

鼠妇乙醇提取物镇痛抗炎作用及化学成分研究

李 宁, 匡岩巍, 陈明友, 张庆林*

(军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的: 研究鼠妇乙醇提取物的镇痛和抗炎作用, 并对其化学成分进行初步分离鉴定。方法: 通过小鼠醋酸扭体法镇痛实验和环氧化酶抑制剂体外检测, 研究鼠妇乙醇提取物的镇痛抗炎作用; 通过色谱方法对鼠妇乙醇提取物化学成分进行分离纯化, 并用各种理化及波谱技术鉴定其化学结构。结果: 鼠妇乙醇提取物能明显延缓小鼠开始扭体反应的时间, 减少小鼠的扭体次数; 鼠妇乙醇提取物对环氧化酶-1(COX-1)、环氧化酶-2(COX-2)均有抑制作用; 从鼠妇乙醇提取物中分离得到 7 个化合物, 分别为 β -谷甾醇、5-烯-3 β -胆甾醇、麦角甾醇、7 α -羟基胆甾醇、7 β -羟基胆甾醇、正十八酸、顺式 9-十八烯酸。结论: 鼠妇乙醇提取物具有明显的镇痛和抗炎作用。

[关键词] 鼠妇; 乙醇提取物; 镇痛; 抗炎; 化学成分

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0074-03

Analgesic, Anti-inflammatory Effects and Chemical Constituents of Ethanol Extract from Shufu

LI Ning, KUANG Yan-wei, CHEN Ming-you, ZHANG Qing-lin*

(Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the analgesic, anti-inflammatory effects and the chemical constituents of alcohol extract of Shufu. (AVA) **Methods:** The analgesic effect of AVA were tested by counting body twisting induced by HAc in mice and the anti-inflammatory effects of AVA were tested by using the Colorimetric COX Inhibitor Screening Assay. The constituents were isolated and purified by chromatographic methods. Their structures were identified by physicochemical properties and spectral analysis. **Results:** AVA could delay the writhing time and reduce the writhing times in mice. AVA could inhibit the COX-1 and COX-2 enzymes activities. Seven compounds were isolated and the structures were identified as β -Sitosterol, cholesterol, ergosterol, 7-OH cholesterol, 7 β -OH cholesterol, octadecanoic acid and 9-octadecenoic acid. **Conclusions:** AVA has obvious analgesic and anti-inflammatory effects.

[Key words] Shufu; alcohol extract; analgesic effects; anti-inflammatory effects; chemical components

鼠妇为鼠妇科动物平甲虫 *Armadillidium vulgare* (Latreille) 的干燥虫体。具有破血、利水、解毒、止痛之功效^[1]。鼠妇可用于治疗中重度癌痛、手术后疼痛等^[2]。本研究对鼠妇乙醇提取物(AVA)的镇痛抗炎作用进行了研究, 对其化学成分进行了分离纯化, 并用理化方法及波谱手段鉴定其结构。

1 材料与方法

1.1 实验材料 鼠妇药材, 由南京中医药大学张民庆教授鉴定并提供; 强痛定, 由沈阳第一制药厂生产; COX 酶试剂盒(Colorimetric COX Inhibitor Screening Assay), 购自美国 Cayman 公司; 昆明小鼠, 体重(20~25)g, 雌雄各半, 由军事医学科学院动物实验中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠妇乙醇提取物的制备 鼠妇 100 g 粉碎成粉末, 置 50 mL 锥形瓶中, 加乙醇 25 mL 并超声 30

[收稿日期] 2008-03-25

[通讯作者] * 张庆林, Tel: (010) 66930270; E-mail: zhangql@nic.bmi.ac.cn

min, 提取两次, 合并滤液, 用旋转蒸发器浓缩, 得到鼠妇乙醇提取物(AVA)。

1.2.2 小鼠醋酸扭体镇痛实验 昆明小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 阳性对照组 sc 强痛定 9 mg·kg⁻¹, 给药组分别 ig 鼠妇醇提取物(AVA) 0.3, 0.6, 1.2 g·kg⁻¹, 空白对照组 ig 同体积溶剂(95% 乙醇: 吐温 80: 生理盐水 = 5: 5: 95), 30 min 后, 全部小鼠 ip 1% 冰醋酸 10 mL·kg⁻¹ 致痛, 记录注射后小鼠开始出现扭体反应的时间和 20 min 内小鼠扭体次数。

1.2.3 COX 酶抑制剂体外检测^[3,4] 按试剂盒提供的方法进行实验。取 96 孔板, 向每孔加入由 160 μL 缓冲液、10 μL 稀释后的血红素溶液和 10 μL DMSO 组成的溶液。3 个孔作为空白对照组。3 个孔加入 10 μL COX 酶溶液作为阳性对照组。向其余孔加入 10 μL COX 酶溶液和 10 μL 不同浓度鼠妇醇提取物 AVA(15.7, 31.25, 62.5, 125, 250 μg·mL⁻¹) 作为给药组, 各个浓度分别设 3 个复孔。室温放置 5 min, 向每个孔加入 20 μL 显色剂和 20 μL 酸剂, 摇匀, 室温放置 5 min。用酶联仪测定各个孔 590 nm 处的吸收值, 计算抑制率。

1.2.4 鼠妇醇提取物的分离 鼠妇干燥粉末 1.0 kg, 用 95% 乙醇回流提取 3 次, 合并提取液, 再依次用氯仿、正丁醇萃取, 得氯仿部位浸膏 46 g 和正丁醇部位浸膏 13 g。对氯仿部位进行硅胶柱层析, 以石油醚: 氯仿 = 2: 3 为洗脱液分离纯化, 结晶, 得到化合物 1(23 mg)。流份 2 经反相 ODS 柱以异丙醇: 水 = 7: 3 为洗脱液分离纯化得到化合物 2(16 mg)。流份 3 经硅胶柱以氯仿: 甲醇 = 19: 1 为洗脱液分离纯化得到化合物 3(11 mg)。流份 4 经硅胶柱以正己烷: 乙酸乙酯 = 10: 3 为洗脱液分离纯化, 结晶, 得到化合物 4(7 mg)、化合物 5(5 mg)、化合物 6(7 mg)。流份 6 经硅胶柱以氯仿: 丙酮 = 5: 1 为洗脱液分离纯化, 得到化合物 7(8 mg)。

1.3 统计学方法 试验结果表示为 $\bar{x} \pm s$, 选用 SPSS 软件, 采用单因素方差分析。P < 0.05 为有统计学差异。

2 实验结果

2.1 AVA 对小鼠扭体反应的影响 见表 1。结果表明, AVA 的中、高剂量组能明显延缓醋酸诱发小鼠扭体反应的开始时间和扭体次数(P < 0.01)。

表 1 AVA 对小鼠醋酸扭体反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 (g·kg ⁻¹)	扭体反应	
		出现扭体反应时间(s)	扭体次数
空白对照组	—	193 ± 25	43 ± 6
强痛定组	0.009	248 ± 29 ¹⁾	27 ± 6 ¹⁾
AVA 组	0.3	206 ± 53	37 ± 3
	0.6	253 ± 30 ¹⁾	28 ± 5 ¹⁾
	1.2	308 ± 26 ¹⁾	20 ± 3 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ P < 0.01

2.2 AVA 对 COX 酶的抑制作用 结果见图 1。鼠妇醇提取物对 COX-1 酶与 COX-2 酶都具有抑制作用。由图 1 可得出鼠妇醇提取物对 COX-1 酶的 IC₅₀ 值为 27.1 μg·mL⁻¹, 对 COX-2 酶的 IC₅₀ 值为 39.1 μg·mL⁻¹。

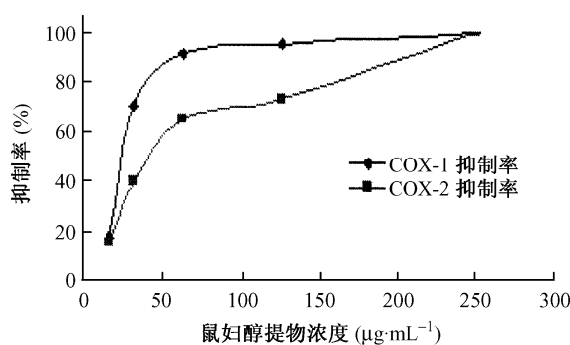


图 1 AVA 对 COX-1、COX-2 酶活力的影响

2.3 鉴定 化合物 1: 白色针晶。EI-MS 显示分子离子峰 m/z 414, IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 3 425, 2 960, 2 936, 2 868, 1 639, 1 465, 1 380, 1 055, 1 022, 958, 801, 591, 与 β-谷甾醇的 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 数据比较^[5] 完全一致。TLC 的 R_f 值及显色行为与 β-谷甾醇对照品一致, 确定此化合物为 β-谷甾醇。

化合物 2: 白色片状结晶。EI-MS 显示分子离子峰 m/z 386, ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) 化学位移 δ 数据为: 5.36(d, 1H, 5-H), 3.52(m, 1H, 3-H), 1.01(s, 3H, 19-CH₃), 0.80~2.40(br, 38H), ¹³C-NMR 数据与文献^[6] 数据比较, 确定此化合物为 5-烯-3β-胆甾醇。

化合物 3: 白色针状结晶, 易溶于氯仿, 难溶于甲醇, Libermann 反应呈紫红色。EI-MS 显示分子离子峰 m/z 396, 理化性质及波谱数据与文献^[7] 对照一致, 故确定化合物为麦角甾醇。

化合物 4: 白色固体, 易溶于氯仿, TLC 检查, 10% 硫酸乙醇加热显蓝色斑点。EI-MS 显示分子离子峰 m/z 402, 波谱数据与文献数据^[8] 一致。确定此化合物为 7α-羟基胆甾醇。

化合物 5: 白色固体, 易溶于氯仿, TLC 检查, 10% 硫酸乙醇加热显蓝色斑点。EFMS 显示分子离子峰 m/z 402, 波谱数据与文献数据^[8]一致。确定此化合物为 7 β -羟基胆甾醇。

化合物 6: 白色片状结晶, EFMS 显示分子离子峰 m/z 284, IR (KBr) $\nu_{\max} \text{ cm}^{-1}$: 2 917, 2 849, 1 704, 1 466, 1 295, 939, 720。¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) 化学位移 δ 数据为: 2.35(2H, t, J= 7.6 Hz), 1.63(2H, m), 1.25(28H, brs), 0.88(3H, t, J= 6.8 Hz), 综合解析以上数据并和文献数据^[9]对照, 确定此化合物为正十八酸。

化合物 7: 黄色油状物, ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) 化学位移 δ 数据为: 5.36(2H, m), 2.34(2H, t, J= 7.0 Hz), 2.03(4H, m), 1.63(2H, m), 0.87(3H, t, J= 7.0 Hz), 结合文献数据, 确定此化合物为顺式 9-十八烯酸。

3 讨论

鼠妇的水提取物及醇提取物对多种疼痛模型均具有明显的抑制作用, 并且无成瘾性^[10, 11], 而抗炎作用与镇痛作用密切相关, COX 酶是前列腺素合成前期中的关键限速酶, 可将花生四烯酸转化成各种前列腺素, 具有重要的生理功能, 如介导炎症应答、血小板凝集等, 因此抑制 COX 酶可以起到抗炎作用。本研究结果表明鼠妇乙醇提取物能抑制由醋酸引起的小鼠扭体反应, 并具有抑制 COX 酶的作用。目前已报道从鼠妇中提取分离得到的化合物主要是胆甾醇和蚁酸等, 本研究也证实其含有多种甾醇和有机酸, 其发挥抗炎镇痛作用的成分可能是甾醇类物质。综上所述, 鼠妇乙醇提取物具有一定的镇痛及抗炎

作用, 为其临床应用应用提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 下册, 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 2499-2500.
- [2] 林明侠, 刘树民. 鼠妇的临床应用进展[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(supp): 127-128.
- [3] Jang M, Cai L, Udeani GO, *et al.* Cancer chemopreventive activity of reveratrol, a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997, 275, 218-220.
- [4] Xie W, Chipman JG, Robertson DL, *et al.* Expression of a mitogen responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 2692-2696.
- [5] Della Greca M, Monaco P, Previtera L. Stigmasterols from Typhalatifolia [J]. J Nat Prod, 1990, 53 (6) : 1430.
- [6] 于德泉, 杨俊山. 分析化学手册: 核磁共振波谱分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1999: 892-893.
- [7] 马祥全, 张广文, 苏镜娉, 等. 格氏短指软珊瑚的次生代谢产物研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41 (6) : 38-41.
- [8] Hietter H, Gouyette A, Van Dorsselaer A, *et al.* Metabolism of cytotoxic hydroxysterols in cultured cells. Chemical characterization of metabolites [J]. J steroid biochem, 1988, 29(5) : 481-489.
- [9] Kong LY, Min ZD. Studies on the chemical constituents of stem and leaf of common poinsettia [J]. Chin Trad & Herbal Drugs, 1996, 27 (8) : 453-456.
- [10] 商亚珍, 缪红, 宋成军, 等. 鼠妇镇痛作用的实验研究 [J]. 承德医学院学报, 2002, 19(1) : 10-11.
- [11] 孟庆繁, 孙凤英, 田晓乐, 等. 鼠妇水提物的镇痛作用 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2005, 31(4) : 501-503.