

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2024.06.002

牙髓干细胞来源外泌体减轻牙周炎 和促进牙周组织再生的作用

姜丽媛 魏元 夏岩 赵琦玥

(安徽医学高等专科学校口腔医学院(附属口腔医院),合肥 230601)

摘要 目的 分析牙髓干细胞(DPSC)来源外泌体(Exos)减轻牙周炎和促进牙周组织再生的作用。方法 选择 30 只 SPF 级 SD 大鼠,分为对照组、模型组、实验组,其中对照组不给予处理,模型组、实验组建立慢性牙周炎(CP)大鼠模型,每组各 10 只大鼠。实验组选择上颌双侧第一磨牙腭侧牙龈给予 DPSC-Exos 注射。比较 3 组大鼠釉牙骨质界至牙槽嵴顶(CEJ-ABC)距离及牙周组织变化。培养牙周膜干细胞(PDLSCs),分为对照组、实验组,对照组不给予处理,实验组培养皿中加入 DPSC-Exos,比较两组细胞的迁移能力、增殖能力、钙结节数量,检测两组细胞 Runt 相关转录因子-2(Runx-2) mRNA、骨涎蛋白(BSP) mRNA 及蛋白表达情况。结果 对照组大鼠牙周组织未见异常情况;模型组大鼠牙周组织可见胶原纤维排列紊乱,出现大量炎症细胞浸润,袋内上皮增生明显且呈向根方偏移的情况,同时存在牙槽骨吸收情况;实验组大鼠牙周组织炎症细胞浸润较模型组减轻,龈沟上皮未见明显增生及向根方偏移的情况。模型组大鼠 CEJ-ASC 距离相较于对照组明显升高;实验组大鼠 CEJ-ASC 距离相较于模型组明显降低($P<0.05$)。24h、72h 时点时,实验组细胞 OD 值相较于对照组明显升高;12h、24h 时点中,实验组细胞迁移率相较于对照组明显升高($P<0.05$)。实验组细胞钙结节数量相较于对照组明显升高($P<0.05$)。实验组细胞 Runx-2 mRNA、BSP mRNA、Runx-2 蛋白、BSP 蛋白相较于对照组明显升高($P<0.05$)。结论 DPSC-Exos 可减轻牙周炎大鼠炎症症状,降低骨吸收程度,同时 DPSC-Exos 可促进 PDLSCs 细胞的增殖及迁移活动,增强 PDLSCs 细胞的成骨分化能力,其机制可能与其介导 Runx-2、BSP 表达有关。

关键词 牙髓干细胞;外泌体;牙周炎;牙周组织再生

中图分类号:R783.3 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2024)12-466-05

The effect of extracellular vesicles derived from dental pulp stem cells on alleviating periodontitis and promoting periodontal tissue regeneration

JIANG Liyuan, WEI Yuan, XIA Yan, ZHAO Qiyue

(School of Stomatology, Anhui Medical College (Affiliated Stomatological Hospital), Hefei 230601, China)

Abstract; Objective To analyse the role of dental pulp stem cell (DPSC)-derived exosomes (Exos) in alleviating periodontitis and promoting periodontal tissue regeneration. **Methods** Thirty SPF-grade SD rats were selected and divided into control, model and experimental groups, in which the control group was not given treatment, the model and experimental groups were established as chronic periodontitis (CP) rat models, with 10 rats in every group and the experimental group received DPSC-Exos injections into the palatal gingiva of the bilateral maxillary first molars. The distance from the enamel bone boundary to the top of the alveolar ridge (CEJ-ABC) and periodontal tissue changes were compared among the three groups of rats. Periodontal ligament stem cells (PDLSCs) were selected and divided into a control group and an experimental group, no treatment was given to the control group, and DPSC-Exos was added to the petri dish of the experimental group, to compare the migration ability, proliferation ability, and the number of calcaneal nodules of the two groups, and to detect the expression of Runt-related transcription factor-2 (Runx-2) mRNA, Bone Salivary Protein

(BSP) mRNA, and protein expression of the cells in the two groups. **Results** No abnormalities were observed in the periodontal tissues of rats in the control group; in the periodontal tissues of rats in the model group, there were disorders in the arrangement of collagen fibres, a large number of inflammatory cell infiltration, obvious proliferation of epithelium in the pocket with a shift towards the root, and resorption of the alveolar bone; in the periodontal tissues of the experimental group, there was a reduction in the infiltration of inflammatory cells compared with that of the control group, and the epithelium of the gingival sulcus did not have obvious proliferation and shift towards the root. The CEJ-ASC distance of rats in the model group was significantly higher than that of the control group; the CEJ-ASC distance of rats in the experimental group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). The OD value of the cells in the experimental group was significantly higher compared with the control group in the 12h, 24h and 72h time points; the migration rate of the cells in the experimental group was significantly higher compared with the control group in the 12h and 24h time points ($P < 0.05$). The number of cellular calcium nodules in the experimental group was significantly higher compared with the control group ($P < 0.05$). The number of cellular Runx-2 mRNA, BSP mRNA, Runx-2 protein, and BSP protein was significantly higher in the experimental group compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** DPSC-Exos can reduce inflammatory symptoms and decrease the degree of bone resorption in periodontitis rats, while DPSC-Exos can promote the proliferation and migration activities of PDLSCs cells, and enhance the osteogenic differentiation ability of PDLSCs cells, the mechanism of which may be related to its mediation of Runx-2 and BSP expression.

Keywords: Dental pulp stem cells; Exosome; Periodontitis; Periodontal tissue regeneration

慢性牙周炎 (chronic periodontitis, CP) 是一种以细菌引起的炎症为特征的疾病, 是一种慢性炎症、非传染性疾病, 并伴有牙周袋的形成、牙周结构破坏, 骨质流失甚至易感人群牙齿脱落等, CP 不仅造成牙周组织不可逆损害, 还影响患者咀嚼功能及语言功能, 同时会影响患者容貌, 对患者生活质量造成严重影响^[1-2]。CP 通常症状较轻微, 不易引起患者重视, 牙周洁治术是临床预防及控制 CP 进展的主要方式^[3-4], 但对于牙周组织再生无明显作用, 如何使 CP 患者牙周组织再生成为目前研究的重点。既往研究认为, 牙髓干细胞 (dental pulp stem cells, DPSC) 可促进成骨分化诱导骨组织再生, 有助于维持完整牙周组织结构^[5-6]。DPSC 外泌体 (exosomes, Exos) 是 DPSC 细胞分泌的胞外囊泡, 具有组织修复、免疫调控等多种生物学作用^[7-8], 但 DPSC-Exos 对于牙周组织再生机制尚不明确, 因此本实验选择 SPF 级 SD 大鼠及 PDLSCs 细胞为观察对象, 旨在分析 DPSC-Exos 对减轻 CP 和促进牙周组织再生的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 30 只 SPF 级 SD 大鼠, 购于成都达硕实验动物有限公司 (实验动物生产许可证号: SCXK (川) 2020-030), 饲养方式: 温度 (24~27) °C、湿度 (40~60)%, 12h 光照/12h 黑暗环境, 自由饮食饮

水。我院伦理委员会审批通过 (202205A051)。

选择牙周膜干细胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs), 购于上海毕合生物化学技术有限公司, 于 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基培养, 置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 DPSC-Exos 提取 取因阻生等原因拔除的人健康完整牙齿, 无菌条件下取出牙髓、剪碎, 制备细胞悬液, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞生长至 60%~80% 时加入胰蛋白酶消化传代, 取第 5 代 DPSC 细胞, 加入 LPS 溶液 24h, PBS 清洗, 无血清培养 48h, 收取细胞上清液, 3000g 离心 30min, 采集上清 5000g/min 离心 30min, 得上清浓缩液, 后加入外泌体提取试剂, 混匀后 4°C 孵育过夜, 1000g/min 离心 60min, 沉淀即为 Exos, Exos 溶解至 RIPA 裂解缓冲液中, 调整浓度为 1 μg/μL。

1.2.2 实验方式 1) 动物实验。选择 30 只 SPF 级 SD 大鼠, 分为对照组、模型组、实验组, 其中对照组不给予处理, 模型组、实验组建立 CP 大鼠模型, 两组大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉, 取 4mg/mL LPS 溶液给予大鼠上颌双侧第一磨牙腭侧牙龈注射, 5 μL/3d, 共注射 28d, 实验组选择上颌双侧第一磨牙腭侧牙龈给予 DPSC-Exos 溶液注射, 1 次/1 周, 共注射 4 次。2) 细胞实验。选择 PDLSCs 细胞, 分为对照组、实验组, 对照组不给予处理, 实验组培养皿中加入 10 μg/mL 的 DPSC-Exos 溶液, 诱

导 7d 后进行其他检查。每组均设置 6 个复孔,且完成 3 次独立重复实验。

1.3 观察指标

1) Micro-CT 扫描检测。处死大鼠,取大鼠上颌双侧磨牙区,4%多聚甲醛固定 48h,采用 Micro-CT 扫描,三维重建后测量并比较 3 组大鼠釉牙骨质界至牙槽嵴顶(cemento-enamel junction and alveolar bone crest, CEJ-ABC)距离。

2) HE 染色检测。取大鼠磨牙区标本,采用 10%EDTA 二钠溶液进行脱钙处理,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,进行切片,给予苏木精-伊红染色,显微镜观察并保留图片。

3) CCK-8 实验检测。取 PDLSCs 细胞,去除旧培养液,加入 90 μ L 新鲜培养基,加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,酶标仪于 450nm 处测量 OD 值,比较两组细胞 12、24、72h 增殖能力。

4) 划痕实验检测。选择 PDLSCs 细胞常规消化计数,调整为 1×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板中,按分组给予处理孵育,分别于 0、12、24h 显微镜拍照,采用细胞划痕法和 Image J 计算并分析两组 PDLSCs 细胞迁移率。12/24h 细胞迁移率=(0h 划痕宽度-12/24h 划痕宽度)/0h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

5) 细胞茜素红染色。选择 PDLSCs 细胞常规消化计数,调整为 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中,分组处理 14d 后弃去诱导液,PBS 清洗,给予 4%多聚甲醛固定,PBC 清洗,给予茜素红染色 5min,PBS 清洗,显微镜下观察并比较两组细胞钙结节数量。

6) PT-PCR 检测。PDLSCs 细胞分组处理后提取总 RNA,逆转录后设计引物,其中 RUNX2 序列(上游:5'-CTTTACTTACACCCCGCCAGTC-3';下游:5'-AGAGATATGGAGTGCTGGTC-3');BSP 序列(上游:5'-CGAACAAAGGCATAAACGGCACCAG-3';下游:5'-TTCTCCATTGTCTCCTCCGCTGCT-3')冰浴条件下配置 PCR 反应液(10 μ L TB Green Premix Ex TaqII、0.8 μ L PCR Forward Primer(10 μ M)、0.8 μ L PCR Reverse Primer(10 μ M)、0.4 μ L Rox Reference DyeII (50 \times)⁺²、2 μ L DNA 模板、6 μ L 灭菌水、20 μ L Total RNA),离心 30s 混匀,Stage1(预变性):1 个循环,95 $^{\circ}$ C 30s;Stage2(PCR 反应):40 个循环,95 $^{\circ}$ C 变性 5s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 34s,进行反应,记录各基因 CT 值,比较两组细胞 Runt 相关转录因子-2(Runt-related transcription factor 2, Runx-2) mRNA、

骨涎蛋白(Bone sialoprotein, BSP) mRNA 表达。

7) Western Blot 检测 Runx-2 蛋白、BSP 蛋白表达。PDLSCs 细胞分组处理后给予 PBS 清洗,RIPA 裂解,BCA 法检测蛋白浓度,制备 SDS-PAGE 胶,电泳并转至 PVDF 膜,置于 5%脱脂牛奶中行封闭处理,加一抗、二抗孵育后洗膜,BIORAD 凝胶成像系统进行显影,分析 Runx-2 蛋白、BSP 蛋白表达量。

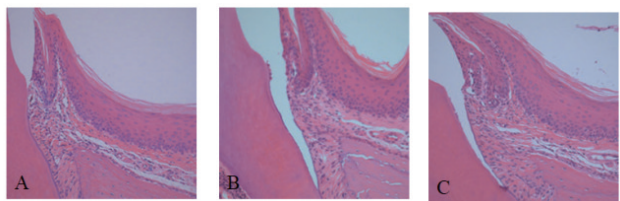
1.4 统计学方法

采用 SPSS20.0 进行分析。以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,两组比较采用独立样本 *t* 检验,两组不同时间点比较采用重复测量方差分析;3 组间比较采用单因素方差分析(*F* 检验),进一步两两比较采用 SNK 法。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠炎症情况

对照组大鼠牙周组织未见异常情况;模型组大鼠牙周组织可见胶原纤维排列紊乱,出现大量炎症细胞浸润,袋内上皮增生明显且呈向根方偏移的情况,同时存在牙槽骨吸收情况;实验组大鼠牙周组织炎症细胞浸润较对照组减轻,龈沟上皮未见明显增生及向根方偏移的情况。见图 1。



注:A 为对照组大鼠牙周组织;B 为模型组大鼠牙周组织;C 为实验组大鼠牙周组织。

图 1 不同组别大鼠牙周组织(HE 染色 $\times 100$)

2.2 各组大鼠 CEJ-ASC 距离

模型组大鼠 CEJ-ASC 距离相较于对照组明显升高;实验组大鼠 CEJ-ASC 距离相较于模型组明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 CES-ASC 距离比较(mm, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CEJ-ASC 距离
对照组	10	0.15 \pm 0.03
模型组	10	0.32 \pm 0.08 ^a
实验组	10	0.21 \pm 0.06 ^{ab}
<i>F</i>		21.849
<i>P</i>		<0.001

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$ 。

2.3 两组 PDLSCs 细胞增殖及迁移情况

两组间 12h OD 值无统计学意义。随着时间推移,相对于对照组,实验组细胞 OD 值逐渐明显升高($P < 0.05$);12h、24h 时点中,实验组细胞迁移率相较于对照组明显升高($P < 0.05$)。见表 2,图 2。

2.4 两组 PDLSCs 细胞成骨分化基因、蛋白表达及钙结节表达情况

实验组细胞 Runx-2 mRNA、BSP mRNA、Runx-2 蛋白、BSP 蛋白相较于对照组明显升高($P < 0.05$),实验组细胞钙结节数量相较于对照组明显升高($P < 0.05$)。见表 3,图 3,4。

表 2 两组细胞 PDLSCs 细胞增殖情况及迁移率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值			迁移率/%	
	12h	24h	72h	12h	24h
对照组	0.19±0.09	0.30±0.11	1.81±0.23	12.09±2.14	29.37±9.18
实验组	0.23±0.10	0.38±0.14	2.29±0.28	25.18±5.07	47.20±10.16
组间效应(F/P)	25.516, <0.001			23.196, <0.001	
组内效应(F/P)	18.125, <0.001			18.560, <0.001	
交互效应(F/P)	19.755, <0.001			20.577, <0.001	

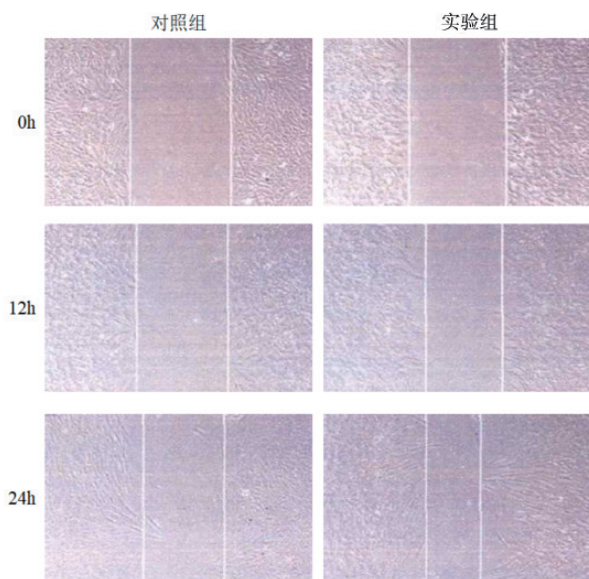


图 2 两组 PDLSCs 细胞迁移情况比较($\times 100$)

表 3 两组 PDLSCs 细胞成骨分化基因、相关蛋白及钙结节表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Runx-2 mRNA	BSP mRNA	Runx-2 蛋白	BSP 蛋白	钙结节数量
对照组	1.02±0.21	1.01±0.23	0.68±0.18	0.51±0.22	1.92±0.76
实验组	1.40±0.36	2.85±0.16	1.09±0.25	1.58±0.43	2.36±0.70
t	4.547	32.660	6.642	11.101	2.130
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.038

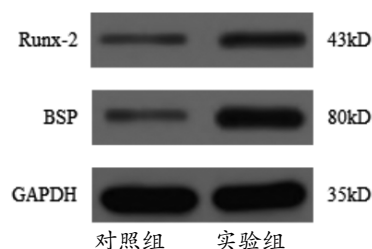
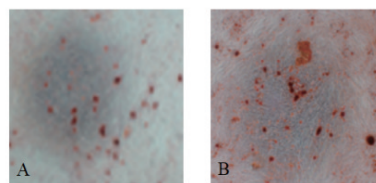


图 3 两组 PDLSCs 细胞成骨分化相关蛋白表达蛋白



注:A 为对照组;B 为实验组。

图 4 两组细胞茜素红染色情况($\times 100$)

3 讨论

CP 是临床最常见的非器械慢性生物膜相关疾病,近年来发病率持续上升,已逐渐成为成人牙齿脱落的重要原因,对患者的日常生活及面部美观影响较大^[9],去除牙石(矿化生物膜)是 CP 的根本治疗方法^[10],但牙周骨缺损的重建仍是目前研究的难点。

DPSC 是成体间充质干细胞,具有成骨向分化能力,王新民等^[11]研究发现,DPSC 联合髓芯减压治疗早期股骨头坏死优于单纯髓芯减压,可帮助改善骨体积分数、骨小梁数量、骨密度等,具有促进骨组织再生的作用。Exos 是用于递送小分子的高效货物系统,含有 miRNA 的 Exos,可传递细胞信息并调节受体细胞的基因表达等。Lu 等^[12]研究显示, PDLSCs 来源 Exos 通过 miR-31-5p/eNOS 信号通路减少了牙槽骨破坏并减少了牙槽骨表面破骨细胞的数量。因此本研究推测,DPSC-Exos 可能具有促进牙周组织再生作用。本文结果示,模型组大鼠牙周组织可见胶原纤维排列紊乱,出现大量炎症细胞浸润,袋内上皮增生明显且呈向根方偏移的情况,同时存在牙槽骨吸收情况;实验组大鼠牙周组织炎症细胞浸润较模型组减轻。模型组大鼠 CEJ-ASC 距离相较于对照组明显升高;实验组大鼠 CEJ-ASC 距离相较于模型组明显降低。说明 DPSC-Exos 处理可改善 CP 大鼠牙周组织炎症,减轻牙槽骨持续性丧失,从而改善 CP 大鼠症状。与张青等^[13]研

究结果相近,该研究显示,以 SHED 等聚合体来源的 Exos 可以通过显著促进血管、神经再生等途径促进小型猪牙髓腔原位移植和裸鼠背部皮下异位移植牙髓组织再生,可用于根尖已闭合恒牙牙髓再生的临床治疗。

牙周组织再生主要包括牙骨质、牙周膜及牙槽骨等的软硬组织再生^[14],因此 PDLSCs 细胞的增殖、迁移及成骨分化能力对于牙周组织的再生具有重要意义。本研究 24h、72h 时,实验组细胞 OD 值相较于对照组明显升高;12h、24h 时点中,实验组细胞迁移率相较于对照组明显升高。实验组细胞 OD 值及迁移率相较于对照组明显升高。实验组细胞钙结节数量相较于对照组明显升高。说明 DPSC-Exos 可促进 PDLSCs 细胞的增殖及迁移活动,促进 PDLSCs 细胞的体外成骨分化。同时本研究发现,实验组细胞 Runx-2 mRNA、BSP mRNA、Runx-2 蛋白、BSP 蛋白相较于对照组明显升高。Runx-2 是成骨相关蛋白,作为早期转录因子可调控细胞的成骨细胞过程,BSP 也参与骨再生过程,其水平变化可影响破骨细胞活性及新骨形成能力^[15],DPSC-Exos 可能通过介导 Runx-2 mRNA、BSP mRNA 的表达调控 PDLSCs 细胞的成骨分化能力,从而促进牙周组织再生。

综上所述,DPSC-Exos 可减轻 CP 大鼠炎症症状,降低骨吸收程度,同时 DPSC-Exos 可促进 PDLSCs 细胞的增殖及迁移活动,增强 PDLSCs 细胞的成骨分化能力,其机制可能与其介导 Runx-2、BSP 表达有关。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Thilagar S, Theyagarajan R, Mugri MH, et al. Periodontal treatment for chronic periodontitis with rheumatoid arthritis [J]. *Int Dent J*, 2022, 72 (6): 832-838. DOI: 10. 1016/j. identj. 2022. 04. 008.
- [2] 荆红鑫,孙珂欣,林源慧,等. 内分泌及口腔医生对糖尿病与牙周病关系的认知[J]. *济宁医学院学报*, 2022, 45 (3): 212-215, 220. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2022. 03. 014.
- [3] 唐小雪,李启期,高芸,等. 杜鹃素对结扎性牙周炎模型大鼠牙周组织损伤及 mTOR/STAT3 信号通路的影响[J]. *中国药* 学杂志, 2023, 58 (24): 2252-2258. DOI: 10. 11669/cpj. 2023. 24. 010.
- [4] Dannewitz B, Holtfreter B, Eickholz P. Periodontitis-therapy of a widespread disease [J]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2021, 64 (8): 931-940. DOI: 10. 1007/s00103-021-03373-2.
- [5] Parsegian K, Randall D, Curtis M, et al. Association between periodontitis and chronic kidney disease [J]. *Periodontol*, 2000, 2022, 89 (1): 114-124. DOI: 10. 1111/prd. 12431.
- [6] Mojtahedi H, Hossein-Khannazer N, Mahmoud Hashemi S, et al. Effects of lipopolysaccharide from porphyromonas gingivalis and escherichia coli on gene expression levels of toll-like receptors and inflammatory cytokines in human dental pulp stem cells [J]. *Iran J Immunol*, 2022, 19 (3): 299-310. DOI: 10. 22034/iji. 2022. 92223. 2136.
- [7] 高雅浩. 外泌体 miRNAs 在常见泌尿系统肿瘤中的作用 [J]. *济宁医学院学报*, 2023, 46 (4): 283-286. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2023. 04. 013.
- [8] 赵军,刘丽娜. 微小 RNA 调控牙周膜干细胞成骨分化的研究进展 [J]. *口腔医学研究*, 2022, 38 (3): 220-222. DOI: 10. 13701/j. cnki. kqxyj. 2022. 03. 004.
- [9] 应乔,俞懿强,苏俭生. 负载脱落乳牙干细胞外泌体的透明质酸可注射水凝胶的制备及其对小鼠牙周炎抗炎成骨的研究 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2023, 33 (5): 292-297. DOI: 10. 12439/kqhm. 1005-4979. 2023. 05. 003.
- [10] 徐溶蔚,王浩,付秋月,等. 骨再生过程中炎症因素与牙髓干细胞的双向作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27 (33): 5385-5393.
- [11] 王新民,刘飞,许杰,等. 髓芯减压联合牙髓干细胞治疗兔早期激素性股骨头坏死 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26 (7): 1074-1079.
- [12] Lu J, Yu N, Liu Q, et al. Periodontal ligament stem cell exosomes key to regulate periodontal regeneration by miR-31-5p in mice model [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 5327-5342. DOI: 10. 2147/IJN. S409664.
- [13] 张青. 乳牙牙髓干细胞聚合体来源外泌体在牙髓再生中的作用研究 [D]. 西安:空军军医大学, 2019.
- [14] Pan L, Zhang C, Zhang H, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-5134-5p interferes with alveolar bone homeostasis by targeting the JAK2/STAT3 axis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 3727-3744. DOI: 10. 2147/IJN. S413692.
- [15] 张淑婷,吴亚星,刘翠翠,等. 外泌体在骨髓间充质干细胞骨向分化及其在牙周再生中的研究进展 [J]. *口腔医学*, 2022, 42 (8): 741-744. DOI: 10. 13591/j. cnki. kqyx. 2022. 08. 013.

(收稿日期 2024-05-06)

(本文编辑:甘慧敏)