

doi:10.12301/spxb202200386

文章编号:2095-6002(2023)02-0121-10

引用格式:马秋云,高观祯,丁亚男,等.河蚬汤纳米颗粒细胞毒性及对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响[J].食品科学技术学报,2023,41(2):121-130.



MA Qiuyun, GAO Guanzhen, DING Yanan, et al. Cytotoxicity of freshwater clam soup incidental nanoparticles and effect on phagocytosis of murine peritoneal macrophages[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(2):121-130.

河蚬汤纳米颗粒细胞毒性及对大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

马秋云, 高观祯, 丁亚男, 柯李晶, 周建武, 汪惠勤*, 饶平凡
(浙江工商大学 现代食品安全与营养协同创新中心, 浙江 杭州 310012)

摘要:许多传统食品中存在大量的伴生性纳米颗粒,其纳米尺度的构造赋予它们特殊的活性与功能,然而这类纳米颗粒对人体细胞的影响尚未被充分揭示。以河蚬汤及其伴生纳米颗粒为例,采用狗肾上皮细胞(MDCK)、人结肠腺癌细胞(Caco-2)、人正常肝细胞(L-02)和大鼠原代腹腔巨噬细胞模型,研究以液相色谱方法分离制备的河蚬汤纳米颗粒的细胞毒性,以及其对大鼠原代腹腔巨噬细胞功能的影响。实验结果表明:15.63~500.00 μg/mL 河蚬汤伴生纳米颗粒对4种细胞均无明显毒性;这些纳米颗粒能被大鼠原代腹腔巨噬细胞吞噬,对正常巨噬细胞的膜电位和吞噬功能无明显影响,抑制AAPH诱导氧化应激引起的细胞膜超极化,拮抗线粒体的氧化应激与细胞吞噬功能损伤。抗氧化测试结果显示,河蚬汤伴生纳米颗粒具有FRAP、ABTS抗氧化活力,但不具有ORAC活性。研究旨在为后续深入开展河蚬汤及其伴生纳米颗粒的功效以及作用机制提供必要的基础数据和理论支持。

关键词:河蚬汤; 纳米颗粒; 细胞毒性; 巨噬细胞; 吞噬功能; 膜电位

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

近年来,纳米技术被越来越多地应用于食品领域,以改善食品品质,如延长产品货架期、提高营养物质的吸收与生物利用度等^[1-2]。以工程化技术制备的纳米颗粒(TiO₂等)随着食品进入机体后,由于纳米颗粒的小尺寸效应,使其具有大比表面积和高反应活性等特性。这些特性可能在发挥预定功能的同时也对机体细胞产生负面影响^[3],由此引发了纳米材料的食品安全议题。然而,人类摄入纳米颗粒的历史要远早于现代纳米材料的发明与应用,食品本身就含有为数众多的微纳米级颗粒物质。

食品是一个多相复杂体系,除了游离态的单分

子成分外,还含有胶束相、多聚体乃至肉眼可见的聚集物等。食品在加工过程中,原料所富含的两性化合物,如多糖、蛋白质和油脂等,在共价键、氢键、离子键、疏水相互作用多种键合力的共同作用下,伴随加工过程自发形成大量的伴生性纳米颗粒(incidental nanoparticles, iNPs)^[4]。这些iNPs,作为一种长期、大量且反复为人体所摄入的食品成分形态,无论在结构特征、形成机制,还是生物活性上,均缺乏完整而深入的研究,该组成正逐渐引起研究者的关注^[5]。借助体外动物细胞模型,开展食品伴生性纳米颗粒的生物学毒性和活性研究,可以为其在食品

收稿日期:2022-04-21

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD0400202)。

Foundation: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0400202)。

第一作者:马秋云,女,硕士研究生,研究方向为食品质量与安全。

*通信作者:汪惠勤,女,博士,助理研究员,主要从事食源性微纳米颗粒生物活性功能方面的研究。

领域中的应用提供基础数据和研究方法的参考。

以河蚬(*Corbicula luminea*,又名黄金蚬)煮制而成的汤,味道鲜美,富含营养物质,并具有多种保健功能,作为保护肝脏、消除黄疸的食疗方被记载于《本草纲目》中。河蚬汤(freshwater clam soup, FCS)富含多糖、蛋白质、鸟氨酸、牛磺酸及植物甾醇等活性成分^[6],其护肝作用已被现代功能食品研究所证实^[7]。FCS对急、慢性肝损伤和非酒精性脂肪肝均具调节作用^[8],能辅助肝功能的恢复^[9]。FCS生物活性相关研究多集中于其所富含的单分子活性成分,然而河蚬在烹饪过程中,原材料中的单分子成分已发生了不可忽视的构造变化。本研究团队的前期研究发现,FCS中单分子成分会形成大量的iNPs,建立了基于带电性和颗粒尺寸的分选方法对FCS中的iNPs进行纯化和表征^[10-11],揭示了FCS及其iNPs性质稳定、呈圆形,包含有植物甾醇等活性成分,具有抑制胆固醇吸收活性,且可能是FCS的活性单元^[11]。这些FCS及其iNPs能耐受口腔和胃肠消化,经口摄入后可与人体消化道表层细胞发生直接作用,并可能被吸收转运至其他脏器。然而这些iNPs对不同组织器官来源的细胞产生的正、负面影响尚待揭示。

本研究拟选取4种细胞,分别为狗肾上皮细胞(MDCK)、人结肠腺癌细胞(Caco-2)、人正常肝细胞(L-02)和大鼠原代腹腔巨噬细胞,评价FCS及其iNPs的体外细胞毒性,并探究其对巨噬细胞胞内氧化还原态、膜电位、线粒体ROS水平和吞噬功能的影响,希望为评价和揭示FCS及其iNPs的生物学活性与作用机制,提供思路并积累基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

河蚬,台湾花莲立川水产场;Uno-Q阴离子树脂,美国Bio-Rad公司;狗肾上皮细胞(MDCK)、人结肠腺癌细胞(Caco-2)和人正常肝细胞(L-02),中科院上海生命科学研究院细胞库;细胞培养基、双抗(青霉素、链霉素)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)、HBSS缓冲液(Hank's balanced salt solution)和谷氨酰胺等,GIBCO公司;胎牛血清(FBS),以色列Biological Industries公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5)-dimethylthiazoliumro-

mid, MTT], AMRESCO公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、2,2'-偶氮二异丁基脒二盐酸盐(2,2'-azodiisobutyramide dihydrochloride, AAPH)、DiBAC₄(3) [bis-(1,3-dibutylbarbituric Acid) trimethine oxonol]染料、尼罗红(Nile red)染料、中性红(Neutral red)、Hoechst33342染料、荧光素钠(sodium fluorescein),美国Sigma公司;MitoSOX™ Red,美国Thermo Fisher公司;总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP法)、总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS法),碧云天生物技术研究;细胞培养板等,美国Corning公司;SPF级SD大鼠(8~12周龄),浙江省动物科学研究所。

1.2 仪器与设备

NU-8500型细胞培养箱,美国NUAIRE公司;FlexStation 3型多功能钙流工作站,美国Molecular Devices公司;Zeiss LSM780型激光共聚焦显微镜,德国Carl Zeiss SAS公司;DMI3000 B型荧光倒置显微镜,美国Leica公司;UV-5100型紫外可见分光光度计,日本HITACHI公司;BioLogic DuoFlow 10型层析系统,美国Bio-Rad公司;DAWN HELEOS-II型十八角度激光光散射仪,美国WYATT Technology公司;Nano-ZS型马尔文激光粒度仪,英国Malvern仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 河蚬汤及其iNPs的制备

参照前期研究进行样品制备^[11],河蚬清水浸泡2~3 h除沙洗净,按料液质量比1:1煮制1 h,收集溶液,静置冷却至室温,离心(10 000 r/min, 15 min)除去沉淀,取上清液,即得到FCS。样品置于-20℃冷冻保存。取一定量的FCS样品,用NaOH溶液将FCS样品体系调至pH值为8.5。选用Uno-Q阴离子交换色谱连接多角度激光光散射仪(multi-angle laser light scattering, MALLS)对FCS的iNPs进行分离纯化,根据颗粒带电性和光散射强度不同获得2种iNPs组分,分别为IEC-P1和IEC-P2。利用动态光散射仪器,对FCS、IEC-P1和IEC-P2的平均水合粒径(Dh)和Zeta电位进行表征。

1.3.2 细胞培养

狗肾上皮细胞(MDCK)、人结肠腺癌细胞(Caco-2)和人正常肝细胞(L-02)分别用MEM培养液(含体积分数为10%的FBS)^[12]、MEM培养液(含体积分数为20%的FBS)^[13]和RPMI1640培养液(含体积分数为15%的FBS)^[14]培养。所有细胞均置于

37 ℃和体积分数为5%的CO₂环境中进行常规培养,隔天更换培养基,当细胞融合度在90%时,进行传代或接种培养。

1.3.3 原代巨噬细胞培养

参照文献[15]方法获得腹腔巨噬细胞。大鼠脱颈处死后仰卧平放,从腹腔左下角注入10 mL DMEM无血清培养基,并轻柔其腹部3 min,静置5 min。然后用无菌剪刀,小心打开其腹腔,利用无菌注射器抽取腹腔体液,置于无菌离心管中进行离心(25 ℃、1 000 r/min、5 min),收集细胞沉淀,用DMEM无血清培养基多次清洗处理,最后用DMEM培养基(含体积分数为15%的FBS与1%的双抗)重悬,并对细胞进行计数,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,后转移到T-75细胞培养瓶中,置于37 ℃和体积分数为5%的CO₂环境中培养2 h,小心将上清液弃掉,除去未贴壁的细胞,加入新培养基后于培养箱中继续培养24 h,用于后续实验。

1.3.4 细胞毒性检测

将MDCK、Caco-2、L-02细胞与原代腹腔巨噬细胞调至 5×10^4 个/mL后,分别接种于96孔细胞板中,于37 ℃和体积分数为5%的CO₂环境中静置培养24 h。实验设置空白对照、对照组与样品组,加入质量浓度为15.63~500.00 μg/mL的各待测样品后共同培养24 h。采用MTT法,检测每孔570 nm波长处的吸光值。细胞存活率根据式(1)计算。

$$\text{细胞存活率} = \frac{A(\text{待测样}) - A(\text{空白孔})}{A(\text{对照组}) - A(\text{空白孔})} \times 100\%。$$

(1)

式(1)中,A(待测样)为待测样品组吸光值,A(空白孔)为空白组吸光值,A(对照组)为对照组吸光值;细胞板中未接种细胞的孔为空白组,接种细胞但未上样的孔为对照组。

1.3.5 巨噬细胞吞噬FCS及其iNPs检测

选用Nile red标记FCS及其iNPs。于FCS、IEC-P1和IEC-P2中加入Nile red溶液(最终质量浓度为1 μg/mL),在常温下避光染色1 h。染色结束后,将样品溶液放置于超滤离心管(100 kDa)中,再加适量的HBSS缓冲液,于5 000 r/min下离心10 min,多次清洗截留组分,充分去除颗粒上未结合的Nile red溶液,直到镜下观察滤过液无红色荧光为止,最后用等体积HBSS缓冲液重悬截留组分,待用。

取 2×10^4 个/mL的巨噬细胞悬液接种于24孔

板中,于37 ℃和体积分数为5%的CO₂环境中培养过夜。更换细胞培养基,并充分润洗后加入截留组分(待测样品),于培养箱中孵育2 h。同时,采用Hoechst33342染料对细胞核进行染色定位(蓝色)。最后,在激光共聚焦荧光显微镜下观察样品与细胞作用的情况。仪器检测条件:双通道,Nile red的激发波长549 nm和发射波长628 nm,Hoechst33342的激发波长346 nm和发射波长460 nm。

1.3.6 巨噬细胞膜电位检测

将 5×10^4 个/mL的巨噬细胞悬液接种于96孔细胞培养板中,置于37 ℃和体积分数为5%的CO₂环境中过夜培养。去除培养基后,加入2.5 μmol/L的DiBAC₄(3)溶液100 μL并孵育15 min,而后加入50 μL待测样品和50 μL AAPH(终浓度为6.4 mmol/L)或50 μL HBSS。实验同时设立空白组(Control)、阳性对照组(AAPH)。加样后置于多功能钙流工作站中检测。检测条件:检测温度37 ℃,激发波长493 nm和发射波长516 nm,每10 min测定一次,检测时长120 min。

1.3.7 巨噬细胞吞噬功能检测

将细胞密度为 5×10^4 个/mL的巨噬细胞悬液接种于96孔细胞板,置于37 ℃和体积分数为5%的CO₂环境中过夜培养。实验时,除去旧培养基,然后用HBSS缓冲液小心清洗1遍。每孔中加入AAPH(终浓度为6.4 mmol/L)和待测样品各100 μL,实验同时设立空白组(Control),阳性对照组(AAPH),置于37 ℃和体积分数为5%的CO₂环境中培养24 h。取出后,小心除去培养板中的溶液,用HBSS缓冲液(37 ℃预热)清洗2遍。加入质量浓度为1 mg/mL的中性红溶液100 μL,于37 ℃下孵育染色1 h。弃掉未被吸附的中性红,并用经37 ℃预热的HBSS溶液清洗2遍,再加入细胞裂解液(乙酸-乙醇溶液,体积比1:1)200 μL/孔,于室温下裂解24 h。最后于钙流工作站中测570 nm波长处吸光值。细胞的吞噬能力根据式(2)计算。

$$\text{细胞吞噬能力} = \frac{A_s}{A_c} \times 100\%。$$

(2)

式(2)中,A_s为实验组吸光值,A_c为空白组吸光值,Control的巨噬细胞吞噬率设为100%。

1.3.8 巨噬细胞线粒体活性氧自由基水平检测

巨噬细胞线粒体的活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)水平采用线粒体ROS荧光探针(MitoSOX Red)的荧光强度表示。将 5×10^4 个/mL

的巨噬细胞悬液接种于黑色透底96孔板培养24 h后,去除培养基并清洗1次,加入100 μL 的MitoSOX Red溶液(终浓度为3 $\mu\text{mol/L}$),于37 $^{\circ}\text{C}$ 和体积分数为5%的 CO_2 环境中静置孵育10 min,去除上清液,用HBSS清洗2遍,加入150 μL 待测样品和50 μL AAPH(终浓度为6.4 mmol/L)或50 μL HBSS,实验同时设立空白组(Control)、阳性对照组(AAPH),孵育2 h后于钙流仪中检测。检测条件:温度37 $^{\circ}\text{C}$ 、激发波长510 nm、发射波长580 nm。

1.3.9 FCS及其iNPs抗氧化活性评估

采用总抗氧化能力检测试剂盒(FRAP法、ABTS法)、氧化自由基吸收能力法(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)评估FCS及其iNPs的抗氧化活性^[16]。样品的总抗氧化能力采用 $\mu\text{mol/g}$ 或 $\mu\text{mol/g}$ 表示。

1.4 数据处理

数据分析使用GraphPad Prism 9.0软件处理。实验均采用3次重复,数据用平均值 \pm 标准偏差(mean \pm SD)表示,采用Student's *t*-test对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。采用Zen software(Zeiss)处理荧光图片。

2 结果与分析

2.1 FCS及其iNPs的物理表征

前期研究建立的阴离子交换色谱-多角度光散射联用的分离纯化方法中^[11],按照紫外信号,FCS可被分成5个组分,其中洗脱时间较长的后3个组分不具有光散射信号,为非颗粒组分;而洗脱时间较短的前2个组分具有显著的光散射信号,代表了FCS中的颗粒物组分。分别收集两组分,并对其进

行尺寸排阻色谱-多角度光散射联用分析,二者均仅有1个兼具颗粒特征光散射信号和紫外吸收的色谱峰,且都在空体积即被洗脱出色谱柱,充分证明了这2个组分为FCS中的颗粒组分,将其分别命名为IEC-P1与IEC-P2。FCS及其iNPs的水合粒径与表面电势如表1和图1。由表1和图1可知,研究分离纯化得到的IEC-P1 Dh为52.42 nm、Zeta电位为-27.00 mV,而IEC-P2 Dh为70.11 nm、Zeta电位为-8.90 mV,这与前期研究结果相符^[11]。前期研究结果显示颗粒呈不规则的圆形,其主要组成成分为多糖、脂质、蛋白质与植物甾醇^[11]。

表1 FCS及其iNPs的Dh与表面电势

Tab. 1 Dh and zeta-potential of FCS and its iNPs

	FCS	IEC-P1	IEC-P2
Dh/nm	79.57 \pm 0.20	52.42 \pm 0.08	70.11 \pm 0.20
Zeta 电位/mV	-6.12 \pm 0.37	-27.00 \pm 2.78	-8.90 \pm 1.04

2.2 FCS及其iNPs对细胞活力影响

目前人工纳米颗粒的生物毒性研究常采用巨噬细胞^[17]、L-02^[18]、Hep-G2^[19]、MDCK^[20]、Caco-2^[21]等细胞系,在几十到几百 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度内进行细胞毒性评估^[22]。因此,本研究选用3种不同组织来源的永生系细胞株(MDCK、L-02、Caco-2)和1种原代细胞(大鼠腹腔巨噬细胞),评估15.63~500.00 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的FCS及其iNPs对细胞的作用,结果如图2。由图2可知,在实验浓度范围内,FCS及其iNPs分别与MDCK、L-02、Caco-2和 大鼠腹腔巨噬细胞作用24 h后,各个质量浓度下的细胞存活率均约为100%,证明FCS及其IEC-P1和IEC-P2纳米颗粒组分对所选用的4种细胞均无明显毒性。FCS及其iNPs对细胞表现出的低毒性

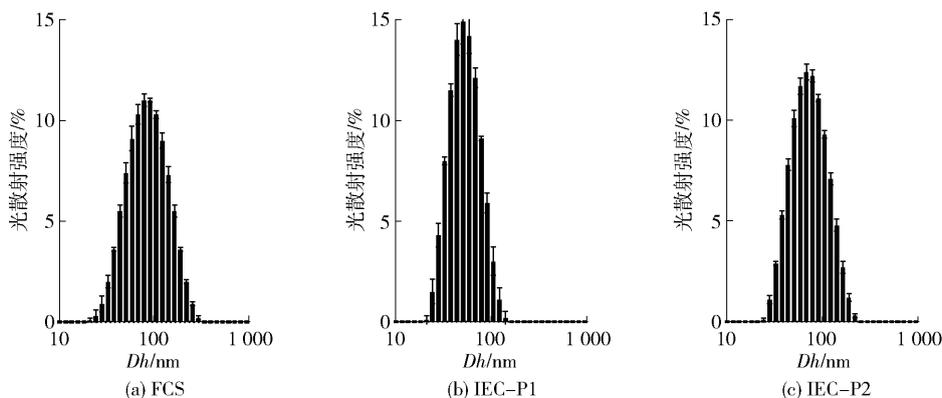
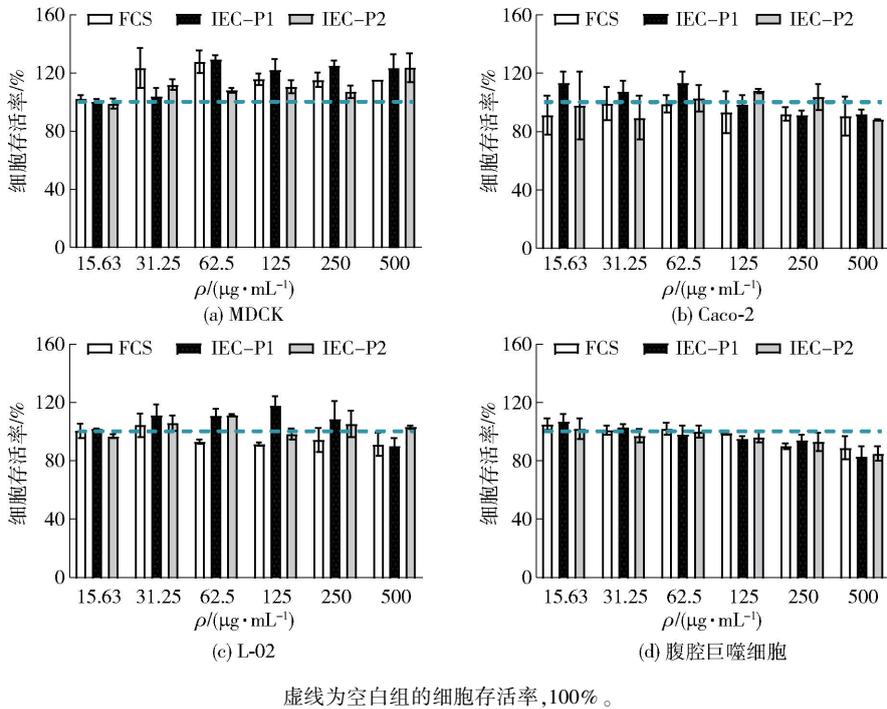


图1 FCS及其iNPs的Dh分布

Fig. 1 Dh distribution of FCS and its iNPs



虚线为空白组的细胞存活率,100%。

图2 FCS及其iNPs对不同细胞的毒性

Fig. 2 Cytotoxicity of FCS and its iNPs on different cells

作用可能归功于其主要组成成分(多糖、脂质与蛋白质)良好的生物相容性^[23]。

目前被广泛研究或应用的人工纳米颗粒(如CuO、TiO₂、ZnO纳米颗粒)多具有细胞毒性^[24]。相比之下,传统食疗汤品FCS中的iNPs对肾脏、肝脏、肠道上皮及黏膜免疫组织来源的细胞均未见细胞毒性,提示传统食品来源的iNPs可能具有出众的安全性,在改善食品品质、提高营养物质的吸收与生物利用度等方面可能具有很大的研究价值和应用前景^[1-2]。此外,嗜好颗粒物质的巨噬细胞对FCS及其iNPs具有良好的耐受力,也为后续实验FCS及其iNPs对巨噬细胞的活性与功能影响的研究提供了必要的基础条件。

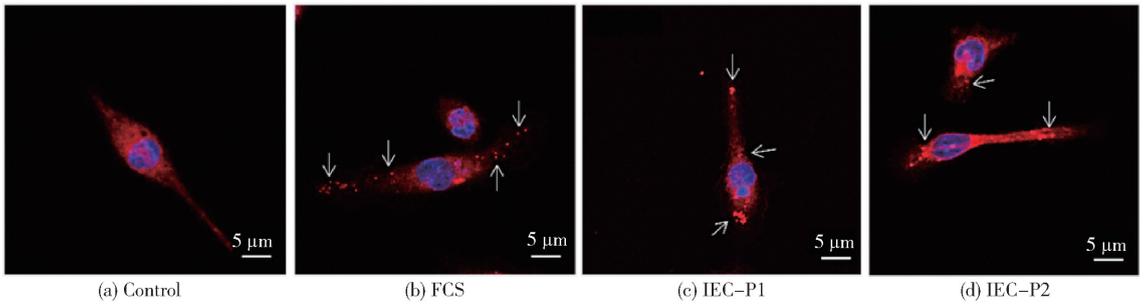
2.3 FCS及其iNPs对腹腔巨噬细胞膜电位及吞噬功能的影响

巨噬细胞在机体中负责识别、吞噬和破坏病原体(外环境的毒素、病原菌和颗粒),启动免疫应答,是机体处理外来颗粒(人工纳米颗粒或iNPs)的第一道防线^[25]。外来颗粒调节巨噬细胞功能对机体生理健康具有重要影响,人工纳米颗粒与巨噬细胞相互作用常被用于评估其对机体免疫等方面影响^[26-28],因此,评估食品中iNPs对巨噬细胞的作用评估其对机体影响的重要一环。利用Nile red标

记的FCS、IEC-P1和IEC-P2分别与巨噬细胞作用2 h,在激光共聚焦显微镜下观察颗粒与细胞的作用,结果如图3。由图3可知,在巨噬细胞胞浆和细胞核中可观察到红色荧光颗粒(箭头标示),这说明FCS及其iNPs会被巨噬细胞吞噬,但具体的吞噬途径仍有待研究。

巨噬细胞膜电位的变化是衡量巨噬细胞功能发生变化的最早指标之一,研究表明巨噬细胞膜电位与巨噬细胞的M1与M2极化分型以及吞噬功能相关^[29]。FCS及其iNPs对腹腔巨噬细胞的细胞膜电位的影响如图4。由图4可知,正常巨噬细胞吞噬FCS及其iNPs后,细胞膜电位荧光探针DiBAC₄(3)的荧光强度未发生变化,表明FCS及其iNPs对正常状态下的腹腔巨噬细胞膜电位无明显影响,与样品对巨噬细胞无毒性的结果一致。

AAPH能诱导产生过氧自由基从而提高细胞内微环境的ROS水平,使腹腔巨噬细胞处于氧化应激状态。升高的ROS减弱了探针DiBAC₄(3)的荧光强度,说明细胞膜发生超极化。研究考察AAPH诱导腹腔巨噬细胞产生ROS状态下,FCS及其iNPs对腹腔巨噬细胞膜电位的影响,结果如图4。由图4可知,不同浓度下的FCS、IEC-P1和IEC-P2纳米颗粒可回升氧化应激状态下的巨噬细胞胞内的



红色为 Nile red 染色的 FCS 及其 iNPs, 蓝色为 Hoechst33342 染色的细胞核。

图3 巨噬细胞对 FCS 及其 iNPs 的吞噬作用

Fig. 3 Phagocytosis of murine peritoneal macrophages on FCS and its iNPs

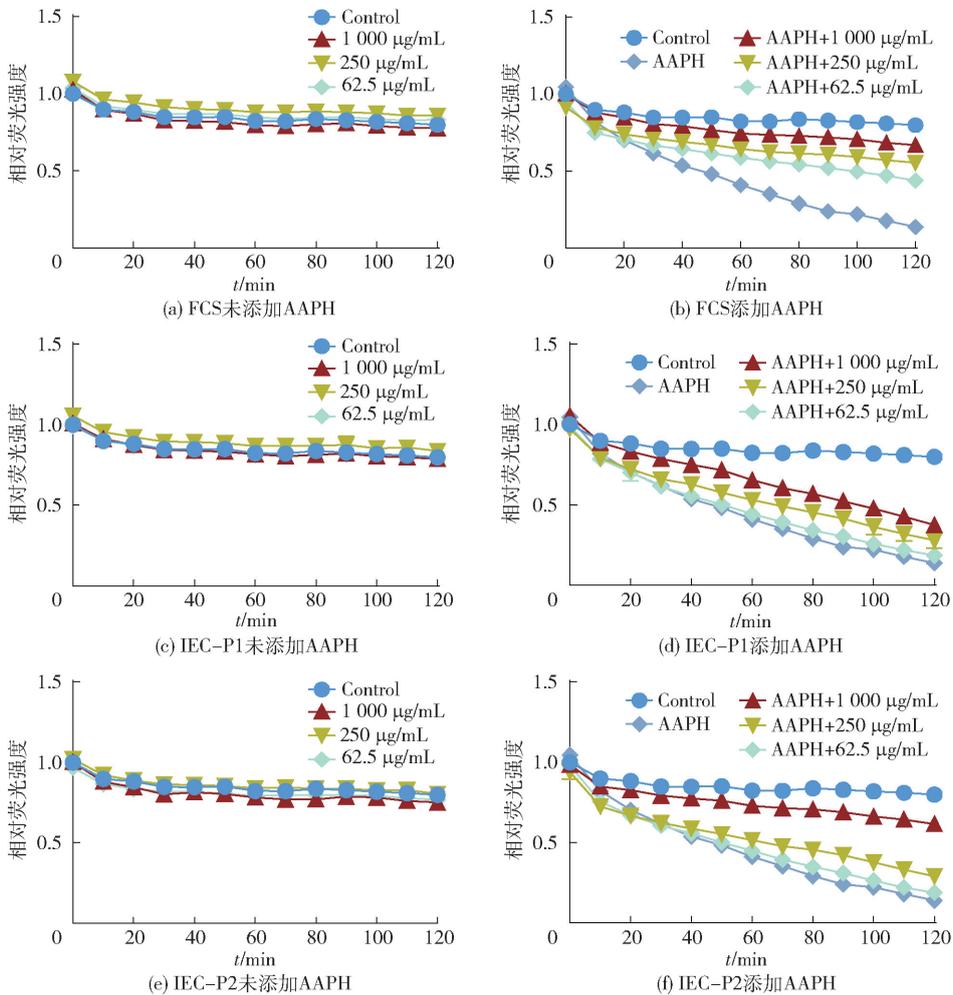


图4 FCS 及其 iNPs 对巨噬细胞膜电位的影响

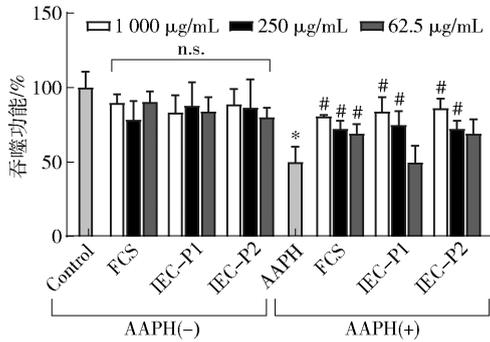
Fig. 4 Effects of FCS and its iNPs on membrane potential of macrophage

DiBAC₄(3) 荧光强度, 说明细胞膜发生去极化, FCS 及其 iNPs 可拮抗氧化应激引起的细胞膜电位变化, 抑制 AAPH 过氧自由基引起的氧化应激损伤。且 IEC-P1 与 IEC-P2 的调节作用强度不同, IEC-P2 强于 IEC-P1, 这可能与 2 种 iNPs 表面电位等的差

异相关, 如金纳米颗粒的表面电位不同会影响膜电位^[30]。

研究进而采用中性红评估 FCS 及其 iNPs 对巨噬细胞吞噬能力的影响^[31], 实验结果如图 5。由图 5 可知, 正常状态的巨噬细胞吞噬 FCS 及其 iNPs

后,对其本身吞噬功能并无明显影响,此结果与颗粒表现出的对巨噬细胞活性(图2)及细胞膜电位无影响(图4)的结果相一致。巨噬细胞受到 AAPH 诱导处于氧化应激态时,吞噬功能会降低到正常细胞的 50%。但 FCS 及其 iNPs,可以不同程度地恢复氧化应激造成的巨噬细胞吞噬功能受损($P < 0.05$)。实验结果表明,FCS 及其 iNPs 改变氧化应激状态下的膜电位后,同时也改变了由氧化应激造成的吞噬功能下降。



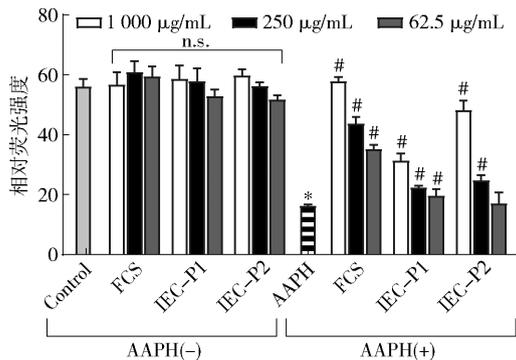
*表示 AAPH 组与 Control 组相比差异显著($P < 0.05$), n. s. 表示未添加 AAPH 的样品组与 Control 组相比差异不显著($P > 0.05$), #表示添加 AAPH 的样品组与 AAPH 组相比差异显著($P < 0.05$)。

图5 FCS 及其 iNPs 对巨噬细胞吞噬功能的影响

Fig. 5 Effect of FCS and its iNPs on phagocytosis of macrophages

2.4 FCS 及其 iNPs 对腹腔巨噬细胞线粒体 ROS 的影响

巨噬细胞线粒体 ROS 变化如图 6。由图 6 可知,FCS 及其 iNPs 对正常状态的巨噬细胞线粒体 ROS 无显著性影响($P > 0.05$),这与其对正常状态



*表示 AAPH 组与 Control 组相比差异显著($P < 0.05$), n. s. 表示未添加 AAPH 的样品组与 Control 组相比差异不显著($P > 0.05$), #表示添加 AAPH 的样品与 AAPH 组相比差异显著($P < 0.05$)。

图6 FCS 及其 iNPs 对巨噬细胞线粒体 ROS 的影响

Fig. 6 Effect of FCS and its iNPs on mitochondrial ROS of macrophages

下的巨噬细胞的细胞活性(图2)、膜电位(图4)及吞噬功能(图5)无影响相一致。当 AAPH 诱导巨噬细胞处于氧化应激态时,其造成细胞线粒体解偶联蛋白激活,导致线粒体呼吸代谢损伤,线粒体内超氧自由基反而减少^[32]。AAPH 造成线粒体 ROS 荧光强度显著性减弱;而 FCS 及其 iNPs 则不同程度地增加荧光强度($P < 0.05$),表明其可改善线粒体的氧化应激,且具有浓度依赖性。这可能与自身的抗氧化能力相关。

此外,研究采用 FRAP、ABTS、ORAC 法评估 FCS 及其 iNPs 的抗氧化能力,结果如表 2。由表 2 可知,IEC-P2 的还原铁抗氧化能力弱于 IEC-P1,两者总抗氧化能力相当,但两者未显示氧化自由基吸收能力活性,表明 FCS 及其 iNPs 与 AAPH 可能无直接作用(ORAC 法中氧化剂为 AAPH)。3 种方法测定自由基原理不同,如 FRAP、ABTS 法考察的是氧化还原反应中的电子转移,而 ORAC 法考察的是反应物间的氢转移^[16]。实验结果表明,FCS 及其 iNPs 可通过干预氧自由基的电子转移而表现出抗氧化活性,但不具备干预氢转移的抗氧化能力,这种抗氧化能力可能与 iNPs 上所装载的植物甾醇^[11,33]、牛磺酸^[34]等小分子活性物质相关。在细胞内,FCS 及其 iNPs 能够帮助巨噬细胞拮抗 AAPH 诱导的氧化应激损伤,但 FCS 及其 iNPs 不具备 ORAC 抗氧化活性,即 iNPs 与 AAPH 不发生直接反应,FCS 及其 iNPs 的存在对 AAPH 诱发过氧自由基的氧化反应无影响。而 FCS 及其 iNPs 显示出 FRAP 与 ABTS 抗氧化活性,表明 FCS 及其 iNPs 可能通过干预自由基的电子转移,抑制了过氧自由基在细胞内诱发的级联反应,减少了 ROS 的产生,从而恢复了由氧化应激而受损的细胞功能。但 FCS 及其 iNPs 拮抗细胞氧化应激损伤的确切作用机制尚有待进一步研究。

表 2 FCS 及其 iNPs 的抗氧化能力

Tab. 2 Antioxidative capacity of FCS and its iNPs

样品	FRAP ($\mu\text{mol/g}$)	ABTS ($\mu\text{mol/g}$)	ORAC ($\mu\text{mol/g}$)
FCS	23.90 \pm 0.20	32.20 \pm 1.23	ND
IEC-P1	495.20 \pm 0.80	29.43 \pm 2.50	ND
IEC-P2	217.30 \pm 0.50	33.43 \pm 1.81	ND

ND 为未检测到活性。

此外,有研究表明线粒体功能异常与巨噬细胞吞噬功能缺陷有关^[35]。部分无机盐类纳米颗粒

对巨噬细胞的线粒体会造成损伤,从而造成细胞毒性^[36];本研究中 FCS 及其 iNPs 可恢复线粒体功能的损伤,其具备的调节自由基与化合物电子转移的能力,与其改善线粒体的氧化应激、恢复细胞膜电位以及维持吞噬功能等保护作用密切相关。实验结果提示 FCS 中的 iNPs 的细胞毒性与人工纳米颗粒有明显不同,值得更广泛与更深入的研究。

3 结 论

本研究初步揭示了 FCS 及其 iNPs 的细胞毒性和生物活性。研究结果证明, FCS 及其 iNPs 对 MDCK、Caco-2、L-02 和大鼠原代腹腔巨噬细胞在 15.63 ~ 500.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度内均无细胞毒性。FCS 及其 iNPs 具有 FRAP、ABTS 抗氧化能力,但不具有 ORAC 活性,可被巨噬细胞吞噬,对正常状态下的巨噬细胞膜电位与吞噬功能无影响,可拮抗氧化应激造成的膜电位超极化,保护巨噬细胞吞噬功能免受氧化损伤,并减轻或消除线粒体的氧化应激。FCS 及其 iNPs 可能通过抑制过氧自由基在细胞内诱发的级联反应减轻细胞的氧化应激损伤,但具体作用机制尚需进一步阐明。本研究旨在为众多传统食品汤中广泛存在的 iNPs 的细胞毒性和生物活性研究提供思路、方法和数据参考。

参考文献:

- [1] NILE S H, BASKAR V, SELVARAJ D, et al. Nanotechnologies in food science: applications, recent trends, and future perspectives [J]. *Nano-Micro Letters*, 2020, 12(1): 45–78.
- [2] TREPTI S, SHRUTI S, PRADEEP K, et al. Application of nanotechnology in food science: perception and overview [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1501–1507.
- [3] HUSSAIN C. *Nanomaterials in chromatography: current trends in chromatographic research technology and techniques*[M]. Oxford: Elsevier, 2018: 437–465.
- [4] KE L J, ZHOU J W, LU W, et al. The power of soups: super-hero or team-work? [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2011, 22(9): 492–497.
- [5] LU W, NISHINARI K, PHILLIPS G O, et al. Colloidal nutrition science to understand food-body interaction [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 109(6): 352–364.
- [6] LIN J J, LIU Y C, CHANG C J, et al. Hepatoprotective

- mechanism of freshwater clam extract alleviates non-alcoholic fatty liver disease: elucidated *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Food & Function*, 2018, 9(12): 6315–6325.
- [7] 鲁伟, 饶平凡, 柯李晶, 等. 河蚬汤中氨基酸组分的分析[J]. *氨基酸和生物资源*, 2012, 34(3): 49–52. LU W, RAO P F, KE L J, et al. Investigation of fresh clam (*Corbicula fluminea*) soup amino acid composition [J]. *Amino Acids and Biological Resources*, 2012, 34(3): 49–52.
 - [8] HUANG S C, LIN J J, LEE M F, et al. Freshwater clam extracts alleviate dyslipidaemia of tilapia fed a high-fat diet as an animal model [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 25: 559–567.
 - [9] 韩鹏, 王勤, 陈清西. 河蚬软体部分营养成分分析及评价[J]. *厦门大学学报:自然科学版*, 2007, 46(1): 115–117. HAN P, WANG Q, CHEN Q X. Analysis and evaluation of nutrients in the soft part of *Corbicula fluminea* [J]. *Journal of Xiamen University: Natural Science Edition*, 2007, 46(1): 115–117.
 - [10] 邹坚桥, 高观祯, 杨多佳, 等. 毛细管电泳分析河蚬汤与巨噬细胞的相互作用[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(9): 265–271. ZOU J Q, GAO G Z, YANG D J, et al. Analysis of interaction between freshwater clam soup and macrophages by capillary electrophoresis [J]. *Chinese Journal of Food*, 2021, 21(9): 265–271.
 - [11] ZHOU J W, GAO G Z, YANG D J, et al. Isolation and characterization of bioactive proteoglycan-lipid nanoparticles from freshwater clam (*Corbicula fluminea* Muller) soup [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(5): 1610–1618.
 - [12] NAKAMURA K, HARADA Y, TAKAHASHI H, et al. Systematic evaluation of suspension MDCK cells, adherent MDCK cells, and LLC-MK2 cells for preparing influenza vaccine seed virus [J]. *Vaccine*, 2019, 37(43): 6526–6534.
 - [13] WU B, WU X, LIU S, et al. Size-dependent effects of polystyrene microplastics on cytotoxicity and efflux pump inhibition in human Caco-2 cells [J]. *Chemosphere*, 2019, 221: 333–341.
 - [14] 金永洋, 高观祯, 汪惠勤, 等. 猪骨汤胞内抗氧化活性评价模型研究[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(2): 244–250. JIN Y Y, GAO G Z, WANG H Q, et al. Studies on evaluation method of intracellular antioxidant activity of

- porcine bone soup [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(2): 244–250.
- [15] 董晓, 柯尊平, 周明, 等. 不同腹腔灌洗液分离培养原代大鼠腹腔巨噬细胞的效率比较及细胞鉴定[J]. 湖北医药学院学报, 2017, 36(5): 418–421.
- DONG X, KE Z P, ZHOU M, et al. Efficiency comparison and cell identification of primary peritoneal macrophages isolated from rats with different peritoneal lavage fluid [J]. Journal of Hubei Medical College, 2017, 36(5): 418–421.
- [16] THAIPOONG K, BOONPARKOB U, CROSBY K, et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2006, 19(6/7): 669–675.
- [17] LANONE S, ROGERIEUX F, GEYS J, et al. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines [J]. Particle and Fibre Toxicology. 2009, 6(1): 14–25.
- [18] TAO R, WANG C, LU Y, et al. Characterization and cytotoxicity of polyprenol lipid and Vitamin E–TPGS hybrid nanoparticles for betulinic acid and low-substituted hydroxyl fullerene in MHC97H and L02 cells [J]. International Journal of Nanomedicine, 2020, 2020(15): 2733–2749.
- [19] KAWATA K, OSAWA M, OKABE S. *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(15): 6046–6051.
- [20] ZHANG Y, XU D, LI W, et al. Effect of size, shape, and surface modification on cytotoxicity of gold nanoparticles to human HepG2 and canine MDCK cells [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2012, 2012: 1–7.
- [21] WANG L, NAGESHA D K, SELVARASAH S, et al. Toxicity of CDSE nanoparticles in Caco-2 cell cultures [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2008, 6(1): 11–25.
- [22] DEVASHRI S, KANNAN G M, MUKUL T, et al. *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles: a comparison between particle size and cell type [J]. Journal of Nanoscience, 2016, 2016: 1–9.
- [23] KOHANE D S, LIPP M M Q, KINNEY R C, et al. Biocompatibility of lipid-protein-sugar particles containing bupivacaine in the epineurium. [J]. Journal of Biomedical Materials Research, 2002, 59(3): 450–459.
- [24] BAHADAR H, MAQBOOL F, NIAZ K, et al. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models [J]. Iranian Biomedical Journal, 2015, 20(1): 1–11.
- [25] ILLUM L, JACOBSEN L O, MULLER R, et al. Surface characteristics and the interaction of colloidal particles with mouse peritoneal macrophages [J]. Biomaterials, 1987, 8(2): 113–117.
- [26] HAMILTON R, BUCKINGHAM S, HOLIAN A. The effect of size on Ag nanosphere toxicity in macrophage cell models and lung epithelial cell lines is dependent on particle dissolution [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(4): 6815–6830.
- [27] ZHANG Z Q, ZHANG C Z, SHAO B, et al. Effects of abnormal expression of fusion and fission genes on the morphology and function of lung macrophage mitochondria in SiO₂-induced silicosis fibrosis in rats *in vivo* [J]. Toxicology Letters, 2019, 312: 181–187.
- [28] TRIPATHY N, HONG T K, HA K T, et al. Effect of ZnO nanoparticles aggregation on the toxicity in RAW 264.7 murine macrophage [J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 270(15): 110–117.
- [29] CAMACHO M, FORERO M E, FAJARDO C, et al. *Leishmania amazonensis* infection may affect the ability of the host macrophage to be activated by altering their outward potassium currents [J]. Experimental Parasitology, 2008, 120(1): 50–56.
- [30] ARVIZO R R, MIRANDA O R, THOMPSON M A, et al. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond [J]. Nano Letters, 2010, 10(7): 2543–2548.
- [31] WU J, LI M, LING L, et al. Nitric oxide and interleukins are involved in cell proliferation of RAW264.7 macrophages activated by viili exopolysaccharides [J]. Inflammation, 2013, 36(4): 954–961.
- [32] WANG H Q, GAO G Z, KE L J, et al. Isolation of colloidal particles from porcine bone soup and their interaction with murine peritoneal macrophage [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 54: 403–411.
- [33] YOSHIDA Y, NIKI E. Antioxidant effects of phytosterol and its components [J]. Journal of Nutritional Science & Vitaminology, 2003, 49(4): 277–280.
- [34] JONG C J, AZUMA J, SCHAFFER S. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production [J]. Amino Acids,

- 2012, 42(6): 2223 – 2232.
- [35] NASSEF M Z, HANKE J E, HILLER K. Mitochondrial metabolism in macrophages [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2021, 321 (6): 1070 – 1081.
- [36] CHEN Q, WANG N, ZHU M, et al. TiO₂ nanoparticles cause mitochondrial dysfunction, activate inflammatory responses, and attenuate phagocytosis in macrophages; a proteomic and metabolomic insight [J]. *Redox Biology*, 2018, 15: 266 – 276.

Cytotoxicity of Freshwater Clam Soup Incidental Nanoparticles and Effect on Phagocytosis of Murine Peritoneal Macrophages

MA Qiuyun, GAO Guanzhen, DING Yanan, KE Lijing, ZHOU Jianwu,
WANG Huiqin*, RAO Pingfan

(*Food Nutrition Sciences Centre, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China*)

Abstract: There are a large number of incidental nanoparticles endowed with special activities and functions by their nano-scale structures in some traditional food systems, but the effects of the incidental nanoparticles on the human cells remain unclear. In the case study of freshwater clam soup and its incidental nanoparticles prepared by liquid chromatography, the cytotoxicity effects of freshwater clam soup and its nanoparticles on MDCK, Caco-2, L-02, and murine peritoneal macrophages were evaluated. Besides, the phagocytosis functions of murine peritoneal macrophages interacted with soup and its nanoparticles were also investigated. The results showed that freshwater clam soup and its incidental nanoparticles did not show apparent toxicity to the four cell within the concentration of 15.63 – 500.00 µg/mL. Further study found that murine peritoneal macrophages could engulf freshwater clam soup incidental nanoparticles. They did not influence the membrane potential and phagocytosis function of the normal peritoneal macrophages but prevented the cells from the membrane hyperpolarization, mitochondrial oxidative stress, and phagocytosis suppression induced by AAPH-induced oxidative stress. The antioxidant analysis revealed that freshwater clam soup incidental nanoparticles exerted FRAP and ABTS antioxidant activity, but not ORAC antioxidant activity. The research results provided a scientific basis for further research on the physiological function and related mechanism of freshwater clam soup and its incidental nanoparticles.

Keywords: freshwater clam soup; incidental nanoparticles; cytotoxicity; macrophage; phagocytosis function; membrane potential

(责任编辑:郝一铭)