

芹菜素对急性局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠半暗区内小胶质细胞的影响

韩书珍, 范海玲, 任素伟, 王 果, 李泽宜, 陈 翔*

温州医学院附属第二医院暨育英儿童医院 康复中心, 浙江 温州 325027

摘 要: 目的 探讨芹菜素对急性局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠半暗区内小胶质细胞的影响及意义。方法 采用改良线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。动物随机分为假手术组、模型组、芹菜素组。模型组和芹菜素组按再灌注时间不同又分为再灌注 6、24、48、72 h 及 7 d 各 5 个小组, 共 11 组。各组观察至规定的时间进行神经行为学评分, 其中随机取 6 只大鼠, 进行异硫氰酸荧光素标记的同工凝集素 B4 (FITC-ILB4) 染色, 激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 观察浸润的单核细胞及半暗区小胶质细胞形态及数量的变化, 余下 6 只大鼠取脑组织, 测定脑含水量。结果 脑缺血再灌注 6 h, 模型组大鼠脑缺血半暗区周围出现同工凝集素 B4 阳性 (ILB4⁺) 表达细胞即分枝状小胶质细胞 (罗丹明 6G 标记阴性即 Rhod 6G⁻) 和浸润的单核细胞 (罗丹明 6G 标记阳性即 Rhod 6G⁺); 48 h 小胶质细胞明显增多, 形态向阿米巴样转变; 72 h 达到高峰, 主要为脑源性小胶质细胞增生, 形态以阿米巴样为主; 7 d 小胶质细胞减少; 芹菜素组相应时间点小胶质细胞较模型组明显减少 ($P<0.05$ 、 0.01), 形态亦呈现相似改变。脑缺血 48、72 h, 芹菜素组大鼠脑组织含水量明显低于模型组 ($P<0.01$)。模型组神经行为学评分与半暗区 ILB4⁺ 细胞数呈负性相关 ($r=-0.415$, $P<0.05$), 且芹菜素能有效降低模型组神经功能缺损程度 ($P<0.05$), 明显减轻脑损伤程度。结论 缺血后的大脑脑实质内一部分小胶质细胞来源于循环中的单核细胞; 半暗区小胶质细胞形态及数量的变化与脑损伤程度具有相关性; 芹菜素对急性局灶性大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 且可能与下调小胶质细胞数量, 抑制小胶质细胞过度活化密切相关。

关键词: 芹菜素; 脑缺血再灌注; 半暗区; 小胶质细胞; 激光扫描共聚焦显微镜; 单核细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0312-06

Effect of apigenin on microglia in penumbra after acute transient focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

HAN Shu-zhen, FAN Hai-ling, REN Su-wei, WANG Guo, LI Ze-yi, CHEN Xiang

Rehabilitation Center, Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China

Abstract: Objective To study the effect of apigenin on the expression of microglia in penumbra and cerebral water content after acute transient focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** The acute transient focal cerebral ischemia-reperfusion models in rats were established with the modified suture method. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into Sham group, model group, and apigenin groups (there were 6, 24, 48, 72 h, and 7 d reperfusion treatments in the model and apigenin groups, $n=12$). All of them are 11 groups. The neurological behavior scores were valued. By FITC labeled isolectin B4 (FITC-ILB4) histochemistry staining, the infiltration of monocytes and the changes of cell morphology and number of brain-derived microglia in penumbra of six rats in every group were observed under laser scanning confocal microscope (LSCM). Water content was measured in isolated brain tissue of other six rats. **Results** The positive cells of ILB4 (ILB4⁺) including microglia cells (Rhod 6G⁻) and infiltration of monocytes (Rhod 6G⁺) were found in cerebral ischemic area around penumbra of rats after 6 h ischemia-reperfusion in model group; The morphology changed to Amoeba-like; Microglia increased significantly after 48 h and reached to peak in 72 h, which mainly belonged to the proliferation of brain-derived microglia in Amoeba-like morphology. Microglia cell decreased in 7 d, and microglia in apigenin group obviously decreased more than that in model group ($P<0.05$, 0.01) with the similar morphological change in corresponding time points. In 48 and 72 h of cerebral ischemia, the water content in brain tissue of rats in apigenin group

收稿日期: 2010-05-12

基金项目: 温州市科技局国际合作项目 (H20070034)

作者简介: 韩书珍 (1982—), 女, 河北石家庄人, 温州医学院硕士研究生, 研究方向为缺血性脑损伤的发病机制。

Tel: 15868725029 E-mail: zhenhow5@126.com

*通讯作者 陈 翔 E-mail: chenxiangnj2005@yahoo.com.cn

was markedly lower than that in model ($P<0.01$). There was negative line correlation between the neurological behavior score and the number of ILB4⁺ cells in penumbra of model group ($r=-0.415$, $P<0.05$). Apigenin could reduce the degree of neurological deficiency in model group and mitigate the brain injury effectively. **Conclusion** A part of microglia cells in penumbra are associated with brain injury; Apigenin shows the protection on acute transient focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, which maybe relates with down-regulating the microglia cell number and inhibiting the excessive activation of microglia cell.

Key words: apigenin; cerebral ischemia-reperfusion; penumbra; microglia cell; laser scanning confocal microscope (LSCM); monocytes

脑缺血是临床上常见且预后不良的病症,其损伤机制复杂,近年来免疫炎症反应在缺血性脑损伤中的作用已有相关研究^[1-2]。小胶质细胞是特殊的免疫活性细胞,发生迁移的部位主要在缺血半暗区(ischemic penumbra, IP)^[3],该区域是动态变化的,如果及时恢复血供,部分缺血细胞可恢复功能^[4-5],是脑缺血和脑保护作用的研究热点之一,也是胶质细胞发生迁移、增殖与凋亡的集中区域。芹菜素是一种天然的黄酮类化合物,有“植物雌激素”之称,具抗肿瘤等多种药理活性^[6]。前期实验研究^[7-8]已经证实芹菜素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用与降低脑毛细血管通透性,减轻脑水肿,稳定神经细胞以及调节 caveolin-1 表达有关。本实验旨在借助激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)进一步明确小胶质细胞的来源,了解脑缺血后半暗区内小胶质细胞数量及形态学变化,从而探讨小胶质细胞在脑缺血的不同时间窗所起的作用,以及进一步探讨芹菜素在脑缺血再灌注后不同时间点的脑保护作用,为脑缺血的治疗提供新的途径,并为阐明芹菜素抗脑缺血作用机制提供新的思路 and 手段。

1 材料

1.1 动物

SPF级健康雄性SD大鼠132只,体质量(250±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物合格证号SCXK(沪)2009-0001。

1.2 药品、试剂与仪器

芹菜素(质量分数≥99%,批号HK20081218)购自陕西慧科植物开发有限公司,使用时先用二甲基亚砜配成母液,再用生理盐水配成浓度为11.6 mmol/L的溶液。罗丹明6G购自德国AppliChem公司(上海亚培生物科技有限公司代理),异硫氰酸荧光素标记的同工凝集素B4(FITC-ILB4)购自美国Sigma公司(温州长风生物技术有限公司代理),荧光淬灭封片剂购自北京索莱宝科技有限公司(温州长风生物技术有限公司代理),4%多聚甲醛、TBS液购自温州长风生物技术有限公司,OCT购自美国

Sigma公司(温州长风生物技术有限公司代理)。Fluo View FV1000共聚焦显微镜(日本),LEICA—CM1900冰冻切片机(德国),FA2104型电子天平(上海天平仪器厂),SSW型电热恒温水浴箱(上海博迅实业有限公司),202-2—BS型电热恒温干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备和给药

动物随机分为假手术组($n=12$)、模型组($n=60$)、芹菜素组($n=60$)。模型组和芹菜素组按再灌注时间不同又分为再灌注6、24、48、72 h及7 d各5个小组(每组 $n=12$),共11组。参照Belayev^[9]线栓法加以改良后建立左侧大脑中动脉栓塞模型。将栓线插入颈内动脉约(18±0.5) mm,阻断大脑中动脉血流2 h后进行再灌注。假手术组操作步骤相同,但栓线只插到颈外动脉和颈内动脉分叉处。芹菜素组于再灌注同时及其后每24 h ip 芹菜素溶液25 mg/kg(0.8 mL/100 g,最佳剂量为11.6 mmol/L^[10]),假手术组和模型组在相同的时间ip等体积生理盐水。在制备模型时和制作后12 h尾iv罗丹明6G(Rhod 6G,第1次2 mg,第2次0.25 mg,分别溶解在1、0.5 mL 0.9%氯化钠溶液中)。

2.2 指标检测

2.2.1 神经行为学评分 阻断血流2 h后参照Zea Longa^[11]5分制评分标准进行评分。标准为0分:无神经缺损症状;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:行走时向偏瘫侧转圈;3分:行走时向偏瘫侧倾倒;4分:不能自主行走,意识受到抑制;5分:死亡(剔除)。评分达到5分者或解剖发现蛛网膜下腔出血或无神经症状体征(0分)均为模型制备失败,不记在内,用来自同一批次的大鼠制成模型后补足数目(所有模型动物均是在模型制备结束2 h后麻醉清醒时进行第1次评分,此次评分用来评价模型是否成功;所有动物均在规定时间处死前再次进行评分作为最后的神经行为学评分)。

2.2.2 脑含水量测定 分别于再灌后不同时间点处

死动物, 取缺血侧或假手术侧大脑半球后部一块脑组织(脚间窝冠状面之后), 装入称量杯(取标本全过程要求在 2 min 内完成), 用电子天平(精确度 0.000 1 g)称取湿质量(室温 25~28 °C, 湿度 60%)后, 放入恒温电热干燥箱 105 °C 烘烤至 24~48 h, 称质量, 至质量无变化为止(两次干质量差值≤0.2 mg), 按 Elliott 公式计算含水量^[12]。

$$\text{含水量} = (\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量} \times 100\%$$

2.2.3 LSCM 观察小胶质细胞数量及形态 脑组织冰冻切片的制作: 各组大鼠观察至规定时间, 用 10% 水合氯醛麻醉后, 经左心室迅速灌注冰生理盐水 150 mL, 再用冷(4 °C) 4% 多聚甲醛灌注 250 mL 后, 快速断头取脑, 取左侧大脑半球视交叉和脚间窝之间切取 4 mm×10 mm×10 mm 的组织块, 置于上述固定液密闭固定 4~6 h。30% 蔗糖缓冲溶液中, 4 °C 冰箱过夜, 至组织沉底, 适量包埋剂(OCT)包埋, 冰冻切片机内连续冠状切片(30 μm)。

凝集素荧光组化即 FITC-ILB4 组化染色法标记脑组织切片: 切片风干后立即用冷(4 °C) 4% 多聚甲醛固定液避光固定 5~10 min; pH 7.4 TBS 液洗 3 次, 每次 2 min; 加 FITC-ILB4 (10 μg/mL), 37 °C 水浴避光作用 30 min; pH 7.4 TBS 液洗 3 次, 每次 2 min; 避光风干后防荧光淬灭封片剂进行封片。

LCSM 观察: 每只动物取连续切片的第 1、5、10 张, 每张切片选取 10 个相同的视野在激光共聚焦显微镜(Fluo View FV1000)下扫描(20×10), 光源分别用 488 nm 和 530 nm 波长的氩离子激光器激发绿色和红色荧光, 扫描分辨率为 1 024×1 024 pixel, 计算机数据采集, 数字成像。用 IPP5.0 彩色图像分析系统, 对荧光标记阳性细胞进行计数。取每只大鼠各切片的平均数, 即为该只大鼠阳性细胞计数, 每组 6 只大鼠取平均值, 即为该组动物阳性细胞计数。

2.3 统计分析

数据采用 SPSS11.5 统计软件进行处理。所有数据进行正态性检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间的比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 两两比较方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Dunnett' T3 检验。

3 结果

3.1 神经行为学评分

动物术后约 2 h 清醒, 模型成功动物麻醉清醒后即有神经功能缺损表现。与假手术组比较, 模型组与芹菜素组神经行为学评分明显升高, 差异非常显著($P < 0.01$)。芹菜素组较模型组各相应时间点神经行为学评分均有降低, 其中除 6 h 组外, 各相应时间点比较差异显著($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 芹菜素对脑缺血再灌注大鼠神经行为学评分、脑含水量、半暗区小胶质细胞数量和固有小胶质细胞与浸润细胞计数比值的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of apigenin on neurological behavior scores, cerebral water content, microglia cell number in penumbra, and (ILB4⁺/Rhod6G⁻)/(ILB4⁺/Rhod6G⁺) in cerebral ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间点	神经行为学评分 (n=12)	脑含水量/% (n=6)	半暗区 ILB4 ⁺ 细胞数量 (n=6)	(ILB4 ⁺ /Rhod6G ⁻)/(ILB4 ⁺ /Rhod6G ⁺) (n=6)
假手术	—	0	78.42±0.15	12.00±1.26	—
模型	6 h	1.83±0.41**	80.88±0.25**	40.50±3.39**	3.52±0.47
	24 h	1.67±0.52**	81.12±0.65**	41.83±2.48**	3.84±0.14
	48 h	1.50±0.55**	83.04±0.22**	98.00±15.28**	4.43±0.53
	72 h	1.17±0.75**	85.96±1.64**	108.00±15.28**	4.99±0.52 ^{△#}
	7 d	1.00±0.63**	78.24±0.50	94.17±14.13**	4.22±0.51 [△]
芹菜素	6 h	1.67±0.52**	80.14±0.33**	22.17±3.58** ^{▲▲}	3.26±0.23
	24 h	1.00±0.00** [▲]	80.46±0.66**	29.17±4.67** ^{▲▲}	3.59±0.20
	48 h	0.67±0.52** [▲]	80.57±0.24** ^{▲▲}	65.67±3.88** [▲]	4.89±0.28 ^{△△}
	72 h	0.50±0.55** [▲]	81.18±0.44** ^{▲▲}	76.50±4.46** [▲]	5.20±0.14 ^{△△####◇◇}
	7 d	0.33±0.52** [▲]	78.45±0.91	54.00±8.41** ^{▲▲}	4.40±0.16 ^{△△####}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组相应时间点比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与同组 24 h 比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$;

与同组 48 h 比较: ^{##} $P < 0.01$; 与同组 7 d 比较: ^{◇◇} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group at corresponding time point; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs 24 h of same group;

^{##} $P < 0.01$ vs 48 h of same group; ^{◇◇} $P < 0.01$ vs 7 d of same group

3.2 脑含水量变化

模型组及芹菜素组大鼠平均脑含水量在6 h时即明显升高,与假手术组相比,差异非常显著($P < 0.01$),72 h时的脑含水量最高,7 d时两组大鼠的脑含水量基本恢复正常,与假手术组相比无明显差异($P > 0.05$)。而芹菜素6 h、24 h、48 h、72 h、7 d组较模型组相应时间点脑组织含水量均有下降,其中芹菜素48、72 h组较模型组相应时间点明显下降,差异非常显著($P < 0.01$)。见表1。

3.3 大鼠脑缺血再灌注后不同时间点半暗区小胶质细胞数量的变化

与假手术组比较,模型组与芹菜素组半暗区ILB4⁺细胞数均增加($P < 0.01$);芹菜素组与模型组各相应时间点比较,半暗区ILB4⁺细胞数有所减少,其中6 h、24 h、7 d组ILB4⁺细胞数明显减少($P < 0.01$),48、72 h组ILB4⁺细胞数减少($P < 0.05$)。见表1。

3.4 半暗区内固有小胶质细胞与浸润细胞计数的比值

模型组半暗区内固有小胶质细胞与浸润细胞计数的比值即(ILB4⁺/Rhod6G⁻)/(ILB4⁺/Rhod6G⁺)组内进行比较,与6、24 h相比,72 h的比值明显升高,差异显著($P < 0.05$)。芹菜素各组半暗区内(ILB4⁺/Rhod6G⁻)/(ILB4⁺/Rhod6G⁺)值组内进行比较,与6、24 h相比,48 h、72 h、7 d的比值非常显著地升高($P < 0.01$);与7 d相比,72 h的比值升高,差异非常显著($P < 0.01$)。芹菜素组与模型组各相应时间点比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

3.5 小胶质细胞形态的变化

假手术组ILB4⁺的细胞较少,形态上呈现高度分枝状,且各时间点比较无形态上差异。与假手术组比较,模型组和芹菜素组随着再灌注后时间的延长,小胶质细胞逐渐活化,形态逐渐由分枝状向阿米巴样转变,向半暗区聚集,72 h达到高峰。6 h时,模型组半暗区ILB4⁺细胞增多,约为假手术组3倍,少数ILB4⁺的细胞被Rhod 6G标记,即ILB4⁺/Rhod6G⁺(图1中白色箭头所示),主要存在于半暗区,梗死灶内几乎没有,形态上表现为圆形或椭圆形,而大部分ILB4⁺的细胞未被Rhod 6G标记,即ILB4⁺/Rhod 6G⁻(图1中黑色箭头所示),形态以分枝状为主;24 h时,模型组半暗区ILB4⁺细胞增多,以ILB4⁺/Rhod 6G⁻细胞增多为主,形态

向阿米巴样转变;48 h时,模型组半暗区ILB4⁺细胞进一步增多,约为假手术组的10倍,以ILB4⁺/Rhod6G⁻细胞增多为主,形态由放射状到阿米巴样,以阿米巴样为主;72 h模型组半暗区ILB4⁺细胞的数量达到高峰,形态以阿米巴样为主。与模型组比较,芹菜素组各相应时间点呈现相似的变化,数量较之减少。见图1。

4 讨论

近年来学者认为小胶质细胞是特殊的免疫活性细胞,与神经细胞的迁移和增殖有关^[13]。研究发现小胶质细胞在脑缺血后异常活跃,包括细胞形态学的改变、增生、迁移,以及一系列炎症损伤因子及保护因子的释放等。小胶质细胞的起源尚有争议,目前主要认为小胶质细胞来源于小胶质细胞的分裂和循环单核细胞(巨噬细胞前身)的迁移^[14]。

本实验采用急性局灶性大鼠脑缺血再灌注损伤的脑组织切片来研究固有的小胶质细胞和浸润的单核细胞的特性,并通过Lyons等^[15]方法体内预先Rhod 6G进行标记。本研究结果显示模型组和芹菜素组再灌注6 h时,单核细胞向脑内的浸润及小胶质细胞的活化并不显著;接下来的42 h小胶质细胞逐渐活化,尤其是在即将进展为梗死的边缘区域,即在半暗区内小胶质细胞大量聚集,并在72 h达到高峰,且通过比较发现以脑源性小胶质细胞的增生为主,形态由静息状态分枝状转化成阿米巴样。脑缺血再灌注时,血脑屏障防御系统受损及大量消耗,脑组织的过度灌注可导致内皮细胞损伤,微血管结构发生改变,从而使血脑屏障遭到破坏。本实验结果表明血脑屏障破坏后,毛细血管壁通透性增高,导致模型组与芹菜素组血液中单核细胞向脑内浸润,且脑缺血作为小胶质细胞活化的重要诱导因素之一,使静息状态的小胶质细胞活化,形态由分枝状转变为阿米巴样。与模型组各相应时间点比较,芹菜素组ILB4⁺/Rhod 6G⁻细胞数均明显低于模型组,且脑组织含水量均有下降,进一步证实芹菜素可减轻脑水肿、维持血脑屏障的完整性,与前期研究结果相符^[8],进而推断芹菜素的脑保护作用可能与其下调小胶质细胞数量,抑制其过度活化密切相关。而假手术组由于血脑屏障的完整性未受到破坏,循环中的细胞未能向脑内浸润,且缺少小胶质细胞活化的诱发因素,使得小胶质细胞仍然处于未活化的静息状态,亦没有明显的活化与增殖。但并非所有增加的小胶质细胞均具有迁移能力,通过比较不

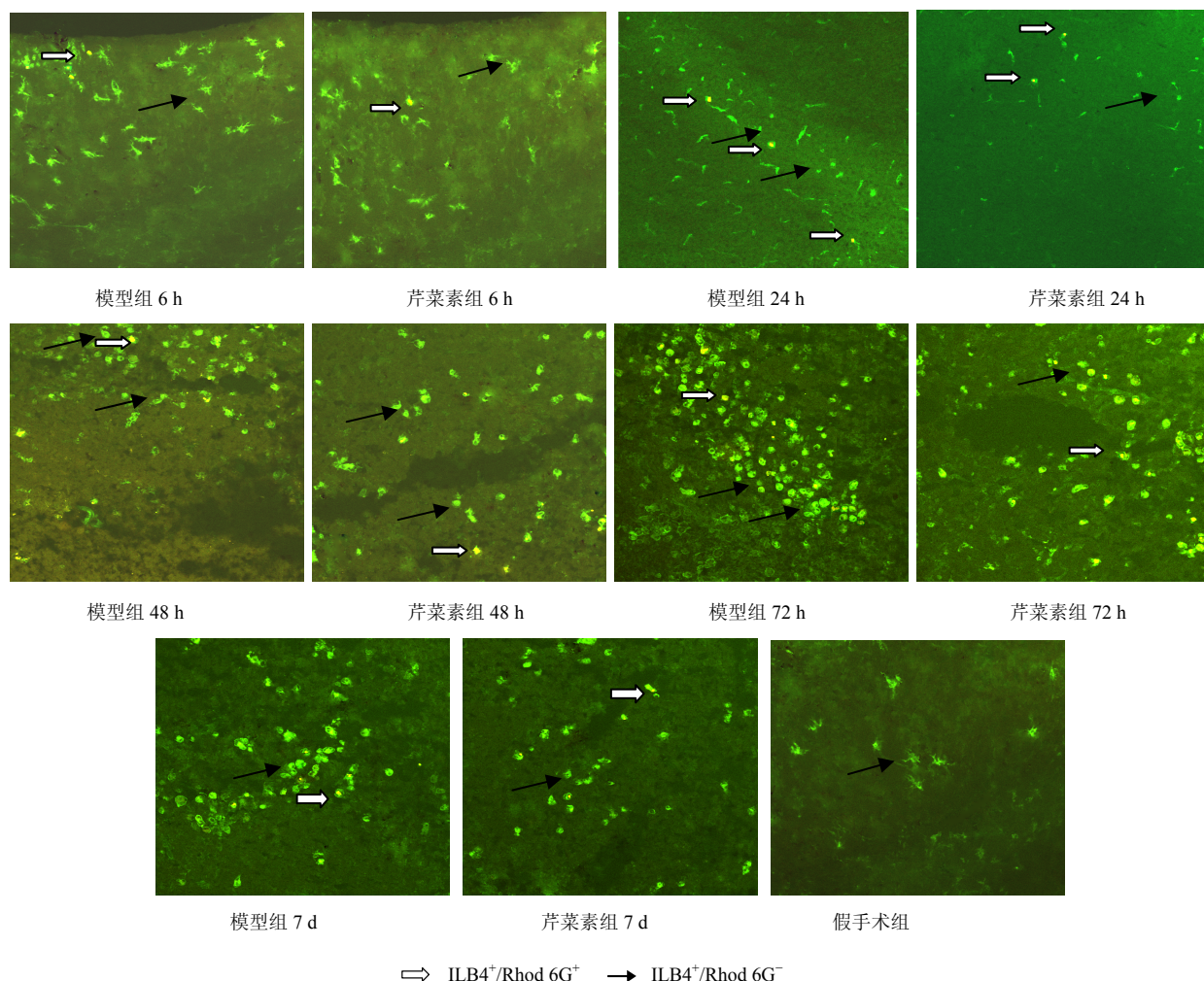


图 1 脑缺血再灌注损伤大鼠半暗区小胶质细胞形态及数量的变化

Fig. 1 Changes of morphology and numbers of microglia cells in penumbra of cerebral ischemia-reperfusion rats

同时点相同区域脑片细胞分布情况发现,与假手术组相比,尽管标记的小胶质细胞数量在梗死半球的几乎每个区域均有增加,但是在非缺血区任意时间点小胶质细胞的分布几乎无变化,而在受损区域通过比较发现,小胶质细胞有向半暗区聚集的趋势,表明小胶质细胞发生迁移的部位主要存在于半暗区。通过比较模型组与芹菜素组半暗区固有小胶质细胞与浸润单核细胞计数的比值发现,随着再灌注时间的延长比值升高,在再灌注后 72 h 达到高峰,由此证明增加的小胶质细胞即发生迁移的小胶质细胞主要为脑源性的小胶质细胞,而非血源性。

迁移的小胶质细胞是很好的抗原提呈细胞,能启动免疫性炎症反应,促进脑缺血时的炎症损伤。但迁移的小胶质细胞也有脑保护作用,首先这些细胞也可能进入受损区域,吞噬细胞碎片,帮助重建神经元的功能环境;其次,炎症反应也可能有助于

髓鞘的修复^[16]。本研究发现,随着再灌注时间的延长,梗死后不同时间内神经行为学评分均有不同程度的改善,模型组神经行为学评分与半暗区 ILB4⁺细胞数呈负性相关 ($r=-0.415$, $P<0.05$),而治疗后芹菜素在有效降低模型组神经行为学评分的同时亦减少了活化小胶质细胞的数量,提示小胶质细胞在脑缺血后的损伤与修复过程中发挥着双重作用,推断芹菜素在此过程中发挥脑保护作用可能与抑制小胶质细胞的过度活化密切相关,为探索芹菜素脑保护作用机制提供新思路与方法。

参考文献

- [1] Wang Q, Tang X N, Yenari M A. The inflammatory response in stroke [J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 184(1/2): 53-68.
- [2] Hou Y Y, Yang Y, Yao Y, et al. Neuroprotection of glycyrrhizin against ischemic vascular dementia *in vivo*

- and glutamate-induced damage *in vitro* [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 125-131.
- [3] Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(1): 53-65.
- [4] Buck B H, Saver J L. A case of acute ischemic stroke: optimizing management with penumbra and vessel imaging [J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3(8): 465-469.
- [5] Berger C, Stauder A, Xia F, *et al.* Neuroprotection and glutamate attenuation by acetylsalicylic acid in temporary but not in permanent cerebral ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2008, 210(2): 543-548.
- [6] 朱荣鑫, 张赛龙, 金永生. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(1): 5-10.
- [7] 牛文泽, 李雪梅, 王 果, 等. 芹菜素对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑内 caveolin-1 表达的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(10): 1658-1662.
- [8] 刘 婵, 涂丰霞, 陈 翔, 等. 芹菜素对急性局灶性大鼠脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用 [J]. *中药材*, 2008, 31(6): 870-873.
- [9] Belayev L, Alonso O F, Busto R, *et al.* Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: Neurological and pathological evaluation of an improved model [J]. *Stroke*, 1996, 27: 1616-1623.
- [10] 刘 婵, 涂丰霞, 陈 翔. 芹菜素对大鼠急性脑损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2009, 40(10): 1598-1602.
- [11] Zea Longa E L, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [12] 韩哲生, 曹美鸿, 虞佩兰. 颅内压与颅内压增高 [M]. 兰州: 甘肃省科学技术出版社, 1993.
- [13] Farooqui A A, Horrocks L A, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(11): 1471-1479.
- [14] Kaur C, Hao A J, Wu C H, *et al.* Origin of microglia [J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 54: 2-9.
- [15] Lyons S A, Paster A, Ohlemeyer C, *et al.* Distinct physiologic properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(11): 1537-1549.
- [16] Simard A R, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia [J]. *FASEB J*, 2004, 19: 998-1000.