

蜂蜜促进创伤愈合的免疫调控机制研究进展

孔祥溢 关 健 杨 义 李永宁 马文斌 幸 兵 王任直

摘 要 蜂蜜是地球上现存的最古老的食物之一,不仅具有很高的食用价值和药用价值,而且近年来在促进伤口愈合方面的作用越来越被重视。蜂蜜有着广谱的抗菌作用,这是其在促进伤口快速愈合方面独有的优势,其具体机制目前已被较为完备地阐述。近年来,蜂蜜在免疫调控方面的作用逐渐被发现并广泛探索,包括:①刺激或抑制单核-吞噬细胞合成与释放特定细胞因子,如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白介素(interleukin, IL)- 1β 等;②调控氧化应激,如中性粒细胞释放活性氧簇(reactive oxygen species, ROSs)等;③调控角质化细胞、成纤维细胞和内皮细胞等的炎症反应。对蜂蜜免疫调控作用的阐述和探索,对于更好地将蜂蜜应用于创伤的临床治疗至关重要。

关键词 蜂蜜 创伤愈合 细胞因子 氧化应激 炎症反应

中图分类号 R593 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.006

蜂蜜是地球上现存的最古老的食物之一,不仅可以食用、营养美味,而且不会变质。早在20世纪初,研究者就发现蜂蜜具有促进伤口愈合的功效。随着1940年抗生素的诞生,蜂蜜的这一应用逐渐减少^[1]。然而,随着近年来抗生素滥用引起的细菌耐药现象的不断出现,蜂蜜促进创伤愈合的作用再次被世人重视^[2]。

蜂蜜有着广谱的抗菌作用,这种抗菌作用是蜂蜜在促进伤口快速愈合方面独有的优势。过去几十年,蜂蜜的抗菌活性被广泛研究^[3-5]。Majtan等^[6]研究发现,防御素-1是蜂蜜中主要的抗菌因子,不同花粉来源的蜂蜜其含量有着很大的不同。Kwakman等^[7]则发现,某些蜂蜜中植物素的含量明显高于其他花粉来源的蜂蜜,而这些蜂蜜的抗菌能力似乎更强。许多具有抗菌活性的蜂蜜,如新西兰的麦卢卡蜂蜜、荷兰的RS蜂蜜已经被列为“医疗级蜂蜜”,并已用于临床^[5,7]。除防御素、植物素等抗菌成分外,蜂蜜中还含有蜜蜂来源或植物来源的免疫调节成分,同样可以促进伤口或溃疡的愈合^[8]。蜂蜜中的免疫调节物质近年来同样被广泛研究,几种主要的免疫调节因子见表1。

一、蜂蜜对细胞因子的调控作用

皮肤覆盖全身,它使体内各种组织和器官免受物理性、机械性、化学性和病原微生物性的侵袭。皮肤

表1 不同种类蜂蜜的免疫调控成分及其在促进创伤愈合方面的生物学功能

调控因子	蜂蜜种类	免疫调控活性	参考文献
阿拉伯半乳糖 261 相对分子 质量的成分	香贯花蜂蜜	单核细胞激活	Gannabathula 等 ^[9]
5.8kDa 的成分	丛林蜂蜜	中性粒细胞激活	Fukuda 等 ^[8]
蜂王浆糖蛋白1	麦卢卡蜂蜜	单核细胞激活	Tonks 等 ^[10]
蜂王浆糖蛋白1	金合欢蜂蜜	巨噬细胞激活	Majtan 等 ^[11]
芹黄素	金合欢蜂蜜	角质化细胞激活	Majtan 等 ^[12]
山柰酚	白兰瓜蜂蜜	抑制 MMP-9	Majtan 等 ^[13]
	白兰瓜蜂蜜	抑制 MMP-9	Majtan 等 ^[13]

具有两个方面的屏障作用:一方面防止体内水分、电解质、其他物质丢失;另一方面阻止外界有害物质的侵入。皮肤受损后,多种免疫细胞被激活,其中最主要的即巨噬细胞,具有强大的吞噬作用和抗原递呈作用。皮肤中的巨噬细胞主要由外周血液中的单核细胞演变而来。当皮肤受损后,单核细胞透过血管壁并释放酶类裂解细胞外基质蛋白,随后迁往皮肤创面。巨噬细胞可以通过经典途径(即脂多糖和干扰素- γ)被激活,也可被 IL-4 和 IL-13 激活^[14]。由脂多糖激活的巨噬细胞能够合成并分泌炎症介质,包括 TNF- α 、NO 和 IL-6。而 IL-4 或 IL-13 激活的巨噬细胞则在促进创面肉芽组织生长、促进血管生成方面起到重要作用。此外,巨噬细胞尚可分泌多种其他细胞因子和生长因子,促进新鲜毛细血管的生长、胶原合成及纤维化^[15]。

近年来,为了探究蜂蜜促进创面愈合方面的分子机制,巨噬细胞或单核细胞逐渐发展为一种较为成熟的用来监测和验证蜂蜜中免疫调节因子活性的实验

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院神经外科

通讯作者:杨义,电子信箱: yangyipumch@sina.com

模型。Tonks 等^[16]认为蜂蜜之所以可以促进创面愈合,其机制就在于创周单核-吞噬细胞分泌促炎因子,调控炎症反应。研究发现,用 1% (w/v) 的麦卢卡蜂蜜或蜂王浆孵化后,单核细胞系 MM6 (Mono Mac 6) 及人外周单核细胞能释放细胞因子,显示出较强的免疫调控作用。与普通糖水(人造蜂蜜)相比较,各种类型的蜂蜜都可诱导并刺激 MM6、人外周单核细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6。这其中尤以蜂王浆的效应最强。研究人员同时指出,蜂蜜中虽存在浓度为 56~690pg/ml 的浓缩内毒素,但其不良反应基本可以忽略不计,而蜂蜜对 MM6 的刺激作用与内毒素并无关系^[17]。值得注意的是,MM6 细胞对内毒素很敏感,蜂蜜中的内毒素可能对 MM6 起作用。内毒素又称“热源”,其化学成分有磷脂多糖-蛋白质复合物,其毒性成分主要为类脂质 A,可引起发热、微循环障碍、内毒素休克及播散性血管内凝血等;多黏菌素 B 可拮抗内毒素对机体的危害作用。低至 3.1pg/ml 的内毒素即可对 MM6 产生刺激作用,而 100pg/ml 的内毒素将刺激 MM6 细胞释放大量的 IL-6^[18]。

Timm 等^[17]曾比较了 4 种不同蜂蜜(含麦卢卡蜂蜜)刺激 MM6 细胞产生促炎因子 IL-6 的能力,结果显示 18h 后,天然蜂蜜刺激产生 IL-6 的量最大。他们认为蜂蜜中具有免疫调控作用的成分具有以下特点:①耐热;②相对分子质量非常大(>20kDa);③多黏菌素 B(具有内毒素拮抗活性)可破坏蜂蜜的免疫调控作用。这些特点与内毒素完全相符。然而,Tonks 等^[10]则认为蜂蜜被加热以后,其刺激 MM6 细胞分泌细胞因子的活性大大下降;而且即便在多黏菌素 B 存在的情况下,蜂蜜刺激 MM6 细胞产生细胞因子的作用依然能被观察到。Gannabathula 等^[9]也做了类似研究,对新西兰蜂蜜刺激单核细胞系 THP-1 和 U937 产生 TNF- α 的作用进行了观察和对比。

很多天然多肽、天然蛋白都有非特异性的免疫调控作用。一般认为,这种免疫调控作用的生物学机制即上述天然多肽或蛋白可特异性结合靶细胞表面的特定受体,激活下游的细胞信号转导通路,最终影响免疫因子的合成和分泌。业已证明,糖基化蛋白即具有诱导巨噬细胞分泌 TNF- α 的能力,而 TNF- α 可介导组织损伤的修复。Majtan 等^[11]研究发现,天然合金欢蜂蜜可刺激鼠类巨噬细胞产生 TNF- α ,而去蛋白的蜂蜜则无此作用,这表明蜂蜜中起免疫调控作用的可能是其蛋白成分(主要为 55kDa 的蜂王浆糖

蛋白)。进一步的研究发现,蜂王浆糖蛋白经过适当的解脲消化后,其免疫调节作用更强;蜂王浆蛋白的 N 末端结构域才是免疫调控的核心部分^[11]。因此,可以推测蜂蜜中的内毒素可能在单核-吞噬细胞的激活过程中起重要作用。另外,Majtan 等^[12]发现,原代培养的表皮角化细胞在浓度为 25 μ g/ml 的蜂王浆糖蛋白的刺激作用下,产生 TNF- α mRNA 的量是原来的两倍。在蜂王浆糖蛋白作用下,人角化细胞产生 IL-1 β 和转化生长因子- β (TGF- β) 的量也成倍增加。蜂蜜中另一免疫调控蛋白是 II 型阿拉伯半乳糖蛋白,分子质量为 110kDa,可刺激单核细胞系 THP-1 和 U937 产生 TNF- α ^[9]。

经过 γ 射线照射消毒后,蜂蜜中的动植物成分如细菌孢子等均失去活性,但内毒素的分子结构保持不变,此时蜂蜜仍然具有免疫调控作用。因此,虽然蜂蜜中有很多天然的动植物成分,有研究者推测,真正起免疫调控作用的还是其中的内毒素。内毒素是革兰阴性细菌细胞壁中的一种成分,叫做脂多糖(LPSs)。其分子结构包括亲水的多聚糖部分和疏水的类脂质 A。内毒素刺激巨噬细胞产生促炎因子,而这些细胞因子在生理状况下受到严密地调控,因为过量的细胞因子会通过级联放大效应诱发机体炎症反应,甚至导致严重的败血症性休克。

二、蜂蜜与 ROSs 的关系

近 10 余年来,许多研究发现蜂蜜能够快速地抑制感染,减轻炎症反应、水肿、疼痛和异味,而且基本没有不良反应。一般认为,蜂蜜的上述作用实质上是其抗炎、抗氧化应激的特性^[19]。众所周知,慢性创面组织因浸润有大量的中性粒细胞和巨噬细胞,并释放大量的 ROS,被认为是高氧化还原电位的环境。ROS 是一种强氧化剂,其意义在于广泛杀灭微生物,包括细菌、芽胞、病毒、真菌等,其杀灭速度较氯快 600~3000 倍。但长期暴露于过量的 ROS 中,组织细胞将严重损伤,极不利于创面愈合^[20]。阻断慢性炎症循环的关键在于清除 ROS,蜂蜜的抗氧化性质使其成为促进创面愈合的天然药物。蜂蜜中的抗氧化物质包括黄酮类、酚醛酸、过氧化物酶、过氧化物异构酶、抗坏血酸、类胡萝卜素及美拉德反应产物。不同花粉和地域来源的蜂蜜,其抗氧化物质的含量与成分有所不同^[21]。Habtermariam^[22]研究发现,酚类化合物(如咖啡酸等)可有效地抑制 L929 细胞中 TNF- α 介导的细胞毒性反应。Kassim 等^[23]在一项体外实验中发现,受到内毒素或 IFN- γ 刺激的细胞系 RAW246.7

和巨噬细胞在蜂蜜甲醛提取物或乙酸乙酯提取物的作用下可减少 NO 的产生;而乙酸乙酯提取物的抑 NO 作用较甲醛更强。但相比于乙酸乙酯提取物,甲醛提取物中含有更多的酚类化合物,包括鞣花酸、五倍子酸、杨梅酮酸、绿原酸和咖啡酸等。Woo 等^[24]发现在许多植物提取物、蜂蜜及蜂胶中含有白杨素。白杨素是一种天然的黄酮类物质,具有抑制巨噬细胞环氧酶-2(COX-2)基因表达的作用,该作用是通过阻断 LPS 与核因子 IL-6 的结合实现的。在细胞炎性反应中,IL-6 是起关键作用的转录因子。

蜂蜜抑制氧化应激的具体机制尚不十分清楚。目前认为有两种可能,一是蜂蜜中的还原性物质抑制中性粒细胞的呼吸爆发;二是直接清除 ROS。Leong 等^[25]研究发现,蜂蜜对中性粒细胞 ROS 产生的抑制作用呈剂量依赖效应,但却与蜂蜜中酚醛酸等的含量无直接关系,这提示蜂蜜的抗氧化应激作用主要是通过抑制中性粒细胞呼吸爆发介导的。

Fukuda 等^[8]在 1 项动物实验中发现,丛林蜂蜜对中性粒细胞有趋化作用。这项研究同时发现,将丛林蜂蜜注入小鼠的肿瘤组织后,大量中性粒细胞浸润肿瘤坏死区域,产生大量的 ROS,而肿瘤的体积则相应减小。综合这些实验结果,可以看出,蜂蜜既能减少 ROS 的产生,又能趋化中性粒细胞并促进 ROS 产生,这取决于特定的微环境。

三、蜂蜜的抗炎作用

炎症是具有血管系统的活体组织对损伤因子所发生的防御反应。在炎症过程中,一方面通过炎症充血和渗出反应,以稀释、杀伤和包围损伤因子,另一方面损伤因子直接或间接造成组织和细胞的破坏。炎症的发生需要炎性介质的参与,如内毒素、细胞因子和 NO 等,因此,抑制炎性反应的关键是控制炎性介质。蜂蜜通过抗炎作用,可以减轻水肿和渗出,缩小瘢痕,促进炎性创伤的愈合^[26]。蜂蜜的抗炎作用表现在多个方面:①阻断经典补体途径;②抑制 ROS 的产生;③抑制白细胞浸润^[27];④抑制 COX-2 和 NO 的合成与释放^[28];⑤抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的作用(在慢性创伤组织中促进组织基质和促细胞生长因子的降解)^[13]。

然而,Majtan 等^[12]发现,对于原代培养的人角化细胞,1% (w/v)的金合欢蜂蜜可显著增加 MMP-9 mRNA 的表达。此外,在人体皮下注射适量蜂蜜 24h 后,皮下基膜和血管附近 MMP-9、IV 型胶原的含量显著增高^[13]。这些实验结果与先前的结论矛盾,因

此,笔者推测,蜂蜜作为一种免疫调节物质,既有抗炎作用,又有促炎作用,其决定因素为细胞微环境。当微环境中炎性介质在低水平时,蜂蜜刺激炎性细胞因子和 MMP-9 的表达;而微环境发生炎性浸润时,蜂蜜则抑制炎性反应和 MMP-9 的表达。这个假说在理论上为蜂蜜治疗皮肤炎性病变打开了新的大门。

总之,富含黄酮类和酚类化合物的蜂蜜在抗炎方面的作用已被部分认识。但是,这些物质在体内抗炎的详细机制及相互作用仍需进一步研究。当传统创伤治疗方法不奏效或者疗效不明显时,蜂蜜的应用前景更显广阔。蜂蜜的抗菌作用目前已被较为完备地阐述,但其调节免疫反应、对抗氧化应激及炎症调节方面的作用仍需进一步深入探索,这对于更好地将蜂蜜应用于创伤的临床治疗至关重要。

参考文献

- Lee DS, Sinno S, Khachemoune A. Honey and wound healing: an overview[J]. *Am J Clin Dermatol*, 2011, 12(3):181-190
- Leal WS. Healing power of honey[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(22):8763-8764
- Belcher J. Dressings and healing with honey[J]. *Br J Nurs*, 2014, 23(6):S22
- Mayer A, Slezak V, Takac P, et al. Treatment of non-healing leg ulcers with honeydew honey[J]. *J Tissue Viability*, 2014, 23(3):94-97
- Carnwath R, Graham EM, Reynolds K, et al. The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates[J]. *Vet J*, 2014, 199(1):110-114
- Majtan J, Klaudiny J, Bohova J, et al. Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: possible therapeutic implications[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(4):671-677
- Kwakman PH, Te VA, de Boer L, et al. How honey kills bacteria? [J]. *FASEB J*, 2010, 24(7):2576-2582
- Fukuda M, Kobayashi K, Hirono Y, et al. Jungle honey enhances immune function and antitumor activity[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011:908743
- Gannabathula S, Skinner MA, Rosendale D, et al. Arabinogalactan proteins contribute to the immunostimulatory properties of New Zealand honeys[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(4):598-607
- Tonks AJ, Dudley E, Porter NG, et al. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(5):1147-1155
- Majtan J, Kovacova E, Bilikova K, et al. The immunostimulatory effect of the recombinant apalbumin 1-major honeybee royal jelly protein-on TNFalpha release[J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(2):269-278
- Majtan J, Kumar P, Majtan T, et al. Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in

human keratinocytes[J]. *Exp Dermatol*,2010,19(8):e73-e79

- 13 Majtan J, Bohova J, Garcia-Villalba R, *et al.* Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing[J]. *Arch Dermatol Res*,2013,305(7):619-627
- 14 Gordon S. Alternative activation of macrophages[J]. *Nat Rev Immunol*,2003,3(1):23-35
- 15 Mirza R, Dipietro LA, Koh T J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice[J]. *Am J Pathol*, 2009,175(6):2454-2462
- 16 Tonks AJ, Cooper RA, Jones KP, *et al.* Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes[J]. *Cytokine*,2003,21(5):242-247
- 17 Timm M, Bartelt S, Hansen EW. Immunomodulatory effects of honey cannot be distinguished from endotoxin[J]. *Cytokine*,2008,42(1):113-120
- 18 Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, *et al.* Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation[J]. *J Surg Res*,2001,100(1):127-134
- 19 Robson V, Dodd S, Thomas S. Standardized antibacterial honey (Medihoney) with standard therapy in wound care: randomized clinical trial[J]. *J Adv Nurs*,2009,65(3):565-575
- 20 Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing[J]. *Am J Surg*,2003,186(3):259-263
- 21 van den Berg AJ, van den Worm E, van Ufford HC, *et al.* An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey[J]. *J Wound Care*, 2008, 17(4):172-174,

176-178

- 22 Habtemariam S. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor- α in L-929 tumor cells[J]. *J Nat Prod*,1997,60(8):775-778
- 23 Kassim M, Achoui M, Mustafa MR, *et al.* Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity[J]. *Nutr Res*,2010,30(9):650-659
- 24 Woo KJ, Jeong YJ, Inoue H, *et al.* Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity[J]. *FEBS Lett*,2005,579(3):705-711
- 25 Leong AG, Herst PM, Harper JL. Indigenous New Zealand honeys exhibit multiple anti-inflammatory activities[J]. *Innate Immun*, 2012,18(3):459-466
- 26 Yaghoobi R, Kazerouni A, Kazerouni O. Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: a review[J]. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*,2013,8(3):100-104
- 27 Leong AG, Herst PM, Harper JL. Indigenous New Zealand honeys exhibit multiple anti-inflammatory activities[J]. *Innate Immun*, 2012,18(3):459-466
- 28 Hussein SZ, Mohd YK, Makpol S, *et al.* Gelam honey inhibits the production of proinflammatory mediators NO, PGE(2), TNF- α , and IL-6 in carrageenan-induced acute paw edema in Rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2012,2012:109636
(收稿日期:2015-03-05)
(修回日期:2015-03-10)

(上接第 191 页)

参考文献

- 1 Mäntynen V, Konttila T, Stenroos M. Investigations of sensitivity and resolution of ECG and MCG in a realistically shaped thorax model[J]. *Phys Med Biol*,2014,59(23):7141-7158
- 2 Gapelyuk A, Wessel N, Fisher R, *et al.* Detection of patients with coronary artery disease using cardiacmagnetic field mapping at rest[J]. *Electrocardiol*,2007,40(5):401-407
- 3 Smith FE, Langley P, Van Leeuwen P, *et al.* Comperison of magnetocardiography and electrocardiography[J]. *Anadolu Kardiyol Dery*, 2007,7(11):20-22
- 4 王波,唐发宽,华宁,等. 高温超导量子干涉器在不稳定性心绞痛诊断中的初步研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2014,8:808-810
- 5 李英梅,金惠根,权薇薇,等. 冠心病患者的心磁图应用[J]. *临床医学*,2008,5:1-3
- 6 权薇薇,陆国平,李英梅,等. 心电图正常或呈非特异性改变的冠心病患者心磁图分析[J]. *中华心脑血管病杂志*,2006,06:500-503
- 7 Patk JW, Hill PM, Chung N, *et al.* Magnetocardiography predicts coronary artery disease in patients with acure chest pain[J]. *Ann Noninvasive Electrocardiol*,2005,10(3):312-323

- 8 Selbig D, Primin M, Gapelyuk A, *et al.* Early diagnosis of single coronaryvessel disease[C]. Helsinki: University of Technology,2001:517-520
- 9 赵丹. 心磁图在冠心病诊断中的临床应用[D]. 天津医科大学, 2010
- 10 Hecker T, Auth-Eisernitz S, Chaikovsky I, *et al.* Maganetoicardiographic mapiing: a noninvasive approach to follow up percutaneous transluminal coronary angioplasty results[A]. Helsinki:University of Technology, Espoo,2001:572-575
- 11 邱春霞,华宁,林乐健,等. 高温超导心磁图仪在冠心病中的应用初探[J]. *中国心血管病研究*,2013,11(4):245-247
- 12 李英梅,金惠根,权薇薇,等. 心磁图用于冠状动脉支架置入术后随访的价值[J]. *中国临床医学*,2008,01:20-21
- 13 Lin HK, Kwon H, Chung N, *et al.* Usefulness of magnetocardiogram to detect unstable angina pectoris and non-ST elevation myocardial infarction[J]. *Am Cardiol*, 2009,103(4):448-454
- 14 Ito Y, Shiga K, Yoshida K, *et al.* Development of a magnetocardiography based algorithm for discrimination between ventricular arrhythmias originating from the right ventricular outflow tract and those originating from the aortic sinus cusp: a pilot study[J]. *Heart Rhythm*, 2014,11(9):1605-1612
(收稿日期:2015-02-25)
(修回日期:2015-03-10)