

羊毛固醇合成酶抑制剂 RO 对 KCs 细胞增殖的影响

刘莉, 顾亚男, 周宏, 李名聪, 罗欣, 张胜权

摘要 目的 研究羊毛固醇合成酶抑制剂(RO)单独或联合胆固醇(CH)使用对皮肤角质形成细胞(KCs)细胞增殖及细胞周期的影响。**方法** RO不同剂量作用KCs一定时间,采用MTS比色法检测KCs细胞增殖的变化;使用一定浓度的RO单独或联合CH作用KCs不同时间,使用MTS比色法和流式细胞仪检测记录KCs细胞增殖和细胞周期的变化;单独使用相同浓度RO或联合CH经过不同时间刺激KCs后通过蛋白质免疫印迹法对细胞周期蛋白CyclinB1、CyclinE表达水平进行分析。**结果** RO抑制KCs细胞增殖,并呈浓度和时间依赖性;联合使用CH降低RO对KCs的增殖抑制作用;RO可时间依赖性增加KCs细胞周期在G1期比例,联合使用CH缓慢增加KCs周期在G1期比例;RO可时间依赖性降低细胞周期调控蛋白CyclinB1、CyclinE的表达,联合使用CH部分拮抗RO下调CyclinE,并具有时间效应,而CyclinB1的表达没有受到明显的影响。**结论** RO可能通过影响CyclinB1、CyclinE的表达使KCs细胞周期G1期阻滞进而抑制KCs增殖。

关键词 RO; CH; KCs; 细胞增殖; 细胞周期蛋白

中图分类号 R 3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0176-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.002

甲羟戊酸途径是各种生命活动中关键的代谢途径之一,该途径主要与细胞内信号转导、细胞增殖等生理活动进程相关。该途径产生众多的中间产物与下游产物,其中主要包括甲羟戊酸(mevalonic, MVK)、香叶焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)、法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)、羊毛固醇(lanosterol, LAN)、胆固醇(cholesterol, CH)等多种脂类物质^[1]。研究发现在甲羟戊酸途径中关键酶编码的基因突变能导致单基因遗传疾病,并且这些疾病中的大部分都表现出了皮肤损伤^[2-3]。皮肤是人体抵御外界侵袭的第一道屏障,参与构成的主要是表皮,由角质形成细胞(keratinocytes, KCs)组成。

有研究发现表皮是甲羟戊酸代谢途径最活跃的场所之一^[4]。甲羟戊酸途径作为影响生命活动的重要途径,在细胞中受到严格的控制,该途径的代谢异常可能参与癌症、心血管系统和神经系统等疾病的发生发展^[5-6]。研究表明羊毛固醇合成酶抑制剂(RO 48-8071)能够抑制乳腺癌细胞中CH的合成,从而无法形成胆固醇类固醇激素的合成前体,下调雌激素水平,抑制乳腺癌细胞增殖^[7]。此外,该实验室前期研究指出MVK的杂合突变可导致播散型浅表性汗孔角化症(disseminated superficial actinic porokeratosis, DSAP)^[8],这些都表明甲羟戊酸代谢途径在皮肤生长发育和疾病转化过程中扮演重要角色,但其具体的调控机制尚不清楚。该研究使用了羊毛固醇合成酶抑制剂RO探讨甲羟戊酸途径异常对KCs增殖的影响并探索其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 小牛血清、MEPICF 500培养基、0.06 mol/L NaCl、Coating Matrix 基质、HKGS(100×)和0.25%胰酶均购于美国Gibco公司;Dispase购于美国Sigma公司;细胞周期试剂盒购于中国上海碧云天生物公司;MTS试剂盒购于美国Promega公司;Cyclin B1、CyclinE及β-actin均购于美国Abcam公司;二抗购于北京中杉金桥生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原代皮肤角质形成细胞培养 取新鲜切除的包皮组织,生理盐水浸泡清洗后用无血清无双抗的DMEM培养基清洗3~5次,用无菌手术剪剪去多余皮下组织并清洗表面细菌,然后将皮肤组织剪成0.5 cm×0.5 cm大小的组织块,用0.4%中性蛋白酶在4℃消化过夜,期间上下颠倒1~2次,充分消化;次日用无菌镊子分离表皮和真皮,表皮中加入0.025%胰酶(含0.01% EDTA)置于37℃孵箱中消化5 min,用含10%胎牛血清DMEM培养基终止胰酶消化;使用200目滤网研磨过滤细胞,1500 r/min,5 min离心,去上清液收集细胞沉淀,按照原代皮肤细胞培养要求配置MEPICF 500培养基并以

2020-09-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271748)

作者单位: 安徽医科大学科研实验中心, 合肥 230032

作者简介: 刘莉, 女, 硕士研究生;

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

5×10^4 个/ml 的细胞数接种, 细胞培养瓶置于 37°C , 5% CO_2 孵箱传代培养 3 代后用于本实验研究。

1.2.2 MTS 法检测细胞增殖 消化收集在对数生长期的 KCs 细胞, 并以细胞计数为 5×10^3 个/ml, 接种于 96 孔板, 每孔 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液, 置于 37°C , 5% CO_2 孵箱培养 1 d 后加入 RO 药液, 使终浓度为 0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$, 并设对照组(0 $\mu\text{mol/L}$), 继续贴壁培养 3 d 后加入 MTS 试剂, 按照试剂盒使用说明书用酶标仪检测 OD 值。同上述方法接种 96 孔板, RO (10 $\mu\text{mol/L}$) 单独或联合 CH (40 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 KCs, 刺激时间分别为 1、2、3 d, 对照组培养孔中加入相同浓度的 PBS, 培养 3 d 后加入 MTS 试剂, 按照试剂盒使用说明书用酶标仪检测 OD 值。根据 OD 值计算每组细胞存活率。

1.2.3 细胞周期检测 消化收集在对数生长期的 KCs 细胞, 接种于 12 孔板使细胞接种最终计数为 5×10^4 个/ml, 置于 37°C , 5% CO_2 孵箱贴壁培养过夜, 单独加入 RO (10 $\mu\text{mol/L}$) 或联合 CH (40 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 KCs, 刺激时间分为 1、2、3 d, 对照组培养液中加入相同浓度的 PBS。3 d 后胰酶消化再次收集细胞, 按照周期试剂盒操作指南, 用流式细胞仪检测细胞周期。检测数据结果用 Flowjo 7.6.1 分析。

1.2.4 细胞周期相关蛋白检测 提取细胞总蛋白, 并按照 $10 \mu\text{l}$ /孔上样量进行 SDS-PAGE 分离蛋白。用 10% 分离胶分离电泳后, 将蛋白质从分离胶中转移到 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉膜室温摇床封闭 2 h。1 : 1 000 稀释 CyclinB1、CyclinE 及 1 : 5 000 稀释 β -actin 抗体作为一抗, 4°C 孵育过夜。TBST 漂洗, 1 : 10 000 稀释二抗, 室温孵育 2 h。TBST 漂洗, 滴加化学发光液进行发光和系统成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 t 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RO 抑制 KCs 细胞增殖 RO 抑制 KCs 细胞增殖, 并呈浓度依赖性, MTS 结果显示 RO 药物 $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{mol/L}$, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。RO 可呈时间依赖性抑制 KCs 细胞增殖, 在作用 3 d 时, KCs 细胞相对存活率最低 (35%), 与对照组比较差异有统计学意义 ($t = 54.947$, $P < 0.05$), RO 联合 CH 作用 KCs 细胞后, CH 削弱 RO 对 KCs 的增殖抑制作用, 在联合 CH 处理 3 d KCs

细胞相对存活率最低 (67%), 与对照组比较差异有统计学意义 ($t = 14.986$, $P < 0.05$)。见图 1。

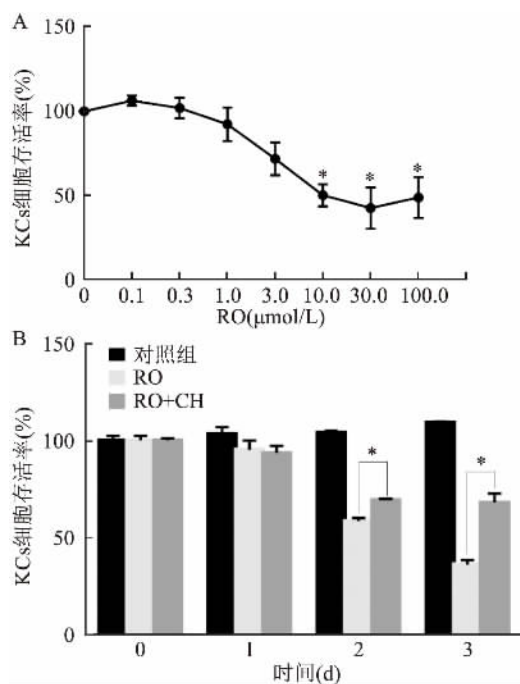


图1 RO单独或联合CH刺激KCs后对细胞存活率的影响

A: 使用不同浓度的RO药物刺激KCs 3 d后对细胞存活率的影响; B: RO (10 $\mu\text{mol/L}$) 单独或联合CH (40 $\mu\text{mol/L}$) 处理KCs不同时间后细胞存活率的变化; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 RO对KCs细胞周期的影响 当RO药物浓度 (10 $\mu\text{mol/L}$) 一定时, 随着作用时间的增加, KCs 细胞周期中的G1期细胞比例上升, 在1、2、3 d实验组G1期DNA平均含量为63.19%、71.54%和83.16%, 与对照组 (54.89%) 比较差异有统计学意义 ($F = 55.9$, $P < 0.05$)。S期呈现下降的趋势, 在1、2、3 d实验组细胞S期DNA平均含量为25.59%、20.43%和9.11%, 与对照组 (35.28%) 比较差异有统计学意义 ($F = 6.635$, $P < 0.05$); G2期细胞比例没有明显变化。RO联合CH处理KCs细胞后, KCs 细胞周期中的G1期细胞比例缓慢上升, S期随着作用时间的增加呈现缓慢下降的趋势, 而G2期细胞比例没有显著变化。见图2。

2.3 周期蛋白表达 蛋白质凝胶电泳结果显示RO单独处理KCs的细胞内CyclinB1、CyclinE蛋白的表达受到明显抑制作用, RO联合CH处理KCs细胞后, RO对CyclinE抑制表达作用减弱, 在联合CH处理2 d最显著 ($P < 0.05$); 但CH对CyclinB1水平的降低没有显著影响。见图3。

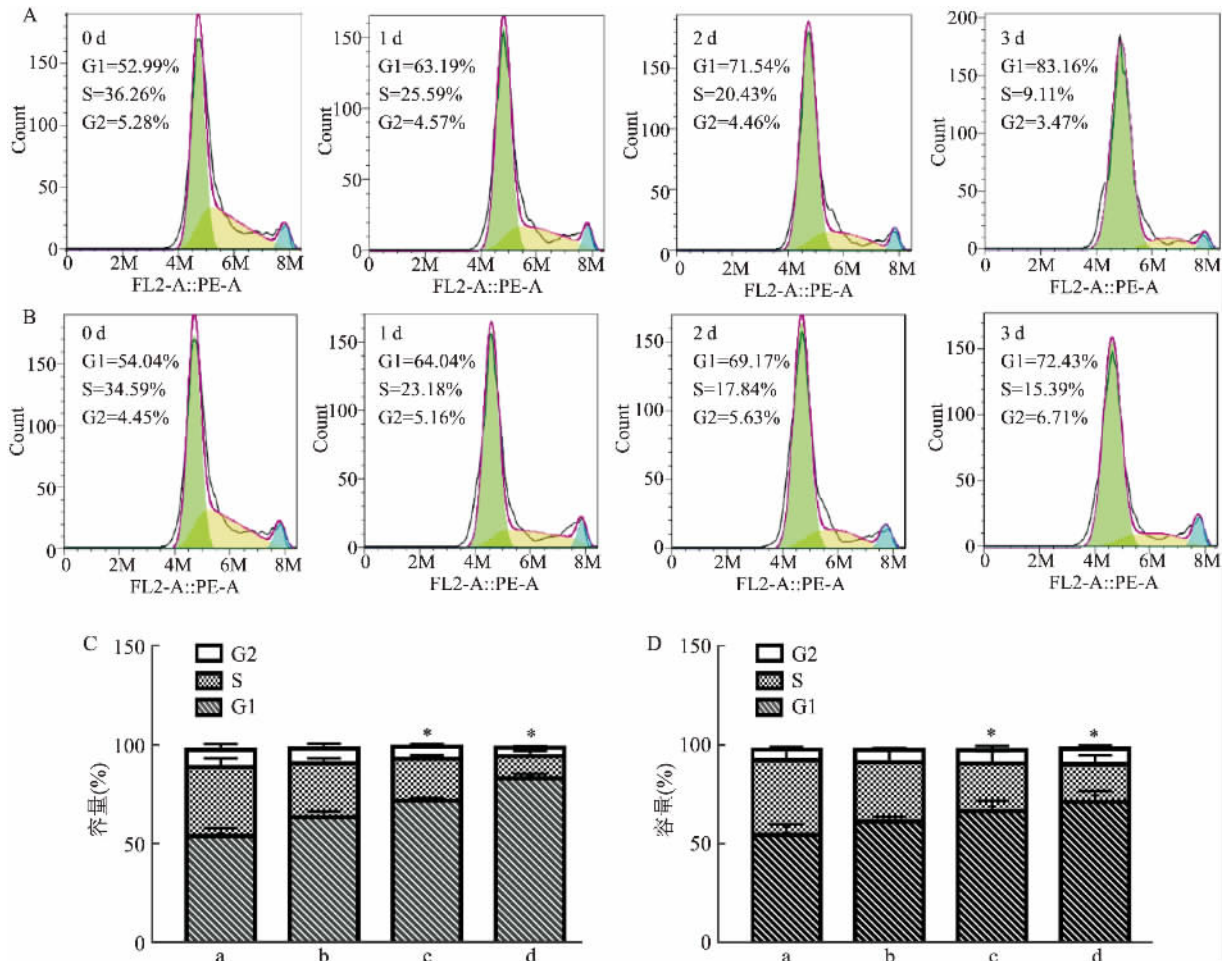


图2 RO单独或联合CH对KCs细胞周期的影响

A: RO 药物单独处理 KCs 不同时间后 KCs 细胞周期的变化; B: RO 联合 CH 处理 KCs 不同时间 KCs 细胞周期的变化; C: 统计 RO 单独作用 KCs 不同时间后各细胞周期比例变化; D: 统计 RO 联合 CH 作用 KCs 不同时间后各细胞周期比例变化; a: 0 d; b: 1 d; c: 2 d; d: 3 d; 与 0 d 比较: * $P < 0.05$

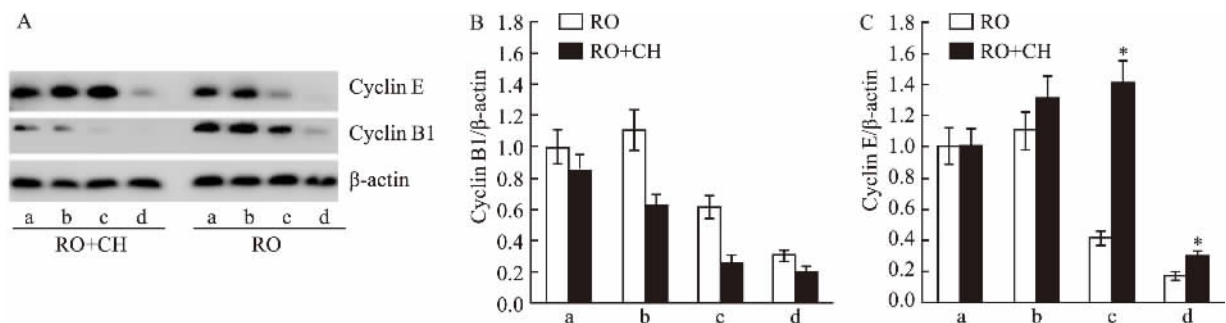


图3 Western blot 分析周期蛋白表达

A: RO 单独或联合 CH 作用 KCs 不同时间后 KCs 细胞内 CyclinB1、CyclinE 表达水平的变化; B: 分析 CyclinB1 表达; C: 分析 CyclinE 表达; a: 0 d; b: 1 d; c: 2 d; d: 3 d; 与同时间段 RO 组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

甲羟戊酸途径是机体重要的代谢活动之一,能够为细胞提供多种营养活性分子。皮肤是人体最大的器官,该器官功能的正常与甲羟戊酸代谢途径顺

利进行息息相关。有研究表明,甲羟戊酸途径中的法尼斯基二磷酸合成酶抑制剂(帕米膦酸盐)可诱导细胞人口腔角质形成细胞衰老和 p63 的表达,并抑制 KCs 增殖^[9]。HMG-CoA 还原酶抑制剂(他汀类、二磷酸盐如唑来膦酸及胺丁膦酸盐)能通过

改变细胞周期相关蛋白表达从而抑制原代角质形成细胞增殖^[10]。在本研究中当 RO 单独作用于 KCs 细胞后,细胞周期的 G1 期阻滞,抑制细胞增殖,并且细胞周期蛋白 CyclinB1、CyclinE 的表达随着作用时间的增加而减少。前期研究发现法尼基转移酶作用 KCs 后,导致 KCs 中 MVA 累积,CH 合成减少,KCs 增殖抑制^[11];本研究发现当 RO 与 CH 联合作用于 KCs 后,CH 可部分削弱 RO 对 KCs 的增殖抑制作用,该结果表明 RO 可能通过减少下游 CH 的合成,进而导致 KCs 细胞基因水平的改变,影响细胞增殖。因此,KCs 的增殖是一个是由许多分子调节的复杂过程。本研究的结果部分解释了甲羟戊酸途径功能障碍所致的 KCs 增殖抑制机制。

综上所述,RO 引起 KCs 甲羟戊酸途径代谢紊乱,KCs 细胞周期和周期蛋白发生了变化,并抑制 KCs 的增殖。因此,有效地调节甲羟戊酸途径顺利进行对 KCs 的增殖至关重要。为研究汗孔角化症等皮肤疾病发病机制提供了一定的理论基础。

参考文献

- [1] Bathaie S Z, Ashrafi M, Azizian M, et al. Mevalonate pathway and human cancers [J]. *Current Molecular Pharmacology*, 2016, 9: 1 - 9.
- [2] Atzmony L, Khan H M, Lim Y H, et al. Second-Hit, Postzygotic PMVK and MVD mutations in linear porokeratosis [J]. *JAMA Dermatol*, 2019, 155(5): 548 - 55.

- [3] Atzmony L, Choate K A. Second-hit somatic mutations in mevalonate pathway genes underlie porokeratosis [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2019, 139: 2409 - 11.
- [4] Feingold K R, Elias P M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(3): 280 - 94.
- [5] Cartocci V, Servadio M, Trezza V, et al. Can cholesterol metabolism modulation affect brain function and behavior [J]. *Cell Physiol*, 2017, 232: 281 - 6.
- [6] Göbela A, Raunera M, Hofbauer L C, et al. Cholesterol and beyond the role of the mevalonate pathway in cancer biology [J]. *Science Direct*, 2020, 188351: 1 - 19.
- [7] Liang Y, Goyette S. Cholesterol biosynthesis inhibitor RO 48-8071 reduces progesterone receptor expression and inhibits progesterone-dependent stem cell-like cell growth in hormone-dependent human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 2017, 9: 487 - 94.
- [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] 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.
- [10] 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.
- [11] Jin R, Luo X, Luan K, et al. Disorder of the mevalonate pathway inhibits calcium-induced differentiation of keratinocytes [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16: 4811 - 6.

Effects of lanosterol synthase inhibitor RO on proliferation of keratinocytes

Liu Li, Gu Yanan, Zhou Hong, et al

(Center for Scientific Research of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of RO or combined cholesterol (CH) on keratinocytes cell proliferation and cyclin expression. **Methods** The KCs were cultured with different concentrations of RO for different times, the proliferation of KCs were analyzed by MTS. Cell cycle of KCs were detected by flow cytometry after using RO with different times or combined treated with CH, and Western blot was used to reveal the expression of CyclinB1 and CyclinE. **Results** The RO inhibited the proliferation of KCs in a quantitative and time-dependent manner. Combined use of CH reduced the proliferation inhibition of RO on KCs. RO could significantly increase the proportion of KCs cell cycle in G1 phase, while combined use of CH reduced G1 phase growth rate of KCs cell cycle. Western blot demonstrated that use of RO could reduced the CyclinB1 and CyclinE content in the KCs in a time dependence manner. Combined use of CH antagonism RO down-regulated Cyclin E, but had no significant effect on the expression of CyclinB1. **Conclusion** RO inhibits the proliferation of KCs by down-regulating the expression of CyclinB1 and CyclinE which blocks the G1 phase of KCs cell cycle.

Key words RO; CH; KCs; cell proliferation; cyclins