

蜂胶黄酮 Pinobanksin-3-acetate 对人肝癌 HepG-2 和肝正常 L02 细胞增殖和凋亡的影响

其曼古丽·吐尔洪¹, 木塔力甫·艾买提², 夏米西丁·阿不都热依木¹,
阿依努尔·玉苏普¹, 胡尼其古丽·阿巴克¹, 依米提·热合曼^{1*}

¹新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046;

²新疆医科大学中心实验室地方病分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 830011

摘要: 为探讨蜂胶黄酮 Pinobanksin-3-acetate (PB3A) 对人肝癌 HepG-2 和肝正常细胞 L02 增殖、形态学变化和细胞凋亡的影响, 采用 MTT 显色法检测不同浓度 PB3A 作用不同时间对 SGC-7901 细胞生长所产生的影响, 计算生长抑制率和 IC₅₀ 值; 倒置显微镜观察 PB3A 干预后细胞的形态学变化; Annexin V-FITC/PI 双染色、流式细胞仪检测细胞的凋亡率; 结果显示, PB3A 可显著抑制 HepG-2 和 L02 细胞的增殖, 并呈浓度和时间依赖性, 各时间段 HepG-2 细胞 IC₅₀ 值明显低于 L02 细胞。流式细胞检测结果显示, PB3A 能促进 HepG-2 和 L02 细胞凋亡, 并呈剂量依赖性, 同浓度 PB3A 诱导 HepG-2 细胞的早期凋亡率明显高于 L02 细胞。上述结果表明, PB3A 对人正常肝 L02 细胞和肝癌 HepG-2 具有明显的区别增殖抑制和诱导凋亡作用, 区别抑制作用的本质是 PB3A 诱导两种细胞凋亡的程度不同。

关键词: PB3A; HepG-2 和 L02; 增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R285

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.2.008

Effects of Pinobanksin-3-acetate on Proliferation and Apoptosis of Human Hepatoma Cell line HepG-2 and Normal Hepatocyte Cell line L02

Chimengul · Turghun¹, Mutallip · Amet², Shamshidin · Abduriyim¹,
Ayinuer · Yusupu¹, Ghuniguli · Abake¹, Yimit · Rahman^{1*}

¹College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;

²Endemic Disease of Molecular Biology Key Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the anticancer activity of pinobanksin-3-acetate (PB3A) on human hepatoma cell line HepG-2 and normal hepatocyte cell line L02. The effect of different concentrations of PB3A for different durations on the proliferation of the cell line HepG-2 and L02 were analyzed by MTT assay. The morphological changes of HepG-2 and L02 cells were observed by the inverted photo microscopy after treatment with different concentrations of PB3A for different durations. The apoptotic rate was measured by flow cytometry. MTT assay showed that PB3A inhibited the growth of HepG-2 and L02 cells in a dose and time dependent manner, in the same incubation time, the IC₅₀ values of HepG-2 cells were lower than L02 cells. FCM results indicated that PB3A induced the apoptosis of HepG-2 cells and L02 cells in a dose-dependent manner. In the same concentration of PB3A, the early apoptotic rate of HepG-2 cells was higher than L02 cells. In conclusion, PB3A can inhibit human hepatoma HepG-2 cells and hepatocyte L02 cells through induction of apoptosis. Higher sensitivity to PB3A were found in HepG-2 cells than L02 cells.

Key words: PB3A; HepG-2 and L02; proliferation; apoptosis

蜂胶是一种蜜蜂产生的经济天然产品, 也是一种令人关注的多种生物活性成分来源。植物树脂、

挥发物、花粉与蜜蜂蜡和其他排泄物包括酶^[1]混合在一起最终形成蜂胶。在蜂巢蜂胶的主要用途为对抗他们的敌人^[2]保护并屏障。蜂胶一直被作为一种疾病预防的补充膳食^[4], 因为其有抗菌、抗病毒^[5]、抗炎^[6]、免疫调节^[7]、抗肿瘤^[8]和抗氧化活性^[9,10]。过去的 400 年里在欧洲, 由于蜂胶具有抗

收稿日期: 2015-05-07 接受日期: 2015-12-03

基金项目: 国家自然科学基金 (31260280)

* 通讯作者 Tel: 86-013999406854; E-mail: yimitrahman@sohu.com

菌活性,被接纳为正式的药物^[3]。据生物活性相关的报道,蜂胶的粗提物和纯提物中发现超过 300 多种特殊成分^[11]。到目前为止被发现并提取及纯化的大多数化合物是多酚类和黄酮类化合物^[12]。

研究表明,蜂胶己烷提取物对五种癌细胞系有最高的体外抗增殖活性,对两种正常细胞系有最低的细胞毒性^[13]。研究发现光足无刺蜂蜂胶含有对肿瘤细胞有抗增殖活性而对正常细胞系没有生物活性的化合物。蜂胶的质量分数越多通常显示越高的抗增殖活性(较低的 IC₅₀值)^[10]。蜂胶的正己烷和二氯甲烷粗提取物在五种癌症细胞系上显示抗增殖、细胞毒性作用^[14]。泰国蜜蜂蜂胶含有至少两种(cardanol 和 cardol)新的抗癌生物活性成分,既可以发展为抗增殖剂并替代未来的抗癌药物^[15]。巴西红蜂蜂胶乙醇提取物(BRP)通过诱导线粒体功能障碍,caspase-3 激活和 DNA 碎片显著降低 MCF-7 细胞生存能力,但对成纤维细胞没有影响^[16]。巴西蜂胶和中国蜂胶具有抗肿瘤,降血脂和免疫调节功能,几乎没有副作用^[17,18]。Khan 等人用甲基化的柯因处理患有肝癌的大鼠,结果发现大鼠的肝实质浆液及导管酶含量均有所减少,表现出一定的护肝作用^[19]。本课题组负责人从新疆蜂胶的醇溶性组分中分离了黄酮单体成分短叶松素-3-乙酸酯(Pinobanksin-3-acetate, PB3A),呈黄色,密度 1.46 g/cm³,溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,为蜂蜜和蜂胶的主要活性成分^[20]。体外实验研究发现该物质对人白血病 Jurkat 细胞表现出强烈的增殖抑制作用,调节细胞周期并通过剂量和时间依赖性方式促进细胞凋亡^[21]。Javier 等人分析了墨西哥索诺拉州蜂胶的化学成分和抗增殖活性,发现索诺兰蜂胶对小鼠和人类肿瘤细胞株具有强烈的抗增殖活性,其活性依赖药物浓度,而索诺兰蜂胶最丰富的成分是 PB3A^[22]。虽然很多研究证明蜂胶及植物来源黄酮类化合物具有抗癌及其他药理活性作用,但其活性成分蜂胶黄酮 PB3A 单体在抗肿瘤方面的研究在国内外文献尚未报道。

本实验用蜂胶黄酮 PB3A 干预肝癌 HepG-2 细胞和正常体细胞(肝脏 L02 细胞),利用 MTT 比色法、FCM 细胞凋亡率检测法来检测 PB3A 对肝细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用,初步探讨并评价 PB3A 对肝正常细胞的毒性,深入阐明 PB3A 的抗肿瘤作用,旨在 PB3A 的广泛开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

质量分数≥99%的蜂胶黄酮 PB3A 为依米提·热合曼教授提供;肝癌 HepG-2 细胞株和正常肝 L02 细胞株购自上海生物化学研究所细胞库。二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)为 MP 公司产品。DMEM 培养基由 Hyclone 公司提供、胎牛血清由 Gibco 公司提供。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒为美国 BD 公司产品。流式细胞仪为美国贝克曼库尔特(Beckman)公司所生产。倒置显微镜 BA210 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HepG-2 和 L-02 细胞培养于含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基(以下简称培养液)中,置于饱和湿度、37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 更换培养液 1 次,胰酶(含 0.25% EDTA)消化,常规传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的 HepG-2 和 L02 细胞,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化培养细胞,用含 100 mL/L 胎牛血清的培养液配成单个细胞悬液,以每孔 4 × 10³ 个细胞接种于 96 孔培养板培养,将培养板移入 CO₂ 孵箱中,在 37 ℃、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度条件下常规培养。24 h 后吸除原培养液,加入含 PB3A 浓度分别为 10、20、40、80 μg/mL 的培养液 200 μL,并设对照组(仅加相同溶剂剂量的 DMSO)。以上各组均设 6 个复孔,分别将各组细胞继续培养 24、48、72 h 后,进行 MTT 实验。每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μL,继续培养 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,轻轻振荡 10 min,使结晶充分溶解,用酶联免疫标记分析仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度 A 值(A₄₉₀),按下列公式计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率 R = [1 - (A 实验组 - A 空白组) / (A 对照组 - A 空白组)] × 100 %。

1.2.3 倒置显微镜动态观察细胞形态学变化

取对数生长期的 HepG-2 和 L02 细胞,用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化培养细胞,以每孔 5000 个细胞接种于 6 孔板培养 24 h 后吸除原培养液,分别加入含有 20、40、80 μg/mL 的 PB3A,设(培养液中不加药物加相同溶剂剂量 DMSO)对照组,只加培养液为空白对照组(细胞培养 24 h 后把

原培养液吸掉换新培养液)继续培养 24 h 后收集细胞(收集细胞时格外注意,不要用力吹打,轻轻地消化下来以免加重细胞的损坏)各组细胞(2000 rpm, 4 °C)离心 5 min 后弃上清,把用预冷的 PBS 重悬细胞,(2000 rpm, 4 °C)离心,弃上清,再次重悬离心后弃上清,分别加入 400 μ L 的 Binding Buffer 轻轻地悬浮细胞,在室温下避光孵育 20 min,再加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI,轻轻混匀,在 30 min 内进行流式细胞仪检测,检测时激发波长 Ex = 488 nm,发射波长 Em = 530 nm, FITC 的绿色荧光 FITC 通道为 FL1, PI 红色荧光 PI 通道为 FL2。

1.2.4 统计学处理

所有数据均以 mean \pm SD 表示,以 SPSS17.0 版专用统计分析软件对各组数据进行 t 检验。以 CalcuSyn Demo Version 1.1.4 统计软件计算 IC₅₀。

表 1 不同浓度的 PB3A 对肝癌细胞 HepG-2 的增殖抑制作用 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of different concentrations of PB3A on the proliferation of hepatoma HepG-2 cells ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

PB3A 浓度 PB3A concentration (μ g/mL)	抑制率 Inhibition rate (%)		
	24 h	48 h	72 h
空白对照 Control	0	0	0
10	9.330 \pm 1.046 ^a	44.290 \pm 2.999 ^A	54.568 \pm 2.995 ^A
20	11.955 \pm 2.883 ^A	47.691 \pm 1.108 ^{Ab}	60.691 \pm 1.233 ^{Ab}
40	21.788 \pm 1.236 ^{ABc}	51.147 \pm 1.187 ^{ABc}	66.123 \pm 3.988 ^{ABc}
80	28.213 \pm 2.981 ^{ABcd}	54.917 \pm 2.931 ^{ABcd}	73.580 \pm 3.877 ^{ABcd}
IC ₅₀	147.595	45.689	12.644

注:^a $P < 0.05$, ^A $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$, ^B $P < 0.01$ vs 10 μ g/mL 组; ^c $P < 0.05$, ^C $P < 0.01$ vs 20 μ g/mL 组; ^d $P < 0.05$, ^D $P < 0.01$ vs 40 μ g/mL 组。

Note: ^a $P < 0.05$, ^A $P < 0.01$ vs control group; ^b $P < 0.05$, ^B $P < 0.01$ vs 10 μ g/mL group; ^c $P < 0.05$, ^C $P < 0.01$ vs 20 μ g/mL group; ^d $P < 0.05$, ^D $P < 0.01$ vs 40 μ g/mL group.

表 2 不同浓度的 PB3A 对正常肝细胞 L02 的增殖抑制作用 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Table 2 The effect of different concentrations of PB3A on the proliferation of normal hepatocyte L02 cells ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

PB3A 浓度 PB3A concentration (μ g/mL)	抑制率 Inhibition rate (%)		
	24 h	48 h	72 h
空白对照 control	0	0	0
10	-16.378 \pm 2.03 ^A	7.497 \pm 1.35 ^A	9.942 \pm 1.04 ^A
20	1.465 \pm 0.35 ^B	15.645 \pm 1.95 ^{AB}	26.968 \pm 2.83 ^{AB}
40	3.297 \pm 0.90 ^B	22.824 \pm 2.32 ^{ABC}	40.514 \pm 2.21 ^{ABC}
80	10.484 \pm 3.37 ^{ABCD}	28.537 \pm 2.36 ^{ABCD}	43.89 \pm 3.85 ^{ABC}
IC ₅₀	150.529	137.195	71.121

注:^a $P < 0.05$, ^A $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$, ^B $P < 0.01$ vs 10 μ g/mL 组; ^c $P < 0.05$, ^C $P < 0.01$ vs 20 μ g/mL 组; ^d $P < 0.05$, ^D $P < 0.01$ vs 40 μ g/mL 组。

Note: ^a $P < 0.05$, ^A $P < 0.01$ vs control group; ^b $P < 0.05$, ^B $P < 0.01$ vs 10 μ g/mL group; ^c $P < 0.05$, ^C $P < 0.01$ vs 20 μ g/mL group; ^d $P < 0.05$, ^D $P < 0.01$ vs 40 μ g/mL group.

2.3 HepG-2 细胞的形态学变化

未 PB3A 处理组及对照组细胞核形态完整, 20、

2 实验结果

2.1 PB3A 对 HepG-2 细胞的增殖抑制作用

用 PB3A 分别作用 24、48、72 h 后 HepG-2 细胞的生长受到明显抑制, 随着 PB3A 浓度的增加和作用时间的延长, HepG-2 细胞的增殖抑制率逐渐升高, 抑制作用呈剂量依赖性和作用时间依赖性(表 1)。PB3A 作用 HepG-2 细胞 24、48、72 h 后, IC₅₀ 分别为 147.6 μ g/mL、45.69 μ g/mL、12.644 μ g/mL。

2.2 PB3A 对 L02 增殖的影响

不同浓度 PB3A 作用 L02 细胞 24、48、72 h 后, 发现 PB3A 对 L02 生长亦有明显的增殖抑制作用(表 2), 低剂量 PB3A 促进 L02 细胞的增殖, 高浓度 PB3A(40 μ g/mL、80 μ g/mL)显著抑制 L02 细胞的增殖($P < 0.05$)。

40、80 μ g/mL 的 PB3A 干预细胞 24、48、72 h 后, 细胞生长速度明显减慢, 形态不规则, 不规则突起, 细

胞膜皱缩,与周围细胞分离,漂浮,死细胞增多,细胞内有沙粒样等明显的生态学变化,而且随着 PB3A

剂量的加大及作用时间的延长,细胞形态的变化越显著,见图 1、2。

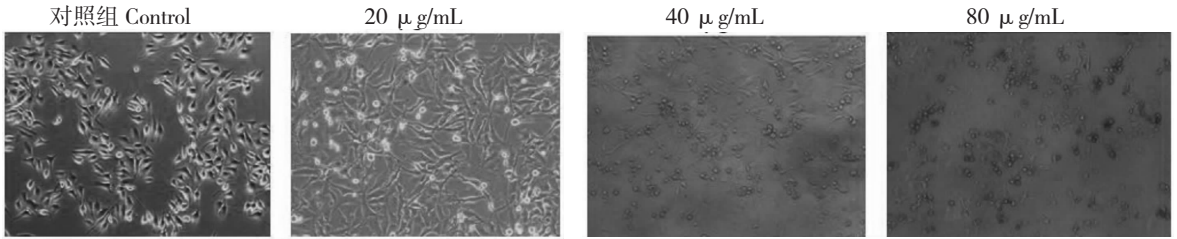


图 1 不同浓度 PB3A 作用 24 h 后 HepG-2 细胞形态学变化 (×100)

Fig. 1 The effect of different concentrations of PB3A on morphological changes of HepG-2 cells after 24 h (×100)

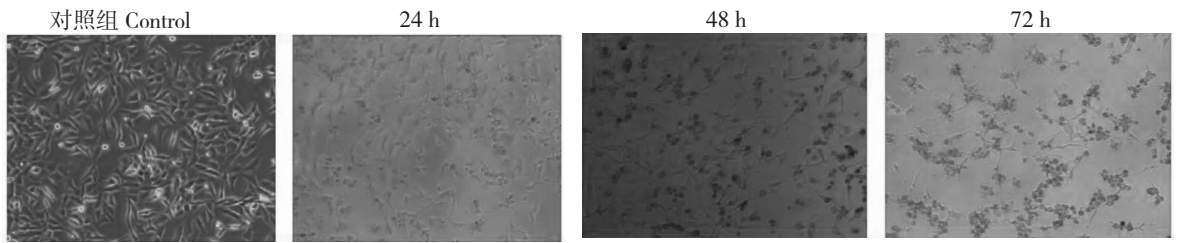


图 2 40 μg/mL PB3A 作用 24、48、72 h 后 HepG-2 细胞形态学变化 (×100)

Fig. 2 The effect of 40 μg/mL of PB3A on morphological changes of HepG-2 cells after 24, 48 and 72 h (×100)

2.4 倒置显微镜下观察 PB3A 对 L02 细胞生长的影响

与对照组相比,低浓度的 PB3A 作用后,L02 细胞的形态及数量无明显变化。高浓度的(40 ~ 80 μg/mL) PB3A 干预细胞后与对照组相比较,PB3A

处理组 L02 细胞,细胞核周围较多空泡样结构,与周围细胞分离,细胞数量减少,从贴壁的多边形逐渐变为圆形,折光性减弱,随着 PB3A 浓度升高,贴壁细胞逐渐减少,并在细胞周围出现细胞碎片,细胞形态学的改变与 PB3A 浓度呈正相关(图 3、4)。

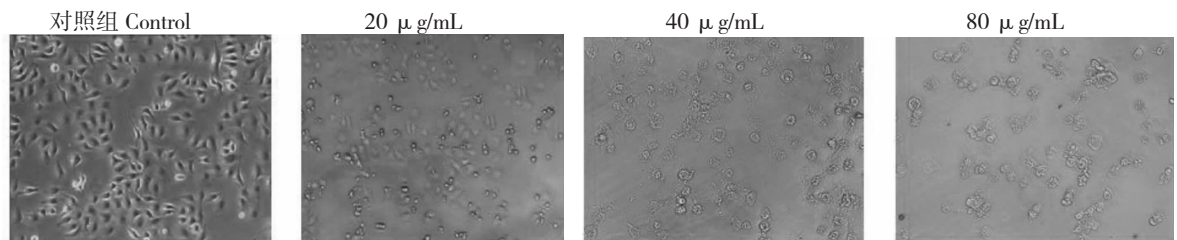


图 3 不同浓度 PB3A 作用 24 h 后正常肝细胞 L02 形态学变化 (×200)

Fig. 3 The effect of different concentrations of PB3A on morphological changes of L02 cells after 24, 48, 72 h (×200)

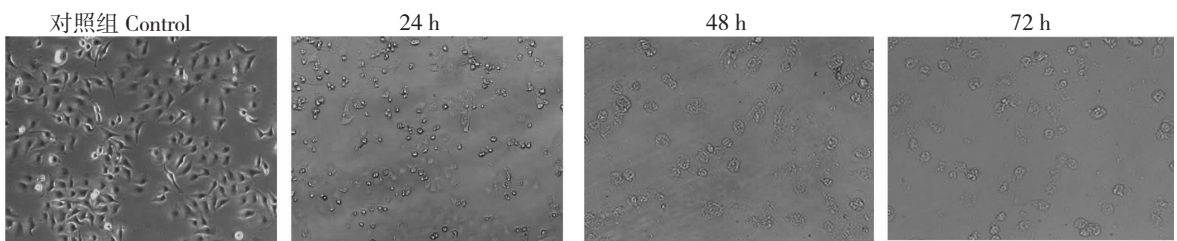


图 4 40 μg/mL PB3A 作用 24、48、72 h 后 L02 细胞形态学变化 (×200)

Fig. 4 The effect of 40 μg/mL of PB3A on morphological changes of L02 cells after 24, 48, 72 h (×200)

2.5 PB3A 对肝癌 HepG-2 细胞凋亡的影响

为了进一步实验研究 PB3A 的抗肿瘤作用是否与凋亡有关。采用 FITC-Annexin V 和 PI 双染色来定量分析 HepG-2 的凋亡。流式细胞术分析显示,细胞自然发生的早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 2.2%、0.8%。经过不同浓度的 PB3A (20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂 (阳性对照组) 干预 24 h 后,凋亡率分别为 11.8%、26.6%、37.8% 和 47.6%。FITC-Annexin V 阳性细胞随 PB3A 浓度的增加而增多,与对照组的凋亡率 4.2% 相比,细胞凋亡率有极显著性差异 ($P < 0.01$),最高浓度药物处理组的凋亡率 (37.8%) 接近与阳性对照组顺铂 (47.6%) 的凋亡率。本实验结果表明:随着药物浓度的增加,药物干预组的早期和晚期凋亡率明显增大 ($P < 0.01$)。

2.6 PB3A 对 L02 细胞凋亡的影响

含不同剂量 PB3A 的培养液培养 L02 细胞 24 h 后,细胞自然发生的早期凋亡率和晚期凋亡率分别为 2%、1.1%。经过不同浓度的 PB3A (20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的顺铂干预 24 h,后实验组早期凋亡率分别为 7.1%、9.1%、18.5% 和 24.1%,FITC-Annexin V 阳性细胞随 PB3A 浓度的增加而增多,与对照组 (3.8%) 相比,细胞早期凋亡率显著增加 ($P < 0.05$),最高浓度药物干预组凋亡率与阳性对照组凋亡率 (24.1%) 相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。本实验结果表明随着 PB3A 剂量的加大,药物干预组早期凋亡率明显增大 ($P < 0.01$)。

3 讨论与结论

肝癌当前仍然是世界上最常见的恶性肿瘤之一,世界卫生组织发表的《全球癌症报告》(2014)提示:2013 年全球癌症患者的发病率和死亡病例居高不下,新增病例中有一半是亚洲人,其中肝癌在我国的新增人数和死亡病例达到世界首位^[23]。肝癌的发生与生活习惯,遗传等因素有关。由于尚未发现具有选择性的抑制或杀死肿瘤细胞而对正常细胞无毒的抗肿瘤药物,使得传统化疗技术的应用受到限制^[24]。许多研究人员试图从蜂胶中分离纯化结构新颖具有抗肿瘤活性的化合物。

通过体外培养 HepG-2 和 L-02 细胞,采用 MTT 法检测不同浓度的 PB3A 对 HepG-2 和 L-02 细胞增殖及凋亡的影响,发现 PB3A 对 HepG-2 细胞有显著的增殖抑制作用,并呈时间和浓度依赖性。10 $\mu\text{g}/$

mL 的 PB3A 作用 24 h 时促进 L-02 细胞生长,但随着 PB3A 浓度的升高并作用时间的延长,PB3A 对 HepG-2 和 L-02 细胞的抑制作用增强。从实验结果可以看出,各时间段 PB3A 作用于 HepG-2 细胞的 IC_{50} 值明显低于 L02 细胞 IC_{50} 值。这表明肝癌 HepG-2 细胞对 PB3A 的敏感比肝正常 L-02 细胞高。

从形态学观察不同浓度的 PB3A 作用 HepG-2 和 L-02 细胞不同时间段后,两种细胞的形态发生变化,L02 细胞收缩变小,与周围细胞分离,细胞核周围出现较多空泡样结构,细胞核物质边集裂等典型的细胞凋亡形态,HepG-2 细胞出现悬浮细胞增多,细胞变成不规则状、与周围细胞分离并不规则突起,皱缩、细胞胞体缩小,以脑细胞似纤维化等。随着作用时间的延长和 PB3A 浓度的增加,HepG-2 和 L-02 细胞的上述形态学特征更为明显。

本研究采用 Annexin V/PI 双染色法检测 PB3A 对不同肿瘤细胞凋亡作用。Annexin V 结合在细胞膜表面作为凋亡的指示。碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 主要用于指示细胞膜的完整性,因此将 Annexin V 与 PI 结合使用,就可以检测早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞、坏死细胞和正常细胞。本研究结果显示,PB3A 作用肝癌 HepG-2 和常肝 L02 细胞 24h 后,随 PB3A 浓度的增多,细胞凋亡率渐增,呈剂量依赖性。从凋亡图可以看到 PB3A 诱导 L02 细胞的早期凋亡率比较明显,但几乎没有晚期凋亡或坏死的细胞,低剂量组间亦没有明显差异 (20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。同浓度 PB3A 诱导 HepG-2 和 L02 细胞的早期凋亡率相比较,HepG-2 细胞的凋亡率明显大于 L02 细胞的凋亡率。

MTT 实验与凋亡实验结果表明,PB3A 在体外对 HepG-2 细胞具有较强的诱导凋亡作用,与 L02 细胞相比 HepG-2 细胞对 PB3A 的敏感性较高。PB3A 的增殖抑制作用可能与诱导细胞凋亡有关,但诱导细胞凋亡的分子机制尚不清楚,需要进一步深入研究。本研究为 PB3A 抗肿瘤作用的深入研究及进一步阐明 PB3A 的抗肿瘤作用机理提供了实验依据。

参考文献

- 1 Bankova VS, De Castro SL, Marcucci MC. Propolis, recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 2000, 31: 3-15.
- 2 Dausch A, Moraes CS, Fort P, et al. Brazilian red propolis-

- chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2008, 5:435-441.
- 3 Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J*, 2014, 2(8):8-28.
 - 4 Chen CN, Hsiao CJ, Lee SS, et al. Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from *Taiwanese propolis*. *Nat Prod Res*, 2012, 26:116-124.
 - 5 Paulino N, Teixeira C, Martins R, et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med*, 2006, 72:899-906.
 - 6 Sa-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *J Ethnopharmacol*, 2003, 87:93-97.
 - 7 Aso K, Kanno S, Tadano T, et al. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. *Biol Pharmaceut Bull*, 2004, 27:727-730.
 - 8 Chan GC, Cheung KW, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44:262-273.
 - 9 Nizam AHT(尼砸木·艾海提), Maryam AK(买热艳木·艾尔肯), Zulpiye SMY(祖丽比亚·司马义), et al. Study on antioxidant activity of propolis from different regions of Xinjiang. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:113-116.
 - 10 Markiewicz-Zukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, et al. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13:50.
 - 11 Szliszka E, Zydowicz G, Janoszka B, et al. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol*, 2011, 38:941-953.
 - 12 Wei Z, Ying HL, Min LC, et al. Protective effects of Chinese and Brazilian propolis treatment against hepato renal lesion in diabetic rats. *Human Exp Toxicol*, 2011, 30:1246-1255.
 - 13 Chan GC, Cheung KW, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2013, 44:262-273.
 - 14 Yang F, Jin H, Pi J, et al. Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organogermanium (IV) complex in MCF-7 cells. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23:5544-5551.
 - 15 Miguel MG, Antunes MD. Is propolis safe as an alternative medicine? *J Pharm Bioallied Sci*, 2011, 4:479-495.
 - 16 Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, et al. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53:643-651.
 - 17 Maruta H, Ohta T. Signal Therapy: Propolis and Pepper Extracts as Cancer Therapeutics. *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*, Elsevier: Academic Press, 2009. 523-539.
 - 18 Seda VH, Sorkun K, Gurhan S, et al. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochemica*, 2010, 6:546-556.
 - 19 Fang JM, Su WC, Cheng YS. Flavonoids and stilbenes from armand pine. *Phytochemistry*, 1988, 27:1395-1397.
 - 20 Rehehan YMT(热合曼·依米提), Otsuka YSSN(大塚靖之), Kure XW(呉晓闻), et al. Screening of antitumor active components included in Chinese propolis. *Pharmacol Funct Foods Nutr*, 2005, 5(2):17-21.
 - 21 Rehehan YMT(热合曼·依米提), Kure XW(呉晓闻), Yamada PRD(山田パトリック), et al. Extracted from propolis flavonoids Pinobanksin-3-acetate the effects of cell growth inhibition and apoptosis on Jurkat cells. The Japanese Society of agricultural chemistry 2006 annual meeting and Collection of papers, 2006, Vol 67.
 - 22 He H(何珂), Hu W(胡蕴), Guo MH(郭慕红), et al. Effect of thyroid stimulating hormone receptor antibody on apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Clin Meta*, 2014, 1:45-48.
 - 23 Lan T(兰涛), Yuan JL(苑建磊), Zhou GQ(周国庆), et al. Expression of vascular endothelial growth factor and apoptosis suppressor gene in hepatocellular carcinoma and its correlation with prognosis. *Chin J Exp Clin Infect Dis*, 2014, 2:41-45.
 - 24 Ren XN(任向楠), Zhang HC(张红城), Dong J(董捷). Research progress of bee pollen. *Food Sci*, 2009, 21:380-383.