

• 基础研究 •

胆固醇对离体培养胰岛素细胞活性的损害作用

赵玉峰 朱运龙 周京军 胡玉珍 韩雪峰

[摘要] 目的 明确游离胆固醇对胰岛素细胞的作用。方法 体外培养 MIN6 小鼠胰岛素细胞,待细胞生长融合后,加入不同浓度的游离胆固醇作用 24h,或用同一浓度的游离胆固醇作用不同时间。采用 MTT 法检测细胞的存活情况。结果 $25\mu\text{mol/L}$ 胆固醇作用 24h 可明显降低 MIN6 细胞的活性; $100\mu\text{mol/L}$ 胆固醇作用 12h 即可明显降低 MIN6 细胞的活性,作用 24h 可导致 MIN6 细胞死亡。结论 游离胆固醇可剂量依赖性和时间依赖性地降低胰岛素细胞的活性,提示血液中游离胆固醇浓度升高在胰岛 β 细胞功能损害中具有一定的作用。

[关键词] 胆固醇;胰岛素细胞;体外培养

Damage of viability of insulin secreting cells by cholesterol in vitro ZHAO Yu-feng, ZHU Yun-long, ZHOU Jing-jun, et al. Department of Physiology, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, Shanxi, China

[Abstract] Objective To identify the influence of cholesterol on insulin-secreting cells. Methods MIN6 mouse insulin cells were cultured in vitro. After confluence of cells, on one hand, free cholesterol in series concentrations was added to culture medium to act for 24 hours, and on the other hand, free cholesterol in same concentration was added to culture medium to act for different periods. MTT test was used to evaluate the viability of MIN6 cells. Results $25\mu\text{mol/L}$ free cholesterol significantly decreased the viability of MIN6 cells after 24 hours and $100\mu\text{mol/L}$ free cholesterol significantly decreased the viability of MIN6 cells after 12 hours and induced cells death after 24 hours. Conclusions Free cholesterol decreases viability of MIN6 cells in a dose-dependent and time-dependent manner, and it is indicated that elevated free cholesterol concentration in blood may be one factor involved in the dysfunction of pancreatic β cells.

[Key words] cholesterol; insulin cells; culture in vitro

中图分类号:R335.9 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)08-0475-02

大量的基础与临床研究表明,高胆固醇血症与动脉硬化有着十分密切的关系,而游离胆固醇可以诱导动脉平滑肌细胞凋亡和动脉硬化斑形成^[1]。不过,越来越多的资料显示,游离胆固醇还可以诱导其他细胞,如巨噬细胞和神经细胞的凋亡^[2-3]。2 型糖尿病常伴发高胆固醇血症。一些资料提示,2 型糖尿病患者血液中游离胆固醇的浓度明显升高^[4],但胆固醇在糖尿病发病中的作用目前还不清楚。为明确胆固醇是否损害胰岛 β 细胞的功能,我们观察了胆固醇对体外培养的胰岛素细胞活性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 本实验所用细胞为小鼠胰岛素细胞株 MIN6 细胞。MIN6 细胞培养于 DMEM 培养液 (Dulbecco's modified Eagle's medium),加入 10% 胎牛血清 (v/v)、青霉素 (100 U/ml)、链霉素 (100 mg/ml) 和 2-巯基乙醇 ($50\mu\text{mol/L}$),在 37°C 的 5% CO_2 培养箱中培养。MIN6 细胞被种植于 48 孔培养板中,每孔加 $400\mu\text{l}$ 培养液,待细胞生长融合后,加入胆固醇观察剂

量效应关系和时间效应关系。观察胆固醇的剂量效应关系时,将细胞分为 6 组(每组 8 个样本),其中 4 组分别加入 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $25\mu\text{mol/L}$ 、 $50\mu\text{mol/L}$ 和 $100\mu\text{mol/L}$ 的水溶性胆固醇作用 24h,第 5 组为对照组,加入同样浓度的胆固醇溶解剂,第 6 组为阴性对照组,不加任何药物,同样条件下作用 24h。观察胆固醇的时间效应关系时,将细胞分为 10 组(每组 8 个样本),其中 5 组为对照组,加入同样浓度的胆固醇溶解剂,另外 5 组在加入 $100\mu\text{mol/L}$ 水溶性胆固醇作用后的第 0h、6h、12h、18h 和 24h 分别测定细胞活性。

1.2 细胞活性测定 采用四唑蓝法 (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT)。MTT 为 Sigma 公司产品,用磷酸缓冲液溶解。药物作用结束后,每孔培养液中加入 $40\mu\text{l}$ 的 MTT 溶液 (5mg/ml), 37°C 孵育 4h。完全去除培养液,每孔加入 $200\mu\text{l}$ 的酸化异丙醇(异丙醇加 0.1 mol/L 盐酸),轻微振荡,使 MTT 结晶充分溶解。测定 570nm 和 690nm 波长下的吸光度。计算 570nm 处吸光度减去 690nm 处背景吸光度后的吸光度值,以此反映细胞活性。

1.3 统计学分析 计算各组的均值和标准差 ($\bar{x} \pm s$),各组间的比较采用方差分析。

作者单位:710032,陕西西安市,第四军医大学生理学教研室。作者

简介:赵玉峰(1973-),男,河北藁城市人,2000 级博士研究生,助教,主要从事内分泌生理研究工作。

2 结果

2.1 胆固醇剂量依赖性地降低 MIN6 细胞的活性

对照组和阴性对照组之间无显著性差异。10 μ mol/L 胆固醇处理 24h 没有明显降低 MIN6 细胞活性。对照组与 25 μ mol/L、50 μ mol/L 和 100 μ mol/L 胆固醇处理组 570nm 的吸光度分别为(0.316 \pm 0.034)、(0.258 \pm 0.033)、(0.191 \pm 0.017)和(0.011 \pm 0.035)。与对照组比较,25 μ mol/L、50 μ mol/L 和 100 μ mol/L 浓度的胆固醇则剂量依赖性地明显降低 MIN6 细胞的活性($P < 0.01$, $n = 8$,见图 1)。

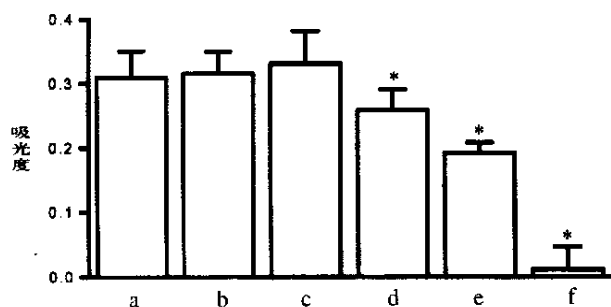


图 1 胆固醇剂量依赖性地降低 MIN6 胰岛素细胞的活性

注:a:阴性对照组;b:对照组;c:10 μ mol/L 胆固醇组;d:25 μ mol/L 胆固醇组;e:50 μ mol/L 胆固醇组;f:100 μ mol/L 胆固醇组;* :与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 胆固醇时间依赖性地降低 MIN6 细胞的活性

100 μ mol/L 胆固醇处理 MIN6 细胞 6h 未明显改变 MIN6 细胞活性,但是处理 12h 后,MIN6 细胞的活性较对照组明显降低,处理 18h 与 24h 后,MIN6 细胞活性进一步下降,均与对照组有高度显著性差异($P < 0.01$,见图 2)。

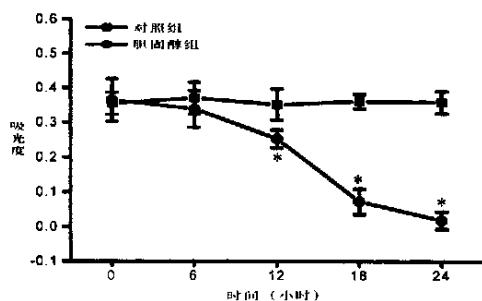


图 2 胆固醇时间依赖性地降低 MIN6 胰岛素细胞的活性

注:* :与对照组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

在 2 型糖尿病中,除了机体组织的胰岛素抵抗外,胰岛 β 细胞的功能也受到损害,并有明显的细胞凋亡现象。目前已知的诱导胰岛 β 细胞凋亡的代谢物质有葡萄糖和脂肪酸。长期高浓度葡萄糖和高浓度脂肪酸刺激可以诱导胰岛 β 细胞的凋亡^[5,6]。许多证据表明,

2 型糖尿病患者的血液中游离胆固醇含量较正常人明显升高^[4,7]。本实验结果显示,胆固醇可显著降低胰岛 β 细胞的活性。这为研究 2 型糖尿病中胰岛 β 细胞功能损害的机制提供了新的线索。

研究表明,胆固醇具有降低多种细胞活性的作用。如胆固醇可降低人动脉平滑肌细胞、动物的神经细胞以及多种肿瘤细胞的活性。原位末端标记技术(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)和 DNA 片段电泳结果显示,胆固醇降低这些细胞活性的机制是诱导这些细胞发生凋亡^[1,3,8]。我们推测,胆固醇降低 MIN6 细胞活性也是通过诱导细胞凋亡而实现的。

本研究结果为明确高胆固醇血症与 2 型糖尿病的关系提供了依据,并且提示,高胆固醇血症,尤其是血液中游离胆固醇浓度升高,不仅损害心血管功能,而且对胰岛素分泌细胞也具有损害作用。因此,防治高胆固醇血症在 2 型糖尿病治疗中具有一定的作用。

[参考文献]

- [1] Ares MP, Porr Ares MI, Moses S, et al. Beta-hydroxycholesterol induces Ca^{2+} oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 2000, 153: 23—35.
- [2] Yao PM, Tabas I. Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 42468—42476.
- [3] Inoue K, Kubota S, Seyama Y. Cholesterol induces apoptosis of cerebellar neuronal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 256: 198—203.
- [4] Jones RJ, Owens D, Brennan C, et al. Increased esterification of cholesterol and transfer of cholesteryl ester to apo B-containing lipoproteins in Type 2 diabetes: relationship to serum lipoproteins A-I and A-II[J]. Atherosclerosis, 1996, 119: 151—157.
- [5] Moran A, Zhang HJ, Olson LK, et al. Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15[J]. J Clin Invest, 1997, 99: 534—539.
- [6] Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, et al. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 2498—2502.
- [7] Owens D, Maher V, Collins P, et al. Cellular cholesterol regulation—a defect in the type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patient in poor metabolic control[J]. Diabetologia, 1990, 33: 93—99.
- [8] Hyun JW, Weltin D, Holl V, et al. Cytotoxic properties of a phosphoglycoconjugated derivative of 7 beta-hydroxycholesterol upon normal and tumor cells in culture[J]. Anticancer Res, 1997, 17: 2621—2626.

(收稿日期:2003-06-23)