doi:10.11659/jjssx.01E023063

·基础研究·

HO1工程化无细胞提取液联合石墨烯远红外光促糖尿病溃疡修复的疗效及机制

温 晴[1],范睿诚[2],杨 艺[3],李红丽[3],熊 玮[1] (1.陆军军医大学第一附属医院老年与特勤医学科,重庆 400038;2.陆军军医大学基础医学院组织学与胚胎学教研室/重庆市神经科学重点实验室,重庆 400038;3.陆军军医大学基础医学院基础医学教学实验中心,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨HO1工程化无细胞提取液(CE)联合石墨烯远红外光(FIR)在糖尿病溃疡创面修复中的疗效及机制。**方法** 将40只6~8周龄雄性C57BL/6小鼠建立正常创面模型(对照组,n=8)及糖尿病溃疡模型(n=32),其中将糖尿病溃疡模型小鼠随机分为糖尿病组、^{HO1}BMSCs-CE组、FIR组、联合组。构建过表达血红素氧合酶1(HO1)的骨髓间充质干细胞(BMSCs),获取工程化富含HO1蛋白的无细胞提取液(^{HO1}BMSCs-CE),运用Western blot、ELISA、RT-PCR、Masson染色、免疫组化等检测各组创面愈合率、组织修复情况、创面氧化应激及炎症水平等。**结果** Western blot及ELISA检测结果显示,^{HO1}BMSCs-CE中HO1、表皮生长因子(EGF)、转化生长因子-β(TGF-β)表达水平显著高于BMSCs-CE(P<0.05)。治疗后第5、11天,联合组的创面愈合率均显著高于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组(P<0.05)。与^{HO1}BMSCs-CE组及FIR组相比,联合组在治疗后第3、7、11天创缘组织中Ca^{2+}浓度较高,TNF-α、IL-6表达水平较低,而ROS水平仅在治疗后第3、7天较低(P<0.05)。治疗后第14天,联合组创面组织的表皮厚度较厚,真皮Masson染色胶原容积分数和VEGF免疫阳性信号OD值均显著高于FIR组和^{HO1}BMSCs-CE组(P<0.05);治疗后第7天,联合组创面组织中凋亡相关蛋白Caspase-3表达水平显著低于FIR组和^{HO1}BMSCs-CE组(P<0.05)。**结论** 糖尿病溃疡创面中运用工程化富含HO1蛋白的^{HO1}BMSCs-CE联合石墨烯FIR治疗可明显抑制局部组织氧化应激反应,减少炎症因子释放和细胞凋亡发生,加快创面区域皮肤组织上皮化形成、真皮胶原和血管增生,较^{HO1}BMSCs-CE或FIR治疗的促愈疗效更为突出,为探索临床糖尿病难愈性创面的新型联合治疗提供了基础研究证据。

[关键词] 糖尿病溃疡;骨髓间充质干细胞;无细胞提取液;血红素氧合酶1;石墨烯远红外光

[中图分类号] R587.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2023-01-13

[基金项目] 国家重点研发计划(2018YFC2000301)

[通信作者] 熊 玮,E-mail:xiongwei64@126.com

[4] Turksen K, Troy TC. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1816(1): 73-79. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.04.001.

[5] Liu Q, Shen H, Naguib A, et al. Knocking down claudin receptors leads to a decrease in prostate cancer cell migration, cell growth, cell viability and clonogenic cell survival[J]. Mol Biomed, 2021, 2(1): 31. doi: 10.1186/s43556-021-00053-0.

[6] Luo Y, Kishi S, Sasaki T, et al. Targeting claudin-4 enhances chemosensitivity in breast cancer[J]. Cancer Sci, 2020, 111(5): 1840-1850. doi: 10.1111/cas.14361.

[7] Breed C, Hicks DA, Webb PG, et al. Ovarian tumor cell expression of Claudin-4 reduces apoptotic response to paclitaxel[J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(3): 741-750. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0451.

[8] Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Luo Y, et al. Anti-claudin-4 extracellular domain antibody enhances the antitumoral effects of chemotherapeutic and antibody drugs in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2018, 9(100): 37367-37378. doi: 10.18632/oncotarget.26427.

[9] 鄢腾峰,谈胤求,李云涛,等. 紧密连接蛋白Claudin-4在肿瘤中的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2022, 43(3): 406-411. doi: 10.14188/j.1671-8852.2021.0126.

[10] Taber A, Christensen E, Lamy P, et al. Molecular correlates of cisplatin-based chemotherapy response in muscle invasive bladder cancer by integrated multi-omicsanalysis[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4858. doi: 10.1038/s41467-020-18640-0.

[11] Hristova VA, Chan DW. Cancer biomarker discovery and translation: proteomics and beyond[J]. Expert Rev Proteomics, 2019, 16(2): 93-103. doi: 10.1080/14789450.2019.1559062.

[12] Nishiguchi Y, Fujiwara-Tani R, Sasaki T, et al. Targeting claudin-4 enhances CDDP-chemosensitivity in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2019, 10(22): 2189-2202. doi: 10.18632/oncotarget.26758.

[13] Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, et al. ROS and the DNA damage response in cancer[J]. Redox Biol, 2019, 25: 101084. doi: 10.1016/j.redox.2018.101084.

[14] de Almeida LC, Calil FA, Machado-Neto JA, et al. DNA damaging agents and DNA repair: from carcinogenesis to cancer therapy[J]. Cancer Genet, 2021, 252-253: 6-24. doi: 10.1016/j.cancergen.2020.12.002.

[15] Noubissi FK, McBride AA, Leppert HG, et al. Detection and quantification of γ-H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8945. doi: 10.1038/s41598-021-88296-3.

[16] 王丽娜,罗 志,张 立. DNA损伤及其标志物γ-H2AX检测的研究进展[J]. 分析试验室, 2020, 39(10): 1131-1136. doi: 10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2020.060402.

[17] Martinez AR, Kaul Z, Parvin JD, et al. Differential requirements for DNA repair proteins in immortalized cell lines using alternative lengthening of telomere mechanisms[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2017, 56(8): 617-631. doi: 10.1002/gcc.22465.

[18] Wang D, Zhou Z, Wu E, et al. LRIK interacts with the Ku70-Ku80 heterodimer enhancing the efficiency of NHEJ repair[J]. Cell Death Differ, 2020, 27(12): 3337-3353. doi: 10.1038/s41418-020-0581-5.

(编辑:杨 颖)

Efficacy and mechanism of HO1 engineered cell-free extract combined with graphene far-infrared radiation in promoting the repair of diabetic ulcer

WEN Qing[1], FAN Rui-cheng[2], YANG Yi[3], LI Hong-li[3], XIONG Wei[1] (1.Department of Geriatrics and Special Service Medicine, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2.Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Army Medical University/Chongqing Key Laboratory of Neuroscience, Chongqing 400038, China; 3.Basic Education and Experimental Center, College of Basic Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the efficacy and mechanism of HO1 engineered cell-free extract (CE) combined with graphene far-infrared radiation (FIR) in the repair of diabetic ulcer wounds. **Methods** A total of 40 male C57BL/6 mice (6 to 8 weeks old) were used to establish normal wound model (the control group, n=8) and diabetic ulcer model (n=32). The diabetic ulcer model mice were randomly divided into the diabetes group, the ^{HO1}BMSCs-CE group, the FIR group and the combined group. The bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) overexpressing heme oxygenase-1(HO1) was constructed to obtain engineered cell-free extract rich in HO1 protein (^{HO1}BMSCs-CE). Western blot, ELISA, RT-PCR, Masson staining and immunohistochemistry were used to detect the wound healing rate, tissue healing status, wound oxidative stress and inflammation levels in each group. **Results** The results of Western blot and ELISA showed that the expression levels of HO1, epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor-β (TGF-β) in ^{HO1}BMSCs-CE were significantly higher than those in BMSCs-CE(P<0.05). The wound healing rate 5 and 11 days after treatment in the combined group were higher than those in the ^{HO1}BMSCs-CE group and the FIR group(P<0.05). Compared with the ^{HO1}BMSCs-CE group and the FIR group, the Ca^{2+} concentration of the wound margin tissue 3, 7 and 11 days after treatment in the combined group were higher, and the expression levels of TNF-α and IL-6 were lower, while the expression levels of ROS 3 and 7 days after treatment were lower (P<0.05). The thickness of epidermis of the wound tissue 14 days after treatment in the combined group was thick, and the Masson staining collagen volume fraction in dermis and the OD value of VEGF immunopositive signal were significantly higher than those in the FIR group and the ^{HO1}BMSCs-CE group (P<0.05). The expression levels of apoptosis-related protein Caspase-3 of the wound tissue 7 days after treatment in the combined group was significantly lower than those in the FIR group and the ^{HO1}BMSCs-CE group (P<0.05). **Conclusion** The application of engineered ^{HO1}BMSCs-CE rich in HO1 protein combined with graphene FIR in diabetic ulcer wounds can significantly inhibit the oxidative stress response of local tissue, reduce the release of inflammatory factors and the occurrence of cell apoptosis, and accelerate the epithelization formation of skin tissue and the proliferation of dermal collagen and blood vessels in the wound area, which has more prominent curative effect than the efficacy of ^{HO1}BMSCs-CE or FIR therapy alone, and provide basic research evidence for the clinical exploration of new combined treatment for refractory diabetic wounds.

Keywords: diabetic ulcer; bone marrow mesenchymal stem cells; cell-free extract; heme oxygenase 1; graphene far-infrared radiation

近年来无细胞提取液(cell-free extract,CE)作为干细胞替代物逐渐受到关注。多项研究表明,CE同样具有促进创面愈合的作用,且无需考虑致癌风险,更易于携带、储存等[1-2]。然而在慢性创面如糖尿病溃疡中,创面局部存在持续且强烈的氧化应激及炎症,局部微循环受损,CE中的活性成分易降解失效,因此,工程化、优化的CE逐渐成为研究热点[3-5]。

血红素氧合酶1(heme oxygenase 1,HO1)是一种具有抗氧化、抗炎作用的细胞保护酶,广泛应用于氧化应激及炎症相关的疾病治疗研究。Maamoun等[6]发现诱导细胞HO1表达可减轻高糖诱导的氧化应激损伤及炎症反应,具有明确的细胞保护效应。但目前关于工程化富含HO1蛋白的无细胞提取液(^{HO1}BMSCs-CE)能否在慢性创面愈合中发挥更好的稳定性及疗效尚未可知。远红外光(far-infrared radiation,FIR)作为一种无创、便捷、低毒性的治疗方式,具有改善皮肤创面微循环和血液循环、减轻疼痛、促进吸收等作用[7-9]。其中石墨烯辐射体来源的FIR与人体自发辐射频谱接近,对人体有更佳的效益性和安全性[8,10],是一种安全、有效、简单易行的辅助治疗手段。因此,本研究将工程化^{HO1}BMSCs-CE联合石墨烯FIR用于糖尿病溃疡创面的治疗,观察联合治疗的效果及可能的相关机制,以期为临床慢性创面的新型促愈治疗提供基础研究证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

SPF级雄性C57BL/6小鼠3~4周龄20只、6~8周龄40只[生产许可证号:SCXK(渝)2022-0011;使用许可证号:SCXK(渝)2022-0018],体质量18~22 g,均由陆军军医大学实验动物中心提供,且本研究经陆军军医大学实验动物伦理委员会批准(AMUWEC20207009)。

HO1过表达腺病毒定制于重庆乐琴公司;DMEM/F-12培养基、胎牛血清购自Hyclone公司;链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)购自美国Sigmag公司;Caspase-3、β-actin、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)抗体均购自武汉博士德;ELISA试剂盒购自美国赛默飞;RNA抽提试剂盒、ROS检测试剂盒购自上海碧云天;反转录试剂盒购自TAKARA公司;钙离子浓度荧光定量检测试剂盒购自上海赫澎生物;HE、Masson染色试剂盒购自北京索莱宝;真空干燥机购自日本Yamato公司;远红外线石墨烯面罩购自重庆墨希公司。

1.2 ^{HO1}BMSCs-CE制备

取3~4周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠胫骨及股骨,通过全骨髓法培养获得骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs),培养于含10%胎牛血清的DMEM/F-12培养基中。取3~6代细胞,待细胞融合达80%时分别用携带HO1基因的腺病毒(HO1-Adv)和空载腺病毒(MOI为200)转染BMSCs,并通过Western blot检测HO1蛋白表达情况。更换无血清培养基10 mL继续培养细胞,连续5 d收集细胞上清液,检测相关活性因子水平,其余细胞上清液通过冻干干燥后储存于-20 ℃,使用时与适量蒸馏水水化溶解。

1.3 糖尿病溃疡模型建立及实验分组

将40只6~8周龄雄性C57BL/6小鼠禁食12 h后,其中8只小鼠腹腔注射柠檬酸缓冲液建立正常创面模型(对照组);其余小鼠予以50 mg/kg 1%STZ-柠檬酸溶液腹腔连续注射5 d构建糖尿病模型,1周后空腹血糖高于16.7 mmol/L并伴有多饮、多食、多尿症状者视为糖尿病小鼠模型构建成功。所有小鼠经5%水合氯醛麻醉后,在其背部作2个直径6 mm的圆形全层皮肤缺损创面,术后单笼喂养。将糖尿病溃疡模型小鼠随机分为糖尿病组、^{HO1}BMSCs-CE组、FIR组、联合组,每组8只。对照组不予以任何治疗;糖尿病组小鼠予以100 μL PBS创缘注射;FIR组小鼠连续7 d予以FIR照射10 min;^{HO1}BMSCs-CE组小鼠予以创缘八点注射100 μL CE;联合组小鼠第1天予以创缘八点注射100 μL ^{HO1}BMSCs-CE,并连续7 d予以FIR照射10 min。本实验采用远红外线石墨烯面罩,其为石墨烯曲面设计,有助于创面均匀照射。

1.4 Western blot检测

取各组创面组织加入裂解液,研磨后离心取上清液提取蛋白;煮沸变性后进行SDS-PAGE凝胶电泳;而后半干转进行转膜,转膜后PVDF膜封闭1 h,加入HO1、Caspase-3、β-actin一抗(1∶1 000)于4 ℃摇床孵育过夜,洗膜后用HRP偶联的山羊抗兔或兔抗小鼠二抗于室温摇床孵育1 h,再次洗膜后进行显影。采用ImageJ软件分析目标蛋白带的灰度。

1.5 ELISA检测

分别取携带HO1基因的腺病毒载体及腺病毒空载体转染的BMSCs的第1~5天的无细胞提取液(BMSCs-CE、^{HO1}BMSCs-CE),按照ELISA试剂盒说明书检测表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)水平。取样品蛋白后加样、加酶,抗体孵育后显色。将96孔板置于酶标仪中,在450 nm波长处测量OD值,使用Curve Expert软件绘制标准曲线,计算样品的浓度值。

1.6 创面愈合率测定

分别于制创第0、5、11天拍摄创面,通过ImageJ软件进行分析。创面愈合率=(创面初始面积-第n天创面面积)/创面初始面积×100%。

1.7 HE染色

采用HE染色试剂盒,按照步骤依次将第14天的创缘石蜡切片放入二甲苯中,梯度乙醇脱蜡后,依次放入苏木素、伊红染液进行染色,而后梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片并拍照。分析图像,统计创面表皮的厚度值。

1.8 总Ca^{2+}浓度测定

采用钙离子浓度荧光定量检测试剂盒,按照步骤取500 mg创缘组织,依次加入清理液Reagent A、裂解液Reagent B后匀浆,4 ℃下以13 000 r/min离心5 min后取上清,荧光酶标仪(22 ℃)激发波长485 nm,散发波长520 nm下测量获得相对荧光单位,计算样品Ca^{2+}浓度。

1.9 RT-PCR检测

根据说明书采用RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒提取第3、7、11天创缘组织的总RNA,然后使用反转录试剂盒将其反转录为cDNA。用分光光度计(NanoDrop)测定RNA浓度。进一步采用PCR仪进行扩增,检测肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)及白介素-6(interleukin-6,IL-6)表达。TNF-α引物上游序列5′-TGTCTCAGCCTCTTCTCATT-3′,下游序列5′-GCCATTTGGGAACTTCTCAT-3′;IL-6引物上游序

列 5′-GAGACTTCACAGAGGATACCA-3′，下游序列 5′-GTGCATCATCGTTGTTCATAC-3′；β-actin引物上游序列 5′-TGTAAAACGACGGCCAGT-3′，下游序列 5′-CAGGAAACAGCTATGACC-3′。

1.10 ROS水平测定

将第3、7、11天的创缘组织匀浆后取上清，采用ROS检测试剂盒，按照说明书于对照组加入Rosup，其余组加入DCFH-DA，使用分光光度计测量各组520 nm波长下的荧光强度。

1.11 Masson染色

采用Masson染色试剂盒，将第14天的创缘切片脱蜡（方法同HE染色），依次加入苏木素、丽春红、苯胺蓝进行染色，乙醇脱水，二甲苯透明。中性树胶封片后拍照。分析图像，统计呈蓝绿色的胶原容积分数。

1.12 免疫组化

将第14天的创缘切片脱蜡（方法同HE染色），依次进行抗原修复、血清封闭、一抗孵育（兔抗VEGF，1∶500）、二抗孵育（生物素化山羊抗兔IgG抗体）、DAB显色，最后梯度乙醇脱水、二甲苯透明，中性树胶封片并拍照，统计VEGF阳性棕色信号OD值。

1.13 统计学方法

应用SPSS 22.0统计学软件分析数据，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，正态分布且方差齐的采用参数检验，否则采用非参数检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 工程化的^{HO1}BMSCs-CE鉴定

Western blot结果显示，HO1-Adv转染2 d后BMSCs中HO1蛋白表达水平显著高于空载腺病毒（$P<0.05$），见图1a、b。^{HO1}BMSCs-CE中转染1 d后EGF、TGF-β蛋白表达水平呈上升趋势，2 d时水平较高，维持至第3天，然后呈逐渐下降趋势（图1c、d）。考虑有效性及时间成本，本实验采用培养第2天的细胞提取液用于后续研究。

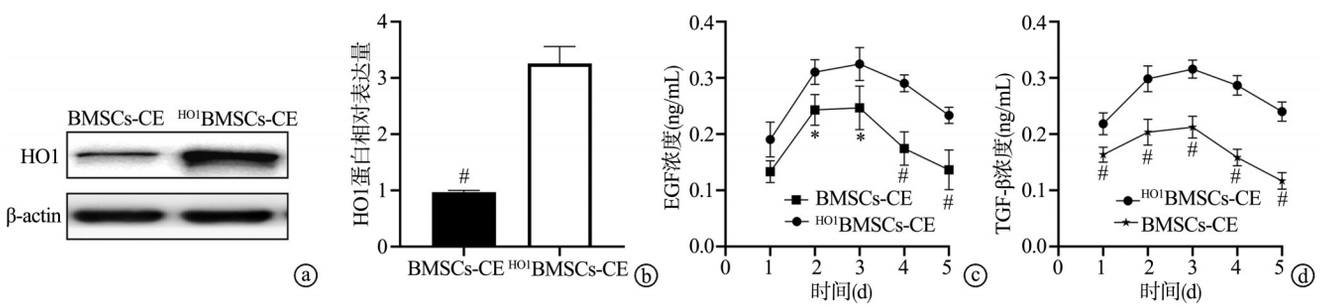
2.2 联合治疗加快糖尿病溃疡创面愈合、促进创面再上皮化

治疗后第5、11天，联合组和对照组创面表层较干净，^{HO1}BMSCs-CE组、FIR组创面表层脓性分泌物虽然较糖尿病组少，但仍可见较多的脓性渗出物（图2a）；联合组的创面愈合率均显著高于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组（$P<0.05$）。治疗后第11天，联合组与对照组的创面愈合率比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；而^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组在各时段的愈合率均高于糖尿病组，低于联合组，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见图2b。HE染色结果显示，第14天联合组的上皮结构连续，完整且厚，真皮结构紧密，毛囊附属器接近对照组；而^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组的上皮结构不完整，仅覆盖薄层表皮，真皮结构紊乱，毛囊附属器少，与联合组相比差异显著（$P<0.05$），见图2c。

2.3 联合治疗抑制创面炎症因子释放及氧化应激反应、提高创面总Ca^{2+}水平

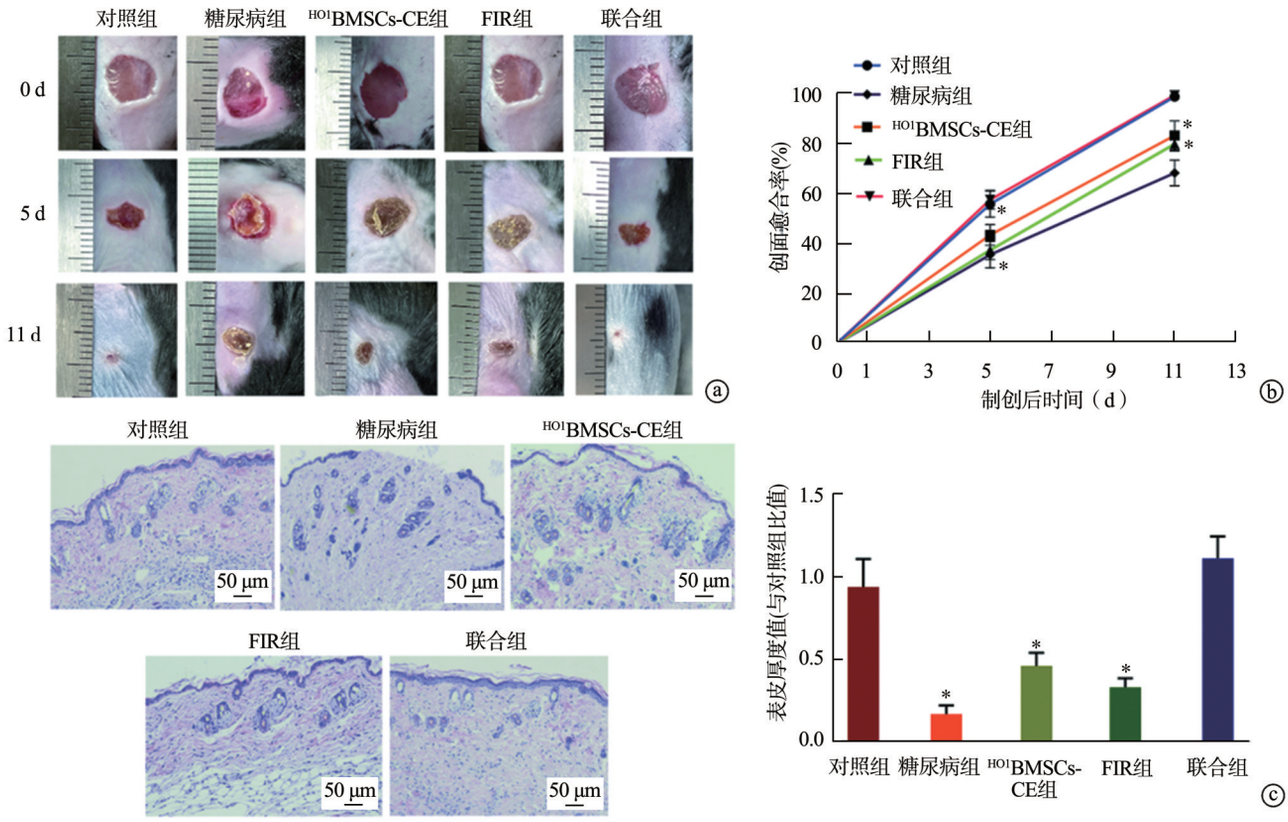
联合组在治疗后第3、7、11天的ROS水平明显低于^{HO1}BMSCs-CE组，在第3、7天低于FIR组，差异有统计学意义（$P<0.05$），而第11天联合组与FIR组ROS水平未见明显差异（$P>0.05$），见图3a。RT-PCR检测结果显示，联合组治疗后第3、7、11天的促炎因子TNF-α和IL-6 mRNA表达水平明显低于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组（$P<0.05$），见图3b、c。

治疗后第3、7、11天，联合组创面局部组织中总Ca^{2+}浓度均高于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；治疗后第7天，联合组创面局部组织中总Ca^{2+}浓度高于对照组（$P<0.05$），见图3d。



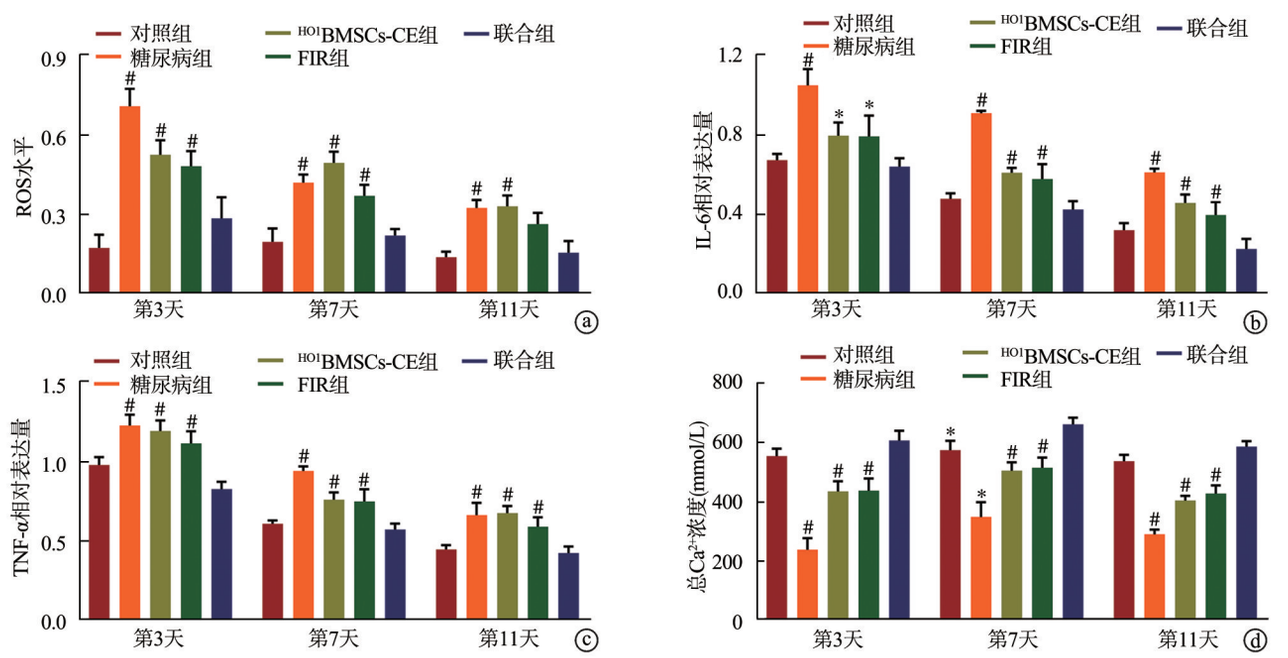
a:HO1蛋白免疫印迹图；b:HO1蛋白表达水平；c:不同时期EGF蛋白表达水平；d:不同时期TGF-β蛋白表达水平 *:与^{HO1}BMSCs-CE比较，$P<0.05$；#:与^{HO1}BMSCs-CE比较，$P<0.01$

图1 工程化的^{HO1}BMSCs-CE的鉴定



a:各组创面愈合情况;b:各组创面愈合率;c:各组第14天HE染色显示再上皮化情况及表皮厚度　*:与联合组比较,$P<0.01$

图2　各组创面愈合情况及再上皮化情况



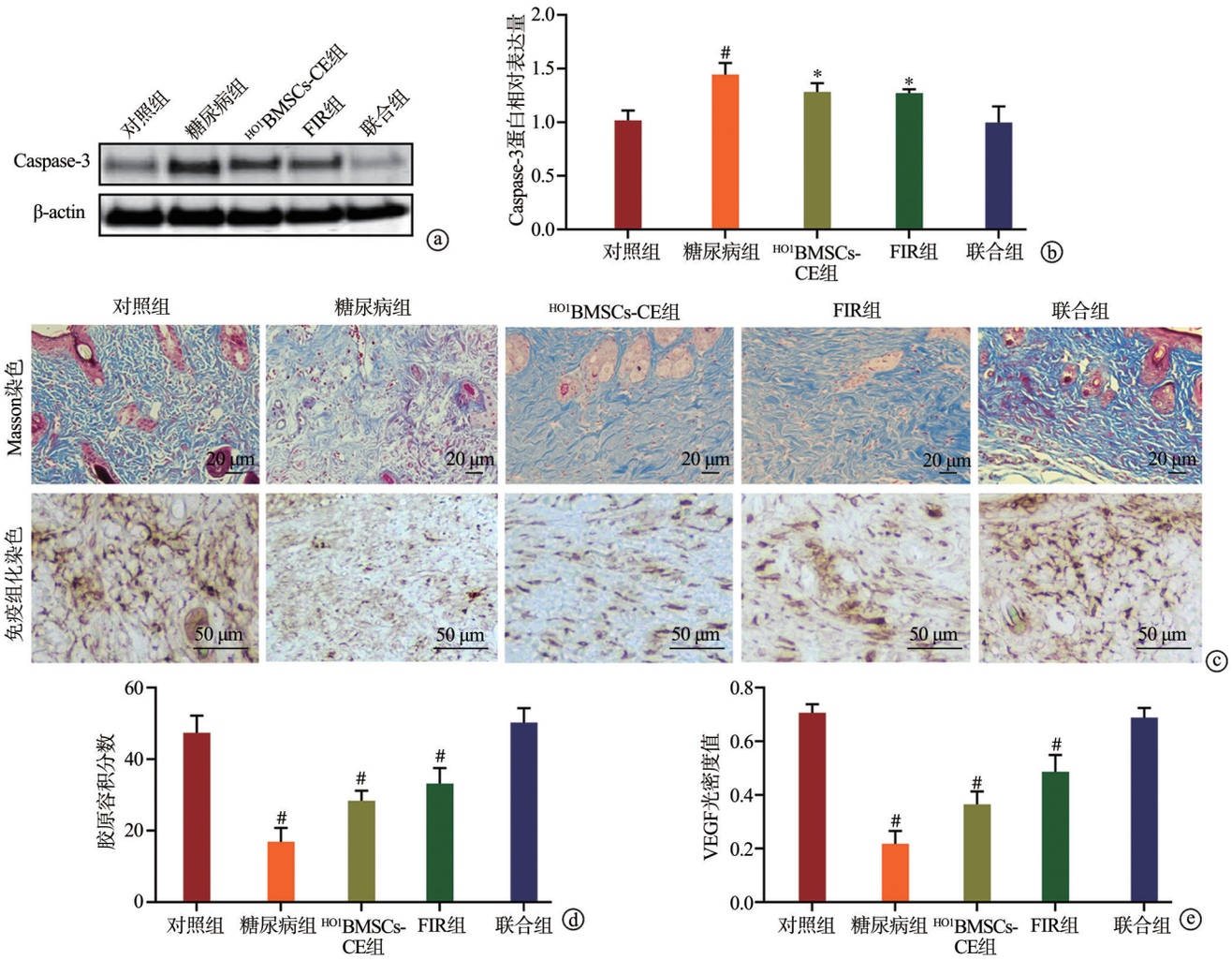
a:ROS水平;b:IL-6水平;c:TNF-α水平;d:创面总Ca^{2+}浓度　*:与联合组比较,$P<0.05$;#:与联合组比较,$P<0.01$

图3　各组创面炎症、氧化应激水平及创面总Ca^{2+}浓度

2.4　联合治疗抑制Caspase-3表达、促进胶原纤维及VEGF表达

Western blot结果显示,治疗后第7天联合组创面组织中凋亡相关蛋白Caspase-3表达水平明显低于HO1BMSCs-CE组和FIR组($P<0.05$),见图4a、b。Masson染色结果显示,治疗后第14天,联合组及对照组的胶原纤维呈蓝色,密集且整齐,HO1BMSCs-CE组及FIR组的胶原纤维呈淡染,纤维结构紊乱,联合组真皮

Masson染色胶原容积分数高于^{HO1}BMSCs-CE组及FIR组(图4c、d)。免疫组化结果显示,联合组与对照组VEGF阳性信号区域分布较广,染色较深,^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组VEGF阳性区域分布分散不均,染色较浅,^{HO1}BMSCs-CE组、FIR组VEGF染色信号的OD值均低于联合组(P<0.05),见图4c、e。



a:第7天Caspase-3蛋白免疫印迹图;b:第7天Caspase-3蛋白相对表达水平;c:第14天Masson染色及VEGF免疫组化染色情况;d:第14天真皮Masson染色胶原容积分数;e:第14天创面VEGF染色强度 *:与联合组比较,P<0.05;#:与联合组比较,P<0.01

图4 各组Caspase-3、胶原纤维及VEGF表达情况

3 讨论

近年干细胞移植治疗创面因存在一定的风险而难以在临床推广应用[5]。研究显示,移植后干细胞发挥作用与其分泌各种创面愈合所需活性成分有关[11]。因此,干细胞来源的CE的应用逐渐成为热点。慢性创面是指经临床规范治疗4周后仍不愈合的创面[12],由于创面强烈的氧化应激及炎症反应等造成局部微环境紊乱,CE的活性成分也被降解而作用受限[13-14]。工程化CE旨在提高活性物质的稳定性及有效性,以获得更为突出的疗效[3-5]。既往研究已证实,BMSCs的CE中包含旁分泌产生的多种生长因子、趋化因子、外泌体、RNA、蛋白等,在创面愈合中发挥重要作用[5]。本研究采用过表达HO1的BMSCs体系获取工程化^{HO1}BMSCs-CE,经检测CE中含有高表达的HO1蛋白和较高水平的EGF、TGF-β蛋白,结果提示HO1可促进BMSCs的旁分泌作用,该结果与Chen等[15]的研究结果一致。我们在糖尿病小鼠创面周围运用^{HO1}BMSCs-CE后发现,治疗第11天创面愈合率达84%,提示工程化^{HO1}BMSCs-CE具有一定的促愈效果,但与对照组(第11天愈合率约为100%)相比促愈作用仍较有限。

石墨烯是近年研发的可产生FIR(6~14 μm)的新型材料,其产生的FIR与人体发射的FIR频谱相似,且有报道证实人体对石墨烯FIR的吸收率达88%,更具安全性及有效性[16]。FIR能够直接穿透皮肤及皮下组

织,作用于血管、神经末梢及淋巴管引起分子共振,产生温热效应,有助于促进血液循环、促进吸收[8,16]。据此,为进一步提高^{HO1}BMSCs-CE的促愈疗效,本研究创新性地将^{HO1}BMSCs-CE联合石墨烯FIR治疗糖尿病溃疡,结果表明,治疗后第11天联合组的创面愈合率约100%,与对照组相比无差异,且各时相点联合组的创面愈合率均明显高于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组,提示^{HO1}BMSCs-CE联合石墨烯FIR治疗的促愈疗效较单纯CE或FIR治疗更为突出。

创面再上皮化是参与创面愈合、收缩的重要环节。再上皮化过程与表皮角质形成细胞迁移覆盖、附属器结构的修复等直接相关。慢性创面的局部微环境极不利于残留组织的存活。因此,探明再上皮化及其相关机制尤为重要。本研究首先通过HE染色观察创面再上皮化的病理变化,结果显示,在治疗后第14天联合组的上皮层连续、近乎完整,厚度与对照组无差异,真皮中附属器等增多,而^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组的上皮层薄、结构不完整,附属器减少,提示联合治疗加速了创面再上皮化过程。

有研究发现,溃疡难愈合的本质是局部微环境被破坏,如氧化应激、炎症反应、循环灌注不良等,最终导致创面愈合过程的细胞及活性成分缺乏[17-18]。因此,调节创面局部微循环或增强灌流对创面修复极为重要。研究表明,HO1蛋白及FIR效应均具有抗氧化、抗炎作用[19-20]。糖尿病溃疡病理条件下产生过多的ROS会导致过度氧化应激,且促炎因子TNF-α及IL-6表达明显增多[21-22]。本研究中联合组在治疗后相应时相点创面组织中的ROS、TNF-α、IL-6水平均显著低于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组,提示联合治疗能更明显地减少ROS的产生及促炎因子的释放,调节氧化还原平衡状态,减轻创面炎症反应。这一有益调节可能与HO1的过表达有关。EGF、TGF-β是与创面愈合相关的重要因子。有研究发现,HO1基因修饰后可增强BMSCs的旁分泌作用,且可通过上调miR-200b减少氧化应激,降低炎症因子TNF-α、IL-6水平[23-25]。此外,FIR在调节氧化应激及炎症过程中也发挥了一定作用。既往研究表明,FIR具有减轻氧化应激及炎症反应的作用[8-10]。因此,联合治疗具有更好的调节创面微环境的效益。

创面微环境紊乱造成的细胞凋亡增加是阻碍创面愈合的重要原因[18,26]。Ca^{2+}不仅是创面止血过程中的关键凝血因子,也是创面愈合过程中细胞功能调节的重要信号分子,调节角质形成细胞增殖、分化和成熟[27-28]。在上皮化即角质形成细胞增殖与迁移过程中,适当提高创面Ca^{2+}浓度可以加快创面愈合[29]。本研究结果显示,联合组创面组织中Ca^{2+}浓度明显高于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组。提示联合治疗可能通过提高创面Ca^{2+}浓度调节功能细胞活性。Caspase-3是参与调节细胞存活的关键蛋白。本研究中,联合组创面组织中的凋亡相关蛋白Caspase-3表达水平明显低于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组。提示联合治疗可抑制Caspase-3蛋白介导的相关信号通路,减轻创面功能细胞死亡,与Sun等[23]的研究结果一致,其通过体外实验证实过表达HO1的BMSCs的无细胞治疗可减轻炎症因子TNF-α诱导的细胞炎性损伤、凋亡,且这一作用可能是通过下调Caspase-3凋亡通路实现。肉芽组织形成是创面愈合增殖阶段的重要事件,胶原纤维和血管是肉芽组织的重要组成部分。本研究结果显示,联合组的局部真皮组织中胶原纤维致密有序、形态完整,与对照组接近,而^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组胶原纤维淡染,排序较紊乱,提示联合治疗更有助于创面胶原纤维生成;且联合组中VEGF的表达高于^{HO1}BMSCs-CE组和FIR组,提示联合治疗更有利于诱导新生血管的生成,改善创面微循环。据此,本研究认为联合治疗可能通过抑制Caspase-3介导的相关通路减少功能细胞的凋亡,促进创面胶原生成、血管新生等,益于创面愈合。

综上所述,本研究初步证实工程化的^{HO1}BMSCs-CE联合石墨烯FIR治疗糖尿病溃疡的疗效较BMSCs-CE或FIR治疗更为突出,更接近于正常愈合过程。其机制可能是通过改善创面微环境,并通过Caspase-3、Ca^{2+}介导的相关通路减少创面有效功能细胞的凋亡,促进创面再上皮化、胶原纤维生成、血管生成等。本实验为探寻临床糖尿病溃疡等慢性创面的有效治疗方案提供了基础研究证据,但具体临床有效性及实用性有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 蔡 原,邓呈亮. 脂肪干细胞无细胞提取液的治疗用途:皮肤老化、创面愈合、瘢痕恢复乃至神经再生[J]. 中国组织工程研究,2021,25(13):2097-2102.

[2] He Y, Xia J, Chen H, et al. Human adipose liquid extract induces angiogenesis and adipogenesis: a novel cell-free therapeutic agent[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 252. doi: 10.1186/s13287-019-1356-0.

[3] Feng W, Jin Q, Ming-Yu Y, et al. MiR-6924-5p-rich exosomes derived from genetically modified Scleraxis-overexpressing PDGFRalpha(+) BMMSCs as novel nanotherapeutics for treating osteolysis during tendon-bone healing and improving healing strength[J]. Biomaterials, 2021,279:121242. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121242.

[4] Jung B, Lee H, Kim S, et al. Effect of Rho-associated kinase inhibitor

and mesenchymal stem cell-derived conditioned medium on corneal endothelial cell senescence and proliferation[J]. Cells, 2021, 10(6): 1463. doi:10.3390/cells10061463.

[5] L PK, Kandoi S, Misra R, et al. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2019, 46: 1-9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.04.002.

[6] Maamoun H, Zachariah M, Mcvey JH, et al. Heme oxygenase (HO)-1 induction prevents Endoplasmic Reticulum stress-mediated endothelial cell death and impaired angiogenic capacity[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 127:46-59. doi:10.1016/j.bcp.2016.12.009.

[7] Wang YH, Cheng FY, Chao YC, et al. Effects of far-infrared therapy on foot circulation among hemodialysis patients with diabetes mellitus[J]. Biol Res Nurs, 2020, 22(3): 403-411. doi: 10.1177/1099800420923730.

[8] 许祥生. 石墨烯智能理疗护膝治疗膝关节骨性关节炎的疗效观察[J]. 中医外治杂志,2020,29(1):60-62.

[9] Lin YH, Li TS. The application of far-infrared in the treatment of wound healing: a short evidence-based analysis [J]. J Evid Based Complementary Altern Med, 2017, 22(1): 186-188. doi: 10.1177/2156587215623436.

[10] Ryzhii V, Ryzhii M, Mitin V, et al. Far-infrared photodetectors based on graphene/black-AsP heterostructures [J]. Opt Express, 2020, 28(2):2480-2498. doi:10.1364/OE.376299.

[11] Lee DE, Ayoub N, Agrawal DK. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7: 37. doi: 10.1186/s13287-016-0303-6.

[12] 苏龙辉,范少勇,双 峰. 慢性创面的治疗进展[J]. 实用中西医结合临床,2020,20(14):156-159.

[13] Watanabe Y, Tsuchiya A, Terai S. The development of mesenchymal stem cell therapy in the present, and the perspective of cell-free therapy in the future[J]. Clin Mol Hepatol, 2021, 27(1):70-80. doi: 10.3350/cmh.2020.0194.

[14] Cai Y, Li J, Jia C, et al. Therapeutic applications of adipose cell-free derivatives: a review[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1):312. doi: 10.1186/s13287-020-01831-3.

[15] Chen QY, Wang GG, Li W, et al. Heme oxygenase-1 promotes delayed wound healing in diabetic rats [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016:9726503. doi:10.1155/2016/9726503.

[16] Grajek H, Jonik J, Witkiewicz Z, et al. Applications of graphene and its derivatives in chemical analysis[J]. Crit Rev Anal Chem, 2020, 50(5):445-471. doi:10.1080/10408347.2019.1653165.

[17] Zarei F, Negahdari B, Eatemadi A. Diabetic ulcer regeneration: stem cells, biomaterials, growth factors[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018, 46(1):26-32. doi:10.1080/21691401.2017.1304407.

[18] Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes[J]. Open Biol, 2020, 10(9):200223. doi: 10.1098/rsob.200223.

[19] Pastore D, Pacifici F, Ciao G, et al. Far infrared technology (FIT) therapy patches, protects from inflammation, oxidative stress and promotes cellular vitality[J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(34):4323-4329. doi:10.2174/1381612826666200427112023.

[20] Ryter SW. Heme Oxgenase-1, a cardinal modulator of regulated cell death and inflammation[J]. Cells, 2021, 10(3):515. doi: 10.3390/cells10030515.

[21] Korkmaz P, Kocak H, Onbasi K, et al. The role of serum procalcitonin, interleukin-6, and fibrinogen levels in differential diagnosis of diabetic foot ulcer infection [J]. J Diabetes Res, 2018, 2018: 7104352. doi:10.1155/2018/7104352.

[22] Deng L, Du C, Song P, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic wound healing[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:8852759. doi:10.1155/2021/8852759.

[23] Sun D, Cao H, Yang L, et al. MiR-200b in heme oxygenase-1-modified bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes alleviates inflammatory injury of intestinal epithelial cells by targeting high mobility group box 3[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(6): 480. doi: 10.1038/s41419-020-2685-8.

[24] Rege AS, Sudan DL. Autologous gastrointestinal reconstruction: review of the optimal nontransplant surgical options for adults and children with short bowel syndrome[J]. Nutr Clin Pract, 2013, 28(1): 65-74. doi:10.1177/0884533612460405.

[25] Murray AR, Chen Q, Takahashi Y, et al. MicroRNA-200b downregulates oxidation resistance 1 (Oxr1) expression in the retina of type 1 diabetes model[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(3): 1689-1697. doi:10.1167/iovs.12-10921.

[26] Bacci S. Cellular mechanisms and therapies in wound healing: looking toward the future [J]. Biomedicines, 2021, 9(11): 1611. doi: 10.3390/biomedicines9111611.

[27] Subramaniam T, Fauzi MB, Lokanathan Y, et al. The role of calcium in wound healing [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(12): 6486. doi: 10.3390/ijms22126486.

[28] Li S, Wang X, Chen J, et al. Calcium ion cross-linked sodium alginate hydrogels containing deferoxamine and copper nanoparticles for diabetic wound healing[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 202:657-670. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.080.

[29] Navarro-Requena C, Perez-Amodio S, Castano O, et al. Wound healing-promoting effects stimulated by extracellular calcium and calcium-releasing nanoparticles on dermal fibroblasts[J]. Nanotechnology, 2018, 29(39):395102. doi:10.1088/1361-6528/aad01f.

(编辑:贺绍梅)