

HucMSC-Ex通过调控TRPC6介导Ca²⁺内流 并促进糖尿病创面愈合

王敏^{1,2} 吴佩佩^{3,4} 史惠^{1*}

(¹江苏大学医学院临床检验教研室, 江苏省医学科学与检验医学重点实验室, 镇江 212000;

²安徽医科大学生物医学工程学院, 合肥 230032; ³中国科学技术大学第一附属医院检验科, 合肥 230000;

⁴中国科学技术大学生命科学与医学部, 合肥 230000)

摘要 该文旨在探讨糖尿病创面中瞬时受体电位阳离子通道亚家族C成员6(transient potential canonical 6, TRPC6)的变化和功能以及人脐带间充质干细胞源外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosome, hucMSC-Ex)对TRPC6的调控作用。组织免疫荧光检测临床糖尿病足部溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)患者创面与创缘组织中TRPC6的表达情况, qRT-PCR和Western blot分别检测晚期糖基化终末产物修饰的牛血清白蛋白(bovine serum albumin modified with advanced glycosylation end products, AGE-BSA)刺激后大鼠真皮成纤维细胞(dermal fibroblasts, DFs)中TRPC6的mRNA和蛋白表达情况; 通过用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)和过表达质粒转染DFs考察TRPC6对DFs Ca²⁺内流、增殖和胶原蛋白分泌等生物学功能的影响。采用细胞免疫荧光检测hucMSC-Ex对DFs分泌胶原蛋白能力的影响, 构建SD大鼠DFU模型, 加入hucMSC-Ex干预, HE染色观察皮肤结构, 评价hucMSC-Ex对DFU的治疗作用。进一步通过qRT-PCR、Western blot、细胞免疫荧光、免疫组化等验证hucMSC-Ex对TRPC6的调控作用。结果显示, 糖尿病创面中TRPC6通道蛋白水平显著降低, 敲减TRPC6减少了DFs Ca²⁺内流, 抑制了其生物学功能; 过表达TRPC6增加了DFs Ca²⁺内流, 促进了其生物学功能。总之, hucMSC-Ex可以通过上调TRPC6表达介导Ca²⁺内流并促进糖尿病创面愈合。

关键词 HucMSC-Ex; 糖尿病创面愈合; DFs; TRPC6; Ca²⁺

HucMSC-Ex Mediates Ca²⁺ Influx and Promotes Diabetic Wound Healing through Regulating TRPC6

WANG Min^{1,2}, WU Peipei^{3,4}, SHI Hui^{1*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Medical Science and Laboratory Medicine, Department of Clinical Laboratory, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China; ²School of Biomedical Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

³Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of USTC, Hefei 230000, China;

⁴Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230000, China)

Abstract This study aimed to investigate the changes and functions of TRPC6 (transient potential canonical 6) in diabetic wounds and the regulatory role of hucMSC-Ex (human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosome) on TRPC6. Tissue immunofluorescence was used to detect the expression of TRPC6 in clinical patients with DFU (diabetic foot ulcer). qRT-PCR and Western blot were used to detect the changes of TRPC6 mRNA and

收稿日期: 2023-10-05

接受日期: 2023-12-08

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 82001975、82303775)和安徽省自然科学基金(批准号: 2308085QH273)资助的课题

*通信作者。Tel: 15896386762, E-mail: shihui@ujs.edu.cn

Received: October 5, 2023

Accepted: December 8, 2023

This work was supported by the National Natural Science Youth Foundation of China (Grant No.82001975, 82303775), and the Natural Science Foundation of Anhui Province (Grant No.2308085QH273)

*Corresponding author. Tel: +86-15896386762, E-mail: shihui@ujs.edu.cn

protein expression in rat DFs (dermal fibroblasts) after stimulation with AGE-BSA (bovine serum albumin modified with advanced glycosylation end products), respectively. Moreover, DFs were transfected with siRNA (small interfering RNA) and overexpressed plasmid to investigate the effects of TRPC6 on the biological functions of DFs, such as Ca²⁺ influx, proliferation, and collagen secretion. Cellular immunofluorescence was used to detect the effect of hucMSC-Ex on the ability of DFs to secrete collagen. A DFU model was constructed in SD rats, and hucMSC-Ex was added to intervene, and the skin structure was observed by HE staining, to evaluate the therapeutic effect of hucMSC-Ex on DFU. Furthermore, qRT-PCR, Western blot, cellular immunofluorescence, and immunohistochemical staining were used to detect the effect of hucMSC-Ex on TRPC6. The results showed that TRPC6 channel protein was significantly decreased in diabetic wounds. Knock-down of *TRPC6* decreased Ca²⁺ influx and impaired the biological function of DFs. On the contrary, overexpression of *TRPC6* enhanced Ca²⁺ influx and biological function of DFs. In conclusion, hucMSC-Ex could regulate TRPC6-mediated Ca²⁺ influx promote diabetic wound healing.

Keywords HucMSC-Ex; diabetic wound healing; DFs; TRPC6; Ca²⁺

糖尿病及其并发症的防控是《“健康中国2030”规划纲要》的重要内容^[1-2]。糖尿病足部溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是糖尿病最严重的并发症之一,其发展会导致患者足部循环和感觉障碍,致使截肢或合并全身严重感染而死亡^[3-4]。DFU难愈性创面是非创伤性截肢的第一大原因,已成为威胁糖尿病患者生命健康的重要问题^[5]。目前的治疗方法如控糖、抗凝、改善神经病变以及外科清创等虽有一定疗效,但尚不能有效促进DFU创面愈合^[6]。因此,积极探索DFU治疗新方案具有重要科学意义与临床转化价值。

研究表明,干细胞在组织损伤修复中具有较好的效果^[7]。以间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)为代表的细胞治疗目前已应用于临床,并取得了一定疗效。研究表明, MSC主要通过细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),尤其是直径小于200 nm的小细胞外囊泡(small extracellular vesicles, sEVs)发挥作用^[8],外泌体(exosomes)是sEVs的一种主要成分,广泛参与细胞存活、血管新生、免疫调节等各种生物学过程^[9-11]。我们团队前期研究证明,人脐带间充质干细胞源外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell derived exosome, hucMSC-Ex)可促进糖尿病创面修复,修复机制与其携带的miR-13474分子有关^[12]; hucMSC-Ex通过Wnt4-β-catenin信号促进皮肤细胞增殖和血管形成从而促进伤口愈合^[13];同时在修复后期hucMSC-Ex也可以抑制疤痕形成^[14],前期研究提出外泌体在皮肤损伤修复中的“油门”和“刹车”动态调控效应,其修复效果较生长因子等单一成分治疗更有优势。

Ca²⁺通道是介导Ca²⁺运输的重要载体, Ca²⁺通道

介导的Ca²⁺运输参与了生理和病理条件下皮肤功能的维持^[15]。钙离子通道一般分为两类:钙流入通道,介导胞外Ca²⁺进入胞内;钙释放通道,介导胞内存储的Ca²⁺转移到细胞质中。钙流入通道包括电压门控钙通道(voltage-gated calcium channels, VGCCs)、配体门控钙通道、存储操纵的钙通道(store operated calcium channels, SOCCs)和瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)等^[16]。其中, VGCCs主要在心肌、神经等兴奋性细胞中介导Ca²⁺运输^[17]。皮肤组织中表达多种Ca²⁺通道,研究显示,敲除TRP等蛋白显著影响葡萄糖转运体4(glucose transporter 4, GLUT4)功能及外周组织对葡萄糖的摄取利用^[18]。瞬时受体电位阳离子通道亚家族C成员6(transient potential canonical 6, TRPC6)是非兴奋细胞中介导Ca²⁺内流最主要的通道^[19], TRPC6激活Ca²⁺反应蛋白钙调磷酸酶,诱导肌成纤维细胞转分化进而促进伤口愈合^[20]。糖尿病创面特定环境下, Ca²⁺通道介导的Ca²⁺运输变化尚不清楚。因此,本研究探讨了糖尿病创面中TRPC6的变化以及hucMSC-Ex对TRPC6的调控作用和对糖尿病创面的修复作用,为解析DFU修复机制提供了新角度。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 原代分离培养大鼠真皮成纤维细胞(dermal fibroblasts, DFs),本课题组前期已经建立分离DFs的方法并且已申请专利(专利号:201410085659.1)。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自苏州依科赛生物科技有限公司;青霉素-链霉素双抗购自北京雷根生物技术有限公司;牛血清白蛋

白 (bovine serum albumin, BSA)购自瑞士 Roche公司; 晚期糖基化终末产物修饰的牛血清白蛋白(bovine serum albumin modified with advanced glycosylation end products, AGE-BSA)购自英国 Abcam公司; α -MEM购自大连美仑生物技术有限公司; β -actin抗体购自美国 Abclonal公司; 羊抗兔二抗、红色荧光标记的驴抗兔二抗购自美国 Invitrogen公司; 绿色荧光标记的羊抗兔二抗购自美国 SAB公司; Hoechst33342购自美国 Sigma 公司; 逆转录试剂盒[*(HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA))*]、高特异性染料法定量PCR检测试剂盒、凋亡检测试剂盒(*Annexin V-FITC/PI*)、CCK-8 试剂盒、Trizol试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *TRPC6*和 *Colla1*的引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 钙离子荧光探针 Fura-2 AM、Lipo8000™转染试剂购自上海碧云天生物技术有限公司; RIPA裂解液购自美国 Thermo Fisher公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将DFs用含10% FBS、1%双抗的 α -MEM培养基进行培养, 当细胞密度达到约90%时, 用胰蛋白酶消化, 一传二进行传代, 置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染 将DFs以每孔 1.5×10^5 个接种于6孔板中, 培养18~24 h, 使第二天细胞密度达到70%~80%。使用4 μ L Lipo8000™转染试剂转染100 pmol siRNA, 或

使用4 μ L Lipo8000™转染2.5 μ g质粒, 无需换液, 48 h后收集细胞进行后续实验。siRNA以及阴性对照的序列见表1。

1.2.3 总RNA提取及qRT-PCR检测 Trizol法提取总RNA, 使用超微量生物检测仪检测RNA浓度, 并进行逆转录, 若不进行逆转录步骤则将RNA放置于-80 °C冰箱保存, 忌反复冻融。逆转录步骤结束后使用实时荧光定量PCR试剂盒进行mRNA定量检测, 以 β -actin作为内参。所用到的引物序列见表2。

1.2.4 Western blot 收集处理48 h后的DFs, 提取细胞总蛋白质, 在加样孔依次加入10 μ L蛋白样品, 在两侧各加5 μ L蛋白预染marker示踪, 经10%的SDS-PAGE分离, 然后在350 mA恒流下进行湿转, 将蛋白质转移到PVDF膜上, 随后将PVDF膜浸泡在5%脱脂奶粉中室温封闭2 h。室温封闭2 h后加入一抗(1:500稀释), 在4 °C孵育过夜, 第2天用TBST洗去游离抗体, 加入HRP标记的山羊抗小鼠或兔IgG二抗(1:10 000稀释), 室温孵育2 h; TBST洗膜5次, 每次5 min, ECL发光液显色。

1.2.5 CCK-8实验 将处理后的DFs接种到96孔板中(1×10^3 个/孔), 每组6个复孔。每孔中加入100 μ L无血清培养基, 然后再向每孔中加入10 μ L CCK-8试剂。37 °C、5% CO₂细胞培养箱避光孵育2 h后, 用酶标仪检测样本在450 nm波长处的吸光度(*D*)值, 吸光度值

表1 小干扰RNA序列
Table 1 Sequences of siRNA

大鼠TRPC6 Rat TRPC6	正向(5'→3') Sense (5'→3')	反向(5'→3') Antisense (5'→3')
siCtrl	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT
siRNA1	GUC CAU UCA UGA AGU UCG UTT	ACG AAC UUC AUG AAU GGA CTT
siRNA2	CGA UGC AAA UGA CAC UUU ATT	UAA AGU GUC AUU UGC AUC GTT
siRNA3	GAC CAG CAU ACA UGU UUA ATT	UUA AAC AUG UAU GCU GGU CTT

表2 qRT-PCR引物序列
Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence
rTRPC6-F	GAC TCC CAG CCA TCT CCC TT
rTRPC6-R	TAG GAG GCG CTC AGT TGT GA
rColla1-F	CCG ATG GAT TCC AGT TCG AGT
rColla1-R	GGG ACT TCT TGA GGT TGC CA
β -actin-F	CAT ACT CCT GCT TGC TGA TC
β -actin-R	CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC

与细胞增殖活性成正比,连续监测4天。

1.2.6 凋亡检测 Accutase(不含EDTA的胰酶)消化DFs后用预冷的PBS洗涤细胞2次,300 ×g、4 °C离心5 min。加入100 μL 1×结合缓冲液,轻轻混匀。加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI染色液,轻轻吹匀后室温避光孵育10 min;孵育结束后每个样本中再次加入400 μL 1×结合缓冲液,混匀后用流式细胞仪立即检测。

1.2.7 细胞免疫荧光 处理后的细胞用4%多聚甲醛于室温固定30 min,洗涤后用免疫染色通透液(Triton X-100)给细胞破膜30 min,经PBS洗涤后用5% BSA于室温封闭30 min。4 °C孵育一抗(1:100稀释)后洗涤,室温避光孵育荧光二抗(1:300稀释),洗涤后孵育Hoechst 33342,室温避光孵育10 min后用PBS洗涤。将爬片置于载玻片后于荧光显微镜下进行观察拍照。

1.2.8 组织免疫荧光 将石蜡切片烘烤后依次放置于二甲苯和100%、95%、85%、75%酒精中;切片再浸于3% H₂O₂中,置于37 °C孵育20 min灭活内源性酶;热修复抗原:洗涤后将切片浸入现配的0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液中,放入蒸笼中加热30 min进行热抗原修复;用5% BSA以1:200比例稀释一抗,4 °C孵育过夜,洗涤后避光孵育荧光二抗(1:300稀释),再孵育Hoechst 33342,滴加抗荧光淬灭剂后加封盖玻片,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.9 Ca²⁺水平检测 采用Ca²⁺荧光探针Fura-2 AM和Fluo-4 AM检测细胞内Ca²⁺浓度。待细胞密度达90%左右后,用PBS洗涤,加入100 μL的5 μmol/L Fura-2 AM或者Fluo-4 AM工作液,37 °C培养箱内孵育30 min进行荧光探针装载。PBS洗涤3次后再于37 °C培养箱内孵育20 min。使用多功能酶标仪检测荧光强度。对于Fura-2 AM,分别检测激发波长为340 nm和380 nm,发射波长为510 nm下的荧光强度,并计算340 nm/380 nm的荧光比值来反映细胞内的Ca²⁺浓度。对于Fluo-4 AM,检测激发波长为488 nm,发射波长为520 nm下的荧光强度。对于Fluo-4 AM流式检测:将细胞于37 °C培养箱内孵育30 min,进行荧光探针的装载。37 °C下用胰酶消化细胞1 min, PBS洗涤后将细胞重悬于PBS中,于流式细胞仪中采用FITC通道进行荧光强度检测和统计。

1.2.10 HucMSC-Ex提取 ① 4 °C、100 000 ×g离心16 h,制备去除外泌体的胎牛血清。当hucMSCs生长融合度达50%~70%时,PBS洗涤3遍,将培养基更换成用

去除外泌体的FBS制备的10% α-MEM完全培养基。继续培养48 h,收集细胞培养上清。② HucMSCs上清分别经过4 °C、300 ×g和2 000 ×g离心10 min及10 000 ×g离心30 min后去除细胞成分。③ 100 kDa超滤离心管,4 °C、2 000 ×g离心30 min对上清进行适当浓缩。④ 浓缩液置于超离管中,4 °C、100 000 ×g离心70 min,超离管底部肉眼可见的白色沉淀即为hucMSC-Ex。⑤ 用PBS清洗1次,4 °C、100 000 ×g离心70 min,弃去上清。⑥ 加入适当体积的PBS重悬hucMSC-Ex。

1.2.11 HucMSC-Ex鉴定 ① HucMSC-Ex形态以及完整性鉴定:采用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)对hucMSC-Ex的形态和大小进行表征分析。② HucMSC-Ex的Zeta电位检测:使用Zetaview纳米颗粒追踪分析仪(nanoparticle tracking analyzer, NTA)来检测hucMSC-Ex的Zeta电位。③ HucMSC-Ex特异性蛋白标记鉴定:一抗及其稀释比例为CD9(1:500)、CD81(1:500)、HSP70(1:500)、Calnexin(1:500)。

1.2.12 T2DM大鼠DFU模型的建立 参照本课题组前期已经成功建立的T2DM大鼠建模方法^[21],构建DFU模型:① 向造模成功的糖尿病鼠腹腔注射10%水合氯醛进行麻醉。② 使用剃毛机和脱毛膏去除毛发并于消毒后做圆形标记(直径20 mm)。③ 在背部切除其全层皮肤,构建直径2 cm的圆形创口。④ 将DFU大鼠分成4组:PBS对照组(200 μL)、hucMSC-Ex组(2 mg hucMSC-Ex溶于200 μL PBS中)、去Ex上清(Ex-free supernatant medium, Ex-free CM)组(200 μL)、人胚肺成纤维细胞来源的Ex(human embryonic lung fibroblast-Ex, HFL1-Ex)组(2 mg HFL1-Ex溶于200 μL PBS中)。用胰岛素注射器定点注射治疗。⑤ 每2~3天测量创面面积并拍照,于溃疡形成后随机取创面组织进行HE染色,观察并鉴定模型建立情况。

1.2.13 免疫组织化学染色 ① 将石蜡切片脱蜡至水:石蜡切片在65 °C烤箱烘烤1 h后依次放置于二甲苯中15 min,重复2次,100%、95%、85%、75%酒精中各2 min,后置于双蒸水中2 min。② 灭活内源性酶:切片浸于3% H₂O₂中于37 °C孵育20 min。③ 热修复抗原:切片浸于0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液中,于蒸笼中加热30 min,冷却后洗涤。④ 甩去多余液体,用组化笔圈出组织大小范围,在组织上均匀滴加5% BSA室温封闭30 min。⑤ 一抗1:100稀释,4 °C孵育过夜,

然后用组化PBS洗涤3次。⑥ 生物素化山羊抗兔/鼠二抗(1:300稀释)于37 °C孵育30 min, PBS洗涤。⑦ 滴加SABC试剂, 37 °C下, 湿盒中孵育30 min。⑧ 加入DAB显色液, 当于显微镜下观察到棕色或棕褐色出现时将切片立即置于双蒸水中, 并进行冲洗。⑨ 滴加苏木素染液复染1 min, 流水冲洗15 min。⑩ 切片置于75%、85%、95%、100%酒精中各2 min, 再放置于二甲苯中30 min。在切片上滴加1滴中性树脂, 加封盖玻片。

1.2.14 统计学分析 各实验均独立重复3次, 通过GraphPad Prism软件(7.0版)进行统计学分析, 数据

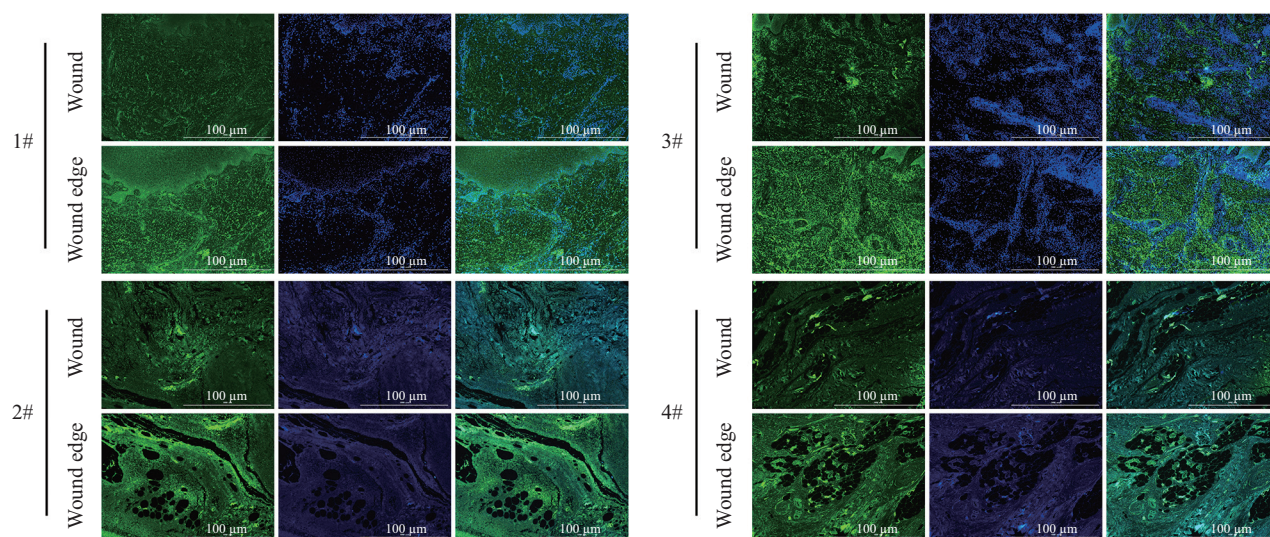
均以平均值±标准误(mean±SEM)表示。*t*检验用于两组间均值的比较, 方差分析用于三组及以上组间差异的统计比较。 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

2 结果

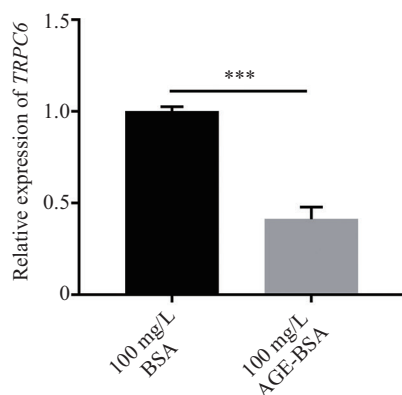
2.1 TRPC6通道蛋白水平在糖尿病创面中显著降低

首先, 我们在4例临床DFU患者皮肤组织中进行组织免疫荧光检测, 结果显示TRPC6在创面中的表达量明显低于相应的创缘组织(图1A)。进一步地, 体外

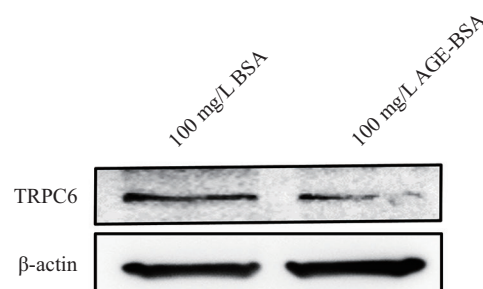
(A)



(B)



(C)



A: 组织免疫荧光检测4例糖尿病足部溃疡患者皮肤组织中TRPC6表达情况; B: qRT-PCR检测AGE-BSA处理DFs 48 h后TRPC6表达情况; C: Western blot验证AGE-BSA处理DFs 48 h后TRPC6表达情况。*** $P<0.001$ 。

A: immunofluorescent staining for the expression of TRPC6 in skin tissues of four diabetic foot ulcer patients; B: qRT-PCR showed the expression levels of TRPC6 in DFs treated with AGE-BSA for 48 h; C: Western blot analysis showed the levels of TRPC6 in DFs treated with AGE-BSA for 48 h. *** $P<0.001$.

图1 TRPC6通道蛋白水平在糖尿病创面中显著降低

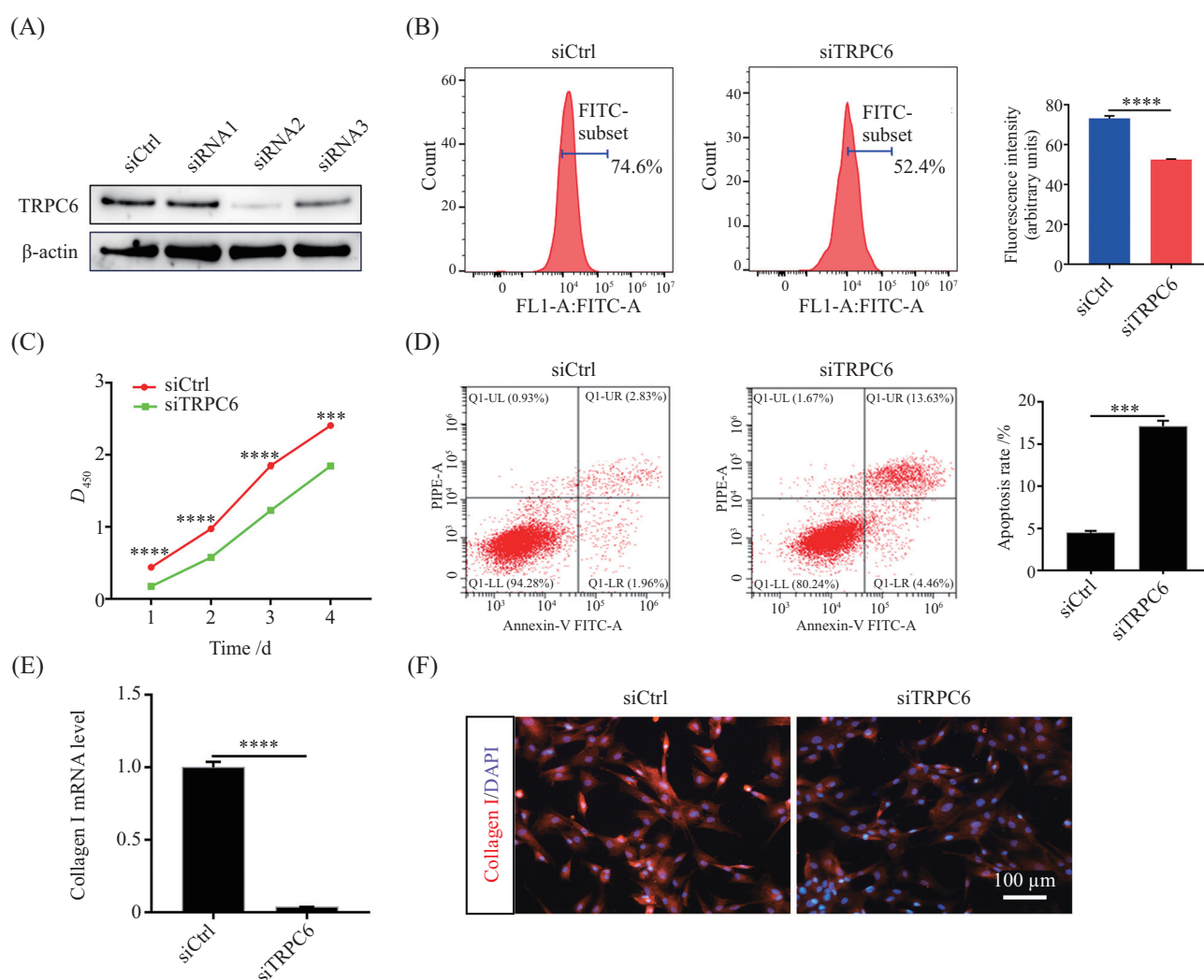
Fig.1 TRPC6 was significantly diminished in diabetic wounds

采用AGE-BSA刺激DFs来模拟高糖状态对皮肤细胞的损伤作用。qRT-PCR分析显示,在AGE-BSA刺激后,*TRPC6* mRNA水平显著下降($P<0.001$,图1B)。Western blot结果也显示在AGE-BSA刺激后,*TRPC6*蛋白水平显著下降(图1C),这与mRNA水平的变化趋势一致。

2.2 敲减*TRPC6*减弱DFs Ca²⁺水平,抑制其生物学功能

*TRPC6*通道蛋白在糖尿病创面中表达降低,其生物学作用尚不清楚。为了确定*TRPC6*通道对DFs的作用,我们使用siRNA片段对*TRPC6*进行敲减。首

先,通过Western blot验证了3个小干扰片段的有效性,发现3个siRNAs序列都能降低*TRPC6*的表达量,且siRNA片段2(siRNA2)的效率最高(图2A)。因此,我们选择了siRNA2进行后续的实验验证。*TRPC6*是介导细胞外Ca²⁺流入胞内的钙通道蛋白,我们使用Ca²⁺荧光探针Fura-2 AM检测细胞内Ca²⁺水平,研究结果表明*TRPC6*敲减后Ca²⁺内流减弱,胞内Ca²⁺水平明显降低($P<0.0001$)(图2B)。通过检测细胞增殖能力以及凋亡水平,发现敲减*TRPC6*后,DFs的增殖能力减弱($P<0.0001$)(图2C),凋亡细胞数量增加($P<0.001$)



A: Western blot检测siRNA转染DFs 48 h后*TRPC6*的表达情况; B: Fluo-4 AM流式细胞仪检测荧光强度; C: CCK-8检测DFs细胞转染*TRPC6* siRNA 48 h后的细胞增殖情况; D: 流式细胞术检测DFs细胞转染*TRPC6* siRNA 48 h后的细胞凋亡情况; E: qRT-PCR检测I型胶原蛋白表达水平; F: 细胞免疫荧光检测I型胶原蛋白表达情况。*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: Western blot analysis of *TRPC6* in DFs when transfected with siRNA of *TRPC6* for 48 h; B: Fluo-4 AM flow cytometry was used to detect fluorescence intensity; C: CCK-8 assay showed proliferation of DFs treated with siTRPC6 for 48 h; D: Annexin V/PI staining of DFs treated with siTRPC6 for 48 h; E: qRT-PCR analysis of the expression levels of collagen I; F: immunofluorescence analysis showed the level of collagen I of DFs. *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图2 敲减*TRPC6*减弱DFs Ca²⁺水平,抑制其生物学功能

Fig.2 Knock-down of *TRPC6* decreased Ca^{2+} influx and impaired the biological function of DFs

(图2D)。其次,对DFs特异性分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的能力进行检测,我们发现,敲减*TRPC6*后DFs中胶原蛋白的表达量降低(图2E和图2F),说明*TRPC6*水平的降低削弱了DFs特异性分泌胶原蛋白和产生ECM的能力($P<0.0001$)。

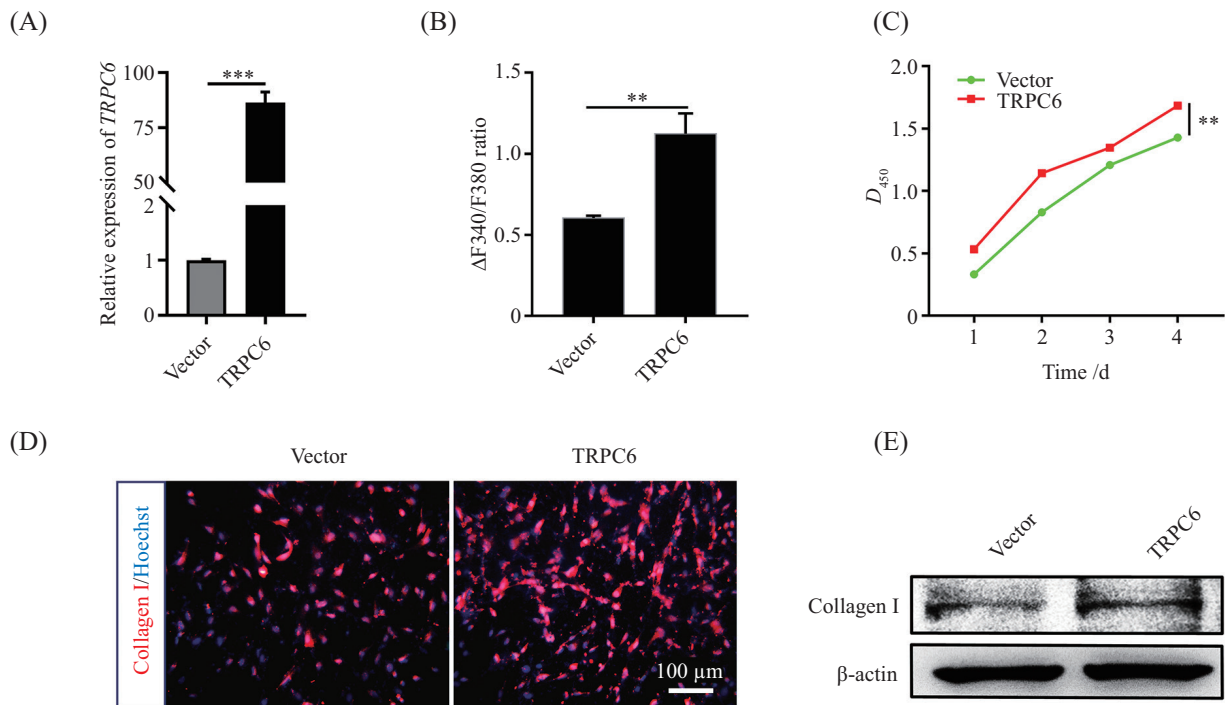
2.3 过表达*TRPC6*增加DFs Ca^{2+} 水平,促进其生物学功能

为了进一步验证*TRPC6*在DFs中的作用,我们也对*TRPC6*进行了过表达处理。构建*TRPC6*过表达质粒,用*TRPC6*过表达质粒转染DFs,首先通过qRT-PCR检测验证了*TRPC6*过表达质粒有较高的转染和过表达*TRPC6*的效率($P<0.001$)(图3A)。其次,使用Fura-2 AM通过细胞成像微孔板检测系统检测荧光强度,结果显示过表达*TRPC6*增加了DFs内 Ca^{2+} 水平($P<0.01$)(图3B)。CCK-8实验检测细胞增殖能力,结果表明过表达*TRPC6*后DFs的增殖能力提高($P<0.001$)(图3C)。进一步研究发现,过表达*TRPC6*后DFs中胶原蛋白的表达水平升高(图3D

和图3E)。

2.4 HucMSC-Ex促进高糖环境下DFs功能和糖尿病创面愈合

为了验证hucMSC-Ex的作用,我们采用超滤联合差速超速离心法分离出hucMSC-Ex。TEM检测发现,hucMSC-Ex呈典型的杯口状和圆盘状(图4A)。Western blot检测结果表明,hucMSC-Ex表达CD9、CD81表面四跨膜蛋白,并且表达内部阳性特征性蛋白HSP70,而不表达Calnexin蛋白(图4B)。NTA检测Zeta电位结果显示,hucMSC-Ex呈现负电位(图4C)。在体外细胞模型中,在AGE-BSA刺激DFs的基础上加入hucMSC-Ex,检测DFs分泌胶原蛋白能力,结果表明hucMSC-Ex可以促进DFs中胶原蛋白的表达(图4D)。在体内糖尿病大鼠溃疡创面模型中,HE染色结果显示,hucMSC-Ex治疗组已经有完整的表皮结构,层次清晰;而相关对照组创面组织结构紊乱,有大量血细胞和炎症细胞浸润且无表皮覆盖(图4E)。

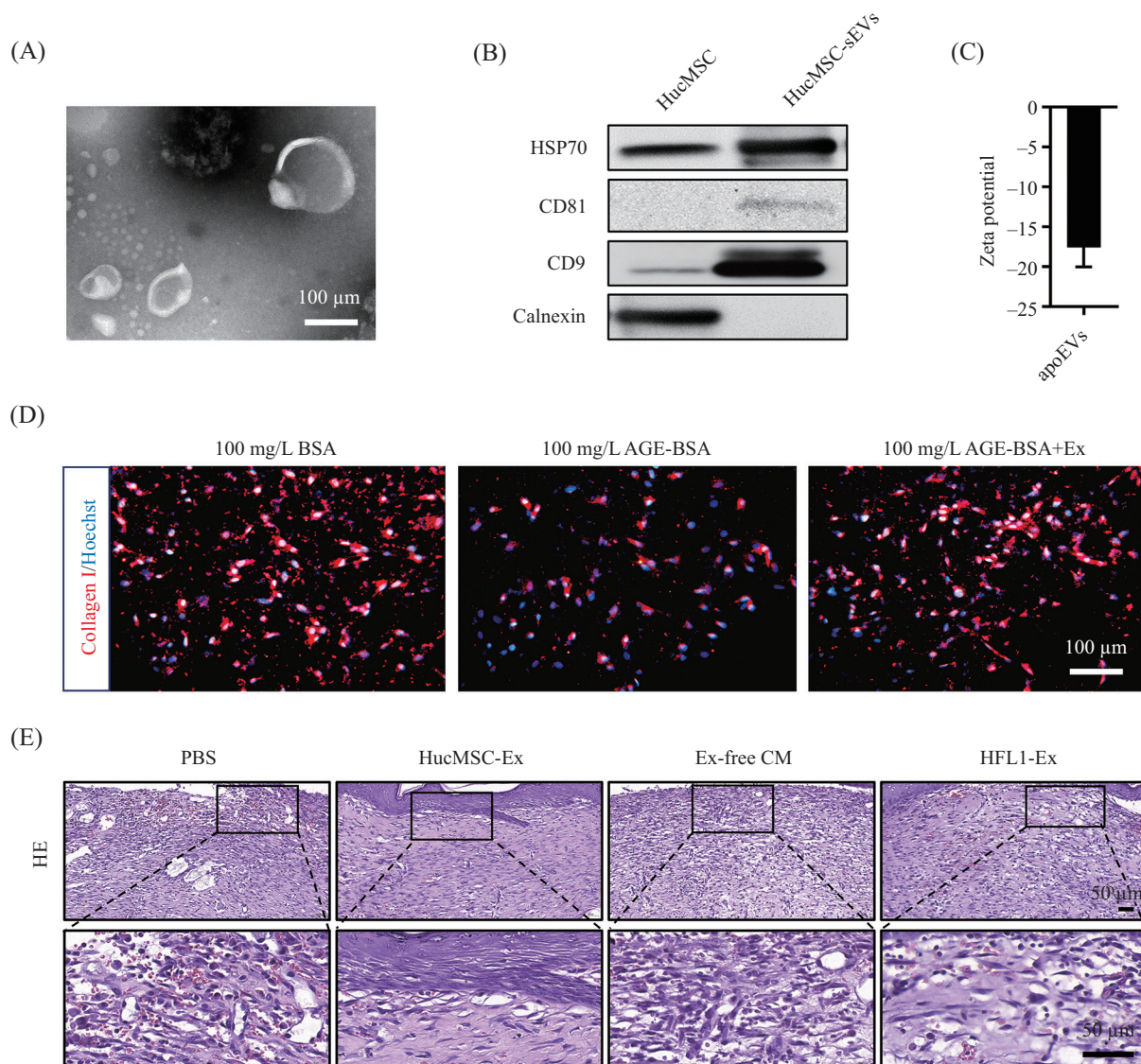


A: qRT-PCR验证DFs转染*TRPC6*过表达质粒后的*TRPC6*表达水平; B: 钙离子荧光染料Fura-2 AM细胞成像微孔板检测系统检测钙离子内流情况; C: CCK-8检测DFs细胞转染*TRPC6*过表达质粒48 h后的增殖情况; D: 细胞免疫荧光检测I型胶原蛋白荧光强度; E: Western blot检测I型胶原蛋白表达水平。*** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: qRT-PCR analysis of the expression levels of *TRPC6* in DFs transfected with overexpression plasmid of *TRPC6*; B: cytosolic Ca^{2+} levels in DFs was detected by Fura-2 AM; C: CCK-8 assay showed proliferation of DFs treated with overexpression plasmid of *TRPC6* for 48 h; D: immunofluorescence analysis showed the level of collagen I of DFs; E: Western blot analysis of collagen I in DFs. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 过表达*TRPC6*增加DFs Ca^{2+} 水平,促进其生物学功能

Fig.3 *TRPC6* overexpress enhanced Ca^{2+} influx and biological function of DFs



A: 透射电子显微镜检测hucMSC-Ex形态大小; B: Western blot检测hucMSC-Ex阳性和阴性特征标记蛋白表达情况; C: 纳米颗粒追踪分析仪检测hucMSC-Ex的Zeta电位; D: 细胞免疫荧光检测hucMSC-Ex处理DFs后的I型胶原蛋白荧光强度; E: 皮肤组织切片HE染色。

A: transmission electron microscopy analysis of hucMSC-Ex; B: Western blot analysis of positive and negative characteristic markers expression of the hucMSC-Ex; C: the Zeta potential of hucMSC-Ex was determined by nanoparticle tracking analysis; D: cellular immunofluorescence detected the fluorescence intensity of type I collagen in DFs after hucMSC-Ex treatment; E: HE staining in skin tissue sections.

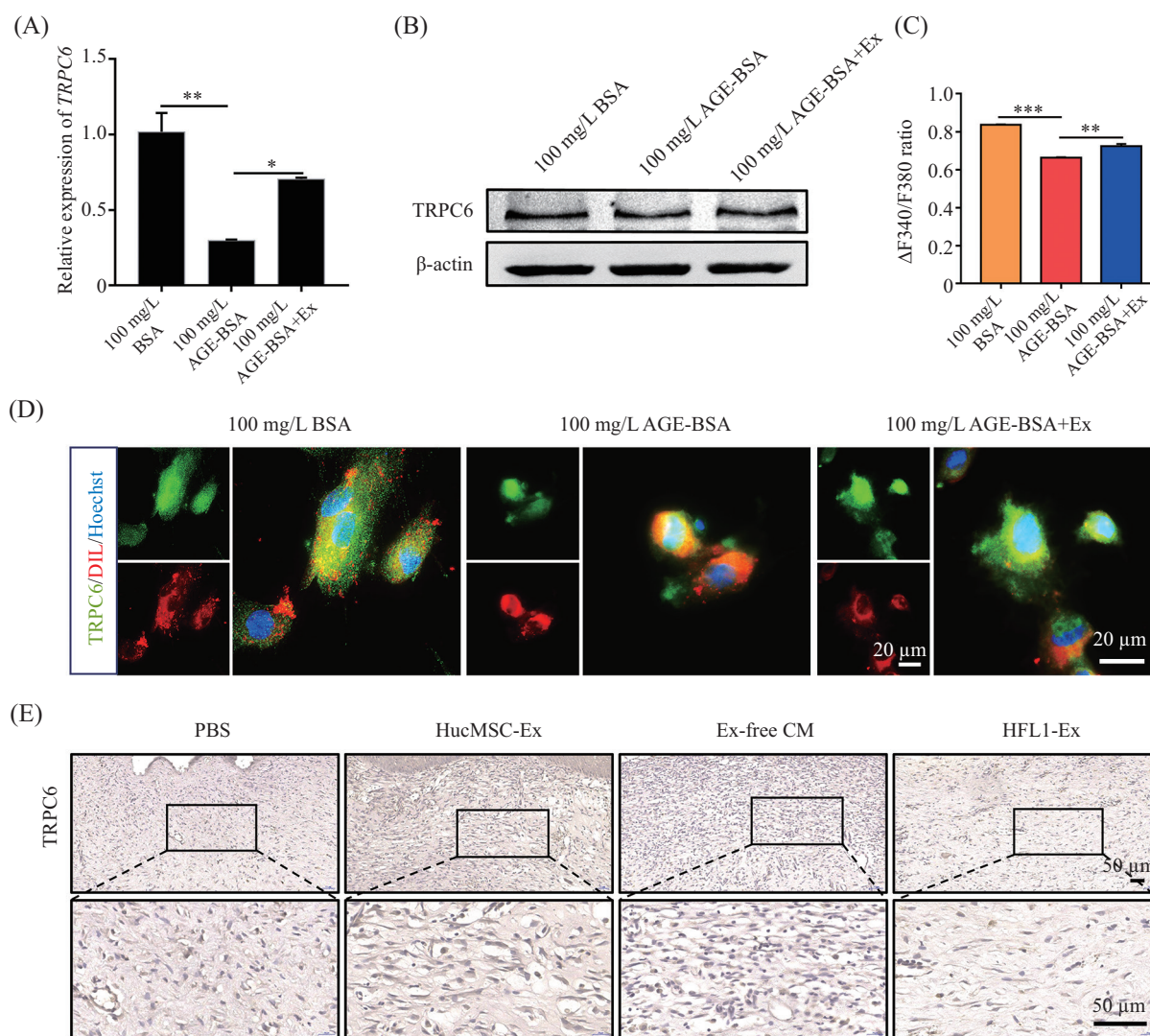
图4 HucMSC-Ex促进高糖环境下DFs功能和糖尿病创面愈合

Fig.4 HucMSC-Ex promotes DFs function in high-glucose environments and diabetic wound healing

2.5 HucMSC-Ex通过上调TRPC6表达介导Ca²⁺内流并促进高糖环境下DFs功能

为了验证 hucMSC-Ex 对 TRPC6 是否具有调控作用, 在体外细胞模型中, 我们检测了 hucMSC-Ex 处理 DFs 后 TRPC6 的表达变化, qRT-PCR 和 Western blot 结果显示, hucMSC-Ex 在 mRNA 和蛋白水平上都能抑制 AGE-BSA 引起的 TRPC6 表达水平降低 ($P < 0.1$) (图 5A 和图 5B)。同时, 使用 Fura-2 AM 检测 DFs 内 Ca²⁺ 水平, 结果显示, hucMSC-Ex 处理可以增加 DFs 内钙离

子水平 ($P < 0.01$) (图 5C)。此外, 我们用红色荧光膜染料 DIL 标记细胞膜, TRPC6 为绿色荧光标记, 激光共聚焦显微镜结果显示红色荧光与绿色荧光存在重合, TRPC6 与 DIL 存在共定位 (图 5D), 表明 hucMSC-Ex 处理可增加表达在细胞膜上的 TRPC6 水平, 进而可能促进细胞 Ca²⁺ 内流, 引起胞内 Ca²⁺ 水平增加。在体内糖尿病大鼠皮肤组织中, 免疫组化结果表明, 与相应对照组相比, hucMSC-Ex 治疗组 TRPC6 水平明显升高 (图 5E), 这与细胞实验结果的趋势一致。



A: qRT-PCR检测hucMSC-Ex处理DFs后的TRPC6表达情况; B: Western blot检测hucMSC-Ex处理DFs后的TRPC6表达情况; C: 钙离子荧光探针Fura-2 AM检测hucMSC-Ex对DFs胞内钙离子浓度影响; D: 激光共聚焦显微镜拍摄TRPC6和DIL共定位以及hucMSC-Ex处理后TRPC6的表达情况; E: 免疫组化染色检测糖尿病大鼠创面中TRPC6的表达情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: qRT-PCR showing the expression levels of TRPC6 in DFs treated with hucMSC-Ex; B: Western blot analysis of TRPC6 expression in DFs treated with hucMSC-Ex; C: the effect of hucMSC-Ex on cytosolic Ca^{2+} levels in DFs was detected by Fura-2 AM; D: laser confocal microscopy analyses TRPC6 and DIL co-localisation and TRPC6 expression after hucMSC-Ex treatment; E: immunohistochemical staining evaluated the expression of TRPC6 in diabetic rats' skin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 HucMSC-Ex通过上调TRPC6表达介导 Ca^{2+} 内流并促进高糖环境下DFs功能

Fig.5 HucMSC-Ex mediates Ca^{2+} influx and promotes DFs function in high-glucose environments through up-regulating TRPC6 expression

3 讨论

在本研究中,我们发现:(1) Ca^{2+} 通道蛋白TRPC6水平在糖尿病创面中降低;(2) TRPC6通道介导外源性 Ca^{2+} 内流,其表达变化会影响 Ca^{2+} 内流,从而影响DFs的生物学功能;(3) hucMSC-Ex可上调TRPC6表达,介导 Ca^{2+} 内流,促进高糖环境下DFs功能和糖尿病创面愈合。这从钙离子信号角度进行了解析,为糖尿病创面愈合提供了新视角。

在本研究中,我们发现TRPC6在DFs功能和糖尿病创面中发挥重要作用。有多种细胞(包括表皮角质形成细胞、真皮成纤维细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞等)参与创面修复过程。TRPC6在其他参与伤口修复的细胞中的表达情况尚不清楚。而TRPC6在人真皮成纤维细胞中的表达水平和作用是否与大鼠真皮成纤维细胞中的相同尚无研究。

HucMSC-Ex与Ca²⁺通道相关,可以上调TRPC6的表达,提高细胞内Ca²⁺水平。HucMSC-Ex携带多种生物活性物质,其调控TRPC6的具体机制尚不清楚,

TRPC6作为一种通道蛋白,不仅在Ca²⁺内流中发挥作用,而且还可作为一种响应蛋白。研究表明,TGF- β -p38信号通路增强TRPC6基因表达,导致Ca²⁺进入,激活钙调磷酸酶和NFAT通路,最终促进肌成纤维细胞分化和伤口愈合^[20]。我们的研究初步发现,TRPC6在糖尿病创面中发挥重要作用,hucMSC-Ex可以促进TRPC6的表达。然而,hucMSC-Ex含有丰富的成分,尚不清楚hucMSC-Ex是通过调控TRPC6通道活性还是调控其转录活性来影响TRPC6的。总之,TRPC6在糖尿病创面中的修复作用仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] XU Z, RAN X. Diabetic foot care in china: challenges and strategy [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4(4): 297-8.
- [2] CHAN J C N, LIM L L, WAREHAM N J, et al. The lancet commission on diabetes: using data to transform diabetes care and patient lives [J]. *Lancet*, 2021, 396(10267): 2019-82.
- [3] WANG Y, SHAO T, WANG J, et al. An update on potential biomarkers for diagnosing diabetic foot ulcer at early stage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110991.
- [4] HU C, JIA W P. Diabetes in china: epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication [J]. *Diabetes*, 2018, 67(1): 3-11.
- [5] MULDER G D, PATT L M, SANDERS L, et al. Enhanced healing of ulcers in patients with diabetes by topical treatment with glycyl-l-histidyl-l-lysine copper [J]. *Wound Repair Regen*, 1994, 2(4): 259-69.
- [6] WEYER C, BOGARDUS C, MOTT D M, et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(6): 787-94.
- [7] GUILLAMAT-PRATS R. The role of MSC in wound healing, scarring and regeneration [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1729.
- [8] WANG Y, CHEN X, CAO W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(11): 1009-16.
- [9] 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): 213-28.
- [10] KALLURI R, LEBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes [J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [11] DIXSON A C, DAWSON T R, DI VIZIO D, et al. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(7): 454-76.
- [12] 韩新烨. 人脐带间充质干细胞源外泌体在糖尿病溃疡创面修复中的作用及机制[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
- [13] ZHANG B, WANG M, GONG A, et al. HucMSC-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(7): 2158-68.
- [14] ZHANG B, SHI Y, GONG A, et al. HucMSC exosome-delivered 14-3-3 ζ orchestrates self-control of the Wnt response via modulation of YAP during cutaneous regeneration [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(10): 2485-500.
- [15] TIMANER M, TSAI K K, SHAKED Y. The multifaceted role of mesenchymal stem cells in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 225-37.
- [16] VANGEEL L, VOETS T. Transient receptor potential channels and calcium signaling [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(6): a035048.
- [17] NANOU E, CATTERALL W A. Calcium channels, synaptic plasticity, and neuropsychiatric disease [J]. *Neuron*, 2018, 98(3): 466-81.
- [18] LANNER J T, KATZ A, TAVI P, et al. The role of Ca²⁺ influx for insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscle [J]. *Diabetes*, 2006, 55(7): 2077-83.
- [19] MÖLLER CC, FLESCHE J, REISER J. Sensitizing the slit diaphragm with TRPC6 ion channels [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(5): 950-3.
- [20] DAVIS J, BURR A R, DAVIS G F, et al. A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing *in vivo* [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(4): 705-15.
- [21] SUN Y, SHI H, YIN S, et al. Human mesenchymal stem cell derived exosomes alleviate type 2 diabetes mellitus by reversing peripheral insulin resistance and relieving β -cell destruction [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7613-28.