

蜂胶环糊精包合最佳工艺优选及 对小鼠辐射损伤的保护作用研究

郭建友¹, 霍海如^{1*}, 李昌煜²

(1. 中国中医研究院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700; 2. 浙江中医学院, 浙江 杭州 310053)

[摘要] 目的: 优选出蜂胶环糊精最佳包合工艺并考察其对小鼠辐射损伤的保护作用。方法: 以总黄酮含量为指标, 选用 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行实验, 优选 β -环糊精包合蜂胶的最佳工艺; 以该蜂胶环糊精包合物为实验药物, 以 ^{60}Co γ 射线照射造成小鼠辐射损伤, 观察小鼠 30 天内存活时间, 并进行常规白细胞计数及硫代巴比妥酸法测定肝脏中脂质过氧化物含量。结果: β -环糊精包合蜂胶的最佳工艺条件是: 蜂胶: β -CD 比例为 1: 2, 乙醇浓度为 95%, 水浴温度为 50 $^{\circ}\text{C}$; 与模型组比较, 蜂胶能显著延长小鼠辐射后 30d 内存活时间 ($P < 0.01$)、提高小鼠外周血白细胞数 ($P < 0.01$)、降低肝脏脂质过氧化物含量 ($P < 0.01$)。结论: 蜂胶对辐射损伤具有保护作用。

[关键词] 蜂胶; 总黄酮; β -环糊精; 辐射损伤

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)01-0039-03

Research on Optimum Technology of Preparation Propolis Wrapped with β -cyclodextrin and Its Protective Effect on Radiation Injury in Rats

GUO Jian-you¹, HUO Hai-ru^{1*}, LI Chang-yu²

(1. Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700, China; 2. Zhejiang College of TCM, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To study the optimum technology of preparation propolis wrapped with β -cyclodextrin (β -CD) and its protective effect on radiation injury in rats. **Methods:** Using orthogonal design method to optimize the technology of preparation propolis wrapped with β -CD, and the amount of flavone was used as a parameter evaluating outcome. Survival duration in 30 days, WBC and MDA were measured in rats after exposed to γ -radiation of 7 Gy. **Results:** The optimum conditions is: ratio of Propolis to β -cyclodextrin is 1 to 2, bathing temperature at 50 degrees Celsius and 95 percent alcohol; compared with the model group, survival duration in 30 days and WBC were increased significantly ($P < 0.01$), the amount of MDA was decreased markedly ($P < 0.01$) in propolis treated group. **Conclusion:** propolis showed the effective of protecting radiation injury.

[Key words] propolis; flavone; β -cyclodextrin; radiation injury

蜂胶是蜜蜂从植物幼芽及树干上采集的树脂并混入其上颚腺分泌物和蜂蜡等加工而成的一种具有芳香气味的胶状固体物。蜜蜂将它涂布于整个蜂巢, 用以加固和堵封蜂巢, 能使阴暗潮湿的蜂巢呈现无菌状态, 花粉、蜂蜜、蜂皇浆不会腐败。蜂胶具有

复杂的化学成分, 最大特点是含有丰富的黄酮类和萜烯类物质, 它们赋予了蜂胶许多奇妙而独特的生物学作用。黄酮类化合物在蜂胶中含量最高, 达到 15% 左右, 目前从蜂胶中分离出的黄酮类化合物已有 40 多种^[1-4]。蜂胶成分复杂、作用广泛, 它是天然广谱抗生物质和珍贵的免疫增强剂。在日用百货、食品等方面已得到广泛应用, 但其对辐射损伤保护作用的报道并不多见, 而且蜂胶粘稠, 难溶于水,

[收稿日期] 2005-03-18

[通讯作者] 霍海如, Tel: (010) 64041008; E-mail: hrhuo@sohu.com

不易直接进行动物实验。为了探讨蜂胶对辐射损伤的保护作用,我们首先以 β -环糊精包合蜂胶,提高其溶解度,掩盖蜂胶本身苦味;在此基础上,观察了蜂胶包合物对小鼠辐射损伤的影响,为蜂胶在预防辐射损伤上的应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 粗蜂胶颗粒(杭州灵芝养蜂场), β -环糊精(β -CD)粉末型(中国医药集团上海试剂公司),芦丁标准品(中国药品生物制品检定所),维生素 E(大连水产制药厂),硫代巴比妥酸(上海第二试剂厂),其它实验试剂均为分析纯。

1.2 动物 昆明种小鼠,体重 18~22g,雌雄各半,由中科院上海实验动物中心提供(动物合格证号:中科动管第 013 号)。

1.3 仪器 电子分析天平(瑞士梅特勒公司),紫外可见分光光度计(美国 PE 公司),磁力搅拌器(德国 IKA),倒置显微镜(日本 Olympus), ^{60}Co γ 射线辐射源(浙江省农科院)。

2 实验方法和结果

2.1 蜂胶粗颗粒的提取工艺研究及结果

2.1.1 工艺研究 鉴于蜂胶的主要有效成分为黄酮类化合物,本实验选择总黄酮为指标,对 β -CD 包合蜂胶的工艺进行优选。选定蜂胶与 β -CD 的比例、乙醇浓度、水浴温度作为考察因素,因素水平安排见表 1。选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表,进行三因素、三水平的九次正交试验,正交实验安排见表 2。

2.1.2 操作步骤 将 5 倍体积的 95% 乙醇溶液加入蜂胶粗颗粒中,每日振摇 2 次,在常温下浸渍 72h 后收集浸出液。加入等量 95% 乙醇重复上述操作,合并两次浸出液于 4℃ 放置 12h,过滤后减压蒸馏,其浓缩物呈褐色,为具有一定纯度的蜂胶。取 β -CD 10g,加入适量的蒸馏水(约 15 倍量)制成饱和溶液,置于恒温水浴中预热。以一定量的蜂胶溶于不同浓度的乙醇中,将蜂胶的乙醇混合溶液缓缓加入 β -CD 溶液中,在水浴中恒温磁力搅拌 30min。然后置于冰箱中 4℃ 冷藏 24h,分别用少量蒸馏水及无水乙醇洗涤包合物,使其至无挥发油气味,45℃ 真空干燥至恒重,得到 β -CD 包合物,为褐色粉末,以正交表安排实验。根据黄酮类化合物与 5% NaNO_2 和 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 反应后,产物在 1mol/L NaOH 溶液中形成一红色产物,510nm 左右有一最大吸收峰,以芦丁为对照品检测蜂胶包合物中总黄酮的含量。

表 1 正交实验因素水平表

水平	因 素		
	蜂胶: β -CD (A) g: g	乙醇浓度 (B) %	水浴温度 (C) ℃
1	1: 1	75	50
2	1: 2	85	60
3	1: 3	95	70

2.1.3 实验结果 由 3 方差分析结果表明可知,因素 A 对试验结果有非常显著的影响,因素 B 对试验结果有显著影响,因素 C 则对试验结果的影响不显著。由表 2 的简单计算可以看出, A 因素对 β -环糊精的量影响最为显著, $K_{2a} > K_{3a} > K_{1a}$, 故因素 A 选择水平 2, 即蜂胶: β -CD 比例为 1: 2; 因素 B 对试验结果的影响也较显著, $K_{3b} > K_{2b} > K_{1b}$, 故选择 B3 水平即乙醇浓度为 95%; C 因素不是显著性因素 $K_{1c} > K_{2c} > K_{3c}$, 因此选择 C1 水平, 即水浴温度为 50℃。得最佳工艺条件为 $A_2B_3C_1$, 即蜂胶: β -CD 比例为 1: 2, 乙醇浓度为 95%, 水浴温度为 50℃。

表 2 β -CD 包结工艺正交实验测定结果 $L_9(3^4)$

试验号	列 号				总黄酮含量 (mg/mL)
	1	2	3	4	
	因 素				
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	11.05
2	1	2	2	2	11.85
3	1	3	3	3	12.09
4	2	1	2	3	13.35
5	2	2	1	1	14.26
6	2	3	3	2	14.28
7	3	1	3	2	12.21
8	3	2	1	3	12.55
9	3	3	2	1	13.05
K1	11.663	12.213	12.627	12.787	
K2	13.963	12.877	12.750	12.780	
K3	12.603	13.140	12.853	12.633	
R	2.3	0.927	0.226	0.154	

表 3 总黄酮含量方差分析

方差来源	离差平方和	自由度	F 值
A	8.023	2	276.65 ²⁾
B	1.408	2	48.55 ¹⁾
C	0.077	2	2.65
误差 e	0.030	2	

$$F_{0.05(2,2)} = 19.00, F_{0.01(2,2)} = 99.00。$$

2.2 蜂胶对辐射损伤的保护作用研究

2.2.1 实验方法 昆明种小鼠 160 只, 体重 18~22g, 6~8 周龄, 雌雄各半。随机均匀分为 4 组, 每组 40 只, 分别为空白对照组、辐射损伤组、蜂胶试验组和阳性对照组。空白对照组和辐射损伤组灌服 β -CD 饱和溶液, 试验组灌服蜂胶的环糊精包合物, 给药剂量为 10g/kg; 阳性组灌服维生素 E, 剂量为 2.5g/kg。给药 7d 后, 辐射损伤组、试验组和阳性对照组均以同一剂量 ^{60}Co γ 射线照射一次, 照射剂量选择在 7Gy, 辐射速度为 1Gy/min。照射后各组继续给予相应的药物, 连续 30d。照射后第 3d, 各组取 10 只小鼠进行眼眶取血, 采用常规细胞计数测定白细胞计数(WBC); 然后处死小鼠, 取出肝脏, 粉碎肝脏组织后, 采用硫代巴比妥酸法测定肝脏中脂质过氧化物(MDA)含量^[5]。各组余下小鼠观察小鼠 30d 内存活时间。

2.2.2 实验结果 与正常组比较, 损伤组、蜂胶组、阳性对照组小鼠 30d 存活时间均显著下降 ($P < 0.01$), 蜂胶组与阳性对照组白细胞计数降低 ($P < 0.05$), 损伤组白细胞计数显著降低 ($P < 0.01$), 各组脂质过氧化物含量均显著增高 ($P < 0.01$)。与损伤组比较, 蜂胶组 30d 内存活时间延长 ($P < 0.01$), 白细胞数显著升高 ($P < 0.01$), 血浆中脂质过氧化物含量明显降低 ($P < 0.01$)。结果见表 4。

表 4 蜂胶对 ^{60}Co γ 射线辐射 3d 后小鼠白细胞计数(WBC)、脂质过氧化物含量(MDA)及 30d 内存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	WBC ($\times 10^9/L, n=10$)	MDA ($\text{nmg}/100\text{mg}, n=10$)	30d 存活时间 (d, $n=30$)
正常对照组	10	8.79 \pm 1.06	89.53 \pm 7.53	30.0 \pm 0.0
损伤组	10	3.32 \pm 0.82 ²⁾	199.12 \pm 8.43 ²⁾	12.8 \pm 10.7 ²⁾
蜂胶组	10	6.86 \pm 0.93 ^{1,4)}	124.39 \pm 7.58 ^{2,4)}	18.3 \pm 7.4 ^{2,4)}
阳性组	2.5	7.13 \pm 0.76 ^{1,4)}	109.64 \pm 8.7 ^{2,4)}	20.5 \pm 5.3 ^{2,4)}

注: 与正常对照组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与损伤组比较: ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

由于蜂胶是一种极其粘稠的物质, 不溶于水, 且有特殊苦味和气味, 对小鼠进行药理实验操作时比较困难。我们在本次实验中, 以 β -环糊精包合蜂胶, 得到的蜂胶包合物易溶于水, 因此进入体内后有利于蜂胶的吸收; 而且能掩盖蜂胶的苦味和气味, 容易对小鼠进行灌胃等操作; 同时其有效成分总黄酮含

量也能达到实验的预期要求, 为药理实验打下了良好的基础。

辐射损伤的机理是电离辐射作用于生物体生物膜、酶、核酸等, 引起一系列自由基损伤反应。使辐射的动物生存时间缩短; 损伤粒细胞的脱氧核糖核酸或抑制其生成, 影响粒细胞增殖, 引起外周粒细胞减少; 线粒体膜中不饱和脂肪酸含量较高, 易受到自由基的攻击而产生脂质过氧化物。脂质过氧化物是机体在照射后主要的辐射性毒物, 照射后机体尚未发现任何损伤时, 它就已经产生, 因此它既是辐射后的产物, 又能加重辐射损伤^[6-7]。本实验中, 蜂胶能延长小鼠辐射后 30d 内存活时间、提高照射损伤后白细胞数和降低肝脏中脂质过氧化物含量, 提示其具有一定的抗辐射作用。根据报道^[8-9], 蜂胶能增加补体和吞噬细胞的活力, 促进细胞分化、增殖, 提高粒细胞数量, 清除氧自由基, 保护细胞膜免受过氧化物的攻击。这可能是蜂胶抗辐射作用的途径, 但其具体的作用机制尚有待于进一步探索。

[参考文献]

- [1] 房柱. 蜂胶-黄酮化合物的宝库[J]. 蜜蜂杂志, 1998, 18(9): 11-13.
- [2] 潘建国. 试论蜂胶调节血脂的机理与新进展[J]. 蜜蜂杂志, 2004, 24(8): 26-27.
- [3] 杨林莎, 秦文杰, 马开, 等. 蜂胶滴丸的制备及其黄酮类化合物的测定[J]. 中成药, 2004, 26(9): 770-771.
- [4] Isla MI, Paredes-Guzman JF, Nieva-Moreno MI, et al. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(4): 1166-1172.
- [5] 赵超英, 李瑞午, 吴绪敏, 等. 原花青素对大鼠离体肝细胞的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(04): 45-46.
- [6] 刘家浩, 王伟, 唐月华, 等. 辐射诱导白血病细胞凋亡的时程、剂量效应及 zVAD-fmk 对凋亡的抑制作用[J]. 现代医学, 2004, 32(6): 366-369.
- [7] Tahara S, Kaneko T. Susceptibility of mouse splenic cells to oxidative DNA damage by x-ray irradiation [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(1): 105-108.
- [8] 梁晓芸, 聂木海, 诸茂盛. 蜂胶胶囊对小鼠的毒性及对体内 SOD 酶、MDA 含量的影响研究[J]. 现代预防医学, 2002, 29(4): 506-507.
- [9] 曹炜尉, 陈锦屏. 蜂胶对氧自由基致鼠红细胞膜损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 118-120.