

综述

脐血间充质干细胞来源外泌体治疗糖尿病足的研究进展*

文 迁¹ 邵挥戈² 孙逸虎² 刘 婷²

1 湖南中医药大学研究生院,湖南省长沙市 410208; 2 南华大学附属长沙中心医院内分泌科

摘要 糖尿病足溃疡(DFU)是糖尿病最严重的慢性并发症之一,主要由外周血管闭塞引起,并伴有不同程度的感染。糖尿病足溃疡的治疗在临床医学中极具挑战性,它带来了坏疽、截肢甚至死亡风险。人脐血间充质干细胞来源的外泌体(HUMSCs-Exos)具有组织修复和再生的潜力,在支持或加速伤口愈合过程中的潜在用途已引起越来越多的关注。现对人脐血间充质干细胞来源的外泌体的生物学特性和功能、在糖尿病足溃疡创面愈合中的作用机制及给药方式进行综述,旨在为糖尿病足溃疡的治疗提供新思路。

关键词 外泌体 人脐血间充质干细胞 糖尿病足溃疡 创面愈合

中图分类号:R587.2 文献标识码:A doi:10.19381/j.issn.1001-7585.2024.04.007

糖尿病足溃疡(Diabetic foot ulcer, DFU)的发生是由于糖尿病合并血管病变致使局部血液供应不足,周围神经病变及机械性损伤合并感染所致,继而溃疡形成和(或)深层组织的破坏。其发生率高达34%,复发率1年内为40%,5年内为65%,是糖尿病患者住院或截肢的最主要原因。DFU目前主要采用内外科联合治疗的方式,中下肢血管严重狭窄者,可行外科血管再造手术及介入放射学治疗。然而在临幊上有一部分患者因下肢微循环差、小动脉完全闭塞、缺乏远端动脉流出通道等原因无法行外科血管重建手术而被迫接受截肢。此外,由于糖尿病足溃疡患者多因年老体弱,或心肺功能差、基础病多而不能进行手术治疗,致残率及致死率不断增加^[1]。因此,开辟新的治疗方式是必然趋势。

近年来,外泌体(Exosomes, Exos)成为创面修复和再生医学的研究热点,其具有缓解炎症反应、促进血管形成、诱导再上皮化等潜在的治疗作用,在DFU创面愈合方面有良好的治疗前景。Exos有多种来源,例如骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞和脐血间充质干细胞等,而人脐血间充质干细胞与其他干细胞相比,具有成本低、侵袭性小、分离方便、细胞含量大、基因转染效率高和免疫原性低等优点,成为细胞疗法和再生医学的首选^[2]。本文对人脐血间充质干细胞来源的外泌体(Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells derived-exosomes, HUMSCs-Exos)的生物学特性和功能、在DFU中的作用机制及给药方式进行综述,旨在为DFU的治疗提供新思路。

1 人脐血间充质干细胞来源的外泌体

外泌体是40~100nm大小的内体来源的小脂质双层囊泡,密度为1.13~1.19g/ml,含有蛋白质、mRNA、miRNA和DNA。它是关键的旁分泌介质,

可以从包括血浆在内的生物体液中获得,并能够通过转移诸如miRNA等活性物质来诱导再生效应,具有修复和再生组织的治疗潜力,包括促进伤口愈合,且与细胞直接处理可避免干细胞移植疗法的许多负面影响。在所有干细胞外泌体中,HUMSCs-Exos具有突出的优势,其应用在各种疾病治疗中被提及,如糖尿病、器官移植、移植物抗宿主病、心血管、炎症、肝、肺、肾、神经、自身免疫,以及骨和软骨疾病,这些研究大多数都已经在动物模型中展开。HUMSCs-Exos具有促进细胞增殖和迁移、血管生成和创面闭合的能力^[3]。Qu等^[4]将提取的HUMSCs-Exos局部注射到小鼠皮肤创面中发现,它可促进成纤维细胞的增殖和迁移,增强内皮细胞的血管生成活性,加速上皮再生并减少瘢痕形成。另外的研究显示在糖尿病或烧伤动物模型中,局部注射HUMSCs-Exos也有相同的作用^[5]。在临幊上,将HUMSCs-Exos应用于人工耳蜗植入过程中,可以减少由电极插入引发的炎症^[6];静脉注射和动脉内靶向注射HUMSCs-Exos至受损肾脏,可以改善炎症免疫反应并暂时(3~6个月)改善Ⅲ~Ⅳ级CKD患者的整体肾功能^[7]。这些研究表明DFU创面愈合基于HUMSCs-Exos的治疗是一种很有前景的疗法,且在人体上应用有一定安全性。

2 糖尿病足溃疡创面愈合

创面愈合是生物分子活动引发的一种复杂而动态的细胞信号响应,一般根据时间、修复过程、病因情况不同可将伤口分为急性伤口和慢性伤口。伤口在通过有序、及时的修复愈合过程后,可恢复解剖和功能的完整性,在这个过程中需要成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞、血小板等多种修复细胞和血液成分的参与^[8]。DFU患者因为下肢血管及神经病变和长期的高糖毒性影响使得溃疡创面中白细胞的吞噬

*基金项目:湖南省自然科学基金课题(2020JJ4638);长沙市科学技术局课题(kzd21077)。通信作者:刘婷

能力减弱,病原菌在组织内的生长条件更加有利,创面更易发生感染且很难控制;像一些炎症修复细胞如碱性成纤维细胞、内皮细胞等,因糖尿病慢性病变综合因素作用,其原有的分泌功能发生障碍致细胞因子分泌减少或细胞增殖减少或凋亡增多,导致用于组织修复的细胞因子如血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子2(FGF2)、血小板源性生长因子(PDGF)等因素的数量减少;炎症相关蛋白分解平衡受损,基质金属蛋白酶类(MMP)水平提升而其酶类抑制剂含量降低,加上受细胞迁移激活的组织支架修复程序破坏及胶原蛋白的过分分解,溃疡创面愈合过程已从分子层面被阻断^[9];末梢血管病变所导致的溃疡局部供血不足造成组织物质交换不足,代谢废物无法及时运输且一些营养物质也无法得到正常供应,使得溃疡创面愈合的能力受到自身因素的限制。对于DFU伤口,如果不及早治疗或受到干扰,运动系统将陷入局部血流减少导致的肌肉痉挛、炎症浸润、缺血或坏死的恶性循环。许多促进愈合的传统治疗方法,如激光、治疗敷料、负压伤口治疗、电刺激、高压氧等,在临幊上都有应用,但这些方法都不完全令人满意,目前,主要研究集中在自体细胞疗法或无细胞疗法,尤其是对HUMSCs-Exos的研究。

3 HUMSCs-Exos 促进糖尿病足溃疡创面愈合的机制

HUMSCs-Exos的治疗应用是一种相对较新的生物技术,代表了许多领域的突破,特别是在DFU创面愈合方面。其作为一种自体无细胞疗法,主要是通过激活伤口愈合机制来促进伤口愈合,而不是一些传统疗法的辅助维持模式。DFU创面愈合是一个复杂的过程,主要有三个基本阶段:急性炎症期、细胞增殖期和表皮及其他组织再生期。而HUMSCs-Exos在创面愈合过程的每个阶段都起到了重要作用。

3.1 HUMSCs-Exos 在急性炎症期的功能 急性炎症期是创面愈合过程中的第一阶段:创面出现不同程度的组织坏死和血管破裂,炎症反应在数小时内发生。富含多种蛋白质和RNA的外泌体与炎症过程的调控紧密相关。急性炎症期主要由中性粒细胞组成的白细胞积聚,3d后转化为巨噬细胞为主的富集。巨噬细胞是重要的炎症细胞,具有促炎M1和抗炎M2两个表型。HUMSCs-Exos中特异表达的miRNA let-7b通过TLR4/NF-κB/STAT3/AKT信号通路稳定调节巨噬细胞的极化,推动巨噬细胞向M2抗炎表型分化,减轻炎症反应并促进糖尿病皮肤伤口的愈合^[10]。另外研究发现HUMSCs-Exos中三种特定的miRNA(miR-21、miR-146a和miR-181)上调表达较显著,它们在调节炎症过程中也起着关键作用。MiR-21在巨噬细胞中诱导细胞增殖,其通过沉默PTEN和GSK3β、抑制NF-κB活化和促进c-Jun/AP1活性来抑制炎症反应并促进伤口愈合^[11];当增强巨噬细胞中miR-146a的转录时,能够抑制体内促

炎巨噬细胞反应,从而抑制NF-κB介导的炎症反应^[12];MiR-181c则通过降低TLR4表达和减少NF-κB/p65活化来调节炎症^[5]。这些结论为HUMSCs-Exos在溃疡创面愈合中的应用提供了理论支持。

3.2 HUMSCs-Exos 在细胞增殖期的功能 在细胞增殖期,内皮细胞和成纤维细胞的增殖促进血管生成和新的细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)合成,这是创面愈合的关键。HUMSCs-Exos可通过miRNA和蛋白质作为载体,调节细胞间的通讯,能显著增强血管内皮细胞和成纤维细胞的增殖和迁移功能。研究显示,将HUMSCs-Exos移植到大鼠皮肤缺损区,缺损区角质形成细胞生长因子(KGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)的量增加。更关键的是,与血管新生相关的重要正向调节剂血管内皮生长因子(VEGF)和成纤维细胞生长因子2(FGF2)表达得更多,该区域的血管新生、胶原合成和再上皮化显著提升,瘢痕组织形成明显减少^[13]。HUMSCs-Exos诱导更高的伤口闭合率,增加体内CD31的表达,并含有血管生成素-2(Ang-2)。其中Ang-2的高表达进一步增强了内皮细胞迁移和血管形成,在大鼠皮肤伤口中发挥治疗和促血管生成作用^[14]。Wnt4是激活β-catenin信号通路的关键因素,预激活Wnt/β-catenin信号通路的脐血间充质干细胞在治疗DFU方面具有一定潜力。Zhang等^[15]发现,Wnt4由HUMSCs-Exos传递,其递送Wnt4从而激活AKT通路来促进创面愈合并抑制热应激诱导的皮肤细胞凋亡。HUMSCs-Exos中Wnt4的降低减少了内皮细胞中的β-连环蛋白核易位,体内促血管生成作用也被Wnt4表达的干扰所抑制,这表明HUMSCs-Exos介导的Wnt4诱导内皮细胞中的β-连环蛋白活化可发挥促血管生成作用。2016年又发现Hippo通路的两个关键调节因子:YES相关蛋白(YAP)和肿瘤抑制因子(p-LATS)参与创面修复,HUMSCs-Exos的14-3-3蛋白通过形成复合物招募p-LATS诱导YAP的Ser127磷酸化,从而通过有效协调Wnt4活性的自我控制来调节皮肤细胞增殖^[16]。

3.3 HUMSCs-Exos 在表皮和其他组织再生阶段的功能 在组织再生过程中,人皮肤成纤维细胞(HDF)和胶原蛋白I是关键。基质金属蛋白酶1(MMP-1)又称间质性胶原酶,可分解I、II和III间质胶原,影响胶原和弹性蛋白的产生。HUMSCs-Exos可以通过直接膜融合、内吞作用或细胞型特异性吞噬作用被HDF吸收并增强体外生长和迁移,在整个皮肤以及角质层和表皮中的渗透显著增加。经局部治疗渗入人皮肤的HUMSCs-Exos会降低离体人皮肤中MMP-1的产生,从而增加胶原和弹性蛋白的产生^[17],这对人类皮肤的恢复至关重要。另外HUMSCs-Exos包含大量生长因子,如外泌体蛋白14-3-3控制了YAP的活性和磷酸化,它在高细胞密度下将p-LATS与YAP结合,由此而形成的复合物可以限制皮肤重塑过程中过度的成纤维细胞扩张和

胶原沉积。简而言之,HUMSCs-Exos 通过调节 YAP 来协调受控的皮肤再生,从而起到信号“刹车”的作用^[17]。转化生长因子-β(TGF-β)被认为是创面愈合中不可或缺的生长因子之一,TGF-β结合并激活膜受体丝氨酸/苏氨酸激酶复合物,磷酸化各种 SMAD 家族蛋白,对创面愈合至关重要。但病理状态下伤口部位高水平 TGF-β 活性与过度瘢痕形成和纤维化有关。所以,干扰 TGF-β/SMAD2 信号转导通路的活性可能会抑制成纤维细胞的分化和过度聚集,从而减少过度纤维化或瘢痕形成。而研究发现 HUMSCs-Exos 衍生的特定 microRNA,如 miR-21、miR-23a、miR-125b 和 miR-145 抑制 TGF-β2、TGF-βR2 和 SMAD2,从而抑制靶基因 α-SMA 和减少胶原蛋白的沉积,在促进伤口愈合的基础上还可以防止瘢痕形成^[18]。

4 Exos 在创面治疗中的给药方式

目前,Exos 治疗创面愈合的常用给药方式为注射,但注射不能使 Exos 与创面直接接触,还会因为清除率快,影响其功能,另一方面,DFU 创面的修复和再生需要相对较长的愈合时间,因此,近年来研究者不断实践开发有效的生物相容性支架,作为 Exos 的缓释载体,以维持其在创面区域的生物活性并促进伤口愈合。其中,应用较多的载体为水凝胶。生物医学水凝胶的结构类似于天然的 ECM,不仅具有良好的生物相容性,还能改变细胞生长的微环境。Wang 等^[19]制成 FHE@ exo 水凝胶除以上特性外,还能促进外泌体持续释放。其处理过的伤口的新血管形成和细胞增殖能力得以提高,获得更佳的促进创面愈合效果。Shi 等^[20]将壳聚糖/蚕丝水凝胶作为外泌体生物支架,与外泌体组合后可促进细胞外基质的再上皮化、促进新血管生成和神经元长入,有效促进了糖尿病大鼠皮肤创面愈合。另外,还有研究指出,外泌体与许多其他形式的水凝胶相结合,如 PF-127 水凝胶、纳米纤维水凝胶、天然甲基纤维素—壳聚糖水凝胶等,同样具有良好的机械性能、保水性、抗感染能力和细胞生物相容性,可以更稳定高效地发挥外泌体对创面的愈合作用。

5 总结与展望

DFU 给患者带来了严重的心理、身体和经济负担,是全球面临的挑战。毫无疑问,从组织再生和干细胞工程的角度确定一种新的促进 DFU 伤口愈合的方法是临床研究的重点。HUMSCs-Exos 作为细胞间相互作用的一个组成部分,在细胞微环境中越来越受到重视。HUMSCs-Exos 的研究揭示了无细胞疗法在创面修复的潜在应用,其分泌并运输多种生物活性成分,参与一系列生理和病理过程中,在分子基因水平上的信号转导中起作用,通过减少炎症反应、促进血管生成和细胞增殖来增强组织再生和修复。并且 Exos 与生物载体的结合,能使其更高效稳定地发挥疗效。这些研究结果为在 DFU 创面愈合中使用 HUMSCs-Exos 疗法提供强大依据。

虽然现有研究展示了 Exos 的广阔应用前景,但

在 HUMSCs-Exos 的广泛临床应用中,该领域仍然存在一些亟待解决的问题:(1) Exos 的提取和纯化过程仍然比较烦琐,无法快速分离所需数量的 Exos 来满足临床的需求;(2) Exos 的内容物、功能及其涉及的信号通路错综复杂,尚未完全透彻阐明,需要更多的研究来进一步阐明 HUMSCs-Exos 促进创面愈合的机制,并进一步革新其制备与纯化技术,探究其在临床治疗中的有效剂量。由于对 HUMSCs-Exos 领域的研究尚处于起步阶段,因此迄今为止尚不清楚 Exos 有助于 DFU 伤口愈合的生物安全性,有效性,可重复性,生产潜力,形成机制和生物学功能,需要进一步深入研究将该方法发展为临床现实,以替代基于细胞的疗法。

参 考 文 献

- [1] Bus SA, Lavery LA, Monteiro-Soares M, et al. Guidelines on the prevention of foot ulcers in persons with diabetes (IWGDF 2019 update) [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2020, 36 Suppl 1: e3269.
- [2] Maqsood M, Kang M, Wu X, et al. Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine [J]. Life Sci, 2020, 256: 118002.
- [3] Kim YJ, Yoo SM, Park HH, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 493(2): 1102-1108.
- [4] Qu Q, Wang L, Bing W, et al. miRNA-126-3p carried by human umbilical cord mesenchymal stem cell enhances endothelial function through exosome-mediated mechanisms in vitro and attenuates vein graft neointimal formation in vivo [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 464.
- [5] Li X, Liu L, Yang J, et al. Exosome Derived From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Mediates MiR-181c Attenuating Burn-induced Excessive Inflammation [J]. EBioMedicine, 2016, 8: 72-82.
- [6] Warnecke A, Prenzler N, Harre J, et al. First-in-human intracochlear application of human stromal cell-derived extracellular vesicles [J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(8): e12094.
- [7] Nassar W, El-ansary M, Sabryd, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases [J]. Biomater Res, 2016, 20: 21.
- [8] Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing [J]. Clin Plast Surg, 2012, 39(1): 85-97.
- [9] Chakraborty R, Borah P, Dutta PP, et al. Evolving spectrum of diabetic wound: Mechanistic insights and therapeutic targets [J]. World J Diabetes, 2022, 13(9): 696-716.
- [10] Ti D, Hao H, Tong C, et al. LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b [J]. J Transl Med, 2015, 13: 308.
- [11] Hu Y, Rao SS, Wang ZX, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function [J]. Theranostics, 2018, 8(1): 169-184.

(下转第 570 页)

(上接第 566 页)

- [12] Ammari M, Presumey J, Ponsolles C, et al. Delivery of miR-146a to Ly6C (high) Monocytes Inhibits Pathogenic Bone Erosion in Inflammatory Arthritis[J]. Theranostics, 2018, 8(21):5972-5985.
- [13] Saheli M, Bayat M, Gganji R, et al. Human mesenchymal stem cells-conditioned medium improves diabetic wound healing mainly through modulating fibroblast behaviors[J]. Arch Dermatol Res, 2020, 312(5): 325-336.
- [14] Liu J, Yan Z, Yang F, et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Enhancing Angiogenesis through Delivering Angiopoietin-2[J]. Stem Cell Rev Rep, 2021, 17(2): 305-317.
- [15] Zhang B, Wu X, Zhang X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell exosomes enhance angiogenesis through the Wnt4/β-catenin pathway[J]. Stem Cells Transl Med, 2015, 4(5):513.
- [16] Zhang B, Shi Y, Gong A, et al. HucMSC Exosome-Delivered 14-3-3 ζ Orchestrates Self-Control of the Wnt Response via Modulation of YAP During Cutaneous Regeneration[J]. Stem Cells, 2016,

34(10): 2485-2500.

- [17] Wang X, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease[J]. Adv Pharmacol, 2018, 81:241.
- [18] Fang S, Xu C, Zhang Y, et al. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal MicroRNAs Suppress Myofibroblast Differentiation by Inhibiting the Transforming Growth Factor-β/SMAD2 Pathway During Wound Healing[J]. Stem Cells Transl Med, 2016, 5(10): 1425-1439.
- [19] 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.
- [20] Nooshabadi T, Khanmohamadi M, Valipour E, et al. Impact of exosome-loaded chitosan hydrogel in wound repair and layered dermal reconstitution in mice animal model[J]. J Biomed Mater Res A, 2020, 108(11): 2138-2149.

收稿日期 2023-01-18
(编辑 佳佳)