

· 实验研究 ·

低强度脉冲超声增效脂肪间充质干细胞源性外泌体修复糖尿病小鼠皮肤创面的实验研究

钟方璐 刘珺碧 蒋日月 桂斌 王浩 姜楠 曹省 周青 邓倾

摘要 **目的** 探讨低强度脉冲超声(LIPUS)对脂肪间充质干细胞源性外泌体(ADSCs-Exos)修复糖尿病小鼠皮肤创面的增效作用。**方法** 将ADSCs-Exos与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)共培养,评估LIPUS对HUVECs摄取ADSCs-Exos的影响。选取SPF级C57BL/6雄性小鼠36只,构建糖尿病小鼠皮肤创面模型,将其随机分为对照组、Exos治疗组及LIPUS+Exos治疗组,每组各12只,应用活体成像观察ADSCs-Exos的分布及作用时间,冰冻切片观察糖尿病小鼠皮肤组织摄取ADSCs-Exos情况;比较各组小鼠治疗后3 d、7 d、10 d、14 d创面闭合率,以及14 d组织学检测情况。**结果** LIPUS可显著增加HUVECs对ADSCs-Exos的摄取,辐照后ADSCs-Exos的荧光强度(2.98×10^5)较未辐照者(0.31×10^5)显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。活体成像观察显示,LIPUS辐照能有效改善皮下注射后ADSCs-Exos的分布,促进其聚集于创面及周围组织,延长外泌体的作用时间;LIPUS+Exos治疗组治疗后1 h、6 h、36 h创面区域ADSCs-Exos的荧光强度分别为 24.14×10^9 、 146.93×10^9 、 26.59×10^9 ,均高于Exos治疗组(15.23×10^9 、 52.38×10^9 、 10.72×10^9),差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。冰冻切片显示,LIPUS+Exos治疗组ADSCs-Exos阳性细胞率为 $(41.20 \pm 1.10)\%$,高于Exos治疗组 $[(23.16 \pm 1.16)\%]$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。LIPUS+Exos治疗组小鼠治疗后3 d、7 d、10 d、14 d创面闭合率均高于其余两组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);以LIPUS+Exos治疗组14 d创面闭合率最高,达 $(98.52 \pm 1.14)\%$ 。组织学检测显示,与对照组和Exos治疗组比较,LIPUS+Exos治疗组小鼠皮肤新生血管面积最大 $[(35.12 \pm 1.93) \text{ mm}^2]$,瘢痕长度最短 $[(1.20 \pm 0.20) \text{ mm}]$,胶原容积分数最高 $[(62.35 \pm 1.72)\%]$,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** LIPUS能有效促进细胞对ADSCs-Exos的摄取,增强血管新生,加速糖尿病小鼠皮肤创面的修复。

关键词 低强度脉冲超声;皮肤创面;修复;脂肪间充质干细胞;外泌体;糖尿病,小鼠

[中图分类号]R445.1;R587.1

[文献标识码]A

Low intensity pulsed ultrasound enhances adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes mediated diabetic wound healing in mice: a experimental study

ZHONG Fanglu, LIU Junbi, JIANG Riyue, GUI Bin, WANG Hao, JIANG Nan, CAO Sheng, ZHOU Qing, DENG Qing

Department of Ultrasound Imaging, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

ABSTRACT **Objective** To investigate the synergistic effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes (ADSCs-Exos) in repairing diabetic wound healing in mice. **Methods** ADSCs-Exos was co-cultured with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in vitro, and the effect of LIPUS on the uptake of ADSCs-Exos by HUVECs was evaluated. In vivo, 36 SPF C57BL/6 male mice were selected to construct diabetic skin wound models. The mice were randomly divided into the control group, Exos treatment group and LIPUS+Exos treatment group, with 12 mice in each group. The distribution and duration of ADSCs-Exos using in vivo imaging were observed. ADSCs-Exos uptake in skin tissue were observed by frozen section. The skin wound closure rate of diabetes mice in each group on the 3rd, 7th, 10th and 14th day after treatment, and the histological evaluation on the 14th day after treatment were compared. **Results** LIPUS can significantly increase the uptake of ADSCs-Exos by HUVECs, with a fluorescence intensity of 2.98×10^5 which was higher than

基金项目:国家自然科学基金项目(81901759,81901757,81971624,82102045)

作者单位:430060 武汉市,武汉大学人民医院超声影像科

通讯作者:邓倾,Email:wudadq@163.com

that without irradiated (0.31×10^5), with a statistically significant difference ($P < 0.01$). In vivo imaging observation shows that LIPUS irradiation can effectively improve the distribution of ADSCs-Exos after subcutaneous injection, promote the aggregation of ADSCs-Exos in wounds and surrounding tissues of diabetes mice, and prolong the action time of extracellular vesicles. The fluorescence intensity of ADSCs-Exos in the wound area at 1 h, 6 h and 36 h after treatment in the LIPUS+Exos treatment group were 24.14×10^9 , 146.93×10^9 , 26.59×10^9 , respectively, which were higher than those of the Exos treatment group (15.23×10^9 , 52.38×10^9 , 10.72×10^9), and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Frozen section showed that the rate of ADSCs-Exos positive cells [$(41.20 \pm 1.10)\%$] was higher than that of Exos treatment group [$(23.16 \pm 1.16)\%$], and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The skin wound closure rates of the mice in the LIPUS+Exos treatment group on the 3rd, 7th, 10th, and 14th day after treatment were higher than that of the other two groups, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The LIPUS+Exos treatment group had the highest wound closure rate on the 14th day after treatment [$(98.52 \pm 1.14)\%$]. The histological evaluation showed that compared with the control group and Exos treatment group, the LIPUS+Exos group had the largest skin neovascularization area [$(35.12 \pm 1.93) \text{ mm}^2$], the shortest scar length [$(1.20 \pm 0.20) \text{ mm}$], and the highest collagen volume fraction [$(62.35 \pm 1.72)\%$], and the difference were statistically significant (all $P < 0.05$).

Conclusion LIPUS can effectively promote cell uptake of ADSCs-Exos, enhance angiogenesis and accelerate the repair of diabetic wound healing in mice.

KEY WORDS Low intensity pulsed ultrasound; Skin wound; Repair; Adipose mesenchymal stem cells; Exosomes; Diabetes, mouse

糖尿病皮肤创面是目前临床工作面临的巨大挑战,每年有大量患者因糖尿病足溃疡而截肢或死亡,给患者及其家庭和社会带来沉重的负担^[1]。然而,常规的清创抗感染治疗效果不佳,故需探索新的治疗方法。研究^[2-3]证实脂肪间充质干细胞源性外泌体(adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes, ADSCs-Exos)具有多种生物功能和治疗优势,在糖尿病皮肤创面修复方面展现了广泛的应用前景。然而,由于ADSCs-Exos在体内半衰期短、生物利用率低、治疗成本高,严重限制了其临床应用。低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)是一种无创性物理刺激,具有多种生物学效应^[4],有助于提高外泌体的生物利用率,进而增强疗效。基于此,本实验旨在探讨LIPUS对ADSCs-Exos修复糖尿病小鼠皮肤创面的增效作用。

材料与方法

一、实验动物、主要实验材料及仪器

1. 实验动物:SPF级C57BL/6雄性小鼠36只,4周龄,体质量12.0~17.0 g,平均 $(15.0 \pm 0.5) \text{ g}$;雄性SD大鼠5只,4周龄,体质量80.0~130.0 g,平均 $(110.0 \pm 3.0) \text{ g}$ 。以上动物均由武汉大学人民医院动物实验中心提供,本实验经我院实验动物伦理委员会批准[WDRM动(福)第20210506号]。

2. 主要实验材料:CD9、Tsg101、GAPDH、Calnexin单克隆抗体(美国Proteintech公司);链脲佐菌素(德国Sigma-Aldrich公司);异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);TBST缓冲液(10X, pH值7.4,北京兰杰柯科

技有限公司);DiI及DiR荧光标记试剂盒(美国Invitrogen公司);抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)、HE及Masson染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);人脐静脉内皮细胞(HUVECs,武汉普诺赛生命科技有限公司);澳大利亚胎牛血清、低糖培养基DMEM(美国Hyclone公司);透明防水敷料(美国3M公司);小鼠CD31、 α -SMA抗体试剂盒、4%多聚甲醛组织固定液(武汉塞维尔生物科技有限公司)。

3. 主要实验仪器:正置荧光显微镜(BX53,日本Olympus公司);激光共聚焦显微镜(FV1200,日本Olympus公司);小动物成像系统(IVIS,美国Perkin Elmer公司);多通道超声辐照仪(重庆医科大学超声影像学研究所);纳米颗粒跟踪分析仪(ZetaView 30,德国Particle Metrix公司);透射电子显微镜(HT7700,日本HITACHI公司);动物血糖仪(VQpet™ H,杭州微策生物技术股份有限公司)。

二、实验方法

(一)ADSCs-Exos的提取及鉴定

从雄性SD大鼠双侧腹股沟脂肪中提取脂肪间充质干细胞(adipose mesenchymal stem cells, ADSCs),传代培养后通过形态学及流式细胞术鉴定ADSCs。采用超速离心法从ADSCs培养液中提取ADSCs-Exos,透射电子显微镜下观察其形态;纳米颗粒跟踪分析仪检测其粒径;Western Blot检测外泌体标志蛋白CD9和Tsg101的表达^[5]。

(二)体外实验检测HUVECs摄取ADSCs-Exos情况

采用含10%胎牛血清的低糖DMEM培养液在37℃、5% CO₂条件下培养HUVECs,待细胞形态饱满后

以每孔 30 000 个细胞铺入 24 孔板,过夜待细胞贴壁延展后将其分为 Exos 组和 LIPUS+Exos 组,每组 12 个复孔。预先采用红色荧光染料 DiI 对 ADSCs-Exos 进行染色,将 DiI 标记的 ADSCs-Exos 加入 24 孔板与 HUVECs 共同孵育,其中 LIPUS+Exos 组先在不菌条件下 LIPUS 辐照 30 min 再共同孵育,辐照参数:工作频率 1.5 MHz,调制频率 1.0 kHz,占空比 20%,声强 0.03 W/cm²。共同孵育 6 h 后去掉培养液并使用 PBS 多次冲洗,加入 4% 多聚甲醛固定 15 min,再次使用 PBS 冲洗后滴加抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI),激光共聚焦显微镜下观察 LIPUS+Exos 组和 Exos 组荧光标记情况,分析 LIPUS 对 HUVECs 摄取 ADSCs-Exos 的影响。

(三)糖尿病小鼠皮肤创面模型构建及分组

所有 C57BL/6 雄性小鼠均进行高脂肪饲料喂养 2 周,然后腹腔注射链脲佐菌素(50 mg/kg),每 2 日采集小鼠血液样本,使用动物血糖仪测量血糖水平,小鼠血糖水平 >16.7 mmol/L 且持续 1 周以上即糖尿病模型构建成功^[6]。使用异氟烷麻醉小鼠后,除净小鼠背部毛发,无菌条件下剪出直径约 10 mm 的圆形全层真皮缺损,构建糖尿病小鼠皮肤创面模型。将其随机分为对照组、Exos 治疗组及 LIPUS+Exos 治疗组,每组各 12 只。对照组于小鼠伤口周围进行多点皮下注射总体积为 100 μ l PBS;Exos 治疗组和 LIPUS+Exos 治疗组则注射含 70 μ g ADSCs-Exos(经 DiI 标记)的 PBS 混悬液 100 μ l,注射后立即使用透明防水敷料封闭伤口;LIPUS+Exos 治疗组小鼠封闭伤口后立即行 LIPUS 辐照 30 min,辐照参数:工作频率 1.5 MHz,调制频率 1.0 kHz,占空比 20%,声强 0.3 W/cm²。操作完成后将小鼠饲养于 SPF 级屏障环境中备用。

(四)活体成像观察 ADSCs-Exos 的分布及作用时间

将 Exos 治疗组和 LIPUS+Exos 治疗组小鼠于异氟烷麻醉下进行活体成像,观察 ADSCs-Exos 治疗后 1 h、6 h、36 h 创面区域经 DiI 标记的 ADSCs-Exos 的分布情况,使用仪器配套软件(Living Image 4.0)分析其荧光强度。

(五)冰冻切片观察 ADSCs-Exos 在糖尿病小鼠皮肤组织中的分布

ADSCs-Exos 治疗后 48 h 将 Exos 治疗组及 LIPUS+Exos 治疗组小鼠伤口及周围皮肤组织制作冰冻切片,激光共聚焦显微镜下观察经 DiI 标记的 ADSCs-Exos 的分布,并使用 ImageJ 软件自动计算其阳性细胞率。

(六)各组小鼠皮肤创面治疗效果评估

1. 观察各组小鼠皮肤创面修复情况:分别于治疗

后 0 d、3 d、7 d、10 d、14 d 肉眼观察小鼠创面区域情况并拍照,并计算创面闭合率,公式为:创面闭合率=(0 d 创面面积-实时创面面积)/0 d 创面面积 $\times$ 100%。

2. 各组小鼠皮肤创面组织学检测:于治疗后 14 d 将各组小鼠脱毛处理,在其背部以瘢痕部位为中心剪出面积约 1 cm² 的正方形全层皮肤组织,生理盐水漂洗后立即放入 4% 多聚甲醛组织固定液中进行固定,将固定好的样品进行脱水处理,石蜡包埋切片后进行 HE 染色和 Masson 染色,正置荧光显微镜下观察各组胶原成熟度,并测量瘢痕长度;使用 ImageJ 软件自动计算胶原容积分数。同时对切片进行免疫荧光染色处理,将切片封闭后加入一抗稀释液 4℃ 孵育过夜,复温后用 TBST 缓冲液洗涤,放入二抗稀释液中避光室温孵育 1 h,再次 TBST 缓冲液洗涤,滴加抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI),正置荧光显微镜下观察血管内皮细胞 CD31 及平滑肌肌动蛋白 α -SMA 的表达情况,使用 ImageJ 软件自动计算新生血管面积。

三、统计学处理

应用 SPSS 24.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验;多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验或 Post-Hoc 分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

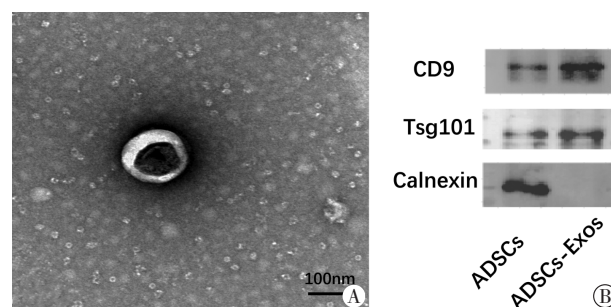
结 果

一、ADSCs-Exos 的鉴定

透射电子显微镜显示,ADSCs-Exos 呈双层膜结构的茶托样囊泡;Western Blot 检测 ADSCs-Exos 可表达 CD9、Tsg101。见图 1。纳米颗粒跟踪分析仪检测其平均粒径为 (133.0 $\pm$ 11.0) nm。

二、LIPUS 对 HUVECs 摄取 ADSCs-Exos 的影响

LIPUS+Exos 组 HUVECs 摄取的经 DiI 标记的 ADSCs-Exos 荧光强度为 2.98 $\times$ 10⁵,较 Exos 组(0.31 $\times$ 10⁵)显著增加,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见图 2。



A:透射电子显微镜下观察 ADSCs-Exos 形态(标尺为 100 nm);B:Western Blot 检测 ADSCs-Exos 可表达 CD9、Tsg101

图 1 ADSCs-Exos 形态及标志蛋白表达检测

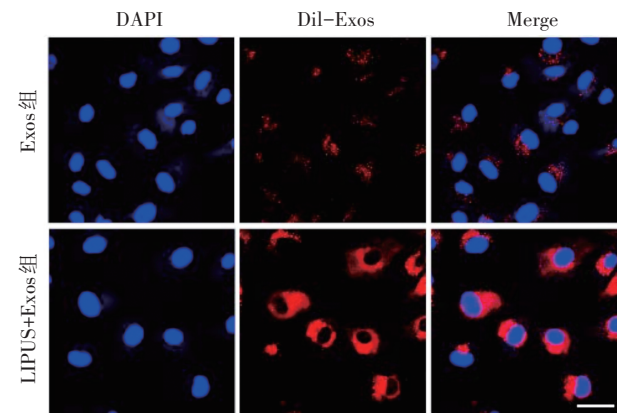


图 2 激光共聚焦显微镜下观察 HUVECs 摄取 ADSCs-Exos 情况(标尺为 50 μm)

三、活体成像观察 ADSCs-Exos 的分布及作用时间
LIPUS 辐照能有效改善皮下注射后 ADSCs-Exos 的分布,促进其聚集于创面及周围组织,延长外泌体的作用时间;LIPUS+Exos 治疗组治疗后 1 h、6 h、36 h 创面区域 ADSCs-Exos 的荧光强度分别为 24.14×10^9 、 146.93×10^9 、 26.59×10^9 ,均高于 Exos 治疗组 (15.23×10^9 、 52.38×10^9 、 10.72×10^9),差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图 3。

四、冰冻切片观察 ADSCs-Exos 在糖尿病小鼠皮肤组织中的分布情况

LIPUS 辐照后可明显促进创面及周围组织细胞摄取 ADSCs-Exos,其中 LIPUS+Exos 治疗组 ADSCs-Exos 阳性细胞率为 $(41.20 \pm 1.10)\%$,明显高于 Exos 治疗组 $[(23.16 \pm 1.16)\%]$,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

五、各组小鼠皮肤创面治疗效果

1. 各组小鼠皮肤创面修复情况: LIPUS+Exos 治疗组小鼠治疗后 3 d、7 d、10 d、14 d 创面闭合率均高于其余两组,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 14 d

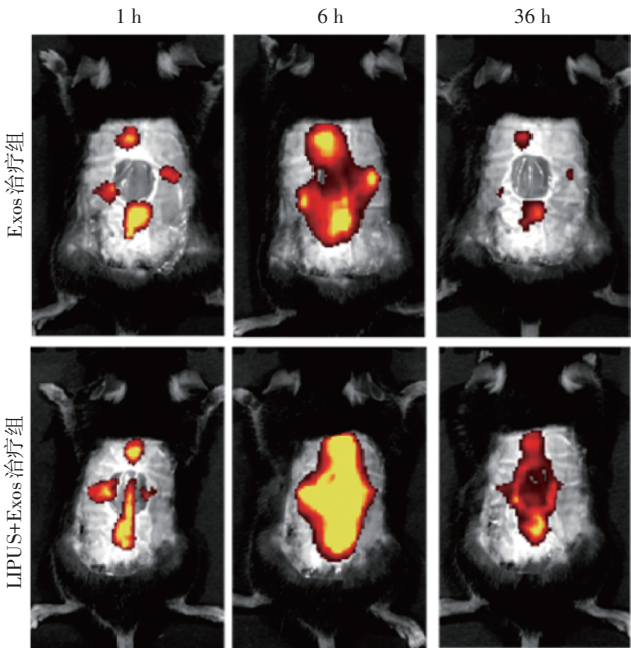


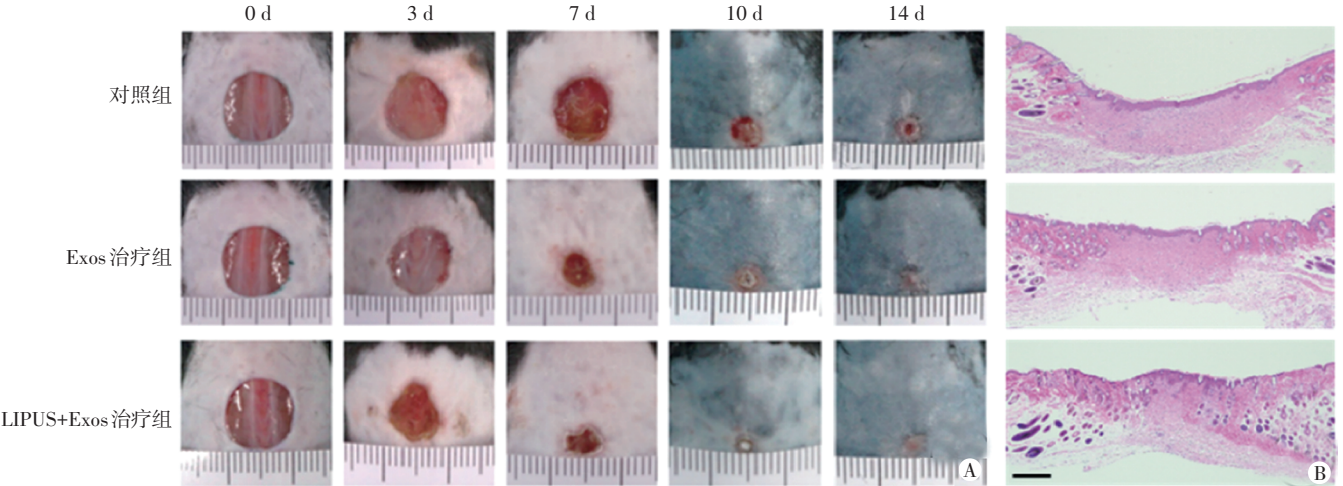
图 3 活体成像观察两治疗组小鼠皮肤创面摄取 ADSCs-Exos 情况
时各组小鼠创面闭合率均 $> 80\%$,其中 LIPUS+Exos 治疗组最高,达 $[(98.52 \pm 1.14)\%]$,创面几乎完全被表皮所覆盖。见表 1 和图 4A。

表 1 各组小鼠治疗后 3 d、7 d、10 d、14 d 创面闭合率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	10 d	14 d
对照组	8.94 ± 0.29	42.23 ± 1.10	72.53 ± 0.93	87.10 ± 1.89
Exos 治疗组	$25.33 \pm 0.41^*$	$76.11 \pm 1.26^*$	$85.95 \pm 1.21^*$	$95.80 \pm 0.49^*$
LIPUS+Exos 治疗组	$42.28 \pm 1.27^{**}$	$82.70 \pm 1.53^{**}$	$95.09 \pm 1.63^{**}$	$98.52 \pm 1.14^{**}$
F 值	1.661	1.465	2.527	1.275
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

与对照组比较, $^*P < 0.05$; 与 Exos 治疗组比较, $^{**}P < 0.05$

2. 各组小鼠皮肤创面组织学检测情况: ①HE 染色显示各组小鼠皮肤创面瘢痕组织情况见图 4B;



A: 小鼠皮肤创面大体观; B: HE 染色显示小鼠皮肤创面瘢痕组织情况($\times 40$)

图 4 各组小鼠皮肤创面修复情况

LIPUS+Exos 治疗组瘢痕长度明显短于 Exos 治疗组和对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且其新生组织最接近正常皮肤;②Masson 染色显示,LIPUS+Exos 治疗组胶原纤维粗大,排布较规则;各组胶原容积分数比较差异有统计学意义($P<0.001$);③LIPUS+Exos 治疗组新生血管面积显著高于对照组和 Exos 治疗组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。见表 2。正置荧光显微镜下观察见图 5。

表 2 各组小鼠皮肤创面组织学检测情况($\bar{x}\pm s$)

组别	瘢痕长度(mm)	胶原容积分数(%)	新生血管面积(mm ²)
对照组	6.11±0.47	20.33±1.28	9.41±0.98
Exos 治疗组	2.53±0.32**	43.93±1.43*	20.25±1.44*
LIPUS+Exos 治疗组	1.20±0.20***	62.35±1.72*#	35.12±1.93**
F 值	0.337	1.923	0.961
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 Exos 治疗组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

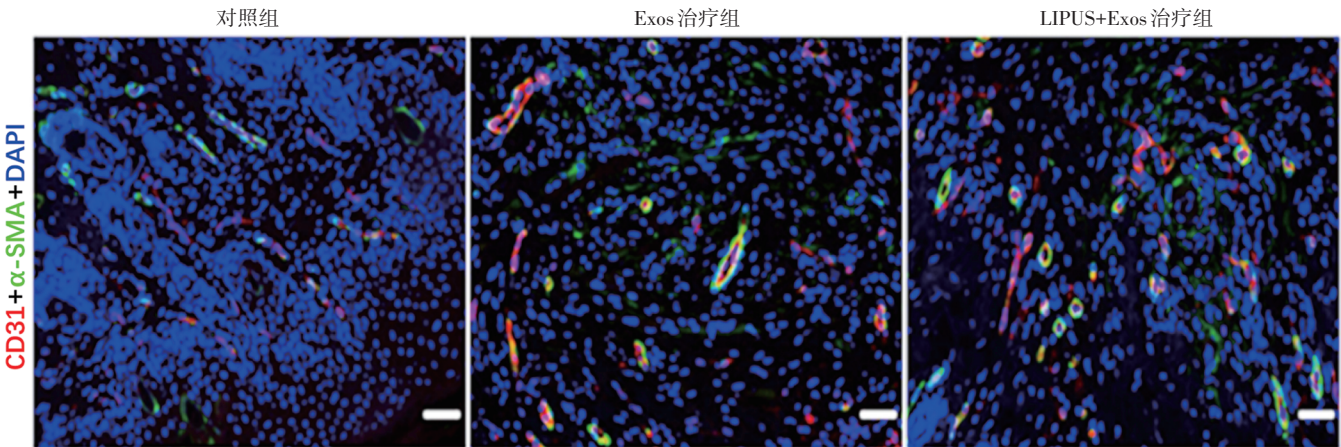


图 5 正置荧光显微镜下观察各组小鼠皮肤创面区域血管新生情况(标尺为 200 μm)

讨 论

糖尿病皮肤溃疡创面是糖尿病严重的并发症之一。血管新生障碍是糖尿病患者创面迁延不愈的重要原因^[7]。目前已知的治疗方法包括各种敷料、高压氧、组织工程皮肤替代品和生长因子等,均被用于促进糖尿病创面的血管新生,然而治疗效果并不理想。研究^[8-9]证实 ADSCs-Exos 具有与干细胞相似的治疗功效,能够促进血管新生,抑制局部的慢性炎症反应,加速皮肤创面的修复,且不存在干细胞植入机体后存活率较低及免疫排斥反应等问题,在糖尿病皮肤创面治疗中具有很好的应用前景。尽管外泌体具有很好的治疗潜力,但是其提取过程繁琐,产量低,体内半衰期较短、生物利用率低,导致其治疗成本较高,从而限制了其在临床上的应用。在干细胞外泌体产量无法显著提升的情况下,尽量提高其生物利用率是目前亟需解决的问题。LIPUS 是一种强度远低于传统超声($<3\text{ W/cm}^2$)的温和物理能量,可对细胞提供非侵入性的局部机械刺激,具有多种治疗效应^[10]。目前,LIPUS 已应用于骨折、软骨及肌腱组织再生、神经系统疾病等的临床治疗且疗效尚佳^[11]。然而其能否促进靶组织对干细胞外泌体的内吞,从而提高外泌体在体内的生物利用率,进而增强干细胞外泌体的治疗效果

目前尚不清楚。因此,本实验通过体外细胞实验和动物实验两方面探讨 LIPUS 对干细胞外泌体内吞的影响,以及促进外泌体内吞对修复糖尿病小鼠皮肤创面的增效作用。

本实验经体外细胞实验结果显示,声强 0.03 W/cm^2 的 LIPUS 辐照 30 min,可显著增加 HUVECs 对 ADSCs-Exos 的摄取,获得更多的生物活性成分。前期实验^[5]也证实外泌体联合 LIPUS 辐照可促使 HUVECs 的增殖、迁移和小管形成能力提高,表明 LIPUS 辐照可提高外泌体的体外生物利用率,促进血管生成。随后进行的动物实验中,活体成像结果显示,LIPUS+Exos 治疗组治疗后 1 h、6 h、36 h 创面区域 ADSCs-Exos 的荧光强度均高于 Exos 治疗组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。表明声强 0.3 W/cm^2 的 LIPUS 辐照能显著促进外泌体向损伤部位的扩散,增加创面周围细胞对外泌体的摄取,降低体内的代谢清除率,延长外泌体的作用时间,提高其生物利用率。冰冻切片也显示,LIPUS+Exos 治疗组创面及周围组织 ADSCs-Exos 阳性细胞率 $[(41.20\pm 1.10)\%]$ 明显高于 Exos 治疗组 $[(23.16\pm 1.16)\%]$,差异有统计学意义($P<0.01$),从微观角度提示 LIPUS 辐照可提高外泌体的生物利用率。本实验各组小鼠皮肤创面修复情况显示,LIPUS+Exos 治疗组小鼠治疗后 3 d、7 d、10 d、14 d 创面闭合率均高于其余两组,差异

均有统计学意义(均 $P<0.05$);14 d 时各组小鼠创面闭合率均 $>80\%$,以 LIPUS+Exos 治疗组最高,达 $(98.52\pm 1.14)\%$,创面几乎完全被表皮所覆盖。表明 LIPUS 联合外泌体治疗可有效促进组织的再生修复,从而加速小鼠皮肤创面的闭合。本实验正置荧光显微镜显示, LIPUS+Exos 治疗组新生血管面积显著大于对照组和 Exos 治疗组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。表明 LIPUS 联合外泌体可使新生组织的血管生成明显增多,提高供血以利于创面的再上皮化。本实验 HE 染色及 Masson 染色显示, LIPUS+Exos 治疗组瘢痕长度明显短于 Exos 治疗组和对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);LIPUS+Exos 治疗组胶原纤维粗大,排布较规则,各组胶原容积分数比较差异有统计学意义($P<0.001$)。提示 LIPUS 联合外泌体可使新生组织得到更好的重塑。由此可见, LIPUS 辐照能显著增加机体细胞和组织对 ADSCs-Exos 的摄取,提高外泌体的生物利用率,放大外泌体的生物效应,促进血管新生,从而加速糖尿病皮肤创面的修复。

LIPUS 增强靶细胞对 ADSCs-Exos 摄取的机制可能与以下原因有关:①LIPUS 辐照在靶区产生稳定的空化效应,使微气泡作为液体环境中的气核不断膨胀和收缩,从而形成微流^[12]。一方面,微流可以使外泌体向不同方向扩散,扩大其在创面区域的分布。本实验中, LIPUS+Exos 治疗组 LIPUS 辐照后, ADSCs-Exos 向不同方向扩散,进而覆盖整个创面,而 Exos 治疗组和对照组中,荧光主要局限于注射部位;另一方面,稳定的空化效应可以促进外泌体与靶细胞的接触,增加细胞膜的通透性,从而显著改善靶细胞的内存作用。快速的扩散和内存作用显著增加了外泌体的摄取,降低了机体代谢清除,从而提高了外泌体的生物利用率。本实验中,活体成像显示 LIPUS 辐照后 36 h, LIPUS+Exos 治疗组仍能观察到大量覆盖创面的荧光,而 Exos 治疗组仅能观察到微弱的点状荧光。②LIPUS 是一种非侵入性的局部机械刺激,具有多种治疗性生物物理效应,虽然 LIPUS 作用的分子机制尚未明确,但越来越多的证据表明, LIPUS“按摩”细胞,并可以通过能量传递激活多种信号通路^[13]。由于 LIPUS 可以激活细胞信号通路,而外泌体是细胞间通讯的重要分子,因此 LIPUS 也可能通过细胞通讯的作用促进外泌体的摄取,甚至二者产生协同效应,增强细胞间通讯,更好地发挥生物功能。这种可能的协同作用有待今后研究的进一步探讨。

综上所述, LIPUS 辐照能有效促进细胞对 ADSCs-Exos 的摄取,提高其生物利用率,增强血管新生,加速糖尿病小鼠皮肤创面的修复;二者的联合效应有助于增强干细胞外泌体治疗的疗效并降低干细胞外泌体治疗的成本,具有较好的临床应用前景。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会,中华医学会感染病学分会,中华医学会儿科分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.
- [2] Zhao B, Zhang X, Zhang Y, et al. Human exosomes accelerate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis in a diabetic mouse model[J]. Stem Cells Dev, 2021, 30(18):922-933.
- [3] Deng H, Chen Y. The role of adipose-derived stem cells-derived extracellular vesicles in the treatment of diabetic foot ulcer: trends and prospects[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13(1):902130.
- [4] Xia P, Shi Y, Wang X, et al. Advances in the application of low-intensity pulsed ultrasound to mesenchymal stem cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1):214.
- [5] 刘珺碧,周青,蒋日月,等.低强度脉冲超声联合脂肪间充质干细胞源性外泌体促进内皮细胞的血管生成[J].临床超声医学杂志,2022,24(1):1-5.
- [6] 李想,吕琴,吴秋月,等.高脂高糖饮食联合 STZ 诱导 C57Bl/6J 品系小鼠构建糖尿病肾病模型的研究[J].重庆医学,2022,51(1):16-19.
- [7] 谷涌泉,周密.糖尿病足缺血性创面的处理原则[J].中华血管外科杂志,2020,5(4):216-219.
- [8] An Y, Lin S, Tan X, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells and application to skin wound healing[J]. Cell Prolif, 2021, 54(3):e12993.
- [9] Hu N, Cai Z, Jiang X, et al. Hypoxia-pretreated ADSC-derived exosome-embedded hydrogels promote angiogenesis and accelerate diabetic wound healing[J]. Acta Biomater, 2023, 157(1):175-186.
- [10] Lucchetti D, Perelli L, Colella F, et al. Low-intensity pulsed ultrasound affects growth, differentiation, migration, and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(6):5363-5377.
- [11] Jiang X, Savchenko O, Li Y, et al. A Review of low-intensity pulsed ultrasound for therapeutic applications[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2019, 66(10):2704-2718.
- [12] Cheng M, Li F, Han T, et al. Effects of ultrasound pulse parameters on cavitation properties of flowing microbubbles under physiologically relevant conditions[J]. Ultrason Sonochem, 2019, 52(1):512-521.
- [13] Li F, Park TH, Sankin G, et al. Mechanically induced integrin ligation mediates intracellular calcium signaling with single pulsating cavitation bubbles[J]. Theranostics, 2021, 11(12):6090-6104.

(收稿日期:2023-02-24)