

第十一屆海峽兩岸
蜜蜂與蜂產品研討會論文集

2016年8月23日

國立中興大學社館大樓 B1 國際會議廳

杜武俊 吳明城 林峻賢 主編

呂庭萱 美編

主辦單位

台灣蜜蜂與蜂產品學會

台灣養蜂協會

中國養蜂學會

協辦單位

國立中興大學昆蟲系

國立台灣大學昆蟲系

國立宜蘭大學生物科技與動物科技系

國立虎尾科技大學生物科技系

台灣蜜蜂與蜂產品學會 編印

2016年08月出版

Proceedings of the Symposium on the Honey Bees and Bee Products

Held at National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan

Edited by

Wu-Chun Tu, Ming-Cheng Wu, Chun-Hsien Lin

Cover designed by

Ting-Hsuan Lu

Published by the

Taiwan Apicultural Society

August, 2016

2016 第十一屆海峽兩岸蜜蜂與蜂產品研討會議程

時間	議程	題目	主持人
08:30 ~ 09:00	報到		
09:00 ~ 09:30	開幕 致詞	開幕及貴賓致詞	林峻賢 秘書長
		台灣蜜蜂與蜂產品學會 理事長致開幕詞	
		台灣養蜂協會理事長致詞	
		中國養蜂學會代表團團長致詞 中興大學農業暨自然資源學院 院長致歡迎詞	
09:30 ~ 09:50	大會合照 與 茶點時間		
09:50 ~ 10:40	專題 演講	蜂王漿主蛋白 1 對高血壓模型小鼠血管平滑肌細胞 的調節作用及作用機制的蛋白質組學研究 李建科 研究員 中國農業科學院蜜蜂研究所	陳黎紅 秘書長
10:40 ~ 11:30		利用 GC-IMS 技術鑑別農畜產品 陳裕文 教授 宜蘭大學生物技術與動物科學系	何鎰光 教授
11:30 ~ 12:00	特別 演講	第 26 屆國際 APIMONDIA 養蜂大會紀實 安奎 榮譽教授 明新科技大學	杜武俊 理事長
12:00 ~ 13:30	午餐		
13:30 ~ 13:50	學術 報告	五種蜂花粉氨基酸分佈及破壁前後氨基酸變化 張紅城 研究員 中國農業科學院蜜蜂研究所	李建科 研究員
13:50 ~ 14:10		蜜蜂病蟲害風險評估研究現狀與發展趨勢 余林生 教授 安徽農業大學動物科技學院	
14:10 ~ 14:30		臺灣林地養蜂芻議 趙榮台 研究員 林業試驗所森林保護組	陳裕文 教授
14:30 ~ 14:50		The studies of aging and longevity in honeybees (<i>Apis mellifera</i>) 徐錦源 教授 長庚大學生物醫學系	
14:50 ~ 15:10	茶點時間		
15:10 ~ 15:30	學術 報告	蜂膠活性成分對腦中風的防治作用 孫麗萍 研究員 中國農業科學院蜜蜂研究所	余林生 教授
15:30 ~ 15:50		不同移蟲日齡蜂王卵巢蛋白組學研究 吉挺 研究員 揚州大學動物科學與技術學院	
15:50 ~ 16:10		《中國蜂業》雜誌發展歷程 方兵兵 研究員 中國農業科學院蜜蜂研究所	

16:10 ~ 16:30	學術 報告	以常壓下化學遊離質譜法鑑定蜂蜜之蜜源與產地 彭及忠 教授 虎尾科技大學生物科技系	安奎 教授
16:30 ~ 16:50		台灣城市養蜂推行與社區營造-以臺北為例 江敬皓 教授 德霖技術學院休閒事業管理系	
16:50 ~ 17:10		台灣北部野生蜜蜂(<i>Apis cerana</i>)養殖 陳柏融 負責人 川樹蜜蜂生態農場	
17:10 ~ 17:25	學術 報告	利用小鼠 PTSD 動物模式探討台灣綠蜂膠抗焦慮之 效果及 CRMP1 基因影響恐懼記憶之固化 陳怡伶 教授 宜蘭大學生物技術與動物科學系	杜武俊 理事長
17:25 ~ 17:40		養蜂是貧困山區農民脫貧致富的捷徑 王建梅 秘書 中國養蜂學會	
17:40 ~ 17:55		回眸海峽兩岸蜂業交流合作 陳黎紅 研究員 中國養蜂學會	
18:30	晚宴		

序 一

蜜蜂是上天最神奇的創造，化石記錄顯示蜜蜂遠在一億三千萬年前的白堊紀就已經出現。而大自然因為有了蜜蜂的授粉，不但直接豐富了整個生態系、也間接促成了生物的多樣性；地球正因為有了蜜蜂如此的貢獻，方能充滿盎然生機。當人類發展出智慧時，馬上汲取了蜜蜂的社會性優點，魚牧、農耕正有如蜜蜂的採粉、採蜜；神農氏嘗百草的過程，彷彿蜜蜂尋覓適合蜂膠植物歷程。至今，其族群內豐富有趣的訊息溝通、嚴謹分明的社會行為、以及許多內在的神經生理、族群遺傳、個體免疫、群體防禦等特質，均足為人類研究、師法的大自然導師。更不用說人們懂得養殖蜜蜂後，蜂蜜、花粉、蜂膠、蜂王漿等具有益壽養生功效的珍貴天然食品，以及蜂蠟、蜂毒等可資應用的蜂產品，逐漸在人類技術發展之下，成為一般民眾普遍接受的健康食品。

正當蜂產品成為熱門產業項目時，「蜂群崩解失調」現象的出現，不但嚴重影響依賴蜜蜂授粉繁殖的植物，也造成蜂產品生產的危機，雖然其原因，仍眾說紛紜，但是根據科學家的歸納，主要仍指向人類直接、間接對於自然環境的破壞，造成蜜蜂生存環境與蜂產品生產的惡化；這現象對於蜜蜂產業的負面效應，正隨著時間而逐步顯現。在面對自然環境對於養蜂產業的挑戰時，因為產業經濟規模的擴大，良莠不齊產品的混充，對於產業管理發展的壓力亦同時發生。因此，如何保存傳統養蜂技術的優點，投入科學管理技術，擴大以生理為基礎的蜜蜂學術研究課題；使得蜂產品從生產質量的提升、附加價值的創新、產銷方式的多元，達到開創整體產業規模與價值的新局，均是本學會關注與努力的方向。

海峽兩岸蜂學交流緣起於何鎧光教授、謝豐國博士與中國農科院蜜蜂研究所張復興所長等人的倡議，並於 1994 年 4 月由福建省蜜蜂研究學者多人組團來台考察；代表團繆曉青所長、高文仲副團長與何鎧光教授、安奎教授提議舉辦海峽兩岸蜜蜂生物學研討會，促成了

2000 年於苗栗區農業改良場舉辦首屆"兩岸蜜蜂生物學研討會"。自此，輪流在兩岸城市舉辦了十屆研討會，本屆（第十一屆）循例由台灣養蜂協會與本學會共同主辦，並由中興大學、台灣大學、宜蘭大學、虎尾科技大學等學校共同協辦。承蒙兩岸籌備同仁的努力，有關會前學者的聯繫，時間場地安排，研討會主題等工作，都能縝密規劃，協調執行，充分展現歷年來所累積的交流成果。

本屆廣邀兩岸蜂學 30 多位專家共襄盛舉，研討會內容豐富多元，從蜜蜂生物學到蜂產品面，皆有涵蓋，相信可以讓與會人員，透過不同主題，開拓視野，交換經驗心得。除此之外，研討會後亦安排數天的養蜂業參訪，期能兼顧理論實務交流，推昇兩岸養蜂產業競爭力。為將此次研討會寶貴成果留下紀錄，特將論文集結成冊，做為研討會專刊，期望藉以廣泛流傳，讓更多人可以深入瞭解有關蜜蜂與蜂產業的資訊。對此，本人謹代表學會，感謝諸位專家熱忱的奉獻與專業付出、感謝台灣養蜂業者熱情贊助幫忙，並期許本次交流研討會議，對於蜂學的研究與推展，帶來正面與實質的量能。

台灣蜜蜂與蜂產品學會 理事長

杜武俊 謹識

2016 年 8 月 14 日

序 二

海峽兩岸蜜蜂與蜂產品研討會，這個兩岸蜂界交流盛事，自 2000 年首次於苗栗區農業改良場舉辦，迄今已堂堂邁入第十一屆。今年很榮幸由台灣養蜂協會與台灣蜜蜂與蜂產品學會共同主辦，首先感謝兩岸科研專家學者，分享多年研究成果，使論文集內容更為豐富充實。更要感謝不辭舟車勞頓，遠道來訪的大陸友人，使本次研討會更臻完美。

台灣地處亞熱帶，氣候溫暖，非常適合養蜂。然而近年因氣候變遷對環境生態所造成的衝擊、蜜蜂病蟲害與農藥施作對蜜蜂的影響等因素，使養蜂產業面臨前所未有的挑戰。解決此問題，端賴產、官、學三方合作，而海峽兩岸蜜蜂與蜂產品研討會便提供一個絕佳平台，使兩岸蜂界產、官、學界人員得以齊聚一堂，共同尋求解決之道。同時，更可藉由研討會開拓雙方視野並學習彼此長處，在科研交流與產業技術之提升，共同攜手努力並進。

最後，身為台灣養蜂界代表，期許未來兩岸養蜂產業持續交流，在養蜂技術與蜂產品之研發更加精進，提升養蜂業之生產力與競爭力，進而活絡產業發展，為這甜蜜產業再創新局。

台灣養蜂協會理事長

江順良 謹識

2016 年 8 月 10 日

目錄

1. Functional and Proteomic Investigations Reveal Roles of Major Royal Jelly Protein 1 in Anti-hypertension in Mouse Vascular Smooth Muscle Cell	1
Pei Fan, Bin Han, Mao Feng, Yu Fang, Lan Zhang, Han Hu, Yue Hao, Yuping Qi, Xiaozhen Zhang, Jianke Li*	
2. 利用氣相層析-離子泳動光譜分析技術 (GC-IMS) 快速鑑別農畜產品	25
陳裕文*、魏于凡	
3. 參加第 26 屆國際 APIMONDIA 養蜂大會紀實	26
安奎	
4. 五種蜂花粉氨基酸分布及破壁前後氨基酸變化	32
張紅城	
5. 蜜蜂病蟲害風險評估研究現狀與發展趨勢	45
余林生*、李耘、張友華、李方東、劉芳、汪天澍、施騰飛、齊磊	
6. 臺灣林地養蜂芻議	60
趙榮台	
7. 蜜蜂(<i>Apis mellifera</i>)老化及長壽機轉之研究	61
徐錦源*、呂政諺	
8. 蜂膠活性成分對腦中風的防治作用	71
孫麗萍	
9. 不同移蟲日齡蜂王卵巢蛋白組學研究	86
吉挺*、龐倩、王瑩、沈芳、孟祥金、牛慶生	
10. 蜂膠醇提物脂質體製備及表征	108
郭夏麗、藍雅惠、鄒藝紅、李熊、羅麗萍*	
11. 蜂膠醇提物微膠囊製備及表征	121
郭夏麗、藍雅惠、鄒藝紅、李熊、羅麗萍*	
12. 以常壓下化學游離質譜法鑑定蜂蜜之蜜源與產地	137
彭及忠*、沈振峯、吳宗元	
13. 臺灣北部野生蜜蜂(<i>Apis cerana</i>)養殖	138
陳柏融	
14. Beekeeping Development in the World	139
Xu Ming, Chen Lihong*, Siriwat Wongsiri	
15. 《中國蜂業》雜誌發展歷程	153
方兵兵*、劉世麗	

16. 养蜂是贫困山区农民脱贫致富的捷径	159
王建梅、陈黎红*、吴杰、胡玘玘、齐烟舟、刘雪菊	
17. 中蜂授粉对蓝莓产量及品质的影响	166
韦小平、林黎、徐祖荫、何成文、孙秋*、杨丰	
18. 新疆南疆蜂业发展现状及建议	174
阿衣努尔.尤里达西	
19. 利用小鼠 PTSD 動物模式探討台灣綠蜂膠抗焦慮之效果及 CRMP1 基因影響恐懼記憶之固化	183
吳學府、余思賢、陳怡伶*	
20. 台灣西洋蜜蜂種源品系調查	207
吳明城、呂庭萱、路光暉*	
21. 蜂毒胜肽 Mastoparan-AF 對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株之抗菌效能	213
林峻賢、杜武俊*	
22. 台灣城市養蜂推行與社區營造-以台北為例	217
江敬皓、蔡明憲	

(以投稿作者演講時間為主要編排順序，其次則以交稿時間)

Functional and Proteomic Investigations Reveal Roles of Major Royal Jelly Protein 1 in Anti-hypertension in Mouse Vascular Smooth Muscle Cell

Pei Fan^{1,2}, Bin Han¹, Mao Feng¹, Yu Fang¹, Lan Zhang², Han Hu², Yue Hao², Yuping Qi²,
Xiaozhen Zhang², Jianke Li^{1,*}

* Corresponding author

1. Institute of Apicultural Research/Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China

2. College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

Abstract

Royal jelly (RJ) is widely reported to have anti-hypertensive effects. As the most abundant RJ protein, the function and mechanism of major royal jelly protein 1 (MRJP1) regulating blood pressure still remains largely unknown. Hence, a cellular model that vascular smooth muscle cells (VSMC) of mouse with delivered *mrjp1* was created to investigate the functionality and mechanism of MRJP1 modulating hypertension. Consequently, *mrjp1* was expressed at both RNA and protein levels. MRJP1 significantly reduced VSMC contraction, migration and proliferation, suggesting its vital roles in decreasing hypertension. To achieve such function, the proteome setting of mouse VSMC was changed. Among 675 differential proteins of 6,380 identified (3,058 groups), 646 were down-regulated. They were significantly enriched essential pathways implicated in muscle filament sliding, actin filament polymerization and assembly, and ATPase activity, which manifests the fact that the diminished VSMC contraction and migration drive the reduction of blood pressure. The significantly enriched carbohydrate/nucleoside metabolic processes, RNA splicing and transport by the down-regulated proteins indicate the lowered VSMC proliferation lessens blood pressure. The data gain functional and mechanistic understanding of MRJP1 in anti-hypertensive activity in VSMC via a new genetic model. This offers a promising avenue to control hypertension by gene-therapy approach using bee-products.

Keywords: Major royal jelly protein 1; Vascular smooth muscle cell; Hypertension

This work is supported by China Postdoctoral Science Foundation Grant (2014M550908), Agricultural Science and Technology Innovation Program (CAAS-ASTIP-2015-IAR) in China, National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31402026) and the earmarked fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (CARS-45) in China. We thank Katrina Klett for her language help with the manuscript.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) severely jeopardize human health and victimize the largest number of people (17.5million deaths per year) among all diseases worldwide ^[1]. Particularly, hypertension, one of the major causes for CVDs, was assessed the leading risk factor for global disease burden ^[2]. Vascular smooth muscle cells (VSMCs), the main cellular constituents of blood vessels, are localized in the tunica media and control vascular contraction/relaxation, thus determining blood pressure ^[3]. Normally, there are two types of VSMCs in blood vessels, proliferating or contractile ones. The differentiated VSMCs from proliferating to contractile type usually happen with the high expression of specific marker genes, including smooth muscle actin α (α SMA), smooth muscle protein 22 α (SM22) and calponin^[4, 5]. Therefore, the VSMC contractile ability can be determined by the expression levels of these markers. Also, the VSMC proliferating ability is closely related to blood pressure regulation^[6]. The increasing number of VSMCs in blood vessels is regarded as a major contributor to the thickness of the blood vessel wall in vascular remodeling, which is a major driving force of increasing contraction in blood vessels, thus in turn driving the blood pressure to be up regulated ^[7]. Consequently, VSMC contraction and proliferation are widely referred to as the key elements that regulate the blood pressure. Moreover, abnormal proliferation and migration of VSMCs may eventually result in atherosclerosis ^[8, 9], another severe cardiovascular disease that also has a close relationship to hypertension. It is known that blood pressure can also be regulated by endogenous and/or exogenous molecules *in vivo* ^[10, 11]. This provides potentials to regulate VSMC contraction, proliferation and migration using specific molecules, such as genes and proteins, for the safe and effective treatment of hypertension.

Royal jelly (RJ), a well-known functional food secreted by the hypopharyngeal and mandibular glands of honey bee workers, has documented wide ranges of biological activities in promoting human health, including anti-hypertension, anti-tumor, anti-infectious and anti-oxidative effects ^[12]. It is known that proteins are the main constituents of royal jelly, accounting for more than 50% of its dry weight. Particularly, major royal jelly proteins (MRJPs) 1-9 are >80% of the protein components, among which MRJP1 is of the highest abundance, consisting approximately 31% of the MRJPs and 48% of the water soluble proteins in RJ with a molecular weight of 55-57 kDa ^[13-15]. Given the importance of MRJP1 for honeybee biology and human health promotion, several works have characterized the biochemical nature of MRJP1 in recent years ^[12, 16]. For honeybees, continuous ingestion of RJ is required for the formation of queen from larva, in which MRJP1 plays the dominate role in determination of larval fate, either

developing into queen or worker bees ^[17], indicating that MRJP1 is the most pivotal functional composition in RJ. In regards to the regulation of hypertension, it is reported that enzymolysis fragments of RJ proteins are capable of down regulating blood pressure in hypertensive animal models ^[18,19], however the specific component works are still unknown. Only very recently work reports that glycosylated MRJP1 has a potential in regulating the blood pressure ^[12]. How and which specific MRJPs, however, regulate blood pressure at cellular and molecular levels still remain to be discovered.

Viral vectors are commonly used as robust tools in delivering specific genes into the mammalian cells, which are characterized by high efficiency, low toxicity and strong targeting ^[20]. Thus, it is usually applied as a promising channel in the area of gene therapy to treat human diseases ^[21]. To fill the knowledge gap of how MRJP1 functions in control of blood pressure, the present work was performed in the aim of illuminating the function and mechanism of blood pressure regulation by the expressed MRJP1 in the mouse VSMC genome by integrated *mrjp1* gene (*A. m. ligustica*). This offers a potentially new avenue to treat the hypertension disease using natural bee products.

Results

Lentivirus can deliver *mrjp1* into mouse VSMC genome

In an effort to deliver *mrjp1* into the mouse VSMC genome, the coding sequence (CDS) of *mrjp1* (*A. m. ligustica*) was inserted into the multiple cloning site of the lentiviral vector as shown in Fig.1A. The successfully transduced VSMCs by the lentivirus were able to express EGFP (Fig.1B). The CDS of *mrjp1* was amplified by PCR and visualized on agarose gel. As expected, no band was found in the control VSMCs (Fig.1C). Comparing to EGFP, the mRNA expression level of MRJP1 was slightly higher but without a statistically significant difference. Noticeably, melting curve was performed to ensure the specificity of MRJP1 mRNA amplification (Fig.1D). In the *mrjp1* CDS delivered VSMCs, the unique peptides (LTSNTFDYDPK and EALPHVPIFDR) of MRJP1 were detected by LC-MS/MS analysis and searched against the protein database of *Apis mellifera* (Fig.1E). In contrast, no such peptides of MRJP1 were found in the control VSMCs, indicating mRNA of *mrjp1* gene can be translated into the corresponding protein of MRJP1 in VSMCs. Altogether, the CDS of *mrjp1* gene was able to be integrated into the VSMC genome and transcribed into mRNA that was finally translated to MRJP1.

Expressed MRJP1 inhibits mouse VSMC contraction

To determine the role of MRJP1 regulating VSMC contractibility, a collagen gel contraction assay was performed for control and MRJP1 expressed VSMCs. The contraction index of MRJP1 expressed VSMC was significantly lower than that of the control, showing that the contractibility of mouse VSMC was down-regulated by MRJP1 (Fig.2A). Moreover, the expression levels of α SMA, SM22 and calponin (Fig.3B) by Western blotting analysis showed that all these VSMC markers that determine VSMC contraction and differentiation were found to be significantly down regulated in MRJP1 expressed VSMCs. In addition, α SMA expression in VSMC was significantly down regulated by MRJP1 through an immunofluorescence assay. Altogether, mouse VSMC contractibility was reduced by MRJP1.

Expressed MRJP1 decreases mouse VSMC migration

To compare the VSMC migrating abilities between control and MRJP1 expressed VSMCs, a wound healing assay was applied. The migration indexes of MRJP1 expressed VSMC were significantly reduced after 6 h and 12 h relative to those in the control, respectively (Fig.2C), indicating MRJP1 could suppress the migrating ability of mouse VSMC.

Expressed MRJP1 hinders mouse VSMC proliferation

To examine the function of MRJP1 in regulating VSMC proliferating ability, a cell number counting assay for control and MRJP1 expressed VSMCs was carried out. The cell numbers of MRJP1 expressed VSMC at 24 h, 48 h and 72 h were significantly reduced relative to controls (Fig.2B). Moreover, the expression level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in MRJP1 expressed VSMCs was significantly reduced compared to controls by Western blotting analysis (Fig.3B). This evidence suggests that mouse VSMC proliferative ability is inhibited by MRJP1.

Expressed MRJP1 in mouse VSMC significantly alters its proteome setting

To determine the proteome setting change by the expression of MRJP1, a state of the art MS-based proteomics was performed. Subsequently, 6,380 proteins (3,058 protein groups) were identified in both control and MRJP1 expressed VSMCs, 675 ones (after redundancy removal) were found to have significantly altered their expression levels (fold change ≥ 1.5 and $p < 0.05$). Noticeably, among those 675 differential proteins between two samples, 646 were down-regulated in MRJP1 expressed VSMCs whereas only 29 were up-regulated. By GO term categorization, the down-regulated proteins were significantly enriched into 31 major functional groups containing 148 pathways. For instance, pathways of muscle filament sliding, regulation of actin polymerization or depolymerization and glycosyl compound metabolic process were

included. However, the up-regulated proteins were only significantly enriched into one pathway (the pathway of mineral absorption). The expression levels of specific markers of VSMC and PCNA also showed similar trends as they did in the Western blotting analysis. Specifically, the expression level of α SMA, calponin and PCNA were found significantly down-regulated in MRJP1 expressed VSMCs in both proteomics and Western blotting analysis. SM22, or transgelin, was significantly down-regulated by Western blotting analysis. Instead, SM22 homolog, or transgelin-2, was significantly down-regulated in proteomics analysis (Fig.3A).

Expressed MRJP1 in mouse VSMC induces down regulation of blood pressure pathways related to VSMC contraction, migration and proliferation

To elucidate the mechanism of MRJP1 regulating VSMC functionalities, a series of bioinformatic tools were used based on a list of differentially expressed proteins. Furthermore, these proteins were significantly enriched to pathways related to VSMC contraction, including muscle filament sliding ($p=0.028019$) and myosin-actin filament sliding ($p=0.041833$). Meanwhile, the functional group relevant to VSMC contraction and migration was also found significantly enriched with actin filament activity. The leading term of actin filament activity was “regulation of actin polymerization or depolymerization ($p=7.38\times 10^{-4}$)”. Furthermore, pathways closely related to VSMC proliferation, including carbohydrate/nucleoside metabolism, RNA splicing and RNA transport, were significantly enriched. The leading terms of these groups were “glycosyl compound metabolic process ($p=2.91\times 10^{-10}$)”, “spliceosome ($p=1.51\times 10^{-12}$)” and “nucleic acid transport ($p=3.97\times 10^{-5}$)”, respectively (Fig.4B). All the significantly enriched pathways were shown in Table S4. For the down-regulated proteins in the PPI networks, 109 terms were significantly involved (Table S5). Especially, terms related to VSMC proliferation, including “glycosyl compound metabolic process ($q=0.00028$)”, “mRNA splicing, via spliceosome ($q=0.015$)”, “nucleic acid transport ($q=0.00016$)” and ATPase activity ($q=0.0012$), were significantly enriched (Fig.5B, D, F & H). The important down-regulated proteins in some essential pathways were highlighted by KOBAS mapping in Fig.5A, C, G & I and shown in the network by NetworkAnalyst (Fig.5E).

Discussion

Hypertension is one of the major risk factors resulting in many CVDs and other diseases in humans [22]. RJ is a well-known natural product that benefits human health. Albeit plenty of reports claim that RJ has a potential function in resisting against hypertension [18, 19], the specific functional components and working mechanisms still have remained to be discovered. To this

effect, we created a model system by cloning the CDS of *mrjp1* (*A. m. ligustica*) into mouse VSMC by the lentivirus, which successfully expressed MRJP1 in mammalian cells. Using our established model, we performed wide ranges of functional analysis to elucidate whether MRJP1 can regulate the blood pressure in mammalian cells. This was achieved by the down-regulated contraction, migration and proliferation in MRJP1 expressed mouse VSMCs. These observations indicate that MRJP1 displays significant roles in controlling blood pressure. This is in accordance with our finding that the purified MRJP1 from RJ displays anti-hypertensive effects by treating mouse VSMCs [12]. To investigate the mechanism of introduced MRJP1 regulating VSMC functions, high resolution and accuracy MS-based proteomic approach was applied to quantify the proteome changes. Interestingly, > 90% of differential proteins were down-regulated by expression of MRJP1 into mouse VSMCs. Those down regulated proteins significantly enriched to a wide array of pathways closely relevant to VSMC contraction and migration, these observations suggest that introducing MRJP1 into VSMC can significantly down regulate the blood pressure via reduction of the functionality of a cell's contraction, migration and proliferation.

Many severe cardiovascular diseases, including hypertension and arteriosclerosis, result from abnormal contraction, migration and proliferation of VSMC's. In blood vessels, VSMC's maintain vascular tone and determine blood pressure via vessel constriction/dilation. The contractile VSMCs, which are non-proliferative and fully differentiated, is usually indicated by the expression of several specific marker genes at high levels, such as α SMA, SM22 and calponin [4,5]. Briefly, α SMA, the major and specific isoform of actin expressed in VSMCs, is responsible for VSMC contraction. An α SMA deficiency can result in decreased contractibility of VSMCs and hypotension in mice [23,24]. SM22 is a calponin-related protein that is specifically expressed in adult smooth muscle [25], which is functionally important in maintaining the contractibility and mobility of VMSC [26]. Meanwhile, calponin, identified as thin filament-binding protein, is considered to serve in the role as contractile apparatus and cytoskeleton of SMC [27]. Hence, expression levels of such VSMC specific marker genes are key to determining the VSMC differentiating and contractile ability [28]. In our study, the reduced VSMC contractibility and down-regulated expression levels of α SMA, SM22 and calponin in MRJP1 expressed VSMC are indicative of the fact that MRJP1 is functionally important for down-regulating blood pressure by decreasing VSMCs contractile phenotype. Moreover, VSMCs, with higher migrating and proliferative ability tend to constitute thicker blood vessel walls of higher lumen/media ratios, posing risk to hypertension and arteriosclerosis [29]. The significantly reduced migrating and proliferative abilities in the MRJP1 expressed VSMCs are a manifestation that MRJP1 plays key

roles to inhibit VSMC growth, and thus this provides sound evidence in the treatment of hypertension and arteriosclerosis using the specific proteins in RJ. It is reported that the over expression or knockout/knockdown of certain genes or proteins in VSMCs can result in up or down regulation of blood pressure ^[11, 30, 31]. However, most genes or proteins discussed above are endogenous molecules. Here MRJP1 is an exogenous protein transferred into VSMCs, suggesting that the encoding protein of MRJP1 in VSMCs has biological activities in mammalian cells. MRJP1 is the most abundant protein in RJ, which is secreted by the hypopharyngeal gland of nurse honeybee workers in order to feed the larvae and queen bees ^[12]. As a highly nutritious and functional food, it imposes no toxic risks on VSMCs. Applying lentivirus as a vector is a widely used tool for generating genetically modified organisms. It is also applicable in gene therapeutic researches. For example, salusin- β , a bioactive peptide involved in the pathogenesis of atherosclerosis, has been delivered into rats through intravenous injection of lentivirus, and this has been successful in creating hypertension in rats ^[11]. Therefore, the introduction of MRJP1 into mouse VSMCs by the lentiviral vector makes MRJP1 function well to inhibit the over contracted, migrating or proliferative VSMCs for remedying hypertension or arteriosclerosis. Hence, the reported data here bring a promising new avenue to treat hypertension or arteriosclerosis for humans by using gene therapy of natural bee-products.

Blood regulatory function is largely dependent on VSMCs contractile and migrating abilities ^[32]. To better understanding the mechanisms of MRJP1 functionalities in regulating VSMC contraction and migration, proteome alteration between the control and MRJP1 expressed VSMCs was compared. For those 646 down regulated proteins, they were significantly enriched to a wide cascade of pathways associated with myosin-actin filament sliding, actin filament polymerization/depolymerization and ATPase activity, suggesting they are essentially important to regulate the VSMC contraction and migration. Generally, in the VSMC contractive process, calcium binds to calmodulin and then activates a myosin light chain kinase by phosphorylating myosin light chains. Then, a cross-bridge between myosin heads and actin filaments is formed ^[33], thus this sliding process results in VSMC contraction. During the phosphorylation process of myosin light chains, ATP is required to facilitate the phosphorylation to form a cross-bridge between myosin heads and actin filaments ^[34]. Here, the down-regulated proteins by expression of MRJP1 in VSMCs, were significantly enriched to these pathways. For example, Myl6b (MLC1SA) is part of myosin light chains with the function of ATPase activity ^[34, 35] and α SMA is the actin filament. The reduced expression of these two proteins caused by expression of MRJP1 in VSMCs suggests that the strength of the cross-bridge is lowered, thereby diminishing the VSMC contraction. Moreover, actin monomers go through

polymerization/depolymerization to cause elongation of actin filaments ^[36, 37], which engage in cell contraction and migration ^[38, 39]. During this process, actin filament assembly is powered by ATP hydrolysis ^[36, 37]. In our work, the down-regulated functions of pathways related to actin filament polymerization/depolymerization in MRJP1 expressed VSMCs indicate that actin filament formation is inhibited. Additionally, the actin filaments are assembled into bundles in the cells. This crosslink can strengthen the actin filaments and their tension, and increase ATPase activity of myosin as well ^[40]. Here, the significantly enriched pathway of actin filament bundle assembly by the down-regulated proteins in MRJP1 expressed VSMCs indicate that the VSMC contractibility is decreased to reduce actin filaments, elongation, and bundle assembly. For example, in the ras homolog gene family, member A (RhoA) is engaged in the pathways of actin filament polymerization and actin filament bundle assembly, for it activates myosin phosphatase target subunit 1 and myosin light chain in VMSCs ^[41]. So, the down regulated RhoA in MRJP1 expressed VSMCs suggests its importance in inhibiting VSMC contraction. ATPase catalyzes ATP hydrolysis to provide energy and phosphates to the donor molecules to promote phosphorylating processes within the cells ^[42]. The down-regulated proteins implicated in ATPase activity in MRJP1 expressed VSMCs imply that the lowered ATPase activity hinders the phosphorylation of myosin light chains, a crucial process prior to cross-bridge formation, thus inhibiting the VSMC contraction. In addition, there are positive relationships between ATPase and calcium binding activities. For instance, SERCA2a, a calcium-transporting ATPase ATP2A2, engages in calcium reuptaking during excitation-contraction coupling ^[43]. Its significant down regulation in MRJP1 expressed VSMCs makes manifest the fact that such proteins that participate in both actin filament and ATPase activities contribute to reinforce the contractibility reduction. Collectively, MRJP1 has potential to reduce VSMC contractibility by the down regulation of functionality in the contracting process involving muscle filament sliding/myosin-actin filament sliding, actin filament polymerization/depolymerization and ATPase activity.

Energy metabolism is essential to cell proliferative ability ^[44]. This is reflected in our data that the down regulated proteins by MRJP1 expression were significantly enriched to energy metabolizing pathways in mouse VSMCs, such as glycolysis, citrate cycle and pyruvate metabolism, which are essential for ATP production. The declined energy supply within the cell definitely results in the lowered VSMC growth ^[45]. For instance, dihydrolipoamide S-acetyltransferase (Dlat), an enzyme anchored in mitochondrion, catalyzes pyruvate to acetyl-CoA that is a basic necessity to the tricarboxylic acid cycle, the key process to produce ATP. The observed down-regulation of Dlat by the expression of MRJP1 signifies that the efficiency

of ATP production is reduced and thus energy provision for cell growth is diminished. Given ATPase activity was reduced by MRJP1 expression, this can give rise to the decreased ATP utilization, and in turn hamper the growth of VSMCs. For majority of cancer cells, fundamental energy metabolism changed to support high proliferation^[46]. Recent reports show that VSMCs have increased rates of glycolysis in pulmonary artery hypertension^[47], indicating there is close correlation between carbohydrate catabolism and hypertension. In addition, cell proliferation requires nucleosides to duplicate the genome. That a large number of down regulated proteins participated in the pathway of nucleoside metabolism is suggestive of the fact that nucleoside metabolism is minimized, thereby leading to the inhibitory effect of VSMC growth due to the dwindled provision of nucleosides materials. For example, phosphoribosylaminoimidazole carboxylase engages in inosine monophosphate (IMP) biosynthesis via de novo pathway^[48]. IMP is then transferred to adenosine monophosphate and guanosine monophosphate, which are utilized as genetic materials. It is well known that cell maintenance and growth demand RNA biogenesis and transport. This is reflected in our data that the down regulated proteins significantly enriched to the pathways of RNA splicing and mRNA nuclear transport. For example, serine/arginine-rich splicing factor 1 plays a wide spectrum of essential roles in RNA splicing, including preventing exon skipping and ensuring splicing accuracy, as well as mRNA nuclear transport^[49-51]. Flotillin-1 is reported to enhance cancer cell growth^[52], which was also enriched in the down regulated pathway of RNA transport. Hence, the expression of MRJP1 in VSMCs makes manifest the significant roles in reduction of RNA splicing and transport, thus the VSMC growth is inhibited. In all, it is clearly demonstrated that the expression of MRJP1 diminishes the VSMC growth by down-regulating the metabolic processes of carbohydrate, nucleoside, and RNA splicing and transport, which ultimately result in the weakening function of VSMC proliferation.

Conclusion

In this work, we have successfully cloned the CDS of *mrjp1* into the lentiviral vector followed by the production of the corresponding lentivirus. After the lentiviral transduction, mouse VSMCs are able to express proteins of MRJP1. Applying our created mouse VSMC model that can express the MRJP1, the most abundant RJ protein, it is found that the contractile, migrating and proliferative abilities of VSMCs are significantly reduced by the expression of MRJP1. This clearly demonstrates that MRJP1 plays a key role in regulating blood pressure. To achieve the functionality in modulating blood pressure, the proteome setting has reshaped in VSMCs to tune the protein activity to optimize cellular behavior for lowering blood pressure. Thus the functionality of wide repertoire of pathways involved in regulating VSMC contraction,

migration and proliferation, including myosin-actin filament sliding, actin filament polymerization, actin filament bundle assembly, ATPase activity, carbohydrate/nucleoside metabolism, RNA splicing and transport are down-regulated. The reported data significantly extend the functional and mechanistic insights into blood pressure regulation by MRJP1. This provides sound clues and potential novel approaches for the treatment of hypertension and the relevant cardiovascular diseases using genetically engineered natural products as gene therapy. Future animal experiments are needed to test the functionality *in vivo* of MRJP1 in vascular smooth muscle cell.

Methods

Chemical reagents

The chemical reagents were bought from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Otherwise the sources were specified.

Mouse VSMC culture

Mouse (C57BL/6 strain) VSMC immortalized with SV40 large T antigen was purchased from American Type Culture Collection (CRL-2797, LOT: 60521753) and cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GIBCO[®], ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS), under the condition of 37°C and 5% CO₂. Cells were dissociated by 0.25% trypsin-EDTA (GIBCO[®]) and thawed in DMEM containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) at -80°C and further in liquid nitrogen. The thawed cells were revived in water bath at 37°C precipitated at 1000 r, 3 min to remove DMSO, then suspended and grown in the above-mentioned cell cultural media.

Construction and genotyping of MRJP1 expressed VSMC

To construct the MRJP1 expressed VSMCs, the CDS of *mrjp1* was synthesized and cloned into the multiple cloning sites of lentiviral vector (PLV-EGFP (2A) Puro), followed by lentivirus production according to the manufacture's protocol (Inovogen Tech. Co., Beijing, PR China). Briefly, HEK293T cells were co-transfected by pLV-MRJP1 and helper plasmids for 48 h. The supernatant was centrifuged 25,000 g for 2 h at 4°C to purify the lentivirus. The cultured VSMCs were then transduced with the lentivirus carrying *mrjp1* gene and screened by puromycin with the concentration of 2ug/ml. The EGFP fluorescence can be observed in the VSMCs successfully transduced by the lentivirus. Meanwhile, VSMCs used for control were transduced with lentivirus that has no *mrjp1* gene expression but has puromycin resistance and EGFP expression. To genotype the MRJP1 expressed VSMCs, the CDS of *mrjp1* gene was amplified by PCR from the total cellular DNA and identified by agarose gel electrophoresis to ensure its integration in

the VSMC genome (primers in Fig. S1). Furthermore, the expression of *mrjp1* mRNA was detected and quantified by real-time RT-PCR, normalized by the mRNA of EGFP (EGFP, an indicator protein from the lentiviral vector, is visible in successfully transduced VSMCs. Therefore, its mRNA level is suitable for the normalization of *mrjp1* mRNA expression), the real time RT-PCR procedure was described in “Real time RT-PCR analysis of *mrjp1* mRNA expression”. Finally, the unique peptides of MRJP1 were detected in *mrjp1* expressed VSMCs by LC-MS/MS analysis to confirm the translation from *mrjp1* mRNA to MRJP1 protein. The LC-MS/MS analytical method was described in “Quantitative Proteomic Analysis of VSMC”.

VSMC contractile ability assay

Collagen gel was used to determine the VSMC contractile abilities of both control and MRJP1 expressed VSMCs. The procedure generally followed the previously reported methods with minor modifications [5, 53]. In brief, VSMCs were added to the collagen type I (Corning, NY, USA) from rat tail and cultured in a 24-well plate at 37°C for 30 min (the mixture of 500 ul in each well containing collagen of 1.67 mg/ml and VSMCs of 1.2×10^5). After the mixture (gel) was coagulated, the edge of the gel was separated by a pipette. Then DMEM containing 10% FBS was added to each well to culture for 72 h. The gel was photographed by a gel imaging system, and measured by NIH image J software (National Institute of Health, USA). The VSMC contractibility was determined by the contraction index (area of well – area of collagen gel/ area of well), which was shown as mean \pm S.D from three independent experiments with a *p* value < 0.05 considered significant by student’s *t* test. In addition, the expression levels of α SMA, SM22 and calponin were determined by Western blot for further verification of VSMC contractile ability as described in “Western blotting”.

VSMC migrating ability assay

The cell wound healing assay was performed to compare the migrating ability between control and MRJP1 expressed VSMCs. Briefly, 1×10^6 VSMCs were planted in each well of the 6-well plate and cultured in DMEM containing 10% FBS at 37°C and 5% CO₂. Having been 100% confluent, the cells were scratched by a 200 ul pipette and immediately photographed. The wound distances were measured at 0 h, 6 h and 12 h. The migration indexes were calculated as (D 0h - D 6h or 12h)/D 0 h.

VSMC proliferative ability assay

The cell number counting method was used to determine the VSMC proliferative ability between control and MRJP1 expressed VSMCs. Briefly, 1×10^5 VSMCs were planted in each

well of the 6-well plate and cultured in DMEM containing 10% FBS at 37°C and 5% CO₂. Cells were dissociated and then counted by using cell counting chamber after 24 h, 48 h and 72 h. Cell numbers were shown as mean ± S.D from three independent experiments with *p* value < 0.05 being considered significant by student's *t* test. The expression level of PCNA was determined by Western blotting as described in "Western blotting" for further verification of VSMC proliferative ability.

VSMC immunofluorescence

Immunofluorescence was applied to further verify that α SMA was down regulated in VSMCs with MRJP1 expression. In brief, VSMCs, planted in a 24-well plate, grow to 70-80% confluent followed by fixation of 4% paraformaldehyde. The fixed cells were then treated with blocking buffer containing 3% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100. Afterwards, the cells were incubated with primary α SMA and secondary antibodies, and mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as well. The fluorescence was observed and photographed in an Olympus X71 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The fluorescent intensity was measured by NIH imageJ software (National Institute of Health, USA) to measure the expression levels of α SMA and DAPI. The α SMA/ DAPI ratio was shown as mean ± S.D from three independent experiments with a *p* value < 0.05 considered significant by student's *t* test.

Real time RT-PCR analysis of *mrjp1* mRNA expression

To ensure that the CDS of *mrjp1* were able to be transcribed into the corresponding mRNA, real time RT-PCR analysis was applied to detect the *mrjp1* mRNA expression. To achieve this, pooled VSMCs growing in DMEM containing 10% FBS were collected for total RNA isolation using TRIZOL method. Briefly, VSMCs were homogenized in TRIZOL reagent followed by chloroform extraction and then centrifuged by 12,000 g for 15 min at 4°C. The recovered supernatant was added to isopropanol to precipitate RNA by centrifuge at 12,000 g for 10 min. The isolated RNA was purified in 75% ethanol and dissolved in DEPC water to avoid RNA degradation. The total RNA was reversely transcribed to cDNA by using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (THERMO) following the manufacturer's instruction. Then SYBR-Green (Applied Biosystems®) based real-time RT-PCR was conducted on a Bio-Rad CFX Connect™ system to quantify the mRNA level of MRJP1 (the primers in the Table S1). The PCR protocol began at 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 55°C for 20 s and 72°C for 20 s; then the fluorescence was measured. Melting curve analysis was performed to ensure the specificity of the PCR product by heating from 65°C to 95 °C in increments of 0.5 °C / s. The relative expression of mRNA in MRJP1 was normalized to that of EGFP. The mRNA

expressions were quantified by $-2^{\Delta\Delta C_t}$ method and were shown as mean \pm S.D from three independent experiments with a p value < 0.05 considered significant by student's t test.

Western blotting

VSMCs at the logarithmic stage were lysated in radioimmune precipitation assay buffer (Solarbio, Beijing, PR China) containing 1% phenylmethanesulfonyl fluoride as proteinase inhibitor. After precipitation in 13,000 g for 10 min, the supernatant containing proteins were collected and followed by denaturing in 100°C with bromophenol blue. The protein samples were loaded to an 8% SDS-PAGE gel for electrophoresis to separate the proteins, and then transferred to the PVDF membranes. The membranes were blocked in 5% fat free milk to avoid non-specific bindings and incubated in primary antibodies against α SMA (BOSTER, Wuhan, PR China), SM22 (Abcam, Cambridge, UK), calponin (BOSTER, Wuhan, PR China), PCNA (Abcam, Cambridge, UK) and GAPDH (CWBIO, Beijing, PR China), followed by incubating in the corresponding secondary antibodies. The membranes were illuminated and photographed in the ChemiDoc imaging system (Bio-Rad). The bands were quantified by QuanyOne software and the abundance level of proteins was normalized by GAPDH. The protein of interest / GAPDH ratio was shown as mean \pm S.D from three separated experiments and p value < 0.05 was considered significant by student's t test.

Protein sample preparation for LC-MS analysis

The total proteins of both control and MRJP1 expressed VSMCs were extracted according to our previously described methods [54]. Briefly, VSMCs were ultrasonicated on ice and lysated in lysis buffer containing 8 M urea, 2 M thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 20 mM Tris-base and 30 mM dithiothreitol (DTT), followed by centrifugation of 15000 g for 15 min at 4 °C to obtain a protein supernatant. The proteins were precipitated by acetone for 30 min at -20°C prior to being centrifuged twice at 15000 g, 4 °C for 10 min. The precipitated pellets were redissolved in 40mM NH_4HCO_3 . The final protein concentration was quantified using a Bradford assay. The protein samples were reduced with a solution of 10 mM DTT for 1 h. Then the samples were incubated in 50 mM iodoacetamide for alkylation in the dark for 1 h. Proteins were digested using trypsin (sequencing grade, Promega) overnight at 37 °C in a 1:50 trypsin-to-protein mass ratio. The enzymatic digestion was stopped by adding 1 μL of formic acid. Finally, peptides were vacuum-dried using a SpeedVac system (RVC 2-18, Marin Christ, Osterod, Germany) for the following LC-MS analysis.

Quantitative Proteomic Analysis of VSMC

To create the quantitative proteomic profiles of control and MRJP1 expressed VSMCs, peptide samples were re-dissolved in 0.1% formic acid and loaded onto an LC-MS system with three replicates. The EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) nano liquid chromatography system was coupled with Q-Exactive plus (Thermo Fisher Scientific) via the nanoelectrospray source. Reverse-phase chromatography and trap column packed with 2 μm C18 (100 \AA , 75 μm x 50 cm, Thermo Fisher Scientific) were used for peptide enrichment, and peptides were further separated on a column packed with 2 μm C18 (100 \AA , 75 μm x 50 cm, Thermo Fisher Scientific) for analysis. The mobile phase buffer consisted of buffer A (0.1% formic acid in water) and buffer B (0.1% formic acid in acetonitrile). Peptides were separated at a flow rate of 350 nl/min using the following gradients: from 3 to 8% buffer B for 10 min, from 8 to 20 % buffer B for 80 min, from 20 to 30% buffer B for 20 min, from 30 to 90% buffer B for 5 min, and 90% buffer B for 10 min. Ion signals were collected in a data-dependent mode with the following settings: full scan resolution at 70,000, scan range: m/z 300-1,800; MS/MS scan resolution at 17,500, isolation window: 2 m/z, normalized collision energy: 27, loop count 10, and dynamic exclusion was also used (charge exclusion: unassigned 1, >8; peptide match: preferred; exclude isotopes: on; dynamic exclusion: 10 s).

The MS/MS data were retrieved using Xcalibur software (version 2.2, Thermo Fisher Scientific). Subsequently, the extracted spectra were searched by in-house PEAKS software (version 7.0, Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canada) against the mouse database generated from UNIPROT containing 76079 protein sequences (released in August 2015). Precursor mass tolerance was set at 15.0 ppm, and fragmentation tolerance was set at 0.05 Da. The following modifications were applied: carbamidomethylation (C)/+57.02 Da was selected fixed modification, and oxidation (M)/+15.99 Da was selected as variable modifications. The other parameters used were the following: enzyme, trypsin; allowing a nonspecific cleavage at neither end of the peptide; maximum missed cleavages per peptide, 2; maximum allowed variable PTM per peptide, 2. A fusion target-decoy approach was used for the estimation of the false discovery rate (FDR) and controlled at $\leq 1.0\%$ ($-10 \log P \geq 20.0$) at both protein and peptide levels.

Protein identifications were used only if at least two spectra were identified in one sample. The relative quantification was performed through the label-free approach in the Q module of PEAKS by using the expectation-maximization algorithm as described previously. Peptide features and proteins of statistical p value < 0.05 and fold change ≥ 1.5 were considered significantly different between groups.

Bioinformatics analysis

To produce the differential protein profile between control and MRJP1 expressed VSMCs, the differentially expressed proteins were clustered using uncentered Pearson correlation and average linkage by gene cluster 3.0 and visualized by Java Treeview software. Furthermore, to interpret the mechanisms of MRJP1 regulating VSMC functions, the down or up regulated protein lists with mouse Uniprot ID were analyzed by ClueGo v. 2.1.6, a Cytoscape plugin (<http://www.ici.upmc.fr/cluego/>)^[55] software through the functional ontology categories in biological process and KEGG pathways. The significances of the enriched pathways were calculated by a right-side hypergeometric algorithm and an FDR was done by Bonferroni step down test to correct the p value in the software. The p value < 0.05 was considered significant. Additionally, to better understand the biological significance in a systematic way of the identified proteins engaged in blood pressure regulatory activities, protein-protein interaction (PPI) networks were constructed by GeneMANIA^[56, 57], the database includes genetic and protein interactions with the settings of all enabled networks and 50 displayed related genes using GO biological process based weighting. The networks were visualized by Cytoscape. Finally, to enrich the significant pathways with the identified proteins which were highlighted, the KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn>)^[58] system was used to annotate the pathways following the previously described methods elsewhere^[54] and the important proteins of the pathways shown in the network were achieved by NetworkAnalyst online software (<http://www.networkanalyst.ca>)^[59, 60].

Figures

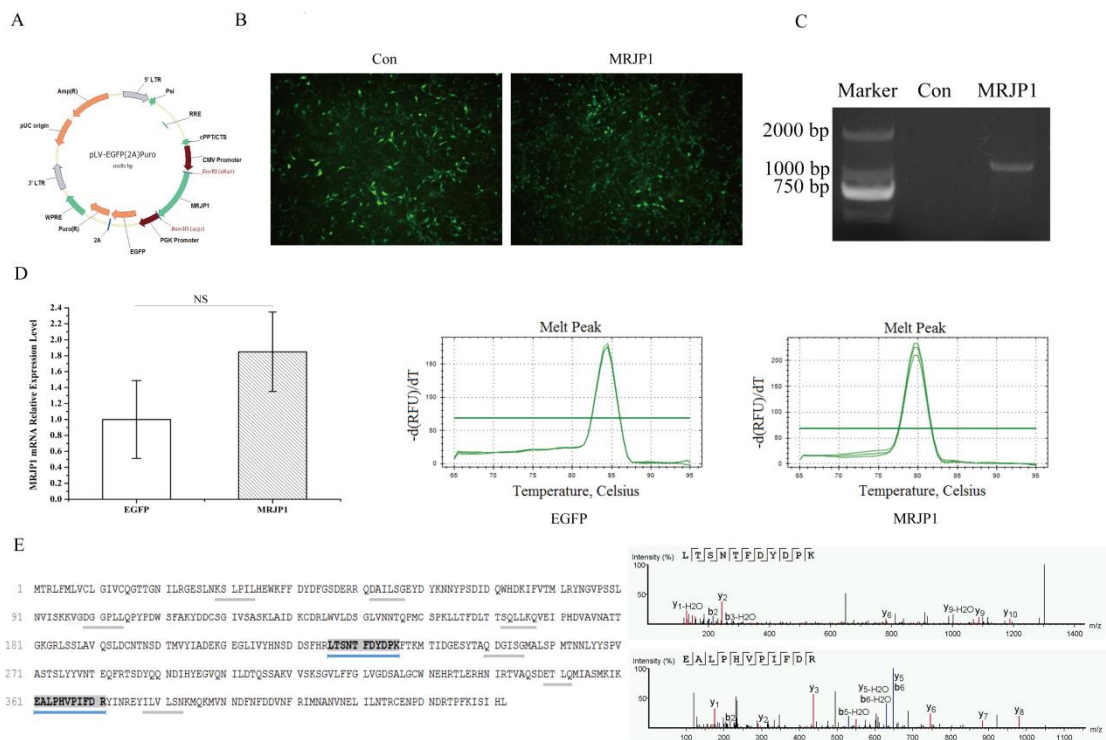


Fig.1. Delivering *mrjp1* gene into mouse VSMC genome by lentiviral vector and its correct expression in VSMC. **A.** Mode plot shows that the synthesized CDS of *mrjp1* gene was inserted into lentiviral vector and promoted by CMV. The lentiviral vector also contained EGFP, the visible marker that is promoted by PGK. **B.** Both control and the one with *mrjp1* gene inserted leniviruses successfully transduced VSMCs, in which EGFP is observed. **C.** PCR amplification of CDS of *mrjp1* gene was visualized on agarose gel by electrophoresis from the transduced VSMCs. **D.** EGFP and mRNAs of *mrjp1* gene are both detected by real time RT-PCR from *mrjp1* integrated VSMCs. Results are represented by mean \pm S.D and the relative expression of *mrjp1* RNA is higher than that of EGFP but without statistical significance from three replicates. Melting curves indicate that RNA amplifications of both *mrjp1* and EGFP are specific. **E.** Specific peptides of MRJP1 are indentified in *mrjp1* integrated VSMCs by LC-MS analysis.

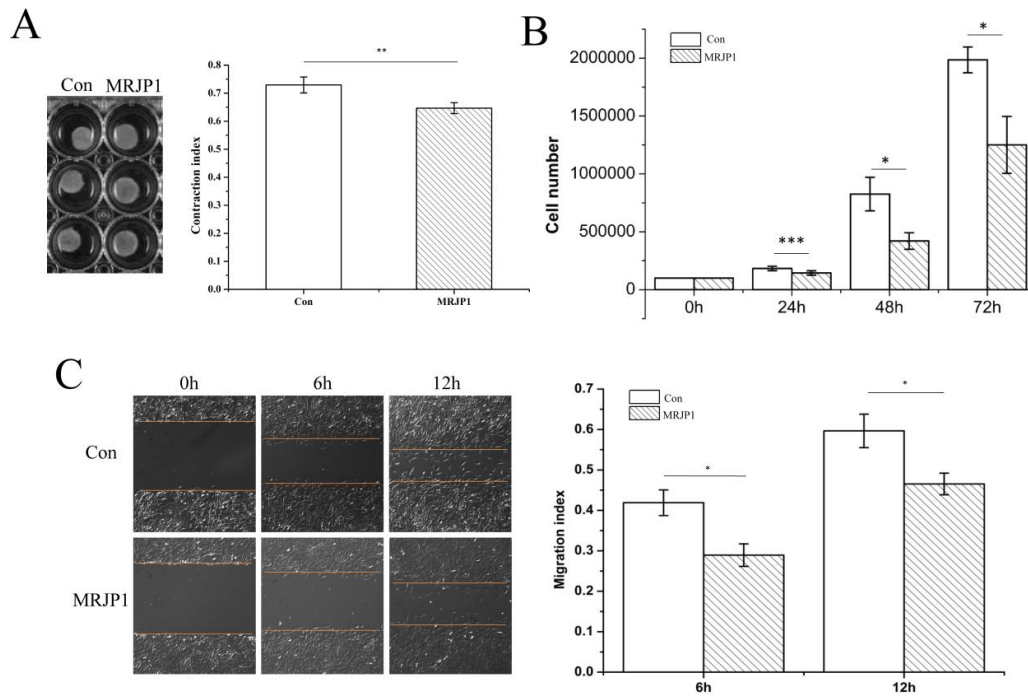


Fig.2. MRJP1 expressed VSMCs show reduced contractive, migrating and proliferative phenotypes. A. Contraction index is significantly reduced in MRJP1 expressed VMSCs compared to control from three independent experiments by collagen gel assay (n=3, mean ± S.D). Results are shown as mean ± S.D and ** $p < 0.01$. B. Cell are counted at 24 h, 48 h and 72 h, respectively, to compare the proliferative rates between control and MRJP1 expressed VSMCs (n=3, mean ± S.D). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. C. Migration index is significantly decreased by the expression of MRJP1 in VSMCs at 6 h and 12 h, respectively by wound healing assay (n=3, mean ± S.D). * $p < 0.05$.

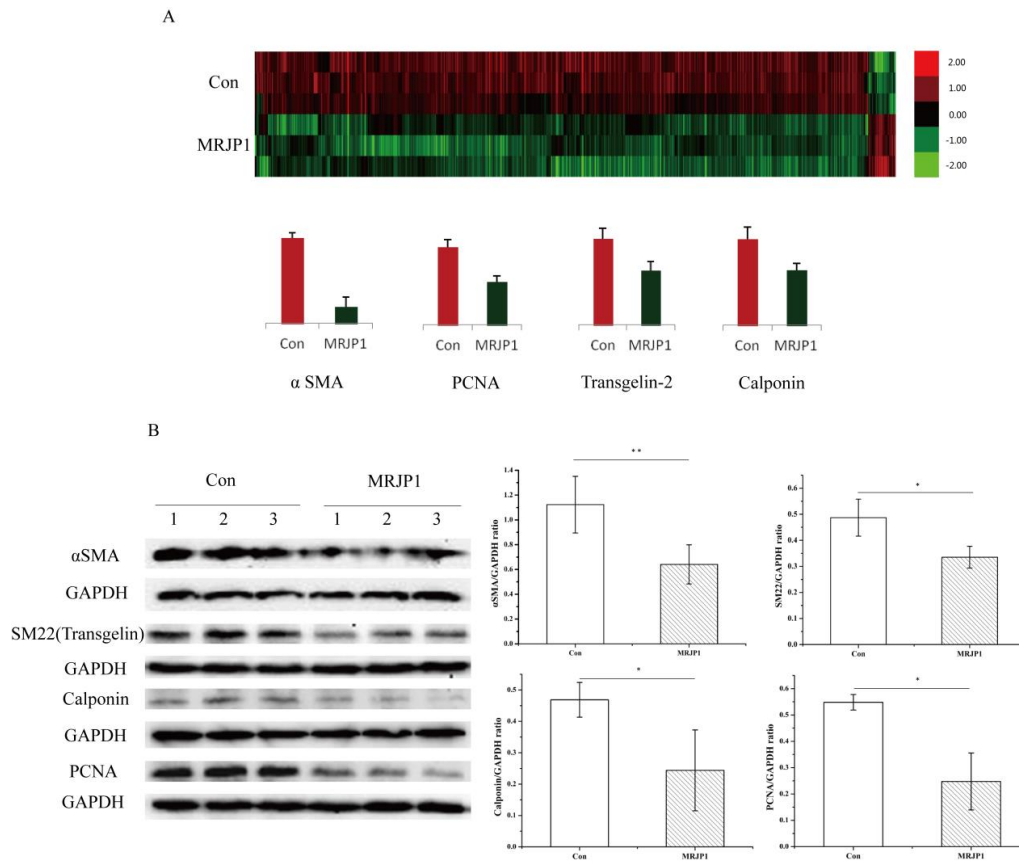


Fig.3. MRJP1 expression changed mouse VSMC proteome setting. A. Clustered heatmap displayed differentially expressed proteins between control and MRJP1 expressed mouse VSMCs with three replications in each group. B. The expressions of α SMA, SM22, calponin and PCNA in MRJP1 expressed VSMCs are significantly reduced by Western blotting analysis compared with controls, the band intensities were normalized to GAPDH (n=3, mean \pm S.D) from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

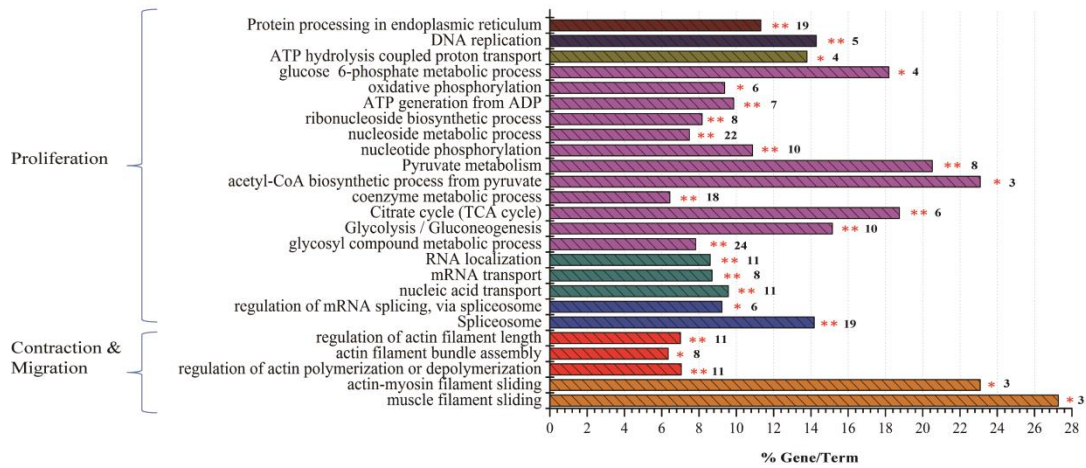


Fig.4. MRJP1 expression altered essential pathways related to VSMC contraction, migration and proliferation. Functional classes and biological pathway enrichment of differential proteins identified between control and MRJP1 expressed VSMCs. The significantly enriched pathways are analyzed by ClueGo, a Cytoscape plugin. p values < 0.05 were considered significant by a right-side hypergeometric algorithm and an FDR is done by Bonferroni step down test to correct the p value of the enriched terms.

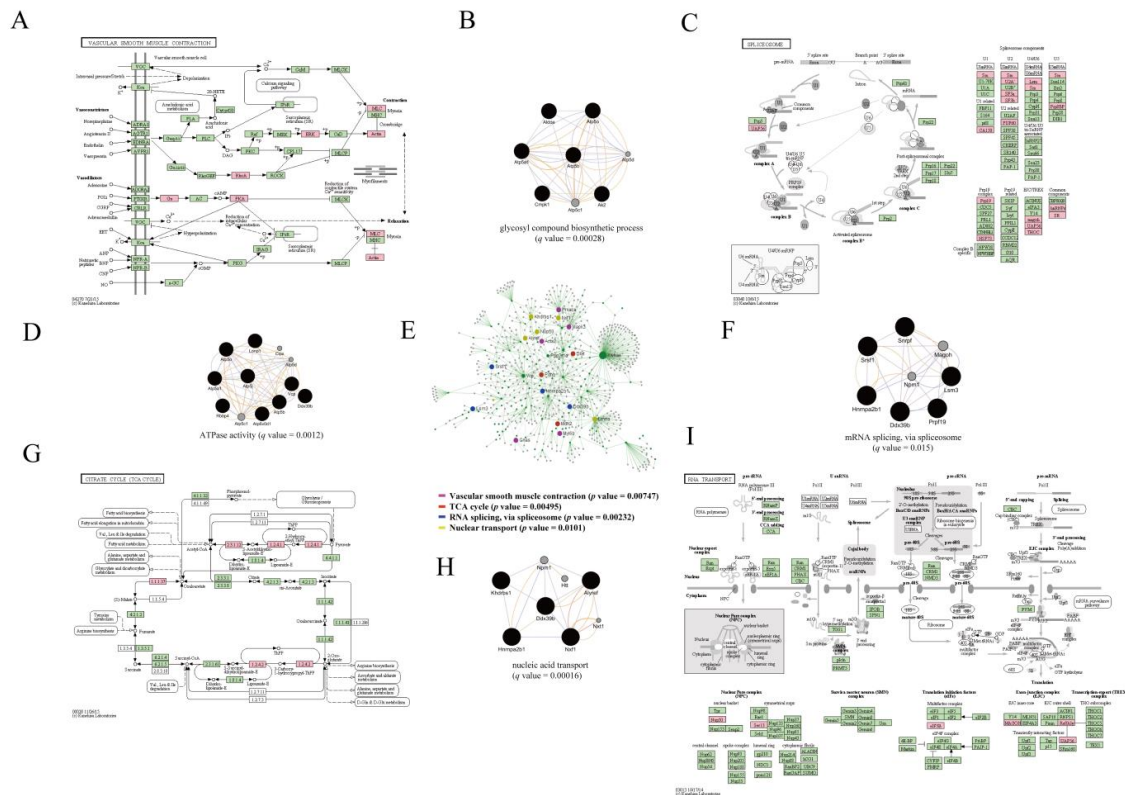


Fig.5. Protein-protein interaction (PPI) network of the down-regulated proteins in MRJP1 VSMC. A, C, G and I denote the down-regulated proteins by MRJP1 expression in VSMC are mapped and enriched to pathways of “vascular smooth muscle contraction”, “spliceosome”, “TCA cycle” and “RNA transport”, respectively, by Kobas software. B, D, F and H represent the PPI network of the down-regulated proteins are visualized by GeneMANIA plugin within Cytoscape. Networks are all enabled and the top 50 related genes and at most 20 attributes were displayed via GO biological process-based weighting. The terms are shown as “glycosyl compound biosynthetic process”, “ATPase activity”, “mRNA splicing, via spliceosome” and “nucleic acid transport”, respectively. q values <0.05 are considered to be significantly enriched. E The important nodes of down-regulated protein in the pathways of “vascular smooth muscle contraction”, “TCA cycle”, “RNA splicing, via spliceosome” and “Nuclear transport” are shown in the networks analyzed by online software NetworkAnalyst (www.networkanalyst.ca). Enrichment pathways are considered to be significant when p values < 0.05 .

References

[1] Ezzati M, Obermeyer Z, Tzoulaki I, et al. Contributions of risk factors and medical care to cardiovascular mortality trends[J]. *Natural Reviews Cardiology*, 2015, 12:508-530.

- [2] Lim SS, Vos T, Flaxman AD ,et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2012, 380:2224-2260.
- [3] Michael SK, Surks HK, Wang Y ,et al. High blood pressure arising from a defect in vascular function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105:6702-6707.
- [4] Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I ,et al. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2014, 2:72.
- [5] Chen Z, Wu J, Yang C ,et al. DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) protein-mediated microRNA biogenesis is essential for vascular smooth muscle cell development in mice[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287:19018-19028.
- [6] Shi N, Chen SY. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation[J]. *Journal of Biomedical Research*, 2014, 28:40-46.
- [7] Alcantara EH, Shin MY, Feldmann J ,et al. Long-term zinc deprivation accelerates rat vascular smooth muscle cell proliferation involving the down-regulation of JNK1/2 expression in MAPK signaling[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228:46-52.
- [8] Ping S, Li Y, Liu S ,et al. Simultaneous Increases in Proliferation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accelerate Diabetic Mouse Venous Atherosclerosis[J]. *PLoS One*, 2015, 10:e0141375.
- [9] Wang Q, Huo L, He J ,et al. Soluble epoxide hydrolase is involved in the development of atherosclerosis and arterial neointima formation by regulating smooth muscle cell migration[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2015, 309:H1894-1903.
- [10] Yoon J, Ryoo S. Arginase inhibition reduces interleukin-1beta-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation by increasing nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 435:428-433.
- [11] Sun HJ, Liu TY, Zhang F ,et al. Salusin-beta contributes to vascular remodeling associated with hypertension via promoting vascular smooth muscle cell proliferation and vascular fibrosis[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2015, 1852:1709-1718.
- [12] Feng M, Fang Y, Han B ,et al. In-Depth N-Glycosylation Reveals Species-Specific Modifications and Functions of the Royal Jelly Protein from Western (*Apis mellifera*) and Eastern Honeybees (*Apis cerana*)[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14:5327-5340.
- [13] Yamaguchi K, He S, Li Z ,et al. Quantification of major royal jelly protein 1 in fresh royal jelly by indirect enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77:1310-1312.
- [14] Han B, Li C, Zhang L ,et al. Novel royal jelly proteins identified by gel-based and gel-free proteomics[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59:10346-10355.
- [15] Srisuparbh D, Klinbunga S, Wongsiri S ,et al. Isolation and characterization of major royal jelly cDNAs and proteins of the honey bee (*Apis cerana*)[J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 36:572-579.
- [16] Zhang L, Han B, Li R ,et al. Comprehensive identification of novel proteins and N-glycosylation sites in royal jelly[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15:135.
- [17] Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees[J]. *Nature*, 2011, 473:478-483.
- [18] Matsui T, Yukiyoishi A, Doi S ,et al. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13:80-86.

- [19] Takaki-Doi S, Hashimoto K, Yamamura M ,et al. Antihypertensive activities of royal jelly protein hydrolysate and its fractions in spontaneously hypertensive rats[J]. *Acta Medica Okayama*, 2009, 63:57-64.
- [20] Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes[J]. *Cytotechnology*, 2014, 66:1031-1038.
- [21] Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV. Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2015, 17:63-89.
- [22] Islam SM, Mainuddin A, Islam MS ,et al. Prevalence of risk factors for hypertension: A cross-sectional study in an urban area of Bangladesh[J]. *Global Cardiology Science& Practice*, 2015, 2015:43.
- [23] Milewicz DM, Ostergaard JR, Ala-Kokko LM ,et al. De novo ACTA2 mutation causes a novel syndrome of multisystemic smooth muscle dysfunction[J]. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2010, 152A:2437-2443.
- [24] Schildmeyer LA, Braun R, Taffet G ,et al. Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle alpha-actin null mouse[J]. *FASEB Journal*, 2000, 14:2213-2220.
- [25] Li L, Miano JM, Cserjesi P ,et al. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis[J]. *Circulation Research*, 1996, 78:188-195.
- [26] Han M, Dong LH, Zheng B ,et al. Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling[J]. *Life Sciences*, 2009, 84:394-401.
- [27] Gusev NB. Some properties of caldesmon and calponin and the participation of these proteins in regulation of smooth muscle contraction and cytoskeleton formation[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2001, 66:1112-1121.
- [28] North AJ, Gimona M, Cross RA ,et al. Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells[J]. *Journal of Cell Science*, 1994, 107 (Pt 3):437-444.
- [29] Brenninkmeijer L, Kuehl C, Geldart AM ,et al. Heme oxygenase-1 does not mediate the effects of extracellular acidosis on vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and susceptibility to apoptosis[J]. *Journal of Vascular Research*, 2011, 48:285-296.
- [30] Wang Y, Thorin E, Luo H ,et al. EPHB4 Protein Expression in Vascular Smooth Muscle Cells Regulates Their Contractility, and EPHB4 Deletion Leads to Hypotension in Mice[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290:14235-14244.
- [31] Andre G, Sandoval JE, Retailleau K ,et al. Smooth muscle specific Rac1 deficiency induces hypertension by preventing p116RIP3-dependent RhoA inhibition[J]. *Journal of American Heart Association*, 2014, 3:e000852.
- [32] Leung A, Stapleton K, Natarajan R. Functional Long Non-coding RNAs in Vascular Smooth Muscle Cells[J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2016, 394:127-141
- [33] Moreland RS, Cilea J, Moreland S. Calcium dependent regulation of vascular smooth muscle contraction[J]. *Advances in Experimental Medicine Biology*, 1991, 308:81-94.
- [34] Kohama K, Ye LH, Hayakawa K ,et al. Myosin light chain kinase: an actin-binding protein that regulates an ATP-dependent interaction with myosin[J]. *Trends Pharmacological sciences*, 1996, 17:284-287.
- [35] Hailstones DL, Gunning PW. Characterization of human myosin light chains 1sa and 3nm: implications for isoform evolution and function[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10:1095-1104.

- [36]Dayel MJ, Mullins RD. Activation of Arp2/3 complex: addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2:E91.
- [37]McCullagh M, Saunders MG, Voth GA. Unraveling the mystery of ATP hydrolysis in actin filaments[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136:13053-13058.
- [38]Vogel SK. Reconstitution of a Minimal Actin Cortex by Coupling Actin Filaments to Reconstituted Membranes[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1365:213-223.
- [39]Crevenna AH, Naredi-Rainer N, Schonichen A ,et al. Electrostatics control actin filament nucleation and elongation kinetics[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288:12102-12113.
- [40]Coleman TR, Mooseker MS. Effects of actin filament cross-linking and filament length on actin-myosin interaction[J]. *Journal of Cell Biology*, 1985, 101:1850-1857.
- [41]Schmidt L, Carrillo-Sepulveda MA. Toll-like receptor 2 mediates vascular contraction and activates RhoA signaling in vascular smooth muscle cells from STZ-induced type 1 diabetic rats[J]. *Pflugers Archiv*, 2015, 467:2361-2374.
- [42]Trivedi DV, Muretta JM, Swenson AM ,et al. Direct measurements of the coordination of lever arm swing and the catalytic cycle in myosin V[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112:14593-14598.
- [43]Schwartz RJ, Yeh ET. Weighing in on heart failure: the role of SERCA2a SUMOylation[J]. *Circulation Research*, 2012, 110:198-199.
- [44]Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27:441-464.
- [45]Chiong M, Morales P, Torres G ,et al. Influence of glucose metabolism on vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Vasa*, 2013, 42:8-16.
- [46]Aminzadeh S, Vidali S, Sperl W ,et al. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor[J]. *Translational Pediatrics*, 2015, 4:20-32.
- [47]Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ ,et al. Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension[J]. *Circulation Research*, 2012, 110:1484-1497.
- [48]Ng A, Uribe RA, Yieh L ,et al. Zebrafish mutations in gart and paics identify crucial roles for de novo purine synthesis in vertebrate pigmentation and ocular development[J]. *Development*, 2009, 136:2601-2611.
- [49]Bermingham JR, Jr., Arden KC, Naumova AK ,et al. Chromosomal localization of mouse and human genes encoding the splicing factors ASF/SF2 (SFRS1) and SC-35 (SFRS2)[J]. *Genomics*, 1995, 29:70-79.
- [50]Kim DJ, Oh B, Kim YY. Splicing factor ASF/SF2 and transcription factor PPAR-gamma cooperate to directly regulate transcription of uncoupling protein-3[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 378:877-882.
- [51]Michlewski G, Sanford JR, Caceres JF. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1[J]. *Molecular Cell*, 2008, 30:179-189.
- [52]Koh M, Yong HY, Kim ES ,et al. A novel role for flotillin-1 in H-Ras-regulated breast cancer aggressiveness[J]. *International Journal of Cancer*, 2016, 138:1232-1245.
- [53]Benoit C, Gu Y, Zhang Y ,et al. Contractility of placental vascular smooth muscle cells in response to stimuli produced by the placenta: roles of ACE vs. non-ACE and AT1 vs. AT2 in placental vessel cells[J]. *Placenta*, 2008, 29:503-509.
- [54]Fang Y, Feng M, Han B ,et al. Proteome Analysis Unravels Mechanism Underling the Embryogenesis of the Honeybee Drone and Its Divergence with the Worker (*Apis mellifera lingustica*)[J]. *Journal of Proteome Research*, 2015, 14:4059-4071.

- [55] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25:1091-1093.
- [56] Zuberi K, Franz M, Rodriguez H, et al. GeneMANIA prediction server 2013 update[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41:W115-122.
- [57] Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38:W214-220.
- [58] Xie C, Mao X, Huang J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39:W316-322.
- [59] Xia JG, Benner MJ, Hancock REW. NetworkAnalyst-integrative approaches for protein-protein interaction network analysis and visual exploration[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42:W167-W174.
- [60] Xia J, Gill EE, Hancock RE. NetworkAnalyst for statistical, visual and network-based meta-analysis of gene expression data[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10:823-844.

利用氣相層析－離子泳動光譜分析技術 (GC-IMS) 快速 鑑別農畜產品

陳裕文、魏于凡

國立宜蘭大學生物技術與動物科學系

摘要

農畜產品的產地與品質鑑別一直是全民關切但不易科學驗證的議題，諸多人為不當混摻狀況不勝枚舉，儼然已經成為國安議題。氣相層析－離子泳動光譜分析儀 (gas-chromatography ion-mobility spectrometry, GC-IMS)，這是一種快速檢測、高靈敏度、操作簡便且低成本的新穎檢測技術，其結合氣相層析與離子泳動光譜分析技術，可選擇性偵測分析樣品的揮發性有機化合物(VOCs)，呈現測試樣品特有指紋型態 (fingerprint pattern)，再利用多種變異資料分析軟體工具，可以快速鑑別食品與農產品的產地鑑別、鮮度鑑別、風味評估...等。利用這項技術，我們分別探討蜂蜜的蜜源鑑別、龍眼蜂蜜的產地鑑別、肉品的種類鑑別和牛樟菇的種類鑑別等，皆能達到快速鑑別之目的，提供農畜產品鑑別品質的參考。

參加第 26 屆國際 APIMONDIA 養蜂大會紀實

安奎博士

台灣養蜂協會顧問、明新科技大學榮譽教授

第 26 屆國際 APIMONDIA 養蜂大會 (26th International Congress of Apiculture of APIMONDIA)，於 1977 年 10 月 13-19 日在澳洲的亞特蘭大 (Adelaide) 舉行。該會議係由「國際養蜂協會聯合會(The International Federation of Beekeeping Associations)」主辦，總部設在羅馬尼亞 (Romania) 的布加勒斯特 (Bucharest)，主要目的在促進養蜂業者聯誼及相關產業發展。與會有 65 個會員國及 2000 多位代表。台灣代表團一行六人，是首次參加該項國際養蜂會議。大會討論內容分為五個主題：養蜂技術及裝備、蜜蜂生物學、蜜源植物及授粉、蜜蜂病蟲害學及養蜂經濟學。會議的活動，除開幕迎賓、期中餐會、閉幕大會及參訪養蜂場外，並安排室外的「養蜂器具」及室內的「蜂產品」兩項展覽。

作者當年是台灣養蜂協會執行秘書，1977 年 1 月 20 日在主編出版的「中華養蜂試刊本」內，專文刊登中英文版本的國際 APIMONDIA 養蜂大會開會通報，鼓勵養蜂業者踴躍參加。台灣代表團結果有五位報名組成：中華蜂王乳公司董事長張朝琴、養蜂協會常務理事李錦洲、中國蜂業公司董事長邱坤豐、台灣蜂王乳公司董事長陳榮輝及三宜養蜂公司董事長林宜鐘(圖 1)。亞洲國家除台灣外，尚有日本、馬來西亞、泰國及印度。

台灣養蜂代表團參加該次國際 APIMONDIA 養蜂大會，是為了拓展蜂王乳外銷，並瞭解國際養蜂運作及廣結善緣。經深入了解，台灣的養蜂事業，從 1956 年 7 月日本井上晃先生帶來「採收蜂王乳技術」影片，指導台灣養蜂業者生產蜂王乳(陳源祥，1977)，給養蜂事業帶來一番新景象。1961 至 1962 年間，養蜂業者開始採收蜂王乳。1964 年台灣的蜂王乳年產約有 50 公斤(Inoue & Inoue, 1964)。

到 1966 年開始外銷蜂王乳，輸往日本 10 公斤，價值新台幣 24,000 元，平均每公斤 2,400 元。1967 年輸往美國 75 公斤，價值新台幣 209,600 元，平均每公斤 2,795 元(程發和，1974)。1973 年外銷蜂王乳已經有 48 公噸，1976 年 91 公噸。金額分別為 2 億 2 千餘萬元，3 億 7 千餘萬元(廖瑞仁，1977)。依統計數據看來，蜂王乳產量從 1966 年後不斷增加，品質也逐年提高。至 1977 年，台灣已經有「蜂王乳王國」的美譽(毛潤豐，1977)。惟蜂王乳外銷與國內產地價格相差數倍，產銷利潤未能合理分配。因之省政府農林廳規劃，由養蜂協會會員共同投資，於 1975 年 8 月 15 日成立「中華蜂王乳產銷股份有限公司」，統籌蜂王乳外銷業務。該公司 1976 年 8 月 1 日與日本京都海友通商株式會社簽約三年，成為日本的總經銷，限價收購(張朝琴，1977)。

作者領隊前往澳洲，負責與大會聯絡報名、訂行程、購機票，並辦理參加國際會議的相關事宜。代表團分兩批出發，張朝琴、李錦洲與作者同行，出國前翁文炳理事長親自到機場送行(圖 2)。其餘三位董事長則自行前往澳洲，在大會報到處會面。作者等三人到雪梨後，先拜訪當年駐澳洲「遠東貿易代表團」，承蒙羅世琪代表(圖 3)熱忱介紹澳洲國情及當地中國人概況，並帶領參觀著名的雪梨歌劇院、博物館及風景區。會議結束後，10 月 22 日參觀墨爾本市，並拜訪遠東貿易公司常董唐賢仁先生。

大會於 10 月 13 日開幕，十月份南半球澳洲春暖花開，氣候宜人。開幕典禮由大會主席杜爾博士 (Dr. K. M. Doull) 主持，在亞特蘭大市可容納兩千人的文化中心大廳舉行。大會期間，在室外的「養蜂器具展覽」，看到許多以前只在書本上見過的養蜂器具，如塑膠蜂箱(圖 4)、吊運蜂箱的大型吊車(圖 5)、蜂王運送器(圖 6)、塑膠巢框(圖 7)等，印象深刻。展覽場中巧遇美國蜜蜂皇后 (Honey Queen) 與觀眾握手，她是大會邀請的貴賓，引起眾人圍觀(圖 8)。另有一場非常特別的澳洲原住民「毛利人長茅及迴旋鏢」表演，L 型的迴旋鏢投到約 20~30 公尺的空中，盤旋後又飛回原表演者的手中。表演時大會主席也到場觀賞，機會難得主動邀請他合照存念(圖 9)。他得知我們來自台灣，也很好奇，詳細詢問了台灣養蜂事業的情況。參加大會的世界各國人士都有，難得遇到穿裙子又打領帶的男人，特別與這對愛爾蘭夫婦合照留念(圖 10)，他們也很高興遇到台灣來的養蜂業者。

「蜂產品展覽」在室內廊廳展出，展場正面是「澳洲蜂蜜局歡迎」的牆面設計(圖 11)，展場中展出電動搖蜜機(圖 12)、手工型巢礎壓製機及蜜蜂觀察箱(圖 13)、蜂蜜品嚐器組(圖 14)、各種蜂蜜及包裝(圖 15)、蜜源植物與蜂蜜(圖 16)、蜂蠟用途及製品(圖 17)等。

歐美普遍使用繼箱飼養蜜蜂，使用繼箱後的蜂箱很重，無法用人工搬運，需要靠大型吊車懸吊並使用拖車拖運。以前從未想過蜂箱及巢礎，還可以使用塑膠材質製作。展出的各式電動搖蜜機，設計精良又合乎衛生。展覽室中展出許多各地古代的蜂巢、模型及照片，蜜源植物、各種蜂蜜容器及包裝等。從這些養蜂展品及器具觀察，台灣小農式的養蜂方式，與歐美集約式大規模的養蜂方式，確實有很大差異。

參加大會時，認識了各國養蜂研究者及養蜂公司負責人，例如日本名古屋養蜂研究所的井上凱夫、神戶大學農學部農業昆蟲研究室的內藤親彥博士、全日本蜜蜂協同組合的副理事長清水進一及日新蜂蜜株式會社的社長岸野憲逸。瑞士的 Paul Yagues、和 Eh. Bonwrd 博士，紐西蘭蜂蜜市場行銷總經理 Curtis Wicht，芬蘭養蜂業的 Kari Koivulehto，捷克養蜂雜誌社的 Mr. Duro Sulimanovic 等。各國養蜂同好都非常友善，交談甚歡。當年蜜蜂蟹蝨在台灣養蜂場中已形成危害，但是歐美養蜂業者及多國養蜂專家，仍然不知蜂蟹蝨危害的嚴重性，這也成為在大會中與歐美專業人士交談的話題。回國後仍與國外專業人士保持聯絡，在蜜蜂病蟲害防治問題上互相切磋。

作者首次出國，第一次參加國際 APIMONDIA 養蜂大會，正巧剛考入博士班攻讀「蜜蜂研究」，有緣參與盛會，實屬榮幸。雖僅短短七天的國際養蜂會議，卻可快速瞭解歐美的養蜂型態，廣增見聞拓展視野，獲益良多。台灣與世界各先進國家的養蜂型態，確實有很大落差。政府的養蜂主管機構、養蜂業者及學術界，都需要在養蜂技術方面更加努力，才能儘快趕上世界水平。

參考文獻

毛潤豐。1977。蜜蜂品嚐展示會宗旨。中華養蜂3期3頁。台灣省養蜂協會。

安奎。1977。中華養蜂試刊號。24-27頁。台灣省養蜂協會。

陳源祥。1977。嘉義市蜂蜜運銷合作社概況。安奎個人通訊。

張朝琴。1977。中華蜂王乳產銷股份有限公司概況。安奎個人通訊。

程發和。1974。台灣蜂場經營之研究。台灣土地金融季刊39：11-1。1-28頁。

廖瑞仁。1977。發展蜂王乳外銷。農業週刊3卷31期。24頁。

Inoue, T. & A. Inoue, 1964. The world royal jelly industry: present status and future prospects. Bee World 45(2) : 59-69.

1.台灣代表團員	2.台灣養蜂協會翁文炳(左一)理事長到機場送機
	
3.「遠東貿易代表團」羅世琪代表(右起)與張朝琴、李錦洲及作者	4.塑膠蜂箱及繼箱
	

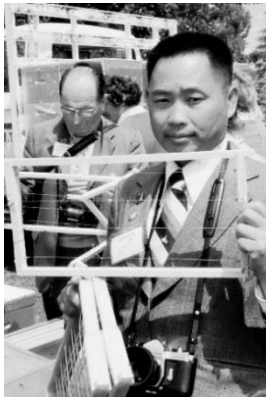
5.吊運蜂箱的大型吊車



6.李錦洲常務理事與蜂王寄送器



7.塑膠巢框



8.美國蜜蜂皇后與毛利人



9.大會主席 Dr. Keith M. Doull 與我代表團合影

1977年澳洲舉辦26屆世界養蜂大會主席
Dr. Keith M. DOULL 與台灣養蜂協會代表團合影



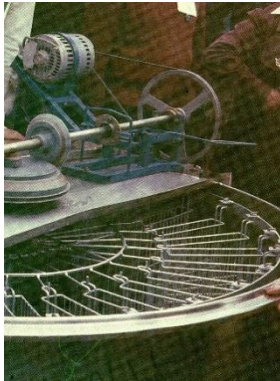
10.穿裙子打領帶的愛爾蘭男人夫婦



11.澳洲蜂蜜局的歡迎主題板



12.電動搖蜜機(54片巢脾)



13.手工型巢礎壓製機(下角)及蜜蜂觀察箱(三片巢脾直立)



14.蜂蜜品嚐器(10個一組)



15.各種蜂蜜及包裝



16. 蜜源植物與蜂蜜展示



17. 蜂蠟用途及製品展示



五种蜂花粉氨基酸分布及破壁前后氨基酸变化

张红城

中国农业科学院蜜蜂研究所

利用飞行时间二次离子质谱 (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, TOF-SIMS) 分析技术分析莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉、茶花蜂花粉五种蜂花粉中氨基酸的分布情况, 以期为破壁提供理论支撑, 并通过氨基酸分析仪测定分析五种蜂花粉破壁前后的氨基酸含量变化。

1. 实验材料与设备

1.1. 实验材料与试剂

莲花蜂花粉, 油菜蜂花粉, 杏花蜂花粉, 五味子蜂花粉, 茶花蜂花粉, 由中国农业科学院蜜蜂研究所提供, 具体信息见表 2-1。新鲜蜂花粉真空冻干至恒重, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存备用。

磷酸盐缓冲液 Thermo Fisher 公司; 环氧树脂 812 上海北诺生物科技有限公司; 钼酸、戊二醛 上海榕柏生物技术有限公司; 茚三酮 上海贺康生物技术有限公司; 0.0025 mol/L 混合氨基酸标准液 仪器制造公司; 盐酸、氢氧化锂、乙醇、苯酚、二甲基亚砷、丙酮、柠檬酸钠、冰乙酸 均为分析纯, 购自北京化工厂。

1.2. 仪器与设备

Leica EM UC6 型超薄切片机 德国 Leica 公司; TOF.SIMS 5 型飞行时间二次离子质谱仪 德国 ION-TOF GmbH 公司; HITACHI L-8900 氨基酸分析仪 日本日立公司; DCTZ-1000 三频多用途恒温超声提取机 北京弘祥隆生物技术开发有限公司; FLUKO 弗鲁克 FA25 高剪切分散乳化机 上海弗鲁克流体机械制造有限公司; LGJ-18S 冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司; Seven Easy 型 pH 计、AL104 型电子天平 Mettler-Toledo 公司; Milli-Q 超纯水系统系列 Merck Millipore 公司。

1.3. 实验方法

1.3.1. 氨基酸分布分析

将自然蜂花粉样品固定、漂洗、过渡、包埋后, 进行超薄切片, 切片厚度要求 $1\text{ }\mu\text{m}$

μm ，并将切片捞至铜网干燥，干燥好后送入仪器样品室待测。

采用 TOF-SIMS 分析蜂花粉中氨基酸分布。样品分析室真空度为 3.0×10^{-9} Torr；离子源为铋 (Bi_3^+) 源，一次离子束的能量为 30 keV，束流为 0.3 pA；使用低能电子枪消除荷电效应；二次离子为正离子。

1.3.2. 氨基酸含量分析

按照 GB/T 5009.124-2003 食品中氨基酸的测定方法进行。

2. 结果与分析

2.1. 氨基酸分布分析

TOF-SIMS 原理：使用脉冲化的一次离子入射到样品表面，把从样品表面溅射出来的二次离子加速到一定的能量（通常 $1 \sim 3\text{keV}$ ），飞行一定的距离后，不同质量的原子或碎片离子、相应的飞行时间不同，从而得知样品中元素、化学成分的组成和分布。近年来，TOF-SIMS 已经成为化学分析中的重要手段，应用 TOF-SIMS 表面质谱、化学成像和深度剖析技术可以鉴定样品表面的有机成分乃至生物成分的二维、三维分布。可获得生物分子在细胞表面及组织切片上的二维分布以及生物分子在细胞和生物体组织中的空间分布。

在阅读一些关于使用飞行时间二次离子质谱分析氨基酸的文献后，归纳整理出部分氨基酸特有的碎片峰（表 2），并认为含有这些特有碎片峰的有机分子为对应的氨基酸，因此特有碎片峰在一定程度上可以反应出对应氨基酸的分布情况。

表2 特有碎片峰及其可能来源

序号	特有碎片峰		可能来源
	分子式	质量数	
1	$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}^+$	56.05	赖氨酸
2	$\text{C}_2\text{H}_5\text{S}^+$	61.01	甲硫氨酸
3	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}^+$	68.05	脯氨酸
4	$\text{C}_4\text{H}_5\text{O}^+$	69.03	苏氨酸
5	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}^+$	72.08	缬氨酸
6	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$	86.09	亮氨酸或异亮氨酸
7	$\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_3^+$	110.07	组氨酸
8	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}^+$	120.08	苯丙氨酸

2.1.1. 赖氨酸分布分析

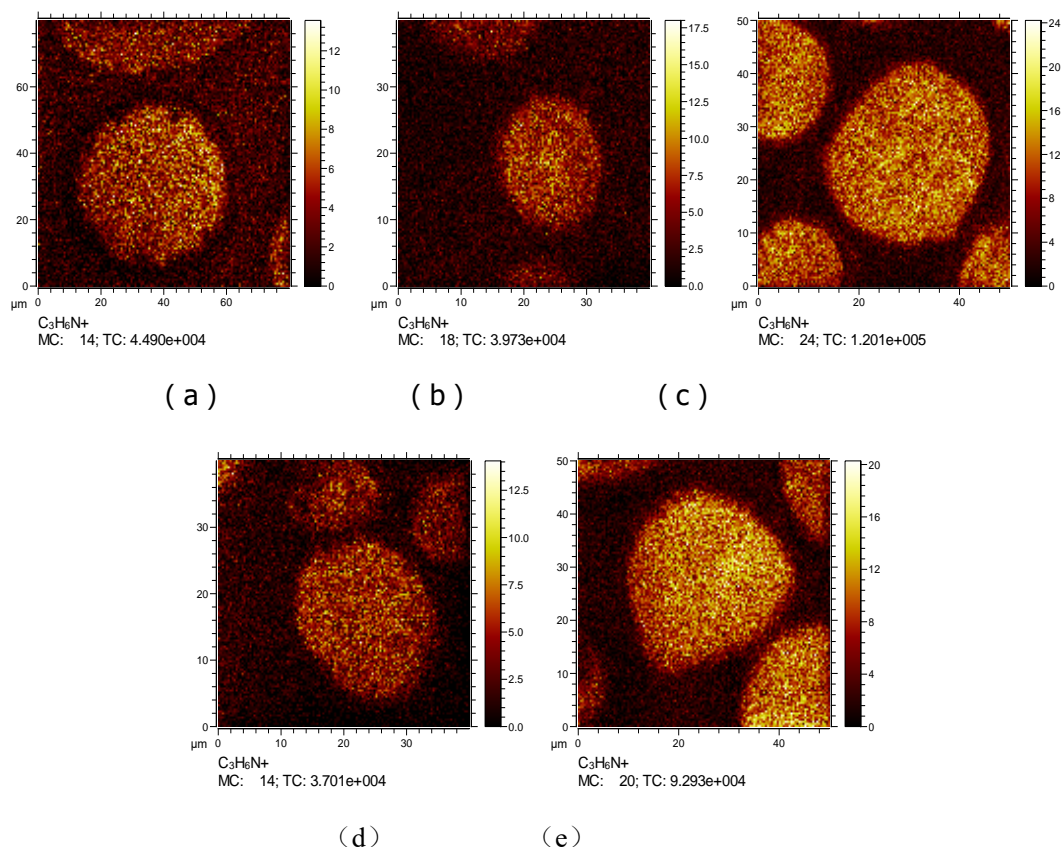


图 1 碎片峰 $C_3H_6N^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图 1 呈现了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉样品切片上碎片峰 $C_3H_6N^+$ 的信号强度。从图中可以看出，对于五种蜂花粉来说，花粉壁内碎片峰 $C_3H_6N^+$ 的信号强度较强，花粉壁外碎片峰 $C_3H_6N^+$ 的信号强度较弱，所以赖氨酸主要分布于花粉壁内部。对于莲花蜂花粉来说，花粉壁内的碎片峰 $C_3H_6N^+$ 信号强度强于花粉壁的碎片峰 $C_3H_6N^+$ 信号强度，所以赖氨酸在花粉壁内的含量要高于花粉壁上的含量。

2.1.2. 甲硫氨酸分布分析

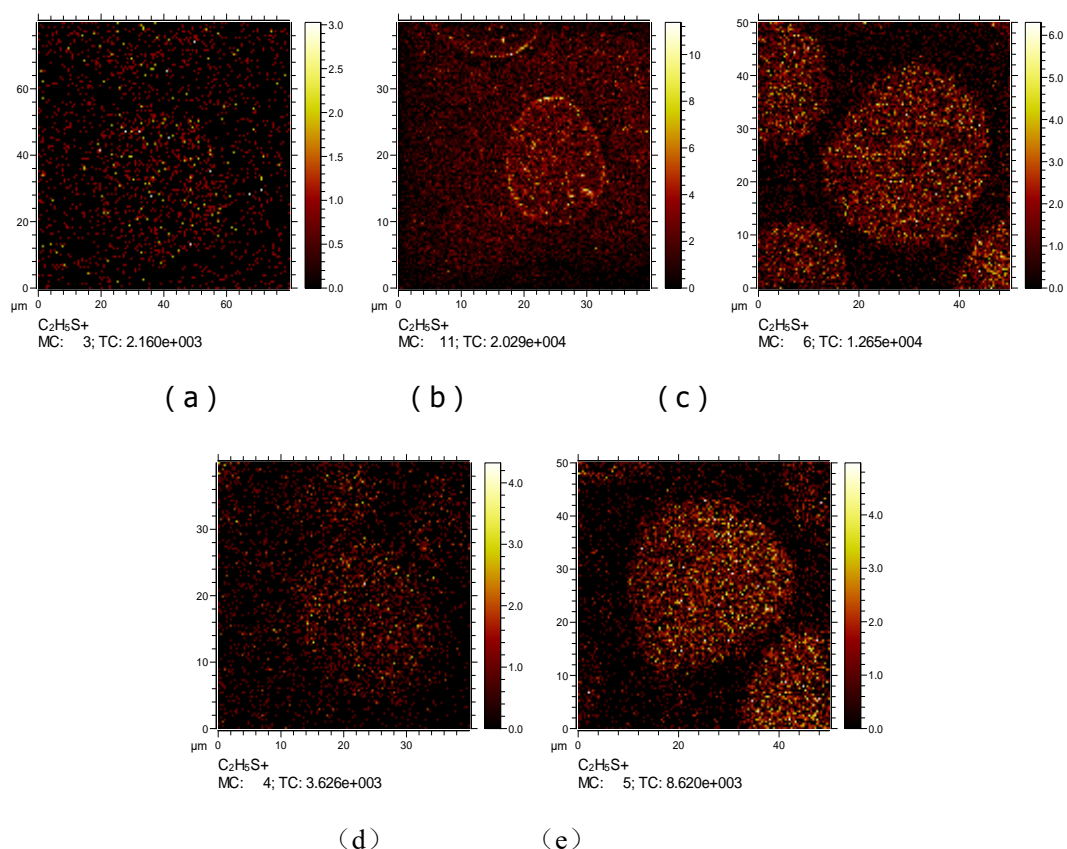


图 2 碎片峰 $C_2H_5S^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图 2 呈现了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉样品切片上碎片峰 $C_2H_5S^+$ 的信号强度。由图可知，对于莲花蜂花粉和五味子蜂花粉来说，花粉壁内外的碎片峰 $C_2H_5S^+$ 信号强度相差不大，并且信号较弱，所以甲硫氨酸均匀分布于花粉壁的内部和外部，并且含量较少。对于油菜蜂花粉来说，花粉壁上的碎片峰 $C_2H_5S^+$ 信号强度强于花粉壁内的碎片峰 $C_2H_5S^+$ 信号强度，所以甲硫氨酸在花粉壁上的含量要高于花粉壁的内部含量。对于杏花蜂花粉和茶花蜂花粉来说，花粉壁内的碎片峰 $C_2H_5S^+$ 信号强度强于花粉壁外的碎片峰 $C_2H_5S^+$ 信号强度，所以甲硫氨酸主要分布于花粉壁内部。

2.1.3.脯氨酸分布分析

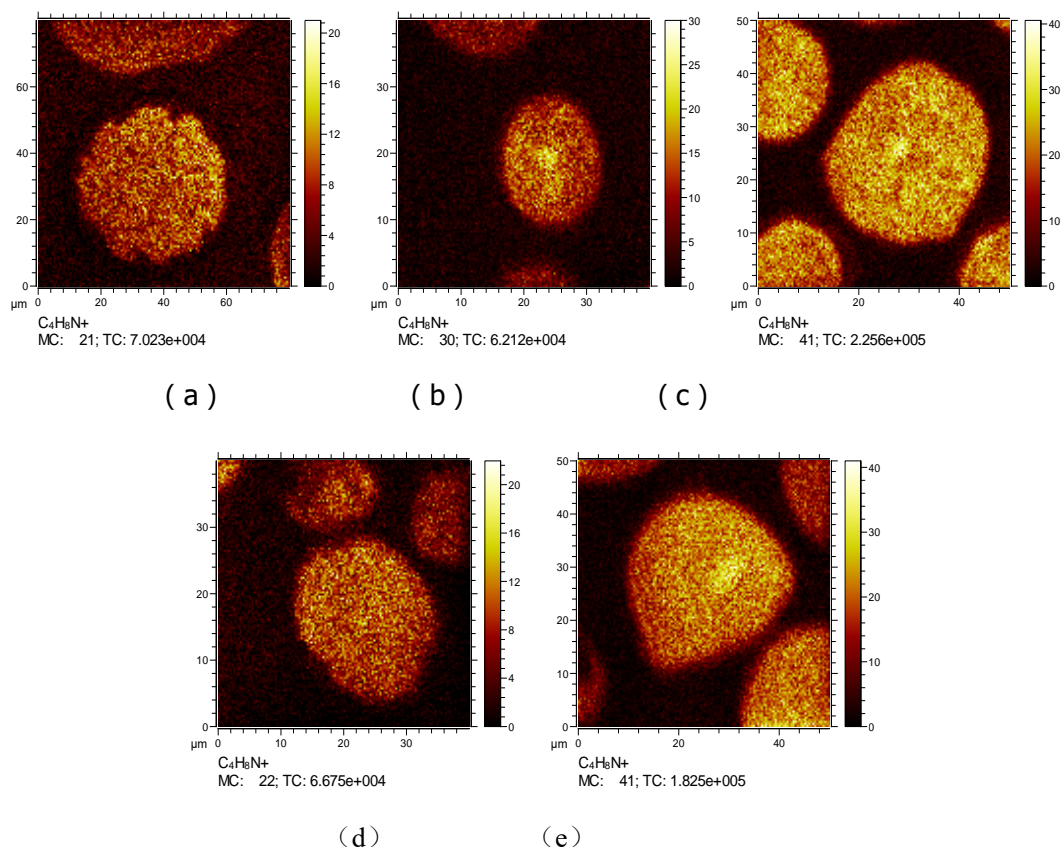


图3 碎片峰 $C_4H_6N^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图3展示了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉样品切片上碎片峰 $C_4H_6N^+$ 的信号强度。从图中可以看出，对于五种蜂花粉来说，花粉壁内的碎片峰 $C_4H_6N^+$ 信号强度远强于花粉壁外的碎片峰 $C_4H_6N^+$ 信号强度，所以脯氨酸主要分布于花粉壁内部。对于莲花蜂花粉来说，花粉壁内的碎片峰 $C_4H_6N^+$ 信号强度强于花粉壁的碎片峰 $C_4H_6N^+$ 信号强度，所以脯氨酸在花粉壁内的含量要高于花粉壁上的含量。

2.1.4. 苏氨酸分布分析

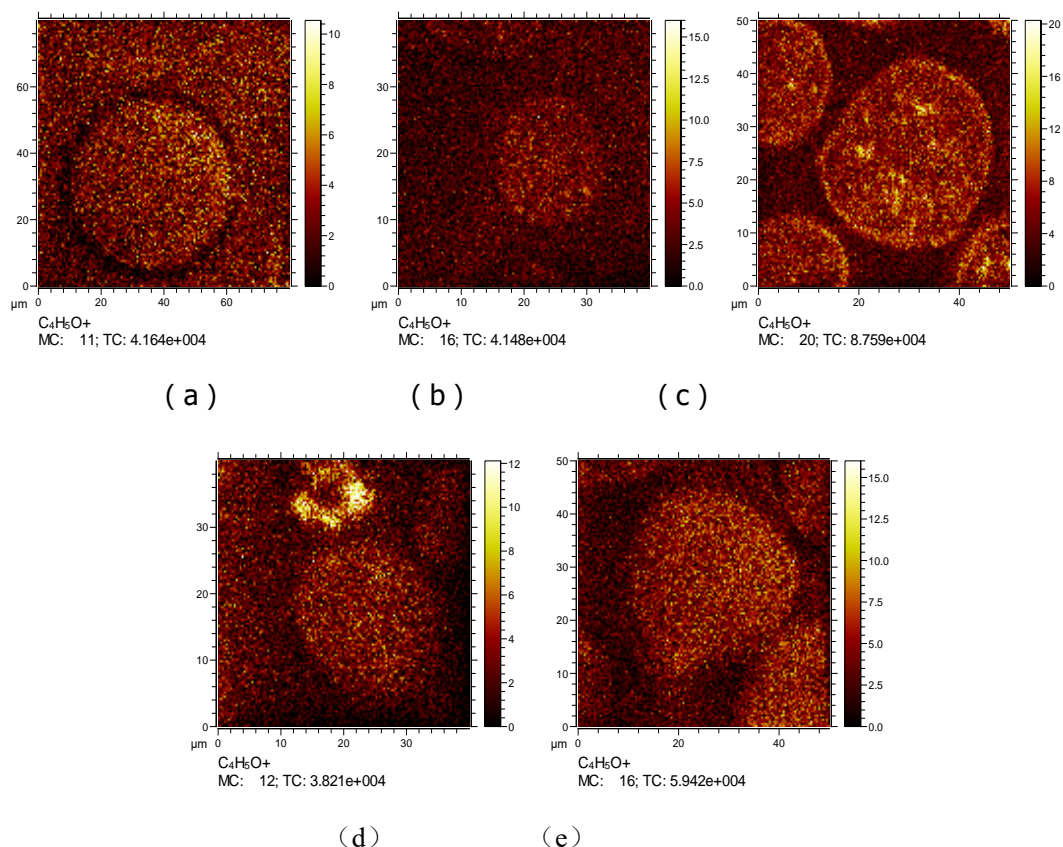


图 4 碎片峰 $C_4H_5O^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图 4 展示了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉样品切片上碎片峰 $C_4H_5O^+$ 的信号强度。由图可知，对于莲花蜂花粉来说，碎片峰 $C_4H_5O^+$ 信号强度在花粉壁内外的各处均匀分布，但花粉壁上的信号明显较弱，所以苏氨酸均匀分布于花粉壁的内部和外部。对于油菜蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉来说，花粉壁内的碎片峰 $C_4H_5O^+$ 信号强度略微强于花粉壁外的碎片峰 $C_4H_5O^+$ 信号强度，小切片五味子蜂花粉壁内的 $C_4H_5O^+$ 信号强度较大，所以苏氨酸主要分布于花粉壁内部。对于杏花蜂花粉来说，花粉壁内某些点及花粉壁的碎片峰 $C_4H_5O^+$ 信号强度最强，花粉壁外的碎片峰 $C_4H_5O^+$ 信号强度最弱，所以苏氨酸主要分布于花粉壁内部。

2.1.5. 缬氨酸分布分析

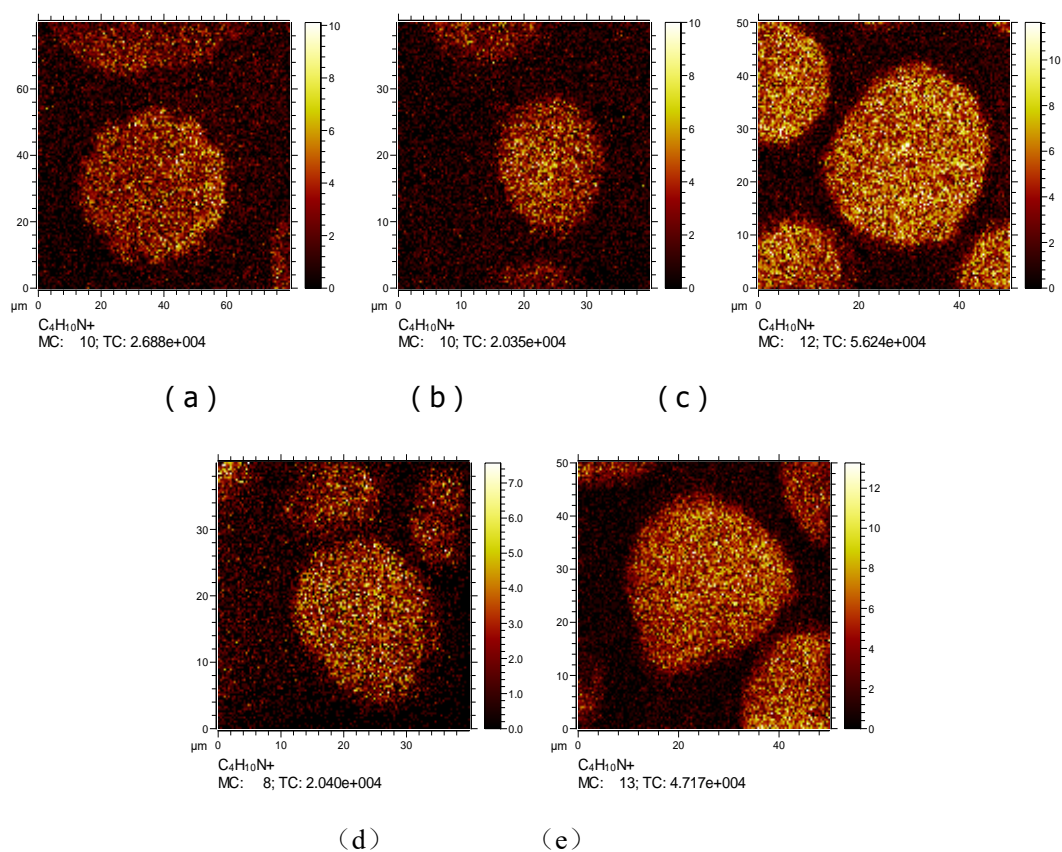


图 5 碎片峰 $C_4H_{10}N^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图 5 呈现了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉样品切片上碎片峰 $C_4H_{10}N^+$ 的信号强度。从图中可以看出，对于五种蜂花粉来说，花粉壁内的碎片峰 $C_4H_{10}N^+$ 信号强度较强，花粉壁外的碎片峰 $C_4H_{10}N^+$ 信号强度较弱，所以缬氨酸主要分布于花粉壁内部。

2.1.7.亮氨酸或异亮氨酸分布分析

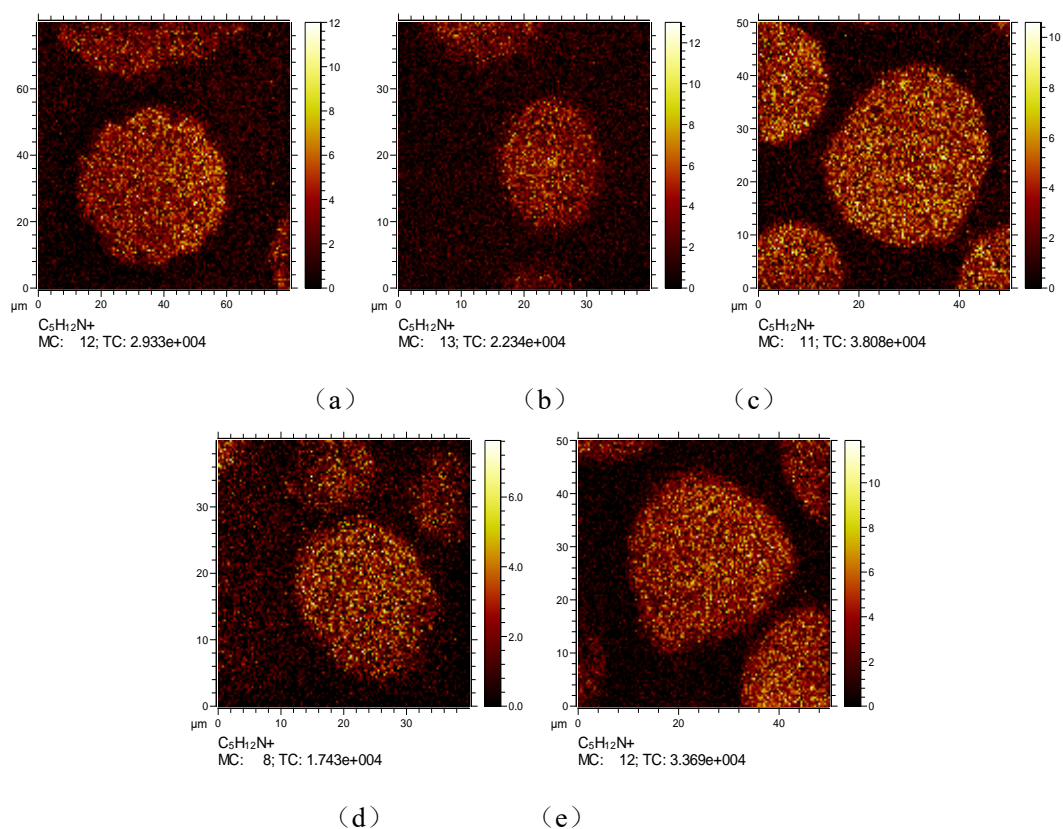


图 6 碎片峰 $C_5H_{12}N^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图 6 展示了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉中碎片峰 $C_5H_{12}N^+$ 的信号强度。从图中可以看出，对于五种蜂花粉来说，碎片峰 $C_5H_{12}N^+$ 在花粉壁内的信号强度强于在花粉壁外的信号强度，所以亮氨酸或异亮氨酸主要分布于花粉壁内部。

2.1.8. 组氨酸分布分析

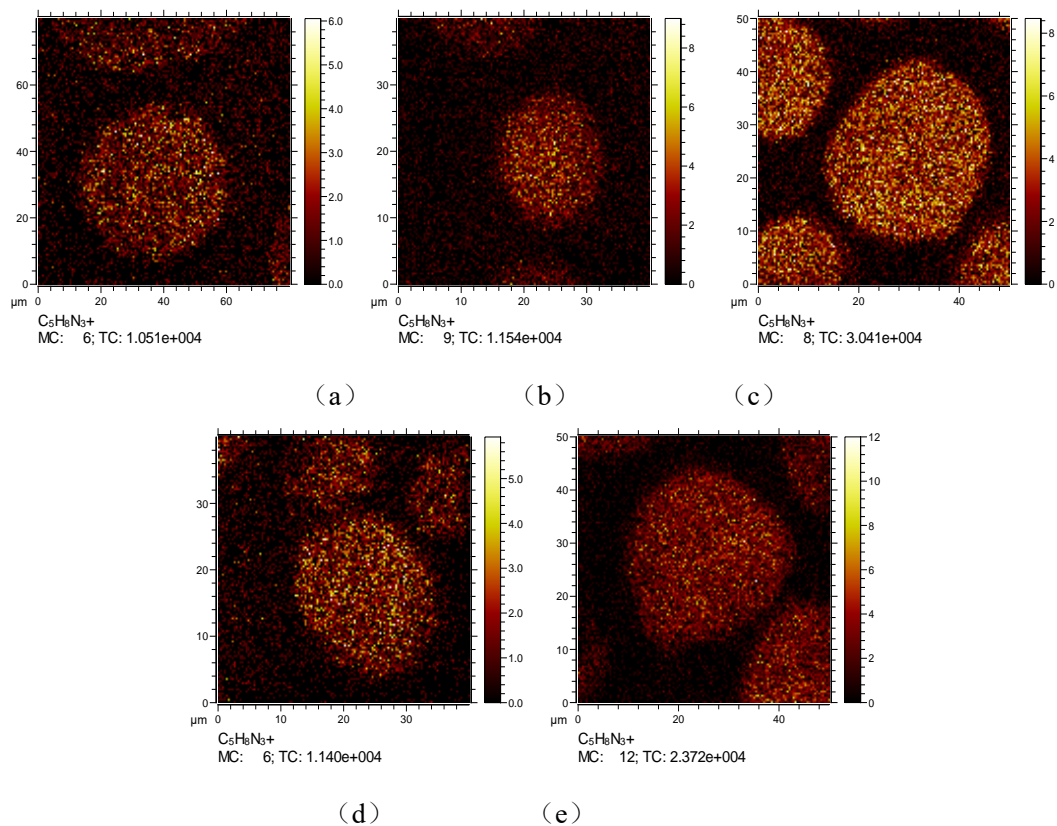


图 3-7 碎片峰 $C_5H_8N_3^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图 7 展示了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉中碎片峰 $C_5H_8N_3^+$ 的信号强度。从图中可以看出，对于五种蜂花粉来说，碎片峰 $C_5H_8N_3^+$ 在花粉壁内的信号强度略强于在花粉壁外的信号强度，所以组氨酸主要分布于花粉壁内部。

2.1.9. 苯丙氨酸分布分析

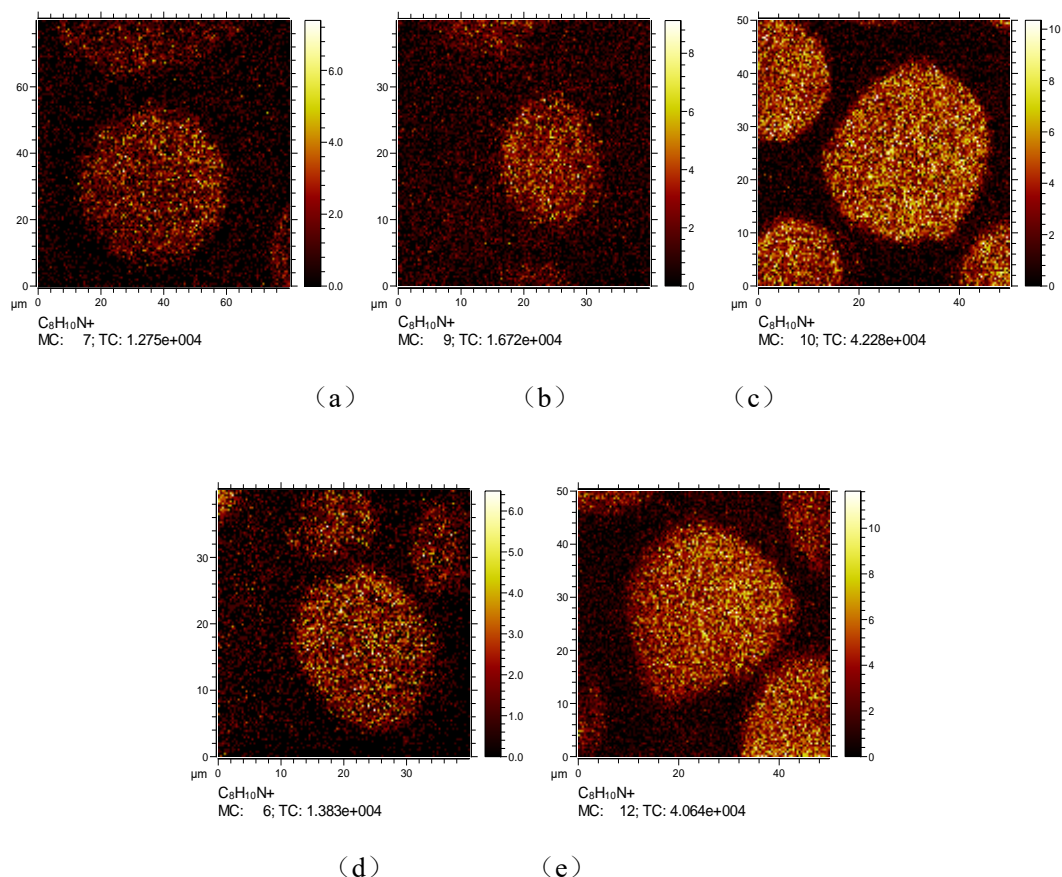


图 8 碎片峰 $C_8H_{10}N^+$ 的位置分布

注：图片 (a) (b) (c) (d) (e) 分别来自莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉。

图 8 呈现了莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉样品切片上碎片峰 $C_8H_{10}N^+$ 的信号强度。从图中可以看出，对于五种蜂花粉来说，碎片峰 $C_8H_{10}N^+$ 在花粉壁内的信号强度强于在花粉壁外的信号强度，所以苯丙氨酸主要分布于花粉壁内部。

综上所述，对于莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉来说，总体看来赖氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸、组氨酸、苯丙氨酸主要分布于花粉壁内部。另外，也有个别蜂花粉的个别氨基酸在花粉壁上的含量较高，如油菜蜂花粉的甲硫氨酸和杏花蜂花粉的苏氨酸；也有个别蜂花粉的个别氨基酸均匀分布于花粉壁的内部和外部，如莲花蜂花粉的甲硫氨酸、苏氨酸和五味子蜂花粉的甲硫氨酸。

2.2.氨基酸含量分析

由表 2 可知，总体看来，破壁后的莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉的氨基酸含量增高，这些氨基酸包括赖氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸和精氨酸。对于莲花蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉、茶花蜂花粉来说，脯氨酸含量增加率最高；对于油菜蜂花粉来说，酪氨酸含量增加率最高。

对于赖氨酸、脯氨酸、苏氨酸来说，破壁后杏花蜂花粉中的含量增加率最高；对于甲硫氨酸、异亮氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸来说，破壁后油菜蜂花粉中的含量增加率最高；对于缬氨酸、组氨酸、苯丙氨酸、精氨酸来说，破壁后茶花蜂花粉中的含量增加率最高；对于亮氨酸来说，破壁后莲花蜂花粉中的含量增加率最高。

表3 蜂花粉中氨基酸的含量

编号	自然蜂花粉 (g/100g)					破壁蜂花粉 (g/100g)					增加率 (%)				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1	0.60	0.61	0.97	0.72	0.99	0.69	0.82	1.43	1.02	1.42	15.00	34.43	47.42	36.00	43.43
2	0.37	0.49	0.51	0.46	0.64	0.36	0.51	0.53	0.46	0.66	2.70	4.08	3.92	0.00	3.13
3	0.53	0.78	1.74	1.31	1.46	0.67	1.09	2.68	1.89	2.12	26.42	39.74	54.02	44.27	45.21
4	0.73	0.89	0.86	0.93	0.98	0.79	1.09	1.07	1.01	1.12	8.22	22.47	24.42	8.60	14.29
5	0.86	0.99	1.23	1.00	1.37	0.95	1.11	1.40	1.13	1.56	10.47	12.12	13.82	13.00	13.87
6	1.41	1.61	1.94	1.63	2.16	1.63	1.74	2.16	1.74	2.37	15.60	8.07	11.34	6.75	9.72
7	0.73	0.85	0.96	0.87	1.12	0.75	0.91	1.01	0.90	1.18	2.74	7.06	5.21	3.45	5.36
8	0.39	0.41	0.49	0.42	0.57	0.42	0.44	0.58	0.50	0.69	7.69	7.32	18.37	19.05	21.05
9	0.84	0.81	0.84	1.10	1.01	0.84	0.96	1.03	1.31	1.25	0.00	18.52	22.62	19.09	23.76
10	0.35	0.53	0.79	0.97	0.88	0.38	1.07	0.77	1.01	0.89	8.57	101.89	2.53	4.12	1.14
11	2.17	1.93	3.12	2.32	2.76	2.19	2.33	3.08	2.38	2.79	0.92	20.73	1.28	2.59	1.09
12	0.96	1.06	1.31	1.16	1.41	0.93	1.36	1.33	1.17	1.42	3.12	28.30	1.53	0.86	0.71
13	2.14	2.23	3.15	2.75	3.37	2.23	2.68	3.19	2.84	3.34	4.21	20.18	1.27	3.27	0.89
14	0.81	0.93	1.07	1.04	1.18	0.79	1.16	1.20	1.08	1.24	2.47	24.73	12.15	3.85	5.08
15	1.17	1.25	1.70	1.22	1.79	1.18	1.27	1.72	1.23	1.81	0.85	1.60	1.18	0.82	1.12
16	0.84	0.97	1.39	0.97	1.34	0.87	1.01	1.43	1.01	1.41	3.57	4.12	2.88	4.12	5.22

注：蜂花粉样品 A-E 分别是 A. 莲花蜂花粉；B. 油菜蜂花粉；C. 杏花蜂花粉；D. 五味子蜂花粉；E. 茶花蜂花粉。编号 1-16 分别是 1. 赖氨酸；2. 甲硫氨酸；3. 脯氨酸；4. 苏氨酸；5. 缬氨酸；6. 亮氨酸；7. 异亮氨酸；8. 组氨酸；9. 苯丙氨酸；10. 酪氨酸；11. 天冬氨酸；12. 丝氨酸；13. 谷氨酸；14. 甘氨酸；15. 丙氨酸；16. 精氨酸。

结合氨基酸分布和氨基酸含量分析可知，赖氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸、组氨酸、苯丙氨酸主要分布于花粉壁内部，而且破壁后这些氨基酸含量都有增加。此外，花粉壁内的特有碎片峰信号强度的强弱与对应氨基酸含量增加率的高低存在一定关系，呈现出信号强度越强，对应氨基酸含量增加率越高的规律。

3. 结论

(1) 通过飞行时间二次离子质谱 (TOF-SIMS)，结合相关文献数据分析，莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉的花粉壁内的碎片峰 $C_3H_6N^+$ 、 $C_2H_5S^+$ 、 $C_4H_6N^+$ 、 $C_4H_5O^+$ 、 $C_4H_{10}N^+$ 、 $C_5H_{12}N^+$ 、 $C_5H_8N_3^+$ 、 $C_8H_{10}N^+$ 信号强度较强，这些碎片峰的可能来源为赖氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸、组氨酸、苯丙氨酸，因此以上这些氨基酸主要分布在花粉壁内部。

(2) 经超声-高剪切联用法破壁后，莲花蜂花粉、油菜蜂花粉、杏花蜂花粉、五味子蜂花粉和茶花蜂花粉等五种蜂花粉的氨基酸含量有所增加，其中油菜蜂花粉总氨基酸含量增加最高，增加率为 347.96%；莲花蜂花粉总氨基酸含量增加最低，增加率为 76.33%。

蜜蜂病虫害风险评估研究现状与发展趋势

余林生¹, 李耘², 张友华¹, 李方东¹, 刘芳¹, 汪天澍¹, 施腾飞¹, 齐磊¹

(1. 安徽农业大学蜂业研究所, 合肥, 230036; 2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京, 100081)

Current Situation and Development Trends of Risk Assessment for Bee Pests & Disease

YU LingSheng¹; LI Yun²; ZHANG YouHua¹; LI FangDong¹; LiuFang¹; Wang Tianshu¹; Shi Tengfei¹; Qi Lei¹

1. AnHui Agricultural University, Anhui, 230036, P.R. China
2. Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-products, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, P.R. China

摘要

鉴于蜜蜂病虫害风险评估对蜂产业健康、可持续发展的战略意义及迫切性, 本文首先阐述了当前国内外蜜蜂风险评估的分类及领域; 其次, 重点介绍了利用 META 方法评价蜜蜂病虫害风险、利用气候相似性原理评价蜂螨对西蜂风险、利用风险指标体系评价囊状幼虫病对中蜂风险、利用场景建模方法评价白垩病对蜜蜂风险, 以及利用云计算实现蜜蜂病虫害风险估计等蜜蜂病虫害风险评估主要且可实现的技术、方法及其应用现状; 最后提出了我国蜜蜂病虫害风险评估当前存在的主要瓶颈和未来发展方向等。

关键词: 蜜蜂病虫害; 风险评估; 研究现状; 发展趋势

Abstract

In view of importance for bee industry health and sustainable development to carry out the bee pest risk assessment, this paper put forward the classification and fields of current risk assessment for bee health; meanwhile, introduce the main and operational methods, technologies and application for assessing the risk to bee, which are including using META method to evaluate pest & disease of bee, climate similarity principle to evaluate the effects of mites in Chinese bee, the risk index system to evaluate Saclike larva disease to West bee, scene modeling methods to evaluate the halkbrood disease, and cloud computing to assess the bee pest risk estimation; finally, raise the main bottleneck and the future development direction of bee pests risk assessment in China.

Keywords: Bee pests & diseases; Risk assessment; Current situation; Development trends

蜜蜂是自然界十分重要的一类生物，不但给消费者提供营养和丰富多样的蜂产品，同时与人类生活密切相关。在欧洲的自然区系中，80%被子植物由昆虫传粉，在395种植物上所采到的838种传粉昆虫中，膜翅目占43.7%，而蜜蜂总科又占膜翅目总数的55.7%，蜜蜂在演化过程中，已逐渐代替了其他物种，成为最主要的传粉昆虫^[1]。由此可见，健康蜜蜂不但带来高品质、高产量的蜂产品，同时还对维护大农业可持续发展具有直接和间接的影响，保证蜜蜂健康是维护蜂产品质量安全和促进蜂产业健康发展的基本前提和必要保障。但目前生态环境恶化、外来生物入侵以及病虫害等原因导致蜂群衰竭失调（CCD），引起蜜蜂抗病虫能力降低以及群势大量损失，所以有针对性开展风险评估已迫在眉睫。随着在其他领域应用上取得的成功，可预计不久的将来，合理、科学、有步骤、有重点地将风险评估技术与蜜蜂病虫害防控的重大需求相结合，必将成为今后蜂产业科研创新和行业发展的新契机和必然途径。

1. 国内外蜜蜂风险评估分类及领域

1.1. 农药对蜜蜂健康影响风险评估

农药（尤其是杀虫剂）大面积喷洒后，易引起蜜蜂直接接触药剂而中毒，有时则因蜜蜂吸食有毒的花蜜或水而中毒，而有时则是蜜蜂将带药的花粉带回蜂房，使整群蜜蜂中毒死亡。因为蜜蜂对农药的敏感性，因此以蜜蜂为环境靶标指示物来评价环境健康风险可为农药登记管理和合理用药提供依据。农药对蜜蜂健康评估方法具有比较成熟的体系，包括蜜蜂毒理评估、田间和半田间评估等几部分，在国外欧盟食品安全局（EFSA）、美国环境保护署（EPA）等官方农药登记管理上应用广泛。该方法是以各农药对蜜蜂毒性有大有小来判定，毒性通常以半数致死中量(LD₅₀)来表示（即将意大利蜜蜂的成年工蜂饲养在 23~27℃ 微光条件下使其接触农药 24 h 后中毒死亡 50% 的农药剂量水平，以 μg/蜂为单位。按 LD₅₀ 值的大小，把农药对蜂蜜毒性划分为三个等级。

——高毒级为 0.01~1.99μg/蜂；

——中等毒级为 2.0~10.99μg/蜂；

——低毒级为大于 11.0μg/蜂。

1.2. 蜜蜂生物入侵风险评估

我国引进西方蜜蜂(意大利蜜蜂、欧洲黑蜂等)后，西蜂在部分城市周边农村迅速扩散，取代了生存在靠近城市平原和半山区的中蜂群，并逐步向各地发展，目前，全国中华蜜蜂种群数量比引进西方蜜蜂前减少 80% 以上。因此，西方蜜蜂对我国中蜂而言属于入侵生物，但当时是在未针对外来蜂群入侵当地蜂群的风险进行合理评价的情况下的引入。美国针对非洲蜜蜂和欧洲蜜蜂入侵其他区域进行定性评估，并基于高、中和低风险来描述^[3]。

1.3. 蜜蜂病虫害风险评估

针对蜜蜂病虫害实施风险评估在发达国家才刚刚起步，相关研究和报道较少，有的更多是定性评价和分析，如美国动植物卫生检验局(APHIS)于 2002 年 3 月至今持续针对澳

大利亚蜜蜂入侵美国境内的概率以及澳大利亚蜜蜂可能携带的 15 种病毒和虫害对美国境内蜜蜂出现不明衰竭失调 (Colony Collapse Disorder, CDD) 的影响展开调查与风险评估^[2]。而在国内, 蜜蜂病虫害风险评估研究及应用几乎空白, 一是由于经济昆虫蜜蜂在生理学和生物学等各方面存在特殊性前端数据储备较少, 带来实现蜜蜂病虫害风险评估难度较大; 二是蜜蜂产业规模较小, 其影响力和重要性无法在短期内得到足够的重视; 三是全世界蜜蜂资源及蜂产品主产区主要集中和分布在亚洲、欧洲、和北美洲, 而亚洲, 尤其我国是全球蜂产品出口和蜜蜂资源储备最丰富的大国, 而我国在蜜蜂病虫害风险评估相关研究和工作几乎空白导致全球在此领域严重滞后。

2. 国内外蜜蜂病虫害风险评估技术及发展趋势

2.1. 应用 META 方法对蜜蜂病虫害相关数据进行筛选和分析

META 方法是对同一议题下多个独立实验或研究结果进行综合统计与分析的方法。该方法脱胎于 1976 年, 但直到 90 年代, META 方法才被生态学家发现, 虽然目前在生态学中应用实例还很少, 但已引起生态学界的高度重视。META 方法在应用于对照实验的综合研究中, 判断实验中处理会对实验对象产生效应正负相关性、大小、一致性、变异性和不确定性等具有一定意义。主要步骤首先是提出收集与议题相关资料的标准, 其中资料可来已发表的正式期刊论文、会议论文、摘要及未发表但通过明确研究方法得出的资料等。然后对资料进行分类和分级, 以作比较。然后是开展定性或定量 META 分析, 定性 META 分析即制定标准, 对研究议题主要特点进行专家评判打分和评估, 综合研究结果和专家打分结果得出结论。也有人称这一步为定量 Meta 分析, 以相对于定性 Meta 分析。定量 META 方法是先提出假设, 构造一个统计量, 然后计算各研究结合统计量, 并用其在定性 META 分析中所得分数去权重它的结合统计量, 计算各级别研究中的加权平均结合统计量做各级别研究间统计量的异质性检验。异质性检验表针参数包括同质性 (Q_{wi})、自由度 (df)、 X^2 检验的 p 值及级别间同质性 (Q_b)、级别内总同质性 (Q_w) 和总同质性 (Q_{total}) 等。如果某一级别内同质性 (Q_{wi}) 经检验显著, 说明该级别内各研究效应值差异较大, 应该进一步划分此级别, 再分析, 直到 Q_{wi} 经检验不显著。

如蜜蜂受病虫害影响因素众多, 且研究来源资料广泛, 可设定利用当前国内外相关资料证明气候参数对蜜蜂病虫害影响是否最重要的议题。

2.2. 采用“气候相似距”针对蜜蜂蜂螨建模及风险评估

蜜蜂蜂螨会受到多维因素的影响，包括气候、蜂农养殖行为、蜜蜂群势、处于同一生态位的大蜂螨和小蜂螨及其本身的生活遗传史等（见图-1），相对复杂。但多维因素中气候因素是影响蜂螨定殖（见图-2），及蜜蜂生长的重要因素，估计出气候因素对蜂螨影响蜜蜂健康影响的权重值，就可以利用“气候相似性原理”来开展风险评估。

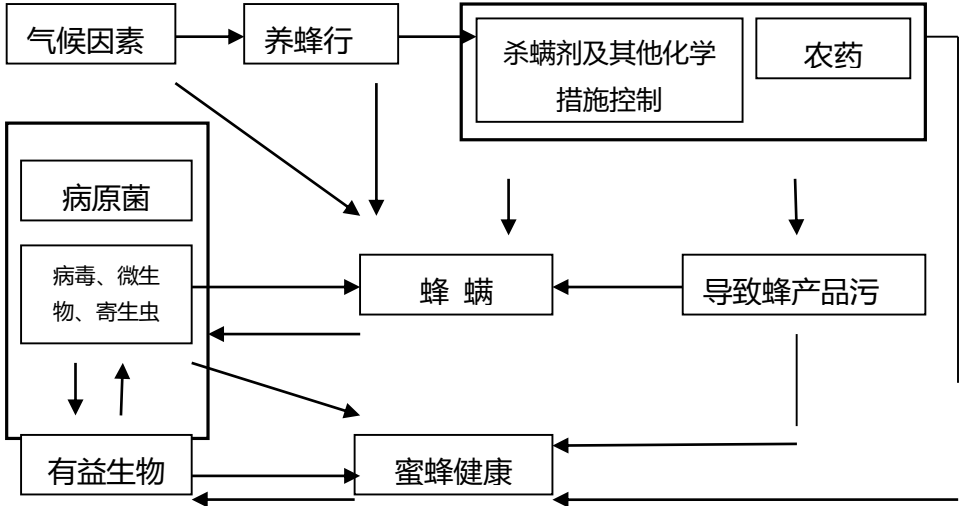


图-1 蜂螨及相关因素综合对蜜蜂健康影响的关系

Figure 1 The relationship between bee health and the mites with related comprehensive factors

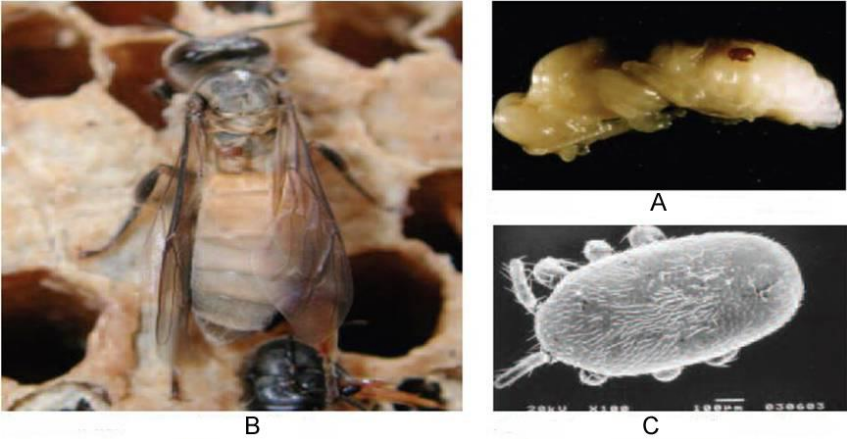


图-2 蜂螨形态，其中A:蜜蜂幼虫上的蜂螨；B:成蜂上的蜂螨；C:电镜下的蜂螨

Figure 2 Bee mites forms, where in A: mites in bee larvae; B: mites on adult bee; C: mites in electron microscope

所谓“气候相似性”是利用蜜蜂主要虫害（蜂螨）生长繁殖区域敏感的温度、湿度、风向、光照等气候指标及其时空分布规律的相似性来做为评定目标区域该虫害适宜分布区域时所遵循的原则。运用该原则，可较准确地预测虫害在目标区域适生的可能性和范围等，达到评估和预测风险的目的。目前，课题组已根据历年我国蜜蜂虫害（蜂螨）爆发积累的数据和征求行业专家意见，提出蜜蜂虫害（蜂螨）敏感的气候参数及优先排序序列，同时构建这些参数形成的空间矩阵。各气候要素 $C=(C_1, C_2, C_3, \dots, C_M)$ 个，每个要素序列 S 有 N 个；其次，寻求固定空间矩阵相似度计算方法并提出基础模型，所谓“气候相似性”是使蜂螨爆发区域 A 空间矩阵与评估目标区域 B 空间矩阵具有结构相似性，目前采用常用单一和多气象因素的欧氏距离和海明距离计算相似离度。改进后的欧式距离法计算相似距，模型见公式-1：

$$d_{ab} = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{k=1}^m (x'_{ak} - x'_{bk})^2}$$

公式-1

模型中 d_{ab} 代表相似距， x'_{ak} 、 x'_{bk} 代表 A 、 B 两个区域点第 k 种敏感气候因子的数据结果，其中：

$$x'_{ak} = \frac{x_{ak} - \bar{x}_k}{\partial_k} \quad \bar{x}_k = \frac{1}{n} \sum_{a=1}^n x_{ak} \quad \partial_k = \sqrt{\frac{\sum_{a=1}^n (x_{ak} - \bar{x}_k)^2}{n-1}}$$

$$x'_{bk} = \frac{x_{bk} - \bar{x}_k}{\partial_k} \quad \bar{x}_k = \frac{1}{n} \sum_{b=1}^n x_{bk} \quad \partial_k = \sqrt{\frac{\sum_{b=1}^n (x_{bk} - \bar{x}_k)^2}{n-1}}$$

公式-1 中 \bar{x}_k 为第 k 种敏感气候因子的平均值， ∂_k 是第 k 种敏感气候因子的均方差。

课题组针对 1960 年我国首次在江西发现的小蜂螨爆发情况为假想 A 地进行模拟分析。时间段选择 1960 年 1 月至今逐月数据， B 地点选择 9 个综合试验站，气候参数选择平均气温 K_1 、平均相对湿度 K_2 、日照时数 K_3 、降水量 K_4 这四个气象指标的数据。然后

对所有结果进行分级，设定爆发预警的级别，根据以上划分预警级别就可以确定适生区的等级标准，继而可以确定目标区域是属于那种等级的适生区。

根据该方法得出新乡综合实验站各站点中浚县、新乡市、长葛市都属于最佳适生区，卢氏县为中度适生区，郑州市为轻度适生区。乌鲁木齐综合实验站各站点中尼勒克县、博湖县为中度适生区，布尔津县、新源县、伊宁市都是非适生区。合肥综合实验站各站点中，桐城市、巢湖市、绩溪县、徽州区都是属于最佳适生区（风险图谱见图-3）。目前课题组已完成相关方法研究并纳入实际平台应用。

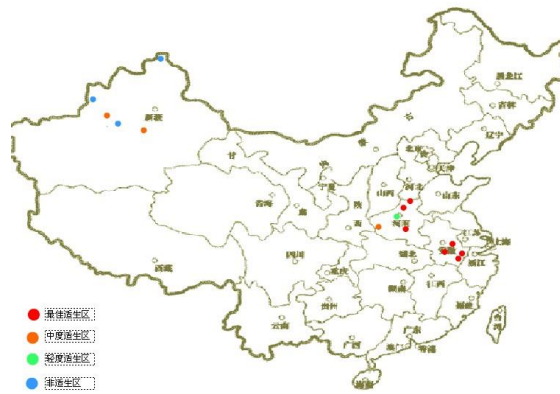
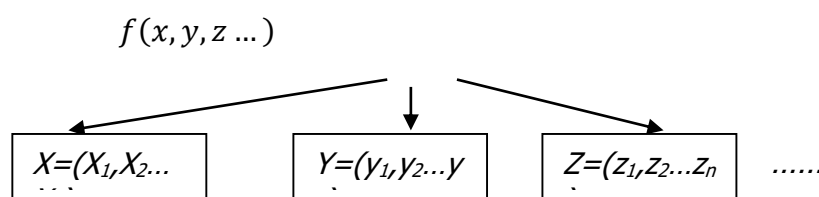


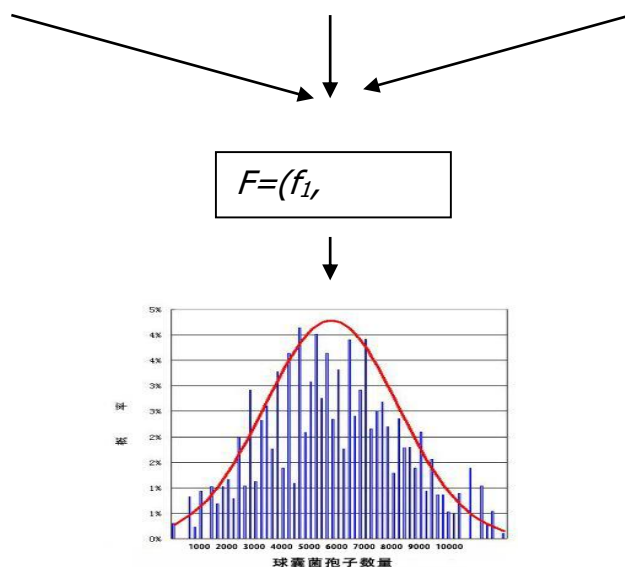
图-3 利用气候相似性原理计算风险并绘制的风险图谱

Figure 3 The risk map according to the results calculated by climate similar methods

2.3. 采用构建场景模式针对蜜蜂白垩病建模及风险评估

通过构建不同场景更为精准模拟蜂球囊菌孢子数量在侵染蜜蜂整个动态过程中变化来实现风险预测具有可实现性，从观察指标（如温度、相对湿度和降雨量等），即可实现对后一段时期内蜜蜂感染白垩病的风险。采用的步骤是确定蜜蜂感染白垩病球囊菌孢子的不同以及可能的场景，确定每个场景中的风险事件，进而采用数学模型来描述场景中球囊菌感染蜜蜂不同过程，最后通过模拟（主要是蒙特卡洛模拟）和采用极大似然估计提出其发生概率（蒙特卡罗方法原理见图-4）





注： $f(x,y,z\dots)$ 表示球囊菌孢子在某评估建模场景中的含量水平； $X=(x_1,x_2,x_3\dots x_n)$ 表示影响含量水平的主要相关参数数据集

Note: $f(x, y, z\dots)$ indicate the balloon spore number in certain model scene; $X=(x_1,x_2,x_3\dots x_n)$ indicate the main parameter sets related with contents .

图-4 Monte Carlo 模拟评估蜜蜂白垩病的球囊菌孢子数量水平分布

Figure 4 Balloon spore number of chalkbrood in bee acquired by Monte Carlo simulation

通过该方法的研究，可探寻到导致部分蜜蜂致病、死亡以及蜂群崩溃等不同危害级别相关的球囊菌孢子存在的阈值水平，从而在实际工作中，只要针对前端的环境因子以及蜜蜂食物（球囊菌孢子主要携带源）中球囊菌阈值水平的监测，就可以预测影响蜜蜂健康的相关危害级别。首先，确定蜜蜂感染球囊菌孢子的所有途径，并建立以人类行为、蜜蜂行为、盗蜂行为为大场景，以家养、野生，未感染、已感染，工蜂、雄蜂，幼虫、成虫等作为划分子场景的依据，因为蜜蜂主要传播媒介是花粉和蜂蜜等，由于这两个途径较容易实验重现和模拟，所以最终选择工蜂摄入花粉和蜂蜜两种途径为主要研究对象。所以首先要描绘出蜜蜂感染球囊菌孢子的整个暴露途径。其次，获取球囊菌孢子在主要场景的主要载体中的生长预测模型。蜜蜂球囊菌的孢子存在于自然环境中，与温度和湿度的关系非常密切，所以在建立生长预测模型时，温度、湿度和 pH 参数为首选。再确定蜜蜂摄入带有球囊菌孢子的蜂蜜和花粉在蜜蜂体内感染的情况，球囊菌孢子在蜜蜂体内

有一个繁殖阶段，最后确定蜜蜂健康的阈值研究。表征此阈值水平的研究和报道较少，需要进一步开展研究，还需要考虑蜜蜂自清洁行为的影响以及蜂王和气候等影响的因素，而这些因素非常难于控制，且很多清理行为在夜晚发生。

当模拟确定出球囊菌孢子含量水平分布后，通过与既定的爆发阈值水平比对，即可确定是否存在风险及风险大小水平。

2.4. 针对蜜蜂病虫害建立风险指标体系实现风险评估

风险评估指标体系主要方法是层次分析法，即 AHP 法。该方法是一种定性与定量相结合的分析决策方法，将复杂问题分解成多个组成因素，形成一个多目标、多层次、有序的逐阶层次结构模型，通过两两比较的方式确定层次中诸要素的相对重要性，对这些元素的整体权重进行排序判断，最后确立各元素的权重。

该方法首先是通过专家打分、资料文献分析或经上述介绍的 META 分析筛选出指标体系；然后对这些指标的相对重要性进行比较和赋值，得到 m 个指标间的判断矩阵 $C=(c_{ij})_{m*m}$ 。其中 $c_{ij}(i,j=1,2\dots m)$ 满足: $c_{ij}=1$ 表示指标 i 比指标 j 极端重要，3、5、7、9 分别表示非常重要、一般重要、重要、偏重要，2、4、6、8 分别表示介于相邻两者之间；倒数则表示指标 j 比指标 i 重要，程度级别与上述对应。

判断矩阵 C 依据以下步骤计算权重因子过程如下：

a) 判断矩阵列向量归一化：
$$C' = (c'_{ij})_{m*m} \quad c'_{ij} = \frac{c_{ij}}{\sum_{k=1}^m c_{kj}} \quad (i=1,2,\dots,m)$$

b) C' 矩阵按行求和：
$$w_i = \sum_{j=1}^m c'_{ij} \quad (i=1,2,\dots,m)$$

c) 向量 $(w_1, w_2, \dots, w_m)^T$ 归一化 (W_i 是指标的权重值)：
$$W_i = \frac{w_i}{\sum_{i=1}^m w_i} \quad (i=1,2,\dots,m)$$

d) 利用特征根法，对最终的权重向量进行一致性检验，修正偏离过大的结果，即主观

性过强。计算最大特征值：
$$\lambda_{\max} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m \frac{c_{ij} w_j}{w_i}$$

目前课题组已利用该方法针对中蜂囊状幼虫病筛选出 13 个关键指标，然后利用上述方法开展风险评估得出相关结论（见表-1），结果显示：蜂种（蜂种抗病性、蜂王质量）是影响中蜂囊状幼虫病最重要的因素。

表-1 利用 AHP 法评价得出中蜂囊状幼虫病风险排序结果

Table 1 Risk ranking results of cystidium in bee using the AHP method

序号	指标	风险排序权重值
1	蜂种（蜂种抗病性、蜂王质量）	0.1547
2	疫区（新病区、老病区、引种、爆发间隔年数）	0.1088
3	春繁初期成年蜂体内病原量	0.0922
4	蜂群中蜂子比（哺育负担）	0.0874
5	蜜粉源条件（尤其春繁初蜜粉源）	0.0769
6	蜂群群势（尤其越冬后蜂群群势）	0.0767
7	春繁初期幼虫体内病原量	0.0756
8	蜂场卫生消毒措施	0.0710
9	蜂巢（巢脾年限、换脾次数）	0.0644
10	气候[蜂场朝向、温度（越冬保温）、湿度、通风透 气、光线]	0.0572
11	饲料（食物）	0.0540
12	蜂脾关系（紧松程度）	0.0489
13	春繁时间（早繁）	0.0322

2.5.利用云计算实现蜜蜂病虫害风险评估

云是用语言描述的定性概念与其数值表示之间的不确定性转换模型，反应自然语言中概念的模糊性和随机性，并构成两者的映射。云模型所表达概念的整体特性利用期望、

熵、超熵三个数字特征来表征。本模型的处理流程：从上述 A 区域的定性概念模糊描述中得出各指标对应的概念取值，匹配标尺云，得到隶属度矩阵，经过加权运算得到融合指标集信息的全等级数字特征矩阵，利用正向云发生器生成综合评估云图，通过分析云图确定最终评估结果。图-5 为方法流程图。

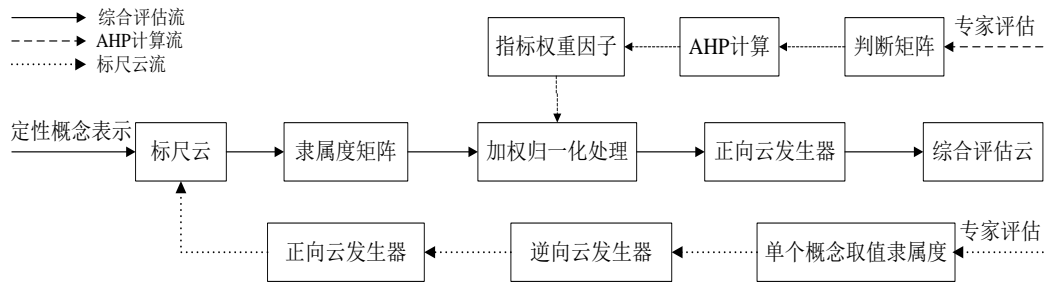


图-5 云计算流程图

Figure 5 Cloud computing flow chart

针对目标对象的程度等级，专家对各个指标下的所有取值进行独立重复评估，给出概念取值对于目标对象程度等级的隶属度分别为： v_i, w_i, x_i, y_i, z_i ，且 $0 \leq v_i, w_i, x_i, y_i, z_i \leq 1$ ，其中 $i \leq n, n$ 为专家的个数。 n 组隶属度构成云滴，利用逆向云发生器得到反映这一概念的程度等级为（重度、偏重、中度、偏轻、轻度）的数字特征 Ex, En, He 。然后，利用正向云发生器生成这一概念对应 5 个程度等级的云图，同理可得上述不同指标的不同取值情况的概念隶属云，即评估标尺云。

然后从专家对于某区域态势模糊描述中，取一个指标概念值与标尺云匹配，对应于不同程度级数的数学期望值作为此指标的隶属度，同理匹配指标的一系列隶属度向量构成相应矩阵，矩阵元素均为隶属度，行代表各个指标，列代表程度等级（概念矩阵见图-6）。

$$\begin{bmatrix} Ex_{v_1} & Ex_{h_1} & Ex_{m_1} & Ex_{l_1} & Ex_{o_1} \\ Ex_{v_2} & Ex_{h_2} & Ex_{m_2} & Ex_{l_2} & Ex_{o_2} \\ \dots & & & & \\ Ex_{v_{13}} & Ex_{h_{13}} & Ex_{m_{13}} & Ex_{l_{13}} & Ex_{o_{13}} \end{bmatrix}$$

图-6 概念矩阵

Figure 6 Concept matrix

程度矩阵每列进行加权求和，使不同列元素归一化为全等级行向量，行向量的值为评估目标的数学期望。熵和超熵的计算方法与期望相同。计算得出多维全等级向量，构成融合所有指标信息的全等级数字特征矩阵。熵越大，则评估数据离散程度越大；超熵越大，则云滴厚度越厚，目标对象确定度的随机性也就越大（综合评估云图见图-7）。

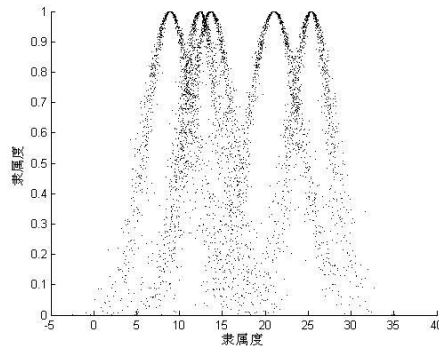


图-7 4个区域（广州、福州、扬州、合肥）等级为重度的中蜂囊状幼虫病
综合评估云图

Figure 7 The cloud figure by comprehensive evaluation for the 4 regions (Guangzhou, Fuzhou, Yangzhou, Hefei) with severe ranking

3. 蜜蜂病虫害风险评估发展瓶颈及未来展望

蜜蜂病虫害风险评估技术体系经过2-3年的研究储备，已在相关基础数据库建设、风险监测、评估和预警方法研究及其平台建立等方面取得初步进展。但同时也发现很多问题。

3.1. 病虫害对蜜蜂健康影响基础性研究相对薄弱

相对其他风险评估研究和工作开展较好的领域，蜜蜂病虫害风险评估前端研究基础储备相对薄弱，主要包括为风险评估提供关键技术支撑的病虫害与蜜蜂致病和发病机理机制，病原物诊断鉴定，病虫害生物学特性、生活史（迁飞、扩散、繁殖与传染行为等）及关键遗传基础，病虫害导致蜜蜂致病预警指标和敏感标记物筛选等。上述基础性和支撑性研究储备不足无法满足风险评估模型建立及其验证，更无法确保预测预报的精

准性。但从我国发表蜜蜂病虫害相关基础性研究论文呈现逐年上升趋势来看（见图-8），蜜蜂病虫害基础性研究方兴未艾。

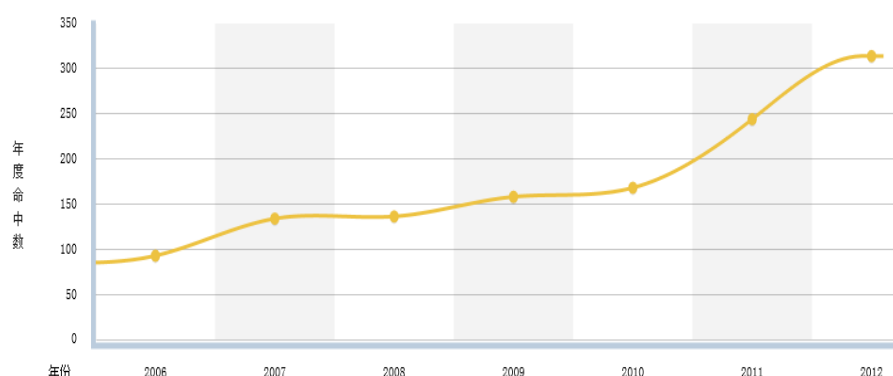


图-8 我国蜜蜂病虫害相关文献发表数量及趋势

Figure 8 Quantity and trend of published literature about Chinese bee pests & diseases

3.2. 蜜蜂病虫害风险评估数据严重不足

风险评估所需大量基础数据储备的严重缺乏和不足是风险评估技术无法真正实现以及应用的最大瓶颈，风险评估领域有“输入垃圾，输出垃圾”说法，即使风险评估技术手段非常先进和风险建模非常完美，但因为本身建模所依靠的数据缺乏或基础信息导向错误，则风险评估模型得到的结论就会存在偏差，甚至错误。因此，开展蜜蜂病虫害风险评估研究，首要工作应当从收集系统、连续和精确数据开始，并确保数据来源及实验条件和水平尽量一致性。

3.3. 蜂产业相对较小且风险评估人才严重缺乏

我国蜂产业生产的总体状况是产业规模较小，蜜蜂养殖的散养化程度高，蜂农文化程度相对低。蜜蜂病虫害领域专业性相对较强，风险评估结合和配套的专业人才极度缺乏，该缺陷导致风险评估研究和工作连续性和科学性存在一定制约，最终导致风险防控技术具体应用示范和推广上出现障碍。

基于上述问题，并结合蜂产业发展未来需求，应当加强蜜蜂病虫害传播机制和机理等方面的基础性研究，建立蜜蜂病虫害基础数据储备；做好风险评估技术与蜜蜂病虫害

防控目标吻合的风险评估技术体系；强化蜜蜂病虫害风险防控技术的集成、应用和示范，注重成果的固化和可操作性，服务产业有明确的目的性，不可为评估而评估；培养一批从事蜜蜂病虫害风险评估专家队伍，为蜜蜂病虫害的防控和蜂产业的可持续发展提供技术支撑和保障。

参考文献

- [1] 余林生, 孟祥金. 意大利蜜蜂与中华蜜蜂授粉生态比较[J]. 养蜂科技, 2001(6):9-10
- [2] Wayne F. Wehling. Pest Risk Assessment: Importation of Adult Queens, Package Bees and Germplasm of Honey Bees, *Apis mellifera* L., From Australia[EB/OL]. http://www.bee-keeping.com/articles/us/import_australia.htm, 2000-4/2011-06-01.
- [3] African bee pest risk assessment [EB/OL]. http://www.oregon.gov/OISC/docs/pdf/calendar_may_assessment09.pdfga=t.
- [4] Conte Y. L., Ellis M., Ritter W. , Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?, INRA/DIB-AGIB/EDP Sciences, 2010.

臺灣林地養蜂芻議

趙榮台

行政院農業委員會林業試驗所森林保護組

台北市南海路 53 號

jtchao@tfri.gov.tw

摘要

臺灣的蜂農過去多在農業區（尤其是果園）養蜂，由於農藥噴撒相當普遍，蜂農必須尋找農藥施用量較低的地區，或與果農達成協議，在花季停止噴藥，以避免農藥汙染蜂蜜，甚至毒殺蜜蜂。相對而言，森林地區完全沒有農藥汙染的問題，而且森林蜜源植物的多樣性遠高於農業作物，具備發展多元蜂產品及特色蜂產品的潛力。此外，林地養蜂有可能增加林農收益，並提高林木結果率，促進森林更新與健康。然而養蜂的規模太大，卻有可能與原生的授粉蜂類競爭，對生物多樣性造成負面影響。而林地養蜂作業和林業經營可否互補，也有待評估。筆者於 2015 年選定人工林（臺灣糖業公司嘉義鰲鼓東石農場 16 號地）一處，天然林（林業試驗所所蓮華池研究中心）一處，委請蜂神養蜂場在兩處各放置西洋蜜蜂（*Apis mellifera*）35 箱，雖然面臨諸多環境影響，東石農場與蓮華池兩地在半年之內仍能生產蜂蜜約 1,600 公斤，收穫量與農作區不相上下，頗具開發潛力。不過，要落實林地養蜂，還需要更廣泛的考量與規劃，進行更多的研究、評估並建立規範。

蜜蜂(*Apis mellifera*)老化及長壽機轉之研究

徐錦源^{1,2,3}，呂政諺²

¹長庚大學醫學院生物醫學系

²長庚大學醫學院生物醫學研究所

³林口長庚醫院婦產科

摘要

蜂王與工蜂擁有相同基因，但是蜂王的壽命比工蜂長 10-20 倍。因此，蜜蜂適合作為探究老化及長壽機轉的模式動物。過去，在營養細胞 (trophocytes) 和扁桃細胞 (oenocytes) 的研究指出工蜂的粒線體能量代謝、能量調節活性、細胞降解活性及細胞能量代謝呈現老化趨勢，在蜂王則維持長壽趨勢。進一步探究發現膽固醇 (cholesterol) 的量及 *cytochrome P450 314A1 20-hydroxylase*、*ecdysone receptor isoform A*、*ecdysone receptor isoform B1*、*ultraspiracle*、*ecdysone-induced protein 74*、*ecdysone-induced protein 75*、*broad-complex*、*vitellogenin* 和 *yolkless* 等基因的 mRNA 表現量，在工蜂維持低量，在蜂王則維持高量，證實膽固醇-蛻皮素-卵黃蛋白原 (cholesterol-ecdysone-vitellogenin) 路徑維持蜂王營養細胞 (trophocytes) 和扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽，此機轉可能參與蜂王的長壽。

簡介

蜜蜂(*Apis mellifera*)是獨特探討老化及長壽機轉的模式動物，因為蜂王與工蜂擁有相同基因，但是蜂王的壽命比工蜂長 10-20 倍 (Page and Peng, 2001; Omholt and Amdam, 2004; Rueppell et al., 2007; Remolina and Hughes, 2008)。除此之外，蜜蜂族群數量大、容易飼養與操作、基因已解碼、基因體接近脊椎動物使得蜜蜂適合做為探討老化及長壽機轉的模式動物 (Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006; Barchuk et al., 2007; Elsik et al., 2014)。

工蜂與蜂王皆是雌性蜂，但是壽命明顯差異。比較蜂王與工蜂的差異指出蜂王終身食用蜂王乳，然而工蜂食用蜂蜜及花粉 (Winston, 1987)。雖然蜂王大部分時間住在蜂巢內，只有交配及分蜂時會離開蜂巢，但是每天產一千五百至兩千個卵 (Camazine, 1991)。工蜂

只住在蜂巢內兩星期擔任蜂巢建造、蜂房清理及哺育的工作，之後每天約飛 21 公里採集花蜜及花粉 (Neukirch, 1982)。雖然蜂王與工蜂的工作不一樣，但是牠們的工作量對壽命的影響有限 (Hsu and Chan, 2013)，主要是受到食物影響 (Kamakura, 2011)。

細胞是構成生物體的基本單位，探討生物體老化及長壽的機轉，可以先探討細胞老化及長壽的機轉，經由細胞老化及長壽的機轉，了解生物體老化及長壽的成因。營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 在蜜蜂腹腔緊密結合形成細胞層環繞在腹腔。營養細胞 (trophocytes) 的型態較大及呈不規則狀，扁桃細胞 (oenocytes) 的型態較小及呈圓形狀，兩者緊密結合分不開。因為營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的生物功能類似哺乳類的白色脂肪組織或肝組織、容易由腹腔取出、方便操作及羽化後不再分裂使得營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 已經被用來當作研究細胞老化及長壽的標的細胞 (Haunerland and Shirk, 1995; Hsieh and Hsu, 2011a, b; Nilsen et al., 2011; Chan et al., 2011; Seehuus et al., 2013; Hsu and Chan, 2013; Chuang and Hsu, 2013; Hsieh and Hsu, 2013; Hsu and Chuang, 2014; Hsu and Hsieh, 2014; Hsu et al., 2014; Hsu and Hu, 2014; Hsu and Lu, 2015; Hsu et al., 2016)。

工蜂營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的老化研究

相對於蜂王，工蜂是易老化的群體。為了探討工蜂的老化過程，我們研究工蜂營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的細胞老化狀態。分析其粒線體能量代謝、能量調節活性、細胞降解活性及細胞能量代謝在老化過程的差異。

在粒線體能量代謝的研究指出(1)粒線體 (mitochondria) 數量隨年紀增加而增加。(2)粒線體的膜電位 (Δm)、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸氧化態 (NAD^+) 的量、腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 的量和 $NAD^+/NADH$ 的比率隨年紀增加而降低。(3) $NADH$ 去氫酶 1 ($NADH$ dehydrogenase 1, ND1)、ATP 合成酶 (ATP synthase) 及電位調控型陰離子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) 隨年紀增加而增加。(4) ND1 及 ATP synthase 除以粒線體 (mitochondria) 及電位調控型陰離子通道 1 (voltage-dependent anion channel 1, VDAC1) 的比例不變。這些結果顯示年輕工蜂比老年工蜂有高的粒線體能量代謝及老化導致粒線體能量代謝的下降 (Chuang and Hsu, 2013)。

在能量調節活性的研究指出(1)腺嘌呤核苷單磷酸活化蛋白激酶 2 (adenosine monophosphate-activated protein kinase 2, AMPK-2) 的表現量隨年紀增加而增加，然而磷酸化腺嘌呤核苷單磷酸活化蛋白激酶 2 (pAMPK-2) 的表現量、pAMPK/AMPK 的比例及 AMPK 活性隨年紀增加而降低。(2)腺嘌呤核苷雙磷酸(ADP) 的量及腺嘌呤核苷三磷酸(ATP) 的量隨年紀增加而降低，但是腺嘌呤核苷單磷酸 (AMP) 的量沒有差異。ADP/ATP 的比例不隨年紀增加而增加，但是 AMP/ATP 的比例隨年紀增加而增加。(3)環狀腺嘌呤核苷單磷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 隨年紀增加而降低及 cAMP 專一磷酸雙酯酶(phosphodiesterases, PDE) 隨年紀增加而增加。(4) Silent information regulator T1 (SirT1) 的表現量隨年紀增加而增加，然而它的活性隨年紀增加而降低。這些結果顯示年輕工蜂比老年工蜂有高的細胞能量調節活性及老化導致細胞能量調節活性下降 (Hsu and Chuang, 2014)。

在細胞降解活性的研究指出(1)20S 蛋白體酶 (20S proteasome) 的活性隨年紀增加而降低，然而其表現量隨年紀增加而增加。(2)微管相關蛋白輕鏈 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II) 和 70 kD 熱休克蛋白同源 (70 kD heat shock cognate protein, Hsc70) 的表現量隨年紀增加而降低。(3)自噬泡 (autophagic vacuoles) 的大小及數量隨年紀增加而降低。(4) p62/SQSTM1 和多聚泛素聚合體 (polyubiquitin aggregate) 的表現量隨年紀增加而降低。(5)溶酶體 (lysosome) 的活性隨年紀增加而降低。(6) molecular target of rapamycin (mTOR) 的表現量隨年紀增加而增加。這些結果顯示年輕工蜂比老年工蜂有高的細胞降解活性及老化導致細胞降解活性下降 (Hsu et al., 2014)。

在細胞代謝的研究指出(1)脂質氧化(β -oxidation)、非酯化脂肪酸 (non-esterified fatty acid, NEFA) 的濃度、脂酶 (lipase) 的活性、磷酸化肝糖合成激酶 (phosphorylated glycogen synthase kinase 3, p-GSK3) 的表現量、真核起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 的表現量及磷酸化真核起始因子 4E 鍵結蛋白 (phosphorylated eIF4E binding protein 1, p-4EBP1) 的表現量隨年紀增加而降低。(2)脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 的活性、脂質堆積 (fat accumulation) 及肝糖堆積 (glycogen accumulation) 隨年紀增加而增加。(3) phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)、乳酸 (lactate) 的濃度及糖解作用 (glycolysis) 不因年紀而改變。這些結果顯示年輕工蜂比老年工蜂有高的細胞代謝活性及老化導致細胞代謝活性下降(Hsu et al., unpublished data; Hsu and Chan, 2013)。

以上的研究指出工蜂的營養細胞(trophocytes)及扁桃細胞(oenocytes)呈現出老化型態(aging phenotypes)。

蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的細胞長壽研究

相對於工蜂，蜂王是長壽的群體。為了探討蜂王的長壽過程，我們研究蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的細胞長壽機轉。分析其粒線體能量代謝、能量調節活性、細胞降解活性及細胞能量代謝在長壽過程的差異。

在粒線體能量代謝的研究指出粒線體 (mitochondria) 數量、粒線體的膜電位(Δm)、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸氧化態 (NAD^+) 的量、菸鹼醯胺腺嘌呤雙核苷酸還原態 (NADH) 的量、腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 的量、 $NAD^+/NADH$ 的比率、NADH 去氫酶 1 (NADH dehydrogenase 1, ND1)/粒線體數量的比率及 ATP 合成酶 (ATP synthase)/粒線體數量的比率，在年輕及老年蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 沒有差異。這些結果顯示老年蜂王的粒線體能量代謝維持類似年輕蜂王的狀態及粒線體能量代謝參與維持蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽 (Hsu and Lu, 2015)。

在能量調節活性的研究指出腺嘌呤核苷單磷酸活化蛋白激酶 2 (adenosine monophosphate-activated protein kinase 2, AMPK-2) 的表現量、磷酸化腺嘌呤核苷單磷酸活化蛋白激酶 2 (pAMPK-2) 的表現量及 cAMP 專一磷酸雙酯酶(phosphodiesterases, PDE) 隨年紀增加而增加。pAMPK/AMPK 的比例、AMPK 活性、ATP 的量、ADP 的量、AMP 的量、ADP/ATP 的比例、AMP/ATP 的比例、cAMP 的量、forkhead box protein O (FoxO) 的表現量、Silent information regulator T1 (SirT1) 的表現量及活性，在年輕及老年蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 沒有差異。這些結果顯示老年蜂王的能量調節活性維持類似年輕蜂王的狀態及能量調節活性參與維持蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽 (Hsu and Hu, 2014)。

在細胞降解活性的研究指出 20S 蛋白體酶 (20S proteasome) 的活性及自噬泡 (autophagic vacuoles) 的大小隨年紀增加而降低。20S 蛋白體酶 (20S proteasome) 的表現量及效率、多聚泛素聚合體 (polyubiquitin aggregate) 的表現量、微管相關蛋白輕鏈 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II)、70 kD 熱休克蛋白同源 (70 kD heat shock cognate protein, Hsc70) 的表現量、自噬泡 (autophagic vacuoles) 的數量、p62/SQSTM1 的表現量、

溶酶體 (lysosome) 的活性、molecular target of rapamycin (mTOR) 的表現量，在年輕及老年蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 沒有差異。這些結果顯示老年蜂王的細胞降解活性維持類似年輕蜂王的狀態及細胞降解活性參與維持蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽 (Hsu et al., 2016)。

在細胞代謝的研究指出脂質氧化 (β -oxidation)、非酯化脂肪酸 (non-esterified fatty acid; NEFA) 的濃度、脂酶 (lipase) 的活性、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 的活性、phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) 的表現量、糖解作用 (glycolysis)、真核起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 的表現量及磷酸化真核起始因子 4E 鍵結蛋白 (phosphorylated eIF4E binding protein 1, p-4EBP1) 的表現量，在年輕及老年蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 沒有差異。然而，脂質堆積 (fat accumulation) 及肝糖堆積 (glycogen accumulation) 隨年紀增加而增加。這些結果顯示老年蜂王的細胞代謝維持類似年輕蜂王的狀態及細胞代謝參與維持蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽 (Hsu et al., unpublished data)。

以上的研究指出蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 呈現出長壽型態 (aging phenotypes)。

比較工蜂及蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的粒線體能量代謝、能量調節活性、細胞降解活性及細胞能量代謝，我們提出蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 擁有長壽的機轉維持營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽，因為工蜂及蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 在羽化後不再分裂。此種蜂王細胞長壽的機制可能與蜂王的長壽有關。

膽固醇 (cholesterol) - 氫氧蛻皮激素 (hydroxyecdysone) - 卵黃蛋白原 (vitellogenin) 路徑參與蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽

因為蜜蜂的循環系統屬於開放式循環，所以活化營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的細胞外物質皆存於血淋巴 (hemolymph) 中。因此工蜂及蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的粒線體能量代謝、能量調節活性、細胞降解活性及細胞能量代謝皆由位於細胞外的物質調控。為了找尋工蜂及蜂王營養細胞 (trophocytes) 及

扁桃細胞 (oenocytes) 的粒線體能量代謝、能量調節活性、細胞降解活性及細胞能量代謝的差異緣由，於是分析工蜂及蜂王的血淋巴 (hemolymph)，發現蜂王的血淋巴 (hemolymph) 有較高的卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 表現。卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 是卵黃蛋白的先驅物質，由脂肪體 (fat body) 合成 (Engels et al., 1990; Sappington and Raikhel, 1995)，而營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 是脂肪體 (fat body) 的主要細胞。過去的研究指出蜂王及長壽的工蜂表達高量的卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) (Robinson et al., 1991; Seehuus et al., 2006)，卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 基因敲除會降低工蜂的壽命 (Corona et al., 2007) 及卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 有抗氧化的能力可以促進蜂王的長壽 (Corona et al., 2007)。根據這些研究成果，蜂王的長壽及蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽可能與卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 的生成有關。

卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 的基因表達由轉錄因子(transcriptional factors) ecdysone-induced protein 74 (E74)、ecdysone-induced protein 75 (E75)及 broad-complex (BR-C) 調控 (Pierceall et al., 1999; Sun et al., 2002; Yang et al., 2014)。而 E74、E75 和 BR-C 的基因表達由 EcR/USP/20-hydroxyecdysone (20E) 細胞核接受體複合物調控 (Paul et al., 2005)。Ecdysone receptor isoform A (EcR-A)、ecdysone receptor isoform B1 (EcR-B1) 及 ultraspiracle (USP) 細胞核接受體複合物是 20-氫氧蛻皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 的接受體 (Yao et al., 1992; Talbot et al., 1993; Barchuk et al., 2004, 2008; Takeuchi et al., 2007; Hill et al., 2013; Hansen et al., 2014; Mello et al., 2014)。20-氫氧蛻皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 是活化的蛻皮激素，由蛻皮激素 (ecdysone) 經 Cyp314A1 酵素轉化而來。而蛻皮激素 (ecdysone) 由膽固醇 (cholesterol) 經蛻皮固醇生成路徑 (ecdysteroid biosynthesis pathway) 轉化而來 (Petryk et al., 2003; Yamazaki et al., 2011)。

在膽固醇 (cholesterol) - 氫氧蛻皮激素 (hydroxyecdysone) - 卵黃蛋白原 (vitellogenin) 路徑的研究指出膽固醇 (cholesterol) 的量、cytochrome P450 314A1 20-hydroxylase (Cyp314A1)、ecdysone receptor isoform A (EcR-A)、ecdysone receptor isoform B1 (EcR-B1)、ultraspiracle (USP)、ecdysone-induced protein 74 (E74)、ecdysone-induced protein 75 (E75)、broad-complex (BR-C)、卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 及 *yolkless* (Yl) 的 mRNA 表現量在蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的表現量高於工蜂的。*yolkless* (Yl) 是卵黃蛋白原 (vitellogenin, Vg) 的細胞膜表面接受體。這些結果顯示膽固醇 (cholesterol) - 氫氧蛻皮

激素 (hydroxyecdysone) - 卵黃蛋白原 (vitellogenin) 路徑參與蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽及參與蜂王的長壽 (Lu and Hsu, unpublished data)。

基於上述的研究成果，我們提出一假說，說明膽固醇 (cholesterol) - 氫氧蛻皮激素 (hydroxyecdysone) - 卵黃蛋白原 (vitellogenin) 路徑如何參與蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽及蜂王的長壽。蜂王食用蜂王乳 (royal jelly) 導致膽固醇 (cholesterol) 濃度上升，經由蛻皮固醇生成路徑 (ecdysteroid biosynthesis pathway) 的 Cyp314A1 生成 20-氫氧蛻皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E)。20-氫氧蛻皮激素 (20-hydroxyecdysone, 20E) 與 EcR-A/EcR-B1/USP 複合體結合錄製 ecdysone-induced protein 74 (E74)、ecdysone-induced protein 75 (E75) 及 broad-complex (BR-C) 複合體。ecdysone-induced protein 74 (E74)、ecdysone-induced protein 75 (E75) 及 broad-complex (BR-C) 複合體再錄製卵黃蛋白原 (vitellogenin)。卵黃蛋白原 (vitellogenin) 與蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 及卵巢的 yolkless (Yl) 結合維持營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 及卵巢活性導致蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽及蜂王的長壽 (Lu and Hsu, unpublished data)。

結論

蜜蜂是一獨特研究老化及長壽的模式動物，因為蜂王與工蜂有相同基因，但是蜂王的壽命比工蜂長。了解蜂王長壽的機轉不僅可以幫助延長生物壽命而且可以促進他們的健康，特別是人類。細胞功能的研究指出工蜂的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 呈現老化的型態但是蜂王的營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 呈現出長壽的型態。蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的細胞長壽促進機轉跟蜂王的長壽有關。膽固醇 (cholesterol) - 氫氧蛻皮激素 (hydroxyecdysone) - 卵黃蛋白原 (vitellogenin) 路徑是蜂王營養細胞 (trophocytes) 及扁桃細胞 (oenocytes) 的長壽促進機轉之一與可能與蜂王的長壽有關。

References

- Page RE, Peng CYS (2001) Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L.. *Exp. Gerontol.* **36**, 695–711.
- Omholt SW, Amdam GV (2004) Epigenic regulation of aging in honeybee workers. *Aging Knowl. Environ.* **26**, pe28.

- Rueppell O, Bachelier C, Fondrk MK, Page RE (2007) Regulation of life history determines lifespan of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Exp. Gerontol.* **42**, 1020–1032.
- Remolina SC, Hughes KA (2008) Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees. *Age* **30**, 177–185.
- The honeybee genome sequencing consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931–949.
- Barchuk AR, Cristino AS, Kucharski R, Costa LF, Simoes ZLP, Maleszka R (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.* **7**:70.
- Elsik CG, Worley KC, Bennett AK, Beye M, Camara F, Childers CP, de Graaf DC, Debyser G, Deng J, Devreese B, Elhaik E, Evans JD, Foster LJ, Graur D (2014) Finding the missing honey bee genes: lessons learned from a genome upgrade. *BMC Genomics* **15**, 86.
- Winston ML (1987) The biology of the honey bee, Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Camazine S (1991) Self-organizing pattern formation on the combs of honey bee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **28**, 61–76.
- Neukirch A (1982) Dependence of the lifespan of the honeybee (*Apis mellifera*) upon flight performance and energy consumption. *J. Comp. Physiol.* **146**, 35–40.
- Hsu CY, Chan YP (2013) The use of honeybees reared in a thermostatic chamber for aging studies. *Age* **35**, 149–158.
- Kamakura M (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* **473**, 478–483.
- Hauerland NH, Shirk PD (1995) Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Annu. Rev. Entomol.* **40**, 121–145.
- Nilsen KA, Ihle KE, Frederick K, Fondrk MK, Smedal B, Hartfelder K, Amdam GV (2011) Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *J. Exp. Biol.* **214**, 1488–1497.
- Chan QWT, Mutti NS, Foster LJ, Kocher SD, Amdam GV, Florian W (2011) The worker honeybee fat body proteome is extensively remodeled preceding a major life-history transition. *PLoS ONE* **6**, e24794.
- Seehuus S-C, Taylor S, Petersen K, Aamodt RM (2013) Somatic maintenance resources in the honeybee worker fat body are distributed to withstand the most life-threatening challenges at each life stage. *PLoS ONE* **8**, e69870.
- Chuang YL, Hsu CY (2013) Changes in mitochondrial energy utilization in young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *Age* **35**, 1867–1879.
- Hsieh YS, Hsu CY (2011a) Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Exp. Gerontol.* **46**, 233–240.
- Hsieh YS, Hsu CY (2011b) The changes of age-related molecules in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **42**, 728–739.
- Hsieh YS, Hsu CY (2013) Oxidative stress and anti-oxidant enzyme activities in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Rejuvenation Res.* **16**, 295–303.
- Hsu CY, Chuang YL (2014) Changes in energy-regulated molecules in the trophocytes and fat cells of young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **69**, 955–964.
- Hsu CY, Chuang YL, Chan YP (2014) Changes in cellular degradation activity in young and old worker honeybees (*Apis mellifera*). *Exp. Gerontol.* **50**, 128–136.
- Hsu CY, Hsieh YS (2014) Oxidative stress decreases in the trophocytes and fat cells of worker honeybees during aging. *Biogerontology* **15**, 129–137.
- Hsu CY, Hu TH (2014) Energy-regulated molecules maintain young status in the trophocytes and fat cells of old queen honeybees. *Biogerontology* **15**, 389–400.

- Hsu CY, Lu CY (2015) Mitochondrial energy utilization maintains young status in the trophocytes and oenocytes of old queen honeybees. *Apidologie* **46**, 583–594.
- Hsu CY, Qiu JT, Chan YP (2016) Cellular degradation activity is maintained during aging in long-lived queen bees. *Biogerontology* doi:10.1007/s10522-016-9652-x.
- Engels W, Kaatz H, Zillikens A, Simões ZLP, Trube A, Braun R, Dittrich F (1990) Honey bee reproduction: vitellogenin and caste specific regulation of fertility. In *Advances in invertebrate reproduction 5*, eds Hoshi M, Yamashita O. Elsevier Science Publishers Press, Nagoya, Japan, pp 495–502.
- Sappington TW, Raikhel AS (1995) Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins by insect oocytes. In *Recent advances in insect biochemistry and molecular biology*, eds Ohnishi E, Sonobe H, Takahashi SY. Nagoya University Press, Nagoya, Japan, pp 235–257.
- Robinson GE, Strambi C, Strambi A, Feldlaufer MF (1991) Comparison of juvenile hormone and ecdysteroid titres in adult worker and queen honey bees. *J. Insect Physiol.* **37**, 929–935.
- Seehuus S-C, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 962–967.
- Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 7128–7133.
- Pierceall WE, Li C, Biran A, Miura K, Raikhel AS, Segraves WA (1999) E75 expression in mosquito ovary and fat body suggests reiterative use of ecdysone-regulated hierarchies in development and reproduction. *Mol. Cell Endocrinol.* **150**, 73–89.
- Sun G, Zhu J, Li C, Tu Z, Raikhel AS (2002) Two isoforms of the early E74 gene, an Ets transcription factor homologue, are implicated in the ecdysteroid hierarchy governing vitellogenesis of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Mol. Cell Endocrinol.* **190**, 147–157.
- Yang C, Lin Y, Liu H, Shen G (2014) The broad complex isoform 2 (BrC-Z2) transcriptional factor plays a critical role in vitellogenin transcription in the silkworm *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**, 2674–2684.
- Paul R, Takeuchi H, Matsuo Y, Kubo T (2005) Gene expression of ecdysteroid-regulated gene E74 of the honeybee in ovary and brain. *Insect mol. biol.* **14**, 9–15.
- Yao TP, Segraves WA, McKeown M, Evans RM (1992) *Drosophila ultra-spiracle* modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**, 63–72.
- Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS (1993) *Drosophila* tissue with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* **73**, 1323–1337.
- Barchuk AR, Figueiredo VLC, Simões ZLP (2008) Downregulation of *ultraspiracle* gene expression delays pupal development in honeybees. *J. Insect Physiol.* **54**, 1035–1040.
- Barchuk AR, Maleszka R, Simões ZLP (2004) *Apis mellifera ultraspiracle*: cDNA sequence and rapid up-regulation by juvenile hormone. *Insect Mol. Biol.* **13**, 459–467.
- Takeuchi H, Paul RK, Matsuzaka E, Kubo T (2007) EcR-A expression in the brain and ovary of the honeybee (*Apis mellifera* L.) *Zool. Sci.* **24**, 596–603.
- Hill RJ, Billas IML, Bonneton F, Graham LD, Lawrence MC (2013) Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 251–271.
- Hansen IA, Attardo GM, Rodriguez SD, Drake LL (2014) Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. *Front. physiol.* **5**, 103.
- Mello TRP, Aleixo AC, Pinheiro DG, Nunes FMF, Bitondi MMG, Hartfelder K, Barchuk AR, Simões ZLP (2014) Developmental regulation of ecdysone receptor (EcR) and EcR-controlled gene expression during pharate-adult development of honeybees (*Apis mellifera*). *Front. Genet.* **5**, 445.

- Petryk A, Warren JT, Marques G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB (2003) Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13773–13778.
- Yamazaki Y, Kiuchi M, Takeuchi H, Kubo T (2011) Ecdysteroid biosynthesis in workers of the European honeybee *Apis mellifera* L. *Insect biochem. Mol. Biol.* **41**, 283–293.

蜂胶活性成分对脑中风的防治作用

孙丽萍

(中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093)

摘要

研究蜂胶中具有神经保护功效的活性成分，对 N2a 细胞进行氧糖剥夺 (OGD) 模拟体内缺血再灌注模型，采用 CCK-8 法检测细胞存活率并以其作为活性筛选指标，以吉姆萨染色法观测细胞形态学指标，对蜂胶分级醇提物进行抗脑缺血再灌注损伤的活性研究，结合 HPLC 进行成分检测分析。结果表明：蜂胶分级醇提物的最大作用质量浓度不超过 20 μ g/mL，以 ODG4h 复糖复氧 24h 为最佳模型条件，对蜂胶分级醇提物进行活性筛选，蜂胶 70% 醇溶物活性最高，5，10 μ g/mL 和 15 μ g/mL 剂量组细胞存活率和细胞形态较模型组细胞均显示有极显著差异，且神经保护活性存在剂量依赖关系。HPLC 分析结果表明，70% 醇溶物中含量较高的黄酮类成分为白杨素和松属素，可作为评估蜂胶神经保护功效活性的指标。

关键词：蜂胶分级醇提物；神经保护功效；氧糖剥夺；高效液相色谱

前言

脑血管疾病是常见的临床的多发病，为目前三大致死疾病之一，其致残率、致死率均呈逐年上升的趋势^[1]。脑中风等脑血管疾病大部分为缺血性脑血管疾病。脑缺血后恢复缺血区的血流供应是防治损伤的最有效措施^[2]，但是有些时候，恢复血供，它的功能不但不能恢复，还会出现更加严重的脑功能障碍，这种现象被称为脑缺血再灌注损伤 (Ischemia re-perfusion injury, IRI)^[3]。脑缺血再灌注损伤是脑中风防治过程中的关键环节，深入探究脑中风的发病机制，探寻有效的药物来降低脑中风损伤，减少患者的致残率、死亡率，有重要的医学意义和社会意义。近年来从天然产物中寻找抗缺血再灌注损伤的活性因子已成为一大研究热点，而蜂胶因其在神经保护方面表现出较高的活性而受到国内外的广泛关注。

蜂胶是蜜蜂从胶源植物的树芽、树皮等部位采集的树脂，并混入其上颚腺的分泌物和蜂蜡，经蜜蜂反复咀嚼代谢而合成的一种胶状物质^[4]。蜂胶中含有丰富的萜烯类、酚类、

黄酮类等生物活性物质，具有抗癌，抑菌，抗炎，抗氧化，保肝，护脑等丰富的药理活性^[5-7]。近年来，研究发现蜂胶乙醇提取物（EEP）可以舒张血管，改善血管的渗透性和弹性，清除血管内壁积存物^[8]，具有清除自由基，抗氧化和抗缺血再灌注损伤作用^[9]。蜂胶黄酮可以通过增加 SOD、CAT 活性，降低 MDA 含量，增强对自由基的清除作用从而保护神经细胞膜的完整性和稳定性^[10]；且通过抑制炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 的表达抑制再灌注后的炎症反应，缩小脑梗死体积，从而对缺血性损伤具有保护作用^[11]；能促进 bcl-2 表达增强，减弱 bax 与 caspase-3 表达，从而有效减少脑缺血再灌注损伤引起的神经细胞凋亡^[12]。目前的相关活性研究多停留在蜂胶提取物层面上，关于蜂胶提取物中保护神经元活性成分的系统研究鲜有报道。

OGD 模型是目前国际模拟缺血再灌注损伤的通用模型^[13]，其损伤机理以缺氧缺血所造成的能量代谢障碍为其发病基础，再灌注时由能量代谢障碍引发的钙离子超载，氧自由基（ROS）损伤和兴奋性氨基酸的毒性作用及炎性细胞因子损伤以及细胞凋亡通路的激活等各种因素和环节互为因果，相互影响，共同导致了细胞的损伤，凋亡和死亡^[14-15]；现已成为研究脑损伤，评价神经保护功能活性物质的活性及其机理的重要方法^[16]。N2a 细胞为小鼠母神经瘤细胞株，是一株含有神经元、胶质细胞和星性胶质细胞等的杂细胞，目前实验室主要将该细胞系用于对脑缺血再灌注，脑卒中和 PD 模型的病理研究。

川芎嗪是中药川芎的有效成分之一，其化学结构为四甲基吡嗪（C₈H₁₂N₂），具有抑制血小板凝集，抗脂质过氧化，扩张血管，改善微循环的作用。有研究^[14,17]表明它能对大鼠脑缺血再灌注损伤起到一定的抑制作用，目前在临床上已制成盐酸川芎嗪注射液、盐酸川芎嗪复方丹参注射液等用于对脑卒中等脑血管疾病的治疗，对急性缺血脑血管疾病有一定的疗效^[18]。

本实验以川芎嗪为阳性品，用来对比供试样品抗缺血再灌注损伤活性的差异，通过对 N2a 细胞进行氧糖剥夺（OGD）处理模拟体内缺血再灌注损伤模型，以细胞存活率为指标，研究蜂胶分级醇提物抗脑缺血再灌注损伤的功效，结合 HPLC 确定蜂胶分级提取物的活性组分，旨在系统确定蜂胶提取物中保护神经元的活性成分，为开发具有拮抗缺血再灌注损伤，保护心脑血管功效的功能食品、药品提供试验依据和理论基础。

1. 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

蜂胶，产地山东，-20℃保存；小鼠神经瘤母细胞 N2a，北京协和细胞库。

胎牛血清，美国 hyclone 公司；DMEM 高糖培养基，美国 Thermo 公司；胰蛋白酶-EDTA 消化液（0.25%）、1×PBS（pH7.2~7.4）、细胞培养级 DMSO、吉姆萨染色试剂盒、川芎嗪，北京索莱宝科技有限公司；CCK-8 试剂盒，日本同仁化学研究所；甲醇（色谱纯），美国 Fisher 公司；芦丁、杨梅酮、槲皮素、松属素、山奈酚、芹菜素、高良姜素、白杨素，美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

DJR-250 恒温电加热真空干燥器，兰格自动化有限公司；5%CO₂、95%N₂ 混合气体，北京海谱气体有限公司；LC20AD 高效液相色谱仪，日本岛津公司；HERA-cell150 CO₂ 培养箱，美国 Thermo 公司；Synergy HT 酶标仪，BioTek 基因有限公司；SW-CJ-1FD 洁净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；IX71 型荧光倒置显微成像系统，日本 Olympus 公司；D-1 型自动蒸气灭菌锅，北京发恩科贸有限公司；旋转蒸发仪、平行蒸发仪，瑞士 Buchi 公司；KQ-500DB 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；AL204 电子天平，瑞士梅特勒-托利多公司；

1.3 方法

1.3.1 样品制备

取粉碎后蜂胶依次用 40%，70%，95% 乙醇溶液进行浸提，取滤液减压浓缩，其中 40% 醇提液脱醇，静置分离沉淀和上清；沉淀干燥后得到 40% 醇溶物，上清冷冻干燥得到 40% 水溶物。70% 和 95% 醇提液分别减压干燥得到 70% 醇溶物和 95% 醇溶物。各提取物作为供试样品置于-20℃保存备用。

精确称取各供试样品及阳性品，加入适量 DMSO 配制成储备液，于 4℃保存备用。以 DMEM 高糖培养基稀释至所需浓度即为样品工作液，该工作液中 DMSO 终含量不超过 0.1%^[19]。

精密称取芦丁、杨梅酮、槲皮素、山奈酚、芹菜素、松属素、白杨素、高良姜素标准品各 5.000mg，甲醇溶解并定容至 5mL，得 1g/L 对照标准品储备液，使用时稀释成合适质量浓度。

1.3.2 CCK-8 法检测细胞存活率^[20]

在96孔板中加入CCK-8液，每孔10 μ L，放入CO₂培养箱中继续孵育1h，用酶标仪在450nm波长处测定吸光度值。每组实验设置3个复孔，根据如下公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率}\% = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\%$$

式中， A_1 ——各试验组吸光值； A_2 ——正常对照组吸光值； A_0 为调零孔吸光值。

1.3.3 N2a细胞的培养及蜂胶分级提取物的干预

N2a细胞以含10%胎牛血清的DMEM培养基培养，以一传三的方式进行传代保证细胞的持续生长，取处于对数期的细胞用于试验。将生长状态良好的细胞随机分为正常组、样品处理组和阳性对照组，分别以5，10，15，20 μ g/mL的工作液孵育24h。根据1.3.2节以CCK-8法检测细胞存活率。

1.3.4 OGD模型的建立及蜂胶分级提取物的干预

OGD模型的建立：取对数生长期N2a细胞，消化后调整细胞密度为 1×10^5 个/mL，加入96孔培养板中，每孔100 μ L细胞悬液，于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中孵育24h，使细胞生长达到最佳状态。OGD模型参照田映红^[21]、莽靖^[22]等方法，将N2a细胞随机分为正常组、模型组和阳性对照组，除正常组外，模型组和阳性对照组进行如下处理：阳性对照组提前以10 μ g/mL的工作液孵育24h，模型组及阳性对照组细胞均用无糖Earle液更换原来的培养基，然后放入自制缺氧装置^[21-22]中，打开进气阀和出气阀，持续缓慢的通入95%N₂、5%CO₂的混合气体，分别缺氧培养1，2，4h和6h，继而以PBS清洗3次，用DMEM高糖培养基更换无糖Earles液，并将细胞放回5%CO₂培养箱中孵育24h。根据1.3.2节，以CCK-8法测定细胞相对存活率。

蜂胶分级提取物的干预：将生长状态良好的N2a细胞随机分为正常组、模型组、阳性组、样品处理组。将对数期N2a细胞加入96孔板，培养24h，阳性组及样品处理组分别以5，10，15 μ g/mL的工作液孵育24h。除正常组外，其余组细胞均按1.3.4节的造模方法进行OGD处理，时间为4h，根据1.3.2节的方法测定细胞相对存活率。

1.3.5 吉姆萨染色

将生长状态良好的N2a细胞铺到细胞爬片上，生长至80%左右后，细胞随机分为正常组、模型组、阳性组、样品处理组。将细胞爬片置于甲醇中固定2~3min，以配置好的吉姆萨染色液（吉姆萨浓缩液：吉姆萨稀释液=1:9）室温染色15~30min，用自来水冲洗爬片，晾干镜检。

1.3.6 HPLC 分析

HPLC 分析条件：按照 GB/T 19427-2003《蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、坎菲醇、芹菜素、松属素、柯因、高良姜素含量的测定方法 液相色谱---串联质谱检测法和液相色谱-紫外检测法》的标准方法^[23] 稍加修改进行测定。以芦丁、杨梅酮、槲皮素、山奈酚、芹菜素、松属素、白杨素、高良姜素为标准对照品，色谱柱：C₁₈ 色谱柱（4.6mm×150mm，5μm）；流动相中溶剂 A 为 0.05% 的磷酸水溶液，溶剂 B 为甲醇，线性梯度洗脱，洗脱程序为：0~10min，40% 甲醇；10~20min，40%~45% 甲醇；20~25min，45%~55% 甲醇；25~42min，55%~75% 甲醇；42~52min，75% 甲醇；52~53min，75%~40% 甲醇；53~73min，40% 甲醇。流速 0.8mL/min，柱温 30℃，进样量 5μL，检测波长 270nm。各供试样品以适量甲醇溶解，过 0.22μm 滤膜后进行 HPLC 测定。

1.3.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件分析，实验结果以均值加减标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间均数比较采用 ANOVA 分析， $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 蜂胶分级提取物对正常 N2a 细胞的影响

以 5，10，15，20μg/mL 剂量的蜂胶 40% 水溶物、40% 醇溶物、70% 醇溶物、95% 醇溶物及川芎嗪作用于正常 N2a 细胞并检测细胞存活率，结果见图 1。

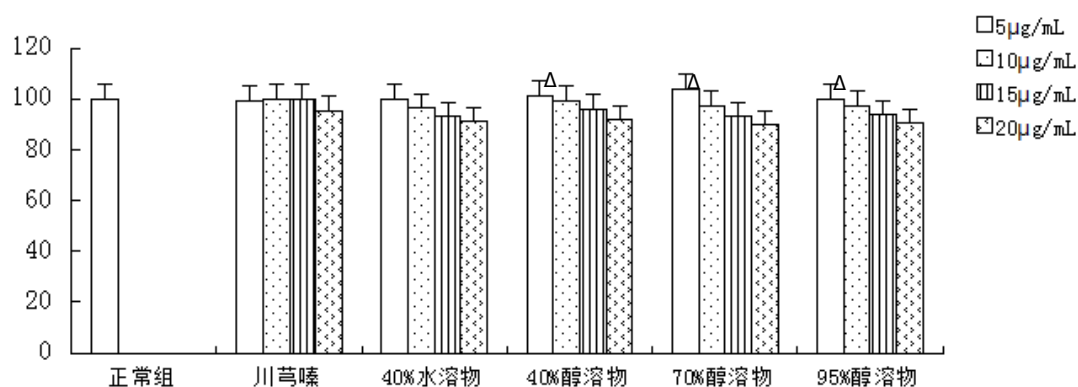


图 1 蜂胶分级醇提取物对正常 N2a 细胞活力的影响

Fig.1. Effect of ethanol extracts of propolis on cell viability of N2a cells ($n=3$)

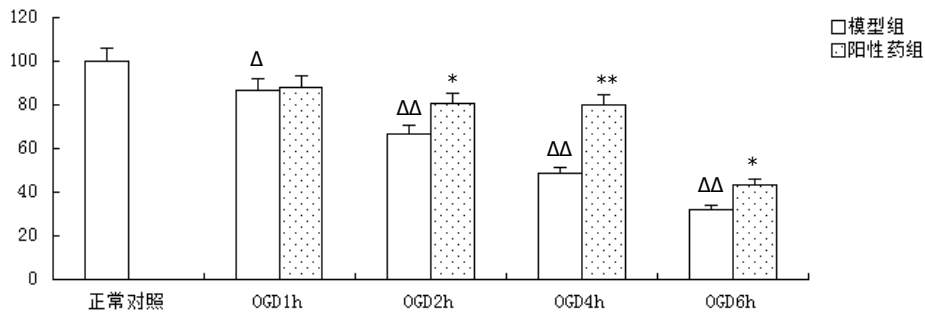
注：Δ. 与正常组相比 $P < 0.05$ ；ΔΔ. 与正常组相比 $P < 0.01$ 。

由图 1 可知，各供试样品在 5~15μg/mL 范围内不影响正常 N2a 细胞的生长，而 40%，

70%，95%醇提取物在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质量浓度下可减低 N2a 细胞的存活率，与正常组比有统计学差异 ($P<0.05$)，提示蜂胶分级醇提取物作用于 N2a 细胞的最大质量浓度最好在 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下，由此本研究选取 5，10，15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行后续试验。

2.2 N2a 细胞 OGD 时间的确定

考察了 OGD1，2，4，6h 并复糖复氧 24h 对细胞存活率的影响，结果见图 2。



注：Δ. 与正常组相比 $P<0.05$ ；(2)ΔΔ. 与正常组相比 $P<0.01$ ；(3)*. 与模型组相比 $P<0.05$ ；(4)**. 与模型组相比 $P<0.01$ 。图 4 同。

图 2 不同 OGD 时间对 N2a 细胞活力的影响

Fig.2. Effect of different treating time of OGD on cell viability of N2a cells

由图2可知，与正常对照组相比，细胞存活率随OGD时间的延长呈下降趋势。OGD损伤1~2h细胞相对存活率大于60%，细胞损伤不明显，若用于造模可能会夸大试样抗脑缺血再灌注损伤的活性作用；OGD损伤6h时细胞相对存活率为32.10%，细胞损伤明显，而阳性品干预后细胞存活率仅有40%，说明细胞损伤严重，川芎嗪无法逆转，无法准确反映保护作用^[22]。OGD4h组细胞存活率为50%左右，细胞损伤明显，与正常组细胞有极显著差异 ($P<0.01$)，加入阳性品后细胞存活率接近80%，显示与模型组细胞有极显著差异 ($P<0.01$)，说明OGD4h的细胞损伤是可以逆转的。

根据1.3.5节的方法对各组细胞进行吉姆萨染色，结果如图3所示。

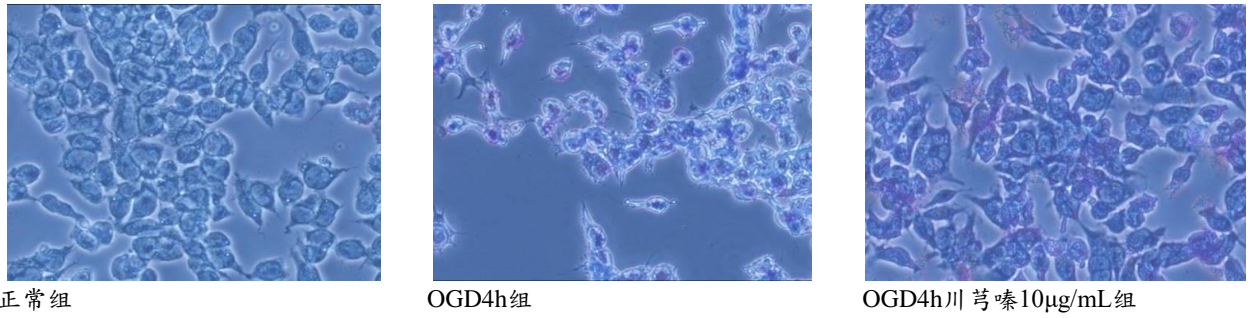


图3. Giemsa染色显示N2a细胞形态(200×)

Fig.3. Morphology of N2a (stained by Giemsa,200×)

染色结果显示，正常组细胞生长密集，呈多边形，有折光性，突触伸展良好；OGD4h组大部分细胞死亡脱落，其余细胞皱缩变圆，体积缩小，结构显示不清，核固缩，突触消失。经10 μ g/mL川芎嗪干预可见部分N2a细胞发生皱缩，大部分贴壁生长，部分细胞突触伸展良好，与模型组相比细胞数目明显增加。结果表明OGD4h的处理条件可使正常细胞出现明显的形态学损伤，川芎嗪干预后可明显抑制细胞形态学损伤的产生。

由此后续试验选择4h为OGD处理时间，用以评价蜂胶分级提取物的抗缺血再灌注损伤功效。

2.3 蜂胶分级醇提物的活性筛选试验

参照 1.3.4 节的方法以不同质量浓度的蜂胶分级醇提物对模型细胞进行干预并测定细胞相对存活率，结果见图 4。

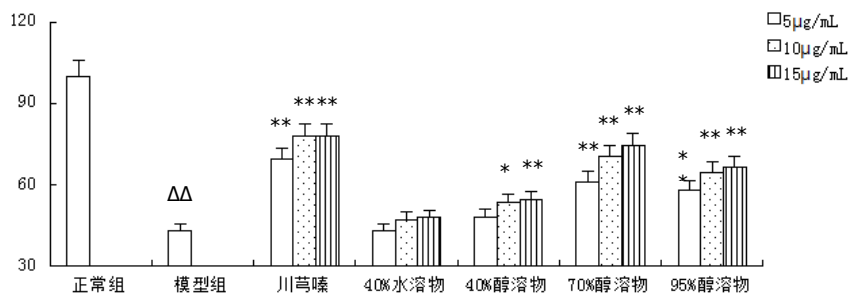


图 4 蜂胶分级醇提物对 OGD 损伤 N2a 细胞活力的影响 (n=3)

Fig.4. Effect of ethanol extracts of propolis on cell viability of N2a cells (n=3)

由图 4 可知，与正常组比对模型组细胞存活率为不足 50%，具有统计学差异 ($P<0.01$)，说明 N2a 细胞 OGD 损伤模型造模成功。

与模型组比较，各供试样品显示出截然不同的活性。70%及 95%醇溶物在质量浓度为 5, 10, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均显示有极显著差异 ($P<0.01$)，表明 70%，95%醇溶物均对 OGD 致损 N2a 细胞有保护作用，而 70%醇溶物的 3 组的活性均明显高于 95%醇溶物；40%醇溶物在 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 显示有显著性差异 ($P<0.05$)，15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时显示有极显著性差异 ($P<0.01$)，表明 40%醇溶物在中高质量浓度下对 OGD 致损 N2a 细胞有保护作用；而 40%水溶物各质量浓度组均未显示明显的改善细胞存活率的效果。

根据 1.3.5 节的方法对蜂胶各级醇提取物 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组细胞进行吉姆萨染色，结果如图 5 所示。

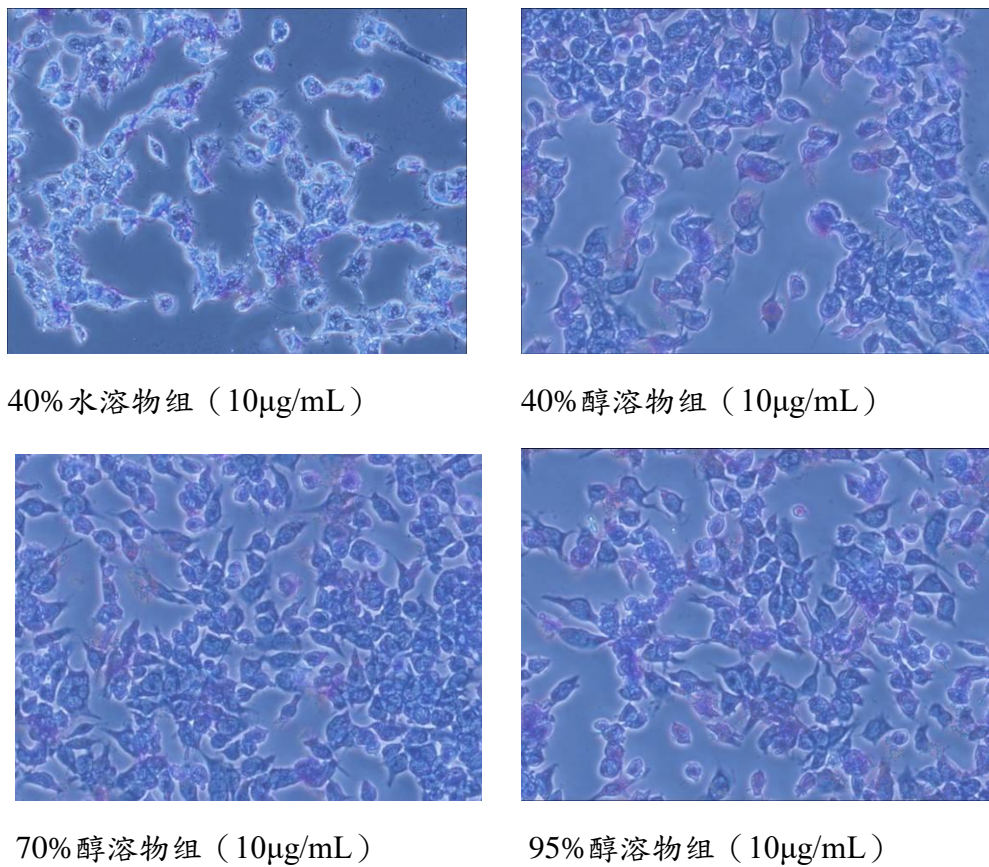


图 5 Giemsa 染色显示各级醇提取物组 N2a 细胞形态(200 \times)

Fig.5. Morphology of N2a cells treated by ethanol extracts of propolis (stained by Giemsa,200 \times)

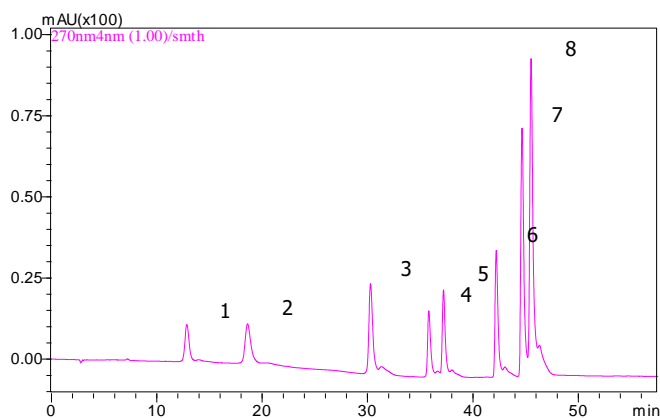
由图 5 可知，蜂胶分级醇提取物中，70%醇溶物组细胞形态学损伤最少，细胞生长状态最好。70%醇溶物组细胞生长较为密集，呈多边形，有折光性，突触伸展良好，少部分细胞皱缩、核固缩、突触消失，与模型组相比细胞数量明显增加；95%醇溶物组细胞明显比 70%醇溶物组细胞数量少，部分细胞死亡脱落，大部分细胞贴壁生长良好，部分细胞皱缩

变圆，核固缩，与模型组相比细胞数量明显增多；40%醇溶物组细胞密度明显低于70%，95%醇溶物组，密度明显高于模型组，较多细胞死亡脱落，部分细胞皱缩变圆，核固缩，大部分贴壁生长；40%水溶物组大部分细胞死亡脱落，其余细胞皱缩变圆，体积缩小，结构显示不清，核固缩，突触消失，与模型组细胞状态差异不明显。

细胞存活率和吉姆萨染色结果表明蜂胶分级醇提取物中，70%醇溶物抗缺血再灌注损伤活性最高，可以明显抑制 OGD 诱发的细胞形态学损伤，说明 70%乙醇有效的富集了蜂胶中抗缺血再灌注损伤的主要活性成分，95%醇溶物次之。

2.4 HPLC 法测定蜂胶分级醇提取物成分及含量

目前已有大量研究^[8-11]表明蜂胶总黄酮具有较好的神经保护作用，对蜂胶中起神经保护作用的具体活性成分的研究也有了一定进展^[25-29]。按 GB/T 19427-2003《蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、坎菲醇、芹菜素、松属素、柯因、高良姜素含量的测定方法 液相色谱--串联质谱检测法和液相色谱--紫外检测法》方法^[23]稍加修改进行蜂胶黄酮的测定，以芦丁、杨梅酮、槲皮素、山奈酚、芹菜素、松属素、白杨素、高良姜素 8 种标准品绘制的标准曲线见图 6。



注：1. 芦丁；2. 杨梅酮；3. 槲皮素；4. 山奈酚；5. 芹菜素；6. 松属素；7. 白杨素；8. 高良姜素。

图 6. 八种黄酮标样的 HPLC 谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of Flavonoids

如图 6 所示，1 号峰为芦丁，出峰时间 12.761min；2 号峰为杨梅酮，出峰时间 18.513min；3 号峰为槲皮素，出峰时间 30.208min；4 号峰为山奈酚，出峰时间 35.758min；5 号峰为芹菜素，出峰时间 37.129min；6 号峰为松属素，出峰时间 42.093min；7 号峰为白杨素，出峰时间 44.548min；8 号峰为高良姜素，出峰时间 45.404min。

对蜂胶分级提取物进行 HPLC 测定，以确定具有神经保护活性的蜂胶提取物所含的黄酮成分及含量，结果见表 1。

表 1 HPLC 法测定蜂胶分级醇提物黄酮类化合物单体的含量(g/100g)

Table 1 HPLC method for determination of propolis ethanol extracts flavonoids

	保留时间 /min	40%水溶物	40%醇溶物	70%醇溶物	95%醇溶物
芦丁	12.761	—	—	—	—
杨梅酮	18.513	—	—	—	—
槲皮素	30.208	—	—	0.21	—
山柰酚	35.758	—	0.33	0.29	0.06
芹菜素	37.129	—	0.25	0.45	0.15
松属素	42.093	0.42	5.45	5.79	1.79
白杨素	44.548	0.53	2.17	9.44	6.87
高良姜素	45.404	0.18	2.32	5.07	2.09
合计		1.13	10.52	21.25	10.96

由表 1 可知，各分级提取物中均未检出芦丁和杨梅酮，说明本试验用蜂胶不含有这两种成分，其它 6 种黄酮均有检出，黄酮合计量以 70% 醇溶物最高，为 21.25%；95% 醇溶物和 40% 醇溶物次之，分别为 10.96% 和 10.52%；而 40% 水溶物仅为 1.13%，约为 70% 醇溶物的 1/20，说明采用乙醇分级提取方法可以有效富集蜂胶黄酮类成分。

关注文献提及的活性成分松属素^[25-26]、白杨素^[25-26]和芹菜素^[29]，可以发现，70% 醇溶物中白杨素、松属素和芹菜素的合计量为 15.68%，显著高于 3 种成分在 95% 醇溶物中的合计量（8.81%）和在 40% 醇溶物中的合计量（7.87%），而 40% 水溶物中合计量仅为 1.13%，详见表 2。

表 2 蜂胶分级醇提物黄酮含量和松属素、白杨素、芹菜素的含量对 OGD 损伤 N2a 细胞活力的影响 ($n=3$)

Table 2 Content of flavone and pinocembrin, chrysin, apigenin of ethanol extracts of propolis and Effect of ethanol extracts of propolis on cell viability of N2a cells ($n=3$)

	10 μ g/mL 组 细胞存活率	8 种黄酮 总含量 /%	白杨素、松 属素、芹 菜素总含量/%	白杨素含量 /%	松属素含 量/%	芹菜素含 量/%
正常组	100 \pm 0.017			—	—	—
模型组	42.88 \pm 3.038 ^{Δ}			—	—	—
川芎嗪	77.79 \pm 1.517* *			—	—	—
40%水溶 物	47.17 \pm 0.785	1.13	0.95	0.53	0.42	—
40%醇溶 物	53.27 \pm 1.160* *	10.52	7.87	2.17	5.45	0.25
70%醇提 物	70.27 \pm 0.485* *	21.25	15.68	9.44	5.79	0.45
95%醇提 物	64.54 \pm 0.633* *	10.96	8.81	6.87	1.79	0.15

注： Δ Δ . 与正常组相比 $P < 0.01$ ；**. 与模型组相比 $P < 0.01$ ；*. 与模型组相比 $P < 0.05$ 。

结合分级醇提物活性及其黄酮含量分析如下：由表 2 可知，蜂胶分级醇提物活性和 8 种黄酮含量的顺序均为 70% 醇溶物 > 95% 醇溶物 > 40% 醇溶物 > 40% 水溶物，说明蜂胶各分级提取物的活性与黄酮含量呈正相关，即蜂胶对受损神经细胞的保护作用随着黄酮含量的增加而增加。

值得注意的是，蜂胶分级醇提物活性中白杨素、松属素、芹菜素合计量的顺序均为 70% 醇溶物 > 95% 醇溶物 > 40% 醇溶物 > 40% 水溶物，与各分级提取物的活性强弱的顺序吻合，说明这 3 种成分在蜂胶各级醇提物中的含量与其抗缺血再灌注损伤活性成正比。

比较松属素、白杨素和芹菜素的含量可知，活性最高的 70% 醇溶物 3 种成分的含量依次为白杨素 (9.44%) > 松属素 (5.79%) > 芹菜素 (0.45%)；95% 醇溶物含量顺序相同，只是含量有所下降，为白杨素 (6.87%) > 松属素 (1.79%) > 芹菜素 (0.15%)；而 40% 醇溶物含量顺序有所不同，为松属素 (5.45%) > 白杨素 (2.17%) > 芹菜素 (0.25%)；40% 水溶物仅存少量的白杨素 (0.53%) 和松属素 (0.42%)，未检出芹菜素。

研究^[25-26]表明松属素和白杨素均能抑制 Caspase-3 及其上游通路的激活，从而抑制 H₂O₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡，对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用。松属素可明显增加动脉栓塞大鼠的存活率，减小脑梗死体积，降低神经行为学评分^[27]；其作用机制主要与降低 ROS 和 NO 的生成，抑制 Caspase-3 的激活等有关，对体外模拟的皮层神经元缺血性损伤具有神经保护作用^[28]。芹菜素能显著提高氧糖剥夺再灌注损伤神经元的存活率，降低受损神经元细胞 LDH 漏出率和凋亡率^[29]，对缺血再灌注致损的神经元有较强的保护作用。

结合表 2 活性推断白杨素、松属素、芹菜素为蜂胶中抗缺血再灌注损伤的功能因子，贡献较大的可能是白杨素和松属素，因芹菜素含量极少，贡献率可能有限，而活性提取物中存在的高良姜素、山奈酚和微量的槲皮素对蜂胶神经保护活性是否有贡献，需要进一步证实。

3 结论

本试验通过蜂胶分级提取物对正常生长的 N2a 细胞进行干预，结果表明质量浓度在 15 μ g/mL 以下的蜂胶分级提取物不影响 N2a 细胞的正常生长，没有细胞毒性；对 N2a 进行 OGD4h 并复糖复氧 24h 为模型模拟体内脑缺血再灌注损伤，并以此对蜂胶分级醇提物进行细胞学筛选，结果表明 70% 醇溶物神经保护活性最高，95% 醇溶物次之，再次为 40% 醇溶物，40% 水溶物无活性。对蜂胶分级醇提物进行 HPLC 分析，结果表明 8 种黄酮总含量以 70% 醇溶物最高，95% 醇溶物和 40% 醇溶物次之，40% 水溶物含量极微，黄酮含量与各分级提取物神经保护活性呈正比；且蜂胶分级醇提物中白杨素、松属素和芹菜素 3 种成分的合计量与各分级提取物活性成正比，推断白杨素、松属素和芹菜素为蜂胶中抗缺血再灌注损伤的有效物质，因芹菜素含量极少，故可重点将松属素和白杨素作为评估蜂胶神经保护功效的活性指标。

参考文献：

- [1] White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury[J]. Journal of the Neurological Sciences, 2000, 179: 1-33.
- [2] 方蕾. 丹酚酸 B 抑制小鼠脑缺血再灌注炎症反应的机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2009, 5-8.
- [3] 吴刚, 薛荣亮, 吕建瑞, 等. 全脑缺血再灌注后 Fas、TNFR1 蛋白的表达与细胞凋亡的关系及 Bcl-2 过度表达对其的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(8):6-10.

- [4] 王储炎,范涛,吴传华,等.蜂胶的研究[J].农产品加工,2009(1):16-21.
- [5] Ugur A, Arslan T. An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey[J]. Med Food,2004,7: 90-94.
- [6] 杜夏,孙丽萍,徐响.蜂胶及活性成分保肝作用的研究进展[J].食品科学,2012(33):305-308.
- [7] Bankova V. Recent trends and important development in propolis research[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2005,2(1):29-32.
- [8] Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine[J]. Fitoterapia, 2002,73 (Supp11):1-6.
- [9] 孔庆峰,许志文,邓玉文.国内蜂胶黄酮的药理学研究近况[J].实用医药杂志,2006,8(1):23..
- [10] 袁丽杰,赵蕾,张悦,等.蜂胶黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国老年医学杂志,2010,8(30):2187-2188.
- [11] 袁丽杰,赵蕾,凌春莹,等.蜂胶黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤后 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量的影响[J].中国比较医学杂志,2008,8(18):11-14.
- [12] 覃燕飞,毕丹东.蜂胶总黄酮对大鼠缺血再灌注后大脑皮质神经细胞凋亡和 caspase-3 与 bcl-2 及 bax 表达的影响[J].中华临床医师杂志,2010,4(7):1023-1027.
- [13] 张拥波,董为伟.氧糖剥夺离体神经元缺血模型的建立[J].重庆医科大学学报,2001,26(2):116-118.
- [14] Shinoura R, Satou R, Yoshida Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of Bcl-X(L) protects neuronal cells from Bax-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res,2000,254:221-231.
- [15] Krause GS, White BC, Aust GW, et al. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence[J]. Crit Care Med, 1988,16: 714-26.
- [16] 翁乔丹,桑磊,方婷,等.改进冻干技术制取杨梅粉及其神经保护功效的研究(二),中国食品学报,2013(13):8-14
- [17] Krause GS, White BC, Aust GW, et al. Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence[J]. Crit Care Med, 1988,16: 714-726.
- [18] Farooqui T, Farooqui AA. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases[J]. Mech Ageing Dev, 2009, 130(4),203-215.
- [19] Tian M, Peng S, Martin FL, et al. Perfluorooctanoic acid induces gene promoter hypermethylation of glutathione-S-transferase Pi in human liver L02 cells[J]. Toxicology, 2012: 296(s 1-3):48-55..
- [20] 熊建文,肖化,张镇西,等.MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J].激光生物学报,2007,16(5):559-562.
- [21] 田映红,李树基,李晓文,等.大鼠海马神经细胞体外缺糖缺氧模型制备方法的改进[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(15):2810-2813.
- [22] 莽靖,李昕华,闫世军,等.大鼠皮层神经元原代培养、鉴定及氧糖剥夺模型的建立[J].中国老年学杂志,2010,3(30):790-791.
- [23] GB/T 19427-2003 蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、柯因、高良姜素含量的测定方法 液相色谱-串联质谱检测法和液相色谱-紫外检测法[S].
- [24] 唐敏.金银花黄酮活性成分分离纯化与生物学效应研究[D].重庆,第三军医大学,2008.
- [25] Sam SK, Ji YL, Yoo KC, et al. Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. 2004,14:2261-2264.
- [26] Gao M, Zhang WC, Liu QS, et al. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio[J]. Eur J Pharmacol,2008,591(s 1-3):73-79.

- [27] Liu R, GaoM, YangZH, et al. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion both *in vivo* and *in vitro*[J]. Brain research,2008 , 1216(26):104-115.
- [28] Guang HM, Du GH. Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rat[J]. Eur J Pharmacol,2006 , 542(1-3):77-83
- [29] 方露玫.芹菜素和木犀草素对缺血/再灌注损伤神经元的作用及机制研究[D].浙江：浙江大学医学院，2010.

The preventive role for stroke with active components of chinese propolis

Sun Liping

(Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing, 100093)

Abstract

To confirm the neuroprotective effective components in ethanol extracts of propolis, a model of N2a cells injured by OGD was established. Cell survival rate measured by CCK-8 assay was considered as the screening criterion. GIMSA dying assay was used to observe morphology changes of N2a cells. HPLC were used as detection and analysis method. The result showed that the action concentration was no more than 20 μ g/mL. The appropriate time of OGD that could induce N2a cells injury was 4 hours. 70% ethanol extract group showed the highest protective effect that the cell survival rate and the morphology of N2a cells of 5 μ g/mL group, 10 μ g/mL group and 15 μ g/mL group was significantly higher than the model group. The result of HPLC qualitative analysis of 70% ethanol extract suggested that major constituents were chrysin, pinocembrin, which can be used as evaluation index of the neuroprotective effect of propolis.

Keyword : ethanol extracts of propolis; neuroprotective effect; Oxygen Glucose Deprivation; High Performance Liquid Chromatography

第一作者：王馨；电话：13261089019；E-mail: julia1989@126.com；通讯地址：北京市海淀区香山北沟1号，中国农业科学院蜜蜂研究所，100093。

通讯作者：孙丽萍研究员；电话：(010)62590442；E-mail: caasun@126.com；通讯地址：北京市海淀区香山北沟1号，中国农业科学院蜜蜂研究所，100093。修改人手机 13910757235

不同移虫日龄蜂王卵巢蛋白组学研究

吉挺^{*2}，庞倩¹，王莹¹，沈芳²，孟祥金²，牛庆生³

(1. 扬州大学动物科学与技术学院，江苏扬州 225009；2. 安徽省蜂业协会，安徽合肥 230001；3. 吉林省养蜂科学研究所，吉林省吉林市 132108)

摘要

[目的]通过研究不同移虫日龄对意大利蜂王卵巢组织蛋白质表达的影响，探讨移虫日龄对蜂王卵巢发育的分子调控机制。**[方法]**对不同移虫日龄培育的蜂王卵巢组织蛋白质进行 iTRAQ 定量分析，筛选差异表达蛋白，探究其在此生理过程中的作用。**[结果]**iTRAQ 定量分析共鉴定到蛋白质二级图谱 452,966 个，最终获得 3642 个蛋白。GO 富集结果表明，不同日龄移虫的蜂王卵巢组织蛋白在细胞代谢、分裂以及蛋白质合成方面存在显著差异。Pathway 富集分析表明，1 日龄移虫和 2 日龄移虫发育蜂王差异蛋白主要富集在代谢通路；1 日龄移虫和 3 日龄移虫发育蜂王差异蛋白主要富集在有机体发育通路、核糖体通路和溶酶体代谢。对差异表达蛋白——储存蛋白 (Hex 110、Hex 70b) 进行荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹检测。结果表明，Hex110、Hex70b 无论是在 mRNA 水平还是蛋白水平，随着移虫日龄的增加，其表达量均呈现降低的趋势。1 日龄移虫发育蜂王卵巢 Hex110 基因表达量显著高于其他组 ($P < 0.05$)，1 日龄移虫发育蜂王卵巢的 Hex70b 基因的表达量极显著高于其他组 ($P < 0.01$)。**[结论]**初步对不同日龄移虫的蜂王之间差异表达蛋白进行系统研究，为进一步研究蜂王生殖发育及级型分化的调控机制提供理论依据。

关键词：移虫日龄；卵巢；蛋白质组学；Hex 110；Hex 70b

²作者简介：吉挺，男，1974 年出生，江苏东台人，博士，通信地址：225009 扬州大学文汇路校区动物科学与技术学院蜜蜂研究所，Tel：13305275665，E-mail：jiting12@sohu.com。

Research on the queen's ovary proteomic of different instar of grafted larvae

JI Ting*¹, PANG Qian¹, WANG Yin¹, SHEN Fang², MENG Xiang-Jin², NIU Qing-Sheng³
(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 22500, Jiangsu Province, China; 2. Anhui Apicultural Association, Hefei 230001, China; 3. Institute of Apiculture of Jilin Province, Jilin 132108, China)

Abstract

Objective: To explore the molecular regulation mechanism of instar of the grafted larvae on queen ovaries development, the effect of different instar of the grafted larvae on ovaries protein expression of queen (*Apis mellifera*) were studied. **Method:** To select differentially expressed proteins and explore its function during the process, iTRAQ method was used to explore the proteins of queen ovaries of different instar of the grafted larvae. **Result:** A total of 452,966 spectrum were obtained and 3642 proteins were identified. GO enrichment analysis suggested that there were differences in metabolism, cell division and protein biosynthesis. The differential proteins of 1 day age and 2 days age group enriched in the carbohydrate metabolism, lipid metabolism, exogenous degradation. The differential proteins of 1 day age and 3 days age group was mainly enriched in developing pathways, ribosome pathways and lysosome metabolic. Furthermore, mRNA and protein expression level of hexamerins were examined by qRT-PCR and Western blot. The results of qRT-PCR and Western blot showed that the expression of Hex110 and Hex70b decreased with the increasing of grafted instar, the expression levels of Hex10 in queen ovaries of 1 day instar of the grafted larvae were significantly higher than that of 2 days and 3 days ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression levels of Hex70b in queen ovaries of 1 day instar of the grafted larvae were extremely significantly higher than that of 2 days and 3 days ($P < 0.01$). **Conclusion:** In order to provide theoretical basis for the regulatory mechanism of the queen reproductive development level, preliminary research were conducted on differentially expressed proteins in queen ovaries of different instar of the grafted larvae.

Keywords: instar of the grafted larvae; ovary; proteomics; Hex110; Hex70b

前言

蜜蜂是社会性昆虫，以群体为单位，包括蜂王、雄蜂以及工蜂。蜂王和工蜂都是由受精卵发育而来的雌性蜂，两者的遗传组成完全一致，但它们在外部形态、生理结构和行为上都存在巨大的差异。蜂王个体大、寿命长并且繁殖力极强，而工蜂却个体小、寿命极短，没有繁殖能力^[1-2]，这种现象称为蜜蜂级型分化，是现今蜜蜂研究的热点问题。石元元^[3]以及陈璇等^[4]研究发现，幼虫摄取的食物会影响其级型分化，决定其是发育成具有繁殖力的蜂王还是无繁殖性能的工蜂。自 2006 年完成西方蜜蜂全基因组测序后，众多学者在基因及蛋白质水平上对蜜蜂级型分化机制进行了深入研究^[5-9]。

在实际人工育王生产中，移虫日龄影响蜂王的繁殖性能。实践证明，蜂王的培育与移虫时间有一定关系，移虫时间的延长会导致工蜂幼虫双向发育能力降低^[10]，但移虫时间越早，蜂群对王台的接受率就越低。此外，卵巢作为雌性蜜蜂生殖系统的重要功能组织，其大小和发育程度代表着蜂王的繁殖能力，而移虫日龄会影响蜂王的卵巢发育^[11]，因此寻找最佳移虫时间是蜜蜂育种的关键点。本研究探究不同移虫日龄对蜂王繁殖性能的影响，运用 iTRAQ 技术对蜂王卵巢组织进行高通量测序，筛选差异表达蛋白（differentially expressed proteins, DEPs），通过蛋白注释、功能预测等分析方法探究其分子调控机制，以期为实际生产提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验蜂群

处女王出房后 8 d，人工注射单只雄蜂的精液，获得单雄授精的意大利蜂王，然后组织单雄授精蜂王进行产卵。单雄受精蜂王及组织蜂群工作均在吉林蜜蜂研究所实验蜂场进行。

1.1.2 主要试剂

Bradford 蛋白定量试剂盒（Bio-Rad，USA），Trichloroacetic acid (abbreviation: TCA)，Dyeing buffer，Loading buffer，Electrophoretic buffer，Destain buffer，Lysis buffer (PH 8.5)，

2-D Quant Kit (GE Healthcare), Trypsin Gold (Promega), TEAB (Applied Biosystems), Formic acid, iTRAQ Reagents-8plex Chemistry (Applied Biosystems), UltraSYBR Mixture (With Rox), 无水甲醇, Western 转膜液, Trizol 购自 Invitrogen 公司, Fast Quant RT Kit (with gDNase) Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (KR106) 购自北京天根生化科技有限公司, 荧光定量 PCR 试剂盒 (cw0956) 购自北京康为世纪生物科技有限公司, RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司, β -Actin 小鼠单克隆抗体购自上海艾博抗贸易有限公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、Hexamerin110 单克隆抗体、Hexamerin70b 单克隆抗体购自艾比玛特生物医药(上海)有限公司, ECL 显色试剂盒、硝酸纤维素膜。

1.1.3 主要仪器

高速离心机 (5430R, Eppendorf), 组织匀浆器 (precllys24, Bertin), 超纯水仪 (Milli-Q Advantage, Millipore), 超声波细胞粉碎机 (VCX130, Sonics), 电泳仪 (Mini PROTEAN tetra Cell, BIO-RAD), SCX Luna (SCX, Phenomenex), 液相色谱 (LC-20AD nanoHPLC, LC-20AB HPLC, SHIMADZU), 串联质谱仪 (UltrafleXtreme, Bruker; LTQ Orbitrap Velos, Thermo fisher) 和 ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

1.2 实验方法

1.2.1 蜂王的培育

将灭菌后的空巢脾放入限王产卵器中, 经工蜂清理 24 h 后, 控制单王授精蜂王产卵 6 h, 将空脾转移到继箱中孵育。98 h 后移取巢脾上的幼虫 (1 日龄幼虫), 122 h 后移取巢脾上的幼虫 (2 日龄幼虫), 146 h 后移取巢脾上的幼虫 (3 日龄幼虫), 培育至蜂王出房的前一天, 全部转移至昆虫培养箱等待蜂王出房。

1.2.2 蛋白质的提取及检测

剖取各组 15 只处女蜂王单侧卵巢样本, 混池, 加入裂解液, 匀浆、超声破碎、离心, 取上清备用。参照伯乐公司的 Bradford 蛋白定量试剂盒操作说明书及 Zor 的试验方法进行。每个样品 95 °C 加热 5 min 后于 12 % 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶、120 V 恒压电泳 120 min。电泳结束后, 考染液染色 2 h, 用每次 30 min 用脱色液脱色 3-5 次。

1.2.3 蛋白质酶解及 iTRAQ 标记

每个样品取出 100 μg 蛋白；蛋白和酶以 20:1 的比例添加 Trypsin，37 $^{\circ}\text{C}$ 酶解 4 h；按上述比例再加一次 Trypsin，继续酶解 8 h。

胰蛋白酶消化后，用真空离心泵抽干肽段；加入 0.5M TEAB 复溶肽段，进行 iTRAQ 标记；使用不同的 iTRAQ 标签标记每一组肽段，室温下培养 2h；各组肽段混合标记后，使用 SCX 柱进行液相分离。

1.2.4 SCX 分离

使用岛津 LC-20AB 液相系统，4.6 \times 250 mm 型号的 Ultremex SCX 分离柱对样品进行液相分离。在标记后抽干的混合肽段加入 4 mL buffer A (25mM NaH_2PO_4 in 25% CAN，pH 2.7) 重复溶解。进柱后用 1 mL/min 的流速进行梯度洗脱：首先 buffer A 洗脱 10 min，然后逐渐加入 5-35% buffer B (25mM NaH_2PO_4 ，1M KCl in 25% CAN，pH 2.7) 洗脱 11 min，最后混入 35-80% buffer B 洗脱 1 min。整个过程在 $\lambda = 214 \text{ nm}$ 吸光度下进行测定，通过筛选共得到 12 个组分。每个组分均用 StrataX 除盐柱除盐，最后冷冻抽干。

1.2.5 基于 Triple TOF 5600 的 LC-ESI-MS/MS 分析

和质谱仪结合的液相系统是 nanoACQuity (Waters)，所用的流动相 A 液 (水:乙腈:甲酸 = 98:2:0.1) 与 B 液 (水:乙腈:甲酸 = 2:98:0.1) 中均加入一定比例的校正液 (Thermo Fisher Scientific)。每次上样量均为 2.25 μg (9 μL)，A 液以 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速率洗脱 15 min，然后使用含 5% 的 B 液流动相以 300 nL/min 速率洗脱 1min，开始建立洗脱梯度：40 min 以内 B 液梯度线型从 5% 上升到 35%，再 5 min 从 35% 增加到 80%，接着 80% 持续进行洗脱 5 min，最后 2 min 恢复柱料。对于 iTRAQ 这样的项目，离子碎裂能量的设定是 $35 \pm 5 \text{ eV}$ ；母离子动态排除设置是：在一半的出峰时间中 (约 18 s)，相同母离子的碎裂次数不超过 2 次。

1.2.6 引物设计与合成

根据 Genebank 中 Hexamerin110 的序列 (NM_001101023.1)、Hexamerin70b 的序列 (NM_001011600.1)，按照荧光定量引物设计原则，设计引物，Hexamerin110 上游：5'-AACGTGCCAGGCGCAGTTGT-3'，下游：5'-TTCACCAGCATGGAGGTTCTGGA-3'；

Hexamerin70b 上游：5'-TGCCGCCAATGTACGAGGTG-3'，下游：5'-GCTCGGGCACGTTGTGTTTG-3'；以 β -actin 作为内参基因，上游：5'-TCCTGCTATGTATGTCGC-3'，下游：5'-AGTTGCCATTCCTGTTC-3'，引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.7 qRT-PCR

取各组 6 只蜂王卵巢，将卵巢组织样品匀浆后按试剂说明书操作，用 Trizol 提取卵巢总 RNA，根据各样品总 RNA 浓度，对 RNA 样品进行稀释，使终浓度为 200 ng/ μ L，然后按照天根的 FastQuant RT Kit (with gDNase) FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (KR106) 操作程序进行反转录。根据北京康为世纪生物科技有限公司的荧光定量 PCR 试剂盒 (cw0956) 说明书进行操作，所有步骤均在冰上进行，qRT-PCR 反应体系为 20 μ L 体系：2 \times Ultra SYBR Mixture (With ROX) 10 μ L，上游引物 1 μ L，下游引物 1 μ L，DNA 模板 2 μ L，RNase-Free Water 6 μ L，PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，共 40 个循环。

1.2.8 Western Blot 检测

将提取的蛋白样品先在沸水中水浴煮沸 5min，使蛋白变性，然后用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后，将蛋白转移到硝酸纤维素膜上，封闭液封闭，TBST 冲洗后，分别与一抗、二抗杂交，ECL 暗室中显色，利用高灵敏蛋白印迹成像和多色荧光定量分析系统观察 Western blot 结果。

1.3 数据分析流程

经 MS/MS 分析后的得到 WIFF 格式的原始数据，转换成 MGF 后提交到参考数据，用 Mascot 2.3.02 软件进行检索^[8]。将设定参数为 MS/MS Ion search 的收缩类型、碎片质量公差为 ± 0.1 Da、肽段误差范围为 ± 0.05 Da 等，鉴定蛋白信息^[12]。

比较各蛋白在各样品之间的相对含量，以差异倍数 > 1.5 倍且经统计检验其 $P < 0.05$ 的蛋白作为差异蛋白。对蛋白进行功能注释分析，预测出这些蛋白可能的功能，之后对其做功能分类统计。对差异表达蛋白进行 pathway 及 GO 的富集分析及表达模式聚类分析，探究不同日龄移虫影响蜂王卵巢发育的分子调控机制。

利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对不同移虫日龄蜂王卵巢内 Hexamerin110 和 Hexamerin70b 基因的表达量进行统计，利用 SPSS 的 ANOVA 的 LSD 法对其进行显著性分析，以 0.05 为显著性水平。

2 结果与分析

2.1 蛋白质检测

蜂王卵巢总蛋白提取后用 BSA 法测定浓度，凝胶电泳结果中蛋白条带清晰完整无杂质（图 3-1），蛋白定量结果中各样品的蛋白浓度高于 $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，总量超过 $900 \mu\text{g}$ ，符合 iTRAQ 蛋白标记的定量要求。

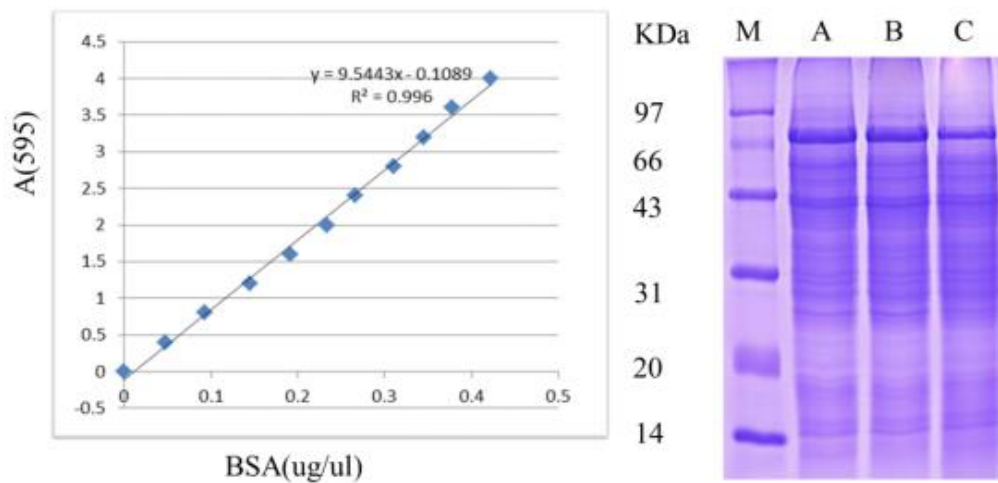


图 3-1 卵巢蛋白质定量检测

Figure3-1 Standard curve and SDS-PAGE of total proteins of ovary

表 3-1 卵巢蛋白定量结果

Table 3-1 Quantification of protein isolated from ovary

样品	Concentration (μg)	Volume (μL)	Total Protein (μg)
1日龄移虫组	17.63	200	3526
2日龄移虫组	15.62	200	3124
3日龄移虫组	4.89	200	978

2.2 蛋白质鉴定及质量评估

2.2.1 蛋白质鉴定结果

蛋白鉴定后，获得二级图谱（Total Spectra）总数为 452966 个，匹配图谱（Spectra）为 55600 个，匹配的特有肽段图谱（Unique Spectra）为 53239 个，鉴定到的肽段（Peptide）为 22423 个，匹配的特有肽段（Unique Peptide）为 21958 个，最终获得 3642 个蛋白。大于 100 KDa 的蛋白有 933（25.64%）个；其余蛋白分子量大部分都集中在 20-80 KDa，共计 2508（68.92.74%），占总蛋白数量的一半以上。

2.2.2 肽段质量评估

对肽段序列长度分布进行统计，结果显示多数肽段长度在 7-17 之间，其中 8-15 的肽段最多。大部分被鉴定到的蛋白所含的肽段数量在 10 个以内，且蛋白数量随着匹配肽段数量的增加而减少。如图 3-2 所示，覆盖度 0%-10%的蛋白数量占总量的 48%，35%以上的蛋白数量占总量的 13%。

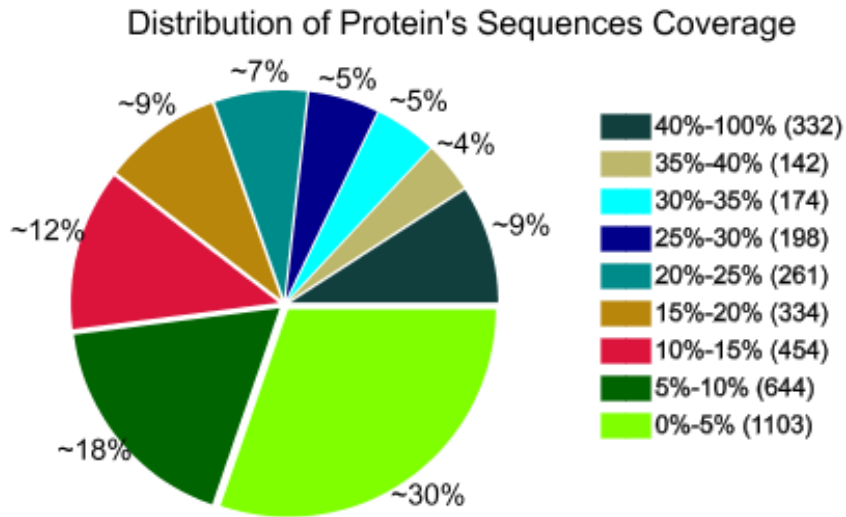


图 3-2 肽段序列覆盖度分布

Figure 3-2 Distribution of protein's sequences coverag

2.3 差异表达蛋白质分析

2.3.1 差异表达蛋白的筛选和维恩图分析

对获得的差异表达蛋白进行筛选，利用维恩图进行分析。由图 3-3 可知，d1-vs-d2 组蜂王的差异蛋白 424 个，d1-vs-d3 组蜂王的差异蛋白 305 个和 d2-vs-d3 组蜂王的差异蛋白 335 个。如图 3-4 所示，d1-vs-d2 特有差异蛋白 242 个，d1-vs-d3 特有差异蛋白 114 个，d2-vs-d2 特有差异蛋白 155 个。三组差异蛋白之间共有差异蛋白 38 个，这些蛋白可能是蜂王发育的必需蛋白。

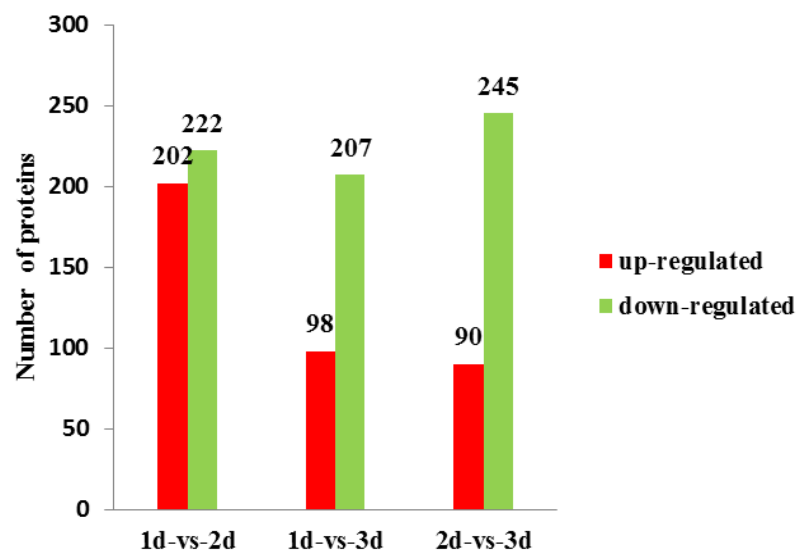


图 3-3 不同日龄蜂王 DEPs 分布及表达情况

Figure 3-3 Distribution and expression profiling of DEGs

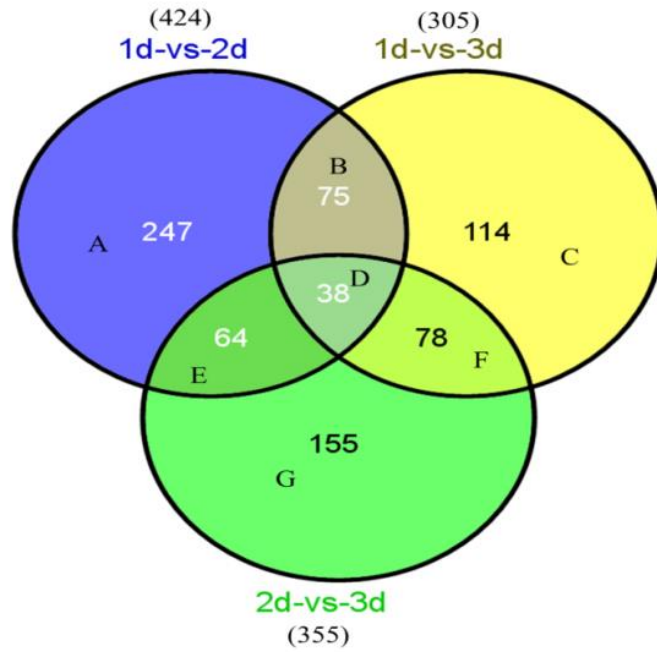


图 3-4 差异蛋白的维恩分析

Figure 3-4 Venn Diagrams of different expressed protein

2.3.2 差异表达蛋白的 GO 富集分析

对不同日龄移虫蜂王卵巢组织差异表达蛋白进行 GO 富集分析 (图 3-5, 3-6, 3-7)。DEPs 大多富集在碱基代谢 (23.9%, BP), 单一生物代谢过程 (28.7%, BP), 细胞质 (53.5%, CC), 细胞膜 (41.4, CC), 离子结合 (35.7%, MF), 大分子复合物 (50.5%, CC), 和蛋白质复合体 (36.0%, CC)。GO 富集结果表明, 不同日龄移虫的蜂王卵巢在细胞代谢、分裂以及蛋白质合成方面存在显著差异。

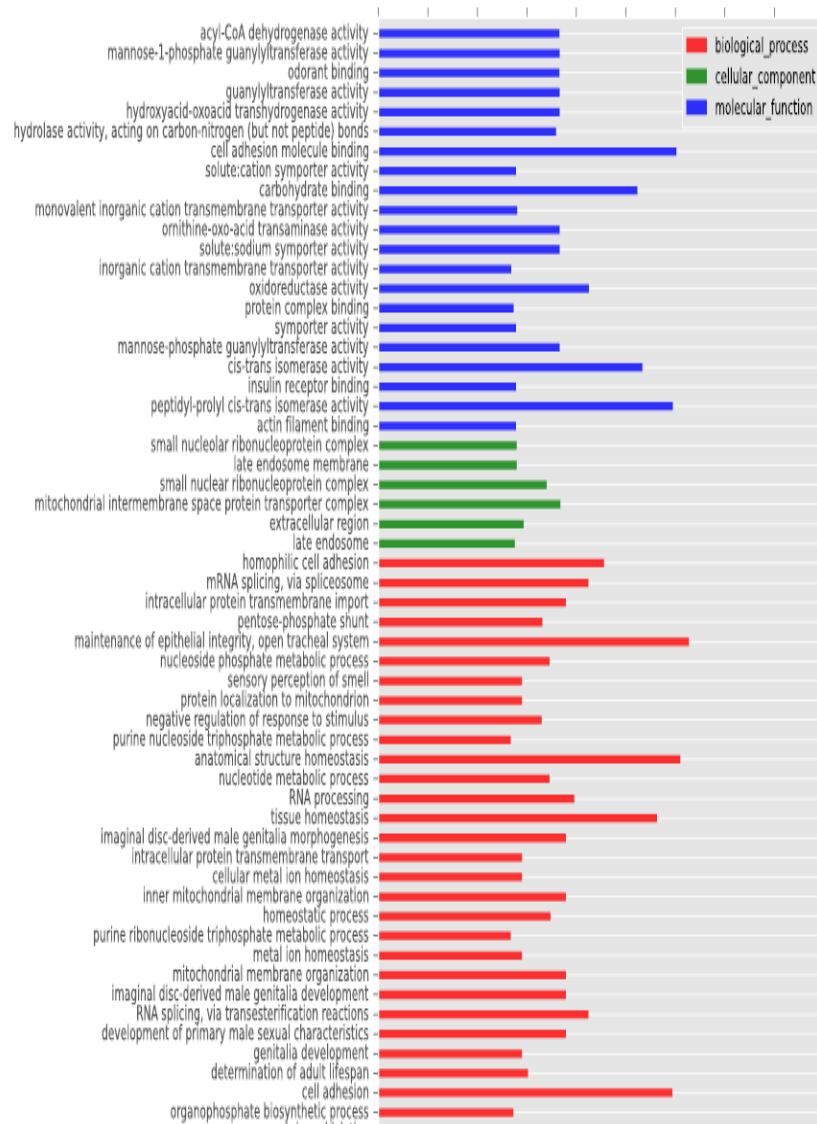


图 3-5 卵巢 DEPs GO 富集分析(1d-vs-2d)

Figure 3-5 GO enrichment of DEPs in ovary(1d-vs-2d)

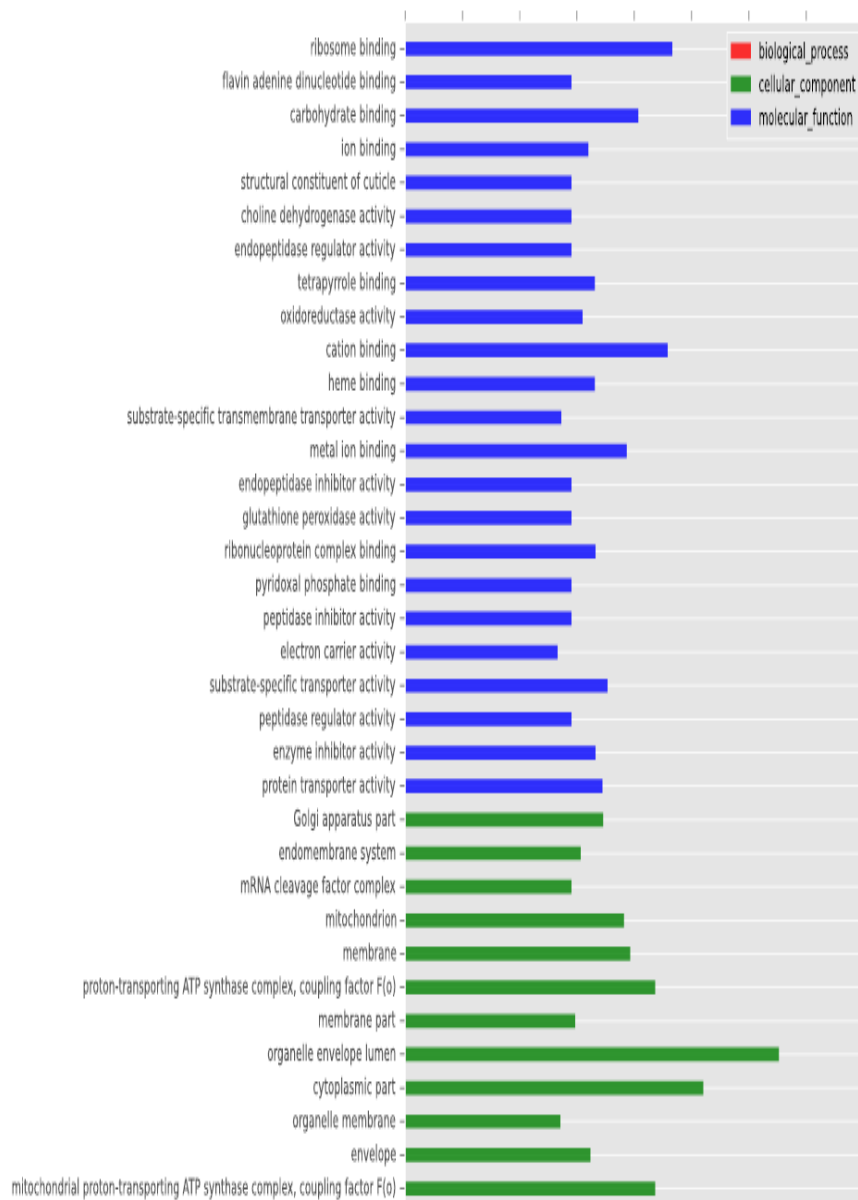


图 3-6 卵巢 DEPs GO 富集分析(1d-vs-3d)

Figure 3-6 GO enrichment of DEPs in ovary(1d-vs-3d)

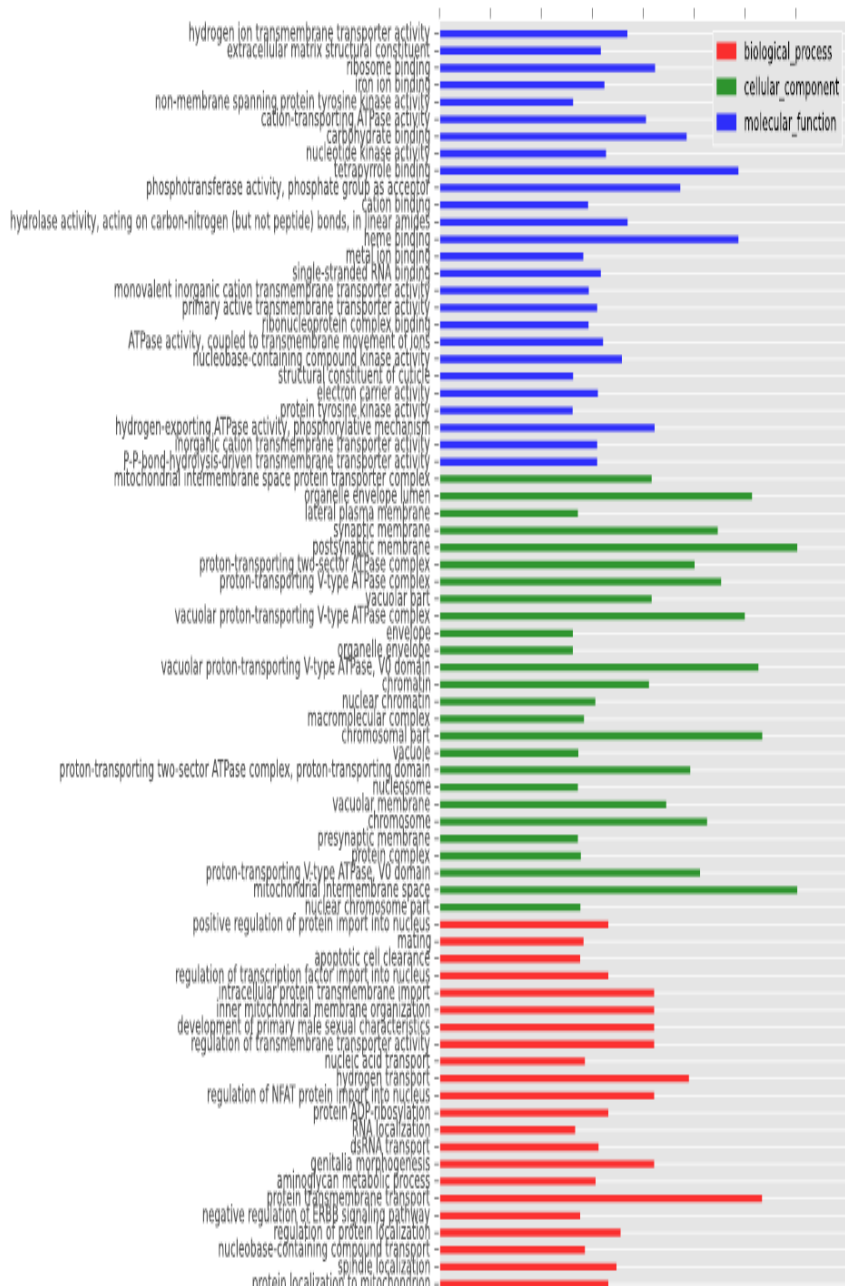


图 3-7 卵巢 DEPs GO 富集分析(2d-vs-3d)

Figure 3-7 GO enrichment of DEPs in ovary(2d-vs-3d)

2.3.3 DEPs 的 pathway 富集分析

将不同日龄移虫蜂王卵巢的 DEPs 两两比对，1 日龄移虫蜂王组和 2 日龄移虫蜂王组之间鉴定到的 424 个差异蛋白共集中在 207 个 pathway。显著富集的有 17 个，其中代谢通路最为富集，其次为焦点粘连通路（表 3-2）。

1 日龄移虫蜂王组和 3 日龄移虫蜂王组之间鉴定到的 305 个差异蛋白集中于 181 个 pathway。显著富集的有 11 个，其中核糖体通路最为富集，其次为溶酶体通路（表 3-3）。1 日龄移虫蜂王组和 3 日龄移虫蜂王组之间鉴定到的 335 个差异蛋白共集中在 172 个 pathway。显著富集的有 17 个，其中氧化磷酸化和亨廷顿氏舞蹈症通路最为富集，其次为震颤性麻痹通路（表 3-4）。

表 3-2 DFPs pathway 显著富集分析结果（1d-vs-2d）

Table 3-2 Pathway significant enrichment of DEPs (1d-vs-2d)

Pathway	DFPs with pathway annotation (360)	Pvalue	Pathway ID
Fructose and mannose metabolism	9 (2.5%)	0.00240698 5	ko00051
Hematopoietic cell lineage	6 (1.67%)	0.00247158 8	ko04640
Renin-angiotensin system	4 (1.11%)	0.00260522 3	ko04614
Amoebiasis	10 (2.78%)	0.00538022 6	ko05146
Steroid biosynthesis	4 (1.11%)	0.00550025 3	ko00100
Steroid hormone biosynthesis	7 (1.94%)	0.00923995 2	ko00140
Glutathione metabolism	9 (2.5%)	0.01116017	ko00480
Focal adhesion	18 (5%)	0.01274657	ko04510
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	8 (2.22%)	0.01491999	ko00980
Galactose metabolism	7 (1.94%)	0.01572944	ko00052

表 3-3 DFPs pathway 显著富集分析结果(1d-vs-3d)

Table 3-3 Pathway significant enrichment of DEPs (1d-vs-3d)

Pathway	DEPs with pathway annotation (248)	Pvalue	Pathway ID
Arachidonic acid metabolism	4 (1.61%)	0.01370989	ko0050
Glutathione metabolism	7 (2.82%)	0.01423081	ko0040
Ribosome	13 (5.24%)	0.01516226	ko0300
Hematopoietic cell lineage	4 (1.61%)	0.01852978	ko0460
Glycine, serine and threonine metabolism	6 (2.42%)	0.02946432	ko0020
Olfactory transduction	4 (1.61%)	0.03099191	ko0470
Phototransduction	3 (1.21%)	0.03306556	ko0474
Lysosome	11 (4.44%)	0.0373622	ko0412
Cell adhesion molecules (CAMs)	4 (1.61%)	0.03869068	ko0454
Calcium signaling pathway	6 (2.42%)	0.03972304	ko0400

表 3-4 DFPs pathway 显著富集分析结果(2d-vs-3d)

Table 3-4 Pathway significant enrichment of DEPs (2d-vs-3d)

Pathway	DEPs with pathway annotation (278)	Pvalue	Pathway ID
Drug metabolism - cytochrome P450	10 (3.6%)	8.74E-05	ko00982
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	10 (3.6%)	0.000124931	ko00980
Oxidative phosphorylation	16 (5.76%)	0.002092483	ko00190
Drug metabolism - other enzymes	8 (2.88%)	0.006185456	ko00983
Glutathione metabolism	8 (2.88%)	0.007594787	ko00480
Rheumatoid arthritis	6 (2.16%)	0.013076	ko05323
Herpes simplex infection	9 (3.24%)	0.03100609	ko05168
Steroid hormone biosynthesis	5 (1.8%)	0.04030873	ko00140
Synaptic vesicle cycle	7 (2.52%)	0.04564869	ko04721
Phagosome	12 (4.32%)	0.04728712	ko04145

2.4 差异表达蛋白的验证结果

2.4.1 不同移虫日龄蜂王卵巢 Hexamerin110、Hexamerin70b 基因的表达

由图 3-8 可见，随着移虫日龄的增加，Hex110 基因的表达量呈降低趋势。1 日龄移虫培育的蜂王卵巢 Hex110 基因的表达量最高，显著高于 2 日龄和 3 日龄移虫组 ($P < 0.05$)。而 2 日龄和 3 日龄移虫培育的蜂王卵巢 Hex110 基因的表达量相近，差异不显

著 ($P > 0.05$)。Hex70b 基因的表达趋势和 Hex110 基因基本一致，但其在 1 日龄移虫培育的蜂王卵巢表达量极显著高于其他组 ($P < 0.01$) (图 3-9)。

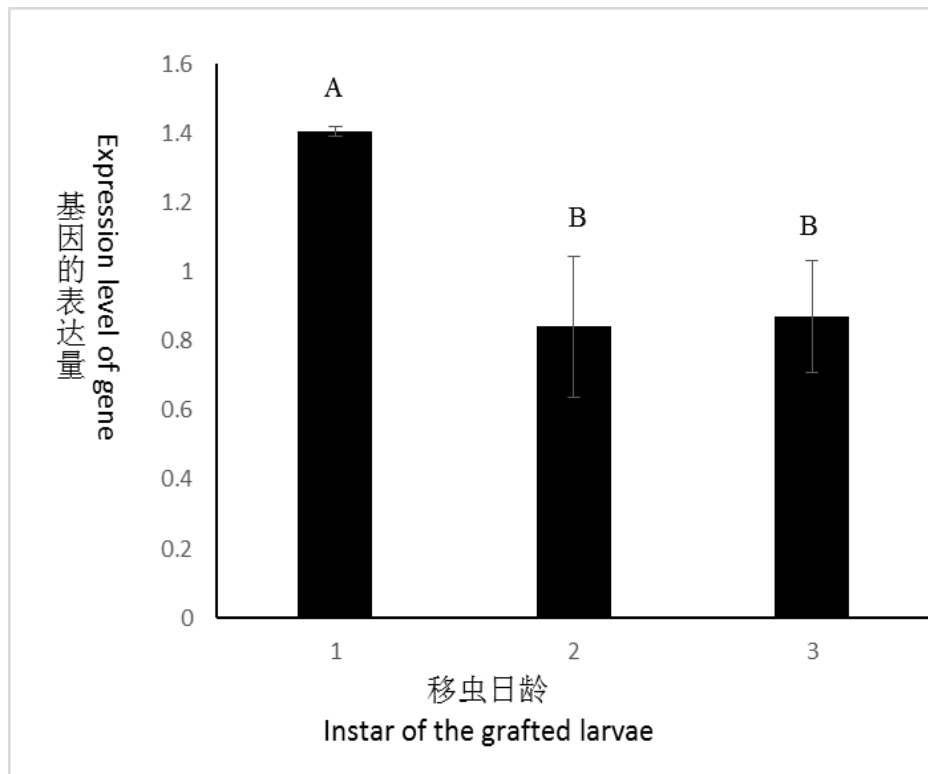


图 3-8 Hex110 基因的表达量

Figure 3-8 Expression levels of Hex110

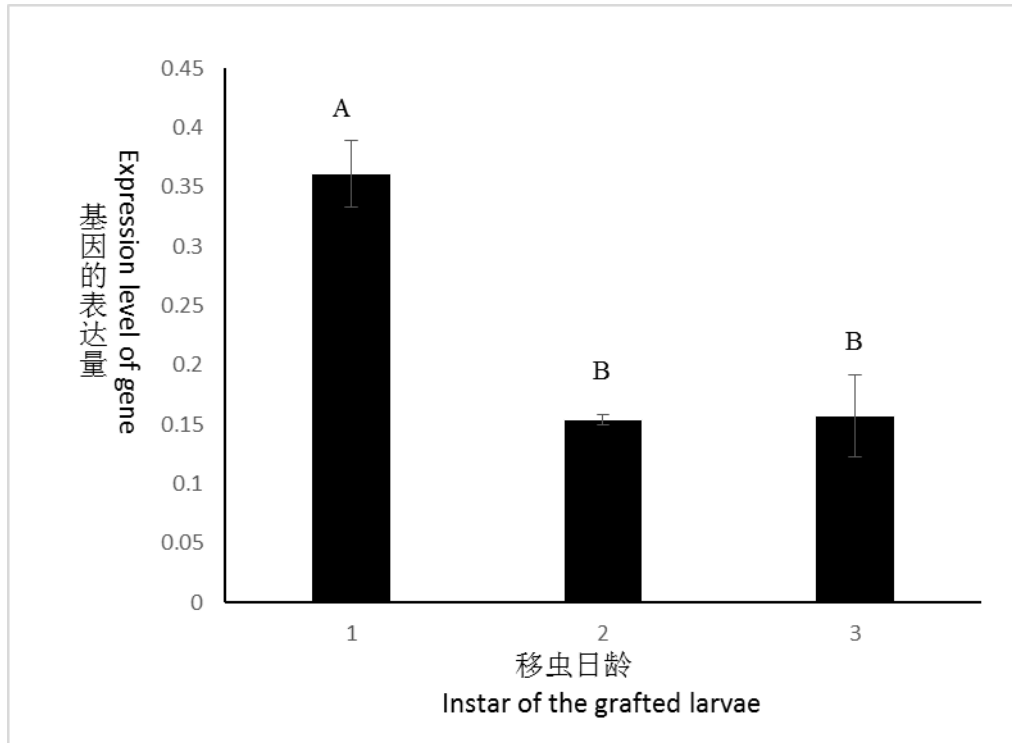


图 3-9 Hex70b 基因的表达量

Figure 3-9 Expression levels of Hex70b

2.4.2 不同移虫日龄蜂王卵巢 Hexamerin110、Hexamerin70 蛋白的表达

由图 3-10 所示，随着移虫日龄的增加，蜂王卵巢中 Hex110、Hex70b 蛋白的表达水平均呈现降低趋势，与其基因表达趋势一致（图 3-10）。

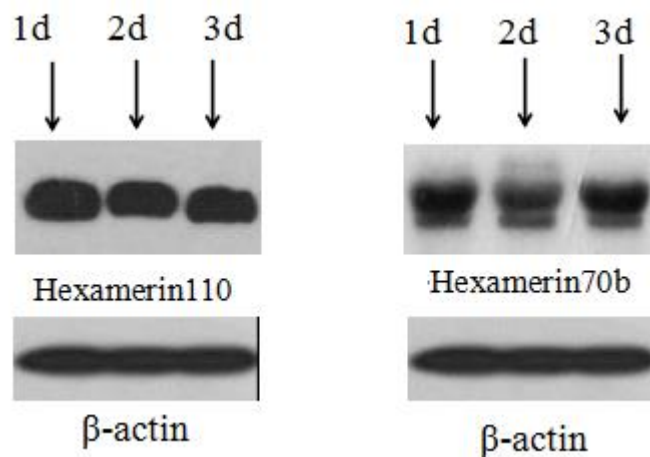


图 3-10 Hexamerin110 蛋白和 Hexamerin70b 蛋白的表达

Figure 3-10 Expression levels of Hexamerin110 protein and Hexamerin70b protein

3 讨论

卵巢是雌性蜜蜂生殖系统的重要功能组织，卵巢的大小和发育程度代表着蜂王繁殖的能力，而移虫日龄是影响蜂王卵巢发育的关键因素。不同移虫日龄的差异蛋白质在碳水化合物代谢和产能类蛋白质代谢聚集较多，一方面可能是由于能量代谢影响到蜂王卵巢的发育；另一方面由于蜂王破茧出房过程中具有很高的呼吸率和代谢率，需要大量的能量和代谢类蛋白质来完成剧烈的代谢活动。由于不同日龄的蜂王组织器官发育相似，因此 90% 以上的代谢通路是一致的，差异代谢通路较少。

值得注意的是，筛选获得的差异蛋白中发现王浆主蛋白 1 (major royal jelly protein 1, MRJP1) 及其前体 (major royal jelly protein 1 precursor)。有研究表明 MRJP1 的单体 Royalactin 是级型分化的关键因素^[13]。研究发现 Royalactin 作用于果蝇可以产生缩短发育时间，增大成年体型，增强产卵力、延长寿命等类似于蜂王的发育特性，Royalactin 可以通过脂肪体细胞表皮生长因子受体通路调节蜜蜂幼虫的发育时间、出房重以及卵巢体积。本研究发现 MRJP1 及其前体在处女王卵巢中表达，并且 2 日龄和 3 日龄移虫蜂王组 MRJP1 的表达量显著低于 1 日龄移虫蜂王，结合前文中对蜂王其他指标的鉴定结果，推断 MRJP1 可能是引起不同移虫日龄蜂王发育产生差异的关键蛋白之一。MRJP1 对蜂王卵巢的分子调节机制，有待进一步深入研究。

此外，我们还发现储存蛋白(Hexamerin)表达差异性明显，呈持续下调模式。储存蛋白为非进食期的昆虫提供物质和能量^[15]，并参与角质层的形成^[16]，有的可以结合保幼激素^[17]以及蜕皮激素^[18]等有机物，还有的可以参与幼虫期激素的调控^[19]。实验结果表明，随着移虫日龄的增加，Hex 呈持续下调模式，可能是因为 Hex 受保幼激素的调控，而且在幼虫期间高蛋白摄入阶段，JH 会诱导 Hex 的高表达^[20]。qRT-PCR 和 Western Blot 的结果显示，随着移虫日龄的增加，Hex110 的表达量无论是在 mRNA 水平还是蛋白水平，均呈现降低趋势，可能是因为 Hex110 与产卵有关，并且在产卵蜂王的卵巢中高表达，而移虫日龄会对蜂王的生长发育以及繁殖性能产生影响，随着移虫日龄的增加，蜂王的卵巢重显著减轻，卵巢管数显著减小^[11]，移虫越晚，人工培育的蜂王的卵巢发育的越不完全，从而导致与产卵有关的 Hex110 表达量的降低。Hex70b 基因的表达受保幼激素和蜕皮激素的调节，Adriana^[21]用保幼激素处理或者注射蜕皮激素会使工蜂 Hex70b 的高表达期延长。随着移虫日龄的增加，Hex70b 的表达量无论是在 mRNA 水

平还是蛋白水平，均呈现降低趋势，与随着移虫日龄的增加，蜂王幼虫的保幼激素和蜕皮激素的含量显著降低的结果一致^[11]，Hex70b 的表达之所以会随着移虫日龄的增加而降低可能是因为不同移虫日龄培育的蜂王取食到的蜂王浆不同，而蜂王浆会影响成虫的保幼激素浓度^[22-23]，保幼激素和蜕皮激素又会诱导、调节 Hex70b 的表达，从而导致 1 日龄移虫培育的蜂王卵巢的 Hex70b 基因的表达量高 2 日龄和 3 日龄移虫培育的蜂王卵巢的 Hex70b 基因的表达量。

本研究对不同移虫日龄蜂王的卵巢蛋白质组学进行了分析，获得了大量的差异表达蛋白，如 MRJP1 及其前体、Hex110 和 Hex70b 在不同移虫日龄下发育的蜂王卵巢中呈现差异表达。初步对不同移虫日龄发育的蜂王之间差异表达蛋白进行系统研究，为进一步研究蜂王生殖发育及级型分化的调控机制提供理论依据，并为指导针对繁殖性状的蜜蜂育种实践提供理论基础。

参考文献

- [1] Page R E, Peng C Y S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L [J]. *Experimental gerontology*, 2001, 36(4): 695-711.
- [2] Hartfelder K, Engels W. Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee [J]. *Current topics in developmental biology*, 1998, 40: 45-78.
- [3] 石元元. 营养和空间因素对雌性蜜蜂发育的影响[D]. 江西农业大学, 2011.
- [4] 陈璇, 胡福良. 雌性蜜蜂级型决定的分子机制[J]. *蜜蜂杂志*, 2011(4): 1003-1091.
- [5] Barchuk A R, Cristino A S, Kucharski R, et al. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera* [J]. *BMC Developmental Biology*, 2007, 7(1):70.
- [6] Evans J, Wheeler D. Expression profiles during honeybee caste determination [J]. *Genome Biology*, 2000, 2(1):6.
- [7] Chen X, Hu Y, Zheng H Q, et al. Transcriptome comparison between honey bee queen-and worker-destined larvae [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, 42: 665-673.
- [8] Li J, Wu J, Rundassa D B, et al. Differential protein expression in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae: underlying caste differentiation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13455.
- [9] 吴静, 李建科. 蜜蜂 (*Apis mellifera* L.) 幼虫级型分化差异蛋白质组分析[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(1): 176-184.
- [10] 沈芳, 殷玲, 刘振国, 等. 蜜蜂级型分化的研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(32): 1-5.
- [11] 沈芳. 移虫日龄对蜂王生长发育及蜂王卵巢蛋白质组学的影响[D]. 扬州大学, 2015.

- [12] Noirel J, Evans C, Salim M, et al. Methods in Quantitative Proteomics: Setting iTRAQ on the Right Track [J]. *Currrent Proteomics*, 2011, 8(1): 17-30.
- [13] Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees [J]. *Nature*, 2011, 473: 478-83.
- [14] 匡邦郁, 匡海鸥. 蜜蜂生物学[M]. 云南科技出版社, 2002.
- [15] Levenbook L, Bauer A C. The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina* [J]. *Insect Biochemistry*. 1984, 14: 77-86.
- [16] Peter M G, Scheller K. Arylphorins and the integument [J]. *Physiology of the Insect Epidermis*, 1991: 113-122.
- [17] Braun R P, Wyatt G R. Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria* [J]. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, 271(49): 31756-31762.
- [18] Enderle U, Kauser G, Reum L, et al. Ecdysteroids in the haemolymph of blowfly larvae are bound to calliphorin [J]. *Journal of Biological Chemistry*. 1983, 40-49.
- [19] Jones G, Brown N, Manczak M, et al. Molecular cloning, regulation, and complete sequence of a hemocyanin-related, juvenile hormone-suppressible protein from insect hemolymph [J]. *Journal of Biological Chemistry*. 1990, 265(15): 8596-8602.
- [20] Martins J R, Nunes F M F, Cristino A S, et al. The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones [J]. *BMC Molecular Biology*, 2010, 11(1): 23.
- [21] Adriana D. Cunha, Adriana M. Nascimento, et al. Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2005, 51(10): 1135-1147.
- [22] Riddiford L M, Truman J W, Mirth C K, et al. A role for juvenile hormone in the prepupal development of *Drosophila melanogaster* [J]. *Development*, 2010, 137(7): 1117-1126.
- [23] 彭文君. 关于蜂王浆[J]. *中国蜂业*, 2007, 58(12):46.

(郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 李熊, 罗丽萍. 蜂胶醇提物脂质体制备及表征[J]. 食品科学, <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20151215.1544.106.html>, 优先发表)

蜂胶醇提物脂质体制备及表征

郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 李熊, 罗丽萍*

(南昌大学生命科学院, 江西南昌 330031)

摘要

脂质体具有良好的细胞膜亲和性, 适合体内降解、无毒性和无免疫原性的特点, 可作为药物载体可控制药物的释放和具有器官靶向性。本文以大豆卵磷脂和胆固醇为膜材, 采用薄膜分散-动态高压技术制备蜂胶醇提物 (EEP) 脂质体, 通过粒度分析仪、透射电子显微镜、清除 DPPH 自由基、低温储存试验等进行性状表征。研究表明, 制备的蜂胶脂质体形状为大小均匀球形, 粒径为 78 ± 14 nm, 包埋率和稳定性参数分别达到 $7.80\pm 5.21\%$ 和 $2.53\pm 0.05\%$ 。4℃下保存 90 天和 180 天后, 包埋率分别下降了 16.74% 和 28.77%, 分散系数 (PDI) 分别增加了 6.61% 和 14.32%, DPPH 自由基清除指数 AAI 分别为 2.78 和 2.71; HPLC 分析贮存 180 天后 EEP 脂质体中 7 种物质变化分别为 1.08%~6.63%, 低于 EEP 的 5.55%~19.42%, 说明对 EEP 中的活性物质具有一定的保护作用。

关键词: 蜂胶醇提物; 脂质体; 形状表征; 稳定性

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BDA29B01-3); 江西省农业科技支撑/江西省国际合作项目(20121BDH80020)

作者简介: 郭夏丽 (1986-), 女, 助教, 硕士, 植物资源开发与利用研究方向。E-mail: guoxiali2520@sina.com

* 通讯作者: 罗丽萍 (1972-), 女, 教授, 博士, 植物资源开发与利用研究方向。E-mail: lluo2@126.com

The preparation and characterization of EEP liposomes

GUO Xiali, LAN Yahui, ZOU Yihong, LI Xiong, LUO Liping
(School of life sciences, Nanchang University, Nanchang Jiangxi, 330031, China)

Abstract

Based on liposomes having a cell affinity, for degradation in vivo, non-toxic and non-immunogenic characteristic, liposomes as drug carriers and controlled release of a drug having a targeted organ. The thin film evaporation-dynamic high pressure microfluidization was used to prepare EEP liposomes with soybean lecithin and cholesterol as the membrane materials. The characterization of prepared EEP liposomes was examined by dynamic light scattering, transmission electron microscopy, DPPH radical scavenging activity, low temperature storage test. The results showed that the average size was $68\pm 14\text{nm}$, encapsulation efficiency was $97.80\pm 5.21\%$, the appearance is uniform spherical, Ke value was $2.53\pm 0.05\%$. The liposomes obtained were incubated at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 90 and 180 days and its encapsulation efficiency fell 16.74% and 28.77%, PDI fell 6.61% and 14.32%, AAI was 2.78 and 2.71, respectively. Contents change of 7 compounds in EEP liposome were 1.08% ~ 6.63% analyzed by HPLC after 180 days storage time, lower than 5.55% ~ 19.42% in EEP. This study highlights the protection of liposome for EEP.

Keywords: Ethanol extract of propolis; Liposome; Characterization; Stability

前言

蜂胶是蜜蜂采集植物幼芽、树皮与树干裂缝处的树脂，混入其上颚腺分泌物和蜂蜡咀嚼后加工而成的具芳香气味的胶状固体物^[1]。其含有丰富的营养素和生物活性成分，如多糖、维生素、多酚类化合物、芳香酸及芳香酸酯、醛及酮类化合物、萜类化合物等^[2-4]。蜂胶具有抗菌消炎、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、调节血脂与血糖、促进组织再生等广泛的生物学作用^[5-8]。近年来，食品行业对天然产物越来越感兴趣，一方面可以从天然原料获得生物活性化合物，另一方面可以利用天然产物生产稳定的功能产品^[9]。蜂胶易因黄酮等活性物质氧化变性而失去活性^[10]，气味浓烈影响产品气味^[11]，目前主要采取乙醇提取法对蜂胶活性物质进行提取，得到的蜂胶醇提物（Ethanol extracts of

propolis, EEP) 由于在水相或油中不易分散^[9], 从而影响蜂胶在日化产品、食品、药物中的广泛应用。脂质体是一种由磷脂在水中自组装形成双层膜小囊泡, 对细胞膜亲和性良好^[12], 作为药物载体具有靶向、高效、缓释、副作用小等特点, 已被广泛应用于医药领域^[5]。蜂胶中极性较强的物质包裹在脂质体的水相中, 而一些极性较弱的脂溶性物质则包裹在脂质膜内, 很好的阻止光、热、氧气和金属离子等环境因素对蜂胶活性成分的破坏^[13]。

关于蜂胶脂质体的制备研究, 国内外都鲜有报道, 仅有 Yunpeng Fan 等^[14]将蜂胶黄酮、大豆卵磷脂、胆固醇、维生素 E 溶于乙醇-氯仿中, 采用薄膜超声法制备淫羊藿多糖-蜂胶黄酮脂质体, 蜂胶黄酮最大包封率为 85.48%, 粒径 < 200 nm; 汤志勇等^[15]采用薄膜超声法、逆向蒸发法、乙醇注入法 3 种方法制备蜂胶脂质体, 薄膜超声法获得最高包埋率 85.7% 的脂质体; 吴亚妮等^[16]采用乙醇注入法进行研究, 发现制备得到的脂质体粒径大、包封药物易变性、乙醇难以除去等问题。动态高压微射流技术(Dynamic High Pressure Microfluidization, DHPM)是一种新型连续化处理技术, 它可将液体在极小空间进行强烈的垂直撞击, 形成持续高速的剪切力, 从而将液体粒径有效减小到分布均匀的纳米级^[17], 利用 DHPM 法和传统的薄膜法结合来制备 EEP 脂质体, 目前还未见到有类似报道。

为了阻止外界环境因素对蜂胶活性成分的破坏, 本文以大豆卵磷脂和胆固醇为膜材, 采用薄膜分散-动态高压技术制备 EEP 脂质体, 考察 EEP 脂质体的理化性质和稳定性, 包括形态学观察、粒径分布、包封率、储藏稳定性等, 通过清除 DPPH 自由基能力对 EEP 脂质体的保护能力进行评价和验证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

EEP 浸膏: 实验室自制。以 1:20(w/v)比例将青海大通蜂胶粉末溶于 60%无水乙醇于 60 °C 水浴提取 3 次, 合并上清液后真空条件 50 °C 旋转蒸发至无水状态。

大豆卵磷脂购自 lipoid GmbH 公司, 碳支撑膜(铜网)购自中镜科仪, Tween-80 购自阿拉丁试剂, 咖啡酸、表儿茶素、芦丁购自中国药品生物制品检定所(北京), 山奈酚、p-香豆酸、阿魏酸购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心(江西), 3, 4-二甲氧基肉桂酸、白杨素(纯度 ≥ 95%)、胆固醇、DPPH(2,4-Dinitrophenylhydrazine) 购自 Sigma-Aldrich, 磷钨酸、无水乙醇和甲醇, 均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JEM-2100 透射电子显微镜，日本电子株式会社(JEOL)；Microfluidizer Processor M-700 微射流仪，美国 Microfluidics 公司；美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪，光电二极管阵列检测器(DAD)，G2170BALC 化学工作站；Nicomp380 ZLS 超细微粒粒度分析仪，美国 PSS 粒度仪公司，California，USA；紫外可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；JAC-300 超声波震荡仪，山东奥波超声电器有限公司；RE52-05 旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；SHZ-III 型循环水真空泵，上海亚荣生化仪器厂；B13-3 型磁力加热搅拌器，上海司乐仪器有限公司；KQ-50E 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 薄膜分散-DHPM 法^[13]制备 EEP 脂质体

将大豆卵磷脂与胆固醇（质量比 20:3，总壁材 368 mg）溶解在 20 mL 无水乙醇中，45 °C 旋转蒸发。加入 20 mL pH 5.4 的 PBS 缓冲溶液，蒸馏水稀释至 50 mL 旋转蒸发 40 min。将得到的脂质体悬液，用微射流均质机 140 MPa 下处理 2 次，即得空白脂质体。

取一定量 EEP 与大豆卵磷脂（质量比 280:1）、胆固醇混合溶解于乙醇中，步骤同上，制备 EEP 脂质体。

1.3.2 EEP 脂质体性质的测定

1.3.2.1 EEP 脂质体形态观察^[18]及其粒径和 ζ 电位^[19]、稳定性参数 Ke 值^[20]、包封率的测定^[17]

取蒸馏水稀释适当倍数（卵磷脂终浓度为 1 mg/mL）的 EEP 脂质体滴加在培养皿中，将铜网浸入脂质体液滴中，4 min 后滤纸吸干，用 pH 6 的磷钨酸溶液对铜网进行染色 4 min，室温自然干燥，透射电子显微镜 200 KV 下观察。

采用 NICOMP380/ZLS 激光纳米粒度分析仪，角度 90°，温度为(25±0.1) °C，光波长为 632.8 nm。样品在测试前用去离子水稀释 10 倍。 ζ 电位的测量需每个样品读取 10 次取平均值。

将脂质体悬浮液于 5000 rpm 离心 10 min，分光光度法测定脂质体悬浮液离心前后在 $\lambda=415$ nm 处吸光值，以蒸馏水为空白。按下面的公式计算 Ke 值。

$$Ke=(A_0-A)/A_0 \times 100\% \quad (2)$$

其中：Ke 为稳定性参数， A_0 和 A 分别为脂质体悬液离心前和离心后在 $\lambda=415$ nm 处的吸光度。

芦丁标准曲线绘制^[21]：精密称取干燥至恒重的芦丁标准品 0.005 g 于 25 mL 容量瓶中，用无水乙醇溶解并定容，配成 0.2 mg/mL 的标准溶液。准确吸取 0.1, 0.2, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 mL 标准液于 25 mL 容量瓶中，加入无水乙醇至 10 mL。各瓶加入 0.5 mL 100 g/L 氯化铝水溶液，混匀，蒸馏水定容，室温静置 15 min。以芦丁空白溶液作对照，415 nm 测定吸光值，以吸光值为横坐标，芦丁终浓度为纵坐标绘制标准曲线。

总黄酮的测定：准确吸取 50 μ L 10 mg/mL EEP 于 25 mL 容量瓶中，加入无水乙醇至 10 mL，0.5 mL 100 g/L 氯化铝水溶液，蒸馏水定容，室温静置 15 min，415 nm 测定吸光值，结果用 mg 芦丁/g 蜂胶表示。

包封率的测定：取一定量 EEP 脂质体悬浮液置于透析袋中，以 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液为外液透析 8 h。吸取透析内液加甲醇，超声振荡充分破乳，离心后取上清液，测定其吸光值，通过芦丁标准曲线计算总黄酮含量。取等量 EEP 脂质体悬浮液不经透析，直接加甲醇，超声振荡破乳，离心后取上清液同上法计算总黄酮含量。

$$\text{包封率 EE(\%)}=n/m \times 100 \quad (1)$$

其中，m 为 EEP 脂质体中总蜂胶的总黄酮含量，n 为包封的蜂胶总黄酮含量。

1.3.2.2 HPLC 检测 180 d 贮存期 EEP 脂质体中 7 种物质的含量变化

取 180 d 贮存期的 EEP 脂质体用甲醇充分破乳后，4000 rpm 离心 10 min 取上清液，稀释一定倍数过滤后，采用课题组之前研究 HPLC 的条件^[22]检测咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、山奈酚、白杨素 7 种物质的含量变化。

1.3.2.3 EEP 脂质体清除 DPPH 自由基能力^[23]及其稳定性的测定

将 EEP 和包埋等量 EEP 的脂质体用甲醇分别释成 100, 200, 300, 400, 500, 600 μ g/mL 样液。取样液 0.1 mL，加入 3.9 mL 0.1~0.2 mmol/L DPPH 甲醇溶液(现配现用)，

0.1 mL 甲醇作空白。室温黑暗条件下静置 90 min，517 nm 测定吸光值。自由基清除率 $I\% = [(A_0 - A_S) / A_0] \times 100\%$ 。IC₅₀（50%抑制浓度）可通过自由基清除活性-样品浓度的线性关系计算出。抗氧化活性用 AAI 表示。

$$AAI = \frac{C_{[DPPH]e}}{IC_{50}} \quad (3)$$

AAI：抗氧化活性指数；C_{[DPPH]e}：DPPH 终浓度，μg /mL；IC₅₀：50%抑制浓度，μg/mL。

将制备好的 EEP 脂质体置于离心管中，4℃冰箱中分别冷藏 90 d 和 180 d，然后检测脂质体粒径大小、尺寸分布、包封率等参数变化。

1.4 数据处理

利用 Excel 绘制各对照品标准曲线，获得线性回归方程及相关系数。所有试验平行 3 次，取平均值。

2 结果与分析

2.1 EEP 脂质体的包封率测定结果

根据芦丁标准曲线，得出新鲜制备的 EEP 脂质体包封率为 97.80±5.21%。汤志勇^[15]使用了 3 种不同方法制备的蜂胶脂质体包封率为 85.7%，张冰慧^[19]制备的蜂胶脂质体包封率最高为 90.69%。脂质体内包埋药物量多少是衡量脂质体性能的最关键因素，而根据薄膜分散-DHPM 法制备得到的 EEP 脂质体包埋蜂胶能力强，蜂胶在制备过程中损失极少，有利于蜂胶脂质体在保健药物、食品添加剂等产品上的大规模应用。

2.2 观察 EEP 脂质体的形态图片

与蒸馏水对比，制得的 EEP 脂质体溶液为乳白色透明状。图 1 透射电镜观察到，EEP 脂质体外观呈分散、单一的圆球形球粒，大小分布较均匀，粒径 < 100 nm，脂质体球体无明显不规则结构及大规模聚集现象，这一特性有助于 EEP 脂质体添加至日化用品中生产中。

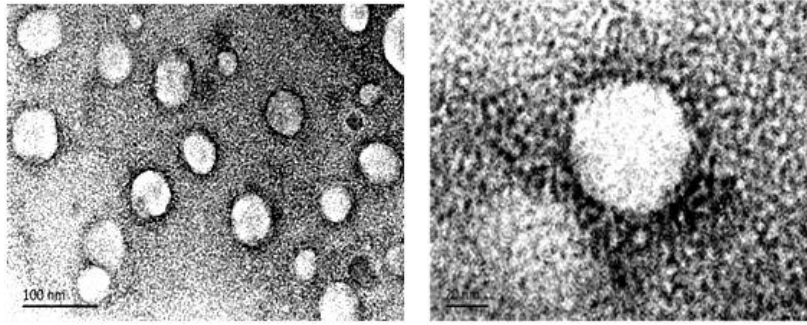


图 1 EEP 脂质体透射电子显微镜观察图片

Fig. 1. TEM micrograph of EEP liposome

2.3 脂质体的粒径和 ζ 电位

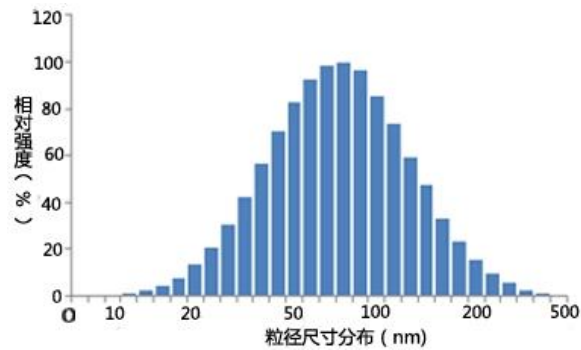


图 2.新鲜制备 EEP 脂质体粒径分布

Fig. 2. Particle size distribution of freshly prepared EEP liposome

EEP 脂质体平均粒径为 78.60 nm(图 2)，PDI 平均值 0.353， ζ 电位-22.69mV，以上结果验证了透射电子显微镜的观察结果，所制得的 EEP 脂质体粒径较小，分散性好。 ζ 电位的绝对值越大，体系中颗粒之间的排斥力越大，则体系越稳定，绝对值越趋于零，颗粒之间可发生凝聚，生成比较大的絮体。但不能认为粒径越小的脂质体就意味着该脂质体性能越好，而需要考虑在有较高包封率的前提下，来制备有较高稳定性的 EEP 脂质体。

2.4 稳定性参数 Ke 值

离心过程中，比重小于分散介质的粒子将上浮，大于分散介质的粒子将下沉，从而引起稳定性参数 Ke 值的变化。Ke 值越小，则体系的物理稳定性越好，反之则越差。本文制得的 EEP 脂质体 Ke 值为 $2.53 \pm 0.05\%$ 之间，小于张冰慧^[24]通过优化实验制得蜂胶脂质体的 Ke 值 $9.70 \pm 1.13\%$ ，由此可见本文制得的 EEP 脂质体稳定性良好，说明 EEP 脂质体对包埋物质具有保护能力，防止 EEP 被氧化从而保持其活性能力。

2.5 清除 DPPH 自由基能力测定

不同贮存时期 EEP 和 EEP 脂质体的 DPPH 自由基半抑制率 IC_{50} 和清除 DPPH 自由基活性指数 (AAI) 见表 1。

表 1. 不同贮存时期 EEP 和 EEP 脂质体清除 DPPH 自由基能力

Tab.1. DPPH radical reducing activity of EEP and EEP liposomes during different storage time

	校正曲线 Calibration curve	相关系数 R^2	半抑制率 $IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	清除指数 AAI
新鲜 EEP	$y = 0.0007x - 0.0007$	$R^2 = 0.9997$	715	3.21
新鲜 EEP 脂质体	$y = 0.0007x - 0.0124$	$R^2 = 0.9967$	732	3.14
贮存 90 d 的 EEP	$y = 0.0006x - 0.0128$	$R^2 = 0.9841$	854	2.69
贮存 90 d 的脂质体	$y = 0.0006x + 0.0046$	$R^2 = 0.9949$	825	2.78
贮存 180 d 的 EEP	$y = 0.0006x - 0.0209$	$R^2 = 0.9909$	868	2.65
贮存 180 d 的脂质体	$y = 0.0006x - 0.0081$	$R^2 = 0.9946$	846	2.71
芦丁	$y = 0.0008x + 0.0143$	$R^2 = 0.9998$	607	3.79

Rodrigo^[25]指出当 $AAI < 0.5$ 时, 说明清除 DPPH 自由基活性不强, $0.5 < AAI < 1.0$ 时, 活性适中, $1.0 < AAI < 2.0$ 时, 活性较强, 当 $AAI > 2.0$ 时, 则说明其活性很强。由此看出, 所有 EEP 和 EEP 脂质体都具有很强的清除 DPPH 自由基活性。通过比较新鲜的 EEP 和 EEP 脂质体, EEP 的清除活性较强, 可能是由于在制备脂质体的过程中 EEP 出现少量损失原因所致; 贮存 90 d 和 180 d 的 EEP 和 EEP 脂质体中, 均发现被脂质体包埋的 EEP 具有更强的清除 DPPH 自由基能力, 从而验证了脂质体对包埋物质的保护能力, 防止 EEP 被氧化从而保持其活性能力。

2.6 HPLC 检测 180 d 贮存期 EEP 脂质体中 7 种物质的含量变化

表 2. 贮存 180 d 的 EEP 和 EEP 脂质体中 7 种标准对照品含量(mg)

Tab. 2. Content of 7 standards in EEP and EEP liposomes for 180 days storage time

	咖啡酸	表儿茶素	p-香豆酸	阿魏酸	3,4-二甲氧基肉桂酸	山奈酚	白杨素
新鲜 EEP	9.18	3.20	1.96	6.11	3.14	16.52	32.04
贮存 180 d 的 EEP 脂质体	8.94	3.09	1.83	6.02	2.95	16.34	30.67
贮存 180 d 的 EEP	8.67	2.84	1.66	5.17	2.53	14.98	29.86

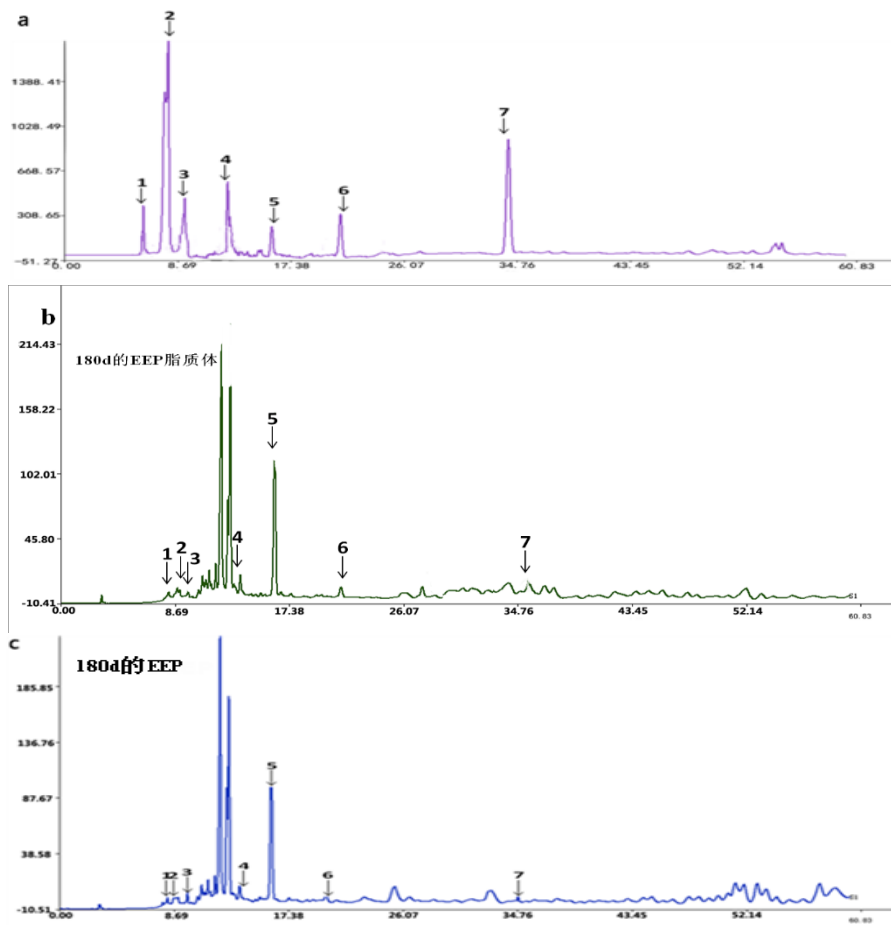


图 3. 280 nm 下 7 种混合对照品色谱图(a)，贮存 180 d 的 EEP 脂质体色谱图(b)，贮存 180 d 的 EEP 色谱图(c) Peak：1.咖啡酸；2.表儿茶素；3.p-香豆酸；4.阿魏酸；5.3,4-二甲氧基肉桂酸；6.山奈酚；7.白杨素。

Fig. 3. HPLC chromatogram of mixed seven standards(a), HPLC chromatogram of EEP liposome after six months(b) and HPLC chromatogram of EEP after six months(c) under 280 nm. Peak:1.Caffeic acid;2.Epicatechin;3.p-Coumaric;4.Ferulic acid;5.3,4-Dimethoxycinnamic acid;6.Keampferol;7.Chrysin.

7种对照品、贮存180 d的EEP和EEP脂质体色谱图(图3)。贮存180 d的EEP脂质体中咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸、山奈酚、白杨素含量分别下降了2.61, 3.43, 6.63, 1.47, 6.05, 1.08和4.27%, 而180 d的EEP中相对应的物质含量分别下降了5.55, 11.35, 15.54, 15.38, 19.42, 9.32和6.80%(表2), 对比两者的物质含量变化, 发现贮存180 d的EEP脂质体中物质含量明显高于180 d的EEP, 说明脂质体对包埋的EEP起保护作用, EEP脂质体中物质在贮存期间的含量损失比裸露EEP少。

2.7 脂质体稳定性的检测

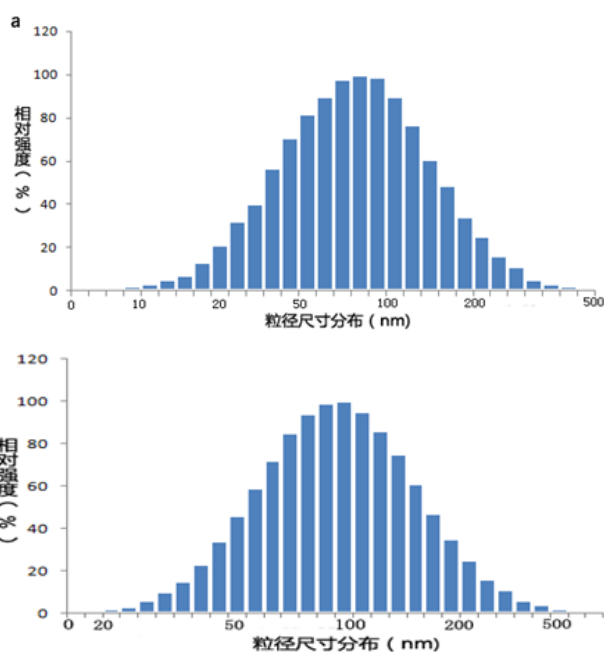


图 4. EEP 脂质体粒径分布图:90 d 贮存期(a), 180 d 贮存期(b)

Fig. 4 Particle size distribution of EEP liposomes during three months (a) and six months(b) storage

将贮存在 4 °C 冰箱 90 d 和 180 d 的 EEP 脂质体按公式(1)进行计算, 得出包封率分别为 $81.42 \pm 6.78\%$ 和 $69.66 \pm 10.01\%$, 平均粒径分别为 89.22 nm 和 97.63 nm(图 4), PDI 值分别为 0.378 和 0.412, ζ 电位分别为 -20.62 mV 和 -20.15 mV。结果发现, 脂质体粒径和分散系数值有所增大, 可能是因为脂质体在储存过程中, 粒子之间发生相互碰撞而倾向于黏着在一起, 进而团聚成更大的脂质体微粒, 使得脂质体的分散系数变得更大, ζ 电位绝对值降低, 造成不均一性。经过 90 d 和 180 d 的贮存, EEP 脂质体的包封率、粒径、分散系数变化不大, 显示出薄膜分散-DHPM 法制得的脂质体具有较好的稳定性。

3 结论

本文采用薄膜分散-DHPM法成功制备蜂胶醇提物脂质体，制备的EEP脂质体粒径在68~82 nm之间，包埋率高达 $97.80\pm 5.21\%$ ，透射电镜观察结果为大小均匀球体，且证明了4℃下贮存180 d的EEP脂质体都具有很强的DPPH自由基清除活性，HPLC分析EEP脂质体中的咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、山奈酚、白杨素7种物质含量减少低于7%。蜂胶中黄酮类化合物是其主要成分和主要的抗肿瘤活性成分，脂质体作为抗肿瘤药物的载体，能够将抗肿瘤药物选择性地分布于体内癌变部位，既可提高癌变部位药物浓度，从而提高药效和药物利用率，又可降低其对正常组织的毒副作用。EEP脂质体的成功制备克服了EEP稳定性差、水溶性差、气味强烈等缺点，为蜂胶在保健食品中的应用提供了新原料。

参考文献:

- [1] KASOTE D, SULEMAN T, CHEN Weiyang, et al. Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis[J]. *Biochemical Systematics and Ecology* 2014, 55:156-163.
- [2] LUIS-Villaroya A, ESPINA L, GARCIA-Gonzalo D, et al. Bioactive properties of a propolis-based dietary supplement and its use in combination with mild heat for apple juice preservation[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 205(16):90-97.
- [3] 崔庆新, 刘国富. 蜂胶乙醇提取物化学成分的GC/MS研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2001, 13(6):36-38.
- [4] 蒋春红, 吕武清, 胡裳洪. 蜂胶的药理作用研究概况[J]. *中国医药指南*, 2011, 9(17):42-43.
- [5] GABRIELA V, CONSUELO C, CATALINA F, et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 168: 37-44.
- [6] CHEN Yan Feng, LI Ying, WANG Yanwen, et al. Berberine improves free-fatty-acid-induced insulin resistance in L6 myotubes through inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor γ and fatty acid transferase expressions[J]. *Metabolism*, 2009, 58(12):1694-1702.
- [7] 谢国芳, 刘春梅, 曹长靓, 等. 基于响应面分析方法蜂胶总黄酮提取条件的优化[J]. *粮油加工*, 2010, (8):156-160.
- [8] 曹小燕, 杨海涛. 蜂胶中黄酮的提取及其自由基清除活性研究[J], *粮油食品科技*, 23(5):45-49.

- [9] DA S F C, DA F C R, DE A S M, et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems[J]. Food and Bioproducts Processing, 2013, 91: 28-36.
- [10] Yuan Ju, Liu Jiaguo, Hu Yuanliang, et al. The immunological activity of propolis flavonoids liposome on the immune response against ND vaccine[J]. International journal of biological macromolecules, 2012, 51: 400-405.
- [11] NORI M P, FAVARO-TRINDADE C S, MATIAS D A S, et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation[J]. LWT - Food Science and Technology, 2011, 44: 429-435.
- [12] DE P E, MARTIN Á, COCERO M J. Formulation of β -carotene with soybean lecithin by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying[J]. The Journal of Supercritical Fluids, 2012, 72:125-133.
- [13] 单良, 汤志勇, 刘元法, 等. 蜂胶黄酮萃取物脂质体制备工艺的优化及体外缓释特性[J]. 食品科学, 2008, 29(8):232-237.
- [14] FAN Yunpeng, LIU Jiaguo, WANG Deyun, et al. The preparation optimization and immune effect of epimedium polysaccharide-propolis flavone liposome[J]. Carbohydrate polymers, 2013, 94:24-30.
- [15] 汤志勇, 王兴国, 金青哲, 等. 蜂胶脂质体的制备[J]. 食品工业科技, 2005, 3:136-138.
- [16] 吴亚妮, 徐云龙, 孙文晓. 木瓜蛋白酶纳米脂质体的制备及其粒度控制[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2007, 25(2):105-109.
- [17] 杨水兵, 刘伟, 刘成梅, 等. Vc 纳米脂质体的制备研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(6):222-225.
- [18] ZOU Liqiang, PENG Shengfeng, LIU Wei, et al. Improved in vitro digestion stability of (-)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation[J]. Food Research International, 2014, 64:492-499.
- [19] ZOU Liqiang, LIU Wei, LIU Weilin, et al. Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(4):934-941.
- [20] XIONG Fei, XIONG Chen, YAO Juan, et al. Preparation, characterization and evaluation of breviscapine lipid emulsions coated with monooleate-PEG-COOH[J]. International journal of pharmaceutics, 2011, 421:275-282.
- [21] 丽艳. 中国不同地区蜂胶醇提物化学组成及抗氧化活性[D]. 南昌大学, 2008.
- [22] GUO Xiali, CHEN Bin, LUO Liping, et al. Chemical compositions and antioxidant activities of water extracts of Chinese propolis[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2011, 59: 12610-12616.

- [23]张茜, 罗丽萍, 陈滨, 等. 不同来源中国蜂胶水提物的化学组成及抗氧化性[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24:444-449.
- [24] 张冰慧. 蜂胶脂质体的制备及其对高血糖小鼠降糖作用的研究[D]. 合肥工业大学, 2009.
- [25] SCHERER R, GODOY H T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method[J]. Food Chemistry, 2009, 112: 654-658.

(郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 李熊, 罗丽萍. 蜂胶醇提物微胶囊制备及表征[J]. 现代食品科技, 已接受, 拟发表在 2016 年第 10 期上)

蜂胶醇提物微胶囊制备及表征

郭夏丽, 蓝雅惠, 邹艺红, 李熊, 罗丽萍*

(南昌大学 生命科学学院, 江西南昌 330031)

摘要

微胶囊具有保护物质免受环境条件影响、掩盖异味和颜色、降低毒性、延长挥发性物质的储存时间, 延缓或控制囊心物的释放等功能。本文采用复凝聚技术制备蜂胶醇提物 (EEP) 海藻酸钠-壳聚糖微胶囊, 利用粒度分析仪、激光共聚焦显微镜、红外光谱仪和 X 射线衍射仪分析、体外释放试验和加速试验等表征微胶囊性状。研究结果表明, 制备的 EEP 微胶囊形状为大小均匀球体, 粒径大小为 265 ± 25 nm, 包埋率和载药量分别达到 $72.80\pm 3.8\%$ 和 $19.96\pm 2.4\%$, 海藻酸钠和壳聚糖反应形成微胶囊。模拟胃液和肠液条件下体外释放 8 h, 释放率 $46.60\pm 0.80\%$; HPLC 分析加速试验 EEP 微胶囊中 7 种物质含量变化为 $14.01\%\sim 39.68\%$, 显著低于 EEP 中 $37.01\%\sim 77.45\%$ 。制得的 EEP 微胶囊粒径小、稳定性良好、释放率符合肠溶体系要求, 对 EEP 中的活性物质具有一定的保护作用。

关键词: 蜂胶醇提物; 海藻酸钠; 壳聚糖; 微胶囊

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BDA29B01-3); 江西省农业科技支撑/江西省国际合作项目(20121BDH80020)

作者简介: 郭夏丽 (1986-), 女, 硕士, 讲师, E-mail: guoxiali2520@sina.com。

通讯作者: 罗丽萍 (1972-), 女, 博士, 教授, E-mail: lluo2@126.com。

The Preparation and Characterization of EEP Calcium Alginate-chitosan Microcapsules

Guo xiali, Lan yahui, Zou yihong, Li xiong, Luo liping*

(School of life sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract

Microcapsules could protect substance from the harsh environment conditions, cover up the smell and color, reduce toxicity, prolonged storage of volatile substances, delay or control the release of the capsule core materials, etc. The calcium alginate-chitosan microcapsules of the ethanol extract of propolis (EEP) were prepared by the complex coacervation, and were characterized by particle size analyzer, confocal laser scanning microscope (CLSM), FITR, X-ray diffraction, a simulated gastrointestinal tract model and a temperature-accelerated test. The results show that EEP microcapsules were spherical with a mean particle diameter of 265 ± 25 nm. The encapsulation efficiency and loading capacity values was $72.80\pm 3.8\%$ and $19.96\pm 2.4\%$, respectively. The in vitro release rate of EEP microcapsules in 8h was $46.60\pm 0.80\%$. Contents change of seven compounds in EEP microcapsules was 14.01%~39.68% analyzed by HPLC after a temperature-accelerated test, lower than 37.01%-77.45% in EEP. The prepared microcapsules have small particle size and better stability with a fitting release rate to the enteric system. Therefore, the active substances inside EEP microcapsules were well protected.

Keywords: ethanol extract of propolis; alginate; chitosan; microcapsules

前言

蜂胶是蜜蜂采集植物树脂经咀嚼加工之后，用于蜂巢内墙保护、填充缝隙，避免和减少昆虫与微生物入侵的芳香胶状物^[1]，由于具有抗氧化^[2]，抑菌^[3]，消炎^[4]，抗肿瘤^[5]，免疫调节^[6]等多种生物活性，引起了研究人员的重视。蜂胶的化学成分复杂，不同类型或产地的蜂胶的化学成分各异，目前已鉴定的化学成分有300多种，含有黄酮类、萜烯类、酮类、酯类、醇类、酚类、醚类、有机酸和大量的氨基酸、酶类、维生素ABC类、以及矿物质等^[7]。目前对蜂胶的研究和利用主要以其醇提物(Ethanol extract of propolis, EEP)为主，而EEP因气味浓烈^[8]、易氧化变质^[9]、水溶性差^[10]等缺陷，造成了蜂胶的应用范围受限、贮存性能不佳和货架期短等问题。

微胶囊技术是一种用成膜材料把固体或液体进行包覆使其形成微小粒子的技术，其中海藻酸钠是一种从天然褐藻中提取的聚阴离子多糖的钠盐，由B-1,4结构的D型甘露糖醛酸的钠盐(M)和A-1,4结构的L型古罗糖醛酸的钠盐(G)共聚而成。因其具有无毒性、生物黏附性、生物相容性和生物降解性以及胶凝特性，被广泛用于食品工业、医药工业、农业以及日用化工业，作为细胞载体、药剂辅料和药物载体等的应用备受关注^[11]。海藻酸钠的分子中含有-COO⁻基，当向海藻酸钠的水溶液中添加二价阳离子时，G单元(α -L-古罗糖醛酸)中的Na⁺会与这些二价阳离子发生交换^[12]，使海藻酸钠溶液向凝胶转变，因此用Ca²⁺交联制备海藻酸钠微胶囊是最常见方法。壳聚糖(chitosan)是直链阳离子聚合物，由甲壳素(chitin)经脱乙酰化反应脱去50%以上乙酰基制备而成，它无毒、生物相容、可生物降解。可与聚阴离子海藻酸钠在静电作用下形成海藻酸钠/壳聚糖微胶囊，且具有很好的生物相容性。

樊英^[13]等通过喷雾式锐孔凝固浴方法制备黄芪多糖-海藻酸钠微胶囊，得到的微胶囊在柠檬酸钠溶液和不同PH磷酸缓冲液中进行药物缓释研究；李沙^[14]等采用乳化胶凝制备方法，以牛血清白蛋白为模型研究海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机理及其对大分子药物的载药及释药特性，得到的微胶囊平均粒径是(59.7±0.9) μm ，包埋率最高为38.12%。Mírian^[8]采用复凝聚技术包埋蜂胶提取物微胶囊，以大豆蛋白和果胶为原料，可有效封装蜂胶提取物，获得稳定的具有抗氧化、抗金黄色葡萄球菌能力的微胶囊以及在食品中控制释放的可能性。

目前，研究微胶囊的粒径大小通常在 2-200 μm ，而理论上制成粒径为 10^2 - 10^4 μm 是可行的^[15]，但该方面研究较少，且蜂胶纳米微胶囊的研究目前还尚未发现。纳米微胶囊具有其比表面积大，利于分离扩散，具有良好的缓释作用，利于人体的吸收利用的特定功效。

樊英^[13]等的研究中发现，药物在不同的释药介质中释药性能差异很大。李沙^[14]等在释药研究中发现药物在前 1 h 突释，且已释放超过 80% 的药物，这显然不符合肠溶药物的要求。为了更好地研究载药微胶囊在人体中的释药特性，释药介质有必要进一步完善，达到更加接近人体胃肠道环境的要求。

为了解决蜂胶的应用范围受限、贮存性能不佳和货架期短等问题，拓展蜂胶应用范围，本研究以蜂胶醇提物为材料，采用复凝聚技术制备 EEP 微胶囊，再通过粒度分析仪、激光共聚焦显微镜、红外光谱仪和 X 射线衍射仪分析、体外释放试验、加速试验等对制备的微胶囊进行表征，从而评价其稳定性及保护内含物能力。本研究结果将有利于蜂胶以 EEP 微胶囊的形式在药物、日化行业中的应用，使得蜂胶宝贵的药用价值得到进一步开发利用。

1. 材料与amp;方法

1.1. 材料与试剂

EEP 浸膏：本实验室自制。以 1:20(w/v) 比例将青海大通蜂胶粉末溶于 60% 无水乙醇于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴提取 3 次，合并上清液后真空条件 50 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至无水状态^[16]。

PBS 缓冲液 (pH 6.5) 实验室自制，壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 95\%$ ，粘度 100-200 mpa.s)、海藻酸钠(CP，粘度 200 ± 20 mpa.s)、Tween 80(分析纯)， CaCl_2 (分析纯)、胰蛋白酶和脂肪酶购自阿拉丁试剂，表儿茶素和桑黄素购自中国药品生物制品检定所(北京)，p-香豆酸、肉桂酸、柚皮素、阿魏酸和槲皮素购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心(江西)，3,4-二甲氧基肉桂酸、生松素、白杨素、胆粉、胃蛋白酶和胰酶购自 Sigma-Aldrich。

1.2. 仪器与设备

LSM 710 激光扫描共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)：德国 CARL ZEISS；多功能 X-射线衍射仪：英国 Bede 公司；美国 Agilent 1200 型高效液相色谱

谱仪，光电二极管阵列检测器 (DAD)，G2170BALC 化学工作站；Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪：美国热电尼高力公司；Nicom380 ZLS 超细微粒粒度分析仪：美国 PSS 粒度仪公司，California，USA；紫外可见分光光度计：北京普析通用仪器有限责任公司；JAC-300 超声波振荡仪：山东奥波超声电器有限公司；RE52-05 旋转蒸发器：上海亚荣生化仪器厂；SHZ-III 型循环水真空泵：上海亚荣生化仪器厂；B13-3 型磁力加热搅拌器：上海司乐仪器有限公司；KQ-50E 型超声波清洗器：昆山市超声仪器有限公司。

1.3. EEP 微胶囊制备

在 Pakamon C^[17] 等方法基础上稍作改进。取 0.6 mL 的 EEP 甲醇溶液(10 mg/mL) 缓慢滴入 20 mL 海藻酸钠水溶液[0.6 mg/mL，其中含有 1%(w/v) Tween 80]，40 °C，450 rpm 的搅拌速度下超声 20 min，待温度自然降至室温后，加入 4 mL CaCl₂ 溶液(0.67 mg/mL)，550 rpm 搅拌 30 min 得到的微胶囊悬浮液，向悬浮液中加入 4 mL 的壳聚糖溶液[0.3 mg/mL，其中含有 1% (v/v) 醋酸溶液]，40 °C，550 rpm 搅拌 30 min 形成微胶囊悬浮液，真空冻干后获得装载有 EEP 的海藻酸钠-壳聚糖微胶囊粉末，简称为 EEP 微胶囊 (图 1)。

1.4. EEP 微胶囊形态观察、尺寸分布、包埋率、载药量和得率测定

采用异硫氰酸荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) 标记壳聚糖，壳聚糖与 FITC 质量比为 25:1，将 FITC 加入壳聚糖溶液中，在 25 °C 条件下反应 4 h 后即可标记壳聚糖溶液。再用此壳聚糖溶液按 1.3 法制备微胶囊，制得微胶囊溶液置于 PBS 缓冲液中透析 4 次以上，至透析液清亮去除游离 FITC，在 CLSM 下观察微胶囊壁膜形态。

尺寸分布测定用 NICOMP380/ZLS 激光纳米粒度分析仪，测试角度 90°，测试温度为(25±0.1) °C，测试光波长为 632.8 nm。样品在测试前用去离子水稀释 10 倍。

包埋率 (Encapsulation efficiency, EE)：分别取两等份的微胶囊悬液，一份用透析法透析 8 h (前期实验证明透析 8 h 后透析完全) 后取透析内液采用无水乙醇破坏乳化剂 Tween 80 的方法充分破乳后进行总酚量测定，即为微胶囊内包埋蜂胶总酚量 W₁；另一份不经过透析直接充分破乳进行总酚测定，即为加入总蜂胶的总酚量 W₂。载药量按公式 (1) 计算。

$$EE\% = \left(\frac{W_1}{W_2}\right) \times 100\% \quad (1)$$

载药量 (Drug loaded content, DLC)：取一定质量的 EEP 微胶囊，称量其质量记为 W₃，将其充分破乳后测定其总酚含量，通过福林试剂法测得的 EEP 中总酚含量，推算

出包埋的 EEP 质量为 W_4 。按公式 (2) 计算载药量。

$$\text{DLC}\% = \left(\frac{W_3}{W_4}\right) \times 100\% \quad (2)$$

得率 (Yield percent, YP): 取一定质量配方比原材料, 称量其总质量记为 W_5 , 按照“1.3”制备 EEP 微胶囊悬浮液, 得到悬浮液冷冻干燥得微胶囊粉末, 称量其质量记为 W_6 。按公式 (3) 计算载药量。

$$\text{YP}\% = \left(\frac{W_5}{W_6}\right) \times 100\% \quad (3)$$

1.5. 采用 FTIR 和 X 射线衍射仪分析评价微胶囊形成与否

取海藻酸钠、壳聚糖、EEP 微胶囊 3 种样品进行 FTIR 分析。取 1-2 mg 样品加入到 200 mg KBr 粉末 (经过研磨并干燥) 中, 在红外灯照射下置于玛瑙研钵中研磨 2-3 min, 使其充分混合。将研磨好的混合物粉末压片后置于红外光谱仪内全波段扫描 (扫描范围 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1}), 获得红外光谱图。

将海藻酸钠、壳聚糖、EEP、EEP 微胶囊样品研磨为粉末, 采用 X 射线衍射仪分析, Cu 靶, 管压 43 kV, 管流 100 mA, 扫描范围 $3\sim 20^\circ$ 。

1.6. 体外释放研究——模拟猪胃肠环境中的释放率 (Release%, R%) [13]

1% EEP 微胶囊加入模拟猪胃液 (Simulated Gastric Fluid, SGF) (w/v), SGF 由 3 g/L NaCl、1.1 g/L KCl、0.15 g/L CaCl_2 、0.6 g/L NaHCO_3 、3 g/L SDS、0.21 g/L 胃蛋白酶和 0.25 g/L 脂肪酶组成, 用 1.0 M HCl 分别在 0、5、30、120、180 min 的时间将 pH 值调整至 6.0、3.5、3.0、2.5 和 2.0。整个试验是在 $39.0\pm 0.5^\circ\text{C}$, 100 rpm 搅拌速度的条件下进行。分别在 0、5、10、20、30、40、60、80、100、120、180、210 和 240 min 时取 1 mL 溶液, 福林试剂法测定总酚含量, 每次取样后即添加等量新鲜 SGF。240 min 后, 添加 1 mL 胰蛋白酶溶液 (2 mg/mL), 14 mL 胆汁溶液 (40 mg/mL), 7.5 mL 的胰腺溶液, 和 7.5 mL 的模拟猪肠液 (Simulated Intestinal Fluid, SIF) (0.6 g/L KCl、5.0 g/L NaCl、0.23 g/L $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 3 g/L SDS) 至 SGF 中。分别在 240 min 和 300 min 时使用 1 M NaHCO_3 调整 pH 值到 5 和 6.5。4 h 内在预定时间间隔 (30 min) 收集 1 mL 的溶液用来测量吸光度, 每次测定添加等量新鲜 SIF 补充。

第 n 次测定的总酚含量推算至 EEP 质量记为 W_n , 第 n 次测定时的模拟环境中体积记为 V_n , 最初加入的微胶囊质量记为 W , 微胶囊质量 W 与载药量 DLC% 相乘即可得到加入的 EEP 质量。释放率的计算公式如下。

$$R \% = \frac{W_n \times V_n}{W \times DLC \%} \times 100\% \quad (4)$$

1.7. 加速试验测定 EEP 微胶囊稳定性

取一定量 EEP 甲醇溶液和包埋等量 EEP 的微胶囊悬浮液放入 60 ± 0.5 °C 的恒温培养箱进行 9 d 加速试验，加速试验结束后微胶囊悬浮液充分破乳后，两者均用甲醇溶剂定容于 50 mL 容量瓶，HPLC 法测定其中咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、3,4-二甲氧基肉桂酸、山奈酚、白杨素 7 种物质含量变化，通过标准品标准曲线计算上述物质的保留量。HPLC 色谱条件为色谱柱：ZORBAX Eclipse XDB C18 色谱柱 4.6 mm×150 mm×5 μm；流动相：甲醇（流动相 A）和 0.1%甲酸-水溶液（流动相 B）；流速：1.0 mL/min；柱温：35 °C；检测波长：256 nm、280 nm；进样量 20 μL。采用梯度洗脱，条件见表 1。

表 1. 梯度洗脱流动相比比例
Table 1. Ratio of mobile phases for gradient elution

时间 (min)	0	5	6	7	40	50	55	60
流动相 A：甲醇 (%)	5	30	30	40	47	55	65	25
流动相 B：0.1%甲酸-水 (%)	95	70	70	60	53	45	35	75

1.8. 数据处理

利用 Excel 绘制各对照品标准曲线，获得线性回归方程及相关系数。所有试验平行三次，取平均值。

2. 结果与讨论

2.1. EEP 微胶囊形态观察和尺寸分布、包埋率、载药量和得率

经过冷冻干燥得到的微胶囊粉末（图 1）易溶于水。微胶囊形成过程中海藻酸钙可壳聚糖发生络合反应形成一层薄膜（图 2 中绿色部分）。该薄膜的形态会影响药物的缓释性能，膜厚度不均一易引起微胶囊的不可控破裂，造成药物的突释。可见壳聚糖全部包裹在微胶囊外表面均匀分布，且微胶囊呈规则球形。粒度分析仪测得微胶囊粒径为 265 ± 25 nm，多分散系数（PDI）值为 0.3419 ± 0.025 ，较低的 PDI 证明制得的微胶囊粒径大小均匀。

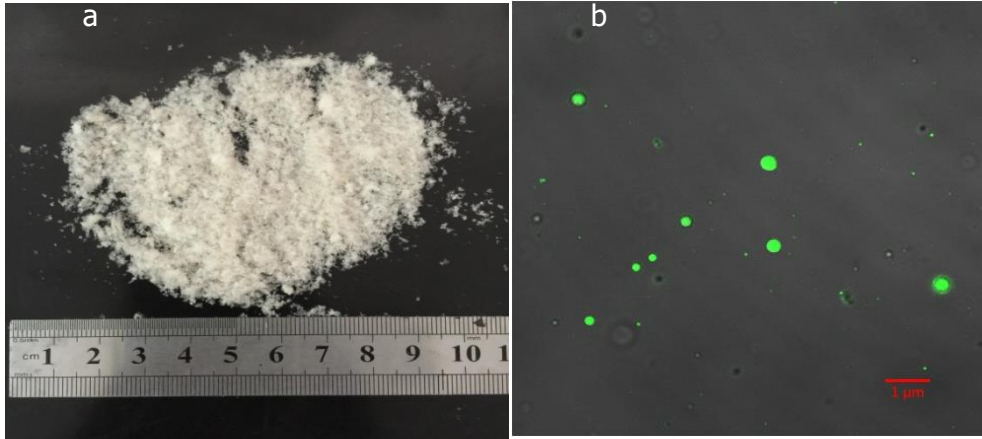


图 1.微胶囊粉末 (a) 及其 CLSM (b) 照片。

Fig. 1. EEP microcapsule powder (a) and its CLSM (b) photograph.

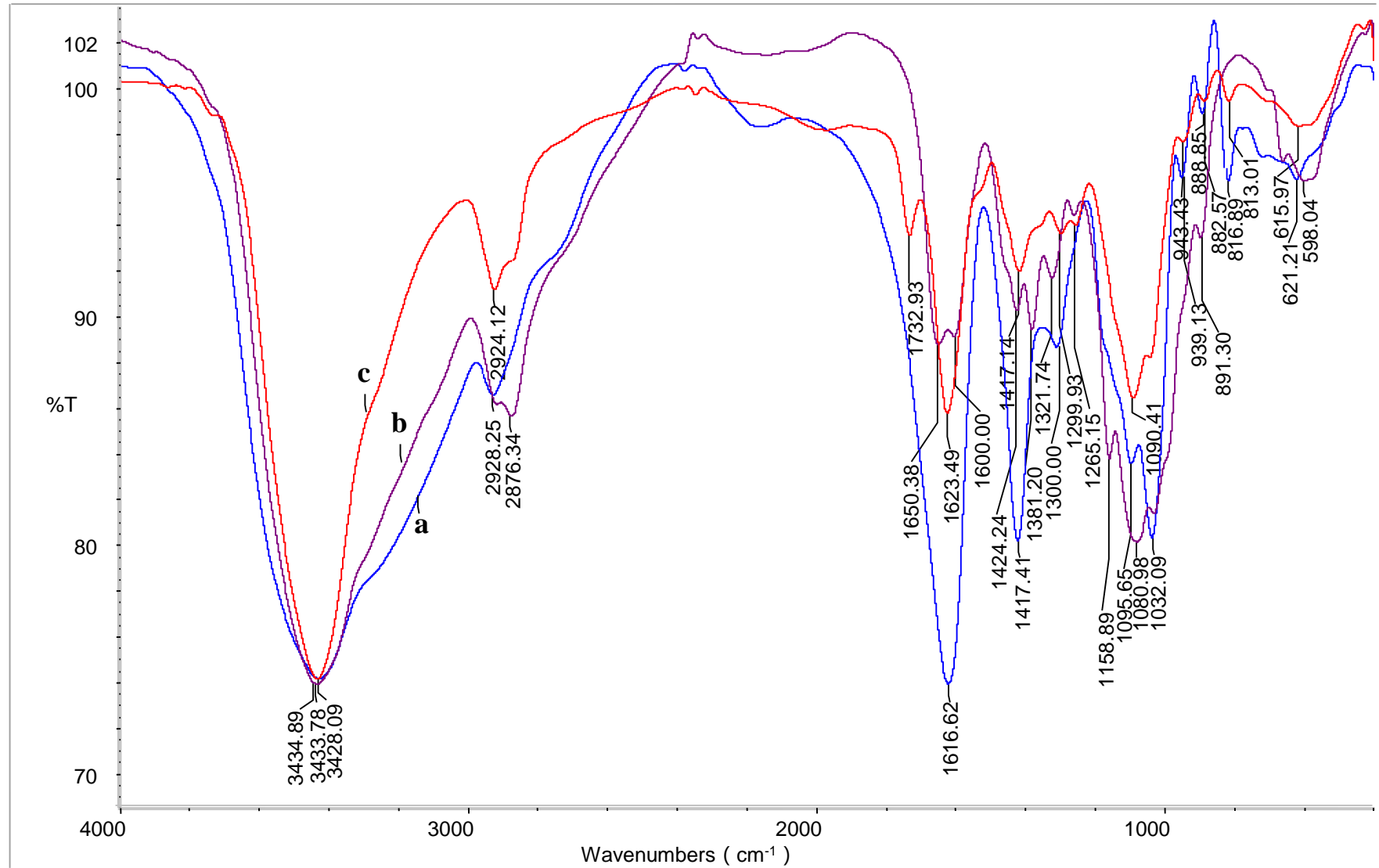


图 2.海藻酸钠(a)、壳聚糖(b)、EEP 微胶囊(c)的 FTIR 图谱。 Fig.2. FTIR spectra of sodium alginate (a), chitosan (b), EEP microcapsules (c).

EEP 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊 EE、DLC 和 YP 分别为 $72.80\pm 3.8\%$ ， $19.96\pm 2.4\%$ ， $11.06\pm 8.2\%$ 。相同的壁材包埋不同的物质时 EE、DLC 各有不同。Azevedo^[18]用海藻酸钠和壳聚糖作为壁材包封维生素 B₂ 的 EE、DLC 分别为 $55.9\pm 5.6\%$ 和 $2.2\pm 0.6\%$ 。李胜^[19]使用海藻酸钠/壳聚糖包埋 β -榄香烯的 EE、DLC 分别为 70.8% 和 9.5% ，虽然它具有较高的包埋率，但它微胶囊粒径尺寸为 $98.7\ \mu\text{m}$ ，显著高于本试验的 $265\ \text{nm}$ 。通过本试验研究方法，获得的 EEP 海藻酸钠/壳聚糖微胶囊具有较高的包埋率和载药量。

2.2. FTIR 分析

图 2a 可见海藻酸钠特有官能团的特征峰：在 $1616\ \text{cm}^{-1}$ 由不对称伸缩振动引起的宽峰，在 $1417\ \text{cm}^{-1}$ 处由对称伸缩引起的窄峰，在 $1032\ \text{cm}^{-1}$ 处有一个更宽的吸收峰是由于 COH 的伸缩振动。壳聚糖在 $3434\ \text{cm}^{-1}$ 左右出现了一个较宽的吸收峰（图 2b），是因为它在酸性条件下合成，壳聚糖的氨基带上了电荷（基本就是 NH_3^+ ）所产生的。在 1650 、 1600 和 $1424\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰也是主要振动方式为 NH_3^+ 的对称和不对称的弯曲振动产生峰。图 2c 中，壳聚糖-海藻酸钠微胶囊在 $1623\ \text{cm}^{-1}$ 处出现尖峰，这是因为海藻酸钠的 COO- 基团使得壳聚糖的氨基在 $1600\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰消失了。同样的，可能是因为微胶囊表面的 COH 和 NH_3^+ 基团之间的离子间作用，在 $1080\ \text{cm}^{-1}$ 附近处的小吸收峰也消失了。这表明了壳聚糖中的氨基和海藻酸钠中的羧基发生了静电相互作用，由此可知，所制得的微胶囊是壳聚糖-海藻酸钠微胶囊。

2.3. X 射线衍射仪分析

在微胶囊 XRD 图谱（图 3）中，可以观察到海藻酸钠、壳聚糖、EEP 的主要衍射峰基本消失，表明反应进行得很完全，并且微胶囊（图 3d）在 27° 处出现特征锐峰，表明新的物相生成。这些变化说明形成的微胶囊体系不存在海藻酸钠、壳聚糖和 EEP 的物理混合物，而是海藻酸钠和壳聚糖发生反应形成微胶囊，也验证了红外光谱分析的结果。

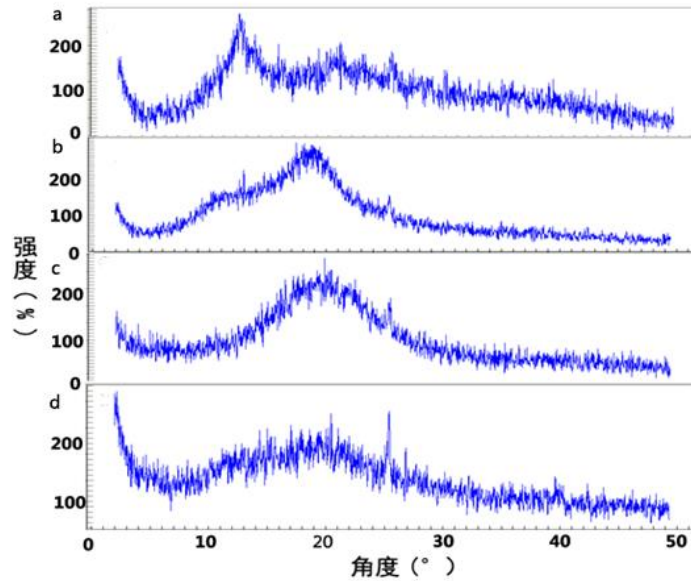


图 3. 海藻酸钠(a)、壳聚糖(b)、EEP(c)、EEP 微胶囊(d)的 X 射线衍射图。
Fig.3. X-ray diffraction pattern of sodium alginate(a), chitosan(b), EEP(c) and EEP microcapsules(d).

2.4. 模拟猪胃肠液环境中的释放率

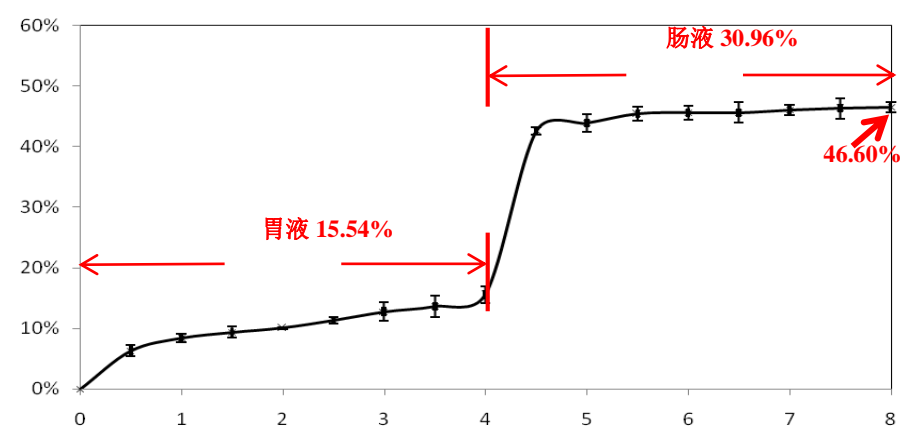


图 4. 模拟猪胃液和肠液条件 8h 内 EEP 微胶囊释放率(%)。
Fig.4. EEP microcapsule release rate in SGF and SIF for 8h (%).

由图 4 可见，在模拟猪胃液环境中停留 240 min 后，微胶囊中酚类物质的释放率为 $15.54 \pm 1.42\%$ ，而微胶囊在肠液中 共有 $30.96 \pm 2.32\%$ 的酚类物质被释放。说明在酸性条件下，微胶囊表面的壳聚糖膜及壳聚糖与海藻酸钠的复合膜遭到破坏，导致内容物释放，被包埋物分子量越小，释放率越高。此外，在酸性溶液中停留时间越长，微胶囊表面的复合膜破坏越严重，对被包埋物的扩散限制作用越差，进而导致微胶囊在模拟肠液环境中的控释能力降低，释放率较高。EEP 的释放主要是靠酸性溶液对外层壳聚糖的溶解，因此模拟胃液中表现为缓释及较小的释放量。

当将微胶囊移入近中性模拟肠液环境中时，由于外层壳聚糖在模拟胃液中的溶解，且剩余的部分壳聚糖发生了脱质子化作用，因此尽管海藻酸盐羧酸根离子解离度增大，两者结合力也呈下降趋势。微胶囊的 EEP 包裹作用主要是靠海藻酸钠核心来完成的，核心中交联剂钙离子与海藻酸钠分子中的羧基相结合，处于羧酸根负离子的包围之中，常被称为“鸡蛋箱”模型。而模拟肠液中的钠离子能与钙离子发生交换反应，使其与海藻酸钠的交联减弱；同时由于海藻酸盐羧酸根离子解离度增加，分子间斥力增大，微胶囊网孔变大，结构疏松而迅速膨胀，通透性增大；另外由于“鸡蛋箱”模型中钙离子的去除，微胶囊发生瓦解，海藻酸盐由于大分子间斥力的增大也逐渐发生溶解。这时，EEP 主要靠微胶囊的瓦解及海藻酸盐核心的溶解而大量释放，因此在模拟肠液中后期表现为缓释及较大的释放量。在模拟猪胃肠体液条件下释放 8 h，微胶囊中 EEP 总释放率为 $46.60 \pm 0.80\%$ 。

对比 Pakamon C^[13] 相同体外模拟条件下的微胶囊释放率为 89.5%~91.6%，以及 J.P. Meunie^[20] 的微胶囊释放率为 $87.2 \pm 4.3\%$ ，本试验制得的微胶囊释放率较低，8 h 在胃肠体系内无法释放完全，可能的原因是本试验采用的壁材与以上两者不同，胃肠液对壁材的消融需要时间较长；在整个模拟体系中，微胶囊的投放量较大，体系中的溶液与微胶囊之间接触面较小。

2.5. EEP 微胶囊的稳定性

加速试验过程中，EEP 中的酚类化合物由于氧化反应等原因而减少。HPLC 对其中的 7 种化合物测定结果表明（表 2 和图 5），9 d 加速试验后的 EEP 微胶囊中咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、山奈酚、白杨素含量较新鲜 EEP 分别下降了 38.67、39.68、34.18、36.17、25.48、19.37 和 14.01%，而未经微胶囊包埋的 EEP，9 d 加速试验后其中的咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、阿魏酸、山奈酚、白杨素含量分别下降了 77.45、86.56、58.16、63.01、48.40、43.28 和 37.01%，未包埋 EEP 中酚类化合物含量损失比微胶囊内 EEP 中相应化合物多了 50% 以上。说明微胶囊包埋对 EEP 中的酚类化合物具有良好的保护作用。

表 2. 9 d 加速试验后 EEP 和 EEP 微胶囊中 7 种标准对照品含量(mg/g EEP)

Table 2. Content of 7 standards in EEP and EEP microcapsules for 9 days acceleration test

	咖啡酸	表儿茶素	p-香豆酸	阿魏酸	3,4-二甲氧基肉桂酸	山奈酚	白杨素
新鲜 EEP	9.18	3.20	1.96	6.11	3.14	16.52	32.04
加速试验后 EEP 微胶囊	5.63	1.93	1.29	3.90	2.34	13.32	27.55
加速试验后 EEP	2.07	0.43	0.82	2.26	1.62	9.37	20.18

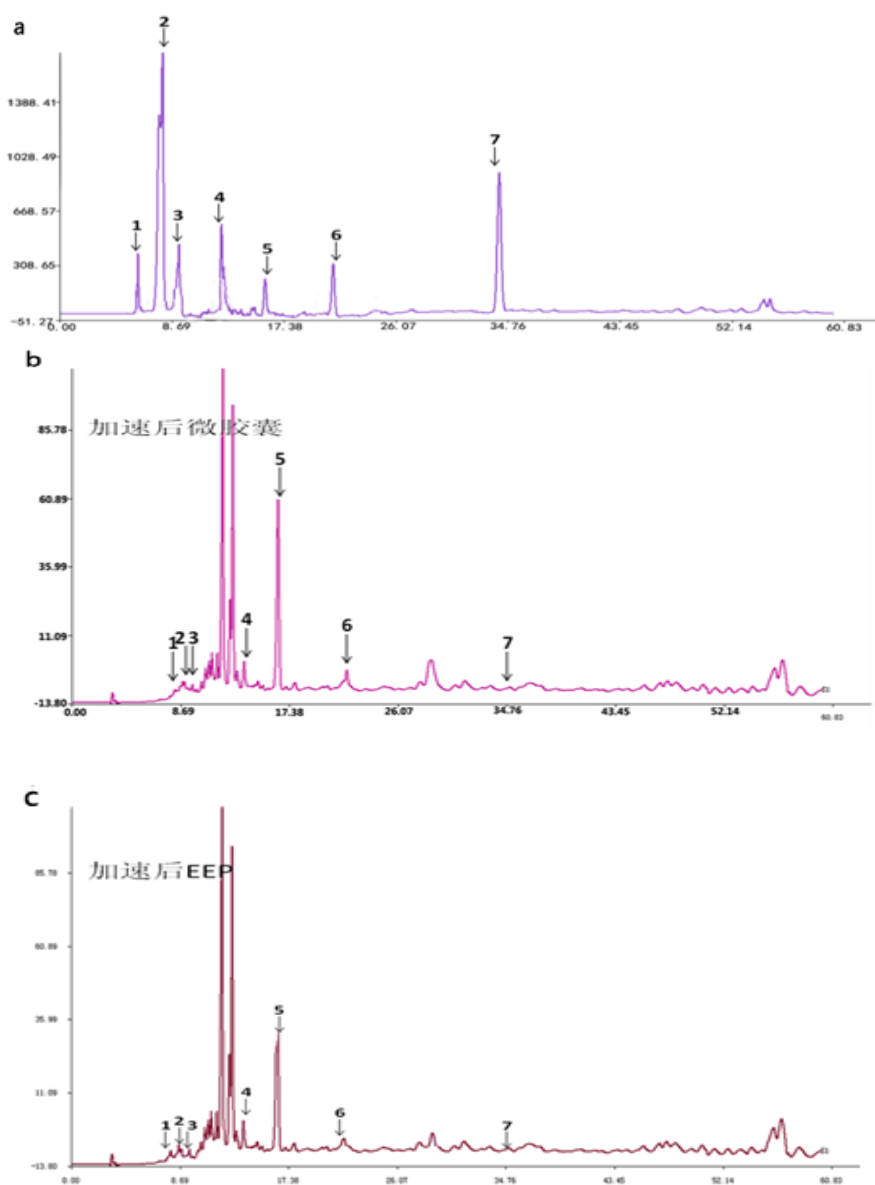


图 5. 280nm 下加速试验后的对照品色谱图(a)、EEP 微胶囊(b)和 EEP 色谱图(c)。
Peak：1.咖啡酸；2.表儿茶素；3.p-香豆酸；4.阿魏酸；5.3,4-二甲氧基肉桂酸；6.山奈酚；7.白杨素

Fig.5. HPLC chromatogram of mixed 7 standards(a), EEP microcapsule (b) and EEP (c) after acceleration test under 280 nm.

3. 结论

本研究以海藻酸钠和壳聚糖为壁材包埋 EEP，成功制备 EEP 海藻酸钠壳聚糖微胶囊，制得微胶囊粒径大小为 265 ± 25 nm，包埋率和载药量达到 $72.80 \pm 3.8\%$ 和 $19.96 \pm 2.4\%$ ，外观为大小均匀球体；并通过 FITR、X 射线衍射仪验证海藻酸钠和壳聚糖反应形成微胶囊；在模拟猪胃液和肠液条件下微胶囊 8 h 释放率达到 $46.60 \pm 0.80\%$ ；HPLC 分析表明微胶囊对包埋物质 EEP 中的生物活性成分具有良好的保护作用。EEP 具有良好的生

物活性，将 EEP 制成水溶性的微胶囊产品，既保护其活性成分，又利于人体吸收，更便于进一步制成具有保健功能的食品或药品。这将吸引越来越多的研究人员将 EEP 应用到食品和化妆品的封装实验中，并提高蜂胶在药物递送系统中的利用潜能。

参考文献

- [1] Lopez B. G., Schmidt E. M., Eberlin M. N., et al. Phytochemical Markers of Different Types of Red Propolis[J]. *Food Chem.*, 2014, 146, 174-80.
- [2] 张茜,郭夏丽,陈滨,等. 不同来源中国蜂胶水提物的化学组成及抗氧化性[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24, 444-449.
ZHANG Xi, GUO Xia-li, CHEN Bin, et al. Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Water Extract of Propolis in Different Seasons and Areas of China[J]. *Natural Product Research and Development*, 2012 , 24: 444-449
- [3] Sharaf S., Higazy A., Hebeish A. Propolis Induced Antibacterial Activity and Other Technical Properties of Cotton Textiles[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 59, 408-416.
- [4] Valenzuela-Barra G., Castro C., Figueroa C., et al. Anti-inflammatory Activity and Phenolic Profile of Propolis from Two Locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 168, 37-44.
- [5] Sobočanec S, Balog T, Šarić A, et al. Antitumor Effect of Croatian Propolis as a Consequence of Diverse Sex-related Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Protein Expression[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18, 852-858.
- [6] LI B, WEI K, YANG S, et al. Immunomodulatory Effects of Taishan Pinus Massoniana Pollen Polysaccharide and Propolis on Immunosuppressed Chickens[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 78, 7-13.
- [7] Escriche I, Garcia-Pinchi R, Andrés A, et al. Osmotic Dehydration of Kiwi Fruit (*Actinidia chinensis*) :Fluxes and Mass Transfer Kinetics[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2002 ,23 (3) :191- 205.
- [8] Nori M P, Favaro-Trindade C S, Alencar S M D, et al. Microencapsulation of Propolis Extract by Complex Coacervation[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2011, 44, 429-435.
- [9] YUAN J., LIU J., HU Y., *et al.* The Immunological Activity of Propolis Flavonoids Liposome on the Immune Response against ND Vaccine[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 51, 400-405.
- [10] da Silva Felipe C., da Fonseca Carolina Rodrigues, de Alencar Severino Matias, *et al.* Assessment of Production Efficiency, Physicochemical Properties and Storage Stability of

Spray-dried Propolis, a Natural Food Additive, Using Gum Arabic and OSA Starch-based Carrier Systems[J]. Food and Bioproducts Processing, 2013, 91, 28-36.

- [11] 吴秋惠,吴皓,王令充,等. 海藻酸钠微球的制备及其在药物载体中的应用进展[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26, 1791-1794.

WU Qiu-hui, WU Hao, WANG Ling-chong, *et al.* Review on Preparation and Application of Alginate Microspheres as Drug Carrier[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2011, 26, 1791-1794.

- [12] 高春梅,柳明珠,吕少瑜,等. 海藻酸钠水凝胶的制备及其在药物释放中的应用[J]. 化学进展, 2013, 25(6), 1012-1022.

GAO Chun-mei, LIU Ming-zhu, LV Shao-yu, *et al.* Preparation of Sodium Alginate Hydrogel and Its Application in Drug Release[J]. Progress in Chemistry, 2013, 25(6), 1012-1022.

- [13] 樊英,许拉,于晓清,等. 黄芪多糖-海藻酸钠微胶囊的制备及释放性能研究[J]. 饲料研究, 2011, 11:6-8.

- [14] 李沙,侯新朴. 海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机理及其对大分子药物的载药、释药研究[J]. 药学学报, 2003, 38(5):380-383.

LI Sha, HOU Xin-pu. Studies on the Formation Mechanism of Alginate-chitosan Microcapsule and its Drug-Loading and Release Properties on Macromolecular Drug[J]. Acta Pharmaceutica Sinica 2003, 38(5):380-383

- [15] 王东辉,赵裕蓉. 微胶囊的应用及研究进展[J]. 化工新型材料, 1999, 27(7):11-14.

WANG Dong-hui, ZHAO Yu-rong. Application and Recent Progress of Microencapsulation[J]. New Chemical Materials, 1999, 27(7):11-14.

- [16] 丽艳. 中国不同地区蜂胶醇提取物化学组成及抗氧化活性[D]. 南昌大学, 2008.

LI Yan. Chemical Compositions and Antioxidant Activities of Ethanol Extract of Propolis from Different Areas of China[D]. Nanchang University, 2008.

- [17] Chitprasert P., Sutaphanit P. Holy Basil (*Ocimum sanctum* Linn.) Essential Oil Delivery to Swine Gastrointestinal Tract Using Gelatin Microcapsules Coated With Aluminum Carboxymethyl Cellulose and Beeswax[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62, 12641-12648.

- [18] Azevedo M. A., Bourbon A. I., Vicente A. A., *et al.* Alginate/Chitosan Nanoparticles for Encapsulation and Controlled Release of Vitamin B2[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 71, 141-146.

- [19] 李胜,许有威,任东文,等. β -榄香烯海藻酸钙-壳聚糖微囊的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(11), 657-660.

LI Sheng, XU You-wei, REN Dong-wen, *et al.* Preparation of b-Elemene Calcium Alginate-Chitosan Microcapsules[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2004, 35(11), 657-660.

[20] Meunier J. P., Cardot J. M., Manzanilla E. G., *et al.* Use of Spray-cooling Technology for Development of Microencapsulated Capsicum Oleoresin for the Growing Pig as an Alternative to in-feed Antibiotics: A study of Release Using in Vitro Models[J]. Journal of Animal Science, 2007, 85, 2699-2710.

以常壓下化學游離質譜法鑑定蜂蜜之蜜源與產地

彭及忠*、沈振峯、吳宗元

國立虎尾科技大學生物科技系

*bocky@nfu.edu.tw

摘要

蜂蜜，主要為蜜蜂採集各種植物之蜜汁或是植物外泌液所釀製而成的天然甜味物質。因此蜂蜜會因其來源於不同植物或者地區而產生不同的揮發性氣味。目前已有文獻利用氣相質譜儀結合固相微萃取(SPME)、超音波萃取法(USE)、動態頂空(HS)等方法，分析蜂蜜中揮發性有機物質(VOCs)以鑑定蜂蜜蜜源。但蜂蜜中揮發性物質繁多，不易找出單一的指標性物質來鑑定不同蜜源的蜂蜜。本研究利用我們所開發的氣盾式大氣壓下化學游離介面(GS-AP)結合大氣壓下質譜儀來分析蜂蜜中揮發性物質的成份。我們以純水將蜂蜜稀釋十倍再以氮氣流將氣味成分送入介面分析以獲得不同蜂蜜樣品之指紋質譜，並將所得到的結果建立指紋圖譜資料庫。結果顯示利用本方法建立之「稀釋/吹氣/GS-AP/MS」分析平台配合蜂蜜氣味質譜資料庫比對，可以對於不同蜜源與不同產區的蜂蜜進行快速之鑑別分析。

臺灣北部野生蜜蜂(*Apis cerana*)養殖

陳柏融

川樹野生蜜蜂生態農場

台灣野生蜜蜂乃屬原生種，對於環境生態變遷非常敏感，且其飼養與管理條件與西洋蜂不盡相同。本人之野蜂實務養殖乃承習蘇清吉老師與黃圳來師兄，目前飼養將近一百多箱的野蜂群，分散於三個蜂場，相隔約兩公里。環境蜜源對於野蜂養殖相當重要，北部山區一年四季皆有蜜源，如：楠木、芸香科植物、蔓藤類植物、山棕樹、紅淡樹、荊桐、咸豐草和鴨腳木等，去年只針對封蓋蜜採收，共產約 1400 罐，皆通過農藥與抗生素的檢驗，此亦證明野蜂於北部山區放養是可行，且所產之蜜由於來自森林植物群，因此無農藥之慮。不過野蜂飼養仍有幾個難題需多著墨，如：虎頭蜂危害、巢蟲為害、蜂群間的盜蜂和逃蜂等，若能克服這幾個問題，相信可以更擴大規模飼養，除了可以採收蜂蜜外，對於山區生態之植物授粉亦有相當的幫助，希望相關單位可以更重視野蜂養殖與研究，有興趣的人可以一起共襄盛舉養殖野蜂。

Beekeeping Development in the World

Xu Ming, Chen Lihong*, Siritwat Wongsiri

Abstract

This review recounted the general situation and trend of development of world apiculture through analyzing the changes on honeybee colonies in key beekeeping countries from 1961-2013. The result shows: the world colonies had experienced rapid development in the twentieth century, which slowed down in early twenty-first century; while the number of colonies is still growing in Asia and Africa, it is declining in developed countries. It is prediction the whole, the apiculture will continue to grow especially developing countries, the number of world honeybee colonies will also continue to rise.

Keyword: beehive, beekeeping, honeybee, colony, world

Honeybees are social insects (Crane, E. 1990) that benefit human society, the ecosystem, agriculture and biodiversity. The value of honeybees lies not only in their products, but more importantly, in the role they play as pollinators. Globally, 80% of flowering plants rely on insect pollination, of which 80% were conducted by honeybees, 90% of fruit trees are pollinated by honeybees (Jurgen Tautz, Helga R. Heilmann, 2007). In North America, honeybees enable the production of at least 90 commercially grown crops; native pollinators contribute more than 24 billion dollars annually to the United States economy, of which honeybees account for more than 15 billion dollars through their vital role in production of fruits, nuts, and vegetables (USDA Forest Service: Pollinator Fact Sheet, 2014). The quality and quantity of crops, fruits and vegetables are increased through pollination by honeybees. However, to our dismay, the past decades have witnessed severe upheavals in managed colony numbers that may have strong repercussions for certain countries.

1. World Total Honeybee Colonies

In the early 1960s, the total world population of honeybee colonies was 44.17 million, according to the incomplete statistics by Food and Agriculture Organization (FAO); this number increased slightly from 1960 to 1970. In early 1970s, the total had grown to 46.02 million, up 4% from the early 1960s. The number of honeybee colonies worldwide maintained this growth trend in the 1980s. In early 1990s, colony numbers grew to 59.74 million, up 26% from the 1960s. By 2009, the world had 65.38 million hives, up 8.6% from the early 1990s, and a 32% increase since the 1960s. In general, it bodes well that the worldwide total of honeybee colonies has been growing in a consistent upward trend (FAO Statistics Division 2011) (Table 1, Figure 1).

Table 1. World Total Honeybee Colonies (1961-2009; Unit: Million)

Year	1961	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970
Number	44.17	44.647	44.97	44.62	44.07	44.58	44.79	45.07	45.987	46.029
Year	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980
Number	46.17	46.48	47.01	46.90	47.45	47.44	47.90	49.40	49.99	51.20
Year	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990
Number	53.25	54.22	55.17	56.46	57.96	57.63	58.04	58.58	59.74	59.64
Year	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Number	61.00	57.68	56.48	56.07	56.36	56.35	56.70	57.30	58.70	59.38
Year	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	
Number	60.33	61.71	61.93	63.36	63.62	65.43	64.91	65.43	65.38	

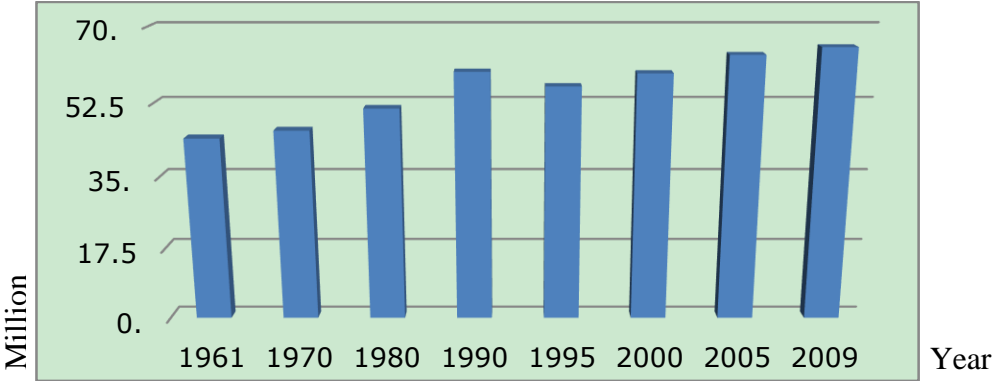


Figure 1. Changes of the World Total Honeybee Colonies (1961- 2009).

2. Continental Distribution of Honeybee Colonies

In the early 1960s, Europe was the leading beekeeping continent with 21.09 million honeybee colonies, accounting for 48% of total world honeybee colonies (44.17 million). Americas ranked second with 10.02 honeybee colonies, accounting for about 23% of world honeybee colonies. Africa had 6.85 million colonies, accounting for 15% of the world honeybee colonies, ranking third in the world. Asia ranked fourth with 5.7 million colonies. Oceania (including Australia & New Zealand, Melanesia and Polynesia) had 0.5 million colonies, accounting for 1% of the world total.

From the 1960s-1970s, honeybee colonies in the above continents continued to grow, but the ranking remained the same.

After 1980, the colonies in all continents kept growing, though Asia and Africa grew faster, surpassing Americas to take the second and third position respectively; Americas and Oceania grew steadily, ranking fourth and fifth, while Europe continued to account for the most colonies in the world.

In the 1990s, the number of colonies in Europe reached 22.69 million, up 7% compared to the same period of 1960s, making it a peak record not yet topped by any other continent. Meanwhile, Asia and Africa both experienced fast growth. Compared to the same period of the 1960s, Asia's colonies more than doubled, reaching 13.43 million; Africa increased 48% with its colony numbers attaining 12.69 million. By contrast, Americas and the Oceania experienced slight increases. With the advent of industrial revolution, the gradual aging of the population engaged in beekeeping, and the occurrence of mysteriously disappearing honeybees in Europe, the number of honeybee colonies and the apicultural industry plunged sharply, leaving Asia the number one beekeeping continent in the world.

In the twentieth century, all continents except for Europe maintained a growth trend. According to the incomplete statistics released by the FAO in November 2011, the number of honeybee colonies in Asia reached 22.35 million by 2009, accounting for 34.5% of the world total (65.38 million). This represents an increase of 39.9% compared to the 1990s, and growth of 74.5% compared to the 1960s. During the same time period, the number of honeybee

colonies in Africa reached 15.99 million, accounting for 24.5% of world total honeybee population, slightly surpassing Europe, an increase of 20.7% and 57.2% compared to the 1990s and 1960s respectively, making it the second largest beekeeping continent in the world. In contrast, Europe experienced sharp decreases in numbers of honeybee colonies; its 15.85 million colonies accounted for 24.2% of the world honeybee population, a reduction of 30.1% and 24.8% compared to the 1990s and 1960s respectively, falling from the top spot to third. Americas maintained a steady marginal growth; its possession of 10.48 million colonies ranked it the fourth in the world, accounting for 16% of the world honeybee colonies, an increase of 3% and 4.3% compared to 1990s and 1960s respectively. Oceania owned 0.71 million colonies, a reduction of 5.3% compared to 1990s, but an increase of 28.1% compared to 1960s, accounting for 1.1% of the world honeybee colonies (FAO Statistics Division, 2011; Chen L., 2009) (Table 2, Figure 2).

Table 2. Continental Honeybee Colonies Distribution (1961-2009; Unit: Million)

Continent\Year	1961	1970	1980	1990	1995	2000	2001
Africa	6.85	8.15	9.37	12.69	14.12	14.39	14.68
Americas	10.02	8.96	10.03	10.17	9.55	10.75	10.71
Asia	5.70	7.23	9.62	13.43	15.80	18.09	18.49
Europe	21.09	21.11	21.42	22.69	16.08	15.34	15.69
Oceania	0.51	0.57	0.76	0.75	0.80	0.80	0.74
Continent\Year	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Africa	15.55	15.99	15.53	16.37	16.05	16.51	15.99
Americas	10.59	10.60	10.46	10.71	10.41	10.48	10.48
Asia	19.48	20.15	20.84	21.25	21.35	21.73	22.35
Europe	15.60	15.9	16.10	16.41	16.37	16.00	15.85
Oceania	0.706751	0.676759	0.675329	0.69	0.71	0.71	0.71

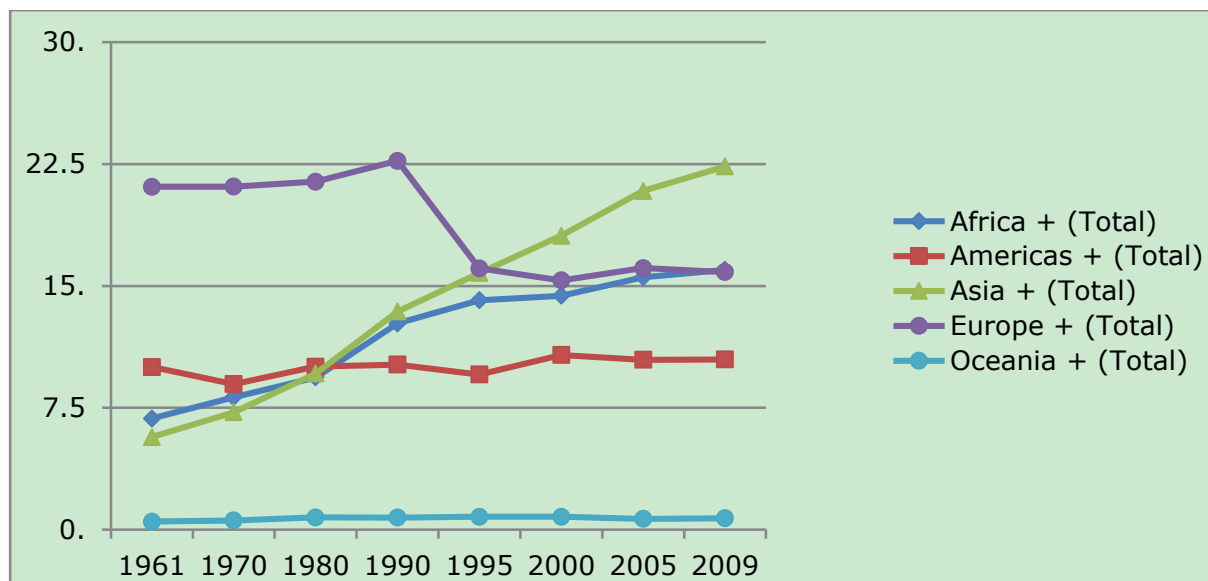


Figure 2. Changes of the Continental Honeybee Colonies (1961-2009 , unit: million).

3. Apiculture Development in Key Beekeeping Countries in the Twentieth Century

The former Soviet Union used to be the biggest beekeeping country in the world. As early as 1961, the Soviet Union alone accounted for 10.25 million colonies, a quarter of the world honeybee colonies. At the same time period, China's was home to only 3.35 million, just one third of the Soviet Union. The top ten beekeeping countries in the world were: the Soviet Union, the United States, China, Ethiopia, Germany, Mexico, Turkey, Poland, Angola, and France (Figure 3).

In the 1970s, former Czechoslovakia, with its colonies exceeding one million, overtook Angola, becoming one of the top ten beekeeping countries in the world (Figure 4). In the 1980s, China moved up to second place in the top ten after a quick expansion of its honeybee colonies. Later Angola and France were replaced by Greece and Argentina when their honeybee colonies passed one million (Figure 5). At that time, other countries with more than one million colonies were Romania and Kenya.

Before its break-up, the Soviet Union had led the world in hive numbers. Even until the early 1990s, as the number one beekeeping country, it owned 9+ million colonies, a historical record which so far has never been broken by any other country. Concurrently, China's colonies

had doubled to 7.48 million compared to the early 1960s, ranking second in the world. Other key beekeeping countries, such as Tanzania, Egypt, Poland, took the spots of Germany, Greece (Figure 6). And Iran, Argentina, Spain got into the world top ten when their honeybee colonies increased rapidly (Figure 7). In the beginning of the 1990s, the break-up of the former Soviet Union and the split of hive numbers into independent countries, led China to the top spot in colony numbers (Figure 7). Toward the end of twentieth century and into the new millennium, only China, the US and Turkey remained in the top ten, while all the others were all overtaken by countries of South America and Africa, leading to a reshuffled top ten list: China, Turkey, Russia, Iran, Ethiopia, Argentina, United States, Tanzania, Kenya and Spain (FAO Statistics Division 2011) (Table 3).

Table 3. Honeybee Colonies in World Top Ten Beekeeping Countries (1961-2000; Unit: Millions)

Country	1961	Country	1970	Country	1980	Country	1990	Country	2000
USSR	10.25	USSR	9.52	USSR	8.19	USSR	9.10	China	7.49
USA	5.51	USA	4.63	China	5.55	China	7.48	Turkey	4.27
China	3.37	China	4.17	USA	4.14	Ethiopia	3.85	Russia	3.46
Ethiopia	2.4	Ethiopia	2.90	Ethiopia	3.42	Turkey	3.28	Iran	3.35
Germany	2	Turkey	1.79	Mexico	2.38	USA	3.21	Ethiopia	3.22
Mexico	1.98	Mexico	1.67	Turkey	2.23	Mexico	2.11	Argentina	2.80
Turkey	1.48	Germany	1.50	Poland	2.21	Kenya	2.00	USA	2.62
Poland	1.2	Poland	1.39	Germany	1.53	Tanzania	1.80	Tanzania	2.60
Angola	1	France	1.07	Greece	1.13	Egypt	1.65	Kenya	2.49
France	0.89	Czech	1.06	Argentina	1.10	Poland	1.65	Spain	2.13

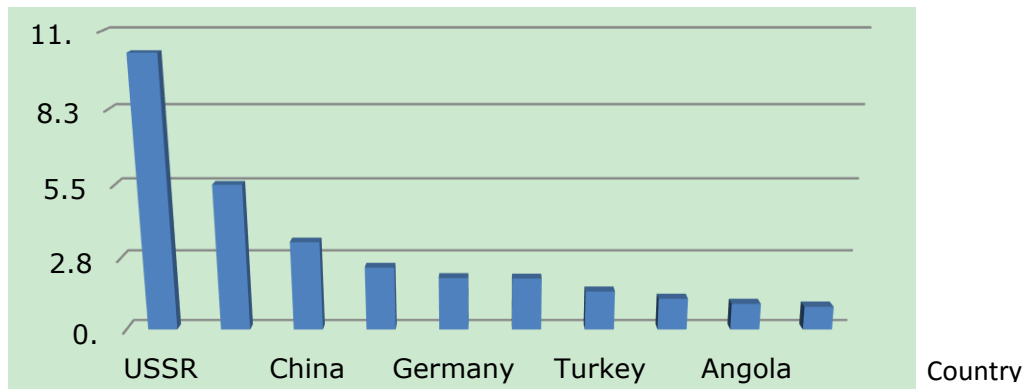


Figure 3. Honeybee Colonies in World Top Ten Beekeeping Country (1960's, unit:million).

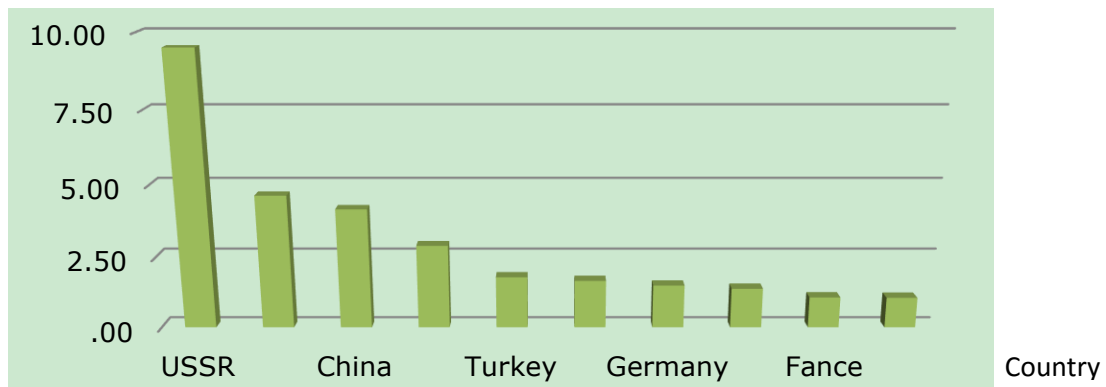


Figure 4. Honeybee Colonies in World Top Ten Beekeeping Country (1970's, unit:million).

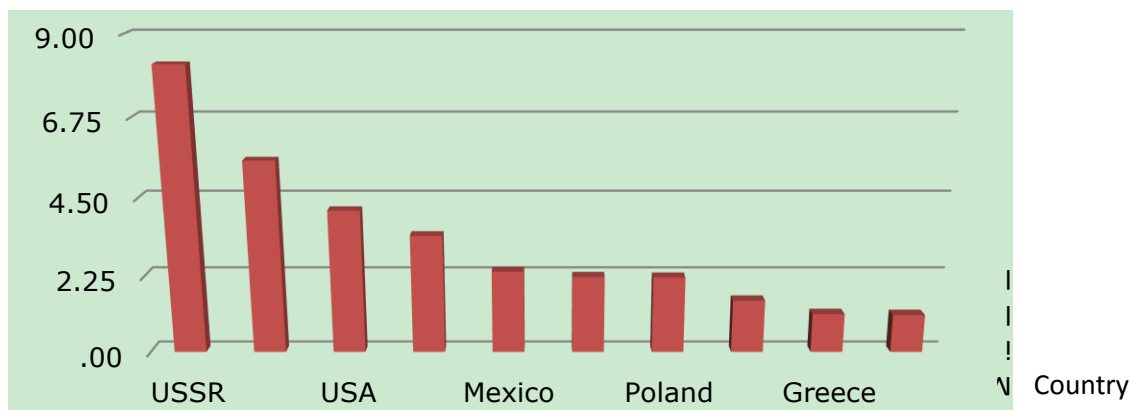


Figure 5. Honeybee Colonies in World Top Ten Beekeeping Country (1980's, unit:million).

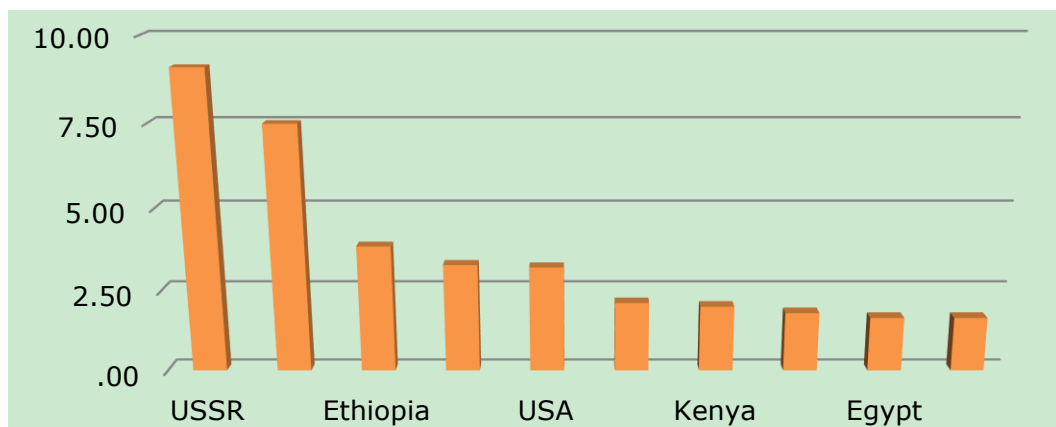


Figure 6. Honeybee Colonies in World Top Ten Beekeeping Country (1990's,unit:million).

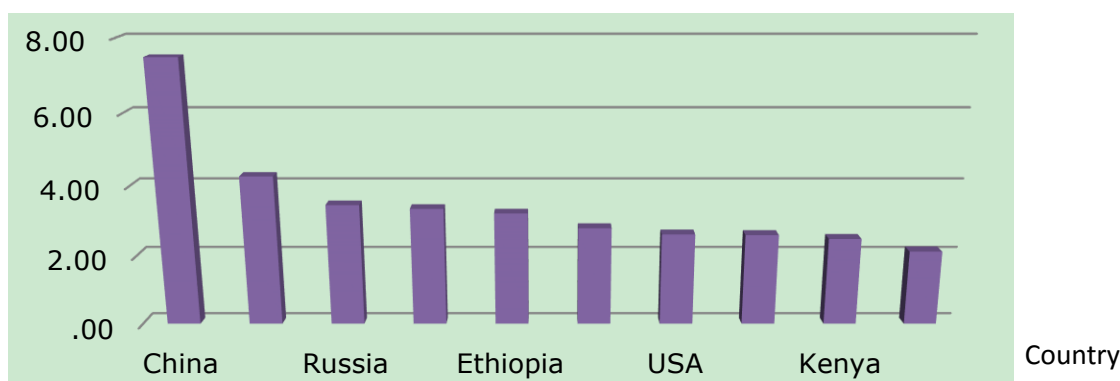


Figure 7. Honeybee Colonies in World Top Ten Beekeeping Country (2000, unit: million).

4. Trend of Apiculture Development in World Key Beekeeping Countries in the Twenty-first Century

Entering the twenty-first century, with the development of science and technology, industrial transformation and the influence of various factors, the number of honeybee colonies declined in most of the developed countries, leading to Europe falling from the world's number one beekeeping continent to the third. Meanwhile, apiculture in Asian and African countries started to boom; it also grew steadily in the Americas and Oceania (FAO Statistics Division 2011)(Table 2).

The statistics of FAO released in 2011 shows that, during 2000-2009, the following countries could be found in the world top ten beekeeping countries list: China, remained number one; Turkey, stayed in second place; Ethiopia, Iran and Russia kept their third, fourth, and fifth positions respectively since 2002; Argentina and Tanzania steadily held the sixth and seventh position; the United States, due to the impact of Colony Collapse Disorder (CCD), dropped from eighth in 2000 to the tenth in 2009; Kenya and Spain surpassed the United States, rising to eighth and ninth place.

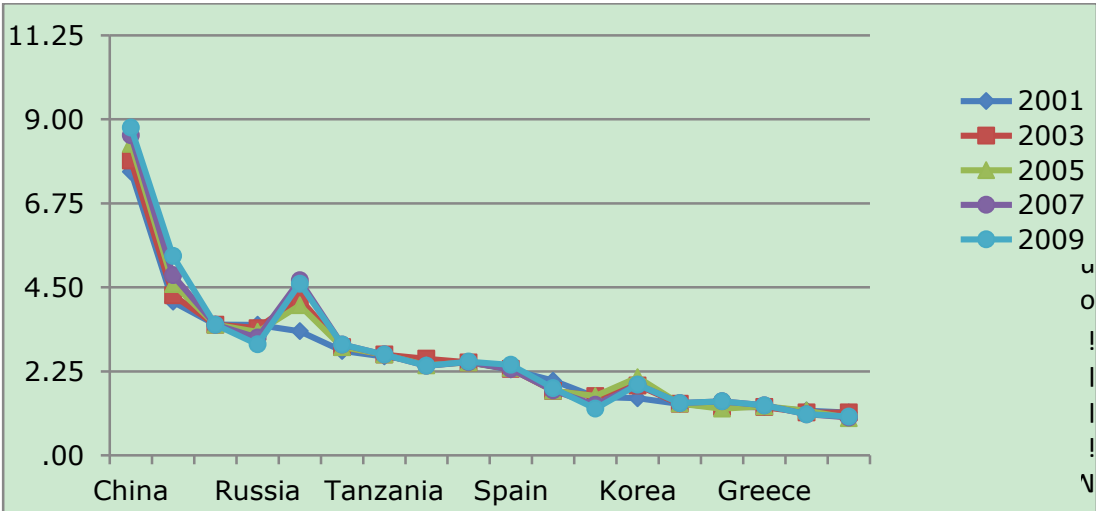


Figure 8. Changes of Honeybee Colonies in Key Beekeeping Country (2000's, unit: million).

4.1. China

In the twenty-first Century, China's apiculture industry maintained the trend of rapid and steady development; the country retained the top position in terms of colony possession and the yield of honeybee products. Based on the 2011 incomplete statistics by FAO, in 2009, China had 8.77 million colonies, accounting for one seventh of the world total honeybee colonies, having grown 17.1%, 58.1% and 162% respectively compared to colony numbers in 2000, 1980 and 1961 (FAO Statistics Division 2011) (Table 4).

4.2. Turkey

As the world second biggest beekeeping country in the twenty-first century, Turkey's apiculture enjoyed rapid growth. In 2009, its colony numbers reached 5.32 million, accounting for one twelfth of the world total, up 29.4%, 139.6% and 257.1% respectively compared to 2000, 1980 and 1961. In comparison, Turkey's apiculture grew faster than most of the key beekeeping countries.

4.3. Ethiopia

Ethiopia ranked first in Africa and third in the world in terms of beekeeping colonies. In 2009, its colonies reached 4.6 million, accounting for one fourteenth of world honeybee colonies, up 38.5%, 34.5% and 91.6% respectively compared to 2000, 1980 and 1961.

4.4. Iran

In the twentieth century, Iran's beekeeping industry enjoyed rapid expansion and maintained steady growth in the twenty-first century. In 2009, it registered 3.5 million colonies, ranking fourth in the world, up 4% compared to 2000, an increase of 159% and 379% respectively compared to 1990 (1.35 million colonies) and 1980 (0.73 million colonies). Iran experienced tremendous growth of 900% when compared with the 0.35 million colonies it possessed in 1961, signifying that Iran is experiencing the fastest growth of beekeeping in the world (FAO Statistics Division 2011) (Table 4).

4.5. Russia

As one of the key beekeeping countries, Russia owned 2.97 million colonies in 2009, making it the biggest beekeeping country in Europe after the break-up of the former Soviet Union. Ranked fifth in the world, Russia accounts for one twentieth of the world honeybee colonies, down 13.9% and 35% compared to colony numbers in 2000 and 1992. Judging by hive numbers, Russia's apiculture industry is in decline (FAO Statistics Division 2011) (Table 4).

4.6. Argentina

Argentina is well-known for its abundant high quality honey favored by world consumers. The country experienced a boom in colony numbers throughout last century, and in twenty-first century its number of hives continues to grow steadily. In 2009, it owned 2.97 million colonies, up 6% compared to 2000. But compared to colony number in 1980 and 1961, it rose by 170% and 356.9% respectively, the second highest growth rate after Iran.

Table 4. Honeybee Colonies in Key Beekeeping Countries (2001-2009; Unit: million)

2001		2003		2005		2007		2009	
China	7.60	China	7.90	China	8.34	China	8.57	China	8.78
Turkey	4.12	Turkey	4.29	Turkey	4.59	Turkey	4.83	Turkey	5.34
Iran	3.50	Ethiopia	4.20	Ethiopia	4.02	Ethiopia	4.69	Ethiopia	4.60
Russia	3.50	Iran	3.50	Iran	3.50	Iran	3.50	Iran	3.50
Ethiopia	3.33	Russia	3.41	Russia	3.31	Russia	3.16	Russia	2.98
Argentina	2.80	Argentina	2.90	Argentina	2.90	Argentina	2.97	Argentina	2.97
Tanzania	2.65	Tanzania	2.70	Tanzania	2.70	Tanzania	2.70	Tanzania	2.70
U.S.	2.51	U.S.	2.59	Kenya	2.49	Kenya	2.50	Kenya	2.51
Kenya	2.49	Kenya	2.49	U.S.	2.41	U.S.	2.40	Spain	2.43
Spain	2.30	Spain	2.32	Spain	2.34	Spain	2.31	U.S.	2.40
Mexico	2.00	Korea	1.87	Korea	2.09	Korea	1.89	Korea	1.90
Egypt	1.57	Mexico	1.73	Mexico	1.73	Mexico	1.74	Mexico	1.80
Korea	1.53	Egypt	1.59	Egypt	1.59	Poland	1.45	Poland	1.45
Central Africa	1.38	Central Africa	1.38	Central Africa	1.39	Central Africa	1.40	Central Africa	1.40
Poland	1.30	Poland	1.30	Greece	1.31	Egypt	1.35	Greece	1.34
Greece	1.29	Greece	1.29	Poland	1.25	Greece	1.34	Egypt	1.25
Angola	1.20	Angola	1.15	Angola	1.20	Angola	1.10	Angola	1.10
France	1.15	France	1.15	France	1.00	France	1.01	France	1.04

NB: the data here are for countries with more than one million honeybee colonies only.

4.7. Tanzania

As one of the top beekeeping countries in the world, Tanzania ranks second in Africa. Its coffee honey is quite popular among European consumers. Colony growth boomed in the last century, but seemed to come to a halt in late twentieth century. In the twenty-first century, Tanzania maintained a marginal growth rate. It possessed 2.7 million colonies, placing Tanzania seventh in the world in 2009, the same rank it held in 2000, up 182% and 382% compared to 1980 and 1960 respectively, making it one of the moderately developing beekeeping countries.

4.8. Kenya

Kenya's apiculture ranked third in Africa, growing at a similar rate as Tanzania. Ranking eighth in the world in 2009, it had 2.51 million colonies, similar to its colony numbers in 2000, but up 137.9% and 402% compared to the 1980 (1.08 million colonies) and 1961 (0.5 million colonies) respectively, rendering it the country with the greatest colony growth in Africa.

4.9. Spain

As a key beekeeping country in Europe, Spain's apiculture boomed in the twentieth century. Ranking ninth in 2009, it owned 2.43 million colonies, up 14.6%, 204.9% and 233.7% compared to 2000, 1980 and 1961 respectively.

4.10. The United States

As early as in 1960s, the United States had mechanized its beekeeping industry. Beekeeping is practiced mainly for pollination. The value for pollination far exceeds the value of the honeybee products. Because of the value of honey bee pollination, the United States attached great importance to Colony Collapse Disorder when it was first recognized in 2006, and invested heavily in research to prevent the honeybee from disappearing.

The United States had more colonies than most of the beekeeping countries in the world at the time the FAO started to collect this data in the 1960s. Regrettably, as economic development and scientific progress increased, the numbers of beekeepers and managed colonies in the United States kept declining. In the 1960s, the US managed 5.51 million colonies, second behind the former Soviet Union. In the 1970s, it was still ranked the second in the world in terms of the honeybee colonies. However by the 1980s, China exceeded the United States to take second place. In 1990, the United States fell to fifth place, its colonies number reduced to 3.21 million, down 41% compared to the 1960s. In 2000, it dropped to seventh, with colony numbers continuing to decline to 2.62 million. By 2005, with 2.41 million colonies, the US fell in rank to 9th place. In 2009, its colonies had shrunk 126% from a peak of 5.5 to 2.4 million, ranking 10th in colony numbers. Nonetheless, the United States is still one of the world's top ten and maintains more colonies than most European developed countries (FAO Statistics Division 2011) (Table 4)

In addition to the top ten, Korea, Mexico, Poland, Central Africa, Greece, Egypt, Angola and France all maintain in excess of 1 million honeybee colonies (FAO Statistics Division 2011) (Table 4).

5. Conclusion

By examining the changes in the numbers of managed honeybee colonies in the world in key beekeeping countries over the past five decades, we conclude that: worldwide apiculture has experienced rapid development in the twentieth century, which slowed down in early twenty-first century; while the number of colonies is still growing in Asia and Africa, it has declined in developed countries. The beekeeping industry, judging by the number of managed colonies, grew relatively faster in the developing countries; while in developed countries the beekeeping industry slowed as honeybee colony numbers continue to shrink.

We cannot help but ask ourselves: Is this the inevitable consequence of social progress and the industrial revolution? Based on the analysis of the past statistics, we

predict that in the next ten years, apiculture in developing countries will keep growing, and so worldwide the number of honeybee colonies will continue to increase. But what will happen after twenty or thirty years? Will China and other developing countries experience the same drop as currently experienced by developed countries? We hope the emerging economies and developing countries will not follow the same track in colony decline as taken by some of the developed countries.

References

1. Crane, E. (1990). *Bees and beekeeping: science, practice, and world resources*. New York, Cornell University Press.
2. Jurgen Tautz, Helga R. Heilmann (2007). *Phanomen Honigbiene* . Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
3. USDA Forest SERVICE: Pollinator Fact Sheet (2014). <http://www.fs.fed.us/wildflowers/pollinators/>
4. FAOSTAT | FAO Statistics Division 2011 [BE/OL]. [2011-11-13]. <http://www.fao.org>
5. Chen L. (2009). Advances on colony collapse disorder (CCD) of honeybee in the world. *China Apiculture* 60(7):57-58
6. Chen L., Sperbear, Wang J. (2012).Beehive stocks of the main beekeeping countries in the world (2001-2009). *China Apiculture* 63 (2):50

*Dr. Chen Lihong, corresponding author, Vice-president & Secretary General of Apicultural Science Association of China (ASAC), Professor of the Bee Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Xiangshan, Haidian District, Beijing, 100093, China. clhb@hotmail.com; chenlihong@caas.cn

《中国蜂业》杂志发展历程

方兵兵，刘世丽

（中国农业科学院蜜蜂研究所 《中国蜂业》杂志社，北京 100093）

摘 要

《中国蜂业》杂志由《中国养蜂》杂志更名而来，其前身为《中国养蜂杂志》，1934年1月由当代著名养蜂家黄子固先生创办。1956年7月，经农业部批准，中国农业科学院接手《中国养蜂杂志》。1957年3月，中国农业科学院正式成立后，《中国养蜂杂志》由院办公室直接领导和管理，并更名《中国养蜂》，刊名是郭沫若同志题写的。1958年，中国农业科学院养蜂研究所在北京香山成立。《中国养蜂》也交由养蜂所主办，编辑部也随迁到北京香山养蜂所内。1997年，根据对外开放形势的需要和读者的要求，并经农业部办公厅批准，增加中国养蜂学会作为杂志的主办单位。2005年，应发展需要，经农业部和国家新闻出版总署批准，改为月刊发行。2006年，根据蜜蜂产业的发展需要，在大量调研的基础上，经农业部和国家新闻出版总署批准，正式更名为《中国蜂业》。

关键词：中国养蜂；中国蜂业

一、杂志发展情况

《中国蜂业》从1956年至今，经历了“三起两落”发展阶段。从中国农业科学院接管到20世纪60年代初，是刊物起步阶段。在这个阶段，《中国养蜂》积极配合国务院、农业部和农垦部，大力发展中国养蜂业方针、政策的宣传，开展养蜂新技术的宣传。通过有力的宣传和报道，使养蜂在现代农业生产中的

重要意义为各级领导和广大劳动群众所认识，显著地促进了养蜂这一古老行业在新中国的蓬勃发展，养蜂已逐渐成为我国农村的一项重要副业。《中国养蜂》在这一阶段发挥了很好的行业导向作用，此后成为我国养蜂行业的指导性科技期刊。

1960年下半年，国家遭受三年自然灾害，《中国养蜂》停刊2年，到1962年下半年复刊。复刊后，主办单位——中国农业科学院养蜂研究所根据当时我国养蜂生产和科研工作迅速发展的需要，在充实了编辑部力量的同时，在《中国养蜂》的宣传报道方面也作了调整，即在宣传党和国家发展养蜂生产的方针和政策，报道各地发展养蜂生产组织领导经验的同时，逐步增加科研动态和成果，养蜂新技术、先进典型的报道，尤其是对推广中蜂新法饲养技术和生产蜂王浆技术等方面进行大量介绍和报道。这一阶段的宣传和报道，极大地促进了我国养蜂科研工作的开展，推动了养蜂科研成果迅速转化为生产力。使我国养蜂生产技术显著进步，生产力明显提高，为20世纪70~80年代我国养蜂生产迅速发展打下了良好的基础。在促进养蜂生产发展的同时，也确立了《中国养蜂》成为中国养蜂科技第一刊的地位。

1966年因“文革”缘故，《中国养蜂》再度停刊，5年后，1972年再度复刊。复刊后的《中国养蜂》进入了第三个发展阶段。1978年后，中国养蜂业在党的十一届三中全会的精神指导下，获得迅猛发展，我国也一跃成为世界第一养蜂大国和第一蜂产品出口国。《中国养蜂》随着养蜂业的发展进入发展最为明显的阶段。这主要表现在编辑部人才建设和设备得到加强，人员素质有了很大提高，编辑手段也日益进步。尤其是编辑、出版工作完成了由传统的计划经济模式向着市场经济条件的转变，走上良性的自立和自我发展之路，为今后杂志在市场经济环境中的生存和发展找到出路。在这一阶段，《中国养蜂》根据我国养蜂生产和科研工作的需要及存在问题，调整和增加了相应的栏目，对推广国内外养蜂科技成果和先进的科学技术及管理经验，对提高生产、经营、管理水平，改进和提高蜂产品质量，加速蜂产品综合加工开发利用等方面，及时地进行了全面报道和宣传。对推动我国养蜂业向现代化方向发展起到巨大的作用，使《中国养蜂》成为国内外蜂业科技和成果交流的平台，成为我国青年科学工作者成才的园地，成为我国养蜂生产者的良师益友。

2005年恢复月刊发行以来，在中国农业科学院蜜蜂研究所的正确领导和大力支持下，杂志的编辑出版工作再次呈现出蓬勃的发展态势。随着编辑队伍的年轻化和知识化，编辑手段全部实现微机化，原来的手工编辑技巧已基本退出历史舞台。编辑队伍得到加强的同时作者队伍得到大幅拓宽，全国几十所大专院校的学者加入到作者队伍中来，一线工作者中文笔优秀的作者也得以被认可并扩充到通讯员队伍中。

为进一步树立和提倡“以读者为本”的出版观，2006年开展了大型读者评刊活动，评选出12位热心读者和一位最热心读者。大量的读者来信为编辑部提供了改进意见，同时拉近了读者与编者的距离。继1996年后再次恢复编委会议制度，在2007年分两次召开在京编委和全国编委会议，广开言路，综合办刊。时刻不忘养蜂人是弱势群体和养蜂业的根本，为养蜂人呼吁的同时继续联合企业开展送种王下乡和送杂志下乡活动。

此时已进入信息高速发展的时期，各种媒体，包括网络对平面媒体产生了强烈的冲击。业内大型企业由于实力的加强和意识的觉醒开办了自己的内部刊物和报纸，随着企业文化改革的日益深化，图书市场也异常活跃，刊物的发展面临了前所未有的挑战。但在大多数杂志发行量快速下滑的大形势下，《中国蜂业》杂志仍以其昂扬的姿态继续在蜂业发展中发挥重要作用，并不断在发展中调整，在改革中创新。

二、办刊宗旨和刊风

《中国蜂业》始终秉承“全心全意服务于我国广大蜂业工作者，紧密结合我国的养蜂科研与生产，理论联系实际，普及与提高相结合，积极传播养蜂科学技术，推动我国养蜂业的进步和发展”的办刊宗旨。遵照这一宗旨，经过几代编委和编辑几十年共同努力和不断创新下，形成了“创新、求真、科学、严谨”的办刊传统和刊风，并以栏目多、内容丰富、信息量大受到广大读者的欢迎，在推广养蜂科研成果，交流先进养蜂经验和促进学科发展方面发挥积极作用。

20世纪50年代,《中国养蜂》根据我国中蜂饲养技术极端原始和落后的现状,大量开展推广中蜂新法饲养技术的报道并及时进行先进典型的宣传,推动了中蜂新法饲养技术在全国各地的推广和普及,使中蜂新法饲养数量大幅上升,由解放初期不足千群上升到20万群,每群产量也由2.5 kg提高至20 kg。60年代《中国养蜂》及时报道了有王群蜂王浆生产技术的科研最新成果,使得这一世界领先的生产技术迅速在国内推广并普及。王浆产量一下由年产不足50吨上升到500吨,成为世界第一王浆生产和出口大国。其中在介绍先进生产技术的同时,也对开展高产蜂种选育工作进行了介绍和报道,使得高产蜂种及时得到推广,并由此带动我国蜂王浆产量再次大幅度提高,由年产500吨上升到目前的1300吨。为我国养蜂生产增加巨大的经济效益。此外,在蜂螨的生物学特性及防治,中蜂囊状幼虫病,蜂王人工授精技术的应用,蜜蜂良种选育和杂种优势利用,蜜蜂为农作物授粉提高农作物产量,以及提高蜂产品质量等关系到我国养蜂业进步和发展的热点问题或难题,及时报道了其科研进展情况和成果,使广大生产者能迅速吸收和转化科研成果,解决生产问题,提高产量和生产效益,促进养蜂业稳步发展,使我国成为世界第一养蜂大国和蜂产品出口大国。

近年来,在秉承优良传统的基础上,把四项使命作为工作重点:

1. 做好科普工作,服务三农。我国拥有丰富的蜜粉资源,发展养蜂有着巨大的潜力。蜂业被誉为“空中农业”,在很多地区尤其是贫困山区是快速引领农民致富的好途径。
2. 站在科技前沿,报道最新科技成果。科技成果是支撑整个行业发展的动力,无论是饲养、蜜蜂保护、还是产品质量监控,都需要科研作为支撑,尤其要使我们的产品超越以原料出口的瓶颈,推广品牌意识,就更需要有科研的支撑。做好科研宣传工作,是杂志义不容辞的责任。
3. 正确引导产品宣传,扶植行业龙头企业。作为行业的当家媒体,有义务引导行业的正确导向,服务整个行业。
4. 及时传播最新资讯和报道行业最新标准、法规和大政方针。

围绕这四项工作重点,报道近年来蜂业科研工作的新进展,例如在种质资源保护和利用方面围绕基因分析作出的新成果,围绕功能性食品的功能因子的

科研做最新报道并适时题写编者按，促进了科技成果的宣传和转化。将信息快速化后也拓展了信息的来源。

三、出版发行情况

从1934年黄子固先生在北平李林园养蜂场创刊算起，《中国蜂业》已有80年历史；如从1956年中国农业科学院接管算起，也有51年的历史。在80年中，《中国蜂业》共出版65卷340期。其中，1956年前共出版13卷145期，1956年后共出版52卷195期。其间，1937年抗日战争时期，1948年解放战争时期，1960年三年困难时期和1966年“文革”动乱时期曾四度停刊。1960年前《中国养蜂》为月刊；1963年后改为双月刊，2005年恢复月刊发行，2011年旬刊发行。2015年，因新闻出版总署广电总局对期刊管理的要求，又恢复月刊。

《中国养蜂杂志》创刊初期，20世纪40年代和50年代初发行量很少，每期只有3千~4千册。被中国农业科学院养蜂研究所接管后，50年代末、60年代初发行量开始上升，每期7千~8千册。70年代初第4次复刊后。随着养蜂在我国农村广泛兴起，杂志发行量也不断攀升，到70年代末最高时曾达12万册。80年代以后，发行量逐年下降。到1995年降到最低，每期不足1万册。1995年后开始回升，发行量每期2.3万册。从20世纪80年代开始，《中国养蜂》就同世界多个国家的大学、研究机构、养蜂协（学）会等团体组织建立了期刊交换业务。2005年恢复月刊发行后，编辑队伍得到了有利加强。2006年更名《中国蜂业》后，全年共发行14期杂志，发行量稳定增长。2007年，编辑队伍进一步加强，网站和世纪检索光盘项目建设得以纳入年度发展规划实施，发行工作进入网络化。2011年，为了顺应研究人员、蜂农、从业企业家们不同的需求，进一步细化工作改为旬刊。旬刊发行三个版本，分别为普及版、学术版、商业版，报道专业性更加细化，时效性大幅提高，2011年到2013年共出版79期，年发行杂志18万册左右。2015年恢复月刊发行，全年发行杂志15万余册，在当前纸媒受网络冲击严重下滑的形势下，保持稳定发展态势。

四、获得荣誉

《中国蜂业》创刊以来，为我国养蜂事业的发展作出了重要贡献，在得到了读者认可的同时，也受到有关部门的表彰：1992年，被评为“全国优秀期刊三等奖”、“农业部优秀科技期刊”、“农科院优秀科技期刊”；1993年，在第33届国际养蜂大会和博览会上，荣获银奖期刊称号；2001年，入选新闻总署期刊方阵，并评选为双效期刊；2006年，获得中国农学会“全国农业期刊金犁奖”。2011年入选“中国农业核心期刊”。

岁月悠悠，几代蜂业人的辛勤汗水，结下了累累硕果。在新时代到来之际，编辑部一定会加快步伐，与广大读者、作者同心协力，为促进我国蜂业的发展，为使蜂产品走入千家万户并且造福人类，作出应有的贡献。

参考文献

- [1] 吴杰主编. 蜂业科技发展的光辉历程[M]. 北京：中国农业科学技术出版社，2007, 83-88.
- [2] 龚一飞. 缅怀蜂学宗师黄子固[J]. 中国养蜂，1996, (3): 24-25.
- [3] 叶振生. 《中国养蜂》——蜂业工作者的良师益友[J]. 中国养蜂, 1998, 49(5): 18.

养蜂是贫困山区农民脱贫致富的捷径

王建梅 陈黎红* 吴杰 胡玼玼 齐烟舟 刘雪菊

(中国养蜂学会, 北京, 100093)

摘要

为了使贫困山区农民摆脱贫困, 中国养蜂学会对云南、陕西、重庆、河南 4 省的贫困山区进行了考察并向贫困户赠送蜂箱、蜂具、养蜂书籍共 3000 余套, 开展蜜蜂标准化养殖技术、蜂产品安全与标准化生产技术培训, 使 1000 余户蜂农受益。农民的养蜂收入以养蜂 100 箱计算, 平均年增收 5-7 万余元, 不仅可使山区贫困农民脱贫, 同时也促进了农业增产增质、生态增效。充分体现了养蜂是贫困山区农民脱贫致富的一条捷径。

关键词: 养蜂; 贫困山区; 脱贫; 致富; 捷径

养蜂是一项不占田、不占地、成本低、收益快、无污染、低碳环保的朝阳产业, 贫困山区具备丰厚的天然养蜂资源, 适合发展养蜂。本项目以“滚动扶贫”方式, 发展长期不间断可持续养蜂扶贫; 以点带面、以“小规模, 大群体”的战略、以“学会+企业/合作社+养蜂户”的形式发展贫困山区养蜂; 利用中国养蜂学会拥有专家学术优势开展技术培训; 利用会员资源优质优价收购蜂产品, 使农民脱贫增收; 同时, 开展蜜蜂授粉宣传与指导, 以达到贫困户、养蜂业、农业、生态多重收益。

在民政部、农业部的大力支持与指导下, 我会对云南、陕西、重庆、河南共 4 省的贫困山区进行了养蜂扶持, 免费发放蜂箱、蜂具、养蜂书籍共 3000 余

套，开展了蜜蜂标准化养殖技术、蜂产品安全与标准化生产技术、蜂农应急救援等培训指导。典型事例汇报如下：

1. 新式蜂箱惠农

云南省维西县是国家级贫困县，地处世界自然遗产“三江并流”腹地，土地面积4661平方公里，森林覆盖率74.83%，该县生物多样、资源丰富。现有养蜂户5025户，蜂群50793群，但养蜂技术落后，基本上都是采用传统方式饲养，蜂群被放置在房前屋后，缺乏相应的科学管理，处于自生自灭的状态。生产方式主要是毁巢取蜜，产量低，质量差，生产力未能获得解放，不能把资源优势变为经济优势，存在很多弊端。我会经过调研，对贫困农户开展了标准化养蜂培训，演示了新式蜂箱使用方法和过箱技术的实践操作，此次培训达到了预期的效果，为实现广大群众养蜂脱贫增收致富开辟了新的渠道。

1.1. 赠送标准蜂箱

中国养蜂学会向云南维西县贫困蜂农免费发放 600 套特制蜂箱及其配套用具，直接受惠34个养蜂场试点，涉及该县6个乡镇14个村委会23个村民小组。从传统的饲养方法到应用新式蜂箱，极大地提高了经济效益。

1.1.1. 新式蜂箱容量大，蜂群旺，产蜜比一般传统蜂箱多 5 至 10 市斤。

1.1.2. 便于蜂群的日常饲养管理，比原始养殖法省时省工并节省劳动力成本。

1.1.3. 新式蜂箱在割蜜、修理巢础、清扫蜂箱时不会伤到蜂群，保证了蜂群的正常发展。

1.1.4. 新式蜂箱能及时发现和处理病虫性灾害，从而杜绝了因病虫性灾害而导致的蜂群死亡现象的发生或扩散。

1.1.5. 新式蜂箱里的蜂蜜因蜜质好，每市斤销售价格比传统蜂箱的蜂蜜高 10 元左右，每箱蜜蜂就能多获利 300 元左右，经济效益更好。

1.1.6. 新式蜂箱的使用带动了更多蜂农科学养蜂的积极性，使科学养蜂产业得到普及推广，促进了蜂产业的发展。

1.2. 通过培训，使蜂农掌握科学饲养技术，提高了效益

为了使蜂农转变传统养蜂方式，我会开展了中蜂科学饲养管理培训。扶植使用活框中蜂箱收养、驯养野生中蜂后，蜂农们体会到在操作、管理、取蜜等方面比传统蜂桶有更大的方便性，并且生产出来的蜂蜜在产量、质量方面都远远超出了传统蜂桶养殖，产量是传统蜂桶的4倍。蜂农们学到了野生中蜂过箱技术（即将收到的野生中蜂转移至新发放的中蜂活框蜂箱中）及中蜂继箱生产技术（以往都是小平箱），蜂农们自己过箱成功率都超过了80%，增产、增收达到了100%，他们亲身体会到科学规范养殖中华蜜蜂带来的经济效益。



原始蜂箱传统饲养与活框蜂箱标准化饲养对照蜂场



当地蜂农学习实践“中蜂过箱技术”
(将中蜂从原始蜂箱转移到赠送的活框标准蜂箱)

2. 扶贫责任到人到户

陕西黄龙县是贫困县，为了更好地发展和壮大中蜂产业，使广大中蜂养殖户尽快脱贫致富，中国养蜂学会向黄龙县贫困蜂农免费发放 900 套中蜂标准蜂箱及其配套用具，直接受惠蜂农 84 个养蜂场试点。发放蜂箱期间，黄龙县养蜂试验站及我会领导、专家走访受扶持的养殖户，查看指导蜂箱的安装使用，并与养殖户签订了《中国养蜂学会扶贫管理责任书》。

2.1. 听取汇报、现场调研

中国养蜂学会一行先后实地考察了岷岭乡天顺立体式中蜂养殖基地、石堡镇庙河中蜂养殖点和部分中蜂养殖点，并深入了解了中蜂养殖现状、病虫害防治情况、销售情况和蜂农在中蜂产业发展中所遇到的困难。调研期间，专家在充分肯定黄龙县中蜂养殖取得成绩的同时，认为要充分利用和发挥好得天独厚的地理优势和自然优势，加大中蜂养殖力度，打造蜂蜜的生态品牌，促进养蜂脱贫致富，并提出了建设性指导意见。

2.2. 以点带面 发展中蜂养殖

蜂农通过对中蜂标准蜂箱的使用，改变了以前土法饲养的方法及意识，开始发展活框饲养，扩大了养殖规模，提高了蜂蜜产量，增加了经济效益，达到了脱贫目的。周边群众也受到影响，开始积极发展中蜂养殖，对黄龙县整个中蜂养殖产业起到推动作用。黄龙岷岭乡贫困蜂农张业明，因土地缺、劳力少，以饲养少量土蜂为副业。在得到我会扶贫的 10 套蜂箱后，产蜜量得到提高，尝到活框饲养的甜头后，又贷款自行购买 30 套郎氏蜂箱，加上政府扶持的蜂箱，当年饲养中蜂达到 100 箱，收入达到 5 万多元，成功实现脱贫致富，并带动了周围村民开始饲养中蜂。

在蜂农使用中蜂标准箱过程中，蜂农学到了一定的知识，认为中蜂标准蜂箱繁蜂快、可继箱取蜜，充分利用中蜂向上贮蜜的习性，生产纯净的分离蜜和巢蜜。该蜂箱空间相对较小，保温保暖性好，早春促进繁殖，夏天有利于散热适应黄龙本地气候条件。流蜜期集中群势采蜜，可以生产优质蜂蜜，对实现现代化、机械化饲养中蜂具有重大意义。我会扶持的中蜂标准蜂箱和其他型号种类蜂箱相比在黄龙山区优势凸显，受到了蜂农的广泛认可。目前，中蜂养殖数量不断扩大，蜂农饲养中蜂积极性不断提高，已成为农民增收、畜牧业发展的重要新生力量。



养蜂扶贫蜂箱发放仪式



赠送中蜂标准蜂箱及其配套用具

3. 建设规模蜂场

重庆彭水县是国家级贫困县。长期以来，彭水县广大山区农户就有养殖中蜂的习俗，中蜂是这里土生土长的野生蜂种，对山区自然条件十分适应，也是山区贫困农民赖以生存的途径。饲养中蜂投入较少，主要投入是蜂箱，蜂箱成为他们发展养蜂、扩大规模、增收脱贫的关键。

中国养蜂学会为彭水县贫困蜂农免费发放标准蜂箱 800 套，重点扶持当地 100 个养蜂场试点发展中蜂养殖，并开展养蜂技术培训。此次养蜂扶贫活动受到广大贫困蜂农的热烈欢迎，他们兴奋地说，养蜂扶贫活动不仅进一步学到了中蜂养殖病虫害防治技术和中蜂养殖标准化技术，还了解了养蜂政策及法律法规，现在养蜂成本大大减少，只通过少量蜂种购入，自繁扩群，就可形成一定规模的蜂场。

3.1 传统饲养得到改造。蜂农采取活框蜂箱饲养方式替代了靠天养殖及毁灭式的木桶养殖方式，蜂箱排放规范，定期或不定期检查巢脾，蜂料准备充足等。

3.2 科学养蜂技术大力推广。通过理论和现场培训，使蜂农掌握了中蜂标准化养殖技术、优质蜂王的培育、圆桶蜂群的过箱技术、蜜蜂病虫害防治技术、生产优质蜂蜜等技术。

3.3 养蜂规模逐步扩大。随着养蜂技术的提高和中蜂蜜市场供不应求，农户养蜂积极性高涨，越来越多的农户加入到了养蜂队伍，中蜂的饲养数量得到了一定

扩大，由最初的户均饲养3-5群，到目前户均饲养20-30群的规模，农户中蜂饲养正朝着标准化和规模化发展。

3.4 蜂蜜品质大大提高。摇蜜机替代了传统取蜜方式，蜂农取封盖成熟蜜，使得蜂蜜品质大幅提升。

3.5 蜂农收入显著提高。饲养技术和规模的提高让农户的养蜂效益也明显提高了。据调查，采用活框饲养技术后，每群蜂每年可以取蜜4次以上，蜂群年均产量为24.5公斤，而未采用活框饲养前，每年可以取蜜1-2次，蜂群年均产蜜8.5-15公斤。目前，彭水中蜂蜜每公斤价格在120-160元，以贫困农户饲养10群中蜂计算，收入在2.94-3.92万元之间，可见，只要掌握科学的养蜂技术，加上中蜂生产的蜂蜜，售价远远高于西蜂蜜，其经济效益十分显著，一次投资长期受益。



养蜂扶贫蜂箱发放仪式及基蜜蜂标准化养殖技术培训

4. 农民增收

中国养蜂学会为河南卢氏县贫困蜂农实施科学养蜂培训和技术指导，免费发放600套意蜂标准蜂箱及其配套用具，直接受惠66个养蜂场试点。受惠蜂农在学习掌握标准化科学养蜂技术后，又得到中国养蜂学会赠送的标准蜂箱，养蜂生产积极性猛增，取得了明显的经济增收。卢氏县依靠山区蜜源植物丰富的优势，通过技术培训推广，完善养蜂设施等一系列工作，本地的养蜂户将从现

在 200 户发展到 300 余户，规划蜂群由 8100 群发展到 10000 群，优质蜂蜜年产量由 45 万公斤提高到 50 万公斤。

官道口镇黑牛村蜂农马章学，领到扶贫蜂箱 30 套，养蜂由原来的 75 箱发展到 110 箱蜂，收蜂蜜 7200 多公斤，年收入 7 万余元。文峪乡望家村蜂农马浩然，领到扶贫蜂箱 30 套，养蜂由 150 箱发展到 215 箱，收蜂蜜 12000 多公斤，年收入 11 万余元。文峪乡南窑村蜂农李长富，10 多年来一直在家坐地养蜂，领到扶贫蜂箱 30 套，养蜂由原来 20 箱发展到 50 箱，收蜂蜜 1500 多公斤，年收入 2 万余元。沙河乡果角村蜂农李九龙，是坐地养蜂户，领到扶贫蜂箱 20 套，现在发展到 90 箱蜂，收蜂蜜 3700 多公斤，年收入 4 万余元，等等。目前，卢氏县新增蜂农 10 余户，新增蜂群 2100 箱。全县现已成立了 6 个养蜂专业合作社，新增收入 50 余万元。



养蜂扶贫蜂箱发放仪式



养蜂扶贫现场技术培训

5. 小结

此项扶贫项目的实施远远超出了既定目标。有的放矢地以点带面促进发展养蜂脱贫致富，让养蜂户掌握科学的养殖技术，改变传统饲养方式，大力推广活框饲养提高蜂蜜产量和质量，以养蜂 100 箱计算，每年增收达 5-7 万余元，进一步促进了农作物增产增质，大大提高了农民的整体收入。由此可见，养蜂业不仅是现代农业的重要组成部分，也是促进农民脱贫致富的一条重要捷径。

中蜂授粉对蓝莓产量及品质的影响

韦小平¹，林黎¹，徐祖荫¹，何成文¹，孙秋^{*3}，杨丰²

(1.贵州省现代农业发展研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州省麻江县果品办, 贵州 麻江 557600)

摘要

以中蜂为试验手段，以蓝莓为试验对象，对贵州蓝莓主产区麻江县的三个主栽品种进行了授粉试验。结果表明，中蜂授粉可显著提高蓝莓产量和品质。经中蜂授粉的蓝莓，其坐果率与结实率达 46%与 42.86%，分别较对照高 44.5 与 41 个百分点；其可溶性固形物（13.85%）与维生素 C（12.57mg/g）分别为对照的 1.5 与 2.2 倍。此外，中蜂授粉对蓝莓单果重、果实直径、花色苷、总酚也有提高作用。研究结果表明，中蜂可作为早春低温期活动的授粉昆虫，用于提高蓝莓的产量与品质，可在生产中进行推广应用。

关键词：中蜂授粉；蓝莓；产量及品质

【基金项目】国家自然科学基金项目 2011 (71263012)：西南喀斯特石漠化成因的文化驱动机制研究；黔农科院院专项 2013 (020) 号：贵州麻山石漠化地区中华蜂保育研究。

【通讯作者】孙秋 (1962 -)，女，研究员，从事农业政策与农村发展研究。

Effects of honeybees-pollination on the yield and quality of blueberry

WEI Xiaoping¹, LIN Li, XU Zuyin¹, HE Chengwen¹ , SUN Qiu*¹,
YANG Feng²

(1.Guizhou Institute of Rural Development Research, Guiyang, Guizhou, 550006; 2.
The Blueberry Research Center, Majing, Guizhou, 557600)

Abstract

Honeybees (*Apis cerana*) were used to pollinate three blueberry varieties in Guizhou Majiang, and test the pollination effects on blueberry's yield and quality. Study results showed that honeybees-pollination method significantly increased the yield and quality of blueberry. Pollinated by bees, blueberry's setting rate, seed-setting rate were 46% and 42.86% respectively, which were 44.5 and 41percentage higher than that of control; its soluble sugar content(13.85%) and vitamin C (12.57mg/g) were 1.5 and 2.2 times higher than that of control. Moreover, its average fruit weight, diameter, anthocyanin, total phenol also increased. The study results indicated that honeybees could be used as important pollination insects to pollinate blueberry and other plants blooming in low temperature season.

Keywords: Honeybees pollination; Blueberry; Yield and quality

1.背景

蓝莓又名越橘 (*Vaccinium uliginosum*)、蓝浆果, 杜鹃花科 (*Ericaceae*) 越橘属 (*Vaccinium spp.*) 植物, 多年生浆果类灌木果树^{[1][2]}。果实深蓝色, 近圆形, 外被果粉。蓝莓果实富含花色苷、类黄酮、酚酸等生物活性成分和营养物质^[3], 不仅具有极高的营养价值, 还具有保护视力、提高免疫力等多种功能^[4]^[5], 被联合国粮农组织列为人类五大健康食品之一。近 20 年来蓝莓在德国、新西兰、日本、中国等地迅速发展, 成为最优良的小浆果果树之一。贵州自 2000 年开始引种栽培^[6], 由于蓝莓对酸性土壤 (pH4.5-5.5) 的特殊要求和贵州酸性黄壤的典型特点, 使得贵州蓝莓种植面积迅速扩大, 成为全省发展山地特色高效农业的重要措施之一。2013 年止, 全省蓝莓面积 10.7 万余亩, 约占全国的 28%, 鲜果产值约 3.6 亿元; 其中黔东南州蓝莓种植面积已达 10.3 万亩, 该州的蓝莓面积已近全国的 1/4, 成为中国南方规模最大的蓝莓生产基地。其核心种植区麻江县种植的蓝莓, 于 2012 年成功入围全国第二批有机产品认证示范创建县。

然而, 蓝莓的高产稳产一直是制约全省蓝莓产业发展的关键问题^{[6][7]}。一方面蓝莓花量大, 花器独特。其花为总状花序, 花两性, 侧生, 倒挂如钟状, 且子房下位, 雄蕊比柱头短, 这导致蓝莓无论风媒还是人工授粉效果都不理想^[8]。另一方面, 蓝莓花期为早春 3-4 月, 阴雨低温时期长, 自然界有效授粉昆虫数量有限。中蜂在贵州山区生息繁衍, 一直是当地早春低温开花植物的主要传粉昆虫^[9]。近二十年来, 退耕还林等政策与项目的实施, 加之 2008 年国家现代蜂产业技术体系的成立, 有效推动了中蜂的发展^[10]。如何利用本土蜂种耐寒、易采集白色蜜源的特点, 寻找提高蓝莓产量与品质的路径, 是贵州发展特色山地农业的关键环节。本研究以中蜂为试验蜂种, 以麻江县有机蓝莓园为试验点, 以 3 个主栽品种为试验对象, 于 2015 年 3-9 月对蓝莓授粉、果实生长发育及品质等 9 项指标进行了比较分析, 以期总结出有效提高蓝莓产量与品质的措施, 为蓝莓产业与蜜蜂授粉业发展提供依据。

2.材料与方法

2.1.试验材料与地点

中蜂 40 群、4 年生蓝莓林 100 亩、网罩大棚及标识挂牌若干；试验选择在贵州省蓝莓中心种植区域即麻江县宣威镇一蓝莓园进行，试验园土壤 pH4.24-5.11,有机质 41.3g/kg,全氮 0.5g/kg,全磷 0.46 g/kg,全钾 13.6 g/kg。试验蓝莓树所在坡向、风向与栽培管理措施一致，试验所用鲜果采于该园。试验于 2015 年 3 月初中蜂进场开始，4 月初末花时蜂群转场，至 9 月蓝莓采收完毕结束。

2.2.试剂与设备

试剂：甲醇、磷酸、草酸分析纯、VC 对照品(批号：HG/T1534F1994，纯度：99.0%，上海试四赫维化工有限公司)、盐酸、氯化钾、醋酸、醋酸钠及乙醇分析纯、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷（批号:7084-24-4，纯度：98.5%，上海永恒生物科技有限公司）。

仪器设备：岛津高效液相色谱仪、AS3120A 超声波提取器（天津奥特赛恩斯仪器有限公司）、BCFCO 型电热恒温水浴锅（北京长凤仪器仪表有限公司）、FA2004 分析天平（上海精密科学仪器有限公司）、TMS-PRO 型物性测定仪（美国 FTC 公司）、UV-2006 紫外可见分光光度计（尤尼柯科学仪器有限公司）、AIPU 404 乙二醇丙二醇冰点折光仪。

2.3.试验方法

试验选择在蓝莓初花期，即 5%的花开放时进场，蜂群均匀分散摆放于试验园。试验设计 3 个品种、3 个对照、3 次重复，对比研究中蜂授粉对蓝莓产量及品质的影响。对照处理以网罩大棚隔离，网罩密度控制在蜜蜂等大型昆虫不能进入，但小型昆虫可进入，即对照处理的蓝莓花仅能依靠风媒、自花和其它小昆虫来完成传粉工作。中蜂授粉处理以 40 目网罩大棚隔离，内置数量相同的蜂群（3 足框/群）。定时观察记录蜜蜂出勤情况、携粉情况等数据。每品种选取 30 株蓝莓树为对象，挂牌标记，详细记录其花芽数、授粉情况，每周统计一次开花量、坐果率与结实率。待蓝莓果实陆续成熟后，分批次采摘标记的果实，随机选择适量蓝莓，对比检测果实的各项生理指标。平均单果重用电子秤测定（精确程度为 0.01g），平均直径用游标卡尺测量，硬度用质构仪测定，可溶性固形物用折光仪测定，总酚与总花色苷用分光光度法测定，维生素 C 用高效液相法测定。

3. 试验结果

3.1. 蓝莓产量指标检测结果

试验结果表明，中蜂对3种蓝莓授粉后，均能明显提高其坐果率（46%）、结实率（42.86%）、单果重和单果直径这4项产量指标（表1）。数据显示，蓝莓对蜜蜂授粉具有高度依赖性，仅依靠风媒、自花和自然界小昆虫授粉，其坐果率低于2%。在同样的中蜂授粉环境下，不同品种蓝莓的坐果率与结果率也有差异，坐果率从高到低依次为粉蓝（66.96%）> 巴尔德温（51.82%）> 灿烂（19.20%）（图1a），结实率依次为粉蓝（61.01%）> 巴尔德温（47.48%）> 灿烂（18.1%）（图1b）。对比分析结果还显示，中蜂授粉的成熟果数与坐果数比值高达93%，而对照的比值仅为54%，即是说自花或风媒授粉后有近一半的果实脱落。此外，中蜂授粉的果实平均重量(1.87g)较对照高0.33g，平均单果直径(16.26mm)较对照大0.69mm，说明中蜂授粉对提高和稳定蓝莓产量有积极作用。

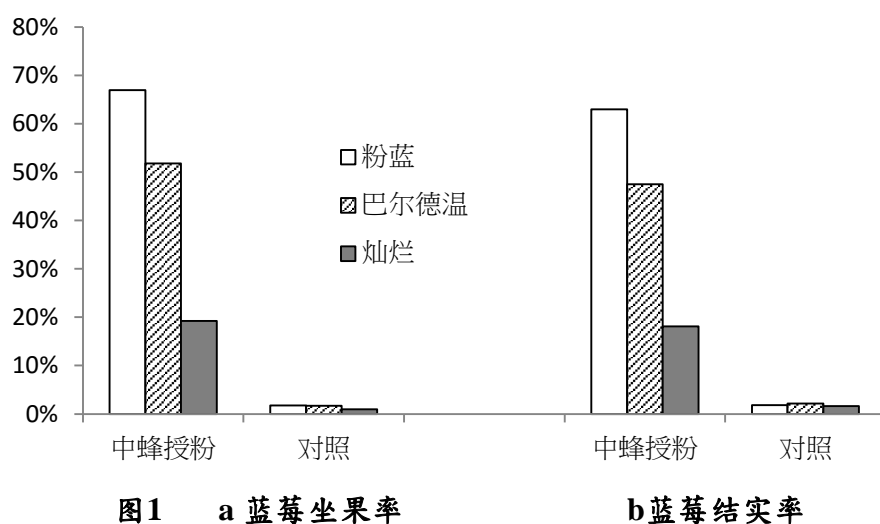


表 1 中蜂授粉后蓝莓果各项指标检测结果

	中蜂授粉	对照
坐果率(%)	46.00**	1.50
结实率(%)	42.86**	1.86
平均单果重(g)	1.87	1.54
平均单果直径(mm)	16.26	15.57
硬度(N)	5.86	6.18
可溶性糖(%)	13.85*	9.10
维生素 C(mg/g)	12.57**	5.69
花色苷浓度(mg/g)	2.18	2.12
总酚(mg/g)	0.78	0.66

注：**表示差异极显著，*表示差异显著

3.2. 蓝莓品质指标检测结果

数据分析结果显示，中蜂授粉对粉蓝、巴尔德温和灿烂三个品种的蓝莓品质均有明显改善作用，尤其是对果实的维生素 C（图 2）与可溶性糖（图 3）这两项指标，差异达显著水平，分别较对照高 1.54 与 2.2 倍（表 1）。不同品种对中蜂授粉的反应不同，其可溶性糖的含量低依次为粉蓝（14.85%）> 巴尔德温（13.83%）> 灿烂（12.88%）> 对照最大值（10.15%），维生素 C 的含量依次为粉蓝（20.59mg/g）> 巴尔德温（9.92 mg/g）> 灿烂（8.80% mg/g）> 对照最大值（6.46mg/g）。由于可溶性糖含量的变化，导致授粉后的蓝莓果实

硬度降低，平均较对照低 0.32N（表 1）。此外，中蜂授粉也提高了蓝莓花色苷总浓度与总酚含量，但差异不显著。

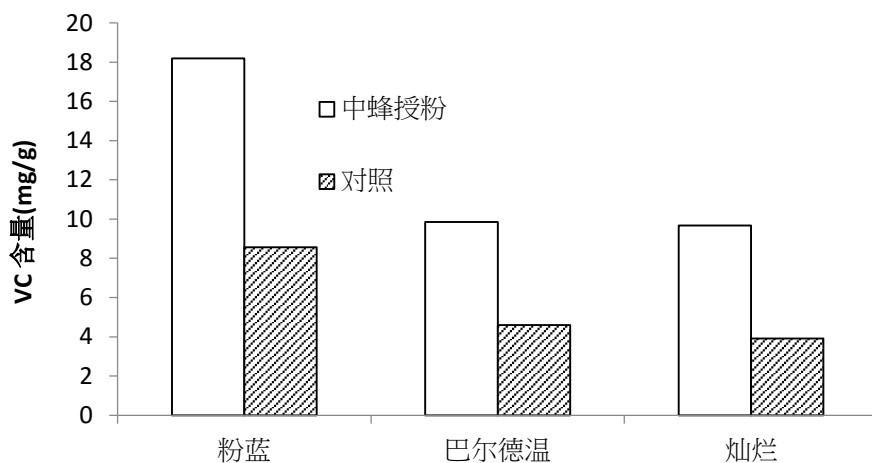


图2 蓝莓维生素C含量

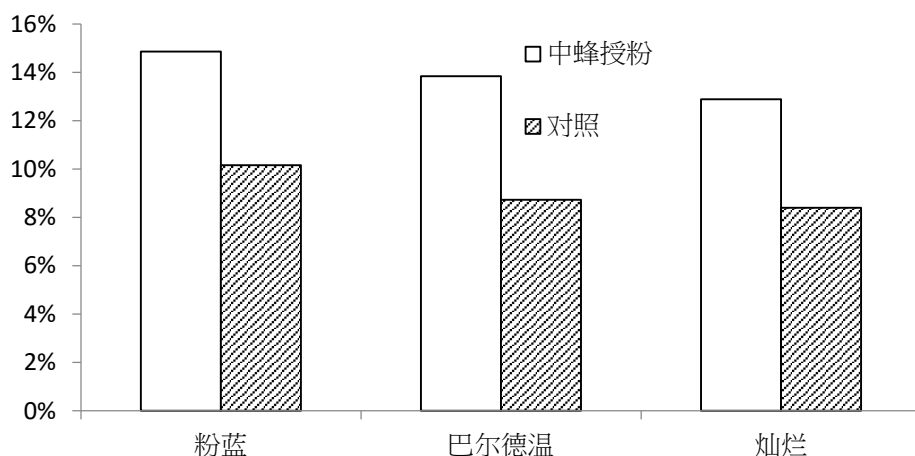


图3 蓝莓可溶性糖含量

3.讨论

研究结果表明，中蜂授粉后蓝莓的平均坐果率（46%）、结实率（42.86%）等产量指标均高于对照，可溶性糖与维生素 C 也分别为对照的 1.5 与 2.2 倍，说明中蜂授粉对蓝莓产量与品质有明显提高与改善作用。但试验所用网罩大棚为 40 目，在隔离蜜蜂进出的同时，也隔离了部分中小型昆虫，不能很好地模拟自

然状况，未来的研究设计中，应考虑放大网罩孔格。另外，在为蓝莓授粉的同时，试验蜂群收获蓝莓蜜 307kg，平均波美度为 38.3 度。蓝莓蜜呈淡琥珀色，色泽透明，气味幽香，味微酸，很受市场欢迎。这表明中蜂授粉既可为蓝莓业服务，也可采收商品蜜，做到授粉采蜜两不误，在生产中有一定推广价值^[11]。最后，试验后期观察结果显示，经中蜂授粉的果实，果蒂干且小，其贮藏期也较未授粉的果实长，但具体的延长时间与原因有待进一步研究确定。

参考文献

- [1] 徐国辉，王贺新，高雄梅.近十年来美国蓝莓新品种资源及其特征[J].中国南方果树,2015，44（4）:138-144
- [2] 李丽敏，赵春雷，郝庆升.中外蓝莓产业比较研究[J].中国农学通报,2012,26(23):354-359.
- [3] 陈介甫，李亚东，徐哲.蓝莓的主要化学成分及生物活性[J].药学学报,2010,45(4):422-429
- [4] 文光琴，聂飞，廖优江.蓝莓果实理化成分含量分析与功能评价[J].江西农业学报,2012:24(1):117-119
- [5] 郝文博，姜广明，车文实.蓝莓花青素的抗氧化作用和抑菌性研究[J].黑河学院学报:自然科学版,2014:5(3):123-125
- [6] 聂飞，房小晶，周红英，周艳.我国蓝莓栽培现状及在贵州的产业化发展前景[J].贵州农业科学,2010,38(10):69-71
- [7] 黄国辉.我国蓝莓生产存在的主要问题及解决对策[J].北方园艺,2008(3):120-121
- [8] 王林，陈黎，万志兵.蓝莓开花结实生物学特性研究[J].安徽林业科技,2011,37(6)：19-22
- [9] 韦小平，冉亚明，何成文，孙秋.中华蜜蜂保护基地的特殊价值探讨[J].蜜蜂杂志,2015(9):4-8
- [10] 吴杰.国家蜂产业技术体系建设简介[J].中国蜂业,2009,60(10):18-20
- [11] 徐祖荫，韦小平，林黎，何成文，范文穗，吴小根.中蜂为蓝莓授粉采蜜初探[J].蜜蜂杂志,2015,(9)：28-30
- [12] 中华蜜蜂在我国森林生态系统中的作用[J].中国蜂业.2009,60(4):5-10

新疆南疆蜂业发展现状及建议

阿衣努尔·尤里达西

新疆维吾尔自治区蜂业技术管理总站

一、新疆养蜂史

新疆养蜂历史，据 1933 年吴绍磷编《新疆概观》记载：“蜜蜂甚多，土人亦知养蜂，但用旧法。”1957 年，自治区农业科学研究所张爱平的调查报告：“新疆养蜂始于 1910-1912 年间。”据尼勒克种蜂场有关《新疆黑蜂资源调查与研究实验报告》介绍，黑蜂是本世纪 20 年代，约 1925 年或 1926 年由俄罗斯人从中亚西亚经哈萨克斯坦带入新疆，带入时只有十群，并定地在伊宁饲养。经过几十年的传播，才逐渐由伊宁市发展到特克斯、新源及北疆的阿勒泰地区。上世纪 50 年代末，由于自治区政府的重视，业务部门开始有计划、有重点发展养蜂生产，制定了“大力发展国营养蜂，社办国营并举；老区的蜂群以采蜜和分蜂并重，新区分蜂为主；积极发展扩大农区和果树区以及牧区的养蜂业，重点建立新的养蜂基地”的养蜂生产方针。为发展新蜂区奠定了基础，使养蜂生产由北向南、由山区草原区扩展到 40 个县市。自此打开南疆养蜂之路。

二、南疆四地州养蜂现状

1.南疆养蜂生产基本情况

南疆地区各市县因气候、土壤及种植业结构的调整，蜜源各有其特点，饲养的主要为意大利蜜蜂，各地养蜂生产情况分述如下：

1.1.喀什莎车县

该县是全国乃至亚洲最大的巴旦木生产基地，种植面积为 100 万亩，其中出于盛果期的巴旦木为 50 万亩，因此巴旦木是该县主要的蜜源植物，蜜蜂授粉

收入成为该县蜂农的主要收入。2015年该县自有蜂农90户，蜂群3万群，蜂机具新旧参差不齐。蜂场卫生条件一般。户均收入（主要授粉收入）3.5万元，主要的病虫害为螨害，有少量白垩病发生。

1.2.和田地区

整个地区共有蜂农251户，全部为维吾尔族蜂农，生产期蜂群2万群上下。生产期户均纯收入（包括授粉收入、从外地调入蜂蜜出售收入）3万元左右，养蜂技术落后，蜂群无法越冬，蜂机具老、旧、落后，蜂场卫生条件差。其中墨玉县、洛浦县、和田市为重点养蜂地区。主要蜜源为棉花、红枣、沙枣、玉米、骆驼刺，红柳。主要蜜蜂病虫害为螨害。

1.3.阿克苏地区

阿克苏地区有蜂农190户，生产期蜂群为4.7万群，相对喀什、和田蜂农的养蜂技术较高，蜂群采集力高，正常年份下中继箱可采棉花蜜60余公斤，生产期户均纯收入3—4万元，主要是由授粉收入、蜂产品收入及春季出卖越冬蜂收入构成。蜜源有棉花、油菜、油葵、红枣、沙枣、苹果、红柳。主要蜜蜂病虫害为螨害。另外棉花花期使用农药对蜜蜂的损失也较大。

1.4.巴州地区

该地区有蜂农230余户，养蜂技术较高，生产期蜂群4万群上下，生产期户均收入4-5万元，蜜源为：棉花、香梨、葵花、杏子、罗布麻、沙枣等。主要蜜蜂病虫害为螨害。另外棉花花期使用农药对蜜蜂的损失也较大。

2. 新疆地区生产现状分析

2.1. 蜂农的养蜂生产技术各地极为不平衡

巴州地区、阿克苏地区主要为汉族蜂农，养蜂技术水平相对较高，在整个养蜂生产周期中，根据季节变化，能够依据蜜蜂生物学特性保持较强的群势，饲养的蜜蜂采集力高，蜜蜂能够安全越冬，正常年份一箱蜜蜂平均采蜜35-45公

斤，养蜂成本在 200 元左右，纯收入达 600 元，而且在春繁期间将当地的越冬蜂群出卖给和田、喀什地区蜂农，因此经济效益较好。

和田、喀什地区主要为维吾尔族蜂农，养蜂卫生条件差，维文养蜂资料匮乏，几乎没有科学的培训机会，对蜜蜂生物学了解不多，仅靠师傅“口传身授”，蜂机具功能性差，因此养蜂技术薄弱，一般蜂势较弱，采集力低，不能安全越冬，蜂蜜的产量不高，正常年份每箱蜜蜂采蜜 15-30 公斤，成本高达 500 元左右，由于当地没有企业，蜂产品主要自产自销，蜂产品零售价格比巴州、阿克苏地区高 2-3 倍，加上小范围内参加当地林果花期的授粉，因此一箱蜂收入并不低于巴州、阿克苏地区。

2.2.各地蜂农的收入均高于当地农民的收入

经在各地探访，南疆各地蜂农的收入普遍高于当地农民的平均收入，如喀什地区莎车 2015 年当地蜂农人均收入 1 万元左右，当地大田农民人均收入 0.62 万元。如和田地区墨玉县养蜂户相对集中的芒来乡和卡尔赛乡，2015 年蜂农人均收入在 1.3 万元左右，大田农民人均收入 0.48 万元，与该县紧邻的和田市、洛浦县大田农民人均收入分别 0.3 万元和 0.61 万元。

2.3.各地促进养蜂业发展的源动力不同

南疆各地区养蜂业的发展的源动力各有其特点，如莎车县由于巴旦姆授粉的需求，当地农业局不但成立了相应的管理机构，而且在资金上给予蜂业大力支持，2015 年莎车县组织本地及外地蜂群 7 万余群参加巴旦姆授粉，授粉补贴资金 500 余万元（巴旦姆授粉补贴每箱达到 80 元），授粉收入成为当地蜂农的主要收入，由于莎车农业局将蜜蜂为巴旦姆授粉的工作列入农业工作的整体，这样不但促进了当地养蜂业的发展，而且吸引了外地蜂群积极参加巴旦姆的授粉工作。

巴州地区由于存在当地香梨、苹果、红枣授粉、葵花制种及蜂产品销售需求，因此该地存在两种主要收入形式：如巴州库尔勒蜂缘养蜂专业合作社在苹果、葵花及巴旦木授粉期有蜂群 1.2-1.3 万群蜜蜂（均为继箱）授粉收入成为该合作社主要的收入，同时也成为当地专业授粉队伍。

库尔勒市甜源养蜂专业合作社年蜂蜜加工量 100 吨，外调蜂产品 300—500 吨，产品主要销往山东、北京、广州、上海等地。和田、喀什地区主要是养蜂的高收入吸引蜂农，尽管养蜂技术水平低，但由于蜂蜜零售价格高和参与林果授粉，一箱蜜蜂的纯收入可达 400-1000 元不等。

2.4.养蜂培训和养蜂资料极为缺乏

南疆地区除莎车县外，当地农业局对养蜂业缺乏关怀，各地养蜂培训工作开展得很少，尤其和田地区 98%以上为维吾尔族蜂农，由于语言障碍和汉族蜂农沟通困难加之维文资料极度缺乏，该地区的养蜂技术水平仍停滞在八十年代，因此出现了蜜蜂越冬及养强群的瓶颈问题。

2.5.蜂牧矛盾突出

一方面，许多牧民对蜜蜂为草场植被授粉的增产增效作用不慎了解，使一些牧民以牧场私有为由不允许蜂农在自己承包的草场内放蜂，甚至有些人打着草原管理站的旗号，“卡”“要”蜂农。另一方面，为了追求牧草质量，牧民打草期不断提前，许多草场在牧草刚开花时就开始打草，不等花种成熟落地，这不仅使蜜源植物减少，还造成草场退化严重。蜜源植物大幅缩减，如草木犀，现在基本不种。加之牧区牛羊过载，不合理放牧，也使牧区蜜源植物遭破坏。这些因素也导致蜂产品产量下降。

2.6.蜜蜂授粉对农牧业增产增效作用宣传不够

在南疆地区，由于对养蜂业宣传力度的欠缺，因此蜜蜂授粉促进农作物增产增效作用还没有被一些政府部门和从事种植业、畜牧业的人们所认识，蜜蜂授粉在农牧业中的重要作用、养蜂业为蜂农增加收入，并吸纳农村剩余劳动力、减轻就业压力的功效也未真正得到充分肯定。致使有些地方出现蜂业无人管理，蜂农、牧民之间的“蜂牧矛盾”比较突出。

3.发展养蜂生产建议

3.1.把养蜂业作为当代广大群众脱贫致富的抓手之一和当地新的经济增长点来抓

养蜂是一项经济效益好、授粉效率高、不占耕地、不争粮食，不耗能源、不污染环境的典型“资源再利用”项目。如和田蜂农购买一群蜂（3张脾）300元左右，备脾，买蜂箱等费用一箱蜜蜂成本在500元左右，经过一个生产周期，纯收入达到400-1000元左右。且投资一次，如能安全越冬，可年复一年的使用。蜜蜂繁殖快，一群蜂一年可增加2群，而且养蜂技术要求不很高，通过一般的培训就可掌握基本技术，易于推广。尤其在当前国家实施精准扶贫政策的大好时机下，各地应充分利用这一机遇，做大做强蜂业产业，为持续稳定增加贫困群众收入，加快当地精准扶贫步伐，起到了非常重要的作用，要让养蜂业成为各地精准扶贫工作的加“分”项。

发展养蜂业不仅是当地农民脱贫致富的好门路，也是安置富裕劳动力发展当地经济新的增长点。如和田地区的墨玉县，农民人均占有土地1.1亩左右，2015年人均收入0.48万元，贫困人口（人均0.3万元以下）有20万人左右。喀什地区莎车县农民人均收入0.62万元，0.28万元以下的贫困人口达20.6万人。在各地农民增收渠道有限的情况下，发展养蜂业增加农民收入无疑应成为当地农业局脱贫致富的抓手之一

各地还要通过举办各种类型的培训班、印发学习资料等形式，积极向果农、牧民以及广大农民群众，宣传蜜蜂授粉的好处及产生的社会效益，使他们自觉主动的为蜂农提供放蜂的有利环境。如蜜蜂进场期间不要喷农药，保证蜜蜂的安全，并尽可能地给蜂农提供生活等各方面便利，已达到互利互助，共同发展的目的。

3.2.大力推广蜜蜂健康高效饲养技术，提高蜂产品的产量和质量

养蜂业的稳步快速发展需要科学技术的支撑，对南疆地区而言，传统农业生产给当地农民致富空间很有限，目前推广蜜蜂高效健康饲养是发展养蜂生产帮助广大群众脱贫途径之一，各地农业部门应提高当地养蜂业认识水平并以经济效益好的养蜂示范场为榜样，通过示范，带动当地养蜂户采用健康高效饲养技术，增强蜂群群势，使蜂蜜产量和效益得到较大提高。

3.3.加大蜂产业人才培养力度

与大宗农产品相比，蜂产业产值低，就业规模小，长期以来得不到政府的重视，蜂农养蜂多靠多年经验的积累，以及简单的师傅带徒弟的传统方式。蜂业管理与从业人员学历普遍偏低，受过正规蜂业专业高等教育的人员匮乏。培育新型蜂农，提高蜂业管理与从业人员的业务素质是蜂产业发展的关键。蜂产业人才培养以政府为主导，蜂业合作经济组织和协会、蜂产品加工企业等蜂业经济主体协助完成。蜂农是蜂业发展的源头，对蜂农的培训放在首位。针对蜂农的技术水平层次不同，对蜂农的培训可分为骨干蜂农培训和一般蜂农培训；培训形式采取定期和不定期的课堂讲授、现场指导、师徒传帮带相结合的形式；培训内容应涵盖具体的蜜蜂日常饲养管理技术、蜂病防治、蜂产品质量控制，以及宏观的蜂产业政策、蜂农权益保护和纠纷的解决等知识和信息；培训资源采取外聘蜂业专家与本地农广校、职业教育学校等现有教育培训资源相结合的方式。蜂业管理与其他从业人员包括政府蜂业管理部门人员、蜂业合作经济组织和协会养蜂技术人员、蜂产品加工企业人员、蜂产品经纪人等。对这些人员的培训以集中授课为主，培训内容主要以蜂产品的市场营销、安全生产、质量安全控制、国家蜂产业政策走向为主。采取定期培训和临时培训互相补充的形式。

3.4.增加养蜂业发展的资金保障

全方位、多渠道的增加资金物资投入，是加快蜂业发展的最重要的经济保障。要加快建立和完善多渠道蜂业投入新机制。政府财政要加大在黑蜂保护区建设、蜂产业布局升级、生产、经营、管理、科技、信息服务体系建设等方面的投入力度，力争财政直接用于蜂业的支出占到当年财政预算总支出的 0.3%。农业、畜牧、财政部门要参照其他农业补贴政策和其他地区的养蜂补贴办法，制定适合本地区的养蜂补贴办法，对蜂农、养蜂专业合作社等生产主体给予资金或物质上的补助、支持，帮助其发展壮大；建立政府扶持、多方参与、市场运作的农村信贷担保机制，降低贷款风险，增加蜂农小额贷款总量。认真落实中央和新疆各项惠农政策，整合财政、农业、畜牧和环保等渠道的资金向蜂业投入。

3.5.提高养蜂认识，做好引导宣传

各地要进一步提高养蜂业对农业生产农民增收的重要作用的认识，按照《养蜂管理办法（试行）》的要求，把蜂业生产作为农业行业管理工作的重要内容之一来抓，各地要高度重视养蜂和蜜蜂授粉工作，通过下发文件、组织学习培训，媒体宣传，技术培训等多种方式，大力宣传养蜂及蜜蜂授粉的作用与意义，要通过培训，提高涉蜂主管部门与蜂农、养蜂授粉户、种植业主的认识水平，强化蜜蜂授粉产业化意识，要组织技术推广部门、相关行业协会、科研院所等有关专家加强对蜂农的技术培训和指导工作。要探索建立授粉中介服务机构，为种植业主提供授粉信息和技术服务。

3.6.将养蜂业和庭院经济进行有机结合

近年来，很多地方把发展庭院经济作为引导农民发家致富的一项重要措施来抓，使不起眼的农家小院成为发家致富的“聚宝盆”。各地农业部门要以开发庭院经济的活动为契机，引导蜂农或农民对庭院以小见大，合理安排，开展农产品和蜂产品的特色经营，因地制宜，综合规划。发展庭院经济科技是第一生产力，以效益优先为原则，各地农业部门要引导蜂农或农民充分利用现有农业、蜂业科技成果，认真管理，合理安排几种经济产业并行，充分利用空间，时间，“精耕细作”来获取效益的最大化。

3.7.建立蜂产品加工基地，抓好产品流通工作

目前，南疆地区的蜂产品加工厂很少，和田地区没有一家，为加速养蜂业的发展，必须建立蜂产品加工基地，搞好蜂产品的深度开发，实现产品多元化、优质化、品牌化，并向药用型、保健型、礼品型扩展。可采取公司+基地+项目的形式，既抓生产又抓加工和市场营销，即“扶持蜂农养、引导蜂农卖，保质保量购”，各地把养蜂业的发展纳入到农业工作的日程中来。

四、南疆各地发展养蜂生产的主要措施建议

南疆地区养蜂生产不仅给蜂农带来蜂产品、授粉等收入，而且促进了当地经济发展，经过走访，我们给出以下地区发展养蜂业主要建议措施是：

4.1.喀什莎车县由于巴旦姆花期早，需要大量的授粉昆虫才可以保证其挂果率，因此对授粉蜂群的需求量较大，2015年本地授粉蜂群喂3万箱和外地授粉蜂群4万群（合计达到7万群），由于巴旦姆进入盛果期，2016年预计授粉蜂群缺口为6万群，如何保证巴旦姆增产，加强养蜂生产是关键，因此我们政府：一是要采用“内培外引”的办法，一方面通过政策扶持引导、技术培训等措施加强本地蜂农的饲养水平和提高蜂群的饲养量。另一方面采取更加优惠人性化的政策吸引外地蜂群给巴旦姆授粉；二是积极争取国家自治区有关项目来支撑本地蜂业发展；三是利用产业结构调整的有力时机，大量种植能给果农、蜂农带来经济效益好的蜜源环境；四是吸引本地贫困、富裕人员参加养蜂生产，积极引导他们争取申请当地的创业小额担保贷款来创业。

4.2.和田墨玉县 一是该县养蜂生产并没有引起当地政府的高度重视，在农民增收空间有限的情况下，也没有将养蜂业列入工作日程，因此我们建议当地政府要将养蜂工作纳入农业工作整体来考虑；二是加强养蜂业对农牧业增产的宣传工作，为养蜂业创造好的社会舆论环境；三是采取请专家学者和经验丰富的蜂农授课，加强养蜂关键技术的培训工作，以解决当地维吾尔族蜂农蜂群群势弱采集力差、蜂群无法越冬的技术瓶颈；三是着力解决维文养蜂资料极为匮乏的问题；四是以养蜂效益好的蜂场为示范点通过大力宣传，鼓励一批维吾尔族贫困人员或富裕劳动力从事养蜂生产。

4.3.阿克苏地区 当前蜜蜂为林果授粉在当地已有商业化趋势，但仍处于不成熟阶段，蜜蜂授粉对作物的增产作用没有引起相关部门的足够重视，因此我们建议：一是大力宣传过蜜蜂授粉对农作物、林果增产作用，创造好的社会舆论环境；二是当地政府要将农业和蜂业工作齐抓共管让蜜蜂授粉真正成为当地农艺增产措施之一。三是加强对果农、蜂农的培训工作，尤其是阿克苏地区的蜜蜂对林果授粉的培训，发展壮大当地的林果产业。四是大力培育蜂业龙头企业，带动蜂农增收的同时也可带动富裕劳动力加入到养蜂队伍中来。

4.4.巴州地区 一是当地政府要高度重视养蜂业的发展，要解放思想、提高认识，加强领导；二是积极宣传与实践蜜蜂对当地林果授粉的生态作用，摆正蜜蜂授

粉在农业中的地位；三是注重选拔奖励卓有成就的优秀蜂农，树立学习榜样鼓励带动富裕劳动力加入养蜂队伍；四是培育龙头企业和名牌产品，增强竞争意识，鼓励蜂产品走向全国。

利用小鼠 PTSD 動物模式探討台灣綠蜂膠抗焦慮之 效果及 CRMP1 基因影響恐懼記憶之固化

吳學府¹ 余思賢² 陳怡伶³

¹國立宜蘭大學 生物技術與動物科學系

²國立宜蘭大學 休閒產業與健康促進學系

³國立宜蘭大學 生物技術與動物科學系

摘要

焦慮是一種模糊、不舒服、籠罩全身的掛慮感受，常伴隨著頭痛、出汗、心悸、胸悶、胃痛，以及坐立不安的狀況。適度的焦慮是生物體對於環境反應的自我保護，但當過度焦慮時往往造成許多負擔。面對現今社會壓力及外在因素，精神疾病逐漸成為全球性疾病負擔 (Global burden of Disease) 前十名，根據衛生署統計台灣在精神科看診的病人中，就有三分之一是屬於焦慮性精神官能症 (Anxiety Disorders)，其盛行率約有 10%。本篇研究目的是藉由植物萃取物和基因剔除鼠各別探討和焦慮之關聯性。蜂膠，早在三千多年前就有人類將之作為天然醫療用的記載，近年來的研究證實蜂膠具有抗氧化、抗腫瘤、抗發炎以及保肝的功能。本實驗所使用的是台灣綠蜂膠 (Taiwanese green propolis) 富含許多類黃酮成分，目前已知具有神經保護以及抗癌之功效，然而目前對於抗焦慮效果仍然未知，因此本篇研究給予小鼠台灣綠蜂膠評估其抗焦慮之效果。結果顯示隨著台灣綠蜂膠萃取物濃度提高 (<10 mg/kg)，小鼠於行為實驗中有顯著的減緩焦慮，並能降低血清中的 MDA (malondialdehyde) 和 Cortisol 的含量。分子機制也以微陣列分析尋找生物標記，並以西方墨點法分析其路徑。在基因剔除鼠研究中 CRMP1 (Collapsing response mediator protein-1) 為神經發育一重要蛋白質，目前已知會影響小鼠大腦發育及認知功能，並在基因剔除小鼠 *CRMP1* KO (*CRMP1* knock-out) 小鼠中呈現憂鬱現象，然而是否會影響小鼠焦慮仍然未知，因此我們利用剔除基因小鼠 *CRMP1* KO 小鼠探討是否可能為焦慮易感基因。在行為分析中 *CRMP1* KO 小鼠與野生型小鼠並沒有顯著差異，因此 CRMP1 可能不影響焦慮的發生。我們更進一步以恐懼制約 (fear conditioning) 方式誘導小鼠產生恐懼記憶以判定 CRMP1 在記憶形成過程中所影響之時機點。恐懼制約為研究恐懼記憶中最高為廣泛之動物模式，並可以於制約後的時間點判定記憶之過程，以制約後 2 到 4 小時認為短期記憶 (Short term memory, STM)，之後則判定為長期記憶 (Long term memory, LTM)，而恐懼記憶的形成仰賴著海馬迴的功能。實驗結果發現制約後的 *CRMP1* KO 小鼠在短期記憶中明顯低於正常小鼠，而在長期記憶中則沒有顯著差異，因此我們可以知道 CRMP1 影響短期記憶的發生。此外我們以不同時間點進行小鼠海馬迴之收樣，在機制之探討，以西方墨點法分析小鼠海馬迴組織發現當恐懼記憶形成後會調控下游之 Fyn 路徑，並活化 NR2B (N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B) 和 PSD95 (Postsynaptic density protein 95) 以影響記憶之形成但 *CRMP1* KO 小鼠其 Fyn 及上游蛋白質明顯受到抑制，並且也減少了 NR2B 之活化。此外利用免疫沉澱進行蛋白質交互作用分析發現 CRMP1 本身會和思

覺失調症相關基因 TRIOBP (TRIO binding protein) 結合，因此依上述實驗我們證實了 CRMP1 在記憶中所扮演之角色及調控之路徑，並提供可能的思覺失調症之生物標記。

關鍵字：台灣綠蜂膠；CRMP1；Sema3A；潰縮；恐懼制約；恐懼記憶；短期記憶；長期記憶；海馬迴；思覺失調症

The Anxiolytic-like Effects of Taiwanese Green Propolis (TGP) By PTSD Animal Model And CRMP1 Regulates Consolidation Of Contextual Fear Memory

Hsueh-Fu Wu¹ Szu-Haien Yu² Yi-Lin Chen³

¹ Department of Biotechnology and Animal science, National Ilan University

² Department of Leisure Industry and Health Promotion, National Ilan University

³ Department of Biotechnology and Animal science, National Ilan University

Abstract

Anxiety “is characterized by a diffuse, unpleasant, vague sense of apprehension, often accompanied by autonomic symptoms, such as headache, perspiration, palpitations, tightness in the chest, and mild stomach discomfort”. Moderate anxiety helps the individual focus of attention for learning, solving problems and protect themselves, but reach the highest level it will be a problem. Face to social stress and life stress, psychiatric disease is the top ten of Global burden of Disease, in Taiwan, there have more one-third of people belong anxiety disease of psychiatric disease, and it’s in approximately 10% prevalence in Taiwan. The aim of this study was to evaluate the effect of Taiwanese Green Propolis on anxiolytic and relation of anxiety with CRMP1 (Collapsing response mediator protein-1). Propolis is a complex mixture of which the main bioactive compound is polyphenolic. Several studies show that propolis has antibacterial, antiviral, antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activity. Prenylflavonones is main bioactive of Taiwanese green propolis, but whether it have the effect of anxiolytic. In this study, we use Taiwanese green propolis to investigate the effect of anxiolytic. The result showed that Taiwanese green propolis (< 10 mg/kg) increase central locomotion in the OF test and decrease the level of MDA and cortisol in mice serum. Furthermore, we still use microarray to investigate the marker of anxiety disease. In the other hand, CRMP1 mediates signals from several extracellular molecules that play essential roles in synapse formation and originally identified knock-out mice will more depressed than WT (wild-type), but it’s not about anxiety in our study. However, the roles of CRMP1 in the regulation of fear memory still unknown. Here we used fear conditioning (FC) animal model to investigate hippocampal memory processes, after training it could divide two phase, short term memory (1-4h) and long term memory (after 4h). In this study we found that *CRMP1* KO (*CRMP1* knock-out) mice exhibited impaired STM (short term memory) consolidation after Fear condition training. And more, we evidence that CRMP1 is involve in Reelin signaling, which regulate Fyn downstream pathway and influence the activity of NR2B (N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B) and PSD95 (Postsynaptic density protein 95), but it were not found in knock-out mice. This finding reveal that CRMP1 is importer in memory formation and consolidation. The last, we use Immunoprecipitation to investigate the protein-protein interaction, we found CRMP1 will interaction with TRIOBP (TRIO binding protein), which is a marker of schizophrenia. In above of our study provide a possible mechanism in fear memory consolidation and probably a biomarker of schizophrenia.

Keywords : CRMP1 ; collapse ; fear conditioning ; fear memory ; short term memory ; long term memory ; schizophrenia

前言

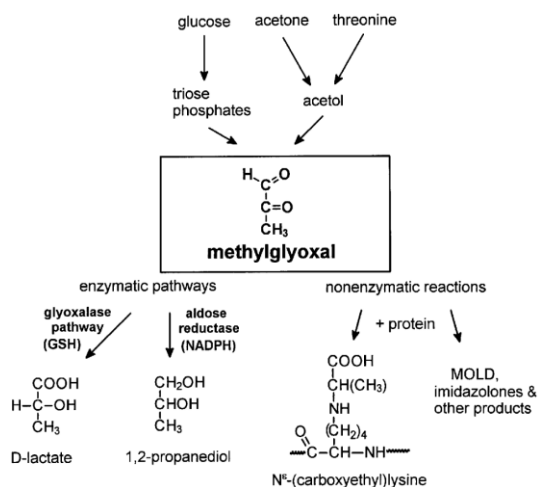
第一節 焦慮與蜂膠抗焦慮研究

1.1 本節概要

焦慮是一種模糊、不舒服、籠罩全身的掛慮感受，常伴隨著頭痛、出汗、心悸、胸悶、胃痛，以及坐立不安的狀況¹。面對現今社會壓力及外在因素，精神疾病逐漸成為全球性疾病負擔 (Global burden of Disease) 前十名，而其中又以情緒障礙如憂鬱症、焦慮症為首，因此是否能藉由傳統草藥做為新藥開發是本節實驗目的。

1.2 焦慮與氧化壓力

正常情況下生物體內會透過適當的機制維持氧化還原的平衡，但是一旦體內自由基的數量超出人體天然防禦的範圍，將造成氧化壓力，促使蛋白質、碳水化合物、脂肪、核酸等構成細胞物質的氧化，造成過氧化脂質的堆積，進而破壞體內的細胞膜、蛋白質及核酸等²，並且氧化壓力是許多退化性疾病的根源³，在動物實驗中也發現飲食缺乏維生素E的小鼠明顯增加焦慮行為，並增加氧化壓力指標^{4,5}，而在氧化代謝酵素中乙二醛 (glyoxalase 1, GLO1) 會和麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 將高毒性的甲基乙二醛 (methylglyoxal, MG) 代謝成無毒的物質⁶，如附圖一；然而因為甲基乙二醛會活化 γ -Aminobutyric acid type A (GABAA) receptors，因此研究發現過表現乙二醛會因為代謝甲基乙二醛而減少 GABAA receptors 活化使小鼠產生焦慮現象^{3,7}，此結果也顯示 GABAA receptors 可能也參與焦慮的調控，並且需要更深入探討抗氧化壓力酵素和焦慮的平衡性。此外在動物實驗或是臨床實驗也證實氧化壓力和焦慮有所關聯³，如附表一，但目前氧化壓力影響焦慮的確切機制仍然不清楚。



附圖一、甲基乙二醛之代謝與來源 (Hassan *et al.*, 2014)

124 *Career Neuropharmacology*, 2014, Vol. 12, No. 2 Hassan *et al.*

Table 1. Evidence of Involvement of Oxidative Stress in Anxiety-related Disorders

S#	Paradigm	Species	Behavioral Profile	Biochemical Profile	References
1.	OF, EPM, Suc box	Mice	Anxiety	p66Shc gene deletion	Berry <i>et al.</i> , 2006
2.	OF	Mice	Anxiety	Plasma phytyltransfer protein (PLTP) effect on vitamin E transport	Dharmas <i>et al.</i> , 2005
3.	Light/dark test	Mice	Anxiety	Intracellular ROS in peripheral granulocytes	Bonnyed <i>et al.</i> , 2007
4.	Light/dark test, OF	Rats	Anxiety	Integrative vitamin A treatment	Obayiri <i>et al.</i> , 2006
5.	Light/dark test, OF	Rats	Anxiety	L-homocysteine (L-H)-sulfhydrylase (HSC)	Saito <i>et al.</i> , 2010a
6.	Light/dark test, OF	Rats	Anxiety	Urinary 8-isoprostanoic malondialdehyde (MDA) levels in the hippocampus and amygdala	Saito <i>et al.</i> , 2010b
7.	Light/dark test, OF	Rats	Anxiety	Protein synthesis of tyrosine and tryptophan in the frontal cortex	Stans <i>et al.</i> , 2007
8.	EPM, OF, Elevated board test	Mice	Anxiety		Masood <i>et al.</i> , 2008
9.	Light/dark test	Mice	Anxiety	ROS in peripheral blood lymphocytes, granulocytes, and monocytes	Rammal <i>et al.</i> , 2008
10.	DSM-IV criteria	Humans	Obsessive-compulsive disorder	Venous blood levels of GSH-Px, CAT, and MDA antioxidant enzymes	Katagiri <i>et al.</i> , 2002a
11.	DSM-IV criteria	Humans	Panic disorder	Levels of GSH-Px, SOD, CAT, and MDA antioxidant enzymes	Katagiri <i>et al.</i> , 2002b
12.	DSM-IV criteria	Humans	Anxiety	plasma catecholamines and ROS	Vasavatti <i>et al.</i> , 2006
13.	EPM	Rats	Anxiety	ROS and MDA in cortex, hippocampus, and cerebellum in High and Low Freezing animals	Hassan <i>et al.</i> , 2013
14.	Depression and alcohol use disorders	Animal models	Depression and alcohol use disorders	ROS levels	Hovatta <i>et al.</i> , 2010
15.	Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and prion disease	Humans	Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and prion disease	ROS and protein aggregation levels	Ghetti and Hider, 2005
16.	Major depression and bipolar disorder	Humans	Major depression and bipolar disorder	Gli3 mRNA in peripheral white blood cells	Fagnano <i>et al.</i> , 2006
17.	Depression	Humans	Depression	Copper levels	Sakami <i>et al.</i> , 2010
18.	Alzheimer's disease	Humans	Alzheimer's disease	Oxidized purine and pyrimidine bases in nuclear DNA damage	Gabbin <i>et al.</i> , 1998
19.	Aging	Humans and mice	Age-related impairment in learning and memory	ROS effects in LTP of hippocampal cells	Serrano and Khan, 2004
20.	Mild cognitive impairment	Humans	Mild cognitive impairment	4-Hydroxy-2-nonenal levels in the hippocampus and midline perirhinal lobules	Butterfield <i>et al.</i> , 2006
21.	Schizophrenia	Humans	Schizophrenia	Plasma levels of peroxyl and serum vitamin B6	Asai <i>et al.</i> , 2003

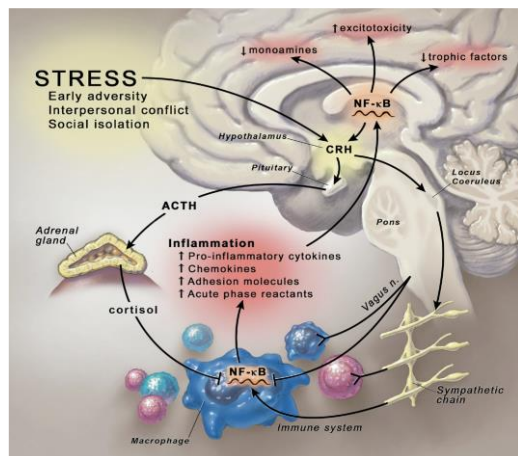
ROS: L-homocysteine (L-H)-sulfhydrylase; CAT: catalase; DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; Hb: hemoglobin; EPM: elevated plus maze; GSH-Px: glutathione peroxidase; LTP: long-term potentiation; MDA: malondialdehyde; OF: open field; PLTP: plasma phytyltransfer protein; ROS: reactive oxygen species; Suc box: sucrose box test; SOD: superoxide dismutase.

附表一、氧化壓力參與焦慮相關疾病之文獻 (Hassan *et al.*, 2014)

1.3 焦慮與發炎反應

氧化壓力和發炎反應是密不可分的相互關係，在正常情況下，生物體是有防禦機制對抗這些壓力，其中當外在壓力上升時，會促使大腦中下視丘釋放促腎上腺皮質激素釋放激素 (corticotropin-releasing hormone, CRH)，CRH 到了腦下垂體前葉促使促腎上腺皮質激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 釋放，到了腎上腺皮質進而促使糖皮質激素 (glucocorticoid)，主要是皮質醇

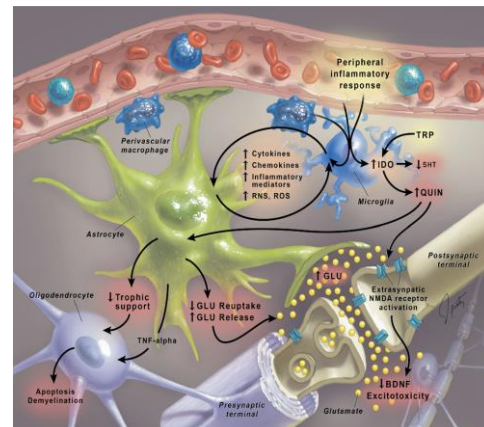
(cortisol) 釋放。因此當壓力上昇時，cortisol 含量會增加傳導壓力的線路⁸如附圖二，而在這過程中也會釋放大量的細胞激素。



附圖二、壓力與細胞激素於神經生理之作用機制 (Miller *et al.*, 2009)

細胞激素是免疫反應中負責傳遞細胞間訊息的一群小分子，成份是蛋白質、胜肽或是醣蛋白 (glycoproteins)，其主要是因輔助性 T 細胞 (T helper cell, Th) 受到刺激時被釋放出來的，功能為幫助細胞間傳遞訊息，而在免疫系統中，細胞激素會促進淋巴球增生、吸引嗜中性球往受傷處移動、活化免疫細胞及抑制腫瘤生成等，而不同的細胞激素會有不同的生理功能；因此，常見的細胞激素包括有腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、介白素-1 (interleukin-1, IL-1) 及介白素-6 (interleukin-6, IL-6) 等。在腦中，發炎反應的形成主要有兩種類型的膠質細胞參與，即微小膠細胞 (microglia) 與星狀膠細胞 (astrocyte)^{9,10}。於正常生理狀況下，腦中的免疫細胞，即微小膠細胞，扮演著監控與防禦的角色；而星狀膠細胞的功能在於維持離子恆定、緩衝神經傳遞物質的作用，以及釋放神經生長因子。然而，為了調控免疫刺激與外來傷害，膠質細胞非常容易活化，活化後的星狀膠細胞會釋放一些滋養因子以增加神經細胞的存活，而活化後的微膠細胞會產生多種發炎因子與神經毒素，如 TNF- α 與 IL-1 β 、脂肪酸代謝物如類花生酸 (eicosanoids) 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 與活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) 如 H₂O₂¹¹，這

些物質的產生與釋放構成先天免疫的一部份，以便抵禦並破壞外來侵犯的病原及恆定腦中的壓力平衡^{12,13}，但同時過度活化這些發炎激素時會增加腦中 IDO (indoleamine 2,3 dioxygenase) 含量並將血清素分解，最終抑制神經傳遞物質運輸及回收，並減少神經滋養因子的釋放，如附圖三。因此不少學者認為發炎激素是憂鬱症的主要病因^{8,14}。



附圖三、發炎反應與細胞激素於憂鬱症之分子機制 (Miller *et al.*, 2009)

此外，發炎激素在研究中也指出和焦慮症有關¹⁵，並在臨床上也發現患者的檢體中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 都明顯高於對照組^{16,17}。並給予抗焦慮藥物 SSRI 有降低患者 IL-6 的表現¹⁸。因此目前認為氧化壓力和細胞激素的交互作用是引發憂鬱、焦慮的根本。

1.4 蜂膠

蜂膠的來源是由蜜蜂在外採集植物之嫩芽或果皮外表的分泌物質，經由蜜蜂的唾液酵素混合著蜂蠟而成，呈現膠狀黏性¹⁹。蜂膠的成分複雜，其主要成分會因為產地或是季節的變化而有所不同，根據 Bankova 博士的分類，他將全世界的蜂膠分為五大類，分別為楊樹屬 (*populus nigra*) 蜂膠、樺樹蜂膠、巴西綠蜂膠、紅色蜂膠以及太平洋蜂膠，主要活性成分是以生物類黃酮或多酚類化合物為主^{20,21}，其中五類之一的太平洋蜂膠其膠源為血桐 (*Macaranga tanarius*) 的果實外皮分泌物，蜂膠產地分佈日本沖繩群島、台灣、菲律賓群島以及所羅門群島，其中主要產區在台灣。在台灣太平洋蜂膠或稱台灣蜂膠 (Taiwanese propolis, TP) 又區分為

TW-1, TW-2 與 TW-3 三種等級的蜂膠，等級越高，其蜂膠總酚含量也越高。而 TW-1 因其色澤呈翠綠色故將 TW-1 蜂膠通稱為臺灣綠蜂膠 (Taiwanese green propolis, TGP)。臺灣蜂膠目前分離出十種主要活性物質，並命名為蜂膠素 A-J (propolin A-J)。其中又以蜂膠素 C, D, F, G 及 H 含量占最多。目前已知蜂膠具有許多生物活性功能，例如抗癌^{22,23}、抗菌²⁴、抗病毒²⁵、抗發炎²⁶以及保肝²⁷等。

1.5 蜂膠抗焦慮之研究

臺灣綠蜂膠 (TGP) 經研究證其有效成分 propolins 具有抑制 HDACs (histone deacetylases) 活性，而 HDACs 將與記憶形成、抗癌等活性有關²⁸，此外 propolins 具有良好的神經滋養活性 (neurotrophic factor-like activity)。尤其以 propolins C, D, G, A, B 及 F 等活性優越；其中更以 propolin C 及 propolin G 活性最佳。但目前少以台灣綠蜂膠進行動物行為相關研究。而近年來研究發現其他地區蜂膠，如巴西蜂膠油萃物、韓國蜂膠酒精萃物，可能有減緩小鼠憂鬱及焦慮的功效^{29,30}，因此是否台灣綠蜂膠也有其減緩焦慮的功效仍需更進一步探討。

第二節 CRMP1 之相關研究

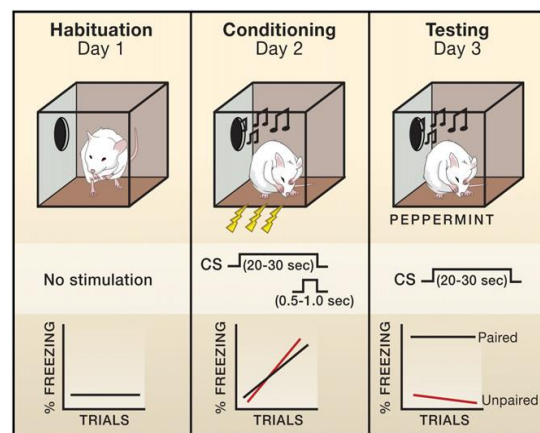
2.1 本節概要

本節主要針對研究背景做論述，主要包含了恐懼制約模式、恐懼記憶、突觸可塑性與記憶形成、CRMP-1 背景與記憶之研究、本實驗的背景和研究動機。

2.2 恐懼制約模式

恐懼制約 (fear conditioning) 是最被常用於研究恐懼記憶形成之路徑探討與焦慮的動物模式之一³¹，主要經由給予一個無傷害性的條件刺激 (conditional stimulation, CS)，例如燈光或聲音，隨後立即再給予一厭惡性的非條件刺激 (unconditional stimulation, US)，例如電擊。在經過幾次配對刺激後，再度給予小鼠條件刺激 (CS) 時，所誘發出動物表現出如靜止不動 (freezing)、驚嚇反射等反應，這種現象與記憶模式和長期的神經可塑性非常有關聯性^{32,33}，在配對中通常只需一次的

配對強度 (CS-US) 就足以使小鼠形成長期記憶³⁴。而在分析的結果中可以分為兩部份，一為 context freeze，將制約後的小鼠再度放回訓練箱，即使不給予任何 CS 刺激，小鼠仍然能自發性的感到恐懼而產生靜止不動、驚嚇反射的現象 (freezing)，而此為海馬迴所掌控³⁵，另一為 cue freeze，則是將制約後的小鼠放回另一完全不同的訓練箱，小鼠因對於此環境不會感到恐懼而有探索之行為，但給予 CS 刺激後小鼠呈現靜止不動、驚嚇反射等反應 (freezing)，此行為由杏仁核所影響³⁶⁻³⁸。其恐懼制約動物模式如附圖四。



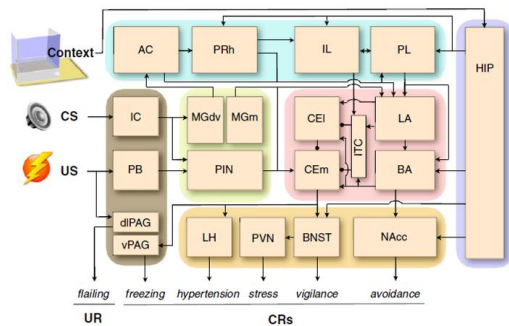
附圖四、恐懼制約動物模式 (Johansen *et al.*, 2011)

2.3 恐懼記憶與杏仁核及海馬迴

學習與記憶為生物體適應環境重要的關鍵，並且可以預測環境所造成之危害而有所適當的防禦反應³⁹，學習記憶有各種不同類型，恐懼記憶則為其中之一。然而在現代社會中，過度的恐懼可能造成生活中不必要的困擾，甚至可能引發焦慮症、憂鬱症等精神疾病，並且也有許多患者深受恐懼記憶之影響，例如 post-traumatic stress disorder (PTSD) 患者⁴⁰。因此，釐清恐懼記憶的形成與消除之機轉為當今重要之研究，同時，可以更進一步探討焦慮症之機制。

恐懼記憶中所牽涉腦區很多，主要分為杏仁核 (amygdala) 及海馬迴 (Hippocampus)，杏仁核位於大腦顯葉中的邊緣系統 (limbic system)，主要由 basolateral complex (BLA) 及 central nuclear group (CEA) 所組成，而 BLA 包含 lateral (LA) nuclei，

basolateral (BL) nuclei 及 basomedial (BM) nuclei 三個腦區，而 CEA 則包含 central nucleus medial (CEm) 及 central nucleus lateral (CEl) 兩個腦區^{39,41}。在杏仁核調控的路徑中以 BLA 先接受各種訊息並將訊息傳至 CEA，而 CEA 再投射到腦幹或下視丘產生各種調控恐懼的生理反應，例如靜止不動的行為 (freezing)、心跳加快、血壓上升、增加壓力荷爾蒙的釋放^{39,42-44}。另一方面，海馬迴所影響的為背景調控，將對於環境之訊息整合後傳至杏仁核中或直接傳至下視丘以調控生理反應^{39,45}，其訊息路徑如附圖五。因此海馬迴和杏仁核是整合恐懼記憶的關鍵腦區。



附圖五、恐懼記憶訊息路徑 (Maren *et al.*, 2011)

2.4 突觸可塑性與記憶形成

記憶形成過程中牽涉到大腦突觸可塑性 (synaptic plasticity) 的改變，其中長期突觸訊息 (synaptic transmission) 的增強，稱之長期增益現象 (long-term potentiation, LTP) 被認為是記憶形成的分子機制，且廣泛的受到研究⁴⁶。此外記憶過程中可以分成三階段: Encoding、Consolidation、Retrieval，又可以藉由時間點不同分為短期記憶 (short term memory, STM) 及長期記憶 (long term memory, LTM)⁴⁷⁻⁴⁹，短期記憶 (制約後 1 到 4 小時) 的形成需活化一些激酶 (kinase) 進而將訊息往下游傳遞，但形成長期記憶則需要產生新的蛋白質增強突觸傳訊作用^{50,51}。而目前已有許多文獻指出其長期記憶的相關分子機制及其迴路⁵²⁻⁵⁴，但 CRMP1 對於記憶形成所扮演的角色仍然未知。

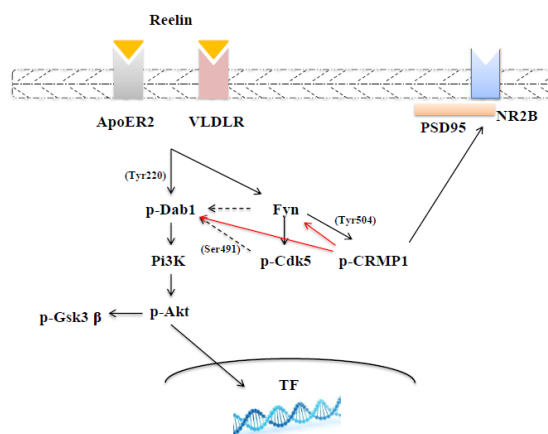
2.5 CRMP1 背景與記憶之研究

CRMP 最早於 1995 年在兩棲動物的卵母細胞中所分離出⁵⁵，而後陸續發現其相關次單位，可以分為 CRMP1-5。主要功能則是影響神經纖維的導向。CRMP1 專一的表現於所有中樞及週邊神經系統，其他的器官及組織幾乎沒有表現⁵⁶，以腦而言，CRMP1 表現於皮層、海馬迴和小腦，其中又以海馬迴表現量為最高，此外在脊髓和背角神經結也都偵測得到其表現。如果以表現的時間點來分析，CRMP1 在胚胎期第十五天開始大量表現，直至出生後一天達到最高點，出生後到成鼠表現量則下降到基礎表現量⁵⁶。

在分子路徑研究中 CRMP1 最早認為承接 *Sema 3A* 所傳遞的訊息促使神經軸突潰縮^{57,58}，也有研究證實 CRMP1 可以在 NT3 的刺激誘發神經軸突延展⁵⁹，但都以 *Sema3A* 路徑為主。當 *Sema3A* 活化後調節下游 Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) 表現而磷酸化 CRMP1/2，當 CRMP1/2 呈現磷酸化態時 Glycogen synthase kinase 3 beta (Gsk3 β) 才會進一步磷酸化 CRMP1/2 以調節神經細胞之潰縮現象^{60,61}。近年來更發現 Gsk3 β /Axin-1/ β -catenin 會承接 *Sema3A* 調控先形成一複合物再活化下游之 CRMP1 的表現。然而這些分子如 Gsk3 β ⁶²、Cdk5⁶³⁻⁶⁶及 β -catenin⁶⁷⁻⁶⁹。除了調控神經細胞導向外也分別影響生物體之正常生理功能，而在行為分析中也證實 *CRMP1*^{-/-} 小鼠不但影響海馬迴神經纖維生長之外在水迷津試驗中有顯著降低空間學習記憶，並於西方墨點分析中發現 *CRMP1*^{-/-} 小鼠腦中 NR2B、PSD95 及 Gap43 蛋白質表現量有明顯降低⁷⁰，但確切記憶之分子機制仍然未知。

除了 *Sema3A* 的調控，也有部分文獻指出 CRMP1 可能承接 *Reelin-Fyn* 路徑所調控^{71,72}。而 *Fyn* 為 *Src* 家族一員，是一種非受體酪氨酸激酶 (non-receptor tyrosine kinase)⁷³，*Src* 家族成員共同的結構特徵為: N 端的豆蔻酰化 (myristoylation)，SH2、SH3 結構和 C-端的激酶結構⁷⁴。*Src* 以其 SH2 結構與 PSD95 的 PDZ3 結構相結合，並在 PSD95 的作用下促使 NR2B 磷酸化以增強 NMDA 受體通道的功能，增加記憶的形成^{75,76}。另

一方面，先前文獻提出 CRMP1 和 Dab1 可能有共定位之現象⁷²，但 $Dab1^{-/-}$ ($Dab1$ knock-out) 小鼠雖會影響記憶形成但不影響 PSD95、NR2B 和 NR2A 的表現量⁷⁷，因此 CRMP1 可能不參與 $Dab1$ 的路徑調控，此外 Fyn 能磷酸化 CRMP1，而 $Dab1$ 和 Fyn 兩者又有相互作用，其可能之機制圖如附圖六。因此本實驗提出假說認為 CRMP1 有可能承接 Fyn 訊號和 $Dab1$ 交互作用，強化彼此下游路徑調控記憶的生成，附圖六之紅色線條為探討之目標。綜合上述所言，CRMP1 是否經由 Reelin-Fyn 及下游 PSD95 路徑調控恐懼記憶之形成以及和 $Dab1$ 的交互作用是值得探討的。

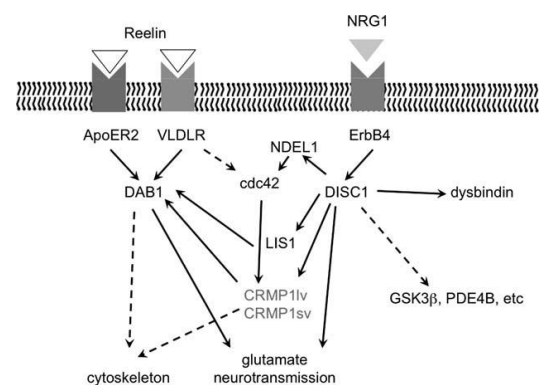


附圖六、CRMP1 可能參與 Reelin 路徑機制圖

2.6 CRMP1 與思覺失調症之研究

思覺失調症 (schizophrenia) 舊名為精神分裂症，是種高度遺傳性及受環境變因很大的精神疾病，而 $Disc1$ (disrupted-in-schizophrenia-1) 為目前思覺失調症最具代表性的標記基因，最早在蘇格蘭一家庭中發現此基因變異和許多精神疾病有關，又以思覺失調症最為顯著^{78,79}。近年來在臨床實驗中卻發現 $Disc1$ 於患者死後腦組織中和對照組相比並沒有顯著的表現⁸⁰，在周邊血液淋巴細胞中則有文獻指出沒有顯著差異⁸⁰，也有結果顯示 $Disc1$ 其表現量反而較低⁸¹。其差異原因仍需更進一步研究。此外，對於思覺失調症好發於青年的病灶也有學者針對腦中不可溶蛋白進行研究，發現 $Disc1$ 可能會形成一巨大的不可溶蛋白 (aggresome) 影響患者正

常生理功能，其中會和 CRMP1 及 TRIOBP 兩蛋白質結合，在患者死後腦組織染色分析中也發現 $Disc1$ 和 CRMP1 有共定位現象，而在患者周邊血液淋巴細胞及腦組織中也發現 CRMP1 表現量高於正常組別⁸⁰，因此這些結果都顯示 CRMP1 有較高機率為一臨床診斷指標，目前台灣也有研究團隊以 CRMP1 基因變異為標的，分析其在思覺失調症患者中的影響。此外，在分子機制中 CRMP1 和 $Disc1$ 都有參與記憶形成的調控，其可能之相關路徑如附圖七所示。然而，在參與生理功能時，蛋白質往往會彼此交互作用增強訊息傳遞或穩定其結構，因此本實驗提出假說認為這些於思覺失調症患者中發現的蛋白質聚集體 (aggresome) 可能因為參與生理過程而聚集，而非單純錯誤摺疊。



附圖七、CRMP1 及 $Disc1$ 可能之分子路徑 (Bader *et al.*, 2012)

材料與方法

一、 $CRMP1^{-/-}$ 小鼠取得

本實驗之實驗動物均由國立台灣大學醫學院實驗動物中心 蘇剛毅老師提供，其動物飼養及操作均於國立宜蘭大學動物中心進行，小鼠年齡為六至十週大，採 12/12 hr 光暗週期 (6:00 a.m 至 6:00 p.m.)，任動物自由進食及飲水。

二、蜂膠取得

台灣綠蜂膠萃取物由國立宜蘭大學生物技術與動物科學系 陳裕文老師實驗室提供。本文中台灣綠蜂膠原塊經磨碎均質後，以溶質比溶劑 = 1:5 的比例萃取台灣綠蜂膠，經超音波震盪 3 小時，常

溫靜置約一天，過濾後的萃取液經減壓濃縮後，乾物質以 DMSO 回溶至濃度 100 mg/ml 分裝置 -20 °C 保存。(圖九)

三、 實驗儀器

37°C 恆溫細胞培養箱 (CO₂ incubator): NUAIRE # NU5500, Plymouth, MN

震盪器 (Vortex Mixer): Velp Scientifica# WX, Bohemia, NY

離心機 (Centrifuge): Beckman coulter # AllegraTMX-12, Brea, CA

微量冷凍離心機 (Microcentrifuge): eppendorf # 5415 R, Hauppauge, NY

全波長微量盤分光光譜儀 (Microplate reader): Molecular Devices Corp# Spectramax M2, Sunnyvale, CA

迷你垂直電泳槽 (Mini-PROTEIN [®] Tetra Cell System): Bio-Rad Scientific# 165-8004EDU, Hercules, CA

電泳轉漬器 (Electrophoretic transfer cell): Bio-Rad Scientific # 170-3930, Hercules, CA
電源供應器 (Electrophoresis power supply): Bio-Rad Scientific# Power Pac[™] Basic, Hercules, CA

酸鹼測量器 (pH meter): JENCO ELECTRONICS# 6173, Grand Prairie, Texas

高壓滅菌器 (Autoclaver): CHIN KU # AS-1060L, Osaka, Japan

微量天秤 (Electronic balance): Sartorius # TE214S, Goettingen, Germany

冷光螢光影像分析儀 (Imaging System): GE Healthcare # Image Quant LAS 4000, UK

恐懼行為學習箱 (Fear Conditioning Chamber Package): Med Associates, St. Albans, VT

恐懼行為即時分析軟體 (FreezeScan Real-time Software): Clever Systems, Reston, VA

動物行為軌跡追蹤分析系統 (Ethovision XT): Noldus, Long Beach, CA

四、 實驗藥品試劑

2-Propanol: Sigma # SI-I9516-500ML, St. Louis, MO

10X TG - SDS buffer: Amresco # 0783-5L, Solon, OH

10X Trypsin-EDTA: GIBCO # 15400-100 ML, Grand Island, NY

40% Acryl/Bis 37.5:1 solution: Amresco# 0254-500ML, Solon, OH

Ammonium persulfate: Sigma# SI-A9164-100G, St. Louis, MO

Bovine serum albumin: Sigma# A3803-10G, St. Louis, MO

Dimethyl sulfoxide: Sigma# RD-34943-1L, St. Louis, MO

Immobiln[™] Western: Millipore# WBKLS0500-500ML, Billerica, MA

Lysis buffer: intron# 17081.1-100ML, Kyungki-Do, Korea

Methanol: Sigma# RD-3016-22, St. Louis, MO

Octyl Phenol Ethoxylate (Triton X100): J. T. Baker# X198-07-500ML, Center Valley, PA

Potassium chloride: Sigma# SI-P5405-500G, St. Louis, MO

Potassium phosphate monobasic: Sigma# SI-P5655-100G, St. Louis, MO

Protein 5X assay dye: Bio-Rad# 500-0006-500ML, Hercules, CA

PVDF: Bio-Rad# 162-0177, Hercules, CA

Sodium bicarbonate: Sigma# SI-S5916-1KG, St. Louis, MO

Sodium dodecyl sulfate: Amresco# 0227-500G, Solon, OH

Sodium phosphate dibasic: Sigma# 30427-250G, St. Louis, MO

TEMED: Amresco# 0716-25ML, Solon, OH

Tris: Amresco# 0826-1KG, Solon, OH

安佳脫脂奶粉 (non-fat milk)

五、 抗體

(一) 一級抗體：

Mouse anti β -actin : Sigma-Aldrich # 5441, St. Louis, MO

Mouse anti Dab1 : SANTA CRUZ# 271136, Dallas, TX

Mouse anti PSD95 : Abcam# 2723, Cambridge, UK

Rabbit anti Akt : Cell signaling# 9272, Danvers, MA

Rabbit anti CRMP1: Origene# TA306259, Rockville, MD

Rabbit anti Disc1 : Abcam# 192258, Cambridge, UK

Rabbit anti Fyn : SANTA CRUZ #16, Dallas, TX

Rabbit anti Gsk3 β : Abcam #32391, Cambridge, UK

Rabbit anti NR2B : GeneTex #109713, Irvine, CA

Rabbit anti p-Akt : Cell signaling #9271, Danvers, MA

Rabbit anti p-Dab1 : SANTA CRUZ#133292, Dallas, TX

Rabbit anti p-Gsk3 β : Cell signaling #9336, Danvers, MA

Rabbit anti Pi3k : Cell signaling #4255, Danvers, MA

Rabbit anti TRIOBP : Abcam # 151320, Cambridge, UK

(二) 二級抗體：

Anti-mouse IgG HRP-linked antibody : Sigma-Aldrich # A9044, St. Louis, MO

Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody : Sigma-Aldrich # A0545, St. Louis, MO

六、 蜂膠實驗流程

取 6 至 10 週大的雄性 C57BL/6 小鼠，分為 6 組，每組 8 隻進行實驗，分別為控制組、電擊組、蜂膠萃取物組 (2 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、200 mg/kg)。實驗前七天為蜂膠 pre-treatment，第七天灌食完進行 training session，第八天為 behavior test，每次進行實驗前均會將小鼠移至行為室以適應環境一小時再進行實驗。以下分別說明：

pre-treatment: 利用管灌方式餵食小鼠蜂膠，而正常組及電擊組則給予佐劑，於灌食後 3 小時將小鼠放置恐懼行為學習箱中適應 10 分鐘，之後放回飼養籠。持續 6 天。

Train session: 第七天灌食完 3 小時，利用一單一頻率之聲音 (conditioned stimulus, CS) 及足部電擊 (unconditioned stimulus, US) 的組合配對 (pair)，對小鼠進行訓練，每次訓練有 3 次配對，每次配對條件為給予持續 20sec 之單一頻率聲音 (2 kHz, 85 dB) 並於最後 1sec 時給予強度為 0.8 mA 的足部電擊，讓小鼠誘發焦慮的現象，之後放回飼養籠。而對照組則不給予電擊，但仍有進行上述其他之操作。

Behavior test: 受過訓練之小鼠進行曠野實驗 (Open field test) 以分析小鼠焦慮程度。流程圖為 (圖十)

七、 恐懼制約試驗 (Fear conditioning test)

取 6 至 10 週大的雄性 C57BL/6 *Wild-type* (WT) 小鼠及 *CRMP1*^{-/-} 小鼠進行恐懼學習與記憶實驗，本實驗分析小鼠 Freeze 行為以進行評估小鼠之恐懼記憶^{31,36}。而所使用的儀器為恐懼行為學習箱 (Med Associates, St Albans, VT)，而分析軟體為 FreezeScan Real-time Software (Clever Systems, Reston, VA)，一隻小鼠需經過 5 至 6 天的實驗過程，前四天為 match sessions，之後為 training session，最後為 behavior test，每次進行實驗前均會將小鼠移至行為室以適應環境一小時，在進行實驗，以下分別說明：

Match sessions: 將小鼠放入恐懼行為學習箱中適應 10 分鐘，之後放回飼養籠。持續 4 天。

Train session: 接下來的訓練過程是利用一單一頻率之聲音 (conditioned stimulus, CS) 及足部電擊 (unconditioned stimulus, US) 的組合配對 (pair)，對小鼠進行訓練，每次訓練有 3 次配對，每次配對條件為給予持續 20sec 之單一頻率聲音 (2 kHz, 85 dB) 並於最後 1sec 時給予強度為 0.8 mA 的足部電擊，讓小鼠對原本無意義的聲音產生強烈恐懼反應。而對照組則不給予電擊，但仍有進行上述其他之操作。

Behavior test: 因為先前文獻指出 *CRMP1*^{-/-} 小鼠於 cue freeze test 和野生型小鼠並無差異，因此只有分析 context freeze test。

制約後進行分析測試，觀察小鼠是否對恐懼箱產生恐懼反應，分為三個不同時間點，制約後 0、2 和 24 小時以評估小鼠產生的恐懼記憶。將制約後的小鼠放入恐懼學習箱中，不給予任何外在刺激 (CS)，單就小鼠靜止不動的行為 (freezing) 分析對於環境的恐懼記憶程度，每次分析時間為 3 分鐘。由以下公式換算成 freezing 百分比: (mice freezing time/total test time) x 100。

八、 曠野實驗 (Open field test)

實驗前將小鼠放置行為室一小時以適應環境，於實驗開始時將小鼠放置 Open field 中央 (20 × 20)，每一 Open field 為 (40 × 40 × 30 cm)。以軟體分析小鼠之移動軌跡、待在中央區時間、小鼠不動之時間，以判定小鼠焦慮程度。

九、 小鼠組織取得及切片

(一) 小鼠腦部灌流

小鼠灌流採用心臟全身性灌流 (cardiac perfusion)，先將小鼠以 2.5% Avertin (100% Avertin, 10 g 2,2,2-tribromoethyl alcohol in 10 ml tert-amyl alcohol) (SIGMA-ALDRICH, 麻州, 美國) 麻醉 (0.015 ml/g) 後，固定於灌流台上。小心以解剖用具剪開小鼠胸腔，使心臟裸露；將連接塑膠導管之 24G 靜脈留置針由左心室插入，並用動脈夾固定。開啟幫浦以 3 ml/min 速度灌流，同時以解剖剪刀於右心房剪開小洞以利灌流液循環全身。灌流分兩階段，以注射用生理食鹽水灌流十分鐘後更換為固定液 (15% picric acid, 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaldehyde in PBS) 繼續等速灌流十分鐘。成功的灌流可以小鼠肝臟血色明顯退去作為判斷標準。

(二) 小鼠腦組織固定及切片

將灌流完成之小鼠頭部剪下，將頭部以前之皮毛由頭頂中線對剪後往兩邊拉開露出顱骨，用剪刀將鼻骨和顱骨交界處剪開小洞後，以尖形手術鑷子由小洞邊緣小心將顱骨剝除至整個腦部呈現。小心將腦下方與脊髓連接處切除，取出整個腦部，以手術刀片將腦由中線切成左右兩半腦 (for sagittal section)，以固定液繼續固定隔夜。將固定好的腦脫完水以欲觀察的方位放置後用石臘包埋，利用石臘

切片機 (Leica RM2125, 德國) 切片 (8μm) 做後續實驗。

十、 西方墨點法 (Western blot)

(一) 小鼠海馬迴之蛋白質萃取

小鼠斷頸犧牲後迅速取出腦部，在解剖顯微鏡下將腦置於冰上並取出海馬迴 (hippocampus) 之部份。並以每 100 mg 之海馬迴重量加入 1 ml PRO-PREP™ (iNtron) Protein lysis buffer，在均質研磨器中磨碎至均勻液狀，全速離心 15 分鐘 (4°C) 後取出上清液定量備用。

(二) 樣品蛋白質濃度的定量分析

以 BSA (bovine serum albumin) 作為蛋白質含量標準，利用蛋白質測定劑 (Bio-Rad protein assay dye reagent) 與蛋白質結合後呈現藍色反應，以微量盤分光光譜儀在波長 595nm 下測其吸光值，計算出標準曲線換算出樣本中所含的蛋白質濃度。將濃度為 100 μg/ml 的 BSA 以二次蒸餾水將每管稀釋成 20 μg/ml, 40 μg/ml, 60 μg/ml 及 80 μg/ml，再將待測樣本各以二次蒸餾水稀釋 100 倍，之後將各管不同濃度的 BSA 溶液與稀釋過的樣本各取 50 μl 至 96 孔微量盤後，每個 well 再加入 200 μl 的蛋白質測定劑均勻混合，以微量盤分光光譜儀在波長 595 nm 下測其吸光值。

(三) 聚丙烯醯胺膠體電泳

依欲觀測蛋白分子量大小配製不同濃度 SDS-polyacrylamide gel 進行電泳分析。先將電壓調為 60 伏特，待樣品通過 stacking gel 後轉為 120 伏特，當染劑到達膠片底部時即可關閉電源，再將蛋白質轉漬至 PVDF 膜，條件為 300 毫安培 120 分鐘。

(四) 西方墨點分析法

PVDF 膜浸置於 blocking buffer (以 1X PBST 配製的 5% 脫脂奶或 BSA) 室溫下 1 小時或 overnight/4°C。之後加入一級抗體，置於室溫下緩慢搖晃作用 2 小時，再以 PBST 清洗 PVDF 膜 10 分鐘 3 次，加入二級抗體，使其在室溫下緩慢搖晃作用 1 小時之後，再用 PBST 清洗 10 分鐘 3 次，將 PVDF 膜與 HRP substrate 反應後，

以全自動冷光分析儀偵測反應強度。

十一、反轉錄酶-聚合酶鏈合反應 (RT-PCR)

(一) 取得小鼠海馬迴之 RNA

小鼠斷頸犧牲後迅速取出腦部，在解剖顯微鏡下將腦置於冰上並取出海馬迴 (hippocampus) 之部份。並以每 100 mg 之海馬迴重量加入 1 ml Trizol 將細胞團塊沖散並且混合均勻，之後室溫靜置 5 分鐘，接著加入 200 μ l 的 chloroform (相當於總體積的 1/5)，充分均勻，室溫靜置 3 分鐘後，再以 12,000 rpm 離心 15 分鐘，4 $^{\circ}$ C。小心吸取上層液至新的微量離心管，再加入等量體積的 chloroform (v/v = 1:1) 充分混勻後離心 12,000 rpm，4 $^{\circ}$ C 15 分鐘，重覆此步驟兩次，之後將上清液取至新的微量離心管，輕輕吸取上清液至新的微量離心管中，加入等量體積的異丙醇 (iosopropanol)，緩慢混勻後，置於冰上作用 5~10 分鐘。以 4 $^{\circ}$ C，12,000 g 離心 10 分鐘後並將廢液去除，此時 RNA 呈現膠狀或白色沉澱，再接著使用 0.5 ml 75% 酒精清洗團塊，於 4 $^{\circ}$ C，7,500 rpm 離心 5 分鐘，重覆此步驟兩次，抽掉所有上清液後待其適度乾燥，最後溶於 DEPC 處理過的滅菌水回溶 RNA。取少許回溶的 RNA 稀釋 100 倍後，以分光光度計偵測 OD 260/280 nm 波長，其比值應介於 1.6-2.0，並進行反轉錄作用以形成 cDNA，剩餘的 RNA 可儲存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

(二) 反轉錄酶反應 (Reverse Transcription)

本實驗使用 QIAGEN Omniscript RT-PCR kit 反應，實驗步驟如下：首先利用組織中抽取出的 2 μ g RNA 加入 RNase-free water 定量至 14 μ l，之後放入聚合酶鏈鎖反應儀中，設定 65 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘，反應結束後將樣本取出，再加入 2 μ l 的 10X reverse transcription buffer、2 μ l 的 5X Mixture、1 μ l 的 oligo (dT) primer、最後再加入 1 μ l 的 reverse transcriptase，混合均勻後放入聚合酶鏈鎖反應儀中，設定 37 $^{\circ}$ C 作用 60 分鐘，以進行反轉錄作用，使 mRNA 反轉錄為 cDNA。

十二、基因微陣列分析 (Microarray)

將抽好 RNA 之樣品委託台大基因體中心進

行基因微陣列實驗，取得之原始結果以線上軟體 MetaCoreTM 進行分析。

十三、免疫沉澱法 (Immunoprecipitation, IP)

將組織以 1 毫克添加 1 毫升的組織裂解液 (lysis buffer) 比例進行組織的裂解，再添加 IgG 和 A/G agarose 進行 Pre-cleaning 的步驟，經 4 $^{\circ}$ C 震盪一小時後取其上清液 500 μ g 濃度的蛋白質裂解液，加入 1 μ g 抗體於 4 $^{\circ}$ C 震盪一小時。在加入 protein A/G agarose 震盪 16~18 小時，離心取其上清液，在以 lysis buffer 清洗數次即可接續西方墨點法。

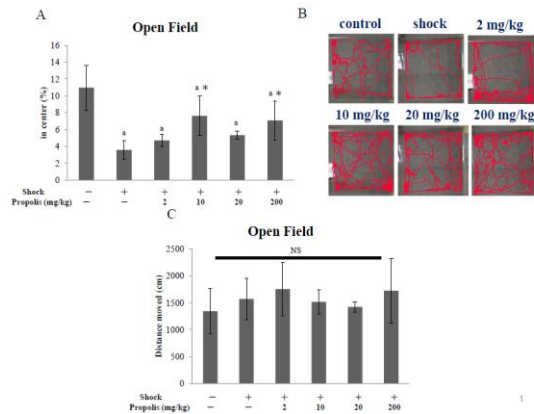
十四、統計分析

實驗結果以平均值標準差 (mean \pm SD) 顯示，使用 Student's two-tailed *t*-test 評估實驗組與對照組間差異，群組 (組間組內) 相比則使用 SAS 9.3 軟體進行 GLM (genera linear model) 及 one-way ANOVA (one-way analysis of variance) 分析

結果與討論

一、動物行為分析發現台灣綠蜂膠 (TGP) 於低濃度即可達到減緩小鼠焦慮之功效

利用灌食方式給予小鼠台灣綠蜂膠萃取物 (TGP) 連續 6 天後利用電擊誘導小鼠焦慮，再行為紀錄分析焦慮程度。圖一.(A) 結果顯示電擊足部傷害明顯誘導小鼠產生高度的焦慮程度，停留於中央區時間顯著降低，而預給予 TGP 濃度 2 mg/kg 以上組別均有顯著回復小鼠焦慮的效果。圖 1. (B) 行為軌跡圖顯示小鼠於電擊後明顯停留在 Open field 周圍，少以穿越中間區域，並於 TGP 濃度 2 mg/kg 以上組別均有明顯改善。圖一. (C) 則為分析其間小鼠行走總距離，顯示給予小鼠 TGP 及電擊傷害並不會影響小鼠行走功能。

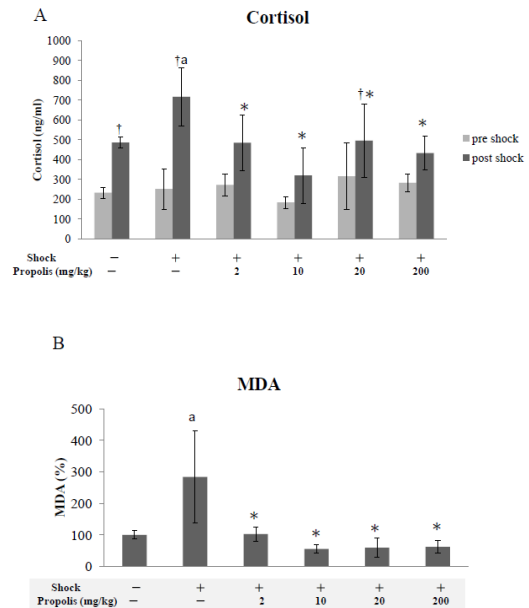


圖一、動物行為分析發現台灣綠蜂膠 (TGP) 於低濃度即可達到減緩小鼠焦慮之功效

(A) 電擊傷害組有降低小鼠於中央區停留時間，預給予 TGP 10 mg/kg 以上於小鼠其待在中央區時間有顯著提高 (B) 電擊傷害組小鼠軌跡幾乎在箱子周圍，預給予 TGP 10 mg/kg 以上於小鼠其穿越中央區軌跡有所提高 (C) 電擊或是 TGP 預處理均不影響小鼠行走功能。結果以平均值標準差 (mean ± SD) 顯示，使用 GLM 及 one-way ANOVA Duncan 分析。a: 和 control 比 $p < 0.05$; *: 和 shock 比 $p < 0.05$; NS: non-significant, 每組小鼠為 4 隻

二、台灣綠蜂膠 (TGP) 能降低壓力荷爾蒙 Cortisol 及脂質過氧化物 MDA 的表現

為了分析焦慮程度的生化指標，分別以整體實驗前和實驗結束後採取小鼠血清並偵測血清中 Cortisol 及 MDA。圖二。(A) 結果顯示在實驗前各組別小鼠血清中的 Cortisol 表現量均無顯著差異，在實驗前後組內相比，Control、Shock 和組別 20 mg/kg 雖有差異，因為生物體對壓力時 Cortisol 表現量會立即上升，其他組別則可能因為個體差異導致沒有統計差異，在實驗結束後則發現電擊傷害組別血清中的 Cortisol 則明顯高於控制組，預給予 TGP 2 mg/kg 組別以上均有明顯降低。圖二。(B) 則為分析血中 MDA，結果顯示電擊傷害組別其血中 MDA 表現量有顯著高於對照組，預給予 TGP 濃度 2 mg/kg 以上組別均有顯著降低小鼠血清中 MDA 的表現量。



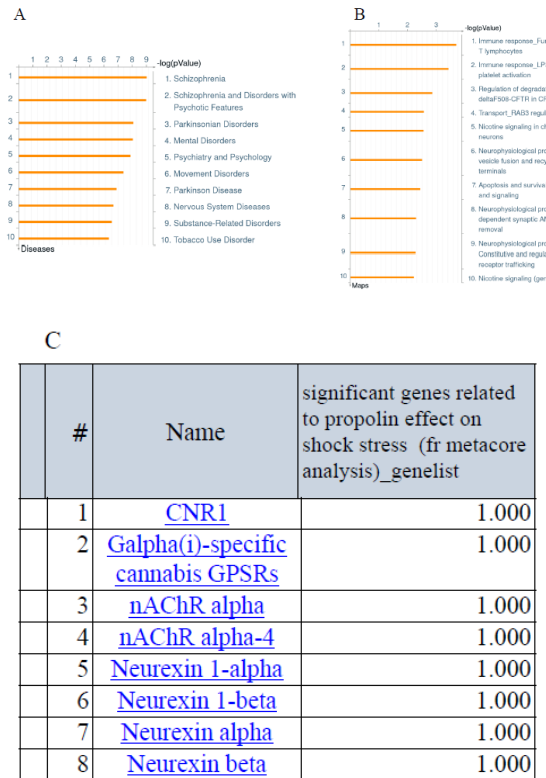
圖二、台灣綠蜂膠 (TGP) 降低壓力荷爾蒙 Cortisol 及脂質過氧化物 MDA 的表現

(A) 電擊傷害組和對照組相比有顯著提高血清中 Cortisol 的表現，預給予 TGP 預處理其血清中 Cortisol 的表現隨劑量依賴性而顯著降低 (B) 預給予 TGP 2 mg/kg 以上於小鼠和電擊傷害組相比其血清中 MDA 均有效降低。結果以平均值標準差 (mean ± SD) 顯示，使用 GLM 及 one-way ANOVA Duncan 分析。†: pre 和 post 組內差異比 $p < 0.05$; a: 和 control 比 $p < 0.05$; * 和 shock 比 $p < 0.05$

三、利用基因微陣列分析台灣綠蜂膠與焦慮症可能之生物標記

根據先前實驗結果發現 TGP 10 mg/kg 既有減緩小鼠焦慮之效果，並在血液生化指標中有顯著降低，因此此次實驗分別收擊對照組、電擊傷組及 TGP 10 mg/kg 組小鼠之半腦進行實驗，主要以電擊組和對照組相比有顯著差異，但在 TGP 處理有回復之基因為目標進行找尋，結果如表一。(A) 此為前 10 名與疾病高度相關之基因，發現以思覺失調症為最有相。表 1。(B) 則是藉由找尋到的基因進行分子路徑之比對，發現多為發炎及記憶之分子路徑。表一。(C) 則是和焦慮症有關聯之基因，此外我們將從這些基因、路徑、疾病三者交叉比對 Pubmed 線上期刊找尋最有機會之基因標的，結果發現

Cannabinoid receptor 1 (CNR1) 較為可能，此基因不但參與焦慮之調控，也有文獻探討和思覺失調症之關係，此外此家族 CNR1、CNR2 均有調控發炎反應之文獻。



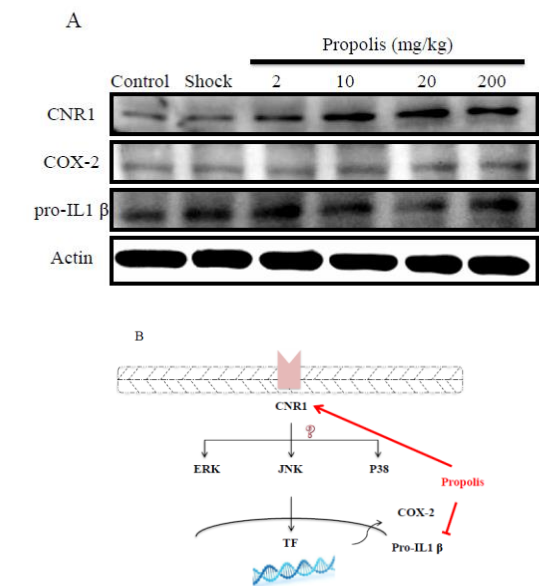
表一、利用基因微陣列分析台灣綠蜂膠與焦慮症可能之生物標記

(A) 微陣列分析出所有差異之基因和疾病的關聯性，前十名多為精神疾病 (B) 微陣列分析出所有差異之基因進行分子路徑之比較，其中前十名以發炎反應為主 (C) 和焦慮症有關聯之基因

四、利用西方墨點法驗證 CNR1 及其相關路徑於小鼠腦組織中的表現量

先前研究發現 CNR1 會活化 MAPK pathway 促進血清素受體 (serotonin receptor) 上升^{82,83}，但過度活化時會增加 MAPK pathway 下游 COX-2、IL-1β^{84,85} 的表現造成星狀細胞發炎進而影響記憶形成及焦慮，因此本實驗利用西方墨點法分析針 CNR1 及相關路徑的蛋白質表現量。結果顯示 TGP 有效提高 CNR1 並減少 pro-IL1β 的表現，但不影響 COX-2 的生成。圖三. (A) 因此結果可推測 TGP 藉由調控 CNR1 並減少下游發炎因子達到減緩焦

慮之效果。圖三. (B)

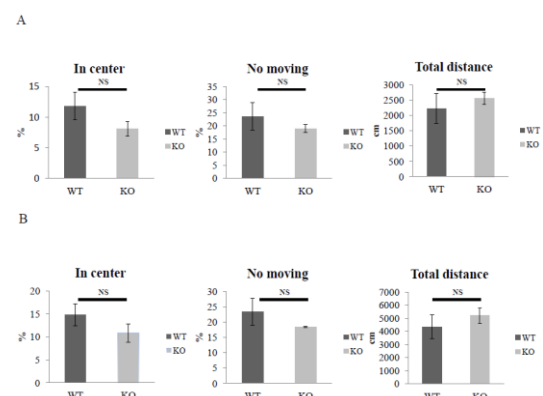


圖三、TGP 藉由上調 CNR1 並降低 pro-IL1β 達到減緩焦慮之效果

(A) 西方墨點法分析 TGP 上調 CNR1 並降低 pro-IL1β 的表現，但不影響 COX-2 的表現 (B) TGP 分子調控路線圖

五、CRMP1^{-/-} 小鼠於焦慮行為分析和野生型小鼠沒有顯著差異

在分析焦慮行為實驗，將小鼠直接放置 Open field 實驗中的白色壓克力箱中央分析 5 和 10 分鐘兩個時間點，評估 CRMP1 此基因剔除後是否自發性誘導小鼠焦慮的現象，圖四. (A) 為測試 5 分鐘，結果顯示不論在中央區停留時間、小鼠不動時間和行走的距離都沒有顯著差異，圖四. (B) 測試 10 分鐘，其結果也沒有顯著差異，因此本實驗說明 CRMP1^{-/-} 小鼠並不會自發性產生焦慮現象，且不影响其行走功能。

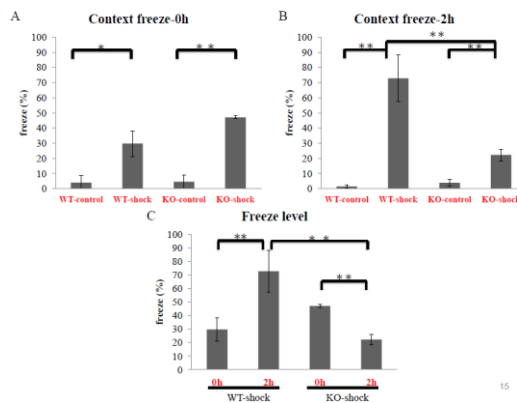


圖四、CRMP1^{-/-} 小鼠於焦慮行為分析和野生型小鼠沒有顯著差異

(A) 分析 5 分鐘 (B) 分析 10 分鐘，結果顯示 CRMP1 KO 小鼠和 WT 相比小鼠在中央區停留時間、不動時間和總行走距離均沒有差異。結果以平均值標準差 (mean±SD) 顯示，使用 Student's *t*-test 統計分析。NS: non-significant，每組小鼠為 4 隻

六、CRMP1^{-/-} 小鼠影響短期記憶而非環境資訊獲取及長期記憶

為了進一步分析 CRMP1 在記憶過程所扮演之角色，以恐懼調控方式做為探討模式，流程圖為 (圖十一)。將制約後之小鼠隨不同時間點利用行為分析小鼠 context freeze 以評估對於環境之恐懼記憶是否存在，圖五。(A) 結果發現制約後 0 小時野生型小鼠靜止不動 (freezing) 程度和 CRMP1^{-/-} 小鼠並沒有顯著差異，此說明缺少 CRMP1 基因之小鼠不影響資訊獲取，也不會因為聽力或是疼痛程度受損影響實驗結果。圖五。(B) 則為制約後 2 小時，結果發現 WT 小鼠靜止不動 (freezing) 程度明顯高於 CRMP1^{-/-} 小鼠，因此可知 CRMP1 顯著影響其短期記憶之形成，圖五。(C) 則為各時間點傷害組之分析圖。



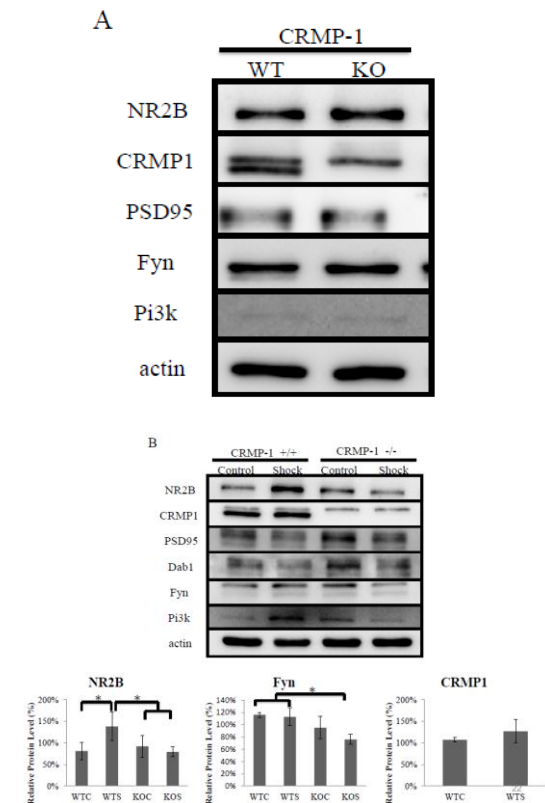
圖五、CRMP1^{-/-} 小鼠影響短期記憶而非環境資訊獲取

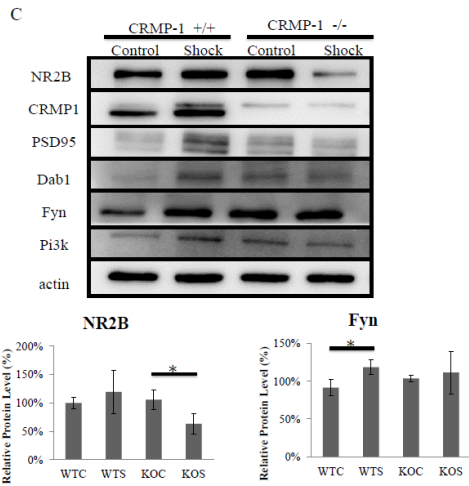
利用恐懼制約分析 CRMP1 KO 小鼠和 WT 小鼠其恐懼記憶程度，(A) 為制約 0 小時，結果顯示 CRMP1 KO 和 WT 小鼠均能誘發恐懼記憶 (B) 為制約 2 小時，結果顯示 CRMP1 KO 小鼠雖能誘

發恐懼記憶，但和 WT 相比顯著降低 (C) 為比較 KO 和 WT 傷害組程度。結果以平均值標準差 (mean±SD) 顯示，使用 GLM 及 one-way ANOVA Duncan 分析。**p*<0.05; ***p*<0.01; #*p*<0.001。每組小鼠為 4 隻

七、恐懼記憶形成過程中 CRMP1 調控 NR2B 之活化並參與 Fyn 之分子路徑

將制約後之小鼠隨各時間點立即犧牲並取其海馬迴，利用西方墨點法分析其中蛋白質表現量，圖六。(A) 先行比較這些蛋白質於 WT 和 KO 的差異，由結果發現原先 Fyn 路徑之蛋白沒有顯著改變。圖六。(B) 則為制約後 0 小時之樣品，結果發現 WT 小鼠制約後有提升 NR2B 的表現，並在 Fyn 中 CRMP1^{-/-} 小鼠顯著低於 WT 組別，圖六。(C) 為制約後 2 小時，結果發現 CRMP1^{-/-} 小鼠明顯的降低了 NR2B 之表現量，且無法提升 Fyn 之表現進而影響下游路徑的活化。





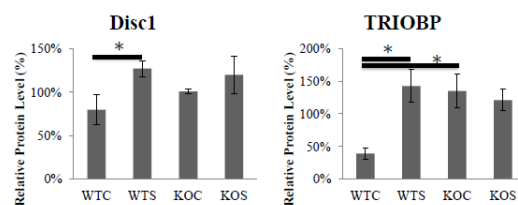
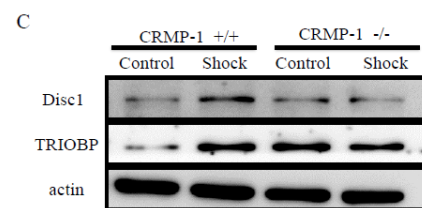
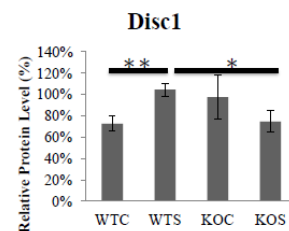
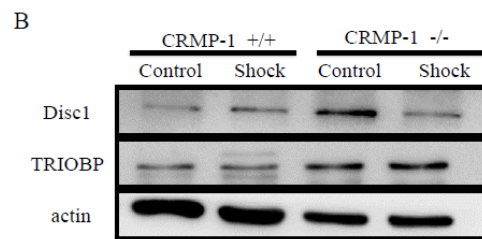
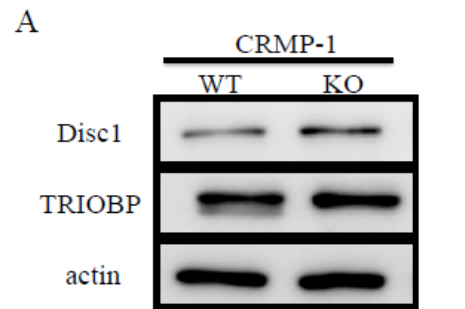
圖六、恐懼記憶形成過程中 CRMP1 調控 NR2B 之活化並參與 Fyn 之分子路徑

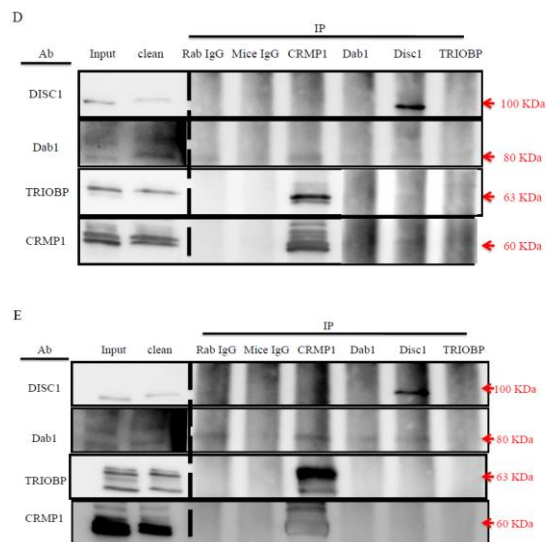
(A) 先行比較這些蛋白質於 WT 和 KO 小鼠海馬迴中的差異 (B) 則為制約後 0 小時，結果發現 WT 小鼠制約後有提升 NR2B 的表現，並在 Fyn 中 *CRMP1*^{-/-} 小鼠顯著低於 WT 組別 (C) 為制約後 2 小時，結果發現 *CRMP1*^{-/-} 小鼠明顯的降低了 NR2B 之表現量，且無法提升 Fyn 之表現。使用 GLM 及 one-way ANOVA Duncan 分析。**p* < 0.05; ***p* < 0.01; #*p* < 0.001。每 land 蛋白質濃度為 30ug，每張蛋白質分析實驗均三重複

八、CRMP1 會和 TRIOBP 結合而非 Disc1，並在參與恐懼記憶形成過程中會和 Dab1 相互結合

先前文獻指出 CRMP1、Disc1、TRIOBP 相互結合影響生物體正常生理功能，可能是導致思覺失調症發生之原因，因此本實驗利用免疫沉澱及西方墨點法分析這三者蛋白質的交互作用及是否參與恐懼記憶之形成。圖七.(A) 為分析此蛋白於 WT 和 KO 的差，結果顯示 *CRMP1*^{-/-} 小鼠其 Disc1、TRIOBP 和 WT 小鼠相比都有較高的表現，但沒有顯著差異，圖七.(B) 為制約後 0 小時的分析圖，結果顯示 WT 小鼠其電擊制約後 Disc1 有顯著高於對照組，且 *CRMP1*^{-/-} 小鼠電擊制約後無有效提高 Disc1 之表現，在 TRIOBP 中則均沒有顯著差異。圖七.(C) 則為制約後 2 小時，結果發現在 WT 小鼠中其 Disc1 和 TRIOBP 均有顯著上升，反之

在 *CRMP1*^{-/-} 小鼠則沒有變化，圖七.(D) 為 WT 小鼠海馬迴組織進行免疫沉澱，分析這些蛋白質是否本身就會聚集，結果顯示沒有進行任何實驗情況下 CRMP1 是會和 TRIOBP 結合，但不會和 Disc1 及 Dab1 作用。圖七.(E) 為制約後 2 小時 WT 小鼠海馬迴組織進行免疫沉澱分析，發現 CRMP1 仍然會和 TRIOBP 結合而非 Disc1，但在 Dab1 則似乎有結合的情況。





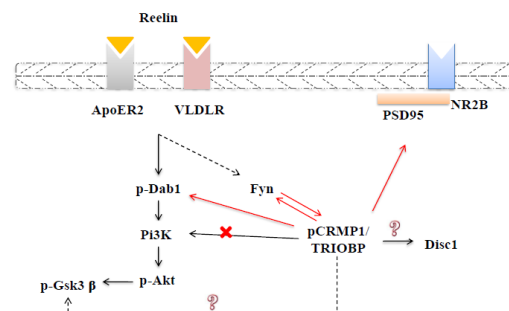
圖七、CRMP1 會和 TRIOBP 結合而非 Disc1，並在參與恐懼記憶形成過程中會和 Dab1 相互結合

(A) *CRMP1*^{-/-} 小鼠其 Disc1、TRIOBP 和 WT 小鼠相比於海馬迴中都有較高的表現，但沒有顯著差異 (B) 為制約後 0 小時，結果顯示 WT 小鼠其電擊制約後 Disc1 有顯著高於對照組，且 *CRMP1*^{-/-} 小鼠電擊制約後無有效提高 Disc1 之表現，在 TRIOBP 中則均沒有顯著差異 (C) 則為制約後 2 小時，結果發現在 WT 小鼠中其 Disc1 和 TRIOBP 均有顯著上升，反之在 *CRMP1*^{-/-} 小鼠則沒有變化 (D) 為 WT 小鼠海馬迴組織進行免疫沉澱，結果顯示 CRMP1 會和 TRIOBP 結合但不會和 Disc1 作用 (E) 為制約後 2 小時 WT 小鼠海馬迴組織進行免疫沉澱分析，發現 CRMP1 仍然會和 TRIOBP 結合而非 Disc1，但在 Dab1 則似乎有結合的情況。使用 GLM 及 one-way ANOVA Duncan 分析。**p* < 0.05; ***p* < 0.01; #*p* < 0.001。每 land 蛋白質濃度為 30ug，每張蛋白質分析實驗均三重複，免疫沉澱以 500ug 蛋白質濃度進行分析

九、本實驗驗證目前 CRMP1 可能之機制圖

綜合先前實驗結果 CRMP1 和 TRIOBP 結合，影響 Fyn 蛋白並強化 Dab1 之表現，但不參與 Pi3k 下游調控。此外可能影響生理機制包含記憶調

控、思覺失調症及情緒障礙如：憂鬱症 (圖八)。



圖八、CRMP1 機制圖

綜合本實驗結果提供 CRMP1 於海馬迴中影響之機制圖

參考文獻

- 1 Harold I. Kaplan, B. J. S. *Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences/ Clinical Psychiatry, 8th Edition.* (1998).
- 2 Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* **160**, 1-40, doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009 (2006).
- 3 Hassan, W., Silva, C. E., Mohammadzai, I. U., da Rocha, J. B. & J, L. F. Association of oxidative stress to the genesis of anxiety: implications for possible therapeutic interventions. *Current neuropharmacology* **12**, 120-139, doi:10.2174/1570159X11666131120232135 (2014).
- 4 Desrumaux, C. *et al.* Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency reduces brain vitamin E content and increases anxiety in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 296-297,

- doi:10.1096/fj.04-2400fje (2005).
- 5 Terada, Y., Okura, Y., Kikusui, T. & Takenaka, A. Dietary vitamin E deficiency increases anxiety-like behavior in juvenile and adult rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **75**, 1894-1899, doi:10.1271/bbb.110190 (2011).
- 6 Ahmed, M. U., Brinkmann Frye, E., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *The Biochemical journal* **324 (Pt 2)**, 565-570 (1997).
- 7 Distler, M. G. *et al.* Glyoxalase 1 increases anxiety by reducing GABAA receptor agonist methylglyoxal. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2306-2315, doi:10.1172/JCI61319 (2012).
- 8 Miller, A. H., Maletic, V. & Raison, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry* **65**, 732-741, doi:10.1016/j.biopsych.2008.11.029 (2009).
- 9 Kreutzberg, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* **19**, 312-318 (1996).
- 10 Aloisi, F. *et al.* Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *European journal of immunology* **29**, 2705-2714, doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<2705::AID-IMMU2705>3.0.CO;2-1 (1999).
- 11 Boje, K. M. & Arora, P. K. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain research* **587**, 250-256 (1992).
- 12 Zujovic, V., Benavides, J., Vige, X., Carter, C. & Taupin, V. Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* **29**, 305-315 (2000).
- 13 Eskes, C., Juillerat-Jeanneret, L., Leuba, G., Honegger, P. & Monnet-Tschudi, F. Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor-alpha release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin. *Journal of neuroscience research* **71**, 583-590, doi:10.1002/jnr.10508 (2003).
- 14 Baune, B. T. *et al.* Inflammatory biomarkers predict depressive, but not anxiety symptoms during aging: the prospective Sydney Memory and Aging Study. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 1521-1530, doi:10.1016/j.psyneuen.2012.02.006 (2012).
- 15 Wilson, C. B. *et al.* Inflammation and oxidative stress are elevated in the brain, blood, and adrenal glands during the progression of post-traumatic stress disorder in a predator exposure animal model. *PloS one* **8**, e76146, doi:10.1371/journal.pone.0076146 (2013).
- 16 Andrews, J. A. & Neises, K. D. Cells, biomarkers, and post-traumatic stress disorder: evidence for peripheral involvement in a central disease. *Journal of neurochemistry* **120**, 26-36, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07545.x (2012).
- 17 Zimmerman, G. *et al.* Post-traumatic anxiety associates with failure of the innate immune receptor TLR9 to evade the pro-

- inflammatory NFkappaB pathway. *Translational psychiatry* **2**, e78, doi:10.1038/tp.2012.4 (2012).
- 18 Jones, K. A. & Thomsen, C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Molecular and cellular neurosciences* **53**, 52-62, doi:10.1016/j.mcn.2012.10.002 (2013).
- 19 Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **36**, 347-363 (1998).
<v15n4a06.pdf>.
- 20 Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2**, 29-32, doi:10.1093/ecam/neh059 (2005).
- 21 Watanabe, M. A., Amarante, M. K., Conti, B. J. & Sforcin, J. M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **63**, 1378-1386, doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01331.x (2011).
- 22 Gribel, N. V. & Pashinskii, V. G. [The antitumor properties of honey]. *Voprosy onkologii* **36**, 704-709 (1990).
- 23 Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L. & Gismondo, M. R. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). *Journal of applied microbiology* **103**, 1914-1921, doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03421.x (2007).
- 24 Shimizu, T. *et al.* Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antiviral chemistry & chemotherapy* **19**, 7-13 (2008).
- 25 Bae, Y., Lee, S. & Kim, S. H. Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor-kappaB. *Toxicology and applied pharmacology* **254**, 56-64, doi:10.1016/j.taap.2011.04.008 (2011).
- 26 Chen, C. S. *et al.* NF-kappaB-activated tissue transglutaminase is involved in ethanol-induced hepatic injury and the possible role of propolis in preventing fibrogenesis. *Toxicology* **246**, 148-157, doi:10.1016/j.tox.2008.01.009 (2008).
- 27 Huang, W. J. *et al.* NBM-HD-3, a novel histone deacetylase inhibitor with anticancer activity through modulation of PTEN and AKT in brain cancer cells. *Journal of ethnopharmacology* **136**, 156-167, doi:10.1016/j.jep.2011.04.034 (2011).
- 28 Reis, J. S. *et al.* Antidepressant- and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **21**, 1466-1472, doi:10.1016/j.phymed.2014.06.001 (2014).
- 29 Lee, M. S. *et al.* Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* **2013**, 217853, doi:10.1155/2013/217853 (2013).
- 30 Anagnostaras, S. G. *et al.* Automated assessment of pavlovian conditioned freezing and shock reactivity in mice using the video freeze system. *Frontiers in*

- behavioral neuroscience* **4**, doi:10.3389/fnbeh.2010.00158 (2010).
- 32 Mao, S. C., Hsiao, Y. H. & Gean, P. W. Extinction training in conjunction with a partial agonist of the glycine site on the NMDA receptor erases memory trace. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 8892-8899, doi:10.1523/JNEUROSCI.0365-06.2006 (2006).
- 33 Berg, W. K. & Davis, M. Associative learning modifies startle reflexes at the lateral lemniscus. *Behavioral neuroscience* **99**, 191-199 (1985).
- 34 LeDoux, J. E. Emotion circuits in the brain. *Annual review of neuroscience* **23**, 155-184, doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.155 (2000).
- 35 Anagnostaras, S. G., Gale, G. D. & Fanselow, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* **11**, 8-17, doi:10.1002/1098-1063(2001)11:1<8::AID-HIPO1015>3.0.CO;2-7 (2001).
- 36 Yamashita, N. *et al.* Mice lacking collapsin response mediator protein 1 manifest hyperactivity, impaired learning and memory, and impaired prepulse inhibition. *Frontiers in behavioral neuroscience* **7**, 216, doi:10.3389/fnbeh.2013.00216 (2013).
- 37 Phillips, R. G. & LeDoux, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral neuroscience* **106**, 274-285 (1992).
- 38 Amorapanth, P., LeDoux, J. E. & Nader, K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nature neuroscience* **3**, 74-79, doi:10.1038/71145 (2000).
- 39 Maren, S. Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron* **70**, 830-845, doi:10.1016/j.neuron.2011.04.023 (2011).
- 40 Davis, L. L., Suris, A., Lambert, M. T., Heimberg, C. & Petty, F. Post-traumatic stress disorder and serotonin: new directions for research and treatment. *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN* **22**, 318-326 (1997).
- 41 Maren, S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends in neurosciences* **22**, 561-567 (1999).
- 42 Davis, M. Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* **9**, 382-402 (1997).
- 43 LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P. & Reis, D. J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **8**, 2517-2529 (1988).
- 44 Kapp, B. S., Supple, W. F., Jr. & Whalen, P. J. Effects of electrical stimulation of the amygdaloid central nucleus on neocortical arousal in the rabbit. *Behavioral neuroscience* **108**, 81-93 (1994).
- 45 Orsini, C. A. & Maren, S. Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **36**, 1773-1802, doi:10.1016/j.neubiorev.2011.12.014 (2012).
- 46 Salter, M. W. LTP gets culture. *Trends in neurosciences* **24**, 560-561 (2001).

- 47 Bourtchouladze, R. *et al.* Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning & memory* **5**, 365-374 (1998).
- 48 Suzuki, A. *et al.* Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* **144**, 810-823, doi:10.1016/j.cell.2011.02.018 (2011).
- 49 Gould, T. J. *et al.* Nicotine shifts the temporal activation of hippocampal protein kinase A and extracellular signal-regulated kinase 1/2 to enhance long-term, but not short-term, hippocampus-dependent memory. *Neurobiology of learning and memory* **109**, 151-159, doi:10.1016/j.nlm.2014.01.009 (2014).
- 50 Klann, E. & Sweatt, J. D. Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiology of learning and memory* **89**, 247-259, doi:10.1016/j.nlm.2007.08.009 (2008).
- 51 Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* **294**, 1030-1038, doi:10.1126/science.1067020 (2001).
- 52 Marek, R., Strobel, C., Bredy, T. W. & Sah, P. The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit. *The Journal of physiology* **591**, 2381-2391, doi:10.1113/jphysiol.2012.248575 (2013).
- 53 Johansen, J. P., Cain, C. K., Ostroff, L. E. & LeDoux, J. E. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* **147**, 509-524, doi:10.1016/j.cell.2011.10.009 (2011).
- 54 Mahan, A. L. & Ressler, K. J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends in neurosciences* **35**, 24-35, doi:10.1016/j.tins.2011.06.007 (2012).
- 55 Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P. & Strittmatter, S. M. Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* **376**, 509-514, doi:10.1038/376509a0 (1995).
- 56 Wang, L. H. & Strittmatter, S. M. A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 6197-6207 (1996).
- 57 Deo, R. C. *et al.* Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *The EMBO journal* **23**, 9-22, doi:10.1038/sj.emboj.7600021 (2004).
- 58 Charrier, E. *et al.* Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Molecular neurobiology* **28**, 51-64, doi:10.1385/MN:28:1:51 (2003).
- 59 Quach, T. T. *et al.* Involvement of collapsin response mediator proteins in the neurite extension induced by neurotrophins in dorsal root ganglion neurons. *Molecular and cellular neurosciences* **25**, 433-443, doi:10.1016/j.mcn.2003.11.006 (2004).
- 60 Uchida, Y. *et al.* Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **10**, 165-179, doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00827.x

- (2005).
- 61 Yamashita, N. *et al.* Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 12546-12554, doi:10.1523/JNEUROSCI.3463-07.2007 (2007).
- 62 Kimura, T. *et al.* GSK-3beta is required for memory reconsolidation in adult brain. *PLoS one* **3**, e3540, doi:10.1371/journal.pone.0003540 (2008).
- 63 Plattner, F. *et al.* Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B. *Neuron* **81**, 1070-1083, doi:10.1016/j.neuron.2014.01.022 (2014).
- 64 Sananbenesi, F. *et al.* A hippocampal Cdk5 pathway regulates extinction of contextual fear. *Nature neuroscience* **10**, 1012-1019, doi:10.1038/nn1943 (2007).
- 65 Guan, J. S. *et al.* Cdk5 is required for memory function and hippocampal plasticity via the cAMP signaling pathway. *PLoS one* **6**, e25735, doi:10.1371/journal.pone.0025735 (2011).
- 66 Morabito, M. A., Sheng, M. & Tsai, L. H. Cyclin-dependent kinase 5 phosphorylates the N-terminal domain of the postsynaptic density protein PSD-95 in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 865-876, doi:10.1523/JNEUROSCI.4582-03.2004 (2004).
- 67 Maguschak, K. A. & Ressler, K. J. Beta-catenin is required for memory consolidation. *Nature neuroscience* **11**, 1319-1326, doi:10.1038/nrn.2198 (2008).
- 68 Xu, N. *et al.* Hippocampal Wnt3a is Necessary and Sufficient for Contextual Fear Memory Acquisition and Consolidation. *Cerebral cortex*, doi:10.1093/cercor/bhu121 (2014).
- 69 Tan, Y., Yu, D., Busto, G. U., Wilson, C. & Davis, R. L. Wnt signaling is required for long-term memory formation. *Cell reports* **4**, 1082-1089, doi:10.1016/j.celrep.2013.08.007 (2013).
- 70 Su, K. Y. *et al.* Mice deficient in collapsin response mediator protein-1 exhibit impaired long-term potentiation and impaired spatial learning and memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 2513-2524, doi:10.1523/JNEUROSCI.4497-06.2007 (2007).
- 71 Buel, G. R., Rush, J. & Ballif, B. A. Fyn promotes phosphorylation of collapsin response mediator protein 1 at tyrosine 504, a novel, isoform-specific regulatory site. *Journal of cellular biochemistry* **111**, 20-28, doi:10.1002/jcb.22659 (2010).
- 72 Yamashita, N. *et al.* Collapsin response mediator protein 1 mediates reelin signaling in cortical neuronal migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 13357-13362, doi:10.1523/JNEUROSCI.4276-06.2006 (2006).
- 73 Salter, M. W. & Kalia, L. V. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nature reviews. Neuroscience* **5**, 317-328, doi:10.1038/nrn1368 (2004).
- 74 Hubbard, S. R. & Till, J. H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annual review of biochemistry* **69**, 373-398,

- doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.373
(2000).
- 75 Sala, C. & Sheng, M. The fyn art of N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 335-337 (1999).
- 76 Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., 2nd & Salter, M. W. NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosine kinase Src. *Science* **275**, 674-678 (1997).
- 77 Trotter, J. *et al.* Dab1 is required for synaptic plasticity and associative learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **33**, 15652-15668, doi:10.1523/JNEUROSCI.2010-13.2013 (2013).
- 78 Blackwood, D. H. *et al.* Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *American journal of human genetics* **69**, 428-433 (2001).
- 79 St Clair, D. *et al.* Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* **336**, 13-16 (1990).
- 80 Bader, V. *et al.* Proteomic, genomic and translational approaches identify CRMP1 for a role in schizophrenia and its underlying traits. *Human molecular genetics* **21**, 4406-4418, doi:10.1093/hmg/dd273 (2012).
- 81 Trossbach, S. V. *et al.* Peripheral DISC1 protein levels as a trait marker for schizophrenia and modulating effects of nicotine. *Behavioural brain research* **275**, 176-182, doi:10.1016/j.bbr.2014.08.064 (2014).
- 82 Franklin, J. M. & Carrasco, G. A. Cannabinoid receptor agonists upregulate and enhance serotonin 2A (5-HT_{2A}) receptor activity via ERK1/2 signaling. *Synapse* **67**, 145-159, doi:10.1002/syn.21626 (2013).
- 83 Franklin, J. M., Mathew, M. & Carrasco, G. A. Cannabinoid-induced upregulation of serotonin 2A receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus and anxiety-like behaviors in rats. *Neuroscience letters* **548**, 165-169, doi:10.1016/j.neulet.2013.05.039 (2013).
- 84 Hermanson, D. J. *et al.* Substrate-selective COX-2 inhibition decreases anxiety via endocannabinoid activation. *Nature neuroscience* **16**, 1291-1298, doi:10.1038/nn.3480 (2013).
- 85 Rossi, S. *et al.* Interleukin-1beta causes anxiety by interacting with the endocannabinoid system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 13896-13905, doi:10.1523/JNEUROSCI.1515-12.2012 (2012).
- 86 Wang, H. *et al.* Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: a new PTSD mouse model. *Neuroscience research* **73**, 142-152, doi:10.1016/j.neures.2012.03.003 (2012).
- 87 Pynoos, R. S., Ritzmann, R. F., Steinberg, A. M., Goenjian, A. & Prisecaru, I. A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational reminders. *Biological psychiatry* **39**, 129-134, doi:10.1016/0006-3223(95)00088-7 (1996).

- 88 Liberzon, I., Krstov, M. & Young, E. A. Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* **22**, 443-453 (1997).
- 89 Svizenska, I., Dubovy, P. & Sulcova, A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **90**, 501-511, doi:10.1016/j.pbb.2008.05.010 (2008).
- 90 Howlett, A. C., Blume, L. C. & Dalton, G. D. CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Current medicinal chemistry* **17**, 1382-1393 (2010).
- 91 Dono, L. M. & Currie, P. J. The cannabinoid receptor CB(1) inverse agonist AM251 potentiates the anxiogenic activity of urocortin I in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology* **62**, 192-199, doi:10.1016/j.neuropharm.2011.06.019 (2012).
- 92 Ujike, H. *et al.* CNR1, central cannabinoid receptor gene, associated with susceptibility to hebephrenic schizophrenia. *Molecular psychiatry* **7**, 515-518, doi:10.1038/sj.mp.4001029 (2002).

(已發表於宜蘭大學生物資源學刊)

台灣西洋蜜蜂種源品系調查

吳明城 呂庭萱 路光暉

國立中興大學昆蟲系

摘要

台灣地處亞熱帶交界處，孕育出眾多蜜源植物，一年四季皆有蜜源可供蜜蜂取食，以致養蜂事業在台灣很興盛。目前記錄顯示西洋蜜蜂最早於 1911 年引進台灣，隨後陸續又有多種西洋蜜蜂亞種引進，截至目前，推測台灣西洋蜂應屬於多種亞種的混合種。本研究乃針對台灣各地養蜂場(共 33 個)之西洋蜜蜂樣本(280 個)，利用粒腺體 DNA 之 cytochrome b (Cyt b)、cytochrome c oxidase subunit I (COI)、large subunit rRNA (Ls rRNA)和 intergenic tRNA^{leu}-COII region 基因片段搭配限制酶酵素進行蜜蜂種源品系分析。發現所採樣本中 87%是屬於 C 品系，而 13%的樣本是屬於 Z 品系。然而原本有引進的 A 與 M 品系則沒有在這次採樣中被偵測到。經由此研究可以確切知道現在台灣蜜蜂以 C 品系為主流，但 Z 品系族群相較於引進時的比例，有逐漸擴大之跡象。未來會更進一步進行品系間的雜交率分析，及各蜂群之生理反應特徵檢視，此資料將有利於未來針對台灣西洋蜂之保種與育種之工作。

關鍵字：西洋蜜蜂、粒線體 DNA、蜜蜂品系

(已投稿於 Saudi Journal of Biological Sciences)

一、台灣西洋蜂概況

台灣因氣候地理條件適宜而擁有 570 多種蜜源植物(An et al. 2004)，加上大面積種植之水果植株，如荔枝與龍眼樹，間接造就養蜂業的興盛。目前就官方統計，西元 2015 年台灣由職業蜂農所管理的蜂群數量有約 12 萬群，除了協助作物授粉外，亦生產 1 萬 2 千噸的蜂蜜與 430 噸的蜂王漿，其中蜂王漿產量更是居世界第二(Bogdanov 2015)。

西洋蜂於 1911 年被引入台灣飼養，隨後陸續引進多種亞種(表一)，如：*armeniaca*, *capensis*, *carnica*, *caucasica*, *cypria*, *ligustica* and *mellifera* 等，進行品種優化。不過 1997 年後，官方已停止從國外引入蜂種(An et al. 2004, Sung et al. 2006)，距今將近二十年間的閉鎖集團式選育，蜂農自行根據採蜜量與產漿量，分品系培育，因此台灣現在的西洋蜂種已被推測是各亞種間互相雜交後的混種。

表一、各西洋蜂亞種引進史(參考 Sun et al., 2006)。

Time	Imported subspecies of <i>A. mellifera</i>	Morphometric lineage	Mitochondrial lineage
1911	<i>A. m. ligustica</i> Spinola	C	C
	<i>A. m. carnica</i> Pollmann	C	C
	<i>A. m. caucasica</i> Gorbachev	O	C
	<i>A. m. cypria</i> Pollmann	C	C
	<i>A. m. armeniaca</i>	O	not available
	<i>A. m. ligustica</i>	C	C
	<i>A. m. ligustica</i>	C	C
	<i>A. m. mellifera</i>	M	M
	<i>A. m. ligustica</i>	C	C
	<i>A. m. ligustica</i>	C	C
1929-1945	<i>A. m. carnica</i>	C	C
	<i>A. m. cypria</i>	C	Z
	<i>A. mellifera</i>	not available	not available
	<i>A. mellifera</i>	not available	not available
	<i>A. mellifera</i>	not available	not available
	<i>A. m. caucasica</i> from Hawaii	O	C
	<i>A. m. ligustica</i> from Japan	C	C
1993	<i>A. m. ligustica</i> from China	C	C
	<i>A. m. carnica</i>	C	C
1997	<i>A. m. capensis</i> Escholtz	A	A

二、西洋蜂品系之分類

根據蜜蜂形態，全球已有 28 個西洋蜜蜂亞種被辨認，它們可以更進一步藉由地理起源而歸納成四個品系，分別為：非洲品系(Africa, A)、西北歐品系(Western Europe, M)、東南歐品系(South-Eastern Europe, C)和中東品系(Middle East, O)(Ruttner 1988, Engel 1999, Gupta 2014)。親源地理關係的研究發現形態特徵會因環境適應而有所改變，進而產生誤判品系的結果，也因此多種分子鑑定的方法被發展，以不同分子資訊為基礎，如：粒線體 DNA(mtDNA)、微衛星

(microsatellites) 和單核酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) (Meixner, Pinto et al. 2013)。粒線體 DNA 經限制酶酵素剪切後，不同片段大小或組成可代表不同品系，例如：粒線體 DNA 之 tRNA^{leu}-COII region 不同品系間有不同的 P element 與 Q element 嵌入數，因此粒線體 DNA 廣泛被利用來鑑定西洋蜜蜂品系(Garnery et al. 1992, Garnery et al. 1993)。

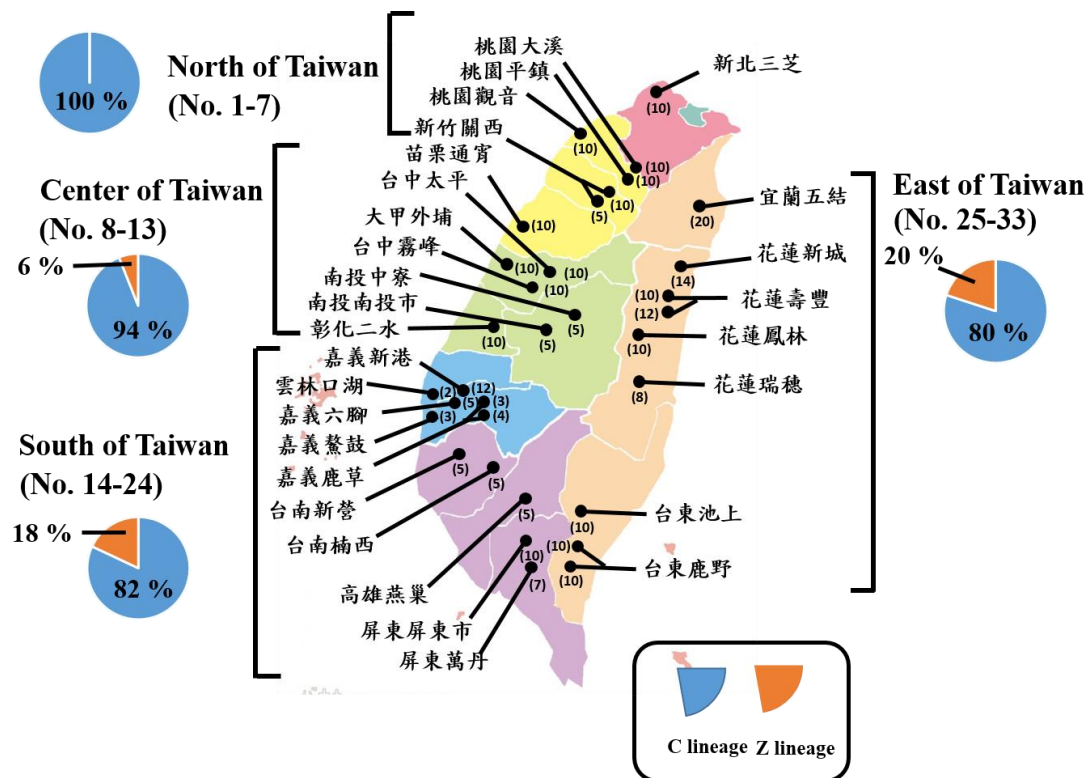
根據粒線體 DNA 資訊，西洋蜜蜂可以區分出五個品系(Meixner, Pinto et al. 2013)。其中粒線體品系 A、M 和 C，可以與根據形態區分的 A、M 和 C 品系吻合(Cornuet and Garnery 1991, Garnery et al. 1992)；不過根據形態分類的 O 品系，經粒線體分析，會分裂成兩群，C 與 Z 品系(Meixner et al. 2013)。最後，第五個粒線體品系是 Y 品系，分布於衣索比亞(Franck et al. 2001)。

三、台灣西洋蜂之品系調查

現在的蜜蜂生存受到多種因子的威脅，如：殺蟲劑、棲地的破壞、病原菌與寄生蜂等(Antunez et al. 2009, Rosenkranz et al. 2010, Sanchez-Bayo et al. 2016)。就如歐美國家發生的蜂群崩解症正迅速蔓延，去年美國共損失42%以上的蜂群(Stokstad 2007, van der Zee et al. 2012, Lee et al. 2015)。除此之外，蜜蜂基因的多樣性正因蜂農為了蜂產品的利益而減小，這也是導致蜜蜂弱勢的原因之一。鑒於台灣尚無蜂群崩解症發生，且該蜂種之蜂產品產量高，實有必要了解台灣西洋蜂的種源起始，因此本研究乃採集台灣各地的西洋蜜蜂樣本，並藉由分析粒線體四個基因，如：Cyt b、COI、Ls rRNA和intergenic tRNA^{leu}-COII之限制酶酵素剪切結果，辨認目前台灣有哪幾個西洋蜜蜂品系，與引進西洋蜜蜂資料交叉比對，建立此基本資料。

在2015年9月到2016年2月期間，280個蜂群樣本分別採自台灣北(7個養蜂場)、中(6個蜂場)、南(11個蜂場)和東(9個蜂場)部，共33個養蜂場(圖一)。四個粒線體DNA片段經限制酶酵素分析結果可發現280個樣本中，35個樣本是屬於Z品系，245個樣本是屬於C品系(詳細電泳圖可見於發表文章)。根據Ruttner的形態分類規則，引進台灣的西洋蜂亞種中，C品系佔70%，O品系佔18%，M品系

佔6%和A品系佔6% (Ruttner 1988)。如果是以粒線體DNA分類系統為規則，有些原本屬於O品系的亞種會合併到C品系中，以致引進之亞種中，C品系佔76%，Z品系佔6%，M品系佔6%和A品系佔6% (Meixner et al. 2013)。今年度共採的280個樣本中，粒線體C品系佔87.5% 而Z品系佔12.5%，其中C品系廣泛分佈全台各地，而Z品系則局部分佈於中部，大部分分佈於南與東部，且相較於引進的數量，是有擴張的趨勢(圖一)。



圖一、33個採樣地點與280個西洋蜂樣本中，西洋蜂品系C和Z於北、中、南和東部所佔的比例。

參考文獻

- An, J. K., Ho, K. K. and Chen, Y. W. 2004. Apiculture. Taipei National Institute for Compilation and Translation. 524 p.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P. and Higes, M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11, 2284-2290.
- Bogdanov, S. 2015. The Royal Jelly Book. Bee Product Science. 1-14.

-
- Cornuet, J. M. and Garnery, L. 1991. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*. 22, 627-642.
- Engel, M. S. 1999. The Taxonomy of Recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae; Apis). *J. Hymenopt. Res.* 8, 165-196.
- Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, B. P., Hepburn, H. R., Solignac, M. and Cornuet, J. M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 86, 420-430.
- Garnery, L., Cornuet, J. M. and Solignac, M. 1992. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1, 145-154.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G. and Cornuet, J. M. 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*. 49, 1016-1021.
- Gupta, R. K. 2014. Taxonomy and Distribution of Different Honeybee Species.
- Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Tarpy, D. R., Caron, D. M., Rose, R., Delaplane, K. S., Baylis, K., Lengerich, E. J., Pettis, J., Skinner, J. A., Wilkes, J. T., Sagili, R. and vanEngelsdorp, D. 2015. A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*. 46, 292-305.
- Meixner, M. D., Pinto, M. A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E. and Fuchs, S. 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52, 1-28.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 96-119.
- Ruttner, F. 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer, Berlin.
- Sanchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K. and Desneux, N. 2016. Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environ. Int.* 89, 7-11.
- Stokstad, E. 2007. The Case of the Empty Hives. *Science*. 316, 970-972.
- Sung, I.-H., Chiang, C.-H., Ho, K.-K. and Yamane, S. 2006. A Review on the History of Beekeeping in Taiwan and the Development of its Research Works (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Formos. Entomol.* 8, 129-147.
- van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Crailsheim, K., Dahle, B., Gajda, A., Gray, A., Drazic, M. M., Higes, M., Kauko, L., Kence, A., Kence, M., Kezic, N., Kiprijanovska, H., Kralj, J., Kristiansen, P., Martin Hernandez, R., Mutinelli, F., Nguyen, B. K., Otten, C., Özkırım, A., Pernal, S. F., Peterson, M., Ramsay, G., Santrac, V., Soroker, V., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wei, S. and Wilkins, S. 2012. Managed

honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *J. Apic. Res.* 51, 100-114.

蜂毒胜肽 Mastoparan-AF 對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株之抗菌效能

林峻賢 杜武俊

國立中興大學昆蟲學系

摘要

多重抗藥性鮑氏不動桿菌的出現已經成為臨床醫療上的重要問題，其已造成用藥選擇之困難。因此，急需開發新型抗菌藥劑或替代療法來對抗多重抗藥性鮑氏不動桿菌之感染。本研究的主要目的為探討自黃腰虎頭蜂毒液分離之兩性胜肽 MP-AF 對多重抗藥性鮑氏不動桿菌之影響。與臨床常用抗生素相較之下，MP-AF 對於七株鮑氏不動桿菌臨床分離株具有良好抗菌效能，最低抑菌濃度介於 4 到 8 $\mu\text{g/ml}$ 。抗菌藥劑合併試驗顯示 MP-AF 與特定抗生素，如 ciprofloxacin、trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)，對於某些多重抗藥性分離株可發揮協同抑菌作用。值得注意的是，與 MP-AF 合併使用，可以減少抗生素使用劑量，降低抗生素之副作用，進而提高藥物治療的安全性。第二，天然資材分離之抗菌胜肽 MP-AF 與化學合成之抗生素，可以降低抗生素對病原菌之選汰壓力，並減少抗藥性菌株之發生。由本試驗結果可知，MP-AF 單獨使用或與特定抗生素合併使用或許可成為對抗多重抗藥性鮑氏不動桿菌感染之替代方案。

關鍵詞：Mastoparan-AF、多重抗藥性鮑氏不動桿菌、抗菌活性

(本文已投稿於 Saudi journal of biological sciences)

近年來，在人類與動物疫病治療大量使用抗生素，使得細菌衍生出抗藥性的情況日趨嚴重，多重抗藥性鮑氏不動桿菌的出現已演變為全球性問題，在醫療端幾乎面臨無藥可用窘境，因此亟需開發新型態之抗菌製劑或發展有效之替代方案，而從昆蟲等自然資材分離出抗菌胜肽或是將不同抗菌作用機制之抗菌製劑合併使用或許可以解決目前所面臨的難題。虎頭蜂蜂毒為虎頭蜂用以抵禦外來入侵者的主要物質，其成分富含許多具有生物活性之分子，蜂毒胜肽(mastoparan, MP)為蜂毒內含量最多之小分子胜肽(Nakajima, 1984; Palma, 2006)，最初於1979年自黃胡蜂(*Vespula lewisii*)毒液中分離出來(Hirai et al., 1979)，由14個胺基酸組成，組成胺基酸包含2至4個陽電性lysine及7至10個疏水性胺基酸，且C端胺基酸具醯胺化修飾(Nakajima, 1984)。蜂毒胜肽於適當環境下會形成雙極性 α 螺旋構型(amphipathic α -helical conformation)(Lin et al., 2011)，此一結構特性使蜂毒胜肽具有抗菌活性，可藉由靜電作用力(electrostatic interaction)和細菌細胞膜陰電性部位作用，形成穿孔，進而造成細菌死亡(Brogden, 2005; Zasloff, 2002)。本實驗室先前研究發現MPs對於革蘭氏陽性菌和陰性菌可發揮廣效性抗菌效能，本試驗擬探討黃腰虎頭蜂之蜂毒胜肽MP-AF與不同抗菌作用機制之抗生素對多重抗藥性鮑氏不動桿菌之抗菌效能，並評估兩者合併使用對多重抗藥性鮑氏不動桿菌是否可以發揮協同抗菌效能。期望解決治療多重抗藥性鮑氏不動桿菌面臨無藥可用之窘境，提升其在抗菌醫療之應用潛力，為昆蟲生物資源開發創新領域。

黃腰虎頭蜂蜂毒胜肽 MP-AF 與不同抗菌作用機制之抗生素對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株之抗菌效能試驗

黃腰虎頭蜂蜂毒胜肽 MP-AF 與七種臨床上常用抗生素對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株之最低抑菌濃度如表一所示。MP-AF 於濃度 4-8 $\mu\text{g/ml}$ 對 7 株臨床分離株皆可發揮良好抗菌效能。Ampicillin、cephalothin 及 gentamicin 於濃度 256 $\mu\text{g/ml}$ 時，仍然無法抑制其生長。Ciprofloxacin 於濃度 64 $\mu\text{g/ml}$ 時僅對一株具抑菌效能，而其餘 6 株則於濃度 256 $\mu\text{g/ml}$ 時，仍無法抑制其生長。Neomycin 於濃度 256 $\mu\text{g/ml}$ 時僅對 2 株菌具抑菌效能，其餘 5 株則於濃度 256 $\mu\text{g/ml}$ 時，仍無法抑制其生長。SXT 於濃度 64 $\mu\text{g/ml}$ 、256 $\mu\text{g/ml}$ 時分別對 2 株菌具抑菌濃能，其餘 5 株則於濃度 256 $\mu\text{g/ml}$ 時，仍無法抑制其生長。Tetracycline 於濃度 128-256 $\mu\text{g/ml}$ 對 7 株分離株可發揮抗菌效能，其中 128 $\mu\text{g/ml}$ 濃度下可抑制 4 株菌生長，其餘 3 株則需在濃度 256 $\mu\text{g/ml}$ 才能被抑制生長。由試驗結

果顯示，多數一線抗生素於劑量高達 256 µg/ml 尚無法有效抑制分離株之生長，僅 MP-AF 可發揮良好抗菌活性，且 MP-AF 在有效抑制濃度下對於人體紅血球細胞幾乎沒有影響，顯見 MP-AF 在對抗多重抗藥性鮑氏不動桿菌之感染具發展潛力。

表一 蜂毒肽 MP-AF 與七種臨床上常用抗生素對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株之最低抑菌濃度

<i>A. baumannii</i> isolates	MIC (µg/ml)							
	MP-AF	AMP	CF	CIP	GM	NEO	SXT	TET
A	8	>256	>256	>256	>256	>256	>256	128
B	8	>256	>256	64	>256	>256	256	128
C	4	>256	>256	>256	>256	256	>256	128
D	4	>256	>256	>256	>256	>256	>256	256
E	4	>256	>256	>256	>256	>256	64	256
F	4	>256	>256	>256	>256	>256	>256	256
G	4	>256	>256	>256	>256	256	>256	128

縮寫：MIC, minimal inhibitory concentration; MP-AF, mastoparan-AF; AMP, ampicillin; CF, cephalothin; CIP, ciprofloxacin; GM, gentamicin; NEO, neomycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TET, tetracycline.

黃腰虎頭蜂蜂毒肽 MP-AF 與不同抗菌作用機制之抗生素合併使用對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株協同抑菌效能之探討

以不同濃度之 MP-AF 分別與七種抗生素合併使用，其抗菌效能如表二所示。結果顯示，當 MP-AF 分別 ampicillin、cephalothin 合併使用時，僅對分離株 A 可發揮部分協同抑菌效能，對於其他分離株之抗菌效能則沒有差異。與 ciprofloxacin 合併使用時對分離株 A、D、G 可發揮協同抑菌效能，對其餘分離株則沒有差異。與 gentamicin 或 neomycin 合併使用時，對七株分離株之抗菌效能皆沒有差異。MP-AF 與 SXT 合併使用時抗菌效能最佳，對分離株 B、C、D、F、G 可發揮協同抑菌效能，對於分離株 E 可發揮部分協同抑菌效能，僅對分離株 A 之抗菌效能沒有差別。與 Tetracycline 合併使用時，對分離株 A、B 具部分協同抑菌效能，對分離株 C、D、E、F 則僅具加成抑菌效能，對分離株 G 之抗菌效能則沒有差別。顯示 MP-AF 與特定抗生素合併使用時可有效發揮協同抑制效果，且合併使用也能降低抗菌藥劑的使用劑量，減少藥物副作用之發生，增加用藥之安全性。使用劑量之減少也能降低藥物對病原菌之選汰壓力，進而延緩抗藥性菌株發生機率。更加凸顯蜂毒肽 MP-AF 在抗菌醫療上之發展潛力，不僅能解決菌株抗藥性嚴重之難題，也為昆蟲資材開創應用新方向。

本試驗結果顯示，MP-AF 不論單獨使用或與特定抗生素合併使用皆可對多重抗藥性鮑氏不動桿菌臨床分離株發揮抗菌效能，在抗菌應用上極具發展潛力。然而，未來若能進一步開發病原菌抗藥性基因即時診斷方法，不僅在治療細菌感染上可提供更精確之診斷依據，更能有效選擇適合的抗生素與 MP-AF 合併使用，以期未來能應用於抗菌醫療上。

表二 蜂毒胜肽 Mastoparan-AF 與七種臨床上常用抗生素合併使用對多重抗藥性鮑氏不動桿菌分離株之 FIC 指數

Antibiotics	FIC index						
	A	B	C	D	E	F	G
AMP	Partial Synergy	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference
CF	Partial Synergy	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference
CIP	Synergy	Indifference	Indifference	Synergy	Indifference	Indifference	Synergy
GM	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference
NEO	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference	Indifference
SXT	Indifference	Synergy	Synergy	Synergy	Partial Synergy	Synergy	Synergy
TET	Partial Synergy	Partial Synergy	Additivity	Additivity	Additivity	Additivity	Indifference

縮寫: MIC, minimal inhibitory concentration; MP-AF, mastoparan-AF; AMP, ampicillin; CF, cephalothin; CIP, ciprofloxacin; GM, gentamicin; NEO, neomycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TET, tetracycline; Synergy, 合併使用後具協同抑菌作用; Partial synergy, 合併使用後具部分協同抑菌作用; Additivity, 合併使用後具加成作用; Indifference, 合併使用後抑菌效能沒有差別。

參考文獻

- Brogden, K. A., A. J. De Lucca, J. Bland, and S. Elliott. 1996. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 93: 412-416.
- Hirai, Y., Yasuhara, H. Yoshida, T. Nakajima, M. Fujino, and C. Kitada. 1979. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. Chem. Pharm. Bull. (Jpn) 27: 1942-1944.
- Lin, C. H., J. T. C. Tzen, C. L. Shyu, M. J. Yang, and W. C. Tu. 2011. Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. Peptides 32(10): 2027-2036.
- Palma, M. S. 2006. Insect venom peptides. In: Kastin AJ, editor. Handbooks of biologically active peptides. Oxford: Academic Press; p. 389-96.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415: 389-95.

台灣城市養蜂推行與社區營造-以台北為例

Urban-beekeeping and community empowerment

江敬皓¹ 蔡明憲²

1. 德霖技術學院 休閒事業管理系；2. 松山社區大學

摘要

城市養蜂(Urban-beekeeping)在世界各大都會已行之有年，例如，德國柏林、日本的東京銀座商業街樓頂層、大阪的大企業大廈頂樓。美國紐約也為城市養蜂而訂定了養蜂相關的規範，日本首相夫人在訪美過程中也參觀白宮花園飼養的蜜蜂，並與美國第一夫人對全球蜜蜂大量消失議題交換意見，可見關懷蜜蜂生存已深入人心。台北於2014年結合企業資源、社會福利機構、學術單位及蜂農等，開啟城市養蜂序幕，所飼養的蜂種為西洋蜜蜂(*Apis mellifera*)。本文內容描述台北地區城市養蜂的蜂群生長狀況，結合社區營造的推廣經驗及都市環境探討。經過一年的觀察，放置於台北市區兩處(各5群)的蜂群，群勢在春秋兩季可達7-9片，其中有四群失王群，其新蜂后均能順利交尾成功，也收取了約5公斤自然成熟蜜。同時因蜜蜂為重要環境指標物種，2015年底檢測位於臺北市仁愛圓環區域的城市養蜂示範場的花粉之結果，331種農藥為未檢出，而5大重金屬檢測中的砷、鉛、鉻、汞零檢出，只有檢出約10.5ppm微量的銅。另一方面，也透過社區型大學之體系，每年開設四次的城市養蜂體驗課程，由都市發起並灌輸學員蜜蜂對人類生活環境與糧食作物的重要性。

城市養蜂，不但提升企業對生態環境的貢獻，社區大學的養蜂推廣課程可使都會人在繁忙的生活步調中，彼此間分享養蜂的樂趣及蜂產品的收穫的喜悅，使原本毫無交集的市民，因城市養蜂而建立互動活絡關係。城市養蜂可以反應出都會環境的綠美化程度，可以是市民及企業員工的休閒活動，增進居民參與社區營造，是生態教育的重要資源，藉由民眾的環保與生態自覺，透過親身養蜂身體力行的方式，期望能挽救蜜蜂族群消失的危機，這也是一種環境教育的體現！目前台北城市養蜂是重要的開端，透過民眾熱情參與，在台灣扎根，更能讓世界看見台灣的城市養蜂特色及對蜜蜂生存環境友善的積極作為，力挽蜜蜂族群逐漸下降的危機。

關鍵字：城市養蜂、社區營造、台北

參加者資訊 (按筆畫順序)

尹萬興
iwbrich3776@yahoo.com.tw

江坤憲
群彩養蜂園

王長添
蜜蜂先生養蜂事業有限公司

何奕陞
蜜蜂王國

王思之
金豐機械
j1050901@gmail.com

吳佳貞
臺北醫學大學附設醫院
kdilu0112@gmail.com

王重鈞
吉木家養蜂農場
zerowilter@gmail.com

吳佳綺
a6221234kimo@yahoo.com.tw

王重雄
國立臺灣大學昆蟲系
wangch@ntu.edu.tw

吳明城
國立中興大學昆蟲系
mcwu12@gmail.com

王家璽
宜蘭縣復興國中
wang6192001@yahoo.com.tw

吳杰樺
鹿草養蜂產銷班

王國全
旺品蜂城
T25236789@yahoo.com.tw

吳俊龍
萊福養蜂場

王惠珊
自營蜂農
beedynasty@yahoo.com.tw

吳姿嫻
行政院農業委員會苗栗區農業改良場
thwu@mdais.gov.tw

王朝棟
鼎豐養蜂場

吳謹全
三奇蜜蜂生態農園

王朝燈
瑞發養蜂場

呂玉潔
法紀地政士事務所
yujie0712@yahoo.com.tw

王瑜慈
中華民國蜂針研究會

呂兒芄
山好蜜

古建凱
宏家養蜂場

呂森榮
山好蜜

宋威霆
峰谷蜂業
swt61021@ms25.hinet.net

杜武俊
國立中興大學昆蟲學系
tuujiun@gmail.com

李仁傑
蜂之鄉有限公司

沈湘娜
蜜蜂故事館

李立文
蜂信子天然養生食品企業股份有限公司
tigerlee1101@yahoo.com.tw

沈敬紘
來成實業股份有限公司

李佩林
信德養蜂場

周千琪
宏家養蜂場

李佳芳
永生蜂業
oldman520oldwoman@yahoo.com.tw

林文鵬
自營蜂農
taison550201@yahoo.com.tw

李宗銘
金日村養蜂園

林宏達
永生蜂業
honda0309@gmail.com

李倫德
時代養蜂場

林明寬
m86130121@gmail.com

李張桂燕
信德養蜂場

林俊良
新南養蜂場

李清杞
中華民國蜂針研究會

林美嬋
永豐養蜂場

李舒晴
mountainhigh168@gmail.com

林英杰
廣閱科技
mej00@ms14.hinet.net

李慶裕
芳喬生物科技股份有限公司

林峻賢
國立中興大學昆蟲學系
roung123@gmail.com

李慶燦
信德養蜂場

林健銘
蜜蜂合夥人
dandylin5868@gmail.com

李鴻洲
阿洲蜜蜂工廠
edward8_5@hotmail.cm

林進通
采蜂林蜂業

林椿淞
采蜂林蜂業
iceman20520@yahoo.com.tw

康眉香
新興養蜂園

林慧甄
陪王家壘前往
wang6192001@yahoo.com.tw

康席榛
吉翔蜂園
amanda94139413@gmail.com

林錫村
永豐養蜂場

康進德
新興養蜂園

姚立龍
萊福養蜂場

張至程
日新蜂業有限公司

柯孝璋
bastian7414@gmail.com

張志文
三峰養蜂場

柯明群
鹿草養蜂產銷班

張進乾
曾文養蜂場

柯純妃
森悅蜂園

張萬得
阿枝蜂蜜

范秀蓉
新竹市民農園租地種菜及養蜂
juliefann0520@gmail.com

張碧芳
鹿草養蜂產銷班

唐賢融
asdr16783@gmail.com

張綺真
來成實業股份有限公司

徐巧容
j1050901@gmail.com

張燕玲
神經內科診所
a08240912961596@gmail.com

徐培修
行政院農業委員會苗栗區農業改良場
pshsu@mdais.com.tw

曹張騫
森林蜜境

徐培榕
hsu425@gmail.com

許殿麟
GP 蜜工坊
jj5303084572@gmail.com

袁聖
石羽石材有限公司
top112020@yahoo.com.tw

許煥謀
自家養蜂場
hhmhinet1974@yahoo.com.tw

許曉婷
鞋全家福
clover7s@gmail.com

陳浩琦
SGS 台灣檢驗科技股份有限公司
meg.chen@sgs.com

郭淑真
千甲生機農園
jksevensal688@gmail.com

陳文琦
大禾工作室
u50080@yahoo.com.tw

陳宗顯
新興養蜂園

陳怡伶
國立宜蘭大學生技動物系
a221865880@yahoo.com.tw

陳泓璋
田蜜園養蜂農場
nocti790211@gmail.com

陳俊宇
田蜜園養蜂農場
nocti790211@gmail.com

陳信坤
吉木家養蜂農場
zerowilter@gmail.com

陳思竹
start0170@yahoo.com.tw

陳昭鈞
國立中興大學昆蟲穴學系
jjchen@nchu.edu.tw

陳昶璋
行政院農業委員會苗栗區農業改良場
ccchen@mdais.gov.tw

陳美惠
山好蜜

陳倫祥
實耐格科技股份有限公司
Chenray0123@gmail.com

黃有財
申豐蜜工坊
u50080@yahoo.com.tw

陳國峯
鹿草養蜂產銷班

陳滄松
cts0812@ms37.hinet.net

陳漢登
自營養蜂

陳德謙
自營蜂農
dcchen0929@hotmail.com

陳鴻文
全真有限公司
ricky@ilifeup.com

陳麗華
自然花園養蜂園

陳麗涵
來成實業股份有限公司

彭及忠
國立虎尾科技大學生物科技系
bocky@nfu.edu.tw

曾國平
養蜂場
aa854854@yahoo.com.tw

程冠璋
茂盛蜂業(股)公司

程淑婷
蜜蜂故事館

童秋芳
土蜂世家

詹承霖
蜂和小鎮

黃志立
阿立養蜂場
hwang7155@yahoo.com.tw

黃怡儒
時代養蜂場

黃俊豪
蜂信子
hjh861515@gmail.com

黃唯洲
愛蜂園有限公司

黃清揚
情人蜂蜜股份有限公司

黃連旺
臻靚養蜂世家

黃進森
森悅蜂園

黃溫雄
永農養蜂場
tashu0881@gmail.com

黃鈺婷
金日村養蜂園

黃鐘頤
綠竹生態蜂業

楊建良
地瓜妹迷你蜂場
lampberger.tw@gmail.com

楊恩誠
國立臺灣大學昆蟲學系
ecyang@ntu.edu.tw

蔡婷仔
大地養蜂場

廖貫博
國立中興大學
v100274634123@gmail.com

劉日貴
朝陽養蜂農場

劉啟明
愛蜂坊蜂園

劉瑞金
自然花園養蜂園

劉筱葶
田蜜園養蜂農場
janet3132@yahoo.com.tw

劉銘賢
volvo0325@yahoo.com.tw

劉靜芳
土蜂世家

蔡文傑
行政院農業委員會農業試驗所
twj1412@yahoo.com.tw

蔡文裕
台中精機
m3808@mail.or.com.tw

蔡世茂
自耕小農
Tsaysm06@yahoo.com.tw

蔡志洋
shoyoung98@gmail.com

蔡明憲
臺北市松山社區大學
ben30003@gmail.com

鍾享鵬
好蜜多養蜂場

蔡慧玲
海納百川人文與生技/台灣女科技人學會
huiling858209@yahoo.com.tw

鍾景和
椰園蜂場
a0910788303@gmail.com

鄧斯為
鹿草養蜂產銷班
kevin318318@gmail.com

龔吉光
佛光養蜂場

鄧象
鹿草養蜂產銷班

彭俊偉
環虹鋁騰科技股份有限公司

鄭紹春
中華科技農漁牧業發展協會
chun995@gmail.com

張偉軍
環虹鋁騰科技股份有限公司

盧偉岸
台灣世界展望會
luwayan@gmail.com

黃偲佳
環虹鋁騰科技股份有限公司

蕭辛諭
采蜂林蜂業

徐于婷
明道大學
babypig7280@gmail.com

蕭詳宸
吉翔蜂園
emma94139413@gmail.com

李岳隆
臺一蜂業
Kkk0912310885@yahoo.com.tw

賴奕成
瀚成實業有限公司
hc54064705@gmail.com

林麗娟
臺一蜂業

賴朝賢
宏基蜜蜂生態農場

賴德成
鳳形養蜂園

謝光霓
沙鹿國中
marsisibest@yahoo.com.tw

謝再添
行政院農業委員會藥物毒物試驗所
htt@tactri.gov.tw

鍾坤旺
野外營

方信中
吳明德
李和展
李美滿
李嘉祥
林見山
林俊佑
林意臻
林祺水
柯宇揚
洪月英
徐林美
徐建庭
康席羚
張世杰
張永坤
張彥文
梁鳳娥
許慶杠
許慶松
郭泓霖
陳文政
陳啟川

陳惠雲
陳翠華
陳顯宗
程啟宗
黃永勝
黃吉義
黃惠暖
楊聯國
劉柏裕
劉謊傑
蔡牡丹
蔡帛晏
鍾瑜潔
簡武諺
簡輔孝
簡誌良
陳國昌

與會者無提供足夠個人資訊，因此僅呈現與會者之姓名於此頁，若想與之聯絡，請通知本會，會協助聯絡事宜。

中國養蜂學會代表團

第十一屆海峽兩岸蜜蜂與蜂產品研討會名單

陳黎紅
中國養蜂學會
chenlihong@caas.cn

李建科
中國農業科學院蜜蜂研究所
apislijk@126.com

孫麗萍
中國農業科學院蜜蜂研究所
caasun@126.com

張紅城
中國農業科學院蜜蜂研究所
460414874@qq.com

方兵兵
中國農業科學院蜜蜂研究所
fangbingbing@caas.cn

余林生
安徽農業大學動物科技學院
yulinsheng@ahau.edu.cn

吉 挺
揚州大學動物科學與技術學院
jiting12@sohu.com

林宇清
麗水市畜牧獸醫局
lsyuqing@163.com

仇志強
揚州蜂行天下文化發展有限公司
404494881@qq.com

劉富海
北京天寶康高新技術開發有限公司
liufuhai7627@126.com

李彬之
北京天寶康高新技術開發有限公司
mifengjiankang@126.com

張其安
山東華康蜂業有限公司
honey@hkhoney.com

吳健新
黃山市徽州区西溪南蜂業合作社
243374435@qq.com

戰立新
黑龍江神頂峰黑蜂產品有限公司
heifeng998@126.com

許金亭
山東萊蕪市朗野蜂業有限公司
lwlangyefengye@163.com

王 斌
山東萊蕪市朗野蜂業有限公司
lwlangyefengye@163.com

王建梅
中國養蜂學會
wangjianmei01@126.com

2016 第十一屆海峽兩岸蜜蜂與蜂產品研討會

贊助捐款芳名錄

序號	代表人	公司名稱
1	李仁傑	蜂之鄉有限公司
2	陳浩琦	台灣檢驗科技股份有限公司
3	孫文耀	泰裕祥股份有限公司
4	王清賢	捷恩麥克生物科技股份有限公司
5	陳金堆	永祥蜂蜜實業有限公司
6	吳慶泉	清蜂巢企業社

(編排順序依造贊助時間先後)