

成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体促进炎症微环境下人牙周膜干细胞成骨分化

艾克帕尔·艾尔肯¹, 陈晓涛^{1, 2}, 吾凡别克·巴合提²

<https://doi.org/10.12307/2025.024>

投稿日期: 2023-11-20

采用日期: 2024-01-13

修回日期: 2024-02-07

在线日期: 2024-03-08

中图分类号:

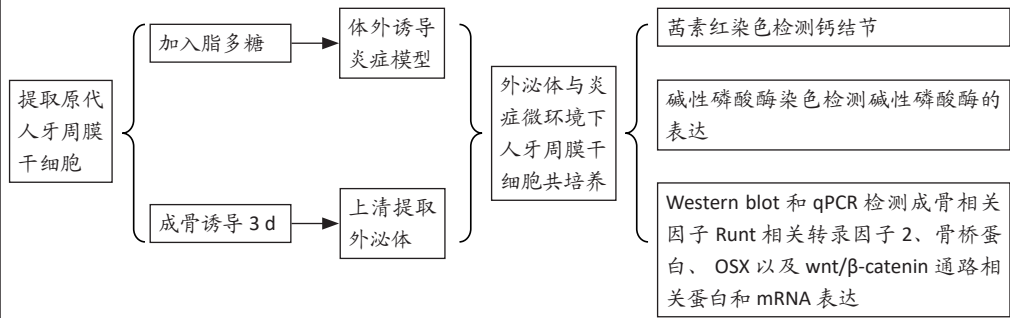
R459.9; R318; [R34]

文章编号:

2095-4344(2025)07-01388-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 炎症微环境下成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体对人牙周膜干细胞成骨分化的影响



文题释义:

间充质干细胞: 是一种来源于中胚层的成体干细胞, 存在于骨髓、脂肪、脐带、脐血和胎盘等多种组织, 具有多向分化潜能。根据国际细胞治疗学会标准, 间充质干细胞/祖细胞阳性表达表面标记CD73、CD90和CD105, 不表达内皮和造血标记CD11b、CD19、CD79α、CD31、CD34、CD45和HLA-DR等抗原。

外泌体: 是一种直径为30-150 nm的细胞外囊泡, 在生理和病理条件下, 几乎所有类型的细胞都会分泌外泌体。外泌体可通过传递蛋白质、脂质、miRNA等多种活性分子实现细胞间信息传递, 此外, 外泌体的生物发生受到许多外部因素的影响, 包括细胞类型、血清条件、细胞因子和生长因子等。

摘要

背景: 成骨诱导间充质干细胞来源外泌体具有较强的成骨分化能力, 但是在炎症微环境下对人牙周膜干细胞成骨分化的影响尚不明确。

目的: 探究成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体在炎症微环境下对人牙周膜干细胞成骨分化的影响。

方法: 收集离体牙并分离培养人牙周膜干细胞, 成骨诱导3 d后提取外泌体。将人牙周膜干细胞分为4组: 对照组加入成骨诱导培养基, 外泌体组加入含5 μg/mL外泌体的成骨诱导培养基, 炎症模型和炎症模型+外泌体组以1 μg/mL脂多糖处理24 h构建细胞炎症微环境, 炎症模型组在脂多糖处理后加入成骨诱导培养基, 炎症模型+外泌体组在脂多糖处理后加入含5 μg/mL外泌体的成骨诱导培养基。通过茜素红以及碱性磷酸酶染色法检测各组人牙周膜干细胞的成骨分化能力; 实时荧光定量 PCR与免疫印迹法检测各组人牙周膜干细胞中Runt相关转录因子2、骨桥蛋白、成骨细胞特异性转录因子Osterix(OSX)和wnt通路相关蛋白β-catenin的表达。

结果与结论: ①与对照组相比, 炎症模型组碱性磷酸酶染色相对面积、矿化结节染色相对面积以及Runt相关转录因子2、骨桥蛋白、OSX的表达量显著降低($P < 0.05$); ②与炎症模型组相比, 炎症模型+外泌体组碱性磷酸酶染色相对面积、矿化结节染色相对面积以及Runt相关转录因子2、骨桥蛋白、OSX的表达显著升高($P < 0.05$); ③与对照组相比, 炎症模型组wnt通路相关蛋白β-catenin表达量显著增加($P < 0.05$); 与炎症模型组相比, 炎症模型+外泌体组β-catenin表达量显著降低($P < 0.05$)。结果表明, 成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体可促进炎症微环境下人牙周膜干细胞的成骨分化, 其作用机制可能与wnt/β-catenin信号通路有关。

关键词: 人牙周膜干细胞; 外泌体; 炎症微环境; 成骨分化; 成骨细胞; 信号通路

Osteogenesis-induced exosomes derived from human periodontal ligament stem cells promote osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in an inflammatory microenvironment

Aikepaer · Aierken¹, Chen Xiaotao^{1, 2}, Wufanbieke · Baheti²

¹School of Life Sciences, Xinjiang University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Aikepaer · Aierken, Master candidate, School of Life Sciences, Xinjiang University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Chen Xiaotao, PhD, Doctoral supervisor, Chief physician, School of Life Sciences, Xinjiang University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; Department of Stomatology, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: The osteogenic differentiation ability of exosomes derived from osteogenic mesenchymal stem cells is well established. However, their impact on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in an inflammatory microenvironment remains unclear.

¹新疆大学生命科学院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000; ²新疆维吾尔自治区人民医院口腔科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

第一作者: 艾克帕尔·艾尔肯, 男, 1997年生, 新疆维吾尔自治区巩留县人, 维吾尔族, 新疆大学在读硕士, 主要从事基础医学研究。

通讯作者: 陈晓涛, 博士, 博士生导师, 主任医师, 新疆大学生命科学院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000; 新疆维吾尔自治区人民医院口腔科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000

<https://orcid.org/0009-0009-2333-4007> (艾克帕尔·艾尔肯)

引用本文: 艾克帕尔·艾尔肯, 陈晓涛, 吾凡别克·巴合提. 成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体促进炎症微环境下人牙周膜干细胞成骨分化 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(7):1388-1394.



OBJECTIVE: To examine the impact of exosomes derived from osteogenesis-induced human periodontal ligament stem cells on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells within an inflammatory microenvironment.

METHODS: Human periodontal ligament stem cells were isolated and cultured. After 3 days of osteogenic induction, exosomes were extracted. Human periodontal ligament stem cells were divided into four groups. Control group was treated with osteogenesis-induced medium. The exosome group was treated with osteogenesis-induced medium containing 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exosomes. Inflammatory model and inflammatory model + exosome groups were treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lipopolysaccharide for 24 hours to construct a cellular inflammatory microenvironment. The inflammatory model group was treated with osteogenesis-induced medium after lipopolysaccharide intervention. The inflammatory model + exosome group was treated with osteogenesis-induced medium containing 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exosome. The osteogenic differentiation ability of human periodontal ligament stem cells was assessed using alkaline phosphatase staining and alizarin red staining. The expressions of Runt-related transcription factor 2, osteopontin, osteoblast-specific transcription factor Osterix (OSX) and wnt pathway-related protein β -catenin were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and western blot assay.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, the relative area stained by mineralized nodules and the expression levels of Runx2, osteopontin, and OSX were significantly decreased in the inflammatory model group ($P < 0.05$). (2) Compared with the inflammatory model group, the expression of Runx2, osteopontin, and OSX in the inflammatory model + exosome group was significantly increased in the relative area of alkaline phosphatase staining, the relative area of mineralized nodules staining ($P < 0.05$). (3) Compared with the control group, the expression of wnt pathway-related protein β -catenin was significantly increased in the inflammatory model group ($P < 0.05$). Compared with the inflammatory model group, the expression of β -catenin in the inflammatory model + exosome group was significantly decreased ($P < 0.05$). These findings indicate that exosomes derived from human periodontal ligament stem cells induced by bone formation can enhance the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells within an inflammatory microenvironment, and the mechanism may be related to wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words: human periodontal ligament stem cell; exosome; inflammatory microenvironment; osteogenic differentiation; osteoblast; signaling pathway

How to cite this article: AIERKEN A, CHEN XT, BAHETI W. Osteogenesis-induced exosomes derived from human periodontal ligament stem cells promote osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in an inflammatory microenvironment. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(7):1388-1394.

0 引言 Introduction

牙周炎是一种以牙周支持组织损伤及缺失为典型特征的炎症性疾病,治疗牙周炎的关键在于控制炎症的同时促进牙周缺损组织再生^[1]。人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)已成为牙周组织再生过程中不可或缺的种子细胞^[2-3],具备自我更新能力和多向分化潜能。然而,在炎症环境下,hPDLSCs的成骨分化能力会下降^[4]。因此,研究如何促进hPDLSCs在炎症微环境下的成骨分化对于牙周炎治疗具有重要价值^[5]。研究表明,旁分泌途径可能是干细胞促进组织再生的主要机制^[6],外泌体作为最重要的细胞外囊泡之一,已受到学者高度关注,尤其是内容物(包括细胞因子、生长因子、mRNA、miRNA和DNA等)在细胞间通讯中的重要作用^[7-8]。据报道,hPDLSCs来源外泌体能够促进骨折愈合、骨软骨再生以及颅骨缺损修复^[9-11],并且成骨诱导能够增强hPDLSCs来源外泌体的促成骨分化能力^[12]。成骨诱导hPDLSCs来源外泌体(osteogenic induced hPDLSCs derived exosomes, OB-EXOs)能否促进炎症环境下hPDLSCs的成骨分化尚未明确。该研究旨在通过构建炎症微环境,探讨OB-EXOs对炎症微环境下hPDLSCs成骨分化的影响,为治疗牙槽骨缺损提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验,两组间数据比较采用独立样本 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于2023年2-11月在新疆维吾尔自治区人民医院医学研究与转化中心实验室完成。

1.3 材料 DMEM基础培养基、胎牛血清(Gibco,美国);0.25%胰蛋白酶,青霉素链霉素混合液、I型胶原酶、BCA蛋白浓度测定试剂盒、PKH26红色细胞膜染色试剂盒(Solarbio,中国);外泌体提取试剂盒(贝贝生物,中

国);CD45、CD146、CD90、CD105(eBioscience,美国);CD63、CD81、TSG101、骨桥蛋白、Runt相关转录因子2抗体和羊抗兔二抗(Abcam,美国);OSX、 β -actin抗体(博士德,中国);油红O染色试剂盒(索莱宝,中国);离心机、CO₂培养箱、酶标仪、超净工作台(Thermo,美国);透射电镜(Hitachi-4800,日本);倒置显微镜系统(Nikon,日本)。

1.4 实验方法

1.4.1 hPDLSCs提取及培养 在新疆维吾尔自治区人民医院口腔科收集16-24岁健康因正畸拔牙患者(均获得知情通知书)的前磨牙或智齿,将收集到的牙齿放入含5%双抗的PBS中4℃保存,送到实验室,准备5个15 mL离心管,每管加入5 mL含2%双抗的PBS,将收集到的牙齿依次在5个离心管内反复洗涤,转移到培养皿,加入2 mL完全培养基(DMEM基础培养基+体积分数20%胎牛血清+1%青-链霉素),用高压灭菌后的拔牙钳夹住牙冠,用刮刮器刮取根中1/3的牙周膜组织,800 r/min离心2 min,弃上清,加入1 mL I型胶原酶(2 mg/mL),充分混匀,于37℃培养箱中消化110 min,每隔15 min摇匀EP管内的混合物,直至组织消化为透明絮状,加入含体积分数20%胎牛血清的DMEM培养基终止消化,颠倒混匀,1 000 r/min离心5 min后缓慢倒去上清,沉淀用500 μL 完全培养基轻柔吹打,细胞悬液按 1×10^6 个/瓶的密度种于T25培养瓶中,置于37℃培养箱中培养。当细胞融合度达到80%-90%后加入1 mL PBS清洗1次,再加入1 mL 0.25%胰酶消化1 min,然后加入3 mL完全培养基终止消化并吹打细胞(注:在吹打过程中不能产生气泡),经1 000 r/min离心5 min后按1:2比例传代,取第3-5代hPDLSCs进行进一步实验。

该研究的实施符合新疆维吾尔自治区人民医院的相关伦理要求(医院伦理批件号:KY2023121201)。

1.4.2 hPDLSCs 的多向分化

(1) 成脂诱导: 将第 3-5 代细胞以 2.5×10^4 个 / 孔的密度接种到 12 孔板中, 待细胞融合度达到 80% 时, 弃去原有培养基, 用 PBS 洗涤后更换为成脂诱导培养基 (DMEM 完全培养基中添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、10 $\mu\text{mol/L}$ 人胰岛素、0.5 mmol/L IBMX 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 吡啶美辛), 每隔 3 d 更换 1 次培养基, 在显微镜下观察到孔内出现较多脂滴时 (21 d 左右), 每孔加入 500 μL 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 加入油红 O 工作液染色 30 min, 显微镜观察并拍照。

(2) 成骨诱导: 将第 3-5 代细胞以 2×10^4 个 / 孔的密度种植到 12 孔板中, 待细胞融合度达到 80% 时, 弃去原有培养基, 用 PBS 洗涤后更换为成骨诱导培养基 (DMEM 完全培养基中添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸、10 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松和 10 mmol/L β -磷酸甘油钠), 每隔 3 d 更换 1 次培养基, 在显微镜下观察到有相当数量的骨钙化结节形成时 (14 d 左右), 每孔加入 1 mL PBS 洗涤 3 次, 再加入 500 μL 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 加入茜素红染色液染色 3-5 min, PBS 洗涤 3 次, 保留最后 1 次的 PBS 在显微镜下观察并拍照。

1.4.3 hPDLSCs 表面标志物的鉴定 取第 3-5 代 hPDLSCs, 用含体积分数 2% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞洗涤 2 次, 以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度分装至 5 个 1.5 mL 离心管中 (每管 500 μL), 除阴性对照组外, 其余每管分别加入 5 μL CD34、CD90、CD105、CD146、HLA-DR 鼠抗人单抗, 避光孵育 45 min, 1 000 r/min 离心 5 min 洗涤多余的抗体, 弃上清后再次加入洗涤液离心, 重悬细胞并上流式细胞仪检测。

1.4.4 OB-EXOs 提取及鉴定 取第 3-5 代 hPDLSCs 接种在 T25 培养瓶中 (1×10^6 个 / 瓶), 待细胞生长融合至 80% 左右时更换成无血清的成骨诱导培养基, 诱导 3 d 后收集上清至离心管中。按照外泌体提取试剂盒的说明操作提取外泌体, 以 5 000 r/min 离心 10 min 弃去悬浮的细胞以及细胞碎片, 将上清过 0.22 μm 滤膜, 再与 EP Solution 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床上孵育 1 h, 12 000 r/min 离心 15 min 后得到 OB-EXOs。

透射电镜观察外泌体: 将铜网置于滤纸上, 吸取 10 μL OB-EXOs 滴加于铜网上静止 3-5 min, 在液滴边缘用滤纸吸去多余液体, 稍干燥; 滴加 10 μL 磷钨酸复染两三分种, 常温干燥数分钟, 透射电镜观察。

外泌体特异性蛋白鉴定: 将提取的 OB-EXOs 与蛋白上样缓冲液按 5 : 1 的比例混合, 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min 使蛋白变性, 制备 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶和浓缩胶进行蛋白分离, 将胶上的蛋白印迹到 PVDF 膜上 (300 mA, 2 h), 完成转膜后将 PVDF 膜置于 10% 多脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 加入按 1 : 2 000 稀释的 CD81、CD9 以及

TSG101 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育; 将一抗回收后用 1 \times TBST 洗涤膜 (10 min \times 3 次), 加入按 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h 后再次用 1 \times TBST 洗涤膜 (10 min \times 3 次), 滴加 ECL 化学发光试剂于化学发光成像系统中进行成像显影。

1.4.5 外泌体摄取实验 使用 PKH26 红色亲脂性染料标记 OB-EXOs。按照说明书使用 200 μL 稀释液 C 重悬外泌体, 加入 5 μL PKH26 混匀后避光静止 5 min; 加入 800 μL 5% BSA 溶液终止反应, 离心弃上清, 除去未结合的染料, 用 300 μL PBS 重悬外泌体。取第 3-5 代 hPDLSCs 以 2×10^4 个 / 孔接种在 12 孔板中, 细胞融合度达到 80% 时每孔加入 100 μL PKH 标记的 OB-EXOs, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h, 弃去培养基, 每孔加入 1 mL 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 200 μL DAPI 染色 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 荧光显微镜下观察并保存图像。

1.4.6 细胞分组及处理 取第 3-5 代 hPDLSCs 以 2×10^4 个 / 孔、接种在 4 个 12 孔板中, 细胞融合度达到 80% 时, 分为对照组、炎症模型组、外泌体组、炎症模型 + 外泌体组。对照组更换为成骨诱导培养基, 外泌体组更换为含 5 $\mu\text{g/mL}$ OB-EXOs 的成骨诱导培养基^[3], 炎症模型和炎症模型 + 外泌体组以 1 $\mu\text{g/mL}$ 脂多糖处理 24 h 构建细胞炎症微环境^[23], 炎症模型组在脂多糖处理后更换为成骨诱导培养基, 炎症模型 + 外泌体组在脂多糖处理后更换为含 5 $\mu\text{g/mL}$ OB-EXOs 的成骨诱导培养基^[3]。

1.4.7 细胞成骨分化检测 成骨诱导培养 7 d 后, 弃去培养基, PBS 洗涤, 用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定 30 min, 然后采用碱性磷酸酶染色试剂盒进行染色。成骨诱导培养 21 d 后, 弃去原有的培养基, PBS 洗涤, 用 40 g/L 多聚甲醛溶液固定细胞 30 min, 加入 1 mL PBS 洗涤 3 次, 加入 0.2% 茜素红 S 染色液进行染色, PBS 洗涤, 倒置显微镜观察并拍照。然后, 使用 Image J 软件对各组的碱性磷酸酶染色和矿化结节染色相对面积进行定量分析。

1.4.8 Western blot 检测 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白、OSX 以及 wnt/ β -catenin 通路相关蛋白表达量 成骨诱导培养 7 d 后收集各组细胞, 加入 100 μL RIPA 裂解液提取总蛋白, 用 BCA 法测蛋白浓度, 取 15 μg 蛋白 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性后进行凝胶电泳, 然后电转至 PVDF 膜上, 以 10% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白、OSX、 β -catenin、 β -actin 一抗 (1 : 2 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日, 回收一抗后用 1 \times TBST 洗涤膜 (10 min \times 3 次), 加入 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, 用 1 \times TBST 洗涤膜 (10 min \times 3 次), 以化学发光试剂对各蛋白印迹显色, 用 Image J 软件量化其灰度值。

1.4.9 qPCR 检测 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白、OSX 以及 wnt/ β -catenin 通路相关 mRNA 表达量 成骨诱导培

养 7 d 后收集各组细胞, 使用 Trizol 提取细胞总 RNA, Nanodrop 进行浓度测定, 利用 Takara 的反转录试剂盒进行反转录, 然后进行荧光定量 PCR 反应, 以 GAPDH 基因对照, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法分析各组基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | 各基因引物序列
Table 1 | Primer sequences of each gene

基因	引物序列 (5'-3')
Runt 相关转录因子 2	F: CGC CTC ACA AAC AAC CAC AG R: TGC AGC CTT AAA TGA CTC GGT
骨桥蛋白	F: AGC GAG GAG TTG AAT GGT GCA TAC R: AAT CTG GAC TGC TTG TGG CTG TG
OSX	F: GTC CTA TGG CGG GGA GGA CTG G R: TGG CAG CTG CAA GCT CTC TGT A
β -catenin	F: AGC TTC CAG ACA CGC TAT CAT R: CGG TAC AAC GAG CTG TTT CTA C
GAPDH	F: CAT GTT CGT CAT GGG GTG AAC CA R: AGT GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT

1.5 主要观察指标 ① hPDLSCs 鉴定结果; ② 外泌体鉴定结果; ③ hPDLSCs 摄取外泌体结果; ④ 在炎症微环境下 OB-EXOs 对 hPDLSCs 成骨分化的影响; ⑤ 在炎症微环境下 OB-EXOs 对 wnt/ β -catenin 通路的影响。

1.6 统计学分析 数据采用 SPSS 26.0 及 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 事后检验。P < 0.05 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过新疆维吾尔自治区人民医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 hPDLSCs 的鉴定结果 原代 hPDLSCs 贴壁生长, 相互黏附, 细胞形态不均一, 呈多边形或长梭形, 见图 1A。成骨诱导后 hPDLSCs 由纤维状开始变为鳞片状, 显微镜下可见 hPDLSCs 逐渐形成钙结节, 经 0.2% 茜素红染液染色后钙结节被染成红色, 见图 1B。成脂诱导培养后 PDLSCs 形态由原本的纤维状变圆, 成脂诱导分化 8-10 d 在显微镜下能够看到脂滴, 油红 O 染色后可见脂滴颗粒均被染成红色, 见图 1C。

流式结果表明 hPDLSCs 高表达 CD90、CD146 和 CD105 表面抗原, 阳性表达率分别为 98.3%、73.7% 和 86.0%, 低表达 CD34, 阳性表达率为 0.62%, 见图 2。

2.2 OB-EXOs 的鉴定结果 OB-EXOs 为圆形或椭圆形, 膜结构完整, 见图 3A; Western blot 结果显示 CD9、CD81 和 TGS101 呈阳性表达, 见图 3B, 符合文献 [14] 报道的外泌体的相关特征, 表明成功提取 OB-EXOs。

2.3 hPDLSCs 摄取 OB-EXOs 为检测 OB-EXOs 能否被 hPDLSCs 摄取, 首先用 PKH26 标记 OB-EXOs, 进一步与 hPDLSCs 共培养, 发现 PKH26 标记的 OB-EXOs 位于

hPDLSCs 内, 并聚集在细胞核附近, 说明 OB-EXOs 能够直接作用于 hPDLSCs, 见图 4。

2.4 各组 hPDLSCs 成骨分化能力 与对照组相比, 炎症模型组的矿化结节相对面积与碱性磷酸酶相对面积显著降低; 与对照组相比, 外泌体组细胞矿化结节相对面积与碱性磷酸酶相对面积显著增加; 与炎症模型组相比, 炎症模型 + 外泌体组细胞碱性磷酸酶相对面积与矿化结节相对面积显著增加, 见图 5-7。

2.5 各组 hPDLSCs 成骨相关因子 mRNA 的表达 与对照组相比, 炎症模型组 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白和 OSX mRNA 表达降低; 与对照组相比, 外泌体组 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白和 OSX mRNA 表达升高; 与炎症模型组相比, 炎症模型 + 外泌体组 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白和 OSX mRNA 表达升高, 见图 8。

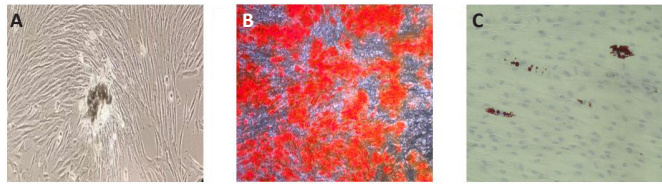
2.6 各组 hPDLSCs 成骨相关因子的蛋白表达 与对照组相比, 炎症模型组 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白和 OSX 蛋白表达量显著降低; 与对照组相比, 外泌体组 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白和 OSX 蛋白表达量显著升高; 与炎症模型组相比, 炎症模型 + 外泌体组 Runt 相关转录因子 2、骨桥蛋白和 OSX 蛋白表达量显著升高, 见图 9。

2.7 各组 hPDLSCs 中 β -catenin 表达 与对照组相比, 炎症模型组 wnt 通路相关蛋白 β -catenin 表达量显著增加; 外泌体组与对照组之间无显著性差异; 与炎症模型组相比, 炎症模型 + 外泌体组 β -catenin 蛋白和 mRNA 表达量显著降低, 见图 10。

3 讨论 Discussion

牙周炎症是导致成人失牙的主要原因之一, 虽然牙周基础治疗、牙周手术都取得了良好的治疗效果, 但是牙周炎导致骨缺损的治疗仍然是一个难题^[1]。目前的研究认为, 导致牙槽骨缺损治疗失败的主要原因是炎症微环境下局部间充质干细胞的成骨分化能力下降。由于 hPDLSCs 具有良好的组织再生能力和成骨分化潜能, 在牙周组织缺损修复中起着关键作用^[14-15]。然而, 研究表明 hPDLSCs 在炎症微环境下的成骨能力会下降^[16]。因此, 研究如何促进 hPDLSCs 在炎症微环境下的成骨分化对于牙周炎的预防和治疗具有重要价值。

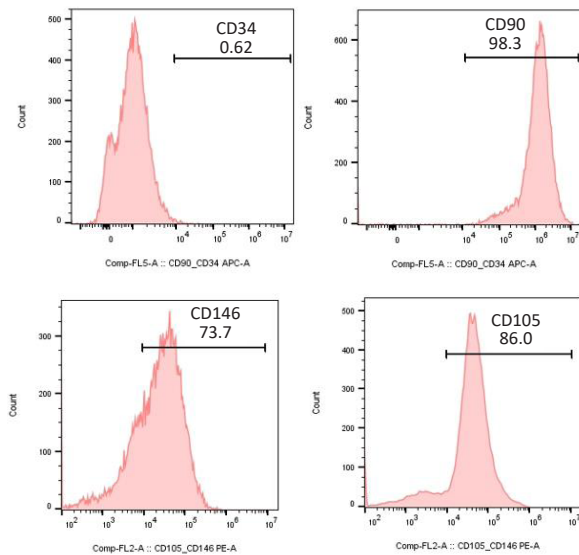
该研究使用胶原酶消化方法成功分离了 hPDLSCs。流式细胞分析结果显示, hPDLSCs 高表达 CD90、CD146 和 CD105, 低表达 CD34, 成脂以及成骨诱导结果显示, PDLSCs 具有成脂和成骨分化潜力, 符合间充质干细胞的基本特征。ZHENG 等^[12]以 1 μ g/mL 牙龈卟啉菌来源的脂多糖处理 hPDLSCs, 发现能够促进炎症因子如白细胞介素 6、白细胞介素 8 和肿瘤坏死因子 α 等的表达, 并降低抗炎因子如白细胞介素 10 的表达, 进而导致成骨相关因子



图注：图 A 为原代人牙周膜干细胞；B 为茜素红染色的钙结节；C 为油红 O 染色的脂滴。

图 1 | 人牙周膜干细胞形态及分化能力 (×40)

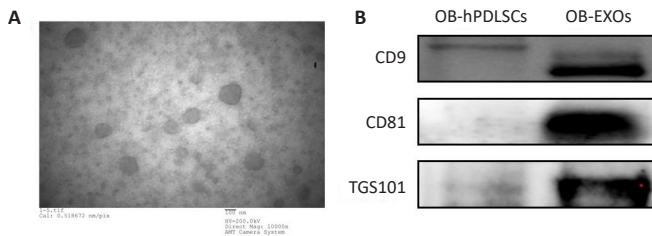
Figure 1 | Morphology and differentiation of human periodontal ligament stem cells (×40)



图注：人牙周膜细胞表面 CD90、CD146 和 CD105 均呈强阳性表达，而 CD34 低表达。

图 2 | 人牙周膜干细胞表面标记鉴定

Figure 2 | Identification of human periodontal ligament stem cell surface markers

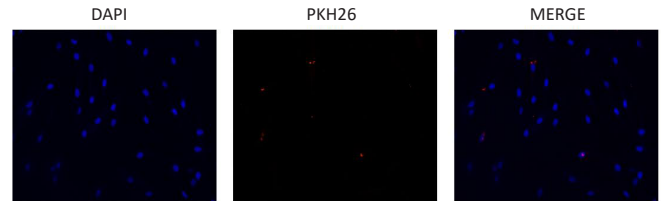


图注：图 A 为透射电镜观察可见脂质双分子层形成的囊泡结构 (×10 000)；B 为 Western blot 检测外泌体特异性蛋白的表达。OB-hPDLSCs：成骨诱导人牙周膜干细胞。

图 3 | 成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体 (OB-EXOs) 的鉴定

Figure 3 | Identification of exosomes derived from osteogenesis-induced human periodontal ligament stem cells

表达降低。该研究选用 1 μg/mL 脂多糖构建炎症模型。外泌体是直径为 30–150 nm 的胞外小囊泡，几乎所有类型的细胞都分泌外泌体，包括间充质干细胞、树突状细胞、B 细胞、T 细胞等，并广泛存在于许多体液中，如血浆、尿液、母乳、精液、羊水和唾液^[17]。外泌体内携带母细胞来源的蛋白、miRNA、核酸等遗传物质，是细胞间通讯的新机制，在免疫调节、肿瘤生长和浸润、病毒传播等



图注：PKH26 标记的成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体位于人牙周膜干细胞内，聚集在细胞核附近。

图 4 | 人牙周膜干细胞摄取成骨诱导人牙周膜干细胞来源外泌体 (×40)

Figure 4 | Human periodontal ligament stem cells ingest exosomes from osteoblast-induced human periodontal ligament stem cells (×40)

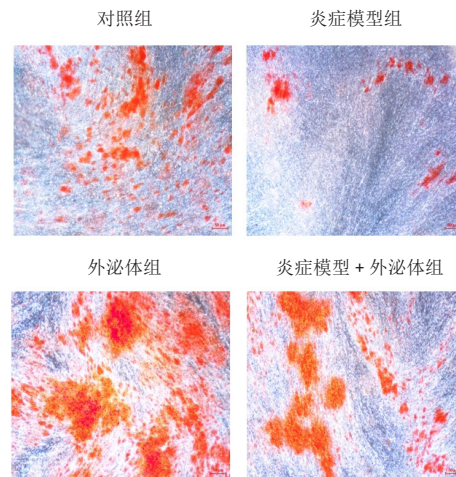


图 5 | 茜素红染色检测各组人牙周膜干细胞的成骨分化能力 (×40)

Figure 5 | Osteoblast differentiation of human periodontal ligament stem cells in each group detected by alizarin red staining (×40)

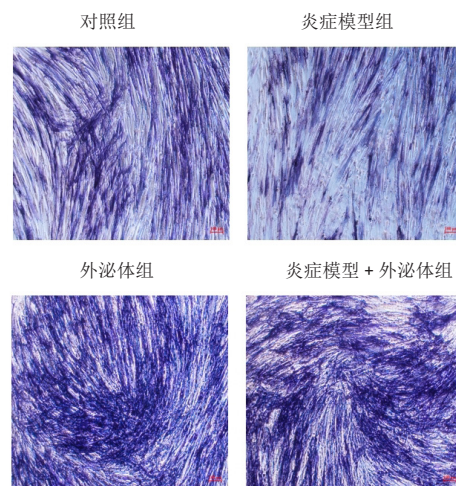
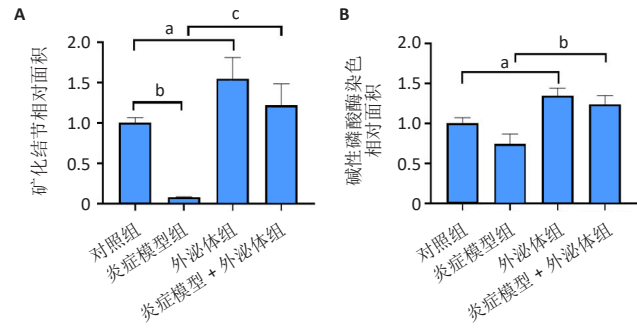


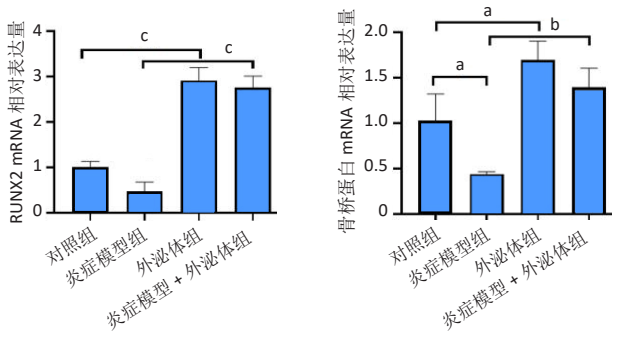
图 6 | 碱性磷酸酶染色检测各组人牙周膜干细胞的成骨分化能力 (×40)

Figure 6 | Osteoblast differentiation of human periodontal ligament stem cells in each group detected by alkaline phosphatase staining (×40)

多种病理生理过程中发挥重要作用^[18]，并且在疾病诊断、治疗和组织再生中得到了广泛研究，在骨缺损修复中具有巨大潜力^[1, 19]。研究表明外泌体的生物学作用在很大程度上取决于供体细胞的来源和所处的微环境^[20]。因此，该研究探讨 OB-EXOs 在炎症微环境下对 hPDLSCs 成骨分化的影响。通过将 hPDLSCs 成骨诱导培养 3 d 后，利用外泌体提取试剂盒分离得到纯度较好的外泌体，Western blot



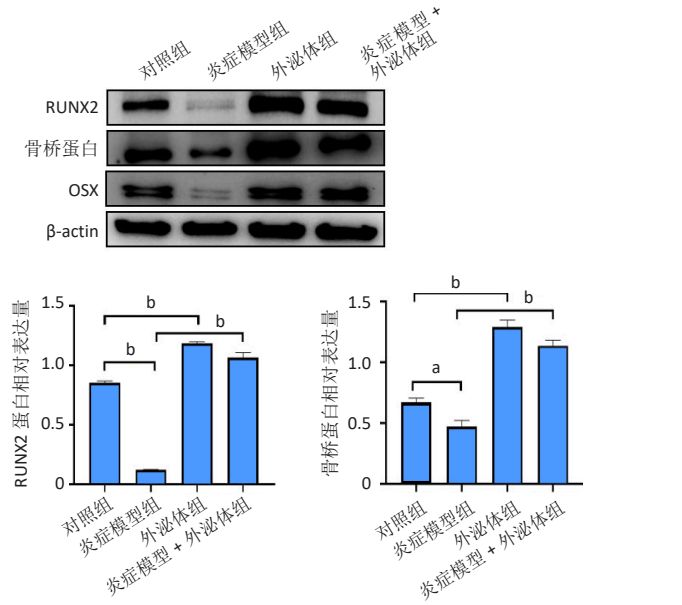
图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$, $n=3$ 。
图 7 | 各组人牙周膜干细胞矿化结节相对面积 (A) 与碱性磷酸酶染色相对面积 (B)
Figure 7 | Relative area of mineralized nodules (A) and relative area of alkaline phosphatase staining (B) in human periodontal ligament stem cells of each group



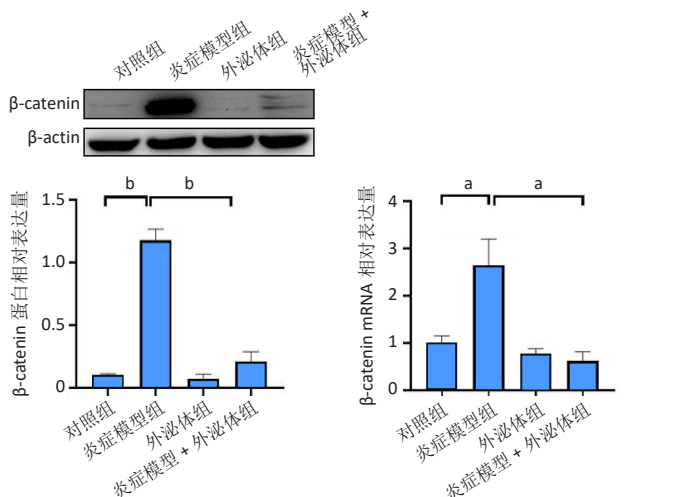
图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.0001$, $n=3$ 。
图 8 | 各组人牙周膜干细胞 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)、骨桥蛋白、OSX mRNA 相对表达量
Figure 8 | Relative mRNA expression levels of Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin, and OSX in human periodontal ligament stem cells of each group

检测结果显示外泌体表达 CD9、CD81 和 TSG101 蛋白, 透射电镜观察可见外泌体为囊泡结构^[21-22]。在 OB-EXOs 刺激下, 成骨诱导培养 14 d 后茜素红染色显示 hPDLSCs 形成更多的钙结节, 并且碱性磷酸酶表达量也显著增加, 说明 OB-EXOs 能够在炎症微环境下促进 hPDLSCs 的成骨分化, 与 LIU 等^[2]的结果相符。

炎症微环境下, AKT 通路、NF- κ B 通路、Notch 和 Wnt/ β -catenin 等通路影响 hPDLSCs 成骨分化过程^[23-26]。典型的 Wnt 信号通路在间充质干细胞成骨分化中起重要作用^[3]。LIU 等^[27]研究发现炎症因子过度激活典型 Wnt 信号抑制 hPDLSCs 的成骨分化, 表明典型 Wnt 通路在炎症环境下与 hPDLSC 成骨分化能力下调有关。因此, 该研究检测了 OB-EXOs 对典型 Wnt 信号通路激活的影响。与先前报道的研究一致^[3, 28], 在炎症微环境下 hPDLSCs 中的 Wnt 信号通路过度激活, OB-EXOs 处理后抑制了 β -catenin 的蛋白表达, 而外泌体组与对照组的 β -catenin 表达没有显著性差异, 结果表明 OB-EXOs 在炎症微环境下可能通



图注: ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.0001$, $n=3$ 。
图 9 | 各组人牙周膜干细胞 Runt 相关转录因子 2 (RUNX2)、骨桥蛋白和 OSX 蛋白相对表达量
Figure 9 | Relative expression levels of Runt-associated transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin, and OSX proteins in human periodontal ligament stem cells of each group



图注: ^a $P < 0.001$, ^b $P < 0.0001$, $n=3$ 。
图 10 | 各组人牙周膜干细胞 β -catenin 蛋白和 mRNA 相对表达量
Figure 10 | Relative expression levels of β -catenin protein and mRNA in human periodontal stem cells of each group

过抑制过度激活的 Wnt 信号传导促进炎症环境下 hPDLSCs 的成骨分化。

综上所述, OB-EXOs 能够促进炎症微环境下 hPDLSCs 的成骨分化及矿化, 作用机制可能是在炎症微环境下 OB-EXOs 抑制典型 Wnt 信号的过度激活, 以恢复 hPDLSCs 在炎症微环境的成骨分化能力。

致谢: 感谢新疆维吾尔自治区人民医院医学研究与转化中心为实验提供平台, 感谢新疆医科大学库得来提·查嗣钦以及新疆大学生命科学学院张胜男等同学在实验过程中提供的帮助。

作者贡献: 实验设计、实验数据分析处理为阿克帕尔·艾尔肯、吾凡别克·巴合提, 实验实施为阿克帕尔·艾尔肯, 文章校对为陈晓涛。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LIN H, CHEN H, ZHAO X, et al. Advances of exosomes in periodontitis treatment. *J Transl Med.* 2022;20(1):279.
- [2] LIU T, HU W, ZOU X, et al. Human Periodontal Ligament Stem Cell-Derived Exosomes Promote Bone Regeneration by Altering MicroRNA Profiles. *Stem Cells Int.* 2020;2020:8852307.
- [3] LEI F, LI M, LIN T, et al. Treatment of inflammatory bone loss in periodontitis by stem cell-derived exosomes. *Acta Biomater.* 2022; 141:333-343.
- [4] 刘焱, 高翔, 赵晓霞, 等. 人牙周膜干细胞条件培养液对炎症组织来源牙周膜干细胞增殖及成骨分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(13):2005-2010.
- [5] PHINNEY DG, PITTENGER MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 2017;35(4):851-858.
- [6] YU W, SU X, LI M, et al. Three-dimensional mechanical microenvironment enhanced osteogenic activity of mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Chem Eng J.* 2021;417:128040.
- [7] 蔡超莹, 陈学鹏, 胡济安. 外泌体复合支架用于口腔组织工程的研究进展 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2022,49(4):489-496.
- [8] NAKAO Y, FUKUDA T, ZHANG Q, et al. Exosomes from TNF- α -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss. *Acta Biomater.* 2021;122:306-324.
- [9] NAGATA M, IWASAKI K, AKAZAWA K, et al. Conditioned Medium from Periodontal Ligament Stem Cells Enhances Periodontal Regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2017;23(9-10):367-377.
- [10] IWASAKI K, AKAZAWA K, NAGATA M, et al. The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):192.
- [11] DIOMEDE F, D'AURORA M, GUGLIANDOLO A, et al. A novel role in skeletal segment regeneration of extracellular vesicles released from periodontal-ligament stem cells. *Int J Nanomedicine.* 2018;13: 3805-3825.
- [12] ZHENG Y, DONG C, YANG J, et al. Exosomal microRNA-155-5p from PDLSCs regulated Th17/Treg balance by targeting sirtuin-1 in chronic periodontitis. *J Cell Physiol.* 2019;234(11):20662-20674.
- [13] 刘文涛, 冯兴超, 杨毅, 等. M2型巨噬细胞外泌体诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2023,27(6):840-845.
- [14] LIU H, ZHENG J, ZHENG T, et al. Exendin-4 regulates Wnt and NF- κ B signaling in lipopolysaccharide-induced human periodontal ligament stem cells to promote osteogenic differentiation. *Int Immunopharmacol.* 2019;75:105801.
- [15] DONG T, SUN X, JIN H. Role of YAP1 gene in proliferation, osteogenic differentiation, and apoptosis of human periodontal ligament stem cells induced by TNF- α . *J Periodontol.* 2021;92(8): 1192-1200.
- [16] YU Y, MU J, FAN Z, et al. Insulin-like growth factor 1 enhances the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK and JNK MAPK pathways. *Histochem Cell Biol.* 2012;137(4):513-525.
- [17] 陈谦谦, 沈梦杰, 杨琨, 等. 牙源性间充质干细胞免疫调节作用及在口腔疾病和组织再生中的意义 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(19):3101-3107.
- [18] HE C, ZHENG S, LUO Y, et al. Exosome Theranostics: Biology and Translational Medicine. *Theranostics.* 2018;8(1):237-255.
- [19] PHINNEY DG, DI GIUSEPPE M, NJAH J, et al. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat Commun.* 2015;6:8472.
- [20] WANG M, LI J, YE Y, et al. SHED-derived conditioned exosomes enhance the osteogenic differentiation of PDLSCs via Wnt and BMP signaling in vitro. *Differentiation.* 2020;111:1-11.
- [21] LYU T, WANG Y, LI D, et al. Exosomes from BM-MSCs promote acute myeloid leukemia cell proliferation, invasion and chemoresistance via upregulation of S100A4. *Exp Hematol Oncol.* 2021;10(1):24.
- [22] ZHANG S, GUO M, GUO T, et al. DAL-1/4.1B promotes the uptake of exosomes in lung cancer cells via Heparan Sulfate Proteoglycan 2 (HSPG2). *Mol Cell Biochem.* 2022;477(1):241-254.
- [23] YANG S, ZHU B, TIAN XY, et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Enhance the Osteoblastic Differentiation of Periodontal Ligament Stem Cells Under High Glucose Conditions Through the PI3K/AKT Signaling Pathway. *Biomed Environ Sci.* 2022; 35(9):811-820.
- [24] CHOI B, KIM JE, PARK SO, et al. Sphingosine-1-phosphate hinders the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in association with AKT signaling pathways. *Int J Oral Sci.* 2022;14(1):21.
- [25] LI M, WANG Y, XUE J, et al. Baicalin can enhance odonto/osteogenic differentiation of inflammatory dental pulp stem cells by inhibiting the NF- κ B and β -catenin/Wnt signaling pathways. *Mol Biol Rep.* 2023; 50(5):4435-4446.
- [26] 何龙, 云蔓, 吴薇薇, 等. lncRNA GAS5 调控 Notch 通路对炎症环境下牙髓干细胞成骨分化的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2022, 38(6):730-736.
- [27] LIU W, KONERMANN A, GUO T, et al. Canonical Wnt signaling differently modulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and from periodontal ligament under inflammatory conditions. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(3): 1125-1134.
- [28] IIZUMI R, HONDA M. Wnt/ β -Catenin Signaling Inhibits Osteogenic Differentiation in Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *Biomimetics (Basel).* 2022;7(4):224.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)