

维生素 C 对 TNF- α 诱导的原代培养大鼠脂肪细胞凋亡的影响

林亚秋 卢建雄 陈国柱 杨公社*

(西北农林科技大学动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100)

摘要 以 5、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 维生素 C (vit C) 及其与 10 ng/ml TNF- α 联合处理体外培养的大鼠脂肪细胞 24 h, 采用流式细胞仪检测脂肪细胞凋亡率, 光学显微镜和透射电镜观察脂肪细胞形态学变化。结果表明, 高浓度 vit C (100 $\mu\text{mol/L}$) 单独作用及与 TNF- α 联用, 均能显著提高脂肪细胞凋亡率 ($P < 0.01$), 且联用组凋亡率显著高于单用 TNF- α 处理组 ($P < 0.01$); 低浓度 vit C (5、10、50 $\mu\text{mol/L}$) 单独作用未检测到凋亡, 且与 TNF- α 联用组凋亡率显著低于单用 TNF- α 处理组 ($P < 0.01$); 光学显微镜和透射电镜观察可见 100 $\mu\text{mol/L}$ vit C 处理组出现凋亡的形态学特征, 细胞收缩变圆, 染色质致密浓染聚集在核膜边缘, 核碎裂成多个凋亡小体, 随即被邻近细胞吞噬。结果提示高浓度 vit C (100 $\mu\text{mol/L}$) 可以引起脂肪细胞凋亡, 并有效地增强 TNF- α 对脂肪细胞的凋亡作用。

关键词 维生素 C; TNF- α ; 脂肪细胞; 凋亡; 大鼠

凋亡是维持哺乳动物组织内环境稳定的重要因素, 机体内环境稳定一旦被打破就会产生各种疾病。肥胖是脂肪细胞数目增多和体积增大共同作用的结果, 人类过于肥胖可引发其他相关疾病, 如高血压、II 型糖尿病、心脑血管疾病、高脂血症、癌症等。动物主要表现为体脂过多、背膘过厚、瘦肉率下降等问题。因此为了提高畜牧业生产的经济效益和产品质量、保护人类健康, 减肥降脂已成为当前世界范围内所面临的重大科学问题, 体脂沉积及其调控机制是核心问题。过去人们一直把注意力集中在脂肪细胞增殖与分化的研究上, 自 1994 年 Prins 等^[1]发现人类脂肪细胞凋亡后, 通过凋亡来调整脂肪细胞的数目被认为是脂肪组织生长和发育过程中正常生理活动的一部分, 有关脂肪细胞凋亡的研究也受到广泛重视。

TNF- α 是脂肪组织的重要调控因子, 可由脂肪细胞分泌产生, 具有促进脂肪分解, 抑制脂肪合成, 诱导前体脂肪细胞、脂肪细胞凋亡等作用^[2]。维生素 C (vitamin C, vit C) 是一种重要的水溶性抗氧化物质, 是细胞外液的主要抗氧化剂。可以诱导或抑制某些种类细胞凋亡^[3,4], 但在脂肪细胞凋亡中的作用至今未见报道。本文主要观察不同浓度 vit C 及其与 TNF- α 联用对大鼠脂肪细胞凋亡的影响, 以

期为调控体脂沉积提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用雄鼠为 20 日龄二级 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 购自第四军医大学实验动物中心; 重组大鼠 TNF- α 购自 Pepro Tech 公司; M199 购自 Gibco BRL 公司; 胎牛血清购自兰州民海生物工程有限公司; 吡啶橙、牛血清白蛋白购自华美生物工程有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 脂肪细胞培养 将 SD 大鼠断颈处死, 用 75% 酒精浸泡消毒, 无菌状态下取腹股沟、附睾远端、肾脏周围的白色脂肪组织, 剪成 1 mm³ 小块, 加消化液 (M199 + 20 g/L 牛血清白蛋白, 临用时加入 1 g/L 的胶原酶 I) 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 60~70 min (每 5 min 振荡一次), 然后依次过孔径为 150 目和 600 目的不锈钢细胞筛, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加红细胞裂解液 (154 mmol/L NH₄Cl + 10 mmol/L KHCO₃)

收稿日期: 2005-01-25 接受日期: 2005-04-28

国家教委博士点基金资助项目 (No. 1998071232)

* 通讯作者。Tel: 029-87092430, Fax: 029-87092430, E-mail:

gsyang999@yahoo.com.cn

+ 0.1 mmol/L EDTA), 室温放置 10 min, 离心 5 min, M199 培养液洗后, 再以 5×10^4 个/cm² 浓度接种到放有盖玻片和不放盖玻片的六孔细胞培养板, 再加适量培养液, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 1 天后换液, 此后每 2 天换一次, 直到 8~10 天出现成熟脂肪细胞。

1.2.2 脂肪细胞鉴定 PBS 冲洗培养第 8 天爬满细胞的盖玻片, 在 10% 甲醛中固定 30 min, 油红 O 染色 9 min, 60% 异丙醇分色 20 s, 自来水冲洗后, 苏木精染液 1 min, 甘油明胶封片。

1.2.3 脂肪细胞处理 取培养第 8 天的脂肪细胞随机分为实验组和对照组。实验组各处理分别为添加 5、10、50、100 μmol/L vit C 及各浓度 vit C 与 10 ng/ml TNF-α 联用, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。以未加处理相应时间段的脂肪细胞作为对照。

1.2.4 脂肪细胞凋亡检测

(1)HE 染色 取实验组和对照组培养至第 8 天、爬满细胞的盖玻片, 按以下步骤操作: PBS 洗 3 次 → 10% 甲醛固定 30 min → PBS 洗 2 次 → 浸入苏木精染液 5~10 min → 自来水浸洗 → 稀盐酸分色 10~30 s → 自来水浸洗 → 浸入淡氨水 3~5 min 使细胞核蓝化 → 自来水浸洗 → 甘油明胶封片, 显微镜下观察。

(2)荧光染色 收集对照组和实验组的脂肪细胞, 制备活细胞悬液(1×10^7 个/ml), 与吖啶橙以 10:1 混合后滴加于 0.8 mm 载玻片上, 加上 0.17 mm 盖玻片封片, 随后在荧光显微镜下观察形态学变化并计数。

(3)透射电镜观察 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化经过处理的脂肪细胞, 收集细胞到尖底离心管中, 2000 r/min 离心 10 min, 2% 戊二醛固定 4 h, 备用。1% 锇酸固定 2 h, 梯度丙酮脱水, 将样品浸入包埋剂 EPON-812 中。超薄切片后, 用乙酸铀染色, 透射电镜观察并照相。

(4)流式细胞术 收集对照组和实验组的脂肪细胞, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 经膜联蛋白 V/PI 双染色, Elite 流式细胞仪采集数据, 并用 Cell Quest 专用软件分析, 通过计数凋亡区细胞数量得出凋亡率。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析与显著性检验。实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 油红 O 染色结果

在光学显微镜下观察经过油红 O 染色苏木精复染后的玻片, 可见脂滴被亲脂的油红 O 着色而呈橘红色, 细胞核因苏木精着色呈兰色, 细胞液无色。脂滴大小不一, 胞核位于细胞一侧, 核/浆比例变小(图 1)。

2.2 HE 染色结果

HE 染色可见凋亡脂肪细胞收缩变圆、变小, 细胞核固缩、碎裂, 染色质致密浓染, 细胞膜皱折、卷曲和出泡, 以及芽生成膜包裹的凋亡小体(图 2)。而正常脂肪细胞经染色显示仍保持细胞原有的生长形状(如圆形或椭圆形), 细胞核被染成均一蓝色(图 3)。根据这个标准在光学显微镜下可见 100 μmol/L vit C 组出现凋亡的细胞, 5、10、50 μmol/L vit C 组未观察到凋亡细胞, 与 TNF-α 联用组均可观察到凋亡细胞, 且 100 μmol/L vit C 与 TNF-α 联用组凋亡的细胞数目最多。

2.3 吖啶橙染色结果

吖啶橙染色后可见正常脂肪细胞核呈均匀的黄色或黄绿色荧光, 细胞质呈均匀的橘红色或橘黄色荧光, 细胞大小基本一致; 处理组细胞核呈绿色或暗绿色荧光, 细胞体积缩小, 可见核凝集或碎裂(图 4)。在荧光显微镜下观察, 5、10、50 μmol/L vit C 组未观察到细胞的凋亡特征改变, 100 μmol/L vit C 组可见凋亡的细胞, 与 TNF-α 联用组均可观察到凋亡细胞, 且 100 μmol/L vit C 与 TNF-α 联用组凋亡的细胞数目最多。

2.4 透射电镜观察 TNF-α 对大鼠脂肪细胞超微结构的影响

透射电镜观察结果显示, 正常脂肪细胞呈圆形或椭圆形, 表面有微绒毛, 胞质内细胞器丰富, 核不规则位于一侧, 细胞内可见脂滴(图 5)。经 vit C 及其与 TNF-α 联合处理发现, 100 μmol/L vit C 处理组脂肪细胞出现典型的凋亡形态学变化, 即微绒毛消失, 细胞表面光滑, 胞质密度增加, 核膜清晰, 染色质凝集成块状并聚积在核膜边缘, 细胞膜完整, 细胞内脂滴几乎消失, 最后细胞核裂解成多个凋亡小体并从细胞表面出芽脱落, 散在细胞间, 最后被邻近脂肪细胞所吞噬(图 6, 图 7); 5、10、50 μmol/L vit C 组未见凋亡的形态学改变; vit C 与 TNF-α 联用组均可见凋亡细胞的形态学变化。

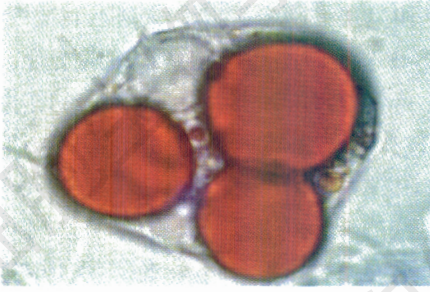


图1 油红 O 染色($\times 1000$)

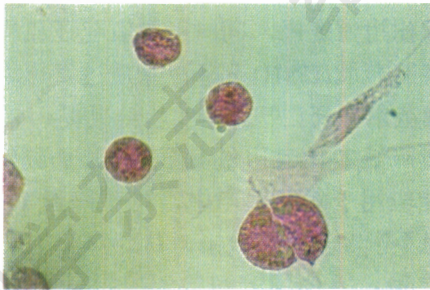


图2 HE 染色凋亡的脂肪细胞($\times 400$)

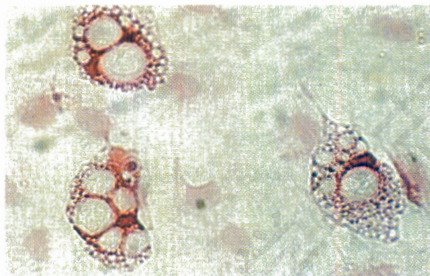


图3 HE 染色正常的脂肪细胞($\times 400$)

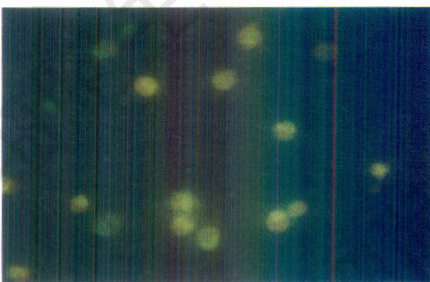


图4 吡啶橙染色结果($\times 200$)

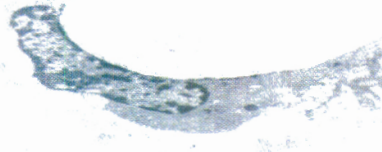


图5 透射电镜下正常的脂肪细胞($\times 5000$)

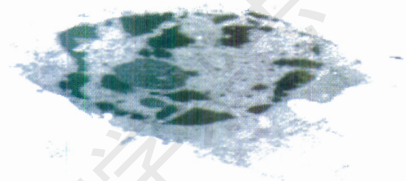


图6 透射电镜下凋亡的脂肪细胞($\times 7500$)



图7 凋亡小体($\times 15000$)

2.5 流式细胞仪检测结果(表 1)

流式细胞仪检测结果见表 1, 由表 1 可以看出, 高浓度 vit C(100 $\mu\text{mol/L}$) 单独及其与 TNF- α 联用, 脂肪细胞凋亡率比对照组显著提高($P < 0.01$), 且联用组凋亡率显著高于单用 TNF- α 处理($P < 0.01$); 较低浓度 vit C(5、10、50 $\mu\text{mol/L}$) 单独作用未检测到凋亡, 且与 TNF- α 联用的凋亡率显著低于单用 TNF- α 处理($P < 0.01$)。

3 讨论

早在上个世纪中期 Kerr 等^[5]就描述了凋亡细胞

表 1 Vit C 与 TNF- α 联用 24 h 后的脂肪细胞凋亡率

TNF- α 浓度(ng/ml)	Vit C 浓度($\mu\text{mol/L}$)				
	0	5	10	50	100
0	3.79 \pm 0.05 ^a	—	—	—	12.54 \pm 0.09 ^b
10	16.95 \pm 0.03 ^c	15.74 \pm 0.07 ^d	14.31 \pm 0.44 ^e	11.07 \pm 0.12 ^f	29.63 \pm 0.35 ^g

表中字母不同者之间表示差异显著($P < 0.01$)。

的形态学特征, 例如细胞皱缩、细胞膜起泡、染色质凝集、核膜碎裂形成膜包裹的凋亡小体等, 凋亡小体迅速被邻近细胞吞噬, 不引起周围的炎症反应。本研究运用荧光显微镜和透射电镜观察 vit C 及其与 TNF- α 联合对大鼠脂肪细胞形态的影响, 得到了凋亡的证据, 其形态学变化与以上描述几乎一致。因为凋亡的形态学检测是其他检测方法的基础, 所以本实验首先从形态学方面对脂肪细胞进行检测。形态学检测方法中以透射电镜检测最为可靠, 因为它可以观察到细胞结构在凋亡不同时期的变化, Saafi 等^[6]研究表明, 电镜用于研究早期凋亡比经典的生化指标更具敏感性并且有助于分子机制的研究。

TNF- α 作为一种多效细胞因子, 可诱导不同类型细胞凋亡^[7]。已有研究报道 TNF- α 能够诱导大鼠棕色脂肪细胞和小鼠的 3T3-L1 前体脂肪细胞凋亡^[7,8]。我们前期研究应用不同浓度 TNF- α 作用大鼠白色脂肪细胞, 发现 10 ng/ml TNF- α 能明显抑制脂肪细胞生长、促进脂肪细胞凋亡^[9]。关于 vit C 在脂肪细胞中的作用, Ono 等^[10]发现 vit C 对 3T3-L1 前脂肪细胞及分化成熟的脂肪细胞的 IV 胶原和其他胶原的合成与分泌均有促进作用, 也可加速脂滴形成。Cryer 等^[11]认为, 前脂肪细胞胶原合成与分泌是脂肪组织发育不可分割的一部分。然而, Ellenbogen^[12]在脂肪移植时加入 vit C, 但没有取得脂肪组织移植后存活率改善的预期结果, 可能是脂肪游离移植完全切断了血管供应, vit C 难以发挥作用之故。朱晓海等^[13]发现 vit C 能促进人前体脂肪细胞的增殖和分化。Vit C 在脂肪细胞凋亡中的作用至今未见报道, 低浓度和高浓度 vit C 在脂肪细胞凋亡中所起的作用是否相同, 与 TNF- α 联用是否可以促进脂肪细胞凋亡, 目前还不清楚。因此, 本实验运用透射电镜、

荧光染色和流式细胞术等方法检测不同浓度 vit C 及其与 TNF- α 联用时脂肪细胞凋亡率的变化。结果发现低浓度 vit C 具有抑制脂肪细胞凋亡的作用, 高浓度 vit C 具有促进脂肪细胞凋亡的作用, 且与 TNF- α 联用时凋亡率显著高于单独使用 TNF- α 处理组。产生此现象的原因可能是 vit C 本身虽具有还原作用, 但在不同条件下显示不同的作用, 即低浓度时为抗氧化作用, 而高浓度时为强氧化作用。进入血浆中的抗坏血酸被氧化成脱氢抗坏血酸盐, 通过葡萄糖转运体进入细胞内, 通过胞内氧化还原系统经酶或非酶作用而还原, 同时引起氧化还原应激, 使细胞内谷胱甘肽(GSH)下降, 脂质过氧化增多, 从而可使细胞出现凋亡^[14]。本实验结果提示 100 μ mol/L vit C 可降低 TNF- α 用量而不影响脂肪细胞的凋亡率, 如能应用于实际生产中, 可望降低 TNF- α 使用剂量而不影响其作用效果, 从而降低 TNF- α 对机体的副作用, 为体脂沉积的调控提供新的途径。

参考文献 (References)

- [1] Prins JB *et al. Biochem Biophys Res Commun.* 1994, **201**: 505
- [2] Qian H *et al. Biochem Biophys Res Commun.* 2001, **284**: 1176
- [3] Connelly AE *et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003, **12**: 559
- [4] Rössig L *et al. Circulation.* 2001, **104**: 2182
- [5] Kerr JF *et al. Br J Cancer.* 1972, **26**: 239
- [6] Saafi EL *et al. Cell Biol Int.* 2001, **25**: 339
- [7] Porras A *et al. FEBS Lett.* 1997, **416**: 324
- [8] Niesler CU *et al. J Endocrinol.* 2000, **167**: 165
- [9] 林亚秋等. *农业生物技术学报.* 2004, **12**: 644
- [10] Ono M *et al. Exp Cell Res.* 1990, **187**: 309
- [11] Cryer A *et al. Eur J Clin Invest.* 1982, **12**: 235
- [12] Ellenbogen R. *Ann Plast Surg.* 1986, **16**: 179
- [13] 朱晓海等. *中华医学美学美容杂志.* 2003, **9**: 356
- [14] Lutsenko EA *et al. J Biol Chem.* 2002, **277**: 16895

Effect of Vitamin C on Primary Rat Adipocyte Apoptosis Induced by TNF- α

Ya-Qiu Lin, Jian-Xiong Lu, Guo-Zhu Chen, Gong-She Yang*

(Laboratory of Fat Deposition and Muscle Development, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling712100, China)

Abstract Primary rat adipocytes were treated with 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ vitamin C (vit C) and combination of vit C (5–100 $\mu\text{mol/L}$) and 10 ng/ml TNF- α , respectively, to investigate their effect on adipocyte apoptosis. The apoptotic rate of adipocytes was measured by flow cytometry. The morphologic change of fat cells was observed with optical microscope and transmission electron microscope. The results show that both higher concentration of vit C (100 $\mu\text{mol/L}$) alone and its combination with TNF- α could significantly increase apoptosis rate of adipocytes ($P<0.01$) and the effect of combination with TNF- α was more apparent than TNF- α alone ($P<0.01$). No apoptosis was detected in adipocytes treated with lower dose of vit C (5–50 $\mu\text{mol/L}$) and the TNF- α -induced apoptosis was markedly inhibited by these concentrations of vit C. The feature of apoptosis was observed in adipocytes treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ vit C, i.e. cellular shrinkage and round, condensation of chromatin adjacent to nuclear membrane, nuclear fragmentation of apoptotic bodies which were rapidly engulfed by neighboring cells. The data suggest that high dose vit C (100 $\mu\text{mol/L}$) may cause adipocyte apoptosis and markedly enhance TNF- α -induced apoptosis.

Key words vitamin C; TNF- α ; adipocyte; apoptosis; rats

Received: January 25, 2005

Accepted: April 28, 2005

This work was supported by the Doctorate Foundation of the Ministry of Education of China (No.1998071232)

*Corresponding author. Tel: 86-29-87092430, Fax: 86-29-87092430, E-mail: gsyang999@yahoo.com.cn