

·基础研究·

成纤维细胞与间充质干细胞来源外泌体修复急性皮肤创面的比较

李锐阳¹, 董秋霖¹, 胡金华², 姜美花¹

(1. 中山大学中山医学院干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510080; 2. 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心泌尿外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】本研究旨在比较成纤维细胞来源外泌体与间充质干细胞来源外泌体对小鼠急性皮肤创面的修复作用。【方法】体外分离培养原代人真皮成纤维细胞(hDF)并鉴定。用超速离心法提取人真皮成纤维细胞来源外泌体(hDF-EXO)、人骨髓间充质干细胞来源外泌体(hMSC-EXO)并鉴定;两种外泌体与hDF共培养24 h后,CCK8细胞增殖实验和划痕实验检测细胞增殖和迁移活性;采用8周龄雌性C57BL/6小鼠构建急性全层皮肤切除模型,在伤口上分别局部涂敷PBS(对照组)、hDF-EXO、hMSC-EXO进行治疗。术后第0、2、4、7天观察小鼠伤口并计算伤口面积。术后第1天取伤口组织检测外泌体摄取情况,并利用qPCR检测伤口组织TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-10炎症因子水平。术后第7天取伤口组织进行HE染色观察伤口组织结构变化,免疫荧光染色观察伤口组织PDGFR- α 、 α -SMA、Ki67表达情况。【结果】hDF表面分子及特异性标志物表达符合成纤维细胞特性。hDF-EXO和hMSC-EXO的形状、粒径、标志物均符合外泌体鉴定标准,且两者浓度差异无统计学意义($P>0.05$);体外试验数据显示,CCK8法检测显示hDF-EXO组和hMSC-EXO组的细胞活力均显著高于对照组($P<0.01$),且hDF-EXO组的细胞活力明显高于hMSC-EXO组($P<0.01$)。划痕实验显示,hDF-EXO组24 h划痕面积修复率显著高于对照组($P<0.01$)和hMSC-EXO组($P<0.05$);体内试验数据显示,术后第1天,观察到两种外泌体均被移植周围组织摄入。qPCR检测hDF-EXO组和hMSC-EXO组伤口组织TNF- α 、IL-6、IL-1 β 炎症因子水平均显著低于对照组(均 $P<0.01$),且hMSC-EXO组炎症因子水平低于hDF-EXO组(均 $P<0.01$)。术后第7天hDF-EXO组和hMSC-EXO组伤口面积均显著小于对照组(均 $P<0.01$),且hDF-EXO组伤口面积小于hMSC-EXO组($P<0.05$)。HE染色显示,与对照组相比,hMSC-EXO组小鼠伤口残留血痂,表皮不连续,仅有部分新生纤维组织。hDF-EXO组小鼠实现了更快的伤口再上皮化,表皮连续性好,新生纤维组织排列整齐。免疫荧光染色显示,hDF-EXO组和hMSC-EXO组相对对照组,成纤维细胞、肌成纤维细胞及增殖细胞数量显著增多,且hDF-EXO组明显多于hMSC-EXO组。【结论】两种外泌体均能有效促进创面愈合,hDF-EXO通过显著促进成纤维细胞增殖、迁移以及分化为肌成纤维细胞(FMT)加速伤口修复,且其修复作用优于hMSC-EXO。而hMSC-EXO相较于hDF-EXO在伤口早期可发挥更佳的炎症抑制作用。

关键词:外泌体;伤口愈合;成纤维细胞;间充质干细胞

中图分类号:R64

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2023)03-0369-10

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2023.0302

Comparison of Exosomes Derived from Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Wound Healing

LI Rui-yang¹, DONG Qiu-lin¹, HU Jin-hua², JIANG Mei-hua¹

(1. Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pediatric Urology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

Correspondence to: JIANG Mei-hua; E-mail: jiangmh2@mail.sysu.edu.cn

收稿日期:2023-02-10

基金项目:国家自然科学基金(31972894)

作者简介:李锐阳,硕士生,研究方向:干细胞与再生医学,E-mail:449692853@qq.com;姜美花,通信作者,教授,博士生导师,E-mail:jiangmh2@mail.sysu.edu.cn

Abstract: **[Objective]** To compare the therapeutical effect of exosomes derived from fibroblasts and mesenchymal stem cells on acute wound healing. **[Methods]** Primary human dermal fibroblasts (hDF) were isolated, cultured and identified. Human bone marrow mesenchymal stem cell exosomes (hMSC-EXO) and hDF exosomes (hDF-EXO) were extracted by ultracentrifugation. After 24 h of coinubation with hDF-EXO or hMSC-EXO, hDFs proliferation and migratory capacity were evaluated by cell counting kit-8 (CCK8) assay and scratch test. Full-thickness cutaneous wounds were created on 8-week-old female C57BL/6 mice, and topically applied with PBS (control), hDF-EXO or hMSC-EXO. Wounds were measured at day 0, 2, 4, 7, and the uptake of exosomes in wound was observed at day 1. Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed to detect the mRNA expression levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 in wound at day 1. HE staining was conducted to analyze the histological structure of wounds at day 7, while immunofluorescence staining was used to examine expression of PDGFR- α , α -SMA, Ki67. **[Results]** hDF exhibited certain fibroblast-like characteristics with respect to expression of cell surface markers and specific proteins. hDF-EXO and hMSC-EXO presented exosomal morphology, size, and markers, and both concentrations were not statistically different ($P>0.05$); CCK8 assay showed that both exosomes promoted hDF cell viability, compared with the negative control ($P<0.01$), and hDF-EXO group had greater cell viability than hMSC-EXO group ($P<0.01$). Scratch test indicated that hDF-EXO induced a significant increase in scratch healing rate versus the negative control ($P<0.01$), hMSC-EXO ($P<0.05$). In vivo experiments showed wound tissues took up exosomes at day 1. qPCR detected TNF- α , IL-6, IL-1 β expression levels in wound at day 1 were lower in exosomes group than in the control group, and were the lowest in hMSC-EXO group (all $P<0.01$). Wound areas were measured smaller at day 7 in exosomes group than in the control group (all $P<0.01$) and hDF-EXO group had better closure than hMSC-EXO group ($P<0.05$). HE staining revealed that compared with control group, scar, incomplete epidermis and few collagen deposition remained in the hMSC-EXO group, whereas hDF-EXO group showed re-epithelialization, continuous neo-epidermis and regenerated dermis. Immunofluorescence staining suggested that the number of fibroblasts, myofibroblasts, proliferating cells was higher in both exosomes group than that in the control group, especially the highest in hDF-EXO group. **[Conclusion]** Our study shows both exosomes accelerate wound healing, whereas hDF-EXO is more effective in promoting fibroblasts proliferation, migration, transition to myofibroblasts, and hMSC-EXO may play a role in inhibiting inflammatory reaction during early stage of wound healing.

Key words: exosome; wound healing; fibroblast; mesenchymal stem cell

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2023, 44(3): 369-378]

皮肤是人体抵御外界环境刺激的第一道防线,大面积撕裂伤、烧伤等急性大面积伤口,以及与肥胖、糖尿病相关的慢性皮肤损伤等严重影响患者生活质量,受到社会广泛关注^[1-2]。因此,探究加速伤口愈合及组织修复机制成为该领域研究热点。成纤维细胞是皮肤真皮层中最主要的实质细胞,发挥维持皮肤稳态和修复组织缺损的重要作用,是创面修复的关键效应细胞。创面修复需要经过成纤维细胞增殖、迁移、分化等机制才能实现皮肤组织结构的再生^[3]。作为一种受损组织的补充细胞疗法,干细胞移植治疗成为了创面修复的新思路。研究显示,成纤维细胞^[4]和间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[5]在加速创面愈合中发挥重要作用,主要通过旁分泌机制减轻炎症、调控细胞外基质重塑、促进血管生成等效应重建皮肤组织。然而,干细胞治疗存在局限性,包

括伦理限制、突变和致瘤性、来源、数量的限制,以及免疫排斥等。干细胞来源外泌体作为细胞旁分泌的关键活性物质表现出与来源细胞相似的生物学效应,且没有免疫原性和恶性转化的风险,易获得、储存和运输等优势,为皮肤再生提供了更安全有效的方案^[6]。近年来研究表明 MSC 外泌体^[7]和成纤维细胞外泌体^[8-9]在伤口愈合、皮肤再生方面显示出良好疗效,但何种来源的外泌体更适合急性伤口愈合尚未探究。本研究主要通过细胞实验和构建急性全层皮肤切除小鼠模型,探讨比较人真皮成纤维细胞来源外泌体(human dermal fibroblast-derived exosome, hDF-EXO)和骨髓间充质干细胞来源外泌体(human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome, hMSC-EXO)对急性伤口愈合的治疗效果。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

SPF级雌性C57BL/6健康小鼠购于广东省医学实验动物中心,8周龄,体质量18~20 g。饲养于中山大学动物实验中心SPF级饲养室,本研究已通过实验动物伦理委员会审查,严格遵照《实验动物环境及设施(GB14925-2010)》,根据中山大学实验动物操作标准进行动物实验。

1.2 细胞培养

人真皮成纤维细胞(hDF)按照已有方法^[10]在健康儿童手术切除的包皮组织中分离提取,临床组织样本由广州市妇女儿童医疗中心在患者监护人知情并同意后提供。新鲜切除的皮肤组织立刻转移至无菌超净台内,用无菌的PBS溶液清洗皮肤组织,去除血管、脂肪、肌肉、筋膜后将组织切成小块,表皮向上地漂浮置于Dispase II (Roche,瑞士)4℃消化24 h。剥离表皮,分离真皮后切碎放入I型胶原酶在37℃消化30 min,终止,将细胞重悬后过70 μm细胞筛网,300×g再次离心后使用含10 g/L胎牛血清、1%青霉素/链霉素的DMEM/F12培养基(Gibco,美国)重悬细胞并接种于细胞培养瓶中贴壁培养,将培养瓶置于37℃,体积分数5% CO₂培养箱。人骨髓间充质干细胞(hMSC)从健康捐献者的骨髓中提取,通过Ficoll-Hypaque密度梯度离心法获得细胞悬液,使用无血清培养基(Gibco,美国)于37℃,体积分数5% CO₂培养箱培养,当细胞密度达80%时用胰蛋白酶消化分离。经鉴定,hMSC表达CD90、CD73、CD105分子标志物,不表达CD45、CD34、CD11b、CD19;具有成脂、成骨、成软骨的多向分化潜能^[11]。

1.3 流式细胞术检测hDF的表面分子

用1.25 g/L胰蛋白酶消化第3代hDF,转移至流式管中,4℃,450×g离心5 min,用100 μL PBS重悬。分别在室温下避光孵育流式抗体PE-CD90 (eBioscience), FITC-CD105 (BD), FITC-CD73 (eBioscience), PC7-CD34 (BD), APC-CD45 (BD), 15 min。标上抗体后,用PBS清洗多余抗体、离心、重悬后用流式细胞仪(Beckman Coulter,美国)检测细胞荧光。

1.4 外泌体提取及鉴定

细胞生长到第3代时将培养基中的胎牛血清

换为无外泌体胎牛血清继续培养,收集细胞培养液提取外泌体。收集第3~5代细胞培养上清液,用超速离心法分离外泌体。4℃2 000×g离心10 min去除培养液中的细胞及细胞碎片,保留上清液在4℃10 000×g离心30 min去除细胞器等杂质,另用0.22 μm滤器过滤。滤液在4℃120 000×g离心90 min,用大量PBS重悬沉淀后于4℃120 000×g再次离心90 min。最后用50 μL PBS重悬外泌体,样品立刻使用或冻于-80℃备用。利用BCA试剂盒(Thermo Fisher Scientific,美国)定量外泌体浓度。

用2%戊二醇固定外泌体样品,将20 μL样本滴在碳膜铜网放置5 min。用滤纸吸去多余液体后用2%磷钨酸负染固定,室温干燥后使用透射电镜(Hitachi,日本)观察拍照;将外泌体样品用PBS稀释后,用纳米颗粒跟踪分析(NTA)机NS300 Nano-sight instrument (Malvern, UK)进行检测,分析出外泌体粒径大小以及浓度;Western Blot验证外泌体特异性标志物CD81, TSG101, HSP70的表达。

1.5 CCK8实验

hDF消化计数后按2×10³/孔种至96孔板置于37℃,体积分数5% CO₂培养箱中培养,6 h贴壁后换液加入实验培养液,每组设6个复孔。实验分组共3组,其中空白对照组仅含培养基无细胞,阴性对照组为无血清培养基常规培养hDF,实验组为含10 μg/mL外泌体的无血清培养基孵育hDF。24 h后,每孔加入10 μL CCK8试剂(碧云天,中国)继续在培养箱中孵育2 h,用酶标仪(Tecan,瑞士)在450 nm波长处测定每组吸光度(OD)值,各组细胞相对活力=(实验组OD值-空白对照组OD值)/(对照组OD值-空白对照组OD值)。

1.6 划痕实验

将hDF消化计数后按2×10⁵/孔种至6孔板在37℃,体积分数5% CO₂培养箱中培养。24 h贴壁铺满后用200 μL枪头垂直孔板进行划痕,用PBS轻轻冲洗细胞3次后加入实验培养液。实验分组共2组,其中阴性对照组为无血清培养基常规培养hDF,实验组为含10 μg/mL外泌体的无血清培养基孵育hDF。在0、24 h时拍照记录,通过Image J软件测量划痕区域面积。计算划痕修复率,划痕修复率(%)=(1-24 h划痕面积÷0 h划痕面积)×100%。

1.7 动物实验

以40 mg/kg的剂量腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,待小鼠进入麻醉状态后,背部进行剃毛、消

毒。使用活检取样器、剪刀、镊子在小鼠背部正中剪出2个直径为5 mm,深度为1 mm的全层皮肤伤口(表皮、真皮、皮下组织均剪除),建立急性全层皮肤切除小鼠模型。本实验将小鼠分为实验组和对照组,每组6只。实验组同一只小鼠造模2个伤口,1个伤口局部涂敷5 μ g hMSC-EXO($n=6$),1个伤口局部涂敷5 μ g hDF-EXO($n=6$);对照组小鼠伤口局部涂敷等体积PBS溶液($n=6$)。透明敷料保护伤口,待小鼠苏醒后分笼饲养。分别于术后第0、2、4、7天,拍照记录小鼠伤口愈合情况,并用Image J软件测量伤口面积。

1.8 HE染色

石蜡切片在65 $^{\circ}$ C烤片2 h,依次将切片放入二甲苯、无水乙醇进行脱蜡至水。用苏木素染液染色5 min,水洗后用分化液进行分化,返蓝液返蓝后流水冲洗。用无水乙醇对切片进行梯度脱水,伊红染液染色5 min,脱水透明后用中性树胶封片。

1.9 免疫荧光染色

用4% PFA固定第3代hDF。石蜡切片在65 $^{\circ}$ C烤片2 h,经脱蜡、梯度酒精脱水后,进行抗原修复。用PBS漂洗3次,分别置于0.3% Triton X-100通透,山羊血清封闭。一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜:anti-Vimentin (CST, 5741S), anti-FSP-1 (Abcam, ab93283), anti- α SMA (Sigma-Aldrich, A2547), anti-PDGFR α (R&D, AF1062), anti-Ki67 (Abcam, ab15580)。二抗37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h, PBS洗净后DAPI复染细胞核,洗涤后用Dako封片。

1.10 蛋白印迹法

将外泌体样品进行SDS电泳后电转移至PVDF膜上,体积分数5%脱脂牛奶室温封闭1 h。一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜:anti-CD81 (Santa Cruz, sc-166029), anti-TSG101 (Abcam, ab83), anti-HSP70 (CST, 4873S);取出室温摇床上再继续孵育30 min后,用TBS/T洗3次,二抗室温孵育1 h。用TBS/T洗3次,加入化学发光底物ECL,使用超高灵敏度化学发光成像系统(Bio-Rad,美国)检测条带。

1.11 逆转录-聚合酶链式反应

小鼠伤口剪碎,加入钢珠及1 mL Trizol,用高速低温组织研磨仪(Servicebio,中国)充分研磨后提取总RNA并检测浓度。使用逆转录试剂盒(Novoprotein,中国)合成cDNA后进行实时荧光定量PCR(qRT-PCR),反应体系包括cDNA 1 μ L、上下游引物各1 μ L、2 \times Mix 10 μ L、DEPC水7 μ L。反应

条件:95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 5 min,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,设置45个循环。TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、GAPDH引物购于上海生工生物公司。引物序列如下:TNF- α 上游引物序列:GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT,下游引物序列:GCCATAGAAGCTGATGAGAGGGAG;IL-6上游引物序列:TACCACTTCACAAG-TCG-GAGGC,下游引物:CTGCAAGTGCATCATCGTT-GTTC;IL-1 β 上游引物序列:TGGA-CCTTCCAG-GATGAGGACA,下游引物:GTTCATCTCG-GAGCCTGTAGTG;GAPDH上游引物序列:CAT-CACTGCCACCCAGAAGACTG,下游引物:ATGC-CACTGAGCTTCCCCT-TCAG。

1.12 统计学分析

实验数据采用Excel、Graphpad、Image J进行统计学分析,统计结果以平均值 \pm 标准差表示。两组间比较采用两独立样本 t 检验,单因素多组间比较采用one-way ANOVA,两两比较采用bonferroni法,双因素多组间比较采用two-way ANOVA,三组四个时间点的数据分析,用重复测量方差分析。 $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

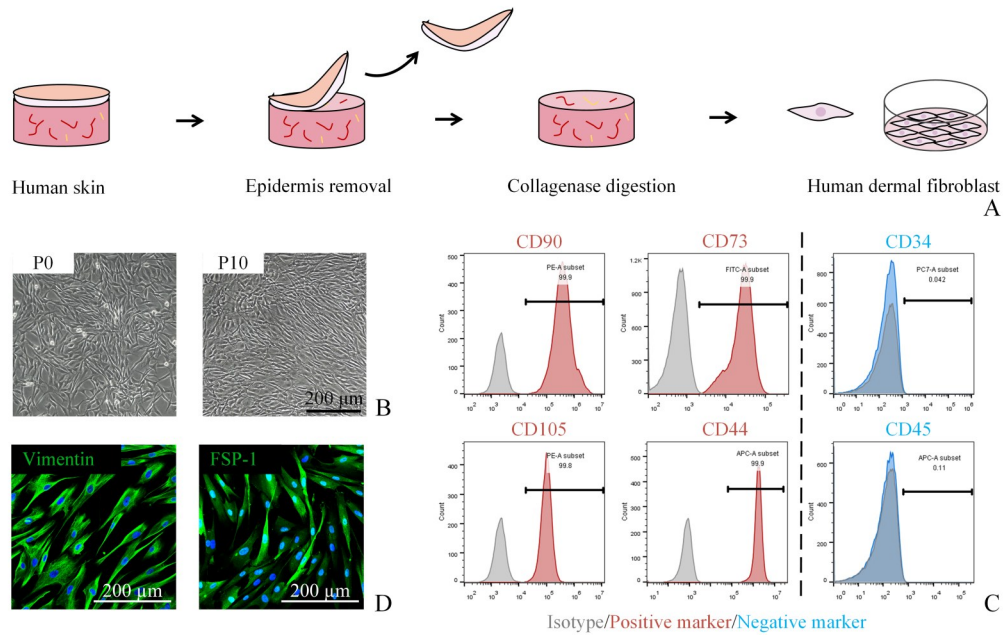
2 结果

2.1 人真皮成纤维细胞原代培养与鉴定

成功分离人真皮成纤维细胞(hDF)并进行培养(图1A),显微镜下观察细胞均匀分布,形态呈典型的纺锤形(图1B)。流式细胞术检测提取的hDF表达间充质来源细胞表型相关蛋白,如CD90、CD105、CD73,不表达CD34、CD45(图1C)。免疫荧光染色进一步检测hDF表达成纤维细胞特异性标志物Vimentin、FSP-1(图1D)。上述结果表明hDF成功分离纯化,细胞形状、标志物均符合成纤维细胞鉴定标准,即用于后续的实验研究。

2.2 外泌体鉴定

通过超速离心法分别获取hMSC-EXO(hMSC已鉴定并符合标准)和hDF-EXO两种外泌体,在透射电镜下观察到hMSC-EXO和hDF-EXO皆为典型的圆盘状或“茶托”样形状,具备完整的膜结构(图2A);用纳米颗粒跟踪分析(NTA)技术检测外泌体的粒径大小和浓度,hMSC-EXO的粒径峰值为128 nm,hDF-EXO的粒径峰值为152 nm(图2B),且hMSC-EXO和hDF-EXO的浓度分别为 $(1.14\pm 0.07)\times 10^9$ 和 $(1.08\pm 0.12)\times 10^9$ particles/mL(图2C),



A: Schematic diagram for primary hDFs isolation. B: The morphology of cultured hDFs was observed using an optical microscope (100 \times). Scale bars, 200 μ m. C: Flow cytometry results of hDFs phenotype. D: hDFs were identified with Vimentin and FSP-1 through immunofluorescence. Scale bars, 200 μ m. hDF, human dermal fibroblast.

图1 hDF原代培养及鉴定

Fig. 1 Isolation and characterization of primary hDF

两者差异无统计学意义($t=0.8161$, $P=0.4456$);利用Western Blot方法进一步鉴定外泌体特异性标志物,结果显示hMSC-EXO和hDF-EXO均表达CD81、TSG101、HSP70(图2D)。上述结果表明制备的两种细胞来源外泌体,其形态、粒径以及标志物的表达均符合外泌体鉴定标准,均用于后续的实验研究。

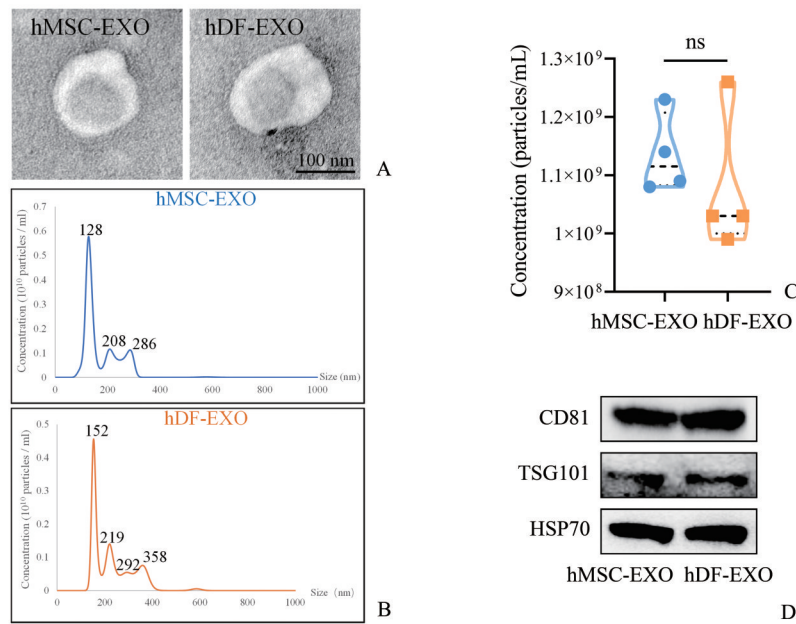
2.3 外泌体对成纤维细胞活性的影响

成纤维细胞是合成、分泌、沉积细胞外基质的主要细胞,对于伤口收缩、胶原蛋白合成和组织重塑至关重要。因此,本研究首先探讨两种外泌体是否能影响成纤维细胞的活性。首先,将提取的hMSC-EXO和hDF-EXO用DIL红色荧光染料标记后分别与hDF体外共培养24h,荧光显微镜下观察hDF均可大量摄入两种外泌体(图3A)。用CCK8法检测两种外泌体与hDF共培养24h后的增殖情况(图3B),结果显示对照组、hMSC-EXO组和hDF-EXO组细胞活力分别为 0.077 ± 0.009 、 0.104 ± 0.010 和 0.137 ± 0.007 ,3组间差异有统计学意义($F=66.82$, $P<0.0001$)。对3组进行两两比较,与对照相比,hMSC-EXO组和hDF-EXO组细胞活力均明显升高,差异具有统计学意义($P_{hMSC-EXO}=0.0004$,

$P_{hDF-EXO}<0.0001$);且hDF-EXO组细胞活力较hMSC-EXO组显著升高,差异具有统计学意义($P<0.0001$)。划痕实验进一步观察hDF细胞迁移活性变化(图3C、D),结果显示对照组、hMSC-EXO组和hDF-EXO组划痕修复率分别为 $(29.39 \pm 11.65)\%$ 、 $(54.19 \pm 15.61)\%$ 和 $(84.21 \pm 6.80)\%$,3组间差异有统计学意义($F=15.94$, $P=0.004$)。对3组进行两两比较,hDF-EXO组的划痕修复率较对照组升高,差异具有统计学意义($P=0.0032$);hDF-EXO组的划痕修复率较hMSC-EXO组升高,差异具有统计学意义($P=0.0488$);hMSC-EXO组与对照组的划痕修复率差异无统计学意义($P=0.0957$)。上述结果表明两种外泌体均能被成纤维细胞直接摄入并能促进细胞增殖和迁移活性,且hDF-EXO促细胞增殖和迁移的能力明显优于hMSC-EXO。

2.4 外泌体对小鼠伤口愈合的治疗作用

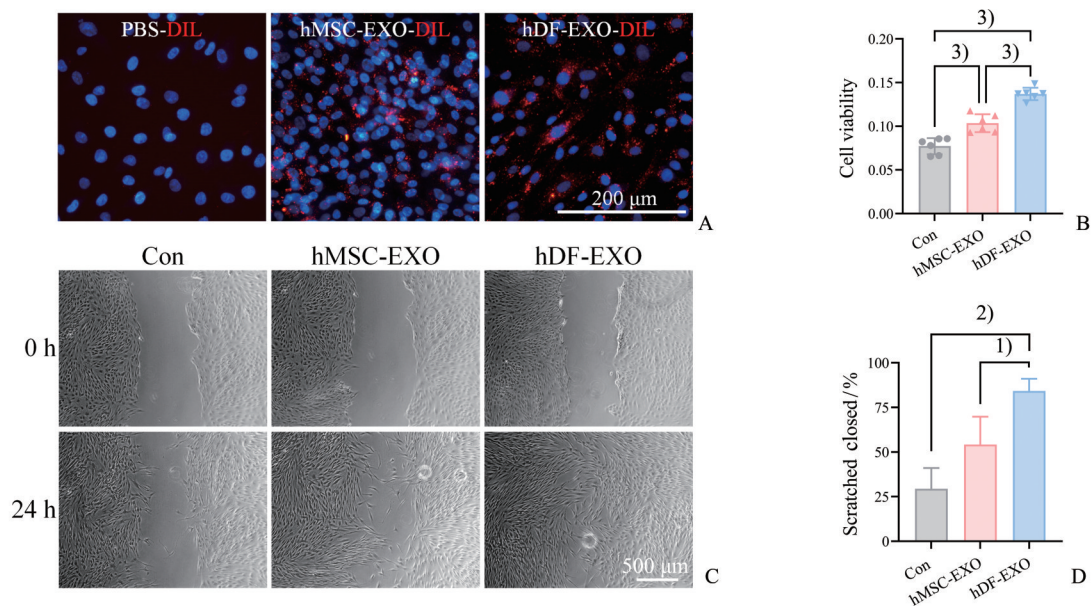
为了比较两种外泌体对伤口愈合的治疗效果,本研究用C57BL/6小鼠构建急性全层皮肤切除模型,在伤口处分别涂敷两种外泌体进行局部治疗。首先将DIL红色荧光染料标记的hMSC-EXO和hDF-EXO涂敷在小鼠造模伤口处,24h后取材伤口组织并切片,荧光显微镜下观察到伤口组织均摄



A: Characterization of the structure of hMSC-EXO and hDF-EXO by transmission electron microscopy. Scale bars, 100 μm . B: Size distribution of hMSC-EXO and hDF-EXO by nanoparticle tracking analysis. C: Concentration level of isolated hMSC-EXO ($n=4$) and hDF-EXO ($n=4$) by nanoparticle tracking analysis. $t=0.816$, $P>0.05$, ns: no significant difference. D: Western blot for detection of exosomal markers CD81, TSG101 and HSP70 on hMSC-EXO and hDF-EXO. hDF-EXO: human dermal fibroblast-derived exosome; hMSC-EXO: human bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosome.

图2 外泌体鉴定

Fig. 2 Identification of exosomes



A: The internalization of DIL-labeled hMSC-EXO or DIL-labeled hDF-EXO by hDFs was observed using a fluorescence microscope. Scale bars, 200 μm . B: Histogram shows cell viability as detected by CCK8 assay 24 hours after treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hMSC-EXO ($n=6$) and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hDF-EXO ($n=6$); $F=66.82$, 3) $P<0.001$. C: A scratch wound healing assay revealed the motility of hDFs with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hMSC-EXO or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hDF-EXO treatment. D: Scratched closed percentage was measured ($n=3$) from the experiment shown in (C) using Image J software; $F=15.94$, 1) $P<0.05$, 2) $P<0.01$.

图3 外泌体促进hDF细胞增殖和迁移

Fig. 3 Exosomes enhance proliferation and migration of hDF in vitro

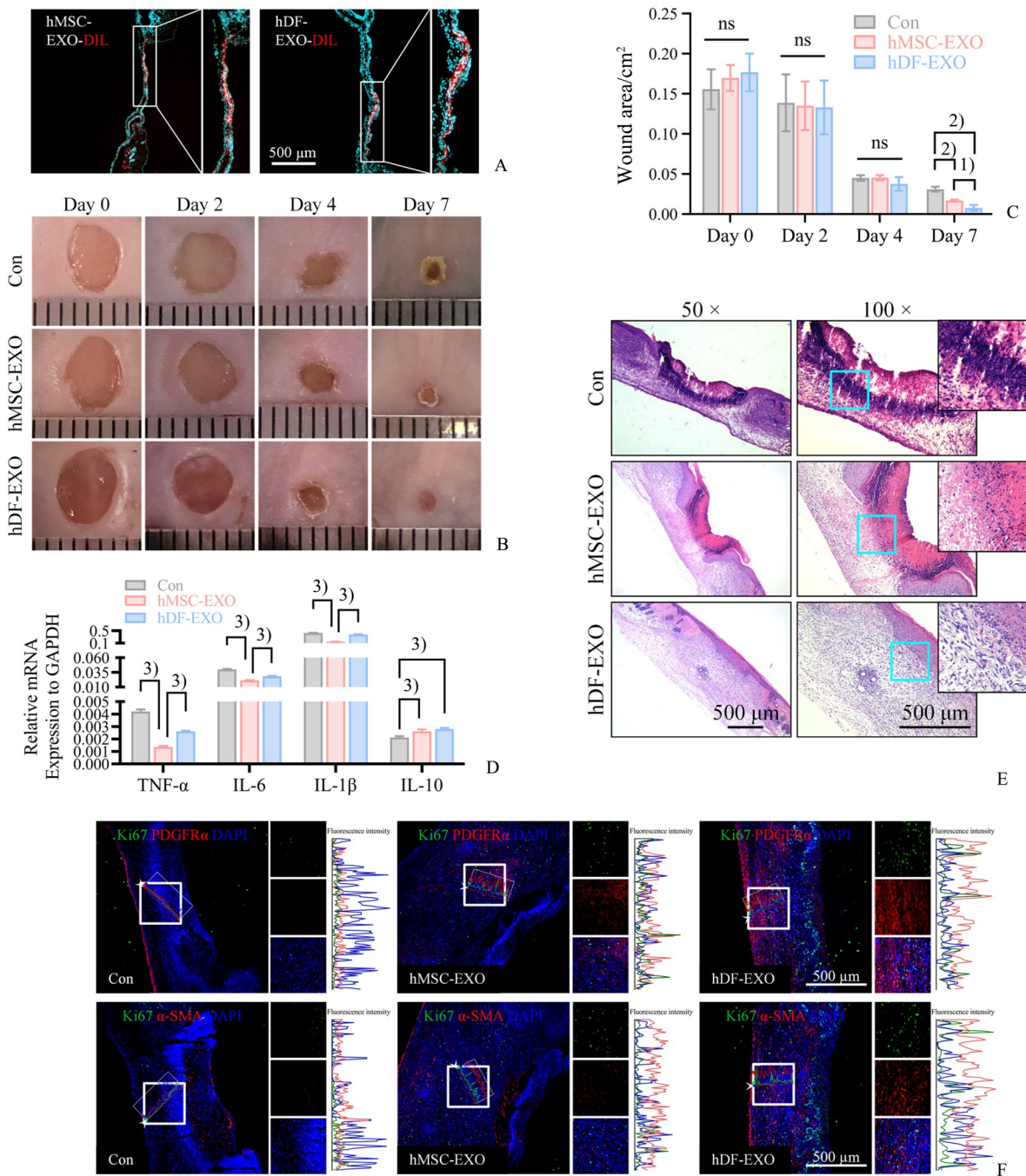
入两种外泌体(图4A)。术后持续观察各组小鼠伤口愈合情况,并选取4个时间点(第0天、第2天、第4天、第7天)拍照记录(图4B)。结果显示,相较于对照组,外泌体组小鼠伤口收缩结痂、愈合速度加快,且hDF-EXO组对小鼠伤口愈合的促进作用明显强于hMSC-EXO组。术后第7天对照组小鼠伤口可见大块血痂,hMSC-EXO组小鼠伤口仍可见小块血痂未脱落,而hDF-EXO组小鼠伤口均已愈合。术后第0、2、4、7天伤口面积结果显示(图4C),经重复测量的方差分析后,治疗组间差异无统计学意义($F=0.077, P=0.93$),时间点组间差异有统计学意义($F=141, P<0.0001$),治疗与时间的交互作用差异无统计学意义($F=0.08, P=0.58$)。进一步两两比较,术后第0、2、4天伤口面积的组间差异无统计学意义(均 $P>0.05$);术后第7天对照组、hMSC-EXO组和hDF-EXO组伤口面积分别为(0.031 ± 0.003)、(0.017 ± 0.001)、(0.007 ± 0.003) cm^2 。与对照组相比,hMSC-EXO组和hDF-EXO组的伤口面积显著减小,差异具有统计学意义($P_{\text{hMSC-EXO}}=0.0092, P_{\text{hDF-EXO}}=0.0014$),且hDF-EXO组较hMSC-EXO组的伤口面积明显减小,差异有统计学意义($P=0.043$),进一步说明了hDF-EXO相比hMSC-EXO对伤口的疗效更佳。qRT-PCR检测术后第1天小鼠伤口组织炎症因子水平(图4D),结果显示TNF- α ($F=525.9, P<0.0001$)、IL-6 ($F=497.1, P<0.0001$)、IL-1 β ($F=1042, P<0.0001$)、IL-10 ($F=28.39, P=0.0009$)的组间比较均有显著差异。与对照组相比,hMSC-EXO组和hDF-EXO组TNF- α 、IL-6、IL-1 β 三种促炎因子水平均明显降低,差异均具有统计学意义(均 $P<0.001$);且hMSC-EXO组的促炎因子水平较hDF-EXO组更低(均 $P<0.001$)。hMSC-EXO组和hDF-EXO组的IL-10抑炎因子水平相比对照组升高,差异具有统计学意义($P_{\text{hMSC-EXO}}=0.0016, P_{\text{hDF-EXO}}=0.0002$);但hMSC-EXO组和hDF-EXO组差异无统计学意义($P=0.2146$)。HE染色结果显示,术后第7天,对照组小鼠伤口皮肤组织不完整、少见新生纤维组织,大部分为血痂。hMSC-EXO组小鼠伤口表皮不连续,可见部分新生纤维组织,仍存在血痂。hDF-EXO组小鼠加速其伤口再上皮化,表皮连续性好,纤维组织再增生后排列整齐(图4E)。免疫荧光染色进一步检测伤口组织中成纤维细胞标志物PDGFR- α 、肌成纤维细胞标志物 α -SMA表达情况以及两种细胞Ki67的表达情

况,结果显示外泌体组伤口组织中PDGFR- α 阳性、 α -SMA阳性以及PDGFR- α /Ki67双阳性、 α -SMA/Ki67双阳性细胞数明显多于对照组,且hDF-EXO组阳性细胞的增多更为明显(图4F)。上述结果表明两种外泌体均能有效促进伤口愈合,且hDF-EXO治疗作用显著优于hMSC-EXO。

3 讨论

本研究首次比较了hDF-EXO和hMSC-EXO在伤口愈合中的治疗作用,发现hDF-EXO组织修复能力优于hMSC-EXO,而hMSC-EXO相较于hDF-EXO在伤口早期可发挥更佳的炎症抑制作用,初步证实了伤口治疗方案中hDF-EXO相对于hMSC-EXO的优劣势,为创面修复开发外泌体新型疗法提供了理论基础。

外泌体是细胞旁分泌的主要活性物质,在细胞间运输和传递各种生物活性分子,介导细胞间通讯交流。除了具有与来源细胞相似的生物学效应外,外泌体还具有化学性质稳定、易储存和运输、生物安全性高的优势^[12]。外泌体除了包含多种活性因子,还可增强成纤维细胞分泌I、III型胶原蛋白、MMP1、bFGF和TGF- β 1等活性因子的能力^[13],与目前临床常用的单一细胞因子相比,外泌体对伤口修复的作用更加广阔。同时,应用牛碱性成纤维细胞因子(rb-bFGF)会导致部分患者过敏。外泌体作为细胞间通讯信使,其活性成分由脂质双分子层包裹,生物相容性高,可与靶细胞直接融合,极大地降低过敏和免疫排斥等风险^[14]。由此,外泌体疗法受到高度关注,成为治疗伤口愈合的新策略。近年来研究发现MSC来源外泌体^[15]可通过抑制伤口炎症反应^[16]、促进伤口再上皮化^[17]和重建新生血管^[15,18]等方式加速伤口愈合,促进创面的修复再生。Li等^[19]的研究阐明人脐带MSC外泌体中的miR-181c通过抑制TLR4信号通路来缓解大鼠伤口的炎症反应。成纤维细胞作为皮肤最主要的驻留细胞,在创面修复中起着关键作用。有研究显示,成纤维细胞中lncRNA-H19通过促进受损皮肤中的真皮成纤维细胞增殖,加速糖尿病患者的伤口愈合^[20]。随后,Oh等^[8]和Xia等^[9]的研究发现成纤维细胞外泌体可通过增强伤口组织中成纤维细胞的增殖、迁移等功能来加速小鼠皮肤创面愈合。然而,何种类型外泌体更适合用于伤口愈合修复尚不



A: Fluorescence microscopic image shows localization of DIL-labeled hMSC-EXO or DIL-labeled hDF-EXO in the wound at 24 h after post-treatment with DIL-labeled exosomes by local application. Scale bars, 500 μm. B: The representative photos shown in the dorsal full-thickness wound area of the mice (n=3). C: Quantitative analysis of wound area in the respective treatment groups (n=3). 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, ns: no significant difference. D: The quantification of relative mRNA expression levels of major inflammation-related gene in Day 1 wound tissue (n=3). 3) $P < 0.001$. E: The representative images of H&E staining in Day 7 skin healed tissue. Scale bars, 500 μm. F: Immunofluorescence staining for PDGFR-α, α-SMA and Ki67 in Day 7 healing tissue. Scale bars, 500 μm.

图4 外泌体促进小鼠伤口愈合

Fig. 4 Exosome treatments accelerate cutaneous wound healing process in vivo

清楚。本研究结果初步显示了,在急性伤口愈合过程中,真皮成纤维细胞来源外泌体的损伤修复作用,明显优于MSC来源外泌体疗效。

伤口愈合是一个复杂的动态过程,主要包括炎症期、增殖期、组织重塑三个阶段^[21],针对不同阶段的关键细胞和生物学过程开展治疗尤为重要。皮肤损伤后,愈合过程首先进入炎症期,不受控制和过度的炎症会导致组织损伤并延迟愈合^[22]。有研究显示,MSC外泌体可防止过度的炎症反应从而促进组织修复^[16],本研究中移植MSC外泌体同样证实了早期炎症反应明显改善,术后第一天hMSC-EXO组伤口促炎因子表达水平相比对照组显著降低。同时,hMSC-EXO组促炎因子水平明显低于hDF-EXO组,提示hMSC-EXO的抗炎能力优于hDF-EXO。随后愈合过程中增殖期的细胞效应对伤口闭合至关重要,发生在损伤后2~10天,主要是成纤维细胞大量增殖、迁移至受损组织,并分化为肌成纤维细胞,合成、分泌细胞外基质来促进伤口组织的修复^[23]。外泌体可通过改善伤口组织中成纤维细胞的功能促进伤口愈合^[24]。本研究体外和体内试验结果均证实了hDF-EXO和hMSC-EXO两种外泌体可增强成纤维细胞的增殖、迁移和分化功能来加速伤口愈合,并对比发现hDF-EXO促进创面修复的能力显著优于hMSC-EXO,表明hDF-EXO通过诱导成纤维细胞增殖、迁移和分化来加速伤口组织修复,且该能力优于hMSC-EXO。有研究显示,在伤口发生后第2-10天的愈合增殖期内,成纤维细胞外泌体中的miR-125b通过抑制Sirt7激活TGF- β 信号通路,促进伤口组织内成纤维细胞

迁移、向肌成纤维细胞分化,从而加快小鼠伤口愈合^[9]。我们的研究同样显示hDF-EXO移植第7天,相较于hMSC-EXO组,伤口处的成纤维细胞与肌成纤维细胞明显增多,促进皮肤损伤修复的相关机制可能与多种miRNA参与其修复过程相关,有待进一步探索。受伤2周后,增殖期中的肌成纤维细胞发生凋亡,伤口进入组织重塑期,成纤维细胞将重构细胞外基质,调整III/I型胶原蛋白的比例,最终恢复正常皮肤结构^[25]。过度的炎症和机械牵拉等因素会造成肌成纤维细胞过度沉积,产生病理性瘢痕。有研究发现干细胞外泌体在组织重塑期通过阻止成纤维细胞向肌成纤维细胞分化、增加TGF- β 3/TGF- β 1的比率,从而减少小鼠伤口瘢痕的生成^[26]。本研究关注外泌体在急性大面积伤口增殖期的修复疗效,至于在组织重塑期中对瘢痕的疗效,还需进一步探讨。此外,外泌体疗法作为一种理想的细胞替代疗法,是否联合hDF-EXO和hMSC-EXO移植,移植具体剂量及次数,以及其最有效分子机制等方面仍有待进一步研究和探索。

综上所述,本研究通过体外细胞实验和体内动物实验首次比较了hDF-EXO和hMSC-EXO在伤口愈合中的治疗作用,证实两种外泌体均能有效促进伤口愈合,初步证实了hDF-EXO通过显著促进成纤维细胞增殖、迁移和分化效应加速伤口修复,其疗效优于hMSC-EXO移植。此外,hMSC-EXO相较于hDF-EXO在伤口早期可发挥更佳的炎症抑制作用。以上结论为后续分子机制研究提供了实验依据,也为针对伤口愈合开发更加合适和有效的外泌体疗法提供了思路。

参考文献

- [1] Guest JF, Fuller GW, Vowden P. Cohort study evaluating the burden of wounds to the UK's National Health Service in 2017/2018: update from 2012/2013 [J]. *BMJ Open*, 2020, 10(12): e045253.
- [2] Sen CK. Human wound and its burden: updated 2020 compendium of estimates [J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2021, 10(5): 281-292.
- [3] Plikus MV, Wang X, Sinha S, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease [J]. *Cell*, 2021, 184(15): 3852-3872.
- [4] Talbott HE, Mascharak S, Griffin M, et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(8): 1161-1180.
- [5] Bian D, Wu Y, Song G, et al. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 24.
- [6] Ha DH, Kim HK, Lee J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration [J]. *Cells*, 2020, 9(5).
- [7] Hade MD, Suire CN, Suo Z. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Applications in regenerative medi-

- cine[J]. *Cells*, 2021, 10(8).
- [8] Oh EJ, Gangadaran P, Rajendran RL, et al. Extracellular vesicles derived from fibroblasts promote wound healing by optimizing fibroblast and endothelial cellular functions[J]. *Stem Cells*, 2021, 39(3): 266–279.
- [9] Xia W, Li M, Jiang X, et al. Young fibroblast-derived exosomal microRNA-125b transfers beneficial effects on aged cutaneous wound healing[J]. *J Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 144.
- [10] Gibot L, Galbraith T, Bourland J, et al. Tissue-engineered 3D human lymphatic microvascular network for in vitro studies of lymphangiogenesis[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(5): 1077–1088.
- [11] Liu J, Lai X, Bao Y, et al. Intraperitoneally delivered mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis through THBS1-mediated induction of IL-10-competent regulatory B cells[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 853894.
- [12] Couch Y, Buzas EI, Di Vizio D, et al. A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles [J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(14): e12144.
- [13] Monguio-Tortajada M, Roura S, Galvez-Monton C, et al. Nanosized UCMSC-derived extracellular vesicles but not conditioned medium exclusively inhibit the inflammatory response of stimulated T cells: implications for nanomedicine [J]. *Theranostics*, 2017, 7(2): 270–284.
- [14] Van Niel G, D'angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(4): 213–228.
- [15] Ding J, Wang X, Chen B, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by deferoxamine accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 9742765.
- [16] Shojaati G, Khandaker I, Funderburgh ML, et al. Mesenchymal stem cells reduce Corneal fibrosis and inflammation via extracellular vesicle-mediated delivery of miRNA [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(11): 1192–1201.
- [17] McBride JD, Rodriguez-Menocal L, Guzman W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived CD63 (+) exosomes transport Wnt3a exteriorly and enhance dermal fibroblast proliferation, migration, and angiogenesis in vitro [J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(19): 1384–1398.
- [18] Liu J, Yan Z, Yang F, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing by enhancing angiogenesis through delivering angiopoietin-2 [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2021, 17(2): 305–317.
- [19] Li X, Liu L, Yang J, et al. Exosome derived from human umbilical cord mesenchymal stem cell mediates miR-181c attenuating burn-induced excessive inflammation[J]. *EBioMedicine*, 2016, 8: 72–82.
- [20] Yu P, Guo J, Li J, et al. lncRNA-H19 in fibroblasts promotes wound healing in diabetes [J]. *Diabetes*, 2022, 71(7): 1562–1578.
- [21] Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes [J]. *Open Biol*, 2020, 10(9): 200223.
- [22] Boniakowski AE, Kimball AS, Jacobs BN, et al. Macrophage-mediated inflammation in normal and diabetic wound healing [J]. *J Immunol*, 2017, 199(1): 17–24.
- [23] Darby IA, Laverdet B, Bonte F, et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2014, 7: 301–311.
- [24] Hu Y, Rao SS, Wang ZX, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function [J]. *Theranostics*, 2018, 8(1): 169–184.
- [25] Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, et al. Wound repair and regeneration [J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 314–321.
- [26] Zhang Y, Pan Y, Liu Y, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor-beta receptor inhibition [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 434.

(编辑 余菁)