

压力通过调控未成熟硬脑膜细胞外泌体参与颅骨细胞成骨的作用研究

王羽^{1,2,3#} 韩彦军^{1,2,3#} 王雷¹ 张春阳^{1,2,3} 孙建营¹ 赵志军^{1,2,3*} 张晓璐^{1,2,3*}

(¹内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院神经外科, 包头 014010; ²包头医学院神经外科疾病研究所, 包头 014010; ³内蒙古自治区骨组织再生与损伤修复工程技术中心, 包头 014010)

摘要 该研究在体外实验中, 将SD大鼠未成熟硬脑膜细胞受到压力刺激后分泌的外泌体, 与颅骨细胞进行共培养, 模拟大鼠颅骨生长发育过程, 探究未成熟硬脑膜在颅骨生长发育中的作用。实验选取3日龄SD大鼠分离提取原代硬脑膜细胞, 通过体外实验对原代培养的硬脑膜细胞给予压力, CCK-8和集落成集检测硬脑膜细胞增殖情况, TUNEL染色检测硬脑膜细胞的凋亡情况; 收取细胞上清, 差速离心法提取外泌体, 通过二代测序检测压力对未成熟硬脑膜细胞外泌体成骨能力的影响; 将压力处理的未成熟硬脑膜细胞外泌体与颅骨细胞共培养, 茜素红和ALP染色检测颅骨细胞的成骨能力, 实时荧光定量PCR检测成骨相关基因的表达情况。结果显示, 压力刺激未成熟的硬脑膜细胞后, 细胞增殖能力加强, 其产生的外泌体中包含更多的调控成骨相关的miRNA(miR-21-5p、miR-132、miR-20a、miR-204), 未成熟的硬脑膜细胞外泌体可以增强颅骨细胞的成骨能力, 压力刺激未成熟的硬脑膜细胞外泌体与颅骨细胞共培养能够增强颅骨细胞的成骨能力, 并使颅骨细胞中的Runx2、OPN和OCN表达水平增加。该研究发现, 未成熟的硬脑膜在颅骨生长发育中发挥重要作用, 压力对未成熟硬脑膜的刺激参与颅骨的生长发育, 为临床上的颅骨缺损修复治疗的修复方式的选择提供基础理论依据。

关键词 压力; 未成熟硬脑膜; 外泌体; 颅骨细胞; miRNA调控

Study on the Role of Pressure in Regulating the Osteogenesis of Cranial Cells through the Exosomes of Immature Dural Cells

WANG Yu^{1,2,3#}, HAN Yanjun^{1,2,3#}, WANG Lei¹, ZHANG Chunyang^{1,2,3}, SUN Jianying¹,
ZHAO Zhijun^{1,2,3*}, ZHANG Xiaolu^{1,2,3*}

(¹Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China; ²Institute of Neurosurgical Diseases, Baotou Medical College, Baotou 014010, China; ³Engineering Technology Center for Bone Tissue Regeneration and Injury Repair, Inner Mongolia Autonomous Region, Baotou 014010, China)

收稿日期: 2026-01-08 接受日期: 2026-04-13

国家自然科学基金(批准号: 82160250、81960238、82360188)、内蒙古自然科学基金(批准号: 2025MS08095)、内蒙古医师协会项目(批准号: YSXH2024KYF072、YSXH2024KYF074)、内蒙古公立医院科研联合基金科技计划(批准号: 2024GLLH0504)、包头市卫生健康科技计划(批准号: 2024wsjkkj24)和包头医学院青年科技人才发展计划(批准号: BYJJ-QNGG202402)资助的课题

*共同第一作者

*通信作者。Tel: 15849244616, E-mail: 15849244616@163.com; Tel: +86-15947129616, E-mail: 41419731@qq.com

Received: January 8, 2026 Accepted: April 13, 2026

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82160250, 81960238, 82360188), the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Province (Grant No.2025MS08095), the Inner Mongolia Medical Practitioners Association Project (Grant No.YSXH2024KYF072, YSXH2024KYF074), the Inner Mongolia Public Hospital Research Joint Fund Science and Technology Program (Grant No.2024GLLH0504), the Baotou City Health and Medical Science and Technology Plan (Grant No.2024wsjkkj24), and the Baotou Medical College Young Science and Technology Talent Development Program Project (Grant No.BYJJ-QNGG202402)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-15849244616, E-mail: 15849244616@163.com; Tel: +86-15947129616, E-mail: 41419731@qq.com

Abstract This study employed *in vitro* experiments to co-culture exosomes secreted by immature dural cells of SD rats under stress with cranial bone cells, simulating the growth and development process of rat cranial bones, to investigate the role of immature dura mater in cranial bone development. Primary dural cells were isolated and extracted from 3-day-old SD rats. *In vitro* experiments were conducted to subject the primary cultured dural cells to stress, with CCK-8 and colony formation assays used to assess dural cell proliferation, and TUNEL staining used to detect apoptosis. Cell supernatants were collected, and exosomes were extracted by differential centrifugation. Next-generation sequencing was employed to analyze the impact of stress on the osteogenic potential of immature dural cell exosomes. Co-cultures of cranial bone cells with exosomes derived from stress-treated immature dural cells were performed, and osteogenic activity was assessed by alizarin red and ALP staining, while real-time quantitative PCR was used to measure the expression of osteogenesis-related genes. Results demonstrated that stress stimulation enhanced the proliferative capacity of immature dural cells, and the exosomes produced contained higher levels of osteogenesis-regulating miRNAs (miR-21-5p, miR-132, miR-20a, miR-204). Immature dural cell exosomes promoted osteogenic activity in cranial bone cells, and co-culturing stress-treated exosomes with cranial bone cells further enhanced osteogenic capacity, accompanied by increased expression levels of Runx2, OPN, and OCN in cranial bone cells. The study found that the immature dura mater plays a crucial role in skull growth and development, and stimulation of the immature dura mater by pressure contributes to skull growth and development, providing a fundamental theoretical basis for selecting appropriate repair methods in clinical skull defect treatment.

Keywords pressure; immature dura mater; exosomes; cranial cells; miRNA regulate and control

人类的颅脑发育起源于胚胎期,并持续到出生后的一段时间^[1]。颅骨和大脑共同生长发育的过程极其复杂,受多种机制调控^[2-3]。二者在发育过程中相互协调,生长模式出现高度一致。在颅骨和大脑中间还存在三层膜性结构,即紧贴颅骨的硬脑膜、中间的蛛网膜和紧贴大脑表面的软脑膜,三者合称为脑膜^[4]。其中最外层的硬脑膜紧贴颅骨,主要由纤维结缔组织构成^[5-6]。硬脑膜在颅骨和大脑的发育中发挥了重要作用,有研究表明,硬脑膜在颅骨生长发育过程中,可以通过分泌和释放相关调控因子调节颅骨的生长发育^[7]。

在人类出生初期,颅骨受到来自于大脑“膨胀式生长”产生的颅内压力,这种压力会刺激颅骨的生长发育^[8-10]。作为大脑和颅骨之间的硬脑膜,必然能够感知并响应这种机械力的作用。生理性的机械应力可促进颅缝骨化,但其对硬脑膜细胞的分子调控机制尚未明确。研究表明,在不同微环境下预处理细胞,得到的外泌体所含的活性物质也会不同^[11-12]。然而,压力刺激硬脑膜细胞产生的细胞因子对颅骨细胞成骨的作用机制尚不明确。

为模拟颅骨生长发育过程中颅内压力的微环境,我们通过对硬脑膜细胞给予压力处理,在体外实验中探究压力处理的硬脑膜细胞外泌体对颅骨细胞

成骨能力的影响。结果发现压力处理的硬脑膜细胞外泌体通过分泌促成骨相关基因,表现出促进颅骨细胞成骨的能力。将压力刺激的硬脑膜细胞外泌体与颅骨细胞共培养后,成骨相关miRNA的功能通路丰富,这进一步说明了压力和硬脑膜在颅骨生长发育中的重要性。这一发现不仅阐明了硬脑膜-颅骨交互作用的力学生物学基础,还为颅缝早闭、颅骨缺损等疾病的靶向治疗提供了新策略。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 8~10周龄SPF级雌性、雄性SD大鼠[SYXK(京)2021-0038]各3只,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,饲养于内蒙古科技大学包头医学院动物房,实验条件适宜,动物可自由采食饮水。实验中涉及动物的操作得到内蒙古科技大学包头医学院实验动物伦理委员会批准(IACUC批准号:2025-D065)。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》,实验设计及饲养过程遵循3R原则。

1.1.2 原代细胞硬脑膜细胞 SD大鼠原代未成熟的硬脑膜细胞,由实验室人员自行分离获得。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM培养基(货号为A4192102)购自Gibco

公司;胎牛血清(货号为164210)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;青霉素/链霉素(货号为E607011-0100)购自BBI公司;TRIzol试剂(货号为15596018CN)、Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) Secondary Antibody(货号为32460)购自Invitrogen公司;Triton X-100试剂(货号为HFH10)、RevertAid First Strand cDNA试剂盒(货号为K1622)购自ThermoFisher Scientific公司;RIPA蛋白裂解液(货号为P0013B)、BCA法蛋白浓度测定试剂盒(货号为P0012)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;PVDF膜(货号为3010040001)购自Roche公司;CD63(货号为52090)、TSG101(货号为72312)和 β -actin(货号为4970)一抗购自Cell Signaling Technology公司;CCK-8试剂盒(货号为CA1210)购自北京索莱宝科技有限公司。

实时荧光定量PCR系统(型号为7900HT)购自ABI公司;化学发光图像分析系统(型号为Tanon 4600)购自上海天能科技有限公司;激光扫描共聚焦显微镜(型号为A1R HD25)购自Nikon公司;透射电子显微镜(型号为Tundra)购自ThermoFisher Scientific公司;纳米粒子电位分析仪(型号为NanoBrook Omni)购自Brookhaven公司;超高速离心机(型号为Avanti JXN-30)购自Beckman公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原代硬脑膜细胞的分离与培养 将3日龄SD大鼠用1%戊巴比妥钠(10 mL/kg)腹腔注射麻醉后进行颈椎脱臼处死,在显微镜下无菌分离硬脑膜,并将其放在含有1%双抗的PBS的1.5 mL的EP管中,清洗其中混杂的血液细胞,向硬脑膜中加入0.1%的I型胶原酶于37 °C消化20 min,1 200 r/min、室温离心3 min后弃上清。使用含15%胎牛血清的DMEM完全培养基重悬后,将其置于T25的培养瓶中培养,培养基中含100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素,并于常氧(21% O₂、74% N₂、5% CO₂)、37 °C条件培养。2 d后进行半换液,3 d进行全换液,之后每3 d进行1次换液,到细胞长至80%~90%时,进行后续实验。此次实验采用原代细胞。

1.3.2 细胞加压模型 将 5×10^5 个硬脑膜细胞接种于T25的培养瓶中,待细胞密度达到70%~90%时,置于细胞加压装置中,将压力值调整为75 mmHg(约10 kPa模拟生理性颅内压^[13]),给予循环压力,每4 h给予1次压力刺激,压力持续30 min。将细胞加压装置放置于常氧(21% O₂、74% N₂、5% CO₂)、37 °C条件培养

24 h。

1.3.3 外泌体提取 收集细胞上清液,4 °C、300 \times g离心20 min去除大块细胞碎片;4 °C、10 000 \times g离心上清液30 min;然后以4 °C、100 000 \times g进一步离心90 min,弃掉上清液,沉淀即为外泌体。将沉淀重悬于无菌的PBS中,于-80 °C进行保存。

1.3.4 电镜观察细胞外囊泡的形态 将10 μ L细胞外囊泡涂在铜网上,室温下静置2 min。将乙酸铀酰和磷钨酸溶液滴在铜网上,室温染色1 min,用滤纸去除多余液体,放在室温下干燥。使用电镜进行观察。

1.3.5 粒径检测 利用纳米粒子电位分析仪测量细胞外囊泡的大小。将待测试样品加入比色皿中进行检测。用盖子盖住比色皿,然后将其插入分析仪的样品槽中进行检测。记录外泌体的大小及分布。

1.3.6 CCK-8检测细胞活力 将硬脑膜细胞以 1×10^5 /孔的密度接种在96孔板中。对细胞进行压力处理24 h,每孔中加入10 μ L CCK-8溶液,37 °C下孵育4 h。使用酶标仪测量450 nm处的吸光度(D)值。

1.3.7 集落形成实验检测细胞的增殖能力 将硬脑膜细胞以 1×10^3 /孔的密度接种在6孔板中,加完全培养基正常培养10 d。培养结束后弃除培养基,加入PBS清洗2次,甲醇室温固定10 min,0.1%结晶紫室温染色15 min,相机拍照,通过ImageJ进行统计分析,计算集落形成率。

1.3.8 Tunel染色检测细胞的凋亡水平 将硬脑膜细胞以 1×10^5 /孔的密度接种在24孔板中,加完全培养基正常培养24 h。样本经固定和通透后,与含末端脱氧核糖核酸转移酶和荧光标记dUTP的Tunel反应液共孵育,标记断裂的DNA。洗涤后以DAPI复染细胞核,荧光显微镜下观察。凋亡细胞核呈绿色荧光,通过ImageJ进行统计分析,计算凋亡率。

1.3.9 二代测序及样本获取 使用差速离心法从硬脑膜细胞上清液中获取外泌体,并将其存放在冻存管中,于-80 °C中保存。外泌体样本送至上海美吉生物医药科技有限公司进行miRNA转录组测序。

1.3.10 RNA提取及实时荧光定量PCR 使用TRIzol试剂从硬脑膜细胞中分离总RNA,并使用RevertAid First Strand cDNA试剂盒合成cDNA。在ABI7900实时定量PCR系统上进行3次实时荧光定量PCR,使用20 μ L体系进行实时定量PCR反应程序:95 °C预变性10 min;随后40个循环,95 °C变性30 s,58 °C退火30 s,72 °C延伸30 s;最后72 °C延伸2 min。

并使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析mRNA的相对丰度。使用的引物在表1中列出。

1.3.11 蛋白免疫印迹 使用RIPA蛋白裂解液提取外泌体蛋白。使用BCA法检测蛋白质浓度,利用SDS/PAGE进行电泳分离蛋白,然后将其转印到PVDF膜上。与CD63、TSG101和 β -actin一抗(1:1 000) 4 °C孵育过夜,然后与二抗(1:5 000) 4 °C孵育3 h,用增强化学发光法ECL(enhanced chemiluminescence),发光液室温浸泡5 s后通过Tanon4600分析PVDF膜上的条带。

1.3.12 茜素红染色 将硬脑膜细胞均匀种在6孔板中,每孔种 2×10^5 细胞,待细胞密度达到70%时,更换成骨诱导培养基,使用成骨诱导培养基进行成骨诱导,每隔3 d进行1次换液,持续换液21 d。成骨诱导培养完成后进行茜素红染色,弃掉原培养基,使用PBS清洗2次,加入4%的多聚甲醛室温下固定30 min,再使用PBS清洗2次,加入茜素红染色液,室温下染色10 min,弃染色液,PBS清洗2次后加入适量PBS,显微镜下观察拍照。

1.3.13 碱性磷酸酶染色 成骨诱导培养完成后,对细胞分别进行茜素红和碱性磷酸酶染色,弃掉原培养基,使用PBS清洗2次,加入4%的多聚甲醛室温下固定30 min,再使用PBS清洗2次。使用碱性磷酸酶染色工作液[3 mL碱性磷酸酯酶显色缓冲液+10 μ L BCIP溶液(300 \times)+20 μ L NBT溶液(150 \times)]室温避光孵育30 min,弃染色工作液,PBS清洗2次后在显微镜下观察拍照。

1.3.14 免疫荧光染色 硬脑膜细胞爬片用0.5% Triton X-100透化,并用10%正常山羊血清4 °C封闭1 h。应用Vimentin的一抗(1:100),4 °C下孵育过夜。之后加入荧光标记的羊抗鼠IgG H+L二抗(1:500),并在黑暗中4 °C孵育4 h。然后用DAPI对细胞核进行

复染。在荧光显微镜下观察荧光强度并拍照,之后用ImageJ软件进行分析。

1.4 统计学方法

使用GraphPad Prism 8.2软件进行数据处理和分析。结果表示为 $\bar{x} \pm s$ 。使用单因素方差分析(One-Way ANOVA)评估统计学显著性,并辅以Bonferroni事后检验进行多重比较。两组间比较采用双尾Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠硬脑膜细胞与颅骨细胞的分离培养及鉴定

大鼠硬脑膜细胞和颅骨细胞由实验室自行分离获得,并进行培养。硬脑膜主要由成纤维细胞构成,其形态特征与成纤维细胞相一致^[14],波形蛋白(Vimentin)是大鼠硬脑膜的特异性抗原^[15],鉴定结果如图1A和图1B所示,免疫荧光染色结果显示,Vimentin的阳性表达率 $\geq 95\%$ 。OPN是颅骨细胞表面标志物,其OPN的阳性表达率 $\geq 95\%$,如图1C和图1D所示。

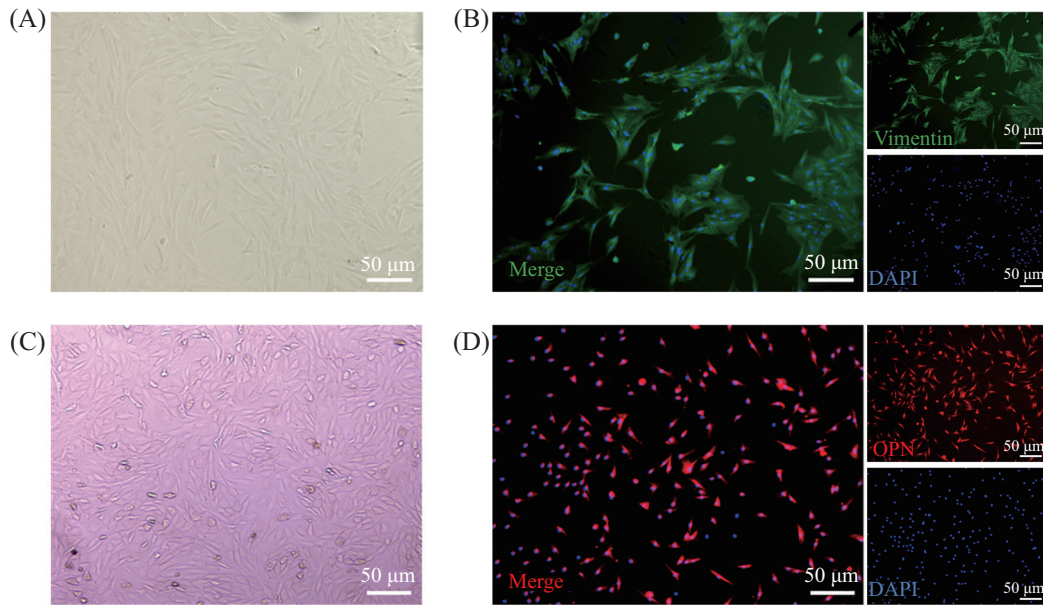
2.2 压力刺激对硬脑膜细胞增殖及凋亡能力的影响

我们对分离提取的硬脑膜细胞进行压力刺激,通过CCK-8和集落形成实验检测压力刺激硬脑膜细胞后细胞增殖情况和单克隆细胞形成能力。结果显示,在体外对硬脑膜细胞进行压力刺激时,与未进行压力刺激组的硬脑膜细胞相比,压力刺激硬脑膜细胞后细胞的增殖能力增强($P < 0.05$),如图2A所示。同样,集落形成实验也显示,压力刺激后的硬脑膜细胞的集落形成能力增强,如图2B所示,并且,在Tunel染色分析结果中显示,与对照组相比,压力组的硬脑膜细胞在经过压力刺激后,细胞的凋亡能力减弱($P < 0.05$),如图2C所示。

表1 PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>Runx2</i>	Forward: CGC CTC ACA AAC AAC CAC AG Reverse: TCA CTG CAC TGA AGA GGC TG
<i>OPN</i>	Forward: TGC ACC CAG ATC CTA TAG CC Reverse: CTC CAT CGT CAT CAT CAT CG
<i>OCN</i>	Forward: GGC AGC GAG GTA GTG AAG AGA Reverse: GAT GCC GTA GAT GCG TTT GTA
<i>β-actin</i>	Forward: TTG CCG ACA GGA TGC AGA AG Reverse: AGG TGG ACA GCG AGG CCA GGA T



A: 硬脑膜细胞体外形态图; B: 硬脑膜细胞Vimentin的免疫荧光染色图; C: 颅骨细胞体外形态图; D: 颅骨细胞OPN的免疫荧光染色图。

A: morphological image of isolated and cultured dural cells *in vitro*; B: immunofluorescence staining image of Vimentin in dural cells; C: morphological image of isolated and cultured skull cells *in vitro*; D: immunofluorescence staining image of OPN in skull cells.

图1 SD大鼠硬脑膜及颅骨细胞形态鉴定

Fig.1 Identification of cell morphology in dural and skull cells of SD rats

2.3 压力刺激硬脑膜细胞分泌的外泌体提取及鉴定

如图3A所示,压力刺激的硬脑膜细胞外泌体表现出典型的球形或杯状形态,与外泌体的特征相一致。粒径结果显示,压力刺激的硬脑膜细胞外泌体(P-DM-Exos)的粒径为115.65 nm,峰值约为118.14 nm(图3B)。此外,通过蛋白免疫印迹发现分离的硬脑膜细胞外泌体(DM-Exos)表达细胞外囊泡的标志物CD63和TSG101,不表达非细胞外标记蛋白 β -actin(图3C)。这些特征表明,压力刺激的硬脑膜细胞衍生的颗粒是外泌体。

2.4 压力刺激硬脑膜细胞外泌体差异表达miRNA的筛选和靶基因分析

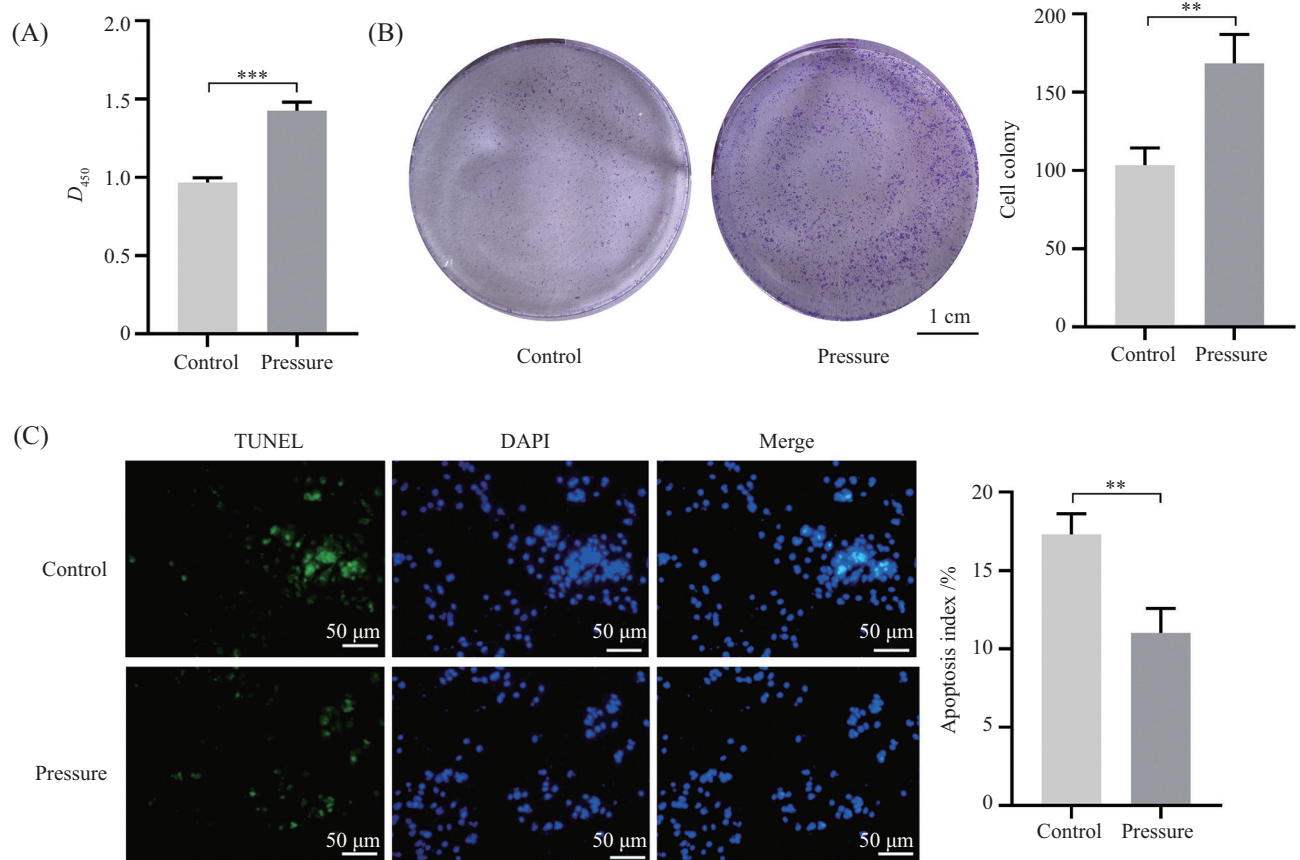
我们对未进行压力刺激的硬脑膜细胞分泌的外泌体和压力刺激硬脑膜细胞分泌的外泌体进行了miRNA的测序分析,并绘制了火山图(图4A)。比较miRNA谱分析确定了未进行压力刺激的硬脑膜细胞外泌体组和压力刺激硬脑膜细胞外泌体组之间差异表达的miRNA,其中3 110种miRNA(包括miR-21-5p、miR-132、miR-20a)表现出显著上调(倍数变化 ≥ 2.0 , $P < 0.05$);以及1 301种miRNA(包括miR-204、miR-140)下调(图4B)($P < 0.05$)。

我们对靶基因进行了GO分析,结果表明:生物过程(biological process, BP)主要与蛋白质磷酸化与

信号转导相关;细胞组分(cellular component, CC)主要与质膜、细胞质、内质网、线粒体及细胞质基质相关;而分子功能(molecular function, MF)主要与蛋白质结合、ATP结合及钙离子结合相关(图4C)。这些发现表明,硬脑膜细胞分泌的细胞外囊泡可能在细胞间通信中起关键作用,调控细胞代谢与能量稳态。KEGG通路分析显示,靶基因主要富集于信号转导通路,包括参与细胞力学信号调控的MAPK信号通路、PI3K-Akt信号通路^[16]。KEGG分析表明,压力刺激硬脑膜细胞分泌的外泌体可能通过调节细胞压力感受,以及细胞增殖和凋亡,从而参与颅骨的生长发育(图4D)。

2.5 压力刺激硬脑膜产生的外泌体对颅骨细胞成骨能力的影响

我们将提取的压力刺激硬脑膜细胞分泌的外泌体加入至SD大鼠的颅骨细胞中,将颅骨细胞分为3组:对照组(无外泌体组即Skull cells组)、无压力刺激硬脑膜细胞外泌体组(即Skull cells+DM-Exos组)、压力刺激硬脑膜细胞外泌体组(即Skull cells+P-DM-Exos组)。随后对处理后的颅骨细胞进行成骨诱导分化,诱导结束后进行茜素红和ALP染色。ALP染色结果发现,经压力刺激的未成熟硬脑膜细胞外泌体可增强颅骨细胞的早期成骨能力(图5A)。茜素红

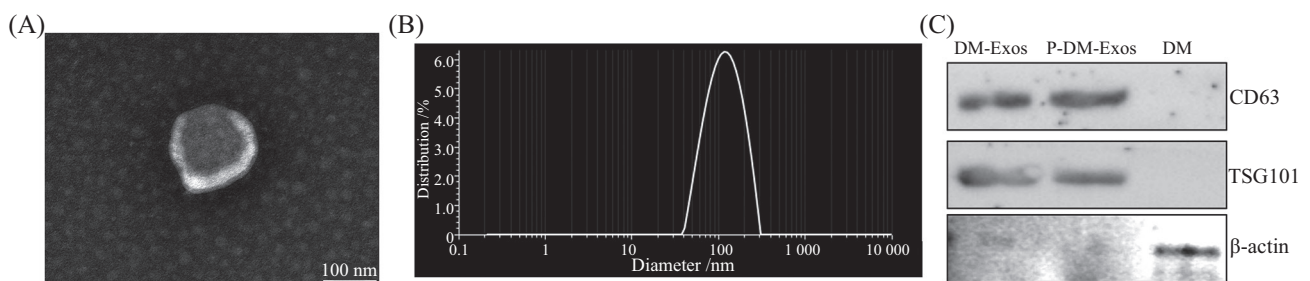


A: CCK-8检测硬脑膜细胞的增殖能力的量化分析; B: 集落形成实验检测硬脑膜细胞的集落形成能力及量化分析; C: TUNel染色检测硬脑膜细胞的凋亡能力及量化分析。 $n=6$, $\bar{x}\pm s$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: quantitative analysis of dural cell proliferation by CCK-8 assay; B: quantitative analysis of colony-forming ability of dural cells by colony formation assay; C: quantitative analysis of dural cell apoptosis by TUNel staining. $n=6$, $\bar{x}\pm s$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图2 硬脑膜细胞增殖能力检测

Fig.2 Detection of proliferation ability of dural cells



A: 使用透射电子显微镜观察压力刺激硬脑膜细胞外泌体的杯状形态; B: 使用纳米粒子电位分析仪分析压力刺激硬脑膜细胞外泌体的粒度分布; C: 免疫蛋白印迹检测细胞外膜标志物CD63、TSG101和 β -actin的蛋白质印迹。

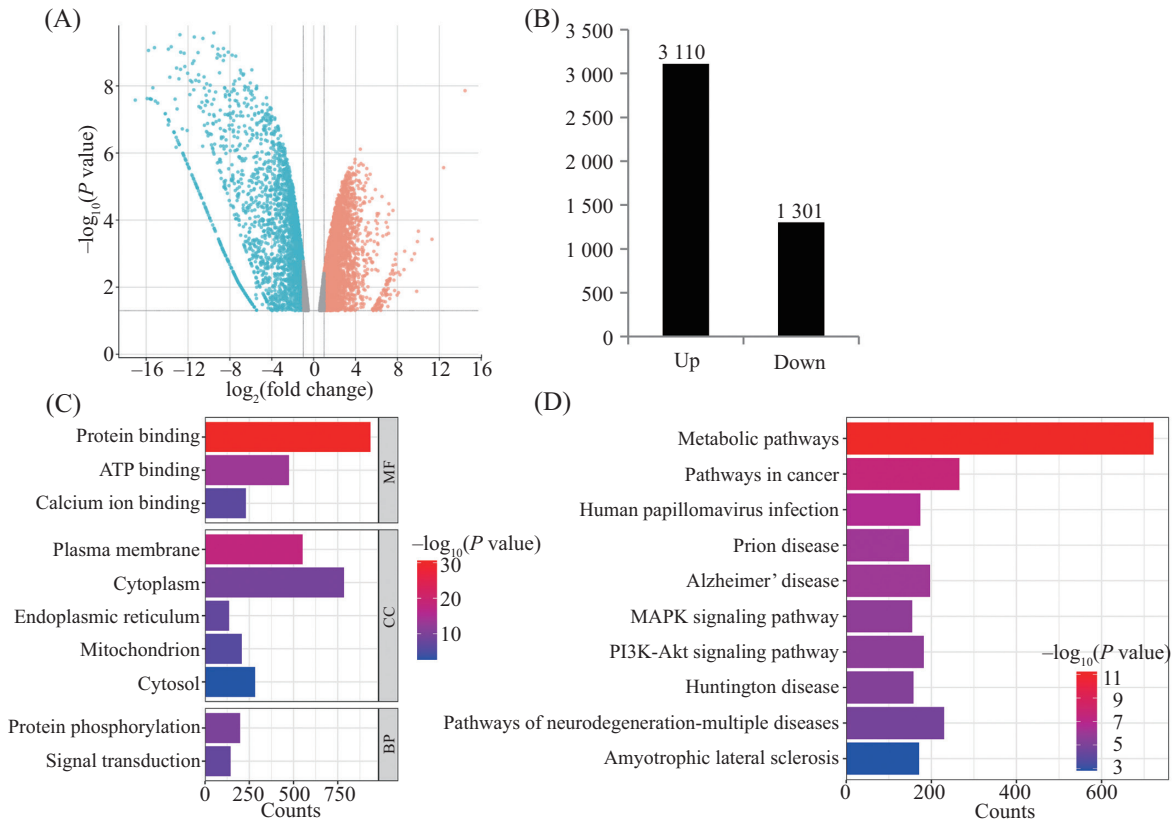
A: cup-shaped morphology of pressure-stimulated dural extracellular exosomes observed using TEM (transmission electron microscopy); B: particle size distribution of pressure-stimulated dural extracellular exosomes analyzed using nanoparticle potential analyzer; C: Western blot for protein immunoblotting of extracellular membrane markers CD63, TSG101, and β -actin.

图3 硬脑膜细胞衍生的外泌体的鉴定

Fig.3 Identification of dural cell-derived exosomes

染色结果显示, 该外泌体同样显著增强了颅骨细胞的成骨能力(图5B)。通过实时荧光定量PCR检测颅骨细胞中*Runx2*、*OPN*和*OCN*的mRNA表达水平, 结

果显示, 加入压力刺激的未成熟硬脑膜细胞外泌体的颅骨细胞的成骨相关基因*Runx2*、*OPN*和*OCN*的mRNA表达水平升高($P<0.05$), 如图5C所示。West-



A: 火山图显示, 压力刺激组与未刺激组硬脑膜细胞外泌体之间的差异基因表达; B: 差异表达的miRNAs种类; C: 靶基因前10位GO功能富集分析; D: 差异表达基因的前10位KEGG通路富集分析。

A: volcano plot showing differential gene expression between dural cell exosomes from the stress-stimulated group and the non-stimulated group; B: types of differentially expressed miRNAs; C: top 10 GO functional enrichment analysis of the predicted target genes; D: top 10 KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes.

图4 富集分析描绘压力刺激下硬脑膜细胞通过miRNA-mRNA调控网络的诱导途径

Fig.4 Enrichment analysis depicting the induction pathway of stress-stimulated dural cells through the miRNA-mRNA regulatory network

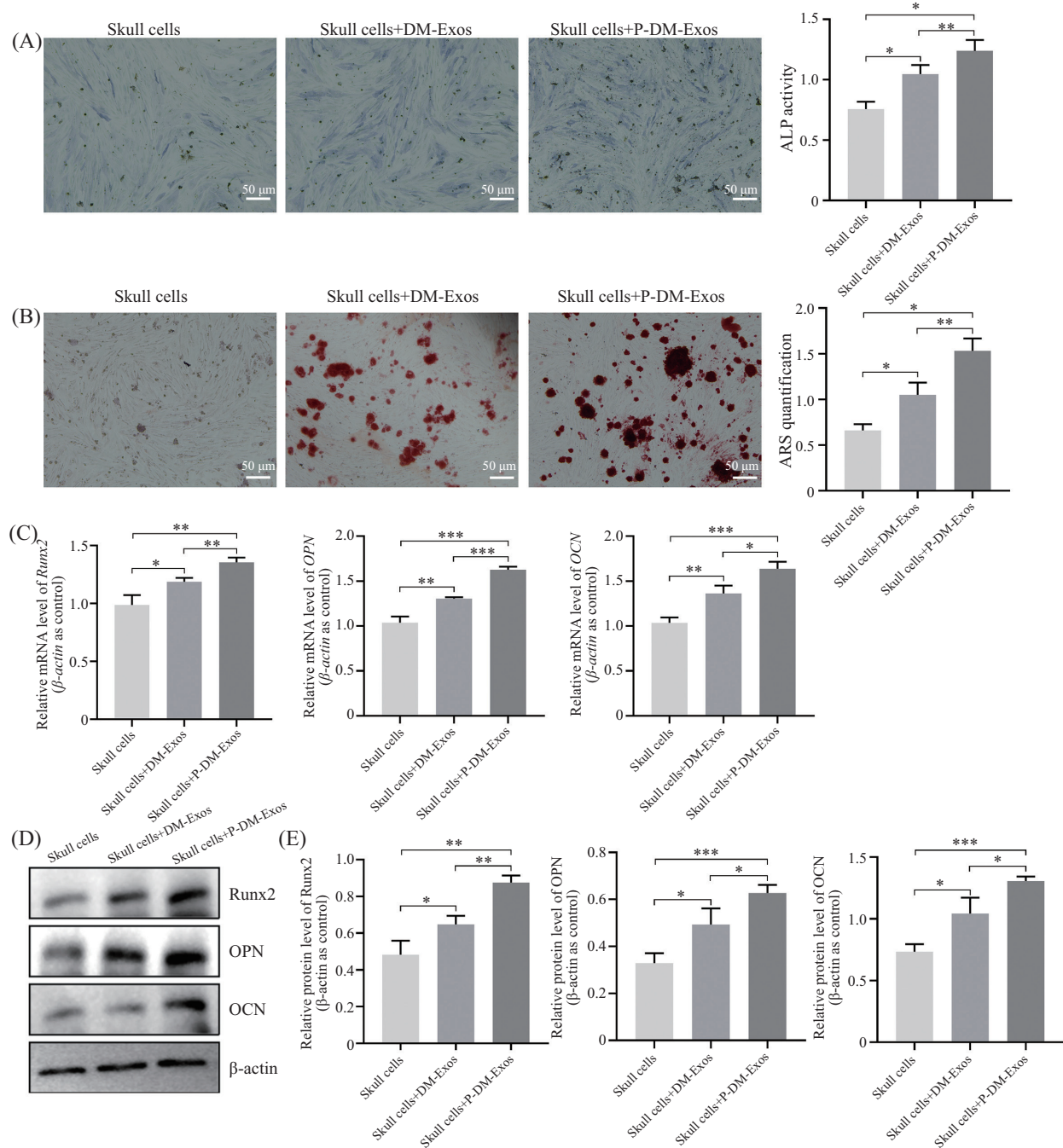
ern blot的检测结果与mRNA的表达结果相一致, 加入压力刺激的未成熟硬脑膜细胞外泌体的颅骨细胞的成骨相关基因 *Runx2*、*OPN*和*OCN*的蛋白表达水平升高($P < 0.05$) 如图5D和图5E所示。

3 讨论

小儿颅骨缺损的原因复杂多样, 常见的原因是颅脑外伤、肿瘤切除及先天性疾病。不仅会导致患儿出现神经功能损伤, 也对家庭造成极大的经济负担。直径小于3 cm的缺损可自愈; 而大于3 cm时, 通常需要通过手术进行修补^[17-18]。由于小儿处于颅骨快速生长期, 大骨瓣缺损的修补难度较大。修补材料与缺损边缘相互冲撞, 可能会导致颅脑损伤、颅脑畸形等并发症发生^[19-20]。如果缺损长期得不到修补, 颅内压力失衡会影响脑脊液和脑血流量^[19]。同时缺损部位的皮层长期缺血易诱发癫痫及神经功能的障碍。长期

颅骨缺失还会加大颅内感染及患皮瓣塌陷综合征的风险, 影响患儿整体外貌与身心健康^[21-22]。因此, 选择合适的修补时机与方法, 对预防颅骨畸形、保障术后颅脑正常发育至关重要。

本研究通过使用原代培养的SD大鼠硬脑膜细胞进行体外实验, 探究硬脑膜在大鼠体内的生物学功能。免疫荧光染色鉴定显示, 提取的硬脑膜细胞波形蛋白阳性率 $\geq 95\%$ 。颅骨内外表面分别被上骨膜和硬脑膜所覆盖^[23-25]。硬脑膜含有具有多向分化潜能的祖细胞群, 在颅骨生理性重塑、损伤修复和再生过程中发挥重要作用^[26]。但目前关于上骨膜和硬脑膜在特定缺损修复中的相对贡献及分子机制仍缺乏深入认识^[27]。在对硬脑膜细胞给予循环压力刺激后发现硬脑膜细胞的增殖能力增强。作为颅骨与脑组织之间的动态界面, 硬脑膜不仅提供物理保护, 还通过分子信号网络与大脑、颅骨形成双向调控,



A: 颅骨细胞ALP染色及量化分析; B: 颅骨细胞茜素红染色及量化分析; C: 实时荧光定量PCR检测颅骨细胞中Runx2、OPN和OCN的mRNA表达水平; D: Western blot检测颅骨细胞中Runx2、OPN和OCN的蛋白表达水平; E: 颅骨细胞中Runx2、OPN和OCN的蛋白表达水平的量化统计。 $n=6, \bar{x}\pm s, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$ 。

A: ALP (alkaline phosphatase) staining and quantitative analysis of skull cells; B: Alizarin red staining and quantitative analysis of skull cells; C: real-time quantitative PCR detection of mRNA expression levels of Runx2, OPN, and OCN in skull cells; D: Western blot analysis of protein expression levels of Runx2, OPN, and OCN in skull cells; E: quantitative statistical analysis of protein expression levels of Runx2, OPN, and OCN in skull cells. $n=6, \bar{x}\pm s, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001$.

图5 压力刺激硬脑膜细胞产生的外泌体促进颅骨细胞的成骨

Fig.5 Exosomes produced by dural cells stimulated by pressure promote osteogenesis of calvarial cells

共同构成高度协调的发育微环境^[26-28]。硬脑膜在发育过程中承担“机械-生物信号转换”的功能。脑组织快速生长导致颅内压升高,这种压力通过硬脑膜

传递至颅骨,激活成骨相关通路,调控颅骨适应性生长。此外,硬脑膜分泌的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、骨形态发生蛋白(bone mor-

phogenetic protein, BMP)等因子可促进颅缝处间充质干细胞的成骨分化,并通过外泌体参与颅骨缺损修复^[26-29]。这种调控能力在成年后显著减弱,提示硬脑膜的发育阶段特异性功能可能是颅脑协同生长的核心机制之一^[30]。

为进一步探究压力对硬脑膜细胞的影响,对给予压力刺激的硬脑膜细胞分泌的外泌体进行miRNA测序。结果发现,与对照组相比,压力刺激组有3 110种miRNA(包括miR-21-5p、miR-132、miR-20a等)上调,以及1 301种miRNA(包括miR-204、miR-140等)下调。这些差异表达miRNA均已被报道与骨形成相关。在差异表达的miRNA中,本研究重点关注与成骨调控密切相关的关键分子。miR-21-5p是上调最为显著的miRNA之一,有研究证实脂肪来源的间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cell, ADMSC)衍生的外泌体中的miR-21-5p通过靶向Notch1/DLL4/VEGFA信号通路促进血管生成,加速骨缺损修复^[31],该结果与本研究测序结果中miR-25-5p上调相一致。同样,压力刺激后miR-132显著上调,既往的研究显示,机械张力刺激下牙周韧带细胞中miR-132-3p表达水平升高,并参与成骨分化调控^[32]。miR-20a作为miR-17-92簇成员,已被证实可通过靶向BMP信号通路促进成骨分化^[33]。此外,先前的研究发现miR-204可直接靶向Runx2抑制成骨分化,其下调有助于解除成骨抑制从而促进骨形成^[34],这与本研究中压力刺激后miR-204显著下调结果相一致。GO分析和KEGG富集分析表明,压力刺激的硬脑膜细胞外泌体可参与细胞间通信,调控细胞代谢与能量稳态。同时,靶基因显著富集于PI3K-Akt、MAPK等力学信号相关通路。有研究表明,神经生长因子(nerve growth factor, NGF)预处理间充质干细胞产生的外泌体,可通过调控PI3K-Akt、MAPK信号通路在股骨远端缺损模型中诱导神经血管形成和促进骨再生^[35]。

为探究压力在硬脑膜和颅骨生长发育中的影响,将压力刺激后的硬脑膜细胞外泌体与颅骨细胞共培养。结果发现颅骨细胞成骨能力增强,Runx2、OPN和OCN的mRNA和蛋白表达水平增加。颅骨缺损的修复能力与缺损大小密切相关^[36-37]。目前,临床常采用自体骨移植、人工材料或生物工程支架修复颅骨缺损^[38]。理想的颅骨修复不仅需恢复解剖形态,还需重建功能性骨组织,恢复神经保护和颅面功

能^[39-40]。相较于传统修复策略,外泌体作为新型无细胞治疗工具,具有免疫原性低、易于储存与运输、可批量生产且能通过负载特定miRNA或活性分子实现靶向调控等优势^[41]。由于小儿颅骨正处于快速生长期,颅内压力的变化尤为显著,因此利用来源于压力刺激硬脑膜细胞产生的外泌体进行颅骨缺损修复,具有独特的应用价值。这类外泌体天然富集成骨相关的功能性miRNA,能够通过调控受体细胞中的成骨相关信号通路,在促进骨再生的同时,降低免疫排斥与异位骨化等并发症的风险,从而为颅骨缺损的功能性修复提供了一种更具前景的替代策略。

本研究证明压力刺激硬脑膜细胞来源的外泌体,在颅骨细胞的成骨中发挥重要作用,但尚缺乏体内实验与机制验证,需进一步深入探究压力-硬脑膜-颅骨的机制研究。外泌体尽管在骨再生中展现出潜力,但目前仍处于临床前阶段,将其运用于临床尚有距离。大尺寸骨缺损的完全功能重建仍是临床难题,未来需深入探索外泌体在骨组织工程中的机制,尤其是机械力-生物学耦合效应,以推动更有效的骨再生疗法的开发。

参考文献 (References)

- [1] CABEZAS M, DIEZ Y, MARTINEZ-DIAGO C, et al. A benchmark for 2D foetal brain ultrasound analysis [J]. *Sci Data*, 2024, 11(1): 923.
- [2] KOVACS M, DOMINGUEZ-BELOSO A, ALI-MOUSSA S, et al. Immune control of brain physiology [J]. *Nat Rev Immunol*, 2025, 25(7): 515-27.
- [3] TO K, FEI L J, PETT J P, et al. A multi-omic atlas of human embryonic skeletal development [J]. *Nature*, 2024, 635(8039): 657-67.
- [4] MOLLGARD K, BEINLICH F R M, KUSK P, et al. A mesothelium divides the subarachnoid space into functional compartments [J]. *Science*, 2023, 379(6627): 84-8.
- [5] ADEEB N, MORTAZAVI M M, TUBBS R S, et al. The cranial dura mater: a review of its history, embryology, and anatomy [J]. *Childs Nerv Syst*, 2012, 28(6): 827-37.
- [6] KINACI A, BERGMANN W, BLEYS R L, et al. Histologic comparison of the dura mater among species [J]. *Comp Med*, 2020, 70(2): 170-5.
- [7] RICHTSMEIER J T, FLAHERTY K. Hand in glove: brain and skull in development and dysmorphogenesis [J]. *Acta Neuropathol*, 2013, 125(4): 469-89.
- [8] YU M F, MA L, YUAN Y, et al. Cranial suture regeneration mitigates skull and neurocognitive defects in craniosynostosis [J]. *Cell*, 2021, 184(1): 243-56, e18.
- [9] CONSOLINI J, OBERMAN A G, SAYUT J, et al. Investigation of direction- and age-dependent prestretch in mouse cranial dura

- mater [J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2024, 23(3): 721-35.
- [10] ANDERSON H, HERSH D S, KHAN Y. The potential role of mechanotransduction in the management of pediatric calvarial bone flap repair [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2024, 121(1): 39-52.
- [11] YUAN F, LIU J, ZHONG L, et al. Enhanced therapeutic effects of hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles in renal ischemic injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2025, 16(1): 39.
- [12] YE H L, LUO H, HE Q, et al. Personalized human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosome pre-treatment based on the simulation of scar microenvironment characteristics: a promising approach for early scar treatment [J]. *Mol Biol Rep*, 2025, 52(1): 747.
- [13] NAGATOMI J, ARULANANDAM B P, METZGER D W, et al. Effects of cyclic pressure on bone marrow cell cultures [J]. *J Biomech Eng*, 2002, 124(3): 308-14.
- [14] SZERLIP N J, CALINESCU A, SMITH E, et al. Dural cells release factors which promote cancer cell malignancy and induce immunosuppressive markers in bone marrow myeloid cells [J]. *Neurosurgery*, 2018, 83(6): 1306-16.
- [15] MEHRARA B J, GREENWALD J, CHIN G S, et al. Regional differentiation of rat cranial suture-derived dural cells is dependent on association with fusing and patent cranial sutures [J]. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 104(4): 1003-13.
- [16] HU W Z, GUO Z Y, TANG W B, et al. Mechanoresponsive regulation of tissue regeneration during distraction osteogenesis [J]. *FASEB J*, 2024, 38(18): e70056.
- [17] HUANG R P, HU C, XU S Q, et al. 3D-printed bifunctional scaffold for treatment of critical bone defects based on osteoimmune microenvironment regulation and osteogenetic effects [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2024, 16(46): 63345-57.
- [18] WANG Z Z, SHI Y W, GAO B T, et al. Development of a multifunctional naringin-loaded bioglass/carboxymethyl chitosan/silk fibroin porous scaffold for hemostasis and critical size bone regeneration [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 290: 138888.
- [19] IACCARINO C, KOLIAS A, ADELSON P D, et al. Consensus statement from the international consensus meeting on post-traumatic cranioplasty [J]. *Acta Neurochir*, 2021, 163(2): 423-40.
- [20] FERREIRA A, VIEGAS V, CEREJO A, et al. Predictive factors for cranioplasty complications: a decade's experience [J]. *Brain Spine*, 2024, 4: 102925.
- [21] HALL W A. Cranioplasty infections: adding insult to injury [J]. *World Neurosurg*, 2014, 82(3/4): e435-7.
- [22] HUGHES E B, ALFARONE J, CHERNOV E S, et al. Polyetheretherketone (PEEK) into the future: lowering infection rates in cranioplasty [J]. *Cureus*, 2024, 16(10): e72060.
- [23] ZHAI Y K, ZHOU Z, XING X J, et al. Differential bone and vessel type formation at superior and dura periosteum during cranial bone defect repair [J]. *Bone Res*, 2025, 13(1): 8.
- [24] Evolutionary origin of vertebrate neural crest and neuromesodermal cells [J]. *Nat Ecol Evol*, 2024, 8(6): 1072-3.
- [25] STANDERWICK R G, ROBERTS W E. Calvarial bloom biomechanics: dural tension governing cranial form [J]. *Clin Anat*, 2025, doi: 10.1002/ca.70041.
- [26] MARUYAMA T. Stem cells of the suture mesenchyme in craniofacial bone development, repair and regeneration [J]. *Keio J Med*, 2019, 68(2): 42.
- [27] RANSOM R C, CARTER A C, SALHOTRA A, et al. Mechano-responsive stem cells acquire neural crest fate in jaw regeneration [J]. *Nature*, 2018, 563(7732): 514-21.
- [28] PI H J, HUANG B, YUAN Q, et al. Neural regulation of mesenchymal stem cells in craniofacial bone: development, homeostasis and repair [J]. *Front Physiol*, 2024, 15: 1423539.
- [29] WANG L Q, RUAN M J, BU Q Q, et al. Signaling pathways driving MSC osteogenesis: mechanisms, regulation, and translational applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1311.
- [30] FOUNTAIN D M, SMITH M J, O'LEARY C, et al. The spatial phenotype of genotypically distinct meningiomas demonstrate potential implications of the embryology of the meninges [J]. *Oncogene*, 2021, 40(5): 875-84.
- [31] CAO L, SUN K, ZENG R, et al. Adipose-derived stem cell exosomal miR-21-5p enhances angiogenesis in endothelial progenitor cells to promote bone repair via the NOTCH1/DLL4/VEGFA signaling pathway [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 1009.
- [32] WU Y, OU Y J, LIAO C F, et al. High-throughput sequencing analysis of the expression profile of microRNAs and target genes in mechanical force-induced osteoblastic/cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6): 3398-411.
- [33] ZHANG J F, FU W M, HE M L, et al. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(5): 829-38.
- [34] HUANG J, ZHAO L, XING L P, et al. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(2): 357-64.
- [35] LIAN M F, QIAO Z G, QIAO S C, et al. Nerve growth factor-preconditioned mesenchymal stem cell-derived exosome-functionalized 3D-printed hierarchical porous scaffolds with neuro-promotive properties for enhancing innervated bone regeneration [J]. *ACS Nano*, 2024, 18(10): 7504-20.
- [36] SZPALSKI C, BARR J, WETTERAU M, et al. Cranial bone defects: current and future strategies [J]. *Neurosurg Focus*, 2010, 29(6): E8.
- [37] EBER P, SILLMANN Y M, GUASTALDI F P S. Beyond 3D printing: how AI is shaping the future of craniomaxillofacial bone tissue engineering [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2025, 11(6): 3095-8.
- [38] LANE J C, BLACK J S. Pediatric cranial defects: what size warrants repair [J]? *J Craniofac Surg*, 2022, 33(2): 517-20.
- [39] DESJARDINS-PARK H E, MASCHARAK S, LONGAKER M T, et al. Endogenous mechanisms of craniomaxillofacial repair: toward novel regenerative therapies [J]. *Front Oral Health*, 2021, 2: 676258.
- [40] SALHOTRA A, SHAH H N, LEVI B, et al. Mechanisms of bone development and repair [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(11): 696-711.
- [41] DAGHRERY A, ARAÚJO I J S, MARQUES J F, et al. Role of exosomes in dental and craniofacial regeneration: a review [J]. *Tissue Cell*, 2025, 93: 102684.