

# 蜂王浆对初情期前雌性日本大耳兔生长发育的影响

许宝华<sup>1,2</sup>, 曾志将<sup>1\*</sup>

(1. 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045; 2. 南昌大学实验动物科学部, 南昌 330031)

**摘要:** 本研究旨在探讨蜂王浆对雌性日本大耳兔初情期前的生长发育影响。将 36 只 50 日龄雌性日本大耳兔随机分为高剂量蜂王浆组(H-RJ)、低剂量蜂王浆组(L-RJ)以及对照组(C), 每组 12 只。高、低剂量组分别按体质量 0.2% 和 0.1% 的量每天进行空腹灌胃蜂王浆, 对照组灌胃体质量 0.1% 的生理盐水。每周同一时间空腹称重。40 d 后, 所有兔子耳静脉取血后各组处死 6 只, 摘取心脏、左侧卵巢和左侧子宫称重, 并冷冻保存右侧卵巢和右侧子宫。采用放免法测定血清中雌二醇( $E_2$ )、促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)、孕激素( $P_4$ )、催乳素(PRL)和睾酮(T)的含量; 用实时荧光定量 PCR 检测右侧卵巢中雌激素  $\beta$  受体( $ER\beta$ ) mRNA 和右侧子宫中雌激素  $\alpha$  受体( $ER\alpha$ ) mRNA 的表达。结果表明: 灌胃蜂王浆 12 d 后, 对照组兔子没有换毛现象, 低剂量和高剂量组分别有 75% 和 67% 的兔子换毛; 蜂王浆对体质量和心脏、左侧子宫、左侧卵巢的脏器系数无显著影响( $P > 0.05$ )。试验组血液中  $E_2$  浓度极显著高于对照组( $P < 0.01$ ), 而其它性激素无明显差异( $P > 0.05$ )。试验组  $ER\alpha$  在子宫和  $ER\beta$  在卵巢的表达量均低于对照组, 对照组与高剂量组的差异极显著( $P < 0.01$ ), 但低剂量组与对照组和高剂量组之间均差异不显著( $P > 0.05$ )。结果提示, 蜂王浆能提高兔子的换毛率, 但对心脏、子宫和卵巢的生长发育无明显影响; 蜂王浆可以提高初情期前雌性日本大耳兔血清中雌激素水平, 但抑制子宫和卵巢雌激素受体的表达。

**关键词:** 蜂王浆; 日本大耳兔; 换毛率; 脏器系数; 雌激素受体

中图分类号: Q418

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)04-0503-05

## Effect of Royal Jelly on Growth and Development before Puberty Female Japanese White Rabbits

XU Bao-hua<sup>1,2</sup>, ZENG Zhi-jiang<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Department of Laboratory Animal Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to explore the effect of royal jelly(RJ) on growth and development of Japanese White rabbits before puberty. Thirty six 50-day-old female rabbits were randomly allocated to three groups of 12 rabbits each: high dose group(H-RJ), low dose group(L-RJ) and control group(C). Rabbits were administrated daily with RJ weighted 0.2% and 0.1% of body weight in the high dose group and low dose group via gastric, respectively; saline water weighted 0.1% of body weight was administrated in the control group via gastric. After 40 days, plasma sample was collected from each rabbit and the levels of  $E_2$ , FSH, LH,  $P_4$ , PRL and T were analyzed by radioimmunoassay. The heart, left uterus and left ovary were collected from six slaughtered rabbits in each group and the expression of the estrogen receptor alpha ( $ER\alpha$ ) in right ovary and estrogen receptor beta ( $ER\beta$ ) in right uterus were detected by real time RT-

收稿日期: 2010-09-06

基金项目: 国家现代蜂产业技术体系资助项目(nycytx-43)

作者简介: 许宝华(1972-), 男, 江西彭泽人, 副教授, 博士生, 主要从事实验动物研究工作, E-mail: xubao72@sina.com

\* 通讯作者: 曾志将, E-mail: bees1965@sina.com

PCR. The results showed that: (1) The molting rate of rabbits in C, L-RJ and H-RJ was 0, 75% and 67% after 12 days, respectively; (2) There was no influence of RJ on the body weight, heart, uterus and ovary coefficients of rabbit ( $P>0.05$ ); (3) The concentration of  $E_2$  was significantly higher in RJ treated groups than that in control group ( $P<0.01$ ), but no significant difference was observed in the other sex hormones ( $P>0.05$ ); (4) The expression of  $ER\alpha$  in the uterus and  $ER\beta$  in the ovary were lower in RJ treated groups than that in control. The results indicated that royal jelly can greatly improve the molting rate of the rabbits, but it did not influence the growth of the heart, uterus and ovary, it increased the serum estrogen level and inhibited the expression of estrogen receptor in uterus and ovary of Japanese White rabbits before puberty.

**Key words:** royal jelly; Japanese White rabbits; molting rate; organ coefficient; estrogen receptor

我国是世界第一养蜂大国。养蜂生产出的蜂王浆、蜂花粉、蜂胶等产品已在畜牧生产中应用<sup>[1-4]</sup>。蜂王浆,又称为蜂皇浆或蜂乳,它是6~15日龄工蜂王浆腺和上颚腺分泌的一种乳白色或淡黄色浆状物质,是工蜂用来饲喂蜂王和蜜蜂幼虫的一种高营养物质<sup>[5]</sup>。蜂王浆包含蛋白质、糖类、脂肪酸、丰富的维生素、矿物质和多种活性物质,具有非常高的营养价值,而且所含有的微量生物活性物质,对动物生殖系统的发育也有一定的影响<sup>[6-8]</sup>,但蜂王浆对家兔的动物生殖系统的发育是否有影响目前还未见报道。本研究以初情期前的雌性日本大耳兔为研究对象,研究不同浓度的蜂王浆对初情期前雌性日本大耳兔生长、换毛、血清中性激素水平以及对卵巢雌激素 $\beta$ 受体( $ER\beta$ )、子宫雌激素 $\alpha$ 受体( $ER\alpha$ )表达的影响,以便为研究蜂王浆对生殖功能的影响提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物和材料 36只50日龄的健康雌性日本大耳兔,体质量( $1.44\pm 0.22$ )kg,由南昌大学实验动物科学部提供。新鲜蜂王浆由江西农业大学动物科学技术学院蜜蜂研究所提供。

1.1.2 主要试剂 雌二醇( $E_2$ )、促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)、睾酮(T)、孕激素( $P_4$ )、和催乳素(PRL)放射免疫试剂盒由北京华英生物技术研究所生产。焦磷酸二乙酯(DEPC)(Amersco公司,美国)、Trizol试剂(Invitrogen公司,美国)、逆转录试剂盒(Fermentas公司,加拿大)、PCR Mix(Transgen,中国)、SYBR Green I(Amersco公司,美国)。

1.1.3 主要仪器 ABI system 7500型PCR仪

(ABI公司,美国);核酸蛋白分析仪(Pharmacia Biotech, Ltd公司,英国);高速冷冻离心机(Sigma公司,美国);r-911全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司,中国)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 动物分组和饲养 将36只50日龄雌性日本大耳兔随机分为高剂量蜂王浆组(H-RJ)、低剂量蜂王浆组(L-RJ)以及对照组(C),每笼3只饲养于南昌大学实验动物科学部开放环境中,每天饲喂充足的基础日粮(配方为:豆粕21%,玉米22%,草粉41%,麦麸15%,食盐0.5%和0.5%的微量元素),自由饮水。

1.2.2 灌胃 每天早上兔子分别空腹灌胃体质量0.2%和0.1%的新鲜蜂王浆,对照组灌胃体质量0.1%的生理盐水。每周早上同一时间空腹称重。

1.2.3 血清性激素和脏器系数测定 兔子灌胃至第40天,次日上午对每只实验兔称量体质量后耳静脉取血,离心获得血清,分别按放免检测试剂盒说明书测定血清中 $E_2$ 、T、PRL、 $P_4$ 、LH和FSH的浓度。采血后每组处死6只兔子,迅速取右侧子宫和右侧卵巢于液氮中速冻,再转入 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。同时分离心脏、左侧子宫和左侧卵巢,剔除组织黏附的脂肪和筋膜,并用滤纸吸干表面体液后立即称重,计算各脏器系数:脏器质量/体质量 $\times 100\%$ 。

1.2.4 子宫 $ER\alpha$ 和卵巢 $ER\beta$ mRNA的表达检测

用Trizol进行子宫和卵巢组织的总RNA提取。合成子宫 $ER\alpha$ 和卵巢 $ER\beta$ 引物并进行扩增。其引物序列分别为: $ER\alpha$  F-GCCCTCCAGCGTTC-TACAG, R-AACATTCTCCCTCCTCTTCGGT;  $ER\beta$  F-CGCCCTTCACCGAGACCT, R-TCATC-CCTATCCAGCACGAG。以GAPDH为内参,其引物序列为:F-TGCACCACCAACTGCTTAGC,

R-GGCATGGACTGTGGTCATGAG。引物均由北京三博远志生物公司合成。逆转录反应体系为:RNA 1  $\mu\text{g}$ ,引物 1  $\mu\text{L}$ , $5\times$  reaction buffer 4  $\mu\text{L}$ ,RNase inhibitor 1  $\mu\text{L}$ ,dNTP 2  $\mu\text{L}$ ,Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{L}$ ,DEPC 水至 20  $\mu\text{L}$ 。cDNA 合成的反应条件为:25  $^{\circ}\text{C}$  5 min;42  $^{\circ}\text{C}$  60 min;70  $^{\circ}\text{C}$  5 min。qPCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 40 s,40 个循环。反应结束后,立即进行熔解曲线分析。

1.2.5 数据处理与统计分析 采用 SPSS13.0 软件差异显著性多重比较方法对试验结果进行分析。

## 2 结果

### 2.1 蜂王浆对日本大耳兔换毛的影响

从表 1 可知,灌胃蜂王浆期间,对照组兔子被毛光泽,颜色无改变,未见脱毛;低剂量组和高剂量组在灌胃蜂王浆 12 d 后出现明显的换毛现象,换毛率分别为 75% 和 67%,与对照组相比差异极显著( $P<0.01$ )。由此可知蜂王浆对兔子换毛作用明显。

### 2.2 蜂王浆对兔子体质量和脏器系数的影响

由图 1 可知,试验组与高、低剂量组每周称量的体质量值没有显著差异( $P>0.05$ )。从表 2 可知,

表 2 各组脏器系数比较

Table 2 Comparison of organ coefficients among different groups

组别	样本含量	心脏	左侧子宫	左侧卵巢
Group	n	Heart	Left uterus	Left ovary
对照组 C	6	2.370 $\pm$ 0.270 <sup>a</sup>	1.571 $\pm$ 0.682 <sup>a</sup>	0.150 $\pm$ 0.031 <sup>a</sup>
低剂量 L-RJ	6	2.406 $\pm$ 0.155 <sup>a</sup>	1.560 $\pm$ 0.999 <sup>a</sup>	0.156 $\pm$ 0.041 <sup>a</sup>
高剂量 H-RJ	6	2.300 $\pm$ 0.289 <sup>a</sup>	1.682 $\pm$ 0.640 <sup>a</sup>	0.123 $\pm$ 0.039 <sup>a</sup>

### 2.3 蜂王浆对兔子性激素水平的影响

由表 3 可知,高、低剂量组血清中  $E_2$  浓度都极显著高于对照组( $P<0.01$ ),但两剂量组之间差异不显著( $P>0.05$ )。而高、低剂量组和对对照组之间的其他 5 种性激素浓度差异均不显著( $P>0.05$ )。

### 2.4 子宫 $ER\alpha$ 和卵巢 $ER\beta$ mRNA 的表达

由表 4 可知,与对照组相比,随着剂量增加,试验组子宫  $ER\alpha$  和卵巢  $ER\beta$  mRNA 的表达呈下降趋势,且对照组与高剂量组的差异极显著( $P<0.01$ ),但对照组与低剂量组间,低剂量组和高剂量组间均

连续灌胃 40 d 后,高、低剂量组与对照组之间的心脏、左侧子宫以及左侧卵巢 3 个脏器系数差异不明显( $P>0.05$ )。

表 1 各组换毛率的比较

Table 1 Comparison of molting rate in each group

组别	样本含量/只	换毛只数/只	换毛率/%
Group	n	Molting number	Molting rate
对照组 C	12	0	0 <sup>A</sup>
低剂量组 L-RJ	12	9	75(9/12) <sup>B</sup>
高剂量组 H-RJ	12	8	67(8/12) <sup>B</sup>

表中同列数字有相同肩标字母表示差异不显著( $P>0.05$ );不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ );不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ )。下同

The values in the same line with the same superscript have no significant difference ( $P>0.05$ ); the different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ); the different capital letters indicate extremely significant differences ( $P<0.01$ ). The same as below

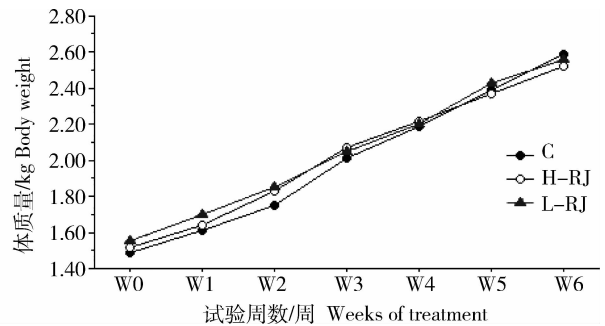


图 1 蜂王浆灌胃对体质量的影响

Fig. 1 Effect of RJ on body weight

差异不显著( $P>0.05$ )。

## 3 讨论

家兔存在生理性换毛现象,分为年龄性换毛和季节性换毛。仔兔出生后的 30~50 日龄间会发生年龄性换毛。换毛受多种因素的影响,有研究表明:雌激素可以影响生物毛发周期<sup>[9]</sup>,高浓度的雌激素使毛囊表皮生长因子受体水平升高,而表皮生长因子受体介导表皮生长因子可以使毛发生长受抑制,

表 3 RJ 对性激素水平的影响

Table 3 Effects of RJ on hormone levels in plasma

组别 Group	对照组 C	低剂量组 L-RJ	高剂量组 H-RJ
样本含量/只	12	12	12
E <sub>2</sub> /(pg·mL <sup>-1</sup> )	81.982±25.433 <sup>A</sup>	132.235±18.155 <sup>B</sup>	126.795±25.030 <sup>B</sup>
T/(ng·mL <sup>-1</sup> )	3.285±1.779 <sup>a</sup>	3.877±1.307 <sup>a</sup>	4.313±1.551 <sup>a</sup>
P <sub>4</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	25.995±6.479 <sup>a</sup>	29.225±10.637 <sup>a</sup>	32.189±8.158 <sup>a</sup>
FSH/(mIU·mL <sup>-1</sup> )	61.547±26.377 <sup>a</sup>	77.517±25.906 <sup>a</sup>	73.249±27.492 <sup>a</sup>
LH/(mIU·mL <sup>-1</sup> )	50.538±11.776 <sup>a</sup>	51.996±12.410 <sup>a</sup>	57.462±12.042 <sup>a</sup>
PRL/(ng·mL <sup>-1</sup> )	37.943±12.499 <sup>a</sup>	29.170±6.216 <sup>a</sup>	28.444±15.187 <sup>a</sup>

表 4 子宫 ER $\alpha$  和卵巢 ER $\beta$  mRNA 的表达Table 4 Expression of ER $\alpha$  in uterus and ER $\beta$  mRNA in ovary

组别 Group	样本含量/只 n	雌激素 $\beta$ 受体 ER $\alpha$	雌激素 $\alpha$ 受体 ER $\beta$
对照组 C	6	0.041±0.025 <sup>A</sup>	0.054±0.027 <sup>A</sup>
低剂量组 L-RJ	6	0.024±0.009 <sup>AB</sup>	0.033±0.019 <sup>AB</sup>
高剂量组 H-RJ	6	0.004±0.003 <sup>B</sup>	0.013±0.017 <sup>B</sup>

毛发直径缩小,毛发断裂,生长期毛囊呈现退行期改变<sup>[10]</sup>。本研究的实验兔处于年龄性换毛期间,在蜂王浆灌胃的试验组中日本大耳兔分别有 75% 和 67% 的兔子提前出现明显的换毛现象。这可能与蜂王浆中含有雌二醇有关。本研究发现,试验组血清中雌激素水平升高,这进一步证实蜂王浆对家兔换毛的影响可能与蜂王浆中雌激素的水平有关。

蜂王浆的成分复杂,具有非常高的营养价值,而且各种营养成分比例较为均衡,具有促进生长的作用<sup>[11]</sup>。有文献报道,蜂王浆能促进培养细胞的生长<sup>[12]</sup>。然而本试验检测了蜂王浆对兔子脏器生长发育的影响,结果发现蜂王浆并没有对兔子脏器系数产生明显的影响,这说明蜂王浆的雌激素水平在安全范围内,这与郭芳彬曾指出蜂王浆中性激素的含量是痕量的,距离发挥人的生理活性的剂量甚远的认识是一致的<sup>[13]</sup>。

雌激素是通过其受体介导的。蜂王浆中高水平的雌激素不能起到使家兔脏器质量增加的作用,可能与雌激素受体的表达受到影响有关。雌激素存在 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  两种受体<sup>[14]</sup>。在女性生殖器官中,ER $\alpha$  和 ER $\beta$  主要存在于卵巢及乳房中,而子宫中以 ER $\alpha$  为主<sup>[15]</sup>。本试验发现蜂王浆中的雌激素未能使子宫和卵巢质量增加,却出现了 ER $\alpha$  和 ER $\beta$  mRNA 的表达下降,这表明尽管蜂王浆中含有较高水平的雌激素<sup>[16]</sup>,但其中也可能含有抑制 ER $\alpha$  和 ER $\beta$

mRNA 表达的成份,受体水平的下降限制了雌激素的作用,使雌激素的某些作用控制在一定范围内。

目前,蜂王浆对成年动物作用的研究比较多<sup>[17-19]</sup>,但对未成熟的哺乳动物作用报道很少。本试验是针对蜂王浆对初情期前日本大耳兔影响的首次研究,结果表明,一定浓度的蜂王浆可以促使生理性换毛提前和换毛率的提高;促使日本大耳兔血液中雌激素水平上升;但却抑制子宫和卵巢雌激素受体的表达。然而这些作用结果的具体机理还不清楚,后续的试验将深入探讨蜂王浆对未成熟哺乳动物的作用机理,以便更科学地揭示蜂王浆对哺乳动物生长发育的作用机制,为更有效的利用蜂王浆提供理论依据。

## 4 结 论

4.1 一定剂量的蜂王浆能提高初情期前日本大耳兔的换毛率,但对心脏、子宫和卵巢的生长发育无明显影响。

4.2 蜂王浆可以提高初情期前雌性日本大耳兔血清中雌激素水平;同时还可以抑制子宫 ER $\alpha$  mRNA 和卵巢 ER $\beta$  mRNA 的表达。

## 参考文献:

- [1] 陈秀芝. 蜂王浆可促进肉仔鸡生长[J]. 中国家禽, 2000, 22(6): 20-22.
- [2] 曾志将,刘三凤,潘珂,等. 蜂花粉蜂胶对肉鸡生产性能及免疫性能的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 751-755.
- [3] 张国锋,刁其玉,屠焰,等. 蜂花粉及其多糖对犊牛体增质量、物质消化与血清指标的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(8): 981-987.
- [4] 许宝华,谢宪兵,康路妹,等. 蜂王浆提高动物繁殖性

- 能的研究进展 [J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(9): 113-115.
- [5] 曾志将. 养蜂学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [6] 陈华生, 高育仁, 黄文忠, 等. 蜂王浆对提高白鹧繁殖能力的试验初报 [J]. 蜜蜂杂志, 1997, (8): 8-9.
- [7] 孙亮先, 林春玉, 陈朝阳, 等. 饲喂蜂王浆对果蝇繁殖力影响的研究 [J]. 中国蜂业, 2008, 59(3): 5-6.
- [8] 王立新, 杜娟, 张树杰, 等. 饲喂胡萝卜和蜂王浆对黄粉虫繁殖力的影响 [J]. 昆虫知识, 2005, 42(4): 434-438.
- [9] THORNTON M J. The biological actions of estrogens on skin [J]. *Exp Dermatol*, 2002, 11(6): 487-502.
- [10] YANG Z Q, TU J B, YAO T H, et al. Effects of NGF and estrogens on human hair follicle *in vitro* [J]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2004, 20: 48-50.
- [11] 苏晔, 敬璞, 丁晓雯, 等. 蜂王浆的化学成分、生理活性及应用 [J]. 农牧产品开发, 2000, 7: 11-12.
- [12] SALAZAR L A, PAZGONZALE Z V. Screening of biological activities present in honeybee (*apis mellifera*) royal jelly [J]. *Toxicol in Vitro*, 2005, 19: 645-651.
- [13] 郭芳彬. 走出蜂王浆会引起性早熟的误区 [J]. 蜜蜂杂志, 1999, 11: 30.
- [14] 詹晓庆, 王鲜忠, 张家骅. 雌激素受体和雌性生殖研究进展 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(12): 35-39.
- [15] SAKAGUCHI H, FUJIMOTO J, BAO L H, et al. Quantitative analysis of estrogen receptor-proteins in rat ovary [J]. *J Steroid Biochem Mole Bio*, 2005, 94(7): 83-91.
- [16] 曹均, 史伯伦, 张艺圃, 等. 蜂王浆活性成分的研究(连载)—性激素的研究 [J]. 农业新技术, 1987, (5): 21-23.
- [17] HUSEIN M Q, KRIDL R T. Reproductive responses following royal jelly treatment administered orally or intramuscularly into progesterone-treated Awassi ewes [J]. *Anim Reprod Sci*, 2002, 74: 45-53.
- [18] HUSEIN M Q, HADDAD S G. A New approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin [J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 93: 24-33.
- [19] KRIDL R T, ALKHETIB S S. Reproductive responses in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly [J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 92: 75-85.

(编辑 郭云雁)