

不同粒径天麻超微粉对脑缺血再灌注脑损伤大鼠的保护作用

陈亭亭^{1,2}, 刘帆^{1,2}, 陈艳^{1,2}, 巩仔鹏¹, 陶陶³, 王爱民^{4*}

(1. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 药学院, 贵阳 550004;
3. 贵州省人民医院, 贵阳 550004;
4. 贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的:研究不同粒径的天麻超微粉对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用,为超微粉技术在天麻相关产品中的应用提供理论依据。方法:SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,天麻超微粉 I 组(1.2 g·kg⁻¹),天麻超微粉 II 组(1.2 g·kg⁻¹),天麻超微粉 III 组(1.2 g·kg⁻¹),阳性药尼莫地平组(12.6 g·kg⁻¹),连续口服给药 7 d 后造模。采用单侧线栓法闭塞中动脉 1 h 后再灌注 24 h,制备局灶性缺血再灌注损伤模型,2,3,5-氯化二苯基四氮唑(TTC)染色法测定脑组织梗死面积,比色法测定脑组织匀浆液和血清中的超氧化物歧化酶(SOD)的活性、丙二醛(MDA)含量、一氧化氮合酶(NOS)活性,液相色谱串联质谱法(LC/MSMS)记录海马中谷氨酸(Glu),天冬氨酸(Asp),甘氨酸(Gly)含量变化。结果:与假手术组比较,模型组出现显著的神经行为学功能缺失体征($P < 0.01$),脑梗死面积显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,天麻超微粉 I, II, III 组均能明显改善神经行为学功能($P < 0.05$),明显降低脑梗死面积比, Glu, Asp, MDA 含量和 NOS 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$),明显升高 SOD 活性和 Gly 含量($P < 0.05$)。与天麻超微粉 I 组比较,天麻超微粉 III 组 SOD 活性和 Gly 含量明显高于超微粉 I 组($P < 0.05$), Glu, Asp, MDA 含量和 NOS 活性均明显低于超微粉 I 组($P < 0.05$),天麻超微粉 II 组则均无显著性变化。结论:不同粒径的天麻超微粉均对脑缺血再灌注损伤具有预防保护作用,但天麻超微粉 III 较天麻超微粉 I, II 预防保护作用较明显,表明天麻超微粉对大鼠大脑中动脉缺血再灌注的脑保护作用与其粒径大小具有一定相关性。

[关键词] 天麻; 超微粉; 脑缺血再灌注; 脑保护作用

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0071-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190803

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1059.007.html>

[网络出版时间] 2019-01-04 9:26

Protective Effect of Gastrodiae Rhizoma Powder with Different Particle Sizes on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

CHEN Ting-ting^{1,2}, LIU Fan^{1,2}, CHEN Yan^{1,2}, GONG Zi-peng¹, TAO Tao³, WANG Ai-min^{4*}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;
2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;
3. People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550004, China;
4. Guizhou Provincial Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Gastrodiae Rhizoma ultrafine powder with different particle sizes on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, in order to provide theoretical basis for the

[收稿日期] 20180820(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560646);贵州省科技厅人才团队项目(黔科合平台人才[2016]5613/5677);贵阳市科研创新团队项目(筑科合同[2017]30-29号)

[第一作者] 陈亭亭,在读硕士,从事中药新药研究开发与有效物质基础研究, E-mail: 1064416893@qq.com

[通信作者] *王爱民,教授,从事中药新药研究开发、药物质量控制及质量标准、中药和天然药物有效物质基础研究, Tel:0851-86908468, E-mail: gywam100@163.com

application of ultrafine powder technology in related products. **Method:** The SD rats were randomly divided into six groups, namely sham-operated group, ischemia-reperfusion group, Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder I group ($1.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder II group ($1.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder III group ($1.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and nimodipine positive drug group ($12.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The cerebral ischemia-reperfusion model was established after 7 days of drug administration. The focal ischemia reperfusion injury model was prepared by middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 1 h followed by reperfusion for 24 h. The infarct size of brain tissue was measured by triphenyltetrazolium Chloride (TTC) staining. The activities of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitricoxide synthase (NOS) in brain homogenate and serum were measured by colorimetry. The contents of glutamate (Glu), aspartic acid (Asp) and glycine (Gly) in hippocampus were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MSMS). **Result:** The model group showed obvious signs of neurobehavioral deficit ($P < 0.01$) compared with the sham operation group. The area ratio of cerebral infarction was decreased significantly, the contents of Glu, Asp, MDA and the activity of NOS were significantly decreased, while the activity of SOD and content of Gly were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder I, II, III groups compared with the model group. SOD activity and Gly content in the Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder III group were significantly higher than those in the Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder I group and the Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder II group ($P < 0.05$), and Glu, Asp, MDA content and NOS activity in the Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder I group were significantly lower than those in the Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder II group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder with different particle sizes has a protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury, and the Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder III group has a more obvious protective effect than the the Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder I group. The results showed that the protective effect of Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder on middle cerebral artery ischemia-reperfusion in rats was related to its particle size.

[**Key words**] Gastrodiae Rhizoma; ultramicro-powder; cerebral ischemia-reperfusion; cerebral protective effect

天麻为兰科植物天麻的干燥根茎^[1], 临床主要用于治疗头痛眩晕、肢体麻木、癫痫等^[2-3], 在方剂中所治之证常与“风证”有关, 用天麻配伍常取其平抑肝阳和息风止痉之功效^[4]。现代药理研究表明, 天麻具有抗缺血缺氧、扩张血管、降低血液黏稠度、对红细胞变形和聚集指数异常均有显著改善作用^[5-6]; 提高超氧化物歧化酶(SOD)的活性、减少丙二醛(MDA)含量^[7], 降低一氧化氮合酶(NOS)的活性^[8]; 调节海马中氨基酸类神经递质含量, 维持抑制性氨基酸和兴奋性氨基酸的动态平衡, 发挥对小鼠缺血再灌注损伤的保护作用^[9]。

超微粉碎技术是近年来国际迅速发展起来的一项现代高科技粉碎技术, 能把原材料加工成微米甚至纳米级的微粉, 已愈来愈多的引起人们关注。由于超微粉粒径小($1 \sim 75 \mu\text{m}$), 比表面积大, 与一般的颗粒比较, 具有更好的溶解性、生物利用度、较高的破壁率、较小的临床使用剂量和毒副作用等优点^[10], 在中药加工和制剂生产中已显露出广阔的应

用前景。天麻经传统炮制工艺制成的产品如全天麻胶囊、复方天麻片、强力天麻杜仲胶囊等均以天麻普通粒径(100 目, $150 \mu\text{m}$)的生粉直接入药, 未经提取, 存在吸收差, 生物利用度低, 患者服用剂量偏大, 顺应性差等问题。将超微粉技术应用于天麻粉碎, 能够使有效成分较大程度溶出, 有利于提高其生物利用度和药效作用, 天麻超微粉较普通粉而言可提高有效成分的提取率, 明显提高小鼠的镇痛作用, 且所用剂量小于普通粉^[11-12], 但不同粒径天麻超微粉对大鼠海马中神经递质和抗氧化酶类等生理指标的影响尚未见报道。因此, 本实验从天麻的氧化应激机制和神经毒性作用方面考察不同粒径天麻超微粉对脑缺血再灌注(I/R)损伤的脑保护作用, 研究不同粒径对天麻超微粉药效的影响, 阐明粒径与药效的关系, 初步筛选天麻超微粉的最佳粉碎粒径, 为天麻超微粉进一步研究提供实验基础和后期天麻超微粉技术应用于天麻相关产品中的工艺改进、深度开发及升级换代提供科学理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康成年 SD 雄性大鼠, SPF 级, 体质量 250 ~ 300 g, 购自长沙市天勤生物科技有限公司, 动物合格证号 SCXK(湘)2014-0010。本实验经贵州医科大学伦理委员会批准(编号 NO1503018), 实验动物符合中国伦理委员会指导原则, 动物饲养于相对湿度(22 ± 2) °C, 相对湿度(60 ± 10)% 的环境中, 饲养管理均严格按照实验动物的要求及规则, 实验前饲养 1 周适应环境。

1.2 药物与试剂 天麻由贵州医科大学药学院药用植物学与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎。天麻超微粉 I (300 目), 天麻超微粉 II (400 目), 天麻超微粉 III (500 目) 由贵州益康制药有限公司提供; 尼莫地平片(山东新华制药厂, 批号 20171013); 羧甲基纤维素钠(索莱宝生物科技有限公司, 批号 20171013); NOS, SOD, MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20180321, 20180407, 20180406); 谷氨酸(Glu), 天冬氨酸(Asp), 甘氨酸(Gly) 对照品, 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑染料(TTC)(美国 Sigma 公司, 批号分别为 BCRW2718, BCBR3884, LRAA6054, #BCBV1635, 纯度均 > 99%); 其余试剂均为分析纯。

1.3 仪器 API 5500/Q-TRAP 型高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪(Acquity HPLC 系统, Analyst, Multiquant 工作站, 包括二元高压梯度泵、自动进样器、电喷雾电离源等); 680 型酶标仪(上海伯乐生命医学产品有限公司); UV-2700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); Allegra 64R 型冷冻高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司); EL204 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); THZ-82 型水浴恒温振荡器(江苏唯美仪器制造有限公司); Water purifier 型实验室专用超纯水机(沃特水处理设备有限公司)。

2 方法

2.1 制备大鼠中动脉阻塞(MCAO)模型 采用改良的 Longa 等^[13] 方法复制大鼠 MCAO 模型。各组大鼠术前禁食 12 h, 按 0.35 mg · kg⁻¹ 的剂量腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉。麻醉后, 仰卧固定于手术台上, 75% 乙醇消毒皮肤, 于颈正中切口, 沿胸锁乳突肌、二腹肌和胸骨舌骨肌三肌肉之间钝性分离, 仔细分离出左侧颈总动脉(CCA), 颈外动脉(ECA), 颈内动脉(ICA)(注意避免伤到迷走神经); 分别在 CCA 上穿入 2 根, ECA 上穿入 1 根 4 号非吸收性缝

合线, 结扎 CCA 近心端和 ECA, 绕线 CCA 远心端, 用显微止血架将 ICA 暂时止血; 于 CCA 上两线间剪一小口, 将型号匹配的线栓自 CCA 插入, 经分叉处通过 ICA 入颅至大脑中动脉(MCA), 线栓插入深度为 18 ~ 20 mm, 并固定; 缺血 1 h 后, 轻轻拔出栓线恢复大脑中动脉血流供应, 再灌注 24 h 后, 进行模型评价; 正常组(即假手术组)大鼠除不插栓线外, 其余操作同模型组。整个过程保持大鼠体温在 37 °C 左右。

2.2 分组与给药 将大鼠随机分成 6 组, 分别为假手术组、模型组、超微粉 I 组、超微粉 II 组、超微粉 III 组、尼莫地平组。超微粉 I, II, III 组每天灌胃给药, 给药剂量参考文献及预实验结果均为 1.2 g · kg⁻¹^[14], 尼莫地平组 12.6 mg · kg⁻¹, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 假手术组及模型组均连续给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。

2.3 神经行为学评分 参照 Longa 等^[13] 的 5 级 4 分法, 对缺血再灌注 24 h 后的大鼠进行评分, 记录神经功能缺失症状, 评分标准如下, 0 分为无神经损伤症状; 1 分为不能完全伸展对侧前爪(提起鼠尾, 前肢弯曲); 2 分为向对侧转圈; 3 分为向对侧倾倒; 4 分为不能自发行走, 意识丧失。评分为 1 ~ 3 分为造模成功, 纳入实验。

2.4 脑梗死面积比的测定 按 2.1 项下的给药方式给予各组大鼠, 大鼠缺血 1 h 再灌注 24 h 后, 通过大鼠神经行为学评分, 将造模后的大鼠断头取脑, 除去小脑和嗅球后, 用生理盐水洗净, 滤纸吸干, 放置 -20 °C 冰箱冷冻 15 min, 沿大脑冠状面切片, 共 5 片, 厚度约为 2 mm。以 1% TTC 的磷酸缓冲液避光孵育 10 min, 红色区域为正常脑组织, 白色区域为梗死脑组织。以 4% 多聚甲醛溶液固定, 数码相机拍照后用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 分析梗死区面积占对侧脑面积的百分比。按以下公式进行计算, 脑梗死面积 = 白色区面积 / (红色区面积 + 白色区面积) × 100%。

2.5 脑组织匀浆液和血清中 SOD, MDA, NOS 水平的测定 大鼠再灌注 24 h 后, 通过大鼠神经行为学评分, 将造模成功的大鼠立即断头处死, 并在冰浴中取脑组织, 分离并除去小脑和嗅球部分, 将整个大脑用生理盐水洗净, 滤纸吸干, 从上至下切除两侧半球的正中结构, 取左侧大脑称质量后加入其体质量的 9 倍生理盐水, 制成 10% 的脑匀浆液, 于 4 °C, 2 500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 按照各试剂盒说明书分别对脑匀浆液中 SOD 和 NOS 活性及 MDA

含量进行测定。用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,从股动脉取血后将全血于 4 ℃ 条件下静止 2 h 后于 4 ℃ 3 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液置 -80 ℃ 冰箱待测。按照各试剂盒说明书分别对血清中 SOD 和 NOS 活性及 MDA 含量进行测定。

2.6 脑海马中神经递质氨基酸的测定 色谱条件: 色谱柱为 SynergiTM Hydro-RP C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 4 μm); 流动相为 A 相 0.1% 甲酸水, B 相为 0.1% 甲酸乙腈, 流速为 1 mL·min⁻¹, 进样量为 1 μL。质谱条件为 ESI⁺ 电离模式, 多反应检测采集方式 (MRM) 离子源温度为 550 ℃; 电喷雾电压为 4 500 V; 雾化气 (GS1) 流速为 55 L·min⁻¹, 辅助气 (GS2) 流速为 55 L·min⁻¹。用于定量的离子对分别为 Glu 母离子 *m/z* 148, 子离子 *m/z* 84; Asp 母离子 *m/z* 134, 子离子 *m/z* 74; Gly 母离子 *m/z* 76, 子离子 *m/z* 30。

样品制备, 将各组造模成功的大鼠立即断头处死, 快速取出脑组织, 于冰台上分离皮层和完整海马组织, 立即置液氮中冷冻, 于 -80 ℃ 保存待测。测定时, 将脑组织解冻 (恢复至室温, 参考文献 [15] 方法制备氨基酸提取液, 进行含量测定)。

对照品溶液制备: 精密称取 Glu 1.01 mg, Asp 1.02 mg, Gly 1.02 mg, 置 10 mL 容量瓶中, 用 0.1% 甲酸水溶解并定容至刻度, 得混合的 Glu, Asp, Gly 混合储备溶液。取不同体积的各氨基酸标准储备液, 用 0.1% 甲酸水稀释成一系列浓度梯度的混合对照品溶液。以峰面积 *Y* 对浓度 *X* (μg·L⁻¹) 进行线性回归, 结果见表 1。

表 1 各种氨基酸的标准曲线及范围

Table 1 Standard curves and linear ranges of amino acid

组别	标准曲线	线性范围 /μg·L ⁻¹	检出限 /μg·L ⁻¹	相关系数 <i>r</i>
谷氨酸	$y = 9.84 \times 10^2 X + 7.56 \times 10^4$	8~8 000	1	0.997 6
天冬氨酸	$Y = 4.67 \times 10^2 X - 6.19 \times 10^3$	30~4 000	2	0.998 0
甘氨酸	$Y = 9.88 \times 10^1 X + 4.02 \times 10^2$	60~2 000	10	0.995 9

2.7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件包对各组实验数据进行分析, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据比较用多组样本比较的 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠神经行为学评分的影响 除假手术组外, 将神经行为学评分为 0 分和 4 分的大鼠舍去。实验结果表明, 大鼠再灌

注 24 h 后, 各组大鼠有明显的行为学特征, 与假手术组比较, 模型组的神经行为学评分显著升高 (*P* < 0.01), 提示 MCAO 模型复制成功, 与模型组比较, 3 种超微粉组和尼莫地平组的神经行为学评分均明显降低 (*P* < 0.05)。与尼莫地平组比较, 3 种超微粉组均无显著性差异。见表 2。

表 2 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠神经行为学评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

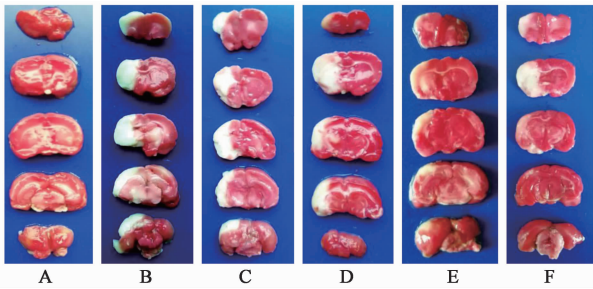
Table 2 Effect of different size Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder on neurological deficits score in I/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	神经行为学评/24 h	脑梗死面积比/%
假手术	-	0	0
模型	-	2.8 ± 0.45 ¹⁾	41.92 ± 10.42 ¹⁾
超微粉 I	1.2	1.8 ± 0.84 ²⁾	16.07 ± 2.53 ^{2,3)}
超微粉 II	1.2	1.8 ± 0.45 ²⁾	11.59 ± 1.46 ^{2,4)}
超微粉 III	1.2	1.0 ± 0.71 ²⁾	9.08 ± 0.99 ^{2,4,5)}
尼莫地平	0.012 6	1.2 ± 0.45 ²⁾	11.05 ± 1.81 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ *P* < 0.01; 与模型组比较²⁾ *P* < 0.05; 与尼莫地平组比较³⁾ *P* < 0.05; 与超微粉 I 组比较⁴⁾ *P* < 0.05; 与超微粉 II 组比较⁵⁾ *P* < 0.05。

3.2 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠脑梗死面积比的影响 TTC 染色后, 正常脑组织呈红色, 缺血梗死区呈白色, 与假手术组比较, 模型组大鼠的脑梗死面积比显著增加 (*P* < 0.01); 与模型组比较, 天麻超微粉 I, II, III 组和尼莫地平组均明显减少脑梗死面积比 (*P* < 0.05); 与尼莫地平组比较, 天麻超微粉 I 组脑梗死面积比明显高于尼莫地平组 (*P* < 0.05), 天麻超微粉 II, III 组均不同程度升高, 但无显著性差异; 与天麻超微粉 I 组比较, 天麻超微粉 II, III 组脑梗死面积比明显减少 (*P* < 0.05), 与天麻超微粉 II 组比较, 天麻超微粉 III 组脑梗死面积比明显减少 (*P* < 0.05)。见表 2 和图 1。

3.3 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠脑匀浆液中 SOD, MDA, NOS 的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠脑匀浆液中 SOD 活性明显降低, NOS 活性明显提高, 且 MDA 的含量也明显增多 (*P* < 0.05), 提示 MCAO 模型复制成功; 与模型组比较, 3 组超微粉组和尼莫地平组 SOD 活性明显增高, NOS 活性明显降低, MDA 的含量也明显减少 (*P* < 0.05); 与尼莫地平组比较, 3 组超微粉组 SOD, NOS 活性和 MDA 含量均无显著性差异。与超微粉 I 组比较, 超微粉 II 组 SOD 有升高趋势, NOS 活性和 MDA 含量有下降趋势, 但均无显著性差异, 超微粉 III 组 SOD 活性



A. 假手术组; B. 模型组; C. 超微粉 I 组; D. 超微粉 II 组; E. 超微粉 III 组; F. 尼莫地平组

图 1 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠脑梗死面积的影响 (TTC)

Fig. 1 Effect of ultramicro-powder of Gastrodiae Rhizoma on cerebral infarction area in I/R rats (TTC)

明显升高, NOS 活性和 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠脑匀浆液中 SOD, MDA, NOS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of different sizes Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder on SOD, MDA and NOS in brain homogenate of I/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /μmol·g ⁻¹	NOS /U·mg ⁻¹
假手术	-	136.52 ± 27.83	2.45 ± 0.16	0.45 ± 0.03
模型	-	91.24 ± 9.02 ¹⁾	4.28 ± 0.47 ¹⁾	0.90 ± 0.14 ¹⁾
超微粉 I	1.2	103.89 ± 4.41 ²⁾	3.33 ± 0.30 ²⁾	0.60 ± 0.07 ²⁾
超微粉 II	1.2	114.99 ± 12.16 ²⁾	2.84 ± 0.44 ²⁾	0.53 ± 0.09 ²⁾
超微粉 III	1.2	119.37 ± 6.68 ^{2,4)}	2.86 ± 0.31 ^{2,4)}	0.48 ± 0.05 ^{2,4)}
尼莫地平	0.012 6	119.59 ± 11.73 ²⁾	2.91 ± 0.46 ²⁾	0.46 ± 0.10 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与尼莫地平组比较³⁾ $P < 0.05$;与超微粉 I 组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与超微粉 II 组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 4, 5 同)。

3.4 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠血清中 SOD, MDA, NOS 的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中, SOD 活性明显降低, NOS 活性明显提高, 且 MDA 的含量也明显增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 3 组超微粉组和尼莫地平组 SOD 活性明显增高, NOS 活性明显降低, MDA 的含量也明显减少 ($P < 0.05$)。与尼莫地平组比较, 3 组超微粉 SOD 活性均明显降低 ($P < 0.05$), 超微粉 I 组 NOS 活性和 MDA 含量均明显高于尼莫地平组 ($P < 0.05$), 超微粉 II 和超微粉 III 组则与尼莫地平组比无显著性差异; 与超微粉 I 比较, 超微粉 III 组 SOD 活性明显升高, NOS 酶活性和 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$), 与脑匀浆液中结果一致。见表 4。

表 4 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠血清中 SOD, MDA, NOS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of different sizes Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder on SOD, MDA and NOS in serum of I/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹	NOS /U·mL ⁻¹
假手术	-	123.03 ± 5.09	8.69 ± 1.80	7.66 ± 0.72
模型	-	84.68 ± 7.75 ¹⁾	10.82 ± 0.39 ¹⁾	11.04 ± 1.68 ¹⁾
超微粉 I	1.2	100.48 ± 5.18 ^{2,3)}	9.74 ± 0.45 ^{2,3)}	8.76 ± 0.33 ^{2,3)}
超微粉 II	1.2	108.76 ± 6.84 ^{2,3)}	8.92 ± 0.87 ²⁾	8.61 ± 0.80 ²⁾
超微粉 III	1.2	113.39 ± 6.03 ^{2,3,4)}	9.59 ± 0.19 ^{2,4)}	7.58 ± 0.63 ^{2,4)}
尼莫地平	0.012 6	130.10 ± 4.88 ²⁾	8.20 ± 1.23 ²⁾	7.74 ± 0.61 ²⁾

3.5 不同粒径天麻超微粉对 I/R 脑海马中神经递质氨基酸的影响 脑缺血再灌注 24 h 后, 模型组大鼠脑海马组织中 Glu 和 Asp 含量与假手术组相比明显升高, Gly 含量明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 3 种天麻超微粉组和尼莫地平组均能明显降低脑海马中 Glu 和 Asp 含量, 明显升高 Gly 含量 ($P < 0.05$)。与超微粉 I 比较, 超微粉 II 组 Glu, Asp 和 Gly 含量无显著性变化, 超微粉 III 可明显降低 Glu 和 Asp 含量, 并明显升高 Gly 含量 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 不同粒径天麻超微粉对 I/R 大鼠脑海马中 Glu, Asp, Gly 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of different sizes Gastrodiae Rhizoma ultramicro-powder on Glu, Asp and Gly in hippocampus of I/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Glu	Asp	Gly
假手术	-	6.90 ± 0.40	1.18 ± 0.10	1.20 ± 0.23
模型	-	8.49 ± 0.65 ¹⁾	1.93 ± 0.10 ¹⁾	0.80 ± 0.05 ¹⁾
超微粉 I	1.2	7.55 ± 0.65 ²⁾	1.70 ± 0.11 ^{2,3)}	1.07 ± 0.12 ²⁾
超微粉 II	1.2	7.40 ± 0.32 ²⁾	1.56 ± 0.18 ^{2,3)}	0.96 ± 0.07 ²⁾
超微粉 III	1.2	6.89 ± 0.70 ^{2,4,5)}	1.46 ± 0.10 ^{2,4)}	1.50 ± 0.20 ^{2,3,4,5)}
尼莫地平	0.012 6	7.04 ± 0.69 ²⁾	1.14 ± 0.36 ²⁾	1.01 ± 0.18 ²⁾

4 讨论

SOD 是体内重要的抗氧化酶, 分布于全身各组织中, 它通过与超氧阴离子自由基反应形成过氧化氢, 再由过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化氢酶转变成水, 从而清除体内过量的超氧阴离子自由基, 当体内自由基过量增多时, SOD 会被大量消耗, 导致活性显著下降。MDA 是脂质过氧化反应的代谢产物, 其含量的高低能间接反映氧自由基的含量, 以及细胞受自由基攻击后脂质氧化的程度^[16]。因此, 提高 SOD 的活性和降低 MDA 的含量能减轻 I/R 的损伤程度, 两者是氧化应激反应的重要生理指标。脑

组织中 NOS 通过催化左旋精氨酸产生过量 NO, 过量的 NO 会对神经细胞具有较强毒性, 因此抑制 NOS 的活性, 能减轻 I/R 的损伤程度, 从而对缺血后再灌注大鼠的脑组织有一定的保护作用^[17]。

Glu 和 Asp 是脑组织中的重要兴奋性氨基酸 (EEA), Gly 是脑组织中重要的抑制性氨基酸 (IAA), 其含量及比例的变化对调节中枢神经系统疾病具有重要作用^[15]。过量的 EEA 所产生的神经毒性作用是脑组织损伤的启动者和执行者, 在 I/R 过程中 EEA 的升高程度与脑缺血程度有关, 缺血程度越重, EEA 释放越多^[18], Gly 可通过调节兴奋性氨基酸, 加强兴奋性氨基酸的毒性作用^[19]。因此可通过脑海马中 Glu, Asp 和 Gly 含量变化观察药物对 I/R 大鼠的脑保护作用。

课题组前期研究发现天麻具有较好的脑保护作用^[20-22], 且天麻超微粉的药理作用明显优于普通粉^[14]。实验结果表明 3 种超微粉能不同程度地提高脑匀浆液和血清中的 SOD 活性, 减少 MDA 的含量和降低 NOS 的活性, 也能不同程度地升高 I/R 大鼠脑海马中 Gly 含量, 降低兴奋性氨基酸 Glu 和 Asp 含量, 说明天麻超微粉对 I/R 损伤的保护作用机制与文献报道一致^[7-9]。天麻超微粉 III 组 SOD 活性和 Gly 含量明显高于超微粉 I 和 II 组, MDA, Asp 和 Gly 含量, NOS 活性、脑梗死面积明显低于超微粉 I 和 II, 表明了天麻超微粉对 I/R 大鼠的脑保护作用与超微粉的粒径有关, 且天麻超微粉 III 对 I/R 大鼠的脑保护作用优于超微粉 I 和 II, 这可能是因为超微粉粒径越细, 使药材中的细胞破壁更彻底, 天麻中的有效成分充分暴露, 更利于其溶出和吸收, 提高生物利用度, 使药效得到充分发挥, 但是粒径越细是否会对组织器官产生蓄积导致毒性作用, 还需要后期进行深入研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018: 58.

[2] 张大燕, 文欢, 王伟, 等. 天麻对帕金森小鼠神经元保护作用机制的转录组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16): 73-81.

[3] 杨飞, 王信, 马传江, 等. 天麻加工炮制、成分分析与体内代谢研究进展[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2207-2215.

[4] 汤小虎, 李波, 胡璘媛, 等. 天麻在《太平惠民和剂局方》中的配伍应用[J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(3): 75-76.

[5] 任世兰, 于龙顺, 赵国举, 等. 天麻对血管阻力和耐缺血缺氧能力的影响[J]. 中草药, 1992, 23(6): 302-

304, 335.

[6] 王正荣, 罗红淋, 肖静, 等. 天麻素对动脉血管顺应性以及血流动力学的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 1994, 17(3): 197-201.

[7] 徐坚, 陶陶, 何燕, 等. 天麻及电针对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国脑血管病杂志, 2004, 5(1): 221-224.

[8] 段小花, 代蓉, 李秀芳, 等. 天麻酚类成分对脑缺血模型大鼠海马一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2011, 13(7): 653-655.

[9] 傅建华, 杜贵友. 天麻促智颗粒对反复脑缺血再灌注小鼠脑组织递质氨基酸含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(1): 54-56.

[10] 李宏岳, 范蕾, 范蕾. 沉香超微粉与山沉香超微粉药效学对比分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12): 92-98.

[11] 刘智, 李诚秀, 李玲, 等. 天麻粉不同粒径的镇静镇痛作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(5): 383-385.

[12] 刘智, 王丽. 天麻细胞级微粉碎和普通粉碎质量标准对比实验研究[J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(6): 474-476.

[13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.

[14] 陶陶, 徐坚, 董佑忠, 等. 天麻超微粉与普通粉对大鼠脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的研究[J]. 中国医药学报, 2004, 19(7): 409-411, 388.

[15] 陈燕, 王有志, 安春志, 等. LC-ESI-MS/MS 测定大鼠海马和纹状体中氨基酸类神经递质的含量[J]. 今日药学, 2013, 23(2): 65-69.

[16] 肖爱娇, 陈日新, 康明非, 等. 热敏灸对脑缺血再灌注损伤大鼠 SOD、MDA 的影响[J]. 天津医药, 2014, 42(1): 51-53.

[17] 王启海, 梁枫, 韩军. 蜂胶总黄酮对脑缺血再灌注大鼠脑水肿和脑组织内 NO 及 NOS 含量的影响[J]. 包头医学院学报, 2015, 31(10): 1-3.

[18] 韩进, 万海同, 李金辉, 等. 3'-甲氧基葛根素对缺血再灌注大鼠脑内氨基酸动态变化的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(7): 1023-1027.

[19] 张颖, 杨坚, 刘罡一, 等. 芍药甘草汤对脑缺血再灌注偏瘫大鼠痉挛状态和氨基酸水平的影响[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(5): 85-89.

[20] 陶陶, 周建, 徐坚, 等. 天麻对大鼠大脑皮质神经元细胞缺氧后超微结构及 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4): 946-951.

[21] 周建, 陶陶, 徐坚, 等. 天麻对缺氧引起大鼠大脑皮质神经元细胞凋亡的保护作用[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 640-644.

[22] 陶陶, 曾可斌, 胡常林. 天麻超微粉对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[J]. 中医杂志, 2005, 46(4): 294-296.

[责任编辑 周冰冰]