

玄参环烯醚萜苷对氧糖剥夺再灌注诱导的原代皮层神经元细胞内质网应激的作用研究

章 蕾, 龚恒佩, 钟晓明, 黄 真*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

摘 要: **目的** 探讨玄参环烯醚萜苷通过内质网应激介导的细胞凋亡通路对氧糖剥夺再灌注 (OGD/R) 诱导的原代皮层神经元细胞的作用及机制。**方法** 分离 SD 大鼠原代皮层神经元, 用玄参环烯醚萜苷 (50、100、200 $\mu\text{g/mL}$) 对原代皮层神经元进行预处理 24 h, 采用 OGD/R 诱导制备脑缺血再灌注细胞模型, 倒置显微镜下鉴定细胞纯度, 观察细胞形态变化; MTT 法检测细胞存活率; 试剂盒检测细胞内乳酸脱氢酶 (LDH) 水平和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blotting 法检测 C/EBP 同源蛋白 (CHOP)、葡萄糖调节蛋白-78 (GRP78) 和 Caspase-12 蛋白表达。**结果** 培养的原代皮层神经元胞体饱满, 状态良好, 纯度较高。与对照组比较, 经 OGD/R 处理后原代皮层神经元整体回缩变圆, 胞体表面变粗糙; 细胞存活率、SOD 活性显著降低; LDH 水平、细胞凋亡率显著升高; CHOP、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达水平显著升高。与模型组比较, 玄参环烯醚萜苷预处理能改善细胞损伤情况; 提高细胞存活率、SOD 活性; 降低 LDH 水平和细胞凋亡率; 降低 CHOP、Caspase-12 和 GRP78 蛋白表达水平。**结论** 玄参环烯醚萜苷能拮抗 OGD/R 诱导的原代皮层神经元神经损伤, 其作用机制与抑制内质网应激介导的细胞凋亡有关。

关键词: 氧糖剥夺再灌注; 玄参环烯醚萜苷; 内质网应激; 细胞凋亡; C/EBP 同源蛋白; 葡萄糖调节蛋白-78; Caspase-12

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)12-2934-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.028

Effect of iridoid glycosides of *Scrophulariae Radix* on endoplasmic reticulum stress induced by oxygen glucose deprivation and reperfusion in primary cortical neurons

ZHANG Lei, GONG Heng-pei, ZHONG Xiao-ming, HUANG Zhen

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of iridoid glycosides of *Scrophulariae Radix* (IGRS) via endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis pathway on the primary cortical neurons induced by oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R). **Methods** Newborn SD rats were performed primary cortical neurons culture. And the primary cortical neurons were pretreated with IGRS (50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, and the *in vitro* model of oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) was applied. The neurons purity and morphology were observed under inverted microscope, the cell viability was detected by MTT assay; the intracellular lactate dehydrogenase (LDH) level and superoxide dismutase (SOD) activity were detected by commercial kit. The apoptotic rate was detected by flow cytometry. The expression of C/EBP homologous protein (CHOP), glucose-regulated protein-78 (GRP78) and Caspase-12 protein were detected by western blotting. **Results** The cultured primary cortical neurons were plump with high purity in good condition. Compared with the control group, the primary cortical neurons were retracted and rounded after OGD/R treatment, and the surface of the neurons became rough; The cell viability and SOD activity were significantly decreased; The LDH level and apoptotic rate were evidently increased; The expression of CHOP, Caspase-12, and GRP78 were significantly increased. Compared with the model group, IGRS could relieve neurons damage, increase cell viability and SOD activity, decrease LDH level and apoptotic rate, and down-regulate the expression of CHOP, Caspase-12, and GRP78. **Conclusion** IGRS can antagonize the neuronal damage induced by OGD/R in primary cortical neurons, and its mechanism is related to the inhibition of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis.

Key words: oxygen-glucose deprivation-reperfusion; iridoid glycosides of *Scrophulariae Radix*; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; C/EBP-homologous protein; glucose-regulated protein 78; Caspase-12

收稿日期: 2019-03-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573643)

作者简介: 章 蕾 (1999—), 女, 浙江余姚人, 本科生, 研究方向为防治脑缺血药物的开发。Tel: 17742020516 E-mail: z1923910804@163.com

*通信作者 黄 真 (1943—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为防治脑缺血药物的开发。E-mail: Huangzhen26@yeah.net

脑卒中是一种急性脑部血液循环障碍疾病^[1],具有发病率高、致死率高和复发率高等特点。WHO 数据显示,卒中是除冠心病以外死亡率最高的疾病,为 15 年来全球的主要死亡原因之一^[2]。中国脑卒中防治报告(2018)指出,卒中是我国成年人致死和致残的首要原因^[3]。及时的血运重建是脑卒中患者治疗的标准方法,恢复缺血区的供血是减少缺血性脑损伤和恢复脑功能的关键。不幸的是,再灌注可以减少梗死面积和改善临床预后,但也可能加剧脑损伤即脑缺血再灌注损伤(CIRI)^[4]。

内质网应激(ERS)介导的细胞凋亡是 CIRI 的关键发病机制,其特征是 C/EBP 同源蛋白(CHOP)和葡萄糖调节蛋白-78(GRP78)表达水平的升高,这与上调的凋亡 Caspase 级联反应一致^[5]。一旦内质网稳态受到 CIRI 的干扰,蛋白质的不准确合成就会彻底启动。这种变化导致内质网中错误折叠或未折叠的蛋白大量积累并导致内质网内发生未折叠蛋白质反应(UPR),被称为内质网应激中最主要的表现形式^[6-7]。

玄参为玄参科玄参属植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根^[8]。诸多研究表明,玄参具有重要的脑血管保护作用,玄参提取物可以改善大鼠因中动脉缺血所致的行为学障碍;缩小模型大鼠的脑梗死面积,降低梗死率;降低中动脉栓塞模型大鼠的脑组织含水量^[9-12],有良好的研究前景。玄参中富含环烯醚萜苷和苯丙素苷类成分,其中环烯醚萜苷类成分是玄参中结构独特且含量丰富的一类活性成分^[13]。然而,玄参环烯醚萜苷(IGRS)对 CIRI 原代皮层神经细胞是否具有保护作用尚未见报道。本研究采取原代培养新生大鼠皮层神经元细胞,氧糖剥夺再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)法制备体外 CIRI 模型,探讨 IGRS 对 OGD/R 诱导的新生大鼠皮层神经元的保护作用,为 IGRS 防治缺血性脑血管疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

出生 24 h 内 SPF 级 SD 乳鼠,由浙江中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号 SYXK(浙)2018-0012。

1.2 药物与试剂

IGRS 由浙江中医药大学中草药栽培与鉴定实验室参考文献方法^[14]制备,质量分数为 53.19%;4-

苯基丁酸钠盐(4-PBA)购自美国 Solarbio 公司;二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、马血清、青霉素、链霉素、B-27 神经细胞培养无血清添加剂、Neurobasal-A 培养基购于美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶、多聚赖氨酸、PBS 缓冲液等购于杭州昊天生物有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;CHOP、Caspase-12、GRP78、 β -actin 抗体购自美国 Abcam 公司;羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗购自美国 LI-COR 公司;RIPA 裂解液、PMSF、Hochest 33342 购自碧云天生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒、神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体、DAB 显色试剂盒购自博士德生物有限公司;PVDF 膜购自美国 Amersham Bioscience 公司;微管相关蛋白-2(MAP-2)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 仪器

Ti-S 倒置荧光显微镜,日本 Nikon 公司;多功能酶标仪,美国伯腾公司;流式细胞仪,美国贝克曼库尔特公司;Bio-Rad 蛋白电泳系统,美国 Bio-Rad 公司;Odyssey 红外荧光扫描成像系统,美国 LI-COR 公司。

2 方法

2.1 原代皮层神经元培养

参考课题组实验方法^[15],冰上分离 SD 乳鼠原代皮层神经元,以 1×10^6 个/mL 种植于 6 孔板,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h,将种植培养液全量换成细胞维持培养液,每隔 3 d 半量换液。期间每天显微镜下观察细胞形态,培养至第 7 天,进行神经元纯度鉴定及后续实验。

2.2 原代皮层神经元纯度鉴定

将培养至第 7 天的神经元进行 NSE 和 MAP-2 蛋白免疫染色检测,鉴定并计算神经元的纯度^[16]。

2.3 分组及 OGD/R 模型制备

利用 MTT 法确定 IGRS 安全剂量并通过预试验确定其质量浓度为 50、100、200 μ g/mL。将原代皮层神经元于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 7 d 后随机分成 6 组,分别为对照组、模型组、4-PBA(1 μ g/mL)组,IGRS 各质量浓度(50、100、200 μ g/mL)组。IGRS 组在氧糖剥夺(OGD)前加药预处理 24 h。参考课题组实验方法^[17]建立 OGD/R 体外模型,除对照组细胞外,其余 5 组均放入缺氧造模盒内,通

入混合气体 (95% N₂+5% CO₂) 进行氧糖剥夺 2 h 后 4-PBA 组加入相应药物, 随后将各组细胞放入 37 ℃、5% CO₂ 恒温箱培养 24 h 进行再灌注。每组 3 次重复实验。

2.4 细胞存活率检测

原代皮层神经元以 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板内, 细胞分组及处理同“2.3”项下, 每组设 6 个复孔。再灌注结束后, 弃去上清液, 加入现配的 MTT (0.5 mg/mL), 放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h, 取出, 轻轻吸出 MTT 溶液, 加入 DMSO 150 μL, 在摇床上振荡 10 min, 使 DMSO 能够充分溶解甲瓚结晶。以空白对照调零, 用酶标仪检测 490 nm 波长处各孔吸光度 (*A*) 值。取复孔平均数, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 LDH 释放及 SOD 活性测定

原代皮层神经元以 1×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板内或 1×10⁶ 个/mL 接种 6 孔板内, 细胞分组及处理同“2.3”项下, 收集 OGD/R 结束后的各组细胞, 按照试剂盒说明书操作, 分别测定细胞培养液中 LDH 水平及 SOD 活性。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

原代皮层神经元以 1×10⁶ 个/mL 接种于 6 孔板内, 细胞分组及处理同“2.3”项下, 收集 OGD/R 结束后的原代皮层神经元细胞并加入 100 μL 的 1×binding buffer 缓冲液重悬, 制成 1×10⁶ 个/mL 的细胞悬液, 加入 AnnexinV-FTTC/PI 各 5 μL, 混匀后于室温下避光放置 15 min, 加入 400 μL 的 1×binding buffer 缓冲液, 1 h 内用流式细胞仪测定细胞凋亡率。

2.7 Western blotting 法检测 CHOP、Caspase-12、GRP78 蛋白表达

原代皮层神经元以 1×10⁶ 个/mL 接种于 6 孔板内, 细胞分组及处理同“2.3”项下, 收集再灌注后的原代皮层神经元于 RIPA 裂解液中冰浴裂解 30 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清。根据 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 酶标仪设定波长为 562 nm。灌制 10% 分离胶、4% 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶。蛋白上样量为 30 μg, 100 V 电泳, 湿法转至 PVDF 膜上。5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 加入鼠抗 CHOP, 兔抗 Caspase-12、GRP78 (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜。加入羊抗兔、羊抗鼠二抗 (1:15 000) 孵育 2 h, TBST 洗涤, 每次 5 min, 共洗涤 3 次, 以 β-actin

为内参, 在 Odyssey 红外荧光扫描成像系统 700、800 nm 双通道检测。用 Image J 软件分析各蛋白的灰度比值, 比较蛋白相对表达量的变化。

2.8 统计学分析

所有实验数据采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 完全随机设计的多个样本均数比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行处理。两组间相互比较, 满足方差齐性时用 LSD 检验, 不满足方差齐性时用 T2 检验。

3 结果

3.1 原代皮层神经元鉴定

倒置显微镜下观察经 NSE 染色后的原代皮层神经元的细胞质、轴突及树突呈棕黄色, 胞体饱满, 突起交织成网络, 而阴性组细胞无棕黄色 (图 1), 表明该细胞为神经元, 随机选取 5 个不同视野, 经过计数其神经元纯度达 90% 以上; 经 MAP-2 鉴定, FITC 和 Hoechst 33342 免疫荧光染色, 在特定波长的荧光下胞质显绿色荧光, Hoechst 33342 染色的所有细胞核发蓝色荧光 (图 2), 随机选取 5 个不同视野, 其纯度达 90% 以上, 可用于后续实验。

3.2 IGRS 对原代皮层神经元形态的影响

倒置显微镜下可见对照组神经元胞体丰满且明显聚集, 折光性和立体感强, 细胞多呈锥体形, 突起较多且延长, 较多分枝形成致密细胞网络结构 (图 3)。与对照组比较, 模型组细胞折光性和立体感明显减弱, 细胞整体回缩变圆, 贴壁细胞数减少, 培养液中悬浮细胞增多, 细胞网络结构被破坏, 神经元胞体表面变粗糙。与模型组比较, 4-PBA 组和 IGRS 各质量浓度组细胞数不同程度增加, 折光性和立体感稍有增强, 神经突出增多, 神经元表面变光滑, 培养液中悬浮细胞较少, 神经元损伤得到不同程度的改善。

3.3 IGRS 对原代皮层神经元细胞存活率的影响

与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 4-PBA 组及 IGRS 100、200 μg/mL 组细胞存活率显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 4。

3.4 IGRS 对原代皮层神经元 LDH 水平和 SOD 活性的影响

与对照组比较, 模型组细胞 LDH 水平显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 4-PBA 组及 IGRS 各质量浓度组细胞 LDH 水平有不同程度的降低, 其中 4-PBA 组及 IGRS (100、200 μg/mL) 组差异

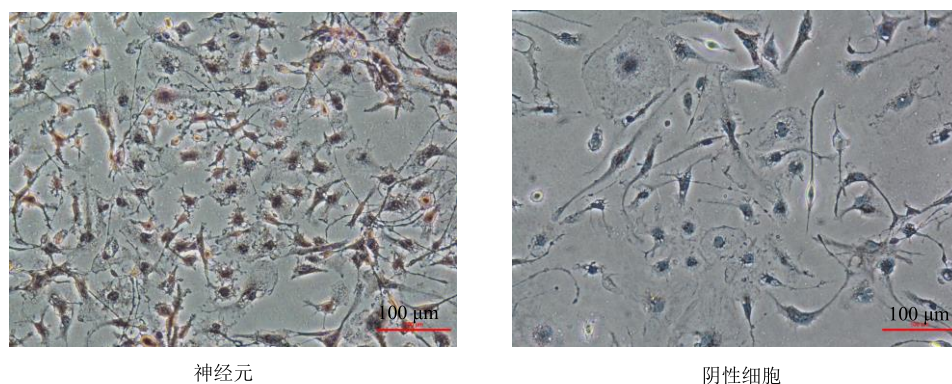


图 1 NSE 鉴定结果 ($\times 200$)
Fig. 1 NSE identification results ($\times 200$)

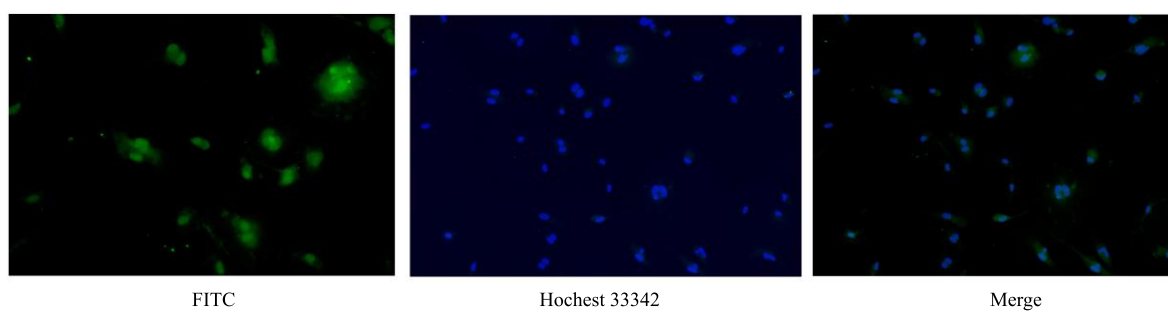


图 2 MAP-2 鉴定结果 ($\times 200$)
Fig. 2 MAP-2 identification results ($\times 200$)

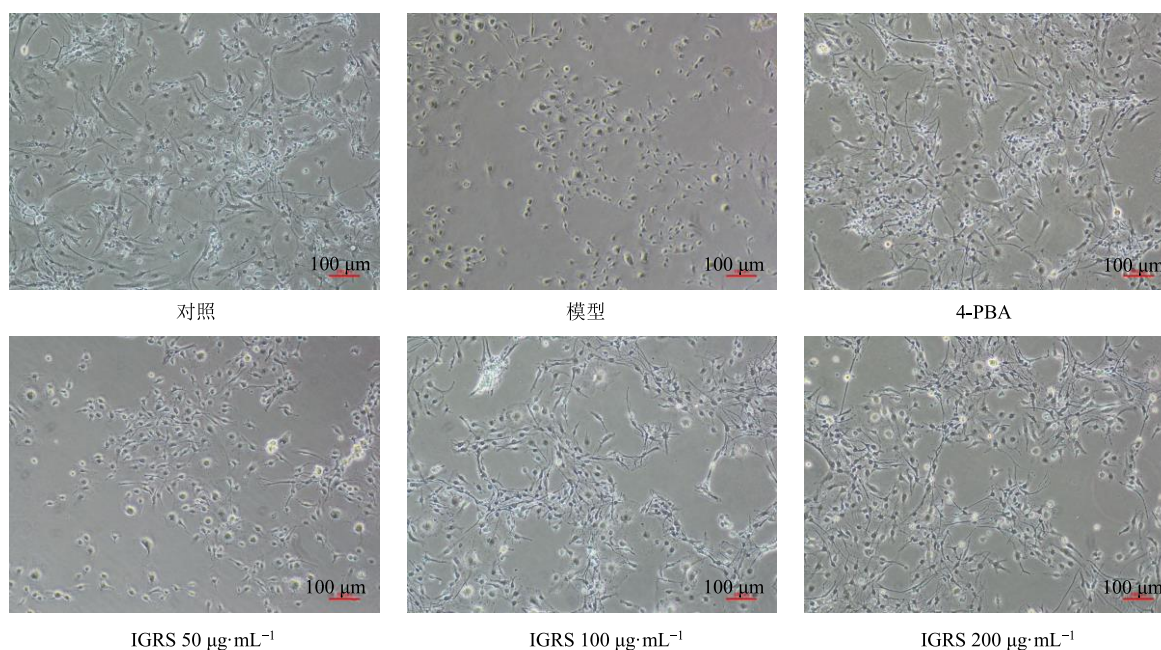
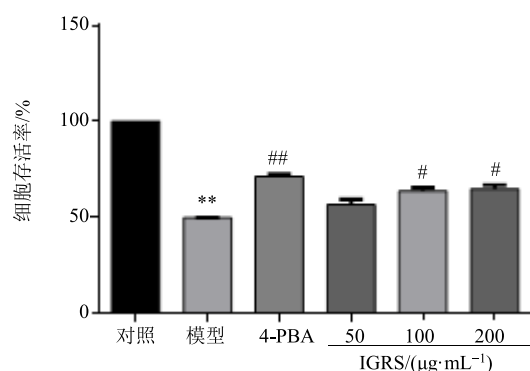


图 3 IGRS 对原代皮层神经元形态的影响 ($\times 100$)
Fig. 3 Effects of IGRS on morphology of primary cortical neurons ($\times 100$)

显著 ($P < 0.01$ 、 0.001), 见图 5。

与对照组比较, 模型组细胞 SOD 活性显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 4-PBA 组和 IGRS

各质量浓度组细胞 SOD 活性均有不同程度升高, 其中 4-PBA 组及 IGRS 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组差异显著 ($P < 0.001$), 见图 5。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

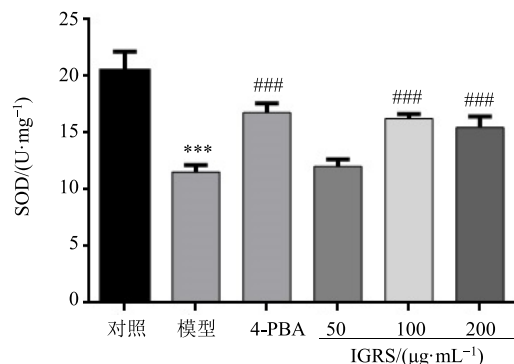
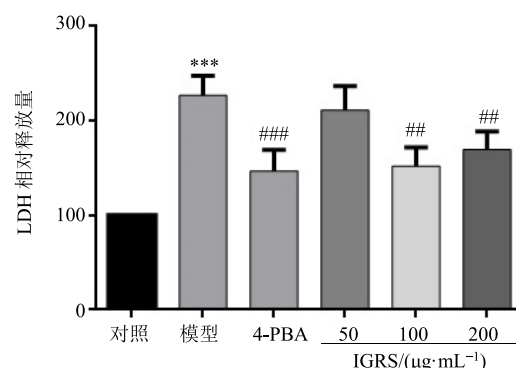
图4 IGRS对原代皮层神经元存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 4 Effects of IGRS on survival rate of primary cortical neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 IGRS对原代皮层神经元凋亡率的影响

与对照组比较, 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 4-PBA组及IGRS各质量浓度组细胞凋亡率均有不同程度降低, 其中4-PBA组及IGRS 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 组差异显著 ($P < 0.001$, 图6)。

3.6 IGRS对原代皮层神经元CHOP、Caspase-12、GRP78蛋白表达的影响

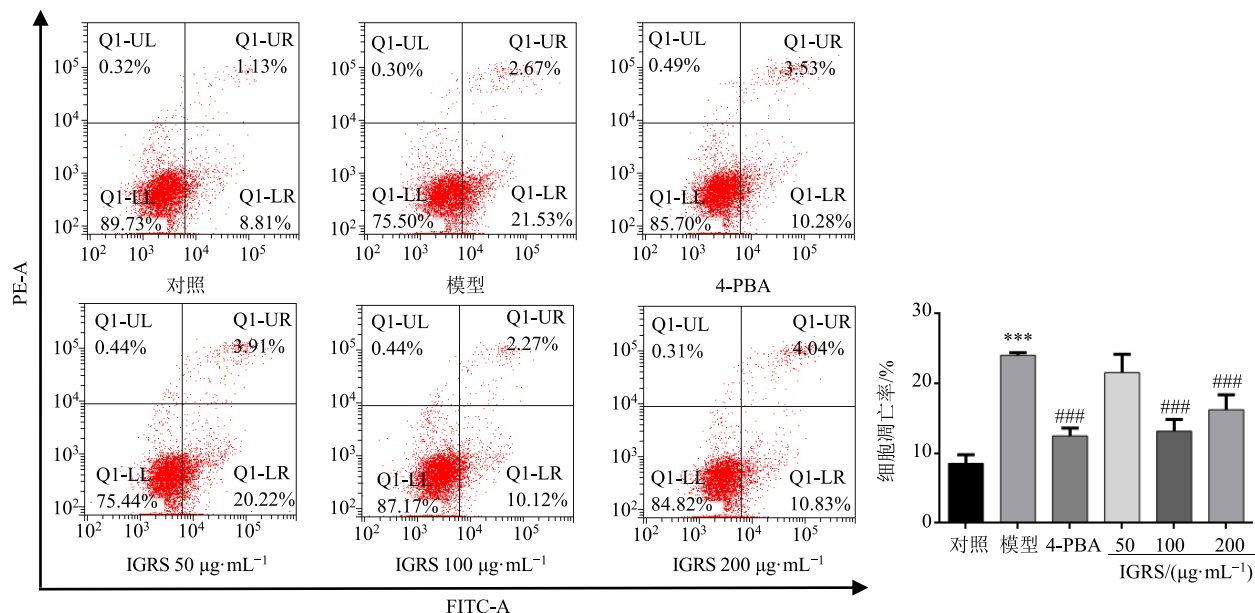
与对照组比较, 模型组细胞中CHOP、Caspase-12、GRP78蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$, 图7)。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

图5 IGRS对原代皮层神经元LDH水平及SOD活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 5 Effects of IGRS on LDH level and SOD activity of primary cortical neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group

图6 IGRS对原代皮层神经元凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of IGRS on apoptosis of primary cortical neurons ($\bar{x} \pm s, n=3$)

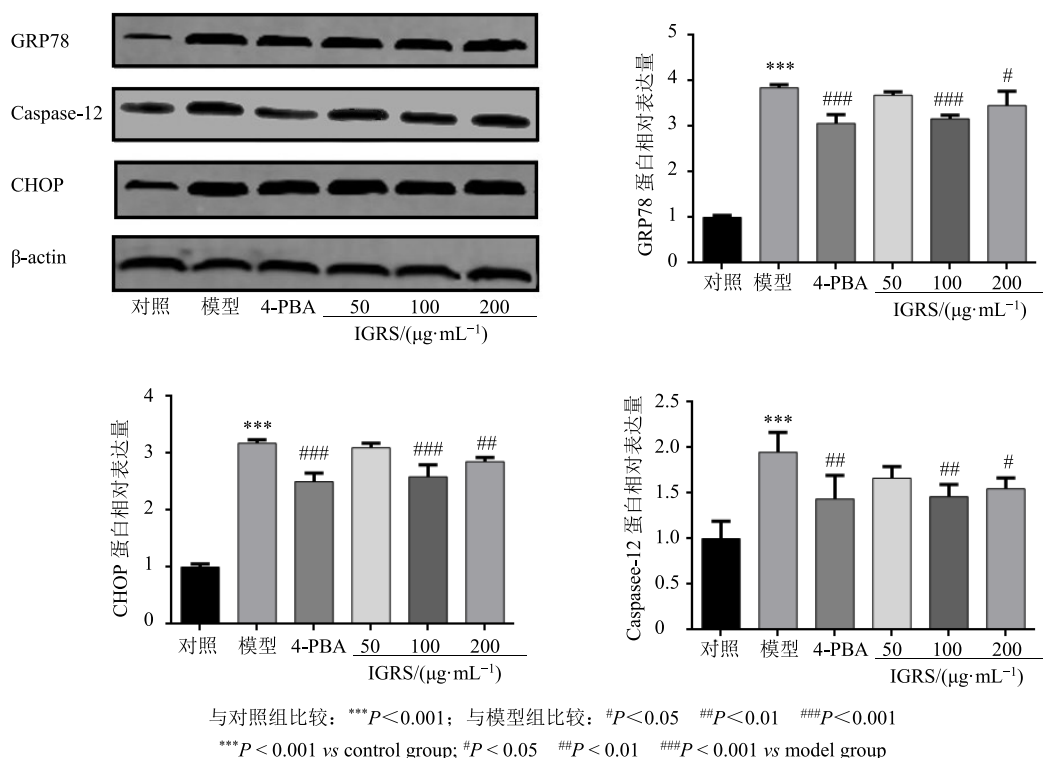


图 7 IGRS 对原代皮层神经元 ERS 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of IGRS on ERS related protein expression in primary cortical neurons ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与模型组比较, 4-PBA 组及 IGRS 100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞中 CHOP、Caspase-12、GRP78 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

4 讨论

脑卒中严重影响人类寿命, 并具有发病率高、致死率高和复发率高等特点。脑缺血发生后, 多种因素、多种机制共同影响机体的各种功能, 最终导致机体受损。CIRI 的重要机制包括氧化应激反应、炎症反应及细胞凋亡等^[18]。研究发现, 神经元 CIRI 的病理生理学与 ERS 及随后的凋亡密切相关^[5]。在 ERS 相关的介质中, GRP78、CHOP 和 Caspase-12 蛋白表达水平决定了 ERS 诱导的细胞凋亡的起始和扩展。尽管近几年有关脑缺血再灌注损伤的分子机制研究已有较大的进展, 但仍缺乏有效的方法来降低 CIRI, 这提示需要研究更为有效的药物或干预手段来保护机体, 进而产生更大的临床效益。

原代皮层神经元取自新生 24 h 的 SD 乳鼠, 在特定条件下培养得到。体外原代培养的神经细胞生长发育与体内类似, 且其具有取材方便、纯度高、实验条件相对简单可控等优点, 操作人员可在体外较好地控制细胞, 避免体内复杂因素的干扰^[19-20], 因此成为神经科学研究中主要的实验材料及模型工具。本实

验运用原代皮层神经元细胞制备体外脑缺血再灌注模型。当细胞受到 CIRI 时, 体内活性氧释放增加, 诱发大量自由基产生, 细胞膜磷脂中不饱和双键极易受到氧自由基的攻击, 导致细胞膜表面磷脂酰丝氨酸 (PS) 外翻, 细胞膜完整性被破坏, 造成大量 LDH 释放到细胞培养液中, 并且会伴随一系列的自由基反应, 使得细胞存活率及 SOD 活性降低, 激活细胞凋亡^[19,21], 因此通过检测细胞存活率、培养液中 LDH 水平、SOD 活性以及细胞凋亡率间接反映细胞健康与否^[22]。

IGRS 是从中药玄参中分离纯化而来。环烯醚萜苷具有多种生物学活性, 包括心脑血管保护作用、抗炎和抗肿瘤等^[23]。值得注意的是, 已有研究揭示了 IGRS 类成分可以抑制 KCl 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平升高^[24]。Meng 等^[25]研究结果表明玄参水提取物能够缓解脑缺血再灌注引起的线粒体损伤和能量代谢紊乱, 抑制氧化应激引起的神经元损伤和凋亡, 发现激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 信号通路可对 OGD/R 和大脑中动脉闭塞/再灌注 (MCAO/R) 诱导的细胞凋亡发挥神经保护作用。然而, 关于 IGRS 是否以凋亡受限的方式减缓 CIRI 的进程尚缺乏相关研究。

本研究结果表明, IGRS 可作用于原代皮层神经元, 并对 OGD/R 损伤产生抗凋亡作用, 具有抗 ERS 和抗凋亡特性。IGRS 预处理可显著降低神经元损伤, 并抑制 ERS 介导细胞凋亡, 从而降低原代皮层神经细胞对 OGD/R 损伤的敏感性。IGRS 能显著改善细胞状态, 提高细胞存活率, 抑制细胞培养液中 LDH 水平的增加, 从而提高细胞膜的稳定性; 能显著提高 SOD 活性, 增强细胞清除氧自由基的能力, 从而达到保护细胞的目的, 并且在 100、200 $\mu\text{g/mL}$ 时均表现出显著的保护作用; 通过下调 ERS 相关标志物 (CHOP、Caspase-12、GRP78) 表达来降低神经细胞凋亡, 说明 IGRS 对氧糖剥夺再灌注诱导的皮层神经元有抗凋亡保护作用, 并且此作用是通过调节 ERS 实现的。本研究初步探讨了 IGRS 对 OGD/R 损伤的原代皮层神经元的保护作用及机制, 并对相关机制进行了初步研究, 为 IGRS 保护 CIRI 的研究提供理论依据。但本研究只进行了相关细胞实验, IGRS 在体内是否也同样具有抑制内质网应激介导的细胞凋亡作用将是本课题组今后着重探讨的内容。

参考文献

- [1] Donnan G, Fisher M, Macleod M, *et al.* Stroke [J]. *Lancet*, 2008, 371(9624): 1612-1623.
- [2] Ozaffarian D, Benjamin E J, Go A S, *et al.* Executive summary: Heart disease and stroke statistics—2016 update: A report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2016, 133(4): 447-454.
- [3] 王陇德, 刘建民, 杨弋, 等. 我国脑卒中防治仍面临巨大挑战——《中国脑卒中防治报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(2): 105-119.
- [4] Molina C A. Reperfusion therapies for acute ischemic stroke: Current pharmacological and mechanical approaches [J]. *Stroke*, 2011, 42(Suppl 1): S16.
- [5] 武彩霞, 刘睿, 杜冠华. 内质网应激与脑缺血/再灌注损伤 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(5): 601-605.
- [6] Zhang H Y, Wang Z G, Lu X H, *et al.* Endoplasmic reticulum stress: Relevance and therapeutics in central nervous system diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(3): 1343-1352.
- [7] Roussel B D, Kruppa A J, Miranda E, *et al.* Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(1): 105-118.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] 李静, 陈长勋, 高阳, 等. 玄参提取物抗炎与抗动脉硬化作用的探索 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 532-534.
- [10] 倪正, 蔡雪珠, 黄一平, 等. 玄参提取物对大鼠血液流变性、凝固性和纤溶活性的影响 [J]. 中国微循环, 2004, 8(3): 152-153.
- [11] 李娟, 萧伟, 刘涛, 等. 玄参脑保护作用提取物的工艺优化 [J]. 中成药, 2011, 33(6): 1057-1059.
- [12] Huang Q, Gong Q, Yao M, *et al.* Protective effect of *Scrophularia ningpoensis* extracts on cerebral ischemia injury in rats [J]. *Chin J New Drugs Clin Remed*, 2004, 23(6): 323-327.
- [13] 李媛, 宋宝安, 杨松, 等. 中草药玄参化学成分的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(1): 47-51.
- [14] 李祚丹, 季金苟, 楚莎莎, 等. 玄参中环烯醚萜类物质的分离纯化工艺 [J]. 中成药, 2015, 37(6): 1367-1369.
- [15] 陈梦静, 龚雪媛, 龚恒佩, 等. 芍药苷对皮质酮致原代皮层细胞神经损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1507-1511.
- [16] 周晓楠, 宋雪兰, 李艳, 等. 对羟基苯甲醛对脑缺血/再灌注损伤的保护作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(12): 1729-1735.
- [17] Wang K, Chen M, Gong H, *et al.* Calcium homeostasis disruption and endoplasmic reticulum stress mediates ischemia/reperfusion-induced PC12 cells apoptosis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(9): 14121-14129.
- [18] 张藺珊, 李娟娟, 吴春云. 脑缺血的损伤机制及相关信号通路的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(6): 729-732.
- [19] 张忠胜. 大鼠皮层神经元内质网应激相关凋亡的实验研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [20] 姜茜, 姜玉武, 王静敏, 等. 一种改进的大鼠皮层神经元原代培养方法及其性质鉴定 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2009, 41(2): 212-216.
- [21] Blankenberg F. *In vivo* detection of apoptosis [J]. *J Nucl Med*, 2008, doi: 10.1002/ejoc.200500912.
- [22] Sun M S, Jin H, Sun X, *et al.* Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: An obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/3804979.
- [23] 俞静静, 陈素红, 吕圭源. 玄参“凉血滋阴”药效相关研究概况 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9): 63-66.
- [24] Chen B, Liu Y, Liu H W, *et al.* Iridoid and aromatic glycosides from *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. and their inhibition of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase induced by KCl [J]. *Chem Biodivers*, 2008, 5(9): 1723-1735.
- [25] Meng X, Xie W, Xu Q, *et al.* Neuroprotective Effects of *Radix Scrophulariae* on cerebral ischemia and reperfusion injury via MAPK pathways [J]. *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules23092401.