

高压氧对实验性脑梗死大鼠神经可塑性的影响

马明明, 张乐, 刘宝琼, 胡中扬, 符鹏程, 杨期东

(中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:探讨高压氧对缺血性脑梗死后神经可塑性的影响及其作用机制。方法:选择4~5个月龄雄性SD大鼠90只,随机分为假手术组、模型组和高压氧组。建立大鼠中动脉闭塞模型,在术后3 h对HBO组大鼠开始高压氧治疗。以横木行走试验进行神经功能评分,高压氧治疗后第1,2周采用免疫组织化学技术检测微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的分布,并用实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-PCR)检测梗死灶周Map-2 mRNA及GFAP mRNA表达量的变化。结果:脑梗死后第2周,大鼠平衡木试验显示高压氧组大鼠肢体功能评分较模型组低。免疫组织化学及荧光定量PCR结果均显示:高压氧治疗第1周,高压氧组梗死灶周围Map-2及Map-2 mRNA表达较假手术组及模型组显著增加,GFAP及GFAP mRNA表达较模型组明显减少但仍比假手术组高;高压氧治疗第2周,高压氧组梗死灶周围Map-2及Map-2 mRNA表达仍较假手术组及模型组高,GFAP及GFAP mRNA表达仍较模型组明显减少但比假手术组高。结论:缺血性脑梗死后,早期反复高压氧治疗可有效地改善肢体运动功能,并可通过促进Map-2以及抑制GFAP的表达促进缺血性脑梗死后神经的可塑性。

[关键词] 脑梗死; 高压氧; Map-2; GFAP

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)12-1113-06

Influence of hyperbaric oxygen treatment on neural plasticity in experimental rats

MA Ming-ming, ZHANG Le, LIU Bao-qiong, HU Zhong-yang, FU Peng-cheng, YANG Qi-dong

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To explore the influence of hyperbaric oxygen (HBO) treatment on neural plasticity and its mechanism in experimental rats with cerebral ischemia. **Methods** Ninety-healthy male adult Sprague-Dawley rats (3~4 month old) were randomly divided into a pseudooperative group, a model group, and an HBO therapy group. The middle cerebral artery occlusion model was duplicated with suture methods, then we used beam walking test (BWT) to determine the motor skill of the rats and immunohistochemistry method to detect the distribution and location of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Quantitative real-time PCR was used to detect the expression of Map-2 mRNA and GFAP mRNA. **Results** Immunohistochemistry showed that the fluorescence gray scale value of Map-2 in the HBO group was the highest in 3 groups at 1st week and 2nd week ($P < 0.05$). The value of GFAP was lower than that of the model group but higher than that of the sham operated group ($P < 0.05$). Real-time fluorescence-quantitative PCR indicated that the Map-2 mRNA of HBO group was the highest in 3 groups at 1st week and 2nd week ($P < 0.05$); but the value of GFAP mRNA in the HBO group is lower than that of the model group, but higher than that of the sham operated group at 1st week and 2nd week ($P < 0.05$). **Conclusion** After cerebral infarction, giving hyperbaric oxygenation treatment can improve the limbs motor function, and hyperbaric oxygenation treatment can increase the expression of

Map-2 and decrease the expression of GFAP, which promote neural plasticity.

Key words: cerebral infarction; hyperbaric oxygenation; Map-2; GFAP

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(12):1113-06]

脑卒中是临床上常见的急性脑血管病,目前我国每年新增患者约为200万,其中70%以上为缺血性脑梗死,虽然超早期溶栓和急性期神经元保护取得了重要进展,但对于大多数患者而言,脑卒中后瘫痪肢体的康复仍不理想。神经系统结构与功能的可塑性是近20年来神经生物学研究发展的重要领域。如何提高缺血损伤后神经系统的可塑性,成为目前神经科学研究的热点问题。以往的研究^[1]表明,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗缺血性脑卒中能有效增加血液中的含氧量,减小梗死灶体积,减轻神经系统症状,改善预后。但目前关于HBO治疗脑缺血的确切机制还不十分清楚。

为探讨高压氧治疗对急性缺血性脑卒中后神经可塑性的影响,本研究选取微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein-2, MAP-2)和胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)两个指标分别从脑梗死后皮层神经元轴突、树突的再生和星形胶质细胞的调控两个方面阐述高压氧对神经可塑性的影响,为进一步研究HBO治疗的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级SD大鼠90只,均为雄性,鼠龄3~4个月,体质量(315±20)g。实验动物均由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供,检疫后备用。

1.1.2 试剂 小鼠抗大鼠Map-2单克隆抗体由美国Santa Cruz公司提供,小鼠抗大鼠GFAP单克隆抗体由美国Sigma公司提供;兔抗小鼠FITC由美国Santa Cruz公司提供;RT-PCR试剂盒由德国QIAGEN公司提供。

1.1.3 仪器 YC32190/0.3-22型高压氧舱系烟台冰轮高压氧舱有限公司生产,ImageScanner II扫描仪由美国Sigma公司提供,LEICA CM1900低温恒冷冰冻切片系德国徕卡公司生产,高速冷冻离心机AVANTI J-25系美国BECKMAN生产,荧光定量仪PE 7000全自动荧光定量PCR仪

系美国Perkin Elmer公司产品,激光扫描共聚焦显微镜FV300系日本Olympus公司生产。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将90只大鼠随机分成假手术组、模型组、HBO组,每组为30只。(1)假手术组:仅分离颈总及颈外动脉,不插入尼龙线结扎大脑中动脉;(2)模型组:只造模,不作其他处理;(3)HBO组:造模后,进行高压氧治疗。

1.2.2 模型制备 将模型组及HBO组大鼠60只用线栓法^[2]制成大脑中动脉梗死模型。在大鼠颈外动脉分叉处结扎颈外动脉,在近心端结扎颈总动脉,在颈总动脉近颈内、颈外动脉分叉处剪一小口,将尼龙线(直径0.188 mm)顺势缓慢插入大脑中动脉,从而栓塞大脑中动脉起始端的血流,然后以尼龙线结扎颈总动脉。如大鼠苏醒后向右旋转或右侧肢体瘫痪则视为栓堵成功并入选实验。

1.2.3 高压氧处理 术后3 h动物进舱,先用纯氧充分洗舱30 min,新鲜钠石灰颗粒吸收CO₂。按100 kPa(1ATA)/min速率加压至0.25 MPa,在高压下停留1 h,之后以0.25 ATA/min速度匀速减压至常压并出舱活动,隔天1次,共暴露8次^[2]。假手术组及模型组大鼠在同时段模拟进出舱活动。

1.2.4 大鼠肢体功能评分 在大脑中动脉梗死术后第5,10,14天对模型组及HBO组大鼠进行横木行走试验(beam walking test, BWT)并评分^[3],以判断肢体功能恢复的程度。

1.2.5 标本的准备 于术后第1,2周分别从各组随机取出6只大鼠,经左心室向主动脉插管,并依次灌注50 mL 4℃生理盐水,4℃的4%多聚甲醛缓冲液约200 mL,之后开颅取脑,固定3 h后依次放入浓度为10%,20%,30%的蔗糖溶液中,而后进行冰冻切片。于第1,2周随机从各组取出4只迅速取梗死灶周3 mm×3 mm范围内脑组织存放于液氮中备取材时用。

1.2.6 免疫组织化学染色 采用水合氯醛腹腔麻醉大鼠,心脏灌注固定,取脑固定、脱水。冰冻切片,片厚40 μm,进行相应的免疫组织化学染色。I抗:小鼠抗大鼠Map-2单克隆抗体,小

鼠抗大鼠 GFAP 单克隆抗体。II 抗:抗小鼠 FITC。用激光共聚焦显微镜检测结果。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测 取梗死灶周围新鲜脑组织,提取总 RNA。Map-2 引物:上游 5'-TGA ACT TCC GAG AGC ATG CA-3',下游 5'-GGC GAC TGT GTG ATG ATC TCA-3'; GFAP 引物:上游 5'-TGC CGG CTT CAA AGA GAC TCG-3';下游 5'-CTGCAG TTG GCG GCG ATA GTC-3'。由于管家基因磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH) 在细胞中的表达量或在基因组中的拷贝数是恒定的,受环境因素影响较小,其定量结果代表了样本中所含细胞或基因组的数量,故内参照选择 GAPDH。样本按以下反应体系进行:5 × 定量 PCR buffer (美国 ABI 公司)10 μL 上游引物 F (10 μmol/L)1 μL,下游引物 R (10 μmol/L)1 μL, dNTPs (25 mmol/L, 美国 Sigma 公司)0.5 μL, 荧光探针 (10 μmol/L)1 μL, Taq 酶 (美国 ABI 公司)1.5 μL, cDNA 5 μL, ddH₂O 30 μL, 总体积为 50 μL, 反应条件为 93 °C 3 min, 然后 93 °C 45 s, 55 °C 45 s, 共 40 循环。

1.2.8 图像分析 采用专业图像分析软件 Image-Pro Plus5.0 测定各病理切片的反应产物阳性信号值,即根据测试区域 A 的灰度级 GA 和面积 (m+n) 及阳性反应产物 α 相的灰度级 Gα 和面积 n 即可求得阳性单位值 (PU)。

1.3 统计学处理 全部数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。利用方差分析和 t 检验等方法,比较模型组、对照组 Ephrine-A5 免疫反应阳性信号值及 RT-PCR 检测结果,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 术后大鼠肢体功能评分 按照平衡木试验评分,结果如表 1 所示。术后第 5 天模型组与 HBO 组评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$),模型组与 HBO 组肢体功能恢复无差异;术后第 10 天和第 14 天模型组与 HBO 组评分差异有统计学意义 ($P < 0.05$),HBO 组肢体功能恢复较模型组好。HBO 组及模型组术后第 10 天评分较此两组第 5 天评分差异有统计学差异 ($P < 0.05$),第 10 天肢体功能较第 5 天有所改善;术后第 14 天评分较此两组第 10 天评分差异有统计学差异 ($P < 0.05$),第 14 天肢体功能均较第 10 天有所改善。

表 1 脑梗死大鼠平衡木试验评分 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Tab. 1 Scores of balance-wood experiment for rats after cerebral infraction ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	肢体功能评分		
	第 5 天	第 10 天	第 14 天
模型组	4.43 ± 0.22	3.20 ± 0.36 ^{*#}	2.80 ± 0.14 ^{*△}
HBO 组	4.38 ± 0.34	2.41 ± 0.36 [#]	2.05 ± 0.31 [△]

与 HBO 组相比, * $P < 0.05$; 与第 5 天相比, # $P < 0.05$; 与第 10 天相比, △ $P < 0.05$ 。

2.2 免疫组织化学检测结果

2.2.1 Map-2 在脑梗死后不同时间点梗死灶周围组织的表达 梗死后第 1 周:HBO 组梗死灶周 Map-2 阳性信号值最高为 21.32 ± 6.11, 明显高于模型组及假手术组 ($P < 0.05$); 假手术组梗死灶周 Map-2 阳性信号值较模型组高 ($P < 0.05$)。梗死后第 2 周:HBO 组梗死灶周 Map-2 阳性信号值最高为 14.95 ± 0.31, 明显高于模型组及假手术组 ($P < 0.05$); 假手术组梗死灶周 Map-2 阳性信号值较模型组高 ($P < 0.05$)。梗死后第 2 周较第 1 周 HBO 组梗死灶周 Map-2 阳性信号值有所降低 ($P < 0.05$, 图 1, 表 2)。

2.2.2 GFAP 在脑梗死后不同时间点梗死灶周围组织的表达 梗死后第 1 周:模型组梗死灶周 GFAP 阳性信号值最高为 14.63 ± 4.73, 与 HBO 及假手术组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); HBO 组梗死灶周 GFAP 阳性信号值较假手术组高 ($P < 0.05$)。梗死后第 2 周:模型组梗死灶周 GFAP 阳性信号值最高为 18.81 ± 0.36, 与 HBO 及假手术组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); HBO 组梗死灶周 GFAP 阳性信号值较假手术组高, ($P < 0.05$)。梗死后第 2 周较梗死后第 1 周 HBO 组梗死灶周 GFAP 阳性信号值有所升高 ($P < 0.05$, 图 2, 表 3)。

表 2 免疫组织化学检测缺血性脑梗死大鼠 Map-2 表达的结果 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Tab. 2 MAP-2 expression in brain of ischemia infarct rats by immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	第 1 周	第 2 周
假手术组	11.93 ± 4.26 [*]	10.68 ± 2.34 [*]
模型组	7.65 ± 3.22 ^{*#}	4.21 ± 0.36 ^{*#}
HBO 组	21.32 ± 6.11	14.95 ± 0.31

与 HBO 组相比, * $P < 0.05$; 与假手术组相比, # $P < 0.05$ 。

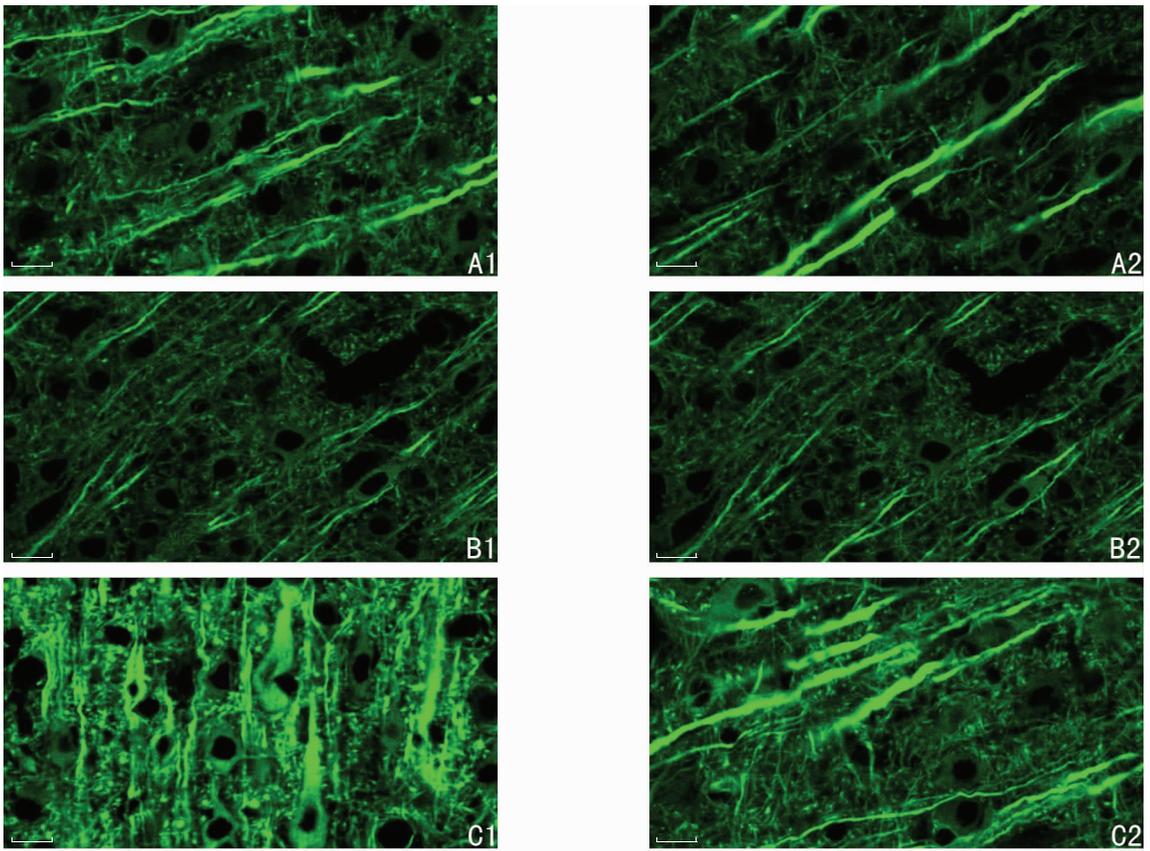


图1 Map-2在脑梗死后梗死灶周组织的表达。A1和A2为假手术组;B1和B2为模型组;C1和C2为HBO组。A1,B1和C1为梗死后第1周;A2,B2和C2为梗死后第2周(标尺:10 μm)。

Fig. 1 Expression of MAP-2 around infarct tissue after cerebral infarction. A1 and A2 belong to the sham operated group; B1 and B2 belong to the model group; C1 and C2 belong to HBO group; A1, B1, and C1 belong to the 1st week group after the infarction; A2, B2, and C2 belong to the 2nd week group after the infarction (Bar = 10 μm).

表3 免疫组织化学检测缺血性脑梗死大鼠 GFAP 表达的结果($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Tab. 3 GFAP expression in brain of ischemia infarct rats by immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

组别	第1周	第2周
假手术组	7.53 \pm 3.06 *	8.08 \pm 2.34 *
模型组	14.63 \pm 4.73 **	18.81 \pm 0.36 **
HBO组	11.02 \pm 5.41	14.85 \pm 0.31

与HBO组相比,* $P < 0.05$;与假手术组相比,# $P < 0.05$ 。

2.3 实时荧光定量PCR检测结果

2.3.1 Map-2 mRNA在脑梗死后不同时间点梗死灶周组织的表达 梗死后第1周:HBO组梗死灶周Map-2 mRNA表达量最高为127.32 \pm 26.41,明显高于模型组及假手术组($P < 0.05$);假手术组梗死灶周Map-2 mRNA表达量较模型组高($P < 0.05$)。梗死后第2周:HBO组梗死灶周

Map-2 mRNA表达量为103.25 \pm 12.31,明显高于模型组及假手术组($P < 0.05$);假手术组梗死灶周Map-2 mRNA表达量较模型组高($P < 0.05$)。梗死后第2周较第1周HBO组梗死灶周Map-2 mRNA表达量有所降低($P < 0.05$,表4)。

2.3.2 GFAP mRNA在脑梗死后不同时间点梗死灶周组织的表达 梗死后第1周:模型组梗死灶周GFAP mRNA表达量最高为98.23 \pm 11.36,明显高于HBO及假手术组($P < 0.05$);HBO组梗死灶周GFAP mRNA表达量较假手术组高($P < 0.05$)。梗死后第2周:模型组梗死灶周GFAP mRNA表达量最高为120.31 \pm 10.36,明显高于HBO及假手术组($P < 0.05$);HBO组梗死灶周GFAP mRNA表达量较假手术组高($P < 0.05$)。梗死后第2周较第1周HBO组梗死灶周GFAP mRNA表达量有所升高($P < 0.05$,表5)。

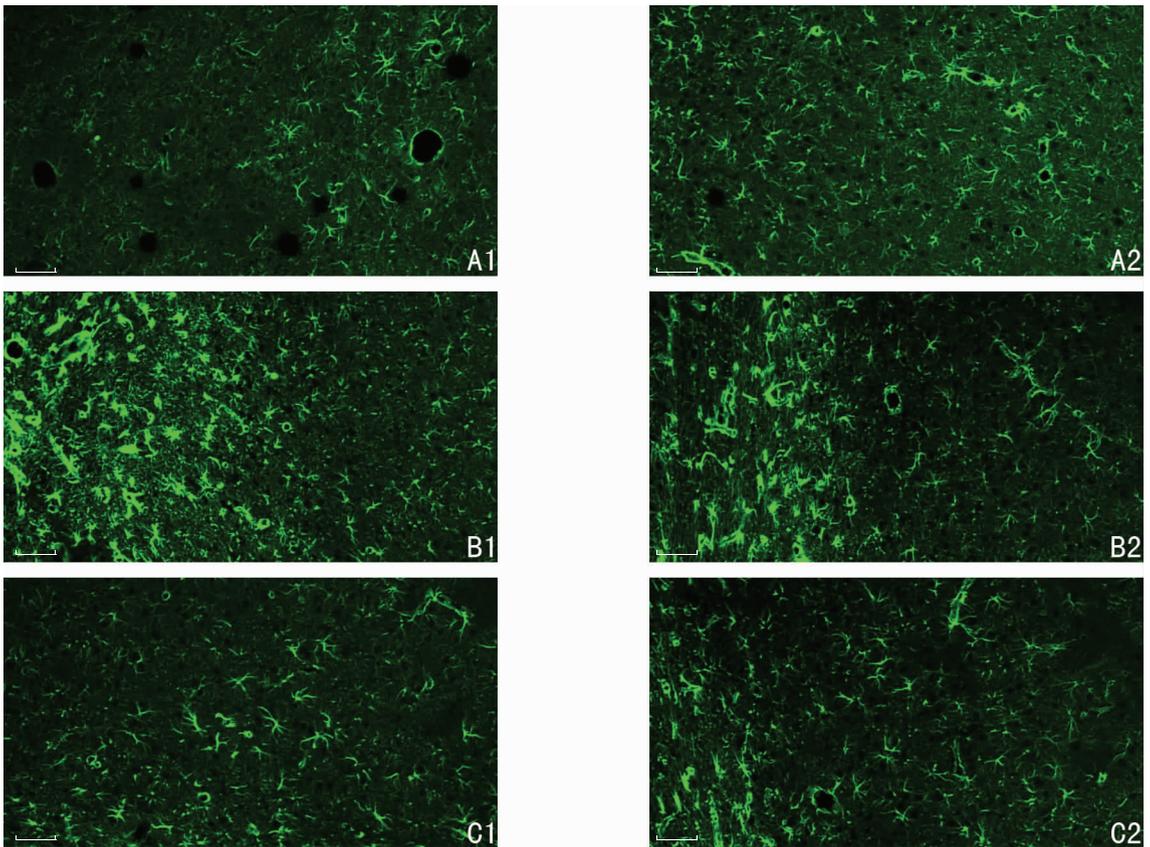


图2 GFAP在脑梗死后梗死灶周组织的表达。A1和A2为假手术组;B1和B2为模型组;C1和C2为HBO组。A1,B1和C1为梗死后第1周;A2,B2和C2为梗死后第2周(标尺:10 μm)。

Fig. 2 Expression of GFAP around infarct tissues after cerebral infarction. A1 and A2 belong to the sham operated group; B1 and B2 belong to the model group; C1 and C2 belong to the HBO group; A1, B1, and C1 belong to the 1st week after the infarction; A2, B2, and C2 belong to the 2nd week after the infarction (Bar = 10 μm).

表4 RT-PCR检测缺血性脑梗死大鼠Map-2 mRNA在梗死灶周表达的结果($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Tab. 4 MAP-2 mRNA expression in brain of ischemia infarct rats by RT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	第1周	第2周
假手术组	88.13 ± 32.76 *	86.68 ± 21.34 *
模型组	56.25 ± 22.32 *#	43.41 ± 17.56 *#
HBO组	127.32 ± 26.41	103.25 ± 12.31

与HBO组相比,* $P < 0.05$;与假手术组相比,# $P < 0.05$ 。

表5 RT-PCR检测缺血性脑梗死大鼠GFAP mRNA在梗死灶周表达的结果($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Tab. 5 GFAP mRNA expression in brain of ischemia infarct rats by RT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	第1周	第2周
假手术组	39.3 ± 6.21 *	36.18 ± 5.24 *
模型组	98.23 ± 11.36 *#	120.31 ± 10.36 *#
HBO组	66.51 ± 11.29	92.35 ± 22.31

与HBO组相比,* $P < 0.05$;与假手术组相比,# $P < 0.05$ 。

3 讨论

高压氧治疗急性缺血性脑卒中的动物实验证实HBO治疗急性缺血性脑卒中模型,特别是缺血再灌注模型疗效显著,而对于大血管永久性阻塞模型的疗效尚有争议^[4-5]。目前研究证实高压氧治疗急性缺血性脑卒中的机制有多种:高压氧可以通过改善缺血细胞代谢,清除氧自由基以及保护梗死周围缺血半暗带组织等改善脑梗死的预后^[6-8]。但目前大多数临床观察还未充分证实急性脑梗死后高压氧治疗的有效性^[9]。本研究以线栓法成功制作大脑中动脉闭塞模型,术后3 h开始给予多次高压氧治疗,发现梗死后第10,14天高压氧组比模型组的神经功能恢复更加明显。证实了早期开始的高压氧治疗能够改善大脑中动脉永久闭塞大鼠神经功能,这与Yin等^[10]的文献报道一致。

MAP-2属于结构性微管相关蛋白家族,参与

神经元发育、结构稳定、突起形成和突触可塑性调节,对神经元轴突和树突的发生、延长和稳定具有重要作用,是研究神经系统可塑性的分子标志物^[11-12]。大量研究报道了脑缺血后大脑组织 MAP-2 表达的减少,认为 MAP-2 是脑缺血的敏感指标^[11]。本研究对实验性脑梗死大鼠梗死后第 1, 2 周进行观察发现:梗死后第 1 周,模型组梗死灶周组织中 Map-2 表达较假手术组低,而 HBO 组梗死灶周组织中 Map-2 表达较假手术组高,差异均有统计学意义。梗死后第 2 周,模型组梗死灶周组织中 Map-2 表达较假手术组低,而 HBO 组梗死灶周组织中 Map-2 表达较假手术组高,差异均有统计学意义。这说明脑梗死后给予高压氧治疗可以通过促进 Map-2 的表达增加树突修复能力,从而增加梗死灶周围神经组织的可塑性,而且这种作用在梗死后第 1 周较明显,梗死后第 2 周逐渐减低。这提示高压氧治疗脑梗死不仅能够改善缺血细胞的代谢、清除氧自由基以及保护梗死周围缺血半暗带组织^[6-8],还可通过促进梗死灶周围神经元突起的再生,达到改善脑梗死后神经功能的恢复。

脑缺血后梗死灶边缘区以及远隔脑区出现大量活化的星形胶质细胞。有关研究表明脑缺血期间缺血边缘区及缺血侧海马大量胶质细胞活化增殖,过度活化的胶质细胞可以释放肿瘤坏死因子(TNF)、白介素、干扰素等有害因子导致迟发性神经元死亡(delayed neuronal death, DND),过度增殖的胶质细胞尤其是胶质疤痕的形成不仅可影响到神经元轴突的生长和突触的重建,还可阻断脑组织微循环^[13]。抑制脑缺血后过度的胶质细胞增生成为脑缺血后神经功能重建目标的重要途径之一。本研究在梗死后第 1, 2 周检测梗死灶周围 GFAP 的表达发现:梗死后第 1 周, HBO 组梗死灶周组织中 GFAP 表达较模型组低但较假手术组高,差异均有统计学意义。梗死后第 2 周, HBO 组梗死灶周组织中 GFAP 表达仍较模型组低但较假手术组高,差异均有统计学意义。梗死后第 2 周 HBO 组及模型组梗死灶周组织中 GFAP 表达较梗死后第 1 周有所增加,但 HBO 组 GFAP 增加较模型组缓慢。这说明脑梗死后星形胶质细胞活性发生了代偿性的增殖,高压氧通过抑制星形胶质细胞的过度增殖来提高脑梗死后梗死灶周围神经组织可塑性,改善神经功能。

综上所述,实验性脑梗死后早期开始高压氧治疗能够显著提高脑梗死后大鼠的神经功能评分,改善其预后。脑梗死后给予高压氧治疗可以

通过增加梗死灶周围神经元树突修复能力和减少过度增殖的神经胶质细胞促进脑梗死后的神经可塑性。

参考文献:

- [1] Veltkamp R, Warner D S, Domoki F, et al. Hyperbaric oxygen decreases infarct size and behavioral deficit after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2000, 853 (1): 68-73.
- [2] 陈浩, 毕竹梅, 崔宁, 等. 不同时间窗高压氧对脑缺血-再灌注大鼠模型学习记忆功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27 (15): 1447-1449.
CHEN Hao, BI Zhu-mei, CUI Ning, et al. The effect of hyperbaric oxygenation therapy at different time windows on learning memory function in rats with ischemia-reperfusion brain injury [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2007, 27 (15): 1447-1449.
- [3] Berman R F, Verweij B H, Muizelaar J P. Neurobehavioral protection by the neuronal calcium channel blocker ziconotide in a model of traumatic diffuse brain injury in rats [J]. *J Neurosurg*, 2000, 93 (5): 821-828.
- [4] Veltkamp R, Siebing D A, Sun L, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2005, 36 (8): 1679-1683.
- [5] Gill A L, Bell C N. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes [J]. *QJM*, 2004, 97 (7): 385-395.
- [6] Helms A K, Whelan H T, Torbey M T. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2005, 20 (6): 417-426.
- [7] Sun L, Marti H H, Veltkamp R. Hyperbaric oxygen reduces tissue hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2008, 39 (3): 1000-1006.
- [8] Calvert J W, Cahill J, Zhang J H. Hyperbaric oxygen and cerebral physiology [J]. *Neurol Res*, 2007, 29 (2): 132-141.
- [9] Carson S, McDonagh M, Russman B et al. Hyperbaric oxygen therapy for stroke: a systematic review of the evidence [J]. *Clin Rehabil*, 2005, 19 (8): 819-833.
- [10] Yin D, Zhang J H. Delayed and multiple hyperbaric oxygen treatments expand therapeutic window in rat focal cerebral ischemic model [J]. *Neurocrit Care*, 2005, 2 (2): 206-211.
- [11] Sharp F R, Liu J, Bernabeu R. Neurogenesis following brain ischemia [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 134 (1-2): 23-30.
- [12] Chen Y, Sun F Y. Age-related decrease of striatal neurogenesis is associated with apoptosis of neural precursors and newborn neurons in rat brain after ischemia [J]. *Brain Res*, 2007, 1166: 9-19.
- [13] Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal Y R, et al. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2007, 82: 95-111. (Review)