

王月华,王变变,尹旭升,等. 中国蜂胶水提物抗肿瘤活性功效成分研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(12):153-156.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.038

中国蜂胶水提物抗肿瘤活性功效成分研究

王月华¹, 王变变¹, 尹旭升², 付崇罗¹, 玄红专¹

(1. 聊城大学生命科学学院, 山东聊城 252059; 2. 山东省蜂业与蜂产品质量检验所, 山东泰安 271000)

摘要:拟研究中国蜂胶水提取物(Chinese propolis water extract,简称CPWE)及其分离纯化的11种化学成分(咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸、短叶松素、咖啡酸苄酯、咖啡酸苯乙酯、芹菜素、松属素、白杨素、高良姜素)对神经胶质瘤细胞(U87和U172)的细胞毒性。将正常培养的神经胶质瘤细胞(U87和U172)经不同浓度的蜂胶提取物(25、50、100 mg/L)及其分离纯化的11种化学成分(40、80、160 μmol/L)分别处理24、48 h,在倒置显微镜下观察其细胞形态,用磺酰罗丹明B(sulforhodamine B,简称SRB)比色法检测细胞存活率。结果表明,咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸对神经胶质瘤细胞均没有细胞毒性;短叶松素、咖啡酸苄酯、咖啡酸苯乙酯、芹菜素、松属素、白杨素、高良姜素明显抑制神经胶质瘤细胞的增殖。由结果可知,中国蜂胶水提物的抗肿瘤功效成分主要是黄酮类化合物和酯类化合物。

关键词:中国蜂胶;水提物;抗肿瘤;功效成分;细胞存活率

中图分类号: S896.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0153-04

蜂胶是西方蜜蜂采集植物树脂并混入唾液腺分泌物后经加工咀嚼而成的一种树脂状物质。蜂胶作为一种重要的蜂产品,已有研究表明其具有丰富而独特的生物活性物质,具有抗菌、抗病毒、抗炎症、抗肿瘤、抗真菌等作用^[1-5]。目前,从蜂胶中鉴定出的化学组分多达20多类、300多种,主要包括黄酮类、酚酸类、萜烯类、类固醇类、氨基酸类^[6-8]等物质。蜂胶易溶于有机溶剂,目前对中国蜂胶乙醇提取物(ethanol extract of Chinese propolis,简称EECP)的研究比较深入,对中国蜂胶水提物(Chinese propolis water extract,简称CPWE)的研究较少。中国蜂胶水提物不仅可以避免有机溶剂对动物产生的有害作用^[9],而且有研究发现,中国蜂胶水提物有较好的生物活性,具有非常好的应用价值,正越来越来得到人们的重视^[10]。

本研究使用的中国蜂胶水提物是通过制备高效液相色谱(preparative high performance liquid chromatography,简称PHPLC)和大孔吸附树脂(macroporous adsorption resin,简称MAR)的方法,分离纯化出11种化学成分(咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸、短叶松素、咖啡酸苄酯、咖啡酸苯乙酯、芹菜素、松属素、白杨素、高良姜素)^[11]。通过磺酰罗丹明B(sulforhodamine B,简称SRB)法检测CPWE及其分离纯化的11种化学成分对神经胶质瘤细胞(U87和U172)的影响,以期发现蜂胶水提物的抗肿瘤功效成分,为蜂胶水提

物的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中国蜂胶产自山东省,胶源植物主要为杨树;巴西绿胶取自巴西 Minas Gerais 州,主要植物来源为酒神菊属。主要试剂有DMEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);胰酶、磺酰罗丹明B(美国Sigma公司);细胞培养皿、96孔板(美国Falcon公司);三羟甲基氨基甲烷[Tris,生工生物工程(上海)股份有限公司]。其他试剂均为分析纯。

中国蜂胶水提物和中国蜂胶乙酸乙酯提取物(ethyl acetate extract of Chinese propolis,简称EAEP)从中国蜂胶中分离、提纯,并经紫外光谱(ultraviolet-visible spectrum,简称UV)和核磁共振(nuclear magnetic resonance,简称NMR)鉴定,纯度为98%以上^[11]。U87和U172细胞由本试验所在实验室保存。

1.2 主要仪器

Heal Force生物安全柜、Heal Force CO₂培养箱,力康生物医疗科技控股有限公司;TE2000S倒置荧光显微镜,日本Nikon公司;MK3酶标仪,芬兰雷勃公司;AR2140电子分析天平,美国奥豪斯公司;Milli-Q Synthesis超纯水系统,美国密理博公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蜂胶中主要组分的制备 (1)提取。依次以水、乙酸乙酯为溶剂对蜂胶中的主要化学成分进行提取,其中水提取物中富含酚酸及其酯,乙酸乙酯提取物中富含黄酮。

(2)粗分离。利用各种色谱技术对蜂胶提取物进行粗分离,水提取物和乙酸乙酯提取物可以分别使用大孔吸附树脂及聚酰胺实现粗分离。通过对试验参数(如树脂的类型、上样量、流动相的组成、流速等)进行优化,建立最佳试验方案。

收稿日期:2016-12-19

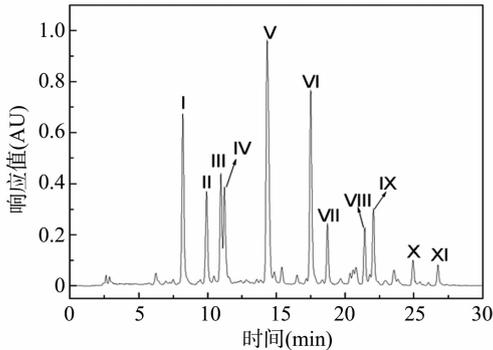
基金项目:国家自然科学基金(编号:31672499);山东省高等学校科技计划(编号:J16LE21);山东省农业创新体系(编号:SDAIT-24-05)。

作者简介:王月华(1990—),女,山东济南人,硕士,主要从事细胞凋亡和自噬研究。Tel:(0635)8230739;E-mail:1570533727@qq.com。

通信作者:玄红专,博士,副教授,主要从事天然产物研究。Tel:(0635)8230739;E-mail:xuanhongzhu@lccu.edu.cn。

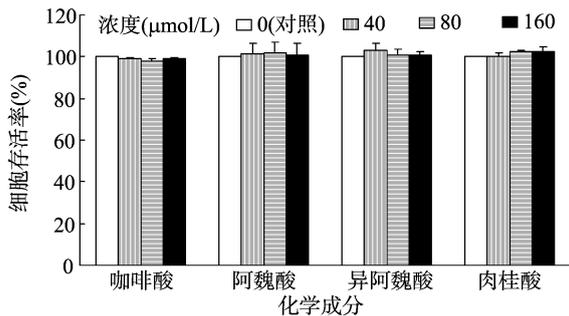
(3)进一步分离与纯化。利用各种色谱技术(超临界流体色谱、制备型高效液相色谱)对蜂胶中多酚类物质的制备型分离纯化方法进行研究,对试验参数(如固定相的种类、流动相的组成、流速、温度、压力、上样量等)进行优化,建立绿色环保、高效快速的分离纯化方法。

(4)结构鉴定。利用X射线单晶衍射、核磁共振、高效液相色谱-质谱联用(high performance liquid chromatography-mass spectrometry,简称HPLC-MS)、红外光谱(infra-red spectrum,简称IR)、紫外光谱等多种鉴定手段对分离得到的化合物进行结构鉴定,以阐明蜂胶中的主要化学组成。蜂胶主要成分的色谱结果见图1。

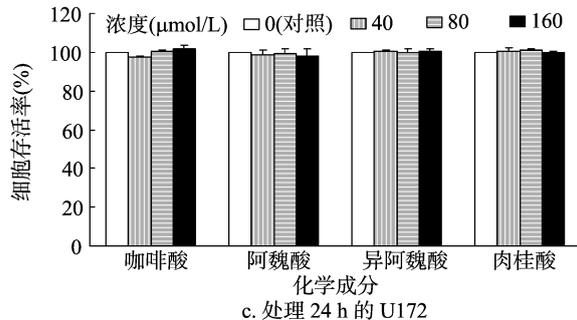


I—咖啡酸; II—阿魏酸; III—异阿魏酸; IV—3,4-二甲氧基肉桂酸; V—短叶松素; VI—咖啡酸苯酯; VII—咖啡酸苯乙酯; VIII—芹菜素; IX—松属素; X—白杨素; XI—高良姜素

图1 蜂胶主要成分的色谱结果



a. 处理 24 h 的 U87



c. 处理 24 h 的 U172

1.3.2 细胞的培养 U87 和 U172 细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。孵育在含有 5% CO₂、37 °C、饱和湿度 CO₂ 培养箱中。在倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 细胞存活率的测定 将处于对数生长期的细胞按 4 000 个/孔 种植到 96 孔板中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育,待肿瘤细胞长到 60% 以上,除正常组外,将所有处理组分别经不同浓度的中国蜂胶乙醇提取物、巴西绿胶乙醇提取物、中国蜂胶水提取物、中国蜂胶乙酸乙酯提取物(25、50、100 mg/L)及中国蜂胶水提取物分离纯化的 11 种化学成分(40、80、160 μmol/L)分别处理 24、48 h 后,弃细胞培养液,用 10% 三氯乙酸于 4 °C 固定 1 h,然后用 SRB 染色 10 min,晾干,用 100 mmol/L Tris 碱溶解,在 492 nm 处测吸光度。细胞存活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率} = [D_{492 \text{ nm}}(\text{处理}) / D_{492 \text{ nm}}(\text{对照})] \times 100\%$$

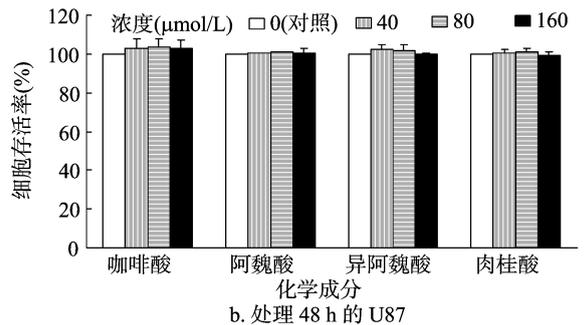
1.4 数据统计

用 SPSS v11.5 软件包进行统计分析。计量资料以“均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,采用 *t* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

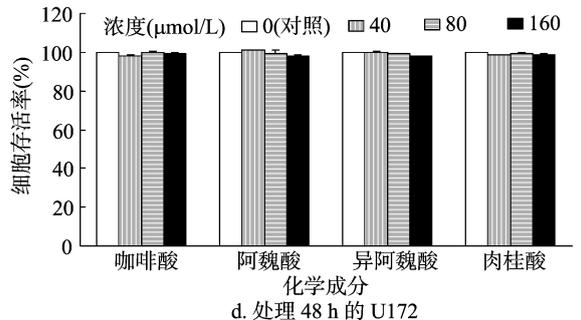
2 结果与分析

2.1 不同浓度中国蜂胶水提取物中 4 种酸类化学成分对 U87 和 U172 细胞存活率的影响

由图 2 可以看出,不同浓度的中国蜂胶水提取物中 4 种酸类化学成分对 U87 和 U172 细胞均没有细胞毒性。



b. 处理 48 h 的 U87



d. 处理 48 h 的 U172

图2 不同浓度的中国蜂胶水提取物中 4 种酸类化学成分对 U87 和 U172 细胞存活率的影响

2.2 不同浓度的中国蜂胶水提取物中 5 种黄酮类化学成分对 U87 和 U172 细胞存活率的影响

由图 3 可以看出,不同浓度的中国蜂胶水提取物中 5 种黄酮类化学成分对 U87 和 U172 的细胞活性不同。芹菜素对 U87 和 U172 细胞的抑制效果最强,48 h 时 160 μmol/L 芹菜素抑制率均达到 55% 以上,短叶松素抑制效果最弱,48 h 时

160 μmol/L 芹菜素抑制率仅为 9.4% 左右。

2.3 不同浓度的中国蜂胶水提取物中 2 种酯类化学成分对 U87 和 U172 细胞存活率的影响

由图 4 可以看出,不同浓度的中国蜂胶水提取物中 2 种酯类化学成分对 U87 和 U172 的细胞活性不同。咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenylester,简称CAPE)对细胞的抑制效果更

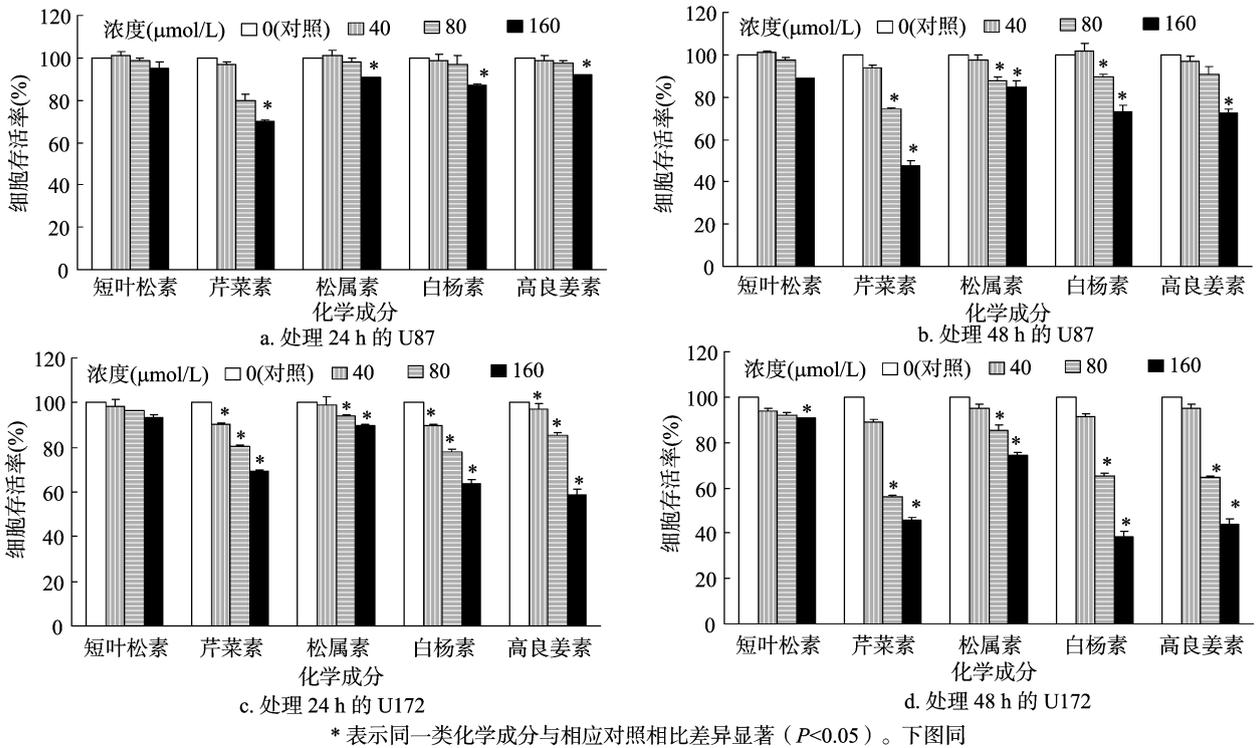


图3 不同浓度的中国蜂胶水提取物中5种黄酮类化学成分对U87和U172细胞存活率的影响

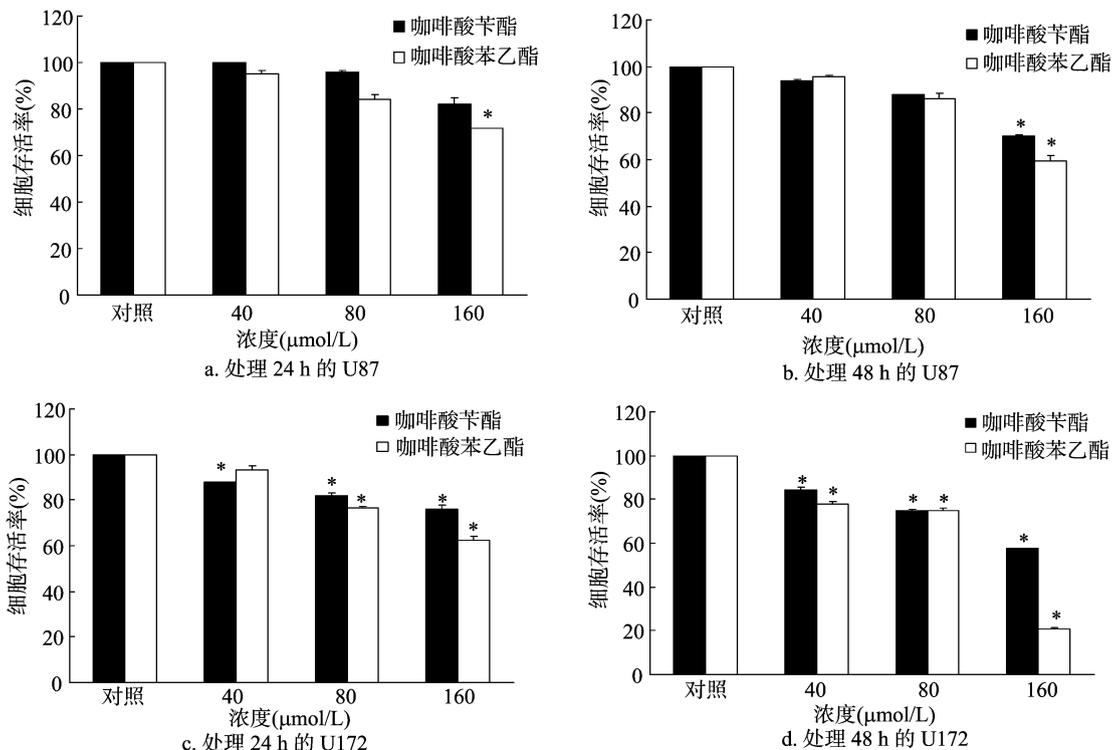


图4 不同浓度的中国蜂胶水提取物中2种酯类化学成分对U87和U172细胞存活率的影响

强,48 h时160 $\mu\text{mol/L}$ 对U172细胞的抑制率达到79.3%。

2.4 不同浓度的中国蜂胶水提取物、乙醇提取物与乙酸乙酯提取物,巴西蜂胶乙醇提取物(EEBP)对U172细胞存活率的影响

EECP对U87和U172的细胞活性不同。EEBP对U87和U172细胞几乎没有细胞毒性。中国蜂胶乙酸乙酯提取物和乙醇提取物只有当浓度高于50 mg/L时,才显著抑制U87和U172细胞增殖,并且具有明显的时间依赖性。

由图5可以看出,在不同浓度的CPWE处理下,EEBP和

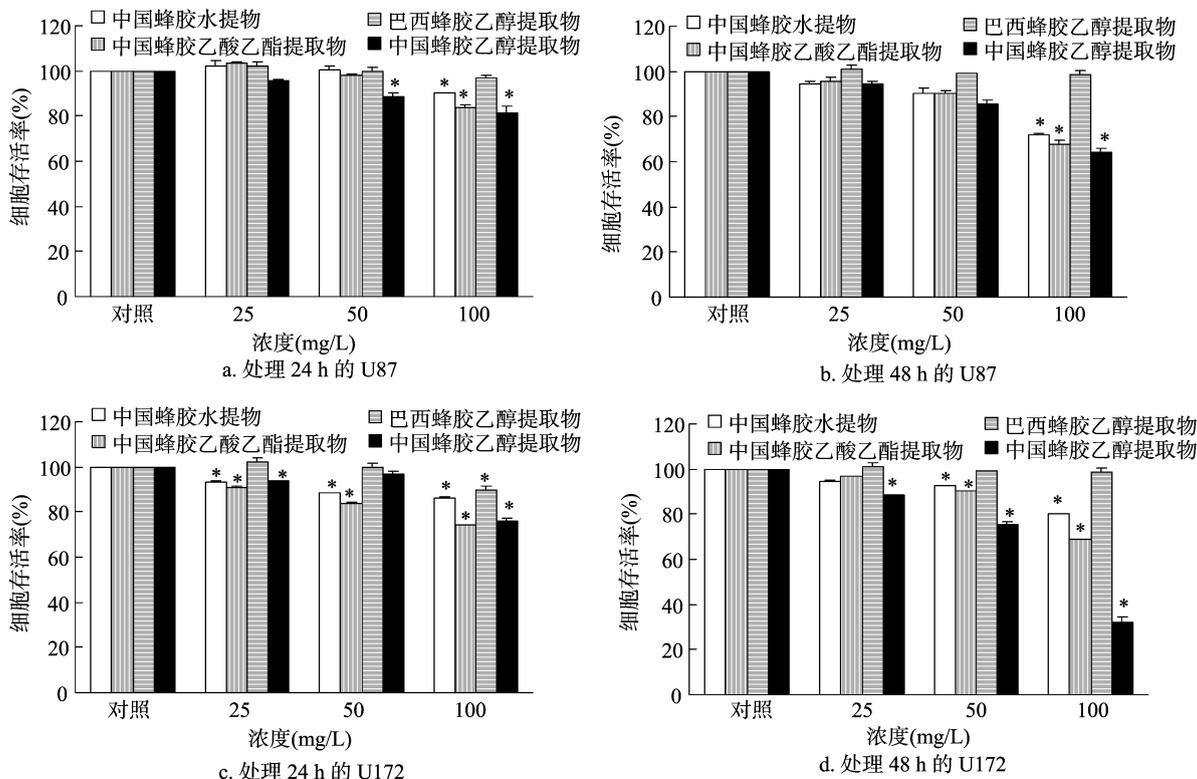


图5 不同浓度的中国蜂胶水提物、乙酸乙酯提取物和乙醇提取物与巴西蜂胶乙醇提取物对 U87 和 U172 细胞存活率的影响

3 讨论

蜂胶是西方蜜蜂采集植物树脂加工而成的一种黏稠物质,具有多种药理学活性,长期在民间得以应用。但目前蜂胶应用中最大的困难就是药效不稳定、药效物质基础不明确。本试验通过对蜂胶水提物中 11 种组分的抗肿瘤活性研究发现,蜂胶中发挥抗肿瘤活性的物质基础主要为咖啡酸苯乙酯和一系列由黄酮类化合物构成的活性成分群,蜂胶中的有机酸类化合物抗肿瘤效果相对较弱,而蜂胶中具体发挥生物活性作用的活性成分群需要进一步发掘、研究。

不同提取方法会影响蜂胶的抗肿瘤功效,蜂胶在水中溶解度较低,因而蜂胶水提物的抗肿瘤功效较弱;蜂胶易溶于有机溶剂,因而蜂胶乙醇提取物和乙酸乙酯提取物均具有较好的抗肿瘤功效。

不同地区蜂胶植物来源不同,决定了蜂胶的化学成分不同,中国杨树型蜂胶主要成分为酚酸类和黄酮类化合物,而巴西蜂胶主要为香豆酸类,由于化学组分不同,中国蜂胶乙醇提取物和巴西蜂胶乙醇提取物抗肿瘤功效不同,巴西蜂胶抗肿瘤功效较弱。

参考文献:

[1] Chan G C, Cheung K W, Sze D M. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis[J]. *Clinical Review in Allergy & Immunology*, 2013, 44(3): 262 - 273.

[2] Patel S. Emerging adjuvant therapy for cancer: propolis and its constituents[J]. *Journal of Dietary Supplement*, 2016, 13(3): 245 - 268.

[3] Sforcin J M, Bankova V. Propolis: is there a potential for the

development of new drugs[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 133(2): 253 - 260.

[4] Valenzuela - Barra G, Castro C, Figueroa C, et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 168: 37 - 44.

[5] Ishiai S, Tahara W, Yamamoto E, et al. Histone deacetylase inhibitory effect of Brazilian propolis and its association with the antitumor effect in Neuro2a cells[J]. *Food Science & Nutrition*, 2014, 2(5): 565 - 570.

[6] Duman M, Özpölat E. Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) filets during chilled storage[J]. *Food Chemistry*, 2015, 189: 80 - 85.

[7] Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 100(1/2): 114 - 117.

[8] Huang S, Zhang C P, Wang K, et al. Recent advances in the chemical composition of propolis[J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 19610 - 19632.

[9] Mani F, Damasceno H C, Novelli E L, et al. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 105(1/2): 95 - 98.

[10] Pietta P G, Gardana C, Pietta A M. Analytical methods for quality control of propolis[J]. *Fiterapia*, 2002, 73(1): S7 - S20.

[11] Li A, Xuan H, Sun A, et al. Preparative separation of polyphenols from water-soluble fraction of Chinese propolis using macroporous absorptive resin coupled with preparative high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatogr B*, 2016, 1012/1013: 42 - 49.