

白蜡虫抗突变实验与主要功效成分分析*

冯颖, 陈晓鸣, 何钊, 郭宝华, 马艳

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南 昆明 650224)

摘要: 对白蜡虫的抗突变功能进行实验研究, 并分析了甲壳素、多糖、维生素和黄酮类等。以白蜡虫为抗突变材料喂饲小鼠, 48 h检测微核的发生率, 各剂量组均比对照组的微核率低, 其中高剂量组与对照有显著差异, 抑制率为34.19%, 说明白蜡虫能够对抗环磷酰胺产生的致突变作用, 具有明显的抗突变功能。分析结果表明: 白蜡虫含有2.14%甲壳素; 7.2%的粗多糖, 除蛋白后的多糖含量4.54%, 多糖含量以葡萄糖计为28.4%, 由葡萄糖、甘露糖和果糖组成, 3种糖的摩尔比为5:21:1。白蜡虫多糖为一种杂多糖-蛋白复合物; 白蜡虫还含有1.3%的总黄酮和多种维生素。甲壳素、多糖、维生素和黄酮类物质应为抗突变作用的主要功效成分。

关键词: 白蜡虫; 抗突变; 甲壳素; 多糖; B族维生素; 黄酮

中图分类号: S899.1 文献标识码: A

Antimutation Experiment of White Wax Scale (*Ericerus pela*) and Analysis of Main Function Factors

FENG Ying, CHEN Xiaoming, HE Zhao, GUO Baohua, MA Yan

(Research Institute of Resource Insects, CAF, Key Laboratory of Resource Insect Cultivation and Utilization, State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract This paper dealt with the antimutation experiment of white wax scale and analysis of main functional factors. The micronucleoli rates in every experimental dose groups were lower than the contrast in 48 h. The difference between high dose group and contrast was obvious. The restriction rate of micronucleoli in high dose group was 34.19%. The results showed that white wax scale could restrict mutation caused by CP and had clear antimutation function. White wax scale contained 2.14% chitin. White wax scale contained 7.2% crude polysaccharide. The polysaccharide content was 4.54% after removing protein by enzyme. The sugar content of the polysaccharide was 28.4% as glucose, composed of glucose, galactose and fructose in molar ratio of 5:21:1. The polysaccharide isolating from white wax scale was polysaccharide-protein complex. This insect contained 1.3% flavonoid and several kinds of vitamins. Chitin, polysaccharide, vitamin and flavonoid were main antimutation functional factors of white wax scale.

Key words *Ericerus pela*; antimutation; chitin; polysaccharide; vitamin; flavonoid

突变是指生物体的遗传物质发生变化, 而导致遗传的表型发生变化。人体除了自发突变外, 还会受到外界环境中的致突变物的影响而发生突变, 在人们的日常生活中, 有许多物质会引起突变, 如多环

芳烃化合物、苯、甲醛、有机氯等化学物质, 黄曲霉素, 紫外线, 电离辐射, 病毒等等。突变发生于体细胞, 影响到发生突变的个体, 突变发生在性细胞, 就会造成性细胞的遗传性改变, 从而影响后代, 突变是

收稿日期: 2005-11-15

基金项目: 国家攻关项目(2004BA502B04)、云南省科技攻关项目(2001NG16)和科技部成果转化项目(02EIN215301189)部分研究内容

作者简介: 冯颖(1960-), 女, 云南昆明人, 博士, 研究员, 首席专家。

* 动物试验由昆明医学院云南省天然药物药理实验室协助完成, 特此致谢!

人体发生癌病变、遗传性疾病等疾病的原因之一。为了减少突变对人类的危害,除了控制环境中的致突变物和减少疾病外,还可以用一些物质来预防和减少突变的发生,研制抗突变保健食品的目的就是通过食用抗突变功能食品来达到抵抗和减少突变的影响。在我国,抗突变的保健食品种类较少,据 2000 年统计,仅有 24 种,约占所有功能类型的 1%,主要有硫酸软骨素、乳酸菌、芦笋等,昆虫的抗突变功能研究很少。对抗突变功能及其功能因子的研究报道也较少,抗突变的功效成分主要有甲壳素、多糖、维生素和黄酮类物质等^[1-3]。

白蜡虫 (*Ericerus pela* Chavannes) 是我国的传统资源昆虫,有悠久的培育利用历史。传统的白蜡生产是以获取白蜡虫雄幼虫分泌的白蜡为目的,只利用雄虫生产白蜡,而大量怀卵的雌成虫除部分用于繁殖后代外,没有得到充分的利用。笔者对白蜡虫的营养成分、功能作用和食用安全性等进行了多年的研究,结果表明,白蜡虫含有丰富的蛋白质、氨基酸、维生素等营养成分,食用安全^[4];白蜡虫还具有特异性免疫调节功能^[5],具有较好的营养保健价值。本文对白蜡虫的抗突变功能进行了试验研究,并对甲壳素、多糖等主要功效成分进行了分析。以期通过研究,为提高白蜡生产的综合效益奠定科学基础,促进白蜡产业化发展。

1 材料和方法

1.1 供试材料和剂量

供试白蜡虫种虫,采自云南昆明,连枝采下、带回室内,剥下种虫,洗净,55℃烘干,粉碎后备用。

试验设计低、中、高剂量和对照 4 组,低剂量组每 kg 小鼠体质量 1 g 白蜡虫粉;中剂量组 2 g 白蜡虫粉;高剂量组 3 g 白蜡虫粉;空白对照组喂饲普通饲料(全价营养饲料),在全价营养饲料中以 10%、20%、30% 的比例加入白蜡虫粉,各剂量组饲料分别混匀加水后制成小饼干,50~60℃烘干备用。

1.2 抗突变作用——骨髓嗜多染红细胞微核试验

试验选用 18~22 g ICR 小鼠(滇实动证 2004010 号,昆明医学院实验动物中心提供)48 只,雌雄各半,分为空白、低、中、高剂量 4 组,每组 12 只。屏障环境条件饲养,室内温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,光照昼夜交替 12 h/12 h 自由饮用高压灭菌水。每天清晨喂饲对照和各剂量组混合饲料 10 g·kg⁻¹ 体质量,吃完后,下午喂饲普通饲

料。连续喂饲 30 d 后,每组动物腹腔注射环磷酰胺 (C.P) 0.04 g·kg⁻¹ 体质量,于注射 C.P 后 48 h 处死动物,取胸骨髓涂片常规制片 Giemsa 染色,油镜检查,每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞,记录微核细胞出现数,并计算微核率和抑制率(抑制率 = 对照组微核细胞出现数 - 试验组微核细胞出现数 / 对照组微核细胞出现数 × 100%),观察给予白蜡虫后小鼠是否具有对抗环磷酰胺的致突变作用。

1.3 甲壳素分析

根据白蜡虫蛋白含量较高的特点,采用碱酸法提取甲壳素,方法为以 7% NaOH、反应温度 80℃、反应时间 1 h 的条件脱除蛋白,水洗至中性后,以 0.2 mol·L⁻¹ HCL 室温、反应时间 70 min 的条件脱出灰分,高锰酸钾和草酸脱色,水洗至中性,烘干、称质量。提取的样品用凯氏定氮法分析氮含量,灼烧法分析灰分含量,质量法分析水分含量。X-远射和红外光谱定性分析,并与标准样品(SIGAMA 公司)比较。

1.4 多糖分析

采用热水浸提、醇沉淀的方法进行提取,方法为样品加 8 倍水 80℃水浴提取 3 次,合并提取液,真空浓缩,4 倍(体积比)95% 乙醇 4℃醇析,离心得沉淀物,无水乙醇洗涤、干燥后得粗多糖。采用木瓜蛋白酶(上海源聚生物科技公司,批号 040812,酶活力 > 2 000 U·mg⁻¹)进行酶解除蛋白,酶解条件为 100 U·mg⁻¹ 底物浓度、50℃条件下,水解 5 h 酶解液减压浓缩后加 4 倍 95% 乙醇沉淀,过滤,干燥。采用凯氏定氮法测定氮含量。粗多糖经水解后采用气相色谱法分析测定其单糖的组成和摩尔比。

1.5 维生素分析

采用高效液相色谱和荧光法分析。

1.6 黄酮类物质分析

采用高效液相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 抗突变作用——骨髓嗜多染红细胞微核试验

小鼠骨髓细胞微核试验是评价某种物质是否具有抗突变作用的指标之一,微核是染色体和染色质受到损伤以后产生的染色体片段,其频率的高低可反映细胞 DNA 的受损程度,环磷酰胺 (C.P) 是已知的致突变物,会造成小鼠骨髓细胞出现微核^[1,2]。在小鼠喂饲低、中、高剂量的白蜡虫粉 30 d 后,注射环磷酰胺,在 48 h 检测微核的发生率,结果见表 1 试

验结果显示, 48 h 时各剂量组均比对照组的微核率低, 其中高剂量组与对照有明显差异, 抑制率为 34. 19%, 说明白蜡虫能够对抗环磷酰胺产生的致突变作用, 具有明显的抗突变功能。

表 1 白蜡虫进行小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果

组别	CP 剂量 / (g·kg ⁻¹)	白蜡虫剂量 / (g·kg ⁻¹)	微核率 ($\bar{x} \pm SD$) / %	抑制率 / %
CP 阳性对照组	0. 04		28. 43 ± 6. 02	
CP+ 低剂量组	0. 04	1	23. 29 ± 6. 37	18. 08
CP+ 中剂量组	0. 04	2	22. 43 ± 8. 12	21. 11
CP+ 高剂量组	0. 04	3	18. 71 ± 3. 86 ^a	34. 19

a 与 CP 阳性对照组比较有显著性差异 (P < 0. 05)

白蜡虫雌成虫的抗突变作用与剂量有关, 在 48 h 检测时, 其微核抑制率与剂量成明显正相关 (图 1)。余红等^[8]用蒲公英 (*Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz) 进行了抗突变作用研究, 蒲公英在 5、10、20 g·kg⁻¹ 的低中高剂量组, 其微核抑制率可分别达到 36. 0%、47. 1%、58. 7%。在本试验中, 高剂量组 3 g·kg⁻¹ 条件下, 白蜡虫的微核抑制率可达 34. 19%。由此分析, 作为保健食品, 没有毒副作用, 如果适当增加剂量, 白蜡虫对抗环磷酰胺的致突变作用可能更有效。

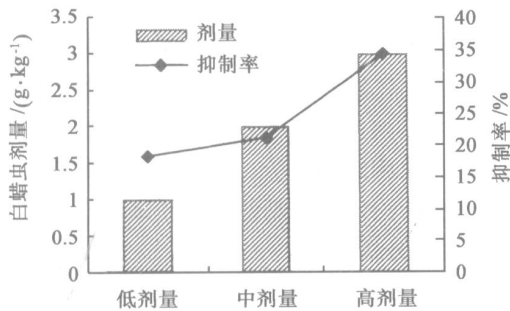


图 1 小鼠骨髓微核抑制率与白蜡虫剂量的关系

2.2 白蜡虫抗突变的主要功能成分分析

自然界中有一些物质具有抗突变的功能, 实验研究表明, 多糖、甲壳素、黄酮、维生素等都具有抗突变的作用。这些物质通过与致突变物作用使其失去活性, 或者阻断正常细胞转变为突变细胞、帮助突变细胞修复等方式来达到抗突变功能, 维生素通过辅助等作用来达到抗突变效果^[7-15]。本文对白蜡虫的甲壳素、多糖、维生素、总黄酮等进行了分析。

2.2.1 白蜡虫甲壳素分析 甲壳素, 又称几丁质,

是昆虫表皮的主要成分。甲壳素具有免疫调节等多种保健功能。研究表明来源于家蝇 (*Musca domestica vicina* Macquart) 的甲壳素具有免疫调节、抗突变等多种保健功能^[16]。

白蜡虫雌成虫怀卵后, 虫体膨大, 形成球状的虫囊, 直径约 0.8~1.2 cm, 虫囊表面由蛋白质、甲壳素和多糖等组成。通过用碱酸法除去蛋白和钙等无机离子, 高锰酸钾和草酸脱色后, 可获得乳白色的甲壳素。提取的甲壳素经 X-衍射和红外光谱分析并与甲壳素标准样品 (SIGAMA 公司) 图谱比较 (图 2、3、4), 红外光谱分析中, 3 400 cm⁻¹ 是 O-H 伸缩振动吸

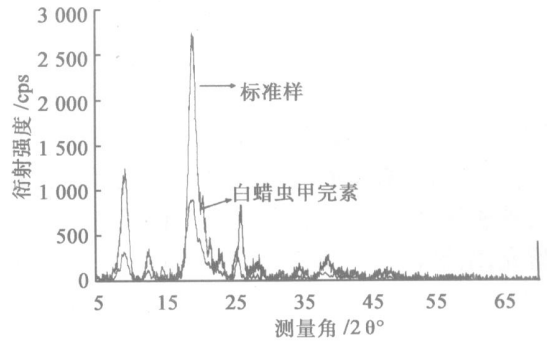


图 2 白蜡虫甲壳素与标样的 X-衍射图

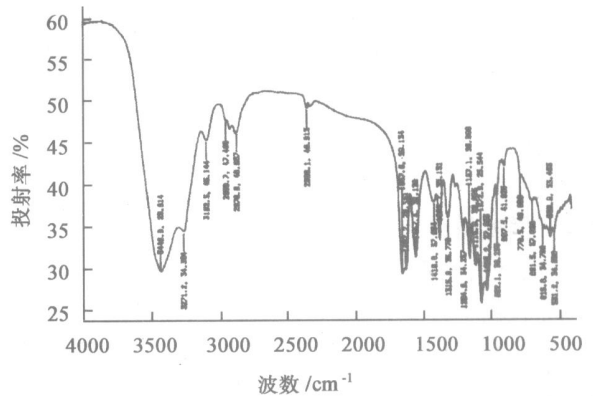


图 3 甲壳素标样红外光谱图

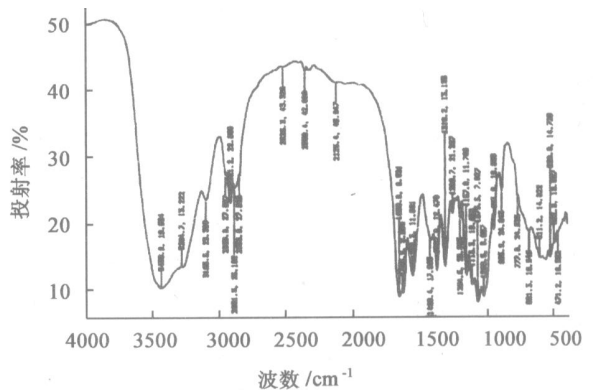


图 4 白蜡虫甲壳素红外光谱图

收峰; $3\ 270\ \text{cm}^{-1}$ 是 N-H 伸缩振动吸收峰; $2\ 960\ \text{cm}^{-1} \sim 2\ 879\ \text{cm}^{-1}$ 的 3 个吸收峰, 是 C-H 伸缩振动吸收峰; 在 $1\ 657\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 557\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 315\ \text{cm}^{-1}$ 的吸收峰, 分别是酰胺 I、II、III 谱带; 这 3 个吸收峰是甲壳素的特征吸收峰, 分析可见, 白蜡虫甲壳素和甲壳素标样的红外光谱基本相同; 从 X 衍射图谱可以看出, 甲壳素标样在 $2\theta = 9\ 28^\circ$ 和 $2\theta = 19\ 11^\circ$ 处有衍射峰, 白蜡虫甲壳素在 $2\theta = 9\ 04^\circ \sim 9\ 25^\circ$ 和 $2\theta = 19\ 05^\circ \sim 19\ 21^\circ$ 之间有也有明显的甲壳素的结晶特征峰, 说明它是一种晶体化合物, 可见白蜡虫甲壳素的 X 衍射图谱和甲壳素标样的 X 衍射图谱很相似。分析结果表明, 白蜡虫甲壳素与甲壳素标样化学结构一致, 属于同一物质。提取的白蜡虫卵囊甲壳素含量为 2.14%, 经分析, 白蜡虫甲壳素的 N 含量为 6.96%, 灰分含量 1.72%, 水分含量 5.74%。说明白蜡虫除含有丰富的蛋白质外, 还含有一定量的甲壳素。

2.2.2 白蜡虫多糖分析 活性多糖具有抑制肿瘤、调节免疫功能、抗突变等多种生物功能, 已取得研究结果主要是在植物多糖和真菌多糖方面, 昆虫多糖的研究极少^[9-17]。

采用热水浸提、醇沉淀的方法, 从白蜡虫中可得褐色的不定型物质, 经用苯酚-硫酸法和凯氏定氮法测定, 粗提物中含有多糖成分和蛋白质, 白蜡虫粗多糖的含量为 7.2%, 粗提物的多糖含量以葡萄糖计为 22.1%, 粗提物中的 N 含量为 6.64%。采用酶法除蛋白, 可去除 52.3% 的蛋白, 除蛋白后的多糖含量 4.54%, 多糖含量以葡萄糖计为 28.4%。粗多糖经冷水水解, 色谱分析表明, 主要由葡萄糖、甘露糖和果糖组成, 其中甘露糖的浓度较高, 3 种糖的摩尔比为 5:21:1。试验结果表明, 采用热水浸提、醇沉淀的方法得到的白蜡虫多糖为一种杂多糖-蛋白复合物。

2.2.3 维生素 维生素是人体正常生理代谢不可缺少的一类小分子物质, 多数不能在体内合成, 维生素的抗突变功能主要是辅助和互补作用。对白蜡虫的部份水溶性和脂溶性维生素含量进行了分析, 分析结果可见, 白蜡虫含有维生素 PP56 $30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $B_1\ 2.30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $B_2\ 2.70\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $B_6\ 3.70\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $V_A\ 1.12\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $V_E\ 0.12\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 含量较丰富。

2.2.4 黄酮类物质 研究表明, 蜂胶除具有调节免疫功能外, 还具有抗肿瘤、抗突变的功能, 其主要的

活性成分为黄酮类, 总黄酮含量可达 10% ~ 35%^[3]。经分析, 白蜡虫含有 1.31% 的总黄酮。

3 结论与讨论

抗突变作用——小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验结果显示, 白蜡虫高剂量的微核发生率明显低于阳性对照 C.P 组, 有显著性差异 ($P < 0.05$), 且有明显的剂量效应关系, 说明白蜡虫具有抗突变作用。白蜡虫含有 2.14% 的甲壳素; 4.54% 的多糖, 多糖由葡萄糖、甘露糖和果糖组成, 为一种杂多糖-蛋白复合物; 含有维生素 PP56 $30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $B_1\ 2.30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $B_2\ 2.70\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $B_6\ 3.70\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $V_A\ 1.12\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $V_E\ 0.12\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 还含有 1.31% 的总黄酮, 白蜡虫的抗突变作用与这些成分有关。

在保健食品的研究中, 对食品抗突变功能及其功能因子的研究报道较少, 具有抗突变功能的食品主要有枸杞 (*Lycium barbarum* L)、胡萝卜素、青椒 (*Zanthoxylum schinifolium* Sieb et Zucc)、西红柿 (*Lycopersicon esculentum* Mill)、蜂胶和真菌多糖等^[17, 17, 21]。昆虫中有报道黄粉虫 (*Tenebrio molitor* L) 幼虫的微核试验表明具有抗突变作用^[18]。赵芬琴等^[8]用层析法从桦褐孔菌 (*Fuscoporia obliqua* (Pers Fr) Aoshi) 中分离得到了具有抗突变作用的物质, $3\beta, 22\text{-R-hydroxy lanosta-8, 24-diene}$ (inotodiol), 并确定了结构, 是目前报道的具有确切化学结构的抗突变功能因子。一般认为, 抗突变的功效成分主要有甲壳素、多糖、维生素和黄酮类物质等^[9-15]。雷朝亮^[16]等用蝇蛆几丁糖进行了小鼠骨髓微核试验、睾丸染色体畸变试验和 TA98 的抗突变试验, 试验结果表明, 蝇蛆几丁糖具有抗突变功能。对山药 (*Dioscorea batatas* Deamc) 活性多糖、芦荟多糖、姬松茸 (*Agaricus blazei* Murrill) 多糖、松杉灵芝 (*Ganoderma tsugae* Murrill) 多糖等的研究表明, 多糖类物质具有很好的抗突变功能^[9-14]; 类黄酮和维生素的抗突变研究表明, 类黄酮具有较好的抗突变作用; 维生素 C、B 族、A 对直接致突变物 1-硝基芘具有抗突变功能, 而对间接致突变物色氨酸热解产物的抗突变作用较差, 维生素的抗突变功能主要是辅助和互补作用^[15]。成分分析证明, 白蜡虫含有较丰富的粗多糖、几丁质、维生素、黄酮类物质, 白蜡虫具有的抗突变效果可能是这些物质综合作用的结果。白蜡虫具有丰富的蛋白质、氨基酸、微量元素,

具有免疫调节作用^[4,5],我国白蜡虫生产潜力巨大,年生产潜力在 2 000 t 以上,资源丰富,作为新的保健食品资源开发利用具有十分广阔的前景。

参考文献:

- [1] 凌关庭. 保健食品功能评价(四) [J]. 粮食与油脂, 2001(9): 46~47
- [2] 周俭. 保健食品设计原理及其应用 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 1~298
- [3] 毛跟年, 许牡丹. 功能食品生理特性与检测技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 70~74
- [4] 冯颖, 陈晓鸣, 陈勇, 等. 白蜡虫卵营养价值与食用安全性研究 [J]. 林业科学研究, 2001, 14(3): 322~327
- [5] 冯颖, 陈晓鸣, 马艳, 等. 白蜡虫免疫调节作用试验研究 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(2): 221~224
- [6] 俞红, 阮海星, 黄靖宇, 等. 蒲公英营养价值及其小鼠微核试验抗突变作用分析 [J]. 贵州医药, 2004 28(8): 762~763
- [7] 曾鼎昌, 洪振丰, 高碧珍, 等. 青椒和西红柿的抗微核突变作用研究 [J]. 海峡药学, 2000 12(1): 32~33
- [8] 赵芬琴, 朴惠善, 韩春姬. 桦褐孔菌的抗突变活性成分分析 [J]. 延边大学医学学报, 2004 27(4): 250~252
- [9] 王利平, 熊正俊, 赵国华. 活性多糖抗肿瘤和抗突变功能的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2001, 22(增刊): 54~56
- [10] 郑克岩, 张洁, 林相友, 等. 松杉灵芝多糖的抗突变作用 [J]. 吉林大学学报, 2005 43(2): 235~237
- [11] 阚健全, 王雅茜, 陈宗道, 等. 甘薯活性多糖抗突变作用的体外实验研究 [J]. 中国粮油学报, 2001, 16(1): 23~27
- [12] 姜成, 黄锦燕, 张学敏, 等. 姬松茸粗多糖抗突变的研究 [J]. 福建中医学院学报, 2003 13(1): 19~21
- [13] 董彩婷, 杨青, 肖元梅, 等. 芦荟多糖抗突变作用的试验研究 [J]. 华西大学学报, 2002, 33(3): 477~478
- [14] 阚健全, 王雅茜, 陈宗道, 等. 山药活性多糖抗突变作用的体外实验研究 [J]. 营养学报, 2001, 23(1): 76~78
- [15] 范远景. 类黄酮和维生素的抗突变研究 [J]. 营养学报, 2003 25(1): 18~22
- [16] 雷朝亮, 钟昌珍, 宗量炳, 等. 蝇蛆几丁糖保健功能的评价 [J]. 华中农业大学学报, 1998 17(2): 117~121
- [17] Vincent E C Ooi, Fang Li. Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes [J]. Current Medicinal Chemistry, 2000 7(7): 715~729
- [18] 杨兆芬, 林跃鑫, 陈寅山, 等. 黄粉虫幼虫营养成分分析和保健功能的实验研究 [J]. 昆虫知识, 1999, 36(2): 97~100