

生化黄腐酸对3种肿瘤细胞体外增殖影响的初步研究

高金岗 陈沫 何滨

(海南师范大学生命科学学院热带动植物生态学省部共建教育部重点实验室 海口 571158)

摘要: 本试验采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法,研究了生化黄腐酸对3种肿瘤细胞(人胃癌细胞株SGC、人肝癌细胞株SPCA和人肺癌细胞株BEL)在体外增殖的影响。在3种不同肿瘤细胞培养液内分别加入6种不同浓度的生化黄腐酸,用酶标仪测定3种不同培养肿瘤细胞的吸光值(OD值),计算生化黄腐酸对3种不同肿瘤细胞的抑制率。试验结果表明:在各个浓度下,生化黄腐酸对3种不同肿瘤细胞的抑制率均低于50%,属于非敏感型药物。生化黄腐酸对肿瘤细胞的体外增殖没有明显的直接抑制作用,且在某种浓度下,生化黄腐酸可能对肿瘤细胞有促进生长的作用。

关键词: 生化黄腐酸 肿瘤细胞 MTT法 细胞体外增殖

中图分类号: TQ314.1, R730.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-9212(2014)03-0022-06

The Preliminary Study of Biochemical Fulvic Acid on the Proliferation of Three Types of Tumor Cells in Vitro

Gao Jingang, Chen Mo, He Bin

(Co-constructing Key Labs by Hainan Province and Ministry of Education for Tropical Animal and Plant Ecology, School of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou, 571158)

Abstract: In this experiment, three kinds of cancer cells, SGC, SPCA and BEL as the object was studied. The [3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide] method (MTT) was applied to study on the influence of three kinds of tumor cell proliferation in vitro. Six different concentrations of biochemical fulvic acid were added into the three different cultured tumor cells. The OD values of three different cultured tumor cells were measured, and the concentration of cell inhibition rate of each was calculated. The results showed that the inhibitions of biochemical fulvic acid on three different tumor cells were less than 50% in all concentrations, indicating that they were not sensitive. The proliferation of three different tumor cells did not induce directly inhibited by biochemical fulvic acid. In addition, biochemical fulvic acid could promote growth of the tumor cells to some extent.

Key words: biochemical fulvic acid; tumor cell; MTT method, cell proliferation in vitro

肿瘤是危害人类健康的恶性疾病之一。近几年来,肿瘤患者的病死率有上升趋势^[1]。抗肿瘤药物在抑制癌细胞的同时,也会损害人体的正常细胞。由于化疗药物的毒副作用大,且易产生耐药性。因此,寻找敏感、毒副作用小的抗肿瘤药物就显得非常必要。

生化黄腐酸(Biotechnology Fulvic Acid,简称BFA)是以作物秸秆等有机物为主要原料,经过微

生物发酵而产生的以黄腐酸为主要成分且含有多种生物活性物质的复合物^[2]。其来源天然,毒副作用极小,长期使用不会产生耐药性^[3,4]。

有报道认为,BFA作为饲料添加剂能明显提高动物的抗炎能力^[5,6]。临床试验也证明,黄腐酸钠在止血、抗炎、止痛和调整肠胃功能等方面具有重要作用^[7]。张覃沐等^[8]报道,煤炭黄腐酸对小鼠体内肿瘤细胞有一定的抑制作用,而对体

外培养的小鼠艾氏腹水癌细胞(ECA)无明显毒性作用。关于BFA是否对体外肿瘤细胞有直接的影响作用尚未见报道。因此,本文以人胃癌细胞株SGC、人肝癌细胞株SPCA和人肺癌细胞株BEL共3种肿瘤细胞为研究对象,初步研究了BFA对肿瘤细胞体外增殖的影响,以探讨BFA对肿瘤细胞的生长是否具有直接的抑制作用,从而为BFA的临床应用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 供试细胞株

人胃癌细胞株SGC、人肝癌细胞株SPCA和人肺癌细胞株BEL,均购自中科院上海细胞库(ATCC)。

1.2 试验仪器

倒置显微镜(重庆光学仪器厂);酶联免疫检测仪(华东电子集团医疗装备有限公司);CO₂恒温培养箱(日本SANYO公司);超净工作台(苏州净化设备厂);立式超低温冰箱(丹麦Heto公司);高压灭菌锅(日本森展企业有限公司);可调式移液器(BRAND公司);96孔细胞培养板(Pore公司)等。

1.3 试验药品及处理方法

1.3.1 试验药品

BFA(购自上海通微生物技术有限公司,棕褐色粉末,BFA含量≥95%);胰蛋白酶(购自Gibco公司);四甲基偶氮唑蓝(MTT,购自Sigma公司);二甲基亚砜(DMSO,购自天津市化学试剂二厂);RPMI-1640培养基(购自Gibco公司);优级新生胎牛血清(购自兰州民海生物工程有限公司);80万单位的青霉素和100万单位的链霉素(均购自海南医学院附属医院药剂室)。

1.3.2 药品处理

(1) RPMI-1640血清培养基: RPMI-1640血清基础培养基1袋,NaHCO₃ 3.7 g,用1000 mL三蒸水溶解,磁力搅拌,调pH=7.5。

(2) 胰蛋白酶(0.25%): 胰蛋白酶0.5 g,三蒸水200 mL,磁性搅拌,待完全溶解后,用直径为

0.22 μm双层滤膜过滤除菌,-20℃保存。

(3) PBS缓冲液: NaCl 8.0 g(pH 7.2~7.4),KCl 0.2 g,NaH₂PO₄ 1.44 g,KH₂PO₄ 0.24 g,三蒸水1000 mL,高压灭菌,室温保存。

(4) 胎牛血清: -20℃保存,取出室温融化,之后,放入56℃恒温槽中,恒定30 min灭活,分装,-20℃保存。

(5) 抗菌素液(双抗液): 用注射器吸5 mL PBS,注入链霉素(100万单位)瓶内,反复吹打,使其完全溶解,然后吸出4 mL再注入青霉素(80万单位)瓶内,反复吹打,使其完全溶解。吸出全部于一小烧杯,加PBS至100 mL,在超净台内用过滤器分装,每瓶5 mL,20℃保存备用。

(6) MTT溶液: MTT 50 mg,加PBS 50 mL,搅拌溶解,用直径为0.22 μm的滤膜过滤除菌后,4℃避光保存,一周内使用。

1.4 试验方法

1.4.1 冻存细胞的复苏

从液氮罐中取出冻存的SGC、SPCA和BEL细胞株,迅速放入37℃水浴中,使其在1 min内完全溶解,将细胞悬液移至离心管(内含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液)中,在4℃、1000 rpm/min下离心3 min,弃上清液,将细胞重新悬浮于RPMI-1640培养液(内含10%胎牛血清)中,置于37℃的CO₂培养箱内培养,24 h后观察细胞贴壁情况,并更换一次培养液。

1.4.2 细胞培养

将冻存复苏的3种细胞株分别装在有适量RPMI-1640培养液(内含10%胎牛血清和双抗液)的培养瓶中,置于CO₂培养箱中,在恒温37℃、5% CO₂浓度、饱和湿度下培养。

每3~4天传代一次,传代时小心弃去旧培养液,用PBS缓冲液(pH7.4)冲洗2次,弃去PBS缓冲液,加入适量0.25%胰蛋白酶,37℃,消化1~2 min,倒置镜下观察细胞,若胞质回缩,细胞之间不再连接成片,表明此时细胞消化适度,加RPMI-1640培养液(内含10%胎牛血清)终止消化,用吹打管将已经消化好的细胞吹打为细胞悬液。将细胞悬液由细胞培养瓶中吸入离心管中,

1000 rpm/min 离心 5 min; 离心后弃去上清液, 再加入新鲜的 RPMI-1640 培养液 (内含 10% 胎牛血清), 用微量进样器轻轻反复吹打细胞悬液, 使细胞重悬混匀后, 分装于培养瓶中再培养。

1.4.3 细胞冻存

在细胞培养的过程中, 防止试验过程中操作不当造成细胞完全死亡, 可以将一部分细胞冻存起来。冻存细胞时选用对数生长期细胞。冻存方法如下: 将细胞制成细胞悬液, 计数、离心、去上清, 加入含 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 的冻存液, 用吸管轻轻吹打使细胞重悬, 使细胞密度达到 5×10^6 个/毫升, 分装入无菌冻存管中, 先在 4 °C 条件下放置 45 min, 然后置于 -20 °C 再放置 45 min, 最后在 -80 °C 下过夜, 逐级降温冷冻, 然后放入液氮罐中保存。

1.4.4 细胞铺板

铺板前处理: 将对数生长期的细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后吹打成单个悬浮细胞, 用血球计数板计数, 将结果代入下式: 细胞个数/毫升原

液 = (四角大格中细胞数之和 / 4) $\times 10^4$, 接着用 RPMI-1640 培养液调整细胞的浓度, 使 SGC 细胞的浓度达 4×10^4 个/毫升, SPCA 细胞浓度达 2×10^4 个/毫升, BEL 细胞浓度达 7×10^4 个/毫升。

将调整好浓度的 3 种细胞分别加入到 96 孔细胞培养板 B 行到 F 行中, 每孔 180 μ L, 铺两行吹匀一次, A 行每孔加 200 μ L RPMI-1640 培养液作为空白对照, 分别置于 37 °C、CO₂ 培养箱培养。

1.4.5 药品溶解及稀释

用电子天平称量 BFA 100 mg, 在超净台内用 1 mL 的 DMSO 溶解, 待溶解后用移液器混匀, 将母液稀释成不同的浓度, 分别为: 0.1 mg/mL、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、50 mg/mL、100 mg/mL。将 6 个浓度的 BFA 药品分别依次加入到 96 孔细胞培养板的 D、E、F 行中; A 行设置空白组 (仅加入不含细胞的培养液), B、C 两行是对照组 (以培养液替代药物), 然后置于 37 °C、5% CO₂ 浓度培养箱中培养。各浓度 BFA 在 96 孔细胞培养板上的安排见表 1。

表1 细胞板上各孔的浓度
Tab.1 The concentration of each hole on the cell board

编号	1	2	3	4	5	6	备注
A	空白	空白	空白	空白	空白	空白	无细胞
B	对照	对照	对照	对照	对照	对照	细胞+PBS
C	对照	对照	对照	对照	对照	对照	
D	0.1 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	细胞+BFA
E	0.1 mg/ml	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	
F	0.1 mg/mL	1 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL	50 mg/mL	100 mg/mL	

1.4.6 MTT 法^[9]测吸光值 (OD 值)

加药 44 h 后, 向 3 个细胞板中分别加入 MTT 溶液, 每孔 50 μ L。4 h 后, 将培养板中培养的 3 种细胞的液体倒掉, 加入 DMSO, 每孔 150 μ L, 震荡 10 min, 使用酶标仪在 570 nm 波长下测定各孔 OD 值。

根据抑制率公式^[10]: 抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 试验组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$, 分别计算不同浓度的 BFA 对 3 种肿瘤细胞的抑制率。

各项试验均重复 3 次以上, 用统计学软件 SPSS 处理。试验组与对照组间采用独立样本 t 检验法, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 BFA 对 3 种肿瘤细胞的影响

根据上述抑制率公式, 分别计算不同浓度的 BFA 对 3 种肿瘤细胞的抑制率, 绘制抑制率曲线, 见图 1 ~ 图 3。同时, 依据吴舟锋^[11]使用的

判断药物是否是肿瘤细胞敏感型药物的标准(抑制率 < 50% 为不敏感; 50% ~ 70% 为中度敏感; > 70% 为高度敏感)进行判断。

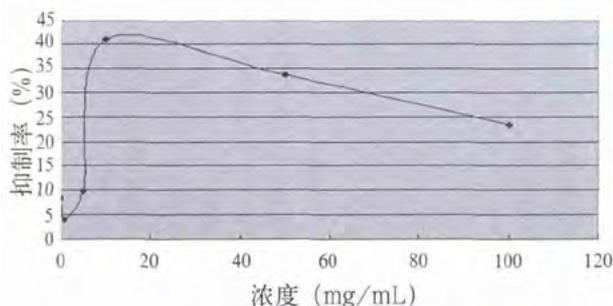


图1 生化黄腐酸对SGC的影响

Fig.1 The influence of biochemistry fulvic acid on SGC

由图1可见,不同浓度BFA对SGC的抑制率不同。在0.1~1 mg/mL浓度范围内,抑制率表现为逐渐下降趋势;在1~10 mg/mL浓度范围内则表现为逐渐增加,至10 mg/mL浓度时达到40.96%抑制率,接近最大抑制率(约42.50%);之后又逐渐减少。各浓度BFA对SGC细胞的抑制率均未达到50%。

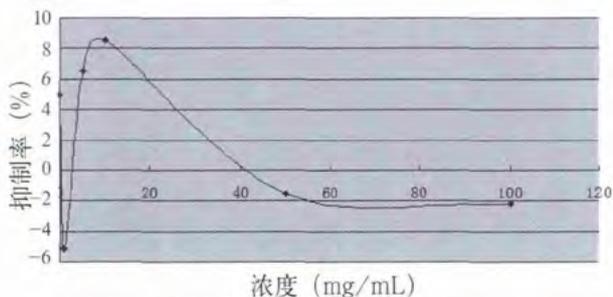


图2 生化黄腐酸对SPCA的影响

Fig2. The influence of biochemistry fulvic acid on SPCA

由图2可见,不同浓度BFA对SPCA的抑制率不同。在0.1~1 mg/mL范围内,抑制率表现出明显地下降趋势,至1 mg/mL时,抑制率为负值;而在1~10 mg/mL范围内,抑制率则表现为逐渐增加趋势,至10 mg/mL浓度时,抑制率达到8.53%,接近最大值(约8.85%);之后,随着浓度增加,抑制率又逐渐降低,当浓度为50~100 mg/mL时,抑制率变化趋于平稳,

但均为负值。各浓度的BFA对SPCA细胞的抑制率远未达到50%。

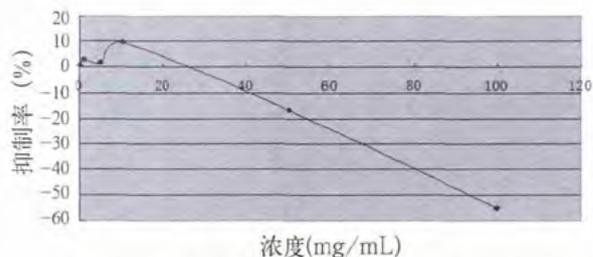


图3 生化黄腐酸对BEL的影响

Fig.3 The influence of biochemistry fulvic acid on BEL

由图3可知,不同浓度BFA对BEL的抑制率不同。在0.1~1 mg/mL浓度范围内,抑制率表现为小幅增加趋势;而在1~5 mg/mL浓度范围内,则表现为下降趋势;当浓度为5~10 mg/mL时,抑制率又逐渐增加,至10 mg/mL浓度时,抑制率达到9.48%,接近最大值(约9.90%);之后,随着浓度的增加,抑制率大幅度下降,在50~100 mg/mL浓度范围内,抑制率均为负值,当浓度达到中100 mg/mL时,抑制率约为-54.93%。各浓度BFA对BEL细胞的抑制率均未达到50%。

2.2 BFA对3种肿瘤细胞抑制结果的分析

为了进一步判断BFA对3种肿瘤细胞体外增殖的抑制作用,根据各浓度试验组所得OD值与对照组OD值进行差异显著性分析,结果见表2。另外,计算出的抑制率也放入表2,用以对BFA的抑制作用进行辅助分析。可见,SPCA细胞组中6个浓度试验组与对照组相比均没有显著差异($P < 0.05$),表明BFA对SPCA细胞没有抑制作用。而SGC细胞组中,有3个浓度(5 mg/mL、10 mg/mL和50 mg/mL)与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)或极显著性差异($P < 0.01$);BEL细胞组中,有2个浓度(50 mg/mL和100 mg/mL)与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)或极显著性差异($P < 0.01$),但这5个试验组对SGC和BEL细胞的抑制率都低于50%,表明BFA对这2种肿瘤细胞也没有明显的抑制作用。

表2 BFA对3种不同肿瘤细胞的抑制作用 (n=6)

Tab.2 Anti-proliferative activity of biochemistry fulvic acid on three tumor cells(n=6)

组别	对照组OD值(x±s)	BFA浓度(mg/mL)	实验组OD值(x±s)	抑制率(%)
SPCA	0.533±0.177	0.1	0.507±0.019	5.002
		1	0.560±0.060	-5.158
		5	0.498±0.024	6.533
		10	0.488±0.006	8.534
		50	0.541±0.007	-1.516
		100	0.545±0.013	-2.157
SGC	0.752±0.135	0.1	0.689±0.019	8.327
		1	0.721±0.032	4.025
		5	0.678±0.009*	9.835
		10	0.445±0.097**	40.958
		50	0.498±0.034**	33.740
		100	0.575±1.040	23.450
BEL	1.331±0.194	0.1	1.324±0.013	0.507
		1	1.291±0.026	3.006
		5	1.310±0.048	1.578
		10	1.205±0.017	9.475
		50	1.553±0.091*	-16.720
		100	2.062±0.214**	-54.925

注：*表示 $P < 0.05$ ，差异显著；**表示 $P < 0.01$ ，差异极显著。

3 结论与讨论

本试验结果表明：BFA对3种肿瘤细胞的体外增殖没有明显的直接抑制作用。

在浓度达到10 mg/mL时，BFA对SGC的抑制率达到40.96%，其最大抑制率约为42.50%（图2），接近了50%的抑制率。统计学处理结果也表明：BFA对SGC具有抑制作用，其中有3个浓度（5 mg/mL、10 mg/mL和50 mg/mL）试验组与对照组相比有显著性差异。BFA对SGC的体外生长可能有一定的影响，但由于BFA的3个浓度的抑制率均小于50%，没有明显抑制肿瘤细胞增殖的作用；而BFA对SGC和BEL两种肿瘤细胞抑制率更低，6个浓度的抑制率均未达到10%。因此，认为BFA不是肿瘤细胞敏感型药物，对癌细胞本身没有直接的抑制或杀灭作用。

张覃沐等^[8]报道，煤炭黄腐酸对体外培养的小鼠艾氏腹水癌细胞(ECA)无明显毒性作用；而在体内对小鼠肿瘤细胞有一定的抑制作用，且口服比注射效果要好。他们认为，煤炭黄腐酸可能是通过提高小鼠自身免疫系统的功能而发挥其抗肿瘤作用的，而不是直接抑制或杀灭肿瘤细胞，本研究结论支持此观点。

本试验结果还显示：当BFA的浓度较高（>50 mg/mL）时，对SPCA和BEL细胞株的负面影响很小（图2和图3）：抑制率很低，甚至出现负值。由此推测：因为BFA具有一定的抑菌作用^[12]，又含有多种营养成分，在体外肿瘤细胞培养体系中，加入一定浓度的BFA，可能有益于细胞的增殖，有促进细胞生长的作用。

虽然本试验结果表明BFA不是肿瘤细胞敏感型药物，对肿瘤细胞本身没有直接的杀灭作用，

但由于BFA来源于天然,毒副作用很小,长期使用不易产生耐药性,在确定有效活性组成后,BFA有可能作为肿瘤患者化疗时的辅助用药使用,提高肿瘤患者的免疫力。

致谢:本文在试验过程中得到了海南师范大学生命科学学院陈忠教授的指导和帮助,在此表示感谢!

参考文献

[1] 黄鸣清, 蒋东旭, 罗明俐, 等. 昆明山海棠抗肿瘤活性部位筛选研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2633 ~ 2636

[2] 李瑞波. 生物腐植酸与生态农业[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 2 ~ 7

[3] 何立千, 薄芯, 高天洲, 等. 对生物技术黄腐酸(BFA)安全性的初步探讨[J]. 腐植酸, 1999, 13(2): 16 ~ 21

[4] 杨耀. 生化黄腐酸应用简介[J]. 腐植酸, 2000, (1):

45 ~ 46

[5] 李红玉. 生化黄腐酸在畜牧业中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(2): 18 ~ 19

[6] 杨晓松, 李良臣. 生化黄腐酸对奶牛乳房炎和生产性能的影响[J]. 中国食草物, 2008, 28(2): 31 ~ 33

[7] 马庆凯, 王虹. 黄腐酸钠灌肠治疗慢性非特异性结肠炎180例[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2002, 19(5): 285

[8] 张覃沐, 胡孟州, 等. 黄腐酸抗肿瘤作用的药理研究[J]. 河南医学院学报, 1983, 18(1): 11 ~ 14

[9] 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版社, 2004

[10] 袁媛, 王琳, 陈光英, 等. MTT法筛选青梅对SPCA-1体外增殖抑制作用有效部位的研究[J]. 海南师范大学学报, 2009, 22(3): 291 ~ 293

[11] 吴舟锋. 肿瘤化疗药物敏感性试验[J]. 国外医学: 外科学分册, 1988, 25(3): 153 ~ 155

[12] 高金岗, 王锐萍, 郝清玉, 等. 生化黄腐酸与常见抑菌药品的抑菌效果比较[J]. 腐植酸, 2009, (5): 18 ~ 23

(来源: 腐植酸, 2014, 3: 22-27)