网络出版时间:2022-1-20 15:46 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220119.1331.033.html

◇基础医学研究◇

羊毛固醇合成酶抑制剂对 KCs 细胞分化和凋亡的影响

刘 莉,顾亚男,李名聪,黄依璇,张胜权

摘要 目的 探究单独应用羊毛固醇合成酶抑制剂(RO)或联合胆固醇(CH)刺激皮肤角质形成细胞(KCs)后对其分化及凋亡的影响。**方法** RO 单独或联合 CH 于 KCs 共培养不同时间后,加入 Ca^{2+}(1.8 mmol/L)处理 1d,Western blot 法分析 KCs 的分化相关蛋白角皮蛋白(INV)和兜甲蛋白的表达;RO 单独或联合 CH 与 KCs 共培养不同时间后,流式细胞术检测 KCs 细胞凋亡变化和 Western blot 法验证凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达。**结果** RO 下调 KCs,Ca^{2+} 诱导的分化标志蛋白 INV 的表达,对 Loricrin 表达抑制作用较弱,而 CH 没有表现出对 RO 的拮抗效应;RO 诱导 KCs 细胞凋亡并呈时间依赖性,CH 能够拮抗 RO 对 KCs 的诱导凋亡作用;RO 单独应用时细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达均受到抑制,联合 CH 应用能部分拮抗 RO 对 Bcl-2 表达抑制作用,对 Bax 的表达抑制无显著影响;RO 能时间依赖性降低 Bcl-2/Bax 的比值,CH 能部分减弱 RO 对 Bcl-2/Bax 比值的影响。**结论** RO 可能通过下调 Loricrin、Bcl-2 的表达,进而抑制 KCs 分化和诱导 KCs 细胞凋亡。

关键词 毛固醇合成酶抑制剂;胆固醇;角质形成细胞;细胞分化;细胞凋亡

中图分类号 R 3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0173-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.002

甲羟戊酸途径是存在于所有高等真核生物和很多病毒中的一条代谢途径。羊毛固醇合成酶[1]是甲羟戊酸途径胆固醇(cholesterol,CH)合成支路中的关键中间产物,胶质瘤中的 MI-2 是通过破坏 CH 稳态,抑制 CH 合成和内源性肝 X 受体配体的产生来介导的,从而导致 CH 耗竭和肿瘤细胞调亡[2-3]。

表皮即皮肤的外层,由角质形成细胞(keratinocytes,KCs)组成,该类细胞分化形成一道防护屏障,抵御外界环境伤害。Jans et al[4]表明甲羟戊酸径中羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂(hydroxymethylglutarate monoacyl coenzyme A reductase inhibitor,PRA)、香叶基转移酶抑制剂(geranifolyl transferase inhibitor,GGTI)刺激 KCs 后,能够抑制 Ca^{2+} 诱导 INV 表达[5]。Zhang et al[6]研究指出甲羟戊酸激酶(mevalonic,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),汗孔角化症皮损的特征之一是 KCs 凋亡[7],但其具体机制尚不清楚。此外,该实验室前期研究[8]指出羊毛固醇合成酶抑制剂(lanosterol synthase inhibitor,RO)通过影响周期蛋白表达从而抑制 KCs 增殖,但 RO 对 KCs 分化和凋亡的影响尚未研究。因此,该研究使用了 RO 探讨甲羟戊酸途径异常对 KCs 分化和凋亡的影响并探索其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 胎牛血清、DMEM、MEPICF 500 培养基、0.06 mol/L NaCl、0.2 mol/L $CaCl_2$、Coating Matrix 基质、HKGS(×100)和 0.25% 胰酶均购自美国 Gibco 公司;Dispase 购自美国 Sigma 公司;RIPA 蛋白裂解液、青霉素-链霉素溶液(×100)购自上海碧云天生物公司;细胞凋亡试剂盒购自中国上海贝博生物公司;Involucrin、Loricrin、Bcl-2、Bax 及 β-actin 均购自美国 Abcam 公司;二抗购自北京中杉金桥生物公司。贝克曼流式细胞仪 CytoFlex、天能电泳仪、天能化学发光成像仪。

1.2 方法

1.2.1 *细胞培养* 皮肤原代细胞培养见参考文献[8]。

1.2.2 *细胞凋亡检测* 胰酶消化收集 KCs 细胞,并调整细胞悬液浓度为 5×10^4 个/ml,分别接种于 12 孔板,培养箱贴壁培养过夜,单独加入 RO(10 μmol/L)或联合 CH(40 μmol/L),作用时间分别为 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,按照凋亡试剂盒操作指

2021-10-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271748);安徽省高校自然科学研究项目(编号:KJ2020A0197)

作者单位:安徽医科大学科研实验中心,基础医学院生物化学与分子生物学教研室,第一临床医学院,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

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

南,用流式细胞仪检测细胞凋亡。检测数据结果用 Flowjo 10.0 分析。

1.2.3 凋亡相关蛋白检测 将上述处理的 KCs 细胞用含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液(RIPA)在冰上裂解细胞提取细胞总蛋白,SDS-PAGE 电泳后,移膜封闭,1∶1 000稀释 Bax 和 Bcl-2,1∶10 000 β-actin 抗体作为一抗,4 ℃孵育过夜。TBST 漂洗,1∶10 000稀释二抗,室温孵育 2 h。TBST 漂洗擦干,按照化学发光试剂盒操作方法进行发光和成像。

1.2.4 分化相关蛋白检测 将 RO 单独或联合 CH 与 KCs 共培养不同时间加入 Ca^{2+}(1.8 mmol/L)处理1d 后提取 KCs 细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳、转膜和封闭后,放入1∶1 000稀释的 Involucrin、Loricrin 和1∶10 000稀释的 β-actin 抗体中 4 ℃孵育过夜。TBST 漂洗,继续孵育二抗(1∶10 000),室温孵育 2 h。TBST 漂洗擦干,按照化学发光试剂盒操作方法进行发光和成像。

1.3 统计学处理 各组之间的凋亡比例和蛋白质含量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用统计学软件 SPSS 16.0 对计量资料进行 t 检验和方差分析,所有实验重复 3 次,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RO 诱导 KCs 细胞凋亡 当 RO(10.0 μmol/L)单独处理 KCs 后,细胞凋亡率随着作用时间的增加而增加,第 2、3 天细胞凋亡率与第 0 天相比,经方差分析,组间差异有统计学意义($F=152.59$,$P<0.05$);而当 RO 联合 CH 处理 KCs 细胞后,CH 部分削弱 RO 对 KCs 凋亡诱导作用,在 2、3 d 细胞凋亡率与 RO 单独处理 KCs 第 2、3 天细胞凋亡率相比,差异有统计学意义($t_1=9.42$、$t_2=10.98$,$P<0.05$)。见图 1。

2.2 细胞凋亡蛋白表达 RO 单独处理 KCs 后,随着作用时间的增加,抑制细胞凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax

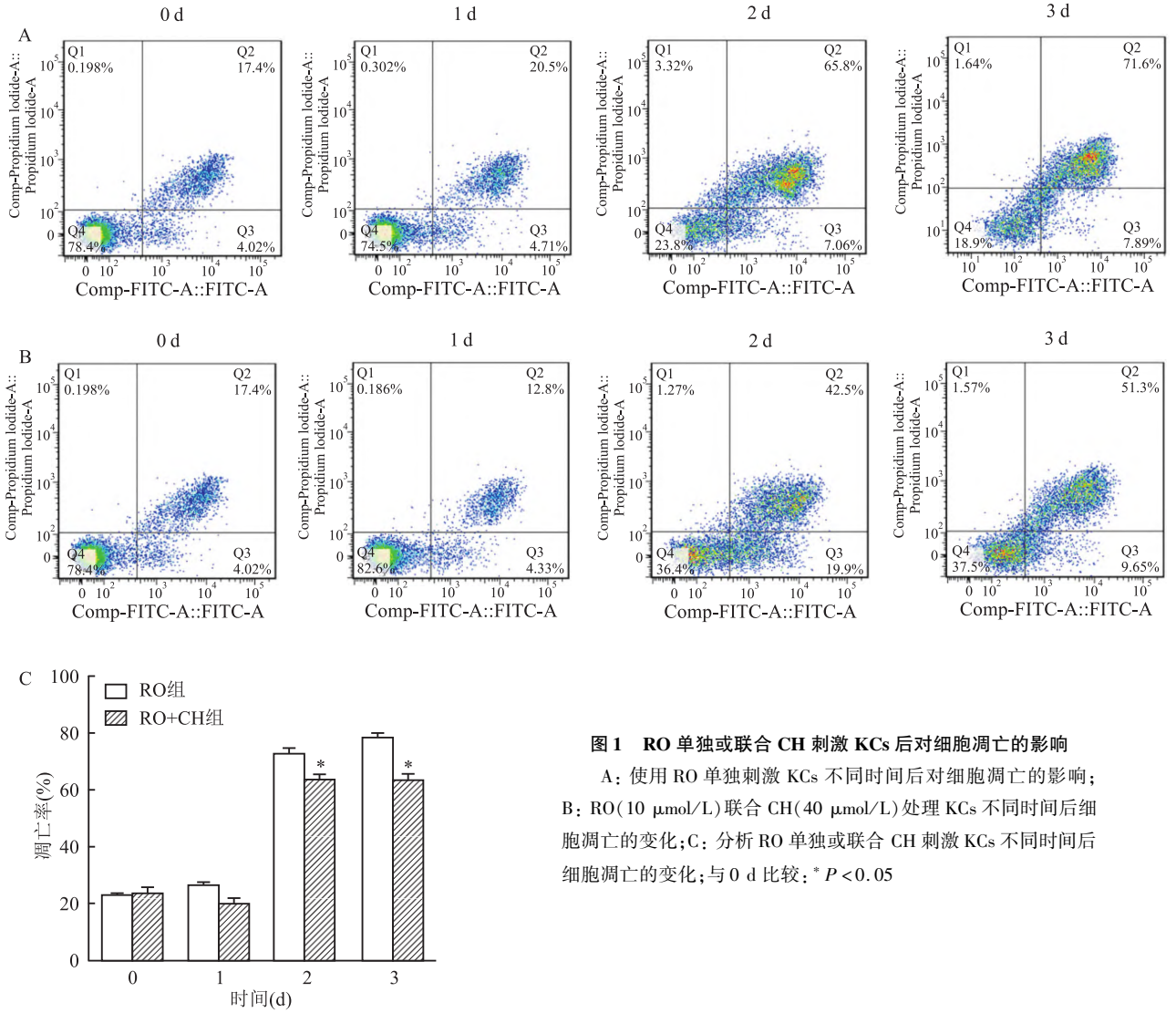

图 1 RO 单独或联合 CH 刺激 KCs 后对细胞凋亡的影响

A:使用 RO 单独刺激 KCs 不同时间后对细胞凋亡的影响;B:RO(10 μmol/L)联合 CH(40 μmol/L)处理 KCs 不同时间后细胞凋亡的变化;C:分析 RO 单独或联合 CH 刺激 KCs 不同时间后细胞凋亡的变化;与 0 d 比较:* $P<0.05$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的表达;当补充 CH 处理 KCs 后,CH 能部分减弱 RO 对 Bcl-2 的表达抑制作用;Bcl-2/Bax 的比值分析表明在单独 RO 与 KCs 共培养时,Bcl-2/Bax 的比值随着共培养时间的增加而降低,而补充 CH 后,RO 对 Bcl-2/Bax 比值降低作用减弱,在处理 3 d 时有显著性差异,各实验组与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

2.3 细胞分化蛋白表达 Western blot 结果显示 RO 单独与 KCs 细胞共培养,Ca^{2+} 处理 1 d 后,Ca^{2+} 诱导的分化标志蛋白 Involucrin 和 Loricrin 的表达下降;而补充 CH 到细胞共培养体系后,RO 对 Involucrin 及 Loricrin 的表达抑制作用未受到显著影响。见图 3。

3 讨论

甲羟戊酸途径作为细胞生命活动进程的基本途

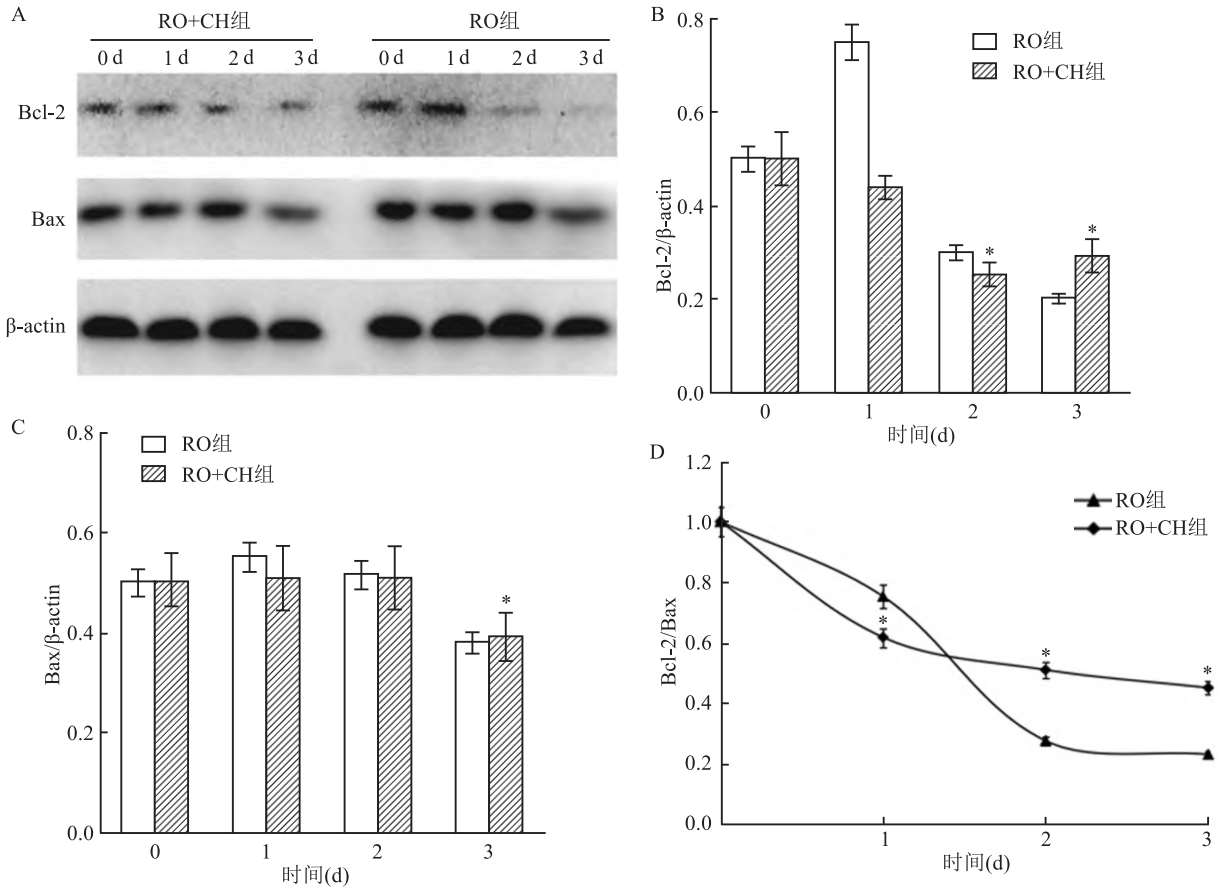

图 2 Western blot 分析凋亡蛋白表达

A:RO 单独或联合 CH 作用 KCs 不同时间后 KCs 细胞内 Bcl-2、Bax 表达水平的变化;B:分析 Bcl-2 表达;C:分析 Bax 表达;D:分析 Bcl-2/Bax 的比值变化;与同时段 RO 组比较:* $P<0.05$

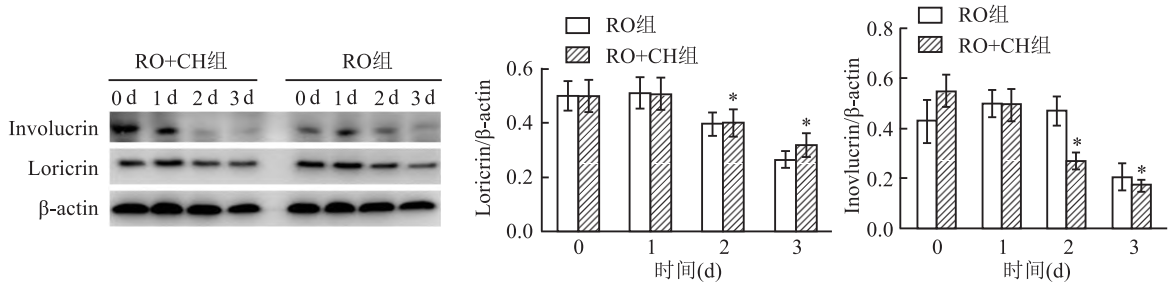

图 3 Western blot 分析分化蛋白表达

与同时段 RO 组比较:* $P<0.05$

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

径,对于维持细胞正常的生理功能具有重要意义。皮肤是机体最重要的器官之一,主要由 KCs 组成的表皮构成,能够防止皮肤水分流失并且阻止体外有害物质损伤皮肤。甲羟戊酸途径在细胞中经过一系列生命活动过程可形成甾醇类,如 CH,可进一步转化为胆汁酸、类固醇激素等。代谢产生的中间产物及终产物如法尼基焦磷酸,香叶基香叶基焦磷酸提供戊二烯基,参与细胞某些蛋白的翻译后修饰,对细胞内相关信号转导产生干扰,导致细胞的增殖、分化、基因表达、蛋白糖基化作用以及细胞骨架的形成等细胞生命活动发生变化。分化是细胞生命活动的必不可少的过程,角质形成细胞的分化成熟表现为从基底层向角质层的逐渐移行。有研究[9-10]表明甲羟戊酸代谢途径相关酶的抑制剂 ALD、PRA 等可抑制由 Ca^{2+} 诱导的 KCs 细胞分化标志蛋白的表达,而 CH 补充能够促进 KCs 细胞分化相关蛋白的表达。在该研究中, RO 对 KCs 细胞 Ca^{2+} 诱导的分化标志蛋白 Involucrin 和 Loricrin 的表达起抑制作用,而补充 CH 后对相关分化蛋白的表达抑制并没有补救作用,这提示 RO 与 ALD 和 PRA 抑制皮肤 KCs 分化的分子机制不同,可能与其下游产物 CH 的耗尽无关。细胞凋亡对维持机体内环境稳定起重要作用,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等。Bcl-2 和 Bax 是凋亡途径中的两种重要蛋白,Bcl-2/Bax 的比值变化影响着细胞凋亡的进程。当其比值下降时,促进细胞凋亡,反之则抑制细胞的凋亡[11]。该研究表明 RO 刺激 KCs 细胞后可时间性促进 KCs 细胞的凋亡,且细胞内凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 的比值下降;而补充下游产物 CH 后,可减弱由 RO 造成的细胞凋亡作用,且 CH 对 Bcl-2/Bax 的比值下降有补救作用,该研究结果显示 RO 可能通过降低 Bcl-2/Bax 的比值而诱导 KCs 细胞凋亡。因此, KCs 的分化和凋亡是一个由许多分子调节的复杂过程。该研究的结果部分解释了甲羟戊酸途径功能障碍所致的 KCs 分化抑制和凋亡诱导机制。

参考文献

[1] Bathaie S Z, Ashrafi M, Azizian M, et al. Mevalonate pathway and human cancers[J]. Curr Mol Pharmacol, 2017, 10(2): 77-85.

[2] Jin R, Luo X, Luan K, et al. Disorder of the mevalonate pathway inhibits calciuminduced differentiation of keratinocytes[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 4811-6.

[3] Leng Y, Yan L, Feng H, et al. Mutations in mevalonate pathway genes in patients with familial or sporadic porokeratosis[J]. J Dermatol, 2018, 45(7): 862-6.

[4] Jans R, Atanasova G, Jadot M, et ,al. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38[J]. J Invest Dermatol, 2004, 123(3): 564-73.

[5] Shen X, Guo M, Yu H, et al. Propionibacterium acnes related anti-inflammation and skin hydration activities of madecassoside, a pentacyclic triterpene saponin from Centella asiatica[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(3): 561-8.

[6] 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.

[7] 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

[8] 刘 莉,顾亚男,周 宏,等. 羊毛固醇合成酶抑制剂(RO)对 KCs 细胞增殖的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(2): 176-9.

[9] Lainka E, Neudorf U, Lohse P, et al. Incidence and clinical features of hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS) and spectrum of mevalonate kinase (MVK) mutations in German children[J]. Rheumatol Int, 2012, 32(10): 3253-60.

[10] Stoffels M, Simon A. Hyper-IgD syndrome or mevalonate kinase deficiency[J]. Curr Opin Rheumatol, 2011, 23(5): 419-23.

[11] Meichner K, Fogle JE, English L, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Bax in lymph node aspirates from dogs with lymphoma[J]. J Vet Intern Med, 2016, 30(3): 819-26.

Effects of lanosterol synthase inhibitor on differentiation and apoptosis of KCs

Liu Li, Gu Yanan, Li Mingcong, Huang Yixuan, Zhang Shengquan

(*Center for Scientific Research of Anhui Medical University, Dept of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, The First College of Clinical Medicine, Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To investigate the effects of RO or incubation with cholesterol (CH) on the differentiation and apoptosis of KCs. ***Methods*** Ca^{2+} (1.8 mmol/L) was added to KCs for 1 day after co-culture of RO alone or combined with CH in KCs for different time. The expression of Involucrin (INV) and Loricrin in KCs was analyzed

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

网络出版时间:2022 - 1 - 20 19:56 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20220119.1131.002.html

iucA 基因缺失对尿路致病性大肠埃希菌增殖、黏附、侵袭和定植能力的影响

邓 聪,康嘉乐,林梅双,林艳芬

摘要 目的 为探究铁摄取相关基因 *iucA* 在尿路致病性大肠埃希菌(UPEC)致病中的作用,利用 UPEC 模式菌株 CFT073,通过 λ Red 同源重组方法构建 *iucA* 基因缺失株 Δ*iucA*,同时构建回补株 C-*iucA*。**方法** 测定 A600 绘制 CFT073、Δ*iucA* 和 C-*iucA* 菌株在 LB 液体培养基和无菌尿液中的增殖曲线。比较 CFT073、Δ*iucA* 和 C-*iucA* 菌株对人膀胱癌上皮细胞株 5637 体外黏附和侵袭能力。构建小鼠尿路感染模型,检测 CFT073、Δ*iucA* 和 C-*iucA* 菌株在膀胱的定植能力。**结果** CFT073、Δ*iucA* 和 C-*iucA* 菌株在 LB 液体培养基中增殖速率相似($P = 0.153$)。Δ*iucA* 在无菌尿液中的增殖速率低于 CFT073($P = 0.001$), C-*iucA* 的增殖速率较 Δ*iucA* 有所上升($P = 0.005$)。Δ*iucA* 对 5637 细胞的黏附和侵袭能力均低于 CFT073($P = 0.007$、0.002)。C-*iucA* 的黏附和侵袭能力较 Δ*iucA* 有所上升($P = 0.046$、0.037)。Δ*iucA* 在小鼠膀胱的定植能力低于 CFT073 和 C-*iucA*($P = 0.002$、0.017)。**结论** *iucA* 基因可能通过促进 UPEC 增殖、黏附和侵袭以及在靶器官的定植能力在 UPEC 致病中发挥作用。

关键词 *iucA* 基因;大肠埃希菌;尿路感染;铁载体;基因缺失

中图分类号 R 378.2 + 1

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2022)02 - 0177 - 05

2021 - 12 - 10 接收

基金项目:广东省医学科研基金(编号:A2019472)

作者单位:广州医科大学附属第二医院检验科,广州 510260

作者简介:邓 聪,女,主管技师;

林艳芬,女,硕士,主管技师,责任作者,E-mail:tongle1212@163.com

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.02.003

尿路感染(urinary tract infections,UTI)是临床上最常见的细菌感染之一[1],其高居不下的复发率、再感染率以及日益增高的多重耐药菌的检出率,强调了发展 UTI 新的治疗策略的必要性[2]。约 75% ~95% 的 UTI 由尿路致病性大肠埃希菌(Uropathogenic *E. coli*, UPEC)所致[3]。铁摄取系统是 UPEC 目前已知的毒力因子之一[4-5]。

铁是微生物生命活动的必要元素。病原菌通过分泌铁载体与宿主体内的铁离子结合,形成复合物并通过外膜表面的相应受体摄取。UPEC 可以分泌多种铁载体,包括耶尔森杆菌素、气杆菌素、肠杆菌素和沙门菌素[6]。其中气杆菌素已被证实通过促进菌株生长、定植等,在肺炎克雷伯菌、禽致病性大肠埃希菌等的致病过程中发挥重要作用[7-8],但其与 UPEC 致病之间的关系至今仍不明确。该研究通过对气杆菌素编码基因 *iucA* 缺失株和回补株的构建,分析 *iucA* 基因在 UPEC 致病中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞 大肠埃希菌 CFT073 菌株(临床 UTI 分离的大肠埃希菌,由美国南加州大学洛杉矶儿童医院黄胜和教授惠赠)。pKD46 质

by Western blot. After co-culture of RO alone or combination with CH in KCs for different time, the apoptotic changes of KCs cells were detected by flow cytometry and the expression of apoptotic proteins Bax and Bcl-2 were verified by Western blot. ***Results*** RO down-regulated the expression of Ca^{2+} induced differentiation marker protein INV, but weakly inhibited the expression of Loricrin, while CH showed no antagonistic effect on RO. RO induced apoptosis of KCs cells in a time dependent manner. CH could antagonize the apoptotic effect of RO on KCs; the expression of Bcl-2 and Bax was inhibited when RO was applied alone, CH could partially antagonize the inhibition effect of RO on Bcl-2 expression, but had no significant effect on Bax; however, RO reduced the ratio of Bcl-2/Bax in a time-dependent manner, and CH partially weakened the effect of RO on the ratio of Bcl-2/Bax. ***Conclusion*** RO may inhibit KCs differentiation and induce KCs cell apoptosis by down-regulating the expression of Loricrin and Bcl-2.

Key words RO;CH;KCs;cell differentiation;cell apoptosis

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net