DOI:10.16016/j.2097-0927.202406063

DDIT4 介导的自噬在毛乳头细胞氧化应激损伤中的保护作用

高媛媛[1],赵恒光[2],杨桂红[1],雷 霞[1] 400042 重庆,陆军特色医学中心皮肤科[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院皮肤科[2]

[**摘要**] **目的** 探索 DNA 损伤诱导转录因子 4(DNA damage induced transcription factor 4,DDIT4)在毛乳头细胞氧化应激损伤中的保护作用及其机制。**方法** 使用长波紫外线(ultraviolet radiation A,UVA)和过氧化氢(H_2O_2)建立毛乳头细胞氧化应激模型;CCK-8 检测不同处理条件下的细胞活力,利用 2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(2′,7′-dichlorofluorescein diacetate,DCFH-DA)试剂检测细胞内活性氧(ROS)的变化;电镜观察自噬小体;Western blot 观察 DDIT4 及自噬相关指标微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC3)、泛素结合蛋白(ubiquitin-binding protein P62,P62)、雷帕霉素哺乳动物靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)、p-mTOR 的表达情况。**结果** UVA 和 H_2O_2 导致毛乳头细胞内 ROS 升高,活力下降($P<0.05$);氧化应激环境下毛乳头细胞内的 DDIT4 表达增加($P<0.05$),而抗氧化剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine,NAC)可有效抑制此效应($P<0.05$);UVA 或 H_2O_2 处理后毛乳头细胞内自噬水平升高,表现为自噬体数量增多,LC3 Ⅱ/Ⅰ比值增高($P<0.05$),P62 表达下降($P<0.05$),3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA)阻断自噬可观察到细胞活力进一步降低($P<0.05$),细胞内 ROS 增多($P<0.05$),反之,雷帕霉素(rapamycin,RAPA)可增加自噬水平提升氧化条件下毛乳头细胞活力,减少细胞内 ROS 生成($P<0.05$);下调 DDIT4 表达可使氧化应激环境下毛乳头细胞自噬减弱,LC3 Ⅱ/Ⅰ减少($P<0.05$),p-mTOR/mTOR、P62 增加($P<0.05$),细胞活力下降($P<0.05$),细胞内 ROS 增多($P<0.05$)。**结论** DDIT4 可能通过自噬缓解毛乳头细胞氧化应激损伤。

[**关键词**] DNA 损伤诱导转录因子 4;自噬;氧化应激;毛乳头细胞
[**中图法分类号**] R322.995;R966;R977.6 [**文献标志码**] A

Protective role of DDIT4-mediated autophagy in dermal papilla cells after oxidative stress injury

GAO Yuanyuan[1], ZHAO Hengguang[2], YANG Guihong[1], LEI Xia[1] [1]Department of Dermatology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042; [2]Department of Dermatology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the protective role of DNA damage induced transcription factor 4 (DDIT4) in oxidative stress injury in dermal papilla cells and its underlying mechanisms. **Methods** Dermal papilla cells were exposed to UVA and H_2O_2 to establish cellular model of oxidative stress. CCK-8 assay was used to detect cell viability under different treatment conditions, and the production of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected using 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Autophagic vesicles were observed with electron microscopy. Western blotting was employed to measure the expression of DDIT4 and autophagy-related molecules, including microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), ubiquitin-binding protein (P62), mammalian target of rapamycin (mTOR), and p-mTOR. **Results** UVA

[**基金项目**] 国家自然科学基金(82173440)
[**通信作者**] 雷 霞,E-mail:dpyyskinlx@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and H_2O_2 resulted in more production of ROS ($P<0.05$) and decreased viability of dermal papilla cells ($P<0.05$). DDIT4 expression was increased in dermal papilla cells under oxidative stress ($P<0.05$), and the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC) could effectively inhibit this effect ($P<0.05$). After treatment with UVA or H_2O_2, cell autophagy was enhanced in dermal papilla cells, characterized by an increase in the number of autophagosomes and an increased LC3Ⅱ/Ⅰ ratio ($P<0.05$), a decrease in P62 expression ($P<0.05$), and 3-methyladenine (3-MA) blocking autophagy led to further reduced cell viability ($P<0.05$) and increased intracellular ROS production ($P<0.05$). Conversely, rapamycin (RAPA) increased autophagy level and improved the viability of dermal papilla cells under oxidative conditions ($P<0.05$), and reduced the generation of intracellular ROS ($P<0.05$). Additionally, down-regulation of DDIT4 weakened autophagy in dermal papilla cells under oxidative stress, reduced LC3Ⅱ/Ⅰ ($P<0.05$), increased p-mTOR/mTOR and P62 ($P<0.05$), inhibited cell viability ($P<0.05$), and enhanced intracellular ROS production ($P<0.05$). **Conclusion** DDIT4 may alleviate oxidative stress injury in dermal papilla cells through autophagy.

[**Key words**] DNA damage induced transcription factor 4; autophagy; oxidative stress; dermal papilla cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82173440). Corresponding author: LEI Xia, E-mail: dpyyskinlx@tmmu.edu.cn

脱发是皮肤科的常见疾病,虽不威胁生命健康,但影响美观,对患者会造成较大的精神负担[1-2]。脱发由遗传、精神情绪压力、营养不良、作息不规律、内分泌紊乱、药物、炎症、自身免疫病、外伤等多种原因造成,这些因素往往相互作用导致发病。随着对脱发机制的探索不断深入,氧化应激损伤被认为在脱发发病机制中扮演了重要角色[3-4]。雄激素性秃发和斑秃是最常见的两种脱发类型,多项临床研究表明,雄激素性秃发和斑秃患者体内均存在氧化与抗氧化的失衡[5-7],从而凸显了深入探究氧化应激在脱发中的作用及其调节分子和机制的重要性。

DNA 损伤诱导转录因子 4(DNA damage induced transcription factor 4,DDIT4;也称 REDD1、RTP801 或 Dig1)是一种保守的应激反应基因,其响应多种刺激而诱导,包括缺氧、氧化应激、糖皮质激素、DNA 损伤等,已被证明可以调节细胞生长、线粒体功能、氧化应激和细胞凋亡[8]。既往研究表明,DDIT4 对缓解氧化应激引起的皮肤老化[9]、保护角质形成细胞免受 UVB 辐射诱导的氧化伤害等方面显示了潜在保护价值[10],此外,DDIT4 在毛囊的增殖分化中具有重要作用[11]。氧化应激可以诱导细胞自噬[12-13],DDIT4 也是参与自噬调节的雷帕霉素哺乳动物靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)的抑制剂,及时的 DDIT4 表达将限制 mTOR 的激活,使细胞在应激期间节省能量,避免能量崩溃和有害后果[14]。但目前关于氧化应激如何影响毛囊尤其毛乳头细胞的具体作用机制,以及 DDIT4 在其中所扮演的角色仍不清楚。

为进一步探索这些问题,本研究采用了物理[长波紫外线(ultraviolet radiation A,UVA)辐射]与化学(H_2O_2 处理)方法来诱导毛乳头细胞的氧化应激,并研究 DDIT4 在抵御此类氧化应激中的具体作用和可能的分子机制,以期为脱发的治疗提供更为精准的靶点及策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM/F12 培养基购自上海源培公司;胎牛血清(FBS)购自上海 VivaCell 公司;PBS 缓冲液干粉、电泳液、电转液、TBST 干粉购自武汉塞维尔公司;链霉素-青霉素双抗、0.25%胰酶(含 EDTA)、BCA 蛋白测定试剂盒、细胞裂解液、活性氧(ROS)检测试剂盒购自上海碧云天公司;30% H_2O_2 购自川东化工;LC3、DDIT4、α-Tubulin 抗体购自 Proteintech 公司;P62、mTOR、p-mTOR 抗体购自美国 Cell Signaling Technology(CST)公司;RAPA、3-MA 购自美国 MCE 公司;NAC 购自上海麦克林公司;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自上海雅酶公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;CCK-8、ECL 超敏发光液购自重庆葆光公司;小干扰 RNA 购自吉玛基因公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞提取 利用 5 周龄 C57BL/6 小鼠提取触须毛乳头细胞,小鼠购自陆军特色医学中心实验动物中心;经两步酶消化法提取,细胞呈聚集生长,毛乳头细胞标志性蛋白 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和波形蛋白(vimentin, VIM)为阳性。

1.2.2 细胞培养及细胞氧化应激模型 在含 10%

胎牛血清+1%双抗的 DMEM/F12 培养基中培养毛乳头细胞,孵箱温度为 37 ℃,CO_2 浓度为 5%,细胞生长至 80%左右进行传代,用第 3 代毛乳头细胞进行实验。紫外线是导致皮肤氧化应激的常见因素,H_2O_2 也常被用于研究中的模拟氧化应激条件,所以利用 UVA 和 H_2O_2 作为本实验氧化应激模型的处理因素,按照所需剂量 UVA 照射细胞或 H_2O_2 干预细胞。

1.2.3 细胞分组 探索氧化应激对毛乳头细胞内 DDIT4 表达的影响时,UVA 作为氧化应激条件,分为对照组(Control, Con)、UVA 组、NAC 组和 UVA+NAC 组,NAC 组和 UVA+NAC 组先用 NAC 含量为 5 mmol/L 的培养基孵育 2 h,再根据分组利用 UVA 处理。为了观察氧化应激条件下毛乳头细胞自噬相关指标的变化及自噬对细胞的影响,UVA 作为氧化应激条件,分为对照组、UVA 组、UVA+3-MA 组和 UVA+RAPA 组,UVA+3-MA 组用自噬抑制剂 3-MA 含量为 2 mmol/L 的培养基孵育 2 h,UVA+RAPA 组用自噬激动剂 RAPA 含量 50 nmol/L 的培养基孵育 2 h,然后再根据分组进行 UVA 处理。在进一步探索 DDIT4 在毛乳头细胞氧化应激中的作用及可能的机制时,UVA 作为氧化应激条件,分为空白干扰组(siNC)、siNC+UVA 组、siDDIT4 组和 siDDIT4+UVA 组,根据分组进行小干扰 RNA 转染,然后用 UVA 进一步处理。H_2O_2 作为氧化应激条件分组同 UVA。

1.2.4 细胞活力检测 细胞干预完成后,按照 CCK-8 试剂盒操作步骤,用无血清 DMEM/F12 培养基+CCK-8 试剂(10∶1)进行换液操作,避光 37 ℃孵育 2 h。酶标仪(波长 450 nm)测定各孔光密度值。

1.2.5 活性氧检测 细胞干预完成后,按照活性氧试剂盒操作步骤,用 PBS 清洗 3 遍,加入无血清 DMEM/F12 培养基稀释 1 000 倍的 DCFH-DA,避光 37 ℃孵育 20 min 后,再用 PBS 清洗 3 遍。使用荧光酶标仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)测定荧光强度,或者使用荧光显微镜观察荧光强度。

1.2.6 蛋白质印迹 将细胞接种在 10 cm 培养皿中,按不同实验目的及分组,分别予不同条件干预。处理完成后,PBS 清洗 3 遍,加入配好的细胞裂解液,用细胞刮将混悬液收集于 EP 管中,冰上裂解 10 min 后,4 ℃,15 000 r/min,离心 15 min,收集的上清液即为提取的蛋白,全程注意在低温环境操作。采用 BCA 法测量蛋白浓度并调平蛋白浓度,后将蛋白煮沸变性,储存于-80 ℃冰箱中。根据蛋白相对分子量大小选择不同浓度 SDS-PAGE 系统进行加载和分离,将蛋白转至 PVDF 膜上,牛奶封闭 1 h,一抗孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,二抗室温孵育 1 h,而后 TBST 洗涤 3 次,配置 ECL 发光液,凝胶成像系统曝光照相记录,采用 ImageJ 对条带灰度进行分析。实验至少重复 3 次。

1.2.7 小干扰 RNA 转染 用 DDIT4 小干扰 RNA(siDDIT4)转染细胞(siNC 作为对照),按照说明书进行操作。siNC 和 siDDIT4 分别转染细胞 48 h,然后再用 UVA 或 H_2O_2 处理,进行后续检测。小干扰 RNA 序列见表 1。

表 1 小干扰 RNA 序列

基因名称	引物序列(5′→3′)
DDIT4-小鼠	正义链:GGAAGACUCCUCAUACCUGTT 反义链:CAGGUAUGAGGAGUCUUCCTT
阴性对照	正义链:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反义链:ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.2.8 透射电镜观察自噬体 将细胞处理完成后收集,用 2.5%戊二醛固定,后续步骤由成都里莱生物科技公司完成。

1.3 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析,相关统计图表使用 GraphPad Prism8 进行绘制,采用 $\bar{x}\pm s$ 描述计量资料,两组间比较用两独立样本 t 检验,多组间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

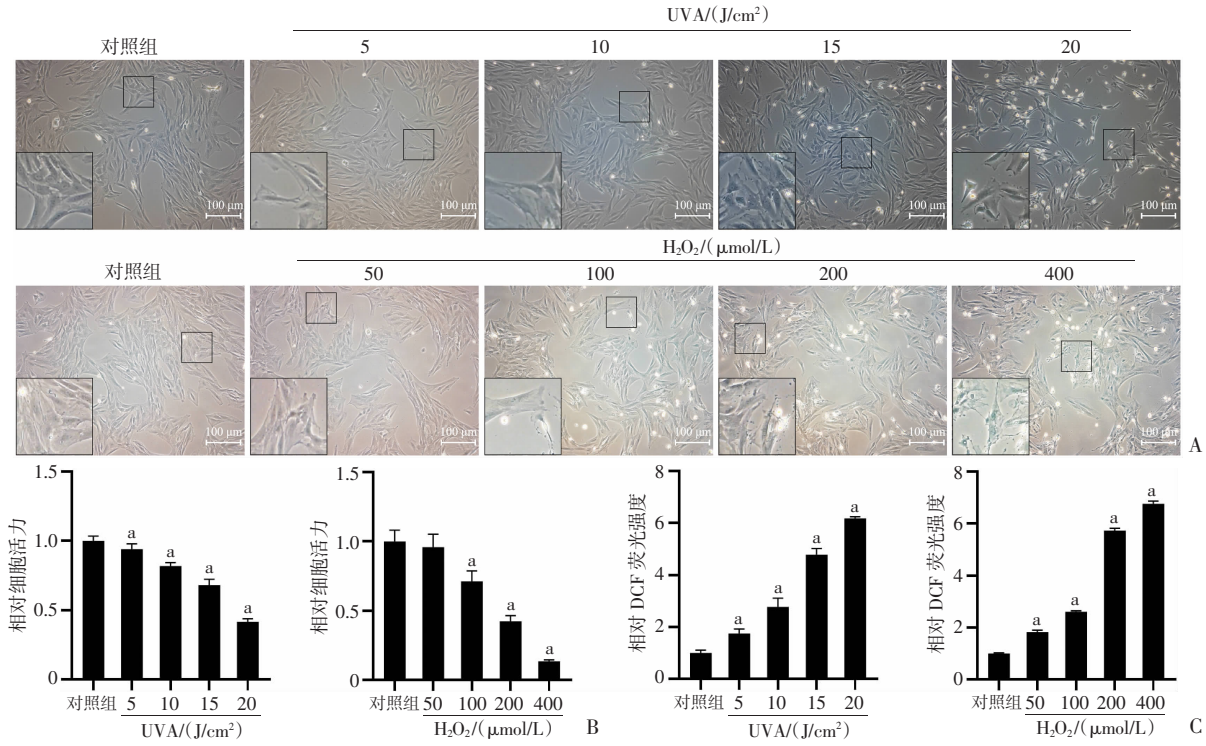
2.1 UVA 和 H_2O_2 诱导毛乳头细胞内 ROS 升高并降低其细胞活力

给予不同剂量的 UVA(5、10、15、20 J/cm^2)照射毛乳头细胞,4 h 后观察,随着光照强度的增强,细胞皱缩,间隙增大,漂浮细胞增多,细胞活力下降,ROS 增加($P<0.05$)。给予不同浓度 H_2O_2(50、100、200、400 μmol/L)处理细胞 4 h,细胞活力呈浓度依赖性降低($P<0.05$),细胞内 ROS 呈浓度依赖性升高($P<0.05$)。

结合不同 UVA 强度及 H_2O_2 浓度对细胞活性和细胞内 ROS 的影响,选择 15 J/cm^2 UVA 或 100 μmol/L 浓度 H_2O_2 作为实验组用于后续实验。见图 1。

2.2 ROS 刺激促进毛乳头细胞 DDIT4 的表达

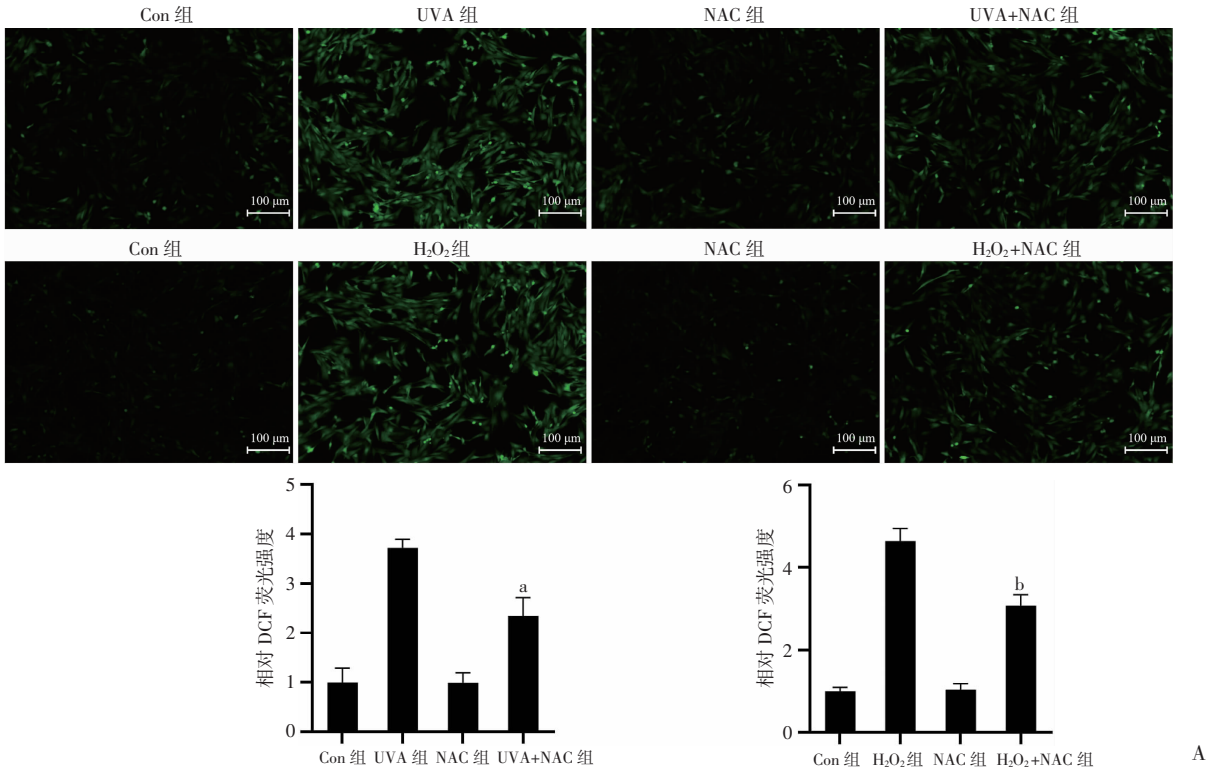
荧光强度定量分析显示,氧化应激条件下毛乳头细胞内 ROS 含量增加,抗氧化剂 NAC 可抑制 ROS 的增加;Western blot 结果显示,UVA 和 H_2O_2 会引起毛乳头细胞内 DDIT4 表达增高($P<0.05$),且这种升高同样可以被 NAC 大部分抑制,说明毛乳头细胞内 DDIT4 的升高与 ROS 生成有关。见图 2。



a: $P<0.05$,与对照组比较

A:不同强度 UVA 和不同浓度 H_2O_2 处理毛乳头细胞后的形态学观察;B:不同强度 UVA 和不同浓度 H_2O_2 处理后 CCK-8 测定细胞活力;C:各组毛乳头细胞内 ROS 水平

图 1 UVA 和 H_2O_2 诱导毛乳头细胞内 ROS 升高并降低其细胞活力

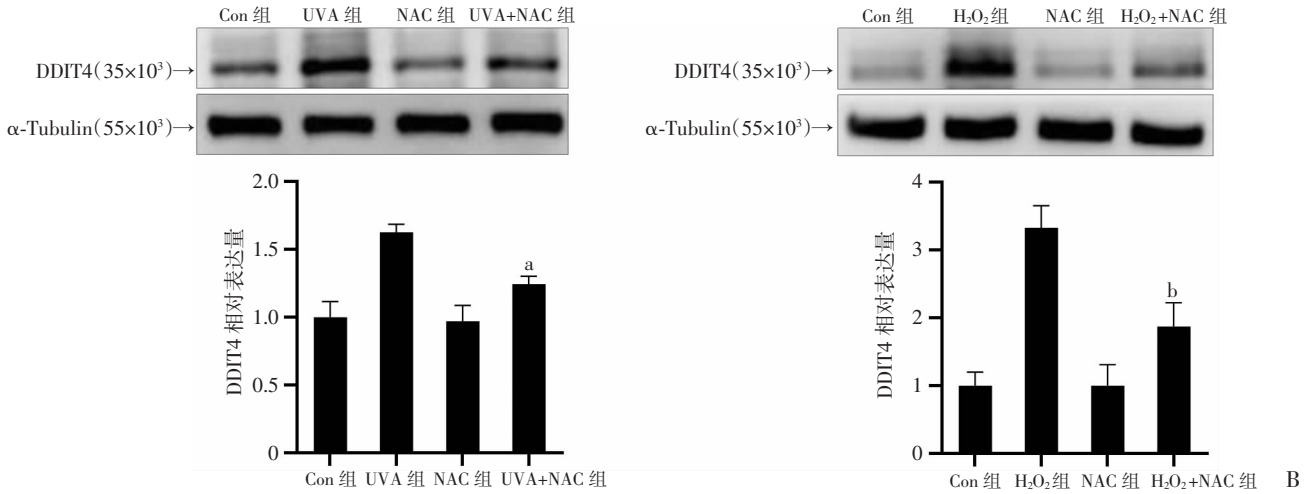


a: $P<0.05$,与 UVA 组比较;b: $P<0.05$,与 H_2O_2 组比较

A:荧光显微镜观察各组细胞内 ROS 含量

图 2 ROS 刺激促进毛乳头细胞中 DDIT4 的表达

(图 2B 续下页)



a: $P<0.05$,与 UVA 组比较;b: $P<0.05$,与 H_2O_2 组比较

B:Western blot 分析各组 DDIT4 的表达情况

续图 2 ROS 刺激促进毛乳头细胞中 DDIT4 的表达

2.3 ROS 诱导自噬以提高毛乳头细胞对氧化应激的耐受性

透射电镜显示,UVA 或 H_2O_2 处理毛乳头细胞后,细胞内自噬小体数目增加。根据分组使用 3-MA(2 mmol/L)、RAPA(50 nmol/L)分别预处理细胞 2 h,再用 UVA 或 H_2O_2 处理细胞。Western blot 半定量结果显示,与对照组相比,UVA 组和 H_2O_2 组的自噬相关蛋白 LC3Ⅱ/Ⅰ增加($P<0.05$),P62 下降($P<0.05$),提示毛乳头细胞的氧化应激会导致自噬水平升高,3-MA 和 RAPA 可分别进一步抑制或增强自噬。与 UVA 组相比,UVA+3-MA 组细胞活力下降,ROS 升高,UVA+RAPA 组细胞活力升高,ROS 下降($P<0.05$)。用 H_2O_2 作为处理条件结果与 UVA 类似($P<0.05$)。结果提示,毛乳头细胞可通过增强自噬减轻自身氧化应激损伤。见图 3。

2.4 DDIT4 调控自噬缓解毛乳头细胞氧化应激损伤

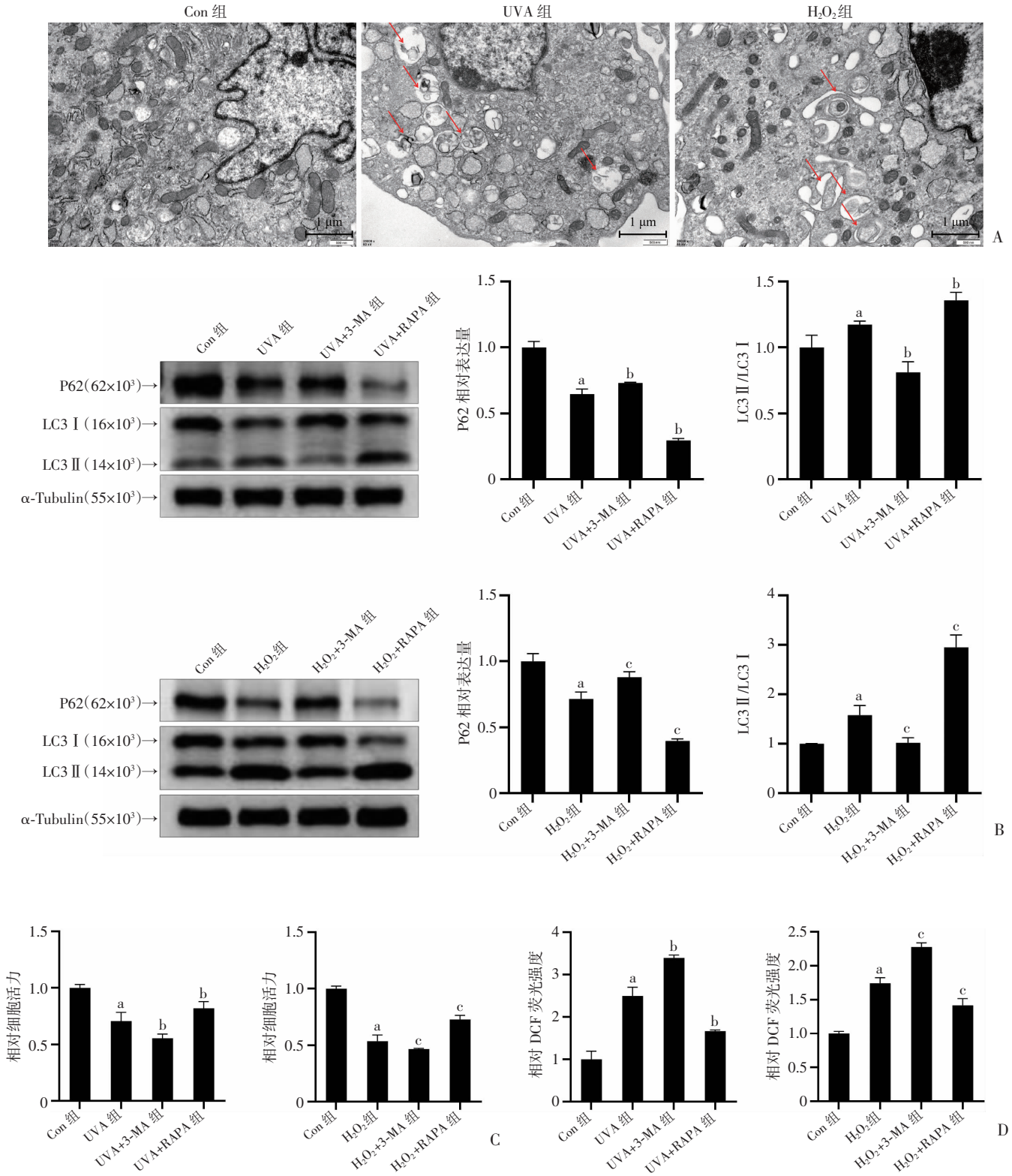
Western blot 检测毛乳头细胞 DDIT4、p-mTOR、mTOR、LC3、P62 蛋白表达情况,结果提示:与 siNC 相比,siNC+UVA 组 DDIT4 相对量、LC3Ⅱ/Ⅰ增加($P<0.05$),p-mTOR/mTOR、P62 下降($P<0.05$),siNC+UVA 组细胞活力下降($P<0.05$),细胞内 ROS 升高($P<0.05$)。与 siNC+UVA 组相比,siDDIT4+UVA 组 DDIT4 表达量明显下降,LC3Ⅱ/Ⅰ减少,p-mTOR/mTOR、P62 增加($P<0.05$),敲低 DDIT4 使得细胞活力进一步下降($P<0.05$),细胞内 ROS 进一步升高($P<0.05$)。在 H_2O_2 作为毛乳头细胞氧化应激条件的实验中可以观察到类似结果($P<0.05$)。结果表明,DDIT4 可能通过自噬缓解毛乳头细胞氧化应激损伤。见图 4。

3 讨论

毛囊作为人体最外层皮肤的附属器官,易受多种外源性和内生性因素产生的 ROS 影响,进而导致损伤。当毛囊经历的轻微应激损伤能够被及时清除时,它可能迅速恢复正常功能。然而,严重或长期的应激可以导致持续损伤,进而导致毛囊再生障碍,最终导致脱发。在体外研究中,人们发现真皮下的氧浓度一般在 1%~5%,对比常氧(21%)和生理氧(约 2%)培养条件下的 AGA 患者秃发区的毛乳头细胞发现,常氧状态会造成毛乳头细胞发生氧化应激,使毛乳头细胞的 ROS 水平升高,细胞发生扁平化,迁移率降低,与衰老相关的因子如 β-半乳糖苷酶的活性增加,且细胞同时表达更多的头发生长相关负性调节因子,产生抗毛乳头细胞增殖的效应[15]。因此,氧化应激在雄激素性脱发、斑秃、休止期脱发中都扮演了重要角色[4, 16]。

毛乳头是控制毛发生长、循环的信号发生器,探索毛乳头细胞在氧化应激中的反应及其保护机制对脱发疾病的治疗有指导意义[17]。紫外线是导致皮肤氧化应激的常见因素[18],H_2O_2 常被用于研究中的模拟氧化应激条件,于是本研究引入 UVA 和 H_2O_2 作为处理条件用于观察毛乳头氧化应激反应,发现 ROS 的增加是导致 DDIT4 升高的主要因素,进一步的观察表明,DDIT4 可能通过自噬缓解毛乳头细胞氧化应激损伤。

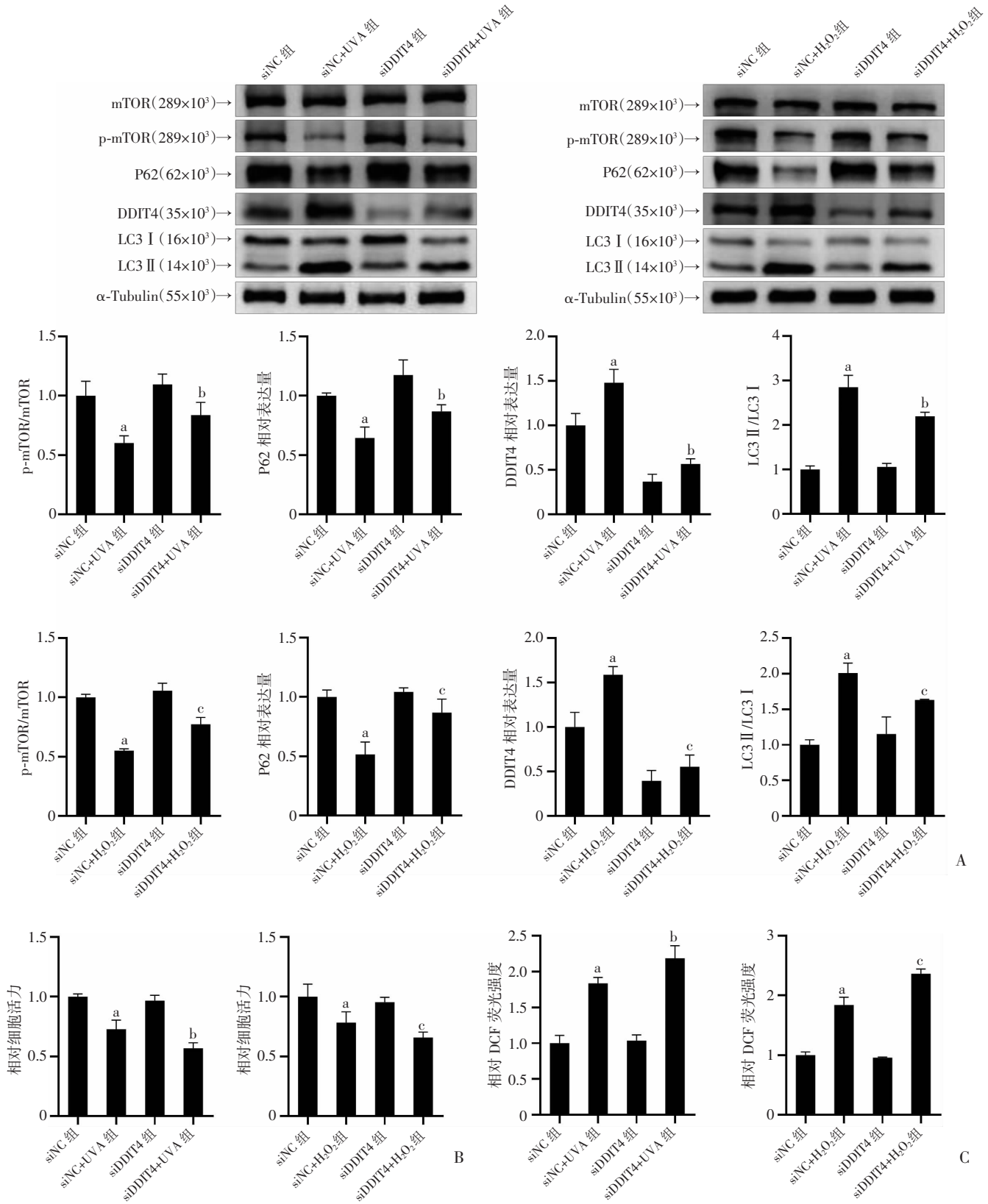
DDIT4 是一种保守且普遍存在的蛋白质,可被多种应激诱导。H_2O_2 诱导肝细胞氧化应激,通过激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)的转录调控,增加 DDIT4 的表达,进而减少细胞内 ROS 的形成,保护肝细



a: $P<0.05$,与 Con 组比较;b: $P<0.05$,与 UVA 组比较;c: $P<0.05$,与 H_2O_2 组比较

A:透射电子显微镜观察自噬体;B:Western blot 分析各组 LC3、P62 的表达情况;C:CCK-8 测定细胞活力;D:各组毛乳头细胞内 ROS 水平

图 3 ROS 诱导自噬以提高毛乳头细胞对氧化应激的耐受性



a: $P<0.05$,与 siNC 组比较;b: $P<0.05$,与 siNC+UVA 组比较;c: $P<0.05$,与 siNC+H_2O_2 组比较

A:Western blot 分析各组 LC3、DDIT4、P62、mTOR 和 p-mTOR 的表达水平;B:CCK-8 测定细胞活力;C:各组毛乳头细胞内 ROS 水平

图 4 DDIT4 调节自噬减轻毛乳头细胞的氧化应激损伤

胞免受氧化应激损伤[19]。另一方面,DDIT4 以 S-亚硝基化依赖性方式克服 BRG1 缺陷,影响 p38-MAPK 信号通路,从而促进 ROS 生成,导致肝细胞损伤加重[20]。这些发现展示了 DDIT4 在不同细胞类型和条件下作为保护或损害氧化应激的双重角色[8]。DDIT4 在皮肤领域的作用已经得到了一定程度的研究,在真皮成纤维细胞中 DDIT4 受 HDAC4 调节和细胞衰老调节,可以逆转与衰老相关的基因(如 SASP 和 SA-β-gal 阳性细胞)的表达[9],但其在毛囊中的作用及相关研究报道较少。本研究发现氧化应激条件下,毛乳头细胞内 DDIT4 的表达增多,且抑制 ROS 的产生后,表达量又会有明显下降,表明 DDIT4 表达与 ROS 水平在毛乳头细胞内有调节关系,其可能的作用有待进一步研究。

自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物的过程,借此实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。毛发的生长和更新与自噬相关,激活自噬可以加速毛发从休止期到生长期的进程,并且能够延长生长期[21-22],斑秃的发病与自噬受损相关,自噬活性在斑秃小鼠模型受到抑制,增强自噬可缓解小鼠脱毛症状[23],同时,自噬受损也是雄激素性秃发病的潜在机制[24]。多种物质包括羟基酪醇、N1-甲基亚精胺、5-溴-3,4-二羟基苯甲醛(BDB)、柠檬素等均可通过增强自噬以增强毛囊相关细胞活性,保护其免受各种刺激损伤[17, 25-27]。P62 和 LC3 是反映自噬程度重要且常用的指标,当细胞启动自噬时,LC3 Ⅰ会被修饰并转化为 LC3 Ⅱ形式,P62 通过与 LC3 Ⅱ结合,将自噬底物标记并引导进入自噬体进行降解,P62 的降解和 LC3 Ⅱ/Ⅰ比值的增加可反映自噬增强。氧化应激是造成脱发的重要因素,自噬可以及时清除这些受损的细胞成分,从而维持细胞内的氧化还原平衡,保护细胞免受氧化应激损伤。本研究观察显示,UVA 和 H_2O_2 均可导致毛乳头细胞的自噬增加,用 3-MA 抑制自噬可进一步加重毛乳头细胞氧化应激损伤,而自噬激活剂 RAPA 可减轻毛乳头细胞的这类损伤效应,提示毛乳头细胞可通过增强自噬减轻自身氧化应激损伤。

mTOR 信号通路控制着大分子合成、细胞生长和代谢,以响应营养物质和生长因子,当细胞处于营养缺乏、能量不足的状态时,mTOR 信号通路被抑制,自噬过程被激活,通过自噬降解一些不必要的细胞器和蛋白质,为细胞提供能量和营养物质,以维持细胞稳态[28]。DDIT4 作为 mTOR 的内源性抑制剂,已被证明可以调节细胞生长、线粒体功能、氧化应激和细胞凋亡[29]。相关研究发现,DDIT4 可以通过竞争结合 14-3-3 蛋白,使得 Tsc2/14-3-3 复合体解聚,从而活化 Tsc1/2 以抑制 mTORC1 的表达[30]。在脑缺血再灌注损伤中,抑制 DDIT4 的表达可以增加 mTOR 的磷酸化,降低细胞自噬水平[31-32]。本研究结果显示,干扰 DDIT4 的表达会使 UVA 和 H_2O_2 条件下毛乳头细胞内 p-mTOR/mTOR 增加、P62 增加、LC3 Ⅱ/Ⅰ下降,这说明下调氧化应激条件下 DDIT4 的表达会影响毛乳头细胞自噬的发生,同时,细胞活力进一步下降,细胞内 ROS 进一步升高。本研究推测,DDIT4 可能通过自噬缓解毛乳头细胞氧化应激损伤(图 5)。

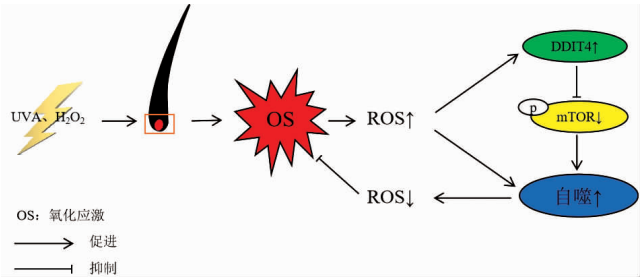


图 5 DDIT4 通过自噬减轻毛乳头细胞的氧化应激损伤

总之,ROS 水平增高会引起氧化应激,这会对毛乳头细胞构成威胁,是导致脱发的重要原因。然而,DDIT4 的上调以及随后增强的自噬可减少细胞内 ROS 的累积,为毛乳头细胞抵御氧化损伤提供了潜在的防御机制。未来在治疗脱发方面,可能将调节 DDIT4 基因的表达和激活自噬机制作为潜在的治疗靶点。

参考文献:

[1] HUANG C H, FU Y, CHI C C. Health-related quality of life, depression, and self-esteem in patients with androgenetic alopecia: a systematic review and meta-analysis[J]. JAMA Dermatol, 2021, 157(8): 963-970. DOI: 10.1001/jamadermatol.2021.2196.

[2] TOUSSI A, BARTON V R, LE S T, *et al*. Psychosocial and psychiatric comorbidities and health-related quality of life in alopecia areata: a systematic review[J]. J Am Acad Dermatol, 2021, 85(1): 162-175. DOI: 10.1016/j.jaad.2020.06.047.

[3] MORINAGA H, MOHRI Y, GRACHTCHOUK M, *et al*. Obesity accelerates hair thinning by stem cell-centric converging mechanisms[J]. Nature, 2021, 595(7866): 266-271. DOI: 10.1038/s41586-021-03624-x.

[4] MA Y Q, SUN Z, LI Y M, *et al*. Oxidative stress and alopecia areata[J]. Front Med, 2023, 10: 1181572. DOI: 10.3389/fmed.2023.1181572.

[5] KAYA ERDOGAN H, BULUR I, KOCATURK E, *et al*. The role of oxidative stress in early-onset androgenetic alopecia [J]. J Cosmet Dermatol, 2017, 16(4): 527-530. DOI: 10.1111/jocd.12300.

[6] CWYNAR A, OLSZEWSKA-SŁONINA D M, CZAJKOWSKI R. The impact of oxidative stress in androgenic alopecia in women[J]. Postepy Dermatol Alergol, 2020, 37(1): 119-120. DOI: 10.5114/ada.2019.81685.

[7] BAKRY O A, ELSHAZLY R M, SHOEIB M A, *et al*. Oxidative stress in alopecia areata: a case-control study[J]. Am J Clin Dermatol, 2014, 15(1): 57-64. DOI: 10.1007/s40257-013-0036-6.

[8] BRITTO F A, DUMAS K, GIORGETTI-PERALDI S, *et al*. Is REDD1 a metabolic double agent? Lessons from physiology and pathology[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2020, 319(5): C807-C824. DOI: 10.1152/ajpcell.00340.2020.

[9] LEE Y R, SONG M J, PARK J H, *et al*. Histone deacetylase 4 reverses cellular senescence *via* DDIT4 in dermal fibroblasts [J]. Aging, 2022, 14(11): 4653-4672. DOI: 10.18632/aging.204118.

[10] FEEHAN R P, COLEMAN C S, EBANKS S, *et al*. REDD1 interacts with AIF and regulates mitochondrial reactive oxygen species generation in the keratinocyte response to UVB[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 616: 56-62. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.05.066.

[11] ZHAO H G, RIEGER S, ABE K, *et al*. DNA damage-inducible transcript 4 is an innate surveillant of hair follicular stress in vitamin D receptor knockout mice and a regulator of wound re-epithelialization[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): 1984. DOI: 10.3390/ijms17121984.

[12] ORNATOWSKI W, LU Q, YEGAMBARAM M, *et al*. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101679. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101679.

[13] XIE X C, ZHANG Y, WANG Z, *et al*. ATM at the crossroads of reactive oxygen species and autophagy[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(12): 3080-3090. DOI: 10.7150/ijbs.63963.

[14] EDDIE IP W K E, HOSHI N, SHOUVAL D S, *et al*. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages[J]. Science, 2017, 356(6337): 513-519. DOI: 10.1126/science.aal3535.

[15] UPTON J H, HANNEN R F, BAHTA A W, *et al*. Oxidative stress-associated senescence in dermal papilla cells of men with androgenetic alopecia[J]. J Invest Dermatol, 2015, 135(5): 1244-1252. DOI: 10.1038/jid.2015.28.

[16] SAVCI U, SENEL E, OZTEKIN A, *et al*. Ischemia-modified albumin as a possible marker of oxidative stress in patients with telogen effluvium[J]. An Bras Dermatol, 2020, 95(4): 447-451. DOI: 10.1016/j.abd.2020.01.005.

[17] CHEN Q, SUN T, WANG J, *et al*. Hydroxytyrosol prevents dermal papilla cells inflammation under oxidative stress by inducing autophagy[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2019, 33(9): e22377. DOI: 10.1002/jbt.22377.

[18] CHEN Q Y, ZHANG H Y, YANG Y M, *et al*. Metformin attenuates UVA-induced skin photoaging by suppressing mitophagy and the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 6960. DOI: 10.3390/ijms23136960.

[19] CHO S S, KIM K M, YANG J H, *et al*. Induction of REDD1 *via* AP-1 prevents oxidative stress-mediated injury in hepatocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 124: 221-231. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.014.

[20] LI Z L, ZHAO Q W, LU Y J, *et al*. DDIT4 S-nitrosylation aids p38-MAPK signaling complex assembly to promote hepatic reactive oxygen species production[J]. Adv Sci, 2022, 9(13): e2201652. DOI: 10.1002/advs.202201652.

[21] CHAI M, JIANG M S, VERGNES L, *et al*. Stimulation of hair growth by small molecules that activate autophagy[J]. Cell Rep, 2019, 27(12): 3413-3421.e3. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.05.070.

[22] PARODI C, HARDMAN J A, ALLAVENA G, *et al*. Autophagy is essential for maintaining the growth of a human (mini-) organ: Evidence from scalp hair follicle organ culture[J]. PLoS Biol, 2018, 16(3): e2002864. DOI: 10.1371/journal.pbio.2002864.

[23] GUND R, CHRISTIANO A M. Impaired autophagy promotes hair loss in the C3H/HeJ mouse model of alopecia areata [J]. Autophagy, 2023, 19(1): 296-305. DOI: 10.1080/15548627.2022.2074104.

[24] LIU W W, LI K T, WANG G F, *et al*. Impairment of autophagy may be associated with follicular miniaturization in androgenetic alopecia by inducing premature catagen[J]. J Dermatol, 2021, 48(3): 289-300. DOI: 10.1111/1346-8138.15672.

[25] MARZANI B, PINTO D, SORBELLINI E, *et al*. New multi-targeting strategy in hair growth promotion: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. G Ital Dermatol Venereol, 2018, 153(3): 338-343. DOI: 10.23736/s0392-0488.18.05891-1.

[26] KANG J I, CHOI Y K, HAN S C, *et al*. 5-bromo-3, 4-dihydroxybenzaldehyde promotes hair growth through activation of Wnt/β-catenin and autophagy pathways and inhibition of TGF-β pathways in dermal papilla cells[J]. Molecules, 2022, 27(7): 2176. DOI: 10.3390/molecules27072176.

[27] KANG J I, CHOI Y K, HAN S C, *et al*. Limonin, a component of immature *Citrus fruits*, activates anagen signaling in dermal papilla cells[J]. Nutrients, 2022, 14(24): 5358. DOI: 10.3390/nu14245358.

[28] KIM Y C, GUAN K L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 25-32. DOI: 10.1172/JCI73939.

[29] LI W Y, HU S, TIAN C F, *et al*. TRIP4 transcriptionally activates DDIT4 and subsequent mTOR signaling to promote glioma progression[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 177: 31-47. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.009.

[30] DEYOUNG M P, HORAK P, SOFER A, *et al*. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling[J]. Genes Dev, 2008, 22(2): 239-251. DOI: 10.1101/gad.1617608.

[31] SUN J G, YUE F L. Suppression of REDD1 attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-evoked ischemic injury in neuron by suppressing mTOR-mediated excessive autophagy[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 14771-14779. DOI: 10.1002/jcb.28737.

[32] ZHANG Y, LIU L Y, HOU X M, *et al*. Role of autophagy mediated by AMPK/DDiT4/mTOR axis in HT22 cells under oxygen and glucose deprivation/reoxygenation[J]. ACS Omega, 2023, 8(10): 9221-9229. DOI: 10.1021/acsomega.2c07280.

(收稿:2024-06-19;修回:2024-08-03)

(编辑 邓强庭)