DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.025

文章编号:1000-5404(2000)04-0363-03

论著

胆固醇缺乏对 Jurkat 细胞增殖功能及凋亡的影响

周东明,糜漫天,郎海滨,杨志祥,韦 娜,黄国荣 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胆固醇缺乏时对 Jurkat 细胞增殖功能及凋亡的影响。方法 用 Lovastatin 抑制 Jurkat 细胞内源性胆固醇的合成,以低密度脂蛋白受体(LDL-R)介导的低密度脂蛋白(LDL)内吞提供细胞外源性胆固醇,细胞处理 1~3 d 后,用流式细胞仪分析各细胞周期相细胞分布,并定量分析胆固醇缺乏对处理 3 d 后细胞凋亡的影响。结果 Jurkat 经去脂血清培养基加 Lovastatin 处理 3 d 后,细胞受阻于 G_0/G_1 期,使细胞增殖明显受抑,且诱导细胞凋亡的出现,加入 LDL 可以部分逆转上述变化。结论 无论是内源性还是外源性胆固醇的缺乏都能抑制 Jurkat 细胞的增殖,并能在一定程度上诱导细胞凋亡的发生,且这一作用与细胞胆固醇的缺乏程度呈正性相关。

关键词:胆固醇;Lovastatin;Jurkat 细胞;细胞凋亡;细胞周期
中图法分类号: R151.2+R329.25 文献标识码:A

Effects of cholesterol deficiency on the proliferation and apoptosis of Jurkat cells *in vitro*

ZHOU Dong-ming, MI Man-tian, LANG Hai-bin, YANG Zhi-xiang, WEI Na, HUANG Guo-rong (Department of Nutrition and Food Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of cholesterol deficiency on the proliferation and apoptosis of Jurkat cells. **Mothods** Lovastatin was used to inhibit the endogenous synthesis of cholesterol of Jurkat cells. Exogenous cholesterol was provided with the the intake of low density lipoprotein (LDL) through the mediation of LDL-receptor (LDL-R). The cycle distribution and apoptosis of Jurkat cells were observed with flow cytometry (FCM) after the cells were cultured with different media for 1 to 3 days. **Results** After the administration of lovastatin for 3 days, the proliferation of Jurkat cells was inhibited and the cell cycle was blocked at the G_0/G_1 phase with the appearance of apoptosis. After the intake of LDL, a partial cessation of above mentioned changes was found. **Conclusion** Cholesterol deficiency induced with either inhibiting endogenous synthesis or decreased exogenous intake can result in the inhibition of proliferation or even apoptosis of Jurkat cells. which is positively correlated to the severity of cholesterol deficiency.

Key words: cholesterol; lovastatin; Jurkat cells; apoptosis; cell cycle

有研究提示,胞内胆固醇或其代谢物与 DNA 合成的激发有关[1,2],某些肿瘤细胞浆膜中胆固醇含量减少。正常细胞通过羟甲基戊二酸单酰 CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, 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,内源性和外源性胆固醇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[3]。本研究选择 Jurkat 细胞为实验对象, 以 Lovastatin 为 HMG-CoA 还原酶抑制剂,探讨细胞在内源性胆固醇合成受抑、外源性胆固醇供给不足时 Jurkat 细胞增殖活化功能的变化以及对细胞凋亡的影响。

作者简介:周东明(1970—),男,浙江省浦江县人,硕士,主治医师,主要从事营养与肿瘤方面的研究,现在南京军区军事医学研究所工作,南京 210002。电话:(025)3387821-3602

收稿日期:1999-08-13;修回日期:2000-01-19

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

1 材料与方法

1.1 细胞株的培养

Jurkat 细胞株由本校免疫学教研室提供。细胞分别在含10%灭活小牛血清或含10%去脂血清的RPMI-1640培养液中常规培养传代。

1.2 去脂血清制备

参照 Corwin 等[4]方法，在－20℃条件下，将小牛血清∶丙酮(1∶9)混合去脂，过滤后将沉淀于真空干燥器内干燥过夜，干粉沫用 Hank's 平衡液溶解，离心去沉淀，取上清过滤除菌即获得去脂血清。

1.3 LDL 及 Lovastatin 处理

Lovastatin(Merk 公司产品)溶于二甲基亚砜(DMSO)中，配成 20 mg/ml 储备液，贮存于－20℃，处理细胞时终浓度为 0.5 μg/ml，LDL(Sigma 产品)用去脂血清培养基配成 1 mg/ml 储备液，处理细胞终浓度为 10 μg/ml。

1.4 实验分组

①正常血清组；②去脂血清＋LDL组；③去脂血清组；④去脂血清＋Lovastatin＋LDL 组；⑤去脂血清＋Lovastatin 组。

1.5 生长曲线的测定

细胞以 5×10^4/ml 密度接种于 24 孔培养板中，分别经不同处理因素处理 1～5 d，台盼蓝染色计活细胞数，绘制生长曲线，每组 4 个复孔。

1.6 细胞周期及细胞凋亡的分析

细胞经不同因素处理 1～3 d，每日收获各组细胞，碘化丙啶染色后用流式细胞仪 FACScan(Becton Dickinson)对细胞 DNA 进行定量分析，测定细胞周期分布，以及亚 G1 期细胞在细胞周期中的比例即细胞凋亡率，每组设 3 复孔。所有资料均经 Becton Dickinson 软件收集，储存和分析。

1.7 统计学处理

采用第四军医大学 SPLM 统计程序对数据进行统计学处理。

2 结果

2.1 Lovastatin 抑制 Jurkat 细胞内源性胆固醇合成的有效剂量

选择 lovastatin 为 HMG-CoA 还原酶抑制剂，抑制 Jurkat 细胞内源性胆固醇合成。结果发现，去脂血清培养基培养的细胞用 0.05～2.0 μg/ml 浓度 Lovastatin 处理后，Lovastatin 与细胞生长呈剂量相依关系，且随着处理时间的延长，高剂量组凋亡细胞数增多。与不加 Lovastatin 组相比较，各剂量组第 3 天细胞生长速度分别降低 19%～74%不等，0.5 μg/ml Lovastatin 生长抑制率达 66%，3H-TdR 掺入试验也得到类似结果，确定抑制 HMG-CoA 还原酶活性的有效 Lovastatin 剂量为 0.5 μg/ml。

2.2 细胞胆固醇缺乏对 Jurkat 细胞生长动力学的影响

结果显示，Jurkat 细胞经去脂血清加不同因素处理 1～5 d，生长速度明显低于正常血清对照组细胞。与正常对照组比较，第5天处理组细胞生长速度降低分别为 31%～95%不等，生长速度明显低于正常对照组($P<0.01$)，见图 1。说明细胞在无外源性胆固醇供给的情况下，靠其内源性合成的胆固醇仍能维持一定的生长状态，而同时以 Lovastatin 抑制内源性胆固醇后，细胞增殖活性显著受抑。若同时补充一定量的 LDL 以提供外源性胆固醇，则细胞生长在一定程度上可以部分恢复。

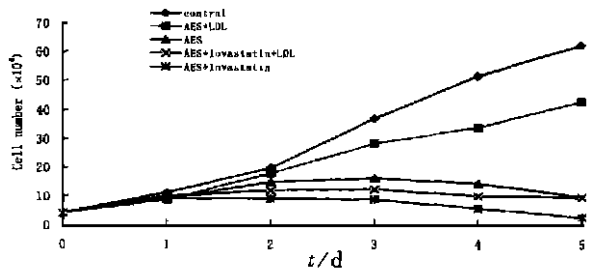


图 1 胆固醇缺乏对 Jurkat 细胞生长动力学的影响

Fig 1 The curve of growth of Jurkat cells in cholesterol defficiency

2.3 细胞胆固醇缺乏对 Jurkat 细胞细胞周期分布的影响

细胞周期分析表明，用去脂血清培养的各处理组细胞，细胞生长明显低于正常血清对照组，G_0/G_1 期细胞数明显增加，而 S 期细胞数明显减少。细胞处理 3 d 后，对照组约有 52%的细胞处于 S 期或 G_2/M 期，而去脂血清＋Lovastatin 组有 81.7%左右的细胞处于 G_0/G_1 期，明显高于正常对照组($P<0.01$)，去脂血清＋Lovastatin＋LDL 组有 61.3%左右的细胞处于 G_0/G_1 期，见图 2。表明细胞内胆固醇不足将导致细胞受阻于 G_0/G_1 期，细胞增殖受抑。

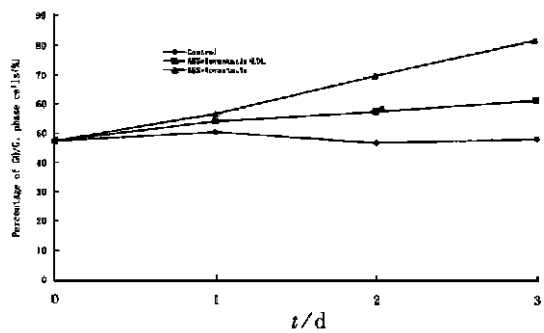


图 2 胆固醇不足对 **Jurkat** 细胞细胞周期分布的影响

Fig 2 Effect of cholesterol deficiency on the cell cycle of Jurkat cells

2.4 细胞胆固醇缺乏诱导的 Jurkat 细胞凋亡

Jurkat 细胞经去脂血清或去脂血清＋Lovastatin 处理 3 d 后，用流式细胞仪分析细胞 DNA 分布，显示典型的凋亡细胞群，细胞凋亡指数分别在 25.5%和 46.2%，均显著高于正常对照组的

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

细胞凋亡指数 7.82%($P<0.01$)。两组分别加用 LDL 以提供外源性胆固醇后，细胞出现凋亡的比例分别下降到 11.7%和 12.1%($P<0.01$)。说明胆固醇缺乏可在一定程度上诱导 Jurkat 细胞凋亡的发生。

3　讨论

胆固醇作为哺乳动物细胞膜上的主要成份之一，对细胞膜的正常结构与功能起着重要的调节作用。既往有研究认为细胞膜胆固醇的含量与细胞的活化功能有关，胆固醇含量可　影响胞内 AC、PKC、Ca^{2+} 泵等活性，改变膜脂质（主要是胆固醇含量）可影响 CD71 分子的结构、表达，以及 CD71 分子在淋巴细胞膜上的运动和结合特性等[5]。由于胆固醇与动脉粥样硬化关系密切，长期以来一直认为胆固醇是一种有害物质，主张体内胆固醇水平越低越好。其实胆固醇是维持细胞正常生长和保持活性状态所必需的，正常细胞的胆固醇水平在多个不同层次受到严格调控，包括通过调控胆固醇合成的限速酶—HMG-CoA 还原酶，以获得细胞自身合成的内源性胆固醇，以及通过调控低密度脂蛋白受体（LDL-R）介导的 LDL 的内吞以提供细胞外源性胆固醇等，细胞通过 LDL-R、HMG-CoA 还原酶、类固醇调节元件（SRE）以及类固醇调节元件结合蛋白（SREBP）等的相互影响构成细胞胆固醇自身调节网络，维持体内细胞胆固醇水平的相对稳定[3,6,7]。有研究显示，细胞内胆固醇缺乏，细胞生长受抑，同时发生表型改变[8]。有关胆固醇影响细胞增殖的详细分子机制尚不十分清楚。

本试验选择 Lovastatin 作为 HMG-CoA 还原酶抑制剂，抑制 Jurkat 细胞内源性胆固醇的合成[9,10]，以去脂血清培养基培养的细胞代表外源性胆固醇供给不足的细胞模型，探讨 Jurkat 细胞在内源性胆固醇合成受抑，外源性胆固醇供给不足时增殖活化功能的变化。结果发现用去脂血清加不同因素处理细胞 1～5 d 后，细胞生长速度受到不同程度抑制，以去脂血清加 Lovastatin 组生长受抑最为明显。流式细胞分析表明，内源性胆固醇合成受抑或外源性胆固醇供给障碍所致的胆固醇缺乏将导致细胞受阻于 G_0/G_1 期，使 DNA 复制及细胞增殖受抑，且在一定程度上可诱导细胞凋亡的发生，这种作用与细胞胆固醇缺乏的程度相关。结果表明，Lovastatn 能通过抑制 HMG-CoA 还原酶活性使细胞增殖速率下降，并可诱导 Jurkat 细胞生长阻滞和凋亡的发生。

胆固醇对维持淋巴细胞的正常功能具有重要意义，无论是外源性胆固醇供给不足，还是细胞自身合成胆固醇受抑，都将严重影响淋巴细胞的增殖转化功能，本研究将有助于进一步认识胆固醇与肿瘤发生的关系，并为从干扰细胞胆固醇的合成、代谢及诱发细胞胆固醇自稳失调等途径，探讨肿瘤化疗的辅助手段提供一定的理论依据。但胆固醇抑制肿瘤细胞增殖转化的过程可能涉及许多复杂的机制，进一步深入阐明其分子机制具有重要的理论和实际意义。

参考文献：

[1] Carlberg M, Larsson O. Stimulatory effect of PDGF on HMG-CoA reductase activity and N-linked glycosylation contributes to increased expression of IGF-1 receptors in human fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 1996, 223(1): 142－148.

[2] Larsson O, Zetterberg A. Existence of commitment program for mitosis in early G1 in tumor cells[J]. Cell Prolif, 1995, 28(1): 33－43.

[3] Lange Y, Duan H, Mazzone T. Cholesterol homeostasis is modulated by amphiphiles at transcriptional and post-transcriptional loci[J]. J Lipid Res, 1996, 37(4): 534－539.

[4] Corwin L M, Humphrey L P, Shloss J. Effect of lipids on the expression of cell transformation[J]. Exp Cell Res, 1977, 108(2): 341－347.

[5] 糜漫天, 朱锡华 . 质膜脂质构成对淋巴细胞 CD71 蛋白表达及其分子特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(4): 293－297.

[6] Ellsworth J L, Lloyd D B, Carlstrom A J, *et al*. Protein binding to the low density lipoprotein receptor promoter in vivo is differentially affected by gene activation in primary human cells[J]. J Lipid Res, 1995, 36(2): 383－392.

[7] Feingold K R, Pollock A S, Moser A H. Discordant regulation of proteins of cholesterol metabolism during the acute phase response[J]. J Lipid Res, 1995, 36(7): 1474－1482.

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

[9] Smith G D, Pekkanen J. Should there be a moratorium on the use of cholesterol lowing drugs[J]? Br Med J, 1992, 304(62 827): 638－639.

[10] Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, *et al*. Synchronization of tumor and nomal cells from G_1 to mutiple cell cycles by lovastatin[J]. Cancer Res, 1991, 51(13): 3 602－3 609.

（编辑　谢义霞）

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