九香虫防御性物质水溶液成分分析及其对LO2细胞活性的影响

侯晓晖，孙廷，李晓飞，钟婷婷，刘川燕
（遵义医学院，贵州遵义 563099）

摘要：研究了九香虫的防御性物质水溶液中挥发性成分及其相对百分含量，以及该水溶液对人肝LO2细胞活性的研究。采用温水浸泡法获得九香虫的防御性物质水溶液；GC-MS获得该水溶液的挥发性成分组成，并用面积归一法计算各成分的相对百分含量；利用MTT法、流式细胞术研究该水溶液对LO2细胞的影响。研究表明，九香虫防御性物质水溶液中挥发性成分包含19种化合物，其中相对百分含量最高的为反-2-己烯醛（88.54%），其次为2-甲基-4-戊烯醛（5.16%）、十三烷（3.43%）等；该水溶液作用LO2细胞后，IC_{50}为3.64 μL，呈剂量依赖性；细胞周期结果显示，G_2/M期细胞比例明显降低，而G_0/G_1期细胞比例明显升高，且差异具有统计学意义。九香虫防御性物质水溶液成分主要是烯醛和烷烃类化合物；该物质能够抑制人肝LO2细胞的体外增殖，可能与其细胞周期阻滞有关。

关键词：*Aspongopus chinensis*；防御性物质水溶液；挥发性成分；GC-MS；LO2细胞；细胞增殖；细胞周期
文章篇号：1673-9078(2013)10-2363-2367

Analysis of the Chemical Constituents of Defensive Substances from *Aspongopus chinensis* and their Effect on the Activity of LO2 Cells

HOU Xiao-hui, SUN Ting, LI Xiao-fei, ZHONG Ting-ting LIU Chuan-yan
(Zunyi Medical College, Guizhou 563000, China)

Abstract: The volatile components and their relative contents of the defensive substances in aqueous solution from *Aspongopus chinensis*, and the effect of aqueous solution on the activity of normal human liver LO2 cells were studied in this research.Warm water immersion of bugs was used to obtain the defensive substances solution, and GC-MS and area normalization was employed to identify the volatile components and calculate their relative contents. MTT and flow cytometry was used to find the effect of the defensive substances solution on liver LO2 cell. The research showed that the solution contained 19 kinds of chemical compounds, and the anti -2- hexenal had the highest relative percentage content 88.54%, then followed by 2-methyl-4-pentene aldehyde (5.16%) and trudecyl (3.43%); IC_{50} was 3.64 μL which presented dose-dependent manner after the solutions reacted with LO2 cells. The result of flow cytometry showed that, compared with the control group, the percentage of G_2/M phase cells from the drug group were reduced obviously and G_0/G_1 phase cells were increased significantly. The major compounds of *Aspongopus chinensis* defensive substances solution were enal and alkanes, which could inhibit the proliferation of normal human liver LO2 cells in vitro because of cell cycle arrest.

Key words: *Aspongopus chinensis*; defensive substances solution; volatile components; GC-MS; LO2; cell proliferation; cell cycle

九香虫（*Aspongopus chinensis* Dallas）为半翅目、蝽科昆虫，俗称打屁虫、屁巴虫等，分布于我国长江以南的广大地区（贵州、四川、云南等）及越南、缅甸和印度等国[1~2]，是一种重要的中药昆虫和保健食品[3~4]。九香虫作为中药昆虫对胸胁胀痛、阳痿早泄、癌症等方面具有一定的疗效[4~8]，但其作为保健食品在我国食品养生等方面有着更为悠久的历史，民间就流传着“有钱吃鹿茸，没钱吃屁巴虫”和“吃了屁巴虫，滋补赛参茸，严冬不怕冷，夜间不尿床”等俗语。从营养学的角度来说，富含蛋白质、脂肪、多种矿质元素和维生素等营养成分的九香虫非常适合作为保健食品[9~10]；但从感官的角度来说，因九香虫所含的防御性物质（俗称“臭气”）具有强烈的刺激性气味[11~12]，无论是对食物的嗅觉或是味觉其均不适合作为食品，

收稿日期：2013-05-27
基金项目：贵州省中药现代化项目（黔科合中药字[2012]5001-1号），贵州省中医药管理局基金项目（QZYY2011-69），省级大学生创新训练计划项目（201310661010），遵义医学院大学生创新性实验计划项目（院发[2012]2909）
作者简介：侯晓晖（1980-），女，博士，副教授，主要从事资源昆虫的开发利用

所以该矛盾是人们在食用前必须克服的。一般情况下，人们会在食用前将其放于热锅上烘炒、温水中浸泡或密闭容器中酒焖数分钟，使其“臭气”尽可能地排出体外，这样就一定程度上避免了该物质对作为食品的九香虫口感的影响。但是，该防御性物质除了会对人体的感官造成影响外，是否还有其他方面的作用，比如对人体正常细胞、组织、器官等有何影响，是否会危及人们的健康呢？迄今为止，无文献资料报道关于九香虫的防御性物质对人体正常细胞等影响的相关研究，故本文以此为切入点开展工作。

本文通过气相色谱-质谱联用技术（GC-MS）分离鉴定防御性物质水溶液中的挥发性成分组成、百分含量，及其对体外培养的正常人肝细胞（LO2细胞）作用的研究，从实际应用的角度出发分析九香虫的防御性物质对人体的影响或有害的方面，旨在更科学、更合理地开发利用九香虫这一重要的保健食品。

1 实验材料

1.1 仪器

GC-MS联用仪（HP6890-5973C），美国安捷仑公司；固相微萃取装置，美国Supelco公司；倒置显微镜等。

1.2 试剂

RPMI 1640培养液（GIBCO）；胎牛血清，杭州四季青公司；细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒，杭州碧云天生物技术有限公司；四甲基偶氮唑盐，MTT，Solarbio；其余试剂均为国产分析纯。

1.3 材料

九香虫，采自贵州省遵义市正安县；LO2细胞株，遵义医学院中心实验室提供。

2 实验方法

2.1 防御性物质的收集

挑选30头中等大小、活跃状态的九香虫成虫，将其置于装有30 mL、50 ℃水的密闭容器中，待其完全排出防御性物质后过滤，获得防御性物质水溶液，过滤除菌，4 ℃保存待用。

2.2 GC-MS分析

2.2.1 固相微萃取方法

取样品约1.5 mL，置于10 mL固相微萃取仪采样瓶中，插入装有2 cm~50/30 μm DVB纤维头的手动进样器，在65 ℃顶空萃取30 min取出，快速移出萃取头并立即插入气相色谱仪进样口（温度250 ℃）中，热解析3 min，进样。

2.2.2 GC-MS条件

2.2.2.1 色谱条件

AB-5MS（5%苯基-95%聚二甲基硅氧烷）色谱柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；程序升温：45 ℃保持2 min，以4 ℃/min升至220 ℃，保持2 min；汽化室温度250 ℃；载气：高纯氦气（He）；柱前压7.62 psi，载气流量1.0 mL/min；不分流进样溶剂延迟时间：1.5 min。

2.2.2.2 质谱条

离子源为EI源，温度230 ℃；四极杆温度150 ℃；电子能量70 eV；发射电流34.6 μA；倍增器电压1064 V；接口温度280 ℃；质量范围20~450 amu。

2.2.2.3 数据处理

对总离子流图中的各峰经质谱计算机数据系统检索及核对Nist2005和Wiley275标准质谱图，确定了防御性物质水溶液中含有的化学成分，用峰面积归一化法计算各化学成分的相对质量分数。

2.3 MTT试验

参考文献[13]，将LO2细胞悬液以浓度为1.6×10^{4}个/mL接种于96孔板中，培养24 h。实验设置空白对照组、给药组（见表2），培养24 h后，弃去培养液，每孔加入20 μL的MTT溶液，继续培养4 h后弃去上清，加入150 μL DMSO，震荡10 min，在490 nm波长处读取吸光度值（OD）。以上实验重复3次，以抑制率为纵坐标（Y），加药浓度为横坐标（X）绘制抑制曲线方程，应用方程计算IC_{50}。

2.4 细胞周期检测

分别收集给药组（4 μL和8 μL）和空白对照组细胞于离心管中，1000 r/min离心；PBS洗涤，70%乙醇固定36 h以上；染色（含RNase A的碘化丙啶染色液PI），上机。

2.5 统计学处

细胞周期数据采用CELL Quest 软件进行分析；细胞增殖抑制实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，利用SPSS 13.0软件进行统计分析，F检验方差齐后，t检验进行组间比较，$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 九香虫防御性物质水溶液中挥发性成分组成及相对含量

经气相色谱法分离及质谱扫描九香虫防御性物质水溶液中挥发性物质，共检出19个色谱峰及对应的质谱，得到的总离子流图见图1。

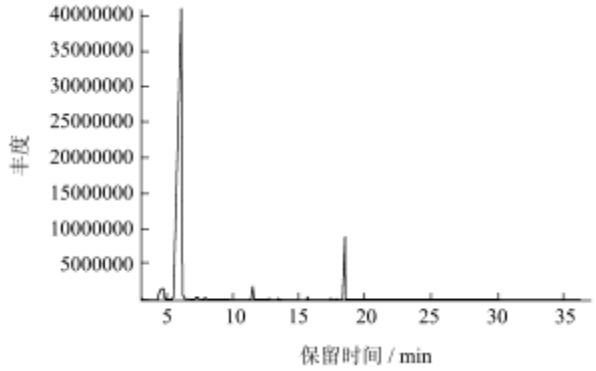


图1 九香虫防御性物质水溶液挥发性成分总离子流图

Fig.1 Total ion current chromatogram of essential oil from defensive substances solution of *Aspongopus chinensis*

表1 九香虫防御性物质水溶液挥发性成分GC-MS分析结果

Table 1 Analysis of essential oil of defensive substances solution from Aspongopus chinensis by GC-MS

No.	RT /min	Name of compound	Molecular Formula	M_w	Relative mass Fraction/%
1	4.64	2-甲基-4-戊烯醛	$C_6H_{10}O$	98	5.16
2	5.63	反-2-己烯醛	$C_6H_{10}O$	98	88.54
3	7.31	反-反-2,4-己二烯醛	C_6H_8O	96	0.34
4	7.95	3-庚烯-2-酮	$C_7H_{12}O$	112	0.22
5	11.51	反-2-辛烯醛	$C_8H_{14}O$	126	1.11
6	12.78	3,6-二甲基癸烷	$C_{12}H_{26}$	170	0.05
7	13.36	四甲基苯	$C_{10}H_{14}$	134	0.06
8	14.34	均四甲苯	$C_{10}H_{14}$	134	0.02
9	14.52	甲基环己基二甲氧基硅烷	$C_9H_{20}O_2Si$	188	0.02
10	15.64	十二烷	$C_{12}H_{26}$	170	0.10
11	16.03	2,6-二甲基十一烷	$C_{13}H_{28}$	184	0.01
12	16.17	3,4-二甲基-苯甲醛	$C_9H_{10}O$	134	0.03
13	17.18	4,6-二甲基十二烷	$C_{14}H_{30}$	198	0.01
14	17.42	2,4-二甲基十二烷	$C_{14}H_{30}$	198	0.04
15	18.47	十三烷	$C_{13}H_{28}$	184	3.43
16	24.12	2,4-二叔丁基苯酚	$C_{14}H_{22}O$	206	0.02
17	32.90	棕榈酸甲酯	$C_{17}H_{34}O_2$	270	0.01
18	36.11	甲基亚油酸	$C_{19}H_{34}O_2$	294	0.05
19	36.22	甲基反油酸	$C_{19}H_{36}O_2$	296	0.03

经分析比对，该防御性物质水溶液中挥发性成分包含19种化合物，其中可鉴定化合物含量占检出的物质总量的99.77%（见表1）。与侯晓晖等[12]得到的九香虫的纯防御性物质成分相比化合物由12种变为18种，而且不完全重合，这可能与纯物质中某些成分遇水后改变为其他物质，抑或后者中某些成分不溶于水而造成的。

其次，该防御性物质水溶液中挥发性成分最早分离出来的3种物质分别是2-甲基-4-戊烯醛、反-2-己烯醛和反-反-2,4-己二烯醛，而文献[12]中最早分离出来的3种物质分别是正己醛、反-2-己烯醛和3-庚烯-2-酮，二者虽略有不同，但基本一致。

最后，该防御性物质水溶液中挥发性成分相对百分含量最高的3种物质分别是反-2-己烯醛、2-甲基-4-戊烯醛和十三烷，而文献[12]中相对百分含量最高的3种物质分别是十三烷、反-2-己烯醛和3,4-二甲基-2-己烯，二者虽略有不同，但基本一致。

3.2 九香虫防御性物质水溶液对LO2细胞增殖的抑制作用

MTT实验结果显示，防御性物质水溶液对LO2细胞具有增殖抑制作用，并呈剂量依赖性（见表2、图2）。根据线性方程Y=10.005X+13.554计算，防御性物质作用于LO2细胞的IC_{50}为3.64 μL。通过统计软件分析，给药组与对照组相比均有统计学意义（P<0.05）。

表 2 九香虫防御性物质水溶液对 LO2 细胞增殖的抑制作用（n=6）

Table 2 Effect of defensive substances solution on the proliferation inhibition of LO2 cell

剂量/μL	抑制率/%
0	0
2	26.13±17.72*
3	42.25±14.48*
4	55.25±8.88*
5	74.68±4.39*
6	79.91±6.10*
7	82.10±6.43*
8	84.72±3.82*

注：*P<0.05。

3.3 九香虫防御性物质水溶液对LO2细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示，中、高剂量（4和8 μL）防御性物质水溶液作用于LO2细胞后，其细胞周期中

各时相细胞相对百分数发生显著变化，整体来说G_0/G_1期细胞相对百分比增加，G_2/M期的相对百分比降低（见图2、表3）。通过统计软件分析，高剂量组（8 μL）与对照组（0 μL）相比具有统计学意义（$P < 0.05$）。

表3 九香虫防御性物质水溶液对L02细胞周期的影响

Table 3 The result of DNAanalysis on cell circle of LO2 from defensive substances solution of *Aspongopus chinensis*

细胞周期	剂量/μL		
	0	4	8
G_0/G_1 /%	56.89±7.78	49.00±27.42	62.84±3.93*
S /%	29.13±3.59	26.61±4.13	29.9±72.15
G_2/M /%	29.05±6.12	17.72±13.72	7.26±4.41*

注：*P<0.05

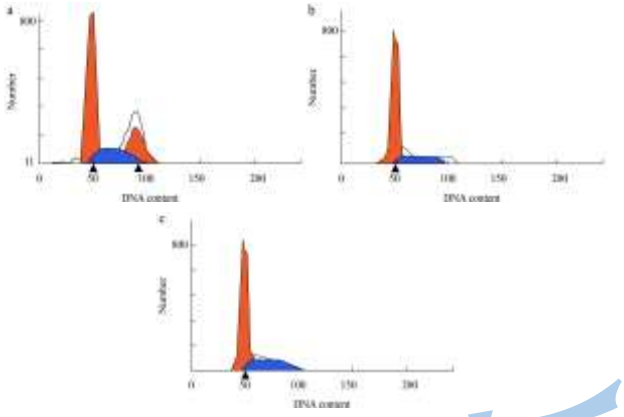


图2 九香虫防御性物质水溶液对L02细胞周期的影响

Fig.2 Effect of the defensive substances solution on cell cycle of LO2

注：a.0 μL；b.4 μL；c.8 μL。

图2和表3的结果说明九香虫防御性物质当达到一定量的时候可以对人体正常细胞产生影响，即细胞周期各时相分布细胞比例发生变化，当G_0/G_1期细胞增多而G_2/M期细胞减少时说明细胞周期被阻滞，减少细胞进入DNA复制时期，这种影响将导致细胞增殖抑制，结局必将走向死亡。

4 结论

4.1 《中华本草》等记载九香虫释放的“臭气”即防御性物质含有烷烃、烯醛或酮类物质[11~12]，与本研究的GC-MS结果基本一致。九香虫作为中药昆虫和保健食品的历史悠久，其防御性物质在食用前需要被排出，由于其具有强烈的刺激性气味，这与前人及本课题组研究所证实的其防御性物质含有挥发性成分-烯醛等有关。除因烯醛等具有刺激性气味，会给人体带来不适外，是否还有其他原因必须排净这种防御性物质呢？本研究证实前期的推测即该类物质可能具有一定的药理作用[12]，即该防御性物质对体外培养的人正常肝LO2细胞的增殖具有抑制作用，并与细胞周期阻滞有关。但是，由于没有对防御性物质中的每一种成分进行实验研究，所以还不能确定到底是何种物质对细胞增殖有影响，抑或在起主要作用。

4.2 九香虫具有诸多优点是一种药食兼用的昆虫，具有巨大的市场开发潜力，但其防御性物质对体外培养的人正常细胞有着一定的影响，也就是说人们在食用九香虫前应尽可能将其体内“臭气”排净为最佳，通过本研究为九香虫的综合开发利用提供更多的基础资料。

参考文献

[1] 姚银花.九香虫的生物学特性及其应用价值[J].黔东南民族师范高等专科学校学报,2006,24(6):48-49
Yao Y H. *Aspongopus chinensis* biological characteristics and application value [J]. Journal of Southeast Guizhou National Teacher's College, 2006, 24(6): 48-49

[2] 萧采瑜.中国蝽类昆虫鉴定手册(第二册)[M].北京:科学出版社,1977
Xiao C Y. China bugs insects Identification Manual (Volume II) [M]. Beijing: Science Press, 1977

[3] 孟庆荣.九香虫的药用功效[J].医药与保健,1996,4:40
Meng Q R. *Aspongopus chinensis* medicinal properties [J]. Medicine and Health Care, 1996, 4: 40

[4] 侯晓晖,孙廷,李晓飞.九香虫粗提物对 SGC-7901 和 HepG2 细胞增殖及细胞周期的影响[J].时珍国医国药,2013,24(1):108-109
Hou X H, Sun T, Li X F. Effects on the Cell Proliferation and Cell Cycle of SGC-7901 and HepG$_2$ from Crude Extracts of *Aspongopus chinensis* Dallas [J]. Lishizhen Medicine and Materiamedica Research, 2013, 24(1): 108-109

[5] 侯晓晖,孙廷,李晓飞.九香虫三氯甲烷浸提物对两种癌细胞增殖和周期的影响[J].中成药,2012,34(12): 2058-2061
Hou X H, Sun T, Li X F. Effects of *Aspongopus chinensis* Dallas extracts on cell proliferation and cell cycle of SGC-7901 and HepG2 cell lines [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2012, 34(12): 2058-2061

[6] 张颖,陈建伟,高源.九香虫资源鉴定、化学、药理与药食应用研究[J].亚太传统医药,2009,5(9):46-47
Zhang Y, Chen J W, Gao Y. *Aspongopus chinensis* resource identification, chemistry, pharmacology and application of food and medicine [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2009, 5(9): 46-47

[7] 钟永楚.九香虫的研究概况[J].时珍国药研究,1994,2(5):42-43

Zhong Y C. *Aspongopus chinensis* Research overview [J]. Traditional Medicines Research, 1994, 2(5): 42-43

[8] 刘庆芳.九香虫现代临床研究与应用[J].河南大学学报(医学科学版),2002,4(20):66-67

Liu Q F. *Aspongopus chinensis* modern clinical Research and Application [J]. Journal of Henan University (Medical Science), 2002, 4(20): 66-67

[9] 刘伦沛,郁建平.九香虫的营养成分分析与评价[J].食品科学,2008,29(2):406-410

Liu L P, Yu J P. *Aspongopus chinensis* Nutrients Analysis and Evaluation [J]. Food Science, 2008, 29(2): 406-410

[10] 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

Li L, Li X F. Analysis of Nutritional Components of *Aspongopus chinensis* in Guizhou [J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2010, 47(4): 748-751

[11] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草(第九册)[M].上海:上海科学技术出版社,1999

State Administration of Traditional Chinese Materia Medica Editorial Board. Chinese Materia Medica (IX) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999

[12] 侯晓晖,李晓飞,孙廷.九香虫"臭气"挥发性成分的 GC-MS 分析[J].广东农业科学,2012,18:133-134

Hou X H, Li X F, Sun T. Analysis on fetor from *Aspongopus chinensis* Dallas with GC-MS [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 18: 133-134

[13] 杨抚华.医学细胞生物学[M].北京:科学出版社,2011

Yang F H. Medical Cell Biology [M]. Beijing: Science Press, 2011

现代食品科技