

# 叶酸预处理髌下脂肪垫来源间充质干细胞来源的外泌体调控巨噬细胞极化

王喆<sup>1,2</sup>, 孔柯瑜<sup>3</sup>, 金明昊<sup>3</sup>, 伍信儒<sup>3</sup>, 范文轩<sup>3</sup>, 翟赞京<sup>3</sup>, 胡子豪<sup>1,2</sup>, 牛琳<sup>2</sup>, 齐岩松<sup>2</sup>, 徐永胜<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>内蒙古医科大学内蒙古临床医学院, 内蒙古 呼和浩特 010017; <sup>2</sup>内蒙古自治区人民医院骨科中心(运动医学中心), 内蒙古 呼和浩特 010017; <sup>3</sup>上海交通大学医学院附属第九人民医院//上海市骨科内植物重点实验室, 上海 201200

**摘要:**目的 探讨叶酸(FA)修饰的髌下脂肪垫间充质干细胞(IPFP-MSCs)来源外泌体(Exos)通过调控巨噬细胞M1/M2极化改善膝骨关节炎(KOA)炎症微环境的作用。方法 提取培养IPFP-MSCs, 加入FA进行处理, 利用超速离心法分离Exos。将RAW264.7细胞分为对照组(未处理)、脂多糖(LPS)组(加入LPS)、LPS+Exos组(加入LPS及Exos)和LPS+FA-Exos组(加入LPS及FA修饰的Exos), 分别处理12 h。采用透射电镜、纳米颗粒跟踪分析和Western blot鉴定外泌体, 使用共聚焦显微镜观察其摄取情况。通过qRT-PCR、ELISA、流式细胞术和免疫荧光检测各组促炎因子(IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、iNOS)与抗炎因子(ARG1、MRC1、CD206)表达水平。结果 透射电镜显示IPFP-Exos呈典型杯状, CD9与CD81蛋白表达阳性; 共聚焦结果证实其可被巨噬细胞摄取。qRT-PCR与ELISA结果表明, LPS+FA-Exos组促炎因子IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NOS2表达较LPS组显著下降( $P < 0.0001$ ), 抗炎因子ARG1、MRC1表达升高( $P < 0.0001$ )。流式检测显示, FA-Exos组CD86阳性比例下降, CD206及其比值升高( $P < 0.0001$ )。免疫荧光显示FA-Exos组iNOS表达减少( $P = 0.0478$ ), CD206表达增强( $P = 0.0003$ )。结论 FA-Exos可有效调控巨噬细胞由M1型向M2型极化, 免疫调节作用优于未修饰Exos, 这种双重调控机制可有效缓解关节腔促炎微环境, 为KOA的靶向治疗提供了新型外泌体修饰策略。

**关键词:** 叶酸; 巨噬细胞; 外泌体; 间充质干细胞; 骨关节炎

## Exosomes from folic acid-treated subpatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells promote M2 polarization of macrophages *in vitro*

WANG Zhe<sup>1,2</sup>, KONG Keyu<sup>3</sup>, JIN Minghao<sup>3</sup>, NG Sonu<sup>3</sup>, FAN Wenxuan<sup>3</sup>, ZHAI Zanjing<sup>3</sup>, HU Zihao<sup>1,2</sup>, NIU Lin<sup>2</sup>, QI Yansong<sup>2</sup>, XU Yongsheng<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Inner Mongolia Clinical Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010017, China; <sup>2</sup>Orthopedics Center (Sports Medicine Center), Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Hohhot 010017, China; <sup>3</sup>Shanghai Key Laboratory of Orthopaedic Implants, Department of Orthopaedic Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai 201200, China

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of exosomes derived from folic acid (FA)-treated infrapatellar fat pad mesenchymal stem cells (IPFP-MSCs) on M1 and M2 polarization of macrophages *in vitro*. **Methods** Infrapatellar fat pad tissues were obtained from surgical patients without knee osteoarthritis to isolate IPFP-MSCs. The exosomes were extracted from the cell cultures with or without FA treatment and identified by transmission electron microscopy, TEM, NTA and Western blotting. RAW264.7 cells were induced with lipopolysaccharide (LPS) and incubated with exosomes from FA-treated or untreated IPFP-MSCs for 12 h, and Exos uptake was observed using confocal microscopy. The changes in expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, ARG1, MRC1, and CD206 in the macrophages were detected using qRT-PCR, ELISA, flow cytometry and immunofluorescence staining. **Results** The exosomes derived from IPFP-MSCs showed a typical cup shape, were positive for CD9 and CD81, and could be uptaken by macrophages. In LPS-induced macrophages, incubation with exosomes from FA-treated IPFP-MSCs significantly decreased the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and NOS2, and increased the expressions of ARG1 and MRC1. Treatment of the macrophages with exosomes from FA-treated IPFP-MSCs significantly lowered CD86-positive cell percentage, increased CD206-positive cells and the CD206/CD86 ratio, lowered cellular expression of iNOS, and enhanced the expression of CD206. **Conclusion** Exosomes from FA-treated IPFP-MSCs promotes M2 polarization of macrophages more effectively than exosomes from unmodified IPFP-MSCs, suggesting a new exosome modification strategy for targeted treatment of knee osteoarthritis.

**Keywords:** folic acid; macrophage; exosomes; mesenchymal stem cells; osteoarthritis

骨关节炎(OA)是一种以关节软骨退行性变为主要特征的慢性进行性骨关节疾病,常伴有关节软骨下骨的

硬化、骨赘形成、滑膜炎反应以及关节结构破坏<sup>[1]</sup>。据估计,全球约有5.95亿人受到骨关节炎的影响。膝关节是最常受影响的部位,约有3.65亿人出现相关症状<sup>[2,3]</sup>。随着全球人口老龄化加剧和肥胖及伤害率的上升,膝关节骨关节炎(KOA)的患病率预计将进一步增加。KOA并非单纯的“磨损性”疾病,低度慢性炎症及免疫代谢紊乱在疾病进展中扮演关键角色,其中巨噬细胞介导的免疫调控机制尤为突出<sup>[4,5]</sup>。OA的各种炎症特征,如低度

收稿日期:2025-06-27

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2024ZD32, 2024LHMS08015);内蒙古自治区首府地区公立医院高水平临床专科建设科技项目(2024SGGZ015)

作者简介:王喆,在读硕士研究生, E-mail: jonna170308@163.com

通信作者:齐岩松,博士,副主任医师, E-mail: malaqinfu@126.com;

徐永胜,博士,主任医师, E-mail: xys\_sportsmedicine@126.com

外周炎症和滑膜炎,对该疾病的病理生理学有重大影响,OA中的免疫变化可引发关节及全身性的低级别炎症,这些炎症反应的潜在机制可能因OA的不同表型(如代谢型、衰老相关型或创伤后型等)而存在差异,进而代表了具有潜在临床适用性的治疗靶点<sup>[6]</sup>。OA关节腔内白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等促炎因子与抗炎因子的失衡,直接加速了软骨细胞外基质的降解<sup>[7]</sup>。

外泌体(Exos)在细胞间通讯和免疫调控中发挥重要功能,其通过细胞间通讯对受体细胞进行调控,是细胞间重要的通讯载体<sup>[8]</sup>。间充质干细胞(MSCs)来源的Exos可有效诱导巨噬细胞由促炎的M1型向抗炎修复型的M2型极化,从而抑制炎症反应并促进组织修复<sup>[9]</sup>。髌下脂肪垫间充质干细胞(IPFP-MSCs)可通过关节镜微创取材、且具有较强组织再生潜能的成体干细胞,其分泌的外泌体(IPFP-Exos)在OA及组织修复研究中显示出良好的免疫调节能力<sup>[10]</sup>。研究表明,Exos可显著降低TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等炎症因子的表达,提升IL-10、精氨酸酶1(ARG1)等抗炎因子水平,从而改善局部炎症微环境,其机制可能与Exos中富含的特定RNA相关(如lncRNA NR\_028113.1、miR-590-5p、miR-21-5p及miR-146a等)<sup>[11-14]</sup>。在急性OA大鼠模型中,关节内注射IPFP-Exos后,巨噬细胞M1/M2比例显著下降,极化向抗炎M2显著转变<sup>[15]</sup>。Exos可以将封装的蛋白质和遗传信息传递给受体细胞,并充当细胞之间的信息信使<sup>[16]</sup>。锚定在来自不同细胞来源的Exos上的表面分子各不相同,这赋予它们对特定受体细胞的选择性。表面工程旨在增加患病部位Exos的局部浓度,最大限度地提高治疗效果<sup>[17]</sup>。

叶酸(FA)作为一种水溶性维生素B族成员,近年来也被发现具有显著的免疫调节功能。FA可通过抑制MAPKs和NF- $\kappa$ B通路,减轻LPS诱导的巨噬细胞炎症反应,抑制M1巨噬细胞极化<sup>[18,19]</sup>,而其缺乏将导致单核细胞-巨噬细胞谱系中的促炎信号增强<sup>[20]</sup>。研究表明,巨噬细胞对FA的摄取与其表型密切相关,M2型巨噬细胞普遍高表达叶酸受体 $\beta$ (FR- $\beta$ ),进一步增强了其对叶酸信号的响应能力<sup>[21]</sup>。Jin等<sup>[22]</sup>以FA为原料制作碳点,通过NF- $\kappa$ B/MAPK通路和巨噬细胞重编程保护软骨细胞,减轻骨关节炎。

既往研究表明,MSCs-Exos通过调控巨噬细胞极化可有效缓解KOA炎症反应,但存在对于炎症部位的靶向性不足、细胞摄取率较低等问题,显著影响了体内治疗的稳定性和有效性<sup>[23-26]</sup>。本研究基于FR在巨噬细胞表面高表达的特性,创新性的利用FA对IPFP-Exos进行修饰,构建靶向递送系统,旨在提高Exos在细胞水平的摄取效率并增强其免疫调节功能。系统比较IPFP-Exos与FA-Exos对巨噬细胞M1/M2型极化的调控效果差异,多维度评估FA-Exos在改善KOA炎症微环境中

的独特优势,为开发新型KOA靶向治疗策略提供实验依据。

## 1 资料和方法

### 1.1 实验材料

RAW264.7巨噬细胞;PBS(武汉赛维尔生物科技有限公司);MEM- $\alpha$ 培养基、DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(Gibco);脂多糖(LPS, Sigma);叶酸(MCE);PKH67荧光染料、Phalloidin、DAPI(上海碧云天生物技术有限公司);TRIzol(Thermo);逆转录试剂盒(TaKaRa);SYBR Green(上海翌圣生物科技股份有限公司);IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒(泉州市睿信生物科技股份有限公司);CD206、iNOS兔单克隆抗体(Abcam);CD9、CD81兔单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);超速离心机(Thermo);倒置显微镜(Leica);透射电子显微镜(TEM);纳米颗粒跟踪分析仪(BeNano 90 Zeta);荧光定量PCR仪;Western blot电泳及转膜系统;化学发光成像系统;酶标仪;流式细胞仪;激光共聚焦显微镜(Leica)。

### 1.2 研究对象和方法

1.2.1 髌下脂肪垫(IPFP)的来源 有8例患者均来自内蒙古自治区人民医院骨科中心(运动医学中心),纳入标准:年龄在20~50岁;非骨性关节炎患者;无传染病病史;行关节镜手术;了解本次研究内容并签署知情同意书。排除标准:伴有系统性炎症性关节疾病;恶性肿瘤患者;伴有糖尿病、严重代谢性疾病;髌下脂肪垫组织量不足或严重纤维化、钙化患者。本研究方案经内蒙古自治区人民医院伦理委员会审核通过(伦理批号:SC-07/01KT2024008)。

1.2.2 髌下脂肪垫间充质干细胞(IPFP-MSCs)的提取 用0.1%的I型胶原酶于37℃下消化1h,将消化后的悬浮液通过70  $\mu$ m细胞过滤器,300 g离心10 min后,用含10%胎牛血清的MEM- $\alpha$ 培养基重悬,并接种于10 cm皿中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养,每2~3 d更换培养基。

1.2.3 IPFP-Exos的提取 采用超速离心法提取Exos,首先在4℃条件下以300 $\times$ g离心10 min去除细胞及细胞碎片,保留上清液;随后将上清液以2000 $\times$ g离心10 min去除死细胞及细胞碎片,再次保留上清;接着以10 000 $\times$ g离心30 min进一步去除细胞碎片,取上清液通过0.22  $\mu$ m滤膜过滤;之后将滤液以100 000 $\times$ g离心70 min获得含有杂蛋白的粗制Exos;最后弃去上清,用PBS重悬沉淀并以100 000 $\times$ g再次离心70 min,即可得到纯度较高的Exos。整个操作过程均在无菌条件下进行,最终获得的Exos用100  $\mu$ L PBS重悬后于-80℃冻存备用。对于FA-Exos,加入30  $\mu$ mol/L FA处理IPFP-MSCs 48 h后,收集细胞上清,采用同上超速离心法提

取FA-Exos。

1.2.4 IPFP-Exos的透射电子显微镜(TEM)观察 吸取10 μL 稀释后的Exos样品,滴加在铜网上,使其沉淀3 min,然后用滤纸吸去浮液。在室温下使其干燥2 min,然后使用TEM(Hitachi-HT7700)进行成像,其操作电压为80~120 kv。

1.2.5 IPFP-Exos的纳米颗粒跟踪分析(NTA) 将1 mL用PBS稀释后的Exos样品缓慢注入纳米粒度及Zeta电位分析仪(BeNano 90 Zeta)的样品池中。在标准操作程序中选择需要的测量方式,调整各项参数进行粒径的观测、跟踪和计算。

1.2.6 IPFP-Exos的细胞内示踪 将RAW264.7接种在共聚焦皿中,加入PKH67标记的Exos培养12 h,去除培养基,PBS清洗2次,加入鬼笔环肽(phalloidin)试剂染色30 min,PBS清洗2次,4%多聚甲醛常温固定15 min,PBS清洗2次,滴入DAPI试剂染色10 min,PBS清洗2次,最后用共聚焦显微镜观察。

1.2.7 IPFP-Exos的BCA蛋白浓度检测 按照试剂盒说明书配制蛋白标准品(0.5 mg/mL BSA),依次稀释成0、0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL系列浓度标准溶液。取1、2、4 μL待测样品加入96孔板中,用PBS缓冲液补足至20 μL/孔,每孔加入200 μL BCA工作液(试剂A:试剂B=50:1现配现用)。将96孔板置于37 °C恒温箱中避光孵育30 min后,立即使用酶标仪测定550 nm波长处各孔的吸光度值。以标准品浓度为横坐标,吸光度

值为纵坐标绘制标准曲线( $R^2>0.99$ ),通过线性回归方程计算待测样品中Exos蛋白的浓度。

1.2.8 IPFP-Exos的Western blot检测 将Exos与裂解液按照1:1比例混合后,在冰上裂解10 min,然后将样品置于离心机中,4 °C、12 000×g离心5 min,取上清液,在其中加入1/4体积的蛋白上样缓冲液,将混合液在95 °C的金属浴加热5 min,随后在室温下冷却。将20 μg蛋白质上样到SDS-PAGE凝胶的每个孔中,并使用Tris-甘氨酸作为电泳缓冲液。在140V电泳1 h后,将蛋白质转移到PVDF膜上并用5% BSA溶液封闭。随后,将膜与相应的一抗(1:500稀释)和二抗(1:5000稀释)一起孵育,并使用OdysseyV3.0图像扫描仪(Li-COR.Inc)对蛋白质条带进行成像。

1.2.9 qRT-PCR检测Exos及FA-exos对RAW264.7巨噬细胞极化的影响 将RAW264.7细胞以 $5 \times 10^5$ 孔密度接种于6孔板,设4组(对照组、LPS组、LPS+Exos组、LPS+FA-Exos组),每组3复孔。常规高糖培养基(含5% FBS)培养24 h后,分别更换为含100 ng/mL LPS及其与100 μg/mL Exos或100 μg/mL FA-Exos组合的培养基,继续培养12 h。采用Trizol法提取细胞RNA,测定纯度( $A_{260/280}>1.8$ )后反转录为cDNA。qPCR反应条件:95 °C预变性2 min;40个循环(95 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s)。以GAPDH为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。实验独立重复3次,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。

表1 qRT-PCR对差异表达miRNA的引物序列

Tab.1 Primer sequence for qRT-PCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ARG1	CCACAGTCTGGCAGTTGGAAG	GGTTGTCAGGGGAGTGTGATG
MRC1	GGCTGATTACGAGCAGTGGA	CATCACTCCAGGTGAACCCC
TNF-α	GCCTTCTCATTCTGCTTGTGG	GTGGTTTGTGAGTGTGAGGGTCT
IL-1β	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	AGGTCCACGGGAAAGACACAGG
NOS2	ACTCAGCCAAGCCCTCACCTAC	TCCAATCTCTGCCTATCCGTCTCG
IL-6	CTTCTGGGACTGATGCTGGTGAC	AGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCTC
GADPH	GGCAAGTTCAACGGCACAG	CGCCAGTAGACTCCACGACAT

1.2.10 ELISA实验检测Exos及FA-Exos对RAW264.7巨噬细胞极化的影响 分组与干预方法同1.2.7。将试剂盒提供的标准品原液用标准品稀释液进行梯度稀释,制备0、20、40、80、160、320、640 pg/mL系列浓度标准品;在预包被抗体的96孔酶标板中设置空白孔(加入50 μL标准品稀释液)、标准孔(加入50 μL各浓度标准品)和待测样品孔(加入40 μL样品稀释液及10 μL待测样本,实现1:5稀释),封板后37 °C孵育30 min;孵育结束后弃去反应液,每孔加入300 μL 1×洗涤液(浓缩洗涤

液用去离子水按1:30稀释),静置30 s后弃去,重复洗涤5次并在吸水纸上拍干;除空白孔外,每孔加入50 μL HRP标记的检测抗体,37 °C孵育30 min后重复上述洗涤步骤;最后每孔加入50 μL终止液终止反应,立即用酶标仪在450 nm波长处测定各孔吸光度值,代入标准曲线计算结果。

1.2.11 流式细胞术检测Exos及FA-exos对RAW264.7巨噬细胞极化的影响 分组与干预方法同1.2.7。收集处理后的RAW264.7巨噬细胞,首先进行Fc受体阻断,

每份样品加入 200  $\mu\text{L}$  PBS 和 1  $\mu\text{L}$  Fc 阻断抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 min; 随后进行 CD86 表面标记, 每份样品加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 和 0.5  $\mu\text{L}$  CD86 抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min; 接着进行细胞固定和破膜处理, 加入 250  $\mu\text{L}$  固定液 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 40 min 后, 用破膜液洗涤 (350 g, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 6 min); 然后进行 CD206 胞内染色, 每份样品加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 和 0.5  $\mu\text{L}$  CD206 抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 40 min; 染色完成后用 2 mL 1 $\times$ Perm/Wash 缓冲液洗涤 (350 g, 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 6 min), 最后用 300  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞并转移至流式管中, 上机检测。

1.2.12 免疫荧光染色检测 RAW264.7 巨噬细胞 iNOS 与 CD206 的蛋白表达 细胞固定后用 0.1% TritonX-100 通透 10 min, 用 5% BSA 封闭 1 h, 然后与一抗 (1:200 稀释) 在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜。第 2 天, 清洗 3 次后, 将切片与山羊抗兔 IgG H&L (AlexaFluor $^{\text{®}}$ 555, Abcam; AlexaFluor $^{\text{®}}$ 488, Abcam) 二抗 (1:1000 稀释) 孵育 1 h 后, PBS 清洗 3

次, 加入 DAPI 染色 10 min 后, PBS 清洗 3 次, 共聚焦显微镜下进行观察拍摄。

### 1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示。两组间比较采用双侧 Student's *t* 检验, 多组间比较采用单因素或双因素方差分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IPFP-MSCs 的鉴定

用流式细胞仪对所提取出的 IPFP-MSCs(P3) 进行干细胞表面标志物的鉴定, 结果显示所提取的细胞 CD90、CD105 和 CD73 表达阳性, 而 CD11b、HLA-DR、CD34、CD45 及 CD19 表达阴性。证实所提取的细胞为间充质干细胞而非造血干细胞 (图 1A~H)。IPFP-MSCs 在光学显微镜下呈典型的长梭状形态 (图 1I)

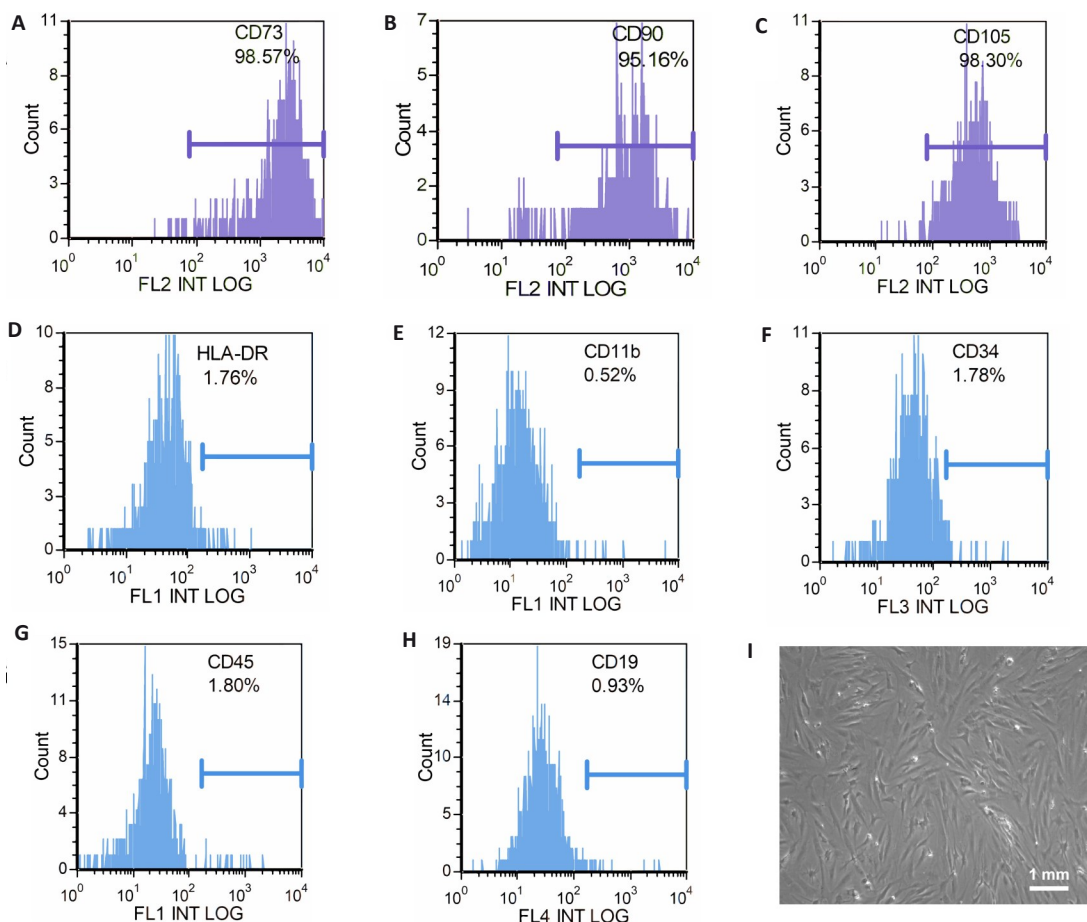


图 1 IPFP-MSCs 流式细胞术鉴定 (A-H) 及光学显微镜下图像 (I)

Fig.1 Identification of infrapatellar fat pad mesenchymal stem cells (IPFP-MSCs) by flow cytometry (A-H) and under optical microscope (I).

### 2.2 IPFP-Exos 的鉴定

采用 TEM、NTA 及 Western blotting 对纯化的 IPFP-Exos 进行鉴定。TEM 结果显示, IPFP-Exos 呈典

型杯状形态 (图 2A), 符合 Exos 的超微结构特征。NTA 分析表明, 囊泡平均粒径 (图 2B) 处于 Exos 的特征性粒径范围 (30~150 nm), 提示分布均一。Western blotting

检测显示,IPFP-Exos 高表达 Exos 标志蛋白 CD9 及 CD81(图 3C)。本研究成功从 IPFPs 上清液中分离出 IPFP-Exos。

### 2.3 RAW264.7 巨噬细胞摄取 IPFP-Exos

共聚焦显微镜下观察,PKH67 标记的 Exos 可以被 Phalloidin 标记的 RAW264.7 巨噬细胞内吞,主要位于细胞胞质内,分布在 DAPI 标记的蓝色核周围,结果显示 IPFP-Exos 可被巨噬细胞有效摄取(图 3D)。

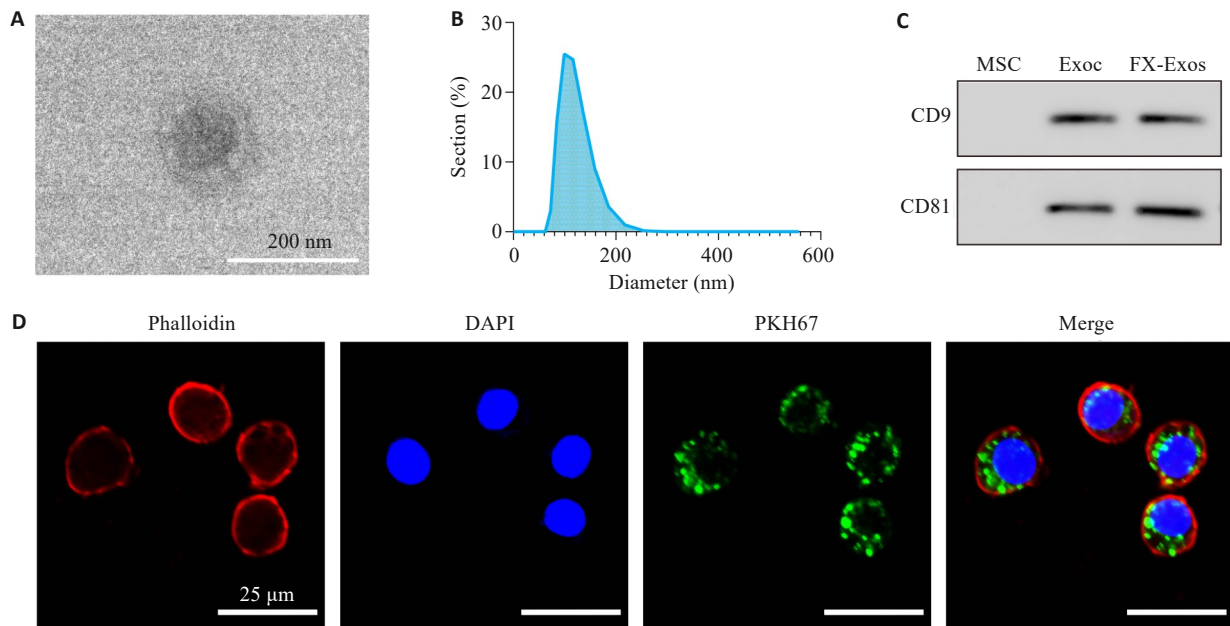


图2 IPFP-Exos的鉴定及其在RAW264.7巨噬细胞中的分布

Fig. 2 Identification of exosomes from IPFP-MSCs (IPFP-Exos) and its distribution in RAW264.7 macrophages. A: TEM observation showing cup-shaped IPFP-Exos. B: NTA showing homogenous diameter of the vesicles. C: Positive expression of surface markers CD9 and CD81 on IPFP-Exos; D: Confocal microscopy for observing distribution of IPFP-Exos in RAW264.7 macrophages.

### 2.4 qRT-PCR检测RAW264.7巨噬细胞极化的效果

与对照组相比,LPS刺激显著上调促炎因子IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和NOS2的mRNA表达水平( $P < 0.0001$ );而LPS+Exos组这些因子的表达量较LPS组显著降低( $P < 0.0001$ ),其中LPS+FA-Exos组的表达水平进一步下降,接近对照组水平(图A~D)。同时,LPS刺激虽使抗炎标志物ARG1和MRC1的mRNA表达呈现下降趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与LPS组相比,LPS+Exos组ARG1和MRC1的表达显著升高( $P < 0.0001$ ;  $P = 0.0015$ ),且LPS+FA-Exos组的表达水平较LPS+Exos组进一步提高( $P < 0.0001$ ,图E、F)。

### 2.5 ELISA检测细胞上清相关炎症因子的表达

与对照组相比,LPS显著促进了RAW264.7细胞上清中IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 的分泌( $P < 0.0001$ ,图4A~C)。在LPS刺激下,给予Exos处理可明显下调上述炎症因子的水平( $P < 0.0001$ ),而给予FA-Exos处理后,炎症因子水平进一步显著下降。其中,LPS+FA-Exos组的IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平均显著低于LPS+Exos组( $P < 0.0001$ ),接近正常对照组水平。

### 2.6 流式细胞术检测RAW264.7巨噬细胞极化的效果

检测CD86和CD206的表达,以评估不同处理对

RAW264.7巨噬细胞极化的影响。结果显示,LPS显著提高了CD86阳性细胞的比例,提示M1型巨噬细胞比例升高( $P < 0.0001$ ,图A、B),同时CD206阳性细胞比例显著下降( $P = 0.0388$ ,图A、C),CD206/CD86比值也显著降低( $P < 0.0001$ ,图D)。与LPS组相比,LPS+Exos处理组的CD86阳性细胞比例显著下降,CD206阳性细胞比例显著升高( $P < 0.0001$ ),CD206/CD86比值也相应提高( $P = 0.0002$ ,图B~D)。而在LPS+FA-Exos组中,CD86阳性细胞比例进一步下降,CD206阳性细胞比例和CD206/CD86比值进一步显著升高。

### 2.7 免疫荧光检测RAW264.7巨噬细胞iNOS与CD206蛋白表达

LPS组iNOS阳性细胞比例显著高于对照组,而Exos和FA-Exos均可明显降低LPS引起的iNOS的高表达( $P < 0.0001$ ),且LPS+FA-Exos组iNOS阳性细胞比例较LPS+Exos组进一步降低( $P = 0.0478$ ,图A、B)。同时,CD206的荧光强度在LPS组较对照组降低,但差异无统计学意义( $P = 0.4326 > 0.05$ ),LPS+Exos组和LPS+FA-Exos组CD206表达水平明显增强( $P = 0.0050$ ;  $P = 0.0003$ ),且LPS+FA-Exos组CD206荧光强度高于LPS+Exos组呈现升高的趋势,但差异无统计学意义( $P = 0.0950 > 0.05$ ,图C、D)。

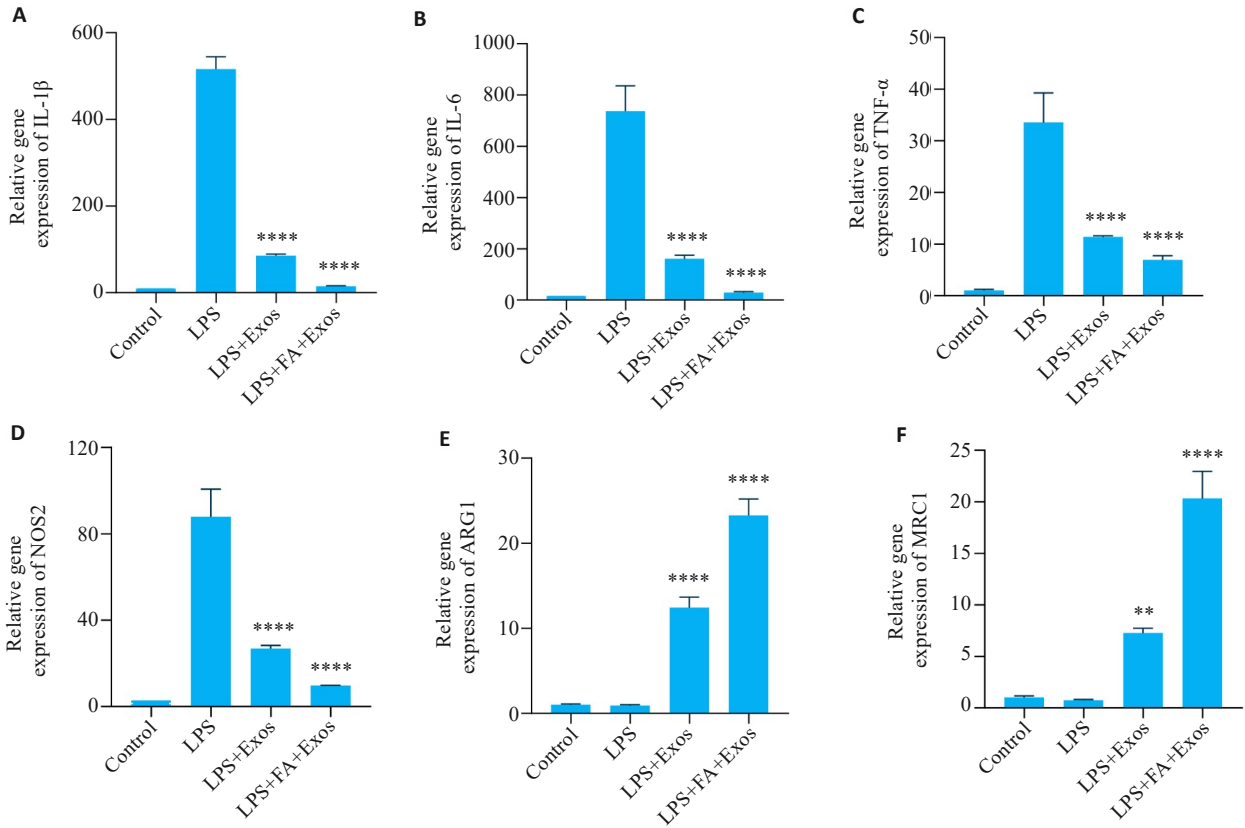


图3 IL-1β、IL-6、TNF-α、NOS2、ARG1和MRC1的mRNA表达水平

Fig.3 Changes in the mRNA expression levels of IL-1β (A), IL-6 (B), TNF-α (C), NOS2(D), ARG1 (E) and MRC1 (F) (n=3). \*\*P<0.01, \*\*\*\*P<0.0001 vs LPS group.

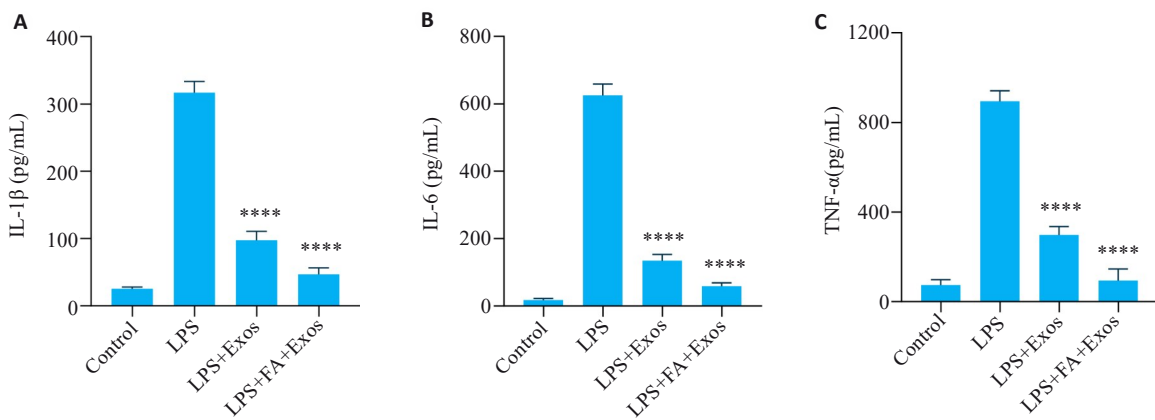


图4 ELISA 检测细胞上清IL-1β、IL-6和TNF-α的表达

Fig.4 Results of ELISA for detecting expression levels of IL-1β (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) in the cell supernatant (n=5). \*\*\*\*P<0.0001 vs LPS group.

### 3 讨论

KOA 的病理过程中,炎症反应始终贯穿疾病的始终,低度慢性炎症状态被认为是疾病进展的核心驱动因素,巨噬细胞极化失衡是导致关节炎微环境恶化的关键环节<sup>[27, 28]</sup>。根据活化状态的不同,巨噬细胞可分为促炎型的M1型和抗炎型的M2型。M1型巨噬细胞通过分泌IL-1β、TNF-α、IL-6等促炎因子激活NF-κB信号通路,促进基质金属蛋白酶和蛋白聚糖酶的表达,加速软骨细胞外基质降解<sup>[29]</sup>。相反,M2型巨噬细胞则通过分

泌IL-10、TGF-β等抗炎因子,上调组织抑制剂金属蛋白酶的表达,发挥抗炎和组织修复作用<sup>[30]</sup>。在KOA患者滑膜组织中,M1/M2型巨噬细胞比例显著失衡,这种极化状态直接影响关节组织的破坏与修复平衡<sup>[31, 32]</sup>。

IPFP作为关节腔内特殊的脂肪组织,其来源的IPFP-MSCs具有独特的免疫调节特性,较其他来源的MSCs表现出更强的软骨保护作用 and 抗炎能力<sup>[33]</sup>。其机制可能与IPFP特殊的解剖位置和微环境有关,使IPFP-MSCs能够适应关节腔的低氧和机械应力环境<sup>[34]</sup>。

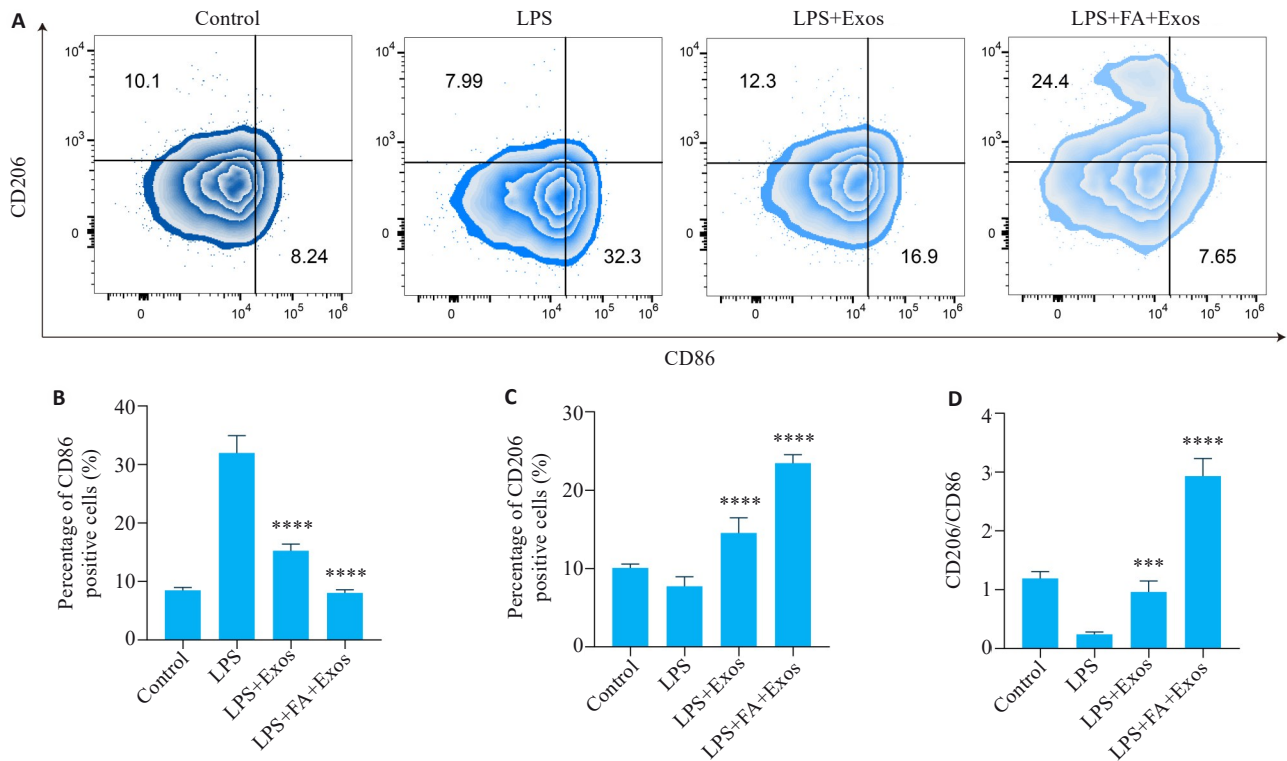


图5 流式细胞术检测RAW264.7巨噬细胞CD86和CD206的表达

Fig.5 Expressions of CD86 and CD206 in RAW264.7 macrophages incubated with the exosomes detected by flow cytometry. A: Two-dimensional density maps of flow cytometry showing the expression of M1-type marker CD86 and M2-type marker CD206 in different groups. B: Bar chart of the percentage of CD86-positive cells in different groups. C: Bar chart of the percentage of CD206-positive cells in different groups. D: The ratio of CD206/CD86 in different groups. (n=4/5). \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 vs LPS group.

Exos 作为细胞间信息传递的新型介质,在炎症性疾病调控中显示出重要作用。IPFP-Exos 富含 miR-100-5p 等功能性 miRNA,可通过调控 mTOR、PI3K/AKT 等信号通路缓解 KOA<sup>[35,36]</sup>,但天然 Exos 存在靶向性差等局限性<sup>[37]</sup>。

尽管已有多种 Exos 靶向化策略被报道,包括通过基因工程使供体细胞表达融合蛋白,以及通过膜化学修饰(如配体偶联、click 化学、脂质插入等)引入靶向配体,这些方法在 OA 中显示出一定的靶向效果与治疗潜力,但仍存在操作复杂、表达水平难以控制、可能破坏 Exos 天然膜结构以及潜在免疫原性增强等问题<sup>[38-40]</sup>。现有 FA 修饰一般用于肿瘤细胞或肿瘤微环境,在一项肿瘤微环境调控中研究中,Feng 等<sup>[41]</sup>将表达透明质酸酶的 Exos 与 FA 自组装,能够降解高分子透明质酸,改善肿瘤基质的渗透性,并调节免疫微环境,增强化疗药物的肿瘤穿透与抑制肿瘤细胞转移。

本研究利用 FA 修饰 IPFP-Exos 针对 KOA 炎症微环境。一方面,FR 在炎症状态下,尤其是在 M2 型巨噬细胞和滑膜炎症组织中呈高表达,为靶向提供了天然的受体基础;我们采用 pre-isolation 策略,即通过在供体细胞培养过程中加入 FA,使分泌出的 Exos 天然带有 FA 修饰。这种方式避免了复杂的基因工程操作,降低了潜在

安全风险,同时在保持 Exos 膜完整性的前提下增强了其靶向性。实验结果进一步证实,FA-Exos 能够更有效地被巨噬细胞摄取,促进其向 M2 型极化(表现为 CD206 阳性细胞比例显著增加),并显著抑制 M1 型标志物 iNOS 的表达。ELISA 结果显示,FA-Exos 处理组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  的水平明显低于未修饰 Exos 组;流式细胞术亦提示 FA-Exos 组 CD206/CD86 比值显著升高。这些结果表明,FA-Exos 通过优化巨噬细胞极化状态,有效改善了 KOA 的炎症微环境。综上,FA-Exos 在靶向性、免疫调控效能以及工艺可重复性和临床转化潜力方面均优于传统的工程化修饰策略,为 KOA 的 Exos 治疗提供了一种更具可行性的新思路。

本研究首次系统评估了 FA-Exos 对 KOA 炎症微环境的改善作用,为开发基于 Exos 的靶向治疗策略提供了实验依据。FA-Exos 促进 M2 型极化同时抑制 M1 型极化的双重调控作用,使其成为潜在的 KOA 治疗新选择。人体内微环境的复杂性将会对 Exos 的实际疗效产生影响,我们将在未来研究进一步探索 FA-Exos 在动物模型中的治疗效果,并与其他治疗手段联合应用,为 KOA 炎症微环境靶向治疗的开发奠定基础。

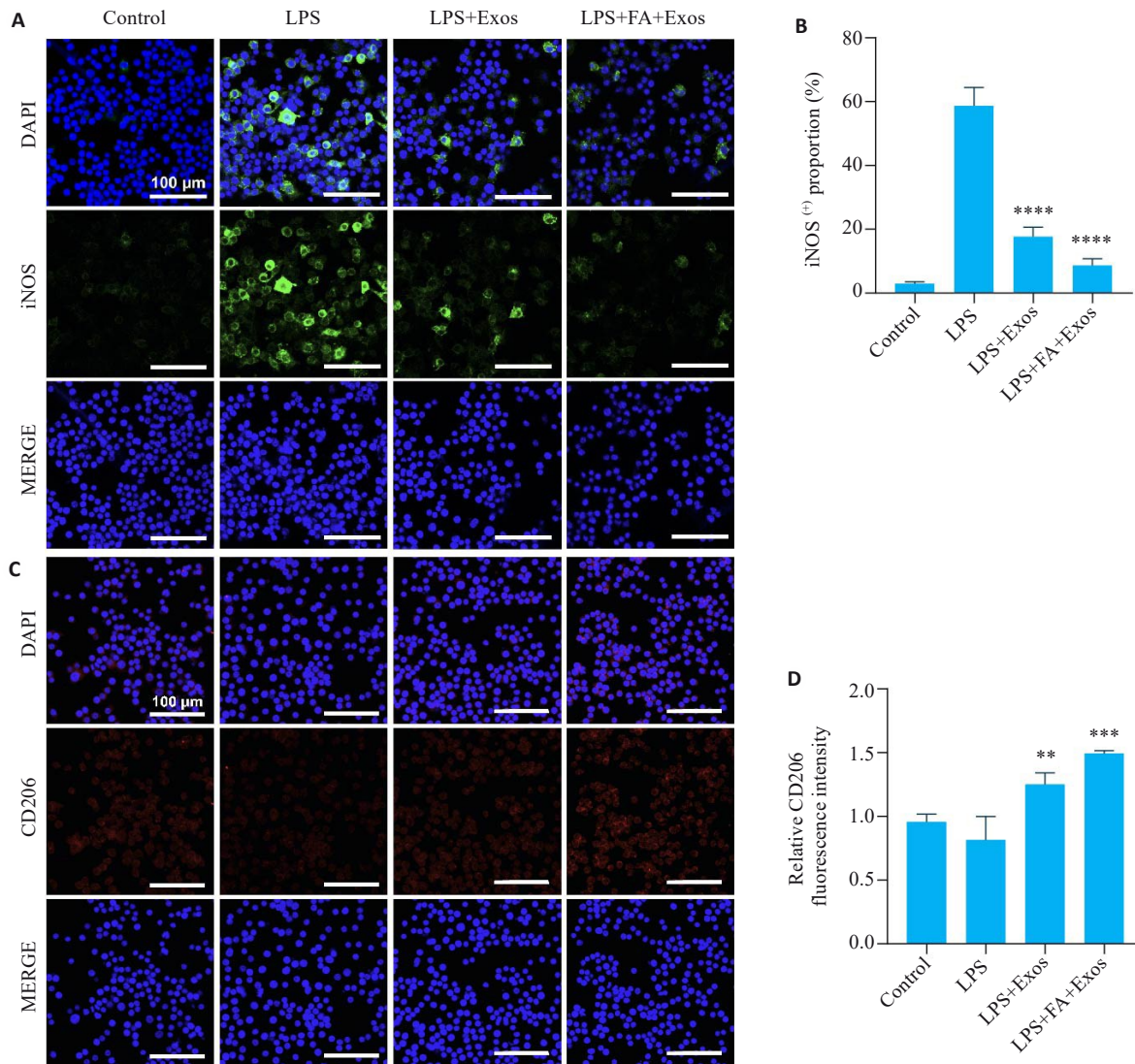


图6 RAW264.7巨噬细胞iNOS与CD206免疫荧光染色

Fig. 6 Immunofluorescence staining of iNOS and CD206 in RAW264.7 macrophages incubated with the exosomes. **A:** Expression of iNOS in RAW264.7 cells in different treatment groups. **B:** Statistical analysis of the proportion of iNOS-positive cells in each group. **C:** Expression of CD206 in RAW264.7 cells in different groups. **D:** Statistical analysis of the fluorescence intensity of CD206 in each group ( $n=3$ ).  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,  $****P<0.0001$  vs LPS group.

**Declaration of interests:** The authors declare no competing interests.

**参考文献:**

[1] Yue LD, Berman J. What is osteoarthritis? [J]. *Jama*, 2022, 327(13): 1300.

[2] GBD 2021 Osteoarthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021 [J]. *Lancet Rheumatol*, 2023, 5(9): e508-22.

[3] Cui A, Li H, Wang D, et al. Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies [J]. *EclinicalMedicine*, 2020, 29/30: 100587.

[4] Xie JW, Huang ZY, Yu XJ, et al. Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 46: 36-44.

[5] Coryell PR, Diekmann BO, Loeser RF. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(1): 47-57.

[6] Moulin D, Sellam J, Berenbaum F, et al. The role of the immune system in osteoarthritis: mechanisms, challenges and future directions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2025, 21(4): 221-36.

[7] De Roover A, Escribano-Núñez A, Monteagudo S, et al. Fundamentals of osteoarthritis: inflammatory mediators in osteoarthritis [J]. *Osteoarthr Cartil*, 2023, 31(10): 1303-11.

[8] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie G, et al. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 9-17.

[9] Che Z, Yan W, Zhao Q. Extracellular vesicles in the mesenchymal stem cell/macrophage axis: potential targets for inflammatory treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(6): 2827.

[10] Otahal A, Kramer K, Neubauer M, et al. Culture of Hoffa fat pad mesenchymal stem/stromal cells on microcarrier suspension in vertical wheel bioreactor for extracellular vesicle production [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 61.

[11] Shen D, He Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes regulate

- the polarization and inflammatory response of macrophages *via* miR-21-5p to promote repair after myocardial reperfusion injury [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(16): 1323.
- [12] Kou M, Huang L, Yang J, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(7): 580.
- [13] 张梦莹, 李志, 裴纬亚, 等. M2型巨噬细胞来源的外泌体 lncRNA NR\_028113.1 通过激活 JAK2/STAT3 通路促进巨噬细胞的极化 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(3): 393-9.
- [14] 涂舒瑜, 陈祥宇, 李程辉, 等. 补阳还五汤通过调控外泌体 miR-590-5p 介导的巨噬细胞极化延缓大鼠血管衰老 [J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(6): 1251-9.
- [15] Kouroupis D, Kaplan LD, Best TM. Human infrapatellar fat pad mesenchymal stem cells show immunomodulatory exosomal signatures [J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 3609.
- [16] Wang Z, Hu Z, Niu L, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis based on rat model [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1588841.
- [17] Kostyusheva A, Romano E, Yan N, et al. Breaking barriers in targeted therapy: advancing exosome isolation, engineering, and imaging [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2025, 218: 115522.
- [18] Fan JH, Xu HX, Qin ZZ, et al. Folic acid protects against kidney damage in mice with diabetic nephropathy by inhibiting M1 macrophage polarization *via* nuclear factor-k-gene binding pathway [J]. *Altern Ther Health Med*, 2023, 29(6): 418-20.
- [19] Feng D, Zhou Y, Xia M, et al. Folic acid inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW<sub>264.7</sub> macrophages by suppressing MAPKs and NF- $\kappa$ B activation [J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(9): 817-22.
- [20] Kolb AF, Petrie L. Folate deficiency enhances the inflammatory response of macrophages [J]. *Mol Immunol*, 2013, 54(2): 164-72.
- [21] Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, et al. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(24): 9395-403.
- [22] Jin Y, Zhang Q, Qin X, et al. Carbon dots derived from folic acid attenuates osteoarthritis by protecting chondrocytes through NF- $\kappa$ B/ MAPK pathway and reprogramming macrophages [J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 469.
- [23] Kim HI, Park J, Zhu Y, et al. Recent advances in extracellular vesicles for therapeutic cargo delivery [J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(4): 836-49.
- [24] Zeng H, Guo S, Ren X, et al. Current strategies for exosome cargo loading and targeting delivery [J]. *Cells*, 2023, 12(10): 1416.
- [25] Abbasi R, Alamdari-Mahd G, Maleki-Kakelar H, et al. Recent advances in the application of engineered exosomes from mesenchymal stem cells for regenerative medicine [J]. *Eur J Pharmacol*, 2025, 989: 177236.
- [26] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [27] Hu X, Ni S, Zhao K, et al. Bioinformatics-led discovery of osteoarthritis biomarkers and inflammatory infiltrates [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 871008.
- [28] Knights AJ, Redding SJ, Maerz T. Inflammation in osteoarthritis: the latest progress and ongoing challenges [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2023, 35(2): 128-34.
- [29] Yuan Z, Jiang D, Yang M, et al. Emerging roles of macrophage polarization in osteoarthritis: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Orthop Surg*, 2024, 16(3): 532-50.
- [30] Ma YD, Yang HY, Zong XQ, et al. Artificial M2 macrophages for disease-modifying osteoarthritis therapeutics [J]. *Biomaterials*, 2021, 274: 120865.
- [31] Liao S, Yang M, Li D, et al. Comprehensive bulk and single-cell transcriptome profiling give useful insights into the characteristics of osteoarthritis associated synovial macrophages [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1078414.
- [32] Lin C, Wan Y, Xu Y, et al. Molecular features and diagnostic modeling of synovium- and IPFP-derived OA macrophages in the inflammatory microenvironment *via* scRNA-seq and machine learning [J]. *J Orthop Surg Res*, 2025, 20(1): 382.
- [33] Liao HJ, Chang CH, Huang CF, et al. Potential of using infrapatellar-fat-pad-derived mesenchymal stem cells for therapy in degenerative arthritis: chondrogenesis, exosomes, and transcription regulation [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 386.
- [34] Zhong YC, Wang SC, Han YH, et al. Recent advance in source, property, differentiation, and applications of infrapatellar fat pad adipose-derived stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 2560174.
- [35] Wu JY, 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 [J]. *Biomaterials*, 2019, 206: 87-100.
- [36] Wu JY, Wu JH, Xiang W, et al. Engineering exosomes derived from TNF- $\alpha$  preconditioned IPFP-MSCs enhance both yield and therapeutic efficacy for osteoarthritis [J]. *J Nanobiotechnol*, 2024, 22(1): 555.
- [37] Rai A, Claridge B, Lozano J, et al. The discovery of extracellular vesicles and their emergence as a next-generation therapy [J]. *Circ Res*, 2024, 135(1): 198-221.
- [38] Chen M, Lu Y, Liu Y, et al. Injectable microgels with hybrid exosomes of chondrocyte-targeted FGF18 gene-editing and self-renewable lubrication for osteoarthritis therapy [J]. *Adv Mater*, 2024, 36(16): e2312559.
- [39] Chen M, Liu Y, Cao Y, et al. Remodeling the proinflammatory microenvironment in osteoarthritis through interleukin-1 beta tailored exosome cargo for inflammatory regulation and cartilage regeneration [J]. *ACS Nano*, 2025, 19(4): 4924-41.
- [40] Pathrikar TV, Baby HM, Hakim B, et al. Cartilage-targeting exosomes for delivery of receptor antagonist of interleukin-1 in osteoarthritis treatment [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2025, 33(7): 835-47.
- [41] Feng CX, Xiong ZY, Wang C, et al. Folic acid-modified Exosome-PH20 enhances the efficiency of therapy *via* modulation of the tumor microenvironment and directly inhibits tumor cell metastasis [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(4): 963-74.

(编辑:余诗诗)