

本文亮点:

- (1) 证实小鼠真皮乳头细胞外囊泡(DPC-EV)对人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)的增殖和迁移及表达纤维化标志物具有调控作用。
- (2) 证实小鼠 DPC-EV 可通过激活 Krüppel 样因子 4 抑制人 HSF 纤维化标志物的表达,为明确 DPC-EV 治疗增生性瘢痕的机制提供新思路。

Highlights:

- (1) It was demonstrated that extracellular vesicles from dermal papilla cells (DPC-EVs) of mice could regulate the proliferation, migration, and expressions of fibrosis markers of human hypertrophic scar fibroblasts (HSFs).
- (2) It was demonstrated that the DPC-EVs of mice could inhibit the expression of human HSFs fibrosis markers by activating Krüppel-like factor 4, which provided a new idea for clarifying the mechanism of DPC-EVs in the treatment of hypertrophic scars.



小鼠真皮乳头细胞外囊泡对人增生性瘢痕成纤维细胞的影响及其机制

王运帷¹ 张浩¹ 曹鹏² 张万福¹ 佟琳¹ 李少琿¹ 陈阳¹ 韩超¹ 官浩¹

¹空军军医大学第一附属医院全军烧伤中心,烧伤与皮肤外科,西安 710032;²江南大学附属医院烧伤诊疗中心,无锡 214062

通信作者:官浩,Email:guanhao2020@yeah.net

【摘要】 目的 探讨小鼠真皮乳头细胞外囊泡(DPC-EV)对人增生性瘢痕成纤维细胞(HSF)的影响及其机制。**方法** 该研究为实验研究。取10只6周龄雄性C57BL/6J小鼠,提取触须的原代真皮乳头细胞(DPC)并成功鉴定。取第3~5代DPC,于培养24 h采用超高速离心法提取DPC-EV,采用透射电子显微镜观察形态、纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径(样本数为3)。将第3代HSF分为DPC-EV组和磷酸盐缓冲液(PBS)组,分别加入DPC-EV、PBS培养,行细胞划痕试验并计算划痕后24 h细胞迁移率(样本数为5),采用细胞计数试剂盒8检测培养0(行饥饿处理12 h后、加入DPC-EV或PBS前)、24、48、72、96 h细胞增殖水平(样本数为4),采用免疫荧光法、蛋白质印迹法检测培养24 h细胞中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及I型胶原蛋白(Col I)的蛋白表达情况,采用蛋白质印迹法检测培养24 h细胞中Krüppel样因子4(KLF4)的蛋白表达情况。取第3代HSF,加入DPC-EV培养24 h后,采用随机数字表法将HSF分为空白对照组、KLF4敲低组和KLF4过表达组,其中空白对照组细胞仅常规培养48 h,KLF4敲低组和KLF4过表达组细胞均先加入KLF4敲低病毒培养24 h,而后KLF4敲低组细胞常规培养24 h,KLF4过表达组细胞加入KLF4过表达病毒培养24 h。于培养48 h,采用蛋白质印迹法检测细胞中KLF4、 α -SMA、Col I的蛋白表达情况。**结果** 培养24 h,提取的DPC-EV为囊泡状结构,平均粒径108.8 nm。划痕后24 h,PBS组HSF的迁移率为(54±10)%,明显高于DPC-EV组的

DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20231107-00185

本文引用格式:王运帷,张浩,曹鹏,等.小鼠真皮乳头细胞外囊泡对人增生性瘢痕成纤维细胞的影响及其机制[J].中华烧伤与创面修复杂志,2024,40(3):258-265. DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20231107-00185.

Wang YW,Zhang H,Cao P et al.Influences and mechanism of extracellular vesicles from dermal papilla cells of mice on human hypertrophic scar fibroblasts[J].Chin J Burns Wounds,2024,40(3):258-265. DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20231107-00185.



(29±8)%($t=4.37, P<0.05$)。培养 48、72、96 h, DPC-EV 组 HSF 的增殖水平明显低于 PBS 组(t 值分别为 4.06、5.76、6.41, $P<0.05$)。培养 24 h, DPC-EV 组 HSF 中 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达均明显低于 PBS 组, 而 KLF4 的蛋白表达明显高于 PBS 组。培养 48 h, 与空白对照组比较, KLF4 敲低组 HSF 中 KLF4 的蛋白表达下调, α -SMA 及 Col I 的蛋白表达均上调; 与 KLF4 敲低组比较, KLF4 过表达组 HSF 中的 KLF4 的蛋白表达上调, Col I 和 α -SMA 的蛋白表达均下调。 **结论** 小鼠 DPC-EV 可抑制人 HSF 的增殖和迁移, 并通过激活 KLF4 抑制人 HSF 中纤维化标志物 α -SMA 和 Col I 的表达。

【关键词】 瘢痕; 胞外囊泡; 成纤维细胞; Krüppel 样因子 4; 真皮乳头细胞

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82272268); 教育部中国高校产学研创新基金(2021JH030)

Influences and mechanism of extracellular vesicles from dermal papilla cells of mice on human hypertrophic scar fibroblasts

Wang Yunwei¹, Zhang Hao¹, Cao Peng², Zhang Wanfu¹, Tong Lin¹, Li Shaohui¹, Chen Yang¹, Han Chao¹, Guan Hao¹

¹Department of Burns and Cutaneous Surgery, Burn Center of PLA, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; ²Burns & Trauma Treatment Center, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Corresponding author: Guan Hao, Email: guanhao2020@yeah.net

【Abstract】 Objective To investigate the influences and mechanism of extracellular vesicles from dermal papilla cells (DPC-EVs) of mice on human hypertrophic scar fibroblasts (HSFs). **Methods** The study was an experimental research. The primary dermal papilla cells (DPCs) of whiskers were extracted from 10 6-week-old male C57BL/6J mice and identified successfully. The DPC-EVs were extracted from the 3rd to 5th passage DPCs by ultracentrifugation, and the morphology was observed through transmission electron microscope and the particle diameter was detected by nanoparticle tracking analyzer ($n=3$) at 24 h after culture. The 3rd passage of HSFs were divided into DPC-EV group and phosphate buffer solution (PBS) group, which were cultured with DPC-EVs and PBS, respectively. The cell scratch test was performed and cell migration rate at 24 h after scratching was calculated ($n=5$). The cell proliferation levels at 0 (after 12 h of starvation treatment and before adding DPC-EVs or PBS), 24, 48, 72, and 96 h after culture were detected by using cell counting kit 8 ($n=4$). The protein expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type I (Col I) in cells at 24 h after culture were detected by immunofluorescence method and Western blotting, and the protein expression of Krüppel-like factor 4 (KLF4) in cells at 24 h after culture was detected by Western blotting. After the 3rd passage of HSFs were cultured with DPC-EVs for 24 h, the cells were divided into blank control group, KLF4 knockdown group, and KLF4 overexpression group according to the random number table. The cells in blank control group were only routinely cultured for 48 h. The cells in KLF4 knockdown group and KLF4 overexpression group were incubated with KLF4 knockdown virus for 24 h, then the cells in KLF4 knockdown group were routinely cultured for 24 h while the cells in KLF4 overexpression group were incubated with KLF4 overexpression virus for 24 h. The protein expressions of KLF4, α -SMA, and Col I in cells were detected by Western blotting at 48 h after culture. **Results** At 24 h after culture, the extracted DPC-EVs showed vesicular structure with an average particle diameter of 108.8 nm. At 24 h after scratching, the migration rate of HSFs in PBS group was (54±10)%, which was significantly higher than (29±8)% in DPC-EV group ($t=4.37, P<0.05$). At 48, 72, and 96 h after culture, the proliferation levels of HSFs in DPC-EV group were significantly lower than those in PBS group (with t values of 4.06, 5.76, and 6.41, respectively, $P<0.05$). At 24 h after culture, the protein expressions of α -SMA and Col I of HSFs in DPC-EV group were significantly lower than those in PBS group, while the protein expression of KLF4 was significantly higher than that in PBS group. At 48 h after culture, compared with those in blank control group, the protein expression of KLF4 of HSFs in KLF4 knockdown group was down-regulated, while the protein expressions of α -SMA and Col I were both up-regulated; compared with those in KLF4 knockdown group, the protein expression of KLF4 of HSFs in KLF4 overexpression group was up-regulated, while the protein expressions of Col I and α -SMA were down-regulated. **Conclusions** The DPC-EVs of mice can inhibit the proliferation and migration of human HSFs and significantly inhibit the expressions of fibrosis markers α -SMA and Col I in human HSFs by activating KLF4.

【Key words】 Cicatrix; Extracellular vesicles; Fibroblasts; Krüppel-like factor 4;

Dermal papilla cells

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (82272268); Industry-University-Research Innovation Fund of Ministry of Education of China (2021JH030)

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)作为一种严重的皮肤纤维化疾病,一直是临床治疗的一大难题。有30%~72%的皮肤创伤或严重烧伤的患者会发生HS^[1]。由HS导致的功能受限和容貌破坏,严重影响着患者的生活质量,仅在发达国家,每年就需花费数十亿美元来治疗HS^[2-3]。然而,目前尚无完备的针对HS的预防和治疗策略。HS的特征表现为肌Fb活化和胶原沉积,其中Fb转分化为肌Fb是HS发病的关键过程,其特征是 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)及I型胶原蛋白(collagen type I, Col I)的高表达^[4-5]。因此,抑制肌Fb的过度活化是预防HS的重要环节。

Krüppel样因子4(Krüppel-like factor 4, KLF4)是一种进化保守的含锌指蛋白的核转录因子,主要通过激活或抑制下游基因的转录而发挥生物学功能^[6]。KLF4在HS Fb(hypertrophic scar fibroblast, HSF)中的表达较正常皮肤组织Fb降低,且KLF4可以通过抑制人肌Fb活化,降低人肌Fb中 α -SMA及Col I等表达水平来抑制皮肤纤维化^[7]。

毛囊是由多细胞组成的具有周期性循环生长能力的皮肤附属器官。毛囊具有抗纤维化潜力^[8],成年小鼠创面新生毛囊周围皮肤组织接近正常皮肤,提示毛囊可能是皮肤再生的关键^[9-10]。真皮乳头细胞(dermal papilla cell, DPC)是位于毛囊基底部分的一群特化的间充质干细胞,处于诱导毛囊形态发生、维持毛囊生物学性状和调控毛囊周期循环的信号交换中心^[11]。有研究证实,DPC外囊泡(extracellular vesicle from dermal papilla cell, DPC-EV)可加快创面愈合速度,然而其是否可以抑制HS纤维化尚不明确。因此,本研究采用小鼠DPC-EV处理人HSF,并通过不同人KLF4病毒对DPC-EV处理后HSF中的KLF4进行干预,旨在明确小鼠DPC-EV对人HSF纤维化标志物的影响与其机制,为探索DPC-EV治疗HS提供理论依据。

1 材料与方法

本研究遵循空军军医大学动物实验伦理委员会和国家有关动物实验管理和使用的规定。

1.1 动物与细胞及主要试剂与仪器来源

10只6周龄体重16~18 g雄性健康无特殊病原

体级C57BL/6J小鼠购自空军军医大学动物实验中心,许可证号:SCXK(陕)2019-001。原代人HSF取自空军军医大学第一附属医院烧伤中心实验室细胞库。胎牛血清、DMEM培养基购自美国Gibco公司,兔抗小鼠KLF4单克隆抗体、兔抗小鼠GAPDH单克隆抗体均购于美国Proteintech公司,兔抗人 α -SMA单克隆抗体、兔抗人Col I单克隆抗体均购自美国Sigma公司,PBS、增强型细胞裂解液、细胞计数试剂盒8(cell counting kit 8, CCK-8)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体、Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司,人KLF4过表达及敲低病毒均购于上海吉凯基因科技有限公司。Zeta VIEW S/N 17-310型纳米颗粒跟踪分析仪购自美国Particle Metrix公司, Tecnai G2 Spirit BioTwin型透射电子显微镜购自美国FEI公司,Mini型蛋白电泳系统购自美国Bio-Rad公司,FSX100型生物导航仪购自日本Olympus公司,Axiovert 200M型倒置相差显微镜购自德国ZEISS公司,Alpha-mager™2200型凝胶图像分析系统购自美国Alpha Innotech公司。

1.2 DPC的提取与鉴定

采用显微分离结合酶消化法^[12],提取10只小鼠触须的原代DPC。将提取的原代DPC接种于培养瓶中,用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、含体积分数5%二氧化碳(常规培养条件下)培养箱中常规培养24 h后传代。取培养24 h后的第3代细胞,经免疫荧光法鉴定为DPC。

1.3 DPC-EV的提取与鉴定

取第3~5代DPC常规培养,待细胞生长达80%融合时,更换为含体积分数10%无细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)血清(将培养基中血清以100 000×g离心16 h去除血清中EV)的DMEM培养基,培养24 h后收集细胞培养上清液,超高速离心法提取DPC-EV。取适量DPC-EV,在100 kV透射电子显微镜40 000倍镜下观察形态,并采用纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径。本实验样本数为3。

1.4 DPC-EV对HSF迁移的影响

取原代人HSF,常规培养至第3代后以5×10⁶个/mL、每孔1 mL接种于6孔板中,将细胞分为

DPC-EV 组和 PBS 组。常规培养待细胞融合度达到 100% 后使用 200 μL 枪头划痕, 然后 DPC-EV 组和 PBS 组每孔分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPC-EV 2 mL 及等量 PBS 后继续常规培养。分别于划痕后 0 (即刻)、24 h, 于 100 倍倒置相差显微镜下拍照, 并计算划痕后 24 h 细胞迁移率, 细胞迁移率=(划痕后 0 h 划痕面积-划痕后 24 h 划痕面积) \div 划痕后 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。该实验样本数为 5。

1.5 DPC-EV 对 HSF 增殖的影响

取第 3 代 HSF, 以 1×10^5 个/mL、每孔 100 μL 接种于 96 孔板中常规培养。待细胞贴壁后次日更换含体积分数 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基行饥饿处理 12 h, 此时记为培养 0 h。同 1.4 分组, 分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPC-EV 100 μL 或等量 PBS 继续常规培养。于培养 0、24、48、72、96 h, 根据 CCK-8 说明书, 用酶标仪测定细胞在波长 450 nm 处的吸光度值, 以此表示细胞增殖水平。该实验样本数为 4。

1.6 DPC-EV 对 HSF 中 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达的影响

取第 3 代 HSF, 按照 50% 密度铺入盖有载玻片的 24 孔板中, 同 1.4 分组, 待细胞贴壁后, 分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPC-EV 1 mL 或等量 PBS 后继续常规培养 24 h。采用免疫荧光法观测细胞中 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达情况。一抗为兔抗人 α -SMA 单克隆抗体、兔抗人 Col I 单克隆抗体 (稀释比均为 1:100), 二抗为 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (稀释比为 1:200), 细胞核用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染色 (阳性染色为蓝色), 采用生物导航仪于物镜 10 倍放大倍数下观察细胞中 Col I (阳性染色为绿色) 和 α -SMA (阳性染色为绿色) 的表达情况。

另取第 3 代 HSF, 铺入 4 个培养瓶中, 同 1.4 分组, 待细胞贴壁后 24 h, 分别加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DPC-EV 5 mL 或等量 PBS 继续常规培养 24 h, 每组 HSF 提取 2 管总蛋白。每组取 1 管总蛋白, 采用蛋白质印迹法检测细胞中 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达情况。其中一抗为兔抗人 α -SMA 单克隆抗体、兔抗人 Col I 单克隆抗体、兔抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体 (稀释比均为 1:1 000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (稀释比为 1:5 000)。上述实验均重复 3 次。

1.7 DPC-EV 对 HSF 中 KLF4 的蛋白表达的影响

取 1.6 中剩余的每组 HSF 的 1 管总蛋白, 采用

蛋白质印迹法检测 HSF 中 KLF4 的蛋白表达情况, 其中一抗为兔抗小鼠 KLF4 单克隆抗体、兔抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体 (稀释比均为 1:1 000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (稀释比为 1:5 000)。该实验重复 3 次。

1.8 不同 KLF4 病毒感染对 DPC-EV 处理后 HSF 中 KLF4、 α -SMA、Col I 的蛋白表达的影响

取第 3 代 HSF, 加入 50 μg DPC-EV 培养 24 h 后, 按随机数字表法分为空白对照组、KLF4 敲低组和 KLF4 过表达组, 其中空白对照组细胞仅常规培养 48 h, KLF4 敲低组和 KLF4 过表达组细胞均先加入 KLF4 敲低病毒培养 24 h, 而后 KLF4 敲低组细胞常规培养 24 h, KLF4 过表达组细胞添加 KLF4 过表达病毒后培养 24 h。于培养 48 h, 采用蛋白质印迹法检测细胞中 KLF4、 α -SMA、Col I 的蛋白表达情况。一抗为兔抗小鼠 KLF4 单克隆抗体、兔抗人 α -SMA 单克隆抗体、兔抗人 Col I 单克隆抗体、兔抗小鼠 GAPDH 单克隆抗体 (稀释比均为 1:1 000), 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (稀释比为 1:5 000)。以 GAPDH 为内参照。该实验重复 3 次。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据处理。计量资料数据均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间总体比较行重复测量方差分析, 2 组间比较行 Sidak 检验或独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DPC-EV 的鉴定

培养 24 h, 提取的 DPC-EV 为囊泡状结构, 平均粒径 108.8 nm, 符合 EV 粒径, DPC-EV 鉴定成功。见图 1。

2.2 DPC-EV 对 HSF 迁移的影响

划痕后 24 h, PBS 组 HSF 的迁移率为 $(54 \pm 10)\%$, 明显高于 DPC-EV 组的 $(29 \pm 8)\%$ ($t = 4.37, P = 0.002$)。见图 2。

2.3 DPC-EV 对 HSF 增殖的影响

培养 48、72、96 h, DPC-EV 组 HSF 的增殖水平均明显低于 PBS 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 DPC-EV 对 HSF 中 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达的影响

培养 24 h, DPC-EV 组 HSF 中 α -SMA 和 Col I

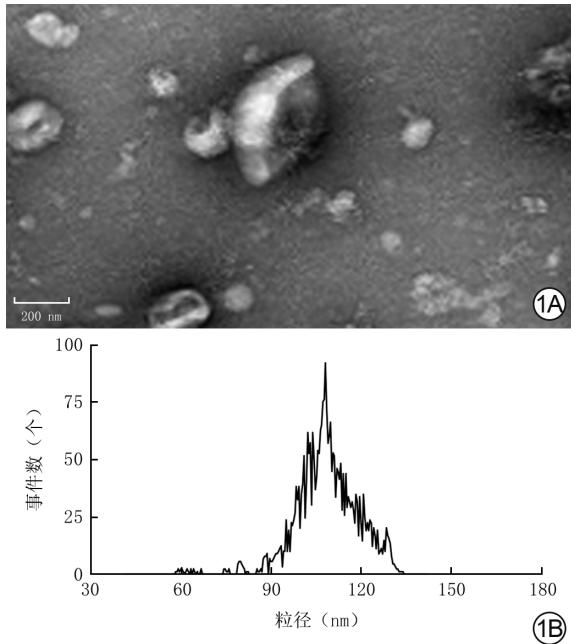


图 1 小鼠真皮乳头细胞外囊泡(DPC-EV)的鉴定。1A. DPC-EV 为囊泡状结构 透射电子显微镜×40 000;1B.DPC-EV 平均粒径为 108.8 nm,符合细胞外囊泡粒径

Figure 1 Identification of extracellular vesicles from dermal papilla cells (DPC-EVs) of mice

的蛋白表达均明显低于 PBS 组。见图 3、4。

2.5 DPC-EV 对 HSF 中 KLF4 的蛋白表达的影响

培养 24 h, DPC-EV 组 HSF 中 KLF4 的蛋白表达明显高于 PBS 组。见图 5。

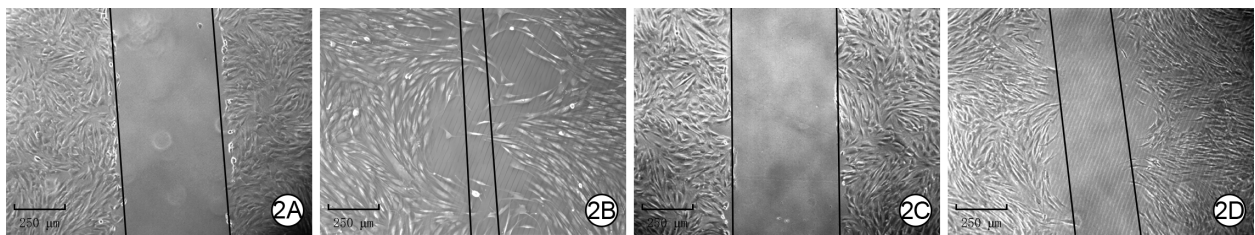
2.6 不同 KLF4 病毒感染对 DPC-EV 处理后 HSF 中 KLF4、 α -SMA、Col I 的蛋白表达的影响

培养 48 h, 与 GAPDH 比较, 空白对照组、KLF4 敲低组、KLF4 过表达组 HSF 中 KLF4 的蛋白表达分别为阳性、阴性、阳性;与 GAPDH 比较, 空白对照组 HSF 中 KLF4 的蛋白表达上调, α -SMA 及 Col I 的蛋白表达均下调。与空白对照组比较, KLF4 敲低组 HSF 中 KLF4 的蛋白表达下调, α -SMA 及 Col I 的蛋白表达上调;与 KLF4 敲低组比较, KLF4 过表达组 HSF 中的 KLF4 的蛋白表达上调, Col I 和 α -SMA 的蛋白表达均下调。见图 6。

3 讨论

HS 不仅影响美观,还会引起疼痛、瘙痒、灼热、感觉异常、瘢痕挛缩等并发症^[13-14]。HS 因在深度皮肤损伤患者中发病率高且缺乏有效的治疗策略,现已成为烧伤整形外科医师面临的重要临床挑战^[15]。本研究通过体外实验,证实小鼠 DPC-EV 可通过激活 KLF4 后调控人 HSF 的生物学行为,进而抑制 HSF 纤维化标志物的表达。

EV 是一种重要的旁分泌介质,按照其粒径大小可分为外泌体、微泡、凋亡小体。各种类型的 EV 通过将其内容物传递给受体细胞,参与细胞间的通讯并影响受体细胞相关基因的表达。因此,它们可



注:图中竖/斜线为细胞迁移的边缘线;磷酸盐缓冲液(PBS)组加入 PBS,真皮乳头细胞外囊泡(DPC-EV)组加入 DPC-EV

图 2 2 组人增生性瘢痕成纤维细胞划痕后 24 h 的迁移情况 倒置相差显微镜×100。2A、2B. 分别为 PBS 组在划痕后 0(即刻)、24 h 的划痕情况;2C、2D. 分别为 DPC-EV 组在划痕后 0、24 h 的划痕情况,图 2D 的细胞迁移较图 2B 少

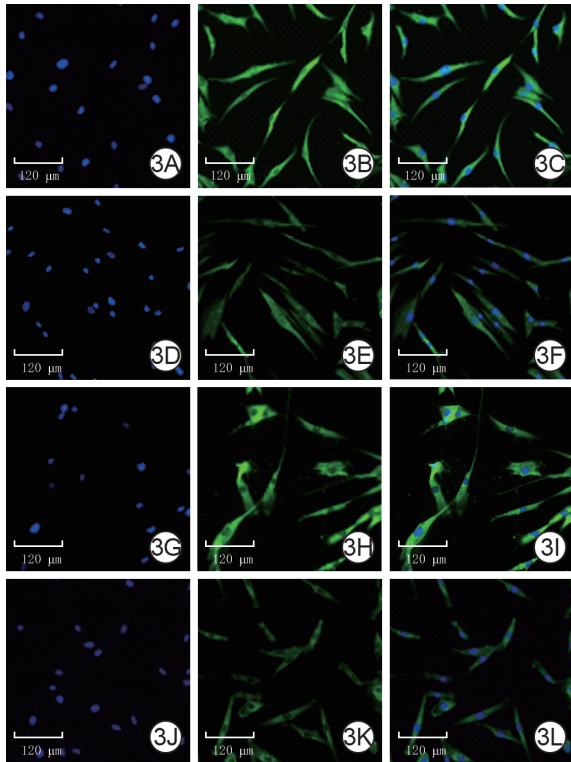
Figure 2 Migration of human hypertrophic scar fibroblasts at 24 h after scratching in the two groups

表 1 2 组人增生性瘢痕成纤维细胞培养各时间点细胞增殖水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cell proliferation levels of human hypertrophic scar fibroblasts at different time points of cell culture between the two groups

组别	样本数	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
PBS 组	4	0.213±0.012	0.607±0.100	0.907±0.088	1.287±0.065	1.504±0.064
DPC-EV 组	4	0.216±0.018	0.444±0.051	0.672±0.075	1.033±0.059	1.195±0.073
t 值		0.26	2.89	4.06	5.76	6.41
P 值		0.999	0.181	0.035	0.006	0.004

注:0 h 为行饥饿处理 12 h 后、真皮乳头细胞外囊泡(DPC-EV)组加入 DPC-EV 或磷酸盐缓冲液(PBS)组加入 PBS 前;处理因素主效应, $F=80.93, P<0.001$;时间因素主效应, $F=391.40, P<0.001$;两者交互作用, $F=6.73, P<0.001$

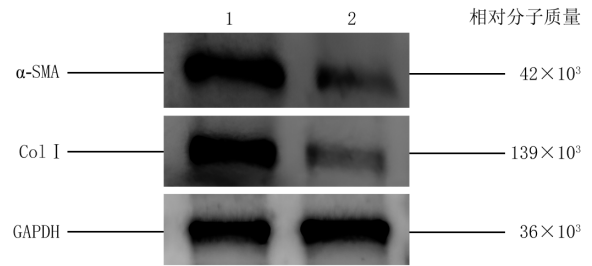


注: α -SMA 为 α 平滑肌肌动蛋白, 其阳性染色为绿色; Col I 为 I 型胶原蛋白, 其阳性染色为绿色; 细胞核阳性染色为蓝色; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 组加入 PBS, 真皮乳头细胞外囊泡 (DPC-EV) 组加入 DPC-EV

图 3 免疫荧光法检测的 2 组人增生性瘢痕成纤维细胞培养 24 h 后 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达 Alexa Fluor 488-4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 $\times 10$ 。3A、3B、3C. 分别为 PBS 组细胞核染色、 α -SMA 染色、细胞核与 α -SMA 染色重叠图片, α -SMA 的蛋白表达较多; 3D、3E、3F. 分别为 DPC-EV 组的细胞核染色、 α -SMA 染色、细胞核与 α -SMA 染色重叠图片, 图 3E 细胞质中 α -SMA 的蛋白表达较图 3B 明显减少; 3G、3H、3I. 分别为 PBS 组细胞核染色、Col I 染色、细胞核与 Col I 染色重叠图片, Col I 的蛋白表达较多; 3J、3K、3L. 分别为 DPC-EV 组细胞核染色、Col I 染色、细胞核与 Col I 染色重叠图片, 图 3K 细胞质中 Col I 的蛋白表达较图 3H 明显减少

Figure 3 The protein expressions of α -SMA and Col I in human hypertrophic scar fibroblasts of two groups at 24 h after culture detected by immunofluorescence method

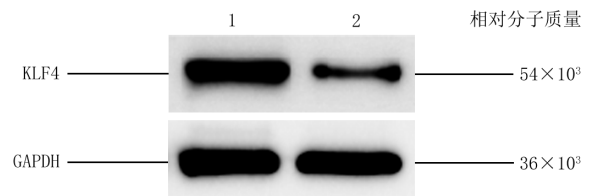
以影响机体许多的生理和病理过程。EV 具有许多显著的优势, 如可穿越血脑屏障、无免疫原性、可多次静脉注射、不良反应小等, 使其在药物研发中备受关注^[16-17]。近年来, 间充质干细胞来源的 EV 已被证实能缓解纤维化疾病的进展中起重要作用^[18]。此外, 长期换药的慢性创面患者的毛囊周围总是可见新生皮岛, 更有趣的是, 毛囊周围的皮肤似乎趋于正常, 其下形成了一层脂肪, 通常不会形成 HS。研究表明, 毛囊可通过旁分泌因子将 Fb 转化为脂



注: α -SMA 为 α 平滑肌肌动蛋白, Col I 为 I 型胶原蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, PBS 为磷酸盐缓冲液, DPC-EV 为真皮乳头细胞外囊泡; 条带上方 1、2 分别指示加入 PBS 的 PBS 组和加入 DPC-EV 的 DPC-EV 组

图 4 蛋白质印迹法检测的 2 组人增生性瘢痕成纤维细胞培养 24 h 后 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达

Figure 4 The protein expressions of α -SMA and Col I in human hypertrophic scar fibroblasts of two groups at 24 h after culture detected by Western blotting



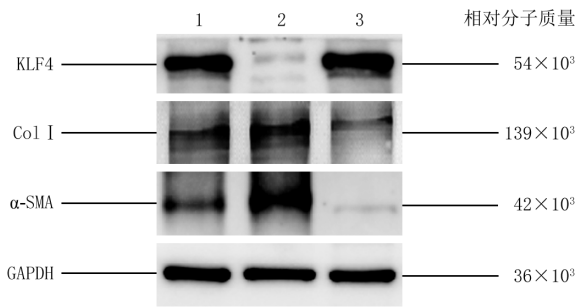
注: KLF4 为 Krüppel 样因子 4, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, PBS 为磷酸盐缓冲液, DPC-EV 为真皮乳头细胞外囊泡; 条带上方 1、2 分别指示加入 DPC-EV 的 DPC-EV 组和加入 PBS 的 PBS 组

图 5 蛋白质印迹法检测的 2 组人增生性瘢痕成纤维细胞培养 24 h 后 KLF4 的蛋白表达

Figure 5 The protein expression of KLF4 in human hypertrophic scar fibroblasts of two groups at 24 h after culture detected by Western blotting

肪细胞^[9]。毛囊在体表广泛分布, 可通过拔毛等非侵入性方式获取, 而 DPC 因具有强大的 EV、多种生长因子等旁分泌功能使其处于毛囊生长发育中串联真皮与表皮信号交换的中心位置。故本研究团队选取了与传统间充质干细胞不同的 DPC 作为 EV 的来源细胞, 探究 DPC-EV 对 HSF 纤维化标志物的影响, 以期 DPC-EV 治疗 HS 纤维化提供理论依据。

HS 组织中, 真皮的 Fb 和肌 Fb 被认为是最主要的细胞, 在 HS 进展过程中, HS 组织中胶原蛋白的表达量较正常组织中显著升高, Fb 被激活并分化为肌 Fb, 其特征是表达 α -SMA 并形成肌动蛋白收缩束以及张力纤维束^[19-21]。肌 Fb 的主要作用是在组织修复过程中产生大量胶原, 并收缩创面促进再上皮化和组织完整性的恢复^[22]。肌 Fb 的过度活跃造成创面挛缩、张力增加, 同时分泌大量 Col I,



注: KLF4 为 Krüppel 样因子 4, Col I 为 I 型胶原蛋白, α -SMA 为 α 平滑肌肌动蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 条带上方 1、2、3 分别指空白对照组、KLF4 敲低组、KLF4 过表达组; 空白对照组细胞仅常规培养, KLF4 敲低组细胞先加入 KLF4 敲低病毒培养再常规培养, KLF4 过表达组细胞先加入 KLF4 敲低病毒培养再加入 KLF4 过表达病毒培养

图 6 蛋白质印迹法检测的 3 组增生性瘢痕成纤维细胞培养 48 h 后 KLF4、Col I、 α -SMA 的蛋白表达

Figure 6 The protein expressions of KLF4, Col I, and α -SMA in human hypertrophic scar fibroblasts of three groups at 48 h after culture detected by Western blotting

这是 HS 形成的重要表现。本研究使用人 HS 组织来源的 HSF, 该组织来源的细胞已被证明含有大量肌 Fb, 现已成为瘢痕研究的常用细胞模型^[7,23]。研究表明, HSF 的阳性标记主要为纤维连接蛋白 ED-A⁺、 α -SMA⁺、合成 Col I、产生基质胶联酶^[20]。本研究结果显示与用 PBS 处理比较, 用小鼠 DPC-EV 处理 24 h 后的人 HSF 中 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达均明显下调, 表明 DPC-EV 处理可下调 HSF 纤维化标志物的表达。

研究显示, KLF4 具有阻滞细胞周期和参与调控多种器官纤维化疾病进展的功能。例如, 小鼠胚胎 Fb 在增殖活跃时 KLF4 的表达水平较低, 但当细胞进入静止期时 KLF4 表达升高^[24]。在本研究中, CCK-8 实验结果表明, 与 PBS 组比较, DPC-EV 组人 HSF 培养 48、72、96 h 的细胞增殖水平明显降低; 同时, 细胞划痕试验表明, DPC-EV 可显著抑制人 HSF 的迁移能力, 其机制可能与 KLF4 抑制了 HSF 的增殖和纤维化进展相关。研究显示, 沉默小鼠平滑肌的血管外膜干细胞抗原 1 细胞的 KLF4 可以促进血管外膜细胞的增殖和分化, 促进纤维化肌 Fb 转化, 从而加速血管纤维化^[25]。有学者报道, 敲除 KLF4 可导致小鼠巨噬细胞 Col I、Col III 和 α -SMA 的表达升高, 加剧 TNF- α 介导的肾损伤和纤维化^[26]。对肝硬化患者和大鼠肝脏的研究均显示, 肝星状细胞中 KLF4 的 mRNA 和蛋白水平均显著下调; 在原代大鼠肝星状细胞中通过特异性小干扰

RNA 抑制 KLF4 后, 其 α -SMA 和 Col I 表达均增加。同时, KLF4 表达的上调可使大鼠原代肝星状细胞中 α -SMA 和 Col I 的表达均减少^[27]。以上结果说明 KLF4 在上游的表达增加可降低 α -SMA 和 Col I 的表达, 从而减少多种组织器官纤维化的发生。本课题组前期研究显示, 三维培养后的小鼠 DPC-EV 可通过 KLF4/VEGFA 通路调控血管成熟进而促进小鼠创面愈合, 同时 KLF4 可通过抑制肌 Fb 活化来缓解 HS 纤维化^[7,28]。故本研究选取 KLF4 作为 HSF 中调控纤维化的分子, 以探究 DPC-EV 中抗纤维化的作用靶点。对 DPC-EV 处理后 HSF 中 KLF4 的蛋白表达的检测结果显示, 与 PBS 组比较, DPC-EV 组 HSF 中 KLF4 的蛋白表达明显升高, 该结果与本研究团队设想的一致。而后, 本研究团队分别通过不同 KLF4 质粒转染 DPC-EV 处理后的 HSF, 结果显示 DPC-EV 处理后空白对照组 HSF 中 KLF4 蛋白表达上调的同时, 伴随着 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达下调; KLF4 敲低组 HSF 中 KLF4 阴性表达伴随着 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达上调; KLF4 过表达组 HSF 可恢复 KLF4 的蛋白表达, 同时 α -SMA 和 Col I 的蛋白表达被抑制。以上结果提示, 小鼠 DPC-EV 处理后人 HSF 中 KLF4 蛋白的升高可以抑制人 HSF 中 Col I 和 α -SMA 的蛋白表达, 抑制人肌 Fb 活化, 从而减少纤维化相关蛋白的产生。即小鼠 DPC-EV 可通过激活 KLF4, 抑制人 HSF 纤维化标志物的表达。

尽管本研究证实 DPC-EV 在 HSF 中具有显著的抗纤维化效果, 然而本次实验对相关机制的研究还不够深入。有研究表明, 毛囊的抗纤维化作用与骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 家族密切相关, DPC 负责毛囊循环的发展和调节, 毛囊内部的 DPC 因具有 BMP 的表达活性而保留了毛囊的抗纤维化潜力^[9]。同时, 有研究报道, KLF4 可直接靶向 BMP4 调控人 Fb 向肌 Fb 的转分化^[7]。因此, 未来本研究团队还应进一步探索 KLF4 翻译后修饰的途径, 进一步完善 KLF4 下游的调控机制。此外, EV 中富含大量功能蛋白和 RNA, 本研究团队还应深入研究 DPC-EV 的功能成分, 明确其改变 KLF4 的蛋白质稳定性、DNA 结合能力和转录活性来调控其抗纤维化功能的具体机制, 为 DPC-EV 未来的临床应用奠定理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 王运帷、张浩、曹鹏: 实验操作、论文撰写; 张万福、官浩: 研究指导、论文修改、经费支持; 佟琳、李少琿: 技术和材料支

持;陈阳、韩超:数据整理、统计分析

参考文献

- [1] Li Y, Zhang JL, Zhang W, et al. MicroRNA-192 regulates hypertrophic scar fibrosis by targeting SIP1[J]. *J Mol Histol*, 2017, 48(5/6): 357-366. DOI: 10.1007/s10735-017-9734-3.
- [2] Ma K, Kwon SH, Padmanabhan J, et al. Controlled delivery of a focal adhesion kinase inhibitor results in accelerated wound closure with decreased scar formation[J]. *J Invest Dermatol*, 2018, 138(11): 2452-2460. DOI: 10.1016/j.jid.2018.04.034.
- [3] Li Y, Zhang J, Shi JH, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells attenuate hypertrophic scar fibrosis by miR-192-5p/IL-17RA/Smad axis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 221. DOI: 10.1186/s13287-021-02290-0.
- [4] Li C, Wei SQ, Xu QC, et al. Application of ADSCs and their exosomes in scar prevention[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2022, 18(3): 952-967. DOI: 10.1007/s12015-021-10252-5.
- [5] 曹鹏, 王运帷, 官浩, 等. 机械张力对兔耳增生性瘢痕的形成及转化生长因子 β_1 /Smad 信号通路的影响[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2022, 38(12): 1162-1169. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211213-00412.
- [6] 王运帷, 刘洋, 曹鹏, 等. Krüppel 样因子 4 对脓毒症小鼠炎症反应与脏器损伤的作用[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2022, 38(11): 1047-1056. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20220111-00005.
- [7] Wang J, Zhao M, Zhang HY, et al. KLF4 alleviates hypertrophic scar fibrosis by directly activating BMP4 transcription[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(8): 3324-3336. DOI: 10.7150/ijbs.71167.
- [8] Rippa AL, Kalabusheva EP, Vorotelyak EA. Regeneration of dermis: scarring and cells involved[J]. *Cells*, 2019, 8(6): 607. DOI: 10.3390/cells8060607.
- [9] Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing[J]. *Science*, 2017, 355(6326): 748-752. DOI: 10.1126/science.aai8792.
- [10] 周圳滔, 赵沁园, 赵钧, 等. 毛囊及相关干细胞在创面无瘢痕愈合中的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021, 35(2): 241-245. DOI: 10.7507/1002-1892.202005086.
- [11] 王运帷, 罗亮, 曹鹏, 等. 真皮乳头细胞分离培养技术的研究进展[J/CD]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2022, 17(6): 520-523. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2022.06.010.
- [12] Topouzi H, Logan NJ, Williams G, et al. Methods for the isolation and 3D culture of dermal papilla cells from human hair follicles[J]. *Exp Dermatol*, 2017, 26(6): 491-496. DOI: 10.1111/exd.13368.
- [13] Huang CY, Ogawa R. Systemic factors that shape cutaneous pathological scarring[J]. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13171-13184. DOI: 10.1096/fj.202001157R.
- [14] Griffin MF, desJardins-Park HE, Mascharak S, et al. Understanding the impact of fibroblast heterogeneity on skin fibrosis[J]. *Dis Model Mech*, 2020, 13(6): dmm044164. DOI: 10.1242/dmm.044164.
- [15] Finnerty CC, Jeschke MG, Branski LK, et al. Hypertrophic scarring: the greatest unmet challenge after burn injury[J]. *Lancet*, 2016, 388(10052): 1427-1436. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31406-4.
- [16] Lou GH, Chen Z, Zheng M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(6): e346. DOI: 10.1038/emmm.2017.63.
- [17] Zhao AG, Shah K, Cromer B, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and their therapeutic potential[J]. *Stem Cells Int*, 2020, 2020: 8825771. DOI: 10.1155/2020/8825771.
- [18] Tian SY, Zhou X, Zhang M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect against liver fibrosis via delivering miR-148a to target KLF6/STAT3 pathway in macrophages[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 330. DOI: 10.1186/s13287-022-03010-y.
- [19] Kamolz LP, Hecker A. Molecular mechanisms related to burns, burn wound healing and scarring[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8785. DOI: 10.3390/ijms24108785.
- [20] Mony MP, Harmon KA, Hess R, et al. An updated review of hypertrophic scarring[J]. *Cells*, 2023, 12(5): 678. DOI: 10.3390/cells12050678.
- [21] Angelini A, Trial J, Ortiz-Urbina J, et al. Mechanosensing dysregulation in the fibroblast: a hallmark of the aging heart[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 63: 101150. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101150.
- [22] Hinz B. Myofibroblasts[J]. *Exp Eye Res*, 2016, 142: 56-70. DOI: 10.1016/j.exer.2015.07.009.
- [23] Zhao W, Zhang R, Zang CY, et al. Exosome derived from mesenchymal stem cells alleviates pathological scars by inhibiting the proliferation, migration and protein expression of fibroblasts via delivering miR-138-5p to target SIRT1[J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 4023-4038. DOI: 10.2147/IJN.S377317.
- [24] Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(33): 20009-20017. DOI: 10.1074/jbc.271.33.20009.
- [25] Lu SZ, Jolly AJ, Strand KA, et al. Smooth muscle-derived progenitor cell myofibroblast differentiation through KLF4 downregulation promotes arterial remodeling and fibrosis[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(23): e139445. DOI: 10.1172/jci.insight.139445.
- [26] Wen Y, Lu XH, Ren JF, et al. KLF4 in macrophages attenuates TNF α -mediated kidney injury and fibrosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(10): 1925-1938. DOI: 10.1681/ASN.2019020111.
- [27] Handa P, Thomas S, Morgan-Stevenson V, et al. Iron alters macrophage polarization status and leads to steatohepatitis and fibrogenesis[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(5): 1015-1026. DOI: 10.1002/JLB.3A0318-108R.
- [28] Wang YW, Shen K, Sun YL, et al. Extracellular vesicles from 3D cultured dermal papilla cells improve wound healing via Krüppel-like factor 4/vascular endothelial growth factor A -driven angiogenesis[J/OL]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkad034[2023-11-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37908562/>. DOI: 10.1093/burnst/tkad034.

(收稿日期:2023-11-07)