

· 论著 · 细胞治疗与创面修复 ·

本文亮点:

- (1) 检测到糖尿病周围神经病变患者神经组织中神经鞘胚素蛋白表达降低,推测神经鞘胚素蛋白表达降低与糖尿病周围神经病变的发生、发展存在一定相关性。
- (2) 证实人脂肪干细胞外泌体可以减轻高糖对施万细胞增殖的抑制作用,该作用的发挥可能与神经鞘胚素蛋白表达改变相关。

Highlights:

- (1) It was detected that the protein expression of artemin in the nerve tissue of patients with diabetic peripheral neuropathy was decreased, speculating that the decreased protein expression of artemin may be related to the occurrence and development of diabetic peripheral neuropathy.
- (2) It was confirmed that human adipose-derived stem cell exosomes can alleviate the inhibitory effect of high glucose on the proliferation of Schwann cells, and this effect may be related to the change of artemin protein expression.



人脂肪干细胞外泌体对糖尿病周围神经病变的作用及其机制

曹涛¹ 郝彤¹ 肖丹¹ 张伟锋² 计鹏¹ 贾艳慧¹ 王婧³ 王许杰¹ 官浩¹ 陶克⁴

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陕西师范大学生命科学院,西安 710032;³解放军 63600 部队医院急诊科,酒泉 712750;
⁴温州医科大学附属第一医院创面修复与再生医学中心创面修复科,温州 325015

通信作者:陶克,Email:tao-ke2001@163.com

【摘要】 目的 探讨糖尿病周围神经病变(DPN)中神经鞘胚素蛋白表达的变化及人脂肪干细胞(ADSC)外泌体对神经鞘胚素蛋白表达变化的调节作用。 方法 该研究为前瞻性观察性临床研究联合实验研究。将空军军医大学第一附属医院(以下简称本院)2022年5月—2023年10月收治的13例符合入选标准的DPN患者(男9例、女4例,年龄32~68岁)作为DPN组,将本院该段时间收治的5例符合入选标准的非糖尿病患者(男4例、女1例,年龄29~61岁)作为对照组。采集2组患者清创或截肢后弃用组织中的趾神经或腓肠神经组织,行苏木精-伊红染色后观察神经组织的病理学变化,行免疫荧光染色后观察神经组织中S100 β 、神经鞘胚素的蛋白表达并对神经鞘胚素蛋白表达进行定量,分别采用蛋白质印迹法和实时荧光定量反转录PCR法检测神经鞘胚素的蛋白和mRNA表达(DPN组样本数均为13,对照组样本数均为5)。取12只雄性3~5 d龄C57BL/6小鼠,提取施万细胞,并将细胞分为常规培养组(常规培养)、单纯高糖组(仅用高浓度葡萄糖溶液培养)、高糖+外泌体组(用高浓度葡萄糖溶液和提取的人ADSC外泌体培养)。培养24 h后,采用细胞计数试剂盒8检测细胞增殖活力(样本数为6);培养48 h后,采用蛋白质印迹法检测神经鞘胚素的蛋白表达(样本数为3)。 结果 相较于对照组,DPN组患者神经组织中神经支持细胞减少、炎症细胞增多,具有典型的神经损伤表现。

DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20231207-00230

本文引用格式:曹涛,郝彤,肖丹,等.人脂肪干细胞外泌体对糖尿病周围神经病变的作用及其机制[J].中华烧伤与创面修复杂志,2024,40(3):240-248. DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20231207-00230.

Cao T, Hao T, Xiao D, et al. Effect and mechanism of human adipose-derived stem cell exosomes on diabetic peripheral neuropathy[J]. Chin J Burns Wounds, 2024, 40(3): 240-248. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20231207-00230.



免疫荧光染色检测显示,相较于对照组,DPN 组患者神经组织中细胞核更多,S100 β 的蛋白表达更少; DPN 组患者神经组织中神经鞘肽素蛋白表达为 71 ± 31 ,明显低于对照组的 $1\ 729\pm 62$ ($t=76.92, P<0.05$)。蛋白质印迹法检测显示,DPN 组患者神经组织中的神经鞘肽素蛋白表达为 0.74 ± 0.08 ,明显低于对照组的 0.97 ± 0.06 ($t=5.49, P<0.05$)。DPN 组患者神经组织中神经鞘肽素的 mRNA 表达明显低于对照组 ($t=7.65, P<0.05$)。培养 24 h 后,与常规培养组比较,单纯高糖组和高糖+外泌体组施万细胞增殖活力均明显降低 ($P<0.05$);与单纯高糖组比较,高糖+外泌体组施万细胞增殖活力明显升高 ($P<0.05$)。培养 48 h 后,与常规培养组比较,单纯高糖组、高糖+外泌体组施万细胞神经鞘肽素蛋白表达均明显降低 ($P<0.05$);与单纯高糖组比较,高糖+外泌体组施万细胞神经鞘肽素蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)。 **结论** DPN 患者神经组织中神经鞘肽素的蛋白表达较正常神经组织降低,这可能与高糖降低了施万细胞增殖活力相关;人 ADSC 外泌体可能通过提高神经鞘肽素蛋白表达,改善施万细胞增殖活力,进而延缓 DPN 的进展。

【关键词】 糖尿病神经病变; 外泌体; 细胞增殖; 施万细胞; 神经鞘肽素; 脂肪干细胞
基金项目:国家自然科学基金面上项目(82272269)

Effect and mechanism of human adipose-derived stem cell exosomes on diabetic peripheral neuropathy

Cao Tao¹, Hao Tong¹, Xiao Dan¹, Zhang Weifeng², Ji Peng¹, Jia Yanhui¹, Wang Jing³, Wang Xujie¹, Guan Hao¹, Tao Ke⁴

¹Department of Burns and Cutaneous Surgery, Burn Center of PLA, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; ²College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710032, China; ³Department of Emergency, PLA 63600 Army Hospital, Jiuquan 712750, China;

⁴Department of Wound Repair, Center for Wound Repair and Regenerative Medicine, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325015, China

Corresponding author: Tao Ke, Email: tao-ke2001@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes of artemin protein expression in diabetic peripheral neuropathy (DPN) and to explore the regulatory effect of human adipose-derived stem cell (ADSC) exosomes on the change of artemin protein expression. **Methods** This research was a prospective observational clinical research combined with experimental research. Thirteen DPN patients (9 males and 4 females, aged 32 to 68 years) who were admitted to the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University (hereinafter referred to as our hospital) from May 2022 to October 2023 and met the inclusion criteria were selected as DPN group, and 5 non-diabetes patients (4 males and 1 female, aged 29 to 61 years) who were admitted to our hospital in the same period of time and met the inclusion criteria were selected as control group. The toe nerve or sural nerve tissue in the abandoned tissue after debridement or amputation of patients in the two groups was collected. The pathological changes of nerve tissue were observed after hematoxylin-eosin staining; the protein expressions of S100 β and artemin in nerve tissue were observed after immunofluorescence staining, and the artemin protein expression was quantified; the protein and mRNA expressions of artemin were detected by Western blotting and real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, respectively (the sample number in DPN group and control group was 13 and 5, respectively). Twelve male C57BL/6 mice aged 3 to 5 days were collected to isolate Schwann cells, and the cells were divided into conventional culture group cultured routinely, high glucose alone group (cultured with high concentration of glucose solution only), and high glucose+exosome group (cultured with high concentration of glucose solution and extracted human ADSC exosomes). After 24 hours of culture, the cell proliferation activity was detected by cell counting kit 8 ($n=6$). After 48 hours of culture, the protein expression of artemin was detected by Western blotting ($n=3$). **Results** Compared with those in control group, the neural supporting cells decreased and the inflammatory cells increased in the nerve tissue of patients in DPN group, showing typical manifestations of nerve injury. Immunofluorescence staining showed that compared with those in control group, the nuclei was more, and the protein expression of S100 β was lower in nerve tissue of patients in DPN group. The protein expression of artemin in nerve tissue of patients in DPN group was 71 ± 31 , which was significantly lower than $1\ 729\pm 62$ in control group ($t=76.92, P<0.05$). Western blotting detection showed that the protein expression of artemin in nerve tissue of patients in DPN group was 0.74 ± 0.08 , which was significantly lower than 0.97 ± 0.06 in control group ($t=5.49, P<0.05$). The artemin mRNA expression in nerve tissue of

patients in DPN group was significantly lower than that in control group ($t=7.65, P<0.05$). After 24 hours of culture, compared with that in conventional culture group, the proliferation activities of Schwann cells in high glucose alone group and high glucose+exosome group were significantly decreased ($P<0.05$); compared with that in high glucose alone group, the proliferation activity of Schwann cells in high glucose+exosome group was significantly increased ($P<0.05$). After 48 hours of culture, compared with those in conventional culture group, the protein expressions of artemin of Schwann cells in high glucose alone group and high glucose+exosome group were significantly decreased ($P<0.05$); compared with that in high glucose alone group, the protein expression of artemin of Schwann cells in high glucose+exosome group was significantly increased ($P<0.05$).

Conclusions The protein expression of artemin in nerve tissue of DPN patients is lower than that in normal nerve tissue, which may be related to the reduction of proliferation activity of Schwann cells by high glucose. Human ADSC exosomes may improve the proliferation activity of Schwann cells by increasing artemin protein expression, thereby delaying the progression of DPN.

【Key words】 Diabetic neuropathies; Exosomes; Cell proliferation; Schwann cells; Artemin; Adipose-derived stem cells

Fund program: General Program of National Natural Science Foundation of China (82272269)

糖尿病已成为继心血管、肿瘤、获得性免疫缺陷综合征之后的第四大致死性疾病,严重威胁人类健康^[1-3]。糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)是糖尿病常见的并发症之一。据报道,糖尿病患者中 DPN 的发生率为 10.31%~69.2%^[4-6]。DPN 主要累及周围神经,导致其功能障碍,进一步引发致残性神经疼痛,50%~75%的非创伤性截肢由 DPN 引起,且其与糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)的发生、发展密切相关^[7-10]。目前 DPN 的发病机制暂未被完全阐明,DPN 的主要治疗方法为基础治疗、手术治疗及脊髓电刺激治疗等,但这些方法的治疗效果差异较大,亟待基于其病因,寻找更为有效的治疗方法^[11]。

施万细胞是周围神经系统中的神经营养细胞,可分泌多种细胞因子,除了具有保护神经纤维的作用外,在各类神经损伤修复中也起到关键性作用^[12-13]。在 DPN 中,炎症、高血糖、氧化应激等导致施万细胞受损,不能发挥其分泌及保护神经纤维的作用,从而导致周围神经损伤程度不断加重^[14-15]。神经鞘肽素是施万细胞分泌的一种神经营养因子,在神经修复过程中发挥重要作用^[16]。在神经性疼痛、神经损伤等疾病中,髓鞘组织中的神经鞘肽素蛋白的分泌量均明显减少,DPN 组织中神经鞘肽素分泌是否受阻目前尚不清楚^[17-19]。本研究旨在探讨 DPN 中神经鞘肽素蛋白的表达及人脂肪干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)外泌体对神经鞘肽素蛋白表达的影响,以寻找改善 DPN 的方法。

1 资料与方法

本前瞻性观察性临床研究通过空军军医大学

第一附属医院(以下简称本院)伦理委员会审批,批号:KY20232327-F-1 号。本实验研究中对实验动物的处理符合国家和本院动物伦理委员会的有关规定。

1.1 动物及主要试剂与仪器来源

12 只健康无特殊病原体级雄性 3~5 d 龄 C57BL/6 小鼠由空军军医大学动物中心提供,许可证号:SYXK(军)2019-001。化学发光检测试剂盒、蛋白定量测定试剂盒、细胞计数试剂盒 8、总 RNA 提取试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,反转录试剂盒及 PCR 检测试剂盒均购自日本 Takara 公司,乙二胺四乙酸抗原修复液(pH 值为 9.0)、40 g/L 多聚甲醛、HE 染色试剂盒、二氨基联苯胺显色试剂盒、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的酪胺、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体、花青素 3 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体均购自武汉赛维尔生物科技有限公司,多聚-D-赖氨酸、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自美国 Sigma 公司, FITC 标记的兔抗人 CD9、CD63、CD81 单克隆抗体均购自美国 CST 公司,兔抗小鼠 S100 β 、神经鞘肽素、微管蛋白单克隆抗体及兔抗人 S100 β 、神经鞘肽素、微管蛋白单克隆抗体均购自美国 Abcam 公司。

Mini 型蛋白电泳系统、DS-U3 型成像系统(包含荧光显微镜)购自日本尼康公司,Chemi DOC 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司, KZ-III -FP 型高速低温组织研磨仪购自武汉赛维尔生物科技有限公司,二氧化碳培养箱购自美国 ThermoFisher

Scientific 公司, FACS Aria III 型流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司, Optima™ XPN 型超高速离心机购自美国 Beckman 公司, N30E 型粒径分析仪购自厦门福流生物科技有限公司, Infinite M200 Pro 型全波长多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 公司, HT-7700 型透射电子显微镜购自日本 Hitachi 公司, Axiovert 5 型倒置相差显微镜购自德国 ZEISS 公司。

1.2 病例入选标准

纳入标准:(1)年龄 18~80 岁。(2)临床资料完整。(3)DPN 患者符合《中国糖尿病足防治指南(2019 版)(I)》^[20]的 DFU 诊断标准,伴有神经性疼痛或感觉异常的临床表现,确诊为 DPN 并需在本院住院行清创手术治疗;对照患者为非糖尿病患者,因创伤等非神经病变因素需在本院行清创或截肢术。(3)患者或患者家属充分了解研究内容并签署知情同意书。

排除标准:(1)患急性或慢性感染或炎性疾病;(2)患风湿性疾病等;(3)患严重的肺、肝或血液疾病;(4)患严重肾脏疾病需行肾透析;(5)患恶性肿瘤。

1.3 样本量计算与临床资料及分组

本研究将人外周神经组织中神经鞘胚素的 mRNA 表达量作为主要评价指标,根据该指标的预估值进行样本量计算。设检验效能 $(1-\beta)=90\%$,双侧检验,显著水平 $\alpha=0.05$,对照组与 DPN 组样本比例为 1.0:2.5;根据预试验结果,2 组间神经鞘胚素的 mRNA 表达量的差异为 2.2,样本标准差为 1.2,使用 PASS 15 软件(美国 NCSS 公司)计算得出对照组样本量为 5、DPN 组样本量为 13。

将本院 2022 年 5 月—2023 年 10 月收治的 13 例符合入选标准的 DPN 患者(其中男 9 例、女 4 例,年龄 32~68 岁)作为 DPN 组,将本院该段时间收治的 5 例肢体毁损伤或严重外伤的非糖尿病患者(其中男 4 例、女 1 例,年龄 29~61 岁)作为对照组。

1.4 样本采集及指标观测

1.4.1 样本采集及处理 采集 DPN 组患者下肢清创组织中活力欠佳的趾神经或腓肠神经组织与对照患者清创或截肢后弃用组织中的趾神经或腓肠神经,将采集的 2 组患者的神经组织均部分用液氮冻存,部分用多聚甲醛固定。

1.4.1.1 HE 染色观察神经组织的形态 取多聚甲醛固定的 2 组患者神经组织,进行石蜡包埋并

切片(厚 5 μm),行常规 HE 染色,于成像系统的 20 倍镜下观察神经组织的病理学变化。

1.4.1.2 免疫荧光染色观测神经组织中 S100 β 与神经鞘胚素的蛋白表达 取多聚甲醛固定的 2 组患者神经组织,进行石蜡包埋并切片(厚 5 μm),进行常规抗原修复后用于免疫荧光双染,使用的一抗为兔抗人 S100 β 单克隆抗体(稀释比为 1:100)、兔抗人神经鞘胚素单克隆抗体(稀释比为 1:200),二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:200)、FITC 标记的酪胺(稀释比为 1:500)、花青素 3 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:200),细胞核染色试剂为 DAPI(阳性染色为蓝色)。于成像系统的 20 倍镜下观察 S100 β (阳性染色为绿色)、神经鞘胚素(阳性染色为红色)蛋白的总体表达情况;另外于成像系统的 200 倍镜下观察神经鞘胚素的表达情况,用 ImageJ 软件(美国国立卫生研究院)分析总荧光强度,以此反映神经鞘胚素的蛋白表达,每张切片选取 5 个视野,结果取均值。

1.4.1.3 蛋白质印迹法检测神经组织中神经鞘胚素的蛋白表达 取液氮冻存的 2 组患者神经组织,使用低温组织研磨仪研磨后,常规提取总蛋白,采用蛋白质印迹法检测神经鞘胚素的蛋白表达。一抗分别为兔抗人神经鞘胚素单克隆抗体(稀释比为 1:1 000)、兔抗人微管蛋白单克隆抗体(稀释比 1:5 000),二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:300)。采用凝胶成像仪自带凝胶图像分析系统获取图像后,采用 ImageJ 软件行灰度分析,以微管蛋白为内参照,计算神经鞘胚素与内参照的灰度值比值,以此表示神经鞘胚素蛋白的表达(数据处理后用)。该实验重复 3 次,结果取均值。

1.4.1.4 神经组织中神经鞘胚素的 mRNA 表达 取液氮冻存的 2 组患者的神经组织,使用低温组织研磨仪研磨后,常规提取总 mRNA。采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测神经鞘胚素的 mRNA 表达, GAPDH 上游引物为 5'-GGACCTGACCTGCCGTC-TAG-3',下游引物为 5'-GTAGCCCAGGATGCCCTT-GA-3',产物大小为 168 bp;神经鞘胚素上游引物为 5'-ATGGAACCTGGACTTGGAGG-3',下游引物为 5'-TCAGCCCAGGCAGCCGCAGGC-3',产物大小为 98 bp。以 GAPDH 为内参照,基于 Δ 循环阈值对神经鞘胚素的 mRNA 表达进行定量。该实验重复

3 次,结果取均值。

1.4.2 人 ADSC 外泌体的提取及鉴定 取 3 名 2023 年 2—5 月于本院行腹部抽脂术的健康女性志愿者(18~30 岁)术后弃用脂肪组织(均签署知情同意书),按照常规方法剪碎、消化、过滤、离心后用含体积分数 10% 胎牛血清及 50 g/L 青霉素和链霉素混合液的 α 最低基本培养基(以下称完全培养基)重新悬浮,然后将细胞接种至直径为 10 cm 的培养皿中进行常规培养,每 2~3 天换液 1 次,待细胞生长至 80%~90% 融合时,进行传代。取第 3~6 代人 ADSC,待细胞生长至 80% 融合时,更换无外泌体的完全培养基继续培养,24 h 后收集上清液,采用密度梯度离心法提取外泌体^[21]。在 80 kV 透射电子显微镜 40 000 倍镜下观察外泌体形态,采用粒径分析仪检测外泌体粒径。采用流式细胞仪检测 CD9、CD63、CD81 阳性细胞百分比,其中抗体为 FITC 标记的兔抗人 CD9、CD63、CD81 单克隆抗体(稀释比均为 1:200),样本数为 3。

1.4.3 小鼠原代施万细胞的培养与鉴定 按照文献[22]所述方法提取小鼠施万细胞。取 12 只 C57BL/6 小鼠,脱颈处死后取双侧坐骨神经主干,充分剪碎后使用配制好的消化液(胶原酶 I:胶原酶 IV:中性蛋白酶体积比=8:1:1)及 2.5 g/L 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸混合液充分消化后,加入用多聚-D-赖氨酸包被的 12 孔板中,每 6 小时换液 1 次。3~5 d 后每孔加入 0.25 μ L 博来霉素,抑制细胞增殖,加入博来霉素 48 h 后在倒置相差显微镜 200 倍镜下观察细胞形态。加入博来霉素后继续培养 3~4 d,待细胞生长达 60% 融合时,进行免疫荧光染色,一抗为兔抗小鼠 S100 β 单克隆抗体(稀释比为 1:100),二抗为花青素 3 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:200),采用 DAPI 进行细胞核染色(阳性染色为蓝色),使用成像系统在 200 倍镜下观察胞质红染细胞,即 S100 β 阳性细胞。

1.4.4 小鼠施万细胞分组处理及增殖活力检测 取第 3~6 代对数生长期的施万细胞,按 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 96 孔板中,加入完全培养基进行培养,每孔 100 μ L。待细胞贴壁后,将完全培养基更换为 100 μ L 不含血清的 α 最低基本培养基进行 12 h 饥饿处理。将细胞分为使用完全培养基进行培养的常规培养组、用含终物质的量浓度 50 mmol/L 葡萄糖溶液的完全培养基培养^[23]的单纯高糖组、用含 1.4.2 中提取的终浓度 1×10^9 个/mL 的人 ADSC 外泌

体和终物质的量浓度 50 mmol/L 葡萄糖溶液的完全培养基培养的高糖+外泌体组。培养 24 h 后,按照细胞计数试剂盒 8 说明书操作要求进行检测,用酶标仪测定细胞在 450 nm 波长处的吸光度值,以此表示细胞增殖活力。该实验样本数为 6。

1.4.5 小鼠施万细胞中神经鞘胚素蛋白表达检测 同 1.4.4 取施万细胞并分组处理 48 h 后,采用蛋白质印迹法检测神经鞘胚素的蛋白表达,其中一抗为兔抗小鼠神经鞘胚素单克隆抗体(稀释比为 1:2 000)、兔抗小鼠微管蛋白单克隆抗体(稀释比为 1:5 000),二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:3 000)。该实验样本数为 3。

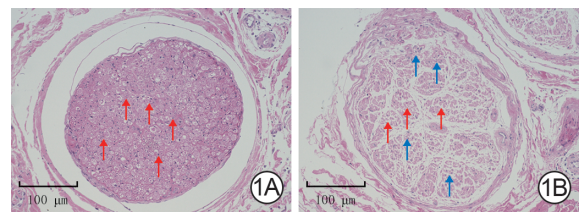
1.5 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计量资料数据均符合正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间总体比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经组织形态

相较于对照组,DPN 组患者神经组织中神经支持细胞减少、炎症细胞增多,具有典型的神经损伤表现^[24]。见图 1。



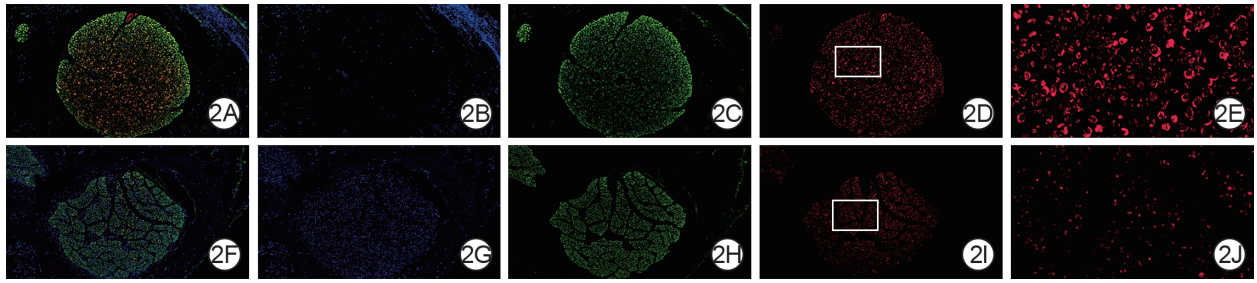
注:DPN 为糖尿病周围神经病变;红色箭头指示神经支持细胞,蓝色箭头指示炎症细胞

图 1 DPN 组 DPN 患者及对照组非糖尿病患者趾神经组织病理学观察 苏木精-伊红 $\times 20$ 。1A、1B 分别为对照组和 DPN 组,图 1B 较图 1A 神经支持细胞减少,炎症细胞增多

Figure 1 Pathological observation of toe nerve tissue of DPN patients in DPN group and non-diabetes patients in control group

2.2 免疫荧光染色检测的神经组织中 S100 β 及神经鞘胚素的蛋白表达

相较于对照组,DPN 组患者神经组织中细胞核更多,S100 β 的蛋白表达更少且分布较紊乱。DPN 组患者神经组织中神经鞘胚素蛋白表达为 71 ± 31 ,明显低于对照组的 $1\,729 \pm 62$ ($t = 76.92, P < 0.001$)。见图 2。



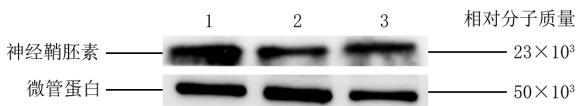
注:进行异硫氰酸荧光素-花青素 3-4', 6-二脒基-2-苯基咪唑染色;图 2A、2B、2C、2D 及 2F、2G、2H、2I 放大倍数为 20 倍;DPN 为糖尿病周围神经病变;细胞核染色为蓝色,神经鞘脂素染色为红色,S100β 染色为绿色

图 2 DPN 组 DPN 患者及对照组非糖尿病患者趾神经组织中神经鞘脂素和 S100β 的蛋白表达。2A、2B、2C、2D、2E 分别为对照组细胞核与神经鞘脂素和 S100β 染色重叠、细胞核染色、S100β 染色、神经鞘脂素染色、图 2D 方框中图形放大 10 倍的图片;2F、2G、2H、2I、2J 分别为 DPN 组细胞核与神经鞘脂素和 S100β 染色重叠、细胞核染色、S100β 染色、神经鞘脂素染色、图 2I 方框中图形放大 10 倍的图片,可见 DPN 组神经组织中细胞核数量较对照组明显增多,S100β 和神经鞘脂素蛋白表达明显减少

Figure 2 The expressions of artemin and S100β in toe nerve tissue of DPN patients in DPN group and non-diabetes patients in control group

2.3 蛋白质印迹法检测的神经组织中神经鞘脂素的蛋白表达

DPN 组患者神经组织中的神经鞘脂素的蛋白表达为 0.74 ± 0.08 , 明显低于对照组的 0.97 ± 0.06 ($t=5.49, P<0.001$), 见图 3。



注:DPN 为糖尿病周围神经病变;条带上方的 1 表示对照组 1 例患者,2、3 表示 DPN 组 2 例患者

图 3 蛋白质印迹法检测 DPN 组 DPN 患者及对照组非糖尿病患者趾神经组织中的神经鞘脂素蛋白表达

Figure 3 The protein expression of artemin in toe nerve tissue of DPN patients in DPN group and non-diabetes patients in control group detected by Western blotting

2.4 神经组织中神经鞘脂素的 mRNA 表达

DPN 组患者神经组织中神经鞘脂素的 mRNA 表达为 0.073 ± 0.009 , 明显低于对照组的 0.113 ± 0.013 ($t=7.65, P<0.001$)。

2.5 人 ADSC 外泌体的鉴定

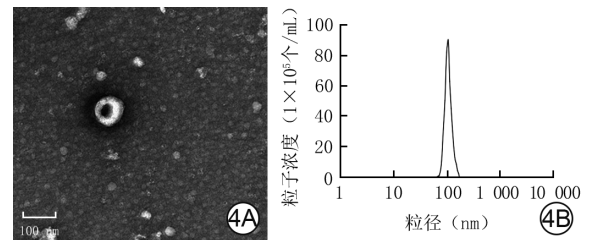
提取的人 ADSC 外泌体呈囊泡状;粒径为 55~160 nm, 平均粒径为 101 nm;CD9、CD63、CD81 阳性细胞百分比均数分别为 17.2%、12.5%、22.3%。见图 4。

2.6 小鼠原代施万细胞的鉴定

加入博来霉素 48 h 后,贴壁的原代细胞大部分呈双极、梭形或三角形,符合施万细胞的经典形态;免疫荧光染色显示,加入博来霉素 3~4 d,细胞中有 S100β 表达,细胞鉴定为施万细胞。见图 5。

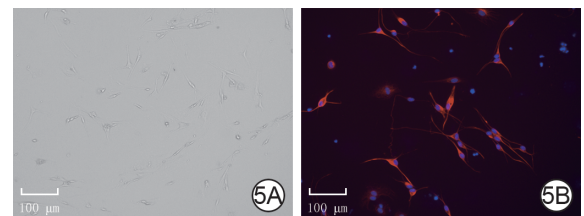
2.7 小鼠施万细胞的增殖活力

培养 24 h 后,常规培养组、单纯高糖组和高糖+



注:图 4B 为横坐标数据经过 lg 处理生成的图
图 4 人脂肪干细胞外泌体的鉴定。4A.外泌体呈囊泡状 透射电子显微镜×40 000;4B.外泌体粒径为 55~160 nm

Figure 4 Identification of human adipose-derived stem cell exosomes



注:S100β 阳性染色为红色
图 5 小鼠原代施万细胞的鉴定。5A.加入博来霉素 48 h 后,原代细胞大部分呈双极、梭形或三角形 倒置相差显微镜×200;5B.加入博来霉素培养 3 d,细胞中有 S100β 表达 花青素 3-4', 6-二脒基-2-苯基咪唑×200

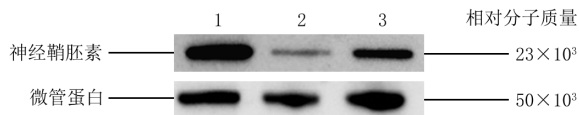
Figure 5 Identification of primary Schwann cells of mice

外泌体组细胞增殖活力分别为 1.158 ± 0.041 、 0.200 ± 0.019 、 0.672 ± 0.052 , 组间总体比较,差异有统计学意义 ($F=886.01, P<0.001$)。与常规培养组比较,单纯高糖组和高糖+外泌体组细胞增殖活力均明显降低 ($P<0.001$);与单纯高糖组比较,高糖+外泌体组细胞增殖活力明显升高 ($P<0.001$)。

2.8 小鼠施万细胞中的神经鞘脂素蛋白表达

培养 48 h 后,常规培养组、单纯高糖组和高糖+外泌体组细胞中神经鞘脂素蛋白表达分别为

1.50±0.06、0.29±0.05、0.66±0.05, 组间总体比较, 差异有统计学意义 ($F=439.73, P<0.001$)。与常规培养组比较, 单纯高糖组、高糖+外泌体组细胞神经鞘胚素蛋白表达均明显降低 ($P<0.001$); 与单纯高糖组比较, 高糖+外泌体组细胞神经鞘胚素蛋白表达明显升高 ($P<0.001$)。见图 6。



注: 条带上方的 1、2、3 分别表示常规培养的常规培养组、用高浓度葡萄糖溶液培养的单纯高糖组、用人脂肪干细胞外泌体和高浓度葡萄糖溶液培养的高糖+外泌体组

图 6 蛋白质印迹法检测的 3 组小鼠施万细胞培养 48 h 后神经鞘胚素蛋白表达

Figure 6 Protein expression of artemin in three groups of Schwann cells of mice cultured for 48 hours detected by Western blotting

3 讨论

DPN 的发病机制非常复杂, 糖代谢异常可直接损伤神经细胞, 并伴随神经营养支持功能受损、氧化应激加重、炎症激活等, 进一步加重神经损伤。在微观层面, DPN 通常表现为神经脱髓鞘和施万细胞凋亡, 其中施万细胞受损导致其营养、支持神经组织功能障碍, 尤其是施万细胞分泌的多种与神经再生相关的神经营养因子, 如脑源性神经营养因子、神经生长因子、神经营养因子-3、胶质细胞源性神经营养因子等减少^[25-26], 而这些因子可在神经组织发生炎症、损伤等病变时促进神经细胞存活, 诱导轴突再生。因此, 提高施万细胞的活性, 减少其凋亡是改善 DPN 的有效手段^[27-28]。

本研究团队观察到 DPN 患者神经组织中神经支持细胞减少、炎症细胞增多, 具有典型的神经损伤表现。进一步进行免疫荧光染色、蛋白质印迹法、实时荧光定量 RT-PCR 检测, 证实了 DPN 患者神经组织中 S100 β 的蛋白表达降低, 神经鞘胚素的蛋白和 mRNA 表达也明显降低。S100 β 表达下降可能与施万细胞受损相关, 神经鞘胚素表达降低则可能是导致神经功能障碍的一个重要因素。神经鞘胚素是胶质细胞源性神经营养因子配体家族的成员, 具有独特的神经营养特性, 它能够促进感觉神经元的存活, 并在外周神经系统的发育中发挥关键作用^[29]。多项研究已经证实, DPN 患者神经组织中施万细胞活性降低、凋亡增加^[30-31]。据此本研究

团队推测神经鞘胚素蛋白可能是影响 DPN 中施万细胞增殖活力的一个关键性因素。由于 DPN 患者神经组织的炎症损伤重, 从其中提取的施万细胞存活率过低, 难以用于后续的实验。因此, 本研究团队提取并培养小鼠施万细胞, 探讨高糖对施万细胞中神经鞘胚素蛋白表达的影响, 证实高糖可以降低施万细胞增殖活力及施万细胞中神经鞘胚素的蛋白表达。已有研究表明, 神经鞘胚素蛋白表达与施万细胞增殖活力密切相关^[32], 因此本研究团队猜测高糖破坏施万细胞中神经鞘胚素蛋白表达, 导致施万细胞增殖活力降低, 这可能是 DPN 发生发展的一个重要的环节。因此, 提高神经鞘胚素蛋白表达, 从而改善施万细胞增殖活力, 可能为治疗 DPN 提供新的思路。

关于干细胞, 尤其是 ADSC 在调节神经再生方面的作用的研究较多。ADSC 具有促进神经再生、减少施万细胞凋亡的作用, 但也存在免疫排斥、不易存活、作用时间短等不足^[33-36]。ADSC 外泌体具有一定的干细胞治疗优势, 具备与干细胞相同的促神经生长特性, 同时可以弥补上述干细胞治疗存在的不足, 也方便运输与保存^[37-38]。本研究进一步证实, 人 ADSC 外泌体对高糖刺激的施万细胞增殖活力具有一定的促进作用, 同时也观察到高糖+外泌体组施万细胞中神经鞘胚素蛋白表达的提高。高糖环境中施万细胞增殖活力与神经鞘胚素蛋白表达之间更为具体的因果关系目前并不能明确, 人 ADSC 外泌体通过何种机制提高施万细胞增殖活力及神经鞘胚素蛋白的表达也暂不明确, 是否可以通过使用人 ADSC 外泌体提高施万细胞中神经鞘胚素蛋白表达, 促进施万细胞增殖活力的方式治疗 DPN 还有待深入研究。

综上所述, DPN 患者神经组织中神经鞘胚素蛋白表达较正常神经组织降低, 这可能与高糖降低了施万细胞增殖活力相关, 而人 ADSC 外泌体可能通过提高神经鞘胚素蛋白表达, 增强施万细胞增殖活力, 进而延缓 DPN 的进展, 为 DPN 治疗提供新思路。本研究团队后续将进行神经组织临床标本的蛋白质组学检测及 DPN 小鼠的在体实验研究, 对本研究的结果进行进一步验证, 并深入探讨相关机制以及相应的因果关系。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 曹涛: 实施研究, 采集数据, 统计分析, 撰写论文; 郝彤、肖丹: 实施研究, 采集数据; 张伟锋、计鹏、贾艳慧、王婧: 起草文章, 修改文章; 王许杰: 实施研究, 采集数据; 官浩: 设计研究, 修

改文章;陶克:酝酿和设计研究,分析数据,修改文章,获取研究经费

参考文献

- [1] Rehman ZU. Saving limbs in diabetics: challenges and opportunities[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2020, 30(10): 1003-1004. DOI:10.29271/jcsp.2020.10.1003.
- [2] Low LL, Kwan YH, Ko MSM, et al. Epidemiologic characteristics of multimorbidity and sociodemographic factors associated with multimorbidity in a rapidly aging Asian country[J]. *JAMA Netw Open*, 2019, 2(11):e1915245. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2019.15245.
- [3] 《多学科合作下糖尿病足防治专家共识(2020版)》编写组. 多学科合作下糖尿病足防治专家共识(2020版)全版[J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(8): E01-E52. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200217-01000.
- [4] Sable-Morita S, Okura M, Tanikawa T, et al. Associations between diabetes-related foot disease, diabetes, and age-related complications in older patients[J]. *Eur Geriatr Med*, 2021, 12(5):1003-1009. DOI:10.1007/s41999-021-00491-7.
- [5] Elafros MA, Andersen H, Bennett DL, et al. Towards prevention of diabetic peripheral neuropathy: clinical presentation, pathogenesis, and new treatments[J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(10): 922-936. DOI: 10.1016/S1474-4422(22)00188-0.
- [6] Eid SA, Rumora AE, Beirowski B, et al. New perspectives in diabetic neuropathy[J]. *Neuron*, 2023, 111(17): 2623-2641. DOI:10.1016/j.neuron.2023.05.003.
- [7] Yin K, Qiao T, Zhang Y, et al. Unraveling shared risk factors for diabetic foot ulcer: a comprehensive Mendelian randomization analysis[J]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2023, 11(6):e003523. DOI:10.1136/bmjdr-2023-003523.
- [8] Sen CK, Roy S, Khanna S. Diabetic peripheral neuropathy associated with foot ulcer: one of a kind[J/OL]. *Antioxid Redox Signal*, 2023(2023-01-25) [2023-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35850520/>. DOI: 10.1089/ars.2022.0093.[published online ahead of print].
- [9] Chen D, Wang M, Shang X, et al. Development and validation of an incidence risk prediction model for early foot ulcer in diabetes based on a high evidence systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2021, 180:109040. DOI:10.1016/j.diabres.2021.109040.
- [10] Bhandari R, Sharma A, Kuhad A. Novel nanotechnological approaches for targeting dorsal root ganglion (DRG) in mitigating diabetic neuropathic pain (DNP) [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 12: 790747. DOI: 10.3389/fendo.2021.790747.
- [11] Sloan G, Alam U, Selvarajah D, et al. The treatment of painful diabetic neuropathy [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2022, 18(5): e070721194556. DOI: 10.2174/1573399817666210707112413.
- [12] Nocera G, Jacob C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(20):3977-3989. DOI:10.1007/s00018-020-03516-9.
- [13] Bosch-Queralt M, Fledrich R, Stassart RM. Schwann cell functions in peripheral nerve development and repair[J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 176:105952. DOI:10.1016/j.nbd.2022.105952.
- [14] Rachana KS, Manu MS, Advirao GM. Insulin-induced upregulation of lipoprotein lipase in Schwann cells during diabetic peripheral neuropathy[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2018, 12(4):525-530. DOI:10.1016/j.dsx.2018.03.017.
- [15] Zhang X, Zhao S, Yuan Q, et al. TXNIP, a novel key factor to cause Schwann cell dysfunction in diabetic peripheral neuropathy, under the regulation of PI3K/Akt pathway inhibition-induced DNMT1 and DNMT3a overexpression[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7):642. DOI:10.1038/s41419-021-03930-2.
- [16] Zhu S, Li Y, Bennett S, et al. The role of glial cell line-derived neurotrophic factor family member artemin in neurological disorders and cancers[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(7):e12860. DOI:10.1111/cpr.12860.
- [17] Ilieva M, Nielsen J, Korshunova I, et al. Artemin and an Artemin-derived peptide, artefin, induce neuronal survival, and differentiation through ret and NCAM[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12:47. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00047.
- [18] Wang R, Rossomando A, Sah DWY, et al. Artemin induced functional recovery and reinnervation after partial nerve injury[J]. *Pain*, 2014, 155(3): 476-484. DOI: 10.1016/j.pain.2013.11.007.
- [19] Wong LE, Gibson ME, Arnold HM, et al. Artemin promotes functional long-distance axonal regeneration to the brainstem after dorsal root crush[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(19): 6170-6175. DOI: 10.1073/pnas.1502057112.
- [20] 中华医学会糖尿病学分会, 中华医学会感染病学分会, 中华医学会组织修复与再生分会. 中国糖尿病足防治指南(2019版)(I)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2019, 11(2):92-108. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-5809.2019.02.004.
- [21] Zhang Y, Bi J, Huang J, et al. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15:6917-6934. DOI:10.2147/IJN.S264498.
- [22] Shan F, Ji Q, Song Y, et al. A fast and efficient method for isolating Schwann cells from sciatic nerves of neonatal mice[J]. *J Neurosci Methods*, 2022, 366: 109404. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2021.109404.
- [23] Li K, Shi X, Luo M, et al. Taurine protects against myelin damage of sciatic nerve in diabetic peripheral neuropathy rats by controlling apoptosis of Schwann cells via NGF/Akt/GSK3 β pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 383(2): 111557. DOI:10.1016/j.yexcr.2019.111557.
- [24] Liu B, Xin W, Tan JR, et al. Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(44):22347-22352. DOI: 10.1073/pnas.1910292116.
- [25] Ahmed Z, Suggate EL, Brown ER, et al. Schwann cell-derived factor-induced modulation of the NgR/p75NTR/EGFR axis disinhibits axon growth through CNS myelin in vivo and in vitro[J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 6): 1517-1533. DOI: 10.1093/brain/awl080.
- [26] Huang L, Xia B, Shi X, et al. Time-restricted release of multiple neurotrophic factors promotes axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury[J]. *FASEB J*, 2019, 33(7): 8600-8613. DOI: 10.1096/fj.201802065RR.
- [27] Majd H, Amin S, Ghazizadeh Z, et al. Deriving Schwann cells from hPSCs enables disease modeling and drug discovery for diabetic peripheral neuropathy[J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(5):632-647. DOI:10.1016/j.stem.2023.04.006.
- [28] Yuan Q, Zhang X, Wei W, et al. Lycorine improves peripheral

- nerve function by promoting Schwann cell autophagy via AMPK pathway activation and MMP9 downregulation in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175:105985.DOI:10.1016/j.phrs.2021.105985.
- [29] Bolon B, Jing S, Asuncion F, et al. The candidate neuroprotective agent artemin induces autonomic neural dysplasia without preventing peripheral nerve dysfunction [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(3): 275-294. DOI: 10.1080/01926230490431475.
- [30] Takaku S, Tsukamoto M, Niimi N, et al. Exendin-4 promotes Schwann cell survival/migration and myelination in vitro [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2971. DOI: 10.3390/ijms22062971.
- [31] Yin Y, Qu H, Yang Q, et al. Astragaloside IV alleviates Schwann cell injury in diabetic peripheral neuropathy by regulating microRNA-155-mediated autophagy[J]. *Phytomedicine*, 2021, 92:153749.DOI:10.1016/j.phymed.2021.153749.
- [32] Fontana X, Hristova M, Da Costa C, et al. c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling[J]. *J Cell Biol*, 2012, 198(1): 127-141.DOI:10.1083/jcb.201205025.
- [33] de Assis ACC, Reis ALS, Nunes LV, et al. Stem cells and tissue engineering-based therapeutic interventions: promising strategies to improve peripheral nerve regeneration[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(2):433-454.DOI:10.1007/s10571-022-01199-3.
- [34] Rhode SC, Beier JP, Ruhl T. Adipose tissue stem cells in peripheral nerve regeneration-in vitro and in vivo[J]. *J Neurosci Res*, 2021, 99(2):545-560.DOI:10.1002/jnr.24738.
- [35] Azam M, Ghufuran H, Butt H, et al. Curcumin preconditioning enhances the efficacy of adipose-derived mesenchymal stem cells to accelerate healing of burn wounds[J/OL]. *Burns Trauma*, 2021, 9: tkab021[2023-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34514007/>. DOI: 10.1093/burnst/tkab021.
- [36] Fan B, Li C, Szalad A, et al. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes ameliorate peripheral neuropathy in a mouse model of diabetes[J]. *Diabetologia*, 2020, 63(2): 431-443.DOI: 10.1007/s00125-019-05043-0.
- [37] Yang Z, Yang Y, Xu Y, et al. Biomimetic nerve guidance conduit containing engineered exosomes of adipose-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 442. DOI: 10.1186/s13287-021-02528-x.
- [38] Yin G, Yu B, Liu C, et al. Exosomes produced by adipose-derived stem cells inhibit schwann cells autophagy and promote the regeneration of the myelin sheath [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2021, 132:105921. DOI: 10.1016/j.biocel.2021.105921.

(收稿日期: 2023-12-07)

·《Burns & Trauma》好文推荐·

放射性溃疡中细胞衰老的特征及间充质干细胞条件培养基的治疗效果

引用格式: Chen W, Wang Y, Zheng J, et al. Characterization of cellular senescence in radiation ulcers and therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived conditioned medium[J/OL]. *Burns Trauma*, 2023, 11:tkad001[2023-10-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37188110/>. DOI: 10.1093/burnst/tkad001.

放射性溃疡是一种严重的皮肤损伤,可持续数月至数年,常呈进行性进展,且皮损易向非照射区域扩展、迁延难愈。然而,现有的理论无法充分解释放射性溃疡的进展机制。近年来,越来越多的证据表明,细胞衰老在不同类型的慢性创面中起着重要作用,提示衰老细胞的积累可能与放射性溃疡相关。陆军军医大学史春梦教授团队在《Burns & Trauma》杂志上发文《Characterization of cellular senescence in radiation ulcers and therapeutic effects of mesenchymal stem cell-derived conditioned medium》。该研究团队首先采用 40 Gy X 线照射大鼠局部皮肤,建立了具有临床患者特征的放射性溃疡动物模型,并对其进行了连续超过 260 d 的观察评估。结果表明,随着放射性溃疡的进展,衰老细胞在辐照组织中不断积累,并在后期保持较高的衰老水平。其中,衰老的巨噬细胞主要出现在放射性溃疡的早期阶段,而衰老的真皮 Fb 和内皮细胞则在辐射后呈持续增加。此外,该研究证实向放射性溃疡中注射外源性衰老细胞,会显著加重皮损的进展。接着,该研究团队通过体外研究观察到,辐照诱导的原发性衰老细胞及其条件培养基(CM)诱导的继发性衰老细胞均可通过旁分泌功能诱导正常细胞发生衰老。最后,该研究团队将标准化制备的人脐带间充质干细胞 CM(uMSC-CM)以 2 mg/kg 的剂量腹腔注射至放射性溃疡大鼠模型中,观察到经 uMSC-CM 处理后,皮损部位的渗出、结痂和溃疡等病理变化得到改善,血清中 IL-1 α 水平明显降低($P < 0.01$),血管生成素-1 水平显著恢复($P < 0.05$),衰老相关基因(*p16*、*p21* 和 *p53*)的蛋白表达显著降低。这些结果表明,uMSC-CM 能够通过抑制细胞衰老,有效缓解放射性溃疡的进展;衰老细胞在放射性溃疡的进展中起着关键作用,或许是治疗放射性溃疡的一个有效靶点;间充质干细胞的分泌因子在放射性溃疡的治疗中存在巨大潜力。

郝家琪,编译自《Burns Trauma》,2023, 11:tkad001;刘琰,审校