

结核杆菌裂解物刺激后的成骨细胞来源 外泌体对破骨细胞的影响

梁思敏¹, 蔡则成², 王志强², 张建群¹, 杨树龙², 刘晓印¹, 马 荣¹, 戈朝晖¹

(1 宁夏医科大学总医院骨科 750001 银川市; 2 宁夏医科大学临床医学院 750001 银川市)

【摘要】目的:研究结核分枝杆菌裂解物(MTL)刺激后的成骨细胞来源外泌体(MTL-OB-Exo)对破骨细胞形成的影响。**方法:**采用细胞增殖与毒性实验(Cell Counting Kit-8, CCK-8)确定 MTL 的最佳剂量为 35.9ng/ml, 用最佳剂量的 MTL 刺激小鼠成骨细胞, 采用差速离心法分离、提取 MTL-OB-Exo 和正常小鼠成骨细胞来源外泌体(OB-Exo), 经透射电镜观察其形态及大小, 采用蛋白质印迹法(Western Blot, WB)检测外泌体跨膜蛋白 CD9 和成骨细胞特异性碱性磷酸酶(AKP)的表达。将小鼠破骨细胞的前体细胞单核巨噬细胞(RAW264.7), 按不同的干预方式分为三组: 实验组, MTL-OB-Exo (10ng/ml); 对照组, OB-Exo (10ng/ml); 空白组, 不予任何处理。培养 4d 后, 在光学显微镜下观察 RAW264.7 的分化情况, 并采用抗酒石酸酸性磷酸酶染色法(tartrate resistant acid-phosphatase, TRAP), 观察各组破骨细胞的形态并计数, 比较破骨细胞形成的数量。同样的分组条件下, 将干预后的细胞在骨磨片上培养 10d, 采用亚甲蓝染色, 观察各组骨吸收陷窝的形态并计数, 比较骨吸收陷窝形成的数量。**结果:**MTL-OB-Exo 为直径 30~100nm 的圆形或椭圆形结构, 高表达 CD9 和 AKP 蛋白。采用不同的方式对 RAW264.7 进行干预后, 实验组破骨细胞形成的数量为 39.60 ± 1.95 个, 显著高于对照组(30.20 ± 1.64 个)和空白组(28.80 ± 1.58 个), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 实验组骨吸收陷窝数量为 21.40 ± 1.52 个, 显著高于对照组(16.20 ± 1.30 个)和空白组(14.40 ± 1.52 个), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**MTL-OB-Exo 可以诱导并增强破骨细胞的形成, 造成骨质破坏。

【关键词】外泌体; 成骨细胞; 破骨细胞; 结核杆菌裂解物

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2021.01.10

中图分类号: Q813.1, R378.91 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2021)-01-0069-07

Experimental study on the effect of osteoblast-derived exosomes stimulated by mycobacterium tuberculosis lysate on osteoclasts/LIANG Simin, CAI Zecheng, Wang Zhiqiang, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2021, 31(1): 69-75

【Abstract】Objectives: To study the effect of osteoblast-derived exosomes(MTL-OB-Exo) stimulated by mycobacterium tuberculosis lysate(MTL) on the formation of osteoclasts. **Methods:** Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to determine that 35.9ng/ml was the optimal dose of MTL, which was used to stimulate mouse osteoblasts. Differential centrifugation was used to separate and extract MTL-OB-Exo and normal mouse osteoblast-derived exosomes (OB-Exo). The morphology and size were observed by transmission electron microscopy, and Western blot(WB) was used to detect the expression of exosomal transmembrane protein CD9 and osteoblast-specific alkaline phosphatase(AKP). Mouse mononuclear macrophages(RAW264.7), the precursor cells of osteoclasts, were divided into three groups according to different intervention methods: experimental group, MTL-OB-Exo (10ng/ml); control group, OB-Exo (10ng/ml); blank group, no treatment. After 4 days of culture, RAW264.7 was observed under light microscope and tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) staining was used. The morphology of osteoclasts in each group was observed and counted, and the difference in the

基金项目:宁夏自然科学基金(编号:2018AAC03263);宁夏自然科学基金(编号:2018AAC03138);宁夏医科大学科学研究基金(编号:XY2017112);国家自然科学基金(编号:8196090244)

第一作者简介:男(1982-),在读博士研究生,副主任医师,研究方向:脊柱结核

电话:(0951)6980016 E-mail:148376463@qq.com

并列第一作者:蔡则成 E-mail:418751857@qq.com

通讯作者:戈朝晖 E-mail:myovid@126.com

number of osteoclasts was compared. In the same intervention group, the cells after intervention were cultured on the bone grinding plate for 10 days. The morphology of bone resorption lacunae in each group was observed and counted by methylene blue staining, and the difference in the number of bone resorption lacunae was compared. **Results:** MMTL-OB-Exo was of a round or round-like structure with a diameter of 30–100nm, and it highly expressed CD9 and AKP proteins. After the intervention of RAW264.7 in different ways, the number of osteoclasts formed in the experimental group was 39.60 ± 1.95 , which was significantly higher than that in the control group (30.20 ± 1.64) and the blank group (28.80 ± 1.58), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The number of bone resorption lacunae in the experimental group was 21.40 ± 1.52 , which was significantly higher than that in the control group (16.20 ± 1.30) and the blank group (14.40 ± 1.52), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions:** MTL-OB-Exo can induce and enhance the formation of osteoclasts, result in bone destruction.

[Key words] Exosomes; Osteoblasts; Osteoclasts; Mycobacterium tuberculosis lysate

[Author's address] Department of Orthopedics, the General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, 750001, China

脊柱结核是由结核分枝杆菌引起的慢性感染性疾病,以进行性骨质破坏为主要病理特征,发病率占骨关节结核的首位,危害极大^[1]。结核性骨质破坏的发生机理复杂,涉及众多因素,国内外目前尚无统一定论。破骨细胞的异常增殖与活化是病理骨破坏的触发因素。正常情况下,成骨细胞形成新骨,破骨细胞吸收旧骨,在骨微环境中两者借助细胞因子、化学递质、细胞接触等多种方式交互作用^[2-3],始终维持着一种动态平衡,保证了骨骼的健康生长^[4]。近年来,外泌体作为细胞间通讯的主要媒介引起了广泛关注,成骨细胞和破骨细胞的相互作用逐渐被人们所认识。研究发现,不但破骨细胞可以通过外泌体转运 miRNA,抑制成骨细胞的功能^[5-7],而且成骨细胞分泌的外泌体也能诱导破骨细胞形成^[8]。在结核造成的骨质破坏中,破骨细胞的大量增殖与活化是否也与成骨细胞分泌的外泌体有关,尚未发现此类报道。本研究采用结核杆菌裂解物 (mycobacterium tuberculosis lysate, MTL) 刺激小鼠成骨细胞,得到 MTL 刺激后的成骨细胞来源外泌体 (osteoblast derived exosomes induced by MTL, MTL-OB-Exo),以 MTL-OB-Exo 诱导破骨细胞前体细胞 RAW264.7 细胞,观察破骨细胞的形成情况,旨在揭示成骨细胞在脊柱结核破骨细胞形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

胎牛血清 (Biological Industries, 以色列)、DMEM 培养基 (Biological Industries, 以色列)、青-

链霉素 (Biological Industries, 以色列)、胰蛋白酶 (Gibco, 美国)、H37Ra (宁夏传染病医院)、小鼠成骨细胞 (MC3T3-E1, 中国科学院细胞库)、小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7, 中国科学院细胞库)、CD9 抗体 (Abcam, 英国)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 抗体 (Abcam, 英国)、抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色试剂盒 (Sigma, 美国)、甲苯胺蓝染色液 (Solarbio, 中国)、亚超速低温离心机 (Beckman AJ-30I, 美国)、透射电子显微镜 (Hitachi H-9500, 日本) 等。

1.2 细胞的体外培养和收集

本研究通过宁夏医科大学总医院医学科研伦理审查 (伦理编号: 2020-995)。将 MC3T3-E1 在含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100mg/L 链霉素、90% 的 DMEM 培养基中培养。RAW264.7 在 RPMI1640+10% 胎牛血清中培养。所有细胞均置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中增殖。H37Ra 接种于罗氏培养基,培养 20d 后收集菌体 5mg,加入 500μl 的 RIPA 裂解液,冰上超声裂解 2min 后继续离心 10min (4℃、12000rpm),收集上清液,调整浓度为 1.0μg/μl, -20℃ 保存备用。

1.3 细胞增殖与毒性实验 (Cell Counting Kit-8, CCK-8)

将 MC3T3-E1 培养 3d 后,用胰酶消化,接种至 96 孔板,每孔 10⁵ 个细胞,24h 后加入 MTL,将浓度分别设为 0ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml。每组分别设置 3 个复孔。处理 24h 后,使用酶标仪测定 450nm 光吸收值,按公式

计算药物对细胞活力的影响。

1.4 外泌体提取

将胎牛血清离心 15h (100000g、4℃) 去除血清中的外泌体。于 DMEM 基本培养基中加入 10% 的无外泌体的胎牛血清、1% 青-链霉素 (终浓度青霉素 100U/ml, 链霉素 100μg/ml), 配制无外泌体培养基。将 MC3T3-E1 接种至 10cm 培养皿中 (7×10⁶ 个/皿, 3 皿), 培养 24h 后分两组处理, 一组给予最适浓度的 MTL (35.9ng/ml), 另一组不做处理。两组分别混匀后于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中继续培养, 待细胞贴壁后将培养基更换为无外泌体培养基, 继续培养至 48h 后收集上清, 用过滤器 (孔径 0.22μm) 进行过滤后, 亚低温超速离心机离心 10min (4℃、300g) 后取上清, 继续离心 10min (4℃、2000g), 取上清, 离心 30min (4℃、10000g), 取上清, 离心 90min (4℃、140000g), 弃上清。两组所得沉淀即为 MTL-OB-Exo 和正常小鼠成骨细胞来源外泌体 (osteoblast derived exosomes, OB-Exo)。用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤沉淀并重悬, 140000g 再次离心 90min, 用 100μl 的 PBS 重悬沉淀, 形成外泌体溶液, 于 -80℃ 低温保存, 备用。

1.5 成骨细胞源性外泌体的鉴定

1.5.1 外泌体形态观察 室温条件下, 在铜网上轻轻滴入两组外泌体溶液各 10μl, 吸附 1min, 干燥 1min, 用滤纸小心地从侧面吸干多余的液体, 醋酸双氧铀室温染色 1min, 吸干染液并自然干燥。12h 后, 透射电镜下观察外泌体的形态。

1.5.2 外泌体特异性蛋白表达的检测 取 20μl 外泌体, 加入 3.5μl 的 6XSDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水变性 5min, 立即冰上孵育静置, 然后进行 12%SDS-PAGE 电泳, 转印至 PVDF 膜, 封闭 1h。一抗 4℃ 过夜孵育 [稀释度: CD9 1:2000 (货号: ab92726); AKP: 1:2500 (货号: ab228636)]; PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 二抗孵育 2h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5min; 最后使用发光底物显影后, 置于蛋白质印记 (Western blot, WB) 显影仪曝光, 观察上述所测外泌体表面标志物的表达情况。

1.6 分组及破骨细胞形成的鉴定

1.6.1 TRAP 染色 RAW264.7 接种于 24 孔板, 每组 3 个复孔, 培养 24h。实验组加入 MTL-OB-Exo (10ng/ml), 对照组加入等体积的 OB-Exo, 空白组不做任何处理。培养 4d 后观察细胞形态的变

化, 并行 TRAP 染色, 具体方法根据试剂盒说明书操作 (sigma, #NO387)。在倒置显微镜下随机选取 5 个视野计数, 取其平均值记作破骨细胞形成的数量。

1.6.2 骨吸收实验 骨磨片放置于 6 孔培养板中, 然后将 8×10⁵ 个 RAW264.7 细胞接种在骨磨片上, 分组处理同 1.6.1。10d 后用甲苯胺蓝进行染色, 在电子显微镜下观察骨吸收的情况, 并在倒置显微镜下计数骨磨片上骨吸收陷窝形成的数量, 方法同上。

1.7 统计学方法

用 SPSS 18.0 统计软件分析数据, 计量资料以平均值±标准差表示, 用单因素方差分析比较各组之间的总体差异, 用 LSD 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MC3T3-E1 的培养

倒置相差显微镜下观察, MC3T3-E1 培养 24h 后可贴壁, 细胞呈梭形、三角形或不规则多边形, 呈铺路石状, 并且呈集落样生长, 集落中心细胞排列紧密甚至重叠, 周围细胞以突起相连, 细胞核居中或偏于细胞一侧 (图 1)。

2.2 MTL 的最佳刺激浓度

CCK-8 实验计算 MTL 刺激成骨细胞的最佳浓度为 35.9ng/ml (图 2)。

2.3 成骨细胞源性外泌体的鉴定

以差速离心法提取的 MTL-OB-Exo 和 OB-Exo 在透射电镜下为圆形或接近圆形, 直径约在 30~100nm, 与文献^[9]报道的外泌体形态、大小基本一致 (图 3)。通过 WB 检测其跨膜蛋白 CD9 和来源细胞的特异性蛋白 AKP 表达阳性 (图 4)。

2.4 不同方式刺激后 RAW264.7 的形态变化

实验组相对于对照组和空白组, 可见 RAW264.7 细胞体积增大, 伪足明显, 长梭状细胞数量增多 (图 5)。

2.5 破骨细胞的形成及骨吸收情况

将细胞核 ≥ 2 个且胞浆出现褐色颗粒的细胞视为 TRAP 染色阳性的破骨细胞, 倒置显微镜下可见空白组有极少量破骨细胞形成, 对照组有散在分布的破骨细胞, 实验组可见大量破骨细胞形成 (图 6)。骨磨片在甲苯胺蓝染色后, 在电镜下可见骨吸收陷窝呈紫蓝色颗粒状, 比较各组破骨细

胞和骨吸收陷窝形成的数量, 实验组较空白组和对照组明显增多(图 7); 实验组与空白组和对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 对照组与空白组相比较差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 1)。

3 讨论

脊柱结核主要的病理特征为进行性的椎骨破

坏, 从而导致脊柱失稳、畸形, 甚至并发截瘫, 严重影响患者的生活质量, 社会危害性大^[1]。成骨细胞和破骨细胞在体内是相辅相成的一对细胞, 二者相互协同、相互制约, 共同促进着骨骼的健康生长, 一旦二者之间的动态平衡被打破, 骨骼的正常结构和功能就会遭到破坏^[2]。脊柱结核骨质破坏的发生与破骨细胞的形成密不可分, 但结核分枝

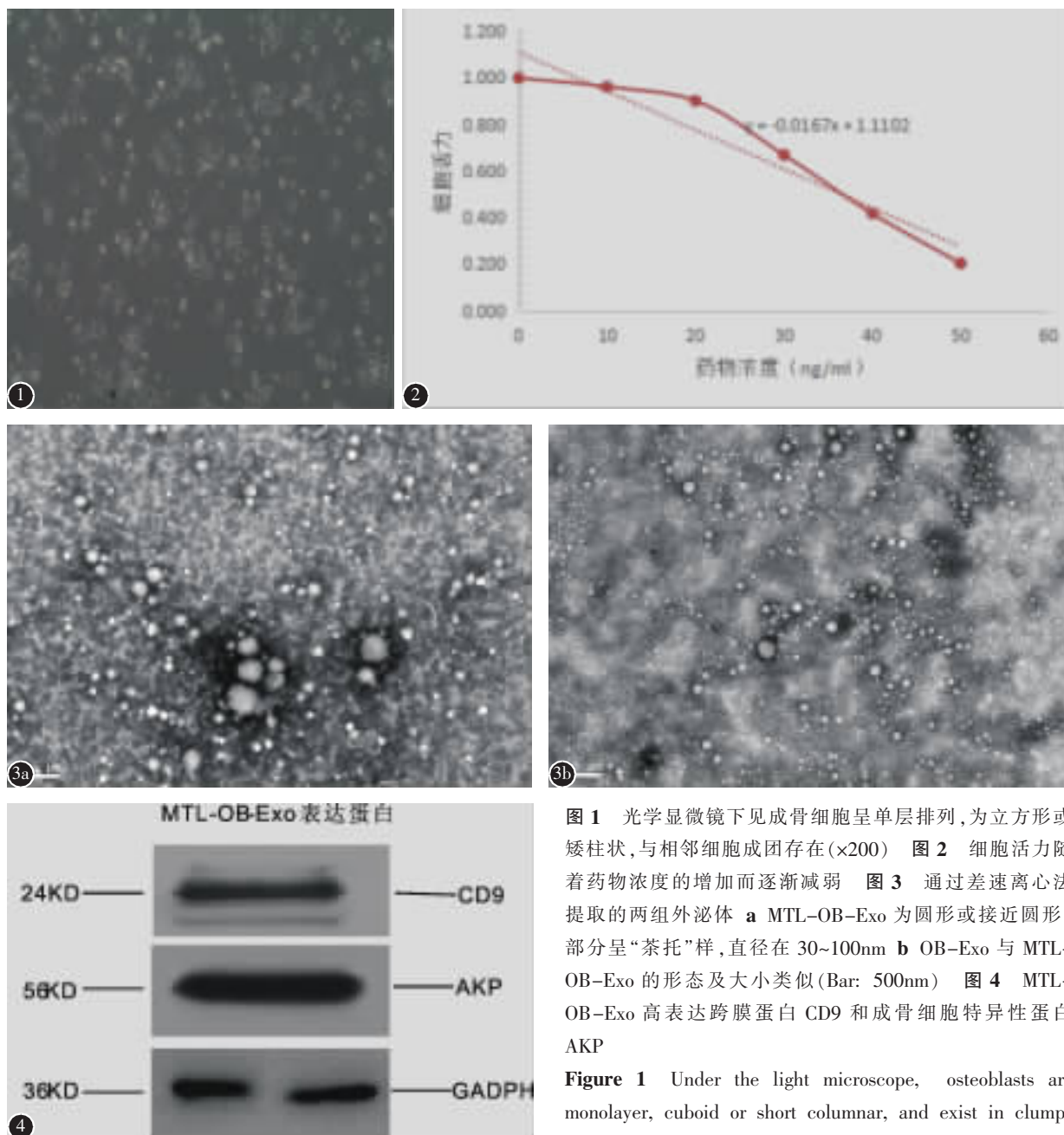


图 1 光学显微镜下见成骨细胞呈单层排列, 为立方形或矮柱状, 与相邻细胞成团存在($\times 200$) 图 2 细胞活力随着药物浓度的增加而逐渐减弱 图 3 通过差速离心法提取的两组外泌体 a MTL-OB-Exo 为圆形或接近圆形, 部分呈“茶托”样, 直径在 30~100nm b OB-Exo 与 MTL-OB-Exo 的形态及大小类似(Bar: 500nm) 图 4 MTL-OB-Exo 高表达跨膜蛋白 CD9 和成骨细胞特异性蛋白 AKP

decreases with the increase of drug concentration **Figure 3** Two groups of exosomes extracted by differential centrifugation a MTL-OB-Exo is round or quasi-circular, partly like a "saucer", with a diameter of 30~100nm b The morphology and size of OB-Exo and MTL-OB-Exo are similar(Bar: 500nm) **Figure 4** High expression of transmembrane protein CD9 and osteoblast specific protein AKP in MTL-OB-Exo

杆菌是如何引起破骨细胞的增殖和活化的,目前并未研究清楚,可能与结核杆菌导致的破骨细胞数量和功能异常有关,也可能与人体的免疫调节、炎症介质、细胞因子或细胞通讯等机制有关^[10]。

外泌体是介导细胞间通讯的主要媒介,最早是由 Johnstone 等^[11]在研究网织红细胞分化时发现的,是由细胞内多泡体 (multivesicular body, MVB) 与细胞膜融合后,释放到细胞外基质中的一种直径约 30~100nm 的脂质双分子囊泡,几乎所有细胞均可分泌。外泌体最初被认为是细胞的代谢废物,后来才发现其承载的“货物”(如 mRNA、miRNA、蛋白质等)在调控靶细胞生物行为方面起着关键作用^[12,13]。

成骨细胞和破骨细胞间的相互交流和作用是否也有赖于外泌体的介导呢? Sun 等^[9]的研究发现破骨细胞分泌的外泌体中所含的 miR-214 可以

特异性地识别成骨细胞,并抑制成骨细胞的形成。Yang 等^[7]的研究也证实破骨细胞来源的含 miR-23a-5p 的外泌体可以通过抑制 Runx2 转录因子,抑制成骨细胞的分化。同样, Li 等^[6]还发现破骨细胞可以将自身的 miR-214-3p 通过外泌体转移至成骨细胞。当然,成骨细胞也可以通过外泌体反作用于破骨细胞, Deng 等^[8]发现成骨细胞脱落的胞外囊泡中含有核因子 κ B 受体激活因子配体 (receptor activator of the NF- κ B ligand, RANKL) 蛋白,此蛋白可与破骨细胞前体细胞表面的核因子 κ B 受体激活因子 (receptor activator of the NF- κ B, RANK) 结合,促进破骨细胞的生成。在脊柱结核骨质破坏发生发展的病理过程中,大量破骨细胞的形成是否也与外泌体的介导有关,成骨细胞是否参与了破骨细胞的增殖和活化,目前鲜有报道。

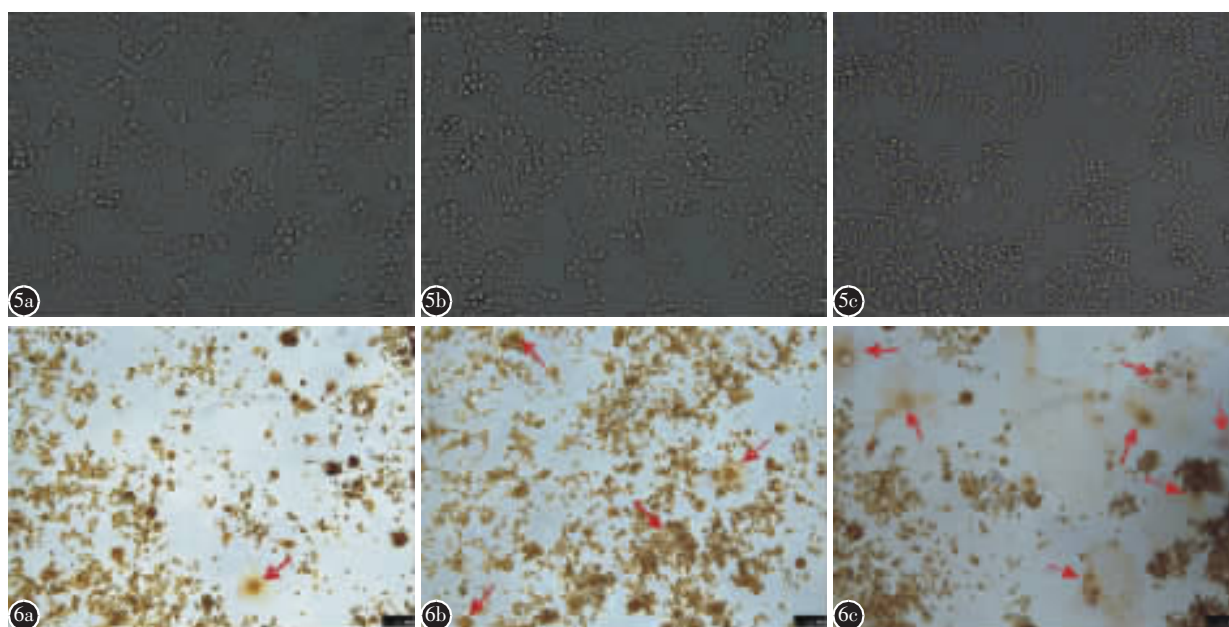


图 5 不同方式刺激后的 RAW264.7 的形态变化($\times 200$) **a** 空白组可见 RAW264.7 呈圆形,体积较大,圆形透亮 **b** 对照组可见少量分化的 RAW264.7,多核细胞数量较少 **c** 实验组可见大量分化的 RAW264.7,呈梭形并带有触角,部分融合为多核细胞 **图 6** 各组 RAW264.7 中可见胞浆内抗酒石酸酸性磷酸酶活性部位形成棕褐色沉淀,细胞核染色呈阴性,多核细胞出现,即破骨细胞形成(箭头所示)($\times 200$) **a** 空白组可见极少量破骨细胞 **b** 对照组可见散在分布的破骨细胞,少量聚集 **c** 实验组可见大量破骨细胞形成,体积较大

Figure 5 Morphological characteristics of RAW264.7 after different stimulations($\times 200$) **a** In the blank group, RAW264.7 is found round, large in volume, and transparent **b** In the control group, a small amount of differentiated RAW264.7 and a small number of multinucleated cells are seen **c** In the experimental group, a large amount of differentiated RAW264.7 is found, fusiform with tentacles, partly fused into multinucleated cells **Figure 6** In each group, the tartrate resistant acid phosphatase active site in the cytoplasm of osteoclasts formed brown precipitates, and the nuclear staining is negative, indicating the appearance of multinucleated cells—the osteoclasts (arrow)($\times 200$) **a** A few osteoclasts were found in the blank group **b** In the control group, scattered and small amount of osteoclasts were observed **c** A large number of large osteoclasts were observed in the experimental group

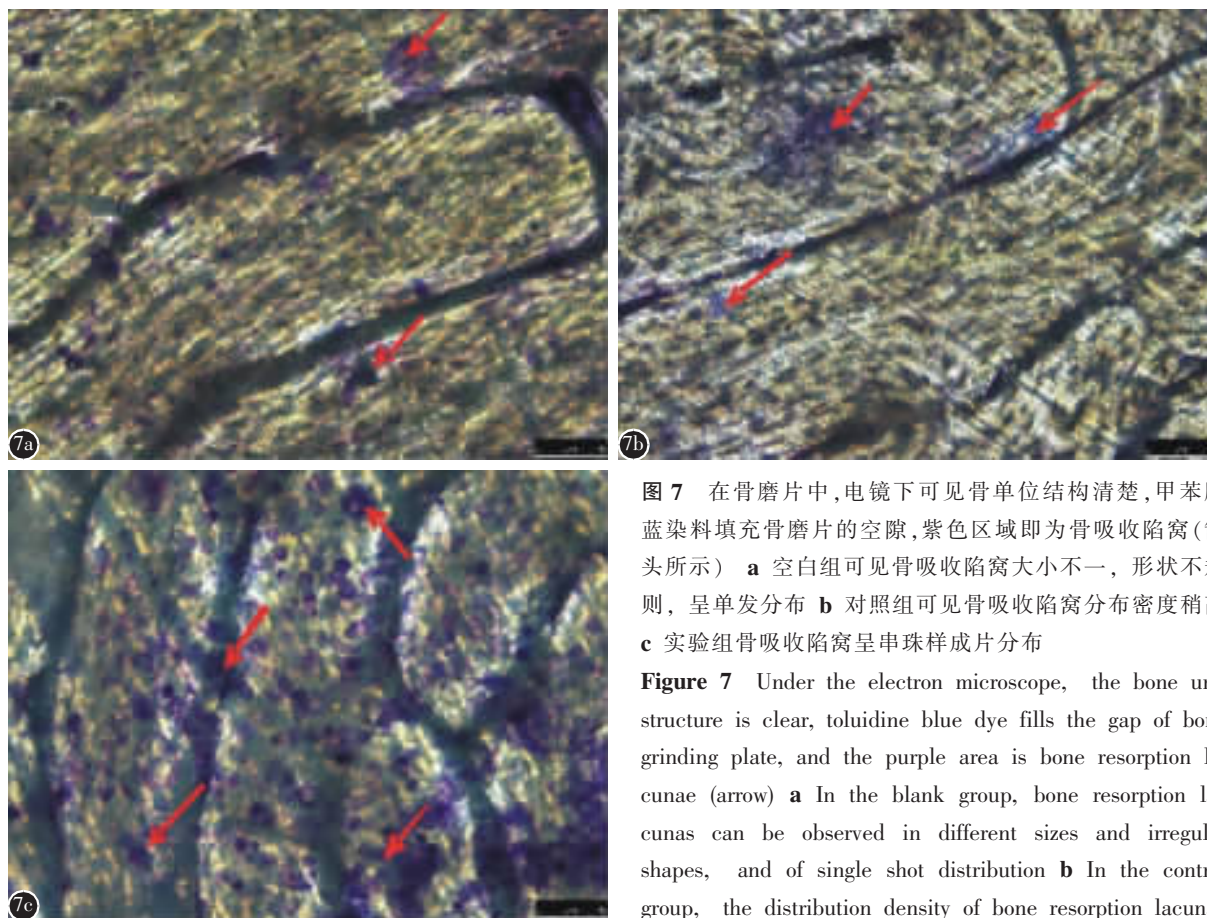


图 7 在骨磨片中,电镜下可见骨单位结构清楚,甲苯胺蓝染料填充骨磨片的空隙,紫色区域即为骨吸收陷窝(箭头所示) **a** 空白组可见骨吸收陷窝大小不一,形状不规则,呈单发分布 **b** 对照组可见骨吸收陷窝分布密度稍高 **c** 实验组骨吸收陷窝呈串珠样成片分布

Figure 7 Under the electron microscope, the bone unit structure is clear, toluidine blue dye fills the gap of bone grinding plate, and the purple area is bone resorption lacunae (arrow) **a** In the blank group, bone resorption lacunae can be observed in different sizes and irregular shapes, and of single shot distribution **b** In the control group, the distribution density of bone resorption lacunae

was higher **c** The bone resorption lacunae are distributed in the bone grinding slices in the form of beads in the experimental group

表 1 三组破骨细胞、骨吸收陷窝的数量

Table 1 Comparison of the number of osteoclasts and bone resorption pits

	实验组 Treatment group	对照组 Control group	空白组 Blank group
破骨细胞 Osteoclast	39.60±1.95 ^①	30.20±1.64 ^②	28.80±1.58
骨吸收陷窝 Bone resorption pits	21.40±1.52 ^①	16.20±1.30 ^②	14.40±1.52

注:①与对照组、空白组比较, $P<0.05$; ②与空白组比较 $P>0.05$

Note: ①Compared with the control group and blank group, $P<0.05$; ②Compared with the blank group, $P>0.05$

本研究在体外建立起结核杆菌裂解物干预的成骨细胞病理模型,以 CCK-8 实验确定的最佳 MTL 浓度来刺激培养成骨细胞,并采用差速离心法分离和提取成骨细胞来源的外泌体,透射电镜观察外泌体呈圆形或类圆形,直径在 30~100nm,经 WB 实验验证外泌体跨膜蛋白 CD9 和成骨细胞特异性蛋白 AKP 的表达,符合外泌体中的部分

蛋白质与来源细胞重叠的特征^[14]。为了证实 MTL-OB-Exo 对破骨细胞形成的诱导作用,我们在体外培养破骨细胞前体细胞即 RAW264.7 细胞,然后用 MTL-OB-Exo、OB-Exo 分别干预,并与空白组对照,观察发现在光学显微镜下实验组的 RAW264.7 细胞较空白组和对照组分化更加明显,而空白组与对照组之间细胞的形态差别不大,经 TRAP 染色计数后发现实验组破骨细胞的数量显著高于对照组和空白组,差异有统计学意义;实验组破骨细胞的形态和体积明显有别于其他两组,对照组破骨细胞形成的数量虽较空白组多,但两者的差异并不显著,说明成骨细胞可以通过外泌体的方式诱导破骨细胞形成,且这种诱导破骨细胞形成的能力在给予了 MTL 的刺激后增强。Deng 等^[8]的研究结果亦证实,外加刺激(甲状旁腺素)可以增强成骨细胞来源外泌体诱导破骨细胞形成的能力。为了进一步验证破骨细胞的骨吸收能力,本研究又进行了骨磨片实验,所得结果与

TRAP染色结果相同。成骨细胞来源的外泌体是如何诱导破骨细胞分化形成,查阅相关文献,可能因为:(1)Deng 等^[8]的研究结果认为成骨细胞所分泌的外泌体中含有 RANKL 蛋白,可以特异性地与破骨细胞前体细胞表面的 RANK 结合,参与 RANKL-RANK-OPG 调节轴,增强了破骨细胞的分化与功能。(2)张元豫等^[15]的研究发现,结核分枝杆菌产生的热休克蛋白 10(heat shock proteins 10,HSP10)可能在骨微环境中作用于成骨细胞,导致 OPG/RANKL 比例失调,引起破骨细胞的异常增殖。(3)Giri 等^[16]发现单核巨噬细胞经结核分枝杆菌刺激后,可以释放含有结核菌蛋白的外泌体,进而诱导破骨细胞分化。

综上所述,经 MTL 刺激后的成骨细胞分泌的外泌体可以增强 RAW264.7 形成破骨细胞的能力,由此推断,在脊柱结核的病理条件下,成骨细胞可能通过外泌体的方式诱导破骨细胞形成,进而出现骨质破坏。本研究为脊柱结核骨破坏的研究提供了一种新的思路,为后续骨破坏的深入研究奠定了基础。但是,脊柱结核骨破坏的病理机制复杂,涉及多种因素,本研究只是在体外从成骨细胞和破骨细胞间的相互通讯方面来探索破骨细胞形成的机制,有一定局限性,且成骨细胞来源的外泌体究竟是怎样诱导破骨细胞形成的,具体机制并未研究,外泌体内的成分多种多样,各自诱导破骨细胞形成的作用也并不清楚。

4 参考文献

1. Khanna K, Sabharwal S. Spinal tuberculosis: a comprehensive review for the modern spine surgeon[J]. Spine J, 2019, 19(11): 1858-1870.
2. Tamma R, Zallone A. Osteoblast and osteoclast crosstalks: from OAF to ephrin[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012, 11(3): 196-200.
3. Yuan FL, Wu QY, Miao ZN, et al. Osteoclast-derived extracellular vesicles: novel regulators of osteoclastogenesis and osteoclast-osteoblasts communication in bone remodeling [J]. Front Physiol, 2018, 9: 628.
4. Chen X, Wang Z, Duan N, et al. Osteoblast-osteoclast interactions[J]. Connect Tissue Res, 2018, 59(2): 99-107.
5. Sun W, Zhao C, Li Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity [J]. Cell Discovery, 2016, 2: 16015.
6. Li D, Liu J, Guo B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10872.
7. Yang JX, Xie P, Li YS, et al. Osteoclast-derived miR-23a-5p-containing exosomes inhibit osteogenic differentiation by regulating Runx2[J]. Cell Signal, 2020, 70: 109504.
8. Deng L, Wang YP, Peng Y, et al. Osteoblast-derived microvesicles: a novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts[J]. Bone, 2015, 79: 37-42.
9. Ge M, Ke R, Cai T, et al. Identification and proteomic analysis of osteoblast-derived exosomes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(1): 27-32.
10. Kanagawa H, Niki Y, Kobayashi T, et al. Mycobacterium tuberculosis promotes arthritis development through toll-like receptor 2[J]. J Bone Miner Metab, 2015, 33(2): 135-141.
11. Johnstone RM. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins [J]. Biochem Cell Biol, 1992, 70(3-4): 179-190.
12. Ingato D, Lee JU, Sim SJ, et al. Good things come in small packages: overcoming challenges to harness extracellular vesicles for therapeutic delivery [J]. J Control Release, 2016, 241: 174-185.
13. Cui Y, Luan J, Li H, et al. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression[J]. FEBS Lett, 2016, 590(1): 185-192.
14. Xie Y, Chen Y, Zhang L, et al. The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(5): 1033-1041.
15. 张元豫, 刘霞, 李坤, 等. 共培养体系中重组结核杆菌热休克蛋白 10 对破骨细胞相关基因表达的影响 [J]. 北京医学, 2014, 36(10): 830-835.
16. Giri PK, Kruh NA, Dobos KM, et al. Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from M. tuberculosis-infected and culture filtrate protein-treated macrophages[J]. Proteomics, 2010, 10(17): 3190-3202.

(收稿日期:2020-01-30 末次修回日期:2020-11-16)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 李伟霞)