

本文引用: 刘颖, 尹园缘, 邹巍莹, 曹晖, 宾东华. 象皮生肌膏预处理的骨髓间充质干细胞源外泌体对人脐静脉内皮细胞血管生成的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2): 249-256.

## 象皮生肌膏预处理的骨髓间充质干细胞源外泌体 对人脐静脉内皮细胞血管生成的影响

刘颖<sup>1,2</sup>, 尹园缘<sup>1,2</sup>, 邹巍莹<sup>1,2</sup>, 曹晖<sup>1</sup>, 宾东华<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

**[摘要]** **目的** 探讨象皮生肌膏(Xiangpi Shengji Ointment, XPSJO)预处理的骨髓间充质干细胞源外泌体(XPSJO-Exos)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)血管生成的影响。**方法** 制备象皮生肌膏溶液, CCK-8法检测不同浓度象皮生肌膏(0、10、20、50、100、200 μg/mL)对骨髓间充质干细胞活力的影响;提取骨髓间充质干细胞中的外泌体(exosomes, Exos)和XPSJO-Exos, 分别设为Exos组和XPSJO-Exos组,另设对照组(HUVEC),通过透射电子显微镜观察Exos的形态,采用粒径分析仪检测其粒径;Western blot检测Exos标志蛋白TSG101、CD9和CD63的表达;采用PKH67标记Exos,观察其能否被HUVEC所摄取;采用CCK-8、划痕实验、小管形成实验、ELISA法检测Exos对HUVEC细胞增殖、迁移、小管形成和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)浓度的影响;采用RT-qPCR检测血管生成相关基因ANG1、PDGF、bFGF、EGF的mRNA的表达。**结果** 10、20、50 μg/mL的XPSJO与0 μg/mL的XPSJO间细胞活力比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。与0 μg/mL的XPSJO比较,100、200 μg/mL的XPSJO细胞活力显著降低( $P<0.01$ )。在后续的实验中选择浓度50 μg/mL作为药物使用浓度。Exos组和XPSJO-Exos组均有呈球形、膜结合囊泡的典型Exos结构(大多数Exos粒径约为120 nm,且能被HUVEC摄取),并均检测到Exos标志蛋白TSG101、CD9和CD63的表达。与对照组比较,Exos组和XPSJO-Exos组在72、96 h时细胞活力均显著增强( $P<0.01$ ),HUVEC小管数量、迁移率、VEGF浓度均显著增加或升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与Exos组比较,XPSJO-Exos组在72、96 h时细胞活力均显著增强( $P<0.05$ ),HUVEC小管数量、迁移率、VEGF浓度显著增加或升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** XPSJO-Exos能促进HUVEC的增殖、迁移及小管形成,并促进VEGF的分泌。

**[关键词]** 象皮生肌膏;外泌体;骨髓间充质干细胞;人脐静脉内皮细胞;血管生成;伤口愈合

**[中图分类号]** R269

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.02.011

### Effects of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes pretreated with Xiangpi Shengji Ointment on angiogenesis of human umbilical vein endothelial cell

LIU Ying<sup>1,2</sup>, YIN Yuanyuan<sup>1,2</sup>, ZOU Weiyang<sup>1,2</sup>, CAO Hui<sup>1</sup>, BIN Donghua<sup>1\*</sup>

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes (Exos) pretreated with Xiangpi Shengji Ointment (XPSJO) on the angiogenesis of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). **Methods** XPSJO solution was prepared, and CCK-8 method was used to detect the effects of different concentrations of XPSJO (0, 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL)

**[收稿日期]** 2022-07-13

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81603634);湖南省中医药管理局重点课题(C2022019);湖南省临床医疗技术创新引导项目(2021SK51416);湖南中医药大学校级科研基金项目(2019XJJJ034);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放课题项目(2020ZXYJH05, 2020ZXYJH57);长沙市自然科学基金项目(Kq2202458)。

**[第一作者]** 刘颖,女,硕士研究生,研究方向:肛肠疾病的中医药研究。

**[通信作者]** \* 宾东华,男,博士,副教授, E-mail: bindonghua@163.com。

on the viability of bone marrow mesenchymal stem cell. Exos and XPSJO-Exos were extracted, set as Exos group and XPSJO-Exos group respectively, and HUVEC as control group. Meanwhile, the morphology of XPSJO-Exos was observed by transmission electron microscopy, the particle size of Exos was detected by particle size analyzer. The Exos marker proteins (TSG101, CD9 and CD63) were detected by Western blot, and Exos were labeled with PKH67 to observe whether they could be taken up by HUVEC. The CCK-8, scratch test, tubule formation test, and ELISA were respectively used to detect the effects of Exos on the proliferation, migration, tube formation and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of HUVEC, and the mRNA expression levels of angiogenesis-related genes (ANG1, PDGF, bFGF, and EGF) were detected by RT-qPCR. **Results** There was no significant difference in cell viability between 10, 20, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  XPSJO and 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  XPSJO ( $P>0.05$ ). Compared with the 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  XPSJO, the cell viability in 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  XPSJO was significantly lower ( $P<0.01$ ). 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration of XPSJO was used in the subsequent experiments. Both in the XPSJO-Exos group and XPSJO-Exos group, there were typical spherical Exos structures with membrane-bound vesicles (The particle size of most Exos was 120 nm, and Exos could be taken up by HUVEC), and the expression of Exos marker proteins (TSG101, CD9 and CD63) were detected. Compared with control group, the cell viability was significantly enhanced at 72 and 96 h both in the Exos group and XPSJO-Exos group ( $P<0.01$ ), the number of tubules, migration rate and VEGF concentration of the HUVEC were significantly higher in the Exos group and XPSJO-Exos group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with Exos group, the cell viability was significantly enhanced at 72 and 96 h in the XPSJO-Exos group ( $P<0.05$ ), and the number of tubules, migration rate and VEGF concentration of the HUVEC were significantly higher in the XPSJO-Exos group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion** XPSJO-Exos can promote the proliferation, migration and tubule formation of HUVEC and accelerate the secretion of VEGF.

[**Keywords**] Xiangpi Shengji Ointment; exosomes; bone marrow mesenchymal stem cell; human umbilical vein endothelial cell; angiogenesis; wound healing

伤口修复自古以来都是临床工作中的一大难题。目前,因创伤、手术、慢性疾病等所导致的皮肤伤口给患者、家庭及社会带来了生理、心理、医疗及经济等方面的沉重负担。因此,寻求有效的方法以促进伤口快速地愈合尤为重要。新血管的生成在伤口愈合的过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。新生的血管可运送营养物质、氧气及生长因子至损伤的组织,并带走相关代谢产物,从而加速伤口愈合。因此,刺激血管生成是促进创面愈合的有效策略。近年来,外泌体(exosomes, Exos)作为一种无细胞疗法,避免了干细胞治疗的免疫排斥、致瘤、栓塞等缺点,以其较高的安全性及稳定性和更强大的组织再生潜能,已成为促进伤口愈合的研究热点<sup>[2]</sup>。研究表明,间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)来源的 Exos 可加速组织修复的新生血管形成和提高再生能力,对多种类型的皮肤组织损伤具有强大的修复作用<sup>[3-4]</sup>。MSC 来源的 Exos 可通过携载诸多生物活性分子,作用于内皮细胞,促进其增殖、迁移和成管,从而调节血管生成过程,加速伤口的愈合<sup>[5-6]</sup>。

象皮生肌膏(Xiangpi Shengji Ointment, XPSJO)出自张山雷的《疡科纲要》,湖南中医药大学第一附属医院药物制剂中心在其原方基础上进一步化裁,并结合现代制备工艺制作成中医外科常用膏剂,具有清热解毒、活血化瘀、祛腐生肌之功效,在湖南中

医药大学第一附属医院外科临床广泛应用,生肌效果显著。已有证据表明,预处理可增强MSC 的生物学功能,增强 Exos 活性,从而提高创面修复效果<sup>[7-10]</sup>。目前,XPSJO 结合 Exos 的研究未见报道。因此,本研究以血管新生为切入点,探讨经 XPSJO 预处理骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)后提取的外泌体(XPSJO-Exos)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的影响,分析 XPSJO-Exos 作为“非细胞治疗”方法在促伤口愈合治疗中的潜力,为 XPSJO 促伤口愈合提供实验证据,并为临床促伤口愈合的治疗提供新思路。

## 1 材料

### 1.1 细胞

BMSC 购自广州赛业生物科技有限公司,批号:HUXMA-01001。HUVEC 购自中国科学院细胞库。

### 1.2 主要药物与试剂

XPSJO 药物组成:象皮粉、生地黄、血余炭、当归、炉甘石、醋龟甲、生石膏等(湖南中医药大学第一附属医院制剂室制备,批号:20210510)。

成人 BMSC 完全培养基(广州赛业生物科技有限公司,批号:HUXMA-90011);成人 BMSC 无血清完全培养基(上海泽叶生物科技有限公司,批号:

ZY3055A);内皮细胞培养基(湖南丰晖生物科技有限公司,批号:SC210513);CCK-8试剂盒(批号:FC101-03)、qPCR试剂盒(批号:AQ601-24)均购自北京全式金生物技术股份有限公司;胎牛血清(批号:42F7180K)、Trypsin-EDTA(批号:25200072)均购自美国Gibco公司;细胞上清液Exos提取分离试剂盒(上海宇玫博医药科技有限公司,批号:UR5212);抗TSG101抗体(批号:ab125011)、抗CD63抗体(批号:ab134045)、抗CD9抗体(批号:ab92726)均购自英国Abcam公司;DAPI染色液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C1005);血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-TSEL-H0026);Trizol试剂(北京天根生化科技有限公司,批号:DF424);预混液形式的两步法RT-qPCR试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号:R233-01)。

### 1.3 主要仪器

透射电子显微镜(日本日立公司,型号:H-7650);显微镜相机(日本尼康公司,型号:DS-Fi3);激光共聚焦高内涵筛选平台(上海赛默飞世尔科技有限公司,型号:Cell Insight CX7 Pro LZR);酶标仪(美国Bio Tek公司,型号:Elx800);酶联免疫检测仪(山东博科生物产业有限公司,型号:BK-EL10C);纳米颗粒跟踪分析仪(德国Particle Metrix公司,型号:ZetaView);电泳仪(北京六一生物技术有限公司,型号:DYY-7C);快速湿转仪(南京金斯瑞生物技术有限公司,型号:eBlotTML1);荧光定量PCR仪(德国Eppendorf公司,型号:Realplex2);化学发光成像系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon 5200);超速离心机(美国Beckman Coulter生物技术有限公司,型号:OptimaTMXPN)。

## 2 方法

### 2.1 XPSJO溶液的制备

取洁净的5 mL EP管,称取1 g XPSJO,加入2 mL PBS,加热后溶解XPSJO;待药物完全溶解后,0.45 μm滤膜过滤溶解后的XPSJO,得到浓度为500 μg/mL的XPSJO溶液,分装后置于-20 °C冰箱内保存。

### 2.2 细胞的培养与预处理

BMSC采用成人BMSC完全培养基培养,HUVEC采用内皮细胞培养基培养,以上细胞均置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,待细胞融合度达80%时进行传代<sup>[11]</sup>。

在96孔板中配制100 μL的BMSC细胞悬液 $4 \times 10^5/\text{mL}$ ,37 °C培养至80%的细胞融合,更换维持培养基(2% FBS+98% DMEM),加入10 μL不同浓度XPSJO溶液(0、10、20、50、100、200 μg/mL),每组5个复孔,并设空白对照孔。24 h后吸去培养液,DPBS洗涤2次,每孔加90 μL维持培养基及10 μL CCK-8溶液,培养2 h后,用酶标仪测定450 nm处的吸光度(A),确定适合的药物浓度。细胞活力(%)= $[A(\text{加药})-A(\text{空白})]/[A_0(\text{加药})-A(\text{空白})] \times 100\%$ 。根据实验结果,在后续的实验中选择浓度为50 μg/mL的XPSJO溶液作为药物使用浓度。

### 2.3 Exos的提取及形态观察

待BMSC融合度到80%时,更换为无血清培养基培养,加入XPSJO或等体积PBS,48 h后收集细胞培养上清液。以300×g离心10 min,2000×g离心20 min后,收集上清液,按照Exos提取分离试剂盒操作说明提取BMSC中的Exos(Exos组)和XPSJO-Exos(XPSJO-Exos组),储存于-80 °C冰箱内,用于下一步的实验。

在孔径为2 nm的载样铜网上滴加Exos悬液,室温静置5 min,滤纸吸干浮液,滴加3%的磷钨酸于载样铜网上,室温下染色1 min,滤纸吸去染色液,透射电子显微镜下观察成像并拍照。

采用粒径分析仪测量Exos的粒径。

### 2.4 Western blot检测Exos标志物蛋白CD9、CD63、TSG101的表达

配制10%分离胶及浓缩胶,以6 μL/孔向加样孔中加入Exos蛋白样品,80 V电泳30 min,调整电压到100 V,溴酚蓝进入到凝胶底部后停止电泳,恒流200 mA转膜1 h,5%脱脂奶粉封闭2 h,加一抗(TSG101、CD63、CD9),4 °C摇床过夜,TBST洗膜,加入二抗室温孵育1 h,TBST洗膜,滴加ECL发光液显色,于化学发光成像系统孵育板上曝光采集图像,Image J软件分析灰度值。

### 2.5 Exos的分离及被HUVEC摄取观察

根据PKH67使用说明书,采用绿色荧光染料标记Exos。将PKH67标记的Exos与HUVEC继续共培养24 h,4%多聚甲醛固定15 min,PBS洗涤3次,滴加2 mg/mL DAPI,室温染核5 min。最后,通过激光共聚焦显微镜观察并拍照。

### 2.6 HUVEC增殖、迁移及小管形成能力检测

在96孔板中配制100 μL的HUVEC细胞悬液(细胞密度 $4 \times 10^5/\text{mL}$ ),37 °C培养至80%的细胞融合后更换维持培养基(2% FBS+98% DMEM),每孔

中加入 10  $\mu\text{L}$  200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Exos, 并设空白对照孔(对照组), 每组 4 个复孔, 放入培养箱中培养。分别在 24、48、72、96 h 时, 吸去培养液, DPBS 洗涤细胞 2 次, 每孔加 90  $\mu\text{L}$  维持培养基及 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 继续培养 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 即为细胞活力。

将 HUVEC 接种于 6 孔板, 待细胞融合达 80% 时, 使用枪头垂直于直尺进行划痕操作, PBS 洗涤细胞 3 次, 加入含 Exos 或不含 Exos 的无血清培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h, 于 0、24 h 使用光学显微镜观察并拍照。

将解冻后的基质胶与无血清培养基按 1:1 混合稀释, 在预冷的 24 孔板中以 150  $\mu\text{L}$ /孔装入混合液, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱内 30 min, 使混合液凝固。将 HUVEC 细胞悬液以  $1.5 \times 10^5$  个/孔接种至 24 孔板, 加入 Exos, 并设置空白对照, 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 6 h, 光学显微镜观察毛细血管样结构的形成并拍照。

### 2.7 ELISA 法检测 HUVEC 的 VEGF 的表达

将 HUVEC 接种于 6 孔板, 加入 Exos 共培养, 并设置空白对照孔(对照组), 离心并收集各组 HUVEC 细胞上清液, 按照 ELISA 试剂盒使用说明, 检测各组上清液中 VEGF 的表达。

### 2.8 RT-qPCR 法检测 HUVEC 的 ANG1、PDGF、bFGF、EGF 表达

将 HUVEC 接种于 6 孔板, 加入 Exos 共培养, 并设置空白对照孔(对照组), 随后进行 RNA 的检测。采用 Trizol 法提取 RNA, 测定 RNA 的浓度后, 使用预混液形式的两步法 RT-qPCR 试剂对提取的 RNA 进行反转录, 获得互补 DNA。采用 SYBR 法对互补 DNA 样品进行 RT-qPCR 检测。95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s、60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 循环 40 次。针对每个基因, 设计一对引物以检测 mRNA 的表达情况,

并设置 GAPDH 作为内参对照, 引物序列见表 1。数据采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行分析。

### 2.9 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行数据分析。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示; 三组间比较采用 *One-way ANOVA* 和 *Turkey* 检验; 两组间比较采用 *t* 检验。以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 XPSJO 的安全浓度

10、20、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 XPSJO 与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 XPSJO 间细胞活力比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 XPSJO 比较, 100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 XPSJO 细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ )。在后续的实验中选择浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为药物使用浓度。详见图 1。

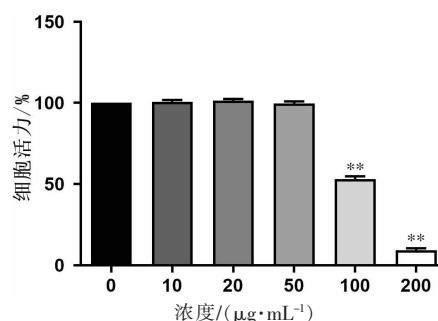


图 1 不同浓度的 XPSJO 对细胞活力的影响

注: 与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 XPSJO 比较,  $**P < 0.01$ 。

### 3.2 Exos 的分离鉴定

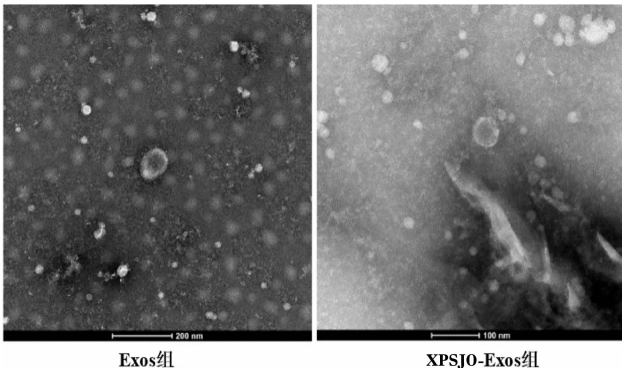
(1) 透射电子显微镜观察到 Exos 组和 XPSJO-Exos 组均有呈球形、膜结合囊泡的典型 Exos 结构。详见图 2。

(2) Western blot 检测结果表明, Exos 组和 XPSJO-Exos 组均检测到 Exos 标志性蛋白 TSG101、CD9 和 CD63 的表达。详见图 3。

(3) 粒径分析研究表明, 大多数 Exos 粒径约为

表 1 引物序列

引物名称	正向序列	反向序列	长度/bp
PDGF	CTCGATCCGCTCCTTTGATGA	CGTTGGTGCCTCTATGAG	193
bFGF	AGAAGAGCGACCCTCACATCA	CGGTTAGCACACACTCCTTTG	228
EGF-1	GTAGATGGACCTCGGGAAC	TGCGCTACCTGAAACTGA	193
ANG1-1	AGCGCGAAGTCCAGAAAC	TACTCTCAGCAGTTGCCAT	182
EGF-2	CAGGGAAGATGACCACCACT	CAGTCCCACCACTTCAGGT	187
ANG1-2	GAAGGGAACCGAGCCTATTC	GGGCACATTTGCACATACAG	181
GAPDH	CCGGGAAACTGTGGCGTGATGG	AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTT	186



Exos组 XPSJO-Exos组

图2 电子显微镜检测 Exos

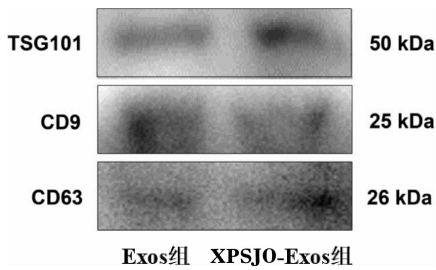


图3 Exos 标记蛋白 TSG101、CD9、CD63 电泳图

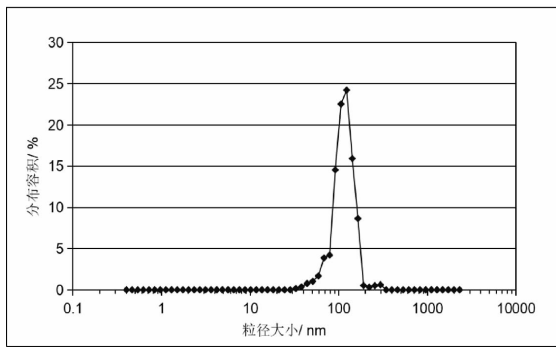
120 nm。详见图4。

(4)激光共聚焦显微镜观察结果显示,成功分离到 Exos,Exos 能被 HUVEC 摄取,且 Exos 组和 XPSJO-Exos 组 Exos 结构、大小、吞噬性能等方面无明显差别。详见图5。

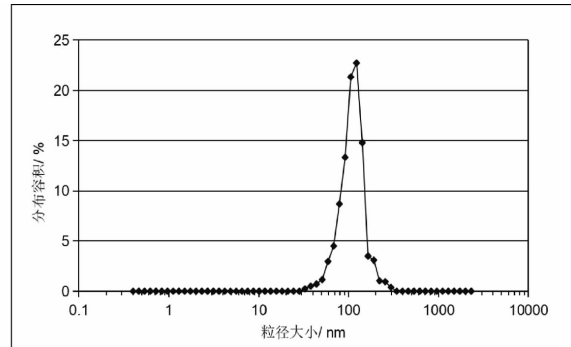
### 3.3 Exos 对 HUVEC 增殖、迁移及小管形成能力的影响

(1)与对照组比较,Exos 组和 XPSJO-Exos 组在 72、96 h 时细胞活力均显著增强 ( $P<0.01$ )。与 Exos 组比较,XPSJO-Exos 组在 72、96 h 时细胞活力均显著增强 ( $P<0.05$ )。详见图6。

(2)与对照组比较,Exos 组和 XPSJO-Exos 组 HUVEC 迁移率显著升高 ( $P<0.01$ )。与 Exos 组比较,XPSJO-Exos 组 HUVEC 迁移率显著升高 ( $P<0.05$ )。详见图7。



Exos组



XPSJO-Exos组

图4 Exos 粒径分析图

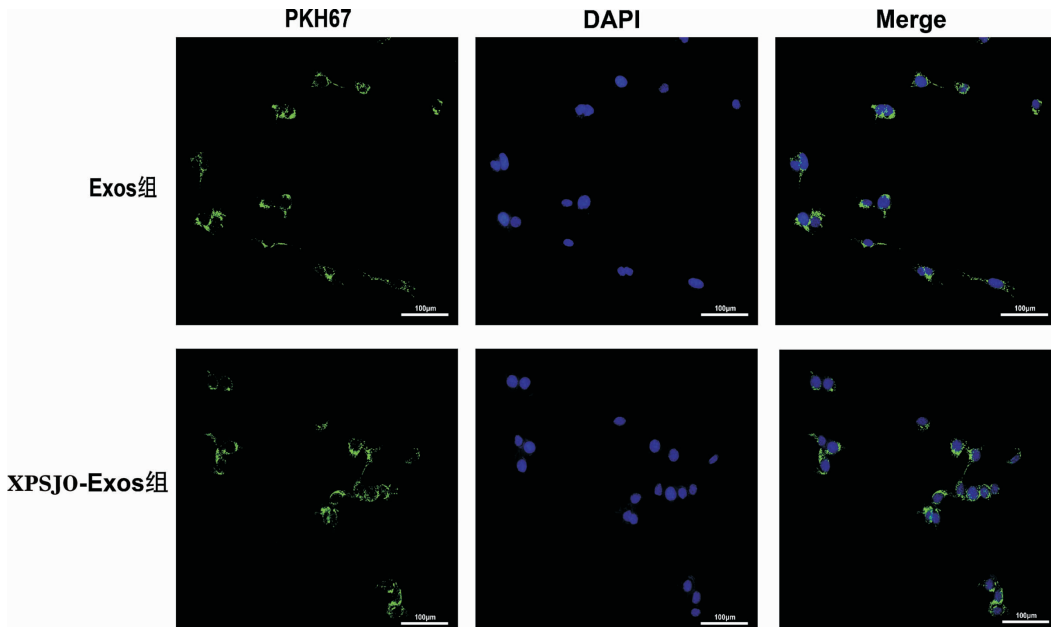


图5 Exos 被 HUVEC 摄取激光共聚焦图

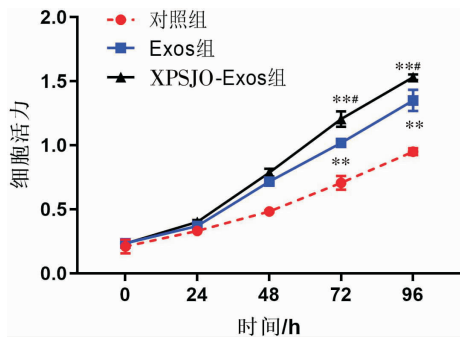


图 6 CCK-8 检测细胞增殖

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 Exos 组比较,# $P<0.05$ 。

(3)与对照组比较,Exos 组和 XPSJO-Exos 组小管数量显著增加( $P<0.01$ )。与 Exos 组比较,XPSJO-Exos 组小管数量显著增加( $P<0.05$ )。详见图 8。

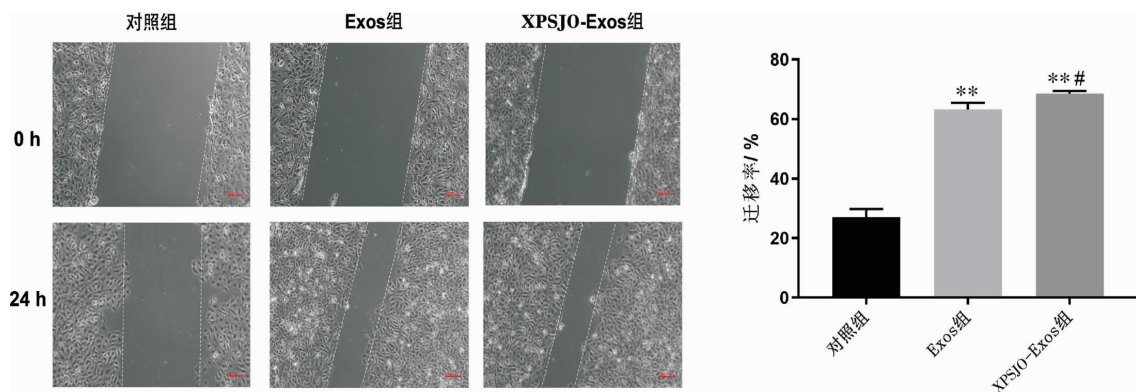


图 7 划痕实验检测细胞迁移(bar=100  $\mu\text{m}$ )

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 Exos 组比较,# $P<0.05$ 。

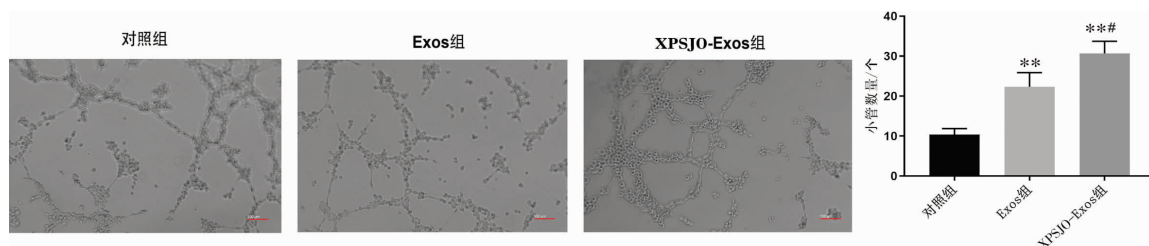


图 8 小管形成实验检测结果(bar=100  $\mu\text{m}$ )

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 Exos 组比较,# $P<0.05$ 。

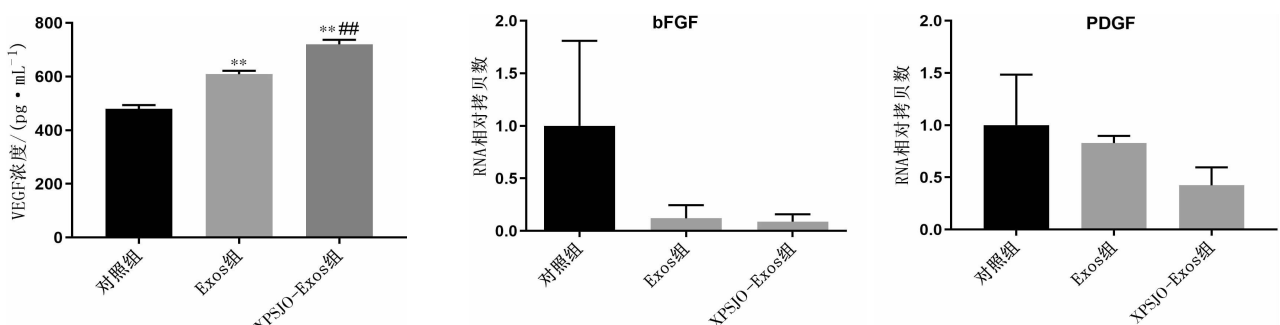


图 9 各组 VEGF 浓度及 bFGF、PDGF RNA 相对拷贝数比较

注:与对照组比较,\*\* $P<0.01$ ;与 Exos 组比较,# $P<0.01$ 。

(4)与对照组比较,Exos 组和 XPSJO-Exos 组 VEGF 浓度显著升高( $P<0.01$ )。与 Exos 组比较,XPSJO-Exos 组 VEGF 浓度显著升高( $P<0.01$ )。详见图 9。

### 3.4 HUVEC 的 ANG1、PDGF、bFGF、EGF 的 RNA 相对拷贝数

与对照组比较,Exos 组和 XPSJO-Exos 组 bFGF、PDGF RNA 相对拷贝数下降,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见图 9。

## 4 讨论

伤口愈合是一个重要并且复杂的生理过程,涉及多种细胞类型及其分泌因子的相互作用<sup>[12-13]</sup>。正

常的伤口愈合包括了4个部分重叠的阶段:稳态、炎症、增殖及重塑阶段,这些阶段紧密协助,促进皮肤伤口愈合,从而恢复皮肤的屏障保护功能<sup>[14]</sup>。由于新形成的伤口区域缺乏氧气和营养,因此,能将营养物质、氧气和生长因子输送到损伤部位的新生血管在皮肤组织再生中至关重要。尤其是对于糖尿病足等慢性伤口而言,血管功能障碍导致创面供血不足,伤口难以愈合,故新生血管的生成是促其伤口修复的关键步骤<sup>[15]</sup>。

在过去的十年里, MSC 以其自我更新、多向分化潜能和免疫调节能力等优点,广泛应用于促进和改善创面愈合,其中,以 BMSC 研究最早且应用最广泛<sup>[16-17]</sup>。但随着研究的进展, MSC 细胞治疗展现出了诸多局限及不良反应,且更多证据表明, MSC 发挥的生物学疗效主要来自于其旁分泌的产物,即 Exos<sup>[18]</sup>。Exos 是粒径在 30~150 nm 的细胞外囊泡,其能携带众多生物活性分子如 mRNA、miRNA 和蛋白质等,发挥类似干细胞的治疗效果,并为伤口修复提供了一种潜在方式。研究表明, MSC 来源的 Exos 参与了血管形成中的多条通路,可通过传递活性因子促进血管新生,在伤口修复中发挥着重要作用<sup>[19-20]</sup>。

中医药促进伤口愈合的方面历史悠久且具有独特优势<sup>[21]</sup>。XPSJO 作为祛腐生肌的代表性药物,广泛应用于多种伤口的修复,如各类溃疡、肛肠疾病术后创面、软组织损伤等,促伤口愈合疗效显著,沿用至今已有百年余<sup>[22-30]</sup>。XPSJO 由象皮粉、生地黄、血余炭、当归、炉甘石、醋龟甲、生石膏等药物组成。其中象皮粉具有敛疮止血的功效;生地黄具有清热养阴生津、凉血止血的功效;血余炭具有收敛止血、化瘀的功效;当归具有补血活血、生肌止痛的功效;炉甘石具有解毒止痒、收湿敛疮的功效;龟甲具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心的功效;生石膏具有解肌清热、泻火解毒的功效。诸药合用,共奏清热活血、收湿敛疮、祛腐生肌之功效。

本研究首先采用不同浓度 XPSJO 预处理 BMSC,通过细胞活力检测发现 XPSJO 安全浓度为 10、20、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而 100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 XPSJO 能显著降低 BMSC 的活力。对提取的 Exos 形态结构、大小、吞噬性能、标志性蛋白进行检测,结果表明, XPSJO-

Exos 和 Exos 在形态结构、大小和表面标记物表达上几乎没有显著差异,证明 XPSJO-Exos 被成功提取,且 XPSJO-Exos 及 Exos 均能被 HUVEC 摄取。

通过使用物理因素、细胞因子及药物等对 Exos 的供体细胞进行预处理,可以提高 Exos 促血管生成功能,达到更好的促伤口愈合效果。如 HU 等<sup>[9]</sup>研究证明,经吡格列酮预处理的 BMSC 的 Exos 在高糖的条件下通过激活 PI3K/AKT/eNOS 通路增加了 VEGF 的表达,进一步增强了 HUVEC 的血管生成能力,通过增强血管生成加速糖尿病大鼠伤口的愈合。同样,使用阿托伐他汀钙预处理的 MSC 来源的 Exos 在糖尿病创面的愈合中展现了显著的促血管生成能力。该研究证实,使用阿托伐他汀钙预处理的 MSC 来源的 Exos 能通过上调 miR-221-3p,介导 AKT/eNOS 信号通路,增强 HUVEC 的生物学功能,从而促进创面修复和再生<sup>[8]</sup>。本研究结果显示:与对照组比较, Exos 组及 XPSJO-Exos 组在体外能促进 HUVEC 增殖、迁移及小管形成等生物学功能,且 XPSJO-Exos 组促进 HUVEC 生物学功能的能力强于 Exos 组。

血管形成是多种促血管形成因子和抑制因子相互协调作用的复杂过程,其中, VEGF 是血管生成的重要调节因子,通过促进血管内皮细胞的增殖及新生血管的形成,从而促进伤口修复<sup>[14]</sup>。本实验结果显示: XPSJO-Exos 能显著升高 HUVEC 细胞上清液中 VEGF 的浓度,表明 XPSJO-Exos 能明显促进 HUVEC 分泌 VEGF,从而加速血管的新生。

本次体外实验证实, XPSJO-Exos 能够增强 HUVEC 促血管生成的能力,但其具体的作用机制需要更深入的研究。同时, XPSJO-Exos 在体内实验的作用效果尚不明确,因此,后续还需进行动物实验以探讨 XPSJO-Exos 对体内血管生成的影响。此外,血管生成相关基因 bFGF、PDGF 的表达呈现下降趋势,但无统计学差异 ( $P>0.05$ ),而 EGF 和 ANG1 未见表达。该结果可能证实 XPSJO-Exos 对血管生成相关基因 (ANG1、PDGF、bFGF、EGF) 的表达无影响。

综上所述,本研究证实 XPSJO-Exos 被成功提取,其能促进 HUVEC 的增殖、迁移及小管形成,并促进 VEGF 的分泌。本研究为促伤口愈合的治疗提供了新思路。

## 参考文献

- [1] VEITH A P, HENDERSON K, SPENCER A, et al. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, 146: 97–125.
- [2] HU P, YANG Q X, WANG Q, et al. Mesenchymal stromal cells-exosomes: A promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration[J]. *Burns and Trauma*, 2019, 7: 38.
- [3] 王江文,易阳艳,朱元正. MSCs 来源外泌体在创面修复中的研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2019, 33(5): 634–639.
- [4] 刘 慧,杨淑娇,李玉霞. 间充质干细胞外泌体研究热点分析与前景展望[J]. *中国医药生物技术*, 2022, 17(1): 64–69.
- [5] HA D H, KIM H K, LEE J, et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes for immunomodulatory therapeutics and skin regeneration[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1157.
- [6] 马 元,庄雪莹,陈旭. 间充质干细胞外泌体调控血管生成机制的研究进展[J]. *中国医科大学学报*, 2021, 50(10): 944–947.
- [7] DING J N, WANG X, CHEN B, et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by deferroxamine accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis[J]. *BioMed Research International*, 2019, 2019: 9742765.
- [8] YU M Y, LIU W, LI J X, et al. Exosomes derived from atorvastatin-pretreated MSC accelerate diabetic wound repair by enhancing angiogenesis via AKT/ENOS pathway[J]. *Stem Cell Research and Therapy*, 2020, 11(1): 350.
- [9] HU Y Q, TAO R Y, CHEN L, et al. Exosomes derived from pioglitazone-pretreated MSCs accelerate diabetic wound healing through enhancing angiogenesis[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 150.
- [10] LIU W, YU M Y, XIE D, et al. Melatonin-stimulated MSC-derived exosomes improve diabetic wound healing through regulating macrophage M1 and M2 polarization by targeting the PTEN/AKT pathway[J]. *Stem Cell Research and Therapy*, 2020, 11(1): 259.
- [11] 杜韦静,陈宝元,薛晓东,等. 生肌象皮膏与无象皮处方生肌膏的体外抗炎及免疫调节作用[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(7): 1290–1294.
- [12] EMING S A, MARTIN P, TOMIC-CANIC M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation[J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(265): 1–16.
- [13] 何秀娟,马慧可,刘青武,等. 细胞因子在创面修复中的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(5): 579–585.
- [14] KARPPINEN S M, HELJASVAARA R, GULLBERG D, et al. Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring[J]. *F1000 Research*, 2019, 8: 787.
- [15] MONIKA P, CHANDRAPRABHA M N, RANGARAJAN A, et al. Challenges in healing wound: Role of complementary and alternative medicine[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 8: 791899.
- [16] HU M S, BORRELLI M R, LORENZ H P, et al. Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: A comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential[J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018: 6901983.
- [17] 曹颖璇,燕建新,刘宏伟. MSCs 治疗慢性创面的临床研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2021, 35(4): 496–501.
- [18] MAROFI F, ALEXANDROVNA K I, MARGIANA R, et al. MSCs and their exosomes: A rapidly evolving approach in the context of cutaneous wounds therapy[J]. *Stem Cell Research and Therapy*, 2021, 12(1): 597.
- [19] 德 奇,巴 特,王宏宇,等. 外泌体携带的微小 RNA 在创面修复中的研究进展[J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)*, 2021, 16(1): 78–80.
- [20] CASADO-DÍAZ A, QUESADA-GÓMEZ J M, DORADO G. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Applications in skin wound healing[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 146.
- [21] 丁晓杰,蒯 仝,李 斌,等. 从祛腐生肌到“清、化、补”动态序贯疗法辨治创面修复理论溯源及经验采撷[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(5): 2578–2580.
- [22] 杜攀攀,李木清,程学荣,等. 象皮生肌膏作用机制与临床应用研究进展[J]. *中国中医药图书情报杂志*, 2020, 44(6): 74–77.
- [23] 雷 宇,周忠志,兰宏伟,等. 象皮生肌膏对糖尿病皮肤溃疡修复的效果及其机理探究[J]. *中国美容医学*, 2022, 31(1): 89–92.
- [24] 高蓝天,周忠志. 象皮生肌膏促糖尿病大鼠皮肤溃疡愈合机制研究[J]. *中医药导报*, 2021, 27(2): 12–15.
- [25] 姜 雄,李木清,毛 滔,等. 象皮生肌膏对慢性创面愈合及 PTEN、p-AKT、VEGF 蛋白表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021, 41(1): 67–71.
- [26] 曾婷婷,宾东华,罗 翌,等. 象皮生肌膏对肛瘘术后模型大鼠创面中白介素-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$  蛋白表达的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(4): 634–637.
- [27] 谢心军,张 博,张 雄,等. 象皮生肌膏对外伤创面修复及 BFGF 表达的影响[J]. *西部中医药*, 2020, 33(4): 121–123.
- [28] 谢先敏,王林华,谢心军,等. 胫骨横骨搬运技术联合外用象皮生肌膏对糖尿病足兔溃疡愈合影响的实验观察[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(1): 18–21.
- [29] 吴 敏,张月娟,余艳兰,等. 象皮生肌膏联合艾灸治疗 III 期压疮合并糖尿病的疗效观察[J]. *中医药导报*, 2018, 24(7): 81–83.
- [30] 李 遼,熊家青,宾东华. 象皮生肌膏治疗糖尿病型肛瘘疗效观察[J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13(1): 131–134.