

# 根尖牙乳头干细胞摄取外泌体的介导途径

高晓敏<sup>△</sup>, 邹晓英<sup>△</sup>, 岳 林<sup>△</sup>

( 北京 大学 口腔 医学院 · 口腔 医院 , 牙 体 牙 髓 科 国 家 口 腔 疾 病 临 床 医 学 研 究 中 心 口 腔 数 字 化 医 疗 技 术 和 材 料 国 家 工 程 实 验 室 口 腔 数 字 医 学 北 京 市 重 点 实 验 室 北 京 100081)

[摘 要] 目的: 探讨根尖牙乳头干细胞( stem cells from apical papilla , SCAP ) 摄取牙髓干细胞( dental pulp stem cells , DPSCs ) 外泌体的作用 , 为揭示其内吞外泌体的途径提供依据。方法: ( 1 ) 采用超速离心法结合超滤法提取 DPSCs 外泌体 , 采用透射电镜观察法、纳米粒子示踪分析法以及 Western Blot 对其进行鉴定。( 2 ) 采用 PKH-26 膜标记技术标记 DPSCs 外泌体 , 37 °C 条件下将其与 SCAP 共培养作为阳性对照组 , 4 °C 条件下将其与 SCAP 共培养作为低温处理组 , 同时设置阴性对照组。采用免疫荧光染色法观察不同培养温度条件下 SCAP 内红色荧光标记情况。( 3 ) 通过胞吞抑制方法观察 SCAP 摄取外泌体的胞吞途径 , 分别采用 10 μmol/L 氯丙嗪( chlorpromazine , CPZ , 抑制网格蛋白介导的胞吞途径 ) 作为 CPZ 组、200 μmol /L 金雀异黄素( genistein , 抑制小窝蛋白介导的胞吞途径 ) 作为 Genistein 组、50 μmol /L LY294002 抑制巨胞饮( macropinocytosis ) 作用作为 LY294002 组处理 SCAP , 将 PKH-26 标记的 DPSCs 外泌体与 SCAP 共培养 , 同时设置溶剂对照组( 添加与抑制剂组等量的 DMSO ) , 采用免疫荧光染色技术观察 SCAP 内红色荧光标记情况和流式细胞技术分析有红色荧光标记的 SCAP 百分比。结果: ( 1 ) DPSCs 外泌体形态呈茶托样 , 具有双层膜结构 , 粒径峰值为 144 nm , 能够表达肿瘤易感基因( tumor susceptibility gene , TSG ) 101 蛋白、CD63 蛋白 , 二者皆为外泌体标志蛋白 , 符合外泌体特征。( 2 ) 免疫荧光结果显示 , 37 °C 共培养 6 h 后可见 SCAP 内有大量红色荧光( PKH-26 ) 标记 , 而 4 °C 共培养 6 h 后 , SCAP 内未见明显红色荧光( PKH-26 ) 标记。( 3 ) 免疫荧光结果显示胞吞抑制后 , SCAP 内部红色荧光( PKH-26 ) 标记减少 , 流式结果显示阳性对照组红色荧光标记的 SCAP 占 35.0% , 阴性对照组红色荧光标记的 SCAP 占 0.5% , 溶剂对照组红色荧光标记的 SCAP 占 29.7% , CPZ 组、Genistein 组、LY294002 组分别下降至 13.7%、16.6%、20.9%。结论: SCAP 能够摄取 DPSCs 外泌体 , 低温可影响该摄取过程; SCAP 摄取外泌体主要依赖网格蛋白介导的胞吞途径、小窝蛋白介导的胞吞途径以及巨胞饮途径。

[关键词] 牙髓干细胞; 根尖牙乳头干细胞; 外泌体; 胞吞途径

[中图分类号] R329.2 [文献标志码] A [文章编号] 1671-467X( 2020 ) 01-0043-08

doi: 10. 19723/j. issn. 1671-467X. 2020. 01. 007

## Mediated pathways of exosomes uptake by stem cells of apical papilla

GAO Xiao-min , ZOU Xiao-ying<sup>△</sup> , YUE Lin<sup>△</sup>

( Department of Cariology and Endodontology , Peking University School and Hospital of Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Laboratory for Digital and Material Technology of Stomatology & Beijing Key Laboratory of Digital Stomatology , Beijing 100081 , China)

**ABSTRACT Objective:** To evaluate the uptake of exosomes by stem cells from apical papilla ( SCAP ) , thus to provide experimental basis for mechanism of the exosomes endocytosis by SCAP. **Methods:** ( 1 ) Exosomes of dental pulp stem cells ( DPSCs ) were isolated by hypercentrifugation combined with ultrafiltration method. The exosomes were identified by transmission electron microscopy , nanoparticle tracking analysis and western blot. ( 2 ) PKH-26 membrane labeling technology was used to mark the DPSCs derived exosomes. The labeled exosomes were co-cultured with SCAP at 37 °C as positive control group , and co-cultured with SCAP at 4 °C as the low-temperature treatment group , while the negative control group was set up. ( 3 ) Using clathrin-mediated endocytosis inhibitor chlorpromazine ( CPZ , 10 μmol /L ) as CPZ group , caveolae-mediated endocytosis Genistein ( 200 μmol/L ) as Genistein group , and macropinocytosis inhibitor LY294002 ( 50 μmol/L ) as LY294002 group to treat the SCAP respectively. Solvent control group ( DMSO group ) was set. Immunofluorescence staining was used to detect the red fluorescence SCAP and flow cytometry was used to analyze the proportion of SCAP labeled with red fluorescence. **Results:** ( 1 ) The bilayer membrane and cup-shaped appearance of representative exosomes were observed. The peak of the size of DPSCs-derived exosomes was at 144 nm. The exosomes expressed exosomal marker proteins TSG101 and CD63 , but not GAPDH which was the cellular internal control pro-

基金项目: 国家自然科学基金( 81650005 , 81200773 ) Support by the National Natural Science Foundation of China( 81650005 , 81200773 )

<sup>△</sup> Corresponding author's e-mail , zouxiaoying1125@163. com , kqlinyue@bjmu. edu. cn

网络出版时间: 2019-4-2-18 11: 32: 05 网络出版地址: http://kns. cnki. net/kcms/detail/11. 4691. R. 20191217. 1520. 026. html

tein. (2) Immunofluorescence staining showed that after being co-cultured at 37 °C for 6 hours , red fluorescence could be detected in SCAP but it could not be detected after being co-cultured at 4 °C for 6 hours. After endocytosis inhibition , the red fluorescence in SCAP was reduced. Flow cytometry showed that the proportion of SCAP labeled with red fluorescence in positive group was 35.0% , in negative control group was 0.5% , and in solvent control group was 29.7% , in CPZ group , Genistein group and Genistein group were reduced to 13.7% , 16.6% , and 20.9% , respectively. **Conclusion:** SCAP could uptake the DPSCs derived exosomes , and low temperature could inhibit this process. The exosomes uptake of SCAP was mediated by the clathrin endocytosis pathway , caveolae-mediated endocytosis and macropinocytosis pathway.

**KEY WORDS** Dental pulp stem cells; Stem cells from apical papilla; Exosome; Endocytosis

外泌体是机体内大部分细胞都能分泌的一种直径在 30 ~ 150 nm 的微囊泡<sup>[1]</sup>。20 世纪 80 年代发现外泌体时 最初认为它是细胞为了维持自身稳定状态向外排泄废物的途径<sup>[2]</sup>。20 世纪 90 年代末 , Raposo 等<sup>[3]</sup>发现 ,人和鼠来源的 B 淋巴细胞外泌体含有组织相容复合体-II ( major histocompatibility complex-II ,MHC-II) 分子 ,可以诱发 T 淋巴细胞的免疫反应 ,提示外泌体在信号传导方面具有重要意义。2007 年 ,Valadi 等<sup>[4]</sup>通过体外实验研究发现 ,小鼠 MC/9 细胞来源的外泌体内含有 RNA 成分 ,能够转运至受体细胞中表达产生蛋白质 ,并发现由于外泌体存在膜包被 ,外泌体的 RNA 成分能够抵抗 RNA 消化酶的降解作用 ,这进一步说明外泌体介导细胞间信号信息传导的重要作用。

随着组织再生工程学的发现 ,人们逐渐注意到外泌体所携带的信号分子有助于干细胞的定向分化。2016 年 Huang 等<sup>[5]</sup>发现 ,牙髓干细胞 ( dental pulp stem cells ,DPSCs) 和骨髓间充质干细胞可以摄取 DPSCs 外泌体 ,外泌体可以促进二者向成牙本质向分化。2018 年 ,Xian 等<sup>[6]</sup>的研究发现人脐带静脉内皮细胞同样可以摄取 DPSCs 外泌体 ,且外泌体可促进人脐带静脉内皮细胞的增殖、促血管生成因子的表达以及增强其小管的形成 ,提示牙髓干细胞外泌体在促进牙髓再生方面具有潜能。2014 年 ,Liu 等<sup>[7]</sup>发现基质细胞衍生因子可以促进根尖牙乳头干细胞 ( stem cells from apical papilla , SCAP) 的迁移 ,为诱导根尖组织的干细胞进入根管内提供了新的方案 ,但如何诱导 SCAP 向成牙本质定向分化仍是实现牙髓牙本质复合体再生的关键问题 ,SCAP 能否摄取 DPSCs 外泌体并利用其信号实现定向分化尚不明确。

本研究目的是探讨 SCAP 对 DPSCs 外泌体的摄取作用及摄取的介导途径 ,为揭示其内吞外泌体的机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 DPSCs 外泌体的提取与鉴定

**1.1.1 分离培养 DPSCs、SCAP** 收集北京大学口腔医院颌面外科门诊因阻生或正畸需要而拔除的前磨牙或第三磨牙。本研究获得北京大学口腔医院医学伦理委员会批准 ( PKUSSIRB-201412020) 。离体牙纳入标准: 患者 18 ~ 25 岁 ,牙齿完整、无龋损、无牙髓或根尖周炎症、无牙周疾病 ,供者身体健康 ,自愿签署知情同意书。本研究选用根尖牙乳头干细胞供者为 18 岁男性左下第三磨牙、21 岁女性右下第三磨牙、22 岁男性右下第三磨牙; 牙髓干细胞供者为 24 岁女性左下第二前磨牙、18 岁男性右下第一前磨牙、20 岁女性右上第二前磨牙。于超净台中切取离体牙根尖的牙乳头组织 ,使用咬骨钳钳碎患牙并取出牙髓组织。将上述组织分别切碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm ,用 3 g/L 的 I 型胶原酶 ( Worthington 公司 ,美国) 和 4 g/L 分离酶 ( Sigma 公司 ,美国) 37 °C 消化 30 ~ 40 min。将消化后的细胞悬液过 70 μm 细胞筛 ,以获得单细胞悬液。将单细胞悬液加入 6 孔板 ( Corning 公司 ,美国) 中 ,加入含有 15% ( 体积分数) 胎牛血清 ( fetal bovine serum ,FBS) 、1% ( 体积分数) L-谷氨酰胺及 1% ( 体积分数) 青-链霉素 ( Gibco 公司 ,美国) 、88% αMEM ( α minimum Eagle's medium ,Hyclone 公司 ,美国) 的普通培养基 ,置于 5% ( 体积分数) CO<sub>2</sub> 37 °C 培养。待细胞长满至 75% 时 ,将原代细胞按照 1 : 3 传代 ,至第 3 ~ 4 代细胞备用。

**1.1.2 提取 DPSCs 外泌体** 将胎牛血清在 4 °C 条件下 100 000 ×g 超速离心 12 h 以去除胎牛血清中的外泌体。取第 3 代 DPSCs 细胞以 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞 / 孔接种于 175 cm<sup>2</sup> 培养瓶中 ,采用含有 10% ( 体积分数) 胎牛血清的普通培养基培养至 5 d 后 ,弃去上清 ,更换为不含外泌体的细胞培养基继续培养 2 d ,收集上清液。将收集好的上清液转移至 50 mL 离心管。以下离心步骤均在 4 °C 条件下完成: 以 300 ×g 转速离心 10 min ( 除去上清液中的细胞) ; 将上清液转移至 50 mL 洁净离心管 ,以 2 000 ×g 的转速离心 10 min ( 除去上清液中的死细胞) ; 将上清液转移至

50 mL 洁净离心管,以  $10\,000 \times g$  的转速离心 30 min(去除上清液中的细胞碎片)后收集上清液。采用相对分子质量 10 000 的孔径超滤管(Millipore, sigma 公司,美国)对离心后的上清液进行超滤浓缩,将浓缩后的上清液加入超速离心机(Optima XPN-10, Beckman 公司,美国)配套的离心管,  $100\,000 \times g$  超速离心 70 min。离心结束后,弃去上清液,加入 0.5 mL PBS 重悬沉淀,获得提取物悬液,置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.1.3 DPSCs 外泌体的鉴定** 透射电镜观察提取物形态:将 10  $\mu\text{L}$  提取物悬液,用 50  $\mu\text{L}$  2% (体积分数)多聚甲醛室温固定 30 min,取上述混合液 8  $\mu\text{L}$ ,滴加至碱涂层铜网格上,风干 10 min,再用 1% (体积分数)醋酸双氧钨染色两次,每次 6 min。将铜网装入透射电镜(JEM-1400, JEOL 公司,日本),电压设置为 120 kV,观察提取物形态。粒径分布:取 1 mL 提取物悬液,采用纳米粒子跟踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)用于确定粒径分布。使用纳米粒子跟踪分析仪(NS3000, Malvern 公司,英国)记录布朗运动下外泌体的运动轨迹,并通过 NTA 分析软件进行分析。Western blot 检测外泌体标志蛋白:取 50  $\mu\text{L}$  提取物悬液,加入 20  $\mu\text{L}$  的 1% (质量分数) Triton 裂解液,冰上裂解 30 min,超声破碎 1 min。  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  12 000 r/min 离心 30 min 提取蛋白,BCA 蛋白试剂盒(Thermo Fisher 公司,美国)检测蛋白浓度,记录结果。  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min,配胶(12% SDS-PAGE, 碧云天公司,中国),15  $\mu\text{L}$  蛋白上样,蛋白分离 2 h (电泳电压为 125 V),切胶;1.5 h 后蛋白转移到 PVDF 膜(Millipore Corporation 公司,美国)上(转膜电压为 100 V);脱脂牛奶封闭 1 h;加入一抗 CD63(1:500, ab68418, Abcam 公司,美国)/TSG101(1:500, 14497-1-AP, Proteintech 公司,美国)/GAPDH(1:500, 10494-1-AP, Proteintech 公司,美国)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;用抗兔 IgG 抗体(1:1 000, 10285-1-AP, Proteintech 公司,美国)孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;应用学发光检测试剂盒(Proteintech 公司,美国),凝胶成像系统(Vilber Lourmat 公司,美国)曝光。

## 1.2 SCAP 对 DPSCs 外泌体的摄取

**1.2.1 PKH-26 标记 DPSCs 外泌体** 采取 PKH-26 (一种亲脂性染料,可以稳定地与细胞膜脂质区结合并发出荧光)膜标记技术标记 DPSCs 外泌体。将 1 mL 10 mg/L (根据第 1.1.3 小节测定的蛋白浓度稀释)的外泌体重悬液加入 1 mL 稀释液 C (Sigma 公司,美国)中,同时将 4  $\mu\text{L}$  的 PKH-26 (Sigma 公

司,美国)加入 1 mL 的稀释液 C 中,将两份溶液混合,共孵育 4 min,而后加入 2 mL 0.5% (质量分数) BSA 中和未结合的染液,采用 0.5% BSA 溶液中和未标记外泌体的 PKH-26 染料作为阴性对照组。将标记好的外泌体加入 PBS 中,  $100\,000 \times g$  转速下离心 70 min ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),弃去上清液,将沉淀用 PBS 重悬。

**1.2.2 SCAP 对 DPSCs 外泌体的摄取作用** 取第 3 代细胞以  $5 \times 10^3$  个细胞/孔接种于圆形盖玻片,待细胞培养至 80% 汇合时,将第 1.2.1 小节中获得的重悬液加入 SCAP 的培养基中,分别在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  与 SCAP 共培养 6 h。6 h 后收集样本, PBS 冲洗两遍,加入 4% (体积分数)多聚甲醛固定液(Solabrio 公司,中国)固定 10 min, PBS 冲洗 3 遍。加入含有 4',6-二氨基-2-苯基吲哚(4',6-diamino-2-phenylindole, DAPI, Sigma 公司,美国)的封片液封片,激光共聚焦显微镜下观察 SCAP 内 PKH-26 的表达情况。

## 1.3 摄取过程依赖的胞吞途径

**1.3.1 分组** 采用不同胞吞抑制剂分别抑制网格蛋白依赖、小窝蛋白介导和巨胞饮依赖途径。(1) 氯丙嗪(chlorpromazine, CPZ)组:采用 10  $\mu\text{mol/L}$  网格蛋白依赖胞吞途径抑制剂 CPZ 处理 SCAP。(2) Genistein 组:采用 200  $\mu\text{mol/L}$  小窝蛋白介导胞吞途径抑制剂 genistein 处理 SCAP。(3) LY294002 组:采用 50  $\mu\text{mol/L}$  巨胞饮依赖胞吞途径抑制剂 LY294002 处理 SCAP。(4) 溶剂对照组:采用与抑制剂组等量的溶剂 DMSO 处理 SCAP 作为对照。

**1.3.2 免疫荧光染色** 取第 3 代细胞以  $5 \times 10^3$  个细胞/孔接种于圆形盖玻片上,待细胞培养至 80% 汇合时,按照上述分组,各组采用相应培养液预处理 SCAP 30 min(后续实验一直存在于培养液中),将 PKH-26 标记好的 DPSCs 外泌体(10 mg/L)加入各组 SCAP 的培养基中。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  共培养 6 h 后收集样本,采用 PBS 冲洗 3 遍,加入 4% (体积分数)多聚甲醛固定液固定 10 min, PBS 冲洗 3 遍。加入含有 DAPI 的封片液封片,激光共聚焦显微镜下观察 SCAP 内红色荧光表达。

**1.3.3 流式细胞分析术** 取第 3 代细胞以  $5 \times 10^4$  个细胞/孔接种于 6 孔板,待细胞培养至 80% 汇合时,按照上述分组,各组采用相应培养液预处理 SCAP 30 min(后续实验一直存在于培养液中),将 PKH-26 标记好的 DPSCs 外泌体(10 mg/L)加入各组 SCAP 的培养基中。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  共培养 6 h 后收集样本,将 SCAP 消化下来后 PBS 冲洗 3 遍,离心弃上

清液 ,采用 0.5% ( 质量分数) BSA 溶液重悬细胞 ,  
300  $\mu\text{m}$  细胞筛过滤细胞形成单细胞悬液 ,应用流  
式细胞仪 ( Aria Sorp ,Becton , Dickinson 公司 ,美  
国) 检测红色荧光标记的根尖牙乳头干细胞百分  
比。

## 2 结果

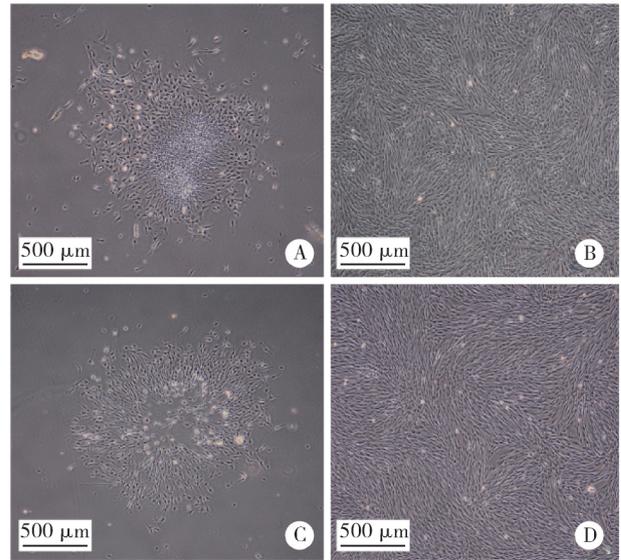
### 2.1 人 DPSCs、SCAP 的形态特征

经酶消化法体外分离培养的人 DPSCs、根尖牙  
乳头细胞生长良好 ,呈梭形、多角形等典型的成纤维  
细胞样形态 细胞大小基本一致( 图 1) 。原代培养  
约 5 d 后 DPSCs( 图 1A) 、SCAP( 图 1C) 可见克隆集  
落形成 ,待各集落细胞逐渐汇合后可见 DPSCs( 图  
1B) 、SCAP( 图 1D) 排列整齐 ,呈漩涡状生长。

### 2.2 DPSCs 来源外泌体的特征

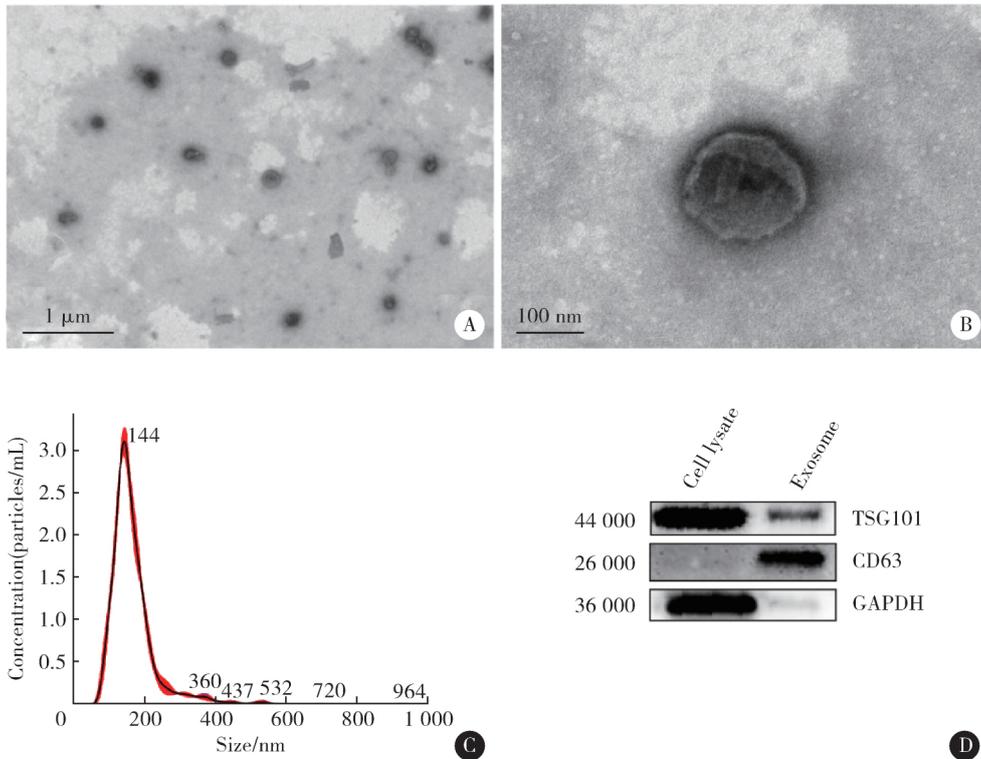
采用多步离心法结合超滤法提取细胞上清液中  
的外泌体 ,透射电镜下可以观察到 DPSCs 外泌体呈  
茶托样 ,具有双层膜结构图( 图 2A、B) 。纳米粒子  
示踪分析技术检测 DPSCs 外泌体粒径峰值为 144  
nm( 图 2C) 。Western Blot 检测 DPSCs 外泌体表达

外泌体特征标志膜结合蛋白 TSG101 和四跨膜蛋白超  
家族 CD63 不表达细胞内参蛋白 GAPDH( 图 2D) 。



A , primary DPSCs cultured for 5 days; B , primary DPSCs cultured for 14 days; C , Primary SCAP cultured for 5 days; D , Primary SCAP cultured for 14 days.

图 1 人原代 DPSCs 和 SCAP 的形态  
Figure 1 Cell morphology of human DPSCs and SCAP



A and B ,morphologic analysis of DPSCs derived exosomes by transmission electron microscopy; C , nanoparticle tracking analysis measurement of particle size of DPSCs derived exosomes; D , detection of exosomal marker expression in DPSCs derived exosomes by Western blot.

图 2 DPSCs 外泌体的分离与鉴定结果

Figure 2 Isolation and identification results of DPSCs derived exosomes

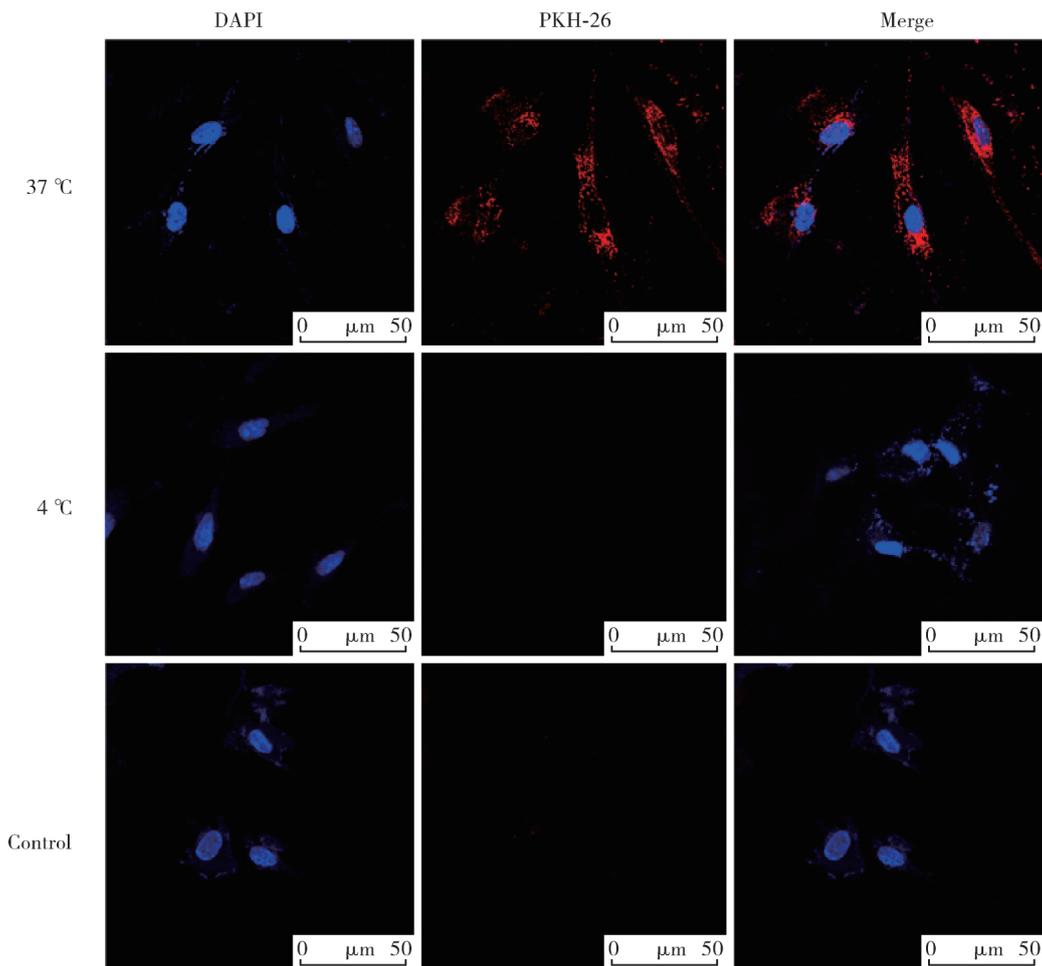
### 2.3 SCAP 对 DPSCs 外泌体的摄取

将 PKH-26 标记后的 DPSCs 外泌体与 SCAP

共培养后采用激光共聚焦显微镜观察 SCAP 对  
DPSCs 外泌体的摄取作用 ,可见蓝色标记的是细

胞核。阳性组在 37 °C 条件下共培养 6 h 后可见大量红色荧光 (PKH-26) 围绕在细胞核周围 (图 3), 而 4 °C 条件下共培养 6 h 后 SCAP 则未见明

显红色荧光 (PKH-26) 标记 (图 3), 同时未添加外泌体的阴性对照组未见红色荧光 (PKH-26) 标记 (图 3)。



DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole.

图 3 SCAP 对 DPSCs 外泌体的摄取作用  
Figure 3 Uptake of DPSCs derived exosomes by SCAP

#### 2.4 SCAP 摄取 DPSCs 外泌体的介导途径

为考察 SCAP 摄取外泌体的介导途径, 本研究设计了三种胞吞抑制剂 CPZ、Genistein 和 LY294002, 抑制 SCAP 的胞吞过程后进一步观察不同的胞吞途径对 SCAP 摄取外泌体的影响, 代表性染色结果见图 4。溶剂对照组 SCAP 细胞核周围存在大量红色荧光 (PKH-26) 标记 (图 4), 与阳性组 (图 3) 基本一致, 而采用胞吞抑制剂对 SCAP 进行处理后, 将 PKH-26 标记的 DPSCs 外泌体与 SCAP 共培养 6 h 后, CPZ 组、Genistein 组细胞核周围红色荧光 (PKH-26) 标记量明显下降, LY294002 组细胞核周围红色荧光 (PKH-26) 标记量有少量下降 (图 4)。流式细胞分析结果 (图 5) 显示阳性对照组中摄取外泌体的 SCAP 占 35%, 阴性对照组中有红色荧光标记的 SCAP 占比 0.5%。溶剂对照组中有红色

荧光标记的 SCAP 占比 29.7%, 而 CPZ、Genistein、LY294002 处理 SCAP 后, 红色荧光标记的 SCAP 占比分别下降至 13.7%、16.6%、20.9%, 与上述免疫荧光染色的结果趋势是一致的。

### 3 讨论

采用酶消化法分别从根尖牙乳头组织、牙髓组织中提取培养 SCAP、DPSCs, 经刘敬一等<sup>[8]</sup>采用流式细胞鉴定显示, 分离培养的 DPSCs、SCAP 均表达间充质干细胞特征标志 STRO-1、CD146、CD105、CD90, 不表达血管内皮细胞标志 CD45, 符合间充质干细胞特征。

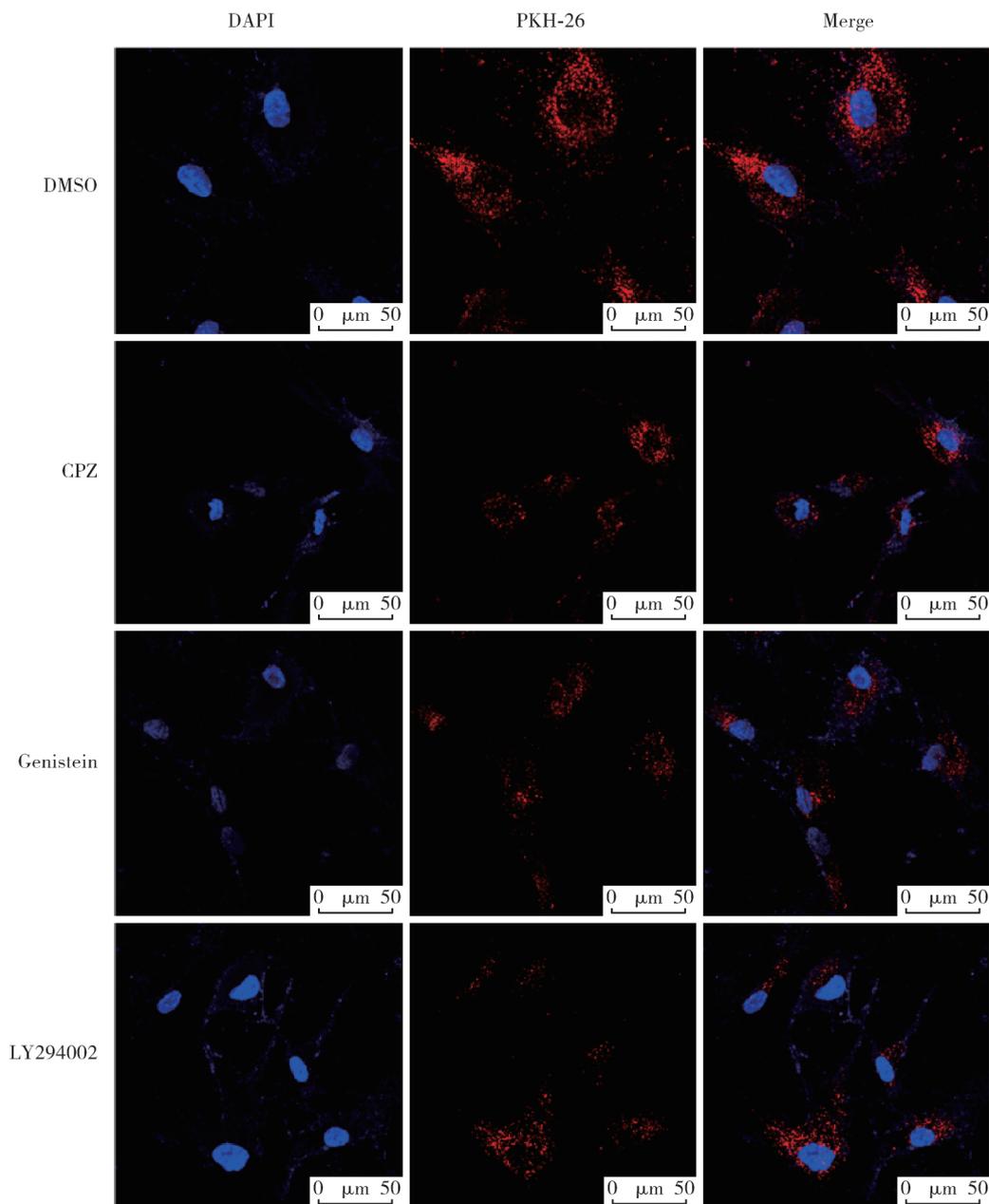
#### 3.1 DPSCs 外泌体的特征

本研究经超速离心法结合超滤法于 DPSCs 上清液获得的提取物, 符合国际细胞外囊泡学会 2014

年指导性声明中的外泌体特征<sup>[9]</sup>。

对于外泌体粒径分布 本研究通过纳米粒子跟踪分析法显示 DPSCs 上清液提取物直径峰值为 144 nm。2015 年 Pivoraite 等<sup>[10]</sup>采用动态激光散射技术对脱落乳牙 DPSCs 外泌体的直径观察发现 其直径在 30 ~ 70 nm 范围内。Xian 等<sup>[6]</sup>采用纳米粒子跟踪分析法对 DPSCs 外泌体的粒径分布检测结果为 87 ~ 143 nm 与本研究结果相近。外泌体尺寸间的差异可能与其来源的细胞以及观察方法不同有关。Sokolova

等<sup>[11]</sup>通过对人胚肾细胞 293T、内皮克隆形成细胞、间充质干细胞三种不同类型的细胞的外泌体分别采用纳米粒子分析技术和动态激光散射技术分析粒径分布 结果发现采用相同技术分析不同细胞的外泌体直径之间存在差异;对同一种细胞来源的外泌体采用不同方法分析其粒径分布 结果也不同 本研究采用的是纳米粒子跟踪分析技术 它是分析颗粒在溶液中动态运动过程的流体动力学直径 粒径较大的颗粒会对检测结果产生较大的影响 会造成粒径结果略偏大。



DMSO , dimethyl sulfoxide; CPZ , chlorpromazine; DAPI , 4' -β-diamidino-2-phenylindole.

图 4 胞吞抑制剂处理后 SCAP 对 DPSCs 外泌体的摄取作用

Figure 4 Uptake of DPSCs derived exosomes by SCAP with the treatment of different endocytosis inhibitors

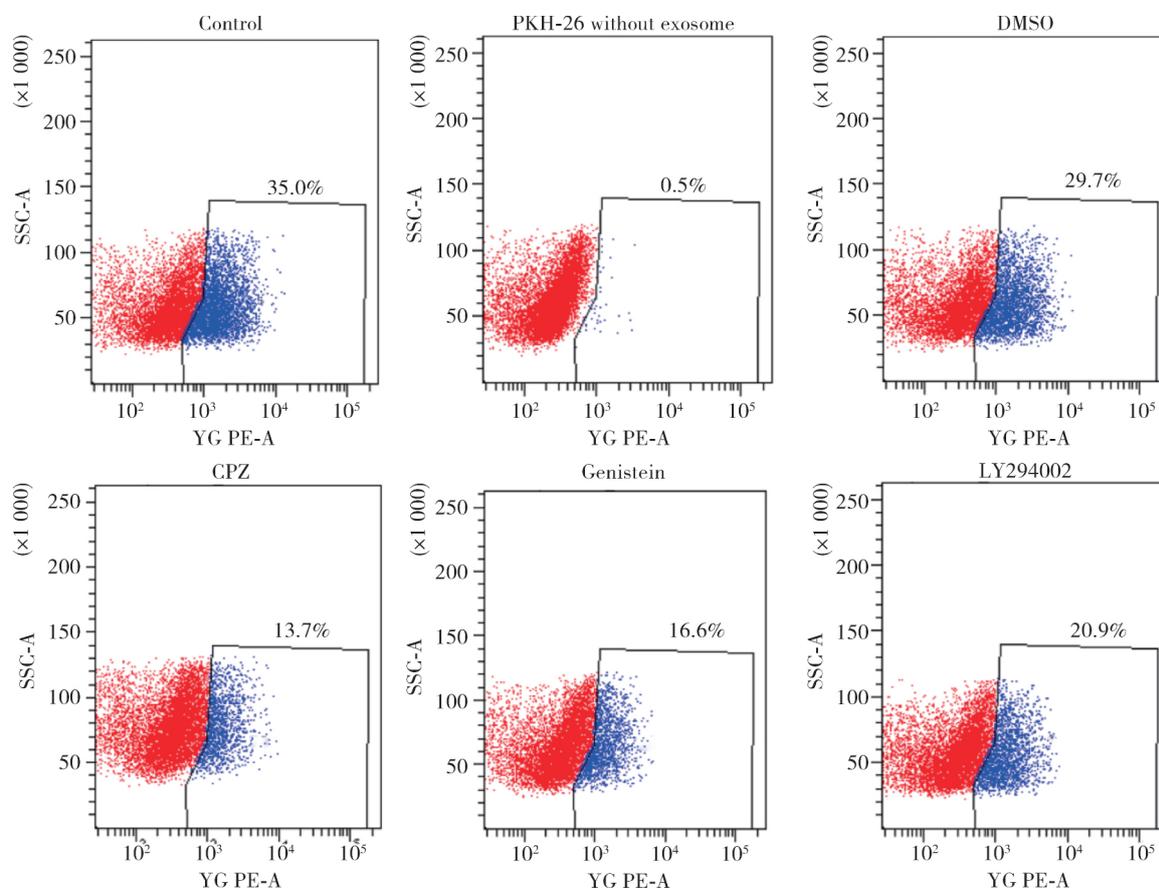
### 3.2 SCAP 对外泌体的摄取作用

本研究观察到将 DPSCs 外泌体与 SCAP 在

37 °C 共培养 6 h 后 SCAP 能够摄取 DPSCs 外泌体 , 而在 4 °C 培养条件下 SCAP 则没有摄取外泌体。虽

然 4 °C 培养条件下 DPSCs 处于较低代谢状态,但低温抑制该摄取提示 SCAP 对 DPSCs 的摄取是一个主动的过程,而非外泌体随机扩散进入 SCAP。2012 年, Tian 等<sup>[12]</sup>采用实时荧光显微镜对 PC12 细胞对十八烷基罗丹明 B 氯化物( R18 ,一种亲脂性阳离子染料,可以作为膜探针标记胞吞过程) 标记的外泌体的摄取作用进行了观察,发现 PC12 细胞对外泌体的摄取作用依赖胞吞途径,而胞吞过程具有温度

依赖性,采用低温孵育细胞的方法能够抑制温度依赖的胞吞途径<sup>[13]</sup>。2016 年, Kusuma 等<sup>[14]</sup>发现在 4 °C 条件下,人血管内皮细胞对于外泌体的摄取作用下降 80%。Huang 等<sup>[5]</sup>采用 37 °C 和 4 °C 两种条件下将 DPSCs 和骨髓间充质干细胞与 DPSCs 外泌体进行共培养,结果发现 4 °C 条件下,两者对 DPSCs 外泌体的摄取能力明显下降,与本研究的结果一致。



DMSO, dimethyl sulfoxide; CPZ, chlorpromazine.

图 5 胞吞抑制剂对 SCAP 摄取外泌体作用影响的流式细胞分析结果

Figure 5 Role of different endocytosis inhibitors in the uptake of DPSCs derived exosomes by SCAP in flow cytometry

### 3.3 SCAP 摄取外泌体的介导途径

本研究发现采用胞吞抑制剂 CPZ、Genistein、LY294002 处理 SCAP 后,SCAP 对 DPSCs 外泌体的摄取能力有明显下降。细胞胞吞途径主要有以下 4 种,网格蛋白介导的胞吞途径、小窝蛋白介导的胞吞途径、巨胞饮作用和吞噬作用,其中吞噬作用主要是一些具有特殊功能的细胞如巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞才会表达的生物学行为,因此本研究主要采用 CPZ、Genistein、LY294002 三种胞吞抑制剂抑制上述除吞噬作用外的三条胞吞途径,研究 SCAP 摄取 DPSCs 外泌体的介导途径。本研究选取的 CPZ ( 10  $\mu\text{mol/L}$  )、Genistein ( 200  $\mu\text{mol/L}$  )、

LY294002( 50  $\mu\text{mol/L}$  ) 经过 Tian 等<sup>[12]</sup>采用钙黄绿素细胞活性分析法检测发现三者对细胞活性无明显影响。2014 年, Tian 等<sup>[15]</sup>对 PC12 细胞摄取外泌体的机制的研究发现网格蛋白介导的胞吞途径和巨胞饮作用在 PC12 细胞摄取外泌体的过程中有重要作用,但该过程不依赖小窝蛋白依赖的胞吞途径。2016 年 Huang 等<sup>[5]</sup>经体外研究发现,DPSCs 对 DPSCs 外泌体的摄取依赖小窝蛋白介导的胞吞途径,而不依赖网格蛋白介导的胞吞途径。上述研究与本研究的结果不完全一致,这可能与不同的细胞对外泌体的摄取机制不同有关。2018 年,Horibe 等<sup>[16]</sup>对人非小细胞肺癌细胞系( A549 )、人结肠癌

细胞(HCT116、COLO205)等细胞对同为A549细胞来源的外泌体的吞噬过程的研究发现,抑制胞吞途径可以抑制细胞对外泌体的摄取作用,且COLO205细胞吞噬外泌体同时依赖网格蛋白介导的胞吞途径和小窝蛋白依赖的胞吞途径,HCT116细胞则仅依赖网格蛋白介导的胞吞途径,而A549不依赖上述两条途径,提示即使外泌体来源相同,不同细胞摄取外泌体时依赖的胞吞途径也可能存在差异。

综上所述,本研究发现SCAP能够摄取DPSCs外泌体,低温环境可影响该摄取过程,SCAP摄取外泌体主要依赖网格蛋白介导的胞吞途径、小窝蛋白依赖的胞吞途径和巨胞饮途径,为进一步研究DPSCs外泌体对SCAP的作用提供了实验依据。

#### 参考文献

- [ 1 ] Vlassov AV , Magdaleno S , Setterquist R , et al. Exosomes: Current knowledge of their composition , biological functions , and diagnostic and therapeutic potentials [J]. *Biochim Biophys Acta* , 2012 , 1820( 7 ) : 940 - 948.
- [ 2 ] Johnstone RM , Mathew A , Mason AB , et al. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: Evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins [J]. *J Cell Physiol* , 1991 , 147( 1 ) : 27 - 36.
- [ 3 ] Raposo G , Nijman HW , Stoorvogel W , et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles [J]. *J Exp Med* , 1996 , 183( 3 ) : 1161 - 1172.
- [ 4 ] Valadi H , Ekstrom K , Bossios A , et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells [J]. *Nat Cell Biol* , 2007 , 9( 6 ) : 654 - 672.
- [ 5 ] Huang CC , Narayanan R , Alapati S , et al. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration [J]. *Biomaterials* , 2016 , 111: 103 - 115.
- [ 6 ] Xian XH , Gong QM , Li C , et al. Exosomes with highly angiogenic potential for possible use in pulp regeneration [J]. *J Endod* , 2018 , 44( 5 ) : 751 - 758.
- [ 7 ] Liu JY , Chen X , Yue L , et al. CXCL12 chemokine receptor 4 is expressed paravascularly in apical papilla and coordinates with stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  during transmigration of stem cells from apical papilla [J]. *J Endod* , 2015 , 41( 9 ) : 1430 - 1436.
- [ 8 ] 刘敬一 , 邹晓英 , 陈雪 , 等. 脂多糖对人根尖牙乳头干细胞中基质细胞衍生因子1表达的影响 [J]. *中华口腔医学杂志* , 2015 , 50( 6 ) : 346 - 351.
- [ 9 ] Lotvall 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 ] Pivoraite U , Jarmalaviciute A , Tunaitis V , et al. Exosomes from human dental pulp stem cells suppress carrageenan-induced acute inflammation in mice [J]. *Inflammation* , 2015 , 38( 5 ) : 1933 - 1941.
- [ 11 ] Sokolova V , Ludwig AK , Hornung S , et al. Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces* , 2011 , 87( 1 ) : 146 - 150.
- [ 12 ] Tian T , Zhu YL , Hu FH , et al. Dynamics of exosome internalization and trafficking [J]. *J Cell Physiol* , 2013 , 228( 7 ) : 1487 - 1495.
- [ 13 ] He ZL , Liu KZ , Manaloto E , et al. Cold atmospheric plasma induces ATP-dependent endocytosis of nanoparticles and synergistic U373MG cancer cell death [J]. *Sci Rep* , 2018 , 8( 1 ) : 5298.
- [ 14 ] Kusuma RJ , Manca S , Friemel T , et al. Human vascular endothelial cells transport foreign exosomes from cow's milk by endocytosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* , 2016 , 310( 10 ) : C800 - C807.
- [ 15 ] Tian T , Zhu YL , Zhou YY , et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery [J]. *J Biol Chem* , 2014 , 289( 32 ) : 22258 - 22267.
- [ 16 ] Horibe S , Tanahashi T , Kawachi S , et al. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake [J]. *Bmc Cancer* , 2018 , 18( 1 ) : 47.

( 2019-10-10 收稿 )  
( 本文编辑: 刘淑萍 )