

外泌体在力相关牙周炎症反应中的作用

张轶凡, 胥春

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔修复科;上海交通大学口腔医学院;国家口腔医学中心;
国家口腔疾病临床医学研究中心;上海市口腔医学重点实验室,上海 200011)

摘要:外泌体是细胞分泌的含有多种分子成分的细胞外囊泡,可以通过自分泌和旁分泌作用来发挥细胞间物质运输和信号交流的功能。外泌体在体内存在广泛,参与多种生理、病理过程,包括与力相关的炎症反应。牙周组织中存在着力学刺激感受细胞,可以感受牙齿受到的应力。其中,适量的力学载荷可以维持牙周组织的健康,而过度的力学载荷则可能引起牙周组织的破坏和吸收,导致牙周组织发生炎症反应。本文对外泌体在力相关的炎症反应,尤其是牙周组织炎症反应中的作用进行综述。

关键词: 外泌体;力学载荷;牙周组织;炎症

中图分类号: R 318.01 **文献标志码:** A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.02.028

The Role of Exosomes in Force-Related Periodontal Inflammatory Response

ZHANG Yifan, XU Chun

(Department of Prosthodontics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China)

Abstract: Exosomes are extracellular vesicles secreted by cells with a variety of molecular components, which can play the role of substance transport and signal communication between cells through autocrine and paracrine. Exosomes exist widely *in vivo* and participate in many physiological and pathological processes, including force-related periodontal inflammation. There are stress receptor cells in the periodontium, which can sense force loading on the tooth. An appropriate amount of mechanical loading can maintain health of the periodontium, while excessive mechanical loading may cause destruction and absorption of the periodontium, leading to periodontal inflammation. This article reviews the role of exosomes in force-related inflammation response, especially in periodontal inflammation response.

Key words: exosomes; mechanical loading; periodontium; inflammation

健康牙周组织是人体维持牙齿稳固、正常行使咀嚼功能的基础。适量的应力负载可以维持牙周组织健康,而过度的应力负载则可能引起牙周组织的炎症反应,引起牙周组织的破坏和吸收^[1-2]。

外泌体在细胞间发挥了物质运输和信号交流的功能,这种功能的发挥结合了自分泌和旁分泌的特征^[3]。随着对外泌体功能的不断探索,研究发现外泌体在力诱导的组织炎症反应中发挥重要的作用,包括力相关的牙周炎症反应。本文对外泌体在力相关炎症反应尤其是牙周炎症反应中的作用进行综述。

1 外泌体

外泌体是细胞分泌的平均直径在 100 nm 左右具有脂质双分子层结构的细胞外囊泡^[4]。外泌体来源于细胞内的多泡体,多泡体由内体膜向内凹陷形成的管腔内囊泡所积累而成,在特定的刺激作用下,多泡体与细胞膜融合后释放到细胞外成为外泌体^[5](见图 1)。这一过程由运输多泡体所需的内体分选复合体蛋白所调节^[6-7]。

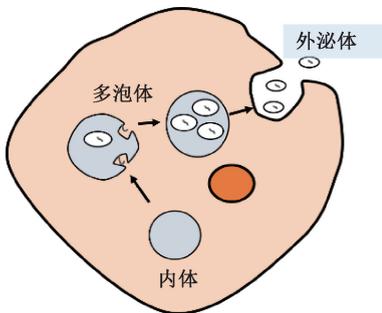


图 1 细胞分泌外泌体过程

Fig.1 Exosomes secretion process from cells

外泌体作为一种细胞外囊泡,理论上可以为机体内的所有细胞所分泌,并广泛存在于人体体液中,如血液、尿液、腹水等^[8]。外泌体中携带了细胞主动分泌的蛋白质、脂质和核酸等需要避免被降解的分子来参与细胞间物质运输,一些蛋白质如 CD9、CD63 和 Alix 等富含在外泌体中并被用作外泌体的标记^[9]。这种结合了自分泌和旁分泌特征的运输方式,在细胞通讯、细胞迁移、血管新生和肿瘤细胞生长等过程中发挥重要作用^[3]。例如,已经有研究证实,外泌体在细菌性牙周炎中扮

演重要的角色。一项病例对照研究发现,牙周炎患者唾液中外泌体含量相较于健康组明显降低,提示外泌体可能是牙周炎病程发展中的重要介质^[10]。为了进一步探索外泌体在细菌性牙周炎中的具体作用,Zhao 等^[11]研究发现,细菌的脂多糖成分可以促进人牙周膜细胞分泌外泌体,并证实脂多糖刺激下,人牙周膜细胞外泌体抑制成骨细胞骨保护素的分泌和成骨细胞的成骨活性,从而促进破骨细胞的分化,激活破骨细胞介导的破骨反应,最终导致牙周组织炎症的发生发展。该结果提示,细菌刺激牙周膜细胞产生的外泌体介导了细菌性牙周组织炎症中牙周膜细胞和成骨细胞等细胞间的信号交流。

2 外泌体在力相关炎症反应中的作用

自从 Trams 等^[12]发现外泌体以来,外泌体在体内多种生理病理过程中的作用引起广泛关注和研究,其中不乏对外泌体在与力相关炎症疾病中作用的探索。

肝脏在肝静脉血栓形成、肝动脉栓塞、门静脉高压等情况下会出现巨大的血流动力学改变,这一变化会造成肝内血管周围微环境的异常。例如,在血液流体压力影响下,微环境中肌成纤维细胞增殖和迁移会发生变化,进而导致门静脉汇管区的纤维化病变^[13]。研究表明,在这些肝脏的生理病理变化过程中,不同细胞来源的外泌体参与细胞间的交流沟通。其中,肝细胞来源的外泌体可以诱导肝细胞增殖、再生和缺血-再灌注损伤后修复^[14-15]。值得一提的是,这些外泌体中包含的微小 RNA (microRNA, miRNA) 在细胞间信号交流中的作用尤为重要,可能作为分子标志物成为诊断和治疗多种肝脏疾病的新靶点^[16-17]。

血流动力学的改变是导致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 等心血管疾病的危险因素之一,应力环境下血管内皮细胞的迁移是 AS 斑块形成过程中的重要一环^[18]。研究显示,血管内皮细胞来源的外泌体可以加重血管的脂质代谢异常和炎症反应,而动脉血管壁中过量脂质的异常沉积所导致的血流动力学变化可以对血管壁造成切应力,从而加速 AS 的形成和发展。其中,内皮细胞分泌的外泌体中肺腺癌转移相关转录因子 1 (metastasis

associated in lung denocarcinoma transcript 1, MALTA1)和巨噬细胞来源外泌体中 miR-21-3p 促进了炎性斑块形成,加重了 AS 病程。研究者已开始关注外泌体在 AS 诊治中的作用。一方面,患者血浆中外泌体内 miR-30e 和 miR-92a 显著升高,两者可能成为诊断 AS 的潜在生物标志物;另一方面,脂肪间充质干细胞来源的外泌体通过抑制内皮细胞 miR-342-5p 和上调蛋白磷酸酶 1 调节亚基 12B (protein phosphatase 1 regulatory subunit 12B, PPP1R12B), 有效地保护了内皮细胞,也为治疗动脉粥样硬化提供新的思路和方法^[19]。

3 外泌体在与力相关的牙周炎症中的作用

人体维持牙齿稳固、正常行使咀嚼功能离不开牙周组织的健康。牙周膜作为口颌系统中特殊的应力感受组织,与生物力学有着密切的联系。牙周膜可以感知到牙齿受到的应力,并将应力分散传递到牙槽骨、牙骨质等组织^[20]。作用于牙周组织的力有咬合力、正畸治疗中的矫治力、创伤性外力等,依据应力形式也可分为剪切力、压缩力、拉伸力等。适量应力负载可以维持牙周组织健康,促进牙周组织改建,而这也是正畸治疗的生物学基础。但过度的应力负载如创伤性咬合、设计制作不当的义齿以及不良的矫治力等对牙齿施力过大,则可能引起牙周组织无菌性炎症反应,激活一系列生物信号导致牙周组织的破坏和吸收^[1,21-22]。

应力对牙周组织的作用与牙周组织细胞对力刺激的感受和响应密不可分。在牙周组织中,牙槽骨骨陷窝中的骨细胞可以感受力学刺激,分泌的前列腺素等介质通过自分泌和旁分泌途径来调节牙槽骨骨细胞和成骨细胞的细胞行为^[23]。和骨细胞相似,牙周膜细胞也可以感知牙周组织中的应力变化而发生细胞内信号的改变^[20]。牙周膜细胞感受牵张力刺激后,细胞中的 NLRP1 和 NLRP3 炎症体被激活,进而炎症相关天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteine-dependent aspartate-specific proteases, caspase) 在炎症体中活化后裂解白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等炎症因子前体使其成熟,诱发牙周膜细胞焦亡,将炎症因子释放到胞外,引发牙周组织炎症反应^[24]。研究显示,创伤性咬合力在数分钟内即可使牙周膜微循环发生变化,导致血

小板聚集,释放 IL-1、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX2) 等促炎细胞因子,引起牙周组织的炎症性反应^[21]。

Atsawasuwan 等^[25]检测了 4 名健康志愿者和 15 名正畸患者的龈沟液,发现龈沟液中存在大量外泌体,其中正畸组患者龈沟液外泌体中 miRNA-29 家族表达明显升高,提示龈沟液外泌体中 miRNA-29 家族可能参与力学刺激作用下牙周组织的炎症反应。上述发现揭示了外泌体在力作用下牙周组织炎症中的潜在作用,外泌体及其携带的 miRNA 等内容物或许可成为力学刺激作用下牙周组织炎症反应的生物标志物。

鉴于骨细胞是牙槽骨中的应力敏感细胞,有学者使用 Flexell 张力加载系统模拟体内牙周组织受到的力学刺激,对小鼠成骨样 MLO-Y4 细胞加载牵张力。结果发现牵张刺激可以促进该细胞分泌外泌体,且分泌的外泌体可以被人牙周膜干细胞 (human periodontal ligament stem cells, HPDLSCs) 摄取。进一步研究发现,该外泌体中携带的 miR-181b-5p 通过抑制 HPDLSCs 中磷酸酶-张力蛋白同源物缺失 (phosphatase tension homolog deletion, PTEN) 和增强蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 的活性来促进 HPDLSCs 增殖,并通过上调 HPDLSCs 中骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 和转录因子蛋白 Runx2 表达来促进 HPDLSCs 成骨分化,进而维持牙周内环境的平衡^[26]。上述结果初步揭示了牙槽骨骨细胞感受力学刺激、调控人牙周膜干细胞增殖和成骨分化的机制 (见图 2)。

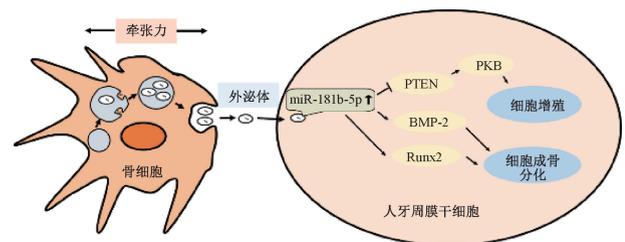


图 2 牵张刺激下骨细胞分泌外泌体调控人牙周膜干细胞增殖和成骨分化机制

Fig.2 Mechanism of exosomes secreted by osteocytes regulating proliferation and osteogenic differentiation of HPDLSCs under mechanical strain

成熟表型的巨噬细胞可以释放 IL-1 β 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12) 以及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等促炎细胞因子,在牙周组织炎症中扮演重要角色。而牙周膜细胞具有力学刺激感受性,被认为是机体在应力下维持牙周稳态的关键细胞。Wang 等^[27]探究了牵张力作用下人牙周膜细胞与巨噬细胞的关系。结果发现,在对人牙周膜细胞加载周期性牵张力后,人牙周膜细胞上清液中可检测到大量的外泌体,且外泌体含量呈加载时长依赖性,加载 36 h 后进入平台期。牵张刺激人牙周膜细胞分泌的外泌体可以进入到巨噬细胞中,并通过抑制巨噬细胞中的细胞核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路,即抑制巨噬细胞中 NF- κ B 的核转位和 NF- κ B p65 的 DNA 结合活性来阻止 NLRP3 炎性小体的激活,从而抑制巨噬细胞中 IL-1 β 的产生,维持牙周组织中炎症和免疫反应的动态平衡。该研究证实了牙周膜细胞可以感受力学刺激并分泌外泌体,并从分子层面上解释了这些外泌体调控下游巨噬细胞的机制(见图 3)。但是,巨噬细胞是否是应力作用下牙周膜细胞分泌的外泌体的唯一靶细胞,仍值得深入探索。例如,成骨细胞和破骨细胞在牙周炎组织破坏吸收中具有重要作用,应力作用下牙周膜细胞分泌的外泌体是否对这些细胞的细胞活性和生理学行为具有调控作用,就值得进一步研究。

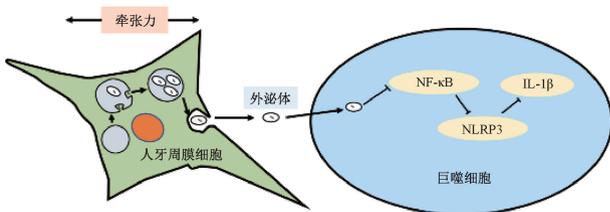


图 3 牵张刺激下人牙周膜细胞分泌外泌体调控巨噬细胞机制
Fig.3 Mechanism of exosomes secreted by HPDLs regulating macrophages under mechanical strain

鉴于破骨细胞在牙周炎组织破坏吸收中的重要作用,也有学者研究破骨细胞分泌的外泌体在应力作用下牙周组织破坏吸收中的作用。Wang 等^[28]研究压应力作用下破骨细胞分泌的外泌体对 HPDLs 成骨分化功能的影响。结果发现,24 h 压

应力加载下,破骨细胞来源的外泌体具有抑制 HPDLs 成骨分化的作用,而外泌体释放抑制剂解除了这种抑制作用。进一步对这些外泌体中的 miRNA 进行测序后发现,对骨形成有抑制作用的 miR-133a-3p、miR-203a-3p、miR-106a-5p 和 miR-331-3p 表达水平增高,而对骨形成有促进作用的 miR-223-5p 和 miR-181a-5p 表达水平降低。研究者推测这些差异表达的 miRNA 是导致压应力下破骨细胞外泌体抑制骨形成作用的重要因素,但其中的具体分子机制有待进一步研究。

压应力加载下破骨细胞来源的外泌体不仅具有抑制 HPDLs 成骨分化的作用,还促进了血管生成。Wang 等^[29]研究发现,压应力加载下,破骨细胞分泌的外泌体明显促进内皮细胞的增殖、迁移和管状成型以及血管内皮生长因子和 CD31 的表达。这些压应力加载下破骨细胞来源的外泌体中,miR-146a 显著降低,其靶标即内皮细胞中的脂联素则明显增多,从而促进血管生成(见图 4)。由于血管生成在促进破骨细胞前体细胞在局部的募集和成熟中具有重要作用,故该研究结果为探索外泌体在力相关牙周组织炎症中的作用机制提供了新视角。

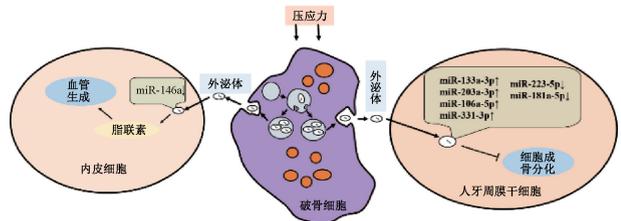


图 4 压应力刺激下破骨细胞分泌外泌体调控人牙周膜干细胞和内皮细胞机制

Fig. 4 Mechanism of exosomes secreted by osteoclasts regulating HPDLs and endothelial cells under compression stress

上述体内和体外研究初步揭示应力作用下牙周组织中力学刺激感受细胞的外泌体分泌情况,以及这些外泌体在力相关牙周组织炎症中的重要作用,但是其中涉及的具体分子机制和信号通路等,尚有待进一步的研究。

4 结论和展望

自从发现外泌体以来,研究者们对其开展大量研究,初步揭示了外泌体在力相关炎症疾病中的作

用,包括在力诱导的牙周组织炎症反应中的作用,但其具体作用机制还有待更深一步的研究和探索。在今后对外泌体在力相关炎症疾病中作用的研究中,很多问题尚需解决。例如:探索外泌体携带的miRNA以外的成分如蛋白质和脂质等在力相关炎症疾病中的作用,进一步明确力学刺激感受细胞所分泌外泌体的具体靶细胞及其作用机制等。深入研究外泌体及其携带的生物信号分子在力相关炎症反应中的调控机制,对于早日实现将外泌体用于力相关炎症疾病的临床诊疗具有重要的科学意义和临床价值。

参考文献:

- [1] FAN J, CATON JG. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations [J]. *J Periodontol*, 2018, 89 (Suppl 1): S214-S222.
- [2] 宋迎爽, 胥春. 微小RNA在力相关牙周炎症反应和组织改建中的作用[J]. *医用生物力学*, 2021, 36(1): 164-168.
SONG YS, XU C. The Role of microRNA in force-related periodontal inflammatory response and tissue remodeling [J]. *J Med Biomech*, 2021, 36(1): 164-168.
- [3] CAMUSSI G, DEREGIBUS MC, BRUNO S, *et al.* Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9): 838-848.
- [4] KALLURI R, LEBLEU VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [5] HEIJNEN HF, SCHIEL AE, FIJNHEER R, *et al.* Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules [J]. *Blood*, 1999, 94(11): 3791-3799.
- [6] BAIETTI MF, ZHANG Z, MORTIER E, *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7): 677-685.
- [7] JACKSON CE, SCRUGGS BS, SCHAFFER JE, *et al.* Effects of inhibiting VPS4 support a general role for ESCRTs in extracellular vesicle biogenesis [J]. *Biophys J*, 2017, 113(6): 1342-1352.
- [8] CHEVILLET JR, KANG Q, RUF IK, *et al.* Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(41): 14888-14893.
- [9] LÖTVALL J, HILL AF, HOCHBERG F, *et al.* Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 26913.
- [10] TOBÓN-ARROYAVE SI, CELIS-MEJÍA N, CÓRDOBA-HIDALGO MP, *et al.* Decreased salivary concentration of CD9 and CD81 exosome-related tetraspanins may be associated with the periodontal clinical status [J]. *J Clin Periodontol*, 2019, 46(4): 470-480.
- [11] ZHAO M, DAI W, WANG H, *et al.* Periodontal ligament fibroblasts regulate osteoblasts by exosome secretion induced by inflammatory stimuli [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 105: 27-34.
- [12] TRAMS EG, LAUTER CJ, SALEM N JR, *et al.* Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 645(1): 63-70.
- [13] 李翠翠, 叶启发. 血流动力学改变与肝脏重塑[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2016, 37(4): 651-654.
- [14] NOJIMA H, FREEMAN CM, SCHUSTER RM, *et al.* Hepatocyte exosomes mediate liver repair and regeneration via sphingosine-1-phosphate [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1): 60-68.
- [15] WANG R, DING Q, YAQOUB U, *et al.* Exosome adherence and internalization by hepatic stellate cells triggers sphingosine 1-phosphate-dependent migration [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(52): 30684-30696.
- [16] HAYES CN, CHAYAMA K. MicroRNAs as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 280.
- [17] SATO K, MENG F, GLASER S, *et al.* Exosomes in liver pathology [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(1): 213-221.
- [18] 张炎林, 兰祥星, 刘睿, 等. Bmi1在低切应力抑制血管内皮细胞迁移中的作用[J]. *医用生物力学*, 2019, 34(5): 536-540.
ZHANG YL, LAN XX, LIU R, *et al.* The role of Bmi1 on migration of HUVECs under low shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(5): 536-540.
- [19] WANG H, XIE Y, SALVADOR AM, *et al.* Exosomes: Multifaceted messengers in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2020, 22(10): 57.
- [20] PAVASANT P, YONGCHAITRAKUL T. Role of mechanical stress on the function of periodontal ligament cells [J]. *Periodontol 2000*, 2011, 56(1): 154-165.
- [21] MCCULLOCH CA, LEKIC P, MCKEE MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament [J]. *Periodontology 2000*, 2000, 24: 56-72.
- [22] LI Z, YU M, JIN S, *et al.* Stress Distribution and collagen remodeling of periodontal ligament during orthodontic tooth movement [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1263.