

对表皮干细胞外泌体影响增生性瘢痕成纤维细胞作用的观察

甄妙¹ 李婧婷² 王鹏¹ 舒斌¹



作者简介:甄妙,女,1997年出生,2020级中山大学硕士研究生,专业为烧伤与创面修复外科学。参与国家级课题1项,参与发表SCI论著1篇。目前主要从事大面积烧伤的救治、慢性难愈性创面的综合治疗及增生性瘢痕防治的研究。

【摘要】 目的 探讨人表皮干细胞(ESC)对增生性瘢痕(HS)成纤维细胞的作用。**方法** 取2021年7月至2022年1月中山大学附属第一医院小儿外科7~12岁健康小儿包皮手术切除的20例包皮组织,采用快速附着法提取ESC,胶原酶消化法提取正常成纤维细胞(FB),运用流式细胞学进行鉴定。取2021年10月至2022年5月中山大学附属第一医院烧伤外科HS增生期患者手术切除的6例HS标本,采用胶原酶消化法提取增生性瘢痕来源的成纤维细胞(HSF)。使用差异高速离心法提取人ESC外泌体和FB外泌体,采用透射电子显微镜观察其形态,纳米颗粒跟踪分析仪检测颗粒直径,蛋白质印迹法检测CD9、CD63和 α -微管蛋白的蛋白表达。利用PKH67染色,将人ESC外泌体、FB外泌体和HSF细胞分别共培养24 h后,观察HSF对外泌体的吞噬情况。将HSF分为ESC外泌体组(包括5 μ g/ml ESC外泌体组、10 μ g/ml ESC外泌体组、20 μ g/ml ESC外泌体组、30 μ g/ml ESC外泌体组)、FB外泌体组(包括20 μ g/ml FB外泌体组、30 μ g/ml FB外泌体组)和对照组(磷酸盐缓冲液PBS),每组3孔,处理24、48、72 h后,采用CCK8法检测HSF的数量以确定外泌体对其增殖能力的影响以及最短处理时间和最低有效浓度。将HSF分为对照组、ESC外泌体组和FB外泌体组,每组3孔(下同),按CCK8实验筛选的最短处理时间和最低有效浓度,采用Ki67免疫荧光染色检测HSF处于增殖期的细胞占有所有细胞的比值。采用划痕实验,在处理第0、12、24、48 h观察细胞划痕面积,计算细胞迁移率。采用胶原收缩实验,在处理第0、24、48、72 h观察胶原剩余面积,计算胶原收缩面积比值。在处理48 h后,收集HSF细胞RNA、总蛋白,采用实时荧光定量RT-PCR法和免疫印迹法检测I型胶原(COL I)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的mRNA和蛋白表达。采用荧光染色法再证COL I和 α -SMA的相对荧光表达强度。数据比较采用重复测量方差分析、单因素方差分析、独立样本 t 检验。**结果** 传代后培养24 h,FB呈典型梭形结构,ESC呈“铺路石”样簇状排列,经流式细胞学鉴定为成纤维细胞、表皮干细胞。外泌体呈囊泡状,ESC外泌体平均粒径为123.1 nm,FB外泌体平均粒径为128.9 nm,均表达CD9、CD63而不表达 α -微管蛋白。共培养24 h后,外泌体被HSF吞入细胞质。培养24 h后,5 μ g/ml ESC外泌体组、10 μ g/ml ESC外泌体组、30 μ g/ml FB外泌体组CCK8吸光度与PBS组差异无统计学意义(t 值分别为0.45、2.04、0.39, $P > 0.05$),20 μ g/ml FB外泌体组CCK8吸光度比PBS组稍高($t = 4.52$, $P < 0.05$),而20 μ g/ml ESC外泌体组、30 μ g/ml ESC外泌体组CCK8吸光度显著低于PBS组(t 值分别为7.06、15.26, $P < 0.001$),说明该浓度的ESC外泌体能显著抑制HSF的增殖,且抑制增殖能力随处理时间延长更加明显(交互作用 $F = 5.19$, $P < 0.001$)。此外,30 μ g/ml ESC外泌体比20 μ g/ml ESC外泌体在24、48、72 h的抑制作用均更加显著(t 值分别为5.88、5.18、13.64, $P < 0.05$)。由CCK8实验可得,ESC外泌体抑制HSF增殖的最短有效时间为24 h,此时

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2023.02.008

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院烧伤与创面修复科¹;510080 广州,中山大学附属第一医院精准医学研究院²

通信作者:舒斌,Email:shubin@mail.sysu.edu.cn

最低有效浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。故选用 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的外泌体处理 24 h 为后续实验条件。刺激 24 h 后,对比 PBS 组,ESC 外泌体处理后的 HSF 中 Ki67 免疫荧光染色阳性的细胞比例显著减少($t = 16.97, P < 0.001$),而 FB 外泌体组差异无统计学意义($t = 1.01, P > 0.05$)。ESC 外泌体培养 12、24、48 h 后,HSF 迁移能力明显下降,细胞迁移率分别为(52.86% $\pm$ 5.02%)、(59.10% $\pm$ 7.45%)、(70.78% $\pm$ 11.33%),低于对照组(60.87% $\pm$ 3.35%)、(92.15% $\pm$ 3.61%)、(100.00% $\pm$ 0.00%),差异有统计学意义(t 值分别为 2.57、10.60、9.37, $P < 0.05$),作用效果随时间延长而增强(交互作用 $F = 33.26, P < 0.001$)。而 FB 外泌体组的细胞迁移率分别为(58.78 $\pm$ 5.46)%、(89.69 $\pm$ 5.80)%、(98.40 $\pm$ 1.28)%,与对照组相比,差异无统计学意义(t 值分别为 1.08、1.28、0.83, $P > 0.05$)。胶原收缩实验结果显示,处理 24、48、72 h 后 ESC 外泌体能明显抑制胶原凝胶收缩,细胞收缩率分别为(23.07% $\pm$ 8.69%)、(30.68% $\pm$ 6.18%)、(45.92% $\pm$ 3.74%),低于对照组(46.18% $\pm$ 2.21%)、(66.80% $\pm$ 7.34%)、(76.65% $\pm$ 3.47%),差异有统计学意义(t 值分别为 5.68、8.88、7.55, $P < 0.001$),作用随时间延长而增强(交互作用 $F = 10.28, P < 0.001$)。而 FB 外泌体组的细胞收缩率分别为(41.19% $\pm$ 12.33%)、(63.54% $\pm$ 4.20%)、(73.05% $\pm$ 3.22%),与对照组相比,差异无统计学意义(t 值分别为 1.09、0.71、0.79, $P > 0.05$)。ESC 外泌体处理 48 h 后 COL I 和 α -SMA 的 mRNA 相对表达量较对照组显著减少(t 值分别为 6.25、3.07, $P < 0.05$),而 FB 外泌体组 COL I 的 mRNA 相对表达量较对照组有轻微提升($t = 3.78, P < 0.05$), α -SMA 的 mRNA 相对表达量与对照组相比差异无统计学意义($t = 1.44, P > 0.05$)。培养 48h 提取总蛋白进行免疫印迹实验和荧光染色,结果显示 ESC 外泌体抑制 HSF 细胞 COL I 和 α -SMA 的表达(t 值分别为 7.00、9.79, $P < 0.001$),而 FB 外泌体则无明显作用(t 值分别为 2.59、3.23, $P > 0.05$)。结论 建立了稳定可靠的人 ESC 培养和外泌体分离提取体系,验证了 ESC 外泌体抑制增生性瘢痕来源成纤维细胞的增殖、迁移、收缩,并抑制其向肌成纤维细胞转化的能力。

【关键词】 表皮干细胞; 外泌体; 成纤维细胞; 增生性瘢痕

Effects of epidermal stem cell-derived exosomes on hypertrophic scars fibroblasts Zhen Miao¹, Li Jingting², Wang Peng¹, Shu Bin¹. ¹Department of Burns and Wound Repair, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; ²Institute of Precision Medicine, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Shu Bin, Email: shubin@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of exosomes derived from human epidermal stem cells (ESCs) on fibroblasts of hypertrophic scars (HS). **Methods** The foreskin tissues were collected from 20 healthy young children (7 ~ 12 years old) who underwent foreskin resection in the Department of Pediatric Surgery, the Hospital, from July 2021 to January 2022. FBs were isolated by the collagenase digestion method, while ESCs were extracted by the rapid attachment method from the foreskin tissues and identified by flow cytometry. Six HS specimens were collected from patients with hyperplasia of HS in the Department of Burn Surgery, the Hospital, from October 2021 to May 2022. Fibroblasts derived from hypertrophic scars (HSFs) were isolated by the collagenase digestion method. ESC exosomes (ESC-Exo) and FB exosomes (FB-Exo) were extracted by differential high-speed centrifugation. The morphology was observed by projection electron microscopy, the particle size was detected by nanoparticle tracking analyzer, and the protein expression of CD9, CD63, and α -tubulin was detected by Western blotting. PKH67-stained ESC-Exo and HSFs were co-cultured for 24 hours to observe the phagocytosis of human ESC exosomes by HSFs. All HSFs were randomly divided into ESC-Exo group (including 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC-Exo, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC-Exo, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC-Exo and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC-Exo group), FB-Exo group (including 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FB-Exo, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FB-Exo group), and control group, with 3 wells in each group. The number of HSFs was measured by CCK8 at 24, 48 and 72 h to determine the effect of exosomes on their proliferative ability, as well as to determine the minimum treatment time and minimum effective concentration. After that, HSFs were randomly divided into the control group, ESC-Exo group, and FB-Exo group, with 3 wells in each group (the same applies to the following). The number and the ratio of HSF cells in the proliferative phase were detected by Ki67 fluorescence staining. Scratch tests were performed according to the lowest effective concentration screened by the CCK8 experiment. The scratch area of cells was observed at 0, 12, 24, and 48 h after treatment, and the cell migration rate was calculated. The collagen contraction experiment was

used to observe the remaining area of collagen at 0, 24, 48, and 72 h after treatment, and the ratio of collagen contraction area was calculated. After 48 hours of treatment, RNA and total protein were collected, and the mRNA and protein expressions of collagen type I (COL I) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by real-time fluorescence quantitative (RT-PCR) and Western blotting. The relative fluorescence expression intensity of COL I and α -SMA was confirmed by fluorescence staining. Data were compared by repeated measure analysis of variance, one-way analysis of variance, and independent sample *t*-test. **Results** At 24 hours of culture, FBs showed a typical fusiform structure, and ESCs arranged in "paving stone" like clusters. ESCs and FBs were identified by flow cytometry. The exosomes were vesicular and positively expressed CD9 and CD63 but did not express α -tubulin. After 24 hours of co-culture, human ESC-Exo was swallowed into HSFs. After 24 to 72 hours of culture, CCK8 tests showed the proliferation of HSFs in groups with 20 μ g/ml and 30 μ g/ml ESC-Exo were significantly lower than in the control group. After 24 hours of culture, the absorbance of CCK8 in the 5 μ g/ml ESC-Exo group, 10 μ g/ml ESC-Exo group, and 30 μ g/ml FB-Exo group were not different from that in the PBS group (*t*-values were 0.45, 2.04, 0.39, $P > 0.05$). The absorbance of CCK8 in the 20 μ g/ml FB-Exo group was slightly higher than that in the PBS group ($t = 4.52$, $P < 0.05$), while the absorbance of CCK8 in 20 μ g/ml ESC-Exo and 30 μ g/ml ESC-Exo groups was significantly lower than that in PBS group (*t*-values were 7.06, 15.26, $P < 0.001$). These results indicated that the ESC-Exo at this concentration could significantly inhibit the proliferation of HSF, and the inhibitory ability became more obvious with the extension of treatment time (interaction $F = 5.19$, $P < 0.001$). In addition, 30 μ g/ml ESC-Exo showed more significant inhibition than 20 μ g/ml ESC-Exo at 24, 48, and 72 h (*t*-values were 5.88, 5.18, 13.64, $P < 0.05$). The shortest effective time was 24 hours, and the lowest effective concentration was 20 μ g/ml. Therefore, 20 μ g/ml was selected as the following experimental concentration. After 24 hours of treatment, the ratio of Ki67-positive cells in the ESC-Exo group was obviously decreased ($t = 16.97$, $P < 0.001$), while there was no significant difference in the FB-Exo group ($t = 1.01$, $P > 0.05$). After a co-culture with ESC-Exo for 12, 24, and 48h, the migration ability of HSF decreased significantly. The migration rates of scratched cells in the ESC-Exo group were (52.86% $\pm$ 5.02%), (59.10% $\pm$ 7.45%), and (70.78% $\pm$ 11.33%), respectively. They were lower than the control group (60.87% $\pm$ 3.35%), (92.15% $\pm$ 3.61%), and (100.00% $\pm$ 0.00%). The difference was statistically significant (*t*-values were 2.57, 10.60, 9.37, $P < 0.05$), and the effect increased with the extension of time (interaction $F = 33.26$, $P < 0.001$). The cell mobility of the FB-Exo group was (58.78% $\pm$ 5.46%), (89.69% $\pm$ 5.80%), and (98.40% $\pm$ 1.28%), respectively, which showed no significant difference compared with the control group (*t*-values were 1.08, 1.28, 0.83, $P > 0.05$). The results of the collagen contraction experiment showed that after treatment for 24, 48, and 72 h, the ESC-Exo inhibited collagen gel shrinkage significantly, and the cell shrinkage rates were (23.07% $\pm$ 8.69%), (30.68% $\pm$ 6.18%), (45.92% $\pm$ 3.74%), respectively. They were lower than the control group (46.18% $\pm$ 2.21%), (66.80% $\pm$ 7.34%), and (76.65% $\pm$ 3.47%). The difference was statistically significant (*t*-values were 5.68, 8.88, 7.55, $P < 0.001$), and the effect increased with the extension of time (interaction $F = 10.28$, $P < 0.001$). The cell shrinkage rates in the FB-Exo group were (41.19% $\pm$ 12.33%), (63.54% $\pm$ 4.20%), and (73.05% $\pm$ 3.22%), respectively, showing no significant difference compared with the control group (*t*-values were 1.09, 0.71, 0.79, $P > 0.05$). The relative mRNA expressions of COL I and α -SMA in ESC-Exo treated for 48 hours were significantly lower than those in the control group ($t = 6.25$, 3.07, $P < 0.05$). Nevertheless, the relative mRNA expression of COL I in the FB-Exo group was slightly higher than that of the control group ($t = 3.78$, $P < 0.05$), while there was no significant difference in α -SMA mRNA between FB-Exo group and control group ($t = 1.44$, $P > 0.05$). Western blot and fluorescence staining results also showed that ESC-Exo inhibited the expression of COL I and α -SMA in HSFs (*t*-values were 7.00, 9.79, $P < 0.001$), while FB-Exo didn't (*t*-values were 2.59, 3.23, $P > 0.05$). **Conclusion** A stable and reliable system for human ESCs culture and exosome isolation and extraction was established to verify the ability of ESC-Exo to inhibit the proliferation, migration, and contraction of fibroblasts derived from hypertrophic scars and suppress their transformation into myofibroblasts.

【Key words】 Epidermal stem cells; Exosome; Fibroblasts; Hypertrophic scars

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是一种常见的真皮损伤并发症,严重影响患者的身心健康,但迄今尚无有效治疗手段^[1]。因此,积极探索促进创面瘢痕良性愈合的治疗方法具有重要意义。增生性瘢痕来源的成纤维细胞(hypertrophic scar fibroblasts, HSF)高表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),能够产生大量I、III型胶原,是导致细胞外基质沉积的决定因素,在HS形成过程中扮演关键角色^[2]。在表皮干细胞(epidermal stem cells, ESCs)丰富的部位或移植表皮干细胞的创面通常具有更高的愈合质量和更低的HS发生率,这表明表皮干细胞可能对HSF具有重要调控作用^[3],但其具体的作用机制尚未被揭示。最近的研究表明,干细胞衍生的外泌体在介导促进创面愈合和减弱瘢痕增生中发挥关键作用^[4-5]。但目前尚缺乏成熟稳定的表皮干细胞来源外泌体(ESC-Exo)的分离和提取体系,且ESC-Exo是否能通过抑制HSF生物学功能发挥减轻HS的作用还未所知。因此,本研究首先构建了稳定的人原代ESCs培养和ESC外泌体分离、提取体系,探讨其对HSF的增殖、功能影响及其量效关系。

资料与方法

一、主要试剂、设备及标本来源

DMEM培养基、EpiLife培养基、EpiLife™成分确定的生长添加剂(EDGS)、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶购于美国Gibco公司。中性蛋白酶II、PKH67绿色荧光细胞连接试剂盒、牛血清白蛋白(BSA)购于美国Sigma-Aldrich公司。IV型胶原酶、I型鼠尾胶原购于美国Corning公司。透明质酸酶购于美国Biofrox公司。FITC标记的山羊抗小鼠CD49f单克隆抗体购于美国BioLegend公司。细胞内固定/透膜染色试剂盒购于美国BD Biosciences公司。Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG多克隆抗体、小鼠抗I型胶原蛋白(COL I)抗体、小鼠抗角蛋白(Pan-Keratin)抗体、兔抗波形蛋白(Vimentin)抗体购于美国Cell Signaling Technology公司。罗丹明标记的鬼笔环肽(Actin)购于美国Thermo Fisher公司。兔 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)多克隆抗体购于中国赛维尔公司。兔Ki67多克隆抗体购于美国Abcam公司。逆转录试剂盒购于日本Takara公司。SYBR Green荧光定量试剂盒和实时定量PCR仪购于瑞士Roche公司。流式细胞检测仪购于美国Beckman公司。激光扫描共聚焦显微镜购于日本OLYMPUS公司。

6例HS标本均取自2021年10月至2022年

5月中山大学附属第一医院烧伤外科HS增生期患者(半年内)手术切除组织,20例包皮组织均取自2021年7月至2022年1月中山大学附属第一医院小儿外科健康小儿包皮手术切除组织。所有程序均按照本院伦理委员会规定(批件号:伦审【2020】307号)且获得患者书面知情同意。

二、原代细胞的培养

1. 原代细胞的提取:取HS标本提取HSF,取健康小儿包皮手术切除的包皮组织分离ESCs和正常皮肤成纤维细胞(fibroblasts, FB)^[6]。采用快速附着法^[7],去除皮下组织和脂肪后消毒组织,4℃下中性蛋白酶II(3 mg/ml)作用过夜分离表皮与真皮。将分离的表皮用预热的胰酶在37℃下消化10 min,获得ESCs,重悬于EpiLife + EDGS完全培养基中,在100 μ g/ml IV型胶原包被培养皿中以 10^5 个细胞/ cm^2 的密度播种,选取10 min内粘附的细胞,每2天换液,待细胞生长至80%,以0.25%胰蛋白酶消化传代培养。采用胶原酶消化法^[8],取分离的真皮用胶原酶IV(3 mg/ml)和透明质酸酶(2 mg/ml)在37℃摇床中消化2 h,70 μ m滤网过滤得到FBs和HSFs,加入适量含体积分数为10% FBS的DMEM中培养,每3天换液,待细胞生长融合成片,消化传代培养。本研究使用第3~6代的细胞。

2. 流式细胞学鉴定表皮干细胞:为了鉴定表皮干细胞,收集 10^6 个细胞,制备成浓度为 1×10^6 /ml单细胞悬液,加入FITC标记的CD49f一抗在室温下避光染色30 min。4℃细胞固定透膜,然后加入K15、Pan-Keratin、Vimentin一抗在室温下避光孵育染色30 min。洗涤后,细胞与Alexa Fluor 488标记的二抗孵育,PBS洗涤、重悬。流式细胞仪检测,采用488 nm激发波长检测CD49f和K15的荧光表达强度,用FlowJo软件v10.8.1对数据进行处理。

三、构建外泌体提取体系

1. 外泌体的分离和鉴定:采用差异超速离心法从细胞培养基中提取外泌体^[9]。当ESCs或FBs达到80%汇合度时,用PBS洗涤细胞,用无血清培养基培养2 d后收集培养基。然后在4℃下分别用 $300 \times g$ 和 $2000 \times g$ 离心10 min后取沉淀,PBS洗涤,再用 $100\,000 \times g$ 离心70 min两次,收集沉淀,用PBS重悬,保存于 -80°C 。用纳米颗粒追踪分析法测量颗粒的粒径分布和浓度,用投射电子显微镜检测形态并拍照。采用二辛丁酸法测定试剂盒对外泌体蛋白进行定量。蛋白质印迹法检测外泌体阳性标记CD9、CD63和阴性标记 α -微管蛋白(α -tubulin)。

2. 外泌体标记和吞噬实验:取HSF细胞,以每孔 1.25×10^4 个细胞的密度接种于48孔板中,用含

体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基培养至细胞生长达50%融合(下同)。取10 μg 的ESC外泌体,加入PKH67染料至终浓度为1 μM ,室温下孵育20 min,然后用0.5% BSA终止孵育,PBS洗涤,离心获取沉淀,并用1 ml DMEM重悬,与HSF共培养,避光孵育24 h,PBS清洗3次后,4%多聚甲醛固定细胞,加入2滴/ml的鬼笔环肽和0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的DAPI。40倍激光扫描共聚焦显微镜下观察HSF对PKH67标记的人ESC外泌体的吞噬情况。

四、外泌体对HSF的影响

1. CCK8增殖实验:取HSF细胞,以每孔8000个细胞的密度接种于96孔板中,用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基培养至细胞生长达50%融合,分为表皮干细胞来源的外泌体(ESC-Exo)组、成纤维细胞来源的外泌体(FB-Exo)组和对照组,每组设3个复孔,ESC外泌体组分别加入5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC外泌体、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC外泌体、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC外泌体、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ESC外泌体,FB外泌体组分别加入20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FB外泌体、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FB外泌体,对照组不做处理。于加药后24、48、72 h换液(90 μl DMEM+10 μl CCK8试剂/孔),细胞培养箱继续培养3 h,最后将96孔板放于酶标仪中,检测450 nm处的吸光度值,采用Graphpad Prism 8.3.0软件分析。

2. 免疫荧光染色:于48孔板中放入9孔可移动玻璃载玻片,再以每孔 1.25×10^4 个细胞的密度接种于48孔板中,用含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养基培养至细胞生长达50%融合,分为对照组、ESC-Exo组和FB-Exo组(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$,下同),每组设3个复孔。加药24 h后用4%甲醛固定细胞,0.1% Triton X-100透膜15 min,2% BSA封闭1 h。加入抗Ki67、抗 α -SMA、抗COL I抗体4℃过夜。PBS洗涤3次,1:2000稀释的耦联Alexa Fluor488的山羊抗兔/鼠二抗避光孵育1 h后复染Actin、DAPI,PBS再次洗涤,滴加抗荧光衰减封片剂,待干后用激光扫描共聚焦显微镜观察,使用ImageJ软件测定荧光强度,以DAPI的荧光强度为内参,计算相对荧光强度。

3. 划痕实验:划痕法检测细胞迁移能力。划痕后0、6、12、24、48 h取样拍照。ImageJ软件测量划痕面积,计算细胞迁移率=(0 h划痕面积-各时段划痕面积)/0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。

4. 胶原收缩实验:根据文献^[10],冰浴中配置加入HSF的I型胶原蛋白溶液,胶原终浓度为1.8 mg/ml,细胞终浓度为 2×10^5 个/ml,取500 μl 混合物加入24孔板中,37℃孵育1 h。待胶原凝固后向孔内加入500 μl 条件培养基(分组同上),用10 μl 无菌枪头沿凝胶

边缘轻轻移动,将凝胶与板分离。划痕后0、24、48 h取样拍照,ImageJ软件测量分析。

5. 实时荧光定量RT-PCR实验:将HSF细胞以 1.5×10^5 个/孔种至6孔板中,待细胞生长至30%融合时换液,分组同上,再培养48 h,采用Trizol试剂提取总RNA,用逆转录试剂盒反转录为cDNA,采用SYBR Green荧光定量行PCR,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算目标基因的相对表达量。引物序列见表1。

表1 实时荧光定量RT-PCR引物序列

引物	引物序列(5'→3')
COL I A1	F: CCCCTGGAAGAATGGAGATG R: AGCTGTTCCGGGCAATCCT
α -SMA	F: GCGGATAGAGATGCTGGAAGC R: CGGCTTCATCGTATTCCTGTT
GAPDH	F: GGAAGCTTGTCATCAATGGAATC R: TGATGACCCCTTTGGCTCCC

6. 免疫印迹法实验:用含蛋白酶磷酸酶抑制剂的高效RIPA裂解液提取各组处理后的细胞总蛋白,冰上裂解30 min,4℃下12 500 $\times g$ 离心10 min,取上清加入蛋白上样缓冲液,100℃下变性10 min,各取30 μg 蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜,将转移后的聚偏二氟乙烯膜放入5% BSA溶液中,室温下封闭1 h,后加入抗 α -SMA、抗COL I、抗GAPDH抗体4℃过夜,用Tris吐温缓冲液(Tris Buffered Saline with Tween,TBST)洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/小鼠IgG二抗,室温下孵育1 h,TBST洗涤,滴加超敏发光液于Image Lab凝胶成像分析仪中进行曝光显影。使用ImageJ软件测定各条带的灰度值,取目标条带及内参条带平均灰度值的比值计算蛋白的相对表达量。

五、统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用Graphpad Prism 8.3.0软件进行重复测量方差分析、单因素方差分析、独立样本 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、ESC鉴定

取传代后培养24 h的ESC和FB拍照,可见FBs呈典型的梭形结构,扁平并伴有突起,生长密集后呈漩涡状排列,而ESCs呈圆形,呈“铺路石”样簇状排列,融合成片(图1A)。流式细胞学分析显示,分离的原代ESC高表达细胞整合素 $\alpha 6$ (CD49f,98.1%)和角蛋白15(K15,92.8%),符合典型的ESC特征(图1B)。此外,分离的原代FB波形蛋白表达呈阳

性(Vimentin, 98.6%),而角蛋白表达呈阴性(Pan-Keratin, 0.80%),符合典型的FB特征(图1C)。

二、外泌体的鉴定和摄取

投射电镜示提取的外泌体均为双层盘状囊泡结构,呈圆形,大小分布均匀(图2A)。纳米颗粒跟踪分析仪检测示ESC外泌体的平均直径为123.1 nm,浓度为 59.2×10^6 个颗粒/ μg 蛋白,每毫升培养基可提取 28.4×10^6 个颗粒外泌体,FB外泌体的平均直径为128.9 nm,浓度为 59.2×10^6 个颗粒/ μg 蛋白,每毫升培养基可提取 33.6×10^6 个颗粒外泌体(图2B)。蛋白印迹表明外泌体特异性标志物CD9、CD63在囊泡中高表达,在细胞中表达较弱; α -微管蛋白在囊泡中不表达,而在细胞中表达(图2C)。在外泌体与HSF共培养24h后,可见ESC外泌体成功被HSF细胞吞入细胞质(图2D)。

三、ESC外泌体抑制HSF细胞的增殖

CCK8实验检测显示,ESC外泌体可抑制HSF

的增殖,而FB外泌体则没有该作用:相较于对照组,在处理24 h后 $5 \mu\text{g/ml}$ 和 $10 \mu\text{g/ml}$ 的ESC外泌体对HSF的增殖无显著作用,而 $20 \mu\text{g/ml}$ 和 $30 \mu\text{g/ml}$ 的ESC外泌体能显著抑制HSF的增殖,抑制增殖能力随处理时间延长更加明显(交互作用 $F = 5.19, P < 0.001$)。且 $30 \mu\text{g/ml}$ 比 $20 \mu\text{g/ml}$ 的ESC外泌体在各检测时间点的抑制作用均更加显著($t = 5.88, 5.18, 13.64, P < 0.05$),见表2。最短有效处理时间为24 h,此时最低有效浓度为 $20 \mu\text{g/ml}$,故选用 $20 \mu\text{g/ml}$ 作为外泌体的实验浓度进行共培养,处理24 h后固定细胞进行Ki67染色。共聚焦显微镜下可见处理24 h后,加入ESC外泌体的组别细胞数量减少,Ki67阳性细胞数量也明显减少(图3),ESC外泌体作用下HSF处于增殖期的细胞数量减少($F = 236.60, P < 0.001$),与对照组相比差异有统计学意义($t = 16.97, P < 0.001$),而FB外泌体的作用差异无统计学意义($t = 1.01, P > 0.05$),见表3。

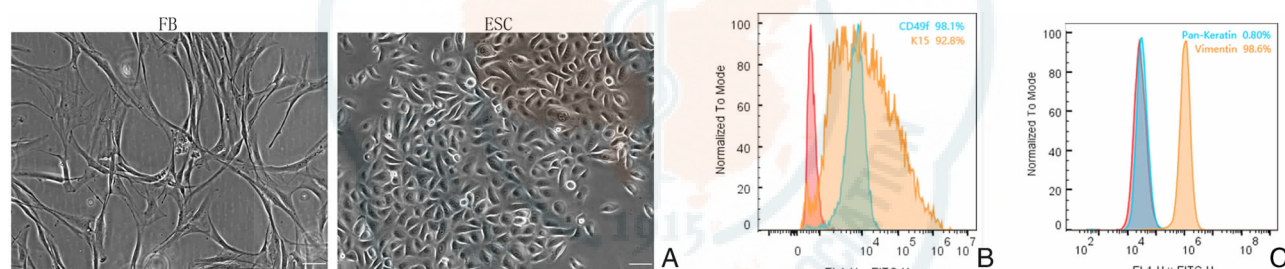


图1 原代细胞的培养和鉴定。A示人成纤维细胞和人表皮干细胞培养24 h的形态,标尺为 $50 \mu\text{m}$;B示流式细胞术分析 ESCs 阳性标记物(CD49f 和 K15);C 示流式细胞术分析 FBs 阳性标记物 Vimentin 和阴性标记物 Pan-Keratin,数字表示 FITC 阳性细胞比例

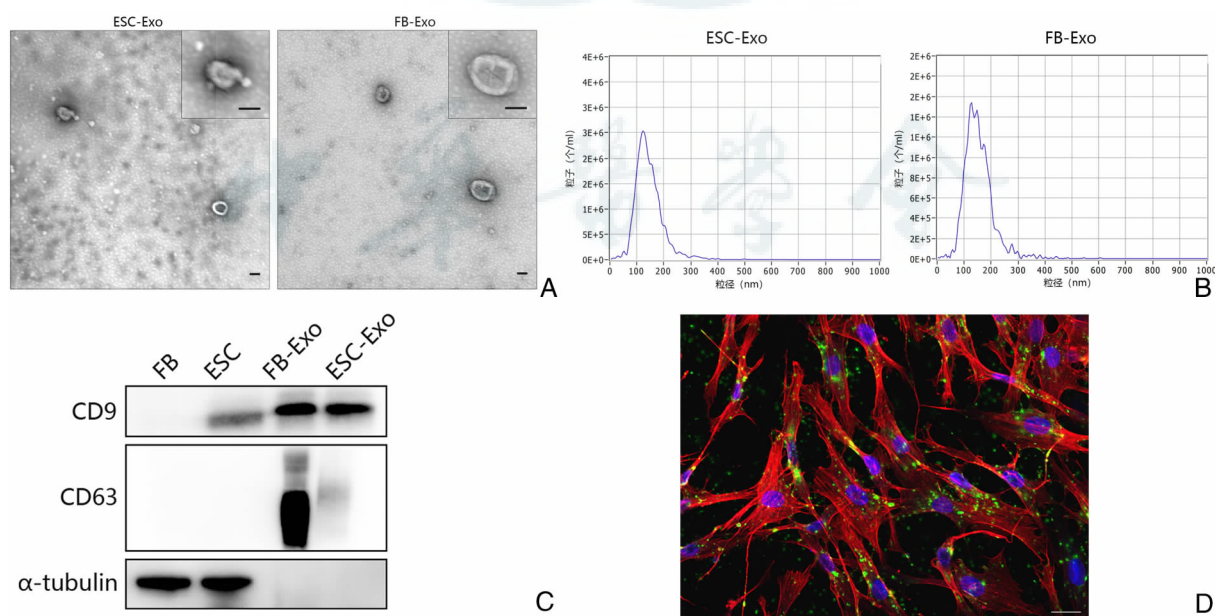
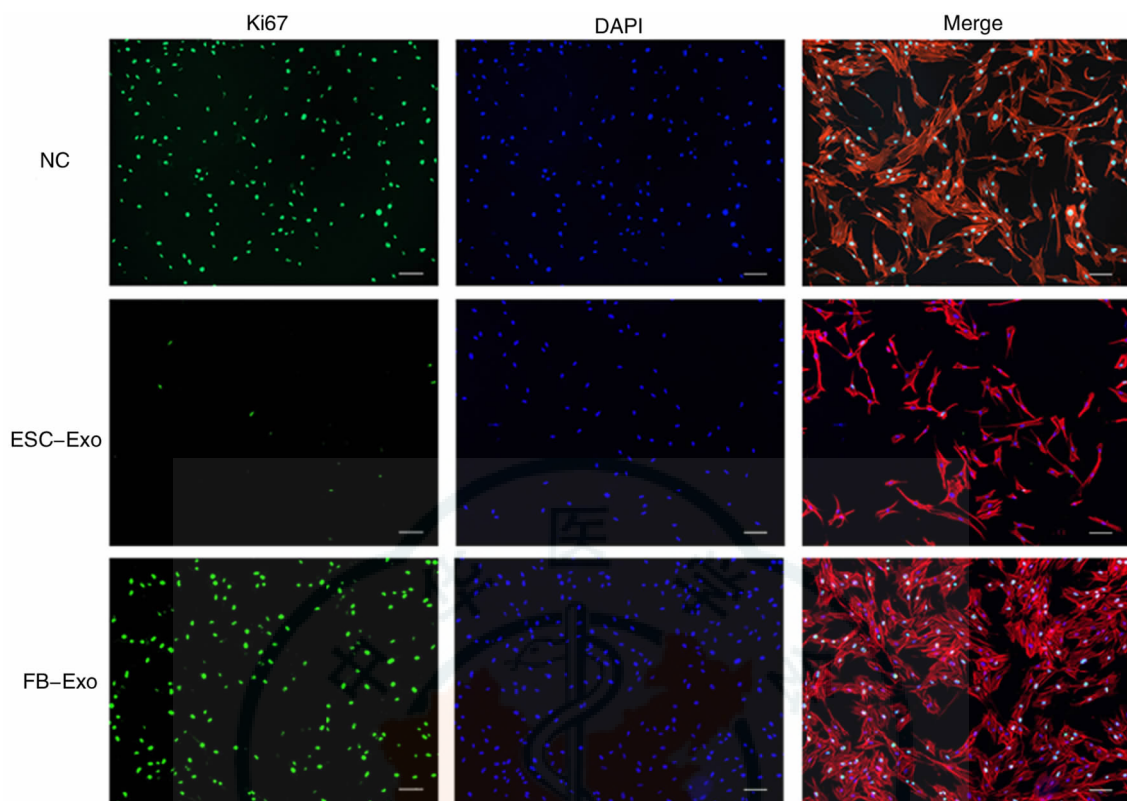


图2 外泌体的鉴定。A 示透射电镜下可见外泌体呈清晰的囊泡状结构,标尺为 100 nm ;B 示纳米颗粒跟踪分析仪检测;C 示蛋白印迹检测法检测外泌体特异性标志物蛋白表达情况;D 示共培养24 h后,HSF 细胞吞噬人 ESC 外泌体,PKH67 标记的人 ESC 外泌体为绿色,细胞核 DAPI 染色为蓝色,细胞骨架 Actin 染色为红色,标尺为 $25 \mu\text{m}$

图3 共聚焦显微镜下各组 HSF Ki67 荧光强度示意图,标尺为 100 μm 表2 3组细胞 CCK8 实验后吸光度比值($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	0.49 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.05
ESC-Exo 组			
5 $\mu\text{g/ml}$	0.50 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.05
10 $\mu\text{g/ml}$	0.54 $\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01
20 $\mu\text{g/ml}$	0.28 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.02
30 $\mu\text{g/ml}$	0.17 $\pm$ 0.00	0.18 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.01
FB-Exo 组			
20 $\mu\text{g/ml}$	0.57 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.06
30 $\mu\text{g/ml}$	0.49 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.04

注:处理因素主效应: $F=155.40, P<0.001$;时间因素主效应: $F=10.07, P=0.002$;两者交互作用: $F=5.19, P<0.001$;5 $\mu\text{g/ml}$ ESC-Exo 组与对照组在 24、48、72 h 相比, $t=0.45, 1.32, 2.82, P=0.660, 0.213, 0.015$;10 $\mu\text{g/ml}$ ESC-Exo 组与对照组在 24、48、72 h 相比, $t=2.04, 0.42, 2.74, P=0.098, 0.691, 0.054$;20 $\mu\text{g/ml}$ ESC-Exo 组与对照组在 24、48、72 h 相比, $t=7.06, 4.56, 1.76, P<0.05$;30 $\mu\text{g/ml}$ ESC-Exo 组与对照组在 24、48、72 h 相比, $t=15.26, 14.57, 12.74, P<0.001$;20 $\mu\text{g/ml}$ FB-Exo 组与对照组在 24、48、72 h 相比, $t=4.52, 1.75, 2.80, P=0.011, 0.156, 0.049$;30 $\mu\text{g/ml}$ FB-Exo 组与对照组在 24、48、72 h 相比, $t=0.39, 2.01, 0.95, P=0.715, 0.115, 0.394$;30 $\mu\text{g/ml}$ ESC-Exo 组与 20 $\mu\text{g/ml}$ ESC-Exo 组在 24、48、72 h 相比, $t=5.88, 5.18, 13.64, P=0.028, 0.035, 0.005$

表3 3组细胞处理 24 h 后 Ki67 染色荧光强度比值($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Ki67
对照组	3	1.00 $\pm$ 0.08
ESC-Exo 组	3	0.15 $\pm$ 0.04
FB-Exo 组	3	0.95 $\pm$ 0.03

注:组间指标总体比较, $F=236.60, P<0.001$;ESC-Exo 组与对照组指标比较, $t=16.97, P<0.001$;FB-Exo 组与对照组指标比较, $t=1.01, P=0.370$;ESC-Exo 组与 FB-Exo 组指标比较, $t=25.59, P<0.001$

四、ESC 外泌体抑制 HSF 细胞的迁移和收缩能力

划痕实验结果表明,用 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 ESC 外泌体共培养 24 h 后,HSF 迁移能力明显下降,而加入 FB 外泌体的组别则差异无统计学意义(图 4A),ESC 外泌体组划痕细胞迁移率为 59.10% $\pm$ 7.45%,低于对照组 92.15% $\pm$ 3.61%,差异有统计学意义($t=10.60, P<0.001$),作用效果随时间延长而增强(交互作用 $F=33.26, P<0.001$),见表 4。而胶原收缩实验结果显示,处理 24 h 后 ESC 外泌体能明显抑制胶原凝胶收缩,而 FB 外泌体则没有明显作用(图 4B),ESC 外泌体组细胞收缩率为 30.68% $\pm$ 6.18%,低于对照组 66.80% $\pm$ 7.34%,差异有统计学意义($t=8.88, P<0.001$),这种作用随时间延长而增强(交互作用 $F=10.28, P<0.001$),见表 5。

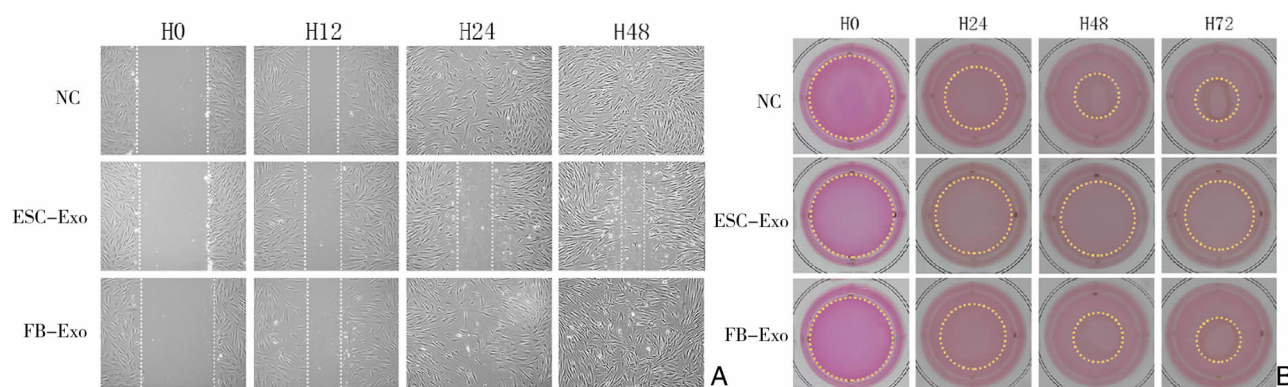


图4 ESC外泌体抑制HSF细胞的迁移和收缩能力。A示划痕实验检测处理后各时间点各组HSF迁移能力(倒置相差显微镜 $\times 100$);B示胶原收缩实验检测处理后各时间点各组HSF收缩能力

表4 3组细胞迁移率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	60.87 $\pm$ 3.35	92.15 $\pm$ 3.61	100.00 $\pm$ 0.00
ESC-Exo 组	52.86 $\pm$ 5.02	59.10 $\pm$ 7.45	70.78 $\pm$ 11.33
FB-Exo 组	58.78 $\pm$ 5.46	89.69 $\pm$ 5.80	98.40 $\pm$ 1.28

注:处理因素主效应, $F=41.44, P<0.001$;时间因素主效应, $F=1962.00, P<0.001$;两者交互作用, $F=33.26, P<0.001$;ESC-Exo 组与对照组指标在 12、24、48 h 比较, $t=2.57, 10.60, 9.37, P=0.014, <0.001, <0.001$;FB-Exo 组与对照组指标在 12、24、48 h 比较, $t=1.08, 1.28, 0.83, P=0.286, 0.209, 0.412$;ESC-Exo 组与 FB-Exo 组指标比较, $t=1.75, 9.05, 8.18; P=0.088, <0.001, <0.001$

表5 3组细胞收缩率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	46.18 $\pm$ 2.21	66.80 $\pm$ 7.34	76.65 $\pm$ 3.47
ESC-Exo 组	23.07 $\pm$ 8.69	30.68 $\pm$ 6.18	45.92 $\pm$ 3.74
FB-Exo 组	41.19 $\pm$ 12.33	63.54 $\pm$ 4.20	73.05 $\pm$ 3.22

注:处理因素主效应, $F=30.65, P<0.001$;时间因素主效应, $F=322.70, P<0.001$;两者交互作用, $F=10.28, P<0.001$;ESC-Exo 组与对照组指标在 12、24、48 h 比较, $t=5.68, 8.88, 7.55; P<0.001, <0.001, <0.001$;FB-Exo 组与对照组指标在 12、24、48 h 比较, $t=1.09, 0.71, 0.79; P=0.292, 0.487, 0.443$;ESC-Exo 组与 FB-Exo 组指标在 12、24、48 h 比较, $t=3.58, 6.49, 5.36; P=0.003, <0.001, <0.001$

五、ESC 外泌体抑制 HSF 细胞的分化

加入 20 $\mu\text{g/ml}$ 外泌体处理 48 h 后收集细胞 RNA 行实时荧光定量 RT-PCR 实验(表 6),发现 ESC 外泌体组的 I 型胶原蛋白(COL I)相对表达量较对照组显著减少($t=6.25, P<0.001$),而 FB 外泌体组相较对照组则有轻微提升($t=3.78, P<0.05$),而 ESC 外泌体组 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的相对表达量较对照组显著减少($t=3.07,$

$P<0.05$),而 FB 外泌体组则无明显作用($t=1.44, P>0.05$)。培养 48 h 提取总蛋白进行免疫印迹实验可见 ESC 外泌体抑制 HSF 细胞 COL I 和 α -SMA 的表达(图 5A),差异有统计学意义($t=7.00, 9.79, P<0.001$),而 FB 外泌体则无明显作用($t=2.59, 3.23, P>0.05$),见表 7。荧光染色结果可见相同趋势(图 5B),提示 ESC 外泌体可抑制 HSF 细胞向肌成纤维细胞的分化,减弱其激活。

表6 3组细胞 2 种纤维化相关因子 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	COL I	α -SMA
对照组	1.28 $\pm$ 0.32	0.92 $\pm$ 0.10
ESC-Exo 组	0.60 $\pm$ 0.15	0.58 $\pm$ 0.10
FB-Exo 组	2.29 $\pm$ 0.57	1.02 $\pm$ 0.15

注:组间 COL I、 α -SMA 总体比较, $F=28.99, 23.28, P<0.001, <0.001$;ESC-Exo 组与对照组 COL I、 α -SMA 比较, $t=6.25, 3.07, P<0.001, <0.05$;FB-Exo 组与对照组 COL I、 α -SMA 比较, $t=3.78, 1.44, P=0.004, 0.182$;ESC-Exo 组与 FB-Exo 组 COL I、 α -SMA 比较, $t=9.53, 2.48, P<0.001, <0.05$

表7 3组细胞 2 种纤维化相关因子蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	COL I	α -SMA
对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
ESC-Exo 组	0.55 $\pm$ 0.13	0.37 $\pm$ 0.10
FB-Exo 组	0.89 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.04

注:组间 COL I、 α -SMA 总体比较, $F=23.68, 101.00, P<0.05, <0.001$;ESC-Exo 组与对照组 COL I、 α -SMA 比较, $t=7.00, 9.79, P<0.001, <0.001$;FB-Exo 组与对照组 COL I、 α -SMA 比较, $t=2.59, 3.23, P=0.061, 0.061$;ESC-Exo 组与 FB-Exo 组 COL I、 α -SMA 比较, $t=4.69, 7.74, P<0.05, <0.001$

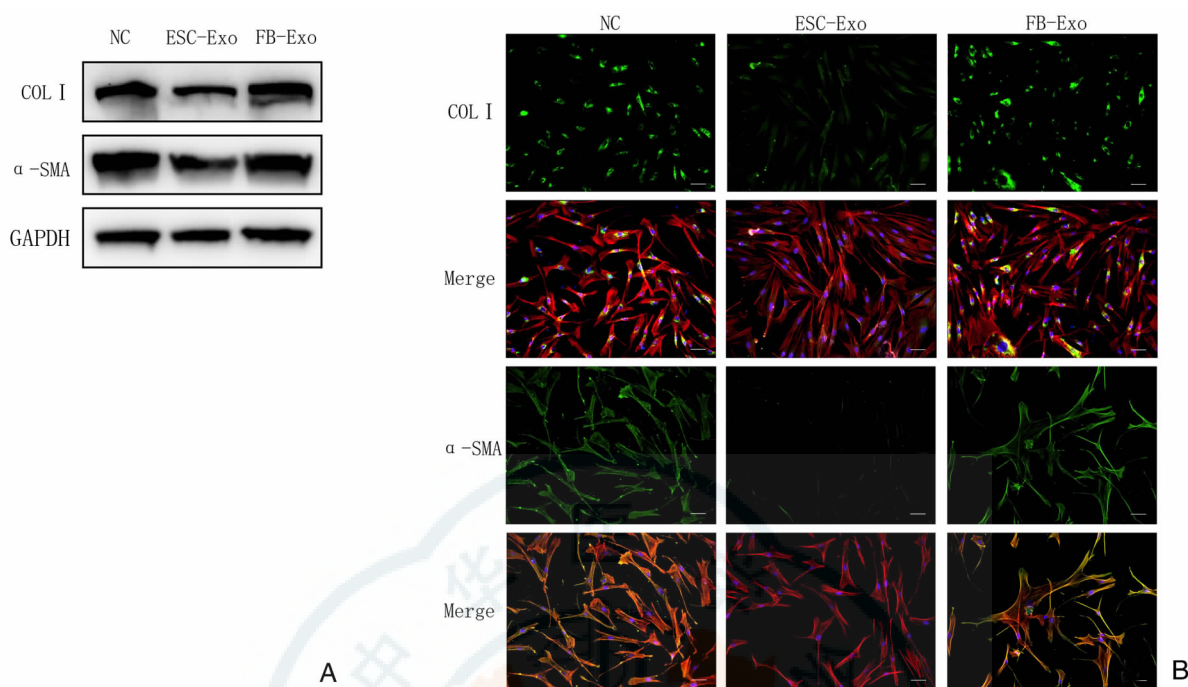


图5 ESC外泌体抑制HSF细胞的分化。A示蛋白印迹法检测COL I和α-SMA蛋白表达;B示共聚焦显微镜下各组HSF细胞COL I和α-SMA荧光强度,标尺为50 μm

讨论

增生性瘢痕是皮肤损伤,如烧伤、外伤、皮肤穿孔、痤疮、手术、疫苗接种等常见的并发症,它是由网状真皮的慢性炎症引发的^[10]。但即使严格按照最新指南进行早期综合治疗,仍然存在疗效欠佳、治愈率低且极易复发等现象,导致HS患者生活质量低下、治疗周期长、医疗费用高、社会负担重^[11]。因此根据HS的关键发病机制探索其新的高效治疗方法,对突破当前HS的治疗瓶颈意义重大。

来源于增生性瘢痕组织的成纤维细胞持续高度增殖,迁移能力显著增强,表现出明显的肌成纤维细胞特性,如高度表达I/III型胶原和α-平滑肌肌动蛋白,过度合成细胞外基质等,最终导致增生性瘢痕发生和发展,是HS形成的重要细胞^[12]。而位于基底层、暴露于不同真皮细胞的表皮细胞,在创面愈合中与成纤维细胞展开了密切的细胞信号交换^[13]。研究表明,表皮异常也可能与增生性瘢痕有关^[14-15]。在创面重塑阶段,表皮干细胞可调控成纤维细胞的生长,减少I型胶原的合成,从而达到减少瘢痕形成的作用^[3,16]。

表皮干细胞是多种表皮细胞的祖细胞,在表皮形成、表皮组织结构稳定中发挥重要作用,具有无限增殖和多向分化的潜能,能主动参与创面修复,因自体移植不存在排斥反应而在创面修复、无瘢痕愈合治疗中具有广阔的应用前景^[17-18]。近年来,表皮干

细胞的研究取得了积极进展,有一些已经进展到临床应用^[19]。研究发现,正常表皮细胞上清液可呈浓度依赖性抑制瘢痕成纤维细胞胶原蛋白分泌。同样,负载正常表皮细胞的组织工程皮肤可以显著抑制真皮纤维化^[20]。但直接外用或注射表皮干细胞的治疗有着许多局限性,如因缺乏细胞外基质的附着造成低存活率、高损耗率、额外的组织损伤以及致瘤、致畸和栓塞的风险等^[21-22]。而外泌体作为细胞与细胞之间通信的介质,与其来源的母细胞具有相似的功能。与干细胞移植相比,外泌体治疗具有免疫原性低、易于储存和管理、可批量生产等优点,是临床应用的理想选择^[23]。最近的研究也表明,干细胞衍生的外泌体具有消除器官过度纤维化的潜在作用^[24-25]。但作为促进创面完美愈合的关键细胞,表皮干细胞来源的外泌体调控HSF的相关作用仍缺乏深入研究。

本研究采用快速附着法,从人包皮中提取人原代表皮干细胞,通过形态学和流式细胞学实验鉴定ESC细胞的纯度,建立稳定的ESC培养体系,再利用差异超速离心法提取其条件培养基中的ESC来源外泌体,并通过透射电镜、纳米颗粒跟踪分析、蛋白免疫鉴定外泌体的成功提取,通过PKH67染色证明HSF对ESC外泌体的摄取。此后,研究通过CCK8实验,确定了ESC外泌体能抑制HSF的增殖,其最低有效条件为20 μg/ml处理24 h。Ki67实验说明ESC外泌体作用下,HSF处于增殖期的细胞数

量明显减少。同时,ESC 外泌体还可明显抑制 HSF 的迁移、收缩能力,减少其 I 型胶原和 α -平滑肌肌动蛋白的表达,抑制其向肌成纤维细胞的转化。由此,通过体外实验,初步说明了 ESC 外泌体通过抑制 HSF 增殖,减弱其迁移、收缩的生物学活动,减少其向肌成纤维细胞的转化,进而可能抑制皮肤纤维化,达到减轻瘢痕增生的效果。

综上所述,本研究成功建立了稳定的表皮干细胞培养和外泌体分离提取体系,验证了 ESC 外泌体可有效抑制增生性瘢痕来源成纤维细胞的生物活性,减弱其增殖、迁移、收缩能力,并抑制其向肌成纤维细胞的转化。研究初步发现 20 $\mu\text{g/ml}$ 处理 24 h 为最低有效 ESC 外泌体处理条件,为 HS 的外泌体治疗提供了研究基础。

参 考 文 献

- [1] Ogawa R, Dohi T, Tosa M, et al. The latest strategy for keloid and hypertrophic scar prevention and treatment; the nippon medical school (NMS) protocol[J]. Journal of Nippon Medical School, 2021, 88(1):2-9.
- [2] Ehrlich HP, Desmoulière A, Diegelmann RF, et al. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar[J]. The American Journal of Pathology, 1994, 145(1):105-113.
- [3] 黄韶斌,胡志成,张逸,等. 异体表皮干细胞对裸鼠全层皮肤缺损创面移植异体全厚皮成活的影响及其机制[J]. 中华烧伤杂志, 2021, 37(11):1061-1069.
- [4] Zhao W, Zhang R, Zang C, 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.
- [5] Li Y, Zhang J, Shi J, 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 Research & Therapy, 2021, 12(1):221.
- [6] Wang P, Theocharidis G, Vlachos IS, et al. Exosomes derived from epidermal stem cells improve diabetic wound healing[J]. J Invest Dermatol, 2022, 142(9):2508-2517.
- [7] Kim DS, Cho HJ, Choi HR, et al. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004, 61(21):2774-2781.
- [8] 刘宁,王鹏,蔡瑞昭,等. 体外构建 3D 细胞压力培养模型研究压力对增生性瘢痕成纤维细胞的作用[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2021, 16(2):132-139.
- [9] Lin S, Yu Z, Chen D, et al. Progress in microfluidics-based exosome separation and detection technologies for diagnostic applications[J]. Small, 2020, 16(9):e1903916.
- [10] Berman B, Maderal A, Raphael B. Keloids and hypertrophic scars: Pathophysiology, classification, and treatment [J]. Dermatol Surg, 2017, 43 Suppl 1: S3-S18.
- [11] Rabello FB, Souza CD, Farina Jr JA. Update on hypertrophic scar treatment[J]. Clinics, 2014, 69(8):565-573.
- [12] Zhang J, Li Y, Bai X, et al. Recent advances in hypertrophic scar[J]. Histol Histopathol, 2018, 33(1):27-39.
- [13] Teepe RG, Kreis RW, Koebrugge EJ, et al. The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds [J]. J Trauma, 1990, 30(3):269-275.
- [14] Andriessen MP, Niessen FB, Van de Kerkhof PC, et al. Hypertrophic scarring is associated with epidermal abnormalities: an immunohistochemical study [J]. J Pathol, 1998, 186(2):192-200.
- [15] Lee JS, Kim JS, Lee JW, et al. Effect of keratinocytes on myofibroblasts in hypertrophic scars [J]. Aesthetic Plast Surg, 2019, 43(5):1371-1380.
- [16] Strong AL, Neumeister MW, Levi B. Stem cells and tissue engineering: regeneration of the skin and its contents [J]. Clin Plast Surg, 2017, 44(3):635-650.
- [17] Pastushenko I, Prieto-Torres L, Gilaberte Y, et al. Skin stem cells: at the frontier between the laboratory and clinical practice. Part 1: Epidermal stem cells [J]. Actas Dermosifiliogr, 2015, 106(9):725-732.
- [18] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches [J]. Science, 2006, 311(5769):1880-1885.
- [19] Teng M, Huang Y, Zhang H. Application of stems cells in wound healing--an update [J]. Wound Repair Regen, 2014, 22(2):151-160.
- [20] Bellemare J, Roberge CJ, Bergeron D, et al. Epidermis promotes dermal fibrosis: role in the pathogenesis of hypertrophic scars [J]. J Pathol, 2005, 206(1):1-8.
- [21] Duscher D, Barrera J, Wong VW, et al. Stem cells in wound healing: The future of regenerative medicine? A mini-review [J]. Gerontology, 2016, 62(2):216-225.
- [22] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells -a review [J]. Biotechnol Adv, 2018, 36(4):1111-1126.
- [23] Lener T, Gimona M, Aigner L, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials -an ISEV position paper [J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4:30087.
- [24] Helissey C, Guitard N, Théry H, et al. Two new potential therapeutic approaches in radiation cystitis derived from mesenchymal stem cells: extracellular vesicles and conditioned medium [J]. Biology (Basel), 2022, 11(7):980.
- [25] Yang Y, Liu Y, Chai Y, et al. Exosomes in pathogenesis, diagnosis, and treatment of pulmonary fibrosis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13:927653.

(收稿日期:2023-03-06)

(本文编辑:付晓娟)

甄妙,李婧婷,王鹏,等. 对表皮干细胞外泌体影响增生性瘢痕成纤维细胞作用的观察[J/CD]. 中华损伤与修复杂志(电子版),2023,18(2):134-143.