

负载人脐带间充质干细胞外泌体的壳聚糖水凝胶促进慢性糖尿病大鼠的伤口愈合

邱晓慧¹, 王 檬², 唐江解³, 周建大⁴, 金 晨⁵

¹中南大学湘雅二医院烧伤整形外科, 湖南 长沙 410011; ²中南大学材料学院, 湖南 长沙 410083; 中南大学湘雅三医院³口腔科, ⁴整形外科, 湖南 长沙 410017; ⁵中南大学湘雅医院神经外科, 湖南 长沙 410008

摘要:目的 探讨负载人脐带间充质干细胞(hUCMSC)外泌体(hUCMSC-exos)的壳聚糖(CS)水凝胶(Exos@CS-Gel)改善糖尿病伤口愈合的机制。方法 提取hUCMSC外泌体并制备Exos@CS-Gel,通过细胞划痕和CCK-8实验评估其对入脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖与迁移的影响。采用链脲佐菌素诱导建立糖尿病大鼠全层皮肤伤口模型,将24只大鼠随机分为4组:Exos@CS-Gel组(100 μg hUCMSC-exos溶于100 μL 24% CS水凝胶)、hUCMSC-exos组(100 μg hUCMSC-exos溶于100 μL PBS)、CS水凝胶组(100 μL 24% CS水凝胶)和对照组(100 μL PBS),局部注射覆盖伤口后,通过免疫组化、HE染色、免疫荧光及qRT-PCR评估伤口愈合效果及机制。结果 成功提取hUCMSC-exos并制备Exos@CS-Gel。体外实验显示,Exos@CS-Gel促进HUVEC增殖与迁移($P<0.05$)。体内实验结果显示,术后14 d Exos@CS-Gel组伤口愈合率达92.7%,高于hUCMSC-exos组(9.12%)、CS水凝胶组(16.28%)和对照组(25.98%)($P<0.05$),微血管密度、血管内皮生长因子和转化生长因子 β -1表达水平均升高。结论 Exos@CS-Gel可提高外泌体体外生存能力,通过促进血管生成与细胞增殖等机制加速糖尿病伤口愈合。

关键词:血管生成;糖尿病;外泌体;人脐带间充质干细胞;壳聚糖;水凝胶

Chitosan hydrogel loaded with human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes healing of chronic diabetic wounds in rats

QIU Xiaohui¹, WANG Meng², TANG Jiangjie³, ZHOU Jianda⁴, JIN Chen⁵

¹Department of Burn and Plastic Surgery, Xiangya Second Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; ²School of Materials Science and Engineering, Central South University, Changsha 410083, China; ³Department of Stomatology, ⁴Department of Plastic Surgery, Xiangya Third Hospital, Central South University, Changsha 410017, China; ⁵Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which chitosan (CS) hydrogel loaded with human umbilical cord mesenchymal stem cell (HUVECs)-derived exosomes (hUCMSC-exos) (Exos@CS-Gel) improves diabetic wound healing. **Methods** hUCMSC-exos were extracted and Exos@CS-Gel was prepared. The effect of Exos@CS-Gel on proliferation and migration of HUVECs were evaluated using scratch wound assay and CCK-8 assay. Diabetic rat models with full-thickness skin wounds established by streptozotocin induction were randomized divided into 4 groups for treatment with Exos@CS-Gel (100 μg hUCMSC-exos dissolved in 100 μL 24% CS hydrogel), hUCMSC-exos (100 μg hUCMSC-exos dissolved in 100 μL PBS), CS hydrogel (100 μL 24% CS hydrogel), or PBS (control group). Wound healing and the therapeutic mechanisms were assessed using immunohistochemistry, HE staining, immunofluorescence, and qRT-PCR. **Results** In cultured HUVECs, Exos@CS-Gel treatment significantly promoted cell proliferation and migration. In the rat models of chronic diabetic wounds, the wound healing rate in Exos@CS-Gel group reached 92.7% on day 14, significantly higher than those in hUCMSC-exos group (9.12%), CS hydrogel group (16.28%), and control group (25.98%). Microvessel density and the expression levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor β -1 were significantly increased in the Exos@CS-Gel group. **Conclusion** Exos@CS-Gel promotes survival capacity of hUCMSC-exos *in vitro* and accelerates diabetic wound healing in rats by promoting angiogenesis and cell proliferation.

Keywords: angiogenesis; diabetic wound; exosomes; mesenchymal stem cells; chitosan; hydrogel

糖尿病足溃疡是糖尿病最严重的并发症之一^[1,2]。流行病学调查显示,糖尿病足溃疡导致的截肢占糖尿病相关下肢截肢总数的84%,甚至可能引发患者严重抑郁和死亡^[3,4]。尽管目前临床采用生长因子、负压吸引等方法治疗糖尿病足溃疡,但存在生长因子易降解、需频繁给药、成本高昂,以及负压吸引设备依赖性强、无法主

动促进细胞再生等问题^[5,6]。因此,开发更有效的糖尿病足溃疡治疗方法具有重要意义。

近年来,间充质干细胞(MSCs)及其分泌的外泌体(Exos)在组织修复中展现出巨大潜力。研究表明, MSCs可通过旁分泌机制促进伤口愈合,而外泌体作为其关键效应分子,具有稳定性高、免疫原性低、可储存性强等优势,已成为“无细胞疗法”的重要载体^[7,8]。其中,人脐带间充质干细胞(hUCMSC)来源的外泌体因其来源广泛、伦理争议少、再生能力强等特点备受关^[9]。然而,外泌体在伤口部位易被快速清除、体内半衰期短的

收稿日期:2024-12-05

基金项目:湖南省自然科学基金青年基金项目(2021JJ40998)

作者简介:邱晓慧,博士,副研究员,E-mail: keyi0540658@163.com

通信作者:金 晨,博士,副主任医师,E-mail: oyqn845ifgi265@163.com

缺陷严重限制了其临床应用^[10]。如何通过合适的递送系统延长外泌体在创面的滞留时间并维持其生物活性,成为当前研究的重点和难点。

壳聚糖水凝胶(CS-Gel)因其优异的生物相容性、可降解性和保湿性能,被美国食品药品监督管理局批准作为伤口敷料使用。既往研究多集中于CS的抗菌性能或作为单一药物载体,而将其与外泌体结合用于糖尿病伤口治疗的研究仍存在空白。虽然已有学者探索了脂肪干细胞(ADSC)或毛囊干细胞(HFSC)外泌体与生物材料的结合应用^[11,12],但针对hUCMSC外泌体与CS水凝胶协同治疗糖尿病伤口的作用机制尚未系统阐明。特别是关于该复合体系如何通过调控血管生成、炎症微环境和细胞增殖等多重机制促进慢性伤口愈合,仍需深入探究。基于此,本研究创新性地构建了负载hUCMSC-exos的壳聚糖水凝胶(Exos@CS-Gel),通过物理包埋和电荷相互作用实现外泌体的长效缓释,解决了外泌体递送效率低的核心瓶颈。本研究不仅证实了Exos@CS-Gel能显著促进糖尿病伤口愈合,更从分子机制层面揭示了其通过上调血管内皮生长因子(VEGF)和转化生长因子 β -1(TGF β -1)表达、增强血管生成和细胞增殖等多途径发挥治疗作用的机理,为开发兼具“被动屏障保护”与“主动再生诱导”功能的智能敷料提供了新思路,也为临床转化应用奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 hUCMSC和HUVEC培养

人脐带间充质干细胞(hUCMSC)购自广州赛莱拉干细胞有限公司。hUCMSC使用DMEM/F12基础培养基(Gibco),并添加10%的无外泌体胎牛血清(Gibco)和1%的青链霉素双抗溶液(Gibco)进行培养。细胞置于37℃、饱和湿度及5% CO₂的培养箱中常规培养。待细胞融合度达到80%~90%时,使用0.25%胰蛋白酶进行消化传代,以1:3的比例进行接种,每2~3 d更换1次培养液。本研究使用第3~5代的hUCMSC进行后续实验。

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自中国科学院上海细胞生物研究所。HUVEC使用高糖DMEM基础培养基(Gibco),并添加10%的胎牛血清(Gibco)和1%的青链霉素双抗溶液(Gibco)进行培养。细胞同样在37℃、5% CO₂的培养箱中培养。待细胞融合度达到80%~90%时,使用0.25%胰蛋白酶进行消化,以1:2的比例进行传代,以确保其良好的生长状态。

1.2 外泌体提取与鉴定

收集hUCMSC细胞培养上清液,用30 mL注射器通过Millex-GP 0.22 μ m孔径过滤膜将其过滤至新的50 mL离心管中,再分装至Amicon@Ultra-15离心过滤器中,4℃、1800 \times g离心40 min浓缩上清液;取上清液分

装至超高速离心管中,4℃、100 000 \times g离心70 min,弃上清,加入PBS,4℃、100 000 \times g再次离心70 min,弃上清,PBS洗涤沉淀1~2次,100 μ L PBS溶解沉淀转移至1.5 mL EP管中,-80℃保存。外泌体样本用1 \times PBS稀释至约1 mL后,用纳米颗粒跟踪分析仪选取合适视野检测外泌体粒径,使用Zeta View 8.04.02分析颗粒直径及浓度;取5 μ L样本于铜网上,经室温孵育后加入2%乙酸双氧铀孵育1 min,干燥后透射电镜观察外泌体形态;使用RIPA裂解液、PMSF及蛋白酶抑制剂混合液提取外泌体蛋白,采用蛋白质免疫印迹分析外泌体标记物(CD63、CD81)表达。

1.3 负载hUCMSC-exos的壳聚糖水凝胶复合材料的构建和温度敏感性测定

采用离子交联法制备Exos@CS-Gel^[11]。将100 mg CS溶于0.1 mol/L乙酸溶液中,室温下连续搅拌4 h使完全溶解,获得CS溶液。称取500 mg β -磷酸甘油酯二钠盐(β -GP)五水合物溶于水中,添加1 g碳酸氢钠并溶解,0.22 μ m滤膜过滤。冰水浴、连续搅拌条件下,将 β -GP溶液滴加至CS溶液,使二者体积比为1:9,滴毕再充分搅拌10 min,得澄清均匀的温敏CS-Gel,置4℃冰箱保存备用。将Exos 100 μ L与CS-Gel 300 mg涡旋混合,得到Exos@CS-Gel。将水浴温度调至10℃,在10~40℃温度范围内检测不同浓度(20%、22%、24%、26%、28%)Exos@CS-Gel溶液的初始凝胶化温度。将另一个恒温水浴调节到37℃,使用浓度梯度的Exos@CS-Gel,测定37℃下的特定凝胶化时间。

1.4 细胞核摄取外泌体能力评估

采用PKH67试剂盒标记外泌体,4℃保存备后续使用。冰浴中将24% CS水凝胶与标记外泌体混合,直至沉淀完全溶解,所得混合物4℃保存。接种至12孔板的HUVEC分成4组:Exos@CS-Gel组:1 mL Exos@CS-Gel;hUCMSC-exos组:1 mL hUCMSC-exos;CS水凝胶组:1 mL 24% CS水凝胶;对照组:1 mL PBS。细胞在5% CO₂培养箱培养12 h,随后采用DAPI染色液对各组细胞进行核染色。

1.5 迁移和增殖试验

细胞迁移采用划痕试验进行评估。将HUVECs以1.2 \times 10⁵/mL的密度接种至6孔板,培养至80%~90%融合度。将细胞分为4组:hUCMSC-exos组:3 mL hUCMSC-exos;hUCMSC上清液组:3 mL hUCMSC上清液;CS水凝胶组:1 mL含24% CS的DMEM;对照组:1 mL DMEM。不同组别细胞5% CO₂培养箱中培养0、4、8、12、18、24 h,检测划痕宽度。采用Transwell系统评估Exos@CS-Gel对HUVEC增殖的影响,分为3组:Exos@CS-Gel组:1 mL Exos@CS-Gel;hUCMSC-exos组:1 mL hUCMSC-exos;对照组:1 mL DMEM。将HUVEC(1 \times 10⁵/孔)置于Transwell系统下室,并在上腔

中分别加入其他3种干预药物。接种后第1、2、3、4、5天,培养基中加入CCK-8试剂(Dojindo),37℃孵育1h后分析结果。

1.6 糖尿病皮肤创伤大鼠模型建立及分组

本研究动物实验通过中南大学湘雅三医院实验动物福利伦理审查(伦理批号:2022-05-04)。实验前SD大鼠适应性喂养1周,然后禁食禁水12h。按照55 mg/kg剂量腹腔内注射用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0~4.5)溶解的10 g/L链脲佐菌素(STZ)诱发糖尿病,之后在第3、7天鼠尾采血测血糖,若血糖 ≥ 16.7 mmol/L,且大鼠出现体质量减轻和多饮多尿的现象,则认为糖尿病模型建立成功。3周后去除大鼠背部毛发,在大鼠背部建立直径为2 cm的圆形全层皮肤缺损。

将24只大鼠随机分为4组(6只/组)。Exos@CS-Gel组:100 μ g hUCMSC-exos溶于100 μ L CS水凝胶(24%)中;hUCMSC-exos组:100 μ g hUCMSC-exos溶于100 μ L PBS;CS水凝胶组:100 μ L CS水凝胶(24%);对照组:100 μ L PBS。将4种不同材料局部注射覆盖伤口。然后将Tegaderm TM(3M)涂在伤口部位,每3 d更换1次。

1.7 伤口愈合率分析

观察各组大鼠存活率和伤口愈合情况。根据术后第0、3、7、14天的照片确定每组糖尿病伤口大小变化情况,并采用Image J软件进行分析。伤口愈合率 $= (S_0 - S_x) / S_0 \times 100\%$,其中 S_0 代表第0天的初始伤口面积, S_x 代表第X天的伤口面积。

1.8 HE染色

水凝胶干预后第14天,采集伤口外缘约3 mm的全层创伤组织样本。所有组织分为两等份:一份4%多聚甲醛4℃固定过夜,石蜡包埋;另一份液氮保存,实时定量转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测基因表达。将组织切片(4 μ m)进行HE染色观察不同时间点组织病理变化情况。

1.9 免疫组化检测伤口组CD31表达及微血管密度

伤口组织切片常规脱蜡脱水后,去石蜡、复水、微波炉中加热2次恢复抗原,3% H_2O_2 处理,5%山羊血清白蛋白孵育。然后用兔抗大鼠CD31一抗(1:75, Santa Cruz Biotechnology)4℃孵育过夜,再用HRP结合的山羊抗兔二抗(1:200, Abcam)孵育1h, DAB试剂盒显影,镜下观察CD31表达情况。每张玻片上选择低倍放大(5倍)下新生血管最多的3个区域,然后以20倍放大率对每个区域中随机选择的3个区域进行成像。使用Image-Pro Plus软件对图像进行分析。每张图像的平均血管数定义为微血管密度(MVD)。

1.10 免疫荧光检测Ki67表达

干预第7天时,采用免疫荧光检测伤口组织中Ki67的表达。常规脱蜡、脱水、抗原修复和阻断后,细胞与兔

抗-Ki67一抗(1:800, Abcam)孵育,然后与羊抗兔IgG Alexa Fluor[®] 594结合的二抗(1:400, Abcam)和DAPI结合。染色后切片在荧光显微镜上以20倍成像,每个样本随机选取5个区域进行分析。使用Image-Pro Plus软件计算每组阳性细胞的百分比。

1.11 qRT-PCR检测伤口组织中VEGF和TGF β -1的表达

采用TRIzol试剂从全层伤口组织中提取总RNA, HiScript II Q RT SuperMix for qPCR试剂盒合成cDNA。采用ChamQ SYBR qPCR Master Mix、cDNA和引物在Roche LightCycler[®] 96系统上进行RT-PCR扩增。管家基因 β -actin确定每个RNA样品的相对表达水平。数据分析采用标准的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法。引物由上海吉玛生物科技有限公司合成,引物序列如下:

β -actin-F: 5'TGCTATGTTGCCCTAGACTTCG

β -actin-R: 5'GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG

VEGF-F: 5'CAATGATGAAGCCCTGGAGTG

VEGF-R: 5'GCTCATCTCTCCTATGTGCTGG

TGF β 1-F: 5'GGCGGTGCTCGCTTTGTA

TGF β 1-R: 5'TCCCGAATGTCTGACGTATTGA

1.12 统计学分析

采用SPSS25.0对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示,组间差异的比较采用单因素方差分析和Tukey后检验,并计算95% CI。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体表征

BCA蛋白定量检测表明,50 mL hUCMSC上清液提取约3 mL hUCMSC-exos,浓度为1617.2 μ g/mL。透射电子显微镜显示,hUCMSC-exos呈典型的“双凹圆碟形”外泌体结构(图1A)。采用NanoSight LM 10分析hUCMSC-exos样品,确定其浓度为 4.19×10^{11} 颗粒/mL,44.4%的颗粒大小在30~150 nm(图1B)。Western blotting结果显示,hUCMSC-exos中外泌体标志物CD63和CD81蛋白呈阳性表达。本研究成功从hUCMSC上清液中提取到外泌体(图1C)。

2.2 Exos@CS-Gel的温度敏感性和摄取能力

随着CS浓度增加,Exos@CS-Gel初始胶凝化温度(IGT)降低。20% Exos@CS-Gel的IGT为 17.2 ± 1.4 ℃,28% Exos@CS-Gel的IGT为 11.8 ± 0.9 ℃。凝胶化时间与温度成反比。24%的Exos@CS-Gel在4℃时呈液态,37℃时呈半固态胶体状态(表1)。与24%的Exos@CS-Gel共培养12h后,HUVEC细胞的细胞质中出现代表hUCMSC-exos的绿色荧光,细胞核周围信号丰富,而与PBS和24% CS共培养的HUVEC则未出现明显的绿色荧光(图2)。

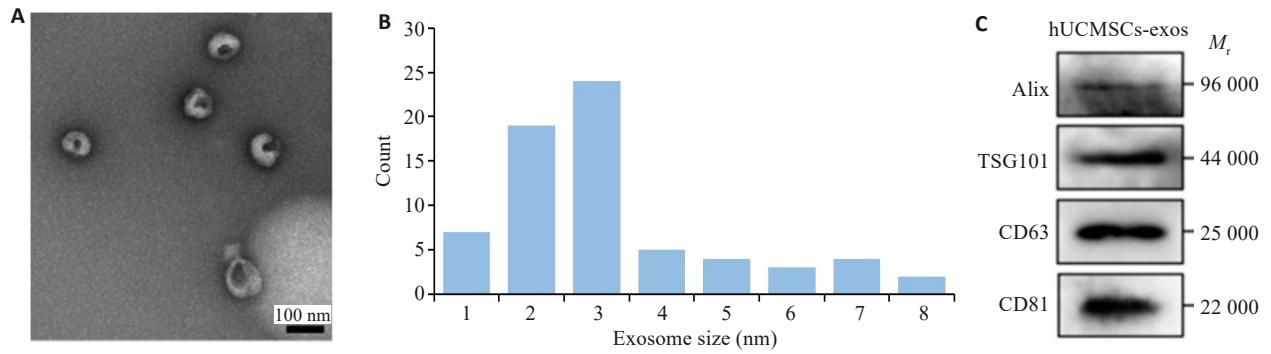


图1 外泌体提取及特征

Fig. 1 Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUVECs)-derived exosomes (hUCMSC-exos). **A:** Transmission electron microscopy (TEM) of hUCMSC-exos. **B:** Histogram showing the diameter and concentration distribution of hUCMSC-exos. **C:** Western blotting of exosomal markers (Alix, TSG101, CD63, and CD81) in hUCMSC-exos.

表1 不同浓度Exos@CS-Gel IGT和37 °C时凝胶化时间

Tab. 1 Initial gelation temperature (IGT) of different concentrations of Exos@CS-Gel and their gelation time at 37 °C (Mean±SD)

Concentration	IGT (°C)	Gelation time at 37 °C (s)
20%	17.2±1.4	92.7±6.3
22%	16.3±1.2	78.5±5.2
24%	14.2±1.5	66.3±3.4
26%	12.9±1.1	51.2±2.7
28%	11.8±0.9	46.9±2.9

IGT: Initial gelation temperature.

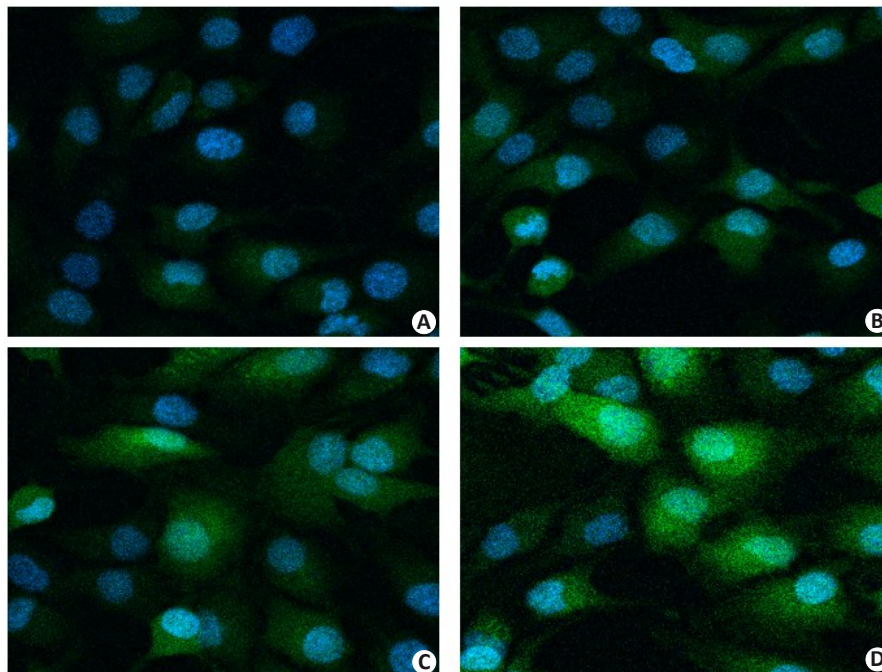


图2 PKH67染色追踪外泌体的细胞定位情况

Fig. 2 Cellular localization of exosomes tracked by PKH67 staining (Original magnification: ×400). **A:** PBS group. **B:** CS group. **C:** hUCMSCs-exos group. **D:** Exos@CS-Gel group. Green indicates PKH67 (exosome staining dye), and blue indicates DAPI (nuclear staining dye).

2.3 Exos@CS-Gel促进HUVEC迁移和增殖

与CS水凝胶组和对照组相比,hUCMSC-exos组和hUCMSC上清液组HUVEC细胞伤口愈合能力更

强,而hUCMSC-exos组的表现最好($P<0.001$,图3A,B)。CCK-8检测显示,Exos@CS-Gel对HUVEC增殖的促进作用优于其他两种干预方法($P<0.001$,图3C)。

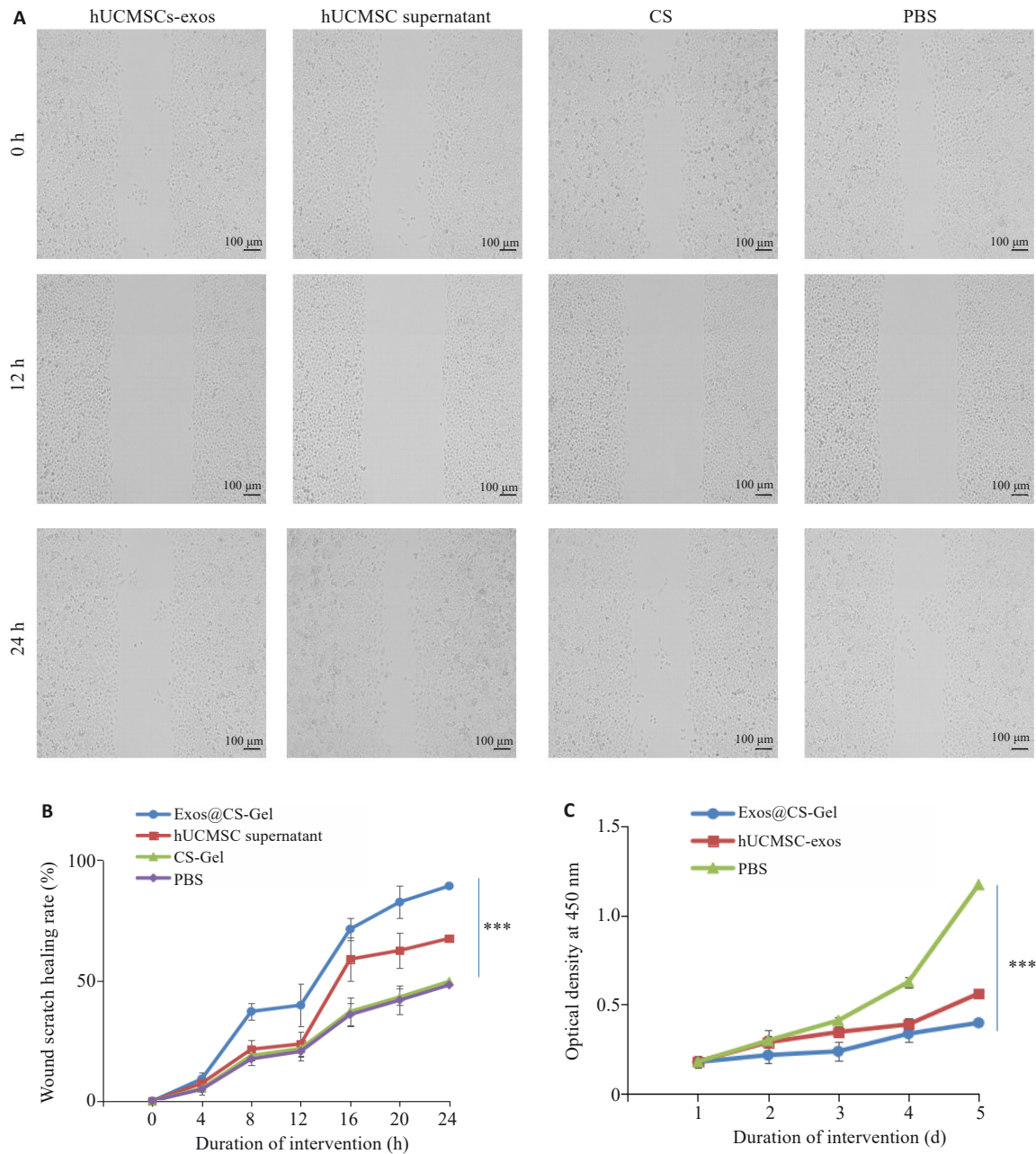


图3 Exos@CS-Gel对HUVEC迁移和增殖的影响

Fig.3 Effect of Exos@CS-Gel on HUVEC migration and proliferation. A: Wound healing assay showing the effect of Exos@CS-Gel on HUVEC cell migration ability. B: Comparison of wound healing rates among different groups. C: CCK-8 assay evaluating the effect of Exos@CS-Gel on HUVEC proliferation ability. *** $P<0.001$.

2.4 伤口愈合率分析

术后第3天,各组伤口愈合情况的差异无统计学意义($P>0.05$)。术后第7、14天,Exos@CS-Gel组伤口面积小于其他组(图4A)。术后14d,Exos@CS-Gel、hUCMSC-exos、CS水凝胶组的创面愈合分别为90.2%、25.98%及16.28%,均高于对照组的9.12%,差异均有统计学意义($P<0.01$,图4B)。

2.5 组织学检测结果

干预第14天时,各组大鼠皮肤伤口新生肉芽组织表皮均完整、厚实。Exos@CS-Gel组伤口表面中央有明显的新毛囊形成,表皮下有成纤维细胞增殖,胶原沉积充分有序。hUCMSC-exos和CS水凝胶组未观察到这些现象。对照组和CS水凝胶组均未在伤口中心发现新毛囊。对照组在第14天仍观察到明显的炎症细胞浸润(图5)。

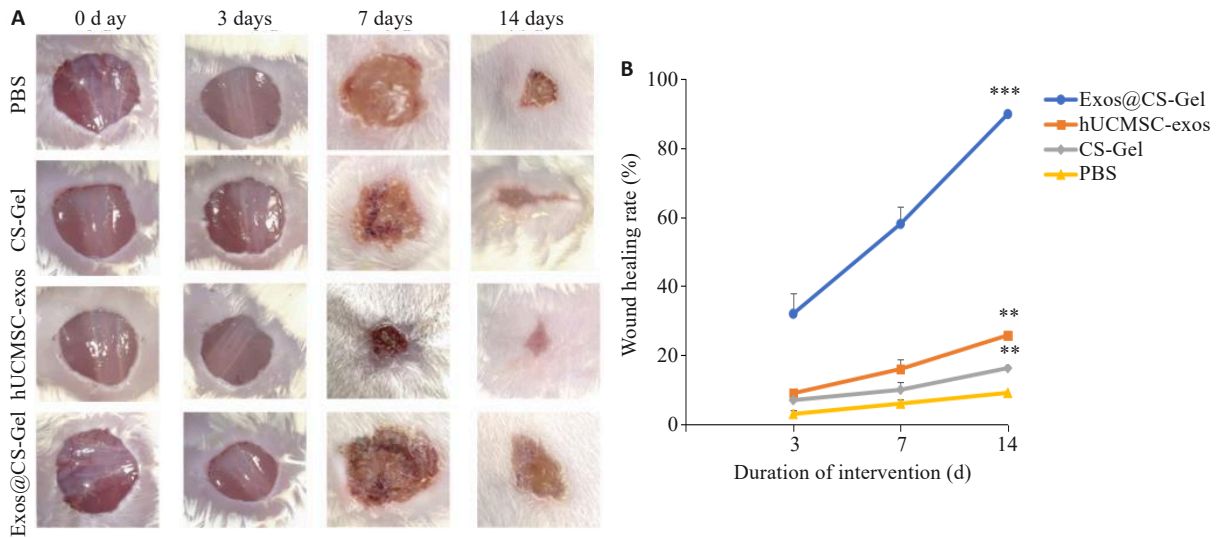


图4 各组大鼠伤口愈合情况

Fig.4 Wound healing c in each group of rats. A: Representative wound images of each group on days 0, 3, 7, 14. B: Comparison of wound area changes over time among the groups. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS group.

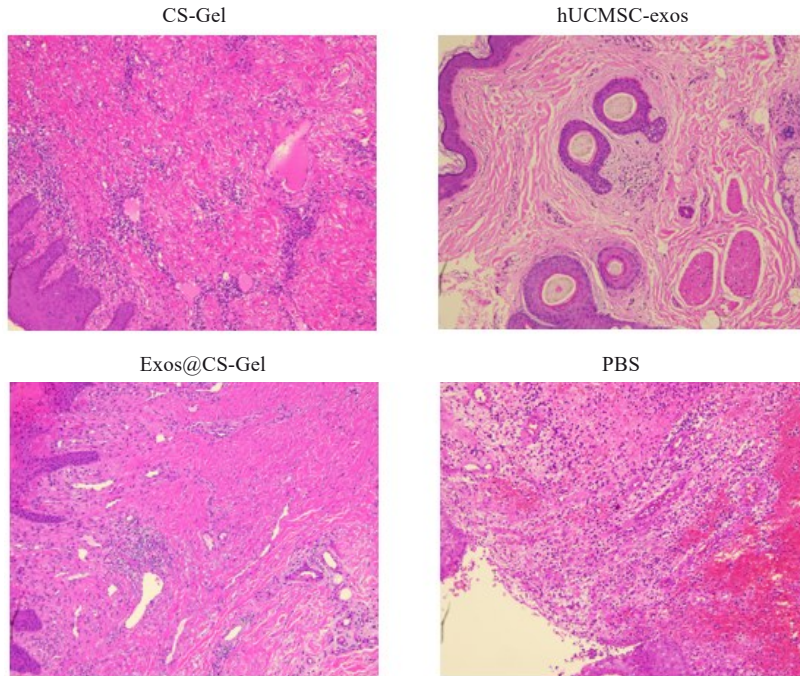


图5 各组大鼠干预第14天时伤口组织HE染色结果比较

Fig.5 HE staining of the wound tissues in each group on day 14 after treatments (×100).

2.6 Exos@CS-Gel对大鼠伤口组织血管生成的影响

各组大鼠干预后第7天时, Exos@CS-Gel组和hUCMSC-exos组血管数量明显高于CS水凝胶组或对照组。第14天时, Exos@CS-Gel组和hUCMSC-exos组的MVD明显高于其他组(图6)。

2.7 Exos@CS-Gel对大鼠伤口组织Ki67表达的影响

免疫荧光染色检测显示, 与PBS组相比, 干预后第7天 Exos@CS-Gel组 Ki67表达增加($P < 0.01$), hUCMSC-exos组和CS水凝胶组 Ki67表达也高于PBS组($P < 0.05$, 图7)。

2.8 Exos@CS-Gel对大鼠伤口组织对VEGF和TGFβ-1表达水平的影响

qRT-PCR分析表明, 干预后第7天和第14天时, Exos@CS-Gel组和hUCMSC-exos组伤口肉芽组织中VEGF和TGFβ-1表达水平高于CS水凝胶组和对照组(图8)。

3 讨论

目前临床上多采用生长因子、负压吸引治疗慢性糖尿病伤口, 但生长因子(rhEGF/bFGF)易被蛋白酶降解、

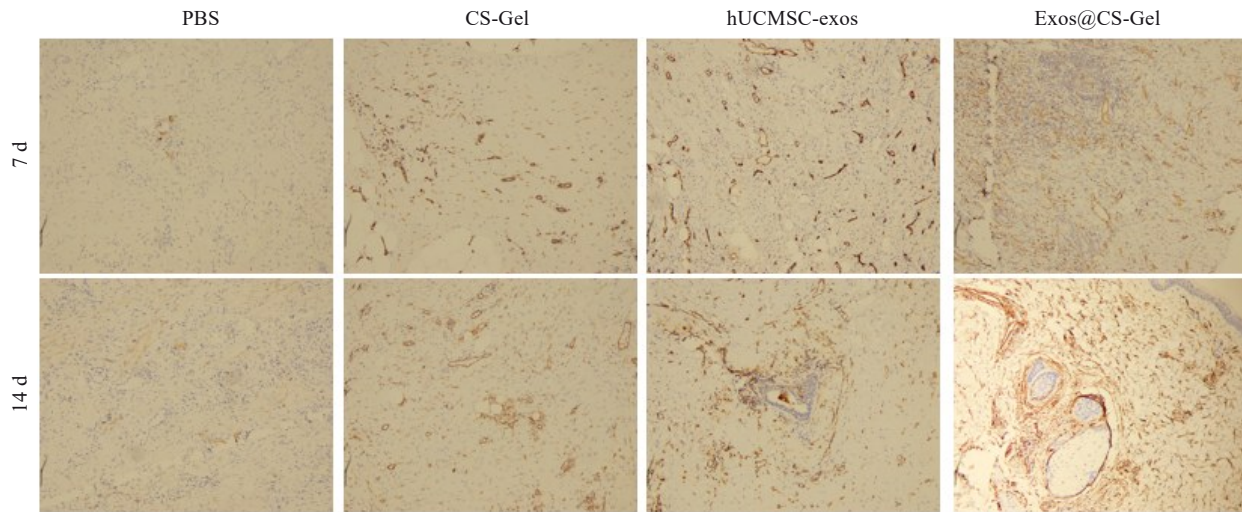


图6 Exos@CS-Gel对大鼠伤口组织血管生成的影响

Fig.6 Effect of Exos@CS-Gel on angiogenesis in rat wound tissues assess by immunohistochemical detection of CD31 expression (vascular endothelial cell marker) in the wound tissues from each group on day 7 and 14 after the treatments (immunohistochemical staining, ×100).

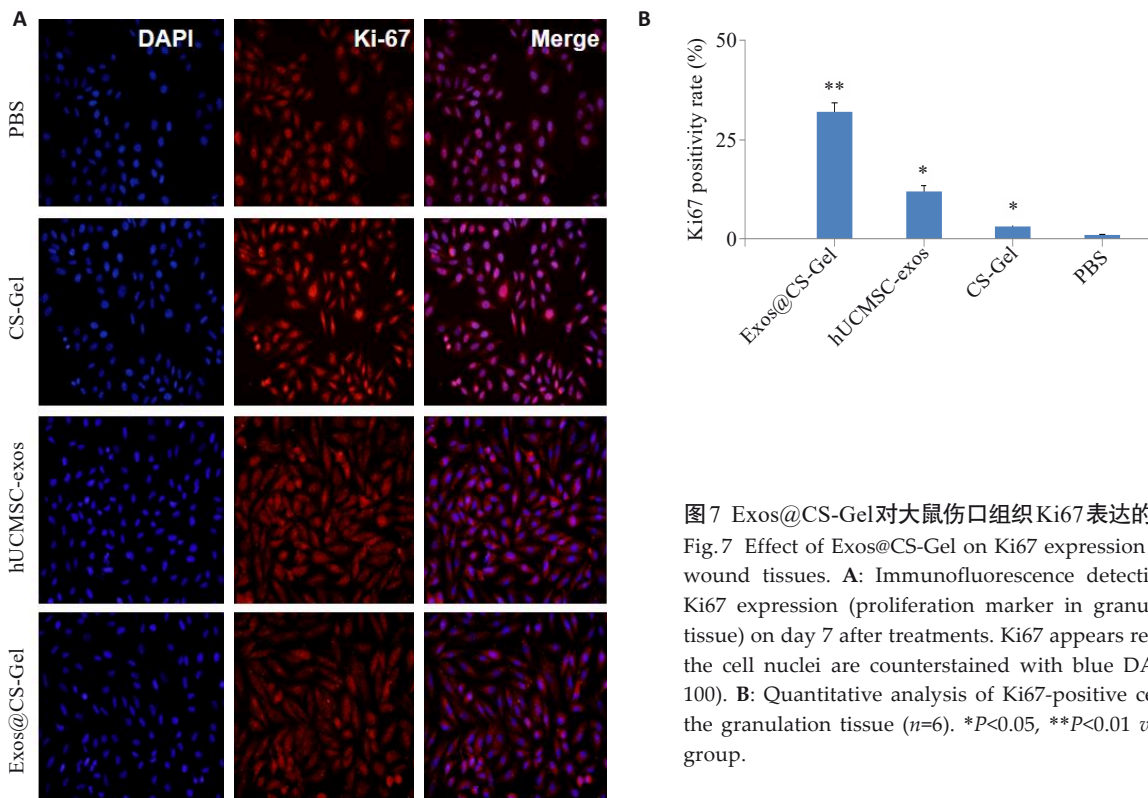


图7 Exos@CS-Gel对大鼠伤口组织Ki67表达的影响

Fig.7 Effect of Exos@CS-Gel on Ki67 expression in rat wound tissues. A: Immunofluorescence detection of Ki67 expression (proliferation marker in granulation tissue) on day 7 after treatments. Ki67 appears red and the cell nuclei are counterstained with blue DAPI (× 100). B: Quantitative analysis of Ki67-positive cells in the granulation tissue (n=6). *P<0.05, **P<0.01 vs PBS group.

需频繁给药、成本高昂;而负压吸引设备依赖性强、无法主动促进细胞再生^[13]。而本研究制备的Exos@CS-Gel能够延长外泌体滞留时间,由于外泌体携带多种miRNA/蛋白(如VEGF),能够同时激活血管新生、抑制炎症;且hUCMSC来源稳定、无免疫排斥风险。基于hUCMSCs-exos的无细胞疗法能够有效促进伤口愈合,降低截肢率,减轻糖尿病社会和医疗负担的理念,本研究构建了负载hUCMSC-exos的壳聚糖水凝胶(Exos@CS-Gel),并将其应用于糖尿病大鼠皮肤损伤模

型,分析Exos@CS-Gel对外泌体体外存活能力及糖尿病伤口愈合能力的影响。结果显示,Exos@CS-Gel显著促进了糖尿病大鼠伤口愈合,同时能够较长时间维持hUCMSC-exos的生物活性。

已有研究将干细胞疗法应用于伤口修复。有研究表明,ADSC和自体生长因子促进伤口愈合的效果相同,ADSC能够通过增加新血管生成、胶原蛋白合成和诱导有利免疫调节作用,促进人类和动物伤口愈合^[14]。ADSC具有多向分化潜能,能够分泌外泌体,外泌体中

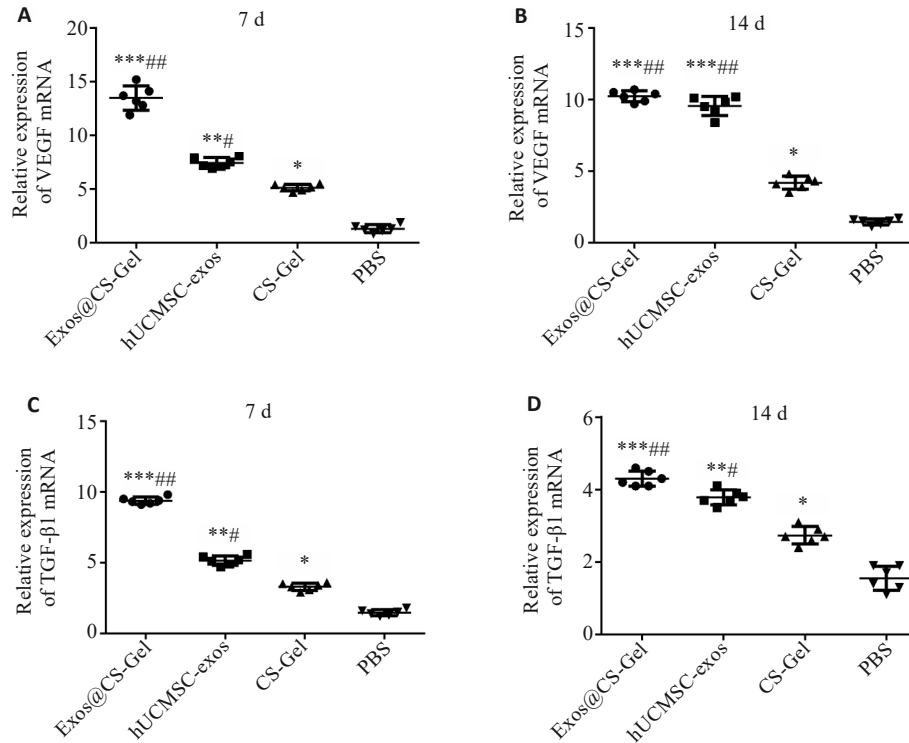


图8 Exos@CS-Gel对大鼠伤口组织对VEGF和TGF-β1表达水平的影响

Fig. 8 Effect of Exos@CS-Gel on VEGF and TGF-β1 expression levels in rat wound tissues, assessed by qRT-PCR of mRNA expression levels of VEGF (A, B) and TGF-β1 (C, D) in the wound granulation tissues on day 7 and day 14 after treatments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs PBS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CS-Gel group.

含有microRNA、RNA和各种生长因子、炎症因子、细胞因子和趋化因子,包括具有抗炎作用的IL-6、IL-8和TNF- α ,以及参与血管形成的VEGF^[15]。此外,另一类与ADSC相似的干细胞——HFSC,也具有促进再上皮化和改善血管生成的能力,并能促进毛囊再生的独特特性。HFSC可以向损伤部位迁移,然后转化为终末分化细胞,参与再上皮化和屏障修复。虽然HFSC促进伤口愈合的机制尚不清楚,但有研究表明,包括Wnt、BMP、Notch和SHH在内的信号通路参与了毛囊再生和伤口修复,其中Wnt/ β -catenin通路起着重要的调节作用^[16]。研究证明,hUCMSCs能够有效促进糖尿病患者慢性难治性伤口愈合,包括刺激血管生成、改善糖尿病周围神经病变和调节免疫^[17-19]。相较于ADSC和HFSC,hUCMSCs的免疫原性更低,而再生及分化能力更强^[20],因此本研究选用hUCMSCs作为外泌体来源于干细胞。

尽管外泌体已被用于伤口修复,但现有研究多直接注射或局部涂抹外泌体悬液,其半衰期短、易失活的缺陷严重限制疗效。本研究将hUCMSC-exos与壳聚糖水凝胶结合,通过物理包埋和电荷相互作用实现外泌体长效缓释(72 h释放85%),解决了外泌体递送效率低的核心瓶颈。既往壳聚糖水凝胶研究主要利用其抗菌性或作为单一药物载体,而本研究通过负载外泌体赋予其

主动调控血管新生和炎症微环境的能力,实现了“被动屏障保护”与“主动再生诱导”的双重功能协同。最近研究表明,干细胞衍生的外泌体含有mRNA、miRNA、生长因子和其他各种蛋白质,可参与各种生理过程。这些过程包括止血、血栓形成、炎症、免疫相互作用、血管生成和伤口愈合过程,如再上皮化、新生血管形成/血管成熟、胶原沉积以及毛囊和皮脂腺的发育^[21]。例如,含有miR-21、miR-23a、miR-125b和miR-145的hUCMSC外泌体可抑制伤口愈合过程中成纤维细胞的增殖,从而减少疤痕的形成^[22]。然而,尽管外泌体具有可观的医疗前景,但其在室温下快速膨胀和失活限制了其应用。因此,选用合适的材料作为外泌体治疗的载体对“无细胞疗法”用于伤口愈合治疗至关重要。本研究采用CS水凝胶作为hUCMSC外泌体的载体,显示出了良好的性能。CS水凝胶以往作为其他来源外泌体及药物,基因载体应用于多种人类疾病的治疗取得了良好的效果^[23,24]。本研究结果与以往研究结果类似,表明CS水凝胶是糖尿病伤口愈合治疗的有效敷料。以往研究表明,各种水凝胶都能促进慢性伤口愈合^[25]。水凝胶在低温下呈液态,随着温度升高逐渐凝固,能够适应形状不规则的糖尿病伤口^[26]。CS具有良好的生物相容性和可吸收性,已被美国食品药品监督管理局批准用于人体^[27]。CS水

凝胶能为伤口愈合提供湿润的环境,并起到阻挡有害物质的作用,因此本研究中CS水凝胶组的伤口愈合效果优于对照组。

目前仍然缺乏成熟有效的间充质干细胞外泌体治疗糖尿病伤口的办法。有研究表明,CS可以包裹ADSCs,从而使ADSCs在材料内保持高存活率和高生物活性。将CS包裹的异体ADSCs移植到糖尿病大鼠伤口上,可有效加快伤口愈合速度,促进肉芽组织的细胞增殖和血管生成^[28]。本研究构建的负载hUCMSC-exos的CS水凝胶,能保持外泌体的生物活性,并在伤口表面持续释放外泌体,促进伤口愈合。本研究培养了hUCMSCs,并从细胞上清液中提取了外泌体,由于24%CS的凝胶时间适中,因此作为外泌体载体。为分析细胞对外泌体的摄取能力,本研究将PKH67标记的hUCMSC-exos与HUVECs共培养12h,结果在细胞质中观察到发出绿色荧光的外泌体,定位和富集于细胞核周围。HUVEC中加入PBS和24%CS水凝胶作为对照时,未观察到绿色荧光。结果表明,hUCMSC-exos可穿透细胞膜并富集在细胞核周围,有助于发挥其功能。

本研究结果表明,hUCMSC-exos和Exos@CS-Gel都能在体内治疗后的前3d减少伤口面积,Exos@CS-Gel比其他治疗方法具有更快的愈合速度,Exos@CS-Gel组中,hUCMSC-exos的生物活性在CS凝胶的保护下得以延长;CD31免疫组化结果表明,Exos@CS-Gel组和hUCMSC-exos组中,血管生成明显增加,且Exos@CS-Gel组血管生成能力增加更明显,表明Exos@CS-Gel组可能保留了更多的功能性外泌体,并在基于水凝胶的皮肤伤口输送过程中持续释放。在体外,与hUCMSC-exos组相比,Exos@CS-Gel组具有更强的促进HUVEC增殖和迁移的能力,这表明Exos@CS-Gel持续释放的功能性外泌体可加速内皮细胞的增殖和迁移,从而促进血管生成。此外,Exos@CS-Gel组和hUCMSC-exos组中,VEGF mRNA表达水平与血管密度呈相似的上升趋势。VEGF是刺激血管生成的重要因子,与两种主要表达在内皮细胞上受体结合,并与其他血管生成因子协同刺激和维持血管系统^[29]。VEGF和TGFβ-1表达减少与血管生成减少有关,是糖尿病患者组织愈合延迟的重要原因^[30-32]。与CS组和对照组相比,Exos@CS-Gel组TGFβ-1 mRNA表达水平明显升高,而hUCMSC-exos组与对照组相比也呈上升趋势。干预后第7天,与其他3组相比,Exos@CS-Gel组伤口组织中反映增殖情况的Ki67阳性细胞数量明显增加。这些结果与伤口愈合率、血管生成和组织学结果一致,表明CS水凝胶可作为外泌体支架,延长外泌体体外存活时间,并将其原位输送至糖尿病伤口。

综上,本研究构建的负载hUCMSC-exos的CS水凝胶可提高hUCMSC-exos在糖尿病伤口炎症环境中的存活率,并保持hUCMSC-exos的活力。随着时间推移,外泌体持续作用于伤口组织,促进伤口肉芽组织血管生成,最终缩短糖尿病伤口愈合时间。CS水凝胶在体内可快速降解,对宿主无不良影响。这种水凝胶可控制各种生化物质的释放,是应用于糖尿病伤口和溃疡复杂环境的理想生物支架。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] McGuire J, Thomson A, Kennedy PG. The biomechanics of diabetic foot amputation[J]. Wounds, 2021: WNDS20210414-2.
- [2] Jiang PN, Li QH, Luo YH, et al. Current status and progress in research on dressing management for diabetic foot ulcer[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1221705.
- [3] Ferreira G, Faria S, Carvalho A, et al. Relaxation intervention to improve diabetic foot ulcer healing: Results from a pilot randomized controlled study[J]. Wound Repair Regen, 2023, 31(4): 528-41.
- [4] Pereira MG, Vilaça M, Pedras S, et al. Wound healing and healing process in patients with diabetic foot ulcers: a survival analysis study[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2023, 198: 110623.
- [5] Rehman ZU, Khan J, Noordin S. Diabetic foot ulcers: contemporary assessment and management[J]. J Pak Med Assoc, 2023, 73(7): 1480-7.
- [6] Deng HB, Li BH, Shen Q, et al. Mechanisms of diabetic foot ulceration: a review[J]. J Diabetes, 2023, 15(4): 299-312.
- [7] Ju YK, Hu Y, Yang P, et al. Extracellular vesicle-loaded hydrogels for tissue repair and regeneration[J]. Mater Today Bio, 2022, 18: 100522.
- [8] Zou JX, Yang WN, Cui WS, et al. Therapeutic potential and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes as bioactive materials in tendon-bone healing[J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 14.
- [9] Wang T, Gao HQ, Wang DZ, et al. Stem cell-derived exosomes in the treatment of *Melasma* and its percutaneous penetration[J]. Lasers Surg Med, 2023, 55(2): 178-89.
- [10] Liu YY, Zhang MW, Liao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes promote murine skin wound healing by neutrophil and macrophage modulations revealed by single-cell RNA sequencing[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1142088.
- [11] Zhang KY, Zhao XN, Chen XN, et al. Enhanced therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes with an injectable hydrogel for hindlimb ischemia treatment[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(36): 30081-91.
- [12] Li ZT, Xing XL, Zhao CR, et al. A rapid interactive chitosan-based medium with antioxidant and pro-vascularization properties for infected burn wound healing[J]. Carbohydr Polym, 2024, 333: 121991.
- [13] 陈金妙, 朱灵颖, 廖米荣, 等. 糖尿病慢性伤口感染患者的临床特点及伤口愈合的危险因素分析[J]. 中国现代医生, 2022, 60(27): 50-4.

- [14] Bi HS, Li H, Zhang C, et al. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 302.
- [15] Kim J, Lee CB, Shin Y, et al. sEVs from tonsil-derived mesenchymal stromal cells alleviate activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through miR-486-5p[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(4): 1471-86.
- [16] Keramaris NC, Kaptanis S, Moss HL, et al. Endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in bone healing [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012, 7(4): 293-301.
- [17] Wang LM, Chen J, Song J, et al. Activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway enhances exosome production by hucMSCs and improves their capability to promote diabetic wound healing[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1): 373.
- [18] Teng LP, Maqsood M, Zhu M, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells accelerate diabetic wound healing *via* promoting M2 macrophage polarization, angiogenesis, and collagen deposition[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10421.
- [19] Yan CC, Xv Y, Lin Z, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes accelerate diabetic wound healing *via* ameliorating oxidative stress and promoting angiogenesis[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 829868.
- [20] 蒋 杨, 陈 博, 王贤君, 等. 人脐带间充质干细胞治疗肺部疾病的研究与应用进展[J]. *临床肺科杂志*, 2022, 27(1): 124-9.
- [21] He SH, Hou TY, Zhou JL, et al. Endothelial cells promote migration of mesenchymal stem cells *via* PDGF-BB/PDGFR β -src-Akt in the context of inflammatory microenvironment upon bone defect[J]. *Stem Cells Int*, 2022, 2022: 2401693.
- [22] Song YL, You YC, Xu XY, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes biopotential extracellular matrix hydrogels accelerate diabetic wound healing and skin regeneration [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(30): e2304023.
- [23] 张丁丁, 郭 荣, 赵松峰, 等. 载锰单原子纳米酶和驱蛔素的壳聚糖水凝胶制备及其抗幽门螺杆菌活性[J]. *中草药*, 2024, 55(6): 1925-34.
- [24] 由子樱, 伍彦霖, 孙一民, 等. 搭载米诺环素-壳聚糖纳米粒复合水凝胶用于牙周炎治疗的初步研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2023, 41(1): 11-20.
- [25] Kwon SK, Song JJ, Cho CG, et al. Polycaprolactone spheres and thermosensitive Pluronic F127 hydrogel for vocal fold augmentation: *in vivo* animal study for the treatment of unilateral vocal fold palsy[J]. *Laryngoscope*, 2013, 123(7): 1694-703.
- [26] Wang CG, Wang M, Xu TZ, et al. Engineering bioactive self-healing antibacterial exosomes hydrogel for promoting chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration[J]. *Theranostics*, 2019, 9(1): 65-76.
- [27] Yang MY, Li JP, Gu P, et al. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(7): 1973-87.
- [28] Amiri Z, Molavi AM, Amani A, et al. Fabrication, characterization and wound-healing properties of core-shell SF@chitosan/ZnO/*Astragalus arbusculus* gum nanofibers[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2024, 19(6): 499-518.
- [29] le Noble F, Kupatt C. Interdependence of angiogenesis and arteriogenesis in development and disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3879.
- [30] Idrovo JP, Yang WL, Jacob A, et al. Combination of adrenomedullin with its binding protein accelerates cutaneous wound healing[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120225.
- [31] Oviedo-Socarrás T, Vasconcelos AC, Barbosa IX, et al. Diabetes alters inflammation, angiogenesis, and fibrogenesis in intra-peritoneal implants in rats[J]. *Microvasc Res*, 2014, 93: 23-9.
- [32] Chuar PF, Ng YT, Phang SCW, et al. Tocotrienol-rich vitamin E (tocovid) improved nerve conduction velocity in type 2 diabetes mellitus patients in a phase II double-blind, randomized controlled clinical trial[J]. *Nutrients*, 2021, 13(11): 3770.

(编辑:郎 朗)