DOI:10.16016/j.1000-5404.202011253

高糖环境下抑瘤素对人皮肤成纤维细胞增殖和细胞外基质分泌的影响

刘露露,符学铭,薛碧宇,薛 斌 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院烧伤整形外科

[摘要] **目的** 探讨高糖环境下抑瘤素(oncostatin M,OSM)对人皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblasts,HDFs)增殖和细胞外基质分泌的影响及其可能的作用机制。**方法** ①高糖模型建立:人皮肤成纤维细胞分为5组,分别给予5、10、15、20、25 mmol/L葡萄糖处理;采用MTT检测高糖培养24、36、48 h各组细胞的增殖活力,Western blot检测对照组(5 mmol/L葡萄糖)和高糖组(20 mmol/L葡萄糖)细胞培养24、36、48 h后ERK、p-ERK和CyclinD1蛋白表达。②探讨OSM对高糖模型作用的最佳浓度:细胞分为5组,对照组给予20 mmol/L葡萄糖处理,其余各组分别给予20 mmol/L葡萄糖+25、50、100、200 ng/mL OSM处理;采用MTT检测各组细胞培养24、36、48 h后的增殖活力;Western blot检测各组细胞Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin蛋白表达。③探讨OSM对高糖模型的作用的机制:将细胞分为对照组、高糖组、高糖+OSM组、高糖+OSM+抑制剂PD98059组。流式细胞仪测定各组细胞周期,Western blot检测ERK、p-ERK、CyclinD1、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin等相关因子的蛋白表达,q-PCR验证各组细胞ERK1/2、CyclinD1、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin基因相对表达量的差异。**结果** 与对照组比较,经20 mmol/L葡萄糖处理后,HDFs的增殖活力显著降低($P<0.001$),G_1期细胞增多($P<0.01$),S期细胞显著减少($P<0.01$);ERK、p-ERK、CyclinD1、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin蛋白表达显著降低($P<0.01$,$P<0.05$)。与高糖组比较,100 ng/mL OSM处理高糖组48 h后,细胞的增殖活力显著增高($P<0.001$);G_1期细胞减少($P<0.05$),S期细胞显著增多($P<0.05$);ERK、p-ERK、CyclinD1、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin的蛋白表达显著增高(均$P<0.01$);q-PCR结果与Western blot结果基本一致,差异均有统计学意义($P<0.05$)。当ERK通路特异性小分子抑制剂PD98059阻断ERK信号通路后,上述效应显著减弱($P<0.05$)。**结论** OSM可能通过ERK信号通路逆转高糖对HDFs增殖和细胞外基质分泌的抑制作用。

[关键词] 抑瘤素;人皮肤成纤维细胞;高糖;细胞增殖;ERK;细胞外基质
[中图法分类号] R322.991;R341;R349.14 [文献标志码] A

Effect of oncostatin M on proliferation and secretion of extracellular matrix in human dermal fibroblasts in high glucose condition

LIU Lulu, FU Xueming, XUE Biyu, XUE Bin Department of Burns and Orthopedic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of oncostatin M (OSM) on the proliferation and extracellular matrix secretion of human dermal fibroblasts (HDFs) in high glucose environment and its possible mechanism. **Methods** ① Establishment of hyperglycemia model: HDFs were treated with 5, 10, 15, 20 and 25 mmol/L glucose, respectively. MTT assay was used to detect the proliferation activity of cells cultured in high glucose for 24, 36 or 48 h. Western blotting was used to detect the protein levels of ERK, p-ERK and CyclinD1 in the HDFs treated with 5 or 20 mmol/L glucose for 24, 36 and 48 h. ② Optimal concentration of OSM on hyperglycemia model: the cells were treated with 20 mmol/L glucose (control group), and 20 mmol/L

[通信作者] 薛 斌,E-mail:cqxuebin@126.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

glucose+25, 50, 100, 200 ng/mL OSM, respectively. MTT assay was used to detect the proliferation of above cells cultured for 24, 36 and 48 h. The protein expression of Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ and fibronectin was detected by Western blotting. ③ Mechanism of OSM on hyperglycemia model: the cells were divided into control group, high glucose group, high glucose+OSM group, and high glucose+OSM+ inhibitor PD98059 group. Cell cycle was determined by flow cytometry. The protein levels of ERK, p-ERK, CyclinD1, CollagenⅠ, CollagenⅢ, fibronectin and other related factors were detected by Western blotting. q-PCR was used to measure the levels of ERK1/2, CyclinD1, CollagenⅠ, CollagenⅢ and fibronectin in each group. **Results** Treatment of 20 mmol/L glucose resulted in significantly decreased proliferation activity ($P<0.001$), increased proportion of G_1 cells ($P<0.01$) and decreased proportion of S-phase cells ($P<0.01$), and reduced expression of ERK, p-ERK, CyclinD1, Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ and fibronectin ($P<0.01$, $P<0.05$) when compared with the control cells. While treatment of 100 ng/mL OSM for 48 h enhanced the proliferation activity ($P<0.001$), decreased the proportion of G_1 cells ($P<0.05$) but elevated the proportion of S-phase cells ($P<0.05$), and raised protein levels of ERK, p-ERK, CyclinD1, Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ and fibronectin cells (all $P<0.01$). q-PCR indicated similar results as Western blotting, and statistical differences were seen in the results of mRNA levels (all $P<0.05$). When ERK pathway specific small molecule inhibitor PD98059 blocked ERK signaling pathway, the above effects were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusion** OSM may reverse the inhibitory effect of high glucose on the proliferation and extracellular matrix secretion through ERK signaling pathway in HDFs.

[**Key words**] oncostatin M; human dermal fibroblasts; high glucose; cell proliferation; ERK; extracellular matrix

Corresponding author: XUE Bin, E-mail: cqxuebin@126.com

近年来,糖尿病发病率持续上升,伤口难愈是糖尿病进程中严重的并发症之一[1-2]。伤口愈合是一个复杂的病理生理过程,包括组织再生、修复、重建等。在这个过程中,人皮肤成纤维细胞(human dermal fibroblasts,HDFs)的增殖、迁移,肉芽组织形成,胶原分泌和创口胶原化,瘢痕形成、改建为主要影响因素[3-6]。在长期高糖因素的刺激下,伤口中血管神经病变以及炎症反应等因素导致参与伤口愈合的多种细胞功能紊乱[7],其中 HDFs 表达水平下降、生长因子功能活性降低,导致创面愈合速度减慢,是慢性难愈合创面形成的重要原因[8-9]。因此,改善高糖环境下 HDFs 的增殖、迁移、细胞外胶原的分泌等功能状态,是促进糖尿病创面愈合的关键。

抑瘤素(oncostatin M,OSM)属于白介素-6 家族成员,主要由激活的 T 细胞和单核细胞产生,作为一种多功能的细胞生长调节因子,通过与细胞膜受体 gp130 结合,激活下游 STAT3、MAPK 和 PI3K 等多种信号通路[10]。OSM 可以抑制多种实体肿瘤及白血病细胞的生长,但是 OSM 对成纤维细胞的作用与其对肿瘤细胞的作用完全不同[11]。已有研究表明,在急性心肌梗死时,OSM 水平增加,通过促进心肌纤维细胞的增殖促进创伤愈合[12],OSM 对成纤维细胞的增殖及细胞外胶原的分泌有促进的作用[10]。但 OSM 促进 HDFs 在高糖环境下的增殖和细胞外胶原分泌的作用和具体机制仍不清楚。因此,本研究主要通过体外实验建立 HDFs 高糖模型,OSM 处理高糖环境下 HDFs,观察高糖环境中 OSM 对 HDFs 增殖及细胞外胶原分泌的影响及机制,为 OSM 用于糖尿病伤口愈合的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞 HDFs 购于重庆莱博斯生物技术有限公司。主要实验试剂:DMEM/High Glucose 培养基购于美国 Gibco 公司;胎牛血清购于德国 PAN 公司;蛋白预染 Marker 购于美国 Thermo 公司;SYBRGreeb PCR 试剂盒、反转录试剂盒购于日本 TaKaRa 公司;胰酶购于美国 Gibco 公司、重组人抑瘤素 M 购于美国 Peprotech 公司、兔抗人 CyclinD1、ERK、p-ERK 抗体、荧光二抗购于英国 Abcam 公司;兔抗人 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin 抗体购于美国 Proteintech 公司;山羊抗兔二抗、β-actin、GAPDH 单克隆抗体购于中国博士德生物公司;RIPA 裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×)、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶电泳试

剂盒购于中国碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 采用 MTT 比色法检测 HDFs 的增殖活力 取第 3~5 代对数生长期的 HDFs,按 2×10^3/孔分别接种于 96 孔板。依据 DMEM 培养基中所含葡萄糖浓度不同将 HDFs 分为 5 组,分别给予 5、10、15、20、25 mmol/L 葡萄糖处理,每组 5 个复孔。对照组加入 0.1%的 DMSO,分别于培养 24、36、48 h 后加入 20 μL 的 MTT,在培养箱中继续培养 4 h,弃掉孔内培养液,加入 150 μL 的 DMSO,振荡混匀 10 min,用酶标仪测定 490 nm 处的 D 值。接着将细胞分为 5 组,对照组给予 20 mmol/L 葡萄糖处理,其余各组分别给予 20 mmol/L 葡萄糖+25、50、100、200 ng/mL OSM 处理。分别于培养 24、36、48 h 后,同上述方法检测 D(490)值。

1.2.2 采用流式细胞术检测 HDFs 的细胞周期 取对数生长期的细胞按 1×10^5/孔接种于 6 孔板,对照组、高糖组、高糖+OSM 组、高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组,每组设置 3 个复孔。对照组加入 0.1%的 DMSO。每组细胞培养 48 h 后进行流式细胞仪检测,探讨 OSM 对高糖环境下 HDFs 细胞周期的影响。

1.2.3 Western blot 检测相关蛋白的表达 ①为检测不同时间段 20 mmol/L 高糖组相对于对照组相关蛋白的表达差异,将贴壁后的 HDFs 分为:对照组(5 mmol/L 葡萄糖)、高糖组(20 mmol/L 葡萄糖),分别培养 24、36、48 h。②为检测 OSM 对高糖组相关蛋白表达的影响及其机制,将细胞分为:对照组、高糖组、高糖+OSM 组、高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组,各组细胞连续培养 48 h。培养完成后,分别提取细胞蛋白检测 ERK、p-ERK、CyclinD1、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 Fibronectin 蛋白的表达水平。RIPA 细胞裂解液提取 HDFs 总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μL 蛋白经 10%SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上,加 5%脱脂牛奶封闭 2 h 后,分别加入兔抗人 CyclinD1(1∶500),兔抗人 ERK1/2 抗体(1∶900),兔抗人 p-ERK 抗体(1∶500),兔抗人 CollagenⅠ(1∶500),Collagen Ⅲ(1∶500)、Fibronectin (1∶1 000),β-actin(1∶1 000)、GAPDH(1∶5 000),4 ℃ 孵育过夜。次日 TBST 洗 3 次,以 1∶5 000 加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,然后加入显影液后在 LAS 4000 图像分析系统进行采图,用 Image J 软件分析进行灰度值分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 Cyclin D1、ERK、CollagenⅠ、Collagen Ⅲ及 Fibronectin 的转录水平 各组细胞培养 48 h 后,TRIzol 法分别提取各组细胞中总 RNA,加入 20 μL DEPC 水,至完全溶解,紫外分光光度计分析测定提取的 RNA 的浓度,反转录制备 cDNA,浓度测量方法同前。PCR 反应体系(总体系 20 μL):2.0 μL cDNA、0.6 mL Primers 、10 μL 2×SYBRGreen、7.4 μL 无菌水。PCR 程序为两步法,q-PCR:95 ℃、15 s 预变性,之后每一步变性 95 ℃、5 s;退火延伸 60 ℃,30 s;共进行 45 个循环,每个样本设 3 个复孔,重复 3 次,取光密度值均数。以 GAPDH 为内参,实时荧光定量 PCR 检测 CyclinD1、ERK1/2、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin mRNA 相对表达量。反应结束后以 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法表示各组目的基因相对表达水平。

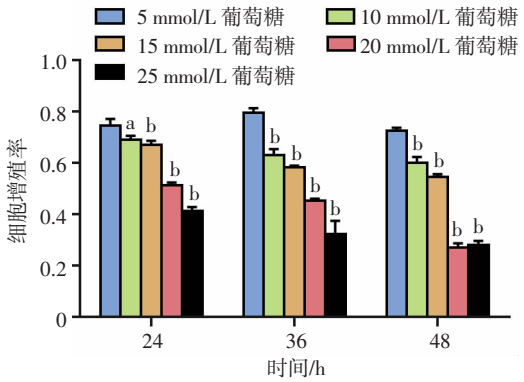
1.3 统计学分析

上述实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 记录。使用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 7 软件进行作图及统计分析。两组资料比较采用 t 检验,多组资料之间的比较采用单因素方差分析。当 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OSM 促进高糖人皮肤成纤维细胞的增殖

2.1.1 细胞增殖活力 MTT 检测结果显示,与对照组(5 mmol/L 葡萄糖)比较,HDFs 的增殖活性随着葡萄糖浓度的增加而不断降低,呈浓度依赖性。20 mmol/L 高糖组较对照组细胞增殖活性下降($P<0.01$),在培养 48 h 后细胞增殖活性下降显著($P<0.01$),25 mmol/L 葡萄糖组较 20 mmol/L 葡萄糖组细胞增殖活性差异无统计学意义($P>0.05$,图 1)。因此选择 20 mmol/L 葡萄糖培养 48 h 作为建立高糖模型的条件。

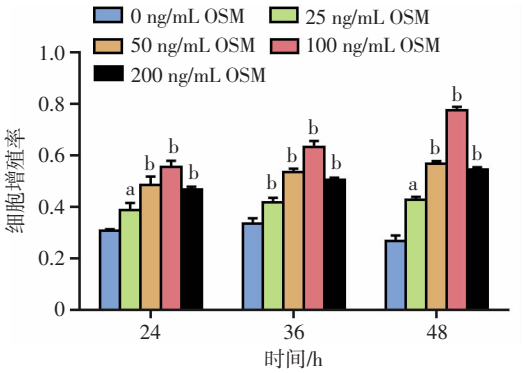


a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 5 mmol/L 葡萄糖组比较

图 1 MTT 检测不同浓度葡萄糖作用后 HDFs 增殖能力的变化 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

与高糖模型组(0 ng/mL OSM)相比,100 ng/mL OSM 组细胞增殖活力显著提高($P<0.01$);与 100 ng/mL

OSM 组相比,200 ng/mL OSM 组细胞活性开始降低($P<0.05$,图 2)。100 ng/mL OSM 组处理 48 h 与 100 ng/mL OSM 组处理 24、36 h 相比,细胞增殖活力显著提高(均 $P<0.01$)。结果表明 100 ng/mL OSM 处理高糖模型 48 h,对细胞的增殖促进作用最显著。



a: $P<0.05$; b: $P<0.01$,与 0 ng/mL OSM 组比较

图 2 MTT 检测不同浓度 OSM 作用于高糖成纤维细胞增殖能力的变化 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

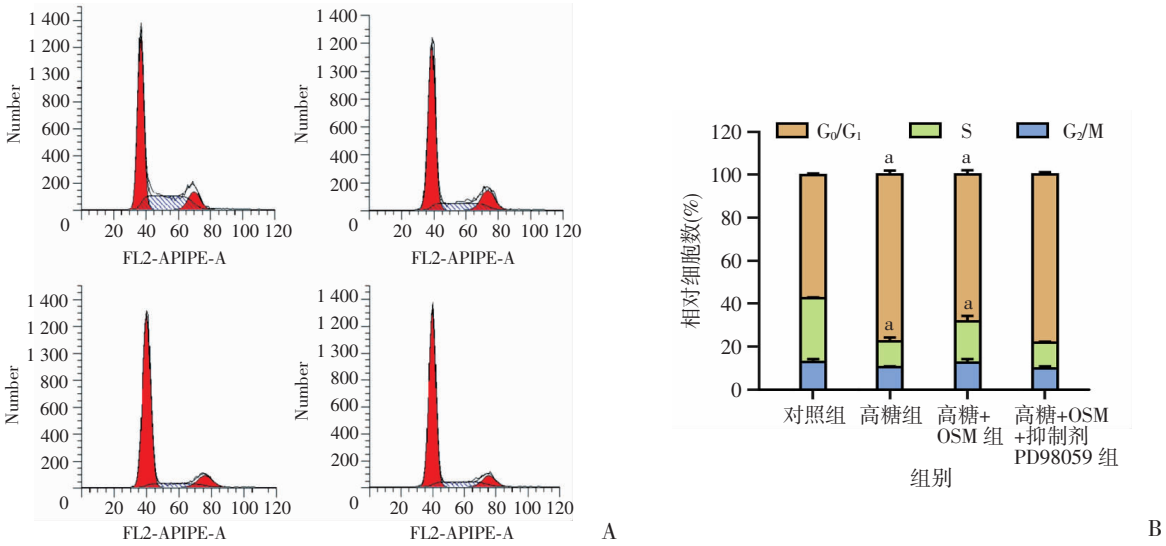
2.1.2 细胞周期 流式细胞仪检测结果显示,与对照组相比,高糖组的 S 期细胞数减少($P<0.05$)、G_1 期细胞数增多($P<0.05$);与高糖组相比,高糖+OSM 组的 S 期细胞数增加($P<0.05$)、G_1 期细胞数减少($P<0.05$);与高糖+OSM 组相比,高糖+OSM+ 抑制剂 PD98059组的S期细胞数减少($P<0.05$)、G_1期细胞数增多($P<0.05$)。与对照组相比,在周期分布上,高糖环境使成纤维细胞出现了 G_0/G_1 期阻滞(图 3);OSM 处理后促进细胞 G_1 期向 S 期转化;加入 ERK 抑制剂 PD98059 后促进效应消失。

2.1.3 ERK、p-ERK 和 CyclinD1 蛋白表达 Western blot 检测结果显示,与对照组比较,高糖组 ERK、p-ERK 和 CyclinD1 表达显著降低(均 $P<0.01$),培养时间为 48 h 时影响最为显著(图 4)。与高糖组相比,高糖+OSM 组 ERK、p-ERK 和 CyclinD1 蛋白表达明显增高($P<0.01$);与高糖组比较,高糖+OSM + PD98059 组蛋白表达差异无统计学意义(图 5)。

2.1.4 Cyclin D1、ERK mRNA 表达 采用 q-PCR 验证各组细胞中 Cyclin D1、ERK1/2 mRNA 表达的差异,与 Western blot 结果基本一致,差异均有统计学意义($P<0.01$,图 6)。结果表明 OSM 可以从转录水平促进 HDFsCyclinD1 的表达,并且这种作用可能是通过 ERK 通路实现。

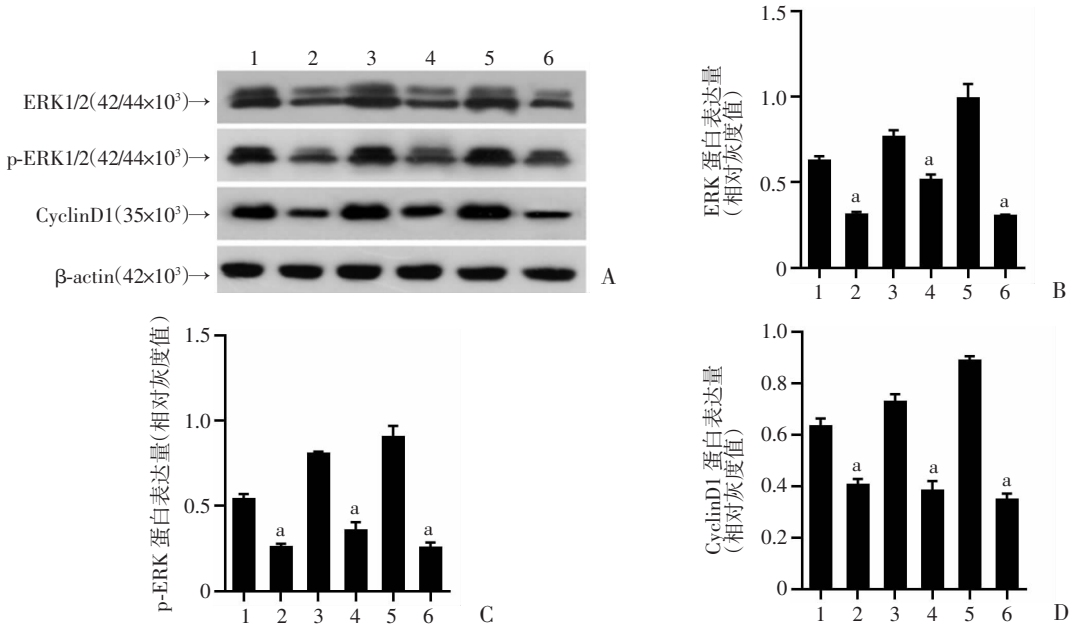
2.2 OSM 促进人皮肤成纤维细胞外基质的分泌

2.2.1 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin 蛋白表达 Western blot 检测结果显示,与高糖组比较,25、50、100、200 ng/mL OSM 处理高糖模型 48 h 后人皮肤成纤维细胞 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、Fibronectin 蛋白表达增加,在浓度为 100 ng/mL 时达到最大,浓度为 200 ng/mL 时蛋白表达开始下降(均 $P<0.01$,图 7),表明 100 ng/mL OSM 为促进 HDFs 细胞外基质分泌的最适浓度。



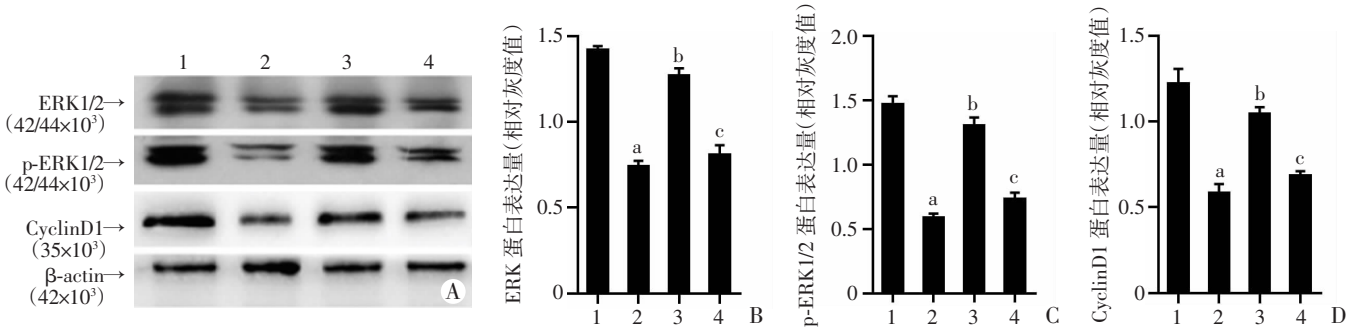
A: 流式细胞术检测结果;B:各组 HDFs 细胞周期统计图($n=3,\bar{x}\pm s$) a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与高糖组比较

图 3 流式细胞术检测各组细胞周期变化



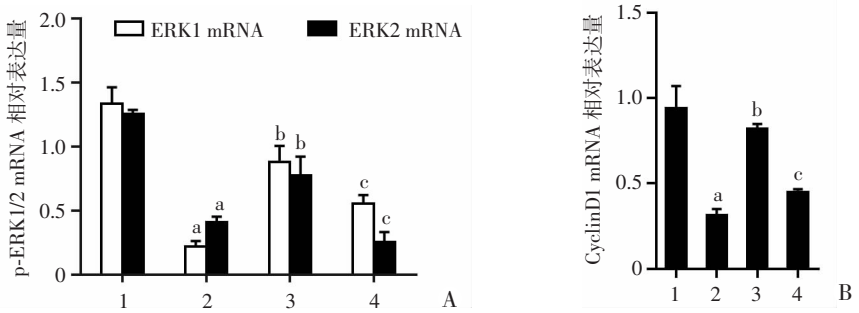
1:5 mmol/L 葡萄糖培养 24 h;2:20 mmol/L 葡萄糖培养 24 h;3:5 mmol/L 葡萄糖培养 36 h;4:20 mmol/L 葡萄糖培养 36 h;5:5 mmol/L 葡萄糖培养 48 h;6:20 mmol/L 葡萄糖培养 48 h;A:Western blot 检测;B:ERK 蛋白相对表达量;C:p-ERK 蛋白相对表达量;D:CyclinD1 蛋白相对表达量 a:$P<0.01$,与 5 mmol/L 葡萄糖培养组比较

图 4 Western blot 检测高糖对 CyclinD1、ERK 和 p-ERK 的蛋白表达的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



1:对照组;2:高糖组;3:高糖+OSM 组;4:高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组 A:Western blot 检测;B:ERK 蛋白相对表达量;C:p-ERK 蛋白相对表达量;D:CyclinD1 蛋白相对表达量;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与高糖组比较;c:$P<0.01$,与高糖+OSM 组比较

图 5 Western blot 检测 CyclinD1、ERK 和 p-ERK 的蛋白相对表达量 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



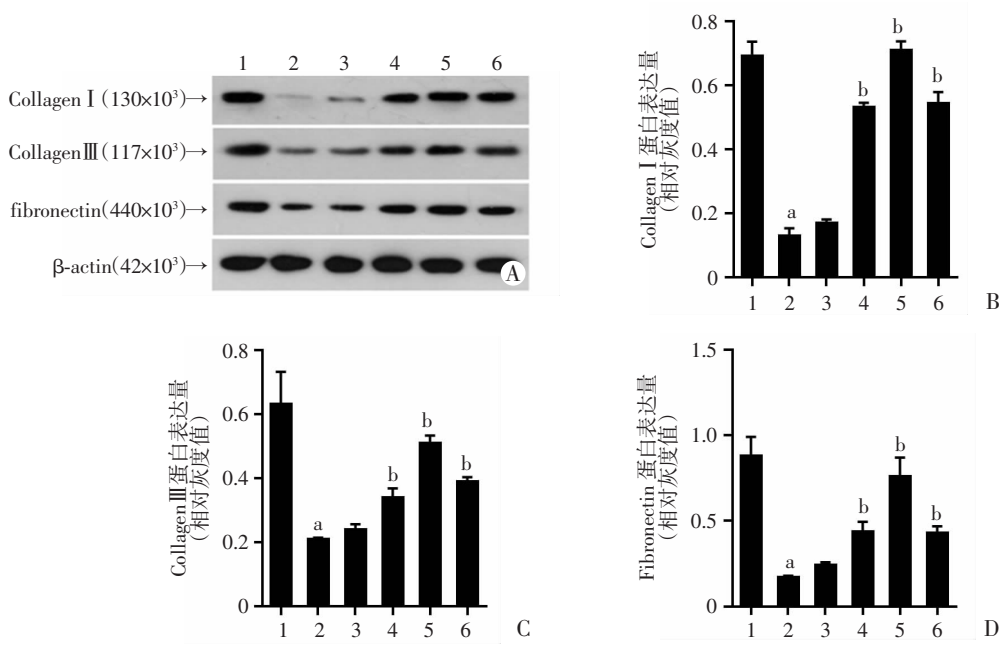
1:对照组;2:高糖组;3:高糖+OSM 组;4:高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组;A:ERKmRNA 相对表达量;B:CyclinD1mRNA 相对表达量 a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与高糖组比较;c:$P<0.01$,与高糖+OSM 组比较

图 6 qPCR 检测 CyclinD1 和 ERK1/2 的 mRNA 的相对表达 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

选取最适浓度后,为探究 OSM 促进细胞外基质分泌的机制,将细胞分为对照组、高糖组、高糖+OSM 组、高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组。结果显示,高糖组较对照组 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 Fibronectin 蛋白表达明显减弱(均 $P<0.01$);高糖+OSM 组较高糖组 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 Fibronectin 蛋白表达明显增高(均 $P<0.01$);高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组与高糖组相比蛋白表达差异无统计学意义(图 8)。综上结果表明 OSM 可能通过 ERK 通路促进 HDFs 的 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 Fibronectin 的表达。

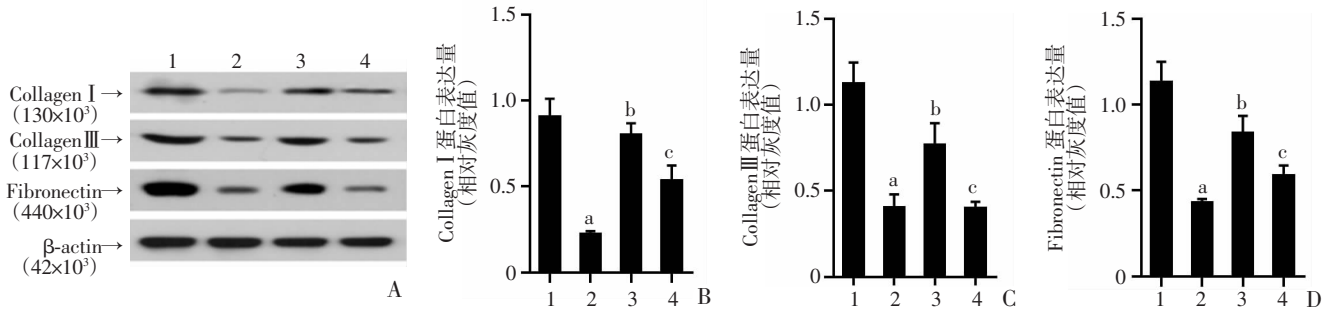
2.2.2 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ、FibronectinmRNA 表达

采用 q-PCR 验证各组细胞中 Collagen Ⅰ, Collagen Ⅲ、FibronectinmRNA 表达的差异。与 Western blot 结果基本一致,差异均有统计学意义($P<0.01$,图 9)。结果表明 OSM 可以从基因层面促进人真皮成纤维细胞 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 Fibronectin 的表达,并且这种作用可能是通过 ERK 通路实现的。



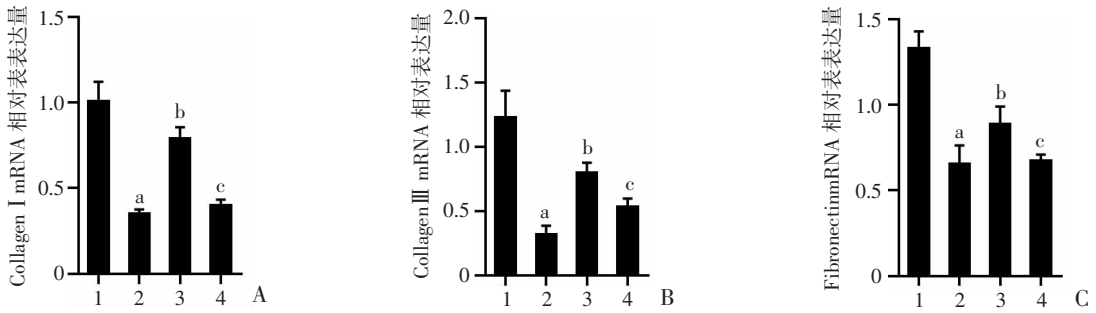
1:对照组; 2:高糖组; 3~6 分别为高糖+OSM 25、50、100、200 ng/mL 组 A: Western blot 检测;B: Collagen Ⅰ蛋白相对表达量; C: Collagen Ⅲ蛋白相对表达量;D: Fibronectin 蛋白相对表达量 a: $P<0.01$,与对照组比较; b: $P<0.01$,与高糖组比较

图 7 Western blot 检测各组细胞 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 Fibronectin 蛋白表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



1:对照组;2:高糖组;3:高糖+OSM 组;4:高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组;A: Western blot 检测; B: Collagen Ⅰ蛋白相对表达量; C: Collagen Ⅲ蛋白相对表达量;D: Fibronectin 蛋白相对表达量 a:$P<0.01$,与对照组比较; b:$P<0.01$,与高糖组比较;c: $P<0.01$,与高糖+OSM 组比较

图 8 Western blot 检测各组细胞 Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ和 Fibronectin 蛋白表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



1:对照组,2:高糖组,3:高糖+OSM 组,4:高糖+OSM+抑制剂 PD98059 组; A: Collagen Ⅰ mRNA 相对表达量;B: CollagenⅢ mRNA 相对表达量;C: Fibronectin mRNA 相对表达量 a:$P<0.01$,与对照组比较;b: $P<0.01$,与高糖组比较;c: $P<0.01$,与高糖+OSM 组比较

图 9 qPCR 检测各组细胞中 Collagen Ⅰ、CollagenⅢ和 Fibronectin 的 mRNA 表达 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

3 讨论

糖尿病在世界范围内属于高发性疾病,伤口愈合延迟导致难愈性创面的形成是糖尿病的严重并发症之一,因缺乏有效的治疗手段,导致全球约 1% 的糖尿病患者因糖尿病足而截肢[13]。伤口愈合通常经历如下阶段: 止血、炎症、增殖、收缩和重塑[4],各时期彼此重叠。正常伤口愈合过程需要多种细胞的协调与同步,其中包含角质形成细胞、表皮细胞、表皮干细胞、成纤维细胞、肌成纤维母细胞以及血管和皮肤附属器等[6]。HDFs 在创伤愈合的各个阶段都发挥着至关重要的作用,在创伤发生时迅速增殖和迁移,组成肉芽组织填补创口,分泌胶原,最终参与瘢痕形成。因此,HDFs 的生物学行为一定程度上决定了创面的愈合情况[14]。已有研究证明,糖尿病所导致的体内代谢紊乱、血管神经病变及炎症反应等使 HDFs 细胞增殖活性与细胞外基质的改变是引起糖尿病伤口难愈的重要因素[15]。因此,若能通过某种手段逆转高糖环境下 HDFs 的生物学行为,可能对糖尿病伤口难愈问题提供有效的治疗手段。

OSM 属于白介素-6 家族成员,主要由激活的 T 细胞、单核细胞产生,作为一种多功能的细胞生长调节因子,在器官发育、组织损伤与再生等方面起到重要的调控作用[10-12]。在体内,OSM 可以通过与细胞膜受体 gp130 结合,选择性地活化下游转录调节因子丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路或者磷脂酰肌醇三激酶(PI3K)/苏氨酸激酶(AKT)信号通路,上调细胞外调节蛋白激酶(extracellular-regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶(c-JunN-terminal kinase, JNK)、P38MAPK 以及 NF-κB 水平[16-18]。当 gp130 通过激活 Src 同源酪氨酸磷酸酶激活 MAPK 信号通路中的 ERK1/2 时,OSM 受体通过募集 Shc 聚集,起到辅助作用,增强 ERK1/2、P38MAPK 及 JNK 的激活水平[19-20]。ERK 为 MAPK 家族的一员,其信号传递途径涉及调节细胞生长发育和细胞分裂[21]。已有实验证实,OSM 能刺激肺部成纤维细胞受体后激活丝裂原活化蛋白激(MAPK)信号转导途径,通过 MAPK 途径调节肺成纤维的活性从而参与肺损伤修复[22-23]。但 OSM 促进 HDFs 在高糖环境下的增殖和细胞外胶原的分泌的作用和具体机制目前尚未探明。本研究使用高糖培养 HDFs 建立高糖模型,探讨 OSM 能否通过逆转高糖对 ERK 信号通路的抑制作用,促进成纤维细胞的增殖以及细胞外胶原的分泌。

G_1/S 期的转换是调控细胞周期的关键限制点,而 Cyclin D1 蛋白是推动细胞越过 G_1/S 限制点的关键分子[24-25]。本研究结果显示,高糖组相比于对照组 HDFs 细胞出现明显的 G_1 期阻滞,Cyclin D1 蛋白表达显著降低,HDFs 的增殖能力明显降低。与对照组相比,高糖环境下 HDFs 增殖相关的 ERK 信号通路蛋白表达显著降低,因此推测高糖可能通过抑制 ERK 信号通路从而抑制 HDFs 的增殖活性。100 ng/mL OSM 作用于 HDFs 后,经 ERK 信号通路传入至胞核后引起 Cyclin D1 蛋白的表达显著增加,进而推动细胞周期由 G_1 向 S 期转化,促进细胞的分裂增殖。加入 ERK 通路抑制剂的各组 HDFs 增殖能力降低,提示 ERK 信号通路可能在 OSM 促进高糖环境下 HDFs 的增殖起到一定的作用。

同时,成纤维细胞是细胞外基质产生和重组的关键。细胞外基质作为细胞与细胞、细胞与基质、基质与蛋白之间相互作用的媒介,是促进伤口愈合的重要成分,起初细胞外基质以纤维蛋白凝块的形式存在,接着

参与肉芽组织的形成,起到填补缺损组织的作用[26-27]。在糖尿病大鼠中,Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ、XⅣ和XⅦ型胶原的表达都有所降低[28]。皮肤的胶原蛋白主要包括Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白,主要分布在皮肤的真皮层[29]。纤连蛋白(fibronectin,FN)是肉芽组织的重要组成成分,研究发现,糖尿病小鼠皮肤中的FN明显减少,外用FN基质类似物能够促进糖尿病小鼠伤口愈合[30]。本研究结果表明,OSM能够增加人皮肤成纤维细胞Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ及Fibronectin的mRNA及蛋白的表达水平,从而起到促进细胞外基质分泌的作用。并且这种作用在使用ERK通路小分子抑制剂PD98059后消失。因此推测OSM促进高糖环境下HDFs细胞外基质分泌的作用可能与OSM上调磷酸化ERK表达有关。但是本实验只涉及体外实验,且不排除OSM可能还具有激活其他信号通路等作用,与OSM有关的相关分子机制还需要借助分子生物学、动物模型等实验进行深入验证。

综上所述,本研究建立了高糖模型,证实了OSM可能通过激活ERK通路,作用于相关转录因子,促进蛋白激酶等多种底物进入细胞核,从而调节CyclinD1、Collagen Ⅰ、Collagen Ⅲ及Fibronectin等相关基因的转录,进而参与HDFs的增殖和细胞外基质分泌等生理过程,缓解高糖对HDFs的抑制状态,为OSM应用于糖尿病慢性难愈性伤口的临床治疗提供参考。

参考文献:

[1] 朱万博. 糖尿病患者创面难愈机制及治疗研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2016, 24(12): 1135-1139. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2016.12.18.
ZHU W B. Research progress of the mechanism and treatment of diabetic non-healing wounds[J]. Chin J Diabetes, 2016, 24(12): 1135-1139. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6187.2016.12.18.

[2] PATEL S, SRIVASTAVA S, SINGH M R, *et al*. Mechanistic insight into diabetic wounds: pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108615. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108615.

[3] SHEDOEVA A, LEAVESLEY D, UPTON Z, *et al*. Wound healing and the use of medicinal plants[J]. Evid-Based Compl Alt, 2019, 2019: 2684108. DOI: 10.1155/2019/2684108.

[4] RODRIGUES M, KOSARIC N, BONHAM C A, *et al*. Wound healing: a cellular perspective[J]. Physiol Rev, 2019, 99(1): 665-706. DOI: 10.1152/physrev.00067.2017.

[5] HAN G, CEILLEY R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments[J]. Adv Ther, 2017, 34(3): 599-610. DOI: 10.1007/s12325-017-0478-y.

[6] HEATHER E D P, DESHKA S F, MICHAEL T L. Fibroblasts and wound healing: An update[J]. Regen Med, 2018, 13(5): 491-495. DOI: 10.2217/rme-2018-0073.

[7] LEFRANCOIS T, MEHTA K, SULLIVAN V, *et al*. Evidence based review of literature on detriments to healing of diabetic foot ulcers[J]. Foot Ankle Surg, 2017, 23(4): 215-224. DOI: 10.1016/j.fas.2016.04.002.

[8] SALAZAR J J, ENNIS W J, KOH T J. Diabetes medications: Impact oninflammation and wound healing[J]. J Diabetes Complicat, 2016, 30(4): 746-752. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2015.12.017.

[9] 王晓雨, 张玉杰, 曲春安, 等. 成纤维细胞在糖尿病患者创伤愈合中作用的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(4): 710-714. DOI: 10.11844/cjcb.2019.04.0021.
WANG X Y, ZHANG Y J, QU C A, *et al*. Research advances of fibroblast in diabetic wound healing[J]. Chin J Cell Biol, 2019, 41(4): 710-714. DOI: 10.11844/cjcb.2019.04.0021.

[10] HERMANNS H M. Oncostatin M and interleukin-31: cytokines, receptors, signal transduction and physiology[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(5): 545-558. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.006.

[11] 黄旭, 陈韵岱, 曹丰. 抑瘤素M的研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2016, 15(12): 940-943. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.12.224.
HUANG X, CHEN Y D, CAO F. Research progress of oncostatin M[J]. Chin J Mult Organ Dis Elder, 2016, 15(12): 940-943. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.12.224.

[12] 王兆鹏, 车妍, 袁园, 等. 抑瘤素M在心脏疾病中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(5): 548-550.
WANG Z P, CHE Y, YUAN Y, *et al*. Research progress of oncostatin M in Heart disease[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2019, 21(5): 548-550.

[13] International diabetes federation: diabetes atlas IDF, 9th edition[EB/OL]. Brussels: International Diabetes Federation, 2019[2019-11-14]. https://www.diabetesatlas.org.

[14] WANG P H, HUANG B S, HORNG H C, *et al*. Wound healing[J]. J Chin Med Assoc, 2018, 81(2): 94-101. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.11.002.

[15] ROGNONI E, WATT F M. Skin cell heterogeneity in development, wound healing, and cancer[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(9): 709-722. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.05.002.

[16] HERGOVITS S, MAIS C, HAAN C, *et al*. Oncostatin M induces RIG-I and MDA5 expression and enhances the double-stranded RNA response in fibroblasts[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(11): 3087-3099. DOI: 10.1111/jcmm.13221.

[17] STEFAN R J. Interleukin-6 family cytokines[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(2): a028415. DOI: 10.1101/cshperspect.a028415.

[18] KUROSAWA T, YAMADA A, TAKAMI M, *et al*. Expression of nephronectin is inhibited by oncostatin M via both JAK/STAT and MAPK pathways[J]. FEBS Open Bio, 2015, 5: 303-307. DOI: 10.1016/j.fob.2015.04.001.

[19] ZHANG X, MA S, ZHANG R, *et al*. Oncostatin M-induced cardiomyocyte dedifferentiation regulates the progression of diabetic cardiomyopathy through B-Raf/Mek/Erk signaling pathway[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016, 48(3): 257-265. DOI: 10.1093/abbs/gmv137.

[20] FRÉDÉRIC T, GUERTON B, ANGINOT A, *et al*. Macrophage-derived oncostatin M contributes to human and mouse neurogenic heterotopic ossifications[J]. JCI Insight, 2017, 2(21): e96034. DOI: 10.1172/jci.insight.96034.

[21] IMAI K, KATO H, TAGUCHI Y, *et al*. Biological effects of shikonin in human gingival fibroblasts via ERK 1/2 signaling pathway[J]. Molecules, 2019, 24(19): 3542. DOI: 10.3390/molecules24193542.

[22] MOZAFFARIAN A, BREWER A W, TRUEBLOOD E S, *et al*. Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis[J]. J Immunol, 2008, 181(10): 7243-7253. DOI: 10.4049/jimmunol.181.10.7243.

[23] SCAFFIDI A K, MUTSAERS S E, MOODLEY Y P, *et al*. Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts[J]. Br J Pharmacol, 2002, 136(5): 793-801. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704769.

[24] 王晓玲. D类细胞周期素在细胞周期中的作用[J]. 国外医学(分子生物学分册), 2002(1): 44-46.
WANG X L. Role of class D cyclins in the cell cycle[J]. J Mol Biol, 2002; 24((1): 44-46.

[25] CHEN C A, CHENG Y C, HWANG J C, *et al*. Cyclin D1 expression in podocytes: regulated by mitogens in collaboration with integrin-extracellular matrix interaction through extracellular signal-regulated kinase[J]. Exp Biol Med Maywood N J, 2012, 237(5): 516-523. DOI: 10.1258/ebm.2012.011156.

[26] TRACY L E, MINASIAN R A, CATERSON E J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2016, 5(3): 119-136. DOI: 10.1089/wound.2014.0561.

[27] 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.

[28] MINOSSI J G, LIMA F O, CARAMORI C A, *et al*. Alloxan diabetes alters the tensile strength, morphological and morphometric parameters of abdominal wall healing in rats[J]. Acta Cir Bras, 2014, 29(2): 118-124. DOI: 10.1590/S0102-86502014000200008.

[29] MAIONE A G, SMITH A, KASHPUR O, *et al*. Altered ECM deposition by diabetic foot ulcer-derived fibroblasts implicates fibronectin in chronic wound repair[J]. Wound Repair Regen, 2016, 24(4): 630-643. DOI: 10.1111/wrr.12437.

[30] BYGD H C, AKILBEKOVA D, MUÑOZ A, *et al*. Poly-L-arginine based materials as instructive substrates for fibroblast synthesis of collagen[J]. Biomaterials, 2015, 63: 47-57. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.05.045.

(**收稿**:2020-11-27;**修回**:2021-01-25)

(编辑 吴培红)