

• 论 著 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.17.016

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200629.0940.002.html>(2020-06-29)

柚皮素对高糖模型 MIN6 细胞的增殖和胰岛素分泌的影响^{*}

王 元^{1,2},曾凯宏^{1,2△},邓 波¹,余雪梅¹,周 雪¹,宋 怡¹,黄璐娇¹

(1.四川省医学科学院·四川省人民医院临床营养科,成都 610072;2.电子科技大学医学院,成都 610054)

[摘要] **目的** 观察不同浓度柚皮素对高浓度葡萄糖(简称“高糖”)模型 MIN6 细胞增殖活性和胰岛素分泌的影响,以进一步探讨柚皮素对高糖环境下胰岛 β 细胞胰岛素分泌的分子机制。**方法** 用高糖培养基培养 MIN6 细胞建立高糖损伤模型,分别用不同浓度(0、25、50、100 μg/mL)的柚皮素对模型细胞进行干预,用噻唑蓝(MTT)检测细胞的增殖活性,ELISA 检测胰岛素释放能力。**结果** 3 个浓度(25、50、100 μg/mL)的柚皮素干预均可恢复高糖模型 MIN6 细胞的增殖活力,可抑制高糖模型 MIN6 细胞胰岛素分泌能力下降,并且柚皮素浓度为 50 μg/mL 时效果最明显($P<0.01$)。**结论** 柚皮素可能作为保护胰岛 β 细胞功能的潜在降糖药物被临床使用。

[关键词] 柚皮素;细胞增殖;胰岛素分泌;MIN6 细胞;高糖模型

[中图法分类号] R151.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)17-2844-05

Effect of naringenin on cell proliferation and insulin secretion in high glucose model of MIN6 cells^{*}

WANG Yuan^{1,2},ZENG Kaihong^{1,2△},DENG Bo¹,YU Xuemei¹,
ZHOU Xue¹,SONG Yi¹,HUANG Lujiao¹

(1. Department of Clinical Nutrition, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan
Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China; 2. School of Medicine,
University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610054, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of different concentrations of naringenin on the proliferative activity and insulin secretion of high glucose model MIN6 cells, and to lay the foundation for further exploring of the effect of naringenin on the insulin secretion of pancreatic islet cells in a high glucose environment. **Methods** MIN6 cells were cultured in high glucose medium to establish the high glucose damage model. The model cells were treated with different concentrations (0, 25, 50, 100 μg/mL) of naringenin, and the proliferation activity of cells was detected by MTT. The ability of insulin secretion was measured by ELISA. **Results** The intervention of 3 concentrations of naringenin restored the proliferative activity of MIN6 cells which damaged by high glucose, inhibited the decrease of insulin secretion ability of high glucose model MIN6 cells, and the effect was most obvious when the naringenin concentration was 50 μg/mL ($P<0.01$). **Conclusion** Naringenin may be used as a potential hypoglycemic agent to protect islet β-cell function.

[Key words] naringenin; cell proliferation; insulin secretion; MIN6 cell; high glucose model

胰岛素是机体内调节糖脂代谢和促进蛋白质合成的一种蛋白质类激素,主要由胰岛 β 细胞分泌^[1],胰岛 β 细胞功能障碍导致体内胰岛素合成和分泌相对不足,导致一系列糖脂代谢障碍疾病^[2]。小鼠来源

的 β 细胞株 MIN6 细胞对高浓度葡萄糖(简称“高糖”)刺激反应灵敏,被用作胰岛功能和胰岛素分泌机制研究的模型^[3]。大量研究报道,柚皮素具有清除自由基、降血糖、降血脂及抑制肿瘤生长等作用,显示出

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81202206);四川省卫生和计划生育委员会项目(150216)。

作者简介:王元(1991—),营养师,硕士,主要从事临床营养研究工作。

[△] 通信作者, E-mail: zengkaihong2013@hotmail.com。

丰富的资源优势 and 巨大的潜在利用价值^[4-6],但柚皮素对胰岛 β 细胞的胰岛素分泌是否也具有一定促进作用,目前尚不清楚。本实验以高糖培养的 MIN6 细胞来探讨柚皮素对高糖模型 MIN6 细胞增殖和胰岛素分泌的影响,为进一步探讨柚皮素对高糖环境下胰岛 β 细胞分泌胰岛素的分子机制做铺垫。

1 材料与方法

1.1 细胞和药物

小鼠胰岛素瘤细胞(MIN6)购于美国菌种保藏中心(ATCC),柚皮素购于上海 BBI 生命科学公司。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购于美国 Gibco 公司,葡萄糖氧化酶法测定试剂盒(GOD)购于北京普利莱公司,噻唑蓝(MTT)购于上海碧云天公司,胰岛素释放试剂盒购于瑞典 Mercodia 公司,其他试剂均为分析纯级别,酶标仪型号为 Thermo Fisher Multiskan FC 酶标仪。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

MIN6 细胞均以适宜密度接种在 100 mL 的培养皿中,其中加入含 10% FBS、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基,放于 37℃、相对湿度为 95% 的含 5% CO₂ 的孵箱中培养。视细胞生长情况,每 24~36 小时更换新鲜培养基,待细胞生长至 75%~85% 时进行传代或冻存。

1.3.2 柚皮素对 MIN6 细胞安全给药浓度的确定

将生长良好的 MIN6 细胞均匀接种到 96 孔板中,按 5×10^5 /mL 细胞浓度加入 100 μ L 完全培养基。分组为溶剂组(5 μ L/mL DMSO,简称 V 组)和不同浓度柚皮素组(0、25、50、100、150、300 mg/mL)。去掉原培养液,在正常的 MIN6 细胞中分别加入各组培养基,分别培养 12、24、36 h,然后用 MTT 法测细胞活性,实验重复 3 遍,并在显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 MIN6 高糖模型建立和细胞形态观察

在 6 孔板中均匀接种生长良好的 MIN6 细胞,按 5×10^5 /mL 加入 2 mL 完全培养基,每孔加入 25 mmol/L 高糖培养液培养 12 h 建立高糖损伤模型^[7],并在显微镜下拍摄正常细胞和高糖模型 MIN6 细胞形态。

1.3.4 柚皮素干预高糖培养 MIN6 细胞增殖和胰岛素释放的分组

将生长良好的 MIN6 细胞,均匀接种到 96 孔板中,按 5×10^5 /mL 细胞浓度加入 100 μ L 完全培养基。将细胞分为以下几组:正常对照组(NC 组),高糖模型

组(HG 组),高糖溶剂组(5 μ L/mL DMSO,简称 HG-V 组),25 mg/mL 柚皮素干预高糖组(HG-L-Nar 组)、50 mg/mL 柚皮素干预高糖组(HG-M-Nar 组)和 100 mg/mL 柚皮素干预高糖组(HG-H-Nar 组)。去掉原培养液,各组中加入相应的培养基,每孔各 100 μ L,分别培养 24 h,MTT 法检测细胞增殖率。

1.3.5 胰岛素的刺激实验

将干预处理后的 MIN6 细胞用 PBS 清洗 2 次,用无糖 KRBH 缓冲液孵育细胞 30 min。用 PBS 洗去 KRBH 缓冲液,用含 20 mmol/L 葡萄糖的 KRBH 缓冲液孵育细胞 1 h,用 0.5 mL EP 管收集上清液,用胰岛素放射免疫试剂盒检测上清液中的胰岛素水平。

1.3.6 ELISA 法测胰岛素分泌

胰岛素测定操作严格步骤如下:(1)制备洗涤缓冲液 1 \times 溶液、酶结合物 1 \times 溶液;(2)制备用于平行测试 3 次的标准品和待测样品及包被微孔;(3)吸取不同浓度的标准品、待测样品各 10 μ L 到微孔中;(4)在各微孔中加 100 μ L 酶结合物溶液;(5)准备平板振荡器,将操作过的孔板放入平板振荡器上,在室温下以 800 r/min 孵育 2 h;(6)孵育结束后,将微孔板倒置在滤纸上,吸掉微孔中反应溶液。然后向每个微孔加入 300 μ L 缓冲液洗涤,在滤纸上吸掉洗涤缓冲液,并轻轻拍打使洗涤缓冲液全部被吸掉。此洗涤过程重复 5 次。操作过程应避免长时间浸泡微孔;(7)加入底物 TMB 200 μ L,在室温下温育 20 min;(8)加入 50 μ L 终止溶液,放到振荡器少许振荡混匀液体,放入酶标仪在 450 nm 处读取吸光度(A)值;(9)最后根据标准品的测定值建立标准曲线,由得出的标准曲线计算各组样品的胰岛素水平,并对数据结果进行统计学分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件分析处理数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

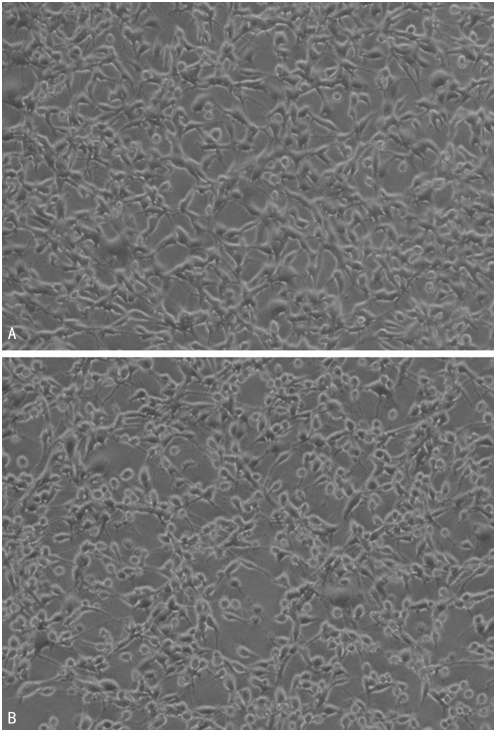
2.1 柚皮素对 MIN6 细胞安全给药浓度的确定

如表 1 所示柚皮素在 0~150 μ g/mL 的浓度范围内培养 36 h 后 MIN6 细胞增殖都未受影响,细胞生长良好,柚皮素在 300 μ g/mL 的浓度时,与未加柚皮素组(0 μ g/mL)比较,MIN6 细胞增殖从 12 h 开始即受到抑制($P < 0.01$)。因此,本实验选择 0~150 μ g/mL 的柚皮素浓度范围对 MIN6 细胞干预 12 h 进行后续实验。

2.2 柚皮素干预对高糖模型 MIN6 细胞形态及增殖

的影响

光学显微镜下,NC 组 MIN6 细胞为贴壁细胞,不聚团生长;HG 组 MIN6 细胞 25 mmol/L 高糖培养 12 h 后,细胞棱角收缩,细胞数量减少,见图 1。



A:NC 组;B:HG 组。

图 1 MIN6 细胞形态图(×100)

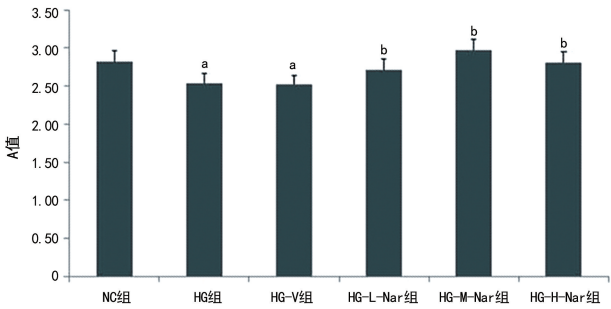
高糖培养 12 h 后,HG 组 MIN6 细胞增殖活力与

NC 组比较明显下降($P<0.01$),不同浓度柚皮素干预组 MIN6 细胞增殖活力较 HG 组明显升高($P<0.01$),其中 HG-M-Nar 组 MIN6 细胞增殖活力最高($P<0.01$),HG-V 组与 HG 组无明显差异,见图 2。各组典型 MIN6 细胞形态,见图 2。

表 1 不同浓度柚皮素作用 MIN6 细胞后的细胞增殖活性(A 值)

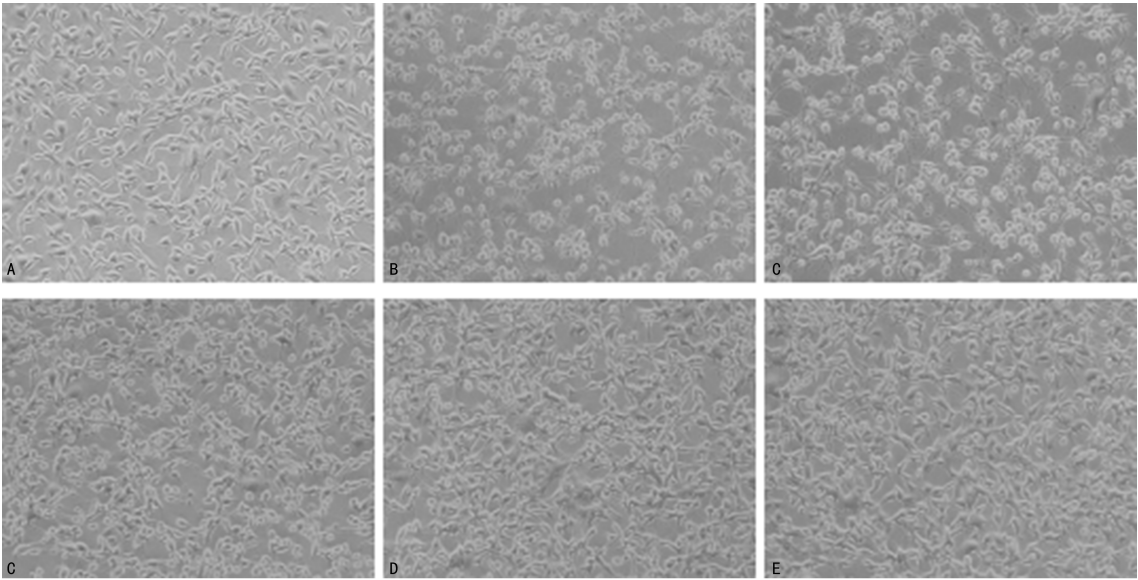
柚皮素浓度(μg/mL)	12 h	24 h	36 h
0	1.723	2.354	3.014
25	1.648	2.424	3.145
50	1.778	2.398	3.043
150	1.689	2.401	3.118
300	0.581 ^a	0.635 ^a	0.567 ^a

^a: $P<0.001$,与 0 μg/mL 比较。



^a: $P<0.01$,与 NC 组比较;^b $P<0.01$:与 HG 组比较。

图 2 柚皮素对高糖模型 MIN6 细胞增殖的影响



A:NC 组;B:HG 组;C:HG-L-Nar 组;D:HG-M-Nar 组;E:HG-H-Nar 组。

图 3 各组典型 MIN6 细胞形态图(×100)

2.3 不同浓度柚皮素对高糖模型 MIN6 细胞胰岛素释放的影响

与 NC 组[(113.21±5.92)μg/mL]比较,HG 组

[(39.78±3.67)μg/mL]MIN6 细胞胰岛素释放明显减少($P<0.01$);与 HG 组比较,HG-L-Nar 组 [(93.46±4.64)μg/mL]、HG-M-Nar 组 [(113.56±

3.13) $\mu\text{g/mL}$], HG-H-Nar 组 $[(108.78 \pm 2.86) \mu\text{g/mL}]$ 胰岛素释放上升 ($P < 0.05$), 其中 HG-M-Nar 组 ($50 \mu\text{g/mL}$ 柚皮素) 上升最为显著 ($P < 0.01$)。各组典型 MIN6 细胞形态图, 见图 3。各浓度柚皮素干预不影响未经高糖干预正常培养 MIN6 细胞的胰岛素释放。

3 讨 论

胰岛素在机体内起着降低血糖, 促进糖原、脂肪和蛋白质合成的作用, 若胰岛素分泌不足或机体产生胰岛素抵抗, 就会发生糖尿病、肥胖等一系列糖脂代谢疾病, 而胰岛素在机体内由胰脏内的胰岛 β 细胞受内源性或外源性如葡萄糖、胰高血糖素等的刺激后分泌^[8-9]。

近年来, 研究具有降糖作用的植物化学成分对胰岛 β 细胞及其功能的保护作用一直是一个热点话题。李琳等^[10] 研究发现适宜浓度的黄芪多糖可以促进 MIN6 细胞的增殖和胰岛素的分泌; 吴成香等^[11] 研究了白藜芦醇发现其可能通过激活胰岛 β 细胞中的 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(PDK-1)/Akt 通路从而改善胰岛 β 细胞的功能; 而最近, 张强等^[12] 在研究灵芝提取物 FYGL 时, 也发现 FYGL 可促进 MIN6 细胞增殖, 同时能抑制 PA 诱导的 MIN6 细胞凋亡作用; 并且, 有研究已证实膳食补充柚皮素具有降低糖尿病小鼠的空腹血糖和血浆的糖化血红蛋白水平, 显著提高糖尿病小鼠血浆中胰岛素水平的作用^[6]。所以本课题选择了具有降糖作用的植物化学成分柚皮素作为研究对象, 探讨柚皮素对胰岛 β 细胞及其功能的保护作用。

本课题组在成功建立高糖模型 MIN6 细胞后, 通过适宜浓度的柚皮素干预, 发现柚皮素可恢复高糖模型 MIN6 细胞的增殖活力, 并可抑制高糖模型 MIN6 细胞胰岛素分泌能力下降, 进一步说明柚皮素可能是一种具有保护胰岛 β 细胞功能的潜在降糖药物, 但是柚皮素通过何种机制对胰岛 β 细胞产生保护作用, 以及对胰岛素分泌起到促进作用仍需继续研究。

微 RNA (MicroRNA, miRNA) 是一种长度为 18~25 nt 的非编码单链 RNA, 参与细胞增殖、分化和凋亡等各种过程, 影响着细胞信号通路转导, 引发一系列生理和病理效应^[13-14], 作为近年来分子机制研究中的关注热点, 已有多篇研究报道其与胰岛 β 细胞的关系密切。葡萄糖刺激的胰岛素分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) 是反应胰岛 β 细胞分泌功能的重要指标, 而 miRNA-375 在胰腺和胰岛 β 细胞中表达最多, 且 miRNA-375 通过抑制 PDK1

从而负性调节 GSIS, 通过 miRNAs 抑制剂抑制 miRNA-375 表达, 可进一步增加 GSIS^[15]。研究还发现, miR-375 是因胰岛素抵抗而增加的胰岛素需求作出反应所必须的因子^[16]。另有研究证实, 在产生胰岛素的细胞中, 足够水平的 miR-9 对于细胞的最佳分泌能力是必不可少的, 而 miR-9 的作用是通过减少转录因子 Onecut-2 的表达, 进而增加与胰岛 β 细胞分泌颗粒相关的 Rab GTPase 效应子的水平来实现的^[17]。此外, miR-34a 的升高与 p53 的激活有关, 可诱导胰岛 β 细胞凋亡, 阻断 miR-34a 和 miR-146a 表达, 可抑制由游离脂肪酸引起的胰岛 β 细胞死亡^[18]。那么, 柚皮素对胰岛 β 细胞的相关作用机制是否与这些 miRNAs 中某一 miRNA 或其下游通路相关需要作进一步探究。

参考文献

- [1] CHEN C, COHRS C M, STERTMANN J, et al. Human beta cell mass and function in diabetes: recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis[J]. Mol Metab, 2017, 6(9): 943-957.
- [2] WENG J, JI L, JIA W, et al. Standards of care for type 2 diabetes in China[J]. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2016, 32(5): 442-458.
- [3] 张玲, 王得华, 马义, 等. 印楝素对 min6 细胞增殖及胰岛素分泌的影响[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(4): 25-29.
- [4] ANNADURAI T, THOMAS P A, GERALDINE P. Ameliorative effect of naringenin on hyperglycemia-mediated inflammation in hepatic and pancreatic tissues of Wistar rats with streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetes mellitus[J]. Free Radic Res, 2013, 47(10): 793-803.
- [5] ALAM M A, SUBHAN N, RAHMAN M M, et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action[J]. Adv Nutr, 2014, 5(4): 404-417.
- [6] ZYGMUNT K, FAUBERT B, MACNEIL J, et al. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 398(2): 178-

- 183.
- [7] 程瑞婷,王晨斌,田春雨,等. MIN6 细胞损伤模型不同造模方法对比研究[J]. 华北理工大学学报(医学版),2017,19(4):258-262.
- [8] CHEN C, COHRS C M, STERTMANN J, et al. Human beta cell mass and function in diabetes; recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis[J]. Mol Metab, 2017, 6(9):943-957.
- [9] AHMAD K. Insulin sources and types; a review of insulin in terms of its mode on diabetes mellitus[J]. Tradit Chin Med, 2014, 34(2):234-7.
- [10] 李琳,刘瑜,刘屏,等. 黄芪多糖对 MIN6 细胞增殖、凋亡及胰岛素分泌的影响[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(21):2139-2142.
- [11] 吴成香,杨达性,姚伟昊,等. 白藜芦醇对 db/db 小鼠胰岛 β 细胞功能的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(11):1027-1032.
- [12] 张强,杨宏杰,何燕铭,等. 灵芝提取物及其含药血清对胰岛 β 细胞的影响[J]. 海南医学, 2018, 29(9):1188-1191.
- [13] BANIKAZEMI Z, HAJI H A, MOHAMMADI M, et al. Diet and cancer prevention: Dietary compounds, dietary Micro RNAs, and dietary exosomes[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1):185-196.
- [14] TAVAKOLIZADEH J, ROSHANAIE K, SALMANINEJAD A, et al. Micro RNAs and exosomes in depression; Potential diagnostic biomarkers[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(5):3783-3797.
- [15] TSUKAMOTO Y, NAKADA C, NOGUCHI T, et al. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta[J]. Cancer Res, 2010, 70(6):2339-2349.
- [16] POY M N, HAUSSE J, TRAJKOVSKI M, et al. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(14):5813-5818.
- [17] PLAISANCE V, ABDERRAHMANI A, PERRETT-MENOUD V, et al. Micro RNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin - producing cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(37):26932-26942.
- [18] LOVIS P, ROGGLI E, LAYBUTT D R, et al. Alterations in micro RNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction[J]. Diabetes, 2008, 57(10):2728-2736.
- (收稿日期:2020-03-02 修回日期:2020-04-05)
-
- (上接第 2843 页)
- [12] FAN J, KOU X, JIA S, et al. Autophagy as a potential target for sarcopenia[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(7):1450-1459.
- [13] LAURENT M R, DUBOIS V, CLAESSENS F, et al. Muscle-bone interactions: from experimental models to the clinic? A critical update [J]. Mol Cell Endocrinol, 2016, 432:14-36.
- [14] GUMUCIO J P, MENDIAS C L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia[J]. Endocrine, 2013, 43(1):12-21.
- [15] JACKSON M J, MCARDLE A. Role of reactive oxygen species in age-related neuromuscular deficits[J]. J Physiol, 2016, 594(8):1979-1988.
- [16] WEI C, LI L, KIM I, et al. NF- κ B mediated miR-21 regulation in cardiomyocytes apoptosis under oxidative stress[J]. Free Radic Res, 2014, 48(3):282-291.
- [17] ZHOU J, ZHANG S, WANG H, et al. LncFunNet; an integrated computational framework for identification of functional long noncoding RNAs in mouse skeletal muscle cells[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(12):e108.
- (收稿日期:2020-03-08 修回日期:2020-05-10)