

·基础研究·

生地预处理对全脑缺血再灌注大鼠血清 TNF 与 NSE 表达的影响*

韩振翔¹ 魏江磊^{1,4} 祁丽丽² 李妙龄³

摘要 目的:观察比较中药生地预处理与缺血预处理减轻全脑缺血再灌注大鼠肿瘤坏死因子(TNF)与特异性神经元烯醇化酶(NSE)表达变化。**方法**:实验选用 25 只雄性 SD 大鼠,体质量 180—220g,随机将 25 只大鼠分为 5 组(假手术组、缺血预处理组、生地预处理组、阿司匹林预处理组、脑缺血再灌注组),采用热凝椎动脉,钳夹双侧颈总动脉建立全脑缺血模型,缺血预处理组缺血 3min,3d 后给予缺血 10min,再灌注 24h 后处死。假手术组暴露双侧颈总动脉不夹闭,缺血再灌注组,夹闭双侧大脑颈总动脉 10min,再灌注 24h 后处死。采用 ELISA 检测血清中 TNF 与 NSE 含量。**结果**:脑缺血再灌注后血清中 TNF 与 NSE 含量增加($P<0.05$),生地预处理组与缺血预处理组血清中 TNF 与 NSE 含量降低,生地预处理组 TNF 与 NSE 含量与缺血预处理组比较 $P>0.05$,两者与缺血再灌注组比较 $P<0.05$ 。**结论**:生地预处理对随后的脑梗死有明显的保护作用,能诱导缺血耐受的产生。其机制可能是调节 TNF 与 NSE 的病理性表达。**关键词** 脑缺血;缺血预处理;生地预处理;肿瘤坏死因子;特异性神经元烯醇化酶

中图分类号:R743,R49 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-03-0248-04

An experimental study on the shendi preconditioning effects on the expression of TNF and NSE in rats with cerebral ischemic-refusion injury/HAN Zhenxiang, WEI Jianglei, QI Lili, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(3): 248—251

Abstract Objective: To investigate the effects of shengdi preconditioning and cerebral ischemic preconditioning on the expression of tumor necrosis factor (TNF) and neuronal specific enolase (NSE) in the blood of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Method:** Twenty-five male SD rats (weight 180—220g) were randomly divided into 5 groups: sham operation group (n=5); ischemic preconditioning group (n=5); shendi preconditioning group (n=5); aspirin (ASP) preconditioning group (n=5); cerebral ischemia and reperfusion group (n=5). The global cerebral ischemia and reperfusion model was established with Pulsinelli's method. The expressions of TNF and NSE were studied respectively in each group. **Result:** The expressions of TNF- α and NSE were very low in sham operation group. After ischemia-reperfusion, the expressions of TNF and NSE increased significantly ($P<0.05$). The contents of TNF and NSE in shendi preconditioning group and ischemic preconditioning group all decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Shengdi preconditioning might provide obvious protection effect to the following cerebral ischemia and induced brain tissue tolerance to secondary severe ischemia through regulating the pathological expressions of TNF and NSE.

Author's address Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai, 200021

Key words cerebral ischemia; ischemic preconditioning; shendi pretreatment; tumor necrosis factor; neuronal specific enolase

脑缺血预处理 (brain ischemic preconditioning, BIP)是指预先短暂性缺血或轻度缺氧激发或动员机体内在的防护能力,使机体对随后严重的缺血、缺氧产生防御和保护作用的现象。1990年,Kitagawa等^[1]最早用沙土鼠全脑缺血模型发现,短暂性全脑缺血后再灌注能减轻随后较长时间的全脑缺血性损伤,首次提出缺血预处理的概念。虽然缺血预处理对脑缺血的保护效应已属公认,但 BIP 诱导损伤性应激过程终究是一种创伤。药物性预处理正是基于这一思路而提出来的,生地具有养阴清热之功,其有效成分梓醇对缺血再灌注受损的神经元有明显的保护作用^[2]。本研究通过观察生药生地预处理 SD 大鼠全脑缺血再灌注损伤血清肿瘤坏死因子 (tumor necrosis

factor, TNF)特异性神经元烯醇化酶(neuronal specific enolase, NSE)的情况,在中药防治缺血性脑血管病的药物性预处理做一些有益的尝试。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

* 基金项目:上海市科委登山项目(06JC14027)

1 上海中医药大学附属曙光医院,上海,200021

2 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院急诊科

3 泸州医学院心电实验室

4 通讯作者

作者简介:韩振翔,男,博士研究生

收稿日期:2008-06-22

雄性健康 SD 大鼠 25 只, 清洁级, 体质量 180—220g, 由泸州医学院实验动物室提供, 医学实验动物合格证号: 川医动字第 017 号, 清洁环境下分笼饲养, 随机将动物分为假手术组 $n=5$, 只暴露双侧颈总动脉而不予夹闭; 缺血再灌注组 $n=5$, 夹闭双侧大脑颈总动脉 10min; 缺血预处理组 $n=5$, 阻塞大脑总动脉 3 min(亚致死性缺血)后松开以恢复血流, 3d 后第 2 次阻塞大脑总动脉 10min(持续性缺血); 阿司匹林预处理组 $n=5$; 生地预处理组 $n=5$ 。

1.2 制备双侧大脑缺血模型

参考 Pulsinelli 所记载的方法^[3], 腹腔内注射戊巴比妥钠 4—5mg/100g 麻醉。

1.2.1 分离颈总动脉: 将已麻醉的大鼠平展四肢仰卧用棉线固定在固定板上, 消毒颈部, 剪毛。在两前肢直线上方沿腹正中线切 1cm 长的皮肤切口, 找到跳动的颈总动脉(CCA)和与之伴行的神经。沿血管纵向钝性分离出 CCA, 用无创棉线环 CCA 成 1cm 的线环, 不阻断血流, 两侧线环相互交叉埋于皮下, 缝合切口。

1.2.2 热凝椎动脉: 大鼠俯卧, 头向下倾斜 30°固定, 剪去头颈部的毛, 消毒。在枕骨下沿背正中切 1cm 长的切口, 切开皮肤和斜方肌, 分离肌肉, 找到第一颈椎后弓上的横突孔, 用直径 0.5mm 针灸针酒精灯烧灼后快速插入 2—3mm, 灼断孔中的椎动脉, 使之永久性阻塞, 热凝完毕, 缝合切口。大鼠放回饲养笼中, 让其自然苏醒, 禁食过夜, 自由饮水。

1.2.3 缺血模型制备方法: 以上手术 24h 后, 大鼠在清醒状态下仰卧固定, 重新打开颈部切口, 用显微动脉夹夹住双侧的颈总动脉, 使大鼠脑部供血完全阻断, 大鼠先挣扎数秒后于 30—60s 内昏迷, 放开固定, 可见大鼠四肢上举, 翻正反射消失, 痛觉反应消失, 双侧瞳孔散大, 眼球呈灰白色, 身体可呈角弓反张, 用脑电图(EEG)(脑电图仪 ADInstruments PowerLab.BioAmp, MacLab, ADInstrument.USA), 以 20k/s 速率采样。双通道记录。)验证, 脑电图几乎呈一直线。实验过程中, 室温保持 20℃ 以上。缺血时间达到实验所需的时间后, 松开动脉夹, 让血液重新流动。

术中保持肛温(以白炽灯照射)(37±0.5)℃, 凡术中动物死亡、出现蛛网膜下腔出血或无梗死灶均为模型制作失败, 不纳入本实验, 再随机补充病例, 保证实验动物每组数量不变。

1.2.4 药物预处理: 阿司匹林肠溶片(国药准字: H13024364)30mg/kg 灌胃, bid, 连续两周, 然后做缺血再灌注处理。生地(玄参科多年生草本植物地黄 R.glutinosa(Gaertn.)Libosch.的根, 上海曙光医院中药

房提供)15g 水煎浓缩, 按体表面积换算公式以 15ml/kg 灌胃, bid, 连续两周, 然后做缺血再灌注处理。

1.3 仪器和试剂

麻醉后腹腔动脉取血, 离心后取血清 -20℃ 冰箱保存。大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒, 深圳晶美生物技术公司提供。NSE ELISA 试剂盒, UNIONHONEST ADL 公司提供。检测时使用 TNF- α , NSE 定量 ELISA 检测试剂盒。

1.4 统计学分析

计量资料用均数±标准差表示, 应用 SPSS12.0 统计软件, 组间均数差异显著性检验用方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

见表 1。缺血再灌注组与假手术组比较 TNF- α 、NSE 含量均升高, 差异有显著性意义($P<0.05$); 生地预处理组和缺血预处理组 TNF- α 、NSE 含量低于假手术组, 差异有显著性意义($P<0.05$); 生地预处理组和缺血预处理组 TNF- α 、NSE 含量低于缺血再灌注组, 有显著性差异($P<0.05$); 生地预处理组与缺血预处理组比较, 两指标差异均无显著性意义($P>0.05$)。阿司匹林预处理组 TNF- α 、NSE 含量低于缺血再灌注组, 差异有显著性($P<0.05$)。

表 1 各组动物血清 TNF- α 、NSE 含量的变化($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

组别	例数	TNF- α	NSE
假手术组	5	7.708±1.389	4.284±0.348
缺血再灌注组	5	15.404±6.922 ^①	8.502±2.677 ^①
缺血预处理组	5	4.632±0.8414 ^{①③}	3.108±0.1629 ^{①③}
生地预处理组	5	4.972±1.074 ^{①③⑤}	2.70±0.369 ^{①③⑤}
阿司匹林预处理组	5	7.036±1.526 ^{②③⑥}	2.250±0.876 ^{①③⑤}

①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与假手术组比较 $P>0.05$; ③与缺血再灌注组比较 $P<0.05$; ④与缺血再灌注组比较 $P>0.05$; ⑤与缺血预处理组比较 $P>0.05$; ⑥与缺血预处理组比较 $P<0.05$

3 讨论

中医药治疗中风的方法较多, 多数医者强调“急则治其标”, 然中风多属肝肾阴亏, 水不涵木, 肝阳上亢而致阳升风动, 脑窍蒙蔽, 证属本虚标实, 故当以本虚立论, 冯兆张《冯氏锦囊秘录》明确指出: “中风一证, 多由肝肾不足, 肾水有亏, 虚火上承, 无故卒倒, 筋骨无养, 偏枯不遂, 故滋肾养肝, 治本之至要”。生地性寒, 味甘, 有清热凉血, 养阴生津之功, 针对中风病机之本而设。可奏养阴生津, 清热凉血, 使阴复而风火自除, 痰瘀易散, 气血运行正常。

以往的资料表明^[4], 大鼠全脑缺血模型中诱导脑缺血耐受的 CIP 适宜时间为 3 min。用 3 min 作为 CIP 时间, 可成功地诱导 BIT 的产生, 诱导海马

CA1 区神经元缺血耐受的时间为 1—7d, 第 2 次损伤性缺血的持续时间为 5—10min^[5-6]。也是本实验中缺血预处理采用预缺血 3min, 间隔 3d 后缺血 10min 的原因。

NSE 是神经元损伤最敏感的生化指标, 能够反映脑损伤的程度。NSE 特异性地存在于神经元和神经内分泌细胞中, 当缺血、缺氧或中毒等因素致脑组织受损时, 神经元细胞膜完整性的破坏使 NSE 从神经元内漏出至细胞间隙, 进而通过血脑屏障进入血液, 被认为是神经元损伤的标志酶, 且为最灵敏的生化指标^[7], 其水平变化能够反映神经元损伤程度及疾病预后^[8]。脑梗死后梗死灶周围的主要病理变化是神经元的变性坏死。神经髓鞘的崩解, 血-脑脊液屏障的破坏, NSE 从细胞内释放通过脑脊液或血-脑脊液屏障进入外周血^[9]。因而可在外周血中检测到 NSE 浓度的升高^[10]。国外学者指出^[11], 血液中 NSE 浓度测定可取代脑脊液 NSE 测定。作为脑实质损害的一个十分敏感的指标, 现已发现, 多数有神经元损伤或坏死的疾病如脑外伤、脑出血、脑梗死、昏迷等均可出现血清 NSE 水平的升高^[12]。本实验过程中, 假手术组仅分离双侧颈总动脉而未行脑缺血, 其血清中 NSE 含量为 $4.284 \pm 0.348 \text{ ng/ml}$, 说明在正常情况下, 这些细胞因子的表达水平较低, 生地预处理组, 缺血预处理组, 缺血再灌注组分别夹闭双侧颈总动脉造成脑缺血, 10min 后行再灌注, 其中缺血再灌注组再灌注 24h 后, 血清中 NSE 含量为 $8.502 \pm 2.677 \text{ ng/ml}$, 高于假手术组 ($P < 0.05$), 说明脑缺血再灌注诱发产生 NSE 参与介导再灌注损伤, 与文献报道一致^[13]。本实验中缺血预处理组在缺血预处理后, 其血清中 NSE 低于缺血再灌注组 ($P < 0.05$), 且与生地预处理组相比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 生地预处理组其血清中 NSE 含量为 $2.70 \pm 0.369 \text{ ng/ml}$, 明显低于缺血再灌注组, 说明生地预处理与缺血预处理可对抗脑缺血再灌注损伤后导致的 NSE 表达而防治再灌注损伤, 疗效确切, 阿司匹林预处理组同样显示此作用。

TNF- α 主要是由激活的单核/巨噬细胞分泌产生的细胞因子, 正常情况下, 血浆存在较低水平的 TNF- α , TNF- α 水平增高是脑缺血的急性炎症反应, 炎症反应程度与局部脑损伤的程度直接相关。TNF 可促进花生四烯酸代谢产物的释放, 并与氧自由基、脂质过氧化物的生成有关, 这些物质均可引起细胞毒性水肿^[14]。TNF- α 作为一种多效性的促炎性细胞因子, 不仅在机体炎症反应和损伤过程中起着重要作用, 而且与缺血性脑血管病关系密切^[15]。TNF

在脑缺血过程中的作用具有多面性^[16], 一方面作为炎前因子广泛参与 CNS 疾病的炎症反应, 另一方面在 CNS 损伤性疾病的早期过度表达对有关的神经组织具有危害性^[17]。但其具体参与脑缺血的机制仍有待进一步研究。一般认为, 脑缺血再灌注后, TNF- α 表达增加, 可诱导内皮细胞表达细胞间黏附分子-1、内皮细胞白细胞黏附分子-1 等黏附分子, 使白细胞、血小板黏附于微血管内, 导致微血管阻塞, 增加了血栓形成的可能性。其次, TNF 可作用于梗死区及非血栓部位的内皮细胞及平滑肌细胞, 影响 ET 和 NO 释放, 使小血管收缩; 诱导血小板活化因子、组织因子、VII 因子的释放, 从而促发一些凝血因子活化。此外, TNF- α 可拮抗某些抗凝机制, 增加纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂, 使纤维蛋白溶酶降低, 最终促成血管内皮细胞表面由抗凝到促凝的转化, 对动脉血栓的产生、形成及发展起了一系列作用, 进一步加重了脑缺血再灌注损伤。本实验过程中, 假手术组仅分离双侧颈总动脉而未行脑缺血, 其血清中 TNF- α 含量为 $7.708 \pm 1.389 \text{ ng/ml}$, 说明在正常情况下, 这些细胞因子的表达水平较低, 生地预处理组, 缺血预处理组, 缺血再灌注组分别夹闭双侧颈总动脉造成脑缺血, 10min 后行再灌注, 其中缺血再灌注组再灌注 24h 后, 血清中 TNF- α 为 $15.404 \pm 6.922 \text{ ng/ml}$, 高于假手术组 ($P < 0.05$), 说明脑缺血再灌注促发产生 TNF- α 参与介导再灌注损伤。本实验中缺血预处理组在缺血预处理后, 其血清中 TNF- α 低于缺血再灌注组 ($P < 0.05$), 且与生地预处理组相比, 无显著性差异 ($P > 0.05$), 生地预处理组与阿司匹林预处理组其血清中 TNF- α 含量明显低于缺血再灌注组, 说明药物预处理可对抗脑缺血再灌注损伤后导致的炎性细胞因子的显著增高, 阻止了 TNF- α 而防治再灌注损伤, 疗效确切, 以上结果表明脑缺血后血清中 TNF- α 含量升高, 预处理可抑制血清中 TNF- α 含量升高, 与文献报道一致^[18-21]。

4 结论

本实验结果表明, 缺血预处理与生地预处理可明显降低血清中 TNF 与 NSE 水平, 两者作用无明显差别, 提示这两种预处理机制可能通过降低 TNF- α 与 NSE 的病理性增高保护神经元。本研究初步探索了中药生地预处理对大鼠全脑缺血再灌注损伤血清中 TNF- α 与 NSE 含量的影响, 并与缺血预处理、阿司匹林预处理进行比较, 为脑缺血损伤的预防, 治疗提供了一种新的思路, 但生地预处理保护脑缺血损伤、减轻脑细胞凋亡的内在机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. "Ischemic tolerance" phenomenon found in the brain [J]. *Brain Res*, 1990, 528: 21—24.
- [2] 李杨, 李丹青. 梓醇对缺血再灌注损伤神经元保护作用的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(10): 1454—1456, 1460.
- [3] Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation [J]. *Stroke*, 1988, 19(7): 913—914.
- [4] Bickler PE, Fahlman CS. Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 2004, 127(3): 673—683.
- [5] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. "ischemic tolerance" phenomenon found in the brain [J]. *Brain Res*, 1990, 528: 21—24.
- [6] Kato H, Liu Y, Araki T, et al. Temporal profile of the effects of pretreatment with brief cerebral ischemia on the neuronal damage following secondary ischemic insult in the gerbil: cumulative damage and protective effects [J]. *Brain Res*, 1991, 553: 238—242.
- [7] Lima JE, Takeyanagui OM, Garcia LV, et al. Neuron-specific enolase in patients with neurocysticercosis [J]. *J Neurol Sci*, 2004, 217(1): 31—35.
- [8] Lima JE, Takayanagui OM, Garcia LV, et al. Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome in patients with neurological disorders [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2004, 37: 19.
- [9] Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, et al. S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(5): 491—498.
- [10] 杨慧君, 王生池, 李云萍, 等. 急性脑梗死神经元特异性烯醇化酶的临床意义 [J]. *中华实用医学*, 2004, 6(4): 16—18.
- [11] Schaarsch CH, Prange HW, Reiber H. Neuron specific enolase concentration in blood as a prognostic parameter in cerebrovascular diseases [J]. *Stroke*, 1994, 25: 558.
- [12] Rabinowicz AL, Correale JD, Bracht KD, et al. Neuron-specific enolase is increased after nonconvulsive status epilepticus [J]. *Epilepsia*, 1995, 36(2): 475.
- [13] 金丽英, 刘真友, 杨学伟, 等. 兔脑缺血再灌注后 NSE 和 S-100 的表达及其血清水平的变化 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(11): 964—967.
- [14] Clark MA, Chen M, Croode ST, et al. Tumour necrosis factor (cachectin) induces phospholipase A2 activity and synthesis of a phospholipase A2 activating protein in endothelial cells [J]. *Biochem*, 1988, 250: 125.
- [15] Ezkur ME, Valdez SR, Seltzer AM. Inflammatory responses of the substantia nigra after acute hypoxia in neonatal rats [J]. *Exp Neurol*, 2006, 197(2): 391.
- [16] Hallenbeck JM. The many faces of tumor necrosis factor in stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(12): 1363—1368.
- [17] Wang CX, Shuaib A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury [J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 67(2): 161—172.
- [18] 陈明生, 朱瑞芬, 詹庆盈. 脑梗死患者血清 TNF- α 、IL-1 β 含量的变化及其临床意义的研究 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2001, 8(1): 32.
- [19] 吴苏宁, 张晓霞, 赵瑞平, 等. 急性脑梗死患者血清肿瘤坏死因子及循环内皮细胞含量变化的对比研究 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2000, 17(3): 149.
- [20] 杨养贤, 延卫东, 乔晋, 等. 黄芩苷对大鼠缺血再灌注脑组织 TNF- α 、IL-1 β 表达的影响 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2005, 26(3): 220—223, 227.
- [21] 程道宾, 王进, 罗杰峰, 等. 脑缺血预处理诱导大鼠脑缺血耐受的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(7): 599—601.

(上接 243 页)

入研究针刺对髓鞘保护作用的分子机制奠定了实验基础。

参考文献

- [1] 刘秉文, 陈俊杰主编. 医学分子生物学 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2000: 568—569.
- [2] 段建钢, 刘鸣. 针刺对缺血性脑卒中大鼠血清 MBP 含量和缺血灶髓鞘再生影响的实验研究 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2007, 29(2): 94—98.
- [3] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 第 1 版. 北京: 中国中医药出版社, 2003. 327—329.
- [4] Gelmini S, Orlando C, Sestini R, et al. Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification [J]. *Clinical Chemistry*, 1997, 43(5): 752—758.
- [5] Miller RH. Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS [J]. *Prog Neurobiol*, 2002, 67(6): 451—467.
- [6] Terra J, Frederick, Teresa L, et al. IGF-I and FGF-2 coordinately enhance cyclin D1 and cyclin E-cdk2 association and activity to promote G1 progression in oligodendrocyte progenitor cells [J]. *Mol. Cell. Neurosci*, 2004, 25(4): 480—492.
- [7] Cohen RI, Rottkamp DM, Maric D, et al. A role for semaphorins and neuropilins in oligodendrocyte guidance [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(5): 1262—1278.
- [8] Hisashi Umemori, Yasunori Kadowaki. Stimulation of myelin basic protein gene transcription by fyn tyrosine kinase for myelination [J]. *J Neuroscience*, 1999, 19(4): 1393—1397.
- [9] Campagnoni AT, Hunkeler MJ, Moskaitis JE. Translational regulation of myelin basic protein synthesis [J]. *J Neurosci Res*, 1987, 17(2): 102—110.
- [10] Bedell MA, Jenkins NA, Copeland NG. Good gene in bad neighbourhoods [J]. *Nat Genet*, 1996, 12(3): 229—232.
- [11] Billings-Gagliardi S, Adcock LH, Wolf MK. Hypomyelinated mutant mice: description of jpmid and comparison with jp and qk on their present genetic backgrounds [J]. *Brain Res*, 1980, 194(2): 325—338.
- [12] Sparkes RS, Mohandas T, Heinemann C, et al. Assignment of MBP gene to human chromosome 18q22-qter [J]. *Hum Genet*, 1987, 75: 147.
- [13] Campagnoni AT. Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system [J]. *J Neurochem*, 1988, 51(1): 1.
- [14] Wei Q, Miskimins WK, Miskimins R. Cloning and characterization of the rat myelin basic protein gene promoter [J]. *Gene*, 2003, 313(8): 161—167.
- [15] Gregersen R, Christensen T, Lehmann E. Focal cerebral ischemia induces increased myelin basic protein and growth-associated protein-43 gene transcription in peri-infarct areas in the rat brain [J]. *Exp Brain Res*, 2001, 138(3): 384—392.
- [16] Felkin LE, Taegtmeyer AB, Barton PJ. Real-time quantitative polymerase chain reaction in cardiac transplant research [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 333: 305—330.
- [17] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction [J]. *Mol Aspects Med*, 2006, 27(2—3): 95—125.
- [18] Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, et al. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats [J]. *Stroke*, 2005, 36(6): 1278—1282.
- [19] Hu QD, Cui XY, Ng YK, et al. Axoglial interaction via the notch receptor in oligodendrocyte differentiation [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2004, 33(5): 581—588.
- [20] 韩俊英, 曾瑞萍. 荧光定量 PCR 技术及其应用 [J]. *国外医学·遗传学分册*, 2000, 23(3): 177.