文章编号:1000-5404(2008)07-0585-03

论著

黑米花色苷对白血病细胞株 HL-60 及正常淋巴细胞活性氧及线粒体膜电位的影响

常 徽[1],糜漫天[1],顾艳艳[1],袁家林[1],凌文华[2],林 辉[1] ([1]第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市营养与食品安全重点实验室,重庆 400038;[2]中山大学公共卫生学院营养系,广州 510080)

摘 要:目的 观察黑米花色苷对白血病 HL-60 细胞和正常淋巴细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平及线粒体膜电位的影响。**方法** 以 2, 7- 二氯荧光素(2, 7-dichloro fluoresceinciactate, DCFH-DA)为细胞内活性氧探针,以罗丹明-123 为反映线粒体膜电位荧光探针,流式细胞仪和激光共聚焦扫描显微镜检测分析黑米花色苷作用下 HL-60 细胞及正常淋巴细胞活性氧水平及线粒体膜电位的变化。**结果** 黑米花色苷处理正常淋巴细胞 2、24 h 其 ROS 水平未见显著变化($P>0.05$);黑米花色苷处理 HL-60 细胞,ROS 水平首先显著升高($P<0.01$),随后逐渐降低,并在 12 h 显著低于对照组($P<0.01$)。黑米花色苷处理正常淋巴细胞 24 h 线粒体膜电位无显著变化($P>0.05$),处理 HL-60 细胞 24 h 线粒体膜电位显著降低($P<0.01$)。**结论** 黑米花色苷能够显著影响 HL-60 细胞活性氧水平,并显著降低 HL-60 细胞线粒体膜电位,而对正常淋巴细胞活性氧及线粒体膜电位无显著影响。

关键词:黑米花色苷;HL-60 细胞;正常淋巴细胞;活性氧;线粒体膜电位
中图法分类号:R151;R329.25;R733.7 **文献标识码:**A

Effects of anthocyanin-rich extract from black rice on ROS and mitochondrial membrane potential of leukemia HL-60 cells and human lymphocytes

CHANG Hui[1], MI Man-tian[1], GU Yan-yan[1], YUAN Jia-lin[1], LING Wen-hua[2], LIN Hui[1] ([1]Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Nutrition, Public Health School, Sun Yet-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To observe the effects of anthocyanin-rich extract from black rice on reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential of leukemia HL-60 cells and human lymphocytes. **Methods** Using a ROS probe (2, 7-dichloro fluorescein diactate, DCFH-DA) and rhodamine-123, the levels of ROS and mitochondrial membrane potential of HL-60 cells and human lymphocytes were determined by flow cytometry and laser confocal scanning microscopy. **Results** The extract had no significant effects on ROS level of human lymphocytes after 2-hour and 24-hour treatment, while it significantly increased ROS level of HL-60 cells after 2-hour treatment ($P<0.01$), then gradually decreased ROS level, which was significantly lower than the level of lymphocytes after 12-hour treatment ($P<0.01$). After 24-hour treatment, the extract had no significant effect on mitochondrial membrane potential of human lymphocytes, while significantly decreased that of HL-60 cells. **Conclusion** Anthocyanin-rich extract from black rice can significantly influence ROS level of HL-60 cells and decrease mitochondrial membrane potential of HL-60 cells, but it has no significant effects on human lymphocytes.

Key words: anthocyanin-rich extract from black rice; HL-60 cell line; human lymphocytes; reactive oxygen species; mitochondria membrane potential

---

基金项目:国家自然科学基金(30671754)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30671754)
作者简介:常 徽,男,山东省泗水县人,博士研究生,助教,主要从事植物黄酮与肿瘤方面的研究,发表论文 5 篇。电话:(023)68752291, E-mail:Henry8010@126.com
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2007-07-19 **修回日期:**2007-09-10

黑米为优良的特种稻米，黑米中特别是谷皮层中，含有丰富的花青素物质。研究报道黑米花色苷具有抗氧化、保护心血管、预防动脉粥样硬化等作用[1-4]。本实验室前期研究表明，黑米花色苷对于白血病 HL-60 细胞具有显著增殖抑制作用，能够有效诱导 HL-60 细胞凋亡[5]。细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）与细胞的增殖、凋亡密切相关[6]。本研究进一步研究黑米花色苷诱导 HL-60 细胞凋亡过程中细胞内 ROS 水平及线粒体膜电位的变化，并以正常淋巴细胞做对比，比较研究黑米花色苷对 HL-60 细胞和正常淋巴细胞作用的不同，探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

白血病细胞株 HL-60 细胞由中科院上海细胞所提供。黑米花色苷采用低温回流法，用 65% 的乙醇提取，提取物低温真空浓缩，除去酒精后，含水浓缩液用大孔吸附树脂吸附，纯化，得到黑米花色苷提取物，主要成分为矢车菊定-3-葡萄糖苷和芍药定-3-葡萄糖苷，由中山大学公共卫生学院营养系提供；黑米花色苷用二甲基亚砜（DMSO）配制成浓度为 40 mg/ml 的储备液，使用时用 1640 培养液稀释至所需浓度。DMSO 在各组培养液中的终浓度均为 0.5 %。活性氧探针 2，7-二氯荧光素（DCFH-DA）和罗丹明-123 购自 Molecular Probes 公司，DMSO 为 Sigma 公司产品，1640 培养基、小牛血清和 Hanks 缓冲液为 HyClone 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 人白血病 HL-60 细胞培养于含 10% 小牛血清的 1640 培养液中，37 ℃，5% CO_2，常规传代培养。正常淋巴细胞取自健康志愿者新鲜肝素抗凝外周血，应用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离得到，培养于含 20% 小牛血清的 1640 培养液中，37 ℃，5% CO_2。以 80 μg/ml 黑米花色苷处理 HL-60 细胞和正常淋巴细胞，分别在处理 2、4、8、12、24 h 检测指标，并设对照组。

1.2.2 细胞内 ROS 水平的测定 2，7- 二氯荧光乙酰乙酸盐（2，7- dichloro fluorescein diacetate，DCFH-DA）自由扩散进入细胞后被酯酶催化变成 DCFH，在活性氧存在下被氧化成 2，7- 二氯荧光素（DCF），DCF 荧光强度与细胞内活性氧水平显示正相关性。DCF 的激发波长为 485 nm，吸收波长为 530 nm。收集 1×10^6 个细胞，用 PBS 洗涤后，加入 1.0 ml Hanks 液使其悬浮，加入 2.5 mmol/L 的 CDFH-DA 液 40 μl，使终浓度为 100 μmol/L，在 37℃、5% CO_2 培养箱内避光孵育 30 min，用 PBS 洗涤 3 次，流式细胞仪和激光共聚焦扫描显微镜检测分析。

1.2.3 线粒体膜电位的测定 收集 1×10^6 个细胞，用 PBS 洗涤后，加入 1.0 ml Hanks 液悬浮，加入 10 μl 2.5 mmol/L 的罗丹明- 123，使其终浓度为 25 μmol/L，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱内避光孵育 30 min，用 PBS 洗涤 3 次，流式细胞仪和激光共聚焦扫描显微镜检测分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

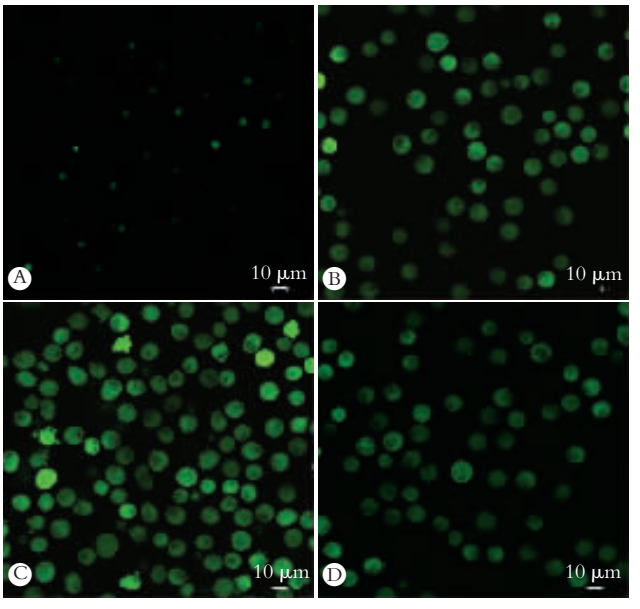
2.1 黑米花色苷对 HL-60 细胞及正常淋巴细胞 ROS 水平的影响

各组细胞 ROS 水平的流式细胞仪及激光共聚焦扫描显微镜分析结果显示，正常淋巴细胞 ROS 水平很低，HL-60 细胞 ROS 水平显著高于正常淋巴细胞（$P<0.01$），80 μg/ml 黑米花色苷处理正常淋巴细胞 2 h 和 24 h 其 ROS 水平未见显著变化（$P>0.05$）；黑米花色苷处理 HL-60 细胞，ROS 水平首先显著升高（$P<0.01$），随后逐渐降低，并在 12 h 显著低于对照组（$P<0.01$）（表 1，图 1）。

表 1 黑米花色苷对 HL-60 细胞及正常淋巴细胞 ROS 水平的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	HL-60 细胞	正常淋巴细胞
对照组	136.4 ± 5.3[a]	8.7 ± 1.2
80 μg/ml 黑米花色苷处理组		
2 h	214.7 ± 4.6[c]	8.3 ± 1.5
4 h	152.6 ± 3.8[b]	–
8 h	129.4 ± 6.4	–
12 h	86.3 ± 4.7[c]	–
24 h	73.7 ± 5.2[c]	7.6 ± 1.8

a：$P<0.01$，与正常淋巴细胞比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与对照组比较

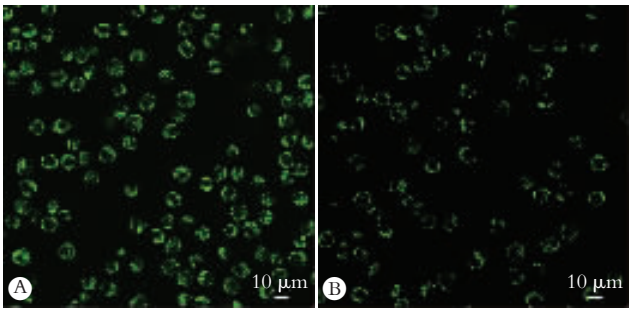


A：正常淋巴细胞；B：HL-60 细胞；C：80 μg/ml 黑米花色苷作用 HL-60 细胞 2 h；D：80 μg/ml 黑米花色苷作用 HL-60 细胞 24 h

图 1 各组细胞 ROS 水平的检测结果 （激光共聚焦扫描显微镜）

2.2 黑米花色苷对 HL-60 细胞及正常淋巴细胞线粒体膜电位的影响

检测结果表明，HL-60 细胞线粒体膜电位（418.1 ± 7.2）显著高于正常淋巴细胞（46.8 ± 3.5）（$P<0.01$），80 μg/ml 黑米花色苷处理正常淋巴细胞 24 h，其线粒体膜电位未见显著变化（54.6 ± 5.7）（$P>0.05$）；黑米花色苷处理 HL-60 细胞 24 h，线粒体膜电位显著降低（350.6 ± 8.4）（$P<0.01$），见图 2。



A：HL-60 细胞；B：80μg/ml 黑米花色苷作用 HL-60 细胞 24 h

图 2　黑米花色苷作用 24 h HL-60 细胞线粒体膜电位的变化（激光共聚焦扫描显微镜）

3　讨论

细胞内环境氧化还原状态平衡对于细胞的生存及功能至关重要，正常情况下，细胞通过抗氧化酶系统以及由 GSH 和硫氧还蛋白（Trx）等组成的巯基还原缓冲体系使细胞内环境氧化还原状态相对稳定，破坏细胞氧化还原状态平衡的主要因素是 ROS 和 GSH。ROS 作为氧化还原信号分子与细胞的增殖、分化、凋亡密切相关，现已知道，低微水平的 ROS 升高可促进细胞增殖，而较高水平的 ROS 则引发细胞凋亡，更高水平的 ROS 则直接导致细胞坏死。黑米花色苷属植物黄酮类化合物，植物黄酮普遍被认为是优良的天然抗氧化剂，但研究表明[5, 6]，植物黄酮可同时具有抗氧化和促氧化两种相反特性，其抗氧化与促氧化可随细胞内环境的不同而不同，而植物黄酮在抗肿瘤及诱导肿瘤细胞凋亡方面，其促氧化可能比其抗氧化更加重要，因为 ROS 可以介导 DNA 损伤甚至片段化，从而导致细胞周期阻滞或凋亡发生，很多抗肿瘤药物如阿霉素、三氧化二砷等，诱导肿瘤细胞 DNA 片段化并引发凋亡其作用都与引发 ROS 密切相关[7, 8]。

本研究结果表明，正常淋巴细胞内 ROS 水平很低，而 HL-60 细胞内 ROS 水平明显高于正常淋巴细胞，显示出肿瘤细胞内氧化还原状态已发生显著改变。黑米花色苷作用于正常淋巴细胞，其 ROS 水平未见显著变化，表明黑米花色苷对于正常淋巴细胞氧化还原状态无显著影响；黑米花色苷作用于 HL-60 细胞，能在短时间内引发胞内 ROS 水平显著升高，显示出显著促氧化作用，而随后 ROS 水平又逐渐降低，表明黑米花色苷在 HL-60 细胞内引发 ROS 是一个早期事件。实验同时观察到黑米花色苷能够显著降低 HL-60 细胞线粒体膜电位，诱导细胞凋亡。由此提示，黑米花色苷诱导 HL-60 细胞凋亡，可能与其在 HL-60 细胞内引发 ROS 有关，ROS 水平的显著升高（$P < 0.05$），可能作为细胞早期事件，对于诱导细胞凋亡及抑制细胞增殖发挥重要作用。

黑米花色苷作用于 HL-60 细胞，首先显示出显著的促氧化作用，使其 ROS 水平显著升高，而后又逐渐发挥抗氧化作用，使其 ROS 水平显著降低，这种相反作用的发挥可能在于黑米花色苷对肿瘤细胞胞内环境的改变使其作用特性也随之改变。有研究表明[9－12]，某些植物黄酮抗氧化与促氧化作用的发挥，可能在于暴露时间和胞内氧化还原状况，特别是胞内 GSH 的储备状况，植物黄酮能够影响 SOD、CAT 等抗氧化酶的活性，随着细胞内抗氧化酶系统和 GSH 水平等氧化还原状况的改变，植物黄酮促氧化及抗氧化特性也随之改变，其具体机制有待证实和研究。

参考文献：

[1] 张名位，张瑞芬，郭宝江，等. 黑米花色苷对血管内皮细胞过氧化损伤的保护作用[J]. 营养学报，2006，28(3)：216－220.

[2] Xia X，Ling W，Ma J，*et al*. An anthocyanin-rich extract from black rice enhances atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E-deficient mice [J]. J Nutr，2006，136(8)：2220－2225.

[3] Ling W H，Wang L L，Ma J. Supplementation of the black rice outer layer fraction to rabbits decreases atherosclerotic plaque formation and increases antioxidant status [J]. J Nutr，2002，132(1)：20－26.

[4] Miyazawa M，Oshima T，Koshio K，*et al*. Tyrosinase inhibitor from black rice bran [J]. J Agric Food Chem，2003，51(24)：6953－6956.

[5] 常　徽，糜漫天，凌文华. 黑米花色苷及联合化疗药物对不同肿瘤细胞增殖的影响 [J]. 第三军医大学学报，2007，29(20)：1943－1946.

[6] Su C C，Lin J G，Li T M. *et al*. Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS，Ca^{2+} and the activation of caspase-3 [J]. Anticancer Res，2006，26(6B)：4379－4389.

[7] Savov V M，Galabov A S，Tantcheva L P，*et al*. Effects of rutin and quercetin on monooxygenase activities in experimental influenza virus infection[J]. Exp Toxicol Pathol，2006，58(1)：59－64.

[8] Michels G，Watjen W，Niering P，*et al*. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells[J]. Toxicology，2005，206(3)：337－348.

[9] Osbild S，Brault L，Battaglia E，*et al*. Resistance to cisplatin and adriamycin is associated with the inhibition of glutathione efflux in MCF-7-derived cells [J]. Anticancer Res，2006，26(5A)：3595－3600.

[10] Haga N，Fujita N，Tsuruo T. Involvement of mitochondrial aggregation in arsenic trioxide (As_2O_3)-induced apoptosis in human glioblastoma cells [J]. Cancer Sci，2005，96(11)：825－833.

[11] Ferraresi R，Troiano L，Roat E，*et al*. Essential requirement of reduced glutathione (GSH) for the anti-oxidant effect of the flavonoid quercetin [J]. Free Radic Res，2005，39(11)：1249－1258.

[12] Leung H W，Kuo C L，Yang W H，*et al*. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis [J]. Eur J Pharmacol，2006，534(1－3)：12－18.

（编辑　王　红）