

# 巴西蜂胶对HepG2细胞增殖抑制活性研究

李赫宇<sup>1</sup>, 赵玲<sup>2</sup>

(1. 天津市益倍建生物技术有限公司, 天津 300457; 2. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

**摘要:** 巴西蜂胶具有丰富而显著的生理活性, 采用 MTT 法对巴西蜂胶提取物进行了 HepG2 细胞增殖抑制活性的研究, 发现巴西蜂胶对 HepG2 细胞增殖具有良好的抑制活性, 且呈显著的量效关系和时效关系, 即剂量越大、药物作用时间越长, 则对 HepG2 细胞的抑制率越高。

**关键词:** 巴西蜂胶; HepG2 细胞; 增殖抑制活性

## Study on the Proliferation Inhibitory Activity of Brazilian Propolis on HepG2 Cell

LI He-yu<sup>1</sup>, ZHAO Ling<sup>2</sup>

(1. Tianjin Ubasic Health Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China; 2. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China)

**Abstract:** The Brazilian propolis has rich and significant physiological activity. The proliferation inhibitory activity of Brazilian propolis extracts on HepG2 cell was studied with the MTT assay. It was found that the Brazil propolis had good inhibitory activity on the proliferation of HepG2 cells, and showed a significant dose effect and time effect relationship, that was, the higher the dose, the longer the action time, the higher the inhibition rate of HepG2 cells.

**Key words:** Brazil propolis; HepG2 cell; proliferation inhibition activity

蜂胶 (Propolis) 是蜜蜂工蜂采集植物树脂等分泌物与其上颚腺、蜡腺等分泌物混合而成的一种天然粘稠物质。蜂胶的应用历史十分悠久, 早在公元前 300 年, 古埃及人就将其作为防腐物质及防治疾病的药物来使用。现代研究表明, 蜂胶含有丰富的黄酮类、酚酸类及萜烯类化合物<sup>[1-3]</sup>, 具有广泛的生物学活性和药理学活性, 如抗氧化、抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、保肝、免疫调节等; 目前已广泛用于医药、保健品、化妆品等领域<sup>[4]</sup>。蜂胶在全世界范围内均有分布, 其中, 巴西因其得天独厚的地理位置和丰富的生物资源而成为蜂胶生产大国。巴西蜂胶种类繁多, 化学组成复杂, 具有丰富而突出的生物学活性。自 20 世纪 90 年代以来, 巴西蜂胶的化学组成及其生物学活性引起了国内外蜂胶研究者的广泛关注。恶性肿瘤是严重威胁人类健康和生命的重大疾病之一, 其发病机制及防治措施多种多样, 本文针对巴西蜂胶抗肝癌 HepG2 细胞增殖活性进行研究, 以期发现较好活性, 为肝癌防治提供参考。

作者简介: 李赫宇 (1982—), 男 (汉), 工程师, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物和功能性食品的开发。

## 1 试验材料

### 1.1 材料和试剂

巴西蜂胶由天津市益倍建生物技术有限公司提供; 噻唑蓝 (MTT): 美国 Sigma 公司; 胎牛血清: 杭州四季青生物工程公司; 二甲基亚砷: Sigma 公司; RP-MI1640、胰蛋白酶: Gibco 公司。

### 1.2 细胞株

肝癌 HepG2 细胞株: 华中科技大学提供。

### 1.3 试验仪器

酶标仪: 美国 PerkinElmer 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱: W200IR 型, 美国 SIM 公司; 倒置显微镜: Olympus 公司; 超净工作台: ZHJH-1112B 型, 上海智诚分析仪器制造有限公司。

## 2 方法

### 2.1 药物制备

巴西蜂胶以 80% 乙醇浸泡 24 h, 低温回收乙醇, 制得提取物。巴西蜂胶提取物适量以 1 mL (DMSO) 二甲基亚砷溶解, 过滤除菌, 置 4 °C 冰箱保存, 临用前用

培养基稀释成所需浓度。

## 2.2 HepG2 细胞培养

将恒温水浴锅的温度设置为 37 ℃,在-80 ℃的低温冰箱里取出已冻存的肝癌 HepG2 细胞株,放入恒温水浴锅中进行水浴,同时不停摇晃,使细胞迅速融化。3 min 后冻存管内成液体状态,取出后防止污染可用酒精棉擦拭。放入超净工作台后,取出离心管并加入 3 mL 的培养基,反复吹打后将冻存管内细胞悬液加入离心管里,吹匀后放入离心机(1 500 r/min, 10 min)。离心后在超净工作台内操作,倒掉离心管内的上清液,加入 1 mL 培养基后分装到 3 个中型培养瓶内培养,每瓶加入 6 mL 培养基。将中型培养瓶放入 37 ℃、5 % CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。

## 2.3 MTT 法测定抑制率

### 2.3.1 铺板

观察细胞状态,细胞成对数生长期后,用胰酶消化,倒掉胰酶后,加入 3 mL 培养基终止消化,用吸管反复吹打但不要产生泡沫,将瓶壁的细胞吹落。吹匀后进行细胞计数,经计算配成 3×10<sup>4</sup> 个/mL 悬液,将细胞悬液接种于 96 孔板内,每孔 100 μL(3×10<sup>4</sup> 个/mL)。放入 37 ℃、5 % CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 24 h。

### 2.3.2 给药

在超净工作台内用 RPMI 1640 稀释巴西蜂胶提取物母液,配置成 6 个质量浓度,分别为 2.18、1.09、0.545、0.272 7、0.136 35、0.068 175 g/mL。每个质量浓度设置 6 个平行孔,每孔加入 100 μL 药物,空白孔加 100 μL(3×10<sup>4</sup> cell)的细胞悬液后,加入 100 μL 的 RPMI 1640,平行条件下铺 3 块板。

### 2.3.3 MTT 法测定

将分别培养 24、48、72 h 的 96 孔板取出,倒掉板孔内液体,再在每孔加入 10 μL MTT,放入培养箱内继续培养 4 h 后取出 96 孔板。吸去孔内 MTT 后,每孔再加入 110 μL 的 Formazan 溶解液,震荡仪上震荡 10 min,使孔内结晶充分溶解。570 nm 波长下酶标仪检测。

### 2.3.4 计算公式

HepG-2 细胞生长抑制率/% = (1-给药孔 OD 值/空白孔 OD 值) × 100

### 2.3.5 数据处理

本实验采用 SPSS19.0 进行分析,使用 ANOVA 方差分析方法、两样本均数比较用 t 检验,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 3 结果

MTT 结果显示不同质量浓度的巴西蜂胶分别培

养 24、48、72 h 后,对 HepG2 细胞有明显抑制作用。当巴西蜂胶浓度大于等于 0.272 7 mg/mL 并培养 48 小时和 72 小时后,对 HepG2 细胞的抑制率均大于 50 %。当浓度增大为 2.18 mg/mL 时,作用 24 h 其抑制率即大于 50 %,具体数据见表 1。巴西蜂胶相对应的 IC<sub>50</sub> 值经计算,分别为 1.395 7、0.323 6、0.025 2 mg/mL。各实验组(P<0.05)均有统计学意义,随着浓度增大和作用时间延长,巴西蜂胶对 HepG2 细胞增殖抑制存在着显著的剂量-效应关系和时间-效应关系(P<0.05),见图 1。

表 1 巴西蜂胶对 HepG2 细胞的抑制率( $\bar{x} \pm SD, n=6$ )

质量浓度/(mg/mL)	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
0.068 175	24.07±1.53	34.70±1.53	39.83±1.49
0.136 35	29.55±1.56	45.21±2.08	49.68±2.68
0.272 7	35.63±1.76	54.51±1.76	60.39±1.34
0.545	40.97±1.83	61.19±1.37	69.96±2.90
1.09	48.54±2.01	67.03±3.23	80.90±2.63
2.18	59.28±2.40	81.67±3.46	93.86±2.46

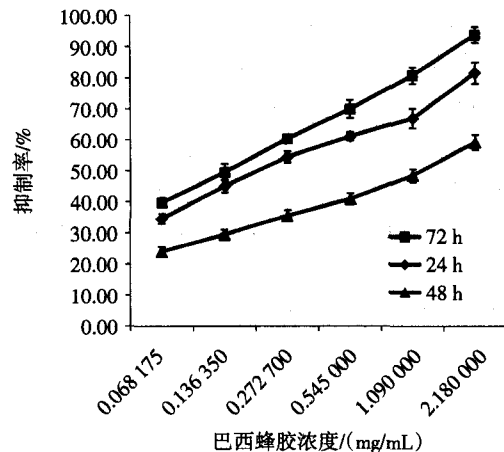


图 1 巴西蜂胶对 HepG2 细胞的抑制率曲线

Fig.1 Inhibition curve of Brazilian propolis on HepG2 cells

## 4 结论与讨论

通过本实验可以看出,巴西蜂胶体外具有良好的抑制 HepG2 细胞增殖的活性,且随着浓度的增加,作用时间的延长,对 HepG2 细胞的抑制率越高,在浓度为 2.18 mg/mL 时,其作用 48 h 和 72 h 的抑制率分别可达 81.67 %和 93.86 %,但是其在体内是否较好的抗肝癌活性及作用机制尚不清楚,仍需进一步深入研究。

我国是一个肝病大国,每年的肝癌发病率及病死率均占全球一半以上<sup>[9]</sup>,现有的抗肝癌药物大都存在各种毒副作用。蜂胶是卫生部公布的可用于保健食品中的物品之一,具有较高的安全性<sup>[6]</sup>。且文献报道其还

# 超声波辅助提取夏橙皮渣果胶研究

廖立敏<sup>1,2</sup>, 李建凤<sup>2</sup>

(1. “果类废弃物资源化”四川省高等学校重点实验室, 四川内江 641100; 2. 内江师范学院 化学化工学院, 四川内江 641100)

**摘要:** 以干燥的夏橙皮渣为原料, 先用复合磷酸盐碱性溶液浸泡 24 h, 采用超声波辅助提取法对果胶进行了提取。以果胶提取率为考察指标, 研究了盐酸浓度、液料比、水解温度、水解时间、超声波处理时间对果胶提取的影响。结果表明, 盐酸浓度为 0.15 mol/L、液料比为 30 mL/g、水解温度为 70 °C、水解时间为 30 min、超声波处理时间为 40 min 时, 果胶提取率高达 20.67%, 试验重现性好。

**关键词:** 夏橙皮; 磷酸盐; 正交试验; 果胶; 超声波辅助提取

## Ultrasound-assisted Extraction of Pectin from Summer Orange Peel

LIAO Li-min<sup>1,2</sup>, LI Jian-feng<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Fruit Waste Treatment and Resource Recycling of Sichuan Provincial College, Neijiang 6411900, Sichuan, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Neijiang Normal University, Neijiang 641100, Sichuan, China)

**Abstract:** Dried summer orange peel was adopted as raw materials in the study. After materials were soaked with phosphate solution for 24 h, pectin was extracted through ultrasound-assisted extraction method. The effects of hydrochloric acid concentration, liquid-solid ratio, hydrolysis temperature, hydrolysis time and ultrasonic treatment time on extraction rate of pectin were studied. The results showed that when the hydrochloric acid concentration was 0.15 mol/L, liquid ratio was 30 mL/g, hydrolysis temperature was 70 °C, hydrolysis time was 30 min, and ultrasonic treatment time was 40 min, the extraction rate of pectin reached 20.67% and the experimental reproducibility was good.

**Key words:** Summer orange peel; phosphate; orthogonal test; pectin; ultrasound-assisted extraction

基金项目: 四川省教育厅青年基金项目(13ZB0003)

作者简介: 廖立敏(1981—), 男(汉), 副教授, 硕士, 研究方向: 果类废弃物资源化。

有提高免疫的作用, 在人们日益追求健康的时代, 具有极大的开发为防治肝癌的药品及保健食品的潜力, 这对人类健康有着非常重要的现实意义。

### 参考文献:

- [1] 张翠平, 胡福良. 蜂胶中的黄酮类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1084-1090
- [2] 张翠平, 胡福良. 蜂胶中的萜类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(7): 976-984

- [3] Zhang C, Wang K, HU Fuliang. Phenolic acid in propolis[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2013, 30(1): 102-105
- [4] VS Bankova, SLD Castro, MC Marcucci. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin[J]. Apidologie, 2000, 31(1): 3-15
- [5] 梁宏元, 卢再鸣. 原发性肝癌综合介入治疗现状与困惑[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(1): 44-48
- [6] 程晓雨, 胡福良. 我国蜂胶保健食品概况[J]. 中国蜂业, 2015, 66(4): 45-47

收稿日期: 2016-07-12