

- 2018, 29(10): 611-615, 后插 10-4. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7040.2018.10.010.
- [30] Akpinar Kara Y, Ozdemir D. Evaluation of food consumption in patients with acne vulgaris and its relationship with acne severity [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2020, 19(8): 2109-2113. DOI: 10.1111/jocd.13255.
- [31] Seo YS, Lee HB, Kim Y, et al. Dietary carbohydrate constituents related to gut dysbiosis and health[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(3): 427. DOI:10.3390/microorganisms8030427.
- [32] Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Malhotra M, et al. Probiotic ferulic acid esterase active lactobacillus fermentum NCIMB 5221 APA microcapsules for oral delivery: preparation and in vitro characterization[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012, 5(2): 236-248. DOI:10.3390/ph5020236.
- [33] Makki K, Deehan EC, Walter J, et al. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease[J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(6): 705-715. DOI:10.1016/j.chom.2018.05.012.
- [34] Onishi N, Kawamoto S, Suzuki H, et al. Dietary pulverized konjac glucomannan suppresses scratching behavior and skin inflammatory immune responses in NC/Nga mice[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 144(2): 95-104. DOI:10.1159/000103220.
- [35] Louw L. Keloids in rural black South Africans. Part 1: general overview and essential fatty acid hypotheses for keloid formation and prevention[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000, 63(5): 237-245. DOI:10.1054/plef.2000.0207.
- [36] Louw L, Dannhauser A. Keloids in rural black South Africans. Part 2: dietary fatty acid intake and total phospholipid fatty acid profile in the blood of keloid patients[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000, 63(5): 247-253. DOI:10.1054/plef.2000.0208.
- [37] Louw L, van der Westhuizen JP, Duyvene de Wit L, et al. Keloids: peripheral and central differences in cell morphology and fatty acid compositions of lipids[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1997, 407: 515-520. DOI:10.1007/978-1-4899-1813-0_77.
- [38] Louw L. Keloids in rural black South Africans. Part 3: a lipid model for the prevention and treatment of keloid formations[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2000, 63(5): 255-262. DOI:10.1054/plef.2000.0209.

(收稿日期: 2021-04-01)

间充质干细胞来源细胞外囊泡促进糖尿病溃疡血管生成的研究进展

刘文剑¹ 刘德伍²

¹武警江西总队医院烧伤整形科, 南昌 330030; ²南昌大学第一附属医院烧伤科, 南昌 330006

通信作者: 刘德伍, Email: dewuliu@126.com

【摘要】 细胞外囊泡(EV)是大多数真核细胞分泌的纳米级颗粒, 在细胞间的物质转运和信息传递中扮演重要角色, 参与炎症、血管生成、抗原呈递、细胞凋亡及分化等生物学过程。间充质干细胞(MSC)培养上清液中富含EV, EV可调控创面愈合和组织修复的关键步骤——新血管形成, 而糖尿病溃疡迁延不愈与创面血管网络的形成受阻密切相关。该文就MSC来源EV在促进糖尿病溃疡血管生成中的作用进行综述, 以期对糖尿病溃疡治疗提供一种新思路。

【关键词】 糖尿病; 伤口愈合; 间质干细胞; 外泌体; 细胞外囊泡; 血管新生

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(81460293)

Research advances on mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in promoting angiogenesis of diabetic ulcers

Liu Wenjian¹, Liu Dewu²

¹Department of Burns and Plastic Surgery, Jiangxi General Hospital of Armed Police, Nanchang 330030, China;

²Department of Burns, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: Liu Dewu, Email: dewuliu@126.com

【Abstract】 Extracellular vesicles are nanoparticles secreted by most eukaryotic cells and play important roles in material transport and information transmission between cells, involved in inflammation, angiogenesis, antigen presentation, cell apoptosis, cell differentiation, and other biological processes. The culture supernatant of mesenchymal stem cells is

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20201207-00520

本文引用格式: 刘文剑, 刘德伍. 间充质干细胞来源细胞外囊泡促进糖尿病溃疡血管生成的研究进展[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38(4): 393-399. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20201207-00520.

Liu WJ, Liu DW. Research advances on mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in promoting angiogenesis of diabetic ulcers[J]. *Chin J Burns Wounds*, 2022, 38(4): 393-399. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20201207-00520.



rich in extracellular vesicles, and the extracellular vesicles can regulate the formation of new blood vessels, a key step in wound healing and tissue repair. The persistence of diabetic ulcers is closely related to the blocked formation of wound vascular network. This article reviews the role of extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells in promoting angiogenesis of diabetic ulcers, in order to provide a new idea for the treatment of diabetic ulcers.

【Key words】 Diabetes mellitus; Wound healing; Mesenchymal stem cells; Exosomes; Extracellular vesicles; Angiogenesis

Fund program: Regional Science Foundation Project of National Natural Science Foundation of China (81460293)

细胞外囊泡(EV)由大多数真核细胞分泌,是纳米级颗粒,参与了包括炎症、血管生成、抗原呈递、细胞凋亡、细胞分化等生物学过程,在细胞间的物质转运和信息传递中扮演重要角色。间充质干细胞(MSC)几乎存在于机体所有的组织和器官中,具有多向分化潜能以及高度自我更新和免疫调节能力。以往认为MSC是通过归巢并直接作用于受损组织或多向分化替代受损组织发挥治疗潜能的,近年来观察到MSC以旁分泌方式实现生物学效应是其主要作用机制,而EV则是旁分泌作用的重要载体^[1]。EV中包含丰富的蛋白质、核酸等活性物质^[2],研究表明MSC来源EV(MSC-EV)可调控创面修复过程,包括创面愈合和组织修复的关键步骤——新血管形成^[3]。糖尿病溃疡迁延不愈的病因是多方面的,原因之一与创面血管网络的形成受阻密切相关,表现为新生血管细胞在增殖、重塑及成熟各阶段功能失调。本文就MSC-EV的生物学特征和功能及其在促进糖尿病溃疡血管生成中的作用进行综述,以期对糖尿病溃疡治疗提供一种新思路。

1 MSC-EV的生物学特性

1.1 EV结构和组成成分

EV是脂质双层膜封闭的亚细胞结构,通常为球形,主要成分为蛋白质、脂类和核酸。20世纪80年代初,有报道指出在网织红细胞形成多囊泡体后存在囊泡释放现象^[4-5]。随后Johnstone等^[6]观察到这些EV存在于多种体液(尿液、唾液和精液等)及离体组织和细胞培养上清液中^[7]。根据EV大小和来源不同,可将其大致分为3类:凋亡小体,直径800~5 000 nm,在细胞发生凋亡时从细胞脱落而产生;微囊泡,直径200~1 000 nm,由质膜以直接出芽的方式产生;外泌体,直径30~150 nm,由多囊泡体与质膜融合,再次向内凹陷出芽为颗粒状小囊泡并释放到细胞外,是EV中含量最多的部分^[8]。目前的分离技术很难完全纯化区分上述3种类别,如分离出的外泌体就常混有多种细胞器、微囊泡,国际EV相关协会指南认为将外泌体、微囊泡一并表述为EV更为合适^[9]。EV富含多种蛋白成分,包括膜表面标志物四跨膜蛋白超家族(CD63、CD9、CD81、CD82等)、热休克蛋白70(HSP70)、囊内标志物凋亡诱导因子6相互作用蛋白、肿瘤易感基因101,以及黏附蛋白、细胞信号分子、代谢酶及细胞因子等^[10]。EV

膜脂质包括神经鞘磷脂、磷脂丝氨酸等,有助于受体细胞摄取EV并提供结构稳定性^[11]。EV中的核酸载体如mRNA、微小RNA(miR)、长链非编码RNA(lncRNA)和DNA等,在细胞通讯中发挥作用,调节受体细胞功能^[12-13]。

1.2 MSC-EV的生物学特征

MSC是一种具有自我更新能力的多能干细胞,可以从骨髓、脐带、脂肪、外周血、牙龈等多种成体组织中分离得到。MSC-EV有着与其他细胞来源EV相似的内容物,如CD63、CD9、CD81、CD82、HSP70、HSP90,这些内容物可作为分析鉴定EV的重要标志物。此外,MSC-EV还有可表达母细胞表面特异性分子CD44、CD73、CD90等^[14]的特异性标志物,以及富含与其修复再生功能密切相关的独特内容物如miR、IL、生长因子及核因子 κ B、TGF- β 、Wnt等大量信号通路蛋白,这些特殊的表面标志物及内容物可与多种类型的细胞发生相互作用,从而介导MSC作为基质支持细胞维持组织内稳态和促进组织修复再生的作用^[15]。

2 MSC-EV的生物学功能

MSC-EV是MSC旁分泌的主要载体,可通过将核酸、蛋白质转移到受体细胞,介导MSC特有的生物学效应。MSC-EV作为无细胞治疗手段在组织修复、神经保护与再生、免疫调节及自噬调节中表现出巨大的作用,展现出治疗心血管疾病、肾脏疾病、肝脏疾病、肺部疾病、神经损伤以及皮肤创伤,特别是糖尿病溃疡的潜力^[16]。MSC已被报道可促进糖尿病溃疡愈合^[17-18],主要通过其旁分泌的EV发挥作用^[19]。EV继承了母体细胞的部分功能和生物学特征,可通过调控创面中的炎症反应、血管生成、细胞增殖和再上皮化等多种途径促进创面愈合,同时避免了MSC直接移植面临的感染、致瘤、栓塞等风险^[20]。

然而,MSC的旁分泌效应很大程度取决于移植部位的微环境^[21]。有研究显示,将MSC暴露在大鼠外周动脉疾病样缺血缺氧微环境中,MSC分泌的EV增加了促血管生成因子,包括VEGF、FGF和血小板衍生生长因子(PDGF)等的表达,这些蛋白通过活化核因子 κ B途径可在体外诱导血管生成^[22]。由此提示研究者不应局限于从条件培养基中获取MSC-EV,通过改变微环境或许可以调控EV的组成成分及含量,从而更好实现其生物学功能。

MSC-EV来源及所处的微环境不同,其内含物的种类和数量也有所差异,但其作为信号体作用于靶细胞的方式基本相同,主要包括:(1)直接作为信号复合物,作用于靶细胞表面配体刺激受体细胞;(2)依赖膜融合后的内容物释放,进行信息转运,在细胞间进行物质转运及信号传递;(3)依赖于胞外释放的信号分子,作用于细胞膜表面受体进行翻译水平后的信息转运;(4)通过转移转录因子、miR、mRNA等进行转录水平的信号传递与调控^[23-24]。

3 MSC-EV在糖尿病溃疡血管生成中的作用和机制

创面愈合是一个复杂但有序的过程,包括止血、炎症、增

殖和重塑 4 个阶段。正常状态下,基础水平的促血管生成因子如 VEGF、FGF 等,以及抗血管生成因子如色素上皮衍生因子(PEDF)、血管抑素等共同维持血管网络处于既不新生也不减少的动态平衡^[25],保障血管系统向机体组织输送足够的营养物质和氧气。当机体组织受伤时,血管网络的动态平衡被打破,最终导致组织缺氧^[26]。随着组织损伤所形成的氧梯度递减,缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)被激活并可通过上调数百个靶基因,包括 VEGF、基质细胞衍生因子 1(SDF-1)、内皮型 NOS(eNOS)、血管生成素 1(Ang-1)等促进血管生成^[27]。在慢性创面中,血管再生包括 2 个过程:(1)血管生成,指已有的血管内皮细胞以出芽方式新生毛细血管,HIF-1 α 在该过程中可活化 VEGF、VEGF 受体和 SDF-1 等诸多因子;(2)血管形成,指内皮祖细胞(EPC)直接参与新血管形成并分泌 VEGF、IL-8 和基质金属蛋白酶(MMP)加速该过程^[28]。除依赖细胞和细胞因子的作用,血管生成还依赖于 ECM 的产生,ECM 可为内皮细胞的迁移提供支架^[29]。

3.1 糖尿病溃疡血管生成障碍机制

糖尿病是以持续高血糖为基本生物化学特征的代谢性疾病,血管病变是其慢性并发症的病理基础。晚期糖基化终末产物(AGE)易引起微血管基底膜增厚、内皮细胞损伤,导致组织缺血缺氧,形成的创面呈现感染加深、血管化障碍、上皮化受阻等难愈特征。影响糖尿病溃疡血管生成的因素,主要包括细胞和相关细胞因子 2 个方面。

3.1.1 细胞因素

血管内皮细胞的损伤和功能异常是糖尿病血管并发症的早期表现。糖尿病大鼠创伤后,血管内皮细胞的数量并未明显减少,但支持有效血运的新生血管密度显著降低,血管紧张素 II 持续高水平表达,提示新生血管的装配障碍导致血管重构受到抑制,此为糖尿病创面新生血管化障碍的重要环节^[30]。一氧化氮是一种重要的血管活性物质,在血管重塑过程中起调节作用,可诱导新生血管形成。糖尿病患者发生代谢紊乱时,高血糖、高血脂、氧化应激均会抑制 eNOS 的活性,减少内皮细胞生成一氧化氮,阻碍新生血管形成^[27]。AGE 和胰岛素抵抗致大鼠血管内皮细胞功能紊乱,所产生的与凝血、纤维蛋白溶解相关因子如组织纤溶酶原抑制剂、TNF- α 等可损伤内皮细胞功能。同时 EPC 数量减少及其功能下降,致使其不能对内皮细胞损伤进行有效修复,以致不能有效形成功能性的毛细血管,导致创面供血不足^[31]。糖尿病溃疡局部缺血缺氧引起的活性氧释放可引发 ECM 降解,使基质细胞相互作用出现障碍,影响内皮细胞的迁移,最终导致创面经久不愈。

正常创面形成后,巨噬细胞从骨髓中被招募至创面参与炎症反应,并从促炎表型的 M1 型巨噬细胞转变为抗炎的 M2 型以促进血管生成和组织重塑。而糖尿病可干扰巨噬细胞的功能,通过减少巨噬细胞在创面中的募集,降低巨噬细胞的吞噬作用,同时通过抑制 M1 型巨噬细胞向 M2 型转变,阻碍创面愈合。巨噬细胞缺陷包括表型改变,如 M2 型巨噬细胞若没有发生极化则会使新生血管生成受到影响,干扰创面愈合及组织重塑。Khanna 等^[32]研究瘦素受体缺陷 db/db

小鼠的结果显示,创面处巨噬细胞吞噬功能减弱,凋亡负担加重,致 VEGF 和其他促血管生成介质的来源减少,创面血管生成减少。

3.1.2 细胞因子因素

研究表明与非糖尿病创面相比,在糖尿病创面中多种促进创面愈合的生长因子呈不同程度表达下调。2 型糖尿病患者下肢创面边缘皮肤中 VEGF、SDF-1、eNOS 等表达明显低于非糖尿病患者。采用链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠的研究显示,该模型小鼠创面中存在多种生长因子包括 VEGF 的合成减少,而缺少 VEGF 会使创面愈合变慢,新生血管退化^[33]。缺氧等因素可刺激 VEGF 基因的表达,如 HIF-1 α 可诱导 VEGF 及其受体使二者表达升高。高糖环境及炎症反应抑制了 HIF-1 α 的表达,还可通过下调 VEGF 和 Ang-1 及其受体的表达,使 EPC 数量减少,并减弱其增殖、黏附、迁移、合成血管的能力,从而抑制新生血管生成。高血糖会使活性氧生成增加,使超氧阴离子生成增加,一氧化氮生成减少。另一方面,糖尿病患者中 eNOS 脱偶联,同样影响一氧化氮的生成,而且 EPC 功能出现障碍,干扰了新生血管形成,影响创面愈合^[34]。

除了促血管生成刺激的减少,有研究证实糖尿病患者创面中抗血管生成因子和毛细血管成熟因子水平均升高。在一项研究中,与非糖尿病和没有溃疡的糖尿病患者相比,糖尿病溃疡患者血清中的 PEDF 水平更高^[35],提示 PEDF 水平升高可能会对创面愈合结果产生负面影响。

3.2 MSC-EV 促进糖尿病溃疡血管生成机制

许多研究提示 MSC 能促进糖尿病溃疡血管生成,与其具有多向分化、免疫调节及组织修复的功能相关^[15,17-18],可能的作用机制如下:(1)全身应用 MSC 时,溃疡组织缺氧、炎症所产生的趋化因子刺激 MSC 归巢、定植创面,并分化形成血管内皮细胞、Fb 等进行组织修复,但实际上 MSC 迁移、定植及分化的效率低,局部应用时也因微环境影响,面临存活及增殖分化低的问题^[36];(2)MSC-EV 与靶细胞融合,释放多种细胞因子,包括 VEGF、碱性 FGF(bFGF)、SDF-1、肝细胞生长因子(HGF)等,直接促进血管新生和 ECM 重建;(3)MSC-EV 在翻译、转录水平向靶细胞传递核因子 κ B、TGF- β 等信号分子及 mRNA、miR,通过调控细胞增殖和凋亡、血管再生、免疫等多种途径,发挥促进血管生成的功能。其中后 2 种机制研究较多,详细阐述如下。

3.2.1 释放、调控细胞因子促进血管生成

EV 在胞内形成时将一些特定的胞质蛋白质甚至一些小的可溶性生物因子如趋化因子、生长因子及转录因子等细胞因子纳入其中^[37],晚期多囊泡体与细胞膜融合时,将囊泡及内容物释放传递到 ECM 中。Anderson 等^[22]应用液相色谱-质谱对人骨髓 MSC-EV 中的蛋白质进行分析,结果显示当 MSC 暴露在外周血管疾病、高血糖等缺血缺氧条件下时,EV 所含 VEGF、PDGF 和 FGF 等血管生成相关因子增加,以此调控血管生成。人脐带血 EPC 衍生的 EV 在创面修复中也释放传递血管生成相关因子,包括 FGF、VEGF、Ang-1、趋化因子 16、eNOS 和 IL-8 等^[38]。

与 MSC-EV 传递促血管生成因子相比,更多文献报道 MSC-EV 通过调控靶细胞(巨噬细胞、血管内皮细胞及淋巴细胞等)促进血管生成因子如 VEGF、FGF、PDGF、TGF 等的表达,促进内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖与迁移、免疫调节、ECM 重塑等过程,使原有血管再分化形成新的血管网,加速创面愈合。Fridoni 等^[39]观察到人骨髓 MSC-EV 可显著增强 HIF-1 α 、bFGF、SDF-1 表达,增加巨噬细胞数量并促进其由 M1 型向 M2 型转变并极化,在糖尿病大鼠感染的创面发挥抗炎及促血管生成作用。另一项研究也证实人骨髓 MSC-EV 具有促进体外高糖微环境下血管再生的功能,其具体机制与多种生长因子如 VEGF、HGF、胰岛素样生长因子等水平上调密切相关^[40]。而人脂肪 MSC-EV 则可能通过调节 TGF-1 表达,促进人脂肪 MSC 定向分化为内皮细胞,从而调节免疫反应和增加 VEGF、HGF 和 FGF 等血管生成因子的表达,进而促进血管新生及创面愈合^[41-42]。人脂肪 MSC-EV 过度表达核转录因子红系数 2 相关因子 2(Nrf-2)对糖尿病动物模型的溃疡愈合也有促进作用。Nrf-2 在氧化应激条件下可从细胞质转移到细胞核,这种转录因子诱导了编码抗氧化酶的基因表达,可提高 VEGF 水平、减轻氧化应激、抑制活性氧和 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子产生,从而阻止高糖及氧化微环境诱导 EPC 衰老,并增强 EPC 增殖及血管生成能力,促进血管生成^[43]。其他来源如脐带 MSC、滑膜 MSC 及尿源性 MSC 的 EV,均能刺激血管生成相关因子的表达进而促进糖尿病溃疡血管生成^[44-45]。

3.2.2 内含 miR、lncRNA 参与调控血管生成 EV 介导的 miR 转移已被证明可以诱导受体细胞的调节效应,从而介导细胞间的通讯。越来越多的研究者认为通过细胞间传递的 miR 调控血管再生、免疫、抗细胞凋亡等细胞活动是实现 MSC-EV 作用的重要途径^[46]。miR 主要是作为转录后基因调节因子发挥作用的,单个 miR 被预测具有多个潜在的靶 mRNA,但单个基因可以受到几个 miR 的调控,增加了 miR 微调基因的复杂性^[47]。

MSC-EV 内含多种 miR 在促进血管再生中发挥重要作用。Liang 等^[48]研究表明人骨髓 MSC-EV 可向血管内皮细胞转运 miR-125a,下调血管生成抑制剂 δ 样配体 4 基因表达,促进内皮细胞的生成,调节血管新生。Kang 等^[49]证实人脂肪 MSC-EV 可以将 miR-31 转移到内皮细胞并促使内皮细胞增殖、迁移,并通过抑制 HIF 的抑制因子促进血管生成。人滑膜 MSC-EV 衍生的 miR-126 释放可刺激糖尿病大鼠创面的表面使之再内皮化及促进血管生成。miR-126 水平与血管发芽形成血管网的密度呈正相关,一定程度上是由于 SPRED1 和磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)调控亚基 2 受到抑制,而它们又是 VEGF 受体的负调控因子^[50]。Tao 等^[51]研究显示,过表达 miR-126-3p 的人滑膜 MSC-EV 可显著激活 PI3K/蛋白激酶 B(Akt)和 MAPK/胞外信号调节激酶 1/2 通路,刺激诱导相关因子如 VEGF、HGF、SDF-1 呈剂量依赖性地促进微血管内皮细胞的增殖。高通量测序表明 miR-221-3p 在 EPC-EV 中高表达,增加了血管生成相关因子 VEGF、

CD31 等的蛋白表达水平,显著促进糖尿病小鼠创面的愈合;生物信息学分析表明 miR-221-3p 可能参与糖尿病并发症的 AGE-AGE 受体信号通路、细胞周期和 p53 信号通路^[52]。

lncRNA 是非编码 RNA 的一种亚型,近年来研究表明 lncRNA 在糖尿病创面血管生成中起着重要作用^[53]。高血糖会导致“胰岛素-PI3K/Akt”信号通路失活,导致血管内皮细胞再生被抑制^[54]。研究显示糖尿病创面中 lncRNA H19 的表达水平明显低于创周正常组织,将载有 lncRNA H19 的模拟 EV 注入糖尿病大鼠创面后,大鼠血糖下降,PI3K/Akt 信号通路被抑制状态得以解除,高血糖对毛细血管的损伤减轻,血管内皮细胞增殖和迁移能力增强,从而显著加速创面愈合^[55]。Li 等^[56]观察到来自 MSC-EV 的 lncRNA H19 会抑制 miR-152-3p,而 miR-152-3p 可以通过介导人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(*PTEN* 基因)的表达,抑制 PI3K/Akt 信号通路下调 HIF-1 α 、VEGF、MMP 的表达,实验结果显示 lncRNA H19 促进了糖尿病足小鼠的血管生成,加速伤口愈合,同时导致 *PTEN* 基因继发上调。含有 lncRNA 转移相关肺腺癌转录本 1(MALAT1)的脂肪 MSC-EV 被证明可以抑制 miR-124 的表达,从而激活 Wnt/ β -连环蛋白通路,促进血管生成,最终促进糖尿病大鼠皮肤创面愈合^[57]。与 EV 传递的 MALAT1 的保护作用相比,细胞中的 MALAT1 在各种糖尿病相关并发症中的表达是上调的。这表明,除 MALAT1 之外,还需要其他因子来增强 EV 介导的伤口修复机制^[58]。

4 MSC-EV 促进糖尿病溃疡血管生成的应用改进

4.1 预处理 MSC-EV 的应用

复杂的微环境对 MSC 功能调节、分裂和分化起着重要作用。预处理 MSC 培养条件是增强 MSC 功能的重要途径,其预处理因素包括细胞因子、缺氧、物理因子等。

各种研究证实经缺氧预处理的 MSC-EV 与普通的 MSC-EV 相比具有更好的特性。在低氧条件下,人脂肪 MSC-EV 可激活蛋白激酶 A 途径进而改善慢性创面中血管生成^[59]。低氧还可促进人牙龈 MSC-EV 的释放,激活 Jagged1/Notch 通路,提高 EV 在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中诱导毛细血管形成的能力^[60]。各种研究已经证明,用丙戊酸、氯化钴、去铁胺和二氧酰甘氨酸等化学和生物因素预处理可以模拟缺氧的影响。与低氧相比,低氧模拟剂还可以诱导相关的低氧基因,在基础研究和临床试验中均证实低氧模拟剂可提高 MSC-EV 促进血管生成的能力^[61]。在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型中,将去铁胺预处理的 EV 应用于溃疡创面可以更有效地诱导血管生成进而加速创面愈合^[33]。这些 EV 中,miR-126 高表达降低了 *PTEN* 基因的表达并激活了 PI3K/Akt 信号通路,从而使得 EV 表现出明显的促血管生成特性^[62]。Ariyanti 等^[63]观察到高血糖状态下红景天苷预处理人 MSC-EV 可增强血红素加氧酶-1、FGF 和 HGF 等的表达水平,并抑制活性氧水平,降低细胞凋亡率,促进血管生成,加快糖尿病大鼠模型创面愈合。吡格列酮预处理骨髓

MSC-EV 通过激活 PI3K/Akt/eNOS 通路促进 HUVEC 的血管生成能力,将吡格列酮预处理的骨髓 MSC-EV 用于大鼠糖尿病创面可促进胶原沉积、ECM 重塑以及 VEGF 和 CD31 的表达,从而加速创面愈合^[64]。

4.2 工程技术改善 MSC-EV 功效和产量

MSC-EV 在创面修复中的应用已经显示出了巨大价值,但是 MSC-EV 的产量限制了其应用,因此亟须在不影响 MSC-EV 功能的情况下提高其产量及功效。MSC 的二维平面培养限制了细胞生长的表面积以及生物环境中细胞间、细胞与 ECM 间的相互作用,而利用 ECM 则可为干细胞提供生长的三维微环境。天然 ECM 可被制备成水凝胶或多孔支架的形式,用于 MSC 培养以产生 EV。ECM 支架还可被用作 EV 的递送载体。Wang 等^[65]开发了一种温度敏感、可注射、自修复黏附性多糖基氟化乙丙烯水凝胶支架,将人脂肪 MSC-EV 装入凝胶中,以 pH 依赖的方式释放 EV,这种策略在体外增加了 HUVEC 的增殖、迁移和血管生成速率,而且在体内加速了糖尿病模型小鼠伤口的愈合。另外在糖尿病大鼠模型中,壳聚糖-EV 敷料加速了伤口的再上皮化、血管生成和胶原成熟^[51]。人工合成的生物材料支架可模拟天然 ECM 结构和功能,通过添加分子修饰可提供更多确定的生物活性。在壳聚糖支架中加入一氧化氮得到的释放一氧化氮的壳聚糖支架可使人胎盘 MSC-EV 中 VEGF 浓度和 miR-126 表达增高,从而促进血管生成^[66]。但 ECM 表面积有限,仍难以满足临床大规模使用的需求。微载体和中空纤维生物反应器具有更大的表面积,是目前在三维环境中大规模扩增 MSC 应用最广的培养器^[67]。

5 总结与展望

虽然有研究已证明 MSC-EV 具有促进糖尿病溃疡血管生成从而促进创面愈合的良好潜能,但其临床应用仍存在障碍。一方面, EV 的异质性普遍存在,同样来源的 EV 可能在多种疾病的治疗中发挥多种功能,意味着来源相同的 EV 在不同个体之间也存在表型、内含物以及功能上的差异^[68],而不同来源的 EV 则差异更大。同时 MSC-EV 所处的局部微环境影响其生物学效应的发挥,应用时需考虑疾病特有的微环境病理特性。目前已开展的预处理甚至可以对 MSC-EV 进行基因编辑和修饰,即针对不同个体、来源及所处微环境的 MSC-EV 进行干预,从而促进其血管生成功能的稳定发挥,但在 EV 的异质性和多样性未被完全阐明之前, MSC-EV 的临床转化应用仍会面临挑战。另一方面, EV 物质转运与信息传递的机制尚未完全明确,其提取、纯化及鉴定复杂,且给药途径、最佳作用浓度与剂量、药物半衰期等临床应用问题还需进一步探索,其安全性和疗效仍不能完全保证。总而言之,需进一步了解 MSC-EV 促进创面愈合的机制,同时改进 EV 的制备、纯化和应用,才能最终使 MSC-EV 成为治疗糖尿病溃疡等慢性创面的有效手段。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Cheng L, Zhang K, Wu S, et al. Focus on mesenchymal stem cell-derived exosomes: opportunities and challenges in cell-free therapy[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 6305295. DOI: 10.1155/2017/6305295.
- [2] 魏在荣,王达利.间充质干细胞与创面修复——间充质干细胞微环境细胞外囊泡假说[J]. *中华整形外科杂志*, 2019, 35(4): 324-330. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-4598.2019.04.002.
- [3] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 75-81. DOI: 10.1126/science.276.5309.75.
- [4] Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor[J]. *Cell*, 1983, 33(3): 967-978. DOI: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.
- [5] Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding [J]. *Eur J Cell Biol*, 1984, 35(2): 256-263.
- [6] Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions[J]. *Blood*, 1989, 74(5): 1844-1851.
- [7] Rani S, Ryan AE, Griffin MD, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications[J]. *Mol Ther*, 2015, 23(5): 812-823. DOI: 10.1038/mt.2015.44.
- [8] Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 170. DOI: 10.3390/ijms17020170.
- [9] Théry C, Witwer KW, 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. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.
- [10] Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(8): e968-e977. DOI: 10.1073/pnas.1521230113.
- [11] Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward[J]. *Prog Lipid Res*, 2017, 66: 30-41. DOI: 10.1016/j.plipres.2017.03.001.
- [12] Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go[J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
- [13] Dorayappan K, Wallbillich JJ, Cohn DE, et al. The biological significance and clinical applications of exosomes in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 142(1): 199-205. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.03.036.
- [14] L Ramos T, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry[J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14: 2. DOI: 10.1186/s12964-015-0124-8.
- [15] Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, et al. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(3): 601-613. DOI: 10.1002/stem.2298.
- [16] Yamashita T, Takahashi Y, Takakura Y. Possibility of exosome-based therapeutics and challenges in production of exosomes eligible for therapeutic application[J]. *Biol Pharm Bull*,

- 2018,41(6):835-842.DOI:10.1248/hpb.b18-00133.
- [17] Moon KC, Suh HS, Kim KB, et al. Potential of allogeneic adipose-derived stem cell-hydrogel complex for treating diabetic foot ulcers[J]. *Diabetes*, 2019, 68(4): 837-846. DOI: 10.2337/db18-0699.
- [18] Wu P, Zhang B, Shi H, et al. MSC-exosome: a novel cell-free therapy for cutaneous regeneration[J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(3): 291-301.DOI:10.1016/j.jeyt.2017.11.002.
- [19] Roche S, D'Ippolito G, Gomez LA, et al. Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system in vivo[J]. *Int J Pharm*, 2013, 440(1): 72-82.DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.12.041.
- [20] Than U, Guanzone D, Leavesley D, et al. Association of extracellular membrane vesicles with cutaneous wound healing[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5):956.DOI:10.3390/ijms18050956.
- [21] Kusuma GD, Carthew J, Lim R, et al. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect[J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(9):617-631.DOI:10.1089/scd.2016.0349.
- [22] Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, et al. Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(3):601-613.DOI:10.1002/stem.2298.
- [23] Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(9):838-848.DOI:10.1038/ki.2010.278.
- [24] Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4:27066.DOI:10.3402/jev.v4.27066.
- [25] Demidova-Rice TN, Durham JT, Herman IM. Wound healing angiogenesis: innovations and challenges in acute and chronic wound healing[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2012, 1(1): 17-22.DOI:10.1089/wound.2011.0308.
- [26] Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing--more than a nutrient[J]. *World J Surg*, 2004, 28(3): 294-300. DOI: 10.1007/s00268-003-7400-2.
- [27] Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(25): 16767-16775. DOI: 10.1074/jbc.M901790200.
- [28] 唐黎珺,张筱薇,金俊俊,等.脂肪源性间充质干细胞外泌体在慢性创面治疗中作用机制的研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2021, 37(2):191-195.DOI:10.3760/cma.j.cn501120-20200220-00076.
- [29] Tsai HW, Wang PH, Tsui KH. Mesenchymal stem cell in wound healing and regeneration[J]. *J Chin Med Assoc*, 2018, 81(3): 223-224.DOI:10.1016/j.jcma.2017.06.011.
- [30] Martin PE, O'Shaughnessy EM, Wright CS, et al. The potential of human induced pluripotent stem cells for modelling diabetic wound healing in vitro[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(15): 1629-1643.DOI:10.1042/CS20171483.
- [31] Kim YH, Tabata Y. Recruitment of mesenchymal stem cells and macrophages by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophage recruitment agent enhances wound closure[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(4): 942-956. DOI: 10.1002/jbm.a.35635.
- [32] Khanna S, Biswas S, Shang Y, et al. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3):e9539.DOI:10.1371/journal.pone.0009539.
- [33] Steinle H, Golombek S, Behring A, et al. Improving the angiogenic potential of EPCs via engineering with synthetic modified mRNAs[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018, 13: 387-398. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.09.005.
- [34] El-Bahy A, Aboulmagd YM, Zaki M. Diabetex: a novel approach for diabetic wound healing[J]. *Life Sci*, 2018, 207: 332-339. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.06.020.
- [35] Qi W, Yang C, Dai Z, et al. High levels of pigment epithelium-derived factor in diabetes impair wound healing through suppression of Wnt signaling[J]. *Diabetes*, 2015, 64(4): 1407-1419.DOI:10.2337/db14-1111.
- [36] Otero-Viñas M, Falanga V. Mesenchymal stem cells in chronic wounds: the spectrum from basic to advanced therapy[J]. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2016, 5(4): 149-163. DOI: 10.1089/wound.2015.0627.
- [37] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease[J]. *Regen Med*, 2011, 6(4):481-492.DOI:10.2217/rme.11.35.
- [38] Li X, Jiang C, Zhao J. Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(6):986-992.DOI:10.1016/j.jdiacomp.2016.05.009.
- [39] Fridoni M, Kouhkeheil R, Abdollahifard MA, et al. Improvement in infected wound healing in type 1 diabetic rat by the synergistic effect of photobiomodulation therapy and conditioned medium[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6):9906-9916.DOI:10.1002/jcb.28273.
- [40] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro[J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(14): 1635-1647. DOI: 10.1089/scd.2014.0316.
- [41] Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 145. DOI: 10.1186/s13287-017-0598-y.
- [42] Gadelkarim M, Abushouk AI, Ghanem E, et al. Adipose-derived stem cells: effectiveness and advances in delivery in diabetic wound healing[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:625-633.DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.013.
- [43] Li X, Xie X, Lian W, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(4):1-14.DOI:10.1038/s12276-018-0058-5.
- [44] Bakhtyar N, Jeschke MG, Herer E, et al. Exosomes from acellular Wharton's jelly of the human umbilical cord promotes skin wound healing[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 193. DOI: 10.1186/s13287-018-0921-2.
- [45] 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. DOI:10.3389/fphys.2017.00904.
- [46] Katsuda T, Ochiya T. Molecular signatures of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-mediated tissue repair[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6:212.DOI:10.1186/s13287-015-0214-y.
- [47] Petkovic M, Sørensen AE, Leal EC, et al. Mechanistic actions of microRNAs in diabetic wound healing[J]. *Cells*, 2020, 9(10):2228. DOI:10.3390/cells9102228.
- [48] Liang X, Zhang L, Wang S, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a[J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(11):2182-2189.

- DOI:10.1242/jcs.170373.
- [49] Kang T, Jones TM, Naddell C, et al. Adipose-derived stem cells induce angiogenesis via microvesicle transport of miRNA-31[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(4): 440-450. DOI: 10.5966/sctm.2015-0177.
- [50] Zhang D, Li Z, Wang Z, et al. MicroRNA-126: a promising biomarker for angiogenesis of diabetic wounds treated with negative pressure wound therapy[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12:1685-1696. DOI:10.2147/DMSO.S199705.
- [51] Tao SC, Guo SC, Li M, et al. Chitosan wound dressings incorporating exosomes derived from microRNA-126-overexpressing synovium mesenchymal stem cells provide sustained release of exosomes and heal full-thickness skin defects in a diabetic rat model[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(3): 736-747. DOI: 10.5966/sctm.2016-0275.
- [52] Xu J, Bai S, Cao Y, et al. miRNA-221-3p in endothelial progenitor cell-derived exosomes accelerates skin wound healing in diabetic mice[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 1259-1270. DOI:10.2147/DMSO.S243549.
- [53] Yu P, Guo J, Li J, et al. Co-expression network analysis revealing the key lncRNAs in diabetic foot ulcers[J]. *Arch Med Sci*, 2019, 15(5):1123-1132. DOI:10.5114/aoms.2019.84699.
- [54] Yu T, Gao M, Yang P, et al. Insulin promotes macrophage phenotype transition through PI3K/Akt and PPAR- γ signaling during diabetic wound healing[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4217-4231. DOI:10.1002/jcp.27185.
- [55] Tao SC, Rui BY, Wang QY, et al. Extracellular vesicle-mimetic nanovesicles transport lncRNA-H19 as competing endogenous RNA for the treatment of diabetic wounds[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1):241-255. DOI:10.1080/10717544.2018.1425774.
- [56] Li B, Luan S, Chen J, et al. The MSC-derived exosomal lncRNA H19 promotes wound healing in diabetic foot ulcers by upregulating PTEN via microRNA-152-3p[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 19:814-826. DOI:10.1016/j.omtn.2019.11.034.
- [57] He L, Zhu C, Jia J, et al. ADSC-exos containing MALAT1 promotes wound healing by targeting miR-124 through activating Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(5): BSR20192549. DOI:10.1042/BSR20192549.
- [58] Abdulle LE, Hao JL, Pant OP, et al. MALAT1 as a diagnostic and therapeutic target in diabetes-related complications: a promising long-noncoding RNA[J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(4):548-555. DOI: 10.7150/ijms.30097.
- [59] Xue C, Shen Y, Li X, et al. Exosomes derived from hypoxia-treated human adipose mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through the PKA signaling pathway[J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(7):456-465. DOI:10.1089/scd.2017.0296.
- [60] Gonzalez-King H, Garcia NA, Ontoria-Oviedo I, et al. Hypoxia inducible factor-1 α potentiates jagged 1-mediated angiogenesis by mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(7):1747-1759. DOI:10.1002/stem.2618.
- [61] An SY, Han J, Lim HJ, et al. Valproic acid promotes differentiation of hepatocyte-like cells from whole human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Cell*, 2014, 46(2): 127-135. DOI:10.1016/j.tice.2013.12.006.
- [62] 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. DOI: 10.1155/2019/9742765.
- [63] Ariyanti AD, Zhang J, Marcelina O, et al. Salidroside-pretreated mesenchymal stem cells enhance diabetic wound healing by promoting paracrine function and survival of mesenchymal stem cells under hyperglycemia[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(4): 404-414. DOI:10.1002/sctm.18-0143.
- [64] Hu Y, Tao R, Chen L, et al. Exosomes derived from pioglitazone-pretreated MSCs accelerate diabetic wound healing through enhancing angiogenesis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2021, 19(1):150. DOI:10.1186/s12951-021-00894-5.
- [65] Wang M, Wang C, Chen M, et al. Efficient angiogenesis-based diabetic wound healing/skin reconstruction through bioactive antibacterial adhesive ultraviolet shielding nanodressing with exosome release[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(9): 10279-10293. DOI: 10.1021/acsnano.9b03656.
- [66] Du W, Zhang K, Zhang S, et al. Enhanced proangiogenic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by a nitric oxide releasing polymer[J]. *Biomaterials*, 2017, 133: 70-81. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.04.030.
- [67] Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, et al. Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors[J]. *Biotechnol J*, 2016, 11(4):473-486. DOI:10.1002/biot.201400862.
- [68] Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977. DOI: 10.1126/science.aau6977.

(收稿日期:2020-12-07)