

· 综述 ·

细胞外囊泡在糖尿病创面修复中的作用机制及应用

冯景浩 陈雅南 袁鸣洲 陈蕾

【摘要】 随着糖尿病发病率逐年增高,糖尿病相关创面带来的社会经济负担日益加重。尽管在过去的几十年里,可选用的治疗方案逐渐增多,开发具有良好的治疗能效的新方法、新材料,从而实现糖尿病创面尤其是难愈创面的快速、高质量修复,仍具有重大的临床意义和市场价值。细胞外囊泡(EV)在“去细胞的干细胞治疗”手段中备受关注,有望为糖尿病创面的治疗提供新方法。本文回顾其在糖尿病创面愈合中的作用,特别是对炎症反应、细胞增殖、迁移、血管生成、胶原生成和细胞外基质重构方面的影响,以期为解决糖尿病患者创面修复问题提供新的思路和方法。

【关键词】 细胞外囊泡; 糖尿病创面; 去细胞疗法

Mechanism and application of extracellular vesicles in diabetic wound repair Feng Jinghao, Chen Yanan, Yuan Mingzhou, Chen Lei. Department of Burn Surgery, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: Chen Lei, Email:chenlei8@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 As the incidence of diabetes increases year by year, the social and economic burden of diabetes-related wounds is increasing. Although the number of treatment options has been increasing in the past few decades, the development of new methods and materials with good therapeutic energy efficiency, so as to achieve rapid and high-quality repair of diabetic wounds, especially refractory wounds, is still of great clinical significance and market value. Extracellular vesicles have attracted much attention in “decellular stem cell therapy” and are expected to provide a new method for the treatment of diabetic wounds. This paper reviews its role in wound healing in diabetes, especially its effects on inflammatory response, cell proliferation, migration, angiogenesis, collagen generation and extracellular matrix remodeling, in order to provide new ideas and methods for wound healing in diabetic patients.

【Key words】 Extracellular vesicles; Diabetic wound; Decellular therapy

一、背景介绍

全球有超过 4.22 亿的糖尿病患者,其中,绝大部分患者分布在我国。2010 年调查数据显示,我国糖尿病发病率已达 9.65%,20~79 岁的人群患病人数超过 9240 万,约占全球总人数的 1/4^[1]。随着社会经济的发展和居民生物水平的提高,糖尿病发病率逐年升高,给患者带来极大痛苦之外亦给社会带来了沉重的经济及医疗负担——WHO 预测,到 2025 年中国糖尿病患者将超过 1.3 亿,而医疗总开支 40% 的费用将用于这部分疾病的管理^[1-2]。

糖尿病创面,特别是糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是糖尿病最严重且治疗费用最高的并发症^[3]。目前,此类创面主要的临床治疗方案包括清创、植皮、应用抗生素进行感染管理和血管重建手术以恢复血流^[4]。虽然通过以上综合治疗,但仍有不少创面迁延不愈,复发,甚至治疗失败和截肢病例——调查显示,在我国三甲医院非创伤性截肢患

者中,糖尿病患者比例占到了三分之一^[3]。

这些问题的存在迫使人们为糖尿病患者寻求更新、更好的治疗方案。新的生物治疗手段——去细胞疗法(使用生长因子、细胞条件培养液、细胞外基质来源的膜片、细胞外囊泡等)因其安全、使用便捷、可批量制备的特点已成为糖尿病创面愈合相关的研究热点^[4]。其中,细胞外囊泡(extracellular vesicle, EV)可能在糖尿病及其并发症的发生、治疗中起重要作用^[5]。EV 是由多种细胞类型释放到细胞外环境的膜包性囊泡,与细胞相似,由双层的脂质膜包围,可分为凋亡体(直径在 1~5 μm 之间,生物学形态多样,当细胞经历凋亡时释放,包含许多来自母细胞的内容物,如各种细胞器及 DNA 片段)、微囊泡(直径在 100~1 000 nm 之间,由质膜萌芽或裂变向外突起分裂而成。有研究认为其与细胞骨架蛋白收缩和磷脂重分布之间的动态作用有关^[6])和外泌体(直径在 40~100 nm 之间,在电镜下呈现一个杯盘状的形态。目前普遍认为外泌体是通过胞吞途径生成,随后通过胞吐作用被分泌到细胞外^[7])。有研究证实,EV 携带来自亲本细胞的 DNA、微小 RNA、蛋白质和膜脂。可通过释放、运输、转移其亲代细胞衍生的分子物质至受体细胞,调控包括免疫反应、细胞增殖、迁移和血管化等在内的多种生物学过程^[8-9]。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-9450.2020.05.013

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2020B1515020049);国家自然科学基金面上项目(81971856)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院烧伤外科

通信作者:陈蕾,Email:chenlei8@mail.sysu.edu.cn

本文首先对糖尿病创面的愈合特点进行介绍,随后对EV及其在糖尿病创面愈合中的作用进行回顾,特别关注了其对创面局部炎症反应、细胞增殖、迁移、血管生成、胶原沉积和细胞外基质重构的影响,旨在为糖尿病创面治疗提供新的思路和方法。

二、健康个体与糖尿病患者的创面愈合过程对比

(一) 健康个体的创面愈合过程

在健康个体中,一个正常的伤口愈合过程由炎症、增殖和重塑3个重叠但不同的阶段组成。不同的细胞类型、生长因子和细胞因子在每个阶段都扮演着重要角色,以协调愈合级联的平稳进展。在炎症期,血液成分外渗导致纤维蛋白形成凝块,其作为炎症浸润细胞的临时支架。中性粒细胞是第一个到达受伤部位的细胞,其作用是清除和破坏外来物质、受损细胞和细菌。随即在趋化因子如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)和单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的作用下,单核细胞被吸引到伤口部位,并分化成巨噬细胞。随后启动伤口愈合的增殖阶段,该阶段特征是不同类型细胞的迁移和增殖,包括内皮细胞、成纤维细胞和角质形成细胞。它们负责血管生成、肉芽组织形成、细胞外基质沉积、伤口收缩以及再上皮化^[10]。在创面愈合的重塑阶段,新生血管数量减少,大多数参与增殖阶段的细胞要么离开创面,要么凋亡,留下一个成熟的、几乎没有血管的细胞环境。此外,较早在肉芽组织中表达的III型胶原逐渐被结构张力较强的I型胶原所取代,使新生组织的牵张强度提高到正常皮肤的80%^[10-11]。具体细节及机制已有相关文献总结,此处不再赘述。

(二) 糖尿病患者的创面愈合过程

糖尿病患者的创面常在炎症阶段停滞不前,其特征是促炎细胞因子、蛋白酶和活性氧水平升高,创面修复相关细胞功能紊乱。由于免疫反应受损,即粒细胞的吞噬和趋化活性受损,导致炎性细胞过度聚集,产生各种活性氧,破坏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的结构元件,再加上促炎因子水平的升高,活性氧诱导丝氨酸蛋白酶和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的表达,导致ECM和生长因子的降解,以及蛋白酶抑制剂的降解,从而对伤口的炎症反应造成进一步破坏,使糖尿病患者的创面更容易发生感染^[12-13]。有研究显示,从糖尿病啮齿动物中分离并在高糖条件下培养的巨噬细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞经组蛋白修饰后呈现出持续的促炎表型,这可能与糖尿病创面不愈相关^[14]。此外,创面局部缺血导致慢性缺氧,同样可以引起活性氧的释放,继而引发严重的ECM降解,这会使基质细胞相互作用出现障碍,将伤口愈合拖入局部组织缺氧—活性氧释放—ECM降解—创面持续不愈,组织缺氧持续存在的恶性循环^[12]。

高血糖引起的分子变化如晚期糖基化终产物(advanced glycation end product, AGE)的形成和积累,也会对创面修复相关细胞,如内皮细胞和成纤维细胞造成不利和不可逆的影响,导致新生血管减少、阻碍肉芽组织形成和ECM沉积。AGE与表达在各种皮肤细胞(角质细胞、成纤维细胞、树突细胞、部分内皮细胞和单核细胞)中的AGE受体结合而诱导活性氧的生成,诱导激活核因子κB(nuclear factor kappa B,

NF-κB),通过干扰细胞的正常活动阻碍创面愈合^[13]。Walker等^[15]研究发现,与正常人群相比,2型糖尿病患者外周血中纤维细胞减少,生长因子受体密度降低,AGE浓度增加,氧化应激反应强烈,促炎细胞因子释放增多,也可能是导致糖尿病患者溃疡创面难愈的原因之一。

三、EV中的功能性成分及其作用

(一) EV中的功能性蛋白质

EV携带与血管生成和凝血过程相关的蛋白成分^[7]。MMP已被确定为血管生成的重要介质,Tara等^[16]的研究显示,经血管生成因子刺激后,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)-2、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及MMP在微囊泡内浓集。而且,经FGF及VEGF刺激的内皮细胞源性EV富含MMP,此EV可对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的迁移和毛细血管样结构的形成起促进作用。但目前EV MMP对血管生成过程的调控机制尚未被阐明^[16]。此外,EV也与凝血有关,因为在微泡中可以检测到血小板和单核细胞中含有的组织因子(tissue factor, TF),而TF是外源性凝血级联反应中的重要物质^[17]。

EV内含具免疫调节功能的蛋白。研究者在EV中检测出含有主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)I类分子,MHC I类分子从黑素瘤细胞系衍生的EV转移到树突状细胞,从而触发了该细胞干扰素的产生^[18]。此外,树突状细胞来源的外泌体携带的MHC I类分子可以激活CD8+T细胞的反应。提示EV可能作为细胞外抗原来源,激活免疫干预,增强糖尿病创面抗菌能力并最终促进创面愈合^[18]。

(二) EV中的功能性脂质

EV所含脂质包括胆固醇、鞘磷脂、神经酰胺、磷脂和葡聚糖,可作为EV的鉴定手段^[19]。研究发现,外泌体富含较高的胆固醇和鞘磷脂,但与母细胞膜相比,外泌体中磷脂酰胆碱含量较低^[20]。Trajkovic等^[21]发现神经酰胺浓集于多泡核内体形成的微区,提示神经酰胺可能与扩大微区和促进诱导出芽有关,而脂质可以部分调控小泡的形成和释放。

(三) EV中的功能性遗传生物分子

在遗传生物分子方面,在细胞培养和体液中释放的3种EV中都发现了大量的信使RNA(messenger RNA, mRNA)和微小RNA(microRNA, miRNA)^[22]。这些遗传分子携带分泌细胞的信息,被分配到EV中,再通过EV分泌到细胞外,作用于周围细胞或靶细胞,继而引起一系列生物学反应,如血管生成、肿瘤进展等^[23]。其中,某些肿瘤细胞分泌的EV含有特征性的RNA,例如在一胶质母细胞瘤微泡的研究中,在患者的血清微泡中可以检测到胶质瘤特征的miRNA,可作为癌症标志物,用于疾病诊断或潜在的治疗目标^[24]。EV mRNA和miRNA除了携带分泌细胞的信息外,还可以促进某些生物过程,包括增殖、血管生成和凋亡。有证据表明,EV mRNA转移到受体细胞后能被翻译成蛋白质,激活受体内皮细胞中的PI3K/AKT信号通路,加速大鼠肝脏的形态学和功能恢复^[25]。此外,Deregibus等^[26]研究发现,内皮祖细胞来源的微泡通过mRNA水平转移激活内皮细胞的血管生成程序。上述研究为EV mRNA和miRNA在调控生物过程

中的作用提供了证据,但仍需要进一步的研究来全面了解EV在基因载体中扮演的角色。

四、EV参与糖尿病创面愈合的过程

(一) 调控炎症反应

在糖尿病患者中,溃疡创面局部的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等表达明显升高,而EV可以通过调节创面局部的炎症反应来促进皮肤修复^[27]。

有研究发现干细胞外泌体通过上调NF- κ B/p65亚单位和激活NF- κ B信号通路诱导M1-M2巨噬细胞极化(M1巨噬细胞表现出促炎属性,而M2巨噬细胞具抗炎与促愈合作用)来减轻炎症^[28]。Li等^[29]通过研究人脐带间充质干细胞外泌体发现,此细胞来源的外泌体可降低促炎因子TNF- α 、IL-1 β 的表达,促进抗炎因子IL-10的表达,并且在糖尿病大鼠烧伤创面的动物实验中,显示出抑制炎症反应的作用。此外,外泌体所含的miR-181c过表达也可以有效减少炎性因子分泌,抑制TLR-4信号通路,减少NF- κ B/p65通路激活,发挥类似抗炎作用^[30]。同时,Ti等^[31]在研究骨髓间充质干细胞的外泌体对糖尿病慢性炎症和创面愈合的治疗效果时发现,骨髓间充质干细胞的外泌体可通过上调抗炎细胞因子的表达和促进M2巨噬细胞活化,激活let-7b/TLR4通路,促进慢性炎症消退,降低炎性因子TNF- α 、IL-1 β 等的表达并最终加速糖尿病溃疡创面的愈合。

(二) 促进创面细胞增殖

目前研究显示,细胞增殖受多种细胞(如间充质干细胞、成纤维细胞、胚胎干细胞和内皮祖细胞)产生的EV调控^[32-34]。EV被成纤维细胞内化后,通过激活Akt和Erk1/2效应通路促进细胞增殖^[34]。其中胚胎干细胞来源的EV可通过活化丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、诱导细胞周期进展相关基因(如原癌基因、细胞周期蛋白A1、细胞周期蛋白D2等)表达、促进如胰岛素样生长因子-1、基质衍生生长因子-1、IL-6、VEGF- α 、TGF- β 等的产生(经旁分泌或自分泌途径)来促进细胞增殖^[33-34]。信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路在伤口愈合中具有重要作用,可以促进迁移、增殖、血管生成和生长因子的产生。Shabbir等^[32]的研究也证明了间充质干细胞外泌体含有转录活性的STAT3,能够促进成纤维细胞的增殖和迁移,从而促进创面愈合。

(三) 参与细胞迁移

皮肤受损后,在趋化因子的作用下,中性粒细胞和巨噬细胞等免疫细胞被招募到创面部位,发挥清除损伤部位坏死组织、碎片和细菌的作用。损伤后数小时内,上皮细胞和成纤维细胞也会迁移到创面部位,通过诱导生长因子分泌、细胞外基质的合成、血管生成等生理过程,参与创面的愈合。初步研究显示,EV参与与皮肤修复相关的各种细胞的迁移活动^[35]。

角质形成细胞的迁移受到不同类型细胞释放的EV的影响。经氯化钴处理的,包含C4.4A、 α 6 β 4整合蛋白和MMP-14肿瘤细胞来源的外泌体可通过降解层粘连蛋白-332来抑制角质形成细胞迁移,导致伤口愈合延迟。而携带热休克蛋白(heat shock protein, HSP)90 α 的角质形成细胞

来源的外泌体则能显著增强划痕模型中原代人角质形成细胞的迁移能力^[36]。

内皮细胞的迁移对血管修复和再生至关重要,多种细胞分泌的EV参与这一重要过程。Zhang等^[37]研究人诱导的多能干细胞来源的间充质干细胞(human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell, hiPSC-MSC)发现,hiPSC-MSC外泌体不仅促进了损伤部位新形成血管的生成,还加速了其成熟,将hiPSC-MSC外泌体移植到大鼠伤口部位可加速创面再上皮化,缩小瘢痕宽度,促进胶原成熟。此外,在体外实验中,hiPSC-MSC外泌体以剂量依赖的方式刺激人真皮成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的增殖和迁移。而且,随着hiPSC-MSC外泌体浓度的增加,成纤维细胞和HUVEC形成的I、III型胶原蛋白和弹性蛋白的分泌和mRNA表达也增加了^[37]。目前认为,毛细血管腔内死亡的内皮细胞通过邻近细胞的有丝分裂或循环内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)的招募而被取代。EPC对正常血管修复有重要作用,它能归向损伤部位,分化为内皮细胞,从而维持血管内皮的完整性。Bhatwadekar等^[38]的研究发现,视网膜毛细血管内皮细胞的凋亡小体介导促血管生成细胞因子和趋化因子的释放,诱导粘附分子表达,促进内皮祖细胞募集。虽然目前尚无EV亚类-凋亡小体治疗糖尿病溃疡的相关研究,但该实验中凋亡促进血管修复和再生的作用,为糖尿病溃疡治疗提供了新思路。

成纤维细胞在伤口愈合过程中发挥着释放生长因子,诱导其他细胞增殖和迁移,产生胶原纤维,搭建创面的骨架结构的作用。多项研究显示,EV可以调节成纤维细胞向创面部位的迁移。目前研究表明,热休克蛋白家族支持新生肽的折叠,阻止蛋白质的聚集,协助其他蛋白通过细胞膜运输,并可诱导细胞运动^[7]。Cheng等^[39]研究证实,TGF通过外泌体途径刺激人角质形成细胞分泌HSP90 α 促进细胞迁移,其机制可能与HSP90 α 通过与细胞表面受体LRP-1/CD91的结合作用促进细胞迁移有关。此外,研究还显示,含有HSP90 α 外泌体的人角质形成细胞条件培养基可刺激真皮成纤维细胞的快速迁移^[40]。与此同时,间充质干细胞和角质形成细胞释放的EV也能促进成纤维细胞中一些重要基因的表达,如TGF- β 、TGF- β 受体II、胶原蛋白I、胶原蛋白III、N-钙黏附蛋白、细胞周期蛋白-1、金属蛋白酶-1、金属蛋白酶-3、IL-6等。这些基因都参与Erk1/2信号通路,发挥促进细胞增殖和迁移的作用^[41]。

(四) 促进血管化

血管可为新形成的组织提供营养和氧气,是决定糖尿病创面愈合结果的关键因素。EV的3个亚群均可以增强促血管生成因子的表达,参与血管形成的调控^[32, 34, 37]。研究发现,人胚胎间充质干细胞和人内皮细胞释放的外泌体通过促进内皮细胞增殖和向伤口部位迁移来增强血管生成^[23, 42]。在该实验中,与对照组相较,外泌体处理组可见大量血管生成。内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞,在生理或病理因素刺激下,可从骨髓中动员到外周血液。有研究发现,内皮祖细胞分泌的外泌体具有促进血管内皮细胞的增殖、迁移能力,提高VEGF、人低氧诱导因子-1 α 等因子表达的作用,

能够加速糖尿病大鼠溃疡创面的愈合^[42]。此外,Li 等^[29]研究结果显示,脂肪间充质干细胞源性的外泌体能够促进内皮祖细胞的增殖和血管生成,促进肉芽组织形成和生长因子表达以及降低炎症和氧化应激相关蛋白水平,显著减少糖尿病大鼠足部溃疡面积。

细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, Erk1/2)信号通路是促血管生成的重要信号通路。研究发现,激活 Erk1/2 信号通路的多种关键促血管生成基因(包括表达 IL-6、IL-8、血管生成素-1、e-选择素和成纤维细胞生长因子-2 等基因),在富血小板血浆和内皮祖细胞来源的外泌体刺激后被上调^[34, 43]。Zhang 等^[37]发现内皮祖细胞分泌的外泌体可以影响 Erk1/2 通路,通过调节及表达相关蛋白来促进糖尿病创面的修复与再生,此外,Erk1/2 信号通路的下游靶点,如 DNA 结合抑制位点-1、环氧合酶 1、血管内皮生长因子 A、血管内皮生长因子受体-2、原癌基因、细胞周期蛋白-d1 也在外泌体处理后表达增加。这更加证实了外泌体可以通过激活 Erk1/2 信号通路来增强内皮细胞功能。然而,多细胞来源的微囊泡经 CD36 处理后,表现为抑制血管内皮细胞管状结构的形成,而同种细胞来源的外泌体与微囊泡没有相同的抑制性^[44]。综上所述,EV 有可能影响血管再生,而 EV 的生物活性可能取决于 EV 的类型和所在细胞的生理条件,还需要进一步的研究来确定具体是哪些 EV 衍生的生物分子负责刺激血管生成。

(五) 细胞外基质的重塑

EV 还对伤口愈合的最后阶段——细胞外基质重塑发挥调节作用。研究表明,EV 能刺激细胞外基质弹性蛋白的分泌。在伤口愈合的早期使用间充质干细胞衍生的外泌体处理创面,可使创面胶原蛋白 I 和 III 量增加,但在该研究中发现,在后期,EV 的作用会转向抑制胶原蛋白的表达,抑制瘢痕增生^[45]。Huleihel 等^[46]的研究发现,细胞外基质内的 EV 与基质胶原网络的形成密切相关。此外,在一例以大鼠为动物实验模型的研究中发现,EV 与膜联蛋白 A1 和甲酰基肽受体的相互作用可显著提高愈合率和减少创面瘢痕面积。

需引起注意的是,上述研究分别从 EV 的功能性成分及其在糖尿病创面愈合的各个生理病理阶段的作用进行了研究和讨论,但部分文献对所涉及的 EV 类型并未进行细致的分类——这可能是由于各亚类 EV 难以通过特定的方法进行提取及纯化,相关研究中涉及的 EV 中可能有 1~2 种甚至更多的亚类存在且发挥类似的作用、且起作用的功能性生物分子多需进一步研究界定的缘故。

五、安全性及局限性

EV 在应用于临床时仍有许多局限,EV 的内容物及生物功能与来源细胞的状态、是否受到损害等因素密切相关,除此之外,EV 中的部分物质,特别是一些 miRNA 可以在不同的组织中引发不同甚至相反的效应,其引发肿瘤的可能不容忽视^[47]。因此,在使用天然或定制的 EV 时,如何根据治疗目标调整细胞状态、培养和刺激条件需要通过进一步研究来确定。

此外,EV 的研究及临床应用还须注意投放方法和投放后的生物分布。其中,生物分布研究对于避免用药后囊泡在预定靶区以外的位置分配不当所造成的不良影响至关重要。

目前,EV 的治疗方式大多数是通过注射的方法,基于此,研究人员尝试使用生物荧光等标记方法来监测 EV 的生物分布。一项研究显示,用超顺磁性氧化铁纳米颗粒标记的黑色素瘤 EV,注射在 C57BL/6 鼠尾垫足(皮内/皮下),随后采用标准的磁共振成像方法,结果显示标记的 EV 到达了鼠的淋巴结^[48]。此类的技术可以用于 EV 跟踪。

使用 EV 另一个需要考虑的重要问题是产量。相对于治疗所需的高剂量,从条件培养基中获得的产量很低。为使 EV 临床可用,规模生产是必不可少的。此外,EV 同质群体纯化和载体的获得也是一个挑战。即使是超离心法与过滤或针对膜蛋白 CD81、CD9 和 CD63 的免疫亲和步骤相结合的优化纯化方法,EV 也没有达到理想的纯度。解决方案可能是合成具有统一脂类、蛋白质组和转录组的 EV。

六、总结

在本文中,笔者对 EV 在糖尿病创面修复中的研究现状进行概括,发现 EV 可通过调控炎症反应、促进成纤维细胞的增殖和迁移、刺激血管生成、加速胶原合成和调控细胞外基质重塑来促进糖尿病创面愈合并提高修复质量。EV 作为一种全新的糖尿病创面治疗手段,具有广阔应用的前景。然而,将 EV 应用于治疗糖尿病创面仍然存在一些问题。目前,EV 的生物安全性、使用方式、剂量和生物分布的研究还不够深入,如何高效制备和分离高纯度的 EV 仍是一个难题。未来的研究应着眼于开发更高效、精准的 EV 刺激及提纯方法和相应机制探索上。

参 考 文 献

- [1] 廖涌. 中国糖尿病的流行病学现状及展望[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(7): 1042-1045.
- [2] Armstrong DG, Boulton A JM, Bus SA. Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence[J]. N Engl J Med, 2017, 376(24): 2367-2375.
- [3] 郭茵, 张鹏飞. 糖尿病足病的中西医治疗进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2016, 14(9): 146-148.
- [4] Cho H, Blatchley MR, Duh EJ et al. Acellular and cellular approaches to improve diabetic wound healing [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2019, 146(3): 267-288.
- [5] Ferreira ADF, Gomes DA. Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair[J]. Bioengineering (Basel), 2018, 6(1): 4.
- [6] Akers JC, Gonda D, Kim R, et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies [J]. J Neurooncol, 2013, 113(1): 1-11.
- [7] Than U, Guanzon D, Leavesley D, et al. Association of Extracellular Membrane Vesicles with Cutaneous Wound Healing [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5): 956.
- [8] Khan M, Kishore R. Stem Cell Exosomes: Cell-FreeTherapy for Organ Repair[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1553: 315-321.
- [9] Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, et al. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair Than iPSCs[J]. Circ Res, 2018, 122(2): 296-309.
- [10] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing[J]. N Engl J Med, 1999, 341(10): 738-746.

- [11] Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 747584.
- [12] Sen CK. Wound healing essentials: Let there be oxygen [J]. *Wound Repair Regen*, 2009, 17(1): 1-18.
- [13] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058-1070.
- [14] Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers [J]. *Wound Repair Regen*, 2005, 13(5): 452-461.
- [15] Walker A, Nissen E, Geiger A. Migratory, metabolic and functional alterations of fibrocytes in type 2 diabetes [J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(11): 1122-1132.
- [16] Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, et al. Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells [J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(2): 673-680.
- [17] Del CI, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation [J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1604-1611.
- [18] Hao S, Bai O, Yuan J, et al. Dendritic cell-derived exosomes stimulate stronger CD8+ CTL responses and antitumor immunity than tumor cell-derived exosomes [J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3(3): 205-211.
- [19] Batista BS, Eng WS, Pilobello KT, et al. Identification of a conserved glycan signature for microvesicles [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(10): 4624-4633.
- [20] Subra C, Laulagnier K, Perret B, et al. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies [J]. *Biochimie*, 2007, 89(2): 205-212.
- [21] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes [J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1244-1247.
- [22] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles [J]. *PLoS One*, 2008, 3(11): e3694.
- [23] Liang X, Zhang L, Wang S, et al. Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(11): 2182-2189.
- [24] Skog J, Würdinger T, van Rijn S, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(12): 1470-1476.
- [25] Herrera MB, Fonsato V, Gatti S, et al. Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(6B): 1605-1618.
- [26] Dereggibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA [J]. *Blood*, 2007, 110(7): 2440-2448.
- [27] 袁佳沁, 宋福晨, 朱美冬, 等. 外泌体在糖尿病性溃疡中作用机制及应用的研究进展 [J]. 实用临床医药杂志, 2019, 23(20): 1-5.
- [28] Kim H, Wang SY, Kwak G, et al. Exosome-Guided Phenotypic Switch of M1 to M2 Macrophages for Cutaneous Wound Healing [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2019, 6(20): 1900513.
- [29] 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.
- [30] Dalirfardouei R, Jamialahmadi K, Jafarian AH, et al. Promising effects of exosomes isolated from menstrual blood-derived mesenchymal stem cell on wound-healing process in diabetic mouse model [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2019, 13(4): 555-568.
- [31] 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.
- [32] Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, et al. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis In Vitro [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(14): 1635-1647.
- [33] Jeong D, Jo W, Yoon J, et al. Nanovesicles engineered from ES cells for enhanced cell proliferation [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(34): 9302-9310.
- [34] Zhang J, Chen C, Hu B, et al. Exosomes Derived from Human Endothelial Progenitor Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis Through Erk1/2 Signaling [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(12): 1472-1487.
- [35] Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(10): 738-746.
- [36] Ngora H, Galli UM, Miyazaki K, et al. Membrane-bound and exosomal metastasis-associated C4.4A promotes migration by associating with the $\alpha(6)\beta(4)$ integrin and MT1-MMP [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(2): 95-107.
- [37] Zhang J, Guan J, Niu X, et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 49.
- [38] Bhatwadekar AD, Glenn JV, Curtis TM, et al. Retinal Endothelial Cell Apoptosis Stimulates Recruitment of Endothelial Progenitor Cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(10): 4967-4973.
- [39] Cheng CF, Fan J, Fedesco M, et al. Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(10): 3344-3358.
- [40] Pearl LH, Prodromou C. Structure and in vivo function of Hsp90 [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10(1): 46-51.
- [41] Hu L, Wang J, Zhou X, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32993.
- [42] Li X, Jiang C, Zhao J. Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function [J]. *J Diabetes*

- Complications, 2016, 30(6): 986-992.
- [43] Li X, Chen C, Wei L, et al. Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function [J]. Cyotherapy, 2016, 18(2): 253-262.
- [44] Zhang J, Chen C, Hu B, et al. Exosomes Derived from Human Endothelial Progenitor Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis Through Erk1/2 Signaling [J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(12): 1472-1487.
- [45] de Jong OG, van Balkom BW, Gremmels H, et al. Exosomes from hypoxic endothelial cells have increased collagen crosslinking activity through up-regulation of lysyl oxidase-like 2 [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(2): 342-350.
- [46] Huleihel L, Hussey GS, Naranjo JD, et al. Matrix-bound nanovesicles within ECM bioscaffolds [J]. Sci Adv, 2016, 2(6): e1600502.
- [47] Pan JH, Zhou H, Zhao XX, et al. Role of exosomes and exosomal microRNAs in hepatocellular carcinoma: Potential in diagnosis and antitumour treatments (Review) [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1809-1816.
- [48] Hu L, Wickline SA, Hood JL. Magnetic resonance imaging of melanoma exosomes in lymph nodes [J]. Magn Reson Med, 2015, 74(1): 266-271.

(收稿日期:2020-07-20)

(本文编辑:谷俊朝)

冯景浩,陈雅南,袁鸣洲,等.细胞外囊泡在糖尿病创面修复中的作用机制及应用[J/CD].中华损伤与修复杂志(电子版),2020,15(5):397-402.

中华损伤与修复杂志