

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cxyb.003279

人羊膜上皮细胞通过抑制中性粒细胞胞外诱捕网促进糖尿病创面愈合

张春林¹,程庆丰²,张莹宵²,杜志鹏²,胡金波²,唐紫薇²

(1. 陆军军医大学第二附属医院内分泌科,重庆 400037;2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘要】目的:糖尿病创面愈合延迟的特征是多细胞功能障碍及中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)的形成。既往研究表明人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)可通过调节成纤维细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞促进糖尿病创面愈合。但hAECs对NETs是否有影响仍不得而知。本研究旨在阐明hAECs对NETs的影响。**方法:**体内:糖尿病大鼠模型通过链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导,在背部建立创面,用hAECs混悬液或PBS(Phosphate buffered saline)对创面进行干预后观察第5和第10天的愈合率,同时检测创面组织NETs相关的生物标志物。体外:提取人中性粒细胞,并用佛波醇(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)刺激,建立体外NETs模型。分别用24、48 h人羊膜上皮细胞的条件培养基(conditioned medium for human amniotic epithelial cells, CM-hAECs)干预中性粒细胞,观察其对NETs生成的作用。**结果:**在第5和第10天,hAECs细胞混悬液干预的创面愈合率均显著高于PBS干预的创面[(32.61 ± 2.48)% vs. (20.80 ± 2.70)% , $P=0.028$; (86.35 ± 0.92)% vs. (61.52 ± 3.70)% , $P<0.001$],且最佳浓度为 5×10^5 个/mL。hAECs细胞混悬液干预组创面组织中NETs相关蛋白组蛋白3(citrullinated histone, Cit-H₃)和中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)的表达在第5天和第10天降低。体外研究表明,hAECs的条件培养基可抑制NETs的生成。**结论:**hAECs可能通过抑制NETs的生成促进糖尿病创面的愈合。

【关键词】糖尿病;人羊膜上皮细胞;创面愈合;中性粒细胞胞外诱捕网

【中图分类号】R587.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-02-01

Human amniotic epithelial cells promote diabetic wound healing by inhibiting neutrophil extracellular traps

Zhang Chunlin¹, Cheng Qingfeng², Zhang Yingxiao², Du Zhipeng², Hu Jinbo², Tang Ziwei²

(1. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Army Medical University;

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】**Objective:** Delayed diabetic wound healing is characterized by dysfunction of multiple cells and formation of neutrophil extracellular traps (NETs). Previous studies demonstrated that human amniotic epithelial cells (hAECs) can promote diabetic wound healing through regulating fibroblasts, macrophages, and vascular endothelial cells. Whether hAECs have any impact on NETs remains unknown. Our research aims to clarify the effect of hAECs on NETs. **Methods:** Wounds were created on the dorsa of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat models. The wounds were treated with hAECs suspension or PBS and then observed for healing rates on days 5 and 10. Meanwhile, NETs-related biomarkers in the wound tissue were measured. Human neutrophils were extracted and stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate to establish an *in vitro* model of NETs. The neutrophils were then treated with conditioned medium for human amniotic epithelial cells (CM-hAECs) at 24 and 48 h to observe its impact on NETs production. **Results:** The wound healing rates were significantly higher for wounds treated with hAECs suspension than for those treated with PBS on days 5 [(32.61 ± 2.48)% vs. (20.80 ± 2.70)% , $P=0.028$] and 10 [(86.35 ± 0.92)% vs. (61.52 ± 3.70)% , $P<0.001$], with an optimal concentration of 5×10^5 /mL. The hAECs suspension-treated group had reduced expression of NETs-related proteins Cit-H₃ and NE in the wound tissue on days 5 and 10. The *in vitro* study showed that CM-hAECs can inhibit NETs production. **Conclusion:** This study suggests that hAECs may promote diabetic wound healing by inhibiting NETs production.

作者介绍:张春林,Email:297197255@qq.com,

研究方向:糖尿病足。

通信作者:唐紫薇,Email:204191@hospital.cqmu.edu.cn。

基金项目:重庆市科卫联合资助项目(2022MSXM072);重庆市体育局资助项目(编号:D202116);重庆市糖尿病足临床诊疗中心、重庆医科大学未来医学青年创新团队支持计划资助项目(编号:W0187)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230717.1546.030.html>
(2023-07-18)

of 5×10^5 /mL. The hAECs suspension-treated group had reduced expression of NETs-related proteins Cit-H₃ and NE in the wound tissue on days 5 and 10. The *in vitro* study showed that CM-hAECs can inhibit NETs production. **Conclusion:** This study suggests that hAECs may promote diabetic wound healing by inhibiting NETs production.

【Key words】diabetes; human amniotic epithelial cells; wound healing; neutrophil extracellular trap

糖尿病患者的创面愈合受损,糖尿病足溃疡会导致极高的发病率、截肢率和死亡率风险,给患者的生活带来严重影响,降低患者的生活质量,增加患者的医疗成本,也是造成社会沉重负担的重大卫生问题^[1]。糖尿病足溃疡患者的创面管理是临床和社会高度关注的问题,愈合延迟或受损的机制使其成为研究重点的关键。糖尿病患者代谢葡萄糖的能力下降,导致其处于高血糖状态,使创口愈合过程进一步复杂化,这可能会导致创口愈合过程停滞^[2]。且糖尿病是一种多方面代谢紊乱疾病,可能合并脂代谢紊乱、免疫调节功能异常、胰岛素抵抗等,这些功能的紊乱均可能使创面长期处于慢性炎症状态,从而延迟创面愈合。

自身免疫系统的第一道防线是中性粒细胞,它们最初被募集到创面床,虽然中性粒细胞有助于清除微生物,但在动物模型中,中性粒细胞的耗竭也可能加速创面愈合^[3]。局部感染在糖尿病足溃疡中很常见,它可能会触发中性粒细胞活化和中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)释放^[4]。NETs是一种DNA网状结构,其网状结构附着多种蛋白,如中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、组蛋白3(citrullinated histone, Cit-H₃)等^[4],NETs利用这种网状结构来捕获和清除细菌。既往研究显示,糖尿病患者伴有并发症如外周动脉粥样硬化^[5]、骨髓炎^[6]或糖尿病足^[7]者NETs的生成明显高于没有并发症的患者。NETs还与糖尿病或非糖尿病患者创面愈合延迟相关^[7]。有研究表明,抑制NETs生成可促进糖尿病创面愈合^[8],其机制多样,并无统一论。因此在评估糖尿病创面治疗效果时,NETs是一个新的研究热点。

人羊膜上皮细胞(human amniotic epithelial cells, hAECs)取材来源较容易,经济实惠,具有多种干细胞特性,且无免疫源性、无致瘤性,因而广泛用于临床创面修复^[9-12]。既往研究表明hAECs可通过促进血管生成和胶原生成来促进糖尿病创面愈合^[13-14]。hAECs在创面愈合过程中是否通过调节中性粒细胞的功能尚不清楚。考虑到NETs对创面愈合的影响以及对NETs的靶向干预可促进创面愈合,本研究旨在探索hAECs对NETs生成的影响及其与创面愈合的关系。

为了探索hAECs是否通过抑制NETs生成促进创面愈合,本研究确定了刺激中性粒细胞的最佳

波醇(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)浓度,以便在体外建立NETs模型。本研究分析了hAECs条件培养基在不同培养时间下对NETs生成的影响。此外,本研究使用hAECs混悬液或标准治疗评估了链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病大鼠创面愈合率和创面组织中NETs相关蛋白的表达。

1 材料与方法

1.1 实验动物

所有动物操作遵循重庆医科大学动物实验中心操作原则,并通过重庆医科大学动物实验中心动物伦理会审查(2022-K531)。选取6~8周的SD雄性大鼠(购于重庆医科大学动物实验中心),体质量(200±20)g,IVC(Individual ventilated cages)级环境饲养,室温26℃,昼夜循环12 h与正常的饮食和饮水,腹腔注射STZ溶液(中国北京索莱宝,S8050)连续3 d(STZ用pH4.2的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液稀释成1%的溶液,30 mg/kg)。造模成功后用血糖仪(中国雅培)测大鼠尾静脉血糖。成功建模的标准是尾静脉血糖≥16.7 mmol/L,之后标准喂养7 d,复测大鼠尾静脉血糖仍≥16.7 mmol/L。

1.2 创面建立及干预

麻醉后在大鼠背部做3个正方形(10 mm×10 mm)标记,局部消毒,再沿着标记剪去全层皮肤直至皮下筋膜。分为实验组(3只)和对照组(3只)。实验组处理:将提取的hAECs消化,同时用无菌PBS(Phosphate buffered saline)洗涤3次,再用无菌PBS重悬。将重悬的细胞悬液以每个创面200 μL(分别予以低、中、高浓度,其中细胞密度分别为2.5×10⁵、5×10⁵、10×10⁵个/mL)的剂量注射在实验组糖尿病大鼠创面的周围皮下。对照组处理:给予等剂量无菌PBS溶液注射。干预创面后第5和第10天观察创面愈合率,同时拍照记录保存图片后计算创面愈合率(Image J软件分析)。

1.3 hAECs 分离

在无菌条件下,取足月剖宫产术中的胎盘(已全部获得产妇知情同意),钝性分离。用无菌PBS(含有1%青霉素、链霉素)洗掉羊膜上的组织碎片及附着的血液,直至羊膜变为半透明。再将其剪成小块,大小约1 mm²,加入提前预热的0.05%胰蛋白酶/0.02%EDTA,100 g离心10 min,弃上清。再加入0.05%胰酶/0.02%EDTA,充分震荡消化60 min(37℃,150 r/min),结束后用含10%胎牛血清的培养基终止消化。细胞悬液用100 μm滤网过滤后在1 000 g条件下离心10 min。重复2次后用完全培养基(含10%胎牛血清、10 ng/mL的表皮生长因子、1%青链霉素的高糖DMEM)重悬后进行细胞计数并接种到T75培养瓶中,接种密度为10×10⁴个/cm²,培养条件为37℃、饱和湿度、5%CO₂环境,记为P1代^[15]。隔1~2 d换培养基,每天用倒置显微镜观察、记录,评估细胞的生长形态和生长状态,并保存图片。取P2或P3代用于后续实验。

1.4 流式细胞分析

取中性粒细胞或 hAECs 分装到 EP 管, 1 000 r/min 离心 5 min, 0.3% BSA 室温封闭 30 min, 封闭结束后再次以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 PBS 清洗细胞 3 次后重悬于 PBS, 中性粒细胞加入直标 CD11b-PE (Biolegend, 美国, 5 μL/百万细胞), hAECs 加入 SSEA-4-APC (Biolegend, 美国, 5 μL/百万细胞)、CD29-PE (Biolegend, 美国, 5 μL/百万细胞)、CD105-PE (Biolegend, 美国, 5 μL/百万细胞)、CD45-APC (Biolegend, 美国, 5 μL/百万细胞), 按说明书稀释抗体 (5 μL/百万细胞) 后室温避光孵育 60 min。孵育结束后室温 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 重悬后混匀上机检测。

1.5 hAECs 的条件培养基 (conditioned medium for human amniotic epithelial cells, CM-hAECs)

将提取的 P1 代或以后生长良好的 hAECs 接种到 T75 培养瓶里, 接种密度为 1×10^5 个/cm², 观察到细胞完全贴壁生长, 并融合 80% 以上后将完全培养基更换为无血清的高糖 DMEM 培养基, 继续在同一培养箱中培养 24 或 48 h 后收集培养基, 300g 室温下离心 5 min, 去除杂质, 收集上清用 0.45 μm PVDF 膜的针头过滤器过滤后置于 -80 °C 冰箱保存用于后续试验。

1.6 中性粒细胞分离提取、体外 NETs 模型建立和实验分组

1.6.1 中性粒细胞分离提取

按 Polymorphprep™ 分离液的试剂说明书提取人中性粒细胞。具体操作流程可详见^[15]。人中性粒细胞提取完成后用 1640 培养基重悬细胞悬液并计数, 根据后续实验需要接种到孔板中。

1.6.2 体外 NETs 模型建立

将提取的中性粒细胞悬液至 6 孔板或者 12 孔板中, 密度为 5×10^4 个/mL; 随后加入 25、50、75、100、125 nmol/L PMA 干预 120 min, 干预结束后轻柔去除培养基; 实验结束前 30 min 加入浓度为 1 μL/mL Sytox Green 荧光染色, 后用倒置显微镜观察 NETs 形态。

1.6.3 实验分组

取无菌 6 孔板, 按每孔 5×10^4 个/mL 的密度将前述提取的中性粒细胞接种于 12 孔板中。PMA 和干预物质同时加入, 置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。各分组及干预方式见表 1。给予前述处理后培养箱里孵育 90 min, 加入浓度为 1 μL/mL Sytox Green, 放入培养箱中孵育 30 min 后, 倒置显微镜记录 NETs 生成量的变化。

表 1 各分组及干预方式

干预方式	CTL	24 h CM-hAECs 组	48 h CM-hAECs 组	Blank
25 nmol/L PMA	+	+	+	-
24 h CM-hAECs	-	+	-	-
48 h CM-hAECs	-	-	+	-
高糖 DMEM	+	-	-	+

1.7 dsDNA 测定

中性粒细胞干预后用酶切方法提取 dsDNA 定量, 用 PicoGreen 试剂盒测定。dsDNA 沉淀物通过 PicoGreen 溶液溶于 TE 缓冲液中, 并在 37 °C 下孵育 5 min。测量荧光强度采用荧光分光光度仪 (480 nmol/L), dsDNA/NETs 含量 (单位为 ng/mL) 通过标准曲线方程计算。

1.8 Western blot

按照全蛋白提取试剂盒 (中国北京索莱宝, BC3710-50T) 说明书提取创面组织和细胞蛋白。再按 BCA 试剂盒使用说明书检测目标蛋白浓度。将质量为 20 μg 的蛋白样品上样到 SDS-PAGE, 电泳后将蛋白转至 PVDF 膜, 之后用快速封闭液室温下封闭 20 min, TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 后与 Cit-H₃ (Abcam, 1:1 000)、NE (Abcam, 1:1 000)、β-actin (proteintech, 1:5 000) 的一抗分别在 4 °C 房间过夜。TBST 洗涤 3 次后, 二抗室温孵育 1 h。用凝胶成像仪检测。使用 Image J 软件对条带的强度进行定量。

1.9 统计学处理

本研究中的所有实验均重复不少于 3 次。数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用非配对 *t* 检验或单因素方差分析。所有统计分析作图均采用 Prism 8.0 进行。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 hAECs 体外培养的形态

hAECs 体外成功分离后接种至培养瓶中, 培养约 12 h 后显微镜下可见散在成团细胞贴壁生长, 形似三角形、多边形或卵圆形, 细胞核圆, 边界清楚。随培养时间延长, 细胞增殖速度逐渐加快, 细胞数逐渐增多, 培养约 8 d 细胞可融合至 90% 以上 (图 1)。显微镜下可见呈铺路石样排列。将细胞消化传代后细胞仍可继续增殖, 增殖速度较快, 但细胞增殖能力约在 P4 代左右变差, 并逐渐老化。

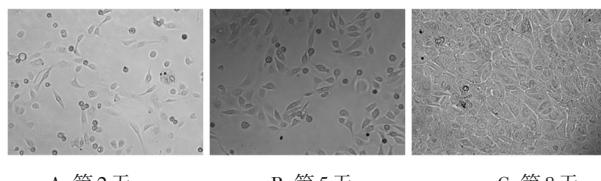


图 1 hAECs 生长形态显微镜下大体观 (200 \times)

2.2 hAECs 的细胞表型

将生长状态好的 hAECs 消化分离后使用流式细胞仪分析检测。结果表明, 分离培养的 hAECs 可高表达 SSEA-4、CD29, 不表达 CD45、CD105, 这说明实验分离培养的 hAECs 纯度较高, 可用于后续实验研究。细胞表型表达结果与既往研究报道一致^[16]。具体如图 2 所示。

2.3 hAECs 促进糖尿病大鼠创面愈合

2.3.1 糖糖尿病大鼠创面组织 HE 染色 建立创面当日 (Day 0) 取材为各组皮肤全层组织, 可见完整表皮, 无肉芽生长 (图 3)。第 5 天 (Day 5) 取材为各组肉芽组织, 无表皮, 镜下呈鲜红色, 垂直创面生长, hAECs 混悬液 (低、中、高浓度组) 干预组肉芽组织生长明显均优于对照组, 低、中浓度组肉芽组织多于高浓度组 (图 4)。第 10 天 (Day 10) 取材为各组肉芽组织, 对照组和高浓度组可见少量新鲜肉芽垂直创面生长, 中浓度组见大量新鲜肉芽, 低浓度组除大量新生肉芽还可见部分爬行的上皮 (图 5)。

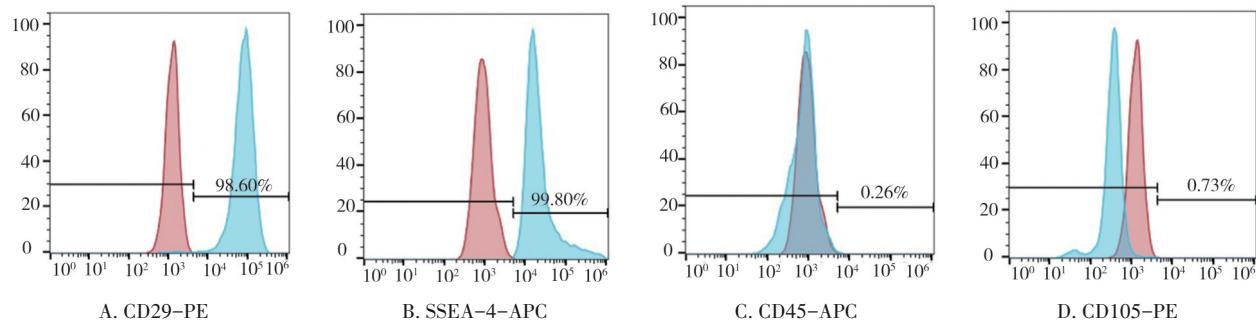
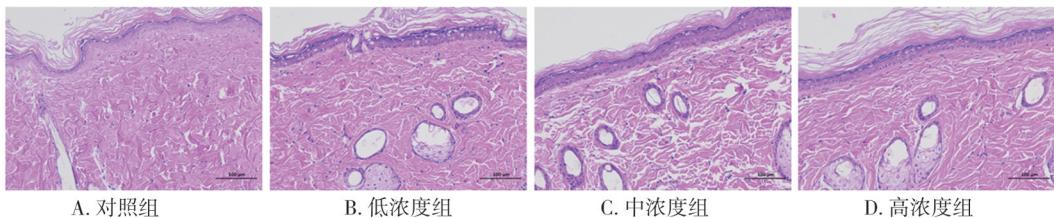
图2 流式细胞仪分析hAECs的细胞表型($n=3$)

图3 第0天糖尿病大鼠创面组织HE染色

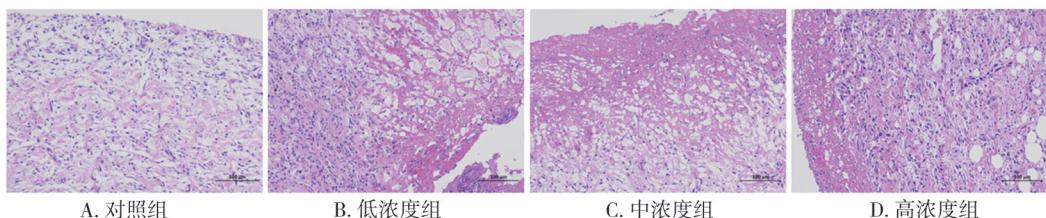


图4 第5天糖尿病大鼠创面组织HE染色

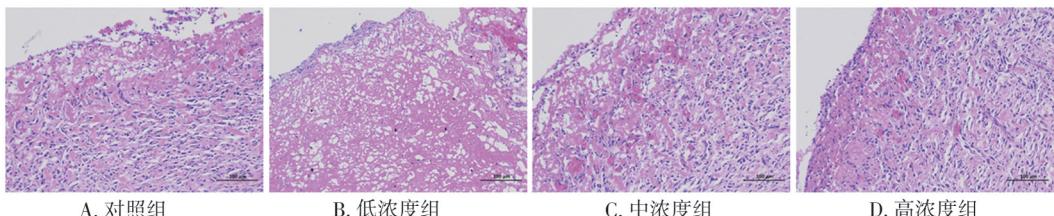


图5 第10天糖尿病大鼠创面组织HE染色

2.3.2 糖尿病大鼠创面愈合率比较 第5天创面愈合率：低、中、高浓度hAECs干预组所对应创面愈合率分别为 $(39.91 \pm 4.11)\%$ 、 $(32.61 \pm 6.57)\%$ 、 $(27.84 \pm 2.27)\%$ ，对照组愈合率为 $(20.80 \pm 10.46)\%$ 。低、中浓度hAECs干预创面后第5天愈合率较对照组高，且有统计学差异($F=4.475, P=0.048$ vs. $P=0.043$)，但低、中浓度2组间比较无明显差异($P=0.749$)；高浓度hAECs干预组跟对照组相比，第5天创面愈合率无明显统计学差异($P=0.734$) (图6A)。结果显示低、中、高浓度hAECs干预第10天创面愈合率分别为 $(87.21 \pm 3.99)\%$ 、 $(86.35 \pm 2.25)\%$ 、 $(67.58 \pm 6.76)\%$ ，对照组为 $(61.52 \pm 12.80)\%$ ，统计分析结果发现低、中浓度hAECs干预组第10天创面愈合率明显高于对照组，并具有统计学差异($F=11.290, P=0.003$ vs. $P=0.000$)，高浓度hAECs与对照组相比，第10天创面愈合率无统计学差异($P=0.778$) (图6B)。通

过实验筛选出最适宜hAECs浓度为中浓度(细胞密度为 5×10^5 个/mL)，此浓度作为后续实验处理组，干预糖尿病大鼠创面后与PBS组对照，发现hAECs可加速创面愈合，且随着时间延长效果更明显(图6C、D)。

2.4 hAECs抑制糖尿病大鼠创面组织NETs的生成

分别在第5、第10天取实验组(细胞密度为 5×10^5 个/mL)与对照组的创面组织，通过Western blot方法评估NETs相关蛋白Cit-H₃和NE的表达水平。结果显示，第5和第10天hAECs干预组糖尿病大鼠创面组织的NETs相关蛋白Cit-H₃表达较对照组明显减少，并有统计学差异($P=0.047$ vs. $P=0.003$)；第5、第10天hAECs干预组创面组织的NETs相关蛋白NE表达较对照组明显减少($P=0.027$ vs. $P=0.005$)，表明hAECs可能通过抑制NETs促进伤口愈合(图7)。

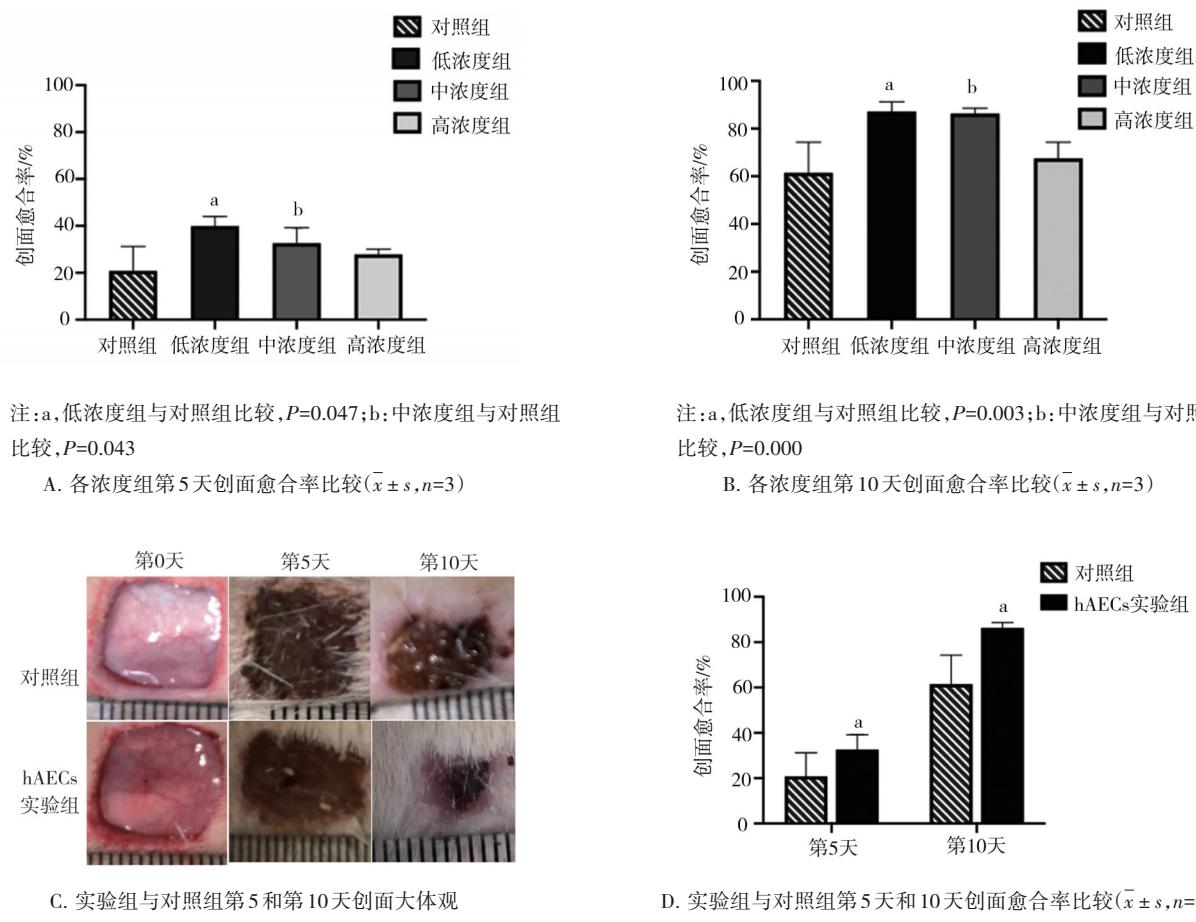
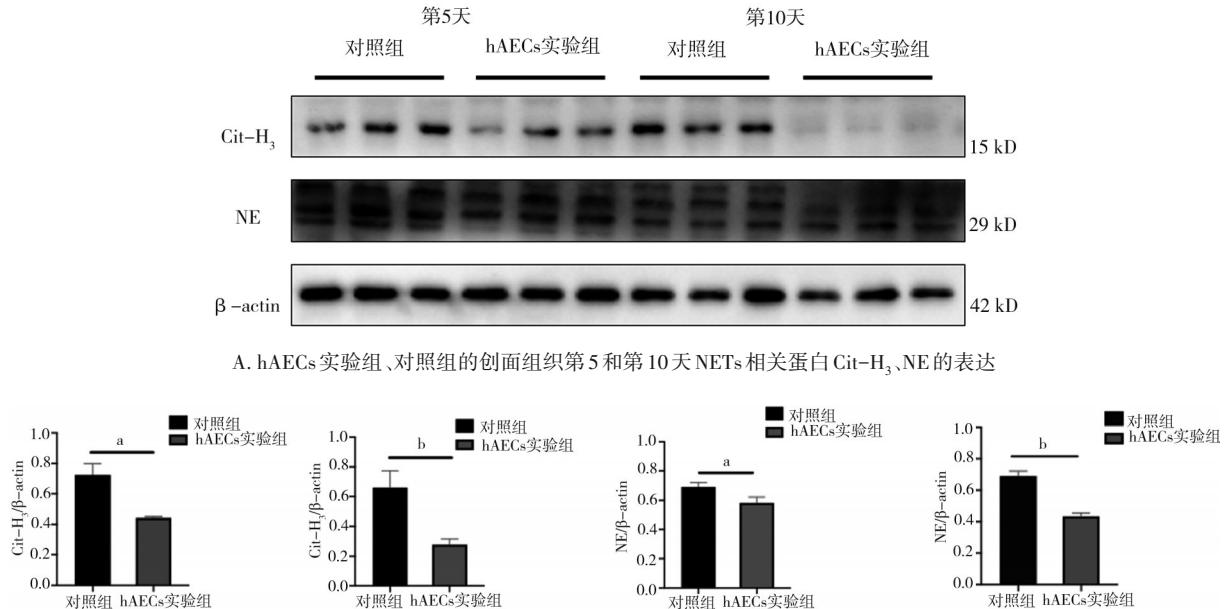
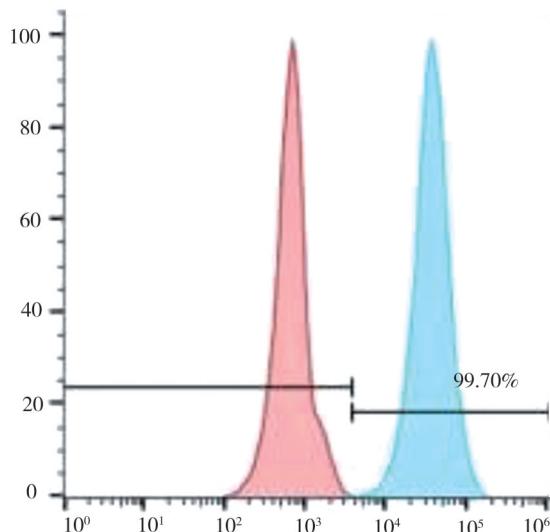


图6 糖尿病大鼠创面愈合率比较

B. 2组大鼠第5和第10天创面组织NETs相关蛋白Cit-H₃和NE的表达及定量分析图7 2组大鼠第5和第10天创面组织NETs相关蛋白Cit-H₃和NE的表达及定量分析($\bar{x} \pm s, n=3$)

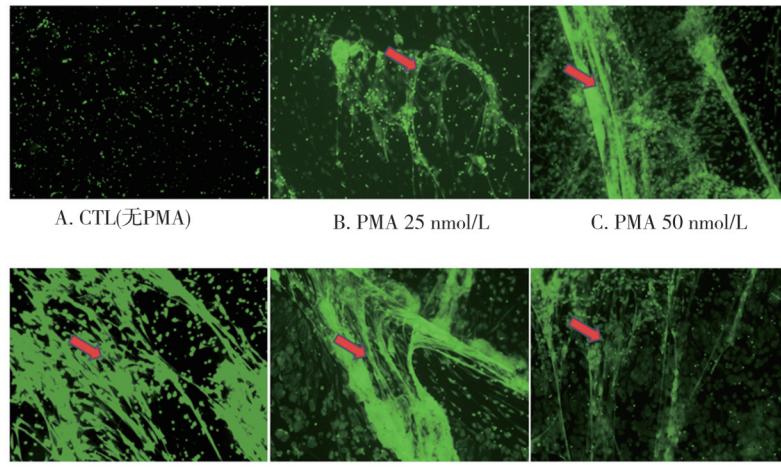
2.5 体外NETs模型的建立

通过流式细胞分析仪检测分离提取的原代人中性粒细胞,CD11b 阳性表达率为 99.70%,纯度超过 95%,可供后续实验研究使用(图 8)。提取的中性粒细胞分别用 0 nmol/L、25、50、75、100、125 nmol/L PMA 刺激中性粒细胞 120 min,通过 Sytox Green 荧光显示 NETs 的形态,显微镜下观察到 NETs 形态为绿色网状和丝状结构(图 9 红色箭头所指),证明成功体外诱导 NETs 模型。实验显示根据 PMA 浓度的增加,NETs 生成量逐渐增多,当 PMA 浓度为 75 nmol/L 时 NETs 生成量最多(图 9)。考虑到最大浓度的 PMA 可能会导致过多 NETs 产生,从而影响观测条件培养基的作用,结合既往相关文献的报道,实验最终选择 PMA 最佳浓度为 25 nmol/L 用于体外诱导 NETs 生成模型来进行后续的实验。



注:通过流式细胞仪分析中性粒细胞 CD11b-PE 的阳性细胞占比

图 8 流式细胞仪分析中性粒细胞的细胞表型($n > 3$)



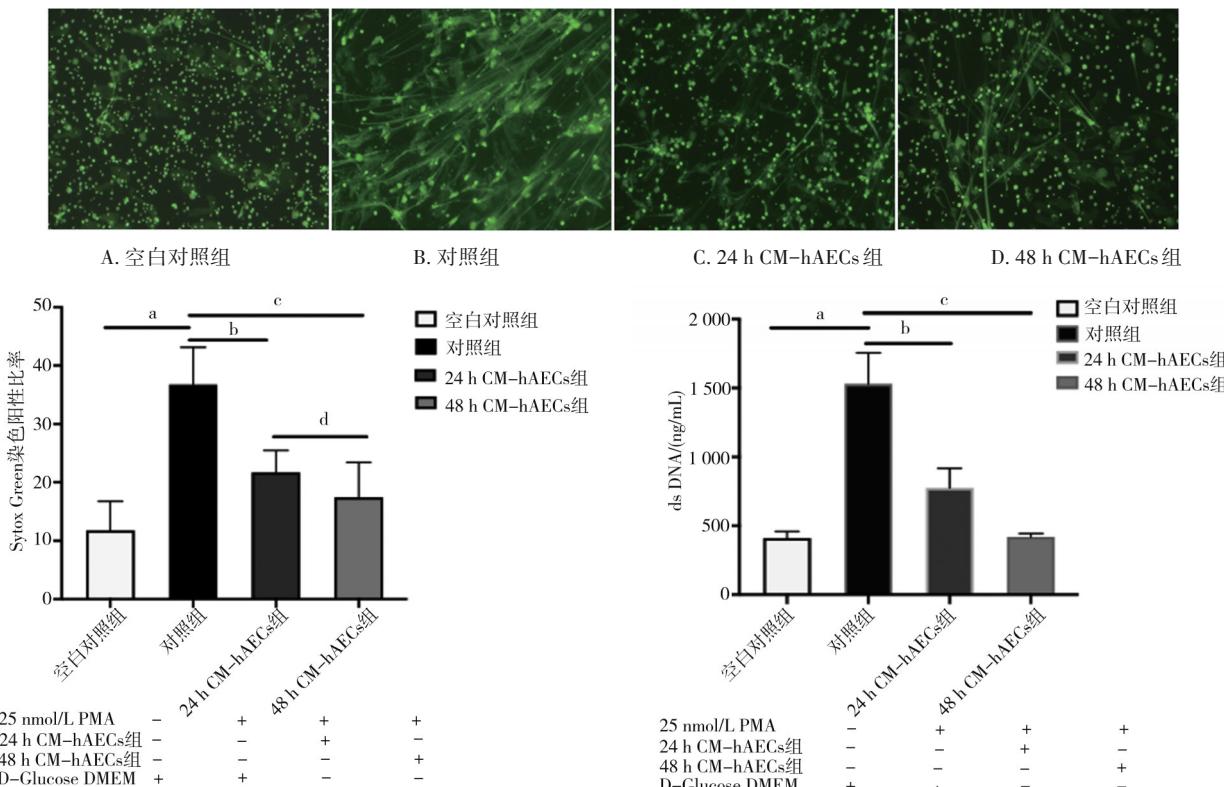
2.6 CM-hAECs 可抑制 PMA 诱导的 NETs 生成

Sytox Green 荧光染色结果显示对照组与空白对照组相比较,对照组 NETs 的生成显著增多,并有统计学差异($P < 0.001$),提示体外 NETs 模型成功建立。24 h CM-hAECs 组、48 h CM-hAECs 组与对照组相比,NETs 生成量显著减少,有统计学差异(21.75 ± 0.71 vs. 17.43 ± 1.22 vs. 36.74 ± 1.17 , $F = 138.000$, $P < 0.001$)。24 h CM-hAECs 组、48 h CM-hAECs 组比较,48 h CM-hAECs 组抑制 NETs 更明显,且具有统计学差异(21.75 ± 0.71 vs. 17.43 ± 1.22 , $P = 0.023$)(图 10)。按以上方案分组后,给予干预措施 120 min 后进行酶切,提取每组的 dsDNA 通过 PicoGreen 与 dsDNA 结合发出的荧光值计算分析得到 dsDNA 浓度。结果显示对照组的 dsDNA 浓度明显高于空白对照组,且有统计学差异($P = 0.000$),这证明 NETs 的体外模型成功建立。24 h CM-hAECs 组、48 h CM-hAECs 组的 dsDNA 浓度明显低于对照组(775.42 ± 141.66 vs. 419.77 ± 24.39 vs. 1528.87 ± 225.16 , $F = 14.950$, $P = 0.006$, $P = 0.000$)。尽管 24 h CM-hAECs 组和 48 h CM-hAFCs 组之间的 dsDNA 浓度没有显著差异,但仍然可以检测到下降趋势(图 10)。

2.7 CM-hAECs 对 NETs 相关蛋白的影响

与对照组相比,24 h CM-hAECs 组和 48 h CM-hAFCs 组中 Cit-H₃ 的表达显著降低($P = 0.043$ vs. $P = 0.017$)。同时 NE 的表达也受到抑制。与对照组相比,24 h CM-hAECs 组被抑制了 32.56%($P = 0.049$)。48 h CM-hAECs 组抑制 NE 表达的程度更明显(46.72%, $P = 0.003$)。24 h CM-hAECs 组与 48 h CM-hAECs 组之间无统计学差异,但 48 h CM-hAECs 与 24 h CM-hAECs 相比呈下降趋势(图 11)。

图 9 不同浓度 PMA 刺激中性粒细胞生成 NETs 及定量分析



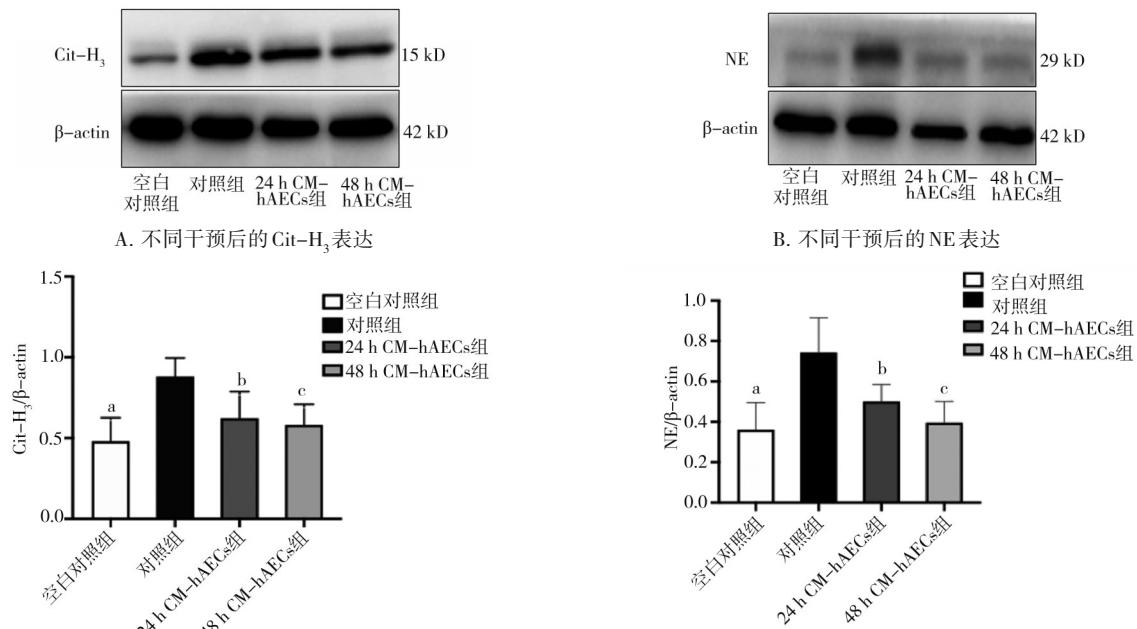
注:a, 空白对照组与对照组比较, $P<0.001$; b: 24 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P<0.001$; c: 48 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P<0.001$; d: 24 h CM-hAECs 组与 48 h CM-hAECs 组比较, $P=0.023$

E. Sytox Green 染色后用 Image J 软件对 NETs 生成的定量分析

注:a, 空白对照组与对照组比较, $P=0.000$; b: 24 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P=0.006$; c: 48 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P=0.000$

F. 用 PicoGreen 与 dsDNA 结合发出荧光, 检测 520/480 nmol/L 荧光值反映各组 dsDNA 含量 (ng/mL)

图 10 CM-hAECs 可以抑制 PMA 诱导生成的 NETs ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:a, 空白对照组与对照组比较, $P=0.016$; b: 24 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P=0.043$; c: 48 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P=0.017$

注:a, 空白对照组与对照组比较, $P=0.001$; b: 24 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P=0.049$; c: 48 h CM-hAECs 组与对照组比较, $P=0.003$

图 11 CM-hAECs 对 NETs 相关蛋白的表达及定量分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨 论

由于体内实验很容易受到不可预测因素的干扰,本研究在体外建立了纯中性粒细胞 NETosis 模型供进一步研究。目前有很多刺激物可用于诱导 NETosis 和 NETs 的形成,如高糖、脂多糖、白细胞介素-8、PMA 等^[17]。糖尿病是一种慢性病,建立急性高血糖 NETosis 模型可能是不合理的,在诱导剂的选择上,PMA 是 NETosis 更好的诱导剂选择,因为它是用于 PKC 激活 DAG 的内源性类似物^[18],这对糖尿病并发症病理生理学改变至关重要,且 PMA 诱导 NETosis 模型也更稳定,故选择 PMA 作体外 NETosis 模型的诱导剂。本研究通过 Sytox Green 荧光显示 NETs 的形态、检测 dsDNA 浓度来判断模型是否成功建立。本研究发现随着 PMA 浓度升高,NETs 的生成量逐渐增加,PMA 浓度达到 75 nmol/L 后逐渐下降,并趋于平衡,NETs 的生成量不随浓度逐渐升高而增加,这与 Chen L 等^[8]关于 25 nmol/L PMA 为最佳诱导浓度的研究结论不太相符;但总体变化趋势一致,这可能与检测方法具有一定的主观性有关,也与不确定的检测方法存在一定的相关性。体外实验通过 Sytox Green 染色显示,24 h CM-hAECs 组和 48 h CM-hAECs 组的 NETs 与对照组相比,生成量明显下降。在测定 dsDNA 浓度时也发现 24 h CM-hAECs 组和 48 h CM-hAECs 组的 NETs 生成量显著减少,Western blot 结果显示 24 h CM-hAECs 组和 48 h CM-hAECs 组的 NETs 相关蛋白 Cit-H₃、NE 的表达也明显减少。以上证据可证实 CM-hAECs 可抑制人中性粒细胞通过 PMA 诱导的 NETs 生成。虽然 24 h CM-hAECs 组和 48 h CM-hAECs 组对 NETs 的抑制无明显统计学差异,但 48 h CM-hAECs 组有下降趋势。由于条件培养基是细胞在脱离了胎牛血清情况下培养得到的,培养时间延长会导致细胞死亡,故本实验选取 48 h 作为培养时间极限,但是否更长时间的培养会获得更佳治疗效果有待后续验证。本研究首次发现 CM-hAECs 可抑制 PMA 诱导的 NETs,这与人羊膜间充质干细胞类似^[19]。本研究也首次发现条件培养基的培养时间不同,对 NETs 的作用效果也有一定的差异,这可能与条件培养基中各种细胞因子含量或者种类有相关

性。hAECs 可分泌和组成性表达如人肿瘤坏死因子诱导蛋白-6、白细胞介素-4、转化生长因子- β ^[20-21]等多种生长因子及细胞因子,也具备调节局部免疫应答的能力和具有干细胞特性^[10]。以上多重原因都有可能影响 NETs 的生成。虽然 hAECs 的生物特性可能受到培养条件及传代次数的影响,但它们在特定的培养条件下仍能充分繁殖并保持可再现的生物学特性^[22]。因此条件培养基对 NETs 生成的作用强弱可能与条件培养基中各种细胞因子含量或种类相关。

糖尿病因其具有炎症或代谢紊乱因素如高血糖,使中性粒细胞更容易发生 NETosis。在高血糖微环境下,活性氧和一些细胞因子也会诱导 NETs 的生成^[17]。而 NETosis 对糖尿病足创面愈合是有害的。创面的愈合过程非常复杂,且是一个动态过程,参与创面愈合的细胞包括多种,如中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞等^[23],而中性粒细胞吞噬作用强,能早期清除细菌和控制炎症,同时还可能通过分泌一些促炎因子增强炎症。糖尿病创面炎症反应出现失调,呈现出早期中性粒细胞反应迟钝,吞噬与趋化作用明显减弱,但相较快速愈合创面时,在中后期中性粒凋亡与 NETs 形成失衡,过多的 NETs 堆积阻碍了创面的正常愈合过程。目前尚无糖尿病大鼠创面自然愈合情况下 NETs 的动态变化和达峰时间,根据野生鼠创面的 NETs 变化过程来看,NETs 可能在创伤 1 d 后开始生成,7 d 左右达峰,随后快速下降。本研究发现,即使在第 5 天, hAECs 也能促进糖尿病大鼠创面愈合,并伴随 NETs 生成降低,这可能提示 NETs 的抑制是生成量减少而不是清除加快的结果。在浓度试验方面,本研究对比了不同浓度 hAECs 干预糖尿病大鼠创面,结果发现与对照组相比,高浓度 hAECs 组并没有表现出明显优势,考虑到与维持细胞在局部微环境中存活的物质营养有限,只能保证移植的细胞存活一定数量。而且本身的炎性创面微环境处于相对缺血缺氧状态,所以移植的细胞数量越多,一些细胞获得足够氧气、血供和营养物质的难度就越大,正常的存活率就越小,所以移植细胞数量增加未必能增加治疗效果,同时也提示 hAECs 的移植数量与治疗疗效并不是所谓的量效线性关系^[15]。本

研究分析了不同浓度 hAECs 对伤口愈合的影响,以选择最佳治疗浓度,这也是本研究的创新点。低、中浓度 hAECs 浓度 2 组间愈合率无统计学差异,结合实验数据统计分析发现中浓度干预组创面愈合率的标准差及标准误更小,变异更小,故创面愈合率更稳定,所以本研究确定中浓度细胞浓度为最佳治疗浓度。这与既往关于 hAECs 促进糖尿病创面愈合的相关研究基本一致^[14]。

糖尿病患者中有 30% 的糖尿病足溃疡是慢性创面,在糖尿病足溃疡中,由炎症、新生血管生成和细胞外基质重塑组成的正常创面愈合过程失调并停滞^[24]。损伤后中性粒细胞和单核细胞到达创口,而中性粒细胞是参与创面早期愈合的主要细胞,从微生物防御机制来看,中性粒细胞通常凋亡于 NETosis,释放浓缩聚合的染色质,形成一种特殊网状结构,也叫 NETs^[25]。然而 NETs 也会诱导组织和细胞损伤,尤其在糖尿病中,中性粒细胞更容易受到 NETosis 的影响。通过蛋白质组学分析糖尿病足溃疡患者血液中的 NETs 成分,如 NE、中性粒细胞明胶酶相关的脂质运载蛋白、Cit-H₃ 明显升高。创口中高浓度的 NETs 与感染和糖尿病足溃疡恶化有关。此外,从糖尿病足溃疡患者血液中分离的中性粒细胞检测出自发性 NETosis 增加^[3],这与本团队的研究结果一致^[15]。有研究报道 NETs 可以通过膜受体 TLR-9 诱导 PAK2 激活,经过一系列转化可促进内皮细胞向间充质细胞转化,最终阻碍新生血管生成并延迟创面愈合。NETosis 的抑制通过减少 EndMT 和促进血管生成来加速伤口愈合^[5]。NETs 也与一些感染性疾病、缺血性病变、血栓形成、慢性炎症状态和自身免疫性疾病的发生、疾病进展及预后相关^[26-29]。糖尿病足溃疡患者血液中的 NETs(ds-DNA) 明显增加,NETs 是抵抗感染的自然反应,但过量或者失调的 NETs 会导致组织损伤,造成创面上皮细胞和内皮细胞功能失调,从而形成异常新生血管和表皮。既往研究证明糖尿病足创面组织的 NE 水平显著升高,血清和创面组织的 NE 水平与创面延迟愈合有明显相关性,故抑制 NETs 生成或降解 NETs 可以改善创面的愈合,对糖尿病足溃疡患者因 NETs 引起的慢性炎症有改善作用。本研究认为,通过抑制 NETs 的生成来促进糖尿病足创面愈合是有

据可循的,可用于糖尿病足溃疡治疗干预的细胞靶点具有相当大的价值。有研究报道 hAECs 可通过调节炎症反应和促进新生血管生成而促进创面愈合^[14],其分泌的外泌体也可有效改善成纤维细胞及内皮细胞的生物学功能来促进创面愈合,即使在高糖环境中也能发挥此作用^[30]。本研究首次发现 hAECs 可以抑制糖尿病创面中 NETs 的生成,并显著促进创面愈合。这一现象有助于进一步了解 hAECs 在组织再生中的功能。

目前的研究有其局限性。首先,缺乏糖尿病大鼠创面组织中 hAECs 的生物活性随时间变化的证据,还无法阐明 hAECs 的最佳治疗周期和使用频率。其次,尽管已经证实 hAECs 可以抑制 NETs 并促进糖尿病创面愈合,但其潜在机制仍需进一步探索。

4 结 论

本研究首次证明,相较于普通的干预措施,hAECs 能够显著加速糖尿病创面的愈合,hAECs 悬液的最佳治疗浓度为 5×10^5 个/mL。该研究结果与 hAECs 对 NETs 生成的抑制作用息息相关。

参 考 文 献

- [1] Sinwar PD. The diabetic foot management: recent advance[J]. Int J Surg, 2015, 15:27-30.
- [2] Patel S, Srivastava S, Singh MR, et al. Mechanistic insight into diabetic wounds: pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112:108615.
- [3] Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, et al. NETosis delays diabetic wound healing in mice and humans[J]. Diabetes, 2016, 65 (4): 1061-1071.
- [4] Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology[J]. Biomolecules, 2019, 9(8):365.
- [5] Dou HJ, Kotini A, Liu WL, et al. Oxidized phospholipids promote NETosis and arterial thrombosis in LNK (SH2B3) deficiency[J]. Circulation, 2021, 144(24):1940-1954.
- [6] Ortines RV, Liu HY, Cheng LI, et al. Neutralizing alpha-toxin accelerates healing of *Staphylococcus aureus*-infected wounds in nondiabetic and diabetic mice[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(3): e02288-e02217.
- [7] Roth Flach RJ, Czech MP. NETs and traps delay wound healing in

diabetes[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(9):451–452.

[8] Yang CT, Chen L, Chen WL, et al. Hydrogen sulfide primes diabetic wound to close through inhibition of NETosis[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 480:74–82.

[9] Tenenhaus M. The use of dehydrated human amnion/chorion membranes in the treatment of burns and complex wounds: current and future applications[J]. *Ann Plast Surg*, 2017, 78(2 Suppl 1):S11–S13.

[10] Miki T. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells[J]. *Am J Reproductive Immunol*, 2018, 80(4):e13003.

[11] Liu QW, Huang QM, Wu HY, et al. Characteristics and therapeutic potential of human amnion-derived stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2):970.

[12] Abbasi-Kangevari M, Ghamari SH, Safaeinejad F, et al. Potential therapeutic features of human amniotic mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: immunomodulation, inflammation suppression, angiogenesis promotion, oxidative stress inhibition, neurogenesis induction, MMPs regulation, and remyelination stimulation[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:238.

[13] Fan YH, Sun JY, Zhang QW, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells promotes morphological and functional regeneration in a rat uterine scar model[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):207.

[14] Zheng YJ, Zheng SQ, Fan XM, et al. Amniotic epithelial cells accelerate diabetic wound healing by modulating inflammation and promoting neovascularization[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018:1–10.

[15] 张春林. 人羊膜上皮细胞通过调控 NETs 促进糖尿病创面愈合的初步机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.

Zhang CL. Preliminary study on the mechanism of human amniotic epithelial cells promoting diabetic wound healing by regulating NETs[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2021.

[16] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(2):300–311.

[17] Menegazzo L, Ciciliot S, Ponceina N, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes[J]. *Acta Diabetol*, 2015, 52(3):497–503.

[18] Jain A, Trivedi V. Docking and virtual screening to identify PKC agonists: potentials in anticancer therapeutics[J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2014, 10(1):50–58.

[19] Magaña-Guerrero FS, Domínguez-López A, Martínez-Aboytes P, et al. Human amniotic membrane mesenchymal stem cells inhibit neutrophil extracellular traps through TSG-6[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12426.

[20] Zhang SZ, He H, Day AJ, et al. Constitutive expression of inter-α-inhibitor (IαI) family proteins and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) by human amniotic membrane epithelial and stromal cells supporting formation of the heavy chain-hyaluronan (HC-HA) complex[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(15):12433–12444.

[21] Motedayen H, Fathi F, Fasihi-Ramandi M, et al. The effect of lipopolysaccharide on anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines production of human amniotic epithelial cells[J]. *Reprod Biol*, 2018, 18(4):404–409.

[22] Zhang QW, Lai DM. Application of human amniotic epithelial cells in regenerative medicine: a systematic review[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):439.

[23] Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, et al. Wound healing: a cellular perspective[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(1):665–706.

[24] Chang M, Nguyen TT. Strategy for treatment of infected diabetic foot ulcers[J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(5):1080–1093.

[25] Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: the biology of chromatin externalization[J]. *Dev Cell*, 2018, 44(5):542–553.

[26] Denning NL, Aziz M, Gurien SD, et al. DAMPs and NETs in sepsis[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:2536.

[27] Thålin C, Hisada Y, Lundström S, et al. Neutrophil extracellular traps[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(9):1724–1738.

[28] Lee KH, Kronbichler A, Park DDY, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: a comprehensive review[J]. *Autoimmun Rev*, 2017, 16(11):1160–1173.

[29] Chen LS, Zhao YF, Lai DM, et al. Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6):597.

[30] Wei P, Zhong CJ, Yang XL, et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate diabetic wound healing via PI3K-AKT-mTOR-mediated promotion in angiogenesis and fibroblast function [J]. *Burns Trauma*, 2020, 8:tkaa020.

(责任编辑:冉明会)