

王献珍,李毅,吴晓伟,等. 过表达 microRNA-26a 大鼠表皮干细胞来源外泌体对深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(11): 34-42, 56.

Wang XZ, Li Y, Wu XW, et al. Effect of microRNA-26a-overexpressed rat epidermal-stem-cell-derived exosomes on wound healing in rats with deep second-degree burns [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(11): 34-42, 56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.11.005

过表达 microRNA-26a 大鼠表皮干细胞来源外泌体 对深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合的影响

王献珍,李毅,吴晓伟,崔强*

(青海大学附属医院,西宁 810000)

【摘要】 目的 探究过表达 microRNA-26a(miR-26a)的大鼠表皮干细胞(EPSC)来源外泌体(Exos)对深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合的影响。方法 体外培养大鼠 EPSC,用携带 miR-26a-绿色荧光蛋白(GFP)的慢病毒颗粒和阴性对照(NC-GFP)转染以上调 miR-26a 表达,并从未转染的 EPSC、NC-GFP 转染的 EPSC 或 miR-26a-GFP 转染的 EPSC 中分离 Exos,透射电子显微镜(TEM)和纳米粒子追踪分析(NTA)观察 Exos 形态和大小,蛋白质印迹(Western blot)检测 Exos 表面标志物 CD9、CD63 和 CD81 的表达,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 EPSC 及 EPSC-Exos 中 miR-26a 表达,CCK-8 法检测 EPSC 的增殖活性;小管形成实验评估 miR-26a-EPSC-Exos 对血管生成的影响。建立大鼠深Ⅱ度烧伤模型,分为对照组(control 组)、NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组,每组 30 只。NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠给予相应的 Exos 干预,control 组大鼠给予等体积的 PBS,每周 1 次,持续 3 周。分别在烧伤后第 7、14 和 21 天,观察各组大鼠烧伤创面状况,计算创面愈合率;HE 染色观察创面组织病理学变化,并进行组织学评分;免疫组织化学法检测创面 CD31 阳性表达,计算微血管密度(MVD)。结果 miR-26a 转染可显著升高 EPSC 及其 Exos 中 miR-26a 表达,促进 EPSC 细胞增殖($P<0.05$);TEM 和 NTA 分析结果显示,Exos 呈球形,直径范围在 40~150 nm,CD9、CD63 和 CD81 均呈阳性;小管形成实验结果显示,miR-26a-EPSC-Exos 可显著增加管长度,促进内皮细胞血管生成($P<0.05$)。体内动物实验结果显示,miR-26a-EPSC-Exos 可显著加速深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合和修复,增加组织学评分和 MVD($P<0.05$)。结论 过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 可促进深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合。

【关键词】 表皮干细胞;深Ⅱ度烧伤;外泌体;microRNA-26a;血管生成

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 11-0034-09

Effect of microRNA-26a-overexpressed rat epidermal-stem-cell-derived exosomes on wound healing in rats with deep second-degree burns

WANG Xianzhen, LI Yi, WU Xiaowei, CUI Qiang*

(Qinghai University Affiliated Hospital, Xining 810000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of exosomes (Exos) derived from rat epidermal stem cells (EPSC) overexpressing microRNA-26a (miR-26a) on wound healing in rats with deep second-degree burns. **Methods** Rat EPSCs were cultured *in vitro* and transfected with lentiviral particles carrying miR-26a-green fluorescent protein (GFP)

[基金项目] 2018 年青海省卫生计生系统适宜技术推广项目(青卫科[2018]29 号)。

[作者简介] 王献珍(1973—),男,硕士研究生,研究方向:烧伤整形。E-mail:10062690@qq.com

[通信作者] 崔强(1973—),男,本科,研究方向:烧伤整形。E-mail:1181548413@qq.com

and negative control (NC-GFP) to up-regulate the expression of miR-26a. Exos were separated from untransfected, NC-GFP-transfected, NC-GFP-transfected and miR-26a-GFP-transfected EPSCs. Transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis were performed to observe the shape and size of the Exos. Western blot was performed to measure the expression of Exo surface markers CD9, CD63 and CD81. Real-time fluorescent quantitative PCR was performed to measure the expression of miR-26a in EPSC and EPSC-Exos, and the CCK-8 method was applied to measure the proliferation activity of EPSC. A tubule formation experiment was performed to evaluate the effect of miR-26a-EPSC-Exos on angiogenesis. A rat model of deep second-degree burns was established and separated into control, NC-EPSC-Exos, and miR-26a-EPSC-Exos groups, with 30 rats in each group. The NC-EPSC-Exos and miR-26a-EPSC-Exos groups were given corresponding Exos intervention, and the control group was given an equal volume of PBS once a week for 3 weeks. On the 7th, 14th and 21st days after rats were burnt, the burn wound conditions of the rats in each group were observed and the wound healing rate was calculated. HE staining was performed to observe histopathological changes of the wounds, and histological scores were obtained. An immunohistochemical method was employed to measure the positive expression of CD31 on the wound and calculate the microvessel density. **Results** miR-26a transfection significantly increased the expression of miR-26a in EPSC and its Exos and promoted the proliferation of EPSCs ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis result showed that Exos were spherical, with a diameter ranging from 40 nm to 150 nm, and positive for CD9, CD63, and CD81. The tubule formation experiments showed that miR-26a-EPSC-Exos was able to significantly increase the tube length and promote endothelial cell angiogenesis ($P < 0.05$). The result of the in vivo experiments showed that miR-26a-EPSC-Exos significantly accelerated wound healing and repair in rats with deep second-degree burns and increased the histological score and microvessel density ($P < 0.05$).

Conclusions EPSC-Exos overexpressing miR-26a can promote wound healing in rats with deep second-degree burns.

[Keywords] epidermal stem cells; deep second-degree burn; exosomes; microRNA-26a; angiogenesis

皮肤是身体中最大的器官,覆盖整个外表面,在世界范围内,数以百万计的患者出现皮肤烧伤,伴随着巨额的治疗费用,导致死亡和广泛的发病率^[1]。在深Ⅱ度烧伤中,患者缺乏足够的皮肤来覆盖他们的烧伤,且由于排斥反应,目前无法选择其他捐赠者的皮肤移植^[2]。目前使用的皮肤替代品和上皮移植物效果有限。因此,迫切需要找到治疗深度烧伤的新方法。

干细胞疗法是一种在治疗深度烧伤领域和再生医学领域中有前景的新方法^[3]。外泌体(exosomes, Exos)是干细胞的关键分泌产物之一,据报道,间充质干细胞及其 Exos 已被证明可促进烧伤伤口愈合,是一种有前景的促进皮肤伤口愈合的治疗方法^[4-5]。除了间充质干细胞外,有报道显示,皮肤组织的自我更新和损伤修复主要依赖于表皮干细胞(epidermal stem cells, EPSC)的代偿性增殖和分化。EPSC 是一种多能细胞类型,在伤口愈合和组织再生中起着关键作用^[6-8],EPSC 已用于修复烧伤、急性创伤和某些疾病引起的皮肤损伤^[9-10]。并且有报道称,EPSC 来源的 Exos(EPSC-Exos)在伤口愈合过程中可促进皮肤再生^[11];转染 miR-26a 的人 CD34⁺干细胞的 Exos 中 miR-26a 的表达显著升高,并可通过促进血管生成和成骨防止糖皮质激素诱

导的股骨头坏死^[12]。而 miR-26a 已被证明可能是皮肤伤口愈合有希望的治疗靶点^[13-15]。因此,本研究以 EPSC 为载体细胞,通过将 miR-26a 转染到 EPSC 中上调 EPSC-Exos 中 miR-26a 的含量以探究其对深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

从中国科学院上海药物研究所[SCXK(沪)2020-0005]获得 90 只 SPF 级成年 Sprague Dawley (SD)雄性大鼠,体重(220±20)g,7~8 周龄。饲养在青海大学医学院高原医学研究中心[SYXK(青)2020-0001],所有大鼠都保持在受控环境条件下:温度(22±2)℃,湿度(55±5)%,12 h 光照/12 h 黑暗循环。本研究经青海大学医学院高原医学研究中心实验动物使用与管理委员会批准(IACUC:2021-008),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 细胞

大鼠 EPSC 和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自上海晶抗生物工程有限公司(JK-R2987、JK-CS3528)。细胞在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血

清)中,在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。当细胞密度达到 80%~90%时进行传代,本研究使用第 3~5 代的细胞。

1.2 主要试剂与仪器

携带 miR-26a-绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的慢病毒颗粒和阴性对照 (NC-GFP) 购自 Genechem Corporation (中国上海);CCK-8 试剂盒 (cell counting kit-8, 批号: C0038)、HE 染色试剂 (批号: C0105)、RIPA 裂解液 (批号: P0013B) 和二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒 (批号: P0012S) 购自碧云天生物科技公司;TRIzol 试剂 (批号: 15596018)、荧光定量[®] RNA 逆转录试剂盒 (批号: AB-4366596) 购自美国 Invitrogen 公司;SYBR Premix Ex Taq (批号: DRR041A, 日本 TAKARA 公司);兔源一抗 CD31 (批号: ab182981) 和 HRP 偶联的 IgG 二抗 (批号: ab6721) 购自英国 Abcam 公司;兔源一抗 CD9 (批号: MA5-31980)、CD63 (批号: PA5-92370) 和 CD81 (批号: MA5-32333) 购自美国 Thermo Scientific 公司。

Synergy LX 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司);Mx3005P 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Stratagene 公司);IX 70 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司);Coulter Optima TM L-80XP 超速离心机 (美国 Beckman 公司);Hitachi H-600 透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司);Nanosight LM10 颗粒跟踪分析仪 (英国 Malvern Panalytical 公司);YLS-5Q 超级控温烫伤仪 (上海软隆科技发展公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 miR-26a 慢病毒转染 EPSC

将每毫升含 1×10^5 个细胞的 EPSC 悬液与 50 μ L 慢病毒颗粒和 20 μ L 感染溶液 (15 μ L HiTransB-1 和 5 μ L HiTransB-2) 共孵育 12 h。72 h 后,使用荧光显微镜观察转染效率。实时荧光定量聚合酶链反应 (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 用于检测 2 μ g/mL 嘌呤霉素分选 20 d 后 EPSC 中 miR-26a 的稳定表达。

此外,CCK-8 试剂盒用于检测细胞活力。将未经转染或转染 NC-GFP、miR-26a-GFP 的 EPSC (5000 个/孔) 接种到 96 孔板中,分别为对照组 (Ctr 组)、NC-GFP 组、miR-26a-GFP 组,培养 24、48、72 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 处测量光密度 (optical density, OD) 值,OD 值代表细胞活力。

1.3.2 Exos 的分离与鉴定

从不同培养组 (未转染 EPSC、NC-GFP 转染的 EPSC 或 miR-26a-GFP 转染的 EPSC) 的无血清培养基中分离 Exos (依次命名为 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos)。将培养基以 1644 r/min 离心 10 min 和 4245 r/min 离心 10 min 去除死细胞和细胞碎片。然后将上清液 9492 r/min 离心 30 min,然后在超速离心机中以 31480 r/min 离心 70 min 收集 Exos。将沉淀物重新悬浮在 2 mL 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 中,并在超速离心机中以 31480 r/min 再次超速离心 70 min。将沉淀的 Exos 重新悬浮在 200 μ L PBS 中,并储存在 -80℃ 用于后续实验。

Exos 的鉴定: (1) 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Exos 形态: 使用 TEM 观察 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos 和 miR-26a-EPSC-Exos 的形态。 (2) 纳米粒子追踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 检测 Exos 大小: 分离后,将 Exos 用 700 μ L 无菌 PBS 稀释并混合均匀。NanoSight LM 10 分析 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos 和 miR-26a-EPSC-Exos 的尺寸大小。 (3) 蛋白质印迹 (Western blot) 检测 Exos 特异性表面标志物的表达: 使用 Western blot 检测 Exos 表面标志物 CD9、CD63 和 CD81 的表达。使用蛋白质分离试剂盒提取 Exos 的蛋白质。使用 BCA 法测定 Exos 的蛋白质浓度,然后在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上电泳分离等量的总蛋白,然后转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜),室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,然后在 4℃ 下用指定的抗体 CD9、CD63 和 CD81 孵育过夜,然后在室温下与辣根过氧化物酶抗过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 偶联的 IgG 二抗 (1 : 5000 稀释) 一起孵育。使用 Quantity One 分析软件分析结果。

1.3.3 RT-qPCR 检测 EPSC-Exos 中 miR-26a 表达

使用 TRIzol 试剂从 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos 中提取总 RNA。使用逆转录试剂盒在 42℃ 下将总 RNA (1 μ g) 转化为第一链互补 cDNA。然后,使用 SYBR Premix Ex Taq 进行 RT-qPCR,条件如下: 在 95℃ 下初始变性 5 min,然后在 94℃ 下变性 30 s、60℃ 20 s、72℃ 25 s,进行 40 个循环。相对 miR-26a 表达被归一化为 U6。采

用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行定量。使用的引物序列如下: miR-26a 正向引物序列 (5' - 3'): CGTCCTTCAAGTAATCCAGGA 和反向引物序列 (5' - 3'): GCAGGGTCCGAGGTATTC; U6 正向引物序列 (5' - 3'): GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT 和反向引物序列 (5' - 3'): CGCTTCACGAATTTGC GTGTCAT。

1.3.4 CCK-8 法检测 miR-26a-EPSC-Exos 对 EPSC 增殖的影响

将 EPSC 以每孔 5000 个细胞的密度置于 96 孔板中,用含 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos (终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的培养基分别处理。然后,在处理 24、48 和 72 h 向每个孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,孵育 2 h。使用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值。

1.3.5 小管形成实验

评估 miR-26a-EPSC-Exos 对血管生成的影响,使用 HUVEC 进行该测定。将 HUVEC 接种到 6 孔板中,并在无血清培养基中用 Ctr-EPSC-Exos、NC-EPSC-Exos、miR-26a-EPSC-Exos (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理。然后将细胞接种到涂有 Matrigel 的 24 孔板上 (2.5 $\times$ 10⁴ 个/孔),在 5% CO₂ 中于 37℃ 孵育 12 h。然后用 1% 戊二醛-2% 多聚甲醛溶液固定。在光学显微镜下观察内皮细胞管状网络的图像并拍照,用 Image J 软件测量管长度。

1.3.6 大鼠深 II 度烧伤模型的建立和 EPSC-Exos 治疗

将大鼠用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后,脱去背部毛发并消毒。参考文献^[16-17]方法采用烫伤仪在骶尾部拟造模区相同位置选取一直径为 2 cm 区域制备深 II 度烧伤大鼠模型,参数设置为:压力 0.03 MPa、温度 106℃ 持续时间 5 s (以上造模条件已经病理切片证实)。伤口部位用无菌生理盐水清洗。造模后乳酸钠林格溶液 (5 mL) 腹腔注射抗休克。

造模后将大鼠分为:对照组 (control 组)、NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组,每组 30 只。NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠分别在伤口周围注射 100 μg Exos (NC-EPSC-Exos 和 miR-26a-EPSC-Exos,悬浮于 200 μL PBS 中),control 组大鼠给予等体积的 PBS,每周 1 次,持续 3 周。

1.3.7 创面状况观察和创面愈合率

观察各组大鼠烧伤创面状况,包括皮肤颜色、

结痂状况、分泌物、愈合状况等。每 7 d 用照片记录一次皮肤损伤,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量和分析伤口大小。创面愈合率 = (1 - 伤口面积/原始面积) $\times$ 100%。重复 3 次,取平均值作为实验结果。

1.3.8 HE 染色

分别在烧伤后第 7、14 和 21 天每组随机选取 10 只大鼠,处死后取伤口周围皮肤 (4 mm²),并固定在 4% 多聚甲醛 (pH=7.4) 中,脱水、石蜡包埋,切成 4 μm 切片,经 HE 染色后进行光学显微镜检查。根据以下参数:再上皮化、炎症反应、巨噬细胞、血管生成和肉芽组织形成,对每张切片进行 1~10 的伤口愈合组织学评分^[18]。

1.3.9 免疫组织化学法

各组石蜡组织切片经二甲苯和分级乙醇脱蜡复水。使用蛋白酶 K 溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在 37℃ 下进行抗原修复 15 min。切片用山羊血清封闭 30 min,然后与一抗 CD31 (1:100) 在 4℃ 下孵育过夜。洗涤后,将切片与荧光标记的二抗 (1:2000) 在室温下孵育 1 h。DAPI 染核,显微镜观察。每张切片随机选择 5 个区域计数 CD31 阳性细胞评估微血管密度 (microvessel density, MVD)。

1.4 统计学方法

数据统计分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件,以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率和细胞活力

在荧光显微镜下成功观察到转染 NC-GFP 和 miR-26a-GFP 的 EPSC,见图 1;与 Ctr 组和 NC-GFP 组相比,miR-26a 转染可显著促进 EPSC 细胞增殖 ($P < 0.05$),见表 1;RT-qPCR 检测结果显示,与 Ctr 组和 NC-GFP 组相比,miR-26a-GFP 组 EPSC 中 miR-26a 表达显著升高 ($P < 0.05$),见表 1。

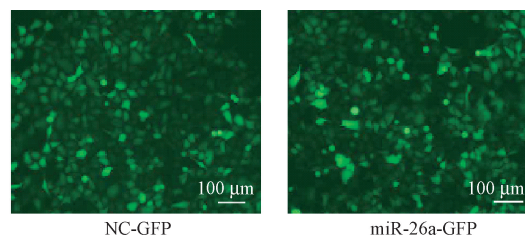


图 1 NC-GFP 和 miR-26a-GFP 的转染效率

Figure 1 Transfection efficiency of NC-GFP and miR-26a-GFP

2.2 EPSC-Exos 中 Exos 的表征和 miR-26a 表达

TEM 和 NTA 分析结果见图 2, Exos 呈球形, 直径范围在 40~150 nm 之间; Western blot 结果显示 Exos 的表面生物标志物 CD9、CD63 和 CD81 均呈阳性。RT-qPCR 结果显示, 与 Ctr-EPSC-Exos 和 NC-EPSC-Exos 相比, miR-26a-EPSC-Exos 中 miR-26a 表达水平显著升高 ($P<0.05$), 见表 2。

2.3 miR-26a-EPSC-Exos 对 EPSC 增殖的影响

与 Ctr-EPSC-Exos 和 NC-EPSC-Exos 相比, miR-26a-EPSC-Exos 可显著增加 EPSC 增殖活性 ($P<0.05$), 见表 3。

2.4 miR-26a-EPSC-Exos 对内皮细胞血管生成的影响

与 Ctr-EPSC-Exos 和 NC-EPSC-Exos 相比, miR-26a-EPSC-Exos 可显著增加管长度 ($P<0.05$), 见图 3 和表 3。

2.5 miR-26a-EPSC-Exos 对深 II 度烧伤大鼠创面愈合的影响

烧伤后第 0 天, 所有烧伤组皮肤创面呈圆形, 灰白色, 边缘光滑。烧伤后第 7 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组大鼠创面有深色干痂, 且结痂厚度不均匀, 部分基底有黄色液体渗出; miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面呈淡红色, 边缘清晰, 烧伤部位覆盖有干痂; 烧伤后第 14、21 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组大鼠的烧伤面积缓慢减少, 仍可见红肿及少量分泌物, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面基本愈合, 痂已经脱落, 新的皮肤组织暴露出来, 见图 4。烧伤后第 14、21 天, 与 control 组相比, NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面愈合率显著增加 ($P<0.05$); 与 NC-EPSC-Exos 组相比, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面愈合率显著增加 ($P<0.05$), 见图 4 和表 4。

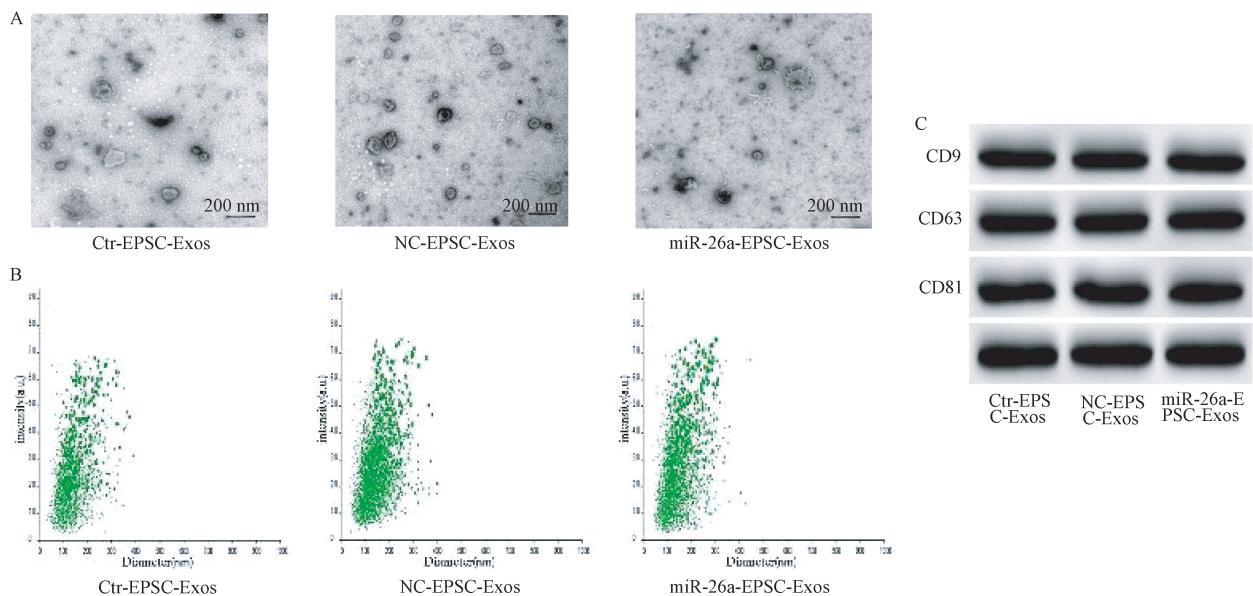
表 1 各组 EPSC 细胞活力和 miR-26a 水平比较 ($n=3$)

Table 1 Comparison of EPSC cell activity and miR-26a level in each group

组别 Groups	细胞活力 Cell activity (OD ₄₅₀)			miR-26a
	24 h	48 h	72 h	
对照组 Ctr group	0.35±0.06	0.50±0.07	0.63±0.08	1.00±0.00
NC-GFP	0.33±0.05	0.47±0.08	0.62±0.07	1.02±0.13
miR-26a-GFP	0.52±0.07 ^{ab}	0.73±0.09 ^{ab}	0.89±0.11 ^{ab}	3.49±0.37 ^{ab}

注: 与对照组相比, ^a $P<0.05$; 与 NC-GFP 组相比, ^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with Ctr group, ^a $P<0.05$. Compared with NC-GFP group, ^b $P<0.05$.



注: A: 外泌体形态; B: 外泌体尺寸; C: 外泌体表面标记物 CD9、CD63 和 CD81 的表达。

图 2 Exos 的表征

Note. A, Exos morphology. B, Exos size. C, Expression of Exos surface markers CD9, CD63 and CD81.

Figure 2 Characterization of Exos

2.6 miR-26a-EPSC-Exos 对深 II 度烧伤大鼠创面组织病理学变化的影响

在烧伤后第 7、14 和 21 天 ($n=10$) 对大鼠进行了组织学评估。HE 染色结果显示, 烧伤后第 7 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组可见少量表皮细胞增殖, 新生肉芽较少, 坏死组织以及炎性细胞浸润较多; miR-26a-EPSC-Exos 组可观察到大量表皮细胞, 肉芽组织生长迅速, 毛细血管增生, 炎性细胞浸润减

表 2 EPSC-Exos 中 miR-26a 表达比较 ($n=3$)

Table 2 Comparison of miR-26a expression in EPSC-Exos

组别 Groups	miR-26a
Ctrl-EPSC-Exos	1.00±0.00
NC-EPSC-Exos	1.05±0.14
miR-26a-EPSC-Exos	3.21±0.35 ^{ab}

注: 与 Ctrl-EPSC-Exos 组相比, ^a $P<0.05$; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, ^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with Ctrl-EPSC-Exos group, ^a $P<0.05$. Compared with NC-EPSC-Exos group, ^b $P<0.05$.

表 3 各组 EPSC 增殖活性和管长度比较 ($n=3$)

Table 3 Comparison of EPSC proliferation activity and tube length in each group

组别 Groups	细胞活力 Cell activity (OD ₄₅₀)			管长度 (μm/field) Tube length
	24 h	48 h	72 h	
Ctrl-EPSC-Exos	0.31±0.04	0.45±0.06	0.53±0.07	6357.29±758.44
NC-EPSC-Exos	0.32±0.05	0.47±0.05	0.56±0.06	6428.34±705.65
miR-26a-EPSC-Exos	0.45±0.06 ^{ab}	0.66±0.07 ^{ab}	0.78±0.08 ^{ab}	12049.56±962.18 ^{ab}

注: 与 Ctrl-EPSC-Exos 组相比, ^a $P<0.05$; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, ^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with Ctrl-EPSC-Exos group, ^a $P<0.05$. Compared with NC-EPSC-Exos group, ^b $P<0.05$.

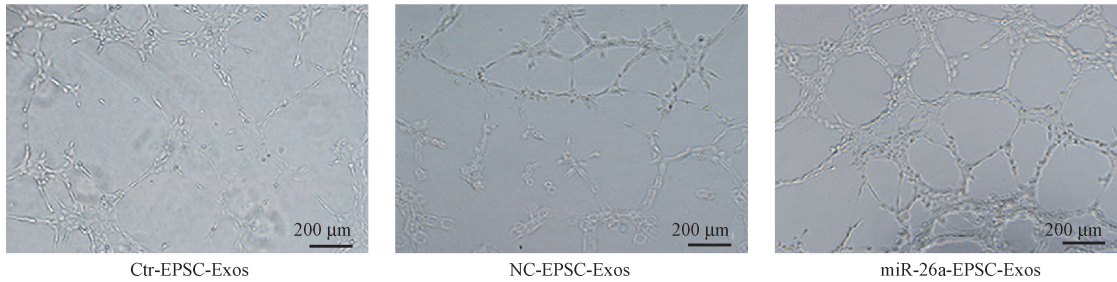


图 3 各组内皮细胞的管形成能力

Figure 3 Tube-forming ability of endothelial cells in each group

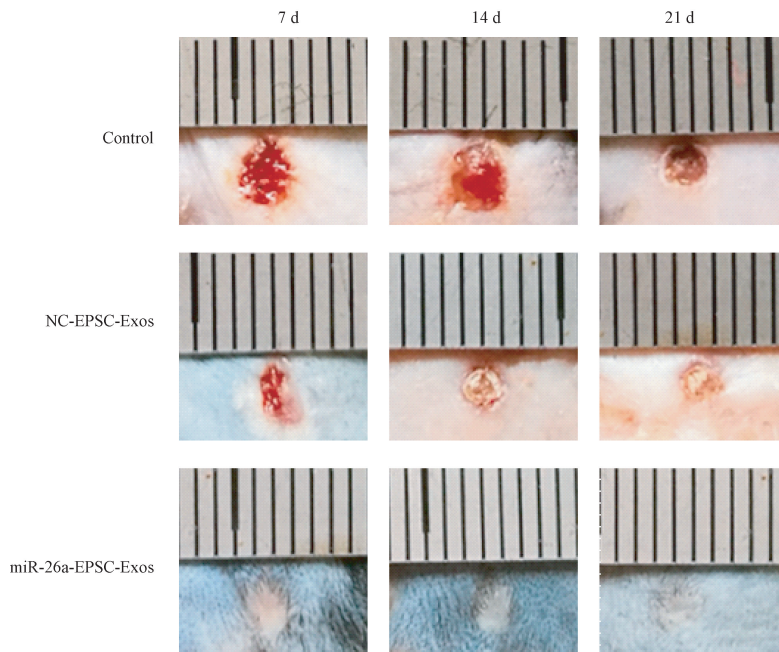


图 4 各组大鼠创面愈合情况

Figure 4 Wound healing of rats in each group

少;烧伤后第 14、21 天, control 组和 NC-EPSC-Exos 组创面出现较薄的新生上皮组织, 炎性细胞浸润减少; miR-26a-EPSC-Exos 组可见新生成的表皮细胞基本覆盖了整个创面, 新生表皮组织向上、向创面方向生长, 可见大量新生肉芽组织, 毛细血管含量更丰富, 未见炎性细胞, 表现出显著增加的再上皮化, 见图 5。在烧伤后第 7、14 和 21 天, 与 control 组相比, NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面组织学评分显著增加 ($P < 0.05$); 与 NC-

EPSC-Exos 组相比, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面组织学评分显著增加 ($P < 0.05$), 见图 5 和表 5。

2.7 miR-26a-EPSC-Exos 对深 II 度烧伤大鼠创面血管生成的影响

与 control 组相比, NC-EPSC-Exos 组和 miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面 CD31 表达呈强阳性, MVD 显著增加 ($P < 0.05$); 与 NC-EPSC-Exos 组相比, miR-26a-EPSC-Exos 组大鼠创面 MVD 显著增加 ($P < 0.05$), 见图 6 和表 6。

表 4 各组大鼠创面愈合率比较 ($n = 10$)

Table 4 Comparison of wound healing rate of rats in each group

组别 Groups	创面愈合率 (%) Wound healing rate		
	7 d	14 d	21 d
Control	9.58±1.24	45.35±4.61	72.76±5.90
NC-EPSC-Exos	10.03±1.46	51.70±5.23 ^a	83.14±6.25 ^a
miR-26a-EPSC-Exos	28.20±1.75 ^{ab}	63.49±6.85 ^{ab}	95.23±6.36 ^{ab}

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, ^b $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P < 0.05$. Compared with NC-EPSC-Exos group, ^b $P < 0.05$.

表 5 各组大鼠创面组织学评分比较 ($n = 10$)

Table 5 Comparison of wound histological scores of rats in each group

组别 Groups	创面组织学评分 Wound histological scores		
	7 d	14 d	21 d
Control	2.49±0.35	4.08±0.50	5.11±0.64
NC-EPSC-Exos	3.15±0.39 ^a	4.72±0.55 ^a	5.90±0.67 ^a
miR-26a-EPSC-Exos	3.64±0.42 ^{ab}	6.59±0.61 ^{ab}	7.21±0.80 ^{ab}

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 NC-EPSC-Exos 组相比, ^b $P < 0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P < 0.05$. Compared with NC-EPSC-Exos group, ^b $P < 0.05$.

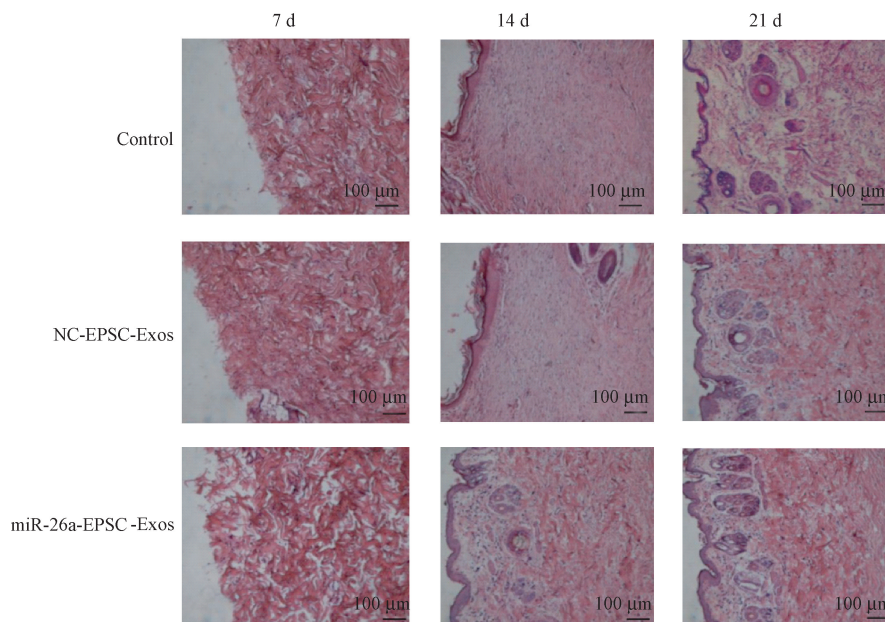


图 5 各组大鼠创面组织 HE 染色

Figure 5 HE staining of wound tissue of rats in each group

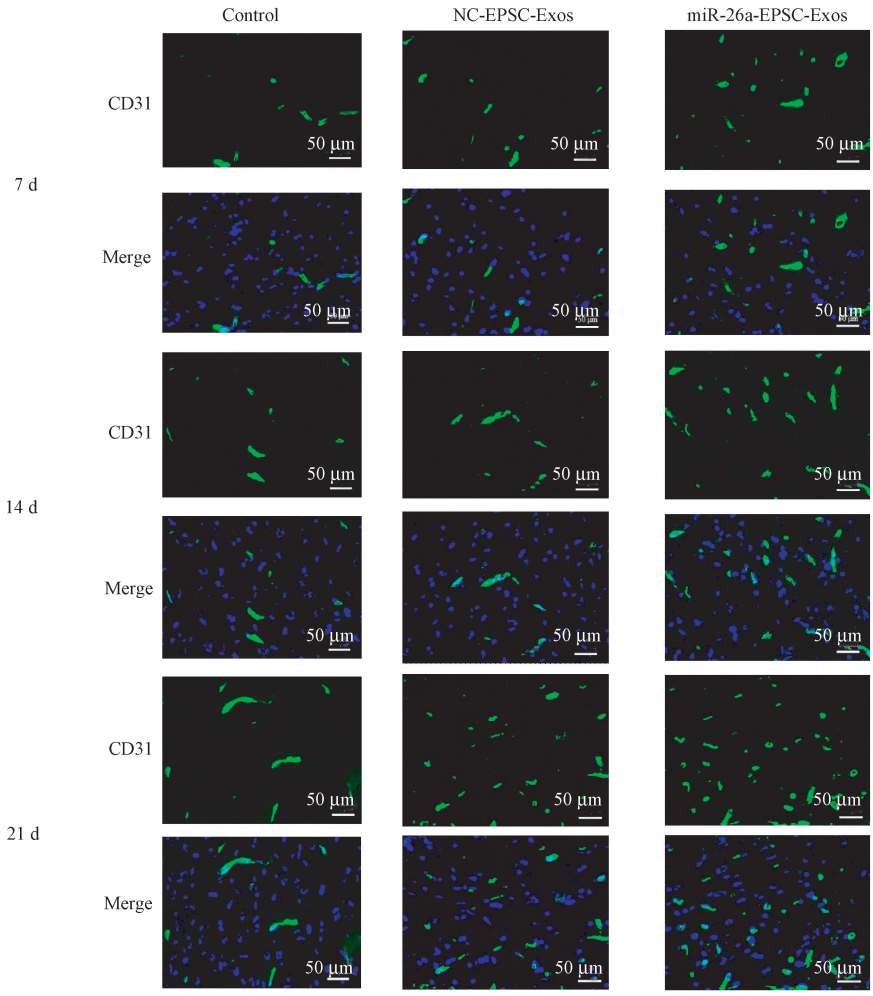


图 6 各组大鼠创面血管生成情况

Figure 6 The angiogenesis of the wound in each group of rats

表 6 各组大鼠创面 MVD 比较 ($n=10$)

Table 6 Comparison of MVD in wounds of rats in each group

组别 Groups	微血管密度(高倍视野) MVD/HPF (high-power field)		
	7 d	14 d	21 d
Control	20.35±3.48	33.08±4.25	51.20±7.16
NC-EPSC-Exos	34.19±3.76 ^a	42.36±5.81 ^a	63.45±8.22 ^a
miR-26a-EPSC-Exos	51.60±5.35 ^{ab}	70.09±8.32 ^{ab}	85.61±8.91 ^{ab}

注:与对照组相比, ^a $P<0.05$;与 NC-EPSC-Exos 组相比, ^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with NC-EPSC-Exos group, ^b $P<0.05$.

3 讨论

烧伤是皮肤损伤的常见原因。如何有效促进创面愈合是烧伤创面治疗的一个重要问题。

微小 RNA (microRNA, miRNA 或 miR) 在血管生成和伤口愈合中发挥重要作用。据报道, miR-26a 可促进大鼠脑梗死模型和小鼠心肌梗死模型血管生成^[13-14], 并且可延长皮肤同种异体移植物存活^[15]; 提示, miR-26a 可能是皮肤伤口愈合有希望的治疗靶点。然而, 使用合成 miRNA 进行治疗的一

个主要挑战是, 外源性添加的 miRNA 会被血浆中高水平的核糖核酸酶迅速降解, 或者被吞噬作用、肾滤过或胆汁排泄迅速清除, 从而导致较小的组织积累和较小的治疗效果^[19-20]。以上这些缺点可以通过使用 Exos 作为 miRNA 载体来克服^[21]。由于 Exos 稳定表达 miRNA, 并且对受体无细胞毒性和致突变性, 因此, 与基于病毒或脂质体的基因递送载体相比, 它们的寿命更长。Exos 一旦进入细胞, 就可以介导细胞间信号转导, 发挥生物调节作用。

干细胞通过旁分泌信号发挥修复作用, 通过释

放生物活性因子影响细胞增殖和迁移^[22]。Exos 是众多细胞类型分泌的重要旁分泌因子,也被认为是通过将功能性蛋白质或 miRNA 转运至相邻细胞的细胞间通讯介质,在组织修复和再生中起主导作用^[23-24]。Exos 的膜与它们的亲代细胞高度相似^[25],稳定 Exos 膜内的 miRNA 可提供有效的细胞-靶标传递系统。在烧伤修复过程中,重新上皮化对于恢复表皮是必要的,而 EPSC 在促进上皮再形成方面发挥着关键作用。EPSC 具有高增殖和分化潜力,参与维持皮肤的正常结构和功能,改变 EPSC 增殖能力是促进皮肤伤口愈合的有效方法^[10]。因此,我们将 miR-26a 慢病毒颗粒转染到 EPSC 以提高 EPSC-Exos 中 miR-26a 水平,并探究其对 EPSC 增殖活性的影响。结果显示,在 EPSC 中过表达 miR-26a 后,其 Exos 会诱导更高的 EPSC 增殖活性;此外,我们发现过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 促进了 HUVEC 细胞小管的形成,表明 EPSC-Exos 通过 miR-26a 对血管生成发挥促进作用。

基于这些体外实验结果,我们使用过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 治疗皮肤烧伤大鼠。在深Ⅱ度烧伤大鼠中,我们发现,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 可显著加速深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合;组织学评估显示,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 促进了伤口的再上皮化,并增加了伤口评分,表明伤口愈合增强;最后,内皮蛋白 CD31 的免疫组织化学染色证实,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 增加了用 EPSC-Exos 治疗的伤口毛细血管密度。提示,EPSC 分泌的因子可以促进血管生成和伤口愈合。我们首次证明 EPSC-Exos 介导的 miR-26a 递送可能为深Ⅱ度烧伤提供一种有前景的治疗策略。

综上所述,过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 可促进深Ⅱ度烧伤大鼠创面愈合。本研究的主要关注点是过表达 miR-26a 的 EPSC-Exos 对伤口愈合的影响,未对其机制进行深入探索,在未来的研究中会结合体外细胞实验,分析其作用机制。

参考文献:

- [1] Wu Z, Zhu M, Mou XX, et al. Overexpressing of caveolin-1 in mesenchymal stem cells promotes deep second-degree burn wound healing [J]. J Biosci Bioeng, 2021, 131(4): 341-347.
- [2] Ayaz M. Scrub sponge as a wound debridement device [J]. Bull Emerg Trauma, 2021, 9(2): 96-100.
- [3] Costa de Oliveira Souza CM, de Souza CF, Mogharbel BF, et al. Nanostructured cellulose-gellan-xyloglucan-lysozyme dressing seeded with mesenchymal stem cells for deep second-degree burn treatment [J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16(1): 833-850.
- [4] Imbarak N, Abdel-Aziz HI, Farghaly LM, et al. Effect of mesenchymal stem cells versus aloe vera on healing of deep second-degree burn [J]. Stem Cell Investig, 2021, 8(1): 12-26.
- [5] Liu J, Yan Z, Yang F, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells accelerate cutaneous wound healing by enhancing angiogenesis through delivering Angiopoietin-2 [J]. Stem Cell Rev Rep, 2021, 17(2): 305-317.
- [6] Shi Y, Yang R, Tu L, et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes burn wound healing by regulating epidermal stem cells [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3): 1811-1820.
- [7] Zhao X, Bian R, Wang F, et al. GDF-5 promotes epidermal stem cells proliferation via Foxg1-cyclin D1 signaling [J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1): 42-52.
- [8] Yang R, Liu F, Wang J, et al. Epidermal stem cells in wound healing and their clinical applications [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 229-242.
- [9] Li Y, Zhang J, Yue J, et al. Epidermal stem cells in skin wound healing [J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2017, 6(9): 297-307.
- [10] Yang R, Wang J, Zhou Z, et al. Role of caveolin-1 in epidermal stem cells during burn wound healing in rats [J]. Dev Biol, 2019, 445(2): 271-279.
- [11] Duan M, Zhang Y, Zhang H, et al. Epidermal stem cell-derived exosomes promote skin regeneration by downregulating transforming growth factor- β 1 in wound healing [J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 452-462.
- [12] Zuo R, Kong L, Wang M, et al. Exosomes derived from human CD34⁺ stem cells transfected with miR-26a prevent glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis and osteogenesis [J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1): 321-334.
- [13] Liang Z, Chi YJ, Lin GQ, et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(11): 3485-3492.
- [14] Icli B, Wara AK, Moslehi J, et al. MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling [J]. Circ Res, 2013, 113(11): 1231-1241.
- [15] Xie F, Chai J, Zhang Z, et al. MicroRNA 26a prolongs skin allograft survival and promotes regulatory T cell expansion in mice [J]. Transpl Int, 2015, 28(10): 1143-1151.
- [16] 李飞龙, 黄赵刚, 程钢, 等. 制痂酊对大鼠深Ⅱ度烧伤的创面修复及作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(8): 1164-1168.
- [17] 浦春宁, 陈骅, 凌书建. 大蒜素对大鼠烧伤创面愈合的影响及其机制 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(11): 1971-1975.

(下转第 56 页)