

## 不同浓度葡萄糖诱导皮肤成纤维细胞老化的实验观察

李炳旻<sup>1</sup>, 唐浩文<sup>2</sup>, 马奎<sup>1</sup>, 杨宇光<sup>3</sup>, 张翠萍<sup>1</sup>

<sup>1</sup>解放军总医院医学创新研究部 创伤修复与组织再生研究中心, 北京 100853; <sup>2</sup>解放军总医院第一医学中心 肝胆胰外科医学部, 北京 100853; <sup>3</sup>解放军总医院第四医学中心 皮肤科, 北京 100084

**摘要:** **背景** 衰老是生理或病理过程综合作用的必然结果。研究如何延缓衰老, 尤其是病理性衰老, 可为许多疾病的治疗提供新的思路。而建立老化细胞模型正是衰老相关研究的基石。**目的** 探究含不同浓度葡萄糖的 DMEM 培养液诱导皮肤成纤维细胞老化的效果, 为衰老研究提供实验基础。**方法** 分别采用含 5.5 mmol/L、15 mmol/L、25 mmol/L、35 mmol/L 和 45 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养成纤维细胞, 通过 CCK-8 实验和细胞划痕试验观察细胞增殖、迁移功能的变化; 对细胞进行  $\beta$ -半乳糖苷酶染色, 判断细胞是否发生衰老; 采用 PCR 检测衰老相关 p53/p21 通路中关键效应分子 p53、p21 和 p16 在不同组中的表达水平。**结果** 相较于 5.5 mmol/L 组, 15 mmol/L 组和 25 mmol/L 组成纤维细胞增殖和迁移功能提高, 而 35 mmol/L 组和 45 mmol/L 组细胞增殖和迁移能力显著下降;  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的细胞比例随葡萄糖浓度的升高而增加; 同时, p53、p21 和 p16 的表达与葡萄糖浓度呈正相关。**结论** 高浓度葡萄糖 ( $\geq 35$  mmol/L) 可抑制细胞的生物学功能, 诱导细胞衰老, 其分子机制可能是通过上调 p53/p21 通路引起 p16 表达水平的增高。

**关键词:** 高糖; 细胞衰老; 成纤维细胞;  $\beta$  半乳糖苷酶类; p53 基因

中图分类号: R 751 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2021)01-0094-05 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.01.020

网络出版时间: 2021-02-05 17:05

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20210205.1556.004.html>

引用本文: 李炳旻, 唐浩文, 马奎, 等. 不同浓度葡萄糖诱导皮肤成纤维细胞老化的实验观察 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42 (1): 94-98.

### Senescent effect of different concentrations of glucose on fibroblast

LI Bingmin<sup>1</sup>, TANG Haowen<sup>2</sup>, MA Kui<sup>1</sup>, YANG Yuguang<sup>3</sup>, ZHANG Cuiping<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center for Tissue Repair and Regeneration and Beijing Key Research Laboratory of Skin Injury, Repair and Regeneration, Innovative Medical Research Department of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; <sup>2</sup>Department of Hepatobiliary Surgery, the First Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China.; <sup>3</sup>Department of Dermatology, the Fourth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100084, China

Corresponding author: ZHANG Cuiping. Email: zcp666666@sohu.com

**Abstract:** **Background** Aging is the inevitable result of the comprehensive action of physiological or pathological processes. Research on how to delays aging, especially pathological aging, can provide new ideas for the treatment of many diseases. The establishment of aging cell model is the cornerstone of aging related research. **Objective** To explore the effect of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with different concentrations of glucose on skin fibroblast aging. **Methods** Fibroblasts were cultured in DMEM medium containing different concentrations of glucose (5.5 mmol/L, 15 mmol/L, 25 mmol/L, 35 mmol/L and 45 mmol/L). Cell proliferation and migration were detected by CCK-8 test and cell scratch assay, respectively.  $\beta$ -galactosidase staining was employed to determine the percentage of senescent cell. PCR was used to detect the expression levels of p53, p21 and p16 in each group to elucidate the underlying mechanism. **Results** Compared with the 5.5 mmol/L group, the proliferation and migration of fibroblasts in the 15 mmol/L and the 25 mmol/L groups increased, while significantly decreased in the 35 mmol/L and the 45 mmol/L groups; the proportion of SA- $\beta$ -gal positive cells increased along with the glucose concentration. Meanwhile, the expressions of p53, p21 and p16 were also positively correlated with glucose concentrations. **Conclusion** Excessively high concentration of glucose ( $\geq 35$  mmol/L) inhibits the biological function of cells and induces cell senescence. The pathogenesis is associated with increased expression of p16 via upregulation of p53/ p21 pathway.

**Keywords:** high glucose; cell senescence; fibroblast; beta-galactosidase; p53 gene

**Cited as:** Li BM, Tang HW, Ma K, et al. Senescent effect of different concentrations of glucose on fibroblast [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42 (1): 94-98.

收稿日期: 2020-04-23

基金项目: 国家自然科学基金 (81571905; 81721092); 北京市自然科学基金资助项目 (7204309)

Supported by the National Nature Science Foundation of China (81571905; 81721092); Beijing Natural Science Foundation (7204309)

作者简介: 李炳旻, 女, 博士。研究方向: 糖尿病慢性创面的治疗。Email: libingmin09@163.com

通信作者: 张翠萍, 女, 副研究员。Email: zcp666666@sohu.com

衰老是发生于生物有机体的一个普遍特征<sup>[1]</sup>。在多细胞生物中, 衰老表现为分子水平、细胞水平和组织水平的功能逐渐丧失。衰老是一项不可逆转的自然进程, 越来越多的研究证据表明一些不良因素可加速细胞、组织、甚至机体的衰老, 如感染、缺氧、光老化等<sup>[2]</sup>。近年来, 高糖引起的

细胞衰老在各个器官得到了普遍的证实<sup>[3]</sup>。在慢性高糖环境的作用下,细胞内产生大量活性氧物质(reactive oxygen species, ROS),ROS可加速端粒缩短、引起DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)并导致衰老相关的细胞生长停滞<sup>[4-6]</sup>。成纤维细胞在慢性糖基化过程中,其细胞骨架的Vimentin蛋白是糖基化终产物的作用靶点之一,长期刺激可导致细胞外基质的机械性能及其与细胞的相互作用均被改变,进而影响细胞的生物学功能<sup>[7-9]</sup>。本文旨在比较不同浓度和不同作用时间高糖DMEM培养液对成纤维细胞的老化作用,为高糖诱导成纤维细胞老化的体外模型建立提供一定的参考。

## 材料和方法

**1 实验设备和试剂** CO<sub>2</sub>细胞培养箱,赛默飞公司;荧光显微镜,莱卡公司;Realtime qPCR,赛默飞公司;中性蛋白酶II,北京索莱宝科技有限公司;DMEM低糖培养液,Gibco;DMEM高糖培养液,Gibco;200 g/L葡萄糖溶液,Gibco;Cell Counting Kit-8试剂盒,Dojindo东仁化学科技有限公司;β-半乳糖苷酶染色试剂盒,Sigma;TRIZOL,Invitrogen;FastKingcDNA第一链合成预混试剂,天根生化科技有限公司;Super-RealPreMix Plus (SYBR Green),天根生化科技有限公司。

**2 原代成纤维细胞分离及培养** 皮肤来源于一名20岁健康男性包皮环切术所切除的包皮组织。碘伏浸泡10 min后,用PBS漂洗3~5次,直至漂洗液清亮透明;去除脂肪组织和结缔组织后,将标本剪成1 mm<sup>3</sup>的组织块,置于含0.5%中性蛋白酶II的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中,4℃消化过夜。收集可覆盖3.5 cm培养皿底部的真皮组织块,加入1 mL血清,然后将组织均匀地贴附于T25培养瓶下表面,垂直置于37℃细胞培养箱中1 h,之后将培养瓶翻转平放,缓慢加入少许DMEM培养液,以刚刚浸没组织块为宜。第2天再向瓶中加入少许培养液。之后每3 d换液1次,并在倒置显微镜下观察。约4 d后组织块周围可见少量梭形的细胞爬出,7 d后组织块周围可见大量呈编织状排列的细胞。PBS冲洗,消化,传代,用含10%血清的DMEM培养基传代培养至第5代(P5)。

**3 细胞增殖能力的测定** 本实验采用CCK-8实验对细胞增殖能力进行评估。首先,将成纤维细

胞接种于4个96孔板中,接种细胞密度约为 $2 \times 10^3$ /孔,在培养箱中过夜,使细胞充分贴壁。次日,在96孔板中,根据分组情况,分别给予含5.5 mmol/L、15 mmol/L、25 mmol/L、35 mmol/L和45 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基进行细胞培养,每组设3个复孔。并于1 d、3 d和5 d时,随机抽取一个96孔板进行光密度值(optical density, OD)测定。首先,弃去细胞培养液,将CCK-8溶液与DMEM培养基按1:10的比例混匀后,每孔加入110 μL混合液,同时,在无细胞的孔中加入等量PBS作为空白对照。37℃避光孵育2 h后用酶标仪(Biotek, VT, USA)分别测量每个孔在450 nm波长处的吸光度,即OD值。

**4 细胞迁移能力的测定** 通过划痕实验检测成纤维细胞在不同培养条件下的迁移能力。首先,将成纤维细胞接种在6孔板中,培养12 h,待细胞完全贴壁后更换为分别含5.5 mmol/L、15 mmol/L、25 mmol/L、35 mmol/L和45 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基。待细胞达到90%~100%单层融合时,用200 μL移液枪头划一条直线,PBS洗涤3次后加入不含血清的培养基继续培养,并分别于0 h和24 h时拍摄照片,比较不同组间细胞的迁移情况,并通过细胞重新覆盖的面积评估细胞的迁移能力,其计算公式:(初始空白面积-实时空白面积)/初始空白面积×100%。

**5 细胞衰老判定** β-半乳糖苷酶(senescence-associated β-galactosidase, SA-β-Gal)活性水平上调是细胞衰老的重要特征之一。因此,我们采用细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒(Sigma)检测各组细胞SA-β-gal的表达,从而判断细胞是否发生衰老。通过β-半乳糖苷酶染色,衰老细胞在显微镜下呈现出蓝色。首先,将细胞接种至6孔板中,分别用不同的培养基培养。第3天和第5天时观察SA-β-gal着色情况。吸除培养液,PBS洗涤1次,每孔加入1 mL固定液室温下固定10 min;配制SA-β-gal染色溶液,每孔加入1 mL,封包后37℃水浴过夜。次日于光学显微镜下观察。分别计数蓝色细胞和总细胞数,确定SA-β-gal阳性细胞的比例。

**6 qRT-PCR检测细胞p16、p21和p53的基因表达** 将细胞接种在6孔板中,并在特定的培养基中培养5 d;每孔依次加入1 mL Trizol(Invitrogen),200 μL氯仿,500 μL异丙醇,提取细胞中的RNA;75%乙醇洗涤纯化RNA后风干;加入DEPC水溶解沉淀后,用分光光度计测量各组RNA浓度;使

用反转录试剂盒 (FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix) 合成 cDNA, 再分别加入 GAPDH、p53、p21 和 p16 引物进行基因扩增。

7 统计学分析 数据采用 SPSS Statistics(IBM, Armonk, NY) 进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett-*t* 法及 SNK 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 高糖环境导致成纤维细胞增殖能力下降

CCK-8 实验发现, 与 5.5 mmol/L 组相比, 随着葡萄糖浓度的升高, 成纤维细胞的增殖能力逐渐增高, 并于 25 mmol/L 时达到顶峰; 当给予更高浓度的葡萄糖环境 ( $\geq 35$  mmol/L) 进行培养时, 成纤维细胞的增殖能力逐渐下降。该结果说明适当的高糖环境 (25 mmol/L) 可促进成纤维细胞的增殖, 而过高的葡萄糖浓度 ( $\geq 35$  mmol/L) 则会对成纤维细胞的增殖产生抑制作用。第 1 天、第 3 天时, 35 mmol/L 和 45 mmol/L 组的 OD 值与 5.5 mmol/L 组比较无统计学差异; 而第 5 天时 35 mmol/L 和 45 mmol/L 组 OD 值低于 5.5 mmol/L 组 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。说明随着高糖环境作用时间的延长, 成纤维细胞的增殖能力受损更加显著。

2 高糖环境损害成纤维细胞的迁移能力 划痕试验发现, 当葡萄糖浓度为 15 mmol/L 和 25 mmol/L 时, 成纤维细胞的迁移能力较 5.5 mmol/L 时提高; 而当葡萄糖浓度  $\geq 35$  mmol/L 时, 成纤维细胞的迁移能力明显下降 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

### 3 高糖环境使成纤维细胞 SA- $\beta$ -gal 表达水平升高

当不同葡萄糖浓度的 DMEM 培养液作用第 3 天时, 各组  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的成纤维细胞均较少, 差异无统计学意义。而第 5 天时, 采用 35 mmol/L 和 45 mmol/L 葡萄糖浓度 DMEM 培养液培养的成纤维细胞中  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性的比例显著增加 ( $P < 0.01$ ) (图 3)。

4 高糖环境导致成纤维细胞 p53、p21 和 p16 表达上调 与 5.5 mmol/L 组相比, 35 mmol/L 组和 45 mmol/L 组成纤维细胞 p53、p21 和 p16 的表达均上调 ( $P < 0.05$ )。说明当培养液中葡萄糖浓度  $\geq 35$  mmol/L 时, 成纤维细胞出现衰老相关表型 (p16 表达上调) (图 4)。由此推测, 高糖诱导成纤维细胞老化的分子机制可能是通过上调 p53/p21 通路, 进而引起 p16 表达水平的升高。

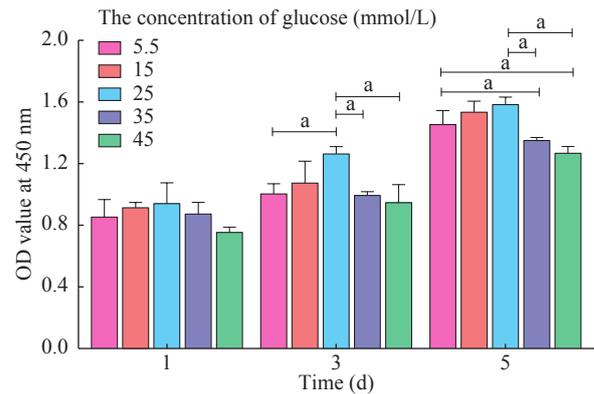


图 1 CCK-8 实验中各组细胞在 1 d、3 d、5 d 时 OD 值的变化 ( $P < 0.05$ )

Fig.1 OD value of each group at day 1, day 3 and day 5 by CCK-8 assay ( $P < 0.05$ )

## 讨论

细胞衰老是一种自然发生的、不可避免的过程<sup>[10]</sup>。然而, 当细胞受到持续性促增殖信号刺激, 或端粒和线粒体功能损害时<sup>[11-12]</sup>, 亦会出现衰老现象, 这是细胞对损伤的反应。损伤为一过性时, 细胞会出现短暂的细胞周期阻滞, 伴 p53 及其下游信号分子 p21 表达上调。应激解除后细胞即可恢复增殖, 而不会发生细胞衰老。当损伤持续存在时, p53/p21 下游的 CDKN2A 位点激活, 产生大量 p16, 进而导致不可逆的细胞生长停滞。在这一阶段, DNA 发生持续性损伤, 此时细胞出现特征性的衰老细胞相关表型<sup>[13]</sup>, 包括: 1) 衰老相关异染色质位点激活; 2) DNA 损伤; 3)  $\beta$ 半乳糖苷酶上调; 4) p16 表达上调; 5) 端粒缩短; 6) 细胞增殖能力下降。

在本研究中, 我们发现当葡萄糖浓度  $\geq 35$  mmol/L 时, 成纤维细胞的增殖和迁移能力显著下降。 $\beta$ -半乳糖苷酶在 3 d 时差异不显著, 而 5 d 时可见显著组间差异, 说明该指标特异性强, 可作为监测细胞是否发生衰老的特征性指标。Chen 等<sup>[14]</sup>报道, 4 d 以上的持续性刺激方可导致细胞分裂进程停滞及不可逆性衰老进程的发生<sup>[15]</sup>。PCR 结果表明, 在高糖环境的作用下, 成纤维细胞 p53、p21 和 p16 的表达上调, 说明 p53/p21 通路可能是高糖环境导致细胞老化的作用靶点。总之, 适当的葡萄糖浓度 (25 mmol/L) 可提高成纤维细胞的增殖和迁移功能, 而过高浓度 ( $\geq 35$  mmol/L) 会抑制成纤维细胞的生物学功能, 诱导细胞发生老化, 且该作用呈时间和浓度依赖性。本研究为高糖诱导成纤维细胞衰老体外模型的建立提供了一定的理论依据, 该模型可用于拮

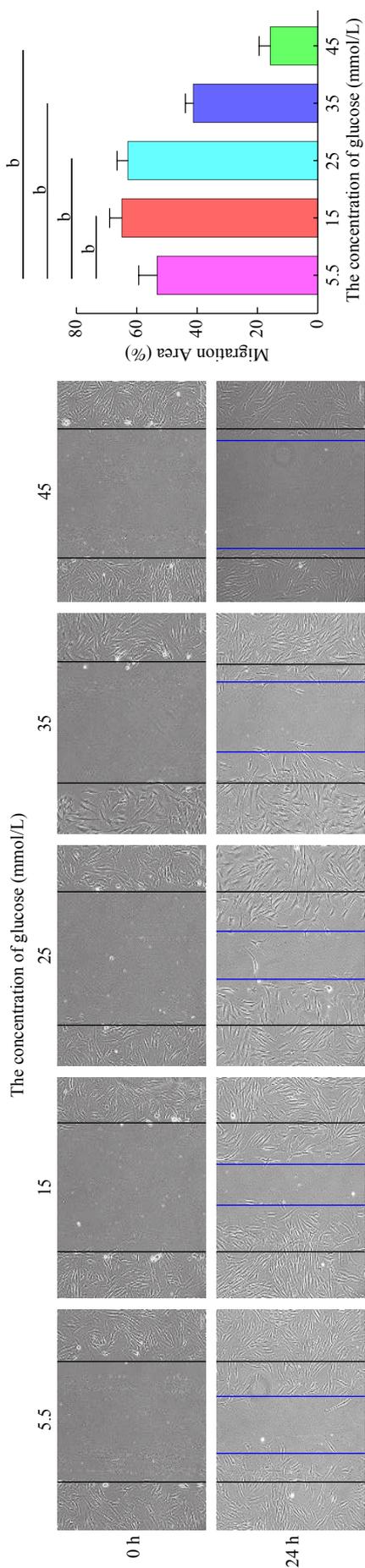


图 2 不同浓度葡萄糖作用下细胞划痕试验 ( $P < 0.01$ )  
 Fig.2 Scratch assay results of fibroblasts treated by different concentrations of glucose ( $P < 0.01$ )

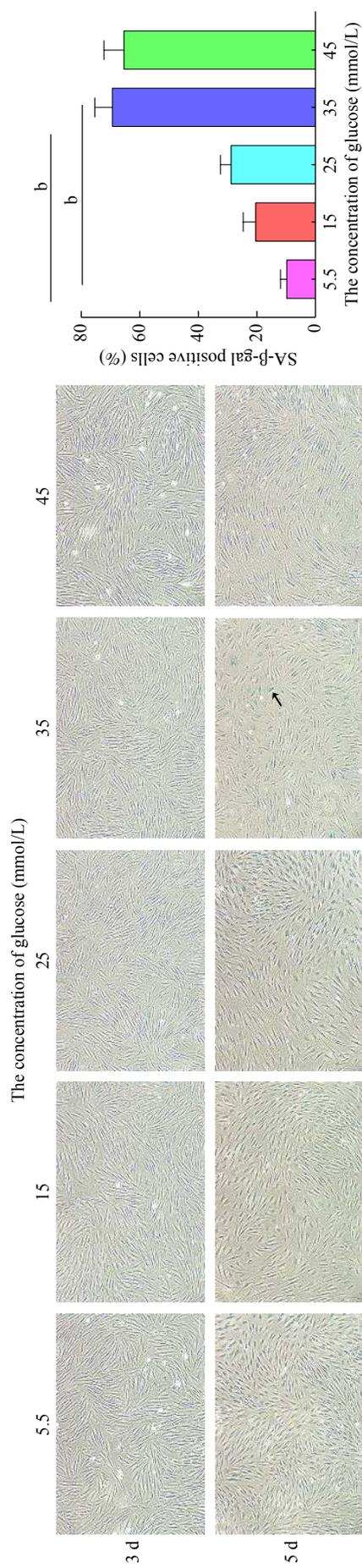


图 3 成纤维细胞 β-半乳糖苷酶染色结果。箭头处为典型 β-半乳糖苷酶染色阳性的细胞 ( $P < 0.01$ )  
 Fig.3 Images of fibroblasts treated by different concentrations of glucose under SA-β-gal staining. The arrow indicates a typical β-galactosidase staining positive cell ( $P < 0.01$ )

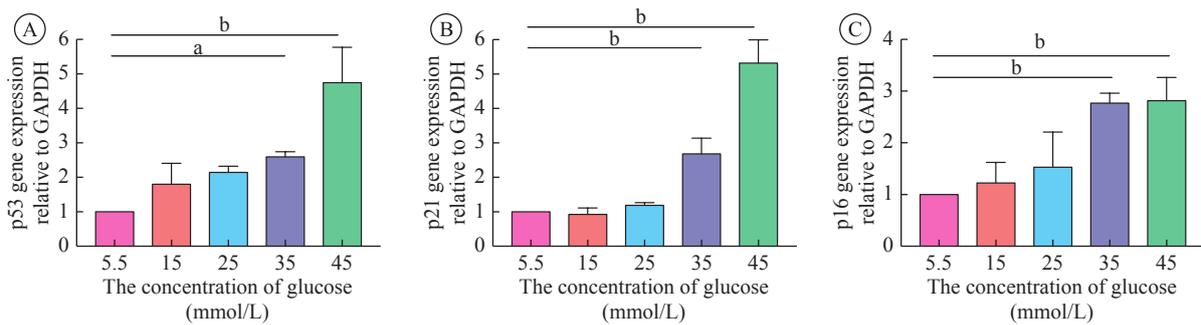


图 4 不同浓度葡萄糖作用下 (A) p53、(B) p21 和 (C) p16 的 PCR 结果 ( $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ )

Fig.4 PCR result of (A) p53, (B) p21 and (C) p16 with different concentrations of glucose ( $^aP<0.05$ ,  $^bP<0.01$ )

抗高糖引发的细胞衰老的药物研究体外实验，或高糖引发细胞衰老机制的进一步探索。

#### 参考文献

- Tabibzadeh S. Cell-centric hypotheses of aging [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26: 1-49.
- Kaur J, Farr JN. Cellular senescence in age-related disorders [J]. *Transl Res*, 2020, 226: 96-104.
- Bian X, Li B, Yang J, et al. Regenerative and protective effects of dMSC-sEVs on high-glucose-induced senescent fibroblasts by suppressing RAGE pathway and activating Smad pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11 (1): 166.
- Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, et al. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling [J]. *Acta Physiol Scand*, 2004, 182 (4): 321-331.
- Buranasin P, Mizutani K, Iwasaki K, et al. High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (8): e0201855.
- Cadau S, Leoty-Okombi S, Pain S, et al. In vitro glycation of an endothelialized and innervated tissue-engineered skin to screen anti-AGE molecules [J]. *Biomaterials*, 2015, 51: 216-225.
- Kueper T, Grune T, Muhr GM, et al. Modification of vimentin: a general mechanism of nonenzymatic glycation in human skin [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1126: 328-332.
- Kueper T, Grune T, Prah S, et al. Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (32): 23427-23436.
- Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts [J]. *J Wound Care*, 2013, 22 (8): 407-408, 410-412.
- Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of in vivo senescence [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15 (7): 397-408.
- Demidenko ZN, Blagosklonny MV. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7 (21): 3355-3361.
- Childs BG, Durik M, Baker DJ, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (12): 1424-1435.
- He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease [J]. *Cell*, 2017, 169 (6): 1000-1011.
- Chen X, Zhang W, Gao YF, et al. Senescence-like changes induced by expression of p21 (waf1/Cip1) in NIH3T3 cell line [J]. *Cell Res*, 2002, 12 (3-4): 229-233.
- Dai CY, Enders GH. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (13): 1613-1622.
- Chen M, Zhou L, Liao Z, et al. Sevoflurane Inhibited Osteosarcoma Cell Proliferation And Invasion Via Targeting miR-203/WNT2B/Wnt/ $\beta$ -Catenin Axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 9505-9515.
- 丁锦, 詹乔乔, 何莲芝, 等.  $\beta$ -catenin、Wnt3a和Lgr5在不同宫颈病变组织中的表达及其意义 [J]. *皖南医学院学报*, 2017, 36 (5): 436-439.
- Tanaka H, Kawaguchi M, Shoda S, et al. Nuclear Accumulation of  $\beta$ -Catenin in Cancer Stem Cell Radioresistance and Stemness in Human Colon Cancer [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39 (12): 6575-6583.
- 张丽君, 王可, 王艺璇, 等. 模拟失重条件下Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路调节成骨细胞功能的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2019, 40 (3): 290-292.

(上接 93 页)