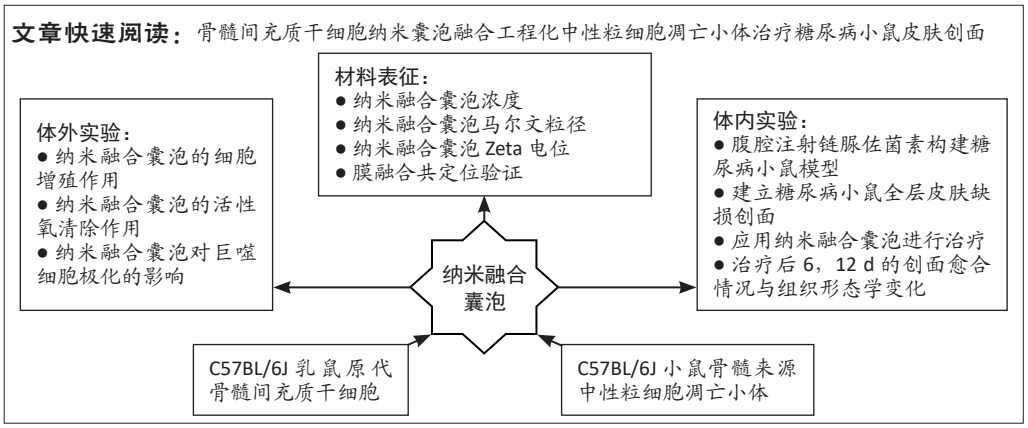
骨髓间充质干细胞纳米囊泡融合中性粒细胞凋亡小体促进糖尿病小鼠皮肤创面愈合

孙展鹏[1]，刘 森[1]，施 灵[1]，陈开元[1]，宋美陈[1]，武 艳[1]，于 晶[2]

https://doi.org/10.12307/2026.507
采用日期：2024-12-31
修回日期：2025-03-17
在线日期：2025-04-03
中图分类号：
R459.9；R318.08；R587.2
文章编号：
2095-4344(2026)01-00034-09
文献标识码：A



文题释义：

骨髓间充质干细胞纳米囊泡：是一种由骨髓间充质干细胞分泌的纳米级细胞外囊泡，含有丰富的生物分子，如脂质、蛋白质、mRNA和miRNA，具有促进细胞生长、抗凋亡、抗炎和抗氧化等作用，在糖尿病伤口愈合中效果显著。

中性粒细胞凋亡小体：在细胞凋亡过程中由中性粒细胞释放的一种特殊类型细胞外囊泡，具有双重靶向性，能启动巨噬细胞极化和促进炎症消退。

摘要

背景：纳米细胞囊泡具有再上皮化、抗氧化、抗炎以及调节细胞外基质重塑等功能，凋亡小体具有免疫调节作用，因此二者结合所形成的纳米融合囊泡可协同促进糖尿病皮肤创面愈合。

目的：探讨纳米融合囊泡对糖尿病小鼠皮肤创面的愈合作用。

方法：①材料制备及表征：分离提取C57BL/6J乳鼠原代骨髓间充质干细胞纳米囊泡和C57BL/6J小鼠骨髓来源中性粒细胞凋亡小体，将二者结合采用微型挤出机制备纳米融合囊泡。②体外实验：采用MTT检测不同浓度纳米融合囊泡对NIH-3T3细胞和人脐静脉内皮细胞的增殖作用；采用活性氧荧光探针检测纳米融合囊泡对过氧化氢干预的NIH-3T3细胞的抗氧化作用；采用实时定量RT-qPCR法检测纳米融合囊泡对脂多糖引发的RAW 264.7巨噬细胞炎症反应的抑制效果。③体内实验：36只雄性C57BL/6J小鼠构建糖尿病小鼠模型，造模成功后在糖尿病小鼠脊柱两侧使用打孔机分别制备直径6 mm的2个圆形创面，采用随机数字表法分为3组，对照组创缘皮下注射0.1 mL磷酸盐缓冲液，纳米囊泡组注射0.1 mL 25 μg/mL纳米囊泡，纳米融合囊泡组注射0.1 mL 25 μg/mL纳米融合囊泡，连续治疗3 d，观察创面愈合情况与组织形态学变化。

结果与结论：①体外实验：纳米融合囊泡在质量浓度为0−100 μg/mL时均无毒性作用，且可促进NIH-3T3细胞和人脐静脉内皮细胞的增殖，其中25 μg/mL纳米融合囊泡促进NIH-3T3细胞增殖的效果最明显，而人脐静脉内皮细胞的存活率则随着纳米融合囊泡质量浓度的增加不断增强。纳米融合囊泡具有良好的抗氧化效果，与过氧化氢组相比，纳米囊泡组和纳米融合囊泡组的活性氧荧光信号依次减弱。此外，纳米融合囊泡还具有抗炎能力，降低了脂多糖诱导的巨噬细胞炎症反应。②体内实验：苏木精−伊红染色与Masson染色显示，与对照组相比，术后第6天纳米囊泡组和纳米融合囊泡组创面均表达出丰富的胶原纤维以及肉芽组织，其中以纳米融合囊泡组最多；术后第12天，纳米融合囊泡组创面显著缩小，且愈合速度显著快于其他组，促创面愈合效果最为显著。结果表明，纳米融合囊泡能够展现出促细胞增殖、抗氧化和抗炎特性，从而在促进糖尿病小鼠皮肤创面愈合过程中发挥积极作用。

关键词：骨髓间充质干细胞；中性粒细胞；凋亡小体；纳米融合囊泡；抗氧化；抗炎；糖尿病；皮肤创面

Bone marrow mesenchymal stem cell nanovesicles fusion neutrophil apoptotic bodies promote skin wound healing in diabetic mice

Sun Zhanpeng[1], Liu Sen[1], Shi Ling[1], Chen Kaiyuan[1], Song Meichen[1], Wu Yan[1], Yu Jing[2]

[1]College of Life Sciences, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157001, Heilongjiang Province, China; [2]Department of Endocrinology, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157001, Heilongjiang Province, China

Sun Zhanpeng, Research assistant, College of Life Sciences, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157001, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Yu Jing, MS, Associate chief physician, Department of Endocrinology, Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157001, Heilongjiang Province, China

[1] 牡丹江医科大学生命科学学院，黑龙江省牡丹江市 157001；[2] 牡丹江医科大学附属红旗医院内分泌科，黑龙江省牡丹江市 157001

第一作者：孙展鹏，1983 年生，黑龙江省饶河县人，汉族，2006 年八一农垦大学毕业，助理研究员，主要从事组织损伤与修复研究。

通讯作者：于晶，硕士，副主任医师，牡丹江医科大学附属红旗医院内分泌科，黑龙江省牡丹江市 157001

https://orcid.org/0009-0005-9435-4057(于晶)

基金资助：牡丹江市指导性科技计划项目 (HT2022JG125)，项目负责人：武艳

引用本文：孙展鹏，刘森，施灵，陈开元，宋美陈，武艳，于晶 . 骨髓间充质干细胞纳米囊泡融合中性粒细胞凋亡小体促进糖尿病小鼠皮肤创面愈合 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):34-42.

Abstract

BACKGROUND: Nanocell vesicles possess functions such as re-epithelialization, antioxidation, anti-inflammation, and regulation of extracellular matrix remodeling. Meanwhile, apoptotic bodies have the immunomodulatory effects. Therefore, the combination of the two to form nanofusion vesicles can synergistically promote the healing of diabetic skin wounds.

OBJECTIVE: To elucidate the impact of nanofusion vesicles on skin wound healing in a diabetic murine model.

METHODS: (1) Material preparation and characterization: The primary bone marrow mesenchymal stem cells of C57BL/6J neonatal mice and the neutrophil apoptotic bodies of C57BL/6J mice were isolated and extracted. The nanofusion vesicles were prepared by micro-extrusion mechanism. (2) *In vitro* experiment: MTT assay was used to detect the proliferative effect of different concentrations of nanofusion vesicles on NIH-3T3 cells and human umbilical vein endothelial cells. Reactive oxygen species fluorescence probe was used to detect the antioxidant effect of nano-fusion vesicles on NIH-3T3 cells treated with hydrogen peroxide (H_2O_2). The inhibitory effect of nanofusion vesicles on RAW 264.7 macrophage inflammation induced by lipopolyside was detected by real-time quantitative RT-qPCR. (3) *In vivo* experiment: 36 male C57BL/6J mice were employed to develop a murine model of diabetes mellitus. Following the successful induction of diabetes, two circular full-thickness wounds, each with a diameter of 6 mm, were created on either side of the diabetic mice's spine using a skin punch. The mice were divided into three groups by random number table method. The control group was injected with 0.1 mL of phosphate buffer solution. The nanovesicle group was injected with 0.1 mL nanovesicles (25 μg/mL). The nanofusion vesicle group was injected with 0.1 mL nanofusion (25 μg/mL) vesicles. After treatment for three consecutive days, the wound healing and histomorphological changes were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) *In vitro* experiment: nanofusion vesicles, when administered at concentrations ranging from 0 to 100 μg/mL, exhibited no toxic effects and promoted the proliferation of NIH-3T3 and HUVEC cell lines. Notably, a concentration of 25 μg/mL nanofusion vesicle significantly enhanced the proliferation of NIH-3T3 cells. Furthermore, the survival rate of human umbilical vein endothelial cells was observed to increase in correlation with escalating concentrations of nanofusion vesicles. Nanofusion vesicles had a good antioxidant effect. In comparison to the H_2O_2 group, the fluorescence signal indicative of reactive oxygen species was progressively diminished in both the nanovesicle group and the nanofusion vesicle group. Furthermore, nanofusion vesicles possessed anti-inflammatory capabilities, effectively mitigating the inflammatory response in macrophages triggered by lipopolysaccharide stimulation. (2) *In vivo* experiment: Hematoxylin-eosin and Masson's trichrome staining revealed that in comparison to the control group, both the nanovesicle group and the nanofusion vesicle group exhibited a significant increase in granulation tissue formation and collagen fiber deposition within the wounds by day 6. Notably, the nanofusion vesicle group displayed the most pronounced effects. On day 12, the wound of nanofusion vesicle group was significantly reduced, and the healing rate was significantly faster than that of other groups ($P < 0.01$), and the effect of promoting wound healing was the most significant. Our findings demonstrated that nanofusion vesicles exhibited superior pro-cell proliferative, antioxidant, and anti-inflammatory properties, thereby exerting a beneficial effect on the promotion of skin wound healing in diabetic mouse models.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; neutrophil; apoptotic body; nanofusion vesicle; anti-oxidation; anti-inflammatory; diabetes; skin wound

Funding: *Mudanjiang City Guided Science and Technology Plan Project, No. HT2022JG125 (to WY)*

How to cite this article: *SUN ZP, LIU S, SHI L, CHEN KY, SONG MC, WU Y, YU J. Bone marrow mesenchymal stem cell nanovesicles fusion neutrophil apoptotic bodies promote skin wound healing in diabetic mice. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):34-42.*

0 引言 Introduction

据国际糖尿病联合会统计，预计到 2030 年，全球有 6.43 亿 20–79 岁的成年人罹患糖尿病，这一数字预计在未来几十年内将持续攀升 [1]。糖尿病不仅严重影响患者的生活质量，还带来了一系列严重的并发症，其中，糖尿病足是糖尿病最常见的并发症之一，具有高发病率、低愈合率及易复发性，给临床治疗带来了巨大挑战 [2]。糖尿病创面难以愈合的根源复杂多样，核心机制之一在于高糖环境引发的慢性氧化应激障碍与炎症反应 [3-4]。在高糖环境中，活性氧的过度产生与晚期糖基化终末产物的加速积累共同导致细胞凋亡，使血管网络受损 [5-6]。这一系列病理生理变化不仅削弱了组织的自我修复能力，还加剧了局部的炎症反应，M1 型巨噬细胞持续释放促炎因子和活性氧，形成恶性循环，阻碍了创面的正常愈合过程 [7]。因此，如何有效促进糖尿病创面组织再生、平衡氧化应激状态以及调控炎症反应成为亟待解决的科学问题。

近年来，随着干细胞科学的不断进展，骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs) 由于具备与众不同的免疫调节特性以及卓越的促组织修复能力，在慢性伤口治疗领域展现出广阔的应用前景 [8]。BMSCs 不仅能够分泌多种生长因子和细胞因子，促进细胞增殖、迁移，还能通过细胞间相互作用调节局部免疫微环境，抑制过度炎症反应，为创面的愈合提供有利条件 [9]。尽管 BMSCs 在慢性伤口治疗中的潜力巨大，但直接应用仍面临一些挑战，如细胞存活率低、作用靶点不明确以及可能引起的免疫排斥反应等 [10]。对于严重的炎症和组织损伤，单独使用 BMSCs 可能难以充分发挥全部治疗效果 [11]。

外泌体作为一类由细胞分泌的纳米级囊泡，直径介于 50–100 nm 之间，内部富含核酸、蛋白质及脂质等多种生物分子 [12]。尽管外泌体在细胞治疗中展现出巨大的应用潜力，但分离和纯化过程却面临效率低下的问题，这在一定程度上限制了临床应用的进展 [13]。为了克服这一挑战，研究人员通过机械破碎细胞得到间充质干细胞纳米囊泡，这种纳米级细胞囊泡不仅在大小、形态和蛋白质组成上与外泌体高度相似，而且在产量上远超外泌体，达到了外泌体的 20 倍之多，从而在生产效率上展现出显著的优势 [14]。

基于此，该研究聚焦于探索一种创新的治疗策略，即通过纳米囊泡融合技术，将 BMSCs 的再生潜能与中性粒细胞凋亡小体 (apoptotic bodys，ABs) 的免疫调节特性相结合，构建出纳米融合囊泡。中性粒细胞凋亡小体作为巨噬细胞 M2 极化的关键诱导物，能够有效调节炎症反应，但本身并不具备直接促进组织再生的能力 [15-16]，通过纳米技术将 BMSCs 的活性成分与凋亡小体整合，有望弥补这一缺陷，制备出既能调节免疫微环境又能促进组织修复的纳米融合囊泡。该研究旨在通过体内外实验，系统评估纳米融合囊泡对糖尿病小鼠皮肤创面的治疗效果，旨在探索一种新型的细胞工程技术策略以治疗糖尿病性创面。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 纳米融合囊泡制备、体外细胞实验与体内动物实验，组间比较进行方差分析 (ANOVA)，然后进行 Tukey 检验。

1.2 实验及地点 实验于 2023 年 3 月至 2024 年 8 月在牡丹江医科大学医药研究中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验细胞 NIH-3T3 成纤维细胞 (源自 Balb/c 系小鼠胚胎细胞株) 和 RAW 264.7 巨噬细胞 (源自 Abelson 小鼠白血病病毒诱导的肿瘤) 均购自上海酶研生物科技有限公司；人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells，HUVECs) 购自上海赛百慷生物技术股份有限公司。

1.3.2 实验动物 新生 0–3 d 的 SPF 级 C57BL/6J 乳鼠用于 BMSCs 原代培养；3–4 周龄的雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠用于中性粒细胞的提取；7–8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 36 只，体质量 25–30 g，用于创建糖尿病创面模型，所有小鼠购于牡丹江医学院比较医学中心，动物生产许可证号：SCXK(黑)2019-003。小鼠饲养于温度 (22±2) ℃、相对湿度 (65±10)%、光照 / 黑暗 12 h 交替循环、干净通风的 SPF 级实验动物房，实验动物使用许可证号：SYXK(黑)2019-006，饲养期间自由进食水，适应性喂养 1 周后进行分组实验。

该研究已获得牡丹江医科大学动物伦理委员会审查批准 (伦理号：20230314-53)，严格遵守国家关于动物保护的相关规定。所有实验动物在进行手术前均已实施麻醉，均采取了所有可能的措施以确保将动物的疼痛、不适以及死亡风险降至最低。

1.3.3 实验药物与试剂 异氟烷购于深圳瑞沃德公司；Ⅰ型胶原酶购于美国 Worthington 公司；聚碳酸酯膜购于英国 Whatman 公司；干细胞培养基购于加拿大 STEMCELL 公司；小鼠骨髓中性粒细胞分离液试剂盒购自天津灏洋生物制品科技有限公司；星孢菌素购于北京中科瑞泰生物科技有限公司；DMEM 高糖培养基、RPIM1640 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司；MTT 购于德国 Biofroxx 公司；胰酶消化液、Hoechst、脂多糖、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、细胞膜红色荧光染色试剂盒 (DiI) 和细胞膜绿色荧光染色试剂盒 (Dio) 均购于上海碧云天生物技术有限公司；二甲基亚砜购于美国 Sigma 公司；H_2O_2 购于上海懋康生物科技有限公司；活性氧检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司；RNA 提取试剂盒购于美国 Omega 公司；RNA 反转录试剂盒购于瑞士 Roche 公司；所有引物均购于上海生工生物工程公司；透明剂购于上海雷根生物科技有限公司；链脲佐菌素、瑞氏－姬姆萨复合染色液、苏木精－伊红染色试剂盒和改良 Masson 三色染色试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司。

1.3.4 实验仪器 微型挤出机购于美国 AVanti 公司；二氧化碳培养箱购于美国 Thermo Fisher 公司；超微量核酸蛋白浓度检测仪购于上海琪特分析仪器有限公司；酶标仪 (Spectra Max M2) 购于美国 Molecular Devices 公司；生物显微镜购于德国 Leica 公司；激光共聚焦显微 (FV4000) 购于日本 OLYMPUS 公司；生物组织脱水机 (HS-1000) 购于华速科技有限公司；荧光定量 PCR 仪 (StepOne) 购于美国 ABI 公司；Nanodrop (2000) 购于美国 Thermo Fisher Scientific；纳米粒度及 Zeta 电位分析仪购于英国 Malvern Panalytical 公司；TG 全景组织细胞定量分析系统购于奥地利 TissueGnostics 公司。

1.4 实验方法

1.4.1 BMSCs 的分离、培养 异氟烷作为麻醉剂对乳鼠实施安乐死，在无菌环境下分离出股骨和胫骨，然后用剪刀剪碎，以便于骨髓细胞的释放。将剪碎的骨骼碎片转移到预先准备好的Ⅰ型胶原酶中进行 200 r/min 的振荡处理，持续 1 h 后以 300×*g* 的离心速度离心 10 min，弃上清，使用干细胞完全培养基进行重悬，并接种于 T75 培养瓶中，在 CO_2 细胞培养箱中培养两三天后换液，当细胞生长至 80%–90% 融合时，用 0.25% 胰酶消化，以 1 ∶ 2 进行传代培养。

1.4.2 制备纳米囊泡 将第 3–5 代 BMSCs 消化后置于 15 mL 离心管中，1 000 r/min 离心 5 min，倒掉上清液，使用 pH 值为 7.4 的 PBS 重新悬浮细胞，使用微型挤压机依次通过孔径为 5 μm、1 μm 和 0.2 μm 的聚碳酸酯薄膜，每一层薄膜均需执行 15 次的重复挤压循环，然后在室温下 10 000×*g* 离心 10 min，去除细胞碎片，使用 100 kD 的离心过滤器在室温下 1 000×*g* 离心 15 min，对纳米囊泡进行纯化和浓缩，离心后使用等量的 PBS 重新悬浮纳米囊泡，并重复上述纯化与浓缩流程共 3 次。最后，将样品储存于 −80 ℃的环境中保存。纳米囊泡的浓度用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒测定。

1.4.3 中性粒细胞的分离、培养 将小鼠用异氟烷麻醉后实施安乐死，喷洒适量乙醇进行全面消毒。剪开小鼠背部皮肤，钝性剥离至足部，使两侧腿部完全暴露，然后分离胫骨和股骨并浸泡在冲洗液中，剪掉骨髓两端，暴露骨髓腔，用 1 mL 注射器吸取适量匀浆冲洗液冲洗出骨髓腔内的骨髓，收集单细胞悬液，用 70 μm 筛网过滤至离心管中，450×*g* 离心 10 min，弃去上清，用 1 mL 红细胞沉降液重悬。取一支硅化离心管，依次加入 3 mL 分离液 1 和 1.5 mL 90% 分离液 1 形成梯度液面，再将单细胞悬液样本缓慢加到分离液面上，700×*g* 离心 25 min，离心后稀释液层下方出现两层白色环状细胞层，其中下层为中性粒细胞层。取下层中性粒细胞层，加入 4 mL 清洗液混匀，400×*g* 离心 10 min，弃上清，加入 3–5 倍清洗液混匀，250×*g* 离心 10 min，重复洗涤两三次获得中

性粒细胞，最后在 RPIM1640 培养基中重悬培养。

1.4.4 中性粒细胞的鉴定 取中性粒细胞悬液，稀释 10 倍后取 5–10 μL 滴于载玻片的一端，选取一块新的载玻片用于推片，将载玻片的一端放置于液滴前方，轻轻向另一侧移动，使悬液均匀分散。待涂片放置自然晾干后，将瑞氏吉姆萨染液 A 液覆盖标本 1 min，再加入 B 液于 A 液上面，以洗耳球吹出微风使液面产生涟漪状，使两液充分混合，染色 3–8 min，倾去染液，蒸馏水洗净，干燥后镜检，二甲苯透明，封片胶封固、保存，生物显微镜下观察并拍照。

1.4.5 制备凋亡小体 用 0.5 μm 的星孢菌素作用于体外培养的中性粒细胞 3 h 以诱导细胞凋亡，收集上清液，50×*g* 离心 5 min，以去除细胞和碎片，重复 2 次，然后将上清液以 1 000×*g* 离心 10 min，收集凋亡小体。浓缩的凋亡小体再悬浮于 PBS 中，用 BCA 蛋白检测试剂盒进行定量。

1.4.6 纳米融合囊泡的制备 首先将纳米囊泡和凋亡小体以 1 ∶ 1 的比例混合，然后使用微型挤出机通过孔隙大小为 0.2 μm 聚碳酸酯膜进行挤压，重复 10 次，获得纳米融合囊泡。纳米融合囊泡的浓度用 BCA 蛋白检测试剂盒测定，纳米颗粒的大小和 Zeta 电位由纳米粒度仪及 Zeta 电位分析仪进行分析。

1.4.7 纳米融合囊泡的膜融合验证 首先，将凋亡小体用 Dil 膜染料 (激发波长 / 发射波长 =549/565 nm) 进行标记，而纳米囊泡则用 Dio 膜染料 (激发波长 / 发射波长 =480/510 nm) 进行标记，将标记好的纳米囊泡与凋亡小体以 1 ∶ 1 的比例混合，形成混合液。随后，利用微型挤出机将混合物通过 0.2 μm 孔径的聚碳酸酯膜进行物理挤压，重复 10 次，通过施加足够的机械力，促进纳米囊泡与凋亡小体之间的膜融合。将经过挤压处理的混合物样品置于激光共聚焦显微镜下观察，在特定的激发光下，Dil 标记的凋亡小体发出红色荧光，而 Dio 标记的纳米囊泡发出绿色荧光，观察这两种颜色的荧光是否在同一位置重叠或出现混合色 (黄色)，用来判断纳米囊泡与凋亡小体之间是否发生了膜融合。

1.4.8 纳米融合囊泡对 NIH-3T3 细胞、HUVECs 的增殖作用 将 NIH-3T3 成纤维细胞与 HUVECs 接种于含体积分数 10% 胎牛血清以及 1% 青霉素 – 链霉素双抗的 DMEM 细胞培养基，于 37 ℃的恒温 CO_2 培养箱中培养，然后将这两种细胞以 3×10^3 个 / 孔密度接种至 96 孔培养板中，24 h 后弃去孔中培养基，设置对照组以及不同质量浓度 (5，10，25，50，100 μg/mL) 的纳米融合囊泡组，每组 3 个复孔，每孔 100 μL，继续在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h，每孔加入 100 μL MTT(5 mg/mL)，与细胞孵育 4 h，再加入二甲基亚砜在摇床上低速振荡 10 min，使用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度值，并计算细胞存活率。细胞存活率 (%)=[(*As*−*Ab*)/(*Ac*−*Ab*)]×100%。其中，*As* 代表实验组吸光度，*Ac* 代表对照组吸光度，而 *Ab* 则代表培养基吸光度。

1.4.9 纳米融合囊泡的抗氧化作用 用 2′，7′– 二氯荧光黄双乙酸盐 (dichlorofluorescein diacetate，DCFH-DA) 作为荧光指示剂，以监测细胞内活性氧的生成水平。将对数生长期的 NIH-3T3 细胞以 1×10^5 个 / 孔密度接种到 6 孔板中，置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱内培养 24 h，然后分为以下几组进行处理：未加 H_2O_2 处理的对照组、H_2O_2(600 μmol/L) 组、纳米囊泡 (25 μg/mL)+H_2O_2(600 μmol/L) 组、纳米融合囊泡 (25 μg/mL)+H_2O_2(600 μmol/L) 组，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h，PBS 洗涤细胞，与 10 μmol/L DCFH-DA 探针共孵育 30 min，PBS 洗涤细胞，使用 Hoechst 染细胞核 10 min，用荧光显微镜观察细胞内的荧光信号的强度与分布。

1.4.10 纳米融合囊泡的抗炎效果分析 将对数生长期的 RAW-264.7 巨噬细胞制成单细胞悬液，并按照 5×10^5 个 / 孔密度接种到 6 孔板中，置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中 12 h，然后分为以下几组进行处理：未经过脂多糖处理的对照组、脂多糖 (100 μg/L) 组，脂多糖 + 纳米囊泡 (25 μg/mL) 组和脂多糖 + 纳米融合囊泡 (25 μg/mL) 组，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 培养箱中孵育 24 h，用预冷的 PBS 洗涤细胞，确保完全去除培养基，采用 RNA 提取试剂盒提取细胞内的总 RNA，用超微量核酸蛋白测定仪定量分析 RNA 的浓度，然后将每个样本的总 RNA 反转录为 cDNA，采用实时定量 PCR(RT-qPCR) 检测细胞中 CD86、肿瘤坏死因子 α、CD206、精氨酸酶 1 水平。采用两步法进行 RT-qPCR 反应：95 ℃预变性 10 min；95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 1 min，共 40 个循环。以 GAPDH 作为内源性参照基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目标 mRNA 相对表达量。引物序列见**表 1**。

表 1 | 引物序列信息
Table 1 | **Primer sequence information**

基因	引物序列 (5′–3′)	产物长度 (bp)
CD86	上游：ACG GAG TCA ATG AAG ATT TCC T	151
	下游：GAT TCG GCT TCT TGT GAC ATA C	
肿瘤坏死因子 α	上游：CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CT	61
	下游：GCT ACG ACG TGG GCT ACA G	
CD206	上游：CCT ATG AAA ATT GGG CTT ACG G	131
	下游：CTG ACA AAT CCA GTT GTT GAG G	
精氨酸酶 1	上游：TTG GGT GGA TGC TCA CAC TG	67
	下游：TTG CCC ATG CAG ATT CCC	
GAPDH	上游：GAA GGT GGA AGA GTG GGA GTT	117
	下游：GAC ATC AAG AAG GTG GTG AAG C	

1.4.11 纳米融合囊泡的体内实验

糖尿病创面小鼠模型建立：取 36 只 C57BL/6J 小鼠，禁食 12–16 h 后，腹腔注射链脲佐菌素，第 1 天注射 100 mg/kg，

之后连续 2 d 注射 50 mg/kg。1 周后使用血糖监测仪测量随机血糖水平≥ 16.7 mmol/L 为造模成功。将造模成功的 36 只小鼠按照随机数字表法分成对照组、纳米囊泡组和纳米融合囊泡组，每组 12 只。术前采用异氟烷对小鼠实施呼吸麻醉，剃除背部毛发并用体积分数 75% 乙醇清洁消毒皮肤，在小鼠背部区域沿着脊柱两侧分别做 2 个直径为 6 mm 的全层皮肤缺损创面。对照组在创缘皮下 (即创面周围的 12 点、3 点、6 点及 9 点处) 注射 100 μL 的 PBS，纳米囊泡组在创缘皮下注射 100 μL 的纳米囊泡 (25 μg/mL)，纳米融合囊泡组在创缘皮下注射 100 μL 的纳米融合囊泡 (25 μg/mL)，每日给药 1 次，连续治疗 3 d。每只小鼠单笼饲养，便于长期创面观察。

创面愈合状况评估：在第 0，6，12 天用数码相机拍摄创面的愈合图片，用 Image J 软件统计每个时间点的创面面积并计算创面愈合率。创面愈合率 (%)=(初始缺损创面面积 − 观察时间点的缺损创面面积) / 初始缺损创面面积 ×100%。

糖尿病小鼠皮肤创面组织的病理学变化：在伤后第 6 天和第 12 天，取创面及创周皮肤组织并在 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 24−72 h，随后进行脱水处理和石蜡包埋，切片后 (切片厚度 4 μm) 进行苏木精 − 伊红染色和 Masson 染色，应用 TG 全景组织细胞定量分析系统观察并拍照，全面评估创面组织的病理学特征。

1.5 主要观察指标 纳米融合囊泡促细胞增殖、抗氧化作用和抗炎效果，并进一步评估纳米融合囊泡对小鼠创面愈合的影响。

1.6 统计学分析 使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析及相关图片的绘制。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组比较使用单因素方差分析 (One Way ANOVA)，进一步使用 Tukey 多重检验方法比较各组之间差异，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已通过牡丹江医科大学统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 中性粒细胞的鉴定分析 如**图 1** 所示，在瑞氏染色血涂片中，中性粒细胞的胞体呈现圆形或类圆形，胞质颜色为透明或淡红色，内含许多分散的细小颗粒，呈浅红色或浅紫色；细胞核呈分叶状或杆状。

2.2 纳米融合囊泡的粒径和 Zeta 电位表征 纳米融合囊泡平均粒径与纳米囊泡相似并且粒径分布均匀，峰值粒径分别为 (106.11±7.45) nm 和 (132.73±4.30) nm(**图 2A**)。此外，纳米粒度及 Zeta 电位分析仪显示纳米融合囊泡带负电荷，Zeta 电位为 (−23.6±1.57) mV(**图 2B**)。

2.3 纳米融合囊泡的膜融合验证 如**图 3** 所示，DiI 膜染料 (红色) 标记的凋亡小体和 Dio 膜染料 (绿色) 标记的纳米囊泡通过微型挤出机处理后，形成具有良好荧光共定位的纳米融合囊泡 (黄色)，表明凋亡小体和纳米囊泡发生有效融合。

2.4 纳米融合囊泡对 NIH-3T3 细胞和 HUVECs 增殖的影响 如**图 4** 所示，0−100 μg/mL 范围区间的纳米融合囊泡均能够促进 NIH-3T3 细胞和 HUVECs 的增殖。对于 NIH-3T3 细胞，25 μg/mL 纳米融合囊泡具有最佳的促细胞增殖作用。对于 HUVECs，细胞增殖活性随着纳米融合囊泡浓度的增加而不断增强。基于这一结果，选择 25 μg/mL 纳米融合囊泡进行后续实验研究。

2.5 纳米融合囊泡的抗氧化作用 将 NIH-3T3 细胞与 H_2O_2 (600 μmol/L) 共同孵育模拟氧化应激环境。使用 DCFH-DA 作为荧光指示剂，以监测细胞内活性氧的生成水平。如**图 5** 所示，经 H_2O_2 处理后，细胞内观察到了高强度的荧光信号，这与细胞内活性氧水平显著增高的趋势紧密相关。与 H_2O_2 组相比较，纳米囊泡组和凋亡小体组荧光信号明显减弱，纳米融合囊泡组的活性氧荧光信号最弱，表明纳米融合囊泡可有效降低活性氧的生成。

2.6 纳米融合囊泡的体外抗炎效果 如**图 6** 所示，100 μg/L 脂多糖刺激后巨噬细胞中促炎因子 CD86 和肿瘤坏死因子 α 的表达显著增加，而与脂多糖组相比较，纳米融合囊泡组促炎因子 CD86 和肿瘤坏死因子 α 的表达减少；另外，脂多糖刺激后巨噬细胞中抗炎因子 CD206 和精氨酸酶 1 的表达明显减少，而在纳米融合囊泡作用下 CD206 和精氨酸酶 1 的表达显著增加。

2.7 小鼠创面宏观愈合情况

2.7.1 实验动物数量分析 在实验过程中，所有参与实验的小鼠均未出现死亡现象，故将 36 只小鼠的数据纳入最终结果统计分析。

2.7.2 创面宏观愈合情况 使用小鼠全层糖尿病创面模型来评估纳米融合囊泡对创面愈合的影响。**图 7A** 直观展示了不同时间点各组小鼠伤口愈合的动态变化。**图 7B** 显示，在治疗第 6 天时，与对照组相比，纳米囊泡组和纳米融合囊泡组的创面面积显著缩小，创面愈合率分别为 70.37% 和 84.26%。在治疗第 12 天时，各组创面面积进一步缩小，以纳米融合囊泡组的创面愈合速度最快，创面愈合率达到 94.74%。**图 7C** 为第 0，6，12 天的伤口愈合过程模拟图。以上结果均表明，纳米融合囊泡显著促进了糖尿病小鼠的创面修复。

2.7.3 糖尿病小鼠的创面组织学染色分析 通过组织学染色分析来评估不同处理组的创面愈合效果。在治疗第 6 天时，苏木精 − 伊红染色显示 (**图 8A**，**B**)，纳米囊泡组和纳米融合囊泡组的创面肉芽组织明显增厚，创面长度开始出现

明显差异。其中，对照组的创面长度最长，为 3.539 mm；而纳米融合囊泡组的创面长度最短，为 1.31 mm(图 8C)。在治疗第 12 天时，各组小鼠的创面长度进一步缩短，纳米囊泡组和纳米融合囊泡组的创面长度分别为 1.54 mm 和 0.91 mm，相较于对照组的 2.69 mm，创面愈合速度更快 (图 8D)。此外，纳米融合囊泡组可见大量皮肤附属器，而其他组未能观察到或仅有少量皮肤附属器。Masson 染色显示 (图 8A，B)，在治疗第 6 天时，相较于对照组，其余两组创面产生了更多的胶原沉积。在治疗第 12 天时，所有组相对于第 6 天显示出更多的胶原沉积，尤其是纳米融合囊泡组的胶原沉积最为显著。

3 讨论 Discussion

糖尿病创面恢复问题涉及诸多挑战，因体内氧化应激障碍、炎症、感染等多种不利因素的交互影响，创面常难以正常愈合 [17]，这不仅使患者承受身体上的痛苦，更带来巨大的经济和心理压力 [18]。随着纳米工程技术的不断进步，纳米囊泡在糖尿病创面愈合方面的应用前景广阔 [19]。该研究致力于开发一种全新的治疗策略，旨在利用纳米囊泡融合技术，将 BMSCs 纳米囊泡与中性粒细胞凋亡小体相结合，能够促进创面组织再生，加速愈合过程，并有效减少感染风险，同时不良反应小、安全性高，为糖尿病患者提供了新的治疗选择。

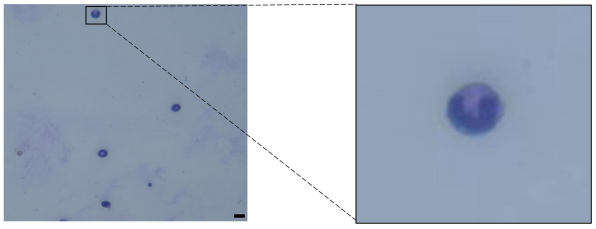
BMSCs 作为一种促进组织损伤与修复的细胞一直受到人们的关注。BMSCs 是干细胞家族的重要成员，来源于发育早期的中胚层，具有自我更新和多向分化的潜能 [20]，BMSCs 分泌的外泌体携带一些特异性的蛋白质以及 mRNAs、miRNAs 等生物活性物质 [21]，在体内参与细胞通讯、促血管新生和抗肿瘤免疫等生理过程，与多种疾病的发生和进程密切相关 [22]。然而，大多数哺乳动物细胞释放的外泌体数量相对较低，并且外泌体的纯化很繁琐，这导致了相对较低的产率 [23]。据相关文献报道，通过机械破碎细胞后得到的纳米细胞囊泡的产量远超天然细胞外囊泡，达到了后者产量的 20 倍 [14]，这一发现预示着模拟外泌体纳米细胞囊泡的发展具有巨大的潜力和吸引力。

中性粒细胞凋亡过程中涉及多种基因和信号通路的调控，其中凋亡小体是中性粒细胞在凋亡过程中形成的一种特殊结构 [24]。在炎症反应中，中性粒细胞的凋亡和随后巨噬细胞的吞噬对于炎症消退和组织修复具有重要作用。凋亡小体被巨噬细胞吞噬且清除，该过程被称为“胞葬作用”，它不仅是一种生理性清除作用机制，而且该过程是凋亡细胞与吞噬细胞之间相互作用的必需阶段 [25-26]。值得一提的是，中性粒细胞凋亡小体在诱导巨噬细胞向 M2 型 (抗炎型) 极化过程中扮演着重要角色，这对于调节免疫反应、促进组织修复具有重要意义 [27]。然而，原位诱导中性粒细胞凋亡的治疗策略可能会对先天免疫反应造成影响，因此需要在治疗过程中谨慎权衡利弊。外源性提供中性粒细胞凋亡小体能够调控复杂的炎性微环境 [28-29]，因此该研究采用工程化的方法体外获取中性粒细胞凋亡小体，并且通过纳米囊泡融合技术，将纳米囊泡和凋亡小体的优势结合起来，构建出纳米融合囊泡，这种融合囊泡能够发挥双重效应，既能够调节免疫微环境，使炎症反应得到适当控制，又能够通过纳米囊泡的再生潜能，直接促进组织的修复和再生。该研究分别从促进细胞增殖、抗氧化作用和抗炎效果 3 个维度综合评价了纳米融合囊泡对糖尿病创面治疗效果的影响。

在糖尿病创面愈合过程中，细胞增殖是至关重要的一环。糖尿病患者由于长期的高血糖状态和微循环障碍，导致伤口周围细胞增殖能力受限，进而影响创面的再上皮化和组织修复 [30]。细胞外囊泡含有许多非编码核糖核酸、DNA 分子、蛋白质和代谢物，可刺激和招募下游分子和效应细胞，诱发一系列级联反应 [31-32]。例如，纳米囊泡所携带的表皮生长因子和血小板衍生生长因子，可与成纤维细胞上的相应受体结合，激活 PI3K/AKT/mTOR 通路，从而促进成纤维细胞的增殖和活化 [33]。纳米囊泡中还含有 microRNAs 和其他非编码 RNA，这些分子可以被受体细胞摄取并影响基因表达，进而调节细胞增殖和分化 [34-35]。有研究发现源于人脐血间充质干细胞的外泌体能有效促进创面愈合，通过抑制转化生长因子 β 受体展现出强大的促细胞增殖和迁移能力，为伤口修复提供了新的治疗途径 [36]。课题组前期通过脂质体挤出机制备的 BMSCs 纳米细胞囊泡能够显著促进 NIH-3T3 细胞增殖、迁移 [37]，这与该研究实验结果相一致，纳米细胞囊泡同样赋予了纳米融合囊泡促进细胞增殖的作用。

此外，在高血糖环境下，免疫细胞及其他细胞产生的活性氧增多，这一现象会触发包括蛋白激酶 C 激活、核因子 κB 信号通路介导的炎症反应，以及血管通透性变化在内的多种细胞机制，这些反应最终导致糖尿病伤口愈合困难 [38-39]。因此，研发一种能够清除伤口处活性氧的材料有助于促进糖尿病创面愈合。WU 等 [40] 发现 BMSCs 衍生纳米囊泡具有清除活性氧和免疫调节活性。该实验结果显示，与对照组相比，纳米融合囊泡组 NIH-3T3 细胞内活性氧水平明显降低，提示纳米融合囊泡可能通过降低活性氧的生成，以减轻氧化应激反应，进而促进创面愈合，这也再次验证了纳米融合囊泡在调控氧化应激平衡中的治疗潜力。

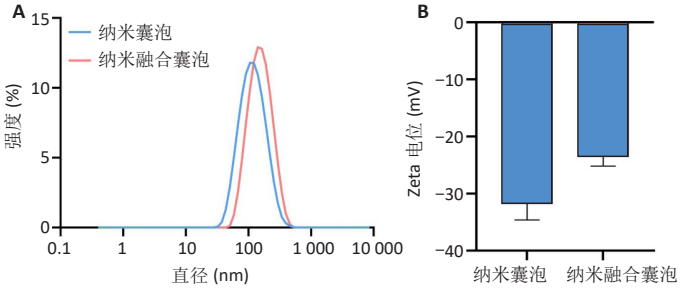
炎症反应在调控伤口愈合和再生中具有重要作用，适当的炎症反应能够有效清除坏死组织和微生物，启动组织修



图注：中性粒细胞的形态学鉴定照片，比例尺为 50 μm。

图 1 | 小鼠骨髓来源中性粒细胞的鉴定

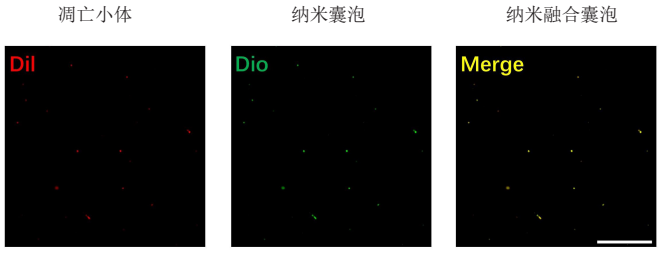
Figure 1 | Identification of mouse bone marrow-derived neutrophils



图注：图 A 为纳米囊泡和纳米融合囊泡的粒径分析；B 为纳米囊泡和纳米融合囊泡的 Zeta 电位分析。

图 2 | 纳米融合囊泡的表征

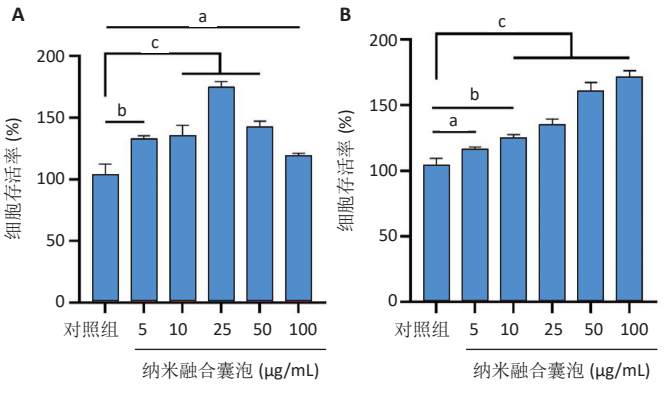
Figure 2 | Characterization of nanofusion vesicles



图注：激光共聚焦显微镜下，凋亡小体 (红色) 与纳米囊泡 (绿色) 形成纳米融合囊泡 (黄色) 的融合效果图像。比例尺为 10 μm。

图 3 | 纳米融合囊泡的融合鉴定

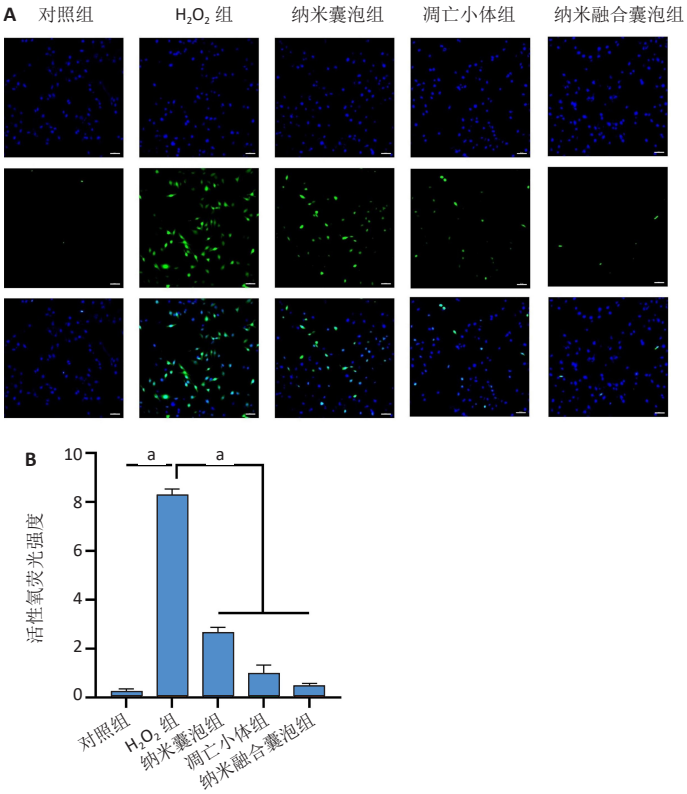
Figure 3 | Fusion identification of nanofusion vesicles



图注：图 A 为不同质量浓度纳米融合囊泡对 NIH-3T3 细胞增殖的作用；B 为不同质量浓度纳米融合囊泡对 HUVECs 增殖的作用。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.001$，$^{c}P < 0.000\ 1$。

图 4 | 纳米融合囊泡对 NIH-3T3 细胞和人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 增殖的影响

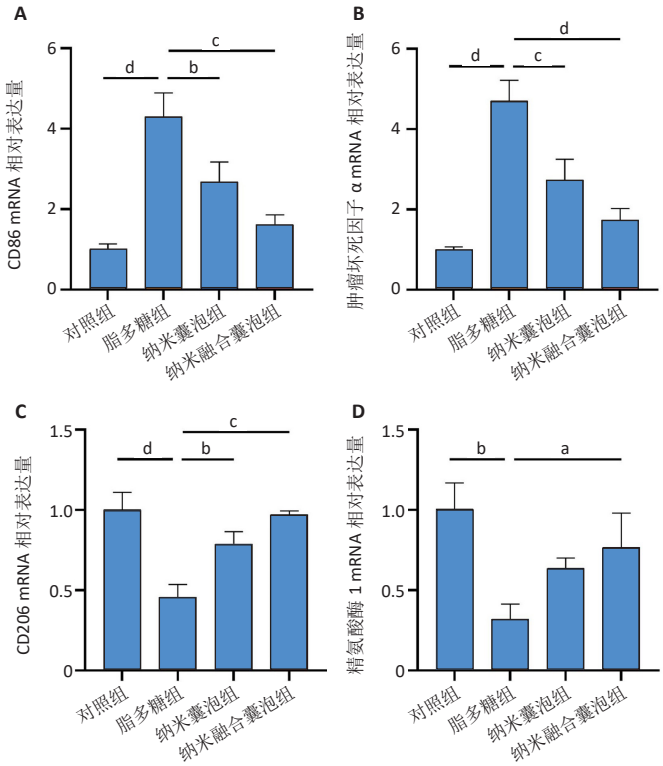
Figure 4 | Effect of nanofusion vesicles on proliferation of NIH-3T3 cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)



图注：图 A 为荧光显微镜观察活性氧荧光信号的强度和分布，比例尺为 50 μm；B 为活性氧荧光强度的定量分析。$^{a}P < 0.000\ 1$。

图 5 | 纳米融合囊泡的抗氧化作用

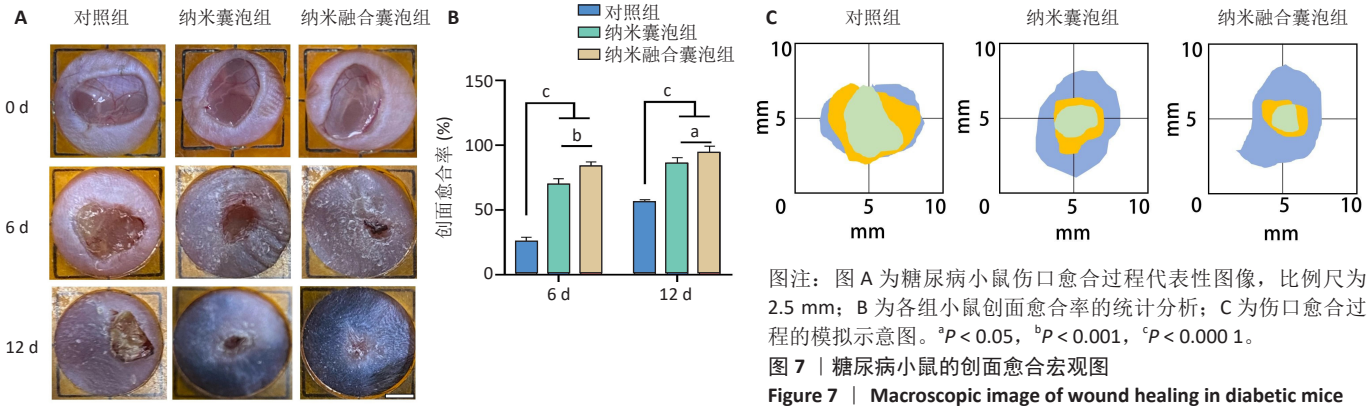
Figure 5 | Antioxidant effects of nanofusion vesicles



图注：图 A–D 分别为 CD86、肿瘤坏死因子 α、CD206 和精氨酸酶 1 的 mRNA 表达，其中 CD86、肿瘤坏死因子 α 代表促炎细胞因子，CD206 和精氨酸酶 1 代表抗炎细胞因子。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$，$^{d}P < 0.000\ 1$。

图 6 | 纳米融合囊泡的抗炎作用

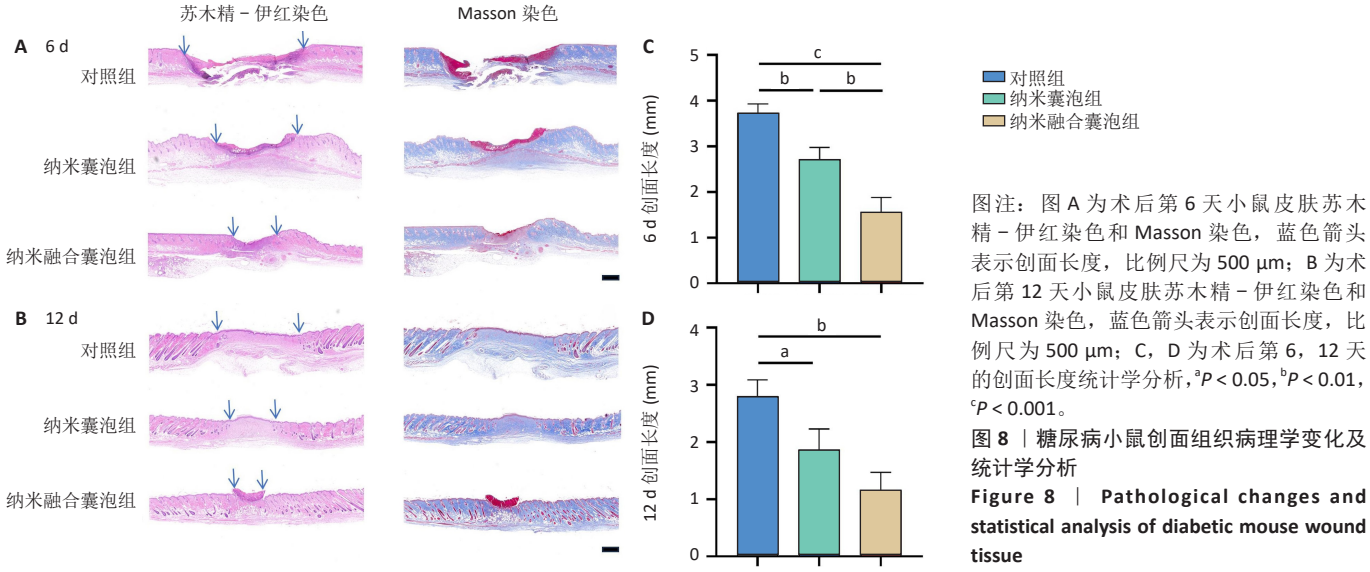
Figure 6 | Anti-inflammatory effect of nanofusion vesicles



图注：图 A 为糖尿病小鼠伤口愈合过程代表性图像，比例尺为 2.5 mm；B 为各组小鼠创面愈合率的统计分析；C 为伤口愈合过程的模拟示意图。$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.001$，$^{c}P < 0.000\ 1$。

图 7 | 糖尿病小鼠的创面愈合宏观图

Figure 7 | Macroscopic image of wound healing in diabetic mice



图注：图 A 为术后第 6 天小鼠皮肤苏木精－伊红染色和 Masson 染色，蓝色箭头表示创面长度，比例尺为 500 μm；B 为术后第 12 天小鼠皮肤苏木精－伊红染色和 Masson 染色，蓝色箭头表示创面长度，比例尺为 500 μm；C，D 为术后第 6，12 天的创面长度统计学分析，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$。

图 8 | 糖尿病小鼠创面组织病理学变化及统计学分析

Figure 8 | Pathological changes and statistical analysis of diabetic mouse wound tissue

复过程，而过度或不足的炎症反应则可能对伤口的愈合产生不利影响[41]。为解决这一难题，该研究创新性地提出利用具有出色的嗜炎性和免疫调节性能的外源性凋亡小体，从而实现调控巨噬细胞向抗炎表型极化，改善炎症微环境，促进糖尿病创面愈合。BAO 等[42]同样也基于这一理论基础将天然中性粒细胞凋亡小体膜与负载 5− 氨基乙酰丙酸己酯盐酸盐的介孔二氧化硅纳米颗粒相结合，靶向调控巨噬细胞和炎性 HUVECs，促进组织再生，以修复心脏功能。该研究采用脂多糖诱导巨噬细胞炎症模型，选取 CD86、肿瘤坏死因子 α、CD206 和精氨酸酶 1 作为炎症相关标志物进行评估，实验结果表明纳米融合囊泡能够降低促炎因子的表达水平，并增强抗炎因子的表达水平。

在体内动物实验中，与对照组相比，纳米融合囊泡组促进伤口愈合的效果最显著，尤其是在伤口愈合的早期阶段 (0−6 d)，这是由于伤口早期的炎症反应较为剧烈，而凋亡小体发挥了较好的抗炎作用。纳米融合囊泡具有促进细胞增殖、抗炎及抗氧化的特性，进而在修复周期内有效促进了上皮细胞的迁移和增殖以及肉芽组织的形成[43]，加速了伤口的闭合。

综上所述，纳米融合囊泡具有良好的促细胞增殖、抗氧化和抗炎能力，可有效促进糖尿病创面愈合，为修复糖尿病难愈合创面提供了一种有前途的治疗策略，同时，这一创新性治疗策略的提出，也有望为许多疾病的治疗提供新的思路和方向。虽然工程化纳米融合囊泡具有诸多优点，但在临床推广之前还需要在大型动物、复杂的疾病模型中进一步验证。

作者贡献：实验设计为孙展鹏，实验实施为孙展鹏、刘森、施灵、陈开元、宋美陈，实验评估为武艳，资料收集为施灵、宋美陈。刘森、施灵成文，于晶审校。

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] CEFALU WT, RIDDLE MC. More Evidence for a Prevention-Related Indication for Metformin: Let the Arguments Resume! Diabetes Care. 2019;42(4): 499-501.
[2] YU L, QIN J, XING J, et al. The mechanisms of exosomes in diabetic foot ulcers healing: a detailed review. J Mol Med (Berl). 2023;101(10): 1209-1228.
[3] GENG X, QI Y, LIU X, et al. A multifunctional antibacterial and self-healing hydrogel laden with bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes for accelerating diabetic wound healing. Biomater Adv. 2022;133:112613.
[4] DENG H, LI B, SHEN Q, et al. Mechanisms of diabetic foot ulceration: A review. J Diabetes. 2023;15(4):299-312.
[5] LI Z, ZHONG Q, YANG T, et al. The role of profilin-1 in endothelial cell injury induced by advanced glycation end products (AGEs). Cardiovasc Diabetol. 2013;12:141.
[6] JU CC, LIU XX, LIU LH, et al. Epigenetic modification: A novel insight into diabetic wound healing. Heliyon. 2024;10(6):e28086.
[7] LI F, LIU T, LIU X, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide hydrogel accelerates diabetic wound healing by regulating macrophage polarization. Int J Biol Macromol. 2024;260(Pt 2):129682.
[8] WU S, ZHOU Z, LI Y, et al. Advancements in diabetic foot ulcer research: Focus on mesenchymal stem cells and their exosomes. Heliyon. 2024; 10(17):e37031.
[9] YU X, LIU P, LI Z, et al. Function and mechanism of mesenchymal stem cells in the healing of diabetic foot wounds. Front Endocrinol (Lausanne). 2023;14:1099310.
[10] SUKMANA BI, MARGIANA R, ALMAJIDI YQ, et al. Supporting wound healing by mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in combination with scaffold, hydrogel, and matrix; State of the art. Pathol Res Pract. 2023;248:154575.
[11] PARK JS, SURYAPRAKASH S, LAO YH, et al. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. Methods. 2015;84:3-16.
[12] HUANG L, WU E, LIAO J, et al. Research Advances of Engineered Exosomes as Drug Delivery Carrier. ACS Omega. 2023;8(46):43374-43387.
[13] MA YN, HU X, KARAKO K, et al. Exploring the multiple therapeutic mechanisms and challenges of mesenchymal stem cell-derived exosomes in Alzheimer's disease. Biosci Trends. 2024;18(5):413-430.
[14] WANG X, HU S, LI J, et al. Extruded Mesenchymal Stem Cell Nanovesicles Are Equally Potent to Natural Extracellular Vesicles in Cardiac Repair. ACS Appl Mater Interfaces. 2021;13(47):55767-55779.
[15] JIAO Y, ZHANG T, ZHANG C, et al. Exosomal miR-30d-5p of neutrophils induces M1 macrophage polarization and primes macrophage pyroptosis in sepsis-related acute lung injury. Crit Care. 2021;25(1):356.
[16] BRAZA MS, CONDE P, GARCIA M, et al. Neutrophil derived CSF1 induces macrophage polarization and promotes transplantation tolerance. Am J Transplant. 2018;18(5):1247-1255.
[17] AKKUS G, SERT M. Diabetic foot ulcers: A devastating complication of diabetes mellitus continues non-stop in spite of new medical treatment modalities. World J Diabetes. 2022;13(12):1106-1121.
[18] SYED MH, SALATA K, HUSSAIN MA, et al. The economic burden of inpatient diabetic foot ulcers in Toronto, Canada. Vascular. 2020;28(5): 520-529.
[19] QIN W, WU Y, LIU J, et al. A Comprehensive Review of the Application of Nanoparticles in Diabetic Wound Healing: Therapeutic Potential and Future Perspectives. Int J Nanomedicine. 2022;17:6007-6029.
[20] LI J, WU Z, ZHAO L, et al. The heterogeneity of mesenchymal stem cells: an important issue to be addressed in cell therapy. Stem Cell Res Ther. 2023;14(1):381.
[21] SHI L, ZHOU Y, YIN Y, et al. Advancing Tissue Damage Repair in Geriatric Diseases: Prospects of Combining Stem Cell-Derived Exosomes with Hydrogels. Int J Nanomedicine. 2024;19:3773-3804.
[22] MONDAL J, PILLARISETTI S, JUNNUTHULA V, et al. Hybrid exosomes, exosome-like nanovesicles and engineered exosomes for therapeutic applications. J Control Release. 2023;353:1127-1149.
[23] CHEN J, LI P, ZHANG T, et al. Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification. Front Bioeng Biotechnol. 2022;9:811971.
[24] CABRINI M, NAHMOD K, GEFFNER J. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival. Curr Opin Hematol. 2010;17(1):31-35.
[25] SKENDROS P, MITROULIS I, RITIS K. Autophagy in Neutrophils: From Granulopoiesis to Neutrophil Extracellular Traps. Front Cell Dev Biol. 2018; 6:109.
[26] DORAN AC, YURDAGUL A JR, TABAS I. Efferocytosis in health and disease. Nat Rev Immunol. 2020;20(4):254-267.
[27] LIEBOLD I, AL JAWAZNEH A, CASAR C, et al. Apoptotic cell identity induces distinct functional responses to IL-4 in efferocytic macrophages. Science. 2024;384(6691):eabo7027.
[28] CAMPBELL EL, KAO DJ, COLGAN SP. Neutrophils and the inflammatory tissue microenvironment in the mucosa. Immunol Rev. 2016;273(1):112-120.
[29] KIM DY, KANG YH, KANG MK. Umbelliferone alleviates impaired wound healing and skin barrier dysfunction in high glucose-exposed dermal fibroblasts and diabetic skins. J Mol Med (Berl). 2024;102(12):1457-1470.
[30] 施芳婷 , 沈佳琪 , 仵敏娟 . 糖尿病难愈性创面的发病机制研究进展 [J]. 生命科学 ,2024,36(4):509-516.
[31] ZAKERI A, KHASEB S, AKHAVAN RAHNAMA M, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells: A promising cell-free therapeutic tool for cutaneous wound healing. Biochimie. 2023;209:73-84.
[32] ABDULMALEK OAAY, HUSAIN KH, ALKHALIFA HKAA, et al. Therapeutic Applications of Stem Cell-Derived Exosomes. Int J Mol Sci. 2024;25(6):3562.
[33] ARIAS-CALDERÓN M, CASAS M, BALANTA-MELO J, et al. Fibroblast growth factor 21 is expressed and secreted from skeletal muscle following electrical stimulation via extracellular ATP activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. Front Endocrinol (Lausanne). 2023;14:1059020.
[34] ZHANG B, BI Y, WANG K, et al. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Promising Therapeutic Opportunities for Diabetic Wound Healing. Int J Nanomedicine. 2024;19:4357-4375.
[35] CHEN P, ZHENG L, WANG Y, et al. Desktop-stereolithography 3D printing of a radially oriented extracellular matrix/mesenchymal stem cell exosome bioink for osteochondral defect regeneration. Theranostics. 2019;9(9):2439-2459.
[36] ZHANG Y, PAN Y, LIU Y, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulate regenerative wound healing via transforming growth factor-β receptor inhibition. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):434.
[37] 苏梦 , 王昕 , 张津 , 等 . 纳米细胞囊泡负载姜黄素促进糖尿病小鼠创面的愈合 [J]. 中国组织工程研究 ,2023,27(12):1877-1883.
[38] FENG J, YAO Y, WANG Q, et al. Exosomes: Potential key players towards novel therapeutic options in diabetic wounds. Biomed Pharmacother. 2023;166:115297.
[39] ZAMANIAN MY, ALSAAB HO, GOLMOHAMMADI M, et al. NF-κB pathway as a molecular target for curcumin in diabetes mellitus treatment: Focusing on oxidative stress and inflammation. Cell Biochem Funct. 2024;42(4):e4030.
[40] WU Y, SU M, ZHANG S, et al. A mesenchymal stem cell-derived nanovesicle-biopotentiated bovine serum albumin-bridged gelatin hydrogel for enhanced diabetic wound therapy. Mater Design. 2023;230:111960.
[41] BURGESS JL, WYANT WA, ABDO ABUJAMRA B, et al. Diabetic Wound-Healing Science. Medicina (Kaunas). 2021;57(10):1072.
[42] BAO L, DOU G, TIAN R, et al. Engineered neutrophil apoptotic bodies ameliorate myocardial infarction by promoting macrophage efferocytosis and inflammation resolution. Bioact Mater. 2021;9:183-197.
[43] DHANDHI S, YESHNA, VISHAL, et al. The interplay of skin architecture and cellular dynamics in wound healing: Insights and innovations in care strategies. Tissue Cell. 2024;91:102578.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)