

脑络欣通对血管性痴呆大鼠学习记忆功能及海马神经元内钙离子浓度的影响

何浩^{1,2}, 孙林娟^{3*}, 杨文明², 胡建鹏¹, 王晓阳²

(1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽合肥 230038; 2. 安徽中医药大学第一附属医院脑病中心, 安徽合肥 230031; 3. 中国中医科学院西苑医院神经内科, 北京 100091)

摘要: 目的 观察脑络欣通对血管性痴呆(VD)模型大鼠学习记忆功能的作用及对大鼠海马神经元胞内钙离子水平的影响。**方法** 采取改良双侧颈总动脉结扎方法(2-VO)造模血管性痴呆大鼠;随机分为模型组、脑络欣通组(8.54 g/kg)、石杉碱甲组(0.06 mg/kg)及假手术组;大鼠灌胃给药1月后, Morris水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力;流式细胞仪检测海马神经元胞内钙离子荧光强度;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠海马组织降钙素基因相关肽及其受体的表达。**结果** 与模型组比较,脑络欣通可明显缩短血管性痴呆模型大鼠的逃避潜伏期($P < 0.01$);可显著增加血管性痴呆模型大鼠停留在站台所在象限时间及穿越平台的次数($P < 0.01$);与模型组比较,脑络欣通可显著减低血管性痴呆模型大鼠海马神经元胞内 Ca^{2+} 水平($P < 0.01$);与模型组比较,脑络欣通可增强血管性痴呆模型大鼠海马组织降钙素基因相关肽及其受体的表达($P < 0.05$)。**结论** 脑络欣通可显著改善血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力,可能与通过增强大鼠海马组织降钙素基因相关肽及其受体表达进而降低海马神经元内 Ca^{2+} 水平有关。

关键词: 脑络欣通;血管性痴呆;降钙素基因相关肽;钙离子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)05-1031-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.005

Effects of Naoluo Xintong Decoction on vascular dementia rats' memory and learning, and hippocampal neuronal intracellular calcium concentration

HE Hao^{1,2}, SUN Lin-juan^{3*}, YANG Wen-ming², HU Jian-peng¹, WANG Xiao-yang²

(1. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 2. The First Hospital Affiliated to University Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 3. Department of Neurology, Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

ABSTRACT: AIM To study the effects of Naoluo Xintong Decoction (NLXTD) on vascular dementia (VD) rats' memory and learning, and hippocampal neuronal intracellular calcium concentration. **METHODS** Rats were divided randomly into model group, NLXTD group (8.54 g/kg), Huperzia-A group (0.06 mg/kg) and sham group. They were made into vascular dementia rats by the improved bilateral carotid artery ligation method (2-VO) thereafter if necessary. After one-month corresponding intragastric administration, the rats were ethologically evaluated by the Morris water maze experiment; their fluorescence intensity of hippocampal neuronal intracellular calcium concentration was determined by flow cytometry, and the expression levels of calcitonin gene related peptide (CGRP) and its hippocampus receptor were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS** Compared with the model group, rats in NLXTD group displayed overall superiority to those of the model group in terms of significantly shortened time of escape latency ($P < 0.01$), significantly increased number through the platform and the times in the fourth quadrant ($P < 0.01$), a lower fluorescence intensity indicating a lower hippocampal neuronal intracellular calcium concentration ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The significant im-

收稿日期: 2017-11-24

基金项目: 省部共建新安医学教育部重点实验室开放项目(2015sbj004)

作者简介: 何浩(1992—),男,硕士生,从事脑血栓基础与临床研究。E-mail: 734090872@qq.com

*通信作者: 孙林娟(1975—),女,博士,从事椎体外系疾病临床与基础研究。Tel: 13699279549, E-mail: sunlinjuan888@163.com

provement of memory and learning observed among VD rats' due to NLXTD intervention may be attributable to its efficacy in reducing the hippocampal neuronal intracellular calcium concentration by enhancing the expression levels of CGRP and its receptor.

KEY WORDS: Naoluo Xintong Decoction (NLXTD); vascular dementia (VD); calcitonin gene related peptide (CGRP); calcium

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指由各种脑血管病引起脑组织损害所致的痴呆, 为次于阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 的第二大类痴呆类型^[1]。近些年来, VD 发生率随着脑血管疾病的增加而逐年上升, 为社会带来了巨大的负担。虽然 VD 是唯一可防治的痴呆^[2], 但是目前尚无特异性疗法。因此, 近些年来人们对此进行大量研究, 希望发现有效药物和疗法。脑络欣通为新安医学大家王乐陶老先生医治缺血性脑血管病的经验用方, 具有益气行血通络的功效。经研究证实, 脑络欣通可通过增加局部脑组织供血、改善血液循环、抗神经元凋亡等途径发挥减轻大脑缺血性损伤和促进大脑功能恢复的作用^[3-5]。同时, 发现其具有改善缺血性脑血管病引起的认知功能障碍的作用, 并且持久。然而, 至今有关脑络欣通对 VD 学习记忆能力的作用及可能途径尚未经具体实验证实。故本实验通过制作 VD 大鼠模型, 探究脑络欣通对 VD 大鼠学习记忆的作用及对海马神经元内钙离子水平的影响, 为其在临床应用和进一步开发提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 健康 SD 雄性大鼠 120 只, 体质量为 230 ~ 270 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (皖) 2011-0002, SPF 级。饲养环境为置于隔离独立送风笼具饲养, 保持自然光照, 维持温度 23 ~ 25 °C 及相对湿度 (50 ± 5)%, 自由取食饮水。

1.2 药品与试剂 脑络欣通由黄芪 30 g、川芎 6 g、三七 4 g、红花 10 g、当归 10 g、天麻 10 g 及蜈蚣 2 条组成, 由安徽中医药大学第一附属医院药剂科提供; 石杉碱甲 (商品名 忆诺, 0.05 mg, 北京华素制药股份有限公司, 批号 15050513)。水合三氯乙醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20110509); 0.25% 胰酶细胞消化液 (江苏碧云天生物技术研究所, 批号 C0201); NeuroGro 神经元细胞基础培养基 (上海源培生物科技股份有限公司, 批号 F20404); Fluo-3/AM 钙离子荧光探针

(日本同仁化学研究所, 批号 KN640); 二甲基亚砜 (DMSO) (日本同仁化学研究所, 批号 KM715); 大鼠降钙素基因相关肽 (CGRP) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号 AK0017APR18095); 大鼠降钙素基因相关肽受体 (CGRPR) 酶联免疫吸附测定试剂盒 (上海谷研实业有限公司, 批号 0170629)。

1.3 主要仪器与设备 Morris 水迷宫实验系统 (淮北正华生物仪器设备有限公司); 1510 型酶标仪 (美国 Thermo 公司); 2-16PK 型高速冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); ICV-450 型电热恒温培养箱 (日本 ASONE 公司); MCO-175 型 CO₂ 培养箱 (日本 Sanyo 公司); FC500 流式细胞仪 (美国 BeckMan 公司)。

2 方法

2.1 改良 VD 模型的制备^[6] 预备手术大鼠术前禁食、禁水 8 h, 在保持适当室温的条件下, 用 3.5% 的水合氯醛 (1 mL/100 g) 腹腔注射大鼠以作麻醉, 仰卧固定于手术台, 碘酒消毒颈前手术部位, 取颈正中纵行切口, 逐步钝性分离皮下软组织及肌层, 暴露右侧的颈总动脉 (CAA) 和迷走神经, 用玻璃分针分离迷走神经和 CAA, 以 1 号手术线将右侧 CCA 永久性结扎, 3 d 后以相同的方法将左侧 CCA 结扎。假手术组以相同的步骤进行操作, 但是只分离双侧 CCA 而不结扎。结扎 CCA 后恢复组织层次、缝合切口, 并行常规消毒, 同时庆大霉素 0.05 mL 腹腔注射, 1 次/d, 连续 5 d, 防止感染。术后动物置于干净鼠笼中, 保持温度, 自由获取水源及饲料。

2.2 分组方法与给药方法 将造模后的大鼠适应性喂养 1 周后, 行 Morris 水迷宫训练, 为时 5 d, 筛选符合 VD 标准的大鼠, 将其采用随机分为模型组、脑络欣通组及石杉碱甲组各 14 只, 另假手术组 14 只。脑络欣通组、石杉碱甲组分别按 8.54 g/(kg · d)、0.06 mg/(kg · d) 给药, 早晚各灌胃 1 次。假手术组及模型组予以等量生理盐水灌胃。如上给药连续 1 月。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 VD标准^[7] 在120 s内,假手术组大鼠寻到并且爬上平台的时间为逃避潜伏期 (escape latency, EL)。将EL的平均值作为参考值,计算出造模组各大鼠各时段逃避潜伏期平均值与参考值之差占该鼠平均逃避潜伏期的比值,若该值>20%则视为VD大鼠模型。

2.3.2 学习记忆能力检测 采用Morris水迷宫^[8]。喂药4周后采用此法对大鼠学习和记忆功能进行测试。Morris水迷宫是一个高50 cm、直径为200 cm的圆形水池,水深30 cm,训练过程中水温控制在25℃左右,水中加入黑色墨水致水质呈不透明,以便利于实验。于池壁上间隔等距离取4个点作标记,将水池分为四个大小相同的象限,依照次序分为第一象限、第二象限、第三象限及第四象限。于第四象限正中放置圆形站台,并使此台面低于水面2 cm。并于实验时,房间内隔绝自然光,使用特定光源以及保持实验室内各物件位置不变。

定向航行实验:于每天固定时间段将大鼠分别从四个象限面朝向池壁轻放入水中,记录每只大鼠EL,如果某大鼠在规定时间内未找到平台,那么将该鼠引导至站台上持续30 s以作学习,同时将其EL记录为120 s。取每只大鼠同一天4次EL的平均数作为该鼠当天学习成绩。连续训练5 d。

空间探索实验:在5 d的定向航行实验后,第六天撤去站台,于第二象限面向池壁将大鼠放入水中,让其在水池中进行为时120 s的自由游泳,记录大鼠穿过站台原属位置的次数,在第四象限活动时间,以作评价空间记忆能力之用。

2.3.3 取材方法 给药结束后,麻醉大鼠,于冰台上迅速断头取脑,分离海马组织。右侧海马用生理盐水洗净海马组织上残留的血液后置于离心管中,用眼科剪剪碎海马组织,以立即作检测海马神经元细胞内钙离子之用;左侧海马则置于冰冻管

中,编号标记后,-80℃保存以作后续ELISA检测降钙素基因相关肽及其受体表达之用。

2.3.4 流式细胞仪检测 海马细胞内钙离子检测 50μg的Fluo3-AM粉末可用44.2 μL的DMSO溶解配制成浓度为1 mmol/L的母液,可置-20℃密封保存。在正式实验时,再用1 mL的HBSS溶液稀释5 μL的Fluo3-AM母液配制成荧光探针工作液。

将上述已准备好的新鲜的海马组织剪碎后加入适量0.25%的胰蛋白酶溶液,充分拌匀后再经37℃水浴消化10 min,加入离心管中,经离心分离细胞,所得沉淀用HBSS溶液漂洗后加入含终浓度为5 mg/L Fluo3-AM的无血清培养基,置入CO₂培养箱,将温度设为37℃孵育30 min,再次离心后沉淀用HBSS反复冲洗3次,留细胞悬液1 mL,200目尼龙网过滤,后使用流式细胞仪进行检测。

2.3.5 ELISA法检测降钙素基因相关肽及其受体检测 将冻存的海马组织取出、称重剪碎,与对应体积的PBS(1:9质重量体积比)一起加入玻璃匀浆器中于冰上充分研磨,将匀浆液于5 000×g离心10 min,小心吸取上清到做好标记的EP管待用。根据ELISA试剂盒说明书所提供的实验步骤进行降钙素基因相关肽及其受体的检测。

2.4 统计学处理 采用SPSS 19.0统计分析软件进行单因素方差分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学差异水平以 $P < 0.05$ 为标准。

3 实验结果

3.1 脑络欣通对血管性痴呆模型大鼠Morris水迷宫逃避潜伏期的影响 结果见表1,在定位航行实验中,各组大鼠平均逃避潜伏期都表现出逐渐缩短的趋势。与假手术组相比,在各时间段模型组大鼠平均逃避潜伏期均明显延长($P < 0.01$)。与模型组相比,脑络欣通组大鼠在第3天逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),在第4~5天逃避潜伏期明显缩短($P < 0.01$)。

表1 脑络欣通对VD模型大鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

Tab. 1 Effects of NLXTD on time of escape latency of VD model rats ($\bar{x} \pm s, n = 14$)

组别	剂量	逃避潜伏期/s				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
假手术组	—	56.62 ± 6.31	49.67 ± 4.80	37.58 ± 5.03	23.26 ± 4.54	13.90 ± 3.90
模型组	—	70.00 ± 11.48*	66.02 ± 10.35*	57.89 ± 8.16*	47.73 ± 7.12*	39.76 ± 5.52*
脑络欣通组	8.54 g/kg	68.20 ± 10.46	63.08 ± 8.28	52.40 ± 7.44#	40.50 ± 5.38##	29.10 ± 4.08##
石杉碱甲组	0.06 mg/kg	65.51 ± 8.37	59.43 ± 8.08#	48.20 ± 6.52##	35.20 ± 5.04##	25.60 ± 3.93##

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

3.2 脑络欣通对血管性痴呆大鼠模型Morris水迷宫第四象限活动时间和穿越平台次数的影响 结果

见表2,与假手术组相比,模型组于第四象限活动时间明显缩短,同时穿越平台次数亦明显减少

($P < 0.01$)。与模型组相比,石杉碱甲组和脑络欣通组在第四象限活动时间明显延长,穿越平台次数亦明显增多($P < 0.01$)。

表2 脑络欣通对VD模型大鼠空间探索的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 14$)

Tab. 2 Effects of NLXTD on the space navigation of VD model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 14$)

组别	剂量	第四象限活动时间/s	穿越平台次数/次
假手术组	—	48.36 ± 6.32	7.2 ± 1.7
模型组	—	29.95 ± 7.19*	2.9 ± 1.4*
脑络欣通组	8.54 g/kg	43.96 ± 6.61 ^{##}	6.7 ± 1.7 ^{##}
石杉碱甲组	0.06 mg/kg	46.14 ± 6.46 ^{##}	6.9 ± 1.6 ^{##}

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$

3.3 脑络欣通对大鼠海马神经元内钙离子荧光强度的影响 见表3和图1,与假手术组相比,VD模型大鼠海马神经元内的 Ca^{2+} 荧光强度显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,脑络欣通组大鼠海马神经元内的 Ca^{2+} 荧光强度显著降低($P < 0.01$)。

表3 脑络欣通对大鼠海马神经元细胞内钙离子荧光强度的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 14$)

Tab. 3 Effects of NLXTD on fluorescence intensity of intracellular calcium of hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s$, $n = 14$)

组别	剂量	平均荧光强度
假手术组	—	7.34 ± 0.45
模型组	—	13.49 ± 1.07*
脑络欣通组	8.54 g/kg	9.11 ± 0.57 ^{##}
石杉碱甲组	0.06 mg/kg	13.12 ± 0.70

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.01$

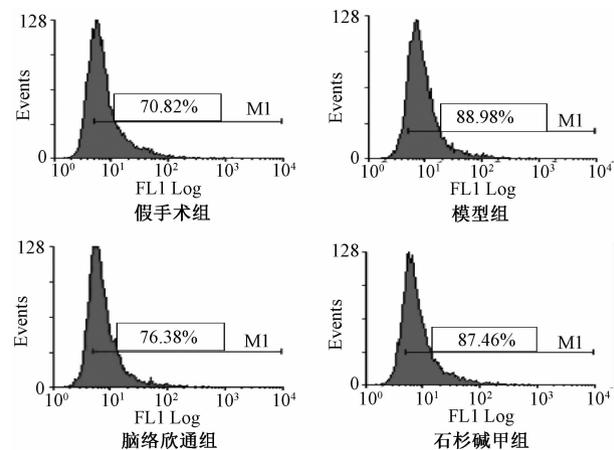


图1 大鼠海马神经元细胞内钙离子荧光强度流式细胞仪图

Fig. 1 Figure of intracellular calcium fluorescence intensity in the hippocampus of rats by flow cytometry

3.4 脑络欣通对大鼠海马组织CGRP及CGRPR的影响 见表4,与假手术组相比,模型组大鼠海马组织CGRP和CGRPR表达水平明显降低($P < 0.01$);与模型组相比,脑络欣通组大鼠海马组织CGRP和CGRPR表达水平升高($P < 0.05$)。

表4 脑络欣通对海马组织CGRP和CGRPR水平表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 14$)

Tab. 4 Effects of NLXTD on the expression of CGRP and CGRPR of hippocampal neurons ($\bar{x} \pm s$, $n = 14$)

组别	剂量	CGRP/ (pg·mL ⁻¹)	CGRPR/ (pg·mL ⁻¹)
假手术组	—	47.83 ± 10.22	1.55 ± 0.37
模型组	—	34.56 ± 6.24*	0.88 ± 0.41*
脑络欣通组	8.54 g/kg	45.55 ± 8.65 [#]	1.43 ± 0.70 [#]
石杉碱甲组	0.06 mg/kg	37.88 ± 9.98	0.94 ± 0.30

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

4 讨论

血管性痴呆属于中医学“善忘”“郁证”及“呆证”等范畴,其基本病机为痰瘀痹阻脑络、髓减脑消及神机失用,以气虚为本,血瘀为标。脑络欣通由黄芪、红花、当归、川芎、三七天麻及蜈蚣组成,具有益气行血、熄风通络的功效,在临床治疗中对缺血性中风病具有显著疗效。现代研究通过建立大鼠缺血损伤动物模型,已经证实脑络欣具有增加局部脑组织供血、改善血液循环、抗神经元凋亡等多环节、多靶点作用机制^[3-5]。因此,本实验在前期研究结果的基础上进一步探究了脑络欣通对VD大鼠模型学习记忆能力的作用及其作用机制。研究结果显示脑络欣通可明显缩短VD大鼠水迷宫实验平均逃避潜伏期,显著延长大鼠在第四象限活动时间,增加其穿越隐藏平台的次数。表明脑络欣通可改善VD大鼠学习记忆能力。

VD患者主要表现为持续性记忆力、判断力、定向力、语言等认知功能障碍,而学习记忆功能障碍被认为是认知功能的基本要素。海马是哺乳动物学习记忆的关键部位^[9],其对缺血缺氧极为敏感。正常情况下, Ca^{2+} 为细胞内第二信使,发挥重要的生理作用。但是在长期缺血缺氧的条件下,细胞内 Ca^{2+} 水平超载^[10]。一方面,神经元内 Ca^{2+} 超载可激发炎症反应、膜降解、自由基大量形成及线粒体功能失调等损害过程,进一步导致神经元变性、坏死,逐步引起认知功能障碍,致使痴呆发生^[11]。另一方面,脑血管平滑肌细胞和内皮细胞内 Ca^{2+} 水平升高可促进白三烯和血栓素的生成和增加动脉

紧张度及收缩强度,引起血小板异常聚集和动脉持续性痉挛,加重脑缺血,进一步诱导神经元凋亡坏死^[12]。因此,人们认为脑组织和神经元内 Ca^{2+} 水平超载是 VD 的重要致病机制之一,有效降低脑细胞尤其是海马神经元内钙离子水平可改善 VD 患者症状。这与安徽医科大学第一附属医院药剂科的一项动物研究结果相符合^[13]。本研究结果不仅再次证明了 VD 大鼠海马神经元内钙水平升高,而且表明脑络欣通可降低 VD 大鼠海马神经元内 Ca^{2+} 水平荧光强度。这提示脑络欣通可能通过降低海马神经元内 Ca^{2+} 水平而发挥改善 VD 大鼠学习记忆能力的作用。

降钙素基因相关肽 (CGRP) 为一种由降钙素基因编码而形成的含 37 个氨基酸的神经肽,是已知目前最强的舒张血管物质。CGRP 主要分布于周围和中枢神经系统中,对全身血管可有不同程度的扩张作用,对心脑血管作用更为显著,可解除血管痉挛、改善血液循环,降低缺血性脑损伤,拮抗内皮素的作用^[14]。另有研究表明,CGRP 结合分布在血管组织的受体而发挥调节细胞内钙离子的作用^[15]。在缺血性脑血管病中,脑组织和血浆中 CGRP 表达降低,在疾病的发生发展中起到了不可忽视的作用。本研究结果显示脑络欣通可增加 VD 大鼠海马组织 CGRP 及其受体的表达。

综上所述,脑络欣通可能通过提高 VD 大鼠海马组织降钙素基因相关肽及其受体的表达,降低海马神经元内超载的钙离子水平,改善 VD 大鼠学习记忆能力。本实验阐明了脑络欣通保护神经元的可能作用机制之一,为脑络欣通后期临床应用提供理论依据。

参考文献:

[1] Gorelick P B, Scuteri A, Black S E, *et al.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia[J]. *Stroke*, 2011, 42(9): 2672-2713.

[2] Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia [J]. *Neuron*, 2013, 80(4): 844-866.

[3] 王 键, 谭 辉, 胡建鹏, 等. 脑络欣通对大鼠中动脉闭塞缺血再灌注损伤模型大鼠空间认知功能和局部脑血流量的影响[J]. *中医杂志*, 2013, 54(8): 687-690.

[4] 李 净, 王 键, 韩小祥, 等. 脑络欣通对脑缺血再灌注模型大鼠海马 CA1 区神经细胞凋亡的动态影响[J]. *中国中医药科技*, 2006, 13(4): 222-223.

[5] 王 键, 谭 辉, 胡建鹏, 等. 脑络欣通对局灶性脑缺血大鼠凝血与纤溶系统的影响[J]. *中医杂志*, 2012, 53(22): 1954-1956.

[6] 吴章福, 高晓平, 李光武. 改良双侧颈总动脉结扎法与传统法制备的大鼠慢性脑缺血模型比较[J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27(3): 206-210.

[7] 郑先振, 马光瑜, 林玉龙. 纳洛酮对血管性痴呆大鼠学习记忆和海马神经细胞内钙离子的影响[J]. *中国新药与临床杂志*, 2005, 24(3): 185-188.

[8] 武海霞, 吴志刚, 刘红彬, 等. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用[J]. *神经药理学报*, 2014, 4(5): 30-35.

[9] Jiwa N S, Garrard P, Hainsworth A H. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review[J]. *J Neurochem*, 2010, 115(4): 814-828.

[10] Sas K, Párdutz Á, Toldi J, *et al.* Dementia, stroke and migraine-some common pathological mechanisms[J]. *J Neurol Sci*, 2010, 299(1-2): 55-65.

[11] Stein D T, Vannucci R C. Calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988, 8(6): 834-842.

[12] 张予阳, 刘 岩, 付守廷. 脑缺血与炎症反应[J]. *中国药理学通报*, 2006(1): 5-9.

[13] 葛朝亮, 王鑫铭, 李飞龙, 等. 通窍活血汤对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马神经元细胞内钙离子浓度的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(8): 671-675.

[14] Dymshitz J, Vasko M R. Endothelin-1 enhances capsaicin-induced peptide release and cGMP accumulation in cultures of rat sensory neurons [J]. *Neurosci Lett*, 1994, 167 (1-2): 128-132.

[15] Chai W, Mehrotra S, Danser A H J, *et al.* The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in ischemic preconditioning in isolated rat hearts[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 531(1-3): 246-253.