DOI:10.16016/j.1000-5404.201608082

肉桂醛促进高糖条件下皮肤成纤维细胞迁移及机制研究

李文杰,蔡雷琴,隆 敏,郑宏庭 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院内分泌科)

[摘要] **目的** 探讨肉桂醛(cinnamic aldehyde,CA),核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid2- related factor,NRF2)通路激动剂对高糖条件下成纤维细胞迁移的影响及可能机制。**方法** 体外培养 HS27 细胞,分为正常对照组(NG,5.5 mmol/L)、高糖组(HG,30 mmol/L)、高糖(30 mmol/L)+肉桂醛(20 μmol/L)组、高糖(30 mmol/L)+Con siRNA 组、高糖(30 mmol/L)+NRF2 siRNA 组。迁移实验观察 CA 对高糖条件下 HS27 迁移的影响。采用 western blot 分析 CA 干预后 NRF2 及下游 HO-1,增殖和凋亡相关蛋白 P21 和 P53 的表达情况。2′,7′-二氯荧光素二醋酸(DCF)法检测 CA 对高糖条件下细胞内活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)水平的影响。采用 NRF2siRNA 抑制 NRF2 通路,观察 HS27 细胞迁移和氧化应激的变化。**结果** 与正常对照组相比,HS27 在高糖情况下,迁移能力明显降低($P<0.05$),CA 干预后,高糖对 HS27 迁移能力的抑制作用得到改善($P<0.05$)。进一步研究发现,CA 上调 NRF2 和 HO-1,减轻高糖导致的 ROS 增加([(4 360 935 ± 1 445 723) *vs* (1 982 673 ± 208 109),$P<0.05$])。然而,高糖条件下敲除 NRF2 后,细胞内 ROS 产生进一步增多,并加剧对成纤维细胞迁移能力的抑制[(0.046 ± 0.018) *vs* (0.318 ± 0.032),$P<0.05$]。**结论** CA 促进高糖情况下成纤维细胞迁移、缓解氧化应激损伤,并有可能部分依赖于 NRF2 通路激活。

[关键词] 肉桂醛;高糖;成纤维细胞;核因子 E2 相关因子;迁移
[中图法分类号] R285.5;R322.99;R587.1 [文献标志码] A

Cinnamic aldehyde improves fibroblasts migration under hyperglycaemic condition and its underlying mechanism

Li Wenjie, Cai Leiqin, Long Min, Zheng Hongting (Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of cinnamic aldehyde (CA), a nuclear factor erythroid 2-related factor (NRF2) pathway activator, on the migration of fibroblasts (HS27 cells) and investigate the potential mechanism. **Methods** HS27 cells were divided into 5 groups, and were treated by normal glucose (NG, 5.5 mmol/L), high glucose (HG, 30 mmol/L), high glucose and CA (20 μmol/L), high glucose and Con siRNA, high glucose and NRF2 siRNA, respectively. Polydimethylsiloxane (PDMS) assay was used to determine the effect of CA on cell mobility under high glucose condition. Western blotting was employed to examine the effect of CA on the expression of NRF2 and its downstream molecule HO-1, and proliferation and apoptosis related P21 and P53. Intracellular reactive oxide species (ROS) were measured in HS27 cells treated with CA using 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCF) assay. NRF2 siRNA were transfected into HS27 cells to further validate the role of NRF2 pathway in the regulation of cell migration and oxidative stress. **Results** Compared with the HS27 cells under normal glucose condition, the migration of the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471039);国家自然科学基金青年科学基金项目(81500647);重庆市集成示范计划项目(2013jcsfc10001-5)
[通信作者] 郑宏庭,E-mail:fnf7703@hotmail.com
隆 敏,E-mail:longmin_casper@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161209.1608.012.html

cells cultured in high-glucose medium were significantly inhibited ($P<0.05$). After treatment with CA, the cell mobility was significantly improved ($P<0.05$) and the expression levels of NRF2 and HO-1 were notably increased. Meanwhile, CA treatment significantly ameliorated hyperglycemia-induced ROS production in HS27 cells (4 360 935 ± 1 445 723 *vs* 1 982 673 ± 208 109, $P<0.05$). However, knocking down of NRF2 far more enhanced ROS levels, and aggravated inhibitory effects of CA on migration of HS27 cells under high glucose condition (0.046 ± 0.018 *vs* 0.318 ± 0.032, $P<0.05$). **Conclusion** CA treatment promotes the migration of fibroblasts and alleviates the oxidative stress damage from high glucose culture, which might be partially due to the activation of NRF2 pathway.

[**Key words**] cinnamic aldehyde; high glucose; fibroblasts; nuclear factor erythroid 2-related factor; migration

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471039), the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81500647) and the Integrated Demonstration Project of Chongqing (2013jcsfc10001-5). Corresponding author: Zheng Hongting, E-mail: fnf7703@hotmail.com; Long Min, E-mail: longmin_casper@163.com

糖尿病溃疡(diabetes ulcers,DUs)慢性迁延不愈,是导致糖尿病患者截肢的重要因素之一。创口愈合是一个复杂的精细的过程,主要分为四个阶段:止血期,炎症期,增殖期和组织重塑期[1]。各阶段由多种组织和细胞通过迁移和增殖的交互作用来闭合创缘[2-3]。在这些细胞中,成纤维细胞在愈合的各个阶段都发挥着至关重要的作用,其正常的增殖和迁移对维持皮肤正常的结构和生理功能具有重要意义[4-5]。与正常创口相比,DUs 患者长期处于高血糖的状态,已有研究表明该因素或为溃疡处各种细胞的行为学功能发生显著变化的因素之一[6]。在人皮肤中,间质细胞如真皮成纤维细胞为表皮角质细胞的功能发挥提供重要的微环境[7]。

我们前期研究表明,DUs 创缘皮肤处于高氧化应激损伤状态,高糖会使机体氧化与抗氧化反应失衡,导致体内活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)增多,从而影响细胞功能。核因子 E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor,NRF2)是氧化还原敏感转录因子,通过调控其下游数十种抗氧化酶和Ⅱ相解毒酶表达,中和过多的 ROS,维持细胞氧化还原平衡[8]。激活 NRF2 可改善高糖导致的氧化应激损伤,有助于糖尿病溃疡愈合[9]。

几个世纪以来,桂皮一直作为中药或者香料被广泛使用,其主要活性成分是肉桂醛(cinnamic aldehyde,CA)。许多研究报道 CA 具有广泛生物和药理活性,可显著改善糖尿病[10-11]及糖尿病肾病[12]。我们的前期研究已经证实,CA 作为一种 NRF2 激动剂,显著促进角质细胞迁移,促进糖尿病鼠创口愈合[9]。另一方面,成纤维细胞在高糖情况下的迁移能力受损[13],迄今为止激活 NRF2 对成纤维细胞的影响尚无研究报道。本研究拟观察 CA 对高糖条件下皮肤成纤维细胞功能的影响,并分析 NRF2 在其中的作用,为 CA 应用于 DUs 治疗提供进一步实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人皮肤成纤维细胞系 HS27 由亚利桑那癌症中心 Dr. Tim Bowden 教授惠赠,DMEM 培养基、胰酶(HyClone 公司);Hanks 平衡盐溶液(Hanks balanced salt solution, HBSS)(Gibico);发光液(Minipore, No. WBKLS0500);胎牛血清(FBS, Gibico 公司);CA、2′,7′-二氯荧光素二醋酸(2′,7′-dichlorofluorescein diacetate, DCF)、D-glucose(G8270)均购自 Sigma 公司(St. Louis, MO);抗体 NRF2, HO-1, P53, P21、β-actin 及结合辣根过氧化物酶(HRP)购自 Santa Cruz 公司;Con siRNA(1027281)和 NRF2 siRNA (S100657937)及所用转染试剂购自 Qiagen 公司(Valencia ,CA)。

1.2 HS27 细胞培养与分组

HS27 细胞置于含 10% FBS 的正常糖(NG, 5.5 mmol/L)DMEM 培养液中于 37°C, 5% CO_2 孵箱中培养。实验前,细胞于正常糖无血清培养基中饥饿培养 24 h,然后分别在正常糖或高糖(HG,30 mmol/L)含 10% FBS 的 DMEM 中培养 2 天。实验分为 5 组:①正常对照组(NG 组):培养基含 5.5 mmol/L D-glucose;②高糖组(HG 组):培养基含 30 mmol/L D-glucose;③高糖 + 肉桂醛(HG + CA):培养基含 30 mmol/L D-glucose 和 20 μmol/L CA;④高糖 + Con siRNA(HG + Con siRNA):培养基含 30 mmol/L D-glucose 和 Con

siRNA;⑤高糖+NRF2 siRNA:培养基含 30 mmol/L D-glucose 和 NRF2 siRNA。

1.3 细胞迁移能力检测

HS27 细胞在 NG 或 HG 中培养 2 天后,HG 组加入 20 μmol/L CA 干预 24 h 后移去聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane,PDMS)膜形成宽度为 1 mm 的空间检测 HS27 细胞的迁移能力。使用 PDMS 膜从而以对细胞损伤最小的方式制造细胞迁移空间,具体迁移实验步骤如文献所述[14]。将紫外消毒的 PDMS 膜(1 mm×2 cm)置于 6 孔板中间,确保膜的底部和培养板底面紧贴,避免留有空隙。将对数生长期的 HS27 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待单层细胞融合后,用镊子移除 PDMS 膜即可产生 1 mm 宽度的划痕。PBS 洗净脱落细胞后分别加入 NG 和 HG 培养基,每 24 h 换液并予 CA 干预,拍照收集图片分析实验结果。将 Con siRNA 或 NRF2 siRNA 干扰(详见后)后的 HS27 细胞以 1×10^5 个每孔细胞密度接种于 6 孔板中,干扰 48 h 后细胞融合形成单层,如上述方法,观察细胞 72 h 迁移情况。

1.4 Western Blot 检测蛋白表达。

用 1×上样缓冲液[50 mmol/L Tris - HCl pH 6.8,2% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),10% 甘油, 100 mmol/L 十二烷基硫酸钠(dithiothreitol,DTT), 0.1% 溴酚蓝]提取干预后的 HS27 细胞蛋白,沸水煮 5 min 后经细胞超声粉碎仪裂解细胞蛋白,行聚丙烯酰胺凝胶(5% 浓缩胶和 8% 分离胶)电泳,经电转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂牛奶封闭,敷一抗(NRF2、HO-1、P53、P21、β-actin)及二抗进行免疫印迹检测,运用发光液在曝光仪(FUSION FX5S)上曝光,得到蛋白灰度图像后分析目的蛋白相对表达水平。

1.5 HS27 细胞内 ROS 水平检测

细胞内活性氧(ROS)检测采用 DCF 非标记的氧化敏感荧光探针。细胞接种于 NG 或 HG 培养基,20 μmol/L CA 每隔 24 h 干预一次,48 h 后,细胞经 HBSS 液洗涤 2 次后,换用含 10 μg/mL DCF 的 HBSS 液在 37°培养箱避光孵育 30 min。然后 HBSS 液洗涤 3 次后置于荧光显微镜(Zeiss Observer. Z1)下采用激光和放射波长为 485 nm 和 530 nm 之间检测荧光强度。采用 Slidebook 5.0 软件分析荧光图像。运用 Image J software 分析每组随机 3 个区域的相对荧光强度从而代表细胞内 ROS 的水平。

1.6 siRNA 转染技术

按照产品说明书,运用 HiPerfect 转染试剂盒(Qiagen)将非特异性的 Con siRNA 或 NRF2 siRNA 转染至 HS27 细胞中。简单概述如下,细胞分别在 NG 和 HG 培养基中培养 2 d,然后分别转染 Con siRNA 和 NRF2 siRNA 后进行下一步实验。拟行 ROS 检测的 HS27 细胞先于 NG 环境中分别转染 Con siRNA 和 NRF2 siRNA,24 h 后将细胞转为 HG 环境中培养并实施预定干预。另外,拟行迁移能力检测的 HS27 细胞,转染 Con siRNA 和 NRF2siRNA 48 h 后移去 PDMS 膜,于高糖条件下培养,每 24 小时观察细胞迁移情况。

1.7 统计学处理

上述实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式记录。使用 SPSS 10.0 进行了统计检验。运用非配对 t 检验分析两组平均值。2 组以上组间比较采用单因素方差分析和 Tukey post hoc test 检验。

2 结果

2.1 CA 对高糖条件下皮肤成纤维细胞迁移的影响

迁移实验所示,NG 组,HG 组和 HG+CA 组培养的 HS27 细胞在前 24 h 的迁移并无明显差异。然而,48 h 时,与 NG 组相比,HG 组 HS27 细胞迁移显著受阻[(0.410 ± 0.053) *vs* (0.642 ± 0.020),$P<0.05$,图 1],给予 CA 干预后,HG+CA 组 HS27 细胞迁移得到显著改善[(0.642 ± 0.020) *vs* (0.443 ± 0.053),$P<0.05$,图 1]。60 h 时,与 NG 组相比,HG 组 HS27 细胞迁移显著受阻[(0.068 ± 0.052) *vs* (0.467 ± 0.023),$P<0.05$,图 1]。观察至 72 h,NG 组已完全愈合,HG 组仅约 70% 的愈合率,HG+CA 组几乎完全愈合。上述结果表明,CA 可显著改善高糖对 HS27 迁移的抑制作用。

2.2 CA 对 HS27 细胞 NRF2、HO-1 及增殖和凋亡相关蛋白 P21 和 P53 表达水平的影响

Western blot 结果显示,与 HG 组相比,HG+CA 组 NRF2 及其下游靶蛋白 HO-1 表达水平显著升高(图 2),表明 CA 可显著激活 HG 环境下成纤维细胞的 NRF2 通路,并上调 HO-1 表达。此外,与 HG 组相比,HG+CA 组 HS27 细胞的 P21 和 P53 表达水平并无显著改变。表明 CA 激活高糖条件下 HS27 细胞的 NRF2 通路,但并不影响细胞增殖和凋亡相关蛋白 P21、P53 的表达水平。

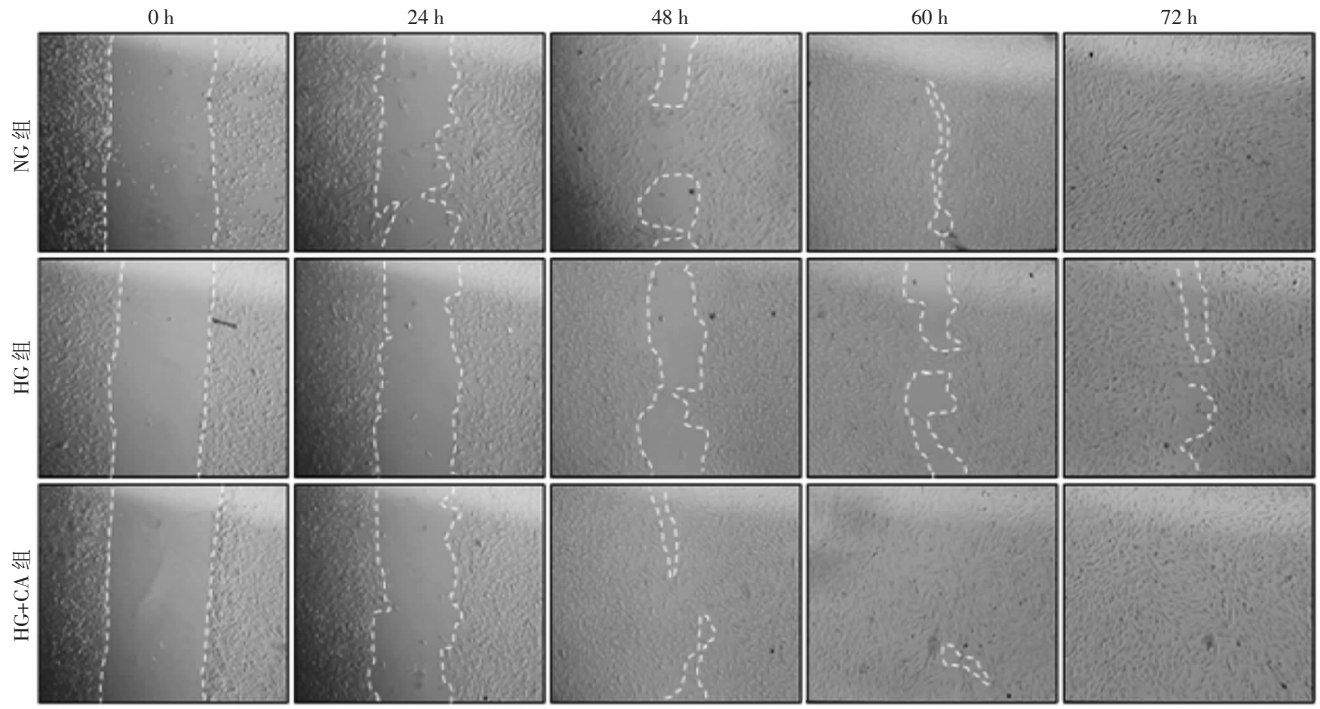
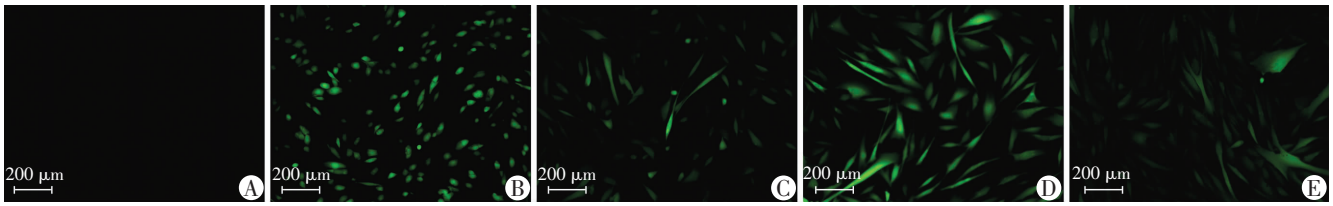
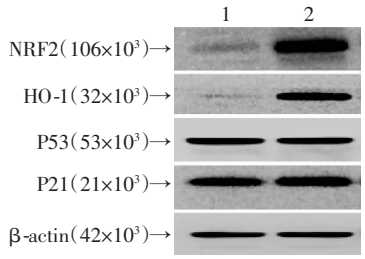


图 1　光镜实时观察各组 HS27 细胞的迁移变化



A:阴性对照;B:阳性对照;C:NG 组;D:HG 组;E:HG + CA 组

图 3　DCF 法检测各组 HS27 细胞内 ROS 水平



1:HG 组;2:HG + CA 组

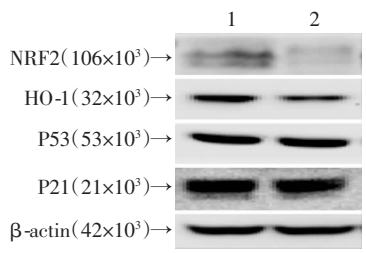
图 2　Western blot 检测 HS27 细胞 NRF2、HO-1、P53、P21 表达

2.3　CA 对高糖条件下 HS27 细胞 ROS 水平的影响

采用 DCF 法检测 HS27 细胞内 ROS 水平,经定量分析,HG 组和 HG + CA 组的相对荧光强度均以 NG 组平均荧光强度值作为标准对比分析。与 NG 组相比,HG 组 ROS 水平显著升高[(1 378 513 ± 154 544) *vs* (4 360 935 ± 1 445 723),$P < 0.05$,图 3],而在 HG + CA 组 ROS 水平较 HG 组显著减弱[(4 360 935 ± 1 445 723) *vs* (1 982 673 ± 208 109),$P < 0.05$,图 3],提示 CA 可以抑制高糖诱导 HS27 细胞的 ROS 水平升高。

2.4　干扰 NRF2 对 HS27 细胞增殖和凋亡相关蛋白 P21 和 P53 表达水平的影响

NRF2 siRNA 和 Con siRNA 和转染至 HS27 细胞后,提取细胞蛋白检测 NRF2、HO-1、P53 及 P21 等蛋白的表达水平。Western blot 结果显示,与 HG + Con siRNA 组相比,HG + NRF2 siRNA 组 NRF2、HO-1 的表达显著降低,增殖和凋亡相关蛋白 P21 和 P53 表达水平并无改变(图 4)。表明阻断 NRF2 通路,并不影响细胞增殖和凋亡相关蛋白 P21 和 P53 的表达水平。

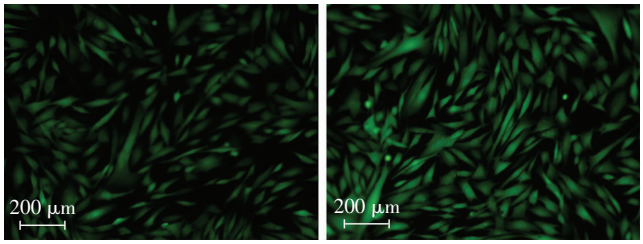


1:HG + Con siRNA 组;2:HG + NRF2 siRNA 组

图 4　Western blot 检测 HS27 细胞 NRF2、HO-1、P53、P21 表达

2.5 干扰 NRF2 对 HS27 细胞 ROS 水平的影响

DCF 法检测 HG + NRF2 siRNA 组和 HG + Con siRNA 组 ROS 水平,与 HG + Con siRNA 相比,HG + NRF2 siRNA 组 ROS 水平显著升高[(2 368 438 ± 313 669)*vs*(3 310 108 ± 658 351),$P<0.05$,图 5],提示 NRF2 通路是调节高糖所致 ROS 增加的重要因素。



A:HG + Con siRNA 组;B: HG + NRF2 siRNA 组

图 5 DCF 法检测干扰 NRF2 对高糖情况下 HS27 细胞内 ROS 水平的影响

2.6 干扰 NRF2 对成纤维细胞迁移能力的影响

迁移实验显示,前 48 h HG + NRF2 siRNA 组与 HG + Con siRNA 组 HS27 细胞迁移并无显著差异,60 h 时,与 HG + Con siRNA 组相比,HG + NRF2 siRNA 组 HS27 细胞迁移显著减弱[(0.046 ± 0.018)*vs*(0.318 ± 0.032),$P<0.05$,图 6]。72 h 时,HG + Con siRNA 组完全愈合,HG + NRF2 siRNA 组愈合率仅约 24%,提示阻断 NRF2 通路抑制成纤维细胞迁移。

3 讨论

DUs 是糖尿病的重要并发症,是导致非创伤性截肢的主要因素之一,严重影响患者的生活质量。创口愈合的各个时期并不能严格区分,大致可分为止血期、炎症期、增殖-迁移期(包括细胞外基质沉积)和重塑期[15]。各时期彼此重叠,需要多种细胞参与进程,包括上皮层(角质上皮细胞、黑色素细胞、朗格汉斯细胞)、真皮层(成纤维细胞和肌成纤维母细胞)、血管、附件结构及皮下脂肪层[16]。糖尿病所致的体内代谢紊乱、血管神经病变及炎症反应使上述参与创口愈合的多种细胞行为学功能紊乱,包括成纤维细胞的增殖和迁移受阻,导致 DUs 愈合延迟[5, 17]。体外多项实验表明,高糖环境可显著抑制角质细胞及成纤维细胞的迁移[5, 9, 18-20]。本研究亦证实了 HG 培养人皮肤成纤维细胞(HS27 cells),与 NG 组相比,人皮肤成纤维细胞的迁移能力明显降低。并且 HG 组 HS27 细胞 ROS 堆积,而经 CA 干预激活 NRF2 通路后细胞内 ROS 水平降低,细胞迁移能力显著增强。提示 CA 可望通过改善成纤维细胞的行为学功能促进糖尿病溃疡愈合。

糖尿病溃疡作为糖尿病的主要并发症之一,慢性迁延不愈,有着不同于一般溃疡的特有的病理生理机制。既往研究亦证实,高糖抑制细胞迁移其机制之一为 ROS 堆积导致氧化应激损伤[21]。有研究表明,对比高糖(HG,30 mmol/L)与正常糖(NG,5.5 mmol/L)培养的人原代包皮成纤维细胞(HSFs),HG 组 ROS 生成增多,细胞迁移能力受损,经 bFGF(basic fibroblast growth factor)干预降低 ROS 水平后,成纤维细胞迁移能力得以改善[20],这与本研究采用高糖(HG,30 mmol/L)培养人皮肤成纤维细胞(HS27)发现其 ROS 水平较正常糖(NG,5.5 mmol/L)培养的 HS27 细胞显著升高相一致。此外,本课题组近期研究发现,糖尿病溃疡患者创缘处皮肤较非糖尿病患者创缘处皮肤氧化应激损伤更严重,NRF2 通路代偿性激活;进一步,在 STZ 诱导的糖尿病溃疡动物模型中,通过 CA 和 SF(Sulforaphane)激活 NRF2 通路显著促进糖尿病创口愈合[9],表明 NRF2 通路在糖尿病溃疡中有重要作用。深入研究发现,高糖导致角质细胞内 ROS 堆积,经 NRF2

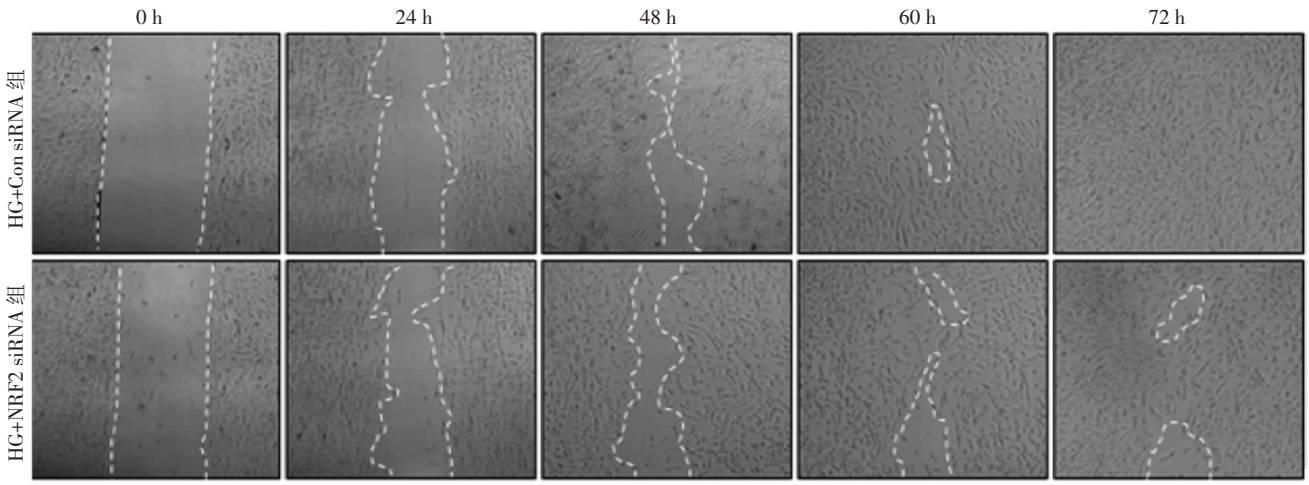


图 6 光镜实时观察各组 HS27 细胞的迁移变化

特异性激动剂 SF 和 CA 干预后,其 ROS 水平明显下降,细胞迁移能力得到显著改善[9]。在此研究基础上,本研究进一步证实了 ROS 对成纤维细胞迁移的影响:CA,一种 NRF2 的特异性激动剂,干预成纤维细胞 48 h 后可使得高糖条件下细胞内增高的 ROS 水平明显降低,迁移能力增强。进一步,阻断成纤维细胞中的 NRF2 通路后,ROS 水平进一步升高,成纤维细胞迁移的抑制效应加剧。提示,高糖环境下成纤维细胞胞内 ROS 水平可能与迁移能力负相关。因此,本研究发现激活 NRF2 通路可明显缓解高糖对成纤维细胞迁移能力的影响,进一步充实了 NRF2 激动剂应用于糖尿病溃疡治疗的科学依据。

此外,成纤维细胞的增殖、凋亡同样参与创口闭合过程。高糖(30 mmol/L 和 60 mmol/L)处理 HSFs 细胞 72 h 后,细胞损伤相关蛋白 P53,c-Caspase-3,TNF-α 和 PAI-1 水平显著升高,但并不影响细胞的增殖活性[20]。P21 抑制细胞周期蛋白 cyclin/CDK 家族的活性,并且过表达 P21 抑制人皮肤成纤维细胞增殖[22-23]。P53 的水平改变诱导细胞活性丧失进而导致细胞凋亡[24]。因此,我们检测了 CA 干预后成纤维细胞 P21 和 P53 的表达水平,发现 P21 和 P53 的表达水平并无显著改变。鉴于成纤维细胞的增殖与多种因素相关,如丝裂原活化蛋白激酶 p42mapk 和 p44mapk[25]、TGF-β1[26]等成纤维细胞增殖的重要调节因子。因此,CA 对成纤维细胞增殖和凋亡有无影响尚不明确,仅提示 CA 并不影响 P21 或 P53 相关增殖或凋亡的信号通路,但对其他因素有无作用尚未可知,需进一步通过其他方法检测不同时间点细胞增殖情况并进一步探讨其他相关信号通路的影响。

另一方面,为进一步阐释 NRF2 及 ROS 水平在调控成纤维细胞迁移、增殖及凋亡中的重要作用,本研究还发现阻断 NRF2 通路后成纤维细胞的 ROS 水平进一步增加,迁移能力严重受损,而增殖和凋亡相关蛋白表达并无明显改变。故此,继发现 NRF2 在糖尿病肾病[12,27]、糖尿病肌萎缩[28]、糖尿病心肌病[29]及糖尿病溃疡(角质细胞)[9]等糖尿病并发症中的重要作用,本研究证实了 NRF2 在糖尿病溃疡中对成纤维细胞的重要保护作用,进一步丰富了氧化应激参与调控糖尿病及其并发症发生发展的重要理论。

未来进一步的研究应该包括敲除 NRF2 后进一步观察 CA 对成纤维细胞的影响,以探讨 CA 促进成纤维细胞迁移是否完全依赖于 NRF2 通路。此外,成纤维细胞是间质细胞的主要类型,参与细胞外基质(ECM)的沉积[30],那么 CA 对成纤维细胞高糖条件下 ECM 表达水平的调节是否有利,尚值得进一步探讨。

综上所述,本研究证实了 CA 降低高糖诱导的皮肤成纤维细胞内 ROS 水平,改善高糖对皮肤成纤维细胞迁移的抑制作用,进一步探索其可能机制,发现 CA 经由 NRF2 通路调节高糖条件下皮肤成纤维细胞的功能,为 CA 应用于 DUs 的临床治疗提供了实验依据。

参考文献:

[1] Game F L, Jeffcoate W J. Dressing and Diabetic Foot Ulcers: A Current Review of the Evidence.[J]. Plast Reconstr Surg, 2016, 138(3 Suppl): 158S-164S. DOI: 10.1097/PRS.0000000000002681

[2] Hata S, Okamura K, Hatta M, *et al*. Proteolytic and non-proteolytic activation of keratinocyte-derived latent TGF-β1 induces fibroblast differentiation in a wound-healing model using rat skin.[J]. J Pharmacol Sci, 2014, 124(2): 230-43. DOI: 10.1254/jphs.13209FP

[3] Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration[J]. Science, 1997, 276(5309): 75-81. DOI: 10.1126/science.276.5309.75

[4] Almeida M E, Monteiro K S, Kato E E, *et al*. Hyperglycemia reduces integrin subunits alpha v and alpha 5 on the surface of dermal fibroblasts contributing to deficient migration[J]. Mol Cell Biochem, 2016, (1-2)(421): 19-28. DOI: 10.1007/s11010-016-2780-4

[5] Shi H, Cheng Y, Ye J, *et al*. bFGF Promotes the Migration of Human Dermal Fibroblasts under Diabetic Conditions through Reactive Oxygen Species Production via the PI3K/Akt-Rac1-JNK Pathways[J]. Int J Biol Sci, 2015, 11(7): 845-859. DOI: 10.7150/ijbs.11921

[6] Blakytny R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes[J]. Diabet Med, 2006, 23(6): 594-608. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2006.01773.x

[7] Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(3): 207-217. DOI: 10.1038/nrm2636

[8] Denicola G M, Karreth F A, Humpton T J, *et al*. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis[J]. Nature, 2011, 475(7354): 106-109. DOI: 10.1038/nature10189

[9] Long M, Rojo D L V M, Wen Q, *et al*. An Essential Role of NRF2 in Diabetic Wound Healing[J]. Diabetes, 2016, 65(3): 780-793. DOI: 10.2337/db15-0564

[10] Koivisto A, Hukkanen M, Saarnilehto M, *et al*. Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: Sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral

diabetic neuropathy[J]. Pharmacol Res, 2012, 65(1): 149-158. DOI: 10.1016/j.phrs.2011.10.006

[11] Anderson R A. Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity[J]. Proc Nutr Soc, 2008, 67(01): 48-53. DOI: 10.1017/S0029665108006010

[12] Zheng H, Whitman S A, Wu W, *et al*. Therapeutic Potential of Nrf2 Activators in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy[J]. Diabetes, 2011, 60(11): 3055-3066. DOI: 10.2337/db11-0807

[13] Lamers M L, Almeida M E, Vicente-Manzanares M, *et al*. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22865. DOI: 10.1371/journal.pone.0022865

[14] Anon E, Serra-Picamal X, Hersen P, *et al*. Cell crawling mediates collective cell migration to close undamaged epithelial gaps[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(27): 10891-10896. DOI: 10.1073/pnas.1117814109

[15] Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot[J]. The Lancet, 2005, 366(9498): 1736-1743. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67700-8

[16] Zielins E R, Atashroo D A, Maan Z N, *et al*. Wound healing: an update[J]. Regen Med, 2014, 9(6): 817-830. DOI: 10.2217/rme.14.54

[17] Sundaram G M, Common J E A, Gopal F E, *et al*. 'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing[J]. Nature, 2013, 495(7439): 103-106. DOI: 10.1038/nature11890

[18] Lan C C, Liu I H, Fang A H, *et al*. Hyperglycaemic conditions decrease cultured keratinocyte mobility: implications for impaired wound healing in patients with diabetes[Z]. 2008: 159, 1103-1115: DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08789.x: DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08789.x.

[19] Fadini G P, Albiero M, Menegazzo L, *et al*. The Redox Enzyme p66Shc Contributes to Diabetes and Ischemia-Induced Delay in Cutaneous Wound Healing[J]. Diabetes, 2010, 59(9): 2306-2314. DOI: 10.2337/db09-1727

[20] Xuan Y H, Huang B B, Tian H S, *et al*. High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108182. DOI: 10.1371/journal.pone.0108182

[21] Xiao H, Gu Z, Wang G, *et al*. The Possible Mechanisms Underlying the Impairment of HIF-1α Pathway Signaling in Hyperglycemia and the Beneficial Effects of Certain Therapies[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(10): 1412-1421. DOI: 10.7150/ijms.5630

[22] Xiong Y, Hannon G J, Zhang H, *et al*. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases[J]. Nature, 1993, 366(6456): 701-704. DOI: 10.1038/366701a0

[23] Serrano M, Hannon G J, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. Nature, 1993, 366(6456): 704-707. DOI: 10.1038/366704a0

[24] Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, *et al*. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6[J]. Nature, 1991, 352(6333): 345-347. DOI: 10.1038/352345a0

[25] G Pagès P L G L. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 18(90): 8319-8323

[26] Li H, Yang L, Zhang Y, *et al*. Kaempferol inhibits fibroblast collagen synthesis, proliferation and activation in hypertrophic scar via targeting TGF-β receptor type I[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 967-974. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.08.011

[27] Jiang T, Huang Z, Lin Y, *et al*. The Protective Role of Nrf2 in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy[J]. Diabetes, 2010, 59(4): 850-860. DOI: 10.2337/db09-1342

[28] Whitman S A, Long M, Wondrak G T, *et al*. Nrf2 modulates contractile and metabolic properties of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic atrophy[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(17): 2673-2683. DOI: 10.1016/j.yexcr.2013.07.015

[29] Bai Y, Cui W, Xin Y, *et al*. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 57: 82-95. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.01.008

[30] Driskell R R, Lichtenberger B M, Hoste E, *et al*. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair[J]. Nature, 2013, 504(7479): 277-281. DOI: 10.1038/nature12783.

(收稿:2016-08-25;修回:2016-12-02)

(编辑 栾 嘉)