

中图分类号: R965; R285 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)06-0062-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.06.013



罗汉松种子总黄酮镇痛作用研究*

黎晶晶¹, 黄增琼^{2△}, 曾繁强¹, 覃园妹³, 郑志感¹

(1. 广西医科大学第八附属医院·广西壮族自治区贵港市人民医院, 广西 贵港 537100; 2. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021; 3. 中南大学湘雅二医院桂林医院, 广西 桂林 541001)

摘要:目的 探讨罗汉松种子总黄酮的镇痛作用。方法 进行小鼠热板致痛、热水甩尾、醋酸扭体和甲醛致痛实验, 记录痛阈值、扭体次数, 并计算疼痛抑制率、痛阈值提高率; 采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中前列腺素 E₂ (PGE₂)、一氧化氮(NO)和环氧合酶-2 (COX-2)的水平。结果 低、高剂量(60, 180 mg/kg)总黄酮均可明显升高小鼠的痛阈值, 对小鼠热板疼痛抑制率分别超过 20% 和 154%, 对小鼠热水甩尾痛阈值升高率分别为 46% 和 100%, 对醋酸扭体致痛的抑制率分别为 64.94% 和 72.41%; 且高剂量总黄酮能明显降低甲醛致痛小鼠的行为反应评分和血清 COX-2 水平。结论 罗汉松种子总黄酮可升高小鼠的痛阈值, 具有明显的镇痛作用, 这可能与降低小鼠血清中 COX-2 水平有关。

关键词: 罗汉松种子; 总黄酮; 镇痛作用; 环氧合酶-2

Analgesic Effect of Total Flavonoids in the Seed of *Podocarpus Macrophyllus*

LI Jingjing¹, HUANG Zengqiong^{2△}, ZENG Fanqiang¹, QIN Yuanmei³, ZHENG Zhigan¹

(1. The Eighth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University · Guigang People's Hospital, Guigang, Guangxi 537100, China; 2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Guilin Hospital of the Second Xiangya Hospital CSU, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the analgesic effect of total flavonoids in the seed of *Podocarpus macrophyllus*. **Methods** The test of pain induced by hot - plate, warm water tail - flick, acetic acid writhing, and pain induced by formaldehyde were established, the pain threshold and number of writhing episodes were recorded, and the pain inhibition rate and pain threshold increase rate were calculated. The enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to detect the serum levels of prostaglandin E₂ (PGE₂), nitric oxide (NO), and cyclooxygenase - 2 (COX - 2) in mice. **Results** Both low - dose (60 mg / kg) and high - dose (180 mg / kg) total flavonoids significantly increased the pain threshold in mice. The pain inhibition rates of hot - plate exceeded 20% and 154%, respectively; the pain threshold increase rates of the warm water tail - flick were 46% and 100%, respectively; and the pain inhibition rates of acetic acid writhing were 64.94% and 72.41%, respectively. Furthermore, the high - dose total flavonoids significantly reduced the behavioral response score in pain induced by formaldehyde mice and reduced the serum COX - 2 level. **Conclusion** Total flavonoids in the seed of *Podocarpus macrophyllus* can elevate the pain threshold in mice and have a significant analgesic effect, which may be associated with the reduction of serum COX - 2 level in mice.

Key words: seed of *Podocarpus macrophyllus*; total flavonoids; analgesic effect; cyclooxygenase - 2

疼痛是机体受损或疾病侵袭的预警信号, 慢性疼痛更被视为一种独立疾病。据《中国疼痛医学发展报告(2020)》, 我国慢性疼痛患者超3亿, 每年新增1 000万至2 000万患者, 成为我国第三大健康问题。临床常用镇痛药物(如非甾体抗炎药及阿片类药物)虽然药效显著, 但存在成瘾、器官损伤及滥用等风险。黄酮类化合物广泛存在于植物中, 具有抗氧化、抗炎、镇痛等多种药理活性^[1-6], 且毒性较低, 在疼痛治疗中作用显著^[7-8]。研究显示, 罗汉松种子总黄酮含量丰富^[9], 且其果实有镇痛功效^[10]。为此, 本研究中通过小鼠热板致痛等实验模型, 系

统评估罗汉松种子总黄酮的镇痛作用, 并初步探讨其作用机制, 以期开发新型天然镇痛药物提供依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: YLS-6B型智能热板仪(济南益延科技发展有限公司); TDZ4-WS型台式低速离心机(长沙高新技术产业开发区离心机仪器有限公司); Synergy H1型多功能酶标仪(南宁市精密仪器仪表有限公司); Gary 3500型紫外分光光度仪(美国 Agilent公司)。

* 基金项目: 广西自然科学基金[2020GXNSFAA259039]。

第一作者: 黎晶晶, 女, 汉族, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药理学、天然药物活性、医院药学, (电子信箱)840273735@qq.com。

△ 通信作者: 黄增琼, 男, 壮族, 博士研究生, 教授, 研究方向为天然药物化学成分分离纯化、结构修饰及生物活性, (电子信箱)huangzengqiong@163.com。

试剂:阿司匹林肠溶片(朝阳龙城制药有限公司,批号为21150803);前列腺素E₂(PGE₂)、一氧化氮(NO)、环氧合酶2(COX-2)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京诚林生物科技有限公司,批号均为202204);甲醛(批号为20190813)、醋酸(批号为2021110901)、99.5%冰乙酸(批号为2021110901),均购自成都市科隆化学品有限公司;0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号为E19101401)。罗汉松种子采自广西北海鑫意园罗汉松种植基地,经广西医科大学药学院中药学教研室李琼副教授鉴定为正品。

动物:SPF级KM小鼠160只,其中雄鼠60只,雌鼠100只,体质量18~22 g,购自广西医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(桂)2020-003,实验动物使用许可证号SYXK(桂)2020-004。适应性喂养7 d。本实验经广西医科大学动物伦理委员会批准,所有动物操作均严格按照相关伦理要求和规范进行。

1.2 方法

1.2.1 罗汉松种子总黄酮提取物的制备

取罗汉松种子适量,粉碎,用65%乙醇回流提取(提取工艺:料液比为1:14,提取40 min,提取3次),合并提取液,减压回收溶剂,烘干得提取物干粉末,用紫外可见分光光度法测定提取物总黄酮含量为71.77%。

1.2.2 分组及给药

实验分为空白对照组[0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)和吐温80]、阿司匹林组(200 mg/kg)^[11]及总黄酮低、高剂量组(60 mg/kg、180 mg/kg)^[9]。灌胃相应药物或溶剂,每天1次,连续7 d^[11]。

1.2.3 热板致痛实验模型

动物筛选:取雌性昆明小鼠,室温环境下适应1 h,依次置于(55±0.5)°C金属热板上,记录自放置至出现舔后足反应的时间,即为痛阈值。每只小鼠间隔5 min测1次,重复2次,取其平均值。剔除单次痛阈值<6 s或>60 s的个体,最终筛选出40只用于后续实验^[12]。

给药实验:按1.2.2项下方法分组及给药。末次给药前,测定小鼠的基础痛阈值。分别于末次给药后10、30、60 min时进行热板致痛实验,记录痛阈值,并计算疼痛抑制率^[13]。热板疼痛抑制率(%)=(给药后痛阈值-基础痛阈值)/基础痛阈值×100%。

1.2.4 热水甩尾实验模型

动物筛选:取雌性小鼠,室温环境下适应1 h。将小鼠尾端3 cm垂直浸入50 °C恒温水浴中,记录自浸入至出现甩尾反应的时间,即为痛阈值。每只小鼠间隔5 min测定1次,重复2次,取其平均值,作为痛阈值。最终筛选出40只用于后续实验。

给药实验:按1.2.2项下方法分组及给药。末次给

药前,测定小鼠的基础痛阈值。末次给药后1 h时进行热水甩尾实验,记录痛阈值,并计算痛阈提高率。痛阈提高率(%)=(给药后痛阈值-基础痛阈值)/基础痛阈值×100%。

1.2.5 醋酸扭体实验

取40只小鼠,雌雄各半,按1.2.2项下方法分组及给药。末次给药后40 min时,分别腹腔注射0.6%醋酸溶液(0.2 mL/kg),观察并记录20 min内小鼠的扭体反应次数,并计算扭体疼痛抑制率。注射醋酸后小鼠出现腹部两侧内凹、躯体扭曲和后肢伸展等系列动作算1次扭体反应。扭体疼痛抑制率(%)=(空白对照组扭体次数-给药组扭体次数)/空白对照组扭体次数×100%^[14]。实验结束后,自小鼠眼眶采血,3 000 r/min离心30 min(下同),分离血清,按ELISA试剂盒说明书操作,于450 nm波长处测定吸光度值,绘制标准曲线,计算血清中PGE₂和NO的水平^[11]。

1.2.6 甲醛致痛实验

取40只雄性小鼠,随机分为4组,按1.2.2项下方法分组及给药。末次给药后1 h时,于小鼠右后足跖皮下注射2.5%甲醛溶液30 μL,立即观察并记录注射后1、10、20、30、40 min时小鼠的疼痛行为反应,每个时间点观察15 s,按以下标准评分:0分(走动自如)、1分(跛行)、2分(提足)、3分(舔、咬或抖足),以每个时段内出现的最高行为评分作为该时间点评分。实验结束后,自小鼠眼眶采血,离心,分离血清,按ELISA试剂盒说明书操作,于450 nm波长处测定吸光度值,计算血清中COX-2和PGE₂的水平^[14-15]。

1.3 统计学处理

采用SPSS 25.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐时行单因素方差分析(ANOVA)检验,方差不齐时行协方差分析(ANCOVA)校正后再分析;计数资料或等级资料行Kruskal-Wallis检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热板致痛实验

空白对照组与总黄酮低剂量组小鼠给药前的痛阈值差异显著($P < 0.05$),故对给药前的痛阈值进行校正后再统计分析。结果见表1。与空白对照组比较,阿司匹林组和总黄酮低、高剂量组小鼠给药后10、30、60 min时的热板痛阈值显著升高($P < 0.01$)。与空白对照组比较,阿司匹林组及总黄酮低、高剂量组小鼠给药后10、30、60 min时的抑制率显著提高,其中总黄酮高剂量组小鼠在各时间点的热板疼痛抑制率均大于100%。详见表2。

表1 各组小鼠热板致痛实验痛阈值比较($\bar{X} \pm s$,秒, $n = 10$)

Tab.1 Comparison of pain thresholds in hot - plate test in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	给药前	给药后		
			10 min	30 min	60 min
空白对照组		9.01 ± 1.72	9.82 ± 0.79	11.58 ± 1.53	10.52 ± 1.91
阿司匹林组	200	11.03 ± 4.78	16.17 ± 0.77 ^{***}	20.83 ± 1.50 ^{***}	24.05 ± 1.87 ^{***}
总黄酮低剂量组	60	13.58 ± 6.42 [†]	13.80 ± 0.81 [†]	17.73 ± 1.58 [†]	18.86 ± 1.96 [†]
总黄酮高剂量组	180	9.74 ± 3.46	23.98 ± 0.78 ^{***}	28.28 ± 1.51 ^{***}	31.81 ± 1.88 ^{***}

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。表2至表6及图1、图2同。

Note:Compared with those in the blank control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ (for Tab.1 - 6 and Fig.1 - 2).

表2 各组小鼠热板疼痛抑制率比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.2 Comparison of pain inhibition rate in hot - plate test in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	痛阈差值(s)			疼痛抑制率(%)		
		10 min	30 min	60 min	10 min	30 min	60 min
空白对照组		0.20 ± 2.92	2.41 ± 4.17	1.03 ± 3.07			
阿司匹林组	200	5.29 ± 3.90 ^{***}	9.90 ± 4.19 ^{***}	13.16 ± 4.04 ^{***}	69.28	116.28	146.45
总黄酮低剂量组	60	2.37 ± 1.77 [†]	5.62 ± 4.54	7.24 ± 4.51 [†]	20.20	46.76	64.16
总黄酮高剂量组	180	13.38 ± 2.70 ^{***}	17.95 ± 7.43 ^{***}	21.28 ± 10.14 ^{***}	154.31	220.93	248.60

2.2 热水甩尾实验

与空白对照组比较,阿司匹林组小鼠给药后的痛阈值显著升高($P < 0.01$),总黄酮低、高剂量组小鼠给药后的痛域值均有一定升高(46%,100%),但差异不显著($P > 0.05$)。详见表3。

表3 各组小鼠热水甩尾实验痛阈值比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Comparison of pain thresholds in warm water tail - flick test in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	给药前(s)	给药后(s)	痛阈值升高率(%)
空白对照组		9.13 ± 2.53	11.78 ± 5.37	29
阿司匹林组	200	12.44 ± 7.35	27.98 ± 16.27 ^{***}	125
总黄酮低剂量组	60	10.71 ± 4.21	15.60 ± 5.60	46
总黄酮高剂量组	180	9.48 ± 4.94	18.95 ± 7.36	100

2.3 醋酸扭体实验

与空白对照组比较,阿司匹林组和总黄酮低、高剂量组小鼠给药后的扭体次数显著减少($P < 0.05$),对醋酸扭体的抑制率分别为77.01%,64.94%和72.41%。详见表4。与空白对照组比较,阿司匹林组及总黄酮低、高剂量组小鼠血清PGE₂和NO水平,均有一定差异($P > 0.05$)。详见图1。

2.4 甲醛致痛实验

Kruskal - Wallis 检验结果显示,注射后10,20,30 min时,各组小鼠甲醛致痛行为反应评分有显著差异($P < 0.05$)。与空白对照组比较,阿司匹林组小鼠给药后10,

表4 各组小鼠醋酸扭体次数和扭体疼痛抑制率比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Tab.4 Comparison of the number and pain inhibition rate of acetic acid writhing in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	扭体次数	抑制率(%)
空白对照组		34.8 ± 9.1	
阿司匹林组	200	8.0 ± 5.7 [*]	77.01
总黄酮低剂量组	60	12.2 ± 8.6 [*]	64.94
总黄酮高剂量组	180	9.6 ± 7.7 [*]	72.41

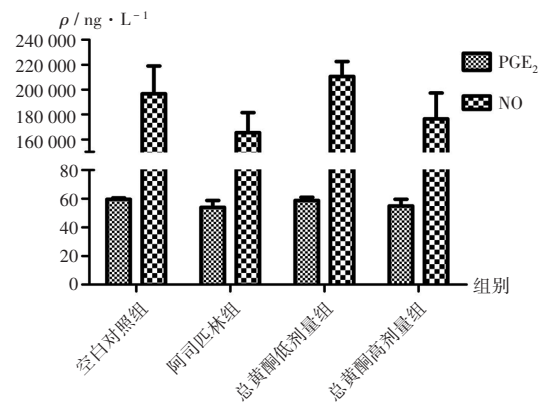


图1 小鼠血清中PGE₂和NO水平($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Fig.1 The levels of serum PGE₂ and NO in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

20,30 min时的行为反应评分均显著降低($P < 0.05$),总黄酮高剂量组注射后30 min时的行为反应评分显著降低($P < 0.05$)。详见表5、表6。与空白对照组比较,阿司匹林组及总黄酮高剂量组小鼠血清中COX - 2水平显著降低($P < 0.05$)。各组小鼠血清PGE₂水平均有一定差异($P > 0.05$)。详见图2。

表5 甲醛致痛模型行为评分的Kruskal - Wallis检验结果

Tab.5 Kruskal - Wallis test results for behavioral scores in the model mice of pain induced by formaldehyde

项目	1 min	10 min	20 min	30 min	40 min
Kruskal - Wallis H(K)	3	7.863	10.129	7.826	6.293
自由度	3	3	3	3	3
渐近显著性(P值)	0.392	0.049	0.017	0.05	0.098

注: $P < 0.05$ 表示同一时间点4组比较差异有统计学意义。

Note: $P < 0.05$ indicates that the difference among the four groups at the same time point was statistically significant.

表6 各组小鼠甲醛致痛行为反应评分比较($\bar{X} \pm s$,分, $n = 10$)

Tab.6 Comparison of behavioral response scores in pain induced by formaldehyde in each group ($\bar{X} \pm s, point, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	1 min	10 min	20 min	30 min	40 min
空白对照组		3.00 ± 0.00	2.50 ± 0.71	2.20 ± 0.79	2.10 ± 0.74	1.90 ± 0.57
阿司匹林组	200	3.00 ± 0.00	1.20 ± 1.12 ^{***}	1.10 ± 0.57 ^{***}	1.20 ± 0.79 ^{***}	1.20 ± 0.63 ^{***}
总黄酮低剂量组	60	2.90 ± 0.32	1.90 ± 0.74	1.70 ± 0.67	1.90 ± 0.32	1.60 ± 0.84
总黄酮高剂量组	180	3.00 ± 0.00	1.70 ± 1.05	1.70 ± 0.67	1.40 ± 0.97 [†]	1.30 ± 0.82

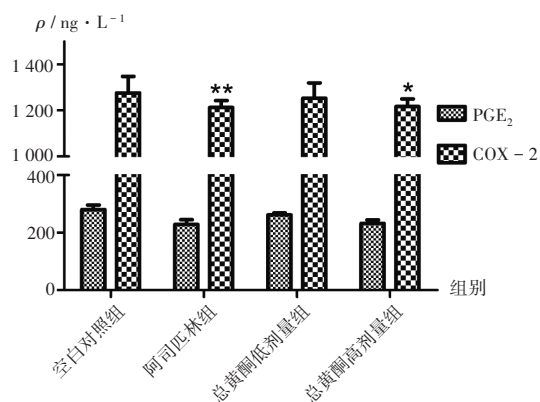


图2 小鼠血清PGE₂和COX-2水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 The levels of serum PGE₂ and COX-2 in each group ($\bar{X} \pm s, n = 10$)

3 讨论

COX是催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键双功能酶,主要分为COX-1和COX-2。在炎性状态下,花生四烯酸生成一系列致痛物质,其中PGE₂是重要的致痛介质。同时,炎性刺激可激活一氧化氮合酶(NOS),催化L-精氨酸合成NO,升高血液中NO水平^[16]。因此,PGE₂和NO常作为炎性疼痛的评价指标。在醋酸扭体实验中,罗汉松种子总黄酮明显抑制了小鼠扭体反应,提示其具有外周镇痛作用。但未显著改善血清PGE₂和NO水平,表明其对这两种炎性介质的合成和释放影响有限。为进一步了解罗汉松种子总黄酮是否影响PGE₂的催化合成酶COX-2,本研究中建立了甲醛致痛模型并进行相关检测。

甲醛致痛实验是模拟急性组织损伤导致的持续性疼痛,其疼痛分两个时相:注射甲醛后0~10 min为第I相(直接刺激C纤维所致),10~60 min为第II相(有炎性机制参与)^[17]。本研究中,罗汉松种子总黄酮的镇痛作用呈现阶段性,对第I相疼痛的抑制效果与阿司匹林相似,但对第II相疼痛的抑制效果相对较弱,且总黄酮低、高剂量均对血清PGE₂水平无显著影响,但总黄酮高剂量能明显降低小鼠血清COX-2水平。这表明罗汉松种子总黄酮的镇痛作用可能与降低血清COX-2水平有关。然而,在醋酸扭体和甲醛致痛实验中,罗汉松种子总黄酮均未明显降低血清中PGE₂水平,这可能与实验时间窗限制,PGE₂的合成与多种酶有关,除了依赖COX-1/2的催化,还需要PGE₂终末合成酶^[18],以及组织特异性表达,或者总黄酮可能对PGE₂水平的影响较弱相关。

综上所述,罗汉松种子总黄酮具有镇痛作用,能降低COX-2水平,但对血清PGE₂和NO水平均无明显影响,提示其可能具有独特的非COX/PGE₂依赖性镇痛特性,这与闹羊花等植物黄酮类成分的多靶点作用机

制^[19]存在差异。下一步可对罗汉松种子黄酮类单体成分的镇痛活性进行筛选,以及对镇痛活性成分的作用靶点和机制进行深入研究,为获得新的镇痛活性先导化合物奠定基础。

参考文献

- [1] SHAFIEE A, ATALA A. Printing technologies for medical applications[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(3): 254-265.
- [2] 陈江新, 马莉, 曹霞. 二氢杨梅素对白念珠菌性阴道炎小鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(11): 1351-1354.
- [3] 黄力鹏. 橙皮素在骨关节炎中的保护作用及其机制的研究[D]. 温州:温州医科大学, 2019.
- [4] 田笑, 金梅花, 刘莉园, 等. 大豆异黄酮诱导小鼠肝癌移植瘤细胞凋亡的机制[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 122-126.
- [5] 李伟, 杜浩, 张小英, 等. 不同来源酱油渣中大豆异黄酮苷元成分分析及抗炎活性研究[J]. 现代食品科技, 2019, 35(5): 52-58.
- [6] 顾超兰, 周杰. 红花黄色素对佐剂型关节炎大鼠的抗炎作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(4): 521-523.
- [7] 赵慧, 杜会枝. 低共熔溶剂提取连翘不同部位总黄酮及抗炎抗氧化活性研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2023, 46(3): 689-698.
- [8] 张蓓蓓. 滁菊总黄酮的镇痛抗炎作用及部分机制研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2013.
- [9] 黎晶晶, 黄增琼. 罗汉松种子总黄酮的抗炎作用研究[J]. 中国医药科学, 2024, 14(7): 64-67.
- [10] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006: 1912-1913.
- [11] 李聪聪, 汪露, 关奎奎, 等. 岩生忍冬黄酮提取工艺优化及其抗炎镇痛、免疫增强和抑制细胞焦亡作用[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5877-5886.
- [12] 刘利敏. 藏药短管兔耳草总黄酮抗炎解热镇痛作用研究[D]. 兰州:兰州大学, 2010.
- [13] 奥斯曼江·麦提图尔荪, 刘涛, 赵军, 等. 砂地柏总黄酮抗炎镇痛作用实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(4): 512-515.
- [14] 谷虹霏, 戴小华, 阿依姑丽·艾合麦提, 等. 新疆野山杏总黄酮对小鼠镇痛作用考察[J]. 中医药信息, 2018, 35(4): 30-33.
- [15] 韦琳, 宗伟, 曾庆鸿, 等. 花椒抗炎镇痛网络药理学分析及实验验证研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(12): 3034-3042.
- [16] 陈俊仁, 曹小玉, 李刚敏, 等. 中药复方镇痛机制的研究进展[J]. 中国药房, 2021, 32(11): 1397-1402.
- [17] 宋妍, 杨雪, 许伯慧, 等. 牡荆素抗豚鼠哮喘活性研究[J]. 现代医药卫生, 2014, 30(6): 18-19.
- [18] KUMAZAWA T, MIZUMURA K, KODA H. Involvement of EP3 subtype of prostaglandin E receptors in PGE₂-induced enhancement of the bradykinin response of nociceptors[J]. Brain Res, 1993, 632(1-2): 321-324.
- [19] 冯靖雯. 闹羊花质量标准提升研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2021.

(收稿日期:2025-02-24;修回日期:2025-09-12)