

局部应用负载外泌体的 DCC 水凝胶对小鼠腹腔粘连的改善作用及其机制

马 宁¹, 柳 爽¹, 王成瑶², 卢嘉骏¹, 陈琳渝², 王梓祎², 赵伟钦², 王伟潼¹, 车鹏程², 孙 红¹
(1. 华北理工大学基础医学院 河北省慢性病重点实验室, 河北 唐山 063210; 2. 华北理工大学护理与康复学院 河北省康复工程与再生医学重点实验室, 河北 唐山 063000)

[摘 要] **目的:** 探讨负载外泌体 (Exo) 的可注射氧化右旋糖酐 (ODex) / 羧甲基壳聚糖 (CMCS) (DCC) 水凝胶 (DCC/Exo) 对小鼠术后腹腔粘连 (PA) 的改善效果, 并阐明其机制。**方法:** 提取大鼠 Exo 并制备 DCC/Exo, 检测其化学结构, 采用免疫组织化学染色法检测注射 DCC/Exo 后小鼠背部皮肤组织中炎症因子 Ly-6G 的表达情况以评价其生物相容性。采用盲肠刮擦法建立小鼠术后 PA 模型。将 KM 小鼠随机分为对照组、透明质酸凝胶 (HA) 组、DCC 组和 DCC/Exo 组。于术后 5 和 14 d 观察各组小鼠 PA 情况并进行评分, 采用 HE 染色观察各组小鼠 PA 组织病理形态表现。于术后 5 d, 采用免疫组织化学染色法检测各组小鼠 PA 组织中髓过氧化物酶 (MPO) 表达水平, 二氢乙锭 (DHE) 荧光探针法检测各组小鼠 PA 组织中活性氧 (ROS) 水平, 免疫荧光染色法检测各组小鼠 PA 组织中氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 和间皮-间质转化 (MMT) 相关蛋白 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 及波形蛋白 (Vimentin) 表达水平, Mitotracker 荧光探针法检测各组小鼠 PA 组织中线粒体损伤程度, 末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 染色法检测各组小鼠 PA 组织中细胞凋亡率。**结果:** 提取分离的 Exo 具有杯形双膜结构; DCC 水凝胶负载 Exo 后, 其特征吸收峰未发生明显位移。免疫组织化学染色法, 小鼠背部皮肤组织中仅存在少量的中性粒细胞浸润。术后 5 和 14 d, 与对照组和 DCC 组比较, DCC/Exo 组小鼠平均粘连评分明显降低 ($P < 0.001$)。HE 染色, 对照组小鼠 PA 严重且出现大量炎性细胞浸润, HA 组和 DCC 组小鼠 PA 减轻, DCC/Exo 组小鼠腹腔未见粘连, 仅见少量炎症细胞。免疫组织化学染色, 术后 5 d, 对照组小鼠 PA 组织表现出明显弥漫炎性浸润; 与对照组和 DCC 组比较, DCC/Exo 组小鼠 PA 组织中 MPO 表达水平明显降低 ($P < 0.001$)。DHE 染色, 与对照组和 DCC 组比较, DCC/Exo 组小鼠 PA 组织中 ROS 水平明显降低 ($P < 0.001$)。免疫荧光染色, 与对照组和 DCC 组比较, DCC/Exo 组小鼠 PA 组织中 8-OHdG 和 Vimentin 表达水平明显降低 ($P < 0.001$), E-cadherin 表达水平明显升高 ($P < 0.001$)。与对照组和 DCC 组比较, DCC/Exo 组小鼠 PA 组织中 Mitotracker 荧光信号面积比例明显升高 ($P < 0.001$), 线粒体损伤程度降低。与对照组和 DCC 组比较, DCC/Exo 组小鼠 PA 组织中细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.001$)。**结论:** 局部应用 DCC/Exo 复合水凝胶可有效减轻小鼠术后 PA 程度, 其作用机制可能与抑制局部炎症浸润、降低组织氧化应激水平、减少细胞凋亡以及抑制 MMT 进程有关。

[关键词] 术后腹腔粘连; 水凝胶; 外泌体; 氧化应激; 间皮-间质转化

[中图分类号] R318.08 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-04-16 **[录用日期]** 2025-06-12

[基金项目] 河北省科技厅自然科学基金项目 (H2023209021, H2024209013); 河北省教育厅大学生创新创业训练计划项目 (202410081057)

[作者简介] 马 宁 (1998—), 女, 河北省秦皇岛市人, 在读硕士研究生, 主要从事组织修复和再生医学方面的研究。

[通信作者] 孙 红, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: sunhong@ncst.edu.cn)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Improvement effect of topical application of exosome loaded hydrogel DCC on peritoneal adhesion in mice and its mechanism

MA Ning¹, LIU Shuang¹, WANG Chengyao², LU Jiajun¹, CHEN Linyu², WANG Ziyi²,
ZHAO Weiqin², WANG Weitong¹, CHE Pengcheng², SUN Hong¹

(1. Hebei Provincial Key Laboratory of Chronic Diseases, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China; 2. Hebei Provincial Key Laboratory of Rehabilitation Engineering and Regenerative Medicine, School of Nursing and Rehabilitation, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the ameliorative effect of the injectable oxidized dextran (ODex)/carboxymethyl chitosan (CMCS) hydrogel (DCC) loaded with exosomes (Exo) (DCC/Exo) on postoperative peritoneal adhesion (PA) in the mice, and to elucidate its mechanism. **Methods:** The exosomes were extracted from the rats, and DCC/Exo was prepared and its chemical structure was characterized. Immunohistochemical staining method was used to detect the expression of the inflammatory factor Ly-6G in mouse dorsal skin tissue after injection of DCC/Exo to evaluate its biocompatibility. The mouse PA model was established by cecal abrasion. The KM mice were randomly divided into control group, hyaluronic acid (HA) group, DCC group, and DCC/Exo group. The PA condition was observed and scored in the mice in various groups at 5 and 14 d after operation. HE staining was used to observe the pathomorphology of PA tissue of the mice in various groups. At 5 d after operation, immunohistochemical staining method was used to detect the expression levels of myeloperoxidase (MPO) in PA tissue of the mice in various groups. The dihydroethidium (DHE) fluorescence probe assay was used to detect the levels of reactive oxygen species (ROS) in PA tissue of the mice in various groups; immunofluorescence staining was used to detect the expression levels of the oxidative damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and the mesothelial-mesenchymal transition (MMT)-related proteins E-cadherin and Vimentin in PA tissue of the mice in various groups. The Mitotracker fluorescence probe assay was used to detect the degree of mitochondrial damage in PA tissues of the mice in various groups. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was used to detect the apoptotic rates of the cells in PA tissue of the mice in various groups. **Results:** The isolated Exos exhibited a cup-shaped double-membrane structure. After loading with Exos, the characteristic absorption peaks of the DCC hydrogel showed no significant shift. The immunohistochemistry analysis results revealed only minimal neutrophil infiltration in mouse dorsal skin tissues. At 5 and 14 d after operation, compared with control group and DCC group, the mean adhesion score of the mice in DCC/Exo group was significantly decreased ($P < 0.001$). The HE staining results showed severe PA with massive inflammatory cell infiltration of the mice in control group, mitigated PA in the mice in HA group and DCC group, and no adhesion with only a few inflammatory cells observed in the abdominal cavity of mice in DCC/Exo group. At 5 d after operation, the immunohistochemical staining results showed significant diffuse inflammatory infiltration in PA tissue of the mice in control group. Compared with control group and DCC group, the expression level of MPO in PA tissue of the mice in DCC/Exo group was significantly decreased ($P < 0.001$). The DHE staining results showed that compared with control group and DCC group, the ROS level in PA tissue of the mice in DCC/Exo group was significantly decreased ($P < 0.001$). The immunofluorescence staining results showed that compared with control group and DCC group, the expression levels of 8-OHdG and Vimentin in PA tissue of the mice in DCC/Exo group were significantly decreased ($P < 0.001$), while the expression level of E-cadherin was significantly increased ($P < 0.001$). Compared with control group and DCC group, the

fraction of Mitotracker fluorescence area in PA tissue of the mice in DCC/Exo group was significantly increased ($P<0.001$), indicating a decreased degree of mitochondrial damage. Compared with control group and DCC group, the apoptotic rate of the cells in PA tissue of the mice in DCC/Exo group was significantly decreased ($P<0.001$). **Conclusion:** Topical application of the DCC/Exo composite hydrogel may effectively attenuate postoperative PA in the mice, and its mechanism may be related to the suppression of local inflammatory infiltration, reduction of tissue oxidative stress, decrease in apoptosis, and inhibition of the MMT process.

KEYWORDS Postoperative peritoneal adhesion; Hydrogel; Exosome; Oxidative stress; Mesothelial-mesenchymal transition

术后腹腔粘连(peritoneal adhesion, PA)是手术后常见的问题,局部受损腹膜摩擦接触和炎症损伤在PA的形成和发展中起重要作用^[1-2]。因此,靶向调控局部受损腹膜的炎症微环境,减少局部炎症和氧化应激损伤,对预防PA至关重要^[3]。现有治疗方案中,水凝胶因其具有良好的生物相容性而成为备受关注的屏障材料^[4-5]。然而,水凝胶只能作为物理屏障隔离损伤组织,无法干预术后粘连形成的关键步骤。脂肪来源的间充质干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)分泌的外泌体(exosomes, Exo)含有多种生物活性分子,可刺激组织细胞增殖和分化,从而多靶点调控炎症因子,且免疫原性低,应用前景广阔,但其在局部稳定性和存留时间方面仍不理想^[6-7]。综上,设计可负载Exo并在原位成胶,减少受损腹膜摩擦接触的递送系统,有望解决上述问题。基于课题组前期工作^[8],本研究以氧化右旋糖酐(oxidized dextran, ODex)和羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, CMCS)为原料,通过席夫碱反应制备可注射ODex/CMCS水凝胶(oxidized dextran-carboxymethyl chitosan, DCC),负载Exo以防治PA。本研究旨在探讨DCC/Exo对小鼠PA组织中局部炎症反应、氧化应激和间皮-间质转化(mesothelial-mesenchymal transition, MMT)的调控作用及其机制,以期降低术后PA发生率和提高患者术后生活质量提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 SPF级雄性KM小鼠(6~8周龄,体重25~50 g)24只和雄性SD大鼠(6~8周龄,体重200~250 g)4只,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0008,饲养期间自由摄食饮水。葡聚糖和CMCS均购自上海麦克林

生化科技有限公司,特级胎牛血清购自大连美伦生物技术有限公司,I型胶原酶和杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)均购自美国Gibco公司,青-链霉素混合液和末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)凋亡试剂盒均购自上海李记生物科技有限公司,医用级透明质酸(hyaluronic acid, HA)凝胶购自杭州协合医疗用品有限公司,淋巴细胞抗原6复合物6G(lymphocyte antigen 6 complex locus G6, Ly-6G)抗体和4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)均购自美国Cell Signaling Technology公司,髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)抗体和波形蛋白(Vimentin)抗体购自杭州华安生物技术有限公司,抗8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanine, 8-OHdG)抗体购自杭州恩瑞科生物科技有限公司,E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体购自美国GeneTex公司,驴抗兔IgG(H+L)交叉吸附二抗、驴抗兔IgG(H+L)交叉吸附二级抗体、DyLight™ 350、Alexa Fluor™ 488标记二抗和MitoTracker荧光探针均购自美国Invitrogen公司,二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)荧光探针购自美国Cayman Chemical公司。透射电子显微镜(型号:H-765003040701)购自日本日立公司,傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)仪(型号:INVENIO-R040708)购自德国Bruker公司,自动脱水机(型号:ASP 200S)、自动组织包埋机(型号:EG1150H+C)和激光共聚焦显微镜(型号:LEICA TCS SP8 STED)均购自德国Leica公司。

1.2 Exo提取和鉴定 取4只健康成年SD大鼠附睾或腹股沟处脂肪组织,无菌条件下剪碎,经I型胶原酶消化后,离心收集细胞沉淀。使用特级胎牛

血清、低糖DMEM培养基和1%青霉素/链霉素配制成专用培养基, 接种培养, 获得大鼠来源ADSCs。细胞每2~3 d更换一次新鲜培养基, 待其融合度达到80%~90%时, 进行消化传代或用于后续实验。收集含Exo的条件培养基, 经差速超速离心法提取Exo。4℃、800 g离心10 min, 去除死细胞。收集上清, 4℃、2 000 g离心20 min, 去除细胞碎片。收集上清, 4℃、10 000 g离心30 min, 去除凋亡小体。使用20 mL注射器收集上清, 经0.22 μm针式滤膜将培养基过滤到无菌离心管中, 4℃、130 000 g离心2 h, 去除大囊泡。得到的沉淀即为Exo, 加入无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)重悬沉淀, 收集到1.5 mL EP管。采用透射电子显微镜观察Exo的形态和结构。

1.3 水凝胶制备、Exo负载及其检测 称取3.96 g葡聚糖溶解于50 mL去离子水中, 加入0.54 g高碘酸钠, 于25℃避光搅拌反应3 h。加入3 mL乙二醇终止反应, 透析纯化(截留相对分子量为35 000)后冻干, 得到氧化度为20%的ODex。将质量分数为5%的ODex溶液与等体积的5%CMCS溶液混合。通过席夫碱反应于pH 7.4、37℃条件下形成动态交联网络, 约1 min内成胶, 得到DCC水凝胶。将30 μg Exo与ODex溶液预混, 再与CMCS溶液交联, 通过物理包埋法获得负载Exo的DCC水凝胶(DCC/Exo), Exo负载浓度为30 μg/100 μL。采用傅里叶红外光谱仪检测其化学结构。

于小鼠背部注射100 μL DCC/Exo, 5 d后取皮下埋植组织进行石蜡包埋、切片。采用免疫组织化学染色法检测组织中炎症因子Ly-6G的表达情况, 以评价DCC/Exo的生物相容性。组织切片经脱蜡、乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)缓冲液高压修复、封闭后, 依次孵育Ly-6G一抗(1:500稀释)和二抗, 3, 3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色, 苏木精复染。

1.4 小鼠术后PA模型制备、分组和处理 将24只小鼠随机分为对照组、HA组、DCC组和DCC/Exo组, 每组6只。各组小鼠于术前12 h禁食, 腹腔注射2.5%三溴乙醇300 μL进行麻醉, 于下腹壁皮肤中线做切口(约1.5 cm)以暴露盲肠。用无菌干纱布轻轻刮擦小鼠盲肠至盲肠浆膜层出现明显点状出血。在腹壁内距离中心切口约1 cm处用手术刀划出深度0.5 mm、大小1 cm×2 cm的区域,

直至出现点状出血但表面不穿孔。随后按分组处理创面: 对照组小鼠创面使用100 μL PBS缓冲液冲洗; HA组小鼠创面均匀涂抹100 μL HA凝胶治疗; DCC组小鼠创面部位注射100 μL DCC水凝胶治疗, DCC/Exo组小鼠创面部位注射100 μL DCC/Exo, 约1 min待成胶后缝合关腹, 确保盲肠与腹壁损伤面充分接触。所有手术操作均在无菌条件下进行。

1.5 各组小鼠PA程度的大体形态表现和评分

分别于术后5和14 d, 随机挑选各组小鼠6只, 腹腔注射过量三溴乙醇进行安乐死。切开小鼠腹壁暴露腹腔, 检查并记录腹壁与盲肠的粘连情况。采用Nair's评分系统^[9], 对各组小鼠PA程度进行双盲评分(得分0~5分代表粘连程度从无到重), 手术实施者不参与打分。

1.6 HE染色观察各组小鼠PA组织病理形态表现

分别于术后5和14 d, 根据PA情况取各组处死后小鼠腹腔组织样本: 对于粘连发生的区域, 切取其腹壁-盲肠粘连区域的组织为样本; 对于未发生粘连的区域, 分别切取其腹壁和盲肠的创面组织为样本。加入4%多聚甲醛溶液固定, 脱水、石蜡包埋制成组织切片。取各组标记好的组织切片放入切片架中, 先将组织上的石蜡脱干净。脱蜡顺序为: 二甲苯Ⅰ 15 min, 二甲苯Ⅱ 15 min, 无水乙醇Ⅰ 5 min, 无水乙醇Ⅱ 5 min, 90%乙醇5 min, 80%乙醇5 min, 70%乙醇5 min。之后水化2 min, 苏木素染色2 min, 流水冲洗1 min后加入盐酸乙醇, 5 s后流水冲洗, 返蓝5 min。伊红染色2 min, 流水冲洗30 s, 梯度乙醇依次处理(70%乙醇10 s, 80%乙醇5 s, 90%乙醇5 s)后将切片擦干, 用中性树胶封片, 于显微镜下观察各组小鼠PA的组织病理形态表现。

1.7 免疫组织化学染色法检测各组小鼠PA组织中MPO表达情况

取各组术后5 d的小鼠组织石蜡切片, 脱蜡至水。使用EDTA(pH=8.0)高压修复3 min, 加入含3% H₂O₂灭活内源性过氧化物酶, 5%驴血清白蛋白封闭。滴加MPO一抗(1:500稀释), 4℃冰箱过夜。滴加二抗, 37℃温箱孵育1 h。DAB显色, 苏木精复染。于显微镜下观察, 细胞质出现棕色或棕黄色颗粒为阳性表达。采用Image-Pro Plus 6.0软件统计各组切片中阳性区域积分光密度(IOD)值, 计算平均光密度(AOD)值。AOD=IOD/阳性区域面积。以AOD值代表组织

中MPO表达水平。

1.8 DHE荧光探针法检测各组小鼠PA组织中活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平 取术后5 d小鼠组织冰冻切片, 将试剂按比例稀释成1:1 000的工作液。滴加DHE工作液, 置于湿盒中37℃避光孵育30 min, 弃去切片上的DHE工作液。PBS缓冲液洗涤后, DAPI封片。于荧光显微镜下观察, 红色荧光代表ROS。采用Image-Pro Plus 6.0软件统计各组切片中DHE荧光面积, 以DHE荧光阳性区域百分率代表组织中ROS水平。

1.9 免疫荧光染色法检测各组小鼠PA组织中8-OHdG、E-Cadherin和Vimentin表达水平 取术后5 d小鼠组织石蜡切片, 脱蜡至水, 使用EDTA缓冲液(pH=8.0)高压修复3 min。加入10%驴血清完全覆盖组织, 室温封闭30 min。使用PBS缓冲液洗涤3 min, 重复3次。在标记好的组织上滴加8-OHdG(1:1 500稀释)、E-Cadherin(1:1 000)和Vimentin(1:1 000)一抗, 4℃孵育过夜。次日取出后, 滴加荧光二抗, 37℃孵育1.5 h, 加入DAPI封片。于荧光显微镜下观察切片荧光表达情况, 采用Image-Pro Plus 6.0软件统计各组小鼠PA组织中各蛋白荧光面积, 以8-OHdG、E-Cadherin和Vimentin荧光阳性区域百分率代表组织中3种蛋白表达水平。

1.10 Mitotracker荧光探针法检测各组小鼠PA组织中线粒体损伤程度 取术后5 d小鼠组织冰冻切片, 滴加1:400稀释的Mitotracker工作液, 湿盒内37℃避光孵育30 min。弃去Mitotracker工作液, PBS缓冲液洗涤, DAPI封片。于荧光显微镜下观察切片荧光表达情况, 采用Image-Pro Plus 6.0软件统计各组切片中Mitotracker荧光面积,

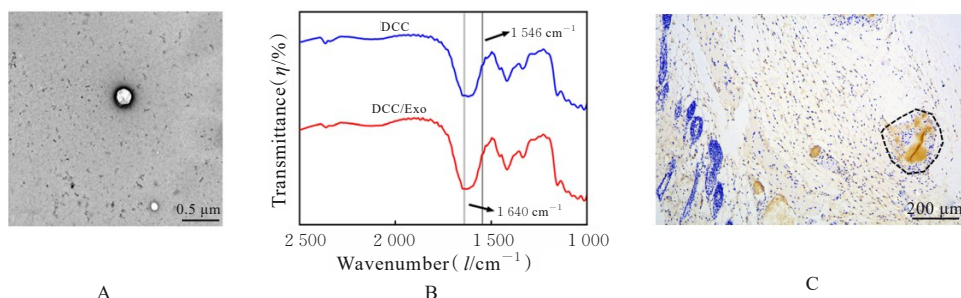
Mitotracker荧光阳性区域百分率越小, 代表组织中线粒体损伤程度越高。

1.11 TUNEL染色法检测各组小鼠PA组织中细胞凋亡率 取术后5 d小鼠组织冰冻切片, 室温晾干15 min, 用含10%驴血清的1×PBS缓冲液室温封闭切片1 h。避光按比例稀释制备TUNEL工作液, 湿盒内37℃避光孵育1 h。弃去TUNEL工作液, PBS缓冲液洗涤, DAPI封片。采用Image-Pro Plus 6.0软件统计各组切片中TUNEL荧光面积, 以TUNEL阳性区域百分率代表细胞凋亡率。

1.12 统计学分析 采用SPSS 26.0和GraphPad Prism 9.0软件进行统计学分析。各组小鼠术后5和14 d PA评分、术后5 d粘连组织中MPO表达水平、ROS水平、8-OHdG、E-cadherin和Vimentin蛋白表达水平、线粒体损伤程度及细胞凋亡率均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Exo鉴定和DCC/Exo的生物相容性 透射电镜图像, 提取分离的Exo具有杯形双膜结构, 证明Exo被成功提取。FT-IR分析, DCC水凝胶存在酰胺键($1\ 640\text{ cm}^{-1}$)和C=C振动峰($1\ 546\text{ cm}^{-1}$)的特征吸收峰, 证明其保持完整的动态亚胺键交联网络特征。DCC水凝胶在负载Exo后, 特征吸收峰未发生显著位移, 表明硝基水杨醛的芳香结构在Exo负载过程中得以完整保留, 这为复合材料的稳定性提供了分子层面的证据。小鼠皮下埋植DCC/Exo, 5 d后组织切片经Ly-6G免疫组织化学染色, 组织中仅存在少量的中性粒细胞浸润。见图1。



A: Transmission electron microscope image; B: FT-IR spectrum of DCC and DCC/Exo; C: Immunohistochemical staining of Ly-6G in skin tissue of mice.

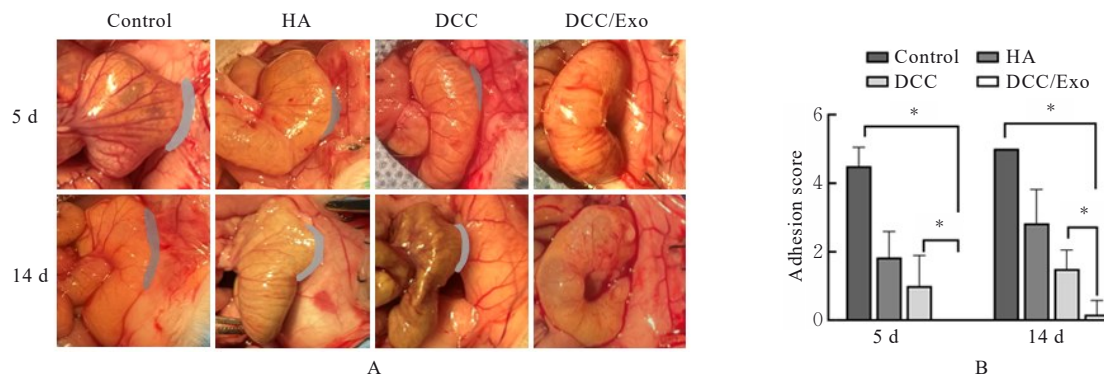
图1 Exo鉴定和DCC/Exo生物相容性

Fig. 1 Exo identification and biocompatibility of DCC/Exo

2.2 各组小鼠PA程度的大体形态表现和评分

术后5 d, 肉眼观察各组小鼠PA情况, 对照组小鼠盲肠浆膜表面有一层胶原纤维沉积, 出现致密广泛的粘连, 粘连难以分离。HA组小鼠PA减轻, 可见薄层透明胶原纤维沉积, 大部分粘连可钝性分离。DCC组小鼠腹腔仅出现轻度粘连, 可见少量胶原纤维沉积, 粘连可被轻易分离。DCC/Exo组小鼠腹腔可见盲肠稍充血, 与腹腔内其他器官、肠道其他部位或脏腹膜未发生粘连; 盲肠形态轻微改变, 有轻微的浅色疤痕, 面积小于初始创面面积。术后14 d, 对照组小鼠PA加重, 小鼠在缺损腹壁和擦伤盲肠之间形成严重粘连, 且粘连向未损伤处延伸; HA组小鼠腹腔出现了较严重的致密粘连, 与

5 d比较有所加重; DCC组小鼠腹腔出现轻度粘连; DCC/Exo组小鼠腹腔未出现粘连, 且盲肠和腹壁的创面恢复良好。术后5 d, 对照组PA评分为4~5分, 平均分数为4.5分; HA组PA评分大部分集中在2分, 平均分数为1.8分; DCC组PA评分为0~2分, 平均分数为0.5分; DCC/Exo组PA评分为0。术后14 d, 对照组PA评分集中在5分, 平均分数为5分; HA组PA评分为1~4分, 平均分数为2.8分; DCC和DCC/Exo组PA评分多为0分, 平均分分别为1.5和0.2分。术后5和14 d, 与对照组及DCC组比较, DCC/Exo组小鼠平均PA评分明显降低 ($P<0.001$)。见图2。



A: Gray regions represented adhesion; B: Adhesion scores at 5 and 14 d after operation (* $P<0.001$).

图2 各组小鼠PA组织的大体形态表现(A)和粘连评分(B)

Fig. 2 Gross morphology(A) and adhesion scores (B) of PA tissue of mice in various groups

2.3 各组小鼠PA的组织病理形态表现 术后5 d, 对照组小鼠可见腹壁和盲肠之间通过致密的结缔组织连接在一起, 粘连区域有大量胶原纤维沉积, 大量炎性细胞浸润。HA组小鼠腹腔出现明显粘连, 但与对照组比较粘结构较为松散。DCC组小鼠腹腔出现轻度粘连。DCC/Exo组小鼠腹壁和盲肠的创面恢复良好, 未出现粘连情况, 创面已出现层次清楚、分布均匀的新生间皮层, 创面有少量炎性细胞浸润。术后14 d, 对照组小鼠PA更为致密, 粘连区域厚度增加, 炎性细胞浸润增多, 可见新生血管。HA组小鼠PA程度较术后5 d更加紧密。DCC组小鼠PA程度较术后5 d轻微加重。DCC/Exo组小鼠腹腔未形成粘连, 可见少量纤维结缔组织生成, 与正常盲肠及腹壁组织形态相似。见图3。

2.4 各组小鼠PA组织中MPO表达水平 术后5 d, 对照组小鼠PA组织表现出明显弥漫炎性浸润, 主要集中在粘连区域。与对照组比较, HA组小鼠

PA组织的浸润程度有所减轻, DCC组小鼠PA组织中MPO阳性区域面积大幅减少。与对照组和DCC组比较, DCC/Exo组小鼠PA组织中MPO表达水平明显降低 ($P<0.001$)。见图4。

2.5 各组小鼠PA组织中ROS水平 术后5 d组织DHE染色结果显示: 对照组、HA组和DCC组小鼠PA组织中细胞核周围可观察到明显红色DHE荧光信号, 其中对照组小鼠盲肠和腹壁粘连组织中红色荧光信号面积最大, DCC/Exo组小鼠PA组织中红色荧光信号面积大幅减少。与对照组和DCC组比较, DCC/Exo组小鼠PA组织中ROS水平明显降低 ($P<0.001$)。见图5。

2.6 各组小鼠PA组织中8-OHdG表达水平 对照组小鼠PA组织中代表8-OHdG的红色荧光信号面积最大, DCC组小鼠PA组织中红色荧光表达明显减少, DCC/Exo组小鼠PA组织中几乎没有红色荧光表达。与对照组和DCC组比较, DCC/Exo组小

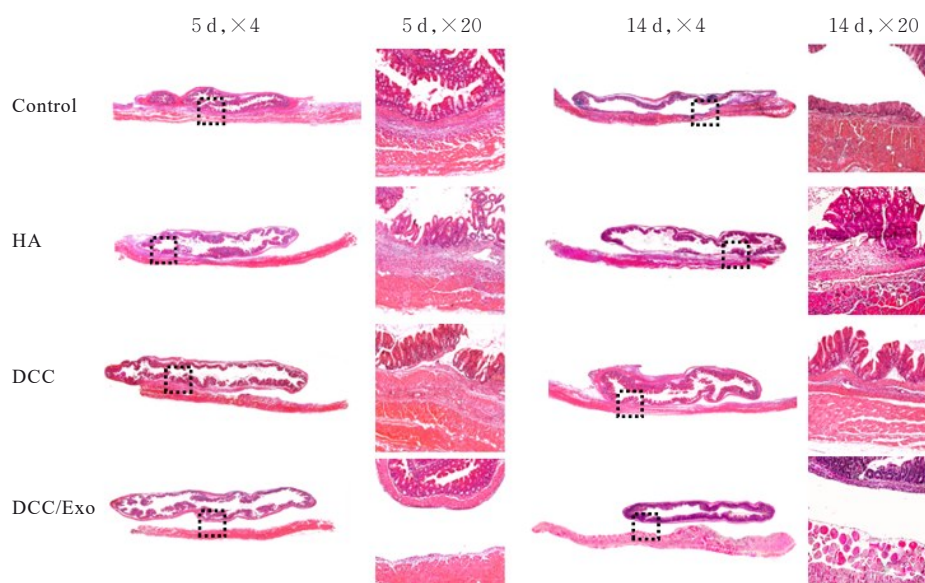


图3 各组小鼠PA组织病理形态表现(HE)

Fig. 3 Pathomorphology of PA tissue of mice in various groups(HE)

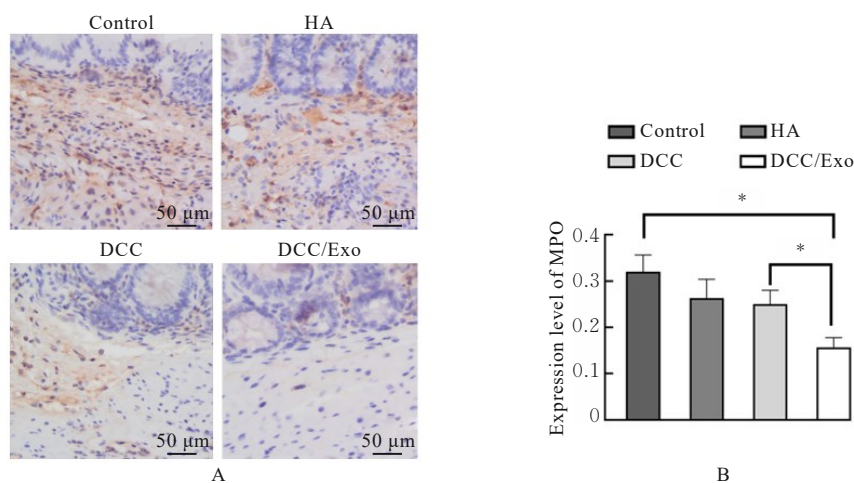
A: Immunohistochemistry staining images; B: Expression level of MPO (* $P < 0.001$).

图4 各组小鼠PA组织中MPO表达情况

Fig. 4 Expression of MPO in PA tissue of mice in various groups

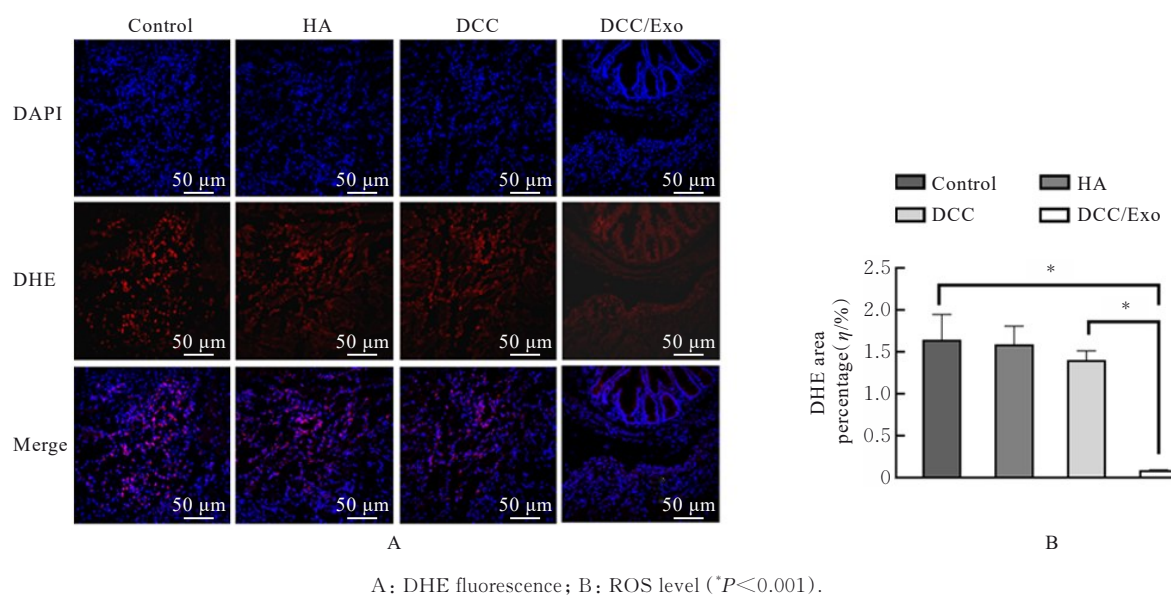
鼠PA组织中8-OHdG表达水平明显降低($P < 0.001$)。见图6。

2.7 各组小鼠PA组织中E-cadherin和Vimentin表达水平 免疫荧光染色结果显示:红色荧光信号代表Vimentin蛋白表达,绿色荧光信号代表E-cadherin蛋白表达。Vimentin荧光信号在对照组小鼠PA组织中表达最高,且阳性表达集中表达在盲肠与腹壁粘连的区域;HA组与DCC组小鼠PA组织中Vimentin荧光信号面积逐渐降低;DCC/Exo组小鼠PA组织中仅有少量荧光信号表达在手术损伤处。E-cadherin荧光信号表达趋势则与上

述相反。与对照组和DCC组比较,DCC/Exo组小鼠PA组织中Vimentin表达水平明显降低($P < 0.001$),E-cadherin表达水平明显升高($P < 0.001$)。见图7。

2.8 各组小鼠PA组织中线粒体损伤程度

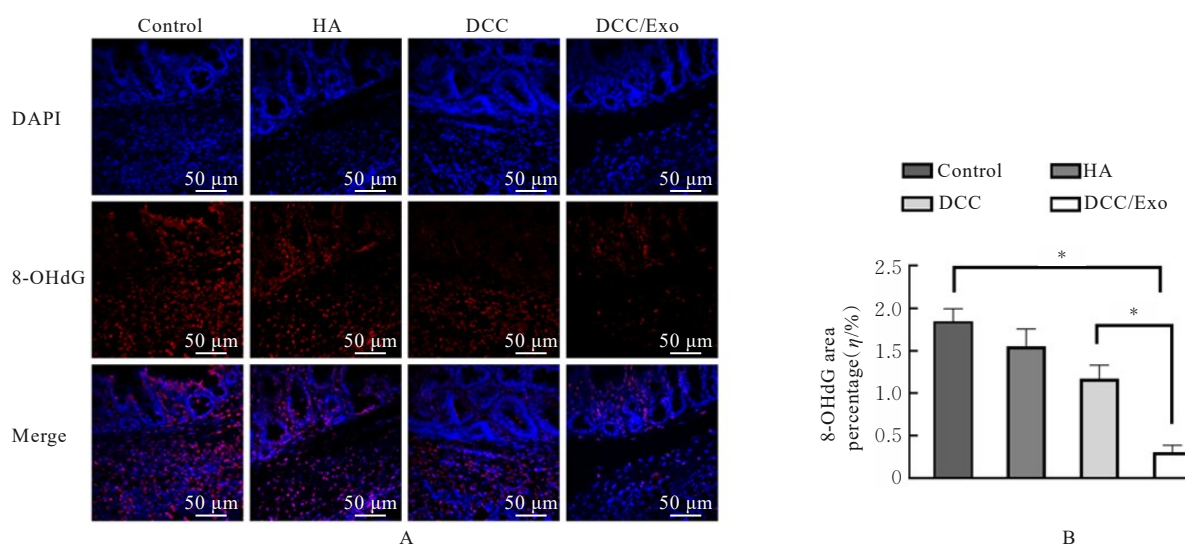
Mitotracker染色结果显示:对照组小鼠PA组织中,代表线粒体的Mitotracker红色荧光面积较少,表明组织中线粒体受到氧化应激损伤,损伤程度较高。与对照组和DCC组比较,DCC/Exo组小鼠PA组织中Mitotracker荧光信号面积比例明显升高($P < 0.001$),线粒体损伤程度降低。见图8。



A: DHE fluorescence; B: ROS level (* $P<0.001$).

图5 各组小鼠PA组织中ROS表达情况

Fig. 5 Expressions of ROS in PA tissue of mice in various groups



A: 8-OHdG fluorescence; B: Expression level of 8-OHdG (* $P<0.001$).

图6 各组小鼠PA组织中8-OHdG表达情况

Fig. 6 Expressions of 8-OHdG in PA tissue of mice in various groups

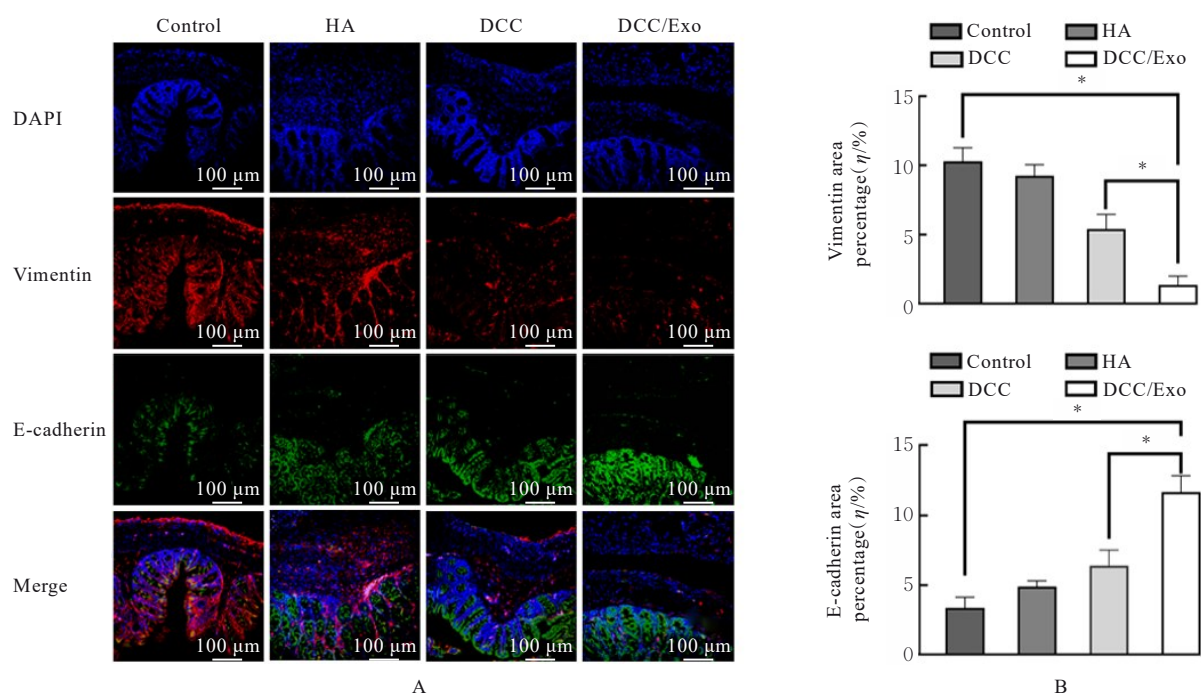
2.9 各组小鼠PA组织中细胞凋亡率 TUNEL染色结果显示: 对照组小鼠PA组织中氧化应激损伤导致大量细胞凋亡, TUNEL阳性信号表达较强; DCC/Exo组小鼠PA组织中TUNEL阳性信号表达明显减弱。与对照组比较, DCC/Exo组小鼠PA组织中细胞凋亡率明显降低 ($P<0.001$)。见图9。

3 讨论

PA是一种常见且严重的术后并发症, 其在腹部手术后的发生率高达90%, 影响全球数百万患

者。PA不但具有极高的复发率, 还可引起多种并发症, 包括肠梗阻、慢性疼痛和不孕症等, 约半数患者需接受二次手术, 是腹部外科临床中面临的重大难题^[10]。目前临床常用的防粘连材料中多数仅具物理屏障作用, 难以有效隔离创面^[11]。因此, 将生物活性因子与功能性水凝胶相结合的新型防粘连策略备受关注。

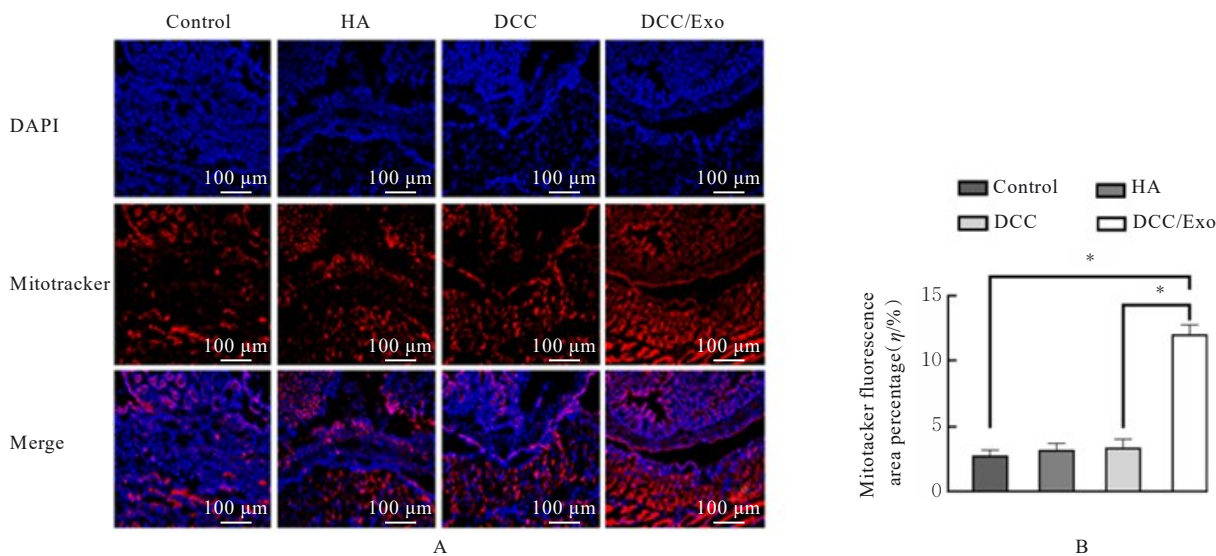
在成功提取并鉴定ADSCs来源Exos的基础上, 本研究基于课题组前期的工作^[8], 以ODex和CMCS为原料, 通过席夫碱反应制备可注射水凝胶



A: Immunofluorescence staining of Vimentin (red) and E-cadherin (green) proteins; B: Expression levels of Vimentin and E-cadherin proteins (* $P < 0.001$).

图7 各组小鼠PA组织中Vimentin和E-cadherin蛋白表达情况

Fig. 7 Expressions of Vimentin and E-cadherin proteins in PA tissue of mice in various groups



A: Mitotracker fluorescence staining; B: Percentage of Mitotracker fluorescence area (* $P < 0.001$).

图8 各组小鼠PA组织中线粒体损伤情况

Fig. 8 Mitochondrial injury in PA tissue of mice in various groups

DCC。该水凝胶有良好的生物相容性，能够高效负载ADSCs来源Exos，皮下包埋实验和FT-IR分析结果显示DCC/Exo体系结构稳定，可成功实现Exo的功能性负载，且未引起周围组织炎症反应。本研究进一步在小鼠术后腹壁-盲肠损伤模型上，

将DCC/Exo用于腹壁盲肠的创面修复，评价DCC/Exo预防术后PA的作用。结果显示：对照组小鼠腹腔可见大量胶原纤维密集聚集，形成连续黏附带，PA组织内观察到大量炎细胞浸润；DCC/Exo组小鼠腹腔则未见严重粘连，仅出现轻微炎症反应，

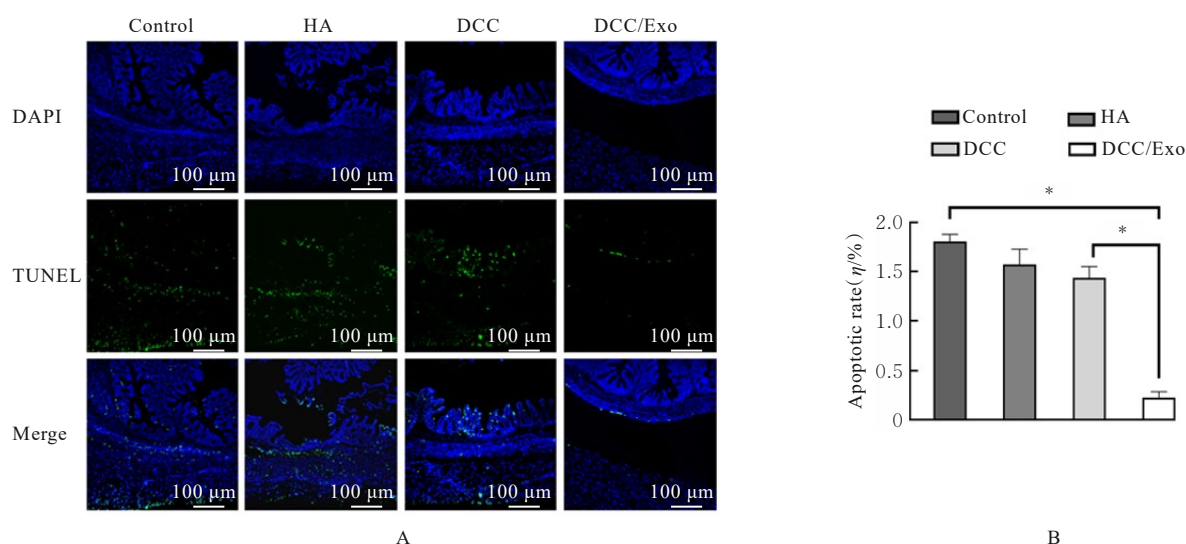
A: TUNEL staining; B: Apoptotic rate of cells (* $P < 0.001$).

图9 各组小鼠PA组织中细胞凋亡情况

Fig. 9 Apoptosis of cells in PA tissue of mice in various groups

腹壁基本完全修复, 上述结果提示DCC/Exo可减少炎症性纤维化和胶原纤维的沉积, 从而有效预防PA。

目前PA形成的病理生理学过程及其形成机制尚未完全阐明。研究^[12-14]表明: 黏附形成是动态再生组织的修复失调, 涉及一系列相互关联的事件和生物学机制, 包括初始组织损伤、伤口愈合、纤维蛋白溶解和纤维化等。间皮层受损引起的炎症在促进PA形成方面具有重要意义^[15-17]。研究^[18]发现: 腹膜损伤后, 中性粒细胞浸润是粘连形成早期的关键事件。研究^[19]显示: 中性粒细胞可通过释放ROS和蛋白酶等清除病原体, 但其过度聚集与滞留会破坏正常组织结构, 促进纤维蛋白沉积, 从而启动早期粘连。MPO是嗜中性粒细胞和多形核白细胞嗜天青颗粒的主要成分, 常反映炎症浸润程度。术后5 d的免疫组织化学染色结果显示: DCC/Exo组小鼠PA组织中MPO表达明显低于其他各组, 与对照组比较, DCC/Exo治疗后MPO阳性面积降低51%, 这提示DCC/Exo可通过减少局部炎症反应来预防PA。

手术损伤会破坏氧化还原平衡, 导致ROS大量蓄积^[20]。过量ROS不仅直接参与PA的发生发展, 还可诱导炎症反应级联扩增, 促进巨噬细胞向促炎表型极化^[21]。本研究通过DHE荧光探针评估了DCC/Exo水凝胶的ROS清除能力, 结果显示DCC/Exo组小鼠PA组织中ROS水平明显低于其

他各组。进一步通过Mitotracker标记线粒体、TUNEL染色标记凋亡细胞, 结果显示: 对照组小鼠PA组织中线粒体数量较少, 提示线粒体在氧化应激下受损; 与对照组比较, DCC/Exo组小鼠PA组织中线粒体荧光信号表达升高3.4倍; 对照组小鼠PA组织中, 氧化应激损伤导致大量细胞凋亡; 与对照组比较, DCC/Exo组TUNEL荧光信号面积降低87%。上述结果表明: 术后小鼠腹壁和肠壁损伤导致ROS积累、线粒体损伤和细胞凋亡, DCC/Exo可持续释放Exo, 减轻局部氧化应激损伤, 对PA预防有积极作用。

腹膜间皮细胞构成覆盖腹膜表面的单层扁平上皮, 正常情况下可作为腹膜表面的物理屏障, 防止器官间的相互粘连^[22]。在损伤或炎症刺激下, 间皮细胞通过MMT过程转化为间质细胞, 进而转化为具有较强迁移能力且能分泌大量细胞外基质能力的肌成纤维细胞, 参与PA的形成^[23-24]。MMT过程中, 间皮细胞从上皮细胞表型转变为间质表型, 表现为间皮细胞上皮表型标志物(如E-cadherin)表达下降, 间质表型标志物(如Vimentin)表达上调^[25]。本研究结果显示: DCC/Exo组小鼠PA组织中E-cadherin表达明显升高, Vimentin表达降低, 证实DCC/Exo可有效抑制MMT过程, 从而阻止粘连发生。上述结果均提示DCC/Exo可通过调节相关的免疫微环境来减少氧化应激和炎症, 减少细胞凋亡, 抑制MMT和纤维

化进程,促进腹膜间皮细胞的修复和再生,从而有助于防止PA发生。

本研究证实DCC/Exo体系具有稳定的化学结构,可成功实现Exo的功能性负载,且生物相容性良好;其可有效预防术后PA的发生,为后续临床研究奠定了基础。但DCC/Exo体系发挥调控作用的分子机制及下游信号尚不明确,有待进一步深入研究,以揭示更多潜在治疗靶点,为开发更具针对性、高效性的抗粘连策略提供理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

马宁和柳爽参与数据采集及论文撰写,王成瑶、卢嘉骏、陈琳瑜、王梓祎、赵伟钦和王伟潼参与数据采集及实验操作,车鹏程和孙红参与研究指导及论文修改。

[参考文献]

- [1] VAKILIAN S, AL-HASHMI S, AL-KINDI J, et al. Avastin-loaded 3D-printed alginate scaffold as an effective antiadhesive barrier to prevent postsurgical adhesion bands formation[J]. *Macromol Biosci*, 2024, 24(6): e2300530.
- [2] LI X Y, CAI J, DUAN X M, et al. Injectable polyamide-amine dendrimer-crosslinked meloxicam-containing poly- γ -glutamic acid hydrogel for prevention of postoperative tissue adhesion through inhibiting inflammatory responses and balancing the fibrinolytic system[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2024, 670: 486-498.
- [3] MA Y Y, SUN T H, REN K J, et al. Plasma-activated solutions prevent peritoneal adhesion formation by regulating eNOS expression in mesothelial cells[J]. *J Adv Res*, 2025, 78: 555-571.
- [4] CHEN Y, WANG X, TAO S, et al. Research advances in smart responsive-hydrogel dressings with potential clinical diabetic wound healing properties[J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 37.
- [5] 江俊杰, 武 皓, 何 康, 等. 人參多肽温敏水凝胶对大鼠热源性皮肤损伤的修复作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2025, 51(2): 360-369.
- [6] MONDAL J, PILLARISSETTI S, JUNNUTHULA V, et al. Hybrid exosomes, exosome-like nanovesicles and engineered exosomes for therapeutic applications[J]. *J Control Release*, 2023, 353: 1127-1149.
- [7] TAN X, ZHANG J, HENG Y Y, et al. Locally delivered hydrogels with controlled release of nanoscale exosomes promote cardiac repair after myocardial infarction[J]. *J Control Release*, 2024, 368: 303-317.
- [8] YU Q Y, SUN H, YUE Z W, et al. Zwitterionic polysaccharide-based hydrogel dressing as a stem cell carrier to accelerate burn wound healing[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(7): e2202309.
- [9] FAN M H, PI J K, ZOU C Y, et al. Hydrogel-exosome system in tissue engineering: a promising therapeutic strategy[J]. *Bioact Mater*, 2024, 38: 1-30.
- [10] ZHANG Z Q, YIN C, SONG X W, et al. A self-fused peptide-loaded hydrogel with injectability and tissue-adhesiveness for preventing postoperative peritoneal adhesions[J]. *Mater Today Bio*, 2024, 28: 101205.
- [11] KRISHNAN M A, ALIM I O A, KUSS M, et al. A dual-layer hydrogel barrier integrating bio-adhesive and anti-adhesive properties prevents postoperative abdominal adhesions[J]. *Adv Healthc Mater*, 2025, 14(11): 2405238.
- [12] ZHANG Y H, YU L, QIU R J, et al. 3D hypoxia-mimicking and anti-synechia hydrogel enabling promoted neovascularization for renal injury repair and regeneration[J]. *Mater Today Bio*, 2023, 21: 100694.
- [13] FOSTER D S, GUO J L, MEANY E, et al. Postoperative adhesions are abrogated by a sustained-release anti-JUN therapeutic in preclinical models[J]. *Sci Transl Med*, 2025, 17(789): eadp9957.
- [14] LI X M, GUO Y F, WANG Z Y, et al. Platelet-rich fibrin promotes mesothelial cell proliferation and peritoneal repair by up-regulating calretinin to prevent postoperative intestinal adhesion[J]. *Int J Med Sci*, 2025, 22(6): 1254-1268.
- [15] JIANG L J, YAO F L, ZHANG E S, et al. Combined treatment of xyloglucan derivative hydrogel and anti-C5a receptor antibody in preventing peritoneal adhesion[J]. *Acta Biomater*, 2022, 151: 163-173.
- [16] GONG P, REN L L, GAO X H, et al. A novel barrier membrane with long-term ROS scavenging function for complete prevention of postoperative adhesion[J]. *Mater Des*, 2024, 238: 112691.
- [17] MASOLA V, BONOMINI M, BORRELLI S, et al. Fibrosis of peritoneal membrane as target of new therapies in peritoneal dialysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 4831.
- [18] LU Y Q, ELROD J, HERRMANN M, et al. Neutrophil extracellular traps: a crucial factor in post-surgical abdominal adhesion formation[J]. *Cells*, 2024, 13(11): 991.
- [19] HERRO R, GRIMES H L. The diverse roles of neutrophils from protection to pathogenesis[J]. *Nat*

- Immunol, 2024, 25(12): 2209-2219.
- [20] CHEN J M, AN X Y, XU L, et al. Adhesive nanoparticle-in-microgel system with ROS scavenging capability and hemostatic activity for postoperative adhesion prevention[J]. Small, 2024, 20(27): e2306598.
- [21] REN Y W, LI G, LI E M, et al. Luteolin blocks the ROS/PI3K/AKT pathway to inhibit mesothelial-mesenchymal transition and reduce abdominal adhesions[J]. Eur J Pharmacol, 2024, 964: 176272.
- [22] LI G, REN Y W, LI E M, et al. Quercetin inhibits mesothelial-mesenchymal transition and alleviates postoperative peritoneal adhesions by blocking the TGF- β 1/PI3K/AKT pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 2): 117242.
- [23] SANDOVAL P, JIMÉNEZ-HEFFERNAN J A, GUERRA-AZCONA G, et al. Mesothelial-to-mesenchymal transition in the pathogenesis of post-surgical peritoneal adhesions[J]. J Pathol, 2016, 239(1): 48-59.
- [24] WANG R P, GUO T K, LI J L. Mechanisms of peritoneal mesothelial cells in peritoneal adhesion [J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1498.
- [25] WANG Y, SHI Y F, TAO M, et al. Peritoneal fibrosis and epigenetic modulation[J]. Perit Dial Int, 2021, 41(2): 168-178.