

网络出版时间: 2024-07-03 17:32:44 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1449.013>

内皮祖细胞外泌体中 miRNA-222-3p 对糖尿病小鼠皮肤伤口愈合的影响

王永琪 季 华 唐 颖 巫婷婷 揭茹艳 陈明卫

摘要 目的 了解内皮祖细胞外泌体(EPCs-Exo)中的 miRNA-222-3p 对糖尿病小鼠皮肤伤口愈合的影响。方法 采用荧光染色法对 C57BL/6 小鼠骨髓来源内皮祖细胞(EPCs)进行鉴定。对从 EPCs 培养基中分离出的 EPCs-Exo 进行鉴定以及 miRNA 高通量测序。建立糖尿病小鼠皮肤损伤模型 随机分为 5 组: PBS 组、EPCs-Exo 组、空白组、agomiR-222-3p 组、antagomiR-222-3p 组。根据不同分组 连续处理 14 d, 观察创面愈合率, 免疫荧光方法了解治疗前后创缘组织中活性氧(ROS)、血管内皮生长因子(VEGF)、CD31 表达水平变化。结果 EPCs-Exo 促进糖尿病小鼠皮肤伤口愈合, 降低创缘组织中 ROS 表达水平, 增加 VEGF、CD31 表达水平 ($P < 0.05$)。高通量测序提示 miRNA-222-3p 在 EPCs-Exo 中高度表达。创缘组织局部皮下注射 miRNA-222-3p 可显著促进糖尿病小鼠皮肤伤口愈合, 降低创缘组织中 ROS 表达水平, 增加 VEGF、CD31 表达水平 ($P < 0.05$)。结论 miRNA-222-3p 促进糖尿病小鼠伤口愈合, 在 EPCs-Exo 促进创面愈合过程中发挥重要作用。

关键词 内皮祖细胞; 外泌体; 糖尿病足; miRNA-222-3p; 创面愈合

中图分类号 R 589.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1195-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.013

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是造成糖尿病患者截肢的主要原因之一^[1-2], 目前临床常用的 DFU 治疗手段难以达到满意效果。外泌体(exosome, Exo)是细胞内多泡体与细胞膜融合后, 释放到细胞外基质中的膜性囊泡。近年来, 应用于细胞来源的外泌体治疗难愈合皮肤创面的研究逐渐受到关注^[3-4]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞, 其功能主要为参与出生后缺血组织的血管发生和血管损伤后的修复。先前的研究^[5]显示 EPCs 产生的 Exo

(EPCs-Exo)可调节血管内皮细胞的功能, 并在血管内皮损伤的修复中发挥重要作用, 然而其作用机制尚不清楚。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种内源性非编码小 RNA, 长度约为 18~25 个核苷酸, 通过与下游靶 mRNA 的 3' UTR 区域特异性结合, 使 mRNA 翻译受到抑制或直接降解, 从而调控基因表达。外泌体中含有大量的 miRNA, 这些 miRNA 具有重要的调节功能, 包括参与血管生成和伤口愈合^[6]。课题组前期应用高通量测序发现 EPCs-Exo 中富含 miRNA-222-3p^[7]。临床研究发现创面组织中 miRNA-222-3p 的表达变化与 DFU 的发病密切相关^[8]。该研究旨在通过动物实验, 进一步探讨 EPCs-Exo 中 miRNA-222-3p 对糖尿病小鼠皮肤伤口愈合的影响, 以期为患者皮肤伤口治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 8 周龄健康 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 44 只, 体质量(33.5 ± 3.6) g, 购自中国科学院上海实验动物中心; 戊巴比妥钠购自德国 Merck 公司; 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自上海碧云天生物科技有限公司; 淋巴细胞分离液、活性氧(reactive oxygen species, ROS)染液、DAPI 购自北京索莱宝科技有限公司; 纤维连接蛋白购自美国 Coring 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、青霉素、链霉素、EGM-2MV、M199 培养基购自美国 Gibco 公司; CD133、CD34、血管内皮生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)、血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF)、CD31、VEGF 一抗及荧光染料标记的相应二抗购自美国 Bio-Rad 公司; CD81 和 CD63 抗体及相应二抗购自美国赛默飞世尔科技公司; 链脲佐菌素(streptozocin, STZ)购自美国 Sigma 公司; agomiR-222-3p、antagomiR-222-3p 购自广州锐博生物技术有限公司;

2024-02-29 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 2108085MH269)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院内分泌科, 合肥 230022

作者简介: 王永琪, 女, 硕士研究生;

陈明卫, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

chmw1@163.com

纳米颗粒跟踪分析仪 ZetaView 购自德国 Particle Metrix 公司; 荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的分离与鉴定 在无菌条件下从 4 只 C57BL/6 小鼠中取出胫骨和股骨, 按照课题组前期研究报道的方案^[9], 获得骨髓腔灌洗液, 运用一系列的分离方法, 得到单核细胞并进行传代培养。应用免疫荧光法对 EPCs 表面特异性标志物 CD133、CD34、VEGFR2 等蛋白表达情况进行检测, 鉴定 EPCs。本研究获安徽医科大学动物伦理委员会批准(批准文号: LLSC20192304)。

1.2.2 EPCs-Exo 的分离、鉴定与测序 在培养的 EPCs 融合率达 80% ~ 90% 时, 用 PBS 进行冲洗。随后将 EPCs 置于不含 FBS 的 EGM-2MV 培养基中培养 24 h 后收集 EPCs 培养基 2 000 r/min 离心 30 min 以消除凋亡细胞和细胞碎片。最后, 将上清液在 4 °C 10 000 r/min 条件下离心 1 h, 获得的沉淀物即为 EPCs-Exo。运用纳米颗粒跟踪分析(nanoparticles tracking analysis, NTA) 技术和 Western blot 方法鉴定提取的外泌体, 使用 BCA 法测定 EPCs-Exo 的浓度。分离到的外泌体在 -80 °C 下储存 1 个月供后续研究使用。此外, 将 4 份不同的 EPCs-Exo 标本委托上海云序生物科技有限公司完成外泌体中 miRNA 高通量测序。

1.2.3 糖尿病小鼠模型的建立 40 只雄性 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后, 根据先前的研究报道方法^[7], 一次性给予腹腔注射 STZ (0.1 mol/L, pH = 4.2) 60 mg/kg。注射 72 h 后, 采尾尖血检测小鼠空腹血糖 2 次空腹血糖 > 11.1 mmol/L 则认为糖尿病小鼠模型建立成功。共有 35 只小鼠造模成功。

1.2.4 糖尿病小鼠皮肤损伤模型的建立 35 只糖尿病小鼠继续饲养 2 周, 并在血糖稳定后进行进一步研究。用 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg) 行腹腔内注射麻醉, 剃除小鼠后腿上毛发, 75% 乙醇消毒皮肤。利用无菌手术剪制作一直径为 4 mm 的全层圆形皮肤伤口, 止血后即为糖尿病小鼠皮肤损伤模型。

1.2.5 糖尿病小鼠皮肤损伤模型的伤口治疗 将 35 只糖尿病皮肤损伤模型小鼠随机分为 PBS 组(伤口涂抹 PBS, 每天 2 次)、EPCs-Exo 组[伤口涂抹与 PBS 等体积的 EPCs-Exo(100 μg/ml), 每天 2 次]、空白组(伤口周围的 4 个部位接受共计 1 ml PBS 皮下注射, 每天 2 次)、agomiR-222-3p 组(伤口周围的 4 个部位接受 0.5 μmol/L agomiR-222-3p 共计 1 ml 皮下注射, 每天 2 次)、antagomiR-222-3p 组(伤口周

围的 4 个部位接受 0.5 μmol/L antagomiR-222-3p 共计 1 ml 皮下注射, 每天 2 次), 每组各 7 只。各组治疗持续 14 d, 应用 ImageJ 软件测量第 0、7 和 14 天的伤口面积。使用公式计算伤口愈合率: 伤口愈合率 (%) = $(A_0 - A_t) / A_0 \times 100\%$, 其中 A_0 为初始伤口面积, A_t 为测量时伤口面积。

1.2.6 免疫荧光分析 分别于伤口治疗前(0 d) 和治疗结束后(14 d) 取各组小鼠伤口创缘组织, 固定于 4% 多聚甲醛, 石蜡包埋, 切片。利用免疫荧光染色对各组小鼠伤口创缘组织切片中 ROS、CD31、VEGF 表达水平进行检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 27.0 软件进行统计分析。服从正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 若进行两组间比较, 再采用最小显著差值法(LSD 法)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPCs 及 EPCs-Exo 的分离与鉴定 通过诱导小鼠骨髓单核细胞分化分离 EPCs, 免疫荧光显示 EPCs 表面特异性蛋白 CD34、CD133、VEGFR2 表达呈阳性, vWF 呈阴性, 提示成功分离出 EPCs, 见图 1A。电子显微镜观察显示外泌体通常为杯状或球形形状, 见图 1B。NTA 显示 EPCs-Exo 直径平均值约为 100 nm, 见图 1C。Western blot 显示外泌体标记蛋白(CD81 和 CD63) 表达明显, 提示成功分离出 EPCs-Exo, 见图 1D。

2.2 EPCs-Exo 促进糖尿病小鼠皮肤伤口愈合 将分离的 EPCs-Exo(100 μg/ml) 或 PBS 直接涂抹于糖尿病小鼠的皮肤伤口。结果显示, 与 PBS 组比较, EPCs-Exo 组糖尿病小鼠伤口闭合速度加快, 至 14 d 时, EPCs-Exo 组创面愈合率明显高于 PBS 组 [(91.8 ± 7.3)% vs (45.7 ± 4.4)% $P < 0.05$]。此外, 使用免疫荧光分析来评估氧化应激标志物 ROS、血管生成相关因子 VEGF、CD31 在小鼠创缘组织中的表达水平。结果显示, 至 14 d 时, 与 PBS 组比较, EPCs-Exo 组创缘组织中 ROS 水平降低, VEGF、CD31 表达水平增加 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 EPCs-Exo 中 miRNA 的高通量测序 应用 R 语言包(version 4.2.3) 对 EPCs-Exo 中 miRNA 表达谱进行聚类分析, 其中横坐标代表样本编号, 纵坐标代表 miRNA 的名称, 见图 3A。此外, 对 EPCs-Exo 中 miRNA 的表达水平进行测序, 并列出了完全表达的前 10 个 miRNA, 结果显示 miRNA-222-3p 在

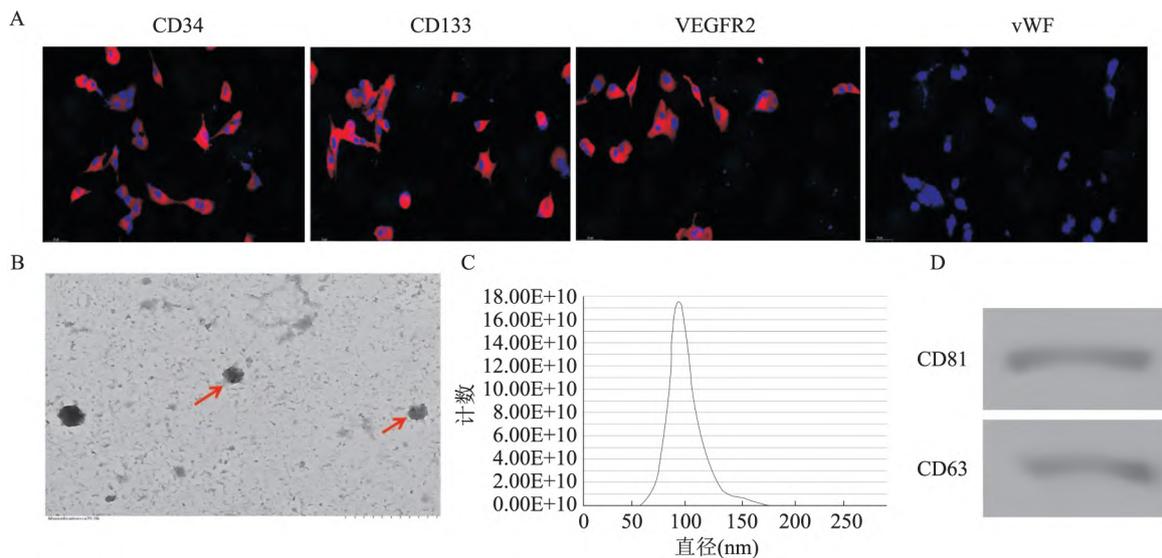


图1 EPCs 及 EPCs-Exo 的鉴定

A: 免疫荧光法检测 EPCs 表面特异性蛋白 CD34、CD133、VEGFR2、vWF 表达(×400); B: 电子显微镜下观察外泌体形态(×400) 红色箭头所指为外泌体; C: EPCs-Exo 直径; D: Western blot 检测外泌体标记蛋白 CD81 和 CD63

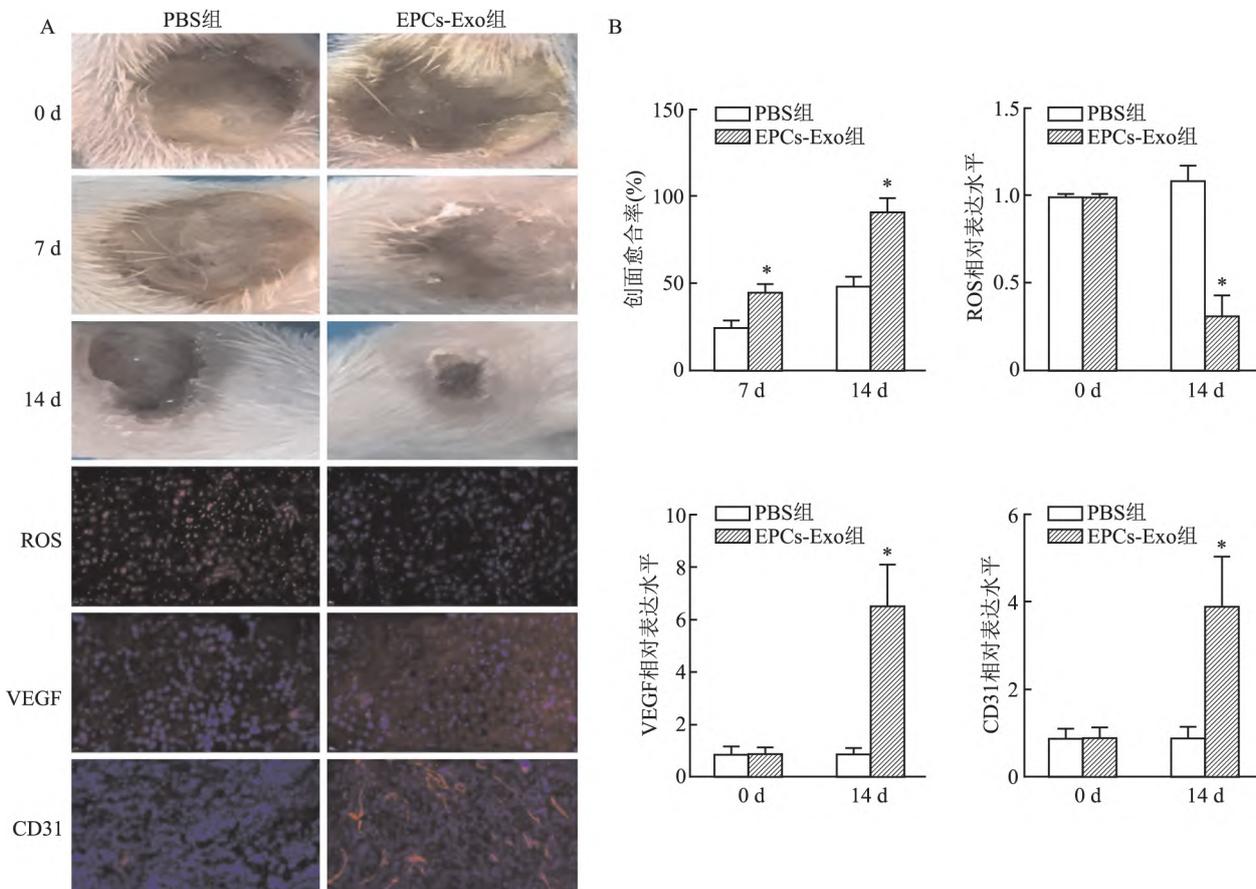


图2 EPCs-Exo 对糖尿病小鼠皮肤伤口愈合的影响

A: 两组小鼠创面愈合情况及免疫荧光法检测创缘组织中 ROS、VEGF、CD31 表达(×400); B: 两组小鼠创面愈合率及创缘组织中 ROS、VEGF、CD31 相对表达水平比较; 与 PBS 组比较: * $P < 0.05$

EPCs-Exo 中高度表达,见图 3B。

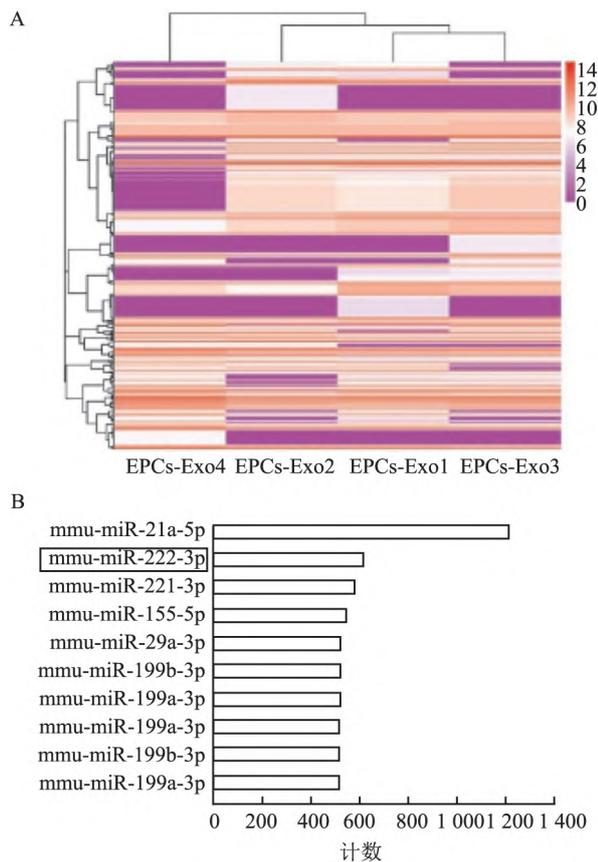


图3 EPCs-Exo 中 miRNA 的高通量测序

A: miRNA 表达谱的聚类分析,红色代表高表达,紫色代表低表达; B: 在 EPCs-Exo 中表达的前 10 种 miRNA,miRNA-221-3p 用红色方框表示

2.4 miRNA-222-3p 对糖尿病小鼠皮肤伤口愈合的影响 将 PBS、浓度为 0.5 μmol/L 的 agomiR-222-3p 或 antagomiR-222-3p 皮下注射于糖尿病小鼠的皮肤创缘组织中,发现 agomiR-222-3p 组糖尿病小鼠伤口的愈合率显著提高,伤口结痂形成更快,至 14 d 时,agomiR-222-3p 组创面愈合率明显高于空白组和 antagomiR-222-3p 组 [(94.2 ± 6.7) % vs (50.8 ± 4.9) % vs (53.5 ± 4.2) % , $F = 34.23$, $P < 0.05$]。免疫荧光分析结果显示,与空白组和 antagomiR-222-3p 组比较,agomiR-222-3p 组的糖尿病小鼠创缘组织中 ROS 水平降低,VEGF、CD31 表达水平增加 ($P < 0.05$)。提示 miRNA-222-3p 可促进小鼠伤口愈合,在 EPCs-Exo 调节创面愈合过程中发挥重要作用。见图 4。

3 讨论

DFU 难愈的原因尚不清楚,可能与糖尿病患者

皮肤的特殊微环境、高糖氧化应激、血管生成减少、相关炎症因子数量变化和免疫反应功能障碍等多种因素有关。其中,氧化应激和血管生成障碍因成为解决 DFU 创面愈合受限的关键环节而受到重视^[10]。

EPCs-Exo 可以调节血管内皮细胞的功能,在血管损伤修复中发挥重要作用。Li et al^[11]在动物实验中证明,EPCs-Exo 可以加速大鼠颈动脉内皮损伤后的早期再分化,从而促进血管修复;在体外实验中,EPCs-Exo 可增强血管内皮细胞的增殖和迁移能力,并上调血管生成相关基因的表达。Zhang et al^[12]研究发现,EPCs-Exo 可通过激活细胞外调节蛋白激酶信号通路来提高内皮细胞的血管生成活性,并最终促进皮肤伤口修复和再生。还有学者发现^[13],在 DFU 大鼠模型中,过表达核因子 E2 相关因子 2 的脂肪干细胞外泌体可降低创面组织中氧化应激相关蛋白表达水平,促进创面血管形成,从而加速皮肤伤口愈合。本研究中,EPCs-Exo 可促进糖尿病小鼠的皮肤伤口愈合,同时观察到伤口组织中血管生成相关分子的表达上调,氧化应激状态降低,这与既往研究结果一致。

外泌体是直径为 40 ~ 150 nm 的细胞外小泡,可转运 circRNA、lncRNA、miRNA、mRNA 和生长因子。研究^[14-15]显示,外泌体在心血管系统、神经系统和肿瘤等疾病的预防、形成、发展和控制过程中发挥至关重要的作用。本研究应用高通量测序首次发现 miRNA-222-3p 为 EPCs-Exo 中表达丰度第 2 位的 miRNA,同时证实 miRNA-222-3p 可加速糖尿病小鼠的皮肤伤口愈合。已知 CD31 是证明内皮细胞组织存在的良好指标,VEGF 是皮肤中最有效的血管生成细胞因子之一^[14]。伤口中 VEGF 的表达量将直接影响血管生成能力和创面愈合结局。此外,增强的氧化应激可使创面愈合延迟,改善创面氧化应激能有效缩短创面的愈合时间,促进创面愈合^[15]。本研究表明,在糖尿病小鼠创面组织中,miRNA-222-3p 可增加 CD31、VEGF 的蛋白表达,降低 ROS 水平,提示 miRNA-222-3p 可降低创面氧化应激,促进血管生成,改善血液灌注,从而促进创面愈合。此效应系 miRNA-222-3p 直接参与还是与 lncRNA 或 circRNA 相互作用而发挥调控作用,有待进一步研究探索。

值得一提的是,本研究结果可能具有潜在的临床应用价值。本研究结果提示,EPCs-Exo 中富含高表达的 miRNA-222-3p,并且用 EPCs-Exo 涂抹糖尿

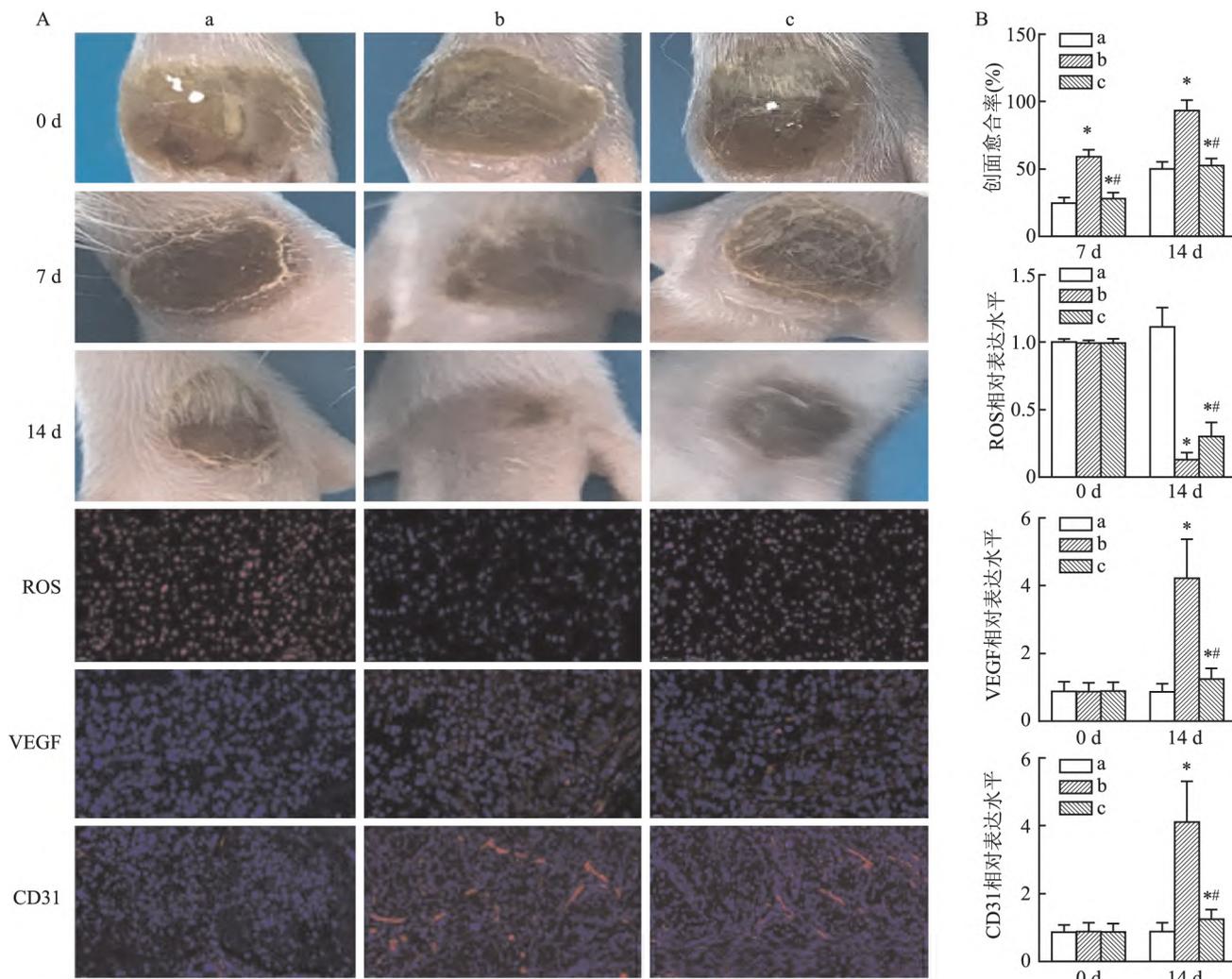


图4 miRNA-222-3p对糖尿病小鼠伤口愈合的影响

A: 三组小鼠创面愈合情况及免疫荧光法检测创缘组织中 ROS、VEGF、CD31 表达($\times 400$); B: 三组小鼠创面愈合率及创缘组织中 ROS、VEGF、CD31 相对表达水平比较; a: 空白组; b: agomiR-222-3p 组; c: antagomiR-222-3p 组; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 agomiR-222-3p 组比较: # $P < 0.05$

病小鼠皮肤伤口与局部使用 miRNA-222-3p 具有相似的治疗效果。实际上,与需要借助转染技术的 miRNA 给药方式比较,外用 EPCs-Exo 治疗糖尿病皮肤创面在临床实践中更方便、可行、实用。因此,未来有必要进行更多的研究来确定这种给药途径在临床实践中的有效性、安全性和可靠性,进一步完善基于外泌体的慢性创面治疗方法。

综上所述,本研究表明 miRNA-222-3p 在 EPCs-Exo 中高度表达,可促进糖尿病小鼠的皮肤伤口愈合。该作用可能与调控氧化应激、促进创面血管生成效应有关,这一发现将为糖尿病皮肤伤口的临床治疗提供一种潜在的新靶点和新方法。本研究也有不足之处,包括未在非糖尿病皮肤伤口中进行 EPCs-Exo 和 miRNA-222-3p 的疗效观察;未进行靶

基因预测和功能富集分析;仅予现象研究,未对涉及到的分子机制进行进一步探索;在研究氧化应激的效应中,仅检测 ROS 表达,未检测包括还原型辅酶 II、还原性谷胱甘肽等参与氧化应激调节过程的其他指标,未来有待进一步完善相关研究。

参考文献

- [1] Mishra S C, Chhatbar K C, Kashikar A, et al. Diabetic foot [J]. BMJ 2017, 359: j5064.
- [2] Grennan D. Diabetic foot ulcers [J]. JAMA 2019, 321(1): 114.
- [3] Hade M D, Suire C N, Mossell J, et al. Extracellular vesicles: Emerging frontiers in wound healing [J]. Med Res Rev 2022, 42(6): 2102-25.
- [4] Vu N B, Nguyen H T, Palumbo R, et al. Stem cell-derived exosomes for wound healing: Current status and promising directions [J]. Minerva Med 2021, 112(3): 384-400.

- [5] Kong J ,Wang F ,Zhang J ,et al. Exosomes of endothelial progenitor cells inhibit neointima formation after carotid artery injury [J]. *J Surg Res* 2018 ,232: 398 – 407.
- [6] Li D ,Wu N. Mechanism and application of exosomes in the wound healing process in diabetes mellitus [J]. *Diabetes Res Clin Pract* , 2022 ,187: 109882.
- [7] Xu J ,Bai S ,Cao Y ,et al. miRNA-221-3p in endothelial progenitor cell-derived exosomes accelerates skin wound healing in diabetic mice [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2020 ,13: 1259 – 70.
- [8] Jie R ,Qian J ,Tang Y ,et al. Role of increased miR-222-3p expression in peripheral blood and wound marginal tissues of type 2 diabetes mellitus patients with diabetic foot ulcer [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2023 ,16: 2419 – 32.
- [9] 解丹丹 ,巫婷婷 ,赵晓彤 ,等. 达格列净通过丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶/内皮型一氧化氮合酶途径调节高糖环境下的内皮祖细胞功能[J]. *安徽医科大学学报* 2022 ,57(6) :957 – 62.
- [10] Raja J M ,Maturana M A ,Kayali S ,et al. Diabetic foot ulcer: A comprehensive review of pathophysiology and management modalities [J]. *World J Clin Cases* 2023 ,11(8) : 1684 – 93.
- [11] 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]. *Cytotherapy* 2016 , 18(2) : 253 – 62.
- [12] 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 – 87.
- [13] Li X ,Xie X ,Lian W ,et al. Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model [J]. *Exp Mol Med* 2018 ,50(4) : 1 – 14.
- [14] Xian W ,Yi T ,Zhao L ,et al. The application potential and advance of mesenchymal stem cell-derived exosomes in myocardial infarction [J]. *Stem Cells Int* 2021 ,2021: 5579904.
- [15] Zhong W ,Zeng W ,Hai X ,et al. Exosomal noncoding RNAs in central nervous system diseases: Biological functions and potential clinical applications [J]. *Front Mol Neurosci* 2022 ,15: 1004221.

Effect of miR-222-3p in endothelial progenitor cell-derived exosomes on skin wound healing in diabetic mice

Wang Yongqi ,Ji Hua ,Tang Ying ,Wu Tingting ,Jie Ruyan ,Chen Mingwei

(Dept of Endocrinology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the effect of miRNA-222-3p in endothelial progenitor cell-derived exosomes (EPCs-Exo) on skin wound healing in diabetic mice. **Methods** Endothelial progenitor cell (EPCs) derived from C57BL/6 mouse bone marrow were identified by fluorescence staining. Subsequently ,EPCs-Exo isolated from the media of EPCs were identified and high-throughput sequencing of EPCs-Exo miRNA was completed. The skin injury model of diabetic mice was established. According to different groups ,the wounds were treated with externally applied phosphate buffer solution (PBS) and EPCs-Exo; Subcutaneous injection of PBS ,agomiR-222-3p ,and antagomiR-222-3p at the edge of the wound was performed continuously for 14 days ,and the wound healing rate was observed. Meanwhile ,immunofluorescence methods were used to investigate the changes in the expression levels of ROS ,CD31 and VEGF in the wound margin tissue before and after treatment. **Results** EPCs-Exo significantly accelerated skin wound healing in diabetic mice ,reduced the level of ROS ,and increased the expression level of VEGF and CD31 in the wound margin tissue ($P < 0.05$). High-throughput sequencing showed that miRNA-222-3p was highly expressed in EPCs-Exo. Local subcutaneous injection of miRNA-222-3p into wound margin tissue significantly promoted the skin wound healing of diabetic mice ,reduced the level of ROS ,and increased the expression level of VEGF and CD31 in the wound margin tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** MiRNA-222-3p promotes wound healing in diabetic mice and plays an important role in EPCs-Exo promoting wound healing.

Key words endothelial progenitor cells; exosome; diabetic foot; miRNA-221-3p; wound healing