

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2022.01.003

· 基础研究 ·

牙髓干细胞来源凋亡小体调节巨噬细胞极化及炎症反应

宫晟凯^{1,2}, 杨晓珊², 窦庚², 李子涵², 刘思颖², 王伟³, 刘世宇²

1. 第四军医大学基础医学院, 陕西 西安(710032); 2. 军事口腔医学国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 陕西省口腔疾病国际联合研究中心, 第四军医大学口腔医院组织工程中心, 陕西 西安(710032); 3. 军事口腔医学国家重点实验室, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 陕西省口腔医学重点实验室, 第四军医大学口腔医院牙体牙髓病科, 陕西 西安(710032)

【摘要】目的 探讨牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)释放的凋亡小体(apoptotic bodies, ABs)对巨噬细胞极化及体内炎症反应的调节作用。**方法** 分离培养、鉴定人来源DPSCs并利用星孢菌素诱导其凋亡,对ABs进行表征鉴定。将体外培养的巨噬细胞分为对照组、LPS组以及LPS+ABs组,分别施加溶剂对照处理、LPS处理、LPS和ABs共处理,观察巨噬细胞对ABs的吞噬情况以及各组M型巨噬细胞标志物CD206表达及细胞因子释放水平的差异。构建小鼠皮肤创伤模型及小鼠葡聚糖硫酸钠结肠炎模型,分为PBS组、DPSCs组及ABs组,分别注射PBS对照、DPSCs及DPSCs来源的ABs,观察各组小鼠体重、损伤局部组织形态、CD206表达、组织再生及细胞因子表达等情况的差异。**结果** 分离培养的DPSCs表面标志物及分化潜能符合间充质干细胞特征。DPSCs在凋亡过程中释放的ABs符合典型凋亡小体特征。ABs可被体外培养的巨噬细胞吞噬,并提高LPS处理组巨噬细胞CD206表达、降低其促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的释放,同时增加炎症调节因子转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)的释放($P<0.01$)。在皮肤创伤模型中,尾静脉注射ABs显著提高皮肤缺损愈合速度($P<0.05$),降低创伤局部炎性因子表达($P<0.01$),并提高CD206阳性细胞数量($P<0.01$);在结肠炎模型中,ABs有效维持小鼠体重($P<0.05$)和结肠长度($P<0.01$),并显著增加局部CD206阳性细胞数量($P<0.01$)。**结论** DPSCs释放的ABs可促进M2型巨噬细胞极化并调节炎症反应,有望替代活细胞移植应用于炎症调节及组织再生。

【关键词】 牙髓干细胞; 巨噬细胞; 巨噬细胞极化; 炎症反应; 凋亡; 凋亡小体; 组织再生; 干细胞移植; 炎症调节

【中图分类号】 R78 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2022)01-0012-08

【引用著录格式】 宫晟凯, 杨晓珊, 窦庚, 等. 牙髓干细胞来源凋亡小体调节巨噬细胞极化及炎症反应[J]. 口腔疾病防治, 2022, 30(1): 12-19. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2022.01.003.

Dental pulp stem cell-derived apoptotic bodies regulate macrophage polarization and inflammatory response
GONG Shengkai^{1,2}, YANG Xiaoshan², DOU Geng², LI Zihan², LIU Siying², WANG Wei³, LIU Shiyu². 1. School of Basic Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi International Joint Research Center for Oral Diseases, Center for Tissue Engineering, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. State Key Laboratory of Military Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & Shaanxi Key Laboratory of Oral Diseases, Department of Operative Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【收稿日期】 2021-08-16; **【修回日期】** 2021-08-27

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31800817); 陕西省重点研发计划项目(No. 2021KW-61)

【作者简介】 宫晟凯, 本科, Email: kk3067017283@163.com

【通信作者】 刘世宇, 副教授, 博士, Email: liushiyu@vip.163.com, Tel: 86-29-84776151; 王伟, 副教授, 博士, Email: weiwang_0510@163.com, Tel: 86-29-84776073



微信公众号

Corresponding author: LIU Shiyu, Email: liushiyu@vip.163.com, Tel: 86-029-84776151; WANG Wei, Email: weiwang_0510@163.com, Tel: 86-029-84776073

【Abstract】 Objective To investigate the effects of apoptotic bodies (ABs) derived from dental pulp stem cells (DPSCs) on macrophage polarization and inflammation response *in vivo*. **Methods** Human DPSCs were extracted, cultured and identified. Staurosporine was used to apoptosis induction and differential methods were performed for ABs identification. The *in vitro* cultured macrophages were divided into 3 groups: solvent control, lipopolysaccharide (LPS), and the LPS+ABs. The macrophages were stimulated with LPS to induce inflammation followed by ABs treatment. In the untreated group, macrophages were added with an equal amount of solvent. The specific uptake of ABs by macrophages, the expression level of CD206 and the levels of inflammatory cytokines were analyzed. The mouse models of cutaneous wounds and dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis were established, and the mice were randomly divided into 3 groups: the PBS-treated group, the DPSCs-treated group, and the ABs-treated group. The mice were injected with the same volume of PBS, DPSCs and ABs, respectively. The body weight, histological pathology, the expression levels of CD206 and cytokines, and the extent of tissue regeneration were measured. **Results** DPSCs and ABs derived from DPSCs were successfully isolated and characterized. ABs could be taken up by macrophage. While lipopolysaccharide (LPS) induced production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), ABs significantly reduced the levels of these pro-inflammatory cytokines and increased the expression of transforming growth factor- β (TGF- β) and CD206 ($P < 0.01$). In the cutaneous inflammatory wound model, the wound closure rate in mice intravenously injected with ABs was significantly accelerated ($P < 0.05$). The administration of ABs markedly reduced the pro-inflammatory factors levels and increased the CD206⁺ cell number. In the colitis model, treatment with ABs markedly reduced the loss in bodyweight ($P < 0.05$), recovered the colon length ($P < 0.01$), and significantly increased the CD206⁺ cell number. **Conclusion** DPSCs-derived ABs could enhance macrophage M2 polarization and attenuate inflammation. Therefore, ABs could be used as a promising cell replacement for inflammatory regulation and tissue regeneration.

【Key words】 dental pulp stem cells; macrophages; macrophages polarization; inflammatory response; apoptosis; apoptotic bodies; tissue regeneration; stem cell transplantation; inflammatory regulation

J Prev Treat Stomatol Dis, 2022, 30(1): 12-19.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31800817) and the Key Research and Development Program of Shaanxi Province (No. 2021KW-61).

近年来,口腔组织来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在炎症调节及组织再生中得到了广泛的应用^[1-2],其中,牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)因具有高增殖活性、多项分化潜能^[3]以及免疫调节能力^[1],成为细胞移植治疗的重要细胞来源。细胞移植入宿主体内可通过分化和释放活性因子发挥治疗作用。然而,细胞移植治疗的机制,尤其是细胞移植后在宿主组织中的高比例、迅速的凋亡^[4-6]和其产生疗效之间的“矛盾现象”尚未阐明。细胞凋亡过程中可释放一种特殊的细胞外囊泡即凋亡小体(apoptotic bodies, ABs),前期研究发现ABs不仅是细胞凋亡产生的废物,还可调控机体骨稳态^[7]、代谢稳态^[8]、以及组织再生过程中的血管化^[6]。本实验拟通过观察DPSCs在凋亡过程中释放的ABs对巨噬细胞极化和炎症因子释放的影响,并利用小鼠皮肤创伤模型和葡聚糖硫酸钠结肠炎模型,探讨ABs对炎症调

节和组织再生的作用及其机制。

1 材料和方法

本实验人DPSCs的使用以及动物实验操作均已得到了第四军医大学口腔医院医学伦理委员会以及第四军医大学动物伦理委员会的批准。

1.1 DPSCs的分离培养与鉴定

采用组织块法培养原代细胞,并将得到的人牙髓干细胞,接种于培养瓶中,在37℃、5% CO₂的孵箱中培养,使用含有10%胎牛血清(Gibco,美国)、2 mM L-谷氨酰胺(Invitrogen,美国)和1%青霉素-链霉素(Invitrogen,美国)的 α -MEM(Gibco,美国)培养基进行培养。本实验所用细胞均为第3代或第4代细胞。

采用流式细胞术对DPSCs表面标记物进行鉴定,包括PE标记的CD90(eBioscience,美国)、CD105(BioLegend,美国)、CD45(BioLegend,美国)

和 FITC 标记的 CD73 (BioLegend, 美国)、HLA-DR (eBioscience, 美国)。用 CytoFLEX 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国) 进行检测。另外, 对 DPSCs 进行克隆形成实验、成脂分化能力检测 (油红 O 染色) 以及成骨分化检测 (茜素红 S 染色)。

1.2 DPSCs 来源的 ABs 的分离提取及鉴定

DPSCs 增殖到 80% ~ 90% 时, 加入 0.1 μ M 凋亡诱导剂星孢菌素 (Cell Signaling Technology, 美国) 作用 12 h。收集上清液, 800 g 离心 10 min, 去除沉淀, 上清转移至新的离心管, 16 000 g 离心 30 min 收集沉淀即为 ABs。通过扫描电镜 (scanning electron microscope, SEM) 和动态光散射分析 (dynamic light scattering, DLS) 观察 ABs 的形态及粒径分布。使用凋亡检测试剂盒 (七海生物, 中国) 检测 ABs 表面 Annexin V 阳性率, 使用流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国) 进行分析量化。

1.3 骨髓来源巨噬细胞的分离培养及分组

取 C57BL/6 小鼠股骨、胫骨, 用预冷 PBS 冲洗骨髓腔获得骨髓单细胞悬液。添加巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF, Peprotech, 美国) (20 ng/mL), 接种于细胞培养板中。体外实验分组为对照组、LPS 组以及 LPS+ABs 组, 分别对巨噬细胞施加溶剂对照处理、LPS 处理、LPS+ABs 共处理。

1.4 小鼠皮肤创伤模型的建立及分组

C57BL/6 小鼠创面大小为直径 1 cm 的圆形。将小鼠分为 3 组, 分别为 PBS 组、DPSCs 组以及 ABs 组, 分别于 0 d 和 3 d 通过尾静脉注射 DPSCs 单细胞悬液 (5×10^6 个/mL), 或 DPSCs 来源的 ABs (200 μ g/只), 每只小鼠注射总量为 100 μ L, PBS 组注射等体积的 PBS 缓冲液。

1.5 葡萄糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导小鼠结肠炎模型的建立及分组

将雌性 C57BL/6 小鼠连续 10 d 通过饮水给予 2.5% (w/v) 的 DSS (MP Biomedicals, 美国)。将小鼠分为 PBS 组、DPSCs 组以及 ABs 组, 分别于 3 d、5 d 和 7 d 对小鼠尾静脉注射 DPSCs 单细胞悬液 (5×10^6 个/mL) 或 DPSCs 来源的 ABs (200 μ g/只), 每只小鼠注射总量为 100 μ L, PBS 组注射等体积的 PBS 缓冲液。

1.6 Western blot 检测凋亡通路蛋白 Caspase-3 裂解片段的表达

使用 Bio-Rad 电泳系统 (Bio-Rad, 美国) 进行蛋白电泳, 电泳结束将蛋白转移至 PVDF 膜, 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗工作液 (1:800) (Caspase-3, 9662, Cell Signaling Technology; Cleaved

Caspase-3, 9661s, Cell Signaling Technology; GAPDH, 30201ES20, YEASEN)。TBST 洗膜 3 次, 室温孵育二抗 1 h。TBST 洗膜 3 次后, 加入显影液, 化学发光检测系统曝光成像 (Tanon4600, 中国)。

1.7 免疫荧光染色观察 ABs 内吞与巨噬细胞 M2 型极化

收集细胞爬片/组织切片进行免疫荧光染色, 4% 多聚甲醛溶液 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。置于 0.1% Triton X-100 溶液室温通透细胞/组织 15 min, 山羊血清封闭 30 min (37 $^{\circ}$ C), 过夜孵育一抗工作液 (1:400) (F4/80, ab6640, Abcam; CD206, ab125028, Abcam)。PBS 洗 3 次, 37 $^{\circ}$ C 孵育荧光二抗 1 h, PBS 洗 3 次, Hoechst (Sigma-Aldrich, 美国) 染核 10 min, PBS 洗 3 次, 80% 甘油封片。激光共聚焦荧光显微镜成像, 拍照。

1.8 ELISA 检测巨噬细胞培养上清及皮肤组织匀浆中细胞因子水平

细胞培养上清样品制备: 收集巨噬细胞培养上清, 4 000 rpm 离心 10 min 去除沉淀。皮肤组织匀浆制备: 取适量皮肤组织, 用预冷 PBS 清洗后剪碎, 将组织块转移入匀浆机 (IKA, 美国) 进行充分研磨, 得到的匀浆液用超声破碎仪进一步破碎。按照 ELISA 试剂盒 (欣博盛, 中国) 说明书操作步骤操作, 并以标准品浓度为纵坐标, 以其对应吸光度值为横坐标绘制标准曲线, 计算各孔细胞因子 (TNF- α 、IL-6、TGF- β) 的浓度。

1.9 疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 与组织学病理评分

DAI 评分为体重下降分数、粪便性状分数和便血分数的总和, 总分为 12 分, 分值越大代表疾病越严重。实验结束后取结肠组织, 测量结肠长度并进行 H&E 染色, 按照炎症浸润和上皮损伤程度进行组织学病理评分 (histological activity index)。具体评分如下: 炎症浸润严重程度 = 0 分 (无), 1 分 (轻度), 2 分 (中度), 3 分 (重度); 炎症浸润程度 = 0 分 (无), 1 分 (黏膜), 2 分 (黏膜及黏膜下层), 3 分 (透过黏膜); 隐窝损伤 = 0 分 (无), 1 分 (杯状细胞少量损失), 2 分 (杯状细胞大量损失), 3 分 (杯状细胞的大量损失, 隐窝少量损失), 4 分 (杯状细胞完全损失, 隐窝大量损失)。

1.10 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计学分析, 结果均采用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Graph-Pad Prism 8.0 软件绘制统计图。多组数据间比较

采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以Tukey进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

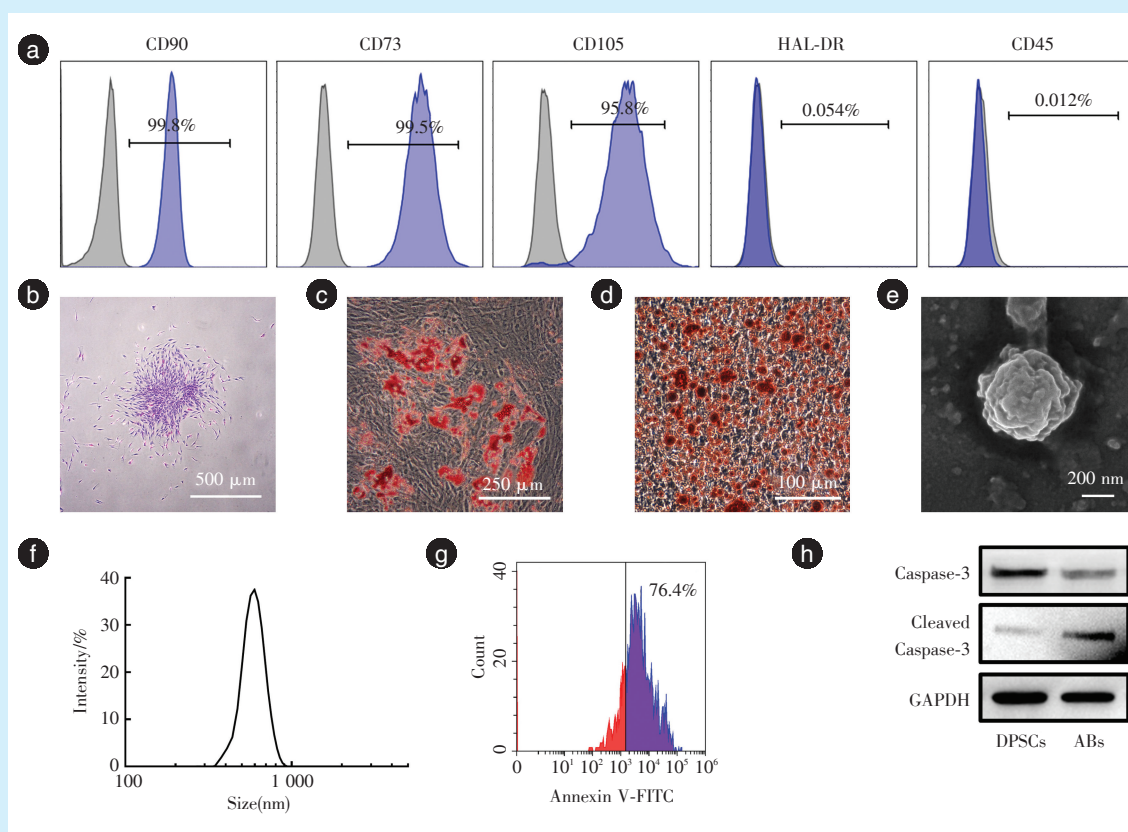
2 结果

2.1 DPSCs及其来源的ABs的分离鉴定

流式细胞术检测结果显示,培养纯化后的DPSCs阳性表达间充质干细胞的表面标志物CD90(99.8%)、CD73(99.5%)和CD105(95.8%),而不表达HAL-DR和CD45(图1a)。另外,本实验检测了DPSCs的克隆形成能力和多向分化能力。培养14 d后,可以观察到蓝紫色细胞克隆(图1b)。DPSCs成脂诱导后进行油红O染色,显微镜下可观察到

红色脂滴(图1c),经成骨诱导后的茜素红染色显示明显的矿化结节(图1d)。以上结果说明分离培养的DPSCs表面标志物符合间充质干细胞特征,并具有成脂和成骨分化潜能。

DPSCs来源的ABs的扫描电镜结果显示ABs形貌成球状(图1e),粒径分布范围在300~900 nm区间内,平均直径为 (634.3 ± 42.4) nm(图1f)。另外,凋亡分子Annexin V阳性表达率在70%以上(图1g)。Western blot结果显示ABs中凋亡通路重要分子Caspase-3的裂解片段(Cleaved Caspase-3)表达明显高于DPSCs(图1h)。以上结果表明,诱导并分离提取DPSCs来源的ABs成功。



a: flow cytometric analysis of the cell surface markers showed positive expressions of CD90, CD73 and CD105, and negative expressions of HAL-DR and CD45; b: representative image of colony formation of DPSCs ($\times 100$); c: representative image of Oil Red O staining of DPSCs ($\times 200$); d: representative image of Alizarin red staining of DPSCs ($\times 200$); e: SEM image of DPSCs-derived ABs; f: the size distribution of ABs; g: the Annexin V-FITC expression of DPSCs-derived ABs detected by flow cytometry; h: Western blot analysis of Caspase-3, Cleaved Caspase-3 in DPSCs and DPSCs-derived ABs; ABs: apoptotic bodies; DPSCs: dental pulp stem cells

Figure 1 Isolation and identification of dental pulp stem cells and dental pulp stem cells-derived apoptotic bodies

图1 牙髓干细胞及其来源的凋亡小体的分离鉴定

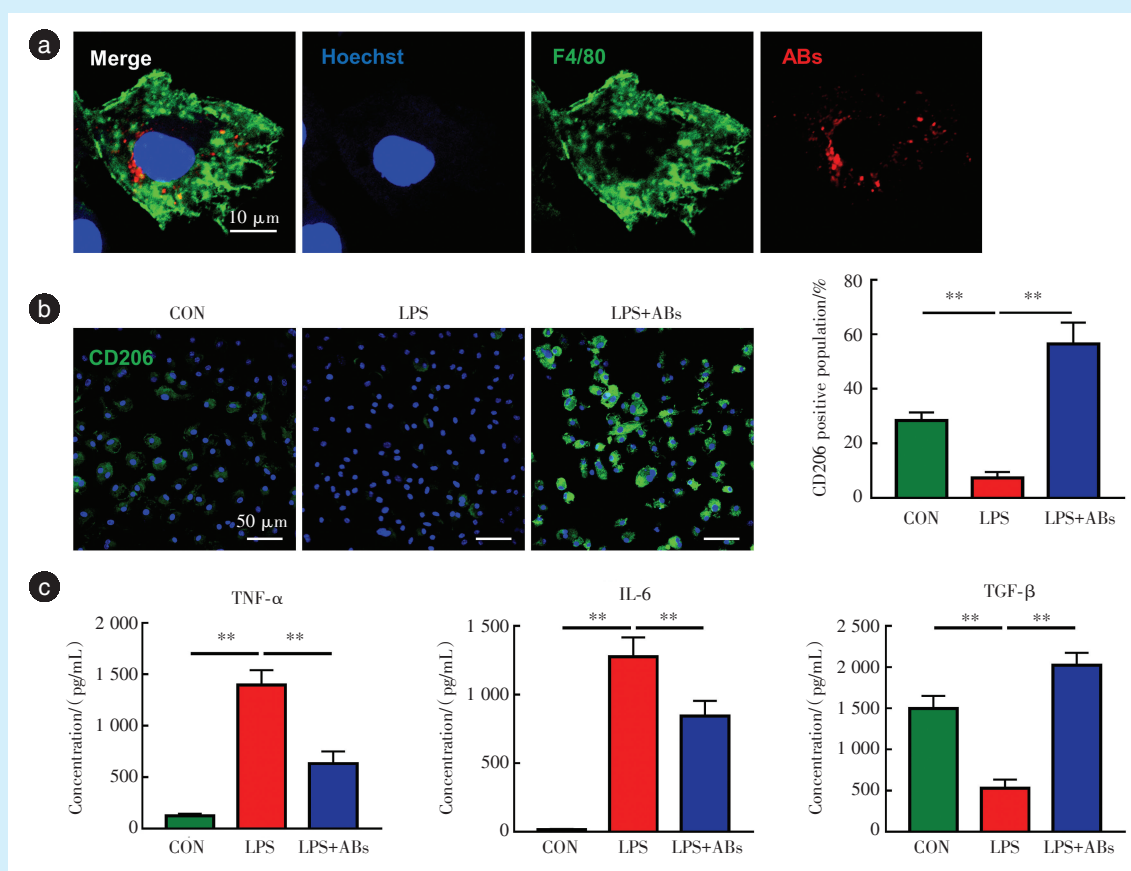
2.2 DPSCs来源的ABs对炎性巨噬细胞的影响

通过LPS($1 \mu\text{g/mL}$)刺激巨噬细胞建立炎性巨噬细胞模型,将PKH26预标记的ABs加入炎性巨

噬细胞中共培养3 h,可以观察到ABs显著的内吞现象(图2a),表明ABs能够被炎性巨噬细胞吞噬。为了进一步证明ABs对炎性巨噬细胞的影响,

将ABs(25 $\mu\text{g/mL}$)加入炎症巨噬细胞中共培养24 h后检测巨噬细胞表型分布。荧光结果显示,与对照组相比,加入LPS后炎症巨噬细胞中抗炎表型CD206阳性分群显著减少($P=0.005$);ABs作用后,显著增加了巨噬细胞中抗炎表型的比例($P<$

0.001)(图2b)。LPS组TNF- α 和IL-6的水平较高,TGF- β 的水平较低;与LPS组相比,LPS+ABs组TNF- α 、IL-6水平显著降低($P<0.001$, $P=0.005$),TGF- β 水平显著升高($P<0.001$)(图2c)。



a: representative images of internalization of ABs by F4/80-positive macrophages ($\times 400$); b: representative images showed the macrophage phenotype after treatment of ABs ($\times 400$), quantitative analysis of the CD206-positive population in macrophages; c: the detection of factors secreted by macrophages after administration of ABs by ELISA kit; ** $P<0.01$; CON: solvent control group; LPS: lipopolysaccharide; ABs: apoptotic bodies

Figure 2 Influence of apoptotic bodies on the phenotype of inflammatory macrophages

图2 凋亡小体对炎症巨噬细胞表型的影响

2.3 DPSCs 来源的 ABs 促进皮肤创面的愈合

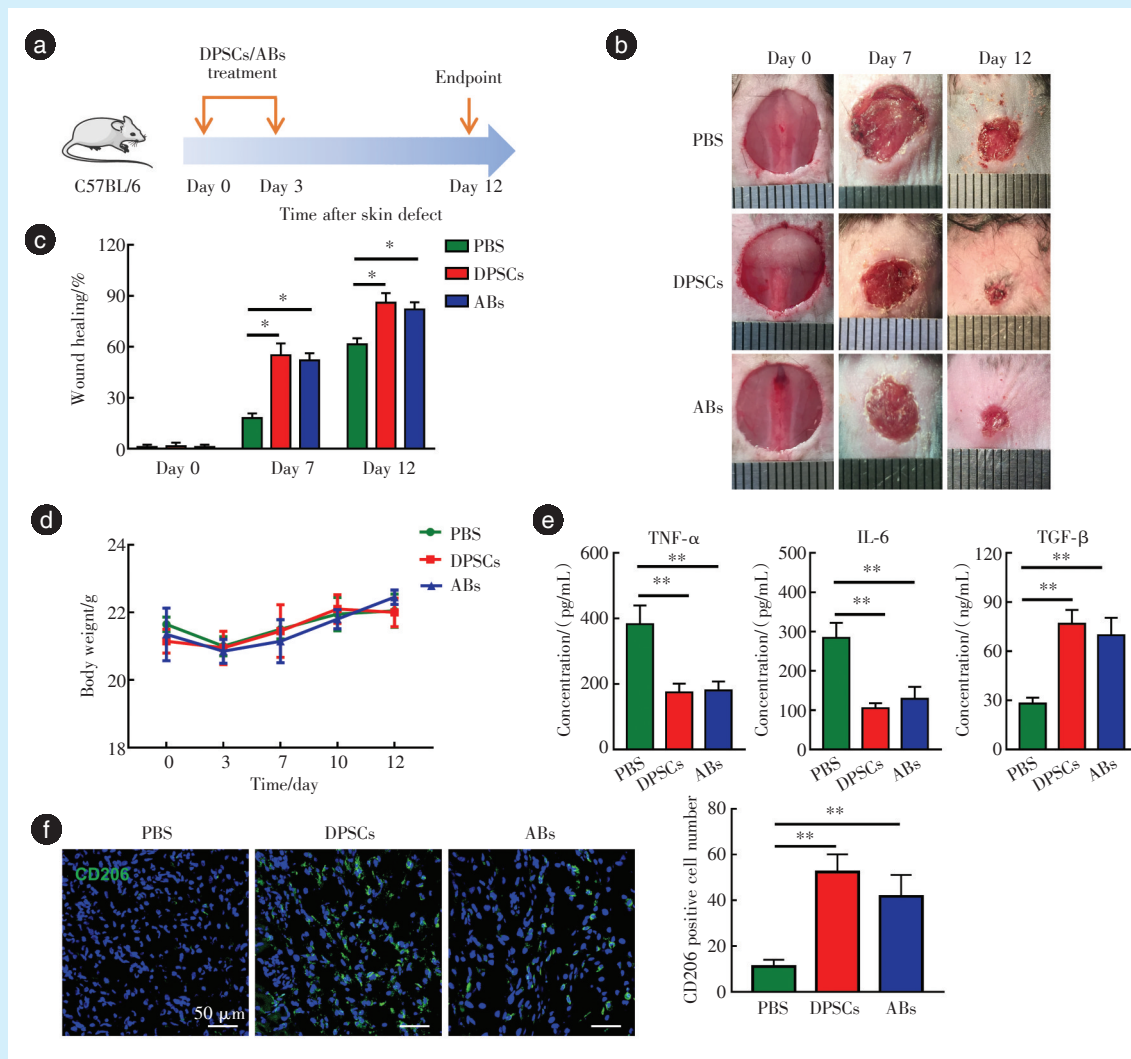
为了探讨 DPSCs 释放的 ABs 对体内炎症反应的调节作用,首先建立了小鼠背部皮肤创伤模型,并于 0 d 和 3 d 分别通过尾静脉注射 DPSCs 或 DPSCs 来源的 ABs,整个实验流程如图 3a 所示。

皮肤创面愈合的大体照片显示,与 PBS 组相比,DPSCs 和 ABs 注射组小鼠创面愈合的速度明显加快(图 3b)。Image J 对愈合率的分析结果显示,第 7 天和第 12 天时,DPSCs 组和 ABs 组愈合情况相比于

PBS 组均有显著性差异(图 3c:第 7 天 DPSCs 组 $P=0.011$,ABs 组 $P=0.014$;第 12 天 DPSCs 组 $P=0.026$,ABs 组 $P=0.041$)。另外,实验全程各组小鼠体重均无显著差异(图 3d)。ELISA 结果显示,与 PBS 组相比,DPSCs 组和 ABs 组 TNF- α (DPSCs 组 $P=0.002$,ABs 组 $P=0.002$)和 IL-6(DPSCs 组 $P<0.001$,ABs 组 $P=0.002$)显著降低,TGF- β 则明显升高(DPSCs 组 $P<0.001$,ABs 组 $P=0.002$)(图 3e)。局部皮肤组织切片荧光结果显示,与对照组相比,DPSCs 组和 ABs

组的CD206阳性细胞数量显著增多,差异具有统计学意义(DPSCs组 $P=0.005$, ABs组 $P=0.001$)(图

3f)。以上结果说明了DPSCs来源的ABs植入体内后可通过调控巨噬细胞表型促进皮肤创面的愈合。



a: the schematic graph of the protocol of establishment and treatment for cutaneous wound healing model; b: representative images of wound healing process of different timepoints in different groups; c: quantitative analysis of the wound healing rate in each group; d: the quantification of body weights in different groups; e: concentrations of TNF-α, IL-6 and TGF-β in skin homogenate by ELISA; f: representative images of the macrophages phenotype in the skin tissue after treatment of DPSCs/ABs (× 400). Quantitative analysis of the CD206-positive macrophages in skin tissue; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ABs: apoptotic bodies; DPSCs: dental pulp stem cells

Figure 3 Effect of apoptotic bodies derived from dental pulp stem cells on skin wound healing in mice

图3 牙髓干细胞来源凋亡小体对小鼠皮肤创面愈合的影响

2.4 DPSCs来源的ABs对DSS诱导的小鼠结肠炎的保护作用

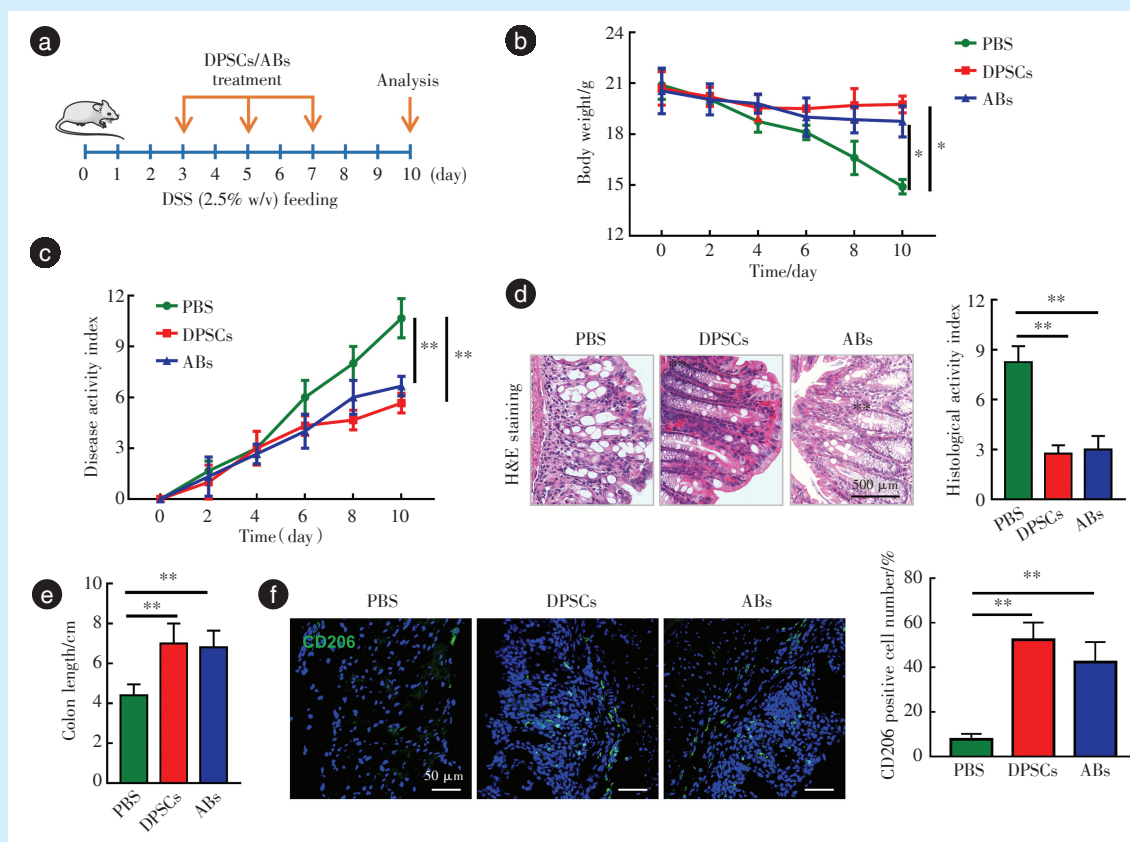
进一步选择了另一种炎症相关疾病模型即DSS诱导的小鼠结肠炎模型,观察DPSCs来源的ABs是否对结肠炎发挥炎症调控作用。在诱导模型建立的第3 d、第5 d和第7 d分别通过尾静脉注射DPSCs或DPSCs来源的ABs,10 d后取材,整个

实验流程图如图4a所示。

各组小鼠体重统计显示,PBS组小鼠体重下降最多,而DPSCs组和ABs组小鼠体重则显著高于PBS组(图4b;DPSCs组 $P=0.010$,ABs组 $P=0.020$)。疾病活动指数(DAI)结果显示,与PBS组相比,DPSCs和ABs注射组小鼠DAI显著降低,代表疾病症状明显减轻(图4c,DPSCs组 $P < 0.001$,ABs组 $P =$

0.002)。实验结束后取结肠组织,测量结肠长度并进行H&E染色。结果显示,PBS组小鼠结肠隐窝破坏,同时出现炎症浸润和结肠上皮明显损伤(图4d)。DPSCs和ABs注射组的结肠组织病理评分则显著下降,与PBS组相比差异有统计学意义(图4d; $P < 0.001$)。结肠长度统计结果显示,DPSCs和

ABs注射组的结肠长度明显大于PBS组(图4e;DPSCs组 $P < 0.001$,ABs组 $P = 0.002$)。结肠组织荧光染色显示,与PBS组相比,DPSCs组和ABs组的CD206阳性细胞数量显著升高(图4f;DPSCs组 $P < 0.001$,ABs组 $P = 0.002$)。



a: the schematic graph of the protocol of establishment and treatment for DSS-induced colitis mice; b: the body weight loss of mice in different groups; c: the disease activity index in different groups during the treatment process; d: histological structure of the colon tissue assessed by hematoxylin and eosin (H&E) staining and the calculated histological activity index ($\times 200$); e: quantitative analysis of the colon length in different groups; f: representative images of the macrophages phenotype in the colon tissue after treatment of DPSCs/ABs ($\times 400$) and quantitative analysis of the CD206-positive macrophages in colon tissue. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ABs: apoptotic bodies; DPSCs: dental pulp stem cells; DSS: dextran sulfate sodium

Figure 4 The protective effect of apoptotic bodies derived from dental pulp stem cells on DSS-induced colitis mice

图4 牙髓干细胞来源凋亡小体对DSS诱导的小鼠结肠炎的保护作用

3 讨论

MSCs移植是实现炎症有效调节和组织再生的重要手段,目前已有多种基于MSCs的细胞治疗方式在进行大动物有效性研究及临床试验。然而, MSCs移植实现广泛临床应用的基础是明确其疗效发挥的机制。以往研究认为植入宿主的MSCs能够完成多向分化及多种因子的释放,而随后的研究认为移植的大多数细胞并不会在宿主体内长期

存活。近年研究发现细胞外囊泡的释放是细胞间相互作用的重要媒介^[9],并且在细胞移植产生的疗效中发挥重要作用^[10]。细胞外囊泡是细胞释放到胞外、具有膜结构、并包含多种信号分子的囊泡,主要包括外泌体、微泡、ABs等,其大小、内容物和生物学功能均具有一定差异^[11]。本实验基于前期发现的细胞移植后广泛凋亡的现象^[4-5],并基于前期课题组发现的ABs的新生物学功能^[7-8],证明了

DPSCs在凋亡过程中释放的ABs具有调节炎症和促进组织再生的功能,拓展了细胞外囊泡新功能研究,并提出了牙源性干细胞移植治疗的新机制。

人体内每天有大量的细胞发生凋亡,为维持机体稳态,需要有迅速而有效的清除凋亡细胞以及凋亡相关细胞外囊泡的机制,其中巨噬细胞是发挥此作用的关键细胞^[12]。细胞凋亡不仅在发育、组织稳态维持中发挥重要作用,也可在组织损伤过程中释放关键信号,诱导组织再生,提示凋亡现象和再生过程具有密切联系^[13]。本实验分离鉴定了DPSCs来源的ABs,发现其基本特征与其他类型细胞释放的ABs类似,并且在体外能够被巨噬细胞吞噬,提示其可能对巨噬细胞功能产生影响。巨噬细胞的极化受多种微环境调控,在组织再生及炎性疾病的发生发展中发挥重要作用^[14]。本实验选择小鼠皮肤创面愈合模型和结肠炎模型,发现DPSCs来源的ABs能够在体外和体内实验中显著增加CD206阳性细胞数量,提示其能够促进M2型巨噬细胞极化。巨噬细胞极化与多种组织再生密切相关,因此调控巨噬细胞极化可促进多种组织再生,成为促进组织再生的重要手段。本课题组前期研究发现ABs可通过促进M2型巨噬细胞极化调控机体骨稳态和代谢稳态^[8]。因此,笔者推测在其他炎性微环境中,ABs同样可能通过调控巨噬细胞极化并促进组织再生。同时,本实验发现DPSCs来源的ABs通过调控巨噬细胞极化发挥抗炎效果,提示牙源性干细胞的ABs移植可作为调控巨噬细胞极化的新策略。细胞外囊泡功能的发挥可依赖于多种机制,包括其内部的信号分子的细胞间转运以及其表面的受体分子^[15],还可能依赖于其内部分子在胞外的释放。本实验发现DPSCs来源ABs可调节巨噬细胞功能,然而其分子机制仍需进一步研究。

【Author contributions】 Gong SK performed the experiments and wrote the article. Yang XS, Dou G, Li ZH and Liu SY assisted in the experiments and analyzed the data. Liu SY and Wang W designed the study and reviewed the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] Zhou LL, Liu W, Wu YM, et al. Oral mesenchymal stem/progenitor cells: the immunomodulatory masters[J]. Stem Cells Int, 2020, 2020: 1327405. doi: 10.1155/2020/1327405.
- [2] Andrukhov O, Behm C, Blufstein A, et al. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells: implication in disease and tissue regeneration[J]. World J Stem Cells, 2019, 11(9): 604-617. doi: 10.4252/wjsc.v11.i9.604.
- [3] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13625-13630. doi: 10.1073/pnas.240309797.
- [4] Galleu A, Riffó-Vasquez Y, Trento C, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces *in vivo* recipient-mediated immunomodulation[J]. Sci Transl Med, 2017, 9(416). doi: 10.1126/scitranslmed.aam7828.
- [5] Liu J, Qiu X, Lv Y, et al. Apoptotic bodies derived from mesenchymal stem cells promote cutaneous wound healing via regulating the functions of macrophages[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 507. doi: 10.1186/s13287-020-02014-w.
- [6] Liu H, Liu S, Qiu X, et al. Donor MSCs release apoptotic bodies to improve myocardial infarction via autophagy regulation in recipient cells[J]. Autophagy, 2020, 16(12): 2140-2155. doi: 10.1080/15548627.2020.1717128.
- [7] Liu D, Kou X, Chen C, et al. Circulating apoptotic bodies maintain mesenchymal stem cell homeostasis and ameliorate osteopenia via transferring multiple cellular factors[J]. Cell Res, 2018, 28(9): 918-933. doi: 10.1038/s41422-018-0070-2.
- [8] Zheng C, Sui B, Zhang X, et al. Apoptotic vesicles restore liver macrophage homeostasis to counteract type 2 diabetes[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(7): e12109. doi:10.1002/jev.12109.
- [9] van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(4): 213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.
- [10] Phinney DG, Pittenger MF. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy[J]. Stem Cells, 2017, 35(4): 851-858. doi: 10.1002/stem.2575.
- [11] Devhare PB, Ray RB. Extracellular vesicles: novel mediator for cell to cell communications in liver pathogenesis[J]. Mol Aspects Med, 2018, 60: 115-122. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.001.
- [12] Elliott MR, Ravichandran KS. The dynamics of apoptotic cell clearance[J]. Dev Cell, 2016, 38(2): 147-160. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.029.
- [13] Diwanji N, Bergmann A. An unexpected friend - ROS in apoptosis-induced compensatory proliferation: implications for regeneration and cancer[J]. Semin Cell Dev Biol, 2018, 80: 74-82. doi: 10.1016/j.semedb.2017.07.004.
- [14] Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. Immunity, 2016, 44(3): 450-462. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
- [15] Keller MD, Ching KL, Liang FX, et al. Decoy exosomes provide protection against bacterial toxins[J]. Nature, 2020, 579(7798): 260-264. doi: 10.1038/s41586-020-2066-6.

(编辑 周春华)



官网