

# 小肠黏膜下层处理的间充质干细胞片促进伤口愈合

沈飞飞,李栋,刘玲红,鞠秀丽

(山东大学齐鲁医院儿科,山东 济南 250012)

**摘要:**目的 探讨细胞外基质(extracellular matrix, ECM),尤其是小肠黏膜下层(small intestinal submucosa, SIS)处理后的脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)细胞片对伤口愈合的影响。方法 使用组织块贴壁法从脐带组织中分离、培养原代 UC-MSCs。化学脱核法制备脱细胞 SIS,通过物理粘附方式将重组人纤维连接蛋白(recombinant human fibronectin, rFN)、SIS 和基质胶(Matrigel)固定在聚苯乙烯(polystyrene, PS)细胞培养皿表面。分析 PS 表面、rFN-PS 表面、SIS-PS 表面以及 Matrigel-PS 表面对 UC-MSCs 形态的影响,RT-PCR 法检测基因表达的变化,使用纳米颗粒追踪分析检测细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)分泌情况的改变。分别用无 ECM 处理的、rFN 处理的、SIS 处理的以及 Matrigel 处理的 UC-MSCs 细胞片治疗大鼠皮肤全层切除创面,通过计算伤口面积占原始伤口面积的比值进一步验证治疗效果。结果 与 PS 表面相比,SIS-PS 表面培养的 UC-MSCs 形态未受影响( $P>0.05$ );RT-PCR 检测结果显示,SIS-PS 表面培养的 UC-MSCs 中 NANOG 同源框(nanog homeobox, NANOG,  $P=0.041$ )、SRY-Box 转录因子-2(SRY-box transcription factor 2, SOX-2,  $P=0.009$ )、八聚体结合转录因子-4(octamer-binding transcription factor-4, OCT-4,  $P<0.001$ )、白介素-10(interleukin-10, IL-10,  $P=0.049$ )、吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO,  $P=0.007$ )和转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ,  $P=0.046$ )基因表达增强,而且分泌 EVs 的能力显著提高( $P<0.001$ )。动物实验结果可见,使用 SIS 处理的 UC-MSCs 细胞片治疗组对伤口愈合的促进作用最为显著,第 7 天伤口占原始伤口面积的比值最低为  $26.9\% \pm 6.1\%$ 。结论 SIS-PS 表面培养的 UC-MSCs 显著提高了免疫抑制和囊泡分泌能力,由此制成的细胞冻干片具有更强的促进伤口愈合的能力。

**关键词:**间充质干细胞;小肠黏膜下层;伤口愈合;细胞外囊泡;胞外基质

中图分类号:R318.08

文献标志码:A

## Umbilical cord mesenchymal stem cells sheets treated by small intestinal submucosa promote wound healing

SHEN Feifei, LI Dong, LIU Linghong, JU Xiuli

(Department of Pediatrics, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of extracellular matrix (ECM), especially the small intestinal submucosa (SIS)-treated umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSCs) sheets on wound healing. **Methods** Primary UC-MSCs were isolated and cultured from umbilical cord tissues using the tissue block apposition method. Decellularized SIS was obtained using a chemical method, and recombinant human fibronectin (rFN), SIS, and Matrigel were immobilized on the surface of polystyrene (PS) cell culture dishes by physical adhesion. The effects of PS surface, rFN-PS surface, SIS-PS surface, and Matrigel-PS surface on the morphology of UC-MSCs were investigated, and the changes in gene expression were detected by RT-PCR, then changes in the secretion of extracellular vesicles (EVs) were detected using nanoparticle tracking analysis. Rat skin total excision wounds were treated with ECM-free, rFN-treated, SIS-treated, and Matrigel-treated UC-MSCs cell sheets, respectively, and the therapeutic effect was further verified by calculating the ratio of wound area to the original wound area. **Results** Compared with the PS surface, the morphology of

UC-MSCs cultured on the SIS-PS surface was almost unaltered ( $P>0.05$ ), and RT-PCR assay showed that gene expression of the SIS-PS surface-cultured UC-MSCs was enhanced, such as Nanog homeobox (NANOG,  $P=0.041$ ), SRY-box transcription factor 2 (SOX-2,  $P=0.009$ ), octamer-binding transcription factor-4 (OCT-4,  $P<0.001$ ), interleukin-10 (IL-10,  $P=0.049$ ), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO,  $P=0.007$ ), and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ,  $P=0.046$ ), meanwhile the ability of the SIS-PS surface-cultured UC-MSCs to secrete EVs was significantly increased ( $P<0.001$ ). The results of the animal experiments revealed that the lowest percentage of wound to original wound area was  $26.9\%\pm 6.1\%$  in the group of animals treated with SIS-treated UC-MSCs cell sheets at day 7. **Conclusion** UC-MSCs cultured on the SIS-PS surface significantly improved immunosuppressive function and EVs secretion ability, and the corresponding cell sheets have a stronger ability to promote wound healing.

**Key words:** Mesenchymal stem cells; Small intestinal submucosa; Wound healing; Extracellular vesicles; Extracellular matrix

研究表明,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是由非细胞结构组成的三维大分子网络,主要包括蛋白聚糖、胶原、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)和其他糖蛋白等物质<sup>[1]</sup>。ECM不仅在细胞生长粘附、受体信号传导、存活和形态中发挥作用<sup>[2]</sup>,而且随着再生医学和组织工程的发展,ECM常作为生物材料在伤口愈合中发挥着不可替代的作用<sup>[3-4]</sup>。除ECM等生物材料外,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)也被广泛应用于促进伤口愈合<sup>[5]</sup>。

MSCs是从多种组织和体液中分离出来的具有多向分化潜能的成体干细胞<sup>[6-7]</sup>,其具有低免疫原性、可调节免疫反应、再生和分泌的能力<sup>[8-9]</sup>,MSCs及其来源的活性物质迅速成为促进伤口愈合的研究热点<sup>[10]</sup>。其中,脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)由于具有无痛的采集程序和更快的自我增殖特性而受到广泛应用<sup>[11]</sup>。本研究拟使用FN、小肠黏膜下层(small intestinal submucosa, SIS)和基质胶(Matrigel)3种常见的ECM,通过物理吸附的方法将其黏附在聚苯乙烯(polystyrene, PS)细胞培养皿表面,观察不同处理表面对UC-MSCs的干性、分泌和免疫调节能力的影响,旨在探讨ECM处理的UC-MSCs细胞片是否促进动物皮肤伤口愈合。

## 1 资料与方法

### 1.1 资料

#### 1.1.1 实验组织

足月妊娠脐带来自于山东大学齐鲁医院产科,脐带采集得到新生儿父母的知情同意及山东大学齐鲁医院科研伦理委员会的批准(批号: KYLL-2022(KS)-014432)。

#### 1.1.2 实验动物

8周龄的SD大鼠购于北京生物技术有限公司,所有动物实验程序和方案均符合《实验动物的护理和使用指南》,并经山东大学齐鲁医院动物实验伦理委员会批准(批号: Pull-2023-098)。

#### 1.1.3 主要试剂

胎牛血清、DMEM/F12购于美国Thermo公司,青/链霉素、0.25%胰蛋白酶购于美国Gibco公司, $\alpha$ -MEM购于北京迈晨科技有限公司,抗人CD29、CD73、CD34、CD45抗体购于美国Biolegend公司,抗人CD44、CD105、CD271抗体购于美国eBioscience公司,抗人CD90、CD31抗体购于美国BD Bioscience公司,成骨、成软骨、成脂肪诱导分化培养基购于美国Cyagen公司,重组人纤维连接蛋白(recombinant human fibronectin, rFN)购于上海煜圣生物科技股份有限公司,基质胶(Matrigel)购自美国Corning公司,胃蛋白酶、4%多聚甲醛、苏木素和伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)试剂盒、TritonX-100、磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)购于北京索莱宝生物科技有限公司,鬼笔环肽和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色试剂盒购于上海贝博生物科技有限公司,TRIzol、琼脂糖购于美国Sigma公司, SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit、BlazeTaq™ SYBR Green qPCR Mix 2.0购于美国GeneCopoeia公司。

#### 1.1.4 主要仪器设备

细胞培养箱(大连冰山松洋生物科技有限公司),Guava easyCyte 6HT流式细胞仪(美国Merck Millipore公司),倒置显微镜(BX53,日本Olympus公司),冻干机(宁波新芝生物科技有限公司),扫描电子显微镜(美国Sigma公司),实时热循环仪(德国Jena公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 UC-MSCs 的制备与鉴定

UC-MSCs 的制备方法参考文献[12],将处理好的脐带组织置于含 10%胎牛血清和 1%青/链霉素的  $\alpha$ -MEM 培养基中,于细胞培养箱中培养 1 周,显微镜下观察可见原代细胞从组织块周围爬出。待细胞融合度达 80%,使用 0.25%胰蛋白酶在室温下消化细胞并记录时间,以 1:3 的比例传代培养,使用 P3 至 P6 代细胞。

将 P3 代  $1 \times 10^6$  个 UC-MSCs 使用 PBS 洗涤 3 次,除阴性孔外,分别孵育相应的荧光标记流式抗体(CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD271、CD31、CD34、CD45),孵育结束后,PBS 洗涤 2 次,重悬并使用流式细胞仪进行检测,数据用 FlowJo 软件分析。

为验证所得 UC-MSCs 的分化能力,细胞分别在成骨、成脂和成软骨分化培养基中培养,每 3 天更换 1 次培养基,共培养 21 d。随后用 4%多聚甲醛固定细胞,并分别用阿利新蓝、油红 O、茜素红进行染色,后置于倒置显微镜下进行观察并记录。

### 1.2.2 ECM 的获取、包被和分组

按照说明书,将 50 mg/mL 的 rFN 均匀平铺在 6 孔板中,37 °C 孵育后使用。

根据生产商的说明,将 3 mg Matrigel 溶于 36 mL DMEM/F12 基础培养基中,6 孔板中每孔加入 1.5 mL,37 °C 孵育后使用。

SIS 按照先前描述的方法制备[13],将新鲜的猪小肠用机械方法去除被膜和被膜肌层,生理盐水清洗后,化学法脱核。随后使用过氧乙酸消毒,-70 °C 预冷过夜后冻干。冻干的 SIS-ECM 经研磨、筛选和辐照灭菌后,溶于含 1 mg/mL 胃蛋白酶(1% w/v)的 0.01 M HCl 溶液中,并于 37 °C 下消化

24 h 后立即用于培养板包被。

根据是否包被 ECM 以及包被的种类,将培养条件分为 4 组:PS 组、rFN-PS 组、SIS-PS 组以及 Matrigel-PS 组。

### 1.2.3 UC-MSCs 形态学观察

将 UC-MSCs 以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度播种在 ECM 处理的 6 孔板中。当细胞融合度达到 80%时,在光镜下观察细胞形态。PBS 冲洗后,在室温下用无水乙醇固定 10 min 并常规 HE 染色,在显微镜下观察细胞形态。

为进一步观察细胞的超微形态,对细胞进行扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察。将培养后的细胞浸入含 3%戊二醛的 0.1 mol/L PBS 缓冲液中,并用 1%锇酸固定 1.5 h,使用发射扫描电子显微镜拍照。

为观察细胞骨架,分别用鬼笔环肽和 DAPI 染色试剂盒对细胞骨架中的肌动蛋白和细胞核进行标记,用 PBS 冲洗细胞,然后 4%多聚甲醛固定 30 min。使用 0.1% TritonX-100 对细胞进行透化处理,加入鬼笔环肽避光染色 40 min,再用 DAPI 染色 1 min,然后在荧光显微镜下观察。使用 ImageJ 软件计算细胞的表面积和核质比。

### 1.2.4 RNA 提取和 RT-PCR

使用 TRIzol 从细胞样本中提取总 RNA。按照生产商说明,使用 SureScript™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒将 500 ng RNA 反转录成 cDNA;按照 BlazeTaq™ SYBR Green qPCR Mix 2.0 的说明书进行荧光定量 PCR;使用实时热循环仪进行荧光检测。修饰组目的基因的相对表达通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算与 PS 组内参 GAPDH 的表达进行归一。所用基因的引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列及长度  
Table 1 Sequence and length of PCR primers

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
NANOG	F AGATGCCTCACACGGAGACT	20
	R GTTTGCCTTTGGGACTGGTG	20
SOX2	F ACATGAACGGCTGGAGCAA	19
	R GTAGGACATGCTGTAGGTGGG	21
OCT-4	F TCAGGAGATATGCAAAGCAGAA	22
	R TTGCCTCTCACTCGGTTCTC	20
IL-6	F ACTCACCTCTCAGAACGAATTG	23
	R CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	23
IDO	F GCCAGCTTCGAGAAAGAGTTG	21
	R ATCCCAGAACTAGACGTGCAA	21
TGF- $\beta$	F CAATTCCTGGCGATACCTCAG	21
	R GCACAACCTCCGGTGACATCAA	21
GAPDH	F ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG	22
	R GCCATCACGCCACAGTTTC	19

### 1.2.5 纳米颗粒追踪分析(nanoparticle tracking analysis, NTA)

收集各组细胞的培养上清,按照文献方法进行细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)的提取<sup>[14]</sup>。通过 NTA 检测分析最终获得的 EVs。将 100  $\mu\text{L}$  EVs 悬液加入到机器上样孔处, EVs 颗粒的浓度使用 NTA 软件进行分析,并对软件自动分析的 EVs 的粒径分布、颗粒浓度、中位数和众数进行记录。

### 1.2.6 细胞片制备

在 48 孔板中均匀加入 0.5% (w/v) 琼脂糖,每孔加入量为 20  $\mu\text{L}$ 。待琼脂糖凝固后,按照上述方法,使用 3 种不同的 ECM 包被琼脂糖表面。然后将孔板放入培养箱中孵育 1 h。按每孔  $5 \times 10^4$  个 UC-MSCs 接种到 ECM 处理的表面,在培养箱中培养 48 h。随后,  $-80^\circ\text{C}$  预冷 4 h,并使用冻干机进行冻干。最后,将  $\gamma$  射线辐照灭菌后的细胞片真空密封保存。

### 1.2.7 大鼠伤口愈合实验

8 周龄的 SD 大鼠购于北京生物技术有限公司。大鼠饲养在 12/12 h 的光-暗周期下,温度控制在  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,相对湿度为  $(55 \pm 10)\%$ ,可自由获取食物和水。使用异氟烷麻醉大鼠,剃除背部毛发后,在大鼠背部切除直径约 1 cm 的圆形全层皮肤。然后将大鼠随机分为 4 组:① a 组(无 ECM 处理的细胞片组);② b 组(rFN 处理的 UC-MSCs 细胞片组);③ c 组(SIS 处理的 UC-MSCs 细胞片组);④ d 组(Matrigel 处理的 UC-MSCs 细胞片组)。伤口制备后,每 3 d 分别使用各组 UC-MSCs

细胞片对伤口进行治疗。第 0、7、14 天拍摄照片并测量伤口面积。然后使用 ImageJ 软件分析伤口面积。

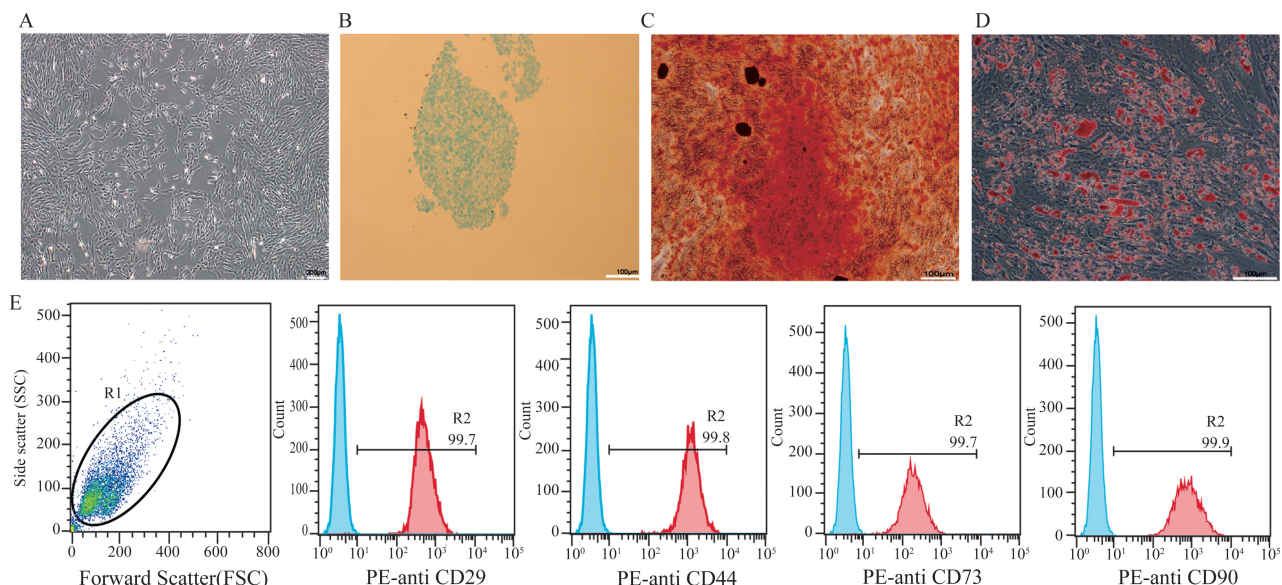
### 1.3 统计学处理

使用 GraphPad Prism 9.0 软件。对定量数据采用 Shapiro-Wilk (S-W) 进行正态分布检验,使用 Levene 检验进行方差齐性检验。对于符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。满足正态分布、方差齐的数据进行多组间比较时采用单因素方差分析,并使用 Tukey's 检验进行两两比较。对于不符合正态分布的数据,采用  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,进行多组间比较时采用 Kruskal-Wallis  $H$  检验进行非参数统计分析,再用 Dunn's 检验进行两两比较。对于重复测量数据,使用重复测量方差分析,并使用 Tukey's 检验进行两两比较。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UC-MSCs 的鉴定

在光镜下,UC-MSCs 呈现典型的纤维状形态(图 1A)。在相应的分化培养基中培养后的 UC-MSCs 呈现出向成软骨细胞(阿利新蓝染色阳性,图 1B)、成骨细胞(茜素红染色阳性,图 1C)和成脂肪细胞(油红 O 染色阳性,图 1D)分化。流式细胞术结果显示,细胞表面表达 CD29、CD44、CD73、CD90 和 CD105,几乎不表达 CD271、CD31、CD34 和 CD45 表面蛋白(图 1E)。



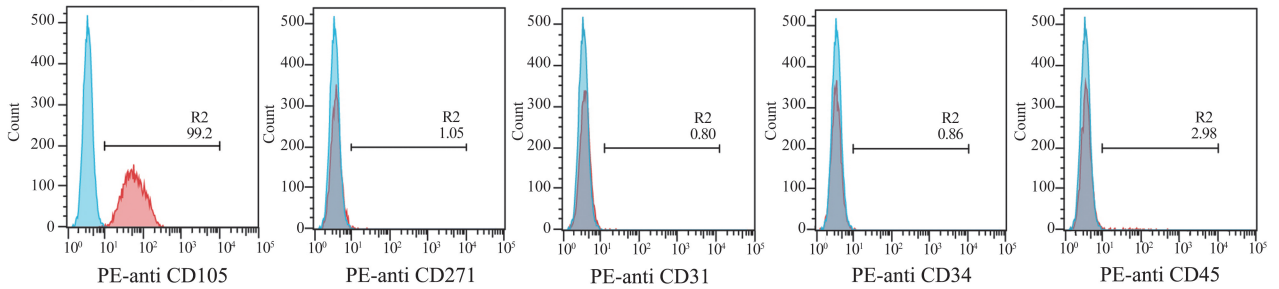


图1 UC-MSCs的鉴定

A: P3代UC-MSCs的形态,比例尺=200  $\mu\text{m}$ ; B: UC-MSCs向软骨细胞分化,比例尺=100  $\mu\text{m}$ ; C: UC-MSCs向成骨细胞分化,比例尺=100  $\mu\text{m}$ ; D: UC-MSCs向成脂肪细胞分化,比例尺=100  $\mu\text{m}$ ; E: UC-MSCs的流式表型分析结果。

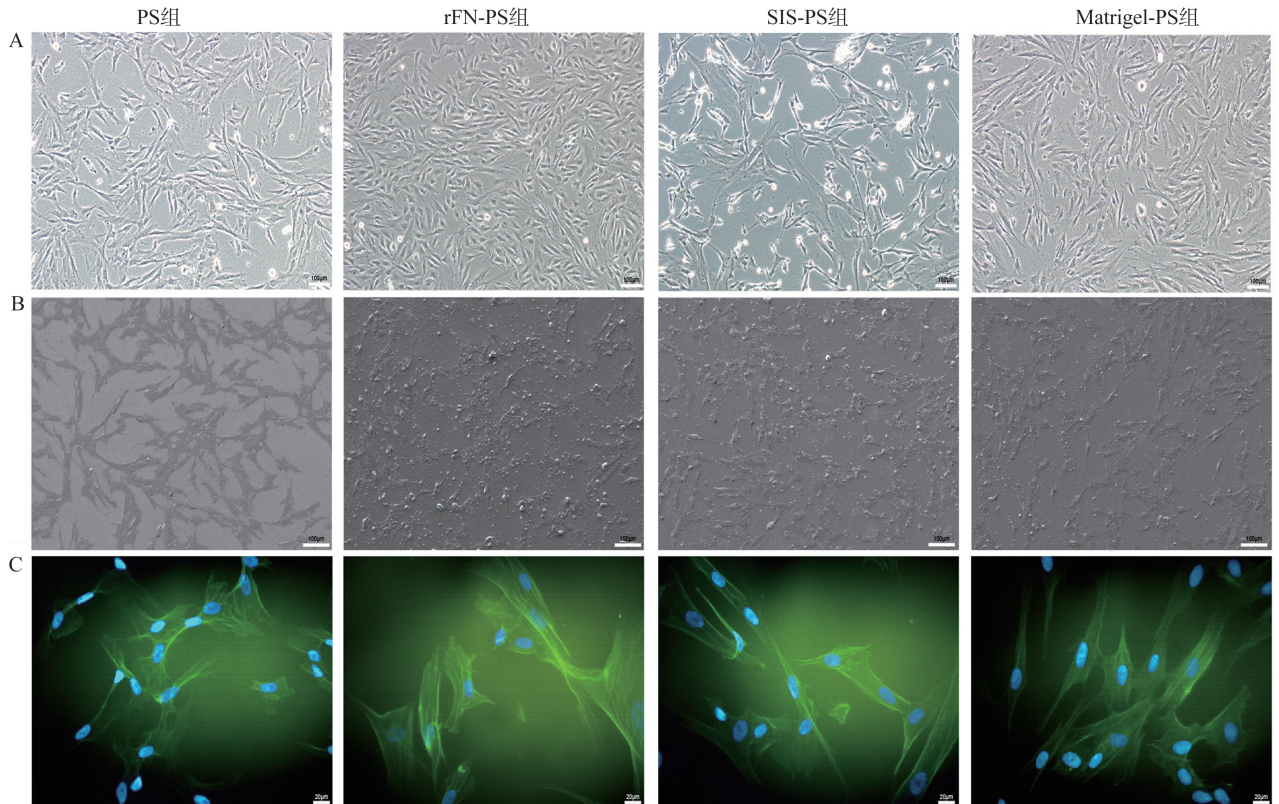
Figure 1 Identification of UC-MSCs

A: Morphology of UC-MSCs at Passage 3, scale bar=200  $\mu\text{m}$ ; B: UC-MSCs differentiated towards chondrocytes, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ; C: UC-MSCs differentiated towards osteoblasts, scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ; D: UC-MSCs differentiated towards adipocytes, scale bar=100  $\mu\text{m}$ ; E: Flow phenotyping results of UC-MSCs.

## 2.2 ECM处理表面对UC-MSCs细胞形态的影响

将UC-MSCs在PS组、rFN-PS组、SIS-PS组和Matrigel-PS组表面培养48 h后,光镜下的细胞形态如图2A所示。为进一步观察UC-MSCs的超微形态,对细胞进行SEM(图2B)、鬼笔环肽和DAPI染色(图2C)以及HE染色(图2D)检测。通过计算,分别确定了各组的UC-MSCs面积:PS组为1799.0(1663.0,2147.0)  $\mu\text{m}^2$ ,rFN-PS组为936.5(904.0,991.4)  $\mu\text{m}^2$ ,SIS-PS组为2175.1(1871.3,2656.0)  $\mu\text{m}^2$ ,Matrigel-PS组为1363.3(1283.4,1979.6)  $\mu\text{m}^2$ 。结果显示,相较于PS组,SIS-PS组的UC-MSCs面积差异无统计学意义( $P>0.999$ ),而rFN-PS组( $P<$

0.001)和Matrigel-PS组( $P=0.018$ )则观察到明显的细胞面积减小(图2E)。通过进一步计算了UC-MSCs的核质比,发现rFN-PS组的核质比为22.2%(19.1%,26.0%),明显高于PS组[14.8%(9.7%,18.6%), $P<0.001$ ]、SIS-PS组[14.7%(10.0%,19.0%), $P<0.001$ ]、以及Matrigel-PS组[15.9%(13.6%,19.1%), $P<0.001$ ]。其余各组间差异无统计学意义(图2F)。SIS-PS的UC-MSCs的消化时间为(169.2 $\pm$ 11.3) s,相较于比PS组[(141.4 $\pm$ 6.9) s, $P<0.001$ ]、rFN-PS组[(132.6 $\pm$ 9.2) s, $P<0.001$ ]和Matrigel-PS组[(134.2 $\pm$ 5.1) s, $P<0.001$ ]的消化时间长(图2G)。



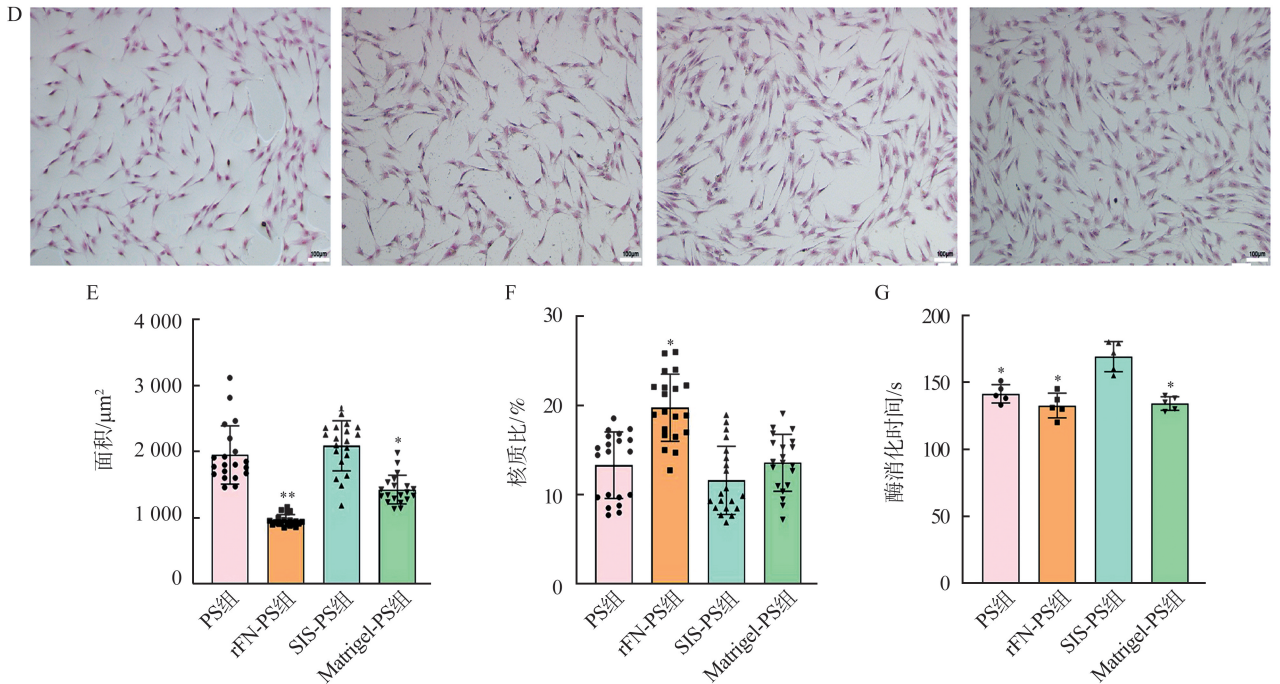


图2 观察生长在不同培养表面上的 UC-MSCs

A: 光镜下的细胞形态, 比例尺 = 100 μm; B: 扫描电镜下的细胞形态, 比例尺 = 100 μm; C: 鬼笔环肽和 DAPI 染色, 比例尺 = 20 μm; D: HE 染色, 比例尺 = 100 μm; E: 面积分析 ( $n = 20$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs PS); F: 核质比率分析 ( $n = 20$ ,  $^*P < 0.05$  vs PS); G: 酶消化时间分析 ( $n = 5$ ,  $^*P < 0.05$  vs SIS-PS)。

Figure 2 Observation of UC-MSC grown on different cultured surfaces

A: Cell morphology under the light microscope, scale bar = 100 μm; B: Cell morphology under SEM, scale bar = 100 μm; C: Phalloidin and DAPI staining, scale bar = 20 μm; D: HE staining, scale bar = 100 μm; E: Area analysis ( $n = 20$ ,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs PS); F: Karyoplasmic ratio analysis ( $n = 20$ ,  $^*P < 0.05$  vs PS); G: Enzyme digestion time analysis ( $n = 5$ ,  $^*P < 0.05$  vs SIS-PS).

### 2.3 SIS-PS 表面提高了 UC-MSCs 的干性和免疫调节相关基因的表达

RT-PCR 检测不同 ECM 处理后的培养表面对 UC-MSCs 基因表达的影响发现, 相较于 PS 组, SIS-PS 组显著上调了 UC-MSCs NANOG 同源框 (Nanog homeobox, NANOG) ( $P = 0.041$ )、SRY-Box 转录因子-2 (SRY-boxtranscription 2, SOX-2) ( $P = 0.009$ )、八聚结合转录因子-4 (octamer-binding transcriptioun-4, OCT-4) ( $P < 0.001$ ) 基因的表达 (图 3A)。免疫调节因子的基因表达结果显示, 与 PS 组和 rFN-PS 组相比, SIS-PS 组的 UC-MSCs 抑炎基因的表达升高。与 PS 组相比, SIS-PS 组 UC-MSCs 的白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 表达上调了约 2.2 倍 ( $P = 0.049$ ), 吲哚胺 2,3-双加氧酶 (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 表达上调了约 1.9 倍 ( $P = 0.007$ ), 转化生长因子-β (transforming growth factor beta, TGF-β) 表达上调了约 1.9 倍 ( $P = 0.046$ ); 相反, 在 Matrigel-PS 组的 UC-MSCs 的 IL-10 表达量下降了约 1.6 倍 ( $P = 0.728$ ); 但 TGF-β 的表达升高了约 2.6 倍 ( $P = 0.001$ ) (图 3B)。

### 2.4 SIS-PS 表面促进 UC-MSCs 分泌 EVs

从 NanoSight 系统获取 UC-MSCs 在不同 ECM 处理的培养表面上释放的 EVs 浓度分布曲线 (图 4A)。进一步分析数据发现, 与 PS 组相比, SIS-PS 组 UC-MSCs 分泌的 EVs 的浓度显著提高 ( $P < 0.001$ ), 提示 SIS 处理后显著促进了 UC-MSCs 分泌 EVs 的能力, 大约上调了 1.4 倍, 而 rFN-PS 组和 Matrigel-PS 组则显著抑制了这种能力, 分别下调了约 12.1 倍 ( $P < 0.001$ ) 和 12.9 倍 ( $P < 0.001$ ) (图 4B)。利用 NTA 数据进一步分析了 EVs 粒径的累积分布, 与 PS 组相比, rFN-PS 组和 Matrigel-PS 组的 EVs 粒径分布几乎保持不变, 而 SIS 组的 EVs 粒径分布则向上移动 (图 4C)。通过上述方法, 获得 EVs 粒径的中位数和众数, 比较各组 EVs 粒径的中位数结果显示, SIS-PS 组的 EVs 粒径中位数明显高于其他组 (图 4D); 此外, EVs 粒径的众数分析显示, 与 PS 组 [ $(136.3 \pm 23.72)$  nm] 相比, rFN-PS 组 [ $(80.57 \pm 3.55)$  nm,  $P = 0.003$ ] 和 Matrigel-PS 组 [ $(83.50 \pm 1.22)$  nm,  $P = 0.004$ ] 的众数明显减小, 而 PS 组 [ $(136.3 \pm 23.72)$  nm] 和 SIS-PS 组 [ $(162.2 \pm 10.32)$  nm] 组间差异无统计学意义 ( $P = 0.149$ ) (图 4E)。

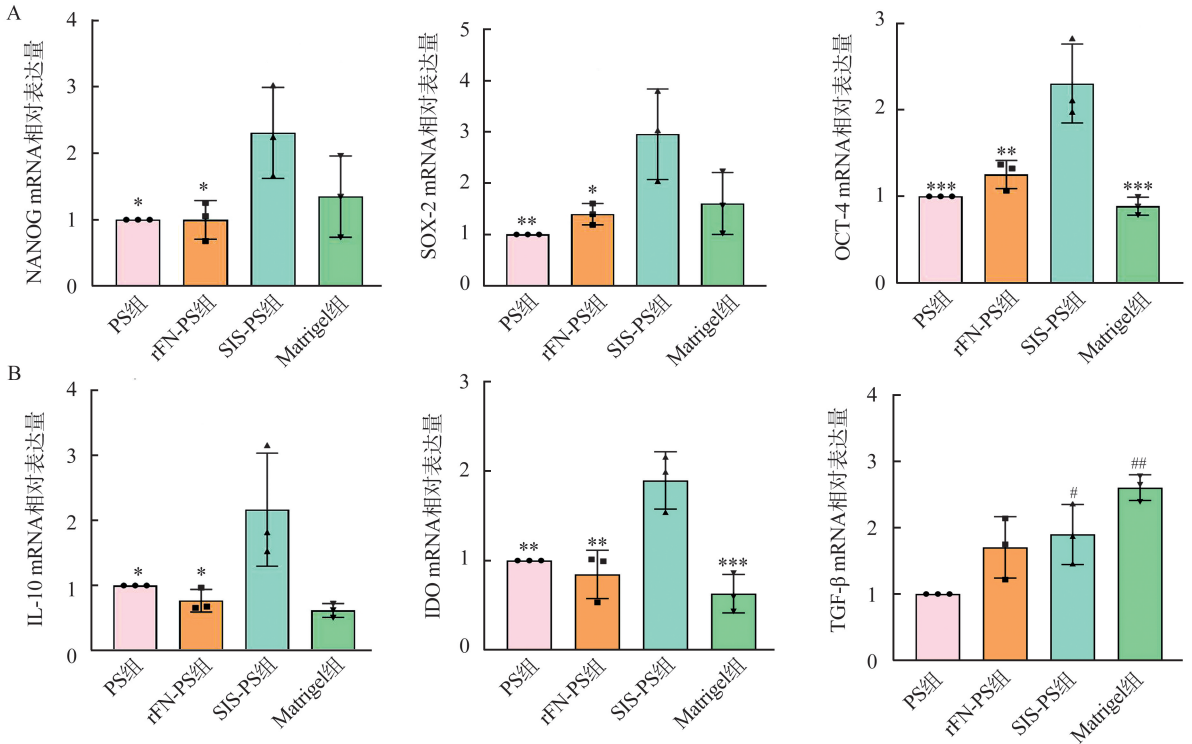


图3 不同组 UC-MSCs 的基因表达  
A: 干性基因表达; B: 免疫调节因子基因表达 ( $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  vs SIS-PS;  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$  vs PS)。

Figure 3 UC-MSCs gene expression in different groups  
A: Stemness gene expression; B: Expression of immunomodulatory factor genes ( $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  vs SIS-PS;  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$  vs PS)。

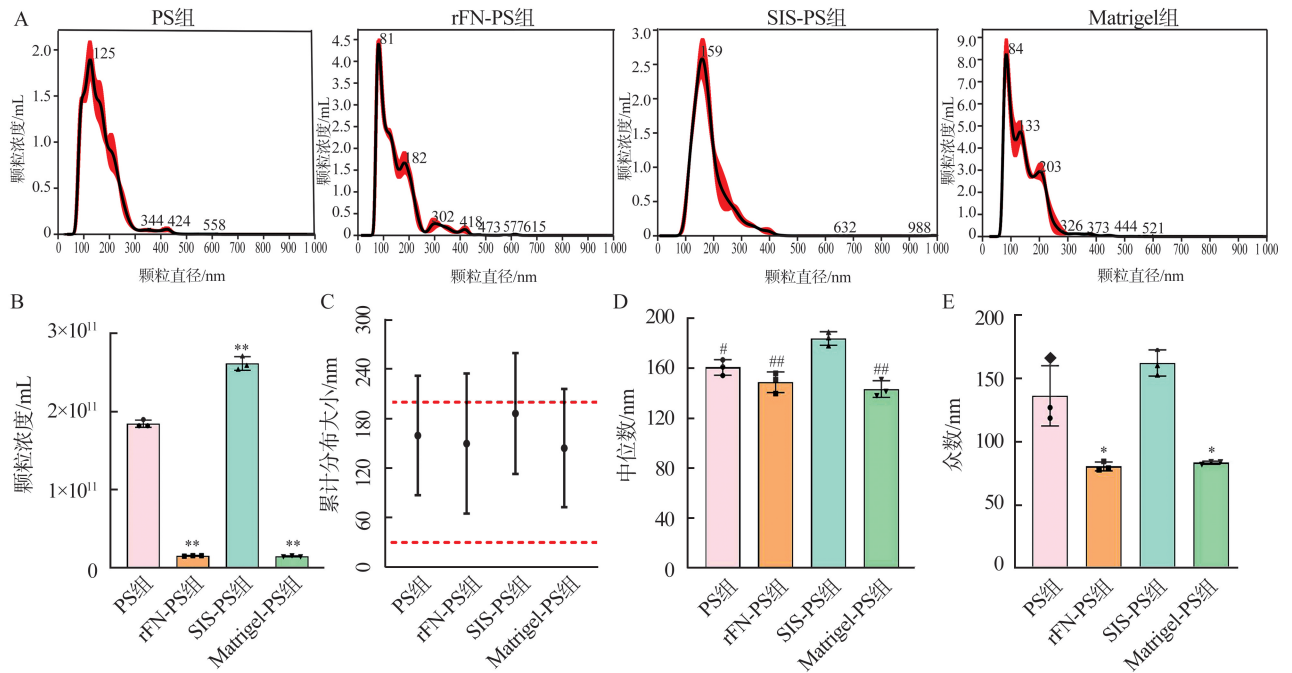


图4 不同组 EVs 的 NTA 数据分析  
A: 粒径分布图; B: 颗粒浓度; C: 累积大小分布; D: 中位数; E: 众数 ( $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs PS;  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$  vs SIS-PS)。

Figure 4 NTA data analysis of different groups of EVs  
A: Images of particle size distributions; B: Particle concentrations; C: Cumulative size distributions; D: Medians; E: Modes ( $n=3$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs PS;  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$  vs SIS-PS)。

## 2.5 SIS 预处理的细胞片可明显促进伤口愈合

第0天、第7天和第14天典型的伤口改变,见图5A。在第7天,a组的伤口占比为(60.0±5.7)%,b组的伤口占比为(43.2±13.7)%,c组的伤口愈合占比为(26.9±6.1)%,d组的伤口占比为(31.8±6.7)%(图5B)。与a组相比,所有ECM处理的细

胞片组都能促进伤口愈合,其中c组( $P=0.022$ )和d组的细胞片( $P=0.027$ )对伤口愈合的促进作用显著,与d组的细胞片相比,c组( $P=0.026$ )促进伤口愈合的效果更佳。第14天时,除a组外,其余各组的平均伤口占比均小于3%(图5B)。因此SIS处理的细胞片能明显促进伤口愈合。

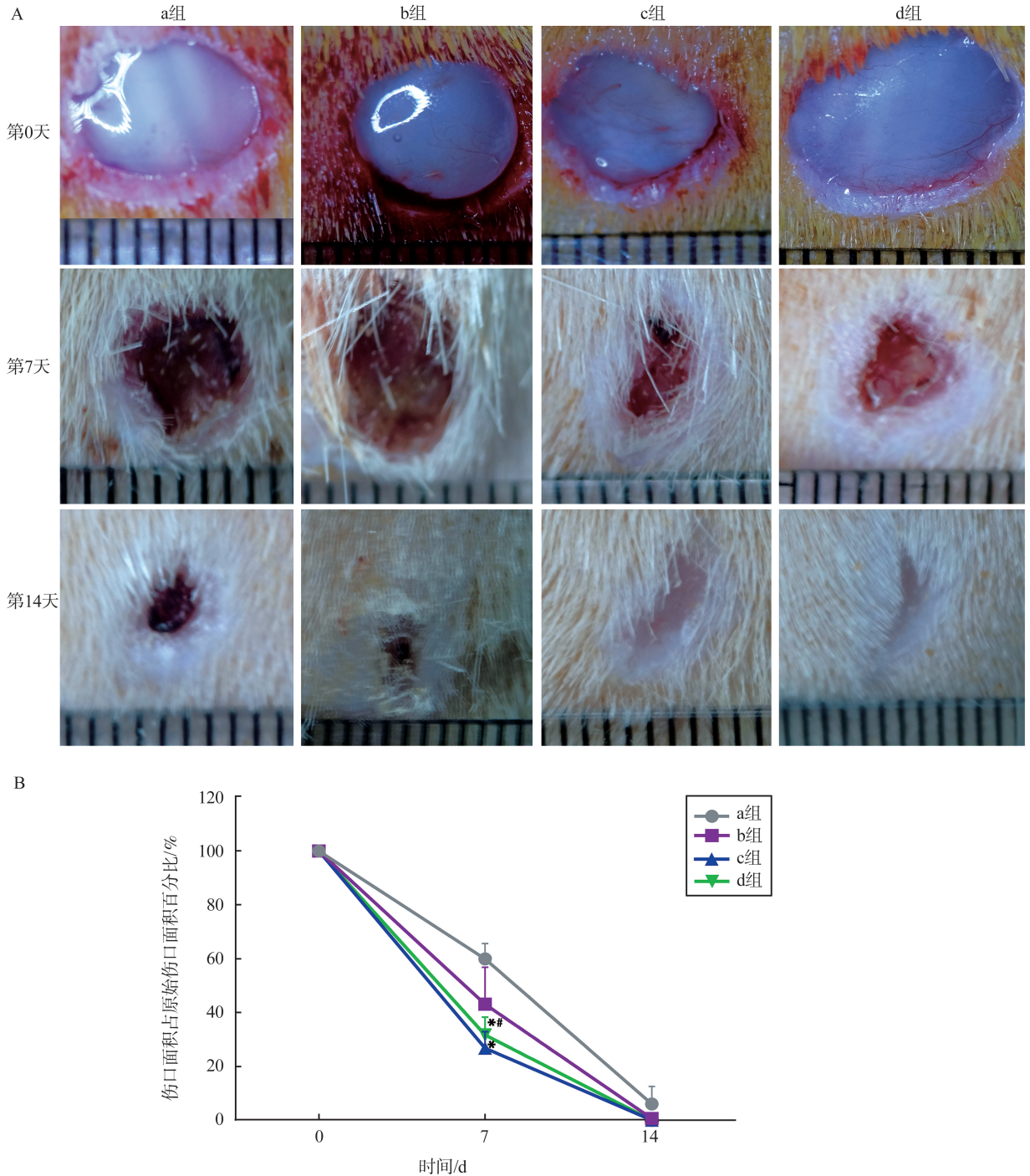


图5 ECM处理的细胞片可加速伤口愈合

A: 伤口愈合后0、7和14天的代表性照片; B: 第7天、第14天各组伤口面积占原始伤口面积百分比( $n=3$ ,  $^*P<0.05$  vs a组;  $^{\#}P<0.05$  vs c组)

Figure 5 ECM-treated UC-MSCs sheets accelerate wound healing

A: Representative photographs of the wound at 0, 7, and 14 days after wound healing; B: Percentage of wound area to original wound area for each group on day 7 and 14. ( $n=3$ ,  $^*P<0.05$  vs group a;  $^{\#}P<0.05$  vs group c)

### 3 讨论

研究表明,无论是在体内还是体外,ECM在细胞粘附、迁移与分化方面都起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。常用于修饰培养层表面的ECM包括胶原蛋白、FN、SIS等<sup>[15-16]</sup>,而Matrigel多用于多能干细胞和类器官培养<sup>[17]</sup>。作为天然脱细胞ECM之一,SIS是最早被研究和最广泛应用的生物材料,与昂贵的ECM(如FN和Matrigel)相比,SIS衍生的ECM成本低、易获得。其主要来源是哺乳动物的小肠,经过脱细胞处理后保留了固有的细胞外成分,如各种胶原蛋白、肝素、血管内皮生长因子和蛋白聚糖等。此外SIS还具有低免疫原性、可在体内完全降解并保留多种生长因子的特点<sup>[16]</sup>。因此,SIS衍生的ECM经常被用于再生医学和组织工程。本研究采用不同来源的ECM对PS表面进行了修饰处理,分析其对UC-MSCs生理特性的影响,结果发现,SIS-ECM改良培养条件可改善UC-MSCs的分泌能力和免疫调节功能,RT-PCR结果显示其表达了更强的干性基因和免疫抑制基因。随后通过制备ECM处理的UC-MSCs细胞片进一步证明了SIS也可用作生物支架材料,促进伤口的愈合修复。

本研究通过观察UC-MSCs的形态改变,发现与PS组相比,SIS-PS组的UC-MSCs没有明显变化。而rFN-PS组的UC-MSCs面积更小,形态更圆。SIS-PS组消化UC-MSCs的时间最长,提示SIS-PS组的细胞粘附能力明显高于其他组。Floren等<sup>[18]</sup>的研究表明,MSCs会因蛋白质组分和基质弹性的不同而表现出不同的粘附和扩散特性;本研究由于其粘附面经过不同的ECMs处理后基质弹性发生了变化,因而UC-MSCs表现出不同的形态和粘附特性。

OCT-4、SOX-2和NANOG被认为是原始干细胞多能性和自我更新的标志蛋白,也被称为干细胞标志物<sup>[19]</sup>。本研究结果表明,SIS对PS的表面修饰提高了UC-MSCs的干性,使细胞高表达NANOG、SOX2和OCT-4等干性基因。然而,在rFN或Matrigel修饰的PS表面并未显示出这一结果。作为一种天然的脱细胞ECM,SIS能促进MSCs表现出抗炎特性,因此被广泛用于促进伤口愈合的研究中<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,SIS-PS组的UC-MSCs表达了更高水平的炎症抑制基因。RT-PCR结果显示,与PS组相比,SIS-PS组的IL-10上调了2.2倍。IL-10是一种抗炎因子,能保护宿主免受病原体和微

生物的伤害。研究表明,IL-10在伤口愈合过程中可诱导上皮细胞增殖和伤口闭合,此外它还是上皮伤口修复的协调因子<sup>[21]</sup>。另一种免疫抑制因子IDO在SIS-PS组中的表达也有所升高。IDO是一种参与色氨酸分解代谢的酶,在体外诱导巨噬细胞的M2极化,从而促进伤口愈合<sup>[22]</sup>。TGF- $\beta$ 可刺激成纤维细胞产生胶原蛋白,作用于细胞表面促进角质形成细胞的迁移和再上皮化,是伤口愈合过程中的重要角色<sup>[23]</sup>。提示ECM,尤其是SIS处理的UC-MSCs,能更好地促进伤口愈合。

EVs在细胞间通信、促进血管生成、免疫调节和周围基质环境重塑中发挥着关键介质的作用,当细胞受到刺激时,它们的分泌也会发生变化<sup>[24]</sup>。Tian等<sup>[25]</sup>研究证实,当Matrigel被包裹在细胞培养皿中时,细胞衰老的速度减慢,并保持在一个相对稳定的状态,这可能是Matrigel-PS组观察到的EVs总数减少的原因。此外,EVs的释放程度受各种细胞条件或外部因素的调节<sup>[26]</sup>提示SIS-PS组中EVs总数的增加可能与细胞骨架和黏附改变相关。Woo等<sup>[27]</sup>发现,FN可通过精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸和多个结合位点促进与细胞和细胞外成分的相互作用,从而固定EVs,这一发现解释了rFN-PS组实验中观察到的EVs总数减少的现象。除了现有的分子刺激和物理方法(如超声波和三维培养<sup>[24]</sup>)外,本研究还发现了一种通过用SIS处理PS表面来促进细胞EVs生成的方便有效的方法。

基于这些结论,本研究试图进一步探索预处理后的UC-MSCs对伤口愈合的影响。因此制备了经过不同ECM处理的细胞片。结果表明,处理后的细胞片可明显促进伤口愈合。Zhang等<sup>[28]</sup>证实UC-MSCs细胞片不仅能加速伤口愈合,还能有效促进伤口区域的再上皮化,但具体促进伤口愈合的机制仍有待进一步研究。

综上所述,本研究使用SIS处理PS表面,发现其促进UC-MSCs抑炎基因的表达,同时促进UC-MSCs分泌更多的EVs。根据这一结果制成的细胞片可以显著促进伤口愈合。

### 参考文献:

- [1] Golebiowska AA, Intravaia JT, Sathe VM, et al. Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: advances, challenges and clinical prospects[J]. *Bioactive materials*, 2024, 32: 98-123. doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.09.017.
- [2] Valdoz JC, Johnson BC, Jacobs DJ, et al. The ECM: to

- scaffold, or not to scaffold, that is the question[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 ( 23 ): 12690. doi: 10.3390/ijms222312690.
- [3] Aazmi A, Zhang D, Mazzaglia C, et al. Biofabrication methods for reconstructing extracellular matrix mimetics [J]. *Bioactive materials*, 2024, 31: 475-496. doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.08.018.
- [4] Yang P, Lu Y, Gou W, et al. Glycosaminoglycans' ability to promote wound healing: from native living macromolecules to artificial biomaterials [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(9): e2305918. doi:10.1002/adv.202305918.
- [5] Keshavarz R, Olsen S, Almeida B. Using biomaterials to improve mesenchymal stem cell therapies for chronic, nonhealing wounds [J]. *Bioeng Transl Med*, 2024, 9 (1): e10598. doi:10.1002/btm2.10598.
- [6] Al-Azab M, Idiattullina E, Safi M, et al. Enhancers of mesenchymal stem cell stemness and therapeutic potency [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 2023, 162: 114356. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114356.
- [7] 段星祥, 张瑞, 贺燕, 等. 间充质干细胞的细胞治疗策略研究进展[J]. *口腔疾病防治*, 2023, 31(10): 745-750. DUAN Xingxiang, ZHANG Rui, HE Yan, et al. Progress on the cell therapy strategy of mesenchymal stem cells [J]. *Journal of Prevention and Treatment for Stomatological Diseases*, 2023, 31(10): 745-750.
- [8] Li H, Dai H, Li J. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal/stem cells: the link with metabolism [J]. *J Adv Res*, 2023, 45: 15-29. doi: 10.1016/j.jare.2022.05.012.
- [9] Lan T, Luo M, Wei X. Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 195. doi: 10.1186/s13045-021-01208-w.
- [10] Ding JY, Chen MJ, Wu LF, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: roles, opportunities and challenges [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 36. doi:10.1186/s40779-023-00472-w.
- [11] Meng M, Zhang WW, Chen SF, et al. Therapeutic utility of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells-based approaches in pulmonary diseases: recent advancements and prospects [J]. *World J Stem Cells*, 2024, 16(2): 70-88.
- [12] Zhou Z, Xun J, Wu C, et al. Acceleration of burn wound healing by micronized amniotic membrane seeded with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mater Today Bio*, 2023, 20: 100686. doi: 10.1016/j.mt-bio.2023.100686.
- [13] Singh H, Hassan S, Nabi SU, et al. Multicomponent decellularized extracellular matrix of caprine small intestine submucosa based bioactive hydrogel promoting full-thickness burn wound healing in rabbits [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 255: 127810. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.127810.
- [14] Hsueh YH, Buddhakosai W, Le PN, et al. Therapeutic effect of induced pluripotent stem cell -derived extracellular vesicles in an in vitro and in vivo osteoarthritis model [J]. *J Orthop Translat*, 2023, 38: 141-155. doi: 10.1016/j.jot.2022.10.004.
- [15] Leite ML, De Oliveira Ribeiro RA, Soares DG, et al. Poly (caprolactone)-aligned nanofibers associated with fibronectin-loaded collagen hydrogel as a potent bioactive scaffold for cell-free regenerative endodontics [J]. *Int Endod J*, 2022, 55(12): 1359-1371.
- [16] Zhao P, Li X, Fang Q, et al. Surface modification of small intestine submucosa in tissue engineering [J]. *Regen Biomater*, 2020, 7(4): 339-348.
- [17] Luo L, Liu L, Ding Y, et al. Advances in biomimetic hydrogels for organoid culture [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2023, 59(64): 9675-9686.
- [18] Floren M, Tan W. Three-dimensional, soft neotissue arrays as high throughput platforms for the interrogation of engineered tissue environments [J]. *Biomaterials*, 2015, 59: 39-52. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.036.
- [19] Stefanska K, Ozegowska K, Hutchings G, et al. Human wharton's jelly-cellular specificity, stemness potency, animal models, and current application in human clinical trials [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(4): 1102. doi:10.3390/jcm9041102.
- [20] Cao G, Huang Y, Li K, et al. Small intestinal submucosa: superiority, limitations and solutions, and its potential to address bottlenecks in tissue repair [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(33): 5038-5055.
- [21] Zhao YZ, Du CC, Xuan Y, et al. Bilirubin/morin self-assembled nanoparticle-engulfed collagen/polyvinyl alcohol hydrogel accelerates chronic diabetic wound healing by modulating inflammation and ameliorating oxidative stress [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 261 (Pt 1): 129704. doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.129704.
- [22] Anderson S, Prateeksha P, Das H. Dental pulp-derived stem cells reduce inflammation, accelerate wound healing and mediate M2 polarization of myeloid cells [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(8): 1999. doi:10.3390/biomedicines10081999.
- [23] Deng Z, Fan T, Xiao C, et al. TGF-beta signaling in health, disease, and therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 61. doi:10.1038/s41392-024-01764-w.
- [24] Debbi L, Guo S, Safina D, et al. Boosting extracellular vesicle secretion [J]. *Biotechnol Adv*, 2022, 59: 107983. doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107983.