

维生素 C-磷脂复合体抑制 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞氧化应激的研究

齐策^{1,2}, 金青哲¹, 王兴国¹

1. 江南大学食品学院;食品科学与技术国家重点实验室,江苏无锡 214122
2. 中粮东海粮油工业(张家港)有限公司,江苏张家港 215633

摘要 为了比较维生素 C-磷脂复合体 (VitC-PC) 和 VitC 体外抑制小鼠腹腔巨噬细胞氧化应激的活性,本研究提取小鼠腹腔巨噬细胞,在体外培养,用沙门氏菌脂多糖 (LPS) 诱导氧化应激,分别用不同浓度 VitC 和 VitC-PC 进行处理,测定培养液一氧化氮 (NO)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA) 和细胞内诱导性 NO 合成酶 (iNOS),以评价细胞炎症反应、细胞膜完整性和脂质过氧化程度。同时静息态腹腔巨噬细胞与不同浓度的 VitC 或 VitC-PC 共孵育,测定细胞内 VitC 浓度,以评价细胞摄取 VitC 或 VitC-PC 的效率。结果发现,在高浓度添加 VitC 时,巨噬细胞摄取 VitC-PC 的效率高于 VitC ($P<0.05$),VitC-PC 抑制 LPS 诱导巨噬细胞释放 NO、发生脂质过氧化 (产生 MDA) 和细胞膜损伤 (LDH 泄露) 的效率显著高于 VitC ($P<0.05$)。因此,本研究证明 VitC-PC 比 VitC 更易进入细胞内部发挥抗氧化作用。

关键词 维生素 C-磷脂复合体;小鼠;巨噬细胞;脂多糖;氧化应激

中图分类号 TS229

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.15.002

Inhibition of LPS Induced Oxidative Stress by VitC-phosphatide Complex in Mice Peritoneal Macrophage

QI Ce^{1,2}, JIN Qingzhe¹, WANG Xingguo¹

1. State Key Laboratory of Food Science and Technology; School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China
2. COFCO Eastocean Oils & Grains Industries Zhangjiagang Co., Ltd., Zhangjiagang 215633, Jiangsu Province, China

Abstract This study makes a comparative analysis of the *in vitro* anti-oxidative effect of vitamin C (VitC) and VitC phosphate complex (VitC-PC). Mice peritoneal macrophages were prepared and incubated *in vitro*. Lipopolysaccharide (LPS) of Salmonella was used to induce the oxidative stress. The cells were treated by VitC and VitC-PC of different concentrations, respectively. Extracellular nitric oxide (NO), lactic dehydrogenase (LDH) and malonaldehyde (MDA) and intraocular inducible nitric oxide synthetase (iNOS) were determined to characterize the extent of inflammatory response, the membrane integrity and the lipid peroxidation, respectively. Untreated macrophages were also incubated with VitC or VitC-PC of different concentrations, and the intraocular VitC was measured to estimate the incorporation efficiency of VitC. The results show that the macrophage uptake of VitC-PC is more significant than that of VitC in a high concentration ($P<0.05$). VitC-PC would inhibit LPS induced macrophage release of NO, and the lipid peroxidation occurs (to generate MDA) and the cell membrane damages (to release LDH), which is more significant than VitC ($P<0.05$). It is concluded that it is easier for VitC-PC than for VitC to enter into cells and to prevent the damage of high molecules by over production of free radicals.

Keywords VitC-phosphatide complex; mice; peritoneal macrophage; LPS; oxidative stress

收稿日期: 2011-01-07; 修回日期: 2011-04-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2009AA1015050)

作者简介: 齐策, 博士研究生, 研究方向为大豆磷脂和特种油, 电子信箱: qicer@yahoo.com; 王兴国 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: E030000247S, E510200008C), 教授, 研究方向为油脂科学, 电子信箱: wxg1002@hotmail.com

0 引言

维生素 C(VitC)是重要的氧自由基清除剂,在体内以两种形式存在,即脱氢抗坏血酸(DHA)和抗坏血酸(AA)。VitC在发挥其抗病毒作用或清除细胞内自由基时,必须从细胞外体液中进入细胞内,如正常人淋巴细胞内 VitC 的浓度是血浆浓度的 50—100 倍,这种逆浓度梯度的转运主要是通过细胞膜上的转运载体将其主动转运至细胞内。VitC 主要通过钠离子依赖性 VitC 转运体(SVCT)和葡萄糖转运体(GLUT)进入细胞,胰岛素是促进 VitC 向细胞内转运的主要因子^[1]。SVCT 表达减低会影响细胞摄取 VitC 的效率^[2],在糖尿病患者,细胞外葡萄糖浓度过高,或胰岛素分泌障碍时由于葡萄糖竞争性结合摄取受体 VitC 的内化被抑制,引起成骨细胞成熟受阻,造成骨质疏松或白细胞损伤。在胰岛素依赖型的糖尿病中,脱氢抗坏血酸可能因为运输能力的降低以及葡萄糖的竞争性抑制作用而滞留在细胞外^[3]。开发提高 VitC 细胞摄取效率的方法有助于 VitC 在高血糖和胰岛素不足人群中有效发挥作用。高浓度 VitC 可抑制肠道上皮细胞 SVCT 表达,抑制 VitC 吸收^[4]。通过改变 VitC 的摄取途径可能提高 VitC 的生物效应。

卵磷脂是细胞膜的基本组成物质,与细胞膜的亲和力强。生物活性物质可以与磷脂分子一起通过电荷迁移作用而形成较为稳定的化合物或络合物。当活性物质与卵磷脂形成复合物后,卵磷脂可携带活性物质进入细胞。因此,与磷脂形成复合物可改变活性物质的理化性质,提高生物利用度,且制备方法简单,成本低廉^[5]。VitC 与磷脂形成复合物后可能改变其理化性质,提高其进入细胞的效率及活性。本课题组已成功制备了磷脂复合 VitC(VitC-PC)。本研究以小鼠腹腔巨噬细胞为模式细胞,研究 VitC-PC 的细胞摄取效率及抗氧化活性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明种雄性小鼠,购自上海斯克来实验动物有限公司。

1.2 主要试剂

VitC 购自江苏江山制药有限公司;VitC-PC 为本实验室自制;沙门氏菌脂多糖(LPS)购自上海西唐生物有限公司;RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,小牛血清购自杭州四季青生物技术公司,青霉素和链霉素购自 Gibco 公司。乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、考马斯蓝蛋白、抗坏血酸(VitC)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。其他试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 动物饲养

清洁级 4 周龄雄性昆明种小鼠 20 只,(20±2)g,饲养在清洁笼内,室温维持在(25±2)℃,小鼠自由采食,自由饮水。

1.3.2 样品制备

用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 值为 7.3)稀释磷脂 VitC-PC 冻干粉,超声作用 10min,用 RPMI-1640 配成 0.1,0.01 和

0.001mmol/L 的 VitC 溶液。

1.3.3 小鼠巨噬细胞的提取与培养

摘眼球放血,脱颈处死小鼠,75%乙醇浸泡杀菌,无菌条件下给小鼠腹腔注入 5mL 预冷 PBS,轻柔 5min,吸取腹腔渗出液后离心(1000r/min,10min),以 RPMI-1640 培养基冲洗细胞 2 次,重悬,调细胞数至 1×10⁶/mL。加入 24 孔板(1mL/孔),37℃,5%CO₂ 培养 2h,细胞贴壁后移去培养液,按照不同处理加样,每个处理设 3 个复孔。继续培养 24h。共设如下处理:① 空白对照;② LPS (10μg/mL);③ LPS (10μg/mL)+VitC (0.1mmol/L);④ LPS (10μg/mL)+VitC (0.01mmol/L);⑤ LPS (10μg/mL)+VitC (0.001mmol/L);⑥ LPS (10μg/mL)+VitC-PC (0.1mmol/L);⑦ LPS(10μg/mL)+VitC-PC (0.01mmol/L);⑧ LPS (10μg/mL)+VitC-PC (0.001mmol/L)。

在进行 VitC 摄取测定时,细胞接种于 96 孔板微孔(200μL/孔),每组设 4 个复孔。37℃,5%CO₂ 培养 2h,细胞贴壁后吸弃培养液,按照不同处理加样,继续培养 24h。处理分为:① 空白对照;② VitC (0.1mmol/L);③ VitC (0.01mmol/L);④ VitC (0.001mmol/L);⑤ VitC-PC (0.1mmol/L);⑥ VitC-PC (0.01mmol/L);⑦ VitC-PC (0.001mmol/L)。

1.3.4 NO、LDH、MDA、VitC 和 iNOS 的测定

采用南京建成公司试剂盒测定,严格按照产品要求操作。

1.3.5 细胞培养上清液或细胞内蛋白含量的测定

用考马斯亮蓝法测定^[6]。

1.3.6 数据处理

用 SPSS 10.0 采用秩和检验中的 Nemenyi 法对数据进行分析。结果采用平均值±标准偏差表示, $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 VitC 及 VitC-PC 对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞产 NO 和 iNOS 的影响

NO 是细菌及其产物刺激巨噬细胞产生的重要致氧化应激物质之一。本研究利用试剂盒法测定了腹腔巨噬细胞产生的 NO,该方法通过测定 NO 转化物(亚硝酸盐和硝酸盐)间接定量分析 NO。由图 1 和图 2 看出,经 Nemenyi 法秩和检验证实,经 LPS 诱导后,巨噬细胞释放的 NO 转化产物和细胞内 iNOS 含量显著增加($P<0.05$)。VitC 可降低 LPS 激活的巨噬细胞培养液中 NO 转化物,其作用具有剂量依赖性,较高浓度 VitC(≥ 0.01 mmol/L)作用显著($P<0.05$)。VitC-PC 也可降低 NO 转化物,其作用与剂量无关,而在低浓度(0.001mmol/L)即可发挥显著作用($P<0.05$)。VitC 和 VitC-PC 对 iNOS 活性的调节方式完全不同,主要表现在 VitC 可通过剂量依赖的方式增强 iNOS 活性,在高浓度(0.1mmol/L)时表现出统计学显著性($P<0.05$),而 VitC-PC 对 iNOS 活性的影响与剂量无关,在中剂量(0.01mmol/L)时可显著抑制 LPS 诱导的 iNOS 活性($P<0.05$)。

2.2 VitC 及 VitC-PC 对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞上清中 MDA 的影响

MDA 是脂质过氧化产物,反映细胞脂质遭受氧自由基攻

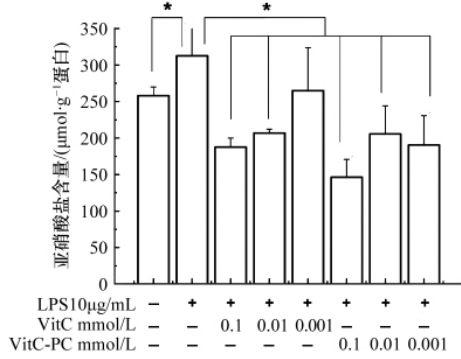


图 1 VitC 及 VitC-PC 对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞产 NO 的影响

Fig. 1 Effect of VitC and VitC-PC on release of NO from LPS induced mice peritoneal macrophages

注: * 表示差异显著, $P < 0.05$ 。以下同。

Note: * indicates significance at 0.05 probability level. The same is true for the following figures.

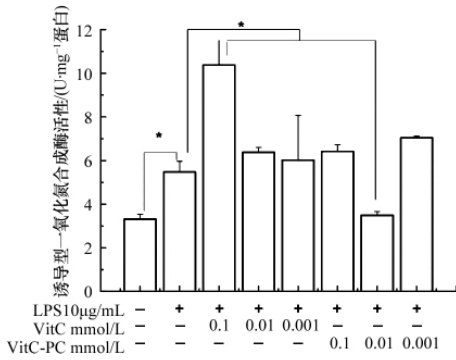


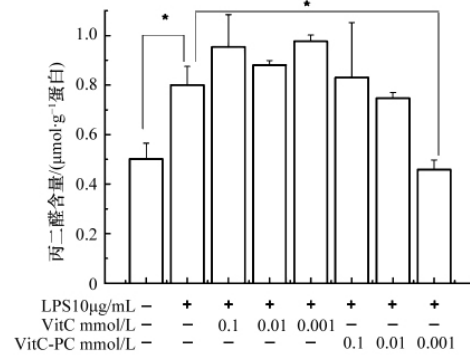
图 2 VitC 及 VitC-PC 对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞内 iNOS 的影响

Fig. 2 Effect of VitC and VitC-PC on intracellular iNOS of LPS induced mice peritoneal macrophages

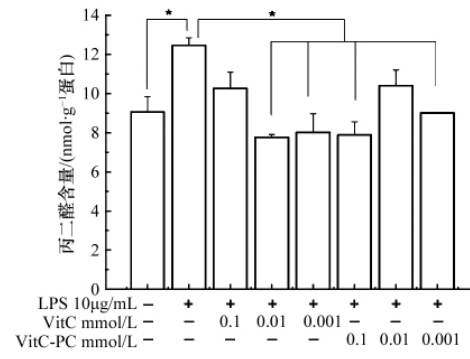
击的情况。由图 3 可以看出,与正常组比较,经 LPS 诱导后,小鼠腹腔巨噬细胞细胞外和细胞内 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$)。图 3(a)显示, VitC-PC 处理可降低细胞外 MDA,其作用与剂量具有反比趋势,在低浓度时与 LPS 处理对照存在显著差异($P < 0.05$)。这说明,高浓度 VitC 并不表现抗氧化作用。图 3(b)显示,除高浓度 VitC 和中浓度 VitC-PC 外,其他剂量 VitC 和 VitC-PC 均能显著降低作用细胞内 MDA ($P < 0.05$)。

2.3 VitC 及 VitC-PC 对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞内 LDH 含量的影响

LDH 主要存在于细胞浆,在细胞膜受损伤后会泄漏到细胞外,细胞外 LDH 可反映细胞膜完整性。由图 4 可以看出,与正常组比较,经 LPS 诱导后,小鼠腹腔巨噬细胞外 LDH 含量显著升高($P < 0.05$)。不同浓度 VitC 和 VitC-PC 均能显著抑制 LDH 释放($P < 0.05$)。VitC-PC 的抑制作用显著强于 VitC ($P < 0.05$)。LPS 诱导后,小鼠腹腔巨噬细胞内自由基含量有所增加,但不显著。低浓度 VitC 和中、低浓度 VitC-PC 与 LPS 协调作用可引起细胞内自由基含量显著增加($P < 0.05$)。



(a)



(b)

图 3 Vitc 及 Vitc-PC 对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞外 (a) 和细胞内 (b)MDA 的影响

Fig. 3 Effect of Vitc and Vitc-PC on extracellular and intracellular MDA of LPS induced mice peritoneal macrophages

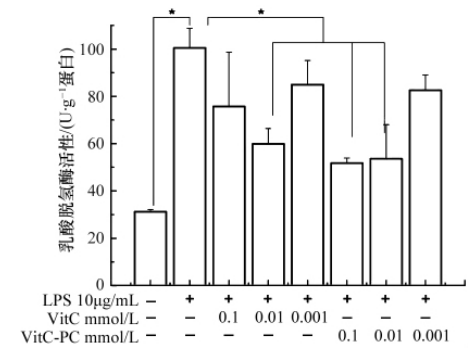


图 4 VitC 及 VitC-PC 对 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞外 LDH 的影响

Fig. 4 Effect of VitC and VitC-PC on extracellular LDH of LPS induced mice peritoneal macrophages

2.4 小鼠腹腔巨噬细胞摄取 VitC 及 VitC-PC 的效率

由图 5 可以看出,除中浓度 VitC-PC 外,不同浓度 VitC 和 VitC-PC 都可提高巨噬细胞内 VitC 含量,但只有高浓度 VitC-PC 处理后达到显著水平($P < 0.05$)。

3 讨论

VitC 能增强机体的细胞免疫和体液免疫功能^[7],具有明显的抗病毒作用。大部分免疫细胞的细胞膜含有丰富的不饱和脂肪酸,易受自由基攻击,单核/巨噬细胞吞噬细菌或与

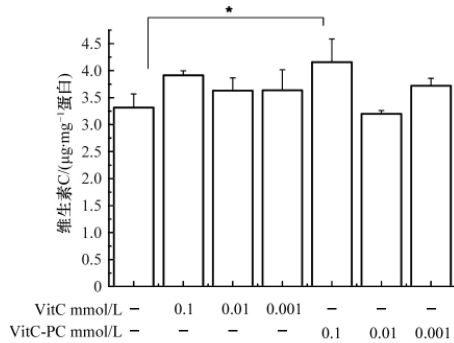


图5 小鼠腹腔巨噬细胞摄取 VitC 的效率
 Fig. 5 Uptake of VitC and VitC-PC by mice peritoneal macrophages

LPS 等细菌成分作用后释放活性氧自由基和多种活性因子。这些免疫细胞内往往富含 VitC, 以预防自身被氧自由基攻击。由于遗传、营养或疾病等原因, VitC 不能有效转运入细胞时候, 免疫系统的抗感染能力将大大降低。

研究表明, LPS 刺激巨噬细胞后可诱导 iNOS 激活, 催化 L-精氨酸合成 NO[®]。本研究结果与此一致。有研究表明, VitC 可通过还原 NO₂ 维持 NO 浓度^[9]。本研究中 VitC 和 VitC-PC 可显著降低 LPS 诱导巨噬细胞培养液亚硝酸盐, 这可能主要通过还原烟硝酸盐而实现。VitC 可通过提高四氢生物喋呤的稳定性, 从而维持 iNOS 活性^[10]。本研究中, 高浓度 VitC 可显著升高激活态巨噬细胞 iNOS 活性, 说明 VitC 进入细胞浆后可能与 iNOS 直接作用从而提高其稳定性。有研究表明, 适宜浓度的 VitC 在合适的生理部位可发挥抗氧化作用, 但高浓度 VitC 出现在炎症部位反而有促氧化作用^[11]。本研究中, 中低浓度 VitC 可抑制 MDA 形成, 而高浓度 VitC 无显著效果, 说明高浓度 VitC 在激活态巨噬细胞可能并不发挥抗氧化作用。而高浓度 VitC-PC 可显著抑制细胞内 MDA, 说明其作用方式不同于 VitC。VitC-PC 具有强疏水性, 它可能主要在细胞器膜或富含疏水性分子微环境中发挥作用, 而这些区域往往更容易遭受自由基攻击。这可能是高剂量 VitC 作用不同于 VitC-PC 的主要原因。

本研究中, VitC 的作用往往存在剂量依赖性, 而 VitC-PC 的作用与剂量无关。尤其是中剂量的 VitC-PC 表现出很奇特的调节作用, 其作用与 VitC 不同, 可抑制 iNOS 活性, 不能降低细胞内脂质过氧化, 同时其进入巨噬细胞的效率低于高剂量和低剂量。研究表明, 中剂量磷脂具有更容易整合入细胞膜^[12], 因此, 中剂量 VitC-PC 与巨噬细胞孵育时, 复合体可能通过磷脂间的疏水作用力被束缚于细胞膜, 而没有进入细胞浆发挥作用, 因此无法在细胞浆中抑制 MDA 形成。其对 iNOS 的抑制作用可能通过改变细胞膜信号传导而实现, 这还有待进一步研究。

本研究中, 高浓度 VitC 并不能提高细胞内 VitC, 说明 LPS 诱导的炎症反应可能削弱了 VitC 转运载体的活性, 而高剂量 VitC-PC 可显著提高细胞内 VitC, 说明高剂量 VitC-PC 可能通过不依赖载体的方式进入细胞。

因此, 本研究表明, VitC 与磷脂形成复合体后, 其生理活

性发生改变, 进入细胞效率升高, 在高剂量时无副作用。研究表明, 在孕期糖尿病等特定生理状态摄入高剂量 VitC 可提高心血管疾病发生的潜在性^[13]。VitC-PC 作为 VitC 的安全替代品在这些方面具有潜在的应用价值, 其可作为一种潜在的食物功能因子在食品体系中发挥抗氧化、增强免疫细胞活性的作用, 同时也可用于油脂体系, 防止脂质氧化。

4 结论

高剂量 VitC 不能抑制 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞内脂质过氧化, 而高剂量 VitC-PC 可高效进入巨噬细胞, 发挥抗氧化作用。中剂量 VitC-PC 可能主要结合于细胞膜, 而不易进入细胞浆。

参考文献 (References)

- [1] Qutob S, Dixon S J, Wilson J X. Insulin stimulates vitamin C recycling and ascorbate accumulation in osteoblastic cells[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(1): 51-56.
- [2] 钱燕春, 资源, 毛山山, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织和外周血白细胞中钠离子依赖性维生素 C 转运体的表达 [J]. *生命科学研究*, 2009, 13(6): 512-516.
Qian Yanchun, Zi Yuan, Mao Shanshan, et al. *Life Science Research*, 2009, 13(6): 512-516.
- [3] Wu X, Iguchi T, Hirano J, et al. Upregulation of sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression in adrenals increases norepinephrine production and aggravates hyperlipidemia in mice with streptozotocin-induced diabetes[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(7): 1020-1028.
- [4] Rivas C I, Zúñiga F A, Salas-Burgos A, et al. Vitamin C transporters[J]. *J Physiol Biochem*, 2008, 64(4): 357-375.
- [5] 孙燕, 高尔, 王汝琴. 中药活性成分磷脂复合物研究进展[J]. *医学综述*, 2007, 13(11): 875-877.
Sun Yan, Gao Er, Wang Ruqin. *Medical Recapitulate*, 2007, 13(11): 875-877.
- [6] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 [M]. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 138-140.
Zhang Longxiang, Zhang Tingfang, Li Lingyuan. *Experimental methods and techniques in biochemistry* [M]. 2ed edition. Beijing: Higher Education Press, 1997: 138-140.
- [7] Jeng K C, Yang C S, Siu W Y, et al. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults[J]. *Am J Clin Nutr*, 1996, 64(6): 960-965.
- [8] Stuehr D J, Marletta M A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(22): 7738-7742.
- [9] Millar J. The nitric oxide/ascorbate cycle: How neurons may control their own oxygen supply[J]. *Med Hypotheses*, 1995, 45(1): 21-26.
- [10] Mizutani A, Tsukagoshi N. Molecular role of ascorbate in enhancement of NO production in activated macrophage-like cell line J774.1 [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1999, 45(4): 423-435.
- [11] Lee S H, Oe T, Blair I A. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins [J]. *Science*, 2001, 292(5524): 2083-2086.
- [12] 夏锦明, 张颖, 康廷国, 等. 活性磷脂延缓果蝇老化的实验研究[J]. *实用药物与临床*, 2006, 9(5): 280-281.
Xia Jinning, Zhang Ying, Kang Tingguo, et al. *Pharmacy and Clinical Remedies*, 2006, 9(5): 280-281.
- [13] Lee D H, Folsom A R, Harnack L, et al. Does supplemental vitamin C increase cardiovascular disease risk in women with diabetes?[J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, 80(5): 1194-1200.

(责任编辑 吴晓丽)