

外泌体治疗糖尿病足溃疡方法探索

赖舒畅, 琚 枫, 陈清华, 邓文艺, 陈宗存, 符茂雄*

海南医科大学第二附属医院内分泌科, 海南 海口

收稿日期: 2024年5月28日; 录用日期: 2024年6月23日; 发布日期: 2024年6月30日

摘 要

背景: 外泌体(Exosomes), 可由多种类型的细胞分泌的多泡内涵体, 通过与细胞膜的融合将其中的递质转移到另一细胞, 从而实现跨细胞信息传递并调节胞间信号传导, 发挥多种生物学功能。外泌体在组织修复中具有优秀的效果。然而外泌体的临床应用也存在着一定的问题, 一方面, 靶向性不足; 另一方面, 外泌体外用存在效果不佳, 失效的速度快的特点。在此, 我们寻找到一种合适的载体对外泌体进行靶向增强以及延长作用时间。本文对我们所使用的研究方法进行简要阐述, 以期为相关的研究提供一定的参考及借鉴。

关键词

外泌体, 糖尿病足, 载体

Exploration of Exosome Therapy for Diabetic Foot Ulcer

Shuchang Lai, Feng Ju, Qinghua Chen, Wenyi Deng, Zongcun Chen, Maoxiong Fu*

Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou Hainan

Received: May 28th, 2024; accepted: Jun. 23rd, 2024; published: Jun. 30th, 2024

Abstract

Background: Exosomes are multivesicular endosomes secreted by various types of cells, which transfer the transmitters to another cell through fusion with the cell membrane, thus achieving transcellular information transmission and regulating intercellular signal transduction, thus playing a variety of biological functions. Exosomes have excellent effects in tissue repair. However, there are some problems in the clinical application of exosomes. On the one hand, the targeting is

*通讯作者。

insufficient; on the other hand, in vitro application of exotin has the characteristics of poor effect and fast failure rate. Here, we find a suitable vector for targeted enhancement of exosomes and prolonging the action time. This article briefly elaborates on the research methods we use, in order to provide some reference and inspiration for related research.

Keywords

Exosomes, Diabetic Foot, Carrier

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖尿病足溃疡(diabetic foot ulcer, DFU)是一种严重的糖尿病慢性并发症,它以机体长期慢性高血糖为因,皮肤的软组织血运障碍、神经病变,皮肤缺损后迁延不愈为果的一种临床常见疾病[1]。据估计,到本世纪中期,糖尿病患者可达到 6.29 亿[2] [3]。糖尿病患者一生之中,有高达 25%的机率出现足部溃疡,而这些溃疡患者中又有接近 30%的人群将接受截肢治疗。糖尿病足溃疡已成为世界性的问题,糖尿病护理成本至少是人均医疗保健支出的 3.2 倍,在出现并发症的情况下,这一数字上升至 9.4 倍,这将给社会和家庭带来严重的经济负担[4]。

近年来,干细胞治疗在糖尿病足溃疡治疗这个领域广为应用。已经有相当多的基础以及临床研究证明在糖尿病慢性难愈性溃疡治疗领域干细胞具有极其优秀的效果及独特的优势[5]-[7]。外泌体(Exosomes),可由多种类型的细胞分泌的多泡内涵体,里面含有蛋白质、脂质、microRNAs、mRNAs、信号分子等多种不同的活性物质,通过与细胞膜的融合将其中的递质转移到另一细胞,从而实现跨细胞信息传递并调节胞间信号传导,发挥多种生物学功能。研究表明外泌体在组织修复中具有优秀的效果,甚至有观点认为干细胞来源的外泌体在组织修复的效果等同于乃至强于干细胞移植[8]-[11]。外泌体的临床应用也存在着一定的问题,一方面,靶向性不足;另一方面,外泌体外用存在效果不佳,失效的速度相当快。寻找一种合适的载体对外泌体进行靶向增强以及延长作用是解决问题的核心。

富血小板凝胶(platelet gel, PG)是富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)按照一定比例与激活剂混合凝固而成的凝胶状物质,其富含多种生长因子,具有明显地加速创面愈合作用。临床研究表明,PG 在糖尿病足溃疡方面有显著疗效,且安全性良好[12]-[14]。将外泌体装载于血小板凝胶并将其集中于伤口处释放,可以保护外泌体免受糖尿病慢性难愈性创口复杂的微环境影响,确保外泌体将集中释放于伤口处并大大增长起效时间,这将直接提升外泌体的治疗效果。

2. 方法及结果

2.1. 脐带间充质干细胞(UMSCs)的提取步骤[15]

1) 产房取无菌脐带,去掉脐带血;2) 生物安全柜中,准备器械,将脐带剪成 2 cm 一小段,用 PBS 清洗 2 次;3) 小心剥离脐带外膜,去除脐带血管(2 根动脉,一根静脉),保留 Walton 胶;4) 将剥离出的 Walton 胶用眼科剪剪碎至小于 1 mm³,加入等体积的 0.1%胶原酶 IV,37℃消化过夜;5) 第二天取出消化液,加入 0.25%胰蛋白酶,配成终浓度 0.05%的消化液,继续 37℃消化半小时;6) 加入 PBS 或基础培

培养基稀释至 200 mL，充分混匀；7) 移至离心管中，3000 rpm，10 min 离心，弃上清；8) 加入适量基础培养基重悬细胞，1500 rpm 离心 10 min，弃上清；9) 加入完全培养液 20 mL (MSC BM 培养基 + 5% Elite Gro + 双抗)重悬细胞，充分混匀；10) 将细胞种到 15 cm 培养皿中，摇匀。37℃，5% CO₂ 培养箱中培养；11) 细胞 90%融合时，进行传代。一般原代细胞在 12~14 天左右进行收集细胞。4~5 天传代一次；12) 收集第 2 代人脐带间充质干细胞做流式鉴定。

2.2. 外泌体的提取与鉴定[16]

提取：外泌体的提取是一个精细且复杂的过程，旨在从细胞培养上清液、血液、尿液或其他体液中高效、纯净地分离外泌体。常用的外泌体提取方法主要包括以下几个步骤：1) 样本预处理；2) 密度梯度离心或超速离心；3) 超滤或过滤；4) 鉴定与验证。

外泌体提取步骤：1) 将第 2 代或第 3 代的细胞种皿，采用无外泌体血清培养细胞，收集细胞上清液；2) 收集的上清液按照(图 1)的操作流程进行提取。



Figure 1. Exosome separation process
图 1. 外泌体分离流程

外泌体鉴定：外泌体的鉴定是一个综合性的过程，通常涉及多个实验技术和方法，以确保所分离得到的样本确实是外泌体。根据国际囊泡协会(MISEV)的规定和推荐，外泌体鉴定的步骤大致可以分为以下几方面：

- 1) 形态学鉴定：电子显微镜(EM)观察：使用透射电子显微镜(TEM)直接观察样本，寻找直径约为 30~150 纳米的典型杯状或圆形膜结构的囊泡，这是外泌体的直接形态特征(图 2)。
- 2) 大小和颗粒度分析：纳米颗粒追踪分析(NTA)：通过动态光散射技术测量外泌体的大小分布和浓度，验证是否大部分颗粒位于外泌体的典型尺寸范围内(通常 30~150 nm) (图 3)。动态光散射(DLS)：另一种测量颗粒大小的方法，但不如 NTA 精确于分辨外泌体的大小分布。
- 3) 蛋白质标志物的 Western Blot (WB)分析：选择外泌体特有的标志蛋白进行检测，如跨膜蛋白 CD9、CD63、CD81 和胞质蛋白 Alix、TSG101 等，同时建议包括至少一个阴性对照蛋白(非外泌体标志蛋白)，如 GRP94、EEA1 等，以排除非外泌体污染。这一步骤不仅确认了外泌体的存在，也通过特定蛋白的表达情况提供了外泌体纯度的信息。

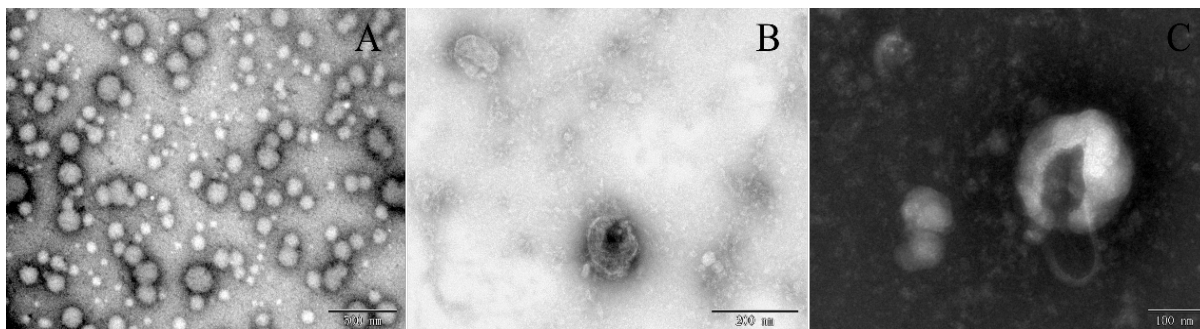


Figure 2. Electron microscopy of exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells

图 2. 脐带间充质干细胞来源的外泌体的电镜检测图

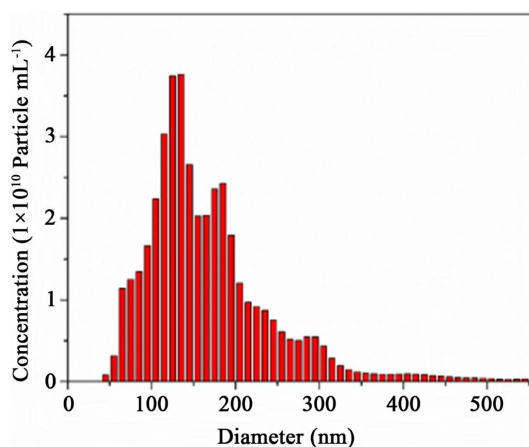


Figure 3. The relationship between particle size distribution and concentration of the sample

图 3. 样品的粒径分布与浓度关系曲线

4) 蛋白质组学分析：通过质谱技术对分离的外泌体蛋白质进行深度分析，以获得更全面的蛋白质组成信息，进一步确认其外泌体特性，并探索潜在的生物标志物。

5) RNA 分析：测定外泌体中的 microRNA、mRNA 或 lncRNA 等核酸内容物，因为它们是外泌体的重要功能性成分，能够反映细胞状态和功能。

6) 浮力密度梯度离心：使用蔗糖梯度或碘克沙密度梯度离心分离外泌体，根据它们的密度特性进行纯化，随后可结合上述方法进一步鉴定。

每个步骤都有其特定的作用和局限性，因此在实际鉴定过程中，通常会结合多种方法以确保鉴定结果的准确性。值得注意的是，随着技术进步，新的鉴定方法也在不断出现，如流式细胞术对外泌体的分析等。

2.3. 外泌体载体(富血小板凝胶)制备流程

1) 血液采集与富血小板血浆(PRP)制备：使用含有 EDTA 采血装置采集患者外周静脉血。对采集的血液进行离心分离，去除红细胞和其他细胞成分，从而获得富含血小板的血浆(PRP)。这一过程需要特定的离心速度和时间设定(4000 转、5 min)。

2) 凝血酶溶液的制备取凝血酶冻干粉，并按照每 1000 单位凝血酶配以 1~2 毫升 10%葡萄糖酸钙溶液的比例混合，制成凝血酶溶液。葡萄糖酸钙作为辅助因子，帮助启动凝血过程。

3) 步骤 2 得到的富血小板血浆(PRP)及步骤 3 制备的凝血酶溶液按体积比 10:1 混合均匀混合后，血小板将在凝血酶的作用下开始聚集，形成凝胶状物质，即富血小板凝胶。

4) 步骤3制备血小板凝胶同时加入一定比例的已经提取的外泌体,即可形成外泌体与血小板凝胶复合体(图4)。



Figure 4. Preparation of exosome and platelet gel complex

图 4. 外泌体与血小板凝胶复合体制备

2.4. 细胞划痕实验用于验证外泌体具有促进细胞迁移能力

1) 准备工作: 取出无菌的 6 孔板, 用 marker 笔在孔底均匀划上平行线, 距离约 0.5 cm, 确保每次拍照位置一致。预先计算并调整细胞密度, 通常每孔加入约 5×10^5 个细胞, 具体数量需根据细胞类型和实验需求调整, 确保细胞在过夜培养后能达到约 80% 汇合。

2) 细胞培养: 将调整好的细胞悬液均匀铺板, 放入培养箱中培养, 直至细胞完全融合成单层, 一般需要过夜或更长时间。

3) 制造划痕: 第二天, 当细胞完全融合成单层后, 使用直尺引导下的 10 μ L 枪头尖端或类似的工具轻轻在细胞单层上划一条直线, 制造一个空白区域(“划痕”)。用 PBS (磷酸盐缓冲盐水) 轻轻洗涤细胞板 3 次, 以去除松动的细胞碎片和死细胞。

4) 拍照记录: 在制造划痕前后立即拍照记录, 确保使用同一放大倍数和位置。根据实验设计, 后续在特定时间点(如 6 小时、12 小时、24 小时等)重复拍照。

培养 HUVE, 进行细胞划痕实验。分为对照组、外泌体组、外泌体 + 血小板组、血小板组。观察 24 h。可见血小板组、外泌体组、血小板 + 外泌体组均比控制组生长速度更高(图 5)。

2.5. 外泌体结合血小板凝胶治疗糖尿病足溃疡

选取合适的糖尿病足患者, 经过常规糖尿病足清创, 抗感染治疗后, 根据糖尿病足溃疡面积, 计算外泌体结合血小板凝胶需要治疗量, 通过特制装置将其覆盖固定于糖尿病足溃疡处(图 6)。

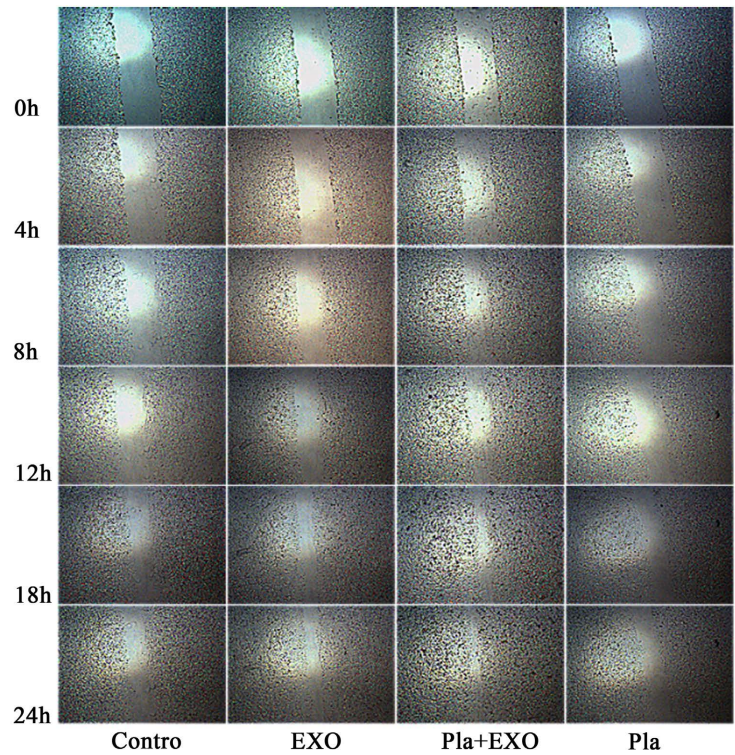


Figure 5. Cell scratch experiment
图 5. 细胞划痕实验



Figure 6. Clinical application of exosome binding platelet gel in diabetic foot patients
图 6. 外泌体结合血小板凝胶在糖尿病足患者中临床应用

3. 总结与展望

本文所提到的外泌体结合血小板凝胶治疗糖尿病足溃疡是一种新型的治疗方法，它将外泌体的生物学特性和血小板凝胶的促进组织修复能力相结合，旨在能更有效地促进糖尿病足溃疡的愈合。理论上将外泌体与血小板凝胶结合起来使用，可以进一步增强其治疗潜力[17]。外泌体可以提供额外的生物活性信号来优化细胞微环境，而血小板凝胶则作为载体，不仅提供结构支持，还能局部释放生长因子，两者协同作用可能更加有效地促进糖尿病足溃疡的愈合，减少感染风险，缩短愈合时间，并可能降低截肢率。本文所使用的研究方法可能为相关的研究提供一定的参考及借鉴。目前，关于外泌体结合血小板凝胶的具体临床研究和数据还在积累之中。随着再生医学和生物技术的进步，这有望为糖尿病足溃疡患者带来新的治疗希望。

基金项目

海南省重点研发计划项目(ZDYF2021SHFZ080)。

参考文献

- [1] Mishra, S.C., Chhatbar, K.C., Kashikar, A. and Mehndiratta, A. (2017) Diabetic Foot. *BMJ*, **359**, j5064. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5064>
- [2] Armstrong, D.G., Tan, T., Boulton, A.J.M. and Bus, S.A. (2023) Diabetic Foot Ulcers. *JAMA*, **330**, 62-75. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.10578>
- [3] Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B.B., *et al.* (2022) IDF Diabetes Atlas: Global, Regional and Country-Level Diabetes Prevalence Estimates for 2021 and Projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **183**, Article ID: 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
- [4] Al-Maskari, F., El-Sadig, M. and Nagelkerke, N. (2010) Assessment of the Direct Medical Costs of Diabetes Mellitus and Its Complications in the United Arab Emirates. *BMC Public Health*, **10**, Article No. 679. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-679>
- [5] Yu, Q., Qiao, G., Wang, M., Yu, L., Sun, Y., Shi, H., *et al.* (2022) Stem Cell-Based Therapy for Diabetic Foot Ulcers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, Article 812262. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.812262>
- [6] Nalisa, D.L., Moneruzzaman, M., Changwe, G.J., Mobet, Y., Li, L.P., Ma, Y.J., *et al.* (2022) Stem Cell Therapy for Diabetic Foot Ulcers: Theory and Practice. *Journal of Diabetes Research*, **2022**, Article ID: 6028743. <https://doi.org/10.1155/2022/6028743>
- [7] Cao, Y., Yan, J., Dong, Z., Wang, J., Jiang, X., Cui, T., *et al.* (2023) Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Are Ideal for the Cell-Based Treatment of Refractory Wounds: Strong Potential for Angiogenesis. *Stem Cell Reviews and Reports*, **20**, 313-328. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10641-y>
- [8] Ma, K., Luo, C., Du, M., Wei, Q., Luo, Q., Zheng, L., *et al.* (2024) Advances in Stem Cells Treatment of Diabetic Wounds: A Bibliometric Analysis via Citespace. *Skin Research and Technology*, **30**, e13665. <https://doi.org/10.1111/srt.13665>
- [9] Levy, D., Abadchi, S.N., Shababi, N., Ravari, M.R., Pirolli, N.H., Bergeron, C., *et al.* (2023) Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Wound Repair in a Diabetic Mouse Model via an Anti-inflammatory Immunomodulatory Mechanism. *Advanced Healthcare Materials*, **12**, e2300879. <https://doi.org/10.1002/adhm.202300879>
- [10] Yu, L., Qin, J., Xing, J., Dai, Z., Zhang, T., Wang, F., *et al.* (2023) The Mechanisms of Exosomes in Diabetic Foot Ulcers Healing: A Detailed Review. *Journal of Molecular Medicine*, **101**, 1209-1228. <https://doi.org/10.1007/s00109-023-02357-w>
- [11] Merino-González, C., Zuñiga, F.A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., *et al.* (2016) Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application. *Frontiers in Physiology*, **7**, Article 24. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00024>
- [12] Peng, G.L. (2019) Platelet-rich Plasma for Skin Rejuvenation. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, **27**, 405-411. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2019.04.006>
- [13] Huber, S.C., de Moraes Martinelli, B., Quintero, M., de Paula, L.Í.S., Cataldo, J.L., de Lima Montalvão, S.A., *et al.* (2021) A Case Series of Platelet Rich Plasma in Chronic Venous Ulcers. *Regenerative Therapy*, **18**, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2021.03.005>
- [14] Li, W., Wang, Q., Bai, X. and Xu, J. (2022) Autologous Platelet-Rich Gel in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: A Retrospective Study. *Medicine*, **101**, e31701. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000031701>
- [15] Markov, A., Thangavelu, L., Aravindhan, S., Zekiy, A.O., Jarahian, M., Chartrand, M.S., *et al.* (2021) Retracted Article: Mesenchymal Stem/stromal Cells as a Valuable Source for the Treatment of Immune-Mediated Disorders. *Stem Cell Research & Therapy*, **12**, Article No. 192. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02265-1>
- [16] Wu, X., Showiheen, S.A.A., Sun, A.R., *et al.* (2019) Exosomes Extraction and Identification. *Methods in Molecular Biology*, **2054**, 81-91. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9769-5_4
- [17] Bakadia, B.M., Qaed Ahmed, A.A., Lamboni, L., Shi, Z., Mutu Mukole, B., Zheng, R., *et al.* (2023) Engineering Homologous Platelet-Rich Plasma, Platelet-Rich Plasma-Derived Exosomes, and Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes-Based Dual-Crosslinked Hydrogels as Bioactive Diabetic Wound Dressings. *Bioactive Materials*, **28**, 74-94. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.05.002>