

# 高糖对人角膜上皮细胞创伤修复中 Cyclin D1 蛋白表达的影响

赵楠楠<sup>1</sup>, 陈梨萍<sup>1</sup>, 修皓<sup>2</sup>, 郑振优<sup>1</sup>, 唐平<sup>1</sup>, 籍雪颖<sup>1</sup>

引用:赵楠楠,陈梨萍,修皓,等.高糖对人角膜上皮细胞创伤修复中 Cyclin D1 蛋白表达的影响.国际眼科杂志 2020;20(9):1504-1508

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81860172);海南医学院第一附属医院青年培育基金项目(No.HYFYYPY201603)

作者单位:<sup>1</sup>(570100)中国海南省海口市,海南医学院第一附属医院眼科;<sup>2</sup>(571199)中国海南省海口市,海南医学院热带医学与检验医学院

作者简介:赵楠楠,毕业于兰州大学,硕士,主治医师,研究方向:眼表疾病、角膜塑形镜、双眼视功能。

通讯作者:陈梨萍,毕业于海南医学院,学士,主任医师,研究方向:白内障、角膜病。65634536@qq.com

收稿日期:2019-11-20 修回日期:2020-08-05

## 摘要

**目的:**研究高糖环境对人角膜上皮细胞损伤修复的影响,初步探讨 Cyclin D1 蛋白在高糖培养的角膜上皮细胞创伤愈合中表达的意义。

**方法:**模拟糖尿病角膜病变的高糖微环境,人角膜上皮细胞经复苏、培养传代后,分别设置等体积蒸馏水的 DMEM 完全培养基的正常对照组和含 25mmol/L 葡萄糖的 DMEM 完全培养基高糖处理组的两组细胞,细胞长满后进行划伤刺激,倒置相差显微镜下观察比较各组细胞生长状况及其变化,于不同时间点(0、12、24、48 和 72h)利用 Western blot 检测分析高糖培养的角膜上皮细胞中 Cyclin D1 蛋白的表达,qRT-PCR 检测 Cyclin D1 mRNA 水平相对表达情况。

**结果:**体外高糖处理条件下,人角膜上皮细胞划伤后修复速度减慢,漂浮细胞增多,细胞重新贴壁少,细胞间距增加,随着高糖处理时间的延长,细胞状态变差,生长速度慢;正常组细胞损伤修复较快,细胞密度增大,且形态规则,细胞膜光滑。Western blot 检测划伤刺激上调 Cyclin D1 的表达,但随着时间延长上调作用呈逐渐减弱,两组 Cyclin D1 最高表达量均出现在 12h。高糖处理组 Cyclin D1 表达量低于正常对照组。qRT-PCR 结果显示:高糖处理后,Cyclin D1 mRNA 表达呈上调趋势,但随着高糖处理时间延长,上调作用减弱,且在 48h 处 mRNA 水平恢复至与对照组同一水平。

**结论:**在角膜上皮细胞创伤愈合过程中,高糖呈负性调节,抑制 Cyclin D1 蛋白的表达,且与角膜上皮细胞增殖能力下降及凋亡相关。

**关键词:**高糖;人角膜上皮细胞;Cyclin D1 蛋白;创伤

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2020.9.07

## Expression of Cyclin D1 in wound healing of human corneal epithelial cells with high blood glucose level

Nan-Nan Zhao<sup>1</sup>, Li-Ping Chen<sup>1</sup>, Hao Xiu<sup>2</sup>, Zhen-You Zheng<sup>1</sup>, Ping Tang<sup>1</sup>, Xue-Ying Ji<sup>1</sup>

**Foundation items:** National Natural Science Foundation (No. 81860172); Youth Science Foundation of First Affiliated Hospital of Hainan Medical University (No.HYFYYPY201603)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China;

<sup>2</sup>School of Tropical Medicine and Laboratory Medicine of Hainan Medical University, Haikou 571199, Hainan Province, China

**Correspondence to:** Li-Ping Chen. Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan Province, China. 65634536@qq.com

Received:2019-11-20 Accepted:2020-08-05

## Abstract

• **AIM:** To study the effect of high glucose environment on human corneal epithelial cell injury and repair, and to explain the significance of Cyclin D1 protein expression in corneal epithelial cell wound healing in high glucose culture.

• **METHODS:** The high-glucose micro-environment of diabetic corneal lesions was simulated. After human corneal epithelial cells were resuscitated, cultured and passaged, a normal control group of DMEM complete medium of equal volume of distilled water and a high-glucose treated group of DMEM complete medium containing 25mmol/L glucose were set respectively. After the cells were overgrown, the cells were stimulated with scratches. The growth conditions and changes of the cells in each group were observed and compared under an inverted phase contrast microscope. Western glucose was used to analyze high glucose at different time points (0, 12, 24, 48, and 72h) Cyclin D1 Protein expression in cultured corneal epithelial cells. The qRT-PCR was used to analyze high glucose at different time points and each group Cyclin D1 mRNA expression.

• **RESULTS:** Under the conditions of high glucose treatment *in vitro*, the repair rate of human corneal epithelial cells was slowed down after injury, floating cells increased, cells reattached less, and cell spacing increased. With the increase of high glucose treatment time, the cell state became worse and the growth rate slow; normal group repaired cell damage faster,

increased cell density, regular morphology, and smooth cell membrane. Cyclin D1 expression was up-regulated by Western blot, but the up-regulation effect gradually weakened with time. The highest expression of Cyclin D1 in both groups appeared at 12h. The expression of Cyclin D1 in the high glucose treatment group was lower than that in the normal control group. The qRT-PCR results showed that after high glucose treatment, the expression of Cyclin D1 mRNA was up-regulated, but with the increase of high glucose treatment time, the up-regulation effect weakened, and the mRNA level recovered to the same level as the control group at 48h.

• CONCLUSION: In the process of corneal epithelial cell wound healing, high glucose negatively regulates and inhibits the expression of Cyclin D1 protein, and is related to the decline of corneal epithelial cell proliferation and apoptosis.

• KEYWORDS: high glucose; human corneal epithelial cells; Cyclin D1 protein; wound healing

**Citation:** Zhao NN, Chen LP, Xiu H, *et al.* Expression of Cyclin D1 in wound healing of human corneal epithelial cells with high blood glucose level. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2020;20(9): 1504-1508

## 0 引言

糖尿病性角膜病变 (diabetic keratopathy, DK) 临床常见于持续性角膜上皮缺损、角膜溃疡、内眼术后角膜上皮再生延迟等<sup>[1]</sup>,严重影响视力,甚至致盲。角膜上皮病变和创伤延迟修复的机制,以及其与糖尿病的关系,是眼科当前学术研究热点。高血糖状态下,机体代谢异常导致细胞结构功能受损。细胞周期素蛋白 (Cyclin) 与细胞分化、增殖密切相关。角膜上皮细胞受损后其修复过程需要细胞进行细胞分裂,需要由细胞分裂的间期进入到分裂期,在细胞周期进程中,Cyclin D1 是 G1 期细胞周期素,其主要调控节点是 G1/S 期,Cyclin D1 能够激活细胞周期蛋白依赖性激酶,从而使细胞由 G1 期进入到 S 期,促进细胞有丝分裂的进行<sup>[2]</sup>,故 Cyclin D1 在角膜上皮细胞修复过程中起着调节细胞增殖能力的作用,对角膜上皮修复快慢及成功与否起着至关重要的作用。Cyclin D1 是 Wnt 信号通路  $\beta$ -catenin 下游靶基因,调控细胞增殖、分化和迁移。有研究证实核糖核酸酶 5 可上调 Cyclin D1 蛋白通过启动细胞周期进程,促进角膜内皮损伤愈合<sup>[3]</sup>。在此基础上我们推测 DK 与角膜上皮细胞 Cyclin D1 的表达存在一定的关系。研究证实,与正常组 (葡萄糖浓度为 5.5mmol/L) 相比,当葡萄糖浓度高于 25mmol/L 时,随着葡萄糖浓度的增加,人角膜上皮细胞的增殖活性降低,并且呈时间和浓度依赖性<sup>[4]</sup>。张颖<sup>[5]</sup>的研究同样显示,葡萄糖浓度为 25mmol/L 时最适合制作人角膜上皮细胞高糖模型,故本实验选取 25mmol/L 为高糖作用浓度,旨在探讨高糖环境下,观察不同时间点人角膜上皮细胞的形态和功能修复的差异,以及人角膜上皮细胞创伤修复过程中细胞周期素 Cyclin D1 蛋白基因表达的意义,以期为进一步防控糖尿病性角膜上皮创伤愈合延迟提供新的实验理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人角膜上皮细胞:北纳创联生物技术有限公

司;货号:BNCC337876,高糖 DMEM: Hyclone;货号:SH30022.01,FBS: Gibco;货号:10099141,双抗: Hyclone;货号:SV30010,胰蛋白酶 0.25%, Trypsin-EDTA (1 $\times$ ) 溶液: Gibco;货号:25200056, DMSO: Sigma;货号: D2650,抗 Cyclin D1 抗体 (兔抗): Abcam;货号: ab134175,二抗山羊抗兔: Abcam;货号: ab6721,抗  $\beta$ -actin 抗体 (鼠抗): Abcam;货号: ab4990,二抗山羊抗鼠: Abcam;货号: ab6785,ECL 显色液: Millipore;货号: WBKLS0100,荧光染料 SYBR Green Mix (2 $\times$ ): Thermo: K0221,蛋白 maker: Fermentas;货号:26617。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞处理和总 RNA 及总蛋白提取 细胞复苏后,用完全培养基 (高糖 DMEM+10%FBS) 重悬,放置在 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳培养箱中培养,当细胞贴壁生长至 80% 以上后,进行传代:将对数生长期的细胞消化制成单细胞悬液,以  $1 \times 10^4$ /孔接种于培养板,37 $^{\circ}$ C, 0.5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。细胞传代 1~2 代后,按上述传代方法将细胞传至直径为 35mm 细胞培养皿中,共传 10 皿,并分为两组:高糖处理组和正常对照组,于 37 $^{\circ}$ C, 0.5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养 24h 后,将高糖处理组培养基更换为含 25mmol/L 葡萄糖的 DMEM 完全培养基,正常对照组则更换为加等体积蒸馏水的 DMEM 完全培养基。待细胞长满后,进行划伤处理,每皿呈“#”字形划伤处理<sup>[6]</sup>。分别培养 0、12、24、48、72h 后提取细胞总 RNA 和总蛋白,并测定总 RNA (Nanodrop 2000 测定) 及总蛋白浓度 (BCA 法测定)。

1.2.2 qRT-PCR 检测 Cyclin D1 mRNA 的表达 根据试剂盒说明书提取细胞总 RNA,用 Transcriptor First-Strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 将 mRNA 逆转录成 cDNA。采用特异性引物进行 qRT-PCR: Cyclin D-F: CTCGGTGTCTACTTCAAATGT; Cyclin D-R: TCCTCGCACTTCTGTTCCT;  $\beta$ -actin-F: ACCCTGAAGTACCCCATCGAG;  $\beta$ -actin-R: ACATGATCTGGGTCATCTTCTC。qRT-PCR 扩增体系为: Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2 $\times$ ) 12.5 $\mu$ L, 正反向引物各 1 $\mu$ L, cDNA 500 ng, ddH<sub>2</sub>O 补充至 25 $\mu$ L。反应程序为: 50 $^{\circ}$ C 2min; 95 $^{\circ}$ C 10min; 95 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 40 cycles; 熔解曲线。

1.2.3 Western blot 检测 Cyclin D1 蛋白的表达 将提取的各时间点总蛋白进行 SDS-PAGE,进行常规 Western blot 实验,检测划伤条件下高糖处理组和正常对照组不同时间 (0、12、24、48 和 72h) 角膜上皮细胞中 Cyclin D1 蛋白的表达。配制 SDS-PAGE 凝胶 (4% 浓缩胶, 12% 分离胶), 根据不同时间点总蛋白浓度计算各时间点用量 (蛋白用量为 2 $\mu$ g), 加入对应量的 5 $\times$  蛋白上样缓冲液,沸水浴煮沸 5~8min,冰浴 5min 后上样,80V 电泳至蛋白到达分离胶时将电压改为 100V 继续电泳 1~2h (根据具体需要进行调整),电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2h,加入兔抗人 Cyclin D1 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 冲洗 3 次后加入山羊抗兔二抗,室温轻微震荡孵育 2h, PBST 冲洗 3 次,黑暗条件下加入 ECL 反应 5~15min,在 BioRad 化学发光凝胶成像系统曝光 1~15min,以  $\beta$ -actin 为内参。

在倒置相差显微镜下观察各组细胞生长状况及其变化,选取各组细胞不同时间点划痕处清晰且宽度基本一致、细胞形态明显处进行观察拍照。

表1 各组细胞中不同时间点 Cyclin D1 mRNA 表达情况

组别	0h	12h	24h	48h	72h
正常对照组	1.00±0.113	0.16±0.006	0.07±0.006	0.21±0.015	0.16±0.000
高糖处理组	1.00±0.077	0.31±0.021	0.52±0.025	0.22±0.015	0.29±0.07
<i>t</i>	0.000	-12.561	-32.257	-1.604	-22.517
<i>P</i>	1.000	<0.001	<0.001	0.184	<0.001

注:高糖处理组:25mmol/L 葡萄糖的 DMEM 完全培养基;正常对照组:蒸馏水的 DMEM 完全培养基。

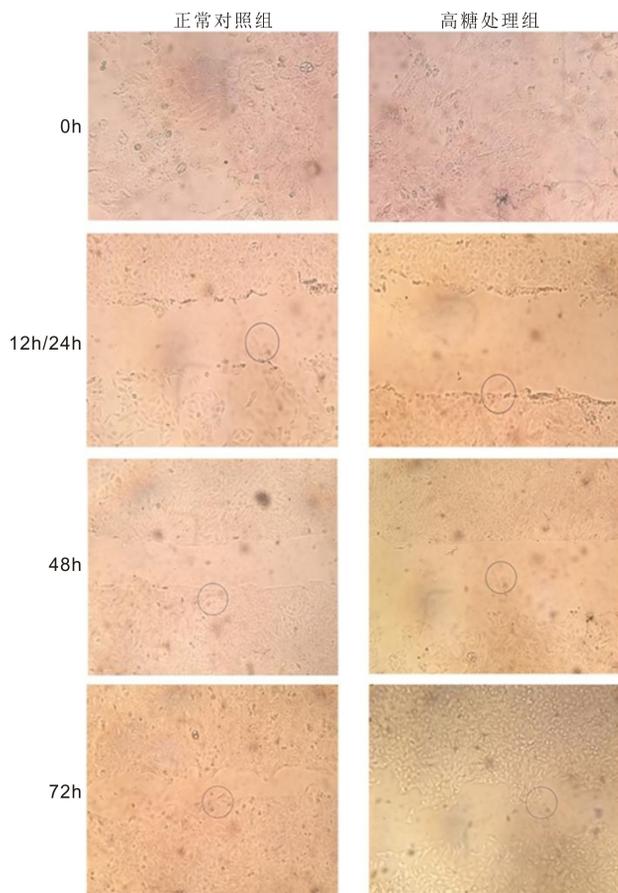


图1 倒置显微镜观察划伤后正常对照组和高糖处理组细胞的形态学变化(×100)。

统计学分析:采用统计学软件 SPSS21.0 分析数据,多组之间比较采用重复测量数据的方差分析,各组的时间差异比较,采用 LSD-*t* 法进行两两比较,各时间点的组间差异比较,采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 角膜上皮细胞细胞形态学观察** 利用倒置显微镜,对划伤刺激条件下正常对照组和高糖处理组细胞进行观察(图1)。结果显示:划伤处理前即处理 0h 的细胞,细胞没有显著差别,细胞呈比较均匀的扁平单层贴壁生长,形态规则,细胞膜光滑,细胞核透亮,整体上高糖处理组的细胞生长较正常对照组缓慢。划伤处理 12h 和 24h 后,划伤处细胞形态并无多大差别,但与正常对照组相比,高糖组划伤边缘处的漂浮细胞明显要多,细胞重新贴壁情况差,间距增加。随着处理的时间延长,划伤处由前面的不平整逐渐趋于平滑,且细胞开始重新向划伤处外缘生长。划伤处理 48h 显示,高糖处理组的细胞生长速度要比正常对照组慢,划伤处不如对照组平整,向外伸出的细胞突起较对照

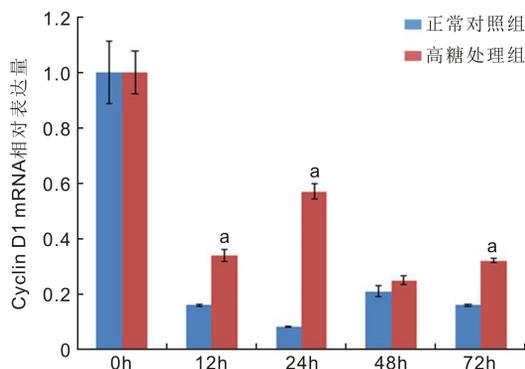


图2 划伤条件下,高糖处理组不同时间点 Cyclin D1 mRNA 的表达  $n = 3, ^a P < 0.05$  vs 正常对照组。

组少。划伤处理 72h,两组划伤处边缘的细胞突起明显增多,细胞密度明显增大,但是正常对照组细胞状态明显要好于高糖处理组,高糖处理组细胞形态有一定改变,明显变圆,高糖处理组虽然细胞突起增大,但是划伤边缘的凹陷仍然较多,对照组则没有这种情况,这反映高糖组的细胞活性较差。

**2.2 qRT-PCR 检测 Cyclin D1 mRNA 表达水平比较** 对 qRT-PCR 数据进行分析结果显示差异有统计学意义 ( $F_{\text{时间}} = 350.985, P_{\text{时间}} < 0.001; F_{\text{交互}} = 2.893, P_{\text{交互}} < 0.001; F_{\text{组间}} = 1906.661, P_{\text{组间}} < 0.001$ );两组间 12、24、72h 比较差异均具有统计学意义(均  $P < 0.001$ )。两组各组内不同时间点(12,24,48,72h)与各组的 0h 间 Cyclin D1 表达量比较差异均有统计学意义(正常对照组: $t_{12h \text{ vs } 0h} = -0.843, P_{12h \text{ vs } 0h} < 0.001; t_{24h \text{ vs } 0h} = -0.927, P_{24h \text{ vs } 0h} < 0.001; t_{48h \text{ vs } 0h} = -0.793, P_{48h \text{ vs } 0h} < 0.001; t_{72h \text{ vs } 0h} = -0.840, P_{72h \text{ vs } 0h} < 0.001$ 。高糖处理组: $t_{12h \text{ vs } 0h} = -0.687, P_{12h \text{ vs } 0h} < 0.001; t_{24h \text{ vs } 0h} = -0.483, P_{24h \text{ vs } 0h} < 0.001; t_{48h \text{ vs } 0h} = -0.773, P_{48h \text{ vs } 0h} < 0.001; t_{72h \text{ vs } 0h} = -0.710, P_{72h \text{ vs } 0h} < 0.001$ ),见表 1。

qRT-PCR 汇总结果如图 2 示:高糖处理组和正常对照组中 Cyclin D1 的表达均随着处理时间延长而下调,各时间点的表达量与 0h 比,均存在显著差异,其中对照组中最低表达量出现在 24h,其表达量仅为 0h 的 0.08 倍,处理组中最低表达量出现在 48h,其表达量为 0h 的 0.25 倍。高糖处理后,与正常对照组相比,Cyclin D1 mRNA 表达呈上调趋势,但随着高糖处理时间延长,上调作用减弱,且在 48h 处 mRNA 水平恢复至与对照组同一水平。

**2.3 Western blot 检测 Cyclin D1 表达** Western blot 检测结果显示见图 3。划伤刺激能够上调 Cyclin D1 的表达,随着时间的延长上调作用逐渐减弱,无论是正常对照组还是高糖处理组,其最高表达量出现在 12h。高糖处理组与正常对照组相比,高糖处理组各时间点的 Cyclin D1 表达量均低于正常对照组,提示,高糖处理对 Cyclin D1 的表达存在抑制作用。因此,Western blot 实验结果显示,划伤刺激

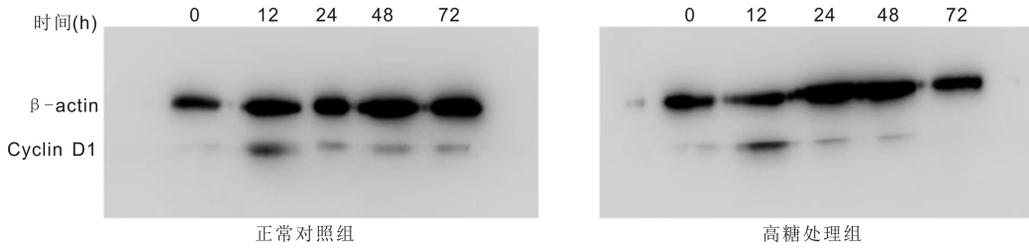


图3 Western blot 检测处理不同时间位点 Cyclin D1 蛋白表达。

能够上调 Cyclin D1 的表达,且 25mmol/L 葡萄糖处理能够减弱划伤刺激对 Cyclin D1 的上调作用,高糖能够抑制 Cyclin D1 的表达。

### 3 讨论

目前中国成为全球糖尿病患者最多的国家之一,在眼科领域,糖尿病患者角膜创伤延迟愈合的发生率较高<sup>[7]</sup>,为临床带来诸多棘手的病症,譬如角膜上皮糜烂、大疱性角膜病变、反复的角膜溃疡甚至致盲,成为眼科学亟待解决的问题。DK 的发病机制尚不明确,研究高血糖对 DK 发展的病理影响,目前主要集中在细胞和分子水平研究。Zhang 等<sup>[8]</sup>报道外源性 netrin-1 促进糖尿病小鼠角膜上皮伤口愈合和神经纤维再生,而高糖可阻断创伤诱导的角膜上皮细胞 netrin-1 表达上调。2 型糖尿病合并角膜点状上皮病变患者的基底下神经丛及基底上皮细胞减少导致角膜上皮愈合延迟<sup>[9]</sup>。另外,高糖状态可以降低细胞间黏附能力,而造成角膜上皮细胞的损伤<sup>[10]</sup>。Song 等<sup>[11]</sup>研究也证实胰岛素依赖型糖尿病可以改变角膜的正常节律性,减少角膜上皮有丝分裂,增加角膜炎性因子的表达。以上研究均表明高糖呈负性调节,导致角膜上皮细胞损伤,神经组织受损,修复再生延迟。

参考针对糖尿病角膜上皮细胞病变机制与高糖状态下人角膜上皮细胞增殖、凋亡模型的文献研究<sup>[4-5]</sup>,筛选出最适高糖浓度及处理时间,以高糖下体外培养的人角膜上皮细胞为研究对象,模拟 DK 的高糖微环境,通过倒置显微镜观察细胞划伤刺激后的生长情况和形态学变化。结果显示,高糖培养的人角膜上皮细胞划伤后,细胞迁移能力受损。与正常对照组相比,高糖处理组迁移入创伤区的细胞数量明显减少,细胞折光性弱,伸展不良,创伤区愈合率显著降低,并且随着处理的时间延长,高糖处理组的人角膜上皮细胞生长速度要比正常对照组慢,细胞突起少且活性较差,细胞分裂现象较正常对照组弱,提示高糖的负性调节作用,与相关文献研究结果一致。

创伤作为一种刺激,可激活机体下游信号通路,诱导细胞迁移至创伤区,细胞周期蛋白 (Cyclin)-细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (Cyclin dependent kinase, CDK)-细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子 (Cyclin dependent kinase inhibitor, CKI) 系统是细胞增殖的内源性调控系统,其中,Cyclin D1 在细胞周期 G1 期启动,是 Wnt 信号通路 β-catenin 下游靶基因,调控细胞增殖、分化和迁移。Wnt 信号通路在眼科学角膜病相关研究中尚处于起步阶段,有研究证实人角膜上皮细胞有 Cyclin D1 蛋白的表达,且 Wnt1 蛋白可促进 Cyclin D1 蛋白基因的表达,且其表达量与 Wnt1 蛋白量呈正相关<sup>[12]</sup>。内外环境刺激下,核糖核酸酶 5 上调 Cyclin D1 蛋白, D3 等通过激活 PI3 激酶/Akt/CECs 启动细胞周期进程,促进角膜内皮损伤愈合<sup>[3]</sup>。基于此,我们初步推断 Cyclin D1 蛋白在调控细胞周期的

作用下,促进了角膜相关细胞活化增殖能力,呈正性调节作用,且与某些信号分子有关。在前期研究<sup>[12]</sup>基础上,本实验设置 25mmol/L 葡萄糖处理组和蒸馏水正常对照组,通过给予角膜上皮细胞划伤刺激后,qRT-PCR 检测两组组间差异性和时间点测量值的时间差异性分析,结果具有统计学意义。划伤刺激后检测两组 Cyclin D1 mRNA 表达水平上调,高糖处理组与正常对照组相比,Cyclin D1 mRNA 表达呈上调趋势,但随着高糖处理时间延长,上调作用减弱,且在 48h 处 mRNA 水平恢复至与对照组同一水平。而 Western blot 检测蛋白表达结果显示:高糖组在各时间点检测的 Cyclin D1 蛋白表达量均低于正常组,提示高糖对 Cyclin D1 的表达存在抑制作用。基因的表达调控存在转录、转录后修饰及翻译等水平的调控,RNA 表达量就是转录水平调控,而蛋白表达量则收到转录后修饰及翻译水平的调控,本研究中的 Cyclin D1 的 RNA 表达和蛋白表达量不一致,说明 Cyclin D1 在角膜上皮细胞中的表达调控可能存在转录后修饰或者翻译水平的调控。另一方面,本实验采用模拟高糖环境,与真正的糖尿病患者角膜上皮细胞所处环境有所差异,故不排除这是导致 qRT-PCR 结果与 Western blot 结果不一致的原因。划伤刺激增加 Cyclin D1 的上调,而高糖环境下,人角膜上皮创伤愈合延迟,并随时间延长呈进行性损害,Cyclin D1 表达受损,从而导致细胞在相应的时相受阻,细胞周期循环不能进行,细胞不能进行有丝分裂,从而诱导人角膜上皮细胞凋亡,这可能是导致角膜上皮细胞创伤愈合延迟的原因之一。另外,也有研究显示,高糖通过活性氧系统抑制表皮生长因子受体的信号转导,从而抑制角膜上皮细胞损伤后修复<sup>[13]</sup>,多种信号通路系统参与调控角膜创伤愈合,这与本实验结论相一致,但是 Cyclin D1 是否可以作为药物相关靶基因,尚需更多研究加以证实。

角膜上皮微环境的动态平衡对维持正常视力和上皮组织的完整性极为重要,人角膜上皮细胞体外培养有助于了解角膜细胞的生物学特性、构建体外疾病模型、构建生物人工角膜<sup>[14]</sup>以及更好地发挥其临床作用<sup>[15]</sup>,譬如利用 Rock 抑制剂联合低氧-常氧培养方式构建工程角膜上皮<sup>[16]</sup>,有助于深入认识角膜上皮病变的病理生理过程,为角膜病的发病机制提供新的思路。本实验采用 25mmol/L 葡萄糖浓度培养基,角膜上皮细胞生长环境为高渗状态,高渗透压可能影响细胞功能及炎症介质功能。譬如谭秋凡等<sup>[17]</sup>研究在高渗条件下,炎症小体各聚合成分和炎症因子的 mRNA 水平上调,人角膜上皮细胞中 c-Jun 氨基末端蛋白激酶对其释放的具有抑制作用。本实验未把渗透压因素作为研究变量,可能对结果有一定影响。但高糖对角膜上皮细胞创伤修复的影响,是否与高渗作用有关,也需要通过后续实验验证。细胞周期蛋白在眼表疾病的科研应用国内外鲜有研究报道,且机制较为复杂,我们实验

初步探索下存在不足之处,也缺少针对蛋白的统计与量化,尚待开展更多高质量研究进一步优化,弥补不足。

综上所述,由于糖尿病导致的疾病流行率、相关医疗费用<sup>[18]</sup>和视力损害的增加,因此,临床医生理应重视并加强对DK的探索。本次实验初步探讨了高糖状态下角膜上皮细胞增殖与分化的潜在机制,以及细胞周期素 Cyclin D1 蛋白基因表达的相关意义,有助于深入了解糖尿病性角膜上皮创伤愈合延迟的分子调控机制,并为DK研究提供新的实验理论依据。

#### 参考文献

- 1 罗荣莹. 糖尿病性角膜病变研究进展. 中华实验眼科杂志 2018;36(6):472-476
- 2 师忠芳, 韩明, 徐立新等. 体外培养大鼠星形胶质细胞划伤模型. 中国康复理论与实践 2007;13(12):1132-1133
- 3 余卫, 张涓. 细胞周期与细胞凋亡共同的调控分子——Survivin 蛋白. 暨南大学学报(自然科学与医学版) 2003;24(6):41-45
- 4 陈晶. 铁皮石斛多糖对高糖状态下 HCEC 增殖、凋亡及 AR、LN 表达的影响. 南华大学 2016
- 5 张颖. IGF-1 调控  $\beta$ -catenin 信号参与糖尿病角膜上皮细胞创伤愈合的机理. 山东大学 2014
- 6 Kim KW, Park SH, Lee SJ, et al. Ribonuclease 5 facilitates corneal endothelial wound healing via activation of PI3-kinase/Akt Pathway. *Sci Rep* 2016;6:31162
- 7 Ensor W, Vrabcic T. Factors associated with corneal epithelial defects after pars plana vitrectomy. *Int Ophthalmol* 2019; 39(4):735-736
- 8 Zhang Y, Chen P, Di G, et al. Netrin-1 promotes diabetic corneal wound healing through molecular mechanisms mediated via the adenosine

2B receptor. *Sci Rep* 2018; 8(1):5994

- 9 Qu JH, Li L, Tian L, et al. Epithelial changes with corneal punctate epitheliopathy in type 2 diabetes mellitus and their correlation with time to healing. *BMC Ophthalmol* 2018; 18(1):1
- 10 Tomomatsu T, Takamura Y, Kubo E, et al. Aldose reductase inhibitor counteracts the attenuated adhesion of human corneal epithelial cells induced by high glucose through modulation of MMP-10 expression. *Diabetes Res Clin Practice* 2009; 86(1):1-23
- 11 Song F, Xue Y, Dong D, et al. Insulin Restores an Altered Corneal Epithelium Circadian Rhythm in Mice with Streptozotocin-induced Type 1 Diabetes. *Sci Rep* 2016;6:32871
- 12 陈梨萍, 李科, 郑振优, 等. Wnt1 蛋白对人角膜上皮细胞 Cyclin D1 蛋白表达的影响及意义. 实用医学杂志 2017;33(11):19-22
- 13 Xu KP, Li YF, Ljubimov AV, et al. High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes* 2009;58(5):1077-1085
- 14 崔雯雯, 肖国蓓, 龚小娜, 等. 人工角膜的临床应用进展. 实用临床医学 2018;19(7):104-107, 110
- 15 王宇静, 杨燕宁. 人角膜上皮细胞体外培养的研究进展. 眼科新进展 2017;37(4):384-387, 391
- 16 瞿杨洛娃, 欧尚坤, 刘婷婷, 等. 一种基于胚胎干细胞构建角膜上皮样组织的新方法. 中华实验眼科杂志 2018; 36(11):826-833
- 17 谭秋凡, 陈淮程, 朱奕睿, 等. c-Jun 氨基末端蛋白激酶在人角膜上皮细胞调控 NLRP3 炎症小体激活中的作用. 温州医科大学学报 2018;48(1):13-19
- 18 贺小宁, 张雅雯, 阮贞, 等. 中国 2 型糖尿病患者慢性并发症患病率与次均医疗费用研究. 中华内分泌代谢杂志 2019;35(3):200-205