

小鼠牙髓干细胞外泌体通过 MSTRG.19716.1 促进少突胶质细胞前体细胞分化的机制研究

赵成伟 杜易敏[△]

(复旦大学附属金山医院口腔科 上海 201508)

【摘要】 目的 探讨小鼠牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)来源外泌体(DPSC-derived exosome, DPSC-exo)通过 MSTRG.19716.1 促进少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cell, OPC)向成熟少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)分化的作用和机制。**方法** 通过 RT-qPCR 检测 DPSC-exo 和 OPC 中 MSTRG.19716.1 拷贝数。小鼠 OPC 经外泌体抑制剂 Dynasore (20 μ mol/L) 预处理或预转染 siRNA-MSTRG.19716.1, 分别给予 10、100 μ g/mL 的 DPSC-exo 处理 48 h。采用免疫荧光法检测 OL 标志物 O4 和髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)表达, 采用 RT-qPCR 检测 MSTRG.19716.1、miR-294-3p 及少突胶质细胞系转录因子 2(oligodendrocyte transcription factor 2, OLIG2) mRNA 相对含量, 采用荧光素酶实验验证 miR-294-3p 与 *Olig2* mRNA 的结合及 MSTRG.19716.1 对其调控作用, 采用外泌体示踪法检测 DPSC-exo 的摄取, 采用 ELISA 检测 OLIG2 蛋白表达。**结果** DPSC-exo 中 MSTRG.19716.1 的拷贝数显著高于 OPC。DPSC-exo 处理可显著上调 OPC 中 MBP 表达水平, 并增加 O₄ 阳性细胞比例, 该作用可被 Dynasore 显著抑制。miR-294-3p 可与 *Olig2* mRNA 结合, 而 MSTRG.19716.1 能抑制二者的结合。DPSC-exo 摄取可显著上调 OPC 中 MSTRG.19716.1 表达水平, 并促进 OLIG2 蛋白表达; 转染 siRNA-MSTRG.19716.1 后, 上述作用明显减弱。**结论** DPSC-exo 可通过递送 MSTRG.19716.1 上调 OPC 中 OLIG2 蛋白表达, 从而促进 OPC 向 OL 分化。

【关键词】 牙髓干细胞(DPSC); 外泌体; 少突胶质前体细胞(OPC); 少突胶质细胞(OL); MSTRG.19716.1; miR-294-3p; 少突胶质细胞系转录因子 2(OLIG2); 小鼠

【中图分类号】 R34, R780.2 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2026.05.004

Mechanisms research on differentiation of oligodendrocyte precursor cells promoted by mouse dental pulp stem cell-derived exosomes via MSTRG.19716.1

ZHAO Cheng-wei, DU Yi-min[△]

(Department of Stomatology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role and underlying mechanism by which mouse dental pulp stem cells-derived exosome (DPSCs-exo) promote the differentiation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) into mature oligodendrocytes (OLs) via MSTRG.19716.1. **Methods** The copy number of MSTRG.19716.1 in DPSCs-exo and OPCs was determined by RT-qPCR. Mouse OPCs were pretreated with exosome inhibitor Dynasore (20 μ mol/L) or pretransfected with siRNA-MSTRG.19716.1, followed by treatment with 10 and 100 μ g/mL DPSCs-exo for 48 h. The expression of O4 (a biomarker of OL) and myelin basic protein (MBP) was detected by immunofluorescence assay. The relative expression levels of

[△]Corresponding author E-mail: 1228326100@qq.com

网络首发时间: 2026-06-29 14:41:42 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20260627.2353.006>

MSTRG.19716.1, miR-294-3p and oligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2) mRNA were measured by RT-qPCR. A luciferase reporter assay was performed to verify the binding of miR-294-3p to *Olig2* mRNA and the regulatory effect of MSTRG.19716.1 on this interaction. Uptake of DPSC-exo was assessed by exosome tracing assay, and OLIG2 protein expression was determined by ELISA. **Results** MSTRG.19716.1 was significantly enriched in DPSCs-exo compared with that in OPCs. Treatment with DPSCs-exo significantly increased MBP expression and the proportion of O4-positive cells in OPCs, and this effect was markedly inhibited by Dynasore. Further studies showed that miR-294-3p could bind to *Olig2* mRNA, whereas MSTRG.19716.1 suppressed this interaction. Uptake of DPSCs-exo significantly upregulated MSTRG.19716.1 levels and promoted OLIG2 protein expression in OPCs. These effects were markedly attenuated after transfection with siRNA-MSTRG.19716.1. **Conclusion** DPSCs-exo promote the differentiation of OPCs into OLs by delivering MSTRG.19716.1, which upregulates OLIG2 protein expression in OPCs.

【Key words】 dental pulp stem cell (DPSC); exosome; oligodendrocyte precursor cell (OPC); oligodendrocyte (OL); MSTRG.19716.1; miR-294-3p; oligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2); mouse

全球超过10亿人受到神经发育障碍(neurodevelopmental disorders, NDD)的影响^[1-2]。NDD是导致发育期儿童行为和认知功能异常的重要原因,通常以儿童早期起病为特征,其核心病因之一是脑功能发育异常^[3-5]。髓鞘是包裹神经元轴突的保护性脂质结构,对加快神经冲动传导和维持神经系统功能稳定至关重要。在神经发育障碍或神经损伤状态下,髓鞘受损或缺失可导致神经元功能障碍甚至死亡。因此,促进髓鞘再生被认为是NDD及相关神经损伤治疗的重要策略^[6]。然而,作为哺乳动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)中有限的内源性修复过程,髓鞘再生效率较低。既往研究表明,少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cell, OPC)向成熟少突胶质细胞(oligodendrocyte, OL)的分化是髓鞘再生的关键环节^[7]。OPC是CNS中的重要细胞群,若其分化功能受损,将导致髓鞘形成不足,进而影响神经信号传导以及神经再生与修复^[8]。因此,阐明OPC分化的调控机制,并积极探索促进OPC向OL分化的新方法和新策略,对于NDD及CNS损伤治疗策略的开发具有重要意义,也有望成为多模式治疗体系的重要组成部分。

外泌体具有天然递送载体的优势,在神经损伤修复和再生医学领域展现出良好的应用前景。牙髓干细胞(dental pulp stem cell, DPSC)可通过分泌

外泌体(DPSC-exo)将蛋白质、脂质及非编码RNA等活性物质递送至受体细胞,从而调控细胞命运转变及组织修复过程^[9-11]。然而,DPSC-exo是否能够调控OPC分化进而促进髓鞘再生,目前尚缺乏明确证据。长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)-MSTRG.19716.1是我们前期通过高通量测序在DPSC-exo中筛选得到的一种高丰度表达分子。生物信息学分析预测其可作为内源竞争性RNA(competing endogenous RNA, ceRNA),通过分子海绵机制吸附miR-294-3p,从而抑制miR-294-3p与其靶基因少突胶质细胞系转录因子2(oligodendrocyte transcription factor 2, OLIG2) mRNA的结合。已知OLIG2是OPC向成熟OL分化过程中关键的转录调控因子之一^[12],上述调控轴提示:DPSC-exo可能通过递送MSTRG.19716.1,解除miR-294-3p对OLIG2的抑制作用,从而促进OPC向OL的分化及髓鞘形成。

本研究拟探讨DPSC-exo通过递送MSTRG.19716.1参与OPC分化调控的功能及其分子机制。作为一种新兴的无细胞治疗策略,DPSC-exo具有低免疫原性、高生物相容性及潜在跨越血脑屏障的能力,在中枢神经系统修复中展现出显著应用前景。因此,解析其携带的关键lncRNA在调控少突胶质细胞分化及髓鞘再生中的作用,对于突破传统治疗手段局限具有重要意义。本研究旨在

揭示 DPSC-exo 介导髓鞘再生的分子机制,拓展 lncRNA-ceRNA 调控网络在神经再生中的理论,并为 NDD 及 CNS 损伤的外泌体精准干预提供新的靶点。

材料和方法

试剂和仪器 小鼠来源的 DPSC-exo 和 OPC 均由课题组前期制备。293 人胚肾细胞(TCHu43)购于中科院上海细胞典藏中心;DMEM/F-12 培养基(11320033)、胎牛血清(A2720803)、0.25% 胰蛋白酶(25200-056)、无菌磷酸盐缓冲液(dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)(10010-023)和 Lipofectmaine® 2000 转染试剂(11668019)均购于美国 Invitrogen 公司;培养板(3516, 3524)购于美国 Corning 公司;细胞总 RNA 抽提试剂盒(9767)、RNA 反转录试剂盒(RR037A)和荧光定量检测试剂盒(RR820A)均购于宝生物工程(大连)有限公司;OL 标志物 O4(MAB1326)一抗购于美国 Bio-Techne 公司;外泌体抑制剂 Dynasore(Ab120192)、蛋白一抗(Ab53521、Ab203491 和 Ab7349)和二抗(Ab150113、Ab150077 和 Ab150159)均购于英国 Abcam 公司;M-PER 细胞总蛋白提取试剂盒(78501)和 BCA 定量试剂盒(78501 和 23225)均购于美国 Pierce 公司。siRNA 和 DNA 合成由上海吉玛生物科技有限公司完成。小鼠 *Olig2* ELISA 试剂盒(MBS2890554)购于美国 MyBioSource 公司,双荧光素酶检测试剂盒(E1910)和 GloMax20/20 Luminometer 型荧光素酶活性检测仪均购于美国 Promega 公司。370 系列 Steri-Cycle 高温灭菌 CO₂ 培养箱购于美国 Thermo 公司,Optima XPN 型超速离心机购于美国 Beckman Coulter 公司,NeoScope JCM-7000 型台式扫描电镜购于日本电子株式会社。

DPSC-exo 表征观察 采用扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)观察 DPSC-exo 的超微结构和形态特征。参照文献方法^[13],基于捕获微珠-外泌体-检测抗体三明治法,结合流式细胞术检测 DPSC-exo 表面标志物 CD81 和 CD9 的表达情况。

OPC 的培养和鉴定 小鼠 OPC 由本课题组前期分离制备,来源于出生 7 天的 C57BL/6 小鼠脑组织。细胞在无血清条件下培养于 DMEM/F12 培养

基中,并补充 2% B27、1% N₂、PDGF-AA(20 μg/L)及 bFGF(10 μg/L),以维持其增殖及未分化状态。培养条件为 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱,每 3 天更换一次培养基。为鉴定 OPC 纯度,将细胞接种于多聚-L-赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)包被的培养板上,培养 24 h 后,采用免疫荧光染色检测其特异性标志物 A2B5 和 PDGFR α 的表达。

实验分组和处理 对照组:OPC 不做处理;DPSC-exo (LD)+OPC 组:DPSC-exo 终浓度为 10 mg/L;DPSC-exo (HD)+OPC 组:DPSC-exo 终浓度为 100 μg/mL;DPSC-exo (HD)+OPC+Dynasore 组:DPSC-exo 终浓度为 100 mg/L, Dynasore 终浓度为 80 μmol/L;DPSC-exo (HD)+OPC+siRNA-MSTRG.19716.1 组:转染 siRNA-MSTRG.19716.1 (5'-GUACUUACACUGUAAUCUA-3')至 OPC 后 24 h,添加终浓度为 100 mg/L 的 DPSC-exo;DPSC-exo (HD)+OPC+siRNA-NC 组:转染 siRNA 错义序列(NC, 5'-UAUCGAUAUCUGCAAAUCU-3')至 OPC 后 24 h,添加终浓度为 100 mg/L 的 DPSC-exo。OPC 按照 1×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔培养板,正常条件过夜培养,待其完全贴壁后添加 DPSC-exo 和 Dynasore,继续培养 48 h。siRNA 转染按照转染试剂说明书进行。

免疫荧光染色 将 OPC 接种于无菌玻片并处理后,用 PBS 洗涤 3 次。活细胞染 O4:加入稀释于培养基中的 O4 一抗,室温孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次后加入相应荧光二抗,室温避光孵育 30 min。细胞用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤后用 0.1% Triton X-100 透化 10 min, PBS 洗涤 3 次。封闭 5% BSA 30 min 后,于 4 ℃ 过夜孵育 MBP 一抗。次日, PBS 洗涤 3 次,加入相应荧光二抗,室温避光孵育 1 h,随后用 Hoechst 染色细胞核 5 min 并封片。荧光显微镜采集图像, ImageJ 软件分析 O4 和 MBP 信号。O4 阳性表示未成熟 OPC 或早期 OL, MBP 阳性表示成熟 OL, 而 O4/MBP 双阳性细胞表示分化中期 OL, 可用于评估 OPC 的分化效率。OPC 的 A2B5 和 PDGFR α 染色按照常规步骤进行。

RT-qPCR 检测 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。取 1 μg 总 RNA 按照 RNA 反转录试剂盒说明书制备 cDNA, 反转录引物使用 Random9 和特异性反转录引物(5'-GTCGTATCC

AGTGC GTGTCGTGGAGTCGGCAATTGCAC TGGATACGATTTTCAC-3')的混合物。取2 μ L反转录产物作为模板进行扩增。反应体系为20 μ L: SYBR Green 预混液 10 μ L, 上、下游引物(20 μ mol/L)各0.2 μ L, cDNA 2 μ L, 无菌水补足至20 μ L。PCR反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性 10 min; 随后进行40个循环: 95 $^{\circ}$ C变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C退火/延伸 60 s。PCR引物为: miR-294-3p, 5'-GTCGTATCCAGT GCGTGTCTGT-3'(上游)和5'-AAAGTGCTTCC CTTTTGTGTGT-3'(下游); U6 (M10329.1), 5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATAT-3'(上游)和5'-AATATGGAACGCTTCACGAATTTG-3'(下游)。MSTRG.19716.1, 5'-GAAGTACTTAC ACTGTAATCTAGGT-3'(上游)和5'-TGTAAGTACTTCTGCAATCATAC-3'(下游引物)。OLIG2 (NM_016967.2), 5'-CGGTGCGCAAGCT CTCCAAG-3'(上游)和5'-TAGATCTCGCTCA CCAGTCGCTT-3'(下游)。 β -actin (NM_007393.5), 5'-GGAGACGGGGTCACCCACACT G-3'(上游)和5'-TCTTCATGAGGTAGTCTG TCAGG-3'(下游引物)。miR-294-3p、MSTRG.19716.1和Olig2 mRNA相对含量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法求得, U6和 β -actin分别被用作内参。

同时, 采用RT-qPCR对DPSC-exo和OPC中的MSTRG.19716.1进行绝对定量分析。首先, 将包含MSTRG.19716.1目标序列的PCR产物克隆至质粒载体中, 测定其浓度并根据相对分子质量计算理论拷贝数。随后对标准品进行10倍系列梯度稀释, 构建标准曲线, 用于后续样本的定量分析。从DPSC-exo及OPC中提取总RNA, 经反转录获得cDNA后进行qPCR检测。根据样本Ct值代入标准曲线方程, 计算DPSC-exo的绝对拷贝数。为实现不同样本间的可比性, 分别以细胞数量(每 10^6 个OPC)及外泌体颗粒数(每 10^9 个颗粒)为归一化单位, 计算单位生物实体中的MSTRG.19716.1拷贝数。基于该统一标准, 对外泌体与OPC中目标转录本的丰度进行比较, 从而评估其在外泌体中的富集程度^[14]。

ELISA检测OPC经相应处理后, 弃去培养液, 使用预冷PBS轻轻洗涤2次, 加入细胞裂解液充分裂解, 4 $^{\circ}$ C下裂解30 min, 并于 $10\,000\times g$ 离心10 min, 收集上清作为待测蛋白样本。按照ELISA试剂盒说明书配制标准品及相关工作液, 将标准品和样本

分别加入酶标板孔中, 37 $^{\circ}$ C孵育30 min; 随后依次加入检测抗体和酶结合物, 按说明书要求孵育并洗板。最后加入显色底物避光反应, 待显色充分后加入终止液终止反应, 使用酶标仪于450 nm波长处测定各孔吸光度(D值), 根据标准曲线计算各组样本中OLIG2蛋白含量。

外泌体摄取实验 DPSC-exo加入前用PKH-26进行标记, 于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下继续培养24 h后去除培养基, 使用0.5 mL的DPBS洗细胞2遍, 以去除未被细胞摄取的游离外泌体。添加500 μ L的4%多聚甲醛固定细胞, 对细胞核进行Hoechst染色后拍照。在获得细胞的荧光图像后, 使用ImageJ软件对这些细胞中的绿色荧光颗粒数量进行计数^[15]。先分离背景, 再根据绿色荧光通道的强度阈值识别绿色荧光颗粒, 并进一步统计颗粒数量及荧光强度。

荧光素酶实验 采用生物信息学软件TargetScan预测Olig2 mRNA与miR-294-3p的潜在结合位点。化学合成miR-294-3p模拟物(5'-AAAGUGCUUCCUUUUGUGUGUdTdT-3')、阻遏物(5'-ACACACAAAAGGGAAGCACUUUdTdT-3')及阴性对照(NC, 5'-CUCUCUAGAUUAGUGUCUGUGUdTdT-3')。将对数生长期的293细胞接种至24孔培养板, 每孔 1×10^4 个, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下过夜培养, 待细胞完全贴壁后, 按照转染试剂说明书进行miR-294-3p模拟物、阻遏物及阴性对照与报告基因载体pGL3-OLIG2-3' UTR(wt)或pGL3-OLIG2-3' UTR(mt)的共转染实验。转染细胞正常条件培养48 h, 收集细胞检测荧光素酶活性。将表达载体pcDH-MSTRG.19716.1、miR-294-3p模拟物与报告基因载体共转染293细胞, 48 h后收集细胞进行荧光素酶活性检测。

统计学分析 采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。所有实验均为体外实验($n=3$)。两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较采用Tukey多重比较检验。在进行统计分析前, 对数据进行正态性检验和方差齐性检验。若数据不符合正态分布或方差不齐, 则采用非参数检验(如Mann-Whitney U检验或Kruskal-Wallis检验)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

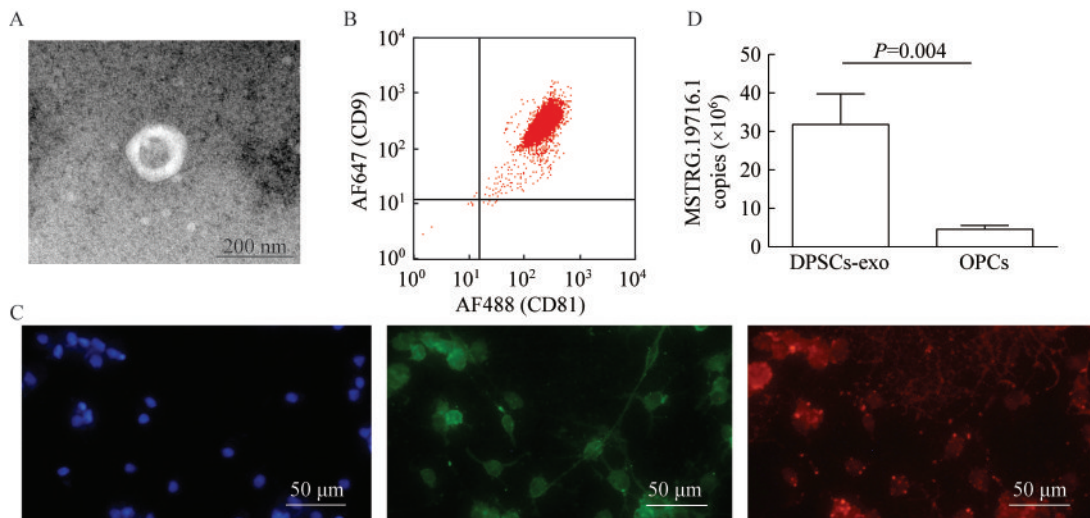
结 果

DPSC-exo 表征和 OPC 细胞鉴定 SEM 表征数据表明,DPSC-exo 的粒径分布于 50~200 nm,符合外泌体大小的理论参数(图 1A)。流式鉴定结果表明,经免疫珠吸附形成的外泌体聚集体绝大多数呈现外泌体标志物 CD81 和 CD9 阳性表达(图 1B)。

免疫荧光染色结果表明,绝大多数 OPC 同时表达 A2B5 和 PDGFR α ,说明 OPC 纯度较高(图 1C)。

DPSC-exo 与 OPC 中 MSTRG.19716.1 含量比较

定量分析结果表明,DPSC-exo 中 MSTRG.19716.1 的拷贝数为 $(31.80 \pm 7.96) \times 10^6/10^9$,显著高于 OPC 中的 $(4.56 \pm 0.98) \times 10^6/10^6$ ($P < 0.01$),提示 MSTRG.19716.1 在 DPSC-exo 中具有较高载量(图 1D)。



A: SEM scan photos of DPSC-exo; B: Flow cytometry identification of DPSC-exo biomarker expression [green fluorescence: AF488-labeled CD81; red fluorescence: AF647-labeled CD9; upper-right quadrant: CD81⁺/CD9⁺ (exosomes)]; C: Immunofluorescence detection of A2B5 and PDGFR α Expression in OPCs; D: Comparison of MSTRG.19716.1 copy numbers in DPSCs-exo ($\times 10^9$) and OPCs ($\times 10^6$). The experiment was set up with 3 biological replicates, and the data were represented as $\bar{x} \pm s$. P values were determined by One-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test as a post-hoc test.

图 1 DPSC-exo 表征、OPC 鉴定和 MSTRG.19716.1 的绝对定量

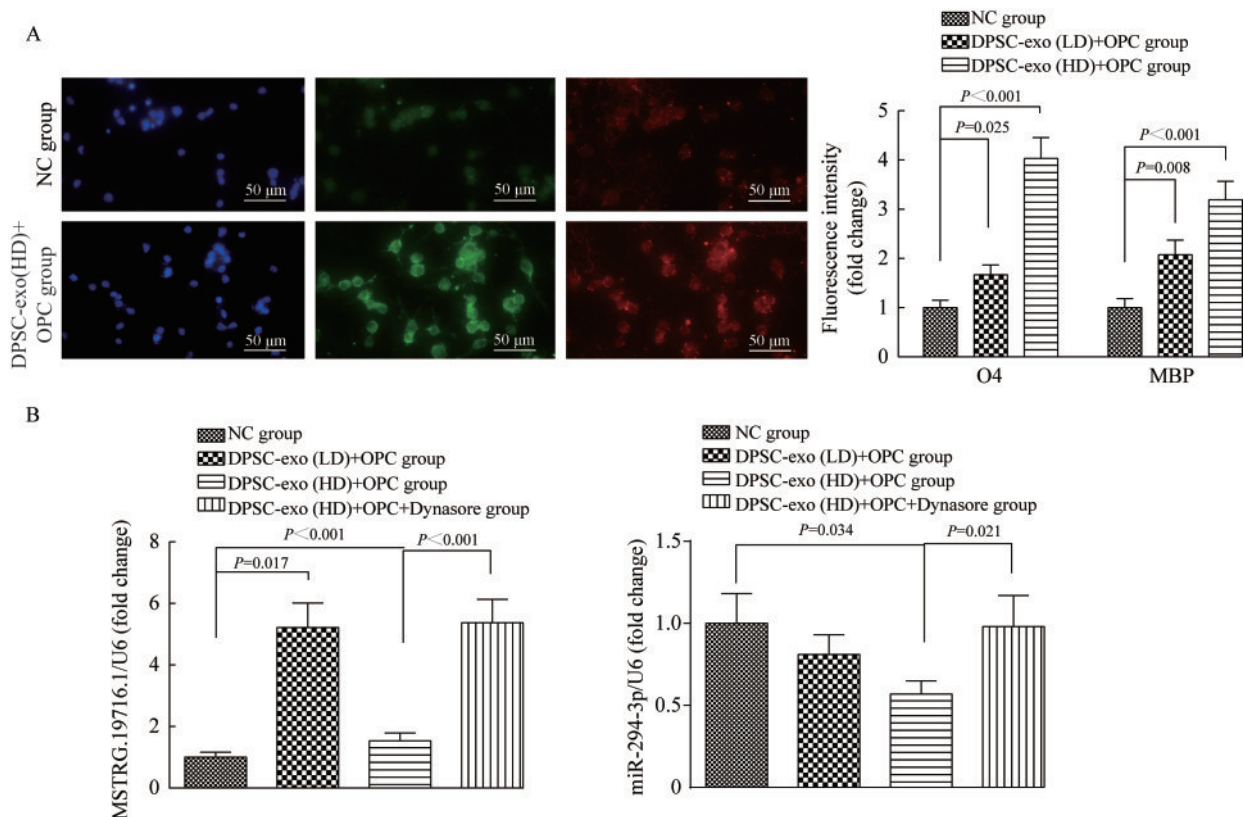
Fig 1 Characterization of DPSC-exo, identification of OPCs and absolute quantification of MSTRG.19716.1

DPSC-exo 对 OPC 分化以及 MSTRG.19716.1 和 miR-294-3p 含量的影响 免疫荧光染色结果表明,与对照组比较,DPSC-exo (LD)+OPC 组细胞中 O4 与 MBP 荧光信号均有所增强 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),DPSC-exo (HD)+OPC 组增加更为显著 (P 均 < 0.001 ,图 2A)。RT-qPCR 检测结果表明,与对照组比较,DPSC-exo (LD)+OPC 组 MSTRG.19716.1 含量明显增加 ($P < 0.05$),DPSC-exo (HD)+OPC 组增加更为显著 ($P < 0.001$);与 DPSC-exo (HD)+OPC 组比较,DPSC-exo (HD)+OPC+Dynasore 组 MSTRG.19716.1 含量明显降低 ($P < 0.001$)。与对照组比较,DPSC-exo (LD)+OPC 组 miR-294-3p 含量有所降低但差异无统计学意义,而 DPSC-exo (HD)+OPC 组明显降低 ($P < 0.05$);与 DPSC-exo (HD)+OPC 组比较,DPSC-

exo (HD)+OPC+Dynasore 组 miR-294-3p 含量明显升高 ($P < 0.05$,图 2B)。

MSTRG.19716.1 对 miR-294-3p 与 Olig2 mRNA 结合的影响

生物信息学预测显示,在小鼠 *Olig2* mRNA 的 3' 非编码区 (untranslated region, UTR),存在 7 个碱基的 miR-294-3p 种子区结合位点 5'-AGCACUU-3' (图 3A)。荧光素酶实验结果表明,与 pGL3-Olig2-3' UTR (wt) 转染组比较,miR-294-5p 模拟物或阻遏物与其共转染组 293 细胞中荧光素酶活性明显降低和升高 (P 均 < 0.01)。与 pGL3-Olig2-3' UTR (mt) 转染组比较,miR-294-5p 模拟物或阻遏物与其共转染组 293 细胞中荧光素酶活性无显著影响。此外,阴性对照转染对 pGL3-Olig2-3' UTR (wt) 及 pGL3-Olig2-3' UTR (mt) 转染的 293 细胞中荧光素酶活性均无显著影响(图 3B)。在



A: Fluorescence imaging (Hoechst-stained nuclei in blue, O4 signals in green, and MBP signals in red) on the left, and analysis of intergroup differences in fluorescence intensity on the right; B: RT-qPCR was used to detect the relative contents of MSTRG.19716.1 and miR-294-3p. U6 was used as internal parameters. All experiments were set with 3 biological replicates, and the data were represented as $\bar{x} \pm s$. *P* values were determined by One-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test as a post-hoc test.

图2 OPC分化指标测定以及MSTRG.19716.1与miR-294-3p含量测定

Fig 2 Identification of OPC differentiation markers and quantification of MSTRG.19716.1 and miR-294-3p levels

MSTRG.19716.1序列上,至少存在3个miR-294-3p种子区结合位点(图3C)。荧光素酶实验结果表明,与pGL3-Olig2-3'UTR(wt)转染组比较,miR-294-5p模拟物与其共转染组293细胞中荧光素酶活性明显降低($P<0.01$);与pGL3-Olig2-3'UTR(wt)+miR-294-5p模拟物转染组比较,pcDH-MSTRG.19716.1+pGL3-Olig2-3'UTR(wt)+miR-294-5p模拟物共转染组293细胞中荧光素酶活性明显上升($P<0.01$,图3D)。

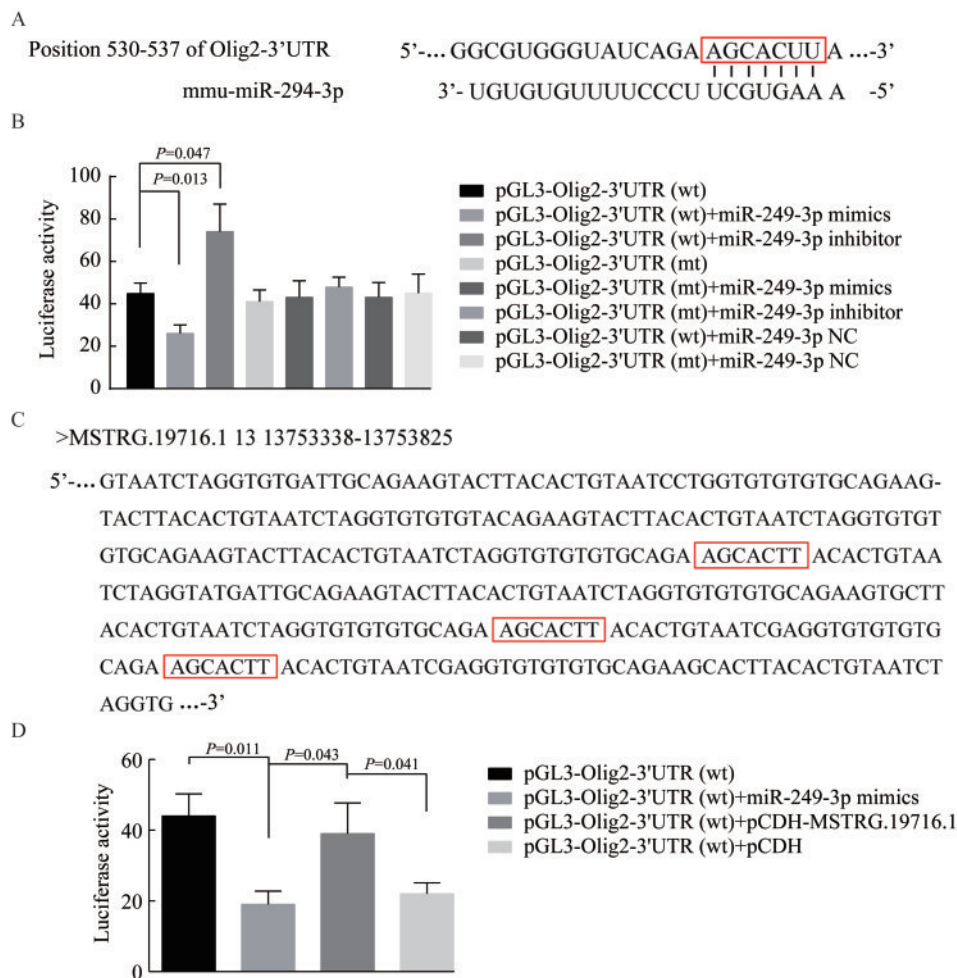
DPSC-exo在OPC中的摄取分析 荧光显微镜下,DPSC-exo进入OPC的效率与共孵育时间以及添加浓度呈正比。与对照组相比,DPSC-exo(LD)+OPC组细胞中红色荧光颗粒数明显增加,且24h组差异有统计学意义($P<0.01$);DPSC-exo(HD)+OPC组中红色荧光颗粒数增加更为显著(12h组: $P<0.05$,24h组: $P<0.001$)(图4A)。

MSTRG.19716.1沉默对DPSC-exo促进OPC中

OLIG2蛋白表达的影响 RT-qPCR检测结果显示,与对照组比较,DPSC-exo(HD)+OPC组MSTRG.19716.1含量明显增加($P<0.001$);与DPSC-exo(HD)+OPC组比较,DPSC-exo(HD)+OPC+siRNA-MSTRG.19716.1组MSTRG.19716.1含量明显降低($P<0.01$),DPSC-exo(HD)+OPC+siRNA-NC组无明显变化(图4B)。ELISA检测结果则表明,OLIG2蛋白在各组OPC中的表达变化趋势与MSTRG.19716.1完全一致(图4C)。

讨 论

OPC是CNS中重要的胶质细胞,在神经发育过程中发挥关键作用^[16],其主要功能是分化为成熟的OL进而形成包裹神经元轴突的髓鞘,从而加快神经冲动传导,维持神经信号的快速高效传递,并为轴突提供保护以及营养和代谢支持。OL的生成



A: Prediction of the binding sites between miR-294-3p and *Olig2* mRNA; B: Detection of luciferase activity and analysis of inter group differences; C: Prediction of binding sites between miR-294-3p and MSTRG.19716.1; D: Detection of luciferase activity and analysis of inter group differences. The relative luciferase activity is expressed as the relative ratio of firefly luciferase activity to sea kidney luciferase activity, with sea kidney luciferase activity as a reference. All experiments were set with 3 biological replicates ($n=3$), and the data were represented as $\bar{x} \pm s$. P values were determined by One-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test as a post-hoc test.

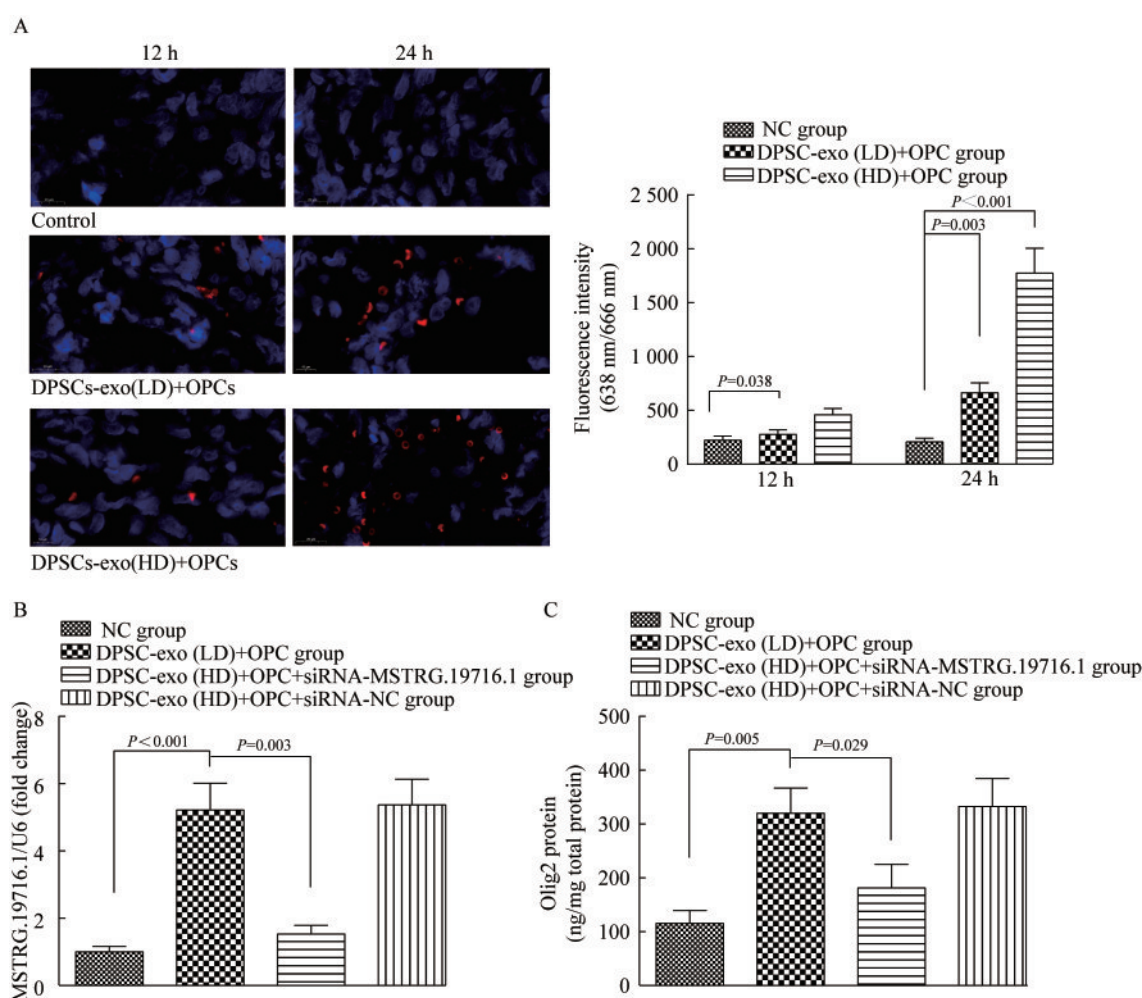
图3 生物信息学分析以及荧光素酶活性检测

Fig 3 Bioinformatics analysis and luciferase activity assay

及髓鞘化是一个受到精细调控的过程,不仅对大脑正常发育至关重要,在神经再生、神经修复及相关疾病治疗中也具有重要意义。OL缺失或功能异常可导致多种神经系统疾病,如多发性硬化症、脑白质疾病及部分遗传性周围神经病,进而引起神经功能障碍^[17-18]。因此,OPC正常分化为OL在很大程度上决定了髓鞘生成与修复的水平^[19-20]。研究表明,促进OPC分化可加快受损髓鞘的再生,并在神经损伤及神经退行性疾病中发挥积极作用^[21]。在NDD等疾病中,再髓鞘化水平的提高亦与临床症状改善密切相关^[22]。基于上述研究结果,以OPC分化调控为模型,进一步探索促进其向OL分化的有效

策略,可为以OPC分化为靶点的神经修复干预提供理论支持。

由于DPSC来源于神经嵟外胚层,具有一定神经趋向性,其外泌体又具备神经保护和促修复再生特性,DPSC-exo在神经损伤修复中的应用潜力已受到广泛关注。研究表明,DPSC-exo可促进神经细胞生长与分化,改善受损神经组织修复,其作用可能与其携带的生长因子及促神经生长信号分子有关。DPSC-exo中的抗炎分子可减轻损伤区域的炎症反应,为神经再生创造有利微环境^[23];其所含的促血管生成因子还能促进新生血管形成,为受损组织提供氧气和营养支持^[24]。Venugopal等^[25]发



A: Exosome tracing (left: cell fluorescence field imaging; right: analysis of differences in red fluorescent particles between groups in OPCs); B: RT-qPCR was used to detect the relative content of MSTRG.19716.1; C: ELISA was used to detect the OLIG2 protein expression level. All experiments were set with 3 biological replicates, and the data was represented as $\bar{x} \pm s$. *P* values were determined by One-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test as a post-hoc test.

图4 OPC的外泌体摄取以及MSTRG.19716.1和OLIG2蛋白含量检测

Fig 4 Detection of MSTRG.19716.1 and OLIG2 protein contents and DPSC-exo uptake in OPCs

现,在体外兴奋性毒性损伤模型中,人DPSC-exo较骨髓间充质干细胞来源的外泌体更能抑制神经细胞凋亡,其机制可能与上调抗凋亡因子Bcl-2有关。另有研究显示,人脱落乳牙干细胞来源的外泌体可显著减少6-羟基多巴胺诱导的多巴胺能神经元凋亡,为其在帕金森病等神经退行性疾病中的应用提供了理论依据^[26]。另有研究表明,人DPSC-exo对创伤性周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)的修复作用可能与促进髓鞘再生有关^[27]。因此,DPSC-exo已成为神经损伤修复生物治疗领域的重要研究热点,其作为神经修复生物治疗材料的潜力已初步显现。本研究发现DPSC-exo与OPC共培养可显著上调细胞中O4和MBP的表达,而使用外

泌体抑制剂Dynasore可有效削弱DPSC-exo的上述作用,提示DPSC-exo能够进入细胞并促进OPC向OL分化。

外泌体富含蛋白质、mRNA、microRNA及lncRNA等多种生物活性分子,能够通过细胞间信息传递调控受体细胞功能^[28]。本研究发现,与OPC相比,DPSC-exo中富集MSTRG.19716.1。进一步机制研究显示,MSTRG.19716.1可通过ceRNA机制竞争性抑制miR-294-3p对OLIG2蛋白表达的负调控,从而促进OPC向成熟OL的分化。目前尚无关于MSTRG.19716.1生物学功能的报道,本研究为其功能研究提供了初步的实验依据。

在生理条件下,DPSC-exo主要作为牙髓微环

境中的旁分泌介质,参与组织稳态维持、炎症调控及再生修复等过程,目前尚缺乏其在体内直接调控 OPC 分化及髓鞘发育的明确证据。然而,鉴于外泌体作为蛋白质及 lncRNA 的重要递送载体,在细胞间通讯中发挥关键作用,DPSC-exo 理论上可能通过递送功能性 RNA 调控分化相关信号通路,从而影响 OPC 分化及髓鞘形成。结合本研究结果,推测 DPSC-exo 可能通过递送 MSTRG.19716.1 调控 miR-294-3p/OLIG2 信号轴,从而促进 OPC 分化。

本研究存在一定局限性。首先,本研究主要基于体外实验,尚缺乏体内验证,在 CNS 发育异常及神经损伤修复中的实际作用仍需进一步明确。其次,虽然本研究通过靶向沉默 MSTRG.19716.1 是否逆转 DPSC-exo 对 OPC 中 miR-294-3p/OLIG2 轴的影响,确认了 MSTRG.19716.1 在 DPSC-exo 促进 OPC 分化中的核心作用,然而,考虑到外泌体成分复杂,DPSC-exo 中是否含有促进 OPC 分化的其他功能分子仍有待进一步的筛查。此外,虽然通过比较发现 MSTRG.19716.1 在 OPC 中的富集程度远低于 DPSC-exo,但这种低背景表达是否受到 OPC 周边微环境及时空特异性的影响仍有待进一步阐明。

本研究首次发现 DPSC-exo 能够促进 OPC 分化和成熟 OL 生成,提示其在髓鞘形成与再生中具有重要作用。机制研究表明,DPSC-exo 的上述作用与其通过递送 MSTRG.19716.1 影响 miR-294-3p/OLIG2 信号轴,进而促进 OPC 分化有关。上述结果为 DPSC-exo 用于神经发育障碍及神经损伤修复提供了新的理论依据。

作者贡献声明 赵成伟 实验实施,数据分析,论文撰写。杜易敏 研究设计,数据审核,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Penner M, Dupuis A, Arnold P, *et al.* Pubertal stage, sex and behaviour in neurodevelopmental disorders versus typical development: a cross-sectional study [J]. *BMJ Paediatr Open*, 2022, 6(1): e001469.
- [2] 张亚南, 席惠, 贾政军, 等. 神经发育障碍 420 例遗传病因学分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(24): 1862-1866.
- [3] Thornicroft G, Sunkel C, Aliev AA, *et al.* The Lancet commission on ending stigma and discrimination in mental health[J]. *Lancet*, 2022, 400(10361): 1438-1480.
- [4] Hafiz H, Raidah A, Shahid B. MRI evaluation of global developmental delay: a retrospective study [J]. *Dubai Medical Journal*, 2020, 3(1): 1-4.
- [5] ALAMRI A, Aljadhahi YI, ALRASHED A, *et al.* Identifying clinical clues in children with global developmental delay/intellectual disability with abnormal brain magnetic resonance imaging (MRI) [J]. *J Child Neurol*, 2021, 36(6): 432-439.
- [6] Suo N, He B, Cui S, *et al.* The orphan G protein-coupled receptor GPR149 is a negative regulator of myelination and remyelination[J]. *Glia*, 2022, 70(10): 1992-2008.
- [7] Martin E, Aigrot MS, Lamari F, *et al.* Teriflunomide promotes oligodendroglial 8, 9-unsaturated sterol accumulation and CNS remyelination [J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2021, 8(6): e1091.
- [8] Ma D, Zhang HY, Yin L, *et al.* Human iPSC-derived endothelial cells promote CNS remyelination via BDNF and mTORC1 pathway[J]. *Glia*, 2024, 72(1): 133-155.
- [9] Chansaenroj J, Kornuthisophon C, Chansaenroj A, *et al.* Potential of dental pulp stem cell exosomes: unveiling mirna-driven regenerative mechanisms[J]. *Int Dent J*, 2025, 75(2): 415-425.
- [10] Godoi-Lopes J, Ribeiro-Silva VHA, do Prado LGC, *et al.* Efficacy of dental stem cell-derived exosomes for pulp regeneration: a systematic review of clinical, animal, and in vitro studies[J]. *Molecular Biology Reports*, 2026, 53: 426.
- [11] Hu S, Chen B, Zhou J, *et al.* Dental pulp stem cell-derived exosomes revitalize salivary gland epithelial cell function in NOD mice via the GPER-mediated cAMP/PKA/CREB signaling pathway[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 361
- [12] Fan C, Kin D, An H, *et al.* Identifying an oligodendrocyte enhancer that regulates Olig2 expression [J]. *Hum Mol Genet*, 2023, 19; 32(5): 835-846.
- [13] Krishan K, Eunsu K, Munirah A, *et al.* Recent advances in microfluidic approaches for the isolation and detection of exosomes[J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2023: 116912.
- [14] Koritzinsky EH, Street JM, Star RA, *et al.* Quantification of exosomes[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(7): 1587-1590.
- [15] Kim CJ, Kuczler MD, Dong L, *et al.* Extracellular vesicle uptake assay via confocal microscope imaging analysis[J]. *J Vis Exp*, 2022(180).doi:10.3791/62836.
- [16] 朱秀婷, 张丽丽, 冯勋刚. 少突胶质细胞的研究进展[J]. 临床医学进展, 2022, 12(9): 8738-8744.