

VEGF基因修饰人骨髓间充质干细胞对脑出血大鼠早期脑水肿的影响^{*}

黄 婷, 陈 波, 曾昭明[△]

西南医科大学基础医学院 人体解剖学教研室(泸州 646000)

【摘要】目的 探究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因修饰的人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSCs)对脑出血大鼠早期脑水肿的影响。**方法** 体外培养hBMSCs和经体外构建的 VEGF 基因慢病毒载体稳定转染的hBMSCs(hBMSCs/VEGF)细胞。采用尾状核注射 I 型胶原酶和肝素方式,制备脑出血动物模型。术后2 h对大鼠进行改良神经功能缺损(mNSS)评分,鉴定造模是否成功。将SD大鼠随机分为假手术组(仅进针不注射造模剂)、脑出血模型组、生理盐水组、hBMSCs组和hBMSCs/VEGF组。造模后第3天, hBMSCs组和hBMSCs/VEGF组大鼠分别按分组右侧尾壳核内注射细胞悬液(2×10^6 个细胞/kg体质量)进行细胞移植,生理盐水组相同部位注射等量生理盐水,假手术组、模型组大鼠不进行干预。干预后3 d、7 d分别进行mNSS评分,处死大鼠,分离脑右侧尾壳核区脑组织标本,干湿重法检测脑组织标本含水量,HE染色观察脑组织标本病理改变,免疫荧光和Western blot检测VEGF、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase, MMP-9)和水通道蛋白-4(aquaporin 4, AQP-4)表达。**结果** 造模术后2 h,与假手术组大鼠比较,各组大鼠mNSS评分增高,均>8分,提示造模成功;在干预后3 d、7 d,模型组和NS组mNSS评分,脑组织含水量, MMP-9、AQP-4、VEGF蛋白表达高于假手术组($P < 0.05$),干预后相同时间点, hBMSCs组上述指标较NS组和模型组减少($P < 0.001$), hBMSCs/VEGF组上述指标高于hBMSCs组($P < 0.05$);光镜下模型组和NS组大鼠脑组织出现明显出血灶和梗死灶,结构紊乱疏松,水肿改变明显, hBMSCs组出血灶和梗死灶减小,而hBMSCs/VEGF组相较hBMSCs组,脑组织结构疏松,呈空泡状,神经元出现多数核固缩等凋亡改变。**结论** hBMSCs移植可改善脑出血大鼠神经功能缺损,减轻脑水肿,但hBMSCs经VEGF基因修饰后移植将增加血管通透性,加重脑出血大鼠的早期脑水肿。

【关键词】 脑出血 脑水肿 慢病毒载体 血管内皮生长因子 人骨髓间充质干细胞

VEGF-transfected hBMSCs Aggravate Early Brain Edema in Cerebral Hemorrhage Rats HUANG Ting, CHEN Bo, ZENG Zhao-ming[△]. Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

[△] Corresponding author, E-mail: 544066675@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of human bone marrow mesenchymal stem cells/vascular endothelial growth factor (hBMSCs/VEGF) transplantation on early brain edema in rats with cerebral hemorrhage. **Methods** Cultured the hBMSCs *in vitro*, transduced the cells with VEGF recombinant lentivirus vector to obtain the hBMSCs/VEGF cells. Intracerebral hemorrhage (ICH) rat model was established by injection of type I collagenase and heparin into the caudate putamen. 2 h after the operation, the rats were evaluated with modified nerve function defect (mNSS) score to ensure whether the model was successfully established. At the third day after the injection, SD rats were randomly divided into sham group (only injected with empty needle), cerebral hemorrhage group, saline group, hBMSCs group and hBMSCs/VEGF group. Saline group, hBMSCs group and hBMSCs/VEGF group mice were injected with normal saline, hBMSCs (2×10^6 cells/kg body mass) and hBMSCs/VEGF (2×10^6 cells/kg body mass) respectively; sham group and model group did not perform intervention. On day 3 and 7 after injection, the rats were evaluated with modified neurological function score (mNSS). Then rats were sacrificed, and brain tissue specimens from the right caudate putamen area were separated. The wet and dry weighing method was used to measure the water content, and HE staining was used to evaluate pathological and functional changes. The expressions of VEGF, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and aquaporin 4 (AQP-4) proteins were detected by immunofluorescence and Western blot. **Results** 2 h after injection, compared with rats in sham operation group, mNSS scores of rats in model group were increased, indicating that the models have successfully established. 3 d and 7 d after intervention, the mNSS score, the content of brain water, the expression level of VEGF, MMP-9 and AQP-4 proteins in model group and NS group were significantly higher than those of sham group ($P < 0.05$), while the above values in hBMSCs group were significantly lower than those in saline group and model group ($P < 0.001$), and the above values in hBMSCs/VEGF group were significantly higher than those of

^{*} 四川省科技厅项目(No. 14JC0055)资助

[△] 通信作者, E-mail: 544066675@qq.com

hBMSCs group ($P<0.05$). There were obvious hemorrhage and infarction in the brain tissue in the model group and NS group rats observed under the light microscope. Besides, the brain tissue developed loose structure and edema change. However, the bleeding and infarction in the brain tissue of hBMSCs group mice were reduced. Compared with the hBMSCs group mice, the brain tissue of hBMSCs/VEGF group mice was looser, more vacuoles occurred, and many neurons showed apoptosis changes such as nuclear deflation. **Conclusion** hBMSCs transplantation could improve neurological function and relieve brain edema. But hBMSCs/VEGF will increase the vascular permeability and then aggravate the early cerebral edema in rats with cerebral hemorrhage.

【Key words】 Cerebral hemorrhage Brain edema Lentiviral vector Vascular endothelial growth factor Human bone marrow mesenchymal stem cells

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是临床常见的急危重症,其发病率呈逐年升高趋势,占脑卒中的20%,致残率、致死率均很高,发病后30 d内死亡率超过40%,且存活者约70%~80%都留有不同程度残疾^[1-4]。而导致预后不良和严重神经功能缺陷的主要病理生理过程是脑出血后脑水肿形成^[5],其中最常见类型是血管源性脑水肿^[6],其机制主要是脑血管破裂出血后,血脑屏障破坏,细胞外液进入脑实质^[7-8]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种可从成体骨髓中获取的干细胞,具有多向分化潜能和低免疫原性等特点,可自体或异体移植,是适合作为临床治疗应用的种子细胞之一^[9]。有研究^[10-12]表明, BMSCs具有强大的细胞因子分泌能力,能通过旁分泌多种神经营养因子修复损伤脑组织,对脑出血和脑缺血均有显著治疗作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能有效促进出血区血管增生,有促进神经轴突生长、刺激神经胶质细胞增殖等神经营养和保护功能,并可促使神经干细胞增殖和向缺血区域迁徙^[13-15]。

BMSCs具有修复损伤脑组织的功能, VEGF具有促进新生血管形成和神经保护以减轻继发性损伤的功能,那么综合BMSCs和VEGF的优势是否对脑出血的治疗具有更佳效果? 研究显示^[16],大鼠脑尾壳核内注射 I 型胶原酶和肝素钠可成功制备脑出血模型。本研究通过制备大鼠脑出血模型,从脑出血后神经功能评分的改变、脑含水量的变化、脑组织病理改变以及与脑水肿相关蛋白基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、水通道蛋白-4(aquaporin 4, AQP-4)的表达等角度,对单纯应用成人BMSCs(hBMSCs)和经VEGF基因修饰的hBMSCs对脑出血损伤后的治疗效果进行比较,从而为后续研究和临床治疗脑出血提供基础实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性SD大鼠81只, SPF级, 体质量220~300 g, 由西南

医科大学实验动物中心提供〔许可证号: SCXK(川)2018-17〕。所有动物自由进食, 每日光照时间12 h, 实验动物操作遵循我国《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892 2018)》提出的原则与要求, 实验方案获得西南医科大学伦理委员会的批准(编号: 2020-032)。

1.2 主要试剂

建模试剂 I 型胶原酶(货号KG2611)购自上海源叶生物科技有限公司; 肝素钠注射液(2 mL: 12 500 U, 国药准字H51021209)购自成都市海通药业有限公司。hBMSCs细胞株(货号130408F01)、绿色荧光蛋白标记的VEGF过表达细胞稳转株hBMSCs/VEGF(货号VB180625-1117rvk, 即体外构建的VEGF基因慢病毒载体并稳定转染hBMSCs)、hBMSCs完全培养基(货号HUXMA-90011)均购自广州赛业生物科技有限公司。免疫荧光及Western blot检测一抗试剂VEGF抗体(货号sc-7269)、AQP-4抗体(货号sc-32739)、MMP-9抗体(货号sc-21733)均购自Santa Cruz公司。

1.3 方法

1.3.1 大鼠脑出血性模型建立与分组 81只雄性SD大鼠, 随机分为假手术组、模型组、生理盐水(NS)组、hBMSCs组及hBMSCs/VEGF组, 除假手术组大鼠为9只外, 余各组均为18只(后4组分为3 d、7 d两个时间点, 每时间点均分为9只大鼠)。大鼠麻醉后固定于脑立体定位仪(51600, Stoelting, 美国)上, 备皮消毒后沿正中剪一约1 cm切口, 暴露前囟, 根据诸葛启钊^[17]大鼠脑图谱定位右侧尾壳核(前囟前0.2 mm, 右3 mm, 深度6 mm), 钻孔后除假手术组大鼠外, 其余各组大鼠右侧尾壳核内注射 I 型胶原酶2 μ L(0.25 U/ μ L)和肝素钠1 μ L(2 U/ μ L), 制备脑出血动物模型^[18]。假手术组仅进针不注射造模剂, 停针10 min后缓慢退针, 无菌骨蜡封孔后缝合切口。术后2 h对大鼠进行改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS), 评分在8分以上者视为造模成功^[19], 纳入实验。

1.3.2 hBMSCs和hBMSCs/VEGF细胞培养与脑内移植 复苏培养hBMSCs和hBMSCs/VEGF细胞, 待细胞传代至第3~5代时, 收集细胞, 镜下观察细胞形态; 调整细胞浓

度为 $2.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 备用。造模后第3天, hBMSCs组和hBMSCs/VEGF组大鼠分别进行细胞移植, 按照 2×10^6 细胞/kg体质量标准, 大鼠右侧尾壳核内注射细胞悬液, 生理盐水对照组注射等体积生理盐水, 假手术组、模型组大鼠不进行干预。

1.3.3 各组大鼠干预后mNSS评分及获取标本 在干预后3 d、7 d分别进行mNSS评分, 包括感觉、运动、平衡和反射4项, 总分18分, 神经功能损伤越严重分值越高。mNSS评分后处死大鼠(各组每时间点处死9只, 假手术组一次处死9只), 获取脑组织标本进行相关检测。

1.3.4 大鼠脑含水量检测 在干预后3 d、7 d, 各组大鼠处死后, 分离大鼠脑右侧尾壳核区脑组织标本, 称重(湿重), 再放入110 ℃烤箱24 h后再次称重(干重), 脑含水量=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

1.3.5 脑组织HE染色 获取的脑组织标本用体积分数为4%的多聚甲醛固定, 48 h后梯度酒精脱水, 制作石蜡切片, 片厚5 μm 。对脑组织标本进行常规HE染色。

1.3.6 免疫荧光标记 脑组织标本冰冻切片后, 按照常规进行组织间免疫荧光染色。一抗MMP-9(1: 50)和AQP-4(1: 50)4 ℃孵育过夜, 荧光标记二抗(1: 1 000)室温避光孵育1 h, DAPI染核后抗荧光淬灭剂封片, 4 ℃保存。荧光显微镜(DM2500, 莱卡, 德国)下观察后对出血灶周围区域进行采图, 其中每只大鼠随机选取5张切片, 每张切片选取5个区域, 每个区域采图5张, 然后用Image Pro Plus 6.0图像分析软件计算每张图片平均光密度值(OD), 半定量分析各组MMP-9和AQP-4表达情况。

1.3.7 Westren blot检测MMP-9和AQP-4蛋白表达 用RIPA裂解液提取各组脑组织标本总蛋白, BCA法定总蛋白浓度。每组样本取等量蛋白并采用SDS-PAGE分离蛋白, 湿转法将蛋白转移到PVDF膜上。封闭1 h后, 一抗VEGF(1: 400)、AQP-4(1: 400)和MMP-9(1: 400)孵育过夜, 二抗孵育1 h后扫描显影。用Image Studio图像分析软件对蛋白条带灰度值进行分析, 用目的条带和内参 β -actin条带的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.3.8 统计学方法 每个实验重复3次, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析或 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑出血模型及干预后mNSS评分

造模术后2 h, 假手术组大鼠mNSS评分为(2.37 $\pm$ 0.25)分, 其余各组大鼠mNSS评分增高, 平均为(12.13 $\pm$ 0.65)分, 均 >8 分, 提示造模成功。由图1可见, 干预后3 d、7 d,

模型组和NS组大鼠mNSS评分高于假手术组, 差异有统计学意义($P < 0.000 1$); 在干预后同时点hBMSCs组大鼠神经功能评分较模型组和NS组大鼠降低($P < 0.05$); hBMSCs/VEGF组大鼠神经功能评分较hBMSCs组高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而与模型组和NS组相比差异无统计学意义。

2.2 移植细胞形态、移植后在脑组织迁移及VEGF蛋白的表达

光镜下hBMSCs呈梭形、漩涡状生长(图2A), VEGF基因转染后细胞形态无明显改变(图2B), 在荧光显微镜下呈绿色荧光(图2C)。hBMSCs/VEGF组大鼠尾壳核内细胞移植后3 d, 荧光显微镜下可观察到出血灶(红色区域)周围有明显绿色荧光出现(图2D), 说明hBMSCs/VEGF细胞在脑组织迁移。Westren blot结果显示, hBMSCs/VEGF组大鼠右侧尾壳核区脑组织VEGF蛋白表达较hBMSCs组增加, 差异有统计学意义($P < 0.000 1$), 见图2E。

2.3 各组大鼠干预后脑组织含水量情况

干预后3 d、7 d, 与假手术组相比, 模型组和NS组脑组织含水量增高, 差异有统计学意义($P < 0.000 1$); 干预后在相同时间点, hBMSCs组脑含水量较NS组和模型组减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); hBMSCs/VEGF组脑含水量高于hBMSCs组($P < 0.05$); 模型组、NS组和hBMSCs/VEGF组脑含水量差异无统计学意义($P > 0.05$)(图3)。

2.4 各组大鼠脑组织HE染色

见图4。与假手术组相比, 模型组和NS组大鼠脑组织出现明显出血灶和梗死灶, 结构紊乱疏松, 水肿改变明显; 在细胞移植后相同时间点, hBMSCs组脑组织结构出血灶和梗死灶较NS组和模型组明显减小; 而hBMSCs/VEGF组相较hBMSCs组, 脑组织结构疏松, 呈空泡状, 镜下呈明显水肿改变, 神经元出现多数核固缩等凋亡改变。

2.5 各组大鼠脑组织免疫荧光染色结果

见图5。模型组和NS组大鼠脑组织出血灶周围MMP-9和AQP-4表达量多于假手术组, 差异有统计学意义($P < 0.000 1$); 在干预后3 d和7 d, hBMSCs组MMP-9和AQP-4表达量较NS组和模型组减少($P < 0.05$); 而在相同时间点hBMSCs/VEGF组与hBMSCs组比较, MMP-9和AQP-4表达增加($P < 0.05$), 与模型组和NS组相比无明显差异($P > 0.05$)。

2.6 各组大鼠脑组织免疫蛋白印记检测结果

见图6。结果显示, 模型组和NS组VEGF、AQP-4、MMP-9表达量均较假手术组增加($P < 0.000 1$); 细胞移植后, 在相同时间点, hBMSCs组VEGF、AQP-4、MMP-9表

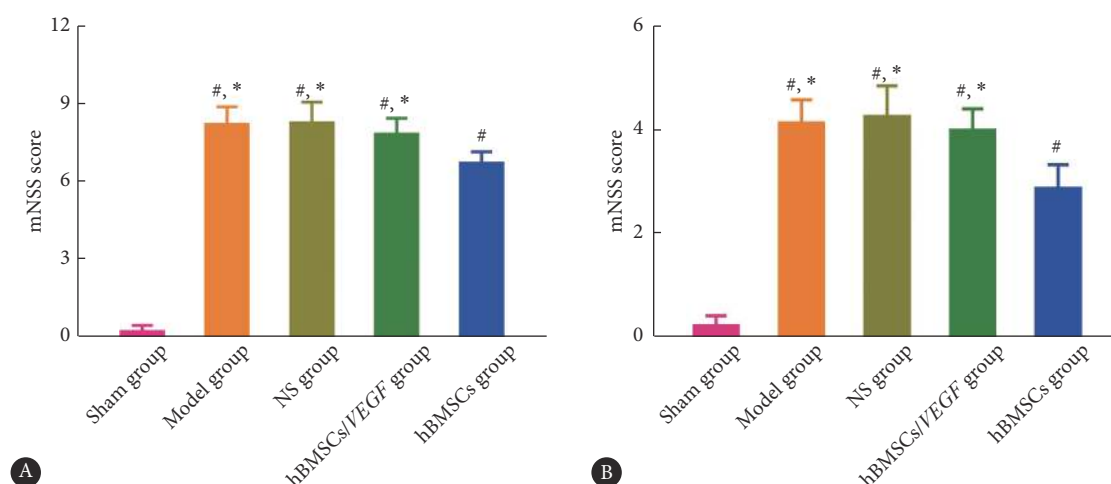


图1 各组大鼠干预后3 d (A)、7 d (B) mNSS评分比较 (n=9)

Fig 1 Comparison of mNSS scores in each group at 3 d (A) and 7 d (B) after intervention (n=9)

$P<0.0001$, vs. sham group; * $P<0.05$, vs. hBMSCs group.

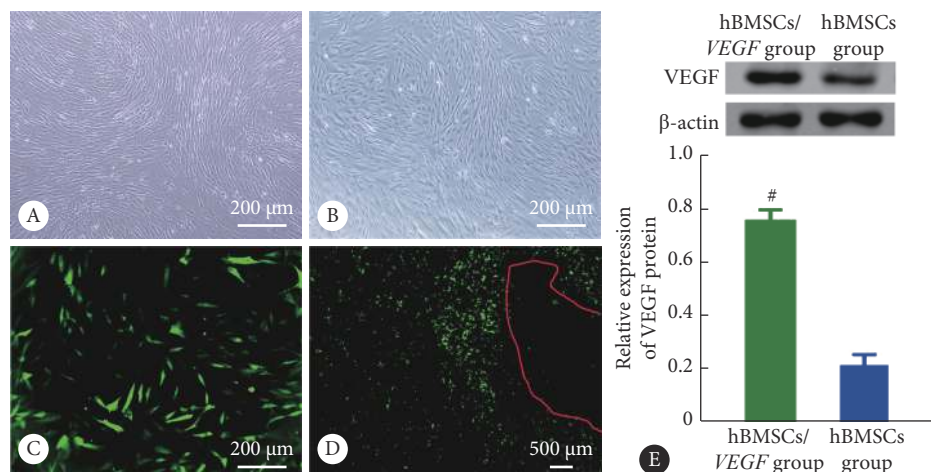


图2 hBMSCs (A)、hBMSCs/VEGF (B、C) 细胞形态, hBMSCs/VEGF移植后在脑组织的迁移 (D) 及VEGF蛋白的表达 (E, n=3)

Fig 2 Morphology of hBMSCs (A) and hBMSCs/VEGF (B, C); cell migration after hBMSCs/VEGF transplanted (D, red sites are bleeding areas); expression of VEGF protein (E, n=3)

$P<0.0001$, vs. hBMSCs group.

达量较NS组均下降($P<0.05$); 而hBMSCs/VEGF组VEGF、AQP-4和MMP-9表达量高于hBMSCs组($P<0.05$), 与模型组和NS组无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

脑出血是临床常见的急危重症, 近年来成为中国的首要死亡原因, 给社会带来严重的负担^[20], 脑出血后脑损伤主要包括两个病理生理阶段: 原发性急性期和继发性亚急性期, 原发性急性期主要表现为血肿扩大, 继发性亚急性期以血脑屏障损伤、细胞凋亡、血肿周围水肿、直接细胞毒性、炎性介质上调等为主要特征^[21]; 而改善血脑屏障损伤、抑制神经细胞凋亡以及控制脑水肿程度等继发性损伤, 缓解神经功能受损是该研究领域的一大难点^[22-23]。

为探索缓解脑出血后脑水肿的有效治疗方法, 本实验通过建立SD大鼠脑出血模型, 分别应用hBMSCs和VEGF基因修饰的hBMSCs进行脑内移植治疗, 在干预后早期从神经功能缺损评分、脑含水量、脑组织病理、与脑水肿相关关键蛋白的表达情况等角度评价两者差异, 结果显示, 单纯的hBMSCs组神经功能评分和脑含水量比NS组明显降低, 说明hBMSCs移植治疗脑出血大鼠能明显改善其神经功能缺损和脑水肿的程度; HE染色显示与NS组相比, hBMSCs组大鼠出血灶明显减小, 脑组织结构完整性更好, 进一步证明单纯hBMSCs移植在脑出血后早期能有效缓解脑水肿的发生, 和当前文献报道一致^[11-12]。而hBMSCs/VEGF组大鼠脑含水量和神经功能评分较单纯hBMSCs组增高, HE染色结果也显示出该组大鼠脑组织结构疏松、

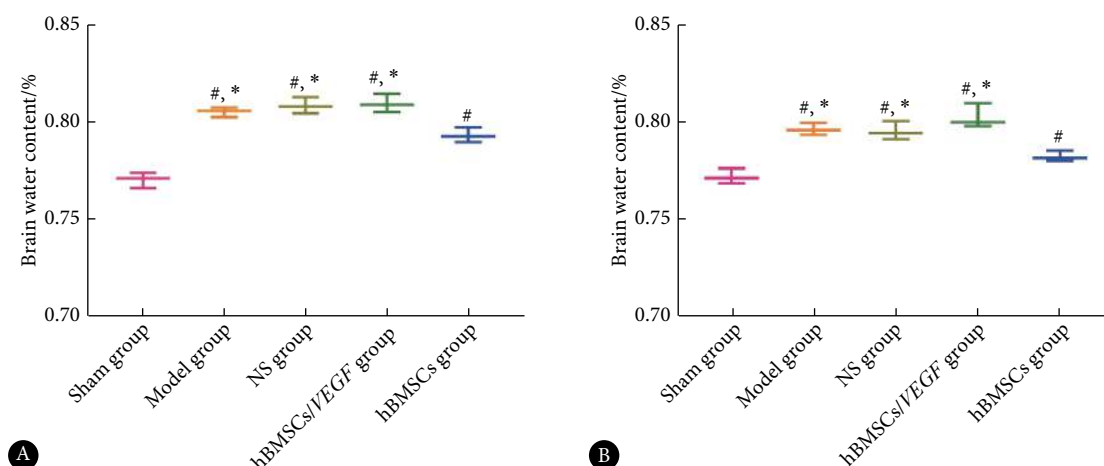


图 3 各组大鼠干预后3 d (A)、7 d (B) 脑含水量比较 ($n=3$)

Fig 3 Comparison of brain water content in each group 3 d (A) and 7 d (B) after intervention ($n=3$)

$P<0.0001$, vs. sham group; * $P<0.05$, vs. hBMSCs group.

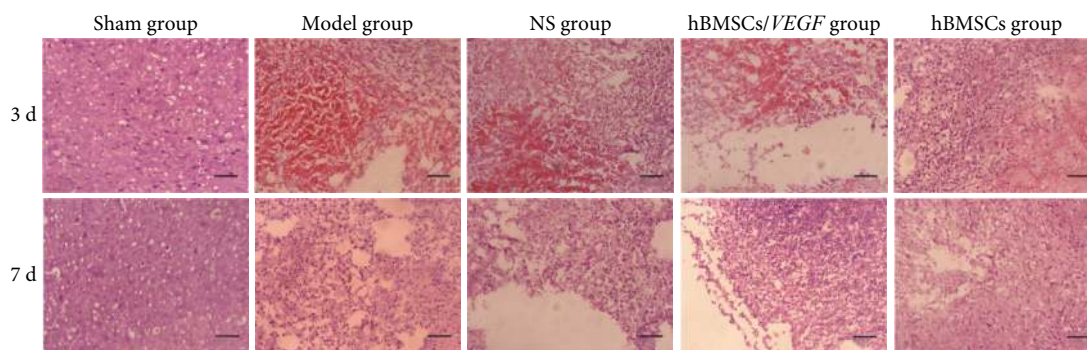


图 4 各组大鼠尾壳核区脑组织HE染色 (标尺=50 μm)

Fig 4 HE staining of brain tissues in caudal putamen of rats in each group (bar=50 μm)

完整性差,有明显空泡和水肿,说明hBMSCs/VEGF加重了脑出血后早期的脑水肿程度,不利于神经功能恢复。

AQP-4是目前已知主要存在于脑组织的水通道蛋白,对脑组织的水平衡调节起着主要作用,在正常脑组织中低表达,其表达量与脑水肿程度呈正相关^[24-25]。本实验检测了出血灶周围脑组织中AQP-4的表达,结果发现hBMSCs移植后,其表达量在相同时间点较NS组明显减少,提示hBMSCs移植对脑出血后脑水肿有积极的治疗作用。而hBMSCs/VEGF组AQP-4的表达量较hBMSCs组明显增加,与模型组和NS组无明显差异,进一步证明经VEGF基因修饰的hBMSCs移植并不能缓解脑出血后脑水肿的发生。本实验首次在hBMSCs/VEGF干预后检测AQP-4的表达,提示VEGF基因修饰的hBMSCs可能通过上调AQP-4的表达而增加脑组织对水的吸收,加重了脑水肿程度。研究表明,脑血管通透性的增加在脑水肿发生和发展过程中具有至关重要的作用^[26-27],而MMP-9可以通过降解血管壁基底层而增加血管通透性,其表达强度与神经功能缺损情况、脑水肿程度呈正相关^[28-29]。那

么,VEGF基因修饰的hBMSCs是否通过促使MMP-9表达增加而加重脑出血后血管源性脑水肿呢?为此,本实验还检测了各组大鼠出血灶周围脑组织中MMP-9蛋白的表达变化。结果显示与NS组相比,hBMSCs组MMP-9的表达明显降低,提示hBMSCs移植后,其可能部分通过下调MMP-9的表达,阻止脑出血后血脑屏障的进一步损伤,从而缓解血管源性脑水肿;而hBMSCs/VEGF组MMP-9的表达量较hBMSCs组明显增加,提示VEGF可能部分通过诱导MMP-9破坏脑血管基底层,增加了血管通透性,从而导致血管源性脑水肿进一步加重。与本实验结果相似,有相关研究表明在急性脑缺血或脑出血早期,静脉注射或侧脑室注射外源性VEGF均会增加微血管的渗出,加重血脑屏障的损伤,从而诱发严重的脑水肿^[30-31]。

从本实验结果来看,脑出血损伤后使用hBMSCs移植能改善神经功能损伤、减轻对脑组织结构的破坏,有效缓解血管源性脑水肿;而VEGF基因修饰的hBMSCs移植后一方面可能通过增加AQP-4的表达,使脑组织对水的吸收增加而加重脑水肿,同时,也可能通过上调MMP-9的表

达,破坏血管基底层,增加血管通透性,导致血脑屏障进一步破坏,从而加重血管源性脑水肿。显然,从脑水肿角度来看,hBMSCs/*VEGF*移植是不利的。如此看来,

*VEGF*是一把双刃剑,一方面其能促进出血灶及周边区血管生成、减少细胞凋亡、提供神经营养功能,而同时*VEGF*也会通过增加脑血管的通透性从而加重脑出血后

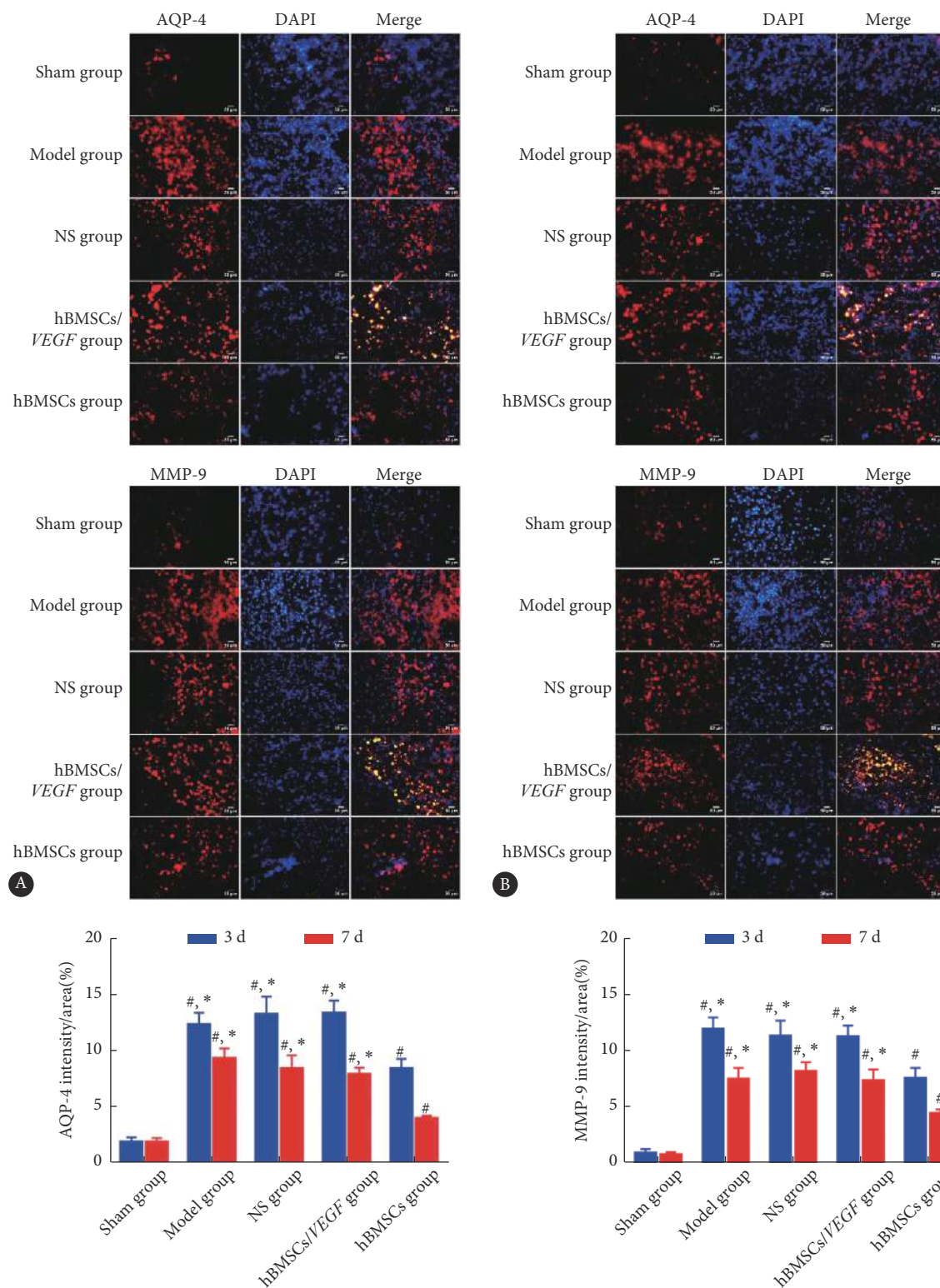


图5 免疫荧光半定量分析各组大鼠干预后3 d (A)、7 d (B) 脑组织AQP-4和MMP-9表达情况 ($n=3$)

Fig 5 Immunofluorescence analysis expressions of AQP-4 and MMP-9 in rat brain tissues in each group 3 d (A) and 7 d (B) after intervention ($n=3$)

$P<0.0001$, vs. sham group; * $P<0.05$, vs. hBMSCs group.

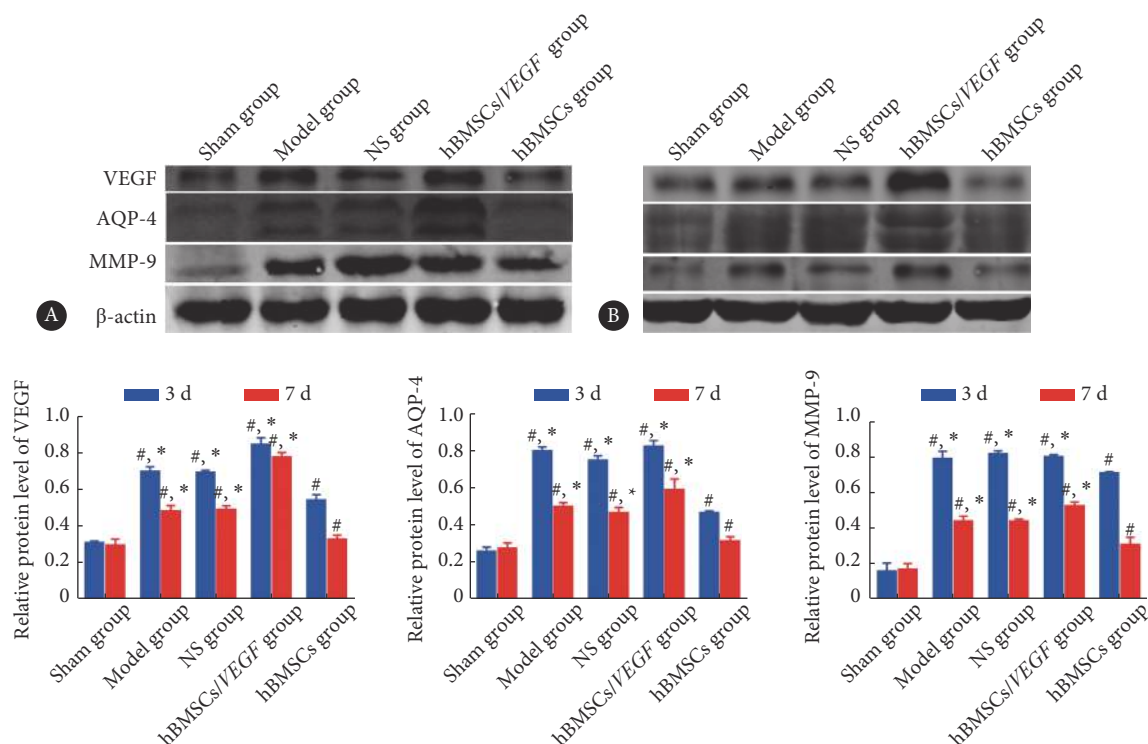


图 6 各组大鼠干预后 3 d (A)、7 d (B) 脑组织 VEGF、AQP-4 和 MMP-9 蛋白变化情况 ($n=3$)

Fig 6 Expression changes of VEGF, AQP-4 and MMP-9 protein in rat brain tissue in each group 3 d (A) and 7 d (B) after intervention ($n=3$)

$P<0.000$ 1, vs. sham group; * $P<0.05$, vs. hBMSCs group.

脑水肿的形成,加重神经功能缺损。因此,在以后探索脑出血的有效治疗方法的相关研究中,除了看到利用 VEGF 能促进新生血管生成和神经保护优势的同时,需要重点考虑克服其加重脑水肿这一缺陷。

参 考 文 献

- [1] NIE Q, GUO P, GE J, *et al.* Cerebral venous sinus thrombosis with cerebral hemorrhage during early pregnancy. *Neurosciences (Riyadh)*, 2015, 20(1): 48–51.
- [2] DELCOURT C, HUANG Y, ARIMA H, *et al.* Hematoma growth and outcomes in intracerebral hemorrhage: the INTERACT1 study. *Neurology*, 2012, 79(4): 314–319.
- [3] 张玉杰, 贾云飞, 陈立娜, 等. TLR4 信号通路在脑出血大鼠模型神经凋亡中的作用. *南昌大学学报(医学版)*, 2019, 59(3): 23–27.
- [4] MCDERMOTT M, SOZENER C B. Acute blood pressure management in acute ischemic stroke and spontaneous cerebral hemorrhage. *Curr Treat Options Neurol*, 2018, 20(9): 39 [2019-12-21]. <https://doi.org/10.1007/s11940-018-0523-4>.
- [5] 刘洋, 伍国锋. 脑出血后脑水肿的病理机制研究进展. *癫痫与神经电生理学杂志*, 2019, 28(2): 119–122.
- [6] LIU D Z, ZANG X, HU B L, *et al.* Src family kinases in brain edema after acute brain injury. *Acta Neurochir Suppl*, 2016, 121: 185–190.
- [7] 韩鹏, 李力仙. 脑出血后脑水肿的形成机制及药物治疗研究进展. *临床与病理杂志*, 2018, 38(2): 424–428.
- [8] 濮璟楠, 师蔚. 脑出血后脑水肿管理专家共识. *实用心脑血管病杂志*, 2017, 25(8): 1–6.
- [9] JIANG Y, JAHAGIRDAR B N, REINHARDT R L, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418(6893): 41–49.
- [10] SHEN Q, YIN Y, XIA Q J, *et al.* Bone marrow stromal cells promote neuronal restoration in rats with traumatic brain injury: involvement of GDNF regulating BAD and BAX signaling. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(2): 748–762.
- [11] SUN J, WEI Z Z, GU X, *et al.* Intranasal delivery of hypoxia-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced regenerative effects after intracerebral hemorrhagic stroke in mice. *Exp Neurol*, 2015, 272: 78–87.
- [12] 雷廷, 李桂宏, 孙玉学, 等. 骨髓间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的多重作用机制. *中国老年学杂志*, 2017, 37(6): 1544–1547.
- [13] GORA-KUPILAS K, JOSKO J. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Folia Neuropathol*, 2005, 43(1): 31–39.
- [14] NAMECINSKA M, MARCINIAK K, NOWAK J Z. VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2005, 59: 573–583 [2019-12-21]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407796>.
- [15] 周经霞, 陈琳, 陈攀琛, 等. 血管内皮生长因子通过 PI3K-Akt 和 MAPK-ERK 通路促进脑梗死大鼠血管新生机制. *中国老年学杂志*, 2019, 39(15): 3749–3752.
- [16] 曹勇军, 陈孝东, 王引明, 等. I 型胶原酶-肝素诱导的大鼠脑出血模

- 型研究. *中风与神经疾病杂志*, 2006, 23(4): 466–468.
- [17] 包新民, 斯舒云. 大鼠脑立体定位图谱. 第1版. 北京: 人民卫生出版社. 1991: 26–27.
- [18] 任泽光, 吴建中. 大鼠脑出血模型. *中华神经外科杂志*, 1993, 9(4): 205–207.
- [19] DENG L, GAO X, FAN G, *et al*. Effects of GDNF-transfected marrow stromal cells on rats with intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(9): 2555–2562.
- [20] 刘丽萍, 李曼, 刘婧伊, 等. 2018年中国卒中管理及研究进展. *临床荟萃*, 2019, 34(1): 5–10.
- [21] BELUR P K, CHANG J J, HE S, *et al*. Emerging experimental therapies for intracerebral hemorrhage: targeting mechanisms of secondary brain injury. *Neurosurg Focus*, 2013, 34(5): E9[2019-12-21]. <https://doi.org/10.3171/2013.2.FOCUS1317>.
- [22] CHANG J J, EMANUEL B A, MACK W J, *et al*. Matrix metalloproteinase-9: dual role and temporal profile in intracerebral hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23(10): 2498–2505.
- [23] ZHENG H P, CHEN C L, ZHANG J, *et al*. Mechanism and therapy of brain edema after intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*, 2016, 42(3/4): 155–169.
- [24] 杨长路, 连丽霞, 罗玉福. 脑出血后脑水肿的形成机制及药物治疗研究进展. *吉林医学*, 2019, 40(3): 642–643.
- [25] WANG B, LI W, JIN H, *et al*. Curcumin attenuates chronic intermittent hypoxia-induced brain injuries by inhibiting AQP-4 and p38 MAPK pathway. *Respir Physiol Neurobiol*, 2018, 255: 50–57.
- [26] MICHINAGA S, KOYAMA Y. Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 9949–9975.
- [27] GREENBERG D A, JIN K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(10): 1753–1761.
- [28] ULRICH N H, DEHMEI T, WITTSACK H J, *et al*. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinase-9 predict lesion volume in acute stroke. *Neurol Sci*, 2013, 34(3): 379–382.
- [29] 顾云鹤, 张默峤, 王宏达, 等. MMP-9抑制剂对大鼠脑出血模型脑水肿程度的影响及其对血脑屏障的作用. *中国实验诊断学*, 2018, 22(12): 2157–2161.
- [30] ZHANG H T, ZHANG P, GAO Y, *et al*. Early VEGF inhibition attenuates blood-brain barrier disruption in ischemic rat brains by regulating the expression of MMPs. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 57–64.
- [31] ZHANG Z G, ZHANG L, JIANG Q, *et al*. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*, 2000, 106(7): 829–838.
- (2019 – 12 – 31收稿, 2020 – 03 – 25修回)
- 编辑 沈 进