



干细胞球聚体微针促进糖尿病创面愈合

吴相依, 黄丹青, 徐晔, 陈国璞, 赵远锦*

南京大学医学院附属鼓楼医院, 烧伤整形科, 南京 210002

* 联系人, E-mail: yjzhao@seu.edu.cn

Stem cell spheroid microneedles promote diabetic wound healing

Xiangyi Wu, Danqing Huang, Ye Xu, Guopu Chen & Yuanjin Zhao*

Department of Burn and Plastic Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210002, China

* Corresponding author, E-mail: yjzhao@seu.edu.cn

doi: [10.1360/TB-2023-0577](https://doi.org/10.1360/TB-2023-0577)

根据世界卫生组织统计, 全球范围内有超过4亿人患有糖尿病^[1]. 由于其发病机制涉及神经病变、血管病变和免疫功能受损等多个因素, 患者易出现皮肤感觉减退、血液供应不足及免疫功能下降等问题^[2]. 据统计, 约15%~25%的糖尿病患者会并发难以愈合的皮肤溃疡, 即糖尿病溃疡, 好发于患者下肢、足部或其他容易受压的部位^[3]. 目前, 促进糖尿病溃疡愈合的方法主要包括管理创面、控制感染、负压吸引、应用生长因子、移植皮肤替代物和皮瓣等. 然而, 由于其发病机制复杂, 糖尿病溃疡的复发率和致残率仍然很高, 因此更有效的治疗方法有待开发. 近年来, 干细胞治疗作为一种前沿的治疗方法, 已受到广泛研究并应用于多个领域, 其在糖尿病溃疡中的治疗价值也得到广泛验证^[4]. 干细胞有多种来源, 包括造血干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、人类胚胎干细胞、诱导多能干细胞等. 其中, 间充质干细胞来源广泛, 具有多向分化潜能, 有助于促进创面修复和组织再生; 此外, 间充质干细胞还能释放生长因子和细胞因子, 促进血管生成、减轻炎症反应, 提高创面愈合能力^[5]. 因此, 间充质干细胞在再生医学领域具有广阔应用前景.

干细胞的应用方式对疾病的治疗效果具有很大影响. 目前干细胞的应用方式主要分为直接注射和组织工程构建两种方式. 直接注射是指将干细胞直接注入溃疡周围或创面内, 以促进创面的修复. 组织工程则是指先将干细胞在体外培养并构建组织工程化复合材料, 然后再将干细胞复合材料植入创面中, 实现组织的修复和再生. 研究表明, 由于创面存在复杂的炎性微环境, 直接注射的干细胞常常会迅速失活, 导致细胞滞留率较低、治疗效果不佳. 为了解决这个问题, 科学家们常常采用组织工程技术开发出多种新型的细胞支架或细胞载体, 作为干细胞输送策略. 细胞支架和细胞载体可以

为干细胞提供生物学和物理学上的支持, 以减少干细胞在输送过程中的损耗和失活^[6]. 值得注意的是, 具有特殊形状和结构的细胞支架被证明可以进一步增强干细胞的递送效果. 其中, 微针结构在透皮输送方面具有显著的优势. 微针是指针头在数毫米或亚毫米尺寸范围内的细小针头结构, 相比于传统的注射用针更小、更尖锐^[7]. 微针仅穿透皮肤的表皮层, 不会进入深层组织或血管, 因此基于微针的药物输送是一种无创且无痛的给药方式. 此外, 通过刺破角质层, 微针能直接输送物质进入皮肤下层组织, 大大提高了药物的皮肤渗透性, 使药物可以更有效地被皮肤吸收和分布到目标区域中^[8]. 多项研究已证实基于微针的药物递送策略在糖尿病溃疡治疗中的具有优越性. 例如, 微针可穿透糖尿病溃疡表面具有抗生素耐药性的细菌生物膜, 使药物有效作用于创面深层组织.

同时, 改变干细胞的生长模式以增强其治疗效果, 是当前干细胞治疗领域的另一个研究热点. 一般来说, 在二维培养条件下生长的干细胞与其三维的自然生长模式相差较大, 因此其功能和治疗效果受到极大的限制. 相比传统的二维培养, 三维培养的细胞球聚体具有更接近真实组织的结构特征. 这种三维结构更符合体内细胞的自然生长环境, 能够更好地模拟细胞之间的相互作用、信号传导以及组织发育等生理过程^[9]. 此外, 三维细胞球聚体可以表现其特定功能和分化状态, 例如表达特定基因、产生细胞分泌物以及发生特定生理反应^[10]. 已有报道表明, 干细胞球聚体相比于分散细胞更易存活, 注射于皮肤创面后能迁徙至创面内部, 帮助表皮重建和血管新生^[11]. 因此, 培养出具有三维结构的干细胞球聚体并靶向递送给病变组织在推动干细胞治疗中具有重要研究价值. 然而, 传统的三维细胞球聚体培养方法(例如悬浮培养法、凝胶下培养法)获得的干细胞球聚体往往大小不均. 过大

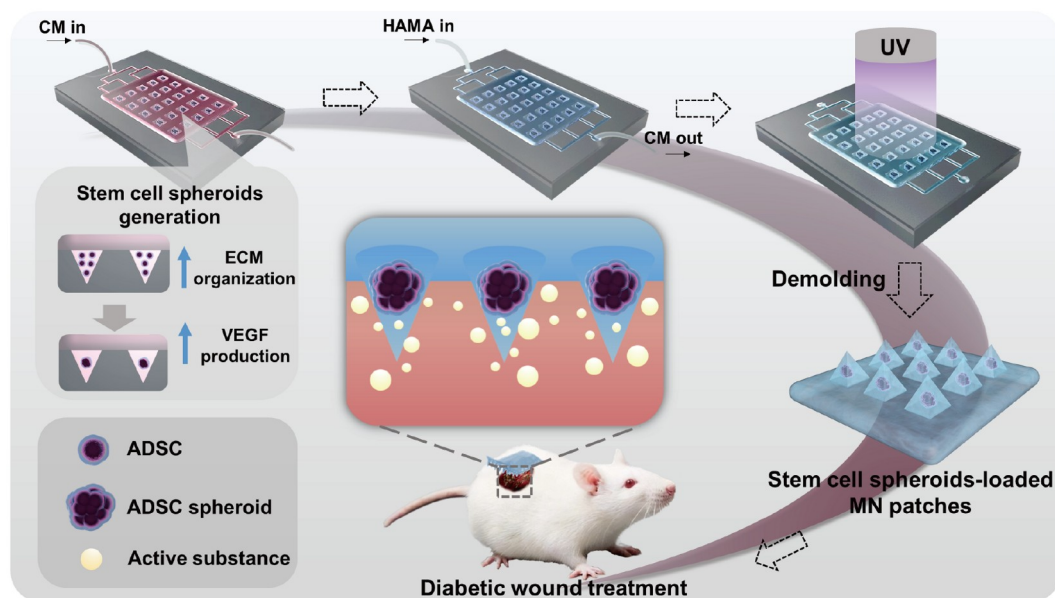


图1 (网络版彩色)干细胞球聚体微针制备与应用示意图: 通过微流控模板实现干细胞球聚体的制备, 获得具有增强促修复能力的干细胞球聚体。将甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA)水凝胶注入微流控模板, 实现干细胞球聚体的原位封装, 获得载有干细胞球聚体的微针。这些载有干细胞球聚体微针能够通过释放活性因子促进糖尿病创面的愈合^[14]。ADSC: 脂肪干细胞; CM: 培养基。Copyright © 2023, John Wiley & Sons

Figure 1 (Color online) Schematic diagram of the preparation and application of MN@SPs: Preparation of stem cell spheroids is achieved through microfluidic templating, resulting in stem cell spheroids with enhanced regenerative capabilities. HAMA hydrogel is injected into the microfluidic template to achieve *in situ* encapsulation of the stem cell aggregates, generating MN@SPs. MN@SPs can promote wound healing in diabetic ulcers through the release of active factors^[14]. ADSC: Adipose-derived stem cell; CM: Culture media. Copyright © 2023, John Wiley & Sons

的球聚体内部细胞处于缺氧状态, 影响球聚体的活力与功能^[12]。因此, 更先进的扩增技术亟须开发, 以获得大批量、大小均一且合适的干细胞球聚体并用于糖尿病溃疡的治疗。

基于此, 为了解决干细胞球聚体制备和在糖尿病溃疡中的递送问题, 本课题组提出了一种基于微流控模板的载干细胞球聚体微针(stem cell spheroids encapsulated microneedles, MN@SPs)。在既往研究中, 制备载细胞微针的步骤包括真空除气或高速离心等, 对细胞的活力和数量均造成损失^[13]。微流控技术是一种能够实现微米级液滴和流体精确控制的技术, 旨在通过微型通道实现对流体的控制 and 操作。基于微流控技术, 我们设计了一种多功能微流控模板, 该模板主要由聚二甲基硅氧烷构成, 可以实现序贯化的干细胞球聚体制备和包装(图1)^[14]。具体操作过程如下: 首先, 将干细胞悬液注入模板的液体流入端, 在分级通道的作用下, 干细胞悬液均匀分布于包含四棱锥凹坑阵列的微流控模板中。待细胞沉降后, 每个四棱锥凹坑中形成细胞聚集物, 最终生长为尺寸均一的细胞球聚体。接下来, 将甲基丙烯酰化透明质酸预凝胶溶液

注入液体流入端, 待溶液充分浸润整个微流控模板后, 通过紫外聚合形成甲基丙烯酰化透明质酸水凝胶。最后, 经过脱模即可获得载有干细胞球聚体的水凝胶微针。通过对干细胞球聚体基因表达进行分析, 我们发现相比于二维培养的干细胞, 干细胞球聚体中与促进血管生成和塑造细胞外基质相关的基因表达水平得到明显提升^[14]。此外, 原位搭载的方式能够显著避免组织工程构建过程中干细胞数量的减少和功能的损失。通过动物实验, 我们证实了MN@SPs可以将干细胞球聚体递送至糖尿病溃疡处, 并通过其分泌的细胞因子促进组织的血管生成和再生, 从而促进糖尿病溃疡的早期愈合^[14]。这一研究成果为未来干细胞在糖尿病溃疡治疗中的应用提供了新思路。尽管目前研究已证实了干细胞球聚体疗法的有效性, 并且组织工程辅助干细胞球聚体递送是未来的主流发展方向, 但仍需要进一步获取大量的临床数据, 以明确干细胞治疗的安全性和治疗效果的持久性。同时, 标准化和规范化的操作流程和治疗方案将有助于组织工程干细胞治疗得到广泛应用。

致谢 感谢国家杰出青年科学基金(T2225003)资助。

推荐阅读文献

- 1 Jodheea-Jutton A, Hindocha S, Bhaw-Luximon A. Health economics of diabetic foot ulcer and recent trends to accelerate treatment. *Foot*, 2022, 52:

101909

- 2 Yuzuguldu B, Zengin B, Simsir I Y, et al. An overview of risk factors for diabetic foot amputation: An observational, single-centre, retrospective cohort study. [Eur Endocrinol](#), 2023, 19: 85
- 3 Matoori S, Veves A, Mooney D J. Advanced bandages for diabetic wound healing. [Sci Transl Med](#), 2021, 13: eabe4839
- 4 Hoang D M, Pham P T, Bach T Q, et al. Stem cell-based therapy for human diseases. [Sig Transduct Target Ther](#), 2022, 7: 272
- 5 Veith A P, Henderson K, Spencer A, et al. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. [Adv Drug Deliver Rev](#), 2019, 146: 97–125
- 6 Yu R, Zhang H, Guo B. Conductive biomaterials as bioactive wound dressing for wound healing and skin tissue engineering. [Nano-Micro Lett](#), 2022, 14: 1
- 7 Ahmed Saeed AL-Japairai K, Mahmood S, Hamed Almurisi S, et al. Current trends in polymer microneedle for transdermal drug delivery. [Int J Pharm](#), 2020, 587: 119673
- 8 Larraneta E, Lutton R E M, Woolfson A D, et al. Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development. [Mater Sci Eng R-Rep](#), 2016, 104: 1–32
- 9 Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? [Front Mol Biosci](#), 2020, 7, doi: 10.3389/fmolb.2020.00033
- 10 Kim W, Gwon Y, Park S, et al. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration. [Bioactive Mater](#), 2023, 19: 50–74
- 11 Wang X, Jiang B, Sun H, et al. Noninvasive application of mesenchymal stem cell spheres derived from hESC accelerates wound healing in a CXCL12-CXCR4 axis-dependent manner. [Theranostics](#), 2019, 9: 6112–6128
- 12 Ryu N E, Lee S H, Park H. Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells. [Cells](#), 2019, 8: 1620
- 13 Chen B Z, Zhao Z Q, Shahbazi M A, et al. Microneedle-based technology for cell therapy: Current status and future directions. [Nanoscale Horiz](#), 2022, 7: 715–728
- 14 Wu X, Huang D, Xu Y, et al. Microfluidic templated stem cell spheroid microneedles for diabetic wound treatment. [Adv Mater](#), 2023, doi: 10.1002/adma.202301064