

• 实验研究 •

布美他尼通过 Nogo-A/RhoA 调控脑梗死大鼠的轴突再生

曲慧玲, 姚志成*

辽宁省人民医院 神经内科, 辽宁 沈阳 110015

摘要: 目的 探讨布美他尼通过 Nogo-A/RhoA 调控脑梗死大鼠的轴突再生。方法 颅内注射内皮素 (ET-1) 制作脑梗死模型。成年雄性大鼠随机分为 3 组: 假手术组、模型组、布美他尼 0.2 mg/kg 组, 每组 10 只, 应用微量注射系统于侧脑室内给药 3 周, 每天 1 次。每组取 5 只大鼠用于测量梗死体积, 免疫荧光染色检测脑梗死大鼠 BDA 阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线的长度; 采用 Western blotting 检测 synaptophysin 和 PSD-95 水平、和轴突生长抑制因子 Nogo-A 和 RhoA 的水平。结果 与模型组比较, 布美他尼组 BDA 阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线的轴突芽生的长度明显增多 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 布美他尼组的 synaptophysin 和 PSD-95 水平明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 布美他尼组 Nogo-A 和 RhoA 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 布美他尼通过 Nogo-A/RhoA 调控脑梗死大鼠的轴突再生, 为更好地了解布美他尼发挥可能的机制和脑梗死的临床康复提供新的理论基础和治疗靶点。

关键词: 布美他尼; 脑梗死; 轴突再生**中图分类号:** R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)09-2577-06**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.09.001**Bumetanide regulate axonal regeneration in rats with cerebral infarction via Nogo-A/RhoA**

QU Hui-ling, YAO Zhi-cheng

Department of Neurology, The People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110015, China

Abstract: **Objective** To discuss the regulation of bumetanide against axonal regeneration in rats with cerebral infarction via Nogo-A/RhoA. **Methods** Cerebral infarction model was made by intracranial injection of endothelin-1 (ET-1). Adult rats were divided into sham group, model group, and bumetanide 0.2 mg/kg group, and each group had 10 rats. Microinjection system was applied to lateral intraventricular administration. Rats were given drugs for 3 weeks, once daily. The infarct volume was measured in 5 rats in each group. The axon sprout length of BDA positive fiber across union of spinal gray matter into the midline in rats with cerebral infarction was detected by immunofluorescent staining. Synaptophysin, PSD-95, Nogo-A, and RhoA levels was detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the axon sprout length of BDA positive fiber across union of spinal gray matter into the midline in the bumetanide group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, synaptophysin and PSD-95 levels in the bumetanide group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, Nogo-A and RhoA levels in the bumetanide group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Bumetanide can regulate axonal regeneration in rats with cerebral infarction via Nogo-A/RhoA, providing new theoretical basis and therapeutic targets for better understanding the possible mechanisms and clinical rehabilitation of cerebral infarction.

Key words: bumetanide; cerebral infarction; axonal growth

目前我国脑梗死患病率持续增长, 尽管有很多药物治疗和康复手段, 但效果有限, 进而给家庭和

社会造成沉重的负担。有证据表明梗死可导致实验动物模型中的轴突发芽^[1-2]。单侧梗死后, 来自对侧

收稿日期: 2019-04-24

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (20180550530)

作者简介: 曲慧玲, 主治医师, 博士。E-mail: huilingqu@163.com

*通信作者 姚志成, 研究方向为脑血管病的康复及治疗。E-mail: 15541955888@163.com

运动皮层的皮质脊髓束(CST)的轴突发生侧枝,这些侧枝交叉到同侧颈髓^[3-5]。这些新形成的同侧脊髓长下行预测可能有助于行为恢复^[4,6]。然而,轴突发芽的程度受到不利的局部微环境的制约,这包含内在生长抑制分子或来自适当神经营养因子的不充分支持^[2,7]。几种内在的髓鞘相关神经生长抑制剂(Nogo-A)、髓鞘相关糖蛋白(MAG)和少突胶质细胞-髓鞘糖蛋白(OMgp)的作用对于防止受损轴突再生至关重要^[8-9]。在与常见的Nogo受体复合物相互作用后,Nogo-A可激活Nogo信号传导的RhoA及其下游靶标Rho相关激酶(ROCK)的细胞内成分,最终导致轴突再生和生长锥塌陷的抑制^[10]。阻断或抑制Nogo-A/NgR或RhoA/ROCK可以抵消这些对内在髓鞘相关的神经突向外生长的不利影响,并且与改善的行为恢复有关^[9,11]。因此,预测通过克服内在抑制来逆转恶劣微环境的策略将增强重新布线并改善中风后的功能结果。袂利尿剂布美他尼是NKCC1的特异性拮抗剂^[12],有动物实验表明在脑梗死的急性期,布美他尼能够抑制脑水肿,减轻神经细胞及少突胶质细胞损伤,发挥了神经保护作用^[13-15]。本研究探讨布美他尼对脑梗死大鼠轴突发生及轴突再生抑制因子的影响,旨在为更好地了解布美他尼发挥可能的机制和脑梗死的临床康复提供新的理论基础和治疗靶点。

1 资料与方法

1.1 实验动物

成年雄性Wistar大鼠,体质量200~250 g,由中国医科大学实验动物中心提供,动物许可证号为SCXK(辽)2008-0005。

1.2 仪器与试剂

内皮素(ET-1,美国Sigma-Aldrich公司);微量注射器(美国Hamilton公司);微量注药系统(深圳瑞沃德生命科技有限公司);生物素葡聚糖胺(BDA,美国Invitrogen公司);注射用布美他尼,1 g/瓶,产品批号B3023,由美国Sigma-Aldrich公司提供。

1.3 颅内注射ET-1制作脑梗死模型

将ET-1用生理盐水稀释成0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,根据大鼠脑解剖图谱注射到以下3点(AP示以前囟为中心向前,ML示以前囟为中心向侧方,DV示以前囟为中心向下方)^[16-17]:(1)AP+0.7 mm,ML+2.2 mm,DV-2.0 mm;(2)AP+2.3 mm,ML+2.5 mm,DV-2.3 mm;(3)AP+0.7 mm,ML+3.8 mm,

DV-5.8 mm。ET-1用微量注射器以0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注射,每点注射完毕,需将注射器针头停留在针道内3 min,缓慢将针头拔出,以防止药物溢出。每点注药2 μL ,总量6 μL 。每注药1 μL ,中间停留1 min。注药完毕后无菌明胶海绵覆盖注药孔,缝合切口。注射ET-1后约3 h(此时大鼠麻醉已清醒)若大鼠出现提尾倒悬时右上肢向胸前屈曲或行走时向右侧倾倒或者向右侧转圈,且症状持续超过24 h,则可判定为脑梗死模型制作成功。

1.4 分组及给药

大鼠随机分为3组:假手术组($n=10$)、模型组($n=12$)、布美他尼组($n=12$)。24只大鼠注射了ET-1,3只大鼠最终死亡。1只大鼠没有明显的脑缺血症状,予以排除。所有的假手术组大鼠均存活。最终分组情况为:假手术组($n=10$)、模型组($n=10$)、布美他尼组($n=10$)。

在大鼠脑缺血术后第7天开始,应用微量注药系统于侧脑室内给予注射用布美他尼,将注射用布美他尼用碱性无菌生理盐水稀释成25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,0.2 mg/kg注射治疗^[18],1次/d,给药3周。

1.5 梗死体积的测量

每组取5只大鼠用于测量梗死体积,使用尼氏染色测量模型组、布美他尼组脑梗死的体积。从前囟前+4.5 mm到后-7.5 mm,以1 mm为间隔取连续冠状脑切片(片厚30 μm),贴片后使用蒸馏水浸湿后放入甲酚紫水溶液中浸染10 min,使用蒸馏水洗至无色,使用95%酒精迅速分化30 s,无水酒精迅速脱水1 min,二甲苯透明2 min,中性树胶封片。脑片对侧及同侧半球区域使用NIH Image J进行测量,每张切片的完整半球区域减去梗死半球区域再乘以间隔得到总的梗死体积。

1.6 对脑梗死大鼠BDA阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线的影响

每组取5只大鼠(同梗死体积测量的大鼠)测量用于BDA标记,大鼠在脑缺血术后14 d麻醉,用脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司)固定。首先纵向切开头皮、暴露颅骨,用直径2 mm电钻钻开颅骨及硬脑膜,标记如下4点,定位大鼠前肢感觉运动皮质区(AP示以前囟为中心向前,ML示以前囟为中心向侧方,DV示以前囟为中心向下方):(1)AP+1.0 mm,ML-2.0 mm;(2)AP 0 mm,ML-1.5 mm;(3)AP-1.0 mm,ML-1.4 mm;(4)AP+2.0 mm,ML-1.4 mm。用10 μL 微量注

射器将 10% BDA 溶液用 0.01 mol/L PBS 配置, pH 7.4 多点注射于右侧感觉运动皮质区, 每只大鼠注射 4 个位点, 每点取 DV-1.5 mm 与 DV-2 mm 2 个深度, 每个深度注射 1 μ L, 总量 8 μ L。在脑缺血后 33 d, 对从完整一侧的皮质脊髓束的芽生延伸到除神经支配的对侧的 BDA 阳性纤维数及其分支的情况进行测定。脊髓的片子用 0.01 mol/L PBS 洗, 10 min $\times$ 3 次, 在 5%山羊血清中孵育 90 min, 随后在 conjugate streptavidin 二抗中 (1:200, Alexa Fluor 594) 中室温避光孵育 2 h, 经 0.01 mol/L PBS 中漂洗后贴片, 用抗荧光淬灭封片液 (Invitrogen) 封片。

1.7 对脑梗死大鼠突触标记物 synaptophysin 和 PSD-95 水平的影响

采用 Western blotting 检测 synaptophysin 和 PSD-95 水平, 取每组 5 只大鼠麻醉, 取每只大鼠的梗死周边皮层组织。参照凯基全蛋白提取试剂盒操作说明进行组织全蛋白提取, 然后进行蛋白定量、煮蛋白、聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、杂交和显色, 最后使用 Image J 软件分析条带灰度值。以目的条带灰度值比内参条带灰度值反映每个样本中目的蛋白含量。

1.8 对脑梗死大鼠轴突生长抑制因子水平的影响

采用 Western blotting 检测 Nogo-A 和 RhoA 水平, 具体操作方法同 1.7 项下操作。

1.9 统计学处理

采用统计软件 SPSS 16.0 进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 梗死体积的测量

模型组的梗死体积为 $(131.6 \pm 11.14) \text{ mm}^3$, 布美他尼组的梗死体积为 $(129.3 \pm 13.34) \text{ mm}^3$, 两组梗死体积比较差异没有统计学意义, 见表 1。

表 1 梗死体积 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Table 1 Infarct volumes ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	梗死体积/mm ³
模型	—	131.6 $\pm$ 11.14
布美他尼	0.2	129.3 $\pm$ 13.34

2.2 对脑梗死大鼠 BDA 阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线的影响

与假手术组比较, 模型组 BDA 阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线的轴突芽生的长度明显增多

($P < 0.01$)。与模型组比较, 布美他尼组 BDA 阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线的轴突芽生的长度明显增多 ($P < 0.05$), 见图 1、表 2。

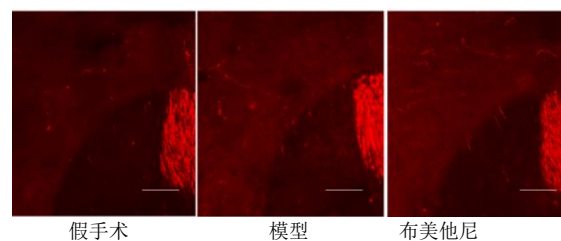


图 1 大鼠脊髓的 BDA 阳性纤维的免疫荧光染色

Fig. 1 Immunofluorescence staining of BDA positive fiber in spinal cord in rats

表 2 布美他尼对脑梗死大鼠 BDA 阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线的轴突芽生长度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of bumetanide against the axon sprout length of BDA positive fiber across union of spinal gray matter into the midline in rats with cerebral infarction ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	侧枝总长度/ μ m
假手术	—	423.4 $\pm$ 82.3
模型	—	932.3 $\pm$ 121.8 ^{##}
布美他尼	0.2	1 532.3 $\pm$ 241.8 [*]

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

2.3 对脑梗死大鼠突触标记物 synaptophysin 和 PSD-95 水平的影响

与假手术组比较, 模型组的 synaptophysin 和 PSD-95 的水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 布美他尼组的 synaptophysin 和 PSD-95 水平明显升高 ($P < 0.05$), 见图 2、表 3。

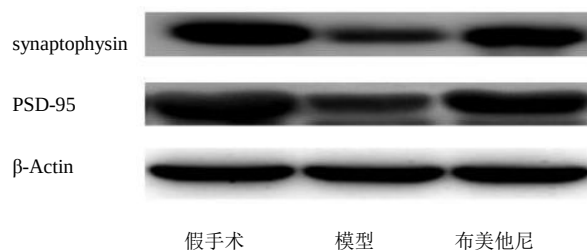


图 2 布美他尼对脑梗死大鼠突触标记物 synaptophysin 和 PSD-95 水平的影响

Fig. 2 Effect of bumetanide against synaptophysin and PSD-95 in rats with cerebral infarction

表3 布美他尼对脑梗死大鼠突触标记物 synaptophysin 和 PSD-95 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)Table 3 Effect of bumetanide against synaptophysin and PSD-95 in rats with cerebral infarction ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	synaptophysin 条带亮度	PSD-95 条带亮度
假手术	—	1 457 434 ± 72 139.3	1 535 025 ± 97 688.39
模型	—	842 033 ± 59 540.72 [#]	948 391 ± 80 255.49 [#]
布美他尼	0.2	1 085 816 ± 76 778.78 [*]	1 549 666 ± 87 662.34 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ [#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

2.4 布美他尼对脑梗死大鼠轴突生长抑制因子水平的影响

与假手术组比较, 模型组脑梗死大鼠轴突生长抑制因子 Nogo-A 和 RhoA 水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 布美他尼组 Nogo-A 和 RhoA 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3、表 4。

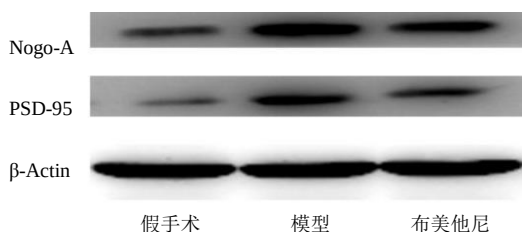


图3 布美他尼对脑梗死大鼠轴突生长抑制因子水平的影响
Fig. 3 Effect of bumetanide against axon growth suppressor levels in rats with cerebral infarction

表4 布美他尼对脑梗死大鼠轴突生长抑制因子水平的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 4 Effect of bumetanide against axon growth suppressor levels in rats with cerebral infarction ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂 量/ (mg·kg ⁻¹)	Nogo-A 条带亮度	RhoA 条带亮度
假手术	—	525 594 ± 33 448.59	223 188 ± 23 672.66
模型	—	837 203 ± 67 578.24 [#]	523 563 ± 100 402.66 [#]
布美他尼	0.2	708 792 ± 66 673.52 [*]	411 892 ± 46 600.26 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ [#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3 讨论

脑梗死是临床上成年人致残的主要原因之一, 对患者、家属及医疗保健系统都造成了极大的负担。虽然脑梗死相关方面已经进行了大量的科学研究, 但目前对其有效的治疗方法还是有限的。急性期溶栓疗法虽然有效, 却受到时间窗(3~6 h)的限制, 所以对于大多数脑梗死患者而言, 神经功能缺失是

不可避免的。脑损伤能够不同程度地促进大脑的神经功能自我修复, 越来越多的研究表明大脑能够对脑损伤产生反应从而促进神经功能的恢复。研究表明布美他尼能够促进脑缺血后大鼠 BDA 阳性纤维通过脊髓灰质联合越过中线, 能够提高脑缺血后大鼠突触标记物 synaptophysin 和 PSD-95 的水平, 同时抑制 Nogo-A 和 RhoA 的表达。表明脑梗死后布美他尼通过 Nogo-A/NgR 及其下游靶点 RhoA/ROCK 调控轴突再生。

研究证实布美他尼能够促进脑缺血后大鼠轴突从颈段脊髓的未受损侧向受损侧延伸, 并形成可能的突触联系。这与之前的研究一致。此外, 布美他尼治疗可降低梗死周围皮质中 Nogo-A 和 RhoA 的表达。然而, 本研究中, 在布美他尼治疗 3 周后, 模型组和布美他尼组的大鼠之间的梗塞面积没有差异。这表明布美他尼可以减少急性期的梗死面积, 但在脑梗死恢复期间对减少梗死面积没有明显作用。因此, 阻断或抑制 Nogo-A 或 RhoA 可以抵消内在髓鞘相关的神经突向外生长的抑制作用并促进行为恢复。

前期有研究表明布美他尼能够促进脑梗死后大鼠轴突从颈段脊髓的未受损侧向受损侧延伸, 同时降低 Nogo-A 水平, 表明布美他尼治疗可促进轴突生长, 同时与髓鞘相关神经突生长抑制剂 Nogo-A 有关^[19]。Nogo-A 可激活 Nogo 信号传导的细胞内成分 RhoA 及其下游靶点 ROCK, 最终抑制了轴突再生和导致生长锥塌陷。本研究进行为期 3 周布美他尼的治疗可以促进脑梗死后大鼠健侧的皮质脊髓束向除神经支配的对侧脊髓灰质芽生及形成分支, 而且布美他尼能够促进突触相关蛋白 synaptophysin 和 PSD-95 的表达, 这些突触蛋白可以作为轴突再生及反应性突触形成的标记物。还在术后第 33 天测量了生长抑制因子的表达, 如 Nogo-A 和 RhoA。ET-1 诱导的脑梗死模型中, 梗死周围皮质中 Nogo-A

和 RhoA 的水平显著增高,这与最近的研究一致^[20],该研究表明在成年大鼠局灶性缺血后,脑缺血会增加神经元 Nogo-A 的表达,同时这种效应随着时间的推移而增加。值得注意的是,Nogo-A 的这种升高与局灶性脑梗死后自发性轴突再生的失败相吻合^[21-22]。虽然没有测量这些生长抑制分子在对侧皮质中的表达谱,但在梗死周围皮质或对侧皮质中的 Nogo-A/NgR 似乎在抑制中风后轴突生长中起关键作用。虽然有对比研究证明 Nogo-A 蛋白表达在缺血后 2~3 周的时间窗内减少^[23-24],Nogo-A 和其他生长抑制分子在缺血后期的时间表达模式及其在脑梗死后轴突发芽中的功能意义尚不清楚。最近的一项研究表明,即使在成年大鼠脑梗死后 9 周开始抗 Nogo-A 治疗,仍然有效地促进完整的运动皮层的轴突向对侧红核生长并改善运动功能。这些结果表明 Nogo-A 即使在超过轴突生长的时间窗之外的缺血晚期仍然对结构可塑性的改善有潜在的作用。即使在缺血晚期,降低 Nogo-A 表达也可以改善梗死的轴突再生^[25]。本研究观察到布美他尼治疗后能够促进轴突的生长并伴随着 Nogo-A 及其下游靶点 RhoA 在梗死周围皮质中的表达减少。关于布美他尼治疗如何抵消 Nogo-A 及其下游目标仍不清楚。研究显示布美他尼在卒中后降低了梗死侧大脑皮层周边 NKCC1 和 Nogo-A 的表达水平,同时提高了 KCC2 和 BDNF 的蛋白表达水平。在未成熟神经元和缺血的条件下,由于 KCC2 下调,NKCC1 上调,细胞内氯离子外流导致 GABA 介导去极化和神经兴奋性效应^[26-27]。与之前的研究结果一致^[28-29],研究进一步表明了脑梗死后在梗死皮层周边 NKCC1 与 KCC2 存在长期的改变,同时也显示布美他尼能够提高 BDNF 的水平,而 Nogo-A 和 BDNF 之间存在相互作用^[30]。BDNF 水平增高能够克服由损伤诱导的 Nogo-A 水平的上调^[31]。所以 Nogo-A 表达水平下降也可能是通过 BDNF 相关性的相关机制来介导的。

综上所述,布美他尼可能通过调控 Nogo-A 及其下游靶点 RhoA 促进脑梗死后大鼠的轴突再生,为更好地了解布美他尼发挥作用的可能机制和脑梗死的临床康复提供了新的理论基础和治疗靶点。

参考文献

[1] Caleo M. Rehabilitation and plasticity following stroke: Insights from rodent models [J]. *Neuroscience*, 2015, 311: 180-194.

[2] Carmichael S T, Kathirvelu B, Schweppe C A, et al. Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke [J]. *Exp Neurol*, 2017, 287(Pt 3): 384-394..

[3] Zhao S, Zhao M, Xiao T, et al. Constraint-induced movement therapy overcomes the intrinsic axonal growth-inhibitory signals in stroke rats [J]. *Stroke*, 2013, 44(6): 1698-1705.

[4] Zai L, Ferrari C, Subbaiah S, et al. Inosine alters gene expression and axonal projections in neurons contralateral to a cortical infarct and improves skilled use of the impaired limb [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(25): 8187-8197.

[5] Qu H, Zhao M, Zhao S, et al. Forced limb-use enhances brain plasticity through the cAMP/PKA/CREB signal transduction pathway after stroke in adult rats [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2014, 32(5): 597-609.

[6] Lee J K, Kim J E, Sivula M, et al. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(27): 6209-6217.

[7] Benowitz L I, Carmichael S T. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 37(2): 259-266.

[8] Pernet V, Schwab M E. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(1): 97-104.

[9] Baldwin K T, Giger R J. Insights into the physiological role of CNS regeneration inhibitors [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, 8: 23..

[10] Schwab M E. Nogo and axon regeneration [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2004, 14(1): 118-124.

[11] Domeniconi M, Filbin M T. Overcoming inhibitors in myelin to promote axonal regeneration [J]. *J Neurol Sci*, 2005, 233(1/2): 43-47.

[12] Blaesse P, Airaksinen M S, Rivera C, et al. Cation-chloride cotransporters and neuronal function [J]. *Neuron*, 2009, 61(6): 820-838.

[13] Yan Y, Dempsey R J, Flemmer A, et al. Inhibition of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage [J]. *Brain Res*, 2003, 961(1): 22-31.

[14] Lu K T, Wu C Y, Cheng N C, et al. Inhibition of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter in choroid plexus attenuates traumatic brain injury-induced brain edema and neuronal damage [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 548(1/3): 99-105.

[15] Wang G, Huang H, He Y, et al. Bumetanide protects focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rat [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(4): 1487-1494.

- [16] Soleman S, Yip P, Leasure J L, *et al.* Sustained sensorimotor impairments after endothelin-1 induced focal cerebral ischemia (stroke) in aged rats [J]. *Exp Neurol*, 2010, 222(1): 13-24.
- [17] Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(14): 5272-5280.
- [18] Xu W, Mu X, Wang H, *et al.* Chloride co-transporter NKCC1 inhibitor bumetanide enhances neurogenesis and behavioral recovery in rats after experimental stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(4): 2406-2414.
- [19] Mu X P, Wang H B, Cheng X, *et al.* Inhibition of Nkcc1 promotes axonal growth and motor recovery in ischemic rats [J]. *Neuroscience*, 2017, 365: 83-93.
- [20] Cheatwood J L, Emerick A J, Schwab M E, *et al.* Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat [J]. *Stroke*, 2008, 39(7): 2091-2098.
- [21] Li S, Carmichael S T. Growth-associated gene and protein expression in the region of axonal sprouting in the aged brain after stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 23(2): 362-373.
- [22] Carmichael S T, Chesselet M F. Synchronous neuronal activity is a signal for axonal sprouting after cortical lesions in the adult [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(14): 6062-6070.
- [23] Carmichael S T, Archibeque I, Luke L, *et al.* Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex [J]. *Exp Neurol*, 2005, 193(2): 291-311.
- [24] Carmichael S T. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves [J]. *Ann Neurol*, 2006, 59(5): 735-742.
- [25] Tsai S Y, Papadopoulos C M, Schwab M E, *et al.* Delayed anti-nogo-a therapy improves function after chronic stroke in adult rats [J]. *Stroke*, 2011, 42(1): 186-190.
- [26] Blaesse P, Airaksinen M S, Rivera C, *et al.* Cation-chloride cotransporters and neuronal function [J]. *Neuron*, 2009, 61(6): 820-838.
- [27] Nabekura J, Ueno T, Okabe A, *et al.* Reduction of KCC2 expression and GABA A receptor-mediated excitation after in vivo axonal injury [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(11): 4412-4417.
- [28] Jaenisch N, Witte O W, Frahm C. Downregulation of potassium chloride cotransporter KCC2 after transient focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2010, 41(3): e151-e159.
- [29] Wang G, Huang H, He Y, *et al.* Bumetanide protects focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rat [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(4): 1487-1494.
- [30] Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, *et al.* Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury [J]. *Nat Med*, 2010, 16(3): 302-307.
- [31] Garraway S M, Huie J R. Spinal plasticity and behavior: BDNF-induced neuromodulation in uninjured and injured spinal cord [J]. *Neural Plast*, 2016, 2016: 9857201.