

人脂肪间充质干细胞源凋亡囊泡促进中性粒细胞炎性坏死转变为中性粒细胞凋亡的研究

宫晓静^{1,2}, 祖潇然², 景志强², 张俊雅², 徐亦驰², 韩岩²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心整形修复科, 北京 100853

摘要:背景 间充质干细胞来源凋亡囊泡(mesenchymal stem cells-apoptotic vesicles, MSCs-apoVs)具有减少多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)发生中性粒细胞炎性坏死(neutrophilic inflammatory necrosis, NETosis), 抑制中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)生成, 促进PMNs凋亡的作用。这使得MSCs-apoVs成为当前治疗NETosis相关免疫疾病的新策略。目的 探讨人脂肪间充质干细胞来源的凋亡囊泡(adipose-derived stem cell-apoptotic vesicles, ADSCs-apoVs)抑制NETosis的机制并促进其凋亡的作用程度。方法 原代分离、培养并鉴定ADSCs, 采用高速离心法提取并鉴定由星孢菌素(Staurosporine, STS)诱导凋亡的ADSCs-apoVs。利用差速离心法结合流式无菌分选技术分离提取小鼠骨髓原代PMNs, 将PMNs与不同浓度(1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$)ADSCs-apoVs共培养8 h, 通过免疫荧光及流式检测不同浓度(1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$)的ADSCs-apoVs作用后PMNs的NETs生成量, NETosis及凋亡变化。结果 ADSCs-apoVs通过浓度依赖的双重机制调控PMNs死亡。NETosis抑制显示, 5 $\mu\text{g/mL}$ 组ADSCs-apoVs与对照组比, 能显著抑制H3cit生成量(48.20 ± 0.96 vs 75.30 ± 1.00 , $P < 0.001$), 同时能显著抑制NETosis的发生(NETosis率: $36.07\% \pm 3.07\%$ vs $57.03\% \pm 5.35\%$, $P = 0.002$); 10 $\mu\text{g/mL}$ 组协同抑制瓜氨酸化组蛋白(citrullinated histone H3, H3cit)生成(24.73 ± 0.90 vs 75.30 ± 1.00 , $P < 0.001$)并降低NETosis率($16.48\% \pm 8.09\%$ vs $57.03\% \pm 5.35\%$, $P < 0.001$)。凋亡阈值效应显示, 10 $\mu\text{g/mL}$ 组与对照组相比能显著促进PMNs发生凋亡($50.70\% \pm 10.86\%$ vs $10.30\% \pm 1.55\%$, $P = 0.001$), 并显著促进早期凋亡($14.30\% \pm 1.97\%$ vs $0.25\% \pm 0.21\%$, $P < 0.001$)及显著促进晚期凋亡($36.40\% \pm 12.75\%$ vs $10.06\% \pm 1.40\%$, $P = 0.011$), 而1、5 $\mu\text{g/mL}$ 组ADSCs-apoVs的PMNs凋亡率无显著变化[($9.14\% \pm 4.82\%$ vs $10.30\% \pm 1.55\%$, $P = 0.997$), ($10.26\% \pm 7.31\%$ vs $10.30\% \pm 1.55\%$, $P > 0.999$)]。结论 ADSCs-apoVs通过双重途径调控PMNs命运, 一是抑制H3cit以抑制NETs的形成进而阻止PMNs发生NETosis; 二是激活凋亡通路, 促进PMNs大量凋亡。5 $\mu\text{g/mL}$ ADSCs-apoVs是NETosis特异性抑制安全窗浓度, 而10 $\mu\text{g/mL}$ ADSCs-apoVs是NETosis抑制协同凋亡激活的有效清除剂量。

关键词:脂肪间充质干细胞; 细胞凋亡; 凋亡囊泡; 中性粒细胞胞外诱捕网; 中性粒细胞炎性坏死

中图分类号: R329.2; R392.12

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)10-0960-12

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25040402

引用本文: 宫晓静, 祖潇然, 景志强, 等. 人脂肪间充质干细胞源凋亡囊泡促进中性粒细胞炎性坏死转变为中性粒细胞凋亡的研究 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (10): 960-971.

Apoptosis vesicles from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote neutrophil apoptosis over inflammatory necrosis

GONG Xiaojing^{1,2}, ZU Xiaoran², JING Zhiqiang², ZHANG Junya², XU Yichi², HAN Yan²

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding authors: HAN Yan. Email: 13720086335@163.com

Abstract: Background Mesenchymal stem cell-derived apoptotic vesicles (MSCs-apoVs) have demonstrated the capacity to promote apoptosis in polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and reduce their neutrophilic inflammatory necrosis (NETosis). Consequently, MSCs-apoVs have emerged as a novel therapeutic strategy for inhibiting NETs formation by suppressing NETosis in PMNs and enhancing their apoptotic processes. **Objective** To investigate the effects of adipose-derived stem cell-derived apoptotic vesicles (ADSCs-apoVs) on promoting PMNs apoptosis and inhibiting NETosis. **Methods** Primary mouse bone marrow-derived polymorphonuclear neutrophils (PMNs) were isolated via differential centrifugation combined with sterile fluorescence-activated cell sorting (FACS). PMNs were co-cultured with adipose-derived stem cell apoptotic vesicles (ADSCs-apoVs) at varying concentrations (1, 5, and 10 $\mu\text{g/mL}$) for 8 hours. NETs formation, NETosis, and apoptosis were quantified using

收稿日期: 2025-04-04

基金项目: 北京市自然科学基金青年项目(7244299)

第一作者: 宫晓静, 在读硕士, 医师。Email: gongxiaojing2021@163.com

通信作者: 韩岩, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师。Email: 13720086335@163.com

immunofluorescence and flow cytometry. **Results** ADSCs-apoVs regulated PMNs fate through dual pathways. NETosis suppression showed that at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, significant reductions occurred in H3cit production (48.20 ± 0.96 vs 75.30 ± 1.00 , $P < 0.001$), NETosis incidence ($36.07\% \pm 3.07\%$ vs control $57.03\% \pm 5.35\%$, $P = 0.002$); At 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, synergistic inhibition was observed for H3cit levels (24.73 ± 0.90 vs 75.30 ± 1.00 , $P < 0.001$), NETosis incidence ($16.48\% \pm 8.09\%$ vs $57.03\% \pm 5.35\%$, $P < 0.001$). Apoptosis threshold effect showed that 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ elevated total apoptosis ($50.70\% \pm 10.86\%$ vs $10.30\% \pm 1.55\%$, $P = 0.001$), early apoptosis ($14.30\% \pm 1.97\%$ vs $0.25\% \pm 0.21\%$, $P < 0.001$), late apoptosis ($36.40\% \pm 12.75\%$ vs $10.06\% \pm 1.40\%$, $P = 0.011$). No significant apoptosis changes occurred at ≤ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($10.26\% \pm 7.31\%$ vs $10.30\% \pm 1.55\%$, $P > 0.999$), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($9.14\% \pm 4.82\%$ vs $10.30\% \pm 1.55\%$, $P = 0.997$). **Conclusion** ADSCs-apoVs regulate PMNs fate through dual pathways by inhibiting histone H3 citrullination to suppress NETs formation, thereby preventing NETosis, and concurrently activating apoptosis pathways to induce extensive PMNs apoptosis. 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADSCs-apoVs defines a therapeutic window for NETosis-selective inhibition, while 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ represents an effective clearance dose for synergistic NETosis suppression and apoptosis activation.

Keywords: adipose-derived mesenchymal stem cells; cell apoptosis; apoptotic vesicles; neutrophil extracellular traps; neutrophilic inflammatory necrosis

Cited as: Gong XJ, Zu XR, Jing ZHQ, et al. Apoptotic vesicles derived from human adipose-derived mesenchymal stem cells facilitate the transition of NETosis to neutrophil apoptosis[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(10): 960-971.

多形核中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophils, PMNs) 是先天免疫的核心效应细胞, 中性粒细胞炎性坏死 (neutrophilic inflammatory necrosis, NETosis) 与凋亡的死亡模式之间的动态平衡决定着炎症转归^[1]。PMNs 发生“NETosis”过程中通过释放中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 捕获细菌等病原微生物, 有助于增强机体抗感染能力, 但过度发生的 NETosis 则会引发免疫失衡并导致多种疾病, 如, 脓毒症、类风湿关节炎等; 凋亡则扮演促进炎症消退并维持免疫稳态的重要角色^[2], 可见机体在 NETosis 与凋亡的平衡中才能实现稳态。

凋亡囊泡 (apoptosis vesicles, apoVs) 是细胞在经历凋亡过程中会产生大量的细胞外囊泡, 包括凋亡小体 (直径 $1 \sim 5 \mu\text{m}$)、凋亡微泡 ($0.1 \sim 1 \mu\text{m}$) 和凋亡外泌体 ($< 150 \text{ nm}$)^[3], 其内含的各类细胞成分, 如蛋白质、核酸和脂质等生物活性分子, 对于维持组织和器官的稳态具有重要意义^[3-5]。间充质干细胞来源凋亡囊泡 (mesenchymal stem cells-derived apoptotic vesicles, MSCs-apoVs) 在调控免疫细胞的活化、迁移、表型转化和调节凋亡等多种机制方面, 展现出显著的免疫调控作用^[6]。最新研究表明, 小鼠尾静脉输注人骨髓间充质干细胞源凋亡囊泡 (human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs-apoVs) 能够调控小鼠体内 PMNs 死亡方式, 即将 NETosis 转变为 PMNs 凋亡^[7]。

脂肪来源间充质干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 因便于获取、增殖迅速、对环境应激敏感, 易于在外界刺激下启动凋亡程序, 产生大量 ADSCs-apoVs^[8]。这些囊泡不仅有助于细胞间的信息传递, 还可能发挥免疫调节和抗炎作用, 具有潜在的临床应用价值^[8]。然而, ADSCs-apoVs

是否具备调控 PMNs 死亡方式的能力尚不明确。本研究旨在制备和鉴定 ADSCs-apoVs 的基础上, 探究不同浓度 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ADSCs-apoVs 对 PMNs 死亡模式从 NETosis 转变为凋亡的影响, 为 ADSCs-apoVs 应用于靶向调控 NETs 的研究提供一种新策略, 为脓毒症、类风湿关节炎、糖尿病创面等 NETosis 相关疾病治疗开辟新途径; 同时推动干细胞囊泡的临床转化, 为靶向调控免疫细胞死亡提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

ADSCs 提取于吸脂术后废弃的活性纯化无菌脂肪颗粒, 伦理编号为 S2023-207-01; PMNs 提取于 6~8 周雄性 C57BL/6N 小鼠的股骨、胫骨骨髓, 伦理编号为 IACUC-20231022-007。小鼠骨髓中性粒细胞分离液试剂盒 (天津灏洋, 中国); 1640 基础培养基、PMA、PBS、青链霉素、 α -MEM 培养基、胎牛血清、Tryple Select (1 \times) (Gibco, 美国); 脂肪干细胞完全培养基、去外泌体脂肪干细胞培养基、干细胞成骨分化试剂盒、干细胞成脂分化试剂盒、干细胞成软骨分化试剂盒 (Oricell, 中国); 星孢菌素 (Staurosporine, STS, Selleck, 美国); DAPI、DiD (碧云天, 中国)、Triton X-100、4% 多聚甲醛 (索莱宝, 中国); 胶原酶 I (Sigma, 美国); 7-AAD/Annexin V-PE 凋亡检测试剂盒 (诺维赞, 中国); SYTOX-Green/Annexin V-mCherry 凋亡检测试剂盒 (碧云天, 中国); APC anti-mouse/human CD11b (Biolegend, 美国); Anti-Ly-6G-PE, mouse (BD, 美国); (Rabbit anti-Mouse, Rat, Human) Histone H3 (citrulline R2+R8+R17) antibody [RM1001] (Abcam, 美国); MPO 一抗 (Abcam, 美国);

Alexa Fluor™568 PE 荧光素、Donkey anti-goat IgG、Alexa Fluor™488 Donkey anti-rabbit IgG、Alexa Fluor™633 Donkey anti-goat IgG (ThermoFisher, 美国); 兔抗人 CD29-PE 流式抗体、兔抗人 CD73-PE 流式抗体、兔抗人 CD90-PE 流式抗体、兔抗人 CD105-PE 流式抗体、兔抗人 CD14-FITC 流式抗体、兔抗人 CD34-FITC 流式抗体、兔抗人 CD45-FITC 流式抗体、兔抗人 HLA-DR 流式抗体(BD, 美国); 兔抗人 Cleaved Caspase3 一抗、兔抗人 Caspase3 一抗(1:1 000, CST, 美国); 兔抗人 GAPDH 一抗、兔抗人 CD9 一抗、兔抗人 TSG101 一抗(1:1 000, ABclonal, 中国)。紫外分光光度计(Hitachi, 日本); 二氧化碳细胞孵箱(ThermoFisher, 美国); 倒置生物显微镜(Nikon, 日本); 超净台(北京东联哈尔, 中国); 台式离心机(KUBOTA, 日本); 高速离心机(Beckman, 美国); 超速离心机(Eppendorf, 德国); 细胞计数仪(Countstar, 中国); 流式细胞检测仪(BD, 美国); 流式细胞分选仪(BD, 美国); 激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国); 透射电子显微镜(Hitachi, 日本); Zetaview 分析仪(Particle Metrix, 德国); 凝胶电泳仪基础电源、蛋白转印系统(Bio-Rad, 美国); 化学发光成像仪(GE, 美国)。细胞计数板(Countstar, 中国); 激光共聚焦小皿(ThermoFisher, 美国)。

1.2 原代 ADSCs 的分离提取、培养、鉴定

采用 I 型胶原酶消化法从新鲜脂肪组织中分离原代 ADSCs。取 20 mL 脂肪组织与 PBS 混合, 经 1 200 rpm 离心 5 min 清洗 3 次。加入 25 mL 0.1% I 型胶原酶 37°C 消化 40 min (120 rpm), 离心后收集底部血管基质成分(富含 ADSCs)。以 α -MEM 完全培养基(含 10% 胎牛血清+1% 双抗)重悬并接种在 10 cm² 培养皿于 CO₂ 培养箱中培养, 3 d 后首次换液去除未贴壁细胞, 后续每 2~3 d 换液, 细胞融合度达 80% 时并换用 ADSCs 完全培养基(含 10% 胎牛血清+1% 双抗)培养、传代、扩增, 取 P3~P6 代细胞用于实验。取 P3 代 ADSCs 按照三系诱导分化说明书进行成脂诱导及油红 O 染色、成骨诱导及茜素红染色、成软骨诱导及阿利辛蓝染色, 并进行流式细胞术鉴定。

1.3 ADSCs 凋亡囊泡的制备

1.3.1 ADSCs 的凋亡诱导与检测 P5 代 ADSCs 细胞培养至细胞密度达 90% 后 PBS 清洗, 换含 STS (0.5 μ m/mL) 的去外泌体完全培养基, 凋亡诱导 4 h 和 12 h, 并设立非凋亡诱导组为空白对照, 光镜下

观察细胞形态, 采用 Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒进行细胞凋亡率流式检测。

1.3.2 ADSCs 凋亡囊泡的提取与鉴定 0.5 μ m/mL STS 凋亡诱导 ADSCs 12 h 后收集上清液进行梯度离心, 于 4°C、1 000 g 离心 15 min 以去除细胞碎片, 再于 4°C、16 000 g 高速离心 40 min, 所得高速离心管侧壁的白色沉淀即为 ADSCs-apoVs。采用紫外线分光光度法测定 ADSCs-apoVs 的总蛋白浓度, 并稀释调整浓度为 1、5、10 μ g/mL。本研究通过透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 ADSCs-apoVs 的形态, 通过纳米颗粒跟踪分析 (nanoparticle tracking analysis, NTA) 检测 ADSCs-apoVs 的粒径分布, 通过 Western blot 检测比较 ADSCs 和 ADSCs-apoVs 表面标记蛋白 CD9, TSG101, Caspase 3, Cleaved caspase 3 的表达情况。

1.4 小鼠骨髓原代 PMNs 的提取

采用小鼠骨髓中性粒细胞分离液试剂盒差速离心法分离出小鼠骨髓 PMNs, 并结合流式无菌分选进一步提纯 PMNs。颈椎脱臼法处死小鼠, 分离股骨和胫骨, 用 1 mL 注射器注入组织样本稀释液冲洗骨髓腔, 45 μ m 细胞筛网过滤冲洗液以获得骨髓单细胞悬液, 离心(450 g, 4°C, 10 min)后, 1 mL 红细胞沉降液重悬细胞沉淀。在 15 mL 离心管中依次加入 3 mL 分离液 1 和 1.5 mL 分离液 2, 形成密度梯度界面后再小心加入 1 mL 骨髓单细胞悬液。离心(450 g, 4°C, 30 min)后, 小心吸取 PMNs 层, 清洗液清洗离心(400 g, 4°C, 10 min)后, 1 mL 含 3% FBS 的 PBS 重悬 PMNs。AOPI 计数后, 采用 Ly-6G-PE 抗体和 CD11b-APC 抗体标记 PMNs, 7-AAD 标记死细胞, 流式分选活 PMNs。本实验后续所用的 PMNs 均用此法进行分离提纯。AOPI 计数后, 1~2 mL 的 1640 完全培养基重悬细胞沉淀后备用。

1.5 激光共聚焦显微镜检测 PMA 诱导 PMNs

将无菌分选出的 PMNs 分 5 组, 每组细胞数为 2.85 \times 10⁴ 个, 接种于被多聚赖氨酸预处理过的激光共聚焦小皿中, 分别设为: 空白对照组, 20 nmol/L PMA 组, 50 nmol/L PMA 组, 100 nmol/L PMA 组, 500 nmol/L PMA 组。PMNs 被 PMA 刺激 4 h 后, PBS 洗涤 3 次, 采用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤 3 遍, 0.1% Triton-x-100 破膜 30 min, PBS 洗涤 3 次, 10% 的驴血清封闭液室温封闭 1 h, 加入 200 μ L 兔重组 H3cit 一抗(1:100)和羊重组 MPO 一

抗(1:100)4°C孵育过夜, PBS洗3次, 加入200 μL 荧光二抗 AF488(1:400)和 AF568(1:400), 室温孵育2 h, PBS洗3次, DAPI(1:500)染核15 min, PBS洗3次, LSM980激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.6 激光共聚焦显微镜检测 PMNs 摄取 ADSCs-apovs

PMNs以 1×10^5 个/mL的密度接种于被多聚赖氨酸预处理过的激光共聚焦小皿中, 加入被DiD(1:1000)标记的ADSCs-apovs(10 μg/mL), 继续孵育8 h, 弃上清, PBS洗1次, 4%多聚甲醛室温固定30 min, 0.1% Triton X-100破膜30 min, 用鬼笔环肽(Actin-Tracker Green-488)(1:200)和DAPI(1:500)染液室温避光孵育30 min, PBS洗3次, LSM980激光共聚焦显微镜观察、拍照。

1.7 激光共聚焦显微镜检测 PMNs 摄取 ADSCs-apovs 后的 NETosis 量和细胞凋亡量

PMNs以 5×10^5 个/皿的密度接种于经多聚赖氨酸预处理的激光共聚焦小皿中, 分为4组: 空白对照组(0 μg/mL ADSCs-apoVs)、1 μg/mL ADSCs-apoVs组、5 μg/mL ADSCs-apoVs组、10 μg/mL ADSCs-apoVs组。各组先分别接受100 nmol/L PMA刺激后, 再加入不同浓度的ADSCs-apoVs的处理, 空白对照组给与等量PBS。4组共聚焦小皿于细胞孵箱中共孵育8 h, 孵育结束后, 采用PBS清洗, 随后采用SYTOX-Green/Annexin V-mCherry凋亡检测试剂盒进行染色, LSM980激光共聚焦显微镜观测NETosis和细胞凋亡的荧光染色。

1.8 流式细胞仪检测 PMNs 摄取 ADSCs-apovs 后 NETs 生成量

PMNs以 5×10^5 个/皿的密度接种于12孔板中, 分为4组: 空白对照组(0 μg/mL ADSCs-apovs)、1 μg/mL ADSCs-apovs组、5 μg/mL ADSCs-apovs组、10 μg/mL ADSCs-apovs组。各组先分别接受100 nmol/L PMA刺激后, 再加入不同浓度ADSCs-apoVs的处理, 空白对照组给予等量PBS。4组PMNs放于细胞孵箱中共孵育8 h, 孵育结束后采用PBS清洗, 随后采用H3cit一抗进行孵育35 min, 清洗后, 孵育PE荧光素1 h后清洗, 100 μm细胞筛网过滤后流式上机检测H3cit生成量(即NETs生成量)。

1.9 流式细胞仪检测 PMNs 摄取 ADSCs-apovs 后的 NETosis 率和细胞凋亡率

PMNs以 5×10^5 个/皿的密度接种于经多聚赖氨酸

酸预处理的激光共聚焦小皿中, 分为4组: 空白对照组(0 μg/mL ADSCs-apovs组)、1 μg/mL ADSCs-apovs组、5 μg/mL ADSCs-apovs组、10 μg/mL ADSCs-apovs组。各组先分别接受100 nmol/L PMA刺激后, 再加入不同浓度的ADSCs-apovs的处理, 空白对照组给与等量PBS。4组共聚焦小皿于细胞孵箱中共孵育8 h, 孵育结束后, 采用PBS清洗, 随后采用SYTOX-Green/Annexin V-mCherry凋亡检测试剂盒, 通过流式细胞术检测NETosis率和细胞凋亡率。

1.10 统计学分析

统计学分析采用SPSS 26.0(IBM)和GraphPad Prism 9.0软件; 所有计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Shapiro-Wilk检验评估正态性, Levene检验验证方差齐性(显著性阈值 $P > 0.05$); 数据满足正态分布且方差齐性条件时: 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), 组间两两比较采用Tukey事后检验, 特定两组比较采用独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

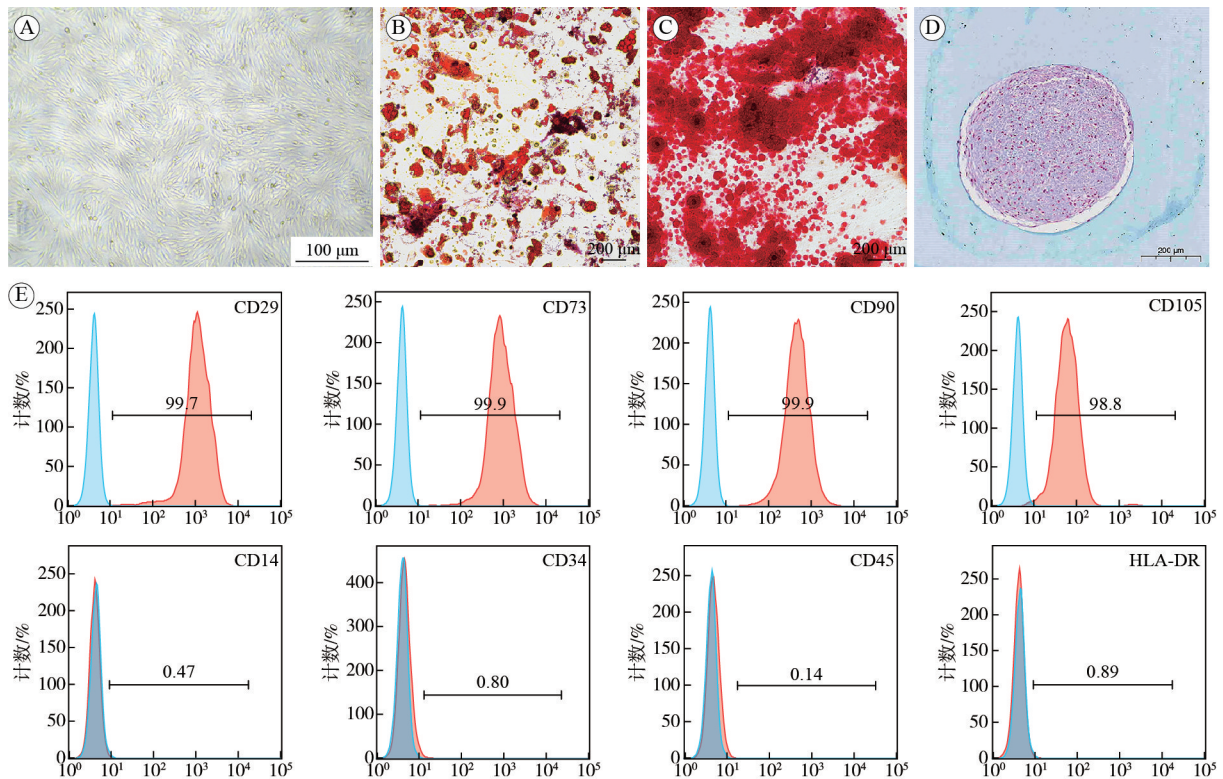
2 结果

2.1 ADSCs 培养鉴定

镜下观察原代ADSCs传至P3代后, 细胞形态大小均一, 呈长梭形、漩涡样贴壁生长, 细胞中央有卵圆形核, 胞质向外伸出长短不同的突起(图1A)。三系诱导分化结果说明提取出的ADSCs具有成脂、成骨、成软骨分化的能力(图1BCD)。流式细胞术检测: CD29、CD73、CD90、CD105均呈高表达($\geq 95\%$), CD14、CD34、CD45、HLA-DR均呈低表达($\leq 2\%$)(图1E), 结果鉴定为ADSCs。

2.2 ADSCs 凋亡诱导及 ADSCs-apovs 鉴定

STS诱导ADSCs凋亡4 h、12 h后, 镜下可见ADSCs细胞体积缩小, 突起变长, 形似树枝, 细胞中央的卵圆形核变得大而圆钝(图2A)。流式结果表明, STS诱导组较对照组凋亡率升高[(31.80% \pm 2.19% vs 3.81% \pm 0.31%, $P < 0.001$)(76.47% \pm 1.33% vs 3.81% \pm 0.31%, $P < 0.001$)], 且ADSCs凋亡率与STS诱导时间呈正相关(31.80% \pm 2.19% vs 76.47% \pm 1.33%, $P < 0.001$), STS诱导时间为0 h, 4 h, 12 h时, ADSCs凋亡率分别为3.81% \pm 0.31%, 31.80% \pm 2.19%, 76.47% \pm 1.33%。说明STS诱导时间为12 h时大部分ADSCs已进入凋亡状态(图2B)。TEM、NTA、Western blot鉴定提纯的ADSCs-apovs, 以确定其纳米颗粒的形态、大小、



A: 光镜下P3代ADSCs(20×10, 标尺100 μm); B: 光镜下油红O染色(10×10, 标尺200 μm); C: 光镜下茜素红染色(10×10, 标尺200 μm); D: 光镜下阿利辛蓝染色(20×10, 标尺200 μm); E: 流式细胞术检测ADSCs表面标志物。

图1 ADSCs分离、培养及鉴定

Fig. 1 Isolation, culture and characterization of ADSCs

表面标记表达情况。TEM显示ADSCs-apovs呈近似规则的圆形或椭圆形的双层膜结构(图2C); NTA结果显示: ADSCs-apovs粒径分布在80~800 nm, 主群的直径分布在100~780 nm(图2D); Western blot分析ADSCs和ADSCs-apoVs均表达TSG101和CD9及凋亡的标志性蛋白Caspase-3, 而CD9在ADSCs-apoVs中表达更高, 且Cleaved Caspase-3仅在ADSCs-apoVs中表达(图2E)。以上鉴定结果均提示, 本研究所提取的ADSCs-apovs与既往报道基本一致^[9]。

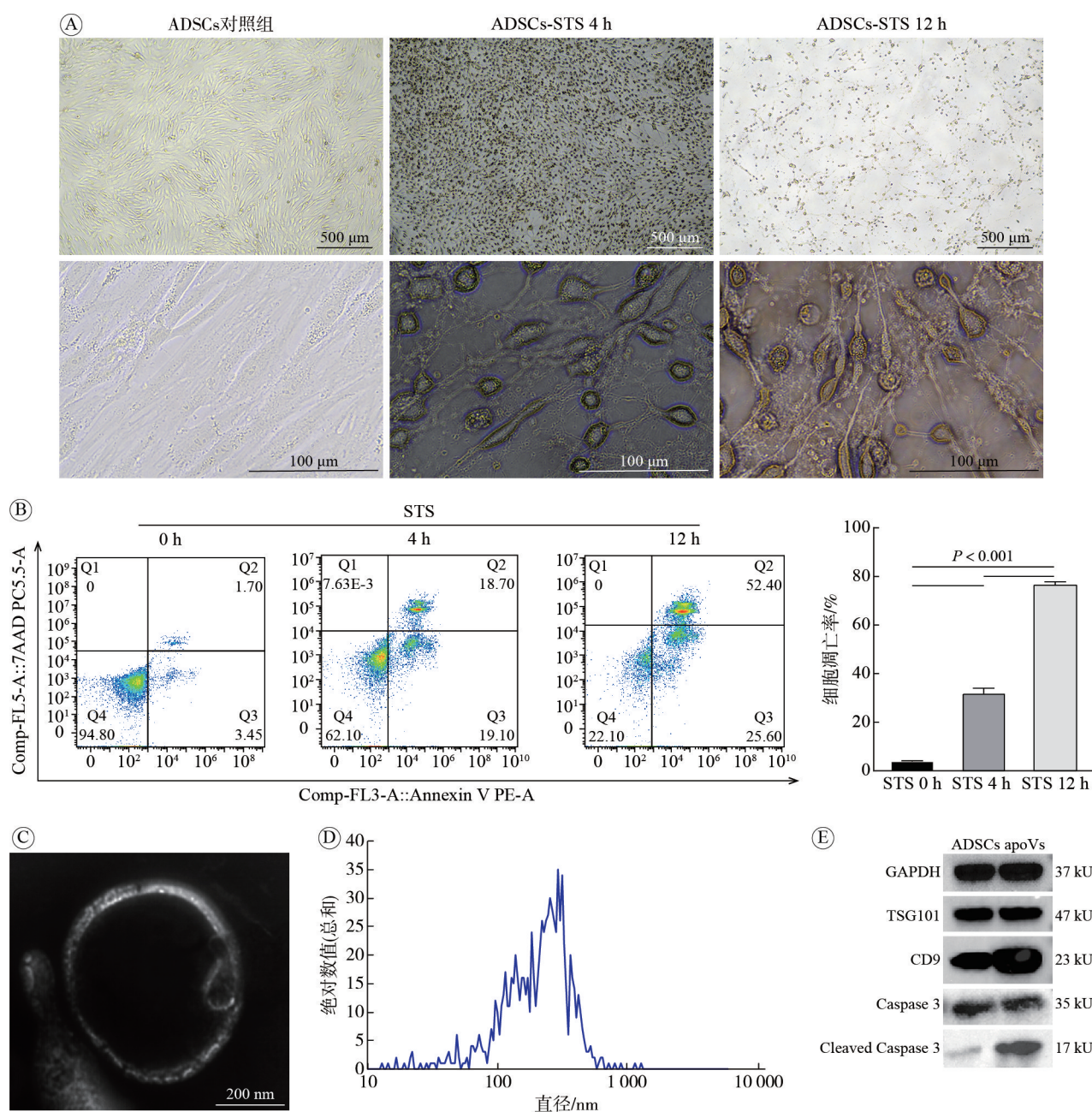
2.3 小鼠骨髓PMNs的分离提取及流式无菌分选

流式结果显示(图3A): 差速离心法分离提取出的CD-11b和Ly-6G双标的PMNs纯度为41.77%±0.49%, 进一步分选, 去除7AAD标记阳性的死细胞群, 圈出7AAD标记阴性的活细胞群(占总细胞群的59.63%±10.47%), 最后分选出被CD-11b和Ly-6G双重标记的活性PMNs(占总细胞群的10.83%±4.56%), 以确保最后提纯出的细胞均为活性PMNs, 纯度为94.17%±1.25%。镜下观察到提纯出的PMNs为圆形悬浮细胞, 大小形态均一, 直径约为10 μm(图3B), 符合PMNs的形态学

特征。

2.4 激光共聚焦显微镜观察PMA诱导PMNs产生NETs

激光共聚焦显微镜下显示, 各浓度(20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 500 nmol/L)PMA组NETs形成的特异标志物H3cit均高于空白对照组(0.51±0.07 vs 0.24±0.10, $P=0.001$; 0.72±0.01 vs 0.24±0.10, $P<0.001$; 1.11±0.04 vs 0.24±0.10, $P<0.001$; 0.88±0.01 vs 0.24±0.10, $P<0.001$)。随着PMA浓度梯度(20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L)递增, NETs的特异性标志物H3cit的生成量显著增多(0.51±0.07 vs 0.72±0.01, $P=0.007$; 0.51±0.07 vs 1.11±0.04, $P<0.001$; 0.72±0.01 vs 1.11±0.04, $P<0.001$)。500 nmol/L PMA组诱导H3cit生成量的效果虽高于50 nmol/L PMA组(0.88±0.01 vs 0.72±0.01, $P=0.043$), 但明显低于100 nmol/L PMA组(0.88±0.01 vs 1.11±0.04, $P=0.004$), 结果说明, NETs的生成量随着PMA刺激的浓度(20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L)递增而增多, 且在此浓度范围内, 100 nmol/L PMA是其最适诱导NETs形成的浓度(图4AC)。同时镜下发现高浓度(100 nmol/L, 500 nmol/L)PMA



A: 光学显微镜下正常ADSCs, STS诱导ADSCs凋亡4 h和12 h的形态学变化(上: 4×10, 标尺500 μm, 下: 40×10, 标尺100 μm); B: 流式细胞术检测STS诱导ADSCs凋亡4 h和12 h的凋亡率及定量分析(n=3); C: TEM观察ADSCs-apoVs形态(标尺200 nm); D: NTA检测ADSCs-apoVs粒径; E: Western blot鉴定ADSCs-apoVs蛋白分子标志物表达。

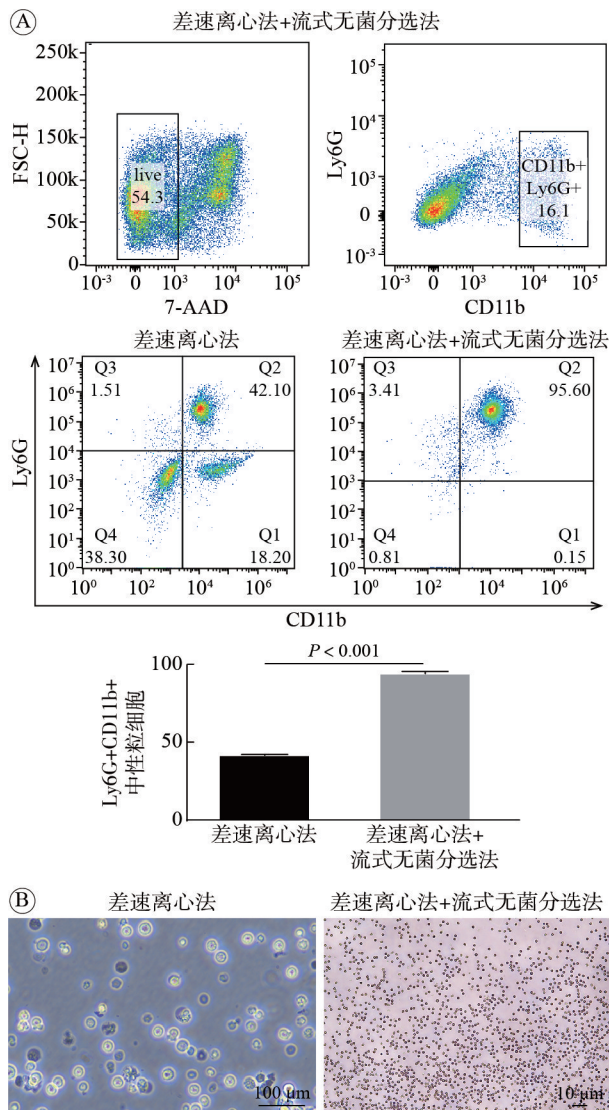
图2 ADSCs诱导凋亡及ADSCs-apoVs鉴定

Fig. 2 Apoptosis induction of ADSCs and characterization of ADSCs-apoVs

组比低浓度(20 nmol/L和50 nmol/L)组更能有效刺激中性粒细胞活化聚集团并释放NETs, 并发现NETs的特异性标志物H3cit、中性粒细胞的活化标志物MPO和cfDNA的免疫荧光共定位呈现出NETs的典型胞外纤维网状结构^[10], 且H3cit和MPO伴随着丝状cfDNA而走行(图4B)。

2.5 激光共聚焦显微镜观察PMNs摄取ADSCs-apoVs

激光共聚焦显微镜下可见: DiD将ADSCs-apoVs染为红色(图5A), 鬼笔环肽(Actin-Tracker Green-488)将PMNs骨架染为绿色(图5B); DAPI将PMNs胞核染为蓝色(图5C), ADSCs-apoVs处理



A: 采用小鼠骨髓中性粒细胞密度梯度分离液通过差速离心法分离提取出PMNs的流式结果及结合流式无菌分选提纯出的活性PMNs的流式结果及定量分析 (n=3); B: 通过差速离心法和结合流式无菌分选得到的PMNs的光镜下细胞学形态(左: 10×10, 标尺100 μm, 右: 4×10, 标尺10 μm)。

图3 小鼠骨髓中性粒细胞的分离提取结合流式无菌分选结果

Fig. 3 Isolation and extraction of mouse bone marrow PMNs combined with flow-type sterile sorting results

PMNs 8 h后, 在PMNs的细胞膜, 细胞骨架及核周区均观察到融合了DiD染色标记的ADSCs-apoVs(图5D), 但DAPI标记的核区内未见红色荧光信号。这表明: PMNs可有效内化ADSCs-apoVs至胞质, ADSCs-apoVs可接近核膜但未穿透完整核膜, PMNs胞质已经完全摄入ADSCs-apoVs。

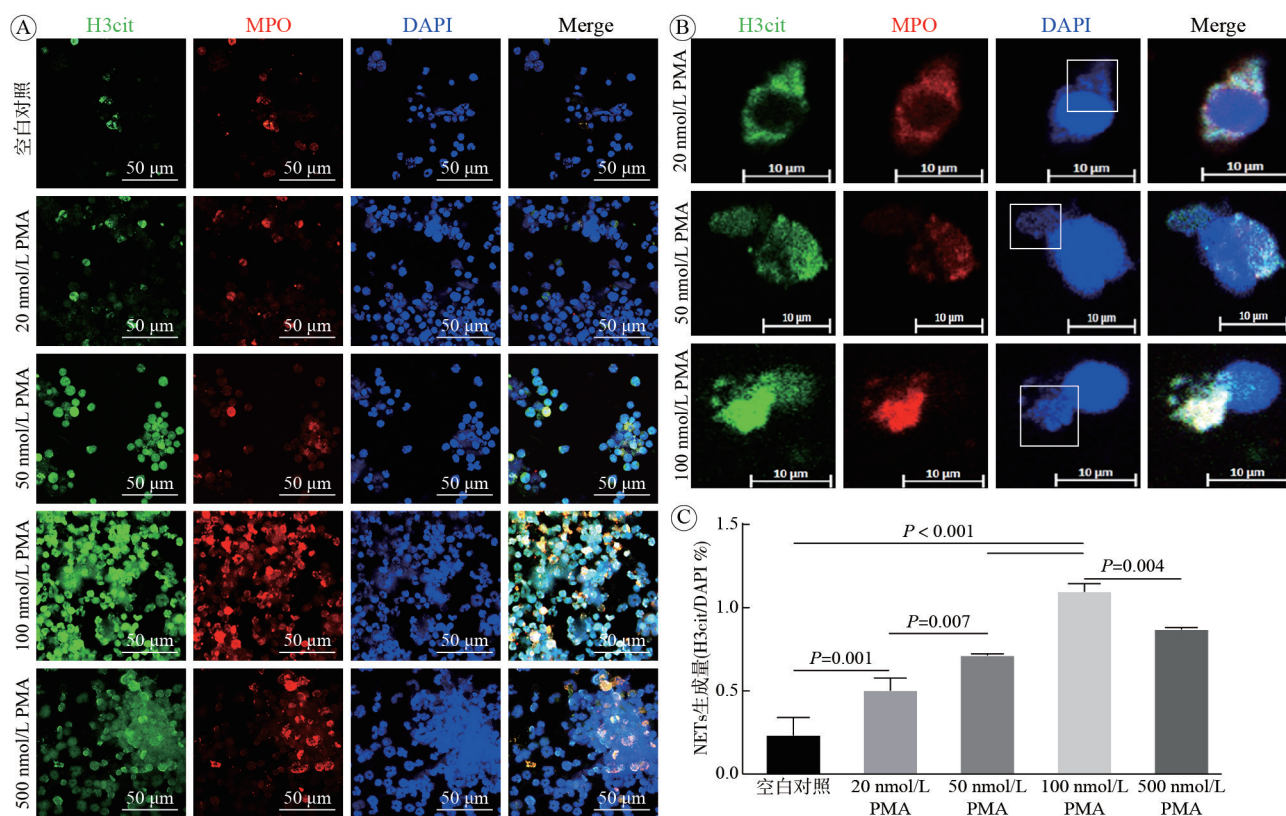
2.6 激光共聚焦显微镜观察PMNs摄取ADSCs-apoVs后的NETosis和凋亡

激光共聚焦显微镜下观察可见: PMNs摄取低、中、高浓度(1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL)

ADSCs-apoVs后观测NETosis和细胞凋亡的变化, 结果显示, 与对照组(0 μg/mL)相比, PMNs摄取1 μg/mL ADSCs-apoVs后NETosis无显著变化(17.44% ± 4.77% vs 17.60% ± 1.98%, $P=0.999$), 细胞凋亡无显著变化(14.60% ± 3.34% vs 15.36% ± 5.21%, $P=0.993$); 而摄取5 μg/mL、10 μg/mL ADSCs-apoVs后NETosis则显著降低[(10.61% ± 0.36% vs 17.60% ± 1.98%, $P=0.043$)(3.12% ± 0.14% vs 17.60% ± 1.98%, $P=0.001$)], 且摄取10 μg/mL ADSCs-apoVs后NETosis的发生比摄取5 μg/mL组降低更明显[(3.12% ± 0.14% vs 10.61% ± 0.36%, $P=0.031$), 但摄取中浓度ADSCs-apoVs细胞凋亡无明显变化(7.59% ± 1.16% vs 14.60% ± 3.34%, $P=0.140$), 而摄取高浓度ADSCs-apoVs细胞凋亡则显著增加(26.32% ± 2.95% vs 14.60% ± 3.34%, $P=0.014$), 且摄取高浓度ADSCs-apoVs比中浓度(5 μg/mL)细胞凋亡明显升高(26.32% ± 2.95% vs 7.59% ± 1.16%, $P=0.001$)。说明在低、中、高浓度范围内, PMNs摄取低浓度(1 μg/mL)ADSCs-apoVs后的NETosis无明显变化($P=0.999$), 而摄取中、高浓度(5 μg/mL、10 μg/mL)ADSCs-apoVs后NETosis则明显降低($P=0.040$, $P=0.001$), 且抑制NETosis发生的效果与ADSCs-apoVs浓度成正相关($P=0.043$, $P=0.001$), 而摄取1 μg/mL、5 μg/mL ADSCs-apoVs的细胞凋亡发生无明显变化($P=0.999$, $P=0.140$), 但摄取高浓度(10 μg/mL)ADSCs-apoVs则细胞明显发生凋亡($P=0.014$)。

2.7 流式细胞术检测PMNs摄取ADSCs-apoVs后的NETs生成的变化量

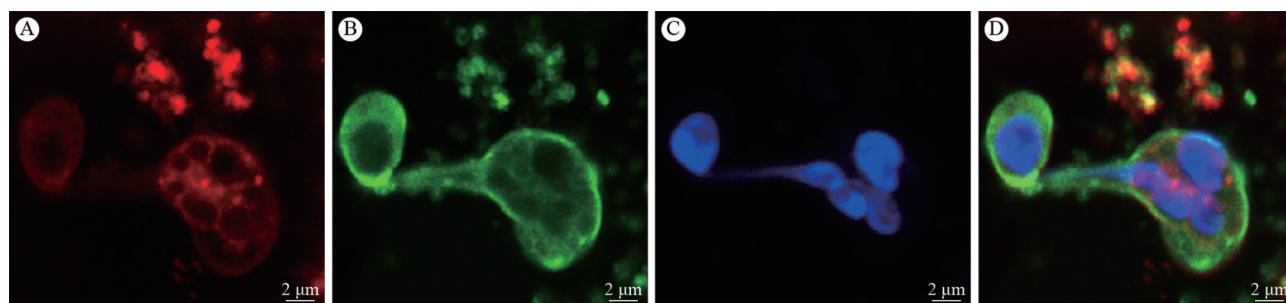
PMNs摄取低、中、高浓度(1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL)ADSCs-apoVs后流式检测NETs特异性标志物H3cit的生成量变化, 结果显示, 与对照组(0 μg/mL)相比, PMNs摄取低浓度(1 μg/mL)ADSCs-apoVs后H3cit的生成量无明显变化(74.47% ± 1.46% vs 75.30% ± 1.00%, $P=0.792$), 而摄取中、高浓度(5 μg/mL、10 μg/mL)ADSCs-apoVs后H3cit的生成量则明显减少(48.20% ± 0.96% vs 75.30% ± 1.00%, $P < 0.001$; 24.73% ± 0.90% vs 75.30% ± 1.00%, $P < 0.001$), 且摄取高浓度(10 μg/mL)ADSCs-apoVs后H3cit的生成量比摄取中浓度(5 μg/mL)组明显减少(24.73% ± 0.90% vs 48.20% ± 0.96%, $P < 0.001$)。说明在此浓度范围内, PMNs摄取低浓度(1 μg/mL)ADSCs-apoVs后的H3cit生成量无明显变化($P=0.792$), 对抑制NETs



A: 不同浓度(20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 500 nmol/L)的PMA刺激PMNs 4 h后, H3cit和MPO与cfDNA的免疫荧光共定位观察NETs的形成。(绿色: H3cit, 红色: MPO, 蓝色: DAPI, 油镜: 40×10, 标尺: 50 μm); B: H3cit和MPO与cfDNA免疫荧光共定位的NETs网状结构(油镜: 63×10, 标尺: 10 μm, 白色方框: cfDNA); C: 免疫荧光定量分析(n=3)。

图4 激光共聚焦显微镜观察不同浓度PMA刺激PMNs产生NETs

Fig. 4 Observation of NETs production by PMNs stimulated with different concentrations (20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 500 nmol/L) of PMA under confocal laser scanning microscopy



A: DiD标记染为红色的ADSCs-apoVs; B: 鬼笔环肽(Actin-Tracker Green-488)标记染为绿色的PMNs细胞骨架; C: DAPI标记染为蓝色的PMNs胞核; D: 融合图示ADSCs-apoVs位于PMNs(油镜: 63×10, 标尺: 2 μm)。

图5 激光共聚焦显微镜观察PMNs摄取ADSCs-apoVs

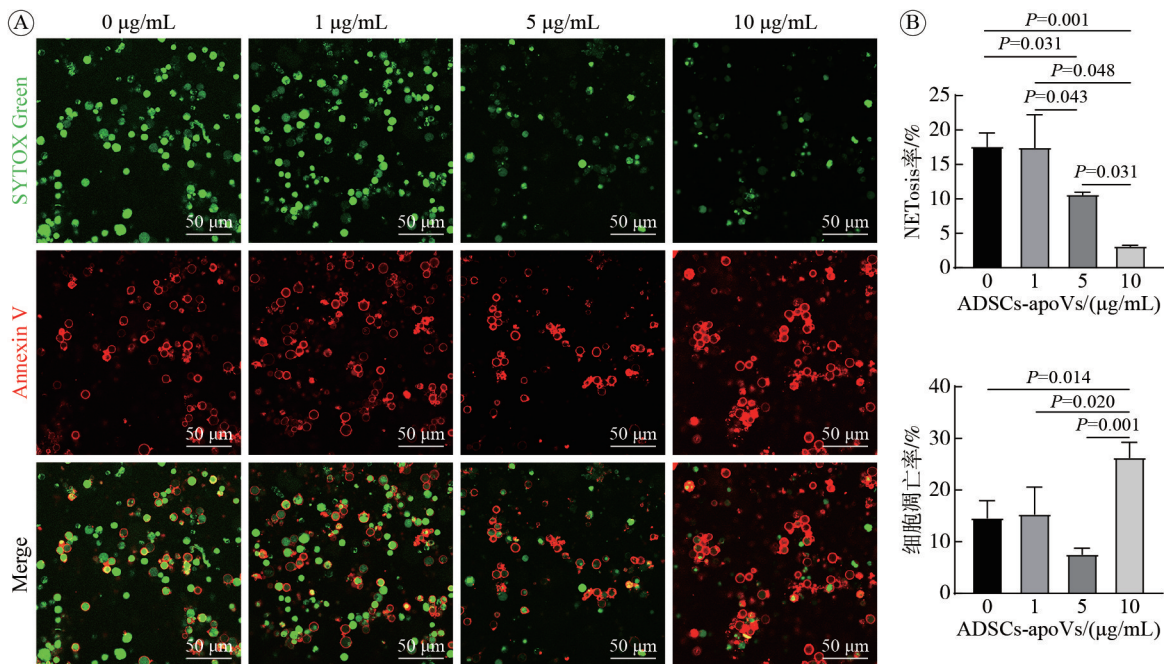
Fig. 5 Uptake of ADSCs-apoVs by PMNs under confocal laser scanning microscopy

形成无显著作用, 而摄取中、高浓度(5 μg/mL、10 μg/mL) ADSCs-apoVs后生成H3cit量(即NETs量)则明显减少($P < 0.001$), 且抑制NETs生成量的效果与ADSCs-apoVs浓度成正相关($P < 0.001$)。

2.8 流式细胞术检测PMNs摄取ADSCs-apoVs后的NETosis率和细胞凋亡率

流式结果所示, PMNs摄取低、中、高浓度(1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL)ADSCs-apoVs后检

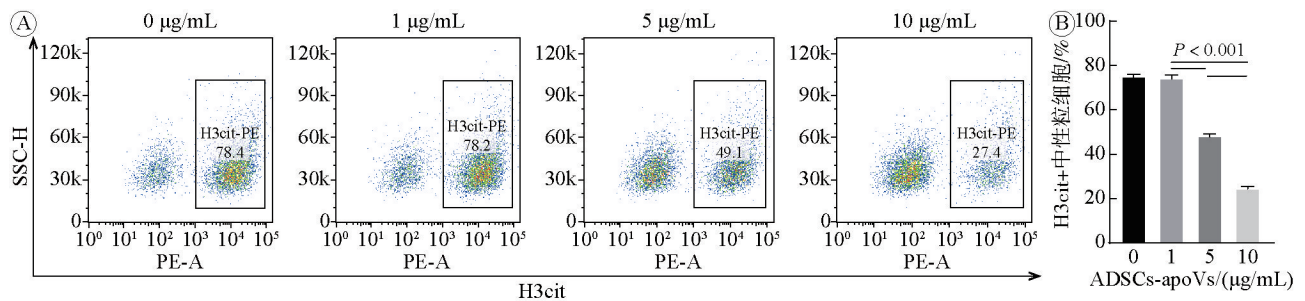
测NETosis率和细胞凋亡率的变化。结果显示。与对照组(0 μg/mL)相比, PMNs摄取低浓度(1 μg/mL) ADSCs-apoVs后NETosis率无明显变化($57.03\% \pm 5.35\%$ vs $60.90\% \pm 3.99\%$, $P = 0.822$), 细胞凋亡率亦无明显变化($9.14\% \pm 4.82\%$ vs $10.30\% \pm 1.55\%$, $P = 0.997$); 而摄取中、高浓度(5 μg/mL、10 μg/mL) ADSCs-apoVs后NETosis则明显降低($36.07\% \pm 3.07\%$ vs $60.90\% \pm 3.99\%$, $P = 0.002$; $16.48\% \pm$



A: 绿色荧光SYTOX-Green 染发生NETosis的核DNA, 红色荧光Annexin V-mCherry标记凋亡的细胞(油镜: 63×10, 标尺: 50 µm); B: NETosis和Apoptosis的免疫荧光定量分析(n=3)。

图6 激光共聚焦显微镜观察PMNs摄取ADSCs-apoVs后的NETosis率和凋亡率

Fig. 6 Observation of NETosis and apoptosis by PMNs after uptake of ADSCs-apoVs under Laser confocal microscopy



A: PMNs摄取不同浓度ADSCs-apoVs 8 h后的NETs生成量的流式检测; B: 流式定量分析(n=3)。

图7 流式细胞术检测PMNs摄取不同浓度ADSCs-apoVs 8h后的NETosis率和凋亡率

Fig.7 Flow detection of NETs production by PMNs after uptake of different concentrations of ADSCs-apoVs

8.09% vs 60.90% ± 3.99%, $P < 0.001$), 且摄取高浓度(10 µg/mL) ADSCs-apoVs后NETosis的发生率比摄取5 µg/mL组降低更明显(16.48% ± 8.09% vs 36.07% ± 3.07%, $P = 0.010$)。与对照组相比, 摄取中浓度(5 µg/mL)ADSCs-apoVs细胞凋亡无明显变化(10.26% ± 7.31% vs 10.30% ± 1.55%, $P > 0.999$), 而摄取高浓度(10 µg/mL)ADSCs-apoVs细胞凋亡不仅显著增加(10.30% ± 1.55% vs 50.70% ± 10.86%, $P = 0.001$), 还比中浓度(5 µg/mL)细胞凋亡明显升高(50.70% ± 10.86% vs 10.30% ± 1.55%, $P = 0.001$)。

早期凋亡变化: 与对照组相比, 中低浓度(1 µg/mL、5 µg/mL)摄取组的早期凋亡率无明显变化(0.63% ± 0.73% vs 0.25% ± 0.21%, $P = 0.986$; 2.38% ± 1.87% vs 0.25% ± 0.21%, $P = 0.318$), 而与

对照组和中低浓度(1 µg/mL、5 µg/mL)摄取组相比, 摄取高浓度(10 µg/mL)ADSCs-apoVs组PMNs早期凋亡则显著增加(14.30% ± 1.97% vs 0.25% ± 0.21%, $P < 0.001$; 14.30% ± 1.97% vs 0.63% ± 0.73%, $P < 0.001$); 14.30% ± 1.97% vs 2.38% ± 1.87%, $P < 0.001$)。

晚期凋亡变化: 与对照组相比, 中、低浓度(1 µg/mL、5 µg/mL)摄取组的晚期凋亡率无明显变化(8.51% ± 4.59% vs 10.06% ± 1.40%, $P = 0.994$; 8.55% ± 6.13% vs 10.06% ± 1.40%, $P = 0.994$); 而与对照组和中低浓度(1 µg/mL、5 µg/mL)摄取组相比, 摄取高浓度(10 µg/mL)ADSCs-apoVs组的PMNs晚期凋亡则显著增加(36.40% ± 12.75% vs 10.06% ± 1.40%, $P = 0.011$; 36.40% ± 12.75% vs

8.51% ± 4.59%, $P=0.008$; 36.40% ± 12.75% vs 8.55% ± 6.13%, $P=0.008$)。以上结果说明: 在低、中、高浓度(1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$)范围内, PMNs摄取低浓度(1 $\mu\text{g/mL}$)ADSCs-apoVs后, 对降低NETosis无明显变化($P=0.792$, $P=0.822$), 而摄取中、高浓度(5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$) ADSCs-apoVs后NETosis则明显降低($P=0.002$, $P<0.001$), 且抑制NETosis发生的效果与ADSCs-apoVs浓度成正相关($P=0.006$, $P=0.010$), 而摄取低、中浓度(1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$)ADSCs-apoVs的细胞凋亡发生无明显变化($P=0.997$, $P>0.999$), 但是摄取高浓度(10 $\mu\text{g/mL}$)ADSCs-apoVs细胞则明显发生凋亡($P<0.001$, $P=0.001$), 且早期与晚期凋亡均明显增加($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$; $P<0.001$, $P=0.008$, $P<0.001$)。

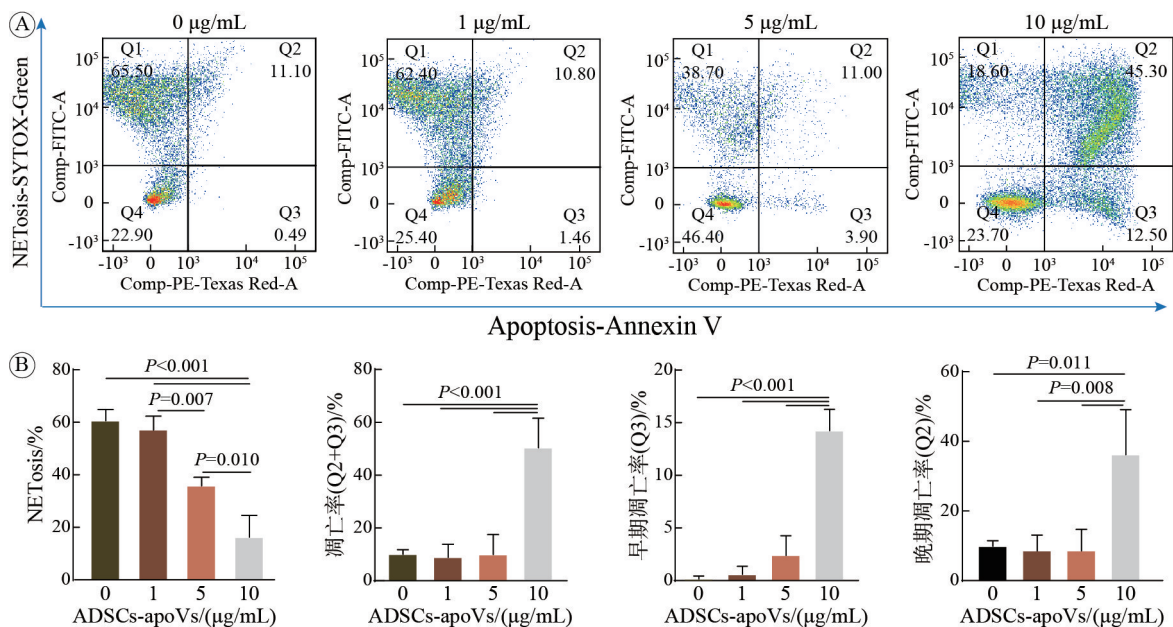
3 讨论

MSCs-apoVs继承了亲本细胞的免疫调节与组织再生能力^[11], hBMSCs-apoVs可诱导巨噬细胞M2极化促进创面愈合^[12-13]及骨修复^[14], 人牙髓间充质干细胞源凋亡囊泡(human dental pulp mesenchymal stem cells, hDPSCs-apoVs)可通过调控自噬加速血管生成^[13]。MSCs-apoVs的浓度变化对靶细胞的影响有显著差异性, 如低浓度(0.2 $\mu\text{g/mL}$ 和1 $\mu\text{g/mL}$)的hDPSCs-apoVs有促进mBMSC增殖的作用, 而高浓度(5 $\mu\text{g/mL}$ 和25 $\mu\text{g/mL}$) hDPSCs-

apoVs则有抑制mBMSC增殖的作用^[15]。ADSCs-apoVs因独特分子组成(如TSG-6、特异性miRNAs)^[11]在巨噬细胞活化、中性粒细胞调控及靶向免疫调节方面优于hBMSCs-apoVs^[16], 可为炎症性疾病的治疗提供新策略, 但其作用和机制尚无类似研究。本研究发现ADSCs-apoVs通过双重途径调控PMNs命运, 一是抑制组蛋白H3瓜氨酸化以抑制NETs的形成进而阻止PMNs发生NETosis; 二是激活凋亡通路, 促进PMNs大量凋亡。其中, 5 $\mu\text{g/mL}$ ADSCs-apoVs是NETosis特异性抑制的安全窗浓度, 而10 $\mu\text{g/mL}$ ADSCs-apoVs是NETosis抑制协同凋亡激活的有效清除剂量。

PMNs通过吞噬、脱颗粒及NETs^[17]等方式清除机体入侵的病原体^[18-19]。本研究采用密度梯度离心法结合流式无菌分选技术进一步优化PMNs提纯方案, 获得高纯度(94.17% ± 1.25%)的活性PMNs以保证本实验目的细胞的纯度, 提升了实验检测数据的可靠性。

NETs在代谢性疾病^[20]、肿瘤^[21-22]、心血管疾病^[23-24]以及组织修复^[25]中具有双重调控作用^[26-27]。NETosis作为PMNs的特殊死亡形式^[28-30], 根据其死亡特征可分为自杀性中性粒细胞炎性坏死(suicidal NETosis)和活性中性粒细胞炎性坏死(vital NETosis)两种亚型。本次研究成功使用(20 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 500 nmol/L)PMA刺激诱导NETs, 并拍摄出较为清晰的典型中性粒细胞



A: PMNs摄取不同浓度ADSCs-apoVs 8 h后的NETosis率和凋亡率的流式检测; B: 流式定量分析(n=3)。

图8 流式细胞术检测PMNs摄取不同浓度ADSCs-apoVs 8h后的NETosis率和凋亡率

Fig. 8 Flow detection of NETosis rate and apoptosis rate by PMNs after uptake of different concentrations of ADSCs-apoVs

的胞外纤维网状结构,佐证了既往文献中关于NETs的网状结构^[10]定义。研究发现,诱导NETs的最佳浓度为100 nmol/L PMA,而500 nmol/L PMA因破坏"NETosis-凋亡"平衡,使凋亡成为主导性死亡路径,从而抑制NETs生成,诱导效果较100 PMA差。

NETosis进程中过量产生的NETs会引发炎症损伤和器官功能障碍,因此通过调控PMNs的死亡方式,抑制其NETs过量产生而引发炎症损伤^[31]。将PMNs死亡方式从NETosis转向凋亡是控制NETs的关键策略^[31],因为凋亡是损伤最小的清除途径^[32],且PMNs凋亡抑制加剧炎症损伤^[33],而适时调控凋亡过程则至关重要。

本研究阐明ADSCs-apoVs通过浓度依赖的双重机制调控PMNs死亡命运:在中、高浓度范围(5~10 µg/mL)内,ADSCs-apoVs能显著抑制NETosis,具体表现为瓜氨酸化组蛋白(H3cit)生成量明显降低($P<0.001$)和NETosis率明显下降($P<0.002$),其分子机制是通过抑制组蛋白H3的瓜氨酸化阻断NETs形成。在凋亡诱导方面,仅10 µg/mL浓度组可激活凋亡通路,使凋亡率显著升高($P=0.001$),并同步增加早、晚期凋亡($P<0.001$);而≤5 µg/mL浓度组凋亡率无显著变化($P>0.999$),表明其中存在严格的浓度阈值效应。

本研究揭示PMNs死亡程序重编程的阶梯响应模式:5 µg/mL浓度可选择性抑制NETosis而不触发凋亡,定义为安全治疗窗浓度;而10 µg/mL浓度则协同抑制NETosis并驱动凋亡主导的死亡模式转换,形成清除剂量。这些发现确立了5 µg/mL作为NETosis特异性阻断的安全浓度,同时阐明ADSCs-apoVs通过双重靶点(组蛋白H3的瓜氨酸化抑制与凋亡激活)重编程PMNs死亡路径的创新机制。本研究为NETs相关炎症疾病提供了剂量优化策略,即5 µg/mL用于控制NETosis炎症扩散,10 µg/mL则用于清除过度活化的PMNs群体。

本研究的临床转化潜力集中于慢性炎症控制和急性炎症清除两大应用层面。如在系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化等慢性炎症性疾病方面可应用5 µg/mL ADSCs-apoVs的剂量来抑制NETosis以进一步控制慢性炎症的进展;而在治疗重症COVID-19、急性肺损伤中过度活化的中性粒细胞等急性炎症疾病方面可应用10 µg/mL的剂量以清除炎症的急性浸润损伤。但同时本研究存在一定局限性:未进一步分选凋亡囊泡亚群(如凋亡小体与微泡)以

明确异质性影响,还未在动物模型中验证浓度依赖效应。这将是未来研究的重点方向。

ADSCs-apoVs作为天然信号载体,有望发展成新型抗炎生物制剂,其核心优势在于提供可切换剂量策略(控炎或清除),并通过冻干制剂开发解决稳定性问题。与现有疗法(如肽酰基精氨酸脱亚氨酶4抑制剂或抗炎抗体)的联合应用,将为NETs相关炎症疾病提供精准干预新范式。本研究不仅揭示了ADSCs-apoVs浓度依赖的死亡程序重编程效应,更为NETs相关疾病提供了创新的剂量干预策略。未来可通过亚群分选、动物模型验证及工程化改造,有望推动其成为临床抗炎治疗的全新生物制剂。

作者贡献 宫晓静:实验设计及完成,数据统计分析,文章撰写;祖潇然、景志强、张俊雅:文献交流、文章校对;韩岩、徐亦驰:实验设计,技术指导,文章审校。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: 13720086335@163.com。

参考文献

- 1 Dejas L, Santoni K, Meunier E, et al. Regulated cell death in neutrophils: from apoptosis to NETosis and pyroptosis [J]. *Semin Immunol*, 2023, 70: 101849.
- 2 Wang H, Kim SJ, Lei Y, et al. Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9 (1): 235.
- 3 Li MJ, Tang Q, Liao CC, et al. Extracellular vesicles from apoptotic BMSCs ameliorate osteoporosis via transporting regenerative signals [J]. *Theranostics*, 2024, 14 (9): 3583-3602.
- 4 Xu XB, Lai YY, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39 (1): BSR20180992.
- 5 Yu LN, Zhu GX, Zhang ZY, et al. Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21 (1): 218.
- 6 Zhu YF, Chen XH, Liao YJ. Mesenchymal stem cells-derived apoptotic extracellular vesicles (ApoEVs): mechanism and application in tissue regeneration [J]. *Stem Cells*, 2023, 41 (9): 837-849.
- 7 Ou QM, Tan LP, Shao YT, et al. Electrostatic charge-mediated apoptotic vesicle biodistribution attenuates sepsis by switching neutrophil NETosis to apoptosis [J]. *Small*, 2022, 18 (20): e2200306.
- 8 Liu AQ, Peng P, Wei CZ, et al. Apoptotic vesicles derived from mesenchymal stem cells ameliorate hypersensitivity responses via inducing CD8+ T cells apoptosis with calcium overload and mitochondrial dysfunction [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2025, 12 (22): e2407446.
- 9 Chen D, Zhao ZX, Zhang K, et al. Protocol for differential centrifugation-based separation and characterization of apoptotic

- vesicles derived from human mesenchymal stem cells [J]. STAR Protoc, 2022, 3 (4): 101695.
- 10 Wang YJ, Du CJ, Zhang Y, et al. Composition and function of neutrophil extracellular traps [J]. Biomolecules, 2024, 14 (4): 416.
 - 11 Caruso S, Poon IKH. Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: more than just debris [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1486.
 - 12 Zheng CX, Sui BD, Zhang X, et al. Apoptotic vesicles restore liver macrophage homeostasis to counteract type 2 diabetes [J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10 (7): e12109.
 - 13 Wang RX, Fu J, He JH, et al. Apoptotic mesenchymal stem cells and their secreted apoptotic extracellular vesicles: therapeutic applications and mechanisms [J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16 (1): 78.
 - 14 Tian GZ, Yin H, Zheng JX, et al. Promotion of osteochondral repair through immune microenvironment regulation and activation of endogenous chondrogenesis via the release of apoptotic vesicles from donor MSCs [J]. Bioact Mater, 2024, 41: 455-470.
 - 15 王鑫源, 姚文德, 李彦, 等. 骨髓干细胞来源的凋亡囊泡对骨髓间充质干细胞增殖和成骨分化能力的影响 [J]. 解放军医学院学报, 2024, 45 (6): 673-680.
 - 16 Li JR, Wei CY, Yang Y, et al. Apoptotic bodies extracted from adipose mesenchymal stem cells carry microRNA-21-5p to induce M2 polarization of macrophages and augment skin wound healing by targeting KLF6 [J]. Burns, 2022, 48 (8): 1893-1908.
 - 17 Garley M, Jabłońska E. Heterogeneity among neutrophils [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018, 66 (1): 21-30.
 - 18 Zhang H, Liu JL, Zhou YL, et al. Neutrophil extracellular traps mediate m6A modification and regulates sepsis-associated acute lung injury by activating ferroptosis in alveolar epithelial cells [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18 (8): 3337-3357.
 - 19 Zou SJ, Jie HY, Han XN, et al. The role of neutrophil extracellular traps in sepsis and sepsis-related acute lung injury [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 124 (Pt A): 110436.
 - 20 Petrelli A, Popp SK, Fukuda R, et al. The contribution of neutrophils and NETs to the development of type 1 diabetes [J]. Front Immunol, 2022, 13: 930553.
 - 21 Cristinziano L, Modestino L, Antonelli A, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 79: 91-104.
 - 22 Ivey AD, Pratt HG, Niemann B, et al. Pancreatectomy induces cancer-promoting neutrophil extracellular traps [J]. Ann Surg Oncol, 2024, 31 (6): 3707-3717.
 - 23 Natarska J, Ząbczyk M, Undas A. Neutrophil extracellular traps (NETs) in cardiovascular diseases: From molecular mechanisms to therapeutic interventions [J]. Kardiol Pol, 2023, 81 (12): 1205-1216.
 - 24 Michalska M, Grochowicki T, Jakimowicz T, et al. A review of the impact of neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) on the development of aortic aneurysms in animal and human studies [J]. Med Sci Monit, 2021, 27: e935134.
 - 25 Yokoyama APH, Kutner JM, de Moraes Mazetto Fonseca B, et al. Neutrophil extracellular traps (NETs), transfusion requirements and clinical outcomes in orthotopic liver transplantation [J]. J Thromb Thrombolysis, 2023, 56 (2): 253-263.
 - 26 Mutua V, Gershwin LJ. A review of neutrophil extracellular traps (NETs) in disease: potential anti-NETs therapeutics [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2021, 61 (2): 194-211.
 - 27 Shafqat A, Khan JA, Alkachem AY, et al. How neutrophils shape the immune response: reassessing their multifaceted role in health and disease [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24 (24): 17583.
 - 28 Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, et al. Cellular mechanisms of NETosis [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2020, 36: 191-218.
 - 29 Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs [J]. J Leukoc Biol, 2021, 110 (4): 797-808.
 - 30 Guillotin F, Fortier M, Portes M, et al. Vital NETosis vs. suicidal NETosis during normal pregnancy and preeclampsia [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 1099038.
 - 31 Singhal A, Kumar S. Neutrophil and remnant clearance in immunity and inflammation [J]. Immunology, 2022, 165 (1): 22-43.
 - 32 张孟昊, 郑文洁. 中性粒细胞程序性死亡在白塞病发病中的作用 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2022, 16 (5): 517-521.
 - 33 刘雪梅. Gel@fMLP/SiO₂-FasL 调控中性粒细胞引导的时序性炎症反应促进难愈性病损组织修复与再生的实验研究 [D]. 西安: 解放军空军军医大学, 2022.

(责任编辑: 迟素敏, 潘越)