

### 壳寡糖及其配合物对胰岛细胞增殖、胰岛素分泌的促进作用\*

刘 冰1,秦贞奎1,林祥梅1,梅 琳1,刘万顺2,韩宝芹2

## Promotion effect of chitooligosaccharides and its derivatives on pancreatic islet cells proliferation and insulin secretion

Liu Bing<sup>1</sup>, Qin Zhen-kui<sup>1</sup>, Lin Xiang-mei<sup>1</sup>, Mei Lin<sup>1</sup>, Liu Wan-shun<sup>2</sup>, Han Bao-qin<sup>2</sup>

#### Abstract

**BACKGROUND:** The coordination compound of chitooligosaccharides and microelement possess both biological activities of chitooligosaccharides and microelement, which have a considerable potential to be utilized in prevention and treatment of diabetes and its complications.

**OBJECTIVE:** To detect the effect of chitooligosaccharides and its Cr, VO, Se derivatives on the pancreatic islet cells proliferation and insulin secretion.

**DESIGN, TIME AND SETTING:** The comparative observation was performed at the Biochemistry Laboratory of Ocean University of China from July to September 2008.

**MATERIALS:** Chitooligosaccharides and its derivatives were prepared at the Biochemistry Laboratory of Ocean University of China. SV40-transformed cell line (NIT-1) was provided by Medicine Institute of Ocean University of China.

**METHODS:** NIT-1 was inoculated into 96-well plate, 100 mg/L chitooligosaccharides and its derivatives were cultured, and the culture medium without chitooligosaccharides was served as the control group. MTT assay was used to detect the cell growth curve at hours 24, 48, 72, 120, 168, 216, respectively. NIT-1 was inoculated into 24-well plate, 100 mg/L chitooligosaccharides and its derivatives were cultured, and the culture medium without chitooligosaccharides was served as the control group. The radioimmunoassay method was used to measure the insulin concentration at the days 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, respectively. Meanwhile, at the days 6, stimulated insulin release test was performed to determine insulin secretion and calculate stimulation index.

**MAIN OUTCOME MEASURES:** Promotion effect of chitooligosaccharides and its derivatives on pancreatic islet cells proliferation and insulin secretion was observed.

**RESULTS:** The results indicated that chitooligosaccharides and its Cr, Se derivatives could effectively accelerate the proliferation of the pancreatic cells at the mass concentration of 100 mg/L at the 48 hours, and cells reach a stationary phase at the 120 hours. Chitooligosaccharides and its Cr derivatives group had the ultimate cell density and higher activity than other groups. The insulin secretion of chitooligosaccharides and its Cr, VO, Se derivatives groups was higher than the control group at the 10 days (P < 0.05), especially significant in chitooligosaccharides group. At days 6, the stimulation index of chitooligosaccharides and its Cr, VO, Se derivatives groups was higher than the control group (P < 0.05).

**CONCLUSION:** Chitooligosaccharides and its derivatives possess obvious promotion effect on the pancreatic islet cells *in vitro* proliferation as well as insulin secretion of pancreatic cells.

Liu B, Qin ZK, Lin XM, Mei L, Liu WS, Han BQ.Promotion effect of chitooligosaccharides and its derivatives on pancreatic islet cells proliferation and insulin secretion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2009;13(3): 513-516(China) [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

#### 摘要

背景:壳寡糖与有益于糖尿病治疗的微量元素形成配合物兼备了壳寡糖及微量元素的各种特性,很有可能在糖尿病及其并 发症预防与治疗的研究方面取得新的进展。

目的:观察壳寡糖及其铬、钒、硒配合物对胰岛 细胞系 NIT-1 的促增殖及促胰岛素分泌作用。

设计、时间及地点:对比观察实验,于 2008-07/09 在中国海洋大学生物化学实验室完成。

材料: 売寡糖及其铬、钒、硒配合物由中国海洋大学生物化学实验室制备;转基因小鼠胰岛 细胞系 NIT-1 细胞株由中国海洋大学药物所提供。

方法: 胰岛 细胞系 NIT-1 细胞株接种于 96 孔板中,实验组加入 100 mg/L 壳寡糖及其配合物的培养液培养,并设加入不含样品的培养液作为对照组,分别在加样后 24,48,72,120,168,216 h 取出,MTT 法测定细胞生长曲线。 胰岛细胞系 NIT-1 细胞株接种于 24 孔培养板中,实验组加入 100 mg/L 壳寡糖及其配合物的培养液,并设加入不含样品的培养液作为对照组,分别在加样后 2,4,6,8,10,12,14 d 取出,用放射免疫法测定培养液中的胰岛素含量。同时在培养6 d 后进行胰岛素刺激释放试验,测定胰岛素释放量,计算刺激指数。

主要观察指标:壳寡糖及其配合物对胰岛细胞促增殖作用及促胰岛素分泌作用。

结果: 売寡糖及铬、硒配合物最适质量浓度为 100 mg/L,对胰岛 细胞有明显的增殖作用。壳寡糖铬、硒配合物在 48 h 促胰岛 细胞增殖明显,且在 120 h 细胞进入生长平台期,壳寡糖铬配合物组细胞密度达到最大,活力高于其他组。壳寡糖及其铬、钒、硒配合物组在第 10 天胰岛素释放量均高于对照组(P<0.05),壳寡糖组促胰岛素分泌作用最为显著。培养第 6 天壳寡糖及其铬、钒、硒配合物组胰岛素刺激指数均高于对照组(P<0.05)。

结论:壳寡糖及其配合物对于胰岛 细胞体外增殖具有明显的促进作用,并可以显著促进胰岛 细胞的胰岛素分泌。 关键词:壳寡糖;糖尿病大鼠;2 h 血糖;糖耐量试验;胰岛细胞;链脲佐菌素

刘冰,秦贞奎,林祥梅,梅琳,刘万顺,韩宝芹.壳寡糖及其配合物对胰岛细胞增殖、胰岛素分泌的促进作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(3):513-516 [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China; <sup>2</sup>College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003,

Liu Bing , Doctor, Associate researcher, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China Iceicecream1221@ 126.com

Correspondence to: Qin Zhen-kui, Doctor, Researcher, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China qinzk1948@126.com

Supported by: the National Scientific Research-related Foundation of China, No.2008JK007\*

Received: 2008-10-13 Accepted: 2009-01-09

<sup>1</sup>中国检验检疫科学研究院,北京市 100025; <sup>2</sup>中国海 洋大学生命学院, 山东省青岛市 266003

通讯作者:秦贞奎,博士,研究员,中国检验检疫科学研究院,北京市100025 qinzk1948@126.com

国家科研院所基本科研业务费资 助 项 目 (2008JK007)\*

中图分类号:R318 文献标识码:B 文章编号:1673-8225 (2009)03-00513-04

收稿日期: 2008-10-13 修回日期: 2009-01-09 (20081119012/M·Z)



#### 0 引言

壳寡糖(chitooligosaccharides,COS)不仅具有和壳聚糖一些相似的性质,而且一些生理活性或功能性质更加显著<sup>[1-8]</sup>,如提高机体免疫、抗肿瘤、降血脂、降血糖、促进双歧杆菌生长、作为植物调节物质、清除超氧阴离子自由基、羟自由基,降低丙二醛水平等作用。实验以转基因小鼠的胰岛 细胞系NIT-1细胞株为研究对象,从细胞水平研究了壳寡糖及其配合物促胰岛 细胞增殖和胰岛素分泌的作用。

#### 1 材料和方法

设计:对比观察实验。

时间及地点:于2008-07/09在中国海洋大学生物化学实验室完成。

材料: 売寡糖及其铬、钒、硒配合物(分别以COS, COS-Cr, COS-VO, COS-Se表示, 钒、硒、铬含量分别为579, 1835, 1192 mg/kg, 中国海洋大学生物化学实验室制备), 在细胞培养时用相应培养基溶解, 0.22 μm过滤除菌,并稀释到相应浓度;转基因小鼠胰岛 细胞系NIT-1细胞株由中国海洋大学药物所提供。

实验试剂及仪器	来源
型胶原酶、MTT	美国 Sigma 公司
Ficoll 400	美国 Pharmacia 公司
FMJ-182 放射免疫 计数器	上海原子核研究所
酶标仪	英国 Thermo Labsystems
胰岛素放射免疫分析测试盒	北京原子能研究所

#### 实验方法:

克寡糖配合物的制备、纯化及其结构表征: 10%的壳寡糖溶液 ( D.D. = 90% ,  $M_w$  = 1200 ),按一定摩尔比加入  $CrCl_3$ 、 $VOSO_4$ 、 $Na_2SeO_3$ 溶液,分别在45 , 30 , 45 下反应6 h。乙醇/ 丙酮(1 1)沉淀,无水乙醇洗涤,40 真空干燥。称取适量配合物样品,溶解于三蒸水中,Sephadex G-25分离纯化,收集主峰后冷冻干燥,得到配合物纯品SUGAR-KS-802柱分析纯度,并测定其相对分子质量、脱乙酰度及铬、钒、硒含量等理化性质。采用 KBr 压片法,FT/IF红外光谱仪在4000~400 cm $^{-1}$ 范围内扫描确证了壳寡糖配合物的结合形式。

克寡糖及其配合物对胰岛 细胞株的促增殖作用:胰岛 细胞株NIT-1用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM 培养液培养,在培养瓶中长满至单层后,2.5 g/L胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,以5.0×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>的浓度接种于96孔板中,每孔加100 μ L,并设不含细胞的空白调零孔,在体积分数为5%CO<sub>2</sub>,37 ,饱和湿度的恒温培养箱中培养24 h后,吸弃原培养液,换成每孔100 μ L无血清

培养液,同步化24 h。之后换成含不同质量浓度COS的培养液(10,100,1000 mg/L),每个浓度设置3个平行孔,培养48 h后倒置显微镜100倍下拍片观察。然后每孔加入5 mg/L的MTT 20 μ L,常规孵育4 h。吸弃培养液,每孔加入100 μ L二甲基亚砜,振荡10 min,使结晶物溶解充分均匀,用酶标仪492 nm处比色,测其各自的光吸收值,计算细胞增殖率,实验结果重复3次。

胰岛 细胞接种于96孔板方法同上,同时实验组加入最适浓度壳寡糖及其配合物的培养液后,在体积分数为5%CO<sub>2</sub>,37 ,饱和湿度的恒温培养箱中培养,并设加入不含样品的培养液作为对照组,分别在加样后24,48,72,120,168,216 h取出,MTT法于酶标仪上492 nm测光吸收值,记录结果,绘制细胞生长曲线。

壳寡糖及其配合物对胰岛细胞的促胰岛素分泌作用:胰岛 细胞接种于24孔培养板中方法同上,每孔加1.0 mL,置体积分数为5%CO<sub>2</sub>,37 ,饱和湿度培养箱中培养,24 h细胞贴壁后,吸去培养板中的培养液,实验组加入最适浓度壳寡糖及其配合物的培养液,并设加入不含样品的1640培养液作为对照组,对照组和实验组均设5个平行孔,分别在加样后2,4,6,8,10,12,14 d取出,用放射免疫法测定培养液中的胰岛素水平,记录结果,绘制壳寡糖促胰岛素分泌作用曲线。同时在培养6 d后进行胰岛素刺激释放试验,吸出培养基,将培养细胞用Hank 's液洗净,先后置于含5.6 mmol/L,16.7 mmol/L葡萄糖的培养液中,37 各孵育2 h,取培养液的上清液测定胰岛素释放量,并计算刺激指数。

主要观察指标:売寡糖配合物的结构表征,MTT法测定胰岛细胞促增殖作用,放射免疫法测定胰岛素促分泌作用。

设计、实施、评估者:此课题由第一、二、五作者设计,第一、五作者负责资料收集,研究过程由第三、四、六作者操作完成,研究所用新试剂及分析工具由第六作者提供,数据分析和评估采用双盲法,由第一、四作者完成,论文写作由第一、二、五作者完成。

统计学分析:全部资料用x±s表示,采用SPSS 11.0 软件One-Way ANOVA过程进行多组样本均数的比较,组间比较采用Duncan's法,显著性界值分别设定为0.05,0.01。

#### 2 结果

2.1 壳寨糖及其配合物理化性质 克寡糖及其铬、钒、硒配合物分离纯化后,纯品分别为白色、墨绿色、棕褐色、黄色粉末,易溶于水、稀酸及稀碱溶液,微溶于甲醇、乙醇,难溶于丙酮、乙醚、石油醚及氯仿等溶剂。含水分10%,灰分0.7%,钒、硒、铬含量分别为579,1835,1192 mg/kg。由壳寡糖红外光谱数据对比可以看出,当壳寡糖与各金属离子配位后,各特征吸收峰发

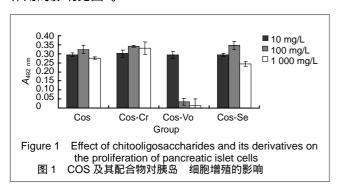


生明显的位移或消失。三价铬离子、氧钒离子、亚硒酸根是连接在 $C_2$ 的氨基和 $C_6$ 的伯羟基上。见表1。

表 1 Table 1	売寡糖及其金属配合物的红外光谱数据 IR spectra of chitooligosaccharide and its derivatives (cm <sup>-1</sup> )							
Group	N-H+O-F	I C-H	C=O	NH	С-Н	C-N	asC-O	
cos	3 432.8	2 921.2	1 735.6	636.51	384.0	1 265.1	1 075.4	
COS-Cr	3 420.8	2 929.4	- '	634.31	383.9	1 251.6	1 074.3	
COS-Vo	3 422.8	2 935.2	- '	633.11	384.1	-	1 089.7	
COS-Se	3421.4	2 937.1	- '	649.21	383.9	-	1 074.7	
COS: chite	ooligosacch	narides						

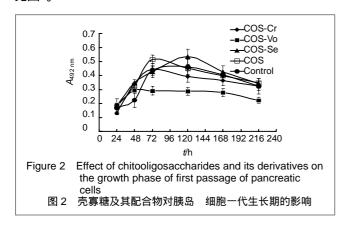
# 2.2 壳寡糖及其配合物对胰岛β细胞株的促增殖及胰岛素分泌的作用

MTT法检测壳寡糖及其配合物对胰岛 细胞的促增殖作用:不同质量浓度壳寡糖及其配合物对胰岛 细胞增殖作用的影响见图1。



COS、COS-Cr和COS-Se对胰岛 细胞增殖作用的最适浓度均为100 mg/L。细胞相对增殖率分别为143.49%、151.71%、153.54%,COS-Cr和COS-Se促增殖作用均好于没有配位的COS(P<0.05)。COS-VO浓度低于10 mg/L,细胞存活未受明显影响,细胞生长状态良好。

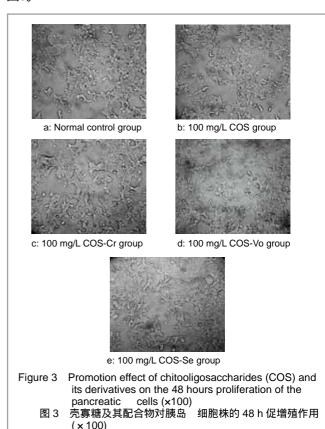
売寡糖及其配合物売寡糖对胰岛 细胞一代生长期的影响 见图2。



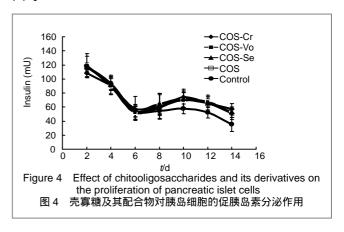
COS、COS-Cr和COS-Se在最适浓度100 mg/L时对胰岛 细胞有明显的增殖作用。COS-Cr与COS-Se在48 h促胰岛 细胞增殖明显,且在120 h细胞进入生长平台期,COS-Se组细胞密度达到最大,活力高于其他组。

当COS-VO浓度低于10 mg/L,细胞存活未受明显影响。

売寡糖及其配合物对胰岛 细胞生长状态的影响:经壳寡糖及其配合物刺激生长48 h后,继续观察胰岛 细胞的生长状态,发现细胞集落情况明显比对照组的密集、胞浆丰富、胞体透明、细胞及核膜界限清晰、状态良好,其中壳寡糖铬、硒的配合物作用要好于没有配位的壳寡糖组。见图3。



壳寡糖及其配合物对胰岛细胞的促胰岛素分泌作用:见 图4。



6 d以后实验组与对照组相比较,胰岛素释放量逐渐增高。在第10天时,实验组与对照组差异最为明显, 売寡糖及其铬、钒、硒配合物组在第10天胰岛素释放量 与对照组比较差异均有显著性意义(P < 0.05), COS 组促胰岛素分泌作用最为显著。



克寡糖及其配合物组培养第6天的胰岛细胞葡萄糖刺激实验显示:16.7 mmol/L葡萄糖孵育的各组胰岛细胞,其胰岛素释放量均大于2.8 mmol/L葡萄糖孵育的胰岛细胞2.5倍以上。未配位的COS组胰岛素刺激指数最高,为2.94倍,COS-Cr组为2.71倍,COS-VO组为2.62倍,COS-Se组为2.54倍,与对照组(2.01倍)比较差异均有显著性意义(P<0.05)

### 3 讨论

3.1 壳寡糖配合物的制备 壳寡糖的分子中有-NH<sub>2</sub>、 -OH和-NHCO-活性基团, 当壳寡糖与各金属离子配位后, 各特征吸收峰会发生明显的位移或消失。与壳寡糖红外光 谱数据可以看出,三价铬离子、氧钒离子、亚硒酸根是连 接在C2的氨基和C6的伯羟基上,主要是因为有以下的光谱 图形和光谱数据变化得到证明:位于3 432.8 cm<sup>-1</sup>的N-H, O-H的吸收峰分别向低频移动到3 420.8, 3 422.4, 3 421.4 cm-1, 说明-NH2和-OH参与了反应; 位于 1 636.5 cm<sup>-1</sup>的 N-H吸收峰反应后分别移动到1 634.3, 1 633.1 , 1 649.2 cm<sup>-1</sup> , 尤其与硒 ( ) 配位后向高频位 移了14 cm<sup>-1</sup>左右,进一步说明-NH<sub>2</sub>参与了配位反应;说 明壳寡糖分子中的氨基参与了反应。位于1 735.6 cm-1处 的乙酰氨基吸收峰,形成配合物后该峰消失,且位于 1 384.0 cm<sup>-1</sup>处的乙酰基的 C-H 吸收峰和位于 1 321 cm<sup>-1</sup>处的 C-N吸收峰都发生一定位移和消失,说 明壳寡糖分子中的乙酰氨基参与了配位反应;反应后, 位于1 100~1 030 cm-1处的宽吸收峰明显变尖,位于 1 075.4 cm<sup>-1</sup>处表征伯羟基的吸收峰有一定的位移,分别 移动到1 074.3 , 1 074.7和1 089.7 cm<sup>-1</sup> , 这说明壳寡糖 分子中伯羟基参与了反应,其中COS-Cr和COS-V吸收峰 位置无明显变化,说明伯羟基的配位作用不强;而且反应 以后,分别在563.0,618.7,和742.2 cm<sup>-1</sup>出现了新的吸 收峰,说明Cr,V,Se没有与C直接相连;另外,3种产 物都在1 523.5, 1 524.0和1 457.9 cm<sup>-1</sup>处出现了-NH<sup>3+</sup>变 形的振动峰说明在C2氨基上发生了成盐反应。由红外数据 可知,在C2的-NH2发生了成盐反应,在C6的伯羟基上发 生了酯化反应。通过红外光谱测定及分析,确定了壳寡糖 可做配体的可能性,证明壳寡糖的水溶液可与Cr3+、VO2+、 SeO3<sup>2</sup>生成稳定的配合物,通过微量元素与壳寡糖配合物 的制备,可实现给机体补微量元素与补寡糖合为一体成为 可能,且壳寡糖与微量元素配合后,具有更强的生理活性。 3.2 壳寡糖及其配合物对胰岛β细胞的作用 研究结 果表明,不同浓度的COS-Cr和COS-Se对胰岛 细胞生 长均有显著的促进作用。在高浓度的情况下对细胞促生 长均有抑制作用。可能因为,高浓度的情况下培养液的渗 透压有变化,使得细胞的生长环境受到影响。COS、

COS-Cr和COS-Se对胰岛 细胞增殖作用的最适浓度 均为100 mg/L。当COS-Cr浓度为100 mg/L,细胞相对增殖率为151.71%; COS-Se浓度为100 mg/L,细胞相对增殖率为153.54%,均好于没有配位的COS,说明Cr与Se元素与COS的配位结合,对胰岛 细胞的增殖有促进作用。当COS-VO浓度低于10 mg/L,细胞存活未受明显影响,细胞生长状态良好。壳寡糖的铬、钒、硒配合物促胰岛素分泌作用显著,其胰岛素释放量均大于2.8 mmol/L葡萄糖孵育的胰岛细胞2.5倍以上,均好于没有配位的COS,当COS-VO浓度低于10 mg/L,细胞存活未受明显影响,细胞生长状态良好。

#### 4 参考文献

- Lin W, Hu X, Zhang W, et al. Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. J Plant Physiol. 2005;162(8):937-944.
- [2] Je JY, Park PJ, Kim SK. Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. Food Chem Toxicol. 2004;42(3):381-387.
- [3] Lee SH, Suh JS, Kim HS,et al. MR evaluation of radiation synovectomy of the knee by means of intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex in patients with rheumatoid arthritis: results at 4-month follow-up. Korean J Radiol. 2003;4(3):170-178.
- [4] Park PJ, Je JY, Kim SK. Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. J Agric Food Chem. 2003;51(16):4624-4627.
- [5] Park PJ, Je JY, Kim SK. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. J Agric Food Chem. 2003;51(17):4930-4934.
- [6] Liu B, Liu WS, Han BQ, et al. Antidiabetic effects of chitooligosaccharides on pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats. World J Gastroenterol. 2007;13(5):725-731.
- [7] Liu B, Liu WS, Han BQ, et al. Gaojishu Tongxun. 2007;17(9):968-973. 刘冰,刘万顺,韩宝芹,等. 壳寡糖对胰岛 细胞的保护及其体内抗氧化作用的研究[J]. 高技术通讯, 2007, 17(9):968-973.
- [8] Liu B, Liu WS, Han BQ. Tongji Daxue Xuebao. 2006;27(6):6-11.刘冰,刘万顺,韩宝芹. 壳寡糖促胰岛细胞增殖、胰岛素分泌及调节餐后血糖作用的研究[J]. 同济大学学报,2006,27(6):6-11.

#### 来自本文课题的更多信息--

课题背景:课题受国家科研院所基本科研业务费项目 (2008JK007)资助。微量元素对人体细胞代谢、生物合成和生命功能的维持起重要作用,部分微量元素在体内作为某些酶、激素的组成成分,直接参与细胞代谢过程。三价铬、硒、钒微量元素能影响胰腺的分泌功能并提高组织胰岛素的敏感性,参与糖尿病的改善。壳寨糖水溶性好与离子易螯合,这使得壳寨糖成为一类新的天然高分子螯合剂。课题组合成制备各种壳寨糖基铬、钒、硒配合物,从细胞水平对新化合物的作用机制进行了研究,对糖尿病及其并发症的预防与治疗将会产生积权的意义。

偏倚或不足:体外实验观察了壳寨糖及其铬、钒、硒配合物对胰岛β细胞的促增殖及胰岛素分泌作用。而对于壳寨糖配合物在体内降低糖尿病大鼠的血糖的作用还有待于进一步的实验研究。

同行评价:实验所用的材料比较新,而且关于壳寨糖有关的研究现在较少。从文章结果看,壳寨糖及其配合物对于胰岛β细胞体外增殖具有明显的促进作用,并可以显著促进胰岛β细胞的胰岛素分泌,有可能在糖尿病及其并发症预防与治疗的研究方面取得新的进展。