

本文引用:马 喆,王思锦,高永红,程炜婷,巩卓彦,孙逸坤,薛程元,金秋硕,高 颖,娄利霞.松龄血脉康胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤内质网应激凋亡相关蛋白的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(5): 685-690.

松龄血脉康胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤 内质网应激凋亡相关蛋白的影响

马 喆¹,王思锦^{1,2},高永红¹,程炜婷¹,巩卓彦¹,孙逸坤¹,薛程元¹,金秋硕¹,高 颖^{1,2},娄利霞^{1*}

(1.北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室,北京 100700;

2.北京中医药大学中医脑病研究院,北京 100700)

〔摘要〕目的 探讨松龄血脉康胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其对内质网应激细胞凋亡的影响。方法 从50只雄性SD大鼠中随机选取11只为假手术组,其余大鼠采用大脑中动脉栓塞法制备脑缺血再灌注损伤模型,造模成功的33只大鼠随机分为模型组、松龄血脉康组及依达拉奉组,每组11只,分别予蒸馏水[10 mL/(kg·d)]、松龄血脉康胶囊溶液[10 mL/(kg·d)]及依达拉奉注射液[3.15 mL/(kg·d)]干预5 d。神经功能评分检测造模后24 h及给药5 d后的神经功能;错步实验检测错步次数;HE染色观察大鼠大脑缺血区形态结构;TUNEL染色法观察细胞凋亡;Western blot法检测Cleaved Caspase-3及内质网应激促凋亡蛋白CHOP、Caspase-12的表达。结果 神经功能评分显示,造模24 h后,与假手术组相比,造模组评分显著降低($P<0.01$),表示造模成功。造模5 d后,模型组神经功能评分仍低于假手术组($P<0.01$);松龄血脉康组与依达拉奉组神经功能评分显著高于模型组($P<0.05$),且分别显著高于本组造模后24 h评分($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。错步实验检测发现,模型组的错步次数显著高于假手术组($P<0.01$);松龄血脉康组及依达拉奉组错步次数显著低于模型组($P<0.01$)。HE染色结果发现,与模型组相比,松龄血脉康组及依达拉奉组缺血区脑组织形态结构显著改善。TUNEL染色结果显示,模型组阳性细胞百分比假手术组显著增加($P<0.01$);松龄血脉康组及依达拉奉组阳性细胞百分比模型组显著减少($P<0.01$)。Western blot检测结果显示,模型组Cleaved Caspase-3与CHOP、Caspase-12相对蛋白表达量较假手术组显著增高($P<0.01$);松龄血脉康组及依达拉奉组Cleaved Caspase-3及CHOP、Caspase-12相对蛋白表达量较模型组明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.05$)。结论 松龄血脉康胶囊可能是通过降低内质网应激促凋亡蛋白CHOP、Caspase-12的表达减少细胞凋亡,减轻脑缺血再灌注损伤,发挥神经保护作用。

〔关键词〕 脑缺血再灌注损伤;松龄血脉康胶囊;依达拉奉注射液;内质网应激;细胞凋亡;凋亡蛋白

〔中图分类号〕R255.2

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.05.006

Effects of Songling Xuemaikang Capsule on Endoplasmic Reticulum Stress Related Apoptosis Proteins in Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

MA Zhe¹, WANG Sijin^{1,2}, GAO Yonghong¹, CHENG Weiting¹, GONG Zhuoyan¹, SUN Yikun¹, XUE Chengyuan¹,
JIN Qiushuo¹, GAO Ying^{1,2}, LOU Lixia^{1*}

(1. Ministry of Education and Beijing Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2. Institute of Traditional Chinese Encephalopathy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the protective effect of Songling Xuemaikang Capsule on cerebral ischemia reperfusion injury in rats and its effect on the apoptosis of endoplasmic reticulum stress cells. Methods A total of 11 male SD rats were randomly selected from 50 male SD rats as the sham group. The other rats were established by right middle cerebral artery embolization to prepare cerebral ischemia reperfusion injury model. 33 rats were successfully modeled, and were randomly divided

〔收稿日期〕2021-03-02

〔基金项目〕国家自然科学基金面上项目(81473660);国家自然科学基金青年项目(81403366)。

〔作者简介〕马 喆,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治心脑血管疾病的机制。

〔通讯作者〕* 娄利霞,女,副研究员,硕士研究生导师,E-mail:lixialou@163.com。

into model group, Songling Xuemaikang group and edaravone group with 11 rats in each group. And they were respectively given distilled water [10 mL/(kg·d)], Songling Xuemaikang Capsules solution [10 mL/(kg·d)] and edaravone injection [3.15 mL/(kg·d)]. They were all treated for 5 days. Neurological function score was used to detect the neurological function 24 hours after modeling and 5 days after administration. Stagger-step experiment was used to detect the number of stagger-step. HE staining was used to observe the morphology and structure of cerebral ischemia in rats. Cell apoptosis was observed by TUNEL staining. The expression of Cleaved Caspase-3 and endoplasmic reticulum stress pro-apoptotic proteins CHOP and Caspase-12 were detected by Western blot.

Results Neurological function score showed that, 24 hours after modeling, the score of the modeling group was significantly lower than that of the sham group ($P<0.01$), indicating that the modeling was successful. After 5 days of modeling, the neurological function score of model group was still lower than that of sham group ($P<0.01$). The neurological function score in Songling Xuemaikang group and edaravone group was significantly higher than that in model group ($P<0.05$), and was significantly higher than that in self group 24 hours after modeling ($P<0.05$, $P<0.01$) respectively. Stagger-step experiment showed the number of wrong steps in the model group was significantly higher than that in the sham group ($P<0.01$). The number of wrong steps in Songling Xuemaikang group and edaravone group was significantly lower than that in model group ($P<0.01$). The results of HE staining showed that, compared with the model group, the morphological structure of ischemic brain tissue in Songling Xuemaikang group and edaravone group was significantly improved. TUNEL staining showed that the percentage of positive cells in the model group was significantly higher than that in the sham group ($P<0.01$). The percentage of positive cells in Songling Xuemaikang group and edaravone group was significantly lower than that in model group ($P<0.01$). Western blot results showed that the relative protein expression levels of Cleaved Caspase-3, CHOP and Caspase-12 in model group were significantly higher than those in sham group ($P<0.01$). The relative protein expression levels of Cleaved Caspase-3, CHOP and Caspase-12 in Songling Xuemaikang group and edaravone group were significantly decreased compared with model group ($P<0.05$ or $P<0.01$).

Conclusion Songling Xuemaikang Capsule may reduce cell apoptosis by reducing the expression of endoplasmic reticulum stress pro-apoptotic proteins CHOP and Caspase-12, alleviate cerebral ischemia reperfusion injury and play a neuroprotective role.

[**Keywords**] cerebral ischemia reperfusion injury; Songling Xuemaikang Capsule; edaravone injection; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; apoptosis proteins

缺血性脑卒中又称中风,其发病原因多为血管阻塞,当阻塞的血管恢复血流通畅后,反而使脑组织的损伤加重,称之为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)。近年来,脑卒中在我国患病群体中占比逐年上升,是导致死亡和残疾的重要原因之一^[1],而患有高血压、高血脂等基础疾病的人群更易发生脑卒中,CIRI是缺血性脑卒中发展过程中的一个病理过程,是影响缺血性脑卒中的预后和转归的重要因素之一^[2]。松龄血脉康胶囊是临床常用药物,可以治疗高血压、高血脂等病,且疗效显著^[3]。已有研究^[4]表明,松龄血脉康胶囊可以减少 CIRI 后神经元细胞凋亡的发生,但其具体分子机制并不清楚。CIRI 的病理机制包括线粒体能量代谢障碍、氧化应激、细胞凋亡等,其中细胞凋亡是 CIRI 的重要机制之一^[5]。细胞凋亡通路包括外源性死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径 3 条,其中内质网途径是细胞凋亡的重要通路^[6]。本研究拟在 CIRI 动物模型中探讨松龄血脉康胶囊是否通过抑制内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)细胞凋亡信号通路治疗 CIRI,从而保护大脑神经细胞,以期松龄血脉康胶囊在脑血管病中的临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量(250~280) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SYXK(京)2016-0006,动物使用许可证号:SYXK(京)2020-0013。动物饲养于北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室动物房(SPF 级),符合动物伦理审查要求。

1.2 试剂及仪器

松龄血脉康胶囊(批号:1901007,国药准字 Z10960023,成都康弘制药有限公司);依达拉奉注射液(批号:80-190907,国药准字 H20031342,南京先声东元制药有限公司);CHOP(批号:L63F7)、Cleaved Caspase-3(批号:Asp175)购自美国 CST 公司;Caspase-12(批号:ab62484)、GAPDH(批号:ab181602)、 β -actin(批号:ab3280)购自美国 Abcam 公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(批号:G3250,美国 Promega 生物公司);全蛋白提取试剂盒(批号:KGP250,江苏凯基技术生物有限公司);DeadEnd™ TUNEL 荧光染色试剂盒(批号:G3250,美国 Promega 生物公司);裂解液(批号:P0013B,碧云天生物技术

公司);PAGE胶(批号:PG113,上海雅酶生物科技有限公司);Western封闭液(批号:P0252,碧云天生物技术公司);羊抗兔二抗(批号:RS0002,美国ImmunoWay Biotechnology公司)。

酶标仪(型号:RT-6000,深圳Rayto公司);自动错步分析仪(型号:BIO-FMA,美国Harvard Apparatus公司);凝胶成像仪(型号:Tanon 4600,北京原平皓生物技术有限公司)。

1.3 动物模型制备

雄性SD大鼠适应性喂养至体质量250~280 g后,禁食12 h,常规给水,1%戊巴比妥腹腔注射(5 mL/kg体质量)进行麻醉,仰卧位固定于鼠板,线栓法制备右侧大鼠大脑中动脉栓塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO),栓线直径0.26 mm,遇到阻碍即停止,插入深度约2 cm,缺血1.5 h后拔出栓线。假手术组大鼠仅分离血管,不插入线栓。在手术结束24 h后对大鼠进行Zea-Longa's评分^[7],得分为1~3分则可入组,余舍弃不用。

1.4 动物分组与干预

从50只雄性SD大鼠中随机选取11只为假手术组,其余大鼠采用右侧大脑中动脉栓塞法制备CIRI模型,造模成功的33只大鼠随机分为模型组、松龄血脉康组及依达拉奉组,每组11只。假手术组及模型组大鼠灌胃蒸馏水10 mL/(kg·d);松龄血脉康组灌胃松龄血脉康胶囊溶液10 mL/(kg·d)(溶液浓度:47.25 mg/mL);依达拉奉组腹腔注射依达拉奉注射液3.15 mL/(kg·d)(溶液浓度:2 mg/mL)。干预5 d后进行检测并取材。

1.5 各组大鼠 Garcia 改良神经功能评分

在MCAO术后24 h及药物干预5 d后,根据Garcia^[8]改良神经功能评分标准对大鼠进行评分,具体评分细则包括自发活动、前肢运动、攀爬能力、躯体感觉、胡须刺激以及平衡木实验。每组大鼠记录造模24 h及造模5 d后的评分,并进行统计。

1.6 错步实验观察大鼠错步次数

各组大鼠干预5 d后进行错步实验^[9]。将大鼠放入错步仪的起始位置,使其跑向终点,在此过程中软件监测并记录大鼠的错步次数。大鼠的四肢或尾巴低于错步仪中的踏板以下的位置时,电脑自动记录一次错步。为减少误差,错步仪中前10个踏板不计算在内。

1.7 HE染色法观察大鼠脑组织形态结构

大鼠脑组织灌流后进行组织固定,48 h后脱水、包埋、切片(厚度为5 μm)。二甲苯脱蜡,梯度浓

度酒精下行水化,采用苏木精-伊红(HE)染液进行胞核和胞质染色,梯度浓度酒精上行脱水,二甲苯透明并滴加中性树脂胶封片,在显微镜下进行观察并拍照。

1.8 TUNEL染色法检测大鼠脑组织细胞凋亡

根据试剂盒操作说明,将大鼠脑组织石蜡切片脱蜡、水化,组织固定于室温30 min,用PBS进行清洗,滴加蛋白酶K工作液(100 μL/片)室温孵育10 min进行消化,PBS清洗后再次室温固定5 min。PBS清洗后,滴加Equilibration Buffer液(100 μL/片)室温孵育10 min用于反应前平衡,吸去Equilibration Buffer液,滴加含荧光标记底物的末端DNA转移酶反应混合液(50 μL/片),37℃避光孵育60 min,2×SSC溶液清洗,最后滴加内含DAPI成分的抗荧光衰减封片剂(10 μL/片)封片。在荧光显微镜下观测,每张切片随机选择10个脑组织缺血区,在400倍镜视野下进行拍照,用Image J软件对凋亡细胞数量进行统计,细胞凋亡率=阳性细胞数/总细胞数×100%。

1.9 Western blot法检测各组大鼠脑组织的Cleaved Caspase-3、CHOP、Caspase-12蛋白表达

取大鼠缺血区脑组织50 mg,加入其10倍体积的裂解液进行蛋白提取,蛋白浓度的测定采用BCA法,并将其浓度全部调整为4 μg/μL,分装冻存于-80℃冰箱备用。采用快速凝胶法制备12.5%的PAGE胶,电泳将不同分子量的蛋白分离(上样量:40 μg),并将其转移至孔径为0.22 μm的NC膜,采用Western封闭液室温封闭1 h后分别加入一抗Cleaved Caspase-3、CHOP、Caspase-12(比例均为1:1 000)及GAPDH(1:10 000)、β-actin(1:20 000),将加入一抗的NC膜存放于4℃冰箱孵育过夜,次日回收一抗,清洗后加入羊抗兔二抗(1:20 000)室温孵育1 h,洗涤后在暗环境中滴加发光液并使用凝胶成像仪记录,Image J软件分析条带相对灰度值,β-actin或GAPDH为内参。

1.10 统计学方法

实验数据通过SPSS 20.0软件进行统计分析,数据结果用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。符合正态分布且方差齐的数据,采用单因素方差分析,组间两两比较采取LSD检验进行;符合正态分布但方差不齐的数据,组间比较则采用单因素方差分析中Dunnett T3检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠神经功能评分比较

造模 24 h 后,假手术组神经功能评分为 22 分,模型组、松龄血脉康组及依达拉奉组评分均低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.01$),表示造模成功。造模 5 d 后,模型组、松龄血脉康组与依达拉奉组神经功能评分仍低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.01, P<0.05$);松龄血脉康组与依达拉奉组神经功能评分显著高于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与造模 24 h 后比较,假手术组及模型组在造模 5 d 后的评分无显著差异($P>0.05$);松龄血脉康组及依达拉奉组神经功能评分显著高于造模 24 h 后评分,差异有统计学意义($P<0.01, P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分($n=5, \bar{x}\pm s$, 分)

组别	造模 24 h 后	造模 5 d 后
假手术组	22.00±0.00	22.00±0.00
模型组	13.60±1.67 ^{##}	15.00±1.87 ^{##}
松龄血脉康组	13.60±1.14 ^{##}	19.40±1.14 ^{*△△}
依达拉奉组	13.80±0.84 ^{##}	18.80±1.64 ^{*△}

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与造模 24 h 后比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

2.2 各组大鼠错步实验结果比较

与假手术组比较,模型组、松龄血脉康组及依达拉奉组大鼠的错步次数显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,松龄血脉康组及依达拉奉组大鼠错步次数显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$);松龄血脉康组与依达拉奉组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠错步实验结果比较($n=6, \bar{x}\pm s$, 次)

组别	错步数/次
假手术组	0.83±0.75
模型组	11.00±1.41 ^{##}
松龄血脉康组	3.67±1.03 ^{##**}
依达拉奉组	3.67±0.82 ^{##**}

注:与假手术组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$

2.3 HE 染色观察各组大鼠脑组织形态结构改变

假手术组大鼠大脑皮层神经元细胞形态完整、结构正常、胞核清晰,胞质充盈,细胞排列整齐;模型组大鼠大脑皮层神经元细胞皱缩,染色质深浓,胞核与胞质无明显分界,部分细胞呈空泡状改变;与模型组比较,松龄血脉康组及依达拉奉组大鼠大脑皮层神经元细胞皱缩减少、细胞形态及结构明显改善。见图 1。

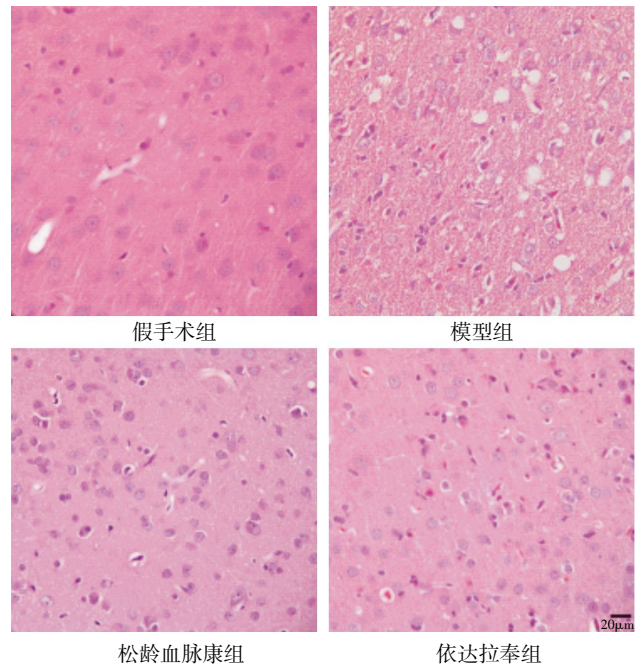


图 1 各组大鼠大脑 HE 染色结果($\times 400$)

2.4 TUNEL 染色观察各组大鼠脑组织细胞凋亡情况

假手术组无阳性细胞染色;与假手术组相比,模型组、松龄血脉康组及依达拉奉组阳性细胞百分比显著增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,松龄血脉康组及依达拉奉组阳性细胞百分比显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$);与依达拉奉组相比,松龄血脉康组阳性细胞百分比显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 2、表 3。

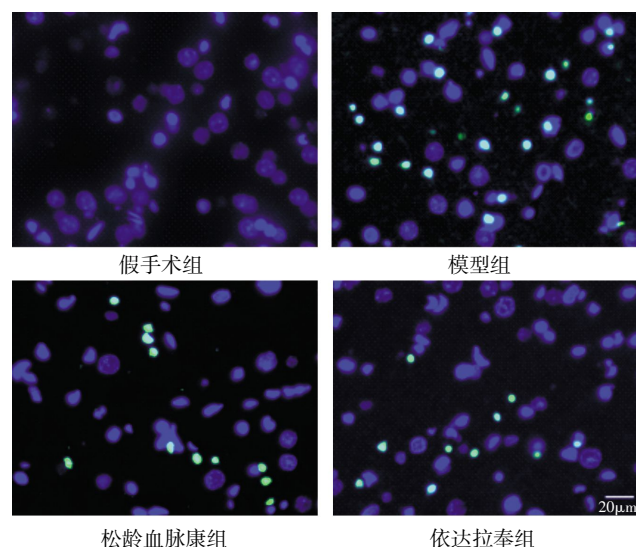


图 2 各组大鼠大脑 TUNEL 染色结果($\times 400$)

2.5 各组大鼠脑组织凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 及 ERS 促凋亡蛋白 CHOP 和 Caspase-12 的表达

与假手术组相比,模型组、松龄血脉康组及依达

表3 各组大鼠大脑 TUNEL 染色细胞凋亡百分比结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	细胞凋亡百分比/%
假手术组	0.00±0.00
模型组	26.52±3.36 [#]
松龄血脉康组	11.66±0.96 ^{#**△△}
依达拉奉组	12.69±1.92 ^{#**}

注:与假手术组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与依达拉奉组比较,^{△△} $P<0.01$

拉奉组 Cleaved Caspase-3 与 CHOP、Caspase-12 相对蛋白表达量显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,松龄血脉康组及依达拉奉组 Cleaved Caspase-3 及 CHOP、Caspase-12 相对蛋白表达量明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与依达拉奉组相比,松龄血脉康组 Cleaved Caspase-3 及 CHOP、Caspase-12 相对蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3、表4。

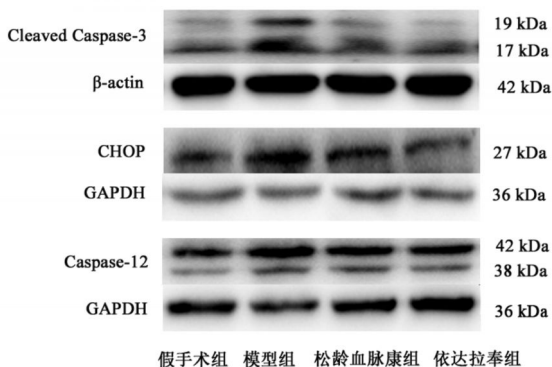


图3 各组大鼠脑组织 Cleaved Caspase-3 及 CHOP、Caspase-12 相对蛋白表达条带图

表4 各组大鼠脑组织 Cleaved Caspase-3 及 CHOP、Caspase-12 相对蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	Cleaved Caspase-3	CHOP	Caspase-12
假手术组	1.13±0.31	1.13±0.11	0.90±0.24
模型组	2.35±0.52 [#]	2.20±0.49 [#]	2.12±0.78 [#]
松龄血脉康组	1.67±0.51 [*]	1.44±0.21 ^{**}	1.34±0.42 [*]
依达拉奉组	1.61±0.63 [*]	1.27±0.32 ^{**}	1.13±0.39 ^{**}

注:与假手术组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

3 讨论

松龄血脉康胶囊成分为鲜松叶、珍珠层粉、葛根;鲜松叶具有祛风燥湿、活血安神等作用。《本草汇言》记载松毛能治“大风痲疾”;珍珠层粉具有重镇平肝、清热凉血等作用,《本草汇言》记录珍珠层粉“镇心,定志”;葛根具有解肌生津、升阳止泻等作用,是阳明经引经药,《本草正》记录葛根“凡热而兼渴

者,此为最良”;三药相伍,共奏平肝潜阳息风、镇心安神之效。CIRI 的中医病机为肝阳上亢,气血逆乱,上犯于脑,因此,从中医学理论角度而言,松龄血脉康可以治疗 CIRI。目前的研究^[10-12]表明,鲜松叶、葛根及珍珠层粉均具有抗氧化应激的作用。CIRI 时会产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),发生脂质过氧化反应,破坏内质网的 Ca^{2+} 稳态,从而诱发 ERS 介导的细胞凋亡^[13]。因此,推测松龄血脉康可以通过减轻 ERS 改善 CIRI。依达拉奉注射液具有抗 ERS 凋亡、清除氧自由基的作用,在 CIRI 中发挥神经保护作用^[14],故作为本研究的阳性对照组。

缺血性脑卒中急性期血管再通后,脑组织缺血区的半暗带受到再灌注损伤,而细胞凋亡是 CIRI 的重要机制之一^[15-16]。CIRI 的治疗旨在减少细胞凋亡,减轻组织灌注不足带来的影响,挽救缺血半暗带,促进神经功能恢复等^[17]。在本研究中,造模 24 h 后模型组大鼠神经功能评分较低($P<0.01$),且与造模 5 d 后相比,其神经功能无显著差异;松龄血脉康组与依达拉奉组在干预 5 d 后神经功能评分显著高于模型组($P<0.05$),并且分别高于本组造模 24 h 后评分($P<0.01, P<0.05$),同时,松龄血脉康组与依达拉奉组神经功能评分无显著差异。表明松龄血脉康胶囊及依达拉奉注射液可以改善 CIRI 后大鼠的神经功能,并且松龄血脉康胶囊和依达拉奉注射液的效果相当。错步实验可以检测大鼠共济失调情况,模型组大鼠错步次数显著增加($P<0.01$),经过松龄血脉康胶囊与依达拉奉注射液治疗后其错步次数显著减少($P<0.01$),说明松龄血脉康胶囊可以改善 CIRI 大鼠共济失调,并且和依达拉奉注射液效果相当。HE 染色中,经过松龄血脉康胶囊和依达拉奉注射液治疗后神经元细胞形态结构较模型组改善。以上研究表明松龄血脉康胶囊可以改善大鼠 CIRI 缺血区神经元细胞形态结构,具有神经保护作用。

已有研究^[18]表明,ERS 是 CIRI 细胞凋亡信号通路的关键组成部分。内质网是蛋白质合成的重要场所,并且参与钙离子稳态调节、脂质和葡萄糖代谢^[19]。当 CIRI 发生时,内质网的稳态被破坏,产生 ERS,导致蛋白质合成障碍而使错误折叠蛋白产生并积聚,从而激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),最初 UPR 的激活可以帮助重建内质网稳态并使内质网功能恢复正常,但是持久而严重的 CIRI 激活 ERS 凋亡通路发生细胞凋亡^[20]。CHOP 是 ERS 信号通路下游重要的促凋亡因子,参与内质网介导的细胞凋亡^[21]。现有研究^[22]表明 CHOP 基因沉默可

以减轻 ERS 诱导的细胞凋亡。CHOP 蛋白的表达可通过 ERS 信号通路 PERK-eIF2-ATF4 及 IRE1a-JNK 调节, ERS 激活 PERK 及 IRE1a, 增加 CHOP 蛋白的表达, 调节 Bcl-2 蛋白及 Bax 蛋白的表达并且启动 Caspase 凋亡信号通路发生细胞凋亡^[23]。Caspase-12 是 ERS 凋亡通路中另一个重要的蛋白, 存在于内质网膜中, 通常以无活性的前体形式存在。已有的研究^[24]证明 ERS 介导的细胞凋亡可以通过抑制 Caspase-12 蛋白表达而减轻。ERS 可以激活 IRE1, 活化的 IRE1 激活 Caspase-12, 启动内质网介导的细胞凋亡^[25]。Caspase-12 活化并裂解 Caspase-9, 后者进一步活化裂解 Caspase-3, 最终导致细胞凋亡。在本研究中, 模型组 Cleaved Caspase-3 与 CHOP、Caspase-12 相对蛋白表达量显著增高 ($P < 0.01$), 而经松龄血脉康胶囊及依达拉奉注射液干预 5 d 后, 其蛋白表达量显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。并且 TUNEL 染色显示模型组阳性细胞百分比显著增加 ($P < 0.01$), 而经松龄血脉康胶囊及依达拉奉注射液干预 5 d 后其阳性细胞百分比显著减少 ($P < 0.01$), 且松龄血脉康组比依达拉奉组细胞凋亡百分比低 ($P < 0.01$)。以上结果表明松龄血脉康胶囊可以减少 ERS 引起的细胞凋亡, 并且其对细胞凋亡的作用与依达拉奉注射液相仿。因此, 推测松龄血脉康胶囊可能是通过降低 ERS 特异的促凋亡蛋白 CHOP、Caspase-12 的表达水平减少细胞凋亡, 减轻 CIRI, 发挥神经保护作用。

参考文献

- [1] ROGER V L, GO A S, LLOYD-JONES D M, et al. Executive summary: Heart disease and stroke statistics: 2012 update: A report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2012, 125(1): 188-97.
- [2] 王拥军, 李子孝, 谷鸿秋, 等. 中国卒中报告 2019(中文版)(1)[J]. *中国卒中杂志*, 2020, 15(10): 1037-1043.
- [3] 蔡周权, 袁浩宇, 俞瑜. 松龄血脉康胶囊联合辛伐他汀治疗心绞痛伴高血脂血症 48 例临床评价[J]. *中国药业*, 2015, 24(17): 29-30.
- [4] 梁汝庆, 姜婧, 丁新生, 等. 松龄血脉康对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤和细胞凋亡的影响[J]. *中国新药与临床杂志*, 2010, 29(3): 221-224.
- [5] 陈媛, 吴海金, 黄晓松, 等. 葛根素对脑缺血再灌注大鼠海马组织 P-STAT3、P53 表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2018, 38(1): 36-39.
- [6] 李春红, 王婕, 吴爱明, 等. 内质网应激与心力衰竭的相关性研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(12): 1662-1666.
- [7] 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.
- [8] GARCIA J H, WAGNER S, LIU K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634, 635.
- [9] METZ G A, WHISHAW I Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: A new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2002, 115(2): 169-179.
- [10] 劳业兴, 张冰若, 苏薇薇. 松龄化学成分及药理研究进展[J]. *中药材*, 2003, 26(9): 681-683.
- [11] 李端, 徐翔, 吴佩君, 等. 水解珍珠层粉在小鼠体内的抗氧化作用[J]. *中成药*, 1996(12): 30-31.
- [12] 毛庆军, 夏瑞, 张传汉. 葛根素对脑缺血再灌注家兔脑组织及内皮细胞的保护[J]. *中国临床康复*, 2006(3): 40-41.
- [13] 周映彤, 肖洪彬, 毕明刚. 活性氧与内质网应激[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(5): 597-600.
- [14] KIKUCHI K, TANCHAROEN S, TAKESHIGE N, et al. The efficacy of edaravone (radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7): 13909-13930.
- [15] MANDALANENI K, RAYI A, JILLELLA D V. Stroke reperfusion injury[M]. *Internet: StatPearls*, 2020: 1-24.
- [16] 雷梦南, 李玉, 胡建鹏. 脑缺血再灌注损伤分子生物学机制及现代中医药治疗进展[J]. *长春中医药大学学报*, 2019, 35(5): 991-994.
- [17] SAVITZ S I, BARON J C, YENARI M A, et al. Reconsidering neuroprotection in the reperfusion era[J]. *Stroke*, 2017, 48(12): 3413-3419.
- [18] 李欲轲, 熊孟连, 徐德, 等. 内质网应激与凋亡研究进展[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(23): 7856-7862.
- [19] PRENTICE H, MODI J P, WU J Y. Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity endoplasmic Reticulum stress and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 2015: 964518.
- [20] LALKOVIOV M, DANIELISOV V. Neuroprotection and antioxidants[J]. *Neural Regeneration Research*, 2016, 11(6): 865-874.
- [21] WALTER P, RON D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation[J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [22] 雷艳, 詹世准, 陈俊秋, 等. CHOP 双重调控衣霉素诱导的 DU-145 细胞凋亡及自噬的研究[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2018, 8(5): 257-263.
- [23] LI Y M, GUO Y S, TANG J, et al. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014, 46(8): 629-640.
- [24] KIKUCHI K, TANCHAROEN S, TAKESHIGE N, et al. The efficacy of edaravone (radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7): 13909-13930.
- [25] ZHAO X M, ZHU L, LIU D Y, et al. Sigma-1 receptor protects against endoplasmic Reticulum stress-mediated apoptosis in mice with cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Apoptosis*, 2019, 24(1/2): 157-167.