

清热化痰颗粒对脑缺血预处理大鼠 肌醇需求激酶 1 表达的影响

胡跃强¹, 唐农^{2*}, 吴林², 胡玉英¹, 苏锦勋², 来要水²

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] 目的: 观察清热化痰颗粒对脑缺血预处理大鼠缺血再灌注后肌醇需求激酶 1 (IRE1) mRNA 及其蛋白表达的影响。方法: 健康雄性 SD 大鼠 80 只, 随机分为 4 组: 假手术组 (SO)、脑缺血再灌注组 (MCAO)、脑缺血预处理组 (BIP)、清热化痰颗粒组 (QRHY), 每组按再灌注后 12 h, 1, 2, 3 d 4 个时间点平均分为 4 个亚组。制备脑缺血预处理模型, 缺血预处理后给大鼠灌胃 14 mL·kg⁻¹ 清热化痰颗粒溶液, 连续 3 d, 每天上、下午各 1 次, MCAO 组和 BIP 组给予等量的生理盐水。用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 法观察再缺血后各个时间点 IRE1 mRNA 及其蛋白的表达变化。结果: MCAO 组 IRE1 mRNA 及其蛋白表达均于缺血再灌注后 12 h 开始明显上升, 1 d 达高峰 ($P < 0.01$), 随再灌注时间延长其表达逐渐下降, 但仍保持较高表达水平 ($P < 0.01$); BIP 组较 MCAO 组 IRE1 mRNA 及其蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), QRHY 组较 BIP 组进一步升高其表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 脑缺血预处理能够诱导脑缺血损伤后 IRE1 的表达, 清热化痰颗粒可进一步促进其表达。

[关键词] 清热化痰颗粒; 缺血预处理; 缺血再灌注; 肌醇需求激酶 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0144-04

[doi] 10.11653/syfy2014020144

Effect of Qingre Huayu Granule on the Expression of Inositol Requiring Enzyme 1 after Focal Ischemic Preconditioning in Rats

HU Yue-qiang¹, TANG Nong^{2*}, WU Lin², HU Yu-ying¹, SU Jin-xun², LAI Yao-shui²

(1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanning 530023, China; 2. Guangxi University of TCM, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of the Qingre Huayu granule (QRHY) on the inositol requiring enzyme 1 (IRE1) mRNA and protein after focal ischemic preconditioning in rats. **Method:** Eighty healthy male SD rats were randomly divided into four groups: sham-operation group, middle cerebral artery occlusion (MCAO) group, brain ischemia preconditioning (BIP) group and QRHY group. Each group was further divided into 4 subgroups according to ischemia/reperfusion (I/R) duration of 12 h, 1, 2, 3 d. The BIP models was established and 14 mL·kg⁻¹ QRHY granule solution was ig given twice everyday for 3 days after preconditioning. But the MCAO and BIP group was ig given same amount physiological saline. The expression of IRE1 mRNA and protein was detected by Real time PCR and Western blot. **Result:** The expression both of IRE1 mRNA and its protein all increased and reached the peak at 24 h, then decreased continuously ($P < 0.05$). BIP could increase their expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). QRHY treatment could further induce its expression compared with BIP group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** BIP could upregulate the expression of IRE1 after focal ischemic injury in rats. QRHY could augment the expression of IRE1 induced by BIP.

[Key words] Qingre Huayu granule; ischemic preconditioning; ischemia/reperfusion; IRE1

[收稿日期] 20130421(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860354); 广西卫生厅重点课题(重 2012D46)

[第一作者] 胡跃强, 博士, 从事神经内科学研究, E-mail: 137463195@qq.com

[通讯作者] * 唐农, 博士, 教授, 从事中医脑病研究, Tel: 0771-3131086, E-mail: shitousay 1111@tom.com

脑缺血预处理 (brain ischemic preconditioning, BIP) 又称为脑缺血耐受 (ischemic tolerance, IT), 是近年发现的重要内源性神经保护机制。最近有研究发现内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 在此环节中发挥了关键作用。作为内质网膜上具有感受腔内未折叠蛋白堆积的跨膜蛋白——肌醇需求激酶 (inositol requiring enzyme 1, IRE1), 在一定条件下通过寡聚体化而激活, 在决定细胞最终生存或死亡上起着至关重要的作用^[1]。

药物预处理成为近年来国内外研究的热点。清热化痰方药理作用机制提示其可能促使预处理后延迟性脑缺血耐受的产生^[2], 前期研究证实其对 ERS 后 PKR 样内质网激酶 (PERK) 信号转导通路有抑制作用^[3], 并能诱导葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 表达而发挥神经保护作用^[4], 但其对 ERS 后 IRE1 信号通路的影响尚有待于阐明。本实验通过建立大鼠局灶性脑缺血预处理模型, 通过检测 BIP 后 IRE1 在脑内的表达变化, 以进一步观察清热化痰颗粒联合 BIP 对脑缺血再灌注损伤的神经保护机制, 从而为其临床治疗缺血性脑血管病提供理论依据。

1 材料

1.1 动物分组及处理 健康雄性 SD 大鼠 80 只, 体重 (250 ± 50) g, SPF 级, 广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (桂) 2009-0002。

1.2 药品与试剂 清热化痰方单味中药浓缩颗粒剂, 组成如下: 水牛角 2 g (相当于 30 g 饮片)、丹参 3 g (相当于 10 g 饮片)、赤芍 2.25 g (相当于 10 g 饮片)、广地龙 1 g (相当于 10 g 饮片)、石菖蒲 2.2 g (相当于 9 g 饮片)、川芎 4 g (相当于 10 g 饮片)、郁金 1 g (相当于 10 g 饮片)、酒大黄 1 g (相当于 6 g 饮片)、天竺黄 0.5 g (相当于 10 g 饮片)。由江苏省江阴市江阴天江药业有限公司制备 (生产批号 1012364)。灌胃液体量为每次 14 mL·kg⁻¹ 大鼠, 其浓度及等效剂量按体表面积折算为 14 g·kg⁻¹·d⁻¹。兔抗大鼠 IRE1 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号 F001135479); 偶联有辣根过氧化物 (HRP) 羊抗兔 IgG 二抗 (博士德公司, 批号 BA1026); 内参 GAPDH, 康成生物公司 (批号 KC-5G6)。总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司, 批号 R6975); PCR 反应试剂盒及逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司, DDR102B); 引物及内参均由大连宝生物有限公司提供。

1.3 仪器 聚丙烯酰胺凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司), 5417R 低温高速离心机 (德国 eppendorf 公司), AER22140 普通电子天平 (上海奥豪斯公司),

TS. B-108 注复式脱色摇床 (江苏海门麒麟医用仪器厂), 核酸水平电泳仪 (北京六一仪器有限公司), 电泳槽 (北京六一仪器有限公司), 超微量紫外光度计 Q3000 (美国 Quawell 公司), 荧光定量 PCR 仪 (美国 MJ Research DNA Engine Opticon)。

2 方法

2.1 动物分组及处理 随机将大鼠分为 4 组: 假手术组 (SO); 大脑中动脉缺血组 (MCAO); 假手术 + 脑缺血组 (SO + MCAO); BIP 组: 预缺血 + 脑缺血组 (BIP + MCAO); 清热化痰颗粒组 (QRHY): 预缺血 + 清热化痰颗粒 + 脑缺血。每组按照再灌注后 12 h, 1, 2, 3 d 4 个时间点平均分为 4 个亚组 ($n = 5$)。分别作如下处理: SO 组: 以假手术代替预缺血及缺血再灌注; MCAO 组: 以假手术代替预缺血, 其余步骤同 BIP 组; BIP 组: MCAO 10 min 后抽出栓线, 完成预缺血, 3 d 后再次行 MCAO 2 h, 灌胃等量生理盐水, 再灌注后 12 h, 1, 2, 3 d 处死大鼠; QRHY 组: 缺血预处理 10 min 后, 在大鼠麻醉清醒后 1 h 灌胃清热化痰颗粒溶液, 连续 3 d, 每天上、下午各 1 次。3 d 后给予 2 h MCAO, 再灌注后 12 h, 1, 2, 3 d 处死大鼠 (期间不再给药)。

2.2 动物模型的制备 参照 Longa 的线栓法进行造模。采用大脑中动脉二次线栓法^[5]制备大鼠脑缺血预处理模型, 结扎大鼠左颈外动脉远端和颈总动脉近端, 将前端用火焰烧圆的尼龙线从颈总动脉残端插入, 进线约 18 ~ 20 mm, MCAO 后 10 min 抽出线栓, 完成预缺血。3 d 后再次行 MCAO 2 h, 规定时间点处死动物取脑。

2.3 观察指标

2.3.1 缺血半暗带脑皮质 IRE1 mRNA 表达测定

① 大脑组织总 RNA 提取参考 Trizol 试剂盒说明书提取总 mRNA。② 引物合成: 荧光定量 RT-PCR 所用的 IRE1 和 GAPDH 引物序列如下: IRE1, 上游 5'-GACGGACAGAATACACCATCAC-3'; 下游 5'-CCAC-CACAGGAGAGGCATAG-3', 产物长度 213 bp; GAPDH, 上游 5'-GACAACCTTTGGCATCGTGGA-3' 下游 5'-ATGCAGGATGATGTTCTGG-3', 产物长度 133 bp。③ 比较两基因扩增效率: 选取 cDNA 样品模板进行 5 倍梯度稀释, IRE1 与 GAPDH 分别进行 real-time PCR 反应, 得出荧光曲线, 通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对 ΔCT 值作图比较两基因扩增效率。④ 反应体系及条件: 两种基因同管扩增, 反应体系均为 10 μ L, 其中 SYBR Premix Ex Taq II (2 ×) 5 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L, 两种基因上下游引物 (10 μ mol·L⁻¹)

各 0.4 μL 、探针 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , 加无 RNA 酶的水至 3.2 μL 。在 DNA Engine Opticon™ 2 连续荧光检测系统中进行扩增反应。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60.2 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60.0 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。每例样品及阴性对照均设 3 个平行复孔, 取均值。

比较两基因扩增效率: 反应结束后仪器自动显示 IRE1 与 GAPDH 的实时荧光曲线, 通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对 ΔCT (ΔCT 表示目的基因与内参基因 CT 值之差) 作图, 所得直线斜率为 0.009 8 (斜率绝对值 < 0.1), 说明目标基因 IRE1 和内参基因 GAPDH 扩增效率相同, 采用比较 CT 值法计算 IRE1 mRNA 相对定量表达。 ΔCT 值与 mRNA 表达量成反比, 即 ΔCT 值越小, 表明 mRNA 表达量越多。

2.3.2 缺血半暗带脑皮质内 IRE1 蛋白表达测定
缺血侧顶叶大脑皮质约 100 mg, 冰上研磨组织后加预冷的蛋白裂解液, 继续碾磨至液态, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$, 14 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 提取上清液, 取 20 μL 用 BCA 法进行蛋白定量测定, 所剩上清液配一致蛋白浓度, 并按 4:1 的比例加 loading, 各样本提取等量总蛋白 (60 μg), 经 100 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 变性后, 采用 10% SDS-PAGE 进行垂直电泳进行分离, 电泳后将凝胶上的蛋白条带电转移至 PVDF 膜上进行免疫反应。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 然后依次加入兔抗 IRE1 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 偶联有辣根过氧化物 (HRP) 羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h。Beyo ECL Plus

超敏发光液中 X-感光盒内曝光。以上反应均在塑料袋内进行, 其间用 TBST 充分洗涤。将胶片进行扫描或拍照, 采用 Alpha Ease FC 软件进行图像分析, 获取各组 Western blot 条带的平均吸光度 (A), 内参为 GAPDH, 目的蛋白与内参吸光度比值即为目的蛋白的相对值。

2.4 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 成组设计多样本均数的比较用单因素方差分析, 多样本均数与同组均数间的比较用 LDS-t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 IRE1 mRNA 表达变化 实时荧光定量 PCR 显示, SO 组有少量 IRE1 mRNA 表达; MCAO 组大鼠脑缺血再灌注 24 h 缺血半暗带 IRE1 mRNA 表达达高峰 ($P < 0.01$), 随再灌注时间延长其表达逐渐下降, 但仍保持较高表达水平 ($P < 0.01$); BIP 组缺血各时间点其表达水平较 MCAO 组均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); QRHY 组较 BIP 组各时间点其表达水平进一步升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 IRE1 蛋白表达的变化 Western blot 显示, SO 组有少量 IRE1 蛋白表达; MCAO 组 12 h 缺血半暗带 IRE1 蛋白表达开始显著增加, 24 h 达高峰, 随再灌注时间延长其表达逐渐下降 ($P < 0.01$), 但仍保持较高表达水平 ($P < 0.01$); BIP 组缺血各时间点其表达水平较 MCAO 组均显著升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); QRHY 组较 BIP 组各时间点其表达水平进一步升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 1 大鼠顶叶皮层 IRE1 mRNA 表达的 ΔCT 比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | IRE1 mRNA 表达/ ΔCT | | | |
|---------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | 12 h | 1 d | 2 d | 3 d |
| 假手术 | - | 8.942 \pm 0.758 | 9.012 \pm 0.642 | 8.891 \pm 0.575 | 8.992 \pm 0.659 |
| 大脑中动脉缺血 | - | 7.728 \pm 0.583 ¹⁾ | 6.683 \pm 0.523 ¹⁾ | 7.670 \pm 0.415 ¹⁾ | 7.732 \pm 0.423 ¹⁾ |
| 脑缺血预处理 | - | 5.853 \pm 0.497 ³⁾ | 5.133 \pm 0.466 ²⁾ | 5.791 \pm 0.433 ²⁾ | 6.668 \pm 0.548 ³⁾ |
| 清热化痰方 | 14 | 4.922 \pm 0.321 ⁴⁾ | 4.236 \pm 0.334 ⁴⁾ | 4.978 \pm 0.386 ⁴⁾ | 5.650 \pm 0.393 ⁴⁾ |

注: 与假手术组比¹⁾ $P < 0.01$; 与大脑中动脉缺血组同时点比²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与脑缺血预处理组比⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 大鼠顶叶皮层 IRE1 蛋白表达的吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | IRE1 蛋白表达/A | | | |
|---------|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | 12 h | 1 d | 2 d | 3 d |
| 假手术 | - | 0.627 \pm 0.056 | 0.683 \pm 0.064 | 0.636 \pm 0.054 | 0.631 \pm 0.063 |
| 大脑中动脉缺血 | - | 0.803 \pm 0.092 ¹⁾ | 0.918 \pm 0.091 ¹⁾ | 0.837 \pm 0.113 ¹⁾ | 0.825 \pm 0.101 ¹⁾ |
| 脑缺血预处理 | - | 0.973 \pm 0.170 ³⁾ | 1.126 \pm 0.186 ²⁾ | 1.034 \pm 0.173 ²⁾ | 0.956 \pm 0.165 ³⁾ |
| 清热化痰方 | 14 | 1.213 \pm 0.168 ⁴⁾ | 1.427 \pm 0.197 ⁵⁾ | 1.319 \pm 0.182 ⁴⁾ | 1.206 \pm 0.173 ⁴⁾ |

4 讨论

最近有研究发现^[6-7] BIP 可激发适当的内质网应激(ERS),通过干预引发 ERS 的机制及细胞自我调控机制,减轻 ERS 及其所致神经细胞凋亡而达到神经细胞保护的作用,这为脑血管病的治疗提供了新的思路。药物预处理即是在 BIP 的基础上发展起来的,通过药物激发机体内源性物质可对脑缺血发挥保护作用,且其具有可控性好和可行性强等优点,但现存诱导脑缺血耐受的化学药物的损伤性使其在临床应用中受到了局限。而中药在提高脑缺血耐受时有自身的优势,其多成分、多靶点的特点而成为缺血预处理研究的热点。依据“毒邪”和“络病”致病理论而设的清热化痰方具有清热解毒,化痰通络之功效,经临床实验证实其是对脑梗死急性期有确切治疗作用的中药复方制剂^[8]。其预处理对 I/R 损伤也具有良好的神经保护作用^[2],但其机制还有待于进一步阐明。

IRE1 通路是误折叠蛋白反应信号转导中一个重要的调节枢纽,一系列研究证实这个通路在代谢和免疫应答调节中的新作用^[9]。IRE1 是 I 型跨膜蛋白,具有丝/苏蛋白激酶和位点特异的核酸内切酶活性,当内质网中误折叠蛋白出现时,促使葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)与 IRE1 解离,IRE1 寡聚化并激活。IRE1 可能通过寡聚化作用直接识别误折叠蛋白,并使其与 IRE1 特定位点结合^[10],导致 GRP78 上调,从而引导蛋白质正确折叠。体内外研究揭示缺血或缺氧所致的 IRE1 通路活化所致的蛋白质合成抑制在短时间内与细胞的自我保护、促进细胞存活有关,长时间的蛋白质合成抑制则可通过一些致凋亡基因如 Gadd153 等的表达诱导细胞凋亡^[11]。而关于 BIP 后 IRE1 的表达变化国内外鲜见报道。

本研究发现,脑缺血 120 min 再灌 24 h 缺血侧顶叶皮层 IRE1 mRNA 及其蛋白表达均达高峰,再灌注 72 h 仍可见其高表达,提示大鼠 I/R 损伤后存在 IRE1 活化,与相关研究报道相一致^[11-12]。而 BIP 干预后其活化程度均有明显的升高,提示 BIP 可能通过影响 ERS 后 IRE1 表达而达到保护神经保护作用。而联合清热化痰方预处理后 IRE1 的表达进一步升高,提示清热化痰方可通过 IRE1 信号转导通路增进大鼠脑缺血耐受作用,减轻随之发生的更为严重的致死性缺血性脑损伤。这些结果可能为 I/R

损伤的治疗提供新靶点和新思路。

[参考文献]

- [1] Oikawa D, Kinata Y, Kohno K. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1 [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(9):1681.
- [2] 胡跃强,唐农,董少龙,等.清热化痰方预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤神经保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012,18(4):186.
- [3] 胡跃强,唐农,董少龙,等.大鼠脑缺血预处理后 PERK 表达的变化及清热化痰方的干预研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(6):1332.
- [4] 胡跃强,唐农,刘泰,等.大鼠脑缺血预处理后 GRP78 表达的变化及清热化痰方的干预研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(6):1162.
- [5] 郝玉曼,罗祖明,周东.局灶性缺血诱导脑缺血耐受的动物模型[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2003, 20(2):129.
- [6] Kim I, Xu W, Reed J C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(6):1013.
- [7] De Gracia D J, Montie H L. Cerebral ischemia and the unfolded protein response [J]. *Neurochem*, 2004, 91(1):1.
- [8] 胡跃强,胡国恒,吴云虎,等.清热化痰颗粒治疗急性脑梗死临床观察[J]. *辽宁中医杂志*, 2004, 31(2):120.
- [9] Randal J K, Siyan C. Inositol-requiring 1/X-box-binding protein 1 is a regulatory hub that links endoplasmic reticulum homeostasis with innate immunity and metabolism [J]. *EMBO Mol Med*, 2010, 2:189.
- [10] Credle J J, Finer-Moore J S, Papa F R, et al. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52):18773.
- [11] Gharibani P M, Modi J, Pan C, et al. The mechanism of taurine protection against endoplasmic reticulum stress in an animal stroke model of cerebral artery occlusion and stroke-related conditions in primary neuronal cell culture [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 776:241.
- [12] 李婧,郭风劲.内质网应激反应时 IRE1 依赖性 XBP1 剪接机制[J]. *生命的化学*, 2008, 28(3):286.

[责任编辑 聂淑琴]