

根尖牙乳头干细胞外泌体对牙髓干细胞增殖和分化的影响

陈跃敏

福建医科大学附属口腔医院, 福建福州, 350001;

摘要: 目的:探讨根尖牙乳头干细胞外泌体(SCAP-Exo)对牙髓干细胞(DPSCs)生物学行为的调控,重点探讨其对细胞增殖及成牙本质/成骨双向分化能力的影响。方法:基于改良酶消化法(I型胶原酶/Dispase酶消化体系)分离培养根尖牙乳头干细胞(SCAP)和DPSCs,超速离心法提取SCAP-Exo,并通过透射电镜及WB验证其特性。采用CCK-8法、茜素红S染色及RT-PCR检测SCAP-Exo对DPSCs增殖、矿化能力及成牙本质分化相关基因(DSP P)的影响。结果:SCAP-Exo呈典型双层膜囊泡结构,表达外泌体标志蛋白Alix和CD9;SCAP-Exo(50/100 $\mu\text{g/mL}$)对DPSCs增殖无显著影响($P>0.05$),但显著提升矿化结节形成量($P<0.0001$)并上调DSPP基因表达($P<0.0001$),而对成骨相关基因OCN、Runx2无显著调控作用。结论:SCAP-Exo可通过其携带的根尖牙乳头组织的特异性生物学信号促进DPSCs成牙本质向分化,为SCAP-Exo作为一种生物制剂应用于再生性牙髓治疗提供依据。

关键词: 根尖牙乳头干细胞; 牙髓干细胞; 外泌体; 成牙本质分化; 再生性牙髓治疗

DOI: 10.69979/3029-2808.25.09.022

再生性牙髓治疗是一种针对坏死牙髓和/或根尖周炎的未成熟牙齿的新治疗方法,它是基于组织工程的原理,实现牙本质-牙髓复合体再生,促使年轻恒牙的牙根继续发育,延长牙齿使用寿命,恢复正常功能^[1]。有研究表明再生性牙髓治疗后根管内形成的新生的硬组织主要是类牙骨质或骨样组织^[2],而不是真正的牙本质-牙髓复合体。因此,如何促进牙髓-牙本质复合体的再生,提高临床疗效,已成为一个研究热点。

SCAP作为定位于未成熟恒牙根尖区牙乳头组织的间充质干细胞群,具有分化为功能性成牙本质细胞及牙髓细胞谱系的生物学特性,在牙根发育过程中通过分泌牙本质基质蛋白(如DSPP、DMP-1)及调控Hertwig's上皮根鞘信号,参与根部牙本质-牙髓复合体的形态发生。研究发现SCAP不仅具有成牙本质分化优势,其多能性特征还体现在成骨分化(Runx2/OCN表达上调)及神经向分化(NSE阳性表达)等跨胚层分化潜能^[3]。有学者在牙体再生实验模型中,采用皮下异位移植技术将SCAP与牙髓干细胞(DPSCs)分别接种于离体根管系统后,组织学分析显示SCAP组形成了具有均匀厚度(约45-60 μm)且矿化结构规则的新生牙本质样组织,而DPSCs组仅呈现局灶性(<20 μm)且矿化前沿不连续的类牙本质结构^[4]。

外泌体是几乎所有细胞分泌的纳米级细胞外囊泡,是细胞间通讯的关键介质^[5],鉴于外泌体在运输包括核酸、蛋白质和脂质等各种生物分子方面的关键作用,其

在再生医学中的潜在应用受到了广泛关注。Chen等人发现外泌体能促进血管内皮细胞增殖、迁移,促进新生血管和血管管腔的形成^[6]。牙髓组织通过多维度生理机制维系其生物学功能:修复性牙本质形成依赖TGF- β /Smad通路介导的成牙本质细胞分化,免疫防御功能涉及TLR4/NF- κ B信号激活的巨噬细胞极化,而营养供给则通过成牙本质细胞突触网络调控牙本质液渗透压动态平衡。血管生成作为牙髓再生微环境重构的核心环节,受HIF-1 α /VEGF-A信号轴的时空特异性调控。Huang等人研究发现牙髓干细胞来源的外泌体通过递送miR-143-3p和BMP-2激活ERK1/2信号通路,显著增强牙本质基质沉积并促进血管新生,为基于外泌体的牙髓再生策略提供了关键实验证据^[7]。因此,牙源性干细胞来源的外泌体有促进牙髓再生的可能。

Gronthos等人首次通过酶消化法从成人牙髓中分离出STRO-1⁺/CD146⁺牙髓干细胞(DPSCs),证实其具有成牙/成骨/成脂多向分化潜能,并在免疫缺陷小鼠异种移植模型中成功生成血管化牙本质-牙髓复合体,该研究为牙髓再生医学奠定了干细胞生物学基础^[8]。Huang等人通过建立人牙髓细胞-牙本质片体外共培养模型,证实TGF- β 1信号激活可诱导牙髓细胞分化为功能性成牙本质样细胞,并形成5-8 μm 厚牙本质样基质层^[9]。

综上所述,根尖牙乳头干细胞来源的外泌体对DPSCs生物学行为的分子机制尚未完全阐明,特别是在其介

导的成牙/成骨向分化调控网络及细胞周期特异性增殖效应方面仍有待系统解析。因此,本研究通过体外实验研究 SCAP-Exo 对 DPSCs 增殖和分化影响,为 SCAP-Exo 作为一种生物制剂应用于再生性牙髓治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 DPSCs 的分离、培养

收集因治疗需要拔除的第三磨牙(12-18岁)。牙拔出后,开髓拔出成形牙髓,采用酶消化法提取原代细胞,在培养箱内培养,待细胞生长汇合,传代培养。

1.2 SCAP 的分离、培养

收集因治疗需要拔除的根尖未发育完成的第三磨牙(12-18岁),使用无菌组织剪沿牙根末端分离根尖牙乳头。将其剪碎后加入 1 mL 的 3g/L I 型胶原酶和 4 g/L Dispase 酶,37℃消化 30 min,加入 α -MEM 完全培养基,接种于培养皿,培养箱培养,待细胞生长汇合,传代培养。

1.3 SCAP-Exo 的提取和鉴定

SCAP 常规培养,SCAP-Exo 提取方法按照参考文献所述的差速离心法进行提取^[10]。将提取的 SCAP-Exo 按照 1:10 稀释后取 20 μ L,滴加于铜网上,干燥固定,磷钨酸标记染色,透射电镜下观察拍照。取 100 μ L SCAP-Exo,加 100 μ L 蛋白裂解液,离心 5 min,测定蛋白浓度。WB 检测 SCAP-Exo 特异性标记蛋白(Alix、CD9)的表达。

1.4 SCAP-Exo 对 DPSCs 增殖能力的影响

收集对数生长期的第 3 代 DPSCs,按 3000 细胞/孔密度接种于 96 孔板中,按照实验分组进行标记,并设置对照组,空白组,每组设置 6 个副孔,培养 24 h,去除原培养基,实验组加入含不同浓度 SCAP-Exo (50 μ g/mL、100 μ g/mL) 的完全培养基培养 1d、3d 和 5d、7d。在避光条件下,按照培养基:CCK-8 试剂 = 10:1 的比例配制 CCK-8 检测液。吸除旧培养液后,加入 CCK-8 检测液,置于培养箱中继续培养 2 h 后,酶标仪检测各孔 OD450 nm 值。

1.5 SCAP-Exo 对 DPSCs 成骨/成牙本质分化能力的影响

将 P3 的 DPSCs 以 2×10^5 个细胞/孔接种到 6 孔板中,每组 3 个副孔,细胞贴壁后用含有不同浓度的 SCAP-Exo (50 μ g/mL、100 μ g/mL) 条件培养基处理 DPSCs 3 d 后,更换成骨/成牙本质诱导培养基。培养 7 d 后收集细胞总 RNA,用于 RT-PCR 检测成骨/成牙本质分化相关基因(OCN、Runx2、DSPP)的表达。培养 21d 后 4% 多聚甲醛固定,1%茜素红 S 染色,拍照。采用 ImageJ 软件进行半定量分析。

1.6 统计分析

使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。所有数据记录为平均值 \pm 标准差,并重复三次独立实验。组间的比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SCAP、DPSCs 和 SCAP-Exo 的提取和鉴定

(1) SCAP、DPSCs 的原代分离培养:提取原代 SCAP,培养 7d 时,可见细胞集落明显形成(图 1 A),培养 10d 时,SCAP 传代培养见细胞涡旋状分布,细胞形态呈梭形,形态均一,(图 1 B),而 DPSCs 贴壁生长,涡旋状分布,形态均一,呈长梭形。(图 1 C 和 D)。

(2) SCAP-Exo 的鉴定:透射电镜观察见 SCAP-Exo 为椭圆形囊泡,囊壁呈双层膜状结构(图 1 E 和 F)。WB 检测结果表明 SCAP-Exo 特异性标记蛋白 Alix 和 CD9 呈阳性表达(图 1 G)。

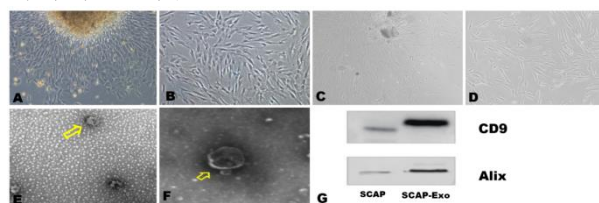


图 1 SCAP、DPSCs 和 SCAP-Exo 的提取和鉴定

(A) 原代培养 7 d, 见 SCAP 从根尖牙乳头组织爬出; (B) 传代培养见 SCAP 形态均一, 呈梭形, 涡旋状分布; (C) 原代培养 7 d, 见 DPSCs 从牙髓组织爬出;

(D) 传代培养见 SCAP 形态均一, 呈长梭形, 涡旋状分布; (E、F) 透射电镜观察 SCAP-Exo 为椭圆形囊泡, 囊壁呈双层膜状结构; (G) SCAP-Exo 特异性标记蛋白(Alix、CD9)呈阳性表达;

2.2 SCAP-Exo 对 DPSCs 的增殖能力无明显影响

与对照组相比,各实验组 DPSCs 的细胞增殖能力无

明显差异,且 50 $\mu\text{g/mL}$ 组和 100 $\mu\text{g/mL}$ 组之间无明显差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

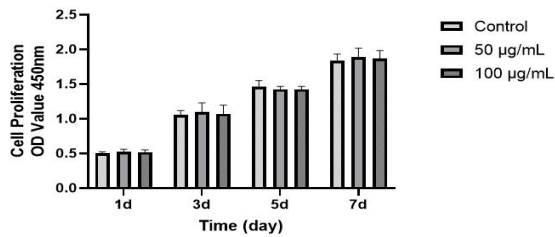


图 2 SCAP-Exo 对 DPSCs 的增殖能力的影响

2.3 SCAP-Exo 提高 DPSCs 矿化能力

茜素红 S 染色结果表明 SCAP-Exo 能够提高 DPSCs 的矿化能力,且随着 SCAP-Exo 浓度升高,矿化结节的形成量增加 ($P < 0.0001$) (图 3)。

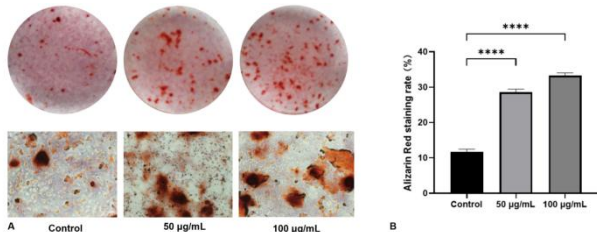


图 3 SCAP-Exo 对 DPSCs 矿化能力的影响

(A) 茜素红 S 染色结果显示随着浓度升高,矿化结节的形成量增加; (B) SCAP-Exo 对 DPSCs 矿化能力的半定量分析结果。**** $P < 0.0001$ 。

2.4 SCAP-Exo 促进 DPSCs 成牙本质向分化能力

RT-PCR 结果显示与对照组相比,不同浓度的 SCAP-Exo 对 DPSCs 的 DSPP 基因表达水平明显提高 ($P < 0.001$),而 OCN, Runx2 基因表达水平无明显影响 ($P > 0.05$)。

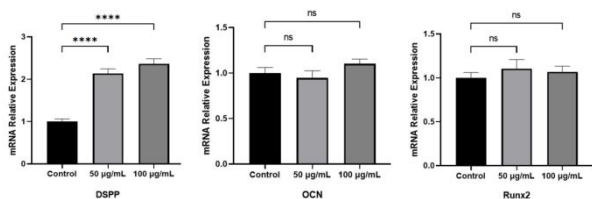


图 4 SCAP-Exo 对 DPSCs 成骨/成牙本质相关基因表达的影响

3 讨论

由于年轻恒牙根管粗大,血运良好,残存的牙髓组织或干细胞在短期的急、慢性根尖炎症情况下也能存活^[1]。因此,牙髓感染进行再生性牙髓治疗后,牙髓组织内残留的干细胞群具有多向分化潜能,可定向分化为成牙骨质细胞、成骨细胞及成牙本质细胞谱系,从而介导

牙根组织的持续发育进程。然而研究表明,再生性牙髓治疗后形成的矿化组织主要呈现类牙骨质或骨样基质的组织学特征^[2],而非具有生理性牙本质-牙髓复合体特征的矿化-软组织复合结构。当前牙本质-牙髓复合体再生技术主要基于两种策略:外源性干细胞移植与内源性干细胞归巢^[12]。外源性方案通过将异源/自体干细胞与生物活性支架材料复合后植入宿主根管系统,利用支架内负载的生长因子(如 BMPs、FGFs)诱导其定向分化;而内源性策略则借助趋化因子梯度(如 SDF-1/CXCR4 轴)介导宿主自体干细胞向损伤部位定向迁移,并通过 Wnt/ β -catenin 等信号通路激活其成牙本质分化潜能。值得注意的是,两种策略在矿化组织类型调控及牙髓样软组织再生效率方面仍存在显著差异。

基于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)的组织再生治疗模式包括将 MSC 动员到该部位并分化为功能细胞以替代受损细胞^[13]。有研究表明人乳牙 DPSC 能够再生整个牙髓并形成新的牙本质以促进牙根发育^[14],而 SCAP 来源于根尖乳头的未成熟组织,由比牙髓更多的未分化细胞组成^[15]。然而, MSC 的临床转化应用受到伦理问题、可用性、干细胞分离和储存以及专业人员的限制。此外,越来越多的证据表明,大多数外源性间充质干细胞在移植后很快消失^[16]。基于细胞归巢(cell homing),理论的内源性再生策略通过时空特异性调控根管系统内残留干细胞及根尖周祖细胞的生物学行为实现组织再生。天然化合物或生物活性物质已被证明具有诱导特定牙本质形成的潜力^[17]。

目前,基于 MSC-Exo 的方法为组织再生提供了新的治疗选择。MSC-Exo 的复杂组成可能反映了其亲代细胞的组成及其向特定组织迁移的能力^[16]。MSC-Exo 还含有许多生物活性分子,可以转移到靶细胞以影响组织再生。有研究表明从牙髓干细胞中分离出的外泌体可在体外诱导牙源性分化,并在体内触发牙髓样组织的再生^[7]。

为了评估 SCAP-Exo 促进牙髓牙本质复合体再生的潜在机制,我们评估了它们对体外 DPSCs 增殖和分化的影响。我们发现 SCAP-Exo 不影响 DPSCs 的增殖,且 SCAP-Exo 可明显提高 DPSCs 的 DSPP 表达水平,且矿化结节的形成量增加,而 OCN 及 Runx2 基因表达水平无明显变化。表明 SCAP-Exo 能够通过传递根尖周组织的生物学信息来重新编程 DPSCs 的功能,促进 DPSCs 向成牙本质分化。然而,SCAP-Exo 影响 DPSCs 生物学功能的详细机制需要进一步探究。因此,SCAP-Exo 的应用可能提

供一种新的策略来促进再生性牙髓治疗后牙本质-牙髓复合体的再生。

参考文献

- [1] 邹晓英, 岳林. 再生性牙髓治疗的生物学基础及临床探索. 中华口腔医学杂志, 2022, 57(1): 3-9.
- [2] Becerra P, Ricucci D, Loghin S, et al. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. J Endod, 2014, 40(1): 133-9.
- [3] Liu Q, Gao Y, He J. Stem Cells from the Apical Papilla (SCAPs): Past, Present, Prospects, and Challenges. Biomedicines, 2023, 11(7): 2047.
- [4] Huang GT, Yamaza T, Shea LD, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. Tissue Eng Part A, 2010, 16(2): 605-15.
- [5] Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015, 13(1): 17-24.
- [6] Chen B, Li Q, Zhao B, et al. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as a Novel Potential Therapeutic Tool for Tissue Repair. Stem Cells Transl Med, 2017, 6(9): 1753-1758.
- [7] 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.
- [8] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13625-30.
- [9] Huang GT, Shagaramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. J Endod, 2006, 32(11): 1066-73.
- [10] 余思, 蒋欢, 刘尧, 等. 根尖牙乳头干细胞外泌体的提取与鉴定. 中国实用口腔科杂志, 2018, 11(06): 347-350.
- [11] Tobias Duarte PC, Gomes-Filho JE, Ervolino E, et al. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. J Endod, 2014, 40(4): 538-42.
- [12] 周建苏盈盈, 王松灵. 无细胞再生性牙髓治疗的现状及展望. 华西口腔医学杂志, 2022, 40(01): 1-6.
- [13] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. Nat Immunol, 2014, 15(11): 1009-16.
- [14] 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[pil].
- [15] Cantore S, Ballini A, De Vito D, et al. Characterization of human apical papilla-derived stem cells. J Biol Regul Homeost Agents, 2017, 31(4): 901-910.
- [16] Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. Stem Cells, 2017, 35(4): 851-858.
- [17] Di Benedetto A, Posa F, De Maria S, et al. Polydatin, Natural Precursor of Resveratrol, Promotes Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. Int J Med Sci, 2018, 15(9): 944-952.

作者简介: 陈跃敏 (1988—), 男, 汉族, 福建龙岩人, 研究生学历, 研究方向为牙体牙髓病学。

基金项目: 福建省自然科学基金项目 2021J01800