

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.01.013

栝楼桂枝颗粒对脑缺血再灌注损伤模型大鼠缺血区脑组织内质网应激及细胞凋亡的影响

罗书萍, 方雅玲, 常小娜, 张玉琴[✉], 褚克丹

福建中医药大学药学院, 福建省福州市邱阳路 1 号, 350122

[摘要] **目的** 探讨栝楼桂枝颗粒治疗脑缺血再灌注损伤的可能作用机制。**方法** 54 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、栝楼桂枝颗粒组, 每组 18 只。模型组、栝楼桂枝颗粒组大鼠采用线栓法致大脑中动脉栓塞建立脑缺血再灌注损伤模型, 假手术组除不插入线栓外其余操作同模型组。各组于造模后 2 h 开始干预, 假手术组和模型组给予生理盐水 10 ml/kg 灌胃, 栝楼桂枝颗粒组给予栝楼桂枝汤颗粒剂 3.6 g/(kg·d) 灌胃。各组均每日 1 次, 连续 7 天。采用改良的神经功能缺损评分 (mNSS)、转角实验对大鼠神经损害程度进行评价; 采用 TUNEL 法检测大鼠缺血区脑组织细胞凋亡情况, 采用 Western blot 法检测脑组织中 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、神经元特异核蛋白 (NeuN) 的相对表达量; Real-Time PCR 法检测缺血区脑组织内质网应激相关因子真核生物起始因子 2 α (eIF2 α)、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (PERK)、内质网源性转录因子 (CHOP)、转录激活因子 4 (ATF4)、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的 mRNA 表达; Western blot 法检测缺血区脑组织 ATF4、CHOP、PERK、eIF2 α 、磷酸化真核生物起始因子 2 α 抗体 (p-eIF2 α)、磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (p-PERK) 蛋白的表达水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠 mNSS 评分、转角百分率升高, 缺血区脑组织细胞凋亡率、Bax 蛋白表达升高, Bcl-2 及 NeuN 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 缺血区脑组织中 GRP78、PERK、eIF2 α 、CHOP、ATF4 mRNA 升高, CHOP、ATF4 蛋白表达及 p-PERK/PERK、p-eIF2 α /eIF2 α 值亦升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 栝楼桂枝颗粒组大鼠上述各指标均明显改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 栝楼桂枝颗粒可通过抑制内质网应激, 从而抑制脑缺血损伤后神经细胞凋亡, 进而发挥抗脑缺血再灌注损伤作用。

[关键词] 脑缺血再灌注损伤; 栝楼桂枝颗粒; 细胞凋亡; 内质网应激

缺血性脑卒中是最常见的脑卒中类型, 具有高发病率、高死亡率、高复发率等特点, 严重危害人类健康^[1]。目前缺血性脑卒中中以溶栓为主要治疗手段, 但是溶栓治疗存在时间窗局限, 不能有效改善脑缺血再灌注损伤等问题^[2]。栝楼桂枝汤出自《金匮要略》, 具有解肌祛邪、舒缓筋脉之效。既往研究^[3-4]显示, 栝楼桂枝汤对于中风患者的日常活动能力、运动功能及痉挛状态均有显著的改善作用; 实验研究^[5-6]则显示, 栝楼桂枝汤能够抑制缺血性脑卒中模型大鼠神经元凋亡、抑制谷氨酸诱导的兴

奋性毒性损伤与细胞凋亡。已有研究^[7]表明, 内质网应激及未折叠蛋白反应介导的细胞凋亡在脑缺血再灌注损伤的发生发展中发挥重要作用。脑缺血再灌注引起的 Ca²⁺超载和氧化应激损伤引起内质网功能障碍, 可导致未折叠蛋白或错误折叠蛋白增多, 在内质网腔内堆积, 即发生内质网应激, 若内质网应激强度过强, 或未折叠蛋白的适应性反应不能起到有效保护作用时, 细胞就会进入凋亡过程^[8]。基于以上研究结果, 本实验从调控内质网应激及未折叠蛋白反应角度, 探讨栝楼桂枝汤抑制脑缺血损伤后神经元凋亡的可能机制, 以期栝楼桂枝汤的临床应用提供依据。本实验已通过福建中医药大学实验动物伦理委员会动物伦理审批, 审批

基金项目: 国家自然科学基金 (81803768); 福建省自然科学基金 (2020J01731)

✉ 通讯作者: 2016003@jtcmm.edu.cn, (0591)22861322

号: 2015075。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 54 只, 3 月龄, 体重 (260±20) g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2012-0002, 饲养于福建中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 实验动物使用许可证号: SYXK (闽) 2014-0005。

1.2 药物

栝楼桂枝汤颗粒剂 (1 g 颗粒剂相当于生药 2 g, 批号: 20160809) 由福建中医药大学附属第二人民医院药学部提供, 由天花粉、桂枝、白芍、生姜、甘草、大枣组成, 用药比例为 10:3:3:3:2:3。根据前期研究结果^[9], 制备临床等效剂量浓度 3.6 g/(kg·d) 进行实验。

1.3 主要试剂与仪器

磷酸化真核生物起始因子 2 α 抗体 (p-eIF2 α , 货号: 3398)、真核生物起始因子 2 α (eIF2 α , 货号: 2103)、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (PERK, 货号: 3192)、磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (p-PERK, 货号: 3179)、 β -actin 抗体 (货号: 4970), CST 公司; 内质网源性转录因子 (CHOP, 货号: BS1136)、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78, 货号: BS1154)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax, 货号: BS2538), Bioworld Technology 公司; B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2, 货号: ab59348)、转录激活因子 4 (ATF4, 货号: ab184909), Abcam 公司; 神经元特异核蛋白 (NeuN, 货号: MAB377), Millipore 公司; HRP 结合山羊抗兔 IgG (货号: S0101)、HRP 结合兔抗鼠 IgG (货号: S0100), 北京兰博利德商贸有限公司; 4% 多聚甲醛 (货号: G1101), 武汉塞维尔生物科技有限公司; TUNEL 试剂盒 (货号: G002-1-1), 南京建成生物研究所; Trizol 试剂 (货号: 15596026), Ambion 公司; First strand cDNA Synthesis 试剂盒 (货号: K1626), Thermo Scientific 公司; RIPA 裂解液 (货号: P0013B), 碧云天生物技术有限公司。

实时荧光定量 PCR 仪 (AppLied Biosystems 公司, 型号: ABI7900); 凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司, 型号: ChemiDoc XRS+); 倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: DMi8); 离心机 (Eppendorf 公司, 型号: Centrifuge 5418R); 电泳仪 (美国 Bio Rad 公司, 型号: PowerPac Basic)。

1.4 造模与给药

将 54 只 SD 大鼠用随机数字表法分为假手术组、模型组、栝楼桂枝颗粒组, 每组 18 只。模型组、栝楼桂枝颗粒组大鼠参照文献 [10] 实行左侧大脑中动脉阻塞再灌注手术制备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。颈部消毒处理后, 钝性分离暴露颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉, 将线栓从颈总动脉插入, 沿颈内动脉进入大脑中动脉, 2 h 后轻轻抽出部分线栓实现再灌注, 结扎缝合。假手术组除不插入线栓外其余操作同模型组。

各组于造模后 2 h 开始干预, 假手术组和模型组给予生理盐水 10 ml/kg 灌胃, 中药组按人临床等效剂量^[5]给予栝楼桂枝汤颗粒剂 3.6 g/(kg·d) 灌胃。均每日 1 次, 连续 7 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 大鼠神经行为学评价 灌胃 7 天后采用改良神经功能缺损程度评分 (mNSS)^[11] 评价大鼠神经功能, 采用转角实验^[12] 对大鼠神经损害程度进行评分。转角实验: 取两块尺寸为 30 cm×20 cm×1 cm 的板, 两板边缘紧靠, 夹角为 30°, 将大鼠置于两板开口处, 当大鼠走进转角时会向右或向左转。每只大鼠测试 10 次, 统计向右转的次数, 据此计算转角百分率。转角百分率=向右转次数/10×100%。

1.5.2 TUNEL 法检测缺血区脑组织中细胞凋亡情况 行为学评价后大鼠麻醉后断头取脑, 各组采用随机数字表法选取 6 只, 取缺血区脑组织, 4% 多聚甲醛固定、纵切为 2 mm 厚度的组织切片 (一般切 6 片), 石蜡包埋。按照 TUNEL 试剂盒说明进行细胞凋亡检测。TUNEL 染色结束后滴加抗荧光淬灭剂封片, 使用荧光显微镜观察并拍照记录。每片取 5 个不重叠视野记录 TUNEL 染色 (绿色) 阳性细胞数, 并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.5.3 Western blot 法检测缺血区脑组织中细胞凋亡相关蛋白表达 行为学评价后大鼠麻醉后断头取脑, 各组采用随机数字表法选取 6 只, 取 100 mg 缺血区脑组织加 1 ml 裂解缓冲液, 于冰上匀浆裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min (离心半径 8 cm) 离心 15 min, 取上清, 取适量蛋白上样, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 电转至固相支持体 PVDF 膜上, 分别按程序加入 Bax、Bcl-2 及 NeuN 抗体, 化学发光后成

像。应用凝胶成像分析系统对杂交蛋白区带细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 及 NeuN 进行积分光密度值分析。

1.5.4 Real-Time PCR 法检测缺血区脑组织中内质网应激及未折叠蛋白反应相关因子 mRNA 表达 行为学评价后大鼠麻醉后断头取脑, 各组剩余 6 只大鼠取 100mg 缺血区脑组织, 加入 1ml Trizol 试剂匀浆, 提取总 RNA。采用 First strand cDNA Synthesis 试剂盒进行逆转录反应提取 cDNA, 然后对目的基因进行 PCR 扩增, 扩增条件如下: 50 ℃ 预热 2 min, 95 ℃ 预热 10 min, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 30 s, 60 ℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因 ATF4、CHOP、GRP78、PERK、eIF2 α 的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成提供。ATF4: 上游 5'-AGG TGTTCCTCGTG-GTTC-3', 下游 5'-CCTAGTAGCTGCTGCTTGT-3', 130 bp; CHOP: 上游 5'-CCTCGCTCTCCAGATTC-CA-3', 下游 5'-CTCCTGCTCCTTCTCCTTCA-3', 141 bp; GRP78: 上游 5'-GAGCTGGTTCTGCTTGATGTG-3', 下游 5'-TCGTTACCTTCGTAGACCTT-3', 174 bp; PERK: 上游 5'-GGAAGGTCATGGCGTTTA-3', 下游 5'-ATCGTCGGCAGAGGAATA-3', 337 bp; eIF2 α : 上游 5'-GTTGGTGCTGAAGGAGTGCT-3', 下游 5'-GCTGTTGAGTGGAAGAGC-3', 148 bp; GAPDH: 上游 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3', 下游 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3', 149 bp。

1.5.5 Western blot 法检测缺血区脑组织中内质网应激及未折叠蛋白反应相关因子蛋白表达 采用 1.5.3 中的 6 只大鼠, 取 100 mg 缺血区脑组织加 1 ml 裂解缓冲液, 于冰上匀浆裂解 30 min, 4 ℃、12 000 r/min (离心半径 8 cm) 离心 15 min, 取上清, 取适量蛋白上样, 经 SDS-PAGE 电泳分离, 电转至固相支持体 PVDF 膜上, 分别按程序加入相关蛋白抗体, 化学发光后成像。应用凝胶成像分析系统对杂交蛋白区带 p-eIF2 α 、eIF2 α 、p-PERK、PERK、CHOP、ATF4 蛋白进行积分光密度值分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 本研究数据均符合正态分布, 均以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 进行多组间单因素方差分析, 方差齐者或不齐者分别采用 LSD 和 Games-Howell 法检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 mNSS 评分、转角百分率均升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 枳椇桂枝颗粒组大鼠 mNSS 评分、转角百分率均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠 mNSS 评分及转角百分率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	mNSS 评分/分	转角百分率/%
假手术组	18	0	0
模型组	18	9.00 $\pm$ 1.48 ^{a)}	75.00 $\pm$ 9.05 ^{a)}
枳椇桂枝颗粒组	18	5.83 $\pm$ 1.90 ^{b)}	60.00 $\pm$ 11.28 ^{b)}

注: mNSS, 改良神经功能缺损程度评分。

a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠缺血区脑组织细胞凋亡率比较

表 2 示, 与假手术组相比, 模型组大鼠缺血区脑组织细胞凋亡率显著升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 枳椇桂枝颗粒组大鼠缺血区脑组织细胞凋亡率明显下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠缺血区脑组织细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	细胞凋亡率/%
假手术组	6	8.12 $\pm$ 1.01
模型组	6	41.71 $\pm$ 5.19 ^{a)}
枳椇桂枝颗粒组	6	24.13 $\pm$ 5.91 ^{b)}

注: a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠缺血区脑组织中 Bax、Bcl-2 及 NeuN 蛋白表达比较

表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠缺血区脑组织中 Bax 蛋白表达升高, Bcl-2 及 NeuN 蛋白表达降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 枳椇桂枝颗粒组大鼠缺血区脑组织中 Bax 蛋白表达降低, Bcl-2 及 NeuN 蛋白表达升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组

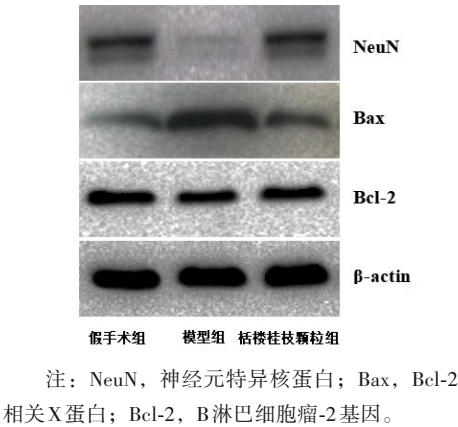
表 3 各组大鼠缺血区脑组织中 Bax、Bcl-2 及 NeuN 蛋白表达比较 (积分光密度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	NeuN	Bax	Bcl-2
假手术组	6	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.24	1.00 $\pm$ 0.20
模型组	6	0.14 $\pm$ 0.05 ^{a)}	2.84 $\pm$ 0.49 ^{a)}	0.65 $\pm$ 0.09 ^{a)}
枳椇桂枝颗粒组	6	0.93 $\pm$ 0.16 ^{b)}	1.37 $\pm$ 0.29 ^{b)}	0.82 $\pm$ 0.26 ^{c)}

注: NeuN, 神经元特异核蛋白; Bax, Bcl-2 相关 X 蛋白; Bcl-2, B 淋巴细胞瘤-2 基因。

a) 与假手术组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

大鼠缺血区脑组织中凋亡相关蛋白电泳图见图 1。



注：NeuN，神经元特异核蛋白；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤-2 基因。
图 1 各组大鼠缺血区脑组织中 Bax、Bcl-2 及 NeuN 蛋白电泳图

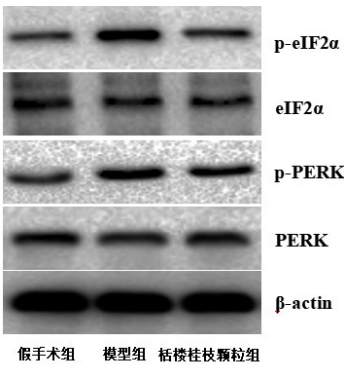
2.4 各组大鼠缺血区脑组织内质网应激及未折叠蛋白反应相关因子 mRNA 表达比较

表 4 示，与假手术组比较，模型组大鼠缺血区脑组织中 GRP78、PERK、eIF2α、CHOP、ATF4 mRNA 均升高，差异具有统计学意义 ($P<0.01$)；与模型组比较，枳椇桂枝颗粒组大鼠缺血区脑组织中 GRP78、PERK、eIF2α、CHOP、ATF4 mRNA 均下降，差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

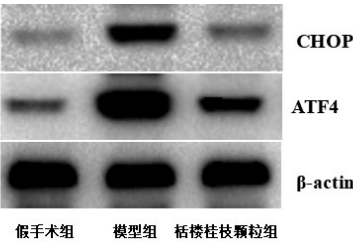
2.5 各组大鼠缺血区脑组织内质网应激及未折叠蛋白反应相关因子蛋白表达比较

本研究以磷酸化蛋白灰度值与总蛋白的比值表示 PERK 及 eIF2α 磷酸化蛋白水平。表 5 示，与假手术组比较，模型组大鼠缺血区脑组织中 CHOP、ATF4 蛋白表达及 p-PERK/PERK、p-eIF2α/eIF2α 值均升高，差异具有统计学意义 ($P<0.01$)；与模

型组比较，枳椇桂枝颗粒组大鼠缺血区脑组织中 CHOP、ATF4 蛋白表达及 p-PERK/PERK、p-eIF2α/eIF2α 值均下降，差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠缺血区脑组织中 p-PERK、PERK、p-eIF2α、eIF2α、CHOP、ATF4 蛋白电泳图分别见图 2、图 3。



注：p-eIF2α，磷酸化真核生物起始因子 2α；eIF2α，真核生物起始因子 2α；p-PERK，磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶；PERK，蛋白激酶 RNA 样内质网激酶。
图 2 各组大鼠缺血区脑组织中 p-PERK、PERK、p-eIF2α、eIF2α 蛋白电泳图



注：CHOP，内质网源性转录因子；ATF4，转录激活因子 4。
图 3 各组大鼠缺血区脑组织中 CHOP、ATF4 蛋白电泳图

表 4 各组大鼠缺血区脑组织 GRP78、PERK、eIF2α、CHOP 及 ATF4 mRNA 表达比较 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GRP78	PERK	eIF2α	CHOP	ATF4
假手术组	6	1.04±0.27	1.06±0.17	1.01±0.07	1.06±0.07	1.01±0.07
模型组	6	2.10±0.19 ^{a)}	2.22±0.29 ^{a)}	1.27±0.10 ^{a)}	1.90±0.10 ^{a)}	2.29±0.30 ^{a)}
枳椇桂枝颗粒组	6	1.01±0.09 ^{b)}	1.56±0.13 ^{b)}	1.06±0.06 ^{b)}	1.14±0.09 ^{b)}	1.49±0.14 ^{b)}

注：GRP78，葡萄糖调节蛋白 78；PERK，蛋白激酶 RNA 样内质网激酶；eIF2α，真核生物起始因子 2α；CHOP，内质网源性转录因子；ATF4，转录激活因子 4。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

表 5 各组大鼠缺血区脑组织中 p-PERK/PERK、p-eIF2α/eIF2α、CHOP、ATF4 蛋白表达比较 (积分光密度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CHOP	ATF4	p-eIF2α/eIF2α	p-PERK/PERK
假手术组	6	1.01±0.24	1.00±0.20	1.01±0.14	1.00±0.20
模型组	6	4.48±0.49 ^{a)}	4.16±0.09 ^{a)}	2.28±0.34 ^{a)}	1.67±0.19 ^{a)}
枳椇桂枝颗粒组	6	1.51±0.29 ^{b)}	1.51±0.29 ^{b)}	1.08±0.09 ^{b)}	1.29±0.10 ^{c)}

注：p-eIF2α，磷酸化真核生物起始因子 2α；eIF2α，真核生物起始因子 2α；p-PERK，磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶；PERK，蛋白激酶 RNA 样内质网激酶；CHOP，内质网源性转录因子；ATF4，转录激活因子 4。

a) 与假手术组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

3 讨论

脑卒中属于中医学“中风”范畴,中风后导致的肢体痉挛属于“痉证”,由筋脉肌肉失却濡养而无法自主引起,其病机多为阴血亏虚、络脉瘀阻、筋脉失养。栝楼桂枝汤重用栝楼根即天花粉为君,具有生津润燥、舒缓筋脉之效;臣以桂枝发汗解肌、助阳化气、温经通脉、散寒止痛,白芍平肝止痛、养血调经、敛阴止汗,两药合用,使筋脉得以濡养,疼痛得以改善;佐以大枣、生姜补益脾胃、解表散寒,使气血阴阳得以平衡,营卫之气得以调和;甘草补脾益气,调和诸药为使。诸药合用,阴阳双补,气血共调,全方共奏养营生津、柔润筋脉之功效,正契合中风后肢体痉挛阴血不足、筋脉失养之病机。本实验结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠 mNSS 评分、转角百分率均升高,经栝楼桂枝颗粒干预后 mNSS 评分、转角百分率均明显降低;TUNEL 染色结果亦显示,模型组大鼠缺血侧皮层细胞呈凋亡状态,而栝楼桂枝颗粒可显著抑制细胞凋亡,降低细胞凋亡率,同时栝楼桂枝颗粒还能够上调大鼠脑组织中神经元标志物 NeuN 蛋白表达,提示栝楼桂枝颗粒能够有效减轻脑缺血再灌注损伤。

有文献^[13-14]报道,内质网应激及未折叠蛋白反应是缺血/再灌注损伤诱导的细胞凋亡的重要机制。内质网是具有多种功能的细胞器,其中跨膜蛋白和分泌蛋白在该细胞器被合成并折叠,发生功能障碍时会导致内质网应激^[7]。未折叠蛋白反应能够恢复内质网功能,一旦机体发生内质网应激,未折叠蛋白反应即被启动,但如果蛋白质持续聚集或应激状态无法得到改善,最终则会导致细胞死亡^[8]。GRP78 上调是内质网应激发生的标志。正常状态下,GRP78 以非活性形式与 PERK 等结合在一起^[15]。在内质网应激状态下,未折叠蛋白在内质网中堆积,GRP78 从 PERK 中分离,并导致 PERK 发生磷酸化;随后,被激活的 PERK 诱导激活未折叠蛋白反应,促进 eIF2 α 的磷酸化,并激活 ATF4 的选择性翻译^[16]。ATF4 是未折叠蛋白反应的重要介体,可通过诱导氨基酸代谢、氧化还原反应、应激反应和蛋白质分泌的内质网应激靶基因来促进细胞存活;若长时间处于应激状态,ATF4 则会激活下游促凋亡基因 CHOP 的表达^[17]。CHOP 基因的转录是导致细胞凋亡的最重要途径之一,可通过调节多种抗凋亡和促凋亡基因如 Bcl-2、Bax 的表达来调节细胞凋亡^[18]。本研究结果显示,栝楼桂枝颗粒

可显著降低脑缺血再灌注损伤大鼠缺血区脑组织 GRP78、PERK、eIF2 α 、CHOP、ATF4 mRNA 表达,以及 p-PERK、p-eIF2 α 、CHOP、ATF4 蛋白表达,同时还可显著下调 Bax、上调 Bcl-2 的蛋白表达,从而减少细胞凋亡,提示栝楼桂枝颗粒可能通过抑制 PERK-ATF4-CHOP 通路来改善内质网应激,进而发挥抗脑缺血再灌注损伤作用。

综上所述,栝楼桂枝颗粒对脑缺血再灌注损伤具有良好的改善作用,其作用机制可能与抑制脑组织中内质网应激相关凋亡通路有关。本研究通过内质网应激对栝楼桂枝颗粒的作用机制进行了初步探讨,在后续的研究中将从相关信号通路机制更进一步地研究栝楼桂枝颗粒对神经保护的药理机制,为临床治疗提供依据。

致谢

本实验在福建省科技厅福建省中药学重点实验室、福建省中药资源研究与开发利用重点实验室完成。

参考文献

- [1] PANDIAN JD, GALL SL, KATE MP, et al. Prevention of stroke: a global perspective [J]. *Lancet*, 2018, 392: 1269-1278. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31269-8.
- [2] FISHER M, SAVER JL. Future directions of acute ischaemic stroke therapy [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(7): 758-767.
- [3] 陈瑛玲, 陈立典, 陶静. 栝楼桂枝汤治疗中风后肢体痉挛的临床研究 [J]. *中医临床研究*, 2013, 5(4): 7-9.
- [4] 菅振刚. 栝楼桂枝汤应用在中风后肢体痉挛治疗中的临床研究 [J]. *内蒙古中医药*, 2017, 36(3): 33.
- [5] 林羽, 徐伟, 张玉琴, 等. 栝楼桂枝颗粒抗缺血性脑卒中大鼠神经元及 65 原代海马神经元凋亡研究 [J]. *康复学报*, 2015, 25(1): 38-43.
- [6] ZHANG Y, LI H, HUANG M, et al. Neuroprotective effects of Gualou Guizhi decoction in vivo and in vitro [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 158: 76-84. doi: 10.1016/j.jep.2014.10.020.
- [7] IURLARO R, MUÑOZ-PINEDO C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *FEBS J*, 2016, 283(14): 2640-2652.
- [8] SZEGEZDI E, LOGUE SE, GORMAN AM, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *EMBO Rep*, 2006, 7(9): 880-885.
- [9] 陈喆鸣. 基于内质网应激 PERK/ATF4 信号通路研究栝楼桂枝汤对脑缺血再灌注损伤大鼠的治疗机制 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.
- [10] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy

- tomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [11] CHEN J, SANBERG PR, LI Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11):2682-2688.
- [12] BAN JY, KANG SW, LEE JS, et al. Korean red ginseng protects against neuronal damage induced by transient focal ischemia in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2012, 3(4):693-698.
- [13] QIU J, WANG X, WU F, et al. Low dose of Apelin-36 attenuates ER stress-associated apoptosis in rats with ischemic stroke[J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 556. doi: 10.3389/fneur.2017.00556.
- [14] LIN YW, CHEN TY, HUNG CY, et al. Melatonin protects brain against ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1):182-192.
- [15] IBRAHIM IM, ABDELMALEK DH, ELFIKY AA. GRP78: a cell's response to stress[J]. *Life Sci*, 2019, 226:156-163. doi: 10.1016/j.lfs.2019.04.022.
- [16] ROZPEDEK W, PYTEL D, MUCHA B, et al. The role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress[J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(6):533-544.
- [17] YANG W, PASCHEN W. Unfolded protein response in brain ischemia: a timely update[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(12):2044-2050.
- [18] HU H, TIAN M, DING C, et al. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection[J]. *Front Immunol*, 2019, 9: 3083. doi: 10.3389/fimmu.2018.03083.

Effects of *Gualou Guizhi Granules* (栝楼桂枝颗粒) on Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Brain Tissue of the Cerebral Ischemic Area of Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

LUO Shuping, FANG Yaling, CHANG Xiaona, ZHANG Yuqin, CHU Kedan

Pharmacy School, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Gualou Guizhi Granules* (栝楼桂枝颗粒, GGG) in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury (CI-RI). **Methods** Fifty-four SD rats were randomized into sham-operation group, model group and GGG group, with 18 rats in each group. The CI-RI model was established in the model group and the CI-RI group with thread occlusion to induce middle cerebral artery occlusion (MCAO), while thread occlusion was not performed in the sham operation group. Two hours after the modelling, the sham operation group and the model group were given normal saline (10 ml/kg) by gavage, and the GGG group was administered with GGG 3.6 g/(kg·d) by gavage; the interventions in all the groups were given once daily for seven consecutive days. The modified neurological severity score (mNSS) and rotation angle test were used to assess the neurological damage in rats. TUNEL method was used to detect cell apoptosis in the brain tissue of the ischemic area, and Western blot was used to detect the relative expression of B lymphoma-2 gene (Bcl-2) related X protein (Bax), Bcl-2 and neuron specific nuclear protein (NeuN) in brain tissue. Real-Time PCR method was used to detect mRNA expressions of endoplasmic reticulum stress-related factors in the ischemic zone including eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α), protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), endoplasmic reticulum-derived transcription factor (CHOP), activator of transcription 4 (ATF4) and glucose regulatory protein 78 (GRP78). Western blot was used to detect the protein expressions of ATF4, CHOP, PERK, eIF2 α , phosphorylated eIF2 α (p-eIF2 α) and phosphorylated PERK (p-PERK) in the ischemic brain tissue of rats. **Results** Compared to those of the sham operation group, the mNSS score and the rotation angle rate of the model group increased; the apoptosis rate and the Bax protein expression in the brain tissue of the ischemic area increased; the Bcl-2 and NeuN protein expression decreased ($P < 0.01$); the mRNA expressions of GRP78, PERK, eIF2 α , CHOP, ATF4, the protein expressions of CHOP and ATF4, and the value of p-PERK/PERK and p-eIF2 α /eIF2 α all increased ($P < 0.01$). Compared to those of the model group, all the above indicators of the GGG group were significantly improved ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** GGG can inhibit the endoplasmic reticulum stress, thereby inhibiting neuronal apoptosis after cerebral ischemia injury and then preventing the occurrence of CI-RI.

Keywords cerebral ischemia-reperfusion injury; *Gualou Guizhi Granules* (栝楼桂枝颗粒); apoptosis; endoplasmic reticulum stress

(收稿日期: 2021-08-17; 修回日期: 2021-10-20)

[编辑: 邓媛]