

# 鼠妇提取物及不同极性部位缓解神经病理性疼痛作用研究

杨玉婕, 戴文玲, 刘吉华

中国药科大学中药学院, 江苏 南京

收稿日期: 2024年4月17日; 录用日期: 2024年5月15日; 发布日期: 2024年5月22日

## 摘要

目的: 比较鼠妇水提取物及不同极性部位缓解神经病理性疼痛的药效作用, 为鼠妇临床应用和镇痛药效物质的深入研究奠定基础。方法: 鼠妇经水提得到水提取物(AVW)后, 依次用石油醚、乙酸乙酯萃取得到石油醚部位(APF)、乙酸乙酯部位(AEF)和水部位(AWF)。此外将AVW经石油醚脱脂后通过硅胶柱层析分段, 制备获得石油醚-乙酸乙酯(3:1)、石油醚-乙酸乙酯(1:1)、石油醚-乙酸乙酯(1:3)、乙酸乙酯、甲醇洗脱部位。建立大鼠坐骨神经慢性压迫损伤模型, 灌胃(0.5 g/kg)或鞘内(0.2 mg/20 $\mu$ L)给予鼠妇提取物或不同部位样品, 运用Von Frey及Hargreaves分别测定大鼠机械及热痛阈值, 评价鼠妇水提取物及不同极性部位的镇痛活性。结果: 鼠妇水提取物有效缓解神经病理性疼痛, 且不同极性部位镇痛活性有差异。结论: 石油醚-乙酸乙酯(1:1)洗脱部位和甲醇洗脱部位具有较强的镇痛活性, 为主要镇痛活性部位。

## 关键词

鼠妇, 神经病理性疼痛, 有效部位

# Analgesic Activities of Different Polarity Fractions of the Aqueous Extract from *Armadillidium vulgare* Latreille

Yujie Yang, Wenling Dai, Jihua Liu

School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

Received: Apr. 17<sup>th</sup>, 2024; accepted: May 15<sup>th</sup>, 2024; published: May 22<sup>nd</sup>, 2024

## Abstract

**Objective:** The aim was to compare the analgesic effect of the aqueous extract and its different po-

larity fractions of *Armadillidium vulgare* Latreille on neuropathic pain, which laid a foundation for further study on clinical application and analgesic substances of *Armadillidium vulgare* Latreille. **Methods:** After AVW was obtained, APF, AEF and AWF were extracted with petroleum ether and ethyl acetate successively. Then, AVW defatted by petroleum ether was segmented by silica gel column chromatography to obtain petroleum ether-ethyl acetate (3:1), petroleum ether-ethyl acetate (1:1), petroleum ether-ethyl acetate (1:3), ethyl acetate, methanol elution parts. The model of chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats was established. After oral administration (0.5 g/kg) or intrathecal administration (0.2 mg/20 $\mu$ L), the mechanical and thermal pain thresholds of rats were determined by Von Frey and Hargreaves respectively to evaluate the analgesic activities of AVW and its different polarity fractions. **Results:** AVW effectively relieved neuropathic pain, and the analgesic activity of different polarity fractions is different. **Conclusion:** Petroleum ether-Ethyl acetate (1:1) eluting site and methanol eluting site had strong analgesic effect, and were the main analgesic active fractions.

## Keywords

*Armadillidium vulgare* Latreille, Neuropathic Pain, Effective Fractions

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是由中枢或外周神经系统损伤或疾病引起的疼痛综合征,以自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏为特征[1],极大影响患者的生活质量。据统计,世界上有7~10%的人口受该类疾病所困扰。由于发病机制复杂, NP的治疗一直是医药界的难题。抗癫痫药(如加巴喷丁)、抗抑郁药(如三环类抗抑郁药)和抗惊厥药(如卡马西平)常用于临床治疗中、重度神经病理性疼痛,但其疗效有限且伴随嗜睡等不良反应[2]。临床二线治疗药物如阿片类镇痛药也具有耐受性、成瘾性等严重副作用[3]。因此,寻找更安全、更有效的治疗药物迫在眉睫。

鼠妇始载于《神农本草经》,为卷甲虫科动物卷甲虫 *Armadillidium vulgare* Latreille 或潮虫科粗糙鼠妇 *Porcellio scaber* Latreille 的干燥全体。味酸,性温,无毒,入肝、肾经。具有利水、通经、化痰、平喘、止痛等功效。临床常用于治疗手术后疼痛、中重度癌痛,效果显著[4]。有报道将鼠妇用于肝癌晚期止痛,作用持久性优于杜冷丁[5]。化学成分研究表明鼠妇中主要含甾醇类、蛋白质类、生物碱类、有机酸类及脂类化合物[6] [7] [8],对其中镇痛活性成分的研究较少,可能与甾醇类和蛋白质类物质有关[9] [10],具体镇痛药效物质仍不清楚。鼠妇对神经病理性疼痛的镇痛作用尚未见报道。本研究通过建立大鼠坐骨神经慢性压迫损伤(Chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI)模型,评价鼠妇及其不同极性部位样品对 CCI 诱导 NP 镇痛药效作用,为鼠妇临床应用和镇痛药效物质研究累计科学数据。

## 2. 实验材料

### 2.1. 药材

鼠妇购自安徽亳州药材市场,经鉴定为卷甲虫科动物卷甲虫 *Armadillidium vulgare* Latreille 的干燥全体。

## 2.2. 动物

SPF 级别雄性 SD 大鼠, 重量为 180~220 g, 购于斯贝福(北京)生物技术有限公司。许可证号为: SCXK(京)2019-0010。实验动物饲养于 12 h~12 h 昼夜交替的独立环境中, 室温维持在  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , 自由饮水和摄食。动物实验经中国药科大学实验动物伦理委员会的批准。

## 2.3. 试剂

石油醚(无锡市亚盛化工有限公司)、乙酸乙酯(上海申博化工有限公司)、甲醇(江苏汉邦科技有限公司)、柱层析硅胶(青岛海洋化工有限公司), 试剂皆为分析纯。

## 2.4. 仪器

Von-Frey 纤维丝(CA91367) (美国 North Coast Medical 公司)、热痛刺激仪(意大利 Ugo basile 公司)、4-0 铬制肠线(上海浦东金环医疗用品有限公司)、万分之一天平(瑞士梅特勒仪器有限公司)、台式高速离心机(德国默克集团)、旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、循环水式真空泵(上海一凯仪器设备有限公司)、恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)、分液漏斗(江苏华欧玻璃有限公司)、层析柱(青岛海洋化工有限公司)。

## 3. 实验方法

### 3.1. CCI 模型制备

雄性 SD 大鼠麻醉后, 右侧俯卧位固定于手术板上。将大鼠后肢大腿外侧剪毛消毒, 于左侧股骨中部外侧, 顺股骨方向进行切口, 钝性分离肌肉组织, 暴露坐骨神经, 以 4-0 铬制肠线于坐骨神经处结扎 4 道, 当观测到大鼠小腿肌肉或脚趾有轻微抽动现象, 表明结扎松紧程度适宜。缝合皮肤后肌肉注射 4,000 单位青霉素。对照组只钝性分离肌肉, 暴露坐骨神经, 游离周围组织, 不结扎坐骨神经。术后 14 天机械痛阈值和热刺激缩足反射阈值较基础值下降 50% 以上者视为 CCI 模型成功, 投入实验。

### 3.2. 机械痛阈值(MWT)测定

采用 Von Frey 纤维丝法测定大鼠足底 MWT。大鼠置于底部为金属网的透明箱内, 适应环境 15 min。取标度分别为 1、1.4、2、4、6、8、10 和 15 g 的纤维丝, 垂直刺激大鼠后肢足底 5 s, 刺激力量以纤维丝弯曲为准。大鼠出现抬足或舔足反应为阳性反应, 将刺激所需最低力度记为 MWT, 重复 3 次取平均值。

### 3.3. 热痛阈值(TWL)测定

采用 Hargreaves 法测定大鼠足底 TWL。大鼠置于玻璃板底厚度为 3 mm 的透明箱内, 适应环境 15 min。调节刺激光源强度为  $55^\circ\text{C}$ , 刺激大鼠后肢足底, 同时开始计时, 当出现抬脚、舔脚、躲避等阳性反应时, 记录热痛仪上时间为 TWL, 设定自动切断时间为 30.1 s, 重复 3 次取平均值。

### 3.4. 鼠妇水提物制备

称取 100 g 鼠妇干燥药材, 粉碎并过 60 目筛, 加入 10 倍量体积水回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并提取液,  $60^\circ\text{C}$  减压回收溶剂, 水定容至 100 mL 得鼠妇水提物(AVW)。

### 3.5. 鼠妇不同极性部位样品制备

取鼠妇水提物, 依次用等体积石油醚、乙酸乙酯萃取, 每个部位各萃取两次, 合并萃取液, 回收溶剂至干得到石油醚部位(APF)、乙酸乙酯部位(AEF), 萃取后剩余部分回收至干得到水部位(AWF)。

### 3.6. 鼠妇硅胶柱层析分段样品制备

取鼠妇水提物，等体积石油醚萃取两次脱脂。水相减压浓缩至浸膏，甲醇复溶，以 100~200 目硅胶拌样并挥干。按照 200~300 目层析硅胶：鼠妇浸膏 = 10:1 的比例装柱后干法上样，然后分别以石油醚 - 乙酸乙酯(3:1)、石油醚 - 乙酸乙酯(1:1)、石油醚 - 乙酸乙酯(1:3)、乙酸乙酯、甲醇洗脱 10 个柱体积，洗脱液回收溶剂至干即得不同分段样品。

### 3.7. 鞘内注射给药

大鼠置于俯卧位，定位髂脊背部，使用微量注射器倾斜 30~45 度于 L5-L6 椎间间隙注射。每只大鼠鞘内给药体积为 20  $\mu$ L，观测到大鼠尾部颤抖或突然甩动表明注射成功。

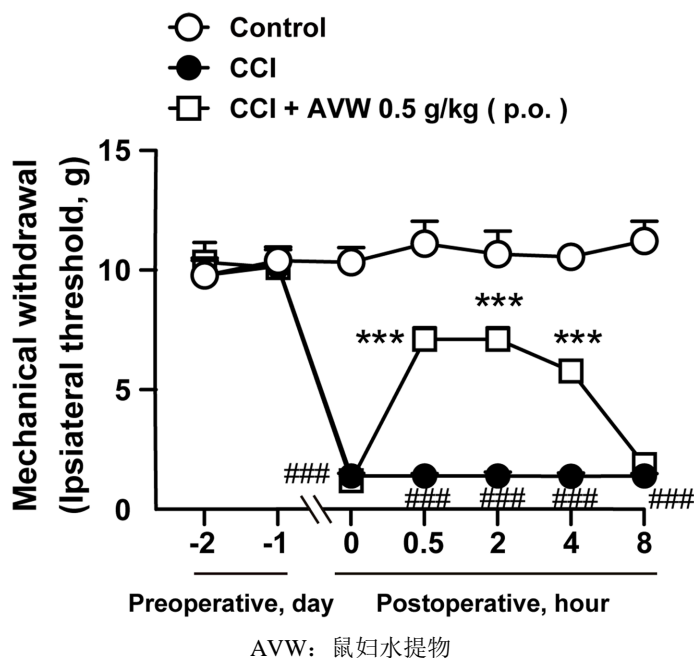
### 3.8. 统计学分析

统计结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示，统计方法采用 t 检验， $P < 0.05$  即存在显著性差异。所有实验结果使用 Microsoft excel, Adobe Illustrator 软件作图。

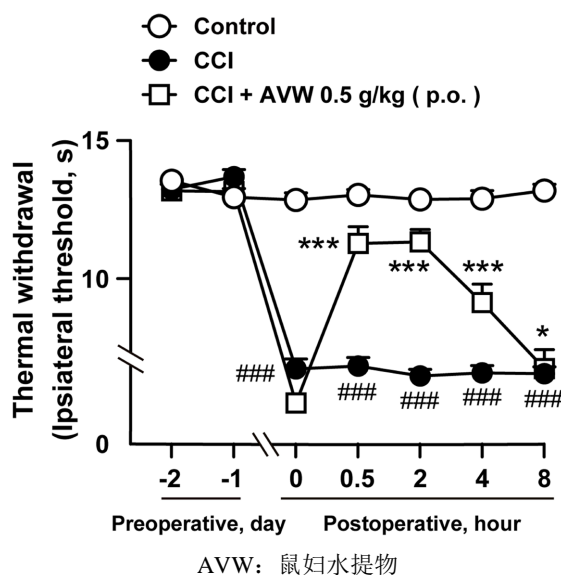
## 4. 实验方法

### 4.1. 鼠妇水提物对 CCI 诱导的神经病理性疼痛镇痛作用

鼠妇水提物对 CCI 诱导的神经病理性疼痛镇痛药效作用见图 1、图 2。CCI 造模 14 天后，大鼠足底 MWT 和 TWL 均显著降低且逐渐稳定，提示神经病理性疼痛模型制备成功(### $P < 0.001$ , 与对照组相比)。单次灌胃给予 AVW (0.5 g/kg)可显著抑制 CCI 模型大鼠足底机械性痛觉超敏和热痛觉过敏。给药后 0.5 h 即发挥镇痛作用，0.5~2 h 镇痛效果最强，MWT 为  $7.11 \pm 1.17$ ，TWL 为  $11.33 \pm 1.09$ ，镇痛时间持续至 8 h (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与 0 h 相比)。而对照组、模型组在 0.5, 2, 4, 8 h, 其术侧机械痛阈和热痛阈与 0 h 相比无显著差异。



**Figure 1.** The effect of AVW on the MWTs of CCI rats (n = 6)  
**图 1.** 鼠妇水提物对 CCI 模型大鼠机械痛阈的影响(n = 6)

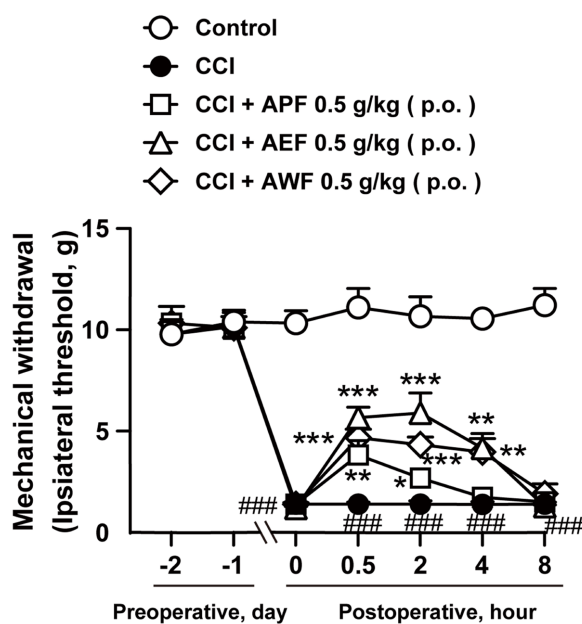


**Figure 2.** The effect of AVW on the TWLs of CCI rats (n = 6)

**图 2.** 鼠妇水提取物对 CCI 模型大鼠热痛阈值的影响(n = 6)

#### 4.2. 鼠妇水提取物不同萃取部位镇痛活性检测

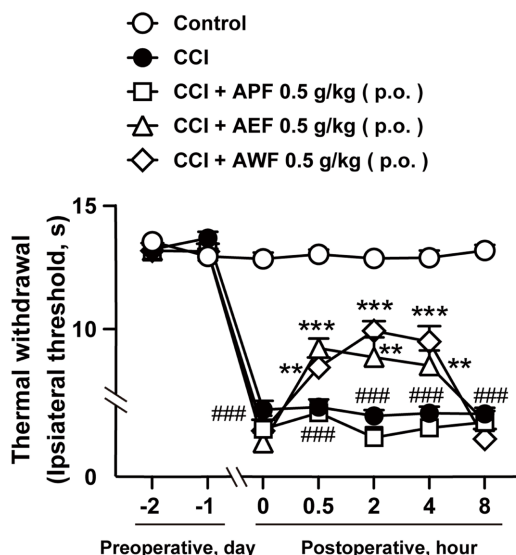
鼠妇水提取物不同萃取部位镇痛药效作用见图 3、图 4。灌胃给予三个部位(0.5 g/kg)后, 乙酸乙酯部位(AEF)和水部位(AWF)均可有效缓解 CCI 诱导的神经病理性疼痛, 给药后 0.5~2 h 镇痛作用较强, MWT 分别为  $5.89 \pm 2.44$  (AEF),  $4.67 \pm 1.03$  (AWF), TWL 分别为  $9.22 \pm 0.97$  (AEF),  $9.93 \pm 0.96$  (AWF), 镇痛时间持续至 8 h (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与 0 h 相比)。而石油醚部位(APF)镇痛作用较弱, 只能轻微抑制 CCI 大鼠的机械性痛觉超敏(\* $P < 0.05$ , 与 0 h 相比)。提示发挥镇痛作用的成分主要集中在中、高极性部位。



APF: 石油醚部位; AEF: 乙酸乙酯部位; AWF: 水部位

**Figure 3.** The effect of APF, AEF and AWF on the MWTs of CCI rats (n = 6)

**图 3.** 鼠妇水提取物不同萃取部位对 CCI 模型大鼠机械痛阈的影响(n = 6)

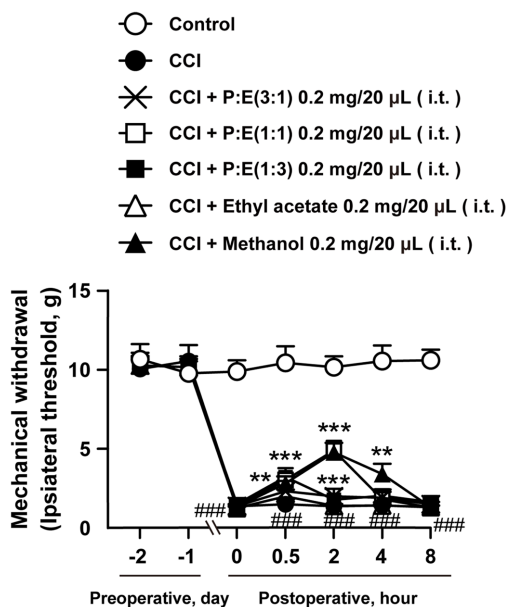


APF: 石油醚部位; AEF: 乙酸乙酯部位; AWF: 水部位

Figure 4. The effect of APF, AEF and AWF on the TWLs of CCI rats (n = 6)  
 图 4. 鼠妇水提物不同萃取部位对 CCI 模型大鼠热痛阈值的影响(n = 6)

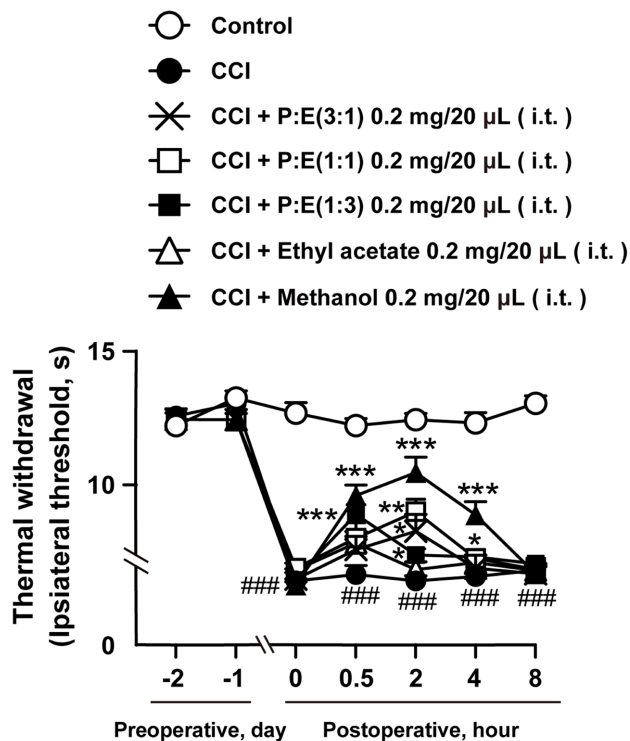
### 4.3. 硅胶柱层析分段样品镇痛活性检测

对鼠妇硅胶柱层析分段样品采用鞘内注射给药(0.2 mg/20 $\mu$ L)。图 5、图 6 显示, 甲醇和石油醚 - 乙酸乙酯(1:1)洗脱部位可显著增加 CCI 大鼠足底机械痛阈值和热痛阈值, 给药后 2 h 镇痛作用较强, MWT 分别为  $4.78 \pm 1.49$ ,  $4.78 \pm 1.71$ , TWL 分别为  $10.46 \pm 1.43$ ,  $8.99 \pm 1.16$  (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, 与 0 h 相比)。而石油醚 - 乙酸乙酯(1:3)洗脱部位镇痛作用较弱, 持续时间较短, 其他部位几乎无镇痛作用。



P:E (3:1): 石油醚-乙酸乙酯(3:1)部位; P:E (1:1): 石油醚-乙酸乙酯(1:1)部位; P:E (1:3): 石油醚-乙酸乙酯(1:3)部位; Ethyl acetate: 乙酸乙酯部位; Methanol: 甲醇部位

Figure 5. The effect of silica gel column chromatography elution fractions on the MWTs of CCI rats (n = 6)  
 图 5. 硅胶柱层析不同极性部位对 CCI 模型大鼠机械痛阈值的影响(n = 6)



P:E (3:1): 石油醚-乙酸乙酯(3:1)部位; P:E (1:1): 石油醚-乙酸乙酯(1:1)部位; P:E (1:3): 石油醚-乙酸乙酯(1:3)部位; Ethyl acetate: 乙酸乙酯部位; Methanol: 甲醇部位

**Figure 6.** The effect of silica gel column chromatography elution fractions on the TWLs of CCI rats (n = 6)  
**图 6.** 硅胶柱层析不同极性部位对 CCI 模型大鼠热痛阈值的影响(n = 6)

## 5. 讨论

中医将神经病理性疼痛归属于痛证,认为“久痛入络”,肝脏、肾脏功能失调与神经病理性疼痛的发生、发展密切相关[11]。动物类中药,尤其是虫类药物在治疗肝病、肾病以及镇痛方面有其自身的特点和优势,但对动物类中药的药效作用及其药效物质研究尚鲜见报道。鼠妇作为常见虫类中药,归肝、肾经,临床应用及实验研究均表明鼠妇具有镇痛药效作用[12] [13] [14],但鼠妇发挥镇痛作用的有效部位及活性成分仍不明确,有研究显示鼠妇中甾醇类成分可能是其镇痛药效成分,该类成分可能通过抑制环氧合酶、减少前列腺素合成发挥镇痛作用[9];也有研究表明蛋白类和氨基葡萄糖是鼠妇镇痛活性成分,镇痛机制包括:鼠妇所含兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸可影响单胺神经递质如 5-羟色胺的合成,导致脑啡肽释放增加,形成突触前抑制,进而阻断 P 物质的兴奋性传导,降低疼痛冲动;可抑制嗜中性粒细胞的活性,减少 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等炎症因子在病灶的表达,从而抑制炎症细胞浸润,缓解炎症反应对机体正常组织的损伤[15] [16]。

本研究首先确证了鼠妇水提物对 CCI 诱导的神经病理性疼痛具有良好的镇痛作用,并通过不同方法制备鼠妇不同极性部位样品,进一步评价鼠妇不同极性部位的镇痛活性,筛选鼠妇缓解 NP 的主要药效活性部位。研究结果显示,鼠妇水提物可有效缓解 CCI 诱导的 NP,其中发挥 NP 镇痛作用的成分主要集中在中、高极性部位,硅胶柱分段部位样品中石油醚-乙酸乙酯(1:1)洗脱部位和甲醇洗脱部位镇痛作用相对较强,提示鼠妇中镇痛活性成分主要富集在这两个部位。本研究首次揭示鼠妇提取物对 NP 具有良好的镇痛作用,发现主要镇痛物质的主要富集部位,为进一步探索其中的镇痛活性成分,明确鼠妇对神经病理性疼痛镇痛的主要药效物质提供支撑,也为其临床应用和产品开发提供科学依据。

## 参考文献

- [1] Finnerup, N.B., Kuner, R. and Jensen, T.S. (2021) Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiological Reviews*, **101**, 259-301. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>
- [2] Fornasari, D. (2017) Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. *Pain and Therapy*, **6**, S25-S33. <https://doi.org/10.1007/s40122-017-0091-4>
- [3] Moisset, X., Page, M.G., Pereira, B., et al. (2022) Pharmacological Treatments of Neuropathic Pain: Real-Life Comparisons Using Propensity Score Matching. *Pain*, **163**, 964-974. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002461>
- [4] 梁超严, 孙志. 鼠妇制剂对中重度癌痛的镇痛效果观察[J]. 山东中医杂志, 1994, 13(4): 159-160.
- [5] 姚善业, 张一雄. 大剂量单味鼠妇止肝癌剧痛六例[J]. 云南中医杂志, 1986(5): 33+49.
- [6] 李军, 刘嘉利, 李尧锋, 等. 鼠妇化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报, 2020, 48(3): 74-76.
- [7] 邓红洁. 鼠妇和鸡屎藤的化学成分研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [8] 闫国卿. 中药桑黄和鼠妇化学成分研究[D]: [硕士学位论文]. 合肥: 安徽大学, 2014.
- [9] 李宁. 鼠妇的镇痛、抗炎作用及化学成分研究[D]: [硕士学位论文]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2008.
- [10] 杨雅莉, 张翼, 李毓, 等. 鼠妇富含蛋白多肽提取物的镇痛作用研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2014, 39(3): 77-81.
- [11] 赵禧, 施国善, 杨舒雯, 等. 基于“久痛入络”理论探讨神经病理性疼痛的中医诊疗思路[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 197-202.
- [12] 苏正兴, 田晓乐, 赵凌志, 等. 鼠妇水煎物镇痛作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1429-1430.
- [13] 吴凌. 复方鼠妇镇痛片剂的研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [14] Guo, S.S., Ren, M.Y., Song, S., et al. (2017) Evaluation of Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Aqueous Extract of *Armadillidium Vulgare* Latreille. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, **23**, 138-145. <https://doi.org/10.1007/s11655-016-2646-3>
- [15] 杨雅莉. 鼠妇蛋白提取物的镇痛作用研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [16] 郭坤坤. 鼠妇镇痛抗炎作用、物质基础及质量控制的实验研究[D]: [博士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2016.