

Notch 信号通路在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤恢复期的表达变化

周芝文¹, 杨期东², 任翔¹, 郑丽君³, 周文胜¹, 李爱平¹

1. 湖南省人民医院(湖南师范大学第一附属医院)神经内三科, 湖南省长沙市 410016
2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008
3. 湖南省人民医院(湖南师范大学第一附属医院)康复科, 湖南省长沙市 410016

摘要: **目的** 探讨局灶性脑缺血再灌注损伤恢复期 Notch 信号通路的表达变化。**方法** 构建 SD 大鼠大脑中动脉模型(MCAO)。将大鼠分为:对照组(12只),急性期组(24只),恢复期组(24只);急性期组分为3d和7d两个亚组,恢复期组分为15d和30d两个亚组。采用RT-PCR和Western blot测定Notch信号分子的mRNA和蛋白的表达变化。**结果** 与对照组大鼠相比,脑缺血再灌注后第3天Delta-like 1、Delta-like 3、Delta-like 4和Jagged 1的mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$);第30天的表达水平显著低于对照组($P < 0.05$)。Notch 1和Notch 2的mRNA表达水平在脑缺血再灌注后第3天显著升高($P < 0.05$);第30天,Notch 1($P < 0.05$)、Notch 2($P < 0.05$)、Notch 3($P < 0.05$)和Notch 4($P < 0.01$)的mRNA表达水平均显著低于对照组。脑缺血再灌注后第3天Hes-1($P < 0.01$)和Hey-1($P < 0.05$)的表达水平较对照组均明显升高;第30天,Hes-1和Hey-1的表达水平低于对照组($P < 0.05$)。NICD1和NICD2在大鼠局灶性缺血后第3天半暗带区的表达水平显著上升($P < 0.05$);第30天的表达水平显著下降($P < 0.05$)。**结论** 大鼠脑缺血再灌注损伤恢复期可能通过抑制Notch信号通路的表达,起到神经保护作用。

关键词: 脑缺血再灌注损伤; Notch 信号通路; 逆转录-聚合酶链反应; 蛋白免疫印迹; 大鼠

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.05.006

Change in the expression of the Notch signaling pathway in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury during recovery

ZHOU Zhi-Wen, YANG Qi-Dong, REN Xiang, ZHENG Li-Jun, ZHOU Wen-Sheng, LI Ai-Ping. The Third Department of Neurology, Hunan Provincial People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410016, China

Corresponding author: LI Ai-Ping, E-mail: wsaping@126.com

Abstract: Objective To investigate the change in the expression of the Notch signaling pathway in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injury during recovery. **Methods** Sprague-Dawley rats were used to establish a model of middle cerebral artery occlusion. The rats were divided into control group with 12 rats, acute stage group with 24 rats, and recovery stage group with 24 rats; the rats in the acute stage group were further divided into 3-day and 7-day subgroups, and those in the recovery stage group were divided into 15-day and 30-day subgroups. RT-PCR and Western blot were used to measure the changes in the mRNA and protein expression of Notch signaling molecules. **Results** Compared with the control group, there were significant increases in the mRNA expression of Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4, and Jagged 1 on day 3 after cerebral ischemia/reperfusion ($P < 0.05$) and significantly lower mRNA expression of these molecules on day 30 ($P < 0.05$). On day 3 after cerebral ischemia/reperfusion, there were significant increases in the mRNA expression of Notch 1 and Notch 2; on day 30, compared with the control group, there was significantly lower mRNA expression of Notch 1 ($P < 0.05$), Notch 2 ($P < 0.05$), Notch 3 ($P < 0.05$), and Notch 4 ($P < 0.01$). Compared with the control group, there were significant increases in the expression of Hes-1 ($P < 0.01$) and Hey-1 ($P < 0.05$) on day 3 after cerebral ischemia/reperfusion; on day 30, there was significantly lower expression of Hes-1 and Hey-1 than the control group ($P < 0.05$). There were

收稿日期:2018-06-08;修回日期:2018-09-25

作者简介:周芝文(1982-),女,主治医师,神经病学博士,主要从事脑血管疾病的基础与临床研究。

通信作者:李爱平(1985-),男,主治医师,神经病学硕士,主要从事脑血管疾病与癫痫的基础与临床研究。E-mail:wsaping@126.com。

significant increases in the expression of NICD1 and NICD2 in the penumbra on day 3 after focal cerebral ischemia ($P < 0.05$) and significant reductions on day 30 ($P < 0.05$). **Conclusions** The inhibition of the Notch signaling pathway during recovery of cerebral ischemia/reperfusion injury may help to protect the nerves.

Key words: cerebral ischemia/reperfusion injury; Notch signaling pathway; reverse transcription-polymerase chain reaction; Western blot; rat

脑血管疾病是当今人类三大死亡原因之一,其中缺血性脑血管病占据绝大部分。了解脑缺血后病理生理变化,寻找脑缺血的防治方法,为目前国内学者研究的热点。Notch 信号通路是一条重要的信号转导通路,在一系列生理、病理过程中发挥重要作用。研究表明,Notch 信号通路对神经细胞的增殖、凋亡和分化发挥重要的作用^[1,2],同时参与神经可塑性调节^[3]。Ren 等^[4]构建大鼠大脑缺血模型研究发现,恢复大脑供血 24 h(再灌注)后,Notch1 和 NICD 在大脑受损区周边的表达水平升高。陈丽等^[5]发现,Notch 激活片段(NICD)在脑缺血再灌注(24 h)损伤后的表达水平升高。但是,目前并未有研究对大脑缺血再灌注损伤恢复期 Notch 信号分子的表达水平进行研究。本实验将探讨大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后恢复期 Notch 信号通路的表达变化。

1 材料与方法

1.1 动物饲养及分组

60 只雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠(8~10 周龄,平均体重 220~250 g),购于中南大学湘雅医学院动物饲养中心。动物实验操作严格遵照美国国立卫生研究院的准则。SD 大鼠培养于塑料培养箱中(长宽高分别为 40 cm、30 cm 和 18 cm),能够自由进食和饮水。每个饲养箱中放四只。饲养箱周围环境温度控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照时间为 12 h,模拟白天和黑夜的生活环境。将大鼠随机分为:对照组(12 只)、急性期组(24 只)和恢复期组(24 只)。急性期组分为 3 d 和 7 d 两个亚组,恢复期组分为 15 d 和 30 d 两个亚组

1.2 构建大鼠 MCAO 模型

SD 大鼠大脑中动脉模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的构建采用经典的 Longa 线栓法。具体方法:腹腔注射 2% 水合氯醛(剂量:5 ml/kg)麻醉大鼠,颈部皮肤消毒,沿颈正中中线切长约 3 cm 的切口,分离颈部皮下组织,依次分离右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid arter-

y, ICA),近心端结扎 CCA 和 ECA,CCA 远心端处挂线,系松结。微动脉夹暂时夹闭 ICA 起始端,眼科剪在 CCA 距分叉口 1 cm 处剪一小口,沿 ICA 的切口缓慢插入直径为 0.19 mm,长度为 30 mm,头端经硅橡胶钝化处理的鱼线,插入深度约为 (18 ± 0.5) mm,然后固定栓线,消毒缝合皮肤。静置 SD 大鼠 2 h。拔出栓线,诱导缺血后再灌注损伤的产生。对照组插线深度为 8~10 mm,其余操作同模型组。

1.3 Real-time PCR 检测

液氮中取出脑组织,研碎,将组织样品转移到离心管中。按照说明书步骤操作,抽提总 RNA,反转录制备 cDNA。采用 Primer 6.0 软件进行引物设计。设计原则为:有引物指导合成的目的片段长度为 80~150 bp,引物退火温度要求在 60°C 左右,引物需在 NCBI/BLAST 进行比对,检测引物特异性。引物序列如表 1 所示。

常规 PCR 反应,以 β -actin 为内参,设定反应程序:在 42°C 的条件下反应 60 min,然后在 70°C 的条件下反应 10 min。将离心管置于冰上冷却。完成逆转录后所得 cDNA 模板稀释 5 倍后放在 -80°C 冰箱备用。

定量 PCR 设定反应程序。 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, $58 \sim 64^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72°C 延伸 15 s, 35 个循环,最后 72°C 延伸 5 min。

1.4 Western blot 检测

液氮中取出脑组织,研碎,将组织样品转移到离心管中。细胞裂解液加入离心管中裂解细胞,提取总蛋白。采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定细胞裂解液中蛋白质浓度。按照蛋白浓度,加入一定量的样品上样缓冲液,将蛋白样品稀释 5 倍,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。通过电转印法将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶上转移到 PVDF 膜上。转印后的 PVDF 膜放置到用 PBS 配制的 5% 脱脂牛奶中, 4°C 封闭过夜或在室温下摇床上封闭 2 h。用 Western 洗涤液(P0023C)或者是 PBST 漂洗一次,1~2 min,取出 PVDF 膜,按预染 Marker 条带显示位置将各目的条

表1 大鼠 Notch 信号分子的基因序列

基因名	引物序列(5' -3')
Notch 1 正义链	CGT GCT ATG TTG TGG ACC ATG GC
Notch 1 反义链	CAC ACT CGT GGG TGG TGT CCC CCG
Notch 2 正义链	CTGA GGA CTC TTC TGC CAA C
Notch 2 反义链	CAG TTG ATC AGC TCT GCC AC
Notch 3 正义链	ATG GCA GGC TTC ACA GGA AC
Notch 3 反义链	TGC AGC TGA AGC CAT TGA CT
Notch 4 正义链	AGT GTC TCC CAG GCT TTG AA
Notch 4 反义链	GAA GAT CAA GGC AGC TGG CT
Delta-like 1 正义链	AGG ACT GTC AGC ACA AGG CT
Delta-like 1 反义链	TGG ACA GGT AGC TCG TGC AC
Delta-like 3 正义链	GCT GGA AGT GGA TTG TGG
Delta-like 3 反义链	CTT GTC GCT GTG AGG ATA C
Delta-like 4 正义链	GCT GGA AGT GGA TTG TGG
Delta-like 4 反义链	CTT GTC GCT GTG AGG ATA C
Jagged 1 正义链	ATG CGG TCC CCA CGG ACG CGC
Jagged 1 反义链	GCC TTT TCA ATT ATG CTA TCA GG
Jagged 2 正义链	GCG CCA ACT GCC ACA TCA A
Jagged 2 反义链	GGC TGC TGG CAC ACT TGT AG
Hes 1 正义链	GGG CAA GAA TAA ATG AAA G
Hes 1 反义链	GCG CGG TAC TTC CCC AAC AC
Hey 1 正义链	CAT TCT GGA AAT GAC TGT GAA
Hey 1 反义链	TGC TGA GCG CGG CG CA
β -actin 正义链	AGA TCC TGA CCG AGC GTG GC
β -actin 反义链	CCA GGG AGG AAG AGG ATG CG

带及内参剪开。然后将这些条带放入稀释好的一抗(Notch1和Notch2抗体)中。4℃孵育过夜或在室温下摇床上孵育1~2h。用PBST洗膜3次,每次5min。用同样的方法添加二抗,4℃孵育过夜或在室温下摇床孵育1h。孵育后弃去二抗,用PBST洗膜3次,每次5~10min。使用辣根过氧化物酶HRP-ECL发光法对PVDF膜上的蛋白进行显影。最后将PVDF膜放置在Western blot成像仪上进行扫描,拍照保存。

1.5 统计学处理

采用SPSS19.0统计软件进行统计学分析。实

验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用ANOVA单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Notch 信号分子 mRNA 表达水平

Notch 信号分子包括 Notch 配体(Delta-like 1、Delta-like 3、Delta-like 4、Jagged 1 和 Jagged 2)和 Notch 受体(Notch 1、Notch 2、Notch 3 和 Notch 4)。

与对照组相比,脑缺血再灌注后第3天Delta-like 1、Delta-like 3、Delta-like 4和Jagged 1表达水平明显升高($P < 0.05$);第7天Jagged 1表达仍显著高于对照组($P < 0.05$);第15天Delta-like 3表达水平显著低于对照组($P < 0.05$);第30天Delta-like 1、Delta-like 3、Delta-like 4、Jagged 1和Jagged 2的表达水平均显著低于对照组($P < 0.05$)。见表2。

与对照组相比,Notch 1和Notch 2的mRNA表达水平在脑缺血再灌注后第3天显著升高($P < 0.05$);第7天Notch 2的mRNA表达水平仍然高于对照组($P < 0.05$);第15天Notch 4的mRNA表达水平下降;第30天Notch 1、Notch 2、Notch 3($P < 0.05$)和Notch 4($P < 0.01$)的mRNA表达水平均显著低于对照组,其中Notch 4的表达水平最低。见表3。

2.2 Notch 信号的靶基因 mRNA 表达水平

Hes-1和Hey-1为Notch信号的靶基因,其表达水平常作为评估Notch信号通路激活的重要标志。

与对照组相比,脑缺血再灌注后第3天Hes-1($P < 0.01$)和Hey-1($P < 0.05$)的表达水平均显著升高;第7天Hes-1和Hey-1的表达水平仍然高于对照组($P < 0.05$);第15和30天Hes-1和Hey-1的表达水平低于对照组($P < 0.05$)。见表4。

表2 Notch 配体的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

基因名	对照组($n=6$)	急性期组($n=24$)		恢复期组($n=24$)	
		3 d	7 d	15 d	30 d
Delta-like 1	1 ± 0.23	2.34 ± 0.51 *	1.22 ± 0.24	0.75 ± 0.08	0.39 ± 0.03 *
Delta-like 3	1 ± 0.16	1.75 ± 0.44 *	0.95 ± 0.34	0.43 ± 0.06 *	0.38 ± 0.04 *
Delta-like 4	1 ± 0.24	1.46 ± 0.29 *	1.37 ± 0.29	0.89 ± 0.13	0.47 ± 0.06 *
Jagged 1	1 ± 0.11	2.14 ± 0.49 *	1.69 ± 0.18 *	1.18 ± 0.14	0.59 ± 0.07 *
Jagged 2	1 ± 0.19	1.39 ± 0.37	1.52 ± 0.23	1.09 ± 0.12	0.69 ± 0.06 *

注: * 为与对照组比较, $P < 0.05$

表3 Notch 受体的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

基因名	对照组(n=6)	急性期组(n=24)		恢复期组(n=24)	
		3 d	7 d	15 d	30 d
Notch 1	1 ± 0.13	1.42 ± 0.27 *	1.32 ± 0.34	1.03 ± 0.36	0.73 ± 0.09 *
Notch 2	1 ± 0.06	1.36 ± 0.19 *	1.38 ± 0.15 *	0.92 ± 0.15	0.57 ± 0.16 *
Notch 3	1 ± 0.09	1.21 ± 0.24	1.25 ± 0.27	0.85 ± 0.21	0.67 ± 0.14 *
Notch 4	1 ± 0.18	1.19 ± 0.13	1.29 ± 0.24	0.67 ± 0.06 *	0.35 ± 0.03 *

注: * 为与对照组比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$

表4 Notch 靶基因的 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

基因名	对照组(n=6)	急性期组(n=24)		恢复期组(n=24)	
		3 d	7 d	15 d	30 d
Hes-1	1 ± 0.16	3.67 ± 0.51 *	1.64 ± 0.25 *	0.72 ± 0.11 *	0.43 ± 0.05 *
Hey-1	1 ± 0.19	2.29 ± 0.37 *	1.42 ± 0.20 *	0.59 ± 0.06 *	0.48 ± 0.08 *

注: * 为与对照组比较, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$

2.3 Notch 信号分子蛋白表达水平

NICD1 和 NICD2 是 Notch 1 和 Notch 2 的激活片段,测定 NICD1 和 NICD2 的表达水平有助于了解 Notch 1 和 Notch 2 被激活的情况。

与对照组相比, NICD1 和 NICD2 在大脑局灶性缺血后第 3 天表达水平显著上升 ($P < 0.05$); 第 30 天的表达水平显著下降 ($P < 0.05$)。见图 1。

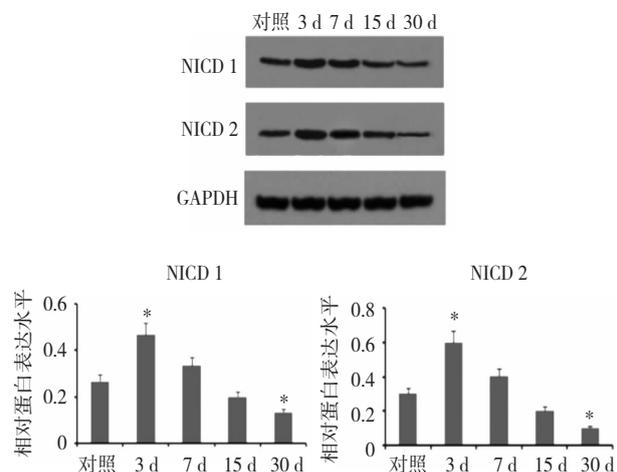


图1 NICD1 和 NICD2 在大脑局灶性缺血后顶叶半暗带区的表达水平

3 讨论

Notch 信号通路参与了多种不同器官的缺血/再灌注损伤,尤其是心脏^[6]和大脑^[7]。研究证实 Notch1 可保护心肌细胞免受缺血再灌注损伤的影响^[6,8-10]。Arumugam 等^[11]报道,应用 γ -分泌酶抑制剂阻断 Notch 信号通路,可减轻局灶性脑缺血再灌注导致的神经元损伤,Notch 信号分子通过增加凋亡、激活小胶质细胞和促进炎性白细胞浸润而导致

神经元损伤。Notch 1 通过激活 JNK/c-Jun 信号通路促进缺血性神经元死亡^[12]。另外,有研究表明,Notch 信号分子通过抑制核因子- κ B、裂解的 caspase-3、4 (NF- κ B) 和 Bim 的表达,对缺血的神经元起保护作用^[13]。Zhao 等^[14]采用电针预处理治疗缺血性损伤也得到了类似的结果。Sun 等^[15]研究提示,Notch 1 和 Jagged 1 信号转导调控正常和缺血条件下老年脑室下区神经发生。这些研究均表明 Notch 信号通路参与了缺血性脑损伤的病理过程。

本研究发现大鼠脑缺血再灌注后急性期 Notch 信号被显著激活。脑缺血再灌注后第 3 天, NICD1 和 NICD2 的表达水平显著升高。Hes-1 和 Hey-1 为 Notch 信号的靶基因,其表达水平常作为评估 Notch 信号激活的重要指标。与上述结果一致, Hes-1 和 Hey-1 的 mRNA 表达水平在脑缺血再灌注后第 3 天显著升高。与 Ren 等^[4]和陈丽等^[5]研究结果一致。但是之前并未有研究报道脑缺血再灌注损伤恢复期 Notch 信号分子的表达变化。本实验发现 Notch 信号分子在脑缺血再灌注损伤恢复期的表达水平下降。第 30 天 Notch 配体包括 Delta-like 1、Delta-like 3、Delta-like 4、Jagged 1 和 Jagged 2 的表达水平均显著低于对照组。此外,第 30 天, Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、Hes-1 和 Hey-1 的 mRNA 表达水平亦显著低于对照组。NICD1 和 NICD2 的蛋白水平也显著降低。这些证据表明 Notch 信号通路在脑缺血再灌注损伤恢复期被显著抑制。

Zhang 等^[16]研究发现, Notch3 和 Notch4 在大鼠缺血再灌注一星期后在大脑梗死区的表达水平显著升高。程连臣等^[17]研究了 Notch1 对脑局灶性缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的影响,发现 NICD1

在缺血后再灌注的第1天、第3天和第7日均明显升高,其中第3天的表达水平最高。这与我们的研究结果一致。程连臣等^[18]还发现,对大鼠注射 Notch1 的抑制剂 DAPT 后,神经细胞的凋亡率增加,他们认为 Notch1 信号抑制了脑局灶性缺血再灌注损伤后神经细胞的凋亡。但是 Shi 等^[18]发现, MicroRNA-137 通过降低 Notch1 的表达水平抑制缺血再灌注致神经细胞损伤,抑制 Notch1 信号增强了 MicroRNA-137 对缺血再灌注后神经细胞的保护作用,促进 Notch1 信号抑制了 MicroRNA-137 对缺血再灌注后神经细胞的保护作用,这提示缺血再灌注后 Notch1 表达水平升高导致了神经元损伤。Meng 等^[19]研究发现,采用 DAPT 抑制 Notch 信号或 siRNA 基因敲除 Notch2,增加了小鼠大脑缺血再灌注后神经细胞的活力,同时增强了神经干细胞的分化能力。Notch 信号对脑局灶性缺血再灌注损伤后神经细胞的作用还有待进一步的研究。大多数的学者认为 Notch 信号可能具有两面性,既有其有利的一面,也有有害的一面。抑制 Notch 信号的过度激活,或者防止 Notch 信号被过度抑制,可能有助于 Notch 信号发挥正常的生理功能,从而起到神经保护作用。

参 考 文 献

[1] Geng X, Sun T, Li JH, et al. Electroacupuncture in the repair of spinal cord injury: inhibiting the Notch signaling pathway and promoting neural stem cell proliferation [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(3): 394-403.

[2] Ha YP, Wang ZL, Lei H, et al. Effects of over-expression of Notch1 intracellular domain on the differentiation of c-Kit + bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*, 2016, 20: 785-792.

[3] 王珏,邓宇斌,万勇. Notch 信号通路对神经干细胞增殖分化的作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(5): 708-712.

[4] Ren C, Li S, Wang B et al. Limb remote ischemic conditioning increases Notch signaling activity and promotes arteriogenesis in the ischemic rat brain [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 3(16): 901-909.

[5] 陈丽,叶军明,王力峰,等. Notch 细胞内片段 (NICD) 在脑缺血再灌注损伤后的表达 [J]. *赣南医学院学报*, 2011, 31(6): 686-687.

[6] Yu L, Li F, Zhao G, et al. Protective effect of berberine against myocardial I1 ischemia reperfusion injury: role of Notch1/Hes1-PTEN/Akt signaling [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(6): 796-810.

[7] Baik SH, Fane M, Park JH, et al. Pin1 promotes neuronal

14 death in stroke by stabilizing Notch intracellular domain [J]. *Ann Neurol*, 2015, 77(3): 504-516.

[8] Pei H, Song X, Peng C, et al. TNF-alpha inhibitor protects against myocardial I9 ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 82: 114-121.

[9] Xu H, Jin L, Chen Y, et al. Downregulation of microRNA-429 protects cardiomyocytes against 22 hypoxia-induced apoptosis by increasing Notch1 expression [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(6): 1677-1685.

[10] Boccalini G, Sassoli C, Formigli L, et al. Relaxin protects cardiac muscle cells from 2 hypoxia/reoxygenation injury: involvement of the Notch-1 pathway [J]. *FASEB J*, 2015, 29(1): 239-249.

[11] Arumugam TV, Chan SL, Jo DG, et al. Gamma secretase-mediated 4 Notch signaling worsens brain damage and functional outcome in ischemic stroke [J]. *Nat Med*, 2006, 12(6): 621-623.

[12] Cheng YL, Choi Y, Seow WL, et al. Evidence that neuronal 14 Notch-1 promotes JNK/c-Jun activation and cell death following ischemic stress [J]. *Brain Res*, 2014, 1586: 193-202.

[13] Arumugam TV, Cheng YL, Choi Y, et al. Evidence that 7 gamma-secretase-mediated Notch signaling induces neuronal cell death via the nuclear 8 factor-kappaB-Bel-2-interacting mediator of cell death pathway in ischemic stroke [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 80(9): 23-31.

[14] Zhao Y, Deng B, Li Y, et al. Electroacupuncture pretreatment attenuates cerebral ischemic injury via notch pathway-mediated up-regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha in rats [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(8): 1093-1103.

[15] Sun F, Mao X, Xie L, et al. Notch1 signaling modulates neuronal progenitor activity in the subventricular zone in response to aging and focal ischemia [J]. *Aging Cell*, 2013, 12(6): 978-987.

[16] Zhang HL, Hu J, Wang J et al. Expressions of Notch3, Notch4, Frizzled2 and Tead1 in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2015, 95(46): 3766-3769.

[17] 程连臣,王昊,徐川,等. Notch1 对局灶性脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的影响 [J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(2): 59-62.

[18] Shi F, Dong Z, Li H et al. MicroRNA-137 protects neurons against ischemia/reperfusion injury through regulation of the Notch signaling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 52(1): 1-8.

[19] Meng S, Su Z, Liu Z et al. Rac1 contributes to cerebral ischemia reperfusion-induced injury in mice by regulation of Notch2 [J]. *Neuroscience*, 2015, 306: 100-114.