

网络出版时间: 2019-7-15 18:05 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190715.0922.001.html>

◇基础医学研究◇

胺丁羟磷酸盐抑制皮肤角质形成细胞的增殖作用

顾亚男, 周宏, 朱婷婷, 李名聪, 罗欣, 张胜权

摘要 目的 探讨胺丁羟磷酸盐(ALD) 对皮肤角质形成细胞(KCs) 增殖的影响及中间产物是否拮抗其影响。方法 一定浓度的 ALD、甲羟戊酸(MVA)、胆固醇(CH)、法尼基焦磷酸(FPP)、香叶基香叶基焦磷酸(GGPP) 单独或联合处理 KCs, 细胞活力测定实验(MTS) 法分析各处理组对 KCs 细胞增殖的影响; 利用流式细胞术检测各加药组对细胞周期的影响; Western blot 分析各加药组对细胞周期蛋白 B1(Cyclin B1)、Cyclin E 和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂(P21) 及磷酸化的蛋白激酶 B(pAKT) 和磷酸化的胞外信号调节激酶 1/2(pERK1/2) 表达量的影响。结果 MTS 实验表明 ALD 对 KCs 增殖有显著抑制作用, 而上游产物 MVA 与其有协同效应; 下游产物中仅 CH 有部分补救作用。流式细胞术检测结果显示 KCs 被 ALD 阻滞在细胞分裂间期 G₁ 期, 而仅 CH 可减弱 ALD 导致的 G₁ 期阻滞。Western blot 结果表明 ALD 显著下调 Cyclin B1, 同时上调 Cyclin E 和 P21 的表达。此外, ALD 能促进磷脂酰基 3-激酶-蛋白激酶 B(PI3K-AKT) 信号通路, 抑制丝裂原激活蛋白激酶-胞外信号调节激酶(MAPKS-ERK1/2) 信号通路的激活。结论 ALD 显著抑制原代 KCs 的增殖, CH 对这种抑制有部分的补救作用。

关键词 甲羟戊酸代谢途径; 胺丁羟磷酸盐; 胆固醇; 皮肤角质形成细胞; 增殖

中图分类号 R 329.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1169-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.001

甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA) 代谢途径是细胞生长过程中重要的代谢途径, 其中间产物与终产物包括 MVA、法尼基焦磷酸(farnesyl diphosphate, FPP)、香叶基香叶基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGPP) 和胆固醇(cholesterol, CH) 等^[1]。此代谢途径产生的 FPP 和 GGPP 可以为小 G 蛋白的脂化过程提供异戊烯基, 从而参与蛋白活化过程, 以

此来影响细胞代谢途径(尤其是对 Ras 超家族)^[2]; 此外, CH 是细胞内膜的组成成分, 也可转化成生物活性物质^[3-4]。研究^[5]表明, MVA 代谢途径中的代谢产物会影响细胞的增殖、分化与凋亡。

MVA 代谢途径中一些酶的特异性抑制剂, 如: 3-羟基 3-甲基戊二酰辅酶 A(3-Hydroxy-3-Methylglutary CoA, HMGCoA) 还原酶抑制剂、他汀类及胺丁羟磷酸盐(alendronate, ALD) 等能通过改变细胞周期相关蛋白的表达来对皮肤角质形成细胞(keratinocytes, KCs) 增殖产生抑制作用^[6]。此外, 当编码 MVA 途径的基因纯合突变时, 由于突变位点的不同从而酶活性缺失程度不同^[7]。2012 年 Zhang et al^[8] 研究表明甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase, MVK) 的杂合突变可导致播散型浅表性汗孔角化症。以上表明了 MVA 途径对皮肤的生长发育产生的重要影响, 但对皮肤影响的可能机制尚不明确。因此, 该实验通过对 KCs 添加一种法尼基合成酶的抑制剂 ALD 来探讨其对 KCs 增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 KCs 细胞是由外科手术所得皮肤经分离获得; M154CF 培养基、胶原涂层基质、中性蛋白酶、胎牛血清和 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 青霉素链霉素溶液、RIPA 裂解液及细胞周期试剂盒购自上海碧云天生物公司; 细胞活力测定实验(MTS) 试剂盒及抑制剂 ALD、MVA、CH、FPP、GGPP 均购自美国 sigma 公司; 细胞周期蛋白 B1(cell cycle protein B1, Cyclin B1)、Cyclin E 及 β -actin 购自美国 abcam 公司; 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂(cyclin-dependent protein kinase inhibitor, P21)、磷酸化的蛋白激酶 B(phosphorylated protein kinase B, pAKT)、磷酸化的胞外信号调节激酶 1/2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, pERK1/2) 均购自美国 Santa Cruz 公司; 所用二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 外科手术获得无菌新鲜皮肤组

2019-04-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271748); 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A195)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 顾亚男, 女, 硕士研究生;

张胜权, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sqz36@yahoo.com

织,无血清的培养基清洗数次以去除表面细菌。用已消毒的镊子和剪刀将皮肤组织剪成数个小块,继续用无血清的培养基冲洗多次后,放置于装有无菌 0.4% 中性蛋白酶的离心管中,4℃ 消化过夜。第 2 天取出消化完全的皮肤组织,无菌镊子撕下表皮,加入 0.025% 的胰蛋白酶消化 3~5 min,然后置于 200 目细胞筛上,用无菌注射器钝头研磨,并用无菌无血清的培养基冲洗数次,将所得液体离心,用 M154 缓慢吹打形成 KCs 悬液,按一定比例接种于细胞培养瓶中,在 37℃、5% CO₂ 恒温恒湿细胞培养箱内培养。本实验中所用药物浓度为 ALD 100 μmol/L、MVA 200 μmol/L、CH 40 μmol/L、FPP 5 μmol/L、GGPP 1 μmol/L。

1.2.2 细胞活力测定实验(MTS) 0.025% 胰酶消化收集 KCs 细胞接种于已铺有胶原涂层的 96 孔板中,细胞悬液浓度调整为 6×10^4 /ml,每孔 100 μl,待细胞达到一定覆盖率时(70%~80%),按以下处理方式:ALD、ALD+MVA、ALD+CH、MVA、CH、ALD+FPP、ALD+GGPP、FPP、GGPP 加入相应药物(药物浓度参见 1.2.1 细胞培养);并设置空白对照组。继续培养 2 d 后,每孔加 20 μl MTS 试剂后,混匀,在细胞培养箱里孵育 2~4 h 后使用酶标仪检测其 490 nm 处的吸光度(optical density, OD)值,实验重复 3 次。

1.2.3 细胞周期检测 0.025% 胰酶消化收集 KC 细胞接种于已铺有胶原涂层的 6 孔板中,每孔细胞数为 5×10^4 ,在孵箱内培养,待细胞密度达到 70%~80% 时,分为药物单独作用组(药物浓度参见 1.2.1 细胞培养):ALD、MVA、CH、FPP、GGPP;联合作用组:ALD+MVA、ALD+CH、ALD+FPP、ALD+GGPP;并设置空白对照组作用 2 d 后,用 0.025% 胰酶消化后收集 KCs 细胞,按照细胞周期试剂盒的说明书操作后,室温下避光染色 30 min,流式细胞仪检测细胞周期,Flowjo 软件分析细胞周期,实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测蛋白 P21、Cyclin B1 和 Cyclin E 的表达 用 0.025% 胰酶消化收集 KCs 细胞接种于已铺有胶原涂层的 24 孔板中,每孔细胞数为 2×10^5 ,待细胞达到 70%~80% 汇合度时,分为药物单独作用组(药物浓度参见 1.2.1 细胞培养):ALD、MVA、CH、FPP、GGPP;联合作用组:ALD+MVA、ALD+CH、ALD+FPP、ALD+GGPP;并设置空白对照组作用 2 d 后,提取细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,按 10 μl/孔上样量加入适当浓度

的胶中,然后进行电泳(浓缩胶 60 V,40 min;分离胶 120 V,1 h)、转移(恒流 300 mA,1.5 h)、封闭(5% 脱脂牛奶封闭 2 h)、孵育一抗(4℃,过夜)、孵育二抗(常温摇床孵育 2 h),洗膜后用 Thermo SuperSignal West Pico Trial Kit 化学发光底物显影,分析各蛋白的表达。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 软件进行统计分析,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CH 能部分补救 ALD 对 KCs 增殖抑制效应

ALD(100 μmol/L)单独处理 KCs 细胞时,其显著抑制 KCs 的增殖,抑制率为 50%,与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);当给 ALD 分别补充 MVA、CH、FPP、GGPP 时,仅 CH 有部分补救 ALD 对 KCs 增殖抑制的影响,与只加 ALD 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);而 MVA 可协同 ALD 对 KCs 增殖的抑制效应。见图 1。

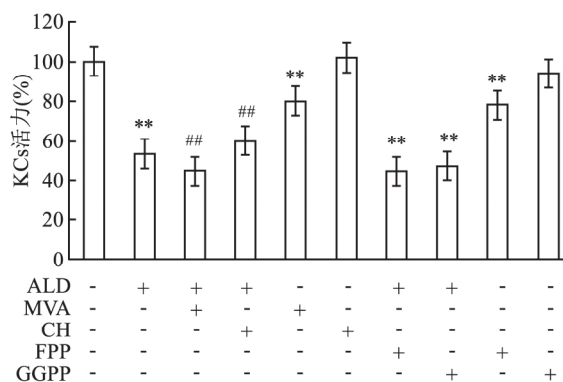


图1 ALD单独或联合MVA、CH、FPP、GGPP对KCs增殖抑制作用

与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与只加 ALD 组比较: ## $P < 0.01$

2.2 CH 能调节 ALD 对 KCs 细胞周期 G₁ 期的阻滞效应 ALD 单独作用于 KCs 时,可造成细胞 G₁ 期阻滞;当补充 MVA、CH、FPP、GGPP 进行处理时,仅 CH 能够部分补救 ALD 引起的 G₁ 期阻滞,FPP、GGPP 单独处理 KCs 时均能造成细胞 G₁ 期阻滞,并且 FPP 能协同 ALD 的 G₁ 期阻滞,与只加 ALD 组相比差异有统计学意义($F = 55.913$, $P < 0.05$)。见图 2。

2.3 ALD 单独或联合 MVA、CH、FPP、GGPP 处理 KCs 对 Cyclin B1、Cyclin E 和 P21 表达的影响

ALD 单独处理 KCs 后,与空白对照组比较,ALD 显著下调 Cyclin B1、上调 P21、Cyclin E 的表达 ($P < 0.01$);联合补充 MVA、CH 后,均能协同 ALD,从而上调 P21 的表达 [ALD 与 MVA 交互作用 ($F = 45.105, P < 0.01$),ALD 与 CH 交互作用 ($F = 106.525, P < 0.01$)]拮抗 ALD 对 Cyclin B1 的下调 [ALD 与 MVA 交互作用 ($F = 352.476, P < 0.01$)],ALD 与 CH 交互作用 ($F = 163.661, P < 0.01$)]拮抗 ALD 下调 Cyclin E 的表达 [ALD 与 MVA 交互作用 ($F = 34.896, P < 0.01$),ALD 与 CH 交互作用 ($F =$

64.070, $P < 0.01$)]与 ALD 组比较,差异均有统计学意义,见图 3A、3B。联合补充 FPP 后,可协同 ALD 下调 Cyclin B1 的表达 [ALD 与 FPP 交互作用 ($F = 23.924, P < 0.01$)]拮抗 ALD 上调 Cyclin E [ALD 与 FPP 交互作用 ($F = 8.930, P < 0.01$)]P21 的表达 [ALD 与 FPP 交互作用 ($F = 62.505, P < 0.01$)]与 ALD 组相比,均有统计学意义;当补充 GGPP 时,能协同 ALD 上调 Cyclin E 的表达 [ALD 与 GGPP 交互作用 ($F = 6.291, P < 0.01$)]与 ALD 组比较,差异均有统计学意义。见图 3C、3D。

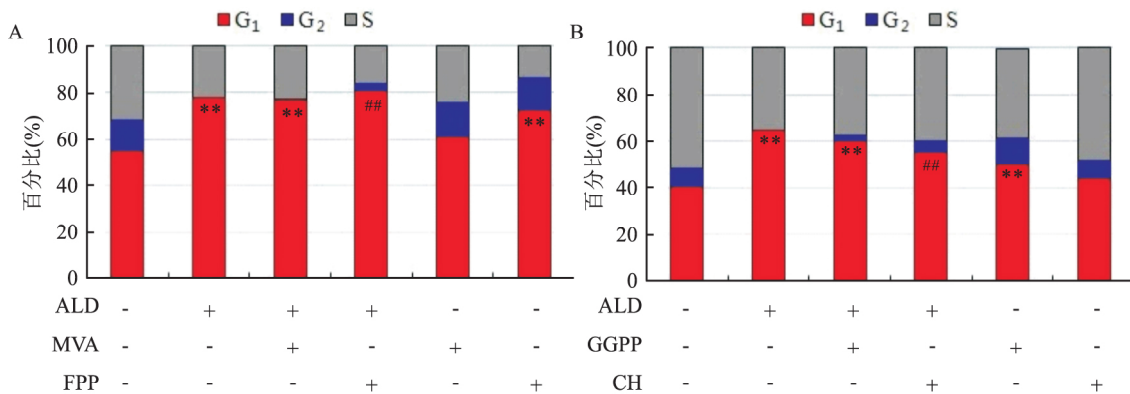


图2 流式细胞术检测细胞周期

A: ALD 单独或联合 MVA、FPP 对 KCs 细胞周期的影响; B: ALD 单独或联合 GGPP、CH 对 KCs 细胞周期的影响; 与空白对照组比较: $**P < 0.01$; 与只加 ALD 组比较: $##P < 0.01$

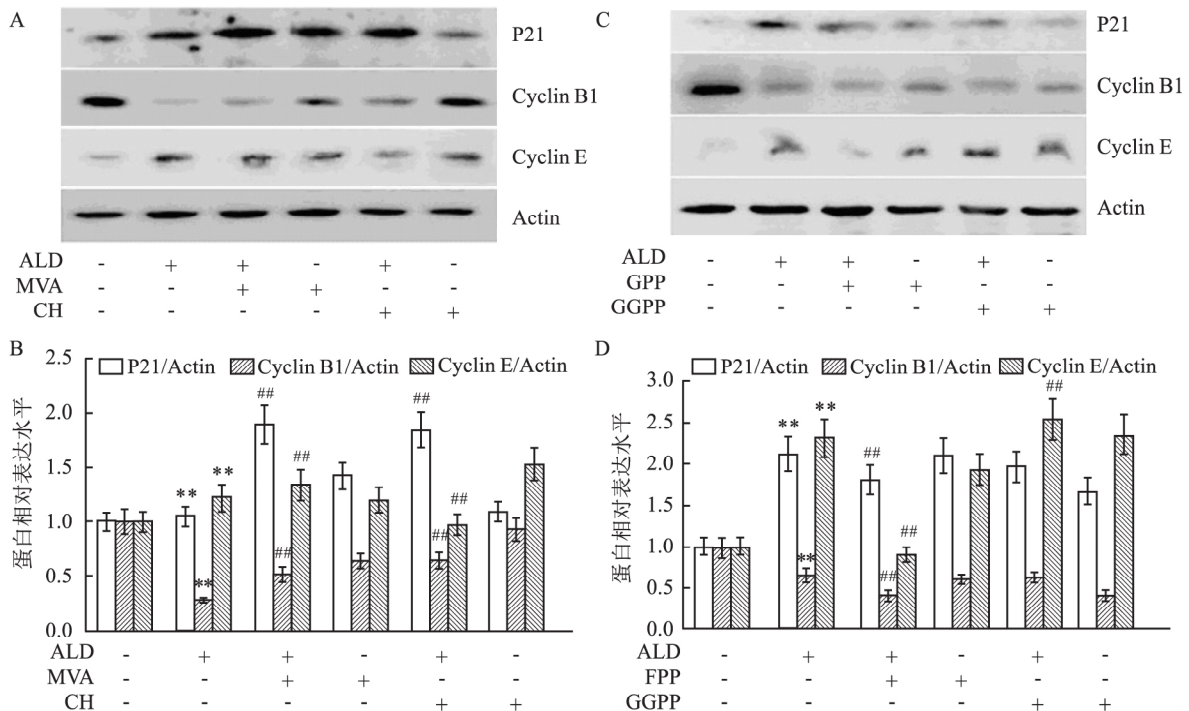


图3 ALD 单独或联合用药对 KCs 细胞周期蛋白表达的影响

A: ALD 单独或联合 MVA、CH 对 KCs 细胞周期蛋白的影响; C: ALD 单独或联合 FPP、GGPP 对 KCs 细胞周期蛋白的影响; B、D: 蛋白表达的灰度分析; 与空白对照组比较: $**P < 0.01$; 与只加 ALD 组比较: $##P < 0.01$

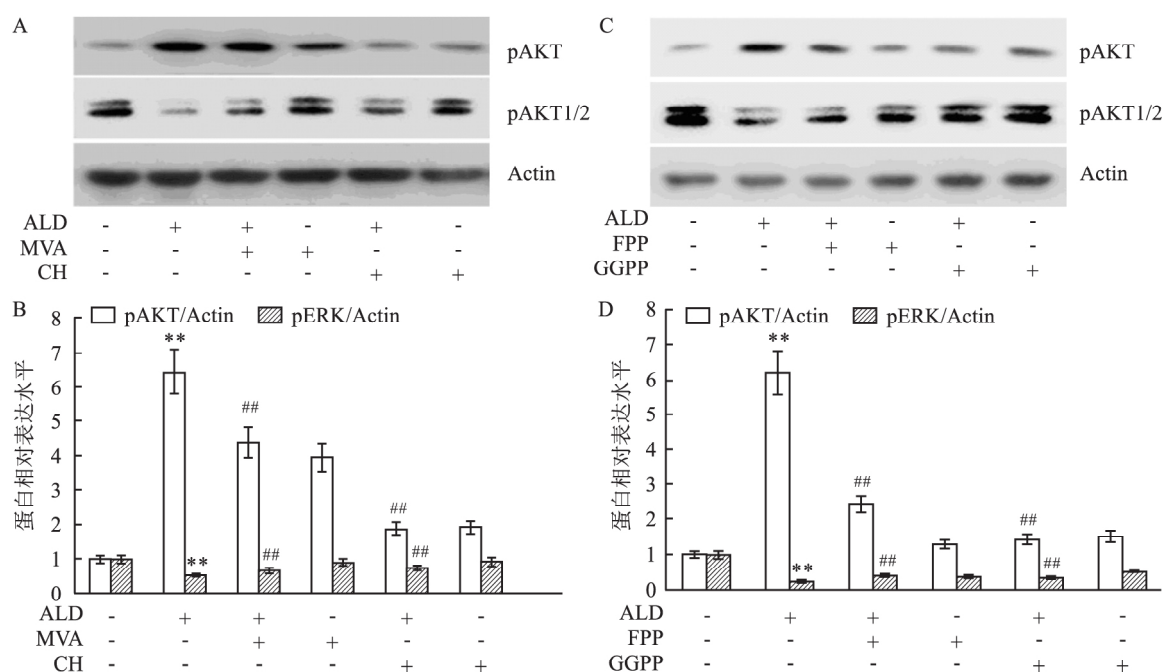


图4 ALD单独或联合用药对KCs信号途径相关蛋白表达的影响

A: ALD单独或联合MVA、CH对KCs信号途径相关蛋白的影响; C: ALD单独或联合FPP、GGPP对KCs信号途径相关蛋白的影响; B、D: 蛋白表达的灰度分析; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与只加ALD组比较: ## $P < 0.01$

2.4 ALD单独或联合MVA、CH、FPP、GGPP处理KCs对PERK1/2、PAKT表达的影响 ALD单独处理KCs时,显著上调PAKT的表达量($F = 33.564$, $P < 0.01$),下调PERK1/2的表达($F = 394.753$, $P < 0.01$),与空白对照比较差异有统计学意义;当给ALD处理组联合补充MVA、CH、FPP、GGPP时,MVA可拮抗ALD的PERK1/2下调,与ALD组比较,差异均有统计学意义[ALD与MVA交互作用($F = 32.413$, $P < 0.01$)],见图4A、4B。而CH、FPP、GGPP均拮抗PAKT的上调[ALD与CH交互作用($F = 95.622$, $P < 0.01$);ALD与FPP交互作用($F = 136.283$, $P < 0.01$);ALD与GGPP交互作用($F = 699.076$, $P < 0.01$)]及PERK1/2的下调[ALD与CH交互作用($F = 47.359$, $P < 0.01$);ALD与FPP交互作用($F = 139.892$, $P < 0.01$);ALD与GGPP交互作用($F = 284.511$, $P < 0.01$)],与ALD组比较,差异均有统计学意义。ALD与MVA、CH单独或联合补充对PAKT、PERK1/2表达的影响见图4A、4B;ALD与FPP、GGPP单独或联合补充对PAKT、PERK1/2表达的影响见图4C、4D。

3 讨论

皮肤是由表皮构成的机体最重要的器官之一,表皮是由皮肤KCs组成的,皮肤KCs能够阻止皮肤

的水分流失及保护皮肤不受体外细菌等微生物的侵袭。MVA途径对机体来说是非常重要的一条代谢途径,能够对细胞起到非常重要的作用,其代谢中间产物及终产物等可影响到细胞的增殖、分化与凋亡等^[9]。

研究^[10]表明ALD能损害上皮细胞的黏附,抑制人口腔黏膜细胞的分化与增殖。本研究中,ALD抑制KCs的增殖,有可能是由于ALD对法尼基合成酶(farnesyl pyrophosphate synthase, FDPS)的抑制,从而使上游产物MVA积累,下游产物FPP、GGPP、CH缺失;一般来说,上游产物MVA的积累有可能导致细胞MVA中毒,从而加强ALD对KCs的抑制,而下游产物FPP、GGPP的补充应当会减弱ALD的抑制,然而,补充下游产物FPP、GGPP,协同作用了ALD对KCs的抑制;仅CH减弱了ALD的抑制作用。ALD明显降低Cyclin B1的表达,且不同程度上增强了Cyclin E、P21的表达,而CH可上调P21,拮抗ALD对Cyclin B1和Cyclin E的表达。研究^[11-12]表明高表达的Cyclin E会出现在G₁期,而Cyclin B1调控细胞从G₂到M期,P21是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂,抑制细胞周期从G₁期到S期,从而使其阻滞在G₁期。因此,CH通过拮抗ALD对Cyclin B1的表达,从而减弱ALD对细胞周期的阻滞作用。除此之外,本研究还探讨了丝裂原

激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 及磷脂酰基酶 3-激酶 - 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B, PI3K-AKT) 代谢途径对 KCs 细胞增殖产生的影响, 以上两种代谢途径对 KCs 增殖的影响很复杂, 表明了 KCs 的增殖不仅与以上两条代谢途径相关, 更是多种代谢途径共同作用的复杂结果, 有待继续探讨。

综上, ALD 抑制 KCs 增殖, CH 可部分减弱 ALD 对 KCs 增殖的抑制作用。结果表明 CH 的缺失有可能会形成某些与 MVA 代谢途径相关的皮肤方面的疾病, 同样, CH 也为某些 MVA 代谢途径相关的皮肤方面的疾病提供了治疗的新思路。然而, 本实验仅局限于体外细胞研究, 下一步可以此为基础, 构建 MVA 代谢途径相关基因的小鼠模型, 从体外转移到体内来研究 MVA 代谢途径紊乱对皮肤表型的影响及其相关分子机制的研究。

参考文献

- [1] Goldstein J L, Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature*, 1990, 343(6257): 425-30.
- [2] Ma S, Ma C C. Recent development in pleiotropic effects of statins on cardiovascular disease through regulation of transforming growth factor- β superfamily [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22: 167-75.
- [3] Slominski A T, Zmijewski M A, Semak I, et al. Cytochromes p450 and skin cancer: role of local endocrine pathways [J]. *Anticancer Agents Med Chem* 2014, 14(1): 77-96.
- [4] Slominski A T, Manna P R, Tuckey R C. On the role of skin in the regulation of local and systemic steroidogenic activities [J]. *Steroids*, 2015, 103: 72-88.
- [5] Thurnher M, Gruenbacher G, Nussbaumer O. Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells [J]. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1831(6): 1009-15.
- [6] Kim R H, Lee R S, Williams D, et al. Bisphosphonates induce senescence in normal human oral keratinocytes [J]. *J Dent Res*, 2011, 90(6): 810-6.
- [7] Carapito R, Carapito C, Morlon A, et al. Multi-OMICS analyses unveil a potential modifier gene in mevalonate kinase deficiency [J]. *Ann Rheum Dis* 2018, 77(11): 1675-87.
- [8] Zhang S Q, Jiang T, Li M, et al. Exome sequencing identifies MVK mutations in disseminated superficial actinic porokeratosis [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(10): 1156-60.
- [9] 金锐, 王芳, 栾康, 等. 甲羟戊酸激酶基因真核及 shRNA 表达载体构建及其对 BxPC-3 细胞周期蛋白表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(1): 22-6.
- [10] Donetti E, Gualerzi A, Sardella A, et al. Alendronate impairs epithelial adhesion, differentiation and proliferation in human oral mucosa [J]. *Oral Diseases*, 2014, 20(5): 466-72.
- [11] Dai X, Yamasaki K, Yang L, et al. Keratinocyte G2/M growth arrest by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 is caused by Cdc2 phosphorylation through Wee1 and Myt1 regulation [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 122: 1356-64.
- [12] Zhang X, Song X, Yin S, et al. p21 induction plays a dual role in anti-cancer activity of ursolic acid [J]. *Exp Biol Med*, 2016, 241(5): 501-8.

Inhibitory effect of amphoteric alendronate on proliferation of skin keratinocytes

Gu Yanan, Zhou Hong, Zhu Tingting, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of alendronate (ALD) on the proliferation of skin keratinocytes (KCs) and to observe the effect of downstream products on this effect. **Methods** KCs were treated with a certain concentration of ALD, mevalonate (MVA), cholesterol (CH), farnesyl pyrophosphate (FPP), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) alone or in combination. MTS was performed to analyze the impact of ALD on the proliferation of KCs. Flow cytometry was used to detect the effect of each drug-added group on cell cycle. Western blot was used to analyze the level of Cyclin B1, Cyclin E and P21, pAKT and pERK1/2. **Results** MTS results showed that ALD significantly inhibited the proliferation of skin keratinocytes (KCs). Flow cytometry results of cell-cycle indicated that ALD caused G₁ arrest. Only CH could rescue the proliferation inhibition and G₁ arrest caused by ALD. Western blot results showed that ALD significantly down-regulated Cyclin B1 and up-regulated the expression of Cyclin E and P21. In addition, ALD could promote the PI3K-AKT signaling pathway and inhibit the activation of the MAPKs-ERK1/2 signaling pathway. **Conclusion** ALD significantly inhibits the proliferation of primary skin keratinocytes (KCs), and CH has a partial remedy for this inhibition.

Key words mevalonate pathway; alendronate; cholesterol; keratinocytes; proliferation