

卷丹百合花金丝桃苷对脑缺血再灌注 损伤大鼠的脑保护作用

周峦¹, 熊英², 彭安林^{3,4}

(1. 武汉市第五医院康复科, 湖北武汉 430050) (2. 武汉市第五医院药学部, 湖北武汉 430050)

(3. 武汉市第三医院药学部, 湖北武汉 430070) (4. 湖北中医药大学药学院, 湖北武汉 430072)

摘要: 为探究金丝桃苷在缺血再灌注损伤大鼠模型对学习记忆能力的改善及对海马组织的保护作用。本文将 50 只雄性 SD 大鼠随机分假手术组 (S)、模型组 (M)、金丝桃苷低 (25 mg/kg)、中 (50 mg/kg)、高 (100 mg/kg) 剂量组。除 S 组外, 建立左侧大脑中动脉梗塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO 模型)。造模 24 h 后, 水迷宫评估大鼠学习记忆能力; 判断神经缺损; 病理 HE 染色评价海马区神经细胞病变; 免疫印迹法 (western-blot) 检测海马 BDNF 和 p75NTR 蛋白表达。结果表明, 与 M 组比较, 金丝桃苷能显著缩短缺血再灌注大鼠的逃避潜伏时间 (15.45±1.86) s, 增加穿越平台次数 (8.67±1.52) 次 ($p<0.05$); 改善海马病理损伤, 神经细胞形态基本正常、结构保持完整; 同时调控大脑海马 BDNF 表达增加, p75NTR 减少 ($p<0.05$)。金丝桃苷能显著改善大鼠认知障碍, 可能是通过上调 BDNF、下调 p75NTR 减少海马神经元及细胞损伤, 提高学习和记忆能力, 具有一定的脑保护作用。

关键词: 金丝桃苷; 脑缺血再灌注; 学习记忆; 海马; 神经营养素受体 p75

文章编号: 1673-9078(2019)07-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.001

Brain Protective effect of *Lilium lancifolium* Hypericin on Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

ZHOU Luan¹, XIONG Ying², PENG An-lin^{3,4}

(1. Department of Rehabilitation, Wuhan No.5 Hospital, Wuhan 430050, China)(2. Department of Pharmacy, Wuhan No.5

Hospital, Wuhan 430050, China)(3. Department of pharmacy Wuhan No.3 Hospital, Wuhan 430070, China)

(4. College of pharmacy, Hubei Medical University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The brain protective effect of *Lilium lancifolium* hypericin on the hippocampal tissue of the rats with cerebral ischemia reperfusion injury was investigated. The 50 male SD rats were randomly divided into sham group (S), model group (M), hypericin low (25 mg/kg), middle (50 mg/kg) and high (100 mg/kg) dose groups in this work. Except S group, other groups were given the modified Longa line blockage method to establish the left middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. After 24 hours of modeling, the learning and memory ability of rats were tested by Morris water test, and brain tissue was taken for pathological HE staining to evaluate the damage of neurons in the hippocampus. Western-blot was employed to detect the expression of BDNF and p75NTR in hippocampus. The results showed that high-dose hypericin could significantly shorten the escape latency times (15.45±1.86) and increase the number of crossing the platform (8.67±1.52) times for the ischemia-reperfusion rats, which was statistically different from that in the M group ($p<0.05$). In addition, the pathological damage in the hippocampal area was improved, so that the nerve cells were arranged orderly, with clear structure and basically intact and normal morphology. It can also regulate the increase of BDNF expression and the decrease of p75NTR lever in hippocampal tissue ($p<0.05$). Hypericin can significantly improve the cognitive impairment caused by ischemia reperfusion injury and improve the learning and memory ability. Moreover, it has a certain brain protective effect, which might be caused by the up-regulation of BDNF and down-regulation of p75NTR expressions to reduce the damage of neurons and neurons in the hippocampus.

Key words: hypericin; cerebral ischemia reperfusion; learning and memory; hippocampus; p75NTR

收稿日期: 2019-03-21

基金项目: 武汉市卫计委重点项目 (WX17A04)

作者简介: 周峦 (1974-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 脑缺血再灌注损伤

通讯作者: 熊英 (1975-), 女, 本科, 主管药师, 研究方向: 药理学

数据显示,脑卒中作为临床上最为常见的缺血性脑血管疾病,近年来发病人数逐年递增,约有 2/3 的脑卒中患者伴有不同程度的认知功能障碍,日常生活及生活质量受到严重影响^[1,2]。有报道证实,海马结构正常和功能完整是学习记忆的基础,海马神经元损伤与脑卒中认知功能障碍密切相关^[3,4]。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 对维持神经元功能具有重要作用^[5],而 BDNF 在脑缺血再灌注损伤大鼠海马区表达上调,可与相关神经营养受体 p75 (p75 neurotrophin receptor, p75NTR) 结合,激活 c-Jun N-末端激酶 (JNK) 通路,诱导神经元细胞凋亡,从而影响认知功能^[6]。

脑缺血再灌注损伤的治疗及相关病例机制探讨是目前研究的热点之一。从药食同源的天然产物中寻找有效的单体物质,预防心脑血管疾病,推动中医药的发展具有重要意义。大量研究表明,天然产物包括黄酮、多糖类等物质具有神经保护作用^[7],例如金丝桃苷 (Hyperin, Hyp) 属于黄酮醇苷类化合物,主要结构为槲皮素-3-半乳糖苷,其毒性小,具有护肝、抗氧化和保护心脑血管等药理功效^[8,9]。但目前从卷丹百合花中提取金丝桃苷的研究鲜见报道,卷丹百合花金丝桃苷是否同样具有心脑血管及神经保护作用,是否通过调控脑缺血再灌注损伤大鼠海马区 BDNF 及 p75NTR 表达而抑制神经元细胞凋亡尚不清楚。本文依据文献方法^[9,10],从卷丹百合花花瓣中分离提金丝桃苷并测定其含量,采用左侧大脑中动脉栓塞法 (Middle Cerebral Occlusion, MCAO) 建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型。采用水迷宫实验评估大鼠学习记忆能力,病理 HE 检测海马神经元形态结构,Western blot 测定海马组织中 BDNF 和 p75NTR 蛋白的表达,探讨卷丹百合花金丝桃苷的脑保护作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

卷丹百合花花瓣,江苏南京艺馨花卉有限公司;金丝桃苷标准品, Sigma; 线栓 3600AAA, 广州佳灵生物技术有限公司; 无水乙醇、甲醇, 上海生化; GAPDH、BDNF 和 p75NTR 等兔抗大鼠一抗均购自美国 Abcom 公司; 辣根过氧化物酶二抗, 武汉安特捷有限公司; 封闭液、一抗稀释液、二抗稀释液, 武汉碧云天有限公司; BCA 试剂盒, 武汉拜意尔公司。

1.2 仪器与设备

水浴锅, HH-600 科华仪器有限公司; 离心机, 飞鸽牌系列; 分析天平, HANGPING FA1004; 超声仪, 厦门华益通超声设备有限公司; 免疫印迹电泳系统, Bio-Rad; Morris 水迷宫, 上海欣软信息科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 卷丹百合花金丝桃苷提取

参考文献采用醇提法提取卷丹百合花金丝桃苷^[9], 步骤如下: 将卷丹百合花花瓣粉碎, 以 1:25 料液比将 20 g 样品粉末溶于 500 mL 60%乙醇中, 65 °C 回流提取 2 h, 采用旋转蒸发器将提取液旋转蒸发至无乙醇味, 再用蒸馏水配成 0.5 g/mL 的粗提物。混合液经活化的 HPD 400 大孔树脂分离纯化, pH 为 2, 上样流速 2 mL/min, 用 80 mL、40%的乙醇以 1 mL/min 的流速进行洗脱, 收集洗脱液后经武汉市第三医院实验中心 HPLC 检测分析, 并测定其含量。

1.3.2 卷丹百合花金丝桃苷的含量测定

采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定^[10], 将卷丹百合花金丝桃苷粗提物经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 采用 HPLC 联合 DAD 检测器检测, 色谱柱及检测条件如下: Zorbax SB-C18 反相色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 流速 0.6 mL/min, 自动进样量 10 μL, 柱温 35 °C, 检测波长 320 nm。流动相 A: 含 1.0%醋酸的水; 流动相 B: 含 1.0%醋酸的甲醇。洗脱条件: 采用梯度洗脱; 以流动相 B 的含量来表示为: 0~15 min, 10% B; 15~40 min, 10~15% B; 40~55 min, 15%~40% B; 55~60 min, 40%~60% B。

以金丝桃苷标准品为参照, 外标法测定计算其含量, 根据得到的数据, 以峰面积为纵坐标, 对照品量 (μg/mL) 为横坐标绘制标准曲线, 计算金丝桃苷的回归方程为 $Y=2675.8X+1.6725$, $r=0.999$ 。

1.3.3 动物造模及分组

根据文献报道方法^[3,4], 采用改良左侧大脑中动脉栓塞法 (Middle Cerebral Occlusion, MCAO) 建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型。具体步骤如下: ①10%水合氯醛腹腔麻醉大鼠 (3 mL/kg), 颈部备皮消毒后正中切开皮肤, 暴露并分离出左侧颈总、颈内和颈外动脉。②于颈内、外动脉分叉处结扎颈外动脉, 近心端结扎颈总动脉。③动脉夹夹闭颈内动脉, 在颈总动脉结扎处远端约 3 mm 处剪一小口, 将线栓沿颈总动脉向颈内动脉方向推入, 至动脉夹夹闭处时松开动脉夹, 经颈内动脉缓慢推入至大脑前动脉近端, 约插入 18~22 mm。④固定线栓, 缝合伤口; 90 min 后回抽线栓至颈总动脉分叉处。实验造模过程中及动物苏醒期

间注意保暖,避免大鼠死亡。

雄性SD大鼠50只,体质量180~200g(购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号为SCXK(湘)2011-0003),动物自由觅食、饮水,适应性喂养1周。然后采用随机数字表法将SD大鼠分为假手术组(S)、模型组(M)、金丝桃苷低(25 mg/kg)、中(50 mg/kg)、高(100 mg/kg)剂量组,每组10只。S组和M组给予等量蒸馏水,给药组每日灌胃给予相应剂量药物,连续给药7d。并于末次给药1h后开始造模,对照组仅分离动脉血管,不结扎及插线栓,其余各组根据MCAO法造模。

1.4 Morris水迷宫实验

评估大鼠学习记忆功能:水迷宫水池(直径160 cm×高50 cm)内水深25 cm,水温(20±2)℃。将水池等划分四个象限,在第一象限内距离池壁35 cm处有一个直径12 cm,高22 cm的圆形黑色平台,该平台位于水下3 cm。于第三象限将大鼠放入游泳池中,水迷宫上方连接的摄像机等系统可在电脑上同步记录大鼠运动轨迹。大鼠放入水中直至到达终点平台的时间记录为逃避潜伏期,此期间穿过第一象限平台上方的次数为穿台次数。每天训练1次,定位航行训练7d,造模后即第8d观察测定大鼠逃避潜伏期和靶象限穿越的平台次数。

1.5 神经功能缺损评分

采用Longa评分法评估造模后各组大鼠神经功能缺损情况^[4,11]:0分表现为无神经功能缺损;1分则是提尾时右前肢内收,不能完全伸展;2分表现是自发行走时向右侧转圈;3分则为行走时身体向右侧倾倒;4分就是不能自发行走,有意识丧失。评分为1~3分时,则表明脑缺血再灌注造模成功。

1.6 脑组织病理切片观察

水迷宫实验后,用过量水合氯醛(1 g/kg)深度麻醉处死大鼠,断头冰下解剖取脑组织。每组取4只脑组织经4%多聚甲醛固定后,行石蜡包埋常规切片,于海马吻合位置连续冠状切片(4 μm)。然后采用苏木素伊红染液行HE染色,光学显微镜下观察脑组织海马区病理学改变,比较各组大鼠脑组织海马神经元损伤情况。

1.7 免疫印迹法检测大鼠海马BDNF和p75NTR蛋白表达

冰下解剖大脑后,取海马组织,以1:10的比例采用1%的苯甲磺酰氟(PMSF)裂解液进行匀浆提取蛋白样品,4℃下10000 r/min离心10 min后取上清,BCA试剂盒测定蛋白含量并调节蛋白浓度至相同,加入5×上样缓冲液沸水浴10 min,-80℃保存备用。取15 μL样品上样,通过10% SDS-P 聚丙烯酰胺凝胶电泳跑胶分离蛋白,湿法转膜,脱脂奶粉封闭。分别加入BDNF、p75NTR和GAPDH(1:2000,武汉安特捷有限公司)抗体4℃孵育过夜,次日加入二抗室温孵育后,ECL法曝光显影获得蛋白条带。

1.8 统计学方法

采用SPSS 21.0对数据进行统计分析。先对水迷宫实验数据、BDNF和p75NTR蛋白检测结果进行数据的正态分布检验,方差齐性检验,并采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述,多组间差异采用单因素方差分析, $p < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 卷丹百合花金丝桃苷的含量测定

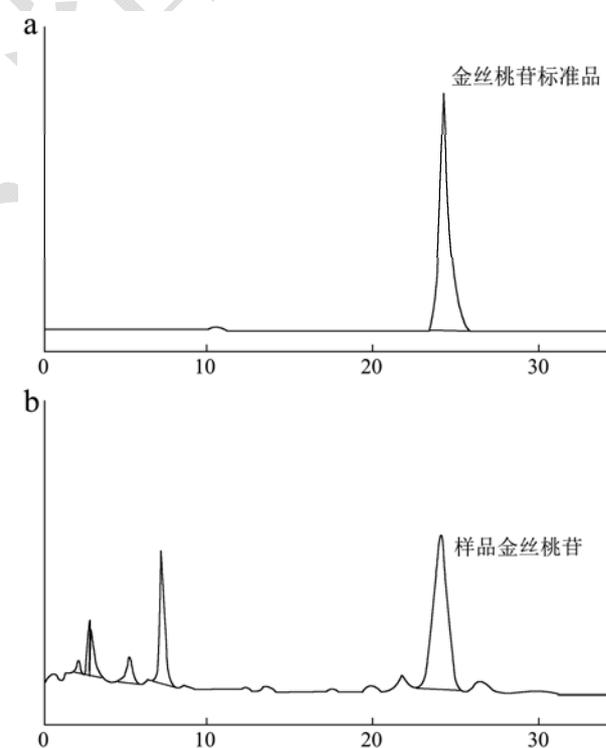


图1 金丝桃苷和样品高效液相色谱图

Fig.1 High-performance liquid chromatography of hyperin and sample

图1a为40 μg/mL金丝桃苷标准对照品的高效液相色谱图,卷丹百合花金丝桃苷粗提物如图1b所示。根据所得回归曲线方程,卷丹百合花中金丝桃苷含量

为 26.4 μg/mL。

2.2 卷丹百合花金丝桃苷对大鼠学习记忆的影响

影响

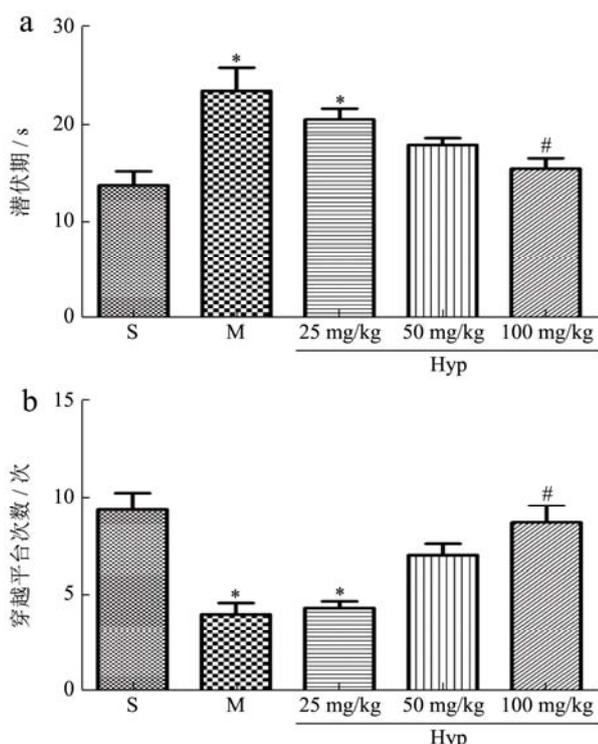


图2 卷丹百合花金丝桃苷对大鼠学习记忆的影响

Fig.2 The effect of *Lilium lancifolium* hyperin on the learning and memory of rats with cerebral ischemia reperfusion injury

注: *与 S 组比较, $p < 0.05$; #与 M 组比较, $p < 0.05$; S: 假手术组, M: 模型组, Hyp: 卷丹百合花金丝桃苷组。

学习和记忆能力是评估脑功能的重要指标。既往研究证实^[3], 脑缺血再灌注损伤常常会导致大脑认知、学习和记忆的衰退, Morris 水迷宫实验作为评估认知、学习、记忆能力的经典行为学实验, 被广泛应用。本研究 Mirror 水迷宫实验发现 (见图 2), M 组大鼠逃避潜伏期时间为 (23.55±4.02) s, 明显高于 S 组 (13.73±2.50) s, 穿越平台次数为 (4.33±1.53) 次, 和对照组 (9.33±1.75) 次比较显著降低, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。这一结果说明, 大鼠在脑缺血再灌注损伤后, 学习记忆能力严重下降, 认知功能发生障碍, 与李晓洁等人的报道相同, 脑组织缺血中枢神经受损^[4]。给药组给予不同剂量的卷丹百合花金丝桃苷干预后, 大鼠逃避潜伏期时间有不同程度的缩短, 同时穿越平台次数也有所增加。尤其是高剂量组 (100 mg/kg), 可明显缩短缺血再灌注大鼠的逃避潜伏时间 (15.45±1.86) s, 并增加穿越平台次数 (8.67±1.52) 次, 与 M 组比较均有统计学差异 ($p < 0.05$), 表明金

丝桃苷能显著改善缺血再灌注损伤造成的认知障碍, 提高学习和记忆能力。

2.3 卷丹百合花金丝桃苷对大鼠神经功能缺损的影响

影响

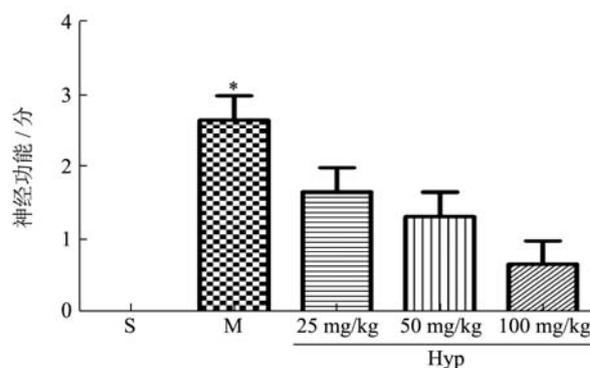


图3 卷丹百合花金丝桃苷对大鼠神经功能缺损的影响

Fig.3 The effect of *Lilium lancifolium* hyperin on the neurological defect of rats with cerebral ischemia reperfusion injury

注: *与 S 组比较, $p < 0.05$; S: 假手术组, M: 模型组, Hyp: 卷丹百合花金丝桃苷组。

国外学者 Longa 等通过观察大鼠脑缺血再灌注后行走状态评估其神经功能缺损状况^[11]。S 组大鼠行走正常, 无神经功能缺损症状。M 组大鼠神经功能缺损评分为 (2.67±0.58), 明显表现为身体右侧倾倒, 或是自发行走向右侧转圈, 说明脑缺血再灌注损伤模型成功。给予金丝桃苷干预后, 大鼠神经功能缺损评分较 M 组有所降低, 虽然无显著性差异, 但大鼠行走状态有所好转, 尤其是高剂量组大鼠神经功能改善明显。

2.4 卷丹百合花金丝桃苷对大鼠海马神经细胞病理改变的影响

影响

大鼠海马组织细胞 HE 检测结果如图 4 所示, S 组海马区神经细胞结构清晰、完整、排列有序, 细胞形态正常无坏死, 未见病理改变; M 组大鼠脑组织切片可见海马神经细胞边界模糊不清、排列杂乱、残存神经元固缩破裂, 存在空泡样变, 同时有炎性细胞浸润, 表明脑缺血再灌注损伤造模成功。对比观察发现, 给药组海马区损伤较模型组轻, 结构较完整, 尤其是高剂量组 HE 染色观察海马组织中神经细胞排列有序、结构清晰、形态基本正常, 较接近 S 组。给药干预后, 大鼠脑组织海马区病理改善显著, 说明卷丹百合花金丝桃苷对缺血再灌注损伤所致的病理破坏有保护作用。这和李春阳等人的报道相符^[9], 蓝莓叶中

提取的金丝桃苷具有抗炎及舒张血管作用, 本文从卷丹百合花提取的金丝桃苷同样可以减少炎症的浸润, 缓解缺血再灌注所致的病理损伤。

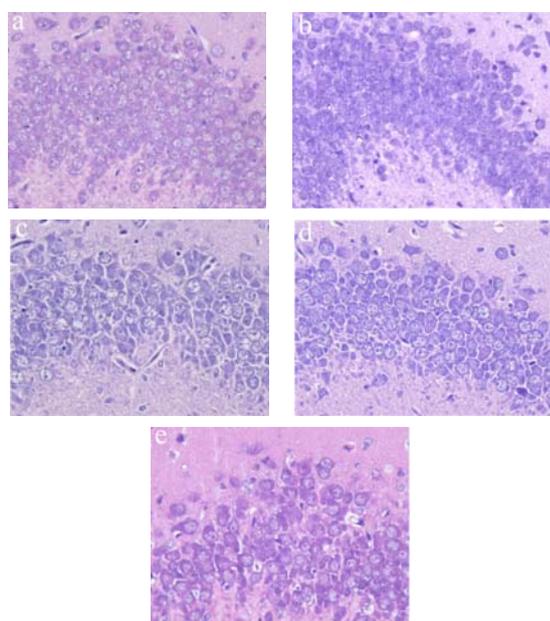


图4 卷丹百合花金丝桃苷对脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经元病理改变的影响

Fig.4 The effect of *Lilium lancifolium* hyperin on the hippocampus neurons pathology change of rats with cerebral ischemia reperfusion injury (HE×400)

注: S: 假手术组, M: 模型组, Hyp: 卷丹百合花金丝桃苷组; a: S, b: M, c: Hyp 25 mg/kg, d: Hyp 50 mg/kg, e: Hyp 100 mg/kg.

2.5 卷丹百合花金丝桃苷对 BDNF/ p75NTR 蛋白表达的影响

BDNF 是一种能促进神经生长的活性蛋白, 广泛分布于大脑皮质、海马等区域。Jain 等报道^[5], BDNF 在脑缺血再灌注损伤中对维持海马区神经元活性及功能, 抑制细胞凋亡发挥了重要作用。神经营养素受体 p75 (p75NTR) 作为肿瘤坏死因子受体之一, 在大脑缺血缺氧等应激刺激下表达增加, 可与神经生长因子、BDNF 等神经营养因子结合, 激发后续 JNK 信号通路及级联反应, 诱导神经细胞凋亡^[4,6,12]。本次研究结果显示, 与 S 组比较, M 组大鼠海马区 BDNF 和 p75NTR 蛋白水平明显升高 ($p < 0.05$), 证实脑缺血再灌注损伤中, 脑组织 BDNF 代偿性上调, 发挥营养神经的作用, 缺血导致的神经元损伤, 抑制神经细胞凋亡; 同时, p75NTR 增加, 说明缺血再灌注损伤激发了下游 JNK 通路及炎症等联级反应。金丝桃苷干预后, 给药组大鼠海马组织 BDNF 表达进一步增加, 但 p75NTR 表达

呈现不同程度的下降, 尤其是高剂量组 (100 mg/kg), BDNF 及 p75NTR 蛋白水平与 M 组比较, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。高剂量金丝桃苷能显著下调脑缺血再灌注大鼠海马组织中的 p75NTR 蛋白水平, 从而阻断 BDNF 与 p75NTR 的结合, 抑制下游 JNK 通路的激活, 减少海马区神经元损伤及神经细胞凋亡。

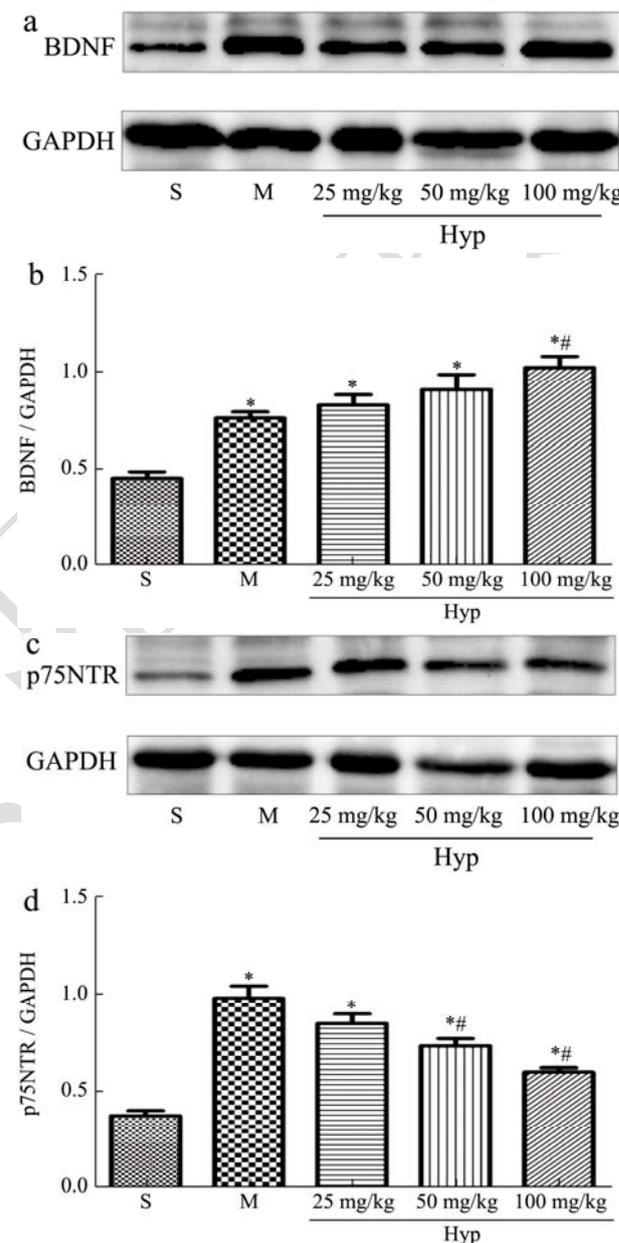


图5 卷丹百合花金丝桃苷对大鼠海马组织 BDNF/p75NTR 蛋白表达的影响

Fig.5 The effect of *Lilium lancifolium* hyperin on the protein expressions of BDNF and p75NTR in the hippocampus of rats

注: *与 S 组比较, $p < 0.05$; #与 M 组比较, $p < 0.05$; S: 假手术组, M: 模型组, Hyp: 卷丹百合花金丝桃苷组。

3 结论

本文研究结果首次报道, 卷丹百合花金丝桃苷对

大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。金丝桃苷能显著缩短逃避潜伏时间, 增加穿越平台次数而改善局灶性脑缺血再灌注大鼠的学习记忆能力, 其作用机制可能与下调海马组织中 p75NRT 蛋白水平, 减少 BDNF 与 p75NRT 的结合, 抑制神经元损伤有关。临床上, 缺血再灌注损伤导致的认知功能障碍机制复杂, 金丝桃苷治疗的确切机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Dacosta-Aguayo R, Grana M, Fernandez-Andujar M, et al. Structural integrity of the contralesional hemisphere predicts cognitive impairment in ischemic stroke at three months [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86119
- [2] Suzuki M, Sugimura Y, Yamada S, et al. Predicting recovery of cognitive function soon after stroke: Differential modeling of logarithmic and linear regression [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53488
- [3] Feng X, Yang S, Liu J, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive impairment through inhibition of NF-kappa B-mediated neuronal cell apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injured rats [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(5): 1516-1522
- [4] 李晓洁, 林如辉, 陶静, 等. 电针对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及海马组织脑源性神经营养因子和神经营养受体 p75 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2015, 21(9): 1020-1024
LI Xiao-jie, LIN Ru-hui, TAO Jing, et al. Effects of electroacupuncture on learning and memory and expression of brain-derived neurotrophic factor and p75 neurotrophin receptor in rats with cerebral ischemia-reperfusion [J]. Chin J Rehabil Theory Prac, 2015, 21(9): 1020-1024
- [5] Jain V, Baitharu I, Prasad D, et al. Enriched environment prevents hypobaric hypoxia induced memory impairment and neurodegeneration: Role of BDNF/PI3K/GSK3beta pathway coupled with CREB activation [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62235
- [6] Longhi L, Perego C, Ortolano F, et al. Tumor necrosis factor in traumatic brain injury: Effects of genetic deletion of p55 or p75 receptor [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(8): 1182-1189
- [7] Nishida S, Satoh H. Role of gap junction involved with endothelium-derived hyperpolarizing factor for the quercetin-induced vasodilatation in rat mesenteric artery [J]. Life Sciences, 2013, 92(13): 752-756
- [8] Fan Y F, Chen Z W, Guo Y, et al. Cellular mechanisms underlying hyperin-induced relaxation of rat basilar artery [J]. Fitoterapia, 2011, 82(4): 626-631
- [9] 李春阳, 付琳, 黄午阳, 等. 蓝莓叶槲皮素和金丝桃苷的 HPLC-MS 鉴定及在内皮细胞中的舒血管和抗炎作用研究 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(1): 20-25
LI Chun-yang, FU Lin, HUANG Wu-yang, et al. Vasodilator and anti-inflammatory effects of quercetin and hyperin from blueberry leaves identified by HPLC-MS in umbilical vein endothelial cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(1): 20-25
- [10] 杨明宇, 高娟, 杜义龙, 等. 一测多评法同时测定山楂叶中 6 种有效成分的含量 [J]. 中国药房, 2016, 27(24): 3404-3407
YANG Ming-yu, GAO Xu, DU Yi-long, et al. Simultaneous determination of six effective components in *Craategus pinnatifida* by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. China Pharmacy, 2016, 27(24): 3404-3407
- [11] 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
- [12] Chen A, Xiong L J, Tong Y, et al. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury [J]. Biomed Rep, 2013, 1(2): 167-176