

• 口腔组织再生专栏 •

经脂多糖和低氧预处理来源的外泌体在组织修复再生中的作用研究进展

陈三 杨润泽 吴家媛

遵义医科大学附属口腔医院牙体牙髓科 遵义 563000

[摘要] 作为促进组织再生的有效工具，外泌体具有免疫原性低、功能性质稳定、无细胞毒性等特点，在组织修复再生领域具有广阔前景。随着预处理方式的兴起，与单纯培养来源的外泌体不同，经预处理来源的外泌体具有增强的生物学特性，且不同预处理方式来源的外泌体可能具有不同的生物学功能。目前的预处理方式以脂多糖和低氧预处理多见，两种方式均可产生优质的外泌体。本文通过描述外泌体在组织修复再生中的作用，引入脂多糖和低氧预处理方式对外泌体的功能优势影响，重点阐述两种预处理来源的外泌体在组织修复再生中的作用潜力，探讨其在血管再生、骨再生、软骨再生、神经保护以及口腔组织再生领域的影响，为优化组织再生提供新的思路。

[关键词] 外泌体；预处理；脂多糖；低氧；组织再生；组织修复

[中图分类号] R78 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2024035



开放科学（资源服务）
标识码（OSID）

Research progress on the role of exosomes derived from lipopolysaccharides and hypoxic preconditioning in the repair and regeneration of tissues

Chen San, Yang Runze, Wu Jiayuan

Dept. of Cariology and Endodontics, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81460102); Guizhou Provincial Science and Technology Program Project (ZK[2022]-638); Science and Technology Fund Project of Guizhou Provincial Health Commission (gz-wjkj2020-1-163); Zunyi Science and Technology Plan Project [Zunyi Kehe HZ Zi (2020) No. 293]

Correspondence: Wu Jiayuan, Email: wujiayuan@zmu.edu.cn

[Abstract] Exosomes are characterized by low immunogenicity, stable functional properties, and non-cytotoxicity and are effective for the promotion of tissue regeneration. The use of exosomes opens up a wide range of prospects in the field of tissue repair and regeneration. Exosomes from pre-treated sources possess enhanced biological properties compared with exosomes from culture alone. Exosomes from different pretreatment methods may have different biological functions. Various pretreatment methods, including pretreatment with lipopolysaccharides and hypoxia, can produce high-quality exosomes. However, few studies have investigated on the application of exosomes derived from these pretreatment methods in the field of tissue repair and regeneration. This article describes the role of exosomes in tissue repair and regeneration, introduces the functional advantages of exosomes derived from lipopolysaccharide and hypoxic preconditioning, and focuses on the potential of such exosomes in tissue repair and regeneration. The effects of exosomes on angiogenesis, bone regeneration, cartilage regeneration, neuroprotection, and oral tissue regeneration are discussed. This work

provides new ideas for optimizing tissue regeneration.

[Key words] exosome; pretreatment; lipopolysaccharide; hypoxia; tissue regeneration; tissue repair

[收稿日期] 2023-08-05; **[修回日期]** 2024-01-21

[基金项目] 国家自然科学基金 (81460102); 贵州省科技计划项目 (ZK[2022]-638); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (gz-wjkj2020-1-163); 遵义市科技计划项目 [遵市科合HZ字 (2020) 293号]

[作者简介] 陈三, 住院医师, 硕士, Email: 704450920@qq.com

[通信作者] 吴家媛, 教授, 博士, Email: wujiayuan@zmu.edu.cn

外泌体 (exosome, Exo) 属于细胞外囊泡的一种, 包含各种生物活性蛋白质和RNA, 在细胞

间通讯中至关重要。Exo具有与其母细胞相似的生物学功能,并且具有非增殖性和低免疫原性,在再生医学领域具有非常广阔的临床应用前景。来源于间充质干细胞的外泌体(mesenchymal stem cells-exosome, MSCs-Exo)具有抗凋亡、抗炎、修复组织损伤以及促组织生成等作用。相比于单纯培养细胞产生的Exo,细胞经预处理刺激后分泌的Exo产量增加,生物学作用显著增强,而且经不同预处理方式作用的细胞来源Exo的生物学特性及作用效果不同^[1-2]。目前Exo的预处理方式主要包括细胞因子预处理、低氧预处理、物理刺激、药物激素预处理、三维培养、基因修饰和组织工程改建等,这些处理方式都可以增强MSCs-Exo的治疗效果。应用于组织修复再生领域的Exo主要以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)与低氧预处理多见,其他预处理方式在一定程度上参与了组织再生过程,而不同预处理方式下Exo对组织再生的具体效果如何,有效作用浓度条件,哪种处理方式下的Exo对组织修复再生的作用更有效等尚少见报道。本文主要对LPS与低氧预处理在组织再生修复中的作用进行综述,以优化组织再生工程,为开发应用组织再生修复策略提供新思路。

1 Exo概述

1.1 Exo特点

Exo是细胞外囊泡中的一种优势囊泡,携带有蛋白质和核酸类等信息物质,参与调节细胞间的信息交流,并可增强组织再生效果,在细胞间信号传导和组织损伤修复中起关键作用^[3]。Exo来源广泛,功能特性稳定,生物相容性好,免疫原性低,致畸致瘤性低,作用高效;此外,作为“无细胞”疗法符合道德伦理的要求,在再生医学领域中较干细胞更具吸引力^[4-5]。Exo内化到受体细胞中有3种潜在机制,包括胞吞作用、配体/受体识别和质膜直接融合。在受体靶细胞中,Exo通过生物信息的调控与转导使其释放相关的信号分子与活性物质,从而高效触发相应的生物学作用^[6],包括增殖、迁移、黏附、转录和分化等效应。Exo在众多研究领域具有突出的功能作用与研究潜力,存在良好的应用前景,可能在抑制炎症,诱导血管生成,预防纤维化,增加神经元存活和保护,刺激组织修复再生和调节免疫反应等方面发挥优势作用,越来越受到广大研究者的青睐。

1.2 Exo促进组织修复再生

间充质干细胞衍生的Exo可以复制其亲代细胞的抗炎、抗凋亡、促组织生成和修复的作用,被认为是基于细胞疗法的替代品。Duan等^[7]研究发现:心肌梗死患者血清来源的Exo可促进脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的增殖、迁移和血管形成,并增强主动脉环微血管的生长。其作用机制在于miR-126在血管内皮细胞中高表达,Exo可能通过miR-126-3p增加低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,最终促进血管生成。这为Exo在急性心肌梗死后血管生成中的作用提供了新的认识,但具体机制尚需进一步探讨,可能涉及miR-126-3p和HIF-1 α 的正反馈环路,需要在未来的研究中进行验证。神经营养因子的高效和稳定输送是为周围神经再生提供适宜微环境的关键因素。神经营养因子-3是外周神经再生过程中重要的神经营养因子。研究^[8]发现:负载神经营养因子-3的脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells, ADSCs)来源的Exo显著促进了神经再生,修复大鼠坐骨神经缺损,这表明Exo不仅可直接参与作用,还具有搭乘载体协同作用的功能,为优化Exo功能特性提供了新的思路。有学者^[9-10]将牙髓组织来源的Exo用于牙髓再生研究,观察到大量新生牙本质沉积在原有牙本质壁上,同时存在牙髓样组织及神经血管组织生成,并且几乎充满整个髓腔。除此以外,Exo还应用于肝再生^[11]、骨骼肌再生^[12]、角膜上皮及基质再生^[13]、头发再生^[14]等组织再生工程。有研究^[15]发现:在单纯培养获得Exo的基础上,经预处理条件来源的干细胞Exo在组织修复再生中具有更强的功能作用,且不同细胞来源或不同状态下分泌的Exo功能有所不同,所携带的生物学信息与其所处的微环境密切相关。研究Exo的供体细胞预处理方式及不同预处理方式产生的Exo的作用效果具有非常重要的价值,同时能促进对组织再生修复过程和机制的更深层次的理解,对再生效果起到优化作用。

2 预处理方式

尽管天然Exo具有巨大的作用潜力与广阔的应用前景,但仍存在许多局限性:常规培养条件获

得的Exo产量较低；母细胞经过多代复制体外培养后发生衰老，通常会导致其分泌的Exo疗效降低；由于天然Exo的固有特性，对体内损伤部位的靶向性较差等^[15-16]。迫切需要探索和开发新的方法来提高Exo的产量、靶向性和疗效，同时又不影响其功能。研究^[16-17]表明：改变细胞的培养条件或预处理细胞，是提高细胞来源Exo产量和疗效的适应性策略，包括三维培养、低氧/缺氧诱导、细胞因子预处理、药物/激素预处理、物理信号刺激以及工程化修饰方法等，这些预处理方式可能通过改变细胞表型、性状、结构和功能等，从而影响Exo分泌的数量和内容物，增强其作用潜力，在组织再生与修复领域具有突出的应用前景^[18]。

目前，以LPS为代表的细胞因子预处理和低氧预处理两种方式的应用较为广泛，在组织再生领域展现出明显的优势，值得进一步归纳总结；药物/激素预处理和物理信号刺激相对便捷，更值得作为临床策略进行探索；而三维培养和工程化修饰方法制作烦琐，要求严格，需要特殊的仪器与设备，成本较高，但可获得优质的Exo。

2.1 LPS 预处理

细胞因子种类繁多，各具不同的优势，其中LPS最具代表性，是目前应用较多的炎症刺激方式。研究^[10,19]表明：适度炎症条件下，细胞分泌的Exo增多，经LPS预处理后来源的Exo可更有效地促进细胞增殖和分化，并且能优化血管形成，提高Exo的抗炎、抗凋亡、组织再生等能力。细胞来源可决定Exo的主要功能，不同的细胞经LPS预处理后，作用效果会有所不同；而LPS浓度不同，作用时间不一致，效果也会有所差异^[20-21]。研究发现：经250 ng/mL LPS预刺激牙囊细胞（dental follicle cells, DFCs）24 h后产生的Exo，可以促进牙周膜细胞（periodontal ligament cells, PDLcs）的增殖迁移和成骨分化，而且100 μg/mL LPS-DFCs-Exo较10 μg/mL LPS-DFCs-Exo对PDLcs的成骨分化作用更强^[21]；而来源于1 μg/mL LPS预处理4 h的牙周膜成纤维细胞（periodontal ligament fibroblasts, PDLFs）的Exo，可通过下调成骨相关基因及蛋白的表达来诱导破骨细胞生成，刺激骨吸收，抑制成骨分化^[22]。牙髓干细胞（dental pulp stem cells, DPSCs）经1 μg/mL的LPS预处理48 h和72 h后，Exo和LPS-Exo物理表型一致，作用相近，但LPS-Exo促进牙髓再生效果更为明显；预处理48 h的LPS-Exo主要促进了细胞的迁移和牙源性

分化^[19]，而预处理72 h的LPS-Exo则显著促进了牙髓再生^[10]。预处理的细胞种类和质量分组对Exo的作用效果存在一定影响，甚至出现完全相反的效应，因此探索各种细胞的最佳预处理浓度以及Exo的最佳浓度，可能是未来进一步探索的方向。

2.2 低氧预处理

在组织损伤修复工程中，细胞微环境除了遭遇上述炎症刺激外，还常伴随有低氧环境产生。氧密度的降低可使细胞功能活性发生一定的变化。长期处于低氧环境时，细胞活性降低，功能受抑制，可能与细胞营养物质摄取障碍，以及细胞与外界交流通道关闭等有关。与低氧持续状态不同，低氧预处理仅使低氧环境作用细胞一定时间，不但不会降低细胞的活性，反而会增强间充质干细胞活性，HIF-1α、VEGF、碱性磷酸酶、骨钙素和I型胶原蛋白的表达增加，促使钙盐沉积，增强成骨并促进血管形成^[23]。在同步体内研究^[23]中，得到了类似的增强效应，提示缺氧预处理会导致间充质干细胞活性增强，功能性得到优化。但经缺氧预处理的间充质干细胞产生的Exo是否也具有类似的效应还未得到充分验证。Zhu等^[24]发现：来自缺氧预处理的骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs）的Exo通过传递miRNA-210、中性鞘磷脂酶2增强了新血管形成和心肌修复的功能。还有研究^[25]发现：负载于黏性水凝胶中的低氧MSCs-Exo通过显著上调HIF-1α和VEGF的表达，实现了创伤性脊髓损伤后的血管生成和功能恢复，提示低氧MSCs-Exo在治疗中枢神经系统创伤和其他缺血性疾病方面具有巨大的潜力。Exo被水凝胶包裹，可持续缓慢释放，有效发挥功能，也提示预处理Exo与支架材料等因素联合可能有利于增强Exo的作用效果。此外，低氧可能与血管生成密切相关。Liu等^[26]发现：低氧预刺激人脐带间充质干细胞衍生的Exo，可通过激活HIF-1α，介导miR-126表达上调，进而通过抑制Sprouty相关EVH1结构域含蛋白1（sprouty-related EVH1 domain-containing protein 1, SPRED1）的活性来促进内皮细胞增殖和迁移，从而激活Ras蛋白/细胞外信号调节激酶（Ras proteins/extracellular signal regulated kinases, Ras/Erk）信号通路，即SPRED1/Ras/Erk通路促进血管生成。类似地，与常氧相比，低氧预处理的ADSCs来源的Exo，其VEGF/VEGF受体的表达显著增加^[27]，具有更高的血管生成能力，且这种作用由激活蛋白激酶A

(protein kinase A, PKA) 信号通路介导^[28]。另一项研究^[29]显示:除了上调VEGF的表达,缺氧预处理的BMSCs产生的Exo还可通过高迁移率组盒1蛋白(high-mobility group box 1 protein, HMGB1)激活c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/HIF-1 α 途径增强血管生成。这些研究表明:缺氧预处理间充质干细胞来源的Exo,可能通过多种不同或联合的信号通路促进血管生成,但系统的血管生成信号通路及每种通路的具体作用机制有待进一步探索。

3 预处理来源的Exo在组织修复再生中的应用

基于“无细胞疗法”的再生结果在很大程度上是由细胞的旁分泌因子介导的,如Exo,这提示细胞衍生的旁分泌因子具有很强的再生潜力,在再生医学领域广受青睐。已有多项研究^[16-17,30]探索Exo作为无细胞治疗剂的再生潜力和应用前景。Exo含有包括微小RNA(microRNA, miRNA)、mRNA以及蛋白质等在内的信息载体,可以介导细胞间的通讯,而细胞预处理可以帮助其产生富含特定miRNA、mRNA和/或蛋白质的Exo,促使其产生的Exo活性增强,分泌量增多,物质表达更为丰富,作用效应更为高效^[10,16,30]。由此可见,通过预处理方法,以低氧和LPS预处理为代表对细胞进行干预,可以达到充分利用预处理来源Exo的优势,支持靶器官和组织修复再生的目的。

3.1 血管再生

血管生成几乎是各组织再生的基础。低氧可促进间充质干细胞的增殖、迁移、分化潜能和旁分泌作用,间充质干细胞衍生的Exo在低氧条件下同样表现出增强的血管生成效能;类似地,Wu等^[31]采用LPS预处理从ADSCs培养基中分离的Exo,发现Exo明显促进了HUVECs迁移和血管形成。肿瘤衍生的Exo可以通过重塑肿瘤微环境,调节细胞增殖、侵袭、转移、血管生成和辐射抗性,从而促进不同癌症的进展。目前辐射条件是否对Exo产生影响,以及在辐射和不同氧浓度条件下,Exo在癌症进展中的作用还知之甚少。目前发现辐射可以促进角质形成细胞、人乳腺癌细胞和人前列腺癌细胞的Exo分泌,且明显影响Exo的释放量和内容物组成^[32-34]。有学者^[35]探讨了辐射和低氧对肺癌细胞的影响。该研究设立了常氧(21% O₂)组、常氧辐照组、低氧(1% O₂)组和低氧辐照

组,分别收集其来源的Exo与HUVECs共培养,结果发现:受低氧和/或辐照预处理的肺癌细胞释放的Exo,对肺癌细胞的增殖、侵袭和迁移有更为显著的促进作用,并对HUVECs的增殖、内皮血管的形成也有明显的增强效果。该结果表明:肺癌细胞的Exo可以增加其受体肺癌细胞的转移,促进HUVECs的血管生成,而辐射和/或低氧预处理则进一步增强了这一作用。目前还需要进一步的研究来确定低氧辐射如何影响血管生成以及预处理来源的Exo如何介导肺癌的进展,以期作为恶性肿瘤的诊断生物标志物和有效的临床治疗靶点。目前的研究提示联合预处理方式可能有助于增强其作用效果,这为下一步研究提供了新的方向。

3.2 神经再生与保护

当中枢神经系统受损时,小胶质细胞被激活,影响星形胶质细胞的转化,而Exo是小胶质细胞和星形胶质细胞之间沟通的重要媒介之一。Ye等^[36]发现:经LPS预处理后,小胶质细胞的形态有所变化,如突起变短和细胞体变大等,炎症因子表达明显升高,提示在LPS处理后,小胶质细胞被激活;该研究者同时收集LPS刺激小胶质细胞产生的Exo作用于星形胶质细胞,发现Smad3水平越高,星形胶质细胞的增殖越明显;但通过上调LPS-Exo中miR-145-5p的表达,抑制了损伤早期星形胶质细胞的增殖,有利于神经功能的恢复。该研究证实:miR-145-5p是星形胶质细胞增殖的负调节因子,其下调反过来可促进Smad3活性,从而促进星形胶质细胞的增殖,提示LPS-Exo中的miR-145-5p可能是影响星形胶质细胞增殖的关键因素之一,为神经损伤的修复机制提供了思路。星形胶质细胞Exo反过来也可以影响少突胶质前体细胞的作用。Xu等^[37]发现:低氧预处理星形胶质细胞衍生的Exo也可促进少突胶质前体细胞的增殖、分化和迁移,成为神经髓鞘再生和修复的潜在治疗靶点,但仅限于轻度低氧条件,严重低氧则抑制了细胞的增殖。这一结果再次提示:低氧预处理因素可能具有时间及浓度依赖性,且Exo的作用浓度是否存在一定影响也有待进一步研究。

3.3 骨再生

严重创伤、肿瘤切除、组织缺血坏死和先天性发育缺陷可导致骨缺损,组织工程骨修复已成为一种有效的治疗策略。Yuan等^[38]研究了低氧预处理来源的Exo对激素诱导的股骨头坏死的治疗效

果, 结果发现: 与常氧条件相比, 低氧预处理 BMSCs 来源的 Exo 显著促进了 HUVECs 的增殖、迁移和血管形成, 并可预防骨丢失, 增加股骨头血管容积, 提示低氧预处理具有良好的骨再生效果, 但低氧预处理来源的 Exo 改善激素诱导的股骨头坏死的确切分子机制尚待研究。二甲苄草酰甘氨酸 (dimethylloxaloylglycine, DMOG) 是一种脯氨酰羟化酶抑制剂, 可以发挥低氧效果。与降低氧浓度制造的物理性缺氧不同, DMOG 主要通过抑制 HIF-1 α 降解而模拟低氧环境发挥化学性缺氧作用, 改善骨组织愈合能力。Liang 等^[39] 使用 DMOG 预处理 BMSCs 衍生的 Exo, 在颅骨缺损大鼠模型体内诱导 8 周, 结果发现: DMOG-BMSCs-Exo 通过靶向丝氨酸/苏氨酸激酶 (又称蛋白激酶 B) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (protein kinase B/mammalian target of rapamycin, AKT/mTOR) 通路显著促进了骨再生。目前在骨再生工程中, 主要使用低氧预处理, LPS 预处理的研究较为少见, 但二者都表现了增强的作用效应。因骨缺损存在成骨细胞与破骨细胞, 除了促进骨再生的一方面, 是否存在预处理来源的 Exo 抑制骨形成的另一方面, 值得进一步探索与研究。

3.4 软骨再生

与其他间充质干细胞相比, 滑膜间充质干细胞 (synovial mesenchymal stem cells, SMSCs) 具有软骨再生的组织特异性优势。研究^[40] 表明: 与 Exo 相比, 经 LPS 预处理 SMSCs 后分泌的 Exo 可显著促进软骨细胞的增殖和迁移, 抑制其凋亡, 有效地保护软骨免受损伤, 促进软骨再生。类似地, 与常氧条件相比, 低氧环境来源的 BMSCs-Exo 对软骨修复亦具有促进作用。磷酸酶和张力蛋白磷酸酶同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN) 可调控细胞内磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 3-磷酸酶的表达水平, 是磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinases/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路的一部分, 通过 miR-205-5p/PTEN/AKT 通路有效促进软骨细胞的增殖、迁移、合成代谢和抗炎功能; 此外, 该团队还制造了一种可注射的丝纤维蛋白水凝胶来保存和缓慢持续释放低氧 BMSCs-Exo, 修复软骨缺损并有效促进了体内软骨再生^[41]。这一结果再次提示低氧预处理来源的 Exo 与支架材料等组成的复合物有助于增强 Exo 功能特性, 两者联合作用可能有助于 Exo 更好的发挥功能。

3.5 口腔组织再生修复

3.5.1 牙髓再生

牙髓对生理性牙根发育、营养支持以及病理性防御反应等至关重要, 它仅从狭窄的根尖孔接受血液供应, 因此牙髓再生是一项艰巨且具有挑战性的任务。Exo 可促进牙髓再生, 经预处理来源的 Exo 在牙髓再生中也具有显著的优势效应^[42]。施万细胞 (Schwann cells, SCs) 可分化为成牙本质细胞, Li 等^[19] 探索了经 LPS 预刺激产生的 DPSCs-Exo 对 SCs 的作用, 结果发现 LPS-DPSCs-Exo 通过促进矿化结节形成, 更好地促进 SCs 的成牙本质分化和成骨分化。除了 SCs, LPS-DPSCs-Exo 也增强了 BMSCs 的成牙本质和成骨分化诱导水平, 与 DPSCs-Exo 相比, 其 VEGF 和神经束蛋白表达显著增高, 在培养 30 d 的小鼠体内牙根模型中, 观察到新血管生成增加, 胶原形成及新生矿化组织规则排列在原有根管壁上, 形成了与正常组织极为相似的牙髓样组织^[10]。在一项牙髓再生体内研究^[43] 中, 通过建立无牙髓根管模型比较了 LPS-DPSCs-Exo 和 DPSCs-Exo 对牙髓再生的促进作用, 结果观察到 LPS-DPSCs-Exo 新生牙髓组织和血管数量较多, 当同时联合基质细胞衍生因子-1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) 时, LPS-DPSCs-Exo 作用显著增强, 其矿化组织更规则, 胶原纤维排列更加整齐, 显示出更强的成牙髓能力。上述研究证实了 LPS 预刺激产生 Exo 的可行性, 分别促进了成牙本质和成骨分化、血管形成以及牙髓组织再生。除了 LPS 刺激外, 牙髓根尖周组织还易受到低氧环境侵蚀, 因此低氧因素是否与 LPS 刺激类似, 影响着牙髓组织再生亦值得探索。DPSCs-Exo 似乎在牙髓再生方面显示出独特的优势, 基于同位素标记相对与绝对定量技术 (isobaric tag for relative and absolute quantification, iTRAQ) 的蛋白质组学分析^[44] 表明: 在低氧预处理下, DPSCs 含有较多的血管生成相关蛋白, 如 HIF-1 α 、VEGF 等, 有助于组织再生。为了更好地重现它们的原始特性, 并促进再生反应, Li 等^[45] 采用 2% O₂ 模拟 DPSCs 低氧微环境, 以常氧 (21% O₂) 条件为对照, 发现低氧组通过上调促血管生成因子表达显著增强了 HUVECs 的增殖、迁移和血管生成, 其中赖氨酰氧化酶样 2 (lysyl oxidase-like 2, LOXL2) 对细胞增殖和迁移起着积极的作用, 参与血管生成、血管保护与修复作用。当沉默低氧和常氧组 HUVECs 中的 LOXL2 后, 结果发现: 在低氧预处理来源的 DPSCs-Exo 组,

LOXL2沉默被缓解,促进了血管生成。由此推测,缺氧预处理来源的DPSCs-Exo可能上调LOXL2的表达,弥补了HUVECs中LOXL2的不足,部分挽救了LOXL2沉默对HUVEC血管形成的抑制作用,相对促进了血管的形成。为阐明Exo-LOXL2是否介导低氧预处理来源Exo的血管生成作用,该团队进一步的研究^[46]结果显示:利用慢病毒转染技术沉默DPSCs-Exo中的LOXL2,部分降低了低氧预处理来源的DPSCs-Exo对HUVEC迁移和体外血管形成的促进,表明LOXL2在一定程度上参与了低氧预处理来源的DPSCs-Exo的血管生成作用。对Exo-LOXL2促进血管生成的潜在机制进行探索发现:血管内皮细胞生长因子A、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、MMP-9和SDF-1是HUVECs中可能受Exo-LOXL2调控的血管生成因子。上述研究表明:沉默HUVECs中的LOXL2可抑制其增殖和迁移,考虑到低氧时DPSCs表现出增殖和迁移能力增强,Exo分泌量增加,提示低氧预处理来源的DPSCs-Exo可能通过LOXL2上调表达促进HUVECs的增殖和迁移,增强其血管生成,有利于牙髓组织的修复和再生。而当低氧预处理来源的DPSCs-Exo中的LOXL2被沉默后,则降低了其在体外对血管生成的促进作用,提示LOXL2是低氧预处理来源的DPSCs-Exo促进血管生成的关键因素。为低氧预处理来源的DPSCs-Exo在再生医学中的应用提供了新的认识。蛋白质组学分析^[45]显示:在低氧环境中,有79种蛋白质的表达显著不同,表明低氧预处理促进组织再生可能是由于改变了DPSCs来源的Exo的蛋白质组谱所致。除蛋白层次的研究以外,Lin等^[47]也进行了分子水平的探索,发现低氧诱导根尖牙乳头干细胞衍生的Exo可以促进HUVECs血管生成,其机制可能与上调miR-126表达,抑制SPRED1并激活ERK信号通路有关。该结果提示:低氧预处理可能是一种提高Exo的血管生成能力的可行方法,可作为一种有前途的无细胞牙髓再生策略进行深入研究。上述研究初步探索了经LPS与低氧预处理来源的Exo对牙髓再生作用的效果,尤以LPS预处理作为典型方式,而低氧预处理似乎更具有应用前景。目前的研究仅限于低氧预处理来源的Exo参与血管生成方面,在牙髓再生领域,参与成骨和成牙本质分化及神经生成的研究还较为少见,有待进一步探索。

3.5.2 牙周再生 牙髓与牙周紧密联系,具有相

同的细胞起源——神经嵴细胞。牙周组织处于动态改建过程中,牙髓组织也在进行永久性重塑。Exo可以促进细胞的增殖、迁移和成骨分化,不仅可作用于正常牙周组织环境,当牙周组织发生炎症以及不良因素损伤时,Exo还可以显著促进组织的再生与修复。预处理来源的Exo是否与在牙髓再生的作用类似,在牙周组织再生方面是否也具有潜力与优势,有待进一步研究。Shi等^[21]发现:LPS预处理可以显著促进DFCs分泌Exo,经LPS预处理DFCs来源的Exo比单纯培养DFCs来源的Exo能更加有效地促进牙周炎PDLFs的增殖,增强其迁移和成骨分化能力,同时在体内应用负载LPS-DFCs-Exo的水凝胶支架植入实验性大鼠后,可以促进初期骨的缺损修复再生,维持治疗后期骨的修复水平。Huang等^[48]研究表明:LPS-DFCs-Exo在抑制牙周炎牙槽骨丢失和促进组织再生方面具有明显优势,可能与活性氧/促分裂原活化蛋白激酶(reactive oxygen species/mitogen-activated protein kinase, ROS/MAPK)信号通路介导的抗氧化作用有关,且高浓度LPS预刺激产生的Exo相对于低浓度LPS预刺激的成骨作用更强。LPS预处理PDLFs衍生的Exo被整合到成骨细胞中时,通过高表达肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β ,抑制碱性磷酸酶、I型胶原、Runx2和骨保护素的表达,诱导炎症发生并抑制成骨分化,显著抑制牙周骨组织的形成^[22],再次证明同一预处理方式作用于不同细胞,可能产生不同的作用效果,甚至结果截然相反。这些研究表明LPS预处理产生的Exo既可以促进牙周骨组织再生,也可以抑制骨形成,与其所处的微环境密切相关。除了炎症刺激外,致密的骨质和狭小的解剖空间也使得牙周组织易受到低氧环境的影响。在乳牙生理性根吸收开始时,牙髓组织中的血管减少,氧气利用率降低,在这种缺血性场景中,如何调节生理功能十分重要。研究^[49]表明:低氧预处理脱落乳牙干细胞,Exo释放增多,显著增强了细胞的生长、迁移和血管形成。let-7家族和miR-210-3p是低氧反应性miRNA,Rab GTP酶家族成员Rab27a是外泌体生物发生和分泌的关键介质,通过miRNA测序分析和相关信号通路验证,发现低氧预处理调节的Exo释放增加可能与Rab27a有关,通过转移let-7f-5p和miR-210-3p从而增强血管生成,以补偿生理性牙根吸收和血管减少时发生的生理性缺血,为替牙期生理性环境变化的牙

周代偿作准备^[49]。

上述研究表明：预处理有可能作为一种新的治疗策略用于口腔组织再生工程，但目前大多数研究局限于LPS与低氧预处理方面，且局限于牙髓和牙周再生领域，其他预处理方式及牙相关的组织再生研究较为少见，值得进一步探索。

4 总结与展望

Exo在组织再生修复领域已取得了一定的治疗效果，而经预处理来源的Exo也逐渐进入研究领域。本文通过回顾文献，发现不同状态下的LPS与低氧预处理方式来源的Exo参与组织再生的潜力不同，经预处理来源的Exo功能特性得到了显著的改善，在血管再生、骨再生、软骨再生、神经保护以及口腔组织再生等方面具有较好的效果，同时也指出Exo在各组织再生领域应用中存在的不足与限制。目前有关Exo参与组织再生与修复的预处理方式多集中在LPS与低氧预处理方式上，将来需要对更多的预处理方式及其产生的Exo进行深层次研究与总结，为优化组织再生提供新思路，为口腔组织再生领域开发新视角。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

5 参考文献

- [1] 艾晓青, 窦磊. 外泌体优化策略的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(16): 190-192.
Ai XQ, Dou L. Research progress of exosome optimization strategies[J]. Clin Res Pract, 2021, 6(16): 190-192.
- [2] 刘威. 预处理的外泌体对骨质疏松骨整合及糖尿病创面修复作用的研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2021.
Liu W. Study on the effect of pretreated exosomes on bone integration in osteoporosis and diabetic wound repair[D]. Shanghai: PLA Naval Medical University, 2021.
- [3] Azoidis I, Cox SC, Davies OG. The role of extracellular vesicles in biomineralisation: current perspective and application in regenerative medicine[J]. J Tissue Eng, 2018, 9: 2041731418810130.
- [4] 陈彦, 杨雪婷, 马悦, 等. 基于外泌体的牙髓再生策略[J]. 中华口腔医学杂志, 2021, 56(7): 709-714.

- Chen Y, Yang XT, Ma Y, et al. Exosomes-based strategies for dental pulp regeneration[J]. Chin J Stomatol, 2021, 56(7): 709-714.
- [5] Mai ZZ, Chen H, Ye Y, et al. Translational and clinical applications of dental stem cell-derived exosomes[J]. Front Genet, 2021, 12: 750990.
- [6] Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavie 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.
- [7] Duan S, Wang C, Xu X, et al. Peripheral serum exosomes isolated from patients with acute myocardial infarction promote endothelial cell angiogenesis via the miR-126-3p/TSC₁/mTORC1/HIF-1 α pathway[J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 1577-1592.
- [8] Yang Z, Yang Y, Xu YC, et al. Biomimetic nerve guidance conduit containing engineered exosomes of adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 442.
- [9] Chen Y, Ma Y, Yang XT, et al. The application of pulp tissue derived-exosomes in pulp regeneration: a novel cell-homing approach[J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17: 465-476.
- [10] Chen WJ, Xie J, Lin X, et al. The role of small extracellular vesicles derived from lipopolysaccharide-preconditioned human dental pulp stem cells in dental pulp regeneration[J]. J Endod, 2021, 47(6): 961-969.
- [11] Jiao Y, Lu W, Xu P, et al. Hepatocyte-derived exosome may be as a biomarker of liver regeneration and prognostic valuation in patients with acute-on-chronic liver failure[J]. Hepatol Int, 2021, 15(4): 957-969.
- [12] Byun SE, Sim C, Chung Y, et al. Skeletal muscle regeneration by the exosomes of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. Curr Issues Mol Biol, 2021, 43(3): 1473-1488.
- [13] Tang QM, Lu B, He J, et al. Exosomes-loaded thermosensitive hydrogels for corneal epithelium and stroma regeneration[J]. Biomaterials, 2022, 280: 121320.
- [14] Wu JY, Yang QY, Wu SN, et al. Adipose-derived stem cell exosomes promoted hair regeneration[J]. Tissue Eng Regen Med, 2021, 18(4): 685-691.

- [15] Ramasubramanian L, Kumar P, Wang AJ. Engineering extracellular vesicles as nanotherapeutics for regenerative medicine[J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 48.
- [16] Chen SY, Sun FT, Qian H, et al. Preconditioning and engineering strategies for improving the efficacy of mesenchymal stem cell-derived exosomes in cell-free therapy[J]. *Stem Cells Int*, 2022, 2022: 1779346.
- [17] Phan J, Kumar P, Hao DK, et al. Engineering mesenchymal stem cells to improve their exosome efficacy and yield for cell-free therapy[J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1522236.
- [18] Joo HS, Suh JH, Lee HJ, et al. Current knowledge and future perspectives on mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic agent[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3):727.
- [19] Li J, Ju Y, Liu S, et al. Exosomes derived from lipopolysaccharide-preconditioned human dental pulp stem cells regulate Schwann cell migration and differentiation[J]. *Connect Tissue Res*, 2021, 62(3): 277-286.
- [20] Wang HS, Yang FH, Wang YJ, et al. Odontoblastic exosomes attenuate apoptosis in neighboring cells [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(11): 1271-1278.
- [21] Shi WW, Guo SJ, 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.
- [22] Zhao M, Dai W, Wang H, et al. Periodontal ligament fibroblasts regulate osteoblasts by exosome secretion induced by inflammatory stimuli[J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 105: 27-34.
- [23] Zhao H, Yeersheng R, Xia Y, et al. Hypoxia enhanced bone regeneration through the HIF-1 α / β -catenin pathway in femoral head osteonecrosis[J]. *Am J Med Sci*, 2021, 362(1): 78-91.
- [24] Zhu J, Lu K, Zhang N, et al. Myocardial reparative functions of exosomes from mesenchymal stem cells are enhanced by hypoxia treatment of the cells via transferring microRNA-210 in an nSMase2-dependent way[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(8): 1659-1670.
- [25] Mu JF, Li LM, Wu JH, et al. Hypoxia-stimulated mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded by adhesive hydrogel for effective angiogenic treatment of spinal cord injury[J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(7): 1803-1811.
- [26] Liu W, Li LW, Rong YL, et al. Hypoxic mesenchymal stem cell-derived exosomes promote bone fracture healing by the transfer of miR-126[J]. *Acta Biomater*, 2020, 103: 196-212.
- [27] Han YD, Ren J, Bai Y, et al. Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019, 109: 59-68.
- [28] Xue CL, Shen YM, Li XC, et al. Exosomes derived from hypoxia-treated human adipose mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through the PKA signaling pathway[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(7): 456-465.
- [29] Gao WL, He RH, Ren JH, et al. Exosomal HMGB1 derived from hypoxia-conditioned bone marrow mesenchymal stem cells increases angiogenesis via the JNK/HIF-1 α pathway[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(5): 1364-1373.
- [30] Haque N, Widera D, Govindasamy V, et al. Extracellular vesicles from stem and progenitor cells for cell-free regenerative therapy[J]. *Curr Mol Med*, 2022, 22(2): 120-131.
- [31] Wu SC, Kuo PJ, Rau CS, et al. Increased angiogenesis by exosomes secreted by adipose-derived stem cells upon lipopolysaccharide stimulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8877.
- [32] Wang JJ, Pothana K, Chen SZ, et al. Ultraviolet B irradiation alters the level and miR contents of exosomes released by keratinocytes in diabetic condition[J]. *Photochem Photobiol*, 2022, 98(5): 1122-1130.
- [33] Jabbari N, Nawaz M, Rezaie J. Ionizing radiation increases the activity of exosomal secretory pathway in MCF-7 human breast cancer cells: a possible way to communicate resistance against radiotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3649.
- [34] Pszczółkowska B, Olejarz W, Filipek M, et al. Exosome secretion and cellular response of DU145 and

- PC3 after exposure to alpha radiation[J]. *Radiat Environ Biophys*, 2022, 61(4): 639-650.
- [35] Mo F, Xu YW, Zhang JL, et al. Effects of hypoxia and radiation-induced exosomes on migration of lung cancer cells and angiogenesis of umbilical vein endothelial cells[J]. *Radiat Res*, 2020, 194(1): 71-80.
- [36] Ye Y, Hao J, Hong Z, et al. Downregulation of MicroRNA-145-5p in activated microglial exosomes promotes astrocyte proliferation by removal of Smad3 inhibition[J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(2): 382-393.
- [37] Xu YP, Tian YY, Wang Y, et al. Exosomes derived from astrocytes after oxygen-glucose deprivation promote differentiation and migration of oligodendrocyte precursor cells *in vitro*[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(7): 5473-5484.
- [38] Yuan N, Ge ZG, Ji WC, et al. Exosomes secreted from hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells prevent steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis in rats[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6655225.
- [39] Liang B, Liang JM, Ding JN, et al. Dimethylglycine-stimulated human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes enhance bone regeneration through angiogenesis by targeting the AKT/mTOR pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 335.
- [40] Duan A, Shen K, Li B, et al. Extracellular vesicles derived from LPS-preconditioned human synovial mesenchymal stem cells inhibit extracellular matrix degradation and prevent osteoarthritis of the knee in a mouse model[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 427.
- [41] Shen K, Duan A, Cheng J, et al. Exosomes derived from hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells laden in a silk hydrogel promote cartilage regeneration via the miR-205-5p/PTEN/AKT pathway [J]. *Acta Biomater*, 2022, 143: 173-188.
- [42] 杨润泽, 王玮, 陈三, 等. 外泌体及预处理方式对牙髓再生的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(13): 2105-2113.
- Yang RZ, Wang W, Chen S, et al. Effect of exosomes and preconditioning on pulp regeneration[J]. *Chin J Tiss Eng Res*, 2024, 28(13): 2105-2113.
- [43] 蓝彬园, 林熹, 陈文璠, 等. 脂多糖刺激人牙髓干细胞分泌的外泌体联合基质细胞衍生因子-1对牙髓再生的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2022, 57(1): 60-67.
- Lan BY, Lin X, Chen WJ, et al. Effect of lipopolysaccharide-stimulated exosomes from human dental pulp stem cells combined with stromal cell-derived factor-1 on dental pulp regeneration[J]. *Chin J Stomatol*, 2022, 57(1): 60-67.
- [44] Dou L, Yan Q, Liang P, et al. iTRAQ-Based proteomic analysis exploring the influence of hypoxia on the proteome of dental pulp stem cells under 3D culture[J]. *Proteomics*, 2018, 18(3/4). doi: 10.1002/pmic.201700215.
- [45] Li BY, Xian XH, Lin XW, et al. Hypoxia alters the proteome profile and enhances the angiogenic potential of dental pulp stem cell-derived exosomes[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(4): 575.
- [46] Li B, Liang A, Zhou Y, et al. Hypoxia preconditioned DPSC-derived exosomes regulate angiogenesis via transferring LOXL2[J]. *Exp Cell Res*, 2023, 425(2): 113543.
- [47] Lin X, Wang H, Wu T, et al. Exosomes derived from stem cells from apical papilla promote angiogenesis via miR-126 under hypoxia[J]. *Oral Dis*, 2023, 29(8): 3408-3419.
- [48] Huang YL, Liu Q, Liu L, et al. Lipopolysaccharide-preconditioned dental follicle stem cells derived small extracellular vesicles treating periodontitis via reactive oxygen species/mitogen-activated protein kinase signaling-mediated antioxidant effect[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 799-819.
- [49] Liu PP, Qin LH, Liu C, et al. Exosomes derived from hypoxia-conditioned stem cells of human deciduous exfoliated teeth enhance angiogenesis via the transfer of let-7f-5p and miR-210-3p[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 879877.

(本文编辑 吴爱华)