

小细胞外囊泡在牙周及牙髓再生中的应用与进展

刘润园, 董明, 韩文青, 董炬宏, 牛卫东

<https://doi.org/10.12307/2022.972>

投稿日期: 2021-11-22

采用日期: 2022-01-29

修回日期: 2022-03-05

在线日期: 2022-04-14

中图分类号:

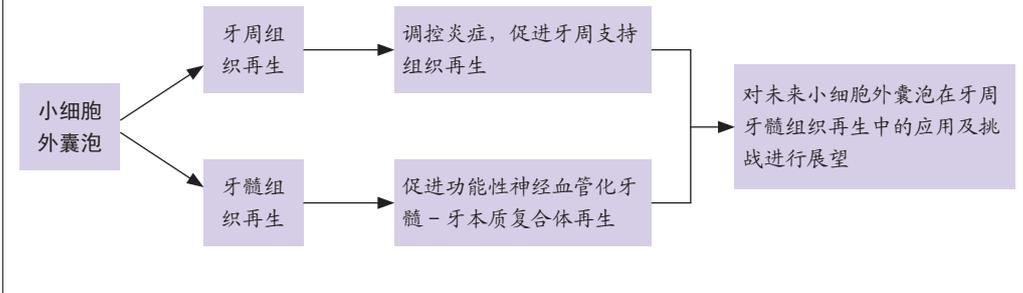
R459.9; R318.08; R781.3

文章编号:

2095-4344(2023)01-00083-08

文献标识码: A

文章快速阅读: 小细胞外囊泡在牙周和牙髓组织再生中的作用



文题释义:

小细胞外囊泡: 是由多种细胞(如上皮细胞、干细胞、免疫细胞和癌细胞等)分泌的纳米级胞外囊泡, 存在于唾液、血液、乳液和脂肪组织之中, 粒径为40~200 nm, 形似杯状, 具有脂质双分子层膜结构, 内含DNA、RNA和蛋白质等遗传物质, 参与细胞间通讯和疾病发生发展, 可应用于疾病的诊断和治疗、药物的递送和组织再生。

牙周和牙髓组织再生: 利用干细胞多向分化的能力, 使其再生牙周膜、牙龈、牙槽骨和牙骨质的过程, 有望代替牙周组织缺损治疗中的自体骨移植和异体骨填充等方法, 称为牙周组织再生。当牙髓发生感染坏死时, 传统治疗方法是根管治疗, 但去除根管内牙髓组织后牙齿会失去活力, 易发生根折, 而牙髓再生是利用干细胞的多能性, 形成含有血管、神经的牙髓-牙本质样复合体, 为牙齿提供营养, 恢复感觉能力和血运, 促进牙根发育, 预后优于传统根管治疗。

摘要

背景: 小细胞外囊泡是细胞旁分泌途径中的重要成分, 近些年小细胞外囊泡在口腔组织再生中的应用受到广泛关注。

目的: 对小细胞外囊泡在牙周和牙髓组织再生中的作用和应用进展做一综述。

方法: 检索近10年PubMed、Web of science数据库及中国知网和万方医学数据库, 英文检索词为“small extracellular vesicles, exosomes, pulp stem cells, periodontal regeneration, bone regeneration, pulp regeneration, regenerative endodontics, revascularization”, 中文检索词为“小细胞外囊泡, 外泌体, 牙髓干细胞, 牙周组织再生, 骨再生, 牙髓再生, 牙髓血运重建”。经过文题、摘要的筛选, 排除相关性差及陈旧和重复的文献, 对最终符合标准的71篇文献进行综述。

结果与结论: ①小细胞外囊泡由多种细胞分泌, 参与细胞间通讯, 介导免疫应答反应, 在组织再生中具有较大的应用潜力; ②小细胞外囊泡在牙周组织修复再生中发挥重要的作用, 可调控牙周炎症, 促进牙周膜和周围骨组织再生; ③小细胞外囊泡作用于牙源性干细胞可再生功能性牙髓-牙本质复合体。

关键词: 小细胞外囊泡; 外泌体; 牙源性干细胞; 牙周组织再生; 骨再生; 牙髓再生; 牙髓血运重建; 综述

Application and progress of small extracellular vesicles in periodontal and pulp regeneration

Liu Runyuan, Dong Ming, Han Wenqing, Dong Juhong, Niu Weidong

Department of Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116041, Liaoning Province, China

Liu Runyuan, Master candidate, Department of Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116041, Liaoning Province, China

Corresponding author: Niu Weidong, MD, Professor, Doctoral supervisor, Department of Dentistry and Endodontics, School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116041, Liaoning Province, China

Abstract

BACKGROUND: Small extracellular vesicles are important components of paracrine pathways. In recent years, the application of small extracellular vesicles in oral tissue regeneration attracted wide attention.

OBJECTIVE: To review the role and application of small extracellular vesicles in periodontal and pulp tissue regeneration.

METHODS: PubMed, Web of Science, CNKI and Wanfang databases were searched for relevant articles published in the past ten years. The retrieval MeSH Terms or key words were “small extracellular vesicles, exosomes, pulp stem cells, periodontal regeneration, bone regeneration, pulp regeneration, regenerative endodontics, revascularization” in Chinese and English, respectively. After removal of poorly related, outdated, and duplicate studies by reading the title and abstract, 71 articles were finally included in result analysis.

大连医科大学口腔医学院牙体牙髓教研室, 辽宁省大连市 116041

第一作者: 刘润园, 女, 1996年生, 内蒙古自治区乌海市人, 汉族, 大连医科大学在读硕士, 主要从事牙体牙髓方面的研究。

通讯作者: 牛卫东, 博士, 教授, 博士生导师, 大连医科大学口腔医学院牙体牙髓教研室, 辽宁省大连市 116041

<https://orcid.org/0000-0002-6100-5038> (刘润园)

基金资助: 辽宁省教育厅自然科学基金基础研究项目(LZ2019038), 项目负责人: 牛卫东; 辽宁省教育厅面上项目(LJKZ0841), 项目负责人: 董明; 辽宁省科学技术计划项目(2021JH2/10300027), 项目负责人: 牛卫东

引用本文: 刘润园, 董明, 韩文青, 董炬宏, 牛卫东. 小细胞外囊泡在牙周及牙髓再生中的应用与进展[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(1):83-90.



RESULTS AND CONCLUSION: (1) Small extracellular vesicles were secreted by many kinds of cells, participated in intercellular communication and mediated immune response. Small extracellular vesicles have a great application potential in tissue regeneration. (2) Small extracellular vesicles play an important role in periodontal tissue repair and regeneration. Small extracellular vesicles can regulate periodontal inflammation and promote periodontal ligament and surrounding bone tissue regeneration. (3) Small extracellular vesicles improve dental stem cells to regenerate functional pulp-dentin complexes.

Key words: small extracellular vesicle; exosome; dental stem cell; periodontal regeneration; bone regeneration; pulp regeneration; pulp revascularization; review

Funding: the Basic Research Program of Natural Science of Liaoning Provincial Education Department, No. LZ2019038 (to NWD); General Project of Education Department of Liaoning Province, No. LJKZ0841 (to DM); Science and Technology Planning Project of Liaoning Province, No. 2021JH2/10300027 (to NWD)

How to cite this article: LIU RY, DONG M, HAN WQ, DONG JH, NIU WD. Application and progress of small extracellular vesicles in periodontal and pulp regeneration. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(1):83-90.

0 引言 Introduction

20 世纪 80 年代初期 PAN 和 JOHNSTONE 首次在红细胞膜上发现了囊泡状物质，并提出了外泌体的概念，将其视为运输细胞内物质的载体，引起了学者们的关注^[1]。但随着多年的研究发现，纯度较高的外泌体仍难以分离，所以依据国际细胞外囊泡协会的建议，将粒径小于 200 nm 的囊泡称之为小细胞外囊泡，这一命名逐渐替代外泌体被广泛接受^[2]。小细胞外囊泡的来源广泛，作用强大，已成为疾病早期诊断的生物标记和疾病治疗的天然纳米级工具，近年来，有学者发现干细胞可分泌大量小细胞外囊泡，通过整合素与受体细胞相应配体结合，以自分泌和旁分泌的方式促进细胞多向分化，发挥再生能力，还可负载小分子药物穿过血脑屏障，在保护药物不被代谢和缓慢释放的同时，提高药物治疗的靶向性，在组织再生中的研究已显现出巨大优势^[3]。目前，小细胞外囊泡已逐渐开始应用于口腔组织再生中，如口腔颌面部软组织和骨再生、颞下颌关节软骨再生、牙周和牙髓组织再生等^[4]。该文章就小细胞外囊泡的特点进行分析，归纳了小细胞外囊泡促进牙周及牙髓组织再生等方面的研究进展，同时展望了小细胞外囊泡在牙周和牙髓组织再生中应用的潜在机会和挑战，为小细胞外囊泡的临床转化提供理论依据。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源

1.1.1 检索人及检索时间 第一作者、第二作者以及通讯作者在 2021 年 8 月进行检索，并实时更新。

1.1.2 检索文献时限 近 10 年的中英文文章。

1.1.3 检索数据库 英文数据库：查阅 PubMed 数据库 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Web of science 数据库 (<https://www.webofscience.com/wos/alldb/basic-search/>) (检索核心集) 可搜索高质量文章，并且可追踪文章的起源和发展。中文数据库：查阅中国知网 (<https://www.cnki.net/>) 和万方医学数据库 (<https://www.wanfangdata.com.cn/index.html?index=true>)。

1.1.4 检索途径 主题词、关键词、标题/摘要及部分全文检索。

1.1.5 检索词 中文检索词为“小细胞外囊泡，外泌体，牙髓干细胞，牙周组织再生，牙髓再生，牙髓血运重建”。英文检索词为“extracellular vesicles, exosomes, small extracellular vesicles, pulp stem cells, periodontal regeneration, regenerative Endodontics, dental pulp regeneration, revascularization”。

1.1.6 检索文献类型 研究原著和综述。

1.1.7 检索策略 见图 1 和图 2。

1.1.8 检索文献量 检索文献总数 612 篇，中文文献 132 篇，英文文献 480 篇。

1.2 入选标准 ①小细胞外囊泡和牙周、牙髓组织再生相关的研究和综述；②质量高：英文杂志 90% 以上来源于 Web of science 核心集，中文杂志为北大核心期刊；③具有创新性；④非重复性的文章。

#1 Exosomes [Mesh]
#2 Extracellular Vesicles [Mesh]
#3 Small Extracellular Vesicles [Title/Abstract]
#4 #1 OR #2 OR #3
#5 Regenerative Endodontics [Mesh]
#6 Revascularization [Title/Abstract]
#7 Pulp Regeneration [Title/Abstract]
#8 #5 OR #6 OR #7
#9 Pulp Stem Cells [Title/Abstract]
#10 Periodontal Regeneration [Title/Abstract]
#11 Bone Regeneration [Mesh]
#12 #9 OR #10 OR #11
#13 #4 AND #8
#14 #4 AND #12

图 1 | PubMed 数据库检索策略

#1 小细胞外囊泡
#2 外泌体
#3 牙髓再生
#4 牙周再生
#5 牙髓干细胞
#6 #1 in 主题
#7 #2 in 主题
#8 #3 in 主题
#9 #4 in 摘要
#10 #5 in 摘要
#11 #6 OR #7
#12 #11 AND #8
#13 #11 AND #9
#14 #11 AND #10

图 2 | 中国知网数据库检索策略

1.3 质量评估 符合要求的 71 篇文献中，文献 [1-22] 介绍了小细胞外囊泡的来源、作用和应用，文献 [23-50] 介绍了小细胞外囊泡在牙周组织再生中的作用和应用，文献 [51-68] 介绍了小细胞外囊泡在牙髓再生中的作用和应用，[69-71] 讨论了小细胞外囊泡存在的问题。

1.4 数据的提取 检索文献总数 612 篇，中文文献 132 篇，英文文献 480 篇，排除陈旧、重复以及相关程度低的文献，共纳入 71 篇符合标准的文献进行综述，其中英文文献 70 篇，中文文献 1 篇。文献筛选流程图，见图 3。

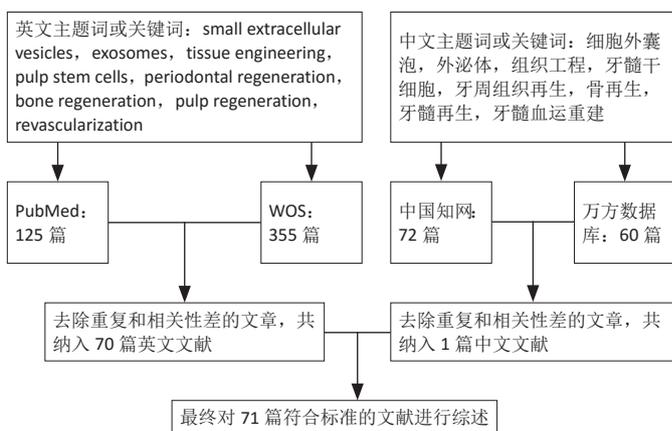


图 3 | 文献筛选流程图

2 结果 Results

2.1 小细胞外囊泡的来源、作用及应用

- 小细胞外囊泡的来源
- 小细胞外囊泡的作用和应用
 - 疾病诊断的生物标志物
 - 提高疾病治疗的靶向性
 - 促进组织修复和再生

2.1.1 小细胞外囊泡的来源 小细胞外囊泡来源广泛,可由各种细胞在一定条件下释放,存在于胞浆中,还广泛分布于血液、乳液、唾液和脂肪组织中^[5]。通过超高速差速离心的方式获取,其分离与鉴定见图4,在透射电镜下观察发现它是一种形似杯状的脂质双分子层膜性纳米级囊泡,内含蛋白质、脂质、miRNA和许多其他非编码RNA。小细胞外囊泡主要包括细胞内途径来源的外泌体,以依赖运输所需的内体分选复合物(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)的方式,形成腔内小泡和多囊体,通过ESCRT-III参与蛋白去泛素化并驱动囊泡分离,与质膜融合形成外泌体并释放到细胞外;其次还有胞膜出芽形成的微囊泡,由ESCRT机制中的关键因子TSG101、VPS4、GTPase ARF6和PLD2调控,促进肌动蛋白细胞骨架解聚,触发胞膜上的囊泡释放,使小细胞外囊泡在胞膜上直接出芽;此外,还包括细胞凋亡产生的凋亡小体以及肿瘤细胞出芽形成的癌小体等^[6]。

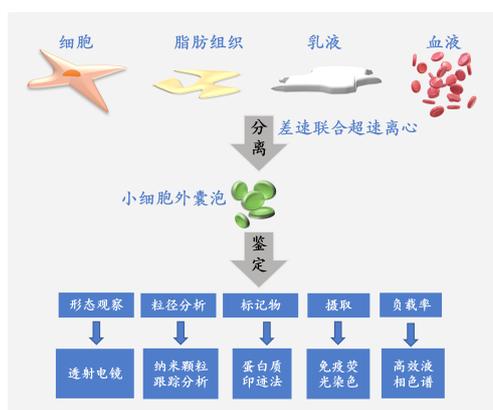


图4 | 小细胞外囊泡的来源、分离和鉴定示意图

2.1.2 小细胞外囊泡的作用和应用

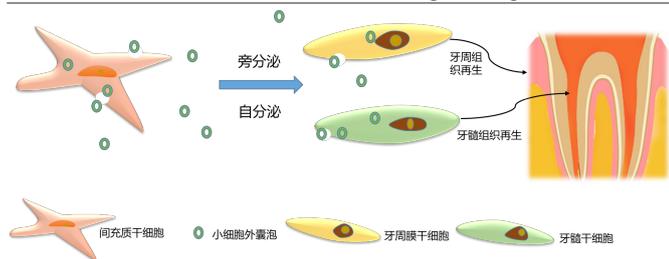
(1) 疾病诊断的生物标志物: 因小细胞外囊泡广泛存在于各种体液中,携带多种胞内遗传物质,在细胞旁分泌过程中发挥重要作用,可调节机体免疫应答反应,参与疾病进程,为疾病诊断提供多项参数,提高疾病诊断的敏感性^[7]。在疾病发展中,小细胞外囊泡内部的蛋白质、RNA和脂质含量会发生变化,在“液体活组织检查”中容易获取,可作为诊断疾病的生物标志物。MONTEIRO等^[8]在妊娠期糖尿病患者和健康妊娠对照者的龈沟液中分离和鉴定小细胞外囊泡,发现糖尿病患者龈沟液中小细胞外囊泡的总量更大,平均浓度更高,对小细胞外囊泡进行量化,可用于妊娠早期疾病的筛查。LAMBRECHT等^[9]收集健康人群和慢性肝病患者的血浆,提取血浆中的小细胞外囊泡,通过qRT-PCR分析小细胞外囊泡中miRNA的表达,发现miRNA-200b和miRNA-122在乙型和丙型肝炎患者早期纤维化期间显著上调,说明小细胞外囊泡中的miRNA可作为肝纤维化早期阶段的诊断标志物。HAN等^[10]在牙周炎患者唾液的小细胞外囊泡中,发现hsa-miR-140-5p、hsa-miR-146a-5p和hsa-miR-628-5p这3种miRNA的表达高于健康牙周组织受试者,提示小细胞外囊泡可以作为牙周炎疾病早期诊断的生物标志物。

(2) 提高疾病治疗的靶向性: 目前,传统的药物递送载体包括脂质体和聚合物两种类型,从而递送抗癌药、抗真菌药和止痛药等不同分子大小的药物^[11],但这种合成纳米颗粒再进入血液循环后,往往面临着毒性和网状内皮系统或单核吞噬细胞系统快速清除的问题^[12]。而小细胞外囊泡可以穿过血脑屏障,

通过一系列表面黏附蛋白和特定的配体如整合素、CD11b和CD18结合,易被细胞摄取而不发生免疫排斥反应,提高治疗的靶向性^[13],是临床上理想的天然纳米级药物递送载体^[14],可负载难溶性中药,增加药物在体内的生物活性,从而提高药物的应用效率,如TIAN等^[15]将姜黄素负载入小细胞外囊泡中,通过特殊方式修饰以结合c(RGDyk)肽和荧光,从而增加与反应性脑血管中整合素 $\alpha v\beta 3$ 的亲合力,提高其靶向性,比单纯的姜黄素能更有效地抑制炎症和脑部损伤区域细胞的凋亡,可作为治疗缺血性脑血管病的有效方法。此外,小细胞外囊泡不仅能够负载小分子药物,还可以负载生长因子,LI等^[16]发现血管内皮生长因子C可促进淋巴管内皮细胞的分化,从而促进淋巴管的形成,但其不稳定性、降解性、给药效率低和滞留时间短限制了其药效,利用电穿孔/超声波的方式使小细胞外囊泡负载血管内皮生长因子C,可将血管内皮生长因子C有效地转运到靶细胞促进淋巴管的形成,加入支架海藻酸钠水凝胶对其进行缓释,延长负载血管内皮生长因子C的小细胞外囊泡的作用时间,改善小鼠淋巴水肿,为疾病治疗提供了一种新的策略。

(3) 促进组织修复和再生: 因小细胞外囊泡具有广泛的来源和强大的生物学功能,还普遍应用于组织的修复与再生以及疫苗开发等领域^[17],已在心脏、肺、肾和脑等组织和器官中得到验证^[18]。WATANABE等^[19]通过建立大鼠双膦酸盐相关性颌骨坏死模型,研究间充质干细胞来源小细胞外囊泡对双膦酸盐相关性颌骨坏死的预防和治疗作用,发现小细胞外囊泡可减少衰老细胞数量,下调衰老相关基因p21、pRB和炎症细胞因子的表达,增加干细胞标志物Bmi1和Hmga2以及血管内皮生长因子的表达,防止干细胞、成骨细胞和成纤维细胞衰老以及慢性炎症的扩散,促进血管和骨再生,从而有效预防双膦酸盐相关性颌骨坏死的发生和发展。脂肪干细胞来源小细胞外囊泡可被人脐静脉内皮细胞和成纤维细胞迅速摄取,并在体外和体内显著促进细胞增殖、迁移和血管生成,使细胞周期蛋白D1、D2、A1和A2等细胞增殖标志物以及生长因子(血管内皮生长因子A、血小板衍生生长因子A、表皮细胞生长因子、成纤维细胞生长因子2)的基因表达上调,还可刺激细胞中AKT和ERK信号通路,增加上皮再生、胶原沉积和新血管形成,加速软组织的损伤愈合^[20]。SHI等^[21]建立大鼠肌腱缺损模型,将骨髓间充质干细胞来源小细胞外囊泡植入缺损部位,4周后,与肌腱基质形成和肌腱分化相关的基因(I型胶原 $\alpha 1$ 和腱调节蛋白)表达显著上调,CD146阳性肌腱干细胞和抗炎巨噬细胞数量明显增加,凋亡细胞和促炎巨噬细胞数量减少,肌腱胶原纤维排列规则和致密,说明骨髓间充质干细胞来源小细胞外囊泡可通过抑制炎症和凋亡,增加肌腱干细胞的比例来促进肌腱愈合。ZHA等^[22]分离小鼠成软骨细胞中的小细胞外囊泡,用电穿孔的方式包裹血管内皮生长因子质粒,并与3D打印的多孔骨支架结合,体外研究发现小细胞外囊泡可诱导骨髓间充质干细胞成骨分化,控制释放血管内皮生长因子并促进血管系统的重建,将其植入大鼠桡骨缺损模型,可诱导大量的血管化骨再生。此外,小细胞外囊泡还可促进颌面骨、牙周、牙髓组织和颞下颌关节的再生,促进颌面部皮肤伤口愈合等^[4]。虽然,天然小细胞外囊泡具有多种潜力,能够模拟间充质干细胞的功能促进牙周和牙髓干细胞的再生,见图5,但其作用机制和应用还有待进一步总结和研究。

小细胞外囊泡作用强大,应用较为广泛,现就其在疾病诊断,药物递送和组织再生方面做一总结,见表1。



图注：间充质干细胞来源小细胞外囊泡通过自分泌和旁分泌的方式调控相关信号通路，促进牙周膜干细胞和牙髓干细胞的增殖、迁移和分化；在牙周组织再生中，小细胞外囊泡促进牙周支持组织即牙周膜和牙槽骨的再生；在牙髓再生中，小细胞外囊泡促进牙髓干细胞向血管、神经和牙本质分化，从而再生功能性神经血管化的牙髓-牙本质复合体

图5 | 间充质干细胞来源小细胞外囊泡在牙周牙髓再生中的作用示意图

表1 | 小细胞外囊泡的作用及应用

疾病诊断						
发表年份	第一作者	研究类型	小细胞外囊泡的来源	实验分组	小细胞外囊泡检测指标	应用
2019	MONTEIRO ^[8]	病例对照研究	妊娠期糖尿病患者龈沟液	妊娠期糖尿病患者和健康妊娠对照	总量、浓度和跨膜蛋白	妊娠糖尿病早期诊断生物标志物
2017	LAMBRECHT ^[9]	病例对照研究	慢性乙、丙型肝炎患者血清	健康个体、乙型肝炎和丙型肝炎	总量和 miRNA 表达	肝纤维化早期标志物
2020	HAN ^[10]	病例对照研究	牙周病患者唾液	健康组、牙龈炎组、III/IV期牙周炎组	形态、尺寸、分布和 microRNA 的表达	牙周炎诊断的生物标志物
药物递送和组织修复再生						
发表年份	作者	研究类型	小细胞外囊泡的来源	研究对象及实验目的	小细胞外囊泡的作用	应用
2018	TIAN ^[15]	基础实验	小鼠骨髓间充质干细胞	负载姜黄素治疗小鼠缺血性卒中	有效抑制缺血性脑损伤区域的炎症和细胞凋亡	药物递送载体
2020	Li ^[16]	基础实验	人脂肪组织衍生干细胞	负载血管内皮生长因子 C 对小鼠淋巴水肿的影响	使生长因子缓慢释放并显著改善淋巴水肿	生长因子递送载体
2020	WATANABE ^[19]	基础实验	人骨髓间充质干细胞	对大鼠双膦酸盐相关性颌骨坏死的影响	减少衰老细胞的数量，降低炎症细胞因子的表达，促进牙槽窝愈合	骨坏死组织修复再生
2021	ZHA ^[22]	基础实验	小鼠成软骨细胞系	负载血管内皮生长因子对小鼠颅骨缺损模型血管化骨再生的影响	使生长因子缓慢持久释放，诱导缺损区大量血管和新骨形成	骨缺损修复再生

2.2 小细胞外囊泡在牙周组织再生中的作用

- 小细胞外囊泡参与牙周炎症的调控
- 小细胞外囊泡促进牙周膜再生
- 小细胞外囊泡在牙槽骨再生中的作用
 - 小细胞外囊泡在骨缺损再生治疗中的作用机制
 - 小细胞外囊泡促进牙槽骨的再生

牙周组织缺损的常规手术治疗方法因无法激活牙周组织再生所必须的细胞间通讯，显示出一定的局限性，而牙周膜干细胞可分化为牙周软组织和牙槽骨，是牙周组织再生最合适的干细胞来源^[23]。目前研究表明，牙周膜干细胞来源小细胞外囊泡可作为主要的细胞间媒介，传递信息并刺激受伤组织自愈^[24]，已成为一种免疫原性低、安全性高的无细胞治疗方法，有望替代牙周膜干细胞，在牙周组织修复再生中发挥重要的作用，已

被应用于牙周慢性炎症的调控、牙周膜和牙槽骨的再生中^[25-26]。

2.2.1 小细胞外囊泡参与牙周炎症的调控 牙周炎是由细菌感染引起的一种炎症性疾病，表现为持续牙周支持组织的破坏和牙齿脱落，慢性炎症环境可能会影响牙周膜干细胞的免疫调节功能，小细胞外囊泡已被证明在不同组织中具有抗炎和免疫抑制作用，通过超高速离心方式分离牙周膜干细胞中的小细胞外囊泡，发现其可竞争结合 Toll 样受体 4 信号通路的靶点，抑制炎症小体 NF-κB 的表达和脂多糖的活性，还可以增加 Akt 及其下游基因 GSK3β(Ser 9) 的磷酸化，通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制 NF-κB 的活性，从而抑制牙周炎的慢性炎症^[27]。骨髓干细胞来源小细胞外囊泡可通过 OPG-RANKL-RANK 信号通路影响巨噬细胞的极化和转化生长因子 β1 的表达，将 M1 型巨噬细胞转化为 M2 型，从而调节炎症反应，抑制牙周炎的发展和牙周组织的免疫损伤，利用水凝胶负载骨髓间充质干细胞来源小细胞外囊泡，注射到实验性大鼠牙周炎模型内，可见牙槽骨的丢失、炎性浸润和胶原破坏明显减少^[28]。用牙龈卟啉单胞菌脂多糖刺激牙周膜干细胞后，牙周膜干细胞来源小细胞外囊泡中 miR-155-5p 表达显著降低，小细胞外囊泡被 CD4⁺ T 细胞摄取，miR-155-5p 可以在 CD4⁺ T 细胞中负调节其下游靶分子 Sirtuin-1，而 Sirtuin-1 可以有效抑制 Th17 细胞，同时使 Treg 细胞的活性及功能得以恢复，调节 Th17/Treg 细胞的平衡，有利于牙周组织炎症与宿主免疫调节达到稳态^[29]。此外，间充质干细胞和免疫细胞分泌的小细胞外囊泡可进行双向的信息交换，间充质干细胞来源小细胞外囊泡可下调促炎细胞因子肿瘤坏死因子 α 的表达，抑制免疫细胞的增殖，减少氧化应激和纤维化，而免疫细胞也可以通过它们的小细胞外囊泡影响间充质干细胞的生物学功能和再生潜力^[30]。

2.2.2 小细胞外囊泡促进牙周膜再生 牙周膜纤维可将牙根表面的牙骨质与牙槽骨连接起来，并将牙齿固定在牙槽窝中，缓冲和减弱咬合力，可有效保护牙齿免受创伤。原有的引导性组织再生方法容易形成结合上皮而非牙周膜，虽然牙周袋变浅但结合不牢固，患者预后较差，因此在牙周组织再生中，形成定向的牙周膜纤维仍然是一个严峻且重要的挑战。研究发现，在慢性牙周炎的炎症微环境下，牙周膜干细胞来源小细胞外囊泡可通过抑制 miR-17-5p 使血管内皮生长因子 A 的表达上调，促进牙周组织中血管的再生^[31]。CHEW 等^[32]将间充质干细胞来源小细胞外囊泡与胶原海绵结合应用于大鼠牙周缺损模型中，发现间充质干细胞来源小细胞外囊泡通过激活 AKT 和 ERK 信号通路以及调控牙周膜细胞增殖、迁移和凋亡相关因子：胰岛素样生长因子、碱性成纤维细胞生长因子和 BCL-2 的表达，形成横跨根面和新生骨的功能性牙周膜纤维。MOHAMMED 等^[33]将脂肪干细胞来源小细胞外囊泡注射到大鼠结扎诱导的牙周袋中，组织学结果显示在大鼠牙槽骨缺损位置形成了新的组织，类似附着于牙骨质和牙槽骨的健康牙周膜纤维，此外，脂肪干细胞来源小细胞外囊泡具有抗炎和免疫调节活性，可以促进多种细胞的生物学功能以及血管生成来诱导组织再生，对牙周炎的治疗效果比单纯脂肪干细胞更好，显示出更大面积的新组织形成。

2.2.3 小细胞外囊泡在牙槽骨再生中的作用 牙周炎会导致牙槽骨的丧失，患者本身的特异性以及环境因素加剧了牙槽骨缺损修复的难度。在过去的几十年里，人们一直致力于探索牙槽骨缺损的骨再生治疗方法，临床上治疗该问题的主要方法是自体或异体骨移植和引导性组织再生，被称为“黄金疗法”，然而自体骨移植不能为具有较大缺损的患者提供足够的骨量；异体骨充填使得超过 30% 的患者患有骨折、骨缺损和感染等并发症；引导性组织再生对患者的要求较高，且治疗效果不稳定^[34]。因此需要寻找一种更加可行的方法弥补传统治疗方式的缺陷，基于干细胞的牙周组织再生应运而生，而干细胞分泌的小细胞

外囊泡同样具有强大的骨组织再生特性，且其安全性较高，有望用于牙槽骨缺损的再生治疗。

(1) 小细胞外囊泡在骨缺损再生治疗中的作用机制：牙槽骨的再生取决于骨吸收和骨形成之间的动态平衡，因此，成骨细胞和破骨细胞之间的相互作用至关重要。研究发现小细胞外囊泡结合支架和生长因子后可同时调控成骨细胞和破骨细胞的功能，促进骨缺损修复^[35]。

在骨形成方面，小细胞外囊泡可作为仿生工具直接诱导间充质干细胞和其他原始干细胞转化为成骨细胞谱系，促进成骨细胞增殖，增加成骨细胞分化相关 miRNA 的表达，抑制 Axin1 激活的 Wnt 信号，诱导成骨分化和骨再生^[36]。高通量 miRNA 测序显示，间充质干细胞经成骨诱导后分泌的小细胞外囊泡中有 41 种 miRNA 差异表达，这些 miRNA 可参与骨的发育和分化，如破骨细胞分化和 MAPK 信号通路，其中 hsa-miR-2110 和 hsa-miR-328-3p 是小细胞外囊泡中最重要的成骨调控 miRNA^[37]。NARAYANAN 等^[38] 研究发现，人骨髓间充质干细胞分泌的小细胞外囊泡可上调骨形成相关基因骨钙素、人侏儒相关转录因子 2、成骨细胞特异性转录因子和骨桥蛋白的表达，在体内和体外均能加速诱导人骨髓间充质干细胞特异性成骨分化，并提高成骨细胞的矿化能力，通过特异性启动子研究发现小细胞外囊泡的 mRNA 可翻译成控制人骨髓间充质干细胞命运的功能蛋白，在人骨髓间充质干细胞谱系分化调控中可能优于细胞外基质。CUI 等^[39] 研究发现，成骨细胞来源小细胞外囊泡不仅可以激活细胞分化相关 miRNA 的表达，促进骨组织再生，还可通过 RANKL-RANK 信号通路，影响破骨细胞的形成，可成为牙槽骨再生中骨稳态平衡的调控因素。此外，牙髓细胞来源小细胞外囊泡可促进人牙髓细胞和小鼠成骨细胞的增殖、迁移，抑制小鼠破骨细胞的形成，有效减轻牙周炎引起的骨缺失^[40]，牙龈间充质干细胞来源小细胞外囊泡可促进成骨细胞的迁移和成骨分化^[41]。

在骨破坏方面，破骨细胞的增殖与分化在牙槽骨再生过程中同样至关重要，而破骨细胞衍生的小细胞外囊泡是调节破骨细胞生物学功能的旁分泌调节剂，来自成熟破骨细胞的小细胞外囊泡含有 RANK 的受体激活剂，以 OPG 的方式与 RANKL 结合，竞争性抑制破骨细胞的形成^[42]。NAKAO 等^[43] 通过结扎法建立小鼠牙周炎模型，观察牙龈间充质干细胞衍生小细胞外囊泡对炎症性骨丢失的影响，通过局部注射牙龈间充质干细胞来源小细胞外囊泡可降低牙周骨吸收和抗酒石酸酸性磷酸酶阳性破骨细胞的数量，用肿瘤坏死因子 α 预处理牙龈间充质干细胞可进一步增强这一效果，说明肿瘤坏死因子 α 预处理的牙龈间充质干细胞来源小细胞外囊泡具有调节炎症和破骨细胞生成的能力。还有研究发现，小细胞外囊泡可下调 miR-214 和阻断 NF- κ B 信号转导，降低破骨细胞标志物抗酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶 K、基质金属蛋白酶 9 的表达，有效抑制骨破坏^[44]。在非小细胞肺癌中，癌细胞分泌的小细胞外囊泡中含有肿瘤不良预后相关基因 AREG，可在破骨前体细胞中诱导 EGFR 通路激活，进而导致 RANKL 表达增加，诱导破骨细胞生成标志物蛋白水解酶的表达，从而引发骨破坏和溶骨性骨转移，导致肺癌恶性循环^[45]，说明小细胞外囊泡来源的差异可能会造成截然不同的结果。KANG 等^[46] 研究发现，M2 型巨噬细胞来源小细胞外囊泡可促进骨组织再生，M1 型巨噬细胞来源小细胞外囊泡则负调节 BMP 信号通路，抑制骨再生，因此小细胞外囊泡来源对于牙槽骨再生效果的影响至关重要。

(2) 小细胞外囊泡促进牙槽骨的再生：在大鼠牙槽骨缺损模型中，使用人脱落乳牙干细胞分泌的小细胞外囊泡，研究其对牙槽骨再生的作用和潜在机制，发现小细胞外囊泡处理后血管生成相关基因基质细胞衍生因子 1、成纤维细胞生长因子和

成骨相关基因 I 型胶原、人侏儒相关转录因子 2、骨桥蛋白以及磷酸化的 MAPK 表达上调，通过 Micro-CT、苏木精-伊红染色、Masson 染色以及免疫荧光染色分析表明，有新生血管形成和骨再生，说明人脱落乳牙干细胞来源细胞外囊泡可能通过 MAPK 信号通路促进牙槽骨再生，有利于牙周骨缺损的治疗^[47]。ZHOU 等^[48] 将牙龈间充质干细胞来源小细胞外囊泡应用于大鼠牙周缺损模型中，可提高牙周组织的再生能力，增加骨结构的形成以及牙槽骨的改建和重塑。研究发现牙髓干细胞来源小细胞外囊泡通过下调 NF- κ B-p65 和 p38-MAPK 信号通路，减轻牙周炎小鼠牙周上皮病变，促进新的牙槽骨形成^[49]。LEI 等^[50] 从牙周健康的受试者中提取牙周膜干细胞来源小细胞外囊泡，用其处理牙周炎患者的牙周膜干细胞，发现小细胞外囊泡可抑制 Wnt 信号的过度激活，促进牙周膜干细胞中矿化结节的形成和成骨因子表达的增加，将其结合 Matrigel 水凝胶用于修复大鼠牙周炎模型牙槽骨缺损，发现小细胞外囊泡能够挽救炎症环境下内源性干细胞的成骨能力，促进牙槽骨的再生，提示小细胞外囊泡是治疗牙周炎的一种有效和实用的无细胞疗法。上述结果表明，小细胞外囊泡可促进牙周支持组织中牙槽骨的再生。

不同细胞来源小细胞外囊泡在牙周组织再生中的作用，见表 2。

表 2 | 不同细胞来源小细胞外囊泡在牙周组织再生中的作用

发表年份	第一作者	小细胞外囊泡来源 (物种)	实验细胞 / 动物类型	实验分组	剂量	作用方式及效果
2021	LIU ^[28]	SD 大鼠骨髓间充质干细胞	SD 大鼠牙周炎模型	健康组、牙周炎组、骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡-水凝胶组	500 μ g/mL	水凝胶负载注射，牙槽骨丢失、炎症浸润和胶原破坏减少，对牙周炎具有治疗作用
2019	ZHENG ^[29]	牙龈卟啉单胞菌脂多糖刺激的人牙周膜干细胞	人牙周血 CD4 ⁺ 淋巴细胞	正常组外泌体和脂多糖刺激组外泌体	100 μ L/mL	microRNA 测序，外泌体通过 Th17/Treg/miR-155-5p/SIRT1 信号通路缓解牙周炎症
2019	CHEW ^[32]	人骨髓间充质干细胞	SD 大鼠牙周炎模型	对照组、外泌体组	40 mg	胶原海绵负载，可增强牙周缺损模型中的骨和牙周韧带再生
2018	MOHAMMED ^[33]	人脂肪组织干细胞	Wistar 大鼠牙周炎模型	对照组、根面平整术组、脂肪干细胞组、外泌体组	80-150 μ g	液体注射，新形成牙周组织的面积百分比高于其他组
2019	WU ^[47]	人脱落乳牙牙髓干细胞	SD 大鼠牙周炎骨缺损模型	对照组、 β -磷酸三钙支架治疗组和 β -磷酸三钙支架加外泌体处理组	2 μ g/ μ L	β -磷酸三钙支架加外泌体处理组的牙槽骨再生效果优于其他组
2022	LEI ^[50]	健康人和牙周炎患者的牙周膜干细胞	SD 大鼠牙周炎模型	未处理组、不含外泌体的 Matrigel 组、含外泌体的 Matrigel 组	150 μ g/ μ L	Matrigel 负载注射，健康牙周膜干细胞来源外泌体组大鼠牙槽骨缺损处有更多的骨形成

2.3 小细胞外囊泡在牙髓再生中的作用

- 小细胞外囊泡可促进血管的形成
- 小细胞外囊泡可促进神经的形成
- 小细胞外囊泡可促进牙髓-牙本质复合体的形成

龋病、牙创伤、牙髓炎以及根尖周炎都可以造成牙髓组织的不可逆损伤，牙源性干细胞成血管、成神经和成牙本质分化形成功能性神经血管化牙髓-牙本质复合体已成为治疗牙髓损伤的研究热点^[51]。牙髓干细胞是牙髓再生的种子细胞，可通过旁分泌途径发挥作用，而小细胞外囊泡是旁分泌的主要介质之一^[52-53]。因此牙髓干细胞介导的组织再生已经转向于探寻其旁分泌介质中小细胞外囊泡的作用，而不是直接研究牙髓干细胞本身^[54-55]。

2.3.1 小细胞外囊泡可促进血管的形成 根管内空间狭小，干细胞容易缺氧坏死，影响其分化能力，而血管生成可为干细胞提供氧气和营养，是牙髓再生不可或缺的因素。研究表明，小细胞外囊泡可以增加血管内皮生长因子和缺氧诱导因子1 α 的表达，增强人脐静脉内皮细胞的管形成能力^[56]。LI等^[57]在组织坏死区域注射骨髓间充质干细胞来源小细胞外囊泡，发现有微血管的形成，为细胞提供营养，促进坏死组织再生，可作为治疗缺血性疾病的有效手段。XIAN等^[58]研究表明牙髓干细胞提取的小细胞外囊泡可通过p38-MAPK信号通路刺激再生牙髓组织内小血管的形成，说明小细胞外囊泡在牙髓血管再生方面也具有较大的潜力。ZHANG等^[59]用纤维蛋白水凝胶负载牙髓干细胞来源小细胞外囊泡，与牙髓干细胞和人脐静脉内皮细胞的共培养悬液混合，注射入根管内预测其可再生牙髓组织，并且迅速形成遍布新生牙髓的血管网络，在体外细胞实验中，通过免疫荧光染色发现，水凝胶支架结合小细胞外囊泡后可促进人脐静脉内皮细胞成血管，优于培养液组和单纯水凝胶组，说明牙髓干细胞来源小细胞外囊泡促进血管形成，而水凝胶只是起到支持和缓释的作用。为进一步研究小细胞外囊泡再生牙髓血管的机制，WU等^[60]发现脱落乳牙牙髓干细胞来源的小细胞外囊泡能够在体外促进人脐静脉内皮细胞分化，并增强血管生成能力，植入小鼠背部皮下的异位牙齿模型中，能显著促进牙髓组织再生和血管生成，经RNA测序分析表明，小细胞外囊泡通过内部的miR-26a参与TGF- β /SMAD2/3信号通路，促进牙髓内血管再生。

2.3.2 小细胞外囊泡可促进神经的形成 牙髓内神经的形成，可使牙齿感知外界机械、温度和化学刺激，做出应答反应，保护牙髓并减少根折发生的风险。将人脱落乳牙牙髓干细胞聚集体植入年轻恒牙根管内，牙髓电活力测试阈值降低，说明牙髓感觉能力恢复，免疫荧光染色显示感冷和感热神经元标志物表达阳性，说明人脱落乳牙牙髓干细胞能够再生新的神经元^[61]，而有其他研究证明，人脱落乳牙牙髓干细胞再生神经的机制是通过介导旁分泌信号通路的方式实现的，其来源的小细胞外囊泡具有强大的神经保护特性^[62]，因此，人脱落乳牙牙髓干细胞来源的小细胞外囊泡能否再生含有神经的牙髓组织还有待研究。HUANG等^[63]研究发现小细胞外囊泡中的miR-124-3p通过靶向磷酸二酯酶4B，抑制mTOR信号通路，从而抑制神经元炎症，促进轴突的生长。ZHANG等^[64]发现上皮根鞘来源小细胞外囊泡可以促进牙乳头细胞中神经源性标志物髓鞘碱性蛋白101、神经丝蛋白200的表达和新神经元的再生。与上述结论矛盾的是，HU等^[65]研究表明牙髓干细胞来源小细胞外囊泡可作为牙髓再生的生物工具，但并不能实现牙髓内神经元的恢复和再生。因此，小细胞外囊泡是否能够促进牙髓中神经的再生还有待进一步研究。

2.3.3 小细胞外囊泡可促进牙髓-牙本质复合体的形成 小细胞外囊泡是牙髓干细胞的诱导剂，可以触发牙髓样组织的再生，牙髓干细胞来源小细胞外囊泡可以激活MAPK途径并促进成牙本质细胞分化，ZHUANG等^[66]用根尖牙乳头干细胞来源的小细胞外囊泡处理骨髓间充质干细胞，发现骨髓间充质干细胞能够摄取小细胞外囊泡，矿化结节形成的基因和蛋白质表达显著增加，植入牙根切片中，发现新形成的牙本质沉积在根管内

壁上，并伴有牙髓样组织的再生。HUANG等^[67]将不同培养条件下牙髓干细胞来源小细胞外囊泡和胶原蛋白膜结合植入3.0-4.0 mm长的牙本质磨片上，并将其植入裸鼠背部皮下，在牙髓干细胞成骨诱导培养条件下，可检测到成牙本质标志蛋白牙本质涎蛋白和牙本质基质蛋白、促血管生成因子血小板衍生因子以及成骨分化因子人侏儒相关转录因子2的表达高于普通培养组，可诱导含有神经血管的牙髓-牙本质样组织再生，进一步证明了牙髓干细胞的生长环境和分化程度会影响其小细胞外囊泡的再生功能。CHEN等^[68]通过研究脂多糖预处理的人牙髓干细胞来源小细胞外囊泡对牙髓再生的影响，发现小细胞外囊泡可调节人牙髓干细胞的增殖、迁移、血管生成和分化，将小细胞外囊泡植入大鼠无髓根管模型中，在移植30 d后对根管中的再生组织进行评估，发现在脂多糖处理后，小细胞外囊泡增强了牙髓组织再生的能力，在再生组织的外层有排列整齐的成牙本质细胞，中间有大量的成纤维细胞和小血管，还可见矿化牙本质的形成，与体内正常牙髓的结构接近，说明在炎症微环境下，有利于牙髓干细胞来源小细胞外囊泡更好地发挥功能。

不同细胞来源小细胞外囊泡在牙髓组织再生中的作用，见表3。

表3 | 不同细胞来源的小细胞外囊泡在牙髓组织再生中的作用

发表年份	第一作者	小细胞外囊泡来源(物种) 型	实验细胞	实验分组	剂量	作用方式及效果
2018	XIAN ^[58]	人牙髓细胞	人脐静脉内皮细胞	加入或不加入外泌体	5 mg/mL	外泌体溶液直接作用方式，促进人脐静脉内皮细胞增殖和促血管生成因子的表达，在血管生成中起重要作用
2020	ZHANG ^[59]	人牙髓干细胞	人脐静脉内皮细胞	纤维蛋白水凝胶组和负载小细胞外囊泡组	200 μ g/mL	纤维蛋白凝胶负载注射方式，促进血管生成，为再生性牙髓治疗提供新的微创策略
2021	WU ^[60]	人脱落乳牙牙髓干细胞聚集体	裸鼠背部皮下异位牙根模型	外泌体抑制剂、聚集体组、聚集体+外泌体组和聚集体+外泌体+抑制剂的组	20 μ mol/L	外泌体溶液直接作用方式，促进再生牙髓组织中小血管的形成
2019	HU ^[65]	不同培养环境中的牙髓干细胞	人牙髓干细胞	常规培养组和无和牙源性分化培养组	无	microRNA测序，在牙源性培养条件下分离的外泌体能够更好地促进牙髓干细胞的牙源性分化
2020	ZHUANG ^[66]	人根尖乳头干细胞	裸鼠背部皮下异位牙根模型	明胶海绵+骨髓间充质干细胞组和明胶海绵+人骨髓间充质干细胞+小细胞外囊泡组	50 μ g/mL	明胶海绵负载注射方式，增强牙本质形成并改善牙髓-牙本质复合物的再生
2016	HUANG ^[67]	不同培养环境中的牙髓干细胞	裸鼠背部皮下异位牙根模型	对照组、常规培养液组和牙源性分化培养液组	常 100 μ L	I型胶原膜负载植入方式，牙源性分化培养液组促进牙本质和血管的形成能力更强
2021	CHEN ^[68]	脂多糖处理的人牙髓干细胞	大鼠无髓根管模型	对照组、无脂多糖处理组和脂多糖处理组	200 mg/mL	多肽水凝胶混合填充方式，在轻度炎症微环境中释放的小细胞外囊泡能更好地促进牙髓再生

3 总结与展望 Summary and prospects

小细胞外囊泡功能强大,是一种极具应用前景的天然生物材料,相比于干细胞本身,小细胞外囊泡的来源丰富,免疫原性低,能穿过血脑屏障,储存运输方便,表现出更好的安全性且不良反应和毒性低,可更好地实现临床转化^[15],是组织再生领域的研究热点。因小细胞外囊泡可促进牙源性干细胞成纤维、成血管、成神经、成骨和成牙本质分化,许多学者将其应用于牙周和牙髓组织的再生,但关于小细胞外囊泡在组织再生中的作用和机制的研究较少,此外,小细胞外囊泡的分离、冷冻保存、运输和来源细胞的培养条件仍无标准程序。文章总结了小细胞外囊泡在牙周和牙髓组织再生中的应用进展,着重总结其来源和作用,并阐明了部分再生机制,强调小细胞外囊泡在牙周和牙髓组织再生中的应用潜力,为牙周牙髓组织再生治疗提供新思路。但关于再生的具体机制、小细胞外囊泡存在的问题以及在口腔再生其他领域的研究还有待进一步探讨。目前,由于小细胞外囊泡本身具有较低的保留率和较短的半衰期,容易在体内被代谢,影响其功能的发挥,已有学者用精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽水凝胶对其进行负载和标记追踪^[69],发现精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽水凝胶增加了小细胞外囊泡的保留率和稳定性,延长了其在体内、体外的作用效果。此外,小细胞外囊泡的自身成分和功能复杂,提取和纯化仍无标准程序,且易出现污染甚至形成血栓^[70-71]。因此,标准化小细胞外囊泡制备方案的确定、缓释支架的结合应用以及再生机制和效果的深入研究仍是未来有待攻克的难题。

致谢:感谢导师的悉心指导,感谢同门的帮助。

作者贡献:董明负责指导设计,所有作者收集资料,刘润园负责整理成文,牛卫东负责审核。

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《系统综述和荟萃分析报告规范》(PRISMA 指南);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] BATRAKOVA EV, KIM MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release*. 2015;219:396-405.
- [2] THÉRY C, WITWER KW, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
- [3] DONG M, WU S, XU H, et al. FBS-Derived Exosomes as a Natural Nano-Scale Carrier for Icarin Promote Osteoblast Proliferation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:615920.
- [4] XING X, HAN S, LI Z, et al. Emerging role of exosomes in craniofacial and dental applications. *Theranostics*. 2020;10(19):8648-8664.
- [5] GARCIA-MARTIN R, BRANDAO BB, THOMOU T, et al. Tissue differences in the exosomal/small extracellular vesicle proteome and their potential as indicators of altered tissue metabolism. *Cell Rep*. 2022;38(3):110277.
- [6] WANG X, THOMSEN P. Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles and bone regeneration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2021;128(1):18-36.

- [7] SUN W, ZHAO C, LI Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity. *Cell Discov*. 2016;2:16015.
- [8] MONTEIRO LJ, VARAS-GODOY M, MONCKEBERG M, et al. Oral extracellular vesicles in early pregnancy can identify patients at risk of developing gestational diabetes mellitus. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218616.
- [9] LAMBRECHT J, JAN POORTMANS P, VERHULST S, et al. Circulating ECV-Associated miRNAs as Potential Clinical Biomarkers in Early Stage HBV and HCV Induced Liver Fibrosis. *Front Pharmacol*. 2017;8:56.
- [10] HAN P, BARTOLD PM, SALOMON C, et al. Salivary Small Extracellular Vesicles Associated miRNAs in Periodontal Status-A Pilot Study. *Int J Mol Sci*. 2020;21(8):2809.
- [11] LUAN X, SANSANAPHONGPRICHA K, MYERS I, et al. Engineering exosomes as refined biological nanoplateforms for drug delivery. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(6):754-763.
- [12] CHINNAPPAN M, SRIVASTAVA A, AMREDDY N, et al. Exosomes as drug delivery vehicle and contributor of resistance to anticancer drugs. *Cancer Lett*. 2020;486:18-28.
- [13] FAMILTSEVA A, JEREMIC N, TYAGI SC. Exosomes: cell-created drug delivery systems. *Mol Cell Biochem*. 2019;459(1-2):1-6.
- [14] LIAO W, DU Y, ZHANG C, et al. Exosomes: The next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy. *Acta Biomater*. 2019;86:1-14.
- [15] TIAN T, ZHANG HX, HE CP, et al. Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials*. 2018;150:137-149.
- [16] LI B, YANG J, WANG R, et al. Delivery of vascular endothelial growth factor (VEGFC) via engineered exosomes improves lymphedema. *Ann Transl Med*. 2020;8(22):1498.
- [17] YU X, ODENTHAL M, FRIES JW. Exosomes as miRNA Carriers: Formation-Function-Future. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2028.
- [18] QIN Y, SUN R, WU C, et al. Exosome: A Novel Approach to Stimulate Bone Regeneration through Regulation of Osteogenesis and Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):712.
- [19] WATANABE J, SAKAI K, URATA Y, et al. Extracellular Vesicles of Stem Cells to Prevent BRONJ. *J Dent Res*. 2020;99(5):552-560.
- [20] REN S, CHEN J, DUSCHER D, et al. Microvesicles from human adipose stem cells promote wound healing by optimizing cellular functions via AKT and ERK signaling pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):47.
- [21] SHI Z, WANG Q, JIANG D. Extracellular vesicles from bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells regulate inflammation and enhance tendon healing. *J Transl Med*. 2019;17(1):211.
- [22] ZHA Y, LI Y, LIN T, et al. Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects. *Theranostics*. 2021;11(1):397-409.
- [23] HUO JF, ZHANG ML, WANG XX, et al. Chrysin induces osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res*. 2021;400(2):112466.
- [24] SONG MK, KIM HY, CHOI BK, et al. Filifactor alocis-derived extracellular vesicles inhibit osteogenesis through TLR2 signaling. *Mol Oral Microbiol*. 2020;35(5):202-210.
- [25] CHAPARRO PADILLA A, WEBER ARACENA L, REALINI FUENTES O, et al. Molecular signatures of extracellular vesicles in oral fluids of periodontitis patients. *Oral Dis*. 2020. doi: 10.1111/odi.13338. Online ahead of print.
- [26] GEGOUT PY, STUTZ C, OLSON J, et al. Interests of Exosomes in Bone and Periodontal Regeneration: A Systematic Review. *Adv Exp Med Biol*. 2021;1341:67-87.
- [27] ČEBATARIŪNIENĖ A, KRIAUCIŪNAITĖ K, PRUNSKAITĖ J, et al. Extracellular Vesicles Suppress Basal and Lipopolysaccharide-Induced NFκB Activity in Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2019;28(15):1037-1049.
- [28] LIU L, GUO S, SHI W, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Promote Periodontal Regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2021;27(13-14):962-976.
- [29] 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.

[30] BÖRGER V, BREMER M, FERRER-TUR R, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Potential as Novel Immunomodulatory Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1450.

[31] ZHANG Z, SHUAI Y, ZHOU F, et al. PDLSCs Regulate Angiogenesis of Periodontal Ligaments via VEGF Transferred by Exosomes in Periodontitis. *Int J Med Sci.* 2020;17(5):558-567.

[32] CHEW JRJ, CHUAH SJ, TEO KYW, et al. Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration. *Acta Biomater.* 2019;89:252-264.

[33] 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. *Biomolecules.* 2018;8(4):167.

[34] SHENG Y, GUO HM, BAI YX, et al. Dehiscence and fenestration in anterior teeth : Comparison before and after orthodontic treatment. *J Orofac Orthop.* 2020;81(1):1-9.

[35] MI B, CHEN L, XIONG Y, et al. Osteoblast/Osteoclast and Immune Cocktail Therapy of an Exosome/Drug Delivery Multifunctional Hydrogel Accelerates Fracture Repair. *ACS Nano.* 2022. doi: 10.1021/acsnano.1c08284.

[36] NARAYANAN R, HUANG CC, RAVINDRAN S. Hijacking the Cellular Mail: Exosome Mediated Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3808674.

[37] YAHAO G, XINJIA W. The Role and Mechanism of Exosomes from Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Inducing Osteogenesis and Preventing Osteoporosis. *Cell Transplant.* 2021;30:9636897211057465.

[38] NARAYANAN K, KUMAR S, PADMANABHAN P, et al. Lineage-specific exosomes could override extracellular matrix mediated human mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials.* 2018;182:312-322.

[39] CUI Y, LUAN J, LI H, et al. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *FEBS Lett.* 2016;590(1):185-192.

[40] SHIMIZU Y, TAKEDA-KAWAGUCHI T, KURODA I, et al. Exosomes from dental pulp cells attenuate bone loss in mouse experimental periodontitis. *J Periodontol Res.* 2022;57(1):162-172.

[41] JIANG S, XU L. Exosomes from gingival mesenchymal stem cells enhance migration and osteogenic differentiation of pre-osteoblasts. *Pharmazie.* 2020;75(11):576-580.

[42] HUYNH N, VONMOSS L, SMITH D, et al. Characterization of Regulatory Extracellular Vesicles from Osteoclasts. *J Dent Res.* 2016;95(6):673-679.

[43] 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.

[44] RAIMONDI L, DE LUCA A, AMODIO N, et al. Involvement of multiple myeloma cell-derived exosomes in osteoclast differentiation. *Oncotarget.* 2015;6(15):13772-13789.

[45] TAVERNA S, PUCCI M, GIALLOMBARDO M, et al. Amphiregulin contained in NSCLC-exosomes induces osteoclast differentiation through the activation of EGFR pathway. *Sci Rep.* 2017;7(1):3170.

[46] KANG M, HUANG CC, LU Y, et al. Bone regeneration is mediated by macrophage extracellular vesicles. *Bone.* 2020;141:115627.

[47] WU J, CHEN L, WANG R, et al. Exosomes Secreted by Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Promote Alveolar Bone Defect Repair through the Regulation of Angiogenesis and Osteogenesis. *ACS Biomater Sci Eng.* 2019;5(7):3561-3571.

[48] ZHOU S, YATES KE, EID K, et al. Demineralized bone promotes chondrocyte or osteoblast differentiation of human marrow stromal cells cultured in collagen sponges. *Cell Tissue Bank.* 2005;6(1):33-44.

[49] DALEY GQ. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015;370(1680):20140376.

[50] LEI F, LI M, LIN T, et al. Treatment of inflammatory bone loss in periodontitis by stem cell-derived exosomes. *Acta Biomater.* 2022. doi: 10.1016/j.actbio.2021.12.035. Online ahead of print.

[51] SCHMALZ G, WIDBILLER M, GALLER KM. Clinical Perspectives of Pulp Regeneration. *J Endod.* 2020;46(9S):S161-S174.

[52] ERAMO S, NATALI A, PINNA R, et al. Dental pulp regeneration via cell homing. *Int Endod J.* 2018;51(4):405-419.

[53] GIRAUD T, JEANNEAU C, ROMBOUTS C, et al. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater.* 2019;35(1):24-35.

[54] SWANSON WB, GONG T, ZHANG Z, et al. Controlled release of odontogenic exosomes from a biodegradable vehicle mediates dentinogenesis as a novel biomimetic pulp capping therapy. *J Control Release.* 2020;324:679-694.

[55] RAINEY K, MICHALEK SM, WEN ZT, et al. Glycosyltransferase-Mediated Biofilm Matrix Dynamics and Virulence of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(5):e02247.

[56] ZHANG Y, HAO Z, WANG P, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells enhance fracture healing through HIF-1 α -mediated promotion of angiogenesis in a rat model of stabilized fracture. *Cell Prolif.* 2019;52(2):e12570.

[57] LI H, LIU D, LI C, et al. Exosomes secreted from mutant-HIF-1 α -modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit. *Cell Biol Int.* 2017;41(12):1379-1390.

[58] XIAN X, GONG Q, LI C, et al. Exosomes with Highly Angiogenic Potential for Possible Use in Pulp Regeneration. *J Endod.* 2018;44(5):751-758.

[59] ZHANG S, THIEBES AL, KREIMENDAHL F, et al. Extracellular Vesicles-Loaded Fibrin Gel Supports Rapid Neovascularization for Dental Pulp Regeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4226.

[60] WU M, LIU X, LI Z, et al. SHED aggregate exosomes shuttled miR-26a promote angiogenesis in pulp regeneration via TGF- β /SMAD2/3 signalling. *Cell Prolif.* 2021;54(7):e13074.

[61] XUAN K, LI B, GUO H, et al. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Sci Transl Med.* 2018;10(455):eaaf3227.

[62] JARMALAVIČIŪTĖ A, TUNAITIS V, PIVORAITĖ U, et al. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy.* 2015;17(7):932-939.

[63] HUANG S, GE X, YU J, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB J.* 2018;32(1):512-528.

[64] ZHANG S, YANG Y, JIA S, et al. Exosome-like vesicles derived from Hertwig's epithelial root sheath cells promote the regeneration of dentin-pulp tissue. *Theranostics.* 2020;10(13):5914-5931.

[65] HU X, ZHONG Y, KONG Y, et al. Lineage-specific exosomes promote the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (DPSCs) through TGF β 1/smads signaling pathway via transfer of microRNAs. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):170.

[66] ZHUANG X, JI L, JIANG H, et al. Exosomes Derived from Stem Cells from the Apical Papilla Promote Dentine-Pulp Complex Regeneration by Inducing Specific Dentinogenesis. *Stem Cells Int.* 2020;2020:5816723.

[67] HUANG CC, NARAYANAN R, ALAPATI S, et al. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration. *Biomaterials.* 2016;111:103-115.

[68] 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 Endod.* 2021;47(6):961-969.

[69] ZHANG C, SHANG Y, CHEN X, et al. Supramolecular Nanofibers Containing Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) Peptides Boost Therapeutic Efficacy of Extracellular Vesicles in Kidney Repair. *ACS Nano.* 2020;14(9):12133-12147.

[70] 罗雅馨, 毕浩然, 陈晓旭. 间充质干细胞来源外泌体与再生医学: 无细胞疗法临床应用的未来 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(19):3055-3062.

[71] YAN X, YANG B, CHEN Y, et al. Anti-Friction MSCs Delivery System Improves the Therapy for Severe Osteoarthritis. *Adv Mater.* 2021;33(52):e2104758.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)