

植物乳杆菌 N1 发酵蜂王浆前后的抗癌 及降血糖活性变化

何荣军^{1*}, 任玫¹, 沈佳儿¹, 王晓宇², 孙培龙¹

(1. 浙江工业大学食品科学与工程学院, 浙江杭州 310020) (2. 浙江江山健康蜂业有限公司, 浙江江山 324100)

摘要: 通过构建 BPA 诱导 MCF-7 细胞增殖模型, 观察植物乳杆菌 N1 发酵的蜂王浆产物对模型 BPA-MCF-7 细胞的活力、迁移能力、侵袭能力及细胞周期与凋亡的影响。以 BPA-MCF-7 细胞为模型, 设置空白组、对照组及药物组, 检测蜂王浆发酵前后细胞活力、细胞迁移、细胞侵袭能力及细胞凋亡与周期的变化; 此外又通过体内降血糖活性检测蜂王浆发酵前后的降血糖活性的变化。与对照组相比, 未发酵蜂王浆和蜂王浆发酵物的细胞增殖能力下降, 蜂王浆发酵物能明显抑制 BPA-MCF-7 细胞的生长。与对照组相比, 蜂王浆发酵物的细胞迁移率和侵袭率分别为 67.06% 和 79.00%, 可以抑制 BPA-MCF-7 细胞的侵袭和迁移能力。流式细胞结果显示, 蜂王浆发酵物可以诱导 BPA-MCF-7 细胞的凋亡, 主要阻滞在 G2/M 期。通过体内斑马鱼降血糖活性实验发现蜂王浆发酵物表现出比蜂王浆未发酵物更强的降血糖活性。结论, 蜂王浆经过发酵后可以诱导 BPA-MCF-7 细胞的凋亡, 抗癌活性更强, 并且降血糖活性也得到了提高, 为蜂王浆的开发利用提供了一定的理论基础。

关键词: 蜂王浆; 植物乳杆菌 N1; 发酵; 双酚 A; 乳腺癌; 降血糖

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.9.0802

Changes in Anticancer and Hypoglycemic Activities of *Lactobacillus plantarum* N1 before and After Royal Jelly Fermentation

HE Rongjun^{1*}, RE Mei¹, SHEN Jieer¹, WANG Xiaoyu², SUN Peilong¹

(1. College of Food Science and Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310020, China)

(2. Zhejiang Jiangshan Healthy Bee Industry Co., Ltd. Jiangshan 324100, China)

Abstract: By constructing a model of BPA-induced proliferation of MCF-7, we observed the effects of royal jelly products fermented by *Lactobacillus plantarum* N1 on the viability, migratory ability, invasive ability, and cell cycle and apoptosis of model BPA-MCF-7. BPA-MCF-7 were used as a model, and blank, control and drug groups were set up to detect changes in cell viability, cell migration, cell invasion ability and apoptosis and cycle before and after royal jelly fermentation; The changes in hypoglycemic activity of royal jelly before and after fermentation were also tested by ex vivo hypoglycemic activity. Compared with the control group, the cell proliferation ability of unfermented royal jelly and royal jelly ferment decreased, and royal jelly ferment significantly inhibited the growth of BPA-MCF-7. Compared with the control group, the cell migration and invasion rates of royal jelly fermentation were 67.06% and 79.00%, respectively, which could inhibit the invasion and migration ability of BPA-MCF-7. Flow cytometric results showed that royal jelly ferment induced apoptosis in BPA-MCF-7, which was mainly blocked in G2/M phase. In vivo zebrafish hypoglycaemic activity assay revealed that royal jelly fermentation exhibited stronger hypoglycaemic activity than royal jelly unfermented. It was concluded that royal jelly could induce apoptosis of BPA-MCF-7 after fermentation, with stronger anticancer activity, and the hypoglycemic activity was also improved, which provided a certain theoretical basis for the development and utilization of royal jelly.

Keywords: royal jelly; *Lactobacillus plantarum* N1; fermented; Bisphenol A; MCF-7; hypoglycemic

雌激素的作用具有两面性, 一方面可以促进机体的正常生长发育, 另一方面会诱导部分恶性肿瘤(例如乳腺癌、子宫癌)的生长。人乳腺癌细胞 MCF-7 属于雌激素依赖型肿瘤细胞, 已经被广泛的用于雌激素对乳腺癌发生

收稿日期: 2024-06-06; 修回日期: 2024-08-29; 接受日期: 2024-08-29

基金项目: 浙江省科技计划项目(2022C02063); 企业委托项目(KYY-HX-20200317)

作者简介: 何荣军(1978-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 功能食品开发, E-mail: hrjun@zjut.edu.cn

和发展机制的研究。双酚 A (Bisphenol A, BPA) 是与雌激素具有类似结构且化学结构非常稳定的外源性雌激素,也是目前人类在日常生活中接触最多的外源性雌激素^[1]。少量的 BPA 能从食物罐头材料或一些塑料器具中浸出,甚至还可以从某些牙科封闭剂渗出而进入人体内,长期蓄积,人体自身很难降解和排除,会影响人体正常的内分泌系统,是典型的环境雌激素^[2]。研究发现 BPA 能够促进恶性肿瘤的迁移、增殖和转移^[3]。若长期暴露于高浓度 BPA 下,可以引起乳腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌等雌激素依赖肿瘤的生长和发展,这可能是因为 BPA 能与雌激素受体结合进而激活雌激素受体信号^[4,5]。因此寻找能够抗 BPA 活性的物质非常重要。

蜂王浆是世界公认的最具营养价值的保健食品,具有抗肿瘤、抑菌、降血糖等作用,在医药行业具有非常广阔的发展前景^[6,7]。Nakaya 等^[8]的研究表明蜂王浆具有抗环境雌激素作用,可以抑制因雌激素引起的 MCF-7 细胞的生长;张爽^[9]的研究表明蜂王浆可以抑制 4T1 乳腺癌肿瘤细胞在小鼠中的生长,不同来源的蜂王浆抑制效果不同。

研究表明食品在发酵的过程中可以改变其营养物质或提高产品的功效,例如可以产生丰富的次生代谢物,可能会有较好的辅助抗肿瘤、降血糖及抗氧化等作用^[10]。植物乳杆菌是目前生活中常见的一种益生菌,可以产生有机酸、多肽和维生素等多种有益物质,具有较高的安全性^[11]。同时植物乳杆菌也是经常应用到食品发酵工程中的菌株,已经被证明对健康具有积极作用^[12]。蜂王浆大都以鲜浆的形式存在,保存时间短并且不宜长期冷藏保存,会影响蜂王浆原本的口感,因此开发利用蜂王浆相关产品,提高蜂王浆的利用率是市场的亟需。因此本研究利用植物乳杆菌 N1 对蜂王浆进行发酵,并研究其对 BPA 诱导的 MCF-7 细胞增殖、迁移、侵袭、凋亡与周期的影响;又通过建立斑马鱼降血糖模型,探讨蜂王浆发酵前后对高血糖斑马鱼的降糖作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

MCF-7 人乳腺癌细胞,中国科学院上海细胞库;蜂王浆,浙江健康蜂业有限公司;植物乳杆菌 N1 (*Lactobacillus plantarum* N1, CGMCC NO.15463), 浙江工业大学功能食品研发中心提供。

1.2 主要试剂与仪器

双酚 A, 碧云天生物技术研究公司;胎牛血清 (FBS, SH30070.03), PBS 磷酸盐缓冲液、二甲基亚砜 (DMSO)、0.25 wt.%胰酶, 杭州双木化工有限公司;CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒, 上海启达生物科技有限公司;Matrigel 基质胶, 4 wt.%多聚甲醛、结晶紫染色液, 碧云天生物技术研究公司;无水葡萄糖、四氧嘧啶, 上海国药集团化学试剂有限公司;阿卡波糖, 上海迈瑞尔生化科技有限公司;氯化钠, 上海泰坦科技股份有限公司;SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司;HSW-150 型培养箱, 上海森信实验仪器有限公司;CKX53 倒置显微镜, 中国 Olympus 公司;Thermo FC 酶标仪, 美国赛默飞世尔科技有限公司;CR21N 落地式高速冷冻离心机, Hitachi Koki 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 蜂王浆发酵步骤

蜂王浆与去离子水按照 1:50 (*m/V*) 混合, 进行高温高压灭菌 118 °C, 20 min, 待液体降到 28 °C 后, 接种菌落浓度为 1×10^7 CFU/mL 的植物乳杆菌 N1 5% V/V (体积分数), 37 °C 发酵, 发酵结束后灭活, 得到蜂王浆发酵液。按照同样的方法制备未发酵的蜂王浆液, 不进行发酵。随后将得到的蜂王浆发酵液和蜂王浆未发酵液进行冻干处理, 得到蜂王浆发酵产物 (Royal jelly fermentation, FJ) 和蜂王浆未发酵物 (Royal jelly, RJ)。以蜂王浆发酵液中反式-10-羟基-2-癸烯酸 (*Trans*-10-hydroxy-2-decenoic acid, 10-HDA) 的含量为评价标准, 参照文献方法进行测定^[13]。

1.3.2 蜂王浆发酵物对 BPA-MCF-7 细胞的影响

1.3.2.1 试验方法 CCK-8 法检测细胞活力

(1) BPA 最佳作用浓度的筛选: 选取生长状况良好的 MCF-7 人乳腺癌细胞, 按每毫升 3×10^4 个接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L。待细胞贴壁后加入不同浓度的 BPA (10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} μ mol/L) 处理, 继

续培养 48 h 后, 分别在实验孔、阴性对照孔、空白孔和阳性对照孔中加入 10 μL CCK-8 试剂和 90 μL MEM 基础培养基, 随后放于培养箱中培养 4 h, 于 450 nm 处测量其吸光度。

(2) 不同浓度 RJ、FJ 对 MCF-7 细胞活力的影响: 选取生长状况良好的 MCF-7 细胞接种到 96 孔板中, 细胞贴壁后分组给药处理, 空白组不进行细胞培养, 阴性对照组加入 MCF-7 细胞和完全培养基, 实验组加入不同浓度的含 MEM 培养基的 RJ、FJ 溶液, 每组设置 6 个复孔, 随后采用 CCK-8 法进行细胞活力检测。

(3) 不同浓度 RJ、FJ 对 BPA-MCF-7 细胞增殖的影响: 确定造模浓度后, 加入不同浓度的 RJ 和 FJ 对 BPA-MCF-7 进行细胞活力检测。以 BPA-MCF-7 细胞为实验细胞, 分别加入不同质量浓度的 RJ 和 FJ 溶液 (50、100、500、1 000 mg/L) 作为实验组, 对照组为 BPA-MCF-7 细胞培养于 MEM 完全培养基中, 空白对照组为正常 MCF-7 细胞, 每组设置 6 个复孔, 干预 48 h 后加入相应的 CCK-8 工作液于多功能酶标仪进行检测并计算细胞活力。

1.3.2.2 细胞划痕实验

以 BPA-MCF-7 细胞为实验细胞, 按照每毫升 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达到 80%~90% 时, 弃去旧培养基, 利用 10 μL 吸头比着铁尺在 6 孔板左中右的方向画“一”字, 随后 PBS 冲洗 3 遍, 除去悬浮细胞碎片, 此时于倒置显微镜下进行拍照, 记录 0 h 的划痕照片。对照组加入 MEM 稀释得到的 BPA 溶液, 药物组加入最终质量浓度为 1 000 mg/L 的 RJ 和 FJ 溶液, 每组设置 3 个复孔, 培养 48 h 后于倒置显微镜下进行拍照, 计算细胞划痕率。

1.3.2.3 Transwell 细胞侵袭实验

以 BPA-MCF-7 细胞为实验细胞, 按照每毫升 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达到 80%~90% 时, 进行药物处理。空白组为正常 MCF-7 细胞, 对照组加入 MEM 稀释得到的 BPA 溶液, 药物组加入最终质量浓度为 1 000 mg/L 的 RJ、FJ 溶液, 每组设置 3 个复孔。药物干预 48 h 后, 消化离心收集细胞, MEM (不含血清) 重悬细胞, 将细胞浓度调整为每毫升 1×10^5 个, 取出提前预冷的 Transwell 小室及 12 孔板 (后续实验全程在冰上进行), 按照无血清培养基: 基质胶 1:9 的比例进行配胶, 小室内铺胶 60 μL , 基底膜水化完成后, 小室的下室加入 1.5 mL 含 10% FBS 的 MEM 培养基, 上室内加入 400 μL 的细胞悬液, 每组设置 3 个复孔, 继续培养 48 h 后, 吸去旧培养基, PBS 清洗 3 遍后, 用沾水的棉签轻轻旋转以便擦去小室内未侵袭的细胞, 随后加入 500 μL 的 4% 多聚甲醛固定 0.50 h, 500 μL 的结晶紫染色液染色 0.33 h, 置于清水中清洗至无明显颜色后, 室温风干, 随后于显微镜下观察拍照。

1.3.2.4 流式细胞术检测 BPA-MCF-7 细胞的周期及凋亡情况

以 BPA-MCF-7 细胞为实验细胞, 消化离心, 加入适量培养基重悬, 按照实验要求调整至合适的细胞浓度并接种于 6 孔板中, 培养 48 h 后加入不同质量浓度的 FJ (0、100、500、1 000 mg/L), 每组设置 3 个复孔, 干预 48 h 后消化离心, 预冷的 PBS 重悬细胞, 按照 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒说明书进行操作, 随后在 0.50 h 内用流式细胞仪进行上机检测细胞凋亡。

以 BPA-MCF-7 细胞为实验细胞, 消化离心, 加入适量培养基重悬, 按照实验要求调整至合适的细胞浓度并接种于 6 孔板中, 培养 48 h 后加入不同质量浓度的 FJ (0、100、500、1 000 mg/L), 每组设置 3 个复孔, 干预 48 h 后消化离心, 预冷的 PBS 洗涤细胞, 随后在细胞 EP 管中加入预冷的 $\varphi=75\%$ 乙醇用于固定, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。取出固定细胞, 用预冷 PBS 清洗, 取少量细胞不标记碘化啉 (Propidium iodide, PI) 作为阴性对照, 其余组别加入配置好的 PI 染色液, 室温下避光孵育 0.33 h 后用流式细胞仪进行上机检测细胞周期。

1.3.3 降血糖实验

1.3.3.1 α -葡萄糖苷酶抑制活性测定

表 1 葡萄糖苷酶活性检测体系组分和顺序

Table 1 Glucosidase activity assay system components and sequence

组名	样品液	PBS	酶液	静置	pNPG	PBS	静置	终止液
空白组	0	50	50		50	0		50
空白对照	0	50	50	37 $^{\circ}\text{C}$	0	50	37 $^{\circ}\text{C}$	50
样品组	50	0	50	0.16 h	50	0	0.33 h	50
样品对照	50	0	50		0	50		50

α -葡萄糖苷酶抑制率的测定参照文献的方法, 并稍作修改^[14]。后续样品溶液均使用 0.1 mol/L PBS (pH 值 6.9)

溶液进行配制。阳性对照组为阿卡波糖 (Acarbose)。加入相关试剂后在 37 °C 水浴锅内进行反应。终止液加入后于 405 nm 处测定吸光值, 计算其抑制率。

按照表 1 中的顺序 (单位: μL) 向 96 孔板中依次添加对应试剂, 并在 37 °C 水浴锅内进行反应。终止液加入后于 405 nm 处测定吸光值, 计算其抑制率。

1.3.3.2 斑马鱼降血糖模型的建立

在显微镜下选取发育正常的 4 dpf (days past fertilization, dpf) 野生型 AB 系斑马鱼于 6 孔板中, 每孔 32 尾, 分别水溶 4 wt.% 的蔗糖和 0.5 mmol/L 的四氧嘧啶的混合溶液 10 mL, 将其浸泡其中并在 28 °C 培养箱孵育 24 h 至 5 dpf 获得糖尿病模型。

1.3.3.3 蜂王浆发酵物对斑马鱼糖尿病模型的降糖作用测定

在显微镜下选取生长状况良好的 4 dpf 野生型 AB 系斑马鱼于 6 孔板中, 每孔 32 尾, 用 0.5 mmol/L 四氧嘧啶 + 4 wt.% 葡萄糖混合液处理并建立斑马鱼糖尿病模型。实验组用相同质量浓度的 RJ、FJ 和阿卡波糖 (Acarbose) 处理。所有组在 28 °C 的培养箱中培养 24 h 之后, 丢弃旧培养基, 将斑马鱼收集到 1.5 mL 离心管中, 每管包含 10 条鱼。将试管中的水干燥后, 加入 100 μL 无水乙醇, 室温静置 0.25 h, 然后转移到 60 °C 的烘箱中 2 h。然后在每管中加入 5 μL 超纯水。再次将试管置于室温下 0.25 h。最后, 取 2 μL 溶液, 用血糖仪测量葡萄糖含量^[15]。

1.4 统计学方法

实验结果采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析和作图。两组数据比较采用独立样本 T 检验, 多组数据比较采用单因素方差分析和 Tukey's 检验。实验数据以 Mean $\pm$ SEM 表示。以 $P < 0.05$ 为统计学显著性差异。不同小写字母代表差异显著。

2 结果与分析

2.1 蜂王浆发酵过程中 10-HDA 含量的变化

蜂王浆中特有的不饱和脂肪酸 10-HDA 的含量是评价蜂王浆质量好坏的标准, 因此在蜂王浆的发酵过程中以 10-HDA 的含量作为发酵的评判标准。从图 1 中可以看出, 蜂王浆中 10-HDA 的含量随发酵时间的增加呈下降趋势, 这表明植物乳杆菌 N1 能够充分利用蜂王浆中的营养物质进行发酵。发酵时间至 72 h 时, 蜂王浆中 10-HDA 的含量为 1.58%, 发酵时长达 96 h 时, 蜂王浆中 10-HDA 的含量为 1.27%, 而国家对蜂王浆中 10-HDA 含量的最低安全标准为 1.40%, 发酵时间 96 h 时, 10-HDA 含量低于国家安全标准, 发酵液颜色呈灰褐色, 粘度增大并且伴有难闻的气味, 发酵过度。因此选用发酵时间为 72 h 为最终的发酵时间。

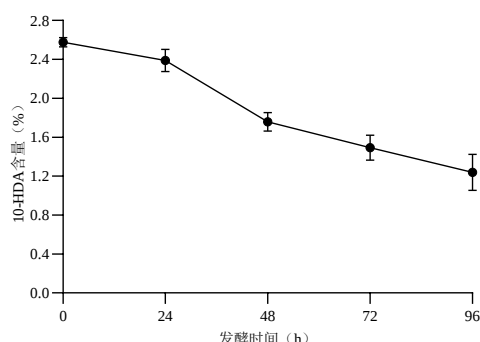


图 1 发酵过程中 10-HDA 含量的变化

Fig.1 Changes in 10-HDA content during fermentation

2.2 蜂王浆发酵物的抗癌活性

2.2.1 蜂王浆发酵前后对 BPA-MCF-7 细胞活力的影响

从图 2 可知经过不同浓度的 BPA 处理 MCF-7 细胞 48 h 后, 与空白对照相比, BPA 促进 MCF-7 细胞的增殖,

并且在 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞活力为 125.24%，相对的增值效果最明显 ($P<0.05$)，可以诱导 MCF-7 细胞达到最大的增殖，这可能是因为 BPA 与细胞膜受体或核受体相结合，通过雌激素途径引起细胞的增殖^[16]。因此选用此浓度构建 BPA 诱导 MCF-7 细胞转化模型。

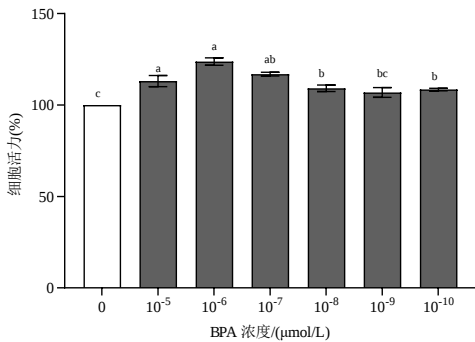


图 2 BPA 对 MCF-7 细胞活力的影响

Fig.2 Effect of BPA on the viability of MCF-7 cells

注：不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$)。下图同。

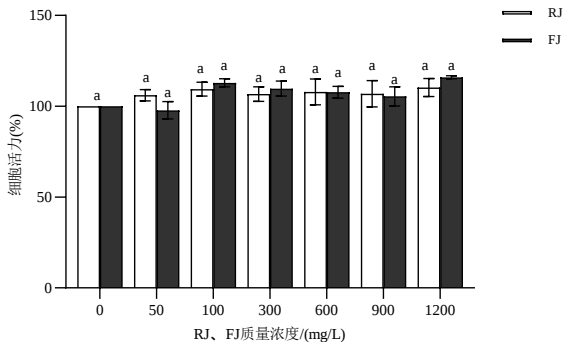


图 3 RJ、FJ 对 MCF-7 细胞活力的影响

Fig.3 Effects of RJ and FJ on MCF-7 cell viability

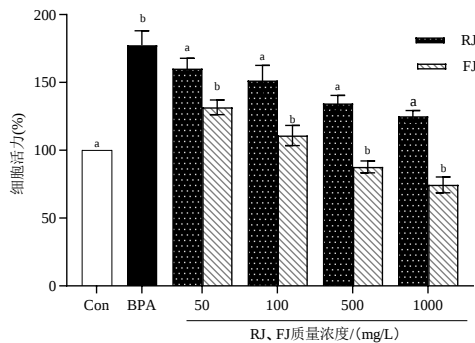


图 4 RJ、FJ 对 BPA-MCF-7 细胞活力的影响

Fig.4 Effect of RJ、FJ on the viability of BPA-MCF-7 cells

利用 CCK-8 法检测不同质量浓度的 RJ、FJ 对 MCF-7 细胞的活力的影响，确定合适的给药区间。从图 3 中可以看出，RJ、FJ 对 MCF-7 细胞活力基本上无差别，这表明在 0~1 200 mg/L 范围内，RJ、FJ 并不会对 MCF-7 细胞产生影响，即无细胞毒性。

选择 BPA 浓度为 10^{-6} $\mu\text{mol/L}$ 构建细胞模型，对已完成的细胞模型 BPA-MCF-7 细胞进行给药实验，利用不同质量浓度的 RJ 和 FJ 处理模型细胞后，由图 4 可知，经过 BPA 的作用后，MCF-7 细胞活力显著上升 ($P<0.05$)；

与对照组相比, RJ 和 FJ 可以抑制 MCF-7 细胞的增殖能力, 质量浓度在 1 000 mg/L 时, 细胞活力达到了最低, 分别为 122.04%和 75.40%; 在相同质量浓度下, 与 RJ 相比, FJ 抑制细胞的增殖能力更强。根据实验结果, 选取 RJ、FJ 的质量浓度 1 000 mg/L 为后续细胞侵袭和细胞迁移实验作用的质量浓度。

2.2.2 蜂王浆发酵前后对 BPA-MCF-7 细胞迁移能力的影响

从图 5 可以看出, 划痕 24 h 后, 与空白组相比, BPA 可以显著的促进 MCF-7 细胞的愈合能力, 这可能是因 为 BPA 可以诱导肿瘤细胞的上皮间质转化, 促进间质蛋白标志物的表达, 从而增强 MCF-7 细胞的迁移能力^[17]。与 BPA 组相比, 经过 RJ 和 FJ 处理的模型细胞愈合率明显降低, 迁移率分别为 88.33%和 67.06%, 这表明 RJ 和 FJ 均可以抑制 BPA-MCF-7 细胞的迁移能力; 与 RJ 组相比, FJ 组迁移能力明显降低, 这说明 FJ 抑制 BPA-MCF-7 细胞的迁移能力更强。

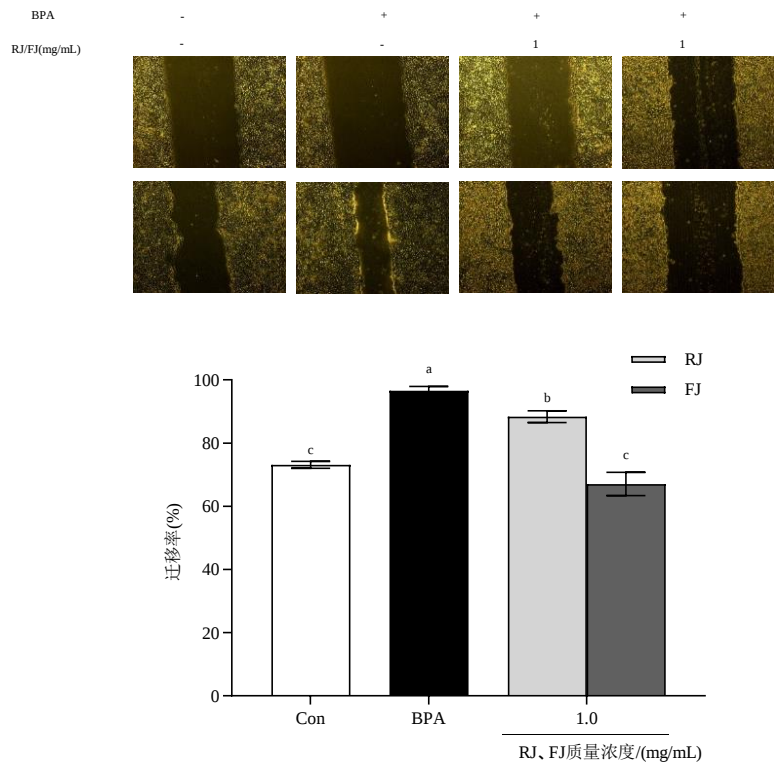


图 5 RJ 和 FJ 对由 BPA-MCF-7 细胞迁移能力的影响

Fig.5 Effect of RJ and FJ on the migration ability of MCF-7 cells migrated by BPA-MCF-7 cells

2.2.3 蜂王浆发酵前后对 BPA-MCF-7 细胞侵袭能力的影响

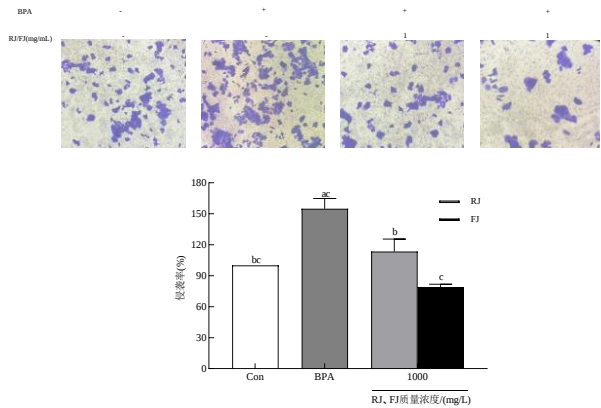


图 6 RJ 和 FJ 对由 BPA-MCF-7 细胞侵袭能力的影响

Fig.6 Effect of RJ and FJ on the ability to invade by BPA-MCF-7 cells

从图 6 中可以看出，与空白组相比，BPA 会增强 MCF-7 细胞的侵袭能力，这是因为雌激素通过与雌激素受体相结合，转录抑制因子 *Snail* 通过抑制 *E-cadherin* 的表达，介导乳腺癌细胞 MCF-7 发生上皮间质转化，进而增加 MCF-7 细胞的侵袭能力^[18,19]。研究表明 BPA 可以增加 *Snail* 的表达，从而使 MCF-7 细胞发生上皮间质转化，增强 MCF-7 细胞侵袭能力^[20]。与 BPA 组相比，RJ 和 FJ 细胞侵袭率分别为 113.50%和 79.00%，RJ 和 FJ 组细胞侵袭能力显著下降，这表明 RJ 和 FJ 均可以抑制 BPA-MCF-7 细胞的侵袭能力，而 FJ 表现出的抑制 BPA-MCF-7 细胞侵袭能力更强。

2.2.4 蜂王浆发酵前后对 BPA-MCF-7 细胞周期及凋亡的影响

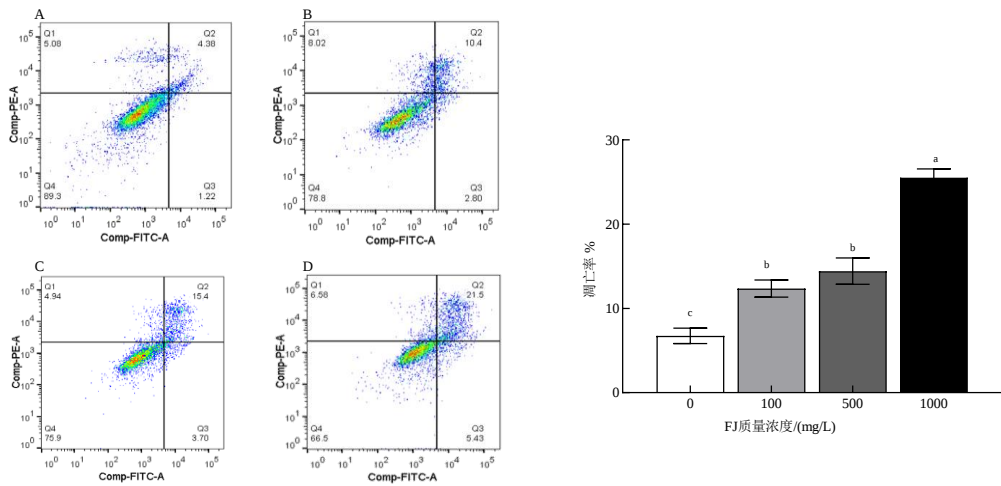


图 7 FJ 对 BPA-MCF-7 细胞凋亡的影响
Fig.7 Effect of FJ on apoptosis of BPA-MCF-7 cells

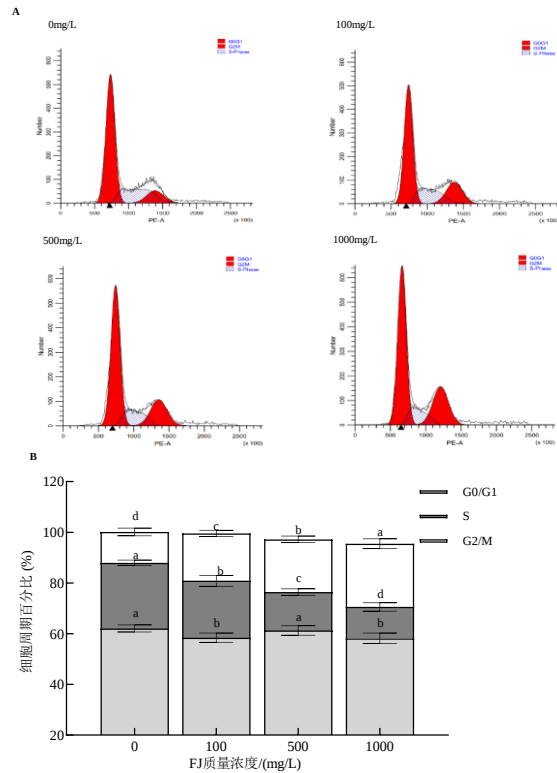


图 8 (A) 不同浓度 FJ 对 BPA 诱导的 MCF-7 细胞周期的影响 (B) 不同浓度 FJ 在 BPA-MCF-7 细胞中周期分布规律
Fig.8 (A) Effects of different concentrations of FJ on BPA-induced MCF-7 cell cycle (B) Periodic distribution pattern of different concentrations of FJ in BPA-MCF-7 cells

流式结果图 7 显示。添加不同质量浓度的 FJ 刺激细胞 48 h 后, 细胞凋亡比例(早期凋亡+晚期凋亡)不断升高, 其中仅 BPA 组细胞的凋亡率为 5.60%。而经过 100、500、1 000 mg/L 的 FJ 处理后的细胞凋亡率分别为 13.20%、19.10%和 26.93%, 由此可见 FJ 可以抑制由 BPA 诱导的 MCF-7 细胞的凋亡, 主要是晚期凋亡, 且随 FJ 质量浓度的增加, 对诱导细胞的凋亡作用更强。

流式结果如图 8 所示。第一个峰为 G_0/G_1 期、凹谷为 S 期、第二个峰为 G_2/M 期, 峰面积的比例即细胞周期的比例。以 BPA-MCF-7 细胞为作用细胞, 添加不同质量浓度的 FJ 刺激细胞 48 h 后, 与 BPA 组相比, 实验组 G_2/M 期细胞数的第二个峰逐渐升高, S 期显著下降。这表明 FJ 是通过抑制 BPA-MCF-7 细胞由 G_2/M 期向 G_0/G_1 期转化, 进而使细胞阻滞在 G_2/M 期。这表明 FJ 能够影响 BPA-MCF-7 细胞周期的变化, 进而阻止细胞分裂、加快凋亡速度。

2.3 降血糖活性

2.3.1 α -葡萄糖苷酶抑制率

研究表明, 蜂王浆具有降血糖活性^[21], 探究添加植物乳杆菌 N1 进行发酵的蜂王浆能否保持原有的活性。从图 9 可以看出, α -葡萄糖苷酶的抑制率随样品质量浓度的升高而不断增加。在相同质量浓度下, RJ 的抑制率基本上低于 FJ 的抑制率, 当作用的质量浓度达到 1 000 mg/L 时, RJ 和 FJ 的抑制率分别为 30.57%和 45.93%。由此可见, 相比于 RJ, FJ 具有更好的体外降血糖活性。

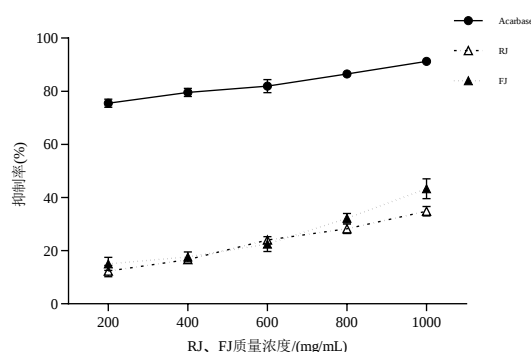


图 9 不同浓度阿卡波糖、RJ 和 FJ 对 α -糖苷酶的抑制作用

Fig.9 Inhibition of α -glucosidase by different concentrations of acarbose, RJ and FJ

2.3.2 斑马鱼降血糖活性测定

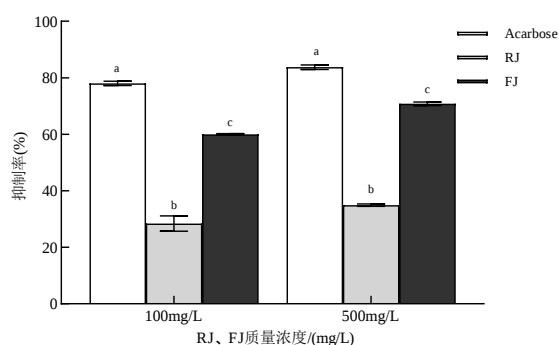


图 10 不同浓度阿卡波糖、RJ 和 FJ 处理糖尿病斑马鱼的降糖率

Fig.10 Glucose reduction rate of diabetic zebrafish treated with different concentrations of acarbose, RJ and FJ

斑马鱼作为一种新型的模式生物, 与其他动物模型相比, 斑马鱼的体积更小, 产卵量大、试验周期短、受试药物量少等优势^[22]。研究表明斑马鱼适用于研究高血糖相关疾病的理想模型, 斑马鱼胰腺对胰岛素敏感, 其调节血糖的关键机制与哺乳动物高度相似^[23], 因此采用斑马鱼建模进行降血糖研究。斑马鱼高血糖模型组的血糖随浓度的升高而升高, 与对照组相比差异显著, 这表明糖尿病模型建立成功。从图 10 中可以看出, 随着药物质量浓度

的升高,阿卡波糖、RJ 和 FJ 对斑马鱼的降血糖效果均有所提高,这说明三者均具有一定的降血糖效果。在相同质量浓度下,FJ 比 RJ 的降糖效果更好,这可能是因为发酵过程中消耗一定的蛋白转化成小分子肽,使其活性物质得到了更好的发挥^[24]。目前对蜂王浆发酵产物的降血糖活性报道较少,虽然本研究的蜂王浆发酵产物具有一定的降血糖活性,但还需进一步对发酵产物进行分离纯化,得到高活性的单一组分,对糖尿病的研究更有意义。

3 结论

BPA 激活雌激素受体信号,促进乳腺癌细胞的增殖,调节各种类型基因的表达,造成肿瘤细胞凋亡、周期异常。研究表明即使在低剂量下,BPA 也会是影响女性身体健康的一个强有力的危险因素,所以寻找一个具有抗 BPA 活性的物质非常重要。根据已经报道的文献,蜂王浆具有抗肿瘤及降血糖活性,但是经过发酵后的蜂王浆是否还具有抗肿瘤和降血糖活性有待进一步研究。本研究利用植物乳杆菌 N1 对蜂王浆进行发酵处理,研究蜂王浆经过发酵后的抗癌及降血糖活性。本实验研究结果表明:BPA 可以诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖;与蜂王浆未发酵产物相比,蜂王浆发酵产物可以抑制由 BPA 诱导的 MCF-7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力;蜂王浆发酵产物可以促进 BPA-MCF-7 细胞的凋亡,并且随质量浓度的增加凋亡率不断上升;周期数据表明,随着蜂王浆发酵产物的质量浓度提高,发生在 G2/M 期阻滞的细胞数也逐渐增加,这表明蜂王浆发酵产物可以使细胞停滞在 G2/M 期而不能继续进行细胞周期,从而达到抗癌的作用;通过体内外降血糖活性检测发现,在体内外,RJ 和 FJ 均具有降血糖效果,并且在相同的质量浓度下,FJ 的降糖效果要高于 RJ。

综上所述,与蜂王浆未发酵物相比,蜂王浆发酵产物具有更好的抗癌和降血糖活性,生物活性得到了提高,这表明蜂王浆发酵产物具有一定的研究意义。蜂王浆作为世界上公认的最具保健作用的食物一直以来都是研究的热点,在实际生产中,蜂王浆大多以鲜浆或冻干粉的形式存在,低温储存以保证其生物活性的完整性,本实验得到的蜂王浆发酵产物提供了一种新的蜂王浆存在形式,并为蜂王浆抗肿瘤及降血糖活性提供一定的科学依据,但是蜂王浆经过发酵后成分复杂,其抗肿瘤及降血糖作用机制有待进一步深入研究,可通过动物实验进一步验证活性。

参考文献

- [1] 程晋鹏,张合喜,朱晓玲,等.双酚 A 对乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖作用及对其癌基因 *EphA2* 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达水平的影响[J].环境与职业医学,2006,5:369-372.
- [2] SINGLETON D W, FENG Y, CHEN Y, et al. Bisphenol-A and estradiol exert novel gene regulation in human MCF-7 derived breast cancer cells [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2004, 221(1): 47-55.
- [3] ROGERS J A, METZ L, YONG V W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms [J]. Molecular Immunology, 2013, 53(4): 421-430.
- [4] 杨淋清,庄志雄.低剂量双酚 A 与乳腺癌关系研究进展[J].中国公共卫生,2010,26(12):1557-1559.
- [5] 卫立,王斌,刘树深,等.低剂量双酚 A 与 17 β 雌二醇对 MCF-7 细胞增殖作用的剂量效应关系及其联合作用探索[J].环境科学学报,2006,6:968-972.
- [6] RAMANATHAN A N K G, NAIR A J, SUGUNAN V S. A review on royal jelly proteins and peptides [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 44: 255-264.
- [7] ALBALAWI A E, ALTHOBAITI N A, ALRDAHE S S, et al. Antitumor activity of royal jelly and its cellular mechanisms against ehrlich solid tumor in mice [J]. BioMed Research International, 2022, 1: 7233997.
- [8] NAKAYA M, ONDA H, SASAKI K, et al. Effect of royal jelly on bisphenol A-induced proliferation of human breast cancer cells [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2007, 71(1): 253-255.
- [9] 张爽.蜂王浆对 4T1 细胞体内外生长的影响及机制研究[D].福州:福建农林大学,2017.
- [10] 赵康琦,金爱静,王晓月,等.白芷在斑马鱼中的降血糖作用及分子对接研究[J].中医药信息,2023,40(6):32-37.
- [11] 陈峰,马微微,于雷雷,等.植物乳杆菌 CCFM8661 增强小鼠免疫力的功能评价[J].食品与生物技术学报,43,5:37-43.
- [12] BORGES S, BARBOSA J, SILVA J, et al. A feasibility study of *Lactobacillus plantarum* in fruit powders after processing and storage [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(2): 381-388.
- [13] 邹力,严烨,范芳芳,等.高效液相色谱法测定蜂王浆中 10-羟基-2-癸烯酸[J].食品安全导刊,2020,3:127.

- [14] CHEN C, YOU L-J, ABBASI A M, et al. Characterization of polysaccharide fractions in mulberry fruit and assessment of their antioxidant and hypoglycemic activities in vitro [J]. Food & Function, 2016, 7(1): 530-539.
- [15] ZHOU H, WU Y, KIM E, et al. Simultaneous tests of theaflavin-3,3'-digallate as an anti-diabetic drug in human Hepatoma G2 cells and zebrafish (danio rerio) [J]. Nutrients, 2021, 13(12): 4379.
- [16] BÖCKERS M, PAUL N W, EFFERTH T. Bisphenolic compounds alter gene expression in MCF-7 cells through interaction with estrogen receptor α [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2020, 399: 115030.
- [17] 冷彦,吴艺舟,孙玉洁.环境类雌激素双酚 A 通过上调 *Snail* 蛋白表达促进 MCF-7 乳腺癌细胞迁移[J].南京医科大学学报(自然科学版),2014,34(10):1297-1304.
- [18] BATLLE E, SANCHO E, FRANC íC, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells [J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(2): 84-89.
- [19] THIERY J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(6): 442-454.
- [20] 柳燕贞,曾国驱,葛李晨,等.双酚 A 诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞上皮间质化的研究[J].环境科学学报,2015,35(2):608-612.
- [21] 朱作艺,张玉,王君虹,等.蜂王浆蛋白肽的制备及其降血糖和抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2020,41(17):45-50.
- [22] 刘慧茹,李文玉,陈立国,等.基于高分辨质谱及斑马鱼模型的磷虾油磷脂组成特征及降血糖活性分析[J].食品科学,2024,45(18):134-142.
- [23] 张露,程鑫鹏,邓梅,等.丹皮乙醇提取物的抗氧化和抗糖尿病活性研究[J].天然产物研究与开发,2024,36(5):762-770.
- [24] MENG F-B, ZHOU L, LI J-J, et al. The combined effect of protein hydrolysis and *Lactobacillus plantarum* fermentation on antioxidant activity and metabolomic profiles of quinoa beverage [J]. Food Research International, 2022, 157: 111416.