DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.015
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0039-04

论著

Lovastatin对HL-60细胞HMG-CoA还原酶mRNA表达及细胞增殖功能的影响

张雪玲[1],糜漫天[1],张乾勇[1],韦 娜[1],李等松[2] ([1]第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038;[2]兰州军区军事医学研究所,兰州 730020)

提 要:目的 探讨胆固醇合成抑制剂洛伐他汀(lovastatin,LOV)对HL-60细胞HMG-CoA还原酶mRNA表达及细胞增殖功能的影响。方法 采用MTT比色法、生长曲线测定、计算细胞生长抑制率、流式细胞仪分析、以及RT-PCR等技术方法,观察LOV对HL-60细胞体外增殖能力、细胞周期分布及HMG-CoA还原酶mRNA表达的影响。结果 HL-60细胞经LOV处理后,生长减慢,细胞周期被阻滞在G_0/G_1期,LOV剂量越大,时间越长,增殖抑制作用越明显;LOV处理HL-60细胞1~3 d,低剂量组(4 μmol/L)HMG-CoA还原酶mRNA表达上调,而中剂量组(8 μmol/L)和高剂量组(16 μmol/L)第1天有增加趋势,第2~3天明显降低。结论 LOV能显著抑制HL-60细胞增殖,使细胞受阻于G_0/G_1期,该作用有明显剂量-效应和时间依赖关系;随洛伐他汀处理剂量和时间的不同,HL-60细胞HMG-CoA还原酶mRNA表达表现为上调或下调变化。

关键词:洛伐他汀;HL-60细胞;胆固醇;细胞增殖;细胞周期;HMG-CoA还原酶mRNA
中图法分类号:R972.6;R329.28;R394.3 文献标识码:A

Effects of lovastatin on the expression of HMG-CoA reductase mRNA and proliferation capacity of HL-60 cells

ZHANG Xue-ling[1], MI Man-tian[1], ZHANG Qian-yong[1], WEI Na[1], LI Deng-song[2]([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Military Medicine, Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730020, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of lovastatin (LOV) on the expression of HMG-CoA reductase mRNA and proliferation capacity of HL-60 cells. **Methods** The cellular proliferation capacity was determined by MTT and growth curve analysis. The cell cycle distribution was measured by flow cytometry (FCM). The expression of HMG-CoA reductase mRNA was analyzed by RT-PCR. **Results** LOV treatment decreased the proliferation capacity of HL-60 cells in dose- and time-dependent manners and blocked cell cycles in the G_0-G_1 phase. Increased expression of HMG-CoA reductase mRNA was found in HL-60 cells after treatment with LOV (4 μmol/L) for 1—3 d and with LOV (8 μmol/L, 16 μmol/L) for 1 d, but decreased expression was found after treatment with LOV (8 μmol/L, 16 μmol/L) for 2—3 d. **Conclusion** Lovastatin can significantly inhibit the proliferation of HL-60 cells *via* cell cycle arrest in G_0/G_1 phase of the cell cycle in time- and dose-dependent manners. The expression of HMG-CoA reductase mRNA is up-regulated or down-regulated in HL-60 cells in time- and dose-dependent manners.

Key words: lovastatin; HL-60 cells; cholesterol; cell proliferation; cell cycle; HMG-CoA reductase mRNA

细胞膜是细胞内外环境的屏障,细胞活化增殖有关或相伴的"早期事件"及"后续事件"的发生都与膜的正常结构与功能有关。胆固醇(cholesterol)作为哺乳动物细胞膜上的主要组成成分,对细胞的生长增殖及细胞膜的功能特性起关键性调节作用,同时它是细胞生长和保持活性状态所必需的物质。正常细胞通过羟甲基戊二酸单酰辅酶A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzymeA,HMG-CoA)还原酶调节内源性胆固醇合成,通过低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor,LDL-R)介导的LDL内吞提供外源性胆固醇,外源性和内源性胆固醇又通过特定机制相互调节,以保持细胞胆固醇水平的相对稳定[1],有研究表明,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271128)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271128)
作者简介:张雪玲(1965—),女,河南省洛阳县人,硕士,助理研究员,主要从事营养与肿瘤方面的研究。现在兰州军区军事医学研究所,兰州730020,电话:(0931)8971585-2021
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2003-01-07;修回日期:2003-07-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞内胆固醇缺乏，细胞生长受抑，同时发生表型改变[1,2]。有关胆固醇影响细胞增殖及凋亡的详细分子机制尚不十分清楚[3]。

HMG-CoA 还原酶抑制剂洛伐他汀（lovastatin，LOV）是 HMG-CoA 还原酶强力和高度专一性的竞争性抑制剂，能通过竞争性抑制作用显著降低 HMG-CoA 还原酶活性，有效地抑制胆固醇的合成，从而影响细胞的增殖和凋亡。本研究以人粒系白血病细胞株 HL-60 为实验对象，以 LOV 为处理因素，观察 LOV 对 HL-60 细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达及细胞增殖功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

LOV（Fluka 产品），溶于二甲亚砜（DMSO），配成 3.2×10^4 μmol/L 贮存液，贮存于－20 ℃。HMG-CoA 还原酶引物、内参照β2-microglubulin（β2-MG）引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。$INCO_2$ 108 型 CO_2 培养箱（德国），PTC-100™型 PCR 扩增仪（美国），FACS-440 型流式细胞仪（美国），TFP-M 型紫外透照仪（法国）。

1.2 细胞株的培养

HL-60 细胞由中科院上海细胞所提供。细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中，37 ℃、5% 的 CO_2 及饱和湿度下，常规培养传代。

1.3 LOV 作用剂量选择

通过 MTT 比色法检测细胞增殖功能来确定 LOV 处理细胞的适宜剂量。用 RPMI1640 培养基将 LOV 贮存液稀释为 3.2×10^2 μmol/L，分别以 0、1、2、4、8、16、32 μmol/L 的终浓度处理细胞。细胞以 1×10^5/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板中，每孔 200 μl，加处理因素，培养 3 d，收获细胞前 4 h，每孔加入 20 μl MTT（5 mg/ml），37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养 4 h，去掉培养液，加入 150 μl DMSO 充分溶解结晶物，用酶联免疫检测仪在 492 nm 处测 A 值，最后，确定 LOV 处理细胞的适宜剂量为 4、8、16 μmol/L。

1.4 实验分组

实验设对照组和 LOV 处理组，根据预实验结果，LOV 处理组分为低（4 μmol/L）、中（8 μmol/L）、高（16 μmol/L）3 个剂量组，以上均为 LOV 处理细胞的终浓度。对照组和各处理组细胞培养液中 DMSO 的终浓度≤0.05%。

1.5 生长曲线的测定

各实验组细胞以 1×10^5/ml 密度接种于 24 孔培养板中，每孔 1 ml，加处理因素，每组设 3 个平行孔，常规培养 4 d，并分别于第 0、1、2、3、4 d 收集细胞，苔盼蓝染色计数活细胞数，绘制生长曲线，并按公式计算细胞生长抑制率。

$$\text{生长抑制率 GI}=\frac{Nc-Nt}{Nc}\times 100\ \%$$

Nc 和 Nt 分别为某时相点对照组和处理组细胞数。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期分布

LOV 处理细胞 2～3 d，收获细胞，70% 冷乙醇固定，RNase 消化，碘化丙啶（PI）染色后，采用流式细胞仪检测细胞周期相分布并计算细胞增殖指数（PI）。

$$PI=\frac{G_2/M+S}{G_0/G_1+G_2/M+S}$$

1.7 RT-PCR 分析 HL-60 细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达

RNA 提取用 Tripure 试剂（Roche 集团）按说明书进行，取 4 μg RNA，用 M-MuLV 逆转录酶制备 cDNA，取 3 μl cDNA 进行 PCR，HMG-CoA 还原酶引物：参照文献[4]方法，FP1：5′-TACCATGTCAGGGGTACGTC-3′，RP2：5′-CAAGCCTAGAGACTAAATCATC-3′，RT-PCR 产物长度为 246 bp。内参照β2-microglubulin（β2-MG）引物：参照 Genebank DNA 序列，β2-MG FP1：5′-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3′，β2-MG RP2：5′-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3′，RT-PCR 产物长度为 120 bp。反应体系为：总体积 50 μl、0.2 mmol/L dNTP、0.1 U/μl Tag DNA 聚合酶、1 mmol/L $MgCl_2$ 缓冲液、10× PCR 缓冲液、上下游引物各 0.3 μmol/L、cDNA 模板 3 μl。扩增条件为：95 ℃，5 min→94 ℃，1 min；60 ℃，1 min；72 ℃，1 min；35 个循环→72 ℃，10 min。取 5 μl 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察并照相。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用单因素方差分析。

2 结果

2.1 LOV 对 HL-60 细胞增殖功能的影响

MTT 实验显示，不同剂量（0、1、2、4、8、16、32 μmol/L）LOV 处理细胞 3 d，各处理组 A_{492} 值均比未经处理的细胞显著下降。各处理组细胞增殖受抑，且随 LOV 剂量增大，对细胞的增殖抑制作用越明显，呈剂量依赖效应（表 1）。

表 1 MTT 法检测 LOV 对 HL-60 细胞增殖功能的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Tab 1 Effect of LOV on the proliferation capacity of HL-60 cells by MTT（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Group	A_{492}（3 d）
Control	0.991±0.135
LOV 1 μmol/L	0.716±0.060 *
LOV 2 μmol/L	0.706±0.025 *
LOV 4 μmol/L	0.661±0.006 **
LOV 8 μmol/L	0.458±0.061 **
LOV 16 μmol/L	0.433±0.018 **
LOV 32 μmol/L	0.333±0.006 **

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control

生长曲线结果显示，不同剂量 LOV 处理 HL-60 细胞 1～4 d，对 HL-60 细胞有明显的增殖抑制作用。4、8、16 μmol/L 3 个剂量处理 HL-60 细胞 1 d，抑制率分别为

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

13.16%、23.68%、28.51%; 处理 2 d 抑制率分别为 15.09%、31.47%、61.21%; 处理 3 d 抑制率分别为 39.76%、68.24%、82.94%; 处理 4 d, 高、中剂量组大量细胞死亡, 以高剂量组最为明显(图 1)。因 1, 2 μmol/L 剂量作用较弱, 而 32 μmol/L LOV 组又见明显细胞死亡, 为了避免死细胞对后续研究内容的干扰, 本研究确定 4、8、16 μmol/L 3 个剂量为处理 HL-60 细胞适宜剂量。

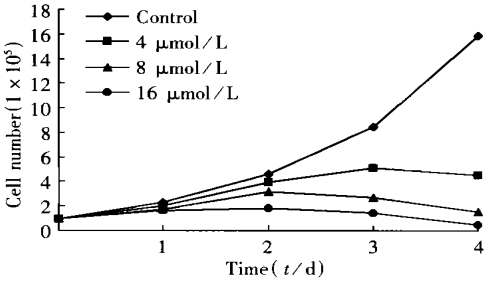


图 1　LOV 对 HL-60 细胞生长的影响

Fig 1　Effect of LOV on the growth of HL-60 cells

2.2　LOV 对 HL-60 细胞周期相分布的影响

流式细胞仪分析细胞周期相分布, 并计算细胞增殖指数(PI)。结果显示: 各处理组 PI 值均小于对照组, 且随 LOV 处理剂量增大、作用时间延长, PI 值降低越明显。细胞周期分析表明, 与对照组相比, 各处理组 G_0/G_1 期细胞增多、S 期和 G_2/M 期细胞减少(表 2), 同样, LOV 剂量越大、作用时间越长, 变化越明显。由此说明, LOV 能显著抑制 HL-60 细胞增殖, 使细胞受阻于 G_0/G_1 期, 该作用呈剂量-效应和时间依赖关系。

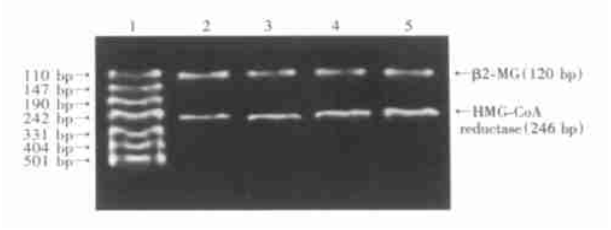
表 2　LOV 对 HL-60 细胞周期分布的影响

Tab 2　Effect of LOV on the distribution of cell cycles of HL-60 cells

Group	Distribution of cell cycles(%)			PI
	G_0/G_1	S	G_2/M	
2 d				
Control	31.85	53.21	14.94	0.6814
4 μmol/L	35.71	50.23	14.06	0.6429
8 μmol/L	38.92	49.85	11.23	0.6108
16 μmol/L	51.26	40.55	8.19	0.4874
3 d				
Control	32.78	52.90	14.32	0.6722
4 μmol/L	42.02	48.00	9.98	0.5798
8 μmol/L	53.14	42.85	4.01	0.4686
16 μmol/L	59.71	40.29	0	0.4029

2.3　LOV 对 HL-60 细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响

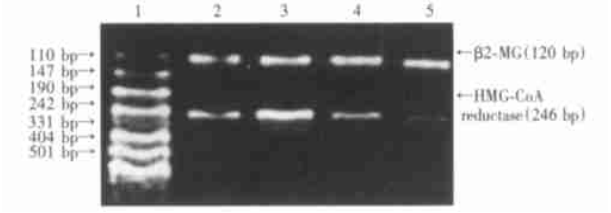
LOV 处理 HL-60 细胞 1～3 d, 半定量 RT-PCR 分析结果显示, 低剂量组 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达上调; 而中剂量组和高剂量组第 1 天有增加趋势, 第 2～3 天明显降低(图 2～4)。



1: PCR marker; 2: Control; 3: Treatment group with 4 μmol/L LOV; 4: Treatment group with 8 μmol/L LOV; 5: Treatment group with 16 μmol/L LOV

图 2　LOV 处理 HL-60 细胞 1 d HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达

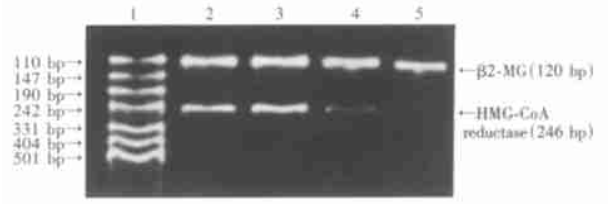
Fig 2　The mRNA expression of HMG-CoA reductase in HL-60 cells after treatment with LOV for 1 d



1: PCR marker; 2: Control; 3: Treatment group with 4 μmol/L LOV; 4: Treatment group with 8 μmol/L LOV; 5: Treatment group with 16 μmol/L LOV

图 3　LOV 处理 HL-60 细胞 2 d HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达

Fig 3　The mRNA expression of HMG-CoA reductase in HL-60 cells after treatment with LOV for 2 d



1: PCR marker; 2: Control; 3: Treatment group with 4 μmol/L LOV; 4: Treatment group with 8 μmol/L LOV; 5: Treatment group with 16 μmol/L LOV

图 4　LOV 处理 HL-60 细胞 3 d HMG-CoA 还原酶 mRNA 的表达

Fig 4　The mRNA expression of HMG-CoA reductase in HL-60 cells after treatment with LOV for 3 d

3　讨论

研究表明, 他汀类药物能抑制多种肿瘤细胞增殖[5,6], 诱导肿瘤细胞凋亡[7], 其中尤以对髓样白血病细胞、恶性胶质瘤细胞为敏感。MTT 实验、生长曲线和细胞生长抑制率结果表明, 不同浓度的 LOV 处理 HL-60 细胞 1～3 d 后, 各剂量组在不同时相点 HL-60 细胞的生长均有不同程度的减慢, 随着 LOV 处理剂量的增加, 作用时间的延长, 其对细胞的增殖抑制作用也逐渐

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

增强。大剂量组处理细胞 3 d 后，抑制率高达 82.94%。细胞周期分析同样提示，LOV 对 HL-60 细胞的增殖具有明显的抑制作用。LOV 处理 HL-60 细胞 2～3 d 后，各处理组与对照组相比，G_0/G_1 期细胞增多、S 期和 G_2/M 期细胞减少，增殖指数(PI)降低，且随着 LOV 剂量增高、作用时间延长，该作用越明显。16 μmol/L LOV 处理 HL-60 细胞 3 d 后，G_0/G_1 期细胞增加最为明显，由处理前的 32.78%增加到 59.71%；PI 值由处理前的 0.67 降为 0.40，该结果提示 LOV 能影响 HL-60 细胞的周期进程，使大部分细胞阻滞于 G_0/G_1 期。从上述实验结果可知，LOV 对 HL-60 细胞具有明显的抑制增殖作用，该作用呈剂量-效应和时间依赖关系。

细胞膜是细胞内外环境的屏障，细胞活化增殖有关或相伴的“早期事件”及“后续事件”的发生都与膜的正常结构与功能有关。已知生物膜的脂质构成，对维持和调节膜的生物物理特性及膜蛋白的结构与功能具有重要的作用。既往研究表明，人为改变淋巴细胞膜脂质组成，尤其是胆固醇含量，可影响淋巴细胞膜生物物理特性(如膜脂质的流动性、跨膜电位等)及膜蛋白的结构与功能[8,9]。胆固醇作为哺乳动物细胞膜上的主要组成成分对膜功能特性起关键的调节作用，同时，它是正常细胞分裂增殖、保持活性状态所必需的物质。我室以往研究[10]也表明细胞胆固醇自稳失调将影响膜蛋白功能以及淋巴细胞膜生物物理特性，从而影响细胞的增殖和凋亡。

HMG-CoA 还原酶抑制剂是 HMG-CoA 还原酶强力和高度专一性的竞争性抑制剂，LOV 通过抑制此酶活性，进而使甲羟戊酸(MVA)代谢及胆固醇合成障碍。本实验用 RT-PCR 检测经 LOV 处理 1～3 d 的 HL-60 细胞中 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达水平。实验结果表明，低剂量组 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达上调，这可能与 HMG-CoA 还原酶活性受抑后，机体反馈调节作用有关；而中剂量组和高剂量组第 1 天有增加趋势，第 2～3 天明显降低，这与 Maksumova 等[11]报道的：LOV 可上调 NB4 等白血病细胞株 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的结果不完全一致。推测，一方面，可能是由于细胞株不同、LOV 作用剂量不同，LOV 对 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达的影响有一定差异；另一方面，可能与机体负反馈调节作用失调有关。

现发现 HMG-CoA 还原酶活性受抑，位于 LDL-R 基因 5′-端启动子区域类固醇反应元件(SRE)与类固醇反应元件结合蛋白(SREBP-1)结合，激发 LDL-R 基因转录，使外源性生物膜上胆固醇摄取增加，但这种补偿作用较为有限。因此，抑制内源性胆固醇合成，影响了细胞膜脂质的构成，从而影响细胞膜结构、特性和膜功能(包括膜蛋白结构与功能)，这直接与信号接收、跨膜信号传递以及细胞代谢和功能变化密切相关。另外，LOV 抑制 HMG-CoA 还原酶活性，还能抑制 MVA 途径，从而阻止蛋白质异戊二烯化。许多具有重要功能的蛋白质如 Ras 蛋白、Rho GTPases 蛋白以及核纤层蛋白(Lamin)等只有异戊二烯化后才能正确在胞浆膜或核膜上定位。推测 LOV 通过抑制蛋白质异戊二烯化扰乱或破坏了细胞骨架结构，也将通过如 JNK/SAPK、P38/MPK2 信号通路改变多种核转录因子活性，而上述信号通路都与细胞的增殖分化、细胞凋亡等密切相关。从本研究高、中剂量 LOV 在抑制 HL-60 细胞增殖的同时，细胞 HMG-CoA 还原酶 mRNA 表达也降低看，提示 HL-60 细胞增殖与此酶的表达两者关系密切。同时也显示，LOV 的作用不仅能直接抑制 HMG-CoA 还原酶活性，在某些类型的细胞中也可通过抑制此酶的表达，进而干扰细胞增殖。

参考文献：

[1] Lange Y, Duan H, Mazzone T. Cholesterol homeostasis is modulated by amphiphiles at transcriptional and post-transcriptional loci[J]. J Lipid Res, 1996, 37(3): 534－539.

[2] Buttke T M, Van Cleave S. Adaptation of a cholesterol deficient human T cell line to growth with lanosterol[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 200(1): 206－212.

[3] 周东明，糜漫天，郎海滨，等. 胆固醇缺乏对 Jurkat 细胞增殖功能及凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(4): 363－365.

[4] Batetta B, Pani A, Putzolu M, *et al*. Correlation between cholesterol esteri-fication, MDR1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines[J]. Cell Prolif, 1999, 32(1): 49－61.

[5] Grip O, Janciauskiene S, Lindgren S. Pravastatin down-regulates inflammatory mediators in human monocytes *in vitro*[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 410(1): 83－92.

[6] Weis M, Heeschen C, Glassford A J, *et al*. Statins have biphasic effects on angiogenesis[J]. Circulation, 2002, 105(6): 739－745.

[7] Di Matola T, D'Ascoli F, Luongo C, *et al*. Lovastatin-induced apoptosis in thyroid cells: involvement of cytochrome c and lamin B[J]. Eur J Endocrinol, 2001, 145(5): 645－650.

[8] 糜漫天，余 琦，杨家驹，等. 膜脂质构成对淋巴细胞膜特性及膜蛋白结构与功能的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志，1998, 14(2): 135－138.

[9] 糜漫天，朱锡华. 膜脂质结构变化对淋巴细胞跨膜膜电位的影响[J]. 免疫学杂志，1996, 12(3): 172－176.

[10] 周东明，糜漫天，许红霞，等. 胆固醇缺乏抑制 Jurkat T 淋巴细胞增殖及分子机制研究[J]. 免疫学杂志，2000, 16(2): 106－109.

[11] Maksumova L, Ohnishi K, Muratkhodjaev F, *et al*. Increased sensitivity of multidrug-resistant myeloid leukemia cell lines to lovastatin[J]. Leukemia, 2000, 14(8): 1444－1450.

（编辑 栗 嘉）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net