

滋肾活血方通过GRP78/PERK/ATF4信号通路减轻 2-VO模型大鼠海马神经元内质网应激的保护机制

苏瑶^{1,2}, 邱峰³, 易韬³, 黎翰权^{1,2}, 谢乐², 张秀丽^{3*}, 伍大华^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南省中西医结合医院/湖南省中医药研究院附属医院,
长沙 410006; 3. 湖南中医药大学科技创新中心, 长沙 410208)

【摘要】 目的:探讨滋肾活血方调控葡萄糖调节蛋白78(GRP78)/蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)/激活转录因子4(ATF4)信号通路改善双侧颈总动脉结扎法(2-VO)模型大鼠认知功能障碍的机制。方法:采用2-VO法建立血管性痴呆(VD)大鼠模型,将72只雄性SD大鼠根据随机数字表法分为假手术组,模型组,盐酸多奈哌齐组(0.45 mg·kg⁻¹),滋肾活血方低、中、高剂量组(8.90、17.80、35.60 g·kg⁻¹),每组12只。Morris水迷宫实验评估大鼠学习记忆能力;新物体识别实验检测大鼠认知水平;苏木素-伊红(HE)和尼氏(Nissl)染色法观察大鼠海马组织结构和形态变化;透射电镜(TEM)观察大鼠海马神经元中内质网形态;免疫荧光检测海马神经元中神经元核蛋白(NeuN)与GRP78、 β III微管蛋白(β III Tubulin)与消泡素D(GSDMD)共定位情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内质网应激(ERS)相关蛋白GRP78、PERK、ATF4、磷酸化PERK(p-PERK)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、NOD样受体蛋白3(NLRP3)、胱天蛋白酶-1(Caspase-1)、GSDMD的表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间显著减少($P<0.01$);识别指数显著减少($P<0.01$);海马神经元细胞排列紊乱,数量减少,胞体变形皱缩,核固缩深染;Nissl小体数量显著减少;内质网数量明显减少,出现异常的扩张和肿胀,正常折叠结构消失;大鼠海马NeuN与GRP78、 β III Tubulin与GSDMD的荧光共定位显著增加;GRP78、p-PERK/PERK、ATF4、CHOP、NLRP3、GSDMD、Caspase-1蛋白表达水平显著上升($P<0.01$)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组、滋肾活血方中、高剂量组逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),平台穿越次数明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);盐酸多奈哌齐组和滋肾活血方各剂量组平台象限停留时间明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);识别指数显著提高($P<0.01$);盐酸多奈哌齐组和滋肾活血方各剂量组海马神经元数量增多,排列趋于紧密,核深染减少;Nissl小体数量增加,形态结构趋于正常;滋肾活血方高剂量组内质网数量增加,恢复折叠结构;大鼠海马NeuN与GRP78、 β III Tubulin与GSDMD的荧光共定位显著减弱;盐酸多奈哌齐组GRP78、ATF4、CHOP蛋白表达显著增加($P<0.01$),p-PERK/PERK蛋白表达明显减少($P<0.05$);滋肾活血方低剂量组GRP78、p-PERK/PERK、CHOP表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);滋肾活血方中、高剂量组p-PERK/PERK、ATF4、CHOP蛋白表达均显著降低($P<0.01$);滋肾活血方高剂量组GRP78蛋白表达显著降低($P<0.01$);盐酸多奈哌齐组Caspase-1蛋白表达显著增加($P<0.01$),NLRP3蛋白表达显著减少($P<0.01$);滋肾活血方低剂量组GSDMD蛋白表达显著升高($P<0.01$),NLRP3蛋白表达显著减少($P<0.01$);经滋肾活血方中、高剂量给药治疗后,NLRP3、GSDMD、Caspase-1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。结论:滋肾活血方对2-VO模型大鼠的认知功能的改善作用可能与调控GRP78/PERK/ATF4信号通路,改善ERS,抑制神经细胞焦亡有关。

【关键词】 滋肾活血方; 血管性痴呆; 内质网应激; 葡萄糖调节蛋白78(GRP78)/蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)/激活转录因子4(ATF4); 神经元损伤

[中图分类号] R277;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)10-0093-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252236

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251112.1736.005>

[网络出版日期] 2025-11-13 10:04:40 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Zishen Huoxue Prescription Alleviates Endoplasmic Reticulum Stress in Hippocampal Neurons of 2-VO Rats via GRP78/PERK/ATF4 Signaling Pathway

SU Yao^{1,2}, QIU Feng³, YI Tao³, LI Hanquan^{1,2}, XIE Le², ZHANG Xiuli^{3*}, WU Dahua^{2*}

[收稿日期] 2025-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374441);湖南省自然科学基金项目(2023JJ30465)

[第一作者] 苏瑶,在读硕士,从事中医药防治脑病研究,E-mail:820655290@qq.com

[通信作者] * 伍大华,博士,主任医师,博士生导师,从事中医药防治脑病研究,E-mail:893049352@qq.com;

* 张秀丽,博士,研究员,硕士生导师,从事脑病发病机制及中医药防治研究,E-mail: 004115@hnucm.edu.cn

- (1. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;*
2. *Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine/Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China;*
3. *Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)*

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism by which the Zishen Huoxue prescription (ZSHXP) ameliorates cognitive dysfunction in rats with vascular dementia (VD) induced by the bilateral common carotid artery ligation (2-VO model rats) through regulating the glucose-regulated protein 78 (GRP78)/protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/activating transcription factor 4 (ATF4) signaling pathway. **Methods:** A VD rat model was established via the 2-VO method. A total of 72 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups: Sham group, Model group, donepezil hydrochloride group ($0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and ZSHXP groups at low ($8.90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), medium ($17.80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and high ($35.60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) doses, with 12 rats in each group. The Morris Water Maze test was utilized to assess spatial learning and memory abilities of rats, and the Novel Object Recognition test was used to evaluate cognitive performance. Hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining were applied to observe the histological and morphological changes in hippocampal tissues. Transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the morphological changes of endoplasmic reticulum in rat hippocampal neurons. Immunofluorescence staining was adopted to detect the colocalization of neuronal nuclei antigen (NeuN) with GRP78 and β III Tubulin with gasdermin D (GSDMD) in hippocampal neurons. Western blot was used to detect the expression levels of endoplasmic reticulum stress (ERS)-related proteins including GRP78, PERK, ATF4, phosphorylated protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (p-PERK), C/EBP homologous protein (CHOP), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), Caspase-1 and GSDMD. **Results:** Compared with the sham operation group, the model group showed a significantly prolonged escape latency ($P < 0.01$), a significant decrease in the number of platform crossings and the residence time in the target quadrant ($P < 0.01$), and a markedly reduced recognition index ($P < 0.01$). Histological observations revealed that the hippocampal neurons in the model group were disorderly arranged with reduced quantity, deformed and shrunken cell bodies, and pyknotic and hyperchromatic nuclei. The number of Nissl bodies decreased significantly. The number of endoplasmic reticula reduced obviously, accompanied by abnormal dilation and swelling, and the loss of normal folding structure. The fluorescence colocalization of NeuN with GRP78 and β III Tubulin with GSDMD in the hippocampus was significantly increased in the model group. The protein expression levels of GRP78, p-PERK/PERK, ATF4, CHOP, NLRP3, GSDMD and Caspase-1 in the model group were significantly elevated ($P < 0.01$). Compared with the model group, the donepezil hydrochloride group and the ZSHXP medium- and high-dose groups had a significantly shortened escape latency ($P < 0.01$) and an increased number of platform crossings ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The residence time in the target quadrant was increased in the donepezil hydrochloride group and all ZSHXP groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with a significantly improved recognition index ($P < 0.01$). In the donepezil hydrochloride group and all ZSHXP groups, the number of hippocampal neurons increased with a more compact arrangement and reduced nuclear hyperchromasia. The number of Nissl bodies increased with morphological structures tending to be normal. In the ZSHXP high-dose group, the number of endoplasmic reticula increased and the folding structure was restored. The fluorescence colocalization of NeuN with GRP78 and β III Tubulin with GSDMD in the hippocampus was significantly weakened in the treatment groups. In the donepezil hydrochloride group, the protein expressions of GRP78, ATF4 and CHOP were increased ($P < 0.01$), while the expression of p-PERK/PERK was decreased ($P < 0.05$). In the ZSHXP low-dose group, the expressions of GRP78, p-PERK/PERK and CHOP were elevated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The ZSHXP medium- and high-dose groups showed a significant decrease in the protein expressions of p-PERK/PERK, ATF4 and CHOP ($P < 0.01$), and the high-dose group had a markedly reduced GRP78 protein expression ($P < 0.01$). In the donepezil hydrochloride group, the Caspase-1 protein expression was increased ($P < 0.01$) and the NLRP3 protein expression was decreased ($P < 0.01$). In the ZSHXP low-dose group, the GSDMD expression was elevated ($P < 0.01$) while the NLRP3 protein expression was reduced ($P < 0.01$). After treatment with medium and high doses of ZSHXP, the protein expression levels of NLRP3, GSDMD and Caspase-1 were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** The ameliorative effect of ZSHXP on cognitive function in 2-VO model rats may be associated with its regulation of the GRP78/PERK/ATF4 signaling pathway, which ameliorates ERS and inhibits neuronal pyroptosis.

[Keywords] Zishen Huoxue prescription; vascular dementia; endoplasmic reticulum stress; glucose-regulated protein 78 (GRP78)/protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)/activating transcription factor 4 (ATF4) signaling pathway; neuronal injury

血管性痴呆(VD)作为一类由脑血管系统异常引发的神经功能损伤综合征,其核心病理机制涉及脑血流动力学障碍导致的脑组织缺血性损伤^[1]。临

床表现为智能障碍,包括记忆力丧失、语言障碍、判断和思维能力、计算能力和社会生活能力的减退,伴随着情感、性格的改变。VD在各类痴呆中约占

五分之一,仅次于阿尔茨海默病,是第二大常见痴呆类型^[2-3]。VD在北美和欧洲约占痴呆患者总数的15%~20%,在亚洲约占30%,这给全球公共卫生带来了沉重的负担^[4]。

海马在学习、记忆等高级认知功能中发挥关键作用,其损伤可能是认知障碍的潜在原因^[5]。慢性脑灌注不足(CCH)导致的海马神经损伤是VD认知障碍的核心病理机制^[6]。CCH诱导的未折叠或错误折叠蛋白积累会触发内质网应激(ERS),并通过激活未折叠蛋白反应(UPR)的特异性信号通路来应对这一应激^[4]。UPR主要由3个信号通路如蛋白肌醇需求酶1(IRE1)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)和激活转录因子6(ATF6)介导。适度的ERS可以通过诱导葡萄糖调节蛋白78(GRP78)等内质网分子伴侣的表达、暂停或减缓新的蛋白质合成,以减少内质网内未折叠或错误折叠蛋白质的数量起到一定的保护作用,对于维持细胞的稳态至关重要^[7-8]。当ERS反应的强度超过细胞的自我调节范围或持续时间超过正常阈值时,PERK与GRP78分离,PERK发生二聚化和自磷酸化以激活其激酶活性,磷酸化真核翻译起始剂2 α (eIF2 α),然后选择性地增加激活转录因子4(ATF4)的翻译。ATF4还会促进C/EBP同源蛋白(CHOP)产生并增强氧化应激,导致细胞死亡级联反应^[9]。因此,ERS是CCH的重要病理特征,也是加重脑血管损伤和认知功能障碍的关键参与者^[10]。研究表明,ERS通过激活PERK信号通路,触发NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体组装,进而活化胱天蛋白酶-1(Caspase-1);活化的Caspase-1特异性切割消皮素D(GSDMD)蛋白,释放其N端成孔结构域,最终导致细胞膜穿孔、炎症因子释放及细胞焦亡^[11]。因此,以调控ERS为治疗靶点,抑制细胞焦亡、维持海马神经元结构功能正常,对改善VD的认知功能具有重要意义。

目前FDA仍无批准治疗VD的药物^[12]。中医通过整体调节与辨证论治体系,展现多成分协同、多环节干预、多靶点调控的系统优势,显著提升认知水平。滋肾活血方(ZSHXP)是在国医大师刘祖贻学术思想的指导下形成的治疗VD的经验方,经多年临床实践验证及科学研究,已证实该方为治疗VD的有效方、安全方^[13-14]。全方由制何首乌、枸杞子、益智仁、桑椹、葛根、丹参、山楂、石菖蒲、郁金、远志、全蝎、五味子组成,具有滋肾填髓、活血通络之功。课题组前期研究表明滋肾活血方能促进海马CA1区神经元再生,改善认知障碍^[15-16]。但其保

护作用是否与GRP78/PERK/ATF4信号通路介导的ERS有关,目前尚不清楚。因此,本研究拟探讨滋肾活血方对GRP78/PERK/ATF4信号通路介导的ERS的干预作用和对细胞焦亡的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠72只,体质量200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2021-0002。饲养于湖南中医药大学实验动物中心,环境温度23~27℃,昼夜各12 h,自由进食、饮水,所有大鼠适应性喂养7 d。

1.2 伦理 本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会审查通过,批件编号HNUCM21-2412-04。

1.3 药物 滋肾活血方颗粒剂组成:制何首乌15 g、枸杞子30 g、益智仁10 g、桑椹30 g、葛根30 g、丹参30 g、山楂15 g、石菖蒲10 g、郁金10 g、远志10 g、全蝎3 g、五味子5 g,均购自湖南天地恒一制药股份有限公司(批号分别为c230363、c250048、c240391、c240557、c250008、c240704、c240723、c250079、c240634、c240860、c250079、c240554)。灌胃给药前将滋肾活血方颗粒剂溶于蒸馏水,水浴加热至其完全溶解。盐酸多奈哌齐片购自重庆锐恩医药有限公司(国药准字H20010723,批号02240010),经研磨粉碎后溶于超纯水,制成混悬液后置于4℃冰箱备用。

1.4 试剂 GRP78抗体、PERK抗体、磷酸化PERK(p-PERK)抗体、Caspase-1抗体、NLRP3抗体、神经元核蛋白(NeuN)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-辣根过氧化物酶(HRP)二抗、羊抗小鼠IgG-HRP二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为11587-1-AP、24390-1-AP、82534-1-RR、81482-1-RR、30109-1-AP、26975-1-AP、66009-1-Ig、10494-1-AP、SA00001-2、SA00001-1);GSDMD抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司,批号DF13758);CHOP抗体(北京博奥森生物有限公司,批号bs-20669R);ATF4抗体(杭州华安生物技术有限公司,批号ET1612-37); β Ⅲ微管蛋白(β Ⅲ Tubulin)抗体(英国Abcam公司,批号AB21503);增强化学发光法(ECL)化学发光底物试剂盒(北京兰杰柯科技有限公司,批号24155985);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司,批号C0105S);尼氏(Nissl)染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号G1430)。

1.5 仪器 Supermaze动物行为学视频分析系统

(中国上海欣软公司);Mini-PROTEAN Tetra型电泳仪;Chemi Dox XRS+型化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);DYCZ-40D型转膜仪(中国北京六一生物科技有限公司);QQMK-10型恒温器(上海启前电子科技有限公司);台式微量冷冻离心机(美国Thermo Fisher公司);TECNAI G2 F20 S-TWIN型透射电子显微镜(美国FEI公司);Leica UC7型超薄切片机(德国Leica公司);NIKON ECLIPSE CI型正置光学显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 造模 参照本课题组前期研究,采用双侧颈总动脉结扎法(2-VO)构建VD大鼠模型^[15]。实验动物采用SD大鼠,经2%戊巴比妥腹腔麻醉后实施手术操作。术中采用钝性分离技术暴露左侧颈总动脉,双重结扎后逐层缝合创口,并肌注青霉素预防感染。术后7 d对右侧颈总动脉实施相同结扎程序。假手术组仅进行双侧颈总动脉的钝性分离操作,不实施血管结扎,其余麻醉及术后处理与模型组完全一致。手术结束后,通过水迷宫实验评估模型有效性:以假手术组大鼠的逃避潜伏期均值为参考值,计算2-VO模型大鼠逃避潜伏期与参考值的差值占该鼠逃避潜伏期的百分比,若该比值>20%则2-VO模型造模成功^[17]。

2.2 分组与给药 造模后1周,待手术伤口完全愈合后灌胃给药。除假手术组外,选取造模成功的大鼠,随机分为模型组,盐酸多奈哌齐组,滋肾活血方低、中、高剂量组。参照徐叔云主编《药理实验方法学》^[18]进行剂量换算,滋肾活血方低、中、高剂量组分别给予相当于成人临床常规等效剂量的0.5、1、2倍,即8.90、17.8、35.60 g·kg⁻¹的剂量灌胃。盐酸多奈哌齐组的灌胃剂量为0.45 mg·kg⁻¹。每日灌胃给药1次,给药14 d。假手术组、模型组均给予等体积的生理盐水灌胃。除去模型复制不成功大鼠和造模灌胃过程中死亡的大鼠,最后假手术组、模型组、盐酸多奈哌齐组各10只,滋肾活血方低、中、高剂量组分别为12、11、11只。

2.3 指标检测

2.3.1 Morris水迷宫检测大鼠学习记忆能力 灌胃给药后进行Morris水迷宫实验。采用直径1.5 m圆形水池,在某个象限中心设置平台,池壁周围设置不同的视觉线索。前5 d为定位航行实验,每次随机选择4个入水点,单次测试限时60 s,若成功登上平台则停止,若失败引导大鼠在平台上学习15 s。第6天为空间探索实验,将大鼠从平台对侧象限放入水中,

记录各组大鼠登台时间,记为逃避潜伏期。撤除平台后记录60 s内各组大鼠逃避潜伏期和穿越原平台所在象限的次数,以此评估大鼠的学习记忆能力。

2.3.2 新物体识别实验检测大鼠认知水平 将动物放在新物体识别箱自由探索5~10 min以熟悉环境,每次测试后需用75%乙醇清洁箱体及物体以消除气味干扰;在箱内2个相对区域放入2个形状、大小、颜色完全相同的圆柱体,动物自由探索5~10 min以记忆物体特征;间隔24 h后,将其中一个圆柱体更换为大小、形状颜色不同的新物体正方体,位置不变,记录动物在5 min内对新旧物体的探索时间,计算新物体识别指数,新物体识别指数=新物体探索时间/(新物体探索时间+旧物体探索时间)×100%。

2.3.3 HE染色和Nissl染色检测大鼠海马神经元的结构和功能变化 水迷宫实验结束后取材,将大鼠脑组织浸泡于4%多聚甲醛溶液中持续固定,按照梯度乙醇(70%、80%、90%、95%、100%)进行常规脱水,石蜡包埋后切片(片厚3 μm),常规脱蜡水化后依次进行HE和Nissl染色,封片后置于显微镜下观察海马神经元形态结构。

2.3.4 透射电镜(TEM)观察大鼠海马神经元中内质网的形态 选取3~5份体积1~3 mm³的脑组织样本,采用电镜固定液、2.5%戊二醛溶液和1%锇酸固定。随后梯度丙酮溶液脱水、包埋后37℃过夜,使用超薄切片机获取50~100 nm厚度的切片。经双染色(3%醋酸铀及硝酸铅)处理,TEM观察内质网的形态结构。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马GRP78、PERK、p-PERK、ATF4、CHOP、NLRP3、GSDMD、Caspase-1蛋白表达 取大鼠冻存海马组织70 mg,加入RIPA强裂解液后使用组织匀浆仪进行充分研磨后提取总蛋白,利用蛋白定量法(BCA)试剂盒测定蛋白浓度后变性煮沸,按20 μg上样进行电泳,电泳结束后300 V恒压转膜90 min,室温下5%脱脂牛奶中封闭90 min,1×TBST洗涤后加入GRP78(1:5 000)、PERK(1:2 500)、p-PERK(1:5 000)、ATF4(1:3 000)、CHOP(1:1 500)、NLRP3(1:3 000)、GSDMD(1:1 500)、Caspase-1(1:5 000)一抗4℃孵育过夜。1×TBST洗膜3次,每次10 min后加入β-actin(1:20 000)、GAPDH(1:10 000)室温孵育1 h,再使用1×TBST洗膜3次,每次10 min加入ELC发光液置于化学发光成像系统中进行显影,使用Image J软件对条带进行灰度值计算和分析。

2.3.6 免疫荧光检测海马组织中 GRP78、GSDMD 的表达 将大鼠脑组织石蜡切片依次进行脱蜡、水化处理,并利用柠檬酸钠完成抗原修复;经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,使用 0.1% Triton X-100 进行通透处理,再次 PBS 洗涤;随后于 37℃湿盒中以 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h;滴加 GRP78、GSDMD、 β Ⅲ Tubulin、NeuN 一抗(稀释倍数均为 1:100)覆盖组织置于湿盒内 4℃冰箱孵育过夜;次日 37℃复温后经 PBST 缓冲液,加入荧光标记二抗(1:100),37℃避光孵育 30 min, PBST 洗涤。甩干切片后,在室温下滴加 Hoechst 进行避光染色 10 min, PBST 洗涤。最后进行封片处理,封片完成后使用倒置荧光显微镜进行观察拍照。

2.3.7 统计学方法 采用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行数据处理与统计分析。符合正态分布且方差齐性的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);若方差齐,则组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD);若方差不

齐,则采用 Games-Howell 法进行事后比较。不符合正态分布的计量资料,采用 Kruskal-Wallis H 检验进行多组间比较。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠学习记忆能力的影响 采用水迷宫检测 VD 大鼠的学习记忆能力,与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越平台次数、平台象限停留时间显著减少($P<0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组、滋肾活血方中、高剂量组逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),平台穿越次数明显增加($P<0.05, P<0.01$),盐酸多奈哌齐组和滋肾活血方各剂量组平台象限停留时间明显增加($P<0.05, P<0.01$),各组游泳速度比较,差异无统计学意义。在新物体识别实验中,与假手术组比较,模型组的识别指数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,经盐酸多奈哌齐和滋肾活血方各剂量组识别指数显著升高($P<0.01$),并且呈现剂量依赖性。见表 1 及增强出版附加材料。

表 1 滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠水迷宫学习记忆能力和新物体识别指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

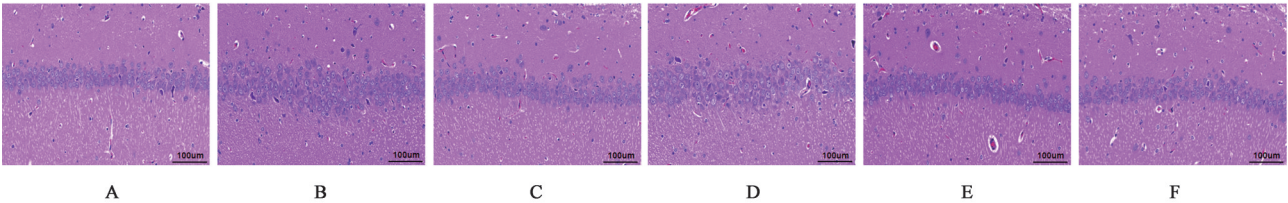
Table 1 Effect of ZSHXP on 2-VO model rat on water maze learning and memory ability and new object recognition index ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	平台穿越次数/次	平台象限停留时间/s	平均速度/mm·s ⁻¹	识别指数/%
假手术组		22.13±1.38	7.50±1.29	29.94±2.55	19.87±0.46	74.55±2.47
模型组		57.35±0.97 ¹⁾	2.25±1.50 ¹⁾	9.60±3.16 ¹⁾	20.95±2.06	23.00±5.10 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	4.5×10 ⁻⁴	32.54±2.41 ³⁾	6.25±1.26 ³⁾	27.40±2.88 ³⁾	21.23±2.05	68.98±1.24 ³⁾
滋肾活血方低剂量组	8.90	58.41±1.38	4.25±0.50	16.83±0.97 ²⁾	19.90±1.27	34.94±2.58 ³⁾
滋肾活血方中剂量组	17.80	43.40±1.91 ³⁾	5.33±1.15 ²⁾	20.83±1.82 ³⁾	20.71±1.96	48.45±2.93 ³⁾
滋肾活血方高剂量组	35.60	27.87±4.02 ³⁾	7.00±1.00 ³⁾	26.33±3.46 ³⁾	21.07±1.56	63.17±1.91 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05, ^3)$ $P<0.01$ (表 2、表 3 同)

3.2 滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠海马组织形态学的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马神经元排列紊乱,数量减少,胞体变形皱缩,核固缩深染;

与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和滋肾活血方各剂量组海马神经元数量增多,排列趋于紧密,核深染减少。见图 1。



注:A.假手术组;B.模型组;C.盐酸多奈哌齐组;D.滋肾活血方低剂量组;E.滋肾活血方中剂量组;F.滋肾活血方高剂量组(图 2、图 4-图 7 同)

图 1 滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠海马 CA1 区病理形态的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of ZSHXP on pathological morphology of hippocampal CA1 region in 2-VO model rats (HE, ×400)

3.3 滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠海马神经损伤的影响 Nissl 染色结果显示,与假手术组比较,模型组海马区神经元坏死严重,细胞排列紊乱稀疏, Nissl 小

体数量显著减少;与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及滋肾活血方各剂量组 Nissl 小体数量增加,形态结构趋于正常。见图 2。

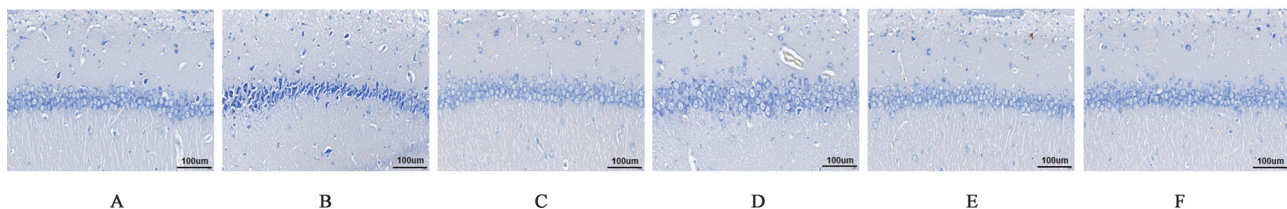


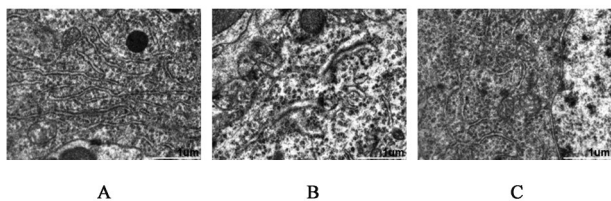
图2 滋肾活血方对2-VO模型大鼠海马组织中Nissl小体的影响(Nissl, ×400)

Fig. 2 Effect of ZSHXP on results of Nissl staining of hippocampal tissues in 2-VO model rats (Nissl, ×400)

3.4 滋肾活血方对2-VO大鼠海马神经元中内质网结构的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马神经元内质网数量明显减少,出现异常的扩张和肿胀,正常折叠结构消失;与模型组比较,滋肾活血方高剂量组内质网数量增加,恢复折叠结构。见图3。

3.5 滋肾活血方对PERK介导的ERS相关蛋白的影响 免疫荧光检测ERS关键蛋白GRP78与神经元标志物NeuN的共定位,结果显示,与假手术组比较,模型组GRP78与NeuN荧光共定位显著升高;经盐酸多奈哌齐和滋肾活血方给药干预后,2-VO模型大鼠GRP78与NeuN荧光共定位显著减弱。见图4。

通过Western blot实验对ERS相关蛋白进行检测,结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马组



注:A.假手术组;B.模型组;C.滋肾活血方高剂量组

图3 滋肾活血方对2-VO模型大鼠海马神经元中内质网形态结构的影响(TEM, ×12 500)

Fig. 3 Effect of ZSHXP on morphological structure of endoplasmic reticulum in hippocampal neurons of 2-VO model rats (TEM, ×12 500)

织中GRP78、p-PERK/PERK、ATF4、CHOP蛋白表达显著增多($P<0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组

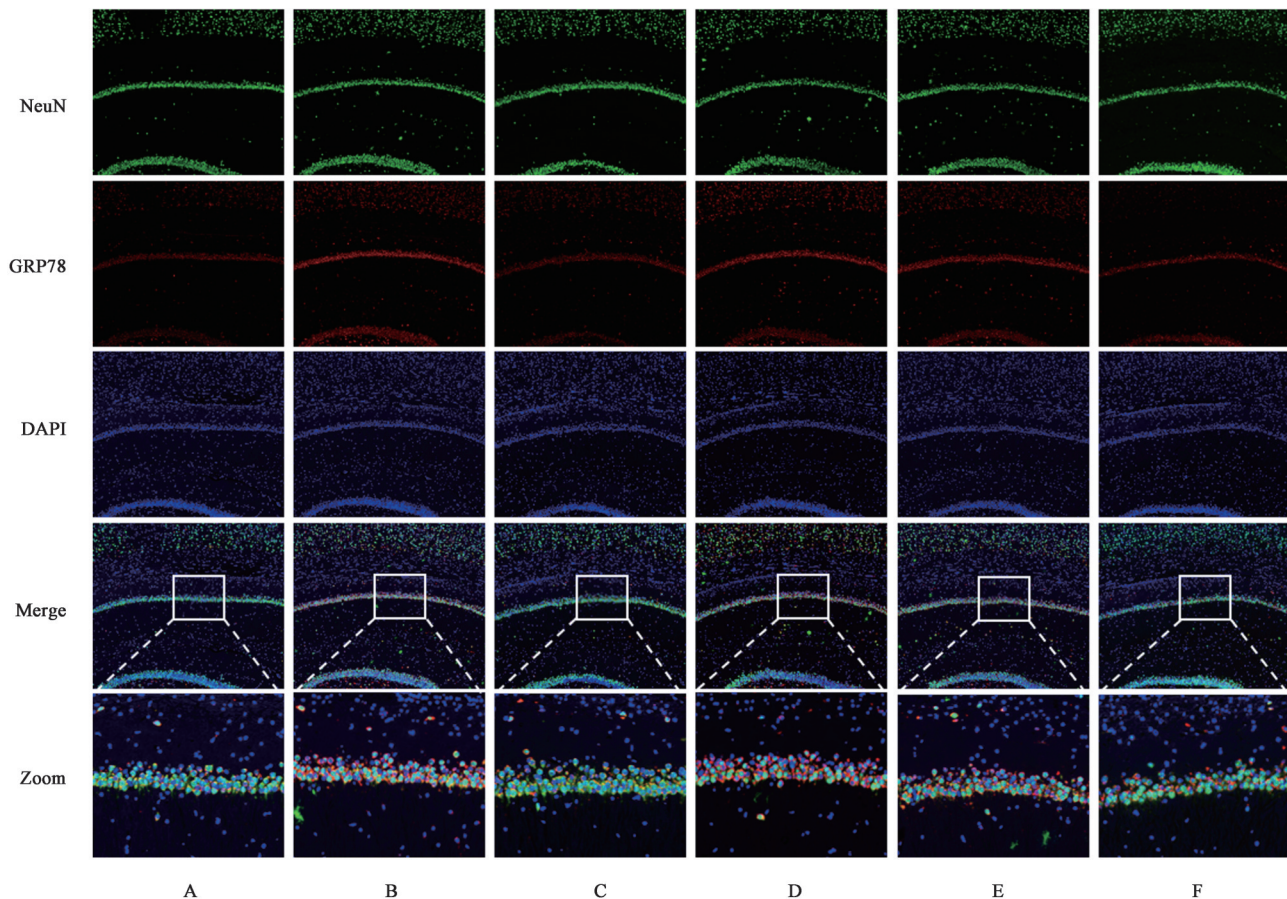


图4 滋肾活血方对2-VO模型大鼠海马GRP78与NeuN蛋白荧光表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of ZSHXP on fluorescence expression of GRP78 and NeuN proteins in hippocampus of 2-VO model rats (IF, ×200)

GRP78、ATF4、CHOP 蛋白表达显著增加($P<0.01$), p-PERK/PERK 蛋白表达明显减少($P<0.05$), 滋肾活血方低剂量组 p-PERK/PERK、CHOP 表达显著增加($P<0.01$), GRP78 明显降低($P<0.05$), 滋肾活血方

中、高剂量组 p-PERK/PERK、ATF4、CHOP 蛋白表达显著降低($P<0.01$), 滋肾活血方高剂量组 GRP78 蛋白表达显著降低, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表 2、图 5。

表 2 滋肾活血方对 PERK 介导的 ERS 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 2 Effect of ZSHXP on proteins associated with PERK-mediated ERS ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	GRP78/GAPDH	p-PERK/PERK	ATF4/GAPDH	CHOP/GAPDH
假手术组		0.43±0.01	0.73±0.04	0.47±0.02	0.32±0.02
模型组		0.75±0.02 ¹⁾	1.32±0.03 ¹⁾	0.77±0.02 ¹⁾	0.53±0.01 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	4.5×10 ⁻⁴	0.87±0.02 ³⁾	1.25±0.04 ²⁾	0.93±0.03 ³⁾	0.65±0.01 ³⁾
滋肾活血方低剂量组	8.90	0.80±0.02 ²⁾	1.50±0.02 ³⁾	0.75±0.02	0.80±0.01 ³⁾
滋肾活血方中剂量组	17.80	0.76±0.01	0.82±0.03 ³⁾	0.65±0.02 ³⁾	0.45±0.02 ³⁾
滋肾活血方高剂量组	35.60	0.65±0.01 ³⁾	0.73±0.03 ³⁾	0.48±0.01 ³⁾	0.43±0.02 ³⁾

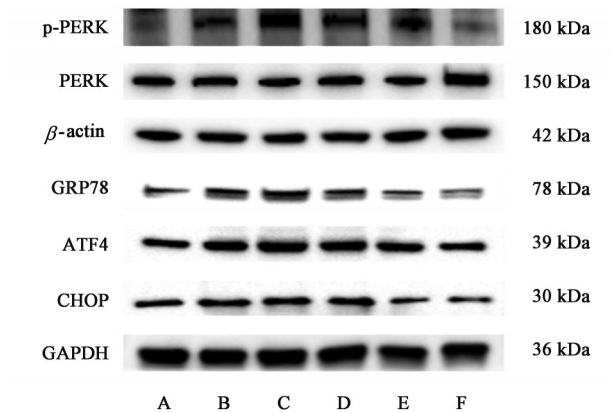


图 5 PERK 介导的 ERS 相关蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of proteins associated with PERK-mediated ERS

3.6 滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠海马组织神经细胞焦亡相关蛋白表达的影响 免疫荧光检测细胞焦亡关键指标 GSDMD 蛋白在各组大鼠海马中的荧光表达, 结果显示, 与假手术组比较, 模型组 GSDMD 和 β III Tubulin 蛋白荧光共定位显著增强升高; 经盐酸多奈哌齐和滋肾活血方给药干预后, 2-VO 模型大鼠 GSDMD 和 β III Tubulin 蛋白荧光共定位显著减少, 中药组随剂量增大抑制荧光共定位效果更明显。见图 6。

通过 Western blot 实验对细胞焦亡相关蛋白进行检测, 结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠海马组织中 NLRP3、GSDMD、Caspase-1 蛋白表达水平显著上升($P<0.01$); 与模型组比较, 盐酸多奈哌齐组 Caspase-1 蛋白表达显著增加($P<0.01$), NLRP3 蛋白表达显著减少($P<0.01$), 滋肾活血方低剂量组 GSDMD 表达显著升高($P<0.01$), NLRP3 蛋白表达显著减少($P<0.01$), 滋肾活血方中、高剂量组

NLRP3、GSDMD、Caspase-1 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$), 且滋肾活血方高剂量组蛋白的表达低于中剂量组。见图 7、表 3。

4 讨论

VD 在中医中可归属为“呆病”“健忘”范畴, 基本病机为肾虚血瘀, 髓损神伤。治法为滋肾填精、活血通络^[17]。方中制何首乌和枸杞子相须为用, 滋补肝肾, 共为君药; 桑椹补益阴血, 益智仁温阳生阴, 二者可使得化源得养, 脑髓充盈, 共为臣药; 丹参化瘀通脉, 葛根升举清阳, 远志安神定志, 五味子固肾敛阴, 石菖蒲醒脑开窍。更以郁金为引, 借其辛散之性疏解气血, 化痰开郁, 引诸药上行。诸药协奏, 髓海得充, 瘀阻得通。临床上运用滋肾活血方治疗 VD^[19], 效果良好。本研究采用改良 2-VO 法来构建 VD 大鼠模型, 结果发现滋肾活血方给药后可显著减少 VD 大鼠的逃避潜伏期, 增加平台穿越次数、平台象限停留时间和新物体识别指数。提示, 滋肾活血方可以缓解 VD 大鼠的认知障碍, 这与课题组前期研究结果相一致^[20-21]。

海马在认知功能方面发挥着重要作用^[22]。HE 染色和 Nissl 染色结果发现, 滋肾活血方干预后的海马神经元存活率显著提高, 形态趋于规则, 核深染现象明显改善; Nissl 小体分布密度增加, 神经元胞体结构完整性显著恢复。这表明, 滋肾活血方对 VD 大鼠认知功能的改善作用与减轻海马神经元的损伤有关。

CCH 状态下内质网受损会触发 ERS, 加剧海马神经元的损伤, 恶化 VD 病程^[23-24]。PERK 是具有丝氨酸/苏氨酸细胞质结构域的 I 型内质网跨膜受体, 正常情况下 GRP78 与 PERK 紧密结合处于稳定状

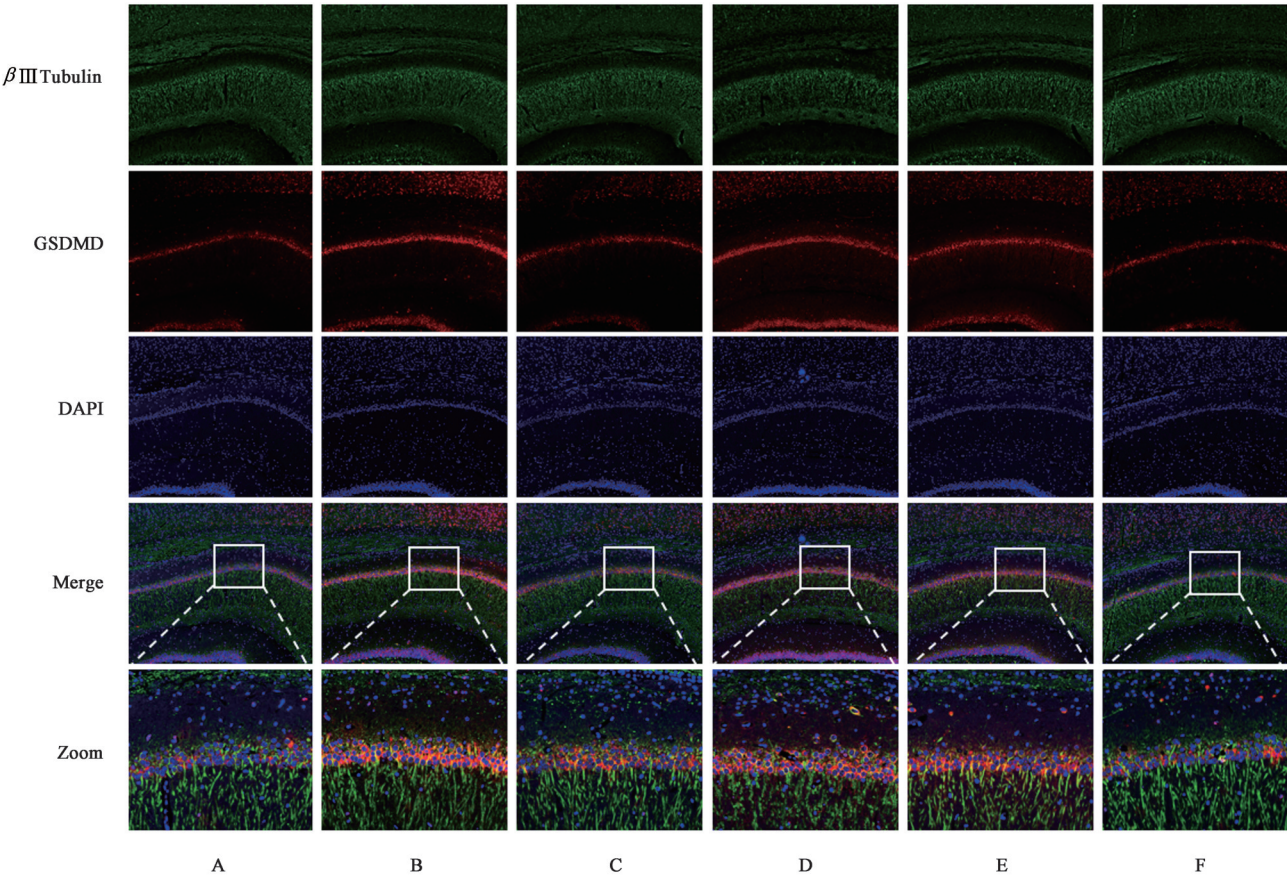


图6 滋肾活血方对2-VO大鼠海马GSDMD与̢III Tubulin蛋白荧光表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 6 Effect of ZSHXP on fluorescence expression of GSDMD and ̢III Tubulin proteins in hippocampus of 2-VO model rats (IF, ×200)

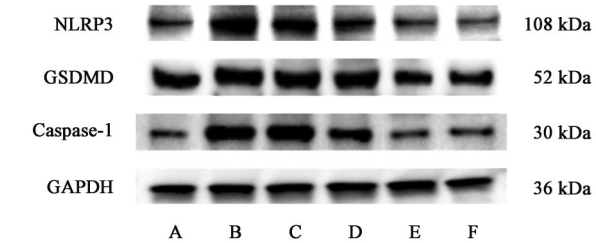


图7 2-VO模型大鼠海马组织细胞焦亡蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of pyroptosis-related proteins expression in hippocampal tissue of 2-VO model rats

表3 滋肾活血方对2-VO大鼠海马组织细胞焦亡蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of ZSHXP on pyroptotic protein expression in hippocampus of 2-VO model rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	NLRP3 /GAPDH	GSDMD /GAPDH	Caspase-1 /GAPDH
假手术组		0.61±0.03	0.73±0.04	0.44±0.04
模型组		0.77±0.01 ¹⁾	0.85±0.03 ¹⁾	0.78±0.02 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	4.5×10 ⁻⁴	0.70±0.02 ³⁾	0.83±0.02	0.88±0.01 ³⁾
滋肾活血方低剂量组	8.90	0.70±0.01 ³⁾	0.93±0.01 ³⁾	0.73±0.02
滋肾活血方中剂量组	17.80	0.66±0.01 ³⁾	0.78±0.02 ³⁾	0.54±0.04 ³⁾
滋肾活血方高剂量组	35.60	0.63±0.01 ³⁾	0.75±0.02 ³⁾	0.48±0.03 ³⁾

态^[25-26],当错误折叠蛋白过度积累时 GRP78 和 PERK 分离,PERK 激活自磷酸化,进一步磷酸化 eIF2 α ,诱导下游 ATF4、CHOP 的表达,促使细胞从存活状态向死亡转变^[27]。在本项研究中,TEM 结果表明,滋肾活血方干预可显著改善 2-VO 模型大鼠海马组织内质网的扩张和肿胀,促进内质网形态与结构的恢复;免疫荧光结果进一步证实,给予滋肾活血方能显著抑制 GRP78 与 NeuN 荧光共定位;Western blot 结果表明该方能有效下调 ERS 标志蛋白 GRP78、p-PERK/PERK、ATF4 及 CHOP 的表达水平。以上结果提示,滋肾活血方对 2-VO 模型大鼠认知功能的改善作用可能与 GRP78/PERK/ATF4 信号通路介导的 ERS 有关。这与蔡元钦等^[28]通过抑制 GRP78/PERK/ATF4 信号通路,减轻大鼠海马神经元损伤的结果一致;许甜甜等^[29]也证实通过 PERK/ATF4 信号通路能够改善大鼠神经元的损伤。提示,抑制 ERS 是发挥神经保护作用的有效途径。

研究表明,ERS 通过激活 PERK 信号通路上调会激活 NLRP3 炎症小体,进而激活 Caspase-1,与 GSDMD 上裂解位点相结合使其裂解,形成含有

GSDMD-NT活性域的肽段,最终导致细胞膜打孔,释放炎症因子,造成细胞焦亡^[30-32]。本实验研究发现,经滋肾活血方干预后VD大鼠海马组织中GSDMD和 β III Tubulin蛋白共定位荧光信号明显降低,NLRP3、Caspase-1、GSDMD细胞焦亡关键蛋白的表达显著减少。结果提示,滋肾活血方对2-VO模型大鼠的改善作用可能是通过调控ERS进而减少海马神经细胞焦亡发挥作用。本研究结果显示,滋肾活血方低剂量组GRP78、p-PERK/PERK、CHOP、GSDMD蛋白表达量均高于模型组,推测结果差异可能是由于中药复方的剂量-效应关系并非线性关系,常存在低剂量负调节的特征^[20]。此外,盐酸多奈哌齐作为阳性对照药,在改善行为学症状方面显示有效性,但未观察到其对ERS/焦亡相关蛋白的显著调节作用。这与该药物主要针对胆碱能系统而非ERS/焦亡通路的作用机制一致。

综上,本研究初步证明滋肾活血方可能通过调控GRP78/PERK/ATF4信号通路,减轻ERS,抑制海马神经细胞焦亡,从而改善VD大鼠认知功能障碍。这一发现为滋肾活血方的神经保护作用提供了新的依据。未来研究可进一步结合通路抑制剂或基因敲除等手段,验证该通路上下游的交互机制,以更全面地了解滋肾活血方调控GRP78/PERK/ATF4通路在VD损伤中的保护作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] CHANG W E, CHANG C H. Vascular cognitive impairment and dementia[J]. *Continuum*, 2022, 28(3): 750-780.
- [2] YANG Y, ZHAO X, ZHU Z, et al. Vascular dementia: A microglia's perspective [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 81: 101734.
- [3] MORGAN A E, M C AULEY M T. Vascular dementia: From pathobiology to emerging perspectives[J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 96: 102278.
- [4] WANG D P, KANG K, HAI J, et al. Alleviating CB2-dependent ER stress and mitochondrial dysfunction improves chronic cerebral hypoperfusion-induced cognitive impairment [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2024, 19(1): 1.
- [5] PEROSA V, PRIESTER A, ZIEGLER G, et al. Hippocampal vascular reserve associated with cognitive performance and hippocampal volume[J]. *Brain*, 2020, 143(2): 622-634
- [6] SHI M, CHAI Y, ZHANG J, et al. Endoplasmic reticulum stress-associated neuronal death and innate immune response in neurological diseases [J]. *Front Immunol*, 2022, 12: 794580.
- [7] SENFT D, RONAI Z A. UPR, autophagy, and mitochondrial crosstalk underlies the ER stress response [J]. *Trends*

- Biochem Sci*, 2015, 40(3): 141-148.
- [8] 孟宇豪,江晓翠,萧闵,等. 丙硫氧嘧啶通过内质网应激损害大鼠生精功能和精子质量的机制及疏肝补肾毓麟汤的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(9): 79-89.
- MENG Y H, JIANG X C, XIAO M, et al. Propylthiouracil impairs spermatogenesis and sperm quality in rats via endoplasmic reticulum stress and intervention of Shugan Bushen Yulin decoction [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(9): 79-89.
- [9] SMEDLEY G D, WALKER K E, YUAN S H. The role of PERK in understanding development of neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8146.
- [10] ZHANG Y, LOU H, LU J, et al. Scalp acupuncture alleviates cerebral ischemic stroke-induced motor dysfunction in rats via regulating endoplasmic reticulum stress and ER-phagy [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 10119.
- [11] MIAO R, JIANG C, CHANG W Y, et al. Gasdermin D permeabilization of mitochondrial inner and outer membranes accelerates and enhances pyroptosis [J]. *Immunity*, 2023, 56(11): 2523-2541.
- [12] 曾逸笛,郑彩杏,赖丽娜,等. 血管性痴呆疾病与非疾病危险因素及发病机制研究进展[J]. *医学综述*, 2022, 28(14): 2821-2826.
- ZENG Y D, ZHENG C X, LAI L N, et al. Research progress on disease and non-disease risk factors and pathogenesis of vascular dementia [J]. *Med Recapitul*, 2022, 28(14): 2821-2826.
- [13] 张媛婷,胡宗仁,谢乐,等. 滋肾活血方治疗肾阴虚血瘀型血管性痴呆的临床观察[J]. *中医药临床杂志*, 2022, 34(1): 151-155.
- ZHANG Y T, HU Z R, XIE L, et al. Clinical observation of Zishen Huoxue prescription in treating vascular dementia with syndrome of kidney yin deficiency and blood stasis [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2022, 34(1): 151-155.
- [14] 伍大华,姚婷,蒋军林,等. 滋肾活血法治疗血管性痴呆肾阴虚血瘀证的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(12): 1372-1374.
- WU D H, YAO T, JIANG J L, et al. Clinical study on Zishen Huoxue therapy for vascular dementia with kidney Yin deficiency and blood stasis syndrome [J]. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis*, 2015, 13(12): 1372-1374.
- [15] 赵梓婷,伍大华,张秀丽,等. 滋肾活血方对2-VO模型大鼠海马CA1区线粒体自噬的调节及神经元再生的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(20): 45-52.
- ZHAO Z T, WU D H, ZHANG X L, et al. Effects of Zishen Huoxue prescription on mitochondrial autophagy in hippocampal CA1 region and neuronal regeneration in 2-VO model rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(20): 45-52.
- [16] 刘桐赫,伍大华,赵梓婷,等. 滋肾活血方对糖氧剥夺/再灌注诱导的海马神经元线粒体自噬的影响[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(6): 1189-1194.
- LIU T H, WU D H, ZHAO Z T, et al. Effects of Zishen Huoxue prescription on mitochondrial autophagy in

- hippocampal neurons induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2023, 39 (6) : 1189-1194.
- [17] 赵梓婷,张秀丽,刘桐赫,等. 基于NMDAR调控线粒体自噬探讨滋肾活血方对血管性痴呆大鼠海马氧化应激损伤的保护作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2023, 46(8): 1128-1138.
- ZHAO Z T, ZHANG X L, LIU T H, et al. Protective effect of Zishen Huoxue prescription on hippocampal oxidative stress injury in vascular dementia rats via NMDAR-regulated mitochondrial autophagy[J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*, 2023, 46(8): 1128-1138.
- [18] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- XU S Y. *Pharmacological Experimental Methodology* [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [19] 姚婷,刘璐,王馨苑,等. 滋肾活血方对血管性痴呆大鼠认知功能障碍的治疗作用[J]. *山西医科大学学报*, 2024, 55(6): 722-730.
- YAO T, LIU L, WANG X Y, et al. Therapeutic effect of Zishen Huoxue decoction on cognitive dysfunction in rats with vascular dementia[J]. *J Shanxi Med Univ*, 2024, 55(6): 722-730.
- [20] 秦茂,伍大华,张秀丽,等. 滋肾活血方对血管性痴呆大鼠分裂与融合蛋白 Mfn1、Mfn2、Drp1、Fis1 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(1): 21-26.
- QIN M, WU D H, ZHANG X L, et al. Effect of Zishen Huoxue decoction on mitochondrial fission and fusion proteins Mfn1, Mfn2, Drp1 and Fis1 in rats with vascular dementia [J]. *J Hunan Univ Chinese Med*, 2023, 43 (1) : 21-26.
- [21] 姚婷,邓谦,蒋军林,等. 基于Nod样受体蛋白3炎性小体通路探讨滋肾活血方对血管性痴呆大鼠海马神经血管单元的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(12): 2226-2231.
- YAO T, DENG Q, JIANG J L, et al. Effect of Zishen Huoxue decoction on hippocampal neurovascular unit in vascular dementia rats based on NOD-like receptor protein 3 inflammasome pathway [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2021, 16(12): 2226-2231.
- [22] IGATA H, IKEGAYA Y, SASAKI T. Prioritized experience replays on a hippocampal predictive map for learning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(1): e2011266118.
- [23] KANG K, CHEN S H, WANG D P, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress improves chronic ischemic hippocampal damage associated with suppression of IRE1 α /TRAF2/ASK1/JNK-dependent apoptosis [J]. *Inflammation*, 2024, 47(4): 1479-1490.
- [24] THANGWONG P, JEARJAROEN P, GOVITRAPONG P. Melatonin improves cognitive function by suppressing endoplasmic reticulum stress and promoting synaptic plasticity during chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 198: 114980.
- [25] 龙春频,林泉峰,欧阳坚,等. 黄连解毒汤含药血清对A β 诱导的海马神经元凋亡及GRP78/PERK/CHOP通路的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(3): 619-623.
- LONG C P, LIN Q F, OUYANG J, et al. Huanglian Jiedu decoction-containing serum inhibits A β -induced hippocampal neuron apoptosis via GRP78/PERK/CHOP pathway [J]. *Chin J Gerontol*, 2023, 43(3): 619-623.
- [26] 李从艺,曹旺杰,苏韫,等. 基于PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP信号通路探讨四味黄芪散对高原低氧致脑损伤大鼠的保护作用及机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(11): 1661-1668.
- LI C Y, CAO W J, SU Y, et al. Siwei Huangqi San protects against high-altitude hypoxia-induced brain injury in rats via PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP signaling pathway [J]. *Tradit Drug Res Clin Pharmacol*, 2024, 35(11): 1661-1668.
- [27] 高琛,孙峰山,李娜. 白术内酯Ⅲ调节PERK-eIF2 α -ATF4信号通路介导内质网应激对脑缺血-再灌注损伤大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. *中药材*, 2024, 47(10): 2615-2619.
- GAO C, SUN F S, LI N. Atractylenolide Ⅲ inhibits neuronal apoptosis by regulating PERK-eIF2 α -ATF4-mediated endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia-reperfusion injury rats [J]. *J Chin Med Mater*, 2024, 47(10): 2615-2619.
- [28] 蔡元钦,陈显兵,龙清华,等. 茯苓散通过抑制GRP78-PERK-ATF4信号通路减轻阿尔茨海默病大鼠海马神经元损伤和铁死亡[J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(5): 874-880.
- CAI Y Q, CHEN X B, LONG Q H, et al. Congrong San alleviates hippocampal neuron injury and ferroptosis in Alzheimer's disease rats by inhibiting GRP78-PERK-ATF4 signaling [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2025, 41(5): 874-880.
- [29] 许甜甜,田晔,王仕铎,等. 基于PERK/ATF4信号通路探讨益气活血化浊解毒方对脑缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2025, 32(7): 81-87.
- XU T T, TIAN Y, WANG S D, et al. Yiqi Huoxue Huazhuo Jiedu formula protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via PERK/ATF4 signaling pathway [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2025, 32(7): 81-87.
- [30] CAO Y, HU L, CHEN R, et al. Unfolded protein response-activated NLRP3 inflammasome contributes to pyroptotic and apoptotic podocyte injury in diabetic kidney disease via the CHOP-TXNIP axis [J]. *Cell Signal*, 2025, 130: 111702.
- [31] 杨柳,丁雅容,贺梅津,等. 解毒生肌膏通过抑制过度内质网应激和调控PERK/IRE1/NLRP3信号通路促进糖尿病大鼠创面修复[J]. *中国病理生理杂志*, 2025, 41(5): 945-952.
- YANG L, DING Y R, HE M J, et al. Jiedu Shengji ointment promotes wound healing in diabetic rats by suppressing excessive endoplasmic reticulum stress and regulating PERK/IRE1/NLRP3 pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2025, 41(5): 945-952.
- [32] 刘迅,刘华,彭岚玉,等. 基于PERK/TXNIP/NLRP3通路探讨左归降糖通脉方对糖尿病合并脑梗死大鼠神经元细胞焦亡的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(10): 1336-1346.
- LIU X, LIU H, PENG L Y, et al. Zuogui Jiangtang Tongmai formula inhibits neuronal pyroptosis in diabetic rats with cerebral infarction via PERK/TXNIP/NLRP3 pathway [J]. *Tradit Drug Res Clin Pharmacol*, 2023, 34(10): 1336-1346.

[责任编辑 孙丛丛]