

·慢性难愈性创面·

短暂高糖环境暴露对人真皮微血管内皮细胞生物学行为的影响

乔亮 杨惠忠 李学川 黄晓琴 原博 周增丁



【摘要】 目的 观察短暂高糖环境暴露对体外培养人真皮微血管内皮细胞生物学行为的影响。方法 本研究所有检测指标对应的细胞分组及处理如下:将第 4 代人真皮微血管内皮细胞按随机数字表法分成 3 组,每组 12 孔。对照组细胞采用含 5 mmol/L D-葡萄糖的完全培养液培养 7 d;短暂高糖组细胞在含 30 mmol/L D-葡萄糖的完全培养液中培养 2 d,再改用含 5 mmol/L D-葡萄糖的完全培养液继续培养 5 d;长时高糖组细胞采用含 30 mmol/L D-葡萄糖的完全培养液培养 7 d。(1)采用倒置光学显微镜观察对照组和长时高糖组培养 7 d 以及短暂高糖组培养 2、7 d 细胞形态学变化。(2)培养 0、2、4、7 d,采用细胞存活率分析计数器检测细胞增殖率。(3)培养 2 d 后进行划痕实验,划痕后继续培养,于划痕后 0、24、48、72、96、120 h 测量划痕面积,计算后 5 个时相点细胞迁移率。(4)培养 0、2、4、7 d,采用细胞分析仪检测细胞凋亡率。(5)培养 7 d 后再在基质胶上培养 24 h,采用倒置光学显微镜观察血管样结构形成情况,并计算血管样结构长度、分叉点数量。(6)培养 2、4、7 d,采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测血管化相关基因基质金属蛋白酶组织抑制剂 3 (TIMP-3) mRNA 表达。对数据行析因设计方差分析、重复测量方差分析、单因素方差分析、LSD 检验。结果 (1)对照组细胞培养 7 d,细胞呈卵圆形,铺路石样排列。短暂高糖组细胞培养 2 d,形态变细长,排列丧失铺路石样;培养 7 d 仍保持细长,丧失铺路石样排列。长时高糖组细胞培养 7 d,形态变细长,排列丧失铺路石样。(2)培养 0 d,3 组细胞增殖率差异无统计学意义 ($F = 0.23, P > 0.05$)。培养 2 d,短暂高糖组和长时高糖组细胞增殖率相近 ($P > 0.05$),且均低于对照组 (P 值均小于 0.01);培养 4、7 d,短暂高糖组和对照组细胞增殖率相近 (P 值均大于 0.05),且均高于长时高糖组 (P 值均小于 0.01)。(3)划痕后 24 ~ 120 h,短暂高糖组和长时高糖组细胞迁移率均相近 (P 值均大于 0.05),且均低于对照组 (P 值均小于 0.01)。(4)培养 0 d,3 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($F = 0.78, P > 0.05$)。培养 2 d,短暂高糖组和长时高糖组细胞凋亡率相近 ($P > 0.05$),且均高于对照组 (P 值均小于 0.01);培养 4、7 d,短暂高糖组和对照组细胞凋亡率相近 (P 值均大于 0.05),且均低于长时高糖组 (P 值均小于 0.01)。(5)短暂高糖组和长时高糖组细胞形成血管样结构长度分别为 $(1.84 \pm 0.10) \times 10^5$ 、 $(1.82 \pm 0.11) \times 10^5 \mu\text{m}$ ($P > 0.05$),均短于对照组的 $(2.75 \pm 0.23) \times 10^5 \mu\text{m}$ (P 值均小于 0.01);短暂高糖组和长时高糖组细胞形成血管样结构分叉点数量分别为 (43 ± 5) 、 (46 ± 8) 个 ($P > 0.05$),均少于对照组的 (103 ± 21) 个 (P 值均小于 0.01)。(6)培养 2、4、7 d,短暂高糖组和长时高糖组细胞 TIMP-3 的 mRNA 表达量相近 (P 值均大于 0.05),且均低于对照组 (P 值均小于 0.05)。结论 短暂高糖环境暴露能诱导体外培养的人真皮微血管内皮细胞形态、迁移和血管形成发生“代谢记忆”从而导致其产生持久的生物学行为变化,其机制可能与调控血管化相关基因发生改变有关。

【关键词】 糖尿病; 细胞增殖; 细胞运动; 细胞凋亡; 微血管内皮细胞; 新生血管化; 难愈性创面

基金项目:国家自然科学基金(81272112)

Effects of transient exposure to high glucose on biological behaviors of human dermal microvascular endothelial cells Qiao Liang, Yang Huizhong, Li Xuechuan, Huang Xiaojin, Yuan Bo, Zhou Zengding. Department of Burns and Plastic Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China
Corresponding author: Qiao Liang, Email: ql10727@rjh.com.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.02.004

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形科

通信作者:乔亮,Email:ql10727@rjh.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the effects of transient exposure to high glucose on biological behaviors of human dermal microvascular endothelial cells cultured in vitro. **Methods** The dividing method and treatment of cells for the detection of all indexes in this study were as follows. Human dermal microvascular endothelial cells of the 4th passage were divided into 3 groups according to the random number table, with 12 wells in each group. Cells in control group (C) were cultured with complete culture solution containing 5 mmol/L D-glucose for 7 d. Cells in transient high glucose group (THG) were cultured with complete culture solution containing 30 mmol/L D-glucose for 2 d and complete culture solution containing 5 mmol/L D-glucose for 5 d. Cells in prolonged high glucose group (PHG) were cultured with complete culture solution containing 30 mmol/L D-glucose for 7 d. (1) The cell morphology in groups C and PHG on culture day 7 and that in group THG on culture day 2 and 7 was observed by inverted optical microscope. (2) On culture day 0, 2, 4, and 7, cell proliferation rate was determined by cell viability analyzing counter. (3) After culture day 2, the scratch experiment was performed, and the cells were further cultured. At post scratch hour (PSH) 0, 24, 48, 72, 96, and 120, the scratch area was measured, and the cell migration rates of the latter 5 time points were calculated. (4) On culture day 0, 2, 4, and 7, the cell apoptosis rate was determined by cell analyzer. (5) Cells were seeded into Matrigel to culture for 24 h after culture day 7. The formation of vessel-like structure was observed by inverted optical microscope. The length and number of branch point of vessel-like structure were calculated. (6) On culture day 2, 4, and 7, mRNA expression of vascularization-related gene tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 (TIMP-3) was determined with real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Data were processed with analysis of variance of factorial design, analysis of variance for repeated measurement, one-way analysis of variance, and LSD test. **Results** (1) Cells in group C exhibited ovary shape in cobble stone order on culture day 7. Cells in group THG exhibited long ovary shape and lost cobble stone order on culture day 2 and kept the same changes on culture day 7. Cells in group PHG exhibited long ovary shape and lost cobble stone order on culture day 7. (2) On culture day 0, there was no significant difference in cell proliferation rate among the 3 groups ($F = 0.23, P > 0.05$). On culture day 2, cell proliferation rates in groups THG and PHG were similar ($P > 0.05$), which were significantly lower than the cell proliferation rate in group C (with P values below 0.01). On culture day 4 and 7, the cell proliferation rates in groups THG and C were similar (with P values above 0.05), which were significantly higher than those in group PHG (with P values below 0.01). (3) At PSH 24–120, the cell migration rates in groups THG and PHG were similar (with P values above 0.05), which were significantly lower than those in group C (with P values below 0.01). (4) On culture day 0, there was no statistically significant difference in cell apoptosis rate among the 3 groups ($F = 0.78, P > 0.05$). On culture day 2, cell apoptosis rates in groups THG and PHG were similar ($P > 0.05$), which were significantly higher than the cell apoptosis rate in group C (with P values below 0.01). On culture day 4 and 7, the cell apoptosis rates in groups THG and C were similar (with P values above 0.05), which were significantly lower than those in group PHG (with P values below 0.01). (5) The length of vessel-like structure of cells in group THG was $(1.84 \pm 0.10) \times 10^5 \mu\text{m}$, close to $(1.82 \pm 0.11) \times 10^5 \mu\text{m}$ in group PHG ($P > 0.05$), both significantly shorter than $(2.75 \pm 0.23) \times 10^5 \mu\text{m}$ in group C (with P values below 0.01). The numbers of branch point of vessel-like structure of cells in groups THG and PHG were 43 ± 5 and 46 ± 8 respectively, which were close to each other ($P > 0.05$) and both significantly less than 103 ± 21 in group C (with P values below 0.01). (6) On culture day 2, 4, and 7, mRNA expressions of TIMP-3 of cells in groups THG and PHG were similar (with P values above 0.05), which were significantly lower than those in group C (with P values below 0.05). **Conclusions** Transient exposure to high glucose can cause metabolic memory of morphology, migration, and angiogenesis in human dermal microvascular endothelial cells cultured in vitro, resulting in sustained changes in biological behaviors. The mechanism may be related to the changes of vascularization-related genes.

【Key words】 Diabetes mellitus; Cell proliferation; Cell movement; Apoptosis; Microvascular endothelial cells; Neovascularization; Refractory wound

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81272112)

已知糖尿病溃疡创面难愈与潜在的神经病变、血管化不足和组织缺氧密切相关^[1]。流行病学资料提示慢性高血糖会使糖尿病并发症进行性发展,严格控制血糖能明显减缓糖尿病神经血管病变、视网膜病变和其他心血管病变等并发症加剧进程^[2]。因此,多年来绝大多数研究都聚焦在慢性高血糖的直

接损伤效应^[3]。20 世纪末,针对 1 型糖尿病患者的糖尿病控制和并发症试验和针对 2 型糖尿病患者的英国糖尿病干预和并发症流行病学研究^[4]证明,血糖控制能减少微血管并发症的发病率。但是后续针对上述患者中的 2 型糖尿病患者的长期随访显示,从研究开始即接受严格血糖控制的患者并发症减

少,而接受常规胰岛素治疗的患者血糖控制不佳;只要有一段时间血糖较高即短暂高糖环境暴露,即使后续再严格控制血糖亦会产生持续的高并发症危险,这种现象被称为“代谢记忆”^[5]。临床也观察到围手术期血糖短暂升高的非糖尿病患者术后创面感染等并发症发生率明显升高,术后创面护理需求增加^[6],佐证了“代谢记忆”现象的存在。因此,探索“代谢记忆”在糖尿病创面中的作用及发生机制,有助于更好地了解糖尿病创面的难愈机制及寻找合适的治疗手段。

创面愈合过程中的一个重要标志是血管化。真皮微血管内皮细胞从静息状态被激活后,进一步增殖、迁移、分化,从而形成新生血管。新生血管形成和成熟过程中各个环节紧密联系,任何一个环节出现问题都会造成血管化障碍,导致创面愈合延迟甚至不愈。既往研究证明,糖尿病创面愈合过程中存在新生血管化障碍,表现为功能性新生血管密度降低。同时笔者亦研究得出,持续高糖环境暴露会抑制真皮微血管内皮细胞迁移和形成血管样结构的能力^[3,7-9]。为此,本研究拟探讨短暂高糖环境暴露是否能诱导真皮微血管内皮细胞产生“代谢记忆”而致其生物学行为发生持续性改变。

1 材料与方法

1.1 主要材料来源

健康成人真皮微血管内皮细胞、Trizol 试剂购自美国 Life Technologies 公司, D-葡萄糖、M131 培养液、微血管内皮细胞生长添加剂、黏附分子蛋白、青霉素、链霉素购自美国 Gibco 公司, Muse[®]膜联蛋白 V 细胞凋亡检测试剂盒和 Muse[®]细胞分析仪购自美国 Millipore 公司, 基质胶购自美国 BD 公司, SYBR Green 荧光定量试剂盒、互补 DNA 反转录试剂盒购自美国 Qiagen 公司。Vi-CELL 型细胞存活率分析计数器购自美国 Beckman Coulter 公司, TE300 型倒置光学显微镜和 Qimaging 型数码成像冷图像传感器购自日本尼康公司, ViiATM 7 型实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 细胞培养

取人真皮微血管内皮细胞,置于加有体积分数 5% 微血管内皮细胞生长添加剂、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的含 5 mmol/L D-葡萄糖的 M131 培养液(以下称完全培养液)中,在 37 ℃ 和体积分数 5% 二氧化碳条件下培养,每 2 天更换 1 次培养液。当细胞生长至 70% 融合时,胰蛋白酶消化传

代。取第 4 代于对数生长期生长良好的细胞,以每孔 4×10^4 个的密度接种在铺有黏附分子蛋白的 6 孔板上,加入完全培养液后在 37 ℃ 和体积分数 5% 二氧化碳条件下培养 48 h。随后弃培养液开始以下实验。

1.3 细胞形态学观察

取细胞以每孔 4×10^4 个的密度接种于 6 孔板,采用随机数字表法分为短暂高糖组、长时高糖组及对照组,每组 12 孔。短暂高糖组:先添加 25 mmol/L D-葡萄糖使完全培养液中 D-葡萄糖最终物质的量浓度为 30 mmol/L(方法下同),培养 2 d 后改为用含 5 mmol/L D-葡萄糖的完全培养液继续培养 5 d;长时高糖组:采用含 30 mmol/L D-葡萄糖的完全培养液培养 7 d;对照组:采用含 5 mmol/L D-葡萄糖的完全培养液培养 7 d。后续实验细胞密度、分组、样本量及所用培养液与本实验相同。采用 40 倍倒置光学显微镜观察对照组和长时高糖组培养 7 d 及短暂高糖组培养 2、7 d 细胞形态学变化,并用冷图像传感器摄影记录。

1.4 细胞增殖率

另取细胞分组及培养,分别在培养 0、2、4、7 d 收集细胞悬液(每个时相点样本数为 3),采用细胞存活率分析计数器检测细胞增殖率。

1.5 细胞迁移率

另取细胞分组及培养 2 d 后,用规格为 200 μ L 的无菌移液器枪头在培养孔底部划痕。划痕后继续培养,于划痕后 0、24、48、72、96、120 h,在 40 倍倒置光学显微镜下用显微成像系统抓取图像,采用 Photoshop CS3 的 FoveaRro 4.0 插件计算细胞划痕面积。计算细胞迁移率,即(划痕 0 h 划痕面积 - 其余时相点划痕面积) \div 划痕 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.6 细胞凋亡率

另取细胞分组及培养,分别在培养 0、2、4、7 d 收集细胞培养液 2 mL(每个时相点样本数为 3)和胰蛋白酶消化的贴壁细胞 2 mL 合在一起,300 $\times g$ 离心 5 min。取 50 μ L 离心后的细胞悬液和 50 μ L 完全培养液,添加 100 μ L 膜联蛋白 V 充分混合,避光室温孵育 20 min,通过细胞分析仪检测细胞凋亡率。

1.7 细胞形成血管样结构能力

另取细胞分组及培养 7 d 后,按每孔 4×10^4 个的密度接种在包被基质胶的 24 孔板上,每组 12 孔。培养 24 h 后,40 倍倒置光学显微镜下同 1.5 抓取图像及处理后,计算图像中细胞形成血管样结构长度、分叉点数量。本实验重复 3 次。

1.8 细胞血管化相关基因 mRNA 表达

用实时荧光定量 RT-PCR 法检测。另取细胞分组及培养,在培养 2、4、7 d,每组收集 4 管细胞悬液,每支管中加入 Trizol 试剂提取总 RNA,用互补 DNA 反转录试剂盒合成互补 DNA,反转录产物用 SYBR Green 荧光定量试剂盒和实时荧光定量 PCR 仪行 PCR。基质金属蛋白酶组织抑制剂 3(TIMP-3)上游引物为 5'-CAGTCATGTCCAACCCAGAA-3',下游引物为 5'-GGACATCCATGAATGCACAG-3',大小 186 bp;内参照肌动蛋白上游引物为 5'-CTGGAACGGT-GAAGGTGACA-3',下游引物为 5'-AAGGGACTTCCT-GTAACAATGCA-3',大小为 98 bp。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 120 s;95 ℃ 变性 15 s,55 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。用 Δ 循环阈值(Ct)法处理结果,计算 TIMP-3 mRNA 表达量,即 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.9 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 9.2 统计软件对组间总体比较行析因设计方差分析、重复测量方差分析、单因素方差分析,组间两两比较行 LSD 检验(软件自动略去该统计量值)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态

对照组细胞培养 7 d,呈卵圆形,排列呈铺路石样。短暂高糖组细胞培养 2 d,形态细长,排列丧失铺路石样;培养 7 d 仍保持细长,丧失铺路石样排

列。长时高糖组细胞培养 7 d,形态细长,排列丧失铺路石样。见图 1。

2.2 细胞增殖率

培养 0 d,3 组细胞增殖率差异无统计学意义(P > 0.05)。培养 2 d,短暂高糖组和长时高糖组细胞增殖率相近(P > 0.05),均低于对照组(P 值均小于 0.01);培养 4、7 d,短暂高糖组和对照组细胞增殖率相近(P 值均大于 0.05),且均高于长时高糖组(P 值均小于 0.01)。见表 1。

表 1 各组人真皮微血管内皮细胞培养各时相点增殖率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0 d	2 d	4 d	7 d
对照组	12	81.1 ± 2.2	77.8 ± 2.3	81.6 ± 2.7	81.4 ± 3.2
		81.6 ± 1.4	45.3 ± 1.6 ^a	73.7 ± 1.2	79.0 ± 2.9
短暂高糖组	12	82.6 ± 1.4	44.0 ± 1.5 ^a	33.9 ± 2.8 ^{ab}	31.0 ± 1.8 ^{ab}
		F 值	0.23	109.35	119.19
P 值		0.79	<0.01	<0.01	<0.01

注: F 值、P 值为组间各时相点总体比较所得;处理因素主效应, F = 230.63, P < 0.01;时间因素主效应, F = 76.57, P < 0.01;两者交互作用, F = 50.41, P < 0.01;与对照组比较,^aP < 0.01;与短暂高糖组比较,^bP < 0.01

2.3 细胞迁移率

划痕后 24 ~ 120 h,短暂高糖组和长时高糖组细胞迁移率均相近(P 值均大于 0.05),且均低于对照组(P 值均小于 0.01)。见表 2。

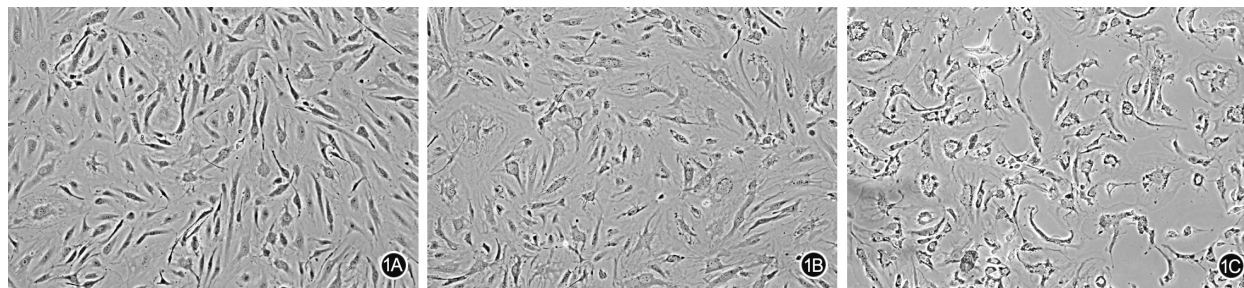


图 1 各组人真皮微血管内皮细胞培养 7 d 形态观察 倒置光学显微镜 ×40。1A. 对照组细胞呈卵圆形,排列呈铺路石样;1B. 短暂高糖组细胞形态细长,丧失铺路石样排列;1C. 长时高糖组细胞细长,丧失铺路石样排列

表 2 各组人真皮微血管内皮细胞划痕后 24 ~ 120 h 的迁移率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
对照组	12	25.8 ± 2.3	45.7 ± 1.9	61.9 ± 3.2	77.1 ± 3.5	94.0 ± 2.3
短暂高糖组	12	15.8 ± 1.9 ^a	30.7 ± 2.7 ^a	46.2 ± 4.6 ^a	51.7 ± 1.4 ^a	65.0 ± 2.0 ^a
长时高糖组	12	17.2 ± 2.3 ^a	29.8 ± 2.1 ^a	43.4 ± 2.6 ^a	54.1 ± 3.3 ^a	61.0 ± 3.8 ^a
F 值		6.03	15.77	7.79	23.48	40.75
P 值		0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: F 值、P 值为组间各时相点总体比较所得;处理因素主效应, F = 80.53, P < 0.01;时间因素主效应, F = 171.22, P < 0.01;两者交互作用, F = 3.26, P < 0.01;与对照组比较,^aP < 0.01

2.4 细胞凋亡率

培养 0 d, 3 组细胞凋亡率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。培养 2 d, 短暂高糖组和长时高糖组细胞凋亡率相近 ($P > 0.05$), 且均高于对照组 (P 值均小于 0.01); 培养 4、7 d, 短暂高糖组和对照组细胞凋亡率相近 (P 值均大于 0.05), 且均低于长时高糖组 (P 值均小于 0.01)。见表 3。

表 3 各组人真皮微血管内皮细胞培养各时相点凋亡率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0 d	2 d	4 d	7 d
对照组	12	4.90 ± 0.42	4.16 ± 0.33	4.96 ± 0.36	5.99 ± 0.40
		5.23 ± 0.30	8.63 ± 0.23 ^a	6.50 ± 0.42	8.29 ± 0.43
短暂高糖组	12	4.59 ± 0.38	9.08 ± 0.21 ^a	21.96 ± 1.50 ^{ab}	42.86 ± 1.28 ^{ab}
		0.78	89.16	78.44	760.99
<i>F</i> 值					
<i>P</i> 值		0.48	<0.05	<0.05	<0.05

注: F 值、 P 值为组间各时相点总体比较所得; 处理因素主效应, $F = 583.68, P < 0.01$; 时间因素主效应, $F = 269.51, P < 0.01$; 两者交互作用, $F = 213.72, P < 0.01$; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与短暂高糖组比较, ^b $P < 0.01$

2.5 细胞形成血管样结构能力

基质胶上培养 24 h 后, 短暂高糖组和长时高糖组细胞形成血管样结构长度相近 ($P > 0.05$), 且均短于对照组 (P 值均小于 0.01); 短暂高糖组和长时高糖组细胞分叉点数量相近 ($P > 0.05$), 且均少于对照组 (P 值均小于 0.01)。见图 2、表 4。

2.6 细胞血管化相关基因 mRNA 表达

培养 2、4、7 d, 短暂高糖组和长时高糖组细胞 TIMP-3 的 mRNA 表达量相近 (P 值均大于 0.05), 且均低于对照组 (P 值均小于 0.05)。见表 5。

3 讨论

皮肤损伤后, 残存的真皮微血管内皮细胞增殖、

表 4 各组人真皮微血管内皮细胞在基质胶上培养 24 h 后形成血管样结构长度和分叉点比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	长度 ($\times 10^5 \mu\text{m}$)	分叉点 (个)
对照组	12	2.75 ± 0.23	103 ± 21
短暂高糖组	12	1.84 ± 0.10 ^a	43 ± 5 ^a
长时高糖组	12	1.82 ± 0.11 ^a	46 ± 8 ^a
<i>F</i> 值		11.37	6.86
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

注: F 值、 P 值为组间各指标总体比较所得; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$

表 5 各组人真皮微血管内皮细胞培养各时相点基质金属蛋白酶组织抑制剂 3 的 mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	2 d	4 d	7 d
对照组	12	1.013 ± 0.111	1.223 ± 0.038	1.150 ± 0.051
		0.610 ± 0.042 ^a	0.483 ± 0.012 ^a	0.447 ± 0.018 ^a
短暂高糖组	12	0.650 ± 0.015 ^a	0.430 ± 0.020 ^a	0.367 ± 0.088 ^a
		10.33	291.75	183.13
<i>P</i> 值		0.01	<0.01	<0.01

注: F 值、 P 值为组间各时相点总体比较所得; 处理因素主效应, $F = 321.85, P < 0.01$; 时间因素主效应, $F = 5.30, P = 0.01$; 两者交互作用, $F = 9.74, P < 0.01$; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$

迁移和分化, 采用芽生的方式形成新生血管, 是创面愈合中不可缺少的必要环节。有关糖尿病创面中真皮微血管内皮细胞的功能状态是目前研究的热点。多篇文献证实持续高糖环境暴露能抑制真皮微血管内皮细胞的迁移和血管形成^[3,6]。本研究的创新点在于短暂(2 d)的高糖环境暴露后, 将细胞恢复至正常培养环境中继续培养 5 d, 观察短暂高糖环境暴露对真皮微血管内皮细胞迁移率及血管形成的影响。

既往研究显示高糖环境下, 真皮微血管内皮细胞形态出现狭长、丧失铺路石样排列的改变。本研究不仅证实了上述现象, 还显示真皮微血管内皮细胞在短暂高糖环境下培养 2 d 后, 即使换成正常糖

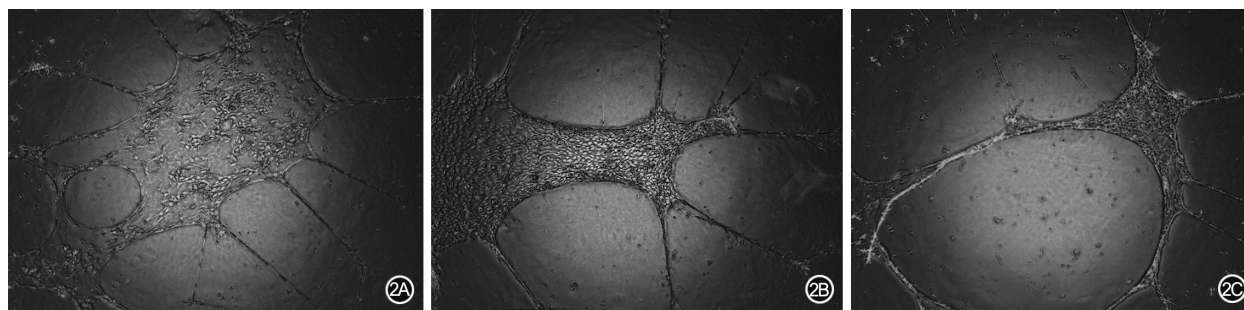


图 2 各组人真皮微血管内皮细胞在基质胶上培养 24 h 后形成血管样结构情况 倒置光学显微镜 $\times 40$ 。2A. 对照组细胞血管样结构长度较长, 分叉点数量较多; 2B. 短暂高糖组血管样结构长度短于图 2A, 分叉点数量少于图 2A; 2C. 长时高糖组血管样结构情况与图 2B 相近

浓度的培养液继续培养,细胞形态也不会恢复原状。提示短暂高糖环境暴露会让真皮微血管内皮细胞形态出现“代谢记忆”。文献报道高糖环境下,真皮微血管内皮细胞增殖率下降、凋亡率增加^[8]。本研究显示,短暂高糖环境暴露后恢复正常糖环境培养,真皮微血管内皮细胞的增殖和凋亡水平都恢复到了正常状态,提示高糖对细胞增殖率和凋亡率的影响具有可逆性;短暂高糖能抑制真皮微血管内皮细胞的迁移,恢复正常培养环境,其迁移能力仍处于抑制状态,提示细胞迁移能力可能对短暂高糖状态出现了“代谢记忆”。现已知,体外培养的真皮微血管内皮细胞在基质胶中具有形成血管样结构的能力。本研究结果显示短暂高糖环境暴露能抑制真皮微血管内皮细胞形成血管,恢复到正常环境,其血管化能力仍处于抑制状态。提示真皮微血管内皮细胞血管化对短暂高糖刺激产生了“代谢记忆”。

短暂高糖环境暴露对真皮微血管内皮细胞增殖、凋亡影响较小,对其迁移、血管化影响却十分显著,其机制可能是调控血管内皮细胞相应生物学功能的基因发生了不同变化。本课题组对调控血管化的 84 种相关基因行基因芯片 PCR 分析,结果显示多种基因参与了血管内皮细胞“代谢记忆”的发生,其中 TIMP-3 最具代表性。TIMP-3 具有调节炎症、血管化和 ECM 重塑的作用^[9],亦是皮肤创面修复中血管化的主要调节因子。本研究显示短暂高糖培养环境能显著下调真皮微血管内皮细胞 TIMP-3 的 mRNA 水平,即使将培养环境恢复至正常, TIMP-3 的 mRNA 仍持续低水平表达。这种现象为解释短暂高糖诱导血管内皮细胞产生“代谢记忆”而致其生物学行为发生持续改变提供了依据^[10]。笔者的既往研究显示,对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠注射胰岛素控制血糖后,深 II 度烫伤创面仍出现创面愈合延迟、血管化障碍现象^[7],这些结果亦佐证了“代谢记忆”存在于血糖控制良好的糖尿病创面中。“代谢记忆”可能与基因调控、表观遗传学修饰和糖尿病机体产生的糖基化终末产物本身效应等多种途径有关^[11-12]。

综上所述,笔者认为短暂高糖环境暴露能诱导人真皮微血管内皮细胞产生持久的生物学行为变化,其机制可能与基因调控转录导致糖尿病致病环境因素虽已被清除,但细胞及组织损伤行为仍继续

有关,但尚需进一步研究探索。

参考文献

- [1] Amin N, Doupis J. Diabetic foot disease: from the evaluation of the "foot at risk" to the novel diabetic ulcer treatment modalities [J]. *World J Diabetes*, 2016, 7(7):153-164. DOI: 10.4239/wjd.v7.i7.153.
- [2] Khalil H. Diabetes microvascular complications—a clinical update [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2016; S1871-4021(16)30264-8. DOI: 10.1016/j.dsx.2016.12.022.
- [3] Qiao L, Lu SL, Dong JY, et al. Abnormal regulation of neo-vascularisation in deep partial thickness scalds in rats with diabetes mellitus [J]. *Burns*, 2011, 37(6): 1015-1022. DOI: 10.1016/j.burns.2011.03.020.
- [4] Pop-Busui R, Braffett BH, Zinman B, et al. Cardiovascular autonomic neuropathy and cardiovascular outcomes in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications (DCCT/EDIC) study [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(1):94-100. DOI: 10.2337/dc16-1397.
- [5] Holman RR, Paul SK, Bethel MA, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [J]. *N England J Med*, 2009, 359(15):1577-1589. DOI: 10.1056/NEJMoa0806470.
- [6] Liou DZ, Singer MB, Barmparas G, et al. Insulin-dependent diabetes and serious trauma [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2016, 42(4):491-496. DOI: 10.1007/s00068-015-0561-5.
- [7] 乔亮,王志勇,韦俊,等.糖尿病大鼠深 II 度烫伤创面新生血管形成障碍的研究 [J]. *中华烧伤杂志*, 2008, 24(1): 18-21. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2008.01.006.
- [8] 林雪松,汪乐,乔亮.高糖及晚期糖基化终末产物环境对血管内皮细胞血管样结构形成的影响 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2014, 34(5):596-602.
- [9] Gill SE, Gharib SA, Bench EM, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 moderates the proinflammatory status of macrophages [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(5): 768-777. DOI: 10.1165/ajrmb.2012-0377OC.
- [10] Ceriello A. The emerging challenge in diabetes: the "metabolic memory" [J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 57(5/6):133-138. DOI: 10.1016/j.vph.2012.05.005.
- [11] Chen Z, Miao F, Paterson AD, et al. Epigenomic profiling reveals an association between persistence of DNA methylation and metabolic memory in the DCCT/EDIC type 1 diabetes cohort [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(21): E3002-3011. DOI: 10.1073/pnas.1603712113.
- [12] Nishikawa T, Araki E. Involvement of advanced glycation end-products in 'hyperglycemic memory' [J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7(3):297-299. DOI: 10.1111/jdi.12405.

(收稿日期:2016-11-13)

(本文编辑:贾津津)

本文引用格式

乔亮,杨惠忠,李学川,等.短暂高糖环境暴露对人真皮微血管内皮细胞生物学行为的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33(2): 77-82. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.02.004.

Qiao L, Yang HZ, Li XC, et al. Effects of transient exposure to high glucose on biological behaviors of human dermal microvascular endothelial cells [J]. *Chin J Burns*, 2017, 33(2): 77-82. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2017.02.004.