

基于缝隙连接蛋白-43调控的运动预处理促进大鼠脑缺血再灌注后神经血管单元重构的机制研究*

李保龙¹ 梁润玉¹ 裴 飞¹ 张金朋¹ 钱 钺¹ 朱路文^{1,2}

摘要

目的:探讨运动预处理通过影响缝隙连接蛋白-43(Cx43),促进脑缺血再灌注损伤(CIRI)后血管神经单元重构的作用。

方法:将72只雄性SD大鼠分为假手术组、模型组、运动预处理组,并用线栓法制作大脑中动脉缺血/再灌注模型。在恢复灌注的1天、3天后分别进行神经功能缺损评分、Western Blot及免疫荧光染色检测Cx43蛋白表达水平、免疫组化法检测CD34表达水平。

结果:与假手术组相比,模型组神经功能缺损评分、缺血侧皮层脑组织中Cx43蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),CD34细胞阳性率显著下降($P<0.01$)。与模型组相比,运动预处理组神经功能缺损评分、缺血侧皮层脑组织中Cx43蛋白表达水平较低,CD34细胞阳性率上升,差异均有显著性意义($P<0.01$)。

结论:作为CIRI和神经血管单元重构机制靶点之一,基于Cx43调控的运动预处理可通过抑制CIRI后Cx43的激活,上调CD34表达,发挥作用。

关键词 脑缺血再灌注;运动预处理;神经血管重构;缝隙连接蛋白-43;CD34

中图分类号:R743,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-03-0299-06

Mechanism of exercise preconditioning based on Cx43 promoting neurovascular unit remodeling after cerebral ischemia-reperfusion in rats/LI Baolong, LIANG Runyu, PEI Fei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(3):299—304

Abstract

Objective: To investigate the effect of exercise preconditioning on the remodeling of vascular nerve units after cerebral ischemia reperfusion injury(CIRI) by affecting connexin-43 (Cx43).

Method: Seventy-two male SD rats were divided into sham group, model group and exercise preconditioning group. Middle cerebral artery occlusion/reperfusion model was made by thread embolus. Modified neurologic severity score, Western Blot and Immunofluorescence staining were used to detect the expression of Cx43 protein and Immunohistochemistry was used to detect the expression of CD34 at 1 or 3 day after reperfusion.

Result: Compared with the sham group, the modified neurologic severity score and the expression of Cx43 in the ischemic cortex of the model group increased significantly ($P<0.01$), and the positive rate of CD34 cells decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the modified neurologic severity score, the expression of Cx43 protein in the ischemic cortex were lower, and the positive rate of CD34 cells in the exercise preconditioning group was higher($P<0.01$).

Conclusion: As one of the targets of CIRI and neurovascular unit remodeling mechanism, exercise preconditioning based on Cx43 can play a role by inhibiting the activation of Cx43 after CIRI and up-regulating the expression of CD34 after CIRI.

Author's address The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine,150000

Key word cerebral ischemia-reperfusion;exercise preconditioning;neurovascular remodeling;connexin-43;CD34

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.03.003

*基金项目:孙申田青年人才基金(KY-201803);中国博士后科学基金(2017M611411)

1 黑龙江中医药大学附属第二医院,黑龙江省哈尔滨市,150000; 2 通讯作者

第一作者简介:李保龙,男,硕士,主治医师;收稿日期:2021-09-16

脑缺血是全球范围内致死、致残的主要原因,严重危害人类的健康与生活质量^[1],并且其发病率也呈现上升趋势^[2]。近年来随着人们对缺血性疾病认知的加深,许多治疗方法及药物应用于临床,并有着良好的疗效。但栓塞切除术、溶栓等治疗方法具有一定的风险,可能产生缺血再灌注损伤及增加出血风险等^[3-5]。脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI),是一种处于缺血缺氧的脑组织突然恢复供血后所产生严重的炎症反应、氧化应激等所造成的损伤。目前该损伤的机制多被认为是再灌注血液中所含有的大量免疫细胞和氧原子等造成的^[6-7]。这种损伤将会导致星形胶质细胞活化并产生严重的损伤^[8]。缝隙连接蛋白-43(Connexin 43, Cx43)广泛存在于神经系统中,缺血性损伤会导致其上调并出现细胞凋亡及抑制血管新生等不良后果,降低Cx43的表达可有效减轻损伤及促进神经单元血管重构^[9-10],对Cx43的干预将有望成为CIRI后治疗的新靶点^[11]。

脑缺血发病迅速,且对于不同情况的患者预后难以估计。就现有治疗手段,一定程度上仍不能取得满意的疗效。近些年随着研究的深入,以及对疾病认识的加深,目前许多研究称有关脑卒中的预防将会是更加有效的策略^[12-13]。为了减少脑缺血等急性缺血缺氧导致的损伤,提高缺血耐受性是一种可行的方案。同时根据中医“治未病”和“既病防变”的理念,在脑缺血发生前给予一定的处理或干预,增强缺血耐受性可以起到减少损伤的作用。运动预处理是一种在脑缺血发生前进行一定量的运动从而产生缺血耐受的干预方式^[14]。在心脑血管疾病等相关共识中将运动列为一级预防,推荐每日进行一定量的运动以预防疾病的发生^[12,15]。另一方面运动预处理还能够提高缺血耐受性增加CIRI后神经血管完整性、促进神经再生以及通过减少炎症反应改善CIRI等作用^[16-17],并且其效果已经被大量实验证实^[18-19]。此外,运动预处理相较于其他预处理方式,有着实行方便且更加安全,受众面更广更易接受等诸多优点^[20]。根据以往研究,我们推测运动预处理可以通过调控CIRI后Cx43表达水平,促进神经血管重构。在本实验中,我们通过对经过运动预处理的大鼠建立大脑中动脉缺血再灌注模型,并研究运

动预处理对Cx43及血管新生标志抗原CD34的影响,进一步探究运动预处理减少CIRI后损伤的机制,同时为其应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

SPF级雄性SD大鼠72只,3月龄,体质量(240±20)g。购自于辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物许可证号SCXK(辽)2015-0001。饲养于安静舒适动物房中,每12h明暗交替,通风良好,室温(23±2)℃,湿度50%±10%。使用SAS产生随机数字表将大鼠分为假手术组、模型组、运动预处理组,每组24只。同时按照不同取材时间点再次分为1d、3d两组,每组12只。每组大鼠分笼饲养,食物水源及活动空间充足。

1.2 主要器材和试剂

ZH-PT/5S动物实验跑台小动物跑步机:安徽正华生物仪器设备有限公司。CX41RF显微镜:OLYMPUS公司。Excelsior AS自动组织脱水机:赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。RM2015切片机:德国徕卡。Tissue lyser-24全自动样品快速研磨仪:上海净信科技。Cx43一抗(Ab11370)、CD34一抗(Ab81289):英国Abcam公司。5×蛋白缓冲液(B30043):北京百奥森泰生物技术有限公司。DAB显色试剂盒:北京中杉金桥生物技术有限公司。山羊兔IgG(ZB-2301):北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 模型制备:于末次干预24h后进行造模,采用Koizumi线栓法^[21]制备大鼠大脑中动脉(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,即将前端包有石蜡的渔线沿颈内动脉缓缓插入大脑中动脉。大鼠术前12h禁食不禁水,手术器械严格消毒,术中保持大鼠自主呼吸,术后2h将线栓缓慢拔出至颈总动脉主干分叉处以达到再灌注的效果。同时使用激光多普勒血流仪检测,当血流恢复到基线50%以上时视为再灌注成功。造模失败及不合格大鼠另选补充。假手术组进行类似方法造模,但线栓仅从颈总动脉插入约10mm,不进入大脑中动脉,其余操作相同。

1.3.2 处理方法:运动预处理组进行适应性跑台训练,速度10m/min,20min/d,持续3d,不能适应则另

选大鼠补充;正式性跑台训练:速度 15m/min,每天训练 30min,坡度为 0,每周训练 6d,连续训练 3 周。运动预处理组于末次正式训练 24h 以后,三组大鼠同时进行造模处理,并分别在再灌注 1d、3d 后取材。

1.4 取材及检测指标

1.4.1 改良神经功能评分(modified neurologic severity score, mNSS):分别在再灌注 1d、3d 后,使用 mNSS 评分评价大鼠神经功能缺损程度。

1.4.2 取材及标本处理:再灌注 1d、3d 以后,使用戊巴比妥钠深度麻醉(50mg/kg)。取 6 只在冰上快速断头取脑,并分离梗死侧皮层脑组织置于液氮中速冻,然后放入 -80℃冰箱中冻存备用。将另外 6 只深度麻醉后从心尖灌注生理盐水及 4%多聚甲醛固定,然后组织固定液中保存。

1.4.3 Western Blot测定 Cx43 蛋白表达水平:将脑组织从 -80℃冰箱中取出,将 0.1g 脑组织加入 1ml 组织蛋白裂解液研磨后进行蛋白定量。每组取 10μg 蛋白裂解液缓冲液离心并 100℃加热 10min,配置 12%SDS-PAGE 分离胶与 5%浓缩胶电泳。将电泳仪调至恒压 100V 后开始电泳,待指示剂进入分离胶后,调整电压 120V 继续电泳,待蓝色指示条接近凝胶底部后停止电泳。使用湿转法 200mA 恒流转膜 2h,此时的蛋白已从凝胶转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜浸泡在 TBST 配制的 5%封闭脱脂牛奶中,室温下摇床封闭 1h。加入一抗 4℃过夜后加入二抗(1:5000),取出 PVDF 膜浸入 TBST 中清洗三次,加 ECL 发光液显色曝光。结果采用 Image J 图像分析软件进行定量分析,以各组 Cx34 与内参 GAPDH 灰度比值即为相对灰度。

1.4.4 免疫荧光双重染色检测 Cx43 表达情况:将灌注后的脑组织以视交叉为切开点切取脑冠状薄片,厚度约 4mm;脱水后固定包埋并切成 5μm 切片。脱蜡、入水后进行热修复。室温滴加山羊血清封闭 20min,甩去多余液体。再次滴加 A+B 第一抗体混合液 4℃过夜。次日加入荧光标记的抗 A+B 第二抗体混合液蔽光孵育 20min。冲洗后加入 DAPI 孵育 8min。蒸馏水洗净,封片。使用显微镜观察并拍照。

1.4.5 免疫组化染色检测 CD34 表达情况:将脑组织切片放置于组织脱水机中脱水包埋后再次切成 4μm 切片并脱蜡。将切片高温修复,PBS 冲洗 3min×

3 次,滴加山羊血清封闭 20—30min,甩去多余液体。加入 CD34 一抗后 4℃过夜,次日取出后等待恢复至室温后,PBS 冲洗 3min×3 次。滴加即用型山羊抗兔二抗,37℃避光孵育 20min,PBS 冲洗 5min×3 次,DBA 显色 5—10s,水洗终止;苏木素复染 20s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,封片。显微镜在 400 倍下观察 CD34 阳性率,Image J 软件进行图像分析,计算目的蛋白表达面积与组织总面积的比率进行统计分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行统计分析。符合正态性分布数据均采用均数±标准差表示,进行方差齐性检验,方差齐则采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;若方差不齐则使用 Tamhane T2。以 $\alpha = 0.05$ 检验为检验水平, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 mNSS 神经功能缺损评分

CIRI 后,与假手术组相比,模型组大鼠与运动预处理组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P < 0.01$),但经过运动预处理后的大鼠在 CIRI 后 1d、3d 时神经功能缺损评分显著低于模型组($P < 0.01$),见表 1。

表 1 CIRI 后各组 mNSS 神经功能缺损评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	例数	1d	3d
假手术组	12	0	0
模型组	12	10.42±1.38 ^①	11.92±1.38 ^①
运动预处理组	12	8.00±1.13 ^{①②}	9.33±1.23 ^{①②}
<i>F</i> 值		337.115	414.073
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

注:①与假手术组比较 $P < 0.01$;②与模型组比较 $P < 0.01$ 。

2.2 Western Blot测定 Cx43 蛋白的表达水平

CIRI 后,与假手术组相比,模型组大鼠与运动预处理组大鼠 Cx43 表达水平显著升高($P < 0.01$),但经过运动预处理后的大鼠在 CIRI 后 1d、3d 时 Cx43 蛋白表达水平均显著低于模型组($P < 0.01$),见图 1。

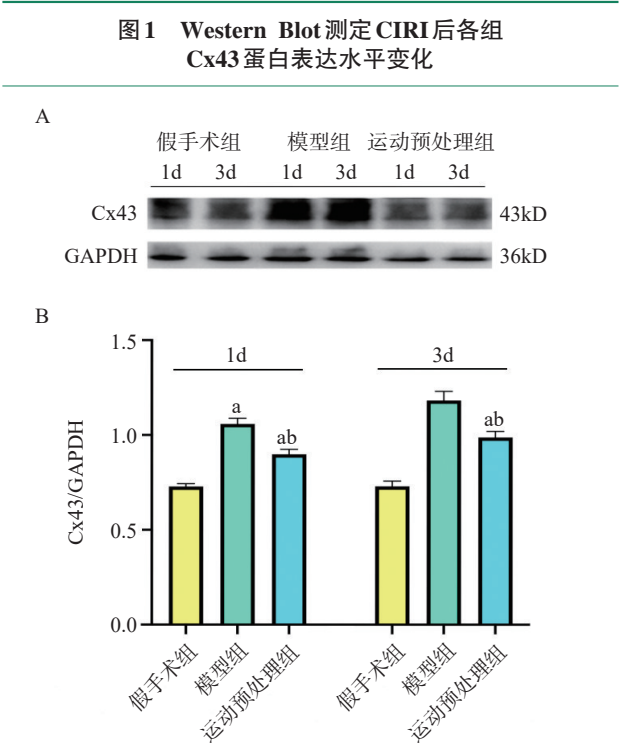
2.3 免疫荧光染色检测 Cx43 表达

免疫荧光染色图示 CIRI 后模型组荧光信号最强。与模型组相比,运动预处理组荧光信号较弱,见图 2。

2.4 免疫组化染色测定 CD34 表达

CIRI 后,与假手术组相比,模型组大鼠 CD34 阳性率显著下降($P < 0.01$),但经过运动预处理后的大

鼠在CIRI后1d、3d时CD34阳性率均显著高于模型组($P<0.01$),见图3,表2。

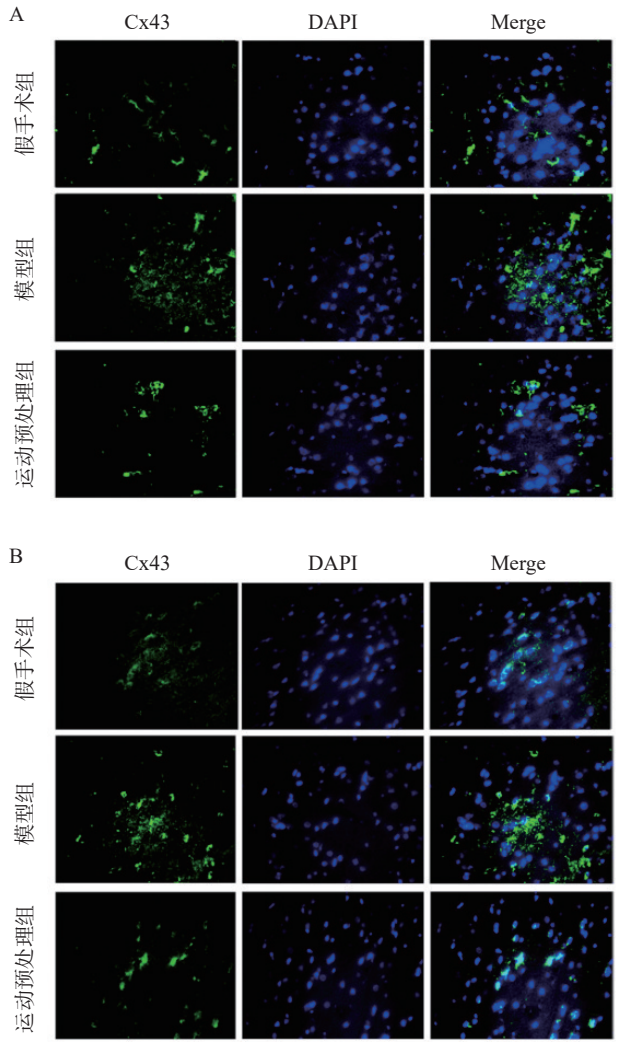


注:A:Western Blot检测造模侧脑组织Cx43蛋白表达水平;B:Cx43相对灰度(Cx43/GAPDH)比较;a与假手术组相比, $P<0.01$, $n=6$;b与模型组相比, $P<0.01$, $n=6$ 。

3 讨论

脑缺血是人类众多疾病中的一大难题,同时它的发生通常是迅速并且难以预料的,即便能够进行尽早的救治,许多患者仍会留下不同程度的后遗症。CIRI就是一个典型的代表,它所造成的大量炎症反应及氧化应激等严重危害患者的预后。此外,脑卒中后预防策略的实施虽然能够减少复发率,但在一些地区仍不理想^[22]。相较于脑卒中发生后的治疗,立足于预防是一种更好的选择。例如缺血预处理、运动预处理、电针预处理等能够激活多种生物分子诱导缺血及缺血再灌注损伤的内源耐受性^[16,23]。机体组织的非致命缺血等一些原因所产生的耐受机制可以提供强大的保护^[24]。运动预处理因为便于实施、限制较少等原因易于推广及研究。运动预处理也能够在增强缺血耐受^[14]、保护心血管的同时^[25],起到促进神经血管再生诱导保护因子等作用^[16]。

图2 免疫荧光染色检测CIRI后各组Cx43蛋白表达变化 (免疫组化染色,×200)



注:A:CIRI后1d时,免疫荧光染色检测Cx43蛋白表达情况;B:CIRI后3d时,免疫荧光染色检测Cx43蛋白表达情况。

本实验通过将经过运动预处理3周的大鼠进行MACO/R造模后,与未经运动预处理的大鼠相对比,检测Cx43及血管新生标志抗原CD34等,以验证运动预处理对CIRI后神经血管重构的影响。

星形胶质细胞是脑实质中数量极多的细胞,能够对中枢神经系统稳态的维持与支持神经元存活起到重要作用^[24,26]。在脑缺早期,由缺血导致的反应性星形胶质细胞增多可以封闭损伤区域以维持区域稳态,但星形胶质细胞的过度增殖会抑制神经的恢复与再生^[27-28]。Cx43是星形胶质细胞中缝隙连接

图3 免疫组化染色测定CIRI后各组CD34蛋白表达水平变化 (免疫组化染色, ×400)

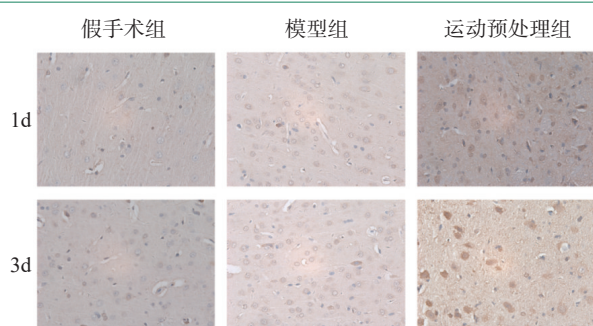


表2 免疫组化染色测定CIRI后各组CD34阳性率水平变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	1d	3d
假手术组	6	9.052±0.827	9.235±0.763
模型组	6	3.968±0.743 ^①	2.462±0.933 ^①
运动预处理组	6	13.204±1.379 ^{①②}	12.631±1.084 ^{①②}
F值		122.84	160.791
P值		<0.01	<0.01

注:①与假手术组比较 $P<0.01$;②与模型组比较 $P<0.01$ 。

的主要组成部分^[26]。星形胶质细胞中Cx43的表达变化与损伤相关,并能够增加脑缺血后神经炎症等^[29],被认为是脑缺血损伤的重要介质^[30]。调控Cx43的表达将成为有潜力的治疗策略^[31]。CIRI在急性期诸多相关因子可呈逐渐上升趋势,后逐渐趋于稳定。本实验选用1d、3d作为观察点,对比了运动预处理对急性期损伤及神经血管单元重构的影响。在本实验两个观察点期间,Western Blot显示模型组大鼠在恢复灌注后病灶侧Cx43蛋白表达较假手术组明显上升,且随时间进展持续上升。而经过运动预处理的大鼠在两个观察点期间Cx43表达均明显低于模型组,表明运动预处理能够减少CIRI急性期导致的Cx43上升,减少Cx43所致的星形胶质细胞的过度增殖,进而间接减少其对神经再生的抑制。

此外,本实验的免疫荧光染色也显示运动预处理组大鼠的Cx43含量更低,具有更好的神经恢复情况。从行为学角度观察,各组动物的mNSS评分显示了相同的结论。mNSS能够反映MCAO大鼠神经功能缺损的情况,在本实验的两个观察点中,模型组出现了明显的神经功能缺损症状,尤其体现在评测运动障碍的行走实验和评测感觉障碍的平衡木实验

上,而运动预处理组大鼠评分则明显较模型组低,虽然表现出了一定程度的功能障碍,但其各方面神经功能均优于模型组。为进一步验证运动预处理对CIRI的机制,本实验还利用免疫组化法对血管新生标志抗原CD34的表达阳性率进行了检测。经过运动预处理的大鼠在CIRI后CD34表达显著高于模型组。CD34的表达与血管生成和造血密切相关^[32],其表达程度的升高意味着血管新生程度的提高,是血管新生及重构的重要标志物^[33]。CD34表达上升代表微血管新生的数量增加,不仅一定程度上也能够反映卒中患者的神经功能情况^[34],而且也是心脑血管修复再生的重要标志^[35]。因此,上调CD34的表达量将成为减轻CIRI损伤的新策略^[36]。

脑缺血的发病率逐年上升,同时考虑到较高的复发率,预防其发生显得尤为重要。根据脑卒中中的一级与二级预防,每日的有氧运动等体育锻炼是非常必要的^[12,37]。每日至少30min的运动有助于减少如高血压、糖尿病、肥胖等高危因素,还能够增强机体抵抗缺血风险的能力等^[38]。本实验结果表明,经过运动预处理的大鼠各项指标均明显优于未经处理的大鼠,神经缺损评分更低,各项功能更好。作为一项预防脑缺血的干预措施在多方面具有明显的实用性及优越性。在此,本实验探讨了运动预处理减少再灌注损伤的机制,为其推广及应用提供了依据。尤其运动预处理理论与中医“治未病”思想存有一定关联性,可为日后基于“治未病”思想的传统运动疗法临床应用提供理论支持。

综上,基于Cx43这一靶点,运动预处理能够提高缺血耐受性,通过减少CIRI后Cx43的升高,降低再灌注损伤,促进神经血管的重构。

参考文献

- [1] Campbell B, Khatri P. Stroke[J]. The Lancet, 2020, 396 (10244):129—142.
- [2] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults[J]. Circulation, 2017, 135(8):759—771.
- [3] Tsivgoulis G, Katsanos AH, Malhotra K, et al. Thrombolysis for acute ischemic stroke in the unwitnessed or extended therapeutic time window[J]. Neurology, 2019, 94(12): e1241—e1248.
- [4] Charidimou A, Kakar P, Fox Z, et al. Cerebral micro-

- bleeds and the risk of intracerebral haemorrhage after thrombolysis for acute ischaemic stroke: systematic review and meta-analysis[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2013, 84(3):277—280.
- [5] Sun MS, Jin H, Sun X, et al. Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: An obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 2018(3804979):1—17.
- [6] Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation[J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(8):869—881.
- [7] Fu Y, Liu Q, Anrather J, et al. Immune interventions in stroke[J]. *Nature Reviews Neurology*, 2015, 11(9):524—535.
- [8] Zhao N, Xu X, Jiang Y, et al. Lipocalin-2 may produce damaging effect after cerebral ischemia by inducing astrocytes classical activation[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2019, 16(1):168.
- [9] Li X, Zhao H, Tan X, et al. Inhibition of connexin43 improves functional recovery after ischemic brain injury in neonatal rats[J]. *Glia*, 2015, 63(9):1553—1567.
- [10] 梁碧莹, 朱路文, 唐强, 等. 运动预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障通透性的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2019, 25(3):302—306.
- [11] Rschulz R, Görges PM, Görges A, et al. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 153(9): 90—106.
- [12] Pandian JD, Gall SL, Kate MP, et al. Prevention of stroke: a global perspective[J]. *Lancet*, 2018, 392(10154):1269—1278.
- [13] Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7609.
- [14] Zhang F, Wu Y, Jia J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance[J]. *Neuroscience*, 2011, 177:170—176.
- [15] Lavie CJ, Arena R, Swift D, et al. Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes[J]. *Circ Res*, 2015, 117(2):207—219.
- [16] Gordon T, English AW. Strategies to promote peripheral nerve regeneration: electrical stimulation and/or exercise[J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 43(3):336—350.
- [17] Lu J, Wang J, Yu L, et al. Treadmill exercise attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by promoting activation of M2 microglia via upregulation of interleukin-4[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8(735485):1—11.
- [18] 裴飞, 王雪冬, 李保龙, 等. 运动预处理对脑缺血再灌注大鼠 VEGF、NeuN 蛋白表达的影响[J]. *康复学报*, 2021, 31(1):37—43.
- [19] Kheravi MT, Nayeibifar S, Aletaha SM, et al. The effect of two types of exercise preconditioning on the expression of TrkB, TNF- α , and MMP2 genes in rats with stroke[J]. *BioMed Research International*, 2021, 1021(11):1—7.
- [20] Crisafulli A, Pagliaro P, Roberto S, et al. Diabetic cardiomyopathy and ischemic heart disease: prevention and therapy by exercise and conditioning[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8):2896.
- [21] Christoph K, Felix F, Michael S. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research[J]. *Drug Design Development & Therapy*, 2015, 9:3445—3454.
- [22] Flach C, Muret W, Wolfe C, et al. Risk and secondary prevention of stroke recurrence: a population-base cohort study[J]. *Stroke*, 2020, 51(8):2435—2444.
- [23] Hao Y, Xin M, Feng L, et al. Review cerebral ischemic tolerance and preconditioning: methods, mechanisms, clinical applications, and challenges[J]. *Front Neurol*, 2020, 11(18):812.
- [24] Hirayama Y, Koizumi S. Astrocytes and ischemic tolerance[J]. *Neurosci Res*, 2018, 126:53—59.
- [25] Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease[J]. *Eur J Clin Invest*, 2017, 47(8):600—611.
- [26] Xing LY, Yang T, Cui SS, et al. Connexin hemichannels in astrocytes: role in CNS disorders[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12(6):23.
- [27] Jha MK, Lee WH, Kyoungsoo Suk. Functional polarization of neuroglia: Implications in neuroinflammation and neurological disorders[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 103(5):1—16.
- [28] Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection[J]. *Neuroscientist*, 2005, 11(5):400—407.
- [29] EV José, Tasha P, Janis B. Cx43 channel gating and permeation: multiple phosphorylation-dependent roles of the carboxyl terminus[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1659.
- [30] Meier C, Rosenkranz K. Cx43 expression and function in the nervous system-implications for stem cell mediated regeneration[J]. *Front Physiol*, 2014, 5(18):106.
- [31] Liang Z, Wang X, Hao Y, et al. The multifaceted role of astrocyte connexin 43 in ischemic stroke through forming hemichannels and gap junctions[J]. *Front Neurol*, 2020, 11(7):703.
- [32] Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, et al. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(6):1380—1389.
- [33] Peng L, Yin J, Wang S, et al. TGF- β 2/Smad3 signaling pathway activation through enhancing VEGF and CD34 ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury after isoflurane post-conditioning in Rats[J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(11):2606—2618.
- [34] Chen X, Sun W, Zhong P, et al. Colony-stimulating factors on mobilizing CD34⁺ cells and improving neurological functions in patients with stroke: A meta-analysis and a systematic review[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12:1528.
- [35] Marvasti TB, Alibhai FJ, Weisel RD, et al. CD34+stem cells: promising roles in cardiac repair and regeneration[J]. *The Canadian journal of cardiology*, 2019, 35(10):1311—1321.
- [36] Pang Q, Zhao Y, Chen X, et al. Apigenin protects the brain against ischemia/reperfusion injury via caveolin-1/VEGF in vitro and in vivo[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018(7017204):1—12.
- [37] Diener HC, Gjh B. Primary and secondary prevention of ischemic stroke and cerebral hemorrhage: JACC focus seminar[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(15):1804—1818.
- [38] Green DJ, Smith KJ. Effects of exercise on vascular function, structure, and health in humans[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018, 8(4):a029819.