

引用:胡清睿,曾楚若,宋小琴,广可颜,刘怡萍,陈奕仁,宾马赢,熊武,韩芳,张熙.黄芪甲苷介导外泌体miR-126-5p对糖尿病皮肤溃疡创面血管新生的影响[J].中医药导报,2026,32(1):14-20.

黄芪甲苷介导外泌体miR-126-5p对糖尿病皮肤溃疡创面血管新生的影响*

胡清睿¹,曾楚若²,宋小琴³,广可颜¹,刘怡萍⁴,陈奕仁¹,宾马赢²,熊武²,韩芳³,张熙¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;

2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;

3.湖南省脑科医院,湖南长沙 410007;

4.湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,湖南长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨黄芪甲苷(AS-IV)介导内皮祖细胞(EPCs)外泌体miR-126-5p对糖尿病皮肤溃疡(DCU)创面血管新生的影响。方法:分离培养人外周血EPCs,通过观察细胞形态、DAPI核染及FITC-UEA-I联合Dil-ac-LDL双荧光染色法鉴定EPCs。将鉴定成功的EPCs分别用PBS、AS-IV处理,培养24 h收集上清液中EPCexos和ASIV-EPCexos,用透射电镜观察两者形态。另用miR-126-5p inhibitor和inhibitor-NC脂质体转染ASIV-EPCexos,检测上述4种外泌体中miR-126-5p水平。建立2型糖尿病SD大鼠DCU模型。造模成功的大鼠随机分为EPCexos组、ASIV-EPCexos组、ASIV-EPCexos+miR-126-5p inhibitor组、ASIV-EPCexos+inhibitor-NC组、模型组,另设空白组。第10天采集创面新生组织,用蛋白质印迹法(Western blotting)与RT-qPCR法检测VEGFA、VEGFb、VEGFc、FGF、Ang-1血管生长因子表达,免疫荧光和PAS染色检测血管新生。结果:培养24 h后,两组大鼠外泌体呈圆形或椭圆形微囊泡结构。与EPCexos组大鼠相比,ASIV-EPCexos组miR-126-5p表达上调($P<0.05$);与ASIV-EPCexos组大鼠相比,ASIV-EPCexos+miR-126-5p inhibitor组miR-126-5p表达下调($P<0.05$)。与空白组大鼠相比,模型组血管生长因子表达量、VEGF荧光强度、BrdU阳性率和内皮细胞数均显著降低($P<0.05$);与模型组大鼠相比,ASIV-EPCexo组血管生长因子表达量、VEGF荧光强度、BrdU阳性率和内皮细胞数均增加($P<0.05$);与ASIV-EPCexo组大鼠相比,ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组血管生长因子表达量、VEGF荧光强度、BrdU阳性率和内皮细胞数均显著降低($P<0.05$)。结论:AS-IV可通过介导EPCs表达负载miR-126-5p的外泌体促进DCU创面血管新生。

[关键词] 糖尿病皮肤溃疡;黄芪甲苷;外泌体;miR-126-5p;血管新生

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951XX(2026)01-0014-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2026.01.003

Effects of Astragaloside IV-Mediated Exosomal miR-126-5p on Angiogenesis in Diabetic Cutaneous Ulcer Wounds

HU Qingrui¹, ZENG Churuo², SONG Xiaoqin³, GUANG Keyan¹, LIU Yiping⁴, CHEN Yiren¹, BIN Maying², XIONG Wu², HAN Fang³, ZHANG Xi¹

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China; 2.The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410007, China; 3.Hunan Brain Hospital, Changsha Hunan 410007, China; 4.College of Acupuncture, Moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan 410208, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Astragaloside IV (AS-IV) on angiogenesis in diabetic cutaneous ulcers (DCU) and its potential mechanism via mediating exosomal miR-126-5p derived from endothelial progenitor cells (EPCs). Methods: Human peripheral blood EPCs were isolated, cultured, and identified based on morphology, DAPI nuclear staining, and dual-fluorescence staining with FITC-UEA-I and Dil-ac-LDL.

*基金项目:湖南省自然科学基金高校联合基金重点项目(2025JJ90013);湖南中医药大学校院联合基金项目(2024XYLH199);湖南省科技厅优秀青年项目(24B0368);湖南省卫生健康委一般项目(202203064523)

通信作者:张熙,女,教授,研究方向为血管再生/慢性创面修复基础研究

Identified EPCs were treated with PBS or AS-IV for 24 h. Exosomes were isolated from the culture supernatants (named EPC-exos and AS-IV-EPC-exos, respectively) and characterized by transmission electron microscopy (TEM). Furthermore, EPCs were transfected with a miR-126-5p inhibitor or inhibitor-NC liposomes, and exosomes were collected from AS-IV-treated transfected cells. The level of miR-126-5p in exosomes from different groups was quantified. A type 2 diabetic SD rat DCU model was established. Successfully modeled rats were randomly divided into EPCexos, ASIV-EPCexos, ASIV-EPCexos + inhibitor-NC, ASIV-EPCexos + miR-126-5p inhibitor and model groups, with a blank group as control. On day 10, wound neotissues were harvested. The protein and mRNA expression levels of vascular growth factors (VEGFa, VEGFb, VEGFc, FGF, Ang-1) were detected by Western blotting and RT-qPCR, respectively. Angiogenesis was assessed by immunofluorescence and PAS staining. Results: TEM showed that exosomes from both groups exhibited round or oval vesicular structures. The expression of miR-126-5p was significantly upregulated in ASIV-EPCexos group compared with EPCexos group ($P<0.05$), while The expression of miR-126-5p was significantly downregulated in ASIV-EPCexos+miR-126-5p inhibitor group compared with ASIV-EPCexos group ($P<0.05$). Compared with the blank group, the model group showed significantly decreased expression of vascular growth factors, VEGF fluorescence intensity, BrdU-positive rate, and endothelial cell number ($P<0.05$). Compared with the model group, the ASIV-EPCexos group exhibited increased expression of vascular growth factors, VEGF fluorescence intensity, BrdU-positive rate, and endothelial cell number ($P<0.05$). However, these promoting effects were significantly attenuated in the ASIV-EPCexos + miR-126-5p inhibitor group compared with the ASIV-EPCexos group ($P<0.05$). Conclusion: AS-IV may promote angiogenesis in DCU wounds by enhancing the enrichment of miR-126-5p in EPC-derived exosomes.

[Keywords] diabetic cutaneous ulcer; Astragaloside IV; exosomes; miR-126-5p; angiogenesis

糖尿病皮肤溃疡(diabetic cutaneous ulcers,DCU)是临床常见的糖尿病并发症。糖尿病患者血糖异常,导致血管内皮功能障碍及血管生成相关因子水平降低,阻碍血管新生,最终延缓创面愈合。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一种存在于骨髓、脐血和成人外周血的血管前体细胞,在修复内皮细胞和血管新生方面发挥重要作用^[1]。有研究证实,高糖环境下骨髓和循环血中EPCs数量减少且其生物功能被抑制,从而导致创面修复能力受损,延缓创面愈合^[2]。外泌体(exosomes, EXOs)作为EPCs释放的一种细胞外囊泡,携带蛋白质、脂质、核酸等多种活性分子,通过膜融合机制将其特异性递送至靶细胞,调控细胞功能和组织修复过程^[3],尤其是在损伤内皮修复和血管新生过程中发挥重要作用^[4]。此外,外泌体内的miRNA也已被证实能够加速血管生成,并促进创面愈合^[4-6]。黄芪甲苷(astragaloside IV, AS-IV)是中药黄芪的主要活性成分之一。本团队前期研究发现,AS-IV可动员骨髓中EPCs迁移入血,并分泌血管生长因子、外泌体。此外,AS-IV可促进EPCs向内皮细胞分化参与糖尿病血管新生^[7-8]。然而,AS-IV介导EPCs外泌体加速血管新生并促进糖尿病皮肤溃疡创面愈合是否与其负载的miR-126-5p有关,仍需实验证实。因此,本研究在前期研究基础上,进一步探讨AS-IV通过EPCs分泌外泌体并介导miR-126-5p在糖尿病皮肤溃疡治疗中的临床应用提供实验依据。

1 材 料

1.1 实验动物 48只雄性SPF级SD大鼠,8周龄,体质量180~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。动物生产许

可证号:SCXK(湘)2021-0002;动物质量合格证号:430727251101138021。所有大鼠饲养于湖南中医药大学实验动物中心,饲养温度为20~25℃,湿度为40%~60%,12 h/12 h明暗周期环境,提供标准饲料,并且保证自由饮水,适应性饲养1周。本研究经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审核并批准(伦理审批号:ZYFY20201018-2)。

1.2 药物与试剂 黄芪甲苷(上海源叶生物科技有限公司,批号:S31401,规格≥98%);链脲佐菌素(STZ)(北京索莱宝科技有限公司,批号:S8050);胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司,批号:10099141);荧光染料4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)(美国abiowell公司,批号:11265-1-AP);乙酰化低密度脂蛋白(Dil-ac-LDL)(上海复申生物科技有限公司,批号:FS1088-500UG);DMEM高糖培养基(美国Sigma公司,批号:D5796-500ML);鼠抗BrdU(德国Sigma-Aldrich公司,批号:B5002);兔抗VEGF(英国abcam公司,批号:ab46154);miRNA逆转录试剂盒(中国北京康为世纪公司,批号:CW2141);VEGFa-抗(批号:ab46154)、VEGFb-抗(批号:ab185696)、VEGFc-抗(批号:ab9546)、FGF-抗(批号:ab208687)和Ang-1-抗(批号:ab183701)均购于英国abcam公司。

1.3 主要仪器 XD-101型CO₂培养箱(日本SANYO公司);YT-CJ-NB型超净工作台(北京亚泰隆公司);DSZ2000X型倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器);BA210T型光学显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);Tecnai 12型透射电子显微镜(美国FEI公司);QuantStudio1型荧光定量PCR仪(美国Thermo公司);ChemiDoc型化学发光成像仪(美国Bio-Rad公司);Tanon 1600型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);YD-

315型切片机(金华益迪医疗设备有限公司);BMJ-A型包埋机(常州中威电子仪器有限公司)。

2 方 法

2.1 EPCs分离培养及鉴定 在无菌条件下采集健康足月新生儿脐带血,用密度梯度离心法分离单个核细胞后,经EGM-2培养基重悬并于37℃、5%CO₂饱和湿度条件下培养,待细胞融合至80%时通过胰酶消化进行传代;为鉴定人EPCs,取P3代细胞进行爬片处理,先后与2.4 g/L Dil-ac-LD、10 g/L的FITC-UEA-I在37℃避光孵育1 h后,经20 g/L多聚甲醛10 min及PBST浸洗后,于荧光显微镜下观察并采集荧光染色图像。本研究经湖南中医药大学第一附属医院伦理审查(伦理批号:HN-LL-KY-2020-013-01),本团队前期已从人脐血中分离和鉴定EPCs^[9]。

2.2 EPC-Exos、ASIV-EPCexos的形态观察 采用P3-P6代EPCs培养上清液,经差速离心法结合超滤法提取外泌体;随后取20 μLEPC-Exos和ASIV-EPCexos悬液滴加于2 nm载样铜网上,室温静置3 min后吸除多余液体,加入30 μL 2%醋酸铀酰负染5 min,经干燥后置于Tecnai Spirit T12透射电镜,80 kV下观察外泌体形态并采集图像。

2.3 外泌体中miR-126-5p的表达 采用RT-qPCR技术检测EPCexo组、ASIV-EPCexo组、ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组和ASIV-EPCexo+inhibitor-NC组中外泌体miR-126-5p的表达水平。按照Lipofectamine转染试剂说明书,将处于对数生长期的细胞以3×10⁵个/孔接种于6孔板上,在培养24 h后换为无血清培养基,分别转染miR-126-5p inhibitor和inhibitor-NC,在37℃、5% CO₂条件下培养6 h后更换新鲜完全培养基。采用Trizol法提取各组外泌体总RNA,经紫外分光光度计检测RNA纯度和浓度后,将其逆转录为cDNA,随后取5 μL cDNA进行PCR。qPCR反应采用95℃预变性30 min,继以95℃5 s、60℃4 s、72℃延伸20 s,共40个循环扩增程序,每个样本设置3个复孔,采用2^{-ΔΔCt}法计算miR-126-5p的相对表达量。

2.4 造模与分组给药

2.4.1 糖尿病模型的建立 将48只SD大鼠适应性饲养1周后,随机挑选40只用高脂饲料喂养4周,另外8只大鼠普通饲料喂养。造模前禁食12~16 h后,40只大鼠通过腹腔注射1% STZ溶液(50 mg/kg)^[10]建立糖尿病模型,另外8只大鼠注射等体积柠檬酸缓冲液,之后每天监测随机血糖,若连续3 d随机血糖浓度均>16.7 mmol/L并伴有饮水增多,排尿增多,饲料摄入增多,体质量减少的“三多一少”典型症状即视为2型糖尿病模型建立成功。

2.4.2 皮肤溃疡模型的建立 造模成功的糖尿病大鼠和普通大鼠腹腔注射适量2%戊巴比妥钠(3 mL/kg)进行麻醉,外用6%硫化钠溶液脱去腰背部毛发,使用直径2 cm的圆形空心柱蘸取适量印泥在大鼠脊柱两侧腰背部对称印章,75%酒精消毒皮肤,于深筋膜上完整切除直径为2 cm的圆形皮肤制成立糖尿病皮肤溃疡模型。

2.4.3 实验分组、给药与标本采集 将造模成功的糖尿病皮肤溃疡大鼠按照随机数字表法分为空白组(普通皮肤溃疡大鼠)、EPCexo组、ASIV-EPCexo组、ASIV-EPCexo+miR-126-5p

inhibitor组、ASIV-EPCexo+inhibitor-NC组和模型组,每组8只。各组分别按以下方案接受处理:EPCexo组用EPCs外泌体干预;ASIV-EPCexo组用AS-IV处理后的EPCs外泌体(ASIV-EPCexo)干预;ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组用转染了miR-126-5p抑制剂的ASIV-EPCexo干预;ASIV-EPCexo+inhibitor-NC组用转染了inhibitor-NC的ASIV-EPCexo干预,外泌体的干预浓度为500 mg/L, miR-126-5p inhibitor和inhibitor-NC的干预浓度为60 nmol/L;空白组和模型组分别用等体积的0.9% NaCl处理。所有药物处理液均通过创面注射,注射体积为200 μL,1次/d,持续10 d。每天使用络合碘对大鼠创面进行消毒后使用生理盐水清洗创面,最后覆盖医用无菌纱布并妥善包扎固定。给药剂量参照课题组前期研究^[4]。所有大鼠持续观察至第10天后处死大鼠,取出大鼠腰背部皮肤溃疡组织,按需分装并保存在-80℃冰箱中。

2.5 观察指标

2.5.1 皮肤溃疡组织中血管生长因子的表达 采用蛋白质印迹法检测皮肤溃疡组织中VEGF_a、VEGF_b、VEGF_c、FGF和Ang-1蛋白的表达。剪取适量皮肤溃疡组织制备匀浆并提取上清液,按试剂盒法提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度后加入蛋白上样缓冲液。取20 μL变性蛋白进行上样,采用SDS-PAGE电泳分离蛋白,将分离后的蛋白移至PVDF膜上,室温封闭1 h。用兔抗鼠VEGF_a(1:1 000)、VEGF_b(1:1 000)、VEGF_c(1:2 000)、FGF(1:2 000)、Ang-1(1:10 000)、β-actin(1:5 000)一抗,4℃孵育过夜。PBST洗膜3次,继续在辣根过氧化物-山羊抗小鼠IgG(1:6 000)的封闭溶液中室温孵育90 min后,经ECL化学发光液显色并通过凝胶成像系统采集图像。

RT-qPCR法用于检测同样因子的mRNA表达。提取总RNA并进行逆转录生成cDNA,用含UltraSYBR荧光染料的混合物进行实时PCR,β-actin作为内参基因,采用2^{-ΔΔCt}法计算基因表达水平。

2.5.2 免疫荧光检测皮肤溃疡组织血管新生情况 将石蜡包埋的皮肤组织切成4 μm切片,按常规方法脱蜡并用二甲苯和梯度乙醇水化。浸入枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)中加热23 min以回收抗原,自然冷却至室温后用PBS洗涤。将切片分别置于硼氢化钠溶液30 min、苏丹黑染液5 min,经自来水冲洗后用5% BSA溶液封闭切片60 min。切片与稀释的BrdU和VEGF一抗在4℃下孵育过夜。第2天,37℃孵育稀释的抗鼠、抗兔IgG二抗90 min,PBS冲洗。经DAPI工作液37℃染色后,PBS洗涤,缓冲甘油封片,荧光显微镜观察(放大200倍数)。

2.5.3 PAS染色检测皮肤溃疡组织中血管新生情况 将皮肤组织进行常规脱水处理并用石蜡包埋后切成4 μm的切片;用二甲苯脱蜡和梯度乙醇再水化,蒸馏水浸洗5 min后滴加过碘酸覆盖组织;自来水冲洗后使用Schiff氏液和苏木素染色,依次用蒸馏水和PBS冲洗,冷风干燥后经梯度酒精脱水;二甲苯透明处理,最终用中性树胶封固。在光学显微镜下(放大200倍数),计数切片中血管内皮细胞核的数量。

2.6 统计学方法 采用SPSS 25.0统计软件分析处理数据。计量资料以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料符合正态性和方差齐性,则采用One-Way ANOVA检验;不符合正态性或

方差齐性的计量资料则选用Kruskal-Wallis *H*检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 EPCs培养与鉴定 培养7d后,经光学显微镜观察发现细胞呈典型的集落形态特征:中央区域细胞呈圆形分布,周边细胞表现为梭形(见图1)。经荧光显微镜鉴定EPCs表现为特征性染色:DAPI核染表现为蓝色荧光,Dil-acLDL摄取表现为红色荧光,FITC-UEA-I结合表现为绿色荧光,双染为橙黄色荧光的细胞即为正常分化的EPCs。(见图2)

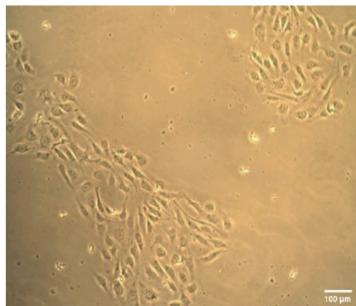
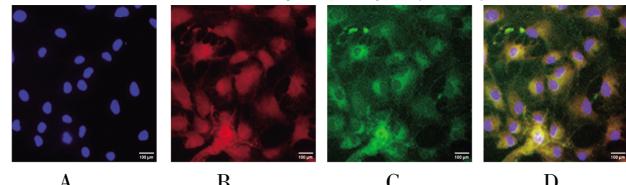


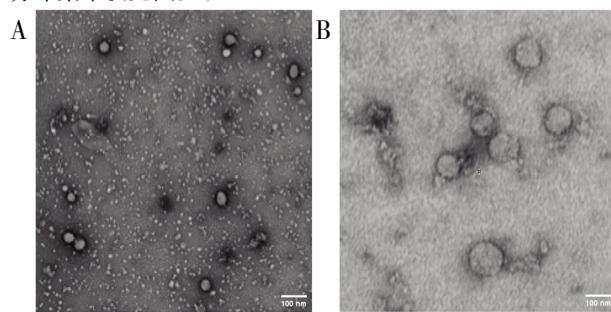
图1 EPCs 的形态观察 ($\times 100$)



注:A.细胞摄取DAPI核染,呈蓝色荧光标记;B.细胞摄取Dil-acLDL,呈红色荧光标记;C.细胞与UEA-1结合,呈绿色荧光标记;D.细胞结合FITC-UEA-I并摄取Dil-ac-LDL后双重染色,呈橙黄色荧光。

图2 EPCs 的荧光染色鉴定结果 ($\times 200$)

3.2 EPC-Exos、ASIV-EPCexos的形态观察 EPC-Exos在呈圆形或椭圆形的膜囊泡结构(见图3A)。与EPCexos比较,ASIV-EPCexos多为包膜完整的圆形小囊泡结构,数量较多且分布集中。(见图3B)



注:A.EPC-Exos的电镜图;B.ASIV-EPCexos的电镜图。

图3 透射电镜下观察到的EPC-Exos、ASIV-EPCexos ($\times 100 000$)

3.3 外泌体中miR-126-5p的表达 与EPCexo组大鼠比较,ASIV-EPCexo组中miR-126-5p相对表达量升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与ASIV-EPCexo组大鼠比较,ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组中miR-126-5p相对表达量降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组大鼠比较,ASIV-EPCexo+inhibitor-NC组中miR-126-5p相

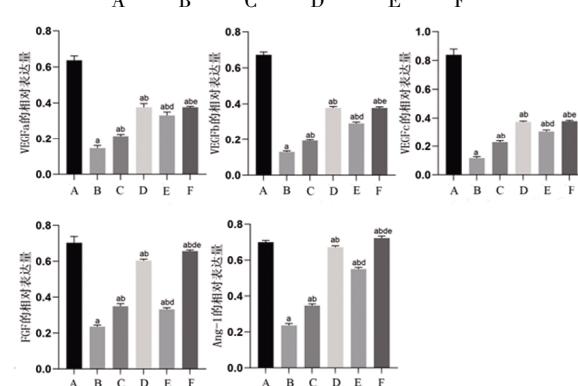
对表达量显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见表1)

表1 各组大鼠外泌体中miR-126-5p表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	miR-126-5p相对表达量
EPCexo组	8	1.90±0.41
ASIV-EPCexo组	8	3.20±0.22 ^c
ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组	8	2.06±0.05 ^d
ASIV-EPCexo+inhibitor-NC组	8	3.28±0.46 ^{ee}

注:与EPCexo组比较,^c $P<0.05$;与ASIV-EPCexo组比较,^d $P<0.05$;与ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组比较,^e $P<0.05$ 。

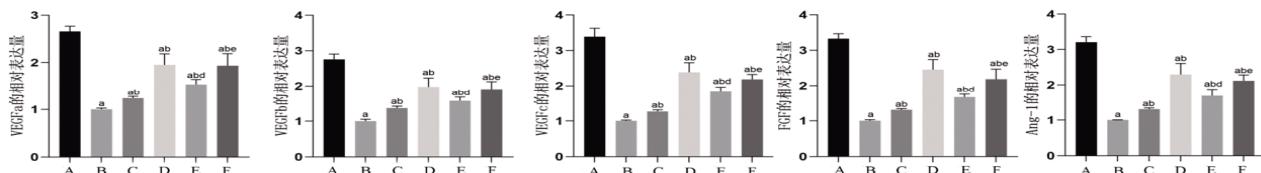
3.4 皮肤溃疡组织中血管生长因子的表达 创面损伤第10天,与空白组大鼠比较,模型组中VEGFa、VEGFb、VEGFc、FGF、Ang-1蛋白及基因表达均显著下调,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组大鼠比较,ASIV-EPCexo组中VEGFa、VEGFb、VEGFc、FGF和Ang-1的蛋白及基因表达均显著上调,差异均有统计学意义($P<0.05$);与ASIV-EPCexo组大鼠相比,ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组中VEGFa、VEGFb、VEGFc、FGF和Ang-1的蛋白及基因表达水平均显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组相比,ASIV-EPCexo+inhibitor-NC组中VEGFa、VEGFb、VEGFc、FGF和Ang-1的蛋白及基因表达水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见图4~图5)



注:A.空白组;B.模型组;C.EPCexos组;D.ASIV-EPCexos组;E.ASIV-EPCexos+miR-126-5p inhibitor组;F.ASIV-EPCexos+inhibitor-NC组。与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与ASIV-EPCexo组比较,^d $P<0.05$;与ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组比较,^e $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠皮肤溃疡组织中VEGFa、VEGFb、VEGFc、FGF、Ang-1蛋白表达情况

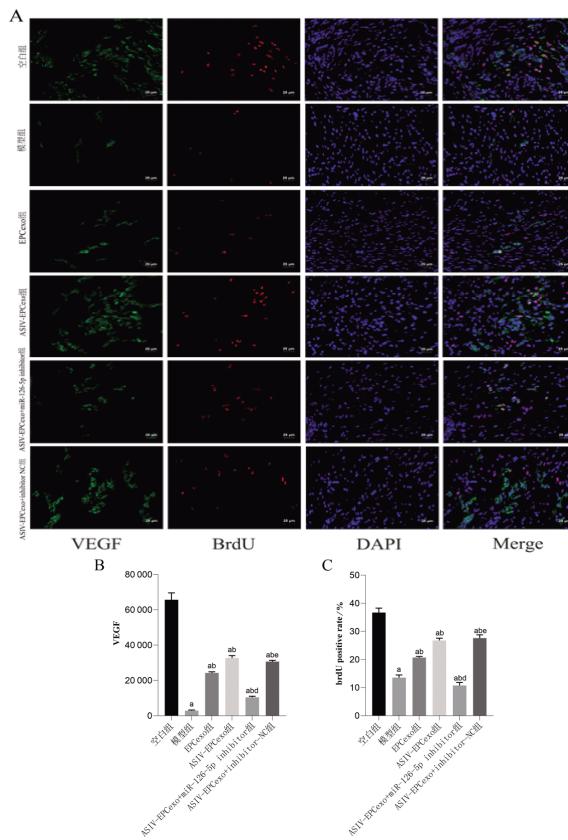
3.5 免疫荧光中皮肤溃疡组织血管新生情况 创面损伤第10天,与空白组大鼠比较,模型组中VEGF免疫荧光强度和BrdU阳性率均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型



注:A.空白组;B.模型组;C.EPCexos组;D.ASIV-EPCexos组;E.ASIV-EPCexos+miR-126-5p inhibitor组;F.ASIV-EPCexos+inhibitor-NC组。与空白组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05;与ASIV-EPCexo组比较,^dP<0.05;与ASIV-EPCexo+miR-126-5pinhbitior组比较,^eP<0.05。

图5 各组大鼠皮肤溃疡组织中VEGFa、VEGFb、VEGFc、FGF、Ang-1基因表达情况

组大鼠相比,ASIV-EPCexo组中VEGF免疫荧光强度和BrdU的阳性率均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与ASIV-EPCexo组大鼠相比,ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组VEGF免疫荧光强度和brdU阳性率均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);与ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组大鼠相比,ASIV-EPCexo+inhibitor NC组VEGF免疫荧光强度和brdU阳性率均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见图6)

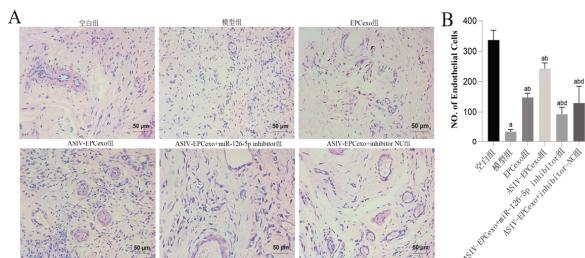


注:A.VEGF和BrdU荧光染色结果,蓝色荧光代表细胞核,红色荧光代表新合成的DNA,指细胞增殖的活跃程度,绿色荧光指VEGF表达情况;B.VEGF平均荧光强度;C.BrdU阳性率。与空白组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05;与ASIV-EPCexo组比较,^dP<0.05;与ASIV-EPCexo+miR-126-5p inhibitor组比较,^eP<0.05。

图6 各组大鼠皮肤溃疡组织中VEGF和BrdU阳性表达情况(×200)

3.6 PAS染色中皮肤溃疡组织血管新生情况 创面损伤第10天,与空白组大鼠相比,模型组内皮细胞数显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组大鼠相比,ASIV-EPCexo组

内皮细胞数显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与ASIV-EPCexo组大鼠相比,ASIV-EPCexos+miR-126-5p inhibitor组内皮细胞数显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。(见图7)



注:A.PAS染色的组织学图像;B.内皮细胞数的定量分析。与空白组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05;与ASIV-EPCexo组比较,^dP<0.05。

图7 各组大鼠皮肤溃疡组织中内皮细胞表达情况(×200)

4 讨论

机体长期处于高血糖状态,可引起周围血管病变、周围神经病变及免疫功能障碍,导致糖尿病患者出现创面愈合障碍,继发感染,形成慢性难愈性创面,严重者可致截肢甚至死亡^[1]。目前,DCU的治疗方法主要包括手术清创和创面换药,但血管再生缓慢,治疗效果有限^[12]。高糖环境通过下调血管生成相关因子表达,诱导血管内皮细胞凋亡,削弱血管内皮细胞增殖、迁移和管腔形成能力,抑制缺血组织血管新生,导致血管新生障碍,延缓创面愈合^[13]。同时,高糖环境和炎症反应可使骨髓和循环血中EPCs数量减少、产能下降、增殖活性降低,削弱其增殖、黏附和迁移能力。血管修复和新生能力变差,使创面愈合更加困难^[14]。此外,糖尿病患者的微循环障碍和慢性炎症反应进一步抑制血管新生,延缓创面愈合^[15]。糖尿病血管新生困难导致创面愈合受阻,目前已成为研究的热点和临床治疗的难点^[16]。而内皮细胞调节功能的丧失是糖尿病血管新生受阻的关键因素^[17]。目前有研究表明高达75%的糖尿病患者死于血管疾病和内皮功能障碍^[18]。可见,高糖环境严重阻碍糖尿病血管新生,而血管新生困难是导致创面迁延难愈的关键因素^[19]。

EPCs是一类源自骨髓且具有多向分化潜能的成血管干细胞^[20],可通过向缺血或损伤部位趋化迁移,分化为成熟内皮细胞并参与血管新生^[4]。同时,EPCs通过旁分泌Exos、VEGF和FGF等因子激活成熟的内皮细胞促进血管生成^[21-22],在血管新生和组织修复中起关键作用。Exos是细胞释放到细胞外基质中的40~100 nm大小的膜性囊泡,包裹大量蛋白、脂质、核酸成分^[3]。Exos可通过传递RNA介导细胞间交流,作用于靶细胞

发挥其生物活性，并调节多种细胞生理和病理过程^[23]。本团队前期研究表明EPC-exos可通过激活PIK3R2/SPRED1信号，促进内皮细胞的增殖、迁移及血管新生，参与糖尿病创面修复的调控过程^[4]。此外，研究发现EPC-exos可通过上调VEGF、FGF-1、Ang-1等血管生成因子表达，显著增强内皮细胞增殖、迁移及血管成管能力，促进血管新生^[24]。研究证实，来源于干细胞的外泌体已被广泛研究并应用于皮肤溃疡的治疗，突显了其在促进伤口愈合方面的巨大潜力^[25]。AS-IV是黄芪中的主要活性成分之一^[26]，具有抗炎、抗纤维化、抗氧化应激、免疫调节及心脑血管保护等多种药理作用^[27]。刘钰等^[7]研究表明，AS-IV在促进组织修复和血管新生方面具有显著成效，经AS-IV处理的EPCs可促进血管生成和伤口愈合^[28]。进一步研究证实，AS-IV预处理EPCs分泌的外泌体可显著增强大鼠主动脉内皮细胞的增殖、迁移和血管再生能力^[29]。可见，ASIV-EPCexos在促糖尿病皮肤溃疡血管新生方面具有重要作用。

Exosomes作为细胞间通讯的关键载体，能通过传递miRNA、竞争性内源性RNA、lncRNA及蛋白质，调控靶细胞的生物学功能^[30]。其中，MicroRNAs作为一类短链非编码RNA，已成为生理和细胞功能的关键基因组调控因子^[31]。目前研究已鉴定出数十种miRNA与血管新生密切相关^[32]，而内皮细胞特异性富集的miR-126是该领域最早被发现的调控分子之一^[33]。既往研究表明，miR-126-5p与内皮细胞功能密切相关，其通过基因表达调控参与多种生物过程，包括内皮细胞功能的调节、糖尿病相关分子信号通路的调控^[34-35]。如研究^[36]发现miR-126-5p可通过靶向抑制内皮增殖的负调控因子Dlk1，促进内皮细胞增殖和再内皮化，加速血管损伤后的修复。miR-126-5p过表达可增强内皮细胞的促血管生成活性^[37]。同时，miR-126-5p可通过NF-κB/PI3K/Akt/mTOR信号通路抑制血管动脉壁内皮细胞凋亡^[38]。此外，内皮细胞来源的miR-126可通过旁分泌方式调节VEGF表达，发挥血管保护作用^[39]。本实验结果显示用AS-IV处理后的EPCexo中miR-126-5p表达上调，ASIV-EPCexo组中蛋白及基因表达水平显著高于其他组别，VEGF荧光强度增加，brdU阳性率增加，内皮细胞数量显著增高，可见AS-IV可通过介导外泌体miR-126-5p促进血管新生，从而加速糖尿病皮肤溃疡愈合。

综上所述，黄芪甲苷可通过介导外泌体miR-126-5p促进糖尿病皮肤溃疡创面血管新生，在糖尿病皮肤溃疡愈合中具有潜在的应用价值。本研究仅从外泌体miRNAs水平分析了黄芪甲苷介导外泌体miR-126-5p对糖尿病皮肤溃疡创面血管新生的影响，其具体作用机制，有待进一步阐明。

参考文献

- [1] LAMIN V, MANI A M, SINGH M V, et al. Endothelial progenitor cells and macrophage subsets recruitment in postischemic mouse hind limbs[J]. J Vasc Res, 2023, 60(3):148–159.
- [2] XIE D D, LI Y T, XU M R, et al. Effects of dulaglutide on endothelial progenitor cells and arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Cardiovasc Diabetol, 2022, 21(1):200.
- [3] 熊武, 谭梅鑫, 邹晓玲, 等. 人参皂苷Rg1调控内皮祖细胞分泌外泌体及表达血管新生相关miRNAs的影响[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(2):277–280.
- [4] XIONG W, ZHANG X, ZHOU J D, et al. Astragaloside IV promotes exosome secretion of endothelial progenitor cells to regulate PI3KR2/SPRED1 signaling and inhibit pyroptosis of diabetic endothelial cells[J]. Cyotherapy, 2024, 26(1):36–50.
- [5] YAN C Q, CHEN J, WANG C, et al. Milk exosomes-mediated miR-31-5p delivery accelerates diabetic wound healing through promoting angiogenesis[J]. Drug Deliv, 2022, 29(1):214–228.
- [6] CAPIK O, GUMUS R, KARATAS O F. Hypoxia-induced tumor exosomes promote angiogenesis through miR-1825/TSC2/mTOR axis in oral squamous cell carcinoma[J]. Head Neck, 2023, 45(9):2259–2273.
- [7] 刘钰, 周建大, 张熙, 等. 黄芪甲苷通过SDF-1α/CXCR4轴促进高糖受损人内皮祖细胞迁移的研究[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8):4714–4719.
- [8] 余亦程, 熊武, 蔡昫, 等. 黄芪甲苷改善高糖受损内皮祖细胞生物学功能的实验研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3244–3249.
- [9] FURMAN B L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats[J]. Curr Protoc, 2021, 1(4):e78.
- [10] 肖慧, 白雪, 余亦程, 等. 黄芪甲苷对高糖受损人内皮祖细胞分泌SDF-1α和CXCR4的影响[J]. 中医药导报, 2020, 26(12):1–4.
- [11] WOOD H. Tackling the global burden of diabetic neuropathy[J]. Nat Rev Neurol, 2023, 19(12):711.
- [12] 李忠兴, 武凤莲. 富血小板血浆局部注射联合血小板凝胶覆盖治疗慢性难愈性创面[J]. 中国美容医学, 2023, 32(8): 67–70.
- [13] OKONKWO U A, CHEN L, MA D, et al. Compromised angiogenesis and vascular integrity in impaired diabetic wound healing[J]. PLoS One, 2020, 15(4):e0231962.
- [14] 黄鸿宇, 郭子莘, 陈甲尧, 等. 托里消毒散对内皮祖细胞外泌体中表达与炎症相关miRNAs的影响[J]. 中医药导报, 2025, 31(5):45–50.
- [15] ZHOU Y L, OGURA S, MA H, et al. Adipose-derived stem cells extracellular vesicles enhance diabetic wound healing via CCN2/PI3K/AKT pathway: Therapeutic potential and mechanistic insights[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1):304.
- [16] WASSIF R K, SHAMMA R N, EL-HOFFY N M, et al. Recent advances in the local drug delivery systems for diabetic wound healing: A comprehensive review [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2025, 26(6):177.
- [17] YANG D R, WANG M Y, ZHANG C L, et al.

- Endothelial dysfunction in vascular complications of diabetes: A comprehensive review of mechanisms and implications[J]. *Front Endocrinol*, 2024, 15:1359255.
- [18] DAL CANTO E, CERIELLO A, RYDÉN L, et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2019, 26(2_Suppl):25–32.
- [19] POLHEMUS D, ALMODIEL D, HARB T, et al. Vericiguat prevents high glucose –mediated impaired vascular smooth muscle cGMP production and vasorelaxation[J]. *Sci Rep*, 2025, 15(1):4939.
- [20] AL-OMAR M T, ALNAJJAR M T, AHMED Z T, et al. Endothelial progenitor cell –derived small extracellular vesicles for myocardial angiogenesis and revascularization[J]. *J Clin Transl Res*, 2022, 8(6):476–487.
- [21] TOKARSKI M, CIERZNIAK A, BACZYNSKA D. Role of hypoxia on microRNA–dependant regulation of HGFA–HGF–c–Met signalling pathway in human progenitor and mature endothelial cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2022, 152:106310.
- [22] DOU Y H, SHU Y, WANG Y Y, et al. Combination treatment of Danggui Buxue Decoction and endothelial progenitor cells can enhance angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia and hyperlipidemia[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 314:116563.
- [23] MA X T, YAO M N, GAO Y, et al. Functional immune cell-derived exosomes engineered for the trilogy of radiotherapy sensitization[J]. *Adv Sci*, 2022, 9(23): 2106031.
- [24] LI X C, JIANG C Y, ZHAO J G. Human endothelial progenitor cells –derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(6):986–992.
- [25] FENG J W, YAO Y C, WANG Q X, et al. Exosomes: Potential key players towards novel therapeutic options in diabetic wounds[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166:115297.
- [26] 李博,耿刚.黄芪的化学成分与药理作用研究进展[J].中西医结合研究,2022,14(4):262–264.
- [27] 邵长鑫,林欢欢,靳晓杰,等.黄芪的炮制历史沿革及现代研究进展[J].中草药,2023,54(15):5057–5074.
- [28] HUANG N C, DAI L G, KANG L Y, et al. Beneficial effects of astragaloside IV –treated and 3 –dimensional –cultured endothelial progenitor cells on angiogenesis and wound healing[J]. *Ann Plast Surg*, 2021, 86(2S Suppl 1): S3–S12.
- [29] YI M, WU Y, LONG J, et al. Exosomes secreted from osteocalcin –overexpressing endothelial progenitor cells promote endothelial cell angiogenesis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317(5):C932–C941.
- [30] ZHENG B, YIN W N, SUZUKI T, et al. Retraction notice to: Exosome –mediated miR –155 transfer from smooth muscle cells to endothelial cells induces endothelial injury and promotes atherosclerosis[J]. *Mol Ther*, 2024, 32(3):855.
- [31] LONGO F, GATTUSO G, SPOTO G, et al. The multi-faceted role of microRNAs in colorectal cancer: Pathogenesis and therapeutic implications[J]. *Noncoding RNA Res*, 2025, 14:65–95.
- [32] FERNÁNDEZ–HERNANDO C, SUÁREZ Y. microRNAs in endothelial cell homeostasis and vascular disease[J]. *Curr Opin Hematol*, 2018, 25(3):227–236.
- [33] FISH J E, SANTORO M M, MORTON S U, et al. miR –126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity[J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2):272–284.
- [34] LEI G, ZHANG Y L, KOPPULA P, et al. The role of ferroptosis in ionizing radiation–induced cell death and tumor suppression[J]. *Cell Res*, 2020, 30(2):146–162.
- [35] YE P P, LIU J, HE F Y, et al. Hypoxia –induced deregulation of miR –126 and its regulative effect on VEGF and MMP–9 expression[J]. *Int J Med Sci*, 2013, 11(1):17–23.
- [36] ZHOU Z, SCHÖBER A, NAZARI –JAHANTIGH M. Dicer promotes endothelial recovery and limits lesion formation after vascular injury through miR –126 –5p[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 273:199–202.
- [37] ESSER J S, SARETZKI E, PANKRATZ F, et al. Bone morphogenetic protein 4 regulates microRNAs miR –494 and miR –126 –5p in control of endothelial cell function in angiogenesis[J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(4):734–749.
- [38] JIA W, LIU J L, TIAN X, et al. Correction to: MircoR –NA –126 –5p inhibits apoptosis of endothelial cell in vascular arterial walls via NF –κB/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in atherosclerosis[J]. *J Mol Histol*, 2022, 53(5):869.
- [39] 马映雪,何广辉,高翔,等人.脐带间充质干细胞外泌体靶向miR-126调节高糖诱导的人视网膜血管内皮细胞中血管内皮生长因子-A的表达[J].中华眼底病杂志,2024,40(5):372–378.

(收稿日期:2025-06-05 编辑:时格格)