

脂肪间充质干细胞来源外泌体改善放射性口腔黏膜炎

李 杨, 付丽丽, 杨建堂

<https://doi.org/10.12307/2025.040>

投稿日期: 2024-01-16

采用日期: 2024-02-22

修回日期: 2024-03-13

在线日期: 2024-03-20

中图分类号:

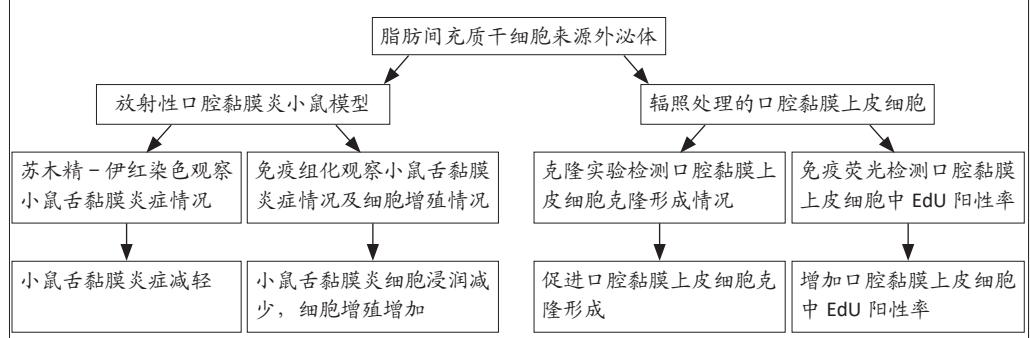
R459.9; R318; R781.5

文章编号:

2095-4344(2025)01-00031-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 脂肪间充质干细胞来源外泌体在放射性口腔黏膜炎中的作用



文题释义:

外泌体: 是细胞通过旁分泌释放的具有特征性表面抗原的小囊泡, 其直径范围为30–150 nm。外泌体通过转运DNA、RNA和蛋白质来调节细胞间的相互作用, 在多种疾病病理生理过程中发挥着重要作用。

放射性口腔黏膜炎: 头颈部恶性肿瘤约占全身恶性肿瘤的5%, 其发病隐匿、易转移, 放疗是其重要的治疗手段之一。但放疗极易引发口腔黏膜炎症, 发病率90%以上, 轻者黏膜充血, 严重者口腔黏膜大面积充血、糜烂及溃疡, 难以进食, 不仅影响患者的生存质量, 而且会影响肿瘤患者的治疗计划。

摘要

背景: 头颈肿瘤放疗极易引起放射性口腔黏膜炎, 严重影响患者的健康及肿瘤的治疗计划。间充质干细胞在多种疾病中表现出治疗潜力, 外泌体是其发挥功能的重要因素之一。目前尚无脂肪间充质干细胞来源外泌体应用于放射性口腔黏膜炎的相关研究。

目的: 探讨脂肪间充质干细胞来源外泌体在放射性口腔黏膜炎中的作用。

方法: 提取脂肪间充质干细胞及脂肪间充质干细胞来源外泌体并进行鉴定。通过3 Gy X射线辐射口腔黏膜上皮细胞诱导放射性口腔黏膜炎体外模型, 在造模前给予脂肪间充质干细胞或脂肪间充质干细胞来源外泌体预处理48 h, EdU实验和克隆形成实验检测口腔黏膜上皮细胞的增殖能力。通过3 Gy X射线辐射构建放射性口腔黏膜炎小鼠模型, 将脂肪间充质干细胞和脂肪间充质干细胞来源外泌体分别注入放射性口腔黏膜炎小鼠尾静脉, 采用苏木精-伊红染色和免疫组化评估口腔黏膜上皮组织的炎症变化。

结果与结论: ①与对照组相比, 脂肪间充质干细胞及脂肪间充质干细胞来源外泌体均可促进口腔黏膜上皮细胞克隆形成, 增加口腔黏膜上皮细胞EdU阳性率; ②脂肪间充质干细胞及脂肪间充质干细胞来源外泌体均能够缓解辐射处理小鼠口腔黏膜上皮组织的炎症; 口腔黏膜上皮组织中CD45阳性细胞均减少, PCNA阳性细胞均增加。结果表明, 脂肪间充质干细胞来源外泌体可促进口腔黏膜上皮细胞增殖, 对放射性口腔黏膜炎小鼠口腔黏膜炎症具有缓解作用。

关键词: 放射性口腔黏膜炎; 脂肪间充质干细胞; 外泌体; 头颈部肿瘤; 放疗; 口腔黏膜; 炎症; 恶性肿瘤

Adipose mesenchymal stem cell-derived exosome attenuates radiation-induced oral mucositis

Li Yang, Fu Lili, Yang Jiantang

Affiliated Stomatological Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Li Yang, Master, Associate chief physician, Affiliated Stomatological Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: Yang Jiantang, MD, Associate professor, Affiliated Stomatological Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Radiotherapy for head and neck tumors is very likely to cause radiation-induced oral mucositis, which seriously affects the health of patients and the treatment plan of tumors. Mesenchymal stem cells have shown therapeutic potential in many diseases, and exosomes are one of the important factors for their function. At present, there is no application of adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes in the study of radiation-induced oral mucositis.

OBJECTIVE: To investigate the role of adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes in radiation-induced oral mucositis.

遵义医科大学附属口腔医院, 贵州省遵义市 563000

第一作者: 李杨, 女, 1982年生, 贵州省遵义市人, 汉族, 2010年四川大学华西口腔医学院毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事口腔黏膜病学及预防医学的研究。

通讯作者: 杨建堂, 博士, 副教授, 遵义医科大学附属口腔医院, 贵州省遵义市 563000

<https://orcid.org/0000-0002-6285-7881> (李杨)

基金资助: 国家自然科学基金项目 (81960202), 项目负责人: 杨建堂; 贵州省科技厅项目 (黔科合基础-ZK[2023]一般534),

项目负责人: 杨建堂

引用本文: 李杨, 付丽丽, 杨建堂. 脂肪间充质干细胞来源外泌体改善放射性口腔黏膜炎 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(1):31-37.



METHODS: Adipose mesenchymal stem cells and adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes were extracted and identified. *In vitro* model of radiation-induced oral mucositis was induced by radiating oral mucosal epithelial cells with 3 Gy X-ray. Adipose mesenchymal stem cells or adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes were pretreated for 48 hours before modeling. The proliferation capacity of oral mucosal epithelial cells was detected by EdU assay and clonal formation assay. A mouse model of radiation-induced oral mucositis was constructed through 3 Gy X-ray radiation. Adipose mesenchymal stem cells and adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes were injected into the tail vein of radiation-induced oral mucositis mice. Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry were used to evaluate the inflammatory changes of oral mucosal epithelial tissue.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the control group, both adipose mesenchymal stem cells and adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promoted the formation of oral epithelial cell clones and increased the positive rate of EdU in oral epithelial cells. (2) Both adipose mesenchymal stem cells and adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviated the inflammation of oral mucosal epithelium of irradiated mice; CD45 positive cells decreased and PCNA positive cells increased in oral mucosal epithelium. It is concluded that adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote the proliferation of oral mucosal epithelial cells and release oral mucosal inflammation in mice with radiation-induced oral mucositis.

Key words: radiation-induced oral mucositis; adipose-derived mesenchymal stem cell; exosome; head and neck tumor; radiation therapy; oral mucosa; inflammation; malignant tumor

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 819620202 (to YJT); Guizhou Provincial Department of Science and Technology Project, No. ZK[2023]534 (to YJT)

How to cite this article: LI Y, FU LL, YANG JT. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosome attenuates radiation-induced oral mucositis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(1):31-37.

0 引言 Introduction

头颈部肿瘤放疗常引起放射性口腔黏膜炎^[1-2], 主要是放射线引起的口腔黏膜细胞损伤^[3-4], 电离辐射所致 DNA 损伤不仅可以杀死癌细胞^[5], 还会破坏周围的正常细胞群^[6]。研究显示, 大量的细胞凋亡和 DNA 双链未及修复, 破坏了损伤与修复再生之间的平衡, 最终导致黏膜溃疡等炎症的形成^[5, 7-8]。放射性口腔黏膜炎可引起患者进食障碍、营养不良, 降低生活质量, 甚至危及生命^[9-10]。因此, 探寻放射性口腔黏膜炎可能的修复方式对于需要头颈部放疗的患者具有重要意义。

间充质干细胞是一类具有自我更新和多分化潜能的成体干细胞^[11], 在血液系统、神经系统及自身免疫病等多个领域中表现出治疗潜能^[12-14]。越来越多的研究表明, 间充质干细胞治疗的关键机制是旁分泌作用, 而不是间充质干细胞本身^[15-16]。间充质干细胞通过旁分泌释放具有特征性表面抗原的小囊泡^[17-18], 这些小囊泡通过其中相关的活性分子发挥功能^[19-21]。对外泌体的研究或许更能进一步明确间充质干细胞在疾病中发挥作用的机制。该研究旨在探讨脂肪间充质干细胞来源外泌体 (extracellular vesicles derived from adipose derived mesenchymal stem cells, AMSCs-exo) 在放射性口腔黏膜炎中的作用及机制, 为放射性口腔黏膜炎的防治提供新的方向。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验, 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 1 月至 2023 年 7 月在贵州省高等学校口腔疾病研究特色重点实验室、贵州省细胞工程重点实验室和遵义医科大学医学与生物学研究中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6-8 周龄 SPF 级雌性 C57/BL6 小鼠 14 只, 体质量 18-20 g, 购自遵义医科大学实验动物中心, 在干燥通风条件下饲养, 自由进食和饮水。所有动物实验均经

遵义医科大学实验动物伦理委员会批准, 编号: 伦审 [2019] 2-026 号。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 实验细胞、试剂和仪器 人口腔黏膜上皮细胞 (HUM-M004) 购自 HAKATA。DMEM 培养基、胎牛血清 (Gibco); CD31-PE、CD34-PE、CD29-PE 和 CD44-PE 单克隆抗体 (Fitzgerald); anti-CD9(70R-32337, Fitzgerald); anti-CD81(10R-CD81dMS, Fitzgerald); anti-TSG101 (70R-21025, Fitzgerald); anti-Alix(A1507-50, Biovision); anti-GM130(A-AJ1327b, Abgent); 山羊抗小鼠 IgG 二抗 (PAB31796, Abnova); anti-PCNA(70R-30716, Fitzgerald); anti-CD45(70R-33484, Fitzgerald); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (43R-1590, Fitzgerald); XCELL160 生物学 X 射线辐照仪 (博卓生物); 苏木精-伊红染色试剂盒 (C0105S, 碧云天); 荧光倒置显微镜 (IX-71, Olympus); M205 体式显微镜 (Leica); 透射电子显微镜 (Olympus)。

1.4 实验方法

1.4.1 脂肪间充质干细胞 (adipose derived mesenchymal stem cells, AMSCs) 分离与鉴定 2 只 6 周龄雌性 C57/BL6 小鼠, 腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥麻醉后, 切取腹股沟脂肪垫。将脂肪组织切碎, 用 PBS 冲洗 2 次; 将剪碎的组织用 1 mg/mL I 型胶原酶在 37 °C 消化 40 min; 在 4 °C、300×g 离心 8 min, 将细胞重悬于 DMEM 中, 并通过 70 μm 尼龙过滤器过滤, 接种于含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 DMEM 中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱培养, 当细胞达 80% 密度时进行传代培养。

使用第 3 代 AMSCs 进行流式鉴定, 向细胞中加入 10 μL 单克隆抗体 (CD31-PE、CD34-PE、CD29-PE 和 CD44-PE) 避光孵育 20 min, 荧光标记 IgG 抗体作为对照, 用 PBS 冲洗细胞 2 次, 以除去未结合的抗体。使用 FACS Calibur 流式细胞仪分析表面抗原。

对第 3 代 AMSCs 进行成骨及成脂诱导 7 d 后, 进行

茜素红染色及油红 O 染色, 光学显微镜下观察。

1.4.2 AMSCs-exo 的分离与鉴定 使用 ExoCap™ 超速离心/储存增强剂分离外泌体。当第 3 代 AMSCs 达到 70%–80% 融合时, 更换为无外泌体培养基培养 24 h, 收集培养基, 离心并用 0.22 μm 过滤器过滤以除去细胞和碎片, 将 1 mL 上清液与 0.2 mL 外泌体分离试剂在 4 °C 孵育过夜, 离心弃上清, 外泌体重悬于 50 μL PBS 中备用。

Western blot 检测: 使用 RIPA 裂解缓冲液提取 AMSCs 和 AMSCs-Exo 中蛋白, 在 10%FuturePAGE™ 上分离出 40 μg 蛋白, 然后将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上, BSA 阻断蛋白 1 h, 用一抗免疫印迹靶向蛋白: anti-CD9(1 : 1 000)、anti-CD81(1 : 400)、anti-TSG101(1 : 1 000)、anti-Alix(1 : 1 000) 和 anti-GM130(1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜, 将膜与山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1 : 4 000) 在室温下孵育 2 h。最后, 使用 ECL 试剂盒显色蛋白, GAPDH 用作内参。

透射电子显微镜观察: 将 10 μL 外泌体沉淀重悬于 100 μL 含 20 g/L 多聚甲醛的二甲砷酸盐缓冲液中, 将 2 μL 细胞悬液滴加到 Formvar-carbon 铜网格上, PBS 冲洗后, 用 2% 乙酸铀和柠檬酸铅染色, 在透射电子显微镜下观察。

纳米颗粒跟踪分析: 外泌体在 PBS 中稀释至 1×10^6 颗粒/mL, 将 200 μL 混悬液加入到 NanoSight NS300 中分析粒度。

1.4.3 PKH67 标记的外泌体被口腔黏膜上皮细胞摄取 将 AMSCs-exo 重悬于 125 μL 稀释剂 C 中, 用 1 μL PKH67 染料 (绿色) 孵育 4 min, 用 1 mL 0.5%BSA 终止染色。当第 3 代口腔黏膜上皮细胞汇合达到 80% 后, 将 PKH67 标记的 AMSCs-exo 加入口腔黏膜上皮细胞中, 37 °C、体积分数 5%CO₂ 培养箱孵育 24 h, PBS 冲洗, 用 40 g/L 多聚甲醛在室温下固定 15 min, 用 DAPI 复染, 共聚焦激光扫描显微镜观察。

1.4.4 人口腔黏膜上皮细胞培养和处理 第 3 代口腔黏膜上皮细胞接种于含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 DMEM 中, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱培养, 培养 72 h 后分别用 AMSCs (细胞浓度 1.5×10^9 L⁻¹, 0.1 mL)、AMSCs-Exo (质量浓度 100 μg/mL, 0.1 mL) 处理 48 h, 对照组未加入任何试剂, 然后暴露于 3 Gy 剂量的 X 射线下, 1 次/d, 共 3 次, 体外模拟放射性口腔黏膜炎。

1.4.5 EdU 检测 使用 Cell-Light EdU Apollo®488 体外成像试剂盒测定细胞增殖情况。将预处理的各组口腔黏膜上皮细胞以 2.5×10^5 个/孔的密度接种到 24 孔板中, 根据生产商说明, 用 100 μL EdU 标记各孔细胞 2 h, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 用 Apollo®488 染色 30 min, 荧光倒置显微镜观察。

1.4.6 细胞集落形成测定 将预处理的各组口腔黏膜上皮

细胞以 2×10^3 个/孔的密度接种到 6 孔板中, 添加含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 孵育 14 d, 弃去培养基, 用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, 用 0.1% 结晶紫染色 10 min, 随机选取 5 个视野, 计数 > 50 个细胞的细胞团。

1.4.7 动物实验 12 只 C57/BL6 小鼠随机分为假手术组、辐照组、AMSCs 组和 AMSCs-exo 组, 每组 3 只。小鼠饲养 1 周后, 通过暴露于 X 射线辐射诱导小鼠放射性口腔黏膜炎模型。辐射方法: 腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥麻醉后对小鼠的头颈部区域进行 3 Gy 剂量的 X 射线照射, 共 3 次 (7 d 内完成), 用铅板覆盖身体其余部分。7 d 后, 将提取制备的 AMSCs 混悬液 (细胞浓度 1.5×10^9 L⁻¹) 0.4 mL 或 AMSCs-exo 混悬液 (质量浓度 100 μg/mL) 0.4 mL 分别注射入小鼠尾静脉; 1 周后, 腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥处死小鼠, 切取小鼠舌黏膜上皮组织, 40 g/L 多聚甲醛固定后石蜡包埋切片。

1.4.8 苏木精-伊红染色 将口腔黏膜上皮组织石蜡包埋, 切片厚 5 μm。将脱蜡至水的切片放入苏木精水溶液中染色 5 min, 酸水及氨水中分色各 3 s, 流水冲洗, 蒸馏水冲洗, 体积分数 90% 乙醇脱水 10 min, 伊红染液染色 3 min, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 树脂封固, 光学显微镜观察。

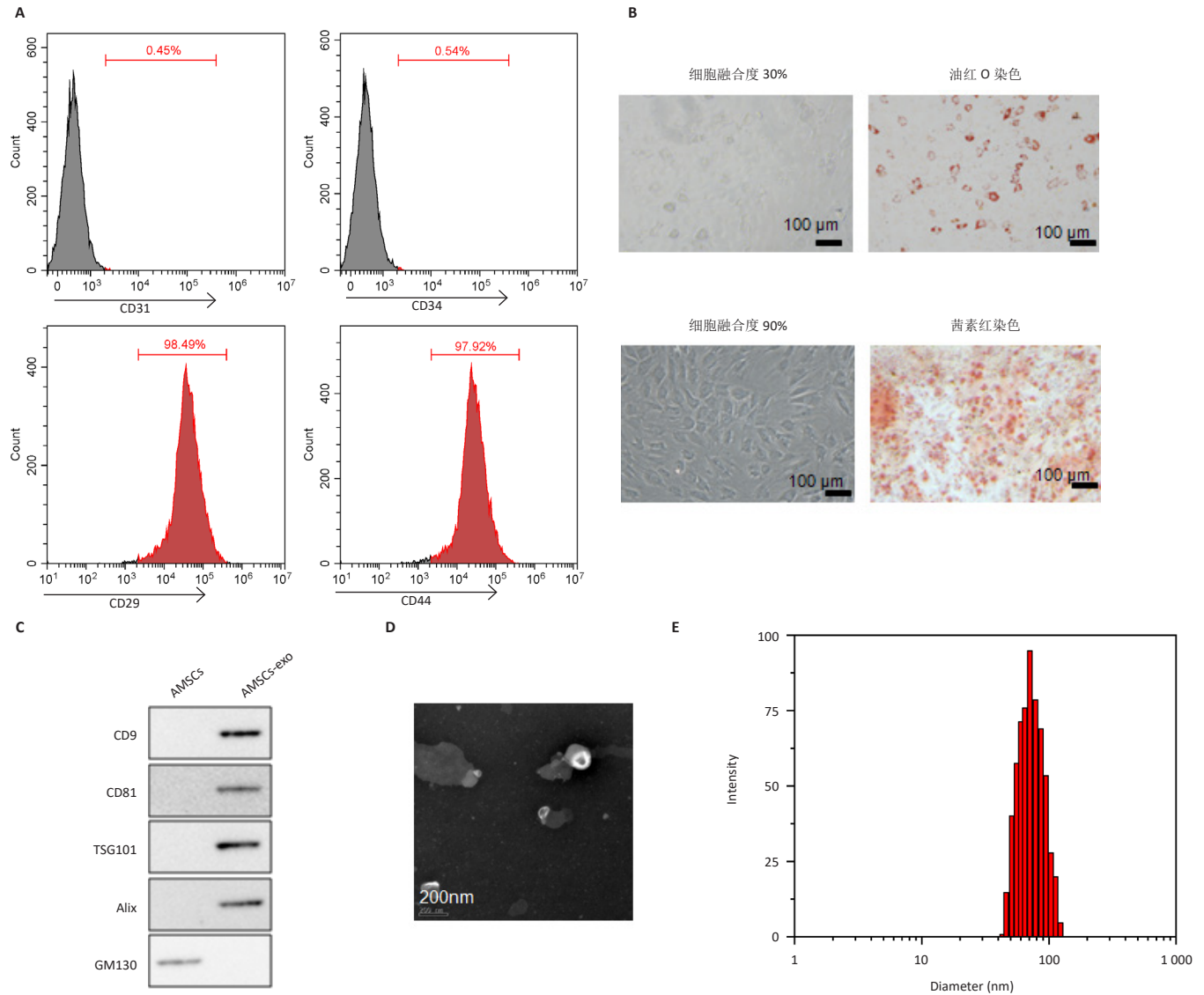
1.4.9 免疫组化 将口腔黏膜上皮组织石蜡切片脱蜡再水化, 用 0.3%Triton X-100 封闭 15 min 后, PBS 漂洗, 用 anti-PCNA(1 : 200)、anti-CD45(1 : 200) 一抗在室温下孵育 2 h, 然后用山羊抗兔 IgG(HRP) 二抗 (1 : 4 000) 37 °C 孵育 2 h, 使用二氨基联苯胺显色试剂盒显色切片, 苏木精复染, 光学显微镜观察。

1.5 主要观察指标 ① AMSCs-exo 处理的辐照后口腔黏膜上皮细胞的增殖情况; ②放射性口腔黏膜炎小鼠尾静脉注入 AMSCs-exo 后舌黏膜炎症变化情况。

1.6 统计学分析 每个实验进行 3 次重复。通过 GraphPad Prism 分析数据。服从正态分布的资料用 *t* 检验, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。不服从正态分布的资料用秩和检验, 数据用中位数 ± 四分位数间距 (*M*±*Q*) 表示, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。*P* < 0.05 为差异有显著性意义。该统计方法经课题组讨论, 遵义医科大学附属口腔医院学术委员会审议通过。

2 结果 Results

2.1 AMSCs 和 AMSCs-exo 鉴定结果 流式细胞术分析显示, AMSCs 中 CD31 和 CD34 阳性细胞均小于 1%, CD29 和 CD44 阳性细胞均大于 95% (图 1A)。当细胞融合达到 90% 时观察到 AMSCs 的形态为梭形, AMSCs 具有成骨和脂肪分化的潜能 (图 1B)。Western blot 实验结果显示, 外泌体的表面标记物 (CD9、CD81、TSG101、Alix) 在 AMSCs-exo 中均为阳性 (图 1C)。透射电镜观察显示, AMSCs-exo 为圆



图注：图 A 为流式细胞术检测 AMSCs 表面抗原 CD31、CD34、CD29 和 CD44；B 为光学显微镜下观察 AMSCs 的形态，油红 O 染色和茜素红染色观察 AMSCs 成脂和成骨分化能力；C 为 Western blot 检测 AMSCs-exo 表面标志物的表达；D 为透射电镜观察 AMSCs-exo 的形态学特征；E 为纳米颗粒跟踪分析 AMSCs-exo 的粒径大小。

图 1 | 脂肪间充质干细胞 (AMSCs) 和脂肪间充质干细胞来源外泌体 (AMSCs-exo) 鉴定

Figure 1 | Identification of adipose mesenchymal stem cells and adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes

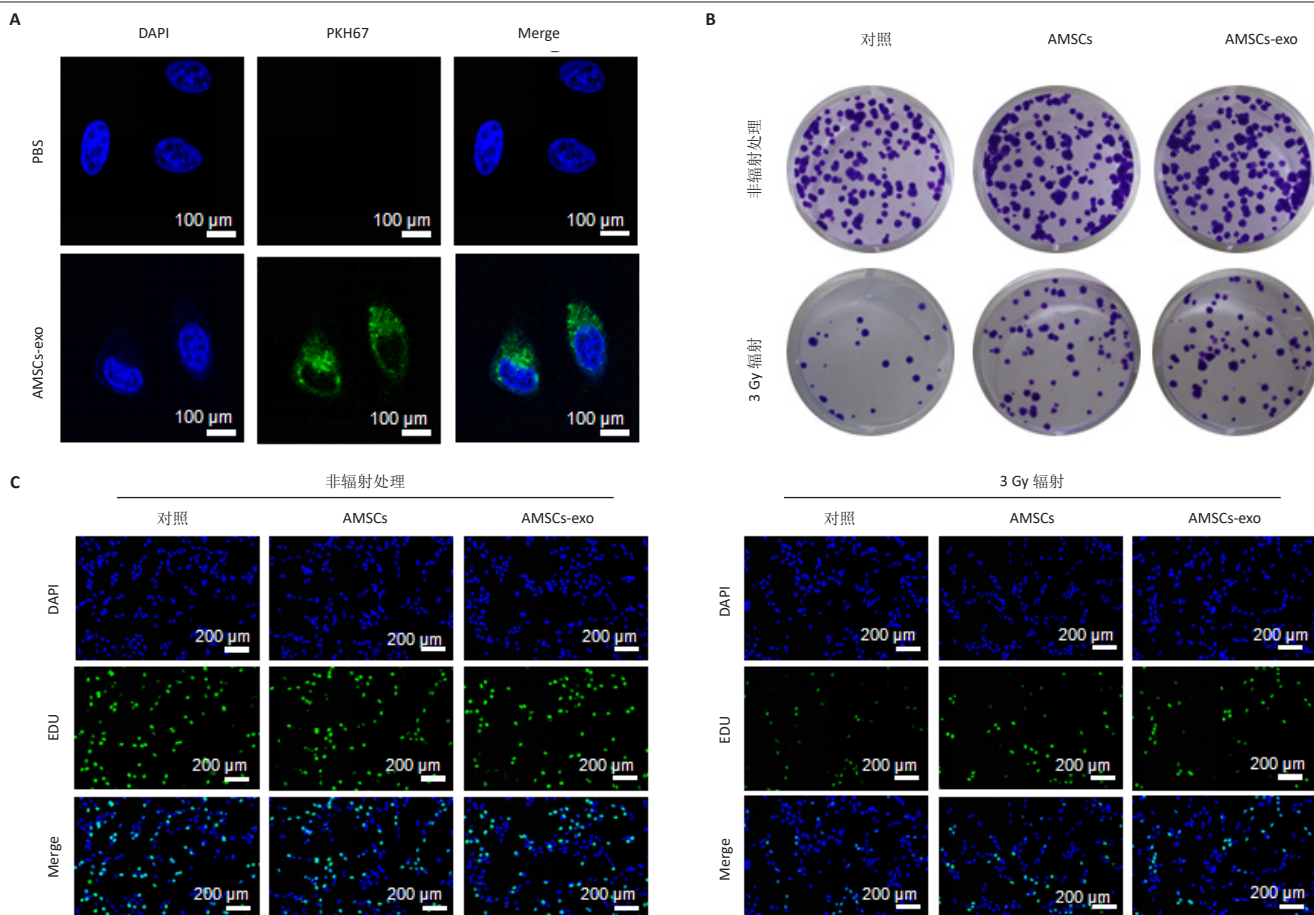
形或近圆形，具有脂质双分子层结构 (图 1D)，纳米颗粒跟踪分析显示，AMSCs-exo 的粒径为 80–110 nm (图 1E)。

2.2 AMSCs-exo 促进辐射后口腔黏膜上皮细胞的增殖 荧光显微镜观察到 PKH67 标记的 AMSCs-exo 能够被口腔黏膜上皮细胞摄取 (图 2A)。克隆实验结果显示，在非辐射处理下，与对照组相比，AMSCs 和 AMSCs-exo 对口腔黏膜上皮细胞克隆形成没有影响；在 3 Gy 辐射处理下，与对照组相比，AMSCs 和 AMSCs-exo 促进口腔黏膜上皮细胞克隆形成 (图 2B)。免疫荧光结果显示，在非辐射处理下，与对照组相比，AMSCs 和 AMSCs-exo 对口腔黏膜上皮细胞中 EdU 阳性率无显著影响；在 3 Gy 辐射处理下，与对照组相比，AMSCs 和 AMSCs-exo 增加口腔黏膜上皮细胞中 EdU 阳性率 (图 2C)。

2.3 AMSCs-exo 有效缓解了放射性口腔黏膜炎小鼠的口腔黏膜上皮组织炎症 为了研究 AMSCs 和 AMSCs-exo 对放射性口腔黏膜炎小鼠模型的影响，将 AMSCs 和 AMSCs-exo 分别注入放射性口腔黏膜炎小鼠尾静脉。苏木精-伊红染色结果显示，AMSCs 和 AMSCs-exo 均能够缓解辐射处理小鼠口腔黏膜上皮组织的炎症 (图 3A)。免疫组化结果显示，AMSCs 和 AMSCs-exo 处理后口腔黏膜上皮组织中 CD45 阳性细胞均减少，口腔黏膜炎症细胞浸润得到改善；PCNA 阳性细胞均增加，口腔黏膜细胞数量增多 (图 3B)。

3 讨论 Discussion

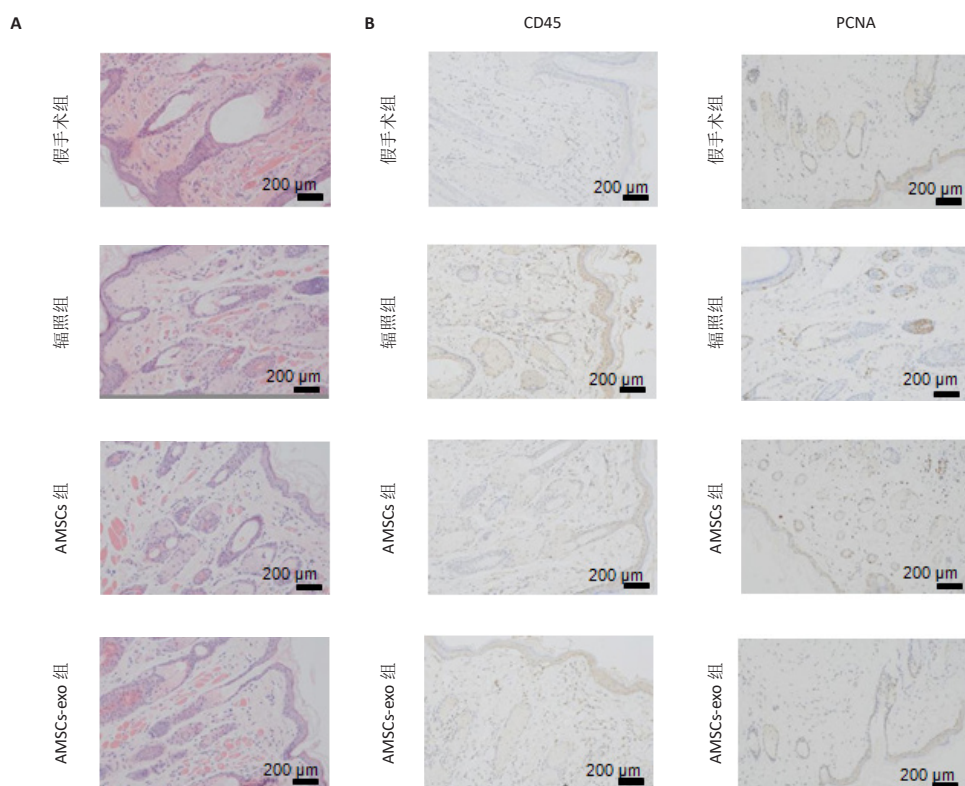
放射性口腔黏膜炎是头颈部肿瘤放疗患者常见的不良反应，发病率极高，急性期临床表现从轻度黏膜充血



图注：图 A 显示 AMSCs-exo 能够被口腔黏膜上皮细胞摄取；B 为克隆实验检测 AMSCs 和 AMSCs-exo 对口腔黏膜上皮细胞克隆形成的影响；C 为免疫荧光检测 AMSCs 和 AMSCs-exo 对口腔黏膜上皮细胞中 EdU 阳性表达的影响。AMSCs：脂肪间充质干细胞；AMSCs-exo：脂肪间充质干细胞来源外泌体。

图 2 | AMSCs-exo 促进辐射后口腔黏膜上皮细胞增殖

Figure 2 | Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes promote the proliferation of oral mucosal epithelial cells after radiation



图注：图 A 为苏木精 - 伊红染色观察小鼠口腔黏膜上皮组织病理变化；B 为免疫组化检测小鼠口腔黏膜上皮组织中 CD45 和 PCNA 表达。AMSCs：脂肪间充质干细胞；AMSCs-exo：脂肪间充质干细胞来源外泌体。

图 3 | AMSCs-exo 有效缓解了放射性口腔黏膜炎小鼠的口腔黏膜上皮病理变化

Figure 3 | Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes effectively alleviate the pathological changes of oral mucosal epithelium in mice with radiation-induced oral mucositis

到大面积深部黏膜溃疡^[22-23]。放射性口腔黏膜炎不仅明显影响患者的口腔功能,而且影响患者的近期和远期生活质量,严重者可影响肿瘤的治疗,降低肿瘤控制率,从而影响患者的生存率^[24]。同时,肿瘤患者体质较差,放疗引起的口腔黏膜炎症不易恢复,临床上缺乏有效的治疗手段^[25]。因此,积极探索改善放射性口腔黏膜炎的方法,对于头颈部肿瘤需要放疗的患者具有重要意义。

近年来,AMSCs在治疗血液、心血管、神经和自身免疫性疾病的临床应用中取得了重大突破^[26-28]。除了多向分化外,间充质干细胞还通过旁分泌实现治疗功能,其中外泌体是主要方式^[29]。AMSCs-exo可以携带具有生物学活性的蛋白质和RNA等物质,将有效成分及信息高效传递至受体细胞,在细胞间的信息交流中起重要作用。间充质干细胞的旁分泌机制可在机体异常条件下发挥抗炎、免疫调节作用,而外泌体可能在此机制中扮演着重要角色^[30]。

体外制备的外泌体能长时间保持生物活性、易保存、无免疫原性,并可以通过靶向修饰或局部注射的方式直接递送到发病部位,从而提高治疗效果。特别是间充质干细胞来源的外泌体,由于其包含大量与组织再生相关的活性分子,使之成为具有类似间充质干细胞作用的无细胞治疗策略的有效手段。课题组在实验中成功分离AMSCs及其来源外泌体,将AMSCs和AMSCs-exo分别注入放射性口腔黏膜炎小鼠尾静脉,苏木精-伊红染色发现,AMSCs和AMSCs-exo均能有效缓解放射性口腔黏膜炎小鼠口腔黏膜炎症;免疫组化发现AMSCs和AMSCs-exo处理后口腔黏膜上皮组织中CD45阳性细胞均减少,口腔黏膜炎症细胞浸润得到改善;PCNA阳性细胞均增加,口腔黏膜细胞增殖。虽然CD45仅仅是炎症细胞浸润的一个标志物,PCNA仅仅是反映细胞增殖的一个指标,但是这也能在一定程度上反映出AMSCs和AMSCs-exo对放射性口腔黏膜炎小鼠口腔黏膜炎症具有缓解作用。除此以外,该实验还建立了放射性口腔黏膜炎的细胞模型,通过体外实验验证了AMSCs和AMSCs-exo能促进口腔黏膜上皮细胞增殖,这也从另一个侧面反映出AMSCs和AMSCs-exo能缓解放射性口腔黏膜炎的炎症并促进愈合。

研究表明,干细胞的治疗功能可能是通过外泌体发挥作用。相较而言,外泌体粒径更小、稳定性更好,易于运输和使用;同时,干细胞成分复杂,容易引起排异反应等炎症反应,故而课题组将积极探索干细胞来源外泌体在放射性口腔黏膜炎中的作用及机制。在实验中发现AMSCs和AMSCs-exo能影响放射性口腔黏膜炎的发展,使口腔黏膜炎细胞的浸润得到改善,口腔黏膜上皮细胞数量增加,说明AMSCs-exo和AMSCs一样能在放射性口腔黏膜炎中发挥治疗作用。有研究发现,不同组织来源

间充质干细胞外泌体能与成纤维细胞等相互作用^[31],调节细胞的迁移和增殖以及基质的生成,从而促进皮肤再生^[32]。AMSCs-exo可体外诱导真皮组织的成纤维细胞或角质形成细胞的迁移和增殖,并增强胶原和弹性蛋白的产生,从而促进小鼠皮肤伤口愈合^[33-34];人胚胎真皮间充质干细胞外泌体通过传递Jagged 1蛋白,激活Notch通路,诱导I/III型胶原、弹性蛋白和纤维连接蛋白mRNA的表达^[35];人骨髓间充质干细胞外泌体可体外诱导成纤维细胞(取自糖尿病患者伤口)增殖和迁移^[36],这些结果均表明间充质干细胞来源外泌体在医疗领域具有广阔的应用前景。

综上所述,研究发现AMSCs-exo可以进入口腔黏膜上皮细胞,在体内实验中能有效缓解放射性口腔黏膜炎的炎症,在体外实验中能促进口腔黏膜上皮细胞的增殖,在放射性口腔黏膜炎的治疗中具有一定的应用价值。在下一步的研究中,课题组将对AMSCs-exo缓解放射性口腔黏膜炎的机制进行进一步研究。

作者贡献: 杨建堂负责实验设计,协调安排实验步骤及具体实施,数据统计,文章撰写,修订;李杨负责动物饲养,动物实验小鼠标本取材,外泌体分离、鉴定、免疫组化实验等;付丽丽负责细胞培养,Western blot检测等。所有作者已阅读并同意最终的文本。

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《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》;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宗旨。

4 参考文献 References

- [1] LY KL, LUO X, RAUB CB. Oral mucositis on a chip: modeling induction by chemo- and radiation treatments and recovery. *Biofabrication*. 2022;15(1):10.1088/1758-5090/ac933b.
- [2] MARIA OM, ELIOPOULOS N, MUANZA T. Radiation-Induced Oral Mucositis. *Front Oncol*. 2017;7:89.
- [3] RAO D, BEHZADI F, LE RT, et al. Radiation Induced Mucositis: What the Radiologist Needs to Know. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2021;50(6):899-904.
- [4] SUBEDI P, HUBER K, STERR C, et al. Towards unravelling biological mechanisms behind radiation-induced oral mucositis via mass spectrometry-based proteomics. *Front Oncol*. 2023;13:1180642.
- [5] NIKITAKI Z, MAVRAGANI IV, LASKARATOU DA, et al. Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new 'old' paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin Cancer Biol*. 2016;37-38:77-95.

- [6] GKANTAIFI A, VARDAS E, ALONGI F, et al. Radiation-Induced Oral Mucositis in Head and Neck Cancer Patients. Five Years Literature Review. *Rev Recent Clin Trials*. 2021;16(2):151-165.
- [7] KIM HJ, KANG SU, LEE YS, et al. Protective Effects of N-Acetylcysteine against Radiation-Induced Oral Mucositis In Vitro and In Vivo. *Cancer Res Treat*. 2020;52(4):1019-1030.
- [8] LEE CT, GALLOWAY TJ. Pathogenesis and Amelioration of Radiation-Induced Oral Mucositis. *Curr Treat Options Oncol*. 2022;23(3):311-324.
- [9] PULITO C, CRISTAUDO A, PORTA C, et al. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):210.
- [10] DAVY C, HEATHCOTE S. A systematic review of interventions to mitigate radiotherapy-induced oral mucositis in head and neck cancer patients. *Support Care Cancer*. 2021;29(4):2187-2202.
- [11] WANG H, ZHANG K, RUAN Z, et al. Correction to: ProbucoL enhances the therapeutic efficiency of mesenchymal stem cells in the treatment of erectile dysfunction in diabetic rats by prolonging their survival time via Nrf2 pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):47.
- [12] SHIN JY, LEE PH. Mesenchymal stem cells modulate misfolded α -synuclein in parkinsonian disorders: A multitarget disease-modifying strategy. *Stem Cell Res*. 2020;47:101908.
- [13] WANG Y, FANG J, LIU B, et al. Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. *Cell Stem Cell*. 2022;29(11):1515-1530.
- [14] ANDRZEJEWSKA A, DABROWSKA S, LUKOMSKA B, et al. Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disorders. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(7):2002944.
- [15] XU L, JI H, JIANG Y, et al. Exosomes Derived From CircAkap7-Modified Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Protect Against Cerebral Ischemic Injury. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:569977.
- [16] HAN Y, YANG J, FANG J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):92.
- [17] OGAY V, SEKENOVA A, LI Y, et al. The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Atherosclerosis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2021;16(7):897-913.
- [18] VAN BALKOM BWM, GREMMELS H, GIEBEL B, et al. Proteomic Signature of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles. *Proteomics*. 2019;19(1-2):e1800163.
- [19] SHANG Y, WANG Q, LI J, et al. Zirconia Nanoparticles Induce HeLa Cell Death Through Mitochondrial Apoptosis and Autophagy Pathways Mediated by ROS. *Front Chem*. 2021;9:522708.
- [20] DING X, NIE Z, SHE Z, et al. The Regulation of ROS- and BECN1-Mediated Autophagy by Human Telomerase Reverse Transcriptase in Glioblastoma. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6636510.
- [21] KMA L, BARUAH TJ. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation. *Biotechnol Appl Biochem*. 2022;69(1):248-264.
- [22] SANKAR V, XU Y. Oral Complications from Oropharyngeal Cancer Therapy. *Cancers (Basel)*. 2023;15(18):4548.
- [23] ELTING LS, COOKSLEY CD, CHAMBERS MS, et al. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68(4):1110-1120.
- [24] LIU S, ZHAO Q, ZHENG Z, et al. Status of Treatment and Prophylaxis for Radiation-Induced Oral Mucositis in Patients With Head and Neck Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:642575.
- [25] SONIS ST. Precision medicine for risk prediction of oral complications of cancer therapy-The example of oral mucositis in patients receiving radiation therapy for cancers of the head and neck. *Front Oral Health*. 2022;3:917860.
- [26] CHEN G, WANG M, RUAN Z, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-143-3p suppresses myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating autophagy. *Life Sci*. 2021;280:119742.
- [27] TELI P, KALE V, VAIDYA A. Extracellular vesicles isolated from mesenchymal stromal cells primed with neurotrophic factors and signaling modifiers as potential therapeutics for neurodegenerative diseases. *Curr Res Transl Med*. 2021;69(2):103286.
- [28] LU X, BAO H, CUI L, et al. hUMSC transplantation restores ovarian function in POI rats by inhibiting autophagy of theca-interstitial cells via the AMPK/mTOR signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):268.
- [29] LI T, GU J, YANG O, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal miRNA-29c Decreases Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury Through Inhibition of Excessive Autophagy via the PTEN/Akt/mTOR Signaling Pathway. *Circ J*. 2020;84(8):1304-1311.
- [30] MA CY, ZHAI Y, LI CT, et al. Translating mesenchymal stem cell and their exosome research into GMP compliant advanced therapy products: Promises, problems and prospects. *Med Res Rev*. 2023. doi: 10.1002/med.22002.
- [31] ZHOU C, ZHANG B, YANG Y, et al. Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):107.
- [32] ZOU J, YANG W, CUI W, et al. Therapeutic potential and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes as bioactive materials in tendon-bone healing. *J Nanobiotechnology*. 2023;21(1):14.
- [33] WANG L, HU L, ZHOU X, et al. Author Correction: Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. *Sci Rep*. 2021;11(1):3245.
- [34] XU T, LIN Y, YU X, et al. Comparative Effects of Exosomes and Ectosomes Isolated From Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on Achilles Tendinopathy in a Rat Model. *Am J Sports Med*. 2022;50(10):2740-2752.
- [35] WANG X, JIAO Y, PAN Y, et al. Fetal Dermal Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Accelerate Cutaneous Wound Healing by Activating Notch Signaling. *Stem Cells Int*. 2019;2019:2402916.
- [36] VU NB, NGUYEN HT, PALUMBO R, et al. Stem cell-derived exosomes for wound healing: current status and promising directions. *Minerva Med*. 2021;112(3):384-400.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)