

·实验研究·

本文引用: 王倩, 陆昊, 任玮, 王青, 范丽桢. 地黄苷 A 通过调控 DLL4/Notch 信号通路保护缺血性脑卒中大鼠血脑屏障并改善认知障碍[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(2): 222-231.

地黄苷 A 通过调控 DLL4/Notch 信号通路保护缺血性脑卒中 大鼠血脑屏障并改善认知障碍

王倩, 陆昊, 任玮, 王青, 范丽桢*

南京鼓楼医院/南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210000

〔摘要〕 目的 探究地黄苷 A 调节 Delta 样配体 4(DLL4)/Notch 信号通路对缺血性脑卒中(IS)大鼠血脑屏障和认知障碍的影响。方法 按照随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、地黄苷 A 低剂量组、地黄苷 A 中剂量组、地黄苷 A 高剂量组、尼莫地平组、地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组、MK-0752 组, 每组 12 只。除假手术组外, 其余各组均采用大脑中动脉闭塞(MCAO)法建立 IS 模型。地黄苷 A 低、中、高剂量组分别腹腔注射地黄苷 A 30、60、120 mg/kg 并灌胃等量生理盐水; 尼莫地平组灌胃 12 mg/kg 尼莫地平并腹腔注射等量生理盐水; 地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组腹腔注射 60 mg/kg 地黄苷 A 并灌胃 100 mg/kg MK-0752; MK-0752 组灌胃 100 mg/kg MK-0752 并腹腔注射等量生理盐水; 假手术组、模型组大鼠腹腔注射并灌胃等量生理盐水。1 次/d, 持续 14 d。通过 Morris 水迷宫试验评估认知功能; 采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评价神经功能缺损程度; 干湿重法测定脑含水量; EB 渗漏法检测血脑屏障通透性, TTC 染色测量脑梗死面积, Nissl 染色观察神经元损伤; qPCR 检测脑组织 DLL4、Notch 同源蛋白 1(Notch1)、闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的 mRNA 表达水平; Western blot 检测脑组织 DLL4、Notch1、ZO-1、Occludin 和 MMP-9 的蛋白表达水平。结果 与假手术组相比, 模型组大鼠逃避潜伏期延长($P<0.05$), 穿越平台次数减少($P<0.05$), 目标象限停留时间缩短($P<0.05$), mNSS、脑含水量、脑组织 EB 含量及 MMP-9 mRNA 与蛋白表达水平均升高($P<0.05$), 脑梗死面积增大($P<0.05$), DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 与蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与模型组相比, 尼莫地平组、地黄苷 A 低、中、高剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠逃避潜伏期均缩短($P<0.05$), 穿越平台次数均增加($P<0.05$), 目标象限停留时间均延长($P<0.05$), mNSS、脑含水量、脑组织 EB 含量及 MMP-9 mRNA 与蛋白表达水平均降低($P<0.05$), 脑梗死面积均缩小($P<0.05$), DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 与蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与尼莫地平组相比, 地黄苷 A 低、中剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠逃避潜伏期均延长($P<0.05$), 穿越平台次数均减少($P<0.05$), 目标象限停留时间均缩短($P<0.05$), mNSS、脑含水量、脑组织 EB 含量及 MMP-9 mRNA 与蛋白表达水平均升高($P<0.05$), 脑梗死面积均增大($P<0.05$), DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 与蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与地黄苷 A 低剂量组比较, 地黄苷 A 中、高剂量组大鼠逃避潜伏期均缩短($P<0.05$), 穿越平台次数均增加($P<0.05$), 目标象限停留时间均延长($P<0.05$), mNSS、脑含水量、脑组织 EB 含量及 MMP-9 mRNA 与蛋白表达水平均降低($P<0.05$), 脑梗死面积均缩小($P<0.05$), DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 与蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与地黄苷 A 中剂量组比较, 地黄苷 A 高剂量组大鼠逃避潜伏期缩短($P<0.05$), 穿越平台次数增加($P<0.05$), 目标象限停留时间延长($P<0.05$), mNSS、脑含水量、脑组织 EB 含量及 MMP-9 mRNA 与蛋白表达水平均降低($P<0.05$), 脑梗死面积缩小($P<0.05$), DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 与蛋白表达水平均升高($P<0.05$); 地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组逃避潜伏期延长($P<0.05$), 穿越平台次数减少($P<0.05$), 目标象限停留时间缩短($P<0.05$), mNSS、脑含水量、脑组织 EB 含量及 MMP-9 mRNA 与蛋白表达水平均升高($P<0.05$), 脑梗死面积增大($P<0.05$), DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 与蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。结论 地黄苷 A 可能通过激活 DLL4/Notch 信号通路, 降低血脑屏障通透性, 改善 IS 大鼠的认知障碍。

〔关键词〕 缺血性脑卒中; 血脑屏障; 地黄苷 A; DLL4/Notch 信号通路; 认知障碍; 紧密连接蛋白

〔中图分类号〕 R277.7

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.02.002

〔收稿日期〕 2025-11-18

〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(82101425)。

〔通信作者〕 * 范丽桢, 女, 博士, 主治医师, E-mail: 15950562108@163.com。

Rehmannioside A protects blood–brain barrier and improves cognitive impairment in rats with ischemic stroke by regulating the DLL4/Notch signaling pathway

WANG Qian, LU Hao, REN Wei, WANG Qing, FAN Lizhen*

Nanjing Drum Tower Hospital/The Affiliated Drum Tower Hospital of the Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210000, China

[Abstract] Objectives To explore the effects of Rehmannioside A on regulating the delta-like ligand 4 (DLL4)/Notch signaling pathway on the blood–brain barrier dysfunction and cognitive impairment in rats with ischemic stroke (IS). **Methods** Rats were randomly assigned to the sham-operated group, model group, low-dose, medium-dose, and high-dose Rehmannioside A groups, nimodipine group, medium-dose Rehmannioside A+MK-0752 group, and MK-0752 group ($n=12$ per group). Except for the sham group, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) method was used to establish the IS model in the other groups. The low-dose, medium-dose, and high-dose groups of Rehmannioside A were intraperitoneally injected with 30, 60 and 120 mg/kg of Rehmannioside A respectively, and intragastric administration of an equal volume of normal saline. The nimodipine group received intragastric administration of nimodipine (12 mg/kg) and intraperitoneal injection of an equal volume of normal saline. The medium-dose Rehmannioside A+MK-0752 group received intraperitoneal injection of Rehmannioside A (60 mg/kg) and intragastric administration of MK-0752 (100 mg/kg). The MK-0752 group received intragastric administration of MK-0752 (100 mg/kg) and intraperitoneal injection of an equal volume of normal saline. The sham and model groups received intraperitoneal injection plus intragastric administration of equal volumes of normal saline. All treatments were given once daily for 14 days. Cognitive function was evaluated using the Morris water maze test. Neurological deficits were assessed by the modified neurological severity score (mNSS). Brain water content was measured by the wet–dry method. Blood–brain barrier permeability was assessed by Evans blue extravasation, cerebral infarct area was measured by 2, 3, 5–triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, and neuronal damage was examined by Nissl staining. Quantitative PCR (qPCR) was performed to determine mRNA expression levels of DLL4, Notch homolog 1 (Notch1), zonula occludens-1 (ZO-1), Occludin, and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Western blotting was used to determine protein expression levels of DLL4, Notch1, ZO-1, Occludin, and MMP-9. **Results** Compared with the sham group, the model group exhibited a prolonged escape latency ($P<0.05$), reduced platform crossings ($P<0.05$), and shortened time spent in the target quadrant ($P<0.05$). The mNSS, brain water content, Evans Blue (EB) content in brain tissue, and MMP-9 mRNA and protein expression levels were higher ($P<0.05$), accompanied by a larger infarct area ($P<0.05$). In contrast, the mRNA and protein expression levels of DLL4, Notch1, ZO-1, and occludin were lower ($P<0.05$). Compared with the model group, the nimodipine group, low-, medium-, and high-dose Rehmannioside A groups, and the medium-dose Rehmannioside A+MK-0752 group showed shortened escape latency ($P<0.05$), increased platform crossings ($P<0.05$), and prolonged time spent in the target quadrant ($P<0.05$). Meanwhile, mNSS scores, brain water content, EB content, and MMP-9 mRNA and protein expression levels decreased ($P<0.05$), the infarct area was reduced ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of DLL4, Notch1, ZO-1, and Occludin increased ($P<0.05$). Compared with the nimodipine group, the low- and medium-dose Rehmannioside A groups, and medium-dose Rehmannioside A+MK-0752 group demonstrated prolonged escape latency ($P<0.05$), reduced platform crossings ($P<0.05$), and shortened time in the target quadrant ($P<0.05$). In addition, mNSS scores, brain water content, EB content, and MMP-9 mRNA and protein expression levels increased ($P<0.05$), the infarct area was enlarged ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of DLL4, Notch1, ZO-1, and Occludin decreased ($P<0.05$). Compared with the low-dose Rehmannioside A group, the medium- and high-dose Rehmannioside A groups exhibited shortened escape latency ($P<0.05$), increased platform crossings ($P<0.05$), and prolonged time in the target quadrant ($P<0.05$). Moreover, mNSS scores, brain water content, EB content, and MMP-9 mRNA and protein expression levels were lower ($P<0.05$), the infarct area was reduced ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of DLL4, Notch1, ZO-1, and Occludin

were higher ($P<0.05$). Compared with medium-dose Rehmannioside A group, rats in the high-dose group showed further shortened escape latency ($P<0.05$), increased platform crossings ($P<0.05$), and prolonged time in the target quadrant ($P<0.05$), along with decreased mNSS scores, brain water content, EB content, and MMP-9 mRNA and protein expression levels ($P<0.05$), a reduced infarct area ($P<0.05$), and upregulated mRNA and protein expression of DLL4, Notch1, ZO-1, and occludin ($P<0.05$). In contrast, the medium-dose Rehmannioside A+MK-0752 group displayed prolonged escape latency ($P<0.05$), reduced platform crossings ($P<0.05$), and shortened time in the target quadrant ($P<0.05$), accompanied by increased mNSS scores, brain water content, EB content, and MMP-9 mRNA and protein expression levels ($P<0.05$), an enlarged infarct area ($P<0.05$), and decreased mRNA and protein expressions of DLL4, Notch1, ZO-1, and occludin ($P<0.05$). **Conclusion** Rehmannioside A may reduce blood-brain barrier permeability and alleviate cognitive impairment in IS rats by activating the DLL4/Notch signaling pathway.

[**Keywords**] ischemic stroke; blood-brain barrier; Rehmannioside A; DLL4/Notch signaling pathway; cognitive impairment; tight junction proteins

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是一种由血管闭塞引起的脑部疾病,会导致认知障碍并增加死亡风险,给社会带来经济负担^[1]。目前,干预 IS 的方法仍然以再灌注为核心,但静脉溶栓/机械取栓受严格时间窗与适应证限制,能够获益的患者比例有限,且即便血流再通,仍可出现血脑屏障破坏、继发性神经炎症及认知功能障碍等问题^[2]。因此,亟须探索更有效的神经保护策略与潜在治疗靶点。IS 临床病理特征之一是血脑屏障功能障碍^[3]。血脑屏障破坏导致脑水肿和血液中的物质侵入脑实质,从而导致神经炎症和进一步的神经元细胞死亡^[3]。因此,保持血脑屏障完整性可以有效预防残疾并促进 IS 的恢复。

地黄苷 A 来源于中药地黄,具有抗氧化、改善记忆能力、恢复神经损伤、免疫控制等多种生理功能,可改善脑缺血后大鼠的认知障碍^[4]。研究发现,地黄苷 A 可通过促进 M2 小胶质细胞极化,缓解神经元凋亡,并促进神经功能恢复^[5]。地黄苷 A 可通过抑制氧化应激、炎症和细胞凋亡减轻血管性痴呆大鼠的认知缺陷^[6]。

Delta 样配体 4(delta-like ligand 4, DLL4)/Notch 信号通路参与神经与血管再生。有研究指出,该通路在脑缺血再灌注损伤模型大鼠中低表达,其激活可有助于改善神经功能缺损并缩小梗死面积^[7]。反之,抑制该通路会导致血管生成异常,并与阿尔茨海默病的血脑屏障功能障碍有关^[8]。但地黄苷 A 通过调节 DLL4/Notch 信号通路对 IS 大鼠血脑屏障和认知障碍的影响尚不清楚。因此,本研究采用大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)法建立 IS 大鼠模型,探究地黄苷 A 对 IS 大鼠血脑屏障和认知障碍的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性成年 SD 大鼠,体质量为 280~350 g,购于北京维通利华实验动物有限公司[动物许可证号:SCXK(京)2025-0003]。根据标准化条件饲养大鼠:12 h 光照/12 h 黑暗循环、室温和湿度恒定。适应饲养至少 1 周,期间自由摄食饮水。本实验已获得南京大学医学院附属鼓楼医院实验动物伦理委员会的批准(批准号:2025AE02011)。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 主要试剂 地黄苷 A(上海贝万塔生物科技有限公司,批号:BJ-10868);尼莫地平(上海冯莱生物科技有限公司,批号:MXS24624-5g);MK-0752(Notch 信号通路抑制剂)(湖北扬信医药科技有限公司,批号:AN217141);TTC 染色试剂盒、EB 染色试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,批号:BB-4291、BB-4134);Nissl 染色试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司,批号:WLA128);RIPA 裂解液(江西江蓝纯生物试剂有限公司,批号:JLC-E1144);BCA 蛋白定量试剂盒(北京雷根生物技术有限公司,批号:PT0001);RNA 提取试剂盒(上海海方生物技术有限公司,批号:EZB-TZ1-L);反转录试剂盒(上海晶抗生物工程有限公司,批号:JK-R5096);ECL 化学发光检测试剂盒(上海恒斐生物科技有限公司,批号:E-CS-0050c);DLL4 抗体、Notch 同源蛋白 1(Notch homolog protein 1, Notch1)抗体、闭锁小带蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)抗体、闭合蛋白(Occludin)抗体、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)抗体、 β -actin 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号为:

21584-1-AP、20687-1-AP、21773-1-AP、27260-1-AP、10375-2-AP、20536-1-AP、SA00001-2)。

1.2.2 主要仪器 高速离心机(无锡百泰克生物技术有限公司,型号:CK4200);多功能酶标仪(北京云肽生物科技有限公司,型号:51B11001);电泳转膜仪(成都君意华荣科技有限公司,型号:JY1000E);光学显微镜(美国 Echo Laboratories 公司,型号:Echo Revolve R4);石蜡切片机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司,型号:KH-LQ3800);荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号:Prism[®] 7500);化学发光成像系统(德国 GE 公司,型号:Amersham Imager 600)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模 按照随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、地黄苷 A 低剂量组、地黄苷 A 中剂量组、地黄苷 A 高剂量组、尼莫地平组、地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组、MK-0752 组,每组 12 只。除假手术组外,其余各组均采用 MCAO 法建立 IS 模型。具体操作如下:备毛后腹腔注射 5%戊巴比妥钠麻醉大鼠,并仰卧固定,显露左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。对 CCA 近端暂时结扎,在 ECA 远端剪一小口,将尼龙单丝经 ECA 插入 ICA 并缓慢推进至大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)起始部,阻断 MCA 血流 2 h,随后抽出单丝,恢复再灌注 24 h^[9]。假手术组操作相同,但单丝到达 MCA 即刻撤出,不造成脑缺血^[10]。术后 24 h 若出现向左自发转圈、提尾试验左前肢伸展不全、行走偏斜等表现,可判定为造模成功^[11]。

1.3.2 动物分组和干预 动物分组和干预措施如下:地黄苷 A 低、中、高剂量组分别腹腔注射地黄苷 A 30、60、120 mg/kg 并灌胃等量生理盐水;尼莫地平组灌胃 12 mg/kg 的尼莫地平,同时腹腔注射等量生理盐水;地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组腹腔注射 60 mg/kg 地黄苷 A 并灌胃 100 mg/kg 的 MK-0752;MK-0752 组灌胃 100 mg/kg MK-0752,同时腹腔注射等量生理盐水;假手术组、模型组大鼠腹腔注射并灌胃等量生理盐水。1 次/d,持续 14 d。地黄苷 A 剂量参考既往文献报道,在动物模型中常采用 30、60、120 mg/(kg·d)的梯度给药方案,且未见明显毒性反应^[4,12]。尼莫地平作为临床常用钙通道阻滞剂,在缺血性脑损伤动物实验中多采用 12 mg/(kg·d)的给药剂量,可发挥稳定的神经保护作用且安全性良

好^[13]。鉴于中剂量的地黄苷 A(60 mg/kg)能够在不造成额外干扰的情况下达到稳定且可重复的药效,同时保留一定的效应余量以便观察通路阻断的影响,故本研究选用该剂量与 Notch 信号通路抑制剂 MK-0752 联合干预,以验证 DLL4/Notch 信号通路在地黄苷 A 作用机制中的参与程度^[12]。MK-0752 可阻断 Notch 受体裂解与下游信号转导,常用于验证 Notch 信号通路在神经损伤及血脑屏障功能障碍中的作用机制^[14];其 100 mg/kg 灌胃剂量依据前期动物研究,能有效抑制 DLL4/Notch 信号通路而无明显毒性^[15]。

1.3.3 Morris 水迷宫实验评估认知功能 采用直径 200 cm、高 50 cm 的圆形水迷宫,水温维持在 23 ℃。逃生平台直径 8 cm,放置在某一象限的中心,平台上表面低于水面 1 cm。位置导航试验连续 5 d 进行,每只大鼠每天训练两次,间隔≥1 h。将其面向池壁放入水中,允许其在 60 s 内找到平台,或在 60 s 后引导到平台并停留 10 s。记录大鼠从入水到成功登上平台所需时间,作为逃避潜伏期,且所有测试尽量在每天相近时间进行。在位置导航测试 24 h 后,进行空间测试。移除平台,将大鼠置于固定入水点自由游泳 60 s,记录穿越平台的次数以及目标象限停留时间,以评估空间记忆^[13]。

1.3.4 改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)评价神经功能缺损程度

药物干预结束后,采用 mNSS 对大鼠神经功能进行综合评估。该评分主要从运动功能、感觉功能、平衡协调能力及反射活动等方面进行判定^[16]。总评分范围为 0~18 分,分值越高,表明神经功能缺损程度越严重。

1.3.5 干湿重法测定脑含水量 药物干预结束后,每组取 6 只大鼠,经戊巴比妥钠麻醉处死后,称取脑组织湿重;在 100 ℃真空烘箱中干燥 48 h,并称重烘干水分后的干重,计算脑含水量。脑含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.6 EB 渗漏法检测血脑屏障通透性 药物干预结束后,立即将 2% EB 染料溶液以 4 mL/kg 注射到尾静脉,EB 循环 2 h 后,用生理盐水进行心脏灌注。为了进行定量测量,将 EB 染色的脑组织与 50%的三氯乙酸溶液在 55 ℃下孵育 18 h,离心 10 min,通过分光光度法分析上清液在 620 nm 处的吸光度。EB 含量根据其标准曲线计算,作为反映血脑屏障通透性变化的指标。

1.3.7 TTC 染色测量脑梗死面积 取出脑组织并在

20 ℃下冷冻 15 min,然后将脑组织沿冠状位切成 2 mm 厚的切片。将切片与 2% 2,3,5-三苯基四氮唑氯化物溶液在 37 ℃下避光孵育 30 min。用 4%多聚甲醛固定后,使用 Image J 软件分析梗死区域。梗死面积百分比=灰白色面积/总面积×100%。

1.3.8 Nissl 染色观察神经元损伤 麻醉大鼠后,经心脏灌注生理盐水进行灌流。将脑组织用 4%多聚甲醛固定 24 h 后取出,用乙醇梯度脱水,经二甲苯透明处理至组织呈透明状,然后浸入蜡中进行包埋。将包埋后的脑组织进行切片,切片厚度为 5 μm。切片用二甲苯脱蜡,依次经梯度乙醇复水,然后将切片置于 Nissl 溶液中 20 min,再梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察神经元损伤。

1.3.9 qPCR 检测脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1、Occludin 和 MMP-9 的 mRNA 表达水平 使用 TRIzol 试剂提取脑组织总 RNA。通过 NanoDrop™ 分析评估总 RNA 的质量。使用反转录试剂盒在 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s 条件下合成 cDNA。使用 SYBR Green Master Mix 预混液进行 qPCR 扩增。热循环条件为:95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 40 次。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 法进行定量分析。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
DLL4	正向:CGTCTGCCTTAAGCACTTCC	142
	反向:GAAATTGAAGGGCAGTTGGA	
Notch1	正向:CAGCGGATCATCTGGAAGTGT	156
	反向:AGCTCATCATCTGGGACAGGA	
ZO-1	正向:TTGACAGTCCACCTCCTTCA	128
	反向:GCTCTTGCTCTGGTTGATGA	
Occludin	正向:GCTACGGTGACAGAGACCAA	121
	反向:AGGACAGGTAGTTGGTGCTG	
MMP-9	正向:GCTGCTTTGCTGTTTGTGCT	167
	反向:AGGTCGAGGTTGAAGCAAAG	
GAPDH	正向:CCTAAGCCCAACCGTGA AAAAG	149
	反向:TCTTCATGCTGCTAGGAGCCA	

1.3.10 Western blot 检测脑组织 DLL4、Notch1、ZO-1、Occludin 和 MMP-9 的蛋白表达水平 用 RIPA 裂解缓冲液裂解脑组织,提取总蛋白,按 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。每组取 30 μg 总蛋白进行电泳,后电转至 PVDF 膜上,膜在室温下用 5%牛血清白蛋白封闭 2 h,然后在 4 ℃下与以下一抗孵育

过夜: DLL4、Notch1、ZO-1、Occludin、MMP-9 及 β-actin(稀释比均为 1:1 000)。随后与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000)室温孵育 1 h。ECL 化学发光显色。使用化学发光成像系统检测和分析化学发光信号,Image-Pro Plus 6.0 对蛋白进行定量分析。

1.4 统计与分析

实验数据用 Graphpad Prism 9.0 软件进行分析。符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。多组间比较采用 *one-way ANOVA*;若方差齐,组间两两的比较采用 *LSD-t* 检验;若方差不齐,组间两两比较采用 *Games-Howell* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 地黄苷 A 对大鼠空间学习记忆能力的影响

与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长($P < 0.05$),穿越平台次数减少($P < 0.05$),目标象限停留时间缩短($P < 0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、地黄苷 A 低、中、高剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$),穿越平台次数均增加($P < 0.05$),目标象限停留时间均延长($P < 0.05$)。与尼莫地平组比较,地黄苷 A 低、中剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠逃避潜伏期均延长($P < 0.05$),穿越平台次数均减少($P < 0.05$),目标象限停留时间均缩短($P < 0.05$)。与地黄苷 A 低剂量组比较,地黄苷 A 中、高剂量组大鼠逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$),穿越平台次数均增加($P < 0.05$),目标象限停留时间均延长($P < 0.05$)。与地黄苷 A 中剂量组比较,地黄苷 A 高剂量组大鼠逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),穿越平台次数增加($P < 0.05$),目标象限停留时间延长($P < 0.05$);地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组逃避潜伏期延长($P < 0.05$),穿越平台次数减少($P < 0.05$),目标象限停留时间缩短($P < 0.05$)。详见表 2。

2.2 地黄苷 A 对大鼠 mNSS 及脑含水量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 mNSS 及脑含水量均升高($P < 0.05$);与模型组比较,尼莫地平组、地黄苷 A 低、中、高剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠 mNSS 及脑含水量均降低($P < 0.05$);与尼莫地平组比较,地黄苷 A 低、中剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠 mNSS 及脑含水量均升高($P < 0.05$);与地黄苷 A 低剂量组比较,地黄苷 A 中、高剂量组大鼠 mNSS 及脑含水量均降低($P < 0.05$);与地黄苷 A 中剂量组比较,地黄苷 A 高剂量组大鼠 mNSS 及脑含水量均降低($P < 0.05$),地黄苷 A 中剂

表2 各组大鼠空间学习记忆能力比较($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 2 Comparison of spatial learning and memory among groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s
假手术组	23.72±1.21	9.84±1.33	18.76±2.61
模型组	46.58±2.79 [#]	2.36±0.68 [#]	7.54±1.37 [#]
尼莫地平组	30.12±2.03 ^{*△}	6.91±1.10 ^{*△}	15.29±1.59 ^{*△}
地黄苷 A 低剂量组	36.84±2.47 ^{*△}	5.28±0.92 ^{*△}	12.58±1.79 ^{*△}
地黄苷 A 中剂量组	33.41±2.29 ^{*△■}	6.17±0.98 ^{*△■}	14.18±1.46 ^{*△■}
地黄苷 A 高剂量组	30.68±2.07 ^{*△▲}	6.82±1.09 ^{*△▲}	15.01±1.57 ^{*△▲}
地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组	38.65±2.61 ^{*△▲}	4.83±0.83 ^{*△▲}	11.21±1.38 ^{*△▲}
MK-0752 组	45.27±2.88 [#]	2.58±0.71 [#]	7.88±1.23 [#]

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与尼莫地平组比较,[△] $P<0.05$;与地黄苷低剂量组比较,[■] $P<0.05$;与地黄苷 A 中剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

量+MK-0752 组大鼠 mNSS 及脑含水量均升高($P<0.05$)。详见表 3。

表3 各组大鼠 mNSS 及脑含水量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 3 Comparison of mNSS and brain water content among groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	mNSS/分	脑含水量/%
假手术组	0.00±0.00	62.15±1.42
模型组	10.38±1.63 [#]	84.78±1.57 [#]
尼莫地平组	4.58±1.11 ^{*△}	64.87±1.20 ^{*△}
地黄苷 A 低剂量组	6.97±1.28 ^{*△}	74.65±1.33 ^{*△}
地黄苷 A 中剂量组	5.24±1.17 ^{*△■}	69.42±1.25 ^{*△■}
地黄苷 A 高剂量组	4.63±1.09 ^{*△▲}	65.12±1.18 ^{*△▲}
地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组	7.42±1.34 ^{*△▲}	76.28±1.29 ^{*△▲}
MK-0752 组	10.12±1.59 [#]	83.96±1.52 [#]

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与尼莫地平组比较,[△] $P<0.05$;与地黄苷 A 低剂量组比较,[■] $P<0.05$;与地黄苷 A 中剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

2.3 地黄苷 A 对大鼠脑组织 EB 含量及脑梗死面积的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 EB 含量升高($P<0.05$),脑梗死面积增大($P<0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组、地黄苷 A 低、中、高剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织 EB 含量均降低($P<0.05$),脑梗死面积均缩小($P<0.05$)。与尼莫地平组比较,地黄苷 A 低、中剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织 EB 含量均升高($P<0.05$),脑梗死面积均增大($P<0.05$)。与地黄苷 A 低剂量组比较,地黄苷 A 中、高剂量组大鼠脑组织 EB 含量均降低($P<0.05$),脑梗死面积均缩小($P<0.05$)。与地黄苷 A 中剂量组比较,地黄苷 A 高剂量组大鼠脑组织 EB 含量降低($P<0.05$),脑梗死面积缩小($P<0.05$);地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织

EB 含量升高($P<0.05$),脑梗死面积增大($P<0.05$)。详见表 4。

表4 各组大鼠脑组织 EB 含量及脑梗死面积比较($\bar{x}\pm s, n=6$)Table 4 Comparison of EB content and infarct area in brain tissues among groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	EB 含量/($\mu\text{g/g}$)	脑梗死面积/%
假手术组	25.37±3.42	0.00±0.00
模型组	82.46±6.35 [#]	38.72±3.16 [#]
尼莫地平组	36.78±3.88 ^{*△}	16.52±2.03 ^{*△}
地黄苷 A 低剂量组	61.29±4.71 ^{*△}	28.43±2.67 ^{*△}
地黄苷 A 中剂量组	49.84±4.12 ^{*△■}	22.18±2.35 ^{*△■}
地黄苷 A 高剂量组	37.56±3.96 ^{*△▲}	16.84±2.07 ^{*△▲}
地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组	57.33±4.39 ^{*△▲}	27.41±2.59 ^{*△▲}
MK-0752 组	80.41±6.12 [#]	37.63±3.08 [#]

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与尼莫地平组比较,[△] $P<0.05$;与地黄苷 A 低剂量组比较,[■] $P<0.05$;与地黄苷 A 中剂量组比较,[▲] $P<0.05$ 。

2.4 地黄苷 A 对大鼠神经元损伤的影响

假手术组海马区神经元排列紧密且规则,细胞形态完整,胞质透明,呈典型的圆锥形或多角形结构,尼氏小体分布均匀且染色清晰;模型组神经元排列紊乱、数量减少,细胞皱缩变形并伴有空泡化现象,尼氏小体减少甚至消失;地黄苷 A 低、中、高剂量组及尼莫地平组神经元结构逐渐恢复完整,排列趋于有序,尼氏小体数量显著增多;地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组神经元损伤再次加重,尼氏小体数量减少;MK-0752 组损伤程度与模型组接近。详见图 1。

2.5 地黄苷 A 对大鼠脑组织 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),MMP-9 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与

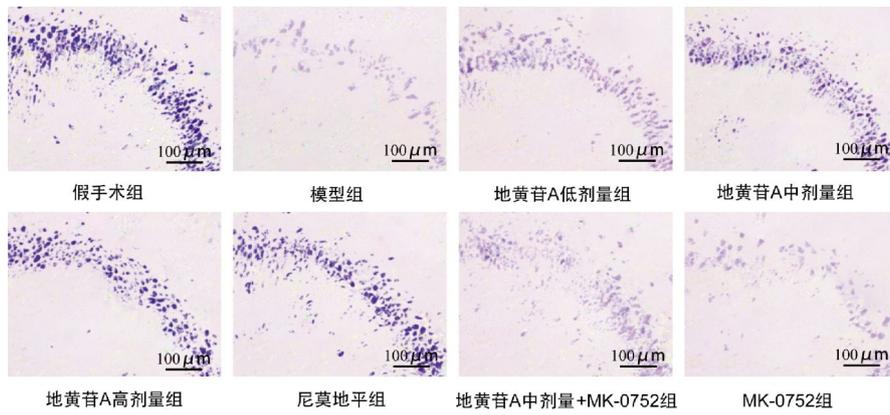


图 1 各组大鼠神经元损伤比较(Nissl,×200)

Fig.1 Comparison of neuronal damage among groups of rats (Nissl, ×200)

模型组相比,地黄苷 A 低、中、高剂量组、尼莫地平组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平均升高($P<0.05$),MMP-9 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。与尼莫地平组比较,地黄苷 A 低、中剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),MMP-9 mRNA 表达水平均升高($P<0.05$)。与地黄苷 A 低剂量组比较,地黄苷 A 中、高剂量组

大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平均升高($P<0.05$),MMP-9 mRNA 表达水平均降低($P<0.05$)。与地黄苷 A 中剂量组比较,地黄苷 A 高剂量组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平均升高($P<0.05$),MMP-9 mRNA 表达水平降低 ($P<0.05$);地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平均降低($P<0.05$),MMP-9 mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。详见图 2。

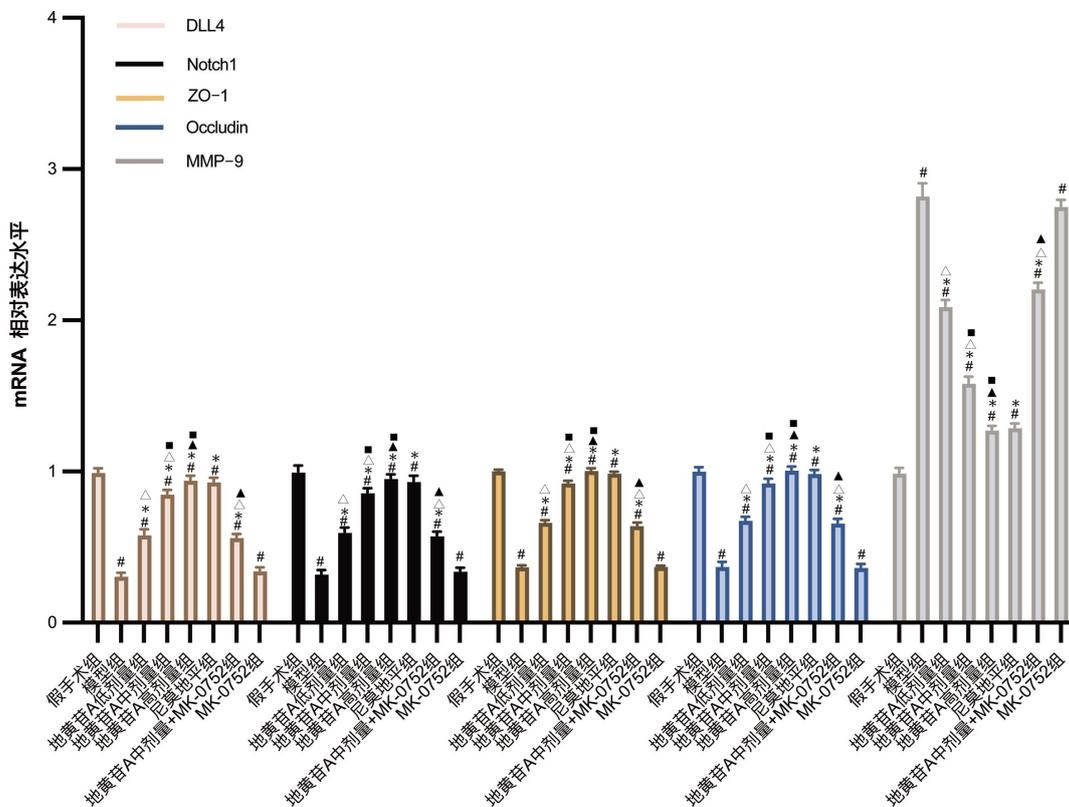


图 2 各组大鼠脑组织 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin mRNA 表达水平比较

Fig.2 Comparison of DLL4, Notch1, ZO-1, and occludin mRNA expression levels in brain tissues among groups of rats

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$;与尼莫地平组比较,^ $P<0.05$;与地黄苷 A 低剂量组比较,■ $P<0.05$;与地黄苷 A 中剂量组比较,▲ $P<0.05$ 。

2.6 地黄苷 A 对大鼠脑组织 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),MMP-9 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与模型组比较,地黄苷 A 低、中、高剂量组、尼莫地平组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平均升高($P<0.05$),MMP-9 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与尼莫地平组比较,地黄苷 A 低、中剂量组及地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、

ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),MMP-9 蛋白表达水平均升高($P<0.05$)。与地黄苷 A 低剂量组比较,地黄苷 A 中、高剂量组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平均升高($P<0.05$),MMP-9 蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与地黄苷 A 中剂量组比较,地黄苷 A 高剂量组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平均升高($P<0.05$),MMP-9 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。地黄苷 A 中剂量+MK-0752 组大鼠脑组织中 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平均降低($P<0.05$),MMP-9 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图 3。

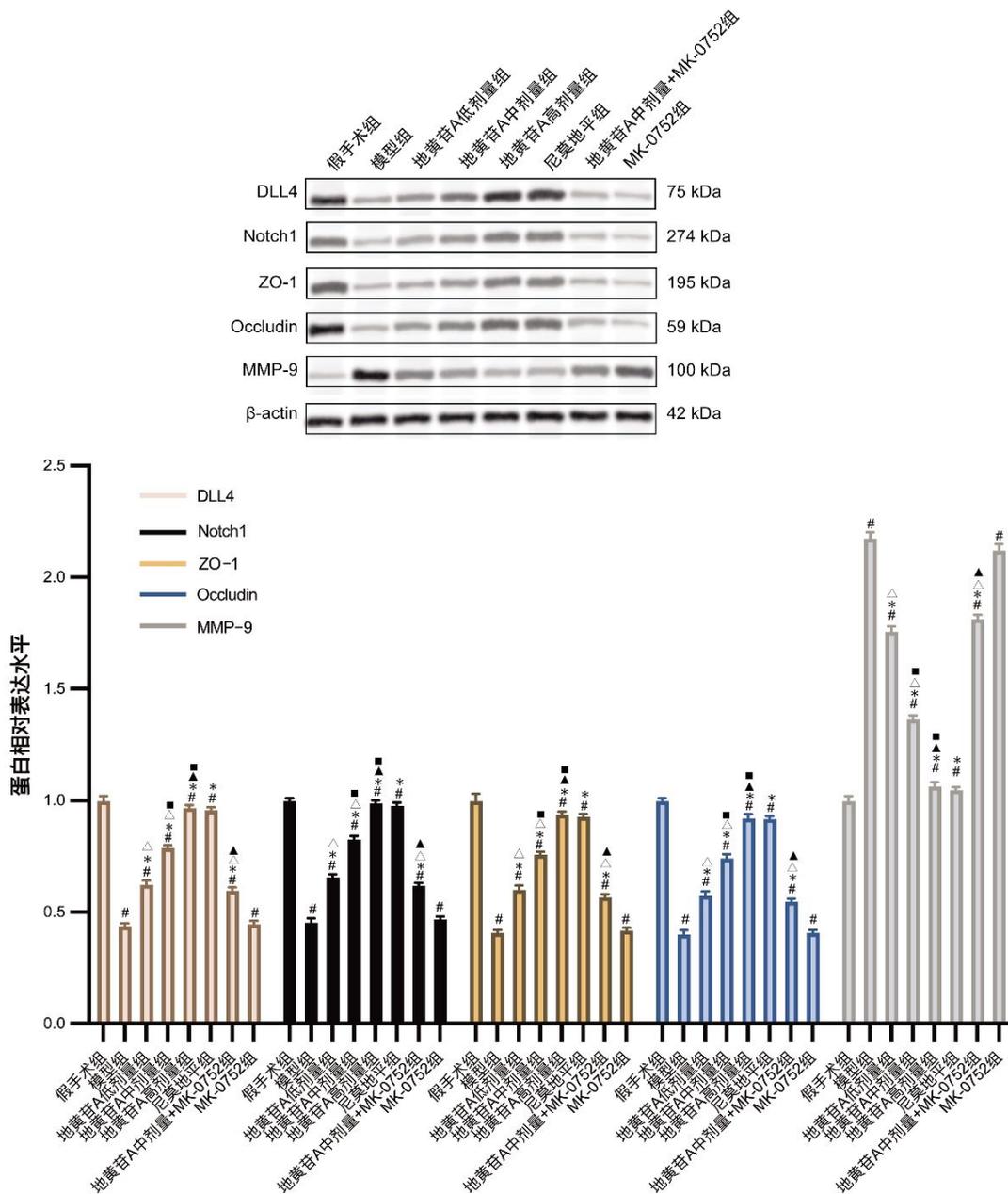


图3 各组大鼠脑组织 DLL4、Notch1、ZO-1 及 Occludin 蛋白表达水平比较

Fig.3 Comparison of DLL4, Notch1, ZO-1, and occludin protein expression levels in brain tissues among groups of rats
注:与假手术组比较, $*P<0.05$;与模型组比较, $*P<0.05$;与尼莫地平组比较, $^{\wedge}P<0.05$;与地黄苷 A 低剂量组比较, $\blacksquare P<0.05$;与地黄苷 A 中剂量组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。

3 讨论

IS 通常由血栓突然阻塞脑血管引起,具有发病率高、死亡率高、残疾率高的特点^[17]。脑缺血是大脑大动脉、中动脉的血液循环不足,从而氧气供应不足,导致脑组织暂时性或永久性死亡^[1]。目前,IS 仍然是一个重大公共卫生问题,亟须新的治疗方法。本研究采用 MCAO 法建立 IS 大鼠模型,发现模型组大鼠逃避潜伏期延长, mNSS、脑含水量、EB 含量升高,脑梗死面积增大,目标象限停留时间缩短,这些结果表明 IS 大鼠模型已成功构建。

地黄苷 A 是地黄的主要活性成分,毒性较低,对神经退行性疾病具有神经保护作用^[4]。研究发现,地黄苷 A 通过抑制铁死亡,激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/核因子 E2 相关因子 2 信号通路以及溶质载体家族 7 成员 11/谷胱甘肽过氧化物酶 4 信号通路改善脑缺血后大鼠的认知障碍^[4]。XIAO 等^[5]研究结果表明,地黄苷 A 通过促进小胶质细胞的 M2 (抗炎表型)极化,抑制核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路,减轻炎症,降低神经元凋亡,在体外和体内发挥神经保护作用。地黄苷 A 还可通过抑制内质网应激和海马神经细胞凋亡,减少模型大鼠抑郁样行为^[18]。本研究结果进一步证实,地黄苷 A 干预可明显缩短 IS 大鼠逃避潜伏期,降低 mNSS、脑含水量、EB 含量,缩小脑梗死面积,同时延长目标象限停留时间,提示地黄苷 A 对脑缺血损伤具有显著的保护作用,其作用主要表现为降低血脑屏障通透性、减轻脑组织水肿及改善认知障碍。

IS 的病理过程与血脑屏障结构破坏密切相关。血脑屏障的完整性依赖于脑微血管内皮细胞紧密连接的稳定状态,其损伤可导致水肿、炎症因子外渗及神经元继发性损害^[19]。因此,维持内皮细胞紧密连接蛋白如 Occludin 及 ZO-1 的表达被认为是保护血脑屏障功能的重要途径^[20]。DLL4/Notch 信号通路在血管内皮稳态和细胞间通信中发挥关键调节作用,但其功能不仅局限于血管生成,还涉及调控内皮细胞的屏障功能及抗炎反应^[21-22]。有研究表明,适度激活 DLL4/Notch 信号通路可增强内皮细胞紧密连接蛋白的表达,减少通透性增加,从而维持血脑屏障结构完整

性^[23]。值得注意的是,血脑屏障并非静态结构,其通透性受脑微血管内皮细胞表型及紧密连接复合体稳定性的动态调控^[23]。既往研究表明, DLL4/Notch 信号通路作为内皮细胞间的重要通讯轴,不仅参与血管发育与内皮稳态维持,还可通过调控内皮细胞分化状态及细胞连接结构的完整性,影响 ZO-1、Occludin 等紧密连接蛋白的表达与分布,从而对血脑屏障功能产生调节作用^[23]。在缺血性脑损伤背景下,该通路还可能通过限制炎症反应过度激活,间接减轻炎症介导的屏障破坏^[24]。此外,既往研究提示,血脑屏障破坏往往伴随多条信号通路的协同异常激活,如 NF- κ B、MAPK 及血管内皮生长因子相关信号通路,这些通路在炎症反应的持续激活、基质降解及内皮屏障破坏中发挥重要作用^[1]。DLL4/Notch 信号通路可能通过与上述炎症或应激相关通路形成交叉调控网络,共同参与缺血后血脑屏障功能失衡的发生发展过程,但其具体作用关系仍有待进一步阐明。

本研究选用 Notch 信号通路抑制剂 MK-0752 阻断 DLL4/Notch 信号,以明确地黄苷 A 发挥作用的通路依赖性。MK-0752 能特异性抑制 Notch 受体裂解并下调其下游信号,是研究 Notch 信号在脑缺血后血脑屏障功能中的常用药理工具化合物^[25]。本研究发现, DLL4、Notch1 mRNA 及蛋白在 IS 大鼠脑组织中低表达,地黄苷 A 可升高 IS 大鼠脑组织中 DLL4、Notch1 mRNA 及蛋白的表达。而 MK-0752 干预后, IS 大鼠脑组织中 DLL4、Notch1 mRNA 及蛋白表达水平降低,血脑屏障通透性增加、脑含水量升高、认知障碍加重。以上结果表明, MK-0752 可减弱地黄苷 A 对 IS 大鼠血脑屏障通透性和认知障碍的改善作用,提示地黄苷 A 可能通过激活 DLL4/Notch 信号通路,降低血脑屏障通透性,进而改善 IS 大鼠的认知障碍。

综上所述,地黄苷 A 在 IS 大鼠中表现出保护血脑屏障与改善认知障碍的作用,其机制可能与 DLL4/Notch 信号通路激活有关。本研究仍存在一定局限性:本实验主要基于药理学抑制剂验证通路依赖性,缺乏更精确的遗传学干预证据;同时,尚未进一步系统评估其与炎症/氧化应激等相关通路的交叉调控关系,后续仍有待探索。

参考文献

- [1] FESKE S K. Ischemic stroke[J]. *The American Journal of Medicine*, 2021, 134(12): 1457-1464.
- [2] HERPICH F, RINCON F. Management of acute ischemic stroke[J]. *Critical Care Medicine*, 2020, 48(11): 1654-1663.
- [3] LIU Z, TANG Y H, ZHANG Z J, et al. Engineering neurovascular unit and blood-brain barrier for ischemic stroke modeling[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2023, 12(19): e2202638.
- [4] FU C, WU Y F, LIU S J, et al. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis via activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 289: 115021.
- [5] XIAO S N, WANG C G, YANG Q M, et al. Rea regulates microglial polarization and attenuates neuronal apoptosis via inhibition of the NF- κ B and MAPK signalings for spinal cord injury repair[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(3): 1371-1382.
- [6] SUN M, SHEN X M, MA Y Z. Rehmannioside A attenuates cognitive deficits in rats with vascular dementia (VD) through suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. *BioMedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 120: 109492.
- [7] 谢占维, 孙玲玲, 石 瑞, 等. 益气活血化浊解毒方对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织 VEGF、Notch1、Dll4 表达的影响[J]. *环球中医药*, 2023, 16(8): 1494-1501.
- [8] VACONDIO D, NOGUEIRA PINTO H, COENEN L, et al. Liver X receptor alpha ensures blood-brain barrier function by suppressing SNAI2[J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14: 781-795.
- [9] 李亚琴, 任 维, 罗 钢, 等. 蛭龙活血通瘀胶囊对缺血性脑卒中模型大鼠的作用及对脑皮层神经元线粒体的影响[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(5): 119-124.
- [10] 叶炎生, 罗 来, 许德顺, 等. 基于 Notch1 通路探讨不同频率重复经颅磁刺激改善大鼠中动脉闭塞大鼠学习记忆能力的机制[J]. *中国康复医学杂志*, 2024, 39(8): 1084-1093.
- [11] 袁 巧, 谢丽英, 陈朝俊. 黄芪多糖减轻大鼠中动脉闭塞模型大鼠的血脑屏障损伤: 基于抑制 P2X7R 通道[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(11): 1705-1711.
- [12] LIU F R, WANG J Q, SUN Z H, et al. Rehmannioside A alleviates renal inflammation and fibrosis in hypertensive nephropathy via AT1R/MAPK14/IL-17 signaling pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2025, 776: 152237.
- [13] ZHANG Y W, YANG M, YUAN Q Q, et al. Piperine ameliorates ischemic stroke-induced brain injury in rats by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 295: 115309.
- [14] 刘 涛, 姚兴璋, 何志军, 等. 消肿止痛合剂对大鼠随意皮瓣血管再生的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(1): 119-127.
- [15] ZHENG R Y, LI M L, WANG S J, et al. Advances of target therapy on NOTCH1 signaling pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Experimental Hematology & Oncology*, 2020, 9(1): 31-40.
- [16] 龙伽雯, 侯凤飞, 曾贵荣, 等. 不同工艺的银苓通脉健脑颗粒对大鼠血管性痴呆模型定位航行的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(2): 220-227.
- [17] DELONG J H, OHASHI S N, O'CONNOR K C, et al. Inflammatory responses after ischemic stroke[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2022, 44(5): 625-648.
- [18] 许 静, 霍 康, 郭秦乐, 等. 地黄苷 A 对 CLP 诱导的脓毒症大鼠脑功能障碍和 Nrf2/GPX4 介导的铁死亡通路的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2024, 24(14): 2619-2625.
- [19] IHEZIE S A, MATHEW I E, MCBRIDE D W, et al. Epigenetics in blood-brain barrier disruption[J]. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2021, 18(1): 17-33.
- [20] SHEN Q, YU Q, CHEN T J, et al. Rosuvastatin mitigates blood-brain barrier disruption in sepsis-associated encephalopathy by restoring occludin levels[J]. *European Journal of Medical Research*, 2025, 30(1): 103-114.
- [21] LI R, LIU X F, HUANG X D, et al. Single-cell transcriptomic analysis deciphers heterogenous cancer stem-like cells in colorectal cancer and their organ-specific metastasis[J]. *Gut*, 2024, 73(3): 470-484.
- [22] REN J S, BAI W, DING J J, et al. Hypoxia-induced AFAP1L1 regulates pathological neovascularization via the YAP-DLL4-NOTCH axis[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 651-676.
- [23] SUN S C, MOTAZEDIAN A, LI J Y, et al. Efficient generation of human NOTCH ligand-expressing haemogenic endothelial cells as infrastructure for in vitro haematopoiesis and lymphopoiesis[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 7698-7712.
- [24] THAPA K, KHAN H, SINGH T G, et al. Traumatic brain injury: Mechanistic insight on pathophysiology and potential therapeutic targets[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2021, 71(9): 1725-1742.
- [25] ZHANG H D, WANG W, WU Z C, et al. Effect of Notch signal pathway on steroid synthesis enzymes in TM3 cells[J]. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 2023, 23(14): 1771-1779.

(本文编辑 陈 晨)