

载外泌体银纳米颗粒抗菌水凝胶的构建及其对人表皮 HaCaT细胞增殖的影响

刘 韬^{1,2}, 傅家财^{1,2}, 钟科明^{2,3}, 滕 旭², 齐 玲²

(1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 广州医科大学附属清远医院 清远市人民医院,
广东 清远 511500; 3. 赣南医学院基础医学院, 江西 赣州 341000)

[摘要] **目的:** 构建负载间充质干细胞外泌体 (MSC-Exo) 和银纳米颗粒 (AgNPs) 抗菌水凝胶, 初步探讨该水凝胶的抗菌活性及促人表皮 HaCaT 细胞增殖的效果, 阐明其在皮肤损伤治疗方面的应用潜力。**方法:** 利用氧化葡聚糖 (ODex) 和改性透明质酸 (HA-ADH) 制备基础水凝胶骨架, 以十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 为稳定剂制备 AgNPs; 培养间充质干细胞 (MSC) 获取 MSC-Exo。构建 AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶。通过 BCA 法评估外泌体的负载率, 选用动态光散射 (DLS) 分析、Zeta 电位分析、紫外-可见分光光度计表征 AgNPs 形貌、表面带电情况和结构, 利用红外光谱表征 HA-ADH/ODex 水凝胶骨架的结构组成, 通过透射电子显微镜 (TEM)、纳米流式检测仪和蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法对 MSC-Exo 进行鉴定, CCK-8 法检测 HA-ADH/ODex 水凝胶和 AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶的细胞存活率及 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶对 HaCaT 细胞的细胞增殖率的影响, 平板涂布法和比浊法评估 AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶的抗菌活性。**结果:** DLS 分析、Zeta 电位分析和紫外分光光度计检测, 成功制备了粒径大小均一、表面带正电的 AgNPs。红外光谱检测, HA-ADH/ODex 水凝胶制备成功。TEM、纳米流式检测和 Western blotting 法验证 MSC-Exo 成功提取, BCA 法证实 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶中 MSC-Exo 负载率为 77.8%。CCK-8 法检测, 稀释倍数为 0、1、2、4、8、16、32 和 64 的 HA-ADH/ODex 水凝胶浸提液处理的 HaCaT 细胞存活率接近 100%。稀释 8 倍及以上的 AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶浸提液处理的 HaCaT 细胞存活率均大于 85%。平板涂布法检测, AgNP/HA-ADH/ODex 和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶具有明显的抗菌活性, 其对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的抗菌率分别为 (96.44±0.16)% 和 (96.62±0.16)%, 对大肠杆菌 (*E. coli*) 的抗菌率分别为 (95.73±0.28)% 和 (95.58±0.14)%。CCK-8 法检测, MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶能够促进 HaCaT 细胞增殖, 细胞增殖率为 (115.00±7.42)%。**结论:** MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶具有优异的抗菌性能, 能够有效促进人表皮 HaCaT 细胞的增殖, 可作为一种安全有效的生物敷料, 用于皮肤创伤的治疗。

[关键词] 透明质酸; 葡聚糖; 银纳米颗粒; 间充质干细胞外泌体; 皮肤创伤; 药物递送

[中图分类号] R751 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-05-11

[基金项目] 广东省卫健委医学科学技术研究基金项目 (A2023208); 广东省清远市人民医院医学科研项目 (20220329, 20190220)

[作者简介] 刘 韬 (1997—), 男, 四川省绵阳市人, 在读硕士研究生, 主要从事水凝胶医学应用方面的研究。

[通信作者] 滕 旭, 副研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: xu0601@163.com);

齐 玲, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: qiling1718@gzhmu.edu.cn)

Construction of exosome and AgNPs-loaded antibacterial hydrogel and its effect on proliferation of human epidermal HaCaT cells

LIU Tao^{1,2}, FU Jiakai^{1,2}, ZHONG Chengming^{2,3}, TENG Xu², QI Ling²

(1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China; 2. affiliated Qingyuan Hospital, Quanzhou Medical University, Institute of Digestive Disease, People's Hospital, Qingyuan City, Qingyuan 511518, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China)

ABSTRACT Objective: To construct the antibacterial hydrogel containing mesenchymal stem cell exosomes (MSC-Exo) and silver nanoparticles (AgNPs), and to preliminarily clarify its antibacterial activity and proliferative effect on the human epidermal HaCaT cells, and to clarify its application potential in treatment of skin wound. **Methods:** The basic hydrogel scaffold was fabricated using oxidized dextran (ODex) and modified hyaluronic acid (HA-ADH). The AgNPs were synthesized with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as the stabilizer, while the MSC-Exo was isolated from the cultured mesenchymal stem cells (MSC). The AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel and MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel were constructed. The loading rate of the Msc-Exo was evaluated through BCA assay; dynamic light scattering (DLS), Zeta potential measurement, and ultraviolet-visible spectroscope were used to analyze the morphology, the charged status of the AgNPs; fourier transform infrared spectra was used to detect the compositions of the HA-ADH/ODex hydrogel framework; transmission electron microscope (TEM), nanoparticle tracking analysis, and Western blotting methods were used to identify the presence of MSC-Exo; the cell survival rates of the HA-ADH/ODex hydrogel and the AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel, and the effect of MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel on the proliferation rate of HaCaT cells were detected by CCK-8 assay; the antibacterial efficacy of the AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel was detected by spread plate method and turbidity measurement. **Results:** The DLS, Zeta potential, and ultraviolet-visible spectrum results showed the successful synthesis of uniform and positively charged AgNPs. The fourier transform infrared spectrometry results showed the HA-ADH/ODex hydrogel was properly formulated. The identification of MSC-Exo was verified by TEM, nanoparticle tracking, and Western blotting methods. The BCA assay results showed that the loading rate of the MSC-Exo on the MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel was 77.8%. The CCK-8 assay results showed that the survival rates of the HaCaT cells were close to 100% when treated with the dilution ratios of 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, and 64 of culture medium-extract of HA-ADH/ODex hydrogel. For the AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel extracted with dilution ratio of 8 and above, the survival rates were greater than 85%. The spread plate method results showed that the antibacterial rates of AgNP/HA-ADH/ODex and MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogels against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*), and the antibacterial rates against *S. aureus* and *E. coli* were $(96.44 \pm 0.16)\%$, $(96.62 \pm 0.16)\%$ and $(95.73 \pm 0.28)\%$, $(95.58 \pm 0.14)\%$, respectively. The CCK-8 assay results showed that the MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel promoted the proliferation of the HaCaT cells, and the proliferation rate was $(115.00 \pm 7.42)\%$. **Conclusion:** The MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel exhibits the excellent antibacterial properties and good ability to promote the proliferation of human epidermal HaCaT cells; it is a safe and effective bio-dressing for the treatment of skin wounds.

KEYWORDS Hyaluronic acid; Dextran; Silver nanoparticles; Mesenchymal stem cell exosome; Skin wound; Drug delivery

皮肤创伤及其疾病进展是全球主要公共卫生问题之一,给患者带来巨大的经济损失^[1]。在皮肤创伤的自我修复过程中,成纤维细胞、内皮细胞和白细胞等在伤口中迁移及增殖进一步促进伤口愈合^[2]。目前,临床皮肤创伤治疗的主要措施为抗感染和促进表皮细胞的修复^[3]。银纳米颗粒(silver nanoparticles, AgNPs)具有优异的抗菌性能,可导致细菌遗传基因的结构改变并阻断其繁殖过程^[4]。来源于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)的外泌体(exosome, Exo)可以促进创伤部位成纤维细胞的募集,加速皮肤神经再生^[1, 5]。因此联合AgNPs和MSC-Exo治疗皮肤创伤可能达到抗感染及促进表皮修复的同步效果。但AgNPs体内给药会在体内沉积,具有较大的生物毒性,而MSC-Exo在体内代谢快、半衰期短,这导致两者全身给药的效果差,在皮肤创伤治疗应用方面受到一定限制^[6-7]。因此,局部给药可能会提高两者联合治疗皮肤创伤的效果。透明质酸(hyaluronic acid, HA)和葡聚糖(dextran, Dex)作为天然多糖化合物,以其为原料制备的HA/Dex水凝胶具有缓释性和可降解性,且对人体具有优异的生物相容性和安全性,可作为一种局部给药的生物敷料^[8-10]。但目前尚无将MSC-Exo和AgNPs与HA/Dex水凝胶结合应用于皮肤创伤治疗的相关报道。本研究将HA和Dex改性以获得改性透明质酸(HA-ADH)和氧化葡聚糖(oxidized Dex, ODex),以两者为原料制备HA-ADH/ODex水凝胶,再负载AgNPs和MSC-Exo构建MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶,并探讨该水凝胶对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的抗菌活性及人表皮HaCaT细胞的促增殖作用,为开发负载Exo的新型水凝胶敷料提供依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 HaCaT细胞和MSC由广州医科大学附属第六医院消化病研究所保存;*S. aureus* (ATCC 25923)和*E. coli* (ATCC 25922)由广州医科大学附属第六医院检验医学部保存, Dex、HA、乙二醇、己二酰肼(adipic dihydrazide, ADH)、1-羟基苯并三唑(1-hydroxybenzotriazole, HOBt)和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购于上海麦克林科技有限公司,十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)

购于北京百灵威科技有限公司,硼氢化钠(NaBH_4)、硝酸银(AgNO_3)和高碘酸钠(NaIO_4)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]购于阿法埃莎(中国)化学有限公司,氢氧化钠和盐酸购于广州化学试剂厂,0.25%胰蛋白酶、高糖杜氏改良培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)和DEME/F12购于美国Gibco公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自上海逍鹏生物科技有限公司,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(1×, pH值7.4)购自武汉塞维尔公司,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购于华中海威(北京)基因科技有限公司,CCK-8试剂盒购于生工生物工程(上海)股份有限公司;酶标仪(型号:INFINIT 200 PRO)购于德国BMG LABTECH公司,纳米流式检测仪(型号:N30E)购于厦门福流生物科技有限公司,透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(型号:HT7800)购于日本株式会社日立制作所、动态光散射仪(dynamic light scattering, DLS)分析(型号:Zetasizer Nano ZSE)购于英国马尔文仪器有限公司,红外光谱仪(型号:IS5)购于美国赛默飞世尔科技公司,紫外-可见分光光度计(型号:UV-7100)购于日本岛津公司。

1.2 AgNPs的制备 以CTAB为稳定剂制备AgNPs^[11]。将60 mL浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3 溶液加入50 mL浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的CTAB溶液中,搅拌5 min。然后,滴加上述混合液至60 mL浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaBH_4 溶液。将反应混合物在磁力搅拌器上以 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌40 min,溶液颜色变成黄色说明生成了AgNPs。 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心去除含有过量CTAB的上清液以得到AgNPs溶液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存备用。使用紫外-可见光分光光度计获取AgNPs溶液的紫外-可见光光谱。

1.3 MSC-Exo的提取及鉴定 使用含有10% FBS和 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ bFGF的DMEM/F12培养基培养人脐带间充质干细胞并收集全部培养基,2000 g离心30 min收集上清液去除细胞碎片,随后10000 g离心45 min去除较大囊泡,最后使用超速离心机在100000 g下离心75 min,将离心管底部沉淀采用PBS缓冲液重悬并收集至离心管中,

并以同样转速超离浓缩得到 MSC-Exo。通过蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法、TEM 和纳米流式检测仪鉴定 MSC-Exo 的蛋白表达、形貌及粒径。

1.4 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶构建 根据文献 [12-13] 制备 HA-ADH/ODex 水凝胶。配制 10% (W/V) Dex 水溶液, 加入 2 mL NaIO₄ 溶液 (100 g·L⁻¹) 后, 室温避光环境氧化反应 24 h。随后, 将 1.5 mL 乙二醇溶液加入至 Dex 反应溶液中以终止氧化反应。用纤维素透析袋 (截留相对分子质量: 7 000~12 000) 透析反应溶液 3 d, 然后将透析后溶液置入冻干机中冻干, 获得 ODex 冻干品。

将 800 mg ADH 加入 25 mL 浓度为 4 g·L⁻¹ HA 水溶液中, 磁力搅拌约 4 h 直至澄清, 将 pH 值调至 4.7。迅速将 100 mg EDC 和 132 mg HOBt 加入至 2 mL DMSO 与超纯水 (V/V, 1:1) 的混合液并充分混匀溶解。将反应液加入到 HA 溶液中并调节 pH 值至 6.8, 反应 4~6 h, 调节 pH 值至 7.0。将反应液用透析袋 (截留相对分子质量: 3 500) 分别置于 100 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液, 25% 乙醇溶液和去离子水中各透析 1 d, 每天更换 3 次透析液。最后将反应液置于冻干机中冻干, 获得 HA-ADH 冻干品。

将 HA-ADH 与 ODex 冻干品以 1:2 的比例混合振荡混匀后冻干得到 HA-ADH/ODex 水凝胶。使用红外光谱仪分别获取 ODex、HA-ADH 和 HA-ADH/ODex 冻干品的红外光谱。分别将 100 μL AgNPs 以及 100 μL MSC-Exo 和 AgNPs (V/V, 1:1) 的混合溶液 12 h 与 1 mg HA-ADH/ODex 水凝胶支架混合孵育 12 h 后获得 AgNP/HA-ADH/ODex 和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶。

1.5 BCA 法检测 MSC-Exo 在 HA-ADH/ODex 水凝胶的负载率 通过 BCA 法检测 MSC-Exo 蛋白浓度验证 MSC-Exo 成功负载于 HA-ADH/ODex 水凝胶上, 并计算其负载率 [14-15]。取 500 μL MSC-Exo, 使用 BCA 试剂检测 MSC-Exo 原液蛋白浓度, 称取 5 mg HA-ADH/ODex 水凝胶浸泡于 MSC-Exo 溶液中 12 h 直至水凝胶溶胀, 取出剩余溶液, 使用 BCA 试剂检测浸泡后剩余溶液的蛋白浓度。负载率 = (MSC-Exo 原液蛋白浓度 - 剩余溶液蛋白浓度) / MSC-Exo 原液蛋白浓度 × 100%。

1.6 CCK-8 法检测细胞存活率 将 HaCaT 细胞加

入含有完全培养基 (含 10% FBS 和 100 g·L⁻¹ 青/链霉素的 DMEM 高糖培养基) 的培养皿中培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中。分别将 1 mg HA-ADH/ODex 和 AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶中加入含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基浸泡 12 h 得到浸提液。将 HaCaT 细胞以每孔 8 000 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 孵育 24 h 弃去培养基, 将浸提液梯度稀释 0、1、2、4、8、16、32、64 和 128 倍后, 加入 96 孔细胞培养板中与细胞共培养 12 h, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 采用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 采用细胞存活率计算公式计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (阴性对照组 A 值 - 空白组 A 值) × 100%。实验组: 含有细胞和 CCK-8 的水凝胶浸提液溶液; 阴性对照组: 含有细胞和 CCK-8 的培养基溶液; 空白组: 含有 CCK-8 的培养基溶液。

1.7 平板涂布法和比浊法检测 AgNP/HA-ADH/ODex 和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶的体外抗菌作用 通过检测 A 值计算细菌的菌落数和抗菌率以研究 AgNP/HA-ADH/ODex 及 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 对 *S. aureus* 以及 *E. coli* 的体外抗菌活性 [16]。首先, 将约 1 mg 干燥水凝胶分别预浸泡在 AgNPs 与 AgNPs 和 MSC-Exo (V/V, 1:1) 的混合溶液中 12 h, 然后将水凝胶分别浸入 8 mL 浓度为 1.0 × 10⁸ CFU·mL⁻¹ 的细菌悬浮液中, 在 37 °C 下共孵育 12 h 后使用酶标仪在 600 nm 处检测 A 值, 从每组中取出 100 μL 细菌溶液并稀释至适宜浓度。取 100 μL 稀释后的细菌悬液均匀涂布在 LB 琼脂平板上。培养过夜后, 对琼脂平板上的细菌菌落拍照。以 PBS 缓冲液处理的细菌悬液作为对照组。抗菌率 = (无水凝胶处理组的 A 值 - 水凝胶处理组的 A 值) / 无水凝胶处理组的 A 值 × 100%。

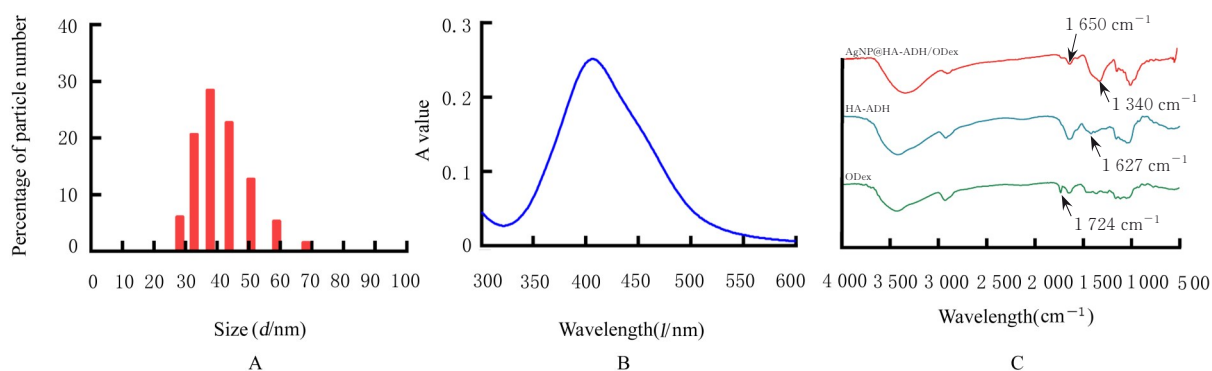
1.8 CCK-8 法检测各组 HaCaT 细胞增殖率 将 HaCaT 细胞加入含有完全培养基 (含 10% FBS 和 100 g·L⁻¹ 青/链霉素的 DMEM 高糖培养基) 的培养皿中培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中。分别取适量 HA-ADH/ODex 水凝胶、AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶, 各自加入含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基浸泡 12 h 得到粗提液。将 HaCaT 细胞以每孔 8 000 个细胞的密度接种于 96 孔

细胞培养板中, 孵育24 h后弃去培养基, 将浸提液稀释8倍后加入96孔细胞培养板中共培养12 h, 然后每孔加入10 μL CCK-8溶液, 采用酶标仪在450 nm处测定A值并计算细胞增殖率。细胞增殖率 = (实验组A值 - 空白组A值) / (阴性对照组A值 - 空白组A值) $\times 100\%$ 。实验组: 含有细胞和CCK-8的水凝胶浸提液溶液; 阴性对照组: 含有细胞和CCK-8的培养基溶液; 空白组: 含有CCK-8的培养基溶液。

1.9 统计学分析 采用Graphpad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。各组细胞存活率、细胞增殖率和抗菌率均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用Tukey检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AgNPs与AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶表征 DLS检测AgNPs粒径(图1A), 其平均粒径为41.64 nm。AgNPs的Zeta电位为7.32 mV。图1B显示在波长为406 nm处出现一个较为明显的吸收峰, 属于AgNPs的等离子共振吸收峰, 表示在CTAB保护下, NaBH_4 成功将 AgNO_3 还原为AgNPs。通过对ODex、HA-ADH和AgNP/HA-ADH/ODex进行红外光谱表征, 在约 3400 cm^{-1} 处均出现代表-OH键的伸缩振动吸收峰。其中, ODex的红外图谱中可见代表醛基的特征吸收峰 1724 cm^{-1} , 证实Dex成功被高碘酸钠氧化; 在HA-ADH图谱 1627 cm^{-1} 处出现ADH特有的氨基特征峰, 表示ADH成功改性HA; 在 1650 cm^{-1} 处出现ODex和ADH代表脲键形成的特征峰, 表明HA-ADH/ODex成功合成(图1C)。



A: Distribution diagram of AgNPs size; B: UV spectrum of AgNPs; C: Fourier transform infrared spectra of ODex, HA-ADH, and AgNP/HA-ADH/ODex.

图1 AgNPs和AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶表征

Fig. 1 Characterization of AgNPs and AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel

2.2 MSC-Exo鉴定及其在HA-ADH/ODex水凝胶中的负载率 纳米流式检测仪检测结果显示MSC-Exo的平均粒径为58.31 nm(图2)。通过TEM拍摄MSC-Exo形貌, 可见MSC-Exo为具有圆形杯托状的双层膜结构, 粒径小于100 nm(图3)。Western blotting法检测结果显示: MSC-Exo表达Alix90、HSP70和CD63蛋白, 微弱表达 β -actin蛋白, 表明已通过培养MSC成功提取MSC-Exo(图4)。BCA法检测MSC-Exo原液和浸泡后剩余溶液中的蛋白浓度, 结果显示: MSC-Exo原液蛋白浓度为 $1.62\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 浸泡后剩余溶液蛋白浓度为 $0.62\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, MSC-Exo负载率为77.8%, 证明MSC-Exo成功负载于AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶上。

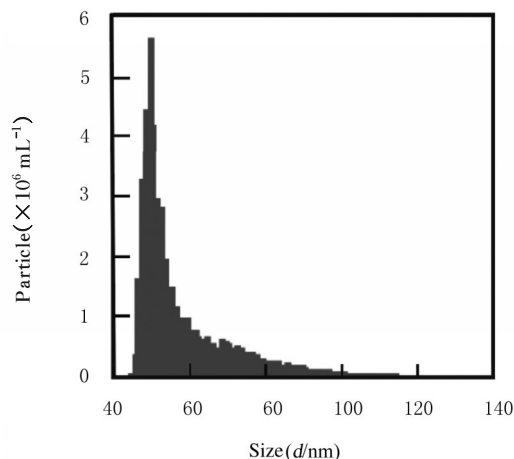
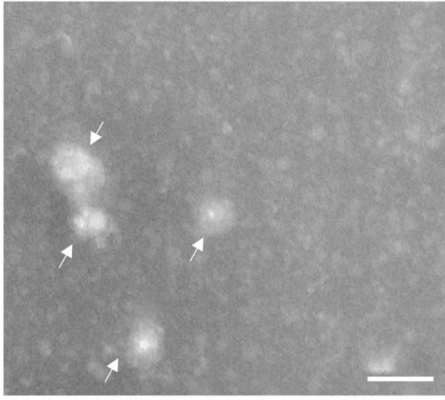


图2 MSC-Exo的粒径分布图

Fig. 2 Distribution diagram of MSC-Exo size



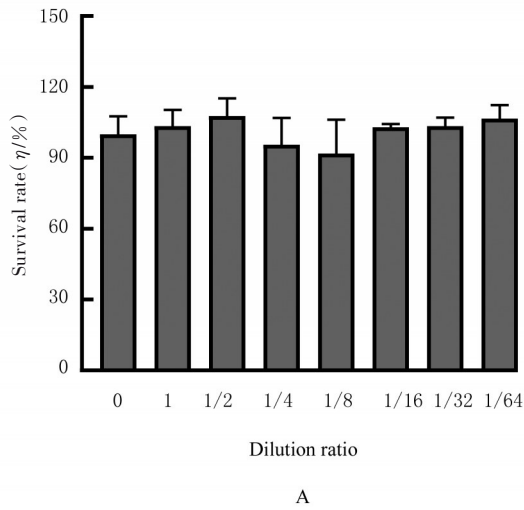
White arrow pointed to MSC-Exo.

图3 TEM下 MSC-Exo 形态表现(Bar=100 nm)

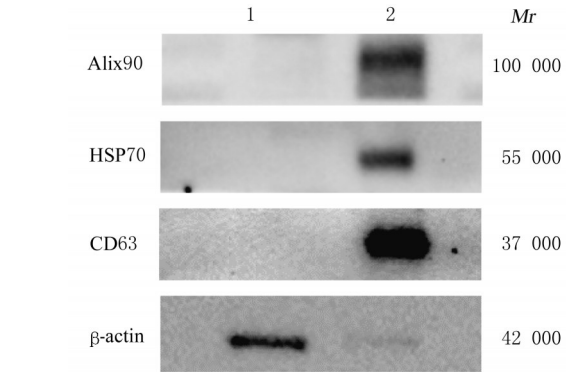
Fig. 3 Morphology of MSC-Exo under TEM(Bar=100 nm)

2.3 HA-ADH/ODex 和 AgNP/HA-ADH/ODex

水凝胶的细胞相容性 梯度稀释至不同浓度的 HA-ADH/ODex 水凝胶浸提液处理的 HaCaT 细胞存活率均大于 90%，各浓度梯度浸提液的细胞存活率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 5A)。



A

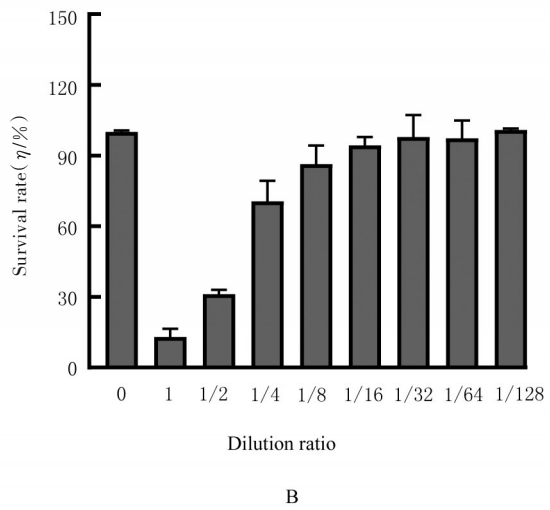


Lane 1: MSC; Lane 2: MSC-Exo.

图4 Western blotting 法检测 MSC 和 MSC-Exo 中 Alix90、HSP70 及 CD63 蛋白表达电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of expressions of Alix90, HSP70, and CD63 proteins in MSC and MSC-Exo detected by Western blotting method

AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶浸提液在稀释倍数小于 8 倍时, HaCaT 细胞存活率低于 80%，且随着稀释倍数的增加, 细胞存活率逐渐升高, 在稀释 8 倍及以上时 HaCaT 细胞存活率均大于 85% (图 5B)。



B

图5 CCK-8法检测 HA-ADH/ODex(A)和 AgNP/HA-ADH/ODex(B)水凝胶的细胞相容性

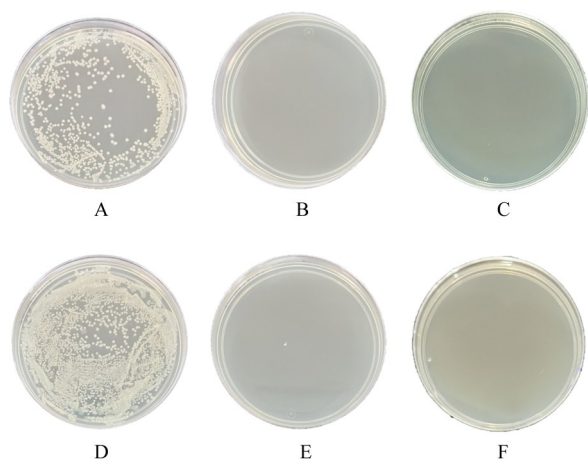
Fig. 5 Cytocompatibility of HA-ADH/ODex(A) and AgNP/HA-ADH/ODex(B) hydrogel detected by CCK-8 assay

2.4 AgNP/HA-ADH/ODex和 MSC-Exo@AgNP/

HA-ADH/ODex 水凝胶的体外抗菌率 平板涂布法检测结果显示: AgNP/HA-ADH/ODex 和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶均能够明显抑制 *E. coli* 和 *S. aureus* 生长 (图 6), 其中空白组中 *E. coli* 和 *S. aureus* 的菌落数分别为 2.53×10^7 和 3.01×10^7 CFU·mL⁻¹, 与 2 种水凝胶处理组比较差异有统计学意义 ($n=3$, $P<0.001$) (图 7A)。

AgNP/HA-ADH/ODex 和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶对 *S. aureus* 的抗菌率分别为 $(96.44 \pm 0.16)\%$ 和 $(96.62 \pm 0.16)\%$, 对 *E. coli* 的抗菌率分别为 $(95.73 \pm 0.28)\%$ 和 $(95.58 \pm 0.14)\%$ (图 7B)。

2.5 各组 HaCaT 细胞存活率 空白组、HA-ADH/ODex 水凝胶组、AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶组和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶



A-C: *E. coli*; D-F: *S. aureus*; A, D: Normal control group; B, E: AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel group; C, F: MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel group.

图6 平板涂布法评估 AgNP/HA-ADH/ODex 和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶的体外抗菌活性

Fig. 6 Antibacterial activity of AgNP/HA-ADH/ODex and MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel *in vitro* detected by spread plate method

胶组的细胞存活率分别为 $(100.00 \pm 3.02)\%$ 、 $(103.00 \pm 2.05)\%$ 、 $(78.00 \pm 3.23)\%$ 和 $(115.00 \pm 7.42)\%$ (图8)。与 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶组比较, 其他3组 HaCaT 组细胞存活率升高 ($n=3$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

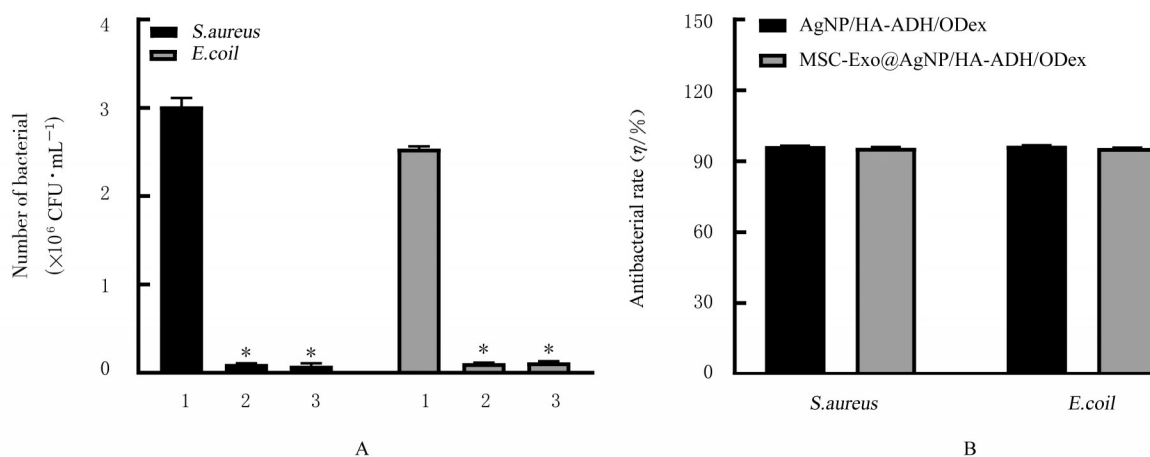
3 讨论

AgNPs 具有良好的抗菌活性, 可通过抑制细

菌 DNA 合成来阻断其繁殖, 因此能够作为一种抗菌药物应用于医疗卫生行业^[17]。AgNPs 可直接引起细菌的细胞膜、细胞壁的破坏而导致细菌死亡^[18]。因 AgNPs 可以抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 (interleukin, IL)-6 和 IL-1 β 等促炎因子的表达, 具有一定的抗炎作用^[19]。基于对 AgNPs 抗菌性能较为成熟的研究, 本课题成功制备了粒径大小均一、表面携带正电荷的 AgNPs, 将其负载于 HA-ADH/ODex 水凝胶上, 并对 *S. aureus* 和 *E. coli* 显示出优异的抗菌活性。因此, AgNPs 可以作为皮肤创伤修复治疗的理想抗菌药物。

由于 Dex 和 HA 具有良好的安全性因此被广泛应用于药物载体材料^[20]。其中, HA 是一种天然存在的无支链糖胺聚糖, 是美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的各种医疗应用配方中的常见成分^[21]。HA 作为细胞外基的重要组成部分, 在细胞分化、增殖、迁移、炎症、血管生成、组织再生、伤口愈合和癌症等多种生理及病理过程中发挥着重要作用^[22]。近年来通过不同物理或化学方法制备的透明质酸或葡聚糖基水凝胶作为 MSC-Exo 的递送载体, 被广泛用于骨关节炎疾病模型中^[23]。本研究选择具有优异生物相容性的天然多糖化合物 ODex 和 ADH 为原料, 对其进行改性并用于构建 HA-ADH/ODex 水凝胶。

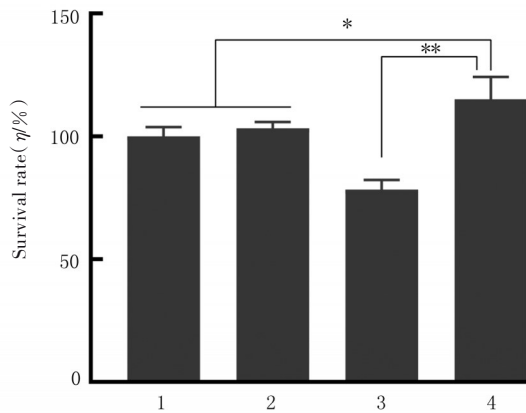
干细胞来源的 Exo 具有高安全性且易于通过细胞间通讯保存和运输, 现已成为无细胞治疗的一种



1: Normal control group; 2: AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel group; 3: MSC-Exo@AgNPS/HA-ADH/ODex hydrogel group. * $P < 0.001$.

图7 AgNP/HA-ADH/ODex 和 MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex 水凝胶的菌落数(A)及抗菌率(B)

Fig. 7 Number of bacterial (A) and antibacterial rates (B) of AgNP/HA-ADH/ODex and MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel



1: Negative control group; 2: HA-ADH/ODex hydrogel group; 3: AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel group; 4: MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex hydrogel group.

图8 各组 HaCaT 细胞存活率

Fig. 8 Survival rates of HaCaT cells in various groups

新兴方式^[24-25]。其中, MSC-Exo是从MSC释放的细胞外囊泡, 这些囊泡携带脂质、蛋白质和核酸等各种生物活性物质, 通过靶细胞内吞作用的方式进入细胞内, 参与人体的免疫反应、抗原呈递、细胞增殖和抗炎等生理过程^[26]。研究^[27]显示: Exo可通过激活信号转导和转录激活因子3 (signal transducers and activators of transcription, STAT3)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 和 Wnt/ β -连环蛋白等信号通路影响细胞增殖、胶原蛋白生成和再上皮化过程。MSC-Exo能够作用于包括控制免疫反应、抑制炎症、促进细胞增殖和血管生成以及减少伤口愈合过程中的瘢痕形成等伤口愈合的所有阶段^[28]。MSC-Exo在体内的半衰期较短, 能够快速被人体代谢^[29]。因此, 将MSC-Exo负载于合适的载药系统使其持续释放是增强MSC-Exo治疗活性的一种有效措施。如LI等^[30]构建了一种可生物降解的双敏感水凝胶负载MSC-Exo, 并持续释放, 以促进伤口愈合和皮肤再生过程。在本研究中, 通过二维培养MSC提取MSC-Exo成功提取的MSC-Exo, 其粒径大小、形貌和表面蛋白表达情况与文献^[31]一致。本课题组进一步将MSC-Exo成功负载于AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶上, 构建MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶。

本研究采用CCK-8法证实HA-ADH/ODex和AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶无明显细胞毒性, 显示出良好的细胞相容性, 且该水凝胶可以有效负载MSC-Exo和AgNPs, 是一种理想的药物载体。

此外, MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶具有促进HaCaT细胞增殖的作用, 与关于MSC-Exo促进皮肤伤口愈合的报道^[32]一致, 在一定程度上可反映其作为生物敷料促进皮肤修复的应用潜力。

综上所述, 本实验构建的HA-ADH/ODex水凝胶可有效负载AgNPs和MSC-Exo。同时, MSC-Exo@AgNP/HA-ADH/ODex水凝胶具有明显的抗菌活性和促进人表皮HaCaT细胞增殖作用, 在皮肤损伤修复方面具有广阔的应用前景。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

齐玲、滕旭和刘韬负责论文的整体设计, 刘韬和滕旭负责论文的撰写, 刘韬、傅家财和钟秤明负责论文的实验实施, 刘韬和滕旭负责数据的统计学分析。

[参考文献]

- [1] ZHU Z Y, ZHANG X N, HAO H J, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells treat cutaneous nerve damage and promote wound healing[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16:913009.
- [2] DORSCHNER R A, LEE J, COHEN O, et al. ECRG4 regulates neutrophil recruitment and CD44 expression during the inflammatory response to injury[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(11):eaay0518.
- [3] LIU P, CHOI J W, LEE M K, et al. Spirulina protein promotes skin wound repair in a mouse model of full-thickness dermal excisional wound[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(1):351-359.
- [4] DARWISH R M, SALAMA A H. Study the effect of conjugate novel ultra-short antimicrobial peptide with silver nanoparticles against methicillin resistant *S. aureus* and ESBL *E. coli*[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(8):1024.
- [5] WHITELEY J, CHOW T, ADISSU H, et al. Topical application of culture expanded CD34+ umbilical cord blood cells from frozen units accelerates healing of diabetic skin wounds in mice[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(8):591-601.
- [6] HU S Q, LI Z H, SHEN D L, et al. Exosome-eluting stents for vascular healing after ischaemic injury[J]. *Nat Biomed Eng*, 2021, 5(10):1174-1188.
- [7] JING Y S, CHENG W J, MA Y F, et al. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of a novel polysaccharide from *Zingiber officinale* and its application in synthesis of silver nanoparticles[J]. *Front*

- Nutr, 2022, 9:917094.
- [8] MICHELE A D, GUTIÉRREZ C L P, PAGANO C, et al. Formulation and characterization of sustainable bioadhesive films for wound treatment based on barley β -glucan extract obtained using the high power ultrasonic technique[J]. Int J Pharm, 2023, 638:122925.
- [9] ZAN J, SHUAI Y, ZHANG J, et al. Hyaluronic acid encapsulated silver metal organic framework for the construction of a slow-controlled bifunctional nanostructure: Antibacterial and anti-inflammatory in intrauterine adhesion repair [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 230:123361.
- [10] LIU S X, JIANG N, CHI Y Q, et al. Injectable and self-healing hydrogel based on chitosan-tannic acid and oxidized hyaluronic acid for wound healing [J]. ACS Biomater Sci Eng, 2022, 8(9):3754-3764.
- [11] SUPHASORN P, APPAMATO I, HARNCHANA V, et al. Ag nanoparticle-incorporated natural rubber for mechanical energy harvesting application[J]. Molecules, 2021, 26(9):2720.
- [12] CHEN X S, ZHANG H M, YANG X, et al. Preparation and application of quaternized chitosan-and AgNPs-base synergistic antibacterial hydrogel for burn wound healing[J]. Molecules, 2021, 26(13):4037.
- [13] ZHU Q Y, JIANG M, LIU Q, et al. Enhanced healing activity of burn wound infection by a dextran-HA hydrogel enriched with sanguinarine [J]. Biomater Sci, 2018, 6(9):2472-2486.
- [14] YU F L, GENG D Z, KUANG Z P, et al. Sequentially releasing self-healing hydrogel fabricated with TGF β 3-microspheres and bFGF to facilitate rat alveolar bone defect repair [J]. Asian J Pharm Sci, 2022, 17(3): 425-434.
- [15] QI M Y, XIA Y, WU Y J, et al. Lin28B-high breast cancer cells promote immune suppression in the lung pre-metastatic niche via exosomes and support cancer progression[J]. Nat Commun, 2022, 13(1):897.
- [16] COCKERILL I, SU Y C, SINHA S, et al. Porous zinc scaffolds for bone tissue engineering applications: a novel additive manufacturing and casting approach [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020, 110:110738.
- [17] GAO C H, CHENG H, XU N, et al. Poly(dopamine) and Ag nanoparticle-loaded TiO₂ nanotubes with optimized antibacterial and ROS-scavenging bioactivities [J]. Nanomed-Nanotechnol Biol Med, 2019, 14(7):803-818.
- [18] WANG Y C, LIN S H, CHIEN C S, et al. *In vitro* bioactivity and antibacterial effects of a silver-Containing mesoporous bioactive glass film on the surface of titanium implants[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16):9291.
- [19] STECKIEWICZ K P, CIECIÓRSKI P, BARCIŃSKA E, et al. Silver nanoparticles as chlorhexidine and metronidazole drug delivery platforms: their potential use in treating periodontitis [J]. Int J Nanomedicine, 2022, 17:495-517.
- [20] CHEN Q, YIN C, MA J, et al. Preparation and evaluation of topically applied azithromycin based on sodium hyaluronate in treatment of conjunctivitis [J]. Pharmaceutics, 2019, 11(4):183.
- [21] KIM T H, YUN Y P, SHIM K S, et al. *In vitro* anti-inflammation and chondrogenic differentiation effects of inclusion nanocomplexes of hyaluronic acid-beta cyclodextrin and simvastatin [J]. Tissue Eng Regen Med, 2018, 15(3):263-274.
- [22] WANG L Y, ZHANG D, REN Y K, et al. Injectable hyaluronic acid hydrogel loaded with BMSC and NGF for traumatic brain injury treatment [J]. Mater Today Bio, 2022, 13:100201.
- [23] SANG X H, ZHAO X H, YAN L Q, et al. Thermosensitive hydrogel loaded with primary chondrocyte-derived exosomes promotes cartilage repair by regulating macrophage polarization in osteoarthritis[J]. Tissue Eng Regen Med, 2022, 19(3): 629-642.
- [24] FARUQU F N, LIAM-OR R, ZHOU S, et al. Defined serum-free three-dimensional culture of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells yields exosomes that promote fibroblast proliferation and migration *in vitro* [J]. FASEB J, 2021, 35(1):e21206.
- [25] LIU B, KONG Y F, SHI W, et al. Exosomes derived from differentiated human ADMSC with the Schwann cell phenotype modulate peripheral nerve-related cellular functions[J]. Bioact Mater, 2022, 14:61-75.
- [26] YANG Y, PENG Y, LI Y, et al. Role of stem cell derivatives in inflammatory diseases[J]. Front Immunol, 2023, 14:1153901.
- [27] GOODARZIP, LARIJANIB, ALAVI-MOGHADAMS, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes for wound regeneration [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1119:119-131.
- [28] VU N B, NGUYEN H T, PALUMBO R, et al. Stem cell-derived exosomes for wound healing: current status and promising directions[J]. Minerva Med, 2021, 112(3): 384-400.
- [29] MAO L, LI Y D, CHEN R L, et al. Heart-targeting exosomes from human cardiosphere-derived cells

- improve the therapeutic effect on cardiac hypertrophy[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1):435.
- [30] LI Q J, GONG S Q, YAO W F, et al. Exosome loaded genipin crosslinked hydrogel facilitates full thickness cutaneous wound healing in rat animal model[J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1):884-893.
- [31] ZHANG Z X, ZHOU Y J, GU P, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate Parkinson's disease and neuronal damage through inhibition of microglia[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(10):2291-2300.
- [32] QIN D, ZHANG A D, WANG N, et al. Hydroxybutyl chitosan/oxidized glucomannan self-healing hydrogels as BMSCs-derived exosomes carriers for advanced stretchable wounds[J]. *Appl Mater Today*, 2022, 26: 101342.