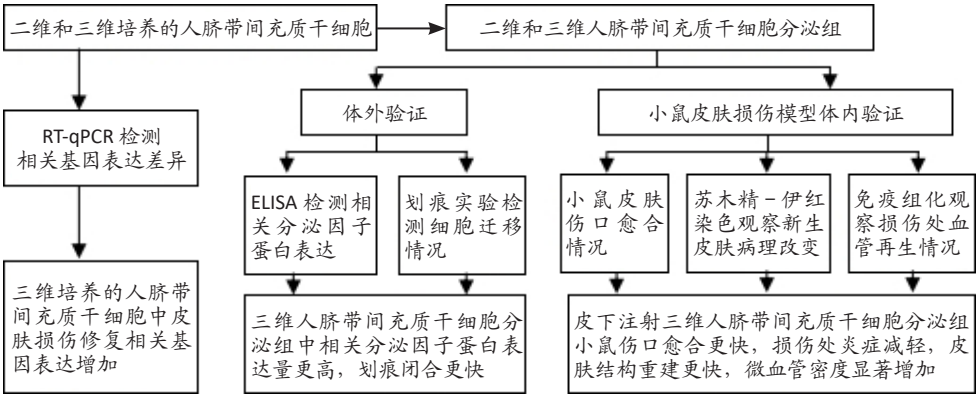
无支架三维人脐带间充质干细胞分泌组修复小鼠皮肤损伤

马文静[1]，张晋豫[1]，姜明霞[2]，修冰水[2]，白 睿[3]，刘玉含[4]，陈旭义[4]，袁增强[1]，刘志强[1]

https://doi.org/10.12307/2025.982
采用日期：2024-12-06
修回日期：2025-01-28
在线日期：2025-02-18
中图分类号：
R456；R318；R751
文章编号：
2095-4344(2026)01-00068-10
文献标识码：A

文章快速阅读： 三维培养人脐带间充质干细胞分泌组对小鼠皮肤损伤的修复效果



文题释义：

无支架三维细胞培养： 在没有可黏附生长的环境中，细胞在重力作用下自组装形成类似于微组织的球状体，比常规二维细胞培养更能模拟细胞在生物体内的生理环境。

间充质干细胞分泌组： 指间充质干细胞培养过程中分泌至细胞外空间的各种分子或细胞外囊泡，由间充质干细胞培养上清液去除杂质后获得，通过各种可溶性分子(如生长因子、趋化因子)及外泌体介导了间充质干细胞的大部分治疗作用，并且能避免细胞移植的弊端。

摘要

背景： 间充质干细胞分泌组中含有生物活性物质、细胞因子及生长因子等，三维细胞培养可调控间充质干细胞内含物的分泌，有望提升损伤修复的潜能。

目的： 探讨三维培养人脐带间充质干细胞分泌组对小鼠皮肤损伤的修复效果。

方法： 用常规二维培养皿和96孔U底细胞培养板培养人脐带间充质干细胞，收集其分泌组分，RT-qPCR检测人脐带间充质干细胞中皮肤损伤修复相关分泌因子基因表达水平，酶联免疫吸附实验检测人脐带间充质干细胞分泌组中皮肤损伤修复相关因子的蛋白表达水平；使用永生化人脐静脉内皮细胞迁移模型检测人脐带间充质干细胞分泌组的血管损伤修复潜能。建立小鼠皮肤损伤模型，经皮下注射人脐带间充质干细胞分泌组，通过伤口愈合率和组织病理学分析验证皮肤损伤的修复效果。

结果与结论： ①培养3 d后，二维培养的人脐带间充质干细胞呈成纤维细胞样漩涡状生长，三维培养的人脐带间充质干细胞为均一微球体；②与二维培养相比，三维培养的人脐带间充质干细胞中转化生长因子β、碱性成纤维细胞生长因子mRNA表达水平显著升高；③与二维培养相比，三维培养的人脐带间充质干细胞分泌组中血管内皮细胞生长因子、白细胞介素10、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子蛋白表达水平显著升高；④与二维培养相比，三维培养的人脐带间充质干细胞分泌组可显著促进永生化人脐静脉内皮细胞的迁移；⑤与未处理对照组和二维培养的人脐带间充质干细胞分泌组相比，三维培养的人脐带间充质干细胞分泌组可显著加快小鼠皮肤伤口愈合速率和伤口皮肤结构重塑。研究结果表明：三维培养可提高人脐带间充质干细胞的旁分泌因子表达，其分泌组可显著促进小鼠皮肤损伤修复。

关键词： 脐带间充质干细胞；三维细胞培养；旁分泌；分泌组；细胞迁移；皮肤缺损；伤口愈合；工程化干细胞

Scaffold-free three-dimensional human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome repairs mouse skin injury

Ma Wenjing[1], Zhang Jinyu[1], Jiang Mingxia[2], Xiu Bingshui[2], Bai Rui[3], Liu Yuhan[4], Chen Xuyi[4], Yuan Zengqiang[1], Liu Zhiqiang[1]

[1]Hengyang Medical School, University of South China, Postgraduate Cooperative Training Base of Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Hengyang 421001, Hunan Province, China; [2]Yantai Laiyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Yantai 265299, Shandong Province, China; [3]Cardiovascular Medicine Department of Sixth Medical Center of People's Liberation Army, Beijing 100853, China; [4]Armed Police Characteristic Medical Center, Tianjin 300162, China

[1] 南华大学衡阳医学院，军事科学院军事医学研究院研究生协作培养基地，湖南省衡阳市 421001；[2] 潍坊医学院附属医院，烟台市莱阳中心医院，山东省烟台市 265299；[3] 解放军第六医学中心心血管病医学部，北京市 100853；[4] 武警特色医学中心，天津市 300162

第一作者： 马文静，女，1999年生，青海省海东市人，汉族，南华大学衡阳医学院，军事科学院军事医学研究院研究生协作培养基地生物学专业在读硕士，主要从事干细胞研究。

通讯作者： 刘志强，博士，研究员，南华大学衡阳医学院，军事科学院军事医学研究院研究生协作培养基地，湖南省衡阳市 421001

共同通讯作者： 袁增强，博士，研究员，南华大学衡阳医学院，军事科学院军事医学研究院研究生协作培养基地，湖南省衡阳市 421001

https://orcid.org/0009-0001-4329-0779(马文静)

基金资助： 国家自然科学基金项目 (82200295)，项目负责人：白睿

引用本文： 马文静，张晋豫，姜明霞，修冰水，白睿，刘玉含，陈旭义，袁增强，刘志强 . 无支架三维人脐带间充质干细胞分泌组修复小鼠皮肤损伤 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):68-77.

Ma Wenjing, Master candidate, Hengyang Medical School, University of South China, Postgraduate Cooperative Training Base of Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Corresponding author: Liu Zhiqiang, MD, Researcher, Hengyang Medical School, University of South China, Postgraduate Cooperative Training Base of Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Co-corresponding author: Yuan Zengqiang, MD, Researcher, Hengyang Medical School, University of South China, Postgraduate Cooperative Training Base of Institute of Military Cognition and Brain Sciences, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Abstract
BACKGROUND: The mesenchymal stem cell secretome contains bioactive substances, cytokines, and growth factors. Three-dimensional cell culture can regulate the secretion of these components, potentially enhancing the ability to promote injury repair.
OBJECTIVE: To investigate the repair effect of three-dimensional cultured human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome on skin injuries in mice.
METHODS: Human umbilical cord mesenchymal stem cells were cultured in conventional two-dimensional culture dishes and 96-well U-bottom cell culture plates, from which their secretory components were subsequently collected. The expression of skin damage repair related secretory factors in umbilical cord mesenchymal stem cells was analyzed using RT-qPCR. The protein expression level of skin damage repair related factors in umbilical cord mesenchymal stem cell secretome was detected using enzyme-linked immunosorbent assay. The potential of human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome to repair vascular injuries was evaluated using an immortalized human umbilical vein endothelial cell migration model. A mouse skin injury model was established, and the human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome was injected subcutaneously. Repair effects on skin injury were assessed through wound healing rates and histopathological analysis.
RESULTS AND CONCLUSION: (1) After three days of cultivation, human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured in two dimensions exhibited a fibroblast-like, swirling growth pattern, whereas three-dimensional culture led to the formation of uniform microspheres. (2) Compared with two-dimensional culture, three-dimensional culture significantly increased the mRNA expression of transforming growth factor β and basic fibroblast growth factor in human umbilical cord mesenchymal stem cells. (3) Compared with two-dimensional culture, three-dimensional cultured human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome significantly enhanced the protein expression of vascular endothelial growth factor, interleukin-10, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome. (4) Compared with two-dimensional culture, three-dimensional cultured human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome significantly promoted the migration of immortalized human umbilical cord mesenchymal stem cells. (5) Compared with the untreated control group and the two-dimensional cultured human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome, the three-dimensional cultured human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome can significantly accelerate the skin wound healing rate and wound skin structure remodeling in mice. These results indicate that three-dimensional culture can enhance the expression of paracrine factors of human umbilical cord mesenchymal stem cells, and their secretome can significantly promote the repair of mouse skin damage.
Key words: umbilical cord mesenchymal stem cell; three-dimensional cell culture; paracrine; secretome; cell migration; skin defect; wound healing; engineered stem cell

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 82200295 (to BR)*
How to cite this article: *MA WJ, ZHANG JY, JIANG MX, XIU BS, BAI R, LIU YH, CHEN XY, YUAN ZQ, LIU ZQ. Scaffold-free three-dimensional human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome repairs mouse skin injury. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):68-77.*

0 引言 Introduction

皮肤作为人体抵御外界刺激与伤害的首道物理防线，不仅在体温调节、感知、代谢和免疫调节等关键生理环节发挥着不可或缺的作用，更是守护机体健康的重要屏障[1]。然而，长期暴露于外界环境的皮肤却时常遭受损伤，这不仅可能引发感染，还可能引发一系列并发症，对身体健康构成威胁[2]。皮肤损伤修复是一个高度复杂且动态的再生过程[3]，它需要经历血液凝固、炎症、增殖和组织重构 4 个阶段[4-5]。在这一过程中，皮肤需要克服诸多挑战，包括调节炎症反应、促进细胞增殖、实现血管再生以及重塑皮肤结构等[6-7]。

间充质干细胞是一类拥有强大自我更新能力和多向分化能力的成体干细胞[8]，更具备免疫调节潜能[9-10]，在皮肤损伤修复中，凭借自我增殖、分化能力和旁分泌信号，有效促进细胞增殖和血管再生，减轻炎症反应，从而加速伤口愈合并提高愈合质量[11-13]。然而，目前间充质干细胞治疗面临着一些挑战，如细胞存活率低[14]、组织靶向困难以及潜在的致瘤风险等[15]。近年来的研究发现，间充质干细胞的旁分泌因子在改善损伤处微环境、促进组织器官损伤修复方面发挥着重要作用[16]，这为组织再生领域提供了一个全新的“无细胞”治疗思路——利用间充质干细胞来源分泌组进行损伤治疗[17]。

分泌组是间充质干细胞培养过程中所释放的所有蛋白质的集合，是间充质干细胞培养液去除细胞、细胞碎片等杂质后保留的主体部分，其中富含间充质干细胞分泌的生物活性因子，如可溶性蛋白、核酸、脂类和细胞外囊泡等，这些因子具有促进损伤修复的潜能[18]。目前，已有大量研究证实了间充质干细胞分泌组治疗的有效性[19-20]，在血管生成、组织修复、免疫调节、伤口愈合等多种生理过程中发挥调节作用。间充质干细胞分泌组通过影响损伤炎症期和增殖期的相应蛋白表达促进皮肤损伤修复，还可将表皮干细胞、成纤维细胞和免疫细胞等募集到损伤部位并协调各细胞以促进伤口修复；此外，间充质干细胞分泌组还可调节内源性细胞因子或生长因子的分泌，发挥旁分泌调控作用[21]。人脐带间充质干细胞分泌组 (human umbilical cord mesenchymal stem cells-secretome，HUCMSCs-Sec) 在成人皮肤细胞、体外皮肤组织和 3D 皮肤模型中具有抗炎、抗凋亡、抗衰老和解毒等一系列对皮肤稳态恢复有益的积极作用[22]。

然而，目前的研究往往以常规二维培养后收集的间充质干细胞分泌组为主，在玻璃或塑料为基底的平面上培养时，细胞以单层形式生长，这种培养方式虽然简便快捷，但是细胞以单层形式生长会影响细胞间以及细胞与细胞外基质之间的相互作用，从而使得常规二维培养的间充质干细胞旁

分泌功能有限，分泌组中相关治疗因子的表达量也较低。而细胞在三维空间环境中生长时能够更加接近“体内”的生长环境[23]，与二维培养相比，三维细胞培养可以上调组织特异性标志物的表达水平，基因表达谱也更趋于多样化[24]。已有研究报道，三维细胞培养能显著提升间充质干细胞的旁分泌功能，从而提高分泌组的损伤修复潜能[25]。为了验证三维间充质干细胞分泌组修复皮肤损伤的效果，采用 96 孔 U 底细胞培养板三维培养人脐带间充质干细胞，收集 HUCMSCs-Sec 组，然后建立小鼠皮肤缺损模型，通过皮下注射三维 HUCMSCs-Sec，观察皮肤缺损修复效果，为三维 HUCMSCs-Sec 在皮肤损伤修复中的应用提供理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验，随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 5 月至 2024 年 7 月在军事科学院军事医学研究院实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 人脐带间充质干细胞由北京中卫医正科技有限公司赠予，伦理审批号：2023–(药) 第 002 号 –001，细胞冻存、培养、传代均在军事科学院军事医学研究院进行；人脐静脉内皮细胞来自军事科学院军事医学研究院冻存细胞系。

1.3.2 实验试剂与仪器 α-MEM 培养基 (Gibco，C12571500BT)；DMEM 高糖培养基 (Gibco，C11995500BT)；胎牛血清 (Biological Industries，04-001-1ACS)；青霉素 – 链霉素双抗溶液 (Sigma，03-031-1BCS)；0.25% 胰蛋白酶消化液 (Biological Industries，03-050-1ACS)；PBS(Gibco，10010049)；血管内皮生长因子 ELISA 试剂盒 (Biolegend，HUEB05478)；白细胞介素 10 ELISA 试剂盒 (Biolegend，HUEB0119)；粒细胞集落刺激因子 ELISA 试剂盒 (爱必信，abs51108)；反转录试剂盒 (北京全式金生物，AU341-02-V2)；RT-qPCR MIX (GenStar，A020-10)；40 g/L 多聚甲醛 (塞维尔，G1101-500ML)；苏木精 (无锡傲悦东源生物科技有限公司，ZLI-9610)；伊红 (无锡傲悦东源生物科技有限公司，ZLI-9613)；二甲苯 (国药集团化学试剂有限公司，20231122)；无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司，20240207)；柠檬酸三钠 (国药集团化学试剂有限公司，20210511)；ABC-Peroxidase Kits(VECTASTAIN，PK-4000)；重组 Anti-CD31 抗体 (Abcam，ab182981)；96 孔 U 底细胞培养板 (Corning，LOT30623044)；透析袋 [索莱宝，Viskase(MD3416)]；二氧化碳细胞培养箱 (瑞沃德，RWD-D180)；倒置荧光显微镜 (蔡司，Vert A1)；RT-qPCR 仪 (Applied Biosystems，QuantStudio3)；普通 PCR 仪 (Bio-Rad，MyCycler)；组织匀浆机 (Bertin，Precellys24)；4 ℃离心机 (Eppendorf，5417R)；NanoDrop 分光光度计 (IMPLEN，Nanophotometer P330)；酶标仪 (TECAN，Infinite M200)；全景扫描仪 (济南丹吉尔电子有限公司，3DHISTECH)。

1.3.3 实验动物 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 11 只，体质量约 20 g，购于北京斯贝福生物技术有限公司，实验动物机构许可证号为 SYXK(京)2024-0010。动物在干燥通风条件下饲养，自由进食和饮水。实验方案经军事医学院军事认知与脑科学研究所军事脑科学研究中心动物实验伦理委员会批准，审批号为 IACUC-DWZX-2022-814。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞的培养 用含体积分数 10% 胎牛血清和 1% 青霉素 – 链霉素双抗溶液的 α-MEM 培养基培养人脐带间充质干细胞，置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 细胞培养箱中，每 2 d 更换 1 次培养基，细胞长至 80%–90% 融合时，用 0.25% 胰蛋白酶消化后按 1 ∶ 3 的比例传代培养。当细胞数量达到实验要求后，将细胞消化制备成浓度为 8×10^7 L^{-1} 的细胞悬液，取 50 μL 细胞悬液加入超低黏附 96 孔 U 底细胞培养板中，将 U 型板转移至 CO_2 细胞培养箱中培养 3 d，作为三维培养组。同时，为了进行对比研究，将相同细胞浓度的细胞悬液接种在 10 cm^2 细胞培养皿中培养 3 d，作为二维对照组。

1.4.2 HUCMSCs-Sec 的收集 将二维和三维培养的人脐带间充质干细胞置于 CO_2 细胞培养箱中培养 3 d 后，收集相应的细胞培养液，2 000 r/min 离心 10 min 以去除其中细胞碎片等杂质，然后将二维和三维细胞培养液装入预先处理好的分子质量为 3 000 kDa 的透析袋，放入无菌 PBS 中，4 ℃透析 24–48 h，至培养基中的酚红完全去除。

1.4.3 RT-qPCR 检测 收集 HUCMSCs-Sec 后在剩余的细胞中加入 1 mL Trizol，研磨成匀浆，随后加入 Trizol 体积 1/5 的三氯甲烷冰浴萃取 10 min，分层后 14 000 r/min 离心 15 min，吸取上清液，加入等体积的异丙醇，涡旋混匀并冰浴 10 min，再次 14 000 r/min 离心 15 min 后弃上清，用 1 mL 体积分数 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次，离心去除乙醇，晾干，最后加入适量无菌无酶水溶解 RNA，用分光光度计检测浓度后，取 1 μg RNA 用反转录试剂盒合成 cDNA，得到的 cDNA 用 RT-qPCR 试剂盒检测碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、白细胞介素 10、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、肿瘤坏死因子刺激因子 6、转化生长因子 β 基因的

mRNA 表达量，以 ACTB 作为内参基因，每个样本设 3 个复孔，反应条件为：95 ℃ 10 min 以活化 DNA 酶，95 ℃ 5 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 10 s，40 个循环为扩增和分析，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算目的基因的表达量。相关基因序列见**表 1**。

表 1 | RT-qPCR 引物序列
Table 1 | **Primer sequences for RT-qPCR**

基因	Forward primer(5′-3′)	Reverse primer(3′-5′)
ACTB	AAG GAG CCC CAC GAG AAA AAT	ACC GAA CTT GCA TTG ATT CCA G
TGF-β	TGG TGG AAA CCC ACA ACG AA	ACA CAG AGA TCC GCA GTC CT
FGF2	TCC ACC TAT AAT TGG TCA AAG TGG T	CAT CAG TTA CCA GCT CCC CC
VEGF	GGC TGG CAA CAT AAC AGA GAA	CCC CAC ATC TAT ACA CAC CTC C
IL-10	TTG CAA AAG AAG GCA TGC ACA G	ATA GAG TCG CCA CCC TGA TG
HGF	GCT ATC GGG GTA AAG ACC TAC A	CGT AGC GTA CCT CTG GAT TGC
TSG-6	AGA TGA CCC AGG TTG CTT GG	TGG AAA CCT CCA GCT GTC AC
G-CSF	GTG CCA CCT ACA AGC TGT GC	AAA GGC CGC TAT GGA GTT GG

表注：ACTB 为肌动蛋白，TGF-β 为转化生长因子 β，FGF2 为碱性成纤维细胞生长因子，VEGF 为血管内皮生长因子，IL-10 为白细胞介素 10，HGF 为肝细胞生长因子，TSG-6 为肿瘤坏死因子刺激因子 6，G-CSF 为粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

1.4.4　酶联免疫吸附实验 (ELISA)　用 ELISA 法检测所收集的 HUCMSCs-Sec 中血管内皮生长因子、白细胞介素 10、肿瘤坏死因子刺激因子 6 蛋白水平，按照 ELISA 试剂盒说明操作，提前准备好洗涤液、检测缓冲液、SA-HRP、信号增强剂、检测抗体和标准品，平衡至室温；用 300 μL 洗涤液泡板 30 s，将 100 μL 不同浓度标准品和 HUCMSCs-Sec 加入相应孔中，封板，室温孵育 1.5 h，每孔加 100 μL 洗涤液洗板 5 次；每孔加 100 μL 检测抗体，室温孵育 30 min，重复洗板操作；每孔加 100 μL 信号增强剂，室温避光孵育 15 min，重复洗板操作；每孔加 100 μL SA-HRP，室温避光孵育 15 min，重复洗板操作；每孔加 100 μL TMB 显色底物，室温避光孵育 5–30 min；每孔加 100 μL 终止液，30 min 内使用酶标仪进行 450 nm 和 570 nm 双波长检测吸光度值，根据吸光度值计算样品蛋白浓度。

1.4.5　人脐静脉内皮细胞迁移模型　用 0.25% 胰蛋白酶消化人脐静脉内皮细胞，待细胞形态变圆后，加入双倍体积的 DMEM 完全培养基以终止消化。待细胞融合率达 80%–90% 后，用 200 μL 移液枪轻轻吹打后使细胞脱落并收集至离心管中，经 1 400 r/min 离心 5 min 后，去除上清液，再加入 1 mL DMEM 完全培养基重悬细胞，计数后按照 1×10^8 L^{-1} 细胞浓度接种至 12 孔板中，每孔 500 μL 细胞悬液，培养至细胞融合率达 80%–90% 后，用 200 μL 移液枪头在孔中央划痕，轻轻加入 PBS 洗去被划起来的细胞，随后更换为 DMEM 完全培养基或含有不同体积分数 (20%，50%) 二维或三维 HUCMSCs-Sec 的培养基，分别在 0，24，36，48 h 时拍摄同一部位，Image J 软件分析细胞迁移情况，根据各个时间点平均划痕宽度，统计划痕细胞迁移率和划痕剩余率以量化评估细胞迁移程度。划痕迁移率 =(初始平均划痕宽度 − 第 *n* 小时平均划痕宽度)/ 初始平均划痕宽度 ×100%，划痕剩余率 =(第 *n* 小时平均划痕宽度 / 初始平均划痕宽度)×100%。

1.4.6　皮肤损伤模型制备　11 只雄性 C57BL/6J 小鼠经腹腔注射 0.3% 戊巴比妥 (0.01 mL/g) 麻醉后，剔除背部毛发，利用无菌眼科剪在小鼠背部上下各形成 2 个直径约 1 cm 的圆形皮肤缺损伤口，随后伤口随机分为无处理对照组、二维 HUCMSCs-Sec 治疗组和三维 HUCMSCs-Sec 治疗组，对照组伤口不做任何处理，二维和三维 HUCMSCs-Sec 治疗组连续 7 d 皮下注射 80 μL 二维或三维 HUCMSCs-Sec，实验期间小鼠单笼饲养，自由摄食，环境保持通风干燥，以确保实验条件稳定。

1.4.7　小鼠伤口愈合的观察指标　观察伤口外观恢复情况。另外，在创伤后 0，1，3，5，7，10，14，16 d 时对创面进行拍照记录。采用 Image J 软件测量创面面积，并计算伤口愈合率，伤口愈合率 =(初始伤口面积 − 第 *n* 天伤口面积)/ 初始伤口面积 ×100%，以量化评估伤口的愈合程度。

1.4.8　小鼠皮肤组织病理学检测　创伤后第 16 天测量愈合伤口面积后，随机取 3 只小鼠，麻醉后取伤口新生皮肤组织及周围少许正常皮肤，用 40 g/L 多聚甲醛固定，将固定好的组织脱水、包埋、切片，进行苏木精 – 伊红染色和免疫组化染色，全景扫描观察新生皮肤病理学改变。

1.4.9　苏木精 – 伊红染色　烤片机烤干石蜡切片，二甲苯脱蜡 5–10 min，将切片依次移入无水乙醇、体积分数 90% 乙醇、体积分数 80% 乙醇、体积分数 70% 乙醇中各 2 min，水中洗片 2 次以洗去乙醇，每次 2.0–3.0 min；然后将切片浸入苏木精中 8–15 min，观察颜色略微深染时移入水中 1.0–2.0 min，以洗去浮色；之后切片转移至体积分数 1% 盐酸乙醇中分化几秒至 30 s，使切片褪色至淡蓝红色，移入流水洗涤 30–60 min，使组织呈鲜蓝色或天蓝色后转入伊红染液中浸染 2–5 min，再转入水中洗去伊红浮色；吸去玻片上多余水分后浸入体积分数 80% 乙醇中脱水 1.0–2.0 min，体积分数 90% 乙醇中脱水 2–4 min，无水乙醇中彻底脱水 4–8 min；最后，移入二甲苯Ⅰ中透明 3–5 min，二甲苯Ⅱ中透明 5–10 min；透明结束后取出，并滴加中性树脂于组织上用盖玻片封固；晾干后，全景扫描机扫片，观察各组皮肤组织结构恢复情况，并对表皮厚度、肉芽组织厚度和真皮厚度进行统计分析。

1.4.10　免疫组化染色　烤片机烤干石蜡切片，二甲苯脱蜡 2 次，每次 20 min；梯度乙醇水化：无水乙醇 5 min，无水乙醇 5 min，体积分数 95% 乙醇 3 min，体积分数 80% 乙醇 3 min，体积分数 70% 乙醇 3 min，ddH_2O 5 min，PBS 5 min；切片用 pH=6.0 的柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复，微波炉

高火 3 min 煮至沸腾后低火 8 min，室温冷却 40 min 后用 PBS 洗 3 次，每次 5 min；然后用体积分数 3% 过氧化氢室温避光孵育 15 min，以封闭内源性过氧化物酶，PBS 洗 3 次，每次 5 min；之后用组化笔圈住组织，30 g/L BSA 室温封闭 30 min；重组 Anti-CD31 抗体按 1 ∶ 2 000 稀释后 4 ℃ 孵育过夜，PBS 洗 3 次，每次 5 min；免疫组化试剂盒中二抗按 1 ∶ 200 稀释后室温孵育 90 min，PBS 洗 3 次，每次 5 min；免疫组化试剂盒中 AB 液按 1 ∶ 100 稀释后室温孵育 90 min，PBS 洗 3 次，每次 5 min；DAB 显色液按 1 ∶ 20 稀释后显色 10–15 min，显色后在显微镜下观察有无阳性染色，观察着色适宜后流水冲洗 5 min 后终止显色；接着用苏木精复染 5 min，流水冲洗 15 min，PBS 反蓝 1 min，ddH_2O 洗 3 min，PBS 洗 3 min；用体积分数 70%、80%，90%，95%，100% 乙醇梯度脱水，每次 3 min；二甲苯透明 2 次，每次 5 min；最后滴加中性树脂于组织上用盖玻片封固；晾干后，全景扫描机扫片，观察各组 CD31 阳性表达并进行定量统计分析。

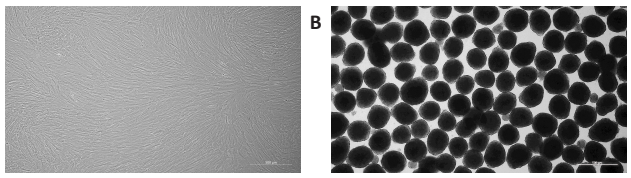
1.5 主要观察指标 ①二维和三维培养的人脐带间充质干细胞形态；②二维和三维培养的人脐带间充质干细胞中皮肤损伤修复相关基因表达差异；③二维和三维培养的 HUCMSCs-Sec 中血管内皮生长因子、白细胞介素 10、肿瘤坏死因子刺激因子 6 的蛋白表达差异；④二维和三维 HUCMSCs-Sec 促进人脐静脉内皮细胞迁移能力的差异；⑤二维或三维 HUCMSCs-Sec 处理后皮肤伤口愈合情况；⑥二维或三维 HUCMSCs-Sec 处理后皮肤组织病理学和免疫组化分析。

1.6 统计学分析 实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 Graphpad prism 9 软件进行 t 检验和单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过中国人民解放军军事科学院军事医学研究院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 细胞形态学鉴定结果 二维或三维培养 3 d 后，在荧光倒置显微镜下观察细胞形态，**图 1A** 显示二维培养的人脐带间充质干细胞贴壁生长，为形态相对均一的梭形细胞，呈平行排列生长或漩涡状生长，细胞密度较高；**图 1B** 显示三维培养的人脐带间充质干细胞在 96 孔 U 底细胞培养板内聚集成干细胞微球，整体形状规则、大小均一。

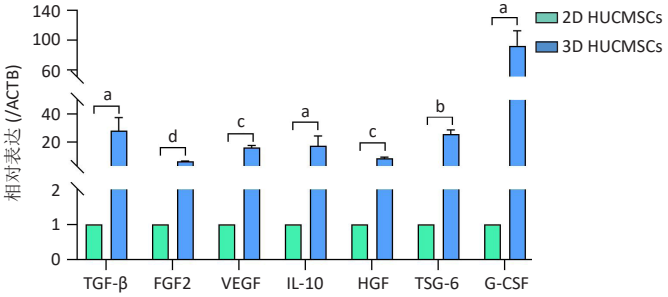
2.2 二维和三维培养人脐带间充质干细胞中相关分泌因子基因表达差异 为了验证三维培养模式下人脐带间充质干细胞分泌皮肤损伤修复因子的能力是否发生改变，收集了不同条件培养 3 d 的二维人脐带间充质干细胞和三维人脐带间充质干细胞，通过 RT-qPCR 检测相关分泌因子的基因表达水平，发现三维人脐带间充质干细胞中与皮肤损伤修复相关营养因子的 mRNA 表达水平显著上调，如**图 2** 所示，转化生长因子 β 上调约 28.2 倍、碱性成纤维细胞生长因子上调约 6.4 倍、血管内皮生长因子上调约 16.2 倍、白细胞介素 10 上调约 17.4 倍、肝细胞生长因子上调约 8.7 倍、肿瘤坏死因子刺激因子 6 上调约 25.7 倍、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子上调约 92.2 倍。



图注：图 A 为二维培养的人脐带间充质干细胞，呈梭形平行或漩涡状生长；B 为三维培养的人脐带间充质干细胞，呈微球状生长。

图 1 | 二维和三维培养的人脐带间充质干细胞形态（标尺为 500 μm）

Figure 1 | Morphology of human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured in two-dimensional and three-dimensional cultures (scale bars: 500 μm)



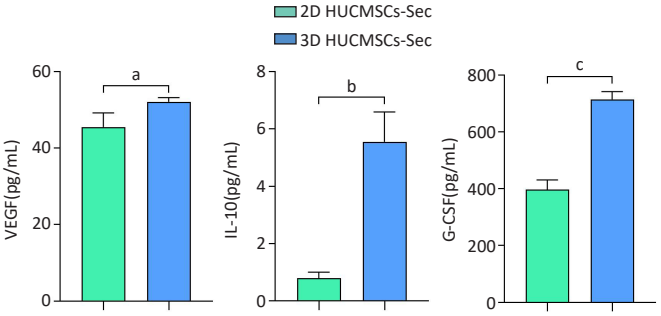
图注：$^aP < 0.05$，$^bP < 0.01$，$^cP < 0.001$，$^dP < 0.000\ 1$（n=3）。2D HUCMSCs：二维培养人脐带间充质干细胞；3D HUCMSCs：三维培养人脐带间充质干细胞；TGF-β：转化生长因子 β；FGF2：碱性成纤维细胞生长因子；VEGF：血管内皮生长因子；IL-10：白细胞介素 10；HGF：肝细胞生长因子；TSG-6：肿瘤坏死因子刺激因子 6；G-CSF：粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

图 2 | 2D HUCMSCs 和 3D HUCMSCs 中相关营养因子基因表达

Figure 2 | Expression of related nutritional factor genes in human umbilical cord mesenchymal stem cells cultured in two-dimensional and three-dimensional cultures

2.3 二维和三维 HUCMSCs-Sec 中旁分泌因子的蛋白表达水平 ELISA 检测培养 3 d 后二维和三维 HUCMSCs-Sec 中血管内皮生长因子、白细胞介素 10、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的蛋白分泌量。如**图 3** 所示，与二维 HUCMSCs-Sec 相比，三维 HUCMSCs-Sec 中血管内皮生长因子的蛋白分泌量上调约 1.2 倍，白细胞介素 10 上调约 7.1 倍，粒细胞巨噬细胞集落刺激因子上调约 1.9 倍。

2.4 二维和三维 HUCMSCs-Sec 对人脐静脉内皮细胞迁移的影响 将 HUCMSCs-Sec 用于人脐静脉内皮细胞划痕损伤培养，以使用 DMEM 完全培养基为对照组，对比二维和三维 HUCMSCs-Sec 对人脐静脉内皮细胞迁移的影响，结果显示与对照组和同体积分数的二维 HUCMSCs-Sec 组相比，划痕损伤后 24 h 时三维 HUCMSCs-Sec 组细胞迁移率已超过 50%，36 h



图注：$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$(n=3)。2D HUCMSCs-Sec：二维人脐带间充质干细胞分泌组；3D HUCMSCs-Sec：三维人脐带间充质干细胞分泌组；VEGF：血管内皮生长因子；IL-10：白细胞介素 10；G-CSF：粒细胞巨噬细胞集落刺激因子。

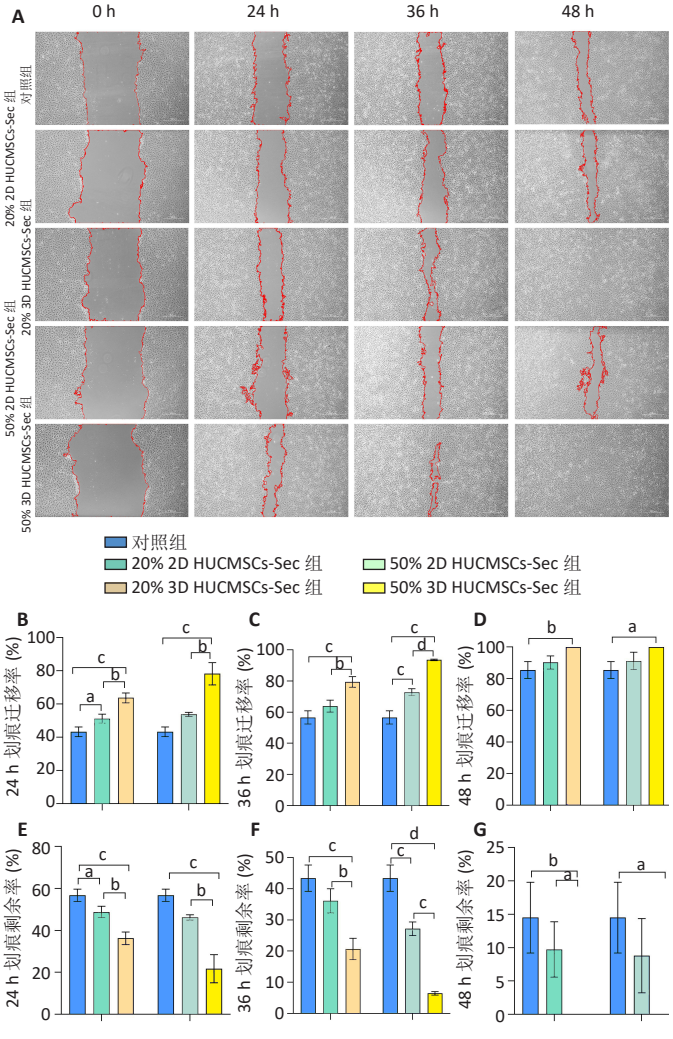
图 3 | 2DHUCMSCs-Sec 和 3DHUCMSCs-Sec 中相关因子的蛋白表达

Figure 3 | **Protein expression of relevant factors in human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome cultured in two-dimensional and three-dimensional cultures**

时三维 HUCMSCs-Sec 组划痕几乎愈合，细胞迁移率 [20% 三维 HUCMSCs-Sec 为 (79.3±3.4)%，50% 三维 HUCMSCs-Sec 为 (93.5±0.5)%] 显著高于其他两组 [对照组为 (56.6±4.2)%，20% 二维 HUCMSCs-Sec 为 (63.9±3.8)%、50% 二维 HUCMSCs-Sec 为 (72.8±2.2)%]；损伤后 48 h 时三维 HUCMSCs-Sec 组划痕完全愈合，愈合率为 100%，显著高于其他两组 [对照组为 (85.5±5.3)%，20% 二维 HUCMSCs-Sec 组为 (90.3±4.1)%，50% 二维 HUCMSCs-Sec 为 (91.2±5.6)%]，见**图 4A–D**；为了更加直观地对比各组人脐静脉内皮细胞的迁移能力，对各个时间点的划痕剩余率进行了定量统计，见图 4A，**图 4E–G**，与对照组和二维 HUCMSCs-Sec 组相比，划痕损伤后 24，36，48 h 时三维 HUCMSCs-Sec 组划痕缩小的速率更快。

2.5 二维和三维 HUCMSCs-Sec 对小鼠皮肤损伤愈合的影响

小鼠皮肤损伤造模后，在 0，1，3，5，7，10，14，16 d 对伤口恢复情况进行拍照记录，如**图 5A，B** 所示，大体观察伤口外观发现，二维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠伤口的炎性浸润程度、伤口结痂程度等与无处理对照组无显著差异，7–16 d 伤口愈合程度无明显差异；而三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠在损伤后 3 d 内的炎性浸润程度较轻、伤口表面渗出液少，损伤后 5 d 时伤口结痂平整，损伤后 7–16 d 伤口开始快速缩小，损伤后 16 d 时创面几乎完全愈合，可见上皮化皮肤。将各个时间点的伤口边缘绘制成伤口愈合趋势图，见**图 5C，D**，也同样显示三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠各个时间点伤口缩小更快。二维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠伤口愈合率在术后各个时间节点与对照组相比无显著差异，见**图 5E**，而三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠伤口愈合率在术后 10，14，16 d 时均显著高于对照组，见**图 5F**。



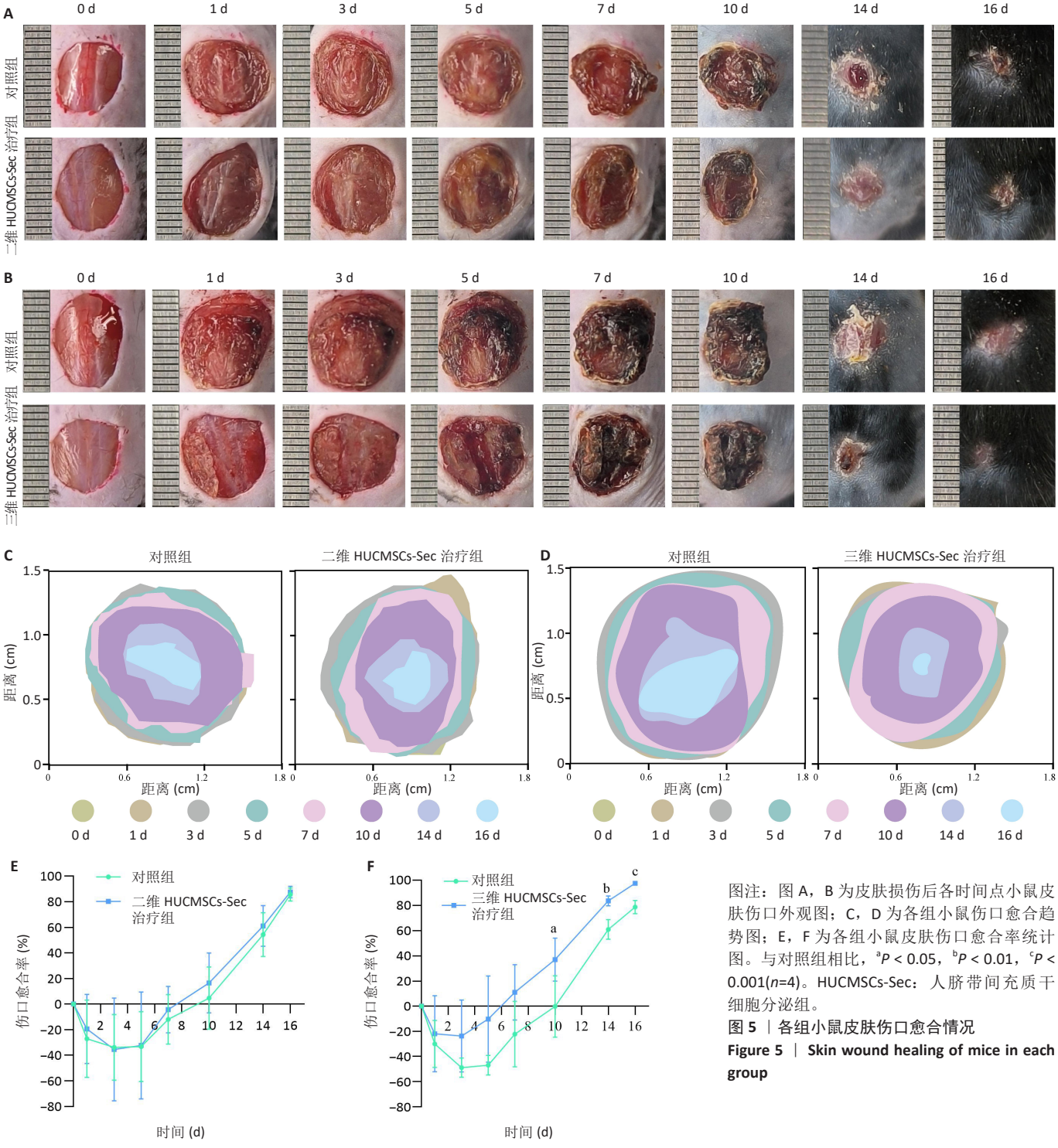
图注：图 A 为 20%，50% 2D HUCMSCs-Sec 或 3D HUCMSCs-Sec 处理 0，24，36，48 h 时的人脐静脉内皮细胞划痕形态 (标尺为 500 μm)；B–D 分别为 24，36，48 h 时各组人脐静脉内皮细胞划痕迁移率统计图；E–G 分别为 24，36，48 h 时各组人脐静脉内皮细胞划痕剩余率统计图。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$，$^{d}P < 0.000\ 1$(n=3)。2D HUCMSCs-Sec：二维人脐带间充质干细胞分泌组；3D HUCMSCs-Sec：三维人脐带间充质干细胞分泌组。

图 4 | 2D HUCMSCs-Sec 和 3D HUCMSCs-Sec 对划痕损伤后人脐静脉内皮细胞迁移的影响

Figure 4 | **Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell secretome cultured in two-dimensional and three-dimensional cultures on human umbilical vein endothelial cell migration after scratch injury**

2.6 二维和三维 HUCMSCs-Sec 对小鼠皮肤损伤组织病理学的影响

2.6.1 苏木精－伊红染色结果 小鼠皮肤损伤后 16 d，取伤口及其周围 1.0–2.0 mm 处的皮肤进行病理染色，如**图 6A** 显示对照组小鼠皮肤角化过度如红色箭头所示，伴有局部棘层增厚如白色箭头所示，胶原纤维缺失，未见皮肤附属器，同时可见少量炎症细胞浸润如黄色箭头所示。此外，局部区域还出现细胞坏死现象，表现为胞核碎裂、固缩及深染，如黑色箭头所示。二维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠皮肤损伤程度较对照组稍有改善，肉芽组织区域有所减少，皮肤附属器官稍有

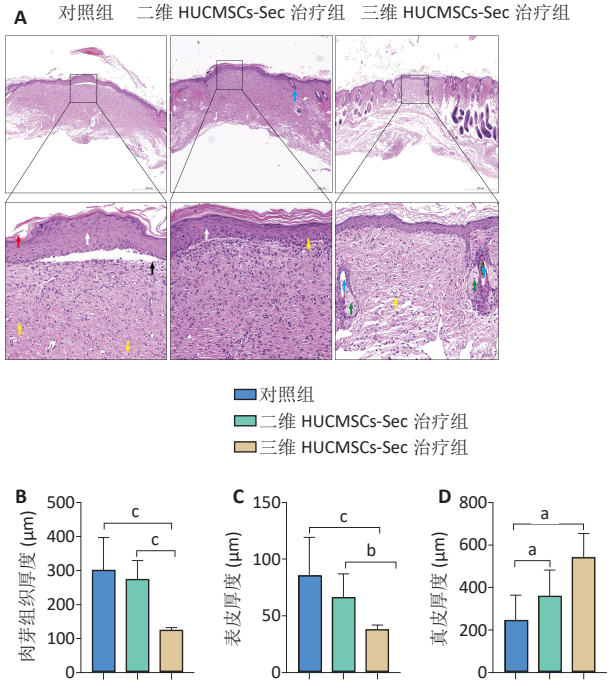


图注：图 A，B 为皮肤损伤后各时间点小鼠皮肤伤口外观图；C，D 为各组小鼠伤口愈合趋势图；E，F 为各组小鼠皮肤伤口愈合率统计图。与对照组相比，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$(n=4)。HUCMSCs-Sec：人脐带间充质干细胞分泌组。

图 5 | 各组小鼠皮肤伤口愈合情况

Figure 5 | Skin wound healing of mice in each group

增多，如黄色箭头所示毛囊；棘层较厚，未见明显变化，真皮层胶原纤维排列疏松，仍可见大量炎症细胞及成纤维细胞。与对照组相比，三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠皮肤表皮层结构保持相对完整，未见明显增厚，可观察到少量皮肤附属器，包括毛囊和皮脂腺，分别为蓝色和绿色箭头所示。更重要的是，三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠皮肤的炎症和坏死症状有所减轻，如黄色箭头所示，三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠皮肤中有较少的炎症细胞。进一步定量分析显示各小鼠在表皮、肉芽组织、真皮厚度方面有显著差异。如**图 6B–D** 所示，三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠的表皮厚度 (38.1±15.3) μm 显著低于对照组的 (85.6±33.7) μm 和二维 HUCMSCs-Sec 治疗组的 (66.5±20.5) μm；三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠肉芽组织厚度 (124.0±34.2) μm 同样低于对照组的 (302.3±95.0) μm 和二维 HUCMSCs-Sec 治疗组的 (275.3±54.6) μm，而三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠的真皮厚度 (544.6±424.1) μm 显著高于对照组的 (246.6±117.5) μm 和二维 HUCMSCs-Sec 治疗组的 (360.6±121.6) μm，表明三维 HUCMSCs-Sec 组治疗后小鼠损伤皮肤结构恢复更为完整。



图注：图 A 为各组小鼠皮肤伤口苏木精－伊红染色 (标尺为 500 μm) 及局部放大图 (标尺为 50 μm)，红色箭头表示皮肤角化过度，局部棘层增厚，白色箭头表示胶原纤维缺失，未见皮肤附属器，黄色箭头表示炎症细胞浸润，黑色箭头表示局部细胞坏死，蓝色箭头表示毛囊，绿色箭头表示皮脂腺；B–D 分别为各组小鼠伤口肉芽组织厚度、表皮厚度和真皮厚度的定量统计图。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.001$，$^{c}P < 0.000\ 1$(n=3)。HUCMSCs-Sec：人脐带间充质干细胞分泌组。

图 6 ｜ 各组小鼠皮肤损伤组织病理学形态 (苏木精－伊红染色)

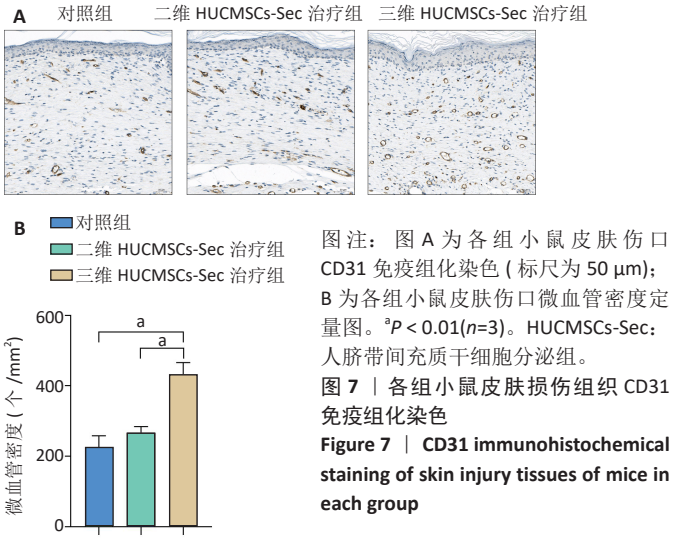
Figure 6 ｜ Pathological morphology of skin lesions in mice in each group (hematoxylin-eosin staining)

2.6.2 免疫组化染色结果 如**图 7A** 所示，小鼠皮肤损伤后 16 d，三维 HUCMSCs-Sec 治疗组小鼠皮肤中 CD31 阳性染色显著增多。如**图 7B** 所示，三维 HUCMSCs-Sec 治疗组 CD31 阳性表达率 (即微血管密度) 达到 (432.6±58.1) 个 /mm^2，对照组 CD31 阳性表达率为 (225.9±32.5) 个 /mm^2，二维 HUCMSCs-Sec 治疗组 CD31 阳性表达率为 (267.5±17.0) 个 /mm^2，三维 HUCMSCs-Sec 治疗组与对照组和二维 HUCMSCs-Sec 治疗组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

皮肤损伤修复是一个错综复杂的生物学过程，它涵盖了皮肤多层结构的再生与重塑。间充质干细胞具有独特的生物学特性，在治疗皮肤损伤方面展现出了巨大的应用潜力。特别是人脐带间充质干细胞，由于易于获取且不受伦理道德的约束，已成为损伤修复和组织再生研究中的热门选择。

当前，国内外大量研究已证实间充质干细胞在皮肤损伤修复中的多种作用机制。间充质干细胞能在损伤部位分化为成纤维细胞、血管内皮细胞和角质形成细胞等伤口区域常驻细胞 [26]，从而直接促进伤口愈合 [27]；其次，免疫调节作用



图注：图 A 为各组小鼠皮肤伤口 CD31 免疫组化染色 (标尺为 50 μm)；B 为各组小鼠皮肤伤口微血管密度定量图。$^{a}P < 0.01$(n=3)。HUCMSCs-Sec：人脐带间充质干细胞分泌组。

图 7 ｜ 各组小鼠皮肤损伤组织 CD31 免疫组化染色

Figure 7 ｜ CD31 immunohistochemical staining of skin injury tissues of mice in each group

能有效调控伤口区域的炎症反应，促进伤口愈合；更重要的是，间充质干细胞通过旁分泌多种损伤修复相关营养因子，显著促进血管再生和组织重塑等 [28]。然而，尽管间充质干细胞移植对皮肤损伤修复具有积极效果，但移植的细胞存活率低等问题限制了疗效的进一步提升 [29]。近年来，间充质干细胞旁分泌组的研究取得了显著进展，大量研究发现其损伤修复效果甚至不亚于细胞本身。间充质干细胞旁分泌组促进皮肤损伤愈合的主要机制是增加细胞迁移和细胞增殖作用，以促进血管生成、再上皮化和胶原沉积等 [30]。有研究报道显示使用骨髓来源间充质干细胞分泌组可显著加快伤口愈合速率，促进肉芽组织形成、血管和毛囊再生，通过中性粒细胞和巨噬细胞浸润发挥免疫调节作用，并在体内发挥一定的抗菌作用 [31]。因此，间充质干细胞分泌组被视为是一种具有潜力的“无细胞疗法”[32]，这种治疗方法避免了细胞移植后的一系列不确定风险，不仅安全性更高，而且易于获取、储存、移植和临床转化 [33]。目前，提升间充质干细胞分泌组治疗效率的研究正在不断深入，有望为临床化应用提供更多科研基础。

相较于常规的二维培养皿培养模式，三维培养技术可通过模拟细胞体内生态位，显著增强细胞与细胞、细胞与基质以及细胞与环境之间的相互作用 [34]，进而增强间充质干细胞的旁分泌效应，提高间充质干细胞分泌组的治疗效果 [35]。因此，该实验对三维 HUCMSCs-Sec 治疗皮肤损伤的效果进行了验证。

皮肤伤口愈合是一个涉及多种细胞和生物活性因子协同作用的过程 [36]，这些因子在炎症调节、血管再生、上皮化、肉芽组织形成和胶原再生等方面发挥着重要作用 [37]。如转化生长因子 β 通过调节伤口处单核细胞转化形成巨噬细胞减少炎症反应 [38]；碱性成纤维细胞生长因子参与肉芽组织再生、

再上皮化和组织重塑[39]；血管内皮生长因子在伤口炎症晚期和修复增殖期发挥作用，对伤口肉芽组织生成、血管再生和胶原纤维合成有重要作用[40]；白细胞介素10作为一种抗炎性细胞因子，在调控创伤性炎症反应中发挥重要作用[41]；此外，在整个损伤愈合过程中，肝细胞生长因子[42]、肿瘤坏死因子刺激因子6[43]、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子等也发挥着重要作用[44-45]。通过RT-qPCR检测二维和三维培养模式下人脐带间充质干细胞中这些分泌因子的表达，发现三维培养的人脐带间充质干细胞微球中上述分泌因子的表达水平均显著上调，表明两种培养模式下的人脐带间充质干细胞旁分泌因子在基因水平上存在显著差异。同时，ELISA检测也显示三维HUCMSCs-Sec中血管内皮生长因子、白细胞介素10、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子等关键因子的蛋白表达水平也显著上调，进一步证实了三维培养对HUCMSCs-Sec的分泌有显著提升作用。

血管再生是指毛细血管以出芽的方式形成新血管，对伤口部位氧气和营养物质输送进而促进皮肤组织修复和再生至关重要[46]。为了进一步探究三维HUCMSCs-Sec在血管再生方面的治疗有效性，利用人脐静脉内皮细胞迁移模型体外模拟了血管损伤，并对比了二维和三维HUCMSCs-Sec对人脐静脉内皮细胞迁移的影响。实验结果显示，与DMEM培养基和二维HUCMSCs-Sec相比，20%和50%的三维HUCMSCs-Sec均能促进划痕损伤修复，这一发现提示三维培养可能显著提升了HUCMSCs-Sec对皮肤损伤修复的潜能。

伤口愈合是皮肤损伤修复的关键指标之一，是一个涉及炎症调节、血管新生、再上皮化和伤口闭合等多个生理现象的动态过程，因此，接下来验证了二维和三维HUCMSCs-Sec促进小鼠皮肤损伤修复的潜能，结果显示：与无处理对照组相比，二维HUCMSCs-Sec治疗组小鼠伤口愈合速率、皮肤结构重塑以及血管再生这些主要的修复指标都没有显著恢复效果，而三维HUCMSCs-Sec治疗组小鼠则表现出更轻的炎症反应和更快的伤口愈合速率。病理染色结果也显示，三维HUCMSCs-Sec治疗组小鼠皮肤结构恢复更加完整，有明显的毛囊和微血管新生。以上结果均表明三维HUCMSCs-Sec对小鼠皮肤损伤模型具有良好的治疗作用。

然而，实验还存在一些局限性：首先，三维HUCMSCs-Sec的成分复杂，关键组分和机制尚不明确[47]；其次，不同批次和状态的细胞产生分泌因子的能力会有所差异，进而导致HUCMSCs-Sec中有效治疗因子的含量难以控制[48]；更重要的是，该实验采用的皮下注射给药方式虽然避免了静脉注射给药时HUCMSCs-Sec在非损伤部位吸收产生的不良反应，但HUCMSCs-Sec作为一种生物活性物质混合物，在皮肤损伤处的稳定性较差、易降解、有效成分难以长期保留、需要连续注射。因此，未来的研究需要进一步优化给药方式[49]、剂量和时间等参数以提高治疗效果，为HUCMSCs-Sec的临床应用提供理论参考。

致谢：感谢军事科学院军事医学研究院实验室提供实验平台，感谢邢晓雯师姐对实验设计的指导和意见。

作者贡献：实验设计为刘志强、白睿，实验实施、论文撰写为马文静，细胞培养及指标检测为马文静、修冰水、姜明霞，动物实验为马文静、张晋豫、刘玉含，数据和文章校对为陈旭义，文章审核为刘志强、袁增强。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] HSU YC, FUCHS E. Building and Maintaining the Skin. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2022;14(7):a040840.
[2] QI L, ZHANG C, WANG B, et al. Progress in Hydrogels for Skin Wound Repair. Macromol Biosci. 2022;22(7):e2100475.
[3] DING JY, CHEN MJ, WU LF, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: roles, opportunities and challenges. Mil Med Res. 2023;10(1):36.
[4] VAZQUEZ-ZAPIEN GJ, MARTINEZ-CUAZITL A, GRANADOS-JIMENEZ A, et al. Skin wound healing improvement in diabetic mice through FTIR microspectroscopy after implanting pluripotent stem cells. APL Bioeng. 2023;7(1):016109.
[5] LUO R, DAI J, ZHANG J, et al. Accelerated Skin Wound Healing by Electrical Stimulation. Adv Healthc Mater. 2021;10(16):e2100557.
[6] SADEGHI-AGHBASH M, RAHIMNEJAD M, ADELI H, et al. Wound Healing: An Overview of Wound Dressings on Health Care. Curr Pharm Biotechnol. 2023;24(9):1079-1093.
[7] WILKINSON HN, HARDMAN MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. Open Biol. 2020;10(9):200223.
[8] JU C, LIU D. Exosomal microRNAs from Mesenchymal Stem Cells: Novel Therapeutic Effect in Wound Healing. Tissue Eng Regen Med. 2023;20(5):647-660.
[9] ZHOU C, ZHANG B, YANG Y, et al. Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing. Stem Cell Res Ther. 2023;14(1):107.
[10] TERATANI T, KASAHARA N, FUJIMOTO Y, et al. Mesenchymal Stem Cells Secretions Enhanced ATP Generation on Isolated Islets during Transplantation. Islets. 2022;14(1):69-81.
[11] LI JY, REN KK, ZHANG WJ, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):247.

[12] FANG Z, CHEN P, TANG S, et al. Will mesenchymal stem cells be future directions for treating radiation-induced skin injury? Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):179.
[13] KOLIMI P, NARALA S, NYAVANANDI D, et al. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. Cells. 2022;11(15):2439.
[14] PITTENGER MF, DISCHER DE, PÉAULT BM, et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. NPJ Regen Med. 2019;4:22.
[15] FUGGLE NR, COOPER C, OREFFO ROC, et al. Alternative and complementary therapies in osteoarthritis and cartilage repair. Aging Clin Exp Res. 2020;32(4): 547-560.
[16] YAO H, YUAN X, WU Z, et al. Fabrication and Performance Evaluation of Gelatin/Sodium Alginate Hydrogel-Based Macrophage and MSC Cell-Encapsulated Paracrine System with Potential Application in Wound Healing. Int J Mol Sci. 2023;24(2):1240.
[17] L PK, KANDOI S, MISRA R, et al. The mesenchymal stem cell secretome: A new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. Cytokine Growth Factor Rev. 2019;46:1-9.
[18] ZHANG C, XIAO J, FA L, et al. Advances in the applications of mesenchymal stem cell-conditioned medium in ocular diseases. Exp Eye Res. 2023;233:109560.
[19] CHEN W, SUN Y, GU X, et al. Conditioned medium of human bone marrow-derived stem cells promotes tendon-bone healing of the rotator cuff in a rat model. Biomaterials. 2021;271:120714.
[20] ALIDOUST L, AKHOONDIAN M, ATEFI AH, et al. Stem cell-conditioned medium is a promising treatment for Alzheimer's disease. Behav Brain Res. 2023;452:114543.
[21] LI X, ZHANG D, YU Y, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell secretome promotes skin regeneration and rejuvenation: From mechanism to therapeutics. Cell Prolif. 2024;57(4):e13586.
[22] WANG X, WANG Q, YIN P, et al. Secretome of human umbilical cord mesenchymal stem cell maintains skin homeostasis by regulating multiple skin physiological function. Cell Tissue Res. 2023;391(1): 111-125.
[23] SON YH, YANG DH, URICOLI B, et al. Three-Dimensional Cell Culture System for Tendon Tissue Engineering. Tissue Eng Regen Med. 2023; 20(4):553-562.
[24] BIAŁKOWSKA K, KOMOROWSKI P, BRYSZEWSKA M, et al. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. Int J Mol Sci. 2020; 21(17):6225.
[25] MAEDA Y, MITSUHARA T, TAKEDA M, et al. Repeated human cranial bone-derived mesenchymal stem cell transplantation improved electrophysiological recovery in a spinal cord injury rat model. Neurosci Lett. 2025;844:138031.
[26] CHENG Y, SONG G. Mesenchymal stem cells and skin injury repair. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2021;38(2):387-392.
[27] 程延思危 , 宋关斌 . 间充质干细胞与皮肤的损伤修复 [J]. 生物医学工程学杂志 ,2021,38(2):387-392.
[28] KIM JH, GREEN DS, JU YM, et al. Identification and characterization of stem cell secretome-based recombinant proteins for wound healing applications. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:954682.
[29] LASOCKA I, JASTRZĘBSKA E, SZULC-DĄBROWSKA L, et al. The effects of graphene and mesenchymal stem cells in cutaneous wound healing and their putative action mechanism. Int J Nanomedicine. 2019;14: 2281-2299.
[30] LI Z, WANG Y, WANG H, et al. Self-Assembled DNA Composite-Engineered Mesenchymal Stem Cells for Improved Skin-Wound Repair. Small. 2024;20(31):e2310241.
[31] DAMAYANTI RH, RUSDIANA T, WATHONI N. Mesenchymal Stem Cell Secretome for Dermatology Application: A Review. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2021;14:1401-1412.
[32] RAJESH A, JU EDE, OXFORD KA, et al. The mesenchymal stromal cell secretome promotes tissue regeneration and increases macrophage infiltration in acute and methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected skin wounds in vivo. Cytotherapy. 2024;26(11):1400-1410.
[33] SUN J, ZHANG Y, SONG X, et al. The Healing Effects of Conditioned Medium Derived from Mesenchymal Stem Cells on Radiation-Induced Skin Wounds in Rats. Cell Transplant. 2019;28(1):105-115.
[34] LIN H, CHEN H, ZHAO X, et al. Advances in mesenchymal stem cell conditioned medium-mediated periodontal tissue regeneration. J Transl Med. 2021;19(1):456.
[35] LIU G, DAVID BT, TRAWCZYNSKI M, et al. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. Stem Cell Rev Rep. 2020;16(1):3-32.
[36] KIM MH, WU WH, CHOI JH, et al. Galectin-1 from conditioned medium of three-dimensional culture of adipose-derived stem cells accelerates migration and proliferation of human keratinocytes and fibroblasts. Wound Repair Regen. 2018;26 Suppl 1:S9-S18.
[37] RAJA IS, JANG HJ, KANG MS, et al. Role of Graphene Family Nanomaterials in Skin Wound Healing and Regeneration. Adv Exp Med Biol. 2022;1351:89-105.
[38] BRUNCHUKOV V, ASTRELINA T, USUPZHANOVA D, et al. Evaluation of the Effectiveness of Mesenchymal Stem Cells of the Placenta and Their Conditioned Medium in Local Radiation Injuries. Cells. 2020;9(12):2558.
[39] ZHANG G, LI J, WANG D, et al. The mechanisms related to fibroblasts in burn surface. Skin Res Technol. 2023;29(8):e13431.
[40] AKITA S, AKINO K, IMAIZUMI T, et al. Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. Wound Repair Regen. 2008;16(5):635-641.
[41] MANDLA S, DAVENPORT HUYER L, RADISIC M. Review: Multimodal bioactive material approaches for wound healing. APL Bioeng. 2018; 2(2):021503.
[42] MŰZES G, SIPOS F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome: A Potential Therapeutic Option for Autoimmune and Immune-Mediated Inflammatory Diseases. Cells. 2022;11(15):2300.
[43] JO H, BRITO S, KWAK BM, et al. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. Int J Mol Sci. 2021;22(5):2410.
[44] KWON JW, SAVITRI C, AN B, et al. Mesenchymal stem cell-derived secretomes-enriched alginate/ extracellular matrix hydrogel patch accelerates skin wound healing. Biomater Res. 2023;27(1):107.
[45] WERNER S, GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiol Rev. 2003;83(3):835-870.
[46] WU S, SUN S, FU W, et al. The Role and Prospects of Mesenchymal Stem Cells in Skin Repair and Regeneration. Biomedicines. 2024; 12(4):743.
[47] WANG Y, CAO Z, WEI Q, et al. VH298-loaded extracellular vesicles released from gelatin methacryloyl hydrogel facilitate diabetic wound healing by HIF-1α-mediated enhancement of angiogenesis. Acta Biomater. 2022;147:342-355.
[48] HEYDARI MB, GHANBARI-MOVAHED Z, HEYDARI M, et al. In vitro study of the mesenchymal stem cells-conditional media role in skin wound healing process: A systematic review. Int Wound J. 2022;19(8): 2210-2223.
[49] NIE S, REN C, LIANG X, et al. Supramolecular Hydrogel-Wrapped Gingival Mesenchymal Stem Cells in Cutaneous Radiation Injury. Cells. 2022;11(19):3089.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)