

高浓度葡萄糖对小鼠表皮干细胞增殖的影响

聂 刚 亓俊华 姜南雁 徐云升

摘 要 **目的** 探讨高浓度葡萄糖对小鼠表皮干细胞增殖的影响。**方法** 利用Ⅳ型胶原的快速黏附法分离培养小鼠表皮干细胞,观察其形态学;通过免疫荧光法检测表皮干细胞标志物 $\beta 1$ 整合素和 K19 来鉴定表皮干细胞;将小鼠表皮干细胞分别放在葡萄糖浓度为 5.6、15 和 30mmol/L 的培养基里培养;MTT 法检测细胞增殖情况,免疫印迹法检测细胞凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的蛋白表达水平。**结果** 体外培养的小鼠表皮干细胞呈克隆样生长,增殖速度较快,细胞形态呈铺路石样,边缘细胞呈梭形,细胞核质比较大;免疫荧光法检测到培养的小鼠表皮干细胞 $\beta 1$ 整合素和 K19 呈阳性表达且阳性表达率均为 100%;MTT 法检测到与对照组(5.6mmol/L 浓度葡萄糖)相比,15mmol/L 浓度葡萄糖刺激 72h 后检测到细胞增殖速度无明显改变,而 30mmol/L 浓度葡萄糖刺激 24、48 和 72h 后检测到细胞增殖速度降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 法检测到与对照组相比,30mmol/L 浓度葡萄糖刺激 48h 后凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达量明显增加而抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** 本研究结果表明较高浓度(30mmol/L)葡萄糖可以明显抑制小鼠表皮干细胞的增殖,从干细胞角度进一步为糖尿病创面难愈的原因提供了实验室依据。

关键词 高浓度葡萄糖 表皮干细胞 增殖

[中图分类号] R329 [文献标识码] A

Effects of High Concentration of Glucose on the Proliferation of Mouse Epidermal Stem Cells. Nie Gang, Qi Junhua, Jiang Nanyan, et al. Department of Dermatovenereology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Institute of Dermatovenereology, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of high concentration of glucose on the proliferation of mouse epidermal stem cells. **Methods** Mouse epidermal stem cells were isolated and cultured by rapid adhesion with collagen IV, and then its morphology was observed. The epidermal stem cells were identified through the detection of $\beta 1$ integrin and K19 which are markers of epidermal stem cells by immunofluorescence method. The cells were cultured with different concentrations of glucose medium including 5.6mmol/L, 15mmol/L, 30mmol/L. The proliferation of cells were detected by MTT assay. The expression levels of apoptotic proteins Bax and anti-apoptotic protein Bcl-2 protein were detected with immunoblotting. **Results** The mouse epidermal stem cells cultured exhibited clonally growth, fast proliferation. The cell morphology was cobblestone with fusiform edge, and the nucleus is relatively large. The expression of $\beta 1$ integrin and K19 in the epidermal stem cells were positive and the positive rate was 100%. Compared with control group(5.6mmol/L), cell proliferation did not significant change in the high glucose (15mmol/L) stimulation group at the time of 72h after stimulation, but cell proliferation was significantly decreased ($P < 0.05$) in the high glucose (30mmol/L) stimulation group at the time of 24, 48 and 72h after stimulation. The expression levels of apoptotic proteins Bax were increased and the expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 protein were decreased in the high glucose group (30mmol/L) compared with control group($P < 0.05$). **Conclusion** This study shows that a higher concentration (30mmol/L) of glucose can significantly inhibit the proliferation of epidermal stem cell, which provides laboratory evidence for the causes of diabetic wound healing from the perspective of stem cells.

Key words High concentration of glucose; Epidermal stem cells; Proliferation

皮肤作为人体最大的一个器官,为机体提供了防止外界侵害的第一道防线,它可以保护机体免遭物

理、化学、生物和环境等因素的侵害。近年来随着人口老龄化和糖尿病发生率的提高,糖尿病创面的发生率也在迅速增加^[1]。糖尿病患者创面愈合困难,严重影响患者的生活质量,是临床上亟待解决的难题之一。

皮肤创面的愈合是一个多种细胞和细胞因子参与的复杂过程,其中的一个基本过程是创面的上皮

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院皮肤科、温州医科大学皮肤性病学研究所(聂刚、姜南雁、徐云升);266071 青岛大学医学院组织胚胎学教研室(亓俊华)

通讯作者:徐云升,电子信箱:xuyunsh@sohu.com

化,即表皮细胞从创缘或残留的表皮细胞岛向创面中心增殖分化以覆盖创面而完成修复过程。表皮干细胞是皮肤组织特异性干细胞,存在于表皮基底层。与其他类型的干细胞一样,表皮干细胞具有很强的自我更新能力和分化的潜能。表皮干细胞可分化形成全层表皮,并具有产生皮肤附属器的作用,在皮肤组织稳态的维持和创面修复过程中发挥重要作用^[2]。Shen等^[3]研究发现表皮干细胞可以分化为表皮细胞,诱导裸鼠全层皮肤缺损原位再生,提高伤口的愈合能力。糖尿病患者创面难以愈合具体机制尚不清楚,可能是众多因素共同作用的结果。国内外研究结果表明,糖尿病创面难于愈合的可能原因包括生长因子产生减少、巨噬细胞功能受损、胶原沉积受阻、角质形成细胞和成纤维细胞迁移及增殖受损等^[4]。糖尿病患者体内存在着碳水化合物、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列的代谢紊乱,其中高血糖为主要特征,糖尿病患者创面难愈合是否与高浓度葡萄糖对表皮干细胞的增殖影响有关呢?目前有关葡萄糖浓度与表皮干细胞增殖间的相关研究报道并不多见。本研究通过高浓度葡萄糖刺激小鼠表皮干细胞,同时观察凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达的变化,以探讨高浓度葡萄糖对小鼠表皮干细胞增殖和凋亡的影响,从干细胞角度进一步为糖尿病创面难治愈的原因提供实验室依据。

材料与方法

1. 材料:(1)主要仪器设备:酶标仪(美国 BioTek 仪器公司);凝胶成像仪(BioDoc-It Imaging System UVP 公司);显微照相装置(PM-CBAD, Olympus 公司);CO₂ 细胞培养箱(HF240, Heal Force 公司);倒置相差显微镜(CKX41-A22PHP, Olympus 公司);倒置相差荧光显微镜(CKX41-F32FL, Olympus 公司)。(2)主要实验试剂:兔抗小鼠 Bax 抗体(Cell signaling 公司);山羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司) β -actin 抗体(Cell Signaling 公司);低糖 DMEM 培养基(Hyclone 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);兔抗小鼠 Bcl-2 抗体(Cell Signaling 公司) β 1-整合素抗体(武汉博士德生物工程有限公司);Hoechst33342(美国 Sigma 公司);角蛋白 K19 抗体(北京博奥森生物技术有限公司)FITC 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);噻唑蓝(美国 Sigma 公司);DMSO(美国 Sigma 公司)。

2. 方法:(1)小鼠表皮干细胞的分离培养:无菌获取新生昆明小鼠背部皮肤,浸泡在无菌 PBS 溶液中充分清洗;用眼科剪和眼科镊尽量去除皮肤上附着的脂肪,将皮肤剪成 1cm × 1cm 大小的小块,然后将其置于 0.02% 的 I 型胶原酶中 4℃ 过夜;次日用眼科镊小心的分开表皮和真皮,然后将表皮置于含有 0.02% EDTA 的 0.25% 胰酶 37℃ 消化 30min,过 400 目细

胞筛;含有 10% FBS 的 DMEM 培养基,IV 型胶原包被过夜的培养瓶,37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,48h 后首次换液;待细胞长到融合率达到 80% 时传代,取 P3 代的表皮干细胞进行实验。

2. 免疫荧光方法鉴定表皮干细胞:培养的第 3 代细胞标本用新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定 15min, PBS 洗涤;加 5% BSA 37℃ 封闭 1h,用 PBS 洗涤 2 次;加入 K19 和 β 1 整合素多克隆抗体(1:100),37℃ 孵育 3h; PBS 洗涤后,加异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记二抗(1:50),37℃ 避光孵育 1h; PBS 洗涤两次,5 μ g/ml 的 Hoechst33342 工作液在 37℃ 避光孵育 20min, PBS 漂洗后 50% 甘油封片,在荧光显微镜相应激发光下观察并摄像。

3. MTT 法检测检测高糖对表皮干细胞的增殖的影响:常规消化,以每孔 3×10^3 个细胞的数量接种在 IV 型胶原包被过夜的 96 孔板上,37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养过夜;次日分别用 DMEM 完全培养基(5.6mmol/L)和加入葡萄糖的 DMEM 完全培养基(15、30mmol/L)200 μ l 刺激 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中分别培养 24、48 和 72h;待刺激过后每孔加入 20 μ l MTT 继续孵育 4h;小心的吸净孔板内的液体,然后每孔加入 100~200 μ l DMSO 充分溶解,酶标仪上 490nm 处的吸光值。同时在倒置相差显微镜下观察细胞的数量及状态,并拍照记录。

4. Western blot 法对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平的鉴定:常规消化细胞,6 孔板每孔接种 5×10^5 个细胞,过夜培养;次日弃去培养细胞的培养基, PBS 洗两次后分别每孔加入 DMEM 完全培养基(5.6mmol/L)和加入葡萄糖的 DMEM 完全培养基(30mmol/L)分别 2ml,37℃、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中培养 48h 后提蛋白,测定蛋白浓度。Western blot 法检测蛋白, Bax (1:5000)、Bcl-2 (1:5000) 和 β -actin (1:10000)4℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 gG (1:5000)室温孵育 2~4h,洗膜显影。

5. 统计学方法:所得数据采用 SPSS 17.0 软件处理,测定值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠表皮干细胞的形态学:由酶消化法分离出来的小鼠表皮干细胞快速贴壁,并且呈克隆样快速增长(图 1A),高倍镜下观察可以看到细胞呈铺路石样,边缘的细胞相对较长,呈梭形,核质比较大(图 1B)。

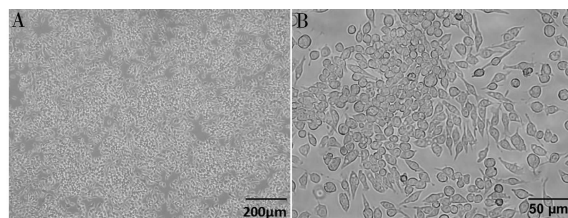


图 1 倒置相差显微镜观察细胞形态

2. 免疫荧光法鉴定表皮干细胞:免疫荧光结果显示,在所分离的细胞细胞质中 β 1 整合素和 K19 均有

表达,阳性表达率均达到 100% ,详见图 2。

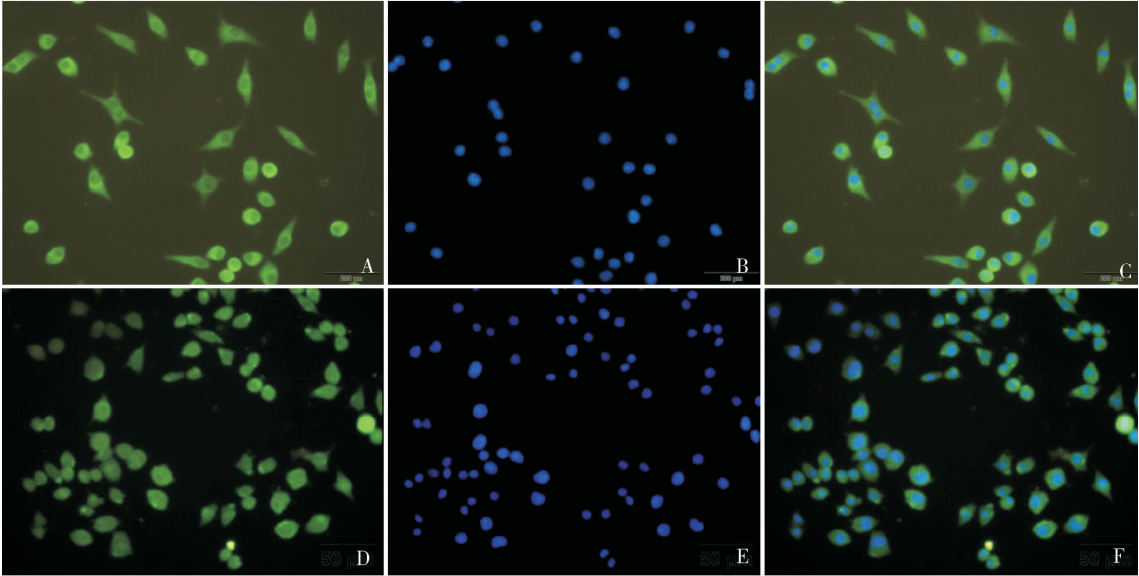


图 2 表皮干细胞的免疫荧光鉴定(× 400)
A ~ C. 免疫荧光法检测 β 1 整合素的表达;D ~ F. 免疫荧光法检测 K19 的表达

3. 表皮干细胞增殖的检测:与对照组(5.6mmol/L 浓度葡萄糖)相比,15mmol/L 浓度葡萄糖刺激 72h 后检测到细胞增殖速度无明显改变(图 3A),而 30mmol/L 浓度葡萄糖刺激 24、48 和 72h 后检测到细胞增殖速度降低,并且差异具有统计学意义(图 3B)。而在倒置相差显微镜下观察细胞形态,可以看到与对

照组(5.6mmol/L 浓度葡萄糖)相比,30mmol/L 浓度葡萄糖刺激 48h 后细胞数量明显降低,并且部分细胞体积变大,形态发生改变(图 3C、D)。这些结果说明 30mmol/L 浓度葡萄糖可以明显的抑制表皮干细胞的增殖,并且在一定程度上可以造成表皮干细胞的损伤。

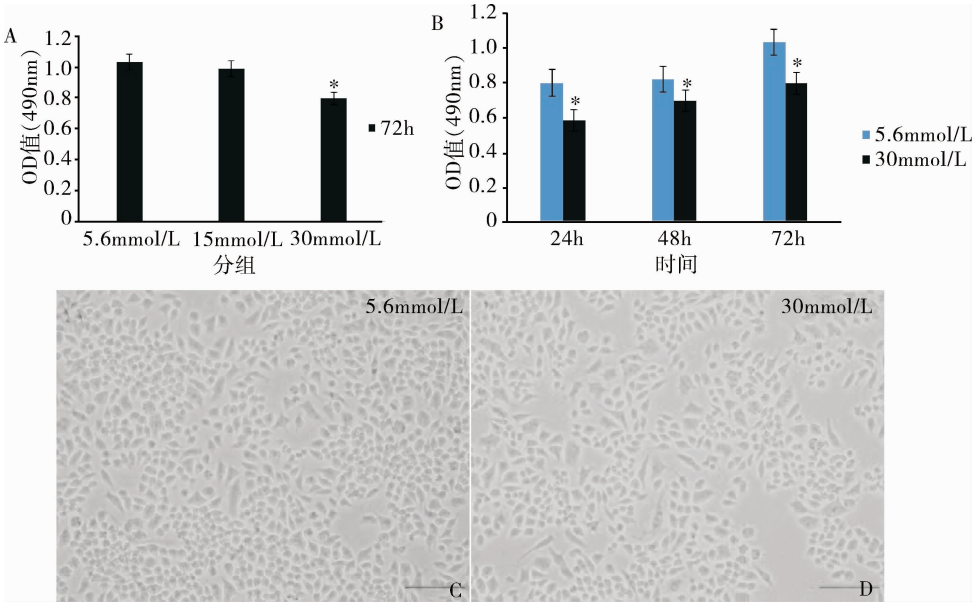


图 3 表皮干细胞增殖的检测
A. 不同浓度葡萄糖刺激 72h 后细胞 MTT 检测;B. 不同浓度葡萄糖刺激后不同时间点细胞 MTT 检测;
C、D. 倒置相差显微镜观察表皮干细胞的增殖(48h);与 5.6mmol/L 相比,* $P < 0.05$

4. Western blot 法检测蛋白表达水平(图4):与对照组(5.6mmol/L 浓度葡萄糖)相比, 30mmol/L 浓度葡萄糖刺激 48h 后凋亡蛋白 Bax 的蛋白表达量明显增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,并且灰度值分析结果显示,两者均有统计学意义($P<0.05$),详见表1。

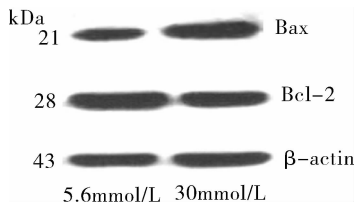


图4 Western blot 法检测蛋白水平

表1 目的蛋白与内参的灰度值比较

分组	目的条带与内参灰度值比	
	Bax	Bcl-2
5.6mmol/L	0.959 ± 0.051	1.263 ± 0.023
30mmol/L	1.270 ± 0.020 *	0.518 ± 0.013 *

讨 论

表皮干细胞是皮肤组织特异性干细胞,存在于表皮基底层,其最显著的两个特征是慢周期性与自我更新能力,慢周期性表现为体内标记滞留细胞,而自我更新能力表现为在离体培养时表皮干细胞呈克隆性生长^[5]。表皮干细胞并不直接分化产生终末分化细胞,而是先分化成短暂扩充细胞,短暂扩充细胞具有定向分化成某种终末分化细胞的能力^[6]。迄今为止,还没有找到一种特异性的表皮干细胞标志物,一些分子如β1整合素、α6整合素、P63、K15、K19和β-catenin被报道为表皮干细胞的标记^[7~9]。研究表明,表皮基底层中K19与β1整合素表达均为阳性的细胞是标志滞留细胞,具有干细胞的慢周期性,目前研究者普遍采用β1整合素和K19作为表皮干细胞的标志物^[10,11]。表皮干细胞及短暂扩充细胞表面高表达β1整合素,而有丝分裂后细胞及终末分化细胞不表达β1整合素,因而可以用β1整合素的抗体来鉴别表皮干细胞及短暂扩充细胞。角蛋白是表皮细胞的结构蛋白,在分化的不同阶段,表皮细胞表达不同的角蛋白,表皮干细胞表达K19,短暂扩充细胞表达K5和K14,而终末分化细胞则表达K1和K10,因而也可以用角蛋白来鉴别表皮干细胞、短暂扩充细胞、终末分化细胞。表皮干细胞还有一个显著特点是通过表达整合素对基膜黏附,并且表皮干细胞与基膜的黏附是其维持干细胞的生物学特性的基本条件。表皮干细胞对基膜的主要成分之一——IV型胶原的

黏附性最强,因此常通过IV型胶原的黏附来筛选表皮干细胞^[12]。本实验应用IV型胶原的快速黏附法筛选表皮干细胞,通过免疫荧光对其标志物K19和β1整合素进行鉴定,结果发现β1整合素(图2A~C)和K19(图2D~F)在细胞质中均有表达,且阳性表达率均达到100%,可以证明表皮干细胞的存在。

糖尿病患者创面难愈合是临床上亟待解决的问题之一。表皮干细胞具有很强的自我更新能力和分化的潜能,可分化形成表皮细胞,并具有产生皮肤附属器的作用,是皮肤发生、修复、改建的关键性来源,在皮肤组织稳态的维持和创面修复过程中发挥重要作用^[2]。已有研究报道,高浓度葡萄糖会影响一些干细胞如神经干细胞、骨髓间充质干细胞,脐血间充质干细胞等的增殖,然而目前有关葡萄糖浓度与表皮干细胞增殖间的相关研究报道并不多见。本研究在体外模拟了糖尿病患者创面愈合的干扰因素之一即高血糖,通过高浓度葡萄糖对小鼠表皮干细胞进行刺激,观察高浓度葡萄糖对小鼠表皮干细胞增殖及凋亡的影响。MTT实验可以检测到与对照组(5.6mmol/L 浓度葡萄糖)相比,15mmol/L 浓度葡萄糖刺激72h后检测到细胞增殖速度无明显改变,而30mmol/L 浓度葡萄糖刺激24、48和72h后检测到细胞增殖速度降低,并且差异具有统计学意义(图3A、B)。而在倒置相差显微镜下观察细胞形态,可以看到与对照组相比,30mmol/L 浓度葡萄糖刺激48h后细胞数量明显降低,并且部分细胞体积变大,形态发生改变(图3C、D),这些结果说明30mmol/L 浓度葡萄糖可以明显的抑制表皮干细胞的增殖,并且在一定程度上可以造成表皮干细胞的损伤。进一步对凋亡通路中发挥重要作用的凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax检测,发现与对照组(5.6mmol/L 浓度葡萄糖)相比,30mmol/L 浓度葡萄糖刺激48h后凋亡蛋白Bax的蛋白表达量明显增加,而抗凋亡蛋白Bcl-2蛋白表达水平明显降低,并且灰度值分析结果显示,两者差异均有统计学意义($P<0.05$)。已知Bcl-2与Bax对细胞凋亡的调节作用不仅取决于其自身的表达水平,而且还与Bcl-2/Bax的比率有关,并认为Bcl-2/Bax比值决定着凋亡信号刺激后细胞的存活状态^[13]。本实验结果发现30mmol/L 浓度葡萄糖刺激小鼠表皮干细胞能明显降低Bcl-2/Bax的比值,表明30mmol/L 浓度葡萄糖一定程度上可以促进小鼠表皮干细胞的凋亡。本研究结果表明30mmol/L 浓度葡萄糖可以抑制体外培养小鼠表皮干细胞的增殖,促进表皮干细胞的凋亡,然

而临床上糖尿病患者血糖往往不会持续在 30mmol/L 水平,但是考虑到体外实验与体内实验存在着多种差异,比如糖尿病患者体内可能还存在着其他影响表皮干细胞增殖的因素如周围血管病变、神经病变等,因此在糖尿病患者体内低于 30mmol/L 的高浓度葡萄糖可能也会影响到表皮干细胞的增殖。

表皮干细胞增殖与分化的调控机制目前还不清楚。现有的研究主要集中在丝裂原激活蛋白激酶信号转导通路、Wnt 信号转导通路、Noah 信号转导通路、骨形态发生蛋白信号转导通路等信号转导通路方面,这些信号转导通路的激活,可引起与细胞增殖分化相关基因的表达,从而调控表皮干细胞的增殖分化。近来研究还发现端粒酶活性的丧失及其增殖相关基因表达的改变可能是引起表皮干细胞体外复制和扩增受限的主要原因。本实验仅初步观察了高浓度葡萄糖对体外培养的小鼠表皮干细胞增殖及凋亡的影响,对于其调控机制尚未涉及,有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Sen CK, Gordillo GM, Roy S, *et al.* Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy[J]. *Wound Repair and Regeneration*,2009,17(6):763-771
- 2 Kishimoto J, Burgeson RE, Morgan BA. Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla[J]. *Genes Development*,2000,14(10):1181-1185
- 3 Shen Y, Dai L, Li X, *et al.* Epidermal stem cells cultured on collagen-modified chitin membrane induce in situ tissue regeneration of full-thickness skin defects in mice[J]. *PLoS One*,2014,9(2):e87557
- 4 Lima MH, Caricilli AM, de Abreu LL, *et al.* Topical insulin accelerates wound healing in diabetes by enhancing the AKT and ERK pathways: a double-blind placebo-controlled clinical trial[J]. *PLoS One*,2012,7(5):e36974
- 5 Ghadially R. Epidermal stem cells[J]. *Advances Dermatology*,2005,21:335-55
- 6 He S, Nakada D, Morrison S J. Mechanisms of stem cell self-renewal[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*,2009,25:377-406
- 7 Michel M, Torok N, Godbout M J, *et al.* Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage[J]. *Journal of Cell Science*,1996,109(Pt 5):1017-1028
- 8 Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, *et al.* p63 identifies keratinocyte stem cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2001,98(6):3156-3161
- 9 Li A, Pouliot N, Redvers R, *et al.* Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny[J]. *Journal of Clinical Investigation*,2004,113(3):390-400
- 10 Liu HW, Cheng B, Li JF, *et al.* Characterization of angiotensin-converting enzyme expression during epidermis morphogenesis in humans: a potential marker for epidermal stem cells[J]. *British Journal of Dermatology*,2009,160(2):250-258
- 11 Potten CS, Booth C. Keratinocyte stem cells: a commentary[J]. *Journal Investigative Dermatology*,2002,119(4):888-899
- 12 Bickenbach JR, Chism E. Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture[J]. *Experimental Cell Research*,1998,244(1):184-195
- 13 Renault TT, Teijido O, Antonsson B, *et al.* Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your friends close but your enemies closer[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,2013,45(1):64-67

(收稿日期:2014-04-09)

(修回日期:2014-04-28)

IL-10 在心力衰竭患者心肌中的表达及其与心肌氧化应激关系的研究

王梦龙 万 军 刘剑芳 罗 臻 刘梦林

摘 要 目的 探讨白细胞介素-10(IL-10)在心力衰竭发病过程中的意义。**方法** 利用 real-time PCR 技术检测 15 例心力衰竭患者和 9 例正常人左心室心肌组织 IL-10、IL-6 及 TNF- α mRNA 水平;采用丙二醛(MDA)试剂盒检测心肌 MDA 含量,并分析 IL-10 与 IL-6、TNF- α 及 MDA 含量的相关性。**结果** 与对照组相比,心力衰竭患者心肌组织 IL-10 mRNA 水平明显下调($P < 0.05$);而 IL-6、TNF- α mRNA 水平及 MDA 含量升高,差异均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相关分析

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管内科

通讯作者:万军,电子信箱:wanjun1963@126.com