



## 细胞外囊泡在治疗膝骨关节炎中的作用与前景\*

曾 斌<sup>1,2)</sup> 梁宇杰<sup>3)</sup> 邓志钦<sup>1)</sup> 苏爱媛<sup>1)</sup> 段 莉<sup>1)\*\*</sup><sup>(1)</sup> 深圳市第二人民医院骨科, 深圳 518035; <sup>(2)</sup> 广西中医药大学深圳市第二人民医院研究生院, 南宁 530200;<sup>(3)</sup> 深圳市康宁医院儿童青少年精神科, 深圳 518020)

**摘要** 膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是以关节软骨退变为主要病变的退行性疾病。目前, KOA 尚无有效治疗药物。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是由细胞释放的脂质双分子层包绕形成的球状膜性囊泡, 可在细胞间传递核酸、蛋白质等生物活性分子。与动物来源 EVs 相比, 植物来源 EVs 因其来源广泛且经济, 在药物载体递送研究领域引起广泛关注。通过基因工程等方法改造 EVs 进行药物递送, 可极大提高药物递送效率及其疗效。本文综述了动、植物两种来源的 EVs 在 KOA 中的治疗进展, 特别聚焦于工程化 EVs 作为药物递送载体在 KOA 治疗中的研发现状, 旨在为利用 EVs 治疗 KOA 提供参考。

**关键词** 膝骨关节炎, 细胞外囊泡, 外泌体

**中图分类号** R684.3

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0320

膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 是一种发病率高且致残率高的关节软骨退行性疾病。目前, 尚无有效的方法可终止或逆转 KOA 病变进展。寻找有效的 KOA 治疗方法成为当前的研究热点。细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 是细胞主动释放的纳米级膜囊泡。EVs 既可发挥母体细胞的部分生物学功能, 又可作为运载工具递送药物。同时, EVs 具有来源广泛、细胞相容性好、容易跨越生物屏障等优势。因此, EVs 在药物递送领域受到研究者的高度关注。近年来, 工程化囊泡递送药物的研究作为 KOA 治疗提供新的策略。本文围绕动植物来源 EVs 及其工程化改造在 KOA 治疗中的应用进行综述。

## 1 KOA 发病机制及传统疗法

### 1.1 KOA 发病机制

KOA 是骨关节炎中最常见的疾病类型<sup>[1]</sup>, 中国症状性 KOA 的患病率约 8.1%<sup>[2]</sup>。KOA 发病率随年龄增长而增加, 女性发病率高于男性, 可能因为女性雌激素在发病过程中起了重要作用, 使用雌激素干预去卵巢绝经后骨关节炎大鼠后, 大鼠软骨退变的程度得到明显缓解<sup>[3]</sup>。在骨关节炎进展过程中, 表达上调的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等炎症因子, 通过

刺激基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 和金属蛋白酶 (ADAMTS) 的产生, 促进软骨细胞凋亡和细胞外基质降解, 导致关节软骨的破坏。目前在对 KOA 相关信号通路的研究中, 主要包括 Wnt 通路、Notch 通路、NF- $\kappa$ B 通路、PI3K/Akt/mTOR 通路、OPG/RANK/RANKL 通路<sup>[4]</sup>。这些通路通过各种分子在基因、转录、表观遗传学等不同水平影响骨关节炎的进程。然而在目前研究中, 大多数都聚焦于对软骨细胞本身的研究, 而活体内的细胞无时无刻不受到周围组织的影响。最近有研究将原子力显微镜及荧光显微镜技术结合来测量牛软骨组织硬度的变化, 并发现 ADAMTS-4 对软骨细胞外基质的破坏导致软骨硬度、嵌入软骨细胞的细胞膜和核膜硬度降低, 该研究在揭示细胞外基质与软骨细胞力学关系的同时, 也提供了新的思路和方法<sup>[5]</sup>。总之, 目前关于 KOA 发病机制的研究尚处在探索阶段, 进一步研究关键通路和重要分

\* 国家自然科学基金 (81972116), 广东省科技厅国际合作项目 (2021A0505030011) 和深圳市科创委项目 (SGDX20201103095800003, GJHZ202000731095606019) 资助。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 18948721893, E-mail: duanl@szu.edu.cn

收稿日期: 2022-07-11, 接受日期: 2022-10-09

子对于疾病的有效治疗有着重大意义；同时在对发病机制更加整体和全面认识的基础上，才能为治疗KOA提供更有效的方案。

## 1.2 KOA传统疗法

临床上的KOA治疗常采用运动疗法、药物治疗、手术治疗和关节置换术等<sup>[6]</sup>。其中运动疗法可促进血液循环改善炎症，有助于增强关节本体感觉和关节稳定性，也可降低患者对疼痛的敏感性，不过对于力线异常的患者，采用运动疗法会加重关节损害<sup>[7]</sup>。药物治疗主要包括外用或口服非甾体类药物或注射糖皮质激素、透明质酸及富血小板血浆（platelet rich plasma, PRP）。非甾体类药物的重复使用会增加不良事件发生的概率，过度使用糖皮质激素也有加重软骨损伤的潜在风险。注射PRP以及透明质酸可在短期内减轻症状并发挥作用，不过两者也需要更多高质量研究以证明其安全性以及具体的作用机制<sup>[8-9]</sup>。一项关于治疗骨关节炎的系统性回顾表明，与透明质酸相比，注射PRP的患者有望获得更好的临床疗效<sup>[10]</sup>，但该疗法也存在一些有待解决的问题。首先，每次注射前的抽血会降低患者的依从性。其次，治疗过程中使用的凝血酶可能会导致免疫反应<sup>[11]</sup>。最后，部分患者在注射后症状反而加重，而其原因可能和PRP含有更多的白细胞有关<sup>[12]</sup>。

对于其他治疗方式均无效且症状严重的患者，临床上一一般采用单髁或全膝关节置换术以减轻患者症状，如关节的疼痛肿胀，提高患者活动能力以及恢复部分的关节功能。然而，关节置换术可能导致并发症，术后存在假体松动以及感染等潜在风险，且假体寿命有限<sup>[13]</sup>。为尽量避免上述不良事件的发生，3D打印技术以及有限元分析已被用于辅助实施关节置换术。3D打印技术能够根据患者膝关节的不同结构个性化定制假体和手术模型，3D打印的导板或模板还可提高手术精度、降低手术难度及缩短手术时间<sup>[14]</sup>。然而目前关节置换的材料种类十分有限，前期建模也需耗费一定时间，并不适用于急诊患者；此外，3D打印技术尚未成熟，打印精度有限且难以实现量产也是目前需要解决的问题<sup>[15]</sup>。

间充质干细胞（mesenchymal stem cell, MSC）具有抗炎、免疫调节和组织再生等功能，近年来有许多临床试验正在调查干细胞治疗骨关节炎疾病的安全性和有效性<sup>[16-18]</sup>。从现有的研究结果来看，干

细胞疗法显示了积极的临床结果，明显改善了关节功能、疼痛程度和生活质量，但干细胞疗法具有一定成瘤风险，这一点也在一定程度上限制了其临床应用<sup>[19]</sup>。最近，干细胞的功效被研究者归因于其旁分泌效应，特别是来源于由干细胞分泌的外泌体<sup>[20]</sup>。外泌体相比干细胞疗法不具备成瘤风险，且能发挥与之相当的疗效，故外泌体疗法有着广阔的应用前景。此外，在以外泌体作为治疗手段的大量临床研究也正在进行中，如使用外泌体治疗肿瘤、帕金森病、新型冠状病毒感染、慢性阻塞性肺病等疾病<sup>[21]</sup>，相信在不久的将来，基于外泌体的治疗方法能够进入临床，应用到对于更多疾病的治疗当中。

## 2 细胞外囊泡治疗膝骨关节炎

KOA传统治疗中存在的一些尚未解决的问题，推动在科研中寻找更加安全有效的替代药物及疗法。EVs能在细胞间传递生物活性分子，并在骨关节炎的诊治中发挥作用。目前EVs的给药方式主要包括口服和局部注射，牛奶来源囊泡以及植物来源囊泡主要通过口服的方式给药，此外绝大多数情况下则采用局部注射如关节腔注射的方式给药。通过关节腔注射胞外囊泡后，胞外囊泡可通过调控在KOA中发挥关键作用的几个信号通路以改善膝骨关节炎。例如，骨髓间充质干细胞来源外泌体可通过抑制NF- $\kappa$ B通路减轻关节炎症<sup>[22]</sup>，脂肪垫干细胞来源外泌体可通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路保护软骨及减轻炎症等<sup>[23]</sup>。总而言之，不同来源的EVs携带不同类型的核酸、蛋白质及脂类物质，能够通过激活或抑制下游通路，发挥促进软骨细胞增殖及软骨修复、减轻炎症和保护软骨等不同的功能。

相比传统药物，具有靶向性是胞外囊泡的优势之一，EVs能够装载核酸、蛋白质等分子参与药物递送，提高治疗的靶向性。EVs的靶向性来源于以下几种情况：a. 同源靶向，如晶状体上皮细胞来源的囊泡更易被晶状体上皮细胞吸收<sup>[24]</sup>；b. 归巢效应，如间充质干细胞及其来源的外泌体具有向炎症部位趋化归巢的能力<sup>[25]</sup>；c. 通过基因工程或者化学修饰等方法可以人为赋予EVs特定的靶向能力<sup>[26]</sup>。

由于治疗KOA的传统药物主要用于减轻疼痛和控制炎症症状，这些药物治疗是非治愈性的，相

比传统药物, 使用 EVs 进行治疗除了能够缓解 KOA 的症状, 还能够促进关节软骨的修复。此外, EVs 免疫原性低, 更容易穿过生物膜被机体吸收<sup>[27]</sup>。另外, 虽然终末期 KOA 可以通过全膝关节置换术进行治疗, 但由于关节置换术增加了医疗成本, 且关节置换术后存在诸多并发症的风险, 因此需要寻找替代的非手术方案来延迟或避免对患者实施关节置换术<sup>[28]</sup>。EVs 的治疗相比关节置换术能够避免手术过程对患者造成的损伤以及术后可能出现的并发症。基于 EVs 的以上优势, 对 EVs 治疗 KOA 的进一步研究有望解决传统药物治疗及手术治疗所面临的问题。

## 2.1 动物细胞来源囊泡

间充质干细胞具有分化潜能, 被广泛应用于再生医学。大量研究表明, 不同类别的间充质干细胞来源的囊泡能起到延缓关节炎的作用。例如, 胚胎间充质干细胞外泌体可通过平衡细胞外基质的合成与降解有效延缓 KOA 进展<sup>[29]</sup>。人骨髓间充质干细胞来源外泌体 (hBMSCs-Exos) 被证明能够显著降低软骨细胞内 IL-1 $\beta$ 、IL-6、NF- $\kappa$ B、MMP-13、SOX9 等的表达水平<sup>[22]</sup>, 但其具体机制还有待阐明。此外, hBMSCs-Exos 还可抑制活性氧产生, 减少软骨细胞凋亡<sup>[30]</sup>。这些外泌体延缓骨关节炎的作用可能与其内包含的物质如蛋白质、DNA、非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 等有关。比如研究指出 hBMSCs-Exos 含有 miRNA、circRNA、lncRNA 等多种 ncRNA。hBMSCs-Exos 中丰富的 miR136-5p 能靶向 ETS 域转录因子 (E74-like factor 3, ELF3) 并下调其表达, 从而抑制软骨细胞的退变<sup>[31]</sup>; hBMSCs-Exos 中的 circRNA\_0001236 可通过靶向 miR-3677-3p 和性别决定基因盒 9 (gene sex-determining region Y-box 9, Sox9) 来减轻关节炎症<sup>[32]</sup>。此外, hBMSCs-Exos 被证明含有丰富的 lncRNA-MEG-3, 而 lncRNA-MEG-3 被证明能够降低软骨细胞衰老和凋亡<sup>[33]</sup>。除了单独使用间充质干细胞来源外泌体进行治疗外, 经过工程化改造或者药物预处理的间充质干细胞能分泌具有特定功能的外泌体。姜黄素具有良好的抗炎杀菌作用, 使用姜黄素预处理干细胞分泌的外泌体相比未处理的干细胞外泌体, 对 KOA 有着更好的治疗效果, 此外, 姜黄素的刺激还能提高细胞分泌外泌体的产量。在机制方面, 姜黄素预处理的干细胞来源外泌体通过调节 miR-124/NF- $\kappa$ B 和 miR-143/

ROCK1/TLR9 信号通路改善骨关节炎症状<sup>[34]</sup>。

除了间充质干细胞来源外, 其他细胞来源如成纤维滑膜细胞、软骨细胞、血细胞来源的囊泡也可用于骨关节炎治疗当中。成纤维滑膜细胞来源外泌体中的 lncRNA H19 能促进软骨细胞增殖和迁移, 抑制细胞外基质的降解<sup>[35]</sup>。另外, 软骨细胞来源的外泌体还能够促进软骨发育成稳定的软骨表型。由于软骨细胞是膝关节主要的细胞类型之一, 软骨细胞分泌的外泌体在骨关节炎中发挥着重要作用, 且软骨细胞外泌体的相关研究较少, 其促软骨发育的具体机制有待更多进一步的研究<sup>[36]</sup>。抗凝富含血小板血浆制剂可用于 KOA 治疗当中, 而该制剂中也存在着大量的 EVs, 与全血制品相比, 从血液中提取的 EVs 能够显著减少软骨细胞中促炎细胞因子的释放<sup>[37]</sup>。

相比于从人类各种组织细胞来源 EVs 的研究, 对于其他动物来源以及细菌来源囊泡的功能以及应用还有待进一步发掘。最近, 研究者发现牛奶中存在大量外泌体 (图 1)。由于牛奶来源外泌体成本低、产量大, 且有研究表明牛奶来源外泌体在人体内的稳定性相比其他细胞来源的外泌体更佳, 对牛奶来源外泌体的批量提取可能有助于快速获得大量外泌体, 促进外泌体的产业化<sup>[38]</sup>。另外, 细菌来源囊泡由于其易于基因改造的特性被应用于针对新冠进行治疗的疫苗递送平台<sup>[39]</sup>, 相信在不久的将来, 基于细菌来源囊泡的疫苗递送平台能够用于各种疾病的治疗性研究当中 (图 1)。

正常状态下外泌体携带的物质与病理状态下存在显著差异, 故 EVs 还有望作为 KOA 的诊断标志物。炎症状态下的软骨细胞中的外泌体样囊泡能够增强巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$  以及加重骨关节和滑膜的炎症<sup>[40]</sup>, 有研究表明 KOA 患者滑液中提取的外泌体, 与正常人滑液来源外泌体相比, 外泌体中差异表达的 mRNA 有 52 种, lncRNA 有 196 种, circRNA 有 98 种<sup>[41]</sup>。通过对关节液、软骨细胞等来源外泌体内容物的分析检测, 能够有助于阐明 KOA 的发病机制, 并可能为其诊断和治疗确定更有效的靶点。

## 2.2 植物来源囊泡

许多中药和其他植物都有着良好的抗炎性能, 植物来源的囊泡也具有减轻炎症、抑制肿瘤、治疗疾病的作用 (图 1)。植物来源囊泡目前主要应用于新型冠状病毒感染、炎性肠病、抗肿瘤等领域。



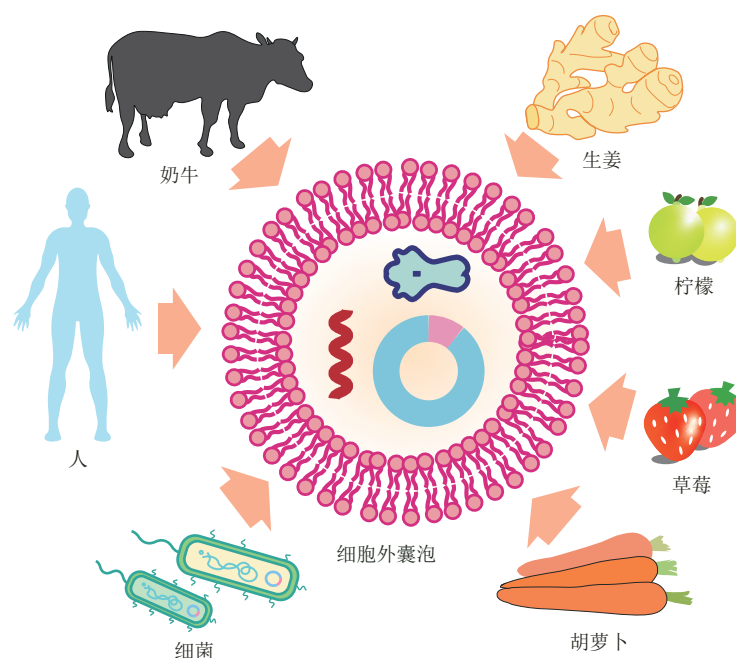


Fig. 1 Extracellular vesicles from different species

图1 不同来源细胞外囊泡示意图

研究表明, 苦瓜来源的细胞外囊泡负载5-氟尿嘧啶能够增强其对于口腔鳞状细胞癌的疗效并降低了其耐药性<sup>[42]</sup>。另外, 葡萄柚、大蒜、柠檬等植物来源的囊泡被证明具有一定的抗癌活性<sup>[43-45]</sup>, 表明植物囊泡在癌症治疗方面具有良好的前景。有团队设计了一种岩藻糖基/聚赖氨酸功能化的生姜来源脂质载体 (LBL-GDLVs), 发现负载阿霉素 (Dox) 的生姜脂质体 (LBL-GDLVs/Dox) 对肿瘤生长有明显的抑制作用, 且比单独使用阿霉素疗效更佳<sup>[46]</sup>。最近, 胡萝卜来源的囊泡也被证明对心肌成肌细胞和神经母细胞瘤细胞有一定的抗氧化以及抗凋亡作用<sup>[47]</sup>。此外, 人来源的囊泡被证可通过调控巨噬细胞极化抑制黑色素瘤生长<sup>[48]</sup>。

最近研究表明, 生姜的纳米囊泡中提取脂类能够自组装成为脂质体, 姜脂纳米粒能够有效靶向结

肠部位, 使用该植物脂质体装载 siRNA 能够靶向结肠部位并发挥显著抗炎作用<sup>[49]</sup>。有研究发现生姜来源囊泡具有良好的载药能力, 且在 15~60 g/L 浓度范围内可被小肠吸收。具体来说, 生姜来源囊泡被小肠吸收的趋势从高到低依次为十二指肠、空肠以及回肠<sup>[50]</sup>, 这些数据可能有助于未来将生姜来源囊泡作为药物递送系统应用于对肠道疾病的研究。葡萄柚中分离出的植物 EVs 能增加细胞活力和细胞迁移, 减少细胞内活性氧的产生并促进伤口愈合<sup>[51]</sup>。此外, 草莓中分离出的类似外泌体的囊泡还具有预防氧化应激的作用<sup>[52]</sup>。以上研究表明了植物来源囊泡在各种疾病当中的治疗作用以及应用前景, 许多植物囊泡的抗炎抗氧化特性也提示了其可能在延缓 KOA、减轻关节炎症方面具有一定潜力。

3 EVs作为药物载体治疗KOA

3.1 药物装载及囊泡工程化

EVs装载药物主要有3种方式(图2): a. 通过基因工程的方法, 将质粒转染进入细胞, 细胞分泌大量表达特定蛋白质或 miRNA、cricRNA 等物质

的囊泡; b. 将药物与分泌囊泡的细胞一起培养, 然后分离出含药物的囊泡, 比如, 有研究使用姜黄素处理后的间充质干细胞能够分泌含有姜黄素的外泌体<sup>[53]</sup>; c. 通过电穿孔法在 EVs 内装载 miRNA、siRNA 等药物分子。此外, 采用一些方法改造囊泡可增强其靶向特定组织的能力, 常用方法主要包括基因工程、化学修饰以及膜融合3种方法(图3)。

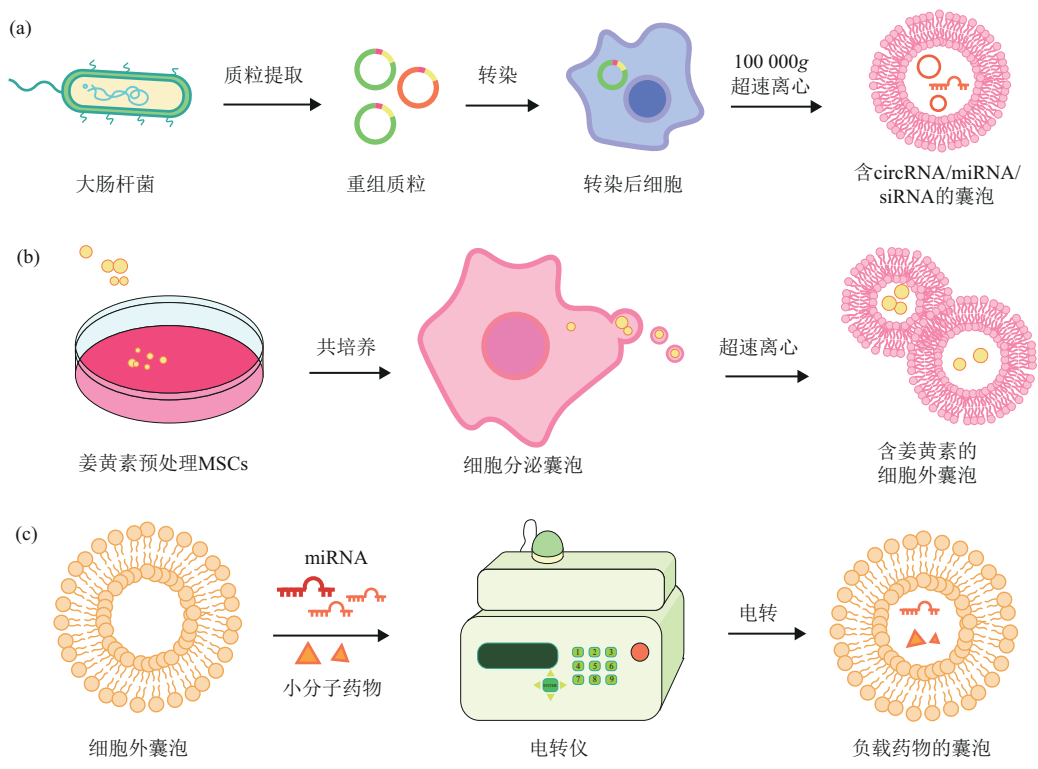


Fig. 2 Drug delivery method using extracellular vesicles as drug delivery system

图2 EVs载药方法总结

(a) 基因工程法; (b) 共孵育法; (c) 电穿孔法。

3.2 EVs作为药物载体

部分中药成分在体内易被清除, 利用率低, 而 EVs 作为药物载体具有良好的跨越生物屏障的性能, EVs 负载中药提取的分子可提高药物的利用率, 应用于各种疾病的治疗。外泌体装载姜黄素被用于治疗脑卒中以及胶质瘤等疾病<sup>[53-54]</sup>, 外泌体递送雷公红藤素也被用于抗肿瘤方面的研究当中<sup>[55]</sup>。目前外泌体递送中药小分子药物用于治疗骨关节炎的相关研究较少, 具有一定的研究价值。有研究表明, miRNA-140 在关节软骨细胞中特异表达, 其能够通过抑制 ADAMTS-5 和 MMP-13

在软骨发育和软骨基质代谢平衡中发挥关键作用<sup>[56-57]</sup>。然而, miRNA 类药物通过致密的非血管性软骨细胞外基质传递到软骨细胞仍是骨关节炎分子治疗的主要挑战, 这一因素很大程度上影响了药物的递送效率与治疗效果。对于 miRNA、lncRNA、cricRNA 等非编码 RNA, 可通过转染的方式负载到囊泡内(图2)。如有研究者指出通过转染的方法, 能够使人滑膜间充质干细胞分泌的外泌体负载大量的 miR-140-5p。动物实验中, 在使用负载 miR-140-5p 的外泌体干预后, 大鼠关节炎症状显著减轻<sup>[58]</sup>。另外, Liang 等<sup>[59]</sup> 通过将软骨

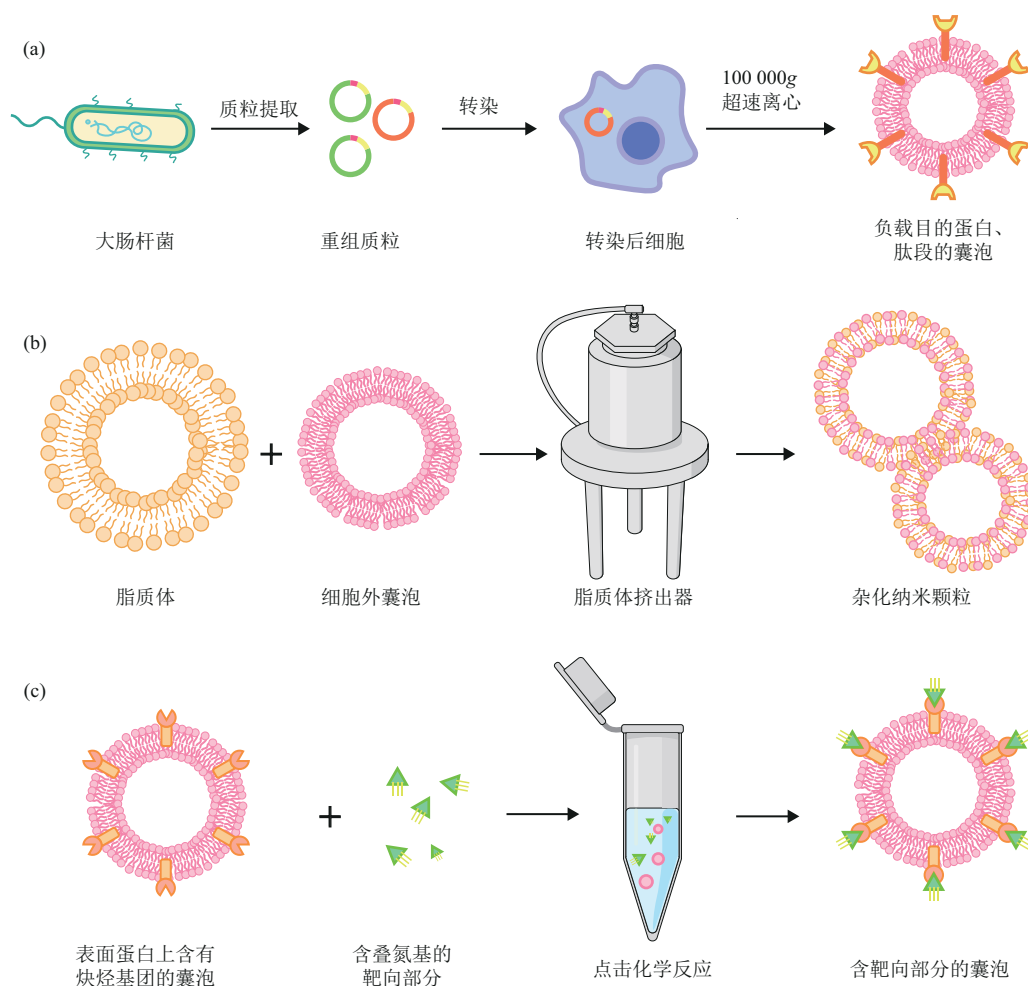


Fig. 3 Preparation of engineered extracellular vesicles

图3 工程化囊泡改造方法总结图

(a) 基因工程改造; (b) 膜融合法; (c) 点击化学修饰。

细胞亲和肽 (CAP) 通过基因工程的方法展示在外泌体表面, 获得了有效负载 miRNA-140 的工程化外泌体, 使用工程化外泌体递送 miRNA-140 能够靶向软骨细胞治疗骨关节炎, 经外泌体靶向治疗后的 KOA 大鼠关节软骨形态上和正常软骨相似。关节腔注射滑液来源的间充质干细胞 (SF-MSCs) 是治疗 KOA 软骨退行性变的治疗方法之一, 但精准控制关节内移植的骨髓间充质干细胞向软骨分化仍是一个挑战。核蛋白原 (KGN) 是一种小分子, 在体外和体内均可诱导干细胞向软骨细胞分化, 然而 KGN 水溶性低的特点限制了其临床应用。Xu 等<sup>[60]</sup> 将干细胞亲和肽 (E7) 与外泌体表面蛋白融

合, 产生具有靶向能力的外泌体 (E7-Exos)。实验结果表明, 靶向肽修饰外泌体递送的 KGN 能够更高效进入干细胞并诱导更高层次的软骨分化, 通过关节腔注射将 SF-MSCs 与 E7-Exo/KGN 联合给药也取得了更加显著的疗效。

尽管外泌体能够负载绝大多数小分子药物, 但由于外泌体直径在 50~200 nm 之间, 故对于一些体积较大的分子 (如质粒) 还不能实现高效率的递送。不过最近这一问题也得到了解决, 将外泌体和脂质体混合制成的纳米颗粒, 能够有效包裹较大的质粒 (图3); 相比脂质体而言, 杂交纳米颗粒可被干细胞内吞并表达其所运载基因, 而单独使用脂

质体递送则未能将质粒成功递送到细胞内, 这项研究体现了外泌体和脂质体融合的独特优势<sup>[61]</sup>。Liang等<sup>[62]</sup>通过软骨细胞亲和肽(CAP)修饰的外泌体与脂质体融合得到杂交工程化外泌体。相比外泌体, 该杂交外泌体具有更大的尺寸和更高的稳定性。工程化杂交外泌体能够有效地负载定向敲除MMP-13的CRISPR/Cas9表达质粒。动物实验表明, CAP修饰的外泌体能够有效进入软骨基质的深层区域, 并将质粒递送到软骨细胞实现对MMP13的敲除, 显著减少软骨细胞中MMP-13的表达, 明显减少软骨中细胞外基质蛋白的降解。基于睡眠有助于软骨修复的现象, Tao等<sup>[63]</sup>使用褪黑素诱导的细胞睡眠, 然后检测到circRNA3503含量显著增加。据此, 该团队制备了负载circRNA3503的EVs (circRNA3503-OE-SEV), 并使用PLEL (PDLLA-PEG-PDLLA) 作为EVs的载体对KOA大鼠进行干预, 结果表明PLEL@circRNA3503-OE SEV复合物能够高效地预防骨关节炎的进展, 减轻炎症诱导的细胞凋亡及细胞外基质合成和降解之间的失衡。

#### 4 结 语

EVs本身携带核酸、蛋白质等物质, 可将所携带物质传递给靶细胞。此外, 利用EVs本身具有的靶向能力或者工程化囊泡递送药物, 能够提高药物在体内的利用率, 目前使用EVs递送circRNA、lncRNA被广泛用于治疗KOA的研究当中。但目前还缺乏能够有效根治骨关节炎的药物或疗法, 一方面, 需要对骨关节炎的发病机制进行更加深入的研究, 另一方面需要不断尝试开发新的治疗方法。EVs可作为良好的药物载体, 使用囊泡负载中药分子可以提高疗效, 弥补部分中药分子在人体内利用度不高的不足, 但要实现EVs快速、高效、高纯度分离纯化仍具有挑战性<sup>[64]</sup>。总的来说, EVs在作为药物载体和协助诊断方面具有独特的优势, 相信在找到EVs高纯度、大规模的制备方法之后, EVs的应用能够给KOA的治疗提供更大的帮助。

#### 参 考 文 献

- [1] Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid M K, *et al.* Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. *Ann Rheum Dis*, 2014, **73**(9): 1659-1664
- [2] Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, *et al.* Exosomes: new molecular targets of diseases. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, **39**(4): 501-513
- [3] Liang Y, Duan L, Lu J, *et al.* Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, 2021, **11**(7): 3183-3195
- [4] 张虎林, 喻琳, 王亮, 等. 膝骨性关节炎关键信号通路的研究进展. *中国中医骨伤科杂志*, 2021, **29**(10): 84-88  
Zhang H L, Yu L, Wang L, *et al.* *Chin J Tradit Med Traumatol Orthop*, 2021, **29**(10): 84-88
- [5] McCreery K P, Xu X, Scott A K, *et al.* Nuclear stiffness decreases with disruption of the extracellular matrix in living tissues. *Small*, 2021, **17**(6): e2006699
- [6] 中华医学会骨科学分会关节外科学组, 中国医师协会骨科医师分会骨关节炎学组, 国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅医院), 等. 中国骨关节炎诊疗指南(2021年版). *中华骨科杂志*, 2021, **41**(18): 1291-1314  
Joint Surg Group Orthop Branch Chin Med Assn, Osteoarthritis Group Orthop Doctor Branch Chin Med Doctor Assn, Natl Clinics Res Cent Geriatr Disord (XiangYa Hospital), *et al.* *Chin J Orthop*, 2021, **41**(18): 1291-1314
- [7] 耿宗洁, 冀全博, 王岩. 骨关节炎不同治疗方法的研究进展. *中国骨与关节杂志*, 2021, **10**(8): 636-640  
Geng Z J, Ji Q B, Wang Y. *Chin J Bone Joint*, 2021, **10**(8): 636-640
- [8] Sheth U, Simunovic N, Klein G, *et al.* Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am*, 2012, **94**(4): 298-307
- [9] Gilat R, Haunschild E D, Knapik D M, *et al.* Hyaluronic acid and platelet-rich plasma for the management of knee osteoarthritis. *Int Orthop*, 2021, **45**(2): 345-354
- [10] Belk J W, Kraeutler M J, Houck D A, *et al.* Platelet-rich plasma versus hyaluronic acid for knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Sports Med*, 2021, **49**(1): 249-260
- [11] 鞠昌军, 严伟, 赵锦伟, 等. 血小板裂解液与富血小板血浆治疗膝骨关节炎的临床研究. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2020, **14**(5): 565-571  
Ju C J, Yan W, Zhao J W, *et al.* *Chin J Joint Surg (eJBD)*, 2020, **14**(5): 565-571
- [12] Yin W J, Xu H T, Sheng J G, *et al.* Advantages of pure platelet-rich plasma compared with leukocyte- and platelet-rich plasma in treating rabbit knee osteoarthritis. *Med Sci Monit*, 2016, **22**: 1280-1290
- [13] Kahn T L, Soheili A, Schearzkopf R. Outcomes of total knee arthroplasty in relation to preoperative patient-reported and radiographic measures: data from the osteoarthritis initiative. *Geriatr Orthop Surg Rehabil*, 2013, **4**(4): 117-126
- [14] 刘德健, 李彦林, 蔡国锋, 等. 3D打印截骨导航辅助人工全膝关节置换术早期疗效分析. *中国修复重建外科杂志*, 2018, **32**(7): 899-905  
Liu D J, Li Y L, Cai G F, *et al.* *Chin J Rep Rec Surg*, 2018, **32**(7): 899-905
- [15] 康雅平, 郭静, 王振国. 3D打印技术在关节置换中的应用. *金属功能材料*, 2021, **28**(5): 111-117  
Kang Y P, Guo J, Wang Z G. *Metallic Funct Matls*, 2021, **28**(5): 111-117



- 111-117
- [16] Freitag J, Bates D, Wickham J, *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Regen Med*, 2019, **14**(3): 213-230
- [17] Chahal J, Gómez-Aristizábal A, Shestopaloff K, *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cell treatment in patients with osteoarthritis results in overall improvement in pain and symptoms and reduces synovial inflammation. *Stem Cells Transl Med*, 2019, **8**(8): 746-757
- [18] Lee W S, Kim H J, Kim K I, *et al.* Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase IIb, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Stem Cells Transl Med*, 2019, **8**(6): 504-511
- [19] Eom Y W, Shim K Y, Baik S K. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med*, 2015, **30**(5): 580-589
- [20] Zhang S, Teo K Y W, Chuah S J, *et al.* MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis. *Biomaterials*, 2019, **200**: 35-47
- [21] Huda M N, Nafujjaman M, Deaguero I G, *et al.* Potential use of exosomes as diagnostic biomarkers and in targeted drug delivery: progress in clinical and preclinical applications. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, **7**(6): 2106-2149
- [22] Zhou L, Ye H, Liu L, *et al.* Human bone mesenchymal stem cell-derived exosomes inhibit IL-1 $\beta$ -induced inflammation in osteoarthritis chondrocytes. *Cell J*, 2021, **23**(4): 485-494
- [23] Wu J, Kuang L, Chen C, *et al.* MiR-100-5p-abundant exosomes derived from infrapatellar fat pad MSCs protect articular cartilage and ameliorate gait abnormalities *via* inhibition of mTOR in osteoarthritis. *Biomaterials*, 2019, **206**: 87-100
- [24] Zhu S, Huang H, Liu D, *et al.* Augmented cellular uptake and homologous targeting of exosome-based drug loaded IOL for posterior capsular opacification prevention and biosafety improvement. *Bioact Mater*, 2022, **15**: 469-481
- [25] Perets N, Betzer O, Shapira R, *et al.* Golden exosomes selectively target brain pathologies in neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. *Nano Lett*, 2019, **19**(6): 3422-3431
- [26] Liang Y, Duan L, Lu J, *et al.* Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*, 2021, **11**(7): 3183-3195
- [27] He L, He T, Xing J, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther*, 2020, **11**(1): 276
- [28] Li D, Gupta P, Sgaglione N A, *et al.* Exosomes derived from non-classic sources for treatment of post-traumatic osteoarthritis and cartilage injury of the knee: *in vivo* review. *J Clin Med*, 2021, **10**(9): 2001
- [29] Wang Y, Yu D, Liu Z, *et al.* Exosomes from embryonic mesenchymal stem cells alleviate osteoarthritis through balancing synthesis and degradation of cartilage extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*, 2017, **8**(1): 189
- [30] Li X, Wang Y, Cai Z, *et al.* Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit ROS production and cell apoptosis in human articular chondrocytes *via* the miR-100-5p/NOX4 axis. *Cell Biol Int*, 2021, **45**(10): 2096-2106
- [31] Chen X, Shi Y, Xue P, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-136-5p inhibits chondrocyte degeneration in traumatic osteoarthritis by targeting ELF3. *Arthritis Res Ther*, 2020, **22**(1): 256
- [32] Mao G, Xu Y, Long D, *et al.* Exosome-transported circRNA\_0001236 enhances chondrogenesis and suppress cartilage degradation *via* the miR-3677-3p/Sox9 axis. *Stem Cell Res Ther*, 2021, **12**(1): 389
- [33] Jin Y, Xu M, Zhu H, *et al.* Therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes on osteoarthritis. *J Cell Mol Med*, 2021, **25**(19): 9281-9294
- [34] Qiu B, Xu X, Yi P, *et al.* Curcumin reinforces MSC-derived exosomes in attenuating osteoarthritis *via* modulating the miR-124/NF- $\kappa$ B and miR-143/ROCK1/TLR9 signalling pathways. *J Cell Mol Med*, 2020, **24**(18): 10855-10865
- [35] Tan F, Wang D, Yuan Z. The Fibroblast-like synoviocyte derived exosomal long non-coding RNA H19 alleviates osteoarthritis progression through the miR-106b-5p/TIMP2 axis. *Inflammation*, 2020, **43**(4): 1498-1509
- [36] Chen Y, Xue K, Zhang X, *et al.* Exosomes derived from mature chondrocytes facilitate subcutaneous stable ectopic chondrogenesis of cartilage progenitor cells. *Stem Cell Res Ther*, 2018, **9**(1): 318
- [37] Otahal A, Kramer K, Kuten-Pella O, *et al.* Characterization and chondroprotective effects of extracellular vesicles from plasma- and serum-based autologous blood-derived products for osteoarthritis therapy. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, **8**: 584050
- [38] Munagala R, Aqil F, Jeyabalan J, *et al.* Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer Lett*, 2016, **371**(1): 48-61
- [39] Jiang L, Driedonks T A P, Jong W S P, *et al.* A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2 protects against disease and elicits neutralizing antibodies to wild-type and Delta variants. *J Extracell Vesicles*, 2022, **11**(3): e12219
- [40] Ni Z, Kuang L, Chen H, *et al.* The exosome-like vesicles from osteoarthritic chondrocyte enhanced mature IL-1 $\beta$  production of macrophages and aggravated synovitis in osteoarthritis. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(7): 522
- [41] Wu X, Bian B, Lin Z, *et al.* Identification of exosomal mRNA, lncRNA and circRNA signatures in an osteoarthritis synovial fluid-exosomal study. *Exp Cell Res*, 2022, **410**(1): 112881
- [42] Yang M, Luo Q, Chen X, *et al.* Bitter melon derived extracellular vesicles enhance the therapeutic effects and reduce the drug resistance of 5-fluorouracil on oral squamous cell carcinoma. *J Nanobiotechnology*, 2021, **19**(1): 259
- [43] Stanly C, Alfieri M, Ambrosone A, *et al.* Grapefruit-derived micro and nanovesicles show distinct metabolome profiles and anticancer activities in the A375 human melanoma cell line. *Cells*,



- 2020, **9**(12): 2722
- [44] Özkan İ, Koçak P, Yıldırım M, *et al.* Garlic (*Allium sativum*)-derived SEVs inhibit cancer cell proliferation and induce caspase mediated apoptosis. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 14773
- [45] Yang M, Liu X, Luo Q, *et al.* An efficient method to isolate lemon derived extracellular vesicles for gastric cancer therapy. *J Nanobiotechnology*, 2020, **18**(1): 100
- [46] Zhang M, Yang C, Yan X, *et al.* Highly biocompatible functionalized layer-by-layer ginger lipid nano vectors targeting P-selectin for delivery of doxorubicin to treat colon cancer. *Adv Ther (Weinh)*, 2019, **2**(12): 1900129
- [47] Kim D K, Rhee W J. Antioxidative effects of carrot-derived nanovesicles in cardiomyoblast and neuroblastoma cells. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(8): 1203
- [48] Cao M, Yan H, Han X, *et al.* Ginseng-derived nanoparticles alter macrophage polarization to inhibit melanoma growth. *J Immunother Cancer*, 2019, **7**(1): 326
- [49] Sung J, Yang C, Collins J F, *et al.* Preparation and characterization of ginger lipid-derived nanoparticles for colon-targeted siRNA delivery. *Bio Protoc*, 2020, **10**(14): e3685
- [50] Man F, Meng C, Liu Y, *et al.* The study of ginger-derived extracellular vesicles as a natural nanoscale drug carrier and their intestinal absorption in rats. *AAPS PharmSciTech*, 2021, **22**(6): 206
- [51] Savcı Y, Kırbaş O K, Bozkurt B T, *et al.* Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing. *Food Funct*, 2021, **12**(11): 5144-5156
- [52] Perut F, Roncuzzi L, Avnet S, *et al.* Strawberry-derived exosome-like nanoparticles prevent oxidative stress in human mesenchymal stromal cells. *Biomolecules*, 2021, **11**(1): 87
- [53] 何如意. 装载姜黄素外泌体的构建及其对脑缺血再灌注大鼠的作用机制研究[D]. 锦州: 锦州医科大学, 2020
- He R Y. Construction of Curcumin Loaded Exosome and Its Mechanism in Cerebral Ischemia Reperfusion Rats[D]. Jinzhou: Jinzhou Med Univ, 2020
- [54] Jia G, Han Y, An Y, *et al.* NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials*, 2018, **178**: 302-316
- [55] Aqil F, Kausar H, Agrawal A K, *et al.* Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer. *Exp Mol Pathol*, 2016, **101**(1): 12-21
- [56] Emery C A, Whittaker J L, Mahmoudian A, *et al.* Establishing outcome measures in early knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2019, **15**(7): 438-448
- [57] Liang Y, Duan L, Xiong J, *et al.* E2 regulates MMP-13 *via* targeting miR-140 in IL-1 $\beta$ -induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 2016, **18**(1): 105
- [58] Tao S C, Yuan T, Zhang Y L, *et al.* Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*, 2017, **7**(1): 180-195
- [59] Liang Y, Xu X, Li X, *et al.* Chondrocyte-targeted microRNA delivery by engineered exosomes toward a cell-free osteoarthritis therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(33): 36938-36947
- [60] Xu X, Liang Y, Li X, *et al.* Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials* 2021, **269**: 120539
- [61] Lin Y, Wu J, Gu W, *et al.* Exosome-liposome hybrid nanoparticles deliver CRISPR/Cas9 system in MSCs. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, **5**(4): 1700611
- [62] Liang Y, Xu X, Xu L, *et al.* Chondrocyte-specific genomic editing enabled by hybrid exosomes for osteoarthritis treatment. *Theranostics*, 2022, **12**(11): 4866-4878
- [63] Tao S C, Huang J Y, Gao Y, *et al.* Small extracellular vesicles in combination with sleep-related circRNA3503: a targeted therapeutic agent with injectable thermosensitive hydrogel to prevent osteoarthritis. *Bioact Mater*, 2021, **6**(12): 4455-4469
- [64] 李春香, 王世颖, 梁军, 等. 系统性红斑狼疮预后因素 Cox 回归分析. *中华风湿病学杂志*, 2011, **15**(4): 245-248
- Li C X, Wang S Y, Liang J, *et al.* *Chin J Rheumatol*, 2011, **15**(4): 245-248

## The Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles in Knee Osteoarthritis\*

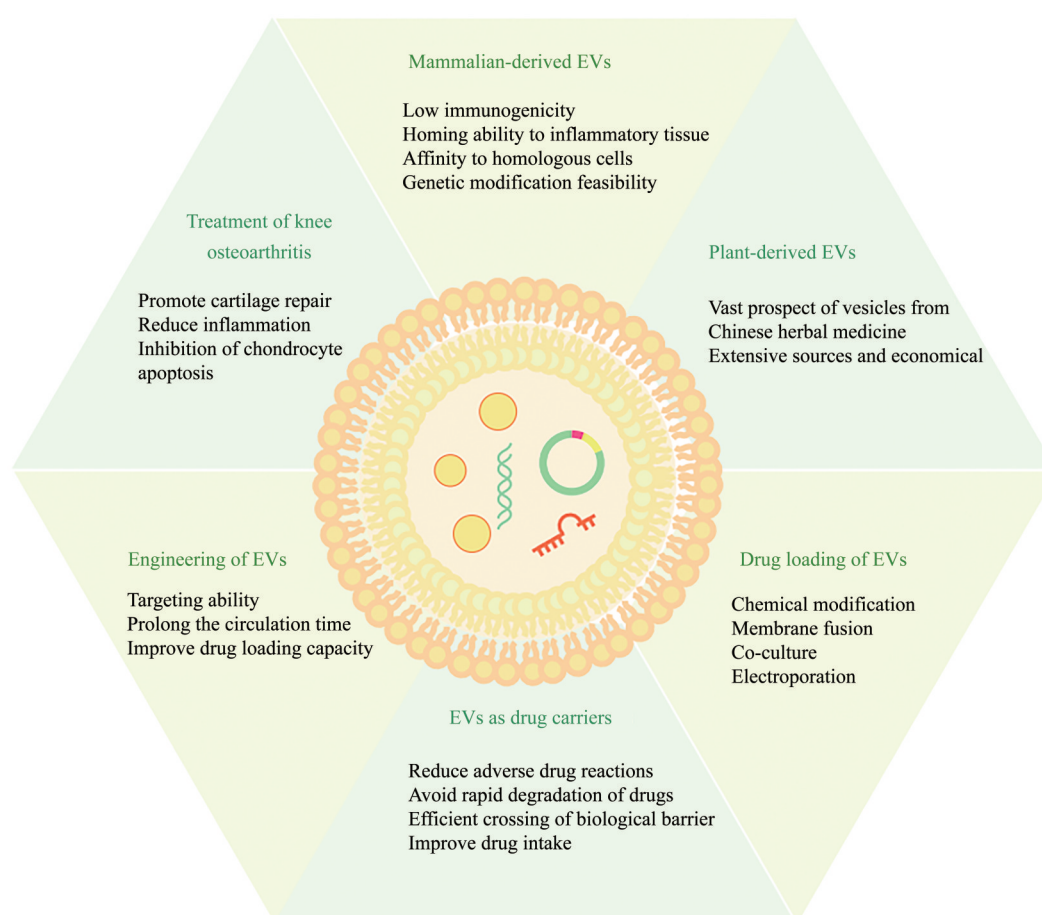
ZENG Bin<sup>1,2)</sup>, LIANG YU-Jie<sup>3)</sup>, DENG Zhi-Qin<sup>1)</sup>, SU Ai-Yuan<sup>1)</sup>, DUAN Li<sup>1)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>Orthopedics Department of Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, China;

<sup>2)</sup>Graduate School of Shenzhen Second People's Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China;

<sup>3)</sup>Department of Child and Adolescent Psychiatry, Shenzhen Kangning Hospital, Shenzhen 518020, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Knee osteoarthritis (KOA) is a degenerative disease characterized by degeneration of articular cartilage. So far, there is no effective drug to treat KOA. Extracellular vesicles (EVs) are spherical membranous vesicles formed by the envelopment of lipid bilayers released from cells, which can deliver bioactive molecules

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81972116), International Cooperation Project of Guangdong Provincial Department of Science and Technology (2021A0505030011), and Shenzhen Science and Technology Innovation Commission Project (SGDX20201103095800003, GJHZ20200731095606019).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-18948721893, E-mail: duanl@szu.edu.cn

Received: July 11, 2022 Accepted: October 9, 2022

such as nucleic acids and proteins between cells. Mesenchymal stem cell derived EVs can be used as an effective way in KOA treatment by reducing inflammation and promoting cartilage repair. Compared with mammalian-derived EVs, plant-derived EVs have attracted much attention in the field of drug carrier delivery research because of their wide and economical sources. It is worth noting that vesicles derived from Chinese herbal medicine have great prospects in disease treatment. Modification of EVs for drug delivery by genetic engineering and other methods can greatly improve drug delivery efficiency and its efficacy. In addition, the hybrid vesicles prepared by membrane fusion can efficiently deliver CRISPR/Cas9 plasmids for KOA treatment. Because of its diversified functions and modifiability, EVs have great prospects in disease treatment and drug delivery. This paper reviews the progress of EVs from animals and plants in the treatment of KOA, focusing on the research and development of engineered EVs as drug delivery carriers in KOA treatment, in order to provide a reference for the use of EVs in the treatment of KOA.

**Key words** knee osteoarthritis, extracellular vesicles, exosomes

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0320