安徽农业大学学报, 2022, 49(4): 617-620
Journal of Anhui Agricultural University
[DOI] 10.13610/j.cnki.1672-352x.20220907.007　网络出版时间：2022-9-8　9:51:47
[URL] https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1162.S.20220907.1117.018.html

独角仙雄虫水提取物对小鼠的镇痛作用

莫云海[1]，周卫青[2]，刘立伟[3]，潜茁林[1]，韩　磊[1]，徐华潮[1*]
(1. 浙江农林大学林业与生物技术学院，临安 311300；2. 浙江省淳安县林业局，淳安 311700；3. 浙江自然博物院，杭州 310000)

摘　要：为研究独角仙雄虫水提取物对小鼠的镇痛作用，以水提法处理独角仙雄虫粉末，将 ICR 小鼠随机分成空白对照组、阳性药阿司匹林组和独角仙雄虫水提取物低、中、高浓度组，采用醋酸致小鼠扭体法、热板法和小鼠甩尾法研究其对醋酸致小鼠扭体次数和小鼠痛阈值的影响。结果表明：低、中、高浓度组小鼠扭体次数分别为（11.17 ± 5.77）次、（15.00 ± 6.00）次和（11.83 ± 4.57）次，低浓度组镇痛百分率达到 51.43%，与模型对照组相比，独角仙雄虫水提取物低、中、高浓度组都能明显降低醋酸对小鼠扭体次数的影响，提升了小鼠痛阈值；延长小鼠在热板和甩尾实验中的耐热时间。研究结果证明独角仙雄虫水提取物对小鼠确实具有一定的镇痛作用且对小鼠无毒副作用，为之后独角仙入药及新型镇痛药物的开发提供一定的理论依据。

关键词：独角仙雄虫；水提取物；镇痛；醋酸致小鼠扭体法；热板法；小鼠甩尾法
中图分类号：Q969.97　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672–352X (2022)04–0617–04

Analgesic effect of water extract of male rhinoceros beetle on mice

MO Yunhai[1], ZHOU Weiqing[2], LIU Liwei[3], QIAN Zhuolin[1], HAN Lei[1], XU Huachao[1]
(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Lin'an 311300;
2. Zhejiang Chun'an County Forestry Bureau, Chun'an 311700; 3. Zhejiang Museum of Natural History, Hangzhou 310000)

Abstract: In order to investigate the analgesic effect of aqueous extract of male rhinoceros beetle on mice, male rhinoceros beetle powder was treated with aqueous extract, and ICR mice were randomly divided into blank control group, positive drug aspirin group, aqueous extract of male rhinoceros beetle with low, medium and high concentrations. The effects of acetic acid on the number of acetic acid torsions and the pain quotient of mice were investigated by the acetic acid-induced writhing, tail-flicking and hot plate methods. The results showed that the writhing times of mice in low, medium and high concentration groups were（11.17 ± 5.77）,（15.00 ± 6.00）,（11.83 ± 4.57）respectively, and the percentage of analgesic in the low concentration group reached 51.43%. Comparing with the model control group, the low, medium and high concentration groups of male rhinoceros beetle aqueous extract could significantly reduce the effect of acetic acid on the number of mouse writhing times, and enhance the mice's pain threshold; prolonged the heat resistance time of mice in hot plate and tail-flick experiments.This experiment results proved that the aqueous extract of male rhinoceros beetle did have certain analgesic effects on mice without toxic side effects, which provided some theoretical basis for the development of rhinoceros beetle as medicine and new analgesic drugs in the future.

Key words: male rhinoceros beetle; water extract; analgesic effect; acetic acid-induced writhing in mice; hot plate test; mouse tail flick test

疼痛是临床常见不适的自觉症状，在很多急慢性炎症性疾患中都可以见到，患者经常承受很大痛苦，严重干扰正常的工作生活[1]。目前，西药多用于治疗各种急慢性疼痛，其中一种是阿片类镇痛药，如杜冷丁、吗啡等，这类镇痛药虽然镇痛效果显著，但长期使用会产生成瘾、依赖等多种副作用，临床应用受到严格限制，另一种是非阿片类镇痛药（如非甾体类抗炎药）、复方阿司匹林和去痛片，仅用于治疗轻度疼痛，并且对胃、肠道有不同程度的不良反应。中医药在几千年的药用历史中已证实具有明显而确切的镇痛、抗炎作用，且毒副作用小[2-3]。独角仙（*Trypoxylus dichotomus*）入药最早记载于《本

收稿日期：2021-11-23
基金项目：浙江省省院合作项目（2020SY08）资助。
作者简介：莫云海，硕士研究生。E-mail：1113736314@qq.com
* **通信作者：**徐华潮，博士，教授，博士生导师。E-mail：404496227@qq.com

草纲目》具有镇惊、化瘀、解毒和通便的功效且具有较好的镇痛效果。

独角仙又名双叉犀金龟，鞘翅目犀金龟科。分布于中国、朝鲜半岛、日本、老挝和马来西亚，国内分布于辽宁、浙江和河北等省[4]。数量过多的独角仙会对森林造成严重的损害，独角仙主要危害杏树、桃树和梨树等的新枝嫩枝或新生树干，导致新枝、新叶枯萎死亡，果实减产[5-6]。独角仙的成虫和幼虫均可入药，成虫药材名独角蜣，幼虫药材名蛴螬。从独角仙中提取到一种名为独角仙素(dicotastin)的物质被证实有一定的抗癌作用, 并且对实体瘤 W-256 癌瘤具有较高的活性, 对 P-388 淋巴白血癌具有边缘活性，其他各国医学学者对此极其关注[7]。

目前国内外对于独角仙的研究主要集中在幼虫的抗炎作用、幼虫肠道微生物及幼虫对高脂肪饮食诱导的肥胖调节作用等方面 [8-11]，关于独角仙成虫的研究主要包括其生活习性、发生规律、危害程度与防治方法以及独角仙的人工饲养等。已有文献记载独角仙雄虫可入药，然而关于独角仙雄虫药用价值的研究还鲜见报道。独角仙在我国分布广泛，资源丰富，目前我国已有比较成熟的人工饲养技术[4]，饲养方便，为独角仙在中药领域的研发与利用提供了深厚的资源基础。近年来，独角仙危害越来越严重，啃食各种果实及树干树枝，对农业生产造成巨大的损害，引起不小的经济损失，如果能将其变害为宝，开发其药用价值，将减少其经济损失，增加社会生产。本实验通过对独角仙雄虫水提取物对小鼠镇痛作用的研究，以醋酸致小鼠扭体次数以及小鼠痛阈值为镇痛指标，探究独角仙雄虫水提取物对小鼠疼痛的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

独角仙在浙江省金华市磐安县野外捕获，通过浙江农林大学林生院森林保护的徐华潮教授鉴定，确定为独角仙。

冰醋酸；生理盐水；阿司匹林肠溶片，粉碎后加入生理盐水配制成 25 $g·L^{-1}$ 的溶液；FA1204B 型电子天平；S20152363 Avanti J-26XP 落地式高速离心机；RV 10 auto pro V-C 旋转蒸发仪；BHS-1 型水浴锅；800 型粉碎机。

ICR 小鼠：雌性 60 只，雄性 30 只，SPF 级，体重（20 ± 2）g，由杭州医学院（HMC）提供。使用许可证：SYXK(浙) 2018—0010。合格证编号：20210908Abbz0100018621。本实验完全遵守《实验动物管理条例》，按照动物实验伦理规范进行实验。动物伦理编号：ZAFUAC2021022。

1.2 方法

1.2.1 独角仙雄虫水提取物的制备 取独角仙干燥雄性成虫 150 g，用研钵捣碎得到粗粉，粗粉在 55 ℃的干燥箱中干燥 36 h 后，用粉碎机碾成细粉，称取 100 g 独角仙雄虫细粉，用 1 000 g 蒸馏水、800 g 蒸馏水和 800 g 蒸馏水先后加热提取 3 次，每次加热提取 30 min，过滤以后收集滤液，将滤液至于旋转蒸发仪中旋转蒸发，直至形成浸膏，得到独角仙水提取物。实验时加蒸馏水混合，搅拌均匀，配制成 0.13、0.26 和 0.52 $g·mL^{-1}$ 的溶液[12]。

1.2.2 醋酸致小鼠扭体反应实验 将 30 只健康灵活的 ICR 小鼠随机分成 5 组，每组 6 只，雌雄各半，5 组分别为：独角仙雄虫水提取物低、中、高剂量组，空白对照组和阳性药阿司匹林组。独角仙水提取物低、中、高剂量组分别灌胃给药 1.3、2.6 和 5.2 $g·kg^{-1}$；空白对照组灌胃生理盐水 0.01 $mL·g^{-1}$；阳性药阿司匹林组灌胃阿司匹林 0.25 $g·kg^{-1}$，每日早 9:00 灌胃给药 1 次，持续 3 d。最后一天给药 60 min 后，各小鼠腹腔注射给药 0.6%冰醋酸 0.01 m $L·g^{-1}$，观察并记录腹腔注射后 0 ~ 15 min 内每只小鼠进行扭体的情况和次数，并计算镇痛百分率[12-14]。

镇痛百分率=(（空白对照组平均扭体次数-用药组平均扭体次数）/空白对照组平均扭体次数)×100%

1.2.3 小鼠甩尾痛阈值检测 实验小鼠分组和给药方法同实验 1.2.2。最后一次给药 60 min 后，将小鼠鼠尾末端 2 cm 浸入(50 ± 0.5) ℃的热水，观察小鼠鼠尾入水到小鼠甩尾出水情况，并记录其入水至出水的时间差，每只小鼠测量 3 次，取 3 次测量结果的平均值视为该小鼠的甩尾痛阈值[12-14]。

1.2.4 小鼠热板痛阈值检测 实验前对小鼠痛阈值进行筛选，将雌性 ICR 小鼠放在 55 ℃的智能热板仪上，小鼠放上热板至其出现舔后足反应的时间间隔视为痛阈值，痛阈值小于 5 s 的和痛阈值大于 30 s 的小鼠不进行实验，其余的小鼠为合格痛阈并进行实验。将 30 只筛选出的雌性小鼠随机分为 5 组，每组 6 只，给药方法同实验 1.2.2。在最后一天给药 30、60 和 120 min 之后分别测量一次小鼠的热板痛阈值。如果达到 60 s 时小鼠仍无反应，则立即将小鼠取出，避免烫伤小鼠，该小鼠痛阈值视为 60 s。实验结束以后，计算镇痛百分率[12-14]。

镇痛百分率=((给药组平均痛阈-给药前平均痛阈）/给药前平均痛阈）×100%

1.2.5 毒性作用检测 观察并记录以上 3 个镇痛

实验过程中，从第 1 次给药到第 3 次给药期间的 48 h 内，小鼠的死亡率。

1.2.6　统计学分析　所有数据均以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示，用 SPSS18. 0 软件进行单因素方差分析，各组间两两比较采用 LSD 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　独角仙雄虫水提取物对醋酸致小鼠扭体实验影响

腹腔注射冰醋酸后，各组小鼠均表现出腹部后缩、腹部前壁贴近笼底、髋部偏斜和后肢伸展等特殊姿势。阳性药阿司匹林组、独角仙雄虫水提取物低、中、高剂量组与空白对照组比较，小鼠的扭体次数均明显减少($P < 0.01$) ，具有统计学意义，独角仙水提取物对醋酸致小鼠疼痛起到一定的止痛作用；与空白对照组比较，独角仙雄虫水提取物低、中、高浓度组镇痛百分率达到 51.3%、34.78%和 48.56%。在醋酸致小鼠扭体反应实验中，独角仙雄虫水提取物低、中、高剂量组的镇痛效果均低于阿司匹林组，且低浓度组优于中浓度和高浓度组（表 1）。

表 1　独角仙雄虫水提取物对醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1　Effects of aqueous extract of male rhinoceros beetle on writhing response induced by acetic acid in mice ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/（g·kg^{-1}）	扭体次数 /次	镇痛百分率/%
模型对照组 CKa	—	23.00 ± 6.40	—
阿司匹林组 CKb	0.25	7.83 ± 6.17**	65.96
低浓度组 LD	1.30	11.17 ± 5.77**#	51.43
中浓度组 MD	2.60	15.00 ± 6.00**##	34.78
高浓度组 HD	5.20	11.83 ± 4.57**##	48.56

注: 与空白对照组比较，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$；与阿司匹林组比较，# $P < 0.05$，## $P < 0.01$。下同。

表 2　独角仙雄虫水提取物对小鼠甩尾痛阈值影响(n=6, $\bar{x}$±s)

Table 2　Effects of aqueous extract of male rhinoceros beetle on reaction time of mouse tail flailing pain (n=6, $\bar{x}$±s)

组别	给药剂量/(g·kg^{-1})	痛阈值/s
CKa	—	4.11 ± 0.16
CKb	0.25	5.79 ± 0.33**
LD	1.30	4.87 ± 0.14*##
MD	2.60	5.16 ± 0.17**#
HD	5.20	5.23 ± 0.35**

表 3　独角仙雄虫水提取物对热板小鼠痛阈值的影响($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3　Effects of aqueous extract of male rhinoceros beetle on mice in hot plate apparatus($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/（g·kg^{-1}）	给药前痛阈值/s	给药后痛阈值/s		
			30 min	60 min	120 min
CKa	—	16.68±1.98	17.36±2.85	18.90±2.20	17.83±4.04
CKb	0.25	18.20±4.02	26.79±6.56**	26.82±8.52**	26.79±12.87**
LD	1.30	17.81±2.21	22.68±4.26**##	22.69±4.40*##	23.35±1.64**#
MD	2.60	18.03±3.40	23.97±12.08**	25.10±5.38**	23.50±7.22**#
HD	5.20	17.96±4.13	21.85±3.45**##	23.09±7.52**#	23.30±8.64**#

表 4　独角仙雄虫水提取物对热板仪致痛小鼠镇痛百分率的影响(n=6, $\bar{x}$±s)

Table 4　Effects of aqueous extract of male rhinoceros beetle on analgesic percentage in mice induced by hot plate apparatus($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药剂量/（g·kg^{-1}）	镇痛百分率/%		
		30 min	60 min	120 min
CKa	—	—	—	—
CKb	0.25	46.65	47.36	46.65
LD	1.3	27.34	27.40	31.11
MD	2.6	32.95	39.21	30.34
HD	5.2	21.65	28.56	29.73

2.2　独角仙雄虫水提取物对小鼠甩尾痛阈值影响

把给药 60 min 后的小鼠尾部 2 cm 左右浸入 50 ℃的热水中，都出现了小鼠尾部抬起的甩尾现象。独角仙雄虫水提取物低、中、高剂量组与空白对照组相比，小鼠鼠尾在热水中时间间隔明显延长，独角仙雄虫水提取物低、中、高浓度组均有不同程度的提高小鼠痛阈值 (P<0.05 或 P<0.01) ，独角仙水提取物高浓度组痛阈值最高，镇痛效果最好（表 2）。

2.3　独角仙雄虫水提取物对小鼠热板痛反应时间的影响

独角仙雄虫水提取物低、中、高浓度组和阳性药阿司匹林组在给药后 30、60 和 120 min 显著提高小鼠痛阈值（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；独角仙雄虫水提取物各浓度组在灌胃 30 min 后就开始发挥镇痛作用，且在 120 min 后仍保持效果，在 3 个时间段均延长小鼠在热板中反应时间；在独角仙雄虫水提取物对小鼠热板痛阈值的影响实验中，中浓度组镇痛效果更好，作用更强。中浓度组在给药 60 min 后，镇痛百分率达到 39.21%，略低于阳性药阿司匹林组给药 60 min 后镇痛百分率，且与阳性药阿司匹林组差异不显著（表 3 与表 4）。

2.4　毒性作用检测

如表 5 所示，独角仙雄虫水提取物在给药的 48 h 内，对小鼠无毒副作用产生。

表 5 独角仙水提物对小鼠的致死性

Table 5 Mortality of mice for taking the aqueous extract of male rhinoceros beetle

组别	剂量/（g·kg^{-1}）	小鼠数	实验 1.2.2（小鼠死亡数）		实验 1.2.3（小鼠死亡数）		实验 1.2.4（小鼠死亡数）	
			24 h	4 8 h	24 h	48 h	24 h	48 h
LD	1.3	6	0	0	0	0	0	0
MD	2.6	6	0	0	0	0	0	0
HD	5.2	6	0	0	0	0	0	0
CKb	0.25	6	0	0	0	0	0	0
CKa	—	6	0	0	0	0	0	0

3 讨论

本研究发现，在醋酸致小鼠扭体反应的实验中，独角仙雄虫水提取物对小鼠的影响与王文春等在苗药青龙方不同提取物的镇痛抗炎作用实验研究结果类似[15]，明显减少小鼠的扭体次数；在独角仙雄虫水提取物对小鼠甩尾反应影响的实验中，与牟建平等在苦归妇炎胶囊的镇痛实验研究中的研究结果相似[16]，均延长小鼠尾巴在热水中的持续时间，提高小鼠的痛阈值；在热板实验中，独角仙雄虫水提取物对小鼠的影响与肖杨等在重楼皂苷Ⅶ、H 及总皂苷镇痛抗炎作用研究的结果类似[17]，均提高给药后小鼠在热板中的反应时间，且效果显著。综上所述，独角仙雄虫水提取物对小鼠具有显著的镇痛作用，且无毒副作用，可为今后开发新型镇痛中药提供依据。

小鼠热板实验与小鼠甩尾实验属于热刺激的致痛模型，醋酸扭体实验是化学刺激的致痛模型。在镇痛实验研究中，PGE_2（前列腺素 E2）是重要指标，很多研究都证明在外周和中枢组织中 PGE_2 具有诱导疼痛的作用。Ferreira 等[18]通过对大鼠皮下注射 PGE_2，可导致大鼠痛觉过敏。β-EP（β-内啡肽）是一种内源性阿片肽，具有调节应激反应、免疫机能和中枢镇痛等功能，它可以通过降低神经元 P 物质释放，抑制伤害性感受器兴奋，从而达到抑制痛觉传导的作用[19]。BK（缓激肽）在调节疼痛感觉的有关离子通道表达方面起关键作用，是公认的致痛物质[20]。独角仙雄虫水提取物对小鼠的镇痛作用可能与改变小鼠体内 PGE_2，β-EP 或 BK 含量有关，但具体改变了什么物质的含量还有待进一步研究证实。

综上所述，本研究证明独角仙雄虫成虫水提取物对疼痛中的小鼠具有一定的镇痛作用，其作用机制可能与增加或减少小鼠体内 PGE2，β-EP 或 BK 含量密切相关。独角仙有较好的镇惊、镇痛、化瘀等功效，未来将针对独角仙入药的其他功效进行相关研究，并对其发挥作用的具体物质进行探讨，期望能够为独角仙入药提供实验基础。

参考文献：

[1] 彭媛, 顾振纶. 植物药镇痛作用的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(1): 19-22.

[2] 郭世民, 马克坚. 中药镇痛研究新思路[J]. 中国民族民间医药, 2008, 17(9): 44-46.

[3] 周志梅, 郭世民, 何静, 等. 镇痛中药的研究进展[J]. 云南中医中药杂志, 2007, 28(4): 52-54.

[4] 李文柱. 中国观赏甲虫图鉴[M]. 北京: 中国青年出版社, 2017.

[5] 吴苏杭, 万一琳, 李红梅, 等. 双叉犀金龟在豫南的危害及防治技术研究[J]. 绿色科技, 2016(21): 53-55.

[6] 葵政, 陈静芳, 葵跃旋. 药用昆虫独角仙的养殖[J]. 中草药, 2000, 31(8): 633-634.

[7] 曲纯松. 用于抗病毒生物坐垫的药物处方: CN102397445A[P]. 2012-04-04.

[8] 裴克, 曹蔚, 郭倩倩, 等. 蛴螬脂溶性成分的气相色谱-质谱联用分析及抗炎、镇痛活性研究[J]. 中药材, 2012, 35(3): 357-360.

[9] KIM K, BAE G D, PARK E Y, et al. *Allomyrina dichotoma* larval extract attenuates intestinal barrier disruption by altering inflammatory response and tight junction proteins in lipopolysaccharide-induced Caco-2 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 532(1): 145-150.

[10] CHAI C Y, HUANG L N, CHENG H, et al. *Metschnikowia baotianmanensis* f.a., sp. nov., a new yeast species isolated from the gut of the Rhinoceros beetle *Allomyrina dichotoma*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2019, 69(10): 3087-3092.

[11] YOON Y I, CHUNG M Y, HWANG J S, et al. *Allomyrina dichotoma* (Arthropoda: Insecta) larvae confer resistance to obesity in mice fed a high-fat diet[J]. Nutrients, 2015, 7(3): 1978-1991.

[12] 黄显章, 丁生晨, 袁林, 等. 蜣螂乙醇提取物的抗炎作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4): 1002-1004.

[13] 赵博, 陈超, 饶娅琦. 复方麦冬丸的镇痛抗炎作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(21): 4186-4190.

[14] 孙展鹏, 高长久, 周雪, 等. 中草药东风菜水和醇提取物的镇痛作用研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(4): 152-154.

[15] 王文春, 王祥培, 吴庭柱, 等. 苗药青龙方不同提取物的镇痛抗炎作用实验研究[J].中国民族医药杂志, 2019, 25(9): 32-34.

[16] 牟建平, 滕宝霞, 顾健沛. 苦归妇炎胶囊的镇痛实验研究[J]. 甘肃医药, 2020, 39(10): 869-870, 875.

[17] 肖杨, 周霞, 唐大轩, 等. 重楼皂苷Ⅶ、H 及总皂苷镇痛抗炎作用研究[J]. 四川中医, 2021, 39(6): 57-60.

[18] FERREIRA S H, NAKAMURA M, DE ABREU CASTRO M S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2[J]. Prostaglandins, 1978, 16(1): 31-37.

[19] 侯公瑾, 柏正平, 曾普华, 等. 蟾龙镇痛膏对骨转移性癌痛模型大鼠疼痛阈值及血清 PGE2、TNF-α、IL-6、β-EP 的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(10): 1222-1227.

[20] 欧凯西, 刘捷, 赵玉民, 等. 风热清口服液的抗炎镇痛药效作用及其机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(7): 1104-1107, 1110.