

九香虫油脂提取条件优化及体外抗乳腺癌活性研究

于姮梅^{1,2}, 赵帅^{1,2}, 蔡仁莲^{1,2}, 田莹^{1,2}, 郭建军^{1,2}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵阳 550025; 2. 农业农村部贵阳作物有害生物科学观测实验站, 贵阳 550025)

摘要: 为了促进九香虫油脂的开发, 采用单因素实验和正交实验对索氏抽提法提取九香虫油脂的工艺条件进行了优化, 并采用 CCK-8 法检测九香虫油脂对小鼠乳腺癌细胞 4T1 和人乳腺癌细胞 HCC1937 增殖的影响。结果表明: 九香虫油脂的最佳提取条件为液料比 6:1、提取温度 90℃、提取时间 3 h, 在此条件下九香虫油脂提取率为 $(44.270 \pm 1.679)\%$; 4、8、12、16 mg/mL 九香虫油脂作用 24 h, 均能抑制两种乳腺癌细胞的增殖, 且对于人乳腺癌细胞 HCC1937 的作用效果优于小鼠乳腺癌细胞 4T1; 另外, 九香虫油脂处理导致两种乳腺癌细胞形态及数量均发生明显变化。综上, 九香虫油脂对乳腺癌细胞具有显著抑制作用。

关键词: 九香虫; 九香虫油脂; 索氏抽提法; 抗乳腺癌活性

中图分类号: TS225.2; TS224.4 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)02-0034-05

Optimization of extraction conditions of *Aspongopus chinensis* Dallas oil and its anti-breast cancer activity in vitro

YU Hengmei^{1,2}, ZHAO Shuai^{1,2}, CAI Renlian^{1,2}, TIAN Ying^{1,2}, GUO Jianjun^{1,2}

(1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Guiyang, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the P. R. China, Guiyang 550025, China)

Abstract: In order to promote the development of the oil from *Aspongopus chinensis* Dallas, single factor experiment and orthogonal experiment were used to optimize the extraction conditions of *A. chinensis* Dallas oil by Soxhlet extraction method. Meanwhile, CCK-8 method was used to detect the effects of the extracted oil on the proliferation of mouse breast cancer cells 4T1 and human breast cancer cells HCC1937. The results showed that the optimal extraction conditions of *A. chinensis* Dallas oil were obtained as follows: liquid-solid ratio 6:1, extraction temperature 90℃, extraction time 3 h. Under the optimal conditions, the extraction rate of oil was $(44.270 \pm 1.679)\%$. The *A. chinensis* Dallas oil with the mass concentration of 4, 8, 12, 16 mg/mL treating for 24 h could inhibit the proliferation of two types of breast cancer cells, and the effect on human breast cancer cells HCC1937 was better than that on mouse breast cancer cells 4T1. Moreover, the morphology and quantity of the two types of cells were significantly changed by *A. chinensis* Dallas oil treatment. In summary, *A. chinensis* Dallas oil obtained has a significant inhibitory effect on breast cancer cells 4T1 and HCC1937 in vitro.

Key words: *Aspongopus chinensis* Dallas; *Aspongopus chinensis* Dallas oil; Soxhlet extraction method; anti-breast cancer activity

收稿日期: 2021-03-23; 修回日期: 2021-10-25

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2021]一般180)

作者简介: 于姮梅(1994), 女, 硕士研究生, 研究方向为资源昆虫及利用(E-mail)gs.hmyu19@gzu.edu.cn。

通信作者: 郭建军, 教授(E-mail)jjguo@gzu.edu.cn。

昆虫是地球上最大的生物类群, 具有种类多、数量大、繁殖速度快等特点, 长期以来被人类作为食品、药品和化学原料利用^[1], 其主要应用价值来自其体内丰富的蛋白质、油脂、碳水化合物等有机物质及多种无机物质^[2]。昆虫因其油脂含量丰富、脂肪酸组成合理, 是潜在的优质食用油脂源^[3]。此外,

昆虫油脂具有抗肿瘤、抗氧化、降血脂、降血糖、改善记忆力、保护肝脏、预防心血管疾病等多种药理活性^[4-10],如:美洲大蠊和丝光绿蝇油脂具有良好的抗氧化活性^[4];大头金蝇幼虫油脂具有护肝和降血脂的功效^[5-6];黄粉虫油脂能够抑制小鼠增重,提高学习记忆力^[7];蚕蛹油脂具有降血脂、降血糖、抗氧化、改善记忆力、保护肝脏、预防心血管疾病等功效^[8-10]。上述诸多研究为昆虫油脂药理活性的深入探索提供了有力的支持。

九香虫(*Aspongopus chinensis* Dallas, 1851)是我国传统的药食两用资源昆虫,是我国部分地区传统的特色食品,同时现代医学证明其具有良好的抗癌功能^[11-13]。九香虫油脂含量丰富^[14-15],李会芳等^[16-17]采用正交实验对超临界CO₂和石油醚回流提取九香虫油脂的工艺条件进行了优化,但总体来说,对九香虫油脂提取方法的研究还比较少。另外,对九香虫油脂相关药理的研究还比较缺乏。基于此,本研究采用索氏抽提法提取九香虫油脂,以油脂提取率为考察指标,以液料比、提取温度、提取时间为影响因素,采用单因素实验和正交实验对九香虫油脂的提取工艺进行了优化,以确定九香虫油脂的最佳提取条件;并以小鼠乳腺癌细胞4T1和人乳腺癌细胞HCC1937为研究对象,通过体外实验验证所提取九香虫油脂的抗乳腺癌活性,以期为九香虫油脂的高效提取及药用价值的深入挖掘提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 虫源及细胞来源

九香虫成虫,采自贵州省凯里市(东经107.80°,北纬26.52°),洗净并用吸水纸吸干虫体表面水分,置于-80℃冰箱储存备用。小鼠乳腺癌细胞系4T1和人乳腺癌细胞系HCC1937,中科院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂

石油醚(沸程60~90℃,分析纯),天津富宇精细化工有限公司;RPMI-1640培养基、丙酮酸钠溶液,美国Gibco公司;胎牛血清,杭州四季青公司;青霉素-链霉素溶液,北京索莱宝科技有限公司;碳酸氢钠(分析纯),天津市永大化学试剂有限公司;葡萄糖(分析纯),成都金山化学试剂有限公司;0.25%胰蛋白酶,美国HyClone公司;PBS缓冲液,上海生工生物工程股份有限公司;CCK-8细胞增殖检测试剂盒,汉恒生物科技有限公司;无水乙醇(分析纯),重庆川东化工有限公司。

1.1.3 主要仪器

Forma 900 series 超低温冰箱、FORM3141型二氧化碳培养箱、Multiskan GO 酶联免疫检测仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;202型电热恒温干燥箱,北京永光明医疗仪器厂;JYS-M01磨粉机,九阳股份有限公司;BSM型电子天平,上海卓精电子科技有限公司;SZF-06A脂肪测定仪,上海昕瑞仪表有限公司;RE-52A旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;Bio-II-A/M生物安全柜,西班牙Telstar公司;IC1000自动细胞计数仪,上海睿钰生物科技有限公司;AE20/21倒置相差显微镜,厦门麦克奥迪公司;Eppendorf移液器;Millex GP过滤器(0.22 μm),美国密理博公司。

1.2 实验方法

1.2.1 九香虫油脂的提取

取九香虫于65℃烘箱中烘干4h,用磨粉机粉碎。称取5.0g九香虫粉,用滤纸筒包裹后置于脂肪测定仪抽提器中,加入石油醚提取一定时间,旋转蒸发仪旋蒸回收溶剂后,置于50℃电热恒温干燥箱中烘干至恒重,得到九香虫油脂。按下式计算九香虫油脂提取率(Y)。

$$Y = m_1 / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 为九香虫油脂质量,g; m_0 为九香虫粉质量,g。

1.2.2 九香虫油脂对乳腺癌细胞的影响

1.2.2.1 细胞培养及油脂预处理

小鼠乳腺癌细胞4T1与人乳腺癌细胞HCC1937于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,在37℃、5%CO₂的恒温培养箱中培养,待细胞生长至培养瓶底70%~80%满时进入对数生长期,待用。

九香虫油脂和无水乙醇分别用0.22 μm过滤器过滤除菌备用。

1.2.2.2 形态学观察

取对数生长期的小鼠乳腺癌细胞4T1、人乳腺癌细胞HCC1937,用0.25%胰酶消化后,采用细胞计数器计数,调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL(细胞悬液)。分别取100 μL细胞悬液接种于96孔培养板中,待24h细胞贴壁后,加入九香虫油脂至终质量浓度分别为0、8、16 mg/mL(均含1%无水乙醇),另设置阴性对照组(不含无水乙醇的完全培养液),24h后于倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.2.2.3 CCK-8法检测九香虫油脂对乳腺癌细胞增殖作用的影响

细胞前期处理同1.2.2.2,实验设置空白对照

组(不加入细胞)。待 24 h 细胞贴壁后,加入九香虫油脂至终质量浓度分别为 0、4、8、12、16 mg/mL(均含 1% 无水乙醇),另设置阴性对照组(不含无水乙醇的完全培养液),每组设置 6 个重复。24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,置于细胞培养箱中继续培养,4 h 后使用酶标仪检测 450 nm 下吸光度(A),按式(2)计算细胞增殖率(Y_1),并利用 GraphPad Prism 8.0 软件计算九香虫油脂对乳腺癌细胞 4T1、HCC1937 的半抑制浓度(IC_{50})。

$$Y_1 = (A_1 - A_0) / (A_2 - A_0) \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_1 为实验组的吸光度; A_0 为空白对照组的吸光度; A_2 为阴性对照组的吸光度。

1.2.3 数据处理

实验数据应用统计软件 SPSS 19.0 进行单因素方差分析,所有数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 九香虫油脂提取单因素实验

2.1.1 液料比的影响

在提取温度 70 $^{\circ}$ C、提取时间 3 h 条件下,考察不同液料比对九香虫油脂提取率的影响,结果见图 1。

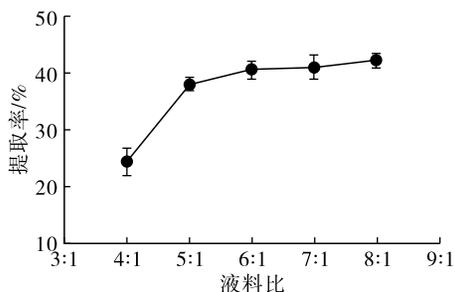


图 1 液料比对九香虫油脂提取率的影响

由图 1 可见,随着液料比的增大,九香虫油脂提取率先逐渐上升后趋于稳定,在液料比为(6~8):1 时,油脂提取率上升幅度不明显。考虑到有机溶剂用量过大,会导致后续旋蒸、挥发有机溶剂等工作量的增加,生产成本增加,故选取液料比 6:1 为较优的提取条件用于后续实验。

2.1.2 提取时间的影响

在液料比 6:1、提取温度 70 $^{\circ}$ C 条件下,考察不同提取时间对九香虫油脂提取率的影响,结果见图 2。

由图 2 可见,九香虫油脂提取率随提取时间的延长先逐渐上升后趋于稳定。在提取时间为 3~5 h 时,油脂提取率变化不明显,且 5 h 时油脂提取率较 4 h 时略有降低,可能是由于提取时间过长九香虫蛋白质对九香虫油脂的反吸附所致^[18]。从节约资

源的角度出发,初步确定提取时间 3 h 为较优的提取条件用于后续实验。

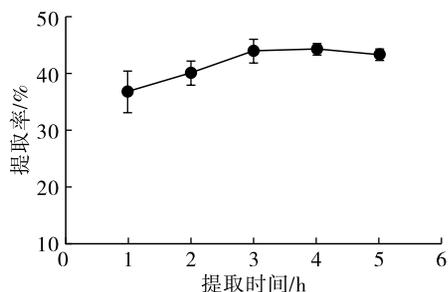


图 2 提取时间对九香虫油脂提取率的影响

2.1.3 提取温度的影响

在液料比 6:1、提取时间 3 h 条件下,考察不同提取温度对九香虫油脂提取率的影响,结果见图 3。

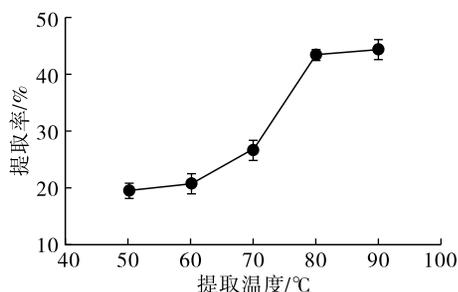


图 3 提取温度对九香虫油脂提取率的影响

由图 3 可见,60 $^{\circ}$ C 以下,由于提取温度过低未达到石油醚沸点而导致九香虫油脂提取率过低,随后随提取温度的升高油脂提取率逐渐上升,80 $^{\circ}$ C 以上时提取温度对油脂提取率无明显影响。因此,选取提取温度 80 $^{\circ}$ C 为较优的提取条件用于后续实验。

2.2 九香虫油脂提取的正交实验

在单因素实验的基础上,以九香虫油脂提取率为考察指标,以液料比(A)、提取温度(B)、提取时间(C)三个因素设计三因素三水平的正交实验,正交实验因素水平见表 1,正交实验设计与结果见表 2(每组实验进行 3 次重复)。

表 1 正交实验因素水平

水平	A 液料比	B 提取温度/ $^{\circ}$ C	C 提取时间/h
1	5:1	70	2
2	6:1	80	3
3	7:1	90	4

由表 2 可知,提取温度对九香虫油脂提取率的影响最大,各因素的影响主次顺序为提取温度 > 液料比 > 提取时间,且最佳提取条件为 $A_2B_3C_2$,即液料比 6:1、提取温度 90 $^{\circ}$ C、提取时间 3 h。在最佳条件下进行 4 次验证实验,九香虫油脂提取率分别为 45.565%、42.686%、42.960%、45.869%,平均为 $(44.270 \pm 1.679)\%$ 。

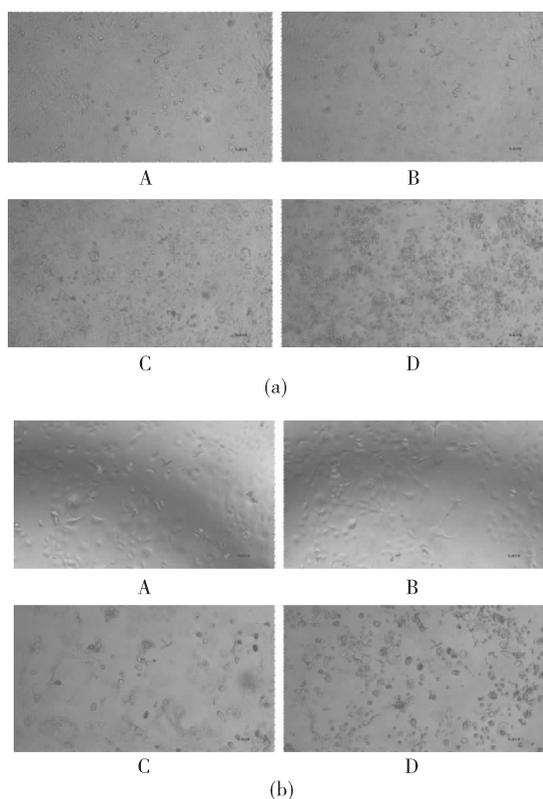
实际应用中可根据需要适当调整提取条件,考虑到实际生产中温度过高可能会破坏油脂结构而影响油脂品质(有待进一步验证),建议提取温度为75~80℃。

表2 正交实验设计与结果

实验号	A	B	C	提取率/%
1	1	1	1	24.733
2	1	2	2	39.336
3	1	3	3	42.890
4	2	1	2	30.260
5	2	2	3	42.286
6	2	3	1	43.886
7	3	1	3	26.400
8	3	2	1	41.980
9	3	3	2	44.000
k_1	35.653	27.131	36.866	
k_2	38.811	41.201	37.865	
k_3	37.460	43.592	37.192	
R	3.158	16.461	0.999	

2.3 九香虫油脂作用下乳腺癌细胞形态学变化

九香虫油脂对小鼠乳腺癌细胞4T1与人乳腺癌细胞HCC1937形态的影响见图4。



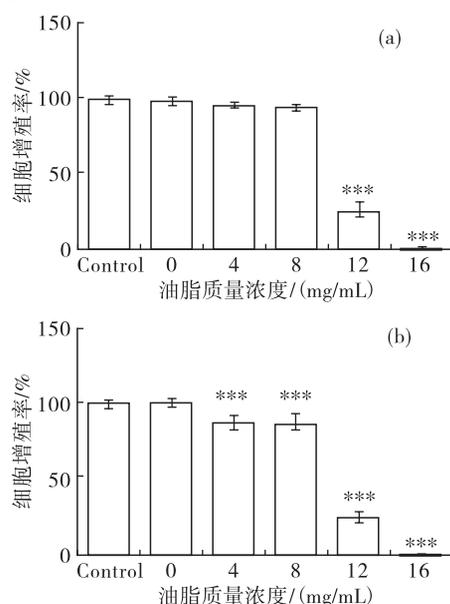
注:A. 阴性对照组;B~D. 分别为0、8、16 mg/mL 九香虫油脂(含1%无水乙醇)处理组。

图4 不同质量浓度九香虫油脂处理的小鼠乳腺癌细胞4T1(a)与人乳腺癌细胞HCC1937(b)形态学特征(100×)

由图4可见:与阴性对照组相比,1%无水乙醇作用24 h,对两种细胞的细胞形态及细胞密度均无明显影响,证实其作为有机溶剂溶解油脂的同时不会对细胞造成损伤;8 mg/mL 九香虫油脂作用24 h,贴壁细胞数量明显减少,且部分细胞发生皱缩;16 mg/mL 九香虫油脂作用24 h,细胞皱缩程度更为明显。结果说明九香虫油脂对两种乳腺癌细胞造成损伤,导致细胞贴壁能力减弱并发生皱缩。

2.4 九香虫油脂对乳腺癌细胞增殖抑制作用

不同质量浓度九香虫油脂处理对小鼠乳腺癌细胞4T1和人乳腺癌细胞HCC1937增殖的影响结果见图5。



注:Control为阴性对照组;***表示各处理组细胞增殖率与阴性对照组比较差异极显著, $P < 0.001$ 。

图5 九香虫油脂对小鼠乳腺癌细胞4T1(a)与人乳腺癌细胞HCC1937(b)增殖的影响

由图5可见,与阴性对照组相比,1%无水乙醇处理24 h对两种细胞增殖率无显著影响(4T1、HCC1937细胞增殖率分别为 $(99.390 \pm 0.007)\%$ 、 $(99.910 \pm 0.025)\%$),证实其作为有机溶剂溶解油脂的同时不会对细胞增殖率造成明显影响。

由图5(a)可见,与阴性对照组相比,4、8 mg/mL 九香虫油脂处理小鼠乳腺癌细胞4T1 24 h,细胞增殖率(分别为 $(97.351 \pm 0.005)\%$ 、 $(95.826 \pm 0.004)\%$)无显著变化,而12、16 mg/mL 九香虫油脂处理小鼠乳腺癌细胞4T1 24 h,细胞增殖率极显著降低(分别为 $(26.275 \pm 0.061)\%$ 、 $(2.129 \pm 0.004)\%$)。由图5(b)可见,与阴性对照组相比,4、8、12、16 mg/mL 九香虫油脂处理人乳腺癌细胞HCC1937 24 h,细胞增殖率极显著降低(分别为

(89.130 ± 0.043)%、(89.150 ± 0.060)%、(17.540 ± 0.039)%、(0.500 ± 0.001)%)。九香虫油脂作用于小鼠乳腺癌细胞 4T1、人乳腺癌细胞 HCC1937 24 h 的半抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 10.850、10.100 mg/mL。本研究证明九香虫油脂具有良好的抗乳腺癌活性,能够改变细胞形态并显著抑制其增殖,这可能与九香虫油脂中含奇数碳脂肪酸相关^[19],有报道称昆虫油脂中含有的奇数碳脂肪酸具有特殊的生理活性,如抗癌活性等^[2,20]。

3 结论

采用索氏抽提法提取九香虫油脂,通过单因素实验和正交实验对提取九香虫油脂的工艺条件进行优化,得到最优提取条件为液料比 6:1、提取温度 90℃、提取时间 3 h,此条件下九香虫油脂提取率为 (44.270 ± 1.679)%。CCK-8 法细胞增殖抑制实验结果表明,九香虫油脂能够显著抑制小鼠乳腺癌细胞 4T1、人乳腺癌细胞 HCC1937 体外增殖,并能够改变细胞形态,导致细胞皱缩,细胞数量减少。

参考文献:

- [1] STORK N E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on earth? [J] *Annu Rev Entomol*, 2018, 63: 31-45.
- [2] 王仲礼. 昆虫油脂功能性成分的开发[J]. *中国油脂*, 2003, 28(6): 33-34.
- [3] 杨青, 刘高强, 魏美才, 等. 昆虫油脂的营养和开发研究[J]. *食品科技*, 2008, 33(3): 246-249.
- [4] 袁东强. 美洲大蠊和丝光绿蝇油脂性质和抗氧化活性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.
- [5] 赵福, 王俊刚, 田军鹏, 等. 大头金蝇幼虫油脂对小鼠的降血脂作用[J]. *昆虫学报*, 2007(2): 113-117.
- [6] 赵福. 大头金蝇脂类营养分析及其免疫调节机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [7] 王南溪, 杨伟, 杨春平, 等. 黄粉虫油脂对小鼠体重及学习记忆能力的影响[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(1): 356-360.
- [8] 廖爱美. 蚕蛹油的提取工艺优化、组分分析及其功能评价[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009.
- [9] KIM Y J, LEE K P, LEE D Y, et al. Inhibitory effect of modified silkworm pupae oil in PDGF - BB - induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2020, 29(8): 1091-1099.
- [10] 张丽丽, 章玉萍, 陈明, 等. 蚕蛹油脂提取方法及其功效研究进展[J]. *北方蚕业*, 2017, 38(2): 1-8.
- [11] TAN J, TIAN Y, CAI R L, et al. Chemical composition and antiproliferative effects of a methanol extract of *Aspongopus chinensis* Dallas [J/OL]. *Evid - Based Compl Alt*, 2019, 2019: 2607086 [2021-03-23]. <https://doi.org/10.1155/2019/2607086>.
- [12] TAN J, TIAN Y, CAI R L, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of a protein component purified from *Aspongopus chinensis* Dallas on cancer cells in vitro and in vivo [J/OL]. *Evid - Based Compl Alt*, 2019, 2019: 8934794 [2021-03-23]. <https://doi.org/10.1155/2019/8934794>.
- [13] 赵帅. 九香虫血淋巴对小鼠乳腺癌移植瘤生长抑制作用[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [14] 刘伦沛. 九香虫的营养成分分析与评价[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008.
- [15] 李俐, 李晓飞. 贵州九香虫营养成分分析[J]. *昆虫知识*, 2010, 47(4): 748-751.
- [16] 李会芳, 杨景娇. 正交设计优化九香虫脂肪油的提取工艺[J]. *山西中医学院学报*, 2013, 14(1): 30-32.
- [17] 李会芳, 许剑侠, 杜俊明. 正交设计优化九香虫脂肪油超临界 CO₂ 萃取工艺[J]. *山西中医学院学报*, 2015(2): 30-32.
- [18] 张瑞, 邢军, 张海玉. 蚕蛹中油脂最佳提取工艺技术研究[J]. *食品工业*, 2012, 33(7): 1-4.
- [19] 涂爱国, 刘宇文, 殷红妹. 气相色谱-质谱联用分析九香虫脂肪油的化学成分[J]. *江西中医药*, 2012, 43(11): 66-67.
- [20] 袁东强, 何钊, 孙龙, 等. 美洲大蠊油脂的提取及性质分析[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(3): 84-90.