

蜂胶抗肿瘤活性及其机制的研究进展

郑宇斐, 王 凯, 胡福良*

浙江大学动物科学学院, 杭州 310058

摘要: 蜂胶是蜜蜂采集植物树脂等分泌物与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合形成的胶粘性物质, 化学成分复杂, 生物学活性广泛。本文对不同地理来源蜂胶的抗肿瘤活性、蜂胶中黄酮类、萜烯类、酚酸类单体成分的抗肿瘤活性, 以及蜂胶及其有效活性成分在诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抗血管增生、抑制信号转导通路的活化、抗肿瘤转移、对致癌因素的防治等抗肿瘤作用机制方面的研究进展进行综述, 以期为蜂胶抗肿瘤活性的进一步研究以及在抗肿瘤药物中的开发利用提供参考。

关键词: 蜂胶; 抗肿瘤; 机制; 综述

中图分类号: S896.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.4.028

Review on Anti-tumor Activity of Propolis and its Mechanisms

ZHENG Yu-fei, WANG Kai, Hu Fu-liang*

College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Propolis is a resinous substance which is collected by bees from tree exudates primarily resins and mixed with secretions of mandibular gland and wax gland. It has a complex chemical composition and extensive biological activities. In this article, the researches about the anti-tumor activity of propolis from different geographic regions and their isolations were summarized. Meanwhile, the anti-tumor mechanisms of propolis as inducing apoptosis, inhibiting cell proliferation and signal transduction pathway, anti-angiogenesis, anti-tumor metastasis and cancer prevention were also involved. By summarizing these researches, we aimed to provide insights for the further studies in these areas and for translating propolis to an effective anti-tumor drug.

Key words: propolis; anti-tumor activity; mechanisms; review

癌症是全球范围内危害人类健康的“头号杀手”, 而化疗是目前使用最为广泛的治疗癌症的方法之一。然而长期接受传统化疗药物会导致一系列副作用, 通过基因变异、DNA 甲基化、组蛋白修饰等行为产生抗药性。因此, 寻找新的抗癌药物成为了目前癌症治疗的新方向。而天然产物是一个很好的来源, 其广泛的生物活性可以通过分子修饰来为临床治疗提供先导化合物。有研究表明, 目前有超过 70% 的抗癌化合物来源于天然产物或天然产物的衍生物。此外, 天然产物与单克隆抗体或者聚合载体的结合可以提供更加有效、更有针对性的治疗^[1]。

蜂胶作为一种生物活性成分极为丰富的天然产物, 具有抗氧化、抗炎症、抗菌、抗病毒、免疫调节和抗寄生虫等广泛的生物学活性。近年来, 大量有关

蜂胶抗肿瘤作用也有了一定报道^[2], 给蜂胶生物学活性的作用机制提供了新的信息, 而蜂胶对癌症的抑制作用还是一个全新的领域, 有很多值得研究的方向^[3,4]。同时, 由于蜂胶对人类没有明显的毒副作用, 它在开发相对廉价的癌症治疗方案中也逐渐得到应用^[5-7]。本文就蜂胶及其活性成分的抗肿瘤活性及可能的作用机制方面的研究进展进行综述, 以期为蜂胶抗肿瘤活性的进一步研究以及在抗肿瘤药物中的开发利用提供参考。

1 不同地理来源蜂胶的抗肿瘤活性

蜂胶的化学成分十分复杂, 一般而言, 蜂胶中约含有 50% 的树脂, 30% 的蜂蜡, 10% 的芳香挥发油, 5% 的花粉和 5% 的杂质, 而不同的植物来源、地理分布、季节都会对蜂胶的化学组分造成影响。近二十年来, 世界各国学者对不同地理来源蜂胶的生物学活性进行了广泛而深入的研究, 然而由于地理来源不同的蜂胶其组分存在较大差异, 这些实验结果

无法平行比较^[2],这使得蜂胶生物学活性评定的标准化过程变得相当艰难。人们普遍认为,由于蜂胶的这一特性,几乎不可能制定一个通用的标准。因此蜂胶的生物学活性研究应当与蜂胶的化学成分与地理来源相结合起来进行^[4]。

Orsolio 等^[8-10]在他们的肿瘤模型中评估了克罗地亚蜂胶和巴西蜂胶的生物调节活性。结果表明,经二者蜂胶水提物处理后的小鼠巨噬细胞的杀瘤活性提高,淋巴激活因子产量增加,并都能有效抑制人宫颈癌细胞(HELA)和中国仓鼠肺成纤维细胞(V79)的增殖。同时,经蜂胶处理过的小鼠对多克隆有丝分裂原表现出了更强的脾细胞反应。

Missima 等^[11,12]评估了巴西蜂胶乙醇提取物对应激状态下患有黑素瘤小鼠的作用。结果发现,在皮下接种 B16F10 细胞后,应激反应引发了更大的肿瘤面积,而喂食过蜂胶的小鼠,其黑色素瘤的发展都与对照组相似。研究还发现,蜂胶能在患有黑素瘤的小鼠上诱导产生更高浓度的白细胞介素 1- β 和白细胞介素-6,刺激 TH1 血细胞因子的产生(白细胞介素-2 和干扰素伽马 γ)。因此,他们推测干扰素 γ 和促炎症因子的协同作用可以通过诱导抗血管生成因子生成而抑制肿瘤在体内的生长。

Awale 等^[13]研究发现,在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,巴西红蜂胶甲醇提取物对人体胰腺癌 PANC-1 细胞系表现出 100% 的选择性细胞毒作用。在后续色谱分析中,他们鉴定分离出了 43 种化合物,其中 3 种是首次报道。他们还研究了分离的单体化合物在营养缺失条件下对 PANC-1 细胞的影响。其中一种化合物[(6aR, 11aR)-3, 8-dihydroxy-9- methoxypterocarpin]表现出最强的(100%)选择性细胞毒作用,且表现出时间和剂量依赖性。该细胞毒作用主要通过非凋亡通路介导,同时不导致 DNA 碎片化,但会导致坏死细胞形态变化。

研究表明,巴西蜂胶乙醇提取物能抑制人体前列腺癌细胞的增殖^[14]。日本蜂胶水提物可以在体外抑制 S-180 小鼠肉瘤生长,还能有效抑制小鼠体内移植瘤的生长^[15]。泰国蜂胶对克隆癌细胞系 SW620 的抑制增殖作用和细胞毒性作用证实了蜂胶水提物比甲醇提取物具有更好地抑制增殖的活性效果^[16]。

有报道证实土耳其蜂胶具有抗肿瘤转移活性,其抗肿瘤效果可以归功于蜂胶中黄酮类化合物抑制癌细胞对胸腺嘧啶脱氧核苷、尿嘧啶核苷和亮氨酸的摄入,从而阻碍了癌细胞的 DNA 复制^[17,18]。Ero-

glu 等^[19]认为膀胱癌细胞在组织培养中降低的有丝分裂指数率预示着蜂胶具有抗癌和抗有丝分裂的作用,并可用于提高人体健康水平。

中国和巴西蜂胶乙醇提取物在 4 种人体直肠癌细胞系(Caco, HCT, HT 和 SW)上均表现出了一定的抗癌活性,且这两种蜂胶提取物都表现出显著的剂量依赖的生长抑制作用。在 HECT 细胞系上,中国蜂胶提取物能诱导细胞凋亡,并呈剂量依赖性导致肿瘤抑制蛋白(p21CIP1 和 p53)mRNA 基因表达量的增加^[20]。王月华等^[21]在 2014 年利用五种癌细胞系(A549、HCT116、MCF-7/MDA-MB-231、HepG-2B、HUVECs)对中国蜂胶和巴西蜂胶的抗肿瘤作用进行了比较。实验表明,中国蜂胶和巴西蜂胶对该五种肿瘤细胞的增殖皆有一定的抑制作用,且同浓度下中国蜂胶对肿瘤细胞的毒性大于巴西蜂胶。

Xuan 等^[22]利用两种不同来源的乳腺癌细胞系 MCF-7(原位 ER 阳性乳腺癌细胞系)和 MDA-MB-231(高转移性恶性乳腺癌细胞系)研究了中国蜂胶对乳腺癌细胞的细胞毒作用。结果发现,中国蜂胶对这两种乳腺癌细胞系均呈剂量、时间依赖性的细胞毒性作用,同时蜂胶处理能显著增加膜联蛋白 A7 的表达量,并显著抑制 ROS 累积和线粒体膜电位水平、降低 NF- κ Bp65 的蛋白表达水平。此外,蜂胶在两种乳腺癌中对肿瘤抑制蛋白(p53 蛋白)的调控作用呈现明显差异,且对正常细胞的细胞毒性作用非常低。

用丁醇从希腊蜂胶中提取和分离的主要成分,二萜类和黄酮醇,可用于抑制人类恶性和正常细胞株的细胞生长,同时对 ht-1080 人类纤维肉瘤和 ht-克隆腺癌细胞表现出细胞毒作用^[23]。

葡萄牙蜂胶一直以其在人体红细胞和 A-498 细胞系上表现出的生物活性而被广泛关注。研究表明,低浓度的葡萄牙蜂胶提取物可以抑制和减少脂质过氧化作用和由过氧化自由基诱发的溶血现象^[24]。此外,葡萄牙蜂胶能有效抑制人体肾癌细胞的增殖活性。而针对正常细胞和癌细胞反应性的体内比较试验发现蜂胶提取物只对癌细胞生长起抑制作用。这些发现都揭示了葡萄牙蜂胶是预防由自由基引起的疾病的临床医药成分,特别是在肾癌的化学预防中,有着良好的开发利用前景。

表 1 显示了不同研究人员所使用的蜂胶提取物或其单体成分和所使用的肿瘤细胞系。

表 1 实验所用蜂胶组分及细胞系

Table 1 The propolis and its components used in the different cell lines

蜂胶提取物或组成 Propolis extract or its component	英文名称 English name	细胞系 Cell Lines used in studies	参考文献 Reference
乙醇提取物(巴西)	Ethanolic extract (Brazil)	DU-145, PC-3, RC-58T/h/SA#4i	[14]
水提取物(土耳其)	Aqueous extract (Turkey)	膀胱癌患者组织	[19]
水提取物(日本)	Aqueous extract (Japan)	S-180	[15]
乙醇提取物(中国和巴西)	Ethanolic extract (China and Brazil)	CaCo2, HCT116, HT-29, SW480	[20]
乙醇提取物	Ethanolic extract	Hela	[54]
乙醇提取物(突尼斯)	Ethanolic extract (Tunisia)	HT-29, A549, HEp-2, RAW264.7, Vero	[23]
乙醇提取物(土耳其)	Ethanolic extract (Turkey)	MCF-7	[17]
甲醇提取物(葡萄牙)	Methanolic extract (Portugal)	A498	[24]
高良姜素	Galangin	B16F10, A549	[35], [36]
槲皮素	Quercetin	HepG2, LNCaP, A549	[32], [33], [34]
槲皮素, 柯因, 咖啡酸, 柚配基, 柚苷	Quercetin, caffeic acid, chrysin, naringenin, naringin	MOLT, JURKAT, HL 60, RAJI, U937	[25]
黄酮醇混合体(中国)	Flavanol racemates and flavanol racemic mixture (China)	Hela	[26]
柯因	Chrysin	DU-145	[29]
黄酮类, 酚酸衍生物, 牛脂酸甘油酯(墨西哥)	Flavonoids, phenolic acid derivatives, glycerides (Mexico)	26-L5, B16-BL6, LLC, A549, HeLa, HT-1080	[27]
二萜类和提取物(希腊)	Extract and diterpenes (Greece)	HT-29	[39]
咖啡酸苯乙酯	Caffeic acid phenethyl ester	A549, LS180, HeLa, NCTC clone I929, M12. C3. F6, BxPC-3, PANC-1, SK-Hep1, HepG2, Daoy, U937, MCF7, MDA231, C6	[45], [46], [47], [48]

注: A: 细胞系; 26-L5: 结肠癌 colon cancer; A375: 人黑色素瘤 human melanoma; A498: 肾细胞癌 renal cell carcinoma; A549: 人肺腺癌 human lung adenocarcinoma; B16-BL6: 小鼠黑色素细胞瘤 mouse melanoma cells; B16-F10: 小鼠黑色素瘤克隆 mouse melanoma clone F1; BL6: 黑色素瘤 melanoma; BxPC-3: 人胰腺癌细胞 human pancreatic cancer cell; C6: 小鼠神经胶质瘤 rat glioma; CaCo2: 人结肠癌 human colon carcinoma; Daoy: 人成神经管细胞瘤 human medulloblastoma; DBTRG-05MG: 人成胶质细胞瘤 human glioblastoma; DU-145: 人前列腺癌 human prostate cancer; HCT8: 人结肠癌 human colon cancer; HCT116: 人结肠腺癌 human colon adenocarcinoma; HeLa: 宫颈腺癌 human cervical adenocarcinoma; HepG2: 人肝癌 HEp-2 human hepatocellular liver carcinoma; HEp-2: 人喉鳞状细胞癌 human laryngeal epidermoid carcinoma; HL60: 早幼粒细胞白血病细胞 promyelocytic leukaemia cell; HT-29: 人结肠腺癌 human colon adenocarcinoma; HT-1080: 人纤维肉瘤 human ? brosarcoma; JURKAT: 人类 T 细胞白血病 leukaemic human T cell line; LLC: 路易斯肺癌 Lewis lung carcinoma; LNCaP: 人前列腺腺癌 human prostate adenocarcinoma; LS 180: 人结肠腺癌 human colon adenocarcinoma; M12. C3. F6: 小鼠 B 细胞淋巴瘤 murine B-cell lymphoma; MCF-7: 人乳腺癌 human breast adenocarcinoma; MDA 231: 人乳腺癌 human breast adenocarcinoma; MDR: 多药耐药细胞 multidrug resistant cell; MOLT: 人恶性体细胞 human malignant T-lymphoblastic cell; PANC-1: 人胰腺腺癌 human pancreatic cancer; PC-3: 人前列腺腺癌细胞 human prostate cancer cell; RAJI: 人类 Burkitt 淋巴瘤细胞系 human Burkitt lymphoma cell line; RAW264.7: 小鼠白血病单核巨噬细胞 mouse leukaemic monocyte macrophage; RC-58T/h/SA#4: 高端粒酶原发人前列腺腺癌细胞系 telomerase-immortalized primary human prostate cancer-derived cell line; S-180: 小鼠肉瘤 mouse sarcoma; SH-SY5Y: 儿童神经母细胞瘤 neuroblastoma; SK-Hep1: 肝癌细胞 hepatocellular carcinoma; SW480: 人结肠腺癌 human colon adenocarcinoma; U937: 人白血病细胞淋巴瘤 human leukaemic monocyte lymphoma; Vero: 非洲绿猴肾上皮细胞 kidney epithelial cells of the African green monkey.

2 蜂胶中活性单体成分的抗肿瘤活性

2.1 黄酮类化合物

黄酮类化合物是蜂胶的主要化学成分, 具有良好的抗肿瘤活性。目前, 自然界已有超过 4000 种具有生物活性的黄酮类化合物被确认, 可分为黄酮醇、黄酮、黄烷醇、黄烷酮、花青素、异黄酮等 6 大类。

而从中国天然蜂胶中提取出来的新外消旋黄烷醇 8-[(E)-4-phenylprop-2-en-1-one]-(2R,3S)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-2-benzopyran-5-methoxyl-3,7-diol 和 8-[(E)-4-phenylprop-2-en-1-one]-(2S,3R)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)-3,4-di-

hydro-2H-2-benzopyran-5-methoxyl-3,7-diol 也表现出了对人海拉卵巢肿瘤细胞系的细胞毒性作用^[26]。

墨西哥蜂胶中的天然黄酮醇 1-phenylallyl moiety [(7"R)-8-[1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)prop-2-en-1-yl] galangin] 在营养缺乏培养条件下表现出很强的细胞毒性, 同时会诱导 PANC 人胰腺癌细胞凋亡, 发生形态改变。同样, phenylpropanoid-substituted flavanol (2R,3S)-8-[4-phenylprop-2-en-1-one]-4',7-dihydroxy 3,5-dimethoxyflavan-3-ol 对 A549 细胞和 HT-1080 细胞表现出很强的细胞毒性, 这种细胞毒性甚至比常用的临床抗肿瘤药物氟尿嘧啶还要有效^[27]。

新疆大学麦麦提等^[28]研究了蜂胶黄酮 PB3A (pinobanksin-3-acetate) 对体外培养的大肠癌 SW480 细胞中 RGS2 和 GEM 基因表达水平的影响。实验表明, PB3A 可能通过上调 RGS2 和 GEM 基因表达从而抑制大肠癌细胞的增殖。

2.1.1 柯因

柯因(5,7-二羟黄酮)是一种具有抗炎、抗癌、抗过敏和抗氧化等丰富生物学活性的黄酮类化合物,并且能阻碍细胞周期运行。

Fu 等^[29]研究发现,柯因可以抑制前列腺癌 DU145 细胞中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 和血管内皮生长因子的表达。柯因通过减少其稳定性来抑制由胰岛素引起的 HIF-1 α 的表达,同时通过脯氨酰羟化增加了 HIF-1 α 的泛素化和降解,干扰 HIF-1 α 和热休克蛋白 90 的反应,并通过 AKT 信号抑制 HIF-1 α 的表达。而在小鼠 B16-F1 和人黑素瘤 A375 细胞系上,柯因可以通过合成和聚集细胞内血红素前体原卟啉 IX 来减少黑素瘤细胞的增殖,并诱导黑素瘤细胞分化。

柯因在由二乙基亚硝胺引起的小鼠早期肝癌发展模型中的效果也得到了研究人员的关注。经柯因处理后的小鼠,可以明显观察到肿瘤结节的减少和减小,血清中谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和 γ -谷氨酰转移酶的活性显著降低。COX-2 和 NF- κ B p65 的表达同时也大幅度降低,伴随着 p53、Bax 和 caspase3 蛋白质翻译量和转移量的增加。另外,研究人员还观察到 β 休止蛋白(在进行性肿瘤中扮演重要角色的一种蛋白)和生存蛋白 Bcl-xL 也出现了明显下降^[30]。

2.1.2 槲皮素

多酚/黄酮类化合物对于不同白血病细胞系的作用已有相关报道。通过比较 5 种化合物(槲皮素、咖啡酸、柯因、柚皮素、柚皮苷)作用在 5 种白血病细胞系上的实验结果发现,槲皮素对 5 种细胞系表现出最强的细胞毒性作用,其次是柯因和咖啡酸^[25]。槲皮素能够通过调整胰岛素样营养因子系统成分和诱导细胞凋亡来降低非激素依赖性前列腺癌细胞的存活率。槲皮素还能抑制乳腺癌细胞、人肺癌和鼻咽癌细胞的增殖。Sugantha 等^[31]实验表明槲皮素可以通过抑制前列腺癌细胞系 PC-3 增殖、存活过程中的入侵、迁移行为和其信号分子导致细胞周期终止,并引起前列腺癌细胞的凋亡。

Xing 等^[32]的实验初步证明了槲皮素可以显著下调与前列腺癌侵袭表型有关的特定基因 NKX3.1 的表达。此外,研究者们还发现槲皮素可以抑制鸟氨酸脱羧酶 (ODC) mRNA 的激素上调水平,而 ODC 是在细胞增殖中扮演十分重要作用的合成多胺的调控因素。

Maurya 等^[33]研究发现,槲皮素可以在 HepG2 细胞中下调 phospho85 α , 此作用与通过减少络氨酸激酶活性导致 PI3K 失活的原理是一样的。研究表明,槲皮素可以通过竞争抑制 P85 α 的 ATP 连接位点抑制 PI3K 活性,证明了其是降低 HepG2 细胞生存率的主要因素。

赵欣等^[34]通过研究槲皮素对基质金属蛋白酶 (MMP-9) 的抑制作用从而阐述其抑制肺癌肿瘤细胞生长和转移的机制。实验表明,槲皮素可以竞争性抑制诱导 MMP-9 活性降低,减少 MMP-9 mRNA, MMP-9 蛋白和 TGF- β 蛋白的表达,最终达到促进肺癌肿瘤细胞凋亡的目的。

2.1.3 高良姜素

高良姜素(3,5,7-三羟黄酮)是在多种天然产物中被发现的一种黄酮类抗癌活性物质,在蜂胶中也十分重要。高良姜素的抗氧化性能保护细胞不受自由基的伤害,并对癌症细胞有抑制作用。研究表明,高良姜素对人白血病细胞传代的细胞的增殖有抑制作用,并能促进其细胞凋亡。

高良姜素可以破坏 B16F10 小鼠黑素瘤细胞中线粒体膜电位,促进细胞凋亡,降低肿瘤细胞存活性。此外,高良姜素还在一定时间内显著地降低了 phospho-p38 MAPK 的活性,并表现出了剂量依赖性^[35]。

伍俊等^[36]则在人肺腺癌细胞株 A549 上研究了高良姜素对肿瘤细胞生长的影响。研究证明高良姜素可以呈浓度依赖性的降低线粒体膜电位,通过激活 caspase3、caspase9 从而诱使细胞凋亡。同时,实验中发现 Bcl-2、Bcl-xL 表达量下降,而 p53、Bax、Bid 表达量上升。

2.2 萜烯类化合物

萜烯类是蜂胶中另一大类主要活性成分。缅甸蜂胶中分离出来的 13 种环阿尔廷醇三萜类和 4 种异戊二烯类黄酮类化合物的抗癌活性已经被普遍研究^[37]。一种环阿尔廷醇型三萜(3 α ,27-dihydroxycycloart-24E-en-26-oic acid)表现出有效的对抗 B16-BL6 黑素瘤细胞毒素活性,而(2S)-5,7-dihydroxy-

4'-methoxy-8,3'-diprenylflavanone 则表现出很强的抑制人体肿瘤细胞系(肺腺癌 A549 细胞、子宫颈 Hela 细胞和纤维肉瘤)细胞活性作用^[38]。另一种缅甸蜂胶的甲醇提取物可以在营养剥夺条件下抑制人胰腺癌 PNAC-1 细胞的增值。该提取物的活性追踪分离结果表明,它是一种环阿尔廷醇三萜类化合物(22Z,24E)-3-oxocycloart-22,24 -dien-26-oic acid, 具有较强的随时间、剂量依赖的细胞毒性^[38]。

研究发现,希腊蜂胶提取物和二萜类物质对 HT-29 人类直肠癌细胞有着很强的细胞毒性,且对正常人类细胞没有影响。其中分离发现的活性最强的物质,二萜化合物泪杉醇,能有效将癌细胞周期阻滞在 G2/M 期^[39]。

2.3 酚酸类化合物

2.3.1 咖啡酸苯乙酯

咖啡酸苯乙酯(CAPE)是杨树型蜂胶中的一种主要活性成分,已有大量实验研究了 CAPE 的生物学活性,包括抗氧化、抗炎、抗血管增生、抗癌细胞转移和抑癌活性等^[40]。通过比较以色列蜂胶对大鼠/人的正常细胞与转移性的大鼠/人的黑素瘤及乳腺癌细胞系的细胞毒性作用和伊朗蜂胶对肿瘤细胞的作用发现,CAPE 是蜂胶中主要的细胞生长抑制剂,相较正常细胞,肿瘤细胞系对 CAPE 表现出更高的敏感度^[41,42]。

在癌症、神经退行性疾病等慢性疾病中,氧化应激是细胞损伤的主要原因。CAPE 可作为一种有效的外源细胞保护剂和抗基因毒性药物,来抵抗细胞氧化性损伤,并能作为一种新药先导来治疗由各种氧化应激诱导产生的疾病^[43]。

通过细胞色素 p450 (CYP450) 进行 CAPE 抗癌作用机制分析发现,CAPE 能影响化学致肝癌形成初期的二乙基亚硝酸代谢^[44]。CAPE 改变了 CYP450 在二乙基亚硝酸激活中的活性,如 CYP1A 1/2 和 CYP2B 1/2,这也从另外角度解释了利用 CAPE 的保护作用来进行替代疗法的作用机制。

Jin 等^[45]研究了 CAPE 在人体髓系白血病 U937 细胞中引发细胞凋亡的机制。DNA 片段化分析反映 CAPE 处理过的 U937 细胞中出现了典型的阶梯样寡聚核小体段和细胞核浓缩现象,意味着细胞凋亡的发生。随后,他们还观察到了细胞色素 C 的释放,Bcl-2 的减少和 Bax 表达量的上升以及 caspase-3、PARP 的激活与剪切。另外,Fas 蛋白(细胞死亡信号通路中的起始介导因子)、磷酸化的 Eif2a、

CHOP(线粒体介导的凋亡通路中重要的信号因子)的表达量并没有明显的改变。因此,他们认为 CAPE 在 U937 细胞中引发的细胞凋亡主要是通过线粒体介导的细胞凋亡途径,并非死亡受体或者雌激素介导的细胞凋亡途径。

在肝癌中,CAPE 通过抑制基质金属蛋白酶 2 和 9 的表达来发挥抗转移作用,其机理可能是靶向干扰癌细胞中的 NF- κ B。Lee 等^[46]利用 t-BHP 对 HegG2 细胞及大鼠肝脏的损伤模型研究了 CAPE 的保护作用,发现 CAPE 能明显降低 HepG2 细胞中由 t-BHP 引起的氧化损伤,并能剂量依赖地缓解 t-BHP 诱导产生的细胞毒性、减缓脂质过氧化作用和降低活性氧水平。CAPE 能明显降低 Bxpc-3 和 Panc-1 细胞活力,减缓脂质过氧化作用和降低活性氧水平。体内实验表明,在施用 t-BHP 之前进行 CAPE 预处理能显著且呈剂量依赖性地增加血清中肝脏标志酶的水平(通过检测血清中的肝酶标记物——丙氨酸氨基转移酶和门冬氨酸氨基转移酶),并减轻大鼠肝脏脂质过氧化水平。CAPE 对由 t-BHP 引起的肝中毒的保护作用一部分原因是清除活性氧的能力和保护 DNA 不受到氧化应激造成的伤害的功能。

CAPE 引起的人类胰腺癌细胞的细胞凋亡主要涉及到诱导癌细胞凋亡蛋白酶和线粒体功能的失调。CAPE 会导致 BxPC-3 和 PNAC-1 细胞活力的显著下降。在 BxPC-3 细胞中,CAPE 会呈时间依赖性地增加亚二倍体的细胞比例,并能显著降低线粒体跨膜电位,诱发由线粒体变化所引起的细胞凋亡,且在 DNA 电泳中未发现 DNA 碎片^[47]。

CAPE 在 C6 神经胶质瘤细胞上具有诱发细胞周期停滞和抗增殖效果。用 CAPE 处理过的 C6 神经胶质瘤会发生形态学变化,变换成为星形细胞型,同时神经胶质分化标识蛋白表达量增加,包括胶质细胞原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein)和 s100 β ,并表现出了对 C6 胶质细胞侵袭的抑制作用^[48]。

肿瘤坏死因子诱导凋亡相关配基 (TRAIL/APO2L) 相关的肿瘤坏死因子是天然的抗肿瘤因子,可以特异性地引发癌细胞的细胞凋亡,且对正常细胞无毒性作用。Szliszka 等^[49]利用蜂胶乙醇提取物及从蜂胶中分离的酚类成分,研究了它们同 TRAIL 联合使用对两种前列腺癌细胞(荷尔蒙敏感型 LN-CaP 和荷尔蒙不敏型 DU-145)的影响。结果表明,与 TRAIL 协同使用下,芹菜素、山奈素、高良姜素和

CAPE 表现出最强细胞毒性作用;蜂胶提取物在前列腺癌细胞中 TRAIL 介导的细胞凋亡显著增强。研究结果推测 CAPE 在前列腺癌的化学预防中可能起着十分重要的作用。

2.3.2 阿替匹林 C

阿替匹林 C 作为巴西绿蜂胶中含量较高的生物活性成分,最早是作为一种肿瘤抑制成分而受到广泛的关注^[50,51]。TRAIL 耐受前列腺癌细胞株在被 TRAIL 和阿替匹林 C 处理后,通过 MTT 和 LDH 测定,发现二者都具有细胞毒性。阿替匹林 C 能够增加 TRAIL-R2 的表达,降低 NF- κ B 的活性。TRAIL 和阿替匹林 C 的联合治疗使得 caspase-8 和 caspase-3 表达量显著增多,同时还引起线粒体膜电位混乱。这些研究结果表明,阿替匹林 C 能使得前列腺癌细胞对 TRAIL 介导的免疫反应敏感,证明了其在前列腺癌的生化预防方面有着一定的前景^[52]。

3 蜂胶及其有效活性成分的抗肿瘤机制

3.1 诱导细胞凋亡

细胞凋亡在平衡细胞死亡与更新的过程中起着十分重要的作用,而肿瘤细胞的一部分成因也是由于细胞的不断增殖和细胞凋亡的减少所造成的。Szliszka 等^[53]研究证实,蜂胶乙醇提取物可诱导海拉癌细胞发生凋亡,并表现出了剂量相关性。Syamsudin 等^[54]研究发现蜂胶乙醇提取物在 MCF-7 乳腺癌细胞系中具有更强的细胞毒性和促凋亡作用。

Samarghandian 等^[55]研究发现蜂胶的主要活性成分柯因可以通过活化 caspase-3 和 caspase-9 诱发人肺上皮癌干细胞系(A549)的凋亡。在成神经瘤细胞(NGP 和 SK-N-AS)中,柯因可以通过诱发细胞凋亡来抑制肿瘤的生长,包括增加 DNA 修复酶和 caspase-3,减少促生存蛋白 survivin 和 XIAP(x 染色体连锁的凋亡抑制蛋白)。

蜂胶的另一成分咖啡酸苯乙酯(CAPE),同样也表现出了很强的抗肿瘤活性。在用 10 μ M CAPE 处理人淋巴细胞性白血病细胞后,Avei 等^[56]观察到凋亡细胞数量增多。同时他们通过荧光显微镜还发现了大量的 JC-1 染料的聚集,这意味着 CAPE 能导致 CCRF-CEM 细胞系膜电位的消失,从而促进促凋亡蛋白的释放。

阿替匹林 C 也可通过诱导人体癌细胞发生细胞凋亡从而发挥抗癌作用。Matsuno 等^[51]发现在人

类和小鼠恶性肿瘤细胞中施用阿替匹林 C 后,肿瘤细胞在生长中产生的细胞毒性效应明显减轻,组织学分析还发现细胞凋亡、顿挫性核分裂及肿瘤大块性坏死。同时,CD4/CD8 T 细胞的比例、辅助 T 细胞的数量也有所上升。这说明阿替匹林 C 激活了免疫系统,从而直接发挥抗癌作用。

3.2 抑制肿瘤细胞增殖

蜂胶在特定的肿瘤细胞上可以表现出一定抗增殖活性,主要通过阻滞细胞周期。目前已有研究机构希望通过蜂胶对癌细胞的生长抑制作用这一特点来作为癌症治疗的突破口。研究表明,蜂胶可以通过调控细胞周期蛋白 D1、B1、细胞周期蛋白依赖激酶及 p21 的表达来抑制前列腺癌细胞的增殖。同时,古巴蜂胶在 MCF-7(雌激素受体阳性,ER+)人类乳腺癌细胞系上表现出显著的抗增殖活性,而对 MDA-MB231 无显著副作用。此抗增殖效果与浓度、时间成依赖相关性,并且研究人员认为,诱导细胞凋亡作用也在其中起到了一定的作用。在剂量和时间相关的研究方式下,试验表明蜂胶可以使 MCF-7 细胞增长停滞在 G1 期^[57]。研究人员还从 *Clusia rosea* Jacq 植物树脂和古巴蜂胶中分离出低浓度的 nemorosone,一种多环二甲苯萜类化合物,同样也表现出了对 MCF-7 的生长抑制作用,而不影响 MDA-MB-231 和 Lncap 的正常生长。因此,蜂胶有可能成为辅助雌激素受体拮抗剂对抗 ER+ 乳腺癌的预防或者治疗的药物^[58]。

Li 等^[14]研究发现巴西蜂胶的乙醇提取物可以有效抑制前列腺转移性癌细胞(DU145 和 PC-3 细胞)的生长,使得前列腺癌细胞生长停滞在 G2 期,从而发挥抑制癌细胞增殖的作用。而蜂胶在膀胱癌患者身上提取的活体组织上的应用结果也证实了蜂胶的使用确实可以减少细胞分裂,这意味着蜂胶有可能用作抗有丝分裂和抗癌的药物。

3.3 抗血管增生

血管增生是肿瘤发展过程中十分重要的一部分,并被认为是治疗实体瘤的突破口。抑制血管增生不仅可以有效抑制肿瘤生长,还具有抗肿瘤迁移的作用。肿瘤主要通过释放血管内皮生长因子(VEGF)诱发血管增生,借助新生血管来获取营养,达到生长、转移的目的^[59]。

研究发现,100 μ /L 柯因在体外可以抑制人乳腺癌细胞(MDA 细胞)和神经胶质瘤(U-343 和 U-118 细胞)的血管内皮生长因子 VEGF 的释放。另

有报道表明,在人前列腺癌细胞(DU145)体外和异种移植模型体内试验中,柯因可以通过 AKT 信号通路抑制诱发 HIF-1 α 表达和持续的 VEGF 释放的胰岛素,从而达到抗血管增生的效果^[60]。

阿替匹林 C 不仅可以直接抑制肿瘤细胞生长,还可以通过抑制血管生成发挥抗癌作用。Ahn 等^[61,62] 研究发现,阿替匹林 C 对抑制人类脐带内皮细胞(HUVECs)血管生成中有显著的量效关系(3.13 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),抑制 HUVECs 的增殖过程也体现了这种量效关系(3.13 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$);血管再生分析显示,阿替匹林 C 能显著减少体内新生血管的数量,这说明阿替匹林 C 具有很强的抗血管生长能力。

3.4 抑制信号转导通路的活化

3.4.1 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 是一类重要的转录因子,可以诱导多种抗凋亡基因(如 Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 和 c-FLIP)的表达。肿瘤细胞可以通过炎症刺激物的应答包括炎症因子 TNF- α 、白介素-1、生长因子、环境污染物、氧化应激等持续激活 NF- κ B。

蜂胶成分柯因被发现在人鼻咽癌细胞系 HCT-116 和人肝癌细胞系 HepG2 中可以显著增加 TNF- α 所引起的细胞凋亡,从而抑制 NF- κ B 的活化,导致 c-FLIP-L 的下调^[27],而 c-FLIP-L 是抗凋亡基因中十分重要的一部分,具有阻碍 TNF caspases 活性的功能。

Shvarzbeyn^[63] 研究表明,在 HTLV-1 感染和未感染的 T 细胞培养过程中,蜂胶乙醇提取物和咖啡酸苯乙酯都可以有效地抑制由 Tax 引起的 NF- κ B 的转录活性。同时,咖啡酸苯乙酯对其他启动子的 Tax 活性(如 HTLV-1 LTR 和 SRF)无作用,而蜂胶乙醇提取物则对这些启动子的 Tax 活性仍有强烈的抑制作用。这说明了蜂胶中仍有其他活性组分在发挥作用,需要进一步的研究。

3.4.2 Wnt 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路是协助 NF- κ B 发挥致癌作用的一类重要通路。有研究表明,NF- κ B 和 Wnt/ β -catenin 信号通路间的有效协作关系是通过糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β) 来进行调节。GSK-3 β 的激活可以使得细胞质中游离的 β -catenin 聚集,从而改变反式激活目标基因核物质,引起癌变。

Khan 等^[64] 研究表明,在早期由 DEN 引起的小鼠肝癌模型中,柯因可以上调 GSK3 β 的表达,下调

casein kinase-2。因此,它能使 β -catenin 上的 Ser33/37 磷酸化,最后导致其降解并减少 Wnt 信号通路。

3.5 抗肿瘤转移

肿瘤的转移是肿瘤发展过程中标志性的一步,也是其高死亡率的原因之一。肿瘤转移过程与 ECM(用于调节基质金属蛋白酶 MMPs)的降解有关。Western blot(蛋白质印迹法)和 gelatin zymography analysis(基质金属蛋白酶明胶酶谱法)显示 CAPE 可以通过上调 TIMP-2 来抑制 MMP-2 的蛋白质表达和酶活性,同时通过减少点状黏附激酶(FAK)的磷酸化,下调 p38 胞外信号调节激酶分子信号通路(p38 MAPK)和 c-Jun 氨基末端激酶(JNKs)来减少细胞的迁移。这意味着 CAPE 有可能被用于防止肿瘤迁移。同样,蜂胶活性成分之一的柯因也可以通过调节 MMP-10 抑制人三阴性乳腺癌细胞的转移^[65]。

有研究表明,蜂胶中活性成分高良姜素也具有抗癌活性。高良姜素可以抑制多种人类肿瘤细胞增殖,并诱导其凋亡,包括乳腺癌、白血病、胰腺癌、胃癌、结肠癌和肝癌。Zhu 等^[35] 的研究证明了高良姜可以在 HNSCC 细胞中诱发细胞凋亡,同时伴随着 Bcl-2 和 Bcl-xL 蛋白表达量的降低, Bax 和 cleaved-caspase 3 表达量的增加。因此,推测蜂胶及其活性成分有可能通过此机制来抑制肿瘤的转移。而在肺转移小鼠模型中,高良姜素可以抑制 B16F10 黑素瘤细胞的增殖和转移。

3.6 对致癌因素的防治

有研究检测了巴西蜂胶甲醇提取物和乙醇提取物对雄性 Wistar Hannover(GALAS)小鼠体内氧化偶氮甲烷引起的异常隐窝灶的作用,发现二者均在结肠癌初期有化学预防能力,可调控细胞的增殖^[66]。

而在日粮中加入蜂胶的主要活性成分之一的柯因则可以很大程度上减少小鼠癌前病变灶和 COX-2 的表达和 NF- κ B 及 p65 的表达量,同时增加了 p53、bax 和 caspase3 mRNA 和蛋白质水平。研究人员还注意到了抑制蛋白水平和抗细胞凋亡标识 bcl-xl 表达量的降低。因此推断柯因具有保肝药的效果,其化学预防活性与 p53 介导的细胞凋亡有关^[67]。

蜂胶也由于在裸鼠实验模型上所表现出的抗光致癌效果而得到关注。悉尼蜂胶可以缓解由 UV 光线照射引起的皮肤炎症,抑制免疫反应和脂质过氧化作用。蜂胶表现出明显且呈剂量依赖性地对抗晒伤水肿,抑制接触性过敏反应和脂质过氧化过程。

白介素-10 的过度表达和白介素-12 的减少是光致癌的明显特征,而在使用蜂胶后,都有明显地改善。此外,白介素-6 的上调减少和与血红素加氧酶的相关诱导性都预示着蜂胶在皮肤保护上有着重要的作用^[68]。

Tavares 等^[69]研究了酒神菊树乙酸乙酯浸提物(Bd-EAE)对由阿霉素诱导的突变性的抑制作用,给实验组大鼠口服不同浓度的 Bd-EAE,再对其腹腔注射化疗剂阿霉素(DXR)。结果发现,相对于直接腹腔注射阿霉素的大鼠而言,能显著减少微核多染性红细胞数量,抑制了细胞突变的发生,而 Bd-EAE 本身不具致突变作用。HPLC 分析表明,Bd-EAE 样品中含大量阿替匹林 C,说明阿替匹林 C 可能是 Bd-EAE 具有抗突变的重要原因。他们在巴西绿蜂胶中也做了类似的实验,发现巴西绿蜂胶也具有抗染色体突变作用。Azevedo 等^[70]在这些研究的基础上对阿替匹林 C 抗化学诱变剂的作用进行了研究,采用微核实验和彗星实验方法,给小鼠服用阿替匹林 C,并验证其对施用 DXR 和甲基磺酸甲酯(MMS)小鼠的影响。结果表明,阿替匹林 C 在实验条件下对化学诱变剂诱导发生染色体 DNA 发生突变具有很好的保护作用,这对相关癌症的防治具有非常重要的意义。

4 结语

虽然蜂胶在体外对不同肿瘤细胞有非常明显的细胞毒性作用,但蜂胶在动物或者人体上的应用仍需考虑其生物可利用性。此外,蜂胶在体内发挥抗癌作用除考虑蜂胶的化学预防或者治疗作用外,也需要与蜂胶的免疫调节活性相结合。

细胞免疫反应主要由激活的 T 淋巴细胞来完成,而高频出现的肿瘤浸润淋巴细胞同缓解肿瘤扩增密切相关,同时也有利于提高癌症病人总体存活率(如黑色素瘤和前列腺癌)。但是,免疫疗法至今没能解决任何一种肿瘤转移病例,肿瘤还发展出多种机制来逃避体内和体外免疫疗法。因此,围绕蜂胶及其组分的体内抗肿瘤和免疫调节活性还需要更多深入的研究。

一些分离的组分同样也被认为可以解释蜂胶的抗肿瘤活性。但是,因为蜂胶的成分十分复杂,需要通过更多的体内外实验来进行相关检测,并阐述其活性成分相互间的协同作用。蜂胶的主要抗肿瘤机制包括促进细胞凋亡、诱导细胞周期阻滞和干扰细

胞代谢途径,这也可以为研发新型诱使癌细胞死亡的靶性药物提供信息^[71]。未来也需进一步开展蜂胶临床前研究来证实蜂胶的抗肿瘤效果。

参考文献

- 1 Karikas GA. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. *J BUON*, 2010, 15: 627-638.
- 2 Sforzin JM, et al. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*, 2011, 133: 253-260.
- 3 Sforzin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113: 1-14.
- 4 Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*, 2005, 100: 114-117.
- 5 Sforzin JM, et al. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. *J Venom Anim Toxins*, 2002, 8: 244-254.
- 6 Mani F, et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J Ethnopharmacol*, 2006, 105: 95-98.
- 7 Jasprica I, et al. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J Ethnopharmacol*, 2007, 110: 548-554.
- 8 Oršolić N, et al. Direct and indirect mechanism(s) of antitumor activity of propolis and its polyphenolic compounds. *Planta Med*, 2006, 72: 20-27.
- 9 Oršolić N, et al. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol*, 2004, 94: 307-315.
- 10 Oršolić N, et al. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84: 265-273.
- 11 Missima F, et al. The effect of propolis on pro-inflammatory cytokines produced by melanoma-bearing mice submitted to chronic stress. *JAAS*, 2009, 1: 11-15.
- 12 Missima F, et al. The effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phytother Res*, 2010, 24: 1501-1507.
- 13 Awale S, et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 181-189.
- 14 Li H, et al. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int J Oncol*, 2007, 31: 601-606.
- 15 Inoue K, et al. Anti-tumor effects of water-soluble propolis

- on a mouse sarcoma cell line *in vivo* and *in vitro*. *Am J Chin Med*,2008,36:625-634.
- 16 Umthong S, *et al.* *Trigona laeviceps* propolis from Thailand: antimicrobial, antiproliferative and cytotoxic activities. *Am J Chin Med*,2009,37:855-865.
 - 17 Ozkul Y, *et al.* Genotoxic potential of Turkish propolis in peripheral blood lymphocytes. *Pharmazie* ,2006,61:638-640.
 - 18 Ozkul Y, *et al.* The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* ,2005,12:742-747.
 - 19 Eroglu HE, *et al.* Anticarcinogenic and antimetabolic effects of Turkish propolis and mitomycin-C on tissue cultures of bladder cancer. *Nat Prod Res* ,2008,22:1060-1066.
 - 20 Ishihara M, *et al.* Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncol Rep* ,2009,22:349-354.
 - 21 Wang F (王付), *et al.* Anti-tumor effects of Chinese propolis and Brazilian propolis. *Apiculture China* (中国蜂业),2014,65:43-48.
 - 22 Xuan H, *et al.* Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 Cells. *Evid-Based Compl Alt* ,2014,280120.
 - 23 Kouidhi B, *et al.* Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe* , 2010, 16: 566-571.
 - 24 Valente MJ, *et al.* Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. *Food Chem Toxicol* ,2011,49:86-92.
 - 25 Josipović P, *et al.* Cytotoxicity of polyphenolic/flavonoid compounds in a leukaemia cell culture. *Arh Hig Rada Toksikol* , 2008,59:299-308.
 - 26 Sha N, *et al.* Cytotoxic constituents of Chinese propolis. *J Nat Prod* ,2009,72:799-801.
 - 27 Li F, *et al.* Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines. *Nat Prod Commun* ,2010,5:1601-1606.
 - 28 Maimaiti A (阿达莱提·麦麦提). Effect of PB3A on RGS2 and GEM gene expression in colorectal cancer SW480 cells. *J Prac Oncol* (实用肿瘤杂志),2014,29:316-320.
 - 29 Fu B, *et al.* Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 through reducing hypoxia-inducible factor-1 stability and inhibiting its protein synthesis. *Mol Cancer Ther* ,2007,6:220-226.
 - 30 Patel S. Emerging adjuvant therapy for cancer: Propolis and its constituents. *J Diet Suppl* ,2016,13:245-268.
 - 31 Priya SE, *et al.* Anti-cancer activity of quercetin in neuroblas-
toma: an *in vitro* approach. *Neurol Sci* ,2013,35:163-170.
 - 32 Xing N, *et al.* Quercetin inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* ,2001,22:409-414.
 - 33 Maurya AK, *et al.* Anticarcinogenic action of quercetin by downregulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC) via induction of p53 in hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Mol Bio Rep* ,2015,42:1419-1429.
 - 34 Zhao X (赵欣), *et al.* Mechanisms for quercetin in prevention of lung cancer cell growth and metastasis. *J Central South Univ* (中南大学学报),2015,40:592-597.
 - 35 Zhu L, *et al.* Galangin inhibits growth of human head and neck squamous carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Chem Biol Interact* ,2014,224C:149-156.
 - 36 Wu J (伍俊), *et al.* Galangin induces apoptosis on lung cancer A549 cells. *Cancer Prevent Treat Res* (肿瘤防治研究),2011,38:1228-1231.
 - 37 Li F, *et al.* Cytotoxic constituents of propolis from Myanmar and their structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull* , 2009,32:2075-2078.
 - 38 Li F, *et al.* Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *J Nat Prod* ,2009,72:1283-1287.
 - 39 Pratsinis H, *et al.* Antiproliferative activity of Greek propolis. *J Med Food* ,2010,13:286-290.
 - 40 Bankova V, *et al.* A Gc/Ms study of the propolis phenolic constituents. *Z Naturforsch C* ,1987,42:147-151.
 - 41 Grunberger D, *et al.* Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* ,1988,44:230-232.
 - 42 Natarajan K, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996,93:9090-9095.
 - 43 Wang T, *et al.* Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Can J Physiol Pharm* , 2008,86:279-287.
 - 44 Beltrán-Ramírez O, *et al.* Evidence that the anticarcinogenic effect of caffeic acid phenethyl ester in the resistant hepatocyte model involves modifications of cytochrome P450. *Toxicol Sci* ,2008,104:100-106.
 - 45 Jin UH, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. *Mol Cell Biochem* ,2008,310:43-48.
 - 46 Lee KJ, *et al.* Protective effect of caffeic acid phenethyl ester

- on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity and DNA damage. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46:2445-2450.
- 47 Chen MJ, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis of human pancreatic cancer cells involving caspase and mitochondrial dysfunction. *Pancreatology*, 2008, 8:566-576.
- 48 Lin WL, *et al.* Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75 (NTR) in C6 glioma cells. *Chem Biol Interact*, 2010, 188:607-615.
- 49 Szliszka E, *et al.* Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol*, 2011, 38:941-953.
- 50 Kimoto T, *et al.* Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1996, 23:1855-1859.
- 51 Matsuno T, *et al.* Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer Res*, 1997, 17:3565-3568.
- 52 Szliszka E, *et al.* Artemillin C (3, 5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Int J Oncol*, 2012, 41:818-828.
- 53 Tani H, *et al.* Inhibitory activity of Brazilian green propolis components and their derivatives on the release of cys-leukotrienes. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18:151-157.
- 54 Szliszka E, *et al.* Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules*, 2009, 14:738-754.
- 55 Sawah JS, *et al.* Apoptosis of human breast cancer cells induced by ethyl acetate extracts of propolis. *Am J Biochem Biotech*, 2010, 84-88.
- 56 Samarghandian S, *et al.* Role of caspases, Bax and Bcl-2 in chrysin-induced apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014, 14:901-909.
- 57 Avci CB, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137:41-47.
- 58 Popolo A, *et al.* Antiproliferative activity of brown cuban propolis extract on human breast cancer cells. *Nat Prod Commun*, 2009, 4:1711-1716.
- 59 Popolo A, *et al.* Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol*, 2011, 89:50-57.
- 60 Vit P, *et al.* Use of propolis in cancer research. *Br J Medicine Medical Res*, 2015, 8:88-109.
- 61 Kasala ER, *et al.* Chrysin and its emerging role in cancer drug resistance. *Chem-Biol Interact*, 2015, 236:7-8.
- 62 Ahn MR, *et al.* Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis; Major component artemillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. *Cancer Lett*, 2007, 252:235-243.
- 63 Ahn MR, *et al.* Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53:643-651.
- 64 Shwarzbejn J, *et al.* Effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on NF κ B activation by HTLV-1 Tax. *Antivir Res*, 2011, 90:108-115.
- 65 Khan MS, *et al.* Methylated chrysin induces co-ordinated attenuation of the canonical Wnt and NF- κ B signaling pathway and upregulates apoptotic gene expression in the early hepatocarcinogenesis rat model. *Chem Biol Interact*, 2011, 193:12-21.
- 66 Kuo YY, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *Int J Mol Sci*, 2015, 16:10748-10766.
- 67 Yasui Y, *et al.* Aqueous and ethanolic extract fractions from the Brazilian propolis suppress azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rats. *Oncol Rep*, 2008, 20:493-499.
- 68 Khan MS, *et al.* Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced pre-neoplastic nodules in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 251:85-94.
- 69 Cole N, *et al.* Topical 'Sydney' propolis protects against UV-radiation-induced inflammation, lipid peroxidation and immune suppression in mouse skin. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 152:87-97.
- 70 Tavares DC, *et al.* Effects of propolis crude hydroalcoholic extract on chromosomal aberrations induced by doxorubicin in rats. *Planta Med*, 2007, 73:1531-1536.
- 71 de Azevedo Bentes Monteiro Neto M, *et al.* Antigenotoxicity of artemillin C *in vivo* evaluated by the micronucleus and comet assays. *J Appl Toxicol*, 2011, 31:714-719.
- 72 Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9:501-507.