

间充质干细胞外泌体在口腔组织再生中的研究进展

胡冰涛 王晓春

摘要 外泌体是由真核细胞合成分泌的纳米级细胞外囊泡,主要通过传递核酸、脂质和蛋白质等信号分子参与多种细胞信号通路,可作为干细胞旁分泌活动的形式参与介导多种组织的再生。越来越多的研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)除了通过多向分化和高度增殖能力加速组织的修复外,还可以通过分泌外泌体来调节内源性干细胞的增殖分化,进一步促进受损组织的愈合。外泌体的应用在再生医学领域中扮演着重要角色,本文对 MSCs 来源的外泌体在血管组织、神经组织、牙髓组织、牙周组织和关节软骨组织再生领域的研究进展进行阐述。

关键词 外泌体 间充质干细胞 组织再生 口腔组织

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.08.004

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为成体干细胞的一种,可以从骨髓、脂肪、外周血和牙髓等成体组织中分离,具备多向分化能力、高度增殖能力、免疫调节能力和致畸风险低等优点,被广泛应用于多种疾病的治疗中^[1]。但同时干细胞疗法也存在一些问题,如机体免疫排斥、干细胞遗传物质变异和体外扩增不易保存等问题^[2]。近年来研究发现, MSCs 可释放出大量细胞外纳米颗粒参与组织损伤修复过程,外泌体作为其中之一备受关注。外泌体是由真核细胞向胞外分泌的微囊泡,含有多种蛋白质、脂质和遗传物质,参与细胞间信号传递和遗传物质转运等多种生理、病理过程。在临床诊疗过程中,口腔颌面部血管、神经、牙齿和关节软骨等组织的损伤,严重危害患者的身心健康。然而利用 MSCs 外泌体既可保留干细胞原有功能,又可以避免细胞移植相关的风险和限制^[3]。因此, MSCs 外泌体有可能作为无细胞疗法在口腔颌面部组织再生研究领域中的潜在解决方案。

一、外泌体概述

1. 外泌体的生物学特征:外泌体最初是在成熟哺乳动物的网织红细胞中发现的,是直径约 30 ~ 150nm 的细胞外囊泡,密度为 1.11 ~ 1.19g/ml,在透射电镜下观察多数为圆形或杯形。外泌体可由不同类型的

细胞分泌释放,如神经细胞、巨噬细胞、肿瘤细胞和干细胞等,并广泛存在于各种体液中^[4]。人们普遍认为,外泌体的形成始于细胞内陷的后期,在与细胞膜接触后以“内吞-融合-外排”的形式排出,形成具有磷脂双层膜结构的囊泡体^[5]。外泌体中所含有的蛋白质主要包括参与其结构形成的膜转运和融合相关蛋白 Rab、膜联蛋白及各类运输蛋白,还有四跨膜蛋白超家族(CD9、CD63、CD81 和 CD82 等)、热休克蛋白家族和各种特异性蛋白质分子。外泌体依靠其丰富的脂质如胆固醇、鞘磷脂和磷酸甘油酯等维持形态,同时也可以传递信号分子介导的生物信息^[6]。外泌体内部含有特定的遗传信息和细胞因子可以使其作为介入靶点,在促进组织修复再生、免疫调节、抑制细胞凋亡及调控肿瘤生长等方面发挥重要作用^[7,8]。

外泌体对受体细胞的生物学作用可能有两种机制:①外泌体膜蛋白直接或间接与靶细胞相互作用并激活细胞内信号传递的内吞作用;②外泌体与靶细胞膜融合或被靶细胞内吞,以非选择性的方式释放其“货物”(miRNA、蛋白质和 mRNA)进入靶细胞,从而调控基因表达和一系列后续的生物效应^[9]。

2. 外泌体的提取、保存及鉴定:外泌体是纳米级大小的细胞外囊泡,因其体积较小导致提取难度较大。目前用于外泌体的提取技术主要有:超速离心法、超滤法、免疫亲和法、聚合物沉淀法、分子排阻色谱法和集成微流控法等^[10]。尽管这些方法已广泛应用,但仍有其缺点,比如提取纯度低、获取量少、耗费时间长、可能对外泌体造成机械损伤等,并且不同的提取方法得到的外泌体的理化性质各不相同,这会对

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(面上项目)(H201427);哈尔滨医科大学附属第四医院基金资助项目(HYDSYTB201921)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院口腔科

通讯作者:王晓春,教授,硕士生导师,电子信箱:wxcwjhome@163.com

后续的实验研究带来极大的不可控性。所以,外泌体的提取问题仍然是未来外泌体应用发展的关键。

合理的保存方法对维系外泌体的直径和完整性有着重要的作用。研究表明,将已成功提取的外泌体放在常温下保存 2 天后,直径降低 60%。在 4℃ 环境下保存 3~4 天后,直径降低 25%。在 -20℃ 环境下,其直径在 1 周以内无明显变化。而在 -80℃ 环境下的外泌体可以维持稳定状态,适宜长期储存^[11]。

外泌体的鉴定通常会采用观察形态学特征、分析粒径分布大小和检测特异性蛋白标志物等方法。目前用于鉴定的仪器主要有透射电子显微镜、扫描电子显微镜、冷冻电子显微镜、原子力显微镜、纳米颗粒跟踪分析仪、流式细胞仪、免疫印迹分析仪和酶联免疫检测仪等。而一般实验研究会使用以上 2~3 种方法或仪器进行联合鉴定。

二、外泌体在口腔组织再生中的研究

1. 血管组织再生:血运重建是口腔颌面部组织损伤后修复与再生中不可缺少的过程,丰富的血运形成对新生组织的生长具有促进作用,是机体生长发育的重要基础。牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)是 MSCs 的一个亚群,它不仅与 MSCs 有极其相似的免疫表型和增殖分化能力,而且来源丰富,取材简便,无伦理争议^[12]。Xian 等^[13]探究 DPSCs 外泌体在人脐静脉内皮细胞中的促血管生成特性,随后发现外泌体可以促进内皮细胞的增殖和促血管生成因子的表达,并且通过使用 P38 MAPK 抑制剂提升了血管形成能力。还有研究发现,过表达低氧诱导因子的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)来源的外泌体可通过增强 Notch 信号通路中 Jagged1 的表达促进血管生成能力,这可能在口腔组织再生治疗方面有潜在的应用^[14]。Qiu 等^[15]在小鼠皮肤损伤模型的体内实验中发现,由新生小鼠血清培养的 MSCs 外泌体通过 AKT/eNOS 信号转导通路调节内皮细胞的功能,促进了伤口愈合和血管生成,为皮肤损伤修复提供了一种新的无细胞治疗策略。

综上所述, MSCs 来源的外泌体主要通过增强血管内皮细胞的活性和增殖能力,在血管生成中起到重要作用,这为外泌体应用于口腔颌面部组织损伤后修复与再生提供新思路。但是不同来源的 MSCs 外泌体在促血管形成能力上有很大差异,未来需要投入更多精力去寻找最适宜血管组织再生的外泌体来源。

2. 神经组织再生:神经组织再生是口腔颌面部组

织再生中决定细胞存活和分化的重要因素,也是口腔组织工程的重要组成部分。外泌体促进神经系统中的细胞间通讯,在周围神经组织修复与再生中起重要作用^[16]。基于人脱落乳牙牙髓干细胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs)具有独特的神经源性特性, Jarmalavičūtė 等^[17]将 SHEDs 和 SHEDs 来源的外泌体分别与 6-羟基多巴胺培养并观察多巴胺能神经元的凋亡情况,结果发现,在 6-羟基多巴胺诱导的氧化应激过程中, SHEDs 外泌体可以抑制神经元凋亡,这表明外泌体对多巴胺能神经元具有神经保护潜力。Yin 等^[18]在大鼠周围神经损伤模型的实验中发现,由脂肪间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)来源的外泌体通过抑制施万细胞自噬作用,促进了髓鞘再生。Zhang 等^[19]研究发现,通过静脉注射 BMSCs 源性外泌体可以治疗大鼠外伤性脑损伤,并显著改善脑外伤后的功能修复,在实验中外泌体促进了内源性血管生成和神经轴突再生,同时抑制神经炎症的反应,这为临床应用外泌体促进神经组织再生奠定了实验基础。

尽管目前大部分的研究局限于体外观察,并且 MSCs 外泌体对神经再生的作用机制仍需进一步探索,但其神经组织保护与促进神经再生作用已为口腔颌面部组织的再生提供新策略。

3. 牙髓组织再生:牙髓组织容易因龋病、外伤、牙周炎逆行性感染等因素发生炎症,炎症的持续发展会导致牙髓及根尖部周围组织坏死^[20]。根管治疗是牙髓疾病中常用的治疗方法,在这个过程中,完全去除发炎或坏死的牙髓,并用合成材料严密封闭整个根管系统。虽然根管治疗已被证明是有效的,但由于失去天然牙髓组织的营养和保护作用,剩余的牙齿结构抗力下降,脆性增加,有牙折的风险。因此,牙髓组织再生的作用显得尤为重要。

Huang 等^[21]探索了 DPSCs 外泌体诱导牙源性分化的潜力,发现外泌体可以与基质蛋白(例如 I 型胶原蛋白和纤维蛋白)相结合,从而使它们能够附着于生物材料,通过内吞机制被 DPSCs 内吞并触发 P38 MAPK 信号途径,促进牙源性分化和组织再生。此外在其牙根切片模型上也证明了外泌体可以诱导牙髓样组织的再生。Hu 等^[22]分别从正常条件下和牙源性分化条件下培养的 DPSCs 中提取外泌体并进行 miRNA 测序,结果表明,牙源性分化条件下培养 DPSCs 所得到的外泌体被内吞后,通过上调 DSP、DMP-1、ALP 和 RUNX2 蛋白诱导 DPSCs 牙源性分

化。进一步研究发现,外泌体中的 miRNA 通过下调隐性 TGF- β 结合蛋白 1 促进了由 TGF- β 1/Smads 信号转导通路介导的牙源性分化。Zhuang 等^[23]将来自根尖乳头的干细胞(stem cells from apical papilla, SCAP)分泌的外泌体引入含有 BMSCs 的牙根片段中,并将其皮下移植到免疫缺陷小鼠体内,结果观察到有牙髓牙本质复合物样组织生成,结合体外研究发现,经 SCAP 外泌体处理的 BMSCs 中牙本质涎磷蛋白基因的表达以及矿化结节的形成均显著增加,这说明使用牙源性 MSCs 外泌体试剂可能是实现牙髓组织损伤后修复与再生的新选择。

4. 牙周组织再生:牙周炎是导致牙周支持组织发生慢性进行性破坏的一种炎症性疾病,可引起牙槽骨的吸收和牙周附着丧失,是导致成年人牙齿松动、脱落的主要原因。因此,实现牙槽骨再生和恢复牙周附着水平是获得牙周组织再生的关键步骤。

Wei 等^[24]将 SHED 来源的外泌体注射到小鼠牙周炎模型的骨缺损区域中,结果发现,外泌体修复骨缺损的程度和原始干细胞相同,并且还可以特异性促进 BMSCs 的成骨作用与抑制脂肪的形成。Chew 等^[25]将负载有人 MSCs 源性外泌体的胶原蛋白海绵作用于牙槽骨缺损的大鼠模型,结果观察到牙槽骨和功能性牙周膜纤维的再生。体外实验进一步证明, MSCs 外泌体通过激活 AKT 和 ERK 信号通路,促进了牙周膜细胞的增殖和迁移,从而实现缺损骨组织的再生。综上所述,外泌体可以通过促进骨缺损区域周围细胞的增殖和成骨分化,实现牙周组织的再生。

5. 关节软骨组织再生:颞下颌关节(temporomandibular joint, TMJ)是由下颌骨髁突和颞骨之间形成的纤维软骨覆盖的复杂关节。在 TMJ 疾病治疗中,越来越多的研究者将干细胞、支架和外泌体结合在一起进行研究。Luo 等^[26]研究发现,来自 SHEDs 携带 miR-100-5p 的外泌体通过激活 mTOR 信号通路抑制 TMJ 中软骨细胞的炎症反应。Zhang 等^[27]将 MSCs 外泌体注射到单碘乙酸诱导的 TMJ 骨关节炎大鼠模型的关节腔室中,通过调节炎症反应,外泌体明显加快了髁突软骨和软骨下骨的愈合,促进了关节软骨组织的修复和再生,这不仅证明了 MSCs 外泌体在 TMJ 疾病治疗中的潜力,而且在关节软骨再生领域展现出良好的应用前景。

三、外泌体在组织工程的应用

近年来,以细胞为基础的组织工程取得了良好的临床效果,然而干细胞移植的非定向分化、免疫排斥

和医学伦理学争议等问题限制了其应用潜能。因此,研究者也在积极地探索其他的无细胞治疗方法。作为 MSCs 旁分泌作用的重要组成部分,基于外泌体的治疗在口腔组织工程中显示出令人兴奋的应用前景。Swanson 等^[28]使用一种以降解性能可调的自组装合成为基础的三嵌段共聚物载体来封装和控制释放牙源性干细胞外泌体,并通过大鼠牙髓切除模型评估其作为生物材料在牙髓再生治疗中的潜力。结果发现,释放出来的外泌体促进了牙源性基因的表达和修复性牙本质的形成,并诱导牙髓组织再生。Ivica 等^[29]将 DPSCs 外泌体与纤维蛋白凝胶药物传递系统结合,共同作用于 MSCs,发现外泌体能够显著诱导 MSCs 自发性聚集并促进其增殖能力,这表明注射纤维蛋白凝胶中递送的外泌体可能是无细胞再生牙髓治疗的有力工具,有望成为填充牙体硬组织的新方法。

四、展 望

在过去的几十年中, MSCs 来源的外泌体作为再生医学研究的焦点,得到越来越多的关注。大量实验也围绕它而展开,已经在各种口腔疾病的模型中取得了令人欣慰的治疗效果。越来越多的证据表明,干细胞外泌体具有诸多优势:①来源丰富,收集方法较多;②良好的生物相容性与稳定性;③分子结构较小,易通过血-脑脊液屏障,能作为天然分子载体靶向转运药物;④可规避干细胞移植治疗的风险等。但是目前对外泌体的研究大多局限于动物模型,并没有将其临床应用于人类口腔组织的修复与再生。此外,关于外泌体剂量和浓度的定义也存在争议,这需要由专业的行业协会提出相关标准。同时,明确不同细胞来源的外泌体诱导再生的作用机制依然是未来研究的重点。相信通过不断地探索,外泌体将在再生医学领域拥有更多令人满意的研究成果。

参考文献

- 1 Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, *et al.* Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6 (12): 2173-2185
- 2 Xuan K, Li B, Guo H, *et al.* Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(455): f3227
- 3 Stanko P, Altanerova U, Jakubecova J, *et al.* Dental mesenchymal stem/stromal cells and their exosomes [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 1-8
- 4 何泓志, 麻丹丹. 牙髓干细胞外泌体的研究进展 [J]. *口腔疾病防治*, 2019, 27(10): 652-657
- 5 David G, Zimmermann P. Heparanase involvement in exosome formation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1221: 285-307

- 6 Kalluri R, Lebleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): 6977
- 7 Reza - Zaldivar EE, Hernández - Sapiéns MA, Minjarez B, *et al.* Potential effects of MSC - Derived exosomes in neuroplasticity in alzheimer's disease[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 317
- 8 Jiang X, Lew K, Chen Q, *et al.* Human mesenchymal stem cell - derived exosomes reduce ischemia/reperfusion injury by the inhibitions of apoptosis and autophagy [J]. *Curr Pharm Design*, 2018, 24(44): 5334
- 9 Mathieu M, Martin - Jaular L, Lavieu 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
- 10 Yang D, Zhang W, Zhang H, *et al.* Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome - based theranostics[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3684 - 3707
- 11 Park SJ, Jeon H, Yoo SM, *et al.* The effect of storage temperature on the biological activity of extracellular vesicles for the complement system[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2018, 54(6): 423 - 429
- 12 Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine[J]. *Cytherapy*, 2018, 20(4): 479 - 498
- 13 Xian X, Gong Q, Li C, *et al.* Exosomes with highly angiogenic potential for possible use in pulp regeneration[J]. *J Endodont*, 2018, 44(5): 751 - 758
- 14 Gonzalez - King H, Garcia NA, Ontoria - Oviedo I, *et al.* Hypoxia inducible factor - 1alpha potentiates jagged 1 - mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell - derived exosomes [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(7): 1747 - 1759
- 15 Qiu X, Liu J, Zheng C, *et al.* Exosomes released from educated mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing via promoting angiogenesis[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(8): e12830
- 16 Xiao T, Zhang W, Jiao B, *et al.* The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer' disease[J]. *Transl Neurodegener*, 2017, 6: 3
- 17 Jarmalavičiūtė A, Tunaitis V, Pivoraitė U, *et al.* Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6 - hydroxy - dopamine - induced apoptosis[J]. *Cytherapy*, 2015, 17(7): 932 - 939
- 18 Yin G, Yu B, Liu C, *et al.* Exosomes produced by adipose - derived stem cells inhibit schwann cells autophagy and promote the regeneration of the myelin sheath[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 132: 105921
- 19 Zhang Y, Chopp M, Zhang ZG, *et al.* Systemic administration of cell - free exosomes generated by human bone marrow derived mesenchymal stem cells cultured under 2D and 3D conditions improves functional recovery in rats after traumatic brain injury[J]. *Neurochem Int*, 2017, 111: 69 - 81
- 20 Mu X, Shi L, Pan S, *et al.* A customized self - assembling peptide hydrogel - wrapped stem cell factor targeting pulp regeneration rich in vascular - like structures[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(27): 16568 - 16574
- 21 Huang C, Narayanan R, Alapati S, *et al.* Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration[J]. *Biomaterials*, 2016, 111: 103 - 115
- 22 Hu X, Zhong Y, Kong Y, *et al.* Lineage - specific exosomes promote the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (DP-SCs) through TGFbeta1/smads signaling pathway via transfer of microRNAs[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 170
- 23 Zhuang X, Ji L, Jiang H, *et al.* Exosomes derived from stem cells from the apical papilla promote dentine - pulp complex regeneration by inducing specific dentinogenesis[J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 5816723
- 24 Wei J, Song Y, Du Z, *et al.* Exosomes derived from human exfoliated deciduous teeth ameliorate adult bone loss in mice through promoting osteogenesis[J]. *J Mol Histol*, 2020, 51(4): 455 - 466
- 25 Chew JRJ, Chuah SJ, Teo KYW, *et al.* Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2019, 89: 252 - 264
- 26 Luo P, Jiang C, Ji P, *et al.* Exosomes of stem cells from human exfoliated deciduous teeth as an anti - inflammatory agent in temporomandibular joint chondrocytes via miR - 100 - 5p/mTOR[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 216
- 27 Zhang S, Teo KYW, Chuah SJ, *et al.* MSC exosomes alleviate temporomandibular joint osteoarthritis by attenuating inflammation and restoring matrix homeostasis[J]. *Biomaterials*, 2019, 200: 35 - 47
- 28 Swanson WB, Gong T, Zhang Z, *et al.* Controlled release of odontogenic exosomes from a biodegradable vehicle mediates dentinogenesis as a novel biomimetic pulp capping therapy[J]. *J Control Release*, 2020, 324: 679 - 694
- 29 Ivica A, Ghayor C, Zehnder M, *et al.* Pulp - derived exosomes in a fibrin - based regenerative root filling material [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(2): 491

(收稿日期: 2021 - 03 - 10)

(修回日期: 2021 - 03 - 19)

(接第 40 页)

- 18 Lewek J, Kaczmarek K, Cygankiewicz I, *et al.* Inflammation and arrhythmias: potential mechanisms and clinical implications[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2014, 12(9): 1077 - 1085
- 19 Hu YF, Chen YJ, Lin YJ, *et al.* Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(4): 230 - 243
- 20 Huang X, Liu G, Guo J, *et al.* The PI₃K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes[J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(11): 1483 - 1496
- 21 Zhao Z, Li R, Wang X, *et al.* Attenuation of atrial remodeling by aliskiren via affecting oxidative stress, inflammation and PI₃K/Akt signaling pathway[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 6(6): 7002 - 7012
- 22 Song J, Wang J, Li BH, *et al.* A study on anti - arrhythmia mechanisms of resveratrol on ischemia/reperfusion in rats by regulating PI₃K/Akt signaling pathway [J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2017, 33(3): 239 - 243
- 23 Katanasaka Y, Suzuki H, Sunagawa Y, *et al.* Regulation of cardiac transcription factor gata4 by post - translational modification in cardiomyocyte hypertrophy and heart failure [J]. *Int Heart J*, 2016, 57(6): 672 - 675

(收稿日期: 2021 - 02 - 23)

(修回日期: 2021 - 03 - 04)