

富马酸二甲酯对人角质形成细胞HaCat 生长和自噬的影响

李红霞 张帆 姚廷燕 樊星 王仁军 刘庆平 秦建中*

(大连大学生命科学与技术学院, 辽宁省糖脂代谢重点实验室, 大连 116622)

摘要 该文探讨了富马酸二甲酯(dimethyl fumarate, DMF)对人角质形成细胞HaCat增殖、细胞周期和细胞自噬的调节作用以及相关机理的影响。应用MTT实验和流式细胞术分别检测细胞增殖和细胞周期的变化。并用免疫荧光染色、Western blot技术检测自噬相关蛋白的水平与分布。结果显示, DMF在25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可较明显地抑制HaCat细胞的增殖, 当浓度达到150 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞几乎完全失去增殖能力。低剂量DMF(25~50 $\mu\text{mol/L}$)同时也可显著抑制HaCat细胞DNA合成, 与对照组相比, S期细胞减少50%($P<0.01$), 而G₁期细胞增高近20%($P<0.05$); 高剂量DMF(100 $\mu\text{mol/L}$)可导致G₂与M期阻滞($P<0.01$), 而氧自由基抑制剂NAC(N-Acetyl-L-cysteine)预处理则几乎完全逆转这一现象。DMF处理诱导细胞出现明显的自噬特征, 表现为LC3-II(microtubule associated protein 1 light chain 3-II)免疫荧光染色呈点状分布并与溶酶体颗粒重合, LC3蛋白质脂化为LC3-II以及自噬相关蛋白成熟型Cathepsin D、LAMP1(lysosome-associated membrane glycoprotein 1)、p62水平增加。此外, DMF对ERK(extracellular regulated protein kinases)、AKT(phosphatidylinositol 3 kinase)以及mTOR(mammalian target of rapamycin)信号相关蛋白的磷酸化也有显著的抑制作用。这些结果表明, DMF可显著抑制人角质形成细胞增殖、抑制DNA合成、诱导细胞发生自噬, 其机理可能与DMF抑制AKT/mTOR、ERK信号功能有关。

关键词 富马酸二甲酯; HaCat细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 自噬; AKT/mTOR

Effects of Dimethyl Fumarate on the Proliferation and Autophagy of HaCat Cells

Li Hongxia, Zhang Fan, Yao Tingyan, Fan Xing, Wang Renjun, Liu Qingping, Qin Jianzhong*

(School of Life Science and Biotechnology, Dalian University, Key Laboratory of Carbohydrate and Lipid Metabolism Research of Liaoning Province, Dalian 116622, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the effects of DMF (dimethyl fumarate) on the proliferation, cell cycle and autophagy of HaCat cells and the underlying mechanisms. MTT assay and flow cytometry analysis were used to monitor the status of cell proliferation and cell cycle. Immunofluorescence staining, Western blot analysis and RT-PCR were employed to detect the level and distribution of autophagy related protein. The results showed that DMF inhibited the proliferation of HaCat cells in a dose-dependent manner, with significant effects at 25 $\mu\text{mol/L}$ and almost complete inhibition at 150 $\mu\text{mol/L}$. Low doses of DMF (25-50 $\mu\text{mol/L}$) inhibited

收稿日期: 2016-01-15 接受日期: 2016-04-07

国家自然科学基金(批准号: 81241148)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0411-87402341, E-mail: jzqin68@hotmail.com

Received: January 15, 2016 Accepted: April 7, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.812411481)

*Corresponding author. Tel: +86-411-87402341, E-mail: jzqin68@hotmail.com

网络出版时间: 2016-06-03 11:07:44

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160603.1107.002.html>

the DNA synthesis of the cells as evidenced by a 50% reduction in S phase cells and a nearly 20% increase in G₁ phase cells compared with the control group ($P < 0.01$), while higher doses of DMF (100 $\mu\text{mol/L}$) resulted in growth arrest at G₂ and M phases ($P < 0.01$), an effect that can be effectively reversed by the pretreatment with ROS scavenge NAC (N-acetylcysteine). HaCat cells treated with DMF also exhibited obvious signs of autophagy, such as the formation of LC3 puncta, increased in LC3-II formation and up-regulation of LAMP1 (lysosome-associated membrane glycoprotein 1), p62 and the mature form of Cathepsin D. An examination of the autophagy regulatory signaling pathways revealed that DMF inhibited the phosphorylation of ERK (extracellular regulated protein kinases), AKT/mTOR (phosphatidylinositol 3 kinase/mammalian target of rapamycin) pathway related protein. Collectively, these data indicated that DMF could significantly inhibit HaCat cell proliferation and DNA synthesis, and induce autophagy, possibly through the down-regulation of AKT/mTOR and ERK (extracellular regulated protein kinases) pathways.

Keywords DMF; HaCat cell; proliferation; cell cycle; autophagy; AKT/mTOR

富马酸二甲酯(dimethyl fumarate, DMF)(商品名: Fumaderm), 具有较为广泛的药理作用。在欧洲, DMF用作治疗银屑病已有近三十年的历史^[1]。最近实验和临床观察发现, DMF用于治疗多发硬化症的新适应症疗效显著, 因此, 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准DMF用于治疗复发-缓解型多发性硬化症, 引发了人们对该药的新认识和研究兴趣^[2]。银屑病是常见的慢性炎症性皮肤病, 表现为境界清楚, 具有鳞屑的斑块或丘疹、皮损反复发作、治疗困难。自从DMF在德国被批准用于治疗银屑病, 人们对其作用机理的研究多侧重于该药的免疫调节功能。研究发现, DMF可以减轻银屑病皮损组织中炎症细胞的侵入, 抑制T细胞和树突状细胞(dendritic cells, DC)分泌炎症性细胞因子, 抑制血管内皮细胞表达黏附因子^[3-5]。

DMF的免疫抑制作用和抗炎症作用与该药对转录因子NF- κ B(nuclear factor-kappa B)的抑制作用有关^[6]。银屑病的病理特征表现为皮肤表皮细胞的过度增殖和炎症反应共存, 但有关DMF对皮肤角质形成细胞直接作用的研究报道相对较少。Gesser等^[7]在2011年报道, DMF能够抑制巨噬细胞游走抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)介导的皮肤角质形成细胞的增殖, 提示DMF对皮肤表皮细胞的异常增殖也有调节作用。近年来, 细胞增殖调控机制和信号通路的研究进展, 使人们对银屑病的病理机制有了崭新的认识, 发现AKT(phosphatidylinositol 3 kinase)/

mTOR(mammalian target of rapamycin)信号系统的相关蛋白质和ERK(extracellular regulated protein kinases)信号蛋白质在银屑病皮损存在异常表达^[8-9]。目前, 关于DMF对角质形成细胞增殖与上述重要信号通路关系的研究尚未见报道。本文研究了DMF对人角质形成细胞增殖、细胞周期和细胞自噬的调节作用及其潜在的信号靶标, 为解释DMF用于治疗银屑病的作用机理提供新的实验证据和理论解释。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

永生化人皮肤角质形成细胞HaCat由南京凯基生物有限公司提供, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂、饱和湿度条件下, 培养于含10%胎牛血清(FBS, Gibco)、100 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素的DMEM培养基中。富马酸二甲酯、碘化丙啶(propidium iodide)、MTT和磷酸氯喹均购自Sigma公司。本研究所用p62(SQSTM1)、溶酶体膜相关蛋白1(lysosome-associated membrane glycoprotein 1, LAMP1)、Cathepsin D、P-P70S6K、起始因子4E结合蛋白1(phosphorylation of 4E-BP 1, P-4EBP1)和GAPDH抗体以及HRP标记的抗小鼠、抗兔和抗羊免疫球蛋白二抗均购自Santa Cruz Biotechnology公司。ERK、P-ERK、AKT、P-AKT特异抗体购自Cell Signaling Technology公司。兔抗LC3-II抗体和荧光素标记的抗兔和抗小鼠免疫球蛋白二抗分别

购自Sigma和Fisher Scientific公司。M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒以及PCR Master Mix以及PCR引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

1.2 MTT法测定细胞增殖率

将HaCat细胞接种于96孔培养板, 10 000细胞/孔, 培养过夜。次日, 将含有不同浓度DMF的培养液加入培养板中, 每个浓度设3个复孔, 继续培养48 h。培养结束前4 h加入用PBS稀释的MTT溶液(5 mg/mL)20 μ L。培养结束后, 弃掉培养液, 每孔加入100 μ L DMSO溶解细胞内沉淀的染色物质, 用多功能酶标仪读取各孔在570 nm波长的吸光度(D)值, 并按下列公式来计算: 细胞的增殖率=药物处理孔的平均D值/对照孔的平均D值 \times 100%。

1.3 细胞周期检测

将HaCat细胞接种于6孔细胞培养板, 每孔 3×10^5 细胞。次日, 加入不同浓度的DMF(0、50、100 μ mol/L)继续培养24 h。胰蛋白酶消化细胞, 制备单细胞悬液, 离心沉淀细胞后, 缓慢加入1 mL预冷的70%乙醇, 在冰上孵育0.5 h, 固定细胞。离心弃上清, 加入250 μ L含RNase(不含DNase, 终浓度10 μ g/mL)的PBS, 37 $^{\circ}$ C孵育15 min, 再加入250 μ L含碘化丙啶(50 μ g/mL)的PBS, 在冰上继续孵育30 min, 然后用流式细胞仪检测细胞DNA含量, 进行细胞周期分析。

1.4 Western blot检测蛋白质水平

将HaCat细胞接种于100 mm直径的塑料培养皿中, 培养过夜。次日加入含不同浓度DMF的培养液, 培养24 h后, 用细胞刮刀收获细胞。离心沉淀细胞, 加入适量NP40缓冲液(20 mmol/L TrisHCl pH8、137 mmol/L NaCl、10% glycerol、1% nonidet P-40、2 mmol/L EDTA、蛋白抑制剂、10 mmol/L PMSF), 放置于冰上孵育30 min并间歇震荡。将各管于4 $^{\circ}$ C低温离心, 收集上清为全细胞蛋白提取物, 蛋白质浓度用Bradford试剂测定。每个样品取30 μ g蛋白质进行SDS-PAGE电泳并转移到PVDF膜。用含5%脱脂奶粉的TBST在室温将膜阻断1 h, 再将膜与适当稀释(1:500或1:1 000)的靶蛋白特异抗体在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日, 用2.5%奶粉(TBST稀释)洗膜, 并加入HRP标记的相应二抗, 室温孵育1 h。膜洗后在其表面加上适量化学发光试剂(ECL), 用化学发光扫描

仪检测蛋白表达信号, 并用ImageJ软件测定蛋白灰度, 计算靶蛋白的相对水平。

1.5 RNA提取和RT-PCR

接种HaCat细胞于6孔板或60 mm细胞培养皿, 加入不同浓度的DMF处理细胞24 h。用1 mL TransZol(北京全式金生物技术有限公司)裂解细胞, 按照试剂说明书的步骤提取细胞总RNA, 紫外分光光度法测定RNA浓度和纯度。每个样品取2 μ g RNA, 使用M-MuLV第一链cDNA合成试剂盒合成cDNA。常规PCR反应用商品化2 \times PCR master mix进行, 每个反应的总体积为25 μ L, 含有2 \times master mix 12.5 μ L, 上下游引物各1 μ L(终浓度200 nmol/L), 模板DNA 1 μ L, H₂O 9.5 μ L, 用AB veriti thermal cycler(Applide Biotechnology)扩增DNA, 变性温度和循环数依据不同引物而定。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳和EB染色后, 用凝胶电泳成像系统(Gene公司)检测。本研究用靶基因的引物序列分别如下所示。LAMP-1: 5'-ATG TGT TAG TGG CAC CCA GG-3'(上游), 5'-TGT TCA CAG CGT GTC TCT CC-3'(下游); p62: 5'-GGC TCG TGC GAG TCG G-3'(上游), 5'-TCC CCG TCC TCA TCC TTT CT-3'(下游); h18S: 5'-CAG CCA CCC GAG ATT GAG CA-3'(上游), 5'-TAG TAG CGA CGG GCG GTG TG-3'(下游)。

1.6 免疫荧光染色

将灭菌盖玻片置于6孔细胞培养板中。接种HaCat细胞, 3×10^5 细胞/孔, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中培养过夜。次日, 加DMF处理6 h。将盖玻片移至新的6孔细胞培养板中, 用PBS洗1次, 加入1 mL 4%多聚甲醛, 室温下固定15 min。PBS洗2次, 加入1 mL 0.2% Triton X-100, 进行细胞通透处理。然后加入1 mL 2%的牛血清白蛋白(BAS), 室温下封闭30 min。将盖玻片转移到湿盒内, 向每张片子上滴加100 μ L稀释的兔抗人LC3-II多克隆抗体(1:300)和鼠抗人溶酶体相关蛋白1抗体(1:200), 置于4 $^{\circ}$ C, 孵育过夜。次日, 将盖玻片用PBS洗2次, 置于湿盒中, 向每张片子滴加100 μ L含Anti-Rabbit-550(1:400)和Anti-mouse-488(1:400)二抗, 室温下避光孵育1 h。用1 \times PBS洗2次, 加入1 mL Hoechst 33342(Invitrogen公司), 浓度为2 μ g/mL, 室温下避光孵育5 min。洗片后,

用封片剂Mountant, PermaFluor(Thermo Scientific公司)封片。通过正置荧光显微镜(BX43, Olympus公司)观察并拍照, 实验重复3次。

1.7 数据统计处理

实验数据采用SPSS 13.0统计学软件进行分析。实验数据以均数±标准误(mean±S.D.)表示, 两样本均数比较采用独立样本 t 检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DMF抑制角质形成细胞增殖

银屑病的显著病理特征之一是皮肤表皮角质形成细胞快速增殖。抑制角质细胞快速增殖是有效治疗银屑病的机理之一, 因此我们首先通过MTT掺入实验观察不同剂量的DMF对永生化人角质形成细胞HaCat增殖的影响。所用剂量范围在25~150 $\mu\text{mol/L}$ 的DMF处理HaCat细胞48 h(图1)。与未加药物的对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较, DMF在25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时对HaCat细胞的增殖就有较为明显的抑制作用, 随着DMF浓度的增加HaCat细胞的增殖率逐渐减小, 当DMF的浓度达到150 $\mu\text{mol/L}$ 时, HaCat细胞几乎完全失去增殖能力。这一结果清晰地证明, DMF对HaCat细胞的增殖有

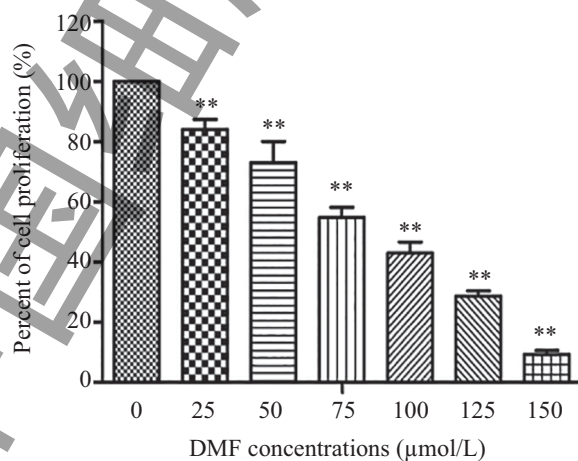
剂量依赖性的抑制作用。

2.2 DMF诱导角质形成细胞发生细胞周期改变

为了进一步探索DMF抑制HaCat细胞增殖的机理, 我们进一步检测了DMF处理后, HaCat细胞周期的改变(图2)。分别用50和100 $\mu\text{mol/L}$ 的DMF处理HaCat细胞24 h后, 其细胞周期均表现明显异常。低剂量DMF(50 $\mu\text{mol/L}$)显著抑制细胞DNA合成, S期细胞仅为对照组的50%($P<0.01$), 而G₁期细胞的比例则比对照升高近20%($P<0.05$)。高剂量DMF(100 $\mu\text{mol/L}$)抑制HaCat细胞进入细胞分裂期, 导致G₂/M期细胞阻滞($P<0.01$, 与对照组比), 同时伴随G₁期细胞的减少($P<0.01$)和诱导少量细胞凋亡(sub G₁细胞, 少于5%)。

2.3 N-乙酰基-L-半胱氨酸(N-Acetyl-cysteine, NAC)拮抗DMF诱导的细胞增殖抑制和细胞周期改变

已有文献报道, DMF进入细胞后能够降低细胞内谷胱甘肽的水平, 干扰细胞氧自由基产生与清除的动态平衡^[10]。为了探讨DMF的上述作用与其抑制细胞增殖和改变细胞周期的关系, 我们用氧自由基抑制剂N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC, 1 mmol/L)预处理细胞1 h, 再用不同浓度DMF(0、25、50、75、100、125、150 $\mu\text{mol/L}$)处理48 h。MTT实验表明, 有NAC存在时DMF失去对HaCat细胞

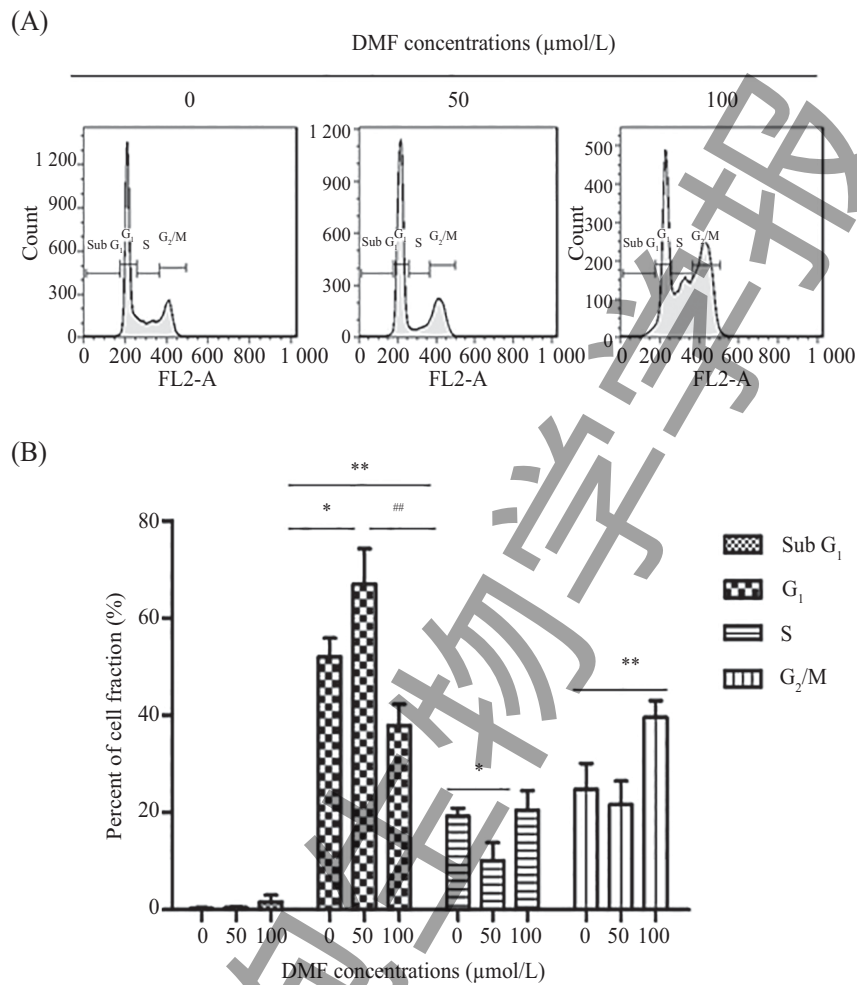


** $P<0.01$, 与对照组比较。

** $P<0.01$ compared with control group.

图1 DMF抑制角质形成细胞增殖

Fig.1 DMF inhibits keratinocyte proliferation



A: 流式细胞术检测细胞周期分布; B: 细胞周期分布的定量。图中每一个数值代表3次独立实验的平均值, 每一个柱子上的标准误差为3次实验的标准误差。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ### $P < 0.01$ 。

A: FACS profiles of cell cycle; B: quantitation of cell fraction. Each value represents an average value of three independent experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplication experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ### $P < 0.01$ 。

图2 DMF诱导角质形成细胞发生细胞周期改变

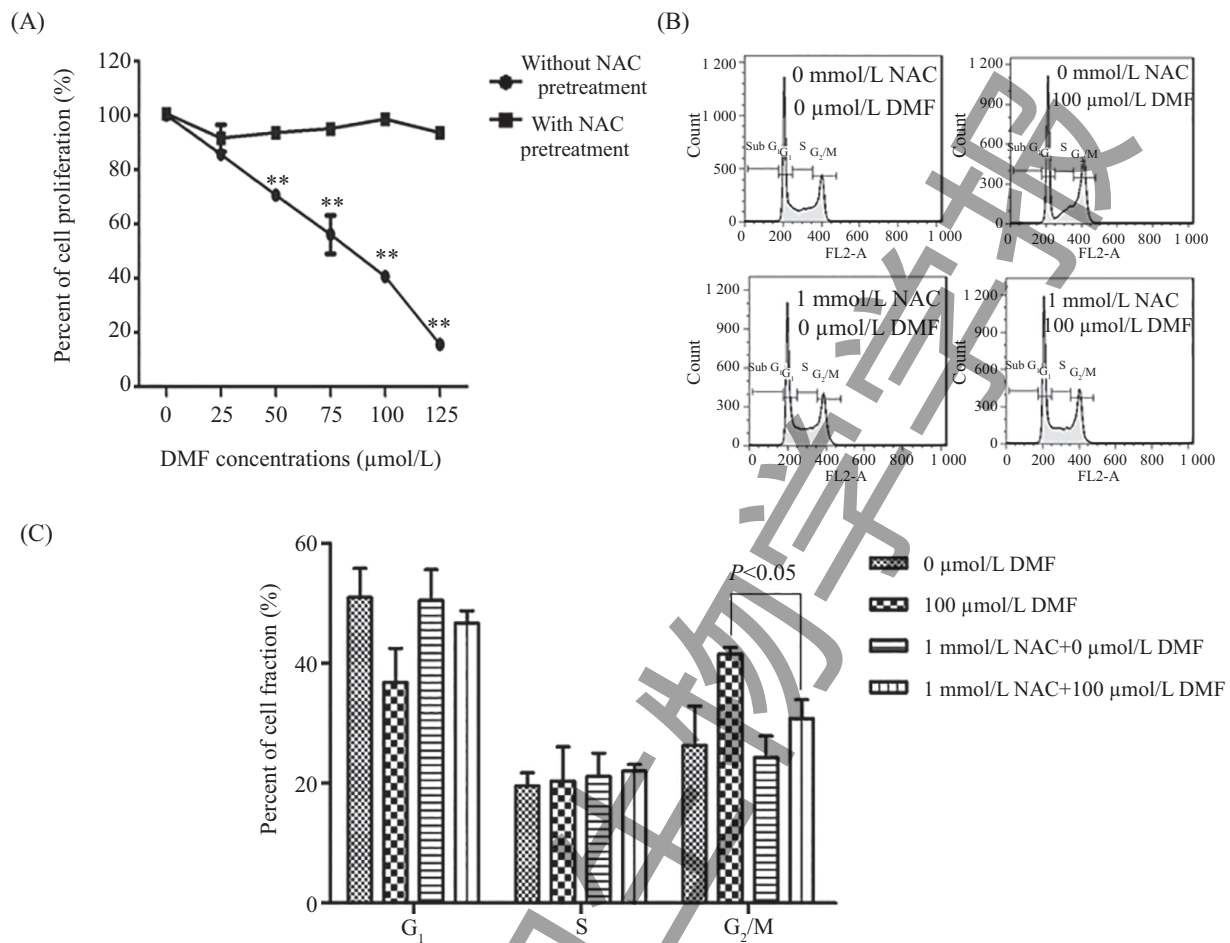
Fig.2 DMF induces cell cycle alteration in keratinocytes

的生长抑制作用(图3A)。此外, 细胞周期检测结果也显示, NAC预处理几乎能完全逆转高剂量DMF(100 μmol/L)诱导的G₂/M期细胞周期阻滞(图3B和图3C)。

2.4 DMF诱导HaCat细胞发生自噬

经DMF处理的HaCat细胞, 在24 h内虽然有明显的细胞周期抑制, 但并没有出现大量的细胞凋亡。我们推测, HaCat细胞可能通过细胞自噬在一定限度内维持自身存活, 因此我们观察了DMF对HaCat细胞发生自噬的影响。免疫荧光染色技术显示, HaCat细胞经DMF处理后, LC3-II阳性反应模式表现为细胞内颗粒状分布, 并与溶酶体膜相关蛋白1(LAMP1)

抗体阳性反应颗粒重合, 这提示细胞内自噬溶酶体形成增加(图4A)。计数含有LC3-II阳性反应颗粒的细胞发现, DMF在50 μmol/L和100 μmol/L剂量时分别诱导25%和35%的HaCat细胞出现自噬特征, 与对照组自噬细胞(<10%)比较有非常显著的统计学意义($P < 0.01$)(图4B)。脂质化LC3(LC3-II)的形成是细胞自噬的主要特征之一。我们用Western blot方法检测到DMF能够以剂量依赖的方式导致LC3-II水平增加(图4D)。为了确定LC3-II水平增加是由于LC3-I向LC3-II转化增加或溶酶体降解减少, 我们检测了在溶酶体抑制剂氯喹存在的条件下LC3-II的水平。结果如图4C所示, 在DMF和氯喹联合处理的细胞LC3-



A: MTT法检测经N-乙酰基-半胱氨酸预处理组与未预处理组细胞的增殖率。 $**P<0.01$, NAC预处理组与其DMF剂量相同但未经NAC预处理组比较。B: 流式细胞术检测经N-乙酰基-半胱氨酸预处理组与未预处理组细胞周期的分布; C: 经N-乙酰基-半胱氨酸预处理组与未预处理组细胞周期分布的定量。图中每一个数值代表3次独立实验的平均值, 每一个柱子上的标准误为3次实验的标准误。

A: MTT assay analyzed the rate of cell proliferation with and without NAC pretreatment groups. $**P<0.01$ compared with groups of same DMF dose without NAC pretreatment. B: FACS profiles of cell cycle with and without NAC pretreatment groups. C: quantitation of cell fraction with and without NAC pretreatment groups. Each value represents an average value of three independent experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplication experiments.

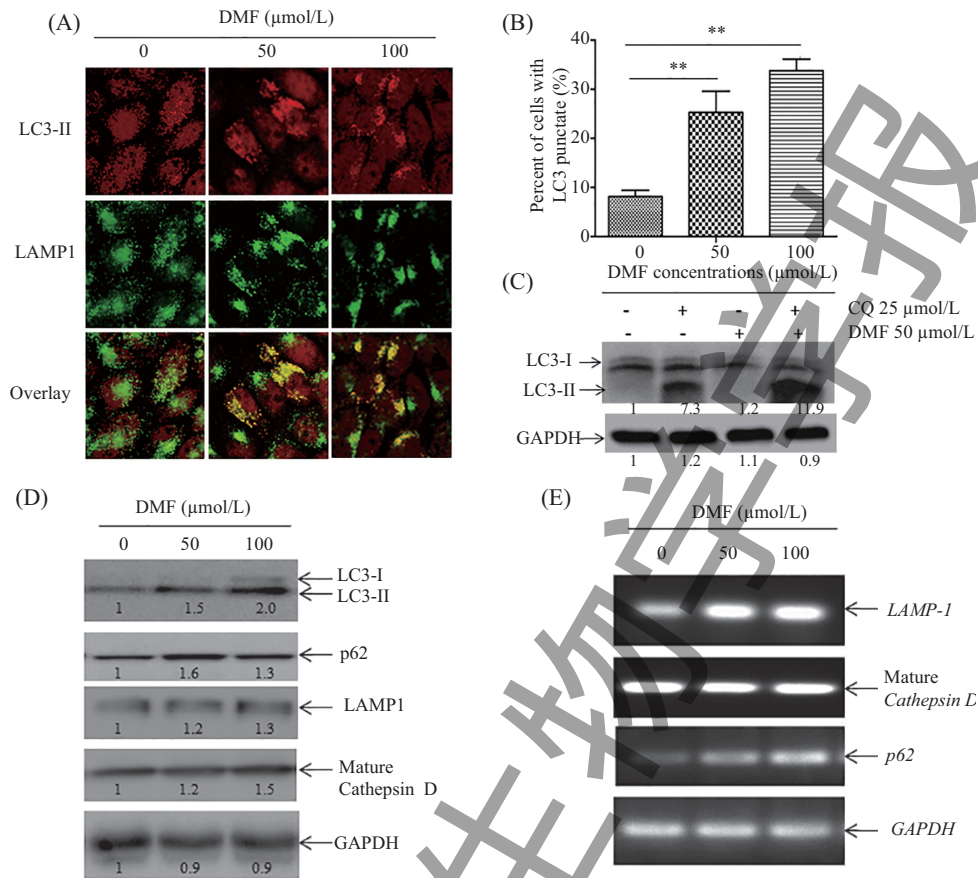
图3 N-乙酰基-半胱氨酸(NAC)拮抗DMF诱导的细胞增殖抑制和细胞周期改变

Fig.3 N-acetyl-L-cysteine antagonizes DMF induced inhibition of cell proliferation and cell cycle alteration in keratinocytes

II含量明显多于氯喹和DMF单独处理组, 证明LC3-II转化增加。DMF对细胞自噬的影响还表现在上调p62的水平, 增强溶酶体膜相关蛋白1(LAMP1)和成熟型组织蛋白酶D的表达(图4D)。p62和LAMP1蛋白在自噬过程中被降解, 它们的上调可能代表溶酶体功能减弱或合成增加。为了明确这一问题, 我们通过RT-PCR方法检测了这两种物质基因和蛋白的转录水平, 结果发现, DMF能够上调p62和LAMP1的转录, 这提示合成增加是这两种自噬相关蛋白增加的主要原因。

2.5 DMF抑制角质形成细胞ERK、AKT/mTOR信号系统的活化

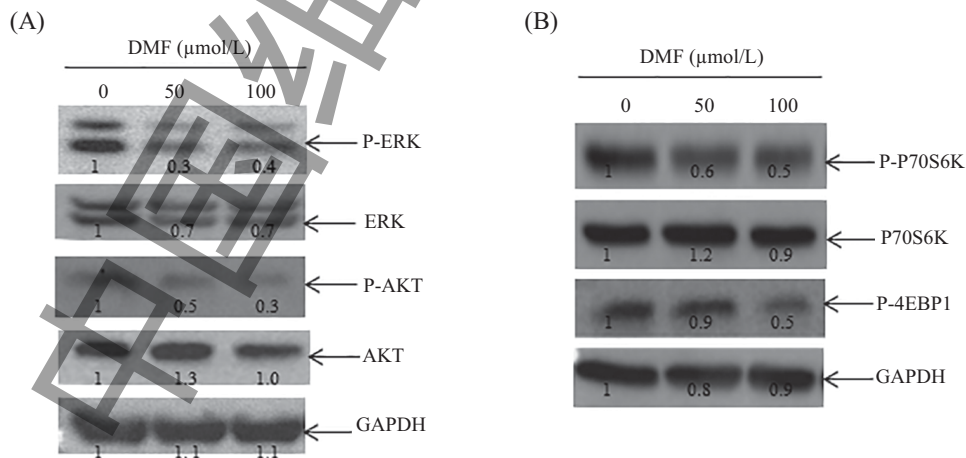
鉴于细胞内ERK和AKT是维持和促进细胞增殖和存活的两大信号系统, mTOR信号通路直接参与调节细胞合成代谢, 是调节细胞合成蛋白质的关键信号分子。我们用Western blot方法检测了DMF处理HaCat细胞对这些信号系统的影响。结果如图5A所示, DMF在低剂量(25~50 $\mu\text{mol/L}$)和高剂量水平时都能显著抑制ERK活化, 表现为磷酸化ERK水平降低。与此相似, DMF也明显抑制磷酸化AKT



A: DMF处理HaCat细胞24 h后, 免疫荧光染色检测细胞自噬。B: 含有LC3-II阳性反应颗粒细胞的定量。图中每一个数值代表3次独立实验的平均值, 每一个柱子上的标准误为3次实验的标准误。** $P < 0.01$ 。C、D: 免疫印迹法检测蛋白质水平。条带下面的数字代表灰度值。E: RT-PCR法检测mRNA水平。

A: immunofluorescence staining detected autophagy. B: quantitation of cells with LC3 puncta. Each value represents an average value of three independent experiments. Each error bar represents the standard deviation of the triplication experiments. ** $P < 0.01$. C, D: Western blot analyzed proteins expression. The numbers below the bands mean grey values. E: RT-PCR analyzed mRNA expression.

图4 DMF诱导HaCat细胞发生自噬
Fig.4 DMF induces keratinocyte autophagy



A、B: DMF处理HaCat细胞24 h后, 免疫印迹法检测蛋白质水平。条带下面的数字代表灰度值。

A, B: HaCat cells were incubated with DMF for 24 h, Western blot analyzed proteins expression. The numbers below the bands mean grey values.

图5 DMF抑制角质形成细胞ERK、AKT/mTOR信号系统
Fig.5 DMF inhibits ERK and AKT/mTOR signaling pathways in keratinocytes

的蛋白质水平。图5B表明, DMF对mTOR活性的也有抑制作用, 高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)的DMF能显著抑制磷酸化核糖体P70S6激酶(P-P70S6K)和真核翻译P-4EBP1的蛋白质水平, 而低浓度DMF仅明显抑制P-P70S6K。

3 讨论

DMF用于治疗银屑病已有多年的历史^[11]。过去人们主要从DMF调节机体免疫功能的角度研究DMF治疗银屑病的机理。本研究则主要探讨DMF对人角质形成细胞的直接作用, 证明DMF抑制人角质形成细胞增殖, 抑制DNA合成或有丝分裂, 诱导细胞发生自噬, 并且这些作用可能与DMF抑制AKT/mTOR和ERK信号功能有关。

本研究检测了不同剂量DMF对永生生化人角质形成细胞(HaCat细胞)增殖的影响, 发现DMF抑制细胞增殖呈剂量依赖性, 而且在低剂量(25~50 $\mu\text{mol/L}$)时即有明显的抑制作用。临床资料表明, 直接测量DMF在人体血清中的浓度比较困难, 因为在体内大多数富马酸二甲酯很快被代谢为富马酸单甲酯(monomethyl fumarate, MMF)。根据血清中MMF的浓度推测, 接受DMF治疗的银屑病患者血清浓度为30~50 $\mu\text{mol/L}$ 左右^[12]。根据本研究结果, 这一浓度范围已能对角质形成细胞产生明显的抑制效应。银屑病的特征之一是角质细胞过度增殖, 我们认为抑制细胞增殖可能是DMF治疗银屑病的主要机理之一。

本研究观察到, DMF对细胞周期的影响模式也与药物剂量有关。50 $\mu\text{mol/L}$ 的DMF主要是阻止HaCat细胞合成DNA, 结果导致G₁期细胞的比例增加。而100 $\mu\text{mol/L}$ 的DMF主要阻止细胞有丝分裂。这两种改变都可以阻滞细胞的过度增殖, 因此进一步证明了DMF对HaCat细胞增殖的抑制作用。文献报道, DMF能降低细胞内谷胱甘肽水平, 诱导氧自由基产生^[10]。本研究发现, 用氧自由基拮抗剂预处理细胞能拮抗DMF诱导的细胞增殖抑制和G₂与M期细胞周期阻滞。这一现象支持DMF能够干扰细胞内氧化还原动态平衡的研究报道。

自噬是一种进化保守的细胞生理反应, 它是指当细胞处于不利的生长环境下, 通过溶酶体系统将自身的结构成分如细胞器和生物大分子消化降解

并且再利用, 以维持细胞继续生长或存活的基本营养与能量需要^[13]。细胞自噬对于细胞生长、分化和存活都有重要影响, 但DMF是否调节皮肤表皮细胞的自噬功能尚无文献报道。本研究证明, DMF处理的细胞显示细胞自噬的特征, 表现为LC3-II免疫荧光染色呈点状分布, 并且与溶酶体标记蛋白LAMP1的阳性反应相重叠, 这提示自噬溶酶体的形成。蛋白质检测也证明, DMF处理的细胞内LC3-II(脂化的LC3)表达增加。由于细胞自噬是一个动态过程, 自噬体形成增加或自噬溶酶体降解能力减弱都可以导致LC3-II的表达增加。为了明确这一点, 我们在溶酶体抑制剂存在的条件下, 检测DMF诱导的LC3-II水平变化, 证明溶酶体功能改变并不是LC3-II增加的全部原因, 因此我们认为, DMF能够诱导LC3-II转化增加, 这与我们用免疫荧光技术观察到自噬溶酶体形成的结果是一致的。在图4C中, 未处理组和DMF单独处理组细胞的LC3-II检测水平均低于图4D相应组, 这可能与两个实验并非同时完成, LC3抗体的活性减弱有关。本研究还从基因转录和蛋白质表达两个水平检测了另外三种细胞自噬相关蛋白的水平, 发现DMF能上调溶酶体膜相关蛋白1(LAMP1)和p62的mRNA与蛋白质的水平, 并上调成熟型组织蛋白酶D(Cathepsin D)的水平。LAMP1是构成溶酶体膜的主要成分之一, Cathepsin D前体蛋白在溶酶体内裂解转化为成熟型组织蛋白酶, 是溶酶体执行消化与裂解功能的重要工具。DMF促进两者的表达与功能, 提示DMF促进细胞内溶酶体的生成及其功能的形成。p62蛋白质是参与自噬体形成和转运自噬物质的关键分子, 在自噬溶酶体中被降解^[14]。虽然通常情况下, 自噬增强会加速p62蛋白质降解, 但在本实验条件下由于DMF促进p62基因转录与蛋白质的合成, 因此p62总体水平显示增加。这些结果都表明, DMF能促进角质形成细胞的自噬反应。至于自噬反应的增强, 仅仅是细胞对DMF处理的应激反应, 还是直接参与细胞生长抑制和有丝分裂阻滞, 有待于进一步的研究。值得提出的是, 最近有研究表明, 细胞自噬对表皮细胞分化有重要影响^[15], 因此DMF诱导角质形成细胞自噬可能有助于表皮细胞分化。

AKT/mTOR促进细胞合成代谢, 是维持细胞增

殖、存活最重要的信号通路,抑制AKT/mTOR系统则导致细胞自噬或死亡^[16]。本研究观察到,DMF能明显抑制AKT蛋白和mTOR系统下游蛋白质4EBP1和P70S6K的磷酸化表达。由于AKT/mTOR信号系统对皮肤表皮细胞增殖起主要调控作用,我们认为,抑制AKT/mTOR信号通路可能是DMF抑制HaCat细胞增殖的主要分子机制之一。此外许多研究证明,抑制AKT/mTOR抑信号会诱导细胞自噬反应^[19-20]。本研究提示,DMF增强HaCat细胞自噬也与其调节AKT/mTOR信号通路有着密切的关系。近年研究发现,银屑病皮损表现出AKT和mTOR信号系统关键成分的异常表达,并且用靶向这些信号通路的特异抑制剂对银屑病有治疗作用^[17-18]。DMF是银屑病的有效治疗药物,本研究结果为解释DMF治疗银屑病的机理提供了新证据。此外,DMF对磷酸化ERK的活化也有抑制作用。已知MEK/ERK信号通路是维持表皮细胞正常细胞周期和分化过程的关键调控因素^[21],ERK激酶系统异常活化与多种皮肤肿瘤发生有关,表皮分化不良也是银屑病的病理特征之一。因此,DMF抑制ERK磷酸化有助于维持表皮细胞正常分化。DMF之所以能影响细胞多种信号通路的功能,可能与其改变细胞的氧化还原状态有密切关系,我们将在这方面作进一步研究。

参考文献 (References)

- Wollina U. Fumaric acid esters in dermatology. *Indian Dermatol Online J* 2011; 2(2): 111-9.
- Bomprezzi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: An overview. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; 8(1): 20-30.
- Höxtermann S, Nuchel C, Altmeyer P. Fumaric acid esters suppress peripheral CD4⁺ and CD8⁺ positive lymphocytes in psoriasis. *Dermatology* 1998; 196: 223-30.
- Ockenfels HM, Schultewolter T, Ockenfels G, Funk R, Goos M. The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokines of the psoriatic cytokine network. *Br J Dermatol* 1998; 139: 390-5.
- Seböck B, Bonnekoh B, Vetter R, Schneider I, Gollnick H, Mahrle G. The antipsoriatic dimethyl-fumarate suppresses interferon-gamma-induced ICAM-1 and HLA-DR expression on hyperproliferative keratinocytes. Quantification by a culture plate-directed APAAP-ELISA technique. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 29-32.
- Gerdes S, Shakery K, Mrowietz U. Dimethylfumarate inhibits nuclear binding of nuclear factor kappa B but not of nuclear factor of activated T cells and CCAAT/enhancer binding protein betain activated human T cells. *Br J Dermatol* 2007; 156: 838-42.
- Gesser B, Rasmussen MK, Raaby L, Rosada C, Johansen C, Kjellerup RB, *et al.* Dimethylfumarate inhibits MIF-induced proliferation of keratinocytes by inhibiting MSK1 and RSK1 activation and by inducing nuclear p-c-Jun (S63) and p-p53 (S15) expression. *Inflamm Res* 2011; 60: 643-53.
- Huang T, Lin X, Meng X, Lin M. Phosphoinositide-3 kinase/protein kinase-B/mammalian target of rapamycin pathway in psoriasis pathogenesis. A potential therapeutic target? *Acta Derm Venereol* 2014; 94(4): 371-9.
- Yu XJ, Li CY, Dai HY, Cai DX, Wang KY, Xu YH, *et al.* Expression and localization of the activated mitogen-activated protein kinase in lesional psoriatic skin. *Exp Mol Pathol* 2007; 83(3): 413-8.
- Nelson KC, Carlson JL, Newman ML, Sternberg P, Jones DP, Kavanagh TJ, *et al.* Effect of dietary inducer dimethylfumarate on glutathione in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 1927-35.
- Wain EM, Darling MI, Pleass RD, Barker JN, Smith CH. Treatment of severe, recalcitrant, chronic plaque psoriasis with fumaric acid esters: A prospective study. *Br J Dermatol* 2010; 162: 427-34.
- Rostami-Yazdi M, Clement B, Mrowietz U. Pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters in psoriasis patients. *Arch Dermatol Res* 2010; 302: 531-8.
- Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 124-31.
- Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Red-ox Signal* 2011; 14(11): 2201-14.
- Aymard E, Barruche V, Naves T, Bordes S, Closs B, Verdier M, *et al.* Autophagy in human keratinocytes: An early step of the differentiation? *Exp Dermatol* 2011; 20(3): 263-8.
- Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI3K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424-30.
- Pang J, Fuller ND, Hu N, Barton LA, Henion JM, Guo R, *et al.* Alcohol dehydrogenase protects against endoplasmic reticulum stress-induced myocardial contractile dysfunction via attenuation of oxidative stress and autophagy: Role of PTEN-Akt-mTOR signaling. *PLoS One* 2016; 11(1): e0147322.
- Fan S, Zhang B, Luan P, Gu B, Wan Q, Huang X, *et al.* PI3K/AKT/mTOR/p70S6K pathway is involved in A β 25-35-induced autophagy. *Biomed Res Int* 2015; doi: 10.1155/2015/161020.
- Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade. *Cytokine* 2012; 60(1): 38-42.
- DattaMitra A, Raychaudhuri SP, Abria CJ, Mitra A, Wright R, Ray R, *et al.* 1 α ,25-Dihydroxyvitamin-D₃-3-bromoacetate regulates AKT/mTOR signaling cascades: A therapeutic agent for psoriasis. *J Invest Dermatol* 2013; 133(6): 1556-64.
- Cursons J, Gao J, Hurley DG, Print CG, Dunbar PR, Jacobs MD, *et al.* Regulation of ERK-MAPK signaling in human epidermis. *BMC Syst Biol* 2015; 9: 41.