

D-柠檬烯对衣霉素诱导的胰腺 MIN6 细胞损伤的保护作用

付柏婷^{1,2}, 张萍^{1*}¹中国科学院西双版纳热带植物园 热带植物资源可持续利用重点实验室, 西双版纳 666303;²中国科学院大学, 北京 100049

摘要:本研究主要探讨 D-柠檬烯对衣霉素(Tm)诱导胰腺 MIN6 细胞损伤的保护作用。设置溶剂对照组、Tm 组、4-苯基丁酸(PBA)组和不同浓度的 D-柠檬烯组,用 Griess 试剂检测 Tm 刺激胰岛 β 细胞产生的 NO 水平; Annexin V-FITC/PI 双染法流式检测细胞凋亡;RT-PCR 法检测 mRNA 的表达水平;Western Blot 法检测相关蛋白的表达。结果显示,D-柠檬烯组与 Tm 组相比,NO 产生量减少、细胞凋亡率降低、内质网应激相关基因 sXbp1 和 CHOP 的 mRNA 表达量显著降低、p-eIF2 α 的蛋白表达量显著下降。结果表明 D-柠檬烯对衣霉素(Tm)诱导的胰腺 MIN6 细胞损伤具有显著的保护作用。

关键词: D-柠檬烯; MIN6; 内质网应激; 凋亡; 细胞损伤

中图分类号: R967

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.10.023

D-limonene Protects Pancreatic MIN6 Cells against Tunicamycin Induced Cellular Damage

FU Bai-ting^{1,2}, ZHANG Ping^{1*}

¹Key Laboratory of Tropical Plant Resource Sciences and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Xishuangbanna 666303, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: In this study, the protective effect of D-limonene on the cellular damage induced by tunicamycin in pancreatic MIN6 cells was investigated. Cells were pretreated with vehicle, PBA and different doses of D-limonene, and then cultured with Tm for 5-24 h. NO production was detected by Griess reagent method. Cells were stained with Annexin V-FITC/PI for apoptosis by flow cytometry. RT-PCR was used to analyze mRNA expression of ER stress related genes sXbp1 and CHOP. Western Blot was used to detect eIF2 α protein expression. Our results showed that, compared with Tm-treated cells, cells treated with D-limonene exhibited significantly decreased NO production and apoptosis. Furthermore, D-limonene treatment resulted in significantly lower mRNA levels of sXbp1 and CHOP as well as lower level of protein expression of phosphorylated eIF2 α . These results demonstrated that D-limonene had a significant protective effect on cellular damage induced by tunicamycin in pancreatic MIN6 cells.

Key words: D-limonene; MIN6; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; cellular damage

D-柠檬烯是一种广泛存在于柑橘、柠檬等芸香科植物中的单萜类化合物(图1)。一些传统药用植物中均含有柠檬烯,如傣药麻欠^[1]、佛手^[2]等。大量研究表明 D-柠檬烯具有抗氧化^[3]、抗炎^[4]、抗癌^[5]及调节酒精性肝损伤脂质代谢紊乱^[6]等多种药理作用。此外,富含 D-柠檬烯的佛手果实精油可刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素^[2]。D-柠檬烯还对 STZ

诱导的糖尿病大鼠有恢复血糖和胰岛素水平的作用^[7]。因此推测 D-柠檬烯可能对胰岛 β 细胞具有直接的保护作用。

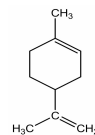


图1 D-柠檬烯结构式

Fig. 1 Structure of D-limonene

收稿日期: 2017-12-06

接受日期: 2018-03-16

基金项目: 中国科学院战略生物资源服务网络计划活性天然化合物发现、评价与转化项目(Y7ZK201B01)

* 通信作者 Tel: 86-018313223296; E-mail: zhangping@xtbg.org.cn

文献表明,小鼠胰腺 MIN6 细胞与从动物体内分离的正常胰岛 β 细胞在葡萄糖代谢和葡萄糖刺激

产生胰岛素的功能方面都很类似^[8],因此可以作为一种简便的工具来研究针对胰岛 β 细胞的药物。而内质网应激是造成胰岛 β 细胞损伤重要因素之一。许多因素都可以引起胰岛 β 细胞产生应激而损伤,如炎症因子、棕榈酸、环境中的污染物及双酚A等^[9-11]。胰岛 β 细胞具有占整个细胞体积3/4的发达内质网,是合成加工包括胰岛素在内一系列蛋白质的重要细胞,且高度表达内质网应激相关基因,如sXbp1、p-eIF2 α 和CHOP等。因此,胰岛 β 细胞是对内质网应激最为敏感的细胞之一^[12]。研究表明通过改善内质网应激是糖尿病治疗药物开发的一种可行思路。衣霉素是一种广泛使用的诱导内质网应激的试剂,而药物PBA被证明具有减轻内质网应激反应的作用^[13]。本研究初步探讨D-柠檬烯对衣霉素(Tm)诱导胰腺MIN6细胞损伤的保护作用并选用PBA为阳性对照。

1 材料与试剂

1.1 细胞株

胰腺 β 细胞系MIN6细胞购买于上海拜力生物科技有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

D-柠檬烯(Sigma公司)、衣霉素(Tm)(Sigma公司)、4-苯基丁酸(PBA)(Sigma公司)、DMSO(Sigma公司)、胎牛血清(Gibco公司)、青/链霉素双抗(P/S)(Hyclone公司);细胞活力测定试剂盒(MTS)(Promega公司);FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I(BD公司);SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II(Takara公司)、TRIzol reagent(Invitrogen公司)、nuclease-free water(Promega公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司)、eIF2 α 抗体(Cell signaling Technology公司)、p-eIF2 α 抗体(Cell signaling Technology公司)、HRP-IgG(Proteintech公司)、 β -actin抗体(Proteintech公司);ECL显色试剂盒(Millipore公司);流式细胞仪(BD FACSVerse,美国);高速冷冻离心机(Eppendorf 5810R,德国);荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司);多功能酶标仪(Thermo scientific,美国);凝胶成像系统(Bio-rad,美国)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

含有10%胎牛血清(FBS),青霉素、链霉素各1 000 U/L和1% β -巯基乙醇的DMEM高糖培养基,

于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂细胞培养箱中培养细胞。取处于对数生长期的细胞用于实验。通过预实验发现用DMSO溶解D-柠檬烯至不同浓度(v/v,0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.008%),处理细胞24 h后,0.006%及以上浓度的D-柠檬烯对细胞有毒性,而0.006%以下浓度对细胞活力无影响,所以后续实验使用的精油浓度为0.001%~0.005%(v/v)。同样浓度的DMSO用于后面所有实验溶剂对照组。

2.2 一氧化氮(NO)含量检测

将处于对数生长期的MIN6细胞以每孔 5×10^3 个细胞接种于96孔板中。贴壁生长24小时后,设置溶剂对照组,Tm+溶剂对照组(简称Tm组),Tm+阳性对照组(PBA组)和Tm+D-柠檬烯(v/v,0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%)组,每组3个平行。分别用5 mM PBA及不同浓度的D-柠檬烯预处理细胞半小时后,每组加入5 μ g/mL Tm刺激细胞24 h。之后,按照Griess试剂盒说明书检测上清液中NO的含量。由NO含量检测实验可以看出,D-柠檬烯(v/v,0.004%)组最大程度抑制Tm诱导的MIN6细胞产生NO,因此后续实验D-柠檬烯浓度均选择0.004%(v/v)。

2.3 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的MIN6细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于6孔板中。过夜贴壁生长后,设置溶剂对照组,Tm+溶剂对照组(简称Tm组),PBA组、Tm+D-柠檬烯(v/v,0.001%)组、Tm+D-柠檬烯(v/v,0.002%)组和Tm+D-柠檬烯(v/v,0.004%)组,每组3个平行。分别用5 mM PBA及D-柠檬烯预处理细胞半小时后,每组加入5 μ g/mL Tm刺激细胞5小时。之后,用不含EDTA的胰酶消化收集细胞,预冷的PBS洗涤细胞两次后按照BD公司FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I试剂盒说明书对各组细胞进行FITC Annexin V/PI双染色,室温避光孵育15分钟。最后流式细胞仪(BD FACSVerse)检测分析。

2.4 RT-PCR检测

将处于对数生长期的MIN6细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于6孔板中。过夜贴壁生长后,设置溶剂对照组,Tm+溶剂对照组(简称Tm组),Tm+阳性对照组(PBA组)和Tm+D-柠檬烯(v/v,0.004%)组,每组3个平行。分别用5 mM PBA及D-柠檬烯预处理细胞半小时后,每组加入5 μ g/mL

Tm 刺激细胞 5 小时。之后,Trizol 裂解细胞,氯仿抽提,异丙醇沉淀 RNA,75% 乙醇(DEPC 水配制)洗涤,nuclease-free water 溶解 RNA。参照 TaKaRa 公司一步法转录试剂盒说明书可逆转录得到 cDNA。按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 说明书在荧光定量 PCR 仪上进行 mRNA 相对定量分析。

2.5 Western blot 检测

将处于对数生长期的 MIN6 细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中。过夜贴壁生长后,设置溶剂对照组,Tm + 溶剂对照组(简称 Tm 组),Tm + 阳性对照组(PBA 组)和 Tm + D-柠檬烯(v/v, 0.004%)组,每组 3 个平行。分别用 5 mM PBA 及 D-柠檬烯预处理细胞半小时后,每组加入 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tm 刺激细胞 5 小时。预冷的 PBS 洗涤细胞一次后,用细胞裂解缓冲液(RIPA 及蛋白酶抑制剂)冰上裂解细胞 10 min 后收集裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心提取蛋白,经 BCA 法测定蛋白浓度后,取蛋白样品与上样缓冲液 4:1 混匀,沸水浴 10 min。根据样品中所含蛋白质浓度确定上样量 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 60 V 约 30 min,分离胶 100 V 约 1 h 30 min),凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜上(4 $^{\circ}\text{C}$ 55 V 转移 4 h),5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 后,分别用 p-eIF2 α 抗体和 eIF2 α 抗体(1:1 000)孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。HRP-IgG 二抗(1:5 000)室温孵育 1.5 h 后 ECL 显影,最后用凝胶成像系统曝光成像。

2.6 数据分析

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行分析以及用 GraphPad Prism 5.0 软件进行图像处理。应用 One-way ANOVA 及 Dunnett's t-test 检验进行显著性分析,数据用 Mean \pm SD 表示,每组 3 个平行,当 $P < 0.05$ 时视为显著差异。

3 结果与分析

3.1 D-柠檬烯对 Tm 诱导 MIN6 细胞产生 NO 的影响

如图 2 所示,Tm 刺激 MIN6 细胞 24 h 后,与溶剂对照组(0.92 $\mu\text{M}/\text{L}$)相比 Tm 组细胞产生的 NO 量显著增多。而 D-柠檬烯预处理的实验组与 Tm 组(2.42 $\mu\text{M}/\text{L}$)相比 NO 的产量显著降低,而且降低程度依赖于 D-柠檬烯剂量。其中浓度为 0.004%、0.005% (v/v) 的 D-柠檬烯处理组与溶剂对照组产生的 NO 水平相当,分别为 0.85、0.84 $\mu\text{M}/\text{L}$,完全抑制了 Tm 诱导的 NO 水平的升高。

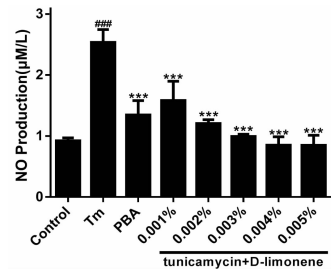


图 2 D-柠檬烯对 Tm 诱导的 MIN6 细胞产生 NO 的影响
Fig. 2 Effect of D-limonene on NO production in MIN6 cells stimulated by Tm

注:与空白对照组相比,### $P < 0.001$;与 Tm 组相比,*** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, ### $P < 0.001$; Compared with Tm group, *** $P < 0.001$.

3.2 D-柠檬烯对 Tm 诱导 MIN6 细胞凋亡的影响

如图 3 所示,Tm 刺激细胞后,与溶剂对照组相比(9.11%),细胞晚期凋亡率(Annexin V $^{+}$ /PI $^{+}$)明显增多(24.47%),而 D-柠檬烯预处理的细胞凋亡率随 D-柠檬烯浓度的增加逐渐减少。当 D-柠檬烯浓度为 0.001%、0.002%、0.004% 时,细胞凋亡率分别为 17.85%、15.97% 和 13.63%。这些结果显示,D-柠檬烯可以显著降低 Tm 诱导的胰腺 MIN6 细胞的凋亡。

3.3 D-柠檬烯对 Tm 诱导 MIN6 细胞内质网应激的抑制作用

如图 4A、B 所示,RT-PCR 结果显示,Tm 刺激细胞后,相对于溶剂对照组的细胞,细胞内 sXbp1 和 CHOP mRNA 水平显著增加。而 PBA 组和 D-柠檬烯组可以显著抑制 sXbp1 (图 4A) 和 CHOP mRNA (图 4B) 的表达,而且 D-柠檬烯抑制 CHOP mRNA 表达的效果比 PBA 还好。

如图 4C 所示,Western blot 检测结果显示,溶剂对照组的细胞表达一定量的磷酸化的 eIF2 α 蛋白水平,Tm 刺激后,磷酸化的 eIF2 α 蛋白水平显著增加。而 D-柠檬烯可以完全抑制磷酸化的 eIF2 α 蛋白的表达,而且效果与 PBA 相当。

4 讨论与结论

国内外研究表明,内质网应激在 2 型糖尿病的发病过程中有很重要的影响^[14]。越来越多的体内和体外实验证明能够缓解内质网应激的药物可以改善胰岛素信号的转导^[15]。内质网应激初期,细胞会启动一系列信号级联反应,也就是未折叠蛋白反

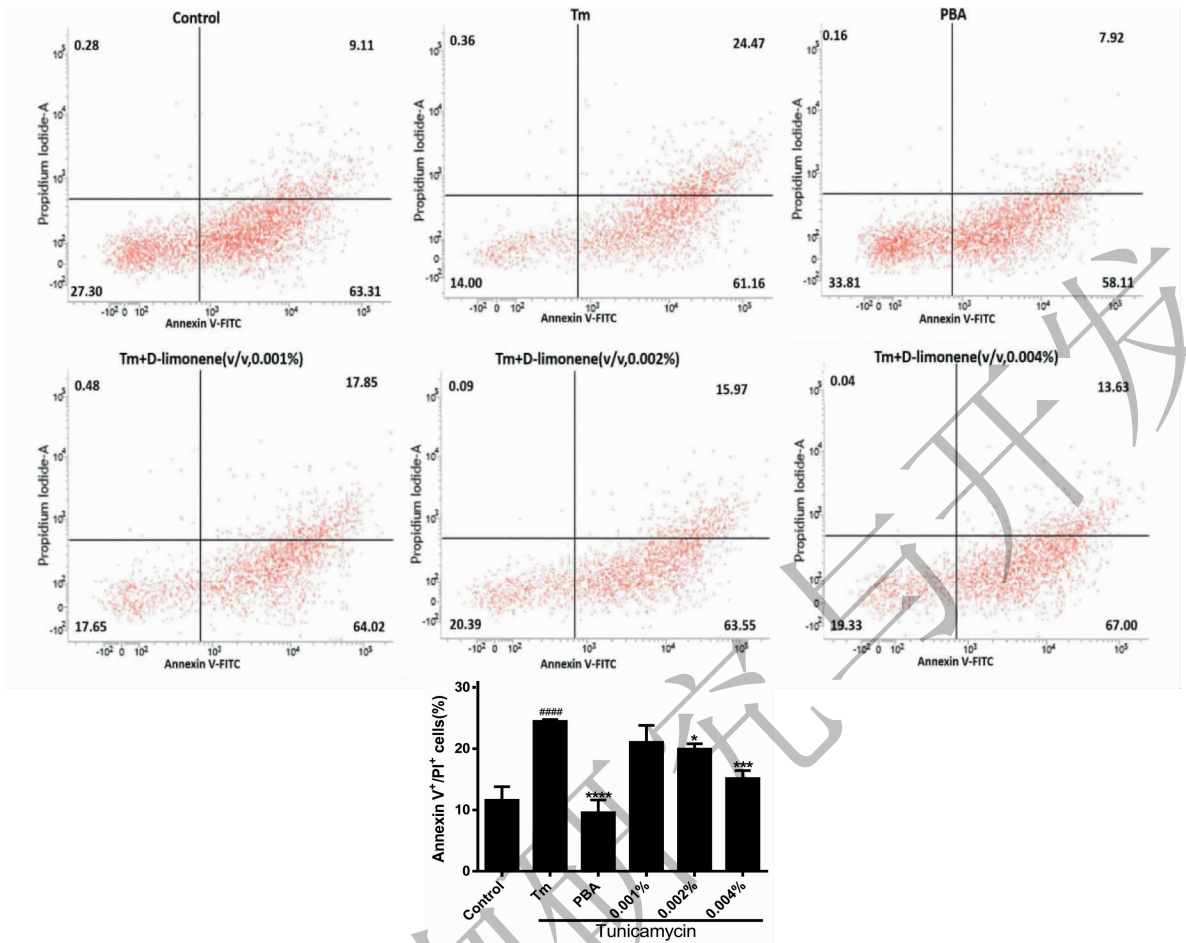


图3 D-柠檬烯对 Tm 诱导 MIN6 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of D-limonene on cell apoptosis in MIN6 cells stimulated by Tm

注:与空白对照组相比,#### $P < 0.001$;与 Tm 组相比,*** $P < 0.001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, #### $P < 0.001$; Compared with Tm group, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.001$, * $P < 0.05$.

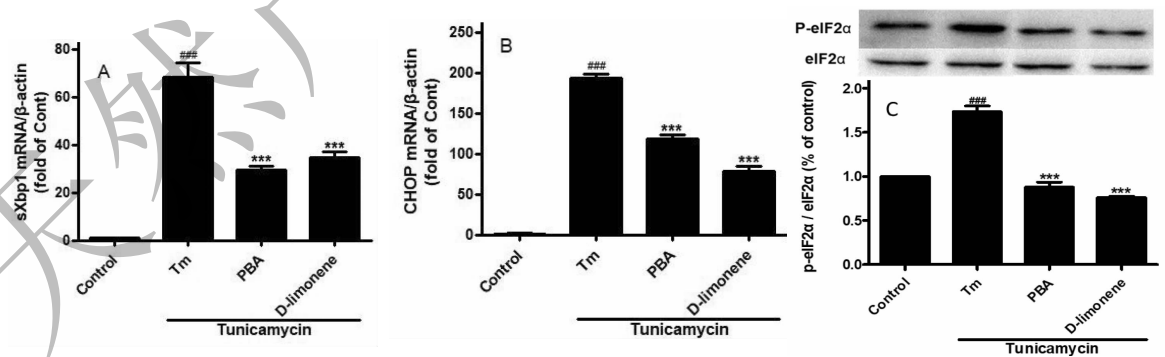


图4 D-柠檬烯对 Tm 诱导 MIN6 细胞内质网应激的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of D-limonene on ER stress in MIN6 cells stimulated by Tm

注:内质网应激相关基因 sXbp1 (A) 和 CHOP (B) 的表达水平,内质网应激相关蛋白 p-eIF2α (C) 的表达水平。与空白对照组相比,#### $P < 0.001$;与 Tm 组相比,*** $P < 0.001$ 。

Note: Expression levels of ER stress-responsive genes sXbp1 (A) and CHOP (B) and expression levels of ER stress-responsive protein p-eIF2α (C) Compared with control group, #### $P < 0.001$; Compared with Tm group, *** $P < 0.001$.

应来处理内质网内未折叠和错误折叠的蛋白质^[16],但是过长时间的內质网应激和內质网不足以处理过多的未折叠和错误折叠的蛋白质时,內质网将会启动凋亡信号通路。因此,缓解內质网应激可能是保护胰岛 β 细胞及抑制其凋亡的重要途径。

本实验结果显示, D-柠檬烯能够显著降低 Tm 诱导的 NO 的产生,同时能够显著降低 Tm 诱导的內质网应激相关转录因子 X 盒蛋白 1 (sXbp1) mRNA 和內质网应激中磷酸化的真核细胞翻译起始因子 (eIF2 α) 的磷酸化。发生內质网应激时, Xbp1 的 mRNA 会被剪接成有活性的转录因子 sXbp1,进而诱导內质网分子伴侣和內质网相关蛋白的降解^[17],从而减轻內质网内蛋白质负担。此外, sXbp1 能够促进磷脂的生物合成,导致內质网膜发生扩张,进而增加內质网的折叠能力而恢复內质网的稳态。当內质网内积累过多的未折叠蛋白和错误折叠蛋白发生內质网应激时,內质网内真核细胞翻译起始因子 2 α (eIF2 α) 发生磷酸化,通过降低蛋白质的翻译来减轻內质网内蛋白质负担,从而缓解內质网应激。本实验结果表明, D-柠檬烯对于 Tm 诱导的內质网应激有很好的抑制作用。CHOP 是于 C/EBP 转录因子家族成员,正常细胞内表达量很低,当外界因素刺激引起內质网应激时, CHOP 表达量显著上升, CHOP 在內质网应激中是促凋亡因子^[18]。本实验结果表明, D-柠檬烯通过降低 CHOP 的 mRNA 水平来抑制 Tm 诱导的內质网应激引起的凋亡。

综上所述,我们的实验结果表明 D-柠檬烯对 Tm 诱导的胰岛 β 细胞损伤有保护作用,并且能够抑制 Tm 诱导的胰岛 β 细胞凋亡。本实验揭示了 D-柠檬烯的这种保护作用是通过降低內质网应激来实现的,因此可以推测 D-柠檬烯对其他因素造成的胰岛 β 细胞损伤可能也有保护作用。

致谢: 部分实验的测定在中科院西双版纳热带植物园中心实验室完成,对中心实验室的工作人员表示真挚的感谢。

参考文献

- 1 Gan XQ, Guo J, Zhang HX, *et al.* Effects of Maqian essential oil on oxidative stress in THP-1 cells stimulated by LPS[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然药物研究与开发), 2016, 28: 833-838.
- 2 Peng CH, Ker YB, Weng CF, *et al.* Insulin secretagogue bioactivity of finger citron fruit (*Citrus medica* L. var. *Sarcodac-*

- tylis Hort, Rutaceae*) [J]. *Agric Food Chem*, 2009, 57: 8812-8819.
- 3 Roberto D, Micucci P, Sebastian T, *et al.* Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. nordic pharmacological society [J]. *Basic Clin Pharm Toxicol*, 2009, 106: 38-44.
- 4 Yoon WJ, Lee NH, Hyun CG. Limonene suppresses lipopolysaccharide-Induced production of nitric oxide, prostaglandin E₂, and pro-inflammatory cytokines in RAW246.7 macrophages [J]. *J Oleo Sci*, 2010, 59: 415-421.
- 5 Lesgards JF, Baldovini N, Vidal N, *et al.* Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review [J]. *Phytother Res*, 2014, 28: 1423-1446.
- 6 Wang DF, Liang H, Wang WC. Effect of D-limonene on lipid metabolism disorder in rats with alcohol-Induced Liver Damage [J]. *Food Sci* (食品科学), 2015, 36: 163-167.
- 7 Murali R, Karthikeyan A, Saravanan R. Protective effects of d-limonene on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 112: 175-181.
- 8 Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, *et al.* Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets [J]. *Diabetologia*, 1993, 36: 1139-1145.
- 9 Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, *et al.* Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress [J]. *Nat Med*, 2014, 20: 1417-1426.
- 10 Sun X, Lin Y, Huang QS, *et al.* Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19: 581-594.
- 11 Lin Y, Sun X, Qiu L, *et al.* Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: 1-10.
- 12 Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus [J]. *Endocr Rev*, 2008, 29: 42-61.
- 13 Mimori S, Ohtaka H, Koshikawa Y, *et al.* 4-Phenyl butyric acid protects neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 6015-6018.
- 14 Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1111-1119.