

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.09.002

◇ 药学研究 ◇

丁苯酞对阿尔茨海默病模型大鼠海马 CA1 区 Wnt3a 及 β -连环蛋白表达的影响

邓春颖¹, 李海滨², 毛文静¹, 李世英¹, 刘斌¹作者单位:¹华北理工大学附属医院神经内科, 河北 唐山 063000;²遵化市人民医院心内科, 河北 遵化 064200

基金项目: 河北省重点研发计划自筹项目(172777151); 华北理工大学科学研究基金项目(Z201734)

摘要:目的 观察丁苯酞(dl-3-n-butylphthalidide)软胶囊对阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)模型大鼠海马 CA1 区 Wnt3a 蛋白及 β -连环蛋白(β -catenin)表达的影响, 探寻丁苯酞发挥脑保护作用的可能机制。方法 将 72 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、AD 模型组(AD 组)、丁苯酞治疗组(丁苯酞组)。向双侧海马区注射 β -淀粉样蛋白 1-42(beta-amyloid people 1-42, A β 1-42)制作 AD 模型, Sham 组注射 5 μ L 0.9% 氯化钠溶液。造模成功后 4 周, 丁苯酞组给予丁苯酞与食用油混合后制成的丁苯酞混合溶液灌胃; Sham 组和 AD 组采用同等剂量的食用油进行灌胃。采用免疫组织化学法和蛋白质印迹法分别于给药后 1、2、4 和 8 周检测海马 CA1 区 Wnt3a 及 β -catenin 表达情况。结果 蛋白质印迹法表明与 Sham 组给药后 1、2、4 和 8 周[(3 845.25 $\pm$ 52.35), (4 385.06 $\pm$ 108.85), (9 392.19 $\pm$ 81.07), (6 833.15 $\pm$ 76.03)]相比, AD 组各时间点 Wnt3a 蛋白表达量增多[(5 595.54 $\pm$ 94.60), (7 223.89 $\pm$ 86.73), (13 671.83 $\pm$ 312.38), (11 641.04 $\pm$ 203.65)], 均 $P < 0.01$; 各时间点 β -catenin 蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 AD 组[(4 132.90 $\pm$ 79.63), (4 758.74 $\pm$ 155.14), (5 188.92 $\pm$ 111.82), (5 912.07 $\pm$ 83.26)]相比, 丁苯酞组各时间点 Wnt3a 蛋白[(6 261.26 $\pm$ 206.51), (8 427.83 $\pm$ 293.61), (16 469.74 $\pm$ 204.55), (13 438.21 $\pm$ 12 399.19)], β -catenin 蛋白表达量明显增多[(5 569.53 $\pm$ 96.52), (7 127.78 $\pm$ 69.64), (11 454.94 $\pm$ 396.43), (9 937.91 $\pm$ 157.87)], 均 $P < 0.01$ 。免疫组织化学法和蛋白质印迹法检测结果相同。结论 丁苯酞可通过上调 Wnt3a 及 β -catenin 蛋白的表达, 发挥对 AD 模型大鼠的脑保护作用。

关键词: 阿尔茨海默病; 海马; 丁苯酞; Wnt3a 蛋白; β -连环蛋白; 大鼠, Sprague-Dawley

The effects of dl-3-n-butylphthalidide on the expression of Wnt3a and β -catenin in CA1 region of hippocampus of rats with Alzheimer disease

DENG Chunying¹, LI Haibin², MAO Wenjing¹, LI Shiying¹, LIU Bin¹

Author Affiliations: ¹Neurology, The Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; ²Internal Medicine-Cardiovascular Department, People's Hospital of Zunhua, Zunhua, Hebei 064200, China

Abstract: Objective Assessed the effects of DL-3-n-butylphthalidide on the expression of Wnt3a and β -catenin in CA1 region of hippocampus of rats with Alzheimer disease, explored the mechanism of brain protection by butylphthalide. **Methods** 72 SD rats were randomly divided into the sham-operation group, the Alzheimer disease model group (AD group) and the NBP treated group (NBP group). The Alzheimer disease rat model was prepared by injecting beta-amyloid people 1-42 into bilateral hippocampus. Four weeks after the model was successfully established, the NBP group was given the mixture solution of NBP and edible oil by gavage, while the Sham group and AD group were given the same dose of edible oil by gavage. The expressions of Wnt3a and β -catenin in the hippocampal CA1 region were detected at 1, 2, 4 and 8 weeks after administration by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Western blotting showed that compared with the results of 1, 2, 4, and 8 weeks after taking medicines in the sham-operation group which were [(3 845.25 $\pm$ 52.35), (4 385.06 $\pm$ 108.85), (9 392.19 $\pm$ 81.07), (6 833.15 $\pm$ 76.03)], the expression of Wnt3a protein increased in AD group at each time points [(5 595.54 $\pm$ 94.60), (7 223.89 $\pm$ 86.73), (13 671.83 $\pm$ 312.38), (11 641.04 $\pm$ 203.65)], the data differences were statistically significant ($P < 0.01$). The data difference of the expression of β -catenin in the two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the AD group [(4 132.90 $\pm$ 79.63), (4 758.74 $\pm$ 155.14), (5 188.92 $\pm$ 111.82), (5 912.07 $\pm$ 83.26)], the expression of Wnt3a protein [(6 261.26 $\pm$ 206.51), (8 427.83 $\pm$ 293.61), (16 469.74 $\pm$ 204.55), (13 438.21 $\pm$ 12 399.19)] and β -catenin [(5 569.53 $\pm$ 96.52), (7 127.78 $\pm$ 69.64), (11 454.94 $\pm$ 396.43), (9 937.91 $\pm$ 157.87)] both increased in NBP group at each time points, the data differences were statistically significant (all $P < 0.01$). The results of immunohistochemistry and western blotting were the same. **Conclusion** NBP can protect the brain of AD model rats by up-regulating the ex-

pression of Wnt3a and-catenin protein.

Key words: Alzheimer disease; Hippocampus; DL-3-n-butylphthalidide; Wnt3a protein; β -Catenin; Rats, Sprague-Dawley

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)目前被认为是导致老年痴呆的主要原因,其发病率不断上升,不仅严重影响病人的生活质量,对社会经济亦造成不良影响。目前关于该病发病机制尚不明确^[1],亦没有特效治疗方法及药物。丁苯酞(dl-3-n-butylphthalidide)是从芹菜籽中提取出来的小分子物质,是我国自主研发的治疗缺血性脑血管病的新药。丁苯酞通过拮抗炎症反应、抑制神经元凋亡等起到保护脑细胞作用^[2]。而体内细胞增殖、分化、凋亡等多种程序受 Wnt 信号通路控制^[3]。研究表明,异常磷酸化的 β -连环蛋白(β -catenin)在 Wnt 信号通路未启动时明显升高,导致 β 淀粉样蛋白(A β)对脑神经元毒性作用加大,而 A β 大量沉积即可诱发 AD^[4-5]。Wnt 通路发挥抗凋亡作用的主要效应因子是 β -catenin^[6]。而 Wnt3a 是 Wnt 信号通路的启动因子,观察其浓度变化,可了解 Wnt 信号通路激活情况。本研究于 2017 年 12 月至 2018 年 12 月通过观察丁苯酞对 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白表达的影响,为 AD 治疗寻找一个新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2~3 月龄健康清洁级雄性 SD 大鼠 72 只,体质量范围为 250~280 g,实验动物购于北京华阜康生物科技有限公司提供,生产许可证号 SCXK[京]2014-0010。将实验动物自由进食喂养于华北理工大学屏障环境动物实验室,室温控制在 24~26℃,相对湿度 45%~55%,12 h 明暗交替光照,实验前适应喂养 1 周。

1.2 药物与试剂 丁苯酞软胶囊(购于石药集团恩必普药业有限公司,国药准字 H20050299,批号 121101,规格 0.1 克/粒);兔抗大鼠 Wnt3a 多克隆抗体、兔抗大鼠 β -catenin 多克隆抗体(均购于北京博奥森生物公司);兔二步法免疫组织化学试剂盒、DAB 显色液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)低分子质量标准蛋白(均购于北京中杉生物有限公司)。

1.3 主要仪器 德国 LEICA 公司的石蜡组织切片机;日本 HITACHI 公司的透射电子镜;安徽淮北正华生物仪器设备有限公司的脑立体定位仪;淮北正华生物仪器设备有限公司的 Morris 水迷宫;张家港市航天医疗电器有限公司的电凝仪。

1.4 方法

1.4.1 动物分组 采用随机数字表法将实验大鼠

分为假手术组(Sham 组)、AD 模型组(AD 组)、丁苯酞治疗组(丁苯酞组),造模成功后,在各组内采用随机数字表法分为造模后 1、2、4 和 8 周 4 个亚组。

1.4.2 模型制备 提前制备浓度为 1 μ g/ μ L 的 β -淀粉样蛋白 1-42(beta-amyloid peptide 1-42, A β 1-42)溶液,并制成凝聚状态。采用 Morris 水迷宫筛选大鼠,保留合格实验动物。采用腹腔注射方式麻醉大鼠(10%水合氯醛,350 mg/kg),麻醉后将大鼠固定于脑立体定位仪上,选择双侧海马 CA1 区为注射区,以前囟为基准点,向后 4.5 mm,中线旁开 2 mm 处,开颅,暴露大鼠硬脑膜,将微量注射器与脑表面垂直,缓慢进针,深度 2 mm,AD 组及丁苯酞组均缓慢注入 5 μ L 提前制备好的 A β 溶液,留针 10 min 后撤出针头,用骨蜡封闭骨质创口,缝合并消毒切口。Sham 组注射 5 μ L 0.9%氯化钠溶液。

1.4.3 给药方法 造模 4 周时进行 Morris 水迷宫实验检测各组大鼠学习记忆能力,造模前后比较差异有统计学意义视为模型成功。丁苯酞组给予丁苯酞混合溶液(丁苯酞与食用油混合,浓度 8 mg/mL,剂量 1 mL/100 g)进行灌胃,每日 2 次;Sham 组、AD 组给予同等剂量的食用油灌胃,每日 2 次,连续给药 1、2、4、8 周。

1.4.4 免疫组织化学检测 将大鼠喂养至各个时相点,腹腔注射麻醉(10%水合氯醛,350 mg/kg)大鼠,麻醉后暴露心脏,由心尖插入灌注针并固定至升主动脉处,剪开右心耳快速灌注 0.9%氯化钠溶液,冲洗血管内血渍,至肝脏变白后,用 4%多聚甲醛滴注至大鼠僵硬后,断头取脑,分离脑组织,脑组织浸泡于 4%多聚甲醛-磷酸缓冲盐溶液(PBS)固定过夜,次日用石蜡包埋含海马的脑组织,制备切片备用。取已经制备好的脑组织切片标本,加封闭液后分别滴加一抗,抗 Wnt3a 抗体(1:400)、抗 β -catenin 蛋白(1:300),4℃过夜,滴加二抗孵育后进行 DAB 显色。参照试剂说明书进行操作。免疫组织化学阳性标准为镜下可见细胞质、细胞核呈棕褐色。采集操作后的组织切片图像(OLYMPUS 摄像显微镜,400 $\times$),采用随机数字表法观察不重叠的各组大鼠海马 CA1 区 6 个视野,导入 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统进行分析。

1.4.5 蛋白质印迹法检测 大鼠喂养至各个时相点后,采用腹腔注射麻醉(10%水合氯醛,350 mg/kg)大鼠,于冰台上直接断头,迅速取出脑组织,用冷

的PBS漂洗后,分离出海马组织。将取出的组织放入15 mL离心管中,加组织裂解液,充分研磨后于浆器中裂解40 min,裂解后离心取上清液,储存于-80 ℃超低温冰箱备用。实验前定量分装蛋白,将其浓度调至800 μg/mL,加等体积上样缓冲液后沸水中煮5 min。冷却至室温,放入4 ℃冰箱备用。实验检测步骤:分别取各组蛋白样品(50 μg),置于10% SDS-PAGE,以湿转法电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,室温封闭2 h。分别加入一抗,抗Wnt3a抗体(1:500)、抗β-catenin蛋白(1:500),置于4 ℃冰箱孵育过夜,次日漂洗后加入羊抗兔二抗(1:2 000),置于37 ℃反应2 h,PBS洗膜3次加5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐/四唑淡蓝(BCIP/NBT)显色数分钟,双蒸馏水终止显色,Image J软件进行灰度值分析。

1.5 统计学方法 应用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马CA1区Wnt3a、β-catenin免疫组织化学检测结果 在Sham组中,Wnt3a、β-catenin蛋白在实验大鼠各时间点海马CA1区可有少量表达。在AD组中,实验大鼠各时间点表达增多,1周时表达量增多,2周时表达继续增多,4周时最高,8周时稍有下降但仍有较多表达。与Sham组相比,Wnt3a蛋白在AD组实验大鼠各时间点表达均增多($P < 0.05$);β-catenin蛋白在AD组大鼠各时间点表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与AD组比较,Wnt3a、β-catenin蛋白在丁苯酞组实验大鼠各时间点表达均明显增加($P < 0.01$)。见表1,2和图1,2。

表1 各组大鼠海马CA1区Wnt3a免疫组织化学检测结果比较/(个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	1周	2周	4周	8周
Sham组	6	8.17±1.34	8.83±1.86	10.17±1.07	11.67±1.25
AD组	6	10.50±0.96 ^a	12.17±1.86 ^a	16.67±0.94 ^a	14.83±1.46 ^a
丁苯酞组	6	12.33±1.25 ^b	15.17±1.21 ^b	19.33±1.60 ^b	17.17±1.77 ^b
<i>F</i> 值		15.29	17.89	72.56	16.73
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与Sham组比较,^a $P < 0.01$;与阿尔茨海默病(AD)组比较,^b $P < 0.01$

表2 各组大鼠海马CA1区β-连环蛋白(β-catenin)免疫组织化学检测结果比较/(个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	1周	2周	4周	8周
Sham组	6	8.83±1.67	9.17±1.77	9.50±1.98	10.67±1.11
AD组	6	9.00±1.53	9.33±1.97	9.83±1.67	11.17±1.34
丁苯酞组	6	26.83±1.57 ^a	31.5±2.22 ^a	36.67±2.05 ^a	34.17±2.11 ^a
<i>F</i> 值		210.89	207.24	333.08	360.50
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与阿尔茨海默病(AD)组比较,^a $P < 0.01$

2.2 各组大鼠海马CA1区Wnt3a、β-catenin蛋白质印迹法检测结果 各组大鼠海马CA1区Wnt3a、β-catenin蛋白质印迹法检测结果同免疫组织化学检测结果,见表3,4和图3。

3 讨论

AD是老年性痴呆中的代表疾病,其发生发展缓慢,且与年龄相关。AD主要临床表现是记忆力减退、进行性认知功能障碍、理解力及判断力衰退等,甚至出现精神行为异常。老年斑形成是AD的主要病理改变,其主要成分为Aβ聚集、Tau蛋白相关的神经元纤维缠结(NFTs)、神经元减少等。Aβ学说认为AD病人脑中堆积的过量Aβ,会对神经元产生毒性作用,并能引起脑部炎症及细胞凋亡^[7]。

表3 各组大鼠海马CA1区Wnt3a相对表达量蛋白质印迹法结果比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	1周	2周	4周	8周
Sham组	6	3 845.25±52.35	4 385.06±108.85	9 392.19±81.07	6 833.15±76.03
AD组	6	5 595.54±94.60 ^a	7 223.89±86.73 ^a	13 671.83±312.38 ^a	11 641.04±203.65 ^a
丁苯酞组	6	6 261.26±206.51 ^b	8 427.83±293.61 ^b	16 469.74±204.55 ^b	13 438.21±12 399.19 ^b
<i>F</i> 值		429.92	612.17	1 305.47	2 802.06
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与Sham组比较,^a $P < 0.01$;与阿尔茨海默病(AD)组比较,^b $P < 0.01$

表4 各组大鼠海马CA1区β-连环蛋白(β-catenin)相对表达量蛋白质印迹法结果比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	1周	2周	4周	8周
Sham组	6	4 132.90±79.63	4 758.74±155.14	5 188.92±111.82	5 912.07±83.26
AD组	6	4 125.98±67.71	4 924.91±91.13	5 309.92±99.01	5 942.20±102.35
丁苯酞组	6	5 569.53±96.52 ^a	7 127.78±69.64 ^a	11 454.94±396.43 ^a	9 937.91±157.87 ^a
<i>F</i> 值		512.26	704.73	1 073.16	1 900.16
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与阿尔茨海默病(AD)组比较,^a $P < 0.01$

发现AD发病机制,并对其进行干预,可能达到改善病情的作用。Wnt/ β -catenin信号通路被公认为与中枢神经系统发生、发展关系密切。Wnt/ β -catenin信号通路对神经干细胞的增殖、分化、对神经元轴突生长及突触发育起调节作用,亦参与凋亡等过程,对中枢神经系统变性起到保护作用^[8-10]。Wnt3a是Wnt信号通路启动因子,其表达量增加能促进细胞分裂、分化、增殖^[11]。Wnt3a对海马的增殖及分化也很重要,敲除Wnt3a基因的小鼠,海马前体细胞增殖受限,致海马功能受损^[12]。 β -catenin是位于Wnt信号通路下游中的关键因子,主要位于细胞膜,少量游离于细胞质中,抑制 β -catenin磷酸化,胞质中其含量增加,对细胞核内靶基因表达起调节作用^[13],参与细胞生长、发育、分化和凋亡等过程。多项研究发现Wnt3a、 β -catenin在AD发病过程中减少,表明此机制参与发病过程。本实验免疫组织化学和蛋白质印迹法结果显示,AD模型组各时间点大鼠海马CA1区Wnt3a、 β -catenin蛋白表达增多,1周时表达增多,2周时表达继续增多,4周时表达量最高,8周时稍有下降但仍处于较高水平,说明Wnt/ β -catenin信号通路在AD的演变过程中起着重要作用。

丁苯酞是我国自主研发的新药,广泛应用于临床,用于治疗缺血性脑血管。而丁苯酞除了具有改善循环、抗自由基等作用外,还具有抗氧化、抑制炎症、抗凋亡等作用^[14-16]。丁苯酞在应用于急性缺血性脑卒中研究中发现丁苯酞能够改善病人认知功能^[17-19]。王伟等^[20]研究发现丁苯酞对海马神经元的保护作用可能是通过降低5-羟色胺的表达来实现的。但国内外关于通过干预Wnt/ β -catenin从而达到脑保护作用的研究较少。本研究免疫组织化学和蛋白质印迹法检测结果均表明,丁苯酞治疗组大鼠海马CA1区Wnt3a和 β -catenin蛋白表达明显增加,说明丁苯酞可通过上调Wnt/ β -catenin途径中启动因子Wnt3a和下游因子 β -catenin的表达,发挥对AD的脑保护作用,在给药4周时作用达到高峰,这为AD的治疗提供了新的思路。

综上,丁苯酞通过上调Wnt3a及 β -catenin的表达,发挥对AD的治疗作用,其与用药时间有关。本研究为AD的治疗提供新线索。

(本文图1~3见插图9-1)

参考文献

- [1] PENG D, PAN X, CUI J, et al. Hyperphosphorylation of tau protein in hippocampus of central insulin-resistant rats is associated with cognitive impairment [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32 (5): 1417-1425.
- [2] 赵秀芹, 邓春颖, 李世英, 等. 丁苯酞注射液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2016, 54(4): 25-31.
- [3] ALVES DOS SANTOS MT, SMIDT MP. En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development [J]. *Neural Dev*, 2011, 6: 23.
- [4] GHANEVATI M, MILLER CA. Phospho-beta-catenin accumulation in Alzheimer's disease and in aggresomes attributable to proteasome dysfunction [J]. *J Mol Neurosci*, 2005, 25(1): 79-94.
- [5] 霍江涛, 张小乔, 严洁, 等. Wnt信号传导通路在阿尔茨海默病防治中的作用[J]. *中国临床研究*, 2015, 28(6): 709-711, 716.
- [6] 刘斌, 董晓柳, 张文彦, 等. 急性脑缺血再灌注大鼠海马CA1区细胞凋亡与 β -catenin、GSK-3 β 蛋白表达的关系[J]. *山东医药*, 2012, 52(17): 28-31.
- [7] IACCARINO L, TAMMEWAR G, AYAKTA N, et al. Local and distant relationships between amyloid, tau and neurodegeneration in Alzheimer's Disease [J]. *Neuroimage Clin*, 2018, 17: 452-464.
- [8] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ β -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [9] MOHAMMED MK, SHAO C, WANG J, et al. Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance [J]. *Genes Dis*, 2016, 3(1): 11-40.
- [10] XU J, HUAI Y, MENG N, et al. L-3-n-Butylphthalide activates Akt/mTOR signaling, inhibits neuronal apoptosis and autophagy and improves cognitive impairment in mice with repeated cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42 (10): 2968-2981.
- [11] GJERTSSON I, LAURIE KL, DEVITT J, et al. Tolerance induction using lentiviral gene delivery delays onset and severity of collagen II arthritis [J]. *Mol Ther*, 2009, 17(4): 632-640.
- [12] LIE DC, COLAMARINO SA, SONG HJ, et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis [J]. *Nature*, 2005, 437 (7063): 1370-1375.
- [13] TOLEDO EM, COLOMBRES M, INESTROSA NC. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 86(3): 281-296.
- [14] 刘倩, 冯友繁, 葛力. 丁苯酞治疗血管性痴呆的临床疗效及其对氧化应激反应的影响[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25 (4): 146-148.
- [15] 毛西京, 罗翔丹, 于挺敏, 等. 丁苯酞对血管性痴呆大鼠海马组织TNF- α 和IL-1 β 表达的影响[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(3): 12-15.
- [16] XIONG Z, LU W, ZHU L, et al. DL-3-n-Butylphthalide treatment enhances hemodynamics and ameliorates memory deficits in rats with chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 238.
- [17] 曾素琴, 陈静, 吴承奇, 等. 丁苯酞注射液对急性缺血性脑卒中患者认知功能的影响[J]. *中国医药导刊*, 2016, 18(1): 44-45, 47.
- [18] 郭刚, 战丽萍, 安明顺, 等. 脑梗死急性期使用丁苯酞注射液对患者脑血流灌注和认知功能的影响[J]. *中国卒中杂志*, 2018, 13(9): 938-943.
- [19] LIUXL, WANGG, SONGW, et al. microRNA-137 promotes endothelial progenitor cell proliferation and angiogenesis in cerebral ischemic stroke mice by targeting NR4A2 through the Notch pathway [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(7): 5255-5266.
- [20] 王伟, 李富强, 郑小影, 等. 丁苯酞预处理对缺血再灌注损伤后大鼠海马神经元的保护作用[J]. *临床神经病学杂志*, 2015, 28 (1): 42-45.

(收稿日期: 2019-04-21, 修回日期: 2019-07-06)