牛血

清和 RPMI - 1640 培养基(美国 Gibco 公司),白细胞介素(interleukin, IL) - 1 $\beta$ (北京同立海源生物科技有限公司), Trizol 试剂、DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒、苏木精伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒、番红 O - 固绿染色试剂盒、阿尔新蓝苏木精/橙 G (Alcian Blue Hematoxylin/Orange G, ABH/OG)染色试剂盒、抗原修复液(上海碧云天生物技术有限公司), 反转录试剂盒(日本 Takara 公司), TaqMan miRNA 分析试剂盒(哈尔滨 HaiGene 公司), Dil 细胞膜红色荧光探针(上海源叶生物科技有限公司), Hoechst33258 染色试剂(合肥 Biosharp 公司), 噻唑蓝[生工生物工程(上海)股份有限公司], 盐酸氯胺酮注射液(重庆药友制药有限责任公司, 国药准字 H50021106)。

**1.3 实验仪器** 超高速离心机(德国 Herolab 公司), 透射电子显微镜(日本电子株式会社), Mastersizer 2000 激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司), Zeta 电位分析仪(美国布鲁克海文仪器公司), D2500 荧光显微镜(德国徕卡公司)。

## 2 方法

**2.1 BMSC 和大鼠软骨细胞的培养** 将 BMSC 和大鼠软骨细胞分别培养于含有 10% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基上, 置于温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中。每 36 h 换液 1 次, 每 72 h 传代 1 次。

### 2.2 BMSC - exo 的制备与鉴定

**2.2.1 BMSC - exo 的制备** 取 4 mL 培养至第 2 或第 3 代的 BMSC 培养液于 15 mL 离心管中, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  下以 2000  $\times g$  离心 5 min 后, 转移上清液至新的 15 mL 离心管。重复该步骤, 依次以 3500  $\times g$  离心 15 min、10 000  $\times g$  离心 30 min、120 000  $\times g$  离心 140 min。最后一次离心完成后, 弃去上清液, 用 4 mL 无菌 PBS 将沉淀重新悬浮, 用 0.22  $\mu\text{m}$  无菌过滤器过滤, 转入 5 mL 离心管中, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下以 120 000  $\times g$  离心 70 min。离心后弃去上清液, 离心管底部残留的微量沉淀即为 BMSC - exo。加入 100  $\mu\text{L}$  的无菌 PBS 悬浮, 放置于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

**2.2.2 BMSC - exo 的鉴定** 取 10  $\mu\text{L}$  BMSC - exo 悬液, 滴入载样铜网中, 保留 1.5 min, 滴加 2% 醋酸双氧乙铀溶液染色 1 min 后, 用滤纸吸干, 再在室温下晾 1 min。将载样铜网置于样品室, 使用透射电子显微镜观察和拍照。取 10  $\mu\text{L}$  BMSC - exo 悬液, 注入 Mastersizer 2000 激光粒度分析仪, 测定 BMSC - exo 的粒

径。取 10  $\mu\text{L}$  BMSC - exo 悬液, 加入到 Zeta 电位分析仪, 测定 BMSC - exo 的 Zeta 电位。

**2.2.3 BMSC - exo 表面标记蛋白分析** 分别取一定量的 BMSC 和 BMSC - exo, 使用蛋白抽提试剂盒提取总蛋白, 并采用 BCA 法测定蛋白浓度。采用蛋白质印迹法(Western Blot)检测 BMSC - exo 的表面标记蛋白 CD9 和 CD63; 取 BMSC 蛋白和 BMSC - exo 蛋白进行 SDS - PAGE, 每个样品设置 6 个复孔, 每孔加入的总蛋白量相同; 将凝胶上的蛋白湿转到硝酸纤维素膜上, 加入 2% 牛血清白蛋白于室温下封闭 2 h, 加入兔抗鼠 CD9、CD63、GAPDH 一抗, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 抗体使用比例分别为 1:800、1:500、1:5000; 使用 TBST 溶液漂洗后加入辣根过氧化物酶标记 IgG 二抗, 抗体使用比例为 1:1 000, 于室温下孵育 1 h, 再次用 TBST 溶液漂洗, 根据化学发光试剂盒说明进行显色。拍照后采用 Image - J 图像处理软件处理图片, 提取蛋白条带的灰度值, 并分别以 GAPDH 蛋白和 BMSC 为基准进行 2 次标准化处理, 计算蛋白条带的相对灰度值, 比较蛋白的相对表达水平。

**2.3 感染重组腺病毒的 BMSC 中 miR - 27b 的表达分析** 取培养至第 2 或第 3 代的 BMSC 分为 2 组, 分别接种在 2 块 6 孔板中, 每孔细胞数量约  $1 \times 10^5$  个。待每孔细胞数量达到约  $2 \times 10^5$  时, 更换新鲜的 RPMI - 1640 培养基, BMSC 组加入 2 mL 新鲜的 RPMI - 1640 培养基, miR - 27b - BMSC 组加入 2 mL miR - 27b 过表达的重组腺病毒(感染复数为 100)培养液。培养 24 h 后, 根据 2.2.1 的方法分别制备 BMSC - exo 和 miR - 27b - BMSC - exo。采用 Trizol 法分别提取 BMSC、BMSC - exo、miR - 27b - BMSC、miR - 27b - BMSC - exo 中的总 RNA; 根据反转录试剂盒合成 cDNA; 采用 TaqMan MicroRNA 检测试剂盒说明进行实时定量 PCR (real time quantitative PCR, RT - qPCR), 使用 U6 作为内参基因; 计算 CT 值, 并使用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算 miR - 27b 的相对表达量。miR - 27b 的正向引物: 5' - CGTGGTGGCGTCAGAGGCCGTTTG - 3', 反向引物: 5' - CCGCCCAGCAGGGACAAAGAAC - 3'; 内参基因 U6 的正向引物: 5' - GCTTCGGCAGCATATACTAAAT - 3', 反向引物: 5' - CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT - 3'。

**2.4 大鼠软骨细胞摄取 miR - 27 - BMSC - exo 的情况观察** 取 100  $\mu\text{L}$  浓度为 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 miR - 27b -

exo, 加入 1 mL Dil 细胞膜红色荧光探针, 于 4 ℃ 染色 30 min; 染色后于 4 ℃ 下以  $10\,000 \times g$  离心 60 min, 弃上清液; 用 PBS 洗涤沉淀 3 次, 每次洗涤后于 4 ℃ 下以  $10\,000 \times g$  离心 60 min, 弃上清液; 加入 100  $\mu\text{L}$  无菌 PBS 将沉淀悬浮以备用。取 1 mL 培养至第 2 或第 3 代的大鼠软骨细胞液(细胞密度约为  $3 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ) 接种于放置有爬片的培养皿中, 培养至细胞汇合率达到 80% 时, 加入 100  $\mu\text{L}$  上述 miR-27b-BMSC-exo 悬液, 8 字轨道轻轻混匀, 于 37 ℃ 下培养 4 h。在培养皿中加入 1 mL Hoechst33258 染色液, 染色 5 min; 吸取染色液, 用 PBS 洗涤 3 次。取出爬片置于载玻片上, 加盖玻片后, 置于荧光显微镜下观察。

**2.5 共培养后大鼠软骨细胞中 miR-27b 的表达分析** 取一定量培养至第 2 或第 3 代的大鼠软骨细胞培养液, 分为 2 组。BMSC-exo 组接种于 BMSC-exo 终浓度为 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI-1640 培养基, miR-27b-BMSC-exo 组接种于 miR-27b-BMSC-exo 终浓度为 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI-1640 培养基; 每组 1 块 6 孔板, 每孔加入 1 mL 培养基和 1 mL 细胞密度约为  $3 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的大鼠软骨细胞培养液, 置于温度为 37 ℃、二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中培养 4 h。收集大鼠软骨细胞, 按照 2.3 的方法进行 RT-qPCR 检测。

## 2.6 miR-27b-BMSC-exo 影响大鼠软骨细胞的观察

**2.6.1 大鼠软骨细胞的分组处理** 取一定量培养至第 2 或第 3 代的大鼠软骨细胞, 分为 4 组。对照组于 RPMI-1640 培养基中培养, 不进行干预, IL-1 $\beta$  组在 IL-1 $\beta$  终浓度为 10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI-1640 培养基中培养, miR-27b-BMSC-exo 组在 IL-1 $\beta$  终浓度为 10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、miR-27b-BMSC-exo 终浓度为 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI-1640 培养基中培养, BMSC-exo 组在 IL-1 $\beta$  终浓度为 10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、BMSC-exo 终浓度为 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI-1640 培养基中培养; 每组 1 块 6 孔板, 每孔加入 1 mL 培养基和 1 mL 细胞密度约为  $3 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的大鼠软骨细胞培养液, 置于温度为 37 ℃、二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中培养。

**2.6.2 大鼠软骨细胞的活力测定** 分别于 0 h、1 h、2 h、3 h、4 h 和 8 h 收集一定量的各组细胞, 接种到 96 孔板中, 每组细胞接种 6 个复孔, 每孔细胞个数约为 3000 个。根据噻唑蓝试剂说明, 采用 MTT 法检测每

个孔的吸光度。

**2.6.3 大鼠软骨细胞中软骨损伤相关蛋白的表达分析** 于培养 24 h 后收集各组细胞, 使用蛋白抽提试剂盒提取总蛋白。采用 Western Blot 检测 caspase-3 前体、切割 - caspase-3、caspase-9 前体、切割 caspase-9、MMP-13 蛋白的表达, 步骤同 2.2.3 中 Western Blot 步骤, 其中 caspase-3 前体、切割 - caspase-3、caspase-9 前体、切割 - caspase-9 等 MMP-13、 $\beta$ -actin 兔抗鼠一抗的使用比例分别为 1:500、1:700、1:400、1:600、1:500、1:2000, 辣根过氧化物酶标记 IgG 二抗的使用比例为 1:1000。拍照后采用 Image-J 图像处理软件处理图片, 提取蛋白条带的灰度值, 并分别以  $\beta$ -actin 蛋白和对照组为基准进行 2 次标准化处理, 计算蛋白条带的相对灰度值, 比较蛋白的相对表达水平。

## 2.7 miR-27b-BMSC-exo 影响骨软骨复合体移植治疗软骨缺损的观察

**2.7.1 骨软骨复合体的制备** 将直径 3.5 mm、高 3.0 mm、孔隙率 91%~96% 的圆柱体 PLGA 支架经多聚赖氨酸浸泡 12 h, 再用 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的环氧乙烷在 55 ℃ 灭菌 12 h, 然后在无菌室静置 5 d, 使用无菌 PBS 漂洗, 干燥后保存于干燥器中以备用。取一定量培养至第 2 或第 3 代的大鼠软骨细胞培养液, 分为 3 组, 分别接种于 RPMI-1640 培养基、BMSC-exo 终浓度为 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 RPMI-1640 培养基进行培养, 制备 chon、BMSC-exo-chon、miR-27b-BMSC-exo-chon 的细胞培养液。将 PLGA 支架放置于培养皿中, 用 PBS 湿润后, 分别加入 1 mL 细胞密度约为  $5 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$  的 chon、BMSC-exo-chon、miR-27b-exo-chon 的细胞培养液, 于温度为 37 ℃、二氧化碳浓度为 5% 的培养箱中培养。检测细胞密度, 待细胞密度达到  $1.5 \times 10^4$  个  $\cdot \text{mm}^{-3}$ , 将骨软骨复合体置于 4 ℃ 下保存。

**2.7.2 软骨缺损 SD 大鼠模型的建立** 将 18 只 8 周龄 SD 雌性大鼠适应性喂养 1 周后, 采用腹腔注射盐酸氯胺酮注射液进行麻醉, 盐酸氯胺酮的用量为 80  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。于 SD 大鼠左后肢膝关节取髌骨内侧纵形切口, 使髌骨侧方脱位, 显露膝关节; 使用直径 4.0 mm 的空心钻在股骨远端滑车沟槽制造直径 4.5 mm、深度 1 mm 的软骨缺损, 建立软骨缺损 SD 大

鼠模型。

**2.7.3 骨软骨复合体植入软骨缺损 SD 大鼠** 采用随机数字表将 18 只软骨缺损 SD 大鼠随机分为 3 组, 对照组植入 chon-PLGA 骨软骨复合体, miR-27b-BMSC-exo 组植入 miR-27b-BMSC-exo-chon-PLGA 骨软骨复合体, BMSC-exo 组植入 BMSC-exo-chon-PLGA 骨软骨复合体。将骨软骨复合体填塞于骨缺损处, 使关节创面平滑, 恢复脱位的髌骨, 逐层缝合切口, 加压包扎。

**2.7.4 SD 大鼠软骨修复观察** SD 大鼠术后饲养 12 周, 采取脊椎脱臼法处死。切取股骨远端, 暴露软骨创面进行观察。取含有创面的骨组织制备石蜡切片, 在切片后分别采用 HE、番红 O-固绿、ABH/OG 试剂盒进行染色, 于显微镜下观察。

**2.7.5 SD 大鼠软骨组织中软骨损伤修复标志蛋白的表达分析** 取切片后的石蜡切片, 加入抗原修复液进行抗原修复。加入兔抗鼠的 II 型胶原蛋白、MMP-13 一抗孵育 20 min, 抗体使用比例分别为 1:600、1:800, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入生物素标记山羊抗兔 IgG 二抗孵育 2 h, 抗体使用比例为 1:2000。根据 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒说明进行显色。显色后用蒸馏水冲洗, 再使用苏木精复染, 于显微镜下观察, 拍照后采用 Image-Pro plus 6.0 图像分析软件处理, 并比较软骨损伤修复标志蛋白的表达阳性率。

**2.7.6 SD 大鼠软骨组织中软骨损伤相关蛋白的表达分析** 取 SD 大鼠含创面的新鲜软骨组织, 磨成匀浆后, 使用蛋白抽提试剂盒提取总蛋白。采用 Western Blot 检测 caspase-3 前体、切割-caspase-3、caspase-9 前体、切割-caspase-9、MMP-13 蛋白的表达, 步骤同 2.2.3 Western Blot, 兔抗鼠 caspase-3 前体、切割-caspase-3、caspase-9 前体、切割-caspase-9、MMP-13、 $\beta$ -actin 一抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗的使用比例与 2.6.3 相同。采用 Image-J 图像处理软件处理图片, 提取蛋白条带的灰度值, 并以  $\beta$ -actin 蛋白为基准进行标准化处理, 计算蛋白条带的相对灰度值, 比较蛋白的相对表达水平。

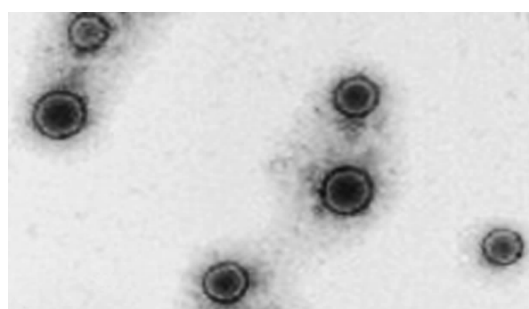
**2.8 数据统计** 采用 GraphPad Prism 5.0 进行实验数据的统计分析。CD9 和 CD63 蛋白表达的相对灰度值、miR-27b 相对表达量的组间比较采用  $t$  检验; 大鼠软骨细胞活力的比较采用重复测量资料的方差

分析; 软骨损伤相关蛋白表达的相对灰度值、软骨损伤修复标志蛋白表达阳性率的组间总体比较均采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

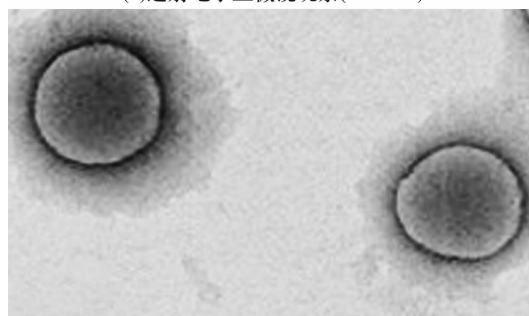
### 3 结果

**3.1 BMSC-exo 的鉴定结果** BMSC-exo 为圆盘形囊泡状膜结构(图 1), 粒径 92~115 nm, 数量占比最高的 BMSC-exo 的粒径为 106 nm(图 2); BMSC-exo 的 Zeta 电位为  $(-22.13 \pm 2.1)$  mV。BMSC-exo 表面标记物 CD9 和 CD63 在 BMSC-exo 组的表达量显著高于 BMSC 组, 差异有统计学意义(图 3、表 1)。

**3.2 miR-27b 表达的检测结果** miR-27b 在 miR-27b-BMSC 组 BMSC 中的表达量高于 BMSC 组(相对表达量:  $46.785 \pm 8.153$ ,  $1.000 \pm 0.280$ ,  $t=13.748$ ,  $P=0.000$ ), miR-27b 在 miR-27b-BMSC 组 exo 中的表达量高于 BMSC 组(相对表达量:  $34.825 \pm 8.612$ ,  $1.000 \pm 0.325$ ,  $t=9.621$ ,  $P=0.000$ )。见图 4。



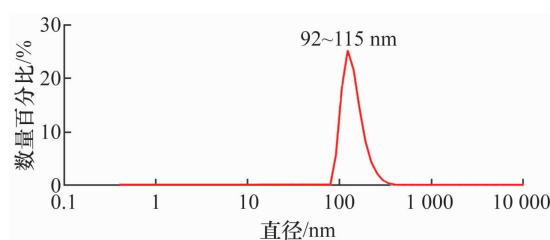
(1)透射电子显微镜观察( $\times 50\ 000$ )



(2)透射电子显微镜观察( $\times 200\ 000$ )

BMSC:骨髓间充质干细胞;exo:外泌体。

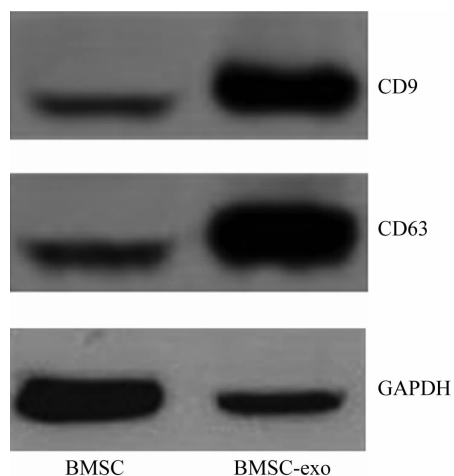
图 1 BMSC-exo 的形态图



BMSC:骨髓间充质干细胞;exo:外泌体。

图 2 BMSC-exo 的粒径分布图





BMSC:骨髓间充质干细胞;exo:外泌体;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶,为内参蛋白。

图3 BMSC和BMSC-exo表面标记蛋白表达的蛋白印迹法检测结果

表1 BMSC和BMSC-exo表面标记蛋白的相对表达量

组别	样本量/个	相对灰度值( $\bar{x} \pm s$ )	
		CD9	CD63
BMSC <sup>1)</sup> 组	6	1.001 ± 0.021	1.026 ± 0.027
BMSC <sup>1)</sup> -exo <sup>2)</sup> 组	6	6.513 ± 0.714	7.564 ± 0.636
<i>t</i> 值		18.902	25.158
<i>P</i> 值		0.000	0.000

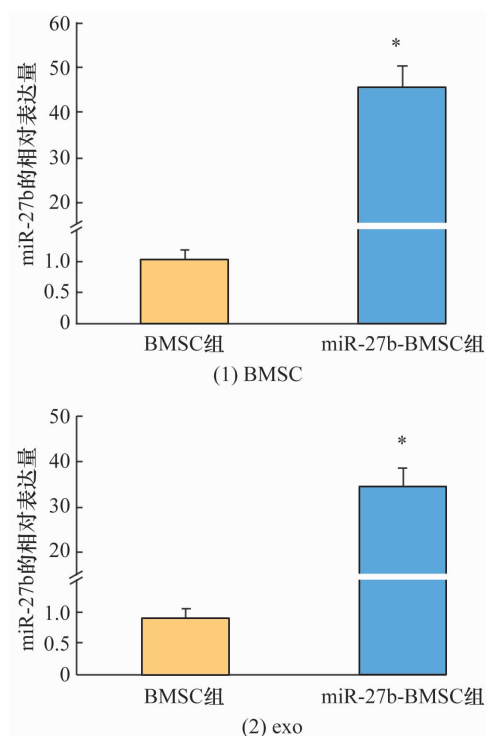
1)骨髓间充质干细胞;2)外泌体。

**3.3 大鼠软骨细胞对 miR-27b-BMSC-exo 的摄取情况** 大鼠软骨细胞和 miR-27b-BMSC-exo 共培养 4 h, miR-27b-BMSC-exo 被大鼠软骨细胞摄取(图 5)。

**3.4 共培养后大鼠软骨细胞中 miR-27b 表达的检测结果** miR-27b 在 miR-27b-BMSC-exo 组大鼠软骨细胞中的表达量高于 BMSC-exo 组(相对表达量:3.315 ± 0.523, 1.000 ± 0.244,  $t = 9.826$ ,  $P = 0.000$ )。见图 6。

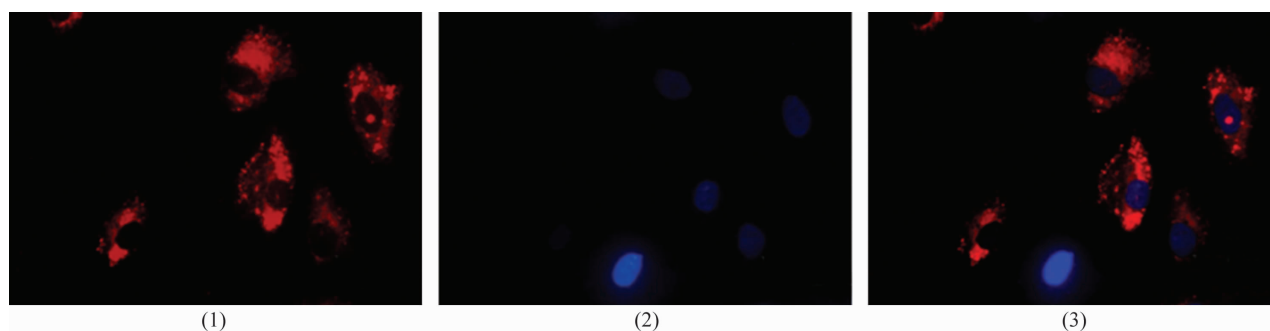
### 3.5 miR-27b-BMSC-exo 对大鼠软骨细胞的影响

**3.5.1 大鼠软骨细胞活力的测定结果** 时间因素与分组因素存在交互效应。4 组大鼠软骨细胞活力总体比较,差异有统计学意义,即存在分组效应。培养前及培养 1 h、2 h,大鼠软骨细胞活力的组间差异无统计学意义;培养 3 h、4 h、8 h,大鼠软骨细胞活力的组间差异有统计学意义,IL-1 $\beta$  组的大鼠软骨细胞活力小于对照组、miR-27b-BMSC-exo 组、BMSC-exo 组(3 h:  $P = 0.002$ ,  $P = 0.011$ ,  $P = 0.026$ ; 4 h:  $P = 0.002$ ,  $P = 0.002$ ,  $P = 0.006$ ; 8 h:  $P = 0.004$ ,  $P = 0.004$ ,  $P = 0.011$ ), miR-27b-BMSC-exo 组的大鼠



miR: microRNA; BMSC:骨髓间充质干细胞;exo:外泌体。

图4 miR-27b在BMSC和exo中的表达结果



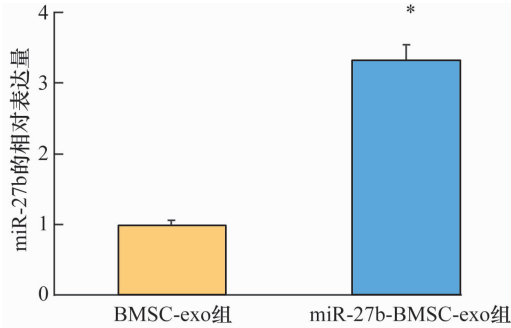
miR: microRNA; BMSC:骨髓间充质干细胞;exo:外泌体。

图5 大鼠软骨细胞摄取 miR-27b-BMSC-exo 图片( $\times 400$ )

注:(1) miR-27b-BMSC-exo,采用 Dil 细胞膜红色荧光探针染色,呈现红色;(2)大鼠软骨细胞,采用 Hoechst33258 染色试剂染色,细胞核呈现蓝色;(3)大鼠软骨细胞与 miR-27b-BMSC-exo 共培养后,大鼠软骨细胞摄取 miR-27b-BMSC-exo。

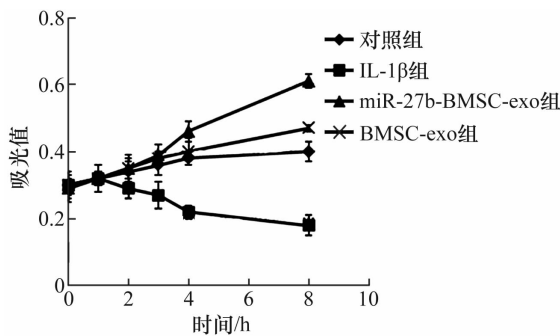


软骨细胞活力大于对照组和 BMSC - exo 组 (3 h;  $P = 0.019$ ,  $P = 0.023$ ; 4 h;  $P = 0.015$ ,  $P = 0.002$ ; 8 h;  $P = 0.003$ ,  $P = 0.029$ )。不同时间点大鼠软骨细胞活力总体比较, 差异无统计学意义, 即不存在时间效应。见图 7、表 2。



miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体。

图 6 miR - 27b 在大鼠软骨细胞中的表达结果

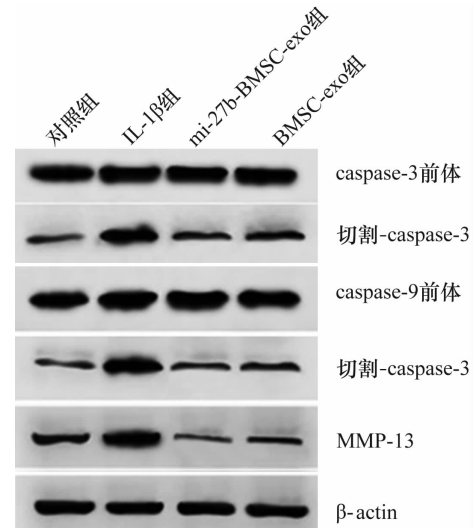


IL: 白细胞介素; miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体。

图 7 4 种不同因素干预后不同时间点 4 组大鼠软骨细胞活力测定结果

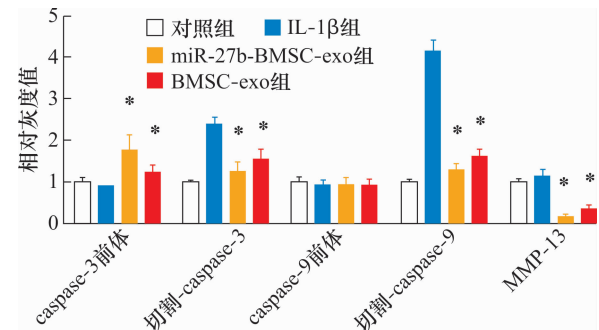
**3.5.2 大鼠软骨细胞中软骨损伤相关蛋白表达的检测结果** 切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 的表达量组间比较, 差异有统计学意义。IL - 1 $\beta$  组大鼠软骨细胞切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 的表达量高于对照组、miR - 27b - BMSC - exo 组、BMSC - exo 组 (切割 - caspase - 3:  $P = 0.025$ ,  $P = 0.020$ ,  $P = 0.006$ ; 切割 - caspase - 9:  $P = 0.011$ ,  $P = 0.008$ ,  $P = 0.036$ ; MMP - 13:  $P = 0.034$ ,  $P =$

$0.003$ ,  $P = 0.009$ ) ; miR - 27b - BMSC - exo 组大鼠软骨细胞中切割 - caspase - 3、切割 - caspase - 9 和 MMP - 13 的表达量低于 BMSC - exo 组 ( $P = 0.023$ ,  $P = 0.010$ ,  $P = 0.007$ )。见图 8、图 9、表 3。



IL: 白细胞介素; miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; MMP: 基质金属蛋白酶;  $\beta$  - actin:  $\beta$  肌动蛋白。

图 8 大鼠软骨细胞中软骨损伤相关蛋白表达的蛋白质印迹法检测结果



IL: 白细胞介素; miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; MMP: 基质金属蛋白酶。

图 9 4 种不同因素干预 24 h 后 4 组大鼠软骨细胞中软骨损伤相关蛋白的表达结果

表 2 4 种不同因素干预后不同时间点 4 组大鼠软骨细胞的活力

组别	样本量/ 个	大鼠软骨细胞活力( $\bar{x} \pm s$ )							F 值	P 值
		0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	8 h	合计		
对照组	6	0.321 ± 0.025	0.356 ± 0.078	0.389 ± 0.031	0.379 ± 0.048	0.387 ± 0.033	0.403 ± 0.018	0.373 ± 0.039	0.107	0.205
IL <sup>1)</sup> - 1β 组	6	0.325 ± 0.051	0.377 ± 0.102	0.326 ± 0.024	0.289 ± 0.034	0.206 ± 0.014	0.189 ± 0.053	0.285 ± 0.046	7.540	0.019
miR <sup>2)</sup> - 27b - BMSC <sup>3)</sup> - exo <sup>4)</sup> 组	6	0.343 ± 0.064	0.368 ± 0.042	0.385 ± 0.077	0.396 ± 0.053	0.412 ± 0.067	0.615 ± 0.105	0.420 ± 0.068	12.095	0.006
BMSC <sup>3)</sup> - exo <sup>4)</sup> 组	6	0.315 ± 0.014	0.371 ± 0.066	0.376 ± 0.041	0.379 ± 0.065	0.399 ± 0.053	0.431 ± 0.034	0.379 ± 0.046	2.719	0.057
合计	24	0.330 ± 0.032	0.372 ± 0.068	0.365 ± 0.068	0.375 ± 0.061	0.345 ± 0.084	0.386 ± 0.104	0.382 ± 0.079	0.258 <sup>5)</sup>	0.083 <sup>5)</sup>
F 值		0.047	0.765	2.095	4.720	7.421	95.348	11.345 <sup>5)</sup>	F = 2.836 <sup>6)</sup>	
P 值		0.406	0.189	0.063	0.039	0.021	0.000	0.000 <sup>5)</sup>	P = 0.049 <sup>6)</sup>	

1) 白细胞介素; 2) microRNA; 3) 骨髓间充质干细胞; 4) 外泌体; 5) 主效应的 F 值和 P 值; 6) 交互效应的 F 值和 P 值。

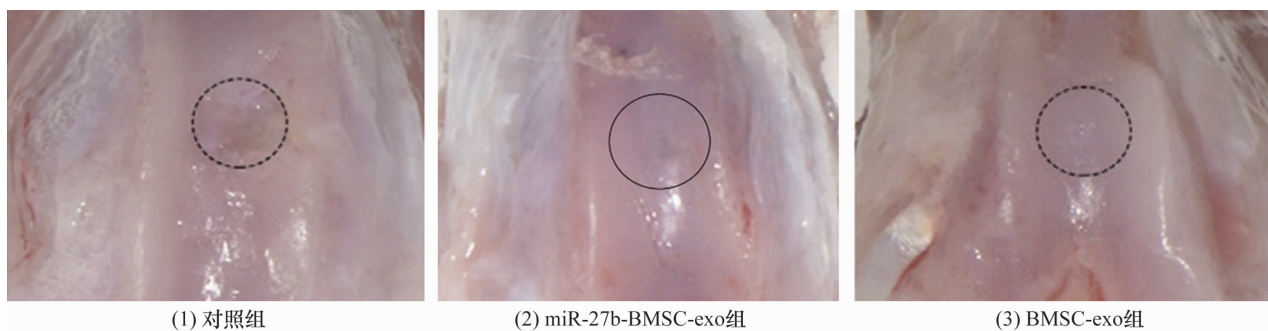
**3.6 SD 大鼠软骨缺损修复效果** 直视下观察, miR-27b-BMSC-exo 组 SD 大鼠软骨损伤修复效果优于对照组和 BMSC-exo 组(图 10)。病理染色结果显示,对照组软骨层较薄,边缘不规则,软骨下骨和

软骨无界限;miR-27b-BMSC-exo 组和 BMSC-exo 组软骨层较厚,边缘光滑,软骨下骨和软骨界限清晰,且 miR-27b-BMSC-exo 组透明软骨修复效果优于 BMSC-exo 组(图 11 至图 13)。

表 3 4 种不同因素干预 24 h 后 4 组大鼠软骨细胞中软骨损伤相关蛋白的相对表达量

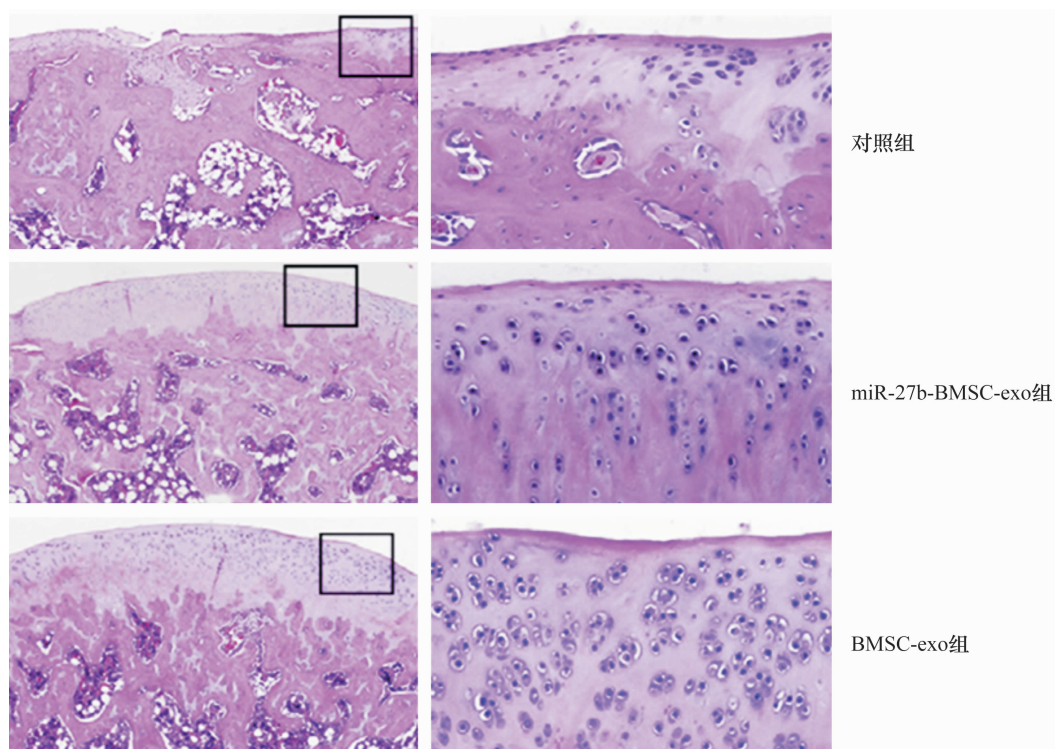
组别	样本量/ 个	相对灰度值( $\bar{x} \pm s$ )				
		caspase <sup>5</sup> -3 前体	切割-caspase <sup>5</sup> -3	caspase <sup>9</sup> -9 前体	切割-caspase <sup>9</sup> -9	MMP <sup>6</sup> -13
对照组	6	1.000 ± 0.100	1.000 ± 0.020	1.000 ± 0.120	1.000 ± 0.060	1.000 ± 0.070
IL <sup>1</sup> -1 $\beta$ 组	6	0.914 ± 0.011	2.400 ± 0.150	0.940 ± 0.100	4.150 ± 0.250	1.140 ± 0.150
miR <sup>2</sup> -27b-BMSC <sup>3</sup> -exo <sup>4</sup> 组	6	1.770 ± 0.360	1.270 ± 0.210	0.950 ± 0.170	1.300 ± 0.140	0.180 ± 0.040
BMSC <sup>3</sup> -exo <sup>4</sup> 组	6	1.250 ± 0.150	1.550 ± 0.240	0.927 ± 0.140	1.630 ± 0.150	0.380 ± 0.070
F 值		12.055	15.691	4.361	98.021	76.312
P 值		0.015	0.024	0.291	0.002	0.004

1) 白细胞介素;2) microRNA;3) 骨髓间充质干细胞;4) 外泌体;5) 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;6) 基质金属蛋白酶。



miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体。

图 10 骨软骨复合体移植后 12 周 3 组 SD 大鼠软骨缺损修复效果直视下观察图片



miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体; 左侧图放大 40 倍; 右侧图放大 200 倍。

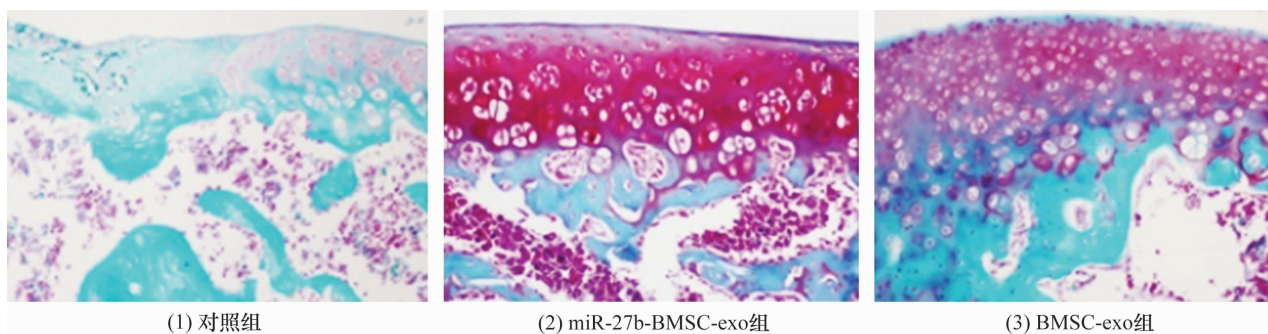
图 11 骨软骨复合体移植后 12 周 3 组 SD 大鼠软骨缺损修复效果 HE 染色图片



**3.7 SD 大鼠软骨组织中软骨损伤修复标志蛋白表达的检测结果** 免疫组织化学染色显示,对照和 BMSC-exo 组 SD 大鼠软骨组织中 MMP-13 高表达,miR-27b-BMSC-exo 组 SD 大鼠软骨组织中 MMP-13 低表达(图 14);对照组 SD 大鼠软骨组织中 II 型胶原蛋白低表达,BMSC-exo 组和 miR-27b-BMSC-exo 组 SD 大鼠软骨组织中 II 型胶原蛋白高表达(图 15)。MMP-13、II 型胶原蛋白的表达阳性率的组间比较,差异有统计学意义,miR-27b-BMSC-exo 组 SD 大鼠软骨组织 II 型胶原蛋白表达量高于对照组和 BMSC-exo 组( $P = 0.005, P =$

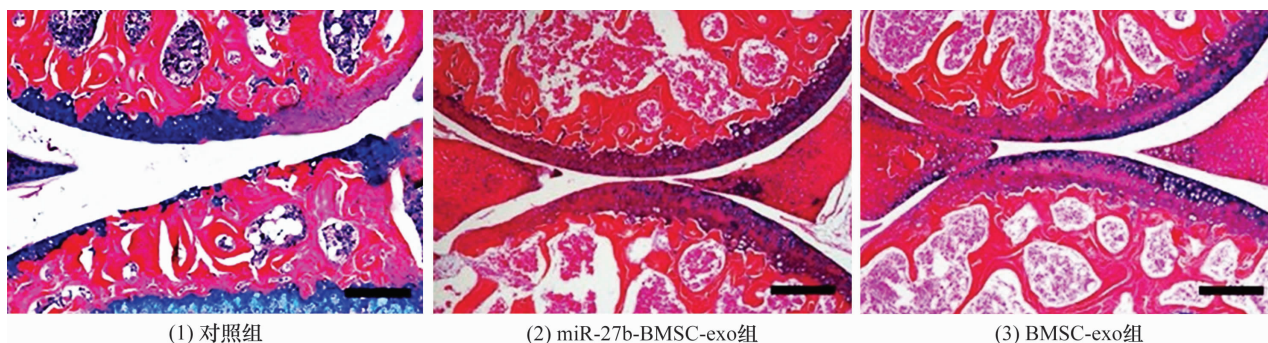
$0.012$ ),MMP-13 的表达量低于对照组和 BMSC-exo 组( $P = 0.029, P = 0.014$ )。见表 4。

**3.8 SD 大鼠软骨组织中软骨损伤相关蛋白表达的检测结果** 切割-caspase-3、切割-caspase-9 和 MMP-13 的表达量组间比较,差异有统计学意义。miR-27b-BMSC-exo 组切割-caspase-3、切割-caspase-9 和 MMP-13 的表达量均低于对照组和 BMSC-exo 组(切割-caspase-3: $P = 0.003, P = 0.006$ ;切割-caspase-9: $P = 0.001, P = 0.019$ ;MMP-13: $P = 0.007, P = 0.008$ )。见图 16、图 17、表 5。



miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞;exo: 外泌体。

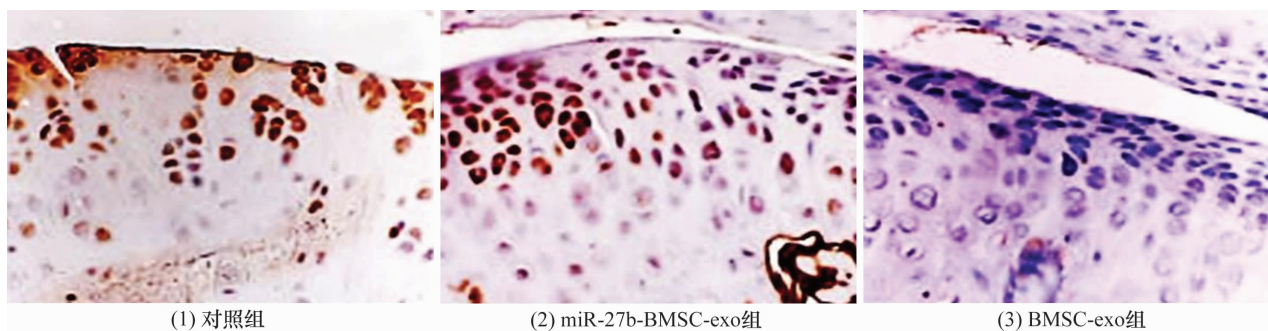
图 12 骨软骨复合体移植后 12 周 3 组 SD 大鼠软骨缺损修复效果番红 O-固绿染色图片( $\times 40$ )



miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞;exo: 外泌体。

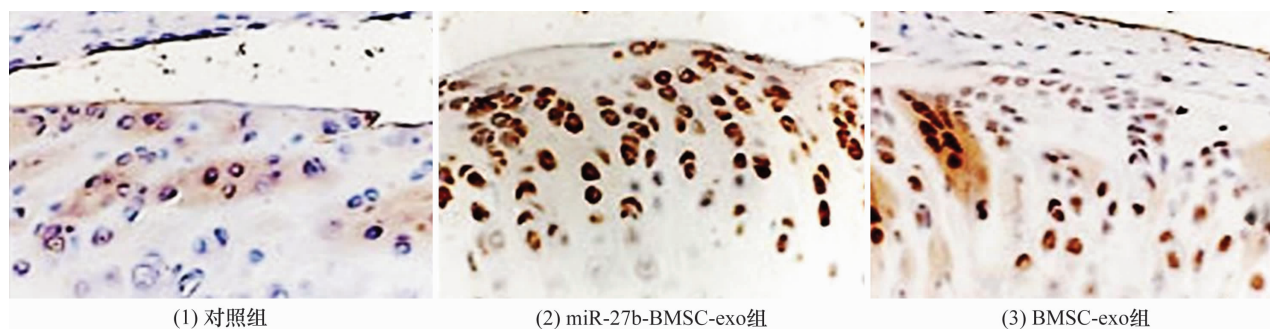
图 13 骨软骨复合体移植后 12 周 3 组 SD 大鼠软骨缺损修复效果 ABH/OG 染色图片( $\times 40$ )

注:图中红色为骨基质,蓝色及蓝紫色为软骨层。



miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞;exo: 外泌体;MMP: 基质金属蛋白酶。

图 14 骨软骨复合体移植后 12 周 3 组 SD 大鼠软骨组织中 MMP-13 表达的免疫组织化学检测结果( $\times 40$ )



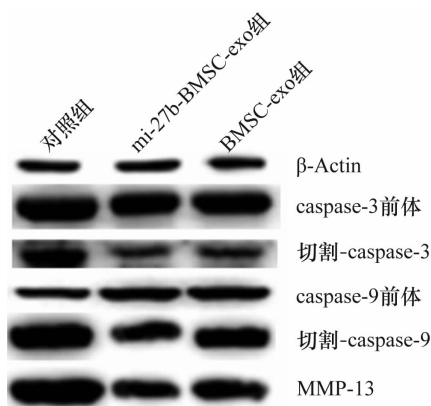
miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体。

图 15 骨软骨复合体移植后 12 周 3 组 SD 大鼠软骨组织中 II 型胶原蛋白表达的免疫组织化学检测结果 (×40)

表 4 骨软骨复合体移植后 12 周 3 组 SD 大鼠软骨组织中 MMP-13 和 II 型胶原蛋白的表达阳性率

组别	样本量/ 只	蛋白表达阳性率/( $\bar{x} \pm s, \%$ )	
		MMP <sup>4)</sup> -13	II 型胶原蛋白
对照组	6	23.612 ± 3.612	6.881 ± 1.250
miR <sup>1)</sup> -27b-BMSC <sup>2)</sup> -exo <sup>3)</sup> 组	6	2.124 ± 0.089	31.255 ± 5.314
BMSC <sup>2)</sup> -exo <sup>3)</sup> 组	6	17.258 ± 2.514	22.547 ± 5.414
F 值		126.178	209.24
P 值		0.002	0.001

1) microRNA; 2) 骨髓间充质干细胞; 3) 外泌体; 4) 基质金属蛋白酶。



miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体;  
β-Actin: β 肌动蛋白; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; MMP: 基质金属蛋白酶。

图 16 SD 大鼠软骨组织中软骨损伤相关蛋白表达的蛋白质印迹法检测结果

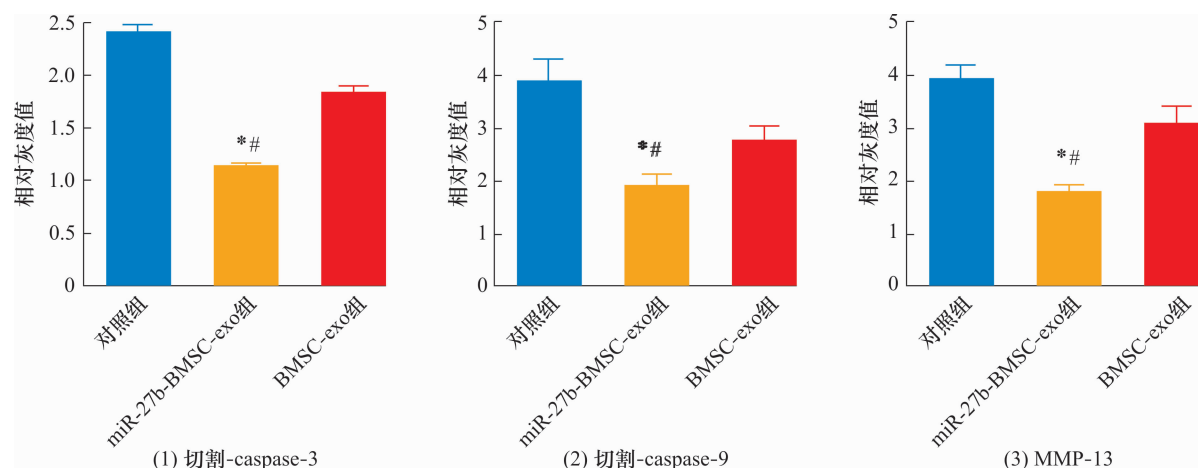
#### 4 讨论

BMSC 的外泌体所含成分较多, 主要包括 miRNA、mRNA、蛋白质等, 这些成分在细胞通信中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。miRNA 种类繁多, 主要参与转录后基因的表达调控, 但大多数 miRNA 的生理功能尚不清楚。Zhou 等<sup>[15]</sup>研究表明, miR-27b 能够显著降低大鼠软骨细胞中促凋亡蛋白 caspase-3 的表达、提高抗凋亡

蛋白 Bcl-2 的表达, 从而抑制大鼠软骨细胞的凋亡。苏永蔚等<sup>[16]</sup>研究发现, 在软骨细胞炎症模型大鼠的关节腔内注射 miR-27b-BMSC-exo, 能够减缓关节软骨退行性病变, 具有明显的抗炎作用。我们通过实验证明了 miR-27b 能够在 BMSC 以及 BMSC-exo 中高表达, 且大鼠软骨细胞能够摄取 miR-27b-BMSC-exo; 而在大鼠软骨细胞摄取 miR-27b-BMSC-exo 后, 能够在大鼠软骨细胞中检测到 miR-27b 过表达, 为进一步观察 miR-27b-BMSC-exo-chon-PLGA 骨软骨复合体移植治疗软骨缺损的效果并探究其作用机制奠定了基础。

Caspase 是一类天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶, 包括 caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8, caspase-9 等, 其中 caspase-8、caspase-9 是细胞凋亡的启动者, 而 caspase-3、caspase-6、caspase-7 是细胞凋亡的参与者<sup>[17]</sup>。Choi 等<sup>[18]</sup>研究发现, caspase-3 在骨缺损模型中高表达。Ren 等<sup>[19]</sup>研究发现, caspase-9 的表达与大鼠软骨细胞凋亡以及软骨损伤的发展密切相关。Jiang 等<sup>[20]</sup>研究发现, 抑制 caspase-9 的激活可以显著降低高糖诱导的软骨终板细胞凋亡。我们给予大鼠软骨细胞炎症刺激后, 切割-caspase-3、切割-caspase-9 的表达量显著增高, 而加入 miR-27b-BMSC-exo 能够显著降低切割-caspase-3 和切割-caspase-9 的表达水平, 且在软骨缺损模型 SD 大鼠的软骨组织中也表现出相同的结果。Zhou 等<sup>[15]</sup>研究发现, miR-27b 能够抑制大鼠软骨细胞中的 caspase-3 和 caspase-9 的表达, 与本研究结果一致。因此, miR-27b-BMSC-exo 促进软骨细胞修复可能与其抑制 caspase-3、caspase-9 的表达有关, 在大鼠软骨细胞损伤过程中发挥了抑制软骨细胞凋亡的作用。





miR: microRNA; BMSC: 骨髓间充质干细胞; exo: 外泌体; caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; MMP: 基质金属蛋白酶。

图 17 骨软骨复合体移植后 12 周 SD 大鼠软骨组织中软骨损伤相关蛋白的表达结果

表 5 骨软骨复合体移植后 12 周 SD 大鼠软骨组织中软骨损伤相关蛋白的表达结果

组别	样本量/只	相对灰度值( $\bar{x} \pm s$ )		
		切割 - caspase <sup>(4)</sup> - 3	切割 - caspase <sup>(4)</sup> - 9	MMP <sup>(5)</sup> - 13
对照组	6	2.412 ± 0.051	3.812 ± 0.596	3.951 ± 0.451
miR <sup>(1)</sup> - 27b - BMSC <sup>(2)</sup> - exo <sup>(3)</sup> 组	6	1.084 ± 0.072	1.960 ± 0.126	1.926 ± 0.210
BMSC <sup>(2)</sup> - exo <sup>(3)</sup> 组	6	1.792 ± 0.072	2.421 ± 0.236	3.022 ± 0.366
F 值		15.126	33.151	53.522
P 值		0.026	0.019	0.016

1) microRNA; 2) 骨髓间充质干细胞; 3) 外泌体; 4) 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 5) 基质金属蛋白酶。

MMP 家族是组织修复和重塑的重要调节酶。在关节中, MMP 的过度表达会导致软骨基质的降解以及软骨细胞的凋亡, 最终导致软骨的破坏, 引起关节病变。Ⅱ型胶原蛋白占关节软骨基质胶原蛋白的 90% ~ 95%。研究表明, MMP - 13 对Ⅱ型胶原蛋白的降解作用最强, 且Ⅱ型胶原蛋白亦被 MMP - 13 优先降解<sup>[21-22]</sup>。MMP - 13 是与软骨退行性病变的发病机制密切相关的一种金属蛋白酶<sup>[23-24]</sup>。Piecha 等<sup>[25]</sup>报道了一种强效的选择性 MMP - 13 抑制剂, 能够显著抑制人类骨关节炎中的软骨降解。因此, 抑制 MMP - 13 的表达是抑制软骨基质降解、促进软骨缺损修复的重要方法。Akhtar 等<sup>[9]</sup>研究发现, 大鼠软骨细胞被 IL - 1 $\beta$  刺激后, miR - 27b 的表达急剧下调, MMP - 13 的表达显著增加, 而过量表达 miR - 27b 的大鼠软骨细胞中, MMP - 13 的表达被显著抑制。Xu 等<sup>[26]</sup>研究发现, 在小鼠关节软骨中过表达 miR - 27b 可以抑制Ⅱ型胶原蛋白和 MMP - 13 的表达, 并促进Ⅱ型胶原蛋白 mRNA 和蛋白水平上调。我们的早期实验也证实了 miR - 27b 能够抑制大鼠软骨细胞中 MMP - 13 的表达, 而本研究采用 miRNA - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA 骨软骨复合体植入软骨缺损的 SD 大鼠, 结果显示 SD 大鼠骨软骨移植修复软

骨缺损的效果显著提高, 而软骨损伤相关蛋白的检测结果显示 MMP - 13 的表达显著下降, 提示其作用机制可能与 miR - 27b 抑制 MMP - 13 的表达, 进而抑制软骨基质降解、促进软骨缺损修复有密切关系。

本研究结果表明, miRNA - 27b - BMSC - exo - chon - PLGA 骨软骨复合体移植治疗软骨缺损, 能够显著提高治疗效果, 其作用机制可能与抑制 caspase - 3、caspase - 9 以及 MMP - 13 的表达、促进Ⅱ型胶原蛋白的表达有关, 但具体的作用机制仍需进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 柳昌全, 王进, 赵广雷, 等. 丝素蛋白支架修复骨软骨损伤研究进展[J]. 国际骨科学杂志, 2019, 40(1): 20 - 24.
- [2] FERRARI M B, SANCHEZ G, CHANG A, et al. Osteochondral allograft transplantation for treatment of focal patellar osteochondral lesion [J]. Arthrosc Tech, 2017, 6(4): e907 - e912.
- [3] LIN T H, WANG H C, CHENG W H, et al. osteochondral tissue regeneration using a tyramine - modified bilayered PLGA scaffold combined with articular chondrocytes in a porcine model[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2): 326.
- [4] CAMPBELL K, NAIRE S, KUIPER J H. A mathematical model of cartilage regeneration after chondrocyte and stem

- cell implantation - I : the effects of growth factors [ J ]. *J Tissue Eng*, 2019, 10 [ 2020 - 06 - 10 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC30906518/>.
- [ 5 ] STODDART M J, CRAFT A M, PATTAPPA G, et al. Developmental biology and musculoskeletal tissue engineering [ M ] // CORREA D, BOWLES A C. Clinical translation of cartilage tissue engineering, from embryonic development to a promising long - term solution. New York : Academic Press, 2018 : 225 - 246.
- [ 6 ] ZHANG S, CHU W C, LAI R C, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration [ J ]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24 ( 12 ) : 2135 - 2140.
- [ 7 ] LIU C, LI Y, YANG Z J, et al. Kartogenin enhances the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells derived exosomes in cartilage repair [ J ]. *Nanomedicine ( Lond )*, 2020, 15 ( 3 ) : 273 - 288.
- [ 8 ] YAO Y, CHEN R, WANG G, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells reverse EMT via TGF -  $\beta$ 1/Smad pathway and promote repair of damaged endometrium [ J ]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10 ( 1 ) : 225.
- [ 9 ] AKHTAR N, RASHEED Z, RAMAMURTHY S, et al. MicroRNA - 27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes [ J ]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62 ( 5 ) : 1361 - 1371.
- [ 10 ] LU X Y, YU Y H, YIN F X, et al. Knockdown of PVT1 inhibits IL - 1 $\beta$ -induced injury in chondrocytes by regulating miR - 27b - 3p/TRAF3 axis [ J ]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79 [ 2020 - 06 - 10 ]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576919318806?via%3Dihub>.
- [ 11 ] LI Y F, LI S H, LIU Y, et al. Long noncoding RNA CIR promotes chondrocyte extracellular matrix degradation in osteoarthritis by acting as a sponge for miR - 27b [ J ]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43 ( 2 ) : 602 - 610.
- [ 12 ] HU P F, WANG T J, LIU H M, et al. Full - length transcriptome and microRNA sequencing reveal the specific gene - regulation network of velvet antler in sika deer with extremely different velvet antler weight [ J ]. *Mol Genet Genomics*, 2019, 294 ( 2 ) : 431 - 443.
- [ 13 ] GENEMARAS A A, ENNIS H, BRADSHAW B, et al. Effects of anti - inflammatory agents on expression of early responsive inflammatory and catabolic genes in ex vivo porcine model of acute knee cartilage injury [ J ]. *Cartilage*, 2018, 9 ( 3 ) : 293 - 303.
- [ 14 ] QIU G G, ZHENG G P, GE M H, et al. Functional proteins of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles [ J ]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10 ( 1 ) : 359.
- [ 15 ] ZHOU Y Z, LI S H, CHEN P, et al. MicroRNA - 27b - 3p inhibits apoptosis of chondrocyte in rheumatoid arthritis by targeting HIPK2 [ J ]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47 ( 1 ) : 1766 - 1771.
- [ 16 ] 苏永蔚, 周山健, 肖大伟, 等. 负载 miRNA - 27b 的 BM-SCs 来源的外泌体治疗实验性骨关节炎 [ J ]. *中国矫形外科杂志*, 2019 ( 8 ) : 726 - 734.
- [ 17 ] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease [ J ]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5 ( 4 ) [ 2020 - 06 - 10 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382736/>.
- [ 18 ] CHOI Y, YOON D S, LEE K M, et al. Enhancement of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration by resveratrol-mediated SOX2 regulation [ J ]. *Aging Dis*, 2019, 10 ( 4 ) : 818 - 833.
- [ 19 ] REN H T, YANG H G, XIE M J, et al. Chondrocyte apoptosis in rat mandibular condyles induced by dental occlusion due to mitochondrial damage caused by nitric oxide [ J ]. *Arch Oral Biol*, 2019, 101 : 108 - 121.
- [ 20 ] JIANG Z X, LU W, ZENG Q M, et al. High glucose-induced excessive reactive oxygen species promote apoptosis through mitochondrial damage in rat cartilage endplate cells [ J ]. *J Orthop Res*, 2018, 36 ( 9 ) : 2476 - 2483.
- [ 21 ] 关钛元, 祁冀, 张磊, 等. 少阳生骨方调节 C518 大鼠膝关节退变软骨细胞 II 型胶原和基质金属蛋白酶 13 的表达 [ J ]. *中国组织工程研究*, 2018, 22 ( 20 ) : 3144.
- [ 22 ] 黄恺, 蔡海丽, 张建方, 等. 黄连素抑制兔骨关节炎软骨基质金属蛋白酶 - 13 及血小板凝集酶敏感蛋白样模体的解整链蛋白金属蛋白酶 - 5 表达保护软骨基质的实验研究 [ J ]. *中华风湿病学杂志*, 2016, 20 ( 8 ) : 514 - 519.
- [ 23 ] MA C H, WU C H, JOU I M, et al. PKR activation causes inflammation and MMP - 13 secretion in human degenerated articular chondrocytes [ J ]. *Redox Biol*, 2018, 14 : 72 - 81.
- [ 24 ] 范凯健, 吴菁, 李钦, 等. 基质金属蛋白酶 13 在软骨重塑和关节炎中的研究进展 [ J ]. *中国药理学通报*, 2018, 34 ( 5 ) : 22 - 26.
- [ 25 ] PIECHA D, WEIK J, KHEIL H, et al. Novel selective MMP - 13 inhibitors reduce collagen degradation in bovine articular and human osteoarthritis cartilage explants [ J ]. *Inflamm Res*, 2010, 59 ( 5 ) : 379 - 389.
- [ 26 ] XU J Y, LV S, HOU Y, et al. MiR - 27b promotes type II collagen expression by targetting peroxisome proliferator - activated receptor -  $\gamma$ 2 during rat articular chondrocyte differentiation [ J ]. *Biosci Rep*, 2018, 38 ( 1 ) [ 2020 - 06 - 10 ]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29187585/>.

(收稿日期: 2020 - 07 - 23 本文编辑: 吕宁)