

米汤炮制天麻工艺的优化及抗炎作用

董欣, 隋欣彤, 胡力铭, 王仁广, 李占国, 王景龙, 王淑敏, 梁磊

Optimization of the Processing with Decoction of Millet Technology of *Gastrodia elata* and Its Anti-inflammatory Efficacy

DONG Xin, SUI Xintong, HU Liming, WANG Renguang, LI Zhanguo, WANG Jinglong, WANG Shumin, and LIANG Lei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023090066>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

乳酸菌发酵天麻口服液工艺优化

Optimization of Fermentation Processing of *Gastrodia elata* Oral Liquid with Lactic Acid Bacteria

食品工业科技. 2023, 44(15): 193-202 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090033>

天麻藤茶红茶复合饮料工艺优化及其抗氧化活性研究

Process Optimization and Antioxidant Activity of *Gastrodia elata*, *Ampelopsis* and Black Tea Compound Beverage

食品工业科技. 2019, 40(18): 139-146 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.18.023>

天麻在我国保健食品中的应用

Application of *Gastrodia elata* in Functional Food in China

食品工业科技. 2023, 44(9): 403-412 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022050051>

乌红天麻干燥工艺研究

Drying Process of Wuhong *Gastrodia*

食品工业科技. 2021, 42(5): 166-169,176 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040119>

新鲜天麻中天麻素与对羟基苯甲醇含量及影响因素分析

Influencing Factors Analysis on the Content of Gastrodin and P-hydroxybenzyl Alcohol in Fresh *Gastrodia elata*

食品工业科技. 2021, 42(6): 233-240 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050162>

基于代谢组学及网络药理学分析天麻熟制过程中生物学活性变化

Analyzing of the Composition and Medicinal Properties of *Gastrodia elata* during Cooking Based on Metabonomics and Network Pharmacology

食品工业科技. 2023, 44(3): 29-39 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022060102>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

董欣, 隋欣彤, 胡力铭, 等. 米汤炮制天麻工艺的优化及抗炎作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(16): 358–367. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090066

DONG Xin, SUI Xintong, HU Liming, et al. Optimization of the Processing with Decoction of Millet Technology of *Gastrodia elata* and Its Anti-inflammatory Efficacy[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(16): 358–367. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090066

· 营养与保健 ·

米汤炮制天麻工艺的优化及抗炎作用

董欣^{1,2}, 隋欣彤^{1,2}, 胡力铭¹, 王仁广¹, 李占国², 王景龙², 王淑敏^{1,*}, 梁磊^{2,3}

(1. 长春中医药大学药学院, 吉林长春 130117;

2. 吉林省中科生物工程股份有限公司, 吉林长春 131508;

3. 吉林省蒲川生物医药有限公司, 吉林长春 131508)

摘要: 优选米汤制天麻的炮制工艺, 并考察其对脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小胶质细胞 (BV-2) 炎症反应的作用。采用高效液相色谱法检测天麻提取物中天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的含量, 以六种成分含量为评价指标, 以米汤与水体积比、煮制时间、干燥温度为单因素变量, 在单因素的基础上, 通过三个指标综合考虑, 设计正交试验, 优化米汤制天麻的制备工艺, 并比较 6 种成分在不同炮制品中的含量。脂多糖诱导的神经炎症细胞模型, CCK-8 法测定天麻炮制品提取物对 BV2 细胞存活率的影响; ELISA 法检测细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放水平; Western blot 法检测 TLR4、MYD88、P65、INOS、COX-2、IL-1 β 蛋白的表达变化。结果表明, 煮制时间和米汤与水体积比对试验结果有显著 ($P < 0.05$) 影响, 米汤制天麻的炮制工艺: 米汤与水体积比为 1:3, 煮制 25 min, 75 °C 烘干。米汤制品中 6 种成分含量综合评分高于蒸制品。天麻提取物对 LPS 诱导 BV2 细胞损伤具有不同程度的保护作用。与正常对照组比较, LPS 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的分泌显著上升 ($P < 0.001$), 与 LPS 组, 两种炮制品均可抑制 TNF- α ($P < 0.05$)、IL-1 β ($P < 0.05$, $P < 0.001$)、IL-6 ($P < 0.05$, $P < 0.001$) 的释放。Western blot 结果显示, 与 LPS 组比较, 两种炮制品可能显著抑制 LPS 诱导的 TLR4/MYD88/NF- κ B 信号通路的激活, 减少 TLR4 ($P < 0.01$)、MYD88 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)、P65 ($P < 0.01$)、INOS ($P < 0.05$)、COX-2 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)、IL-1 β ($P < 0.001$) 蛋白的表达。优选的米汤制天麻工艺操作简便, 稳定可行; 天麻炮制品可能通过抑制 TLR4/MYD88/NF- κ B 信号通路, 而降低炎症因子的表达。

关键词: 天麻, 米汤制, 正交试验法, 神经炎症

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)16-0358-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023090066

本文网刊:



Optimization of the Processing with Decoction of Millet Technology of *Gastrodia elata* and Its Anti-inflammatory Efficacy

DONG Xin^{1,2}, SUI Xintong^{1,2}, HU Liming¹, WANG Renguang¹, LI Zhanguo², WANG Jinglong²,
WANG Shumin^{1,*}, LIANG Lei^{2,3}

(1. College of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jilin Zhongke Bio-engineering Co., Ltd., Changchun 131508, China;

3. Jilin Prochance Biomedical Co., Ltd., Changchun 131508, China)

Abstract: To optimize the processing technology of *Gastrodia elata* by water in which millet had been cooked and investigate the effects of LPS-induced microglia (BV2) inflammatory responses. Determination of gastrodin, p-hydroxybenzyl alcohol, parishin A, parishin B, parishin C, parishin E in the extract of *Gastrodia elata* by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the content of six components were used as evaluation index, the volume ratio of water

收稿日期: 2023-09-11

基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (20210204198YY)。

作者简介: 董欣 (1985-), 女, 博士, 研究方向: 中药炮制关键技术及科学内涵, E-mail: dongxin85@163.com。

* 通信作者: 王淑敏 (1965-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药炮制、中药分析、药用微生物物质基础与药理学, E-mail: wangsm@ccucm.edu.cn。

in which millet had been cooked to water, cooking time and drying temperature were selected as single factor variables. The designation of orthogonal test was based on single factor on three indicators, then optimization of the preparation technology. Comparison of the content of six components in different processed product. The neuroinflammatory cell model was induced by LPS and the cell viability was evaluated after treatment with the extract of processed products by a Cell Counting kit 8 (CCK-8) assay. The levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β in the cell culture medium were measured with ELISA kits. The protein expressions of TLR4, MYD88, P65, INOS, COX-2, IL-1 β in LPS-induced BV2 cells were detected by Western blot. The results showed that the cooking time and the volume ratio of water in which millet had been cooked to water had a significant effect on the test results. The water in which millet had been cooked of *Gastrodia elata* processing technology: The ratio of the volume water in which millet had been cooked to water was 1:3, the boiling time was 25 min and the temperature of drying was 75 °C. The comprehensive score of the six components in processing with water in which millet had been cooked products was higher than that of steamed products. The extract of *Gastrodia elata* had exhibited varying degrees of protective activity on LPS-induced BV2 cells. The results showed that the secretion of TNF- α , IL-6, IL-1 β was significantly increased in BV2 microglial cells induced by LPS compared with the normal control group ($P<0.001$). Compared with the LPS group, the two extract of *Gastrodia elata* significantly decreased the expression level of TNF- α ($P<0.05$), IL-6 ($P<0.05$, $P<0.001$), IL-1 β ($P<0.05$, $P<0.001$) in LPS-induced BV2 microglial cells. The result of Western blot showed that PZH significantly inhibited the LPS-induced TLR4/MYD88/NF- κ B signaling pathway activation, and decreased the protein expressions of TLR4 ($P<0.01$), MYD88 ($P<0.01$, $P<0.05$), P65 ($P<0.01$), INOS ($P<0.05$), COX-2 ($P<0.05$, $P<0.001$), IL-1 β ($P<0.001$). The optimized processing technique is simple, stable and feasible. The mechanism of processed drugs of *Gastrodia elata* may reduce inflammatory factor expression by inhibiting the TLR4/MYD88/NF- κ B signaling pathway.

Key words: *Gastrodia elata*; processed with millet soup; orthogonal design method; neuroinflammation

天麻为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎,为我国临床常用中药材^[1],自 2019 年起天麻成为“药食同源”品种,具有药用、保健和食用三重价值^[2]。天麻含有较多成分,多采用加热的方法来保护苷类的含量,如煮制、蒸制、酒制、姜制、蜜制等^[3],不同方法炮制后各种化学成分含量也会有变化^[4-5]。天麻提取物或活性成分具抗炎、抗氧化^[6-7]、抗癫痫、改善调整记忆^[8-9]和神经保护等作用^[10-11]。

神经炎症的发生是导致神经退行性病进展的主要机制之一,如帕金森、阿尔茨海默病等。神经炎症的发生与小胶质活化密切相关,进而增加促炎因子的释放,导致神经元细胞阶段性死亡^[12-13]。天麻中主要活性成分天麻素可抑制 Toll 样受体-4(Toll-like receptor4, TLR-4)的表达,降低了脓毒症急性肺损伤小鼠模型全身和肺脏中的炎症因子,并能够减轻肺脏的损伤^[14],可改善神经炎症诱导的大鼠认知功能障碍^[15],也可通过调节肠道微生物群组成和减轻神经元兴奋来改善 AD 小鼠模型的记忆^[16],改善小鼠的抑郁和焦虑样行为^[17-19],也可减轻 LPS 诱导的小鼠神经炎症和抑郁-焦虑样行为^[20],还可以改善衰老的小胶质细胞,增加细胞活力以减少炎症因子的释放^[21],抑制 NF- κ B 信号通路的激活^[22],调节 TLR4/TRAF6/NF-kappaB 通路,减少小胶质细胞活化^[23],发挥抗神经炎症作用;从中药天麻中分离的联苯化合物 20C 通过 MAPKs 和 TLR4/AKT/mTOR 信号通路调节 LPS 激活的小胶质细胞的自噬,可显著抑制 TLR4 的表达水平^[24]。天麻炮制品提取物是否能抑制 BV2 小胶质细胞激活后的神经炎症反应以及潜在的分子作用机制还需要进一步研究。

米汤制天麻为吉林省道地药材长白山乌杆天麻的独特炮制方法,已成为吉林省天麻炮制特色,如何使特色工艺方法规范化,可控化,充分发挥其食药价值,尚有待解决。因此,本研究采用正交试验法,优化米汤制天麻的制备工艺,结合高效液相色谱法检测其提取物中天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 的含量,并与药典中收录的炮制方法蒸制天麻进行含量比较。以脂多糖诱导小胶质细胞(BV2)建立神经炎症细胞模型,考察米汤制天麻、蒸制天麻提取物是否抑制神经炎症细胞的炎性反应,并进一步探讨其作用机制,以期为天麻的炮制加工生产提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

天麻药材 购自吉林省白山市,经王淑敏教授鉴定为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Bl.)的干燥块茎(批号 20220926);小鼠小胶质细胞(BV2) 购自中国科学院上海细胞研究所;对羟基苯甲醇 中国食品药品检定研究院;天麻素、巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E 上海源叶生物科技有限公司;脂多糖 Sigma 公司;DMEM/F12 Grand Island Biological 公司;胎牛血清 Viva Cell 公司;TLR4、 β -Actin、MYD88、COX-2、NF- κ B p65、m-IgG κ BP-HRP Santa-Cruz 公司;INOS Abcam 公司;封闭液 碧云天公司;TNF- α 、IL-6、IL-1 β 南京建成生物工程研究所;乙腈、甲醇 美国 Fisher 公司;乙醇 北京化工厂有限责任公司;水为超纯水。

LC-20AT 高效液相色谱仪 DAD 检测器 岛津(中国)有限公司;XSelect HSS T3 色谱柱(4.6 mm \times

250 mm, 5 μm) 美国 Waters 公司; 电子分析天平 (十万分之一) 瑞士 Mettler Toledo 公司; Chemi-Scope 5300 化学发光成像系统 上海勤翔科学仪器; 3111 细胞培养箱、1300 生物安全柜、X1 离心机、1510 酶标仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

1.2.1.1 米汤的制备 根据文献 [25] 报道及药农经验, 采用小米与水的质量比为 1:3, 煮制, 水沸计时 3 min (米无白心), 关火, 纱布过滤, 米汤备用。

1.2.1.2 米汤炮制天麻的制备 取同一批次大小相近的新鲜天麻清洗干净 (30 \pm 5) g, 备用。使用米汤水溶液煮制鲜天麻干燥后备用。

1.2.1.3 蒸制天麻的制备 取同一批次大小相近的新鲜天麻清洗干净 (30 \pm 5) g, 蒸软 (30 min), 切薄片, 干燥^[1]。

1.2.2 供试品溶液的制备 取炮制品粉末 (过 40 目筛), 精密称取 2.0 g, 参照《中国药典》2020 版天麻项下供试品溶液的制备方法制备^[1]。

1.2.3 对照品溶液的制备 精密称取巴利森苷 E、天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 C、巴利森苷 B、巴利森苷 A 对照品适量, 3% 乙腈水溶液溶解, 并制成质量浓度依次为 3.2100、3.2301、3.2422、3.2802、3.2908、3.3240 mg/mL 的贮备液。取适量, 稀释后至每 1 mL 中分别含 0.8025、0.1615、0.1621、0.1640、0.1645、0.1662 mg/mL 的溶液, 即得。

1.2.4 色谱条件 采用 Waters XSelect HSS T3 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 以乙腈 (A)/0.1% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 具体程序详见表 1, 检测波长 220 nm, 流速 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution programs

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.01~5	1~1	99~99
5~8	1~5	99~95
8~13	5~5	95~95
13~28	5~12	95~88
28~30	12~12	88~88
30~35	12~17.5	88~82.5
35~50	17.5~17.5	82.5~82.5

1.2.5 单因素实验

1.2.5.1 米汤与水体积比 取大小相近的新鲜天麻清洗干净 (30 \pm 5) g, 米汤与水混合液煮制, 沸腾后计时 20 min, 干燥温度设定为 70 $^{\circ}\text{C}$, 设定米汤与水体积比为 1:1、1:3、1:6、1:9、1:12。以 6 种成分含量综合评分高低来确定米汤与水体积比。

1.2.5.2 煮制时间 取大小相近的新鲜天麻清洗干净 (30 \pm 5) g, 米汤与水体积为 1:3, 混合后煮制天

麻, 沸腾后计时, 设定煮制时间为 10、15、20、25、30 min, 干燥温度设定为 70 $^{\circ}\text{C}$ 。以 6 种成分含量综合评分高低来确定煮制时间。

1.2.5.3 干燥温度 取大小相近的新鲜天麻清洗干净 (30 \pm 5) g, 米汤与水体积为 1:3, 混合后煮制天麻, 沸腾后计时, 煮制时间为 20 min, 设定干燥温度为 60、65、70、75、80 $^{\circ}\text{C}$ 。以 6 种成分含量综合评分高低来确定干燥温度。

1.2.6 正交试验设计 根据单因素结果, 以米汤与水体积比 (A)、煮制时间 (B)、干燥温度 (C) 为考察因素, 以天麻素等六种成分含量的综合评分为评价指标, 将指标性成分天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的含量作为权重指标赋值, 天麻素和对羟基苯甲醇含量分别赋值 0.1, 巴利森苷 A 含量赋值 0.35, 巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C 的含量分别赋值 0.15。因此, 综合评分 = (天麻素含量/天麻素含量最大值 \times 0.1 + 对羟基苯甲醇含量/对羟基苯甲醇含量最大值 \times 0.1 + 巴利森苷 E 含量/巴利森苷 E 含量最大值 \times 0.15 + 巴利森苷 B 含量/巴利森苷 B 含量最大值 \times 0.15 + 巴利森苷 C 含量/巴利森苷 C 含量最大值 \times 0.15 + 巴利森苷 A 含量/巴利森苷 A 含量最大值 \times 0.35) \times 100%。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法^[26] 进行工艺优化, 正交试验设计具体见表 2。

表 2 正交试验的因素及水平
Table 2 Factors and level selection of orthogonal test

因素	水平		
	1	2	3
A: 米汤与水体积比例	1:1	1:3	1:6
B: 煮制时间 (min)	15	20	25
C: 干燥温度 ($^{\circ}\text{C}$)	65	70	75

1.2.7 炮制工艺验证及比较 取 3 份天麻鲜品, 应用 1.2.6 项下最佳工艺制备米汤制炮制品, 按照“供试品溶液制备方法”制备样品, 并按“色谱条件”进样检测, 与蒸制天麻中各成分含量进行比较。

1.2.8 体外抗炎作用考察

1.2.8.1 BV2 细胞培养 应用 DEME/F12 完全培养基 (含有 10% FBS) 培养, 5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养。

1.2.8.2 CCK-8 法检测各药物对细胞活性率的影响 将 BV2 细胞配制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板中培养 (100 μL /孔), 贴壁后弃去培养基, 并更换含有不同质量浓度的天麻提取物、LPS 的培养基, 作用细胞 24 h, 10 μL /孔 CCK-8 试剂, 培养条件下孵育 1 h, 在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD) 值。细胞活力 (%) = (OD 给药组/OD 空白组) \times 100。

1.2.8.3 试验分组 细胞试验分为正常对照组 (DEME/F12 培养基); LPS 组 (含有 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 DEME/F12 培养基); 天麻提取物组 (含有 250 $\mu\text{g/mL}$ 蒸制天

麻制品提取物、250 μg/mL 米汤制天麻品提取物的 DEME/F12 培养基, 给药 4 h 后添加 LPS), 各组均培养 24 h。

1.2.8.4 Western blot 法检测炎症相关蛋白表达 制备细胞悬液接种于 6 孔板中过夜培养, 1.5×10^5 个/mL, 2 mL/孔, 参照 1.2.8.3 项下分组、培养 24 h。从培养箱中取出孔板置于冰上, 收集培养上清液(检测因子待用), 80 μL/孔蛋白裂解液, 作用细胞 30 min, 然后离心 15 min(预先设置 4 ℃, 12000 r/min), 取上清, 检测蛋白含量, 将蛋白置于沸水浴中变性处理。10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转于 PVDF 膜上, 封闭 2 h, 分别使用 TLR4、MYD88、P65、INOS、COX-2、IL-1β、β-Actin 的抗体(1:800)于 4 ℃ 孵育过夜, TBST 清洗后加入二抗(1:2000)室温孵育, 再次清洗, 然后化学发光法显影。通过 Image J1.8 软件可以对所得的各图像灰度值进行解析, 并以目的蛋白质灰度值和内参蛋白(β-Actin)灰度值的比较, 作为该蛋白质的表达水平值。

1.2.8.5 上清培养液中炎症因子水平的测定 将 1.2.8.4 项下收集的培养上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 检测天麻蒸制品和米汤制品提取物对 LPS 诱导的 BV2 的 TNF-α、IL-6、IL-1β 释放的影响。

1.3 数据处理

采用 GraphpadPrism 5.0 和 Excel WPS 对数据进行分析处理, 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 为差异显著, 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 方法学考察

2.1.1 标准曲线的绘制 精密吸取“1.2.3”中对照品适量, 以甲醇为溶剂, 制成不同质量浓度的对照品溶液, 在“1.2.4”项色谱条件进样检测, 每个质量浓度进样 3 次, 10 μL/次。以质量浓度($X, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行回归。六种成分在其各自范围内线性关系良好, 色谱峰分离良好, 无其他杂质干扰, 见图 1, 具体结果见表 3。

2.1.2 精密度试验 精密吸取“1.2.3”中对照品溶液 10 μL, 按“1.2.4”色谱条件连续进样 6 次。天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的 RSD 值分别为 0.29%、1.11%、0.26%、0.21%、0.26%、0.68%, 结果表明仪器精密度良好。

2.1.3 稳定性试验 取一份药材粉末按“1.2.2”方法制备供试品溶液, 室温条件下放置 0、2、4、8、12、24 h 后, 分别进样 10 μL 测定。天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 E、B、C、A 的 RSD 值分别为 0.56%、0.75%、0.47%、0.45%、0.30%、0.15%, 结果表明该方法制备的供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.4 重复性试验 取 6 份同一样品, 按“1.2.2”方法制备供试品溶液, 按“1.2.4”色谱条件进样测定。

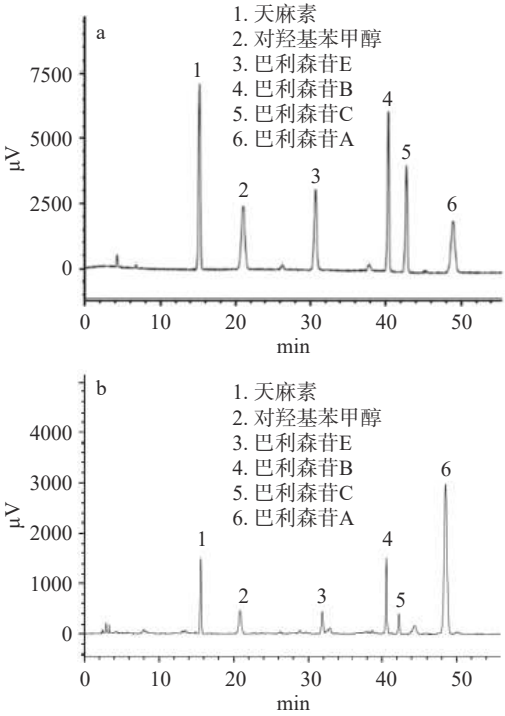


图 1 混合标准品、样品的色谱图
Fig.1 Chromatograms of standard mixture and samples
注: a: 混合标准品; b: 样品。

表 3 各成分线性关系
Table 3 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
天麻素	$Y=13722.2X+12648.0$	0.9991	10.72~161.83
对羟基苯甲醇	$Y=26715.7X+26233.1$	0.9992	10.79~161.75
巴利森苷E	$Y=13273.2X+59802.9$	0.9994	10.90~161.82
巴利森苷B	$Y=14018.4X+6502.89$	0.9991	10.99~162.00
巴利森苷C	$Y=3671.74X+5933.08$	0.9991	10.09~162.33
巴利森苷A	$Y=11545.7X+9961.51$	0.9993	54.53~806.91

测得天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 E、B、C、A 的色谱峰面积, 得 RSD 值分别为 0.68%、1.83%、0.41%、0.44%、0.84%、0.32%, 结果表明该制备方法重复性良好。

2.1.5 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的本品内容物粉末 6 份, 精密加入对照品溶液, 按“1.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“1.2.4”项色谱条件下进样。天麻素、对羟基苯甲醇、巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 A 的平均加样回收率分别为 100.30%、96.62%、96.73%、98.93%、101.59%、96.31%, RSD 值分别为 1.44%、1.07%、1.41%、1.04%、1.21%、1.30%, 表明此方法准确可行, 结果见表 4。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 米汤与水体积比 天麻素等 6 种成分含量的综合评分结果见图 2a, 由图 2a 可知, 当二者体积比为 1:3 时, 6 种成分含量的综合评分最高, 故米汤与水的体积比选择 1:3 为单因素最适条件, 并选用

表 4 各成分加样回收率试验结果
Table 4 Results of recovery tests for various constituents

成分	样品含有量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
天麻素	2.013	2.021	4.009	98.76	100.30	1.44
	2.027	2.021	4.078	101.49		
	2.005	2.021	4.077	102.52		
	1.997	2.021	4.000	99.11		
	2.014	2.021	4.032	99.85		
	2.011	2.021	4.033	100.05		
对羟基苯甲醇	0.7510	0.7552	1.5086	100.31	99.62	1.07
	0.7634	0.7552	1.5091	98.73		
	0.7613	0.7552	1.5101	99.15		
	0.7562	0.7552	1.5129	100.19		
	0.7648	0.7552	1.5070	98.29		
	0.7597	0.7552	1.5229	101.05		
巴利森苷E	1.2037	1.1875	2.3294	94.80	96.73	1.41
	1.2293	1.1875	2.3757	96.54		
	1.2164	1.1875	2.3831	98.25		
	1.1958	1.1875	2.3622	98.22		
	1.2025	1.1875	2.3394	95.74		
	1.2167	1.1875	2.3663	96.80		
巴利森苷B	1.2642	1.2813	2.5426	99.78	98.93	1.04
	1.3247	1.2813	2.5760	97.66		
	1.2882	1.2813	2.5652	99.67		
	1.2591	1.2813	2.5397	99.95		
	1.2713	1.2813	2.5242	97.78		
	1.2891	1.2813	2.5543	98.74		
巴利森苷C	0.9454	0.9375	1.8833	100.04	101.59	1.21
	0.9669	0.9375	1.9237	102.06		
	0.9578	0.9375	1.9248	103.15		
	0.9650	0.9375	1.9091	100.71		
	0.9667	0.9375	1.9123	100.86		
	0.9611	0.9375	1.9239	102.70		
巴利森苷A	1.3079	1.3125	2.5650	95.78	96.31	1.30
	1.3123	1.3125	2.6004	98.14		
	1.3424	1.3125	2.5865	94.79		
	1.3457	1.3125	2.5987	95.46		
	1.3528	1.3125	2.6314	97.42		
	1.3687	1.3125	2.6323	96.27		

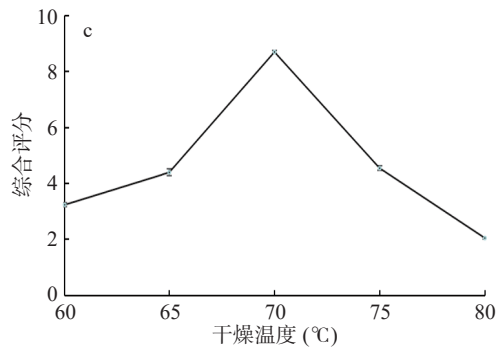
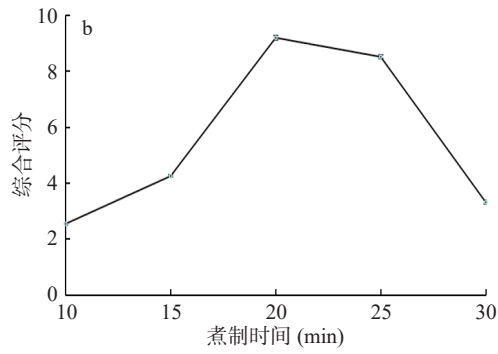
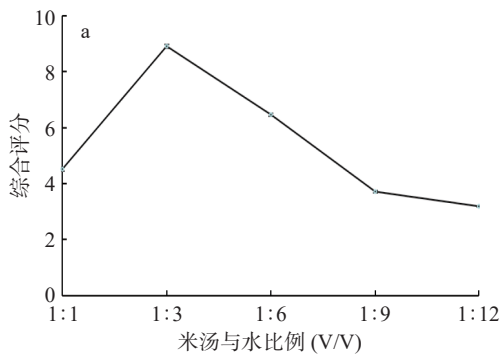


图 2 各种因素对米汤制天麻品中 6 种成分含量的影响
Fig.2 Effects of each factor on the content of 6 components in processing with water in which millet has been cooked drugs of *Gastrodia elata*

1:1、1:3、1:6 三个水平进行后续的正交试验。

2.2.2 煮制时间 天麻素等 6 种成分含量的综合评分结果见图 2b,由图 2b 可知,当煮制时间为 20 min 时,6 种成分含量的综合评分最高,故选择煮制时间 20 min 为单因素最适条件,并选用 15、20、25 min 三个水平进行后续的正交试验。

2.2.3 干燥温度 天麻素等 6 种成分含量的综合评分结果见图 2c,由图 2c 可知,当干燥温度为 70 °C 时,6 种成分含量的综合评分最高,故选择干燥温度 70 °C 为单因素最适条件,并选用 65、70、75 °C 三个水平进行后续的正交试验。

2.3 正交试验结果

按照 $L_9(3^4)$ 正交试验法进行实验对 9 份样本进行含量测定,结果见表 5 和表 6。

根据表 5 直观分析中极差 R 值比较可知,3 个因素对天麻素等 6 个成分的含量的影响大小为煮制时间(B)>米汤与水体积比(A)>干燥温度(C),对于因素 A: $k_2 > k_1 > k_3$,对于因素 B: $k_3 > k_2 > k_1$,因素 C: $k_3 > k_2 > k_1$ 。从表 6 方差分析结果可知,米汤与水体积比、煮制时间两个因素对试验结果有显著影响,干燥温度对试验结果影响不明显。因此,米汤制天麻的最佳炮制工艺条件为 $A_2B_3C_3$,即取米汤与水体积比为 1:3,煮制 25 min,75 °C 烘干,即得。

2.4 最佳工艺验证结果及比较

经最佳工艺制备的 3 批天麻炮制品,各成分含量结果见表 7,生品和炮制品外观见图 3。米汤制天麻色泽呈黄棕色,3 批验证试验综合评分均值为

表 5 正交试验设计和结果
Table 5 Design and results of orthogonal test

实验号	因素				天麻素 (mg·g ⁻¹)	对羟基苯甲醇 (mg·g ⁻¹)	巴利森苷E (mg·g ⁻¹)	巴利森苷B (mg·g ⁻¹)	巴利森苷C (mg·g ⁻¹)	巴利森苷A (mg·g ⁻¹)	综合评分 (%)
	A	B	C	D(空列)							
1	1	1	1	1	3.107	1.331	3.185	3.864	3.120	7.473	65.73
2	1	2	2	2	2.566	1.343	3.247	3.917	3.176	7.490	80.69
3	1	3	3	3	3.372	1.787	7.534	4.646	3.640	6.227	84.87
4	2	1	2	3	2.087	1.829	4.715	3.112	2.869	6.452	75.46
5	2	2	3	1	2.571	1.322	3.297	3.952	3.231	7.446	79.16
6	2	3	1	2	3.611	2.372	4.745	5.193	4.605	8.060	95.15
7	3	1	3	2	2.504	2.024	5.010	3.618	3.321	6.937	69.90
8	3	2	1	3	2.655	0.811	4.867	4.337	2.989	7.073	66.09
9	3	3	2	1	3.296	1.696	7.707	4.602	3.517	6.090	73.69
k ₁	77.10	70.36	75.66	72.86							
k ₂	83.26	75.31	76.61	81.91							
k ₃	69.89	84.57	77.98	75.47							
R	13.36	14.21	2.32	9.053							

表 6 方差分析结果
Table 6 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	P
A米汤与水比例	268.412	2	32.910	19.000	<0.05
B煮制时间	312.018	2	38.256	19.000	<0.05
C干燥温度	8.156	2	1.000	19.000	>0.05
误差	8.160	2			

表 7 最佳工艺验证结果
Table 7 Verification testing results

评价指标	天麻素(mg·g ⁻¹)	对羟基苯甲醇(mg·g ⁻¹)	巴利森苷E(mg·g ⁻¹)	巴利森苷B(mg·g ⁻¹)	巴利森苷C(mg·g ⁻¹)	巴利森苷A(mg·g ⁻¹)	综合评分(%)
含量	3.713±0.021	2.367±0.016	4.651±0.020	5.038±0.063	4.521±0.022	8.226±0.051	99.227±0.155



图 3 天麻的生品(a)、蒸制品(b)、米汤制品(c)图
Fig.3 Figure of raw drugs (a) steamed drugs (b) and processing with water in which millet has been cooked drugs (c) of *Gastrodia elata*

99.227%, RSD 为 0.190%, 验证工艺的综合评分高于正交试验中的任何工艺综合评分,表明该制备工艺可行。

天麻蒸制炮制品中除巴利森苷 E,其他 5 种成分含量均低于米汤制品,对蒸制品和米汤制品中的 6 种成分进行综合评价,炮制品的综合评分为 99.227%,而蒸制品的综合评分为 46.306%,天麻经米汤水煮制后各成分含量呈升高趋势,具体见表 8,初步说明该炮制工艺下制得的炮制品在各成分含量优于药典炮制方法。

表 8 不同炮制品的含量测定
Table 8 Determination of different processed products

评价指标	天麻素(mg·g ⁻¹)	对羟基苯甲醇(mg·g ⁻¹)	巴利森苷E(mg·g ⁻¹)	巴利森苷B(mg·g ⁻¹)	巴利森苷C(mg·g ⁻¹)	巴利森苷A(mg·g ⁻¹)	综合评分(%)
米汤制品	3.713±0.021	2.367±0.016	4.651±0.020	5.038±0.063	4.521±0.022	8.226±0.051	99.227±0.155
蒸制品	1.805±0.110	0.432±0.086	5.535±0.033	2.071±0.065	1.563±0.023	2.529±0.048	46.306±0.45

2.5 体外抗炎作用结果

2.5.1 各药物对细胞活力的影响 采用 CCK-8 法筛选各药物对 BV2 细胞的作用浓度。结果显示 LPS 在 1~20 μg/mL 的浓度下,均可显著降低细胞活力 ($P<0.001$),因此选取 1 μg/mL 为 LPS 的后续实验浓度,诱导 BV2 细胞建立炎症细胞模型,结果见图 4a;天麻蒸制和米汤制品提取物均在作用浓度为 20~50 μg/mL 的条件下影响细胞活力,并呈降低趋势,具有显著性 ($P<0.05$),说明两种天麻炮制品提取物在质量浓度为 2.5~10 μg/mL,对细胞不具有毒性,因此选取 10 μg/mL 用于后续实验,具体见图 4b、图 4c。

2.5.2 TLR4/MYD88/NF-κB 信号通路相关蛋白的表达 TLR4 蛋白是脂多糖的受体,位于细胞膜上,在神经炎症中行使重要功能^[27],当与脂多糖结合后,通过 MYD88 触发信号传导级联反应,导致 NF-κB 发生活化,调控其他炎症因子合成,诱导 COX-2 蛋

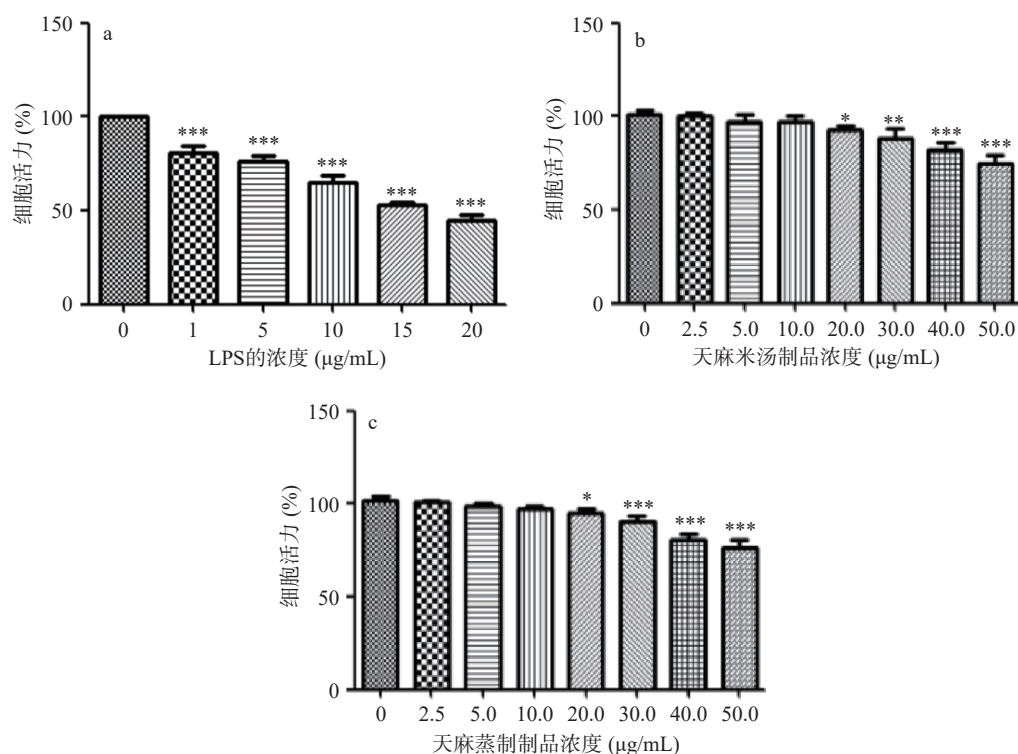


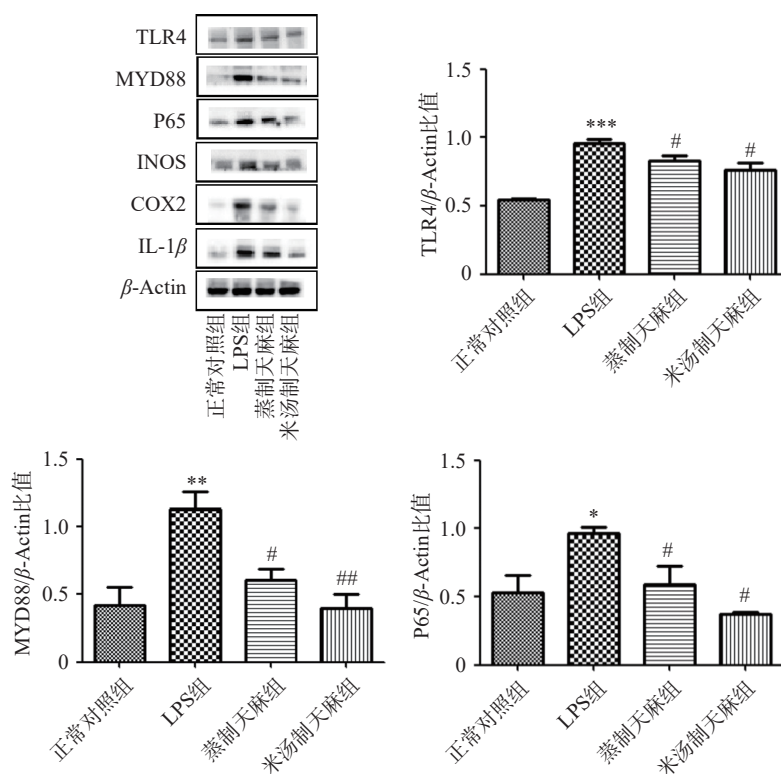
图4 LPS(a)、米汤制品(b)、蒸制品(c)对 BV2 细胞活力的影响

Fig.4 Effects of LPS (a), water in which millet has been cooked processed drugs (b), and steamed processed drugs (c) on BV2 cell viability

注: 与空白组比较, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 。

白^[28-29]。因此, 本实验中选取 LPS 诱导小胶质细胞, 结果显示, 与正常组比, LPS 组的 TLR4、IL-1 β 、COX2 表达明显增加($P<0.001$), MYD88、INOS 表达增加($P<0.01$), P65 表达也增加($P<0.05$); 与模型组比, 蒸制天麻组和米汤制天麻组均能降低 TLR4 ($P<0.05$)、MyD88($P<0.05$, $P<0.01$)、INOS($P<0.01$)、

IL-1 β ($P<0.001$)、COX2($P<0.01$, $P<0.001$)、P65($P<0.05$)的表达, 具有显著性; 其中炎症因子 IL-1 β 、COX2, 给药组间比较具有显著性($P<0.01$), 表明天麻炮制品提取物对脂多糖诱导的 BV2 细胞的炎症损伤有抑制作用。TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路在炎症反应中发挥重要作用^[30-31], 研究显示天麻素可改



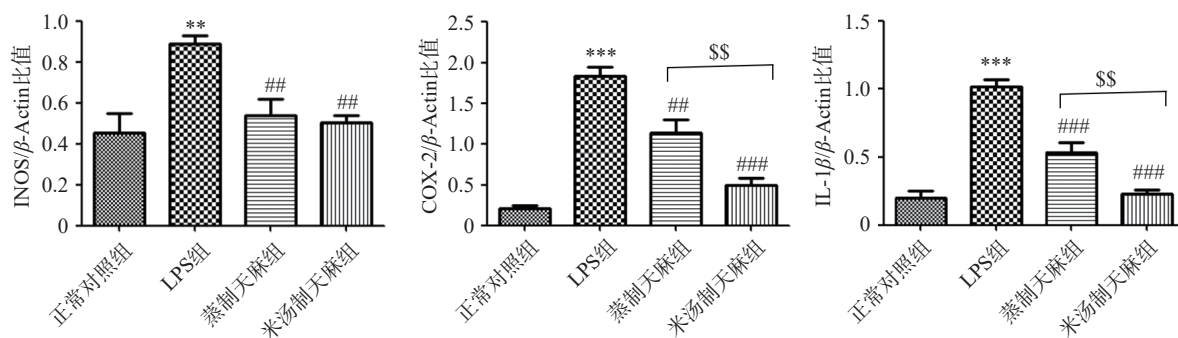


图 5 天麻炮制品提取物对 LPS 诱导 BV2 细胞 TLR4、MYD88、P65、INOS、COX2、IL-1 β 、蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of extract of *Gastrodia elata* processed drugs on LPS-induced expression of TLR4, MYD88, P65, INOS, COX2, IL-1 β , proteins in BV2 cells

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$; 给药组间比较, \$\$ $P < 0.01$; 图 7 同。

善 BV2 细胞衰老染色和衰老蛋白表达^[21], 可通过调控 NF- κ B/NLRP3 信号通路抑制 BV2 细胞的炎症损伤^[32]; 而酚性成分组合物(含对羟基苯甲醛、对羟基苯甲醇、4-甲氧基苄醇、3,4-二羟基苯甲醛)也可明显抑制 BV2 细胞炎症反应, 并能促进促炎表型的 M1 型小胶质细胞转化为抗炎表型的 M2 型小胶质细胞^[33]。本实验中所用的天麻炮制品提取物含有天麻素、对羟基苯甲醇等成分, 且米汤制品提取物对炎症因子的抑制优于蒸制品提取物, 具体见图 5, 抗炎作用机制见图 6 所示。

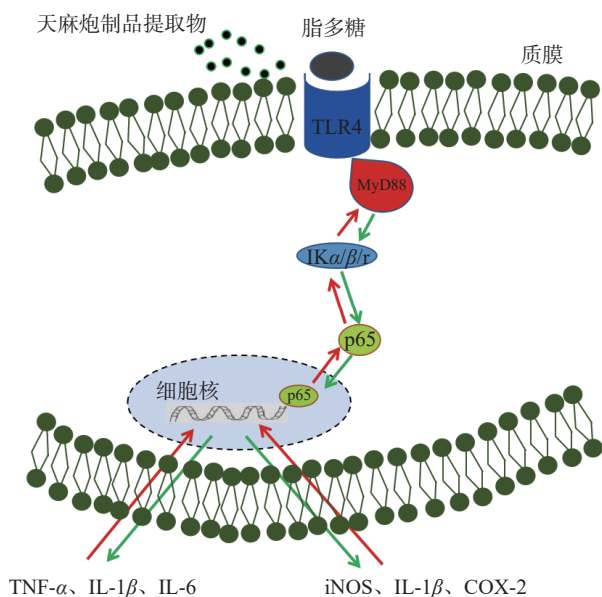


图 6 天麻炮制品通过 TLR4-MyD88-NF- κ B 通路抑制脂多糖诱导 BV2 细胞的神经炎症

Fig.6 Anti-neuroinflammatory effects of *Gastrodia elata* processed drugs involving TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathways in LPS-stimulated BV2 cells

注: 绿色箭头表示信号通路的方向, 红色箭头表示天麻炮制品提取物对该通路的抑制作用。

2.5.3 上清培养液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平 研究表明, 小胶质细胞被过度激活会合成并释放大量的 NO、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子, 促使神经元细胞损伤或死亡^[34], 可通过下调 TNF- α 、IL-6、

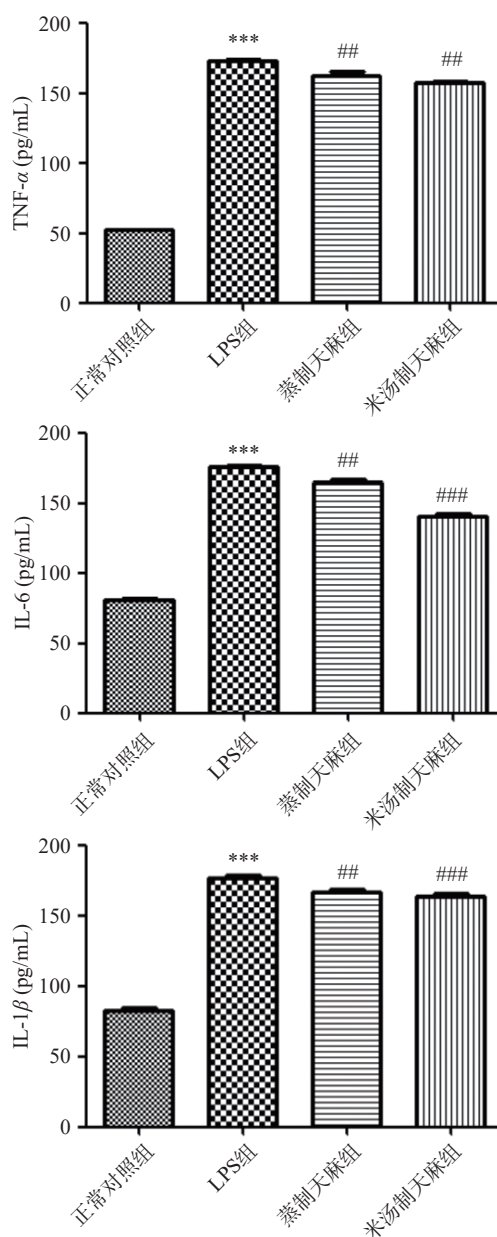


图 7 天麻炮制品提取物对 LPS 诱导 BV2 细胞炎症因子的影响

Fig.7 Effect of extract of *Gastrodia elata* processed drugs on inflammatory cytokines induced by LPS in BV2 cells

IL-1 β 的水平来抑制神经炎症^[35]。本实验中,小胶质细胞经 LPS 诱导后,刺激其分泌炎症因子,与空白组比较,模型组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 释放增多($P<0.001$);与模型组比较,蒸制天麻组和米汤制天麻组的 TNF- α ($P<0.01$)、IL-6($P<0.01$, $P<0.001$)、IL-1 β ($P<0.01$, $P<0.001$)释放减少,说明蒸制和米汤制制品提取物均可抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放,结果见图 7。

3 结论

本研究在流动相使用方面,分别采用甲醇-0.05% 磷酸水溶液、乙腈-0.1% 磷酸水溶液、乙腈-水 3 个流动相进行考察,发现乙腈-0.1% 磷酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱,在检测波长为 220 nm 的条件下,6 个成分的色谱峰分离度较好,可实现完全分离。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验法显示使用小米汤与水比为 1:3,煮制 25 min,干燥温度为 75 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳工艺,该制备工艺稳定,并且实操简便,便于推广使用。天麻生品气味特殊,有“马尿味”,不易让人接受。天麻蒸制干燥后呈灰白色,而经米汤水煮制干燥后得炮制品则呈黄棕色,色泽鲜亮通透。将米汤制品粉碎,取微粉用开水冲泡后,呈糊状,口感略微苦,回甘,易于食用,并且微粉也有神经保护作用,并且粒径越小药效越好。米汤制品与蒸制制品比较,除巴利森苷 E 其他 5 种成分含量均高 2~5 倍不等,综合评分也高于蒸制制品,初步说明米汤制天麻较药典中的炮制方法,不仅主要活性成分含量高,而且外观色泽佳,提高米汤制天麻的市场竞争力。本研究中, BV2 细胞在预先加入天麻蒸制品和米汤制品的提取物后,可抵御 LPS 的诱导伤害,在蛋白水平上显著减弱了 TLR4、MyD88、P65、INOS、IL-1 β 、COX2 的表达,并抑制细胞上清液中 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等炎症因子的分泌。说明天麻蒸制和米汤制炮制品的提取物对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症有一定保护作用,其作用机制可能是通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κB 信号通路的激活,减少细胞炎性介质 COX-2、INOS、炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的释放,从而减轻 LPS 对细胞的损伤。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 59-60. [State Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 59-60.]

[2] 单锋, 周良云, 蒋长顺, 等. 天麻的食用历史及发展建议[J]. 中国食品药品监管, 2021, 3: 110-115. [SHAN F, ZHOU L Y, JIANG C S, et al. Food history and development suggestions of *Gastrodia elata*[J]. China Food & Drug Administration Magazine, 2021, 3: 110-115.]

[3] 周娜, 王进, 王蕾, 等. 金寨天麻蒸制、干燥工艺的优化[J]. 中成药, 2021, 43(7): 1858-1862. [ZHOU N, WANG J, WANG L, et al. Optimization of steaming and drying process of *Gastrodia elata* in Jinzhai[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(7): 1858-1862.]

[4] 张玮玮, 郑司浩, 王永辉, 等. 不同干燥和炮制方法对天麻品质的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(4): 1278-1284. [ZHANG W W, ZHENG S H, WANG Y H, et al. Study on the quality of *gastrodiae* rhizoma under different drying and processing methods[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Materia-World Science and Technology, 2020, 22(4): 1278-1284.]

[5] 左雅敏, 张煜, 王燕, 等. 不同炮制方法对天麻 6 个成分含量的影响与评价术[J]. 贵州科学, 2018, 36(4): 83-88. [ZUO Y M, ZHANG Y, WANG Y, et al. Effects of different processing methods on the content of six components in *Gastrodia elata*[J]. Guizhou Science, 2018, 36(4): 83-88.]

[6] PENG Z W, WANG S Q, CHEN G J, et al. Gastrodin alleviates cerebral ischemic damage in mice by improving anti-oxidant and anti-inflammation activities and inhibiting apoptosis pathway[J]. Neurochemical Research, 2015, 40(4): 661-673.

[7] TAN W J, ZHENG Q H, FENG K X, et al. Neuroprotection of *Gastrodia elata* polyphenols against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress[J]. Front in Pharmacology, 2022, 13: 1050775.

[8] YANG L, TSAI T H. Neuroprotective effect and herbal-drug pharmacokinetic interaction of *Gastrodia elata* extract on valproic acid[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2022, 156: 113938.

[9] HUANG Hong, JIANG Ning, ZHANG Yiwen, et al. *Gastrodia elata* blume ameliorates circadian rhythm disorder-induced mice memory impairment[J]. Life Sci Space Res, 2021, 31: 51-58.

[10] LIU Y, GAO J I, PENG M, et al. A review on central Nervous system effects of gastrodin[J]. Front in Pharmacology, 2018, 9(24): 1-18.

[11] YANG F, LI G Z, LIN B, et al. Gastrodin suppresses pyroptosis and exerts neuroprotective effect in traumatic brain injury model by inhibiting NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. Journal of Integrative Neuroscience, 2022, 21(2): 072-077.

[12] AN J, CHEN B, KANG X, et al. Neuroprotective effects of natural compounds on LPS-induced inflammatory responses in microglia[J]. American Journal of Translational Research, 2020, 12(6): 2353-2378.

[13] YAO Y Y, LING E A, LU D I. Microglia mediated neuroinflammation-signaling regulation and therapeutic considerations with special reference to some natural compounds[J]. Histology and Histopathology, 2020, 35(11): 1229-1250.

[14] 俞江灏, 周金山, 蒋晓宁, 等. 天麻素通过抑制 TLR4/ASK1 信号减轻脓毒症小鼠的肺脏炎症[J]. 中成药, 2021, 43(9): 2520-2524. [YU J H, ZHOU J S, JIANG X N, et al. Gastrodin attenuated lung inflammation in septic mice by inhibiting TLR4/ASK1 signaling[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2021, 43(9): 2520-2524.]

[15] ZHENG X, GONG T W, TANG C C, et al. Gastrodin improves neuroinflammation-induced cognitive dysfunction in rats by regulating NLRP3 inflammasome[J]. BMC Anesthesiology, 2022, 22(1): 371.

[16] FASINA O B, WANG J, MO J, et al. Gastrodin from *Gastrodia elata* enhances cognitive function and neuroprotection of AD mice via the regulation of gut microbiota composition and inhibition

- of neuron inflammation[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 814271.
- [17] HUANG Y J, CHOONG L C, PANYOD S, et al. *Gastrodia elata* Blume water extract modulates neurotransmitters and alters the gut microbiota in a mild social defeat stress-induced depression mouse model[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 5133–5142.
- [18] GAO M, WU Y, YANG L, et al. Anti-depressant-like effect of fermented *Gastrodia elata* Bl. by regulating monoamine levels and BDNF/NMDAR pathways in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115832.
- [19] ZHANG J Q, LI L Y, LIU Q, et al. Gastrodin programs an Arg-1+microglial phenotype in hippocampus to ameliorate depression-and anxiety-like behaviors via the Nrf2 pathway in mice[J]. *Phytomedicine*, 2023, 113: 154725.
- [20] SONG J J, LI H, WANG N, et al. Gastrodin ameliorates the lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice by downregulating miR-107-3p[J]. *Front in Pharmacology*, 2022, 13: 1044375.
- [21] 管桐, 高丽莎, 隋德志, 等. 天麻素调控 SIRT3 改 BV2 细胞衰老和炎症的作用[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(19): 410–418.
- [GUAN T, GAO L S, SUI D Z, et al. Ameliorative effect of gastrodin on aging and inflammation of BV2 cells by regulating SIRT3[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(19): 410–418.]
- [22] FU J, LU Z T, WU G, et al. *Gastrodia elata* specific miRNA attenuates neuroinflammation via modulating NF-kappaB signaling pathway[J]. *Int J Neurosci*, 2023, 15: 1–11.
- [23] WANG W, WANG Y, WANG F, et al. Gastrodin regulates the TLR4/TRAFF6/NF-kappaB pathway to reduce neuroinflammation and microglial activation in an AD model[J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155518.
- [24] SHAO Q H, ZHANG X L, CHEN Y, et al. Anti-neuroinflammatory effects of 20C from *Gastrodia elata* via regulating autophagy in LPS-activated BV-2 cells through MAPKs and TLR4/Akt/mTOR signaling pathways[J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2018, 99: 115–123.
- [25] 周莉萍. 米汤炙党参炮制最佳工艺筛选研究[J]. *现代农业科技*, 2018, 8: 79–83. [ZHOU L P. Research on the best processing with water in which rice has been cooked *Codonopsis pilosula* [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018, 8: 79–83.]
- [26] 叶喜德, 彭巧珍, 李旭冉, 等. 正交设计法优选建昌帮姜制天麻炮制工艺研究[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(2): 347–349. [YE X D, PENG Q Z, LI X R, et al. Optimization of processing technology of *Gastrodia elata* with ginger in Jianchang by orthogonal design[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2018, 29(2): 347–349.]
- [27] SANGARAN PG, IBRAHIM ZA, CHIK Z, et al. LPS preconditioning attenuates apoptosis mechanism by inhibiting NF- κ B and caspase-3 activity: TLR4 pre-activation in the signaling pathway of LPS-induced neuroprotection[J]. *Molecular Neurobiology*, 2021, 58: 2407–2422.
- [28] MARIA P, MARIA CR, LUCIA N, et al. Toll-like receptors in neuroinflammation, neurodegeneration, and alcohol-induced brain damage[J]. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 2021: 1–16.
- [29] LI J, ADAM C, JIN J L, et al. Therapeutic developments targeting toll-like receptor-4-mediated neuroinflammation[J]. *Journal of Medicine Chem*, 2016, 11(2): 154–165.
- [30] 吴小盈, 周雪, 胡晓霞, 等. 天麻素通过调控 NF- κ B/NLRP3 信号通路对 BV2 细胞炎症损伤的保护作用[J]. *中成药*, 2023, 45(3): 918–923. [WU X Y, ZHOU X, HU X X, et al. Gastrodin protects against inflammatory damage in BV2 cells by regulating the NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2023, 45(3): 918–923.]
- [31] 聂发龙, 郑俭彬, 朱紫陌, 等. 天麻酚性成分组合物减轻 LPS 刺激致 BV2 细胞炎症模型的影响[J]. *云南中医中药杂志*, 2022, 43(12): 62–67. [NIE F L, ZHENG J B, ZHU Z M, et al. *Gastrodia* phenol-based composition alleviates the effect of LPS-induced inflammatory model of BV2 cells[J]. *Yunnan Journal of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*, 2022, 43(12): 62–67.]
- [32] 李翠茹, 周康, 彭买姣, 等. 天麻饼干的研制[J]. *保鲜与加工*, 2023, 23(7): 50–56. [LI C R, ZHOU K, PENG M J, et al. Development of *Gastrodia elata* Bl biscuits[J]. *Storage and Process*, 2023, 23(7): 50–56.]
- [33] 陈亭亭, 刘帆, 陈艳, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(8): 71–76. [CHEN T T, LIU F, CHEN Y, et al. Protective effect of *Gastrodiae rhizoma* powder with different particle sizes on cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2019, 25(8): 71–76.]
- [34] 陈婷婷, 周雪, 徐旖旎, 等. 天麻超微粉调控胆碱能系统改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(15): 26–32. [CHEN T T, ZHOU X, XU N A, et al. Effect of ultrafine powder of *Gastrodiae rhizoma* in improving learning and memory ability of vascular dementia rats by regulating cholinergic system[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2020, 26(15): 26–32.]
- [35] ZHANG Y, YE P, ZHU H, et al. Neutral polysaccharide from *Gastrodia elata* alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation via the NRF2/HO-1 signaling pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(3): e14456.