

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.06.0677

环王巴明加剧大鼠脑缺血再灌注损伤

王 莉, 余萍萍, 唐凡人, 周露玲, 曾 立, 宋晓松, 陈吉祥, 杨 琴*

重庆医科大学附属第一医院神经内科, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨环王巴明(Cyc)对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响。**方法** 60只SD雄性大鼠随机分成假手术组(Sham组)、脑缺血再灌注对照组(Con组)和脑缺血再灌注Cyc干预组(Cyc组),每组20只。于脑缺血再灌注后3h腹腔注射Cyc(10 mg/kg)或无水乙醇,连用7d。采用Longa评分法行脑缺血后1d和14d神经功能缺损评分。脑缺血24h时,干湿质量法检测脑含水量,氯化三苯基四氮唑(TTC)染色测脑梗死体积,H-E染色观察病理改变,原位末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡。免疫化学法检测缺血后24h NeuN、caspase-3蛋白及14d时胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达。**结果** Cyc和Con组大鼠神经功能缺损评分、脑含水量、脑梗死体积、TUNEL阳性细胞计数、caspase-3和GFAP蛋白表达均高于假手术组($P < 0.05$),且Cyc组较Con组更高($P < 0.05$)。Cyc和Con组NeuN蛋白表达低于假手术组($P < 0.05$),且Cyc组较Con组更低($P < 0.05$)。组织病理见Cyc组细胞和间质水肿、神经细胞变形、核固缩、细胞坏死等重于Con组。**结论** Cyc可加剧大鼠脑缺血再灌注损伤。

[关键词] 环王巴明;脑缺血;再灌注损伤;caspase-3;胶质纤维酸性蛋白

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)06-0677-06

Cyclopamine aggravates rat cerebral ischemia-reperfusion injury

WANG Li, YU Ping-ping, TANG Fan-ren, ZHOU Lu-ling, ZENG Li, SONG Xiao-song, CHEN Ji-xiang, YANG Qin*

Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of cyclopamine (Cyc) on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups ($n=20$): sham operation group, cerebral ischemia-reperfusion group (Con group) and cerebral ischemia-reperfusion+Cyc group (Cyc group). Cyc (10 mg/kg) or absolute ethyl alcohol was intraperitoneally injected in animals 3 h after cerebral ischemia for 7 d. Neurological deficit was assessed by Longa scale on day 1 and 14 after cerebral ischemia. At 24 h after cerebral ischemia, the cerebral water content, cerebral infarction area, pathological changes and cell apoptosis were evaluated by dry-wet method, 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) staining, H-E staining and TUNEL method, respectively. Immunohistochemical method was used to examine the protein expression of NeuN and caspase-3 at 24 h after ischemia and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression on day 14 after ischemia. **Results** Neurological deficit score, cerebral water content, cerebral infarction area, TUNEL positive cell counting, protein levels of caspase-3 and GFAP in Cyc and Con groups were significantly higher than those in sham operation group ($P < 0.05$), and the above parameters in Cyc group were also significantly higher than those in Con group ($P < 0.05$). NeuN protein expressions in Cyc and Con groups were significantly lower than those in sham operation group ($P < 0.05$), and NeuN protein in Cyc group was also significantly lower than that in Con group ($P < 0.05$). Cellular and interstitial edema, neurocyte deformation, pyknosis and necrocytosis were more severe in Cyc group than in Con group. **Conclusion** Cyclopamine can aggravate rat cerebral ischemia-reperfusion injury.

[Key words] cyclopamine; cerebral ischemia; reperfusion injuries; caspase-3; glial fibrillary acidic protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(6): 677-682]

[收稿日期] 2015-09-09 **[接受日期]** 2016-03-01

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071119),卫生和计划生育委员会国家临床重点专科建设项目[卫办医政函(2012)649号]。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (81071119) and National Key Clinical Specialty Construction Projects of Health and Family Planning Commission of China (2012-649).

[作者简介] 王 莉,硕士生。E-mail: 286303289@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-82712487, E-mail: xyqh200@126.com

缺血性脑卒中是导致我国患者残疾和死亡的主要原因之一。脑卒中后的病理生理十分复杂,阐明其病理生理机制、寻找有效治疗药物一直是神经科学研究者努力的方向。Hedgehog(HH)信号参与调控胚胎及出生后大脑的发育^[1]。Sonic hedgehog(Shh)是HH信号通路配体之一,近年研究表明Shh信号参与调控卒中后神经功能恢复^[2-7],我们的前期研究也表明Shh信号能参与调控体外氧糖剥夺再复氧损伤后神经干细胞的增殖^[8-9]。环王巴明(cyclopamine,Cyc)是一种提取自百合类植物的甙类生物碱,为Shh信号通路的特异性抑制剂^[7,10-11],其对脑卒中的影响尚不甚清楚。本研究拟采用大鼠大脑中动脉柱塞再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion,MCAO/R)模型,探讨Cyc对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF级SD雄性健康成年大鼠,体质量220~250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)2012-0001。

1.2 主要试剂 Cyc(纯度 $\geq 98\%$,批号:c4116)和2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)购自Sigma公司,TUNEL试剂盒购自Roche公司,免疫组化试剂盒PV-9001、DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司,兔抗caspase-3多克隆抗体购自Bioworld公司,兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体购自Abcam公司,小鼠抗NeuN多克隆抗体购自Millipore公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 大鼠大脑MCAO/R模型建立及神经功能缺损评分 采用Longa改良线栓法^[12]建立MCAO/R模型。选用市售进口鱼线,直径0.23~0.26 mm,长4 cm,头端去棱角使其光滑,在距头端2 cm处用黑色记号笔标记,乙醇消毒后备用。大鼠术前禁食12 h,自由饮水,用10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)经腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,颈部备皮,消毒后,作正中切口,分离并暴露右侧颈总动脉、颈内外动脉,结扎颈总动脉近心端及颈外动脉远心端,在颈内动脉近端备线,远端放置动脉夹,颈总动脉分叉膨大处切口,松开动脉夹,向颈内动脉插入鱼线18~20 mm(视体质量而定),结扎颈总动脉并固定鱼线,外留10 mm线头,缝合皮肤。缺血90 min后,将线栓拉出至结扎端使血流再灌。术后用白炽灯加热维持大鼠体温,待大鼠苏醒后放回鼠笼,自由饮食。按照Longa评分标准评价神经功能缺损:0分为正常,无神经学征象;1分为动物不能完全伸展左前肢;2分为动物左侧肢体瘫痪,行走时向左侧转圈,出现追尾现象;3分为

动物行走向左侧跌倒,或动物不能站立或动物打滚;4分为无自发活动,有意识障碍。神经功能缺损评分在1~3分者为模型成功,0分和4分者均剔除。后续实验中予以补充,保证每组大鼠数量不变。

1.4 实验分组及给药 将60只大鼠随机分为假手术组(Sham组)、脑缺血/再灌注对照组(Con组)和脑缺血/再灌注Cyc干预组(Cyc组),每组20只。Cyc组于MCAO/R后3 h腹腔注射Cyc(10 mg/kg,溶于1.5 mL无水乙醇),每天1次,连用7 d。Sham组手术分离右侧颈总、颈内外动脉,但不插入线栓。Sham组和Con组于相同时间点给予1.5 mL无水乙醇,每天1次,连用7 d。

1.5 干湿质量法测脑水肿含量 各组随机取4只大鼠在术后24 h麻醉后断头取脑,将缺血侧脑组织用滤纸吸去脑表面的水分,称取湿质量,然后置于100℃烤箱内烘至恒质量,称取干质量。脑含水量(%)=(湿质量-干质量)/湿质量 $\times 100\%$ 。

1.6 TTC法测脑梗死体积 各组随机取4只大鼠,术后24 h断头取鲜脑,用锡箔纸包裹置-20℃冰箱速冻30 min,做2 mm厚冠状切片,6片,置于2% TTC染液中,放置于37℃烤箱孵育30 min,期间可翻转组织以便更好着色。白色区域为梗死灶,红色区域为正常组织,数码相机拍照,分离白色和红色区域分别称质量。脑梗死体积(%)=苍白区质量/(苍白区质量+非苍白区质量) $\times 100\%$ ^[13]。

1.7 H-E染色法观察脑组织病理 各组随机取4只大鼠,在术后24 h经10%水合氯醛麻醉后,用4%多聚甲醛灌流取脑。脑组织用4%多聚甲醛固定24 h,冠状切取大脑视交叉部位组织,常规石蜡包埋,制成5 μm 厚切片,H-E染色,中性树胶封片,光镜下观察脑组织病理形态学改变。

1.8 TUNEL检测细胞凋亡 各组随机取4只大鼠,在术后24 h取脑,冰冻切片。将切片用4%多聚甲醛常温固定20 min,PBS漂洗30 min,细胞通透液0.1% Triton X-100 4℃通透2 min,PBS漂洗2次,每次5 min;加TUNEL反应液(TdT+荧光素标记的dUTP),37℃湿盒中避光孵育60 min,PBS洗3次,每次5 min;加DAPI(1:400)染核5 min,PBS漂洗3次,每次5 min;加防荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦下观察拍照,所有切片随机选取5个视野(每只大鼠选2张)。

1.9 免疫化学法检测NeuN、caspase-3和GFAP蛋白表达 各组随机取4只大鼠,在术后24 h或14 d(caspase-3及NeuN于术后24 h,GFAP于术后14 d)行10%水合氯醛麻醉,4%多聚甲醛灌注取脑。脑组织用4%多聚甲醛固定后行石蜡包埋或冰冻切片。

石蜡切片采用微波修复抗原免疫组化 PV 二步法染色。于 60℃ 烤箱烤片 30 min;二甲苯 I、II 各 10 min、梯度乙醇脱水各 5 min;之后浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液中进行微波热修复 15 min, PBS 洗涤 3 次, 3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min; PBS 洗涤, 滴加一抗 caspase-3 (1:100) 和 GFAP (1:100), 置于湿盒中 4℃ 冰箱过夜; PBS 洗涤 2 min×3 次; 滴加试剂 1 (聚合物辅助剂), 37℃ 孵育 20 min, PBS 洗涤 2 min×3 次; 滴加试剂 2 (辣根酶标记抗兔 IgG 聚合物), 37℃ 孵育 20 min, PBS 洗涤 2 min×3 次; 应用 DAB 显色; 自来水冲洗, 复染, 脱水, 透明, 封片。所有切片随机选取 5 个视野 (每只大鼠选 2 张), 在显微镜下观察阳性细胞表达并计数。

冰冻切片行 0.4% Triton 破膜, 冰冻修复液修复 30 min, 10% 山羊血清封闭 2 h, 滴加一抗 NeuN (1:100) 4℃ 过夜, 复温 1 h, 滴加二抗 TRITC (1:100) 孵育 90 min, 滴加二抗后需注意避光, 用 DAPI (1:400) 染核 5 min, 50% 甘油封片, 激光共聚焦观察拍照, 所有切片随机选取 5 个视野 (每只大鼠选 2 张) 计数。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件对实验数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 MCAO/R 模型成功情况 在 60 只实验大鼠中, Con 组和 Cyc 组各有 3 只大鼠神经功能评分为 4, 被剔除。Con 组和 Cyc 组共有 9 只在 MCAO/R 24 h 时死亡, 解剖可见颅底大量血凝块, 考虑血管破裂导致蛛网膜下隙出血。实验模型成功率 90% (54/60), 死亡率 16.67% (9/54)。后续实验中随机补充, 保证每组动物数不变。

2.2 Cyc 对 MCAO/R 损伤后大鼠神经功能的影响 Longa 评分显示, Sham 组大鼠由于没有插入线栓, 未出现神经功能缺损症状。术后 1 d, Con 组和 Cyc 组大鼠均出现明显的神经功能缺损, Longa 评分分别为 2.10 ± 0.31 和 2.85 ± 0.37 , 其中 Cyc 组较 Con 组更为严重 ($P < 0.05$); 术后 14 d, Con 组和 Cyc 组大鼠神经功能缺损有所恢复, 但 Cyc 组 (Longa 评分为 2.50 ± 0.51) 仍较 Con 组 (Longa 评分为 1.25 ± 0.44) 严重 ($P < 0.05$)。

2.3 Cyc 对 MCAO/R 损伤后大鼠脑梗死体积的影响 TTC 染色结果 (图 1) 显示, Sham 组无脑梗死; Con 组和 Cyc 组缺血侧出现明显脑梗死, 梗死体积分别为 $(36.41 \pm 0.64)\%$ 和 $(44.01 \pm 0.53)\%$, 其中

Cyc 组梗死体积较 Con 组大 ($P < 0.05$)。

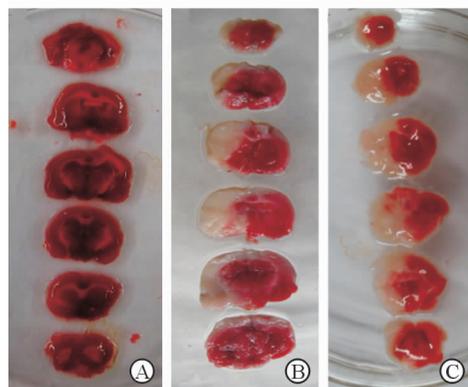


图 1 Cyc 对大鼠大脑中动脉缺血再灌注 (MCAO/R) 后脑梗死体积的影响

Fig 1 Effect of Cyc on infarct volume after MCAO/R in rats

A: Sham group; B: Con group; C: Cyc group. Con: Control; Cyc: Cyclopamine; MCAO/R: Middle cerebral artery occlusion reperfusion

2.4 Cyc 对 MCAO/R 损伤后大鼠脑含水量的影响 结果显示, Con 组和 Cyc 组脑含水量分别为 $(79.48 \pm 2.01)\%$ 和 $(87.01 \pm 1.44)\%$, 均较 Sham 组 [$(74.32 \pm 1.15)\%$] 增加 ($P < 0.05$), 其中 Cyc 组较 Con 组增加更显著 ($P < 0.05$)。

2.5 Cyc 对 MCAO/R 后大鼠脑组织病理改变及 NeuN、TUNEL、caspase-3 的影响 H-E 染色结果 (图 2A~2C) 显示, Sham 组大鼠细胞形态、结构正常, 间质无水肿; 而 Con 组和 Cyc 组细胞结构疏松紊乱, 可见明显细胞和间质水肿, 不同程度的细胞变形、核固缩、细胞坏死等, 且 Cyc 组较 Con 组损伤更严重。

免疫荧光结果 (图 2D~2F) 显示, Con 组和 Cyc 组缺血侧缺血半暗带 NeuN 阳性 (红色) 细胞数分别为 $(50.85 \pm 3.53)/0.24 \text{ mm}^2$ 和 $(26.55 \pm 2.76)/0.24 \text{ mm}^2$, 均明显低于 Sham 组 [$(95.55 \pm 4.25)/0.24 \text{ mm}^2$, $P < 0.05$], 且 Cyc 组较 Con 组更低 ($P < 0.05$)。

TUNEL 染色结果 (图 2G~2I) 显示, Sham 组偶见 TUNEL 阳性细胞, 阳性细胞数为 $(2.15 \pm 0.86)/0.24 \text{ mm}^2$; 而缺血 24 h 时 Con 组和 Cyc 组缺血侧缺血半暗带 TUNEL 阳性细胞增多, 分别为 $(69.85 \pm 2.50)/0.24 \text{ mm}^2$ 和 $(109.68 \pm 2.51)/0.24 \text{ mm}^2$ ($P < 0.05$), 且 Cyc 组较 Con 组更多 ($P < 0.05$)。

Caspase-3 免疫组化染色结果 (图 2J~2L) 显示, Sham 组有少量 caspase-3 阳性细胞, 细胞数为 $(11.13 \pm 10.29)/0.24 \text{ mm}^2$; 而缺血 24 h 时 Con 组和 Cyc 组缺血侧缺血半暗带 caspase-3 阳性细胞数分别为 $(77.83 \pm 1.62)/0.24 \text{ mm}^2$ 和 $(103.90 \pm 2.37)/0.24 \text{ mm}^2$, 明显多于 Sham 组 ($P < 0.05$), 且 Cyc 组较 Con 组更多 ($P < 0.05$)。

2.6 Cyc 对 MCAO/R 损伤后大鼠 GFAP 表达的影响 免疫组化结果(图 3)显示,脑缺血后 14 d, Con 组和 Cyc 组缺血侧缺血半暗带 GFAP 阳性细

胞数明显多于 Sham 组($P < 0.05$),细胞体积更大,突起更长、更粗,GFAP 阳性强度更强,且 Cyc 组表现较 Con 组更明显($P < 0.05$)。

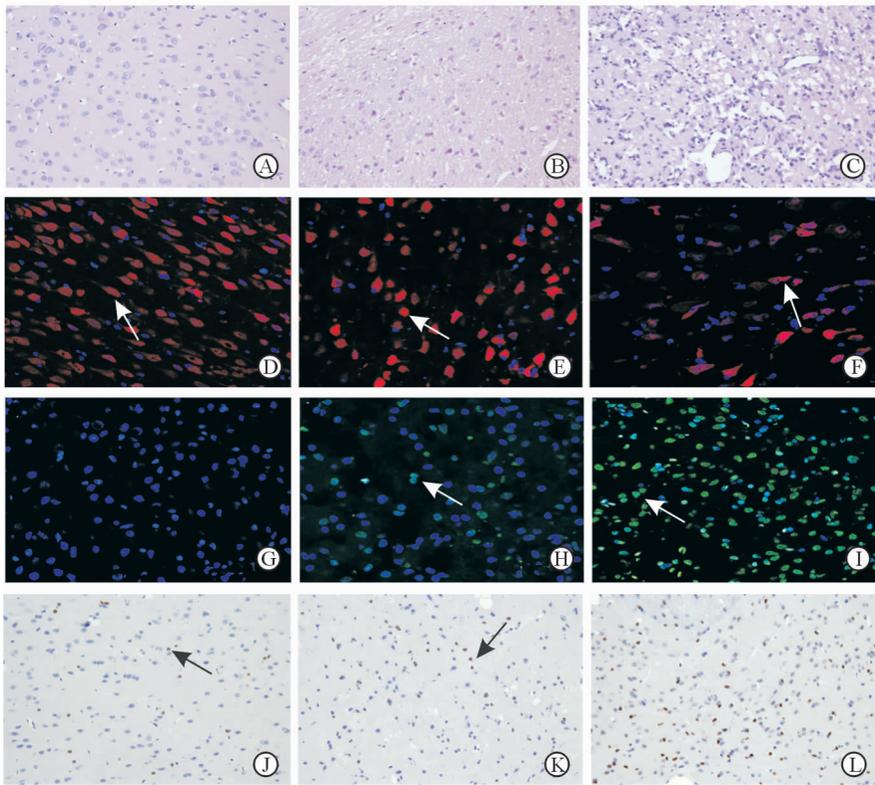


图 2 Cyc 对大鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)后组织病理改变及 NeuN、TUNEL、caspase-3 的影响

Fig 2 Effects of Cyc on pathology, expressions of NeuN, TUNEL and caspase-3 after MCAO/R in rats

A, D, G, J: Sham group; B, E, H, K: Con group; C, F, I, L: Cyclopamine group. A-C: H-E staining; D-F: The expression of NeuN with immunofluorescence (TRITC, red, arrows show the NeuN); G-I: The expression of TUNEL with immunofluorescence (FITC, green, arrows show the TUNEL); J-L: The expression of caspase-3 with immunohistochemistry (brown, arrows show the caspase-3). D-I: DAPI staining (blue). Con: Control; Cyc: Cyclopamine; MCAO/R: Middle cerebral artery occlusion reperfusion. Original magnification: $\times 200$ (A-C, J-L), $\times 400$ (D-I)

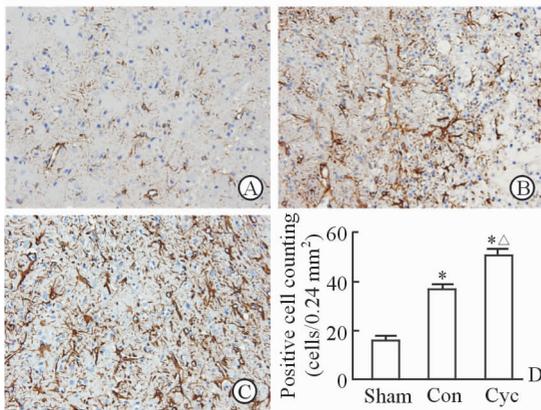


图 3 Cyc 对大鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)后 GFAP 表达的影响

Fig 3 Effects of Cyc on expression of GFAP after MCAO/R injury in rats

A: Sham group; B: Con group; C: Cyclopamine group; D: The quantitative data of GFAP protein expression in 3 groups. Con: Control; Cyc: Cyclopamine; MCAO/R: Middle cerebral artery occlusion reperfusion. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs Con group. $n=4$, $\bar{x} \pm s$. Original magnification: $\times 400$ (A-C)

3 讨论

Cyc 是一种提取自百合类植物的甙类生物碱,主要通过改变 Shh 信号通路成分 Smo 受体蛋白的空间结构而抑制 Smo 活性,从而抑制 Shh 信号通路^[7]。Shh 信号通路与神经系统发育密切相关,激活 Shh 信号通路能通过抗氧化、抗凋亡、促血管增生等途径减轻脑缺血性损伤,改善神经功能^[5-6,10-11];抑制 Shh 信号通路能通过加剧氧化途径加重脑缺血性损伤,抑制神经功能的恢复^[7,14-17]。在本研究中,大鼠脑缺血后 3 h 给予 Shh 信号通路成分 Smo 受体特异性抑制剂 Cyc 干预,能增加脑梗死体积、加重脑水肿、阻碍神经功能恢复,再次证明抑制 Shh 信号通路能加剧脑缺血性损伤。

脑缺血后,炎症、兴奋毒性、氧化应激等导致神经元的脱失、凋亡。凋亡是脑缺血半暗带细胞死亡

的模式之一,为可逆性损伤。脑缺血半暗带凋亡细胞的多少决定脑梗死体积的大小^[17-18]。TUNEL法是最常用的检测凋亡的方法,caspase-3是凋亡的另一敏感指标^[19]。本研究检测TUNEL阳性细胞和caspase-3蛋白的表达,结果显示脑缺血24h时,对照组TUNEL阳性细胞和caspase-3蛋白的表达明显增加,同时H-E染色见大量细胞脱失、坏死,免疫荧光也证实大量NeuN阳性细胞脱失,这表明脑缺血导致了神经细胞的脱失和凋亡。在脑缺血后3h给予Cyc干预,缺血24h时,TUNEL阳性细胞数、caspase-3蛋白的表达显著高于对照组,H-E染色见细胞脱失、坏死更显著,免疫荧光见NeuN阳性细胞数明显低于对照组。这表明Cyc可加剧缺血性脑损伤后细胞的凋亡、脱失。

脑缺血后神经功能的恢复不仅依赖于神经元脱失、凋亡的程度,也依赖于胶质细胞的变化。近年神经科学研究者逐渐关注到星形胶质细胞的作用不再局限于脑保护及营养支持,其对神经功能的恢复也有重要影响。在脑缺血早期,星形胶质细胞能释放一氧化氮、促进谷氨酸和S-100 β 释放、上调血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶的表达、激活水通道蛋白4,从而加剧神经元的损害,抑制损伤后恢复;在脑缺血晚期,其可异常活化、形成胶质瘢痕、释放炎症因子、抑制轴突再生等,从而阻碍神经功能恢复^[20]。因此,寻找有效的药物或其他方法干预星形胶质细胞过度活化及胶质瘢痕形成,有利于神经功能的改善。

GFAP是星形胶质细胞的特异性标志蛋白,广泛用于研究和鉴别星形胶质细胞。据报道在全脑缺血第7天,海马CA1区GFAP阳性细胞数增多,细胞形态增大肿胀,突起增多增粗^[21]。本实验在大鼠MCAO/R后14d也观察到Con组缺血半暗带皮质区GFAP阳性细胞数增加,且细胞体积增大,突起增多增粗,表明脑缺血导致了星形胶质细胞的异常活化和增殖。在MCAO/R后3h给予Cyc处理,14d时缺血半暗带皮质区GFAP阳性细胞数高于对照组,且细胞体积较对照组大,突起较对照组多而粗。这表明Cyc增强了星形胶质细胞的异常活化。

综上所述,Cyc可能通过加剧细胞的凋亡、脱失和增强星形胶质细胞的异常活化,从而阻碍神经功能的恢复。我们的前期研究显示Cyc能抑制体外氧

糖剥夺后神经干细胞的增殖^[8],而Cyc是Shh信号通路成分Smo受体特异性抑制剂,这些从反面证实Shh信号通路在缺血性脑损害后神经功能的恢复中起重要作用。Shh信号通路对缺血性脑损害后神经功能恢复的详细机制有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] 黄家贵,徐兰,沈长波,刘舒,杨琴. 初级纤毛介导的Shh信号对大鼠骨髓基质细胞神经元样细胞分化的影响[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34: 934-939. HUANG J G, XU L, SHEN C B, LIU S, YANG Q. Effect of primary cilia-mediated Shh signaling on neuronal-like cell differentiation of rat bone marrow stromal cells[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34: 934-939.
- [2] ZHANG L, CHOPP M, MEIER D H, WINTER S, WANG L, SZALAD A, et al. Sonic hedgehog signaling pathway mediates cerebrolysin-improved neurological function after stroke[J]. Stroke, 2013, 44: 1965-1972.
- [3] DING X, LI Y, LIU Z, ZHANG J, CUI Y, CHEN X, et al. The sonic hedgehog pathway mediates brain plasticity and subsequent functional recovery after bone marrow stromal cell treatment of stroke in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33: 1015-1024.
- [4] JIN Y, RAVIV N, BARNETT A, BAMBAKIDIS N C, FILICHIA E, LUO Y. The shh signaling pathway is upregulated in multiple cell types in cortical ischemia and influences the outcome of stroke in an animal model[J]. PLoS One, 2015, 10: e0124657.
- [5] CHECHNEVA O V, MAYRHOFER F, DAUGHERTY D J, KRISHNAMURTY R G, BANNERMAN P, PLEASURE D E, et al. A smoothed receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1481.
- [6] HUANG S S, CHENG H, TANG C M, NIEN M W, HUANG Y S, LEE I H, et al. Anti-oxidative, anti-apoptotic, and pro-angiogenic effects mediate functional improvement by sonic hedgehog against focal cerebral ischemia in rats [J]. Exp Neurol, 2013, 247: 680-688.
- [7] JI H, MIAO J, ZHANG X, DU Y, LIU H, LI S, et al. Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates

brain damage associated with the down-regulation of Gli1, Ptch1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 506: 1-6.

[8] CHENG W, YU P, WANG L, SHEN C, SONG X, CHEN J, et al. Sonic hedgehog signaling mediates resveratrol to increase proliferation of neural stem cells after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury *in vitro* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35: 2019-2032.

[9] 成薇,沈长波,王莉,余萍萍,杨琴.白藜芦醇预处理对氧糖剥夺/再复氧损伤大鼠皮质神经干细胞增殖的影响[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31: 113-118.

[10] 牛广义,白宏英,曾志磊,陈苗苗,刘花艳. 特异激活 SHH 信号通路对急性脑缺血大鼠 NGF, BDNF 表达的影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2013, 30: 895-897.

[11] 朱美霖,白宏英,曾志磊,张沛琳. 特异性激活 SHH 通路对急性脑缺血大鼠血管再生影响[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29: 1098-1101.

[12] LONGA E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.

[13] 任俊伟,杨琴,陈娜,范层层. 白藜芦醇对脑缺血后再灌注后细胞凋亡及 Caspase-3 表达的影响[J]. *中成药*, 2011, 33: 570-573.

[14] 张沛琳,娄季宇,范波胜,白宏英,曾志磊,朱美霖. 环杷明对急性脑梗死大鼠血管再生的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2013, 34: 357-360.

[15] 周逢海,孙全武,王养民,迟强,赵志强. 环王巴明诱

导 DU415 细胞凋亡的机制研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18: 1267-1270.

[16] 李锦成,薛万里,朱德森,陶维. 环王巴明对人乳腺癌细胞系 MCF-7 的作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21: 2596-2599.

[17] Mattson M P, Duan W, Pedersen W A, Culmsee C. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases[J]. *Apoptosis*, 2001, 6: 69-81.

[18] BROUGHTON B R, REUTENS D C, SOBEY C G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2009, 40: e331-e339.

[19] 王宇卉,邵福源,夏春林,孙茂民. 大鼠海马神经元缺氧/复氧后 caspase-3 活性的变化[J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23: 1214-1217.

WANG Y H, SHAO F Y, XIA C L, SUN M M. Changes of caspase-3 activities in rat hippocampal neurons during hypoxia/reoxygenation[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2002, 23: 1214-1217.

[20] ZHAO Y, REMPE D A. Targeting astrocytes for stroke therapy[J]. *Neurotherapeutics*, 2010, 7: 439-451.

[21] GIRBOVAN C, PLAMONDON H. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. *Brain Res*, 2015, 1608: 203-214.

[本文编辑] 尹茶