

· 综述 ·

MIN6 细胞系的细胞学特性及其应用

冯俊杰 戴阳丽 王秀敏

【摘要】 MIN6 细胞系是从表达类人猿病毒 40 大 T 抗原(受胰岛病毒启动子控制)的转基因非肥胖糖尿病小鼠胰岛瘤中建立的,其内分泌功能与胰腺组织非常接近,是研究胰岛细胞功能的理想模型。MIN6 细胞系可用于胰腺分泌的研究, β 细胞的适宜刺激信号的探索;1 型糖尿病发病机制的研究;氧化应激、自噬、游离脂肪酸对 2 型糖尿病发病的影响;在胰腺移植后发生排斥的机制研究。

【关键词】 MIN6;糖尿病;细胞学特性;自噬

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30971125,81370930)

Cytological characteristics and application of MIN6 cell line Feng Junjie, Dai Yangli, Wang Xiumin.

Department of Endocrinology, The Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

Corresponding author: Wang Xiumin, Email: wangxiumin1019@126.com

【Abstract】 MIN6 cell line is established from insulinomas obtained by targeted expression of the simian virus 40 T antigen in transgenic non-obese diabetic mice. The endocrine function of MIN6 cells is similar to pancreatic tissue, which makes it an ideal model in researching the function of islet cells. The MIN6 cell line is used in pancreatic secretion in recent years, and also in finding stimulus signal to β cells. MIN6 cell line is used to study the pathogenesis of type 1 diabetes as well as the effects of oxidative stress, autophagy and free fatty acids on the pathogenesis of type 2 diabetes. At the same time, it can be used to discuss the mechanism in reject reaction after pancreas transplantation.

【Key words】 MIN6;Diabetes mellitus;Cytological characteristics; Autophagy

Fund Program: The National Natural Science Foundation of China(30971125, 81370930)

由于人原代胰岛细胞获取困难,且不能连续传代,所以多选用体外培养胰岛 β 细胞的细胞株作为替代,常用的有大鼠胰岛 β 细胞瘤细胞株(RINm5F)及仓鼠胰岛 β 细胞(HIT-T15)。其在胰岛素基因的研究中广泛应用,缺点是胰岛素分泌远低于正常胰岛细胞,且葡萄糖刺激的胰岛素分泌(GSIS)也与 β 细胞有所不同,故不能完全替代正常 β 细胞。小鼠胰岛素瘤细胞(MIN6 细胞系)是从小鼠胰岛 β 细胞瘤或胰岛细胞瘤中分离得到的永久细胞系,它保留了胰岛细胞的 GSIS,对脑型葡萄糖转运蛋白(GLUT)不敏感,而特异地对肝型 GLUT 敏感,可以反映胰岛 β 细胞的功能变化,是研究胰岛细胞功能的理想模型。以下就 MIN6 细胞系的细胞学特性及其在研究中的作用作一综述。

1 MIN 细胞系的制备和功能

MIN6 细胞系是从胰岛素启动子控制下的表达

类人猿病毒 40 大 T 抗原的转基因非肥胖糖尿病小鼠胰岛瘤中建立的^[1]。将这些小鼠喂养至 13 周处死,切除肿瘤后获得肿瘤细胞,经过单独洗涤,加入 DMEM 培养基后在培养箱内传代培养。2 周后,得到紧密排列、密集生长的细胞克隆,用胰蛋白酶常规消化后进行细胞传代。最终得到两个细胞系:从 IT6 模型小鼠的肿瘤细胞中得到单一细胞克隆即是 MIN6 细胞系,而从 IT7 模型中获得的是 MIN7 细胞系。MIN6 细胞系经孵育 12 h 后,取上清液,离心去除细胞碎片,储存于 -20°C 。MIN6 细胞系的 GSIS 与胰岛细胞基本相似,是一种被广泛使用的 β 细胞系。Nakashima 等^[2]发现,MIN6 细胞还可分泌胰高血糖素、生长抑素和 ghrelin,提示其是体外代替胰岛组织培养的较好的细胞系。

2 MIN6 细胞系的细胞学特性

MIN6 和 MIN7 细胞系都是由类人猿病毒 40 大 T 抗原启动子所激发而得到的,两者都呈均匀形态、集落生长,有一定的神经内分泌功能,包含较高水平的胰岛素 mRNA 和类人猿病毒 40T 抗原 mRNA。免疫组化分析也提示它们是由同一种胰岛 β 细胞分

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2016.02.014

作者单位:310003 杭州,浙江大学附属儿童医院内分泌科(冯俊杰,戴阳丽,王秀敏);314001 浙江省嘉兴市第一医院儿科(冯俊杰);200127 上海儿童医学中心(王秀敏)

通信作者:王秀敏,Email:wangxiumin1019@126.com

化演变而来。但两者的 GSIS 不同, MIN6 细胞系分泌胰岛素的量随血糖升高而显著升高, 这与体外培养的正常胰岛细胞基本相似。它们都能产生较高水平的肝型 GLUT mRNA, MIN6 细胞系只能产生少量的脑型 GLUT mRNA。故 MIN6 细胞系在功能上更接近于胰岛 β 细胞。

MIN6 细胞系保留了 β 细胞特性, 可以在血糖和其他促分泌因素刺激下分泌胰岛素。但是 MIN6 细胞在多次传代后会发生基因改变, 从而失去分泌胰岛素的能力, 这些基因的改变包括下调某些基因如磷脂酶 D_1 和胆囊收缩素。多次传代的细胞对某些蛋白也会出现低表达, 包括参与内质网应激和活性氧簇生成的抗氧化酶。GLUT 是葡萄糖通过细胞膜的重要受体, 其中 GLUT9 和 GLUT2 也参与了 GSIS^[3]。既往研究发现, 传代次数不多的 MIN6 细胞系 GLUT2 的表达几乎没有差异, 与多次传代的 MIN6 细胞系相比较, 在基因和蛋白水平的表达均有改变, 但是不影响代谢结果^[4]。近年来 Yamato 等^[5]发现, MIN6 亚群 C4 更好的保留了 GSIS 能力, 更适用于体外胰岛 β 细胞系研究。

MIN6 细胞系不仅可以分泌胰高血糖素样肽-1, 其信号可以通过一种自分泌方式被放大, 从而维持其胰岛素分泌的功能^[6]。这是 MIN6 细胞系生存和分泌胰岛素的基础。

3 MIN6 细胞系的临床应用

3.1 测定胰腺分泌的激素 胰腺组织有 5 种内分泌细胞: 分泌胰高血糖素的 α 细胞, 分泌胰岛素的 β 细胞, 分泌生长抑素的 δ 细胞, 分泌胰多肽的 γ 细胞, 分泌 ghrelin 的 ϵ 细胞。它们共同维持血糖的稳定。MIN6 细胞系可分泌以上 5 种激素^[2]。Nakashima 等^[2]发现 MIN6 细胞系可以表达 Pdx1, NeuroD, Nkx6.1, Nkx2.2, Pax6, Ngn3, Pax4, Brn4 和 CckBr 等基因, 而这些基因同样也在胰岛中表达。

3.2 在氨基酸研究中的应用 某些氨基酸, 如 L-谷氨酸和 L-精氨酸, 是胰岛 β 细胞的适宜刺激信号。研究发现, 在接受 L-谷氨酸和 L-精氨酸刺激后, MIN6 细胞内三磷酸肌醇和 Ca^{2+} 浓度均显著上升, 这有助于了解 Tas1R 家族的表达情况^[7]。所以, 可以利用 MIN6 细胞系表达氨基酸受体作相关研究。

AMP 活化蛋白激酶 (AMPK) 是反映细胞状态的传感器, 其活化影响了胰岛 β 细胞的 GSIS。哺乳动物的 AMPK 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其功能是灭活葡萄糖。MIN6 细胞系中, 蛋白激酶 A 使 AMPK α 1 Ser173、Ser485 和 Ser497 位点磷酸化, 通过上游激酶活化而阻碍了 Thr172 磷酸化^[8]。蛋白激酶

B 则使 AMPK α S485 位点活化, 并抑制肝激酶 B1 (LKB1) 的 Thr172 磷酸化, 从而减少 AMPK 的活化。但使用 INS-1 β 细胞系在研究过程中得到不同结果, 蛋白激酶 B 引起 AMPK α Ser485 位点发生磷酸化, 阻止了 LKB1Thr172 的磷酸化, 由于 AMPK-LKB1 间的级联反应而降低了 AMPK 的活性。出现这种矛盾的结果可能与使用不同的细胞系有关^[9]。王威等^[10]发现, MIN6 细胞系对血糖的调节能力优于 INS-1 细胞系。

3.3 在糖尿病发病机制研究中的应用

3.3.1 1 型糖尿病 1 型糖尿病是一种具有严重炎症反应的慢性自身免疫性疾病, 由于胰岛 β 细胞大量破坏引起胰岛素分泌不足, 导致机体糖代谢紊乱^[11]。通过对 MIN6 细胞系的进一步研究发现, miR-146、miR-21、miR-34a 在白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 等诱导的 β 细胞功能衰竭中有重要作用, 而 miR-34、miR-146a 能保护 MIN6 细胞免受细胞因子诱发的死亡, 提示微小 RNA 异常可能引起自身免疫反应, 从而导致 1 型糖尿病^[12]。曹朝晖等^[13]的研究认为, caspase-3 激活与 MIN6 细胞凋亡有关, 炎症反应因子可能通过激活凋亡相关蛋白诱导细胞的凋亡, 这其中可能涉及细胞凋亡的线粒体途径和死亡受体途径的信号转导。以 MIN6 细胞系为例, 对 1 型糖尿病的发生有一定的意义。

3.3.2 2 型糖尿病 代谢综合征是 2 型糖尿病的高危因素之一, Ding 等^[14]通过对 MIN6 细胞系的研究发现, 木犀草素可以通过核因子- κ B-诱导型一氧化氮合酶-一氧化氮途径调节转录因子 MafA 的表达, 而该途径是高尿酸作用于胰岛 β 细胞的关键, 由此降低高尿酸相关性代谢综合征的发生几率, 进而降低高尿酸相关性糖尿病的风险。硫化壳寡糖可以对抗过氧化氢对 MIN6 细胞系的损害, 其机制可能是增强了抗氧化酶的活性, 并抑制胞内活性氧簇产生^[15]。生理条件下, 自噬主要受外源性营养物质的调节, 当机体处于饥饿状态时, 自噬活性增加。同时, 自噬也是机体消除错误折叠的大分子、衰老及失能的细胞器的一种途径。自噬与 2 型糖尿病有潜在的关系, 作为机体防御机制可清除失能细胞器导致的氧化应激和内质网应激^[16]。胰岛素能抑制自噬, 通过激活 mTOR 依赖性信号通路, 与靶细胞表面胰岛素受体结合诱导自身磷酸化, 最终使 ULK1-Atg13-FIP200 复合体失去活性, 从而抑制自噬^[17-18]。而 2 型糖尿病患者由于胰岛素抵抗, 相关作用减弱, 最终导致细胞自噬增强。杜世春等^[19]发现, 晚期糖基化终末产物可以抑制 MIN6 细胞活力, 并使细胞内活

性氧簇的生成增加,诱导 MIN6 细胞氧化应激,从而影响胰岛素分泌。

RIP140 是代谢性核受体辅助因子家族中的一员,主要作为抑制因子调控肝脏、肌肉及脂肪中的糖、脂代谢。2 型糖尿病患者外周血单核细胞中 RIP140 的表达较正常明显升高。敲除小鼠 RIP140 基因能改善高脂饮食条件下的胰岛素抵抗、增加胰岛素刺激时的糖摄取,同时还可以抑制年龄和饮食诱导的糖耐量异常的发生。下调 RIP140 表达能够通过上调能量消耗相关基因来改善细胞内氧化应激水平。薛君力等^[20]通过利用 H₂O₂ 建立了 MIN6 细胞的氧化应激损伤模型,并利用 RNA 干扰下调 MIN6 细胞中的 RIP140 表达,观察到以 RIP140 为靶点可以调控 β 细胞损伤。

3.3.2.1 β 细胞胰岛素分泌 β 细胞分泌胰岛素是一个双相的过程。第一时相发生较快,在血糖变化后 10 min 之内,分泌高峰在 1~2 min。第二时相出现较晚,但持续时间较长,峰值在 25~30 min。2 型糖尿病患者最初第一时相受损,但保留了第二时相的功能。故是否存在第一时相的损害是预测 1 型和 2 型糖尿病风险的因素之一。通过对 MIN6 细胞的观察,多次传代的 MIN6 细胞形态不均匀,失去了第一时相功能,GSIS 完全受损,胞内 ATP 明显减少,葡萄糖吸收、氧化和脂质氧化也减少,糖酵解基因和脂质处理基因包括 Srebp1c 表达降低,导致 Sirt3 和 Nampt 基因表达降低,乳酸含量减少,一些脂类合成基因也出现了低表达,包括重要的转录因子 Srebp1c。这也使得 GLUT1 明显下降,GLUT2 也有下降的趋势。已知 ATP/ADP 比值上调是 β 细胞释放胰岛素所必须的,其可能会通过提高吸收葡萄糖并氧化来提高 ATP^[4]。

3.3.2.2 游离脂肪酸(FFA)的毒性作用 FFA 对 β 细胞有细胞毒性作用。高水平 FFA 可以导致内质网的钙离子耗尽,而 β 细胞需要钙离子的储备。故 β 细胞对内质网应激非常敏感,钙离子缺乏会诱导其凋亡。棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡与尿酸相关性代谢综合征内质网应激有关。脂肪酸可以激活 G 蛋白耦联受体 40 (GPR40),提高胞内游离钙离子,并可以促进 GSIS。持续高水平的 FFA 使 β 细胞受到破坏,并可能通过 GPR40 导致胞内钙离子功能紊乱。GPR40 基因敲除小鼠在高脂饮食条件下对肝脂肪变性、高甘油三酯血症和其他一些糖尿病相关性疾病有抵抗,GPR40 过度表达可以导致小鼠出现糖尿病表型。实验证明饱和脂肪酸如棕榈酸可导致 β 细胞凋亡,而 GPR40 拮抗剂 DC260126 在 48 h

内可以呈剂量依赖方式保护 MIN6 细胞避免被诱导凋亡。提示 GPR40 参与了棕榈酸诱导的 MIN6 细胞凋亡^[21]。人类白血病相关基因 16 可以调节 MIN6 细胞系的胰岛素分泌和 GSIS,其过表达还可以加强 MIN6 细胞系对脂毒性的抗凋亡作用,而 ghrelin 则可以通过磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 途径对 MIN6 细胞系起到相同的作用^[22-23]。

3.4 胰腺移植后排斥 雷帕霉素(西罗莫司)是一种胰腺移植术后常用的免疫抑制剂,但是长期使用这种药物的患者胰岛细胞功能和活力会受损。对胰腺移植失败的患者进行尸检,没有发现移植的胰腺发生了自身免疫或同种免疫性损害,提示移植失败是由非免疫性因素所导致的,如药物毒性。对 MIN6 细胞的实验结果表明,雷帕霉素的药理作用是通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)完成的,mTOR 存在两个配体,mTORC1 和 mTORC2。mTORC1 对雷帕霉素高度敏感,而 mTORC2 则不敏感。研究发现,雷帕霉素对 MIN6 细胞系的功能及寿命均有有害影响。链唑霉素可以诱导 β 细胞出现细胞凋亡,蛋白激酶 B 通过介导胰岛素的抗凋亡因子如胰岛素样生长因子-1 和胰高血糖素样肽-1,保护了 β 细胞。蛋白激酶 B α 基因敲除的小鼠出现 β 细胞数量下降,而蛋白激酶 B β 基因敲除小鼠出现 β 细胞质量下降,两者都可导致凋亡增加^[24]。提示雷帕霉素引起的损害是由 mTOR2 抑制介导的。

综上所述,MIN6 细胞系是从小鼠胰腺肿瘤细胞得到的一个细胞系,其来源于胰岛 β 细胞,与胰腺组织功能上较为相近,是研究胰腺功能的较好的一种细胞系,在糖尿病研究等领域有着较为广泛的应用。

参 考 文 献

- [1] 郑倩,刘华,曹弟勇,等. 虫草菌丝对 IL-1 β 诱导 MIN6 细胞凋亡的保护作用与机制的实验研究[J]. 川北医学院学报, 2014, 29(5): 416-420. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-3697. 2014. 05. 01
- [2] Nakashima K, Kanda Y, Hirokawa Y, et al. MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones[J]. Endocr J, 2009, 56(1): 45-53.
- [3] Evans SA, Doblado M, Chi MM, et al. Facilitative glucose transporter 9 expression affects glucose sensing in pancreatic beta-cells[J]. Endocrinology, 2009, 150(12): 5302-5310. DOI: 10. 1210/en. 2009-0747.
- [4] Cheng K, Delghingaro-Augusto V, Nolan CJ, et al. High passage MIN6 cells have impaired insulin secretion with impaired glucose and lipid oxidation[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40868. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0040868.
- [5] Yamato E, Tashiro F, Miyazaki J. Microarray analysis of novel candidate genes responsible for glucose-stimulated insulin secretion in mouse pancreatic β cell line MIN6[J]. PLoS One, 8

- (4):e61211. DOI:10.1371/journal.pone.0061211.
- [6] Nakashima K, Shimoda M, Hamamoto S, et al. Self-inducible secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) that allows MIN6 cells to maintain insulin secretion and insure cell survival [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 349 (2): 281-288. DOI: 10.1016/j.mce.2011.11.008.
- [7] Oya M, Suzuki H, Watanabe Y, et al. Amino acid taste receptor regulates insulin secretion in pancreatic β -cell line MIN6 cells [J]. Genes Cells, 2011, 16(5): 608-616. DOI:10.1111/j.1365-2443.2011.01509.x.
- [8] Djouder N, Tuerk RD, Suter M, et al. PKA phosphorylates and inactivates AMPK α to promote efficient lipolysis [J]. EMBO J, 2010, 29(2): 469-481. DOI:10.1038/emboj.2009.339.
- [9] Garcia-Haro L, Garcia-Gimeno MA, Neumann D, et al. Glucose-dependent regulation of AMP-activated protein kinase in MIN6 beta cells is not affected by the protein kinase A pathway [J]. FEBS Lett, 2012, 586(23): 4241-4247. DOI:10.1016/j.febslet.2012.10.032.
- [10] 王威, 张丹, 陈颖, 等. 胰岛 β 细胞株 INS-1 和 MIN6 有关糖毒性的比较研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(13): 1940-1942.
- [11] Kang S, Park EJ, Joe Y, et al. Systemic delivery of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) elevates levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice [J]. Endocrinology, 2010, 151(12): 5638-5646. DOI: 10.1210/en.2009-0478.
- [12] Roggli E, Britan A, Gattesco S, et al. Involvement of microRNAs in the cytotoxic effects exerted by proinflammatory cytokines on pancreatic beta-cells [J]. Diabetes, 2010, 59(4): 978-986. DOI: 10.2337/db09-0881.
- [13] 曹朝晖, 覃剑, 董世办, 等. IFN- γ 和 TNF- α 联合对 MIN6 细胞 caspase-3 活化的影响 [J]. 免疫学杂志, 2014, 30(1): 17-20. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20140004.
- [14] Ding Y, Shi X, Shuai X, et al. Luteolin prevents uric acid-induced pancreatic β -cell dysfunction [J]. J Biomed Res, 2014, 28(4): 292-298. DOI: 10.7555/JBR.28.20130170.
- [15] Lu X, Guo H, Zhang Y. Protective effects of sulfated chitoooligosaccharides against hydrogen peroxide-induced damage in MIN6 cells [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50(1): 50-58. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.09.020.
- [16] Jing K, Lim K. Why is autophagy important in human diseases [J]. Exp Mol Med, 2012, 44(2): 69-72. DOI: 10.3858/emmm.2012.44.2.028.
- [17] Chen YY, Sun LQ, Wang BA, et al. Palmitate induces autophagy in pancreatic β -cells via endoplasmic reticulum stress and its downstream JNK pathway [J]. Int J Mol Med, 2013, 32(6): 1401-1406. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1530.
- [18] Bachar-Wikstrom E, Wikstrom JD, Kaiser N, et al. Improvement of ER stress-induced diabetes by stimulating autophagy [J]. Autophagy, 2013, 9(4): 626-628. DOI:10.4161/auto.23642.
- [19] 杜世春, 林宁, 葛勤敏, 等. 糖化终末产物对 MIN6 细胞活力及活性氧 (ROS) 水平的影响 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2011, 27(2): 152-154.
- [20] 薛君力, 邓浩华, 曾娇娥, 等. RIP140 在 H₂O₂ 诱导 MIN6 细胞损伤中的作用机制研究 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(6): 516-519. DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2014.06.017.
- [21] Wu J, Sun P, Zhang X, et al. Inhibition of GPR40 protects MIN6 β cells from palmitate-induced ER stress and apoptosis [J]. J Cell Biochem, 2012, 113(4): 1152-1158. DOI:10.1002/jcb.23450.
- [22] Li XJ, Guo QH, Wang X, et al. LRP16 gene protects mouse insulinoma MIN6 cells against fatty acid-induced apoptosis through Akt/FoxO1 signaling [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(10): 1695-1702.
- [23] Wang W, Zhang D, Zhao H, et al. Ghrelin inhibits cell apoptosis induced by lipotoxicity in pancreatic beta-cell line [J]. Regul Pept, 2010, 161(1-3): 43-50. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.12.017.
- [24] Barlow AD, Xie J, Moore CE, et al. Rapamycin toxicity in MIN6 cells and rat and human islets is mediated by the inhibition of mTOR complex 2 (mTORC2) [J]. Diabetologia, 2012, 55(5): 1355-1365. DOI: 10.1007/s00125-012-2475-7.

(收稿日期:2015-05-27)

• 消息 •

2016 年《国际内分泌代谢杂志》征稿暨征订启事

《国际内分泌代谢杂志》原刊名《国外医学内分泌学分册》，是由中华人民共和国国家卫生与计划生育委员会主管，中华医学会、天津医科大学主办的国内、外公开发行的国家级医学学术期刊，是中华医学会系列杂志之一。本刊为中文科技核心期刊。主要栏目设有述评、专家论坛、临床热点话题、综述、论著、报道与交流、临床病例讨论、争鸣园地、短篇报道、新药介绍、网上快讯、会议精粹等。

除综述类文章，本刊还欢迎具有独创性和包含重大研究成果的论著文章。已在国外核心期刊发表的研究成果可以中文形式在本刊二次发表，以促进国内研究人员对该研究工作的深入了解。另外，如果您有内分泌方面的常见但易于误诊、误治或疑难、罕见病例，也欢迎您投稿。

《国际内分泌代谢杂志》中国标准连续出版物号: CN 12-1383/R, ISSN 1673-4157。

本杂志印刷版为大 16 开 72 页，双月刊，逢单月 20 日出版，每册定价 12 元，全年 6 期，共计 72 元。国外代号: W 86。国内邮发代号: 6-53，全国邮局均可订阅，也可直接向编辑部订阅。

地址: 300070 天津市和平区气象台路 22 号天津医科大学院内《国际内分泌代谢杂志》编辑部

电话: 022-83336730 022-83336731

本刊编辑部