

蜂胶中提取的咖啡酸苯乙酯和咖啡酸苄酯抑制食管癌 Eca109 细胞的功效

刘 会, 袁雯雯, 李俊雅, 玄红专*

聊城大学生命科学学院, 聊城 252059

摘要: 本文研究了蜂胶中两种主要组分咖啡酸苯乙酯(CAPE)和咖啡酸苄酯(CABE)对食管癌 Eca109 细胞的抑制功效及初步作用机理。通过 SRB 法检测了细胞存活率; 划痕法结合 Transwell 实验检测对 Eca109 细胞迁移和浸润的影响; DAPI 染色结合 Western blotting 检测了对 Eca109 细胞凋亡和凋亡执行者 Caspase 3 和 PARP 蛋白表达的影响; 通过两种荧光探针分别检测了对细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位(MMP)的影响。结果表明, CAPE 和 CABE 能够显著抑制 Eca109 细胞增殖, 诱导其凋亡, 上调 Caspase 3 和 PARP 的水平, 同时 CAPE 和 CABE 显著上调 ROS 水平并降低 MMP 水平。说明 CAPE 和 CABE 是两种有潜力的治疗食管癌的天然产物。

关键词: 蜂胶; 咖啡酸苯乙酯; 咖啡酸苄酯; 食管癌; 凋亡

中图分类号: S896.6

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)11-1904-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.11.014

The inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid benzyl ester extracted from propolis on esophageal carcinoma Eca109 cells

LIU Hui, YUAN Wen-wen, LI Jun-ya, XUAN Hong-zhuan^{1*}

School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

Abstract: The inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and caffeic acid benzyl ester (CABE) extracted from propolis on esophageal carcinoma Eca109 cells were studied in the present study. Cell viability was measured by SRB assay. Cell apoptosis was tested by DAPI staining and Western blotting. Tumor invasion and migration were studied by Transwell experiment and scratch assay. Reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) were tested by two different fluorescence probes. The results showed that CAPE and CABE significantly inhibited the proliferation of Eca109 cells, and obviously suppressed migration and invasion of Eca109 cells. Moreover, CAPE and CABE induced apoptosis by up-regulating the levels of Caspase 3 and PARP, and increasing ROS levels and decreasing MMP levels. CAPE and CABE are two promising natural compounds in the treatment of esophageal carcinoma.

Key words: propolis; caffeic acid phenethyl ester; caffeic acid benzyl ester; esophageal carcinoma; apoptosis

蜂胶是蜜蜂采集植物树脂并混入其上颚腺、蜡腺的分泌物加工而成的一种具有芳香气味的胶状固体物^[1]。由于植物来源不同, 蜂胶的化学成分非常复杂。世界不同地区的蜂胶大致分为七类, 分别是: “杨树型”蜂胶、“桦树型”蜂胶、巴西绿胶、红胶、太平洋蜂胶、地中海蜂胶以及“克鲁西属”蜂胶^[2]。中国蜂胶属于杨树型蜂胶并且其主要的化学组分是黄

酮类及酚酸类。到目前为止, 已有 600 种以上的成分从蜂胶中鉴定出来^[3]。现代药理学研究表明, 蜂胶具有抑菌^[4]、抗炎^[5,6]、抗病毒^[7]、抗肿瘤^[8]、抗氧化^[9]及免疫调节^[10,11]等功效。

研究表明蜂胶对多种不同肿瘤细胞具有较好的抑制功效^[12-14], 特别是蜂胶中短叶松素、咖啡酸苄酯(CABE)、咖啡酸苯乙酯(CAPE)、芹菜素、松属素、白杨素和高良姜素等^[15]。食管癌是一种严重的恶性肿瘤, 严重威胁人类的身体健康。由于食管癌细胞高度浸润和转移, 使得该疾病的治疗和预后效果都较差^[16,17]。从天然产物中发掘抑制食管癌的

收稿日期: 2020-01-19 接受日期: 2020-09-18

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系蜂产业创新团队蜂产品加工与质量控制(SDAIT-24-05); 农业部蜂产品质量安全控制重点实验室开放课题(FCPZLAQ-2018-03)

* 通信作者 Tel: 86-635-8239910; E-mail: hongzhuanxuan@163.com

药物也是食管癌治疗的一个重要方向。CAPE 和 CAGE 是蜂胶中的两种重要酯类,但它们对食管癌的影响还未见报道。本研究重点研究了 CAPE 和 CAGE 对食管癌 Eca109 细胞的抑制功效及作用机理,为蜂胶应用于食管癌的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

中国蜂胶产自山东省(购于蜂农),主要胶源植物为杨树。主要试剂包括: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(SRB)、Hoechst 33258、活性氧检测荧光探针 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)和线粒体膜电位荧光探针 JC-1(美国 Sigma 公司);Matrigel 胶和 Transwell 孔板(美国 Corning 公司)、DAPI 染料(美国 Genview 公司)、抗体 Caspase-3、PARP(美国 Cell Signaling Technology)、 β -actin(美国 Santa Cruz Biotechnology)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所);其它试剂均为分析纯。

Eca109 细胞由本实验室保存。

1.2 试验仪器

Heal Force 生物安全柜、Heal Force CO₂ 培养箱(力康生物科技控股有限公司);TE2000S 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);激光扫描共聚焦显微镜(Olympus);电泳仪和电转仪(Bio-Rad 公司);MK3 酶标仪(芬兰雷勃公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 CAPE 和 CAGE 的制备方法

CAPE 和 CAGE 的制备方法根据参考文献^[18,19]。首先将中国蜂胶冷冻,粉碎,用热水浸提,过滤,滤液减压浓缩。然后向浓缩液中加入 95% 乙醇至乙醇含量为 70% 左右,静置过夜,取上清液浓缩得浸膏。再用大孔吸附树脂粗分离,再依次用 0%、20%、40%、60%、80%、95% 乙醇-水溶液为流动相梯度洗脱,分别收集洗脱部分,浓缩,得粗分样品。将粗分样品用半制备型高效液相色谱进行分离纯化,色谱柱为 C₁₈ SMB 100 柱(400 mm × 25.4 mm, 10 μ m),流动相为甲醇-水,检测波长为 280 nm,根据采集到的色谱图手动收集各个目标组分馏分,将得到的馏分减压浓缩。对于高纯度的馏分,其化学结构经核磁共振、X 射线单晶衍射等手段进行鉴定,得到 CAPE 和 CAGE。

1.3.2 细胞培养

食管癌 Eca109 细胞培养在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,孵育条件为:5% CO₂、37 $^{\circ}$ C、饱和湿度 CO₂ 培养箱中。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,24 h 后,除正常组外,处理组细胞分别经 CAPE(80 μ M)和 CAGE(80 μ M)处理后,弃细胞培养液,用 10% 三氯乙酸 4 $^{\circ}$ C 固定 1 h,然后用 SRB 染色 10 min,晾干,100 mmol/L Tris 碱溶解,在 492 nm 处测吸光值。

$$\text{细胞存活率} = (\text{处理组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$$

1.3.4 DAPI 染色

DAPI 染色主要用于观察细胞核的形态,在 48 h,所有细胞用 300 nM DAPI 染液室温孵育 5 min,细胞经 1 \times PBS 轻轻漂洗 2~3 次,然后在激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞核的形态并拍照。

1.3.5 LDH 分析

在 48 h 收集对照组和处理组细胞培养液,离心。上清液中的 LDH 含量按照试剂盒的操作进行测定。

1.3.6 细胞浸润实验

取对数生长期的 Eca109 细胞,消化,调整细胞密度到 5 \times 10⁵ 个/mL,Transwell 上室加入 200 μ L 细胞悬液,下室中加入 750 μ L 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37 $^{\circ}$ C 孵育 48 h。用湿棉签擦掉上室上面的 Matrigel 和非侵袭细胞,上室下面用 95% 酒精室温固定 10 min,然后用 0.1% 结晶紫继续固定染色 15 min,高倍镜下计数穿过微孔膜的细胞数。直径上取 4 个视野,求其平均值。

1.3.7 细胞迁移实验

在 24 孔板中,当细胞密度达到 80% 时,用 10 μ L 白枪尖垂直在细胞表面划线,然后用 1 \times PBS 轻轻冲洗掉细胞碎片。按照实验分组,细胞分别经 CAPE(80 μ M)及 CAGE(80 μ M)处理 48 h,每 12 h 在倒置相差显微镜下观察、拍照细胞迁移情况。用 Image-Pro Plus 软件计算细胞迁移率。

1.3.8 活性氧(ROS)水平的检测

将处于对数生长期的 Eca109 细胞按 4 \times 10⁴ 个/mL 种植到共聚焦小皿中。待细胞长到 60% 以上,除正常组外,处理组细胞分别经 CAPE(80 μ M)

及 CAFE(80 μM)处理 24 h。弃细胞培养液,用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗 1 次,加 DCFH-DA 应用液 1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。弃 DCFH-DA 应用液,用 $1 \times \text{PBS}$ 漂洗 3 次,每次 5 min,在激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3.9 线粒体膜电位检测

将处于对数生长期的 Eca109 细胞按 4×10^4 个/mL 种植到共聚焦小皿中。待细胞长到 60% 以上,除正常组外,处理组细胞分别经 CAPE(80 μM)及 CAFE(80 μM)处理 24 h。弃细胞培养液。用 $1 \times \text{PBS}$ 清洗,加 JC-1 染色液 500 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。弃 JC-1 染色液,用 $1 \times \text{PBS}$ 漂洗 3 次,每次 5 min,在激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.3.10 细胞蛋白提取及蛋白质免疫印迹

CAPE(80 μM)及 CAFE(80 μM)分别处理细胞

后收集各组细胞,在 RIPA 裂解液中冰上裂解 30 min,BCA 法测定总蛋白浓度。取 30~40 μg 总蛋白提取物上样,经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h,然后加入 Caspase 3、PARP 和 β -actin 一抗稀释液(1:1 000)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。用 $1 \times \text{PBST}$ 洗膜三次,每次 5 min;再加入二抗(1:5 000),室温孵育 1 h, $1 \times \text{PBST}$ 洗膜三次,每次 5 min,然后 ECL 显色。Quantity One 进行蛋白定量分析。

1.4 数据统计

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料采取均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

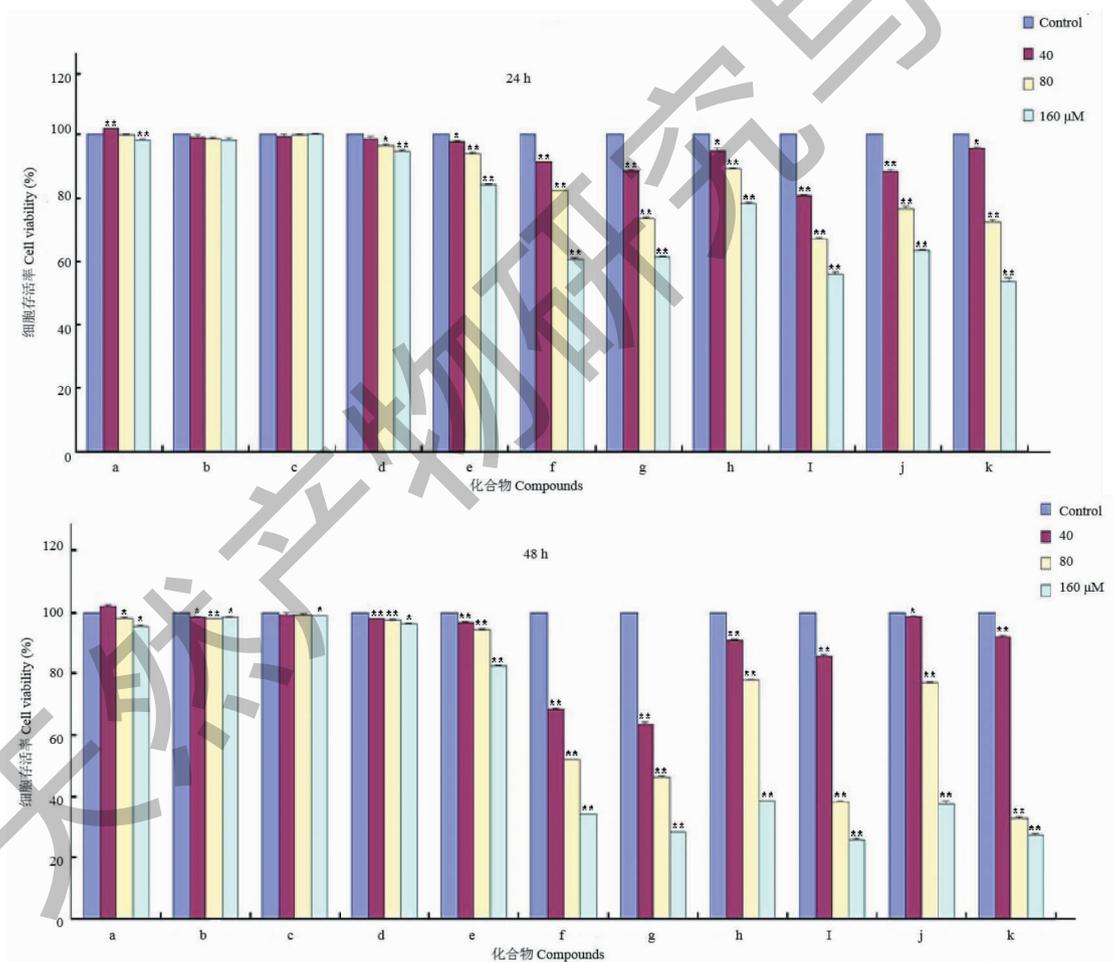


图1 蜂胶中 11 种组分对 Eca109 细胞增殖的影响

Fig. 1 The effects of 11 constituents extracted from propolis on Eca109 cells

注:a:咖啡酸;b:阿魏酸;c:异阿魏酸;d:3,4-二甲氧基肉桂酸;e:短叶松素;f:CABE;g:CAPE;h:芹菜素;i:松属素;j:白杨素;k:高良姜素。与空白对照组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。下同。Note:a:Caffeic acid;b:Ferulic acid;c:Isoferulic acid;d:3,4-dimethoxycinnamic acid;e:Pinobanksin;f:CABE;g:CAPE;h:Apigenin;i:Pinocembrin;j:Chrysin;k:Galangin. Compared with control, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. The same below.

2 结果

2.1 蜂胶中 11 种组分对 Eca109 细胞增殖的影响

前期我们从蜂胶中分离出 11 种组分,分别是咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸、短叶松素、CABE、CAPE、芹菜素、松属素、白杨素和高良姜素。首先检测了这 11 种组分对食管癌 Eca109 细胞增殖的影响。结果见图 1。由图 1 可以看出,咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸对 Eca109 细胞的增殖没有显著的影响。CABE 和 CAPE 显著抑制食管癌 Eca109 细胞的增殖 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)。

2.2 CAPE 和 CABE 抑制 Eca109 细胞增殖并诱导其凋亡

通过初步筛选可以看出 CAPE 和 CABE 显著抑

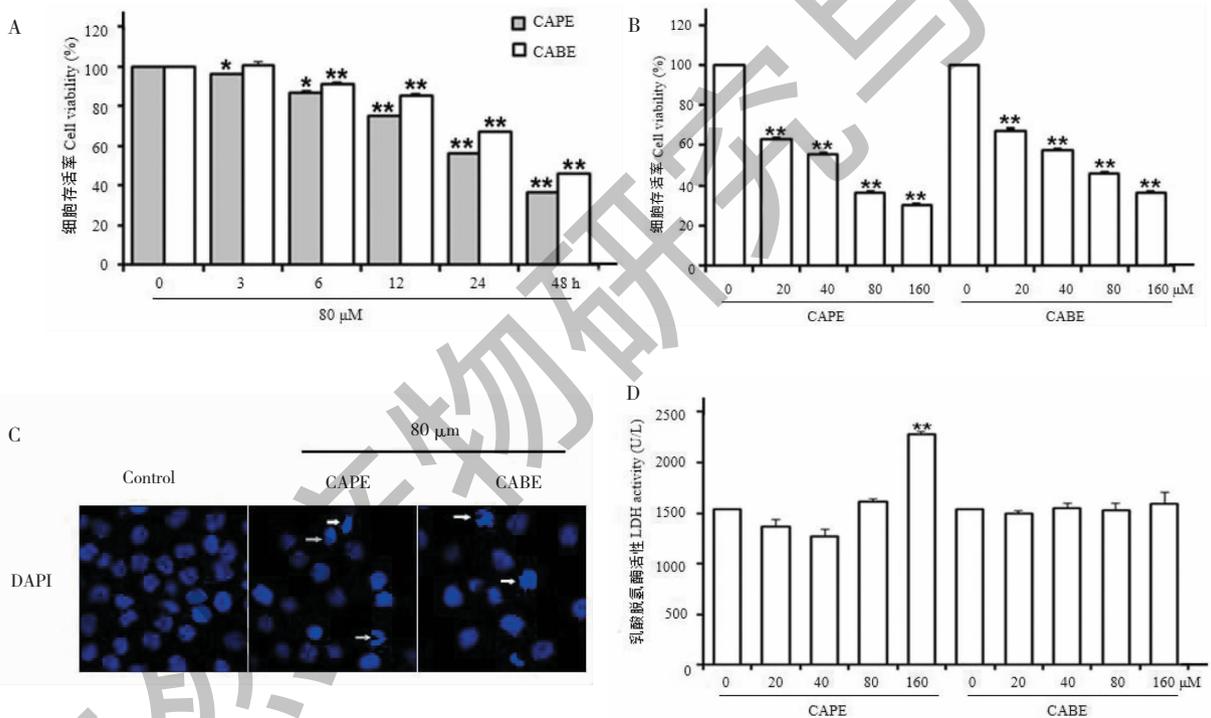


图 2 CAPE 和 CABE 抑制 Eca109 细胞增殖并诱导其凋亡

Fig. 2 CAPE and CABE inhibited proliferation and induced apoptosis in Eca 109 cells

注:A:80 μM CAPE 和 CABE 处理 Eca109 细胞 0、3、6、12、24 和 48 h 后细胞存活率;B:不同浓度 CAPE 和 CABE 处理 Eca109 48 h 后细胞存活率;C:DAPI 染色(200 ×);D:CAPE 和 CABE 处理对 Eca109 细胞中 LDH 的影响。Note:A:Eca109 cells were treated with 80 μM CAPE and CABE for 0,3,6,12,24 and 48 h;B:Cell viability of Eca109 48 h after treatment with different concentrations of CAPE and CABE;C:DAPI staining (200 ×);D:Effects of CAPE and CABE treatment on LDH in Eca109 cells.

2.3 CAPE 和 CABE 抑制 Eca109 细胞迁移和浸润

如图 3 所示,随着时间的延长,与对照组相比 CAPE 和 CABE(80 μM)显著抑制 Eca-109 细胞的迁移和浸润 (** $P < 0.01$),并且 CAPE(80 μM)对 Eca109 的抑制迁移功效要好于 CABE。

制 Eca109 细胞增殖,接下来我们详细研究了 CAPE 和 CABE 在不同时间和不同浓度条件下对 Eca109 细胞的影响,结果发现在 80 μM 时,CAPE 和 CABE 随着时间的延长显著抑制 Eca109 细胞的增殖,且 CAPE 的效果优于 CABE(图 2A)(** $P < 0.01$, * $P < 0.05$);在 20 ~ 160 μM 时随着浓度的增加 CAPE 和 CABE 显著抑制 Eca109 细胞的增殖,且 CAPE 效果优于 CABE(图 2B)(* $P < 0.05$);通过 DAPI 染色发现 CAPE 和 CABE(80 μM)显著引起细胞核的断裂和浓缩(图 3C);LDH 的检测发现,CAPE(20 ~ 80 μM)和 CABE(20 ~ 160 μM)对 LDH 的释放没有显著影响,但 CAPE 在 160 μM 时,LDH 释放显著升高,说明高浓度的 CAPE 可能引起 Eca109 细胞的坏死(图 2D)。

2.4 CAPE 和 CABE 上调 Eca109 细胞中 Caspase 3 和 PARP 水平

接下来,我们检测了 CAPE 和 CABE 对 Eca109 细胞中凋亡执行者 Caspase 3 和 PARP 水平的影响。结果可以看出,CAPE 和 CABE(80 μM)显著上调了

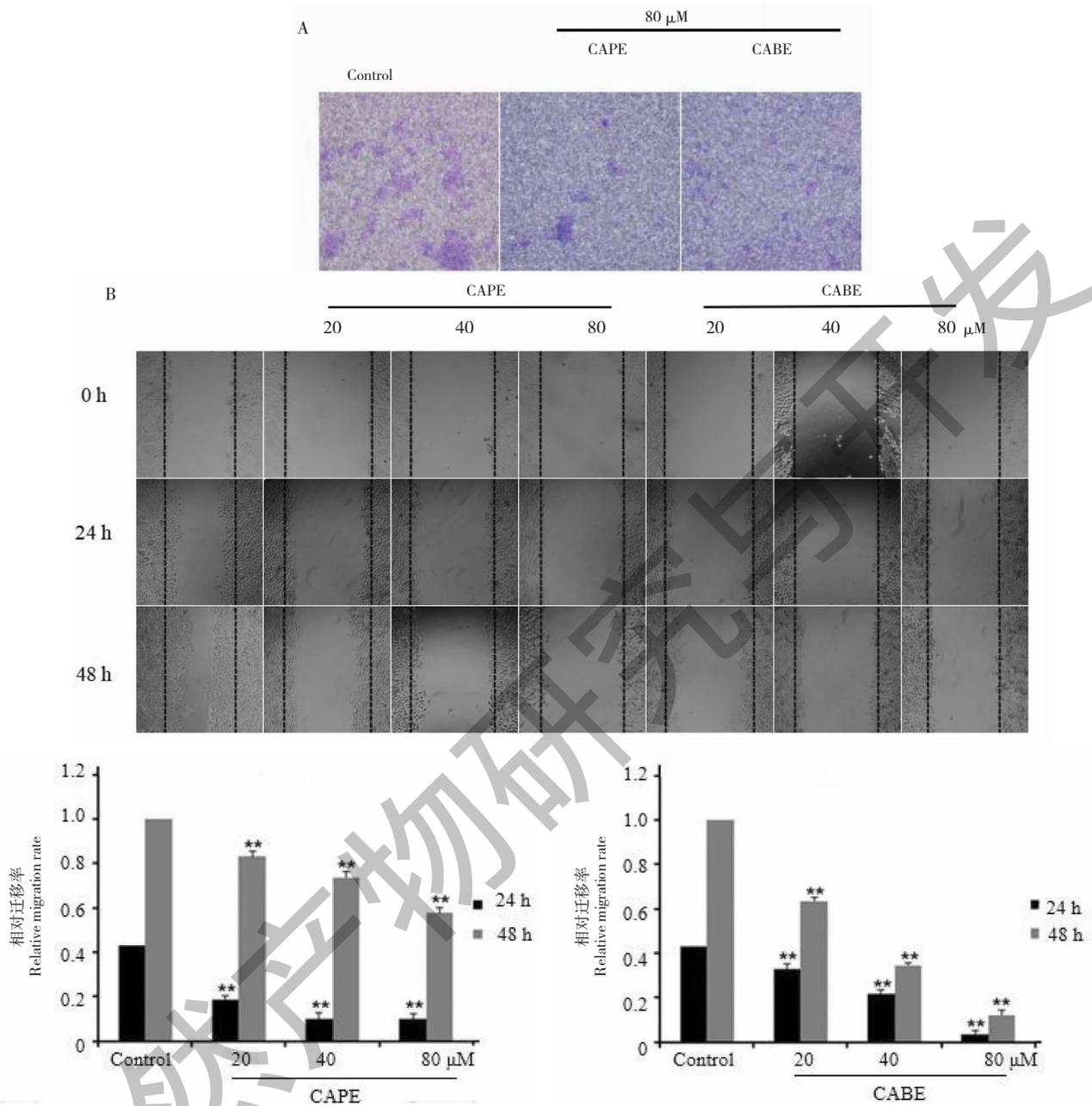


图3 CAPE和CAGE抑制Eca109细胞迁移和浸润

Fig. 3 CAPE and CAGE significantly suppressed the migration and invasion of Eca109 cells

注:A:CAPE和CAGE对Eca109细胞浸润的影响;B:CAPE和CAGE对Eca109细胞迁移的影响;C:CAPE和CAGE对细胞迁移影响的量化图。Note:A:Effects of CAPE and CAGE on Eca109 cell infiltration;B:Effects of CAPE and CAGE on migration of Eca109 cells;C:Quantification of the effects of CAPE and CAGE on cell migration.

Caspase 3 和 PARP 的水平 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$),表明 CAPE 和 CAGE 诱导 Eca109 细胞凋亡,而且随着浓度和时间的延长,CAPE 和 CAGE 诱导凋亡更显著(图4)。

2.5 CAPE 和 CAGE 抑制 Eca109 细胞中 Pro-caspase 9 和 Bcl-2 的水平

进一步检测了 CAPE 和 CAGE 处理 Eca109 细

胞 24 h 后对细胞中 Caspase 9、Bcl-2 和 BAX 的影响。结果发现,CAPE 和 CAGE 显著抑制 Bcl-2 蛋白的表达和 Pro-caspase 9 的水平 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$),而且 CAPE 的效果要好于 CAGE。CAPE 和 CAGE 对 Eca109 细胞中 Bax 的蛋白表达具有抑制趋势。

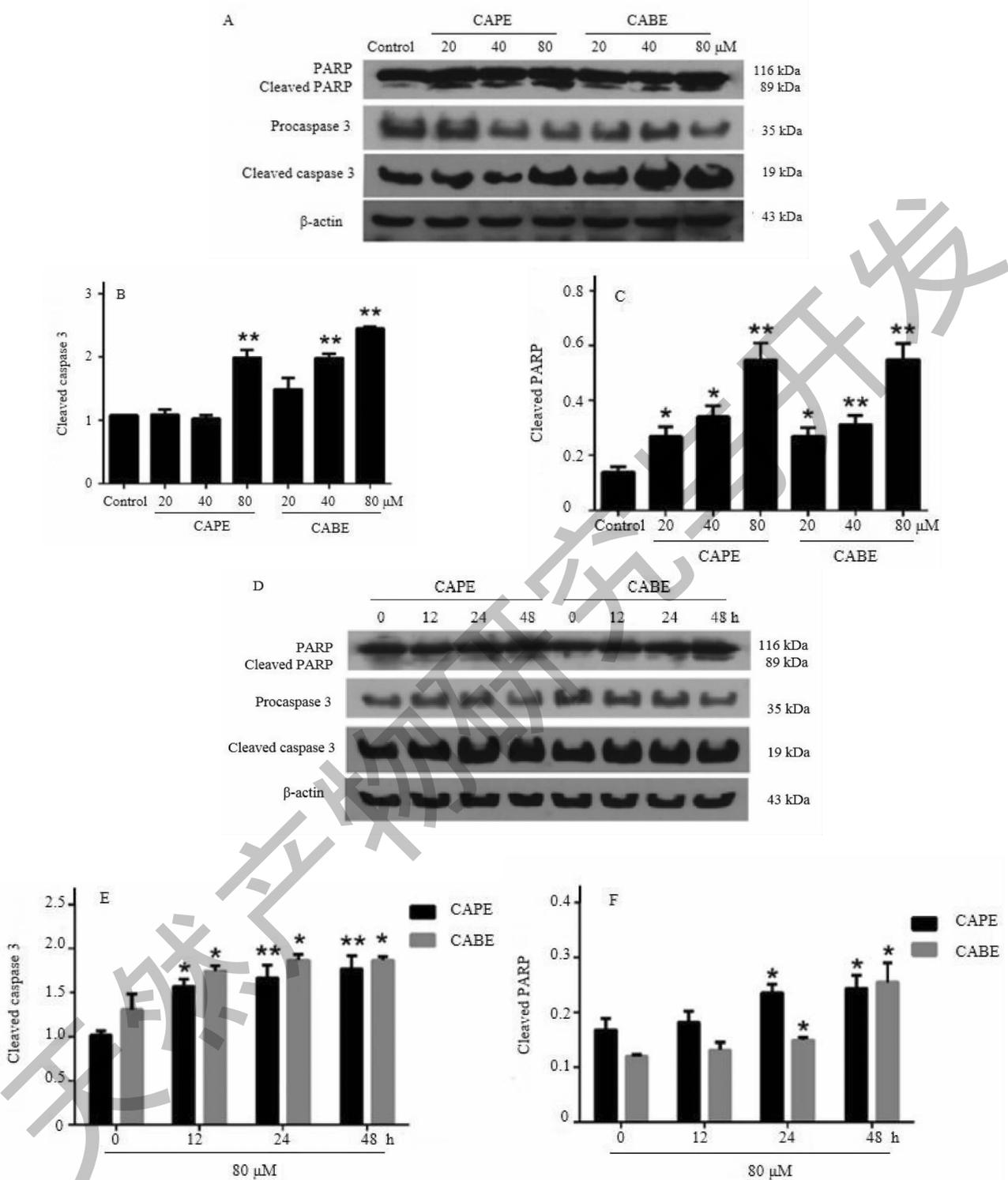


图4 CAPE 和 CBE 上调 Eca109 细胞中 Caspase 3 和 PARP 的水平

Fig. 4 CAPE and CBE obviously upregulated the levels of Caspase 3 and PARP in Eca109 cells

注: A 和 D: Eca109 细胞经 CAPE 和 CBE 处理后 PARP、Procaspase 3、Caspase 3 和 β -actin 蛋白表达; B、C、E、F: PARP、Caspase 3 蛋白量化图。

Note: A and D: Expression of PARP, Procaspase 3, Caspase 3 and β -actin in Eca109 cells treated with CAPE and CBE; B, C, E and F: Quantification of relative protein expression quantity of PARP, Caspase 3.

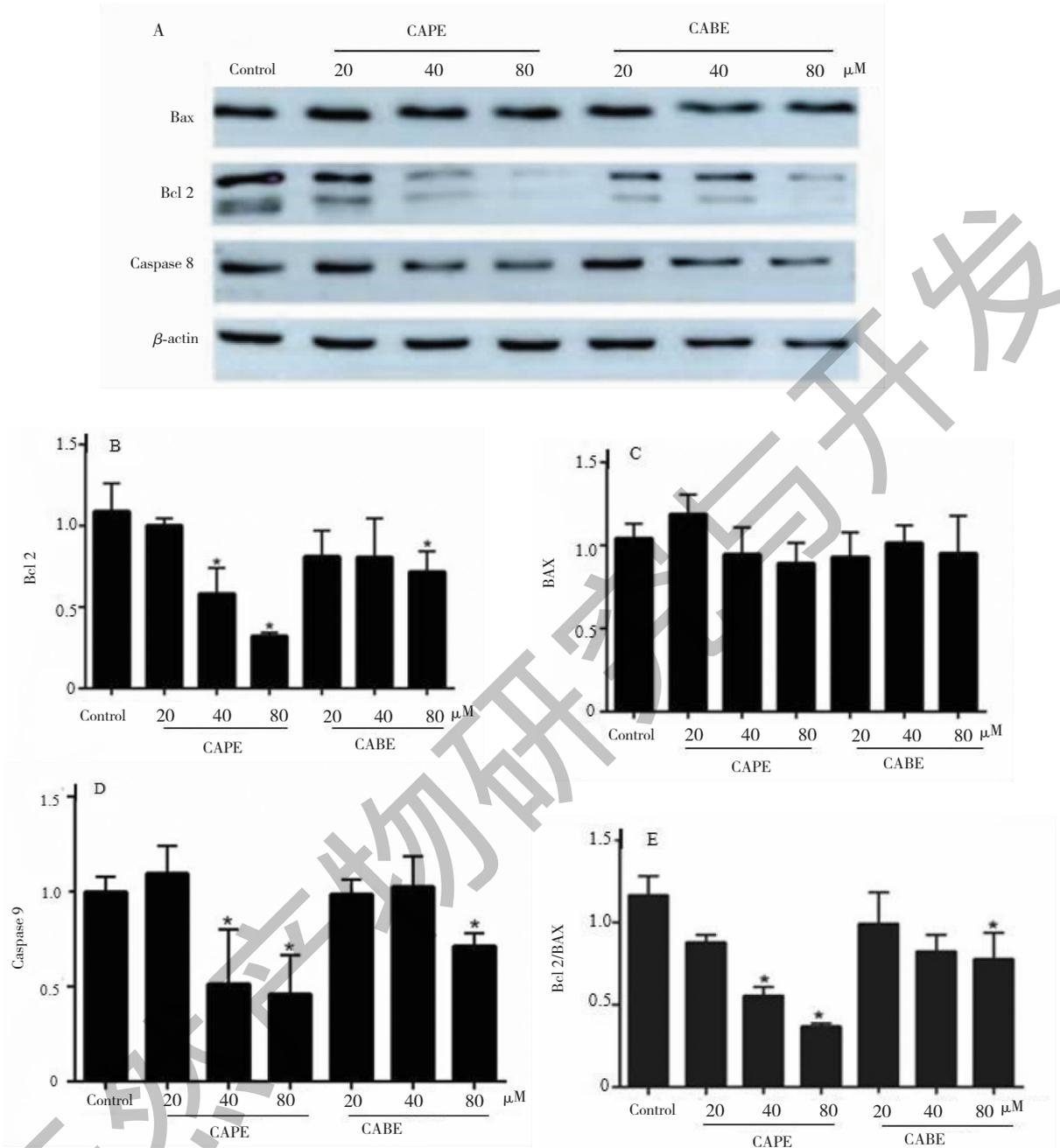


图5 CAPE 和 CAGE 抑制 Eca109 细胞中 procaspase 9 和 Bcl-2 的水平

Fig. 5 CAPE and CAGE obviously down-regulated the levels of procaspase 9 and Bcl-2 in Eca109 cells

注:A;Eca109 细胞经 CAPE 和 CAGE 处理 24 h 后 procaspase 9、BAX、Bcl-2 和 β -actin 蛋白表达;B、C 和 D;procaspase 9、BAX 和 Bcl-2 蛋白量化图;E;Bcl-2 和 BAX 的比值。Note:A;Expression of procaspase 9, BAX, Bcl-2 and β -actin in Eca109 cells treated with CAPE and CAGE at 24 h.

B, C and D;Quantification of relative protein expression quantity of procaspase 9, BAX and Bcl-2;E;The ratio of Bcl-2 to BAX.

2.6 CAPE 和 CAGE 上调 ROS 水平并降低线粒体膜电位

CAPE 和 CAGE (80 μ M) 显著上调 Eca109 细胞中的 ROS 水平,同时 CAPE 和 CAGE 也显著降低细胞内线粒体膜电位水平(图 6)。

3 讨论与结论

我们前期研究了蜂胶及其主要组分对人乳腺癌细胞(MCF-7 和 MDA-MB-231)、肺癌细胞(A549)、宫颈癌细胞(HeLa)、胶质瘤细胞(U87、U172)以及人肝癌细胞的抗肿瘤活性^[18-20]。本实验首次研究

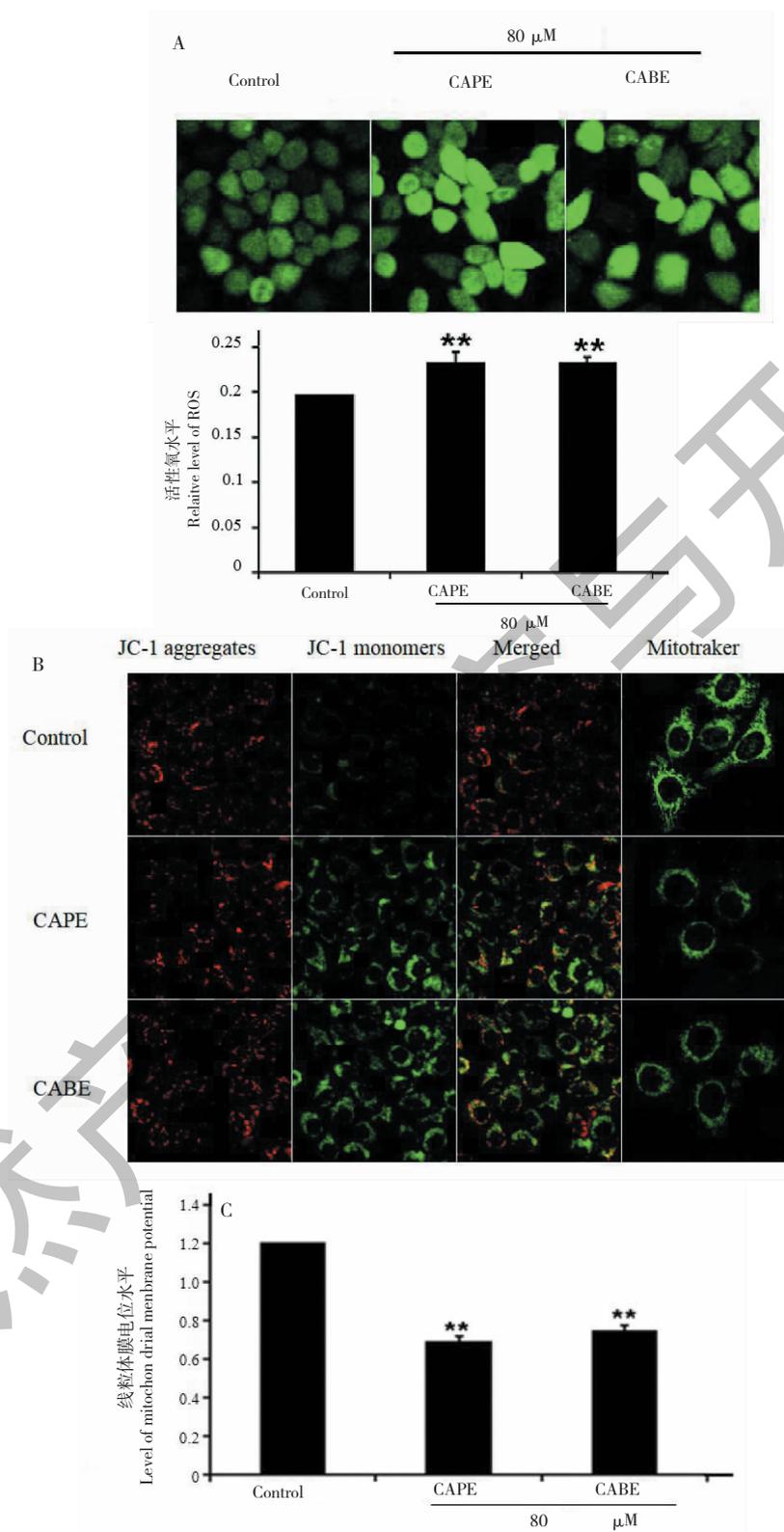


图 6 CAPE 和 CABE 上调 Eca109 细胞中 ROS 水平并降低线粒体膜电位

Fig. 6 CAPE and CABE obviously increased the levels of ROS and decreased mitochondrial membrane potential level in Eca109 cells
 注:A:CAPE 和 CABE 对 ROS 影响及量化图;B 和 C:CAPE 和 CABE 对线粒体膜电位的影响及量化图。Note:A:Quantification of CAPE and CABE on the levels of ROS;B and C:Effects of CAPE and CABE on mitochondrial membrane potential and quantification diagram.

了蜂胶中 11 种主要组分对人食管癌细胞 Eca109 的毒性,发现 CAPE 和 CAGE 对人食管癌细胞具有较好的抑制的功效,而且在有效的抑制肿瘤细胞增殖的浓度范围内不会引起细胞的坏死,表明蜂胶中的这两种酯类化合物在治疗和预防食管癌方面具有潜在的应用价值。

活性氧(ROS)主要包括超氧阴离子、氢氧自由基和过氧化氢等。高水平的 ROS 对细胞产生显著的损伤效应,可导致 DNA 损伤、蛋白质氧化以及脂质功能紊乱,从而引起细胞代谢、功能异常。大量研究表明,ROS 可以作为第二信使参与包括凋亡在内的细胞代谢调控,在细胞内信号转导通路中发挥重要作用。而且 ROS 与癌细胞的异常增殖、转移和侵袭过程密切相关。本研究表明,CAPE 和 CAGE 处理引起 Eca109 细胞中 ROS 水平显著上调,并且促凋亡蛋白显著上调,抑凋亡蛋白显著下降,同时肿瘤细胞的增殖、迁移和浸润都受到显著抑制。据此,推测 CAPE 和 CAGE 主要是通过 ROS 介导的线粒体内源性途径促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖和迁移。

食管癌是常见的消化道肿瘤,是一种食管上皮组织的恶性肿瘤,我国是世界上食管癌高发地区之一。蜂胶是一种重要的天然产物,对多种肿瘤细胞具有抑制功效。本研究进一步证实蜂胶中的 CAPE 和 CAGE 是两种重要的抑制食管癌细胞增殖的天然产物。相比较于 CAGE,CAPE 的研究非常多,其药理学活性研究的非常深入^[20]。CAGE 的研究相对较少,但通过本实验研究发现,CAGE 也是一种重要的抑制食管癌细胞增殖、转移、浸润并诱导其凋亡的重要化合物,今后还需要进一步深入研究 CAGE 的药理学活性和作用机理。

总之,尽管 CAPE 和 CAGE 化学结构非常相似,但其对食管癌 Eca109 的抑制活性还是有差异,CAPE 比 CAGE 显示出更好地促进食管癌细胞凋亡的活性。CAPE 和 CAGE 抑制食管癌 Eca109 细胞增殖主要是通过线粒体介导的内源性途径促进肿瘤细胞凋亡。CAPE 和 CAGE 是潜在的治疗食管癌的化合物,值得深入研究。

参考文献

1 Marcucci MC, Ferreres F, Custodio AR, et al. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions[J]. Z Naturforsch C, 2000, 55:76-81.

- 2 Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research[J]. Evid-based Compl Alt, 2005, 2:29-32.
- 3 Huang S, Zhang CP, Wang K, et al. Recent advances in the chemical composition of propolis [J]. Molecules, 2014, 19: 19610-19632.
- 4 Ong TH, Chitra E, Ramamurthy S, et al. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms [J]. PLoS One, 2017, 12:e0174888.
- 5 Wang K, Zhang J, Ping S, et al. Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus x canadensis*) [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155: 300-311.
- 6 Xuan H, Li Z, Wang J, et al. Propolis reduces phosphatidylcholine-specific phospholipase C activity and increases annexin a7 level in oxidized-LDL-stimulated human umbilical vein endothelial cells [J]. Evid-based Compl Alt, 2014, 2014:465383.
- 7 Yildirim A, Duran GG, Duran N, et al. Antiviral activity of hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2 [J]. Med Sci Monitor, 2016, 22:422-430.
- 8 Sun LP, Chen AL, Hung HC, et al. Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis [J]. J Agr Food Chem, 2012, 60:11748-11758.
- 9 Zheng YF, Wang K, Hu FL. Myeloid PTEN promotes chemotherapy-induced NLRP3-inflammasome activation and antitumor immunity [J]. Nat Prad Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28:627-636.
- 10 Ivanovska ND, Dimov VB, Bankova VS, et al. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 1995, 47:145-147.
- 11 Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, et al. Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue [J]. Adipocyte, 2013, 2:227-236.
- 12 Mthong S, Phuwapraisrisan P, Puthong S, et al. *In vitro* anti-proliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines [J]. BMC Complem Altern M, 2011, 11:37.
- 13 Xuan H, Li Z, Yan H, et al. Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells [J]. Evid-based Compl Alt, 2014, 2014:280120.