

不同品种及饲养季节家蚕雄蛹 睾酮含量的研究*

王艳辉^{1,2}, 陈亚³, 黄平², 刘宏程⁴,
陈松², 白兴荣², 廖鹏飞², 和绍禹^{1**}

- [1. 云南农业大学 东方蜜蜂研究所, 云南 昆明 650201;
2. 云南省农业科学院 蚕桑蜜蜂研究所, 云南 蒙自 661101;
3. 云南农业大学 基础与信息工程学院, 云南 昆明 650201;
4. 农业部农产品质量监督检验测试中心(昆明), 云南 昆明 650223]

摘要: 用高效液相色谱法分析了不同品种、不同饲养季节家蚕雄蛹睾酮含量。结果显示, 家蚕雄蛹睾酮含量在 10 个供试品种间存在显著差异 ($P < 0.05$)。在供试的 10 个品种中, 含量最高的是菁松 × 皓月 (41.28 ng/g), 含量最低的是日新 × H05 (17.71 ng/g); 含量在 20 ~ 30 ng/g 范围内的居多, 共有 6 个品种; 含量在 30 ~ 40 ng/g 范围内的有 2 个品种。在不同的饲养季节采集的家蚕品种云 7、菁松 × 皓月、云 7 × 云 8 雄蛹睾酮含量春季 > 夏季 > 秋季 ($P < 0.01$)。

关键词: 睾酮含量; 家蚕雄蛹; 高效液相色谱法

中图分类号: S 881.26 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X (2010) 02-0235-04

Testosterone Contents in Male Silkworm Pupae of Different Breeds in Different Seasons

WANG Yan-hui^{1,2}, CHEN Ya³, HUANG Ping², LIU Hong-cheng⁴,
CHEN Song², BAI Xing-rong², LIAO Peng-fei², HE Shao-yu¹

- [1. Eastern Bee Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Sericultural and Apicultural Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China;
3. College of Basic Science and Information Engineering, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
4. Supervision and Testing Center for Farm Product Quality, Ministry of Agriculture (Kunming), Kunming 650223, China]

Abstract: Testosterone contents in the male silkworm pupae of different breeds in different seasons were analyzed by High Performance Liquid Chromatography. There was significant difference among the 10 tested breeds ($P < 0.05$), with the highest content of Jingsong × Haoyue (41.28 ng/g) and the lowest content of Rixin × H05 (17.71 ng/g). Testosterone contents of 6 breeds were between 20 ~ 30 ng/g, and the other 2 were between 30 ~ 40 ng/g. Seasonal effect on the testosterone contents of male silkworm pupae among the breeds Yun 7, Jingsong × Haoyue, Yun 7 × Yun 8 was significant; in Spring season the content was the highest, in the Summer season it was lower, in autumn season it was the lowest ($P < 0.01$).

收稿日期: 2009-03-30 修回日期: 2009-05-19

* 基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项经费(nyhyzx07-020-16)。

作者简介: 王艳辉(1973-), 女, 云南建水人, 在读硕士研究生, 主要从事蚕桑蜜蜂资源利用研究。

** 通讯作者 Corresponding author: 和绍禹(1952-), 男, 教授, 主要从事东方蜜蜂学研究。

E-mail: kmhsy@163.com

Key words: Testosterone contents; male silkworm pupae; High Performance Liquid Chromatography

睾酮是主要的雄性激素,由睾丸间质细胞分泌。雄性激素的功能除主要维持雄性器官和副性腺的发育外,还能促进蛋白质的合成,加强脂肪应用,刺激红细胞生成,帮助骨的生长和钙化^[1]。研究表明,中老年男子体内总睾酮含量以每年 0.8% 的速度递减,其中游离睾酮和白蛋白结合睾酮以每年 2% 的速度下降^[2]。而这种随着年龄增长引起的睾酮生成减少可导致老年期骨质疏松,使骨折风险增加^[3]。睾酮含量和前列腺癌还具有密切的关系。HAPER 报道 222 例前列腺患者的血清睾酮值偏低^[4]。而 SEVERI 的研究报告指出,血清睾酮值高者发生更具侵袭性的前列腺癌的风险较小^[5]。以上研究结果表明,适当补充睾酮对中老年男性、内源性雄性激素不足及体质虚弱者显然很有必要,探索天然来源的睾酮成为研究的热点。

蚕蛹是蚕从幼虫向成虫过渡的一种中间生命形态。《本草纲目》记载,蚕蛹具有生津止渴、消食理气、壮阳、滋补等作用。鞠贵春等研究发现,柞蚕蛹中含有主要的雄性激素——睾酮^[6]。而关于家蚕蛹中睾酮的研究报道则很少。本文采用高效液相色谱法分析不同品种及不同饲养季节家蚕雄蛹睾酮含量,为合理开发家蚕雄蛹作为天然雄性激素补充资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

5 个家蚕原种(云 8,皓月, H05, 云 H18, 云 H26)和 5 个一代杂交种(云 7 × 云 8, 菁松 × 皓月, 日新 × H05, 新松 × 云 H18, 蒙草 × 云 H26)样品采集秋季雄蚕蛹。不同季节(春季、夏季、秋季)蚕蛹中睾酮的含量差异研究采集原种云 7, 一代杂交种菁松 × 皓月、云 7 × 云 8。样品于 2008 年采自云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所。家蚕按常规方法饲养至上簇结茧,化蛹后削茧取蛹,鉴别雌雄后置于饲养环境中至羽化前一天取雄蛹(复眼变黑,蛹体软化,蛹皮色泽加深并失去光泽、生皱)于 60℃ 烘箱内干燥后粉碎得家蚕雄蛹粉。

1.2 睾酮的分析测定

1.2.1 仪器与试剂

Waters Alliance 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),附 2487 双波长紫外检测器,自动进样系统,固相萃取装置(SUPELCO),C18 固相萃取小柱(J. T Baker, 3 mL, 500 mg),旋转蒸发器(Heidolph Haborota 4000),Sartorius 纯水器,离心机(TDL-40B, 上海安亭),组织捣碎机(江苏盐城)。

睾酮(Testosterone, Dr. Ehrenstorfer GmbH, 99%),甲醇(Merk, 色谱级),甲醇、乙腈、正己烷均为分析纯,超纯水。

1.2.2 色谱条件

Hypersil ODS C18 色谱柱:4.6 mm × 250 mm, 5 μm (Thermo electron co.),柱温 30℃,进样量 80 μL。

流动相为甲醇:水 = 55:45 (V/V)。流速为 1 mL/min,波长为 245 nm。

1.2.3 标准曲线的绘制

配制浓度系列为 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 μg/mL 的睾酮标准溶液,进样 80 μL,测定峰面积,以峰面积对浓度作曲线,计算出回归方程。睾酮在 0.01 ~ 0.5 μg/mL 范围内线性关系良好,回归方程为 $Y = 1.3e^5 X - 1.41e^3$,相关系数是 0.999 5。

1.2.4 样品处理及净化

样品处理:准确称取 5 g 雄蛹粉于 100 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 甲醇,振荡 30 min 后把提取液及样品倒入 50 mL 带盖塑料离心管中,用离心机离心 10 min (3 000 r/min),取上清液于蒸馏烧瓶中,残渣再分别用 20 mL 甲醇重复提取两次,合并上清液于蒸馏烧瓶中,35℃ 下在旋转蒸发器上浓缩至干。

将甲醇提取物用 20 mL 乙腈移到 100 mL 小烧杯中,在 70℃ 水浴上蒸汽加热并用玻棒搅拌提取 10 min,把上清液移入分液漏斗中,残渣再用 20 mL 乙腈重复提取两次,上清液合并于分液漏斗中,加入 30 mL 正己烷,振荡、静置,分液后取乙腈层于蒸馏烧瓶中,35℃ 下在旋转蒸发器上浓缩至干,加入 2 mL 水溶解,待净化。

样品净化: 取 C18 小柱, 依次加入 5 mL 甲醇, 5 mL 超纯水, 待净化样品水溶部分, 5 mL 超纯水, 真空抽干小柱。用 3×1 mL 80% 甲醇/水溶解烧瓶中未溶于水的样品, 上抽干后的小柱, 用 80% 的甲醇/水洗脱, 收集定容 5 mL, 经 $0.2 \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 待 HPLC 分析。

1.2.5 数据分析

用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析。不同品种、不同季节雄蚕蛹中睾酮含量差异用多重方差

分析 (One-way ANOVA), 原种和杂交种两组雄蚕蛹间睾酮含量差异用 t 检验。

2 结果与分析

2.1 不同品种家蚕雄蛹中睾酮含量测定

在采集的 5 个家蚕原种和 5 个一代杂交种雄蛹中睾酮的含量存在差异 (每个样品平行测定 5 次, 表中数值为平均值 \pm 偏差), 如表 1。

表 1 不同品种家蚕雄蛹中睾酮含量

Tab. 1 Testosterone contents in male silkworm pupae of several breeds

原种名 protospecies	睾酮含量/(ng · g ⁻¹) testosterone contents	杂交种名 hybrid species	睾酮含量/(ng · g ⁻¹) testosterone contents
云 8 Yun8	24.51 \pm 0.92 ^f	云 7 \times 云 8 Yun 7 \times Yun 8	26.83 \pm 1.15 ^e
皓月 Haoyue	38.43 \pm 1.43 ^b	菁松 \times 皓月 Jingsong \times Haoyue	41.28 \pm 1.29 ^a
H05 H05	21.85 \pm 0.96 ^e	日新 \times H05 Rixin \times H05	17.71 \pm 1.53 ^b
云 H18 YunH18	28.13 \pm 1.65 ^{de}	新松 \times 云 H18 Xinsong \times YunH18	32.38 \pm 1.64 ^c
云 H26 YunH26	28.94 \pm 1.34 ^d	蒙草 \times 云 H26 Mengcao \times YunH26	23.16 \pm 1.26 ^{fe}

注: 不同的小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。Note: different lowercases mean significant difference ($P < 0.05$).

(1) 原种间睾酮含量存在明显差异, 含量最高的是皓月, 含量最低的是 H05, 极差为 16.58 ng/g。(2) 杂交品种间睾酮含量存在明显差异, 含量最高的是菁松 \times 皓月, 含量最低的是日新 \times H05, 极差为 23.57 ng/g。(3) 父本和杂交品种间睾酮含量存在差异。杂交品种云 7 \times 云 8、菁松 \times 皓月、新松 \times 云 H18 睾酮含量显著超过其父本云 8、皓月、云 H18 ($P < 0.05$)。杂交品种日新 \times H05、蒙草 \times 云 H26 睾酮含量显著小于其父本 H05、云 H26 ($P < 0.05$)。(4) 原种和杂交种两组蚕蛹间睾酮含量差异不显著 ($P >$

0.05)。

2.2 不同季节雄蚕蛹中睾酮含量比较

不同饲养季节采集的原种云 7、杂交品种菁松 \times 皓月、云 7 \times 云 8 羽化前一天家蚕雄蛹睾酮含量均存在差异 (每个样品平行测定 5 次, 表中数值为平均值 \pm 偏差): 原种云 7、杂交品种云 7 \times 云 8 睾酮含量春蚕蛹 $>$ 夏蚕蛹 $>$ 秋蚕蛹, 差异极显著 ($P < 0.01$); 杂交品种菁松 \times 皓月睾酮含量春蚕蛹 $>$ 夏蚕蛹, 差异极显著 ($P < 0.01$), 夏蚕蛹睾酮含量 $>$ 秋蚕蛹, 但差异没有达到极显著水平 ($P > 0.01$)。

表 2 不同季节家蚕雄蛹中睾酮含量

Tab. 2 Testosterone contents in male silkworm pupae in different seasons

品种名 breeds	春蚕期/(ng · g ⁻¹) Spring	夏蚕期/(ng · g ⁻¹) Summer	秋蚕期/(ng · g ⁻¹) Autumn
云 7 Yun7	43.63 \pm 1.59 ^A	32.51 \pm 1.09 ^B	28.21 \pm 1.54 ^C
菁松 \times 皓月 Jingsong \times Haoyue	54.32 \pm 1.30 ^B	45.46 \pm 1.55 ^A	41.28 \pm 1.29 ^A
云 7 \times 云 8 Yun7 \times Yun8	46.53 \pm 1.43 ^C	35.82 \pm 1.56 ^B	26.83 \pm 1.15 ^A

注: 品种内比较, 不同的大写字母表示极显著差异 ($P < 0.01$)。

Note: Comparison was taken among the breeds, different majuscules mean extremely significant difference ($P < 0.01$).

3 讨论

研究表明,不同品种、不同饲养季节蚕蛹中睾酮的含量存在显著性差异,含量最高的是菁松×皓月,含量为 41.28 ng/g;含量最低的是日新×H05,含量为 17.71 ng/g;极差是 23.57 ng/g。在所选的 10 个品种中,含量在 20~30 ng/g 范围内的居多,共有 6 个品种,含量在 30~40 ng/g 范围内的有 2 个品种。在春、夏、秋 3 个不同的蚕季采集的原种云 7、杂交品种菁松×皓月、云 7×云 8 睾酮含量春蚕蛹>夏蚕蛹>秋蚕蛹。家蚕雄蛹睾酮含量在品种间和饲养季节间存在差异原因可能在以下几个方面:(1)遗传因素造成不同品种合成和分泌激素的能力差异。(2)不同季节桑叶营养成分差异可能是造成不同季节蚕蛹中睾酮含量不同的主要原因。蚕体内的营养物质以及由这些物质转变的生成物取决于食物的营养水平。春叶营养丰富,蚕发育较快;夏、秋叶老硬,蚕可利用的营养成分显著减少,发育慢^[7]。春蚕期桑叶的水分含量(76.13%)比夏、秋蚕季的稍高(分别为 67.65%和 65.73%)^[8]。研究发现,当昆虫老龄幼虫只取食含水量在 70%以下,含氮量通常少于 3%以下的树叶时,它的最大相对生长率值被限制到只及一般的食草者的一半^[9]。春蚕期的桑叶蛋白质含量(22.98%)比夏、秋季(18.10%,16.21%)高。蛋白质是构成蚕体的基本物质之一,它和其它物质结合后具有调节体内物质代谢的机能。蚕体消化吸收的桑叶蛋白质有 90%留在体内^[8]。不同季节桑叶中其它成分如粗脂肪、微量元素、维生素以及黄酮、1-脱氧野尻霉素、多糖等生物活性成分的含量差异也可能会影响蚕体的发育、组成。昆虫雄性激素的合成和分泌是诸多因素调控的过程,包括酶的参与、其它激素的调控等。今后应从

食物对蚕的生理、代谢及内分泌的影响进一步研究造成差异的原因。

蚕蛹中具有雄激素样作用的物质除睾酮外还有促前列腺激素、胆甾醇、 β -谷甾素、 β -蜕皮激素等^[10],这些物质在雄蚕蛹中的雄激素样作用的药理地位有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张家骅. 家畜生殖内分泌学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [2] 陈炜, 罗俊航. 中老年男子雄性激素部分缺症的特征与对策 [J]. 新医学, 2003, 34 (9): 536-537.
- [3] 舒德芬, 陈永华, 董碧蓉. 睾酮补充治疗新进展 [J]. 华西医学, 2004, 19 (3): 507-508.
- [4] HARPER M E, PIERREPOINT C G, GRIFITHS K. Carcinoma of the prostate: relationship of pre-treatment hormone levels to survival [J]. European Journal of Cancer & Clinical Oncology, 1984, 20 (3): 477-482.
- [5] SEVERI G, MORRIS H A, MACLNNIS R J, et al. Circulating steroid hormones and the risk of prostate cancer [J]. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2006, 15 (1): 86-91.
- [6] 鞠贵春, 李栋材, 范玉林, 等. 柞蚕蛹感温发育阶段性激素变化的研究 [J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18 (1): 30-33.
- [7] 邹钟琳. 昆虫生态学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1980.
- [8] 浙江农业大学. 蚕体解剖生理学 [M]. 北京: 农业出版社, 1981.
- [9] 傅贻玲. 昆虫生理学研究进展 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [10] 宋燕青, 邓树海, 隋志义, 等. 蚕蛹药用成分及其提取工艺研究概况 [J]. 中国生化药物杂志, 2006, 26 (5): 306-309.