



(扫描二维码查看原文)

· 论著 ·

从调控血管内皮生长因子及其受体激活 Notch 信号通路角度探讨生地梓醇促血管新生及神经功能重塑作用

孙立平¹, 周霞², 刘炬³, 张佳乐¹, 王祥煜¹, 郭炳杉¹, 刘伟¹

【摘要】 背景 近几年较多研究发现了生地梓醇的脑保护作用,但其具体机制尚未完全明确。以血管内皮生长因子(VEGF)及其受体为切入点,研究生地梓醇的促血管新生及神经功能重塑作用,对于其在临床中的应用具有重要意义。**目的** 从调控 VEGF 及血管内皮生长因子受体(VEGFR)激活 Notch 信号通路角度探讨生地梓醇促血管新生及神经功能重塑作用。**方法** 本研究时间为 2019 年 7 月至 2021 年 1 月。将 24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为生地梓醇组、生理盐水组、假手术组,各 8 只。生地梓醇组、生理盐水组大鼠参照 Longa 改良线栓法进行脑卒中造模,大鼠清醒后 2 h 采用 Longa 5 分法进行神经功能评分,评分 1~3 分视为造模成功。剔除神经功能评分为 0、4 分或在手术过程中死亡的大鼠,然后重新选取大鼠进行造模,补充到相应组别中,保证每组动物数量始终为 8 只。脑卒中造模成功后 24 h,生地梓醇组大鼠腹腔注射生地梓醇溶液(9 mg/kg),生理盐水组和假手术组大鼠均腹腔注射等量的 0.9% 氯化钠溶液,1 次/d,连续 7 d。分别于造模后 1、5、8 d 评估各组大鼠神经功能评分、平衡木实验评分,观察各组大鼠病灶区脑组织形态,检测脑组织 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量。**结果** 干预方法与时间在神经功能评分、平衡木实验评分上存在交互作用($P < 0.05$);干预方法、时间在神经功能评分、平衡木实验评分上主效应显著($P < 0.05$)。生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 1、5、8 d 神经功能评分、平衡木实验评分高于假手术组($P < 0.05$);生地梓醇组大鼠造模后 5、8 d 神经功能评分、平衡木实验评分低于生理盐水组($P < 0.05$)。生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 5、8 d 神经功能评分、平衡木实验评分分别低于本组造模后 1 d($P < 0.05$);生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 8 d 神经功能评分、平衡木实验评分分别低于本组造模后 5 d($P < 0.05$)。假手术组大鼠无脑梗死现象;生理盐水组大鼠仍有脑梗死现象;生地梓醇组大鼠仍存在脑梗死现象,但梗死范围较生理盐水组减小,脑组织缺血再灌注恢复及组织形成情况明显优于生理盐水组。生地梓醇组大鼠脑组织 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量高于假手术组、生理盐水组($P < 0.05$)。**结论** 生地梓醇可通过调控 VEGF 及 VEGFR 激活 Notch 信号通路来促进血管新生与神经功能重塑,且不增加组织水肿。

【关键词】 卒中;大鼠;生地梓醇;血管新生;神经功能重塑;血管内皮生长因子;Notch 信号通路

【中图分类号】 R 743 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.261

孙立平,周霞,刘炬,等.从调控血管内皮生长因子及其受体激活 Notch 信号通路角度探讨生地梓醇促血管新生及神经功能重塑作用[J].实用心脑血管病杂志,2021,29(11):63-68.[www.syxnf.net]

SUN L P, ZHOU X, LIU J, et al. Effect of Shengdi catalpol in promoting angiogenesis and neural function remodeling by regulating vascular endothelial growth factor and its receptors to activate Notch signaling pathway [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29(11): 63-68.

Effect of Shengdi Catalpol in Promoting Angiogenesis and Neural Function Remodeling by Regulating Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors to Activate Notch Signaling Pathway SUN Liping¹, ZHOU Xia², LIU Ju³, ZHANG Jiale¹, WANG Xiangyu¹, GUO Bingshan¹, LIU Wei¹

1. Department of the First Clinical Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, China

2. Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, China

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2019MH128)——基于 VEGF-Notch-Ang 信号通路探讨生地梓醇的促血管新生与神经重塑效应

1.250001 山东省济南市,山东中医药大学第一临床医学院 2.250001 山东省济南市,山东中医药大学第二附属医院康复医学科

3.250001 山东省济南市,山东第一医科大学第一附属医院医学研究中心

通信作者:周霞, E-mail: lusy2000@126.com

3. Medical Research Center, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan 250001, China

Corresponding author: ZHOU Xia, E-mail: lusy2000@126.com

【 Abstract 】 Background In recent years, many studies have discovered the protective effect of Shengdi catalpol, but its specific mechanism has not yet been fully clarified. Taking vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors as the entry point, the angiogenesis and nerve function remodeling effects of Shengdi catalpol are of great significance for its clinical application. **Objective** To explore the effect of Shengdi catalpol in promoting angiogenesis and neural function remodeling from the perspective of regulating VEGF and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) to activate the Notch signaling pathway. **Methods** This study was conducted from July 2019 to January 2021. Twenty-four SPF male SD rats were randomly divided into Shengdi catalpol group, normal saline group and sham operation group, with 8 rats in each group. The rats in catalpol group and normal saline group were modeled according to the Longa modified suture method, neural function score was measured by Longa 5-point method at 2 h after the rats awake, and the neural function score of 1 to 3 indicated that the modeling was successful. The rats with neural function score of 0 or 4 or which died during the operation were excluded, and then the rats were re-selected for modeling and added to the corresponding groups to ensure that the number of animals in each group was always 8. Twenty-four hours after the successful modeling of stroke, the rats in the Shengdi catalpol group were intraperitoneally injected with Shengdi catalpol solution (9 mg/kg), the rats in the normal saline group and the sham operation group were intraperitoneally injected with the same amount of 0.9% sodium chloride solution, once a day for 7 consecutive days. The neural function score and balance beam test score of rats in each group were evaluated at 1, 5 and 8 days after modeling, the brain tissue morphology of rats in each group was observed, and the relative expressions of VEGF, VEGFR, Notch1 and Notch4 mRNA were detected. **Results** There was an interaction between intervention method and time on neural function score and balance beam test score ($P < 0.05$); the main effect of intervention method and time on neural function score and balance beam test score was significant ($P < 0.05$). The neural function score and balance beam test score of normal saline group and Shengdi catalpol group were higher than those of sham operation group at 1, 5 and 8 days after modeling ($P < 0.05$). The neural function score and balance beam test score of Shengdi catalpol group were lower than those of normal saline group at 5 and 8 days after modeling ($P < 0.05$). The neural function score and balance beam test score of normal saline group and Shengdi catalpol group at 5 and 8 days after modeling were lower than those at 1 day after modeling, respectively ($P < 0.05$). The neural function score and balance beam test score of normal saline group and Shengdi catalpol group at 8 days after modeling were lower than those at 5 days after modeling, respectively ($P < 0.05$). There was no cerebral infarction in sham operation group. Cerebral infarction was still observed in rats of normal saline group. Cerebral infarction still existed in the Shengdi catalpol group, but the extent of infarction was smaller than that in the normal saline group, and the recovery and tissue formation of cerebral ischemia reperfusion were significantly better than those in the normal saline group. The relative expression of VEGF, VEGFR, Notch1, Notch4 mRNA in the brain tissue of rats in the Shengdi catalpol group was higher than that in the sham operation group and the normal saline group ($P < 0.05$). **Conclusion** Shengdi catalpol can promote angiogenesis and neural function remodeling by regulating VEGF and VEGFR to activate Notch signaling pathway and without increasing tissue edema.

【 Key words 】 Stroke; Rats; Shengdi catalpol; Angiogenesis; Neural function remodeling; Vascular endothelial growth factor; Notch signaling pathway

脑卒中具有高发病率、高死亡率和高致残率等特点,其已成为我国成年人致死、致残的首位病因^[1]。在针对错失溶栓治疗时间窗的脑梗死患者的药物治疗中,神经保护剂仍未取得高质量研究证据与强推荐,因而具有活血化瘀功效的中药及其组分在脑卒中的早期干预中具有重要意义^[2]。地黄是治疗中风经典方剂中的常用药物之一,如地黄饮子、血府逐瘀汤等,生地梓醇作为小分子环烯醚萜葡萄糖苷类化合物,是其主要功效组分之一。有研究者认为,生地梓醇通过上调血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达水平而发挥促血管新生作用,但VEGF能增加血管通透性,进而加重组织水肿^[3]。而只有新生血管成熟为

稳定的微血管网时,其血管稳定性才增加,组织水肿才不加重,而Notch信号通路可通过参与内皮细胞的增殖以及细胞相互作用而维持血管稳定^[4]。本研究拟从调控VEGF及血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)激活Notch信号通路角度,探讨生地梓醇促血管新生及神经功能重塑的作用机制,实证《神农本草经》关于生地“干地黄,主折跌绝筋,伤中,逐血痹,填骨髓,长肌肉……除痹,生者尤良”的功效记载^[5-6],以期为临床转化提供更多证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取SPF级雄性SD大鼠31只,平均体质量(220 ± 20)g,购自济南朋悦实验动物繁育

有限公司。动物合格证号: SCXK(鲁)2019-0003。动物适应环境: 温度 21~25 °C, 日温差 ± 1 °C, 湿度 50%~70%, 普通饲料喂养。

1.2 实验药物 生地梓醇购自上海源叶生物科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$, 相对分子量为 362.33), 以终浓度为 1 mg/ml 的生地梓醇溶液作为神经保护的最好浓度^[7]。

1.3 实验仪器与试剂 高速低温组织研磨仪(KZ-III-F)购自 Servicebio 公司, 台式高速冷冻型离心机(0004219-11)购自德国 Hettich 公司, 荧光定量 PCR 仪(CFX connect)购自上海土森视觉科技有限公司, 超纯 RNA 提取试剂盒(CW0581M)、TRIzol Reagent(CW0580S)购自康为世纪, 三氯甲烷(10006818)、异丙醇(80109218)、无水乙醇(10009218)购自国药集团化学试剂有限公司, SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(AG11701)、Evo M-MLV 反转录试剂预混液(AG11706)购自艾科瑞生物。

1.4 实验时间 本实验时间为 2019 年 7 月至 2021 年 1 月。

1.5 实验方法

1.5.1 分组及干预方法 将 24 只大鼠随机分为生地梓醇组、生理盐水组、假手术组, 各 8 只。生地梓醇组、生理盐水组大鼠参照 Longa 改良线栓法^[8]进行脑卒中造模, 具体如下: 腹腔注射 10% 水合氯醛(0.40 ml/100 g)麻醉大鼠, 而后于颈部正中切口, 分离出右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)和颈内动脉(internal carotid artery, ICA); 结扎 ECA 远心端和 CCA, 再使用动脉夹夹闭 ICA; 距离 CCA 分叉 3 mm 处剪一个“V 型”切口, 将尼龙线栓(直径为 0.33 mm)从小口小心插入, 深度 18~20 mm, 以阻断血流, 然后常规缝合颈部创口, 预留线栓于皮肤外, 整个手术过程中注意保暖。假手术组接受与造模相同的颈动脉分离, 但不插入尼龙线栓。大鼠清醒后 2 h 采用 Longa 5 分法进行神经功能评分, 0 分为无神经损伤症状, 1 分为不能完全伸展对侧前爪, 2 分为向对侧转圈, 3 分为向对侧倾倒, 4 分为不能自发行走、意识丧失; 评分 1~3 分视为造模成功^[8]。剔除神经功能评分为 0、4 分或在手术过程中死亡的大鼠, 然后重新选取大鼠进行造模, 补充到相应组别中, 保证每组动物数量始终为 8 只。脑卒中大鼠造模成功后 24 h, 生地梓醇组大鼠腹腔注射生地梓醇溶液(9 mg/kg), 生理盐水组和假手术组大鼠均腹腔注射等量的 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 7 d。

1.5.2 评估神经功能评分 分别于造模后 1、5、8 d 评估各组大鼠神经功能评分, 采用 Longa 5 分法进行神经功能评分^[8], 评分越高表示大鼠神经功能损伤越严重。

1.5.3 评估平衡木实验评分 分别于造模后 1、5、8 d 对各组大鼠进行平衡木实验。实验方法: 将一长 1.0 m、

宽 1.5 cm 的方形平衡木一端搭在黑色方盒内, 另一端悬空。将大鼠放在平衡木的悬空端, 木条下放上软垫以保护大鼠, 防止跌伤。记录大鼠进入黑色方盒内所花时间, 根据时间长短进行 0~5 分的评分, 评分标准按 Longa 5 分法^[8]及 Bederson 5 分制法^[9]。若超过 60 s 未能到达黑色方盒, 则记录为 60 s。评分越高, 说明大鼠行为障碍越严重。

1.5.4 观察病灶区脑组织形态 于造模后第 8 天完成神经功能评分及平衡木实验后, 各组分别取 3 只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉, 处死大鼠并取脑组织进行 TTC 染色, 观察病灶区脑组织形态。

1.5.5 检测脑组织 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量 于造模后第 8 天完成神经功能评分及平衡木实验后, 各组分别取剩余的 5 只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行麻醉, 处死大鼠并取脑组织, 提取总 RNA。取 2.5 μ l 反转录产物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 以 GAPDH 为内参基因。按照试剂盒说明书建立体积为 25.0 μ l 的 PCR 反应体系, 其中 2 \times 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) Mix 12.5 μ l、7.5 μ mol/L 基因引物 2.0 μ l、反转录产物 2.5 μ l、双蒸水 8.0 μ l。PCR 步骤: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 44 个循环。VEGF 正向引物为 5'-CGACAGAAGGGGAGCAGAAA-3', 反向引物为 5'-GCTGGCTTTGCTGAGTTTG-3'; VEGFR 正向引物为 5'-AGATCCCCGACTCCCTTTGA-3', 反向引物为 5'-CACCAACTCTGAAAACGCGG-3'; Notch1 正向引物为 5'-TTGGTCCGAGGGCATCTCTA-3', 反向引物为 5'-ACAGAGCTTGGGAACGGAAG-3'; Notch4 正向引物为 5'-GTCCCCTTAAACTCGGGTGG-3', 反向引物为 5'-TCCTCTTGAGCTGCCCTAT-3'; GAPDH 正向引物为 5'-TGATGACATCAAGAAGTGGTGAAG-3', 反向引物为 5'-TCCTTGAGGCCATGTGGGCCAT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量。

1.6 统计学方法 使用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。服从正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验; 重复测量资料比较采用双因素重复测量方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠不同时间神经功能评分比较 干预方法与时间在神经功能评分上存在交互作用 ($P < 0.05$); 干预方法、时间在神经功能评分上主效应显著 ($P < 0.05$)。生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 1、5、8 d 神经功能评分高于假手术组, 差异有统计学意义

($P < 0.05$)；生地梓醇组大鼠造模后 5、8 d 神经功能评分低于生理盐水组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 5、8 d 神经功能评分分别低于本组造模后 1 d，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 8 d 神经功能评分分别低于本组造模后 5 d，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 1。

表 1 三组大鼠不同时间神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分, $n=8$)

Table 1 Comparison of neural function scores in the three groups at different time

组别	造模后 1 d	造模后 5 d	造模后 8 d
假手术组	0.45 ± 0.07	0.57 ± 0.11	0.52 ± 0.03
生理盐水组	4.36 ± 0.11 ^a	3.22 ± 0.04 ^{ac}	2.08 ± 0.06 ^{acd}
生地梓醇组	4.23 ± 0.04 ^a	2.55 ± 0.55 ^{abc}	1.38 ± 0.02 ^{abcd}
F 值	$F_{交互}=1\ 982.53, F_{组间}=17\ 562.96, F_{时间}=6\ 833.08$		
P 值	$P_{交互} < 0.001, P_{组间} < 0.001, P_{时间} < 0.001$		

注：^a表示与假手术组比较， $P < 0.05$ ；^b表示与生理盐水组比较， $P < 0.05$ ；^c表示与本组造模后 1 d 比较， $P < 0.05$ ；^d表示与本组造模后 5 d 比较， $P < 0.05$

2.2 三组大鼠不同时间平衡木实验评分比较 干预方法与时间在平衡木实验评分上存在交互作用 ($P < 0.05$)；干预方法、时间在平衡木实验评分上主效应显著 ($P < 0.05$)。生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 1、5、8 d 平衡木实验评分高于假手术组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；生地梓醇组大鼠造模后 5、8 d 平衡木实验评分低于生理盐水组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 5、8 d 平衡木实验评分分别低于本组造模后 1 d，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后 8 d 平衡木实验评分分别低于本组造模后 5 d，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 2。

2.3 三组大鼠病灶区脑组织形态 假手术组大鼠无脑梗死现象，见图 1A；生理盐水组大鼠仍有脑梗死现象，见图 1B；生地梓醇组大鼠仍存在脑梗死现象，但梗死

范围较生理盐水组减小，脑组织缺血再灌注恢复及组织形成情况明显优于生理盐水组，见图 1C。

2.4 三组大鼠脑组织 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量比较 三组大鼠脑组织 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。生地梓醇组大鼠脑组织 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量高于假手术组、生理盐水组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 3。

表 2 三组大鼠不同时间平衡木实验评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分, $n=8$)

Table 2 Comparison of balance beam test scores in the three groups at different time

组别	造模后 1 d	造模后 5 d	造模后 8 d
假手术组	0.12 ± 0.04	0.14 ± 0.07	0.12 ± 0.04
生理盐水组	4.35 ± 0.72 ^a	2.25 ± 0.46 ^{ac}	1.13 ± 0.64 ^{acd}
生地梓醇组	4.38 ± 0.11 ^a	1.38 ± 0.52 ^{abc}	0.63 ± 0.52 ^{abcd}
F 值	$F_{交互}=417.57, F_{组间}=2\ 971.73, F_{时间}=1\ 608.87$		
P 值	$P_{交互} < 0.001, P_{组间} < 0.001, P_{时间} < 0.001$		

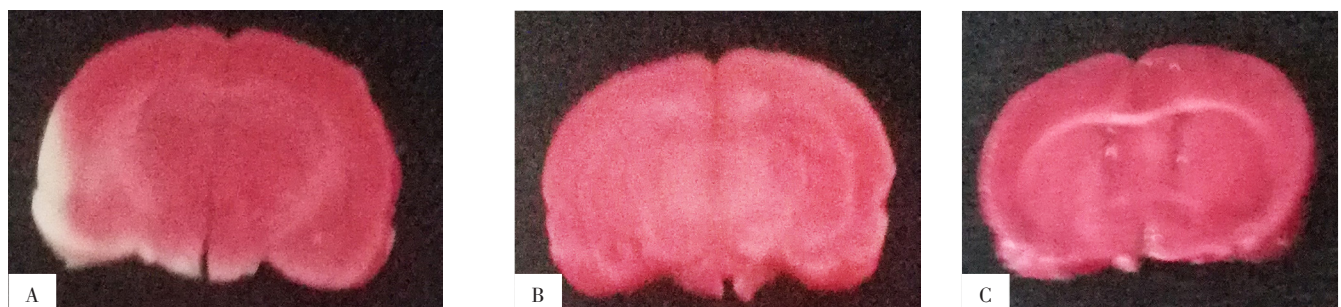
注：^a表示与假手术组比较， $P < 0.05$ ；^b表示与生理盐水组比较， $P < 0.05$ ；^c表示与本组造模后 1 d 比较， $P < 0.05$ ；^d表示与本组造模后 5 d 比较， $P < 0.05$

表 3 三组大鼠脑组织 VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Comparison of the relative expression of VEGF, VEGFR, Notch1, Notch4 mRNA in the brain tissue of rats in the three groups

组别	VEGF mRNA	VEGFR mRNA	Notch1 mRNA	Notch4 mRNA
假手术组	0.96 ± 0.18	0.91 ± 0.20	0.92 ± 0.26	1.18 ± 0.38
生理盐水组	0.99 ± 0.08	1.00 ± 0.12	1.04 ± 0.11	1.04 ± 0.10
生地梓醇组	2.28 ± 0.14 ^{ab}	3.63 ± 0.18 ^{ab}	2.98 ± 0.22 ^{ab}	3.52 ± 0.25 ^{ab}
F 值	145.865	412.540	156.550	134.228
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：^a表示与假手术组比较， $P < 0.05$ ；^b表示与生理盐水组比较， $P < 0.05$ ；VEGF= 血管内皮生长因子，VEGFR= 血管内皮生长因子受体



注：A 为假手术组，B 为生理盐水组，C 为生地梓醇组

图 1 三组大鼠病灶区脑组织形态 (TTC 染色)

Figure 1 Brain tissue morphology of lesion area in the three groups

3 讨论

生地是治疗中风经典方中的常用药,《中药学》将其列为“清热凉血”药,载其具有“清热凉血、养阴生津”之效^[10]。《神农本草经》《药性论》等载其有“逐血痹”“通血脉”“活血生新”之效,《本草正义》称其“非谓地黄滋补之药,竟能消积通痹也。生者尤良,则采取鲜新,其力尤足耳”。上述文献中均强调地黄的“生用”,当成熟地时便不再具有活血生新之效。梓醇遇热不稳定,生地炮制成熟的过程也正是梓醇含量递减至基本消失,而糖类递增的过程^[11-12]。基于此,本项目组认为:梓醇作为生地中的标志性成分,有可能是生地发挥“活血生新”功效的主要原因,其中“生新”主要体现在“生新脉”,即“促进血管新生、成熟、微循环重建”等^[5]。在脑梗死的临床治疗过程中,缺血区血管重建与血液再灌注是治疗的重点。为恢复血液供应,除溶栓、开放血管旁路外,促进微血管网的形成是修复半暗带神经元和重塑神经功能的另一条重要途径。血管新生到功能血管网的形成包括细胞外基质降解、内皮细胞芽生、尖端细胞迁移、干细胞增殖等^[13]。VEGF是内皮细胞特异性促有丝分裂原和趋化因子,作用于血管内皮细胞表面的相应受体,从而激活相关的缺血缺氧转导通路,促进新生血管形成。本研究组前期研究表明,地黄梓醇可以作用于VEGF及其受体,从而发挥促脑微血管生成的作用^[5]。Notch信号通路对促进血管新生及神经功能的恢复十分重要^[14]。Notch信号通路可由VEGF激活,亦可刺激VEGF的表达,当这种平衡调节被打破后,就会导致无功能的血管生成、血管渗漏或血管生成过度。本研究通过观察生地梓醇作用于VEGF及其受体后,激活下游Notch信号通路及其受体的变化,探讨VEGF与Notch信号通路之间的互相调控作用,VEGF是Notch信号通路的正向调控基因,而Notch信号通路对VEGF具有负反馈调控作用,从而诱导新生血管进化为功能成熟和管腔完整的成熟血管,最终形成具有完整功能的血管网^[15-16]。脑血管网络的重建和再通与神经结构网络的重构在结构和功能上相偶联,微血管新生与血管网络重建是实现脑缺血后神经功能重塑的关键。

本研究结果显示,生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后1、5、8d神经功能评分、平衡木实验评分高于假手术组,生地梓醇组大鼠造模后5、8d神经功能评分、平衡木实验评分低于生理盐水组;生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后5、8d神经功能评分、平衡木实验评分分别低于本组造模后1d,生理盐水组、生地梓醇组大鼠造模后8d神经功能评分、平衡木实验评分分别低于本组造模后5d;从行为学层面体现了生地梓醇的神经功能重塑作用。TTC染色结果显示,假手术组大鼠无脑梗死现象;生理盐水组大鼠仍有脑梗死现象;生地梓

醇组大鼠仍存在脑梗死现象,但梗死范围较生理盐水组减小,脑组织缺血再灌注恢复及组织形成情况明显优于生理盐水组;从组织形态学层面体现了生地梓醇改善缺血区再灌注与脑组织保护作用。本研究结果还显示,生地梓醇组大鼠脑组织VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4 mRNA相对表达量高于假手术组、生理盐水组,表明生地梓醇可上调VEGF、VEGFR、Notch1、Notch4表达,激活Notch信号通路,调控血管新生与成熟,促进功能血管生成,进而实现神经功能重塑。有研究表明,生地梓醇通过上调VEGF来发挥促血管新生作用的同时,伴有组织水肿的加重^[17]。而本研究发现生地梓醇能够实现VEGF/Notch信号通路的双调控,形成功能稳定的血管网,且并未发现大鼠脑组织水肿加重。因此,VEGF与Notch信号通路的动态平衡是微血管形成和稳定的关键。

本实验大鼠样本量较小,结果可能存在偏倚,仍需要大样本量的研究进一步证实。对于生地梓醇在临床中的促血管新生与神经重塑作用,有待于进一步探讨。

综上所述,生地梓醇可通过调控VEGF及VEGFR激活Notch信号通路来促进血管新生与神经功能重塑,且不增加组织水肿。其促血管新生作用可视为生地“生新脉”功效的微观体现,值得进一步研究及临床转化。

作者贡献:孙立平、周霞进行文章的构思与设计;刘炬、刘伟进行研究的实施与可行性分析;郭炳彬进行数据收集、整理;王祥煜进行统计学处理;孙立平、张佳乐进行结果的分析与解释;孙立平撰写论文;周霞进行论文的修订,负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 倪小佳,陈耀龙,蔡业峰.中西医结合脑卒中循证实践指南(2019)[J].中国循证医学杂志,2020,20(8):901-912.
NI X J, CHEN Y L, CAI Y F. Evidence-based practice guideline on integrative medicine for stroke 2019 [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2020, 20(8): 901-912.
- [2] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会.中国急性缺血性脑卒中中西医结合急诊诊治专家共识[J].中华危重病急救医学,2018,30(3):193-197. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.03.001.
- [3] 潘之光,毛颖,孙凤艳.血管内皮生长因子促损伤脑内神经血管单元的重构[J].生理学报,2017,69(1):96-108. DOI: 10.13294/j.aps.2016.0106.
PAN Z G, MAO Y, SUN F Y. VEGF enhances reconstruction of neurovascular units in the brain after injury [J]. Acta Physiologica Sinica, 2017, 69(1): 96-108. DOI: 10.13294/j.aps.2016.0106.
- [4] XIE Q, CHENG Z W, CHEN X C, et al. The role of Notch signalling in ovarian angiogenesis [J]. J Ovarian Res, 2017, 10(1): 13. DOI: 10.1186/s13048-017-0308-5.
- [5] 周霞,张文倩,刘炬,等.从血管内皮生长因子及其受体调控

- 角度探讨地黄梓醇促血管新生作用及分子机制研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2020, 28 (2): 64-68. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2020.01.y04.
- ZHOU X, ZHANG W Q, LIU J, et al. Neovascularization promotion effect and molecular mechanism of rehmannia catalpol in terms of regulation of VEGF and its receptors [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2020, 28 (2): 64-68. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2020.01.y04.
- [6] 周霞, 刘炬, 李丽, 等. 地黄活血生新功效考辨 [J]. 中医文献杂志, 2018, 36 (2): 22-25. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4737.2018.02.008.
- ZHOU X, LIU J, LI L, et al. Textual research on effects of Di Huang (rehmannia glutinosa) by refreshing blood with renewing body [J]. Journal of Traditional Chinese Medicinal Literature, 2018, 36 (2): 22-25. DOI: 10.3969/j.issn.1006-4737.2018.02.008.
- [7] LIU Y R, LI P W, SUO J J, et al. Catalpol provides protective effects against cerebral ischaemia/reperfusion injury in gerbils [J]. J Pharm Pharmacol, 2014, 66 (9): 1265-1270. DOI: 10.1111/jphp.12261.
- [8] 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. DOI: 10.1161/01.str.20.1.84.
- [9] 翟志永. 强制性运动疗法对大鼠脑缺血再灌注后内源性血管再生和神经再生的影响及其与 nogo-A-RhoA-ROCK 信号通路的关系 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- [10] 高学敏. 中药学 [M]. 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2017.
- [11] 邢立志, 暴春艳. 地黄加工过程中梓醇含量稳定性分析 [J]. 中国民族民间医药, 2009, 18 (4): 4. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8517.2009.04.003.
- [12] 王宏洁, 金亚红, 李鹏跃, 等. 鲜、生、熟地黄药材中 3 种活性成分含量的比较 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (15): 1923-1925.
- [13] RUST R, GANTNER C, SCHWAB M E. Pro- and antiangiogenic therapies: current status and clinical implications [J]. FASEB J, 2019, 33 (1): 34-48. DOI: 10.1096/fj.201800640RR.
- [14] PANNEERSELVAN N, RAGUNATHAN M. Targeting expression of adenosine receptors during hypoxia induced angiogenesis—a study using zebrafish model [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99: 101-112. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.032.
- [15] RUST R, GRÖNNERT L, WEBER R Z, et al. Refueling the ischemic CNS: guidance molecules for vascular repair [J]. Trends Neurosci, 2019, 42 (9): 644-656. DOI: 10.1016/j.tins.2019.05.006.
- [16] 王美玲, 刘华绪. HIF-VEGF-notch 信号通路在血管生成中的作用 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2021, 37 (5): 332-336. DOI: 10.12144/zgmfskin202105332.
- WANG M L, LIU H X. Role of HIF-VEGF-Notch signaling pathway in angiogenesis [J]. China journal of Leprosy and Skin Diseases, 2021, 37 (5): 332-336. DOI: 10.12144/zgmfskin202105332.
- [17] 祝慧凤, 万东, 周佳丽, 等. 梓醇促局灶性脑缺血大鼠血管新生观察 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (2): 232-236.
- (收稿日期: 2021-08-23; 修回日期: 2021-10-18)
(本文编辑: 崔丽红)

(上接第 51 页)

- [11] KUSIRISIN P, CHATTIPAKORN S C, CHATTIPAKORN N. Contrast-induced nephropathy and oxidative stress: mechanistic insights for better interventional approaches [J]. J Transl Med, 2020, 18 (1): 400. DOI: 10.1186/s12967-020-02574-8.
- [12] YI B, MO S, JIANG Y, et al. Efficacy and safety of nicorandil in preventing contrast-induced nephropathy after elective percutaneous coronary intervention: a pooled analysis of 1229 patients [J]. J Interv Cardiol, 2020, 2020: 4527816. DOI: 10.1155/2020/4527816.
- [13] SHIMIZU S, SAITO M, KINOSHITA Y, et al. Nicorandil ameliorates ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney [J]. Br J Pharmacol, 2011, 163 (2): 272-282. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01231.x.
- [14] NAWA T, NISHIGAKI K, KINOMURA Y, et al. Continuous intravenous infusion of nicorandil for 4 hours before and 24 hours after percutaneous coronary intervention protects against contrast-induced nephropathy in patients with poor renal function [J]. Int J Cardiol, 2015, 195: 228-234. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.05.078.
- [15] SÁNCHEZ-DUARTE S, MÁRQUEZ-GAMIÑO S, MONTOYA-PÉREZ R, et al. Nicorandil decreases oxidative stress in slow- and fast-twitch muscle fibers of diabetic rats by improving the glutathione system functioning [J]. J Diabetes Investig, 2021, 12 (7): 1152-1161. DOI: 10.1111/jdi.13513.
- [16] JIANG X S, WU D, JIANG Z C, et al. Protective effect of nicorandil on cardiac microvascular injury: role of mitochondrial integrity [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 4665632. DOI: 10.1155/2021/4665632.
- [17] ZHANG P, LI W Y, YANG S C, et al. Preventive effects of nicorandil against contrast-induced nephropathy in patients with moderate renal insufficiency undergoing percutaneous coronary intervention [J]. Angiology, 2020, 71 (2): 183-188. DOI: 10.1177/0003319719841733.
- [18] LENZ M, KAUN C, KRYCHTIUK K A, et al. Effects of nicorandil on inflammation, apoptosis and atherosclerotic plaque progression [J]. Biomedicines, 2021, 9 (2): 120. DOI: 10.3390/biomedicines9020120.
- [19] 张鹏, 张雪, 杨世诚, 等. 尼可地尔对经皮冠状动脉介入治疗中肾功能不全患者对比剂肾病的预防作用 [J]. 中国新药与临床杂志, 2020, 39 (6): 357-362. DOI: 10.14109/j.cnki.xyyle.2020.06.08.
- (收稿日期: 2021-08-16; 修回日期: 2021-10-12)
(本文编辑: 崔丽红)