

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.

印楝素对 min6 细胞增殖及胰岛素分泌的影响

张 玲^{1,2},王得华¹,马 义¹,徐汉虹²

(1 暨南大学 生命科学技术学院,广东 广州 510632; 2 天然农药与化学生物学教育部重点实验室/
华南农业大学 农学院,广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究印楝素对 min6 细胞增殖、葡萄糖摄取及胰岛素分泌的影响,并探讨其作用机制。【方法】不同浓度印楝素处理 min6 细胞 48 h,检测细胞增殖量。在 5.5 和 25.0 mmol · L⁻¹葡萄糖条件下,检测印楝素处理细胞的葡萄糖摄取水平,胰岛素 ELISA 检测试剂盒检测细胞胰岛素的分泌。【结果】与对照组相比,在 5.5 和 25.0 mmol · L⁻¹葡萄糖条件下,印楝素均表现促进细胞增殖活性。印楝素处理下,与 25.0 mmol · L⁻¹葡萄糖条件相比,5.5 mmol · L⁻¹葡萄糖表现出更显著地促进葡萄糖摄取和胰岛素分泌的作用。【结论】印楝素可能通过调控葡萄糖水平影响胰岛素的分泌。

关键词:印楝素; min6 细胞; 细胞增殖; 胰岛素分泌; ELISA 检测
中图分类号:S511; S502 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)04-0025-05

Effects of azadirachtin on proliferation and insulin secretion of min6 cells

ZHANG Ling^{1,2}, WANG Dehua¹, MA Yi¹, XU Hanhong²

(1 College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2 Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/ College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effects of azadirachtin on cell proliferation, glucose uptake and insulin secretion in min6 cells and their possible mechanisms. 【Method】The min6 cells were cultured *in vitro* and treated with various concentrations of azadirachtin for 48 h. Cell proliferation was measured. In the presence of 5.5 and 25.0 mmol · L⁻¹ glucose, glucose uptake was measured and insulin secretion in min6 cells were detected by the insulin ELISA kit. 【Result】Azadirachtin promoted the proliferation of min6 cells in the presence of 5.5 and 25.0 mmol · L⁻¹ glucose compared to the control group. Compared with the 25.0 mmol · L⁻¹ glucose condition, azadirachtin in the presence of 5.5 mmol · L⁻¹ glucose more significantly promoted glucose uptake and insulin secretion in min6 cells. 【Conclusion】Azadirachtin could affect insulin secretion by regulating glucose concentration.

Key words: azadirachtin; min6 cells; cell proliferation; insulin secretion; ELISA test

印楝素是从印楝 *Azadirachta Indica* 种子中提取的柠檬素类化合物,属于四环三萜类化合物,包括 10 多个结构类似物^[1]。印楝素对生长发育的调控表现为抑制昆虫的生长发育和干扰昆虫的内分泌导致其变态发育异常^[2-3]。印楝素对昆虫的生长发育的调控可能涉及多种因素,印楝素能明显地影响昆虫体内糖、蛋白质和脂肪的合成代谢,影响内源激素的调控途径^[4-5]。在昆虫生长发育中,胰岛素信号通路参

与调控营养代谢物,间接调控昆虫的变态生长发育^[6-7]。在前期研究中,天然农药与化学生物学教育部重点实验室通过对印楝素作用下的昆虫幼虫和离体细胞差异表达基因/蛋白文库分析,提出了印楝素可能通过营养-胰岛素信号(IIS)途径调控昆虫生长发育^[6]。

哺乳动物的胰岛素是机体中促进合成和代谢的多肽类激素。胰岛 β 细胞是胰岛素合成和分泌的主要场所,调控机体中糖、脂肪及蛋白质代谢等^[8-9]。胰岛 β 细胞合成和分泌胰岛素受到营养物质等多种因素的调控,葡萄糖是最主要的调控因子^[10]。本研究在胰岛 β 细胞 min6 细胞水平,研究印楝素对胰岛素信号途径的影响,通过印楝素对葡萄糖和胰岛素的调控,探讨印楝素可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠胰岛瘤细胞 min6 细胞,采用 DMEM 基础培养基(分别含 5.5 和 25.0 mmol $\cdot$ L⁻¹葡萄糖)培养,15%(φ)胎牛血清临用前添加,加入胎牛血清、100 U $\cdot$ mL⁻¹青霉素、0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹链霉素、50 μ mol $\cdot$ L⁻¹ β -巯基乙醇,调节 pH 至 7.35~7.45,在 37 $^{\circ}$ C,5%(φ)CO₂条件下常规培养。

印楝素从印楝素种子中提取,其中印楝素 A 质量分数>90%,由天然农药与化学生物学教育部重点实验室提供。DMEM 培养液、0.05%(φ)胰酶-EDTA、胎牛血清均购自 Gibco 公司;D-(+)-葡萄糖、2 β -巯基乙醇、DMSO,购自 Sigma 公司。ELISA 胰岛素试剂盒购自 Linco 公司。

KRBH 缓冲液(1 L):NaCl 7.54 g;KCl 0.36 g;MgSO₄0.15 g;KH₂PO₄0.16g;CaCl₂0.28 g;NaHCO₃0.42 g;BSA 1.00 g;HEPES 2.38 g;去离子水 1 L,磁力搅拌器混匀后,调节 pH 7.4,过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖测定 用 MTT 法检测印楝素对 min6 细胞增殖活性的影响。取对数生长期的 min6 细胞,调整浓度为 2 $\times$ 10⁵ mL⁻¹,接种至 96 孔板中,每孔加入 DMEM 完全培养液 150 μ L,培养 24 h,细胞贴壁后,弃培养液,PBS 缓冲液洗 2 次。加入印楝素 200 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 150 μ L,顺序加入倍半稀释浓度,培养 48 h 后,每孔加 CCK8 20 μ L,继续孵育 4 h;孵育 4 h 后小心吸弃上清液,每孔加入 150 μ L 的 DMSO,振荡 10 min。酶标仪测定 570 nm 的光密度值。

1.2.2 min6 细胞葡萄糖摄取量测定 将 min6 细胞以 2 $\times$ 10⁵ 个细胞接种于 12 孔培养板中,细胞贴壁

后,弃去板中培养基,用 KRBH 缓冲液轻柔地洗 2 次,再用含 100 μ g 印楝素的 KRBH 缓冲液继续孵育 2 h。然后,加入 5.5 和 25.0 mmol $\cdot$ L⁻¹的葡萄糖孵育 20 min,收集上清液,通过检测上清液中葡萄糖的含量反映细胞对葡萄糖的吸收。

1.2.3 min6 细胞内胰岛素含量的测定 取对数生长期的细胞,消化后计数,调整细胞密度至 2 $\times$ 10⁵ L⁻¹,接种于 12 孔板,24 h 后弃细胞培养基,用 KRBH 缓冲液轻柔地洗 2 次,再用 KRBH 预孵育 2 h,使细胞对葡萄糖致敏。然后,换用新鲜的 KRBH 缓冲液分别加入 0、50、100、150、200 μ g $\cdot$ mL⁻¹印楝素,以及 5.5 或者 25.0 mmol $\cdot$ L⁻¹葡萄糖继续孵育 1 h,收集上清液,ELISA 胰岛素试剂盒测定胰岛素的含量。

以上试验均重复 6 次。

1.3 数据处理

应用 SPSS 17.0 统计软件对试验结果进行统计学分析,采用方差分析和 *t* 检验进行差异显著性分析。应用 Sigmaplot 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 印楝素对 min6 细胞增殖的影响

不同浓度印楝素分别作用于高糖培养基(25.0 mmol $\cdot$ L⁻¹葡萄糖)和低糖培养基(5.5 mmol $\cdot$ L⁻¹葡萄糖)培养的 min6 细胞,48 h 后检测细胞存活率。试验结果如图 1 所示。不同浓度印楝素分别处理 48 h 后,采用 CCK8 检测 min6 细胞的存活状态。由图 1 可知,min6 细胞在高糖和低糖培养基条件下均生长良好,印楝素均表现出促进增殖活性,且表现出一定的浓度依赖性。印楝素质量浓度为 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹时,在低糖培养基中,增殖率提高 20%,而在高糖培养基中,增殖率提高 13%。

2.2 印楝素对 min6 细胞葡萄糖摄取的影响

min6 细胞过夜培养,加入缓冲溶液饥饿 2 h 后,分别在 5.5 和 25.0 mmol $\cdot$ L⁻¹葡萄糖新鲜的 KRBH 缓冲溶液中,用 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹印楝素处理,继续培养 20 min,取上清检测培养基中葡萄糖的含量。

试验结果如图 2 所示,在低糖培养条件下,印楝素处理组培养基中葡萄糖浓度与无药物处理组相比明显降低,试验检测葡萄糖浓度降低 11%,表明细胞对葡萄糖的摄取量增加,间接表明印楝素可以促进胰岛 β 细胞对葡萄糖的吸收。而在无糖对照组中,印楝素处理组与未用药组没有显著差异。在高糖培养条件下,印楝素处理组培养基中葡萄糖浓度降低,与未用药组比较差异不显著。

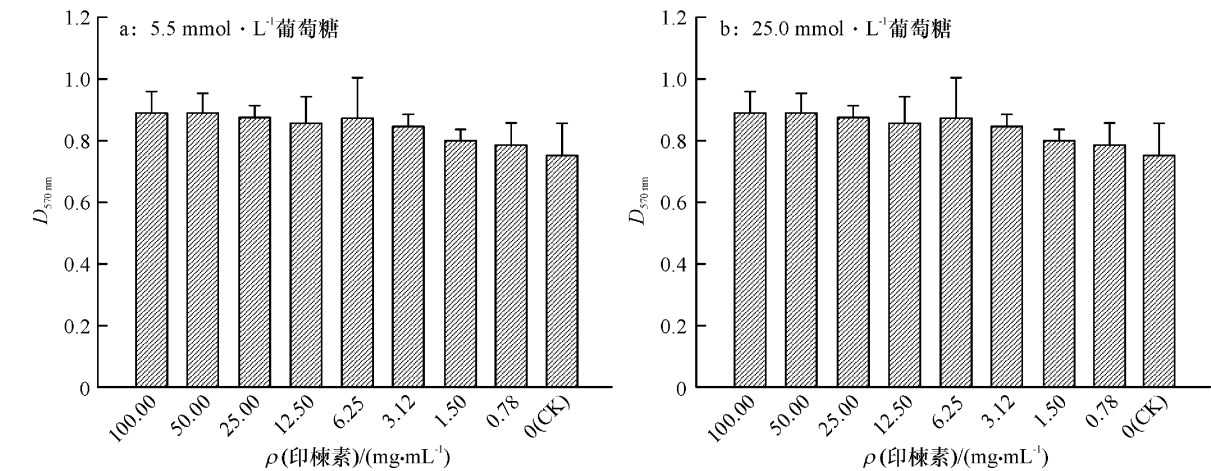
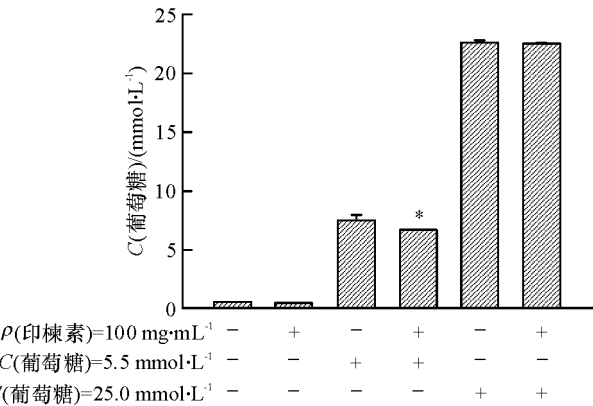
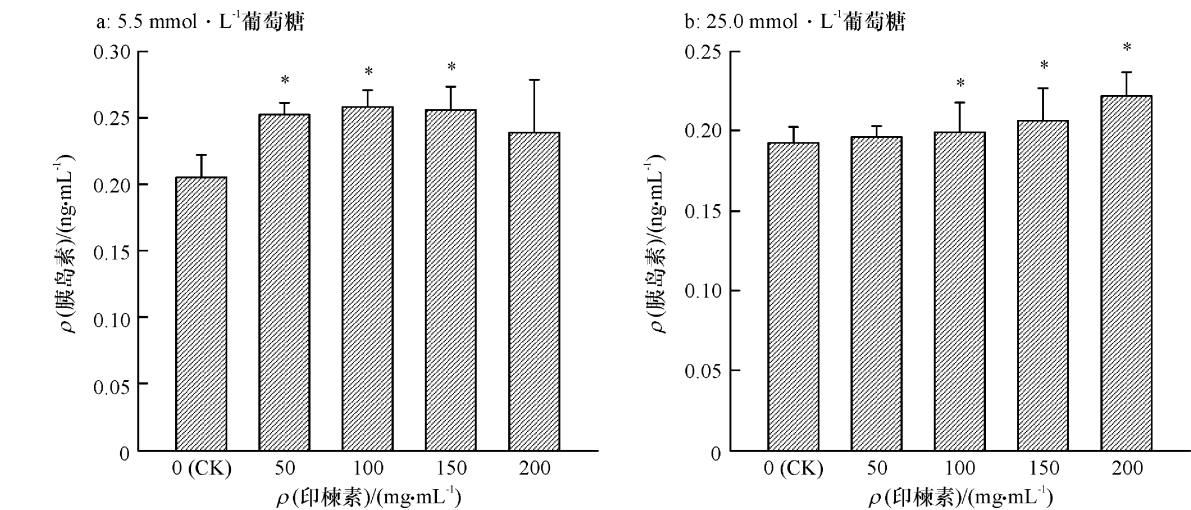


图1 印楝素对 min6 细胞增殖的影响
Fig.1 Effect of azadirachtin on proliferation of min6 cells



* 表示处理与对照差异显著 ($P<0.05$, DMRT 法)。
图2 印楝素对 min6 细胞葡萄糖吸收的影响
Fig.2 Effect of azadirachtin on glucose uptake of min6 cells

2.3 印楝素对 min6 细胞胰岛素分泌的影响
min6 细胞培养 24 h 后,用 KRBH 缓冲溶液孵育



分泌的胰岛素以每小时计, * 表示处理与对照差异显著 ($P<0.05$, DMRT 法)。
图3 印楝素对 min6 细胞胰岛素分泌的影响
Fig.3 Effect of azadirachtin on insulin secretion of min6 cells

3 讨论与结论

昆虫 min6 细胞系是胰岛素分泌研究中常用的细胞模型,该模型已经具备完善的研究方法和理论基础,在该细胞模型中研究印楝素处理下对葡萄糖以及胰岛素分泌的影响,可为后续的昆虫体系的试验提供理论参考。

在β细胞中,营养因子葡萄糖是刺激胰岛素分泌的最主要因素。葡萄糖由葡萄糖转运载体转运进入胰岛β细胞,参与生物体血糖的调节,因而细胞中影响葡萄糖代谢的影响因子均对胰岛素的分泌产生影响。因此,选择胰岛β细胞作为研究印楝素对营养因子及其相关信号调控的研究体系。

在本研究中试验结果显示不同浓度的印楝素,在 5.5 和 25.0 mmol·L⁻¹葡萄糖培养基中,均表现出对胰岛β细胞不同程度的促增殖作用。在 5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖培养基中促增殖作用更加显著。同时,印楝素在低葡萄糖和高葡萄糖环境下能够促进细胞对葡萄糖的吸收,在 5.5 mmol·L⁻¹低葡萄糖条件细胞摄取更多的葡萄糖。而糖的吸收和代谢是葡萄糖依赖的胰岛素分泌的主要影响因素。影响葡萄糖在β细胞代谢中的因素均可影响到胰岛素的分泌。试验结果显示,检测不同浓度印楝素处理的细胞胰岛素分泌水平,在 5.5 mmol·L⁻¹低糖培养基中,胰岛素分泌水平增加,这与相同条件下试验检测的葡萄糖摄取水平一致。作为葡萄糖依赖的胰岛素分泌,胰岛素的分泌主要受葡萄糖的刺激影响,葡萄糖的摄取量增加直接导致胰岛素的分泌增加。试验结果显示印楝素在低葡萄糖环境中促进细胞对葡萄糖的吸收,促进胰岛素的分泌,进而推断印楝素的作用可能是调控葡萄糖的吸收,间接的产生葡萄糖刺激胰岛素分泌的响应。而在高葡萄糖环境中,印楝素促葡萄糖吸收作用减弱,胰岛素分泌量没有显著的增加。试验结果表明,印楝素作用的胰岛β细胞中,胰岛素的分泌和印楝素作用下葡萄糖的吸收结果一致。因此可以推断印楝素可能是通过调控细胞内葡萄糖浓度,进而影响到细胞胰岛素的释放,而不是简单作用于胰岛素及其受体本身。

在之前的文献报道中,印楝素在多种细胞上均表现出抑制细胞生长作用。在昆虫细胞中,印楝素表现出明显的抑制生长和诱导凋亡^[11-12]。在哺乳动物细胞中,文献报道印楝素提取物也表现出抑制细

胞增殖,诱导凋亡等^[13-14]。在子宫癌 Hela 细胞系中,印楝素显著地抑制细胞的增殖,诱导细胞凋亡^[14]。因而,印楝素通常情况下具有抑制细胞的生长作用。本研究结果表明,min6 细胞在葡萄糖存在条件下,印楝素表现出促增殖活性,促进细胞对葡萄糖的摄取以及细胞胰岛素的分泌,因而推断在 min6 细胞中印楝素调控胰岛素分泌可能与印楝素调控抑制细胞生长和诱导凋亡的机制不同。在胰岛β细胞中,葡萄糖-胰岛素信号途径为主要的调控通路,而细胞生长是通过 PI3K 信号通路调控的,因而印楝素在胰岛β细胞中可能是通过调节葡萄糖合成和代谢中的靶标,达到调控葡萄糖吸收的目的,间接地调控细胞内胰岛素的释放。

文献报道番石榴酸在 Ins-1 胰岛β细胞中表现相似的促细胞增殖活性和影响胰岛素合成和分泌的作用^[15]。番石榴酸结构上属于羟基萜类化合物,鉴于印楝素与羟基萜类化合物在结构上的相似性,该类化合物在葡萄糖-胰岛素调控中的作用机制研究可以成为印楝素进一步研究的参考。

参考文献:

[1] BUTTERWORTH J H, MORGAN E D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts[J]. J Chem Soc Chem Commun, 1968(1): 23-24.

[2] 李晓东, 赵善欢. 印楝素对昆虫的毒理作用机制[J]. 华南农业大学学报, 1995, 17(1): 118-122.

[3] MORGAN E D. Azadirachtin, a scientific gold mine[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17: 4096-4105.

[4] MORDUE A J, BLACKWELL A. Azadirachtin: An update[J]. J Insect Physiol, 1993, 39: 903-924.

[5] 查友贵, 徐汉虹. 印楝及印楝生物农药[J]. 世界农药, 2003, 25(4): 29-30.

[6] LAI D, JIN X, WANG H, et al. Gene expression profile change and growth inhibition in *Drosophila* larvae treated with azadirachtin[J]. J Biotechnol, 2014, 185: 51-56.

[7] WANG H, LAI D, YUAN M, et al. Growth inhibition and differences in protein profiles in azadirachtin-treated *Drosophila melanogaster* larvae[J]. Electrophoresis, 2014, 35(8): 1122-1129.

[8] RITZEL R A. Therapeutic approaches based on beta-cell mass preservation and/or regeneration[J]. Front Biosci, 2009, 14: 1835-1850.

[9] WEIR G C, BONNER-WEIR S. Islet β cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death[J].

Ann NY Acad Sci, 2013, 1281(1): 92-105.

[10] GEMBAL M, GILON P, HENQUIN J C. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse β cells[J]. J Clin Invest, 1992, 89(4): 1288-1295.

[11] 程杏安, 黄劲飞, 胡美英, 等. 印楝素 A 诱导 S9 细胞凋亡的显微和超微形态变化[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(4): 52-58.

[12] HUANG J F, SHUI K J, LI H Y, et al. Antiproliferative effect of azadirachtin A on *Spodoptera litura* SI-1 cell line through cell cycle arrest and apoptosis induced by up-regulation of p53[J]. Pestic Biochem Physiol, 2011, 99(1): 16-24.

[13] MAHAPATRA S, KARNES R J, HOLMES M W, et al. Donkena, novel molecular targets of *Azadirachta indica* associated with inhibition of tumor growth in prostate cancer [J]. The AAPS J, 2011, 13: 365-377.

[14] GUNADHARINI D N, ELUMALAI P, ARUNKUMAR R, et al. Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 134(3): 644-650.

[15] 王婧茹, 赵晶晶, 叶春玲, 等. 番石榴叶总三萜对 2 型糖尿病大鼠的降血糖和血脂作用[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28(6): 1109-1113.

【责任编辑 霍 欢】