

[文章编号] 1671-587X(2025)03-0621-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250307

人脂肪干细胞和人真皮成纤维细胞来源外泌体对紫外线诱导 裸鼠光老化皮肤皱纹的改善作用

迪丽达尔·地里夏提, 贾琳

(新疆医科大学第一附属医院医学整形美容中心, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:** 探讨人脂肪干细胞(hADSCs)和人真皮成纤维细胞(HDFs)来源的外泌体(Exo)对紫外线诱导裸鼠光老化皮肤皱纹的改善作用,并阐明其作用效果。**方法:** 分别由hADSCs和HDFs中分离Exo,采用Western blotting法鉴定,记为hADSCs-Exo和HDFs-Exo。将28只裸鼠随机分为对照组、模型组[注射Hank's平衡盐溶液(HBSS)]、hADSCs-Exo组(注射hADSCs-Exo)和HDFs-Exo组(注射HDFs-Exo),每组7只,除对照组外,其余3组裸鼠建立背部皮肤光老化模型,4周后,观察各组裸鼠背部皮肤大体形态表现并进行皮肤皱纹等级评分,HE染色观察各组裸鼠皮肤组织病理形态表现,酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组裸鼠皮肤组织中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法和Western blotting法检测各组裸鼠皮肤组织中胶原蛋白I(Col I)、基质金属蛋白酶(MMP)-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA及蛋白表达水平,免疫组织化学染色法观察各组裸鼠皮肤组织中Col I、原弹性蛋白和原纤维蛋白1蛋白表达情况。**结果:** 由hADSCs和HDFs中分离的颗粒物均表现为典型的囊泡状结构,直径为50~100 nm,CD81、CD63、热休克蛋白70(HSP70)和肿瘤易感基因101蛋白(TSG101)均呈高表达,表明成功分离hADSCs-Exo和HDFs-Exo。对照组裸鼠背部皮肤光滑,未见松弛或皱纹;模型组裸鼠皮肤皱纹严重,可见表皮粗糙、干燥和色素沉积等损伤情况;与模型组比较,hADSCs-Exo组裸鼠背部皮肤有少量深皱纹和轻度皮肤松弛,HDFs-Exo组裸鼠背部皮肤皱纹深度明显减轻。皮肤皱纹等级评分,与对照组比较,模型组裸鼠皮肤皱纹等级评分明显升高($P<0.05$);与模型组比较,hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤皱纹等级评分明显降低($P<0.05$);与hADSCs-Exo组比较,HDFs-Exo组裸鼠皮肤皱纹等级评分均明显降低($P<0.05$)。HE染色观察,对照组裸鼠皮肤组织分层结构清晰,表皮较薄;模型组裸鼠皮肤组织分层紊乱,结构松散,表皮明显增厚;与模型组比较,hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织病变减轻,且HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织表皮变薄,组织分层较为清晰,皮肤结构趋于正常。ELISA法检测,与对照组比较,模型组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平均明显降低($P<0.05$);与hADSCs-Exo组比较,HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均明显降低($P<0.05$)。RT-qPCR法和Western blotting法检测,与对照组比较,模型组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$),MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA及蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$);与模型组比较,hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA及蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$),MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA及蛋白表达水平均明显降低

[收稿日期] 2024-06-29 [录用日期] 2024-10-04

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金项目(2022D01C757)

[作者简介] 迪丽达尔·地里夏提(1990—),女,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人,住院医师,医学硕士,主要从事皮肤美容临床诊疗及相关基础方面的研究。

[通信作者] 贾琳,主任医师,副教授,硕士研究生导师(E-mail: 9518247@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

($P<0.05$); 与hADSCs-Exo组比较, HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA及蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。免疫组织化学染色法观察, 与对照组比较, 模型组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度均明显减弱; 与模型组比较, hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度均明显增强; 与hADSCs-Exo组比较, HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度更深。**结论:** hADSCs和HDFs来源的Exo对紫外线诱导裸鼠光老化皮肤皱纹具有明显的改善作用, 且HDFs来源的Exo作用效果要优于hADSCs来源的Exo。

[关键词] 人脂肪干细胞; 人真皮成纤维细胞; 外泌体; 光老化; 皮肤皱纹

[中图分类号] R751; R622.9 [文献标志码] A

Improvement effect of exosomes derived from human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts on ultraviolet-induced photoaging skin wrinkles in nude mice

DILIXIATI·Dilidaer, JIA Lin

(Medical Plastic Surgery Center, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the improvement effect of exosomes (Exo) derived from human adipose-derived stem cells (hADSCs) and human dermal fibroblasts (HDFs) on ultraviolet-induced skin wrinkles in photoaged nude mice, and to clarify its effect. **Methods:** The Exo were isolated from hADSCs and HDFs, respectively, and identified by Western blotting method, designated as hADSCs-Exo and HDFs-Exo. Twenty-eight nude mice were randomly divided into control group, model group [injected with Hank's balanced salt solution (HBSS)], hADSCs-Exo group (injected with hADSCs-Exo), and HDFs-Exo group (injected with HDFs-Exo), and there were 7 mice in each group. Except for control group, the other three groups were used to establish a photoaging model on the dorsal skin. After 4 weeks, the gross morphological changes of dorsal skin of the nude mice in various groups were observed, and the wrinkle severity scores were evaluated; HE staining was used to observe the pathomorphology of skin tissue of the nude mice in various groups; ELISA was used to detect the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor α (TNF- α) in skin tissue of the nude mice in various groups. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting method were used to detect the expression levels of collagen I (Col I), matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 mRNA and protein in skin tissue of the nude mice in various groups; immunohistochemical staining was used to observe the protein expression of Col I, tropoelastin, and fibrillin-1 in skin tissue of the nude mice in various groups. **Results:** The particles isolated from hADSCs and HDFs exhibited typical vesicle-like structures with diameters of 50–100 nm, and highly expressed CD81, CD63, heat shock protein 70 (HSP70), and tumor susceptibility gene 101 protein (TSG101), indicating successful isolation of hADSCs-Exo and HDFs-Exo. The dorsal skin of the nude mice in control group was smooth without looseness or wrinkles, while severe wrinkles, rough epidermis, dryness, and pigmentation were observed in model group. Compared with model group, the dorsal skin of the nude mice in hADSCs-Exo group showed fewer deep wrinkles and mild looseness, whereas the wrinkles in HDFs-Exo group were significantly alleviated compared with control group, the wrinkle severity score in model group was significantly increased ($P<0.05$), compared with model group, the wrinkle severity scores of the mice

in hADSCs-Exo and HDFs-Exo groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with hADSCs-Exo group, the wrinkle severity score of the mice in HDFs-Exo group was decreased ($P < 0.05$). The HE staining results showed that clear skin tissue stratification and thin epidermis in control group, while disordered structure, loose arrangement, and thickened epidermis were observed in model group. Compared with model group, the skin lesions in hADSCs-Exo and HDFs-Exo groups were alleviated, with thinner epidermis, clearer stratification, and normalized structure in HDFs-Exo group. The ELISA results showed that compared with control group, the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in skin tissue of the mice in model group were significantly increased ($P < 0.05$), and compared with model group, the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in skin tissue of the mice in hADSCs-Exo and HDFs-Exo groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with hADSCs-Exo group, the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in skin tissue of the mice in HDFs-Exo group were decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR and Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of Col I mRNA and protein in skin tissue of the mice in model group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the levels of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the expression levels of Col I in skin tissue of the mice in hADSCs-Exo and HDFs-Exo groups were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with hADSCs-Exo group, the expression levels of Col I in skin tissue of the mice in HDFs-Exo group were increased ($P < 0.05$), while the levels of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 were further decreased ($P < 0.05$). The immunohistochemical staining results showed that compared with control group the staining intensities of tropoelastin, fibrillin-1, and Col I in skin tissue of the mice in model group were significantly weakened, and compared with model group, the staining intensities of tropoelastin, fibrillin-1, and Col I in hADSCs-Exo and HDFs-Exo groups were enhanced. Compared with hADSCs-Exo group, the staining intensities in HDFs-Exo group were stronger. **Conclusion:** The Exo derived from hADSCs and HDFs significantly improve ultraviolet-induced skin wrinkles in the photoaged nude mice, with HDFs-Exo exhibiting superior effects compared with hADSCs-Exo.

KEYWORDS Human adipose-derived stem cells; Human dermal fibroblasts; Exosomes; Photoaging; Skin wrinkle

皮肤老化可分为内源性老化和外源性老化, 由遗传因素控制的程序性老化过程为内源性老化或称自然老化, 随时间而发展, 具有不可抗性; 由环境因素引起的老化为外源性老化, 其中最主要的是由紫外线反复照射造成的皮肤老化, 即光老化^[1]。光老化主要表现为暴露部位皮肤松弛、干燥粗糙、皱纹加深、色素沉着和血管扩张等, 皱纹作为皮肤老化最明显的外在特征, 其一旦形成将难以平复, 严重影响皮肤外观^[2]。临床上常采用肉毒素注射、激光和皮肤填充手术等方式进行治疗, 但任何一种单独的方法均难以取得满意的疗效, 临床上需要根据患者的皮肤特点和具体病情选择合适的治疗方案^[3-4]。因此, 需要开发新的方法抑制皮肤光老化和减轻皮肤皱纹, 从而改善光老化皮肤的表现形态。

外泌体 (exosome, Exo) 是一种具有磷脂双分子层膜结构的囊泡, 直径为 30~150 nm, 其可通

过直接接触、内分泌或旁分泌的方式将内含的生物活性物质选择性地传递至靶细胞, 实现细胞间信号分子的传递^[5]。研究^[6]表明: Exo在治疗皮肤光老化方面具有较大潜力, 其可以作为修复、再生和恢复皮肤组织活性的新治疗选择。人脂肪干细胞 (human adipose-derived stem cells, hADSCs) 是从脂肪组织中分离得到的一种细胞, 因其具有多能性、自我更新和促进再生细胞因子分泌的能力而备受关注。人真皮成纤维细胞 (human dermal fibroblasts, HDFs) 是皮肤真皮组织中的主要细胞, 可以产生丰富的胶原蛋白 (collagen, Col) 和细胞因子, 也是皮肤光老化的主要影响靶标。研究^[7-8]显示: hADSCs和HDFs来源的Exo对皮肤光老化均能起到保护作用, 但相关作用机制及二者的作用效果是否存在差异尚未明确。本研究通过比较hADSCs和HDFs来源Exo对紫外线诱导裸鼠光

老化皮肤皱纹的改善效果,分析2种细胞来源的Exo在治疗皮肤光老化中的疗效差异,为Exo在治疗皮肤光老化中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 28只BALB/c裸鼠,SPF级,雄性,6周龄,购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2022-0002,所有实验动物适应性饲养1周后开始正式实验。hADSCs和HDFs(美国ScienCell公司)。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(上海康朗生物公司),DMEM培养基(美国Gibco公司),Exo提取试剂盒(上海贝博生物公司),RIPA蛋白裂解液(北京中杉金桥生物公司),ECL试剂液(南京诺唯赞生物公司),白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(北京欣博盛生物公司),TRIzol试剂(美国Sigma公司),反转录试剂盒和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)试剂盒(北京聚合美生物公司),HE染色试剂盒、DAB染色液和中性树胶(北京中杉金桥生物公司),抗体CD81、CD63、热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)、肿瘤易感基因101蛋白(tumor susceptibility gene 101 protein, TSG101)、Col I、基质金属蛋白酶(matrix metalloprotease, MMP)-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13(美国Abmart公司),抗体 β -actin(美国Abcam公司),抗体原弹性蛋白和原纤维蛋白1(美国Proteintech公司)。BPN-50CH培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),ZetaView纳米颗粒跟踪分析仪(德国Particle Metrix公司),BV-2垂直电泳仪(武汉塞维尔生物科技公司),Tanon 5200化学发光仪(上海天能科技有限公司),CKX53倒置光学显微镜(日本Nikon公司),Infinite F50酶标仪(瑞士Tecan公司),CFX96 RT-qPCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 hADSCs和HDFs来源Exo的提取及鉴定

hADSCs和HDFs分别置于含10% FBS的DMEM培养基中,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养,待细胞融合至约80%时进行传代培养。将hADSCs和HDFs的上清液分别收集于离心管,4 500 r \cdot min⁻¹离心15 min,去除上清液中的死

胞,再以12 000 r \cdot min⁻¹离心20 min,去除上清液中的细胞碎片。将上清收集于干净离心管,取Exo提取液A加入上清中,涡旋混匀,4 $^{\circ}$ C静置过夜。次日,12 000 r \cdot min⁻¹离心60 min,弃上清,获取沉淀,吸取Exo保存液B重悬沉淀,获得Exo溶液,保存于-20 $^{\circ}$ C环境中。将分离的hADSCs和HDFs来源的Exo溶液滴于铜网上,室温静置孵育10 min,吸干边缘残留液体,滴上2%磷钨酸复染5 min,于白炽灯下烘干,透射电镜下观察并拍照。采用纳米颗粒跟踪分析仪测定Exo的粒径分布,使用标准品对仪器进行校准,注射器吸取待测Exo样品进行上机测定。Exo在电镜下呈现典型的双层膜囊泡状结构,直径为30~150 nm,表达CD81、CD63、HSP70和TSG101等特定表面蛋白。

1.3 Western blotting法检测Exo标志蛋白CD81、CD63、HSP70和TSG101表达情况 将新鲜RIPA总蛋白裂解液加入至Exo中,提取总蛋白。将蛋白与Buffer缓冲液混匀,煮沸10 min,获得变性后的蛋白。将变性后的蛋白通过凝胶电泳分离,并转至PVDF膜上,再将膜浸入5%脱脂奶粉中,室温处理1 h。在4 $^{\circ}$ C下将膜与稀释后的特异性一抗共置于4 $^{\circ}$ C孵育过夜,Exo检测中使用的一抗分别为CD81(1:1 000)、CD63(1:1 000)、HSP70(1:1 000)、TSG101(1:1 000),再将膜与稀释后的二抗(1:1 000)于室温下孵育2 h,ECL显影,观察蛋白条带明暗程度,条带亮度增加表明蛋白表达增强。

1.4 裸鼠皮肤光老化模型的制备及分组处理 将28只裸鼠随机分为4组,每组7只,分别为对照组、模型组、hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组。除对照组外,其余3组裸鼠均建立背部皮肤光老化模型,将裸鼠用自制设备固定,暴露背部5 cm \times 5 cm面积,其余部位遮挡防护;设置裸鼠的最小红斑剂量(minimal erythema dose, MED)为150 mJ \cdot (cm \times cm)⁻¹,使用4盏户外紫外线(ultraviolet radiation b, UVB)灯[TL20W/12RS;紫外线B(290~320 nm)]照射背部,每周6次,共6周。对各组裸鼠进行不同的处理,模型组用0.5 mL Hank's平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS)注射至裸鼠背部皮肤皱纹中;hADSCs-Exo组裸鼠用0.5 mL ADSCs-Exos(浓度为20 mg \cdot L⁻¹)注射至裸鼠背部皮肤皱纹中;HDFs-Exo组裸鼠用0.5 mL HDFs-Exo(浓度为20 mg \cdot L⁻¹)注射至裸鼠背部

皮肤皱纹中。注射深度为皮内和皮下, 注射4周后比较造模结果。本研究动物实验通过本院伦理委员会审核批准(伦理审批号: 20230315-09)。

1.5 各组裸鼠背部皮肤大体形态表现及皮肤皱纹等级评分 每日照射前观察裸鼠背部皮肤状况, 出现局部增厚、松弛、深皱纹和色泽晦暗等光老化表征, 表明模型构建成功。取材前, 对各组裸鼠背部皮肤拍照, 并按照参考文献[9]中的方法, 对皮肤皱纹等级进行评分: 0分, 皮肤上为正常细小皮纹; 1分, 皮肤上可见少量横向浅皱纹; 2分, 皮肤上有部分横向粗糙皱纹; 3分, 皮肤上有大量横向粗糙皱纹, 且持续存在。评分结果取平均值。

1.6 HE染色观察各组裸鼠皮肤组织病理形态表现 采集裸鼠皮肤组织, 投入甲醛溶液中固定, 修剪、脱水和透明, 浸蜡后包埋, 切片机上切为5 μm 厚度的组织切片。石蜡切片脱蜡至水, 进行HE染色, 按照试剂盒说明书操作, 染色后用中性树胶封片, 光学显微镜观察并采集图像。

1.7 ELISA法检测各组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平 在皮肤组织中加入适量磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS), 超声破碎仪将其充分匀浆, 2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 收集上清液, 采用ELISA法检测各组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平, 按照试剂盒说明书操作, 绘制标准曲线, 计算各细胞因子水平。

1.8 RT-qPCR法检测各组裸鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA表达水平 取裸鼠皮肤组织剪碎后置于无菌离心管中, 加入TRIzol充分匀浆, 提取总RNA, 反转录合成cDNA。按照RT-qPCR扩增试剂盒说明书操作, 配制反应体系, 混匀后, 在仪器上设定扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min预变性, 循环1次; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 循环40次。采集熔解曲

线, 收集各组Ct值, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因mRNA表达水平。引物序列见表1。

1.9 Western blotting法检测各组小鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13蛋白表达水平 将新鲜RIPA总蛋白裂解液加入至皮肤组织中, 提取总蛋白。皮肤组织检测中使用的一抗分别为Col I (1:1 000)、MMP-1 (1:1 000)、MMP-2 (1:1 000)、MMP-3 (1:1 000)、MMP-9 (1:500)和MMP-13 (1:500)。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin作为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.10 免疫组织化学染色法检测各组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I表达情况 将皮肤组织石蜡切片脱蜡至水, 加3% H_2O_2 覆盖切片, 室温孵育10 min, 置于PBS缓冲液中浸泡, 微波炉加热修复抗原, 用10%正常山羊血清封闭, 室温孵育10 min。滴加稀释后的一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。PBS缓冲液冲洗, 滴加适量生物素标记二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min。PBS缓冲液冲洗, 辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, PBS缓冲液洗涤, 加入DAB显色剂显色后, 自来水充分冲洗, 苏木精复染, 脱水透明, 中性树胶封片, 在光学显微镜下观察并采集图像。

1.11 统计学分析 采用SPSS 23.0统计软件进行统计学分析, GraphPad Prism 8.0软件绘制图像。各组裸鼠背部皮肤皱纹等级评分, 各组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平, 各组裸鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA及蛋白表达水平均符合正态分布, 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, 组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 基因引物序列

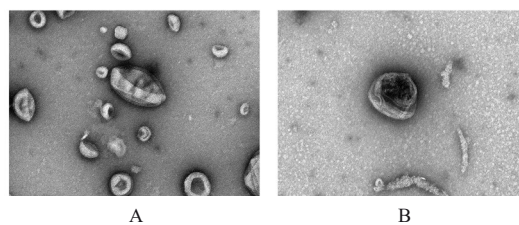
Tab. 1 Primer sequences of genes

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
Col I	CCAGCCGCAAAGAGTCTACA	GGGTCCCTCGACTCCTACAT
MMP-1	AGCTATGAAGAAGCCCAGGTG	TCCTCATTGTTGTCGGTCCA
MMP-2	TTTCCGCTGCATCCAGACTT	GGGAAGTTGATGATGGGCGA
MMP-3	TGCATGACAGTGCAAGGGAT	TGTCTTGGCAAATCCGGTGT
MMP-9	GAGAAGGGTTCAGGTGGCAA	ACTCAGAGCAGTCAAGGGAC
MMP-13	ACAGTTGACAGGCTCCGAGA	AAAAGCGTGTGCCAGAAGAC
β -actin	ACGATATCGCTGCGCTGG	CACGGTTGGCCTTAGGGTTC

2 结果

2.1 hADSCs和HDFs来源Exo鉴定 透射电镜观察结果显示:由hADSCs和HDFs中分离的颗粒物均表现为典型的双层膜囊泡状结构,直径为50~100 nm,Exo标记蛋白CD81、CD63、HSP70和TSG101均呈高表达,表明成功分离hADSCs和HDFs来源的Exo,分别记为hADSCs-Exo和HDFs-Exo。见图1~3。

2.2 各组裸鼠背部皮肤大体形态表现和皮肤皱纹等级评分 对照组裸鼠背部皮肤光滑,未见松弛或皱纹;模型组裸鼠背部皮肤皱纹严重,可见表皮粗糙、干燥和色素沉积等损伤情况;与模型组比较,hADSCs-Exo组裸鼠背部皮肤有少量深皱纹和轻度皮肤松弛,HDFs-Exo组裸鼠背部皮肤皱纹深度明显减轻。与对照组比较,模型组裸鼠皮肤皱纹等级

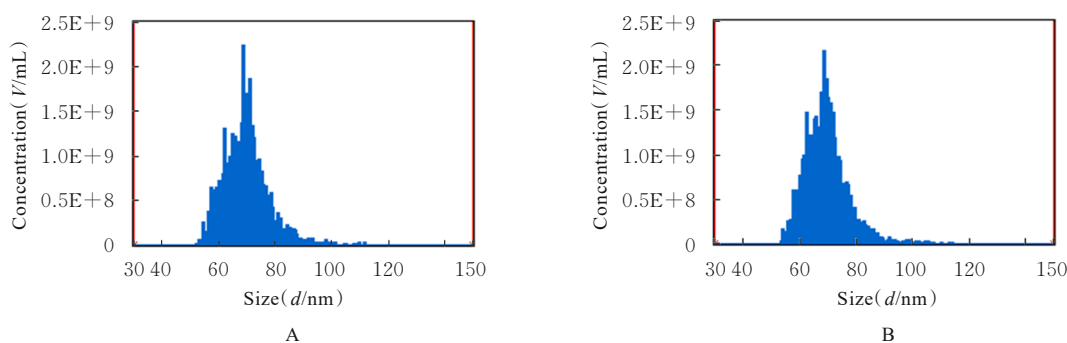


A:hADSCs-Exo; B:HDFs-Exo.

图1 透射电镜观察Exo形态表现($\times 20\,000$)

Fig. 1 Morphology of Exo observed by transmission electron microscope($\times 20\,000$)

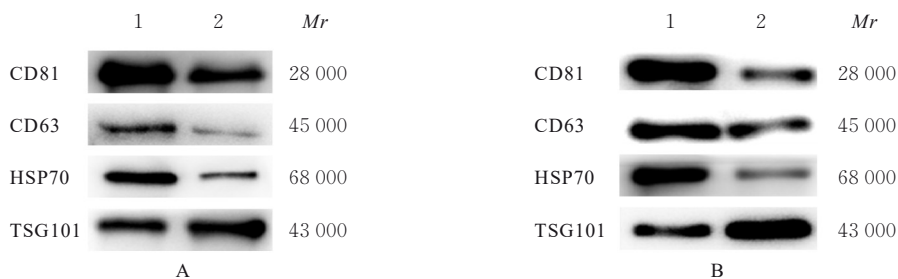
评分明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤皱纹等级评分均明显降低 ($P < 0.05$);与hADSCs-Exo组比较,HDFs-Exo组裸鼠皮肤皱纹等级评分明显降低 ($P < 0.05$)。见图4和5。



A:hADSCs-Exo; B:HDFs-Exo.

图2 纳米颗粒跟踪分析仪测定Exo直径

Fig. 2 Diameter of Exo analyzed by nanoparticle tracking analyzer



A:hADSCs(Lane 1: hADSCs-Exo; Lane 2: hADSCs); B:HDFs(Lane 1: HDFs-Exo; Lane 2: HDFs).

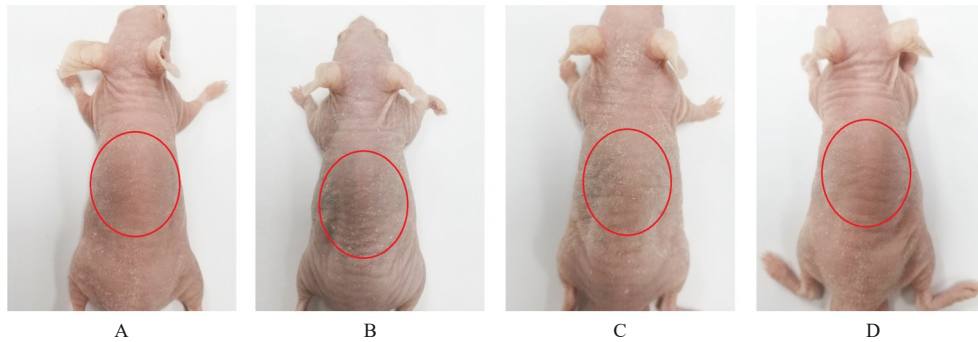
图3 Western blotting法检测hADSCs和HDFs中Exo标志蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of Exo marker proteins in hADSCs and HDFs detected by Western blotting method

2.3 各组裸鼠皮肤组织病理形态表现 对照组裸鼠皮肤组织分层结构清晰,表皮较薄;模型组裸鼠皮肤组织分层紊乱,结构松散,表皮明显增厚;与模型组比较,hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织病变减轻,且HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织

表皮变薄,组织分层较为清晰,皮肤结构趋于正常。见图6。

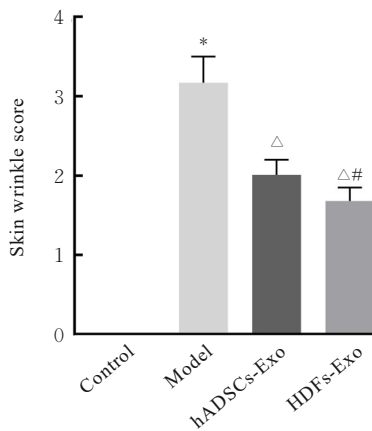
2.4 各组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平 与对照组比较,模型组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.05$);与模



Red circle represented damaged skin area. A: Control group; B: Model group; C: hADSCs-Exo group; D: HDFs-Exo group.

图4 各组裸鼠背部皮肤外观形态表现

Fig. 4 Morphology of back skin of nude mice in various groups



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with model group; $\Delta\# P < 0.05$ compared with hADSCs-Exo group.

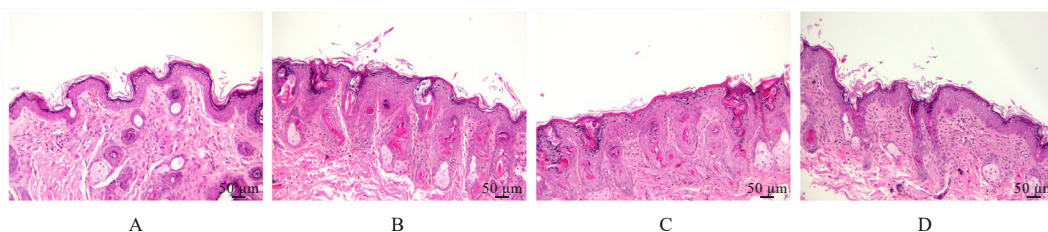
图5 各组裸鼠皮肤皱纹等级评分

Fig. 5 Skin wrinkle severity scores of nude mice in various groups

型组比较, hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平均明显降低

($P < 0.05$); 与hADSCs-Exo组比较, HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见表2。

2.5 各组裸鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA表达水平 与对照组比较, 模型组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA表达水平明显降低 ($P < 0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA表达水平明显升高 ($P < 0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA表达水平均明显降低 ($P < 0.05$); 与hADSCs-Exo组比较, HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA表达水平明显升高 ($P < 0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见表3。



A: Control group; B: Model group; C: hADSCs-Exo group; D: HDFs-Exo group.

图6 各组裸鼠皮肤组织病理形态表现(HE)

Fig. 6 Pathomorphology of skin tissue of nude mice in various groups(HE)

2.6 各组裸鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13蛋白表达水平 与对照组比较, 模型组裸鼠皮肤组织中Col I蛋白表

达水平明显降低 ($P < 0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, hADSCs-Exo组

表2 各组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平Tab. 2 Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in skin tissue of nude mice in various groups [$n=6$, $\bar{x}\pm s$, $\rho_{\text{B}}/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$]

Group	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Control	76.54 \pm 7.98	86.73 \pm 8.70	34.60 \pm 3.55
Model	116.83 \pm 12.75*	164.14 \pm 16.73*	124.34 \pm 13.17*
hADSCs-Exo	97.30 \pm 9.93 Δ	130.28 \pm 13.52 Δ	84.56 \pm 8.66 Δ
HDFs-Exo	84.59 \pm 8.61 Δ #	103.69 \pm 11.56 Δ #	65.62 \pm 6.32 Δ #

* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with hADSCs-Exo group.

表3 各组裸鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA表达水平

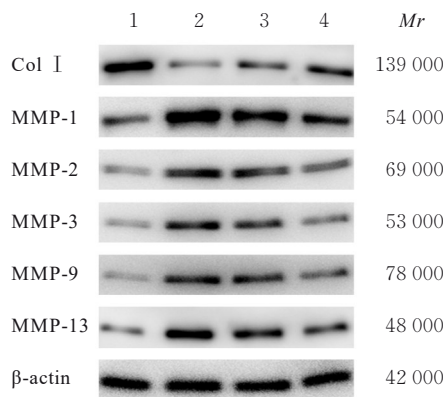
Tab. 3 Expression levels of Col I, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 mRNA in skin tissue of nude mice in various groups ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Col I	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13
Control	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.12
Model	0.23 \pm 0.03*	3.69 \pm 0.38*	3.11 \pm 0.32*	4.23 \pm 0.44*	3.37 \pm 0.34*	2.99 \pm 0.31*
hADSCs-Exo	0.62 \pm 0.05 Δ	3.04 \pm 0.28 Δ	2.87 \pm 0.29 Δ	2.73 \pm 0.28 Δ	2.93 \pm 0.30 Δ	2.23 \pm 0.24 Δ
HDFs-Exo	0.80 \pm 0.09 Δ #	1.59 \pm 0.17 Δ #	2.20 \pm 0.24 Δ #	1.97 \pm 0.20 Δ #	2.11 \pm 0.23 Δ #	1.38 \pm 0.15 Δ #

* $P<0.05$ compared with control group; $\Delta P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with hADSCs-Exo group.

和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$); 与hADSCs-Exo组比较, HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I蛋白表达水平明显升高($P<0.05$), MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。见图7和表4。

2.7 各组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I蛋白表达情况 与对照组比较, 模型组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度均明显减弱; 与模型组比较, hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度均明显增强; 与hADSCs-Exo组比较, HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度更深。见图8。



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: hADSCs-Exo group; Lane 4: HDFs-Exo group.

图7 各组裸鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13蛋白表达电泳图

Fig. 7 Electrophoregram of expressions of Col I, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 proteins in skin tissue of nude mice in various groups

3 讨论

与干细胞比较, Exo具有易保存、易运输、稳定性好和可通过血脑屏障等优势, 规避了干细胞移植治疗中免疫系统排斥及致瘤等风险, 现已成为抗衰和皮肤再生的研究热点^[10]。研究^[11]表明: Exo可预防紫外线造成的皮肤组织损伤, 促进真皮弹性纤维再生, 增强光老化皮肤的真皮厚度, 减少炎症和皱纹生成。目前, 已有不同细胞来源的Exo在皮肤光老化的治疗中取得了明显效果。在光老化皮肤大鼠模型中, 注射hADSCs来源的Exo治疗可明显降低光老化皮肤的表皮厚度, 增加真皮厚度, 对皮肤光损伤起到改善作用^[12]; 将HDFs来源的Exo注射在紫外线照射小鼠背部皮肤组织后, 皱纹形成数量减少且皱纹明显变浅, 改善了皮肤炎症和衰老^[13]; 骨髓间充质干细胞来源的Exo能够消除紫外线辐射

表4 各组裸鼠皮肤组织中Col I、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of Col I, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, and MMP-13 proteins in skin tissue of nude mice in various groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Col I	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9	MMP-13
Control	0.99±0.10	1.12±0.09	1.11±0.11	0.99±0.10	1.03±0.09	1.00±0.12
Model	0.24±0.02*	2.92±0.31*	4.19±0.43*	4.31±0.45*	4.65±0.48*	5.09±0.52*
hADSCs-Exo	0.39±0.04 [△]	2.43±0.25 [△]	3.63±0.37 [△]	2.72±0.28 [△]	3.52±0.37 [△]	4.40±0.46 [△]
HDFs-Exo	0.60±0.07 ^{△#}	1.76±0.17 ^{△#}	2.60±0.27 ^{△#}	1.50±0.16 ^{△#}	2.34±0.25 ^{△#}	3.31±0.35 ^{△#}

* $P<0.05$ compared with control group; [△] $P<0.05$ compared with model group; [#] $P<0.05$ compared with hADSCs-Exo group.

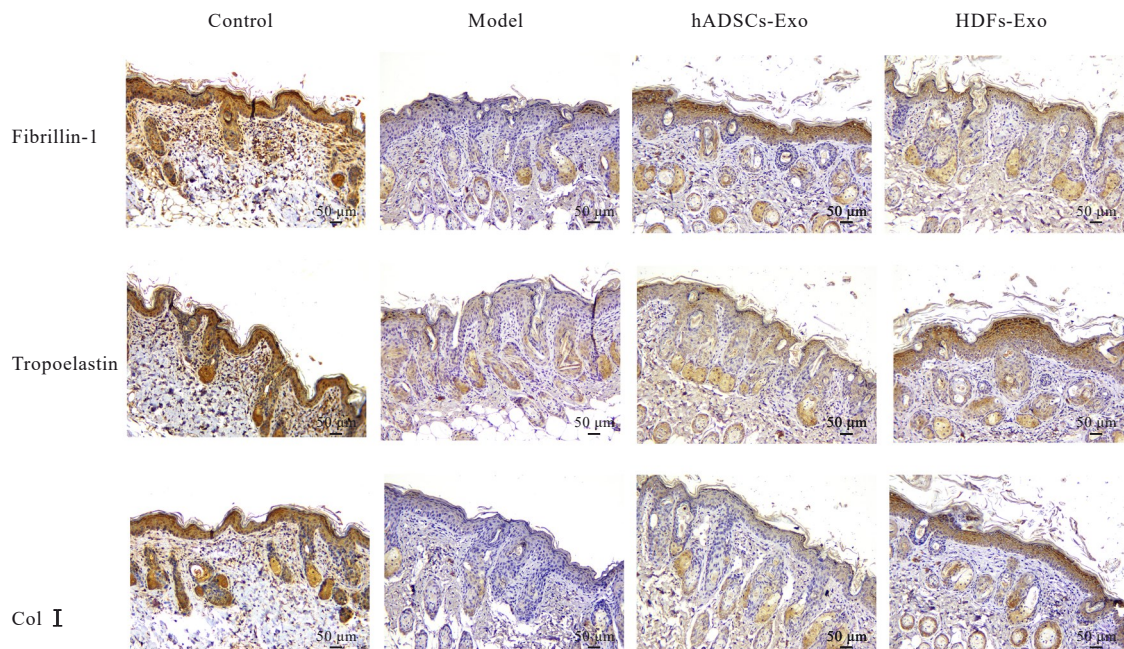


图8 各组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I蛋白表达情况(免疫组织化学染色)

Fig. 8 Expressions of tropoelastin, fibrillin-1, and Col I in skin tissue of nude mice in various groups (Immunohistochemistry)

诱导的人真皮成纤维细胞损伤, 抑制氧化应激和炎症, 减轻皮肤光老化^[14]。然而, 不同细胞来源的Exo在皮肤光老化患者治疗中是否存在疗效需进一步探索。本研究结果显示: hADSCs和HDFs来源的Exo均能够改善裸鼠皮肤皱纹, 减轻皮肤组织损伤, 但与hADSCs来源的Exo比较, HDFs来源的Exo对裸鼠皮肤皱纹及损伤的改善效果更加明显。

研究^[15-16]表明: 炎症参与皮肤光老化过程。紫外线照射会激活皮肤炎症状态, 并增加一系列促炎细胞因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α)的表达, 引起皮肤瘙痒或疼痛感, 导致皮肤皱纹形成, 加速皮肤光老化^[17]。IL-1 β 、IL-6和TNF- α 是皮肤老化病理机制中的重要细胞因子, 因此降低相关促炎细胞因子水平有利于修复皮肤损伤。 α 紫罗兰酮处

理紫外线诱导的人表皮角质形成细胞后, 可降低细胞中IL-1 β 、IL-6、IL-8和TNF- α 水平, 并抑制细胞内活性氧增加, 从而改善紫外线介导的光老化和屏障功能障碍^[18]。蛋白酶激活受体2(protease-activated receptor 2, PAR2)在皮肤光老化过程中通过诱导活性氧介导的炎症反应加速皮肤老化, 敲除或抑制PAR2表达能够抑制角质形成细胞中IL-6和IL-1 β 的释放, 改善皮肤局部炎症^[19]。本研究结果显示: 与模型组比较, hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平降低, HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平较hADSCs-Exo组更低。由此可见, HDFs来源的Exo对裸鼠光老化皮肤皱纹改善效果与其较强的炎症抑制作用有关。

MMP是依赖于钙离子或锌离子等金属离子的内肽酶,由皮肤组织中角质形成细胞和真皮成纤维细胞分泌。紫外线辐射可激活MMP并导致其分泌增加,降解基底膜和细胞外基质(extracellular matrix, ECM),促进Col流失,从而导致皮肤出现松弛和皱纹等老化改变,是皮肤光老化相关的主要机制之一^[20]。MMP-1和MMP-13属于胶原酶,是降解Col I和Col III的主要蛋白酶;MMP-2和MMP-9属于明胶酶,可降解Col IV、部分蛋白聚糖和层黏连蛋白并降解MMP-1产生的胶原蛋白片段;MMP-3属于一种溶基质蛋白酶,不仅降解Col III、Col IV、蛋白聚糖和纤连蛋白,也可激活MMP-1和MMP家族其他成员^[21]。因此,抑制MMP的表达和活性是防止皮肤光损伤的策略之一,能够有效减少皱纹的形成。本研究结果显示:与模型组比较,hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA及蛋白表达上调,MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA及蛋白表达下调;此外,与hADSCs-Exo组比较,HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中Col I mRNA和蛋白表达上调,MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13 mRNA及蛋白表达下调。原弹性蛋白和原纤维蛋白1是弹性纤维的核心成分,而弹性纤维对于维持皮肤弹性和柔软性至关重要。在光老化皮肤组织中,原弹性蛋白和原纤维蛋白1表达降低会使弹性蛋白与微原纤维分离,使得弹性纤维更易被MMP降解,加速皱纹的形成^[22]。本研究结果显示:hADSCs-Exo组和HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度明显高于模型组,HDFs-Exo组裸鼠皮肤组织中原弹性蛋白、原纤维蛋白1和Col I染色强度明显高于hADSCs-Exo组。提示HDFs来源的Exo可抑制多种MMP表达,并提高Col I、原弹性蛋白和原纤维蛋白1的表达,改善裸鼠光老化皮肤皱纹,修复皮肤光损伤。

综上所述,hADSCs和HDFs来源的Exo通过减少紫外线辐射诱导的裸鼠皮肤组织中IL-1 β 、IL-6及TNF- α 水平,降低MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9和MMP-13水平,促进Col I、原弹性蛋白和原纤维蛋白1表达,从而改善皮肤皱纹、减轻皮肤光损伤,且HDFs来源的Exo对裸鼠光老化皮肤皱纹的改善效果相较于hADSCs来源的Exo更佳。

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:

迪丽达尔·地里夏提参与研究设计和论文撰写,贾琳参与研究指导和论文审核。

[参考文献]

- [1] BERRY K, HALLOCK K, LAM C. Photoaging and topical rejuvenation [J]. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 2022, 30(3): 291-300.
- [2] SALMINEN A, KAARNIRANTA K, KAUPPINEN A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin [J]. *Inflamm Res*, 2022, 71(7/8): 817-831.
- [3] CALVO M J, NAVARRO C, DURÁN P, et al. Antioxidants in photoaging: from molecular insights to clinical applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(4): 2403.
- [4] 唐秋月,车启蕾,瓦庆彪.皮秒激光治疗面部光老化的应用进展[J].*中国医疗美容*, 2022, 12(10): 91-95.
- [5] ARYA S B, COLLIE S P, PARENT C A. The ins-and-outs of exosome biogenesis, secretion, and internalization [J]. *Trends Cell Biol*, 2024, 34(2): 90-108.
- [6] HAJIALIASGARY NAJAFABADI A, SOHEILIFAR M H, MASOUDI-KHORAM N. Exosomes in skin photoaging: biological functions and therapeutic opportunity [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 32.
- [7] NGUYEN D D N, VU D M, VO N, et al. Skin rejuvenation and photoaging protection using adipose-derived stem cell extracellular vesicles loaded with exogenous cargos [J]. *Skin Res Technol*, 2024, 30(2): e13599.
- [8] PARK A Y, LEE J O, JANG Y, et al. Exosomes derived from human dermal fibroblasts protect against UVB-induced skin photoaging [J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52(6): 120.
- [9] 王倩,万品文,曹丽楠,等.人参皂苷Rb1对小鼠皮肤光老化氧化应激的改善作用[J].*广州中医药大学学报*, 2021, 38(11): 2479-2484.
- [10] ZHOU C C, ZHANG B Y, YANG Y Q, et al. Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 107.
- [11] VYAS K S, KAUFMAN J, MUNAVALLI G S, et al. Exosomes: the latest in regenerative aesthetics [J]. *Regen Med*, 2023, 18(2): 181-194.

- [12] LIANG J X, LIAO X, LI S H, et al. Antiaging properties of exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells in photoaged rat skin [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 6406395.
- [13] HU S Q, LI Z H, CORES J, et al. Needle-free injection of exosomes derived from human dermal fibroblast spheroids ameliorates skin photoaging [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(10): 11273-11282.
- [14] YAN T T, HUANG L N, YAN Y L, et al. MAPK/AP-1 signaling pathway is involved in the protection mechanism of bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes against ultraviolet-induced photoaging in human dermal fibroblasts [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2023, 36(2): 98-106.
- [15] ZHANG Q, QIAO S Y, YANG C S, et al. Nuclear factor-kappa B and effector molecules in photoaging [J]. *Cutan Ocul Toxicol*, 2022, 41(2): 187-193.
- [16] TANG S C, HSIAO Y P, KO J L. Genistein protects against ultraviolet B-induced wrinkling and photoinflammation in *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Genes Nutr*, 2022, 17(1): 4.
- [17] 孙在崢, 曹惠妍, 马伟, 等. 十精丸对光老化大鼠皮肤LCs及炎症因子水平影响的研究[J]. *中国美容医学*, 2024, 33(2): 51-55.
- [18] GENG R X, KANG S G, HUANG K L, et al. α -Ionone protects against UVB-induced photoaging in epidermal keratinocytes [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 15(1): 132-138.
- [19] BANG E, KIM D H, CHUNG H Y. Protease-activated receptor 2 induces ROS-mediated inflammation through Akt-mediated NF- κ B and FoxO6 modulation during skin photoaging [J]. *Redox Biol*, 2021, 44: 102022.
- [20] CUI B N, WANG Y, JIN J H, et al. Resveratrol treats UVB-induced photoaging by anti-MMP expression, through anti-inflammatory, antioxidant, and antiapoptotic properties, and treats photoaging by upregulating VEGF-B expression [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6037303.
- [21] PITTAYAPRUEK P, MEEPHANSAN J, PRAPAPAN O, et al. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 868.
- [22] LOCKHART-CAIRNS M P, NEWANDEE H, THOMSON J, et al. Transglutaminase-mediated cross-linking of tropoelastin to fibrillin stabilises the elastin precursor prior to elastic fibre assembly [J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(21): 5736-5751.