

adenosine injection on three days before surgery, once a day; the rats in the sham operation group and IR group were intraperitoneally injected with the same amount of normal saline on three days before surgery, once a day. The middle cerebral artery occlusion(MCAO) models were established by wire embolization in the IR group and AP group, and the thread was pulled out at 2 hours after embolization to prepare the IR models. The rats in the sham operation group were not inserted with wire embolization, and the residual treatments were same as those in the IR group and AP group. At 24 hours of reperfusion, the rats in the three groups were performed with the neurological impairment score according to the 5-point neurobehavioral scale. Then, the rats in the three groups were sacrificed, and the brain tissues of the rats were taken; the histopathological changes in brain tissues of rats in the three groups were observed by hematoxylin-eosin, the relative expression of CHOP mRNA in the brain tissues of rats in the three groups was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction, the positive expression of CHOP protein in the brain tissues of rats in the three groups was detected by immunohistochemistry, and the cell apoptosis in the brain tissues of rats in the three groups was detected by TdT mediated dUTP nick end labeling method. **Results** There was significant difference in neurological impairment score of rats among the three groups ($F = 157.923, P < 0.05$). The neurological impairment score of rats in the IR group and AP group was significantly higher than that in the sham operation group ($t = 17.663, 7.133; P < 0.05$), and the neurological impairment score of rats in the AP group was significantly lower than that in the IR group ($t = -10.530, P < 0.05$). In the sham operation group, the morphology and structure of brain neurons of rats were normal, the nuclei were intact, and the interstitial edema was not observed. In the IR group, the number of neurons decreased, the nuclei dissolved, the vacuoles appeared, the interstitial edema was observed and the tissue was loose. The injury degree of neurons of rats in the AP group was significantly lower than that in the IR group. There was significant difference in the relative expression level of CHOP mRNA in brain tissues of rats among the three groups ($F = 2989.751, P < 0.05$). The relative expression level of CHOP mRNA in brain tissues of rats in the IR group and AP group was significantly higher than that in the sham operation group ($t = 75.514, 23.502; P < 0.05$), and the relative expression level of CHOP mRNA in brain tissues of rats in the AP group was significantly lower than that in the IR group ($t = -52.171, P < 0.05$). There was significant difference in the rate of CHOP protein positive cells in brain tissues of rats among the three groups ($F = 2257.096, P < 0.05$). The rate of CHOP protein positive cells in brain tissue of rats in the IR group and AP group was significantly higher than that in the sham operation group ($t = 65.927, 21.744; P < 0.05$), and the rate in CHOP protein positive cells in brain tissue of rats in the AP group was significantly lower than that in the IR group ($t = -44.183, P < 0.05$). There was significant difference in the cell apoptosis rate in brain tissue of rats among the three groups ($F = 1519.372, P < 0.05$). The cell apoptosis rate in brain tissue of rats in the IR group and AP group was significantly higher than that in the sham operation group ($t = 5.512, 2.693; P < 0.05$), and the cell apoptosis rate in brain tissue of rats in the AP group was significantly lower than that in the IR group ($t = -2.818, P < 0.05$). **Conclusion** AP can reduce cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting the expression of CHOP.

Key words: cerebral ischemia-reperfusion injury; adenosine; CCAAT/enhancer binding protein homologous protein; endoplasmic reticulum stress; cell apoptosis

急性缺血性卒中(acute ischemic stroke, AIS)是以突然起病、迅速出现神经功能障碍为特征的一类脑血管病,发病率较高。据统计,2010 年至 2019 年,我国 AIS 的发病率从 129/10 万上升至 145/10 万^[1]。AIS 具有高致残率、高致死率的特点,患者即使得到及时治疗,也常因缺血、坏死等脑组织损伤而引起语言和肢体功能障碍。尽早开始再灌注治疗,挽救缺血半暗带以减轻脑缺血时脑损伤程度是 AIS 治疗的关键。国际指南广泛推荐的有效的再灌注治疗措施有急性期应用静脉溶栓及血管内介入治疗等措施^[2-3]。但是,在恢复脑循环灌注时不可避免地会对脑组织结构产生进一步损害,影响大脑功能,即脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI),因此,寻找一种减轻 CIRI 的有效措施对于脑缺血性卒中的治疗极为重要^[4-5]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)作为 CIRI 的重要机制可诱导

细胞凋亡^[6-7]。CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer binding protein homologous protein, CHOP)是 ERS 的经典标志物,也是启动细胞凋亡的关键点^[8]。腺苷是一种神经保护剂,有研究显示,腺苷激动剂可通过抑制 ERS 减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤^[9]。刘超等^[10]研究显示,腺苷激动剂可降低 CHOP 的表达,减轻大鼠心肌 ERS,从而抑制细胞凋亡。基于此,本研究观察腺苷预处理(adenosine preconditioning, AP)对大鼠 CIRI 后 CHOP 表达和 ERS 的影响,探讨腺苷对 CIRI 的保护作用和机制,以期预防 AIS 后 CIRI 提供新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只健康成年雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠由新乡医学院动物中心提供,体质量 250 ~ 280 g。大鼠单笼饲养在鼠房内,给予自由饮水和充

足的食物,并保持鼠房良好的通风、适宜的温度和湿度及明暗周期均衡的光线。

1.2 主要试剂与仪器 大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型栓线购自北京西浓科技有限公司,水合氯醛购自上海源叶生物科技有限公司,腺苷购自美国 Sigma 公司,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染料、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TdT mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)细胞凋亡荧光检测试剂盒以及蛋白酶 K 购自上海碧云天生物技术有限公司,CHOP 抗体购自美国 Signalway Antibody (SAB)有限公司,兔链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin peroxidase, SP)试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,CHOP 引物由广州如期生物技术有限公司设计并合成, mRNA 提取试剂(RNAiso Plus)、cDNA 反转录试剂盒(PrimeScript RT Master Mix)购自北京宝日医生物技术北京有限公司,实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(PowerUp SYBR Green Master Mix)购自赛默飞世尔科技有限公司;qRT-PCR 仪购自美国 Thermofisher 公司,冷冻离心机购自德国 HERMLE 公司,全波长读数仪购自上海徠卡仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及预处理 按随机数字表法将 36 只健康雄性 SD 大鼠分为假手术组、缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)组和 AP 组,每组 12 只。术前各组大鼠禁食 12 h、禁水 2 h。AP 组大鼠腹腔注射腺苷注射液($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 生理盐水稀释至 2 mL, 术前 3 d, 每日 1 次);假手术组和 IR 组大鼠在相同时间和地点腹腔注射 2 mL 生理盐水(术前 3 d, 每日 1 次)。

1.3.2 大鼠 MCAO 及 CIRI 模型制备 IR 组和 AP 组大鼠参考 LONGA 等^[11]的方法制备 MCAO 模型:2 组大鼠腹腔注射 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛溶液($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,固定大鼠四肢于专用手术台并始终保持大鼠仰躺姿势状态,备皮、碘伏消毒颈部皮肤,铺洞巾,颈部正中偏左约 0.5 cm 处做纵向手术切口,钝性分离筋膜、肌肉及神经,结扎左侧颈外动脉及左侧颈总动脉,并在颈总动脉上剪一小口,轻轻插入 MCAO 栓线至颈内动脉,深度 18~20 mm,缝合皮肤,碘伏消毒伤口,栓线固定于胸前皮肤。栓塞 2 h 后,向外拔栓线约 1 cm 制备 CIRI 模型。假手术组大鼠不插入栓线,余处理同 IR 组及 AP 组。

1.3.3 大鼠神经功能损伤评分 3 组大鼠苏醒后,按照 5 分制评分标准^[12]对 3 组大鼠进行神经功能

缺损评分,1~3 分为有效模型;0、4 分或死亡为无效模型,剔除术中因栓线插入过深致蛛网膜下腔出血的大鼠、麻醉药物个体差异等原因所致死亡的大鼠及无效 MCAO 模型大鼠,随时补充各组大鼠,以保证每组 MCAO 模型大鼠的数量一致;评分后单笼饲养于条件良好稳定的鼠房内,给予充足的食物和水。

1.3.4 组织取材和标本制备 随机选取每组大鼠各 6 只,于再灌注 24 h 后腹腔注射 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛溶液($3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行麻醉,麻醉成功后开胸经心脏快速灌注生理盐水 200 mL 后再灌注 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛 200 mL;将灌注后的大鼠快速断头取脑,冠状切取视交叉前后各 2 mm 脑组织,置于 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 多聚甲醛溶液中固定 24 h,脱水、透明、固定,石蜡包埋,使用切片机制备脑组织切片(厚度约 $5 \mu\text{m}$),用于 HE 染色、免疫组织化学染色及 TUNEL 染色。各组余下的 6 只大鼠于再灌注 24 h 后迅速断头取脑,新鲜脑组织保持于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,用于 qRT-PCR 检测。

1.3.5 HE 染色观察脑组织形态 石蜡切片于烤片机上 $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤片 2 h,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇(下行梯度 100%、95%、85%、75%)脱二甲苯,流水冲洗,行苏木精染色,盐酸酒精分化、伊红染色,再经梯度乙醇(上行梯度 75%、85%、95%、100%)脱水,二甲苯透明处理后中性树胶封片,显微镜下观察大鼠脑组织病理学变化。

1.3.6 qRT-PCR 法检测脑组织中 CHOP mRNA 的表达 取 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷存脑组织,应用 TRIzol 法提取总 mRNA,应用全波长读数仪测波长 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(absorbance, A)值,并选取 A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.1 之间的样本测定其浓度。按 PrimeScript RT Master Mix cDNA 反转录试剂盒说明书合成 cDNA,反应条件:反转录反应 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min,反转录酶失活反应 $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 维持。按 PowerUp SYBR Green Master Mix qRT-qPCR 试剂盒说明书进行定量检测,以 β -actin 为参照。反应条件:UDG 酶激活 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min,预变性 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s,共 40 个循环。CHOP mRNA 上游引物序列为 5'-TGTTGAAGAT-GAGCGGCTGG-3',下游引物序列为 5'-TGGACCG-GTTTCTGCTTCA-3'; β -actin 上游引物序列为 5'-TCAGCAAGCAGGAGTACGATG-3',下游引物序列为 5'-GTGTAACACGCAGCTCAGTAACA-3'。检测荧光信号,获得相应 Ct 值,应用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 CHOP mRNA 相对表达量。

1.3.7 SP 法检测大鼠脑组织中 CHOP 蛋白表达 取各组大鼠脑组织石蜡切片,经二甲苯脱蜡、下行梯

度乙醇脱二甲苯、水洗及磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗、高压锅内抗原修复;滴加内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 20 min,滴加山羊血清室温封闭 30 min,再滴加 CHOP 一抗 (滴度 1 : 100), 4 ℃ 冰箱过夜;然后,滴加生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物室温孵育 20 min,滴加辣根酶标记链霉标记卵白素工作液室温孵育 20 min;滴加二氨基联苯胺液染色,纤维镜下观察至细胞质出现黄色或棕黄色,自来水冲洗终止染色;苏木精复染 1 min,盐酸乙醇分化数秒后再经上行梯度乙醇脱水,二甲苯透明后封片。显微镜下观察,细胞质呈黄色或棕黄色者为 CHOP 蛋白阳性表达。每张切片随机选取 5 个不重叠高倍视野 ($\times 400$) 采集图像,应用 Image J 图像分析软件计算 CHOP 蛋白阳性细胞表达率。CHOP 蛋白阳性细胞表达率 = CHOP 蛋白阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.8 TUNEL 法检测大鼠脑组织细胞凋亡的情况 取各组大鼠脑组织石蜡切片,在烤片机上烤片 30 min,温度设置在 65 ℃;二甲苯脱蜡 2 次、梯度乙醇 (下行梯度为 100%、90%、70%) 脱二甲苯 3 次,水洗后滴加 Tris-HCl (pH = 7.4) 稀释的不含 DNase 的蛋白酶 K,室温下孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,充分洗去蛋白酶 K;然后,滴加 TUNEL 检测液,37 ℃ 避光孵育 60 min, PBS 充分洗涤 3 次后用抗荧光淬灭封片液封片,避光下用荧光显微镜 ($\times 200$) 观察,每张切片选取 3 个不重叠高倍视野 ($\times 400$) 采集图像,应用 Image J 图像分析软件计算细胞凋亡率,细胞凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

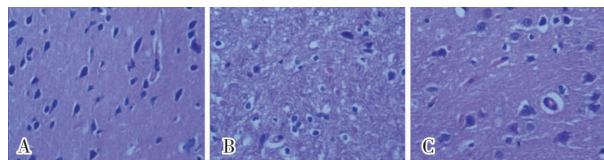
1.4 统计学处理 应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠神经功能缺损评分比较 假手术组、IR 组和 AP 组大鼠神经功能缺损评分分别为 (0.000 ± 0.000)、(2.889 ± 0.272)、(1.167 ± 0.408) 分,3 组大鼠神经功能缺损评分比较差异有统计学意义 ($F = 157.923, P < 0.05$);IR 组和 AP 组大鼠神经功能缺损评分显著高于假手术组,差异有统计学意义 ($t = 17.663, 7.133, P < 0.05$);AP 组大鼠神经功能缺损评分显著低于 IR 组,差异有统计学意义 ($t = -10.530, P < 0.05$)。

2.2 3 组大鼠脑组织病理学表现 结果见图 1。假手术组大鼠脑组织神经元形态结构正常,细胞核完整,间质无水肿;IR 组大鼠脑组织神经元数目减少、

细胞核溶解、出现空泡,间质水肿,组织疏松;AP 组大鼠神经元损伤程度低于 IR 组。



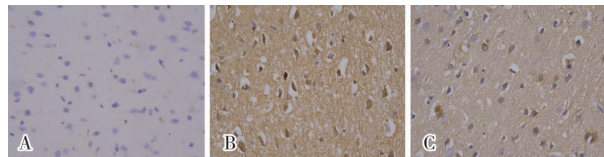
A:假手术组;B:IR 组;C:AP 组。

图 1 3 组大鼠脑组织病理形态学表现 (HE 染色, $\times 400$)

Fig. 1 Pathomorphological manifestations of brain tissue of rats in the three groups (HE staining, $\times 400$)

2.3 3 组大鼠脑组织中 CHOP mRNA 相对表达量比较 假手术组、IR 组和 AP 组大鼠脑组织中 CHOP mRNA 相对表达量分别为 1.000 ± 0.000 、 3.850 ± 0.091 、 1.881 ± 0.067 。3 组大鼠脑组织中 CHOP mRNA 相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 2989.751, P < 0.05$);IR 组和 AP 组大鼠脑组织中 CHOP mRNA 相对表达量显著高于假手术组,差异有统计学意义 ($t = 75.514, 23.502, P < 0.05$);AP 组大鼠脑组织中 CHOP mRNA 相对表达量显著低于 IR 组,差异有统计学意义 ($t = -52.171, P < 0.05$)。

2.4 3 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白阳性细胞表达比较 结果见图 2。CHOP 蛋白在细胞质中呈黄色或棕黄色。IR 组和 AP 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白阳性细胞较假手术组显著增多,AP 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白阳性细胞显著少于 IR 组。假手术组、IR 组和 AP 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白阳性细胞表达率分别为 (0.767 ± 0.505)%、(21.650 ± 3.442)%、(7.654 ± 1.199)%。3 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白阳性细胞表达率比较差异有统计学意义 ($F = 2257.096, P < 0.05$);IR 组和 AP 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白阳性细胞表达率显著高于假手术组,差异有统计学意义 ($t = 65.927, 21.744, P < 0.05$);AP 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白阳性细胞表达率显著低于 IR 组,差异有统计学意义 ($t = -44.183, P < 0.05$)。



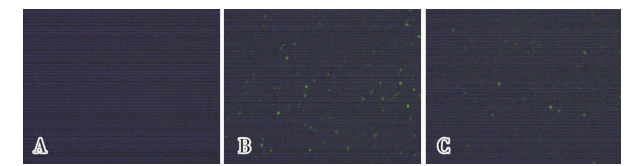
A:假手术组;B:IR 组;C:AP 组。

图 2 3 组大鼠脑组织中 CHOP 蛋白表达 (免疫组织化学染色, $\times 400$)

Fig. 2 Expression of CHOP protein in brain tissues of rats in the three groups (immunohistochemical staining, $\times 400$)

2.5 3 组大鼠脑组织细胞凋亡情况比较 结果见图 3。假手术组、IR 组和 AP 组大鼠脑组织细胞凋亡率分别为 (0.063 ± 0.137)%、($18.565 \pm$

2.232)%、(9.104±2.030)%。3组大鼠脑组织细胞凋亡率比较差异有统计学意义($F=1\,519.372$, $P<0.05$);IR组和AP组大鼠脑组织细胞凋亡率显著高于假手术组,差异有统计学意义($t=5.512$ 、 2.693 , $P<0.05$);AP组大鼠脑组织细胞凋亡率显著低于IR组,差异有统计学意义($t=-2.818$, $P<0.05$)。



A:假手术组;B:IR组;C:AP组。
图3 3组大鼠脑组织细胞凋亡情况(TUNEL染色,×200)
Fig.3 Cell apoptosis in brain tissues of rats in the three groups(TUNEL staining, ×200)

3 讨论

1977年HEARSE^[13]首次提出组织及器官在低灌注缺血后恢复血流灌注可进一步加重组织及器官的损伤。脑缺血再灌注期间可产生一系列复杂的生化代谢、生理功能、病理形态改变等,其机制复杂,包括炎症反应、兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载、能量代谢障碍、自由基损伤和细胞凋亡等多种机制。腺苷作为一种神经调节剂,其对CIRI的保护作用已被证实^[14]。在脑组织缺血缺氧情况下,腺苷由低浓度生成和代谢平衡状态,快速调整为高浓度状态而发挥其神经保护作用。腺苷的主要神经保护机制有:抑制钙离子内流,减少兴奋性神经递质释放,阻止NO合成;抑制炎症细胞黏附和浸润,减轻炎症细胞介导的细胞损伤;抑制血小板的聚集,扩张脑血管;抑制自由基产生,减轻自由基介导的再灌注损伤;降低缺血后神经元的能量消耗,增加能量供应^[15]。本研究结果显示,IR组和AP组大鼠神经功能缺损评分明显高于假手术组,AP组大鼠神经功能缺损评分明显低于IR组。假手术组大鼠脑组织神经元形态结构正常,细胞核完整,间质无水肿;IR组大鼠脑组织神经元数目减少、细胞核溶解、出现空泡,间质水肿,组织疏松;AP组大鼠神经元损伤程度较IR组显著减轻。IR组和AP组大鼠脑组织细胞凋亡率显著高于假手术组,AP组大鼠脑组织细胞凋亡率显著低于IR组。以上研究结果提示,腺苷可通过降低脑组织细胞凋亡来改善CIRI。

细胞凋亡除有死亡受体途径、线粒体途径,还有ERS^[16]。合成、加工及转运蛋白需在内质网这一重要细胞器中进行,缺血缺氧会导致内质网功能紊乱,诱导一些未折叠的蛋白及错误折叠的蛋白,这些错

误蛋白聚集在内质网内从而会影响内质网正常生理功能,进而导致细胞凋亡。细胞对未折叠的蛋白及错误折叠的蛋白做出的应对反应为未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)。UPR主要通过激活3种跨膜蛋白的激活发挥调节作用,分别是内质网膜应激传感器蛋白激酶RNA样内质网激酶、肌醇需要酶、激活转录因子6,这3种跨膜蛋白均可激活CHOP的表达^[17]。CHOP在生理状态下以很低的表达水平存在于细胞质中,当ERS发生时其表达量显著增加。CHOP为内质网相关促凋亡蛋白,是ERS启动细胞凋亡的重要位点。研究表明,柚皮甙^[16]、大黄酚^[18]等药物预处理及低温预处理^[19]、电针预处理^[20]等方法可通过抑制CHOP表达来抑制细胞凋亡,进而减轻CIRI。本研究结果显示,IR组和AP组大鼠脑组织中CHOP mRNA相对表达量和CHOP蛋白阳性细胞表达率显著高于假手术组,AP组大鼠脑组织中CHOP mRNA相对表达量和CHOP蛋白阳性细胞表达率显著低于IR组,这说明,脑缺血再灌注可使大鼠脑组织CHOP mRNA及CHOP蛋白的表达量显著升高,而AP使大鼠脑组织CHOP mRNA及CHOP蛋白的表达量显著降低,提示腺苷改善CIRI可能与其抑制CHOP的表达有关。推测其机制可能是:正常生理状态下ESR未被启动,CHOP未被激活,处于静息状态;当细胞发生缺血再灌注时,细胞为应对ERS出现未折叠蛋白反应,从而激活CHOP,使CHOP呈高表达状态,进而诱导细胞凋亡发生,造成脑组织损伤,出现神经功能缺损症状;AP使CHOP的表达降低,从而减轻细胞凋亡程度,改善脑组织损伤及神经功能缺损症状。

综上所述,腺苷可能通过抑制CHOP的表达,抑制ESR,进而抑制细胞凋亡,从而减轻CIRI,发挥脑保护作用;这为腺苷的神经保护作用提供新的支持点,为AIS后CIRI的治疗提供新的治疗依据。

参考文献:
[1] 《中国卒中中心报告2020》编写组.《中国卒中中心报告2020》概要[J].中国脑血管病杂志,2021,18(11):737-743.
REPORT ON STROKE CENTER IN CHINA WRITING GROUP. Brief report on stroke center in China,2020[J].Chin J Cerebrovasc Dis, 2021,18(11):737-743.
[2] 王春娟,霍晓川,冀瑞俊,等.急性缺血性卒中再灌注治疗医疗质量评价与改进专家建议[J].中国卒中杂志,2021,16(7):705-715.
WAND C J, HUO X C, JI R J, et al. Consensus on evaluation and improvement of healthcare quality of acute ischemic stroke reperfusion therapy[J]. Chin J Stroke, 2021, 16(7):705-715.
[3] 庞艳利,许二妮,尉娜,等.腺苷预处理对大鼠脑缺血再灌注损

- 伤后 Caspase-3 的表达及细胞凋亡的影响[J]. 山东医药, 2020, 60(13): 42-45.
- PANG Y L, XU E N, WEI N, *et al.* Effects of adenosine preconditioning on expression of Caspase-3 and apoptosis of rats after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Shandong Med J*, 2020, 60(13): 42-45.
- [4] SUN X, LIU H, SUN Z, *et al.* Acupuncture protects against cerebral ischemia-reperfusion injury via suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis[J]. *Mol Med*, 2020, 26(1): 105.
- [5] XU F, MA R, ZHANG G, *et al.* Estrogen and propofol combination therapy inhibits endoplasmic reticulum stress and remarkably attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury and OGD injury in hippocampus[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 1596-1606.
- [6] 李兆珍, 张丹参. 脑缺血再灌注损伤相关机制的研究进展[J]. 神经药理学报, 2020, 10(6): 60-63.
- LI Z Z, ZHANG D S. Research progress on related mechanisms of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Acta Neuropharmacol*, 2020, 10(6): 60-63.
- [7] 屈生彪, 王勇. 内质网应激在脑缺血再灌注损伤中作用[J]. 华夏医学, 2018, 31(1): 170-174.
- QU S B, WANG Y. Role of endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Acta Med Sinica*, 2018, 31(1): 170-174.
- [8] 张翼飞, 郑辑英, 李东芳, 等. 内质网应激与脑缺血再灌注损伤研究进展[J]. 临床医药实践, 2017, 26(5): 384-387.
- ZHANG Y F, ZHENG J Y, LI D F, *et al.* Research progress of endoplasmic reticulum stress and cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Proceed Clin Med*, 2017, 26(5): 384-387.
- [9] 王雅男, 李红杰, 杨一飞, 等. 腺苷受体激动剂对心肌缺血再灌注损伤大鼠内质网应激的影响及其作用机制研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(17): 3245-3249.
- WANG Y N, LI H J, YANG Y F, *et al.* Effects of adenosine receptor agonists on endoplasmic reticulum stress in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Progress Modern Biomed*, 2018, 18(17): 3245-3249.
- [10] 刘超, 孟树萍, 丁付燕, 等. 腺苷 A_{2a} 受体激动剂 (CGS21680) 对体外循环大鼠心肌功能的影响及其作用机制[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(11): 2195-2198.
- LIU C, MENG S P, DING F Y, *et al.* Effects of adenosine A_{2a} receptor agonist (CGS21680) on myocardial function in rats undergoing cardiopulmonary bypass and its mechanism[J]. *Chin J Exp Surg*, 2021, 38(11): 2195-2198.
- [11] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [12] 赵欣, 裴科阳, 谭军. 腺苷预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注后线粒体活性氧含量及线粒体呼吸链复合体 I、III 活性和脑组织总抗氧化能力的影响[J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(4): 305-308.
- ZHAO X, PEI K Y, TAN J. Effect of adenosine preconditioning on reactive oxygen species content, activity of respiratory chain complex I and III of mitochondria and the total antioxidant capacity of brain tissue after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2019, 36(4): 305-308.
- [13] HEARSE D J. Reperfusion of the ischemic myocardium[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1977, 9(8): 605-616.
- [14] 阴雪妍, 郭哨恺, 谭军, 等. 腺苷预处理对大鼠脑缺血-再灌注损伤后脑内肿瘤坏死因子 α 和核因子 κB 表达的影响[J]. 解剖学报, 2020, 51(6): 839-847.
- YIN X Y, GUO S K, TAN J, *et al.* Effects of adenosine preconditioning on the expression of tumor necrosis factor α and nuclear factor κB in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Acta Anatomica Sinica*, 2020, 51(6): 839-847.
- [15] 庞艳利, 尉娜, 谭军. 腺苷预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 新乡医学院学报, 2020, 37(2): 125-130.
- PANG Y L, WEI N, TAN J. Protective effect of adenosine preconditioning on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Xinxiang Med Univ*, 2020, 37(2): 125-130.
- [16] WANG L, ZHANG Z, WANG H. Naringin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Transl Neurosci*, 2021, 12(1): 190-197.
- [17] WU S, PIAO X, WANG N, *et al.* Naoluo Xintong capsule ameliorates apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(5): 2913-2925.
- [18] ZHAO Y, FANG Y, ZHAO H, *et al.* Chrysophanol inhibits endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia and reperfusion mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 1-9.
- [19] 操良斌, 桂勤劳, 陈泳伊, 等. 浅低温联合硫化氢对全脑缺血再灌注后海马内质网应激的影响[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(44): 3592-3597.
- CAO L B, GUI Q F, CHEN Y Y, *et al.* Mild hypothermia combined with hydrogen sulfide alleviates hippocampal endoplasmic reticulum stress after global cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Natl Med J China*, 2018, 98(44): 3592-3597.
- [20] 吴家鹏, 李学智, 汪莹, 等. 电针结合脑内注射血管内皮生长因子对脑缺血再灌注损伤大鼠内质网应激反应相关蛋白 ATF6、IRE1 α 、XBPI、CHOP 的影响[J]. 针刺研究, 2018, 43(6): 341-346, 359.
- WU J P, LI X Z, WANG Y, *et al.* Electroacupuncture combined with intracerebral injection of VEGF improves neurological dysfunction possibly by down-regulating expression of endoplasmic reticulum stress related proteins ATF6, etc. in cerebral ischemia-reperfusion injury rats[J]. *Acupunct Res*, 2018, 43(6): 341-346, 359.

(本文编辑:周二强)