

网络出版时间: 2020-2-19 12:57 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.001.html

◇基础医学研究◇

法尼基转移酶抑制剂和香叶基香叶基转移酶抑制剂 对皮肤角质形成细胞增殖的抑制作用

周宏 李名聪 顾亚男 朱婷婷 罗欣 张胜权

摘要 目的 探讨法尼基转移酶抑制剂 (FTI) 和香叶基香叶基转移酶抑制剂 (GGTI) 对皮肤角质形成细胞 (KCs) 增殖的影响。方法 使用不同浓度的 FTI、GGTI 对 KCs 进行处理,细胞活力测定实验 (MTS) 法分析 KCs 增殖受各处理组的影响;利用流式细胞术检测各加药组细胞周期受一定浓度 FTI、GGTI 的影响;Western blot 分析各加药组细胞周期蛋白 CyclinB1、CyclinE 和 P21 及 pAKT 和 pERK1/2 表达量受一定浓度 FTI、GGTI 的影响。结果 MTS 显示 FTI、GGTI 对 KCs 增殖有抑制作用,并呈浓度依赖性,FTI (5 $\mu\text{mol/L}$)、GGTI (5 $\mu\text{mol/L}$) 时 KCs 细胞活力最小,抑制率分别为 14.7%、24.5%。流式周期结果表示 FTI、GGTI 阻滞 KCs 在 G1、G2、S 各期不明显。Western blot 结果表明 FTI、GGTI 均能够下调 CyclinB1,并且可以上调 P21 和 CyclinE 的表达。同时,FTI、GGTI 能促进 PI3K-AKT 信号通路的激活,抑制 MAPKs-ERK1/2 信号通路的激活。结论 FTI、GGTI 对原代 KCs 的增殖有抑制作用。

关键词 甲羟戊酸代谢途径;法尼基转移酶抑制剂;香叶基香叶基转移酶抑制剂;皮肤角质形成细胞;细胞增殖

中图分类号 R 329.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0155-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.001

皮肤覆盖于人体表面,是人体最大的器官之一。皮肤由表皮和真皮两部分组成,其中表皮的关键功能是在生物体和外界之间形成屏障,对人体有重要的保护作用。皮肤角质形成细胞 (keratinocytes, KCs) 是表皮的主要组成部分^[1]。甲羟戊酸途径是细胞重要的代谢途径,其通过合成甾醇类异戊二烯 (如:胆固醇) 和非甾醇类异戊二烯在多种细胞过程中起关键作用^[2]。甲羟戊酸途径的中间产物及终产物包括:甲羟戊酸 (mevalonic, MVA)、法尼基焦磷

酸 (farnesyl pyrophosphate, FPP)、香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)、胆固醇 (cholesterol, CH) 等^[3]。胆固醇是细胞膜系统的组成成份,在体内可进一步转化成重要的生理活性物质,如胆汁酸、类固醇激素及维生素 D (vitamin D, VitD)^[4]。FPP 和 GGPP 可以提供异戊烯基给小 G 蛋白的脂化过程,通过活化蛋白来影响细胞代谢途径^[5]。研究^[6-7]表明法尼基转移酶抑制剂 (farnesyltransferase inhibitor, FTI)-277 和香叶基香叶基转移酶抑制剂 (geranylgeranyl transferase inhibitor, GG-TI)-298 的组合模拟了他汀类介导的细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases5, ERK5) 激活内皮保护机制。香叶基香叶基醇能够阻断细胞凋亡,香叶基香叶基化参与了蛋白质的凋亡途径^[8-9]。现使用 FTI-277 和 GGTI-298 作用于 KCs,初步探讨其对 KCs 增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞及实验试剂 从外科手术获得的皮肤中分离出 KCs; M154CF 培养基、Coating Matrix 基质、胎牛血清、DMEM 培养基和 neutral protease (中性蛋白酶) (美国 Gibco 公司);青霉素链霉素溶液、RIPA 裂解液和细胞周期试剂盒 (上海碧云天生物公司);MTS 试剂盒及抑制剂 FTI 和 GGTI (美国 sigma 公司);CyclinB1、CyclinE 及 β -actin (美国 abcam 公司);P21、p-AKT、p-ERK1/2 (美国 Santa Cruz 公司);所有使用的二抗 (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 在无菌条件下,用 70% 乙醇漂洗手术中取得的患者包皮组织。在无血清的培养基清洗数次以去除表面细菌。用已高温灭菌的镊子和剪刀将皮肤组织剪成多个小块,反复用无血清的培养基冲洗数次,转移至中性蛋白酶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜。第 2 天取出充分消化的皮肤组织剥离表皮层,加入 0.025% 胰蛋白酶消化 5 min。然后用无菌注射器钝头在 200 目细胞筛上研磨,用无菌无血清的

2019-12-09 接收

基金项目:国家自然科学基金 (编号:81271748);安徽省高等学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:周宏 男 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

培养基反复冲洗,将所得液体离心,用 M154 培养基缓慢吹打形成 KCs 悬液,在细胞培养瓶中接种,37 °C、5% CO₂ 恒温恒湿细胞培养箱内培养。

1.2.2 细胞活力测定实验(MTS) 在 96 孔板中预先铺上 Coating Matrix,再接种 KCs 细胞(0.025% 胰酶消化收集),每孔 100 μl(6 × 10⁴/ml),均匀铺板,直到细胞密度达到 70% ~ 80%,分别加入药物 FTI(使终浓度分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μmol/L)、GGTI(使终浓度分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 μmol/L),同时设置对照组(0 μmol/L)。2 d 后,每孔加 20 μl MTS 试剂混匀,37 °C、5% CO₂ 孵育 3 ~ 4 h 后,酶标仪检测在 490 nm 处的吸光度,实验重复 3 次。

1.2.3 细胞周期检测 在 6 孔板中预先铺上 Coating Matrix,再接种 KCs 细胞(0.025% 胰酶消化收集),密度为 5 × 10⁴/ml,孵箱中孵育,直到细胞密度达到 70% ~ 80%,分别加入药物: FTI(5.0 μmol/L)、GGTI(5.0 μmol/L),并设置对照组(0 μmol/L)。2 d 后,收集 KCs(0.025% 胰酶消化),室温下,按照细胞周期试剂盒的说明书操作,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、CyclinB1 和 CyclinE 的表达 在 24 孔板(2 × 10⁵/孔)中预先铺上 Coating Matrix,再接种 KCs 细胞(0.025% 胰酶消化收集),直到细胞密度达到 70% ~ 80%,分别加药: FTI(5.0 μmol/L)、GGTI(5.0 μmol/L),并设置对照组(0 μmol/L)。2 d 后,收集 KCs 细胞(0.025% 胰酶消化),从细胞中提取总蛋白,SDS-PAGE 凝胶电泳,配制适当浓度的胶,每孔加入 10 μl 上样,然后电泳,恒压 60 V 电泳 45 min,加压到 120 V 恒压电泳 1 h,转膜(恒流 300 mA,1.5 h),5% 脱脂牛奶封闭 2 h,一抗(CyclinB1、CyclinE 及 β-actin 浓度 1 : 1 000, P21、p-AKT、p-ERK1/2 浓度 1 : 500)孵育 2 h,洗膜,常温摇床孵育二抗(浓度 1 : 10 000) 2 h,用 Thermo Super Signal West Trial Kit 化学发光底物显影,分析目的蛋白的表达情况。

1.3 统计学处理 SPSS Statistics 统计软件对数据分析处理,全部计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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 FTI 和 GGTI 能抑制 KCs 增殖

随着 FTI、GGTI 药物浓度的增加,细胞活力呈下降趋势,当 FTI 药液浓度为 5 μmol/L、GGTI 药液浓度为 5 μmol/L 时 KCs 细胞相对活力最小,与空白对照组相比差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 1A。KCs 细胞分别被 FTI(5.0 μmol/L)、GGTI(5.0 μmol/L)单独处理时,FTI 处理组的 KCs 细胞活力为 85.3%,GGTI 处理组的 KCs 细胞活力为 75.5%,FTI 和 GGTI 均能抑制 KCs 细胞增殖,抑制率分别为 14.7%、24.5%(*F* = 305.418, *P* < 0.01),与空白对照组相比差异有统计学意义。见图 1B。

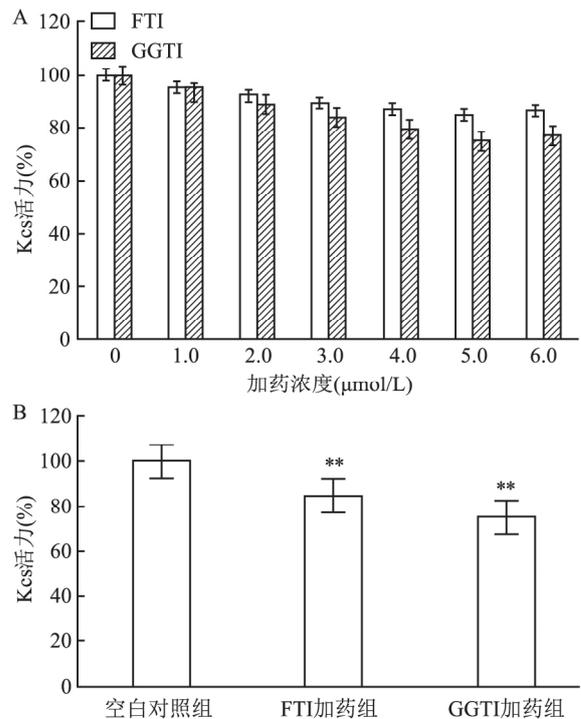


图1 FTI 和 GGTI 单独处理对 KCs 增殖抑制作用

A: 不同浓度的 FTI、GGTI 单独作用 KCs 细胞 2 d 后对细胞增殖的影响; B: FTI(5.0 μmol/L)、GGTI(5.0 μmol/L) 单独处理 KCs 后对其增殖影响; 与空白对照组比较: ** *P* < 0.01

2.2 FTI 和 GGTI 对 KCs 细胞周期 G1 期的阻滞效应不明显 FTI、GGTI 单独处理 KCs 细胞时,对细胞 G1 期阻滞作用均不明显。见图 2。

2.3 GGTI、FTI 单独处理 KCs 对细胞周期蛋白 CyclinB1、CyclinE 和 P21 表达的影响 GGTI 单独处理 KCs 后,与空白对照组相比,GGTI 加药组 CyclinB1 表达下调(*F* = 358.748, *P* < 0.01),CyclinE 的表达上调(*F* = 16.684, *P* < 0.05); 同时 FTI 单独加药组 CyclinB1 表达下调(*F* = 15.065, *P* < 0.05),CyclinE 的表达上调(*F* = 78.880, *P* < 0.01); GGTI、FTI 单独加药组均能上调 P21 的表达(*F* = 348.004,

$P < 0.01$) ,与空白对照组比较差异有统计学意义。见图 3A、B。

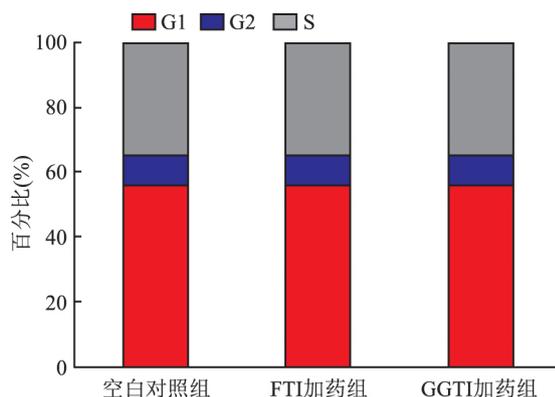


图 2 流式细胞术检测细胞周期

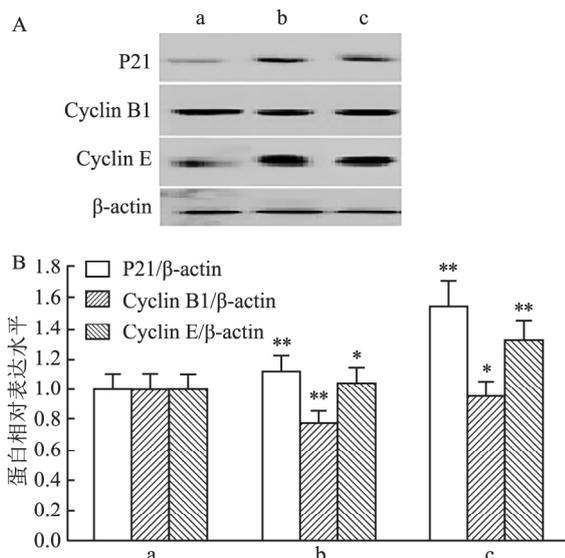


图 3 FTI 和 GGTI 单独用药对 KCs 细胞周期蛋白表达的影响

A: 各加药组对 KCs 细胞周期蛋白的影响; B: 各加药组蛋白表达的灰度分析; a: 空白对照组; b: GGTI 加药组; c: FTI 加药组; 与空白对照组相比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 FTI、GGTI 单独处理 KCs 对 PERK1/2、pAKT 表达的影响 FTI、GGTI 分别单独处理 KCs 后, PERK1/2 的表达下调 ($F = 89.980, P < 0.01$) ,pAKT 的表达上调 ($F = 37.709, P < 0.01$) ,与空白对照组比较差异有统计学意义。见图 4A、B。

3 讨论

皮肤的屏障结构和功能对人体健康至关重要。表皮角质形成细胞的功能表明,皮肤在使全身生理适应不断变化的环境中起着重要作用^[10]。甲羟戊

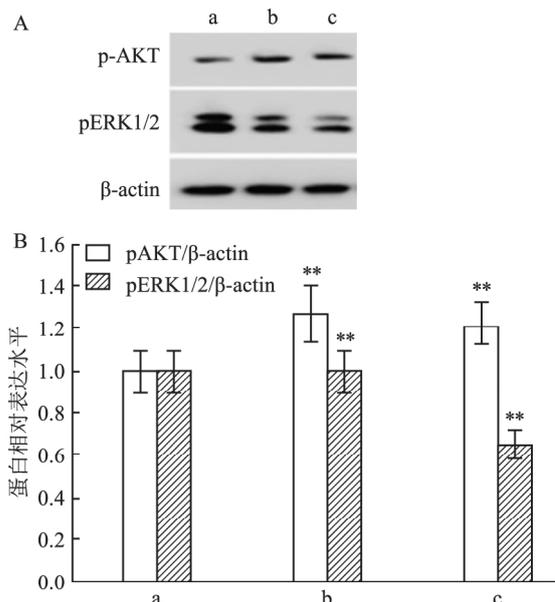


图 4 FTI 和 GGTI 单独用药对 KCs 信号途径蛋白表达的影响

A: 各加药组单独处理 KCs 对信号途径蛋白的影响; B: 蛋白表达的灰度分析; a: 空白对照组; b: GGTI 加药组; c: FTI 加药组; 与空白对照组相比较: ** $P < 0.01$

酸途径对细胞影响重大,是细胞最重要的代谢途径之一^[11]。甲羟戊酸激酶对 KCs 的增殖、分化、凋亡及相关信号途径有重要的影响^[12]。

本研究表明,FTI 和 GGTI 对 KCs 的增殖有抑制作用,可能是在甲羟戊酸代谢途径中,FTI 对 FPP、GGTI 对 GGPP 抑制下游反应进行,导致其积累上游产物 MVA、FPP、GGPP,缺失下游产物 CH,上游产物累积和下游产物 CH 缺失都可能引起细胞代谢紊乱。P21 抑制细胞周期从 G1/S 期^[13],CyclinE 过表达会停留在 G1 期^[14],降低 CyclinB1 阻滞细胞于 G2/M 期^[15]。FTI 和 GGTI 降低了 CyclinB1 的表达,与此同时 CyclinE、P21 的表达得到了增强。此外,MAPK 是接受膜受体转换与传递的信号并将其带入核内的重要途径,在许多细胞增殖相关信号通路中具有关键作用。P13K-AKT 参与细胞增殖、分化、凋亡等多种细胞功能的调节。从而探讨了 MAPK 和 P13K-AKT 两个代谢途径中 KCs 增殖的影响,分别单独补充 FTI、GGTI 这两种抑制剂,与空白对照组相比,均表现为 pERK1/2 下调且 pAKT 的上调。然而这两种信号途径相当复杂,其影响的具体方式和途径还有待讨论。

所以,FTI 和 GGTI 对皮肤角质形成细胞的增殖均有抑制作用。根据本研究结果,推测甲羟戊酸代谢途径中胆固醇合成受到影响,破坏皮肤细胞正常增殖。本实验仅为体外细胞研究,可以此为基础,构

建甲羟戊酸代谢途径相关基因的动物模型,通过体外和体内两角度来研究甲羟戊酸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] Elias P M, Feingold K R. Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology[J]. *Semin Dermatol*, 1992, 11(2): 176–82.
- [2] Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(13): 3524–31.
- [3] Miziorko H M. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 505(2): 131–43.
- [4] Thurnher M, Gruenbacher G, Nussbaumer O. Regulation of mevalonate metabolism in cancer and immune cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(6): 1009–15.
- [5] Waller D D, Park J, Tsantrizos Y S. Inhibition of farnesyl pyrophosphate (FPP) and/or geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) biosynthesis and its implication in the treatment of cancers[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2019, 54(1): 41–60.
- [6] Garcia-Ruiz C, Morales A, Fernandez-Checa J C. Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2012, 12(4): 303–15.
- [7] Chu U B, Duellman T, Weaver S J, et al. Endothelial protective genes induced by statin are mimicked by ERK5 activation as triggered by a drug combination of FTI-277 and GGTI-298[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(7): 1415–25.
- [8] Gordon L B, Massaro J, D'Agostino R B Sr, et al. Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome[J]. *Circulation*, 2014, 130(1): 27–34.
- [9] Agabiti S S, Li J, Wiemer A J. Geranylgeranyl diphosphate synthase inhibition induces apoptosis that is dependent upon GGPP depletion, ERK phosphorylation and caspase activation[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2678.
- [10] Prescott S L, Larcombe D L, Logan A C, et al. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming[J]. *World Allergy Organ J*, 2017, 10(1): 29.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] El-Deiry W S. p21(WAF1) mediates cell-cycle inhibition, relevant to cancer suppression and therapy[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(18): 5189–91.
- [14] Dai L, Liu Y, Liu J, et al. A novel cyclinE/cyclinA-CDK inhibitor targets p27(Kip1) degradation, cell cycle progression and cell survival: implications in cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2013, 333(1): 103–12.
- [15] Gao S Y, Li J, Qu X Y, et al. Downregulation of Cdk1 and cyclinB1 expression contributes to oridonin-induced cell cycle arrest at G2/M phase and growth inhibition in SGC-7901 gastric cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(15): 6437–41.

Inhibition of keratinocyte proliferation by FTI and GGTI

Zhou Hong, Li Mingcong, Gu Yanan, et al

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

Abstract Objective To investigate the effects of farnesyltransferase inhibitor (FTI) and geranylgeranyl transferase inhibitor (GGTI) on the proliferation of keratinocytes (KCs). **Methods** KCs were treated with different concentrations of FTI and GGTI. MTS analysis was used to analyze the effect of each treatment group on KCs cell proliferation. Flow cytometry was used to detect the effect of certain concentrations of FTI and GGTI on the cell cycle. Western blot was used to analyze the effects of certain concentrations of FTI and GGTI on the expressions of CyclinB1, CyclinE and P21, pAKT and pERK1/2 in each group. **Results** MTS showed that FTI and GGTI inhibited the proliferation of KCs in a concentration-dependent manner. The activity of KCs was the smallest in FTI (5 $\mu\text{mol/L}$) and GGTI (5 $\mu\text{mol/L}$), and the inhibition rates were 14.7% and 24.5%, respectively. The results of the flow cycle indicated that the FTI and GGTI retardation of KCs were not obvious in all phases of G1, G2 and S. Western blot results showed that FTI and GGTI could down-regulate CyclinB1 and up-regulate the expression of P21 and CyclinE. At the same time, FTI and GGTI could promote the activation of P13K-AKT signaling pathway and inhibit the activation of MAPKs-ERK1/2 signaling pathway. **Conclusion** FTI and GGTI have an inhibitory effect on the proliferation of primary KCs.

Key words mevalonate pathway; farnesyltransferase inhibitor; geranylgeranyl transferase inhibitor; keratinocytes; cell proliferation