天麻不同提取部位抗缺血性脑卒中作用比较Δ

许春萍*，杨　茜，孟庆婷，颜明丽，宁　珑，孙　航，何芳雁#（云南中医药大学中药学院，昆明　650500）

中图分类号　R965；R285　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）04-0429-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.04.09

摘　要　目的　比较天麻不同提取部位的抗缺血性脑卒中（IS）作用，为筛选天麻抗IS的有效部位提供参考。**方法**　采用乙醇回流提取、乙酸乙酯萃取法对天麻进行提取分离。以花生四烯酸颈内动脉注射诱导大鼠弥漫性脑血栓模型，以缺血侧脑组织中伊文思蓝（EB）含量为指标考察天麻生粉、天麻醇提取物、天麻醇提取残渣、天麻乙酸乙酯提取物、天麻乙酸乙酯提取残渣、天麻素以及阿司匹林（阳性对照药）的抗IS作用。**结果**　与模型组比较，阿司匹林、天麻醇提取物、天麻乙酸乙酯提取物均可显著降低模型大鼠缺血侧脑组织中EB含量（$P<0.05$）；天麻生粉有降低模型大鼠缺血侧脑组织中EB含量的趋势，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；天麻醇提取残渣、天麻乙酸乙酯提取残渣、天麻素对模型大鼠缺血侧脑组织中EB含量均几乎无影响。**结论**　天麻醇提取物和天麻乙酸乙酯提取物均具有抗IS作用，且作用强于天麻生粉。

关键词　天麻；缺血性脑卒中；提取部位；药效学；有效部位

Comparison of anti-ischemic stroke effect of different extraction parts from *Gastrodia elata*

XU Chunping, YANG Qian, MENG Qingting, YAN Mingli, NING Long, SUN Hang, HE Fangyan (College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To compare anti-ischemic stroke (IS) effect of different extraction parts from *Gastrodia elata*, and to provide reference for screening the anti-IS effective parts of *G. elata*. **METHODS** *G. elata* was extracted and separated by ethanol reflux extraction and ethyl acetate extraction. The rat model of diffuse cerebral thrombosis was induced by internal carotid artery injection of arachidonic acid (AA); the anti-IS effect of *G. elata* powder, ethanol extract of *G. elata*, residue of ethanol extract of *G. elata*, ethyl acetate extract of *G. elata*, residue of ethyl acetate extract of *G. elata*, gastrodin and aspirin (positive control drug) were investigated with the content of Evans blue (EB) in the ischemic brain tissue as index. **RESULTS** Compared with model group, aspirin, ethanol extract of *G. elata* and ethyl acetate extract of *G. elata* could significantly decrease the content of EB in the ischemic brain tissue of model rats ($P<0.05$). *G. elata* powder had the tendency to reduce the content of EB in the ischemic brain tissue of model rats, without statistical significance ($P>0.05$). The residue of ethanol extract of *G. elata*, residue of ethyl acetate extract of *G. elata* and gastrodin had little effect on the content of EB in the ischemic brain tissue of model rats. **CONCLUSIONS** Both ethanol extract of *G. elata* and ethyl acetate extract of *G. elata* have anti-IS effects, which are stronger than that of *G. elata* powder.

KEYWORDS　*Gastrodia elata*; ischemic stroke; extraction part; pharmacodynamics; effective part

缺血性脑卒中（ischemic stroke，IS）是我国脑血管疾病中发病率最高的病种，具有致残率高、病死率高、复发率高等特点，其已成为我国成人致残、致死的首要病因[1]。该病的病理生理变化过程涉及多个环节，脑缺血时神经元、神经胶质细胞及微血管组成的血管神经单元均受损；IS的早期以炎症、神经元凋亡表现为主，后期以神经再生、血管新生表现为主[2-4]。早先的研究由于忽略了脑缺血后神经元、神经胶质细胞及血管内皮细胞之间的脑组织结构功能的整体性和联系，导致目前溶栓药和神经保护剂靶点单一、疗效不佳，因此，目前药物治疗的目标转变为对受损的脑组织进行多方位、多途径的全面保护[5-7]，强调干预脑缺血后病理过程的多个环节。

天麻（*Gastrodia elata* Bl.）为云南省道地药材。本课题组前期在对天麻抗IS作用的药效学及物质基础研究中发现，天麻酚性成分对IS过程中炎症发生、神经凋亡、血管新生等病理环节均有干预作用[8-11]。已有研究表明，脑血栓的形成是造成脑缺血的重要原因，临床弥漫性脑血栓是造成IS的主要原因之一[12]。基于此，本研究

Δ**基金项目**　云南省科技厅科技计划项目（No.202101AT070264）

* **第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药药理学。E-mail：2354950225@qq.com

\# **通信作者**　实验师，博士研究生。研究方向：中药药理学。E-mail：735137511@qq.com

采用弥漫性脑血栓大鼠模型[13]，以脑组织中伊文思蓝（Evans blue，EB）含量为评价指标，比较天麻不同提取部位的抗IS作用，以筛选出天麻抗IS的有效部位，为IS的中药新药开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ZDHW型调温电热套（北京中兴伟业仪器有限公司）、NVC-2100型旋转蒸发仪（日本EYELA株式会社）、1260 Infinity Ⅱ型高效液相色谱仪（美国Angilent Technologies公司）、KA-1000型台式低速离心机（上海安亭科学仪器厂）、QL-861型旋涡混合器（江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司）、Infinite M200 PRO型酶标仪（瑞士Tecan公司）、AB204-S型电子分析天平（瑞士Mettler Toledo公司）。

1.2 主要药品与试剂

天麻药材购自云南省昭通市彝良县原生态天麻种植专业合作社，经昭通天麻研究所陈顺芳鉴定为真品。阿司匹林（批号MKBT1587V，纯度99%）和EB染料（批号MKBTQ3656V）均购自美国Sigma公司；阿托品注射液（批号130404，规格10 mg/支）购自上海禾丰制药有限公司；天麻素（批号J1516031，纯度98%）购自美国Alladdin公司；无水乙醇（批号20160310，分析纯）和乙酸乙酯（批号20161020，分析纯）均购自天津市风船化学试剂科技有限公司；花生四烯酸（arachidonic acid，AA；批号XKN3C-JG，规格50 mg/支）购自东京化成工业株式会社。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠72只，体质量250～300 g，6～8周龄，由斯贝福（北京）生物技术有限公司提供，生产许可证号为SCXK（湘）2019-0004。所有大鼠饲养在温度为20～25 ℃，相对湿度为50%～65%，12 h昼夜交替的环境中，自由进食与饮水。动物实验方案经本单位实验动物伦理委员会审批通过（编号为R-062019LH001）。

2 方法

2.1 天麻不同提取部位的制备

2.1.1 天麻醇提取物和醇提取残渣 取天麻药材粉碎物过2号筛，取100 g用3倍生药量的70%乙醇溶液回流提取3次，提取时间分别为3、2、1 h，合并滤液，利用旋转蒸发仪回收乙醇，得醇提取物（得率为11.57%）和醇提取残渣（得率为87.92%）。

2.1.2 天麻乙酸乙酯提取物和乙酸乙酯提取残渣 取天麻醇提取物适量，用3倍水进行溶解，以等体积的乙酸乙酯溶液连续萃取6次，合并滤液，利用旋转蒸发仪回收乙酸乙酯、浓缩，得乙酸乙酯提取物（得率为2.13%）和乙酸乙酯提取残渣（得率为9.45%）。

2.2 给药溶液的制备

依据预实验，精密称取天麻醇提取物、天麻醇提取残渣、天麻乙酸乙酯提取物、天麻乙酸乙酯提取残渣各适量，分别加入聚山梨酯-80适量，使完全溶解后用蒸馏水定容，制成所需质量浓度后，于4 ℃密封保存，备用。

2.3 大鼠弥漫性脑血栓模型的建立

参照文献方法，建立大鼠弥漫性脑血栓模型[13]。用异氟烷吸入麻醉大鼠，并肌内注射治疗剂量的阿托品，使右侧颈部皮下筋膜暴露，钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉，并结扎颈外动脉分支和颈总动脉近心端，在其远心端用动脉夹夹紧，显微剪在颈总动脉游离端剪一个小口，插入导管，去除动脉夹。将0.5 mg/kg AA经导管注入颈总动脉，后结扎远心端动脉，进行缝合。实验过程中使大鼠仰卧于加热垫上，保持肛温恒定在37 ℃[12,14]。假手术组钝性分离大鼠右侧颈总动脉、颈外动脉后即可进行缝合，不注入AA。

2.4 分组与给药

根据前期天麻药效学实验结果，在保证天麻药材量一致的情况下按提取率折算大鼠天麻生粉和各提取部位等的给药剂量：天麻生粉为1.740 g/kg，天麻醇提取物为0.843 g/kg，天麻醇提取残渣为1.610 g/kg，天麻乙酸乙酯提取物为0.155 g/kg，天麻乙酸乙酯提取残渣为0.689 g/kg，天麻素为0.026 g/kg[15]。将72只大鼠随机分为假手术组、模型组、阿司匹林组（阳性对照药，0.100 g/kg[11]）、天麻生粉组、天麻醇提取物组、天麻醇提取残渣组、天麻乙酸乙酯提取物组、天麻乙酸乙酯提取残渣组、天麻素组，每组8只。各组大鼠均按每100 g体质量灌胃相应药液1 mL，每日1次，连续7 d，末次给药1 h后按“2.3”项下方法建立大鼠弥漫性脑血栓模型。

2.5 缺血侧脑组织EB渗出及EB含量测定

2.5.1 EB渗出情况观察 大鼠AA注入5 min后立即注入0.2%EB（每100 g体质量注入0.5 mL），5 min后立即断头处死，取大脑，称取脑湿重后，沿脑桥上界面切断，去除嗅球。由前向后做连续冠状切片，共5片。第1刀在脑前极与视交叉连线中点，第2刀在视交叉处，第3刀在漏斗柄处，第4刀在漏斗柄与后叶尾极之间[13]。观察各组大鼠脑组织切片中EB染色情况并拍照。

2.5.2 EB含量测定 脑组织切片拍照后，放入匀浆器中，加入5 mL 0.5%硫酸钠及丙酮混合液（3∶7，*V*/*V*）制成匀浆液，密封静置60 min以上，3 000 r/min离心10 min，

取上清液在620 nm波长处测定吸光度（A）。以缺血侧的A值与脑湿重之比表示EB的含量，以此反映脑血栓的严重程度。

2.6 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析，结果以$\bar{x}\pm s$表示，数据不符合正态分布时采用非参数检验；数据符合正态分布时行方差齐性检验，方差齐时采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-t检验，方差不齐时采用秩和检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 大鼠脑组织EB渗出情况

与假手术组比较，模型组大鼠缺血侧脑组织可观察到有明显的EB渗出情况；与模型组比较，阿司匹林组、天麻醇提取物组、天麻乙酸乙酯提取物组大鼠缺血侧脑组织的EB渗出情况明显减轻，天麻生粉组大鼠缺血侧脑组织EB渗出情况稍有减轻，天麻醇提取残渣组、天麻乙酸乙酯提取残渣组、天麻素组大鼠缺血侧脑组织的EB渗出情况无明显变化。脑组织形态图见图1。

3.2 大鼠缺血侧脑组织中EB含量比较

与假手术组比较，模型组大鼠缺血侧脑组织中EB含量显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，阿司匹林组、天麻醇提取物、天麻乙酸乙酯提取物组大鼠缺血侧脑组织中EB含量均显著降低（$P<0.05$），天麻生粉组大鼠缺血侧脑组织中EB含量有降低趋势，但差异无统计学意义（$P>0.05$），天麻醇提取残渣组、天麻乙酸乙酯提取残渣组、天麻素组大鼠缺血侧脑组织中EB含量均几乎无变化。结果见表1。

表1 各组大鼠缺血侧脑组织中EB含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	给药剂量/(g/kg)	EB含量
假手术组		0.16±0.03
模型组		0.25±0.10[a]
阿司匹林组	0.100	0.16±0.12[b]
天麻生粉组	1.740	0.22±0.06
天麻醇提取物组	0.843	0.19±0.04[b]
天麻醇提取残渣组	1.610	0.25±0.07
天麻乙酸乙酯提取物组	0.155	0.18±0.05[b]
天麻乙酸乙酯提取残渣组	0.689	0.25±0.05
天麻素组	0.026	0.24±0.12

a：与假手术组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$

4 讨论

由于天麻中含有较多的淀粉，水煎煮液黏稠不利于有效成分的扩散、溶出，且大多有效成分属于脂溶性酚性成分[16—17]。有研究显示，采用70%乙醇进行提取的天麻总提取物得率最高，并且天麻素提取更完全[18]。故本研究采用溶解性强的乙醇作为溶剂对天麻进行提取。此外，本课题组前期研究发现，天麻乙酸乙酯提取物中含有酚性成分，为了验证天麻乙酸乙酯提取物的抗IS作用，本研究还采用乙酸乙酯对天麻进行提取。

脑血栓的形成是造成脑缺血的重要原因，AA可诱导大鼠弥漫性脑血栓模型，此模型在损伤后几分钟即可发生血脑屏障功能的改变，从而导致脑缺血发生[12]。EB是一种偶氮基荧光染料，入血后几乎全部与血浆白蛋白结合，正常情况下不能透过血脑屏障，只有当血脑屏障被破坏，通透性升高时，才可透过血脑屏障。随脑损伤程度的加大导致血脑屏障通透性不断升高，则EB的透过量越多，脑组织的染蓝程度越明显，因此检测脑组织中EB的含量可以有效判断脑损伤的程度[19]。本研究选



图1 各组大鼠脑组织EB渗出情况的切片形态图

择颈内注射AA，能诱发大鼠同侧脑半球弥漫性脑血栓的形成，对于对侧脑半球影响较小，同时在建模过程中，对颈外动脉进行结扎，使AA与EB全都流入颅内，保证了模型的可靠性[20]。本研究结果发现，弥漫性脑血栓模型大鼠缺血侧脑组织中EB含量显著高于假手术组，经天麻醇提取物或天麻乙酸乙酯提取物干预后，模型大鼠缺血侧脑组织中EB含量均显著降低；经天麻生粉干预后，模型大鼠缺血侧脑组织中EB含量有降低趋势；经天麻素或天麻醇提取残渣或天麻乙酸乙酯提取残渣干预后，模型大鼠缺血侧脑组织中EB含量均几乎无变化。这表明天麻醇提取物和天麻乙酸乙酯提取物均具有抗IS作用，且作用强于天麻生粉，而天麻素、天麻醇提取残渣、天麻乙酸乙酯提取残渣均没有抗IS作用。

参考文献

[1] 王陇德，彭斌，张鸿祺，等.《中国脑卒中防治报告2020》概要[J]. 中国脑血管病杂志，2022，19(2)：136-144.

[2] FAN R，YU T，LIN J L，et al. Remote ischemic preconditioning improves post resuscitation cerebral function via overexpressing neuroglobin after cardiac arrest in rats[J]. Brain Res，2016，1648(Pt A)：345-355.

[3] HUANG S Q，YIN L H，XU Y H，et al. The homocysteine associated variant rs548987 of SLC17A3 confers susceptibility to ischemic stroke in Chinese population[J]. J Neurol Sci，2016，370：78-81.

[4] LUO Y P，ZHANG H，HU H F，et al.Protective effects of ginkgo terpene lactones meglumine injection on focal cerebral ischemia in rats[J].Zhongguo Zhong Yao Za Zhi，2017，42(24)：4733-4737.

[5] FEUERSTEIN G Z，CHAVEZ J. Translational medicine for stroke drug discovery：the pharmaceutical industry perspective[J].Stroke，2009，40(3 Suppl)：S121-S125.

[6] AL-MUFTI F，MISIOLEK K A，ROH D，et al. White blood cell count improves prediction of delayed cerebral ischemia following aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neurosurgery，2019，84(2)：397-403.

[7] XIAN J W，CHOI A Y，LAU C B，et al. *Gastrodia* and *Uncaria*(Tianma Gouteng)water extract exerts antioxidative and antiapoptotic effects against cerebral ischemia *in vitro* and *in vivo*[J]. Chin Med，2016，11：27.

[8] 文金隆. 天麻酚性成分对H_2O_2诱导PC12细胞氧化损伤的保护作用研究[D]. 昆明：云南中医学院，2013.

[9] 李艳. 天麻酚性成分对大鼠原代皮层神经元OGD/R损伤的保护作用研究[D]. 昆明：云南中医学院，2015.

[10] 韩春妮. 天麻酚性成分C对氧化应激损伤PC12细胞的保护作用研究[D]. 昆明：云南中医学院，2015.

[11] 蒋石. 天麻酚性成分对脑缺血致脑内炎症损伤的保护作用及机制研究[D]. 昆明：云南中医学院，2015.

[12] CAHN J，BORZEIX M G. The sodium arachidonate-induced cerebral infarct in the rat：a model for the study of drugs[J]. J Cereb Blood Flow Metab，1982，2(Suppl 1)：S74-S77.

[13] 宁珑，孙航，冯晋，等. 花生四烯酸诱导建立大鼠弥漫性脑血栓模型[J]. 实验动物与比较医学，2022，42(2)：141-145.

[14] 何芳雁，韩春妮，李艳，等. 制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要点及体会[J]. 实验动物科学，2013，30(4)：46-48.

[15] 何芳雁. 天麻对MCAO/R模型大鼠血脑屏障的保护作用及机制研究[D]. 昆明：云南中医学院，2015.

[16] 肖慧，王跃生，陈莎，等. 动态优化法在天麻提取工艺优化中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20(20)：35-38.

[17] 高淑杰，陈璇. 正交实验优化天麻提取工艺研究[J]. 中国民康医学，2011，23(4)：500-501.

[18] HU P Y，YUE P F，ZHENG Q，et al. Pharmacokinetic comparative study of gastrodin after oral administration of *Gastrodia elata* Bl. extract and its compatibility with the different indigents of *Ligusticum chuanxiong* Hort. to rats [J]. J Ethnopharmacol，2016，191：82-86.

[19] LEE B R，JOO K I，CHOI E S，et al. Evans blue dye-enhanced imaging of the brain microvessels using spectral focusing coherent anti-stokes raman scattering microscopy [J]. PLoS One，2017，12(10)：e0185519.

[20] SUN Q，SHI P Q，LIN C L，et al. Effects of *Astragalus* polysaccharides nanoparticles on cerebral thrombosis in SD rats[J]. Front Bioeng Biotechnol，2020，8：616759.

（收稿日期：2022-10-06　修回日期：2023-01-30）

（编辑：邹丽娟）