

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.16.004

文章编号: 1005-8982(2016)16-0018-05

论著

白细胞介素 8 对高糖诱导的人脂肪间充质干细胞损伤的保护作用*

沈雷,沙峰,孙权,张鹏,孙石柱,张晓东,姚立杰,李静平
(齐齐哈尔医学院解剖教研室,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 探讨白细胞介素 8(IL-8)对高糖诱导人脂肪间充质干细胞(hAdMSC)损伤的保护作用。**方法** 含 250 mmol/L 葡萄糖的培养基建立细胞高糖模型;P65 质粒转染人 IL-8 基因到 hAdMSC 为 IL-8 转染组,仅转染 P65 质粒者为 P65 对照组,在 IL-8 转染组中添加 PD98059 为 Erk 抑制剂组。利用 MTT 细胞增殖实验、ELISA 或流式细胞技术检测各组 hAdMSC 增殖的光密度值(OD 值)、Caspase-3、Erk 或 VEGF 等蛋白的表达。**结果** 与 P65 对照组比较,IL-8 转染组 hAdMSC 增殖 OD 值明显升高,Caspase-3 蛋白表达下降($P < 0.01$);IL-8 转染组 Erk 蛋白活性和 VEGF 蛋白含量明显高于 P65 对照组($P < 0.01$);但与 IL-8 转染组比较,Erk 抑制剂组 hAdMSC 增殖的 OD 值降低,Caspase-3 蛋白表达升高($P < 0.01$)。**结论** IL-8 在高糖环境下,通过 Erk 通路,发挥对 hAdMSC 的保护作用。

关键词: 高糖;白细胞介素 8;人脂肪间充质干细胞;Erk 通路

中图分类号: R641

文献标识码: A

Protective effect of interleukin-8 on injury of human adipose derived mesenchymal stem cells induced by high glucose*

Lei Shen, Feng Sha, Quan Sun, Peng Zhang, Shi-zhu Sun,
Xiao-dong Zhang, Li-jie Yao, Jing-ping Li

(Department of Anatomy, Qiqihar Medical School, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of interleukin-8 (IL-8) on high glucose induced injury of human adipose derived mesenchymal stem cells (hAdMSC) induced by high glucose. **Methods** High glucose model with 250 mmol/l glucose medium was established. In IL-8 transfection group, human IL-8 gene was transfected into hAdMSC by p65 plasmid. In the control group, and P65 plasmid was transfected, and in Erk Inhibitor group, PD98059 was added into IL-8 transfection group. MTT cell proliferation assay, ELISA and flow cytometry was used to detect hAdMSC proliferation of the optical density (OD) or Caspase-3, Erk and VEGF protein. **Results** Compared with the p65 control group, OD of IL-8 transfection group was increased significantly and the proliferation of hAdMSC was increased, Caspase-3 protein expression was decreased, $P < 0.01$. Erk protein activity and VEGF protein in IL-8 transfected group were significantly higher than those in p65 control group, $P < 0.01$. But compared with the IL-8 group, OD of hAdMSC proliferation in Erk inhibitor group was decreased, expression of Caspase-3 protein was increased, $P < 0.01$. **Conclusions** In the high glucose environment, IL-8 plays a protective role for human adipose derived mesenchymal stem cells through the Erk signal pathway.

Keywords: high glucose; interleukin-8; human adipose derived mesenchymal stem cells; Erk signal

研究发现,全球糖尿病患者人数目前约为 3.22 亿人,到 2035 年将达到 5.92 亿^[1]。中国人口老龄化问

题日益严重,老年人糖代谢比较紊乱、机体功能减退,是糖尿病的好发人群^[2];高血糖会使体内活性氧

收稿日期:2015-12-14

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No:81541137);黑龙江省教育厅指令科研课题(No:12541901)

等自由基大量增多,活跃的自由基造成体内细胞结构紊乱,活性和功能降低^[3],进而引发全身多种组织和器官发生严重的糖尿病并发症^[4]。目前发现,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)具有来源广泛、免疫低、多分化性等优点,是治疗糖尿病血管、神经等复杂病变的首选种子细胞^[5]。研究还发现,高糖环境会对移植的细胞、体内宿主细胞造成严重的损伤^[6],如何避免高糖损伤,是值得研究的科学问题。

宫颈癌细胞在缺氧刺激下会大量表达白细胞介素 8 (Interleukin-8, IL-8), IL-8 会促进肿瘤细胞增殖、促进血管内皮细胞归巢和血管新生,达到抗缺氧的效果^[7],但是在糖尿病性高糖环境中, IL-8 是否也会发挥抑制 MSC 损伤、促进 MSC 增殖研究却鲜见报道。结合文献报道,本研究拟以人 IL-8 修饰人脂肪间充质干细胞,既发挥 IL-8 保护细胞抗高糖损伤的作用,又能促进体内细胞归巢,对治疗糖尿病等缺血性疾病具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人脂肪间充质干细胞(human Adipose derived mesenchymal stem cells, hAdMSC)购于武汉普诺赛生物公司,以色列 Bioind 公司生产的 BI 胎牛血清,青链霉素和 α -MEM 培养基均购自美国 Hyclone 公司,人 IL-8 引物:正向 5'-CTGGCTTATCTTACCAT-CAT-3',反向 5'-TCAAATACGGAGTGACGAA-3',由大连宝生公司合成测序。DH5 α 大肠杆菌和 P65 质粒由本教研室提供, Lipofectamine™ 3000 购自美国 Invitrogen 公司,葡萄糖、MTT 和 PD98059 均购自美国 Sigma 公司,小鼠抗人 IL-8 和小鼠抗人 Erk/磷酸化 Erk(P-Erk)抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,人 VEGF-ELISA 试剂盒购自美国 RD 公司, Erk、P-Erk 活性检测试剂盒购置 Cell Signaling 公司, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡双标试剂盒购置杭州碧云天生物公司,流式细胞分选仪(美国 BD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和分组 hAdMSC 用含 10%胎牛血清的 α -MEM 培养基培养;在 α -MEM 培养基中添加 250 mmol/L 葡萄糖为 hAdMSC 高糖培养基。在高糖模型下,无任何刺激者为对照组,仅转染 P65 质粒者为 P65 对照组, P65 质粒转染人 IL-8 基因到 hAdMSC 为 IL-8 转染组,在 IL-8 转染组中添加

50 μ mol/L PD98059 为 Erk 抑制剂组,正常条件下培养 MSC 者为正常对照组。

1.2.2 IL-8 基因稳定转染 MSC 稳定转染一般步骤为:培养 3×10^5 hAdMSC,采用 Lipofectamine™ 3000 试剂盒将 P65 IL-8 重组质粒转染 MSC。培养 2 d 后,用含 300 μ g/ml G418 的 α -MEM 培养液进行筛选,2 周后收集阳性细胞,获得稳定转染 IL-8 的 MSC,利用蛋白免疫印迹法(Western blot)实验进行鉴定^[8]。

1.2.3 Western blot 检测人 IL-8 的表达 裂解各组细胞, 12 000 r/min,提取蛋白液, SAB 法进行蛋白定量;凝胶电泳 60 min 后;转膜至硝酸纤维素薄膜;山羊血清封闭 60 min;再添加小鼠抗人 IL-8(1:150)等抗体, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(1:200); ECL 试剂等步骤检测蛋白表达, Image-Pro Plus 6.0.1 软件分析各蛋白条带的灰度值, 计算蛋白相对灰度值, β -actin 为内参对照。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖情况 按 hAdMSC 分组情况, 96 孔板的每孔内接种 2×10^4 hAdMSC, 用 100 μ l 的 hAdMSC 培养基培养 48 h 后, 0.01 mmol/L PBS 清洗, 每孔加入 20 μ l 5 mg/ml 的 MTT, 孵育 4 h 后, 添加 100 μ l DMSO, 充分振荡, 使用 450 nm 波长测定每个样品吸光度(OD 值)。

1.2.5 流式细胞技术实验检测各组细胞凋亡率 按照实验分组情况, 培养每组 5×10^6 hAdMSC, 0.25% 胰蛋白酶 -EDTA 消化细胞, 0.01 mol/L PBS 清洗, 按照细胞凋亡双标试剂盒致使进行细胞标记后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.6 VEGF 蛋白含量和 P-Erk/Erk 蛋白活性检测 按照实验分组情况, 培养 5×10^7 hAdMSC, 0.01 mol/L PBS 清洗, 以含 0.1%胎牛血清的 hAdMSC 高糖培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳条件下培养 12 h, 收集各组细胞的上清液, ELISA 试剂盒进行检测 VEGF 含量, 分别利用 Erk/P-Erk 活性检测试剂盒检测各组 hAdMSC 中 P-Erk/Erk 蛋白活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每次试验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 IL-8 的表达

P65 对照组 IL-8 的表达与正常对照组比较, 差

异无统计学意义($P>0.05$);与 P65 对照组比较,IL-8 转染组的 IL-8 蛋白相对含量提高 1.679 倍,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1 和图 1。

2.2 IL-8 对 hAdMSC 增殖和凋亡的影响

高糖环境下,IL-8 转染组 hAdMSC 增殖的 OD 值是 P65 对照组的 3.172 倍,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$);而 Erk 抑制剂组的 hAdMSC 增殖的 OD 值则是 IL-8 组的 0.571 倍,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2A 和表 2;IL-8 转染组的细胞凋亡率是高糖对照组的 0.365 倍,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$);而 Erk 抑制剂组的细胞凋亡率则是 IL-8 组的 1.296 倍,两者比较差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2B、2C 和表 2。

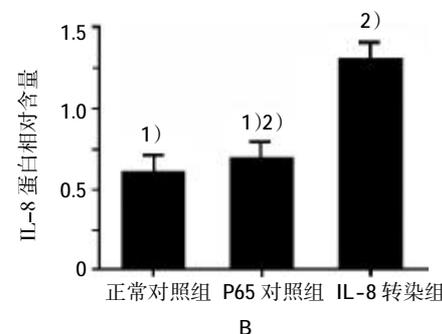
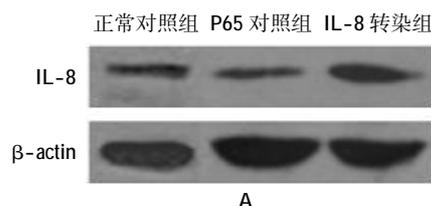
2.3 各组 hAdMSC 的 P-Erk/Erk 和 VEGF 蛋白的表达

IL-8 转染组 P-Erk/Erk 相对灰度值是 P65 对照组的 1.313 倍($P<0.01$);Erk 抑制剂组 P-Erk/Erk 相对灰度值是 IL-8 转染组的 0.679 倍($P<0.01$),见表 3 和图 3A、3B;IL-8 转染组 VEGF 蛋白含量是 P65 对照组的 2.118 倍($P<0.01$);Erk 抑制剂组 VEGF 蛋白含量是 IL-8 转染组的 0.338 倍($P<0.01$),见表 3 和图 3C。

表 1 各组 hAdMSC 表达的 IL-8 方差分析

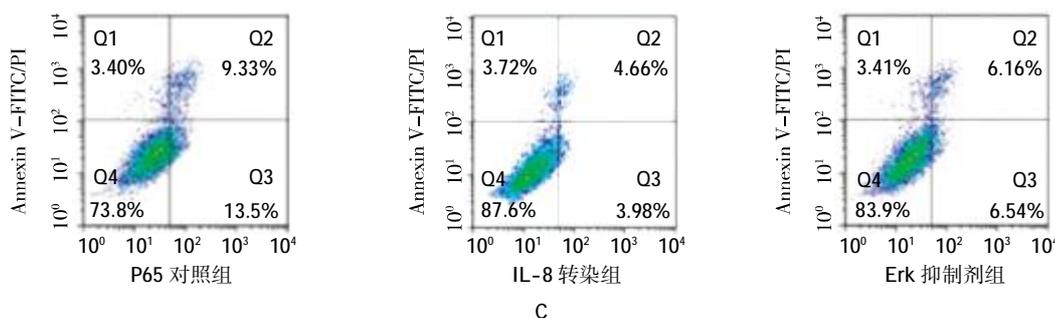
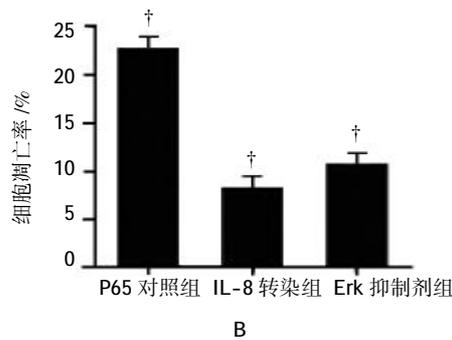
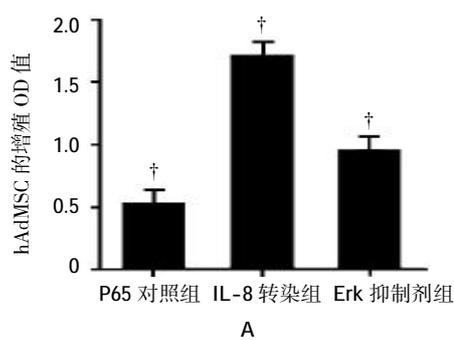
组别	例数	均值($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
正常对照组	18	0.678 \pm 0.031		
P65 对照组	18	0.692 \pm 0.043 ¹⁾	1049.931	0.000
IL-8 转染组	18	1.154 \pm 0.032 ²⁾		

注:1) 正常对照组与 P65 对照组 IL-8 蛋白相对含量比较, $P>0.05$;
2)IL-8 转染组与 P65 对照组 IL-8 蛋白相对含量比较, $P<0.01$



A:Western blot 实验检测 IL-8 蛋白;B:各组 hAdMSC 的 IL-8 蛋白相对含量比较,1) $P>0.05$;2) $P<0.01$ ($n=18$)

图 1 hAdMSC 的 IL-8 蛋白表达



A:各组 hAdMSC 的增殖 OD 值比较,† $P<0.01$ ($n=18$);B:各组 hAdMSC 的凋亡率比较,† $P<0.01$ ($n=18$);C:分别为 P65 对照组、IL-8 转染组、Erk 抑制剂组的细胞凋亡流式图

图 2 IL-8 对 hAdMSC 增殖和凋亡的影响

表 2 各组 hAdMSC 增殖和凋亡的方差分析 (n=18, $\bar{x} \pm s$)

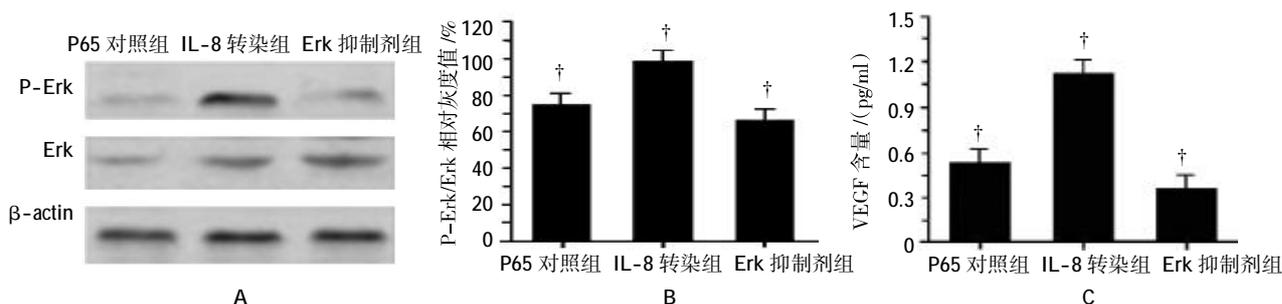
组别	hAdMSC 增殖的 OD 值			hAdMSC 凋亡率 /%		
	($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值	($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
P65 对照组	0.542 ± 0.021			22.831 ± 0.502		
IL-8 转染组	1.721 ± 0.023 ¹⁾	15 456.98	0.0001	8.346 ± 0.424 ³⁾	6 096.17	0.000
Erk 抑制剂组	0.984 ± 0.015 ²⁾			10.825 ± 0.316 ⁴⁾		

注:1)P65 对照组与 IL-8 转染组 hAdMSC 增殖的 OD 值比较, P<0.01;2)IL-8 转染组与 Erk 抑制剂组 hAdMSC 增殖的 OD 值比较, P<0.01;3)P65 对照组与 IL-8 转染组 hAdMSC 凋亡率的比较, P<0.01;4)IL-8 转染组与 Erk 抑制剂组 hAdMSC 凋亡率的比较, P<0.01

表 3 各组 hAdMSC 的 p-Erk/Erk 相对灰度值和 VEGF 蛋白的方差分析 (n=24, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-Erk/Erk 相对灰度值			VEGF 蛋白含量 / (pg/ml)		
	($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值	($\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
P65 对照组	75.227 ± 1.032			0.532 ± 0.028		
IL-8 转染组	98.831 ± 1.948 ¹⁾	2 550.01	0.000	1.127 ± 0.043 ³⁾	3 218.48	0.000
Erk 抑制剂组	67.104 ± 1.676 ²⁾			0.381 ± 0.029 ⁴⁾		

注:1)P65 对照组与 IL-8 转染组 P-Erk/Erk 相对灰度值比较, P<0.01;2)IL-8 转染组与 Erk 抑制剂组 P-Erk/Erk 相对灰度值比较, P<0.01;3)P65 对照组与 IL-8 转染组 VEGF 蛋白含量比较, P<0.01;4)IL-8 转染组与 Erk 抑制剂组 VEGF 蛋白含量比较, P<0.01



A:Western blot 实验检测各组 hAdMSC 的 P-Erk/Erk 蛋白;B:各组 hAdMSC 的 P-Erk/Erk 相对灰度值比较, †P<0.01(n=24);C:各组 hAdMSC 的 VEGF 含量比较, †P<0.01(n=24)

图 3 IL-8 对 hAdMSC 表达 P-Erk/Erk、VEGF 蛋白的影响

3 讨论

糖尿病是严重的多系统多器官损伤的慢性疾病, YANG 等在《N Engl J Med》撰文, 认为糖尿病及心、肾、脑等部位的并发症是中国及其世界进步和发展的严重阻碍因素之一^[9], 虽然各国均投入大量的人力、物力和财力进行糖尿病相关研究, 但是, 糖尿病及其并发症仍然是棘手的医学难题^[9]。究其原因, 主要是由于高血糖状态造成体内物质代谢紊乱, 氧自由基增多, 血管神经变性等改变^[10], 因此, 如果从内在因素考虑糖尿病及其并发症的形成和病理过程, 有可能加大治疗效果。

间充质干细胞是一类存在于脂肪、骨髓和角膜等部位, 具有多分化特性、多组织适应性、多来源途径的干细胞, 由于其免疫性较低, 移植 MSC 避免伦

理问题的纠纷, 成为细胞治疗的重要细胞^[11]。近年来的研究发现, 存在于人体脂肪组织的脂肪间充质干细胞, 由于含量较多, 易于获得, 因此成为组织工程首先考虑的种子细胞。研究发现, AdMSC 可以有效地促进血管新生, 加速伤口愈合^[12], 并发现, MSC 表面表达多种趋化因子受体, CXCL12 和 CXCL1 等多种趋化因子, 多招募 MSC 归巢具有重要作用^[13]。2014 年 Science 杂志报道, 伤口周围巨噬细胞、中性粒细胞等细胞会释放大量 IL-8 等趋化因子, IL-8 起到招募血管内皮细胞、成纤维细胞归巢, 加速细胞外基质形成等作用, 对伤口愈合具有积极作用^[14]。但是, 在糖尿病皮肤溃疡组织周围, 由于高血糖导致细胞功能降低, IL-8 等趋化因子释放大量减少, 致使糖尿病皮肤溃疡迁延愈合甚至不愈合^[14]。由此启发, 如果外源

性给与 IL-8,有可能诱导细胞归巢,加速糖尿病并发症修复的速度。

本实验发现正常环境下,培养的 MSC 上清液中可以表达 IL-8,与 P65 对照组比较,差异无统计学意义,也有研究发现,骨髓和骨膜等部位来源的 MSC 可以表达少量 IL-8 等因子^[15]。进行转染 IL-8 的 MSC 上清液中 IL-8 含量增加,说明转染成功。

研究发现,与 P65 对照组比较,转染 IL-8 的 hAdMSC 能够高效表达 IL-8 蛋白,IL-8 转染组 hAdMSC 的细胞增殖 OD 值明显比缺氧对照组升高,IL-8 转染组的细胞凋亡率比缺氧对照组降低,这提示,高糖环境下,IL-8 能够与 hAdMSC 表面的 CXCL1/2 受体结合^[15],激活了相应信号通路。本研究以 PD98059 阻断 Erk 通路,发现 Erk 抑制剂组的细胞增殖 OD 值与凋亡率表达与 IL-8 转染组均呈现反向关系,Erk 蛋白在 IL-8 转染组和 Erk 抑制剂组表达均较高;而与 IL-8 转染组比较,Erk 抑制剂组 P-Erk 蛋白表达明显降低,证明 IL-8 通过 Erk 蛋白通路发挥对高糖诱导人脂肪间充质干细胞损伤的保护作用。ELISA 研究发现,IL-8 转染组 VEGF 蛋白表达均高于 P65 对照组,而 Erk 抑制剂组 VEGF 蛋白的表达则降低,这可能是由于 IL-8 与 hAdMSC 表面的受体结合,激活 MAPK-Erk 信号通路,导致 VEGF 基因表达,进而使 VEGF 和 IL-6 表达升高^[16],当然,IL-8 也可以通过 Akt 通路促进细胞活化^[7],相关机制还需要深入研究。

综上所述,IL-8 转染的 hAdMSC 可以发挥抗高糖导致的 MSC 损伤,对 hAdMSC 具有保护性作用。下一步将拟用高效液相色谱技术确定 IL-8 刺激 hAdMSC 的有效分泌因子,并建立糖尿病皮肤溃疡动物模型,观察 IL-8 联合 MSC 对该动物模型皮肤溃疡愈合作用,为开发 IL-8 等趋化因子的应用奠定实验基础。

参 考 文 献:

- [1] GUARIGUATA L, WHITING D R, HAMBLETON I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2): 137-149.
- [2] 李桂玲,李彩福.同伴支持教育对社区糖尿病老年人自我管理能力的干预效果评价[J]. *当代医学*, 2015(31): 98-99.
- [3] DANGI-GARIMELLA S. A big step forward in treating chronic diabetic foot ulcers[J]. *Am J Manag Care*, 2014, 20(4): E8.
- [4] 史丽,苏胜偶,赵占胜,等.血糖波动与糖尿病并发症的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(17): 2557-2559.
- [5] SUN H, YANG H L. Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(8): 1121-1127.
- [6] SARGENT J. Diabetes: functional impairment of bone marrow progenitor cells in diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(7): 379.
- [7] LIU L B, XIE F, CHANG K K, et al. Hypoxia promotes the proliferation of cervical carcinoma cells through stimulating the secretion of IL-8[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(2): 575-583.
- [8] 张剑凯,朱楚洪,糜建红,等.锌指蛋白 A20 基因对内皮细胞缺氧损伤的保护作用[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2008, 26(2): 163-165.
- [9] YANG W, LU J, WENG J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [10] BERKOW J W, RICKETTS R L. Spontaneous diabetes mellitus in dogs[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1965, 146: 1101-1105.
- [11] STODDART M J. Mesenchymal stem cells as a source of repair cytokines: mesenchymal stem cells as the conductor [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2015,23(7):452-453.
- [12] PARK I S, CHUNG P S, AHN J C. Adipose-derived stromal cell cluster with light therapy enhance angiogenesis and skin wound healing in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 462(3): 171-177.
- [13] SI X Y, LI J J, YAO T, et al. Transforming growth factor-beta1 in the microenvironment of ischemia reperfusion-injured kidney enhances the chemotaxis of mesenchymal stem cells to stromal cell-derived factor-1 through upregulation of surface chemokine (C-X-C motif) receptor 4[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(5): 1794-1798.
- [14] SUN B K, SIPRASHVILI Z, KHAVARI P A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds[J]. *Science*, 2014, 346(6212): 941-945.
- [15] JANSEN E J, EMANS P J, GULDEMOND N A, et al. Human periosteum-derived cells from elderly patients as a source for cartilage tissue engineering[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(6): 331-339.
- [16] KANO H, TANABE T, RUBIN B K. Dapsone inhibits IL-8 secretion from human bronchial epithelial cells stimulated with lipopolysaccharide and resolves airway inflammation in the ferret[J]. *Chest*, 2011, 140(4): 980-990.

(张蕾 编辑)