

银杏内酯注射液联合氯吡格雷对大鼠局灶性脑缺血侧支循环形成及HIF-VEGF-Notch通路的影响

谭丽艳 焦岩 矫桂凤 郑文旭

116011 大连市友谊医院神经内科

通信作者:焦岩, Email: 67343788@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.08.010

【摘要】目的 探究银杏内酯注射液联合氯吡格雷对大鼠局灶性脑缺血侧支循环形成及HIF-VEGF-Notch通路的影响。**方法** 将60只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组。除假手术组外,其余各组以大脑中动脉线栓法建立脑缺血再灌注大鼠模型,分组处理后,以Longa分级法对各组大鼠神经功能缺损进行评分,以三苯基氯化四氮唑(TTC)染色观察各组大鼠脑梗死面积,以免疫组织化学染色检测各组大鼠脑组织微血管密度(CD31阳性细胞表达),采用实时荧光定量(qRT-PCR)及蛋白免疫印迹法检测脑组织中HIF-VEGF-Notch通路相关蛋白表达情况。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积、脑组织CD31阳性细胞表达、HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA及蛋白表达均升高($P < 0.05$)。与模型组比较,银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积均降低($P < 0.05$),脑组织CD31阳性细胞表达、HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA及蛋白表达均升高($P < 0.05$);与银杏内酯注射液组及氯吡格雷组分别比较,银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积均降低($P < 0.05$),脑组织CD31阳性细胞表达、HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA及蛋白表达均升高($P < 0.05$)。**结论** 银杏内酯注射液及氯吡格雷均可促进大鼠局灶性脑缺血侧支循环形成及HIF-VEGF-Notch通路表达,两者合用具有协同作用。

【关键词】 银杏内酯类; 氯吡格雷; 脑缺血再灌注; 侧支循环; HIF-VEGF-Notch通路

Effects of ginkgolide injection combined with clopidogrel on collateral circulation formation and HIF-VEGF-Notch pathway in rats with focal cerebral ischemia

Tan Liyan, Jiao Yan, Jiao Guifeng, Zheng Wenxu

Neurology Department, Youyi Hospital, Dalian 116011, China

Corresponding author: Jiao Yan, Email: 67343788@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of ginkgolide injection combined with clopidogrel on collateral circulation formation and HIF-VEGF-Notch pathway in rats with focal cerebral ischemia. **Methods** Totals of 60 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, ginkgolide injection group, clopidogrel group and ginkgolide injection + clopidogrel group. In addition to the sham-operated group, the middle cerebral artery occlusion method was used to establish the rat model of cerebral ischemia-reperfusion. After grouping and treating, Longa grading method was used to evaluate the neurological deficits of the rats in each group, cerebral infarction area was observed by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining, microvessel density (CD31 positive cell expression) was detected by immunohistochemical staining, and expression of HIF-VEGF-Notch pathway-related protein in brain tissue was detected by real-time fluorescence quantitative (qRT-PCR) and Western blotting. **Results** Compared with the sham-operated group, the neurological deficit score, cerebral infarction area, CD31 positive cell expression, HIF-1 α , VEGF, Notch1 mRNA expressions and protein expressions in the model group were increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the neurological deficit score and infarct area of rats in ginkgolide injection group, clopidogrel group, ginkgolide injection + clopidogrel group were decreased ($P < 0.05$), while CD31 positive cell expression, HIF-1 α , VEGF, Notch1 mRNA expressions and protein expressions in brain tissue were increased ($P < 0.05$). Compared with ginkgolide injection group and clopidogrel group, the neurological deficit score and

cerebral infarction area of rats in ginkgolide injection + clopidogrel group were decreased ($P < 0.05$), and the CD31 positive cell expression, HIF-1 α , VEGF, Notch1 mRNA expressions and protein expressions in brain tissue were increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Ginkgolide injection and clopidogrel can promote collateral circulation formation and expression of HIF-VEGF-Notch pathway in rats with focal cerebral ischemia, and the combination of them has a synergistic effect.

【Key words】 Bilobalides; Clopidogrel; Cerebral ischemia-reperfusion; Collateral circulation; HIF-VEGF-Notch pathway

脑卒中是造成中国居民死亡的主要原因之一,其中约80%患者为缺血性脑卒中,临床发病率高,病情进展迅速,会因脑损伤造成偏瘫、行走障碍等后遗症,预后差,致残、致死率高^[1]。机体发生脑缺血时,脑侧支循环可发挥替代作用,维持并恢复脑组织血流供应,进而减轻脑损伤,因此促进脑侧支循环形成对缺血性脑卒中的治疗具有重要意义^[2]。低氧诱导因子(HIF)-血管内皮生长因子(VEGF)-Notch通路介导血管内皮细胞增殖、迁移,是调节局灶性脑缺血侧支循环的一个作用靶点,机体脑组织缺血缺氧时可促进HIF-1 α 蛋白表达,上调下游VEGF、Notch1信号分子表达,进而促使新生血管形成,减轻脑损伤^[3-4]。研究发现,银杏内酯注射液可通过激活Akt/Nrf2信号减轻脑缺血时的氧化应激损伤,促进VEGF表达,修复脑损伤,发挥神经保护作用^[5-6],抑制TNF- α 诱导的人肺血管内皮细胞炎症,保护血管内皮细胞功能^[7]。氯吡格雷临床中广泛用于治疗缺血性脑卒中,可升高急性脑梗死患者血清VEGF水平,减轻缺血再灌注引起的血管内皮功能障碍,抑制脑损伤^[8-10]。但银杏内酯注射液联合氯吡格雷是否可上调HIF-VEGF-Notch通路,进而促使局灶性脑缺血侧支循环形成目前还不清楚,本文通过建立脑缺血再灌注大鼠模型,对此进行研究。

一、材料与方法

1. 实验动物: SD大鼠, SPF级, 雄性, 购自广东省医学实验动物中心, 动物质量合格证号: 44007200021086, 生产许可证号: SCXK(粤)2016-0002。在大连市友谊医院动物房中饲养, 保持环境安静、清洁、透气, 12 h/12 h昼夜交替照明, 温度25 $^{\circ}$ C, 相对湿度50%, 自由饮食及饮水, 定时更换垫料, 对鼠笼进行清洁、消毒。

2. 主要试剂及仪器: 银杏内酯注射液(成都百裕制药股份有限公司, 规格2 ml/支), 国药准字: Z20110035; 氯吡格雷(厦门慧嘉生物科技有限公司), 货号: HJIR-11460; TTC(Amresco公司), 货号: 298964; 大鼠二步法免疫组化试剂盒、DAB试剂盒(北京中杉金桥公司): 货号分别为: k137723c、ZLI-

9017; 兔源GAPDH一抗、兔源HIF-1 α 一抗、兔源VEGF一抗、兔源Notch1一抗、兔源CD31一抗、羊抗兔二抗(英国Abcam公司), 货号分别为: ab181602、ab179483、ab46154、ab52301、ab119339、ab150077; HIF-1 α 、VEGF、Notch1、GAPDH引物(上海生工生物工程股份有限公司合成); RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司), 货号: DP430; 逆转录试剂盒(美国Genecopoeia公司), 货号: C0210B; 荧光定量PCR试剂盒(日本Takara公司), 货号: 639519; 蛋白提取试剂盒、BCA试剂盒(上海碧云天公司), 货号分别为: P0027、P0011。

SMZ745光学显微镜(日本尼康公司); 3900型高通量DNA合成仪(美国应用生物系统公司); CFX96 Touch Deep Well 荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司); GIS-500凝胶成像仪(杭州米欧仪器有限公司); CM3050S切片机、EG1160包埋机、HI1220烤片机(德国Leica公司); 垂直电泳仪及转移系统、制冰机、精密电子秤(日本Sanyo公司)等。

3. 动物模型制备及分组给药: 参考文献[11], 以大脑中动脉线栓法建立模型, 方法如下: 腹腔注射45 mg/kg 2.5%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 仰卧位固定在鼠板上, 喷洒75%酒精消毒颈部, 备皮后纵向切开皮肤, 分离并暴露颈外动脉(external carotid artery, ECA)、左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA), 将ECA、CCA近心端用缝合线结扎, 同时动脉夹夹闭ICA, 接着于距CCA分叉部4 mm处剪一小口, 向CCA中插入一根直径0.24 mm拴线进入ICA, 阻断大脑中动脉血流, 最后将拴线尾端部分暴露于外, 逐层缝合, 2 h后抽出拴线, 模型即完成。观察大鼠活动情况, 以Longa分级法对造模后大鼠进行神经功能缺损评分, 大鼠评分为1~3分时, 表示模型制备成功^[12], 共制备55只, 成功48只, 将其随机分为模型组、银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组, 每组12只。另取12只大鼠仅分离CCA、ECA、ICA后缝合伤口, 设为假手术组。

参照文献, 模型建立成功2 h后, 将银杏内酯注

射液^[13]以 1 ml/kg 剂量做尾静脉注射,以生理盐水溶解氯吡格雷配制 0.771 mg/ml 溶液后以 10 ml/kg 剂量灌胃^[14],模型组和假手术组尾静脉注射并灌胃等剂量生理盐水,持续 14 d。

4.大鼠神经功能缺损评分及标本采集:末次给药 24 h 后,参照 Longa 分级法评分标准^[12]对各组大鼠神经功能缺损情况进行评分,见表 1。各组大鼠麻醉后处死,解剖完整取出大脑,经生理盐水漂洗干净后,分别随机自每组中选取 6 只大鼠的大脑备用;各组剩余 6 只各剪取脑组织约 1 g 冻存在 -80 °C 冰箱中备用,剩余脑组织经 4% 多聚甲醛固定、由低到高浓度梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后以切片机制备常规病理切片备用。

表 1 神经功能缺损评分

神经功能缺损行为	评分(分)
无神经功能缺损	0
不能完全伸展对侧前爪	1
行走向对侧转圈	2
行走向对侧倾倒	3
意识丧失,不能自发行走	4
死亡	5

5.大鼠脑梗死面积的测定:将采集标本的脑组织沿冠状切面切为 5 片,厚度大致相同,采用 2% TTC 染液于 37 °C 水浴中避光染色 30 min,经蒸馏水漂洗、4% 多聚甲醛固定后,肉眼观察并拍照脑片,以 Image pro 软件分析所得照片,得出大鼠脑梗死面积,公式为:脑梗死面积=全脑梗死面积/全脑片面积 × 100%。

6.大鼠脑组织微血管密度检测:参照文献[15],通过测定 CD31 表达检测大鼠脑组织微血管密度,方法如下:将采集标本石蜡切片脱蜡后,以梯度酒精(高到低)依次浸泡处理,然后以蒸馏水漂洗,加入 0.3% H₂O₂,室温孵育 30 min;加入 5% 血清,室温孵育 2 h;加入 CD31 一抗,4 °C 孵育过夜;TBS 漂洗 3 次,采用大鼠二步法免疫组化试剂盒及 DAB 试剂盒做免疫组化染色,操作步骤参照说明书,然后以蒸馏水漂洗、梯度酒精脱水(低到高)、透明后封片,在光学显微镜下观察 CD31 阳性细胞比例。

7. qRT-PCR 检测大鼠脑中 HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA 表达:取出采集标本中冻存的脑组织约 0.5 g,以 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒得 cDNA,具体参照说明书进行操作,然后以荧光定量 PCR 试剂盒进行 qRT-PCR 反应,反应总体系的

配制、反应条件的设定参照试剂盒说明书进行,以 GADPH 为内参基因,qRT-PCR 引物序列见表 2,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 算法对数据进行分析,得出各组 mRNA 表达量。

表 2 qRT-PCR 引物序列

引物名称	方向	序列(5' -3')
HIF-1 α	F	GTCGGACAGCCTCACAAACAGAGC
	R	GTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG
VEGF	F	TGCCCCCTAATGCGGTGT
	R	TGCTGCTTTGGTGAGGTT
Notch1	F	CCCATTACATGCCGCTGTTTC
	R	CATCATGCATTGGGGCATC
GADPH	F	AGTCAGGTATCCCACAGGAAACAG
	R	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA

8.大鼠脑组织中 HIF-1 α 、VEGF、Notch1 蛋白表达检测:采集标本剩余的冻存脑组织,使用蛋白提取试剂盒、BCA 试剂盒提取总蛋白后测定其浓度,根据结果将各组蛋白浓度调至相同,取相同体积样品液于电泳仪中进行电泳,采用转膜仪将蛋白转移至硝酸纤维膜上,加入 5% 脱脂奶粉,室温封闭 2 h,截取目的蛋白条带置于小盒中,分别加入 HIF-1 α 、VEGF、Notch1 一抗溶液,4 °C 孵育过夜,经 TBST 漂洗后,加入羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,经 TBST 漂洗后,以增强化学发光法显色,以凝胶成像仪拍摄图像,并使用 Tanon 软件分析各组蛋白相对表达量。

9.统计学方法:采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较进行单因素方差分析,两组间进一步比较行 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1.各组大鼠神经功能缺损评分的比较:见表 3。与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠神经功能缺损评分降低($P < 0.05$);与银杏内酯注射液组及氯吡格雷组分别比较,银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠神经功能缺损评分降低($P < 0.05$)。

2.各组大鼠脑梗死面积的比较:见图 1(见本期封三)、表 4。与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死面积显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠脑梗死面积降低($P < 0.05$);与银杏内酯注射液组及氯吡格雷组分别比较,银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠脑梗死面积降低($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠神经功能缺损评分(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	神经功能缺损评分
假手术组	12	0
模型组	12	3.24 ± 0.49 ^a
银杏内酯注射液组	12	1.85 ± 0.26 ^b
氯吡格雷组	12	1.89 ± 0.25 ^b
银杏内酯注射液+氯吡格雷组	12	0.63 ± 0.12 ^{bcd}
F值		245.97
P值		<0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与银杏内酯注射液组比较,^c $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^d $P < 0.05$

表4 各组大鼠脑梗死面积的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	脑梗死面积
假手术组	6	0
模型组	6	41.31 ± 8.24 ^a
银杏内酯注射液组	6	20.57 ± 4.85 ^b
氯吡格雷组	6	19.48 ± 3.14 ^b
银杏内酯注射液+氯吡格雷组	6	4.12 ± 0.81 ^{bcd}
F值		156.68
P值		<0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与银杏内酯注射液组比较,^c $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^d $P < 0.05$

3. 各组大鼠脑组织微血管密度的影响:见图2(见本期封三)、表5。与假手术组比较,模型组及药物处理组大鼠脑组织微血管密度(CD31阳性细胞表达)均升高($P < 0.05$);与模型组比较,银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠CD31阳性细胞表达升高($P < 0.05$);与银杏内酯注射液组及氯吡格雷组分别比较,银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠CD31阳性细胞表达升高($P < 0.05$)。

4. 各组大鼠脑组织中HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA表达的比较:见表6。与假手术组比较,模型组及药物处理组大鼠脑组织HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA表达均升高($P < 0.05$);与模型组比

表5 各组大鼠脑组织中CD31阳性细胞表达的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	CD31阳性细胞表达
假手术组	6	8.08 ± 0.72
模型组	6	14.91 ± 2.11 ^a
银杏内酯注射液组	6	41.20 ± 5.05 ^b
氯吡格雷组	6	40.89 ± 5.14 ^b
银杏内酯注射液+氯吡格雷组	6	67.04 ± 11.01 ^{bcd}
F值		187.49
P值		<0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与银杏内酯注射液组比较,^c $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^d $P < 0.05$

较,银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠脑组织HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA表达均升高($P < 0.05$);与银杏内酯注射液组及氯吡格雷组分别比较,银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠脑组织HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA表达升高($P < 0.05$)。

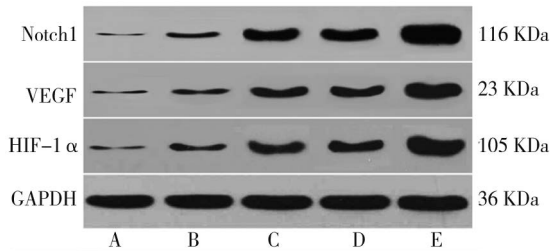
5. 各组大鼠脑组织中HIF-1 α 、VEGF、Notch1蛋白表达的比较:见图3、表7。与假手术组比较,模型组及药物处理组大鼠脑组织HIF-1 α 、VEGF、Notch1蛋白表达均升高($P < 0.05$);与模型组比较,银杏内酯注射液组、氯吡格雷组、银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠脑组织HIF-1 α 、VEGF、Notch1蛋白表达均升高($P < 0.05$);与银杏内酯注射液组及氯吡格雷组分别比较,银杏内酯注射液+氯吡格雷组大鼠脑组织HIF-1 α 、VEGF、Notch1蛋白表达升高($P < 0.05$)。

讨论 缺血性脑梗死患者血管可代偿性再生,进而建立侧支循环,维持大脑血液供应,促使侧支循环及时建立,可尽快恢复血流,减轻脑梗死面积,保护脑组织,是临床治疗脑缺血再灌注损伤关键,对缺血性脑卒中患者的预后极为重要^[16],因而对侧支循环形成的研究具有重要的临床意义。本文以大脑中动脉线栓法建立脑缺血再灌注大鼠模型对此进

表6 各组大鼠脑组织中HIF-1 α 、VEGF、Notch1 mRNA表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HIF-1 α /GAPDH	VEGF/GAPDH	Notch1/GAPDH
假手术组	6	0.99 ± 0.13	0.98 ± 0.12	1.01 ± 0.15
模型组	6	1.28 ± 0.24 ^a	1.31 ± 0.27 ^a	1.32 ± 0.29 ^a
银杏内酯注射液组	6	1.69 ± 0.31 ^b	1.83 ± 0.32 ^b	1.86 ± 0.33 ^b
氯吡格雷组	6	1.71 ± 0.29 ^b	1.81 ± 0.30 ^b	1.88 ± 0.34 ^b
银杏内酯注射液+氯吡格雷组	6	2.34 ± 0.46 ^{bcd}	2.51 ± 0.52 ^{bcd}	2.58 ± 0.56 ^{bcd}
F值		33.53	36.94	33.70
P值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与银杏内酯注射液组比较,^c $P < 0.05$;与氯吡格雷组比较,^d $P < 0.05$



注: A 假手术组; B 模型组; C 银杏内酯注射液组; D 氯吡格雷组; E 银杏内酯注射液+氯吡格雷组

图3 免疫印迹检测各组大鼠脑组织中 HIF-1 α、VEGF、Notch1 蛋白表达

行研究,结果显示,模型组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积均升高,表明以大脑中动脉线栓法阻断血流后,大鼠出现脑梗死,神经功能受损,发生脑损伤。CD31是表达于内皮细胞间紧密连接处的一种血小板-内皮细胞黏附分子,参与介导血管生成,可反映微血管密度大小,因此可作为检测微血管生成的标记物^[15],模型组大鼠脑组织CD31阳性细胞表达升高,表明大鼠脑部微血管密度增加,揭示大鼠脑部微血管代偿性再生,侧支循环形成,模型建立成功。

研究发现,银杏内酯可通过增强脑缺血/再灌注大鼠神经干细胞的增殖分化来促使其中枢神经系统的自我修复,并可抑制血管内皮细胞炎症反应,上调VEGF表达,减轻脑损伤^[5-6, 17]。氯吡格雷可上调急性脑梗死患者VEGF表达,缓解缺血再灌注导致的血管内皮功能障碍,修复脑损伤,对缺血性脑卒中的治疗具有较好的疗效^[9-10, 18]。VEGF是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,可促进血管内皮细胞迁移、增殖及血管形成^[19],因而银杏内酯注射液联合氯吡格雷可能对局灶性脑缺血侧支循环形成具有促进作用。本文研究结果显示,以银杏内酯注射液、氯吡格雷分别处理后,模型大鼠神经

功能缺损评分、脑梗死面积均降低,脑组织CD31阳性细胞表达均升高,以银杏内酯注射液及氯吡格雷联合处理后,模型大鼠神经功能缺损评分、脑梗死面积进一步降低,脑组织CD31阳性细胞表达进一步升高,表明银杏内酯注射液、氯吡格雷可降低脑梗死面积,促进脑部微血管形成,修复神经功能,两者联合使用具有协同效应,共同促进局灶性脑缺血侧支循环形成。

HIF-VEGF-Notch通路介导局灶性脑缺血侧支循环形成,机体发生脑缺血时,通路信号分子HIF-1 α、VEGF、Notch1表达升高,促使微血管代偿性再生,进而建立侧支循环,减轻脑损伤^[3-4, 19-20],是调节局灶性脑缺血侧支循环形成的作用靶点之一。本文研究结果显示,以银杏内酯注射液、氯吡格雷分别处理后,模型大鼠脑组织HIF-1 α、VEGF、Notch1 mRNA及蛋白表达升高,以银杏内酯注射液及氯吡格雷联合处理后,模型大鼠脑组织HIF-1 α、VEGF、Notch1 mRNA及蛋白表达进一步升高。表明银杏内酯注射液、氯吡格雷可上调HIF-VEGF-Notch通路表达,两者联合使用具有协同效应,揭示上调HIF-VEGF-Notch通路表达可能是银杏内酯注射液联合氯吡格雷协同促进局灶性脑缺血侧支循环形成的作用机制。

综上所述,银杏内酯注射液、氯吡格雷可激活HIF-VEGF-Notch通路,减少梗死面积,促进缺血再灌注后微血管生成,保护脑组织,改善神经功能障碍,两者联合使用具有协同效应,上调HIF-VEGF-Notch通路表达可能是其作用机制之一,对临床脑缺血再灌注损伤的治疗具有一定的参考意义,但本文未使用通路抑制剂及激动剂进行对照验证,且关于银杏内酯注射液及氯吡格雷调控HIF-VEGF-Notch通路的具体分子机制本研究也未涉及,还存在不足,需要后续的深入研究。

表7 各组大鼠脑组织 HIF-1 α、VEGF、Notch1 蛋白表达的比较(̄x ± s)

组别	例数	HIF-1 α/GAPDH	VEGF/GAPDH	Notch1/GAPDH
假手术组	6	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.09 ± 0.02
模型组	6	0.34 ± 0.06 ^a	0.33 ± 0.07 ^a	0.31 ± 0.08 ^a
银杏内酯注射液组	6	0.67 ± 0.13 ^b	0.62 ± 0.12 ^b	0.76 ± 0.18 ^b
氯吡格雷组	6	0.66 ± 0.12 ^b	0.61 ± 0.11 ^b	0.77 ± 0.19 ^b
银杏内酯注射液+氯吡格雷组	6	0.98 ± 0.21 ^{bcd}	0.96 ± 0.22 ^{bcd}	1.12 ± 0.24 ^{bcd}
F值		84.31	75.74	75.46
P值		< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与假手术组比较,^aP < 0.05;与模型组比较,^bP < 0.05;与银杏内酯注射液组比较,^cP < 0.05;与氯吡格雷组比较,^dP < 0.05

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验设计为谭丽艳,郑文旭,研究实施、资料收集为谭丽艳,矫桂凤,论文撰写为谭丽艳,论文修订为焦岩,论文审核为郑文旭

参 考 文 献

[1] Anderson CS, Robinson T, Lindley RI, et al. Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke [J]. *N Engl J Med*, 2018, 374(24): 2313-2323. DOI: 10.1056/NEJMoa1515510.

[2] Miranda B, Fonseca AC, Ferro JM. Patent foramen ovale and stroke[J]. *J Neurol*, 2018, 265(8): 1943-1949. DOI: 10.1007/s00415-018-8865-0.

[3] 段颖,张淑清,于俊义.丹栀逍遥散加减对肝郁气滞型新生血管性青光眼的临床应用及机制探讨[J].*世界中医药*, 2016, 11(7): 1282-1285. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.07.034. Duan Y, Zhang SQ, Yu JY. Clinical Application of Danzhi Xiaoyao Powder in Treating Neovascular glaucoma of Qi Stagnation due to Depression of Liver and Its Mechanism[J]. *World Chinese Medicine*, 2016, 11(7): 1282-1285.

[4] 陈懿,葛金文,廖君,等.局灶性脑缺血大鼠VEGF/Notch1信号分子的表达及脑泰方的调节作用[J].*中国老年学杂志*, 2014, 34(20): 5784-5786. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2014.20.076. Chen Y, Ge JW, Liao J, et al. Expression of VEGF/Notch1 signal molecules of rats with focal cerebral ischemia and the effect of Nao-Tai decoction[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2014, 34(20): 5784-5786.

[5] Liu Q, Jin Z, Xu Z, et al. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(2): 441-452. DOI: 10.1007/s12192-019-00977-1.

[6] 刘秀萍,邓方.银杏内酯和白果内酯对大鼠脑缺血再灌注损伤后VEGF的表达的影响[J].*中风与神经疾病杂志*, 2015, 32(2): 108-111. Liu XP, Deng F. Effects of ginkgolides and bilobalide on VEGF expression in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2015, 32(2): 108-111.

[7] Zhang M, Sun J, Chen B, et al. Ginkgolide B inhibits platelet and monocyte adhesion in TNF α -treated HUVECs under laminar shear stress[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 220-228. DOI: 10.1186/s12906-018-2284-8.

[8] Kwong W, Parker JD. The Effect of Clopidogrel on the Response to Ischemia Reperfusion[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2017, 22(4): 368-373. DOI: 10.1177/1074248416683047.

[9] Weisshaar S, Litschauer B, Eipeldauer M, et al. Ticagrelor mitigates ischaemia-reperfusion induced vascular endothelial dysfunction in healthy young males - a randomized, single-

blinded study[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(12): 2651-2660. DOI: 10.1111/bcp.13378.

[10] 陈小晓,郑灿荣.阿替普酶溶栓治疗急性脑梗死的效果及对血清VEGF、Ang-2的影响[J].*临床医学工程*, 2018, 25(9): 1213-1214. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4659.2018.09.1213. Chen XX, Zheng CR. Effect of Alteplase Thrombolysis in the Treatment of Acute Cerebral Infarction and the Influence on Serum VEGF and Ang-2 [J]. *Clinical Medical & Engineering*, 2018, 25(9): 1213-1214.

[11] 郭东艳,范妤,赵晓平,等.健脑益智胶囊不同纯化工艺对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织炎症反应的影响[J].*中国老年学杂志*, 2017, 37(3): 538-540. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.03.007.

[12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson SR, et al. Reversible middle artery occlusion without craniectomy[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.

[13] 张映娜.银杏内酯注射液联合依达拉奉治疗急性脑梗死的疗效[J].*北方药学*, 2019, 16(7): 120-121.

[14] 张亚雯,时红,张宇明,等.氯吡格雷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制[J].*中国老年学杂志*, 2017, 37(10): 2390-2392. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.10.018.

[15] Xing J, He W, Ding YW, et al. Correlation between Contrast-Enhanced Ultrasound and Microvessel Density via CD31 and CD34 in a rabbit VX2 lung peripheral tumor model[J]. *Med Ultrason*, 2018, 1(1): 37-42. DOI: 10.11152/mu-1234.

[16] Wufuer A, Mijiti P, Abudusalimu R, et al. Blood pressure and collateral circulation in acute ischemic stroke[J]. *Herz*, 2019, 44(5): 455-459. DOI: 10.1007/s00059-018-4691-5.

[17] Zheng PD, Mungur R, Zhou HJ, et al. Ginkgolide B promotes the proliferation and differentiation of neural stem cells following cerebral ischemia/reperfusion injury, both in vivo and in vitro[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(7): 1204-1211. DOI: 10.4103/1673-5374.232476.

[18] Johnston SC, Easton JD, Farrant M, et al. Clopidogrel and Aspirin in Acute Ischemic Stroke and High-Risk TIA[J]. *N Engl J Med*, 2018, 379(3): 215-225. DOI: 10.1056/nejmoa1800410.

[19] 侯岩.阿司匹林联合氯吡格雷对脑梗死患者血清VEGF、Ang-II、MMP-9的影响及预后分析[J].*现代诊断与治疗*, 2018, 29(19): 51-53. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8174.2018.19.024.

[20] 林冠宇,林博杰,朱江英,等.天然水蛭素对人大微血管再生作用的初步研究[J].*中国修复重建外科杂志*, 2018, 32(12): 1586-1591. DOI: 10.7507/1002-1892.201806055. Lin GY, Lin BJ, Zhu JY, et al. Effect of natural hirudin on angiogenesis of human microvascular endothelial cells[J]. *Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*, 2018, 32(12): 1586-1591.

(收稿日期:2019-06-09)

(本文编辑:戚红丹)