

杨树芽提取物体外抗肿瘤活性的研究



ZHENG Guang-yao

郑光耀¹, 康宏兴², 薄采颖¹, 宋强¹, 周维纯¹

(1. 中国林业科学研究院 林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室; 国家林业局 林产化学工程重点开放性实验室, 江苏 南京 210042; 2. 南京老山林场, 江苏 南京 211811)

摘 要: 采用四甲基偶氮唑盐比色 (MTT) 法观察杨树芽提取物对 MCF-7、SMMC-7721 和 A549 3 种肿瘤细胞的体外生长抑制作用, 并与市售蜂胶和杨树胶的抗肿瘤活性进行对比。结果表明: 杨树芽提取物对 3 种肿瘤细胞作用 48 h 的抑制率分别为 97.1%、88.7% 和 60.5%, 半数抑制质量浓度 (IC₅₀) 分别为 58.4、83.9 和 196.3 mg/L, 均高于蜂胶和杨树胶。杨树芽提取物对体外培养的肿瘤细胞生长有明显的抑制作用, 提示杨树芽提取物具有良好的抗肿瘤活性。

关键词: 杨树芽提取物; 四甲基偶氮唑盐比色法; 抗肿瘤活性

中图分类号: TQ351

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2009)06-0038-05

Study on Anti-tumor Activity of Poplar Bud Extract *in vitro*

ZHENG Guang-yao¹, KANG Hong-xing², BO Cai-ying¹, SONG Qiang¹, ZHOU Wei-chun¹

(1. Institute of Chemistry and Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. on Forest Chemical Engineering, SFA, Nanjing 210042, China; 2. Nanjing Laoshan Forest Farm, Nanjing 211811, China)

Abstract: The growth-inhibition effect of poplar bud extract on MCF-7, SMMC-7721 and A549 cell lines by MTT assay were observed and the anti-tumor activity was compared with propolis and poplar gum from market. The results showed that the inhibitory rates of poplar bud extract on the three cell lines for 48 h, were 97.1%, 88.7% and 60.5%, with the IC₅₀ of 58.4, 83.9 and 196.3 mg/L, respectively, which were higher than those of propolis and poplar gum. Poplar bud extract has significantly inhibited the growth *in vitro* on the three cell lines, suggesting that poplar bud extract has obvious anti-tumor activity.

Key words: poplar bud extract; MTT assay; anti-tumor activity

杨树是我国重要的造林绿化、工业用材树种之一, 主要分布于辽宁、华北、西北、华东等地区, 资源极为丰富。每年 12 月至翌年 2 月, 尤其是黑杨组和青杨组的杨树, 其树芽会分泌大量的芳香类树脂。Greenaway 等^[1]对蜜蜂采集的杨树芽分泌物的成分进行了分析, 发现这些杨树芽的分泌物中含有数百种酚类化合物, 同时这些化合物在蜂胶中也存在, 表明杨树芽分泌物是蜂胶的胶源物质。曹伟等^[2]对我国 30 个不同产地蜂胶样品和 2 个不同产地杨树芽提取物的成分进行了分析, 发现杨树芽提取物与蜂胶的成分十分相似, 它们都含有黄酮类、萜烯类、酚酸类及其酯类等生物活性物质。蜂胶的抗肿瘤作用已成为各国科学家和医学家研究的热点。Matsuno 等^[3]报道蜂胶对人肝癌 HuH13 细胞、人口腔癌 KB 细胞、人宫颈癌 Hela 细胞等具有强烈的毒杀作用。Banskota 等^[4]实验发现, 巴西、秘鲁、荷兰和中国的 9 个蜂胶样品的甲醇及水提取物作用于鼠结肠癌 26-L5 细胞和人纤维肉瘤 HT-1080 细胞, 均显示细胞毒杀作用。Aso 等^[5]研究表明, 蜂胶提取物作用于人白血病 U937 细胞, 能显著抑制 U937 细胞的生长及细胞中大分子化合物的合成, 最终诱导 U937 细胞凋亡。近年来, 国内外对杨树芽化学成分研究的文献报道较多^[2,6-7], 但有关其抗肿瘤活性的研究报道还很少。作者采用四甲基偶氮唑盐比色 (MTT) 法观察杨树芽提取物对人肝癌 SMMC-7721 细胞、人肺腺癌 A549 细胞和人乳腺癌 MCF-7 细胞 3 种肿瘤细胞体外生长的抑制作用, 并与市售蜂胶和杨树胶的抗肿瘤活性进行对比, 现将结果报道如下。

收稿日期: 2009-08-05

作者简介: 郑光耀 (1964-), 男, 福建莆田人, 副研究员, 主要从事植物资源的提取分离技术及其活性成分开发利用研究;

E-mail: zhguya@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杨树芽提取物,杨树芽 2008 年 1 月采自 107 速生杨,经石油醚脱脂、无水乙醇浸提、浸提液浓缩干燥而得,自制^[8]。杨树胶,由河南省长葛市森蕾天然树胶加工厂提供。蜂胶,由浙江省慈溪市新浦联合蜂场提供。杨树芽提取物、杨树胶和蜂胶采用二甲基亚砜(DMSO)-乙醇(体积比 1:1)溶解为质量浓度 30 g/L 的母液,贮存于 4 °C 冰箱。实验前用细胞培养液稀释成 20、40、80、160、320 mg/L。RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品。胰蛋白酶为华美生物工程公司产品,用 D-Hanks 溶液配成 0.25 % 酶溶液。四甲基偶氮唑蓝(MTT)、DMSO、小牛血清为 Sigma 公司产品,小牛血清经 56 °C 水浴 30 min 灭活后,小量分装, -20 °C 保存备用。其余试剂均为市售分析纯。

人肝癌 SMMC-7721 细胞、人肺腺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所,常规方法传代培养。

1.2 溶液配制

细胞培养液: RPMI 1640 或 DMEM 培养基用超纯水配成细胞培养液,每升细胞培养液中含有 RPMI 1640 或 DMEM 培养粉剂 10.4 g、Hepes 4.8 g、NaHCO₃ 2.4 g、青霉素和链霉素各 100 mg, pH 值 7.2,用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后,分装,4 °C 冰箱保存备用。临用前加入小牛血清,使其终体积分数为 10 %。磷酸盐缓冲液(PBS, g/L): NaCl 8、KCl 0.2、Na₂HPO₄ 3.48、KH₂PO₄ 0.2,用超纯水充分溶解,高压灭菌,4 °C 保存备用。MTT 工作液:称取 0.5 g MTT 粉剂,溶于 100 mL PBS 中,配制 5 g/L 的贮备液,搅拌溶解,0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装,4 °C 保存备用,新鲜配制。D-Hanks 溶液(g/L): NaCl 8、KCl 0.4、Na₂HPO₄ 0.134、KH₂PO₄ 0.06、NaHCO₃ 0.35、酚红 0.02,用超纯水充分溶解,高压灭菌,4 °C 保存备用。

1.3 体外抑瘤实验

人肝癌 SMMC-7721 细胞加入 RPMI 1640 培养液,人肺腺癌 A549 细胞、人乳腺癌 MCF-7 细胞加入 DMEM 培养液,在 37 °C、5 % CO₂ 饱和湿度的培养箱中常规培养。48 h 更换培养液,细胞汇合时,用 0.25 % 胰蛋白酶消化传代。收集对数生长期细胞,台盼蓝拒染法表明细胞活力 >95 %,将细胞制成 5 × 10⁴/mL(以悬液计,下同),接种至 96 孔培养板内,每孔 200 μL,细胞贴壁后给药。实验分别设溶剂对照组和给药组,每组 6 孔,给药组用杨树芽提取物、杨树胶或蜂胶(20、40、80、160、320 mg/L)分别作用 24、48 和 72 h 后,每孔加 5 g/L MTT 20 μL,继续培养 4 h,吸去上清液,每孔加 DMSO 200 μL,充分振荡混匀后用酶联免疫检测仪在 570 nm 处测定各孔的吸光度(用 OD 值表示),实验重复 3 次,取平均值。按以下公式计算抑制率,并以药物质量浓度的对数和抑制率作回归方程,求得半数抑制质量浓度(IC₅₀)的值。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{药物组吸光度值} / \text{对照组吸光度值}) \times 100 \%$$

1.4 数据处理

数据采用 SPSS 统计程序进行两样本均数比较的组间 *t* 检验。结果以平均 ± S. D($\bar{x} \pm s$) 来表示。^{*} *P* < 0.05、^{**} *P* < 0.01 为差异有显著的统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 杨树芽提取物、杨树胶和蜂胶对 SMMC-7721 细胞的抑制作用

由表 1 可以看出,杨树芽提取物、杨树胶和蜂胶 3 种药物对 SMMC-7721 细胞均有明显的抑制作用,且随药物质量浓度的增加和时间的延长而增强,呈现明显的质量浓度和时间效应关系;3 种药物的 IC₅₀ 值见表 2,抑制肿瘤作用的强弱顺序为:杨树芽提取物 > 蜂胶 > 杨树胶。

2.2 杨树芽提取物、杨树胶和蜂胶对 A549 细胞的抑制作用

由表 3 可以看出,杨树芽提取物和蜂胶 2 种药物对 A549 细胞都有明显的抑制作用,且随药物质量浓度的增加和时间的延长而增强,呈现明显的质量浓度和时间效应关系,杨树胶对 A549 细胞也有抑制

作用,但与对照组相比无显著性差异;3种药物的 IC_{50} 值见表4,杨树芽提取物抑制肿瘤作用大于蜂胶,杨树胶的 IC_{50} 值大于 500 mg/L,表明对 A549 细胞无效。

表1 不同质量浓度药物对 SMMC-7721 细胞的体外抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibitory effect of three drugs on SMMC-7721 cell *in vitro*

药物 drugs	质量浓度/ ($mg \cdot L^{-1}$) mass concn.	24 h		48 h		72 h	
		OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate	OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate	OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate
空白对照 control	0	1.24 ± 0.07	0	1.22 ± 0.05	0	1.18 ± 0.09	0
杨树芽提取物 poplar bud extract	20	1.10 ± 0.08	11.3	1.04 ± 0.09	16.1	1.02 ± 0.06	17.7
	40	0.96 ± 0.06 *	22.6	0.91 ± 0.07 **	26.6	0.88 ± 0.07 **	29.0
	80	0.85 ± 0.02 **	31.4	0.79 ± 0.04 **	36.3	0.68 ± 0.03 **	45.2
	160	0.46 ± 0.04 **	62.9	0.37 ± 0.04 **	70.1	0.36 ± 0.02 **	70.9
	320	0.15 ± 0.02 **	87.9	0.14 ± 0.01 **	88.7	0.031 ± 0.004 **	97.5
杨树胶 poplar gum	20	1.08 ± 0.09	12.9	1.07 ± 0.06	13.7	1.06 ± 0.07	14.5
	40	1.04 ± 0.07	16.1	1.01 ± 0.07	18.5	0.95 ± 0.04 *	23.4
	80	0.85 ± 0.05 **	31.4	0.83 ± 0.05 **	33.1	0.79 ± 0.03 **	36.3
	160	0.74 ± 0.05 **	40.3	0.65 ± 0.04 **	47.6	0.60 ± 0.04 **	51.6
	320	0.60 ± 0.02 **	51.6	0.55 ± 0.04 **	55.6	0.49 ± 0.03 **	60.5
蜂胶 propolis	20	1.11 ± 0.05	10.5	1.07 ± 0.06	13.7	1.05 ± 0.07	15.3
	40	0.99 ± 0.01 *	20.2	0.92 ± 0.08 *	25.8	0.87 ± 0.05 **	29.8
	80	0.88 ± 0.01 **	29.1	0.82 ± 0.03 **	33.9	0.69 ± 0.05 **	44.4
	160	0.60 ± 0.03 **	51.6	0.49 ± 0.04 **	60.5	0.37 ± 0.03 **	70.1
	320	0.26 ± 0.02 **	79.1	0.16 ± 0.02 **	87.1	0.093 ± 0.01 **	92.5

表2 不同药物对 SMMC-7721 细胞的半数抑制质量浓度

Table 2 Half inhibitory concentration of three drugs on SMMC-7721 cell

药物 drugs	$IC_{50} / (mg \cdot L^{-1})$		
	24 h	48 h	72 h
杨树芽提取物 poplar bud extract	99.7	83.9	64.2
杨树胶 yungshu gum	270.9	208.2	167.9
蜂胶 propolis	131.6	96.7	73.9

表3 不同质量浓度药物在不同时间下对 A549 细胞的体外抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Inhibitory effect of three drugs on A549 cell *in vitro*

药物 drugs	质量浓度/ ($mg \cdot L^{-1}$) mass concn.	24 h		48 h		72 h	
		OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate	OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate	OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate
空白对照 control	0	1.19 ± 0.05	0	1.17 ± 0.08	0	1.15 ± 0.09	0
杨树芽提取物 poplar bud extract	20	1.05 ± 0.09	11.8	1.04 ± 0.11	12.6	1.03 ± 0.08	13.4
	40	0.99 ± 0.07	16.8	0.96 ± 0.09	19.3	0.94 ± 0.11 *	21.0
	80	0.84 ± 0.08 **	29.4	0.82 ± 0.07 **	31.1	0.79 ± 0.06 **	33.6
	160	0.73 ± 0.08 **	38.6	0.72 ± 0.07 **	39.5	0.69 ± 0.09 **	42.0
	320	0.52 ± 0.05 **	56.3	0.47 ± 0.05 **	60.5	0.46 ± 0.04 **	61.3
杨树胶 poplar gum	20	1.15 ± 0.08	3.4	1.15 ± 0.09	3.4	1.14 ± 0.12	4.2
	40	1.10 ± 0.09	7.6	1.12 ± 0.10	5.9	1.14 ± 0.09	4.2
	80	1.07 ± 0.11	10.1	1.06 ± 0.13	10.9	1.03 ± 0.09	13.4
	160	1.06 ± 0.08	10.9	1.02 ± 0.05	14.3	0.94 ± 0.07	21.1
	320	1.04 ± 0.06	12.6	0.96 ± 0.12	19.3	0.90 ± 0.11 *	24.4
蜂胶 propolis	20	1.11 ± 0.06	6.7	1.08 ± 0.06	9.2	1.08 ± 0.07	9.2
	40	1.06 ± 0.04	10.9	1.04 ± 0.07	12.6	1.02 ± 0.08	14.3
	80	0.87 ± 0.04 *	26.9	0.92 ± 0.08 *	22.7	0.89 ± 0.09 *	25.2
	160	0.81 ± 0.04 **	31.9	0.79 ± 0.05 **	33.6	0.77 ± 0.06 **	35.3
	320	0.70 ± 0.05 **	41.2	0.59 ± 0.06 **	50.4	0.57 ± 0.06 **	52.1

表 4 不同药物对 A549 细胞的半数抑制质量浓度

Table 4 Half inhibitory concentration of three drugs on A549 cell

药物 drugs	IC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
杨树芽提取物 poplar bud extract	233.5	196.3	181.2
杨树胶 poplar gum	>500.0	>500.0	>500.0
蜂胶 propolis	341.0	300.5	269.1

2.3 杨树芽提取物、杨树胶和蜂胶对 MCF-7 细胞的抑制作用

由表 5 可以看出,杨树芽提取物、杨树胶和蜂胶 3 种药物对 MCF-7 细胞均有明显的抑制作用,且随药物质量浓度的增加和时间的延长而增强,呈现明显的质量浓度和时间效应关系;3 种药物的 IC₅₀ 值见表 6,抑制肿瘤作用的强弱顺序为:杨树芽提取物 > 蜂胶 > 杨树胶。

表 5 不同质量浓度药物在不同时间下对 MCF-7 细胞的体外抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 5 Inhibitory effect of three drugs on MCF-7 cell *in vitro*

药物 drugs	质量浓度/ (mg·L ⁻¹) mass concn.	24 h		48 h		72 h	
		OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate	OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate	OD 值 OD value	抑制率/% inhibition rate
空白对照 control	0	1.27 ± 0.09	0	1.21 ± 0.12	0	1.19 ± 0.13	0
杨树芽提取物 poplar bud extract	20	0.99 ± 0.09 *	22.1	0.94 ± 0.11 **	25.9	0.88 ± 0.09 **	30.7
	40	0.85 ± 0.09 **	33.1	0.88 ± 0.13 **	30.7	0.71 ± 0.07 **	44.1
	80	0.62 ± 0.07 **	51.2	0.72 ± 0.09 **	43.3	0.51 ± 0.04 **	59.9
	160	0.40 ± 0.05 **	68.5	0.31 ± 0.03 **	75.6	0.25 ± 0.03 **	80.3
	320	0.24 ± 0.02 **	81.1	0.037 ± 0.005 **	97.1	0.0089 ± 0.001 **	99.3
杨树胶 poplar gum	20	1.18 ± 0.12	7.1	1.15 ± 0.14	9.5	1.12 ± 0.06	11.8
	40	1.09 ± 0.11	14.2	1.03 ± 0.13	18.9	0.97 ± 0.08 *	23.6
	80	0.97 ± 0.09 *	23.6	0.87 ± 0.09 **	31.5	0.80 ± 0.08 **	37.0
	160	0.69 ± 0.07 **	45.7	0.52 ± 0.04 **	59.1	0.38 ± 0.04 **	70.0
	320	0.39 ± 0.04 **	69.3	0.36 ± 0.03 **	71.7	0.30 ± 0.04 **	76.4
蜂胶 propolis	20	1.09 ± 0.13	14.2	1.03 ± 0.10	18.9	1.01 ± 0.14 *	20.5
	40	0.94 ± 0.12 **	26.0	0.89 ± 0.09 **	29.9	0.86 ± 0.09 **	32.3
	80	0.77 ± 0.09 **	39.4	0.73 ± 0.07 **	42.5	0.70 ± 0.09 **	44.9
	160	0.37 ± 0.04 **	70.9	0.35 ± 0.04 **	72.4	0.32 ± 0.04 **	74.8
	320	0.21 ± 0.01 **	83.5	0.13 ± 0.01 **	89.8	0.074 ± 0.01 **	94.2

表 6 不同药物对 MCF-7 细胞的半数抑制质量浓度

Table 6 Half inhibitory concentration of three drugs on MCF-7 cell

药物 drugs	IC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
杨树芽提取物 poplar bud extract	75.1	58.4	43.9
杨树胶 poplar gum	179.7	137.2	105.9
蜂胶 propolis	90.2	73.8	64.5

2.4 讨论

蜂胶是蜜蜂从植物树芽处采集保护植物嫩叶的天然树脂,并混入蜜蜂上颚腺分泌物而形成的一种具有芳香味的胶状固体物。Bankova 等^[9]和 Marcucci^[10]的研究表明,蜜蜂在温带主要选择杨树芽的分泌物作为蜂胶的原料,杨树是温带地区蜂胶的主要胶源植物。蜂胶作为一种天然药物,已证明其具有抗病原微生物、抗炎、免疫调节和抗肿瘤作用,特别是其抗肿瘤作用引起人们广泛的关注。杨树芽提取物与蜂胶的成分非常相似,它们都含有黄酮类、萜烯类、酚酸类及其酯类等化合物,作者选用抗肿瘤药物体外筛选实验常用的 SMMC-7721 细胞、A549 细胞和 MCF-7 细胞 3 种肿瘤细胞对杨树芽提取物的抗肿瘤作用进行研究。实验结果表明,杨树芽提取物和蜂胶对 SMMC-7721 细胞、A549 细胞和 MCF-7 细胞的生长都有明显抑制作用,杨树胶对 SMMC-7721 细胞和 MCF-7 细胞的生长也有明显抑制作用,但对

A549 细胞的生长无明显抑制作用,提示杨树芽提取物、蜂胶和杨树胶都含有抗肿瘤活性物质。从 IC_{50} 值可看出,杨树芽提取物、蜂胶和杨树胶的共同特点是对 MCF-7 细胞抑制作用最强、其次是 SMMC-7721 细胞、对 A549 细胞抑制作用相对最弱或无效,抑制肿瘤作用的强弱顺序为:杨树芽提取物 > 蜂胶 > 杨树胶,提示杨树芽提取物的抗肿瘤活性优于蜂胶和杨树胶。杨树胶是杨树芽经过高温蒸煮熬出的胶状物质,再用乙醇浸泡提取浓缩而制成的一种杨树芽粗提物。研究发现,杨树芽的提取方法不同,可能导致化学成分的不同,生物活性也就不尽相同^[8]。杨树胶抗肿瘤活性低于杨树芽提取物和蜂胶,说明杨树芽有效成分的提取方法对于抑制肿瘤作用是非常重要的。因此,对杨树芽抗肿瘤有效成分的分离纯化定性等方面的研究十分必要,将是下一步研究工作的重点。

3 结论

3.1 杨树芽提取物和蜂胶对 SMMC-7721 细胞、A549 细胞和 MCF-7 细胞的生长都有明显抑制作用,杨树胶对 SMMC-7721 细胞和 MCF-7 细胞的生长也有明显抑制作用,但对 A549 细胞的生长无明显抑制作用,提示杨树芽提取物、蜂胶和杨树胶都含有抗肿瘤活性物质。

3.2 从 IC_{50} 值可看出,杨树芽提取物、蜂胶和杨树胶的共同特点是对 MCF-7 细胞抑制作用最强、其次是 SMMC-7721 细胞、对 A549 细胞抑制作用相对最弱或无效,抑制肿瘤作用的强弱顺序为:杨树芽提取物 > 蜂胶 > 杨树胶,提示杨树芽提取物的抗肿瘤活性优于蜂胶和杨树胶。

3.3 杨树芽提取物在质量浓度为 320 mg/L 时,对 SMMC-7721 细胞、A549 细胞和 MCF-7 细胞作用 48 h 的抑制率分别为 88.7%、60.5% 和 97.1%, IC_{50} 值分别为 83.9、196.3 和 58.4 mg/L,均高于蜂胶和杨树胶,提示杨树芽提取物具有良好的抗肿瘤活性,但杨树芽提取物的抗肿瘤作用机理及体内抑瘤实验尚需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] GREENAWAY W, SCAYSBROK T, WHATLEY F R. The composition and plant origins of propolis[J]. *Bee World*, 1990, 71: 107-118.
- [2] 曹炜,符军放,索志荣,等. 蜂胶与杨树芽提取物成分的比较研究[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(7): 162-166.
- [3] MATSUNO T, MATSUNMOTO Y, SAITO M, et al. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis[J]. *Z Naturforsch*, 1997, 52: 702-704.
- [4] BANSKOTA A H, TEZUKA Y, ADNYANA I K, et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China[J]. *J Ethnopharmacol*, 2000, 72(1/2): 239-246.
- [5] ASO K, KANNO S, TADANO T, et al. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(5): 727-730.
- [6] ENGLISH S, GREENAWAY W, WHATLEY F R. Analysis of phenolics of bud exudates of *Populus stritis* by GC/MS[J]. *Z Naturforsch*, 1992, 47: 512-515.
- [7] MACIEJEWICZ W, DANIEWSKI M, DZIDO T H, et al. GC-MS and HPLC analysis of phenolic acids extracted from propolis and from *Populus nigra* bud exudate[J]. *Chem Anal*, 2002, 47: 21-30.
- [8] 郑光耀,王良桂,王成章,等. 杨树芽脂的提取方法及其抗氧化活性的研究[J]. *现代化工*, 2008, 28(增刊2): 335-337.
- [9] BANKOVA V, DYULGEROV A, POPOR S, et al. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin[J]. *Apidologie*, 1992, 23: 79-85.
- [10] MARCUCCI M C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity[J]. *Apiologie*, 1995, 26: 83-99.