

复方景川片调控低氧诱导因子-1 α 表达对大鼠缺血性脑损伤的保护作用

张 岩, 刘庆焕, 王 宏, 张 婷, 王文彤*, 李冬冬

天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要:目的 探究复方景川片对大鼠缺血性脑损伤的保护作用并探讨其对低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达的影响。方法 60只大鼠按体质量随机分为假手术组、模型组、尼莫地平(0.012 g/kg)组和复方景川片(0.780、1.560、3.120 g/kg)组,除假手术组外,其余各组均采用线栓法构建大鼠大脑中动脉闭塞模型,连续给药10 d。采用评分法测定复方景川片对大鼠神经行为学的影响,采用TTC染色法测定脑梗死比例,采用TUNEL染色法检测大鼠缺血区脑组织神经细胞凋亡比率,并通过Real-Time PCR法和Western blotting法检测复方景川片对HIF-1 α mRNA和蛋白表达水平的影响。结果 与模型组比较,复方景川片各剂量组均能降低大鼠神经功能评分和横木行走实验评分,能显著性减少神经细胞凋亡、减小梗死体积,其中0.78、1.56、3.12 g/kg组脑梗死面积分别为44.53%、33.71%、29.93%。HIF-1 α 在复方景川片各剂量组中呈高表达状态,其升高水平与模型组相比具有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。结论 复方景川片在一定剂量范围内能够有效改善大鼠脑缺血损伤程度并减少神经细胞凋亡,其对脑缺血损伤中的神经保护作用可能与其对HIF-1 α 表达的调控有关。

关键词: 复方景川片; 缺血性脑损伤; 神经行为学; 低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)12-3506-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.12.002

Protection of Compound Jingchuan Tablets on expression of HIF-1 α in rats with ischemic brain injury

ZHANG Yan, LIU Qing-huan, WANG Hong, ZHANG Ting, WANG Wen-tong, LI Dong-dong

Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of Compound Jingchuan Tablets on cerebral ischemic injury model in rats and its effect on the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α). **Methods** Totally sixty rats were randomly divided into Sham group, model group, nimodipine (0.012 g/kg) group, and Compound Jingchuan Tablets (0.78, 1.56, and 3.12 g/kg) group according to body weights. Except Sham group, the middle cerebral artery occlusion model of rats was established with thread blocking method in all groups for 10 d. The effects of Compound Jingchuan Tablets on neurobehaviour in rats were determined by scoring method, the proportion of cerebral infarction was determined by TTC staining, the percentage of neuronal apoptosis in ischemic brain tissue was detected by TUNEL staining, and the expression of HIF-1 α was detected by Real-Time PCR and Western blotting methods. **Results** Compared with the model group, each dose group of Compound Jingchuan Tablets could decrease the neurological function score and the horizontal wood walking test score of rats, and significantly reduce neuronal apoptosis and infarct volume. The infarct area of 0.78, 1.56, and 3.12 g/kg groups were 44.53%, 33.71%, and 29.93%, respectively. It was highly expressed in the various dose groups of Compound Jingchuan Tablets, and its elevated level was statistically significant compared with the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Compound Jingchuan Tablets can effectively improve the degree of cerebral ischemia injury and reduce neuronal apoptosis in rats within a certain dose range. Its neuroprotective effect on cerebral ischemia injury may be related to its regulation of HIF-1 α expression.

Key words: Compound Jingchuan Tablets; cerebral ischemic injury; neurobehaviour; HIF-1 α

收稿日期: 2019-08-30

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(17JCYBJC28700); 天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题(2017079); 天津市卫生健康委、天津市中医药管理局中医、中西医结合科研课题(2019105)

作者简介: 张 岩, 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向为中药及中药药理学。E-mail: yanyan0911110@126.com

*通信作者 王文彤, 女, 研究员, 从事中药、天然产物的制备及新药研发。E-mail: wwt0331@sina.com

近年来,随着人们生活方式和饮食习惯的变化,脑血管疾病的发病比例呈逐年上升的趋势^[1],其中脑梗死具有高发病率、致残率和致死率的特点,使其成为了当前威胁人类健康的三大主要疾病之一,已经成为整个医疗界关注的焦点问题^[2]。中药在该领域有着悠久的历史背景和丰富的经验,并具有毒副作用小、整体调节的优势和特点,目前已成为脑梗死预防和治疗的重要手段^[3]。缺血、缺氧能够引起脑组织的缺血性坏死,造成神经损伤,因此对脑梗死的病理生理学有重要贡献^[4]。在缺血期间,缺氧会激活缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),而 HIF-1 α 可调节缺氧、缺血反应并诱导多种基因表达的主转录因子,帮助细胞适应低氧水平、保护神经元免受缺血损伤^[5]。因此在前期建立了稳定的质量评价标准的基础上^[6],本研究采用大鼠大脑中动脉闭塞模型,对复方景川片在大鼠脑缺血损伤中的神经保护作用进行了研究,并探讨了其治疗作用与其对 HIF-1 α 调节的相互关系,旨在探究复方景川片治疗脑梗死的作用机制,为其进一步开发利用提供实验数据。

1 材料与仪器

1.1 仪器

BX51T-PHD-J11 型光学显微镜(日本奥林巴斯公司); TGL-16 型台式高速冷冻离心机(Cence 公司); RM2015 型石蜡切片机(德国莱卡公司); 电泳仪(北京六一仪器厂); 灌胶、垂直电泳、转印装置(上海天能公司) ME203E 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); TC-XP 型基因扩增仪(杭州博日科技公司); LightCycler 96 型荧光定量 PCR 仪(Roche 公司); Image-Pro Plus 型功能真彩色细胞图象分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司); Tanon5200 型自动化学发光成像分析系统(上海天能公司)。

1.2 材料

原位细胞凋亡检测试剂盒(美国罗氏公司); HIF-1 α 引物: 碱基序列(5'-3')上游 GGCGGCGAGA ACGAGAAG、下游 GTGGCAACTGATGAGCAAG C (Invitrogen Biotechnology 中国公司合成); 蛋白内参 β -actin(1:1 500 稀释)小鼠单克隆抗体(Boster 公司, 货号 BM0627); HIF-1A 抗体(1:1 000 稀释)(ABCAM 公司, 货号 ab1) 120 kD; HRP-羊抗小鼠抗体(1:1 500 稀释)(Boster 公司, 货号 BA1050); 复方景川片由天津市医药科学研究所制剂中心提供, 规格 0.5 g/片, 由红景天、川芎、延

胡索、冰片组成, 以红景天苷计为 3.35 mg/g; 尼莫地平片, 天津市中央药业有限公司, 规格 30 mg/片, 产品批号: 171102; 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC), 天津市瑞金特化学品有限公司, 批号 0412A18; 2432-A4 线栓(北京西浓科技有限公司)。

1.3 动物

60 只雄性健康 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 160~180 g, 由北京维通利华实验技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK(京)2016-0006, 购入后自由饮水, 饲养环境温度为(25 $\pm$ 2)℃。

2 方法

2.1 分组和给药

60 只大鼠按体质量随机分为假手术组、模型组、尼莫地平(0.012 g/kg)组和复方景川片(0.780、1.560、3.120 g/kg)组, 每组各 10 只。复制模型前 7 d 开始灌胃给药, 1 次/d, 给药体积为 10 mL/kg, 连续给药 10 d。假手术组和模型组灌胃给予等体积纯净水。

尼莫地平成人(按 60 kg 计)缺血性脑血管病每日用量最高为 120 mg; 复方景川片成人(按 60 kg 计)每日 4 次, 每次 5~8 片; 大鼠给药剂量为成人等效剂量的 6 倍, 因此尼莫地平大鼠给药剂量为 0.012 g/kg; 将复方景川片大鼠给药剂量为 1.56 g/kg 设为中剂量, 大鼠给药剂量为成人等效剂量的 3 倍设为低剂量 0.78 g/kg, 大鼠给药剂量为成人等效剂量的 12 倍设为高剂量 3.12 g/kg。

2.2 动物模型制备

采用 Longa 线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型^[7-8]。术前禁食不禁水 12 h。10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉, 将大鼠仰卧位固定于手术台上。常规消毒, 沿大鼠颈部正中线略偏右侧作纵行切口, 分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA), 小心分离与 CCA 伴行的迷走神经, 在分叉处用 5-0 号丝线结扎 CCA 和 ECA, 于距离 CCA 分叉处 0.5 cm 左右处剪一小口, 将栓线送入剪切口, 向内推行至中动脉, 直至感受到轻微阻力时停止并结扎 ICA, 从 CCA 分叉处开始计算插入深度(1.8 $\pm$ 0.5)cm, 此即完成一侧的大脑中动脉闭塞模型, 缝合手术创口并消毒。假手术组只分离血管, 不结扎不插栓线。术中用白炽灯照射大鼠, 使肛温保持在(37.0 $\pm$ 0.5)℃。

2.3 神经行为学评价

2.3.1 神经功能实验评分 造模 48 h 后采用

Longa 评分法对各组大鼠的神经功能缺损情况进行测定并评分^[9]。评分标准如下：0 分，大鼠活动正常、无神经功能缺失症状；1 分，大鼠尾巴提起时，对侧前爪不能完全伸展；2 分，大鼠爬行时，有向偏瘫侧转圈现象出现；3 分，爬行时，大鼠身体出现向偏瘫侧倾倒现象；4 分，大鼠意识丧失、不能行走；5 分，死亡。将评分为 0 分的大鼠剔除。

2.3.2 横木行走实验评分^[8] 取长 120 cm、宽和高均为 2.5 cm 的横木，水平放置于距地面 60 cm 处，在末次给药 1 h 后，对各组大鼠进行横木行走实验，并对其脑缺血损伤后运动行为能力进行评定。评分标准为：0 分，大鼠能够保持平衡并顺利通过横木；1 分，大鼠通过横木，但爪子抓住了横木边缘；2 分，大鼠抓住横木，且自横木上垂下 1 只爪子；3 分，自横木上垂下 2 只爪子，或在横木上旋转停留 60 s 以上；4 分，大鼠试着在横木上维持平衡 40 s 以上，跌落横木；5 分，在横木上维持平衡时间超过 20 s 后跌落；6 分，从横木上跌落且在横木上停留时间不超过 20 s。

2.4 脑梗死比例测定

制作模型成功后 48 h，以 10% 的水合氯醛（3.5 mL/kg）腹腔注射的方式使大鼠麻醉，迅速断头取脑，用冷盐水冲洗，放置于 -20 °C 下 10 min。待脑组织稍硬后，取出并切掉嗅球、垂体和低位脑干，由前向后冠状切片，并使脑切片厚度为 2 mm 左右，等分切成 5 片。脑切片置于 1% 的 TTC 磷酸盐缓冲液中，于 37 °C 下避光温育 30 min，每隔 5 分钟左右翻动 1 次。采用 4% 多聚甲醛固定，正常脑组织呈玫瑰红色，梗死区脑组织呈白色。眼科镊精确剥离脑梗死部位，精密称定脑梗死部位、全脑的质量，计算脑梗死比例^[9]。

脑梗死比例 = 梗死部位质量 / 全脑质量

2.5 TUNEL 染色法测定大鼠神经细胞凋亡

参照罗氏公司 TUNEL 细胞凋亡相关检测程序测定^[8]。对石蜡包埋的切片进行预处理，常规脱蜡脱水；用蛋白酶 K 工作液室温孵育 15~30 min 后，于 37 °C 孵育 15 min，再用磷酸盐缓冲液漂洗 2 次；标记：擦干样品周围的水，滴加 TUNEL 反应混合溶液 50 μL，在湿盒中 37 °C 孵育 60 min 后用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次；信号转化与分析：待玻片干后，加入转化剂 POD 50 μL，在湿盒中 37 °C 孵育 30 min 后用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次，再次加入 DAB 底物溶液 50~100 μL，室温孵育 10 min 后用磷酸盐缓

冲液冲洗 3 次；使用苏木素复染细胞核，封片，在光镜下对图像进行分析。

2.6 免疫印迹法检测大鼠脑组织中 HIF-1α 的蛋白表达水平

依据 TTC 染色结果，将大鼠皮质缺血区脑组织切成小块，研磨充分后加入 RIPA 裂解液进行吹打混匀，超声后置冰上裂解 0.5 h，离心，提取样品中总蛋白，并用考马斯亮蓝法检测样本中总蛋白含量。样品蛋白在 10% SDS-PAGE 中进行电泳后采用半干法转移到 PVDF 膜上，封闭 1.5 h，加入一抗 HIF-1α（1:1 000），置于 4 °C 条件下摇床孵育过夜，次日洗膜。加入二抗，于 4 °C 下摇床震动孵育 2 h，洗膜除去游离二抗。加 ECL 工作液于印迹膜上 30~60 s，吸干发光液，置印迹膜于成像分析仪自动成像，软件 ImageJ 分析蛋白条带灰度值。以 HIF-1α 灰度值与 β-actin 灰度值的比值反映 HIF-1α 蛋白表达水平。

2.7 Real-time PCR 法检测大鼠脑组织中 HIF-1α 的 mRNA 表达水平

取各组大鼠皮质缺血区脑组织研磨、裂解、提取 RNA，并参照 TaKaRa RT-PCR 说明书经过反转录制得 cDNA。选用 HIF-1α 为目标基因，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）做为内参，HIF-1α 引物由 Invitrogen Biotechnology 中国公司合成，上游碱基序列（5'-3'）为：GGCGGCGAGAACGAGAAG、下游碱基序列（5'-3'）为：GTGGCAACTGATGAGCAAGC，扩增产物长度为 127 bp。在荧光定量 PCR 仪中进行反应与分析，反应条件为：95 °C 预变性 1 min，进行 PCR 循环（95 °C 维持 15 s，58 °C 维持 20 s，72 °C 维持 20 s）40 次，72 °C 末段延伸 5 min。用相对定量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对 mRNA 表达水平进行分析。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对本实验所有的实验数据进行统计学分析，计量资料的结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示，并采用 Bonferroni's Multiple Comparison Test 和单因素方差分析的方式对数据结果进行多组组间差异比较。

3 结果

3.1 神经行为学评价

各组大鼠神经功能评价、横木行走实验评分结果见表 1。实验评分过程中未见老鼠死亡，结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠神经功能评分、

横木行走评分均显著增高 ($P<0.01$), 表明大鼠出现明显的神经功能损伤、行为能力下降的情况, 同时也说明该模型制作成功。模型组、尼莫地平组和复方景川片 1.560 g/kg 组各有 1 只大鼠死亡, 死亡率为 10%。在神经功能评分实验中, 与模型组比较, 尼莫地平组和复方景川片各剂量组评分均显著降低

($P<0.05$ 、0.01); 在横木行走评分实验中, 与模型组比较, 尼莫地平组和复方景川片 1.560、3.120 g/kg 组评分均显著降低 ($P<0.05$)。结果表明复方景川片能够有效改善缺血性脑损伤大鼠的神经行为学功能, 且复方景川片 1.560、3.120 g/kg 组改善效果相对较好。

表 1 大鼠行为学实验评分 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Behavior test scores of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经功能评分	横木行走评分
假手术	10	—	0.00±0.00	0.00±0.00
模型	9	—	3.70±1.20 ^{##}	5.00±0.71 ^{##}
尼莫地平	9	0.012	2.13±0.25 [*]	3.40±0.55 ^{**}
复方景川片	10	0.780	2.30±0.57 [*]	4.17±0.75
	9	1.560	1.90±0.22 [*]	3.80±0.84 [*]
	10	3.120	2.10±0.65 [*]	3.67±0.52 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P<0.01$; 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

3.2 复方景川片对脑缺血梗死比例的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织出现明显的脑缺血损伤现象 ($P<0.01$), 脑梗死面积比例为 54.95%; 与模型组比较, 尼莫地平组、复方景川片各剂量组脑梗死面积均有不同程度的减少, 脑梗死比例分别为 25.98%、44.53%、33.71%、29.93%, 其中尼莫地平组和复方景川片 1.560、3.120 g/kg 组与模型组比较有统计学差异 ($P<0.05$ 、0.01)。结果表明 1.560、3.120 g/kg 复方景川片可以有效改善模

型大鼠的脑缺血损伤程度, 结果见图 1、表 2。

3.3 复方景川片对大鼠神经细胞凋亡的影响

大鼠皮质区神经细胞经 TUNEL 染色后, 凋亡的神经细胞胞体会固缩并呈现出棕色, 结果见图 2、表 2。假手术组仅有少量神经细胞出现凋亡现象, 模型组与之相比, 细胞凋亡数目和比率均有显著增加 ($P<0.01$); 与模型组相比, 复方景川片组、尼莫地平组均能明显减少细胞凋亡, 并且复方景川片 1.560、3.120 g/kg 组减少细胞凋亡效果更为显著。

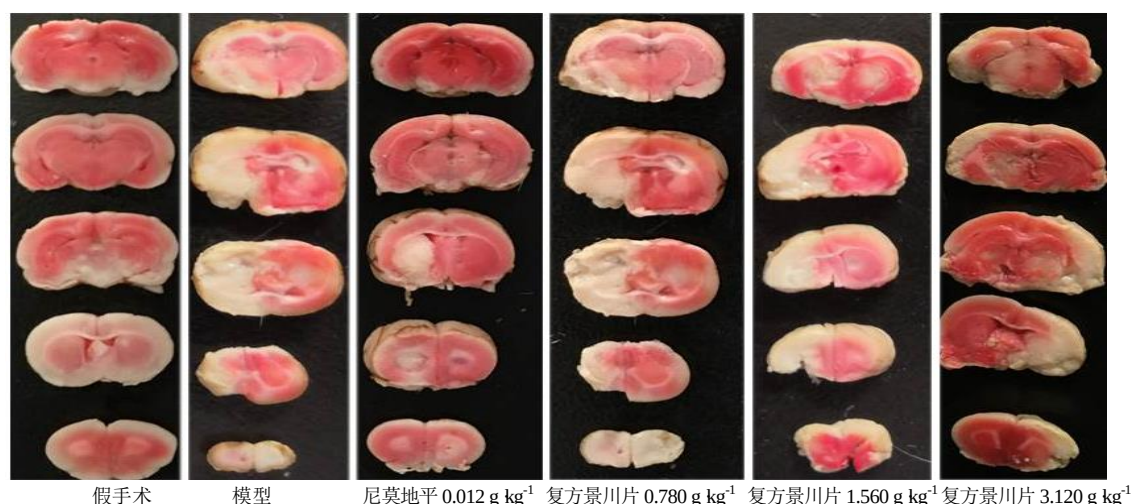


图 1 大鼠脑梗死面积的 TTC 染色图

Fig. 1 TTC staining of cerebral infarction area in rats

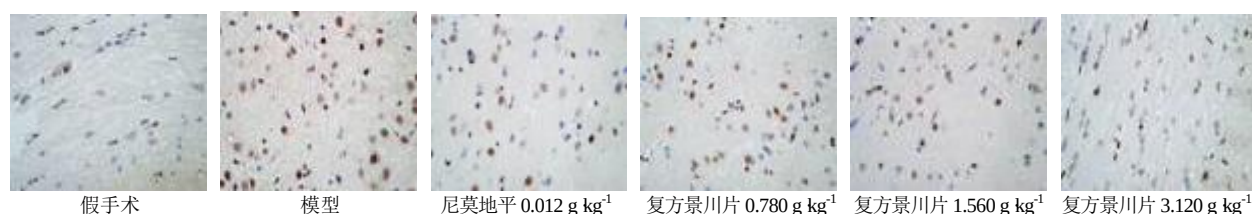


图2 大鼠皮质组织神经细胞 TUNEL 染色图

Fig. 2 TUNEL staining of neurons from rat cortex tissue

表2 复方景川片对大鼠脑梗死面积和神经细胞凋亡的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 2 Effect of Compound Jingchuan Tablets on cerebral infarction area and neuronal apoptosis in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脑梗死比例/%	神经细胞凋亡率/%
假手术	—	0.00±0.00	6.80±2.59
模型	—	54.95±11.43 ^{##}	37.20±4.32 ^{##}
尼莫地平	0.012	25.98±6.37 ^{**}	26.60±1.95 [*]
复方景川片	0.780	44.53±14.27	28.00±2.92 ^{**}
	1.560	33.71±10.65 [*]	21.20±3.19 ^{**}
	3.120	29.93±11.91 ^{**}	14.80±2.86 ^{**}

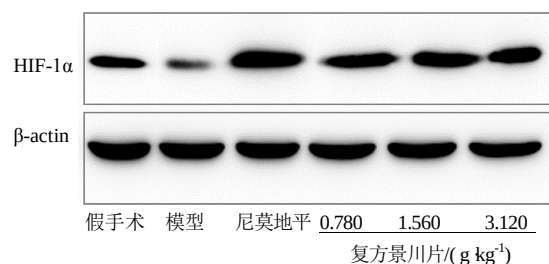
与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.4 复方景川片对大鼠皮质缺血区脑组织中 HIF-1 α 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠皮质缺血区脑组织中 HIF-1 α 的蛋白表达水平均显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 复方景川片组 HIF-1 α 的蛋白表达随着给药剂量的增加而增高, 并且 1.560、3.120 g/kg 组 HIF-1 α 蛋白表达的显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 见图 3、表 3。

3.5 复方景川片对大鼠皮质缺血区脑组织中 HIF-1 α mRNA 表达的影响

对各组大鼠皮质缺血区脑组织中 HIF-1 α mRNA 表达结果进行比较分析, 见表 3。结果显示: 假手术组 HIF-1 α mRNA 表达相对较弱, 与其相比较, 模型组大鼠脑组织中 HIF-1 α mRNA 的表达水平显著增高($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方景川片组 HIF-1 α mRNA 的表达会随着给药剂量的增加而增高, 总体趋势与 HIF-1 α 蛋白的表达趋势相一致, 并且各剂量组 HIF-1 α mRNA 表达的升高水平均具有统计学意义($P < 0.05$ 、0.01)。

图3 大鼠皮质缺血区脑组织 HIF-1 α 的蛋白表达 ($n = 5$)Fig. 3 Protein expression level of HIF-1 α in cerebral tissue of rat cortical ischemia ($n = 5$)表3 大鼠皮质缺血区脑组织 HIF-1 α 蛋白和 mRNA 的表达
($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 3 Protein expression level and mRNA expression level of HIF-1 α in cerebral tissue of rat cortical ischemia($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	HIF-1 α /β-actin	HIF-1 α /GAPDH
假手术	—	0.20±0.06	1.02±0.24
模型	—	0.41±0.06 ^{##}	1.57±0.46 [#]
复方景川片	0.780	0.54±0.13	2.75±0.46 ^{**}
	1.560	0.63±0.09 ^{**}	3.03±0.90 [*]
	3.120	0.84±0.11 ^{**}	3.98±0.75 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 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

4 讨论

复方景川片主要用于治疗气虚血瘀、脑脉瘀阻所致的中风头痛。为了进一步探讨其对缺血性脑损伤的治疗作用、相关作用机制, 本研究建立了大鼠大脑中动脉闭塞模型, 并通过神经功能实验和横木行走实验证实了复方景川片能够有效地改善大鼠神经行为学功能, 经对 TTC 染色和 TUNEL 染色结果分析发现复方景川片能够有效降低大鼠的脑缺血损伤程度, 并能减少神经细胞凋亡。结果提示, 复方景川片具有一定的治疗缺血性脑损伤的作用, 且该作用会随着给药剂量的增加而增加, 具有一定的剂

量相关性。

由于缺血性脑损伤与大脑的缺血缺氧密切相关,当大脑处于缺血缺氧性损伤状态时,会使一系列分子产生神经生物学变化,而这些分子表达中HIF-1 α 起着重要作用^[10],且HIF-1 α 的调节作用是双向的^[5,11]:一方面,HIF-1 α 可以启动机体保护机制,提高机体应激反应能力,促进机体修复;另一方面,HIF-1 α 可以启动细胞凋亡途径,从而促进神经细胞凋亡。此外,经前期研究发现该制剂相关提取物具有耐缺氧的作用^[12]。因此推测复方景川片对缺血性脑损伤的治疗作用可能与其对缺血缺氧的改善有关,因而本研究进一步探讨了复方景川片对大鼠皮质缺血区脑组织中HIF-1 α 表达的影响。结果发现,在正常状态下HIF-1 α 处于低表达现象,随着脑组织缺血缺氧现象的出现,HIF-1 α 表达逐渐增加,启动凋亡途径,促进神经细胞死亡^[13]。与模型组比较,复方景川片组HIF-1 α 的表达显著增加,且该增加与给药剂量呈一定的相关性,推测复方景川片组HIF-1 α 的表达大量增加,不仅可以促进神经细胞存活,而且可能会通过影响目的基因的转录调控,从而使细胞定向迁移,促进机体修复^[14]。结果提示复方景川片对缺血性脑损伤的保护作用可能与其对HIF-1 α 的表达及相关信号通路的调控有关。

参考文献

- [1] Hu X, De Silva T M, Chen J, *et al.* Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke [J]. *Circ Res*, 2017, 120(3): 449-471.
- [2] Wang Y, Ren Q, Zhang X, *et al.* Neuroprotective mechanisms of calycosin against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 537-546.
- [3] Zhang Z, Ji S, Yu X, *et al.* A new way to analyze the traditional Chinese medicine syndrome: heat toxin syndrome in cerebral infarction [J]. *J Trad Chin Med Sci*,

2014, 1(1): 9-19.

- [4] 刘磊, 刘丽华, 马玉奎. 脑缺血再灌注损伤机制研究进展 [J]. *药学研究*, 2016, 35 (9): 542-544.
- [5] Benderro G F, Sun X, Kuang Y, *et al.* Decreased VEGF expression and microvascular density, but increased HIF-1 and 2 α accumulation and EPO expression in chronic moderate hyperoxia in the mouse brain [J]. *Brain Res*, 2012, 1471: 46-55.
- [6] 张婷, 刘庆焕, 王文彤. UHPLC-ESI-MS/MS 测定复方景川片中6种成分的含量 [J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(11): 1627-1631.
- [7] Wang J, Gan Y, Han P, *et al.* Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by chemokine receptor CX3CR1 [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 556.
- [8] 王宏, 康利, 刘庆焕, 等. 复方红景天对大鼠缺血性脑损伤后海马组织细胞凋亡的影响 [J]. *天津中医药*, 2017, 34(8): 554-558.
- [9] 杜秋, 夏勤, 谈瑄忠, 等. 川芎嗪注射液穴位注射对缺血性脑中风模型大鼠脑梗死比例及行为学评分的影响 [J]. *中医药导报*, 2017, 23(17): 32-34.
- [10] 陈文, 张赛, 涂悦, 等. 缺氧诱导因子1 α 在缺血性脑卒中发病过程中的作用 [J]. *中国医药*, 2019, 14(9): 1433-1436.
- [11] 余震. 缺氧诱导因子-1 α 对脑出血后神经干细胞的增殖、迁移、分化及血管新生作用的实验研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2009.
- [12] 陶遵威, 谭洪湘, 王文彤, 等. 一种具有耐缺氧、抗疲劳的营养保健品的活性成分及其制备方法 [P]. 中国: 103039970A, 2016-01-20.
- [13] Althaus J, Bernaudin M, Petit E, *et al.* Expression of the gene encoding the pro-apoptotic BNIP3 protein and stimulation of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein following focal cerebral ischemia in rats [J]. *Neurochem Int*, 2006, 48(8): 687-695.
- [14] 邢英琦, 徐静, 李琳, 等. 缺氧诱导因子(HIF-1)的结构、调节与靶基因研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(1): 177-179.