

负载 Wharton's Jelly 源间充质干细胞来源 外泌体的水凝胶可促进小鼠创面修复

徐崔博诚, 徐正保, 余承洋, 蒋祖福

台州市中心医院台州学院附属医院肛肠科, 浙江 台州 318000

[摘 要] **目的:**探究负载 Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞(WJMSC)来源的外泌体(WEX)的水凝胶对创面修复的作用。**方法:**从 WJMSC 中提取 WEX,通过透射电子显微镜和纳米粒度分析仪分析 WEX 的形态和大小,通过蛋白质印迹法检测外泌体表面标志物(CD9、CD81 和 Calnexin)鉴定 WEX。通过结合 WEX 与海藻酸钠水凝胶来制备 WEX 水凝胶,扫描电子显微镜观察 WEX 水凝胶的形态,流式细胞仪检测 WEX 水凝胶的流变行为,BCA 法评估 WEX 水凝胶的体外释药性能。海藻酸钠水凝胶、WEX 和 WEX 水凝胶作用巨噬细胞系 RAW264.7 后,流式细胞术检测 CD86 和 CD206 的表达。建立小鼠全层皮肤创伤模型,将小鼠随机分为空白对照组、WEX 对照组和 WEX 水凝胶组,按照分组分别将磷酸盐缓冲液、WEX 和 WEX 水凝胶覆盖到创面。造模第 3 天,取小鼠皮肤组织,采用平板计数法评价 WEX 水凝胶的抗菌功效。造模后第 15 天处死小鼠,计算残余创面百分比,苏木精-伊红染色及 Masson 染色后观察皮肤创面组织学变化,免疫组织化学法检测皮肤创面组织中 CD86、CD206、CD31 和血管内皮生长因子(VEGF)的表达。**结果:**成功从 WJMSC 中提取出 WEX。制备的 WEX 水凝胶呈现规整的三维网络结构,具有良好的流变学和药物控释性能。WEX 水凝胶可以促进体外 RAW264.7 细胞从 M1 表型极化为 M2 表型。空白对照组、WEX 对照组和 WEX 水凝胶组残余创面百分比分别为 $(27.5\pm 3.4)\%$ 、 $(15.3\pm 1.2)\%$ 和 $(7.6\pm 1.1)\%$,WEX 水凝胶明显增强 WEX 对小鼠皮肤创面的修复作用($P<0.05$),且抗菌性能优于 WEX($P<0.05$)。WEX 水凝胶组的真皮厚度、新生毛囊数和胶原蛋白沉积率均明显高于其余两组(均 $P<0.05$)。WEX 水凝胶可抑制皮肤创面组织中 CD86 的阳性表达,并促进 CD206、CD31 和 VEGF 的阳性表达(均 $P<0.05$)。**结论:**WEX 水凝胶能够通过调节巨噬细胞极化明显促进小鼠皮肤创面修复。



[关键词] 创面修复; 间充质干细胞; 外泌体; 海藻酸盐水凝胶; 巨噬细胞; 小鼠

[中图分类号] R282.5 **[文献标志码]** A

收稿日期(Received):2023-07-10 接受日期(Accepted):2023-09-11 网络预发表日期(Online):2023-10-10

基金项目(Funding):浙江省医学会临床科研基金(2019ZYC-A182)

第一作者(First author):徐崔博诚,医师,主要从事生物工程材料促进创面修复研究;E-mail:zthi1018@126.com;https://orcid.org/0009-0007-5428-1572

通信作者(Corresponding author):蒋祖福,主任医师,主要从事生物工程材料促进创面修复研究;E-mail:syqk12@126.com;https://orcid.org/0009-0005-0702-7745

Hydrogel loaded with exosomes from Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice

XU Cui Bocheng, XU Zhengbao, YU Chengyang, JIANG Zufu (*Department of Anorectal Surgery, Taizhou Central Hospital & Affiliated Hospital of Taizhou College, Taizhou 318000, Zhejiang Province, China*)

Corresponding author: JIANG Zufu, E-mail: syqk12@126.com, <https://orcid.org/0009-0005-0702-7745>

[**Abstract**] **Objective:** To explore the effect of hydrogel loaded with exosomes from Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cell (WJMSC) on wound healing. **Methods:** Exosomes were extracted from WJMSC, and the morphology and size of WJMSC-derived exosomes (WEX) were analyzed by transmission electron microscopy and nanoparticle size analyzer, respectively. The surface markers CD9, CD81, and Calnexin of WEX were detected by Western blotting. Exosome-loaded alginate hydrogel (WEX-gel) was prepared; its morphology was studied by scanning electron microscope, and its rheological behavior was examined by a rheometer. The *in vitro* drug release performance of WEX-gel was investigated by BCA method. RAW264.7 cells were treated with alginate hydrogel, WEX and WEX-gel, respectively; and the expression of CD86 and CD206 in macrophages was detected by flow cytometry. A full-thickness skin wound model was established in mice; the model mice were randomly divided into blank control group, WEX control group and WEX-gel group, and PBS, WEX and WEX-gel were applied to the wound area of mice, respectively. On day 3, the skin tissue of mice was excised, and the antibacterial effect of WEX hydrogel was evaluated by plate counting. On day 15, the mice were euthanized and the percentage of residual wounds was calculated. The histological changes of the skin wound were observed after hematoxylin and eosin (HE) and Masson stainings. The expression of CD86, CD206, CD31 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the skin wound tissue was detected by immunohistochemistry. **Results:** Exosomes were successfully extracted from WJMSC. WEX-gel presented a regular three-dimensional network structure, good rheology and controlled drug release performance. WEX-gel promoted the polarization of RAW264.7 cells from the M1 phenotype to M2 phenotype *in vitro*. The residual wound percentage in blank control group, WEX control group and WEX-gel group were $(27.5 \pm 3.4)\%$, $(15.3 \pm 1.2)\%$ and $(7.6 \pm 1.1)\%$, respectively ($P < 0.05$). The antibacterial property of WEX-gel is better than that of WEX ($P < 0.05$). The dermis thickness, the number of new hair follicles, and the rate of collagen deposition in the WEX-gel group were significantly higher than those in the other two groups (all $P < 0.05$). The expression of CD206, CD31 and VEGF in skin wound tissue was higher and the expression of CD86 was lower in WEX-gel group than those in other two groups (all $P < 0.05$). **Conclusion:** WEX-gel can significantly promote wound healing in mice by regulating the polarization of macrophages.

[**Key words**] Wound healing; Mesenchymal stem cell; Exosome; Alginate hydrogel; Macrophages; Mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2023, 52(6): 766-776.]

[缩略语] Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞(Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells, WJMSC); WJMSC 来源的外泌体(WJMSC-derived exosomes, WEX); 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF); 苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE 染色); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS); 十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS); 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF); 含吐温-20 的 Tris 缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20, TBST)

治疗严重的皮肤创伤,如大面积皮肤伤口、糖尿病伤口和皮肤烧伤等,通常需要清创手术、补充生长因子或使用生物活性敷料配合负压治疗^[1],但这些疗法的治疗效果对于许多患者来说往往并不令人满意。免疫系统在皮肤创伤后的炎症期和修复期都起着重要作用,免疫细胞和分泌的外泌体不仅直接参与创面修复阶段,还通过旁分泌机制发挥调节作用^[2]。外泌体是一种由细胞分泌的细胞外囊泡,含有蛋白质、DNA 和 RNA^[3]。近年研究证实,来自各种细胞的外泌体作为细胞间交流的信使参与了免疫反应^[4],如间充质干细胞衍生的外泌体参与了抗原提呈、免疫激活和免疫抑制等免疫反应^[5]。

研究发现,静脉注射的外泌体由于被单核吞噬细胞大量清除而导致半衰期较短,其治疗效果因保留时间短暂而受到明显限制,单纯提供更多的外泌体并不能延长其半衰期^[6]。因此,目前需要开发一种新的方法来延长外泌体的保留时间,以增强其疗效。海藻酸盐水凝胶由于具有良好的生物相容性,凝胶化过程温和,而且其机械性能与细胞外基质相似,因此在组织工程和再生医学领域得到广泛应用^[7]。将这种水凝胶注射到皮肤创面中,可为受损创面提供物理支持,从而增加疤痕厚度^[8]。在最近的一项研究中,Shafei 等^[9]使用海藻酸盐水凝胶作为生物活性物质的载体,将装载有脂肪干细胞来源的外泌体的凝胶注入皮肤创伤组织,发现凝胶可以延长外泌体的保留时间,并增强外泌体对皮肤创伤的修复作用。本研究将 WEX 负载在海藻酸钠水凝胶中,开发了一种可注射的基于海藻酸钠的 WEX 水凝胶,以期延长 WEX 的体内保留时间,提高其在皮肤创伤中的修复效果,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞、试剂及仪器

20 只 6~7 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0011]。所有涉及动物的实验均通过台州市中心医院机构动物保护与使用委员会审查(2020-02)。

巨噬细胞 RAW264.7 细胞株购于美国模式培养物保藏所;WJMSC 为武汉普诺赛生命科技有限公司产品。胎牛血清、1% 青霉素-链霉素溶液、DMEM/F12 培养基和 RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品;巨噬细胞集落刺激因子为北京百普赛斯生物科技股份有限公司产品;ExoQuick-TC™ 外泌体提取试剂盒为北京博迈斯生物科技有限公司产品;BCA 蛋白定量试剂盒、海藻酸钠为 Sigma 公司产品;CD9、CD86、CD81、CD206、Calnexin、VEGF 为 Abcam 公司产品;HE 染色试剂盒和 Masson 三色染色试剂盒为北京索莱宝科技有限公司产品。大肠埃希菌(*E. coli* ATCC 8099)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus* ATCC 6538)为上海鲁微科技有限公司产品;CD31 一抗为武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司产品。

UV-2550 紫外分光光度计为岛津公司产品;AR 1500ex 流变仪为 TA Instruments 公司产品;S-3400I 型扫描电子显微镜为 Hitachi 公司产品;NanoSight NS300 纳米粒度分析仪为 Malvern Panalytical 公司产品;357 酶标仪为 ThermoScientific 公司产品;GX35 倒置显微镜为 Olympus 公司产品;FACSymphony™ A3 流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.2 细胞培养

经检测,WJMSC 无细菌、真菌、支原体和病毒

污染,表达多种干细胞特异性标志物,并具有良好的增殖和分化潜力。WJMSC在含有10%无外泌体血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM/F12培养基中培养。

巨噬细胞在含有10%血清、10 ng/mL的巨噬细胞集落刺激因子、1%青霉素-链霉素溶液的RPMI-1640培养基中培养,培养基每隔一天更换1次。在第7天收集细胞用于后续实验。

1.3 WEX提取并鉴定

收集第3~5代WJMSC的上清液,使用外泌体提取试剂按1:5的比例加入上清液中,在4℃下孵育过夜(12 h以上),将样品在室温下以1500×g离心30 min,去除上清液。最后,用100~500 μL PBS重新悬浮所获得的外泌体。

将上述提取的WEX加入5×SDS缓冲液[30 mmol/L Tris-HCl(pH=6.8)、2% SDS、0.05% 溴酚蓝、12.5%甘油和2.5%巯基乙醇]中煮沸5 min。然后将20 μg WEX加到10% SDS聚丙烯酰胺凝胶各个泳道中,将样品转移到PVDF膜上,用5%牛奶在室温下阻断1 h,加入适量CD9(稀释度为1:1000)和CD81(稀释度为1:500)一抗并在4℃孵育过夜。TBST洗涤三次后,加入二抗(稀释度为1:10 000)室温处理2 h,再加入DAB显色剂显色,采用Bio-Rad凝胶成像仪记录蛋白条带灰度并拍照。

1.4 制备WEX水凝胶和表征其物理特性

在室温下,将海藻酸钠粉末溶解在PBS中,形成2%(w/v)海藻酸钠溶液。为了确定最佳的海藻酸钠水凝胶系统,使用不同浓度的氯化钙溶液研究WEX的控释能力。将海藻酸钠溶液分别与1%、2%(w/v)氯化钙溶液以1:4的体积比混合,形成海藻酸钠水凝胶。然后将30 μg WEX加入50 μL海藻酸钠溶液中,搅拌,形成含有WEX的海藻酸钠水凝胶。

WEX水凝胶经真空冷冻干燥,取干品断面真空喷金后使用扫描电子显微镜观察水凝胶的微观结构,使用流变仪来评估水凝胶的流变行为。体外WEX释放测试在37℃条件下温和摇动中进行。将制备好的100 μL WEX水凝胶转移到200 μL PBS(pH=7.4)溶液中。每两天去除上清液,加入新鲜PBS。然后用BCA蛋白检测试剂盒测定释放到培养基中的WEX质量,进而计算得到累积释放的WEX质量。某一时刻WEX的累积释放率

(%)= $m_t/m_0 \times 100\%$,式中 m_t 代表t时刻WEX累积释放质量, m_0 代表凝胶中WEX总质量。

1.5 流式细胞术检测巨噬细胞中CD86和CD206的表达

将巨噬细胞以 5×10^4 个/孔的细胞密度接种在24孔板中,分为空白对照组、水凝胶对照组、WEX对照组和WEX水凝胶组,分别用PBS、海藻酸钠水凝胶提取液、WEX悬浮液(20 μg/mL)、WEX水凝胶提取液(WEX浓度为20 μg/mL)处理细胞并孵育24 h,收集细胞,并与Fc受体阻断剂孵化,以减少非特异性抗体结合,细胞重新悬浮在染色缓冲液中,用荧光标记的CD86和CD206抗体染色后,使用流式细胞仪对细胞进行检测。

1.6 制备小鼠全层皮肤创伤模型及分组干预

将小鼠麻醉后俯卧在手术台上,用电剪刀和脱毛蜡依次剃除背部区域的毛发后,用活检穿孔器在每只小鼠背部打出直径12 mm的皮肤全层圆形伤口。所有小鼠随机分为三组,每组6只,分别为空白对照组(50 μL PBS)、WEX对照组(30 μg WEX加入50 μL PBS)和WEX水凝胶组(30 μg WEX封装于50 μL海藻酸钠水凝胶)。所有药物每日1次局部涂抹于伤口部位。术后第0、3、6、9、12、15天观察伤口部位并拍照,使用Image-Pro Plus 6.0软件进行残余创面百分比分析,残余创面百分比=第n天创伤面积/第0天创伤面积×100%

1.7 平板计数法评价WEX水凝胶的抗菌功效

将第3天的鼠皮肤组织用2 mL无菌等渗氯化钠溶液匀浆,将100 μL匀浆添加到革兰阴性菌培养基(选择性培养大肠埃希菌)和甘露醇盐琼脂培养基平板(选择性培养金黄色葡萄球菌)。将平板置于37℃的生化培养箱中进行倒置培养24 h后,对平板上的菌落形成单位进行计数。

1.8 HE染色观察组织病理学变化

手术后15 d,采用颈椎脱位法对小鼠实施安乐死,解剖出伤口组织后立即用4%多聚甲醛固定48 h,然后用梯度乙醇脱水。石蜡包埋后将皮肤组织切成5 μm的薄片,将切片用100%二甲苯脱蜡3 min,100%乙醇水化3 min,95%乙醇水化3 min,苏木精染色5 min,去离子水洗涤5 min;用酸性乙醇(1%盐酸溶液溶于70%乙醇溶液中)浸泡5次,并用去离子水冲洗,氨水处理后用去离子水冲洗;用伊红溶液在室温下染色1 min,梯度乙醇脱水(95%乙醇2 min,100%乙醇2 min)并用二

甲苯清除(100%二甲苯 30 min)。切片置于光学显微镜下观察。

1.9 Masson 染色观察组织病理学变化

经脱蜡和水化后,切片在 56 °C 下用 Bouin 溶液处理 15 min, 18~26 °C 的水浴中冷却 5 min 后,室温下使用苏木精溶液染色 5 min, 用去离子水冲洗, 用 Biebrich 碱性品红染色 5 min, 去离子水冲洗 1 min; 室温下用磷钨酸/磷钼酸溶液处理 5 min, 置于苯胺蓝溶液中 5 min, 用 1% 乙酸处理 2 min, 并通过不同浓度乙醇溶液(70%、80%、90%、100%)脱水, 在二甲苯中清除 5 min。所有切片在蔡司扫片机下进行图像采集, 使用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件分析胶原蛋白沉积率。

1.10 免疫组织化学检测组织中 CD86、CD206 和 CD31 的表达

术后第 15 天用免疫组织化学检测创面组织中巨噬细胞的极化情况。皮肤组织用 5% 甲醛固定过夜, 采用梯度乙醇脱水法将组织脱水后包埋在石蜡中切片。组织切片用 10 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液在 94 °C 下修复 15 min 后, 冷却至室温并用 1% 牛血清白蛋白密封 30 min。随后, 分别用 CD86、CD206 和 CD31 一抗处理切片, 再用生物素化标记的二抗孵化, 并用苏木精重新染色。最后在光学显微镜下观察染色切片。CD86、CD206 和 VEGF 在细胞质中呈棕黄色, CD31 表达于细胞膜中呈棕黄色。随机选择 20 个视野并在低倍镜下拍照, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件分析 CD86 和 CD206 在肿瘤组织中的积分光密度值。

1.11 统计学方法

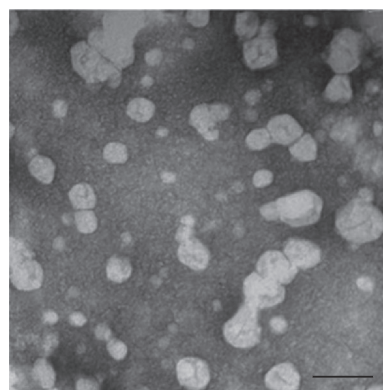
使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。Kolmogorov-Smirnov 检验用于验证正态性, 正态分布的计量数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用单因素方差分析或双因素方差分析进行比较, Tukey 法进行多重比较检验, $P < 0.05$ (两侧) 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功提取 WEX

扫描电子显微镜结果显示, WEX 呈圆形或椭圆形(图 1); WEX 的密度为 1.34×10^9 /mL, 平均直径为 (118.0 ± 21.7) nm。蛋白质印迹法结果表明, 分离的外泌体富含内体四联跨膜蛋白, 如 CD9 和 CD81 (外泌体阳性标志物), 而外泌体阴性标志物

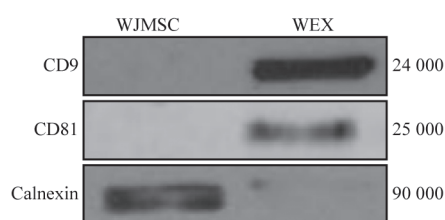
Calnexin 蛋白在分离的外泌体中几乎不存在(图 2)。可见从 WJMSC 上清液中成功提取 WEX。



WEX 呈圆形或椭圆形结构, 标尺=500 nm。WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体。

图 1 电子显微镜下 WEX 图像

Figure 1 Electron microscopy image of WEX



WJMSC: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞; WEX: WJMSC 来源的外泌体。

图 2 WEX 中外泌体相关标志物的蛋白电泳图

Figure 2 Exosomal markers in WEX determined by Western blotting

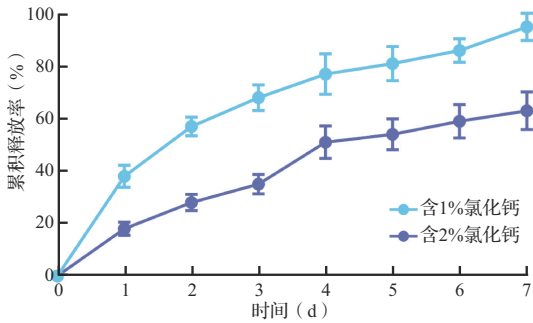
2.2 WEX 水凝胶表征结果

结果显示, 含 1% 氯化钙溶液的水凝胶在 7 d 内释放了 95% 的 WEX, 且在最初的 3 d 内有明显的爆发性释放效果; 而含 2% 氯化钙溶液的水凝胶在 7 d 内只释放了 62% 的 WEX (图 3)。皮肤创伤的炎症期和修复期主要发生在第 1 周内^[1]。因此, 选择 1% 氯化钙溶液制备的海藻酸钠水凝胶进行后续研究。

对 WEX 水凝胶的流变学特性进行检测发现, WEX 水凝胶的储能模量(G')为 (1541 ± 36) Pa, 远大于损耗模量(G''), 见图 4。透射电子显微镜图像显示, WEX 水凝胶表面有许多孔隙, 大小从 50 到 150 μ m 不等, 高分辨率图像可以观察到负载在 WEX 水凝胶中的外泌体颗粒(图 5)。

2.3 WEX 水凝胶可调节体外巨噬细胞极化

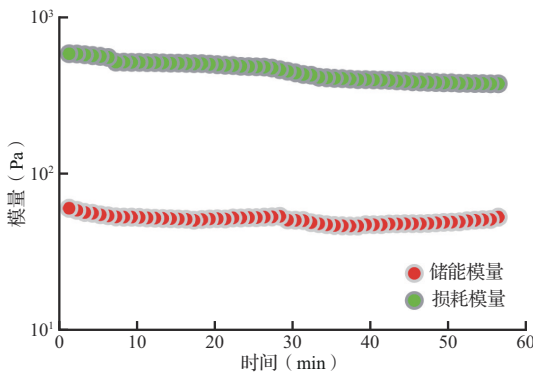
流式细胞术检测结果表明, 与空白对照组比较, 海藻酸钠水凝胶对巨噬细胞中 CD86 (与 M1



WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

图3 含不同浓度氯化钙的WEX水凝胶药物释放曲线

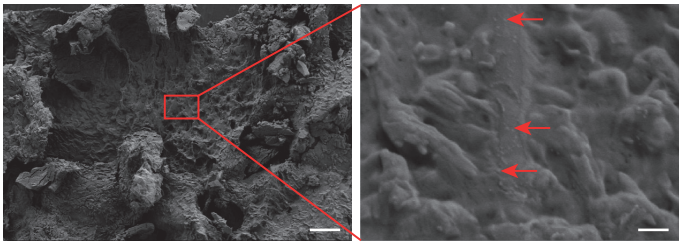
Figure 3 Drug release profile of WEX-gel with different concentrations of CaCl_2



WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

图4 不同时间WEX水凝胶的储能模量(G')和损耗模量(G'')

Figure 4 The storage modulus and loss modulus of WEX-gel determined by rheometer



WEX水凝胶呈疏松多孔结构,孔隙大小为50~150 μm ,放大后可以观察到负载在水凝胶中的外泌体颗粒(箭头指示).左图标尺=50 μm ,右图标尺=500 μm . WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

图5 WEX水凝胶的扫描电子显微镜图像

Figure 5 Representative scanning electron microscopy images of WEX-gel

型巨噬细胞相关的表型标志物)和CD206(与M2型巨噬细胞相关的表型标志物)的阳性表达无明显影响(图6)。与水凝胶对照组比较,WEX可下调CD86的阳性表达($P<0.05$),但对CD206的阳

性表达无明显影响;WEX水凝胶可明显下调CD86的阳性表达($P<0.05$),同时显著促进CD206阳性细胞比例($P<0.05$)。与水凝胶对照组比较,补充WEX或WEX水凝胶后M2型/M1型巨噬细胞的比率增加($P<0.05$)。见表1。表明WEX可促进体外巨噬细胞从M1型极化为M2型。

2.4 WEX水凝胶可促进模型鼠皮肤创伤愈合

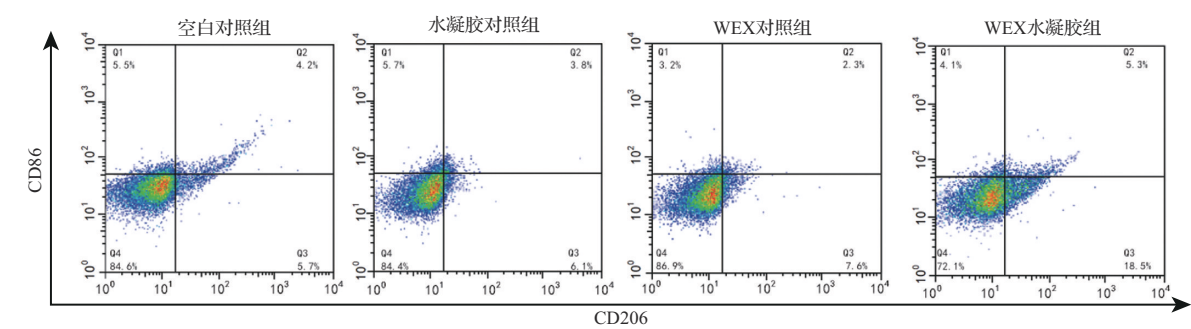
小鼠全层皮肤创伤模型中。术后3 d,空白对照组创面可见明显红肿及分泌物,其余两组均未见明显伤口炎症及感染迹象。术后7 d,三组创面均开始结痂,伤口明显收缩,其中WEX水凝胶组愈合最好。术后15 d,WEX水凝胶组皮肤创面几乎完全愈合,而其他组仍可见不同程度未愈合的创面,空白对照组、WEX对照组和WEX水凝胶组残余创面百分比分别为($27.5\pm 3.4\%$)、($15.3\pm 1.2\%$)和($7.6\pm 1.1\%$)。与空白对照组比较,WEX对照组残余创面百分比明显缩小($P<0.05$),表明单独使用WEX对皮肤创面恢复有促进作用。与WEX对照组比较,WEX水凝胶组残余创面百分比进一步缩小($P<0.05$),见图7。结果表明,WEX水凝胶可增强WEX对皮肤创伤的修复作用。

2.5 WEX水凝胶具有体内抗菌作用

将第三天的创面组织进行培养,WEX水凝胶组创面中大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均减少(图8),存活数均少于WEX对照组(均 $P<0.05$),见表2。结果说明WEX水凝胶具有优异的抗菌性能。

2.6 WEX水凝胶可促进创面皮肤组织新生

组织病理学检查结果,三组皮肤组织均可观察到不同程度的炎症反应,空白对照组的炎症反应最为严重,表现为局部出血、大量炎症细胞聚集、纤维组织和结缔组织大量减少;与空白对照组比较,WEX对照组的炎症反应有所减轻;与WEX对照组比较,WEX水凝胶组创面组织中的炎症细胞明显减少。WEX水凝胶组的真皮厚度比其他组厚(均 $P<0.05$),且真皮内的成纤维细胞更加丰富;与WEX对照组比较,WEX水凝胶组的新生毛囊数明显增多,WEX水凝胶组的胶原蛋白沉积率也增



WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

图6 四组巨噬细胞中CD86和CD206的阳性表达流式细胞术检测结果
Figure 6 Positive expression of CD86 and CD206 in macrophages analyzed by flow cytometry

表1 四组巨噬细胞中CD86和CD206阳性比例比较
Table 1 Positive rates of CD86 and CD206 in macrophages
($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	CD86 阳性比例	CD206 阳性比例	M2 型/M1 型比率
空白对照组	5.6±0.7	5.7±0.6	1.1±0.2
水凝胶对照组	5.8±0.6	6.2±0.7	1.2±0.3
WEX 对照组	3.5±0.4*	6.8±0.8	2.7±0.3*
WEX 水凝胶组	3.8±0.4*	19.3±2.3*	5.2±0.5*

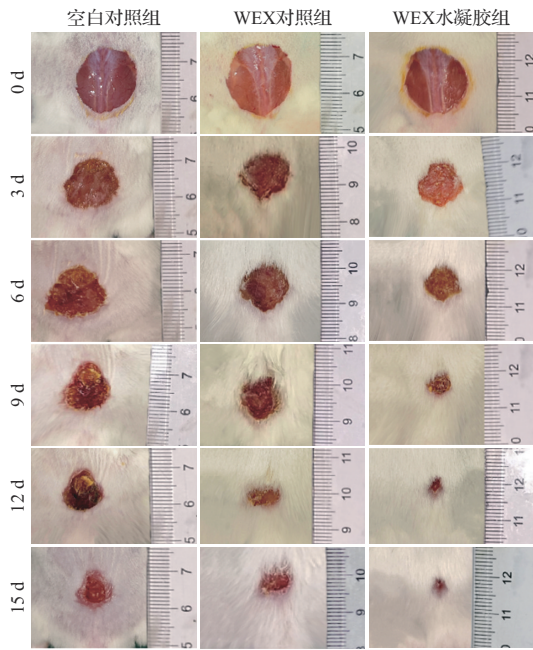
与水凝胶对照组比较, * $P<0.05$. WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

加(均 $P<0.05$),见图9和表3。

2.7 WEX水凝胶可调节体内巨噬细胞极化和血管新生

CD86在各组创面组织中均有不同程度表达。与空白对照组比较,WEX对照组和WEX水凝胶组中CD86的阳性表达均减少($P<0.05$),同时WEX水凝胶组CD86的阳性表达少于WEX对照组($P<0.05$)。与空白对照组比较,WEX对照组CD206阳性表达增加($P<0.05$);与WEX对照组比较,WEX水凝胶组CD206阳性表达进一步增加($P<0.05$)。见图10、表4。提示WEX水凝胶可促进创面组织中的巨噬细胞从M1型极化为M2型巨噬细胞。

与空白对照组比较,WEX对照组CD31阳性表达增加($P<0.05$);与WEX对照组比较,WEX水凝胶组CD31阳性表达进一步增多($P<0.05$)。与空白对照组比较,WEX对照组VEGF阳性表达无明显变化($P>0.05$);与WEX对照组比较,WEX水凝胶组VEGF阳性表达增多($P<0.05$),见图10、表4。提示WEX水凝胶可促进创面组织的血管新生。

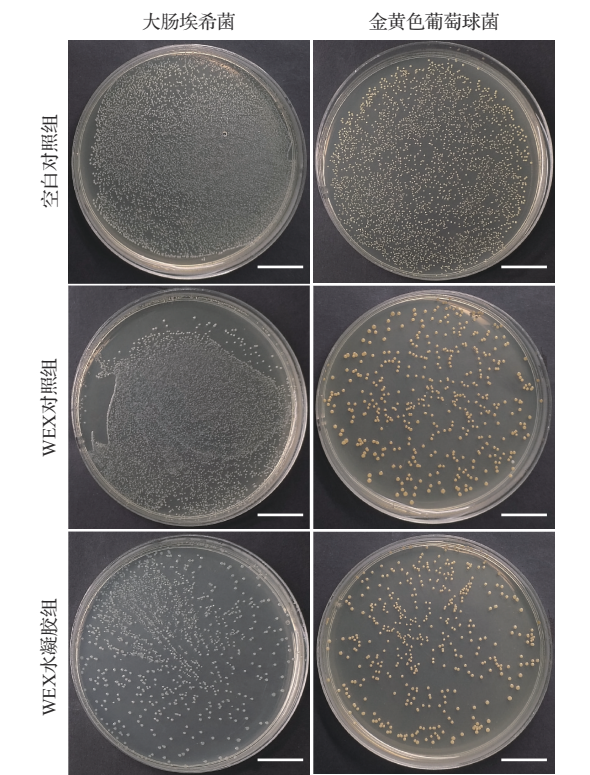


在创伤愈合过程中,空白对照组可见创面红肿及分泌物,术后15 d仍残留创面未愈合;WEX对照组未见明显创面感染迹象,在术后9 d可见创面结痂,术后15 d残留创面面积小于空白对照组;WEX水凝胶组创面在术后15 d基本痊愈,愈合效果最好. WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

图7 三组干预后不同时间创面外观
Figure 7 Wound healing in blank control, WEX control and WEX-gel groups at different time points

3 讨论

WJMSC等干细胞疗法可以加速创面愈合,从而在组织再生和伤口修复中发挥重要作用。基于此,本研究构建了海藻酸钠水凝胶和WEX的复合体,并应用于小鼠全层皮肤创伤模型,结果表明这种复合材料能促进小鼠皮肤创伤后的创面恢复,其作用机制与WEX促进巨噬细胞从M1



空白对照组皮肤组织匀浆后,可见大量大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌菌落生长,表明创面组织中有大量细菌感染;WEX对照组创面组织中的细菌菌落较空白对照组明显减少;WEX水凝胶组创面组织中大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌菌落较WEX对照组进一步减少. 标尺=2 cm. WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

图8 三组小鼠创面组织大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌培养结果大体观

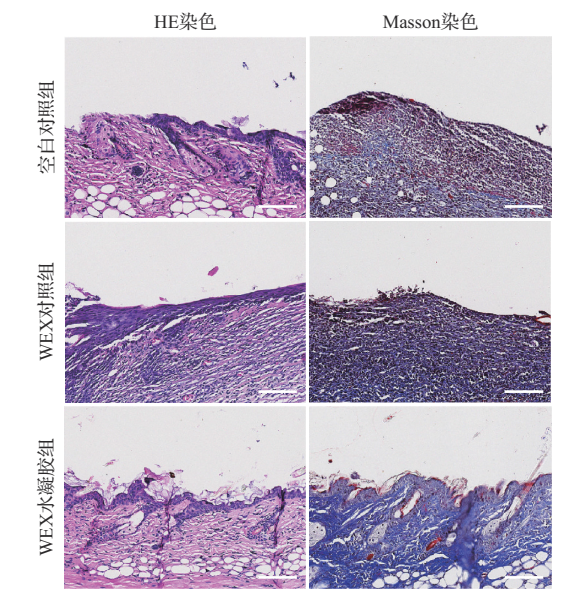
Figure 8 Cultures of *E. coli* and *S. aureus* in wound tissue of mice in three groups

表2 三组琼脂平板菌落计数的定量结果比较
Table 2 Quantitative analysis of colony counts on agar plates in three groups

($\bar{x} \pm s$, CFU $\times 10^5$)			
组别	n	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌
空白对照组	3	4.21 $\pm$ 0.52	3.36 $\pm$ 0.47
WEX对照组	3	3.63 $\pm$ 0.31*	1.49 $\pm$ 0.16*
WEX水凝胶组	3	2.45 $\pm$ 0.26**	1.15 $\pm$ 0.12**

与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与WEX对照组比较, ** $P<0.05$. WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体; CFU: 菌落形成单位.

型极化为M2型有关。
作为一种新型的非细胞疗法,外泌体在皮肤创伤后的创面愈合和皮肤重塑中发挥重要作用^[3-5]。目前普遍认为,干细胞衍生的外泌体具有与干细胞本身相同甚至更好的组织修复能力。更重要的是,与细胞移植比较,外泌体介导的干



HE染色结果显示,空白对照组皮肤组织中可见出血和炎症细胞聚集等炎症反应,同时真皮厚度较薄;WEX对照组创面组织炎症反应较空白对照组减轻;WEX水凝胶组创面组织中的炎症反应最轻,真皮最厚,同时新生毛囊数最多. Masson染色结果显示,WEX水凝胶组创面组织中的胶原蛋白沉积率最高(蓝色区域面积). 标尺=100 μ m. WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体; HE染色: 苏木精-伊红染色.

图9 三组创面皮肤组织病理学表现
Figure 9 Histopathology results of wound skin tissues in three groups

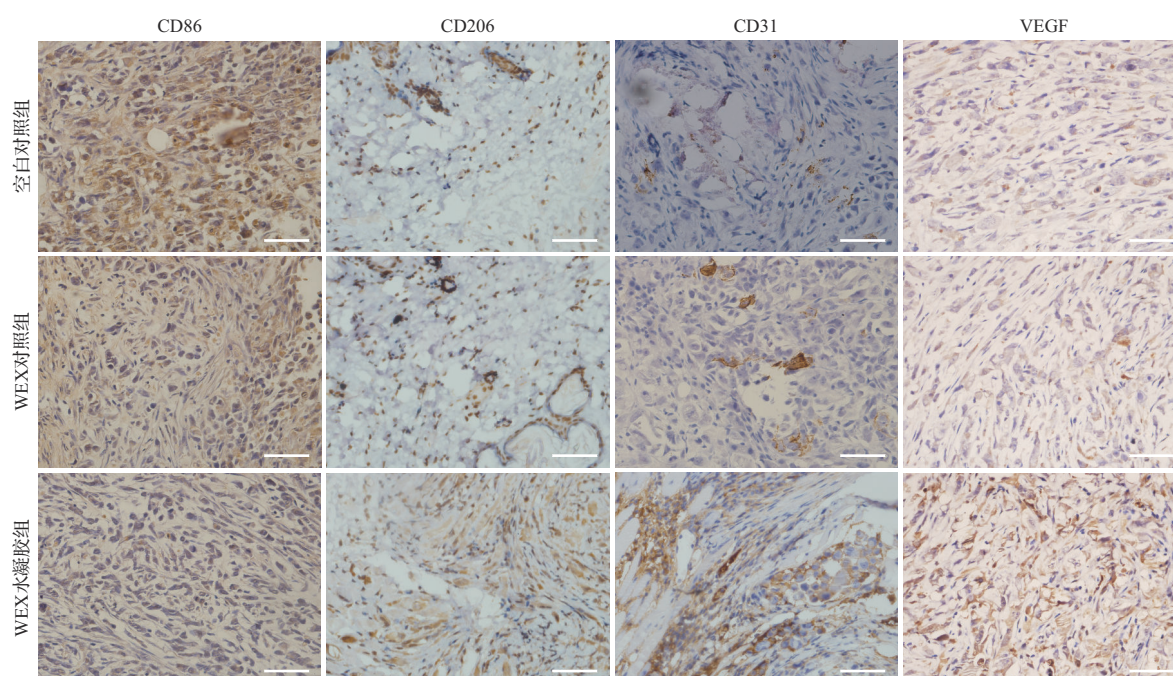
表3 三组创面皮肤组织中真皮厚度、新生毛囊数、胶原蛋白沉积率比较

Table 3 Quantitative analysis of dermal thickness, number of new hair follicles, and collagen deposition rate of wound skin tissues in three groups
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	真皮厚度(μ m)	新生毛囊数	胶原蛋白沉积率(%)
空白对照组	458.3 $\pm$ 38.6	8.5 $\pm$ 1.6	20.8 $\pm$ 2.1
WEX对照组	786.1 $\pm$ 101.7*	10.6 $\pm$ 1.2*	24.6 $\pm$ 1.7
WEX水凝胶组	1659.2 $\pm$ 210.3**	22.4 $\pm$ 2.8**	62.5 $\pm$ 5.4**

与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与WEX对照组比较, ** $P<0.05$. WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体.

细胞疗法具有更高的稳定性和可储存性,无异位组织形成的风险,而且发生免疫排斥的可能性更小。然而,外泌体应用于皮肤创伤治疗存在一定挑战,因为外泌体会从注射部位迅速流失,且在体内存活时间很短。因此,将外泌体与生物材料结合起来,在不影响其生物活性的情况下,延长外泌体在移植部位的保留时间,以促进外泌体的疗效已成为开发基于外泌体疗法的研究重点。



CD86在空白对照组中阳性表达(棕色颗粒)较丰富,而CD206、CD31和VEGF的阳性表达较贫乏;CD86在WEX水凝胶组中阳性表达明显降低,而CD206、CD31和VEGF的阳性表达明显增加。标尺=100 μm。WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体;VEGF:血管内皮生长因子。

图10 三组创面组织中巨噬细胞极化和血管新生相关标志物的表达(免疫组织化学法)

Figure 10 The expression of CD86, CD206, CD31 and VEGF in skin tissue of each group (immunohistochemical method)

表4 三组创面组织中巨噬细胞极化和血管新生相关标志物相对表达水平比较

Table 4 Comparison of macrophage polarization and angiogenesis related biomarkers in wound tissues of each group

($\bar{x} \pm s, n=3$)				
组别	CD86	CD206	CD31	VEGF
空白对照组	145.6±19.8	73.6±8.1	34.1±5.6	58.9±9.8
WEX对照组	62.3±7.4*	133.1±17.5*	78.6±11.4*	62.3±10.7
WEX水凝胶组	41.7±3.9**	256.2±25.8**	234.5±21.3**	195.2±14.6**

*与空白对照组比较, $P<0.05$; 与WEX对照组比较, $^*P<0.05$ 。WEX: Wharton's Jelly 衍生的间充质干细胞来源的外泌体; VEGF: 血管内皮生长因子。

许多研究表明,水凝胶可以增强细胞的特性和过程,如细胞生长速度、骨形成和血管吻合等;水凝胶还可以包裹细胞,形成支架并作为药物载体,从而提高药物的生物利用度^[10]。Shi等^[11]使用可生物降解和生物相容性的壳聚糖/丝绸水凝胶海绵,将人类牙龈间充质干细胞来源的外泌体输送到小鼠的糖尿病伤口组织,这种水凝胶复合物可以通过增强再上皮化、胶原蛋白沉积和血管新生来促进伤口愈合。此外,一种PF-127水凝胶被发现对保留人类脂肪间充质干细胞来源的外泌体

有好处,并且这种组合促进了小鼠大面积皮肤创伤修复^[12]。但很少有研究调查干细胞源性外泌体与海藻酸盐水凝胶的组合对皮肤创伤的治疗效果。海藻酸盐水凝胶具有良好的耐受性,不良事件发生率低^[7]。因此,将海藻酸盐水凝胶与具有治疗作用的生物活性因子联合应用,可以提供更好的治疗方法。然而,海藻酸盐水凝胶是否能影响WEX对皮肤创伤的疗效仍是未知数。为了确定最佳的海藻酸钠水凝胶系统,本研究检测了1%和2%的氯化钙溶液对WEX水凝胶控释能力的影响。考虑到皮肤创伤的炎症期和修复期主要发生在第1周内^[1],本研究选择了1%氯化钙溶液制备的水凝胶,其能在1周内释放几乎全部的WEX,符合创面修复的病理生理过程。除此以外,由1%氯化钙组成的水凝胶表现出的储能模量值也更适合于皮肤组织工程^[10]。在体内实验中,本研究将WEX水凝胶应用到皮肤创面,与预期一致的是,WEX水凝胶增强了WEX对皮肤创面的修复效果,表现为炎症反应减轻、真皮厚度和新生毛囊数增加、胶原蛋白沉积区域扩大和丰富的新生血管。表明WEX

水凝胶可延长 WEX 的保留时间,从而加强了 WEX 在皮肤创伤中的治疗作用。

皮肤创面愈合过程一般可分为止血期、炎症期、增殖期和成熟期^[13]。止血期通常在皮肤损伤出血后几十秒内停止;随后,炎症期在皮肤创伤后数小时内开始,在促炎性细胞因子的诱导下,中性粒细胞和巨噬细胞聚集在伤口区域,杀死入侵的病原体并清除坏死的组织碎片;在创伤后 24 h 内开始增殖期,典型特征是表皮基底层细胞大量增殖和创面边缘新生血管形成;在创伤后第 3 天开始的成熟期,创面开始出现新生肉芽组织和疤痕组织,以增强伤口部位的完整性并最终闭合伤口^[14]。先前研究表明,皮肤创面愈合涉及皮肤细胞、免疫细胞和细胞外基质成分之间复杂的相互作用^[15]。巨噬细胞在伤口愈合过程的不同阶段发挥着关键作用^[2]。巨噬细胞大致分为 M1 型和 M2 型,M1 型巨噬细胞多见于损伤修复早期,可以清除伤口中的外来病原体和坏死组织碎片,其特点是产生大量促炎性细胞因子,如 IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α ,从而导致创伤部位早期的器官功能障碍^[16]。M1 型巨噬细胞可转化为 M2 型,活化的 M2 型巨噬细胞可以通过参与抗炎因子的产生和分泌来缓解炎症反应^[17]。同时,M2 型巨噬细胞通过招募附近的成纤维细胞,促进损伤部位胶原蛋白沉积,从而促进创面的成熟和修复^[18]。越来越多的证据表明,伤口环境中高比例的促炎型巨噬细胞和低比例的抗炎型巨噬细胞是伤口愈合的巨大障碍^[19]。在伤口局部注射胰岛素可以促进 M1 型巨噬细胞极化为 M2 型巨噬细胞,从而影响炎症反应过程,最终加速术后感染伤口的愈合^[20]。最近的一项研究表明,作为一种 Th2 型免疫诱导剂,IL-33 添加到皮肤伤口中可以显著上调巨噬细胞中的 M2 型/M1 型比值,从而增强皮肤细胞增殖和血管新生来加速小鼠糖尿病伤口模型的愈合^[21]。上述研究表明,促进巨噬细胞从 M1 型向 M2 型极化可以为难治性伤口愈合提供有效的治疗方法。本文资料显示,WEX 可有效降低体外 CD86 阳性表达的巨噬细胞比例,同时上调 CD206 阳性表达的巨噬细胞比例,表明 WEX 可以调节体外巨噬细胞的表型。与体外实验结果相仿,体内实验中 WEX 水凝胶可有效促进创面组织中的巨噬细胞由 M1 型极化为 M2 型,充分表明 WEX 水凝胶可能主要通过调节巨噬

细胞的极化过程,从而发挥对皮肤创伤的修复作用。除此以外,微生物感染会严重阻碍伤口愈合,理想的伤口敷料应具有良好的抗菌性能^[10]。大多数获得性伤口感染的微生物来源是多种的,其中金黄色葡萄球菌最常见^[19]。在本研究中,WEX 水凝胶可有效抑制创面中细菌生长,对金黄色葡萄球菌的抑制效果更加明显。推测其原因是 WEX 水凝胶可缓慢释放 WEX 到创面微环境中,通过调节巨噬细胞的极化,从而产生优异的抗菌功能。M2 型巨噬细胞可以通过释放转化生长因子- β 、VEGF 等血管生长因子来刺激血管内皮细胞和成纤维细胞的活化^[22]。新血管的形成对于协调伤口愈合至关重要。慢性伤口不愈合主要是由于血管生成受损,无法为受伤部位提供足够的营养^[23]。本研究也观察到 WEX 水凝胶显著提高了创面组织中 CD31 的表达,同时创面组织中 VEGF 的表达也在 WEX 水凝胶的作用后得以明显上调,进一步验证了 WEX 水凝胶通过调节 M2 型巨噬细胞的极化来促进血管新生和细胞增殖,同时抑制炎症反应,进而达到促进创面愈合的效果,这为 WEX 水凝胶在难愈性创面修复中的临床转化提供了实用的治疗方法。

总之,本研究开发了一种基于藻酸盐水凝胶的负载 WEX 水凝胶系统,可延长 WEX 在创面的停留时间,通过促进巨噬细胞从 M1 型极化为 M2 型,达到促进皮肤创面愈合的效果。本研究结果为创伤性皮肤缺损的临床治疗提供理论依据。然而,值得注意的是,治疗创伤性皮肤损伤需要多管齐下,WEX 水凝胶可以与其他治疗方法(如手术换药、血糖控制、抗生素等)相结合,从而达到理想的治疗效果。

志谢 研究得到浙江省医学会临床科研基金(2019ZYCA182)支持

Acknowledgements This study was supported by Clinical Research Fund of Zhejiang Provincial Medical Association

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2023. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

参考文献(References)

- [1] WILKINSON H N, HARDMAN M J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes[J]. **Open Biol**, 2020, 10(9): 200223.
- [2] PIIPPONEN M, LI D, LANDÉN N X. The immune functions of keratinocytes in skin wound healing[J]. **Int J Mol Sci**, 2020, 21(22): 8790.
- [3] KWAK G, CHENG J, KIM H, et al. Sustained exosome-guided macrophage polarization using hydrolytically degradable PEG hydrogels for cutaneous wound healing: identification of key proteins and miRNAs, and sustained release formulation[J/OL]. **Small**, 2022, 18(15): e2200060.
- [4] XIONG Y, CHEN L, LIU P, et al. All-in-one: multi-functional hydrogel accelerates oxidative diabetic wound healing through timed-release of exosome and fibroblast growth factor[J/OL]. **Small**, 2022, 18(1): e2104229.
- [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] LV H, LIU H, SUN T, et al. Exosome derived from stem cell: a promising therapeutics for wound healing [J]. **Front Pharmacol**, 2022, 13: 957771.
- [7] LV K, LI Q, ZHANG L, et al. Incorporation of small extracellular vesicles in sodium alginate hydrogel as a novel therapeutic strategy for myocardial infarction[J]. **Theranostics**, 2019, 9(24): 7403-7416.
- [8] SARAIVA M M, CAMPELO M, CÂMARA NETO J F, et al. Alginate/polyvinyl alcohol films for wound healing: advantages and challenges[J]. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 2023, 111(1): 220-233.
- [9] SHAFEI S, KHANMOHAMMADI M, HEIDARI R, et al. Exosome loaded alginate hydrogel promotes tissue regeneration in full-thickness skin wounds: an *in vivo* study[J]. **J Biomed Mater Res A**, 2020, 108(3): 545-556.
- [10] HUANG C, DONG L, ZHAO B, et al. Anti-inflammatory hydrogel dressings and skin wound healing[J/OL]. **Clin Transl Med**, 2022, 12(11): e1094.
- [11] SHI Q, QIAN Z, LIU D, et al. GMSC-derived exosomes combined with a chitosan/silk hydrogel sponge accelerates wound healing in a diabetic rat skin defect model [J]. **Front Physiol**, 2017, 8: 904.
- [12] ZHOU Y, ZHANG X L, LU S T, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells-derived exosomes encapsulated in pluronic F127 hydrogel promote wound healing and regeneration[J]. **Stem Cell Res Ther**, 2022, 13(1): 407.
- [13] FLYNN K, MAHMOUD N N, SHARIFI S, et al. Chronic wound healing models[J]. **ACS Pharmacol Transl Sci**, 2023, 6(5): 783-801.
- [14] SHAO X, ZHANG Y, LIN Y. Cyclic stretch-regulated wound healing[J]. **Biophys J**, 2023, 122(12): 2381-2382.
- [15] WEINSTEIN B, SCHECHTER L. Wound healing complications in gender-affirming surgery[J]. **NeuroUrol Urodyn**, 2023, 42(5): 990-995.
- [16] HESKETH M, SAHIN K B, WEST Z E, et al. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing[J]. **Int J Mol Sci**, 2017, 18(7): 1545.
- [17] SHARIFIAGHDAM M, SHAABANI E, FARIDI-MAJIDI R, et al. Macrophages as a therapeutic target to promote diabetic wound healing[J]. **Mol Ther**, 2022, 30(9): 2891-2908.
- [18] SCHMITT H, ULMSCHNEIDER J, BILLMEIER U, et al. The TLR9 agonist cobitolimod induces IL10-producing wound healing macrophages and regulatory T cells in ulcerative colitis[J]. **J Crohns Colitis**, 2020, 14(4): 508-524.
- [19] SORG H, TILKORN D J, HAGER S, et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts[J]. **Eur Surg Res**, 2017, 58(1-2): 81-94.
- [20] SHIN Y E, CHOI J W, PARK Y I, et al. 7, 8-Dihydroxyflavone attenuates inflammatory response and insulin resistance induced by the paracrine interaction between adipocytes and macrophages[J]. **Int J Mol Sci**, 2023, 24(4): 3520.
- [21] LI Y, LIN S, XIONG S, et al. Recombinant expression of human IL-33 protein and its effect on skin wound healing in diabetic mice[J]. **Bioengineering (Basel)**, 2022, 9(12): 734.
- [22] VAR S R, SHETTY A V, GRANDE A W, et al. Microglia and macrophages in neuroprotection, neurogenesis, and emerging therapies for stroke[J]. **Cells**, 2021, 10(12): 3555.
- [23] ZOLEIKHA A, SIMIN N, WEBSTER THOMAS J, et al. Stem cell-mediated angiogenesis in skin tissue engineering and wound healing[J]. **Wound Repair Regen**, 2022, 30(4): 421-435.

[本文编辑 余 方 沈 敏]