DOI:10.16016/j.2097-0927.202401069

Del-1 纳米颗粒/丝素水凝胶通过促进炎症消退加速慢性皮肤伤口愈合修复

阚雪薇,姚萍萍,陈嘉琪,唐 隽 230001 合肥,中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)皮肤科

[摘要] **目的** 探讨负载发育内皮基因座-1(developmental endothelial locus-1,Del-1)纳米颗粒的丝素水凝胶对小鼠慢性皮肤伤口愈合的影响。**方法** 在6~8周BALB/c小鼠背部皮肤用磁铁挤压12 h放松12 h,循环4 d,形成慢性压疮;小鼠分为3组,每组8只,分别给予皮肤创面PBS、丝素水凝胶或Del-1纳米颗粒/丝素水凝胶治疗,拍照并计算创面愈合率,连续治疗9 d,HE、Masson染色检测皮肤组织愈合;通过CD14和TNF-α的免疫荧光检测创面巨噬细胞和炎症因子表达;过氧叔丁醇(tert-butyl hydroperoxide,TBHP)体外刺激小鼠巨噬细胞系RAW 264.7和小鼠血管内皮细胞系C166;在C166细胞中过表达Del-1,结晶紫染色检测巨噬细胞迁移;RT-qPCR检测炎症因子IL-6表达。**结果** 小鼠实验证实Del-1纳米颗粒/丝素水凝胶组的创面愈合快于丝素水凝胶组和PBS组($P<0.01$);Del-1纳米颗粒/丝素水凝胶组创面的TNF-α及CD14的表达低于丝素水凝胶组和PBS组($P<0.01$),但胶原沉积和组织修复高于PBS和丝素水凝胶组($P<0.01$)。体外实验证实TBHP激活巨噬细胞向内皮细胞迁移,但Del-1过表达组巨噬细胞迁移率显著下降($P<0.01$);RT-qPCR显示Del-1抑制了IL-6表达($P<0.01$)。**结论** Del-1纳米颗粒/丝素水凝胶能够加速小鼠压疮愈合,其机制可能是通过促进炎症消退和组织修复。

[关键词] Del-1;丝素蛋白;慢性伤口愈合;巨噬细胞;炎症消退

[中图法分类号] R364.5;R640.5;R977.6 [文献标志码] A

Del-1 nanoparticles/silk fibroin hydrogel accelerates the healing of chronic skin wounds by promoting inflammation regression

KAN Xuewei, YAO Pingping, CHEN Jiaqi, TANG Jun Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China(Anhui Provincial Hospital), Hefei, Anhui Province, 230001, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of silk fibroin hydrogel loaded with developmental endothelial locus-1 (Del-1) nanoparticles on the healing of chronic skin wounds in mice. **Methods** The back skin of BALB/c mice (6-8 weeks old) was pressed with a magnet for 12 h and then relaxed for 12 h, for 4 consecutive days to establish a chronic pressure ulcer wound. After infliction, the mice were randomly divided into 3 groups ($n=8$), and the skin wounds were treated with PBS, silk fibroin hydrogel or Del-1 nanoparticles/silk fibroin hydrogel. The wound healing was recorded with camera to calculate the wound healing rate. In 9 d after treatment, HE and Masson staining were used to observe the wound healing, and immunofluorescence staining for CD14 and TNF-α was used to compare the appearance frequency of skin macrophages and the expression of inflammatory factors. After Tert-butyl peroxide (TBHP) was used to stimulate mouse macrophage RAW 264.7 cells and mouse vascular endothelial C166 cells, C166 cells were transfected with lentival vector to overexpress Del-1. Crystal violet staining was used to observe the migration of macrophages. RT-qPCR was used to detect the expression of inflammatory factor IL-6. **Results** The wound healing was significantly faster in the Del-1 nanoparticles/silk fibroin hydrogel group than the silk fibroin hydrogel group and the PBS group ($P<0.01$). The expression levels of TNF-α and CD14 in the wound

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82273516)

[通信作者] 唐 隽,E-mail:tangjun0212@ustc.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

surface were lower ($P<0.01$), but collagen deposition and tissue repair were better in the Del-1 nanoparticles/silk fibroin hydrogel group than the silk fibroin hydrogel group and the PBS group ($P<0.01$). *In vitro* experiments, macrophages migrated to endothelial cells stimulated by TBHP, but the migration rate of macrophages was significantly lower in the Del-1 overexpression group ($P<0.01$). RT-qPCR confirmed that Del-1 inhibited the transcription of IL-6 ($P<0.01$). **Conclusion** Del-1 nanoparticles/silk fibroin hydrogel can significantly accelerate the healing of skin wounds, and its mechanism may be through promoting the regression of inflammation and tissue repair.

[**Key words**] Del-1; silk fibroin; chronic wound healing; macrophage; inflammatory regression

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82273516). Corresponding author: TANG Jun, E-mail: tangjun0212@ustc.edu.cn

慢性伤口指无法正常修复而停滞在炎症期的伤口,临床上常见于压疮、糖尿病溃疡、静脉性溃疡、动脉性溃疡4种类型[1],久治不愈的慢性伤口需要面临截肢甚至死亡。随着社会老龄化程度加速,糖尿病、压疮等老年人易患疾病的增多,导致慢性伤口正在成为老龄化社会日渐严重的社会经济问题[2-3]。

丝素蛋白(silk fibroin,SF)是从蚕丝中提取的富含18种氨基酸的天然蛋白,运用在皮肤中具有生物安全性和美白保湿抗紫外线等功效,由丝素蛋白制成的丝素水凝胶和丝素蛋白纳米粒子也常在医学领域中应用。丝素水凝胶因良好的生物相容性、稳定性、透气性和载药的缓释性能,常作为皮肤伤口敷料的优选[4-6]。BHAR等[7]报道SF水凝胶通过促进IL-10分泌发挥免疫调节功能。LIU等[8]制备的银纳米颗粒/芦荟SF水凝胶通过抗菌和促进细胞增殖、迁移加速伤口愈合。负载姜黄素的SF水凝胶通过抑制细菌粘附改善了伤口愈合环境[9-10]。丝素蛋白纳米颗粒可以帮助药物或蛋白更好地进入细胞发挥生物活性,成为药物递送系统的优选[11]。MONTALBÁN等[12]将姜黄素负载在丝素蛋白纳米颗粒中,使其更好地促进姜黄素进入细胞。

发育内皮基因座-1(Del-1)是一种分泌性多结构域蛋白,可以结合整合素来发挥调节炎症维持稳态的重要作用。ESKAN等[13]报道了Del-1缺陷小鼠会自发产生严重的牙周炎,在肺部炎症和多发性硬化模型中Del-1缺陷鼠也显示出比野生型小鼠更无法消退的炎症反应导致组织破坏增加[14-15]。补充Del-1已被证实可以预防牙周炎的发生,改善肺部纤维化[15]和过敏性哮喘[16],这表明了Del-1在抑制慢性炎症上强大的治疗潜力。皮肤压疮因为压疮部位持续的炎症而延迟愈合,但关于Del-1对皮肤压疮的影响尚未见报道。目前对于Del-1在其他疾病的应用都是通过全身性给药,但这种方法不仅降低了药物使用率,同时有创不便捷,对于皮肤伤口并不是优选。本研究构建一种皮肤慢性伤口敷料,通过包裹Del-1丝素纳米颗粒将其负载在SF水凝胶(NPs@Del-1-SF hydrogel)中,纳米粒子增强Del-1蛋白的有效递送和活性,丝素水凝胶可以保护创面、提供保湿、作为缓释载体发挥对创面的持续治疗作用,这可以为Del-1治疗皮肤压疮提供实验依据,有望成为治疗慢性皮肤伤口的新方法。

1 材料与方法

1.1 小鼠压疮模型与NPs@Del-1-SF hydrogel干预

BALB/c小鼠(6~8周,雄性,体质量18~25 g)经由陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会批准(AMUWEC20230373),由陆军军医大学实验动物中心提供。用3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉小鼠后脱去背部毛,使用直径8 mm、高1.5 mm的圆柱形磁铁对背部皮肤施加压力,每天持续12 h,放松12 h,持续4 d直到溃疡形成。用刀片去除压疮坏死组织,将小鼠分为3组,丝素水凝胶组(SF水凝胶组,$n=8$)、负载Del-1纳米颗粒的丝素水凝胶组(NPs@Del-1-SF水凝胶组,$n=8$)以及PBS组($n=8$)进行治疗持续9 d。为了评估水凝胶缓释载体对压疮溃疡的愈合效果,在第0、3、5、7、9天对溃疡表面拍照,在第9天麻醉处死小鼠,取各治疗组的压疮皮肤进行HE、Masson染色、免疫组织化学染色来观察创面内炎症因子与炎性细胞的表达。使用Image J软件统计Masson染色中的胶原含量,计算伤口愈合率=100%-(当前伤口面积/原始伤口面积×100%)。

1.2 免疫荧光染色

将小鼠治疗第9天的皮肤组织切下,4%多聚甲醛浸泡组织30 h,经过石蜡包埋,切片,脱蜡水合,胰蛋白酶抗原修复,内源性过氧化物酶阻断,封闭后,与抗CD14抗体(Proteintech,武汉)、抗TNF-α抗体(Bioworld,美国)在4 ℃孵育14 h,PBS洗涤后与Alexa Fluor 488、594荧光二抗(Proteintech,武汉)37 ℃孵育切片1.5 h,洗涤后DAPI染色10 min,洗涤后荧光显微镜拍照(Leica,德国)。

1.3 巨噬细胞迁移实验

分别取 1×10^5 血管内皮细胞(C166,北纳创联生物技术公司,北京)悬液和过表达 Del-1(HBLV-m-Del-1-3xflag-ZsGreen-Puro,汉恒生物公司,上海)的 Lenti-C166 细胞悬液铺板在 24 孔板里,待细胞汇合度达到 60%时,加入过氧化叔丁醇(TBHP)40 μmol/L 刺激细胞 24 h 后,将 Transwell 小室放入 C166 细胞上,取 RAW 264.7 细胞(1×10^5/孔)在 Transwell 上室培养 24~48 h,取出小室,4%多聚甲醛处理细胞 10 min,加入结晶紫染料(Beyotime,上海)染色 14 min。PBS 清洗后用棉签轻轻擦拭小室上壁的细胞,在显微镜下拍照观察。

1.4 NPs@Del-1 被内皮细胞吞噬实验

丝素蛋白溶液的制备同前期研究[17],将 50 μL 0.8 mg/mL Del-1 蛋白(novoprotein,苏州)以 1∶10 的质量比加入到 100 μL 丝素蛋白溶液(4 mg/mL)中充分混匀,将混合溶液和 200 μL 纯丝素蛋白溶液分别逐滴加到正在涡旋的丙酮溶液中(5 mL),涡旋 30 s,10 000 r/min 离心 4 min,去除丙酮,重复用去离子水洗涤纳米粒子 2 遍,6 000 r/min 离心 10 min,取乳状上清液以 12 000 r/min 离心 10 min,获得 NPs@Del-1 和 NPs,将 2 种纳米粒子与罗丹明 B 异硫氰酸酯(RBITC,高友生物技术公司,广东)避光染色 30 min,再用 DMEM 培养基润洗 3 遍后,用培养液重悬后各取 100 μL 加入已贴壁的 C166 细胞中培养 20 h 后,洗涤固定封闭细胞后与抗 Del-1 抗体(Abcam,MA)4 ℃孵育 14 h,再与 Alexa Fluor 488 荧光二抗(Proteintech,武汉)30 ℃处理 1.5 h,洗涤细胞后与 DAPI 染色 10 min,在荧光显微镜下拍照(Leica,德国)。

1.5 丝素蛋白水凝胶及负载 NPs@Del-1 丝素水凝胶的制备

将 0.32 g 卡波姆溶解在 3 mL 去离子水中充分溶解 30 min,将 850 μL 的 1 mol/L NaOH 溶液和 850 μL 20%(w/v%)聚乙烯醇溶液加入到卡波姆溶液中并充分搅拌,制作 2 份上述溶液。随后在 2 份上述溶液中分别加入 2 mL 20%(w/v%)(200 mg/mL)丝素蛋白溶液和 NPs@Del-1 与 2 mL 20%(w/v%)(200 mg/mL)丝素蛋白溶液混合物充分搅拌,在 30 ℃下放置 12~24 h 后丝素水凝胶和 NPs@Del-1 丝素水凝胶成型。

1.6 NPs@Del-1 在丝素蛋白水凝胶中的释放速率测定

将 RBITC 避光染色 30 min 的 NPs@Del-1 等分为 2 份,一份用于制作标准曲线,另一份装载进 SF 水凝胶中。待胶成形后将其浸泡在 15 mL PBS 溶液 37 ℃,每隔 2 h 各取出 100 μL PBS 液体到 96 孔板中,并补充 100 μL 新鲜 PBS 溶液继续浸泡胶体。在 540 nm 下测定胶浸液的光密度值,根据标准曲线算出释放的纳米粒子的速率。

1.7 实时荧光定量 RT-qPCR 法检测 Del-1 和 IL-6 的表达

每 1×10^6 细胞加 1 mL Trizol 试剂提取 RNA,测定浓度后使用逆转录试剂盒(ABclonal,武汉)逆转录为 cDNA。细胞 mRNA 的表达水平根据 Ct 值计算,方法使用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$。具体引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因	序列(5′→3′)
Del-1	正义:AGCATACCGAGGGGATACATT
	反义:CAAGGCTCAACTTCGCATTCA
IL-6	正义:CCAAGAGGTGAGTGCTTCCC
	反义:CTGTTGTTCAGACTCTCTCCCT
β-actin	正义:CGTGCGTGACATCAAAGAGAAG
	反义:CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAGA

1.8 统计学分析

每组实验重复 3 次以上,采用 Origin 2020 软件对数据进行统计处理,数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析,$P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

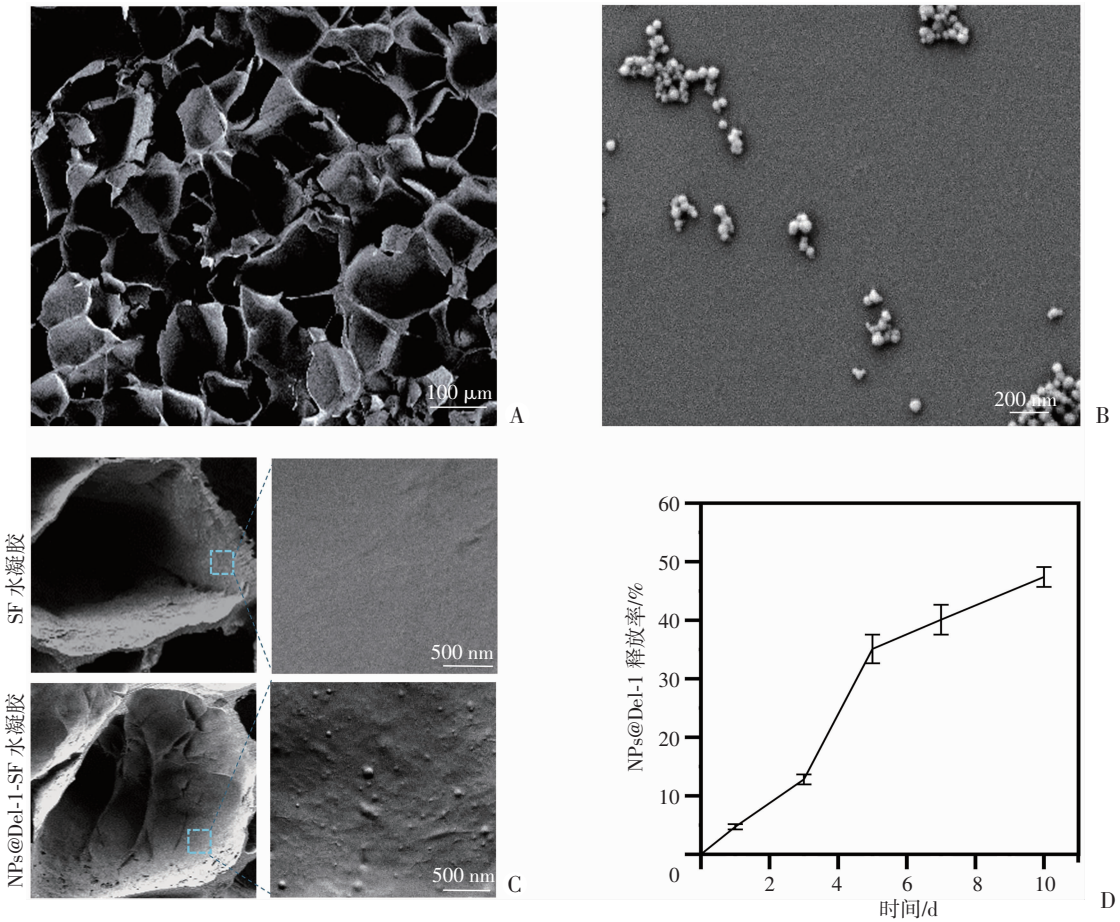
2 结果

2.1 丝素水凝胶的扫描电镜以及 NPs@Del-1 的释放速率

扫描电镜结果显示丝素水凝胶呈疏松多孔状(图 1A)。纳米颗粒呈圆形,直径约为 200 nm(图 1B)。将 NPs@Del-1 负载于丝素蛋白水凝胶中,扫描电镜结果显示纳米颗粒可均匀分布在胶体中(图 1C)。通过将 RBITC 染色后的 NPs@Del-1 负载在 SF 水凝胶并浸泡在 PBS 溶液中,第 10 天 NPs@Del-1 释放速率达到 47%,证明 SF 水凝胶缓释功能优越(图 1D)。

2.2 NPs@Del-1 被内皮细胞吞噬

鉴于 SF 纳米颗粒可促进 Del-1 进入细胞,将 NPs@Del-1 和空载 NPs 用 RBITC 染色,并与小鼠血管内皮细胞系(C166)共培养 20 h,免疫荧光染色结果显示 NPs@Del-1 可顺利进入 C166 细胞,在 NPs@Del-1 孵育的 C166 细胞内 Del-1 相对荧光定量显著高于空载 NPs 孵育的细胞(2.28±0.13 *vs* 1.00±0.19, $P<0.01$,图 2)。结果表明 NPs@Del-1 被内皮细胞吞噬后可释放其包裹的 Del-1,以显著增强胞内 Del-1 的水平。



A:丝素水凝胶的扫描电镜观察;B:NPs@ Del-1 的扫描电镜观察;C:NPs@ Del-1 负载在丝素水凝胶里的扫描电镜观察;D:NPs@ Del-1 在丝素水凝胶中的释放速率

图 1 丝素水凝胶和 NPs@Del-1 的表征

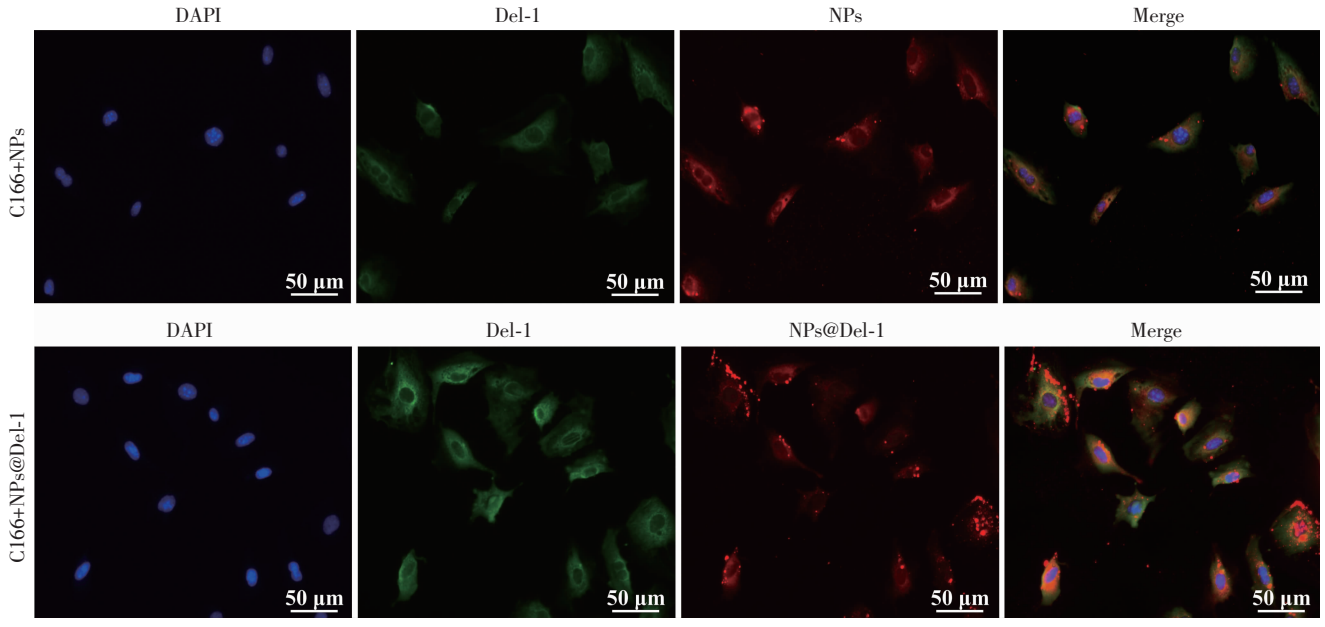


图 2 NPs@Del-1 被内皮细胞吞噬

2.3 NPs@Del-1-SF 水凝胶加速小鼠压疮伤口愈合

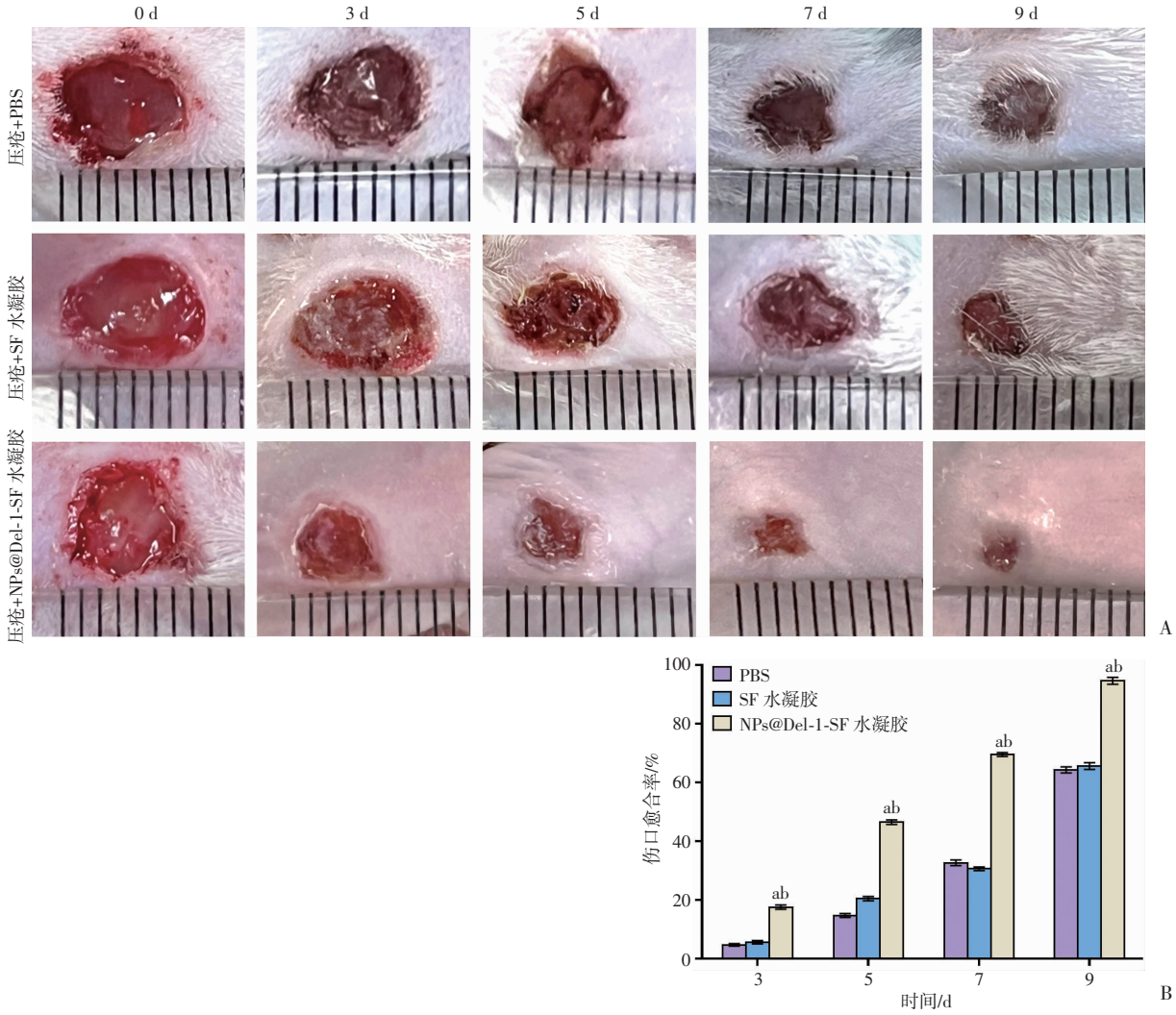
为探究 NPs@Del-1-SF 水凝胶对慢性伤口疗效,制作小鼠压疮模型,分别使用 PBS、SF 水凝胶和 NPs@Del-1-SF 水凝胶对清创后的创面进行治疗,每 2 天更换 1 次水凝胶敷料。对创面拍照并进行统计分析发现,NPs@Del-1-SF 水凝胶治疗组创面愈合快于 PBS 和 SF 水凝胶组($P<0.01$);第 9 天创面愈合率为 94.68%,而 PBS 和 SF 水凝胶组只有 64.51%和 65.96%(图 3),表明 NPs@Del-1-SF 水凝胶对小鼠皮肤压疮的治愈效果最好,加速了伤口愈合。

2.4 NPs@Del-1-SF 水凝胶增加创面胶原沉积

对治疗第 9 天的小鼠创面皮肤进行 HE 和 Masson 染色,分析创面愈合过程皮肤的组织结构变化,结果显示 NPs@Del-1 丝素水凝胶治疗组伤口愈合最好,出现皮肤附属器且再上皮化程度高,PBS 和 SF 水凝胶组伤口仍未闭合有厚重红痂(图 4A);Masson 染色结果显示 NPs@Del-1 丝素水凝胶治疗组的胶原沉积较 SF 水凝胶组和 PBS 组更致密完整[(76.16±1.23)% *vs* (54.79±0.60)% *vs* (53.39±1.10)%,$P<0.01$,图 4B],提示 NPs@Del-1-SF 水凝胶可以通过促进胶原沉积加速皮肤压疮伤口愈合。

2.5 NPs@Del-1-SF 水凝胶抑制创面巨噬细胞聚集和炎症因子表达

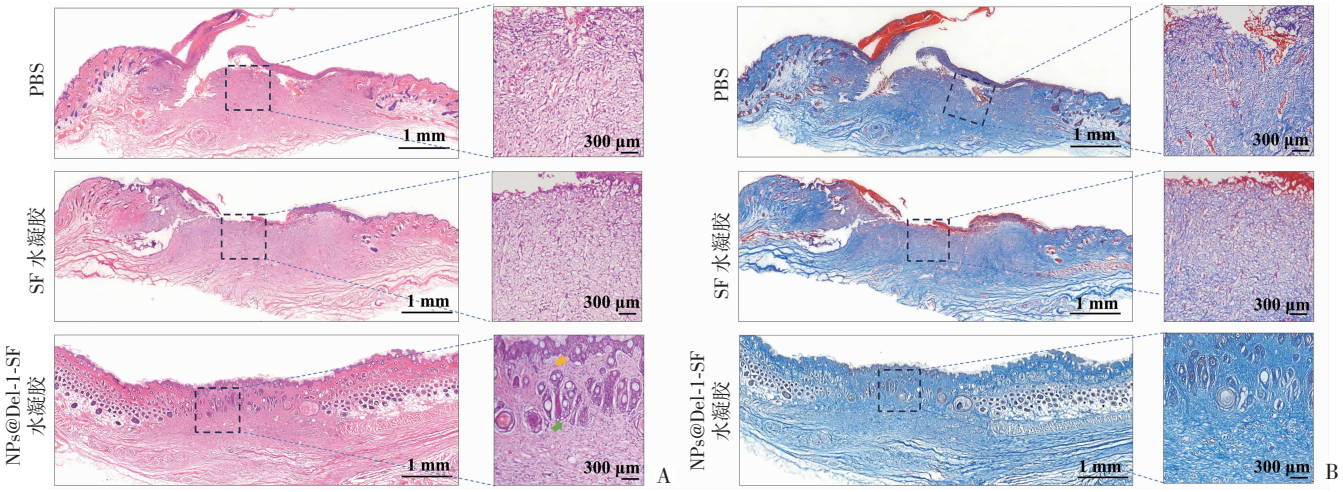
取治疗 9 d 的小鼠创面皮肤,免疫荧光染色检测创面组织巨噬细胞(CD14)和炎症因子 TNF-α 的表达。结果见图 5,PBS 组和 SF 水凝胶组创面巨噬细胞仍大量聚集($P<0.01$),促炎因子 TNF-α 高表达($P<0.01$),说明伤口还处于炎症期,而 NPs@Del-1-SF 水凝胶治疗组的巨噬细胞基本消退,TNF-α 表达显著降低,说明 NPs@Del-1-SF 水凝胶抑制炎症,促进炎症消退,使压疮伤口从炎症期进入重塑期(图 5)。结果表明 NPs@Del-1-SF 水凝胶能抑制炎症加速压疮伤口炎症消退。



a: $P<0.01$,与 PBS 组比较; b: $P<0.01$,与 SF 水凝胶组比较

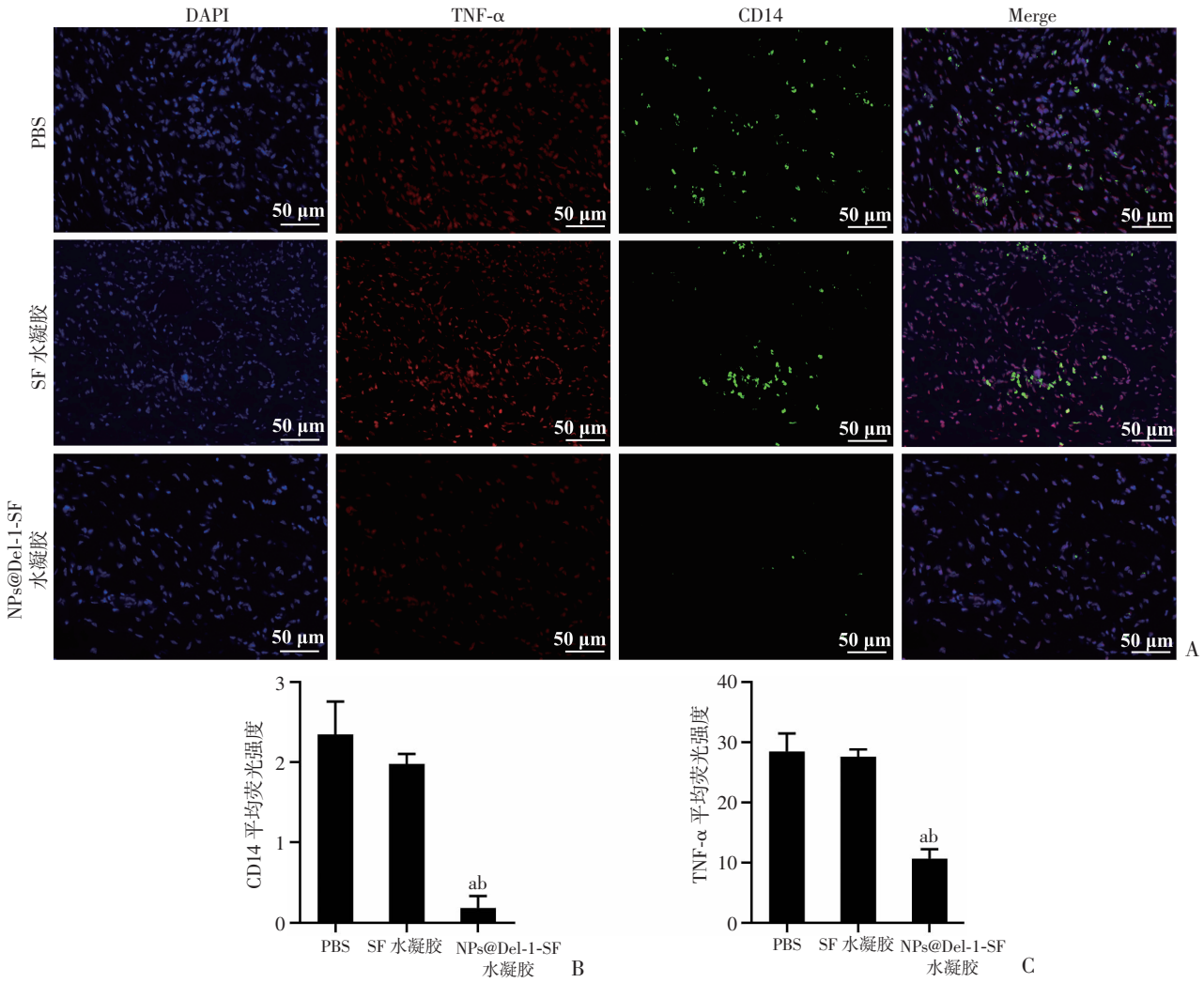
A:小鼠压疮伤口治疗第 0、3、5、7、9 天伤口大小示意图;B:各组小鼠伤口愈合率统计

图 3 NPs@Del-1-SF 水凝胶加速压疮小鼠的伤口愈合



A:创面组织的 HE 染色,绿色箭头代表新生的表皮,黄色箭头代表新生的皮肤附属器;B:创面组织的 Masson 染色

图 4 NPs@Del-1-SF 水凝胶增加创面胶原沉积加速愈合



a:$P<0.01$,与 PBS 组比较; b:$P<0.01$,与 SF 水凝胶组比较

A:创面组织 TNF-α 和 CD14 的免疫荧光染色;B:CD14 平均荧光强度;C: TNF-α 平均荧光强度

图 5 各组小鼠创面组织 TNF-α 和 CD14 的免疫荧光染色

2.6 Del-1 抑制巨噬细胞的迁移和炎症因子的释放

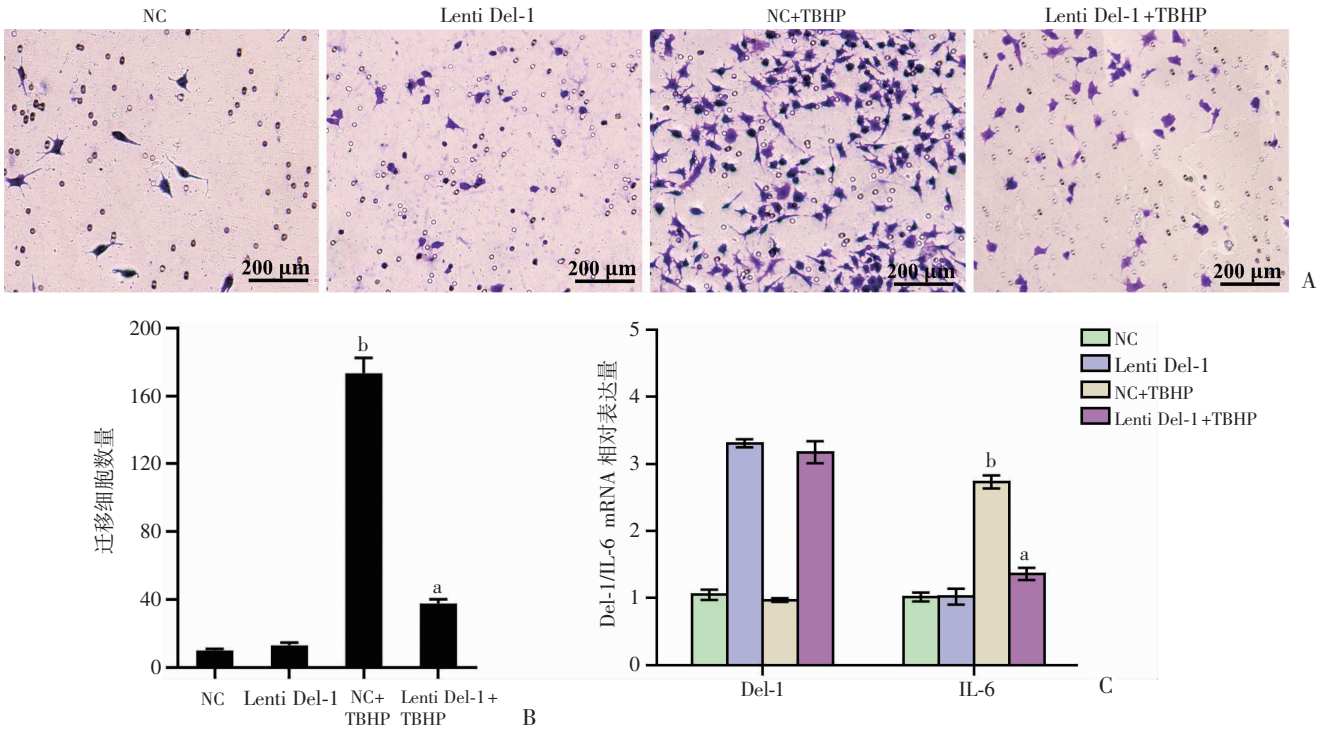
将 C166、C166-Lenti Del-1 与 RAW264.7 细胞 Transwell 共培养,加入 TBHP(40 μmol)刺激 24~48 h。与未加 TBHP 处理的 NC 组相比,TBHP 加速了巨噬细胞向内皮细胞的迁移($P<0.01$);而与 Lenti-Del-1+TBHP 组相比,Del-1 能显著降低 TBHP 刺激产生的巨噬细胞迁移($P<0.01$,图 6 A、B)。结果表明 Del-1 在 TBHP 产生的炎症环境下抑制了巨噬细胞的迁移。

在 C166 细胞和 C166-Lenti Del-1 细胞中加入 TBHP(40 μmol),处理 72 h,RT-qPCR 检测 Del-1 和 IL-6 的 mRNA 水平。结果显示 TBHP 处理组 IL-6 的 mRNA 水平上升,但 Lenti Del-1 组 IL-6 的 mRNA 水平较未受 NC+TBHP 组显著下降(2.70±0.13 *vs* 1.36±0.08,$P<0.01$,图 6 C)。结果表明 TBHP 作为强氧化剂刺激 C166 细胞产生了炎症,但是 Del-1 可以抑制内皮细胞的炎症。

3 讨论

巨噬细胞是调控伤口愈合的关键细胞[18],在正常伤口愈合的炎症期,单核细胞浸润到创面分化成巨噬细胞发挥抵抗细菌感染、吞噬凋亡的中性粒细胞等作用;随后伤口进入增殖期,巨噬细胞由 M1 型向 M2 型转化,促进血管生成因子 VEGF 生成和成纤维细胞活化,增加胶原沉积完成伤口修复[19-21]。然而,炎症性巨噬细胞也能通过释放活性氧(ROS)和基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-6)加重创面损伤,阻碍增殖阶段延迟愈合[22-23]。慢性皮肤伤口的免疫学特点是促炎表型巨噬细胞数量过多、炎症期无法消退[24]。虽然巨噬细胞在早期有助于创面愈合,但持续过度的巨噬细胞募集也会阻碍伤口愈合[25],因此,减少炎症期巨噬细胞过度募集可以促进慢性皮肤伤口愈合。

NPs@Del-1-SF 水凝胶在伤口处持续释放 NPs@Del-1,NPs@Del-1 被伤口处的内皮细胞吞噬后发挥促进血管生成[26],抑制促炎因子产生和抑制白细胞粘附的功能,也有研究报道 Del-1 在巨噬细胞内可以促进巨噬细胞对凋亡细胞的胞吞作用加快炎症消退,以及促进巨噬细胞向 M2 表型极化[27-28]。在体内实验中可以看到 NPs@Del-1-SF 水凝胶使小鼠压疮伤口在 9 d 内达到伤口愈合率 95%,明显高于其他组,同时压疮创面组织里的炎症因子 TNF-α 以及巨噬细胞数量相比其他组明显减少,说明 PBS 组和 SF 水凝胶组仍处于炎症期,而 NPs@Del-1-SF 水凝胶组从炎症期进入重塑期,胶原沉积更多更致密完整,再上皮化程度高,达到压疮皮肤基本愈合。



a:$P<0.01$,与 NC+TBHP 组比较;b:$P<0.01$,与 NC 组比较

A:Del-1 降低巨噬细胞的迁移;B:迁移的巨噬细胞数量统计图;C:Del-1 降低 IL-6 的表达

图 6 Del-1 抑制炎症刺激下巨噬细胞的迁移以及炎症因子的表达

综上所述,本研究探讨了新型皮肤压疮伤口敷料 NPs@Del-1 丝素蛋白水凝胶通过 Del-1、纳米技术和丝素水凝胶的搭配提高了 Del-1 治疗的便捷性与稳定性,有效促进了压疮伤口的炎症消退,增强了胶原沉积,加速了皮肤慢性伤口创面修复。本研究结果为慢性皮肤伤口的临床治疗提供新方法和实验依据。

参考文献:

[1] MERVIS J S, PHILLIPS T J. Pressure ulcers: Pathophysiology, epidemiology, risk factors, and presentation [J]. J Am Acad Dermatol, 2019, 81(4): 881-890. DOI: 10.1016/j.jaad.2018.12.069.

[2] OLSSON M, JÄRBRINK K, DIVAKAR U, *et al*. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review[J]. Wound Repair Regen, 2019, 27(1): 114-125. DOI: 10.1111/wrr.12683.

[3] BEYENE R T, DERRYBERRY S L JR, BARBUL A. The effect of comorbidities on wound healing[J]. Surg Clin North Am, 2020, 100(4): 695-705. DOI: 10.1016/j.suc.2020.05.002.

[4] ZHENG H Y, ZUO B Q. Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications[J]. J Mater Chem B, 2021, 9(5): 1238-1258. DOI: 10.1039/D0TB02099K.

[5] GHOLIPOURMALEKABADI M, SAPRU S, SAMADIKUCHAKSARAEI A, *et al*. Silk fibroin for skin injury repair: where do things stand? [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 153: 28-53. DOI: 10.1016/j.addr.2019.09.003.

[6] MAZUREK Ł, SZUDZIK M, RYBKA M, *et al*. Silk fibroin biomaterials and their beneficial role in skin wound healing [J]. Biomolecules, 2022, 12(12): 1852. DOI: 10.3390/biom12121852.

[7] BHAR B, CHAKRABORTY B, NANDI S K, *et al*. Silk-based phyto-hydrogel formulation expedites key events of wound healing in full-thickness skin defect model[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 203: 623-637. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.142.

[8] LIU Y K, FAN J C, LV M Q, *et al*. Photocrosslinking silver nanoparticles-aloe vera-silk fibroin composite hydrogel for treatment of full-thickness cutaneous wounds [J]. Regen Biomater, 2021, 8(6): rbab048. DOI: 10.1093/rb/rbab048.

[9] WANG R F, RUAN L M, JIANG G H, *et al*. Fabrication of curcumin-loaded silk fibroin and polyvinyl alcohol composite hydrogel films for skin wound healing[J]. ACS Appl Bio Mater, 2022. DOI: 10.1021/acsabm.2c00548.

[10] CHAALA M, SEBBA F Z, FUSTER M G, *et al*. Accelerated simple preparation of curcumin-loaded silk fibroin/hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications [J]. Polymers, 2023, 15(3): 504. DOI: 10.3390/polym15030504.

[11] RUIZ-ALCARAZ A J, NÚÑEZ-SÁNCHEZ M Á, ASENSIO RUIZ M A, *et al*. Optimizing the preparation of silk fibroin nanoparticles and their loading with polyphenols: towards a more efficient anti-inflammatory effect on macrophages[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(1): 263. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010263.

[12] MONTALBÁN M G, COBURN J M, LOZANO-PÉREZ A A, *et al*. Production of curcumin-loaded silk fibroin nanoparticles for cancer therapy[J]. Nanomaterials, 2018, 8(2): 126. DOI: 10.3390/nano8020126.

[13] ESKAN M A, JOTWANI R, ABE T, *et al*. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss[J]. Nat Immunol, 2012, 13(5): 465-473. DOI: 10.1038/ni.2260.

[14] CHOI E Y, LIM J H, NEUWIRTH A, *et al*. Developmental endothelial locus-1 is a homeostatic factor in the central nervous system limiting neuroinflammation and demyelination [J]. Mol Psychiatry, 2015, 20(7): 880-888. DOI: 10.1038/mp.2014.146.

[15] KANG Y Y, KIM D Y, LEE S H, *et al*. Deficiency of developmental endothelial locus-1 (Del-1) aggravates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 445(2): 369-374. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.009.

[16] YAN S, CHEN L, ZHAO Q, *et al*. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) antagonizes interleukin-17-mediated allergic asthma[J]. Immunol Cell Biol, 2018, 96(5): 526-535. DOI: 10.1111/imcb.12023.

[17] LUO L W, ZHANG H Y, ZHANG S Y, *et al*. Extracellular vesicle-derived silk fibroin nanoparticles loaded with MFGE8 accelerate skin ulcer healing by targeting the vascular endothelial cells [J]. J Nanobiotechnol, 2023, 21(1): 455. DOI: 10.1186/s12951-023-02185-7.

[18] LI M R, HOU Q, ZHONG L Z, *et al*. Macrophage related chronic inflammation in non-healing wounds [J]. Front Immunol, 2021, 12: 681710. DOI: 10.3389/fimmu.2021.681710.

[19] WILLENBORG S, SANIN D E, JAIS A, *et al*. Mitochondrial metabolism coordinates stage-specific repair

processes in macrophages during wound healing[J]. Cell Metab, 2021, 33(12): 2398-2414.e9. DOI: 10.1016/j.cmet.2021.10.004.

[20] XIONG Y, LIN Z, BU P Z, *et al*. A whole-course-repair system based on neurogenesis-angiogenesis crosstalk and macrophage reprogramming promotes diabetic wound healing[J]. Adv Mater, 2023, 35(19): e2212300. DOI: 10.1002/adma.202212300.

[21] HASSANSHAHI A, MORADZAD M, GHALAMKARI S, *et al*. Macrophage-mediated inflammation in skin wound healing[J]. Cells, 2022, 11(19): 2953. DOI: 10.3390/cells11192953.

[22] WLASCHEK M, SINGH K, SINDRILARU A, *et al*. Iron and iron-dependent reactive oxygen species in the regulation of macrophages and fibroblasts in non-healing chronic wounds[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 262-275. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.036.

[23] WU Y K, CHENG N C, CHENG C M. Biofilms in chronic wounds: pathogenesis and diagnosis[J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(5): 505-517. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.10.011.

[24] RAZIYEVA K, KIM Y, ZHARKINBEKOV Z, *et al*. Immunology of acute and chronic wound healing[J]. Biomolecules, 2021, 11(5): 700. DOI: 10.3390/biom11050700.

[25] DIPIETRO L A, WILGUS T A, KOH T J. Macrophages in healing wounds: paradoxes and paradigms[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 950. DOI: 10.3390/ijms22020950.

[26] NIU X P, LI X H, FENG Z P, *et al*. EDIL3 and VEGF synergistically affect angiogenesis in endothelial cells[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2023, 16: 1269-1277. DOI: 10.2147/CCID.S411253.

[27] SHINDE R, HEZAVEH K, HALABY M J, *et al*. Apoptotic cell-induced AhR activity is required for immunological tolerance and suppression of systemic lupus erythematosus in mice and humans[J]. Nat Immunol, 2018, 19(6): 571-582. DOI: 10.1038/s41590-018-0107-1.

[28] KOURTZELIS I, LI X F, MITROULIS I, *et al*. DEL-1 promotes macrophage efferocytosis and clearance of inflammation[J]. Nat Immunol, 2019, 20(1): 40-49. DOI: 10.1038/s41590-018-0249-1.

(收稿:2024-01-17;修回:2024-02-29)

(编辑 邓强庭)