

海南无刺蜂蜂蜜中多酚类物质成分分析及其抗氧化、抗炎活性评价

梁馨文¹, 李强强¹, 高景林², 王 凯¹, 吴黎明^{1,*}

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南 海口 570100)

摘 要: 以海南无刺蜂蜂蜜及其多酚类提取物为研究对象, 分别测定分析无刺蜂蜂蜜的理化成分和多酚物质, 研究其抗氧化和抗炎活性。通过液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱分析多酚类成分, 并采用福林-酚法和硝酸铝比色法测定多酚类提取物总酚酸和总黄酮含量。采用1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸) 二铵盐自由基 (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical, ABTS⁺·) 清除实验和铁离子还原力实验评价多酚类提取物的体外抗氧化活性, 并采用细菌脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的RAW 264.7细胞体外炎症模型, 探究多酚类提取物的抗炎活性。结果显示, 无刺蜂蜂蜜水分质量分数为(26.3±0.1)%, pH 3.7±0.2, 蛋白质含量为(628.2±9.0) mg/kg, 淀粉酶值为(19.6±0.2) mL/(g·h), 总糖质量分数为(46.7±6.0)%, 包括果糖(21.0±3.7)%, 葡萄糖(24.9±2.2)%, 蔗糖(0.8±0.1)%; 多酚类提取物的总酚酸和总黄酮含量分别为(96.6±0.4) μg CAE/g和(16.1±0.3) μg QE/g; 多酚类提取物的DPPH自由基和ABTS⁺·清除能力IC₅₀值分别为(435.1±0.4)、(423.0±0.3) μg/mL, 铁离子还原力为(0.6±0.02) μmol Trolox/g; 在体外抗炎实验中, 多酚类提取物能显著抑制由LPS诱导的RAW 264.7细胞NO的释放, 并显著抑制促炎症基因*iNOS*、*IL-1β*、*IL-6*和*MCP-1*的表达, 显著增强抗氧化基因*HO-1*的表达, 并呈剂量相关性。综上所述, 海南无刺蜂蜂蜜营养成分丰富, 富含酚酸和黄酮类物质, 且具有很强的抗氧化和抗炎能力, 具有良好的开发利用价值。

关键词: 无刺蜂蜂蜜; 成分分析; 抗炎; 抗氧化

Polyphenic Constituents and Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Stingless Bee Honey from Hainan

LIANG Xinwen¹, LI Qiangqiang¹, GAO Jinglin², WANG Kai¹, WU Liming^{1,*}

(1. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China;

2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570100, China)

Abstract: This study aimed to analyze the physicochemical properties and polyphenolic composition and to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of stingless bee honey (SBH) from Hainan, China. The polyphenolic compounds were analyzed by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF-MS). The contents of total phenolics and total flavonoids in SBH extract were determined by the Folin-Ciocalteu method and AlNO₃ colorimetry, respectively. The antioxidant activity of SBH was assayed *in vitro* by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate radical) (ABTS⁺·) scavenging and reducing power methods. Its anti-inflammatory effect was investigated using lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cells. Our results showed that SBH possessed the physicochemical properties: moisture content (26.3 ± 0.1)%, pH 3.7 ± 0.2, protein content (628.2 ± 9.0) mg/kg, amylase activity (19.6 ± 0.2) mL/(g·h), fructose content (21.0 ± 3.7)%, glucose content (24.9 ± 2.2)%, sucrose content (0.8 ± 0.1)%. The contents of total phenolics and total flavonoids in the extract were (96.6 ± 0.4) μg CAE/g and (16.1 ± 0.3) μg QE/g, respectively. The IC₅₀ values of the extract for scavenging of DPPH and ABTS radicals were (435.1 ± 0.4) and (423.0 ± 0.3) μg/mL, respectively, and its ferric reducing power was (0.6 ± 0.02) μmol Trolox/g. SBH exhibited potent concentration-dependent anti-inflammatory effects by inhibiting nitric oxide (NO) release from LPS-stimulated RAW 264.7 cells, markedly decreasing the mRNA expression of *iNOS*, *IL-1β*, *IL-6* and *MCP-1*, and significantly increasing the mRNA

收稿日期: 2017-06-02

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-2016-IAR); 国家现代农业 (蜂) 产业技术体系建设专项 (CARS-45)

第一作者简介: 梁馨文 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向蜂产品质量与安全。E-mail: liangxinwen2017@126.com

*通信作者简介: 吴黎明 (1973—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为蜜蜂饲养管理学和蜂产品加工。E-mail: apiswu@126.com

expression of *HO-1*. These results suggest that SBH was rich in nutrients, phenolic acids and flavonoids, and had potent antioxidant and anti-inflammatory properties, making it very promising.

Keywords: stingless bee honey; food composition analysis; antioxidant; anti-inflammatory

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201808023

中图分类号: S896.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 08-0141-08

引文格式:

梁馨文, 李强强, 高景林, 等. 海南无刺蜂蜂蜜中多酚类物质成分分析及其抗氧化、抗炎活性评价[J]. 食品科学, 2018, 39(8): 141-148. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201808023. <http://www.spkx.net.cn>

LIANG Xinwen, LI Qiangqiang, GAO Jinglin, et al. Polyphenic constituents and antioxidant and anti-inflammatory activities of stingless bee honey from Hainan[J]. Food Science, 2018, 39(8): 141-148. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201808023. <http://www.spkx.net.cn>

蜂蜜不仅被作为一种天然的甜味剂, 由于其存在的活性成分, 也被广泛应用于临床实践。已有报道证明蜂蜜具有多种生物活性, 例如, 抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗癌, 降血脂和糖尿病辅助治疗等^[1-2]。同时, 蜂蜜已经被作为一种重要的天然抗氧化剂和伤口愈合剂, 广泛应用于创伤治疗; 其对胃肠道的保护作用可降低肠道炎症等胃肠道疾病^[3]; 并能有效抑制埃希氏杆菌、志贺氏菌、沙门氏菌等致病菌的生长^[4-5], 对乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌和骨肉瘤表现出一定的抗癌作用^[6-8]; 除此之外, 蜂蜜已经被作为治疗糖尿病和高血脂的辅助药剂, 能够改善甲状腺功能, 并可作为一种肝脏和心脏的保护剂^[9], 有效降低个体患多种疾病的风险。

无刺蜂是一类营群体生活并能酿蜜的昆虫, 隶属于膜翅目(Hymenoptera), 蜜蜂总科(Apoidea), 蜜蜂科(Apidae), 蜜蜂亚科(Apinae), 麦蜂族(MeliPonini), 无刺蜂属(*Trigona*), 体呈黑色, 体小灵活, 是热带地区植物的主要传粉蜂种, 主要分布于热带和亚热带地区, 我国仅在云南、海南和台湾地区的田间森林有分布。无刺蜂蜂蜜是无刺蜂从植物蜜腺或其他部位采来的花蜜, 经充分酿造, 存储于巢房的甜蜜物质, 与西方蜜蜂蜂蜜相比, 具有水分含量高、酸度高、酶值低、黏度低等特点^[10]。无刺蜂蜂蜜含有丰富的营养物质和生物活性成分, 世界范围内, 主要产自秘鲁、瓜地马拉、墨西哥、委内瑞拉等国家。*Melipona* spp.、*Scaptotrigona* spp.、*Trigona* spp.等无刺蜂属蜂蜜已广泛应用于传统医学^[11], 具有显著的抗氧化、抗菌、抗突变、促进伤口愈合^[12-14]等生物活性功能。无刺蜂蜂蜜的化学成分复杂, 尤其是其主要活性成分酚酸黄酮类物质, 因蜂种、采集植物、地理环境、气候、季节的变化而导致无刺蜂蜂蜜成分、活性的差异。目前, 我国无刺蜂蜂蜜的研究尚处于起步阶段, 并无有关我国无刺蜂蜂蜜成分和活性的研究报道。本实验通过XAD-2柱层析法富集了我国海南无刺蜂蜂蜜中的多酚类有效活性成分, 利用液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法测定其多酚

化学成分, 研究我国无刺蜂蜂蜜多酚类提取物的体外抗氧化活性(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐自由基(2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) radical, ABTS⁺·)的清除、总还原力)及对细菌脂多糖诱导的小鼠单核巨噬细胞体外炎症反应的调节作用, 探讨无刺蜂蜂蜜的抗炎、抗氧化作用及其可能的机制, 为我国无刺蜂蜂蜜的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄纹无刺蜂(*Trigona ventralis* Swith)蜂蜜, 2016年11月采自海南省白沙黎族自治县南开乡; 小鼠单核巨噬细胞(RAW 264.7)由浙江大学动物科学学院胡福良教授惠赠。

脂多糖、DMEM培养基 美国Sigma公司; 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物上海生工生物工程技术有限公司; Prime ScriptTM RT Master Mix试剂盒、SYBR[®]Premix Ex TaqTM 宝生物工程(大连)有限公司; Amberlite XAD-2树脂 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 乙醇、乙酸乙酯均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

6510液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱 美国安捷伦科技有限公司; SpectraMax[®]i3酶标仪 美谷分子仪器(上海)有限公司; NanoDrop 2000超微量分光光度计 美国赛默飞世尔科技有限公司; PCR仪 东胜创新生物科技有限公司; 荧光定量PCR仪 杭州博中科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 理化指标测定

水分含量和pH值采用SN/T 0852—2012《进出口蜂蜜检验规程》测定; 淀粉酶值采用GB/T 18932.16—2003

《蜂蜜中淀粉酶值的测定方法 分光光度法》测定；还原糖（果糖和葡萄糖）和蔗糖含量采用GB/T 18932.22—2003《蜂蜜中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的测定方法 液相色谱示差折光检测法》测定；蛋白质含量参照考马斯亮蓝法测定。

1.3.2 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物样品前处理

称取800 g无刺蜂蜂蜜，加入4 L醋酸水（pH 2.0），搅拌溶解后100 kHz功率超声30 min，棉花过滤，待用。Amberlite XAD-2大孔树脂经乙醇浸泡24 h后，称取800 g活化的大孔树脂，水洗2~3遍至无味后倒入无刺蜂蜂蜜水溶液中，动态搅拌吸附1 h。静置，弃去上清液，并将大孔树脂填入玻璃柱中，分别用1.6 L pH 2的醋酸水溶液、2.4 L纯水淋洗以除去糖等极性物质，最后用6.4 L无水乙醇溶液洗脱并收集洗脱液，40 °C减压真空浓缩至固形物，复溶于10 mL纯水，并用40 mL乙酸乙酯萃取。收集乙酸乙酯层，氮气吹干，所得无刺蜂蜂蜜多酚类提取物置于-20 °C冰箱中备用。

1.3.3 液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱分析无刺蜂蜂蜜多酚类提取物

色谱条件：采用Proshell 120 SB-C₁₈色谱柱（2.1 mm×100 mm，2.7 μm）；流动相为纯水（A）-甲醇（B）；流速0.2 mL/min；进样量2 μL；柱温30 °C；洗脱梯度为0~2 min，15%；2~10 min，15%~30%；10~25 min，30%~90%；25~30 min，90%；30~31 min，15%。

质谱条件：电喷雾离子源；载气温度350 °C；干燥气流速11 L/min；雾化气压40 psig。

1.3.4 总酚酸及总黄酮含量测定

选用福林-酚法测定无刺蜂蜂蜜多酚类提取物总酚酸含量^[15]，并加以改进。将100 μL无刺蜂蜂蜜多酚类提取物溶液和100 μL福林-酚试剂振荡混匀，避光保存5 min后加入300 μL 0.02 g/mL碳酸钠溶液，放置2 h，在波长765 nm处测吸光度（96孔板中测定，200 μL/孔）。结果用绿原酸当量（chlorogenic acid equivalent, CAE）表示。

参照Zhang Jianglin等^[15]实验方法，测定无刺蜂蜂蜜多酚类提取物中总黄酮含量。将150 μL无刺蜂蜂蜜多酚类提取物样品溶液，10 μL硝酸铝（100 g/L），10 μL醋酸钾（9.8 g/L）振荡混匀，加入30 μL的纯水避光反应1 h后，在波长415 nm处测吸光度（96孔板中测定，200 μL/孔）。结果用槲皮素当量（quercitrin equivalent, QE）表示。

1.3.5 自由基清除能力和还原力测定

1.3.5.1 DPPH自由基清除率测定

参照Yang Haisha等^[16]方法并适当调整，测定无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对DPPH自由基清除能力。将100 μL无刺蜂蜂蜜多酚类提取物溶液和100 μL DPPH工作液混合，加入96孔板中（100 μL/孔）。室温避光反应30 min后，

在波长517 nm处测吸光度。无刺蜂蜂蜜多酚类提取物DPPH自由基清除力用IC₅₀值（μg/mL）表示。

1.3.5.2 ABTS⁺·清除率测定

参照Yang Haisha等^[16]实验方法并适当调整，测定无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对ABTS⁺·清除能力。将100 μL ABTS工作溶液和50 μL样品溶液加入到96孔板中，室温避光放置10 min，在波长734 nm处测吸光度。无刺蜂蜂蜜多酚类提取物ABTS⁺·清除力用IC₅₀值（μg/mL）表示。

1.3.5.3 还原力测定

参照Guo Xiali等^[17]方法并适当调整，测定无刺蜂蜂蜜多酚类提取物铁还原力。将50 μL样品溶液、12.5 μL磷酸缓冲液（0.2 mol/L，pH 6.6）、12.5 μL 1%铁氰化钾溶液混合，50 °C孵育20 min，随后加入12.5 μL 10%的三氯乙酸。混合均匀后2 000×g离心10 min。反应体系包括1 mL上清液、12.5 μL蒸馏水和25 μL 0.1%的氯化铁溶液，混合均匀后加入到96孔板中（200 μL/孔），在波长700 nm处测定吸光度。结果用μmol Trolox/g表示。

1.3.6 体外抗炎活性

1.3.6.1 细胞培养及细胞活力测定

小鼠巨噬细胞RAW 264.7孵育在含体积分数10%热灭活胎牛血清、100 μg/mL链霉素和100 U/mL青霉素的DMEM高糖培养基中，并放置在37 °C、含5% CO₂的培养箱培养。使用CCK-8测定细胞生长活力，将10×10⁴/mL小鼠巨噬细胞RAW 264.7接种于96孔细胞培养板中，孵育24 h后，加入适量不同浓度的无刺蜂蜂蜜多酚类提取物，24 h后再加入10 μL CCK-8，37 °C反应2 h，利用酶标仪测定波长450 nm处吸光度。

1.3.6.2 Greiss法测定细胞培养液中NO浓度

将RAW 264.7细胞接种在24孔细胞培养板中，孵育24 h后，加入适量不同浓度的无刺蜂蜂蜜多酚类提取物预处理1 h，后加入1 μg/mL细菌脂多糖（lipopolysaccharides, LPS）刺激细胞产生炎症反应。孵育24 h后，收集细胞培养液，离心，取100 μL上清液和100 μL GreissA试剂（1%对氨基苯磺酰胺）混合，吸取100 μL混合液加入96孔板中，再加入50 μL GreissB试剂（0.1% N-（1-萘基）乙二胺二盐酸盐），利用酶标仪测定波长550 nm处的吸光度。

1.3.6.3 RNA提取和荧光定量PCR

小鼠巨噬细胞RAW 264.7总RNA通过RNA提取试剂盒提取，置于-80 °C待测。采用NanoDrop 2000微量分光光度计检测RNA浓度和纯度，使用PrimeScriptTM RT Master Mix反转录试剂盒，以1 μg总RNA作为合成第1链cDNA模板进行反转录，反转录产物置于-20 °C待用。实验所需引物信息如表1所示，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。实时荧光定量PCR采用SYBR[®]Premix EX TaqTM试剂盒进行，每孔反应体系

20 μL , 利用两步法PCR检测。GAPDH为管家基因, 对靶基基因标准化, 可作为靶基基因的标准参照物, 结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示^[18]。

表1 qRT-PCR实验中的引物序列
Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

基因	上游引物	下游引物
iNOS	5'-TTTCCAGAAGCAGAAATGTGACC-3'	5'-AACACCACTTTCACCAAGACTC-3'
IL-1 β	5'-CCAACAAGTGATATCTCCATGAG-3'	5'-ACTCTGCAGACTCAAACTCCA-3'
IL-6	5'-CTCTGCAAGAGACTTCCATCC-3'	5'-GAATTGCCATTGCACAACCTC-3'
HO-1	5'-ACATTGAGCTGTTTGAGGAG-3'	5'-TACATGGCATAAAATCCCACTG-3'
MCP-1	5'-AAGAAGCTGTAGTTTTTGTCAACCA-3'	5'-TGAAGACCTTAGGGCAGATGC-3'

2 结果与分析

2.1 海南无刺蜂蜂蜜理化成分分析

表2 无刺蜂蜂蜜理化指标
Table 2 Physicochemical parameters of stingless bee honey

水分质量分数/%	pH	蛋白质含量/(mg/kg)	淀粉酶值/(mL/(g·h))
26.3 $\pm$ 0.1	3.7 $\pm$ 0.2	628.2 $\pm$ 9.0	19.6 $\pm$ 0.2
果糖质量分数/%	葡萄糖质量分数/%	蔗糖质量分数/%	总糖质量分数/%
21.0 $\pm$ 3.7	24.9 $\pm$ 2.2	0.8 $\pm$ 0.1	46.7 $\pm$ 6.0

如表2所示, 水分质量分数是评价蜂蜜质量的一个重要标准, 所测无刺蜂蜂蜜样本的水分质量分数为(26.3 $\pm$ 0.1)%, 与国外报道的无刺蜂蜂蜜含水量相符(20%~30%)^[11,19]。由于蜂蜜产品行业标准(GH/T 18796—2012)中规定: 一级品蜂蜜(*Apis mellifera*)的水分含量不得高于20 g/100 g, 故相比西方蜜蜂(*Apis mellifera*)蜂蜜, 无刺蜂蜂蜜具有较高的含水量, 花蜜来源、热带雨林气候条件、土壤条件、采集时间和蜂巢中蜂蜜的成熟程度是影响其水分含量高的主要因素^[20]。pH值是影响蜂蜜货架期的重要因素^[21], 海南无刺蜂蜂蜜pH值为3.7 $\pm$ 0.2, 与国外无刺蜂蜂蜜pH值相符(2.9~5.3)^[12,22-23], 蜜源植物和贮存过程是影响其pH值的主要原因^[24]。淀粉酶值是判断蜂蜜质量品质的重要指标, 海南无刺蜂蜂蜜的淀粉酶值为(19.6 $\pm$ 0.2) mL/(g·h), 不同地区的无刺蜂蜂蜜淀粉酶值存在差异, 如澳大利亚为0.4~0.9 mL/(g·h), 泰国为1.5~3.1 mL/(g·h), 巴西为4.4~49.6 mL/(g·h)等^[22,25-26], 地理环境可能会影响无刺蜂蜂蜜的淀粉酶值。海南无刺蜂蜂蜜的总糖质量分数为(46.7 $\pm$ 6.0)%, 低于西方蜜蜂(*Apis mellifera*)蜂蜜(>60%)^[27], 其中葡萄糖含量最高, 为(24.9 $\pm$ 2.2)%, 其次为果糖(21.0 $\pm$ 3.7)%和蔗糖(0.8 $\pm$ 0.1)%, 较低的含糖量使无刺蜂蜂蜜甜味较淡^[23]。蜂蜜中存在的蛋白质主要来源于花蜜、花粉和蜜蜂分泌的酶类^[28]。不同种类的无刺蜂蜂蜜蛋白质含量存在显著差异, 本实验所测海南无刺蜂蜂蜜蛋白质含量为(628.2 $\pm$ 9.0) mg/kg, 低于Sousa等^[23]报道的巴西无刺蜂蜂蜜蛋白质含量(2 000~5 000 mg/kg)。

2.2 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物酚酸黄酮分析

建立24种酚酸黄酮类物质液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱检测方法, 其中在海南无刺蜂蜂蜜中检出15种酚酸黄酮物质, 如表3所示。在海南无刺蜂蜂蜜中没食子酸和桑色素含量最高, 分别为225.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 和265.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 。其中海南无刺蜂蜂蜜中没食子酸的含量显著高于西方蜜蜂蜂蜜(琵琶、枣花、益母草、野桂花、紫云英、椴树、荔枝和龙眼(2.6~37.9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$))^[29], 因此, 高含量的没食子酸可作为海南无刺蜂蜂蜜潜在的标志物。丁香酸、阿魏酸、咖啡酸苯乙基酯和芹菜素含量较低, 高良姜黄素在无刺蜂蜂蜜中首次检出, 异阿魏酸、迷失香酸、松鼠素、柯因、杨梅素、姜黄素、3,4-二甲氧基肉桂酸、槲皮素和芦丁这9种物质并没有在无刺蜂蜂蜜中检出, 但Sousa^[19]和Silva^[30]等分别在巴西无刺蜂蜂蜜中检测出杨梅素和芦丁, 说明不同区域的无刺蜂蜂蜜酚酸黄酮种类存在差异, 蜜蜂种属、植物和地理来源都会影响到蜂蜜中多酚物质的差异。此外, 已报道的无刺蜂蜂蜜中存在的多酚物质还包括安息草酸、苯甲酸衍生物、秦皮苷、佛手柑、白杨素、脱落酸、多种二碳-芹菜素苷、异鼠李素苷和黄酮碳苷, 这也表明对于我国无刺蜂蜂蜜中多酚物质仍需更进一步研究^[12,19,30]。

表3 液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱分析15种酚酸黄酮化合物在无刺蜂蜂蜜中含量

化合物	保留时间/min	[M-H] ⁻¹	回归方程	R ²	线性范围/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	含量/ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
没食子酸	2.555	169.014 2	y=14 098x-12 231	0.996 7	1~30	225.3
原儿茶酸	3.972	153.019 3	y=308 527x-313 422	0.992 7	0.1~30	105.5
香草酸	9.415	167.035 0	y=332 867x-111 062	0.999 1	0.1~30	11.1
咖啡酸	10.400	179.035 0	y=351 249x-2 $\times$ 10 ⁶	0.993 8	5~30	68.3
丁香酸	11.901	197.045 5	y=357 093x-90 427	0.999 6	0.1~30	1.3
P-香豆酸	15.289	163.040 1	y=794 725x+104 855	0.998 6	0.1~30	17.6
阿魏酸	17.461	193.050 6	y=418 495x-130 802	0.999 5	0.1~30	4.3
反式肉桂酸	24.107	147.045 2	y=581 423x+84 069	0.997 2	0.1~30	43.9
桑色素	24.981	301.035 4	y=1 $\times$ 10 ⁵ x-62 982	0.999 9	0.1~30	265.3
柚皮素	25.125	271.061 2	y=3 $\times$ 10 ⁵ x+644 858	0.991 0	0.1~10	14.4
木犀草素	25.972	285.040 5	y=1 $\times$ 10 ⁵ x-137 470	0.999 0	0.1~30	11.4
山奈酚	26.963	285.040 5	y=733 361x+151 093	0.990 4	0.1~30	40.0
高良姜黄素	27.568	269.045 5	y=1 $\times$ 10 ⁵ x+175 820	0.993 5	0.1~10	27.0
咖啡酸苯乙基酯	30.256	283.097 6	y=1 $\times$ 10 ⁵ x-222 387	0.994 7	0.1~30	3.9
芹菜素	30.625	269.045 5	y=1 $\times$ 10 ⁵ x-55 243	0.998 7	0.1~10	0.7

2.3 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物抗氧化性

表4 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物总酚酸和总黄酮含量及抗氧化能力
Table 4 Total flavonoid, total phenolic content and antioxidant activity

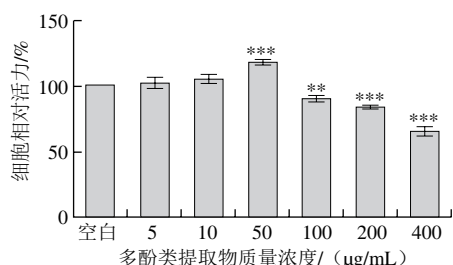
总酚酸含量/($\mu\text{g CAE/g}$)	总黄酮含量/($\mu\text{g QE/g}$)	总多酚含量/($\mu\text{g/g}$)
96.6 $\pm$ 0.4	16.1 $\pm$ 0.3	112.3 $\pm$ 0.7
DPPH自由基清除力IC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)	ABTS ⁺ 清除力IC ₅₀ /($\mu\text{g/mL}$)	还原力/($\mu\text{mol Trolox/g}$)
435.1 $\pm$ 0.4	423.0 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.02

蜂蜜的生物活性很大程度上取决于酚酸黄酮含量, 因此对于无刺蜂蜂蜜的多酚成分分析是研究其生物活性功能的重要基础。由表4可知, 无刺蜂蜂蜜多酚类提取

物的总酚酸和总黄酮含量分别为 $(96.6 \pm 0.4) \mu\text{g CAE/g}$ 和 $(16.1 \pm 0.3) \mu\text{g QE/g}$, 酚酸黄酮类物质含量丰富。其总黄酮含量高于*Apis mellifera*蜂蜜(如柑橘蜂蜜: $1.7 \mu\text{g QE/g}$; 椴树蜂蜜: $9.5 \mu\text{g QE/g}$)^[31-32]。已有研究结果表明, 植物的生长环境和气候条件会直接影响花蜜的成分组成^[33], 接受充足阳光的植物比生长在阴凉处相同品种及其他植物具有更多的多酚含量^[34], 特别是阳光充足、炎热潮湿的地区(如海南热带雨林地区)对于植物中的多酚含量影响显著, 使得无刺蜂蜂蜜中含有较多的多酚物质。

基于DPPH、ABTS和还原力具有显著的重复性和可靠性, 广泛用于定量测定天然产物和植物提取物的抗氧化能力^[35]。DPPH自由基是一种很稳定的氮中心的自由基, 通过捕获物质的自由基反映其抗氧化性; ABTS氧化后生成蓝绿色 $\text{ABTS}^+\cdot$, 当抗氧化物存在时 $\text{ABTS}^+\cdot$ 受到抑制; 还原 Fe^{3+} 离子能力能够反映物质的抗氧化能力。由表4可知, 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物DPPH自由基清除能力 IC_{50} 值为 $(435.1 \pm 0.4) \mu\text{g/mL}$, $\text{ABTS}^+\cdot$ 清除能力 IC_{50} 值为 $(423.0 \pm 0.3) \mu\text{g/mL}$, 还原力为 $(0.6 \pm 0.02) \mu\text{mol Trolox/g}$, 具有很好的抗氧化性。蜂蜜的抗氧化性主要取决于一些生物活性化合物, 尤其是黄酮物质和酚酸物质, 这些物质能够直接捕获活性氧, 抑制相关酶类降低超氧化物阴离子的释放, 螯合过度金属, 阻止过氧化过程^[36]。此外, Silva等^[37]研究发现蜂蜜中的酚醛类物质(安息香酸、没食子酸和香草酸)具有较强的自由基清除能力和铁离子还原能力。由此推测, 无刺蜂蜂蜜较好的抗氧化性来源于其丰富的黄酮类物质及高含量的没食子酸。

2.4 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对RAW 264.7细胞活力的影响



与空白组相比较, *差异显著 ($P < 0.05$); **差异高度显著 ($P < 0.01$); ***差异极显著 ($P < 0.001$)。

图1 多酚类提取物对RAW 264.7细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of SBH on the viability of RAW 264.7 cells

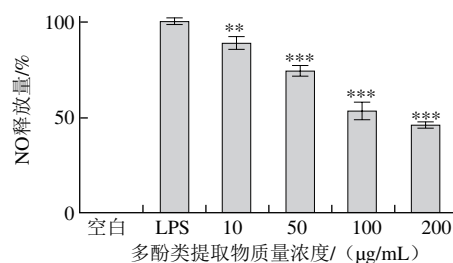
为保证无刺蜂蜂蜜对细胞的新陈代谢没有毒性作用, 使用CCK-8测定不同质量浓度无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对RAW 264.7细胞生长活力的影响, 确定无刺蜂蜂蜜多酚类提取物使用的最适质量浓度, 如图1所示。质量浓度为5~50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对RAW 264.7细胞生长活力未出现抑制作用, 尤其是无刺蜂蜂蜜多酚类提取物的质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 时可以极显著的促进细胞的生长活力。质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活力受到高度显著性抑制, 质量

浓度在200~400 $\mu\text{g/mL}$ 时对细胞的生长活力有极显著的抑制作用, 因此以100 $\mu\text{g/mL}$ 设为实验上限质量浓度。

2.5 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对RAW 264.7细胞体外抗炎作用

巨噬细胞在天然免疫中具有关键作用, 激活的巨噬细胞能够启动和增加多种炎症反应^[38]。抑制巨噬细胞的激活或阻碍巨噬细胞NO的过度释放可作为抑制多种炎症反应的治疗方法^[39]。RAW 264.7细胞是由Abelson小鼠白血病病毒转换的巨噬细胞, 对多种炎症刺激具有免疫活性^[40]。本研究选用1 $\mu\text{g/mL}$ LPS刺激细胞建立体外抗炎模型。为探讨无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对炎症反应的调节作用, 利用Greiss反应测定细胞NO释放量及荧光定量PCR检测一些炎症因子。

2.5.1 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对NO释放作用



与LPS组相比, *差异显著 ($P < 0.05$); **差异高度显著 ($P < 0.01$); ***差异极显著 ($P < 0.001$); 图3同。

图2 多酚类提取物对RAW 264.7细胞释放NO能力的影响

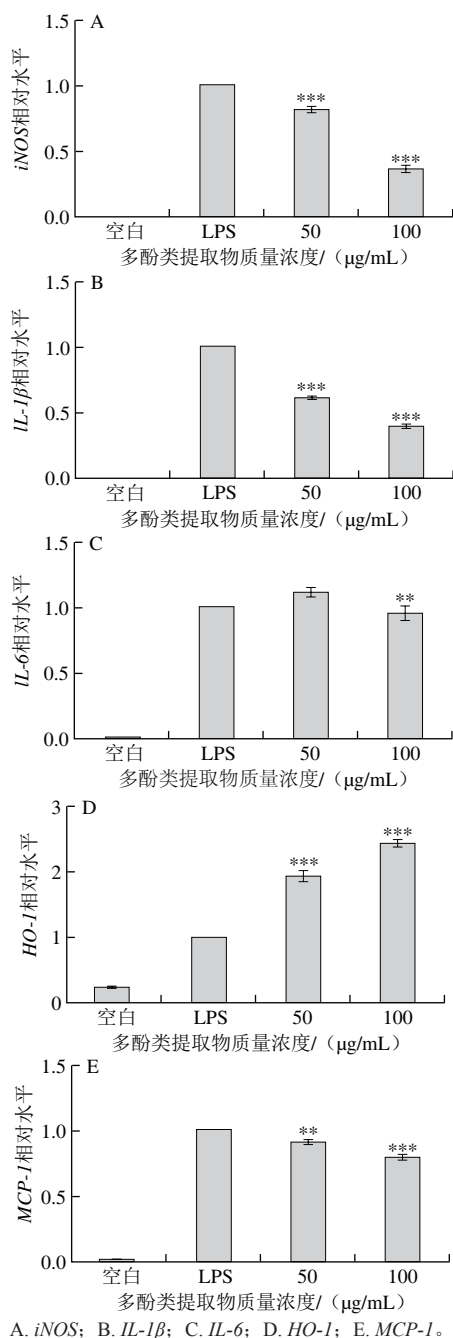
Fig. 2 Effect of SBH on nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells

炎症发生时, 巨噬细胞可分泌大量NO, NO作为一种重要的跨膜分子信号, 能够损伤周围组织^[41]。已有报道表明LPS作用RAW 264.7细胞可以急剧增加NO的释放量, 造成细胞产生炎症反应^[42]。本研究评价了不同质量浓度的无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对1 $\mu\text{g/mL}$ LPS刺激的RAW 264.7细胞NO释放量的影响, 结果见图2。经LPS刺激24 h后, 刺激前用不同质量浓度无刺蜂蜂蜜多酚类提取物处理1 h, 其NO的释放量显著低于未经蜂蜜样品前处理组, 表明无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对NO的释放有一定的抑制作用。且随着样品质量浓度的增加, NO释放量逐步降低, 说明NO的释放量与样品的质量浓度呈一定的相关性。在浓度为50、100 $\mu\text{g/mL}$ 和200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对NO的释放量有极显著的抑制作用。由此推测无刺蜂蜂蜜多酚类提取物通过抑制NO的释放起到抗炎作用。

2.5.2 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对炎症调节因子mRNA的水平表达

为了评估无刺蜂蜂蜜多酚类提取物对LPS刺激的RAW 264.7细胞mRNA表达水平的影响, 本研究利用qRT-PCR测定了参与炎症反应的5个关键基因表达量。iNOS在炎症过程高量表达, 可造成NO在细胞培养基的积累^[43]; IL-1 β 是一种重要的促炎症因子, 能够加剧炎症反应, 造成组织器官损伤^[44]; IL-6促炎细胞因子在炎症反应过程中

能够出现高量表达^[42]；HO-1是一种应激反应蛋白质，能够有效调节细胞内的活性氧水平，具有抗氧化作用，在炎症反应过程中高量表达能够降低NO的释放而抑制炎症反应，并增强细胞抵抗凋亡的能力^[45]；MCP-1是重要的细胞趋化因子，能够趋化及活化血液中的单核/巨噬细胞向炎症部位聚集，在炎症细胞渗透中发挥重要作用，参与多种慢性炎症疾病，并在激活的巨噬细胞中高水平表达^[46]。因此，这些细胞因子的mRNA表达水平可作为抗炎活性的重要指标。



A. *iNOS*; B. *IL-1 β* ; C. *IL-6*; D. *HO-1*; E. *MCP-1*.

图3 多酚类提取物对RAW 264.7细胞相关炎症基因mRNA水平表达的影响
Fig. 3 Effect of SBH on mRNA expression levels of key inflammatory genes in LPS-stimulated RAW 264.7 cells

如图3所示，相比LPS未刺激对照组，LPS刺激组对于炎症相关基因的转录有明显变化，能够诱导*iNOS*、*IL-1 β* 、*IL-6*和*MCP-1*基因的高表达。与LPS组比较，低质量浓度无刺蜂蜂蜜多酚类提取物预处理组（50 $\mu\text{g/mL}$ ）能够极显著抑制*iNOS*和*IL-1 β* 基因mRNA的水平表达（ $P<0.001$ ），基因表达水平随无刺蜂蜂蜜多酚类提取物质量浓度的增加而降低，具有一定的质量浓度相关性。并极显著增强*HO-1*基因mRNA的水平表达（ $P<0.001$ ），其表达水平随着剂量的增大而加强，由此推测无刺蜂蜂蜜多酚类提取物作为一种强氧化剂保护损伤细胞。无刺蜂蜂蜜多酚类提取物预处理组对*IL-6*基因mRNA的水平表达抑制性不显著，50 $\mu\text{g/mL}$ 处理组并没有出现抑制作用，但质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时，高度显著抑制基因的表达（ $P<0.01$ ），其对*IL-6*基因的抑制作用低于*iNOS*和*IL-1 β* 基因。50 $\mu\text{g/mL}$ 无刺蜂蜂蜜多酚类提取物预处理组高度显著抑制*MCP-1*基因mRNA的水平表达（ $P<0.01$ ），质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时具有极显著的抑制作用。这些结果表明，无刺蜂蜂蜜多酚类提取物具有较强的抗炎作用，其抗炎活性在炎症过程中能够选择性的改变抗炎相关基因mRNA的表达。

3 结论

无刺蜂蜂蜜理化指标如下：水分质量分数为（ 26.3 ± 0.1 ）%，pH 3.7 ± 0.2 ，蛋白质含量为（ 628.2 ± 9.0 ）mg/kg，淀粉酶值为（ 19.6 ± 0.2 ）mL/（g·h），总糖质量分数为（ 46.7 ± 6.0 ）%，包括果糖（ 21.0 ± 3.7 ）%、葡萄糖（ 24.9 ± 2.2 ）%、蔗糖（ 0.8 ± 0.1 ）%，相比西方蜜蜂蜂蜜，无刺蜂蜂蜜具有水分高、口感酸、糖度低等特点。无刺蜂蜂蜜多酚类提取物富含酚酸和黄酮物质，其总酚酸和总黄酮含量分别为（ 96.6 ± 0.4 ） $\mu\text{g CAE/g}$ 和（ 16.1 ± 0.3 ） $\mu\text{g QE/g}$ 。无刺蜂蜂蜜多酚类提取物DPPH自由基和ABTS⁺清除能力IC₅₀值分别为（ 435.1 ± 0.4 ） $\mu\text{g/mL}$ 和（ 423.0 ± 0.3 ） $\mu\text{g/mL}$ ，还原力为（ 0.6 ± 0.02 ） $\mu\text{mol Trolox/g}$ ，具有较强的抗氧化能力。细胞实验表明，无刺蜂蜂蜜多酚类提取物能够有效抑制NO的产生，抑制*iNOS*、*IL-1 β* 、*IL-6*和*MCP-1*相关促炎基因的表达，同时增强*HO-1*的基因表达，具有较强的抗炎活性。无刺蜂蜂蜜多酚类提取物的抗氧化和抗炎活性为我国无刺蜂蜂蜜的开发利用提供依据。

参考文献：

- [1] KISHORE R K, HALIM A S, SYAZANA M S, et al. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources[J]. Nutrition Research, 2011, 31(4): 322-325. DOI:10.1016/j.nutres.2011.03.001.

- [2] VIUDA-MARTOS M, RUIZ-NAVAJAS Y, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly[J]. Journal of Food Science, 2008, 73(9): 117-124. DOI:10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x.
- [3] EL-ARAB A M E, GIRGIS S M, HEGAZY E M, et al. Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2006, 6(1): 1-13. DOI:10.1186/1472-6882-6-6.
- [4] GULFRAZ M, IFTIKHAR F, RAJA S, et al. Quality assessment and antimicrobial activity of various honey types of Pakistan[J]. African Journal of Biotechnology, 2016, 9(41): 6902-6906. DOI:10.5897/AJB10.003.
- [5] MCGOVERN D P, ABBAS S Z, VIVIAN G, et al. Manuka honey against *Helicobacter pylori*[J]. Journal of the Royal Society of Medicine, 1999, 92(8): 439. DOI:10.1177/014107689909200832.
- [6] FAUZI A N, NORAZMI M N, YAACOB N S. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines[J]. Food & Chemical Toxicology, 2011, 49(4): 871-878. DOI:10.1016/j.fct.2010.12.010.
- [7] SAEED S, TAVAKKOL A J, SAEIDEH D. Chrysin reduces proliferation and induces apoptosis in the human prostate cancer cell line pc-3[J]. Clinics, 2011, 66(6): 1073-1079. DOI:10.1590/S1807-59322011000600026.
- [8] GHASHM A A, ISMAIL N M, OTHMAN N H, et al. Antiproliferative effect of Tualang honey on oral squamous cell carcinoma and osteosarcoma cancer cell lines[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2010, 10(1): 49-57. DOI:10.1186/1472-6882-10-49.
- [9] RAHMAN S, BEGUM M M, MAHADI H, et al. Comparative study of anti-hyperglycemic and anti hyperlipidemic effects of honey, coccinia cordifolia and hilsha fish oil in streptozotocin induced diabetic rats[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 51(2): 253-259. DOI:10.4172/0974-8369.1000272.
- [10] ALMEIDA-MURADIAN L B D, STRAMM K M, ESTEVINHO L M. Efficiency of the FT-IR ATR spectrometry for the prediction of the physicochemical characteristics of *Melipona subnitida*, honey and study of the temperature's effect on those properties[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2013, 49(1): 188-195. DOI:10.1111/ijfs.12297.
- [11] SOUZA B A, ROUBIK B, BARTH D, et al. Composition of stingless bee honey: setting quality standards[J]. Interciencia, 2006, 31(12): 867-875. DOI:10.1007/s00464-010-1064-4.
- [12] GUERRINI A, BRUNI R, MAIETTI S, et al. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product[J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1413-1420. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.11.023.
- [13] IRISH J, CARTER D A, BLAIR S E, et al. Antibacterial activity of honey from the Australian stingless bee *Trigona carbonaria*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2008, 32(1): 89-90. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2008.02.012.
- [14] BOORN K L, KHOR Y Y, SWEETMAN E, et al. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(5): 1534-1543. DOI:10.1111/j.1365-2672.2009.04552.x.
- [15] ZHANG J L, SHEN X, WANG K, et al. Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis* propolis and *Eucalyptus* propolis in RAW64.7 cells[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(10): 1-16. DOI:10.3109/13880209.2016.1151444.
- [16] YANG H S, DONG Y, DU H, et al. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China[J]. Molecules, 2011, 16(4): 3444-3455. DOI:10.3390/molecules16043444.
- [17] GUO X L, CHEN B, LUO L, et al. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of chinese propolis[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(23): 12610-12616. DOI:10.1021/jf202818p.
- [18] XIE C, KANG J, LI Z, et al. The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2012, 23(9): 1184-1191. DOI:10.1016/j.jnutbio.2011.06.013.
- [19] SOUSA J M D, SOUZA E D, MARQUES G, et al. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region[J]. Food Research International, 2016, 84: 61-68. DOI:10.1016/j.foodres.2016.03.012.
- [20] SILVANO M F, VARELA M S, PALACIO M A, et al. Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region[J]. Food Chemistry, 2014, 152(2): 500-507. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.12.011.
- [21] FINOLA M S, LASAGNO M C, MARIOLI J M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina[J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 1649-1653. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.12.046.
- [22] CHUTTONG B, CHANBANG Y, SRINGARM K, et al. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand)[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 149-155. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.06.089.
- [23] SOUSA J M B D, SOUZA E L D, MARQUES G, et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 65: 645-651. DOI:10.1016/j.lwt.2015.08.058.
- [24] VANHANEN L P, EMMERTZ A, SAVAGE G P. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey[J]. Food Chemistry, 2011, 128(1): 236-240. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.02.064.
- [25] BILUCA F C, BRAGHINI F, GONZAGA L V, et al. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*)[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2016, 50: 61-69. DOI:10.1016/j.jfca.2016.05.007.
- [26] ODDO L P, HEARD T A, RODRÍGUEZ-MALAVER A, et al. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia[J]. Journal of Medicinal Food, 2008, 11(4): 789-794. DOI:10.1089/jmf.2007.0724.
- [27] BOGDANOV S, LÜLLMANN C, MARTIN P, et al. Honey quality and international regulatory standards: review by the International Honey Commission[J]. Mitteilungen Aus Lebensmitteluntersuchung Und Hygiene, 1999, 90(1): 108-125. DOI:10.1080/0005772X.1999.11099428.
- [28] 周厚报. 单花种蜂蜜中蛋白质及氨基酸组分研究[D]. 西安: 西北大学, 2015.
- [29] 孙崇臻, 王超, 蔡子哲, 等. 高效液相色谱测定蜂蜜中的脱落酸、黄酮和酚酸[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 281-285. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201310062.
- [30] SILVA I A A D, SILVA T M S D, CAMARA C A, et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil[J]. Food Chemistry, 2013, 141(4): 3552-3558. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.06.072.

- [31] LIANDA, SANT'ANA R L P, D'OLIVEIRAECHEVARRIA L, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts[J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2012, 91(5): 689-698. DOI:10.1590/S0103-50532012000400006.
- [32] CAN Z, YILDIZ O, SAHIN H, et al. An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles[J]. Food Chemistry, 2015, 180: 133-141. DOI:10.1016/j.foodchem.2015.02.024.
- [33] SHANTAL R F M, ESCUREDO O, CARMEN S M. Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys[J]. Food Chemistry, 2015, 166: 101-106. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.06.005.
- [34] TENORE G C, RITIENI A, CAMPIGLIA P, et al. Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian black honeybees (*Apis mellifera*, ssp. *sicula*)[J]. Food & Chemical Toxicology, 2012, 50(6): 1955-1961. DOI:10.1016/j.fct.2012.03.067.
- [35] DUDONNÉ S, VITRAC X, COUTIÈRE P, et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(5): 1768-1774. DOI:10.1021/jf803011r.
- [36] BRIDI R, MONTENEGRO G. Honey analysis[M]. Croatia: INTECH, 2017: 63-78. DOI:10.5772/67103.
- [37] SILVA T M S, SANTOS F P D, EVANGELISTA-RODRIGUES A, et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandafra (*Melipona subnitida*) honey[J]. Journal of Food Composition & Analysis, 2013, 29(1): 10-18. DOI:10.1016/j.jfca.2012.08.010.
- [38] CHAWLA A, NGUYEN K D, GOH Y P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease[J]. Nature Reviews Immunology, 2011, 11(11): 738-749. DOI:10.1038/nri3071.
- [39] DUFFIELD J S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde[J]. Clinical Science, 2003, 104(1): 27-38. DOI:10.1042/cs1040027.
- [40] NDIAYE F, VUONG T, DUARTE J, et al. Anti-oxidant, anti-inflammatory and immunomodulating properties of an enzymatic protein hydrolysate from yellow field pea seeds[J]. European Journal of Nutrition, 2012, 51(1): 29-37. DOI:10.1007/s00394-011-0186-3.
- [41] NATHAN C, XIE Q W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls[J]. Cell, 1994, 78(6): 915-918. DOI:10.1016/0092-8674(94)90266-6.
- [42] SZLISZKA E, MERTAS A, CZUBA Z P, et al. Inhibition of inflammatory response by Artepillin C in activated RAW264.7 Macrophages[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013: 735176. DOI:10.1155/2013/735176.
- [43] ROSSI A, LIGRESTI A, LONGO R, et al. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages[J]. Phytomedicine, 2002, 9(6): 530-535. DOI:10.1078/09447110260573164.
- [44] KYUNGHEE L, EUNMI C. Effect of pine pollen extract on experimental chronic arthritis[J]. Phytotherapy Research Ptr, 2009, 23(5): 651-657. DOI:10.1002/ptr.2526.
- [45] LIU Z M, CHEN G G, NG E K, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(2): 503-513. DOI:10.1038/sj.onc.1207173.
- [46] REMPPIS A, BEA F, GRETEN H J, et al. Rhizoma coptidis inhibits LPS-induced MCP-1/CCL2 production in murine macrophages via an AP-1 and NF-kappaB-dependent pathway[J]. Mediators of Inflammation, 2010, 2010(1): 194896. DOI:10.1155/2010/194896.