

细胞外囊泡与慢性牙周炎

刘卓冉¹, 姜明², 李友瑞¹<https://doi.org/10.12307/2022.976>

投稿日期: 2021-12-24

采用日期: 2022-02-15

修回日期: 2022-03-10

在线日期: 2022-04-16

中图分类号:

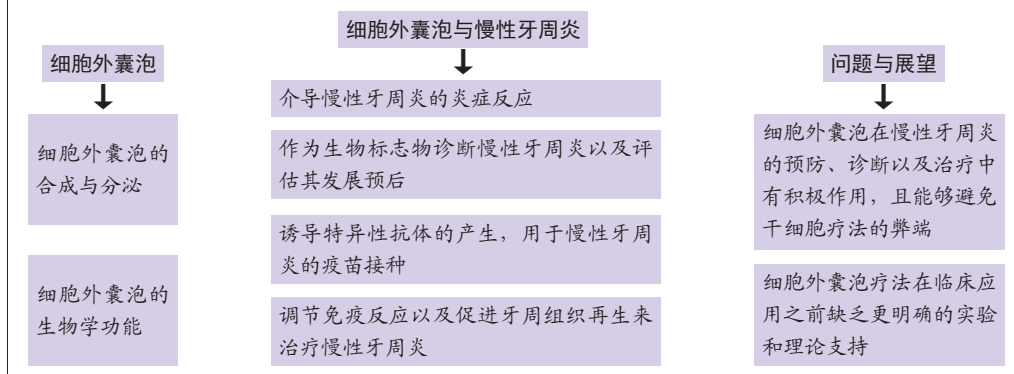
R459.9; R394.2; R781.4

文章编号:

2095-4344(2023)01-00099-06

文献标识码: A

文章快速阅读: 细胞外囊泡的合成与分泌、生物学功能及与慢性牙周炎的关系



文题释义:

慢性牙周炎: 是由牙菌斑等局部因素引起的牙周支持组织的慢性炎症, 是成年人失牙的主要原因, 因其早期症状不明显而常被人忽视, 慢性牙周炎的早期预防与干预治疗是保护牙周组织的重要手段。

细胞外囊泡: 是细胞在生理和病理条件下分泌产生的脂质双分子层包裹的球囊状结构, 不同细胞来源的细胞外囊泡可以行使不同功能, 其可参与到机体免疫应答、抗原提呈、细胞迁移、细胞分化、肿瘤侵袭等方面。

摘要

背景: 细胞外囊泡可以通过参与细胞间信号免疫调节来控制炎症反应, 同时也可修复牙周组织, 促进牙周组织的再生。将该技术应用于慢性牙周炎的预防诊断与组织再生, 有望成为一种无细胞组织再生方式。

目的: 就细胞外囊泡的合成与分泌、生物学功能、与慢性牙周炎的关系以及在慢性牙周炎的诊断、预防、治疗中的最新进展做一综述。

方法: 由第一作者应用计算机在PubMed、Web of Science和CNKI等数据库检索涉及细胞外囊泡在慢性牙周炎防治中的相关研究, 检索关键词为“extracellular vesicle, exosome, periodontal disease, immunomodulatory, outermembrane vesicles, bone regeneration”和“细胞外囊泡, 外泌体, 牙周病, 免疫调节, 外膜囊泡, 骨再生”, 检索时间范围为2014年4月至2021年10月。

结果与结论: 细胞外囊泡是几乎所有细胞都能产生的球囊状小体, 其广泛存在于各种体液中, 表面含有丰富的蛋白质、脂质以及遗传物质, 通过介导细胞间的信息传递来影响靶细胞的生物学行为。一方面, 慢性牙周炎的炎症反应离不开细菌分泌的细胞外囊泡的介导, 其能够作为生物标志物来诊断、评估慢性牙周炎; 另一方面, 利用细胞外囊泡制备的新型慢性牙周炎疫苗初有成效, 载有信息分子的细胞外囊泡还能够参与调节免疫反应, 促进牙周组织的修复与再生。因此, 在慢性牙周炎的组织损伤修复与再生领域, 细胞外囊泡是一种极具潜力的无细胞新疗法, 但其提取、纯化以及安全性仍然是临床转化前需要克服的问题。

关键词: 细胞外囊泡; 外泌体; 牙周病; 免疫调节; 外膜囊泡; 骨再生; 综述

Extracellular vesicles in chronic periodontitis

Liu Zhuoran¹, Jiang Ming², Li Yourui¹

¹Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China; ²First Department of Dentistry and Endodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China

Liu Zhuoran, Master candidate, Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600, Shandong Province, China

Corresponding author: Jiang Ming, MD, Professor, First Department of Dentistry and Endodontics, Jinan Stomatological Hospital, Jinan 250000, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Extracellular vesicles can control the inflammatory response by participating in immunomodulation of intercellular signaling, while also repairing periodontal tissue and promoting periodontal tissue regeneration. The application of this technology to the preventive diagnosis and tissue regeneration of chronic periodontitis is expected to become a method of cell-free tissue regeneration.

OBJECTIVE: To review the synthesis and secretion of extracellular vesicles, biological function, relationship with chronic periodontitis, and recent advances in the diagnosis, prevention and treatment of chronic periodontitis.

METHODS: The first author applied the computer to search for relevant studies involving extracellular vesicles in the prevention and treatment of chronic periodontitis in databases such as PubMed, Web of Science and CNKI. The search keywords were “extracellular vesicle, exosome, periodontal disease, immunomodulatory, outermembrane vesicles, bone regeneration” in Chinese and English. The retrieval time was from April 2014 to October 2021.

¹滨州医学院附属医院口腔修复科, 山东省滨州市 256600; ²济南市口腔医院牙体牙髓病1科, 山东省济南市 250000

第一作者: 刘卓冉, 女, 1997年生, 湖北省十堰市人, 汉族, 滨州医学院在读硕士, 主要从事口腔修复学研究。

通讯作者: 姜明, 博士, 教授, 济南市口腔医院牙体牙髓病1科, 山东省济南市 250000

<https://orcid.org/0000-0002-8121-6828> (刘卓冉)

引用本文: 刘卓冉, 姜明, 李友瑞. 细胞外囊泡与慢性牙周炎 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(1):99-104.



RESULTS AND CONCLUSION: Extracellular vesicles are balloon-like bodies that can be produced by almost all cells, which are widely present in various body fluids, and are rich in proteins, lipids and genetic material on the surface, which affect the biological behavior of target cells by mediating information transfer between cells. On the one hand, the inflammatory response of chronic periodontitis is inseparable from the mediation of extracellular vesicles secreted by bacteria, which can be used as a biomarker to diagnose and evaluate chronic periodontitis; on the other hand, the new chronic periodontitis vaccine made by extracellular vesicles has initially been effective, and the extracellular vesicles containing information molecules can also participate in regulating the immune response and promoting the repair and regeneration of periodontal tissue. Therefore, in the field of tissue damage repair and regeneration of chronic periodontitis, extracellular vesicles are a new and potential cell-free therapy, but their extraction, purification and safety are still challenges to be overcome before clinical translation.

Key words: extracellular vesicle; exosome; periodontal disease; immunomodulation; outer membrane vesicle; bone regeneration; review

How to cite this article: LIU ZR, JIANG M, LI YR. Extracellular vesicles in chronic periodontitis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2023;27(1):99-104.

0 引言 Introduction

慢性牙周炎是一种生活中最常见的口腔慢性炎症性疾病,其特点是以牙周支持组织的慢性破坏为主。第四次全国口腔健康流行病学调查报告显示,87%-97%的中国成年人患有不同程度的牙周疾病[1]。如果对牙周病的发展不加以干预和治疗,那么往往会导致牙周附着的丧失、牙槽骨的吸收甚至牙齿的松动脱落,是成年人失牙的主要原因。目前多因素所致的牙周炎疾病的致病机制尚不明确,早期牙周病常因其症状不明显以及X射线片诊断的局限性无法进行明确诊断,晚期牙周病组织再生治疗的预后也难以达到理想状态。慢性牙周炎的可能致病机制、诊断方法以及干预治疗方法都是慢性牙周炎诊疗中亟待解决的问题。

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EV)是指由细胞产生并分泌到细胞外的囊泡状小体[2],其最初被认为是无生物活性和功能的微粒,而近年来发现其能够在免疫调节[3]、血管生成[4]、组织修复[5]、肿瘤微环境调节等生物过程中发挥重要作用[6]。细胞外囊泡内部以及表面包含与其来源细胞类似的蛋白质、脂质、微小核糖核酸、核糖核酸和许多其他非编码核糖核酸[7],细胞外囊泡将信息物质从母细胞运送到靶细胞,介导细胞间的通讯,从而影响靶细胞的生物学行为,包括细胞凋亡、增殖、迁移和谱系特异性分化[8],因此细胞外囊泡逐渐被评估为疾病诊断和预后的生物标志物。近年来,国内外研究表明细胞外囊泡与慢性牙周炎之间存在着密切联系,但其中机制仍不明确。文章对细胞外囊泡在慢性牙周炎发生机制中可能发挥的作用及其在慢性牙周炎预防、诊断、治疗中的研究进展做一综述,为慢性牙周炎的发生机制以及临床慢性牙周炎的疫苗研制和牙周组织的修复再生提供细胞外囊泡方向的思路。

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 第一作者在2020年10月至2021年10月进行检索。

1.1.2 检索文献时限 2014年4月至2021年10月。

1.1.3 检索数据库 中国知网、万方数据库、PubMed数据库。

1.1.4 检索词 中文检索词为:细胞外囊泡,外泌体,外膜囊泡,牙周病,免疫调节,骨再生。英文检索词为: extracellular vesicle, exosome, outer membrane vesicles, periodontal disease, immunomodulatory, bone regeneration。

1.1.5 检索文献类型 综述性论文、研究性论文及著作。

1.1.6 检索策略 以PubMed数据库为例,见图1。

1.1.7 检索文献量 中文文献20篇,英文文献70篇。

1.2 纳入标准 细胞外囊泡与慢性牙周炎相关的文献。

1.3 排除标准 ①与研究目的不相关文献;②重复性文献;③观点陈旧性文献。

1.4 资料整合 共检索到90篇文献,中文文献20篇,英文文献70篇,排除与研究目的不相关、重复性以及观点陈旧性文献40篇,最终纳入50篇符合标准的文献进行综述,见图2。

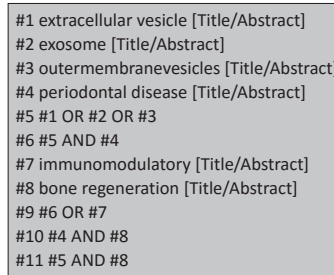


图1 | PubMed 数据库检索策略

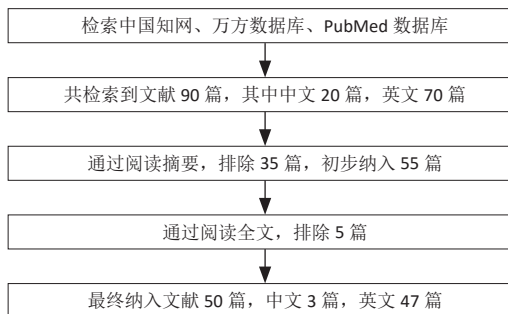


图2 | 文献检索流程图

2 结果 Results

2.1 细胞外囊泡的合成与分泌 细胞外囊泡是细胞在生理和病理条件下分泌产生的脂质双分子层包绕的球囊状结构,其直径从40-1 000 nm不等。根据其大小和生成途径,细胞外囊泡可分为3种主要类型:外泌体、微泡和凋亡小体[9]。外泌体是多囊泡体通过溶酶体降解或者与细胞质膜融合释放到细胞外的小泡,直径在30-120 nm之间;微泡是通过出芽方式直接从细胞膜表面脱落产生,其直径在100-1 000 nm之间;凋亡小体是由caspase介导的程序性死亡或凋亡细胞出泡形成的泡状突起[10],直径在500-4 000 nm之间,见图3。

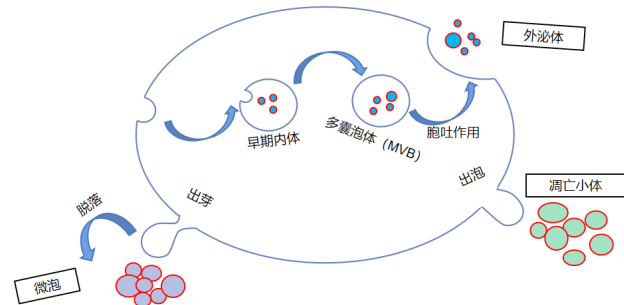


图3 | 细胞外囊泡的分泌

细胞外囊泡来自于不同生物体的细胞,多种研究表明,细胞外囊泡可由不同类型的哺乳动物细胞分泌(包括骨髓间充质干细胞、免疫细胞、骨细胞等)[11],也能够多细胞生物的体液中分离出来(包括血液、尿液、唾液、母乳、精液等)[12]。原核生物(例如细菌细胞)产生的细胞外囊泡通过介导细菌-细菌和

细菌-宿主间相互作用，在生理和病理功能中发挥重要作用，而来自革兰阴性菌的细胞外囊泡通常被称为外膜囊泡^[13]。

细胞外囊泡的内部以及表面包含各种蛋白质、脂质、微小核糖核酸、核糖核酸和许多其他非编码核糖核酸，其中蛋白质占据细胞外囊泡内容物的绝大部分，主要是由非特异性蛋白以及特异性蛋白组成。非特异性蛋白在细胞外囊泡的生成和释放中发挥重要的作用，如膜融合与膜转运蛋白(如Annexin、GTPases、Rab2、Rab7)、热休克蛋白(HSP70、HSP84、HSP90)、跨膜蛋白(如CD9、CD63、CD59)、新陈代谢相关酶(如磷脂酶)等^[14]。特异性蛋白主要与细胞的特异性功能相关，如B淋巴细胞表面的黏附分子(MHC I、II类分子)能够刺激CD4⁺细胞的抗肿瘤反应；树突细胞也能产生具有抗原呈递能力的细胞外囊泡。在不同的生理病理条件下特异性蛋白发挥不同的调节功能，因此也具有生物学标志物的潜力^[15]。细胞外囊泡膜上富含胆固醇、鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸、神经酰胺等，而在细胞外囊泡上表达的磷脂酰丝氨酸是其特征之一^[16]。除了蛋白质和脂类，细胞外囊泡还可以整合遗传物质(miRNA、miRNA、circularRNA、circRNA等)，其中异常表达的circRNAs作为microRNA或蛋白质翻译的新模板在许多疾病的发生中起关键作用^[17]，见图4。

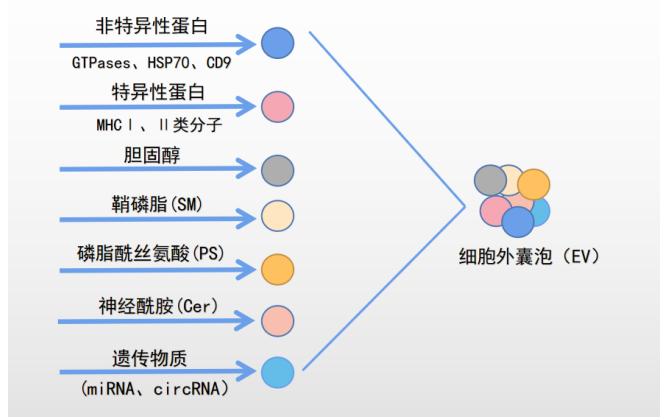


图4 | 细胞外囊泡的组成

2.2 细胞外囊泡的生物学功能 近年来，各项研究发现，虽然所有细胞都通过释放细胞外囊泡来清除细胞内的代谢废物，但细胞内吞作用形成的细胞外囊泡也包含了许多重要信息分子^[18]。

来自肿瘤细胞的细胞外囊泡发出细胞侵袭性的信号，并携带对以前使用的治疗方法(化疗、放疗)耐药的信息，从而成为选择个人适合疗法的标记物^[19]。当肿瘤细胞来源细胞外囊泡被器官特异性细胞摄取时，重新创造生态位，为转移前做准备。在器官模型中，利用细胞外囊泡疗法可以重新定向肿瘤细胞的转移。

细胞外囊泡被宿主细胞释放后可与受体细胞合并释放内容物，在内化以后，它们可以改变基因的表达。HUANG等^[20]对人牙髓干细胞来源细胞外囊泡诱导原始人牙髓干细胞和骨髓间充质干细胞向牙源性分化的潜能进行了评估，发现人牙髓干细胞和骨髓间充质干细胞都能内吞与基质蛋白(如I型胶原)结合的细胞外囊泡，引起牙源性分化所需基因表达的增加，因此细胞外囊泡可以作为重要的诊断以及预后的标记物。

表达自杀基因酵母融合胞嘧啶脱氨酶::尿嘧啶磷酸核糖转移酶(yCD::UPRT)的间充质干细胞对于肿瘤的抑制倾向是持续性的，由自杀基因yCD::UPRT转导的人牙髓干细胞来源细胞外囊泡中含有其mRNA。这些细胞外囊泡容易穿透并整合人类肿瘤细胞，在前药5-氟胞嘧啶存在的情况下，可导致肿瘤细胞凋亡^[21]。蛋白质组学分析、核酸测序分析以及胞外囊泡研究的数

据库都能够让人们进一步了解以及探索细胞外囊泡所介导的生物学效应和其广泛的临床应用潜力。

2.3 细胞外囊泡与慢性牙周炎

- 细胞外囊泡介导慢性牙周炎的炎症反应
- 细胞外囊泡在慢性牙周炎的诊断、病情以及预后评估中的作用
- 细胞外囊泡在预防慢性牙周炎中的作用
- 细胞外囊泡在慢性牙周炎免疫治疗中的应用
- 细胞外囊泡在牙周组织修复再生中的潜能

2.3.1 细胞外囊泡介导慢性牙周炎的炎症反应 菌斑微生物及其产物的侵袭是慢性牙周炎的始动因子，菌斑中的细菌种类繁多，研究证实其中30余种细菌与牙周病的发生和发展相关^[22]，主要包括牙龈卟啉单胞菌(Porphyrromonas gingivalis, Pg)、福赛斯坦纳菌(Tannerella forsythensis, Tf)、牙密螺旋体(Treponema denticola, Td)、伴放线放线杆菌(Actinobacillus actinomycetecmcomitans, Aa)等。

巨噬细胞是最早对细菌及其产物做出反应的免疫细胞之一，通过比较巨噬细胞对牙龈卟啉单胞菌及其细胞外囊泡的反应，发现牙龈卟啉单胞菌来源细胞外囊泡可显著刺激巨噬细胞产生肿瘤坏死因子α、白细胞介素12p70、白细胞介素6、白细胞介素10、干扰素β和一氧化氮^[23]，而牙龈卟啉单胞菌产生的这些介质水平非常低。牙龈卟啉单胞菌来源细胞外囊泡刺激诱导巨噬细胞代谢转移，增加糖酵解重要基因的表达，降低与三羧酸循环相关基因的表达。炎症小体信号转导和细胞凋亡检查发现，牙龈卟啉单胞菌并不激活巨噬细胞中的炎症小体，相比之下其细胞外囊泡诱导巨噬细胞炎症小体的激活^[24]。FIMA是一种广为人知的黏附调节因子，其被认为是牙龈卟啉单胞菌黏附和侵袭宿主细胞的重要因子。来自FIMA突变株的细胞外囊泡能够穿透细胞，但在缺失牙龈卟啉单胞菌的细胞外囊泡的情况下，渗透率显著降低^[25]。这些数据表明了牙龈卟啉单胞菌来源细胞外囊泡对巨噬细胞炎症表型、线粒体功能以及炎症小体激活有更为显著的影响，这提示牙龈卟啉单胞菌来源细胞外囊泡可能在慢性牙周炎的发生机制中存在潜在影响。

伴放线放线杆菌(Aa)伴发疾病与局限性侵袭性牙周炎(LAP)发生相关，伴放线放线杆菌产生许多毒力因子，包括一种白毒素(LtxA)，它能特异性地杀死宿主免疫细胞，为细菌提供定植优势^[26]。明确白毒素被运送到宿主细胞的机制可以帮助识别局限性侵袭性牙周炎的新治疗靶点。研究发现含白毒素的伴放线放线杆菌胞外囊泡比不含白毒素的细胞外囊泡的毒性更强，说明正是在细胞外囊泡中存在的白毒素介导了这种细胞毒性。白毒素有2种不同的分泌形式，一种是需要宿主细胞上的淋巴细胞功能相关抗原1和胆固醇的游离形式，另一种是不需要淋巴细胞功能相关抗原1和胆固醇的细胞外囊泡相关形式。细胞外囊泡结合方式为白毒素提供了与多种宿主细胞类型相互作用的能力，从而提高了白毒素的活性。这提示细胞外囊泡可以为细菌毒素提供特异性传递系统，从而加强细菌毒素的作用^[27]。这一发现对于明确伴放线放线杆菌的致病机制以及设计抑制白毒素活性的药物治疗局限性牙周炎具有重要意义。

2.3.2 细胞外囊泡在慢性牙周炎的诊断、病情以及预后评估中的作用 细胞外囊泡能被选择性分泌到细胞外，其mRNA可作为慢性牙周炎早期诊断以及炎症发展导致骨吸收的生物标志物^[28]。

生物信息学分析表明慢性牙周炎与炎症基因表达特征有关，程序性死亡-配体1也被称为B7-H1受体，在细胞介导的免疫反应中发挥重要作用，程序性死亡-配体1调节T细胞的

激活和耐受, 宿主细胞中程序性死亡-配体 1 的高表达可能有助于炎症疾病的慢性化^[29]。牙周炎患者唾液来源细胞外囊泡中富含程序性死亡-配体 1, 而且其表达与炎症程度呈正相关, 其程序性死亡-配体 1 的表达明显高于非牙周炎患者。这表明唾液来源细胞外囊泡中程序性死亡-配体 1 mRNA 在牙周炎不同分期之间差异有统计学意义^[30], 提示唾液来源细胞外囊泡中程序性死亡-配体 1 mRNA 的检测具有鉴别牙周炎和健康人的潜力, 重度牙周炎患者牙周组织中程序性死亡-配体 1 的表达增加可能与机体需要更多的程序性死亡-配体 1 来抑制炎症组织的破坏有关。

慢性牙周炎晚期可能通过干扰肿瘤坏死因子 α 作为杠杆来干预成骨和破骨细胞的平衡^[31], 导致骨组织的吸收以及抑制成骨作用。破骨细胞分泌富含 mRNA 的细胞外囊泡, 而破骨细胞衍生的细胞外囊泡优先将 miR-214 转移到成骨细胞中以抑制其活性。这些细胞外囊泡通过 ephrinA2 和 EphA2 之间的相互作用特异性识别成骨细胞。在破骨细胞特异性 miR-214 转基因小鼠中, 细胞外囊泡分泌到血清中, miR-214 和 ephrinA2 水平升高。因此, 破骨细胞分泌富含 mRNA 的细胞外囊泡在成骨细胞活性中具有抑制作用^[32], 提示胞外囊泡在骨生成以及骨吸收过程中的有效调节作用, 揭示细胞外囊泡可作为慢性牙周炎的潜在生标志物用于诊断牙槽骨的早期吸收。

2.3.3 细胞外囊泡在预防慢性牙周炎中的作用 牙周炎关系到口腔和全身的健康, 因此迫切需要新的预防方法来预防该疾病, 利用牙龈卟啉单胞菌的胞外囊泡开发新型疫苗已经初有成效。经鼻或经皮注射牙龈卟啉单胞菌 40 kD 外膜蛋白可诱导特异性抗体, 从而抑制牙龈卟啉单胞菌的共聚集活性^[33], 这意味着这种破碎的外膜蛋白可用于慢性牙周炎的疫苗接种。

外膜囊泡是革兰阴性菌的细胞外囊泡的统称, 外膜囊泡的结构和功能稳定, 表现为对蛋白酶 K 的抗性和长期储存的能力, 被认为有利于将外膜囊泡组分带入宿主免疫系统。外膜囊泡鼻腔接种小鼠可诱导外膜囊泡以剂量依赖的方式在血液和唾液中产生牙龈卟啉单胞菌特异性抗体, Toll 样受体 3 激动剂 Poly(I: C) 的加入显著增强了这种抗体的产生。用外膜囊泡 + Poly(I: C) 佐剂免疫的小鼠血清样本检测发现不仅疫苗株和异源株的牙龈蛋白水解酶活性受到明显抑制, 对小鼠牙龈菌蛋白水解酶活性也有明显的抑制作用, 提示外膜囊泡 + Poly(I: C) 免疫血清可降低牙龈卟啉单胞菌的存活率。外膜囊泡 + Poly(I: C) 滴鼻免疫小鼠血清 IgG (包括 IgG1 和 IgG2a) 和唾液 S-IgA 水平升高, 免疫后至少维持 28 周和 18 周。外膜囊泡在近端器官中的积累实验和脑内注射实验同时证实了外膜囊泡的安全性^[34]。外膜囊泡 + Poly(I: C) 鼻腔免疫在牙龈卟啉单胞菌清除和安全性方面是一种可行的疫苗策略。

2.3.4 细胞外囊泡在慢性牙周炎免疫治疗中的应用 在牙周形成炎症的过程中, 一系列的微生物因子诱导了宿主的一系列反应。干细胞可以通过旁分泌机制创造最佳的微环境, 以减少炎症和促进组织修复, 其中细胞外囊泡及其 microRNAs(miRNAs) 起着关键作用^[35]。

牙周炎患者外周血中辅助 T 细胞 17(Th17)/ 调节性 T 细胞 (Treg) 的平衡不稳定, 证明慢性牙周炎患者存在 Th17/Treg 功能障碍^[36], 通过免疫介导的组织破坏诱导 Th17 上调或 Treg 下调^[37]。通过牙龈卟啉单胞菌脂多糖模拟慢性牙周炎所导致的炎症微环境, 从牙周膜干细胞中提取其胞外囊泡, 在正常以及炎症条件下观察其对 CD4⁺T 细胞产生的作用, 结果炎症条件下胞外囊泡组辅助 T 细胞 17 表达明显低于正常条件下胞外囊泡组, 调节性 T 细胞表达高于正常条件下胞外囊泡组, 进一步研究发现 miR-

155-5p 在两组之间显示出显著的差异, miR-155-5p 被抑制, 调节性 T 细胞下调, 辅助 T 细胞 17 上调, 辅助 T 细胞 17/ 调节性 T 细胞比例上升, 机体处于炎症状态。提示牙周膜干细胞来源细胞外囊泡可以将 miR-155-5p 转移到 CD4⁺T 细胞中, 进而调节 CD4⁺T 细胞中蛋白的表达, 从而影响辅助 T 细胞 17/ 调节性 T 细胞的平衡, 对炎症微环境有调节和减轻炎症的作用^[38]。

在牙周病引起的先天性免疫中, 巨噬细胞对牙周病原体起着至关重要的防御作用。针对不同的局部微环境, 幼稚的巨噬细胞 (M0) 可以极化为两种不同的表型, 促炎 (M1) 或抗炎 (M2), 并在不同的生理或病理条件下发挥不同的作用^[39]。

在患有慢性牙周炎的患者中, M1 巨噬细胞起主要作用, M1 相关促炎因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 12、白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 、CD86 水平也较高^[40]。当脂多糖和干扰素 γ 作用于巨噬细胞时, 可诱导高水平的白细胞介素 12、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β , 从而促进了巨噬细胞的炎症反应。牙龈间充质干细胞衍生细胞外囊泡作用于巨噬细胞后, 白细胞介素 12、肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β 的表达低于未添加细胞外囊泡的对照组, 而 M2 巨噬细胞高表达的白细胞介素 10 水平高于对照组^[41], 提示牙龈间充质干细胞来源细胞外囊泡与巨噬细胞共同作用时能够抑制 M1 促炎因子的分泌, 同时刺激 M2 抗炎因子的水平增加, 促使细胞外囊泡在临床治疗巨噬细胞所致相关炎症时有了替代牙龈间充质干细胞的可能。

2.3.5 细胞外囊泡在牙周组织修复再生中的潜能 再生医学中, 干细胞治疗是最主要的途径, 具有自我更新以及多向分化潜能的间充质干细胞在动物研究和人类研究中应用广泛^[42]。然而, 干细胞体内移植存活量少, 增殖、分化不可控, 输送、储存困难等局限性始终难以克服。而近年来研究发现干细胞旁分泌作用中产生的细胞外囊泡能够介导新组织的宿主细胞形成, 诱导细胞分化、组织再生和血管生成, 它们也可以通过参与细胞间信号分泌的免疫调节作用来控制伤口的愈合和再生^[8]。

利用大鼠牙周骨内缺损模型评估人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡复合胶原海绵的治疗效果, 结果可见成纤维样细胞浸润增强, 促进了新软组织的形成, 同时发现胶原海绵残留物。相反, 未治疗组细胞浸润较少, 牙龈软组织塌陷。而且仅有细胞外囊泡处理组在骨缺损顶端显示少量新形成的牙槽骨。而后通过对牙周膜细胞培养, 证明了人骨髓间充质干细胞所分泌的胞外囊泡可被牙周膜细胞快速摄取, 并且通过 CD73 介导的腺苷受体激活促生存的 AKT 和 ERK 信号来促进牙周膜细胞的迁移和增殖, 借此来促进牙周再生。若将该技术应用于牙周组织再生^[43], 那么可以避免细胞移植产生免疫排斥反应以及伦理等问题, 为将人骨髓间充质干细胞所分泌的胞外囊泡作为一种即用且无细胞的牙周再生疗法提供基础。

人骨髓间充质干细胞含有多种血管生长因子, 如血管内皮生长因子^[44], 它对周围的内皮细胞有趋化因子作用, 可以增加局部区域的血管数量, 通过刺激血管内皮细胞来促进骨的形成与发育^[45]。利用大鼠颅骨缺损模型, 每周通过分析人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡组、人骨髓间充质干细胞组、人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡 + 血管生成抑制剂组样本来评估骨形成, 结果表明人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡组为受体细胞提供了一些与血管生成和骨再生相关的信息, 从而激活了受体细胞分泌的血管内皮生长因子和成骨相关旁分泌因子。人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡组培养的人骨髓间充质干细胞中血管生成相关基因如血管内皮生长因子、血管生成素 1 和血管生成素 2 的表达也显著上调^[46], 提示人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡组具有显著的成骨潜能, 人骨髓间充质干细

胞中含有的细胞外囊泡可能通过促进血管生成在骨再生中发挥重要作用。

软骨修复和再生受软骨细胞和软骨细胞染色体的影响^[47]。有研究在大鼠股骨远端的滑车沟上制造骨软骨缺损模型，然后分为两组，实验组术后关节内立即注射人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡，另一组关节内立即注射 PBS，随后每周 1 次采集股骨远端和滑膜组织样本进行分析，同时采集滑液样本进行细胞因子的测定，结果可见，细胞外囊泡组最早在 2 周就开始修复临界大小的骨软骨缺损，显著促进了新组织的形成和 II 型胶原的细胞外基质沉积^[48]。与此同时，细胞外囊泡组也伴随着活跃的细胞迁移和增殖，这从软骨缺损部位和滑膜上的 PCNA 阳性细胞数量的增加可以体现。在第 6 周时，细胞外囊泡处理组的 CCP3 阳性凋亡细胞数量明显减少，到 12 周时，与对照组 CCP3 阳性数量无明显区别^[49]。人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡的许多成分是有组织再生所必需的，并进一步指出细胞外囊泡是有利于软骨修复的“无细胞”策略。见表 1。

表 1 | 细胞外囊泡与慢性牙周炎的关系

阶段	来源	意义	参考文献
炎症反应阶段	牙龈卟啉单胞菌来源细胞外囊泡	刺激诱导巨噬细胞代谢转移，增加糖酵解重要基因的表达，降低与三羧酸循环相关基因的表达，从而激活炎症小体	[22-24]
炎症反应阶段	牙龈卟啉单胞菌来源细胞外囊泡	协同黏附因子 F1MA 穿透细胞，参与牙龈	[25]
炎症反应阶段	伴放线放线杆菌来源细胞外囊泡	为细菌毒素提供特异性传递系统，为细菌提供定植优势，从而加强细菌毒素的作用	[26-27]
诊断及预后阶段	牙周炎患者唾液来源细胞外囊泡	从炎症疾病的慢性化相关的程序性死亡 - 配体 1 高表达趋势来诊断慢性牙周炎	[28-30]
诊断及预后阶段	破骨细胞来源细胞外囊泡	通过 ephrinA2 和 EphA2 之间的相互作用特异性识别成骨细胞以抑制其活性	[31-32]
疾病的防治阶段	牙龈卟啉单胞菌来源细胞外囊泡	以剂量依赖的方式在血液和唾液中产生牙龈卟啉单胞菌特异性抗体，以用作牙周炎疫苗的候选免疫原和佐剂	[33-34]
疾病的防治阶段	牙周膜干细胞来源细胞外囊泡	将 miR-155-5p 转移到 CD4 ⁺ T 细胞中，调节其中蛋白表达，从而影响辅助 T 细胞 17/ 调节性 T 细胞的平衡，对炎症微环境有调节和减轻炎症的作用	[36-38]
疾病的防治阶段	牙龈间充质干细胞来源细胞外囊泡	与巨噬细胞共同作用时能够抑制 M1 促炎因子的分泌，同时刺激 M2 抗炎因子的水平增加	[39-41]
疾病的防治阶段	人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡	被牙周膜细胞摄取并且通过 CD73 激活促生存的 AKT 和 ERK 信号来促进牙周膜细胞的迁移和增殖	[43]
疾病的防治阶段	人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡	为受体细胞提供了与血管生成和骨再生相关的信息，激活受体细胞分泌的血管内皮生长因子和成骨相关旁分泌因子	[44-46]
疾病的防治阶段	人骨髓间充质干细胞来源细胞外囊泡	促进新组织的形成和 II 型胶原等细胞外基质沉积，CCP3 阳性凋亡细胞数量明显减少，修复软骨缺损区域	[48-49]

3 讨论 Discussion

3.1 既往他人在该领域研究的贡献和存在的问题 尽管该文章探讨了细胞外囊泡在慢性牙周炎中的研究进展，但是目前关于细胞外囊泡的研究仅局限于动物和细胞实验阶段，主要包括牙龈卟啉单胞菌、伴放线放线杆菌、牙周膜干细胞、人骨髓间充质干细胞等。

3.2 作者综述区别于他人他篇的特点 不同来源细胞外囊泡可以行使不同的功能，一方面，细菌来源的细胞外囊泡可以介导慢性牙周炎的炎症反应，是慢性牙周炎发病机制的潜在因素^[50]；另一方面，细胞外囊泡还能够参与调节免疫反应，促进牙周组织的修复与再生。因此，讨论细胞外囊泡与慢性牙周炎之间的关系至为重要。上述研究表明，细胞外囊泡可以诱导炎症小体（如白细胞介素）的激活、为细菌毒素（如 LtxA）提供特异性传递系统，

也可以通过细胞平衡（如 Th17/Treg、M1/M2）调节炎症微环境，调控某些信号通路（如 AKT 和 ERK）来促进牙周组织的修复再生。与传统干细胞疗法相比，细胞外囊泡可以积极和消极地调节免疫反应，同时细胞外囊泡疗法出现严重并发症，如肿瘤、栓子形成或移植物抗宿主反应的风险较低。

3.3 综述的局限性 在细胞外囊泡疗法成功转向临床应用之前仍然有许多限制和挑战需要克服，如其在慢性牙周炎的诊断、病情评估和治疗中的作用机制需进一步进行研究，不同种类细胞外囊泡的特征以及精确分离、纯化方法尚不明确，细胞外囊泡的用量、应用的安全性、稳定性和储存策略均需进一步探索，见表 2。

表 2 | 细胞外囊泡疗法的优缺点

优点	缺点
(1) 靶向特定的组织，调节特定的细胞功能	(1) 疗法仅局限于实验阶段，数据样本不足
(2) 通过细胞平衡（如 Th17/Treg、M1/M2）调节炎症微环境	(2) 在慢性牙周炎中的诊断治疗作用机制不够明确
(3) 调控某些信号通路（如 AKT 和 ERK）来促进牙周组织的修复再生	(3) 不同种类细胞外囊泡的特征以及精确分离、纯化方法尚不明确
(4) 可以积极和消极地调节免疫反应	(4) 细胞外囊泡疗法的用量以及在在不同器官的分布因素均不明确
(5) 出现严重并发症（如肿瘤、栓子形成或移植物抗宿主反应）的风险较低	(5) 应用的安全性、稳定性和储存策略均需进一步探索

3.4 综述的重要意义 细胞外囊泡工程的最新进展证明了产生无细胞纳米级颗粒的可能性，这些颗粒可以调节特定的细胞功能，并可以靶向特定的组织和细胞。

致谢：感谢姜明老师对文章提供的耐心指导，感谢李友瑞老师的无私帮助。

作者贡献：姜明、刘卓冉负责综述构思设计，刘卓冉负责文章写作校对，刘卓冉参与文献收集、分析总结，李友瑞负责项目指导。

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表稿宗旨。

4 参考文献 References

- 王兴. 第四次全国口腔健康流行病学调查报告 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- COLOMBO M, RAPOSO G, THÉRY C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:255-289.
- JIANG XY, YANG YZ, HU XL, et al. Research Advances on the Biological Characteristics of Hematological Malignant Cells Immunologically Regulated by Exosome—Review. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2020;28(1):339-342.
- MOGHIMAN T, BARGHCHI B, ESMAEILI SA, et al. Therapeutic angiogenesis with exosomal microRNAs: an effectual approach for the treatment of myocardial ischemia. *Heart Fail Rev.* 2021;26(1):205-213.
- TAN SHS, WONG JRY, SIM SJY, et al. Mesenchymal stem cell exosomes in bone regenerative strategies—a systematic review of preclinical studies. *Mater Today Bio.* 2020;7:10067.

- [6] XIE Y, DANG W, ZHANG S, et al. The role of exosomal noncoding RNAs in cancer. *Mol Cancer*. 2019;18(1):37.
- [7] ZABOROWSKI MP, BALAJ L, BREAKEFIELD XO, et al. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015;65(8):783-797.
- [8] COOPER LF, RAVINDRAN S, HUANG CC, et al. A Role for Exosomes in Craniofacial Tissue Engineering and Regeneration. *Front Physiol*. 2020; 10:1569.
- [9] RAPOSO G, STOOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-383.
- [10] TODOROVA D, SIMONCINI S, LACROIX R, et al. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ Res*. 2017;120(10):1658-1673.
- [11] MENDT M, REZVANI K, SHPALL E. Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(Suppl 2): 789-792.
- [12] 王璵, 陈建英. 细胞外囊泡研究新进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(4):621-626.
- [13] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(1):13-24.
- [14] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREF AR, et al. Exosomes: composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. *Mol Cancer*. 2019;18(1):75.
- [15] DENG F, MILLER J. A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *J Histotechnol*. 2019;42(4):226-239.
- [16] VERDERIO C, GABRIELLI M, GIUSSANI P. Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *J Lipid Res*. 2018;59(8):1325-1340.
- [17] SKOTLAND T, HESSVIK NP, SANDVIG K, et al. Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res*. 2019;60(1):9-18.
- [18] STANKO P, ALTANEROVA U, JAKUBECHOVA J, et al. Dental Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Exosomes. *Stem Cells Int*. 2018;2018: 8973613.
- [19] HOSHINO A, COSTA-SILVA B, SHEN TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015;527(7578):329-335.
- [20] 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.
- [21] ALTANER C. Prodrug Gene Therapy for Cancer Mediated by Mesenchymal Stem/Stromal Cells Engineered to Express Yeast Cytosine deaminase::Uracilphosphoribosyltransferase. *J Stem Cell Res Ther*. 2015;5(2):264.
- [22] NUNN ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 2003;32:11-23.
- [23] VEITH PD, CHEN YY, GORASIA DG, et al. Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors. *J Proteome Res*. 2014;13(5):2420-2432.
- [24] FLEETWOOD AJ, LEE MKS, SINGLETON W, et al. Metabolic Remodeling, Inflammasome Activation, and Pyroptosis in Macrophages Stimulated by Porphyromonas gingivalis and Its Outer Membrane Vesicles. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:351.
- [25] MANTRI CK, CHEN CH, DONG X, et al. Fimbriae-mediated outer membrane vesicle production and invasion of Porphyromonas gingivalis. *Microbiologyopen*. 2015;4(1):53-65.
- [26] NYGREN P, BALASHOVA N, BROWN AC, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin causes activation of lymphocyte function-associated antigen 1. *Cell Microbiol*. 2019;21(3):e12967.
- [27] NICE JB, BALASHOVA NV, KACHLANY SC, et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin Is Delivered to Host Cells in an LFA-1-Independent Manner When Associated with Outer Membrane Vesicles. *Toxins (Basel)*. 2018;10(10):414.
- [28] KIMAK A, STRYCHARZ-DUDZIAK M, BACHANEK T, et al. Lipids and lipoproteins and inflammatory markers in patients with chronic apical periodontitis. *Lipids Health Dis*. 2015;14:162.
- [29] ZAMANI MR, ASLANI S, SALMANINEJAD A, et al. PD-1/PD-L and autoimmunity: A growing relationship. *Cell Immunol*. 2016;310:27-41.
- [30] YU J, LIN Y, XIONG X, et al. Detection of Exosomal PD-L1 RNA in Saliva of Patients With Periodontitis. *Front Genet*. 2019;10:202.
- [31] ZHOU R, SHEN L, YANG C, et al. Periodontitis May Restrain the Mandibular Bone Healing via Disturbing Osteogenic and Osteoclastic Balance. *Inflammation*. 2018;41(3):972-983.
- [32] SUN W, ZHAO C, LI Y, et al. Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity. *Cell Discov*. 2016;2: 16015.
- [33] MAEBA S, OTAKE S, NAMIKOSHI J, et al. Transcutaneous immunization with a 40-kDa outer membrane protein of Porphyromonas gingivalis induces specific antibodies which inhibit coaggregation by P. gingivalis. *Vaccine*. 2005;23(19):2513-2521.
- [34] NAKAO R, HASEGAWA H, DONGYING B, et al. Assessment of outer membrane vesicles of periodontopathic bacterium Porphyromonas gingivalis as possible mucosal immunogen. *Vaccine*. 2016;34(38): 4626-4634.
- [35] DU YM, ZHUANSUN YX, CHEN R, et al. Mesenchymal stem cell exosomes promote immunosuppression of regulatory T cells in asthma. *Exp Cell Res*. 2018;363(1):114-120.
- [36] WANG L, WANG J, JIN Y, et al. Oral administration of all-trans retinoic acid suppresses experimental periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. *J Periodontol*. 2014;85(5):740-750.
- [37] KARTHIKEYAN B, TALWAR, ARUN KV, et al. Evaluation of transcription factor that regulates T helper 17 and regulatory T cells function in periodontal health and disease. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(Suppl 2): S672-676.
- [38] 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.
- [39] YANG J, ZHU Y, DUAN D, et al. Enhanced activity of macrophage M1/M2 phenotypes in periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2018;96:234-242.
- [40] RIOS FJ, TOUYZ RM, MONTEZANO AC. Isolation and Differentiation of Human Macrophages. *Methods Mol Biol*. 2017;1527:311-320.
- [41] WANG R, JI Q, MENG C, et al. Role of gingival mesenchymal stem cell exosomes in macrophage polarization under inflammatory conditions. *Int Immunopharmacol*. 2020;81:106030.
- [42] MORENO SANCHO F, LEIRA Y, ORLANDI M, et al. Cell-Based Therapies for Alveolar Bone and Periodontal Regeneration: Concise Review. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(12):1286-1295.
- [43] 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.
- [44] LEE E, KO JY, KIM J, et al. Osteogenesis and angiogenesis are simultaneously enhanced in BMP2-/VEGF-transfected adipose stem cells through activation of the YAP/TAZ signaling pathway. *Biomater Sci*. 2019;7(11):4588-4602.
- [45] DREYER CH, KJAERGAARD K, DING M, et al. Vascular endothelial growth factor for in vivo bone formation: A systematic review. *J Orthop Translat*. 2020;24:46-57.
- [46] TAKEUCHI R, KATAGIRI W, ENDO S, et al. Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis. *PLoS One*. 2019;14(11): e0225472.
- [47] SEKIYA I, MUNETA T, HORIE M, et al. Arthroscopic Transplantation of Synovial Stem Cells Improves Clinical Outcomes in Knees With Cartilage Defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(7):2316-2326.
- [48] ZHANG S, CHU WC, LAI RC, et al. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(12):2135-2140.
- [49] ZHANG S, CHUAH SJ, LAI RC, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*. 2018;156:16-27.
- [50] 黄海宁, 黄乾生. 细菌胞外囊泡的研究进展 [J]. *微生物学报*, DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20210582.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)