

• 实验研究 •

脑络欣通对气虚血瘀型中脑动脉阻塞再灌注大鼠海马及额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a 和 β -Catenin 表达的影响

邓 勇,王 键,谭 辉,何 玲

(安徽中医药大学,安徽 合肥 230012)

[摘要]目的 探讨益气活血通络法代表方脑络欣通对气虚血瘀型中脑动脉阻塞再灌注(middle cerebral artery occlusion-reperfusion, MCAO/R)模型大鼠的保护机制。方法 采用随机数字表法将雄性 SD 大鼠分成正常组、模型组、脑络欣通组和通心络组,每组 18 只。按随机数字表法将各组再分成 1、3、7 d 组,每时间节点组 6 只。气虚血瘀证采用饥饿、疲劳、缺氧及高脂饮食等多因素模拟,线栓法制作 MCAO/R 模型参照改良后的 LONGA 法。脑络欣通配制成浓度为 0.26 g/mL 的溶液,通心络配制成浓度为 0.02 g/mL 的溶液。按每日 10 mL/kg 灌胃给药。正常组及模型组按等容量生理盐水灌胃。利用 RT-PCR 检测各组大鼠海马及额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a 和 β -Catenin 的表达。结果 与正常组比较,模型组大鼠缺血侧海马和额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a、 β -Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$);与模型组比较,通心络组、脑络欣通组大鼠缺血侧海马和额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a 和 β -Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$);与通心络组比较,脑络欣通组大鼠缺血侧海马和额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a 和 β -Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$)。结论 脑络欣通可能通过上调 Wnt3a、Wnt5a 以及 β -Catenin 的表达调节脑缺血后神经干细胞的增殖分化。

[关键词]脑缺血;益气活血通络法;脑络欣通;Wnt/ β -Catenin 信号通路

[中图分类号]R255.2;R743.3 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2017.03.018

缺血性脑血管病(ischemic cerebrovascular disease, ICVD)的病因、发病机制和干预因素复杂。目前已知成年哺乳动物脑组织特定区域的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在特定条件下,可产生增殖和分化,参与神经再生和组织修复。因此,通过外在干预手段促进 NSCs 增殖及定向诱导分化的规律和调控机制,以修复受损的神经细胞,实现 ICVD 后神经功能的重建恢复,受到广泛关注。中医药在 ICVD 的防治研究中已显示出较为显著的疗效,被认为在整体调节和综合治疗方面具有重大优势^[1-3]。益气活血通络法是新安王氏内科特色治法之一,前期临床研究表明,其在缺血性脑病的防治中有明显作用;基础研究也证实该方具有益气活血功效和抗缺血性脑损伤、促进神经功能恢复的效应,并多靶点、多环节、多通路地参与诱导 NSCs 的增殖分化过程^[4-6]。本研究通过动态观察脑缺血模型大鼠及其

在中医药干预下,大鼠缺血侧海马及额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a、 β -Catenin 相对表达量的变化,探索益气活血通络法及其代表方药脑络欣通对脑缺血再灌注损伤神经再生和保护的可能机制。

1 材料

1.1 动物及分组 健康 SD 雄性大鼠 72 只,体重 250~300 g,由安徽省实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK2011(皖)-002。采用随机数字表法将大鼠分成正常组、模型组、脑络欣通组和通心络组,每组 18 只。按随机数字表法将各组再分成 1、3、7 d 组,每个时间节点 6 只。

1.2 药物 脑络欣通颗粒剂组成:黄芪、红花、三七、川芎、蜈蚣、当归、天麻等,由安徽中医药大学第一附属医院制剂中心生产,院内制剂批号为 20120625,配制成浓度为 0.26 g/mL 的溶液。通心络胶囊组成:人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、制乳香、炒酸枣仁、冰片,由石家庄以岭药业股份有限公司生产,国药准字号为 Z19980015,批号为 110819,将其配制成浓度为 0.02 g/mL 的溶液。动物给药均采用中剂量,按每日 10 mL/kg 灌胃给药(脑络欣通颗粒每袋 10 g,成人每次 10 g,每日 3 次;通心络胶囊每粒 0.26 g,成人每次 3 粒,每日 3 次)。正常组及模型组按等量生理盐

基金项目:国家中医药管理局“新安王氏内科流派传承工作室”建设项目(国中医药人教函[2012]228 号);国家自然科学基金青年项目(81603523);安徽中医药大学探索性课题(2016ts082)

作者简介:邓勇(1982-),男,博士研究生,副研究馆员

通信作者:王键, wangjian6301@163.com

水灌胃。

1.3 主要仪器 JW-3021HR 高速冷冻离心机:安徽嘉文仪器装备有限公司; LX 300 低速 mini 离心机:海门市其林贝尔仪器制造有限公司; K960 普通 PCR 仪:杭州晶格科学仪器有限公司;微量移液器:德国 Eppendorf 公司;万分之一天平:上海菁海仪器有限公司;PIKOREAL 96 荧光定量 PCR 仪:Thermo;MINI-P25 微孔板迷你离心机:杭州奥盛仪器有限公司。

1.4 主要试剂 Trizol(批号 101002):Invitrogen 公司;氯仿、异丙醇、无水乙醇:均由上海苏懿化学试剂有限公司提供;PIKO Plate Illuminator:Thermo 公司;DEPC(批号 20150802554):Sigma 公司;QuantiFast SyBr Green PCR 试剂盒(批号 151033144):Qiagen;引物合成:生工生物工程(上海)股份有限公司;逆转录试剂盒 K1622(批号 00330969):Thermo 公司;核酸染料(批号 150618):赛百盛 GoldView;DEPC(批号 20150802554):Sigma 公司。

2 方法

2.1 模型复制 ①中医气虚血瘀证^[7]采用饥饿、疲劳、缺氧及高脂饮食的多因素模拟,中脑动脉阻塞再灌注(middle cerebral artery occlusion-reperfusion, MCAO/R)模型的复制参照改良后的 LONGA 法^[8]。②大鼠麻醉后仰卧,将四肢及头部固定于无菌木板上,常规备皮无菌操作手术区,沿正中线切开表面皮肤及皮下组织,钝性分离肌肉与筋膜,在二腹肌和胸锁乳突肌之间放置开颅器。③外科镊分离颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,电凝枕动脉、甲状腺上动脉,以及翼腭动脉;④在手术显微镜下颈外动脉远心端结扎两处,并用动脉夹夹闭颈总动脉和颈内动脉。⑤从颈外动脉两结扎处中间剪断,向下轻拉颈外动脉,使之与颈内动脉成一条近似直线。⑥在颈外动脉近游离端斜剪一“V”形切口并快速插入栓线,此时在颈外动脉近游离端连同栓线一起结扎,不系紧。⑦调整角度和方向后继续将栓线插入颈内动脉 17.5~18.5 mm,直至感觉有少许阻力为止。⑧在切口下方,将颈内动脉与丝线一起结扎后,松开动脉夹,常规缝合。有效阻断大脑中动脉血流,造成局灶性脑缺血。⑨手术完成约 2 h 后,拔出栓线 4.0~5.0 mm,造成脑缺血再灌注损伤。⑩苏醒后神经功能损伤评分,2~3 分者入选。

2.2 取材 ①3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉后处死大鼠。②立刻断颈,剥离大鼠头部皮毛,取出全脑,放置冰上。③横向断去小脑,并用手术刀沿前脑中线切开,取右脑。④手持镊头进入海马槽,从其外侧进行钝性分离,向中心方向分离海马与额顶叶皮质。⑤取材后海马与额顶叶皮质分置冻存管中,置于-80℃冰箱中保存。

2.3 RT-PCR 检测方法 根据 GneBank 提供的序列号(Wnt3a、Wnt5a、 β -Catenin 的 GeneBank 序号分别为 NM_022631.2、NM_001107005.2、NM_053357.2)进行引物的设计与合成。反应体系包括:2×SYBR Green mixture,正向引物(10 μ mol/L),反向引物(10 μ mol/L),cDNA,无 RNA 酶的水,反应总体积 10 μ L;95℃加热 5 min、95℃退火 5 s、60℃延伸 30 s,共 40 个循环。按照反转录试剂盒和荧光定量试剂盒进行操作。各检测指标引物序列见表 1。本次实验所使用的分析方法为相对定量法,计算方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

表 1 Wnt3a、Wnt5a、 β -Catenin 的引物序列

引物	序列	产物长度/bp
β -actin	正向引物:5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	反向引物:5'-TTTAATGTGCACGCACGATTTC-3'	
Wnt3a	正向引物:5'-GGACCTATTCCATTCCCAGA-3'	139
	反向引物:5'-AGGAAGCTCTTGTGGCAGAT-3'	
Wnt5a	正向引物:5'-ACTTCTGTCTTTGGCAGGGT-3'	90
	反向引物:5'-CATGGCATTACCACTCCAG-3'	
β -Catenin	正向引物:5'-TTCCTGAGCTGACCAAACTG-3'	141
	反向引物:5'-GCACTATGGCAGACACCATC-3'	

2.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件分析数据。呈正态分布的变量以“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。多组均数比较采用单因素方差分析,组间均数两两比较采用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠缺血侧海马 Wnt3a、Wnt5a、 β -Catenin 表达水平比较 与正常组比较,模型组大鼠 Wnt3a、Wnt5a、 β -Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$);与模型组比较,通心络组、脑络欣

通组 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$);与通心络组比较,脑络欣通组 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠缺血侧海马 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Wnt3a			Wnt5a			β-Catenin		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
正常	6	1.00±0.07	1.01±0.16	1.01±0.13	0.99±0.09	1.01±0.09	1.00±0.09	1.00±0.08	1.01±0.11	1.01±0.08
模型	6	1.29±0.09*	1.37±0.08*	1.23±0.06*	1.08±0.10*	1.35±0.10*	1.26±0.12*	1.45±0.10*	1.19±0.10*	1.77±0.15*
通心络	6	1.52±0.16#	2.07±0.21#	2.21±0.13#	1.44±0.20#	1.98±0.19#	2.58±0.27#	2.34±0.27#	2.64±0.16#	3.13±0.21#
脑络欣通	6	2.57±0.11△	2.87±0.18△	3.04±0.22△	1.66±0.10△	2.82±0.19△	3.66±0.46△	4.32±0.35△	5.19±0.57△	9.02±0.65△

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与通心络组比较,△ $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠缺血侧额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 的表达水平比较 与正常组比较,模型组大鼠 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$);与模型组比较,通心络组、脑络欣通组 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$);与通心络组比较,脑络欣通组 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 在 1、3、7 d 表达水平显著上调($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠额顶叶皮质 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Wnt3a			Wnt5a			β-Catenin		
		1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d	1 d	3 d	7 d
正常	6	1.01±0.12	1.01±0.11	1.01±0.14	0.99±0.05	1.01±0.12	1.00±0.07	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.07
模型	6	1.59±0.21*	1.57±0.19*	1.26±0.07*	1.50±0.08*	1.90±0.21*	2.24±0.14*	1.34±0.07*	1.46±0.08*	1.35±0.08*
通心络	6	1.88±0.06#	2.67±0.19#	3.60±0.33#	2.45±0.24#	2.44±0.14#	2.73±0.11#	2.28±0.15#	2.45±0.20#	2.57±0.16#
脑络欣通	6	3.81±0.32△	4.38±0.59△	6.56±0.23△	4.65±0.52△	4.57±0.35△	5.50±0.29△	4.69±0.50△	5.21±0.26△	5.43±0.29△

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与通心络组比较,△ $P<0.05$ 。

4 讨论

RT-PCR 检测结果显示,模型组各时间节点的大鼠缺血侧海马以及额顶叶皮质区 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 的表达均呈上升趋势,这可能与脑缺血后自发存在的内源性 NSCs 向损伤区域的定向增殖分化有关。而在治疗药物(通心络、脑络欣通)的干预下,大鼠缺血侧海马以及额顶叶皮质区的 Wnt3a、Wnt5a、β-Catenin 的表达继续上调。脑络欣通上调效果优于通心络($P<0.05$)。

脑组织中存在多种 Wnt 基因,Wnt3a 作为 Wnt 信号通路的起始蛋白,是 Wnt 基因家族中重要的激活剂,其表达可使 Wnt 信号增强^[9-11],且更多地表现在促进细胞的分裂、加速细胞的分化增殖^[12],以及增加神经细胞结构与功能的复杂性等方面^[13]。通过横向比较笔者发现,模型组大鼠缺血侧海马以及额顶叶皮质区 Wnt3a 表达上调,而脑络欣通组和通心络组的表达则更为显著。有研究^[14-15]表明,Wnt3a 的高表达可增加脊髓中有丝分裂细胞数目,减少神经球的形成,促进 NSCs 向神经细胞及神经胶质细胞分化。而基因敲除胚胎脑组织中的 Wnt3a 可导致整个海马的缺失,造成这些缺陷的原因可能是因为 Wnt 信号的改变而干扰了脑室区 NSCs 的增殖^[16-18]。

Wnt5a 广泛参与胚胎发育及疾病等多种生理、病理性进程^[19-20]。在 Wnt 信号通路中,Wnt5a 能够调节内皮细胞的存活、增殖和基因表达,能够与 Frz/LRP5 结合,从而激活经典的 Wnt 信号通路^[21-22]。在本次实验中,与 Wnt3a 的情况相似,模型组大鼠缺血侧海马以及额顶叶皮质区 Wnt5a 表达上调,而脑络欣通组和通心络组的 Wnt5a 表达则更为显著。结合课题组前期的研究^[23],笔者认为这可能与 Wnt3a、Wnt5a 能够诱导 NSCs 增殖分化相关。此外,亦有研究^[24]证实,缺血后处理及低温通过 Wnt5a 非经典信号通道抑制 Bax、Caspase-3 的激活及脑细胞的凋亡,可能是减轻大鼠全脑缺血再灌注脑损伤的机制之一。

β-Catenin 在神经发育过程中能决定神经前体细胞的增殖和分化^[25],作为将核外信号传递到核内的信号分子,其表达水平直接影响着 Wnt 通路的生物学效应,是该信号通路的枢纽^[26]。同时,β-Catenin 作为转录因子,可使 NSCs 重新进入细胞周期而不是进行分化,从而介导 NSCs 的增殖^[27]。本次实验中,模型组各时间节点的大鼠缺血侧海马以及额顶叶皮质区 β-Catenin 的表达均呈上升趋势,而在治疗药物(通心络、脑络欣通)的干预下,大鼠缺血侧海马以及额顶叶皮质区的 β-Catenin 的表达继续上调。这可能与 β-Catenin 作为细胞核内外信号传递的信号蛋白,及其在 Wnt 信号通路中的作用有关。

中医药在促进脑缺血后神经功能恢复方面具有一定的临床疗效。不同中医治法可不同程度、不同

途径影响脑缺血损伤后神经再生。气虚血瘀一直被认为是缺血性脑中风的主要病机^[4],益气活血通络法代表方脑络欣通是目前中医临床治疗缺血性脑病最常用方药之一。方中重用黄芪为君,川芎为臣,再配红花、三七、天麻、当归、蜈蚣等,活血寓于甘温补气之中,气贯经脉,推动血行,再借活血之品辛散之性,使留络之瘀得以消散,营血流畅,经脉得养。全方益气以助血行,活血以畅气机,肢体偏废均能自愈^[5]。

益气活血通络法是缺血性脑病治疗的重要环节,本治法体现了新安王氏内科的特色治疗思路。以补为通,益气扶正以帅血;以通助补,活血通脉以载气,以益气之法改善素体气虚状态,以活血之法畅通全身气血,扶正祛邪,以达康复之机^[6]。

参考文献:

- [1] 张志伟,刘秦.缺血性脑血管病颈动脉超声检测及中药干预研究进展[J].中国中医急症,2011,20(6):936-937.
- [2] 董秋菊,杨志新.中医治疗缺血性中风的现状[J].中国临床医生,2012,40(11):33-35.
- [3] 王键,谭辉,胡建鹏.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.
- [4] 胡建鹏,王键.缺血性中风病“气虚血瘀”病机学说的形成及其理论与实践意义[J].中医药临床杂志,2003,15(5):6-9.
- [5] 谭辉,王键,尹婷婷,等.脑络欣通方对脑缺血大鼠血管再生及局部脑血流量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(22):21-25.
- [6] 陈业农,王键,唐巍,等.脑络欣通对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经上皮干细胞蛋白巢蛋白表达的影响[J].中国中医药信息杂志,2008,15(10):29-31.
- [7] 王键,赵辉,李净,等.多因素复合制作气虚血瘀证脑缺血动物模型的实验研究[J].中国实验动物学报,2001,9(4):26-30.
- [8] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] TOLEDO E M, COLOMBRES M, INESTROSA N C. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation [J]. Prog Neurobiol, 2008, 86(3): 281-296.
- [10] SHRUSTER A, BEN-ZUR T, MELAMED E, et al. Wnt signaling enhances neurogenesis and improves neurological function after focal ischemic injury [J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40843.
- [11] GJERTSSON I, LAURIE K L, DEVITT J, et al. Tolerance induction using lentiviral gene delivery delays onset and severity of collagen II arthritis [J]. Mol T-

- her, 2009, 17 (4): 632-640.
- [12] ZHU Y, LI C, SUN A, et al. Quantification of mirna-210 in the cerebrospinal fluid and serum: implications for Alzheimer's disease [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(3): 1013-1017.
- [13] JANG M H, BONAGUIDI M A, KITABATAKE Y, et al. Secreted frizzled related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis [J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(2): 215-223.
- [14] XING Y, ZHANG X, ZHAO K E, et al. Beneficial effects of sulindac in focal cerebral ischemia: a positive role in Wnt/ β -Catenin pathway [J]. Brain Res, 2012, 30(1482): 71-80.
- [15] CHEN B Y, WANG X, WANG Z Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ β -Catenin signaling pathway [J]. J Neurosci Res, 2013, 91(1): 30-41.
- [16] YIN Z S, ZU B, CHANG J, et al. Repair effect of Wnt-3a protein on the contused adult rat spinal cord [J]. Neurol Res, 2008, 30(5): 480-486.
- [17] CERPA W, GODOY J A, ALFARO I, et al. Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons [J]. J Biol Chem, 2008, 283(9): 5918-5927.
- [18] LEE S M, TOLE S, GROVE E, et al. A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus [J]. Development, 2000, 127(3): 457-467.
- [19] ALLGEIER S H, LIN T M, VEZINA C M, et al. Wnt5a selectively inhibits mouse ventral prostate development [J]. Dev Biol, 2008, 324(1): 10-17.
- [20] KIM J, KIM D W, HA Y, et al. Wnt5a induces endothelial inflammation via β -Catenin-independent signaling [J]. J Immunol, 2010, 185(2): 1274-1282.
- [21] GORDON M D, NUSSE R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(32): 22429-22433.
- [22] WEHRLI M, DOUGAN S T, CALDWELL K, et al. Arrow encodes an Ldl-receptor-related protein essential for wingless signalling [J]. Nature, 2000, 407(6803): 527.
- [23] 宋祖荣,胡建鹏,徐伟,等.益气活血方和补肾生髓方对脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区 wnt5a、LRP5 蛋白表达的影响[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(1): 36-38.
- [24] 陈强.通过调节 JAK2-STAT3 和 Wnt5a 信号通路可能是缺血后处理及低温减轻全脑缺血性脑损伤的分子机制[D].福州:福建医科大学,2012.

[25] 陈明军,于剑锋,柴继侠,等. Wnt 通路信号蛋白 β -catenin 和 GSK-3 β 在孤独症模型大鼠脑中表达的变化[J]. 神经解剖学杂志,2009,25(4):361-368.

[26] WILLERT K, BROWN J D, DANENBERG E, et al. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors[J]. Nature,2003,423(6938):448-452.

[27] 曹泽标,周小青,刘旺华,等. 丹龙醒脑方对脑缺血再灌注损伤大鼠 SVZ 区 Frizzled3、Dsh1 及 β -catenin 表达的影响与促进神经干细胞增殖的机制[J]. 中华中医药杂志,2016,31(10):4206-4210.

(收稿日期:2017-03-24;编辑:曹健)

Effect of Naoluoxtong on Expression of Wnt3a, Wnt5a, and β -Catenin in the Hippocampus and Frontal and Parietal Cortex in a Rat Model of Middle Cerebral Artery Occlusion/Reperfusion with Qi Deficiency and Blood Stasis

DENG Yong, WANG Jian, TAN Hui, HE Ling
(Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective mechanism of Naoluoxtong Prescription, a representative qi-tonifying, blood-activating, and collateral-dredging prescription, in a rat model of middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) with qi deficiency and blood stasis. **Methods** A total of 72 male Sprague-Dawley rats were divided into normal group, model group, Naoluoxtong group, and Tongxinluo group using a random number table, with 18 rats in each group. Each group was further divided into 1-, 3-, and 7-day groups using a random number table, with 6 rats in each group. Qi-deficiency and blood-stasis syndrome was simulated by starvation, fatigue, hypoxia, and high-fat diet, and with reference to the modified LONGA method, the suture method was used to establish a rat model of MCAO/R. The concentration of Naoluoxtong solution was 0.26 g/mL and that of Tongxinluo solution was 0.02 g/mL. The rats in the Naoluoxtong group and Tongxinluo group were administered Naoluoxtong and Tongxinluo, respectively, by gavage at a dose of 10 mL/kg every day, and those in the normal group and model group were given an equal volume of normal saline by gavage. RT-PCR was used to measure the expression of Wnt3a, Wnt5a, and β -Catenin in the hippocampus and the frontal and parietal cortex. **Results** Compared with the normal group, the model group had significant increases in the expression of Wnt3a, Wnt5a, and β -Catenin in the hippocampus and the frontal and parietal cortex in the ischemic hemisphere on days 1, 3, and 7 ($P<0.05$). Compared with the model group, the Tongxinluo group and the Naoluoxtong group had a significant increase in the expression of Wnt3a, Wnt5a, and β -Catenin in the hippocampus and the frontal and parietal cortex in the ischemic hemisphere on days 1, 3, and 7 ($P<0.05$). Compared with the Tongxinluo group, the Naoluoxtong group had a significant increase in the expression of Wnt3a, Wnt5a, and β -Catenin in the hippocampus and the frontal and parietal cortex in the ischemic hemisphere on days 1, 3, and 7 ($P<0.05$). **Conclusion** Naoluoxtong can regulate the proliferation and differentiation of neural stem cells after cerebral ischemia, possibly by upregulating the expression of Wnt3a, Wnt5a, and β -Catenin.

[Key words] Cerebral ischemia; Qi-tonifying, blood-activating, and collateral-dredging method; Naoluoxtong; Wnt/ β -Catenin signaling pathway