

雪上一枝蒿总碱及其主要二萜生物碱的镇痛活性研究

苏东雪,彭海燕,庄馨瑛,何芳雁,周志宏,马晓霞
(云南中医药大学 中药学院,云南 昆明 650500)

摘要: 分别采用醋酸扭体法和热板法研究雪上一枝蒿总碱及5个主要二萜生物碱成分乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱外周和中枢的镇痛活性。与空白对照组比较,雪上一枝蒿总碱高、中剂量组,乌头碱高、中、低剂量组,尼奥灵高、中剂量组,12-表-15-乙酰欧乌头碱的高剂量组和12-表-欧乌头碱的中剂量组对冰醋酸所致的小鼠扭体均具有抑制作用,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与本组基础痛阈值比较,雪上一枝蒿总碱高、中、低剂量组,乌头碱高、中、低剂量组,3-去氧乌头碱高剂量组,尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱以及12-表-欧乌头碱的高、中剂量组在给药15 min后均能显著延长热板所致小鼠疼痛的痛阈值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由此可得,雪上一枝蒿总碱及5个主要二萜生物碱成分均有明显的镇痛作用。

关键词: 雪上一枝蒿总碱;二萜生物碱;镇痛

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-8513(2024)06-0680-05

雪上一枝蒿药材为毛茛科乌头属植物短柄乌头(*Aconitum brachypodum* Diels)的干燥块根^[1],俗称一枝蒿、铁棒锤、铁牛七、三转半等,主要分布在云南东北部、西北部及四川西南部^[2]。雪上一枝蒿性温,味苦、辛,有大毒,具有祛风除湿、散瘀疗伤及活血止痛等功效,民间用于治疗风湿疼痛、关节炎、跌打损伤等^[3-5]。研究表明,雪上一枝蒿含多种乌头烷型二萜生物碱,这些生物碱是其活性和毒性的物质基础。各地野生雪上一枝蒿药材成分含量和组分比例差异非常大,迄今仍然仅以紫外分光光度法测定总生物碱作为含量控制指标^[6],既不能准确地反应药物活性高低,也不能有效控制毒性大小。本文对云南昆明东川区栽培的雪上一枝蒿药材生物碱化学成分进行了系统研究^[7],根据其中所含双酯型-醇胺型生物碱比例对药材进行了化学型分类^[8],又在对其总生物碱及其主要组分进行毒性研究基础上,研究了混合型药材总生物碱及其主要组分的镇痛活性研究,以期为建立基于物质基础的质量标准和为临床用药提供科学支撑。

1 仪器和材料

1.1 药品和试剂

乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱均为本课题组从雪上一枝蒿总碱中分离得到;阿司匹林(北京索拉博科技有限公司);吗啡(成都埃法生物科技有限公司);冰醋酸(重庆川东化工有限公司);0.9%氯化钠注射液(双鹤药业);化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

JA-20001 电子天平(广州玉治仪器有限公司);AB265-S 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);RB-200 智能热板仪(成都泰盟科技有限公司);4℃ 冰箱(BCD-290W,青岛海尔股份有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级昆明种小鼠,由昆明医科大学实验动物学部提供,生产许可证号:SCXK(滇)K2020-0004,体重

收稿日期:2022-12-27.

基金项目:云南省科技计划项目(2019ZF003);昆明市科技计划项目(2019-1-N-2531800002197).

作者简介:苏东雪(1997-),女,硕士研究生.主要从事中药质量控制研究.

通信作者:马晓霞(1980-),女,副研究员,硕士生导师.主要从事中药质量控制研究.

18~22 g,雌雄兼用,于实验条件下适应性饲养3~5 d.

2 实验方法

2.1 药物配制

2.1.1 各受试药溶液的配制

各取雪上一枝蒿总碱、乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱,加浓盐酸和无水乙醇($V_{\text{浓盐酸}}:V_{\text{无水乙醇}}=1:20$)溶解,再加0.9%氯化钠注射液配制成所需浓度的溶液,置4℃冰箱中保存备用.

2.1.2 阳性药溶液的配制

分别取适量阿司匹林和吗啡,按“2.1.1”项下配制方法配成所需浓度的溶液.

2.1.3 0.6%冰醋酸溶液的配制

取新开封的冰醋酸适量,加0.9%氯化钠注射液配制成0.6%的冰醋酸溶液,现配现用,配好后分装,密封保存.

2.2 小鼠醋酸扭体实验

取昆明小鼠240只,雌雄各半,随机分为20组,空白对照组、阳性对照组(阿司匹林组)、各受试药低、中、高剂量组,每组12只.各组小鼠均以0.01 mL/g体积给药,空白对照组肌肉注射空白溶剂体系;阿司匹林组小鼠按600 mg/kg体重腹腔注射阿司匹林溶液;以前期小鼠急性毒性实验结果来确定不同成分的镇痛剂量,其中雪上一枝蒿总碱、乌头碱、3-去氧乌头碱、尼奥灵小鼠肌肉注射的 LD_{50} 分别为6.48、0.32、2.36、300.86 mg/kg;12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱小鼠肌肉注射的最大给药量分别为200.00、100.00 mg/kg.最终确定雪上一枝蒿总碱低、中、高剂量分别按1.28、1.71、2.56 mg/kg肌肉注射给药;乌头碱低、中、高剂量分别按0.01、0.02、0.03 mg/kg肌肉注射给药;3-去氧乌头碱低、中、高剂量组分别按0.08、0.12、0.24 mg/kg肌肉注射给药;尼奥灵低、中、高剂量组分别按3.01、5.01、10.03 mg/kg肌肉注射给药;12-表-15-乙酰欧乌头碱低、中、高剂量组分别按25.00、37.50、75.00 mg/kg肌肉注射给药;12-表-欧乌头碱低、中、高剂量组分别按8.33、12.50、25.00 mg/kg肌肉注射给药.各组小鼠给药后30 min,经腹腔注射0.6%冰醋酸0.2 mL/只,记录20 min内小鼠的扭体次数,各给药组与空白对照组比较,计算各组疼痛抑制百分率见公式(1)^[9-11].

$$\text{疼痛抑制百分率} = \frac{\text{空白对照组扭体次数} - \text{给药组扭体次数}}{\text{空白对照组扭体次数}} \times 100\%. \quad (1)$$

2.3 小鼠热板致痛实验

取雌性昆明小鼠,18~22 g,放入(55±0.5)℃的热板中,以热刺激小鼠足部产生疼痛反应(舔后足),测定小鼠痛阈(出现疼痛反应即舔后足的时间),凡在5 s内舔后足者及30 s内不舔后足或逃避者弃之不用,从中筛选出合格的雌性小鼠240只.将合格小鼠随机分为20组,空白对照组、阳性对照组(吗啡对照组)、各受试药低、中、高剂量组,每组12只.各组小鼠给药前测2次痛阈值,取其平均值作为基础痛阈值.各组小鼠均以0.01 mL/g体积肌肉注射给药,吗啡对照组按10 mg/kg体重给予吗啡溶液,其余给药组剂量同“2.2”.给药后15、30、60、90、120和150 min各测定1次痛阈值.若放入热板内60 s仍无反应,便将小鼠取出,痛阈值以60 s计,各给药组与本组基础痛阈值比较,计算各组痛阈值提高百分率见公式(2)^[9-12].

$$\text{痛阈值提高百分率} = \frac{\text{给药后痛阈值} - \text{基础痛阈值}}{\text{基础痛阈值}} \times 100\%. \quad (2)$$

2.4 统计学分析

用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较用单因素方差分析,组间两两比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 具有统计学差异.

3 结果

3.1 小鼠醋酸扭体实验

腹腔注射0.6%冰醋酸后,空白对照组小鼠均出现明显的扭体动作,躯干和后肢伸长、腹腔凹陷、臀部抬

起.小鼠扭体次数越少、疼痛抑制率越大,表明各受试药物提高小鼠痛阈的程度越高,镇痛作用越强.与空白对照组比较,阿司匹林组和各给药组均能降低小鼠的扭体次数,其中雪上一枝蒿总碱高、中剂量组,乌头碱高、中、低剂量组,尼奥灵高、中剂量组,12-表-15-乙酰欧乌头碱高剂量组,12-表-欧乌头碱中剂量组对冰醋酸所致的小鼠扭体均具有抑制作用,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表1.

表1 各药物对小鼠醋酸致痛作用的影响

($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	20 min 内扭体次数/次	疼痛抑制百分率/%
空白对照组	—	28.92 ± 6.80	—
阿司匹林组	600	4.58 ± 1.71 ***	84.15
雪上一枝蒿总碱	1.28	19.91 ± 4.14	31.14
	1.71	13.21 ± 3.01 **	54.32
	2.56	15.84 ± 5.07 *	45.23
乌头碱	0.01	17.77 ± 2.81 *	38.54
	0.02	11.90 ± 2.85 **	58.85
	0.03	8.66 ± 2.59 ***	70.05
3-去氧乌头碱	0.08	27.56 ± 4.92	4.69
	0.12	27.11 ± 3.87	6.25
	0.24	24.47 ± 4.25	15.36
尼奥灵	3.01	23.47 ± 3.47	18.82
	5.01	15.58 ± 2.54 *	46.12
	10.03	14.29 ± 3.01 **	50.59
12-表-15-乙酰欧乌头碱	25.00	24.25 ± 5.57	16.14
	37.50	22.08 ± 4.86	23.63
	75.00	15.92 ± 4.51 *	44.96
12-表-欧乌头碱	8.33	23.25 ± 4.44	19.60
	12.50	15.08 ± 4.08 *	47.84
	25.00	20.25 ± 4.29	29.97

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$.

3.2 小鼠热板致痛实验

将小鼠放置于热板上,各组小鼠均因疼痛而出现舔后足的表现.各组之间给药前的基础痛阈值差异无统计学意义($P > 0.05$).与本组基础痛阈值比较,吗啡组、雪上一枝蒿总碱高、中、低剂量组,乌头碱的高、中、低剂量组,3-去氧乌头碱的高剂量组,尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱以及12-表-欧乌头碱的高、中剂量组在给药15 min后均能显著延长热板所致小鼠疼痛的痛阈值($P < 0.05$),在给药90 min后,各受试药的痛阈值均随时间的延长呈降低趋势,见表2.

表2 各药物对小鼠热板致痛作用的影响

($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	基础痛 阈值/s	给药后痛阈值/s					
			15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
空白对照组	—	11.86 ± 3.31	11.01 ± 3.10	10.51 ± 5.28	11.09 ± 6.02	9.27 ± 2.95	11.75 ± 4.39	10.49 ± 2.27
吗啡组	10	13.36 ± 4.28	50.75 ± 11.56 ***	46.78 ± 13.11 ***	41.43 ± 12.17 ***	14.90 ± 4.32	12.59 ± 4.98	13.06 ± 6.91
雪上一枝蒿 总碱	1.28	9.11 ± 0.91	9.67 ± 1.23	10.81 ± 1.35	11.61 ± 1.20	12.07 ± 1.54 *	10.37 ± 0.73	9.66 ± 0.70
	1.71	8.81 ± 0.57	9.51 ± 0.98	10.96 ± 1.55	13.29 ± 1.99 **	15.88 ± 2.09 ***	13.02 ± 2.19 *	11.27 ± 1.91
	2.56	9.29 ± 1.15	9.71 ± 1.41	11.90 ± 1.67	13.16 ± 1.71 **	15.26 ± 3.13 ***	11.78 ± 2.56	10.70 ± 1.92

续表 2

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	基础痛 阈值/s	给药后痛阈值/s					
			15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
乌头碱	0.01	13.59 ± 4.83	17.71 ± 6.76 *	15.24 ± 5.78	13.48 ± 4.99	10.99 ± 4.27	10.15 ± 4.82	9.72 ± 3.87
	0.02	12.38 ± 2.80	19.39 ± 6.83 **	16.63 ± 4.91 *	12.89 ± 4.86	11.57 ± 4.13	12.43 ± 4.36	9.76 ± 2.61
	0.03	14.40 ± 2.89	25.51 ± 8.48 ***	24.05 ± 8.00 ***	18.94 ± 7.28 **	14.79 ± 6.93	11.04 ± 6.58	12.11 ± 7.35
3-去氧乌 头碱	0.08	14.24 ± 4.54	14.53 ± 6.04	14.43 ± 5.33	12.59 ± 5.31	11.60 ± 5.78	11.75 ± 6.47	15.39 ± 3.54
	0.12	13.07 ± 2.40	15.04 ± 4.33	13.25 ± 6.87	10.49 ± 4.79	11.68 ± 3.31	9.70 ± 5.44	10.24 ± 5.70
	0.24	15.56 ± 3.44	18.12 ± 6.76 *	16.24 ± 5.22 *	12.98 ± 5.29	10.05 ± 3.94	9.69 ± 3.64	9.89 ± 4.06
尼奥灵	3.01	12.64 ± 3.38	14.31 ± 2.84	13.07 ± 5.21	12.57 ± 5.85	12.20 ± 3.89	10.20 ± 4.11	12.48 ± 4.54
	5.01	13.04 ± 3.90	17.23 ± 5.71 *	15.47 ± 6.26	12.60 ± 4.65	12.12 ± 3.94	11.69 ± 4.15	12.20 ± 5.75
	10.03	11.64 ± 3.15	17.19 ± 3.74 **	14.54 ± 5.67	11.91 ± 5.18	9.93 ± 5.34	9.70 ± 4.55	10.75 ± 4.35
12-表-15-乙 酰欧乌头碱	25.00	11.30 ± 2.40	12.47 ± 5.00	12.40 ± 4.91	11.94 ± 7.22	9.15 ± 4.58	9.09 ± 4.32	10.48 ± 4.96
	37.50	10.89 ± 1.24	15.19 ± 4.06 ***	12.82 ± 3.85	13.86 ± 5.58	9.88 ± 4.39	10.30 ± 5.10	7.56 ± 1.80
	75.00	11.40 ± 2.24	16.28 ± 5.61 ***	14.50 ± 2.87 **	12.73 ± 3.95	12.15 ± 4.08	11.19 ± 4.10	11.33 ± 4.37
12-表-欧 乌头碱	8.33	12.33 ± 4.02	13.62 ± 5.70	13.17 ± 4.13	8.61 ± 4.79	9.94 ± 5.85	6.74 ± 4.79	6.79 ± 3.99
	12.50	11.02 ± 2.85	15.81 ± 9.22 *	13.74 ± 7.62	10.77 ± 4.06	8.66 ± 3.40	8.55 ± 6.49	9.27 ± 4.91
	25.00	11.61 ± 3.31	15.67 ± 6.98 **	12.13 ± 4.99	11.08 ± 3.23	10.54 ± 5.06	9.25 ± 4.71	8.60 ± 5.05

注:与本组基础痛阈值比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$.

4 讨论与结语

雪上一枝蒿中其主要活性和毒性成分为乌头烷型二萜生物碱,其中双酯型生物碱是主要的毒性贡献者,而其他单酯型和醇胺型生物碱(统称其他生物碱)毒性低于双酯型生物碱,但在远低于毒性剂量的情况下,其镇痛活性与双酯型生物碱基本相当,因此也是雪上一枝蒿药材镇痛活性的物质基础.前期研究^[8]表明,根据所含生物碱中双酯型和醇胺型成分比例的不同,雪上一枝蒿药材可分为双酯型、醇胺型和混合型:双酯型药材中含双酯型生物碱为主,醇胺型含量少;醇胺型药材中含醇胺型生物碱为主,双酯型含量较少;混合型药材中则双酯型和醇胺型生物碱均有,且含量基本相当.不同比例的双酯型-醇胺型总生物碱的毒性和活性不同,采用混合型药材提取总生物碱并进行活性研究,为后续雪上一枝蒿药材使用提供指导.

从结构上看,云南省昆明市东川区所栽培的雪上一枝蒿中所含的总生物碱中,各类二萜生物碱展现出独特的性质.其中,乌头碱与3-去氧乌头碱作为双酯型生物碱的代表,不仅活性显著,同时也伴随着较高的毒性,因此被视为需要严格监控的毒性组分;而其他生物碱(尼奥灵、12-表-15-乙酰欧乌头碱、12-表-欧乌头碱)应是药材发挥镇痛作用的主要活性成分.镇痛活性初步研究表明,雪上一枝蒿总碱及5个生物碱成分均具有较好的镇痛活性,其中尼奥灵镇痛作用虽然弱于乌头碱,却强于3-去氧乌头碱.此前已有文献^[13]报道,同为醇胺型生物碱的异塔拉定虽然毒性小,却有较强的镇痛活性.可见,某些醇胺型生物碱的毒性很小,但其镇痛效果并不差,在同等剂量下甚至强于某些双酯型生物碱,因此传统认为的二萜生物碱镇痛作用越强则毒性越大的表述并不全面,后续的乌头类药物开发应重点关注高效低毒的醇胺型生物碱成分.

综上所述,雪上一枝蒿总生物碱镇痛活性介于双酯型与醇胺型生物碱之间,即活性弱于双酯型生物碱而强于醇胺型生物碱.因此,基于活性物质基础的质量标准应该以醇胺型生物碱(尼奥灵等)为指标建立最低控制线保障药物临床疗效,以双酯型生物碱(乌头碱等)为指标建立最高含量控制线以保证临床用药的安全性.

参考文献:

[1] 云南省卫生厅. 云南省药品标准 1996 年版[M]. 昆明: 云南大学出版社, 1996: 95-96.

- [2] 韩东铁. 雪上一枝蒿的化学成分与药理作用研究概况[J]. 延边大学医学学报, 2007, 30(3): 223 - 224.
- [3] 李梅, 陈慧, 柯才华, 等. 金不换与雪上一枝蒿不同比例配伍的减毒增效作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 166 - 172.
- [4] 杨立国, 夏伟军, 唐梦云, 等. 雪上一枝蒿化学成分和药理作用研究概况[J]. 云南中医学院学报, 2016, 39(6): 95 - 97.
- [5] 黄先菊, 任炜, 潘乐, 等. 雪上一枝蒿醇提物体外抗炎作用的研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2012, 31(4): 36 - 40.
- [6] 中华人民共和国卫生部药品标准. 雪上一枝蒿总碱注射液: WS3 - B - 4005 - 98[S]. 中华人民共和国卫生部, 1998.
- [7] 彭海燕, 张彬若, 周志宏, 等. 云南东川雪上一枝蒿栽培品的化学成分研究[J]. 中药材, 2022, 45(12): 2862 - 2867.
- [8] 彭海燕, 马晓霞, 周志宏, 等. 雪上一枝蒿药材化学型鉴别研究[J]. 中国民族民间医药, 2023: 接收发表待刊.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 906 - 916.
- [10] 王三炜, 谢言青, 金叶, 等. 沉香叶的镇痛抗炎作用研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2024, 33(1): 17 - 22.
- [11] 吴丽, 王丽丽, 费文婷, 等. 芍药苷和芍药内酯苷对小鼠疼痛模型的镇痛作用及对 β -EP、PGE₂的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 915 - 918.
- [12] 张泉龙, 马晓花, 邱建国, 等. 独一味总环烯醚萜苷胶囊的主要药效学及急性毒性[J]. 中成药, 2018, 40(9): 2048 - 2051.
- [13] SHAO S, XIA H, HU M, et al. Isotalatizidine, a C19 - diterpenoid alkaloid, attenuates chronic neuropathic pain through stimulating ERK/CREB signaling pathway - mediated microglial dynorphin A expression[J]. Journal of Neuroinflammation, 2020, 17(1): 13.

Study on the analgesic effects of total alkaloid and its main diterpenoid alkaloids isolated from the *Aconitum brachypodum* Diels

SU Dong-xue, PENG Hai-yan, ZHUANG Xin-ying,
HE Fang-yan, ZHOU Zhi-hong, MA Xiao-xia

(School of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: To study the analgesic effects of total alkaloid of *Aconitum brachypodum* and its five main diterpenoid alkaloids, aconitine, 3 - deoxyaconitine, neoline, 12 - epi - 15 - acetylaconitine and 12 - epi - aconitine. The peripheral and central analgesic effects were observed by acetic acid writhing method and hot plate method. Compared with the blank control group, the high and middle - dose groups of total alkaloids from *Aconitum brachypodum*, the high, middle, and low - monitoring groups of aconitine, the high and medium - dose groups of neoline, the high - dose group of 12 - epi - 15 - acetylaconitine and the medium - dose group of 12 - epi - aconitine showed significant inhibitory effects on acetic acid - induced writhing in mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the basic pain threshold of this group, the high, middle and low - dose groups of total alkaloids from *Aconitum brachypodum*, the high, middle, and low - monitoring groups of aconitine, the high - dose group of 3 - deoxyaconitine, the high and medium - dose groups of neoline, 12 - epi - 15 - acetylaconitine and 12 - epi - aconitine could significantly prolong the pain threshold 15 minutes after administration in hot plate mice model ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). All of the content of the total alkaloids and five components have obvious analgesic effects.

Key words: total alkaloid of *Aconitum brachypodum*; diterpenoid alkaloid; analgesic

(责任编辑 王煜丹)