doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.12.009

七氟醚预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的改善机制 *

霍 苗[1] 张 倩[2] 张 阳[3] 郑星星[1] 曹 元[1] 陈 欣[1△]

（1 陕西省人民医院麻醉科 陕西 西安 710068；
2 陕西省人民医院烧伤整形美容医学外科 陕西 西安 710068；3 江苏省淮安市第一人民医院麻醉科 江苏 淮安 223300）

摘要 目的：探究七氟醚预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响，以及转化生长因子 -β2（TGF-β2）/Smad3 信号通路的活化情况。**方法：**将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组（n=10）：假手术组、模型组、七氟醚预处理组、吡非尼酮组和七氟醚预处理 + 吡非尼酮组。通过右颈内动脉（ICA）缝线结扎方法制备脑缺血再灌注（I/R）损伤模型。建模前 1h，七氟醚组大鼠吸入 2.0%七氟醚 1h，吡非尼酮组大鼠腹膜内注射 200 mg/kg 的 TGF-β2 抑制剂吡非尼酮，七氟醚 + 吡非尼酮组大鼠同时应用两种药物处理。再灌注 24 h 后，通过 Zea-Longa 五级评分法评价大鼠神经功能缺损评分，处死大鼠并测量梗死体积。通过苏木精 - 伊红（HE）染色和 Nissl 染色评价脑组织损伤程度。TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法（TUNEL）分析细胞凋亡。免疫荧光染色和 Western blot 检测 TGF-β2、Smad3、血管内皮生长因子 -A（VEGF-A）和 CD34 的表达情况。**结果：**七氟醚预处理明显降低了大鼠的脑梗塞面积和神经功能缺损评分。七氟醚预处理抑制了大鼠大脑皮质和海马 CA1 区的神经元凋亡。七氟醚预处理上调了 TGF-β2、VEGF-A 和 CD34 的表达，以及 Smad3 的磷酸化水平。TGF-β2 抑制剂吡非尼酮处理均可减弱七氟醚的脑保护作用并抑制 TGF-β2、VEGF-A 和 CD34 的表达和 Smad3 的磷酸化。**结论：**七氟醚预处理通过激活 TGF-β2/ Smad3 信号通路来减轻 I/R 损伤大鼠的脑损伤。

关键词：脑缺血再灌注损伤；七氟醚；TGF-β2 / Smad3 信号通路；脑保护；脑梗死

中图分类号：R-33；R743；R614 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2020)12-2246-06

Mechanism of Sevoflurane Pretreatment on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats*

HUO Miao [1], ZHANG Qian [2], ZHANG Yang [3], ZHENG Xing-xing [1], CAO Yuan [1], CHEN Xin [1△]

（1 Department of Anesthesiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;
2 Department of Burn and Plastic Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;
3 Department of Anesthesiology, Huai'an First People's Hospital, Huaian, Jiangsu, 223300, China）

ABSTRACT Objective: To explore the effect of sevoflurane pretreatment on cerebral ischemia-reperfusion injury and the activation of transforming growth factor-β2 (TGF-β2)/Smad3 signaling pathway. **Methods:** Fifty SD rats were randomly divided into 5 groups (n=10): sham group, model group, sevoflurane pretreatment group, pirfenidone group, and sevoflurane pretreatment + pirfenidone group. A brain I/R model was prepared by suture ligation of the right internal carotid artery (ICA). 1 h before modeling, rats in the sevoflurane group inhaled 2.0% sevoflurane for 1 h, rats in the pirfenidone group were injected intraperitoneally with 200 mg/kg of TGF-β2 inhibitor pirfenidone, rats in the sevoflurane pretreatment + pirfenidone group were treated with two drugs simultaneously. After 24 h of reperfusion, the neurological deficit score of the rats was evaluated by Zea-Longa five-level scale. The degree of brain tissue damage was evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining. Apoptosis was analyzed by TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method. Immunofluorescence staining and Western blot were used to detect the expression of TGF-β2, Smad3, Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and CD34. **Results:** Sevoflurane pretreatment significantly reduced cerebral infarct size and neurological deficit score in rats. Sevoflurane pretreatment inhibited neuronal apoptosis in rat cerebral cortex and hippocampal CA1 region. Sevoflurane pretreatment up-regulated the expression of TGF-β2, VEGF-A and CD34, as well as the phosphorylation level of Smad3. Treatment with the TGF-β2 inhibitor pirfenidone attenuated the brain protective effect of sevoflurane and inhibited the expression of TGF-β2, VEGF-A and CD34 and phosphorylation of Smad3. **Conclusion:** Sevoflurane pretreatment can reduce brain injury in rats with I/R injury by activating the TGF-β2 / Smad3 signaling pathway.

Key words: Cerebral ischemia-reperfusion injury; Sevoflurane; TGF-β2/Smad3 signaling pathway; Brain protection; Cerebral infarction

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743; R614 Document code: A

Article ID:1673-6273（2020）12-2246-06

* 基金项目：陕西省自然科学基金项目（2018JQ8023）

作者简介：霍苗（1981-），男，硕士，主治医师，研究方向：围术期应激反应、镇痛与免疫

△ 通讯作者：陈欣（1987-），男，博士，主治医师，研究方向：围术期脑保护研究，电话：15289363933，E-mail：firem326@126.com

（收稿日期：2019-12-28 接受日期：2020-01-25）

前言

七氟醚是一种常用的吸入麻醉药物[1-3]，有人研究显示，七氟醚预处理可减轻大脑中动脉闭塞（Middle cerebral artery occlusion, MCAO）大鼠的脑组织损伤[4]。转化生长因子-β（Transforming growth factor-β, TGF-β）家族是生长因子的超家族，在调节生物过程中起重要作用，可调节细胞增殖、凋亡、组织修复等多种生物功能[5,6]。TGF-β2是必不可少的神经保护因子，相关工作者已经对TGF-β1进行了广泛的研究，但很少报道TGF-β2在脑缺血中的作用[7,8]。多种生物学因素和相关的信号通路都可能参与脑缺血再灌注（Ischemia/Reperfusion, I/R）损伤保护过程，其他研究者发现，吸入七氟醚通过降低肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor, TNF-α）和白细胞介素1（Interleukin-1, IL-1β）水平对局灶性脑I/R损伤起延迟性保护作用[9]。然而，尚不清楚TGF-β2/ Smad3信号通路是否参与七氟烷预处理对脑I/R损伤的保护机制。本研究旨在阐明TGF-β2/ Smad3信号通路在七氟醚预处理后脑I/R损伤中的神经保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

成年雄性Sprague-Dawley大鼠由陕西省人民医院（SYXK（陕）2016-006）提供，体重为220～260 g。七氟醚(sevoflurane, SEV H20060586) 购自美国Baxter公司，吡非尼酮购自美国Selleck Chemicals公司，盐酸氯胺酮购自江苏恒瑞医药股份有限公司。TTC（2,3,5-氯化三苯基四氮唑）染色溶液、Nissl染色液和HE染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。化学发光ECL试剂购自美国Thermo Fisher公司。光学显微镜和聚焦激光扫描显微镜购自日本奥林巴斯。原位细胞凋亡检测试剂盒购自德国罗氏公司，BCA蛋白质测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所。TGF-β2、p-Smad3、total-Smad3、VEGF-A、CD34和GAPDH一抗购自美国Santa Cruz Biotechnology公司，HRP标记的山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物造模 将大鼠饲养在25℃、55%相对湿度、12h光照周期的实验室内，不限制饮食。使用右颈内动脉（ICA）缝线结扎方法制备脑I/R模型[10]。大鼠腹膜内注射盐酸氯胺酮60 mg/kg麻醉，将大鼠仰卧固定，颈前正中切开逐层分离，暴露了右颈总动脉（CCA）、颈外动脉（ECA）和ICA。然后将18毫米3-0尼龙线插入ICA并结扎。缺血1.5 h后开始灌注。

1.2.2 动物分组和药物处理 将50只大鼠随机分为5组（n=10）：假手术组（Sham）、模型组（Model）、七氟醚预处理组（SEV）、吡非尼酮组（PIR）和七氟醚预处理+吡非尼酮组（SEV+PIR）。建模前1 h，七氟醚组和七氟醚+吡非尼酮组大鼠经Ibis200七氟烷挥发罐吸入2.0%七氟醚，共吸入1 h。七氟醚+吡非尼酮组大鼠在吸入等量的七氟醚基础上，于建模前腹膜内注射200 mg/kg的TGF-β2抑制剂吡非尼酮。

1.2.3 神经功能缺损评分的评估 再灌注24 h后，对大鼠进行神经功能评分来观察脑缺血对神经功能的影响。采用Zea-Longa五级评分法评估神经功能[11]，评分标准如下：0分：无神经功能缺损；1分：轻微神经功能缺损，无法完全伸展左前肢；2分：中度神经功能缺损，表现为对侧旋转；3分：严重的神经功能缺损，表现为向对侧倾倒；4分：无法独立行走并表现出较低的意识水平。评分越高代表神经功能损伤越严重。

1.2.4 梗死体积的测量 将大鼠深麻醉并处死。分离大脑并切成2 mm厚的切片，在黑暗环境中与TTC（2,3,5-氯化三苯基四氮唑）染色溶液在37℃下孵育30 min。染色后，将大脑固定在4%多聚甲醛中并进行成像和分析。

1.2.5 苏木精-伊红（HE）染色 麻醉大鼠，在建模24 h后用生理盐水和4%多聚甲醛进行心脏灌注。分离大鼠海马组织10%甲醛固定，常规石蜡包埋，用切片机4 μm厚切片，然后用苏木精染色3 min，伊红染色1 min。

1.2.6 Nissl染色 对海马组织切片进行常规脱蜡再水化。然后，在37℃下用Nissl染色液将切片染色1 h。在显微镜下观察大脑皮层和海马CA1区的细胞形态。

1.2.7 细胞凋亡检测 染色之前将石蜡切片在60℃的烤箱中烤片2 h。按照制造商的说明，使用原位细胞凋亡检测试剂盒进行TUNEL分析并计算细胞凋亡率。

1.2.8 免疫荧光染色 将切片用3% H_2O_2处理30 min。然后用含0.3% Triton X-100和10%牛血清白蛋白的PBS封闭，将切片与抗TGF-β2（1∶1000）在4℃下过夜。接下来，在黑暗中将细胞核用碘化丙啶溶液染色5 min。最后，使用日本奥林巴斯聚焦激光扫描显微镜捕获图像，并使用Image-Pro Plus 6.0软件分析平均荧光密度。

1.2.9 Western blot分析 从大鼠脑组织中分离蛋白质并使用BCA蛋白质测定试剂盒检测蛋白浓度。然后，将样品加载到6-12%SDS-PAGE凝胶上并转移到PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭1h后，将膜与抗TGF-β2（1∶1000）、p-Smad3（1∶1000）、total-Smad3（1∶1000）、VEGF-A（1∶1000）、CD34（1∶500）和GAPDH（1∶500）抗体在4℃下孵育过夜。然后在室温下用HRP标记的山羊抗兔二抗（北京中杉金桥生物技术有限公司）孵育1 h。用增强的化学发光ECL试剂（美国Thermo Fisher公司）检测蛋白质的表达水平，并使用Image J软件进行光密度定量。

1.3 统计分析

使用SPSS 19.0软件进行统计分析，所有数据均表示为平均值± 标准差。通过单因素方差分析及Tukey事后检验进行组间数据差异比较。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 七氟醚预处理在大鼠I/R损伤后减少了梗塞体积并改善了神经系统

与模型组相比，七氟醚预处理组大鼠的梗塞面积明显减少。相反，TGF-β2抑制剂吡非尼酮显著减弱了七氟醚预处理的保护作用。此外，吡非尼酮还增加了右颈内动脉结扎和再灌注后大鼠的梗塞体积。在假手术组中未观察到梗塞体积和神经功能缺损。再灌注24 h后，与模型组相比，七氟醚预处理组的神经功能缺损评分降低，而吡非尼酮显著提高了神经功能缺损评分。见图1。

2.2 七氟醚预处理减轻I/R损伤后的皮质和海马组织学损伤

HE染色结果显示，假手术组的皮质细胞形态正常。在模型组中，神经元发生固缩并且具有不规则的外观。与模型组相比，

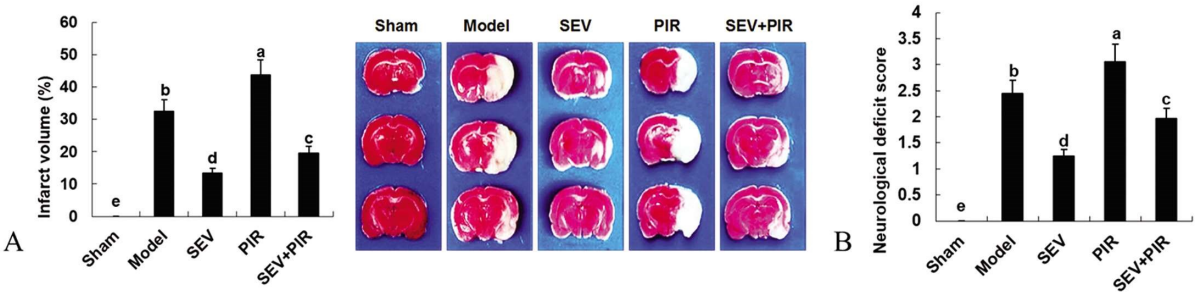

图 1 各组大鼠的脑梗死体积和神经功能缺损评分

Fig. 1 Cerebral infarction volume and neurological deficit scores in each group of rats

Note: A: cerebral infarction volume; B: neurological deficit score; "abcde": Different letters indicated comparison between groups, $P<0.05$. Identical letters indicated comparison between groups, $P>0.05$.

七氟醚预处理组的神经元形态学改变较少。在吡非尼酮组和七氟醚预处理+吡非尼酮组中,发现了大量不规则和空泡化的神经元,并且细胞周围的间隙变宽。海马 CA1 区神经元的形态学变化与皮质神经元相似。Nissl 染色结果显示,假手术组的皮质神经元被深染色并呈现蓝紫色,并且在边界清晰的神经元中发现了大量 Nissl 体。模型组的结构模糊,神经元中的 Nissl 体较少。与模型组相比,七氟醚预处理组的神经元数量更多,并且神经元中的 Nissl 体更为丰富。而且,与七氟醚预处理组相比,吡非尼酮组和七氟醚预处理+吡非尼酮组中的 Nissl 体的数量明显减少,并且染色变浅。同样,CA1 区的神经元也显示出这种变化趋势。见图 2。

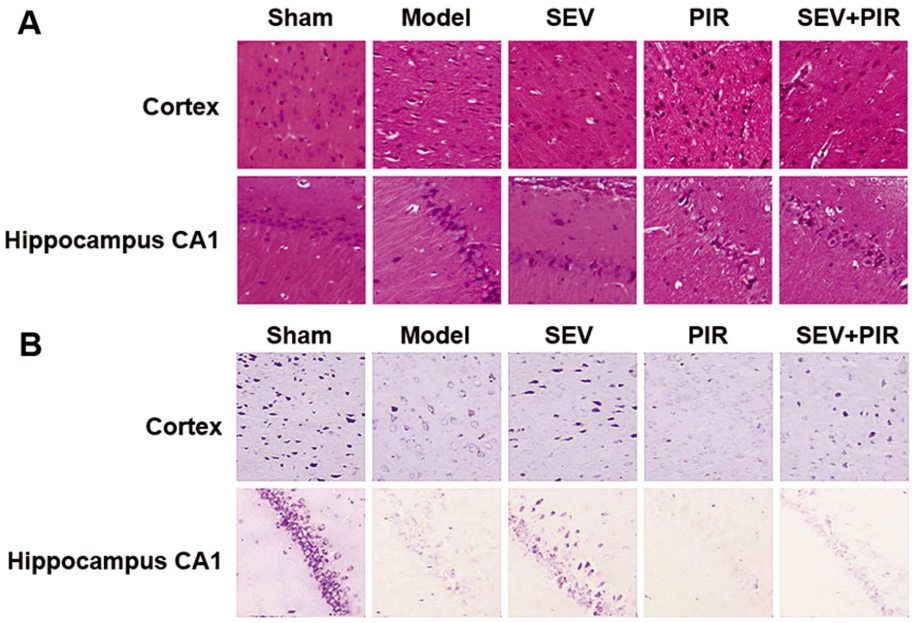

图 2 各组大鼠大脑皮层和海马 CA1 区 HE 染色和 Nissl 染色

Fig. 2 HE staining and Nissl staining in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area of each group of rats

Note: A: HE staining; B: Nissl staining.

2.3 七氟醚预处理降低 I/R 损伤后的皮质和海马细胞凋亡

TUNEL 染色结果显示，假手术组大鼠大脑皮层中仅发现了少数 TUNEL 阳性细胞。与模型组相比,七氟醚预处理组的皮质凋亡指数显著降低。吡非尼酮显著增加了皮层凋亡指数。在海马 CA1 区中,与假手术组相比,模型组海马细胞凋亡指数显著增加。与模型组相比,七氟醚预处理组的海马凋亡指数明显下降。同样,吡非尼酮增加了海马 CA1 中的细胞凋亡指数。见图3。

2.4 七氟醚预处理增强了大鼠 I/R 损伤后 TGF-β2 的表达

免疫荧光染色表明 TGF-β2 位于细胞质中。皮层中 TGF-β2 的荧光密度分析表明，在假手术组中 TGF-β2 的表达水平较低。与假手术组相比,模型组中 TGF-β2 的表达水平显著增加,并且七氟醚预处理增加了 TGF-β2 的表达。然而,吡非尼酮减弱了 TGF-β2 的表达。此外,吡非尼酮组中 TGF-β2 的表达水平在所有组中最低。海马 CA1 区中 TGF-β2 的荧光密度分析表明,I/R 损伤后 TGF-β2 明显增加,而七氟醚预处理进一步促进了 TGF-β2 的表达。吡非尼酮处理显著抑制了海马 CA1 中 TGF-β2 的表达。见图 4。

2.5 七氟醚预处理上调了 TGF-β2、VEGF-A 和 CD34 的表达

Western blot 结果表明，模型组的 TGF-β2、VEGF-A 和 CD34 的表达及 Smad3 的磷酸化水平显著升高。与模型组相比，七氟醚预处理组的 TGF-β2、VEGF-A 和 CD34 的表达和 Smad3 的磷酸化水平显著上调。而吡非尼酮抑制了 TGF-β2、VEGF-A 和 CD34 的表达和 Smad3 的磷酸化。见图 5。

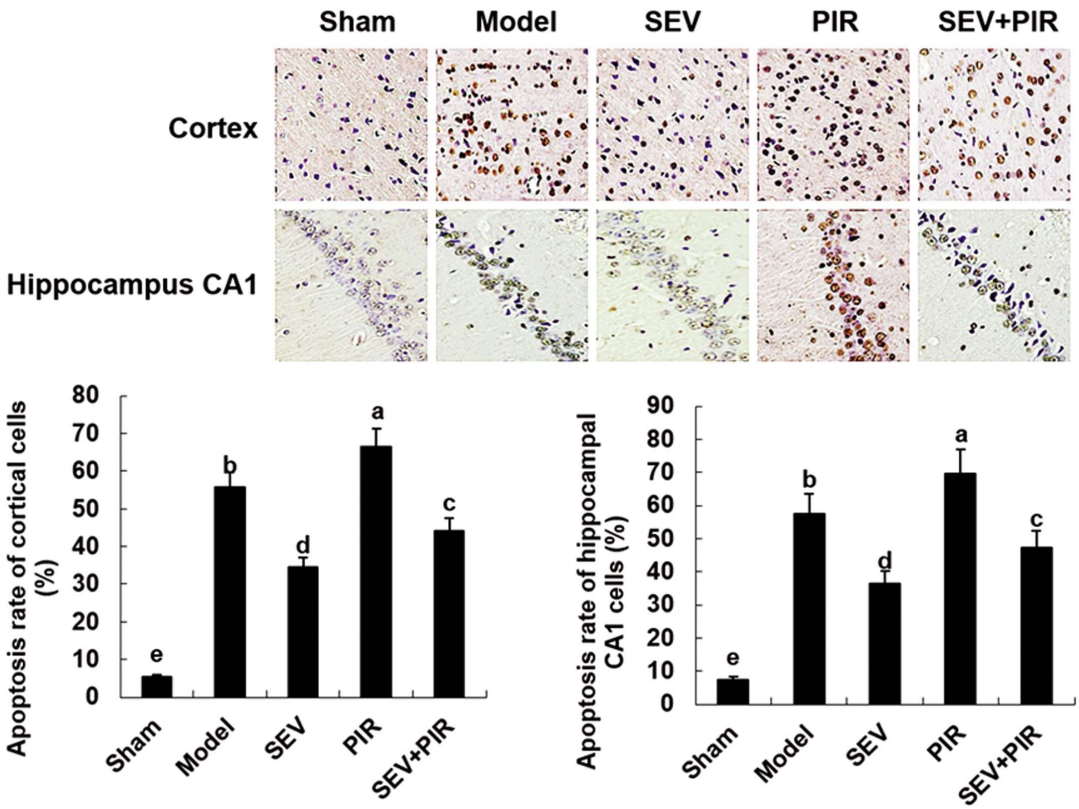

图 3 TUNEL 检测各组大鼠大脑皮层和海马 CA1 区的细胞凋亡

Fig. 3 TUNEL to detect apoptosis in cerebral cortex and hippocampal CA1 region of each group of rats

Note: "abcde": Different letters indicated comparison between groups, $P<0.05$. Identical letters indicated comparison between groups, $P>0.05$.

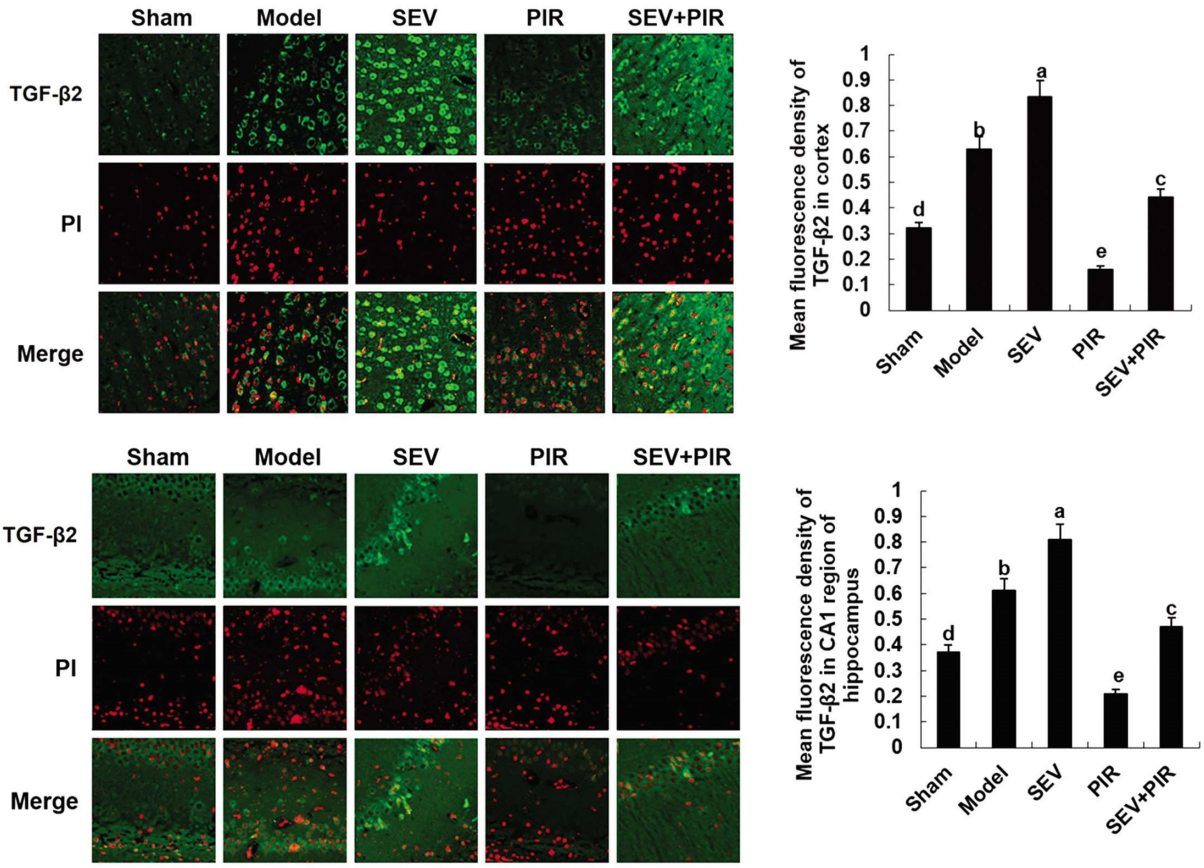

图 4 免疫荧光染色检测各组大鼠大脑皮层和海马 CA1 区的 TGF-β2

Fig. 4 Immunofluorescence staining to detect TGF-β2 in the cerebral cortex and hippocampal CA1 region of each group of rats

Note: "abcde": Different letters indicated comparison between groups, $P<0.05$. Identical letters indicated comparison between groups, $P>0.05$.

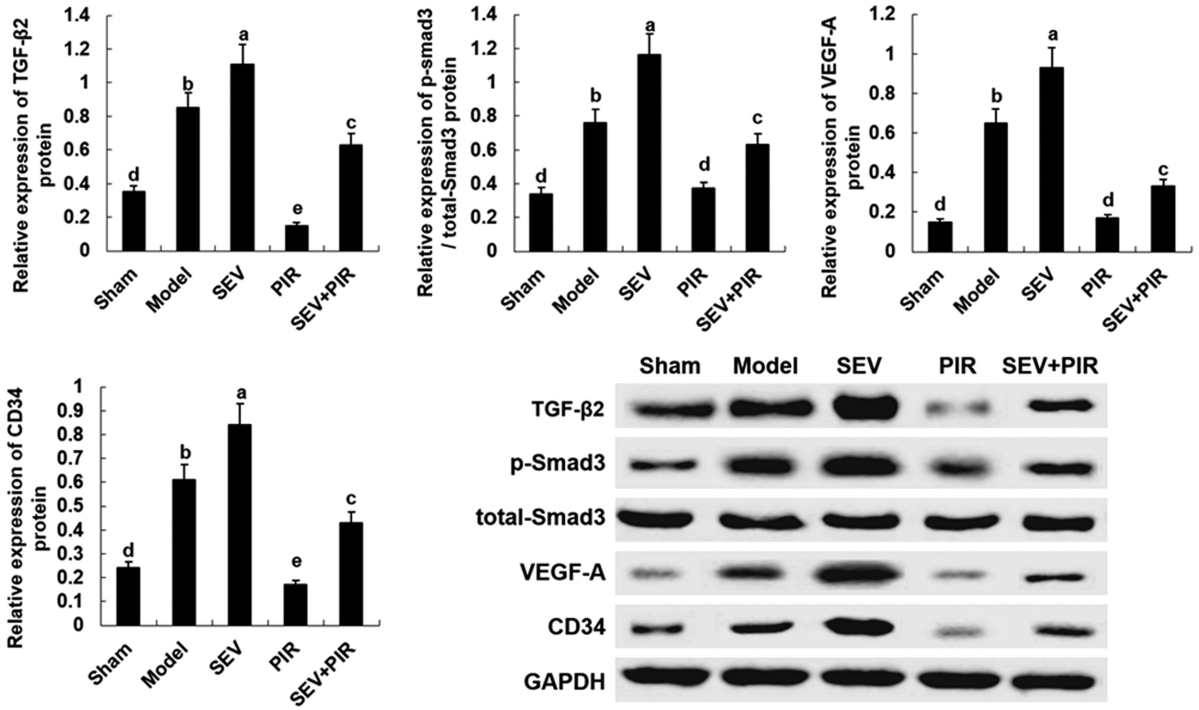

图 5 Western blot 检测各组大鼠大脑皮层和海马 CA1 区的 TGF-β2、VEGF-A 和 CD34 的蛋白表达及 Smad3 的磷酸化情况

Fig.5 Western blot to detect TGF-β2, VEGF-A and CD34 protein expression and phosphorylation of Smad3 in cerebral cortex and hippocampal CA1 region of each group of rats

Note: "abcde": Different letters indicated comparison between groups, $P<0.05$. Identical letters indicated comparison between groups, $P>0.05$.

3 讨论

中风是一种由脑血管血流循环障碍引起的高死亡率和致残率的常见脑血管疾病。中风可分为两类:缺血性中风和出血性中风,前者占 80%。目前,中风已成为中国居民死亡的主要原因[12-17]。迄今为止,只有溶栓治疗获得了美国食品药品监督管理局的临床批准。但是,经过一段时间后,血流的恢复可能会加剧局部脑损伤和功能障碍,这种现象称为脑缺血 / 再灌注(I/R)损伤。因此,研究具有神经保护作用的药物具有重要的临床价值和意义。

有人研究显示, 七氟醚预处理可减轻 MCAO 大鼠的脑组织损伤[4,18,19]。此外,七氟醚预处理可以改善大鼠模型的生存率和神经系统疾病[20]。本研究发现,七氟醚预处理在大鼠 I/R 损伤后减少了梗塞体积、改善了大鼠的神经系统、减弱了皮质和海马组织学损伤及细胞凋亡。证实了七氟醚预处理的脑保护作用。

转化生长因子 β(TGF-β)家族是生长因子的超家族,在调节生物过程中起重要作用[21]。它的成员包括许多细胞因子,例如 TGF-β1、TGF-β2、TGF-β3、骨形态发生蛋白(BMP)、激活素等。TGF-β 是一种多功能细胞因子,可调节细胞增殖、凋亡、组织修复等多种生物功能[5,6]。TGF-β 储存在细胞外基质中并调节血管基质,从而调控细胞变化和血管生成[22]。前人研究证明,TGF-β2 调节海马神经元的增殖和分化,TGF-β2 是必不可少的神经保护因子[7,8]。Dhandapani 等人报道称 17β- 雌二醇通过增加神经保护性细胞因子 TGF-β2 的表达,从而提供了神经保护作用[23]。此外,TGF-β2 蛋白的高表达可保护短暂性脑缺血动物模型的神经元。因此,活化的 TGF-β2/ Smad3 信号通路对于缺血性脑损伤的神经保护至关重要。本研究发现,七氟醚预处理增强了大鼠 I/R 损伤后 TGF-β2/ Smad3 信号通路的活化,说明七氟醚预处理的神经保护作用与 TGF-β2/ Smad3 信号通路的活化密切相关。

据报道,缺血区域的毛细血管灌注程度直接影响患者的预后和生存时间 [24]。在控制血管功能的关键细胞因子中,TGF-β 信号通路在血管生成中起关键作用。缺血性中风后,人体开始进行代偿性血管生成,新的毛细血管可以改善局部缺血区域的血液灌注,为神经细胞的修复提供良好的微环境,并促进脑梗死后神经功能的恢复[25-27]。然而,代偿性血管生成常常不足。在 I/R 损伤后,VEGF 发挥促进血管生成、改善神经功能和神经血管重塑的作用[28]。CD34 是血管生成的间接标记物[29]。本研究表明, 七氟醚预处理后可显著提高 VEGF-A 和 CD34 的表达水平。这项研究的结果与前人研究结果一致。据报道,脑 I/R 损伤后 VEGF 表达的增加与梗死面积的减少以及神经系统恢复的改善有关[30]。本研究进一步确定了 TGF-β2/ Smad3 信号通路是否参与了七氟醚预处理诱导的血管生成。用吡非尼酮处理后发现,VEGF-A 和 CD34 的表达水平显著下调, 表明 TGF-β2/ Smad3 信号通路通过调节 VEGF-A 和 CD34 的表达来介导七氟醚对血管生成的调控作用。

综上所述, 本研究表明,TGF-β2/ Smad3 信号通路参与调节 I/R 损伤的病理过程, 七氟醚预处理通过激活 TGF-β2/ Smad3 信号通路来减轻 I/R 损伤大鼠的脑损伤。

参 考 文 献(References)

[1] 黄健, 雍俊, 王冬婷, 等. 姜黄素通过激活海马神经元自噬抑制七氟醚诱导的小鼠记忆提取障碍[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(7): 838-841

[2] 戴双波, 齐娟. 不同浓度七氟醚对静态膨肺患者心肺转流后肺气体

交换的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2018, 34(10): 945-948

[3] 刘永臣, 刘景彬, 温敏, 等. 七氟醚预处理对缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用及机制研 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(29): 5630-5632

[4] Gaidhani N, Sun F, Schreihofer D, et al. Duration of isoflurane-based surgical anesthesia determines severity of brain injury and neurological deficits after a transient focal ischemia in young adult rats[J]. Brain Res Bull, 2017, 134: 168-176

[5] 刘浩, 赵燕, 张晓, 等. 转化生长因子 -β 信号通路抑制剂对胚胎干细胞定向分化的影响[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(16): 4023-4027

[6] Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44(3): 469-474

[7] Polazzi E, Altamira LE, Eleuteri S, et al. Neuroprotection of microglial conditioned medium on 6-hydroxydopamine-induced neuronal death: role of transforming growth factor beta-2 [J]. Journal of Neurochemistry, 2009, 110(2): 545-556

[8] Wu J, Chen X, Liu X, et al. Autophagy regulates TGF-β2-induced epithelial-mesenchymal transition in human retinal pigment epithelium cells[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 17(3): 3607-3614

[9] 叶治, 郭曲练, 王锷, 等. 七氟醚预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的延迟性保护作用[J].中南大学学报(医学版), 2009, 34(2): 152-157

[10] Yuan M, Ge M, Yin J, et al. Isoflurane post-conditioning down-regulates expression of aquaporin 4 in rats with cerebral ischemia/reperfusion injury and is possibly related to bone morphogenetic protein 4/Smad1/5/8 signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 97: 429-438

[11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91

[12] 李兴兰, 王金海, 张婷卓, 等. 正五聚环蛋白 3 在缺血性中风发病中的作用研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(2): 247-250

[13] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in china[J]. Circulation, 2017, 135(8): 759-771

[14] Su EJ, Cao C, Fredriksson L, et al. Microglial-mediated PDGF-CC activation increases cerebrovascular permeability during ischemic stroke[J]. Acta Neuropathologica, 2017, 134(4): 585-604

[15] Pool EM, Leimbach M, Binder E, et al. Network dynamics engaged in the modulation of motor behavior in stroke patients [J]. Human Brain Mapping, 2018, 39(3): 1078-1092

[16] Meissner Y, Richter A, Manger B, et al. Serious adverse events and the risk of stroke in patients with rheumatoid arthritis: results from the German RABBIT cohort[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2017, 76(9): 1583-1590

[17] Yang H, Bai L, Zhou Y, et al. Increased inter-hemispheric resting-state functional connectivity in acute lacunar stroke patients with aphasia[J]. Experimental Brain Research, 2017, 235(3): 941-948

[18] Liu JJ, Pan SY. Protective effects of estrogen combined with sevoflurane in an experimental model of cerebral infarction and focal cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2016, 20(9): 1839-1844

[19] Wang H, Shi H, Yu Q, et al. Sevoflurane Preconditioning Confers Neuroprotection via Anti-apoptosis Effects[J]. Acta Neurochir Suppl, 2016, 121: 55-61

[20] Zhang YJ, Wu MJ, Yu H, et al. Emulsified isoflurane postconditioning improves survival and neurological outcomes in a rat model of cardiac arrest[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2017, 14(1): 65-72

[21] 康伊, 张艳, 张伟. 转化生长因子 β 信号在内皮细胞中通过上调 ULK1 蛋白抑制细胞周期[J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(9): 783-787

[22] Loeys BL, Mortier G, Dietz HC. Bone lessons from Marfan syndrome and related disorders: fibrillin, TGF-B and BMP at the balance of too long and too short[J]. Pediatr Endocrinol Rev, 2013, 10(2): 417-423

[23] Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, et al. Astrocyte-Derived Transforming Growth Factor-β Mediates the Neuroprotective Effects of 17β-Estradiol: Involvement of Nonclassical Genomic Signaling Pathways[J]. Endocrinology, 2005, 146(6): 2749-2759

[24] Adamczak J, Hoehn M. Poststroke angiogenesis, con: dark side of angiogenesis[J]. Stroke, 2015, 46(5): 103-104

[25] Meretoja A, Keshtkaran M, Tatlisumak T, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke: Save a minute-save a week [J]. Neurology, 2017, 88(22): 2123-2127

[26] Pierot L, Soize S, Benaissa A, et al. Techniques for endovascular treatment of acute ischemic stroke [J]. Revue Neurologique, 2015, 46(3): 909-914

[27] Chu HJ, Tang SC, Lee CW, et al. Endovascular thrombectomy for acute ischemic stroke: A single-center experience in Taiwan [J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2018, 117(9): 806-813

[28] Huang Q, Zhong W, Hu Z, et al. A review of the role of cav-1 in neuropathology and neural recovery after ischemic stroke [J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 15(1): 348-353

[29] 陈作观, 刁永鹏, 吴志远, 等. 人脐带血 $CD34^+$细胞诱导小鼠缺血肢体血管生成[J].中国医学科学院学报, 2016, 38(5): 491-496

[30] Zhao Y, Pang Q, Liu M, et al. Treadmill exercise promotes neurogenesis in ischemic rat brains via Caveolin-1/VEGF signaling pathways[J]. Neurochemical Research, 2017, 42(2): 389-397