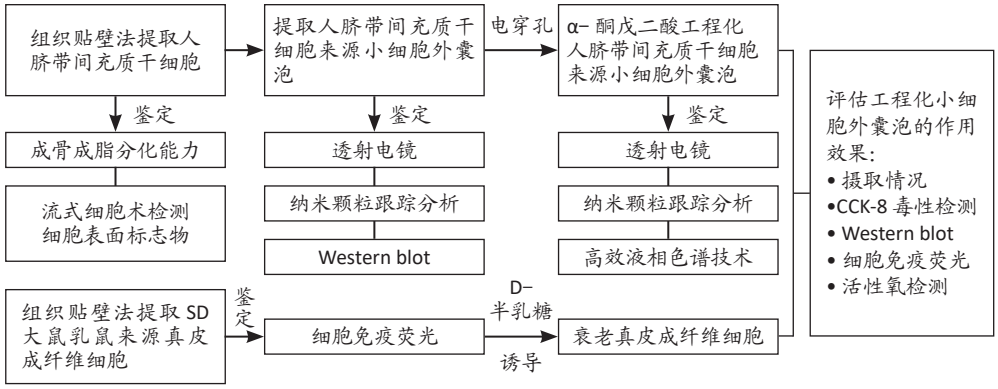
α-酮戊二酸工程化小细胞外囊泡延缓皮肤衰老

吴芷菁[1,2]，李加利[1,2]，张佳昕[1,2]，王唐蓉[1,2]，郑煜洲[1,2]，孙梓暄[1,2]

https://doi.org/10.12307/2026.538
采用日期：2025-01-21
修回日期：2025-03-31
在线日期：2025-04-22
中图分类号：
R459.9；R318；R751
文章编号：
2095-4344(2026)01-00120-10
文献标识码：A

文章快速阅读： α-酮戊二酸工程化人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡延缓真皮成纤维细胞的衰老进程



文题释义：

小细胞外囊泡： 是由细胞分泌的一种直径小于200 nm的具有双层膜结构的纳米囊泡，其中含有蛋白质、核酸和脂质等生物活性成分，在损伤修复方面有巨大的应用前景。

α-酮戊二酸： 是一种小分子化合物，参与三羧酸循环，调节细胞能量代谢，作为多种氨基酸的前体，α-酮戊二酸不仅能直接供能还参与多种化学反应。

摘要

背景： 无细胞疗法是当今医疗美容抗衰领域的研究热点，人脐带间充质干细胞旁分泌的小细胞外囊泡装载抗衰药物α-酮戊二酸延缓皮肤衰老的作用仍然未知。

目的： 探究抗衰老剂α-酮戊二酸工程化人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡在D-半乳糖诱导的真皮成纤维细胞衰老模型中的作用效果。

方法： ①通过成骨、成脂分化实验和流式细胞术对原代人脐带间充质干细胞进行生物学特征鉴定；②使用差速-超速离心法获取人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡，使用电穿孔技术构建α-酮戊二酸工程化人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡，通过透射电子显微镜和纳米颗粒跟踪分析仪进行生物学特征鉴定，同时使用高效液相色谱技术评估包封率；③通过CCK-8和Edu细胞增殖检测试剂盒评估α-酮戊二酸对真皮成纤维细胞增殖能力的影响；④使用活性氧检测试剂盒、Western blot、细胞免疫荧光等评价α-酮戊二酸工程化人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡延缓真皮成纤维细胞衰老的作用效果。

结果与结论： ①所获取的人脐带间充质干细胞以及人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡符合生物学特征；②当α-酮戊二酸的使用浓度范围在0.5-8 mmol/L时，对真皮成纤维细胞无毒性作用；③D-半乳糖诱导了真皮成纤维细胞的衰老，而α-酮戊二酸工程化人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡处理可以降低真皮纤维细胞氧化应激水平、减少DNA损伤、减少胶原蛋白流失，进一步验证了α-酮戊二酸工程化人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡可以有效延缓皮肤衰老进程。

关键词： 小细胞外囊泡；人脐带间充质干细胞；α-酮戊二酸；衰老；真皮成纤维细胞；电穿孔；氧化应激；DNA损伤；工程化细胞外囊泡

Alpha-ketoglutarate engineered small extracellular vesicles delay skin aging

Wu Zhijing[1,2], Li Jiali[1,2], Zhang Jiaxin[1,2], Wang Tangrong[1,2], Zheng Yuzhou[1,2], Sun Zixuan[1,2]

[1]Department of Laboratory Medicine, Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China; [2]Zhenjiang Key Laboratory of High Technology Research on Exosomes Foundation and Transformation Application, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Wu Zhijing, Master candidate, Department of Laboratory Medicine, Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China; Zhenjiang Key Laboratory of High Technology Research on Exosomes Foundation and Transformation Application, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Sun Zixuan, MD, Associate professor, Master's supervisor, Department of Laboratory Medicine, Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China; Zhenjiang Key Laboratory of High Technology Research on Exosomes Foundation and Transformation Application, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China

[1]江苏大学医学院检验医学系，江苏省镇江市 212013；[2]镇江市外泌体基础与转化应用高技术研究重点实验室，江苏省镇江市 212013

第一作者： 吴芷菁，女，2001年生，江苏省江阴市人，汉族，江苏大学在读硕士，主要从事小细胞外囊泡与损伤修复方向的研究。

通讯作者： 孙梓暄，博士，副教授，硕士研究生导师，江苏大学医学院检验医学系，江苏省镇江市 212013；镇江市外泌体基础与转化应用高技术研究重点实验室，江苏省镇江市 212013

https://orcid.org/0009-0002-7031-5094(吴芷菁)

基金资助： 国家自然科学基金项目 (82003379)，项目负责人：孙梓暄

引用本文： 吴芷菁，李加利，张佳昕，王唐蓉，郑煜洲，孙梓暄 . α-酮戊二酸工程化小细胞外囊泡延缓皮肤衰老 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):120-129.

Abstract

BACKGROUND: Cell-free therapy is a research hotspot in the field of medical cosmetic anti-aging. It is still unknown for paracellular secretion of human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles loaded with the antiaging drug α-ketoglutaric acid to delay skin aging.

OBJECTIVE: To investigate the effect of the anti-aging agent α-ketoglutarate engineered human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles in a D-galactose-induced model of dermal fibroblast senescence.

METHODS: (1) Biological characteristics of primary human umbilical cord mesenchymal stem cells were identified by osteogenic-lipogenic differentiation staining and flow cytometry. (2) The small extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cell were obtained by using differential-ultracentrifugation. α-Ketoglutarate-engineered human umbilical cord mesenchymal stem cell-small extracellular vesicles were constructed by electroporation, and biologically characterized by transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analyzer, while the encapsulation rate was assessed using high-performance liquid chromatography. (3) The effect of α-ketoglutarate on the proliferative capacity of dermal fibroblasts was assessed by CCK-8 and Edu cell proliferation assay kits. (4) The effect of α-ketoglutarate-engineered human umbilical cord mesenchymal stem cell-small extracellular vesicles on delaying the senescence of dermal fibroblasts was evaluated by reactive oxygen species detection kit, western blot assay, and cellular immunofluorescence.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The obtained human umbilical cord mesenchymal stem cell and human umbilical cord mesenchymal stem cell-small extracellular vesicles were biologically compatible. (2) There was no toxic effect on dermal fibroblasts when α-ketoglutarate was used in the concentration range of 0.5–8 mmol/L. (3) D-gal induced senescence in dermal fibroblasts, while α-ketoglutarate-engineered human umbilical cord mesenchymal stem cell-small extracellular vesicles treatment reduced the level of oxidative stress, DNA damage, and collagen loss, which was further verified that α-ketoglutarate-engineered human umbilical cord mesenchymal stem cell-small extracellular vesicles could effectively slow down the skin aging process.

Key words: small extracellular vesicle; human umbilical cord mesenchymal stem cell; α-ketoglutarate; senescence; dermal fibroblast; electroporation; oxidative stress; DNA damage; engineered extracellular vesicle

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 82003379 (to SZX)*

How to cite this article: *WU ZJ, LI JL, ZHANG JX, WANG TR, ZHENG YZ, SUN ZX. Alpha-ketoglutarate engineered small extracellular vesicles delay skin aging. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):120-129.*

0 引言 Introduction

随着人口老龄化，衰老引起的皮肤问题日益凸显，包括皮肤干燥、皱纹生成、弹性降低、屏障完整性降低、表皮变薄、色素沉着和伤口愈合迟缓等[1-4]。在衰老过程中，分子、细胞和器官表现出不同层面相互依存的特征[5]。细胞衰老最早被描述为复制性衰老[6]，是皮肤衰老中不可忽视的重要因素，内源性和外源性的刺激因素都会在一定程度上加剧衰老细胞的积累，衰老细胞通过分泌衰老相关分泌表型、炎症因子和活性氧，进一步加剧衰老过程[7-8]。糖摄入水平是近年来人们关注的除紫外线辐射外另一个影响皮肤衰老的关键因素[9-10]。D- 半乳糖作为一种强大的糖基化剂[11]，可以诱导机体产生晚期糖基化终产物并在皮肤中积累[12]，该产物通过诱导氧化应激反应破坏细胞功能，最终加速皮肤衰老[13-14]。

小细胞外囊泡是一种直径小于 200 nm 的双层脂质膜性囊泡[15]，具有携带生物活性物质和分子信号转导的能力。近年来，小细胞外囊泡在皮肤衰老领域得到了广泛关注，有研究人员证明人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡 (human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles，hucMSC-sEV) 可以作为纳米治疗剂，通过 TIMP1/Notch1 通路挽救短波紫外线诱导的皮肤光老化[16]；课题组前期研究发现 hucMSC-sEV 也可以正向调节妊娠区蛋白来抑制基质金属蛋白酶 1 表达，从而预防光老化[17]，这些结果为开发基于小细胞外囊泡的皮肤抗衰纳米制剂奠定了理论基础。此外，由于小细胞外囊泡具有低免疫原性和跨越生物屏障的能力，可保护内容物免受降解，并促进细胞内化，正逐渐发展为潜力巨大的药物递送系统[18-19]。更重要的是，工程化的修饰方法在一定程度上弥补了天然小细胞外囊泡本身靶向性不足、半衰期短、递送效率低等问题，同时也实现了小细胞外囊泡的大规模生产和快速分离，随着纳米医学和材料制造方法的不断推进，未来工程化小细胞外囊泡在再生医学领域将有更广阔的应用前景[20-21]。

α- 酮戊二酸 (α-Ketoglutaric acid，AKG) 是三羧酸循环中的关键分子，在维持细胞代谢平衡与葡萄糖稳态方面有着重要作用[22]。另外，AKG 作为一种新兴的抗衰老小分子药物[23-24]，在皮肤领域的应用涵盖了多个方面，包括改善皮肤水合作用与屏障修复能力[25]、抑制皱纹生成[26]、抗炎和抗氧化等[27-29]，但 AKG 存在膜渗透性较差、半衰期短等缺陷[30]，一定程度上限制了在皮肤领域的应用效能。

该研究使用的膜穿透策略即电穿孔技术[31-32]，在药物装载效率、可控性和可重复性方面显著优于传统共孵育、冻融循环等技术[33-34]，进一步优化 hucMSC-sEV 药物递送系统，同时提高抗衰药物 AKG 皮肤递送的稳定性、渗透性和生物利用度。在此，该实验初步探究了 AKG 工程化 hucMSC-sEV 能否发挥延缓皮肤衰老的功效，为推动其在医疗美容抗衰以及皮肤疾病防治中的转化应用提供理论和技术支撑。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学基础实验，采用 one-way 或 two-way ANOVA 分析。

1.2 时间及地点 实验于 2024 年 4–11 月在江苏大学外泌体基础与转化应用高技术研究重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 选择一两日龄的 SD 大鼠乳鼠，雌性，由江苏大学实验动物中心提供，动物机构许可证号：SCXK(SU) 2023-0017。实验方案均经江苏大学实验动物伦理委员会批准。

1.3.2 实验细胞、试剂和仪器 人脐带间充质干细胞 (江苏大学第四附属医院)；AKG 粉末 (药物滴定纯度≥ 98% titration，R026648-1g，罗恩，上海)；D- 半乳糖粉末 (HY-N0210，MCE，美国)；α-MEM 营养液 (C12571500BT，Gibco，美国)；胎牛血清 (F101-01，Gibco，美国)；PBS(QB1001，山东齐都，中国)；抗生素 (CA0075，北京雷根，中国)；脱脂奶粉 (伊利)；RIPA 蛋白裂解液 (89901+A32961，赛默飞，美国)；Loading Buffer(NP0008，Invitrogen，美国)；α- 平滑肌肌动蛋白抗体 (1 ∶ 500，P62736，Bioworld，美国)；波形蛋白抗体 (1 ∶ 500，5741S，CST，美国)；角蛋白 10 抗体 (1 ∶ 500，RKSE60，Santa Cruz，美国)；CD63(1 ∶ 500，25682-1-AP，Proteintech，美国)；CD9(1 ∶ 500，13174S，CST，美国)；Alix(1 ∶ 500，92880S，CST，美国)；TSG101(1 ∶ 500，28283-1-AP，Proteintech，美国)；Calnexin(1 ∶ 500，2679S，CST，美国)；β-actin(1 ∶ 4 000，AC038，ABclonal，中国)；Ⅰ型胶原 α1 (1 ∶ 500，BS70155，Bioworld，美国)；基质金属蛋白酶 9(1 ∶ 500，A25299，Abclonal，中国)；Bax(1 ∶ 500，50599-2-Ig，Proteintech，美国)；P21(1 ∶ 500，R381102，正能生物，中国)；γH2AX (1 ∶ 500，R381558，正能生物，中国)；ECL(E422-02，Vazyme，中国)；人脐带间充质干细胞成骨诱导分化试剂盒 (HUXUC-90021，Oricell，中国)；人脐带间充质干细胞成脂诱导分化试剂盒 (HUXUC-90031 Oricell，中国)；CCK-8 检测试剂盒 (40203ES80，翌圣生物，中国)；羊抗兔 IgG 二抗偶联 HRP(1 ∶ 4 000，31460，Invitrogen，美国)；羊抗兔 IgG 偶联 FITC(1 ∶ 200，L30113，SAB，美国)；羊抗鼠 IgG 偶联 Cy3(1 ∶ 200，AS008，Abclonal，中国)；鬼笔环肽 (1 ∶ 200，40736ES7，翌圣生物，中国)；CM-DiL(V22888，Invitrogen，美国)；电泳仪 (Biorad，美国)；转膜仪 (Biorad，美国)；化学发光成像仪 (e-BLOT，中国)；倒置光学显微镜 (Nexcope，美国)；透射电子显微镜 (H-7800，日本)；激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP5，德国)；倒置荧光相差生物显微镜 (Nikon Ti2-U，日本)；流式细胞仪 (Beckman Coulter，美国)；纳米颗粒跟踪分析仪 (ZetaView Twin pmx220，德国)；多功能酶标仪 (BioTek，美国)；电转仪 (BEX，日本)；电极杯 (BEX，日本，体系 40-400 μL)。

1.4 实验方法

1.4.1 人脐带间充质干细胞的分离、培养、鉴定 经江苏大学第四附属医院伦理委员会批准 (批准号：202301) 并征得产妇知情同意后，收集产妇新鲜脐带组织。将脐带组织置于含双抗的 PBS 溶液中，剔除静脉和动脉，将组织剪成小块贴于小皿皿底，倒扣晾干后，加入含体积分数 15% 胎牛血清的 α-MEM 培养基，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱中培养至细胞从组织块中爬出。通过成骨、成脂诱导分化试剂盒检测人脐带间充质干细胞的成骨、成脂分化能力，流式细胞术和 Western blot 检测表面标志物表达，收集第 3-7 代人脐带间充质干细胞上清液用于分离提取小细胞外囊泡。

1.4.2 hucMSC-sEV 的分离与鉴定 采用差速 - 超速离心法，将收集的人脐带间充质干细胞上清液在 4 ℃条件下 2 000×*g* 离心 30 min 去除细胞碎片，接着 10 000×*g* 离心 30 min 去除细胞器，将上清转移至 100 kD 超滤离心管中 2 000×*g* 离心 30 min，收集滤芯底部浓缩液，置于超速离心机中 100 000×*g* 离心 2 h，弃一半体积上清，用 PBS 清洗沉淀后再次 100 000×*g* 离心 2 h，最终收集沉淀，加入 PBS 后溶解过夜。将溶解的小细胞外囊泡经 0.22 μm 滤器除菌，溶于 PBS 中，分装保存于 -80 ℃。使用纳米颗粒跟踪分析仪检测粒径大小和 Zeta 电位，透射电镜观察小细胞外囊泡形态，Western blot 鉴定膜表面标志物表达。

1.4.3 真皮成纤维细胞的分离与鉴定 将 SD 大鼠乳鼠处死，使用体积分数 75% 乙醇进行全身消毒，置于含双抗的 PBS 溶液中，剥离背部皮肤，用镊子刮去脂肪组织，剪成小块贴于中皿皿底，倒扣晾干后，加入含体积分数 10% 胎牛血清的 α-MEM 培养基培养 3-7 d，直至细胞从组织块中爬出，通过细胞免疫荧光技术鉴定真皮成纤维细胞的表面标志物。

1.4.4 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的构建

(1) 制备 AKG 工程化 hucMSC-sEV：分别将 5×10^9，1×10^{10}，5×10^{10} 个粒子数的 hucMSC-sEV 与 2 mmol/L AKG 溶于 PBS 中使最终体系为 200 μL，将体系加入电极杯中，放置在电转仪上，在“CHECK”欧姆 < 0.2 的条件下进行电穿孔，之后用 200 μL PBS 润洗电极杯 2 次，放入 37 ℃孵箱孵育 40 min 以恢复小细胞外囊泡的膜结构，接着将体系转移至 100 kD 超滤管中 2 000×*g* 离心 30 min，收集滤芯底部的液体，重复 3 次，最后经 0.22 μm 滤器除菌，溶于 PBS 中。

(2) 透射电镜观察 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的形态：将新鲜的 AKG 工程化 hucMSC-sEV 溶液滴加在铜网上，将铜网倒扣在 pH 6.8 的磷钨酸 (30 g/L) 上负染 5 min，烘干后置于透射电镜下观察。

(3) 纳米颗粒跟踪分析技术检测 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的粒径分布和浓度：用标准品溶液对仪器进行校准，之后用怡宝水以 1 ∶ 1 000 的浓度稀释，用 1 mL 注射器吸取液体，推入大于 1 mL 的待测样品上机检测。

(4) 高效液相色谱技术检测 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的包封率：按“1.4.4(1)”所述方法制备出 AKG 工程化 hucMSC-sEV，收集超滤管中残留的液体，使用高效液相色谱技术测定残留液体中游离的 AKG 含量，采用 Inertsustain® C18，4.6 mm×

250 mm，5 μm 色谱柱，以 0.1 mol/L NaH_2PO_4 缓冲液为流动相，流速为 1 mL/min，紫外检测波长 215 nm，根据 AKG 的标准曲线，计算出游离的药物含量。按以下公式计算出包封率。包封率 (%)=(m_{total}–m_{free})/m_{total}×100%。其中，m_{total} 是溶液中 AKG 的总质量；m_{free} 是溶液中游离的 AKG 质量。

1.4.5 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的体外评价

(1) 真皮成纤维细胞老化防御模型的构建：选择增殖能力强、生长状态良好的第 3–4 代真皮成纤维细胞构建 D– 半乳糖诱导的衰老模型。实验分为正常对照组、D– 半乳糖组、AKG 组、hucMSC-sEV 组和 AKG 工程化 hucMSC-sEV 组，具体干预方式如下：

D– 半乳糖溶液配置和模型构建 (基于课题组前期研究处理浓度)：称取 0.01 g D– 半乳糖粉末溶于 α-MEM 完全培养基中，使 D– 半乳糖的终质量浓度为 10 g/L。在 6 孔板中每孔接种 $2×10^4$ 个真皮成纤维细胞，待细胞贴壁后，弃培养液，加入 1 mL D– 半乳糖溶液处理 24 h。

AKG 溶液配制和处理：4.5 μL AKG 原液 (200 mmol/L) 溶于 995.5 μL 含 D– 半乳糖的 α-MEM 完全培养基中，使得 AKG 的终处理浓度为 0.9 mmol/L，在 6 孔板中加入上述 1 mL AKG 溶液处理 12 h。

HucMSC-sEV 的处理：取适量 hucMSC-sEV 溶于 1 mL 含 D– 半乳糖的 α-MEM 完全培养基中，使得 hucMSC-sEV 的终处理浓度为 $1×10^9$ particles/mL，在 6 孔板中加入 1 mL 上述 hucMSC-sEV 溶液处理 12 h。

AKG 工程化 hucMSC-sEV 的处理：取适量 AKG 工程化 hucMSC-sEV 于 1 mL 含 D– 半乳糖的 α-MEM 完全培养基中，使得 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的终处理浓度为 $1×10^9$ particles/mL，在 6 孔板中加入 1 mL 上述 AKG 工程化 hucMSC-sEV 溶液处理 12 h。

(2) 真皮成纤维细胞摄取 hucMSC-sEV 和 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的检测：将相同浓度的 hucMSC-sEV 或 AKG 工程化 hucMSC-sEV 与 CM-DiL 染料孵育 1 h 得到 DiL-sEV，转移至 100 kD 超滤管中 2 000×*g* 离心 30 min，收集滤芯底部浓缩液，经 0.22 μm 滤器除菌，溶于 PBS 中。将细胞爬片贴于 12 孔板板底，每孔接种 $2×10^4$ 个真皮成纤维细胞，待细胞贴壁后弃去培养液，换成 1 mL 含有 DiL-sEV 的 α-MEM 培养基，于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱避光孵育 12 h。孵育结束后弃培养基，PBS 洗涤后每孔加入 500 μL 40 g/L 多聚甲醛室温固定 10 min，PBS 洗 3 次，再加入 Triton-X 室温破膜 10 min，PBS 洗 3 次，每孔加入 500 μL 5%BSA 室温封闭 90 min，加入鬼笔环肽室温染色 40 min，PBS 洗 3 次，最后加入 Hochest 染料避光孵育 10 min，PBS 洗涤 3 次，加入抗荧光淬灭剂进行封固，在共聚焦显微镜下观察内化情况。

(3)CCK-8 细胞毒性实验：将真皮成纤维细胞按照 800 个 / 孔的密度接种在 96 孔板中，在细胞贴壁后，加入终浓度为 0.5，1，2，4，8 mmol/L 的 AKG 与细胞共孵育，分别孵育 24 h 和 48 h 后，弃培养液，加入 CCK-8 检测试剂，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱中避光孵育 2 h，于酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度值。

(4)CCK-8 细胞增殖实验：将真皮成纤维细胞按照 800 个 / 孔的密度接种在 96 孔板中，在细胞贴壁后，加入终质量浓度为 10 g/L 的 D– 半乳糖溶液，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱中处理 24 h，分别加入终浓度为 0.5，1，2，4，8 mmol/L 的 AKG 与细胞共孵育 12 h，去除培养液，加入 CCK-8 检测试剂，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱中避光孵育 2 h，于酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度值。

(5)Edu 细胞增殖检测：将爬片贴于 12 孔板底部，将真皮成纤维细胞按照 $1×10^4$ 个 / 孔的密度接种在 12 孔板中，在细胞贴壁后，加入终质量浓度为 10 g/L 的 D– 半乳糖溶液，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱中处理 24 h，分别加入终浓度为 0.5，1，2，4，8 mmol/L 的 AKG 与细胞共孵育 12 h，去除培养液，加入 37 ℃预热的 2×Edu 工作液 (20 μmol/L) 以及等体积的培养液，使 Edu 终浓度为 1×，继续孵育细胞 2 h，Edu 标记完成后去除培养液并加入 500 μL 40 g/L 多聚甲醛室温固定 15 min，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 500 μL 0.3%Triton-X 室温破膜 10 min，PBS 洗涤 3 次，将爬片置于载玻片上，每片滴加 50 μL Click 反应液，室温避光孵育 30 min，吸去反应液，PBS 洗涤 3 次，每片加入 50 μL Hoechst(1 ： 1 000) 细胞核染料染色 10 min，PBS 洗涤 3 次，最后在载玻片上滴加抗荧光淬灭剂进行封固，在荧光显微镜下观察。使用 Image J 软件进行 Edu 阳性细胞百分比半定量分析。

(6) 活性氧荧光检测：根据 1.4.5(1) 进行分组处理后，去除培养液，PBS 洗 2 遍，加入 1 mL 无血清细胞培养液稀释的探针，在 37 ℃、体积分数 5% CO_2 孵箱中避光孵育 20 min，用无血清 α-MEM 培养基洗 2 遍去除未结合的 DCFH-DA，于荧光显微镜下观察。使用 Image J 软件进行荧光强度半定量分析。

(7) 细胞免疫荧光：将爬片贴于 12 孔板底部，再将真皮成纤维细胞按照 $4×10^3$ 个 / 孔的密度接种在 12 孔板中，根据 1.4.5(1) 进行分组处理后，去除培养液，PBS 洗涤 2 次，每孔加入 500 μL 40 g/L 多聚甲醛室温固定 10 min，PBS 洗涤 3 次，每孔加入 500 μL 0.1%Triton-X 室温破膜 10 min，PBS 洗涤 3 次，加入 5% BSA 室温封闭 2 h，将爬片置于载玻片上，每片滴加 PBS 稀释的 50 μL Ⅰ型胶原蛋白、γ-H2AX 抗

体 (1 ： 200) 4 ℃孵育过夜，次日回收一抗，PBS 洗涤 3 次，与荧光二抗在室温下孵育 2 h，PBS 洗涤 3 次，每片加入 50 μL Hoechst(1 ： 200) 细胞核染料染色 10 min，PBS 洗涤 3 次，最后在载玻片上滴加抗荧光淬灭剂进行封固，在共聚焦显微镜或荧光显微镜下观察。使用 Image J 软件进行荧光强度半定量分析。

(8)Western blot 检测：根据 1.4.5(1) 进行分组处理后，去除培养液，PBS 洗涤 2 次，加入 200 μL RIPA 蛋白裂解缓冲液，用细胞刮板将细胞刮下并收集在 Ep 管中振荡 1 min，冰上静置 5 min，重复 3 次，在 4 ℃条件下 12 000×*g* 离心 15 min，取上清液弃沉淀，以 1 ： 3 的比例加入 4×Buffer 缓冲液 (Buffer ：上清液 =1 ： 3)，在沸水中煮 10 min，冷却至室温后，−20 ℃保存。蛋白样品通过 SDS-PAGE 电泳分离并转移至 PVDF 膜上，室温条件下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h，将 TBST 稀释的 200 μL 抗体 [Ⅰ型胶原蛋白、基质金属蛋白酶 9、Bax、P21 抗体 (1 ： 500)，内参为 β-actin (1 ： 4 000)] 滴加在膜上，4 ℃孵育过夜，次日回收一抗，用 TBST 洗涤 4 次，每次 5 min，在室温条件下与二抗 (1 ： 4 000) 孵育 2 h，用 TBST 洗涤 4 次，每次 5 min，最后将条带置于化学发光成像仪上，滴加超敏 ECL 曝光液，检测蛋白表达含量。使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.5 主要观察指标 ①激光共聚焦显微镜观察真皮成纤维细胞对 hucMSC-sEV 的摄取情况；② CCK-8 法检测不同浓度 AKG 对真皮成纤维细胞的毒性作用以及增殖的影响；③荧光显微镜观察经不同处理后真皮成纤维细胞内活性氧水平；④细胞免疫荧光评估真皮成纤维细胞内Ⅰ型胶原蛋白和 γ-H2AX 蛋白表达水平；⑤ Western blot 检测真皮成纤维细胞中Ⅰ型胶原蛋白、基质金属蛋白酶 1、P21、Bax 蛋白表达水平。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad prism 8.0 软件进行统计学分析及绘图。采用 one-way(单因素) 或 two-way(多因素) ANOVA 分析，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。该文章的统计学方法已通过江苏大学医学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

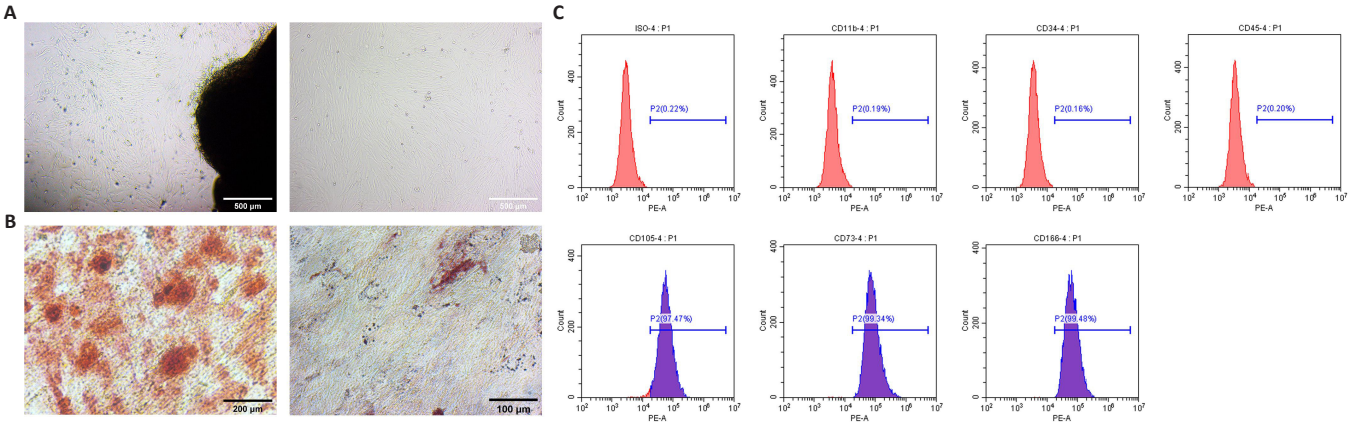
2.1 人脐带间充质干细胞及 hucMSC-sEV 的生物学特征 分离培养的原代人脐带间充质干细胞从组织块周围爬出，细胞形态呈梭状，细胞状态良好呈漩涡状生长，见**图 1A**；经过成骨和成脂培养基诱导分化后进行茜素红或油红 O 染色，可见明显的钙结节和脂滴，表明人脐带间充质干细胞成骨、成脂分化能力良好，见**图 1B**；流式细胞术结果表明，人脐带间充质干细胞高表达阳性标志物 CD105、CD73、CD166，阴性标志物 CD11b、 CD34、CD45 和 ISO 几乎不表达，见**图 1C**，符合间充质干细胞的生物学特征。

收集人脐带间充质干细胞上清液，进行差速－超速离心法得到 hucMSC-sEV，在透射电镜下观察到 hucMSC-sEV 有典型的囊泡膜结构并且呈茶托状，见**图 2A**；纳米粒子跟踪分析仪检测粒径分布在 180.8 nm 处，Zeta 电位为 (−29.32±1.16) mV，见**图 2B**；Western blot 结果显示，hucMSC-sEV 表达小细胞外囊泡特征性标志物 CD63、CD9、Alix、TSG101，不表达阴性标志物 Calnexin，见**图 2C**。

2.2 AKG 对真皮成纤维细胞增殖能力的影响 分离培养的真皮成纤维细胞从大鼠乳鼠的皮肤组织块中爬出，细胞形态呈短梭状，细胞状态良好呈漩涡状生长，见**图 3A**；细胞免疫荧光结果显示，真皮成纤维细胞表达特征性标志物波形蛋白和 α− 平滑肌肌动蛋白，不表达阴性标志物即表皮标志物角蛋白 10，见**图 3B**，符合真皮成纤维细胞的生物学特征。分别将 0.5，1，2，4，8 mmol/L 的 AKG 与真皮成纤维细胞共孵育 24 h 和 48 h，CCK-8 结果显示 AKG 没有抑制真皮成纤维细胞的增殖，表明 AKG 对真皮成纤维细胞无毒性，见**图 3C**，由于在传统的电穿孔过程中投入的药物量会有一定的损失，同时通过参考相关文献 [35]，最终选择 2 mmol/L 浓度进行后续实验。

2.3 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的构建与鉴定 使用电穿孔技术，分别将 2 mmol/L 的 AKG 载入 5×10^9 particles/mL，1×10^{10} particles/mL 和 5×10^{10} particles/mL 的 hucMSC-sEV 中，在透射电镜下观察到 AKG 工程化 hucMSC-sEV 囊泡膜结构完整并呈茶托状，见**图 4A**；纳米粒子跟踪分析仪检测 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的粒子分布和 Zeta 电位，与 hucMSC-sEV 相比均无明显变化，表明电穿孔对小细胞外囊泡几乎无损伤作用，见**图 4B**。使用高效液相色谱技术检测 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的包封率，得到标准曲线为 Y=1 613 593.088X+21 958.278，R^2=0.999 9，表明 AKG 的浓度在 0−5 mmol/L 范围内线性关系良好。通过公式计算 5×10^9，1×10^{10}，5×10^{10} particles/mL 的 hucMSC-sEV 与 AKG 进行电穿孔后相应的包封率分别为 (44.93±0.97)%，(45.38±4.36)% 和 (40.13±2.31)%，结果显示当小细胞外囊泡粒子数在 1×10^{10} particles/mL 时包封率最高，因此选择此浓度进行后续实验。

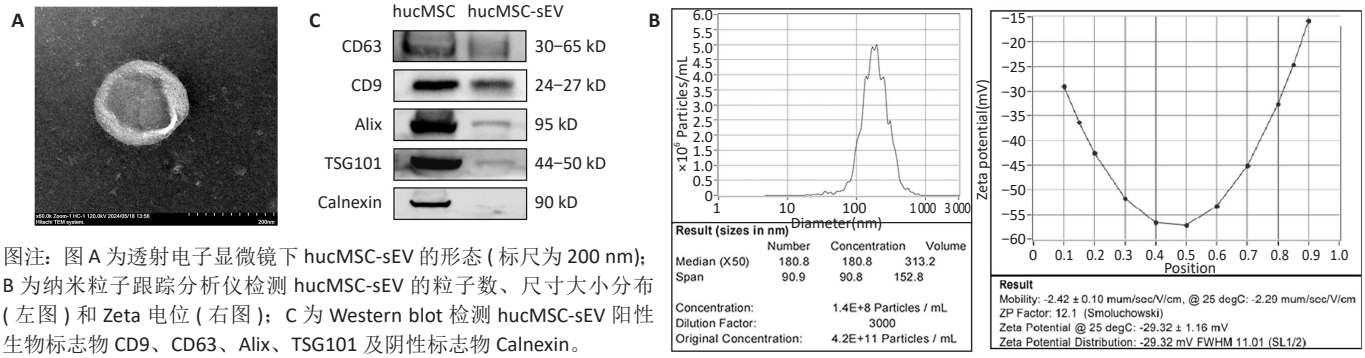
2.4 AKG 工程化 hucMSC-sEV 延缓 D− 半乳糖诱导的真皮成纤维细胞衰老进程 建立真皮成纤维细胞老化模型，见**图 5A**，在 D− 半乳糖处理 24 h 后，向细胞中分别加入 AKG 或 hucMSC-sEV 或 AKG 工程化 hucMSC-sEV 处理 12 h 进行后续实验。在共聚焦显微镜下观察到 hucMSC-sEV 与真皮成纤维细胞共孵育 12 h 后能被有效摄取，而 AKG 工程化 hucMSC-sEV 组的摄取效率要略低于 hucMSC-sEV 组，可能与电穿孔造成



图注：图 A 为光学显微镜下人脐带间充质干细胞形态 (标尺为 500 μm)；B 为光学显微镜下人脐带间充质干细胞的成骨分化能力 (左图，茜素红染色) 和成脂分化能力 (右图，油红 O 染色) (标尺分别为 200 μm 和 100 μm)；C 为流式细胞术检测人脐带间充质干细胞阳性表面标志物以及阴性标志物。

图 1 ｜人脐带间充质干细胞的生物学特征

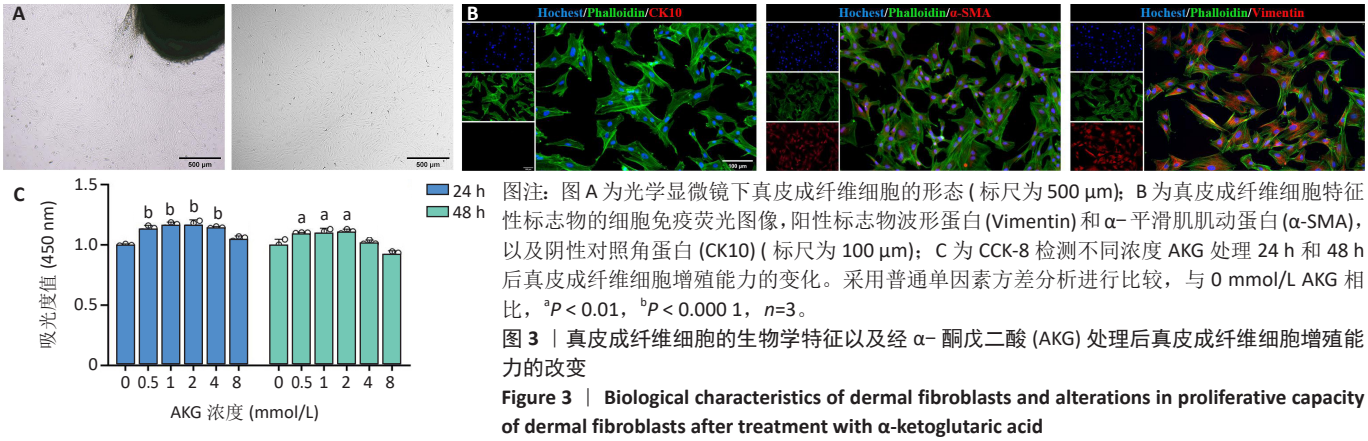
Figure 1 ｜ Biological characteristics of human umbilical cord mesenchymal stem cells



图注：图 A 为透射电子显微镜下 hucMSC-sEV 的形态 (标尺为 200 nm)；B 为纳米粒子跟踪分析仪检测 hucMSC-sEV 的粒子数、尺寸大小分布 (左图) 和 Zeta 电位 (右图)；C 为 Western blot 检测 hucMSC-sEV 阳性生物标志物 CD9、CD63、Alix、TSG101 及阴性标志物 Calnexin。

图 2 ｜人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡 (hucMSC-sEV) 的生物学特征

Figure 2 ｜ Biological characteristics of small extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells (hucMSC-sEV)



图注：图 A 为光学显微镜下真皮成纤维细胞的形态 (标尺为 500 μm)；B 为真皮成纤维细胞特征性标志物的细胞免疫荧光图像，阳性标志物波形蛋白 (Vimentin) 和 α− 平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)，以及阴性对照角蛋白 (CK10) (标尺为 100 μm)；C 为 CCK-8 检测不同浓度 AKG 处理 24 h 和 48 h 后真皮成纤维细胞增殖能力的变化。采用普通单因素方差分析进行比较，与 0 mmol/L AKG 相比，$^{a}P < 0.01$，$^{b}P < 0.000\,1$，n=3。

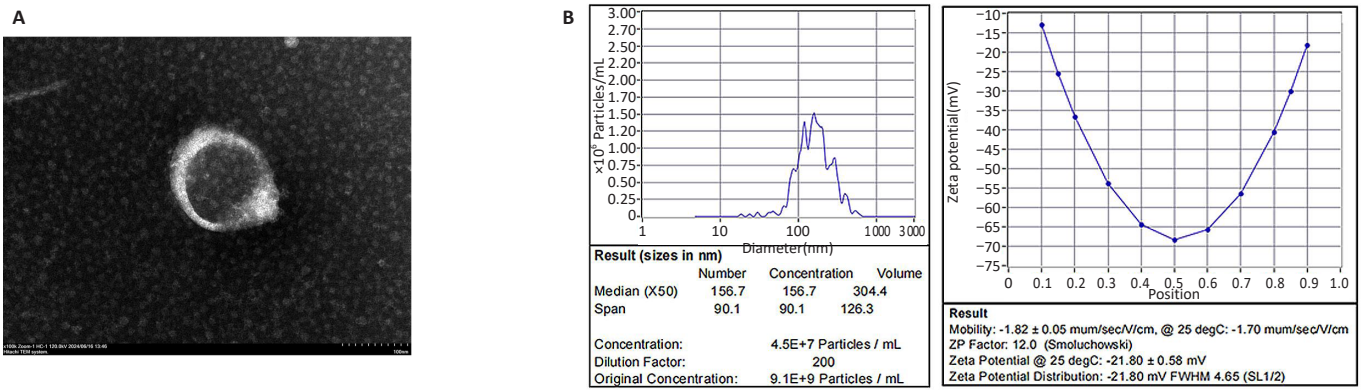
图 3 ｜真皮成纤维细胞的生物学特征以及经 α− 酮戊二酸 (AKG) 处理后真皮成纤维细胞增殖能力的改变

Figure 3 ｜ Biological characteristics of dermal fibroblasts and alterations in proliferative capacity of dermal fibroblasts after treatment with α-ketoglutaric acid

小细胞外囊泡数量上的损失有关，见**图 5B**。

2.4.1　AKG 工程化 hucMSC-sEV 促进衰老真皮成纤维细胞的增殖　通过 CCK-8 法来评估不同浓度 AKG 对 D− 半乳糖诱导的衰老真皮成纤维细胞增殖的影响。使用 0.5，1，2，4，8 mmol/L AKG 与真皮成纤维细胞共孵育，CCK-8 结果显示 AKG 浓度在 2 mmol/L 以内时，对衰老的真皮成纤维细胞有促增殖作用，且当浓度为 1 mmol/L 和 2 mmol/L 时效果最为显著，Edu 细胞增殖实验也具有相同的结果，见**图 5C–E**，结合 AKG 对真皮成纤维细胞的毒性实验，以及药物在电穿孔过程中存在损失，最终选取 2 mmol/L 进行后续实验。

2.4.2　AKG 工程化 hucMSC-sEV 降低衰老真皮成纤维细胞氧化应激水平　使用活性氧评估不同处理组衰老真皮成纤维细胞内氧化应激水平，结果显示，与 D− 半乳糖组相比，各处理组显著抑制了细胞内活性氧的产生，降低了氧化应激水平，



图注：使用 1×10^{10} particles/mL 的 hucMSC-sEV 与 AKG 进行电穿孔。A 为透射电子显微镜下 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的形态 (标尺为 100 nm)；B 为纳米粒子跟踪分析仪检测 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的粒径大小分布 (左图) 和 Zeta 电位 (右图)。

图 4 | α− 酮戊二酸 (AKG) 工程化人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡 (hucMSC-sEV) 的生物学特征

Figure 4 | **Biological characteristics of small extracellular vesicles derived from α-ketoglutarate engineered human umbilical cord mesenchymal stem cells (hucMSC-sEV)**

其中 AKG 工程化 hucMSC-sEV 组效果更优，见**图 5F–G**。

2.4.3 AKG 工程化 hucMSC-sEV 减少真皮成纤维细胞的胶原蛋白流失并降低 DNA 损伤水平 Western blot 结果显示，与 D− 半乳糖组相比，AKG 工程化 hucMSC-sEV 组能有效增加Ⅰ型胶原蛋白表达，并下调基质金属蛋白酶 9 表达，在一定程度上抑制了胶原蛋白的降解，同时下调 Bax 蛋白表达，有效抑制了细胞凋亡，此外衰老相关标志物 P21 表达水平也显著下调。细胞免疫荧光结果也证实，AKG 组、hucMSC-sEV 组和 AKG 工程化 hucMSC-sEV 组均能提升Ⅰ型胶原蛋白表达水平，下调 DNA 双链断裂标志物 γ-H2AX 表达水平，表明经处理后，衰老真皮成纤维细胞的胶原蛋白含量有所恢复，DNA 断裂引起的损伤减轻，其中 AKG 工程化 hucMSC-sEV 组的效果最好，见**图 5H–M**。

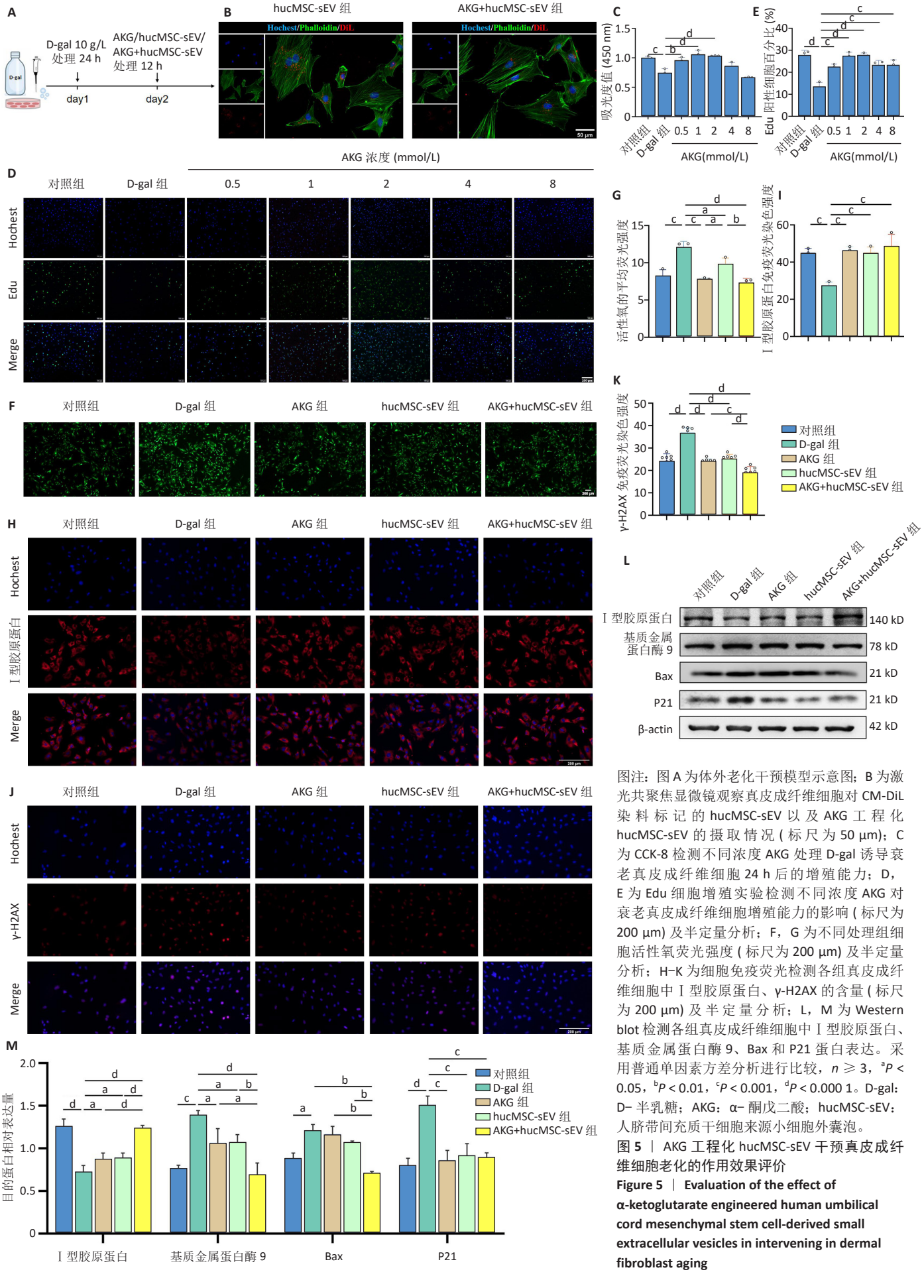
3 讨论 Discussion

皮肤老化是一个复杂的生物学过程，受内在和外在因素的共同影响 [36]，内源性因素包括遗传和荷尔蒙变化 [37]，外源性因素包括太阳辐射、空气污染、气候因素、营养、吸烟等 [38]。随着年龄的增长，人类皮肤的总暴露量在不断增加，其中活性氧生成、基质金属蛋白酶表达含量上升以及胶原蛋白降解反映了皮肤老化的核心问题 [39-43]。据报道，D− 半乳糖诱导的衰老模型能够模拟自然衰老过程中的多种生理和病理特征，包括寿命缩短、认知衰退、氧化应激等等，相较于紫外线照射可以更好地模拟正常人体皮肤衰老的状态；另外，D− 半乳糖诱导的衰老模型与氧化应激有关 [44]，并且相较于其他衰老模型具有不良反应小、耗时短以及实验期间生存率高等优势 [45-47]。

在此背景下，D− 半乳糖诱导机体葡萄糖代谢异常，进一步激活线粒体氧化代谢 [44, 48]，而 AKG 作为三羧酸循环中的代谢产物，其延缓衰老的作用效果已经得到充分验证，不仅可以通过氧化脱羧反应释放出大量 ATP，增加氧利用率，还可以降低全身炎症细胞因子水平从而达到抗炎抗氧化的效果 [27, 49]。

然而，AKG 的生物利用度低，在一定程度上限制了其皮肤抗衰效果，于是引入了小分子药物的新型递送载体小细胞外囊泡，因小细胞外囊泡具有跨生物屏障、稳定运输生物活性成分以及免疫原性低等优点，有望改善 AKG 的药代动力学以及递送效率，最终增强治疗效果 [50]。

此次研究成功分离提取了 hucMSC-sEV，进而通过电穿孔技术构建了 AKG 工程化 hucMSC-sEV，同时验证了膜结构完整性。此外，高效液相色谱结果显示使用 1×10^{10} particles/mL 小细胞外囊泡与 AKG 构建的 AKG 工程化 hucMSC-sEV 药物包封率最高，可达 (45.38±4.36)%。体外 CCK-8 细胞毒性实验结果显示，AKG 对真皮成纤维细胞无毒性作用，是一种相对安全的小分子药物。最后对 AKG 工程化 hucMSC-sEV 延缓真皮成纤维细胞老化的作用效果进行评价，Western blot 结果显示 AKG 工程化 hucMSC-sEV 可以通过抑制基质金属蛋白酶 9 的表达从而减少胶原蛋白的流失，同时降低衰老相关指标 P21 的表达水平，有效延缓老化进程；细胞免疫荧光结果显示，真皮成纤维细胞在经过 D− 半乳糖处理后，DNA 损伤标志物 γ-H2AX 水平上升，而经过 AKG 或 hucMSC-sEV 或 AKG 工程化 hucMSC-sEV 干预后均出现 γH2AX 水平下降，并且 AKG 工程化 hucMSC-sEV 组在减少 DNA 损伤方面要优于其他组，说明 AKG 工程化小细胞外囊泡抗衰老的机制可能与抑制 DNA 损伤有关；活性氧荧光检测结果也显示，AKG 工程化 hucMSC-sEV 组显著降低了衰老细胞内的活性氧水平，表明 AKG 与小细胞



图注：图 A 为体外老化干预模型示意图；B 为激光共聚焦显微镜观察真皮成纤维细胞对 CM-DiL 染料标记的 hucMSC-sEV 以及 AKG 工程化 hucMSC-sEV 的摄取情况 (标尺为 50 μm)；C 为 CCK-8 检测不同浓度 AKG 处理 D-gal 诱导衰老真皮成纤维细胞 24 h 后的增殖能力；D，E 为 Edu 细胞增殖实验检测不同浓度 AKG 对衰老真皮成纤维细胞增殖能力的影响 (标尺为 200 μm) 及半定量分析；F，G 为不同处理组细胞活性氧荧光强度 (标尺为 200 μm) 及半定量分析；H–K 为细胞免疫荧光检测各组真皮成纤维细胞中Ⅰ型胶原蛋白、γ-H2AX 的含量 (标尺为 200 μm) 及半定量分析；L，M 为 Western blot 检测各组真皮成纤维细胞中Ⅰ型胶原蛋白、基质金属蛋白酶 9、Bax 和 P21 蛋白表达。采用普通单因素方差分析进行比较，$n \geq 3$，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$，$^{c}P < 0.001$，$^{d}P < 0.000\,1$。D-gal：D– 半乳糖；AKG：α– 酮戊二酸；hucMSC-sEV：人脐带间充质干细胞来源小细胞外囊泡。

图 5 | AKG 工程化 hucMSC-sEV 干预真皮成纤维细胞老化的作用效果评价

Figure 5 | Evaluation of the effect of α-ketoglutarate engineered human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles in intervening in dermal fibroblast aging

外囊泡在减少氧化应激水平和抑制 DNA 损伤方面具有协同作用，两者的联合应用将有望从多个方面发挥抗皮肤衰老的功效。结合临床应用，脂溶性的小细胞外囊泡携载水溶性药物 AKG 可以更好地穿越皮肤屏障系统，促进皮肤吸收，从而增加药物缓释型和生物利用度。

综上所述，实验通过电穿孔技术成功构建了 AKG 工程化 hucMSC-sEV，通过一系列实验验证其能够有效延缓皮肤老化，在减少胶原蛋白流失、降低氧化应激水平、降低衰老相关标志物水平和逆转 DNA 损伤方面有着显著效果。该实验的局限性在于缺乏分子机制的深入探索以及体内的抗衰效果验证，未来将关注并挖掘 AKG 工程化小细胞外囊泡与 DNA 损伤相关的关键分子，进一步探究其中的分子机制，同时开展动物实验，有助于全面了解 AKG 工程化小细胞外囊泡延缓皮肤衰老的作用机制，为临床应用提供科学依据。

致谢：感谢课题组的指导教师们，不仅在实验研究思路和方法上给予我指导性意见，而且在论文构思和写作上也给予很大帮助。其次，感谢我的同门、舍友和师兄师姐们，我们一起探讨交流问题，互帮互助，努力奋斗，克服了诸多困难。最后，我还要感谢我的家人和朋友，他们一直支持着我，他们的理解和鼓励是我前进的动力。

作者贡献：吴芷菁负责实验设计、实验实施、细胞培养、指标检测、数据分析、论文撰写、数据和文章的校对，李加利负责实验设计、数据与文章的校对；张佳昕负责细胞培养、指标检测、数据分析；王唐荣负责细胞培养、数据分析与校对；郑煜洲负责指标检测、数据和文章的校对；孙梓暄负责实验设计、数据和文章的校对。

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] FRANCO AC, AVELEIRA C, CAVADAS C. Skin senescence: mechanisms and impact on whole-body aging. Trends Mol Med. 2022;28(2):97-109.

[2] CSEKES E, RAČKOVÁ L. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. Int J Mol Sci. 2021;22(23):12641.

[3] GRIFFITHS TW, WATSON REB, LANGTON AK. Skin ageing and topical rejuvenation strategies. Br J Dermatol. 2023;189(Suppl 1):i17-i23.

[4] BLAIR MJ, JONES JD, WOESSNER AE, et al. Skin Structure-Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. Adv Wound Care (New Rochelle). 2020;9(3):127-143.

[5] HÖHN A, WEBER D, JUNG T, et al. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. Redox Biol. 2017;11:482-501.

[6] HARLEY CB, FUTCHER AB, GREIDER CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature. 1990;345(6274):458-460.

[7] PEZONE A, OLIVIERI F, NAPOLI MV, et al. Inflammation and DNA damage: cause, effect or both. Nat Rev Rheumatol. 2023;19(4):200-211.

[8] BHARATH LP, AGRAWAL M, MCCAMBRIDGE G, et al. Metformin Enhances Autophagy and Normalizes Mitochondrial Function to Alleviate Aging-Associated Inflammation. Cell Metab. 2020;32(1):44-55.e6.

[9] ANSARY TM, HOSSAIN MR, KAMIYA K, et al. Inflammatory Molecules Associated with Ultraviolet Radiation-Mediated Skin Aging. Int J Mol Sci. 2021;22(8):3974.

[10] LOVELL CR, SMOLENSKI KA, DUANCE VC, et al. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. Br J Dermatol. 1987;117(4):419-428.

[11] WANG H, WEI S, XUE X, et al. Adipose stem cells' antagonism in glycosylation of D-galactose-induced skin aging of nude mice and its skin recovery function. Int J Immunopathol Pharmacol. 2016;29(3):376-385.

[12] CRISAN M, TAULESCU M, CRISAN D, et al. Expression of advanced glycation end-products on sun-exposed and non-exposed cutaneous sites during the ageing process in humans. PLoS One. 2013;8(10):e75003.

[13] WANG L, JIANG Y, ZHAO C. The effects of advanced glycation end-products on skin and potential anti-glycation strategies. Exp Dermatol. 2024;33(4):e15065.

[14] MAURELLI M, GISONDI P, GIROLOMONI G. Advanced Glycation End Products and Psoriasis. Vaccines (Basel). 2023;11(3):617.

[15] THÉRY C, WITWER KW, AIKAWA E, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles. 2018;7(1):1535750.

[16] ZHANG H, XIAO X, WANG L, et al. Human adipose and umbilical cord mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles mitigate photoaging via TIMP1/Notch1. Signal Transduct Target Ther. 2024;9(1):294.

[17] SUN Z, WANG T, HOU X, et al. Mesenchymal stromal cells-derived small extracellular vesicles protect against UV-induced photoaging via regulating pregnancy zone protein. Stem Cells Transl Med. 2024;13(11):1129-1143.

[18] RÄDLER J, GUPTA D, ZICKLER A, et al. Exploiting the biogenesis of extracellular vesicles for bioengineering and therapeutic cargo loading. Mol Ther. 2023;31(5):1231-1250.

[19] 张咪 , 吴赛璇 , 董明 , 等 . 新型纳米递送系统：工程化小细胞外囊泡 [J]. 中国组织工程研究 ,2022,26(27):4417-4422.

[20] WU P, ZHANG B, OCANSEY DKW, et al. Extracellular vesicles: A bright star of nanomedicine. Biomaterials. 2021;269:120467.

[21] HERRMANN IK, WOOD MJA, FUHRMANN G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. Nat Nanotechnol. 2021;16(7):748-759.

[22] YUAN Y, ZHU C, WANG Y, et al. α-Ketoglutaric acid ameliorates hyperglycemia in diabetes by inhibiting hepatic gluconeogenesis via serpina1e signaling. Sci Adv. 2022;8(18):eabn2879.
[23] 吴楠 .α- 酮戊二酸在果蝇抗衰老中的作用及其机制研究 [D]. 雅安 : 四川农业大学 ,2017.
[24] CHIN RM, FU X, PAI MY, et al. The metabolite α-ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. Nature. 2014;510(7505):397-401.
[25] YANG F, ZHOU Z, GUO M, et al. The study of skin hydration, anti-wrinkles function improvement of anti-aging cream with alpha-ketoglutarate. J Cosmet Dermatol. 2022;21(4):1736-1743.
[26] SON ED, CHOI GH, KIM H, et al. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice. Biol Pharm Bull. 2007;30(8):1395-1399.
[27] ASADI SHAHMIRZADI A, EDGAR D, LIAO CY, et al. Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. Cell Metab. 2020;32(3):447-456.e6.
[28] LIU S, HE L, YAO K. The Antioxidative Function of Alpha-Ketoglutarate and Its Applications. Biomed Res Int. 2018;2018:3408467.
[29] SALMINEN A, KAARNIRANTA K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. Ageing Res Rev. 2012;11(2):230-241.
[30] BAYLIAK MM, LUSHCHAK VI. Pleiotropic effects of alpha-ketoglutarate as a potential anti-ageing agent. Ageing Res Rev. 2021;66:101237.
[31] KOMURO H, AMINOVA S, LAURO K, et al. Advances of engineered extracellular vesicles-based therapeutics strategy. Sci Technol Adv Mater. 2022;23(1):655-681.
[32] MUKHOPADHYA A, TSIAPALIS D, MCNAMEE N, et al. Doxorubicin Loading into Milk and Mesenchymal Stem Cells' Extracellular Vesicles as Drug Delivery Vehicles. Pharmaceutics. 2023;15(3):718.
[33] CHEN C, LI Y, WANG Q, et al. Single-particle assessment of six different drug-loading strategies for incorporating doxorubicin into small extracellular vesicles. Anal Bioanal Chem. 2023;415(7):1287-1298.
[34] TIAN J, HAN Z, SONG D, et al. Engineered Exosome for Drug Delivery: Recent Development and Clinical Applications. Int J Nanomedicine. 2023;18:7923-7940.
[35] WANG Y, DENG P, LIU Y, et al. Alpha-ketoglutarate ameliorates age-related osteoporosis via regulating histone methylations. Nat Commun. 2020;11(1):5596.
[36] LEE CM, WATSON REB, KLEYN CE. The impact of perceived stress on skin ageing. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2020;34(1):54-58.
[37] SHIN SH, LEE YH, RHO NK, et al. Skin aging from mechanisms to interventions: focusing on dermal aging. Front Physiol. 2023;14:1195272.
[38] KRUTMANN J, SCHIKOWSKI T, MORITA A, et al. Environmentally-Induced (Extrinsic) Skin Aging: Exposomal Factors and Underlying Mechanisms. J Invest Dermatol. 2021;141(4S):1096-1103.
[39] KOHL E, STEINBAUER J, LANDTHALER M, et al. Skin ageing. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011;25(8):873-884.
[40] MARTINI H, PASSOS JF. Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. FEBS J. 2023;290(5):1186-1202.
[41] SREEDHAR A, AGUILERA-AGUIRRE L, SINGH KK. Mitochondria in skin health, aging, and disease. Cell Death Dis. 2020;11(6):444.
[42] POLJŠAK B, DAHMANE RG, GODIĆ A. Intrinsic skin aging: the role of oxidative stress. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat. 2012;21(2):33-36.
[43] LEE H, HONG Y, KIM M. Structural and Functional Changes and Possible Molecular Mechanisms in Aged Skin. Int J Mol Sci. 2021;22(22):12489.
[44] UMBAYEV B, ASKAROVA S, ALMABAYEVA A, et al. Galactose-Induced Skin Aging: The Role of Oxidative Stress. Oxid Med Cell Longev. 2020;2020:7145656.
[45] KUMAR H, BHARDWAJ K, VALKO M, et al. Antioxidative potential of Lactobacillus sp. in ameliorating D-galactose-induced aging. Appl Microbiol Biotechnol. 2022;106(13-16):4831-4843.
[46] WEI H, LI L, SONG Q, et al. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. Behav Brain Res. 2005;157(2):245-251.
[47] AZMAN KF, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. Biogerontology. 2019;20(6):763-782.
[48] DU XL, EDELSTEIN D, ROSSETTI L, et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(22):12222-12226.
[49] GYANWALI B, LIM ZX, SOH J, et al. Alpha-Ketoglutarate dietary supplementation to improve health in humans. Trends Endocrinol Metab. 2022;33(2):136-146.
[50] WIKLANDER OPB, BRENNAN MÁ, LÖTVALL J, et al. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. Sci Transl Med. 2019;11(492):eaav8521.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)