

文章编号: 1673-1689(2011)05-0648-05

蜜蜂巢脾水提液的抗炎活性

褚亚芳¹, 胡福良^{* 1}, 杨 锋², 戴关海²

(1. 浙江大学 动物科学学院, 浙江 杭州 310029; 2. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310006)

摘 要: 为了研究蜜蜂巢脾对急性炎症模型动物的影响, 作者以中蜂巢脾和意蜂巢脾为材料, 水提法处理样品, 研究其对二甲苯致小鼠耳肿胀、醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增强和角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响。结果表明, 中蜂巢脾水提物和意蜂巢脾水提物均显著抑制二甲苯引起的耳肿胀, 显著降低角叉菜胶引起的足肿胀程度和局部炎症组织的 PGE₂ 含量, 对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增强则无抑制作用。此外, 中蜂巢脾水提物的抗炎活性表现出剂量依赖效应。

关键词: 蜜蜂巢脾; 水提液; 抗炎; 急性炎症; PGE₂

中图分类号: S 896. 9

文献标识码: A

Anti-Inflammatory Activities of Water Extract from Honeycomb

CHU Ya-fang¹, HU Fu-liang^{* 1}, YANG Feng², DAI Guan-hai²

(1. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Zhejiang Institute of Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China)

Abstract: The aim of this study is to explore the pharmacological activities of honeycomb against acute inflammation in animals, for this, the effect of water extracts from *Apis cerana cerana* honeycomb and *A. mellifera ligustica* honeycomb on Xylene-induced ear edema, acetic acid-induced vascular permeability and carrageenan-induced hind paw edema tests in mice were investigated. The results showed that both samples exhibited remarkable inhibition in xylene-induced ear edema model, carrageenan-induced hind paw edema model and the content of PGE₂ in the inflammatory tissues, while they showed no anti-inflammatory against acetic acid-induced vascular permeability. The pharmacological activities of the water extracts of *A. cerana cerana* honeycomb show in a concentration-dependent manner.

Key words: honeycomb, water extract, anti-inflammatory, acute inflammation, PGE₂

蜜蜂巢脾是蜜蜂泌蜡建造而成, 是其栖息、繁衍育子、酿造贮存蜂蜜、保存蜂花粉的场所。巢脾的基本成分为蜂蜡, 包括少量蜜蜂建筑巢房时咀嚼蜂蜡而加入的抗菌肽和酶类物质^[1]。随着巢脾内

繁育的蜜蜂世代的增加, 巢脾的颜色由白色或者淡黄色转为褐色甚至黑色, 巢脾的成分也变得相当复杂。老巢脾含有大量蜜蜂生产和代谢的各种产物, 如茧衣、蜂胶、蜂王浆、花粉、蜂蜜等物质^[2]。由于

收稿日期: 2010-09-13

基金项目: 国家蜂产业技术体系建设专项资金项目(NYCYTX-43)

* 通信作者: 胡福良(1964-), 男, 浙江东阳人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事蜜蜂科学方面的研究。

Email: flhu@zju.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*, 中蜂)和意大利蜜蜂(*A. mellifera ligustica*, 意蜂)的习性差异,其相应的巢脾成分也存在较大的差异^[2]。巢脾是一种中国民间传统药物,对于鼻炎和肝炎具有显著的治疗效果^[3-4],也被用于辅助治疗支气管炎、风湿性关节炎、牙周炎、皮肤病等,此外还具有抗菌、镇痛、降血压等功效^[5-6]。

中国是世界第一的养蜂大国,目前生产蜂群700多万群,包括意蜂400多万群和中蜂200多万群。每年生产淘汰的老巢脾有数千万张,然而这一丰富的可再生资源尚未得到合理开发和充分利用。作者通过比较中蜂巢脾水提液和意蜂巢脾水提液对急性炎症模型动物的影响,探讨不同品种蜜蜂巢脾抗炎活性及其差异。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂巢脾及其处理

意蜂巢脾(使用一年以上):由杭州蜂之语蜂业股份有限公司有机蜂场提供;中蜂巢脾(使用一年以上):由浙江省金华市大地养蜂专业合作社提供;巢脾水提液的制备:巢脾, -18℃冷冻,粉碎,过20目筛,水提3次(固液质量体积比1:6);98℃水浴(1 h/次),过滤,除蜡,浓缩, -18℃保存。

1.2 实验动物

ICR小鼠:雄性,清洁级,体重(20±2)g,上海斯莱克SLAC实验动物有限责任公司及浙江省实验动物中心供应。使用许可证:SYXK(浙)2009-0122。

1.3 药物和仪器

伊文思兰:Fluka公司;角叉菜胶:Sigma公司;吲哚美辛:江苏亚邦爱普森药业有限公司,药用级;二甲苯、冰醋酸、甲醇和KOH:分析纯。

GS6R离心机:美国贝克曼公司;Mikro 200R型离心机:德国Hettich公司;岛津UV-2550型光谱仪:日本岛津公司;UV-1000紫外分光光度计:上海天美科学仪器公司;RT-02型二两装高速中药粉碎机:永康市屹立工具厂;R系列旋转蒸发器:上海申生科技有限公司;SHB-III型循环水式多用真空泵:河南太康教材仪器厂;W201型恒温水浴锅:上海申生科技有限公司;BS124S型电子天平:北京赛多利斯仪器系统有限公司,0.0001g;7 mm内径打孔机。

1.4 巢脾水提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的作用

取80只ICR小鼠,随机分为8组(每组10只) - M_w高中低剂量组、C_w高中低剂量组、阳性对照组(吲哚美辛)和模型对照组。灌胃给药0.2 mL/

10 g,连续3 d。最后1次给药后30 min,取20 μL二甲苯涂抹于小鼠右耳两面。2 h之后,脱颈椎处死小鼠。用7 mm内径的打孔器,分别将小鼠的左右耳片打下。立即将左右耳片称质量,用于计算肿胀度和肿胀抑制率^[8]。

肿胀度 $T = \text{右耳片质量} - \text{左耳片质量}$

肿胀抑制率 $I/\% = \frac{T_{\text{模型组}} - T_{\text{给药组}}}{T_{\text{模型组}}} \times 100\%$

1.5 巢脾水提取物对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响

取ICR小鼠80只,随机分为8组,分组方法同1.4。灌胃给药0.2 mL/10 g,连续3 d。末次给药后20 min,小鼠尾静脉注射0.5%伊文思兰(生理盐水溶液),0.1 mL/10 g,并立即腹腔注射0.6%醋酸,0.2 mL/只。20 min后处死小鼠。腹腔内注入5 mL生理盐水,轻轻按揉腹部,用滴管吸出洗液,注入试管,3 000 r/min离心15 min,取上清液,590 nm处测量腹腔洗液伊文思兰吸光度值^[8]。

1.6 巢脾水提取物对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响

取ICR小鼠80只,随机分为8组,分组方法同1.4。灌胃给药0.2 mL/10 g,连续3 d。实验当天提前用游标卡尺测定所有小鼠右后肢厚度作为造模前的正常值。末次给药30 min后,于每只小鼠右后肢足跖处皮下注射1%角叉菜胶悬液(0.03 mL/只),以造成急性足跖肿胀模型。注射角叉菜胶后分别于1、2、3、4、6 h后测定右后足跖的厚度,以肿胀度和肿胀抑制率作为检测指标^[9]。

肿胀度 $T = \text{右足跖厚} - \text{左足跖厚}$

肿胀抑制率 $I/\% = \frac{T_{\text{模型组}} - T_{\text{给药组}}}{T_{\text{模型组}}} \times 100\%$

小鼠局部炎症组织PGE₂含量:上述实验完毕后,立即处死小鼠,将致炎足自踝关节以上1 cm处剪下,称质量,剪碎皮肤放入1 mL生理盐水浸泡24 h。离心取上清液0.3 mL,加入2 mL KOH-甲醇溶液(0.5 mol/L),50℃水浴异构化20 min,加甲醇稀释至4 mL,然后以岛津UV-2550型光谱仪于278 nm处测定PGE₂含量(以OD值表示)^[10]。

1.7 急性毒性

观察并记录以上3个急性炎症实验过程中,从第一次给药到第三次给药期间的48 h内,小鼠的死亡率。

2 结果与分析

2.1 巢脾水提取物对二甲苯致小鼠耳肿胀的作用

巢脾水提取物对二甲苯引起的小鼠耳肿胀具有

一定程度的抑制作用,且 15 g/kg 剂量中蜂巢脾水提物组的小鼠的肿胀程度显著低于模型对照组。中蜂巢脾水提物呈现一定的剂量依赖效应,其对耳肿胀的抑制作用随着剂量的提高而增强。意蜂巢脾水提物则不同,中剂量组的抑制作用最佳。结果见表 1。

表 1 巢脾水提物对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响
Tab. 1 Effects of water extracts of honeycomb on xylene induced ear edema in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g/kg)	肿胀度/ mg	肿胀 抑制率/%
中蜂巢 脾水提液	15.00	5.33±3.97*	44.02
	10.00	7.01±2.75	26.30
	5.00	8.15±2.53	14.32
意蜂巢 脾水提液	15.00	6.99±2.8	26.54
	10.00	6.68±2.18	29.80
	5.00	7.31±3.58	23.13
吲哚美辛	0.01	7.31±3.58	23.13
模型对照	-	9.51±3.52	-

与模型对照组比较,显著性差异* $P < 0.05$ 。

2 2 巢脾水提取物对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响

巢脾水提物对醋酸引起的腹腔毛细血管通透性增强无抑制作用,中、高剂量下反而显著促进毛细血管通透性增强。阳性对照组(20 mg/kg 吲哚美辛)对醋酸引起的小鼠腹腔毛细血管通透性增强起到极显著的抑制作用,结果见表 2。

表 2 巢脾水提物对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响
Tab. 2 Effects of water extracts of honeycomb on acetic acid induced vascular permeability in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量/(g/kg)	OD _{590nm}
中蜂巢脾水提物	15.00	0.464±0.157*
	10.00	0.416±0.096*
	5.00	0.271±0.096
意蜂巢脾水提物	15.00	0.430±0.135*
	10.00	0.436±0.094*
	5.00	0.344±0.07
吲哚美辛	0.02	0.144±0.044*
模型对照	-	0.311±0.092

与模型对照组比较,显著性差异* $P < 0.05$; 极显著性差异** $P < 0.01$ 。

炎症是某一组织对损伤或者感染的一种局部应答。包括 3 方面的反应:感染区域供血量增加;白细胞从血管进入炎症组织;毛细血管通透性增加,免疫应答的可溶性介质渗出,利于感染控制。一旦最初的抗原被清除,则白细胞激活和迁移停止,炎症消失^[11]。醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增强,从致炎到处死仅 20 min,即实验结果表示的为炎症初期反应。以此,我们推断巢脾提取物可能会增强机体免疫力,促进炎症早期的免疫应答的快速发生,及时清理抗原。

2 3 巢脾水提取物对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响

角叉菜胶致小鼠足肿胀主要分为两个阶段,其涉及众多的炎性介质。致炎后的 0~ 2.5 h 为第一阶段,主要为组胺、5-HT 和缓激肽等炎性介质对血管通透性造成的影响。组胺和 5-HT 的释放主要集中在前 1.5 h,而缓激肽主要在前 2.5 小时之内^[12]。致炎后 3 h 肿胀度可以达到最大值,随后开始降低^[13]。炎症后期,致炎后 4.5~ 6 h,主要由类激肽物质,如前列腺素、胰酶类和溶酶体的过度产生引起^[7]。

在炎症初期(注射角叉菜胶后的 1~ 2 h),中蜂巢脾水提物和意蜂巢脾水提物显著抑制了足跖肿胀度,尤其是高剂量组($P < 0.01$)。注射角叉菜胶 1 h 后,中蜂巢脾水提物高剂量组和意蜂巢脾水提物中剂量组的肿胀抑制率分别达到了 39.12% 和 33.64%。3~ 4 h 后小鼠足肿胀达到高峰,巢脾提取物对肿胀的抑制率水平下降。在炎症后期(注射角叉菜胶后的 4~ 6 h),意蜂巢脾水提物的中、低剂量组再次有效抑制足肿胀,其抑制率分别达到了 19.09% 和 19.27%,结果见表 3。根据实验结果以及角叉菜胶致小鼠足肿胀的原理,推断中蜂巢脾提取物和意蜂巢脾水提物均可有效抑制角叉菜胶致小鼠足肿胀早期相关炎症因子的合成或者降低其活性,而意蜂巢脾水提物对后期炎症因子也有较强的抑制作用。

作者进一步探究了巢脾水提物对炎症后期其作用的主要炎症介质—PGE₂ 质量分数的影响,结果见表 4。与模型对照组相比较,中蜂巢脾水提物中剂量组和意蜂巢脾水提物中、低剂量组均极显著降低了小鼠局部炎症组织中 PGE₂ 质量分数,中蜂巢脾水提物低剂量组也表现出显著作用。此结果与表 3 中最后一列数据趋势一致,即小鼠致炎足中 PGE₂ 质量分数与注射角叉菜胶 6 h 后小鼠足肿胀程度相对应。以此推断,巢脾提取物对角叉菜胶致

小鼠足肿胀后期的抑制作用可能与其对局部炎症组织内 PGE₂ 合成影响相关。

表 3 巢脾水提物对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响

Tab. 3 Effects of water extracts of honeycomb on carrageenan-induced paw edema in mice			($\bar{x} \pm s$, n= 10)				
组 别	剂量/ (g/ kg)		时间/h				
			1	2	3	4	6
中蜂巢脾水提物	15	足跖肿胀度/mm	0. 932±0. 145 ^{* *}	1. 443±0. 136 ^{* *}	1. 926±0. 367	2. 001±0. 233	1. 515±0. 161
		抑制率/ %	39. 12	25. 62	12. 73	8. 76	7. 62
	10	足跖肿胀度/mm	1. 235±0. 152 ^{* *}	1. 702±0. 188 [*]	1. 956±0. 178 [*]	2. 035±0. 214	1. 448±0. 223
		抑制率/ %	19. 33	12. 27	11. 37	7. 2	11. 71
	5	足跖肿胀度/mm	1. 281±0. 077	1. 803±0. 187	2. 106±0. 265	2. 056±0. 265	1. 474±0. 225
		抑制率/ %	16. 33	7. 06	4. 58	6. 25	10. 12
意蜂巢脾水提物	15	足跖肿胀度/mm	1. 139±0. 23 ^{* *}	1. 597±0. 118 ^{* *}	2. 019±0. 239	1. 969±0. 162	1. 514±0. 175
		抑制率/ %	25. 6	17. 68	8. 52	10. 21	7. 68
	10	足跖肿胀度/mm	1. 016±0. 256 ^{* *}	1. 639±0. 225 [*]	2. 101±0. 328	1. 875±0. 272 [*]	1. 327±0. 213 ^{* *}
		抑制率/ %	33. 64	15. 52	4. 8	14. 5	19. 09
	5	足跖肿胀度/mm	1. 139±0. 255 ^{* *}	1. 78±0. 273	2. 155±0. 278	1. 87±0. 355	1. 324±0. 381 [*]
		抑制率/ %	25. 6	8. 25	2. 36	14. 73	19. 27
吲哚美辛	0. 02	足跖肿胀度/mm	0. 746±0. 098 ^{* *}	1. 235±0. 175 ^{* *}	1. 438±0. 197 ^{* *}	1. 541±0. 209 ^{* *}	1. 171±0. 141 ^{* *}
模型对照		足跖肿胀度/mm	1. 531±0. 154	1. 94±0. 248	2. 207±0. 265	2. 193±0. 356	1. 64±0. 192

与模型对照组比较, 显著性差异^{*} $P < 0. 05$; 极显著性差异^{* *} $P < 0. 01$ 。

表 4 巢脾水提物对炎症组织 PGE₂ 含量的影响
Tab. 4 Effects of water extracts of honeycomb on the content of PGE₂ in the inflammatory tissues in mice
($\bar{x} \pm s$, n= 10)

组 别	剂量/ (g/ kg)	PGE ₂ (OD _{278nm})
中蜂巢脾水提物	15	0. 577±0. 150
	10	0. 442±0. 152 ^{* *}
	5	0. 499±0. 144 [*]
意蜂巢脾水提物	15	0. 568±0. 104
	10	0. 466±0. 129 ^{* *}
	5	0. 427±0. 124 ^{* *}
吲哚美辛	0. 02	0. 445±0. 147 ^{* *}
模型对照	—	0. 697±0. 189

与模型对照组比较, 显著性差异^{*} $P < 0. 05$; 极显著性差异^{* *} $P < 0. 01$ 。

2.4 急性毒性

如表 5 所示, 中蜂巢脾水提物和意蜂巢脾水提

物在给药的 48 h 内, 对小鼠无急性毒性作用产生。

表 5 巢脾水提物对小鼠的致死性
Tab. 5 Mortality of mice for taking the water extracts of honeycomb
($\bar{x} \pm s$, n= 10)

组别	剂量/ (g/ kg)	小鼠 数	实验 1. 4		实验 1. 5		实验 1. 6	
			24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
中蜂巢脾水提物	15	10	0	0	0	0	0	0
	10	10	0	0	0	0	0	0
	5	10	0	0	0	0	0	0
意蜂巢脾水提物	15	10	0	0	0	0	0	0
	10	10	0	0	0	0	0	0
	5	10	0	0	0	0	0	0
吲哚美辛	0. 02	10	—	—	0	1	0	2
	0. 01	10	1	0	—	—	—	—
模型对照	—	10	0	0	0	0	0	0

3 结 语

蜜蜂巢脾水提物对二甲苯致小鼠耳肿胀和角叉菜胶致小鼠足肿胀等急性炎症有显著的抑制作用,对醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增强则无抑制作用。中蜂巢脾水提物和意蜂巢脾水提物对急性炎症表现不同,但是无规律性差异。中蜂巢脾水提物对急性炎症抑制作用表现剂量依赖效应,给药浓度越高则抑制效果越佳。意蜂巢脾提取物则不然,在二甲苯致小鼠耳肿胀实验中,中剂量组效果最佳,其次为高剂量组,低剂量组效果最差。在角叉菜胶致小鼠足肿胀实验中,炎症前期中、高剂量组表现较优,在炎症后期则中、低剂量组的肿胀抑制效果更好。以此推断中蜂和意蜂巢脾水提液成分可能存在差异,且意蜂巢脾水提物对角叉菜胶致

足肿胀的炎症前期和炎症后期产生功效的活性成分也可能不同。蜜蜂巢脾活性成分分析工作尚未全面展开,缺乏分析的理论依据,因此巢脾成分的定性定量分析存在重要意义。

此外,通过比较和分析小鼠足跖注射角叉菜胶 6 h 后,巢脾提取物对足肿胀抑制率和致炎足组织内 PGE₂质量分数的关系,推断巢脾提取物对角叉菜胶致小鼠足肿胀炎症后期的抑制作用可能主要与其对局部炎症组织内 PGE₂合成相关。但是炎症反应涉及众多的炎症介质和白细胞,且不同阶段的作用主体细胞类型和介质也不同,为了合理的阐述蜜蜂巢脾的药理学机理需要更多深入研究。总体而言,蜜蜂巢脾提取物对急性炎症具有显著抑制作用,且毒副作用小甚或无毒,是一种潜在的资源丰富的天然抗炎制剂。

参考文献(References):

[1] 于尔根·陶茨. 蜜蜂的神奇世界[M]. 苏松坤 译. 北京: 科学出版社, 2008: 176- 180.

[2] 陈盛禄. 中国蜜蜂学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 667.

[3] 匡邦郁. 蜜蜂产品成分及其在医疗上的应用[J]. 浙江中医学院学报, 1979, 3(5): 38.

KU ANG Bang-yu. The composition of bee products and apply in medical treatment[J]. **Journal of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine**, 1979, 3(5): 38. (in Chinese)

[4] 李金枝, 何光源. 蜂巢治疗过敏性鼻炎的初探[J]. 中国蜂业, 2008, 59(2): 33.

LI Jin-zhi, HE Guang-yuan. An approach to treating allergic rhinitis with honeycomb[J]. **Apiculture of China**, 2008, 59(2): 33. (in Chinese)

[5] 朱俊彦, 喻庆禄, 邓必麟, 等. 蜂巢药效学研究[J]. 时珍国医国药, 1999, 10(3): 168- 169.

ZHU Jun-yan, YU Qing-lu, DENG Bi-lin, et al. Pharmacodynamics research of the honeycomb [J]. **Lishizhen Medicine and Material Medical Research**, 1999, 10(3): 168- 169. (in Chinese)

[6] 龚 蜜, 徐冰璐. 中、意蜂老巢脾水提液对金黄色葡萄球菌抑制作用的研究[J]. 中国蜂业, 2008, 59(11): 11- 12.

GONG Mi, XU Bing-lu. Study on the inhibitory effect of the dark comb water extracts from Chinese honeybee and Italian honeybee hives on *Staphylococcus aureus*[J]. **Apiculture of China**, 2008, 59(11): 11- 12. (in Chinese)

[7] Olajide Oa, Makinde MJ, Awe So. Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced edema and granuloma tissue formation in rats and mice[J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 1999, 66: 113- 117.

[8] GAO YL, LI GS, LI CM et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of sophocarpine [J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2009, 125: 324- 329.

[9] 高莹莹, 敖明章, 万军梅, 等. 维药刺山柑醇提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中药材, 2007, 30(6): 702- 704.

GAO Ying-ying, AO Ming-zhang, WAN Jun-mei, et al. Study on anti-inflammatory and analgesia effect of alcohol extract of *Capparis spinosa* L. [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2007, 30(6): 702- 704. (in Chinese)

[10] 胡福良, 李英华, 陈民利, 等. 蜂胶醇提液和水提液对急性炎症动物模型的作用[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2003, 29(4): 444- 448.

HU Fu-liang, LI Ying-hua, CHEN Min-li, et al. Study on the effect of propolis extracted by ethanol or water on acute inflammation in animals based on model tests[J]. **Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Sciences**, 2003, 29(4): 444- 448. (in Chinese)

[11] 周光炎. 免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 52- 62.

[12] Cifuentes Da, Simirgiotis Mj, Favier Ls, et al. Anti-inflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice[J]. **Phytotherapy Research**, 2001, 15: 529- 531.

[13] Yonathan M, Asres K, Assefa A, et al. In vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Cheilanthes farinosa* [J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006, 108: 462- 470.