

三七总皂苷对全脑缺血大鼠海马脑水肿及 GFAP 表达的影响

贺旭^{1,2,3}, 刘英飞⁴, 王伟¹, 赵宏¹, 严小新², 易亚乔^{5*}, 葛金文^{3*}

1. 益阳医学高等专科学校 解剖教研室, 湖南 益阳 413000

2. 中南大学基础医学院 人体解剖与神经生物学系, 湖南 长沙 410013

3. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

4. 益阳医学高等专科学校附属医院 内一科, 湖南 益阳 413000

5. 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探讨三七总皂苷(TSPN)对全脑缺血后成年大鼠海马胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达及脑水肿的影响。方法 采用四血管阻断法制作全脑缺血模型,大鼠被随机分成假手术组、模型组和TSPN组。TSPN组大鼠全脑缺血后30 min ip 75 mg/kg TSPN,每天1次,假手术组和模型组ip给予等体积的生理盐水,连续14 d。分别于再灌注1、3、7、14 d后处死。采用干湿法计算各组大鼠脑组织含水量,免疫组织化学染色观察海马齿状回(SGZ)区GFAP的表达,免疫荧光双标观察SGZ区GFAP/DCX的共表达情况,免疫印迹技术检测海马CA1区GFAP蛋白表达水平。结果 TSPN组大鼠脑组织含水量显著低于模型组($P<0.05$);TSPN组、模型组SGZ区GFAP⁺细胞密度值在3、7、14 d有统计学差异($P<0.05$);两组SGZ区GFAP/DCX共表达细胞与DCX阳性表达细胞数目的比值在第7、14天差异显著($P<0.05$);免疫印迹结果显示TSPN组海马CA1区GFAP蛋白表达水平在第3、7、14天显著高于模型组($P<0.05$)。结论 TSPN可通过促进全脑缺血后大鼠SGZ区星形胶质细胞活化、促进神经再生、减轻脑水肿而发挥神经保护作用。

关键词: 三七总皂苷;全脑缺血;海马;胶质纤维酸性蛋白;神经再生

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)22-4695-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.016

Effect of total saponins of *Panax notoginseng* on expression of GFAP in hippocampus and brain water content in rats subjected global cerebral ischemia injury

HE Xu^{1,2,3}, LIU Ying-fei⁴, WANG Wei¹, ZHAO Hong¹, YAN Xiao-xin², YI Ya-qiao⁵, GE Jin-wen³

1. Department of Anatomy, Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China

2. Department of Anatomy and Neurobiology, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410013, China

3. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. Hospital Affiliated Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China

5. Department of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore the effect of the total saponins of *Panax notoginseng* (TSPN) on the expression of GFAP in hippocampus and brain water content in rats subjected global cerebral ischemia injury. **Methods** Using four-vessel occlusion method built the global cerebral ischemia model. Rats were divided into Sham group, vehicle group, and TSPN group. The rats in the TSPN group were administered TSPN intraperitoneally 30 min post-brain ischemia. The dose of TSPN (75 mg/kg) was suspended in 0.9% saline, once per day for days 1, 3, 7, and 14 after reperfusion. While rats in the vehicle group was treated with equal volume of 0.9% saline, one injection per day until the rats were sacrificed at either days 1, 3, 7, and 14 after brain ischemia. The brain water content

收稿日期: 2017-05-28

基金项目: 湖南省教育厅优秀青年课题(16B269); 益阳医学高等专科学校引进高层次人才科研启动经费(2016-001); 益阳市科技局课题(2015JZ42)

作者简介: 贺旭(1984—),男,博士,讲师,主要研究方向为中药在心脑血管疾病神经发生与神经再生中作用的研究。

Tel: 13787196994 E-mail: Hexu0628@163.com

*通信作者 易亚乔(1978—),女,硕士研究生,副教授,主要从事中西医结合防治心脑血管疾病研究。Tel: 13907487410 E-mail: 375248683@qq.com

葛金文(1965—),男,博士,博士生导师,教授,主要从事脑血管病发病机制及中西医结合防治研究和中西医结合方法学研究。

Tel: (0731)88458761 E-mail: Cmgjw@tom.com

was detected by dry-wet technique and GFAP expression in the dentate subgranular zone (SGZ) was assessed by immunohistochemistry. Moreover, immunofluorescence was applied to detect the GFAP/DCX in the SGZ, and western-blot was adopted to test the protein level of GFAP. **Results** The brain water content in the TSPN group was significantly lower than the vehicle group ($P < 0.05$); There was statistical difference in the GFAP⁺ cells density in SGZ at the 3th, 7th, 14th day in two groups ($P < 0.05$). Furthermore, compared with the vehicle group, the ratio of the GFAP/DCX to DCX in the SGZ at 7th, 14th d of TSPN group was significantly different ($P < 0.05$), and the protein level of GFAP on days 3, 7, 14 in the TSPN group was higher ($P < 0.05$). **Conclusion** TSPN could play a neuroprotective effect through promoting gliosis, neuroregeneration in the SGZ, and alleviating brain water content of rats following global cerebral ischemia.

Key words: total saponins of *Panax notoginseng*; global cerebral ischemia injury; hippocampus; GFAP; neuroregeneration

缺血性脑卒中是世界上第二常见的死亡原因和成年人致残的主要原因,一旦发生脑缺血,只有少部分患者能完全痊愈,大部分患者都存有一定程度的神经功能损害^[1]。三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 又称田七、参三七或人参三七;主要分布在云南和广西等地区,属五加科人参属植物,是我国重要的具有明显药用价值的中药材。三七总皂苷 (total saponins of *Panax notoginseng*, TSPN) 是三七中提取的活性成分,具有活血祛瘀、通脉活络功效。研究表明 TSPN 可通过降低损伤脑组织中细胞因子的表达和血脑屏障的通透性而发挥对脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用^[2]。联合运用 TSPN 与黄芪总提取物能增强脑缺血的保护作用,其作用机制可能是联合应用提高了早期能量代谢,提高了能通过抑制线粒体凋亡 JNK 信号转导而缓解迟发性凋亡^[3]。Gui 等^[4]在一项临床试验中发现血栓通注射液 (TSPN) 可明显改善老年腔隙性脑梗死患者的神经功能缺陷。笔者前期研究结果也表明 TSPN 能通过促进全脑缺血后侧脑室室管膜区的神经再生,抑制海马区神经元的凋亡而发挥神经保护作用^[5-6]。但目前关于 TSPN 在脑缺血中的作用机制尚未完全阐明。胶质原纤维酸性蛋白 (glia fibrillary acidic protein, GFAP) 是星形细胞内特有的结构蛋白,表达在成熟的星形胶质细胞。脑缺血可诱导 GFAP⁺ 细胞大量表达,且早期胶质细胞应答可通过去除组织瘢痕以及合成和释放如脑源性神经营养因子、神经生长因子等神经营养因子以及一些细胞外基质成分,对神经元的修复产生保护作用同时促进神经突起再生^[7]。因此本研究拟探讨 TSPN 对全脑缺血后海马 GFAP 的表达及脑水肿的影响,进一步揭示 TSPN 抗脑缺血的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 体质量 250~290 g, 8 周龄,

雄性, 由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (湘) 2009-0012。所有动物适应环境 5 d 后开始实验, 模型制作中尽可能减少动物的痛苦及使用的数量。整个实验程序均通过中南大学伦理委员会的批准。

1.2 仪器、药品与试剂

Kopf 脑立体定位仪 (David KOPF Instruments 公司); GX.SS.22-3 手术显微镜 (上海医疗器械股份有限公司); 珊顿冰冻切片机 (Shan Don 公司); Olympus BX67 荧光显微镜 (奥林巴斯公司); TSPN (四川成都麦卡希有限公司, 总皂苷质量分数 $\geq 98\%$, 批号 12052901); Double-cortin 羊抗 (Santa Cruz Biotechnology 公司, 货号 sc-8066); GFAP (Sigma-Aldrich 公司, 货号 G9269)。

2 方法

2.1 分组、脑缺血模型制备和给药

SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和 TSPN 组。通过四动脉血管阻断法建立全脑缺血模型^[8]: 大鼠 ip 1%戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 仰卧固定于脑立体定位仪台面; 钝性分离两侧颈总动脉; 俯卧位, 电凝两侧椎动脉; 过夜, 乙醚吸入麻醉, 拉出颈总动脉, 微动脉夹阻塞血管 30 min, 松开微动脉夹后实行再灌注。模型组在脑缺血后 30 min ip 等体积生理盐水, TSPN 组在脑缺血后 30 min ip 75 mg/kg^[5]的 TSPN (药物溶解在生理盐水中, 质量浓度为 10 g/L), 每天给药 1 次。假手术组只分离两侧血管, 不夹闭动脉, 实验过程中同模型组 ip 等体积生理盐水。模型组和 TSPN 组大鼠分别在全脑缺血再灌注后 1、3、7、14 d 处死, 考虑到假手术对脑组织生化指标的影响不大, 因此假手术组在全脑缺血后 14 d 处死大鼠以作为参照。

2.2 脑含水量的测定

采用干、湿质量法。脑缺血后 14 d, 各组大鼠给予过剂量的 10%水合氯醛麻醉, 断头处死, 取出

脑组织,用滤纸吸干脑组织表面水分,用电子天平称质量,记录为脑组织湿质量。然后将锡箔纸包好的脑组织置入 100 ℃ 恒温烤箱内烘烤 24 h 以上至恒定质量,所称的质量为脑组织干质量。计算脑含水量。

脑含水量=(湿质量-干质量)/湿质量

2.3 脑组织中 GFAP 蛋白表达的测定

模型组及 TSPN 组分别于全脑缺血再灌注后 1、3、7、14 d (假手术组于全脑缺血再灌注后 14 d) 给予大鼠麻醉,灌注取出大鼠脑组织,4 ℃ 后固定过夜,梯度沉糖,恒低温冰冻切片机上采用邻切法对海马进行冠状切片^[5],切片厚度为 30 μm。

2.3.1 免疫组织化学染色 采用 ABC-DAB 免疫组织化学方法染色。3% H₂O₂ 处理 30 min; 5% 马血清+0.1% tritonX-100 磷酸缓冲液孵育 2 h; 加入兔抗 GFAP (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜; 经广谱生物素化二抗 (1:400) 处理, 反应 1 h 后在提前 30 min 配好的 ABC 溶液中孵育 2 h, 免疫反应产物经 DAB 显色。阴性对照采用正常马血清代替一抗, 以排除二抗的非特异性染色, 结果为阴性。

2.3.2 免疫荧光双标染色法 选取 6 μm 切片, 5% 驴血清+0.1% tritonX-100 磷酸盐缓冲液室温孵育 2 h; 然后将脑片与该组抗体孵育: 兔抗 GFAP (1:2 000) 与山羊抗 DCX (1:1 000); 加入一抗过夜; Alexa Fluor 488 与 Alexa Fluor 594 偶联驴抗兔及驴抗山羊 IgG (1:200) 室温孵育 2 h; 双苯酰亚胺 (1:5 000) 染核 10 min; 贴片, 50% 甘油封片。

2.3.3 免疫印迹检测 麻醉大鼠, 冰上操作迅速分离海马 CA1 区, 按照组织/蛋白提取剂 1 g/10 mL 的比例稀释后破碎组织。4 ℃ 低温离心, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 凝胶电泳, 每个泳道上载 50 μg 总蛋白。电泳分离蛋白转移至 PVDF 膜上 (Bio-Rad 公司实验室), 转膜约 70 min。将含有目的蛋白的 GFAP (1:50 000) 孵育, 4 ℃ 过夜。1×TBST 溶液漂洗, 然后和偶联 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5 000, 由 Bio-rad 公司提供) 室温下作用 2 h。1×TBST 溶液漂洗, 采用 ECL 化学发光法显影, 以 β-actin 作为内参, 使用 NIH Image J 分析条带, 最终数据是指目的蛋白条带与内参 β-actin 的平均光密度比值。

2.4 成像、数据分析和统计学处理

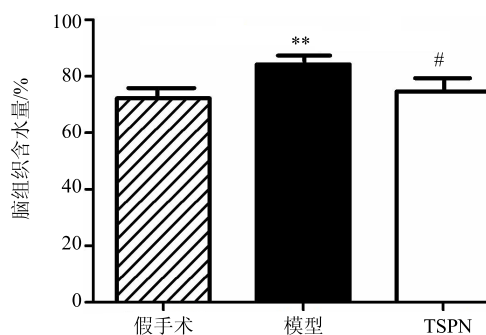
免疫组织化学片子在目镜 (×10) 下拍照, 每

套组化片子取相同的部位进行细胞计数, 取平均值。免疫荧光双标图片分析: 选用一套 6 μm 厚度的 SGZ 区的脑片, 每个动物挑选 4 张片子, 图像在目镜 (×20) 下拍照, 每张片子拍照 4 个视野, 记录每张片子 4 个视野总细胞数目和共表达细胞的数目, 统计 4 张脑片的细胞数量 (1 只大鼠的细胞数量总和), 最后每个时间点挑选 5 只大鼠, 计算细胞各个时间点细胞总数量; 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计学软件 Prism GraphPad 5.0 进行统计分析, 通过双因素方差分析或者配对学生 *t* 检验比较组间差异。

3 结果

3.1 对全脑缺血后大鼠脑组织含水量变化的影响

全脑缺血 30 min 后再灌注 14 d 处死 3 组大鼠, 对 3 组大鼠进行脑组织含水量的测定。假手术组与模型组大鼠的脑含水量分别为 (72.2±6.2)%、(84.2±7.1)%, 差异显著 ($P<0.01$); 与模型组相比, TSPN 组脑组织含水量 [(74.6±4.9)%] 显著下降 ($P<0.05$)。见图 1。



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

图 1 TSPN 对全脑缺血大鼠脑组织含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Fig. 1 Effect of TSPN on brain water content of rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.2 对全脑缺血后大鼠 SGZ 区 GFAP 表达的影响

GFAP 是星形胶质细胞的标记物, 脑缺血刺激后常出现阳性细胞的胞体增生、肥大。实验结果显示假手术组 GFAP⁺细胞染色较浅, 模型组和 TSPN 组染色加深, 细胞密度相对较大。见图 2。与假手术组相比, 全脑缺血后 GFAP⁺细胞显著增加, 给予 TSPN 干预后, GFAP⁺细胞增加更为显著 ($P<0.05$); 与模型组相比, TSPN 组 GFAP⁺细胞在第 7、14 天增加显著 ($P<0.05$ 、0.01)。

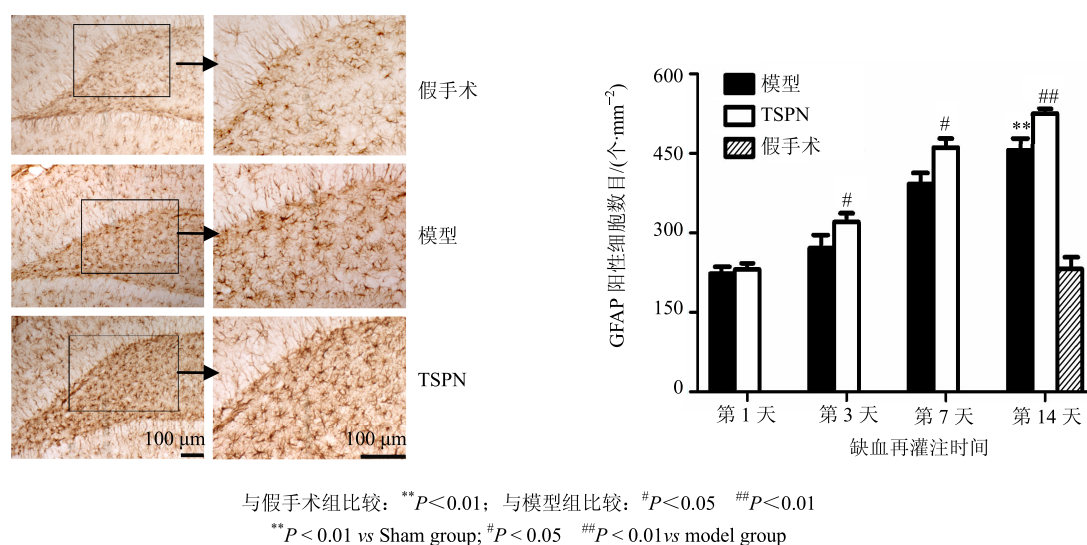


图 2 TSPN 对全脑缺血后大鼠 SGZ 区 GFAP 阳性表达细胞数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of TSPN on expression of GFAP⁺ cells in SGZ of rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.3 对全脑缺血大鼠 SGZ 区 GFAP/DCX 共表达细胞数目的影响

本实验计算模型组和 TSPN 组全脑缺血后各个时间点 (第 1、3、7、14 天) GFAP/DCX 共表达细胞的数目, 再计算相应时间点的 DCX 阳性表达的数目, 以 GFAP/DCX 共表达细胞数目与 DCX 阳性表达细胞数目比值代表神经干细胞的分化。各组全脑缺血大鼠 SGZ 区 GFAP/DCX 共表达细胞主要分布在突起部位, 呈点状。TSPN 组 SGZ 区的 GFAP/DCX 共表达细胞数目与 DCX 阳性表达细胞数目比值在第 7、14 天与模型组相比均差异升高 ($P < 0.001$)。见图 3。

3.4 对全脑缺血大鼠海马 CA1 区 GFAP 蛋白表达水平的影响

免疫组化结果显示 TSPN 可促进全脑缺血后 SGZ 区 GFAP⁺细胞的表达, 为进一步验证, 采用免疫印迹技术检测 GFAP 蛋白表达。蛋白定量分析结果显示, 与假手术组比较, TSPN 组、模型组大鼠海马 CA1 区 GFAP 蛋白水平均显著增加 ($P < 0.001$); TSPN 组第 3、7、14 天大鼠海马 CA1 的 GFAP 蛋白表达水平均显著高于模型组 ($P < 0.001$)。见图 4。

4 讨论

前期研究发现 TSPN 可以改善全脑缺血后大鼠的神经功能缺损体征, 抑制全脑缺血后大鼠海马

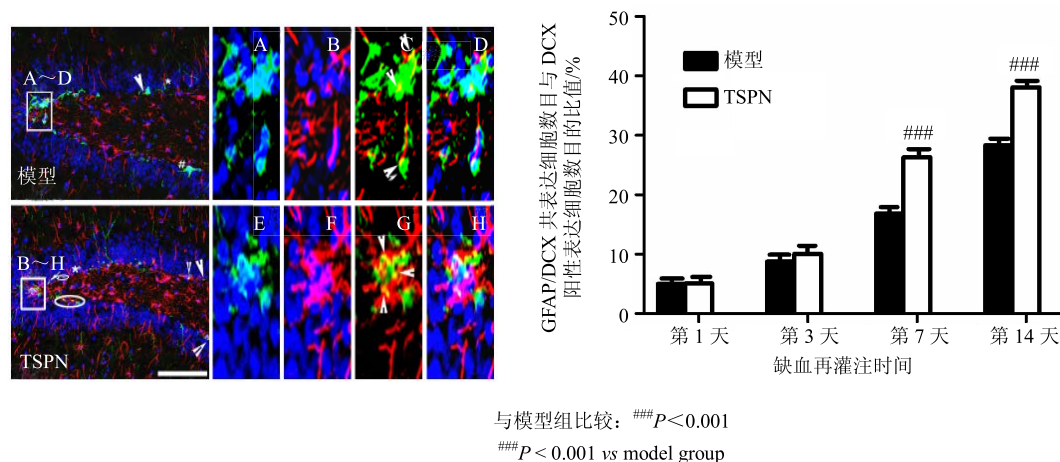
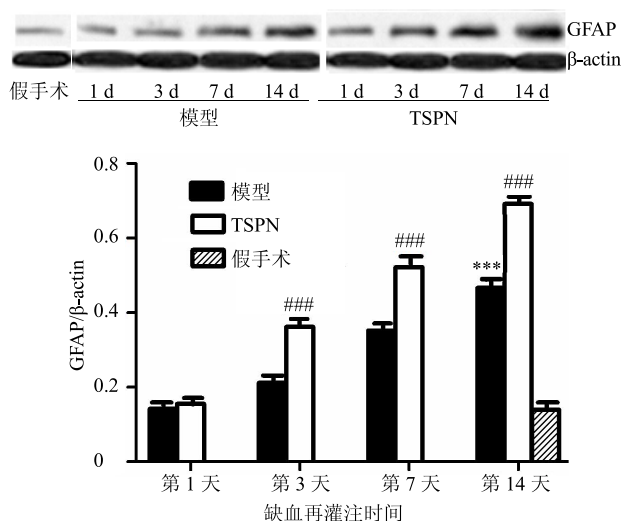


图 3 TSPN 对全脑缺血大鼠 SGZ 区 GFAP/DCX 共表达与 DCX 阳性表达细胞数目比值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of TSPN on ratio of GFAP-labeled cells co-expressing DCX to DCX in rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs Sham group; ### $P < 0.01$ vs model group

图4 TSPN对全脑缺血大鼠海马CA1区GFAP蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 4 Effect of TSPN on GFAP protein expression in CA1 subfield of rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

CA1区神经元的凋亡^[5],促进侧脑室室管膜区的神经再生^[6]。本实验结果显示TSPN可以通过促进海马GFAP的表达、加速GFAP转化为新生未成熟神经元以及减轻脑水肿而发挥神经保护作用。

星形胶质细胞是中枢神经系统的全能看守人,对于大脑发育起着重要作用,表现为维持离子浓度、神经递质、水和能量平衡以及调节神经元信号通路^[9]。当中枢神经系统(脑和脊髓)发生脑缺血性疾病、神经外伤或者其他神经退行性疾病时,胶质细胞可被激活,引起的次级反应为星形胶质细胞增生(Gliosis)。星形胶质细胞有神经干细胞的属性,是成年神经再生的主要“龕”,脑缺血可引起星形胶质细胞增生且分化成新生神经元^[10-13]。本研究使用GFAP作为星形胶质细胞活动状态的标记物。免疫荧光结果显示全脑缺血后SGZ区GFAP胞体增生肥大,突起多而长,相互缠绕,出现典型的星形胶质细胞增生。免疫荧光双染色法结果显示全脑缺血后SGZ区GFAP/DCX共表达细胞数目与DCX阳性表达细胞数目的比值在第14天最高,这提示脑缺血的确可刺激星形胶质细胞分化成新生的具有迁移功能的未成熟神经元,并且在脑缺血早期阶段这种现象不断加强。而给予TSPN干预后,这种现象更明显,这表明全脑缺血后TSPN可刺激增生的星形胶质细胞进一步分化。免疫组织化学结果显示

脑缺血后GFAP⁺细胞密度显著增加,并且给予TSPN干预后,GFAP⁺细胞密度在第3、7、14天进一步增加($P < 0.05$)。这说明TSPN促进了SGZ区GFAP⁺细胞的表达。为了更进一步验证TSPN是否通过促进GFAP的表达而在全脑缺血中发挥保护作用,开展了Western blotting实验进行蛋白分析。定量分析结果显示全脑缺血后模型组海马SGZ区GFAP蛋白水平均显著增加,与模型组相比,TSPN组GFAP蛋白水平在第3、7、14天均具有显著性差异($P < 0.05$),与免疫组织化学结果具有一致性。这可能是全脑缺血14d属于早期胶质细胞应答阶段,TSPN可能通过免疫应答合成和释放一些营养因子,修复受损的神经元,重建神经突起甚至是突触之间的联系。但持续性的神经炎症是有害的,能产生促炎酶和促炎细胞因子,引起病变区周围神经元的损害,最终诱导神经元变性^[14-15]。脑水肿是脑缺血再灌注损害的重要原因之一,血脑屏障功能的破坏以及脑实质钠离子和胞内液体的聚集均可引起^[16-17],本实验结果显示TSPN可以减轻缺血脑组织的含水量($P < 0.05$)。然而关于TSPN是通过GFAP调节细胞内外钙离子浓度的变化还是其他的作用途径减轻脑水肿,在接下来研究中还需进一步深入探讨。

综上所述,TSPN可通过促进海马星形胶质细胞活化增生,同时加速星形胶质细胞转化成新生未成熟神经元,减轻脑水肿的损害而发挥神经保护作用。

参考文献

- [1] Varona J F, Bermejo F, Guerra J M, *et al.* Long-term prognosis of ischemic stroke in young adults. Study of 272 cases [J]. *J Neurol*, 2004, 251(12): 1507-1514.
- [2] 唐婧姝, 裴清华. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(15): 210-213.
- [3] Huang X P, Tan H, Chen B Y, *et al.* Combination of total astragalus extract and total *Panax notoginseng* saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, doi: 10. 1007/s11655-015-1965-0.
- [4] Gui Q F, Yang Y M, Ying S H, *et al.* Xueshuantong improves cerebral blood perfusion in elderly patients with lacunar infarction [J]. *Neural Regener Res*, 2013, 8(9):

- 792-801.
- [5] 贺旭, 葛金文, 邓长青, 等. 三七总皂苷抑制大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元凋亡及其机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1337-1344.
- [6] 贺旭, 葛金文, 黄俊, 等. 三七总皂苷对全脑缺血成年大鼠侧脑室室管膜区神经再生的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1535-1540.
- [7] 戴佳茹, 郭珊珊, 罗丽. 缺血性脑卒中运动康复机制研究进展 [J]. 曲阜师范大学学报: 自然科学版, 2017, 43(1): 119-123.
- [8] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267-272.
- [9] Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis [J]. *Glia*, 2005, 50(4): 427-434.
- [10] Robel S, Berninger B, Gotz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(2): 88-104.
- [11] Liu Y, Namba T, Liu J, *et al.* Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2010, 166(1): 241-251.
- [12] Hye K I, Lee J C, Ha P J, *et al.* Time interval after ischaemic preconditioning affects neuroprotection and gliosis in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient cerebral ischaemia [J]. *Neurol Res*, 2016, 38(3): 210-219.
- [13] Pan A, Li M, Gao J Y, *et al.* Experimental epidural hematoma causes cerebral infarction and activates neocortical glial and neuronal genesis in adult guinea pigs [J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(2): 249-261.
- [14] Glass C K, Saijo K, Winner B, *et al.* Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 918-934.
- [15] Pizza V, Agresta A, D'Acunto C W, *et al.* Neuroinflamm-aging and neurodegenerative diseases: an overview [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, 10(5): 621-634.
- [16] 侯景明, 黎海涛. 血脑屏障破坏与脑水肿发生研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2010, 37(3): 260-263.
- [17] Michinaga S, Koyama Y. Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 9949-9975.