

HucMSC-Ex调控自噬增强高糖环境下真皮成纤维细胞功能

缪徐¹ 李淋丽² 钱晖^{1*} 许文荣^{1*} 史惠^{1*}

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

²南京医科大学附属常州第二人民医院, 常州 213000)

摘要 该研究旨在探讨在高糖损伤模型中, 人脐带间充质干细胞源外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosome, hucMSC-Ex)对真皮成纤维细胞(dermal fibroblasts, DFs)的影响, 并探究自噬在糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)修复中的作用。通过多种方法(包括形态分析、粒度测量、表面标记表征等)对hucMSC和hucMSC-Ex进行全面的鉴定。同时, 使用Western blot和免疫荧光分析鉴定原代DFs表面标志物。通过流式细胞术、qRT-PCR、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测以及线粒体膜电位的检测, 分别评估高糖损伤模型中DFs的凋亡情况、炎症因子表达水平、活性氧产生情况和线粒体功能。为了深入研究自噬在修复DFU中的作用, 该研究通过免疫组织化学染色和Western blot技术检测DFU患者组织中LC3BII/I的表达情况, 并提取组织蛋白进行自噬相关蛋白的表达差异情况分析。此外, 在使用自噬诱导剂和抑制剂后, 对DFs给予hucMSC-Ex处理, 观察其增殖和迁移情况。研究表明, hucMSC-Ex可能通过调控自噬反应来增强高糖损伤下DFs的功能, 从而促进DFU的修复。

关键词 hucMSC-Ex; 糖尿病足溃疡; DFs; 自噬

HucMSC-Ex Regulates Autophagy to Enhance the Function of Dermal Fibroblasts in a High-Glucose Environment

MIAO Xu¹, LI Linli², QIAN Hui^{1*}, XU Wenrong^{1*}, SHI Hui^{1*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Medical Science and Laboratory Medicine, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China; ²the Changzhou No.2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000, China)

Abstract The objective of this study was to investigate the impact of hucMSC-Ex (human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosome) on DFs (dermal fibroblasts) in a high-glucose damage model and to explore the role of autophagy in the repair of DFU (diabetic foot ulcer). A comprehensive identification of hucMSC and hucMSC-Ex was conducted using various methods, including morphological analysis, particle size measurement, and surface marker characterization. Additionally, surface markers of primary DFs were identified through Western blot and immunofluorescence analyses. The assessment of apoptosis, inflammatory factor expression, ROS (reactive oxygen species) production, and mitochondrial function in DFs under high-glucose damage conditions separately were performed using flow cytometry, qRT-PCR, ROS detection, and measurement of mitochondrial

收稿日期: 2024-02-02 接受日期: 2024-04-01

国家自然科学基金(批准号: 82001975、82272179)资助的课题

*通信作者。Tel: 15951285038, E-mail: lshmmmlst@163.com; Tel: 13605283151, E-mail: icls@ujs.edu.cn; Tel: 15896386762, E-mail: shihui@ujs.edu.cn

Received: February 2, 2024 Accepted: April 1, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82001975, 82272179)

*Corresponding authors. Tel: +86-15951285038, E-mail: lshmmmlst@163.com; Tel: +86-13605283151, E-mail: icls@ujs.edu.cn; Tel: +86-15896386762, E-mail: shihui@ujs.edu.cn

membrane potential. To further investigate the role of autophagy in DFU repair, the expression of LC3BII/I in DFU patient tissues was examined through immunohistochemistry and Western blot techniques. Differences in the expression of autophagy-related proteins were analyzed by extracting tissue proteins. Moreover, hucMSC-Ex was administered to DFs after treatment with autophagy inducers and inhibitors to observe their proliferation and migration capabilities. The research results suggest that hucMSC-Ex may enhance the function of DFs under high glucose damage by modulating the autophagic response, thereby promoting the repair of DFU.

Keywords hucMSC-Ex; diabetic foot ulcer; DFs; autophagy

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)由于其复杂的病理生理学机制和有限的治疗选择,在临床中构成重大挑战。糖尿病足溃疡是由糖尿病神经病变、血管疾病和细菌感染引起的慢性伤口不愈合。根据糖尿病足溃疡的特征,利用的传统临床疗法包括手术清创、减轻负重、抗生素治疗和伤口敷料等^[1]。然而,长时间和反复的清创可能给患者带来极大的疼痛和经济负担^[2]。此外,耐药微生物的出现可能影响抗生素的疗效。与此同时,传统敷料虽然发挥了其作用,但需要频繁更换^[3-4]。近年来,干细胞治疗在临床领域引起了越来越多的关注。干细胞作为关键的“种子细胞”,具有招募巨噬细胞和内皮细胞到缺血和受损组织的能力,且干细胞可分泌生长因子,为伤口愈合创造有利环境^[5]。

外泌体是干细胞分泌物的重要组成部分,已被证实具有与干细胞类似的调节功能。源自干细胞的外泌体在治疗多种疾病中表现出显著的疗效,这归功于其维持细胞稳态、促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、调节免疫反应、促进血管新生以及促进神经再生的能力^[6-7]。更为重要的是,与细胞移植相比,外泌体介导的无细胞疗法具有更高的安全性、稳定性以及较低的免疫原性^[8]。这些新的治疗方法为治疗糖尿病足溃疡提供了新的方向,具有潜在的优势。因此,外泌体疗法值得进一步研究和探讨,以便更好地改善患者的治疗体验和治疗效果。

自噬是一种细胞自我降解的保守性过程,通过分解细胞内部的损伤或受损结构,提供细胞修复和再生所需的能量和物质,从而维持细胞稳态^[9]。近年来,研究发现自噬在多种生理和病理过程(包括细胞生存、代谢调节和应激应答等)中都扮演着关键的角色^[10]。自噬失调也与糖尿病的发病机制有关,并可导致伤口愈合延迟^[11]。然而,在糖尿病创面中,自噬的确切作用和机制尚未完全明确。

本文旨在系统探讨自噬在促进伤口愈合、减缓

病情进展方面的效果,深入了解人脐带间充质干细胞源外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosome, hucMSC-Ex)如何调节自噬以促进糖尿病伤口愈合。我们期望为未来糖尿病足溃疡的治疗策略提供更全面的理论支持和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 ① 人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cell, hucMSC): 通过胎儿脐带组织原代分离培养获得。② 真皮成纤维细胞(dermal fibroblasts, DFs): 本课题组前期已经建立分离DFs的方法并申请专利(专利号: 201410085659.1)。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素-链霉素双抗购自美国Excell公司;成骨、成脂诱导分化培养基试剂盒以及活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司;明胶溶液购自美国Cyagen公司;RIPA裂解液、蛋白酶和磷酸酶抑制剂购自美国ThermoFisher Scientific公司;CD9、CD81抗体购自美国Proteintech公司;Vimentin抗体购自美国Santa Cruz公司;CK10、CK16抗体以及NIPSNAP1(4-nitrophenyl phosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog 1)抗体购自美国Abcam公司;羊抗兔二抗、红色荧光膜染料Dil购自美国Invitrogen公司;Hoechst 33342购自美国Sigma公司;山羊抗兔IgG、FITC购自美国SAB公司;β-actin抗体、山羊抗小鼠IgG、FITC购自美国Abclonal公司;高敏型ECL检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒、第三代全长cDNA链合成试剂盒(去基因组)、高特异性染料法定量PCR检测试剂盒购自上海诺唯赞生物技术有限公司;Alix、Calnexin、α-SMA、LC3B、Caspase3抗体购自美国CST公司;JC-1染料、3-MA、CCCP、CsA购自美国MCE公司。

1.2 方法

1.2.1 HucMSC的原代培养 在得到产妇及其家属的同意后,从镇江市第四人民医院获得了新鲜的脐带,并将其带回实验室。在超净台内,用含有10%抗生素的PBS溶液对脐带进行了2次清洗,每次15 min。然后将脐带剪成小段,并使用眼科镊和眼科剪剔除了两根脐动脉和一根脐静脉,同时刮除了脐静脉内皮。随后,将脐带放置在含有15% FBS的 α -MEM营养液中,修剪成约3 mm×1 mm×1 mm大小的小块,均匀贴附在35 mm培养皿的底部。将这些小皿放置于10 cm培养皿中,然后倒置于37 °C、5% CO₂培养箱中1 h,以确保组织小块更好地附着在小皿上。最后添加适量的含有15% FBS、1%青霉素-链霉素的 α -MEM营养液。每隔3天更换1次培养液,约10天后,当观察到细胞形态呈螺旋状时,于37 °C条件下进行胰酶消化1 min,用P3~P8代细胞进行后续实验研究。本研究的相关实验均得到江苏大学医学伦理委员会的批准(批准号: 2020161)。

1.2.2 HucMSC成骨诱导分化实验 ① 明胶包被培养皿表面: 在6孔板中注入适量的0.1%明胶,轻轻摇晃以确保其均匀覆盖整个底部表面。将6孔板静置于无菌操作台上至少30 min,将明胶弃去并将样品晾干,备用。② 成骨诱导分化: hucMSC经过胰酶消化后,以每孔 1×10^5 个细胞的密度种植在涂有明胶的6孔板上进行细胞培养。当细胞融合度为60%至70%时,去除旧培养基,每孔加入2 mL人脐带间充质干细胞成骨诱导分化完全培养基。每隔3天使用预热至37 °C的新鲜制备的成骨诱导完全分化培养基替换旧培养基。③ 茜素红染色分析: 在诱导后的第14~28天,当大量的钙结节出现在成骨培养基中时,吸去培养基, PBS洗2次,每次洗5 min。加入1 mL 4%多聚甲醛溶液30 min。进行PBS冲洗后,每个孔都需要加入1 mL的茜素红染液,并保持染液接触5 min,之后再进行2~3次的PBS冲洗。在显微镜下观察6孔板的成骨染色结果。

1.2.3 HucMSC成脂诱导分化实验 将37 °C条件下经胰酶消化1 min后的细胞以每孔 1×10^5 个细胞的密度种植在6孔板中,每个孔都需要添加2 mL α -MEM营养液,直至细胞融合度达到或超过100%。然后,去除所有培养基,加入2 mL成脂诱导分化培养基A液到6孔板中。经过3天的诱导后,用2 mL成脂诱导分化培养基B液替代A液。培养24 h后,吸去B

液,重新加入A液。这种A液和B液的交替循环重复5次,然后继续用B液维持培养7天。在此期间,每隔2~3天更换1次新鲜的B液。分化完成后,从6孔板中吸去诱导分化的脂质形成培养基,并用PBS洗涤。4%多聚甲醛室温固定30 min,每孔添加1.5 mL油红O染料工作液染色, PBS冲洗。随后,将培养板置于显微镜下以观察成脂染色效果。

1.2.4 流式细胞术检测hucMSC表面抗原分子 当状态良好的hucMSC生长密度为80%~90%时,收集细胞并进行胰酶消化,然后将细胞悬浮在流式细胞缓冲液中,并调节细胞浓度至每毫升 3×10^6 个细胞。将100 μ L的细胞悬浮液倒入已经标记好的1.5 mL EP管中。加入2 μ L与相应标记名称一致的一抗(1:100稀释),充分混合,4 °C孵育30 min。孵育后,样品用PBS洗涤2次,250 $\times$ g离心5 min,丢弃上清。每组加入100 μ L PBS,同时加入2 μ L荧光二抗(1:200稀释),充分混合,4 °C孵育30 min。孵育后,250 $\times$ g离心5 min,丢弃上清。加入400 μ L流式细胞术缓冲液,立即上机检测。

1.2.5 HucMSC-Ex的提取 ① 对胎牛血清进行超速离心处理: 在4 °C条件下,以100 000 $\times$ g的条件将胎牛血清离心处理16 h。离心完成后,收集上层澄清液,即为去除血清外泌体的胎牛血清。② 收集hucMSC-Ex上清: 经过P3~P8传代的hucMSC在含有10%胎牛血清的 α -MEM培养基中培养24 h后,丢弃培养基,用PBS洗涤3次,然后更换含有超速离心胎牛血清的 α -MEM培养液,继续培养48 h,最后收集上清液。③ 超速离心: 在4 °C下以300 $\times$ g的速度离心15 min,以去除死细胞;收集上清液以2 000 $\times$ g的速度离心30 min,去除细胞碎片;以10 000 $\times$ g的速度离心30 min,去除细胞器碎片;随后,将上清液转移至100 kDa Millipore超滤管柱中,在4 °C、2 000 $\times$ g的离心条件下浓缩液体30 min;将浓缩的液体以100 000 $\times$ g的速度离心90 min,弃去上清,留下沉淀,并加入无菌PBS进行重悬;最后,100 000 $\times$ g离心90 min,弃去上清,用适量的PBS重悬白色沉淀,并在4 °C条件下溶解过夜。④ 分装与保存: 经过一次性滤器除菌处理后,将样品分装至EP管中,并置于-80 °C的冰箱中保存。

1.2.6 透射电子显微镜观察hucMSC-Ex 在PBS中稀释hucMSC-Ex,充分混合,取20 μ L稀释后的外泌体,滴于试纸上形成液滴。将装有样品的铜网格倒置到液滴表面,使其在室温下不受干扰地静置15 min。

除去多余的液体,将铜网格倒置在3%磷钨酸液滴上,室温静置5 min,风干,随后用透射电子显微镜观察hucMSC-Ex的形貌。

1.2.7 Nanosight粒径分析与浓度测定 按照程序指导,取1 μL hucMSC-Ex用怡宝饮用纯净水稀释至最佳浓度,使用5 mL一次性无菌注射器提取样品,然后将其注射到样品室。调整流体流速,系统地按照软件的操作步骤进行分析,最终得到颗粒分布曲线和颗粒数。

1.2.8 Western blot 收集细胞或外泌体,添加等体积的RIPA裂解液以提取总蛋白质。使用BCA蛋白质测定试剂盒确定总蛋白质浓度。等量的提取蛋白经过12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,随后在350 mA恒流条件下进行湿转,将蛋白质转移到PVDF膜上,使用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,然后4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜进行一抗(1:500稀释)孵育。然后,用1 $\times$ TBST洗涤膜去除游离抗体,并在室温下用HRP标记的山羊抗兔/抗鼠IgG二抗(1:1 000稀释)室温孵育1 h。TBST洗膜5次,每次5 min,使用ECL发光液对膜进行均匀覆盖,然后在超敏化学发光成像仪上进行显影。

1.2.9 原代DFs的培养 文章中所有涉及动物实验的程序均已经过江苏大学实验动物使用和管理委员会审查并许可(伦理审查编号: UJS-IA-CUC-2023030904)。将出生1~2天的SD红皮乳鼠断颈处死并取下背部皮肤,将皮肤放入含有0.25% Dispase酶的溶液中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下进行过夜消化。使用眼科镊取下已经被消化的皮肤组织中的真皮,然后将其浸泡在含有抗体的PBS溶液中进行洗涤。随后将真皮组织修剪成1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm~3 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm大小的组织块,并粘贴在培养皿中。使用包含10%胎牛血清的 α -MEM培养基,并将细胞培养皿放入细胞培养箱中进行培养。每2天更换1次培养液,在培养5~7天后,细胞会达到一定的密度,使用胰酶在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化1 min后进行传代。最后,使用P3~P6代的DFs进行后续实验。

1.2.10 细胞免疫荧光 弃去处理结束的细胞培养液,在室温下用4%多聚甲醛固定细胞30 min。洗涤后用0.1% Triton进行破膜处理30 min,经过PBS洗涤后,使用含5% BSA进行室温封闭处理30 min。按照1:100的比例用5% BSA稀释一抗,在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。将已经清洗过的荧光二抗以1:200的稀释比

例均匀地涂抹在玻片上,在室温下孵育60 min后进行洗涤。使用Hoechst 33342染料进行核染色10 min,随后进行PBS洗涤。最后,滴加抗荧光淬灭剂封片,并使用荧光显微镜进行观察和拍照。

1.2.11 总RNA提取及qRT-PCR检测 将1 mL Trizol加入细胞中,颠倒混匀后,置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。随后,取出样本并加入200 μL 三氯甲烷,上下剧烈颠倒混匀,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置15 min。接着,在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 的条件下离心15 min。离心后的样品分层为有机相和水相,小心吸取上层水相并将其转移到新的EP管中。向样品中加入500 μL 异丙醇,轻柔混匀,将样品置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀。在4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 的条件下离心15 min,然后加入750 μL 75%乙醇进行洗涤。轻轻拍动EP管底部的沉淀,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 、7 500 $\times g$ 的条件下离心5 min,弃去上清。在超净台中加速风干,当底部沉淀变为半透明状时,加入一定量的DEPC水,将提取的RNA放置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱溶解。最后,利用NanoDrop设备检测RNA样品的浓度和纯度,遵循诺唯赞逆转录试剂盒的操作指南,进行cDNA逆转录反应,并根据实时荧光定量PCR试剂盒的说明书,进行mRNA的定量检测。所用到的引物序列见表1。

1.2.12 活性氧检测 在6孔板每孔中种植 6×10^4 个DFs,24 h贴壁后加入不同的处理,继续培养48 h。使用不含血清的 α -MEM,按照1:1 000的比例稀释DCFH-DA,丢弃原有的营养液,用PBS洗涤2~3次,然后每孔加入1.5 mL的DCFH-DA,使其均匀覆盖6孔板底部,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育30 min。随后,用不含血清的细胞培养液洗涤细胞3次,立即使用荧光显微镜进行拍摄。

1.2.13 JC-1检测线粒体膜电位 将JC-1粉末溶解于DMSO中,制备成1 mmol/L的母液。使用不含血清的 α -MEM稀释JC-1染料,按1:1 000的比例稀释,丢弃6孔板中原有的营养液,用PBS洗涤后每孔加入1.5 mL的JC-1染料,并将6孔板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱内孵育30 min。随后,用不含血清的细胞培养液洗涤细胞3次,立即进行拍照。

1.2.14 流式检测细胞凋亡情况 将PBS洗涤后的细胞加入不含EDTA的胰酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下消化1 min,然后在4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 $\times g$ 的条件下离心5 min,弃去上清并收集细胞。将100 μL 的1 $\times$ 结合缓冲液加入样品中,轻轻吹散以获得单细胞悬液。随后,加入5 μL 的Annexin V-FITC和5 μL 的碘化丙啶染色液,轻轻

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

mRNA引物名称 Primer name for mRNA	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	扩增产物长度/bp Length of amplified product /bp
β-actin	Forward: CAT SCT CCT GCT TGC TGA CT Reverse: CAC GAA ACT ACC TTC AAC TCC	265
IL-1β	Forward: TTG AGT CTG CAC AGT TCC CC Reverse: TCC TGG GGA AGG CAT TAG GA	160
IL-6	Forward: AGA GAC TTC CAG CCA GTT GC Reverse: TGC CAT TGC ACA ACT CTT TTC	199
IL-10	Forward: CTG CAG GAC TTT AAG GGT TAC T Reverse: ACA GTG TTT GTT GGG TGG CT	217

吹匀;在避光条件下,室温孵育15 min。最后,加入100 μL的1×结合缓冲液,混合均匀后使用流式细胞仪进行检测。

1.2.15 DFs对hucMSC-Ex的摄取 取1 mL稀释的hucMSC-Ex与1 μL的Dil涡旋混匀后,在37 °C下避光孵育30 min。随后,将混合物转移至100 kDa超滤离心管,4 °C、1 500 ×g离心30 min,重复执行此操作2次。将带有Dil标记的hucMSC-Ex和DFs在37 °C的细胞培养箱中孵育12 h。为研究hucMSC-Ex被DFs摄取的情况,采用4%多聚甲醛固定细胞,并在共聚焦荧光显微镜下进行观察。

1.2.16 免疫组织化学染色 ① 石蜡切片脱蜡至水:将组织白片于70 °C烘箱烘烤1~2 h。切片先后放入二甲苯中浸泡脱蜡,每次15 min,共2次;随后,使用100%、95%、85%、75%酒精进行梯度脱水,每次1 min。最后,将切片放入ddH₂O中洗涤3 min。② 灭活内源性酶:使用3% H₂O₂在室温孵育组织切片30 min, PBS洗涤3次,每次5 min。③ 热修复抗原:用新鲜配制的1×枸橼酸盐缓冲液浸没切片,加热30 min,待其自然冷却后,用PBS洗涤3次。④ 封闭:在室温下使用5% BSA封闭3 min。⑤ 将一抗以1:100稀释,置于湿盒中在4 °C孵育过夜, PBS洗涤3次,每次10 min。⑥ 生物素化二抗(1:300稀释)室温下孵育15 min, PBS洗涤。⑦ SABC试剂在室温下孵育20 min,用PBS进行洗涤。⑧ DAB显色液显色1~2 min, ddH₂O冲洗。⑨ 苏木素复染30~60 s, ddH₂O冲洗。⑩ 脱水至蜡:完成脱蜡至水步骤的逆操作后,接着滴加中性树脂以封固盖玻片,显微镜下拍照。

1.2.17 细胞克隆形成实验 将DFs细胞进行消化,

选取2 000个细胞并种植到小皿中,充分混匀。经过24 h的贴壁后,施加相应的处理措施。每隔3天更换1次新鲜的细胞培养基。经过9~12天后,弃去细胞培养液,使用4%多聚甲醛固定细胞20 min,然后用PBS洗涤3次。进行结晶紫染色5~10 min,随后再次用PBS洗涤。拍照并观察细胞集落的大小和数量。

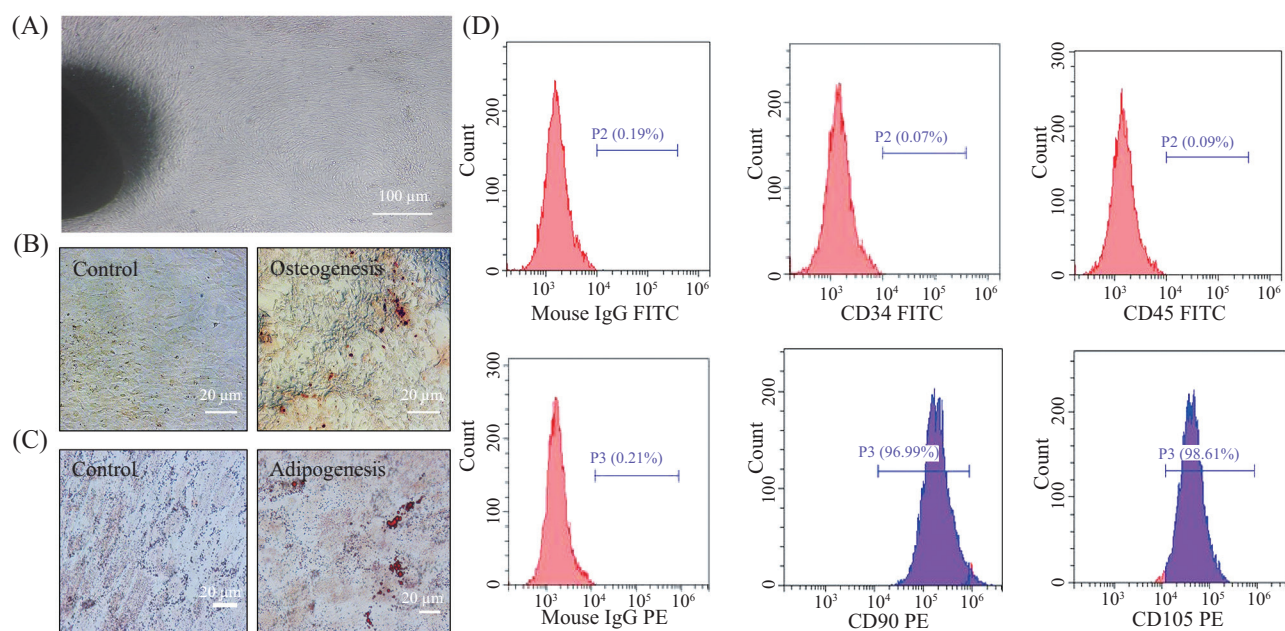
1.2.18 Transwell迁移实验 将DFs细胞种植到6孔板中,经过贴壁后加入相应的处理因素。使用胰酶消化融合度达到90%的细胞。随后,将3×10⁴个细胞计数后悬浮于200 μL无血清培养基,并接种到Transwell迁移板的上室,同时,在下室中加入600 μL含有10%胎牛血清的培养基。在37 °C、5% CO₂的细胞培养箱中放置20 h后,在4%多聚甲醛溶液中固定细胞30 min,然后使用含有结晶紫的染色溶液进行染色。在PBS清洗后用棉签轻拭迁移小室上膜表面。最后,将样品晾干,并在显微镜下拍照观察。

1.2.19 统计学分析 使用GraphPad Prism进行统计学分析,数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。通过方差分析的方法,探究均数之间的差异情况。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HucMSC的培养及其鉴定

新生儿脐带组织在添加了20% FBS和双抗的α-MEM培养基中贴壁培养12天后,原代hucMSC在显微镜下呈现出长梭形的形态,并形成旋涡状聚集(图1A)。经过21天的成骨诱导培养后,茜素红染色结果显示,相较于对照组,诱导培养组的细胞呈现红色变化(图1B)。在成脂培养基中进行18天的诱导培养后,与对照组相比,添加了油红O染料的诱导培养组细胞



A: 原代hucMSC的形态观察; B: hucMSC的成骨诱导分化; C: hucMSC的成脂诱导分化; D: 流式检测hucMSC表面标志物的表达。

A: morphological observation of primary hucMSC; B: osteogenic differentiation of hucMSC; C: adipogenic differentiation of hucMSC; D: flow detection of the expression of surface markers of hucMSC.

图1 HucMSC的培养及其鉴定

Fig.1 Culture and identification of hucMSC

上出现大小不一、圆形或椭圆形的红色脂滴(图1C)。流式细胞仪检测hucMSC表面标志物,结果显示CD34和CD45呈阴性,而CD90和CD105呈阳性(图1D)。

2.2 HucMSC-Ex的分离鉴定

使用超滤联合差速超速离心法对hucMSC-Ex进行分离纯化。通过透射电子显微镜观察,我们可以看到hucMSC-Ex呈现典型的杯状或盘状结构(图2A)。粒径分析结果显示, hucMSC-Ex的直径主要分布在180 nm左右(图2B)。Western blot分析的结果显示, hucMSC-Ex和hucMSC均阳性表达CD9、CD81、Alix等特征性蛋白质,然而Calnexin在hucMSC-Ex中不表达(图2C),这表明成功分离出了hucMSC-Ex。

2.3 SD大鼠真皮成纤维细胞的原代培养及鉴定

贴壁培养6天后,在显微镜下观察发现,新生SD大鼠背部真皮组织中的DFs呈现梭形,并形成了漩涡状结构(图3A)。Western blot分析表明, DFs表达了Vimentin和 α -SMA(图3B)。在免疫荧光分析中, DFs表现出CK10和CK16的较低表达或不表达的特征,然而Vimentin、 α -SMA和FAP的表达则为阳性(图3C)。

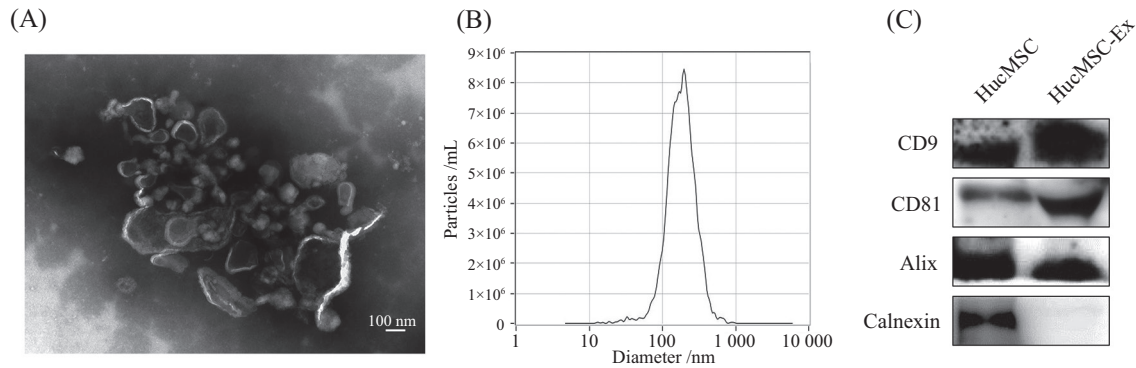
2.4 HucMSC-Ex缓解高糖诱导的真皮成纤维细胞的损伤

在DFs与hucMSC-Ex联合培养12 h后,我们用

红色膜染料DiI标记hucMSC-Ex, 荧光显微镜下观察到细胞内出现红色荧光,表明DFs可以通过吞噬的方式摄取hucMSC-Ex(图4A)。在高糖和外泌体处理后,高糖组的促炎细胞因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6表达量明显增加,而加入外泌体后,它们的表达量有所下降。与此同时,抗炎因子IL-10的表达具有相反的倾向(图4B)。通过检测DFs释放的活性氧发现,高糖处理导致DFs释放更多活性氧,而外泌体显著降低了活性氧的释放量(图4C)。经过高糖处理后,与正常组相比,线粒体的膜电位降低,而经过外泌体处理后,线粒体的膜电位升高(图4D)。利用Annexin V FITC/PI流式检测技术检测细胞凋亡情况,我们发现hucMSC-Ex可以减轻由高糖引起的真皮成纤维细胞的凋亡现象(图4E)。

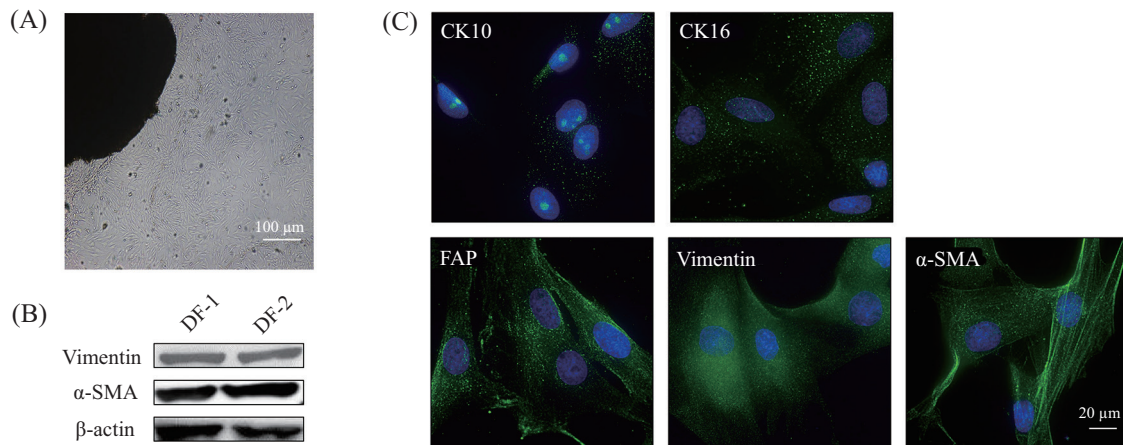
2.5 自噬参与体内DFU的修复

研究表明自噬在调节炎症等多种反应中起作用^[12],糖尿病的高糖环境会导致自噬失调,从而延迟糖尿病伤口愈合^[13],由此本节旨在讨论自噬在糖尿病创面修复以及皮肤细胞功能恢复中的作用。为了验证这一猜想,我们收集了糖尿病溃疡创面的临床样本,并检测了其自噬相关蛋白的表达情况。实验结果显示,在创口周围的组织中,自噬相关蛋白



A: 透射电镜观察hucMSC-Ex形态; B: Nanosight检测hucMSC-Ex粒径分布; C: Western blot检测外泌体标记物CD9、Alix、CD81、Calnexin。
A: observe the morphology of hucMSC-Ex by transmission electron microscope; B: Nanosight detects the particle size distribution of hucMSC-Ex; C: Western blot was used to detect exosomal markers CD9, Alix, CD81 and Calnexin.

图2 HucMSC-Ex的分离及鉴定
Fig.2 Isolation and identification of hucMSC-Ex



A: 显微镜观察原代DFs的形态; B: Western blot检测DFs表面标志物; C: 免疫荧光检测DFs表面标志物的表达情况。
A: observation of the morphology of primary DFs with microscope; B: Western blot was used to detect DFs surface markers; C: immunofluorescence was used to detect the expression of DFs surface markers.

图3 SD大鼠真皮成纤维细胞的原代培养及鉴定
Fig.3 Primary culture and identification of SD rat derived dermal fibroblasts

LC3B和NIPSNAP1的表达水平较高,但在创面内它们的表达则显著减少。相反,在创缘部位,凋亡相关蛋白Caspase3的表达水平较低,但在创面区域其却表现出较高的表达水平(图5A)。通过使用免疫组化方法检测DFU患者组织中与皮肤创面和创缘有关的LC3B表达情况(图5B),结果与利用Western blot进行检测的结果一致。这初步验证了自噬可能参与糖尿病溃疡创面的病理过程。

2.6 自噬参与调控DFs的迁移能力

如前所述,外泌体在高糖诱导的DFs损伤中展现出修复效果,同时在创缘部位观察到自噬相关蛋白表达上调,由此推测外泌体可能通过调控自噬来促进修复过程。为了进一步研究自噬在糖尿病溃疡创面中

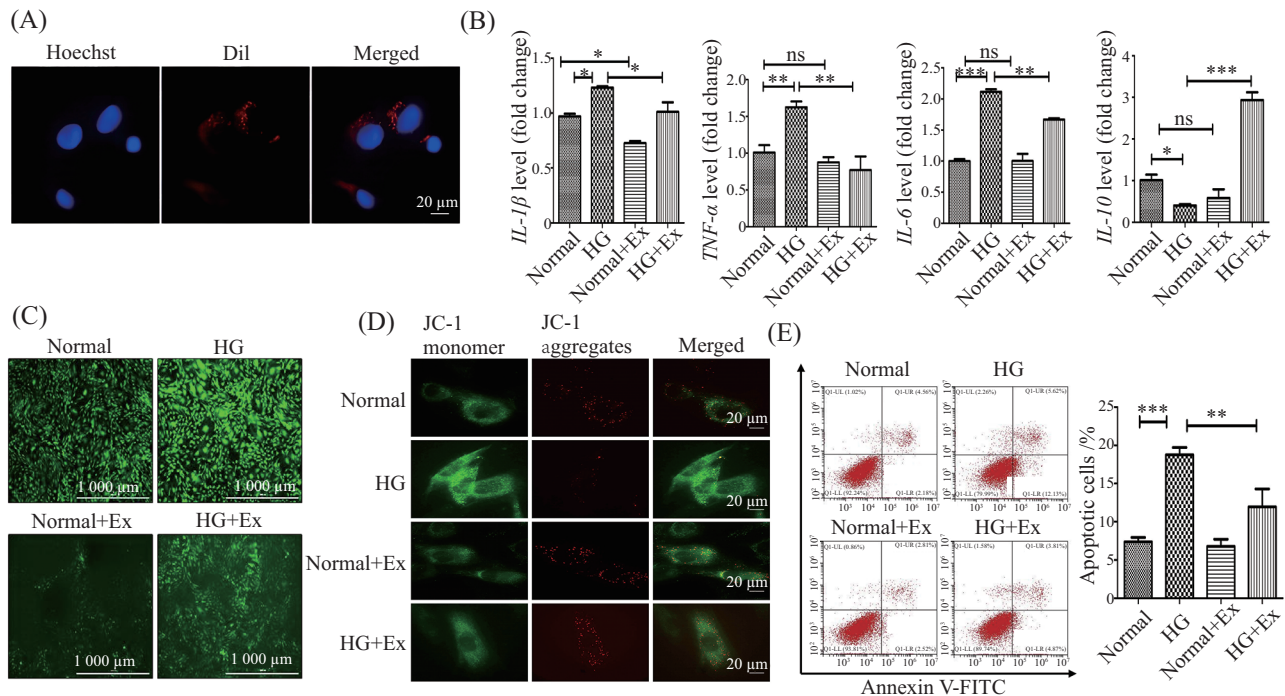
的作用,我们使用了自噬抑制剂CsA和3-MA来处理DFs,结果显示它们的迁移能力有所降低(图6A和图6C)。相反地,使用自噬诱导剂CCCP和RPM处理DFs后,观察到了DFs的迁移能力增强的现象(图6B和图6D)。

2.7 自噬参与调控DFs的增殖能力

我们分别使用了自噬抑制剂3-MA和CsA处理DFs,观察到经过处理后它们的增殖能力有所减弱(图7A和图7C)。相反地,使用自噬诱导剂RPM和CCCP处理DFs后,我们观察到DFs的迁移能力增强(图7B和图7D)。

2.8 HucMSC-Ex调控自噬增强DFs的增殖迁移能力

为了验证hucMSC-Ex在创面修复过程中对自噬

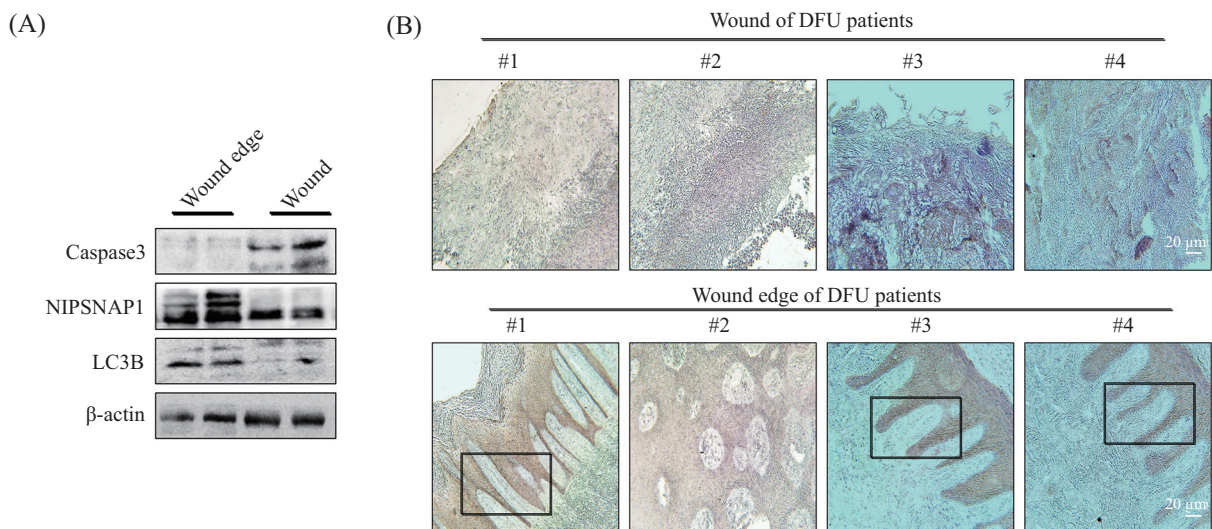


A: 荧光显微镜观察DFs摄取hucMSC-Ex的情况; B: 实时荧光定量PCR检测炎症因子的表达情况; C: 荧光检测活性氧的产生; D: JC-1检测DFs细胞线粒体膜电位; E: 流式检测细胞凋亡。n=3; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; ns: 无显著性差异。

A: the observation of the uptake of hucMSC-Ex by DFs with fluorescence microscope; B: real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression levels of inflammatory factors in DFs; C: fluorescence detection of the generation of reactive oxygen species; D: JC-1 dye was used to detect the mitochondrial membrane potential of DFs; E: cell apoptosis was detected by flow cytometry. n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ns: no significant difference.

图4 HucMSC-Ex缓解高糖诱导的真皮成纤维细胞的损伤

Fig.4 HucMSC-Ex alleviated the damage of dermal fibroblasts induced by high glucose

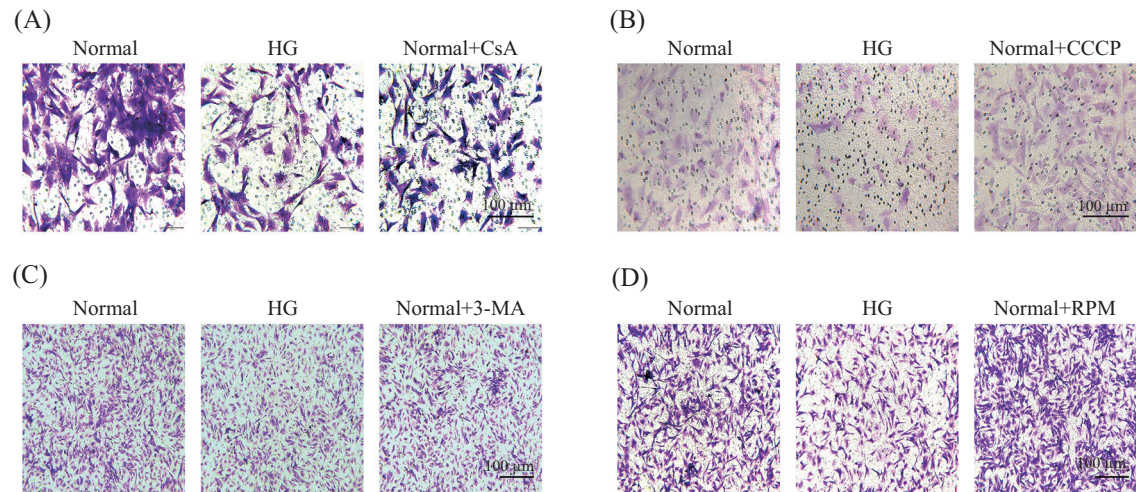


A: Western blot检测DFU病人组织标本创缘和创面中自噬以及凋亡相关蛋白的表达情况; B: 免疫组织化学检测DFU病人组织标本创缘和创面中LC3B的表达情况。黑色方框指示LC3B的表达。

A: Western blot was used to detect the expression of autophagy and apoptosis-related proteins in wound edges and wounds of DFU patient tissue sample; B: immunohistochemistry was used to detect the expression of LC3B in wound edges and wounds of DFU patient tissue sample. Black box indicates the expression of LC3B.

图5 自噬参与体内DFU的修复

Fig.5 Autophagy participated in the repair of DFU in vivo

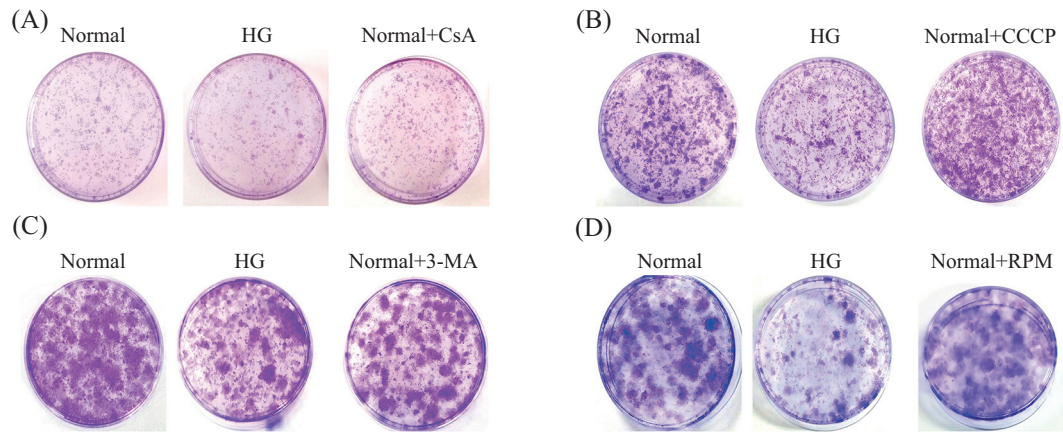


A: CsA处理DFs 10 h后, Transwell检测DFs的迁移情况; B: CCCP处理DFs 8 h后, Transwell检测DFs的迁移情况; C: 3-MA处理DFs 8 h后, Transwell检测DFs的迁移情况; D: RPM处理DFs 8 h后, Transwell检测DFs的迁移情况。

A: after CsA treated DFs for 10 h, Transwell was used to detect the migration ability of DFs; B: after CCCP treated DFs for 8 h, Transwell was used to detect the migration ability of DFs; C: the analysis of migration ability of DFs after 3-MA treated DFs for 8 h; D: after treating DFs in RPM for 8 h, Transwell was used to detect the migration ability of DFs.

图6 自噬参与调控DFs的迁移能力

Fig.6 Autophagy was involved in regulating the migration ability of DFs



A: CsA处理DFs 10 h后, 克隆形成实验检测DFs的增殖情况; B: CCCP处理DFs 8 h后, 克隆形成实验检测DFs的增殖情况; C: 3-MA处理DFs 8 h后, 克隆形成实验检测DFs的增殖情况; D: RPM处理DFs 8 h后, 克隆形成实验检测DFs的增殖情况。

A: after CsA treated DFs for 10 h, cloning formation experiment was used to detect the proliferation of DFs; B: after CCCP treated DFs for 8 h, cloning formation experiment was used to detect the proliferation of DFs; C: the analysis of proliferation ability of DFs by cloning formation experiment after 3-MA treated DFs for 8 h; D: after treating DFs in RPM for 8 h, cloning formation experiment was used to detect the proliferation of DFs.

图7 自噬参与调控DFs的增殖能力

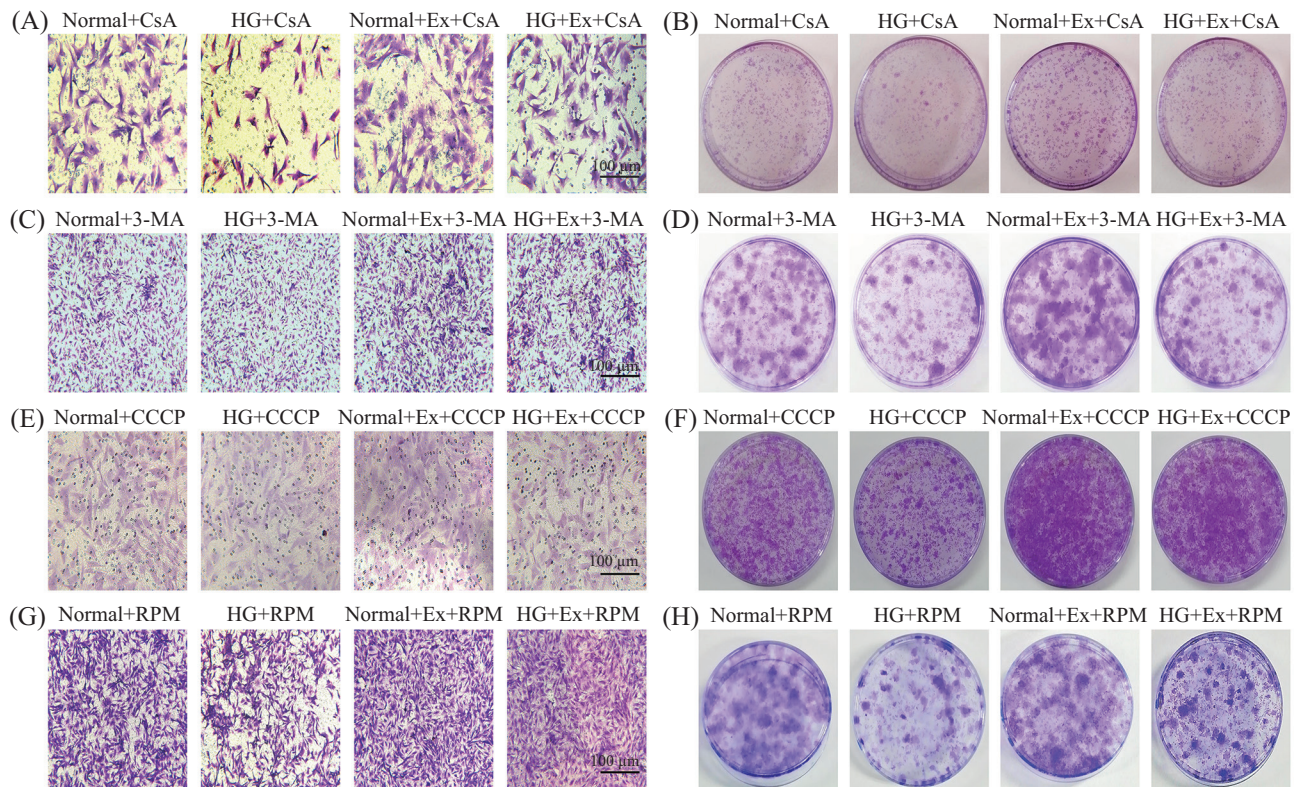
Fig.7 Autophagy was involved in regulating the proliferation of DFs

是否具有调控作用,在体外细胞模型中,我们检测了经hucMSC-Ex处理后的DFs的增殖迁移情况。进一步的研究发现,自噬抑制剂CsA和3-MA处理DFs后给予hucMSC-Ex,细胞迁移能力明显增强(图8A和图8C),这一现象在克隆实验中也得到了证实(图8B和图8D)。同样,在使用自噬诱导剂CCCP和RPM处理DFs后加入hucMSC-Ex,能显著促进DFs迁移(图8E和图8G);克

隆形成实验也显示了同样的现象(图8F和图8H)。

3 讨论

在本研究中,我们已明确了:(1)通过应用hucMSC-Ex,能够有效降低DFs的炎症水平,抑制活性氧物质的释放,减少细胞凋亡,并同时提高线粒体膜电位,从而对DFU的修复产生积极的效果;(2)在



A, C: Transwell检测经hucMSC-Ex和自噬抑制剂CsA、3-MA处理后的DFs的迁移情况; B, D: 平板克隆检测经hucMSC-Ex和自噬抑制剂CsA、3-MA处理后DFs增殖情况; E, G: Transwell检测经hucMSC-Ex和自噬增强剂CCCP、RPM处理后DFs迁移情况; F, H: 平板克隆检测经hucMSC-Ex和自噬增强剂CCCP、RPM处理后DFs增殖情况。

A, C: Transwell assay was used to assess the migration ability of DFs after treatment with hucMSC-Ex and autophagy inhibitors CsA, 3-MA; B, D: plate clone assay was used to evaluate the proliferative capacity after treatment with hucMSC-Ex and autophagy inhibitors CsA, 3-MA; E, G: Transwell assay was used to examine the migration ability of DFs after treatment with hucMSC-Ex and autophagy enhancers CCCP, RPM; F, H: plate clone assay showed the proliferative capacity after treatment with hucMSC-Ex and autophagy enhancers CCCP, RPM.

图8 HucMSC-Ex调控自噬增强DFs的增殖迁移能力

Fig.8 HucMSC-Ex regulated autophagy to enhance the proliferative and migratory capacities of DFs

DFU患者的组织标本中, LC3B和其他自噬相关蛋白在创缘部位的表达水平较高; (3) hucMSC-Ex通过调控自噬来增强DFs的增殖迁移能力。

已有证据表明, 炎症在DFU的发生和发展中扮演关键角色, 许多免疫细胞和炎症因子推动着这一过程。例如, 活化的炎症细胞能够产生多种促炎细胞因子, 导致M1和M2巨噬细胞比例不平衡。在未愈合的DFU患者中, 肿瘤坏死因子的表达水平较高^[14-16]。在体外处理DFs的实验中, 我们发现高糖处理后, 其促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 的表达水平升高, 而加入外泌体后, 这些因子的表达水平有所降低。相比之下, 抗炎因子IL-10的表达则呈相反趋势。这表明hucMSC-Ex具有减轻高糖诱导下DFs炎症反应的能力。

在正常创面愈合过程中, ROS起着至关重要的作用, 扮演着许多免疫细胞和非淋巴细胞第二信使

的角色。这些ROS有双重作用, 通过调节血管生成、抑制细菌生长, 并协调淋巴细胞的募集, 从而在伤口部位发挥作用^[17]。然而已有证据表明, ROS的过度产生与创面长期无法愈合之间存在密切联系。ROS的过度产生和长期存在会引发炎症细胞因子的持续分泌, 导致皮肤成纤维细胞严重受损, 同时破坏角质细胞的功能^[18-19]。在我们的研究中发现, hucMSC-Ex可以减少高糖引起的DFs中ROS的释放。这一发现有望加速DFU的愈合过程, 从而缓解创面长期无法愈合的问题。

过量ROS在细胞内的存在可能会对线粒体的DNA、蛋白质和脂质造成伤害, 从而导致线粒体功能受到抑制^[20], 进而引发细胞凋亡。线粒体膜电位是评估细胞内线粒体运行状态的关键指标。实验结果表明, 当引入高糖后, 线粒体膜电位会发生去极化, 然而在加入hucMSC-Ex后, 这一现象得到改善

(图4D)。这表明hucMSC-Ex可能有助于维持线粒体的正常功能,从而减缓细胞凋亡的发生。

DFU患者创缘和创面中自噬相关蛋白,即LC3B和NIPSNAP1的表达差异表明自噬在DFU修复过程中可能发挥着重要作用。此外,我们评估了创缘和创面之间凋亡相关蛋白表达的差异,获得的结果与预期相一致。

在明确了hucMSC-Ex的修复作用以及在DFU患者组织标本中创缘部位自噬相关蛋白高表达的基础上,我们随后研究了hucMSC-Ex是否能够调节自噬对成纤维细胞功能的影响。研究结果显示,由于自噬作用,真皮成纤维细胞的增殖和迁移能力明显增强;并且在hucMSC-Ex的介入下,DFUs功能恢复更为显著。这凸显了自噬在hucMSC-Ex促进DFU创面恢复中的关键作用。DFU也涉及其他类型细胞,如角质形成细胞、血管内皮细胞和免疫细胞等,然而我们对自噬在这些细胞中所产生的影响尚未完全理解。此外,我们计划在患有糖尿病的大鼠身上建立DFU模型,以深入研究自噬在DFU修复中的角色,进一步探索其作用机制。

参考文献 (References)

- [1] BALTZIS D, ELEFThERiADOU I, VEVES A. Pathogenesis and treatment of impaired wound healing in diabetes mellitus: new insights [J]. *Adv Ther*, 2014, 31: 817-36.
- [2] HSU C R, CHANG C C, CHEN Y T, et al. Organization of wound healing services: the impact on lowering the diabetes foot amputation rate in a ten-year review and the importance of early debridement [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2015, 109(1): 77-84.
- [3] LONG L, LIU W, HU C, et al. Construction of multifunctional wound dressings with their application in chronic wound treatment [J]. *Biomater Sci*, 2022, 10(15): 4058-76.
- [4] ZHANG X, SHU W, YU Q, et al. Functional biomaterials for treatment of chronic wound [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 516.
- [5] CHEN X, WU J, CAO X, et al. The role of gel wound dressings loaded with stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(12): 13261.
- [6] PEGTEL D M, GOULD S J. Exosomes [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 487-514.
- [7] THÉRY C, WITWER K W, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. *J Extracell Vesicles*, 2018, 7(1): 1535750.
- [8] MERINO-GONZÁLEZ C, ZUÑIGA F A, ESCUDERO C, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote angiogenesis: potencial clinical application [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 24.
- [9] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-41.
- [10] MIGNEAULT F, HÉBERT M J. Autophagy, tissue repair, and fibrosis: a delicate balance [J]. *Matrix Biol*, 2021, 100: 182-96.
- [11] TSENG C H, SHAH K M, CHIU I J, et al. The role of autophagy in type 2 diabetic kidney disease management [J]. *Cells*, 2023, 12(23): 2691.
- [12] DERETIC V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism [J]. *Immunity*, 2021, 54(3): 437-53.
- [13] QIANG L, YANG S, CUI Y H, et al. Keratinocyte autophagy enables the activation of keratinocytes and fibroblasts and facilitates wound healing [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2128-43.
- [14] NABZDYK L P, KUCHIBHOTLA S, GUTHRIE P, et al. Expression of neuropeptides and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing [J]. *J Vasc Surg*, 2013, 58(3): 766-75, e12.
- [15] TELLECHEA A, KAFANAS A, LEAL E C, et al. Increased skin inflammation and blood vessel density in human and experimental diabetes [J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2013, 12(1): 4-11.
- [16] DINH T, TECILAZICH F, KAFANAS A, et al. Mechanisms involved in the development and healing of diabetic foot ulceration [J]. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2937-47.
- [17] DUNNILL C, PATTON T, BRENNAN J, et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process [J]. *Int Wound J*, 2017, 14(1): 89-96.
- [18] SCHÄFER M, WERNER S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(2): 165-71.
- [19] MOSELEY R, STEWART J E, STEPHENS P, et al. Extracellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid: lessons learned from other inflammatory diseases [J]. *Br J Dermatol*, 2004, 150(3): 401-13.
- [20] YOULE R J, VAN DER BLIEK A M. Mitochondrial fission, fusion, and stress [J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1062-5.