

黄血高度油蚕全蚕粉对小鼠的急性经口毒性试验

何行健 艾均文 薛宏 郑颖 刘勇 唐芸 刘洋 汪维熙 朱贤 叶征明

(湖南省蚕桑科学研究所, 湖南长沙 410127)

摘要 参照 2003 版保健食品检验与评价技术规范的规定,对以黄血高度油蚕 5 龄第 3 天幼虫为原料制备的全蚕粉进行了小鼠的急性经口毒性试验,采用最大耐受剂量法,以 250 mg/mL 浓度的黄血高度油蚕全蚕粉溶液按最大灌胃剂量 20 mL/kg,对雌雄各 10 只共 20 只 ICR 小鼠分别实施 1 日内 2 次(间隔 4~6 h)灌胃操作,连续观察 7 d。试验结果表明,在试验条件下,试验小鼠未出现明显不良症状和死亡情况,黄血高度油蚕全蚕粉对小鼠的急性经口毒性最大耐受剂量大于 10 000 mg/kg,急性毒性属实际无毒。

关键词 全蚕粉; 降血糖; 黄血高度油蚕; 小鼠; 急性经口毒性; 安全性; 黄酮类化合物

中图分类号 S885.2 **文献标识码** B **文章编号** 1007-0982(2018)02-0014-03

家蚕幼虫在降血糖方面的利用是家蚕多功能利用中较为突出的方向。自研究人员发现全蚕粉的降血糖作用后^[1],在包括韩国在内的亚洲国家中,由家蚕 5 龄幼虫制备的全蚕粉长期以来受到糖尿病患者的青睐。研究表明,1-脱氧野尻霉素(DNJ)作为一种潜在的降糖成分,在全蚕粉中的含量约为在干桑叶粉中含量的 2.7 倍^[2]。以全蚕粉为原料研制的降血糖产品,作为保健食品在韩国已通过食品和药物管理局认定,自 1995 年以来已生产约 3 000 t^[3]。日本甚至有望将全蚕粉作为治疗 II 型糖尿病的替代药物来使用^[4]。我国也从 2000 年开始关注全蚕粉^[5],普遍认为,全蚕粉在中国开发应用的前景十分广阔。

有研究发现,普通家蚕幼虫体壁含有大量的尿酸盐结晶^[6],有诱发痛风的可能,不太适宜于直接制备全蚕粉。而马宝俊等^[7]、杜鑫等^[8]、王安皆等^[9]研究发现,油蚕体壁中尿酸盐富集程度明显低于普通蚕,更适合作为药食用的原料,但到目前为止,对于这类特殊资源的毒理学安全性评价方面的研究还很少。本研究对以黄血高度油蚕 5 龄第 3 天

幼虫为原料制备的全蚕粉进行急性经口毒性检测,以期黄血高度油蚕全蚕粉的进一步开发利用提供试验依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验用全蚕粉 黄血高度油蚕全蚕粉,是黄血高度油蚕^[10] 5 龄第 3 天幼虫经真空冷冻干燥后制备成的,200 目左右,湖南省农产品加工研究所生产。

1.1.2 试验动物 ICR 小鼠,许可证编号 SCXK(沪)2012-0002,健康、初成年、未使用过,雌性动物未产且无孕,试验开始体质量为 12~22 g/只,同性别试验动物个体间体质量相差不超过平均体质量的 20%,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司;玉米芯垫料及辐照灭菌饲料,苏州双狮实验动物饲料科技有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 试验器具的处理 将黄血高度油蚕全蚕粉接触的所有器具均置于压力蒸汽灭菌器内 115 ℃,30 min 灭菌后使用。

1.2.2 ICR 小鼠的饲养 使用苏州双狮实验动物饲料科技有限公司生产的玉米芯垫料及辐照灭菌饲料,饮用灭菌水,在室温 20~26 ℃、相对湿度 30%~70%、全光谱日光灯每天进行 12 h 光照条件下饲养。

收稿日期:2018-03-13; 接受日期:2018-03-22

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号 CARS-18)。

第一作者信息:何行健(1982—),男,湖南岳阳,硕士,农艺师。

Tel: 15084819509, E-mail: huadi0913@163.com

通讯作者信息:艾均文(1968—),男,湖南鼎城,博士,研究员。

Tel: 13574832818, E-mail: aijunwen718@sina.com

1.2.3 急性经口毒性试验 参考急性经口毒性试验方法^[11]进行:取 20 只 ICR 小鼠,雌雄各半,分组,染色标记,试验前,禁食过夜,不限制饮水。采用最大耐受剂量法,根据全蚕粉有关资料,全蚕粉为显示毒性极小或未显示毒性的受试物,确定全蚕粉浓度为 250 mg/mL[以毒性极小或未显示毒性的受试物的最大耐受剂量为 10 000 mg/kg 来设定,即供试样品浓度=最大耐受剂量(10 000 mg/kg)/(20 mL/kg×2)=250 mg/mL]作为试验样品的供试浓度,1 日内 2 次(间隔 4~6 h)通过灌胃方式给予浓度为 250 mg/mL 的试验样品混悬液 20 mL/kg(小鼠最大灌胃剂量)进行试验。灌胃后继续禁食 1~2 h。灌胃完毕后的 30 min 内,观察小鼠即时反应,再观察 24 h 内小鼠的毒性反应,以后每天观察和记录每只小鼠的一般状态,毒性表现,毒性反应出现时间、持续时间、恢复时间,动物死亡时间及死亡数。试验

结束后对所有动物进行大体解剖观察,记录大体病变,灌胃后超过 24 h 死亡的动物,若发现脏器病变则进行组织病理学检查。

2 结果与分析

试验观察发现,供试的 20 只小鼠在 7 d 观察期内未出现死亡,也未出现中枢神经系统、自主神经系统和呼吸系统及躯体运动等方面的任何异常症状,试验结束时对所有动物进行大体解剖观察,未见主要脏器组织(如脾脏、肝脏、肾脏、心脏、胸腺等)发生病变。从以黄血高度油蚕为原料制备的全蚕粉对小鼠的急性经口毒性(表 1)可以看出,在本试验条件下,以黄血高度油蚕为原料制备的全蚕粉对小鼠的急性经口毒性最大耐受剂量大于 10 000 mg/kg,在灌胃剂量为 20 mL/kg·次下,供试小鼠无明显不良症状,按急性毒性分级属实际无毒。

表 1 以黄血高度油蚕为原料制备的全蚕粉对小鼠的急性经口毒性

试验动物	灌胃剂量/(mL/kg·次)	数量/只	初质量/(g/只)	终质量/(g/只)	死亡数/只	脏器病变数/只
雌性 ICR 小鼠	20	10	22.1±0.7	26.3±0.4	0	0
雄性 ICR 小鼠	20	10	21.8±0.5	25.5±0.9	0	0

表中的初质量、终质量为 10 只 ICR 小鼠的平均值;用于灌胃的黄血高度油蚕全蚕粉的浓度为 250 mg/mL。

3 小结与讨论

全蚕粉因降血糖作用显著且无明显的毒副作用而具有广阔的开发前景,长期以来受到国内外学者的广泛关注。研究人员对全蚕粉及原材料的组成成分、功效成分、生理活性进行了比较系统的研究。KIM^[12]报道,全蚕粉主要含 54.8%的粗蛋白、9.4%的粗脂肪、7.2%的粗纤维、7.7%的灰分和 10.6%的水分;金洁等^[13]研究发现,家蚕幼虫体富含具有抗过敏、抗炎、抗菌、抗突变、抗肿瘤、保肝、雌激素样等作用的黄酮类化合物,最高可达 11.107~27.705 mg/g;桂仲争等^[14]检测结果表明,全蚕粉中含有对胰岛素水平及其受体可能起一定作用的活性物质三碘甲腺原氨酸(T3),含量约为 0.913 ng/g。对家蚕药食用安全性方面的研究也有不少,端礼荣等^[15]为验证家蚕作为生物反应器对人体的安全性,对家蚕幼虫和蛹的体液、蚕卵等进行了急性毒性试验,结果表明所有受试物的急性毒性均为无毒级;岳万福^[16]在家蚕体内表达 SOD(super-

oxide dismutase,超氧化物歧化酶)基因后,以获得的可表达 SOD 的家蚕为材料通过低温冷冻真空干燥制备 SOD 全蚕粉,并对 SOD 全蚕粉进行了急性毒性检验和长期毒性检验,以明确 SOD 全蚕粉在使用中的安全性,SOD 全蚕粉急性毒性检验结果表明,SOD 全蚕粉在灌胃最大限度时,无动物死亡,最大耐受剂量下也未见明显毒副反应,长期毒性试验结果表明,SOD 全蚕粉对小鼠的健康没有明显不良影响。

相对于普通家蚕,黄血高度油蚕具有黄血和高度油蚕 2 种特殊性状。在家蚕中,白血是正常血型,黄血作为一种突变血型,反映在蚕体形态上,有幼虫腹足和羽化初期蛾翅为黄色等特点^[17],据陈智毅等^[18]、肖阳等^[19]对黄血蚕的营养成分和药食用价值的研究表明,黄血蚕含有大量的蛋白质、丰富的微量元素、高比例的不饱和脂肪酸和较高含量的黄酮类化合物等,具有比普通家蚕更高的营养价值。另外,油蚕也是一种突变型,油蚕体壁的透明程度由体壁真皮细胞中尿酸盐结晶的含量决定,高度油

蚕的体壁真皮细胞中尿酸盐结晶的含量最低^[6]。由于尿酸盐结晶可以直接被机体吸收而有诱发痛风的风险^[20],因此尿酸盐含量较低的高度油蚕更适于药食品的开发利用。目前,聚合了这2种突变性状的黄血高度油蚕尚未发现有药食用相关的研究。本研究结果显示,由黄血高度油蚕5龄第3天幼虫所制备的全蚕粉在1日内2次,20 mL/kg·次的小鼠最大灌胃剂量(最大耐受剂量10 000 mg/kg)下,未见小鼠出现异常和死亡。根据急性毒性评价标准可认为由黄血高度油蚕所制备的全蚕粉为无毒级。该试验系统由小鼠来检测接触此类全蚕粉的急性经口毒性反应,为黄血高度油蚕全蚕粉在人类中的推广和应用提供了试验依据。

参考文献

[1] JEONG S H, KIM M S, RYU G S. Effect of silkworm extract on intestinal α -glycosidase activity in mice administered with a high carbohydrate-containing diet[J]. *Korean J Seric Sci*, 1997, 39(1): 86-92.
 [2] ASANO N, YAMASHITA T, YASUDA K, et al. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.)[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(9): 4 208-4 213.
 [3] 柳江善, 李羲三, 金基永, 等. 韩国对家蚕及其产品的功能性研究进展[J]. *蚕业科学*, 2012, 38(4): 749-757.
 [4] YATSUNAMI K, MURATA K, KAMEI T. 1-Deoxyojirimycin content and alfa-glucosidase inhibitory activity and heat stability of 1-deoxyojirimycin in silkworm powder[J]. *Food Nutr Sci*, 2011, 2(2): 87-89.
 [5] 桂仲争, 庄大桓. 全蚕粉及其生理功能[J]. *中国蚕业*, 2000, 21

(2): 53-54.
 [6] 畑村又好. 油蚕性与尿酸的关系[J]. *蚕丝试验场报告*, 1943, 11(3): 347-357.
 [7] 马宝俊, 高玉军. 特殊用途家蚕品种介绍[J]. *承德医学院学报*, 2005, 22(1): 70-71.
 [8] 杜鑫, 费建明, 李军, 等. 蚕品种选育多用途化发展趋势[J]. *蚕桑通报*, 2007, 38(1): 11-14.
 [9] 王安皆, 姜齐年, 周丽霞, 等. 油蚕的生理特征及其开发利用[J]. *北方蚕业*, 2009, 30(2): 9-10.
 [10] 何行健, 薛宏, 刘昌文, 等. 全蚕粉用黄血高度油蚕品种的选育初报[J]. *中国蚕业*, 2016, 37(2): 47-51.
 [11] 国家技术监督局. 食品安全性毒理学评价程序: GB 15193. 3—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 19-88.
 [12] KIM Y H. Effect of bread with added silkworm powder and cholesterol on lipid metabolism of rat[J]. *Korean J Food Nutr*, 2008, 21(3): 306-311.
 [13] 金洁, 刘淑梅, 时连根. 家蚕幼虫体中黄酮类化合物含量的变化规律[J]. *蚕业科学*, 2005, 31(2): 141-144.
 [14] 桂仲争, 陈杰, 陈伟华, 等. 全蚕粉(SP)降血糖的作用效果及其机理的研究[J]. *蚕业科学*, 2001, 27(2): 114-118.
 [15] 端礼荣, 何家禄, 陆荣柱, 等. 家蚕制品的急性毒性及微核试验[J]. *毒理学杂志*, 2000, 14(1): 55-55.
 [16] 岳万福. 基于家蚕杆状病毒表达系统表达外源基因研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
 [17] 代方银, 鲁成, 张健飞. 家蚕蛾黄翅的遗传分析与黄血基因的多效作用[J]. *蚕学通讯*, 2000, 20(1): 1-4.
 [18] 陈智毅, 廖森泰, 李清兵, 等. 多化性黄血蚕的食用和药用价值的研究[J]. *蚕业科学*, 2002, 28(2): 173-176.
 [19] 肖阳, 吴福泉, 王振江, 等. 蚕体黄酮类化合物的提取及不同家蚕品种间的含量差异[J]. *蚕业科学*, 2011, 37(2): 358-361.
 [20] 董鹏, 宋慧. 痛风发病机制研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2015, 35(12): 1 695-1 699.

· 信息、广告索引 ·

陕西省安康市蚕种场	(封面)	成果快讯: 家蚕新品种华康3号通过四川省蚕品种审定委员会审定	(P9)
中国农业科学院蚕业研究所附属蚕药厂	(封二)	书讯:	
湖州市经济作物技术推广站	(封三)	《蚕学精义丛书》	(P13)
江苏生久农化有限公司	(封底)	《国家蚕桑产业技术路线图》	(P20)
四川省南充蚕具研究有限公司	(彩插1)	《蚕业史论文选》	(P34)
凉山彝族自治州蚕种场	(彩插2)	《中国蚕业史话》	(P62)
湖州宝成蚕业用品有限公司	(彩插3)	稿件规范化与标准化:	
西昌市蚕种场	(彩插4)	正体与斜体使用规则	(P29)
四川南充上智农业机械设备有限公司	(彩插5)	计量单位	(P29)
杭州市蚕桑技术推广总站	(彩插6)	参考文献著录方法与格式	(P72)
江苏省昆山市巴城跨越塑料制品厂	(黑插1)	《蚕业科学》征订启事	(P50)
江苏省东台市腾飞塑料制品厂	(黑插2)		
《中国蚕业》稿约	(P5)		