

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.07.027

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1726.006.html\(2021-12-15\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211214.1726.006.html(2021-12-15))

## 干细胞源性细胞外囊泡在牙周再生治疗中的研究进展\*

张秀丽<sup>1</sup>, 武 曦<sup>2</sup>综述, 李昀生<sup>3△</sup> 审校

(1. 北京联合大学门诊部口腔科, 北京 100101; 2. 陆军军医大学第二附属医院口腔科, 重庆 400037; 3. 应急总医院口腔科, 北京 100028)

**[摘要]** 干细胞是一类未分化的多功能细胞, 由于具备高度自我更新和多向分化的能力, 在再生医学中具有广泛的前景。干细胞源性细胞外囊泡是由干细胞分泌的一类脂质囊泡, 内含 RNA、蛋白质等生物活性物质, 可以在细胞间传递信息, 具有促进组织再生的作用。细胞外囊泡可以避免干细胞治疗的一些缺陷, 如有效细胞数目不足及免疫原性问题, 并且还具备诸多优势, 包括易于获得、可长期存储、易于包装等, 这为组织再生提供了无细胞治疗的全新前景。本文就干细胞源性细胞外囊泡的生物学特性、功能及其在牙周组织再生治疗中的机制及应用前景作一综述。

**[关键词]** 干细胞; 干细胞源性; 细胞外囊泡; 牙周再生

**[中图法分类号]** R781.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)07-1216-04

### Advances in the study of stem cell-derived extracellular vesicles in periodontal regenerative therapy\*

ZHANG Xiuli<sup>1</sup>, WU Xi<sup>2</sup>, LI Yunsheng<sup>3△</sup>

(1. Out-Patient Department of Beijing Union University Hospital, Beijing 100101, China; 2. Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Beijing 400037, China; 3. Department of Stomatology, Emergency General Hospital, Beijing 100028, China)

**[Abstract]** Stem cells are undifferentiated and multipotent cells which have the capability of self-renewal and can differentiate into various types of cells. Stem cell-derived extracellular vesicles are a class of lipid vesicles secreted by stem cells, which contain biologically active substances such as RNA and protein, which can transmit information between cells and have the effect of promoting tissue regeneration. Extracellular vesicles can avoid some of the pitfalls of stem cell therapy, such as insufficient number of effective cells and immunogenicity issues, and also have many advantages, including easy access, long-term storage, ease of packaging, etc., which provides cell-free therapy new prospects for tissue regeneration. This review summarized biological characteristics and function of stem cell-derived extracellular vesicles, as well as the mechanisms and potential applications in periodontal regenerative treatment.

**[Key words]** stem cells; stem cell-derived; extracellular vesicles; periodontal regeneration

牙周炎是 1 种慢性感染性疾病, 是由于菌斑生物膜导致机体产生免疫应答, 进而导致牙齿支持组织的破坏, 最终造成牙齿的松动和脱落, 是牙丧失的重要原因<sup>[1]</sup>。再生性治疗是牙周炎治疗的重要手段之一, 其目的是重建因牙周炎破坏的牙周组织的解剖结构及功能, 包括牙槽骨、牙周膜及牙骨质<sup>[2]</sup>。然而, 牙周组织的再生一直被认为极富挑战性, 其中干细胞由于具有多向分化及自我复制的能力, 被认为是 1 种有效的再生治疗手段, 具有广泛的临床前景<sup>[3]</sup>。细胞外囊

泡(extracellular vesicles, EVs)是由细胞分泌的具有双层膜结构的脂质囊泡, 干细胞分泌的 EVs 可表现出与干细胞相近的功能, 如促进组织修复及再生等<sup>[4]</sup>。利用干细胞源性 EVs 治疗可以规避干细胞移植的风险, 提供无细胞再生的方法, 近年来成为再生领域的研究热点之一<sup>[5]</sup>。本文对干细胞源性 EVs 在牙周再生中的研究进展及应用作一综述。

#### 1 EVs 的生物学特性

##### 1.1 EVs 的生物起源

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81600873)。 作者简介: 张秀丽(1972—), 主治医师, 本科, 主要从事牙周疾病研究。 △ 通信作者, E-mail: lyseql@163.com。

根据 EVs 的生物发生机制及生物生理学特性, EVs 可分为 3 类: 外泌体(exosomes)、微囊泡(microvesicles)及凋亡小体(apoptotic bodies)。外泌体的直径大小为 30~120 nm, 其形成是通过细胞膜内吞, 与早期内体(early endosomes)融合, 内陷形成多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs)。MVBs 与细胞膜上特定的部位融合, 形成芽泡, 以外泌的方式释放<sup>[6]</sup>。在细胞膜内吞融合过程中, 细胞质中的成分会通过内体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)分选到 MVBs 内的管腔内囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)中<sup>[7]</sup>。

与外泌体不同, 微囊泡是 1 组直接源于细胞膜的非凋亡细胞外囊泡, 直径大小为 50~1 000 nm。当细胞激活信号引起细胞质的  $Ca^{2+}$  水平增高, 导致脂质运载蛋白的变化, 翻转酶的失活及转出酶的活化, 细胞膜出泡, 形成微囊泡, 释放到细胞外<sup>[8]</sup>。

细胞在凋亡过程中会释放一类细胞外囊泡, 称为凋亡小体。凋亡小体的直径范围较大, 在 50~2 000 nm, 其形成是细胞膜向外出泡, 并包含部分细胞膜片段<sup>[9]</sup>。

## 1.2 EVs 的组成

EVs 的组成成分会根据细胞来源有所不同, 总体而言, EVs 普遍包含蛋白质、脂质和核酸等多种生物活性物质<sup>[10]</sup>。EVs 的蛋白成分主要包括质膜蛋白及与其形成相关的蛋白, 如 ESCRT 和膜运转相关蛋白。外泌体含较多跨膜蛋白及多泡小体形成相关蛋白, 而微囊泡富含整合蛋白、选择蛋白及 CD40 配体<sup>[11]</sup>。EVs 中包含大量核酸, 包括 DNA、微 RNA(miRNA)、信使 RNA(mRNA)、转运 RNA 及长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA), 可以表现出不同的生物学功能。EVs 脂质成分包括鞘磷脂、胆固醇、磷脂酰丝氨酸及神经酰胺, 存在于其脂质双分子层膜中, 而 EVs 内部也包含胆固醇、类花生酸脂肪酸等生物活性脂质<sup>[12]</sup>。

## 1.3 干细胞源性 EVs 的生物学功能

干细胞源性 EVs 可通过旁分泌途径发挥干细胞的治疗作用<sup>[4]</sup>, 包括: (1) 组织损伤中起到保护作用; (2) 免疫调节作用; (3) 促进血管形成、细胞分化及抑制细胞凋亡的作用。干细胞源性 EVs 在几种损伤类型的疾病中显示出了可期望的治疗前景。RANGHINO 等<sup>[13]</sup>在急性肾损伤的大鼠模型研究中发现, 干细胞源性 EVs 可以通过激活肾小管上皮细胞增殖而减轻肾损伤及改善肾功能。在急性肝损伤动物模型研究中, TAN 等<sup>[14]</sup>发现干细胞源性外泌体可以引起增殖蛋白的高表达并抑制肝细胞凋亡, 从而起到细胞保护作用。干细胞源性 EVs 亦可缓解动物模型的心肌损伤。MAO 等<sup>[15]</sup>研究发现, EVs 中的 miRNA224-5p 可以起到对抗心肌细胞凋亡的作用。干细胞源性 EVs 具有免疫活性, 包含趋化分子及细胞因子可以调

控免疫细胞。这些细胞因子包括转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、干细胞生长因子(HGF)、吡啶胺-2,3-双加氧酶-1(IDO-1)及白细胞介素-10 等, 可以通过信号通路调控自然杀伤细胞(NK 细胞), 单核细胞、T 细胞、B 细胞及树突状细胞<sup>[16]</sup>。干细胞源性 EVs 还有促进血管生成的功能。有研究发现, 在支气管肺发育不良的大鼠模型中, 干细胞源性 EVs 可以对 II 型肺泡上皮细胞和肺血管内皮细胞起到保护作用, 从而改善模型动物的肺泡化及血管生成<sup>[17]</sup>。

## 2 干细胞源性 EVs 在牙周再生中的应用

### 2.1 干细胞源性 EVs 治疗的优势

在当前的牙周再生性手术中, 往往采用合成或天然的生物材料用以修复牙周支持组织的结构及功能, 但这些治疗手段尚不能获得可靠而完全的牙周再生。因此, 干细胞源性 EVs 基于组织工程学及干细胞的再生疗法作为新疗法逐渐崭露头角<sup>[18]</sup>。干细胞由于具备自我更新、多向分化及免疫调节的功能, 被许多学者应用于牙周再生的研究中。在动物实验中, 自体或异体的干细胞增殖后, 附于各种支架材料上, 移植于动物的牙周缺损组织中, 可以成功地重建出牙槽骨样、牙骨质样及牙周韧带样组织<sup>[19]</sup>。然而, 直接的干细胞疗法却存在许多问题。首先, 移植的干细胞进入体内后, 会大量死亡, 最终发挥细胞替代再生作用的数目有限。其次, 体内干细胞移植治疗也存在致癌风险, 细胞生长及分化不可控, 以及可能的免疫原性<sup>[20]</sup>。有研究显示, 干细胞源性 EVs 的介质可以复制干细胞的治疗效果, 提示在干细胞介导的组织再生中, 旁分泌因子起到重要作用<sup>[21]</sup>。干细胞源性 EVs 还具备其他的诸多优势。首先, 干细胞源性 EVs 不表达细胞表面组织相容性复合体(MHC), 因此, 免疫原性更低; 其次, 与干细胞需要培养、难于贮存不同, EVs 易于存储, 可长期保存并保持活性<sup>[22]</sup>。综合这些优点, 干细胞源性 EVs 凸显了巨大的治疗潜力, 为组织再生提供了无细胞治疗的全新前景。

### 2.2 干细胞源性 EVs 在牙周再生中的应用

牙周炎的临床特征就是牙周支持组织的破坏, 其中包括牙槽骨、牙周膜、牙骨质及牙龈, 因此, 牙周组织再生包括牙槽骨、牙周膜和牙骨质的再生。干细胞源性 EVs 在牙周再生方面的研究主要集中于体外实验和动物实验。

在人骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)分泌的 EVs 与牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells, PLSCs)共同培养的研究中, 结果显示 BMMSCs 分泌的外泌体可以促进 PLSCs 的体外增殖和成骨分化能力<sup>[23]</sup>。ZHANG 等<sup>[24]</sup>的研究中将人间充质干细胞来源的 EVs 与 BMMSCs 共同培养, 发现 EVs 为 BMMSCs 所吸收, 随之 BMMSCs 发生增殖和成骨分化。当介质中加入磷脂酰肌醇-3-羟激酶(phosphoinositide 3-

kinase, PI3K) 抑制剂时, 成骨过程受到抑制。说明 EVs 诱导的 BMMSCs 增殖和成骨分化部分是通过 PI3K/Akt 通路所激活的。而牙周再生的主要目的之一就是因牙周炎破坏的牙槽骨的再生。GANGA-DARAN 等<sup>[25]</sup>研究发现, 在体外, 人脂肪干细胞来源的 EVs 可以增强血管内皮细胞的迁移和增殖, 而且可以促进血管内皮细胞的管状形成, 而在小鼠体内实验中, EVs 可以促进血管形成, 而血管形成是牙周组织再生所必须的生理学基础。

干细胞源性 EVs 在牙周再生的体内研究多选择不同干细胞来源的 EVs 或包含 EVs 的条件培养液 (conditioned medium, CM), 应用各种给药方式在动物模型上进行研究。MOHAMMED 等<sup>[26]</sup>采用结扎建立大鼠牙周炎模型, 将脂肪干细胞来源的 EVs 注射到缺损区, 结果获得排列有序类似于牙周膜韧带的组织再生, 治疗效果优于采用脂肪干细胞本身的治疗效果。CHEW 等<sup>[27]</sup>用胶原海绵作为人干细胞源性 EVs 的载体, 用于外科所致大鼠牙周骨内缺损的再生治疗, 结果发现含有新生骨及牙周韧带的牙周组织再生。该研究发现, EVs 是通过 CD73 介导的腺苷受体激活蛋白激酶 B 及细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路来促进牙周膜细胞的迁移及增殖。QIU 等<sup>[28]</sup>用手术造成大鼠的牙周组织缺损, 用可吸收胶原膜作为载体, 结合牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs)、牙龈间充质干细胞 (gingival mesenchymal stem cells, GMSCs) 来源的 EVs 进行治疗, 结果获得明显的牙周组织再生。其机制可能包括 PDLSCs、GMSCs 来源 EVs 对牙炎症因子的调控及促进成骨前体细胞的成骨分化。另一研究选择牙周炎大鼠模型, 用水溶胶作为载体, 将 BMMSCs 源性 EVs 注入牙周病变区。结果显示 BMMSCs 源性 EVs 可以促进牙周组织的再生, 其部分原因可能为 EVs 介导 OPG/RANKL/RANK 信号通路以调节破骨细胞功能, 以及影响巨噬细胞聚集和 TGF- $\beta$ 1 表达来调节炎症免疫反应<sup>[29]</sup>。类似的实验研究也发现, 脂多糖预处理过的牙囊细胞来源的 EVs 可以促进牙周膜细胞的增殖, 并且将载有牙囊细胞来源的 EVs 的水溶胶注射到牙周炎大鼠模型的牙周袋中, 可以促进牙周组织的再生<sup>[30]</sup>。

综上所述, 无论干细胞的选择还是载体的选择, 动物模型研究发现, 干细胞源性 EVs 可以为牙周组织再生提供有效的更为安全的新无细胞疗法。但 EVs 应用于牙周再生目前尚无人体研究, 真正应用于临床实践, 尚需进一步的基础及设计良好的临床试验加以验证。

## 参考文献

[1] SUVAN J, LEIRA Y, MORENO SANCHO F

M, et al. Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review[J]. J Clin Periodontol, 2020, 47(Suppl 22):155-175.

[2] WOO H N, CHO Y J, TARAFDERS LEE C H. The recent advances in scaffolds for integrated periodontal regeneration[J]. Bioact Mater, 2021, 6(10):3328-3342.

[3] SALLUM E A, RIBEIRO F V, RUIZ K S, et al. Experimental and clinical studies on regenerative periodontal therapy [J]. Periodontol 2000, 2019, 79(1):22-55.

[4] TSIAPALIS D, O'DRISCOLL L. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles for tissue engineering and regenerative medicine applications[J]. Cells, 2020, 9(4):991.

[5] VIZOSO F J, EIRO N, CID S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9):1852.

[6] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes[J]. Annu Rev Biochem, 2019, 88:487-514.

[7] JUAN T, FÜRTHAUER M. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles [J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 74:66-77.

[8] TAYLOR J, BEBAWY M. Proteins regulating microvesicle biogenesis and multidrug resistance in cancer[J]. Proteomics, 2019, 19(1/2):e1800165.

[9] XU X, LAI Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials [J]. Biosci Rep, 2019, 39(1):BSR20180992.

[10] PHILLIPS W, WILLMS E, HILL A F. Understanding extracellular vesicle and nanoparticle heterogeneity: novel methods and considerations[J]. Proteomics, 2021, 15:e2000118.

[11] DOYLE L M, WANG M Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis[J]. Cells, 2019, 8(7):727.

[12] ABELS E R, BREAKFIELD X O. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake [J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(3):301-312.

[13] RANGHINO A, BRUNO S, BUSSOLATI B, et al. The effects of glomerular and tubular renal progenitors and derived extracellular vesicles on recovery from acute kidney injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1):24.

- [14] TAN C Y, LAI R C, WONG W, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(3): 76.
- [15] MAO C, LI D, ZHOU E, et al. Extracellular vesicles from anoxia preconditioned mesenchymal stem cells alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Aging*, 2021, 13(4): 6156-6170.
- [16] HARRELL C R, FELLABAUM C, JOVICIC N, et al. Molecular mechanisms responsible for therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretome [J]. *Cells*, 2019, 8(5): 467.
- [17] YOU J, ZHOU O, LIU J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles alleviate lung injury in rat model of bronchopulmonary dysplasia by affecting cell survival and angiogenesis[J]. *Stem Cells Dev*, 2020, 29(23): 1520-1532.
- [18] LIU J, RUAN J, WEIR M D, et al. Periodontal bone-ligament-cementum regeneration via scaffolds and stem cells[J]. *Cells*, 2019, 8(6): 537.
- [19] XU X Y, LI X, WANG J, et al. Concise review: periodontal tissue regeneration using stem cells: strategies and translational considerations [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(4): 392-403.
- [20] ANKRUM J, KARP J M. Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back [J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(5): 203-209.
- [21] GAMA K B, SANTOS D S, EVANGELISTA A F, et al. Conditioned medium of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells as a therapeutic approach to neuropathic pain: a preclinical evaluation[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 8179013.
- [22] TSIAPALIS D, O'DRISCOLL L. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles for tissue engineering and regenerative medicine applications[J]. *Cell*, 2020, 9(4): 991.
- [23] 朱斌, 李楠, 田自锋, 等. 骨髓间充质干细胞来源的外泌体促进牙周再生的体外研究[J]. *中国实用口腔科杂志*, 2016, 9(12): 709-713.
- [24] ZHANG J, LIU X, LI H, et al. Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1): 136.
- [25] GANGADARAN P, RAJENDRAN R L, OH J M, et al. Identification of angiogenic cargo in extracellular vesicles secreted from human adipose tissue-derived stem cells and induction of angiogenesis in vitro and in vivo[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(4): 495.
- [26] MOHAMMED E, KHALIL E, SABRY D. Effect of adipose-derived stem cells and their exo as adjunctive therapy to nonsurgical periodontal treatment: a histologic and histomorphometric study in rats [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 167.
- [27] CHEW J R J, CHUAH S J, TEO K Y W, et al. Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration [J]. *Acta Biomater*. 2019, 89: 252-264.
- [28] QIU J, WANG X, ZHOU H, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by conditioned media from gingiva-derived or periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: a comparative study in rats[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 42.
- [29] LIU L, GUO S, SHI W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles promote periodontal regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2020, 10, 1089.
- [30] SHI W, GUO S, LIU L, et al. Small extracellular vesicles from lipopolysaccharide-preconditioned dental follicle cells promote periodontal regeneration in an inflammatory microenvironment[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(10): 5797-5810.

(收稿日期: 2021-11-20 修回日期: 2021-12-28)