

# 内质网应激通路在脑泰方提取物保护局灶性缺血大鼠海马神经元中的作用

石咏梅<sup>1</sup> 廖 君<sup>1</sup> 黄 娟<sup>3</sup> 易亚桥<sup>2</sup> 杨 丽<sup>3</sup> 王国佐<sup>3</sup> 余清平<sup>1</sup> 葛金文<sup>3</sup>

(1 湖南中医药大学解剖教研室,长沙,410083; 2 湖南中医药大学中医学院,长沙,410083; 3 湖南中医药大学中西医结合学院,长沙,410083)

**摘要** 目的:缺血性脑卒中是发病率越来越高的一种临床疾病,但是有关它的治疗还缺乏十分有效的手段,此实验的目的是通过探索中药复方(脑泰方)提取物作用于脑缺血的可能机制从而为临床提供有针对性的治疗方案。方法:自备中药复方益气活血方(脑泰方)连续灌胃 7 d,在体制备大鼠大脑中动脉栓塞模型(MCAO),观察术后大鼠的神经行为,同时使用 TTC 染色观察神经元凋亡情况,RT-qPCR 观察内质网应激通路相关蛋白的表达。结果:神经行为学评分反应出脑泰方(NTF)提取物可改善大鼠脑缺血后的神经行为;TTC 染色显示脑泰方可明显增加 MCAO 后海马 CA1 区神经元的存活。RT-qPCR 显示脑泰方能明显促进 GRP78 基因的表达,同时抑制 CHOP 基因的表达。结论:内质网应激参与了缺血导致的大鼠大脑海马神经元的损伤。益气活血法对脑缺血引发的内质网应激具有一定的干预作用,尤其是在脑缺血的早期。

**关键词** 脑泰方;内质网;应激;海马;神经元

## The Role of ER Stress in Protection Effect of Naotai Fomula Extraction on Ischemia Hippocampus Neuron of Rats

Shi Yongmei<sup>1</sup>, Liao Jun<sup>1</sup>, Huang Juan<sup>3</sup>, Yi Yaqiao<sup>2</sup>, Yang Li<sup>3</sup>, Wang Guozuo<sup>3</sup>, Yu Qingping<sup>1</sup>, Ge Jinwen<sup>3</sup>

(1 Department of Anatomy, Hunan university of Chinese medicine, Changsha 410083, China; 2 Traditional Chinese Medicine College of Hunan university of Chinese medicine, Changsha 410083, China; 3 Integrated Traditional Chinese and Western Medicine College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410083, China)

**Abstract Objective:** To observe the possible mechanisms of the extraction of Naotai Fomula (NTF) on the regional cerebral ischemia so as to provide treatment to the more and more common disease-cerebral arterial thrombosis. **Methods:** Self-made Naotai Fomula were given to SD rats by gavage administration for 7 days before the occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) operation. After the operation, the TTC staining was used to show the apoptosis of the hippocampal neurons and RT-PCR was used to show gene expression of GRP78 and CHOP of the ischemia cerebrum of rats. **Results:** Firstly, the extraction of NTF could improve the neuro behavior score and at the same time decrease the death rate of the hippocampal neuron after MCAO operation. Secondly, the extraction of NTF elevated the expression of GRP78 and decreased the expression of CHOP. **Conclusion:** Firstly, ER Stress is involved in the hippocampal neuronal injury caused by the ischemia in the rats. Secondly, the extraction of NTF can regulate ERS especially in the early stage after acute ischemia of the brain in rats.

**Key Words** Naotai Fomula; Endoplasmic reticulum; stress; Hippocampus; Neuron

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.04.006

## 1 前言

脑血管疾病是威胁人类健康的重大疾病之一,具有高死亡率,高发病率和并发症发生率的特点,其中约 70% 为缺血性脑血管疾病。随着人们生活水平的提高和社会竞争的日益激烈,脑血管病的发病率呈不断增高的趋势,因此研究中药复方对脑缺血的治疗作用及其作用机制具有重要的意义。

目前中药和中药复方主要通过:1)改善脑血液

循环,增加脑血流量。2)减轻神经细胞的形态学损伤。3)改善脑细胞能量代谢。4)抗氧化作用。5)减轻炎症反应。6)抑制细胞凋亡。7)促进血管新生等作用机制保护缺血后的脑神经元<sup>[1]</sup>。随着脑缺血性疾病治疗的中药愈来愈多,有中药提取成分也有中药复方。考虑到脑缺血发病机制的复杂性,具有多作用靶点的中药复方将发挥愈来愈重要的角色,但到目前为止,中药和中药方剂作用于脑缺血的现

基金项目:湖南省教育厅项目(编号:13C699)——基于内质网应激通路的调控探讨脑泰方治疗脑缺血的分子机制;湖南省中医药管理局项目(编号:201593)——从亚细胞应激反应的角度探讨益气活血法治疗脑缺血的分子机制;国家自然科学基金青年项目(编号:81303078)——基于铁代谢失调探讨脑缺血及缺血再灌注损伤新机制及益气活血法的干预作用

作者简介:石咏梅(1979.06—),女,在读博士研究生,讲师,研究方向:脑血管病的中医药防治,E-mail:1585163439@qq.com

通信作者:葛金文(1965.09—),男,博士后,教授,湖南中医药大学副校长,研究方向:脑血管病的中医药防治;血浆药理学,E-mail:40831556@qq.com

代机理还需进一步研究,这也严重制约了中医药的发展。

以往的研究表明,脑缺血性疾病引发的细胞损伤主要集中在钙超载、自由基损伤、线粒体功能障碍、兴奋性氨基酸毒性作用、缺血区半暗带迟发性细胞死亡和缺血区细胞凋亡和自噬等方面<sup>[2-3]</sup>。然而脑缺血性疾病发病过程和发病机制非常复杂,且各种发病机制之间存在相互影响,构成了一个复杂的发病机制网络。同时随着研究的深入众多的实验证据表明各种细胞器在脑缺血引发的脑损伤中的发生和发展过程中发挥着重要作用。

研究发现脑组织缺血或者缺血再灌注后,钙超载、ATP耗竭及自由基生成等因素均可引起包括内质网、线粒体和高尔基体等多个亚细胞器超微结构的形态和功能发生变化,并且出现一系列的亚细胞应激反应,可作为判断神经细胞受损与否以及损伤程度的重要标志。内质网应激是研究最早并且是目前研究最为深入的亚细胞反应。

基于此,我们拟用形态学技术以及分子生物学技术,探讨益气活血方(补养还五汤的加减方:脑泰方)对局灶性脑缺血后内质网功能的影响,从而观察其治疗作用是否与调节缺血后内质网应激并进而抑制神经细胞凋亡有关。

## 2 材料和方法

2.1 动物来源 实验使用健康成年 SD 大鼠,体重 220 ~ 250 g,雄性。来源于湖南中医药大学实验动物中心,共 120 只。

2.2 药物制备及使用方法 脑泰方提取物:脑泰方由黄芪、川芎、地龙和僵蚕组成,经水煎、醇提后制成浸膏粉(由湖南中医药大学药学院制剂教研室提取)<sup>[4]</sup>。临用时以生理盐水调成所需浓度。选取高中低 3 个浓度即每 200 mL 生理盐水中分别加入 15.42 g 7.71 g 3.86 g NTF。对照药物采用尼莫地平,使用时配置成浓度 3.2 mg/mL。

2.3 动物模型 大脑中动脉栓塞(MCAO)法制备大鼠局灶性脑缺血模型<sup>[5]</sup>。10%水合氯醛按 0.2 mL/50 g 体重腹腔注射麻醉。仰卧位固定,颈正中线切口,分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。然后在距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一小口,将拴线(用直径为 0.26 mm 渔线,头端用石蜡制备成膨大且光滑的球形,头直径为 0.32 ~ 0.34 mm)插入到 ICA,插入深度为(22 ± 0.5) mm。神经行为学改变和 TTC 染色判断造模是否成功。

## 2.4 试验方法

2.4.1 神经行为学评分 采用 Longa 等制定的 5 级评分法,0 分为无功能障碍;1 分为不能伸展前肢;2 分为向一侧旋转;3 分为向一侧倾倒;4 分为无自主活动伴意识抑制<sup>[6]</sup>。

2.4.2 TTC 染色 10%水合氯醛按 0.2 mg (kg · wt)麻醉大鼠,取脑置于 -20 ℃冰箱冷冻 20 min,取出后置于脑槽中使用手术刀片切片,第 1 刀位于脑前极与视交叉连线终点处,第 2 刀位于视交叉处,第 3 刀位于漏斗柄处,第 4 刀位于漏斗柄与后叶尾极之间。切片置于 37 ℃ 2% TTC 染液中避光孵育 15 min,4%多聚甲醛固定,拍照,缺血区呈白色。取第 3 片使用 Motic 图像分析软件分析缺血区占整个脑组织切片面积的百分比。

2.4.3 qPCR 检测相关基因的表达 1)引物设计:从 NCBI 中下载以下基因序列,引物设计采用 Primer 5.0 软件,引物序列见表 1。

表 1 GRP78 和 CHOP 的引物序列

| Gene    | Name      | Sequence                    | Tm   | 长度    |
|---------|-----------|-----------------------------|------|-------|
| GRP78   | Sense     | 5'-GCACAGACGGGTCAATCCAC-3'  | 59 ℃ | 120bp |
|         | Antisense | 5'-CCTATGTGCGCTTCACTCC-3'   |      |       |
| CHOP    | Sense     | 5'-CACTCTTGACCTGCTTCTC-3'   | 60 ℃ | 116bp |
|         | Antisense | 5'-TCTTCTCTCTCTTCTCTCTG-3'  |      |       |
| β-actin | Sense     | 5'-AGTGGCGACCTGGACATCCG-3'  | 60 ℃ | 166bp |
|         | Antisense | 5'-TGGCTCTAACAGTCCGCCTAG-3' |      |       |

2)RNA 提取及逆转录:从组织中提取 RNA 并反转录得到 cDNA,并以该 cDNA 为模板,用针对目的基因设计合成的 QPCR 引物进行 real-time PCR,以检测组织中目的基因的表达。按照以下步骤抽提组织中总 RNA:取 50 ~ 100 mg 组织,每孔加入 1000 μL Trizol,吹打,室温静置 5 min;每管加入 200 μL 氯仿,剧烈震荡 15 s,室温静置 3 min;4 ℃,12 000 r/min,离心 15 min;从每管中吸取上清至另一新的 1.5 mL EP 管。加入等体积异丙醇,混匀后室温静置 20 min;4 ℃,12 000 r/min,离心 10 min 后,去上清;加入至少 1 mL 4 ℃预冷的 75%乙醇,洗涤沉淀;4 ℃,10 000 r/min 离心 5 min,弃上清;4 ℃,10 000 r/min 再次离心 5 min,吸去残液,室温干燥(不需完全干燥);加入 20 μL RNase-free 水,至完全溶解,取 1 μL 进行电泳检测。

3)1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 纯度 见图 1。

4)测 RNA 浓度与纯度。见表 2。

5)第一链 cDNA 合成:取 1.0 μg Total RNA 加 Nuclease-Free Water 到无 RNA 酶的 EP 管中,混匀后

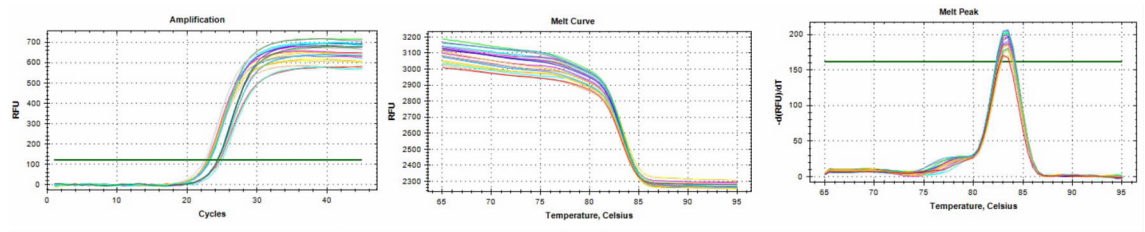


图 2

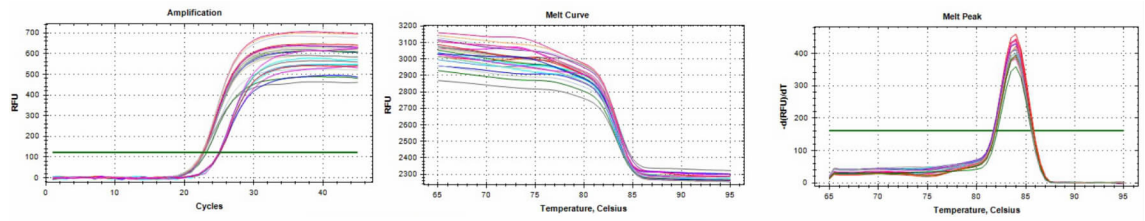


图 3

离心,70 ℃ 温浴 10 min,立即置于冰上。按下表的比例加一下反应体系的其他试剂(冰上进行),混匀,短暂离心。见表 3。

浴锅中水浴 10 min 使 Reverse Transcriptase 失活。将得到 cDNA 置于 -20 ℃ 保存备用。

6)real-time PCR 检测(Bio-Rad CFX Connect)

按下列比例配置反应体系。见表 4。扩增程序:94 ℃ 4 min;94 ℃ 40 s,60 ℃ 30 s,×40cycle。

表 4 RT-qPCR 反应体系

| 名称                    | 体积(μL) |
|-----------------------|--------|
| 2 × Real-time PCR mix | 10     |
| cDNA 模板               | 1      |
| 上游引物                  | 1      |
| 下游引物                  | 1      |
| ddH <sub>2</sub> O    | 7      |
| 总体积                   | 20     |

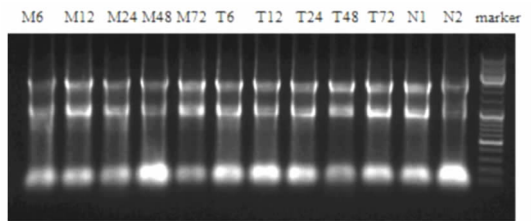


图 1

表 2 RNA 浓度与纯度测定

| 标本     | 浓度(μg/μL) | OD260/280 |
|--------|-----------|-----------|
| M6     | 0.474     | 1.810     |
| M12    | 0.623     | 1.879     |
| M24    | 0.537     | 1.900     |
| M48    | 0.481     | 1.808     |
| M72    | 0.755     | 1.861     |
| NTF6   | 0.720     | 1.904     |
| NTF 12 | 0.716     | 1.905     |
| NTF 24 | 0.719     | 1.862     |
| NTF 48 | 0.787     | 1.887     |
| NTF 72 | 0.790     | 1.870     |
| NC1    | 0.792     | 1.904     |
| NC2    | 0.435     | 1.807     |

表 3 CDNA 合成体系

| 名称                              | 用量     |
|---------------------------------|--------|
| MgCl <sub>2</sub> (25 mM)       | 4 μL   |
| Reverse Transcription 10XBuffer | 2 μL   |
| RNasin 抑制剂                      | 2 μL   |
| AMV Reverse Transcription       | 15 U   |
| Oligo (dT) <sub>15</sub>        | 0.5 μg |
| Total RNA                       | 1 μg   |
| Nuclease-Free Water             | 20 μL  |

7)扩增效率的检测(见图 2,图 3)

2.5 统计分析 所有数据均用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm SD$ )来表示。统计分析使用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$  具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 神经行为学评分 见表 5。

表 5 Neuroethological score of the rats after MCAO ( $\bar{x} \pm SD, n = 10$ )

| Group | NS           | NTF(L)       | NTF(M)     | NTF(H)     | Nimodipine |
|-------|--------------|--------------|------------|------------|------------|
| Score | 2.7 ± 0.15 * | 2.3 ± 0.16 * | 2.0 ± 0.21 | 1.5 ± 0.17 | 1.9 ± 0.18 |

注: \*  $P < 0.05$ 。

3.2 TTC 染色 使用 NTF 提取物后大鼠脑梗死面积明显减少 见图 4。见表 6。

表 6 The percentage of infaract size within 24 hours after MCAO( $\bar{x} \pm SD, n = 10$ )

| Group         | NS            | NTF(L)      | NTF(M)     | NTF(H)     | Nimodipine |
|---------------|---------------|-------------|------------|------------|------------|
| percentage(%) | 24.6 ± 2.07 * | 10.6 ± 1.37 | 9.8 ± 0.85 | 6.4 ± 0.46 | 7.4 ± 0.71 |

注: \*  $P < 0.05$ 。

上述体系在 42 ℃ 反应 15 min,然后在 70 ℃ 水



图 4

3.3 RT-q PCR 结果 CT 值。见表 7。

表 7 RT-qPCR CT 值

| 编号     | GRP78 | CHOP  | beta-actin |
|--------|-------|-------|------------|
| M6     | 23.10 | 24.64 | 23.36      |
| M12    | 22.79 | 24.34 | 23.53      |
| M24    | 22.72 | 23.23 | 23.30      |
| M48    | 22.84 | 23.13 | 23.30      |
| M72    | 25.15 | 23.13 | 23.29      |
| NTF6   | 25.10 | 23.01 | 23.20      |
| NTF 12 | 23.16 | 23.01 | 23.30      |
| NTF 24 | 22.65 | 23.20 | 23.45      |
| NTF 48 | 22.50 | 24.31 | 22.99      |
| NTF 72 | 22.84 | 24.42 | 23.02      |
| NC1    | 25.09 | 23.27 | 22.45      |
| NC2    | 25.01 | 23.18 | 22.98      |
| M6     | 22.62 | 22.93 | 22.73      |
| M12    | 22.47 | 23.03 | 22.48      |
| M24    | 22.50 | 22.47 | 22.91      |
| M48    | 22.77 | 22.80 | 23.12      |
| M72    | 25.02 | 22.83 | 24.15      |
| NTF6   | 25.14 | 23.79 | 24.33      |
| NTF 12 | 22.73 | 24.42 | 24.25      |
| NTF 24 | 22.80 | 23.17 | 24.12      |
| NTF 48 | 22.77 | 22.92 | 24.02      |
| NTF 72 | 22.75 | 24.40 | 24.03      |
| NC1    | 25.09 | 24.32 | 23.93      |
| NC2    | 24.93 | 24.64 | 24.05      |

利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Livak 方法计算目的基因的相对表达量。

4 讨论

内质网是真核细胞内广泛存在的具有管状膜结构的细胞器,负责大部分分泌及跨膜蛋白的合成、修饰加工、成熟和转运。同时内质网也是维持细胞内钙离子平衡的关键场所。作为蛋白折叠、质量控制

及转运定位的中心细胞器,内质网能够调节自身的容量以适应细胞内合成、代谢和其他生理状态的需求。缺血、缺氧、低温和氧化应激等均可导致内质网功能失调,使内质网的折叠能力不能满足细胞内新合成的未折叠蛋白的需求,细胞处于内质网应激状态(UPRER)<sup>[7]</sup>。实验研究发现在植物体内和链孢霉内膜相关基础亮氨酸拉链转录因子 bZIP 和 RNA 剪切因子充当了应激感受器<sup>[8-9]</sup>,但是对哺乳动物而言何种因子充当了应激感受器还需要深入研究。内质网应激早期激活未折叠蛋白反应(UPRER)。

在正常情况下,内质网分子伴侣 (GRP78/BiP) 与 3 种内质网膜上的 UPRER 蛋白 (ATF6, IRE1, PERK) 结合,使其失活。当内质网应激时细胞内积累的未折叠蛋白使 GRP78 与 UPRER 蛋白脱离,从而激活内质网应激通路<sup>[10]</sup>。内质网应激早期的未折叠蛋白反应表现为 3 条应激通路的激活:其一,激活活化转录因子 ATF6,使其转运至高尔基体内被剪切为具有活性的 cATF6, cATF6 从胞浆转运至细胞核,作为转录因子促进 UPRER 及 CAMP 反应元件 (CRE) 的基因激活,上调内质网相关分解蛋白的表达,从而提升细胞降解和清除错误折叠蛋白的能力<sup>[11]</sup>。其二,激活肌醇需要酶 1 (IRE1), IRE1 集激酶和核算内切酶活性于一体,通过自身二聚化和磷酸化被激活的 IRE1 的内切酶活性作用于编码 XBP1 (X-box binding protein 1) 的 mRNA 上,非常规的剪切掉一个由 26 个碱基组成的内含子,形成具有转录活性的转录因子 XBP1s,激活下游一系列 UPRER 基因的转录,包括分子伴侣 GRP、内质网形成、ER 相关分解蛋白 (ERAD) 及蛋白分泌相关基因,从而发挥细胞保护作用<sup>[12]</sup>。其三,激活 PERK,通过磷酸化被激活后形成的活性形式 P-PERK 作用于真核细胞翻译起始因子 eIF2 $\alpha$ ,从而抑制细胞的整体蛋白翻译水平,减轻细胞负担<sup>[13]</sup>。但目前研究发现,若应激持续存在或过强将诱导内质网相关性死亡 (ERAD),即诱导相关性细胞凋亡,清除受损细胞,包括内质网应激诱导 CHOP (CCAAT/enhancer binding protein homologous protein) 表达、生长抑制和 DNA 损伤基因 34 (GADD34) 表达、JNK (c-jun 氨基末端激酶) 的激活以及 caspase-12 蛋白水解酶的活化等一系列生物学效应<sup>[14-16]</sup>。中药及其复方治疗脑缺血性疾病一直是近年来研究的热点,补阳还五汤等一大批中药复方已经应用于临床,而 NTF 作为其加减方其治疗作用我们以往也进行了实验和临床研究。实验表明使用 NTF 提取物后,大鼠 MCAO 术

后神经行为有很明显的改善。TTC 染色显示 NTF 提取物能够显著减少急性期缺血区的面积从而证明了 NTF 的神经保护作用。

众多实验研究发现神经系统的病变如脑缺血性疾病、脑的缺血再灌注损伤、神经退行性疾病(帕金森氏病)等均与 ERS<sup>[17-19]</sup> 密切相关。我们的实验结果表明,在 MCAO 术后,海马神经元 ERS 相关通路蛋白的表达出现了明显变化。首先葡萄糖调节蛋白 78 是热休克蛋白 70 家族的成员之一,作为一种分子伴侣在蛋白质的折叠和转运过程及内质网应激反应中发挥重要作用。Sun X 等通过细胞培养发现 GRP78 在成熟的神经元内的表达明显受到缺血的影响<sup>[20]</sup>。Liu X 在使用长期缺血预处理干预脑缺血的实验中发现 GRP78 的表达显著升高,并伴随 CHOP 的表达下调<sup>[21]</sup>。在广泛性基底前脑缺血时使用 MNAF 可以抑制由于缺血引发的内质网分子伴侣 GRP78 及 XBP1 的表达上调<sup>[22]</sup>。Miura H 等发现 Oida Y 等在侧脑室内注射 BiP(即 GRP78)重链蛋白诱导剂(BiP inducer x-BIX)可以明显减少由于短暂性前脑缺血所引起的海马 CA1 区神经元的死亡<sup>[23]</sup>。Nakka 等研究发现大鼠局灶性缺血再灌注后 GRP78、caspase 9、CHOP 及 XBP1 表达上调<sup>[24]</sup>。我们的实验研究发现,脑缺血后使用 NTE GRP78 的表达明显较模型组升高且维持在较高水平,提示其可能参与了缺血后神经元的保护作用,但是 Duan SR 等通过对脑缺血患者的研究发现在脑缺血后梗死区周围 GRP78、caspase 9( caspase 12 的下游因子)和 TUNEL 阳性细胞依次出现,提示 ERS、凋亡启动和 DNA 分解在神经元内依次出现,而过度的缺血最终导致内质网应激触发细胞凋亡而不是发挥保护作用<sup>[25]</sup>。内质网应激导致细胞凋亡的标志主要是 CHOP 基因表达的增加,研究发现滋补脾阴药物血清和参麦注射液及原青花素等均能够通过抑制 CHOP 的表达从而减少内质网应激引起的神经元凋亡<sup>[26-28]</sup>。而我们的实验研究也发现,使用 NTE 后,CHOP 的表达调,明显下尤其是在术后 72 h 后。提示 NTE 对内质网应激引起的神经元凋亡有一定的抑制作用。

但是,NTE 具体通过哪条途径影响 ERS 还需要进一步的实验研究。中药复方因其成分的复杂性,作用机制也十分复杂,因此其他可能的机制还需要进一步探讨。

#### 参考文献

[1]刘健,樊小农,张占军. 中药治疗脑缺血作用机制的研究进展

- [J]. 中医药学刊,2006,24(2):326-328
- [2]王梅,王友群. 缺血引发的脑损伤发病学机理[J]. 中国实用医药,2008,3(25):183-186.
- [3]Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta2 lactamases among ischeria coli, K lebsiella2 pneumoni-ae, and proteusn[J]. J Clin Microbiol,2000,38(5):1791-1796.
- [4]陈敏,朱惠斌,葛金文,等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠血管新生作用的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报,2010,30(1):12-16.
- [5]Liao J, Xia X, Wang GZ, et al. Naotafang extract treatment results in increased ferroportin expression in the hippocampus of rats subjected to cerebral ischemia[J]. Mol Med Rep,2015,11(6):4047-4052.
- [6]Hunter AJ, Mackay KB, Rogers DC. To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? [J]. Trends Pharmacol Sci,1998,19(2):59-66.
- [7]Mamady H, Storey KB. Coping with the stress; expression of ATF4, ATF6, and downstream targets in organs of hibernating ground squirrels[J]. Archives of biochemistry and biophysics,2008,477(1):77-85.
- [8]Srivastava R, Deng Y, Howell SH. Stress sensing in plants by an ER stress sensor /transducer, bZIP28[J]. Front Plant Sci,2014,26(5):59.
- [9]Montenegro-Montero AI, Goity AI, Larrondo LF1. The bZIP Transcription Factor HAC-1 Is Involved in the Unfolded Protein Response and Is Necessary for Growth on Cellulose in Neurospora crassa[J]. PLoS One,2015,10(7):e0131415.
- [10]Peng L, Fang WR, Geng XH, et al. Therapeutic neuroprotective effects of ginkgolide B on cortex and basal ganglia in a rat model of transient focal ischemia [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences,2011,44(3):235-240
- [11]Zhu H, Wang Z, Xing Y, et al. Baicalin reduces the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia in vitro by increasing the expression of tight junction proteins in brain microvascular endothelial cells[J]. J Ethnopharmacol,2012,141(2):714-720
- [12]Wang J, Hou J, Zhang P, et al. Geniposide reduces inflammatory responses of oxygen-glucose deprived rat microglial cells via inhibition of the TLR4 signaling pathway[J]. Neurochem Res,2012,37(10):2235-2248
- [13]Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Álvarez-Grech J, et al. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats[J]. Neuroscience, 2011,175(1):394-405
- [14]Song L, Wang Y, Wang J, et al. Trinitrotoluene Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in HePG2 Cells[J]. Med Sci Monit. 2015,21:3434-3441.
- [15]Zhao YN, Li JM, Chen CX, et al. Hypertension-mediated enhancement of JNK activation in association with endoplasmic reticulum stress in rat model hippocampus with cerebral ischemia-reperfusion [J]. Genet Mol Res,2015,21,14(3):10980-10990.
- [16]Cao Y, Hao Y, Li H, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of differentiated mouse podocytes induced by high glucose [J]. Int J Mol Med,2014,33(4):809-816.

(下接第 596 页)

- [10] Huang XP, Ding H, Lu JD, et al. Effects of the Combination of the Main Active Components of Astragalus and Panax notoginseng on Inflammation and Apoptosis of Nerve Cell after Cerebral Ischemia-Reperfusion[J]. Am J Chin Med, 2015, 18: 1-20.
- [11] Huang XP, Tan H, Chen BY, et al. Combination of total astragalus extract and total Panax notoginseng saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in mice[J]. Chin J Integr Med, 2015: 24.
- [12] Liu G, Song J, Guo Y, et al. Astragalus injection protects cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis and the expression of JNK3 after cerebral ischemia reperfusion in rats[J]. Behav Brain Funct, 2013, 9: 36. doi:10.1186/1744-9081-9-36.
- [13] Tan F, Fu W, Cheng N, et al. Ligustrazine reduces blood-brain barrier permeability in a rat model of focal cerebral ischemia and reperfusion[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(5): 1757-1762.
- [14] Zhang C, Teng F, Tu J, et al. Ultrasound-enhanced protective effect of tetramethylpyrazine against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e113673.
- [15] Koo BS, An HG, Moon SK, et al. Bombycis corpus extract (BCE) protects hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2003, 25(2): 191-201.
- [16] 陈懿, 朱惠斌, 廖君, 等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 的调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(10): 1205-1230.
- [17] 陈懿, 葛金文, 廖君, 等. 局灶性脑缺血大鼠 VEGF/Notch1 信号分子的表达及脑泰方的调节作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 10(34): 5784-5786.
- [18] 廖君, 张薇, 夏兴, 等. 脑泰方对局灶性脑缺血大鼠脑组织核因子- $\kappa$ B、基质金属蛋白酶 9 及其抑制剂表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(9): 28-30.
- [19] 廖君, 葛金文, 陈懿, 等. 脑泰方对局灶性脑缺血大鼠血清 MMP-9、PA 及 TIMP-1 表达的影响[J]. 中国中医药现代远程教育杂志, 2013, 11(3): 150-152.
- [20] McCarthy RC, Kosman DJ. Mechanistic analysis of iron accumulation by endothelial cells of the BBB[J]. Biometals, 2012, 25(4): 665-675.
- [21] Vivot RM, Goitia B, Usach V, et al. DMT1 as a candidate for non-transferrin-bound iron uptake in the peripheral nervous system[J]. Biofactors, 2013, 39(4): 476-484.
- [22] Boserup MW, Lichota J, Haile D. Heterogenous distribution of ferroportin-containing neurons in mouse brain[J]. Biometals, 2011, 24(2): 357-375.
- [23] Schulz K, Kroner A, David S. Iron efflux from astrocytes plays a role in remyelination[J]. J Neurosci, 2012, 32(14): 4841-4847.
- [24] Yasuda K, Cline CB, Vogel P, et al. Drug Transporters on Arachnoid Barrier Cells Contribute to the Blood-cerebrospinal Fluid Barrier[J]. Drug Metab Dispos, 2013, 41(4): 923-931.
- [25] Abuznait AH, Kaddoumi A. Role of ABC Transporters in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease[J]. ACS Chem Neurosci, 2012, 3(11): 820-831.
- [26] Wolf A, Bauer B, Hartz AM. ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma[J]. Front Psychiatry, 2012, 3: 54.

(2016-03-24 收稿 责任编辑:洪志强)

## (上接第 591 页)

- [17] Kong QX, Wu ZY, Chu X, et al. Study on the anti-cerebral ischemia effect of borneol and its mechanism[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 11(1): 161-164.
- [18] Hayashi Y, Homma K, Ichijo H. SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS[J]. Adv Biol Regul, 2015: 31.
- [19] Penke B, Ferenc B, Fül p L. Protein Folding and Misfolding, Endoplasmic Reticulum Stress in Neurodegenerative Diseases; in Trace of Novel Drug Targets[J]. Curr Protein Pept Sci, 2015, Nov 1. [Epub ahead of print]
- [20] Sun X, Crawford R, Liu C, et al. Development-dependent regulation of molecular chaperones after hypoxia-ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2015, 82: 123-131.
- [21] Liu X, Zhao S, Liu F, et al. Remote ischemic postconditioning alleviates cerebral ischemic injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis[J]. Transl Stroke Res, 2014, 5(6): 692-700.
- [22] Yang W, Shen Y, Chen Y, et al. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor prevents neuron loss via inhibiting ischemia-induced apoptosis[J]. J Neurol Sci, 2014, 344(1-2): 129-138.
- [23] Oida Y, Izuta H, Oyagi A, et al. Induction of BiP, an ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil[J]. Brain research, 2008, 1208(1): 217-224.
- [24] Nakka VP, Gusain A, Raghurib R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats[J]. Neurotox Res, 2010, 17(2): 189-202.
- [25] Duan SR, Wang JX, Wang J, et al. Ischemia induces endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis in human brain[J]. Neuroscience letters, 2010, 475(3): 132-135.
- [26] 胡守玉, 梁丽娜, 战丽彬, 等. 滋补脾阴方药对脾阴虚糖尿病大鼠大脑皮质内质网应激的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(1): 42-53.
- [27] 李晓峰, 张红, 董艳玲, 等. 参麦注射液对大鼠神经元内质网应激诱导凋亡的影响[J]. 中国老年医学杂志, 2010, 30(2): 187-190.
- [28] 黄澈, 闵鹤鸣, 闵连秋. 原青花素对脑缺血再灌注大鼠海马内质网应激相关分子 GRP78 和 CHOP 表达的影响[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(2): 156-159.

(2016-03-24 收稿 责任编辑:洪志强)