

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2021.02.002

· 基础研究 ·

脂多糖预处理的牙囊细胞外泌体对牙周炎牙周膜细胞成骨分化的影响

石维薇^{1,2,3}, 丁一³, 田卫东^{1,2,4}, 郭淑娟^{1,2,3}

1. 口腔转化医学教育部工程研究中心 四川大学, 四川 成都(610041); 2. 口腔再生医学国家地方联合工程实验室 四川大学华西口腔医院, 四川 成都(610041); 3. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院牙周病科, 四川 成都(610041); 4. 口腔疾病研究国家重点实验室 国家口腔疾病临床医学研究中心 四川大学华西口腔医学院创伤与整形外科, 四川 成都(610041)

【摘要】 目的 探究脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)预处理牙囊细胞(dental follicle cells, DFCs)外泌体(exosomes, Exos)在不同浓度条件下对牙周炎患者的牙周膜细胞(periodontal ligament cells of periodontitis, p-PDLCs)成骨分化能力的影响, 为牙周病的防治提供基础。**方法** 组织块酶消化法培养DFCs及p-PDLCs, 提取经250 ng/mL LPS刺激DFCs 24 h后的Exos, Exos的表征通过透射电镜扫描、粒径分析以及蛋白印记法进行鉴定; 通过逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、茜素红染色等方法检测10 μ g/mL以及100 μ g/mL浓度的Exos对p-PDLCs成骨向分化能力的影响。**结果** LPS预处理的DFCs外泌体(L-Exos)为直径30~100 nm之间的囊泡样结构, 高表达CD63和相互作用蛋白X(ALG-2 interacting protein-X, Alix)。100 μ g/mL L-Exos上调p-PDLCs骨膜蛋白、I型胶原、III型胶原基因的表达($P < 0.05$); 而10 μ g/mL L-Exos仅上调p-PDLCs的转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)基因的表达($P < 0.01$)。在成骨诱导7 d后, L-Exos组的矿化结节明显多于对照组($P < 0.01$), 并且100 μ g/mL L-Exos组的矿化效果更佳($P < 0.01$)。**结论** 100 μ g/mL L-Exos较10 μ g/mL L-Exos更有利于增强p-PDLCs成骨向分化能力。

【关键词】 脂多糖; 牙囊细胞; 牙周膜细胞; 外泌体; 成骨分化; 胶原纤维; 矿化; 牙周再生

【中图分类号】 R781 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2021)02-0081-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID)

【引用著录格式】 石维薇, 丁一, 田卫东, 等. 脂多糖预处理的牙囊细胞外泌体对牙周炎牙周膜细胞成骨分化的影响[J]. 口腔疾病防治, 2021, 29(2): 81-87. doi:10.12016/j.issn.2096-1456.2021.02.002.

Exosomes derived from lipopolysaccharide-preconditioned dental follicle cells regulate osteogenic differentiation of periodontal ligament cell in periodontitis SHI Weiwei^{1,2,3}, DING Yi³, TIAN Weidong^{1,2,4}, GUO Shujuan^{1,2,3}

Engineering Research Center of Oral Translational Medicine, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. National Engineering Laboratory for Oral Regenerative Medicine, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Periodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Clinical Research Center for Oral Diseases, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China.

Corresponding authors: GUO Shujuan, Email: guo.shujuan@yahoo.com, Tel: 86-13550047365

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the effect of different concentrations of exosomes (Exos) secreted from dental follicle cells (DFCs) preconditioned with lipopolysaccharide (LPS) on the osteogenic differentia-

【收稿日期】 2020-02-19; **【修回日期】** 2020-04-28

【基金项目】 国家重点研究开发项目(2017YFA0104800)

【作者简介】 石维薇, 硕士, Email: 494808794@qq.com

【通信作者】 郭淑娟, 副教授, 博士, Email: guo.shujuan@yahoo.com, Tel: 86-13550047365

tion ability of periodontal cells in periodontitis (p-PDLCs) in patients to provide a basis for the prevention and treatment of periodontal disease. **Method** Tissue block and enzyme digestion methods were used to culture DFCs and p-PDLCs. Exosomes were isolated from 250 ng/mL LPS-preconditioned DFCs 24 h later. The characteristics of exosomes were detected by transmission electron microscopy, particle size analysis and Western blotting. The effects of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ exosomes on the osteogenic differentiation of p-PDLCs were detected by RT-PCR and Alizarin red staining. **Results** LPS-pretreated DFC-derived exosomes (L-Exos) are vesicle-like structures with a size between 30-100 nm that positively express CD63 and Alix. Compared with the control group, exosomes significantly upregulated Periostin, Col I, and Col III expression at 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.05$), while TGF- β 1 was significantly upregulated at 10 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$). At 7 days after osteogenic induction, mineralized nodules were significantly more abundant in the exosome group than in the control group ($P < 0.01$), and the results were better at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0.01$). **Conclusion** 100 $\mu\text{g/mL}$ L-Exos are better than 10 $\mu\text{g/mL}$ L-Exos in enhancing the osteogenic differentiation ability of p-PDLCs.

【Key word】 lipopolysaccharide; dental follic cells; periodontal ligament cells; exosomes; osteogenic differentiation; collagen fiber; mineralization; periodontal regeneration

J Prev Treat Stomatol Dis, 2021, 29(2): 81-87.

【Competing interests】 The authors declare no competing interests.

This study was supported by the grants from National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFA0104800).

牙周炎是以牙周支持组织炎症和破坏为特征的感染性疾病。牙周治疗终目的是牙周支持组织的再生与功能重建。牙囊细胞(dental follic cells, DFCs)自我增殖能力强,具有多向分化的潜能,可分化为成骨细胞、成牙骨质细胞、牙周膜细胞(periodontal ligament cells, PDLCs),利于牙周软硬组织的再生与重建,是牙周组织再生工程中研究较为广泛的种子细胞^[1]。本课题组前期研究发现牙龈卟啉单胞菌来源的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对DFCs以及PDLCs的分化作用是不同的。当LPS预处理DFCs 24 h后,DFCs膜片能够上调成骨、成纤维相关基因如碱性磷酸酶、骨钙素、Ⅲ型胶原(Collagen III, Col III)的表达,同时对黏附相关基因骨膜蛋白的表达无影响;然而,经LPS刺激后的PDLCs膜片则表现为成纤维、成骨以及黏附相关基因表达的下调,不利于牙周组织再生。因此,DFCs相较于PDLCs具有抵抗LPS刺激调节炎性微环境的能力,利于分化形成完整的牙周组织结构^[2]。然而,LPS预处理后的DFCs促进牙周组织再生的机制尚不明确。外泌体是由细胞分泌的胞外囊泡,直径为30~100 nm,主要以内出芽的形式产生^[3]。与细胞分泌的生长因子不同的是外泌体包裹着丰富的来源细胞的蛋白质、核糖核酸、微小核糖核^[4],具有靶向性,并且这些重要组份使外泌体在疾病的免疫调控^[5]、组织损伤修复^[6]以及临床疾病检测与诊断^[7]等过程中发挥重要作用。近期研究发现,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)可以

通过旁分泌机制分泌外泌体替代MSCs发挥促进组织缺损修复及骨再生的作用^[8]。本实验旨在探究LPS预处理DFCs分泌的外泌体(LPS pretreated DFCs derived exosomes, L-Exos)浓度在10 $\mu\text{g/mL}$ 以及100 $\mu\text{g/mL}$ 时对牙周炎患者的牙周膜细胞(periodontal ligament cells of periodontitis, p-PDLCs)成骨分化功能的影响。为L-Exos作为替代细胞疗法用于牙周组织再生提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

胎牛血清(Gibco,美国); α -MEM完全培养液(GE Healthcare Life Sciences,美国);青链霉素(Solarbio,中国);胰蛋白酶(Millipore,美国);I型胶原酶(Sigma,美国);Trizol(Invitrogen,美国);茜素红(Sigma,美国);CD31、CD34、CD73、CD90、CD106、CD146和Actin抗体(Abcam,美国);CD63和Alix抗体(正能,中国);超滤管(Millipore,美国);外泌体提取试剂盒(Invitrogen,美国);扫描透镜(HT7700 TEM,日本);纳米粒度及Zeta电位分析仪(Malvern Instruments,英国);高速离心机(Backman,美国);Thermo Micro 21R台式冷冻离心机(Eppendorf,德国)。本研究获得四川大学华西口腔医院伦理委员会批准,患者知情同意。

1.2 细胞培养与鉴定

1.2.1 DFCs组织块酶消化法培养 取12~20岁健康受试者需要拔除的未发育完全的智齿。收

取包裹于牙冠的牙囊组织,置于10%双抗磷酸缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)中洗净,剪成0.5~1.0 mm的细碎组织块, I型胶原酶消化30 min,离心,弃上清,用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)以及2%双抗的 α -MEM完全培养基洗涤,重悬。将组织平铺于T25小瓶中,滴加少量含15%FBS的 α -MEM培养基,置细胞孵箱中(5%CO₂, 37℃),24 h后将培养基加至2 mL。每3 d换液1次,应用倒置显微镜观察细胞状态,当细胞生长至60%~80%时用0.25%的胰蛋白酶消化传代,取第5代用于后续实验。

1.2.2 p-PDLCs组织块酶消化法培养 取40~60岁被诊断为慢性牙周炎的患者需要拔除的牙(牙周探诊深度大于4 mm,探诊出血且存在附着丧失),患者知情同意。拔除后置于10%含双抗的PBS中,洗净。刮取收集根中1/3牙周膜组织于I型胶原酶中消化20~30 min,离心,用 α -MEM培养基洗涤,重悬,均匀平铺于小皿中,滴加少量15%FBS的 α -MEM培养基,置细胞孵箱中(5%CO₂, 37℃),24 h后将培养基缓慢加至2 mL。当细胞生长至80%时用0.25%的胰蛋白酶消化传代,取第3代用于后续实验。

1.2.3 DFCs细胞表型鉴定 选用P3代的DFCs,计数,细胞悬液分装至1.5 mL的EP管中,浓度为 2×10^5 个/200 μ L,含2%FBS的PBS洗涤2次后,每个离心管中加入2 μ L的CD31、CD34、CD73、CD90、CD106和CD146抗体在4℃下避光孵育1 h,含2%FBS的PBS洗涤2遍。细胞悬液通过200目的细胞筛,流式细胞仪检测。

1.3 LPS刺激DFCs并提取外泌体进行鉴定

P5代的DFCs置于T75大瓶中培养至80%时,加入250 ng/mL LPS 24 h, PBS清洗2遍后,加入无血清培养48 h,收取细胞上清于50 mL离心管

中。于3 000 g离心30 min,接着采用0.22 μ m的滤器过滤收集的上清,将过滤后的上清(分子粒径<220 nm)置于100 KD的超滤管中,5 000 g/min离心30 min,得到分子粒径为30~220 nm的上清浓缩液,并置于-80℃冰箱备用。浓缩液按2:1的体积加入外泌体提取试剂,充分混匀,4℃孵育过夜,10 000 g/min离心60 min,沉淀即为L-Exos。将离心后得到的白色沉淀溶于生理盐水后,2%戊二醛固定1 h,进行透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察外泌体的结构;纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)技术分析外泌体粒径分布范围;蛋白印迹(Western Bolt)法检测其表面标记物。

外泌体溶解在RIPA裂解缓冲液中,通过BCA方法计算蛋白总量后,将裂解液与蛋白缓冲液按比例混合,最终将浓度调至为1 μ g/ μ L^[9]。将封闭后的膜分别与CD63(1:1 000, Zen Bioscience, China, 615509)、Alix(1:1 000, Zen Bioscience, China, 341000)和Actin(1:1 000, Abcam, ab3280)的一抗在4℃过夜,然后在室温下二抗孵育1 h,进行检测。

1.4 经LPS刺激DFCs后的外泌体对p-PDLCs的分化影响

1.4.1 RT-PCR P3代的p-PDLCs以 5×10^5 个细胞/孔的细胞数接种至12孔板,待细胞贴壁至60%约24 h后,将L-Exos重悬于培养基中分别以10、100 μ g/mL的浓度加入p-PDLCs中(对照组加入相应剂量的PBS),在诱导7 d后,每孔加入500 μ L Trizol裂解液,分离提取RNA,并逆转录为cDNA^[10]。利用RT-PCR仪进行荧光定量检测分化相关基因:Periostin、I型胶原(Collagen I, Col I)、Col III、转化生长因子- β (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1),引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Gene	Forward	Reverse
Periostin	5'-CACTCTTTGCTCCCAATA-3'	5'-ATTTCCTTCCAGCGTCTCAA-3'
Col I	5'-AACATGGAGACTGGTGAGACCT-3'	5'-CGCCATACTCGAACTGGAATC-3'
Col III	5'-TGGAGGATGTTGCACGAAA-3'	5'-ACAGCCTTGCGTGTTCGATA-3'
TGF- β 1	5'-CACGTGGAGCTGTACCAGAA-3'	5'-GAACCCGTTGATGTCCACTT-3'
GAPDH	5'-GTTTGGTATCGTGAAGGACTC-3'	5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'

1.4.2 L-Exos对p-PDLCs成骨的影响 将P3代的p-PDLCs分别以 5×10^5 个细胞/孔接种于12孔板中,待细胞贴壁至60%约24 h后,将L-Exos重悬于成骨诱导培养基中分别以10、100 μ g/mL的浓度加入p-PDLCs

中。7 d后,弃上清, PBS洗涤,4%多聚甲醛固定15 min,按参考文献方法^[11]进行茜素红染色、矿化结节的观察以及半定量分析。其中成骨诱导液为含5 mmol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/mL维生素C、

100 mmol/L 地塞米松、10% FBS 的 α -MEM 培养液。

1.5 统计学方法

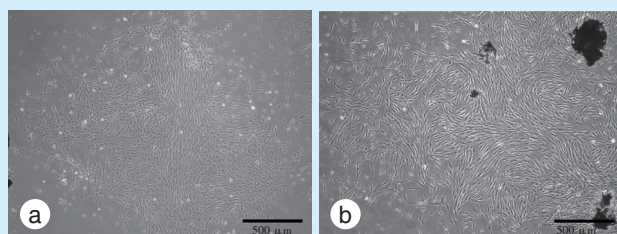
采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,多组均值的比较采用单因素方差分析,组间比较运用 Bonferroni 法进行两两比较,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 DFCs 与 p-PDLCs 的培养

在 DFCs 分离培养 3 d 后,细胞开始从组织块中

缓慢爬出,爬出的细胞以组织为中心呈放射状向周围排列,长梭形,胞体饱满,偶有散在上皮团从组织块分离,10 d 后多处组织块中大部分的细胞已分离爬出,细胞生长汇合达培养瓶的 60% ~ 70% (图 1a)。p-PDLCs 分离培养 4 ~ 7 d 后开始有少量 p-PDLCs 迁移出组织块,无序排列,为典型的成纤维样。15 ~ 20 d 后爬出的细胞增多,呈旋涡状或放射状细胞簇散在铺于培养皿(图 1b)。



a: dental folic cells (DFCs); b: periodontal ligament cells of periodontitis (p-PDLCs); bar = 500 μ m

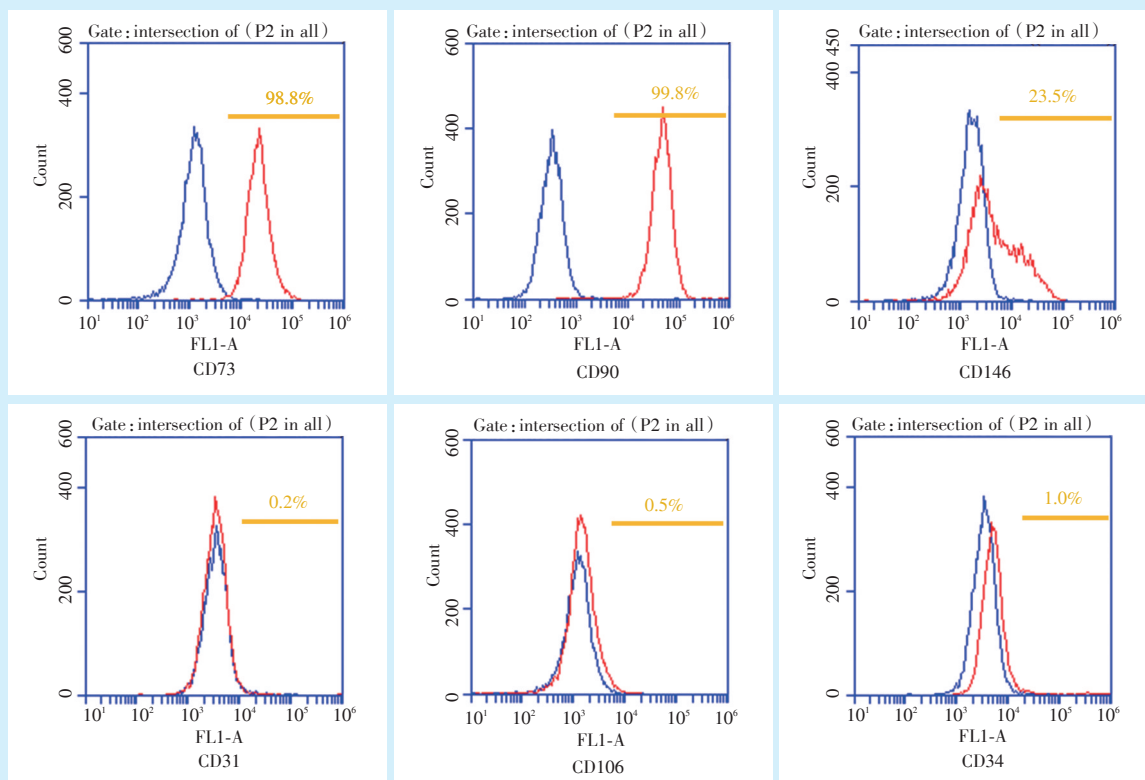
Figure 1 The cell culture of DFCs and p-PDLCs

图 1 牙囊细胞和牙周炎患者的牙周膜细胞原代培养

2.2 DFCs 的鉴定

DFCs 的表面标记物 CD73、CD90、CD146 阳性表达,并且 CD31、CD106、CD34 显示阴性,因此分

离培养的 DFCs 来源于间充质干细胞,并非造血干细胞来源(图 2)。



DFCs positively expressed CD73, CD90 and CD146, while negatively expressed CD31, CD106 and CD34; DFCs: dental folic cells

Figure 2 Flow cytometry analysis for DFCs

图 2 DFCs 的流式细胞术分析

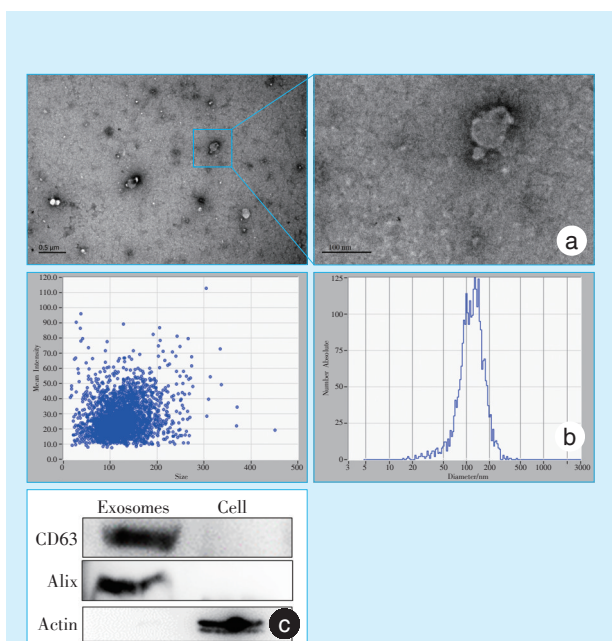
2.3 外泌体的鉴定

L-Exos 是直径为 30~100 nm 的囊泡样结构, 囊泡周缘可观察到脂质双分子层(图 3a)。将白色沉淀溶于生理盐水后, 纳米颗粒追踪分析结果如图 3b 示, 所提取的 L-Exos 直径大小的峰值主要分布在 100 nm 左右。运用 Western Blot 检测囊泡表面标记物 CD63、外泌体特有标记物 ALG-2 相互作用蛋白 X (ALG-2-interacting protein X, Alix) 以及细胞的表面标记物肌动蛋白水平, 结果显示提取物强阳性表达 CD63 和 Alix, 不表达细胞表面标记物 Actin, 而对照组细胞的结果则与之相反(图 3c)。进而证明, 该方法提取的分离物为外泌体。

2.4 L-Exos 对 p-PDLs 成骨向分化的影响

RT-PCR 检测 Periostin、Col I、Col III、TGF- β 1 的表达, 10、100 μ g/mL L-Exos 组中 Periostin 和 Col I 的表达均高于对照组 ($P < 0.05$), 且浓度为 100 μ g/mL 时的表达量更高; Col III 在 100 μ g/mL 外泌体组的表达为对照组以及 10 μ g/mL 外泌体组的 2 倍 ($P < 0.01$), 而 TGF- β 1 的表达则在 10 μ g/mL 外泌体组呈现出最高的表达量 ($P < 0.01$, 图 4)。

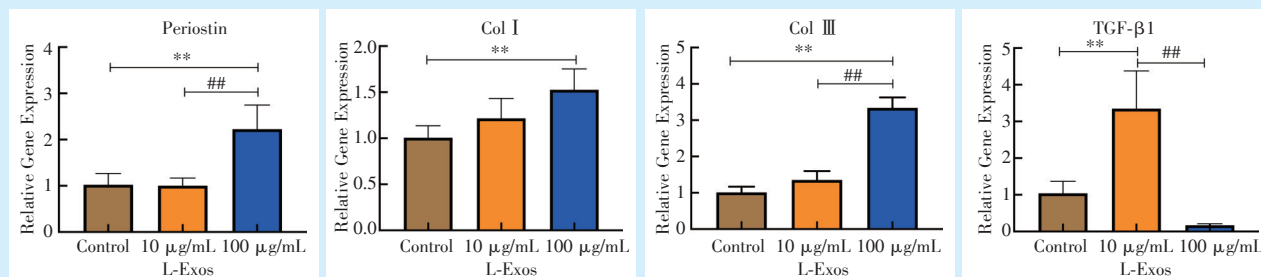
细胞茜素红染色结果显示, 与对照组比较, 10、100 μ g/mL 浓度的外泌体组均可见到茜素红染料标记的阳性矿化结节 ($F = 237.761$, $P < 0.01$), 且 100 μ g/mL 外泌体组钙结节数量多于 10 μ g/mL 组 ($P < 0.01$, 图 5)。



a: transmission electron microscopy detected that L-Exos were vesicle-like structures; b: nanoparticle tracking analysis determined that the size distribution of L-Exos was mainly approximately 100 nm; c: surface markers of exosomes (CD63, Alix) and cell markers (Actin) were detected by Western blotting; L-Exos: LPS-pre-treated DFC-derived exosomes

Figure 3 Identification of exosomes

图3 外泌体的鉴定



Col I: Collagen I; Col III: Collagen III; TGF- β 1: transforming growth factor- β 1; L-Exos: LPS pretreated DFCs derived exosome; p-PDLs: periodontal ligament cells of periodontitis; **: $P < 0.01$ vs. Control; #: $P < 0.01$ vs. 10 μ g/mL

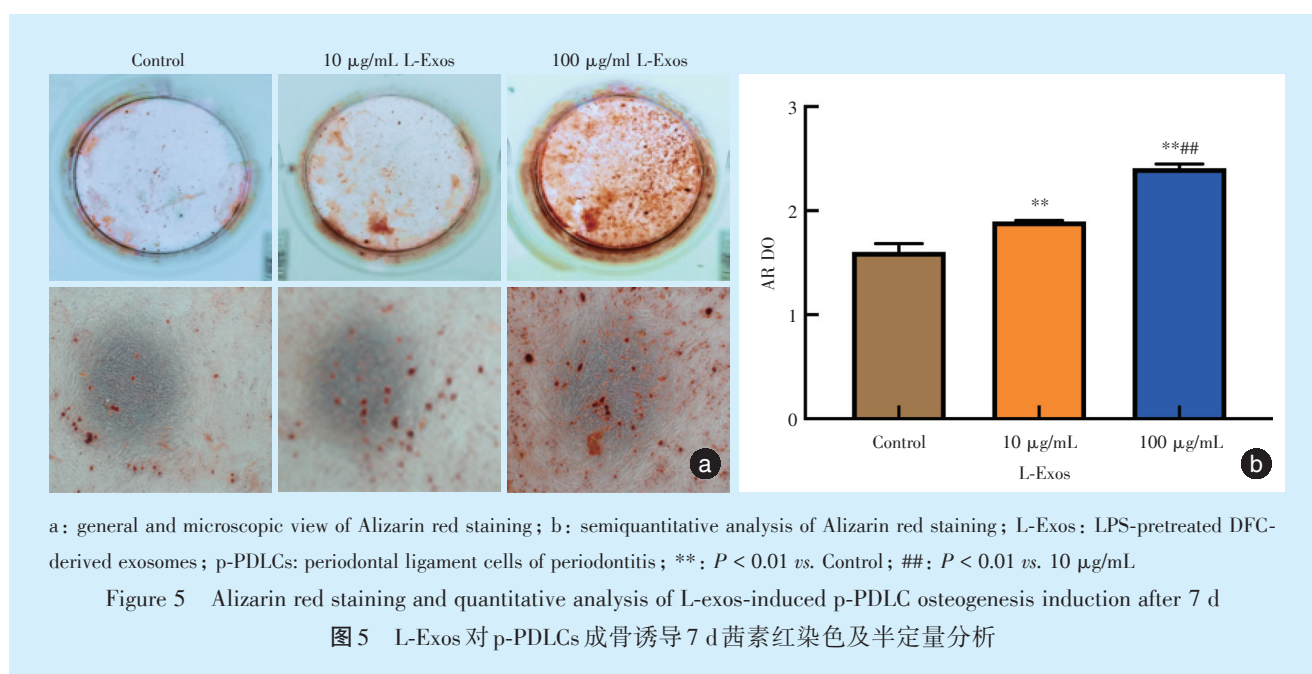
Figure 4 The expression of L-Exos-induced p-PDL osteogenic and adhesion-related genes was detected by RT-PCR

图4 RT-PCR 检测 L-Exos 对 p-PDLs 成骨相关基因表达

3 讨论

越来越多的研究表明 MSCs 除了通过自我增殖分化加速组织修复外, 还可通过其分泌外泌体等调节内源性干细胞分化、增殖从而促进受损组织的愈合^[12]。基于目前的研究, 外泌体的提取方法主要为蔗糖-密度梯度离心法、超速离心法、超速法以及商品化试剂盒法(类似于聚合物沉淀)

等^[13]。由于目前外泌体提纯技术的局限性, 无论是超速离心法还是试剂盒法提取的外泌体均可能含有小的细胞外囊泡或其他成分, 如同等大小的脂质体、蛋白质等, 而不是单纯的外泌体^[14]。因此针对提取方法的选择问题, 国际细胞外囊泡协会指出提取方法的选择应以所需的囊泡纯度和浓度为指导^[13]。本实验旨在初步探究牙囊细胞外泌体



对p-PDLCs的作用,因此选用商品化的试剂盒作为本实验外泌体的提取方法。在本研究中,透射电镜结果显示外泌体形态大小不一,直径在30~100 nm之间,具有脂质双分子层结构,NTA检测外泌体粒径分布发现外泌体样本大小峰值在100 nm,这些特性同先前文献结果是一致的^[15]。此外,根据蛋白质组学研究,与细胞相比,外泌体特异性表达四跨膜蛋白,如CD63、肿瘤易感基因101蛋白(tumor susceptibility gene 101, TSG101)、Alix等^[15]。本实验Western Blot结果显示提取的外泌体样本高表达CD63、Alix而不表达Actin,由此认为通过本实验方法提取的是牙囊细胞外泌体。

DFCs在牙发育过程中分化形成牙骨质、牙周膜以及牙槽骨,是形成牙周组织的前体细胞,取材方便,增殖分化能力强,是牙周组织工程中常用的一种种子细胞^[1]。同时本课题组的前期研究将牙龈卟啉单胞菌来源的LPS预处理DFCs 24 h后其细胞膜片表现出较PDLCs更强的成骨、成胶原能力,更有利于牙周组织再生^[2]。然而,LPS预处理后的DFCs分泌的外泌体对牙周组织作用的机制尚不明确。

研究表明,MSC分泌的外泌体可促进组织源性细胞增殖和分化能力。而目前外泌体对于牙周组织再生的研究是局限的。Jiang等^[16]发现乳鼠切牙MSCs外泌体在浓度为10 µg/mL时能明显升高上皮细胞碱性磷酸酶活性,牙本质涎蛋白表达,促进矿化物质形成,效果优于浓度为0.1 µg/mL、1 µg/mL的MSCs外泌体。Chew等^[17]将40 µg MSCs

外泌体载入胶原海绵中治疗大鼠牙周缺损发现, MSCs外泌体通过增强PDLCs的增殖分化功能促进牙周缺损的骨修复,但结果中的牙槽骨的再生效果不佳,而高浓度的外泌体对细胞分化影响尚不明确,如何提高外泌体的效能是急需解决的问题。本研究发现100 µg/mL L-Exos上调p-PDLCs成骨相关基因Col I、Col III的表达以及黏附相关基因Periostin的表达。Periostin是一种基质细胞蛋白,可调节细胞迁移、募集、黏附,表达于各种组织的愈合区域^[18],在牙周组织及其周围骨的再生中起重要作用^[19]。Col I是最早发现的成骨细胞标志物之一,它在成骨前体细胞中表达上调并沉积为细胞外基质,是早期成骨细胞分化的标志^[20]。Col III对胶原弹性有重要作用,在组织修复初期Col III含量较高,随后逐渐被Col I替代^[21]。这些基因的表达水平上调均能调控牙周骨组织再生,增强p-PDLCs的成骨能力。研究表明,TGF-β1对间充质细胞和某些其他特定细胞类型如牙周膜细胞、成纤维细胞,和成骨细胞等具有增强细胞活性,促进细胞生长的能力^[22]。在本实验中,TGF-β1基因在10 µg/mL L-Exos组相对表达量明显高于100 µg/mL L-Exos组,这表明在诱导7 d后,10 µg/mL L-Exos组p-PDLCs增殖活性较强,而100 µg/mL L-Exos组p-PDLCs成骨向分化能力较强,进而证明100 µg/mL L-Exos较10 µg/mL L-Exos具有更强的促进p-PDLCs成骨向分化能力,益于牙周组织再生。

综上所述,本研究发现LPS预处理后的牙囊细胞

外泌体具有促进p-PDLCs的成骨向分化能力,并且当外泌体浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时较10 $\mu\text{g/mL}$ 效果更佳,为后期实验对外泌体浓度的选择提供研究依据。但仍有很多问题需要后续进一步研究,如动物体内研究以及L-Exos促进p-PDLCs可能存在的机制。

【Author contributions】 Shi WW processed and analyzed the data, wrote the article. Ding Y, Tian WD revised the article. Guo SJ designed the study, guided the writing of the article. All authors read and approved the final manuscript as submitted.

参考文献

- [1] 叶青松, 王晓燕. 牙源性干细胞储存和临床应用的研究进展[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(1): 15-25. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2018.01.004.
- [2] Ye QS, Wang XY. Progress in storage and clinical application of dental stem cells [J]. J Prev Treat Stomatol Dis, 2018, 26(1): 15-25. doi: 10.12016/j.issn.2096-1456.2018.01.004.
- [3] Guo SJ, Kang J, Ji BH, et al. Periodontal-derived mesenchymal cell sheets promote periodontal regeneration in inflammatory microenvironment [J]. Tissue Eng Part A, 2017, 23(13-14): 585-596. doi: 10.1089/ten.TEA.2016.0334.
- [4] Yang F, Liao XZ, Tian Y, et al. Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies [J]. Biotechnol J, 2017, 12(4). doi: 10.1002/biot.201600699.
- [5] Zhang J, Li S, Li L, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function [J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2015, 13(1): 17-24. doi: 10.1016/j.gpb.2015.02.001.
- [6] Clayton SM, Archard J, Wagner J, et al. Immunoregulatory potential of exosomes derived from cancer stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2020, 29(6): 327-335. doi: 10.1089/scd.2019.0197.
- [7] Qiu H, Liu S, Wu K, et al. Prospective application of exosomes derived from adipose-derived stem cells in skin wound healing: A review [J]. J Cosmet Dermatol, 2020, 19(3): 574-581. doi: 10.1111/jocd.13215.
- [8] Mannavola F, D'oranzo S, Cives M, et al. Extracellular vesicles and epigenetic modifications are hallmarks of melanoma progression [J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 52. doi: 10.3390/ijms21010052.
- [9] Li WY, Liu YS, Zhang P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(6): 5240-5254. doi: 10.1021/acsami.7b17620.
- [10] Dai MJ, Yu M, Zhang Y, et al. Exosome-like vesicles derived from adipose tissue provide biochemical cues for adipose tissue regeneration [J]. Tissue Eng Part A, 2017, 23(21-22): 1221-1230. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0045.
- [11] Shen YX, Guo SJ, Chen GQ, et al. Hyperglycemia induces osteoclastogenesis and bone destruction through the activation of Ca (2+)/calmodulin-dependent protein kinase II [J]. Calcif Tissue Int, 2019, 104(4): 390-401. doi: 10.1007/s00223-018-0499-9.
- [12] Chen T, Liu Z, Sun WH, et al. Inhibition of apei redox activity promotes odonto/osteogenic differentiation of dental papilla cells [J]. Sci Rep, 2015, 5: 17483. doi: 10.1038/srep17483.
- [13] 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.
- [14] Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research [J]. J Extracell Vesicles, 2013, 2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20360.
- [15] He CJ, Zheng S, Luo Y, et al. Exosome theranostics: biology and translational medicine [J]. Theranostics, 2018, 8(1): 237-255. doi: 10.7150/thno.21945.
- [16] Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(2): 193-208. doi: 10.1007/s00018-017-2595-9.
- [17] Jiang N, Xiang LS, He L, et al. Exosomes mediate epithelium-mesenchyme crosstalk in organ development [J]. ACS Nano, 2017, 11(8): 7736-7746. doi: 10.1021/acsnano.7b01087.
- [18] Chew JRJ, Chuah SJ, Teo KYW, et al. Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration [J]. Acta Biomater, 2019, 89: 252-264. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.021.
- [19] Du J, Li MQ. Functions of periostin in dental tissues and its role in periodontal tissue regeneration [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1132: 63-72. doi: 10.1007/978-981-13-6657-4_7.
- [20] 屈俊秀, 贾立辉, 车彩昕, 等. 胰岛素样生长因子1(IGF-1)促进人牙周膜干细胞增殖并诱导其向牙周膜成纤维细胞分化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(4): 471-476. doi: 10.13423/j.cnki.cjcmi.008102.
- [21] Qu JX, Jia LH, Che CX, et al. Insulin-like growth factor 1 promotes the proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells into periodontal ligament fibroblasts [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2017, 33(4): 471-476. doi: 10.13423/j.cnki.cjcmi.008102.
- [22] Pivodova V, Frankova J, Ulrichova J. Osteoblast and gingival fibroblast markers in dental implant studies [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011, 155(2): 109-116. doi: 10.5507/bp.2011.021.
- [23] 张晓东, 林珠, 李永明. 正畸牙齿移动时牙周膜 I、III型胶原变化的实验研究 [J]. 临床口腔医学杂志, 2005, (3): 164-166.
- [24] Zhang XD, Lin Z, Li YM, et al. Experimental investigations of collagen type I and III of periodontal tissues during tooth movement [J]. J Clin Stomatol, 2005, (3): 164-166.
- [25] Koivisto L, Heino J, Hakkinen L, et al. Integrins in wound healing [J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014, 3(12): 762-783. doi: 10.1089/wound.2013.0436.

(编辑 罗燕鸿, 曾曙光)



官网



公众号