

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.05.013

实验研究

养阴通脑颗粒对脑缺血再灌注损伤大鼠海马内质网应激的影响

荣妍, 张宇燕, 杨洁红, 何昱, 付楠, 程兰, 万海同*

(浙江中医药大学, 浙江省杭州市滨江区滨文路 548 号, 310053)

摘要 目的 探讨养阴通脑颗粒减轻脑缺血再灌注损伤的可能作用机制。方法 将 162 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、养阴通脑颗粒组, 每组 54 只。模型组和养阴通脑颗粒组通过大脑中动脉局灶性栓塞手术建立脑缺血再灌注损伤模型。养阴通脑颗粒组造模成功后每 12 h 给予养阴通脑颗粒 0.5 g/kg 灌胃, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。于造模后 12、24、48、72 h 观察大鼠神经功能缺损评分、大脑海马葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK) 蛋白及 mRNA 表达及真核生物翻译起始因子 2 α (eIF2 α)、内质网源性转录因子 (chop)、转录激活因子 4 (ATF4) mRNA 表达; 并于造模后 72 h 检测脑梗死体积及脑组织海马区病理变化。结果 与假手术比较, 模型组大鼠各时间点神经功能缺损评分, GRP78、PERK 蛋白及 mRNA 表达, eIF2 α 、chop、ATF4 mRNA 表达均明显升高, 脑梗死体积明显增大 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 养阴通脑颗粒组各时间点神经功能缺损评分, PERK 蛋白及 PERK、eIF2 α 、chop、ATF4 mRNA 表达明显降低, GRP78 蛋白和 mRNA 表达均显著升高, 脑梗死体积明显缩小 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 养阴通脑颗粒可能通过调节海马内质网相关因子表达, 抑制内质网应激, 从而减轻脑缺血再灌注损伤。

关键词 脑缺血再灌注损伤; 养阴通脑颗粒; 内质网应激

缺血性脑卒中为临床常见病, 具有极高的发病率、致残率及死亡率, 严重危害人类健康。目前治疗方法以溶栓为主, 但存在治疗时间窗短, 不能改善脑缺血再灌注损伤等问题^[1]。养阴通脑颗粒是现代中药复方制剂, 前期研究表明, 养阴通脑颗粒可以通过抗炎、抗血栓、抑制氧化应激损伤等来保护缺血再灌注损伤^[2-4]。近来研究发现, 内质网应激在缺血病理过程中发挥着重要作用^[5-7], 抑制内质网应激成为治疗缺血性脑卒中的新靶点。本研究从内质网应激方面探讨养阴通脑颗粒治疗脑缺血再灌注损伤的可能作用机制, 为其临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 162 只, 雄性, 2 月龄, 体质量

(280 ± 20) g, 由浙江省医学科学院提供, 实验动物许可证号: SCXK (浙) 2014-0001。

1.2 主要试剂和仪器

养阴通脑颗粒由浙江中医药大学制剂重点实验室制备 (批号 2003L00206), 组成: 生地黄、石斛、黄芪、葛根、水蛭、川芎比例为 1 : 1 : 1 : 1.2 : 0.2 : 0.67; 多聚甲醛磷酸盐缓冲溶液 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20140904); 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC, Sigma 公司, 批号 BCBP3272V); 兔 kit (北京中杉金桥公司, 批号 pv-6001); 兔抗葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78, Abcam 公司, 批号 GR123478-42); 兔抗蛋白激酶 R 样内质网激酶 (PERK, Santa Cruz 公司, 批号 SC-43073); Trizol Reagent (TakaRa 公司, 批号 14105); 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Amresco 公司, 批号 1505G07); 逆转录试剂盒 (ABM 公司, 批号 AT95639C); PCR 试剂盒 (ABM 公司, 批号 MG795339C)。低温离心机 (型号 LDZ5-2, 北京医

基金项目: 国家自然科学基金 (81374053, 81274176, 81473587); 浙江省自然科学基金 (LR12H27001)

* 通讯作者: whtong@126.com, (0571) 86613711

用离心机厂); 荧光显微镜 (型号 BX60, 日本 Olympus 公司) 纯水仪 (型号 Simplicity, 美国 Millipore 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (型号 0802174S, 美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物分组、造模及给药

162 只大鼠采用随机数字表法将分为假手术组、模型组和养阴通脑颗粒组, 每组 54 只。模型组和养阴通脑颗粒组参照文献 [7] 方法进行大脑中动脉局灶性栓塞手术建立脑缺血再灌注损伤模型。手术前 12 h 禁食不禁水, 大鼠给予 10% 水合氯醛 (3.5 ml/kg) 腹腔注射麻醉。分离右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉, 用丝线将颈外动脉结扎, 用微型动脉夹将颈总动脉和颈内动脉夹闭, 在颈外动脉近分叉部切一小口, 将线栓自切口插入, 轻轻推进线栓, 打开颈内动脉动脉夹, 使线栓沿颈内动脉进入大脑中动脉起始端。缺血 1 h 后, 轻轻抽出线栓进行再灌注, 扎紧切口, 缝合回笼。假手术组除不插线栓外, 其余同模型组。最终 108 只造模成功, 模型组 54 只, 养阴通脑颗粒组 54 只。造模成功后养阴通脑颗粒组以每 12 h 给予养阴通脑颗粒 0.5 g/kg 灌胃给药, 假手术组与模型组给予等量生理盐水, 共观察 72 h。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 神经功能缺损评分 分别于造模后 12、24、48、72 h (每个时间点 6 只大鼠) 进行神经功能缺损评分, 参考文献 [8] 标准, 0 分: 无神经功能缺损症状; 1 分: 轻度, 提尾时对侧前肢内收屈曲, 不能完全伸展对侧前肢; 2 分: 中度, 即行走向对侧转圈 (追尾症); 3 分: 重度, 即行走困难, 并向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识水平下降。

1.4.2 脑梗死体积 大鼠造模后 72 h 后断头取脑, 生理盐水冲洗残血, 置 -20℃ 冰箱冷冻 10 min 左右, 作连续冠状切片 7 片 (厚约 2 mm), 放入 2% TTC 染液中, 37℃ 温育 30 min, 未梗死脑组织区呈玫瑰色, 梗死区呈苍白色。再将脑片置 4% 多聚甲醛中固定并于 24 h 内拍照, 采用图像分析软件 Image J1.46r 计算脑梗死体积/全脑体积。

1.4.3 脑组织病理学观察 各组大鼠在造模后 72 h (每组 6 只大鼠) 进行取材, 取脑组织视交叉前后 2 mm 厚的中段脑组织, 放入 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲溶液固定 24 h (pH 7.4) 后, 进行石蜡包埋, 连续冠状切片, HE 染色后光学显微镜观察。

1.4.4 大脑海马 CA1 区 GRP78、PERK 蛋白表达 各组大鼠在造模后 12、24、48、72 h (每个时间

点 6 只大鼠) 采用免疫组化法检测。石蜡切片经常规脱蜡、复水, 按照免疫组化试剂盒说明进行常规 SABC 法, 阳性对照采用 PBS 代替一抗。显微镜下观察大脑海马 CA1 区 GRP78 和 PERK 蛋白表达情况, 阳性反应染为棕黄色。每只大鼠取 1 张脑组织切片, 显微镜下定位, 取缺血侧大脑海马 CA1 区观察, 每张切片采集 5 个具有代表性的高倍视野, 以 Image Pro 6.0 图像分析软件对脑组织免疫组化结果进行分析, 用平均积分光密度值 (IOD) 表示阳性物质的相对表达量。

1.4.5 大脑海马内质网相关因子 mRNA 表达 各组大鼠在造模后 12、24、48、72 h (每个时间点 6 只大鼠) 采用实时荧光定量 PCR 检测。取冻存的脑组织置于离心管中, Trizol 法抽提大鼠右侧海马区 RNA, 逆转录得到 cDNA; 逆转录反应条件为: 25℃ 10 min, 42℃ 15 min, 85℃ 5 min。检测 GRP78、PERK、真核生物翻译起始因子 2 α (eIF2 α)、内质网源性转录因子 (chop)、转录激活因子 4 (ATF4) mRNA 的表达情况, 荧光定量 PCR 扩增反应条件为: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析, 以 GAPDH 作为内对照, 采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因 mRNA 的相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, GRP78: 上游: TTGAACTGTGGGAGGTGTC; 下游: ATTGTTACG-GTGGGCTGATT; PERK: 上游: GGAAGGTCATG-GCGTTTA; 下游: ATCGTCGCCAGAGGAATA; eIF2 α : 上游: GTTGGTGCTGAAGGAGTGCT; 下游: GCTGGTTGAGTGGAAAGAGC; chop: 上游: AG-GAGGTCTCTCTCAGATGA; 下游: ATGTGCCT-GTGACCTCTGTTG; ATF4: 上游: AGGTGTTCTCTGTTGCTC3; 下游: CCTAGTAGCTGCTGTCTT-GTT; GAPDH: 上游: GGAAATCGTCCGTGACAT-TA; 下游: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG。

1.5 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析, 数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间神经功能缺损评分比较

表 1 示, 与假手术比较, 模型组大鼠各时间点神经功能缺损评分均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 养阴通脑颗粒组各时间点神经功能缺损评分明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠不同时间神经功能缺损评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	造模后 12 h	造模后 24 h	造模后 48 h	造模后 72 h
假手术组	6	0	0	0	0
模型组	6	2.71 $\pm$ 0.75*	3.42 $\pm$ 0.79*	2.29 $\pm$ 0.49*	1.86 $\pm$ 0.69*
养阴通脑颗粒组	6	2.00 $\pm$ 0.58 Δ	2.57 $\pm$ 0.53 $\Delta\Delta$	1.43 $\pm$ 0.53 $\Delta\Delta$	1.14 $\pm$ 0.37 Δ

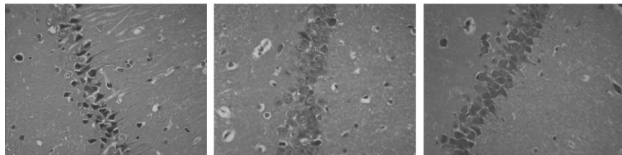
注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠造模后 72 h 脑梗死体积/全脑体积比较

造模后 72 h, 假手术组脑梗死体积为 0, 模型组脑梗死体积/全脑体积为 (25.38 $\pm$ 3.03)%, 养阴通脑颗粒组为 (13.98 $\pm$ 2.81)%。与假手术组比较, 模型组脑梗死体积/全脑体积明显增大 ($P < 0.01$); 养阴通脑颗粒组较模型组脑梗死体积/全脑体积明显缩小 ($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠造模后 72 h 脑组织病理情况

图 1 示, 假手术组大鼠海马结构完整, 层次清晰, 分布均匀, 海马神经元细胞的形态结构未出现异常, 椎体细胞形态正常, 细胞核呈圆形, 核仁明显。模型组病变区呈筛状坏死灶, 椎体细胞失去完整结构, 胞核固缩, 核仁消失, 细胞周围形成空泡, 神经元密度下降。养阴通脑颗粒组病理变化特点同模型组, 但病灶周围细胞损伤减轻。



假手术组 模型组 养阴通脑颗粒组

图 1 各组大鼠脑缺血再灌注损伤后 72 h 脑组织病理图 (HE 染色, $\times 400$)

2.4 各组大鼠不同时间大脑海马 CA1 区 GRP78、PERK 蛋白表达比较

表 2 示, 与假手术组比较, 模型组各时间点

GRP78、PERK 蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 养阴通脑颗粒组各时间点 GRP78 蛋白表达均显著增加, PERK 蛋白表达均显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠不同时间大脑海马 CA1 区 GRP78、PERK 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	时间	GRP78	PERK
假手术组	6	造模后 12 h	0.26 $\pm$ 0.012	0.21 $\pm$ 0.002
	6	造模后 24 h	0.32 $\pm$ 0.009	0.20 $\pm$ 0.017
	6	造模后 48 h	0.28 $\pm$ 0.010	0.20 $\pm$ 0.010
	6	造模后 72 h	0.26 $\pm$ 0.012	0.20 $\pm$ 0.018
模型组	6	造模后 12 h	0.31 $\pm$ 0.008*	0.23 $\pm$ 0.002*
	6	造模后 24 h	0.36 $\pm$ 0.009*	0.26 $\pm$ 0.005*
	6	造模后 48 h	0.34 $\pm$ 0.004*	0.25 $\pm$ 0.002*
	6	造模后 72 h	0.31 $\pm$ 0.004*	0.24 $\pm$ 0.003*
养阴通脑颗粒组	6	造模后 12 h	0.40 $\pm$ 0.017 Δ	0.22 $\pm$ 0.005 Δ
	6	造模后 24 h	0.43 $\pm$ 0.016 Δ	0.23 $\pm$ 0.021 $\Delta\Delta$
	6	造模后 48 h	0.38 $\pm$ 0.026 Δ	0.24 $\pm$ 0.004 Δ
	6	造模后 72 h	0.38 $\pm$ 0.007 Δ	0.22 $\pm$ 0.004 Δ

注: GRP78, 葡萄糖调节蛋白 78; PERK, 蛋白激酶 R 样内质网激酶; 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.5 各组大鼠不同时间大脑海马内质网相关因子 mRNA 表达比较

表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠大脑海马 GRP78、PERK、eIF2 α 、chop、ATF4 mRNA 在各个时间点表达均显著升高 ($P < 0.01$)。GRP78、

表 3 各组大鼠不同时间大脑海马 GRP78、PERK、eIF2 α 、chop 及 ATF4 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	时间	GRP78	PERK	eIF2 α	chop	ATF4
假手术组	6	造模后 12 h	1	1	1	1	1
	6	造模后 24 h	1	1	1	1	1
	6	造模后 48 h	1	1	1	1	1
	6	造模后 72 h	1	1	1	1	1
模型组	6	造模后 12 h	1.54 $\pm$ 0.389*	4.69 $\pm$ 0.707*	1.32 $\pm$ 0.227*	4.51 $\pm$ 1.259*	3.91 $\pm$ 1.378*
	6	造模后 24 h	2.26 $\pm$ 0.951*	6.60 $\pm$ 1.333*	1.53 $\pm$ 0.117*	3.14 $\pm$ 0.536*	4.60 $\pm$ 0.600*
	6	造模后 48 h	1.46 $\pm$ 0.271*	2.97 $\pm$ 0.460*	2.26 $\pm$ 0.393*	2.24 $\pm$ 0.424*	2.86 $\pm$ 0.681*
	6	造模后 72 h	1.25 $\pm$ 0.093*	2.10 $\pm$ 0.515*	1.27 $\pm$ 0.140*	1.89 $\pm$ 0.241*	1.89 $\pm$ 0.241*
养阴通脑颗粒组	6	造模后 12 h	2.68 $\pm$ 0.352 Δ	3.79 $\pm$ 0.558 Δ	1.14 $\pm$ 0.072 Δ	2.54 $\pm$ 0.314 Δ	1.47 $\pm$ 0.149 Δ
	6	造模后 24 h	3.63 $\pm$ 0.331 $\Delta\Delta$	3.50 $\pm$ 0.925 $\Delta\Delta$	1.21 $\pm$ 0.096 $\Delta\Delta$	2.08 $\pm$ 0.359 $\Delta\Delta$	2.07 $\pm$ 0.436 $\Delta\Delta$
	6	造模后 48 h	1.90 $\pm$ 0.237 $\Delta\Delta$	1.56 $\pm$ 0.334 $\Delta\Delta$	1.51 $\pm$ 0.225 $\Delta\Delta$	1.49 $\pm$ 0.257 $\Delta\Delta$	1.51 $\pm$ 0.237 $\Delta\Delta$
	6	造模后 72 h	1.44 $\pm$ 0.235 $\Delta\Delta$	0.55 $\pm$ 0.142 $\Delta\Delta$	0.51 $\pm$ 0.233 $\Delta\Delta$	1.21 $\pm$ 0.147 $\Delta\Delta$	1.21 $\pm$ 0.147 $\Delta\Delta$

注: GRP78, 葡萄糖调节蛋白 78; PERK, 蛋白激酶 R 样内质网激酶; eIF2 α , 真核生物翻译起始因子 2 α ; ATF4, 转录激活因子 4; 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

PERK、eIF2 α 、chop, ATF4 mRNA 表达在脑缺血再灌注后均逐渐上升, 其中 chop 在 12 h 达到高峰, 之后逐渐下降; GRP78, PERK, ATF4 在 24 h 达到高峰, 之后逐渐下降; eIF2 α 在 24 h 仍持续上升, 48 h 达到高峰。养阴通脑颗粒组 GRP78 mRNA 在各个时间点的表达均显著高于模型组, 而 PERK、eIF2 α 、chop、ATF4 mRNA 各时间点的表达均显著低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤属于中医学中风范畴, 病位在脑, 病理基础为肝肾阴虚, 为本虚标实之证, 阴虚气弱为本, 血瘀为标, 以益气养阴、活血化瘀为基本治则。养阴通脑颗粒系现代中药复方制剂, 具有养阴益气、活血化瘀之功效, 方中生地黄、石斛滋补阴液, 增水行血; 濡润脉道, 有利血行; 滋养脏腑, 调节血行, 滋阴降火达到滋而能通。黄芪补气以推动血液运行, 加强活血药作用, 养阴益气治阴虚气弱之本。葛根、水蛭、川芎活血化瘀以祛瘀血之标实。现已完成 II、III 期临床研究, 证明其疗效确切, 无不良反应^[8]。本研究结果显示, 应用养阴通脑颗粒干预后, 脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺损评分明显降低, 细胞坏死数量明显减少, 脑梗死体积明显减小, 提示养阴通脑颗粒对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

内质网是细胞内重要的细胞器, 主要参与蛋白质的合成、加工和转运。脑缺血缺氧、能量耗竭、钙超载、大量自由基的产生、炎症反应等均可引起内质网功能障碍, 从而触发内质网应激^[9]。生理状态下, 内质网分子伴侣 GRP78 与内质网跨膜蛋白 PERK 暴露于内质网中的结构域结合, 处于非活化状态^[10]。当脑缺血时, 内质网功能受损, 内质网中未折叠蛋白增多, GRP78 与 PERK 解离, PERK 被激活, 磷酸化 eIF2 α 来抑制下游蛋白质的合成^[11]; 与此同时, GRP78 与未折叠蛋白结合, 促进蛋白质的正确折叠, 尽快恢复内质网功能^[12]。然而当内质网应激过强或者时间过长时, PERK 被激活, 磷酸化 eIF2 α 导致转录因子 ATF4 增加, ATF4 进入胞核后激活 chop, 从而促进细胞凋亡^[13]。本研究结果显示, 模型组各个时间点 PERK、eIF2 α 、ATF4、chop mRNA 较假手术组均明显上升, 提示内质网应激的产生可能与脑缺血再灌注损伤激活 PERK-eIF2 α -ATF4 介导的凋亡通路使得促凋亡蛋白 chop 的增加有关。有研究报道,

chop 基因敲除鼠较正常小鼠有更好的抗缺血作用, 其缺血后神经元死亡明显减少^[14]。GRP78 的上调能增强内质网处理未折叠蛋白反应的能力, 导致适当的蛋白质折叠, 它的保护作用在体外实验已经被证实^[15]。本研究结果显示, 脑缺血再灌注损伤大鼠给予养阴通脑颗粒干预后, 各个时间点 GRP78 mRNA 表达量均显著升高, 各个时间点 PERK、eIF2 α 、ATF4、chop mRNA 表达量均显著降低, 提示养阴通脑颗粒可能通过上调 GRP78、抑制 PERK 介导的凋亡通路从而减轻内质网应激来发挥对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

综上所述, 养阴通脑颗粒具有治疗脑缺血再灌注损伤的作用, 抑制缺血再灌注后内质网应激可能是其发挥保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] 张彬, 赵玉武, 孙晓江. 急性缺血性脑卒中溶栓治疗进展 [J]. 世界临床药物, 2011, 32(3): 186-189.
- [2] 杜月光, 万海同, 孟祥磊, 等. 脑缺血-再灌注损伤时 MMP9 表达及养阴通脑颗粒干预作用的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(6): 330-332.
- [3] 杨洁红, 别晓东, 杜月光, 等. 大鼠脑缺血后脑组织内皮素-1 基因表达及养阴通脑颗粒对其干预的作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(6): 324-325.
- [4] 朱肖星, 梅其炳, 王跃民, 等. 养阴通脑颗粒增加脑血流量的机制 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(14): 1276-1278.
- [5] XIN Q, JI B, CHENG B, et al. Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemic [J]. Neurochem Int, 2014, 68: 18-27. doi: 10.1016/j.neuint.2014.02.001.
- [6] CHEN W, SUN Y, LIU K, et al. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia [J]. Neural Regen Res, 2014, 9(12): 1210-1216.
- [7] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 万海同, 别晓东, 姚政, 等. 养阴益气活血方治疗气阴两虚证、瘀血阻络证缺血性中风疗效观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3): 281-286.
- [9] NAKKA VP, GUSAIN A, RAGHUBIR R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. Neurotox Res, 2010, 17(2): 189-202.
- [10] AYAUB EA, KOLB PS, MOHAMMED-ALI Z, et al. GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis

- [] . J Pathol, 2016, 239(4) : 411-425.
- [1] POMAR N, BERLANGA JJ, CAMPUZANO S, et al. Functional characterization of Drosophila melanogaster PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase [] . Eur J Biochem, 2003, 270(2) : 293-306.
- [2] LEE AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress [] . Methods, 2005, 35(4) : 373-381.
- [3] DEGRACIA DJ, MONTIE HL. Cerebral ischemia and the unfolded protein response [] . Neuro chem, 2004, 91(1) : 1-8.
- [4] TAJIRI S, OYADOMARI S, YANO S, et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP [] . Cell Death Differ, 2004, 11(4) : 403-415.
- [5] YU Z, LUO H, FU W, et al. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis [] . Exp Neurol, 1999, 155(2) : 302-314.

Impact of *Yangyin Tongnao Keli* (养阴通脑颗粒) on Hippocampus Endoplasmic Reticulum Stress in Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

RONG Yan, ZHANG Yuyan, YANG Jiehong, HE Yu, FU Nan, CHENG Lan, WAN Haitong

(Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, 310053)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yangyin Tongnao Keli* (养阴通脑颗粒) decreasing cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** Totally 162 Sprague Dawley (SD) rats were randomized into sham operation group, model group and *Yangyin Tongnao Keli* group, with 54 rats in each group. The model group and the *Yangyin Tongnao Keli* group were established cerebral ischemia reperfusion injury models by middle cerebral artery focal embolism operation. The *Yangyin Tongnao Keli* group was given *Yangyin Tongnao Keli* 0.5 g/kg by gavage every 12 hours. The sham operation group and the model group were given equivalent normal saline. After 12, 24, 48, and 72 hours of modeling, neurological deficit score, glucose regulated protein 78 (GRP78) in CA1 area of hippocampus, protein kinase R-like ER kinase (PERK) and the expressions of mRNA, as well as the mRNA expressions of eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), endoplasmic reticulum derived transcription factor CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (chop) and activating transcription factor 4 (ATF4) were observed. The volume of cerebral infarction and the pathological changes of hippocampus in brain tissue were detected after 72 hours of modeling. **Results** Compared with the sham operation group, neurological deficit score, GRP78, PERK protein and mRNA expressions, as well as the expressions of eIF2 α , chop and ATF4 at each time point in the model group increased. The volume of cerebral infarction increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, neurological deficit score, PERK protein and the mRNA expressions of PERK, eIF2 α , chop and ATF4 decreased. GRP78 protein and the expression of mRNA increased. The volume of cerebral infarction decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Yangyin Tongnao Keli* might inhibit endoplasmic reticulum stress by regulating the expressions of hippocampus endoplasmic reticulum related factors to decrease cerebral ischemia reperfusion injury.

Keywords cerebral ischemia reperfusion injury; *Yangyin Tongnao Keli*; endoplasmic reticulum stress

(收稿日期: 2016-07-07; 修回日期: 2016-08-26)

编辑: 王利芬