



# Effects of *Buyang Huanwu* Decoction on Endoplasmic Reticulum Stress-Autophagy Response and GADD34 Expression in Mice with CIRI

Zhou Shengqiang<sup>1</sup>, Li Bo<sup>2</sup>, Liu Fang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Affiliated Hospital, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, China

<sup>2</sup>The First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, China

## Email address:

549160941@qq.com (Zhou Shengqiang), 670447095@qq.com (Li Bo), msluifang23@126.com (Liu Fang)

\*Corresponding author

## To cite this article:

Zhou Shengqiang, Li Bo, Liu Fang. Effects of *Buyang Huanwu* Decoction on Endoplasmic Reticulum Stress-Autophagy Response and GADD34 Expression in Mice with CIRI. *Science Discovery*. 9(6): 417-423. doi: 10.11648/j.sd.20210906.33

Received: November 19, 2021; Accepted: December 6, 2021; Published: December 7, 2021

**Abstract:** *Objective:* To investigate the effects of *Buyang Huanwu Decoction* on endoplasmic reticulum stress-autophagic response and the expression of GADD34 in ischemic penumbra of mice with CIRI. *Methods:* The mice were randomly divided into sham operation group, model group and *Buyang Huanwu Decoction* low-, medium-, and high-dosage groups. The mice were treated by gavage for 7 days before modeling and 24 hours after modeling. CIRI model was established by the thread embolization method. The neurological function was evaluated on the 48 hours after modeling; TTC staining was used to observe the cerebral infarct volume; HE staining was used to observe the pathological changes of ischemic penumbra; TUNEL was performed to assess cell apoptosis; Western blot was performed to assess the expression of endoplasmic reticulum stress marker protein GRP78 and autophagy marker proteins LC3 and p62; Immunohistochemistry and real-time PCR were applied to examine the protein and mRNA expressions of GADD34. *Results:* Compared with the model group, neurological function score and volume of cerebral infarction were decreased, reperfusion injury of ischemic penumbra was improved with varying degrees, number of apoptotic cells was decreased, expression of GRP78 and p62 protein were down-regulated while ratio of LC3-II/ LC3 – I was up-regulated, and expression of GADD34 protein and mRNA were up-regulated in each *Buyang Huanwu Decoction* group, with statistical significance ( $P < 0.01$ ). *Conclusion* *Buyang Huanwu Decoction* can significantly improve the damaged neurological function, cerebral infarction volume and histopathological damage of ischemic penumbra, as well as reduce the apoptosis cells, which plays a neuroprotective role in mice with CIRI. Its mechanism may be related to up regulating the expression of GADD34, regulating the steady-state balance of endoplasmic reticulum stress autophagy response in ischemic penumbra.

**Keywords:** *Buyang Huanwu Decoction*, Cerebral Ischemia-reperfusion Injury, Endoplasmic Reticulum Stress-autophagic Response, Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein 34, Mice

## 补阳还五汤对CIRI小鼠内质网应激-自噬反应及GADD34表达的影响

周胜强<sup>1</sup>, 李博<sup>2</sup>, 刘芳<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>湖南省中医药研究院附属医院, 长沙, 中国

<sup>2</sup>湖南中医药大学第一附属医院, 长沙, 中国

## 邮箱

549160941@qq.com (周胜强), 670447095@qq.com (李博), msluifang23@126.com (刘芳)

**摘要:** 目的: 观察补阳还五汤对 CIRI 小鼠缺血半暗带内质网应激-自噬反应及 GADD34 表达的影响。方法: 小鼠随机分为假手术组、模型组及补阳还五汤低、中、高剂量组。于造模前连续 7d 及造模后 24h 予以灌胃处理。线栓法复制 CIRI 模型。造模 48h 后对小鼠神经功能进行评分, TTC 染色测定脑梗死体积, HE 染色观察缺血半暗带病理形态, TUNEL 法检测细胞凋亡, Western blot 检测内质网应激标志蛋白 GRP78 以及自噬标志蛋白 LC3 和 P62 表达, 免疫组化与荧光定量 PCR 分别检测 GADD34 蛋白及 mRNA 表达。结果: 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组小鼠神经功能评分降低, 脑梗死体积减少, 缺血半暗带组织再灌注损伤不同程度减轻, 凋亡细胞数减少, GRP78 与 P62 蛋白表达降低, LC3-II/LC3-I 比值升高, GADD34 蛋白及 mRNA 表达升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论: 补阳还五汤可明显改善 CIRI 小鼠受损神经功能、脑梗死体积及缺血半暗带组织病理损伤程度, 减少细胞凋亡, 发挥神经保护作用, 其机制可能与上调 GADD34 表达, 调节缺血半暗带内质网应激-自噬反应稳态平衡有关。

**关键词:** 补阳还五汤, CIRI, 内质网应激-自噬反应, GADD34, 小鼠

## 1. 引言

缺血性卒中是一种临床常见的脑血管疾病, 具有高发病率、高复发率、高致残率等特点。溶栓等血管再通疗法是改善缺血性卒中结局最有效的治疗方法, 但超过时间窗限制后, 血流再灌注会导致神经损伤加重, 出现脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) [1]。一直以来氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、钙超载以及炎症反应等多种因素诱发的缺血半暗带细胞凋亡被认为是导致 CIRI 发生的主要病理机制[2]。遗憾的是既往针对上述机制的神经保护剂均陷入了实验室有效而临床无效的尴尬境地[3]。因此, 深入阐明 CIRI 发生的分子病理机制并寻找新的有效药物, 具有重要的理论与临床意义。

中医药在防治 CIRI 方面有着独特的作用和优势[4]。中医认为 CIRI 发生的核心病机在于气虚血瘀, 益气活血是其重要治法[5]。补阳还五汤系益气活血法代表方, 为清代名医王清任所创, 出自《医林改错》, 全方由黄芪、当归、川芎、赤芍、桃仁、红花和地龙共 7 味药组成。前期临床与实验研究均证实其对 CIRI 具有明确的神经保护作用[6,7], 给缺血性卒中后再灌注治疗患者带来了新的希望, 市场潜力巨大, 但其作用机制仍不完全清楚。

近年来, 内质网应激-自噬反应稳态失衡在 CIRI 机制研究中受到广泛关注。研究发现, 缺血半暗带内质网应激被过度诱导而自噬激活程度不足是介导神经细胞向凋亡转化的关键病理环节[8,9], 而生长停滞与 DNA 损害可诱导蛋白 34 (GADD34) 是决定其在内质网应激-自噬反应过程中是否发生凋亡的“分子开关”[10]。但是, 内质网应激-自噬反应是否参与了补阳还五汤对 CIRI 的保护作用? 其机制是否与调控 GADD34 表达相关? 目前尚未见相关报道。因此, 本研究拟通过大脑中动脉缺血再灌注损伤小鼠模型, 模拟人类 CIRI 的发病过程, 观察补阳还五汤对缺血半暗带组织内质网应激-自噬反应的影响, 并探讨其潜在分子机制, 旨在为其临床推广提供科学依据。

## 2. 方法

### 2.1. 动物

SPF 级 KM 小鼠 70 只, 雌雄各半, 体质量 18~20g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物生产许可证号:

SCXK (湘) 2019-0004, 动物质量合格证号: 430727211100892986。饲养于湖南省中医药研究院 SPF 级实验动物中心, 温度 25°C, 相对湿度 50%, 昼夜光照节律, 自由摄食饮水。

### 2.2. 药物及制备

补阳还五汤 (黄芪 120g, 归尾 6g, 赤芍 4.5g, 桃仁 3g, 红花 3g, 地龙 3g, 川芎 3g), 饮片购自湖南省中医药研究院附属医院, 由药剂科田其学主任药师鉴定为正品。先将饮片用 2000mL 蒸馏水浸泡 30min, 煎煮 30min, 收集药液, 然后药渣再加 2000mL 蒸馏水煎煮 30min, 合并 2 次药液, 分别浓缩至含原药材 0.465、0.93、1.86g/mL, 置于 4°C 冰箱保存备用。

### 2.3. 主要试剂与仪器

微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3)、泛素结合蛋白 P62 (P62) 抗体, 武汉三鹰生物技术有限公司, 货号分别为 14600-1-AP、18420-1-AP; 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、GADD34, 北京博奥森生物技术有限公司, 货号分别为 bs-1219R、bs-10287R; 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH), 武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号为 GB11002; 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC), 国药集团化学试剂有限公司, 货号为 30187713; 苏木素伊红 (HE) 染色液、TUNEL (荧光) 试剂盒、HRP 标记山羊抗兔 IgG、免疫组化试剂盒, 武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号分别为 G1005、G1501、GB23303、G1211。RNA 逆转录试剂盒、TRIzol RNA 分离试剂, 美国 Invitrogen 公司, 货号分别为 K1691、15596026; 荧光定量 PCR 试剂盒, 日本 TaKaRa 公司, 货号为 RR82LR。硅胶包被线栓 (北京西浓科技有限公司, 规格 1218A5), 电泳仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 型号 BV-2), 转膜仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 型号 BT-2 型), 化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司, 型号 ChemiScope 6000), 石蜡切片机 (上海徕卡仪器有限公司, 型号 RM2016), 光学显微镜 (日本尼康, 型号 NIKON ECLIPSE E100), 荧光显微镜 (日本尼康, 型号 NIKON ECLIPSE TI-SR), 台式高速冷冻离心机 (德国 HERMLE 公司, 型号 Z32HK), 核酸水平电泳仪 (北京百晶生物技术有限公司, 型号 BG-SUHWIDI), 核酸蛋白浓度测定仪 (英国 BioDrop 公司, 型号 BD1106), PCR 扩增仪 (美国

Bio-Rad公司, 型号T100 thermal cycler), 荧光定量PCR仪(德国Eppendorf公司, 型号realplex2)。

#### 2.4. 分组与给药

适应性喂养1周后, 将小鼠按随机数字表法随机分为假手术组、模型组、补阳还五汤低剂量组、补阳还五汤中剂量组和补阳还五汤高剂量组, 每组12只。给药剂量根据人与小鼠体表面积进行换算[11], 补阳还五汤低、中、高剂量组分别按9.2625、18.525、37.05g/kg剂量灌胃给药(相当于成人日用剂量0.5、1、2倍), 给药体积均为0.4mL, 假手术组和模型组予以等体积蒸馏水灌胃, 每日1次, 于造模前连续7d及造模后24h灌胃处理。

#### 2.5. 造模及评价

参照课题组前期研究方法[12], 线栓法阻塞小鼠大脑中动脉, 2h后拔出, 造成CIRI模型。小鼠清醒后, 采用Longa评分法评定神经功能[13], 选取1~3分小鼠纳入实验, 死亡小鼠予以随机替补。假手术组只分离皮肤、血管, 不插入线栓。

#### 2.6. 标本采集与处理

各组小鼠于造模后48h取材。异氟烷吸入麻醉后, 打开小鼠胸腔暴露心脏, 剪开右心耳, 将注射器针头经心尖插入至主动脉端并固定好, 生理盐水灌流, 待心脏无血液流出及前爪、肺部颜色变白后, 开颅取脑, 去除小脑、脑干及嗅球后, 每组随机选择6只用于TTC染色, 剩余6只切取缺血半暗带组织, 一部分置于4%多聚甲醛中固定, 4℃冰箱保存, 用于HE染色、免疫组化及TUNEL(荧光)检测, 另外一部迅速投入液氮中冷冻, 然后存放于-80℃冰箱保存, 用于Western blot及荧光定量PCR检测。

#### 2.7. 指标检测

##### 2.7.1. 神经功能评分

于造模后48h采用Clark局灶性功能损伤评分[14]评定小鼠神经功能, 对小鼠运动、感觉、反射和平衡能力进行全面评价, 总分28分, 分值越高表示神经功能缺损越严重。

##### 2.7.2. TTC染色

采用TTC染色测定脑梗死体积。将小鼠脑组织置于-20℃冰箱速冻15min, 自额极后1mm切等距离5个冠状切片, 用2%TTC溶液37℃避光染色20min, 然后用4%多聚甲醛固定过夜。数码相机拍照, 正常脑组织呈鲜红色, 梗死脑组织呈白色, 使用Image Pro-Plus 6.0图像分析软件测定每片脑片正常侧脑组织和梗死侧非梗死区体积, 计算相对脑梗死体积。

##### 2.7.3. HE染色

采用HE染色观察缺血半暗带组织病理形态学改变。将4%多聚甲醛固定中的半暗带脑组织取出, 石蜡包埋切

片, HE染色, 中性树胶封片。每张切片随机选取5个缺血半暗带视野拍照采集图像。

##### 2.7.4. TUNEL染色

采用TUNEL荧光染色法检测缺血半暗带组织细胞凋亡情况。石蜡切片常规脱蜡至水, 蛋白酶K室温修复22min, 0.1%Triton X-100透膜处理5min, PBS洗5min×3次, TUNEL反应液室温避光孵育2h, PBS洗5min×3次, DAPI染色液避光室温孵育10min, PBS洗5min×3次, 抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜下观察, 绿色荧光为阳性凋亡细胞, 蓝色荧光为细胞核, 每张切片随机选取5个缺血半暗带视野拍照采集图像, 采用Image Pro Plus 6.0图像分析软件计算单位面积内凋亡细胞数, 取其平均值进行定量分析。

##### 2.7.5. Western blot 检测

采用Western blot法检测缺血半暗带组织中内质网应激标志蛋白GRP78以及自噬标志蛋白LC3和P62表达。将-80℃保存的脑组织加入RIPA裂解液后, 离心收集上清, 提取总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 蛋白煮沸变性, 上样进行SDS-PAGE凝胶电泳, 300mA恒流转膜30min, 5%的脱脂牛奶封闭, 加入一抗(内参蛋白GAPDH稀释比例1:3000, 目的蛋白GRP78、LC3及P62稀释比例均为1:1000), 摇床上4℃孵育过夜, 1:1000稀释比例加入二抗HRP标记山羊抗兔IgG, 室温下孵育30min, ECL显色液显影, 化学发光系统成像, Image J软件测量灰度值, 将目的蛋白与内参蛋白条带灰度比值计算平均灰度值, 进行蛋白表达的相对定量分析。

##### 2.7.6. 免疫组化检测

采用免疫组化法检测缺血半暗带组织中GADD34蛋白表达。脑组织切片常规脱蜡至水, EDTA(pH9.0)抗原修复20min, 3%双氧水溶液室温避光孵育25min, 3%BSA室温封闭30min, 加入GADD34抗体(1:200), 4℃冰箱孵育过夜, 滴加HRP标记山羊抗兔IgG(1:500), 室温孵育50min, DAB显色, 苏木素复染细胞核, 脱水后中性树胶封片。光学显微镜下观察, 以棕黄色颗粒为阳性表达, 每张切片随机选取5个缺血半暗带视野拍照采集图像, 采用Image Pro Plus 6.0图像分析软件计算GADD34蛋白表达的平均光密度值(MOD值), 进行相对定量分析。

##### 2.7.7. 荧光定量PCR检测

采用荧光定量PCR法检测缺血半暗带组织中GADD34基因表达。从NCBI网站下载小鼠基因序列, 运用Primer 6.0软件设计引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列信息见表1。Trizol法提取脑组织总RNA, 测定RNA浓度及质量, 两步法将RNA逆转录为cDNA。PCR反应体系为20μL: 2×SYBR Green Mix 10μL, cDNA 2μL, 引物对1μL, Rox 0.4μL, ddH<sub>2</sub>O 6.6 μL。扩增曲线反应程序: 预变性95℃、2min, 变性95℃、15s, 退火58-62℃、1min, 循环40次。熔解曲线反应程序: 95℃、15s, 60℃、15s, 温度缓慢上升(20min), 95℃、15s。内参基因选用β-actin, 采用2<sup>-ΔΔCt</sup>进行相对定量, 表示该

基因的相对表达水平。 $\Delta\text{Ct}$ 值=基因Ct值-内参Ct值,  $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值=实验组 $\Delta\text{Ct}$ 值-对照组 $\Delta\text{Ct}$ 值。

表1 PCR各基因引物序列。

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp
GADD34	F:GTTTGCACGAGATCGAAGCC	183
	R:GGTGTGGTCACATCTTGGGT	
$\beta$ -actin	F:GCAGATGTGGATCAGCAAGC	102
	R:AGGGTGTAACGCAGCTCAG	

2.8. 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析,采用GraphPad Prism 5软件进行柱状图的制作。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐时采用LSD法进行两两比较,若方差不齐时则采用Tamhane's  $T^2$ 法进行两

两比较。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义,  $P<0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

3. 结果

3.1. 补阳还五汤对模型小鼠神经功能评分及脑梗死体积的影响

与假手术组比较,模型组小鼠神经功能评分显著升高,脑梗死体积显著增加,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,补阳还五汤各剂量组神经功能评分显著降低,脑梗死体积显著减少,差异均有统计学意义( $P<0.01$ ),其中补阳还五汤高剂量组作用最明显。结果见表2、图1。

表2 各组小鼠神经功能评分及脑梗死体积比较 ( $\bar{x}\pm s$ )。

组别	只数	神经功能评分/(分)	脑梗死体积/(%)
假手术组	6	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
模型组	6	18.33 $\pm$ 0.82**	31.36 $\pm$ 2.75**
补阳还五汤低剂量组	6	16.00 $\pm$ 0.89 <sup>##</sup>	21.94 $\pm$ 1.99 <sup>##</sup>
补阳还五汤中剂量组	6	14.67 $\pm$ 1.03 <sup>##</sup>	16.06 $\pm$ 1.87 <sup>##</sup>
补阳还五汤高剂量组	6	13.50 $\pm$ 0.55 <sup>##</sup> ▲▲	10.42 $\pm$ 1.68 <sup>##</sup> ▲▲

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ ;与补阳还五汤低剂量组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与补阳还五汤中剂量组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$ 。

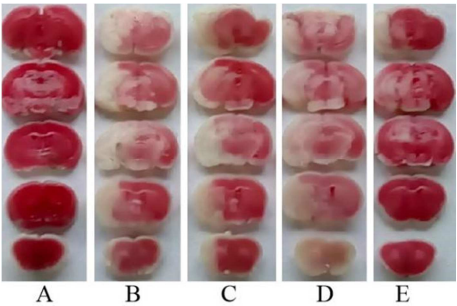


图1 各组小鼠脑组织TTC染色图。

注: A.假手术组; B.模型组; C.补阳还五汤低剂量组; D.补阳还五汤中剂量组; E.补阳还五汤高剂量组。

3.2. 补阳还五汤对模型小鼠缺血半暗带病理形态的影响

假手术组脑组织结构清晰,细胞形态正常,排列整齐,胞核染色较浅,核膜完整、核仁清楚,间质染色均匀;模型组缺血半暗带组织结构紊乱,细胞数量减少,排列不齐,细胞间隙增宽,部分胞体皱缩变性呈嗜酸性改变,核固缩深染,形态变成三角形或长条形,间质水肿,染色变浅;补阳还五汤各剂量组核固缩细胞数量显著减少,排列较整齐,核较清晰,间质水肿减轻,染色较均匀,其中补阳还五汤高剂量组病理形态改善最明显。结果见图2。

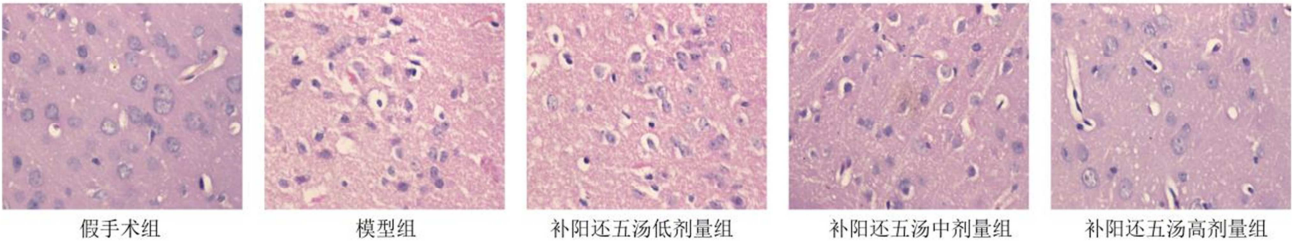


图2 各组小鼠脑组织缺血半暗带组织病理形态 (HE染色,  $\times 400$ )。

3.3. 补阳还五汤对模型小鼠缺血半暗带细胞凋亡的影响

假手术组脑组织可见少量凋亡细胞;与假手术组比较,模型组缺血半暗带凋亡细胞数显著增加 ( $P<0.01$ );与

模型组比较,补阳还五汤各剂量组缺血半暗带凋亡细胞数均显著减少 ( $P<0.01$ ),其中补阳还五汤高剂量组减少最明显。结果见图3。



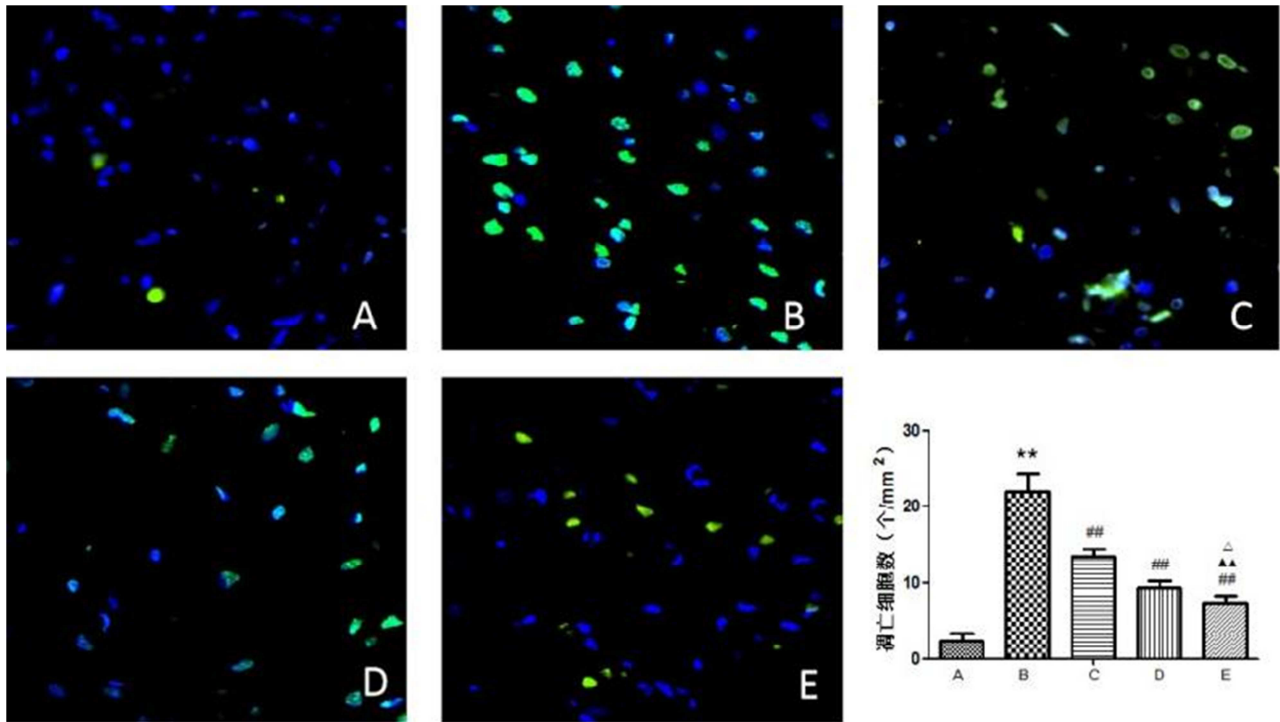


图3 各组小鼠脑组织缺血半暗带凋亡细胞数比较 (TUNEL染色,  $\times 400$ )。

注: A.假手术组; B.模型组; C.补阳还五汤低剂量组; D.补阳还五汤中剂量组; E.补阳还五汤高剂量组; 与假手术组比较,  $**P<0.01$ ; 与模型组比较,  $##P<0.01$ ; 与补阳还五汤低剂量组比较,  $▲▲P<0.01$ ; 与补阳还五汤中剂量组比较,  $\Delta P<0.05$ 。

### 3.4. 补阳还五汤对模型小鼠缺血半暗带内质网应激和自噬标志蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组小鼠缺血半暗带组织内质网应激标志蛋白GRP78表达显著升高, 自噬标志蛋白LC3-II/LC3-I 比值升高, P62蛋白表达减少, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ ); 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组小鼠缺血半暗带组织GRP78和P62蛋白表达显著降低, 而LC3-II/LC3-I 比值显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 其中补阳还五汤高剂量组作用最明显。结果见图4、表3。

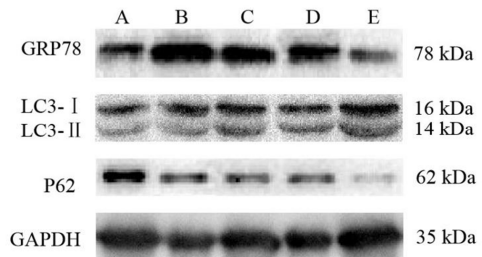


图4 各组小鼠缺血半暗带组织GRP78、LC3及P62蛋白免疫印迹图。

注: A.假手术组; B.模型组; C.补阳还五汤低剂量组; D.补阳还五汤中剂量组; E.补阳还五汤高剂量组。

表3 各组小鼠缺血半暗带组织GRP78、LC3及P62蛋白表达比较 ( $\bar{X} \pm s$ )。

组别	只数	GRP78/GAPDH	LC3-II/LC3-I	P62/GAPDH
假手术组	6	0.41 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02
模型组	6	0.96 $\pm$ 0.02**	0.53 $\pm$ 0.02*	0.41 $\pm$ 0.01*
补阳还五汤低剂量组	6	0.82 $\pm$ 0.03##	0.61 $\pm$ 0.01##	0.30 $\pm$ 0.01##
补阳还五汤中剂量组	6	0.73 $\pm$ 0.02##	0.71 $\pm$ 0.01##	0.22 $\pm$ 0.01##
补阳还五汤高剂量组	6	0.49 $\pm$ 0.01###▲▲	0.83 $\pm$ 0.01###▲▲	0.10 $\pm$ 0.01###▲▲

注: 与假手术组比较,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ; 与模型组比较,  $##P<0.01$ ; 与补阳还五汤低剂量组比较,  $▲▲P<0.01$ ; 与补阳还五汤中剂量组比较,  $\Delta\Delta P<0.01$ 。

### 3.5. 补阳还五汤对模型小鼠缺血半暗带GADD34蛋白及mRNA表达的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠缺血半暗带组织GADD34蛋白及mRNA表达均明显升高, 差异有统计学意义

( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 补阳还五汤各剂量组缺血半暗带组织GADD34蛋白及mRNA表达显著升高, 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 其中补阳还五汤高剂量组作用最明显。结果见图5、图6。

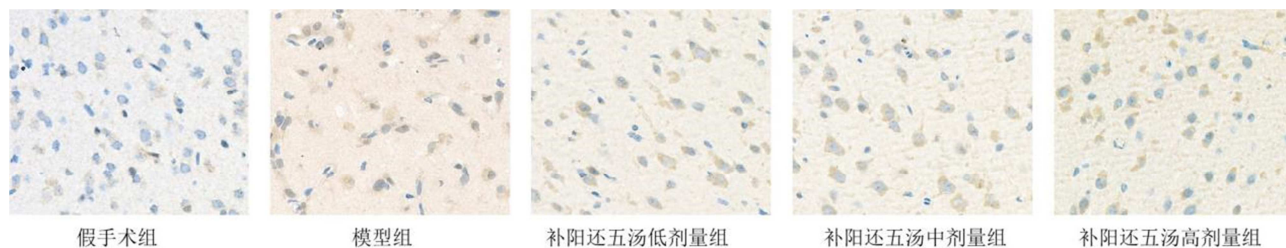


图5 各组小鼠缺血半暗带GADD34蛋白阳性表达(免疫组化染色, ×400)。

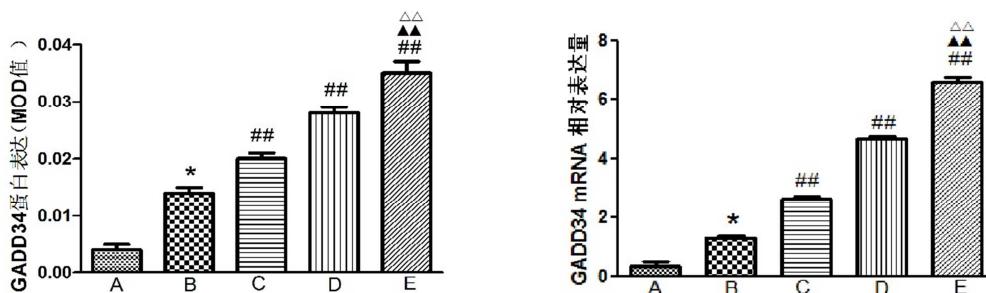


图6 各组小鼠缺血半暗带GADD34蛋白及mRNA表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ , 每组6只)。

注: A.假手术组; B.模型组; C.补阳还五汤低剂量组; D.补阳还五汤中剂量组; E.补阳还五汤高剂量组; 与假手术组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与补阳还五汤低剂量组比较, ▲ $P < 0.01$ ; 与补阳还五汤中剂量组比较, ▲▲ $P < 0.01$ 。

#### 4. 讨论

凋亡是CIRI过程中缺血半暗带细胞死亡的主要方式。既往研究证实, 补阳还五汤能显著抑制啮齿类动物CIRI模型缺血半暗带细胞凋亡, 发挥神经保护作用[15]。本研究同样发现, 补阳还五汤不同剂量组均能显著抑制CIRI小鼠缺血半暗带细胞凋亡、改善组织病理损伤程度, 减少脑梗死体积与神经功能缺损评分。表明其具有明显的神经保护作用, 这与既往研究结果一致。

细胞在应激状态下主要通过内质网应激与自噬维持自身稳态[16]。当缺氧、营养缺乏、代谢紊乱一系列病理因素刺激下, 细胞内环境稳态遭到破坏, 内质网功能失调, 导致未折叠/错误折叠蛋白在内质网腔聚集, 细胞首先会通过内质网应激来启动内质网相关蛋白降解以维持内环境的稳定[17]。但过强的刺激, 则会触发内质网应激相关凋亡信号, 导致凋亡[18]。而在内质网应激向凋亡转化过程中, 自噬扮演了重要角色。研究表明, 内质网是自噬的启动部位, 自噬是内质网应激的下游事件, 当内质网腔中聚集的未折叠/错误折叠蛋白超出了内质网应激反应的清除能力, 细胞自噬则会被诱导[19]。因此, 足够水平的自噬激活是细胞在过度内质网应激状态下维持自身存活的一道防线[20]。新近研究证实, 在整个CIRI过程中, 内质网应激-自噬反应的稳态平衡起着重要作用, 内质网应激被过度诱导的同时自噬激活程度却相对不足, 二者稳态失衡介导了缺血半暗带神经细胞向凋亡转化[8,9]。本研究结果显示, 模型组小鼠缺血半暗带组织内质网应激标志蛋白GRP78蛋白表达水平显著升高而自噬标志蛋白LC3-II/LC3-I比值升高、P62蛋白表达减少, 表明内质网应激-自噬反应稳态失衡参与了CIRI的病理过程; 补阳还五汤

低、中、高剂量预处理均能明显抑制小鼠缺血半暗带GRP78及P62蛋白的表达, 并能促进LC3-I向LC3-II的转化, 其中以高剂量组效果最佳, 提示补阳还五汤可能通过抑制缺血半暗带过度的内质网应激、促进不足的自噬, 调控内质网应激-自噬稳态平衡进而对CIRI产生保护作用, 且这种保护作用具有剂量依赖性。

GADD34是一种细胞周期调节蛋白, 参与内质网中蛋白质合成受阻后的再启动, 同时也是内质网应激-自噬反应过程中的重要调控分子, 控制着细胞从存活到凋亡的短暂转换[10]。既往研究报道, 大鼠脑缺血再灌注可诱导GADD34在梗死周边区大量转录并翻译, 其中GADD34 mRNA表达于再灌注后3h达高峰, 蛋白表达于再灌注后24h达高峰, 且GADD34免疫阳性细胞形态大多正常, 提示GADD34可能在脑缺血再灌注后缺血半暗带细胞存活中发挥重要作用[21]。进一步研究发现, 脑缺血再灌注后GADD34表达增加可能通过促进eIF2 $\alpha$ 的去磷酸化恢复蛋白质合成、下调内质网应激水平, 诱导细胞自噬, 进而减少缺血半暗带细胞凋亡[22]。我们采用免疫组化和荧光定量PCR技术检测了小鼠脑缺血再灌注48h后缺血半暗带GADD34的表达情况。结果显示, 模型组GADD34蛋白及mRNA表达均升高, 而补阳还五汤处理后, GADD34表达进一步上调, 并体现出量效关系。提示补阳还五汤的神经保护作用与增强GADD34表达水平有关。

综上所述, 补阳还五汤能够明显减轻CIRI诱导的神经功能缺损、脑梗死体积及缺血半暗带组织损伤程度, 发挥神经保护作用, 可能是通过调控GADD34表达, 维持内质网应激-自噬反应稳态平衡, 进而抑制脑缺血半暗带细胞凋亡实现的。本研究为补阳还五汤防治CIRI的新机制进行了初步探讨, 但其确切分子机制还有待下一步深入研究。

## 5. 结论

补阳还五汤可能通过上调GADD34表达,抑制缺血半暗带细胞过度内质网应激而增强其自噬能力,调节二者稳态平衡进而发挥神经保护作用。

## 致谢

本文为湖南省自然科学基金青年基金项目(2019JJ50347)及湖南省中医药研究院院级重点课题(201902)的阶段性成果之一。

## 参考文献

- [1] LAPCHAK PA. Critical early thrombolytic and endovascular reperfusion therapy for acute ischemic stroke victims: a call for adjunct neuroprotection [J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6 (5): 345-54.
- [2] 李国前,王杰华,苏钦坡,等.瑞舒伐他汀对脑缺血再灌注后大鼠 XIAP 与 Smac 表达的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(24): 2818-2820.
- [3] CHAMORRO Á, DIRNAGL U, URRÁ X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15 (8): 869-881.
- [4] 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(05): 991-994.
- [5] 张楠,郭乐,周玉莹,等.中医药对气虚血瘀型脑缺血再灌注损伤拮抗机制的研究进展 [J]. *长春中医药大学学报*, 2017, 33(03): 505-507.
- [6] SHE Y, SHAO L, ZHANG Y, et al. Neuroprotective effect of glycosides in Buyang Huanwu Decoction on pyroptosis following cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242: 112051.
- [7] JIANG C, XU YC, ZHANG W, et al. Effects and safety of Buyang-Huanwu Decoction for the treatment of patients with acute ischemic stroke: A protocol of systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (23): e20534.
- [8] AHSAN A, ZHENG YR, WU XL, et al. Urolithin A-activated autophagy but not mitophagy protects against ischemic neuronal injury by inhibiting ER stress in vitro and in vivo [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25 (9): 976-986.
- [9] YIN Y, SUN G, LI E, et al. ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 34: 3-14.
- [10] HOLCZER M, BESZE B, ZÁMBÓ V, et al. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Promotes Autophagy-Dependent Survival via Influencing the Balance of mTOR-AMPK Pathways upon Endoplasmic Reticulum Stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 6721530.
- [11] 贺石林,王键,王净净.中医科研设计与统计学[M].湖南:科学技术出版社, 2012. 48-49.
- [12] 周胜强,易健,周赛男,等.补阳还五汤对局灶性脑缺血小鼠半暗带细胞自噬水平的影响 [J]. *湖南中医杂志*, 2017, 33(02): 119-123.
- [13] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [14] CLARK WM, LESSOV NS, DIXON MP, et al. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse [J]. *Neurol Res*, 1997, 19 (6): 641-8.
- [15] 张颖,陈自雅,刘强,等.补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠脑损伤的保护作用 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21(08): 867-870.
- [16] KAPUY O, MÁRTON M, BÁNHEGYI G, et al. Multiple system-level feedback loops control life-and-death decisions in endoplasmic reticulum stress [J]. *FEBS Lett*, 2020, 594 (6): 1112-1123.
- [17] CHU Q, MARTINEZ TF, NOVAK SW, et al. Regulation of the ER stress response by a mitochondrial microprotein [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 4883.
- [18] HOLCZER M, MÁRTON M, KURUCZ A, et al. A Comprehensive Systems Biological Study of Autophagy-Apoptosis Crosstalk during Endoplasmic Reticulum Stress [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 319589.
- [19] CAI Y, ARIKKATH J, YANG L, et al. Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders [J]. *Autophagy*, 2016, 12 (2): 225-44.
- [20] QI Z, CHEN L. Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 167-177.
- [21] 申向民,杨期东,谭利明,等.大鼠脑缺血再灌注后梗死周边区 GADD34 的表达变化 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2010, 36(11): 676-678.
- [22] NAKKA VP, PRAKASH-BABU P, VEMUGANTI R. Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress, Oxidative Stress, and Autophagy: Potential Therapeutic Targets for Acute CNS Injuries [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (1): 532-544.