

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2019.11.008

· 基础研究 ·

脑梗死后囊腔微环境分析

李秀明¹, 刘罡²

1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院北院, 上海市 201801; 2. 复旦大学附属华山医院, 上海市 200031

通讯作者: 刘罡, E-mail: surgeonliu@126.com

基金项目: 上海市卫计委课题 (No. 20154Y0101)

摘要

目的 研究脑梗死囊腔内液化学成分和囊腔壁血供情况, 分析其是否适宜神经干细胞移植。

方法 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 20 只行永久性大脑中动脉栓塞术。造模后 3 d、10 d、21 d MRI 观察梗死后囊腔形成情况, 获取囊腔和侧脑室坐标。形成囊腔的大鼠抽取囊腔内液和脑脊液质谱分析。鼠脑 HE 染色和免疫荧光凝集素染色进行观察。

结果 造模后 21 d 时, 大鼠脑梗死区液体囊腔形态基本稳定。囊腔由坏死区周边正常脑组织与软脑膜共同构成。囊腔中心无细胞结构存在; 囊腔壁部分由软脑膜构成, 脑膜结构完整, 其上可见脑膜血管; 囊腔中心与脑膜交界处可见大量细胞聚集。囊腔周围有血管分布, 与对侧相应脑区无明显差别。与脑脊液相比, 囊腔微环境中共筛选出 36 种差异分子, 31 种上升, 5 种下降。差异最大的 10 种分子中, 多数对干细胞移植具有正面促进作用, 包括抗炎、抗肿瘤、促进神经细胞存活等。但缺乏促进神经干细胞向神经元分化的相关分子, 促进向胶质增生的相关分子增高。

结论 脑梗死慢性期形成的囊腔作为一个相对封闭的液体空间, 具备神经干细胞移植的基本条件, 适宜移植细胞存活。但微环境中有关分子成分多促进神经干细胞向胶质细胞分化。

关键词 脑梗死; 囊腔; 微环境; 脑脊液; 质谱分析; 差异因子

Microenvironment Analysis of Cystic Cavity after Cerebral Infarction

LI Xiu-ming¹, LIU Gang²

1. North Hospital of Ruijin Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201801, China; 2. Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200031, China

Correspondence to LIU Gang, E-mail: surgeonliu@126.com

Supported by Shanghai Health and Family Planning Committee Research Project (No. 20154Y0101)

Abstract

Objective To study the liquefaction in the cystic cavity of cerebral infarction and the blood supply in the wall to explore whether it is suitable for neural stem cell transplantation.

Methods A total of 20 male Sprague-Dawley rats were established middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. They were observed the formation of cystic cavity three, ten and 21 days after modeling with MRI, and the coordinates of cystic cavity and lateral ventricle were recorded. Intracystic fluid and cerebrospinal fluid were extracted from the rats with cavities for mass spectrometry. Frozen sections of the brains were stained with HE and immunofluorescence agglutinin and observed.

Results The cystic cavity in the infarction area became stable 21 days after modeling, which was composed of the brain tissue and the pia matter. There was no cellular structure in the center of the cystic cavity. The wall of the cystic cavity was partly composed of the pia matter. There were a large number of cells at the junction between the center of the cystic cavity and the meninges. Blood vessels distributed around the cystic cavity, similar with those in

作者简介: 李秀明(1984-), 女, 汉族, 山东滨州市人, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 脑卒中的康复治疗、骨关节疾病康复等。通讯作者: 刘罡, 男, 博士, 主治医师, 主要研究方向: 脑卒中的康复治疗、骨关节疾病康复。

unaffected side. A total of 36 different molecules were screened out, in which 31 increased and five decreased. For the top ten molecules, most of them positively benefited stem cell transplantation, including anti-inflammatory, anti-tumor and promoting the survival of nerve cells. However, they did not liked to promote neural stem cells differentiating into neurons, but glial cells.

Conclusion As a relatively closed fluid space, the cystic cavity formed in the chronic cerebral infarction can provide basic conditions for neural stem cell transplantation. However, relevant molecular components in the microenvironment mostly promote the differentiation of neural stem cells into glial cells.

Key words: cerebral infarction; cystic cavity; microenvironment; cerebrospinal fluid; mass spectrometry; differential factors

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2019)11-1293-10

[本文著录格式] 李秀明,刘罡. 脑梗死后囊腔微环境分析[J]. 中国康复理论与实践, 2019, 25(11): 1293-1302.

CITED AS: LI Xiu-ming, LIU Gang. Microenvironment Analysis of Cystic Cavity after Cerebral Infarction [J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2019, 25(11): 1293-1302.

脑梗死是发病率最高的脑血管疾病,也是世界范围内引起死亡和严重残疾的主要原因之一^[1-2]。在众多治疗策略中,细胞替代治疗让新生的神经细胞替代脑梗死后死亡的神经细胞,十分具有临床应用前景。自神经干细胞分离成功以来^[3],经过数十年发展,其体外培育、扩增和定向分化技术已经非常成熟,能为移植治疗提供充足的供体细胞。

囊腔是脑组织缺血坏死后的终产物。脑梗死急性期大量炎性细胞和炎性因子浸润^[4-5],这些炎性细胞和因子在慢性期会发生何种变化尚不清楚,是否适宜移植神经干细胞的存活和分化尚不能确定。此外,脑梗死除造成神经组织坏死外,也会损伤缺血区的血管结构^[6-7],导致囊腔内缺乏微血管,移植细胞可能无法获得足够养分。本研究观察囊腔内液化学成分和囊腔壁血供情况,以初步探索囊腔微环境,分析其是否适宜干细胞移植,为神经干细胞移植部位选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 20 只,2~3 月龄,体质量 220~260 g,SPF 级,购买于复旦大学实验动物部,并饲养于该中心 SPF 环境中。许可证号 SYXK(沪)2014-0029。室温(22±1)℃,日光灯 6:00~18:00 照明模拟明暗周期。每笼饲养大鼠 4~5 只,给予充足饲料及饮用水,定期专人更换垫料。

实验中所涉及的动物操作均按照国际实验动物伦理及福利标准施行,并严格遵守复旦大学实验动物伦理规定。

1.2 动物模型的制备

采用线栓法制作大鼠永久大脑中动脉缺血(mid-

dle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。

大鼠吸入 1.5% 异氟烷麻醉,仰卧位固定于操作台上,颈部剃毛备皮,安尔碘局部消毒。颈部正中纵行切口,钝性分离左颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎左颈外动脉远心端,同时在其近心端打一个小活结,其间斜剪一小切口,将线栓(深圳瑞沃德科技公司)沿切口插入近心端,打紧活结。斜切口剪断颈外动脉,将线栓近心端下拉,直至与颈内动脉呈一直线,将线栓沿颈外动脉插入颈内动脉,术者感到有阻力感,约距左颈总动脉分叉处 18 mm 处,停止插入。此时线栓硅胶头位于大脑中动脉处。将颈总动脉连同线栓尾部的尼龙线一起结扎,剪断多余部分,缝合皮肤。

1.3 神经行为学评分

大鼠麻醉苏醒后,立即按 Longa 法对大鼠进行行为学评分,以评价造模是否成功。0 分,无神经功能缺损;1 分,提鼠尾使其倒立,右侧上肢不能完全向地面伸展;2 分,自发行走时向右侧转圈;3 分,自发行走时身体向右侧倾倒;4 分,意识丧失不能自发行走;5 分,死亡。

1~3 分的动物用于后续实验。

1.4 MRI

术后 3 d、10 d 和 21 d,大鼠前法麻醉,采用 MAGNETOM Trio Tim 3.0 T 核磁共振成像仪(德国 SIEMENS 公司)采集图像,信号接收使用 4 通道动物线圈。MRI 检测序列及参数如下。T₁WI: TR 550 ms, TE 12 ms,层厚 2.0 mm,15 层,FOV 60×60 mm,矩阵 320×256,分辨率 0.2×0.2×2.0 mm。T₂WI: TR 3330 ms, TE 68 ms,层厚 1.0 mm,18 层,FOV 50×

50 mm, 矩阵 256×256, 分辨率 0.2×0.2×1.0 mm; FLAIR: TR 2000 ms, TE 12 ms, 层厚 2.0 mm, 15 层, FOV 60×60 mm, 矩阵 256×256, 分辨率 0.2×0.2×2.0 mm。观察梗死后空腔形成情况, 获取空腔及侧脑室坐标。

1.5 囊腔内液及脑脊液抽取

术后 23 d, 选 MRI 扫描确认囊腔形成的大鼠, 前法麻醉, 头部固定于脑立体定位仪(美国 DAVID KOPF 公司)上, 使大鼠上切牙根部低于外耳道连线(耳间线) 3 mm, 保持大鼠颅顶处于水平面上。剔除颅顶毛发, 消毒皮肤。切开皮肤、皮下组织和颅顶骨膜, 少量 3% H₂O₂ 涂布术区, 充分止血并显露前后囟。以前囟为基准点, 根据 MRI 获取的侧脑室和囊腔中心点坐标调整立体定位仪, 牙科钻颅骨钻孔, 直径 0.5 mm, 暴露硬脑膜。钻孔时滴加生理盐水, 保持暴露部位湿润。立体定位仪移动臂将 25 μ l 微量进样器缓慢插入囊腔中心, 留置 2 min 后缓慢抽取囊腔内液, 留针 5 min, 退针。同法侧脑室抽取脑脊液。囊腔内液和脑脊液分组别混匀, -70 $^{\circ}$ C 低温冰箱(美国 HARRISZHIZ 公司)冰冻保存。

1.6 囊腔

1.6.1 大体观察与取材

实验动物深度麻醉处死, 经心脏灌注生理盐水 200 ml, 后灌注 4% 多聚甲醛 300 ml, 取脑, 观察囊腔大体解剖情况。为更好显示脑膜血管, 1 只实验动物未经心脏灌注。大脑置 4% 多聚甲醛固定过夜; 10%、20%、30%、30% 梯度蔗糖脱水沉底; OCT 包埋剂(日本 SAKURA 公司)包埋, 冷冻后 RM213 冰冻切片机(德国 LEICA 公司)切片, 厚 20 μ m。

1.6.1 HE 染色

冰冻切片流水冲洗后苏木素(碧云天公司)染 10 min, 酒精性伊红复染 30 s, 95%、95%、100%、100% 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。光学显微镜观察。

1.6.2 Lectin 染色

冰冻切片加 10% 正常山羊血清(碧云天公司)室温孵育 2 h; 异硫氰酸荧光素-葡聚糖(美国 SIGMA 公司)标记的兔抗 Lectin 一抗(美国 SIGMA 公司, 1:1000) 4 $^{\circ}$ C 孵育 48 h; TBS 缓冲溶液漂洗 3 次, 每次 10 min, 封片。随机选取脑梗死周边区及梗死对侧大脑相对区域各 3 个高倍镜视野, 采集图像并观察囊腔形态及周边组织构造。

1.7 质谱检测

对混匀的脑脊液和复融后的囊腔液分别进行质谱检测及数据分析。Bradford 法测定蛋白浓度, 12% SDS-PAGE 电泳银染。各样品中加入适量 4% SDS、50 mmol/L Tris.HCl (pH = 7.5) 充分混匀, 加入 DTT 使终浓度为 100 mmol/L, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min。冷却后加 UA 缓冲液 200 μ l, 转入 30 K filter 中, 12 000 r/min 离心 15 min; 再加 UA 缓冲液 200 μ l, 12 000 r/min 离心 15 min。加 50 mmol/L IAA 溶液 100 μ l, 室温避光放置 20 min, 12 000 r/min 离心 15 min。加 50 mmol/L NH₄HCO₃ 100 μ l, 12 000 r/min 离心 15 min, 重复 2 次。加 Trypsin 50 μ l 37 $^{\circ}$ C 酶解过夜。加 50 mmol/L NH₄HCO₃ 溶液 50 μ l, 12 000 r/min 离心 15 min。收集管中酶解产物, 冷冻干燥, 0.1% 甲酸水复溶。取样品 2 μ g 行液质联用 Orbitrap 检测。

取酶解产物 20 μ l, 加 0.1% 甲酸水 400 μ l 和 SCX 6.0 μ l, 充分混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清于干净 EP 管中, 标记为 ft; 加入 pH4 缓冲 400 μ l 充分混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清置干净 EP 管中, 标记为 pH4; 加 pH6 缓冲 400 μ l 充分混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清置干净 EP 管中, 标记为 pH6; 最后加入 25% 氨水、50% 乙腈溶液 400 μ l 充分混匀, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清置 EP 管中, 标记为 pH10。不同组分收集液冷冻干燥后, 0.1% 甲酸水充分溶解。

将各分级组分转入进样瓶中, 取适量液质联用检测。各分级洗脱梯度 2 h, 色谱柱为 C18 3 μ m, 120 A, 75 μ m ID, 长 150 mm。QExactive 质谱检测, MaxQuant 进行数据分析。

将囊腔液与脑脊液质谱分析结果进行对比, 筛选差异分子。筛选标准为分子浓度比 > 2.0 或 < 0.5, 倍数变化最高前 10 种分子为显著差异分子。筛选出的差异分子 GeneCard 检索, 分析其主要功能。

2 结果

2.1 脑梗死后囊腔形成

术后 3 d, MRI 示坏死区组织肿胀, 信号不均匀; 10 d 坏死区囊腔形成, 囊腔内有 T₁ 低信号、T₂ 高信号液体信号; 21 d 坏死区囊腔形态基本稳定。见图 1。

2.2 囊腔大体解剖

囊腔由坏死区周边正常脑组织与软脑膜共同构成, 软脑膜完整, 表面存在血管。见图 2。

2.3 HE 染色

囊腔中心无细胞结构；部分囊腔壁由软脑膜构成，脑膜结构完整，其上可见脑膜血管；囊腔中心与脑膜交界处可见大量细胞聚集。见图3。

2.4 Lactin 染色

囊腔周围可见血管分布，与对侧相应脑区相比，未见明显差异。见图4。

2.5 差异分子

共筛选出36种差异分子，其中31种上升，5种下降。相对浓度变化最大的10种分子见图5。经检索，其中6种显著差异分子对干细胞移植具有正面促进作用，如抗炎、抗肿瘤、促进神经细胞存活等。NCAN (神经黏蛋白)是由神经元分泌的特异性蛋白质，广泛分布于神经系统，可与神经元细胞膜上特异性受体神

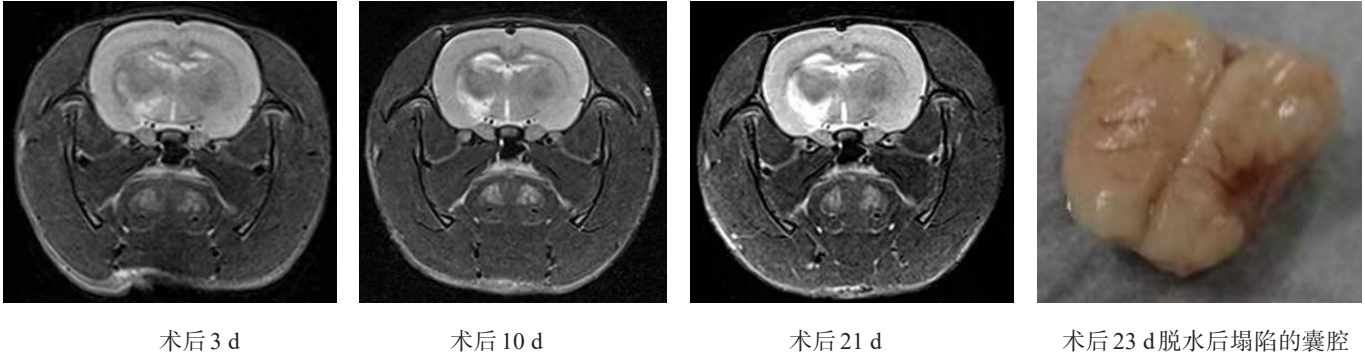


图1 脑梗死后囊腔形成



图2 囊腔大体解剖

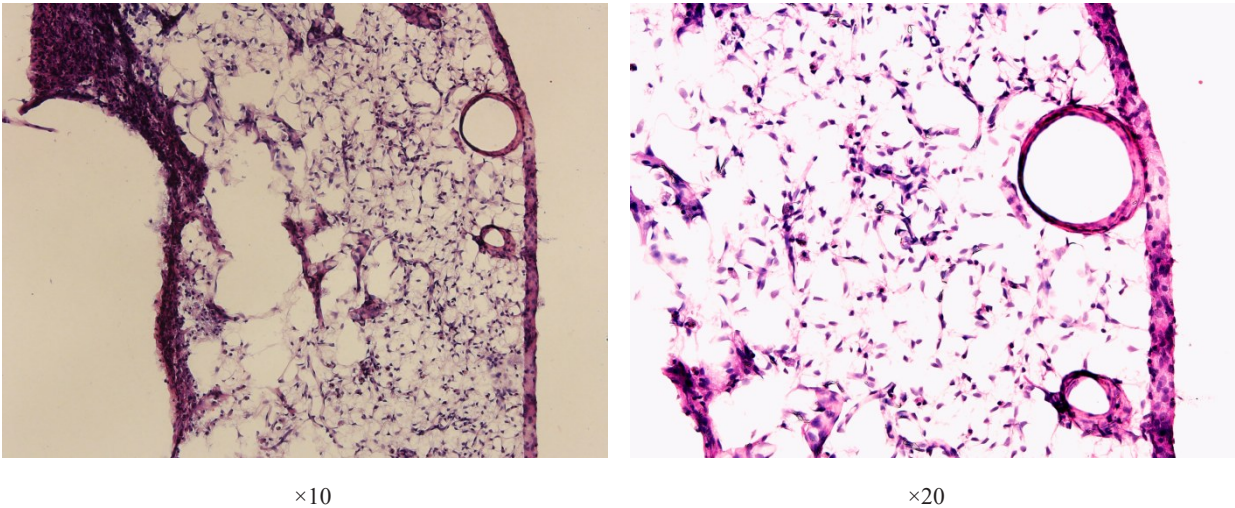


图3 囊腔周边HE染色

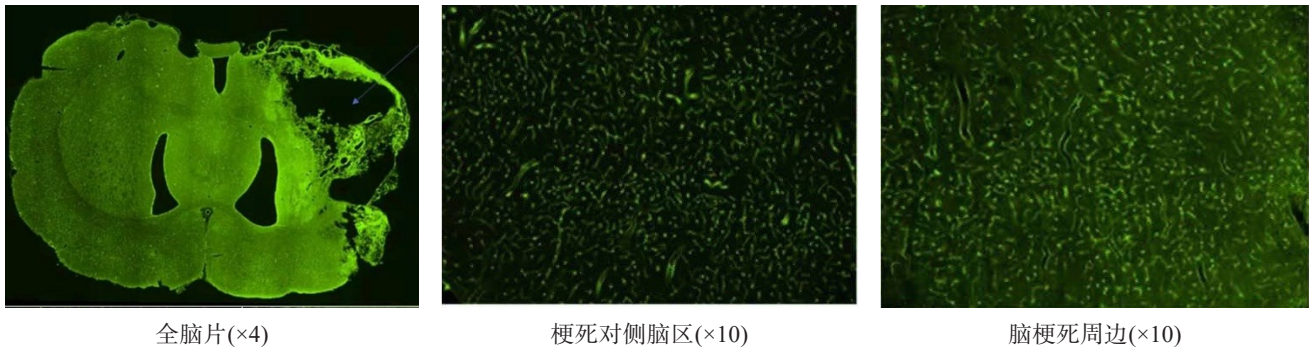


图 4 囊腔周边 Lactin 染色

经黏附分子和胶质细胞黏附分子结合，调节细胞连接，影响轴突生长；在中枢神经系统损伤后其表达增加，并抑制轴突生长。BCAN(短蛋白聚糖)为神经细胞外基质分子，在胶质增生过程中表达增高。PLA2G7(血小板活化因子乙酰水解酶)可明显减轻血小板活化因子和氧化磷脂的炎症介质效应，抑制氧化应激连锁反应，对血管内皮有保护作用。SPARCL1(富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白样蛋白 1)可能抑制肿瘤生成。NELL2(神经上皮生长因子样蛋白 2)可促进神经细胞存活及生长。LGALS3BP(半乳糖凝集素-3 结合蛋白)可促进整合素介导的细胞黏附，可能刺激抗病毒及肿瘤防御。

未发现能促进神经干细胞向神经元分化的相关分子，而促进向胶质增生分化的相关分子较多，另外一些分子，如神经黏蛋白，可能阻碍神经轴突生长。囊腔微环境可能主要诱导神经干细胞向胶质方向分化。

Fold Change up-regulated	
Molecules	Exp. Value
IGSF1	↑47.603
NCAN *1	↑28.046
HP	↑21.772
BCAN *2	↑15.527
PLA2G7 *3	↑12.109
CHGB	↑11.922
APLP1	↑10.930
SPARCL1 *4	↑9.788
NELL2 *5	↑9.730
LGALS3BP *6	↑9.598

图 5 囊腔液/脑脊液质谱分析结果(相对分子倍数变化)

2.7 质谱分析

急性期反应信号通路分析显示参与急性期反应的分子表达减少，急性期反应通路抑制；经典通路分析示抗炎及抗凋亡相关蛋白表达增加。囊腔内液分子重要网络分析示，囊腔内液分子主要涉及神经系统疾

病、细胞聚集与组织形成、组织发育、肿瘤和结缔组织紊乱。见图 6~图 9。

3 讨论

脑梗死后缺血区神经元大量死亡，组织结构破坏，可引起相应的功能障碍^[8-10]；基于神经可塑性的功能代偿往往并不充分，由缺血性损伤诱发的内源性神经再生也极为有限，远不能替代缺血所致的神经元丧失^[11]。因此，脑梗死后功能障碍常持续存在^[1]。

神经干细胞移植可通过调控炎症反应、神经保护及营养、增加突触可塑性、促进内源性神经细胞再生等非细胞替代机制，减少缺血性损伤程度，促进部分神经功能恢复^[12-13]。但受脑内微环境影响，由移植细胞分化而来的成熟神经元数量低^[14]，无法重建坏死区组织结构。寻找脑梗死后适宜移植神经干细胞生长的微环境，对提高移植治疗效果极为重要。

不同移植部位微环境特点各有不同^[12]。在缺血坏死区周围或对侧脑实质内移植，移植细胞向坏死区迁移受限，且由于脑实质结构致密，存在形成假瘤的风险^[15]；通过动静脉系统移植^[16-17]，细胞不易穿过血脑屏障到达梗死部位；通过脑室系统移植，移植细胞可随脑脊液播散，或因脑脊液屏障存在，不易在坏死区大量聚集^[18]。

在缺血坏死区，因急性期组织坏死产生大量炎性细胞和坏死因子，不利于细胞存活，曾被认为是移植效率较低的部位。但脑梗死发生后，受累组织依次经历缺血水肿、炎性渗出、坏死液化等病理变化，最终会在缺血坏死区形成囊腔样结构。囊腔形成的病理过程始于脑血流中断后导致的能量代谢障碍，继而引发一系列瀑式反应，最终导致细胞死亡和组织崩解^[4,19-21]。同时，小胶质细胞被缺血性损伤激活，大量增殖，在损伤部位和缺血半暗带区聚集。外周免疫细

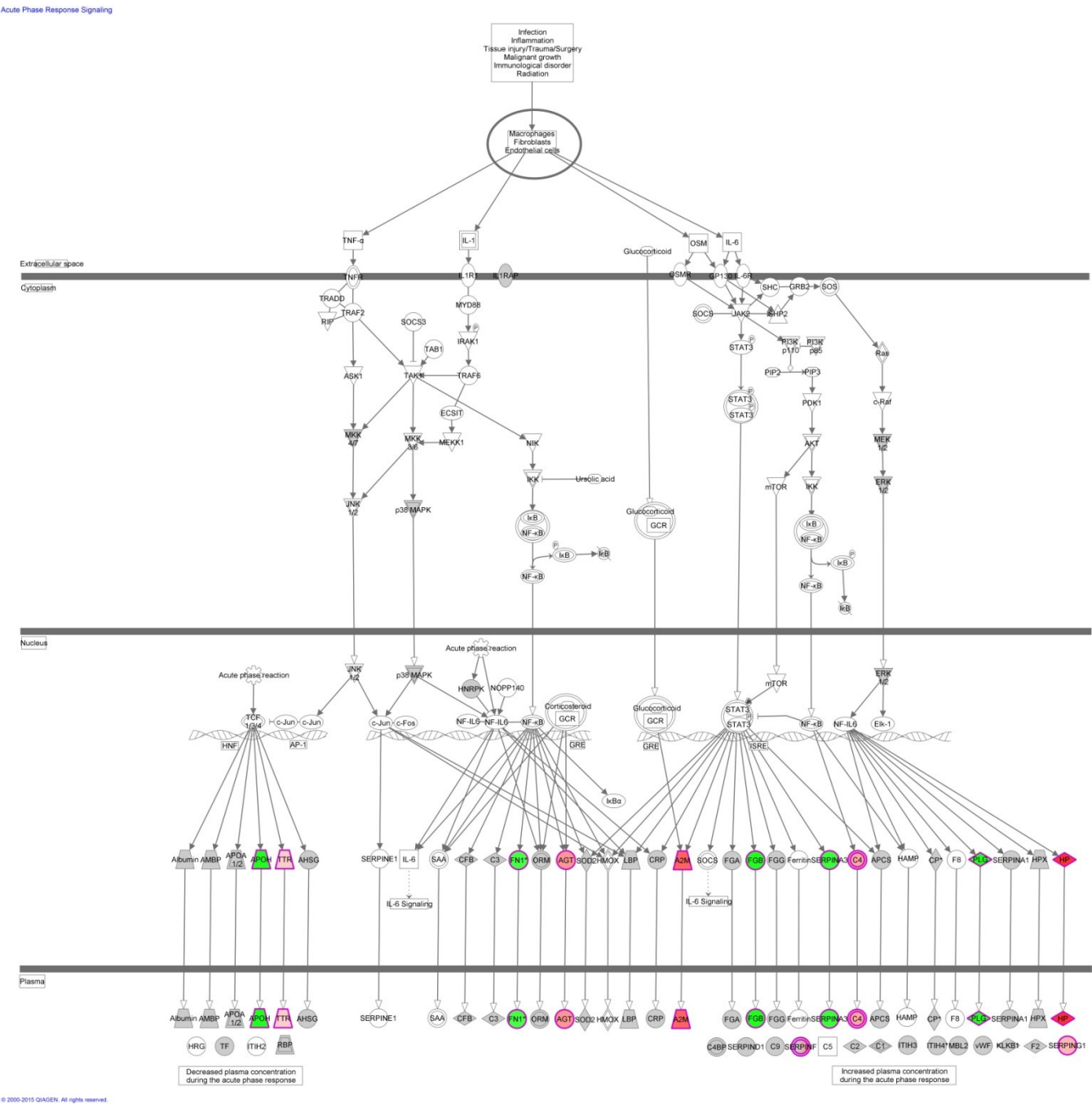
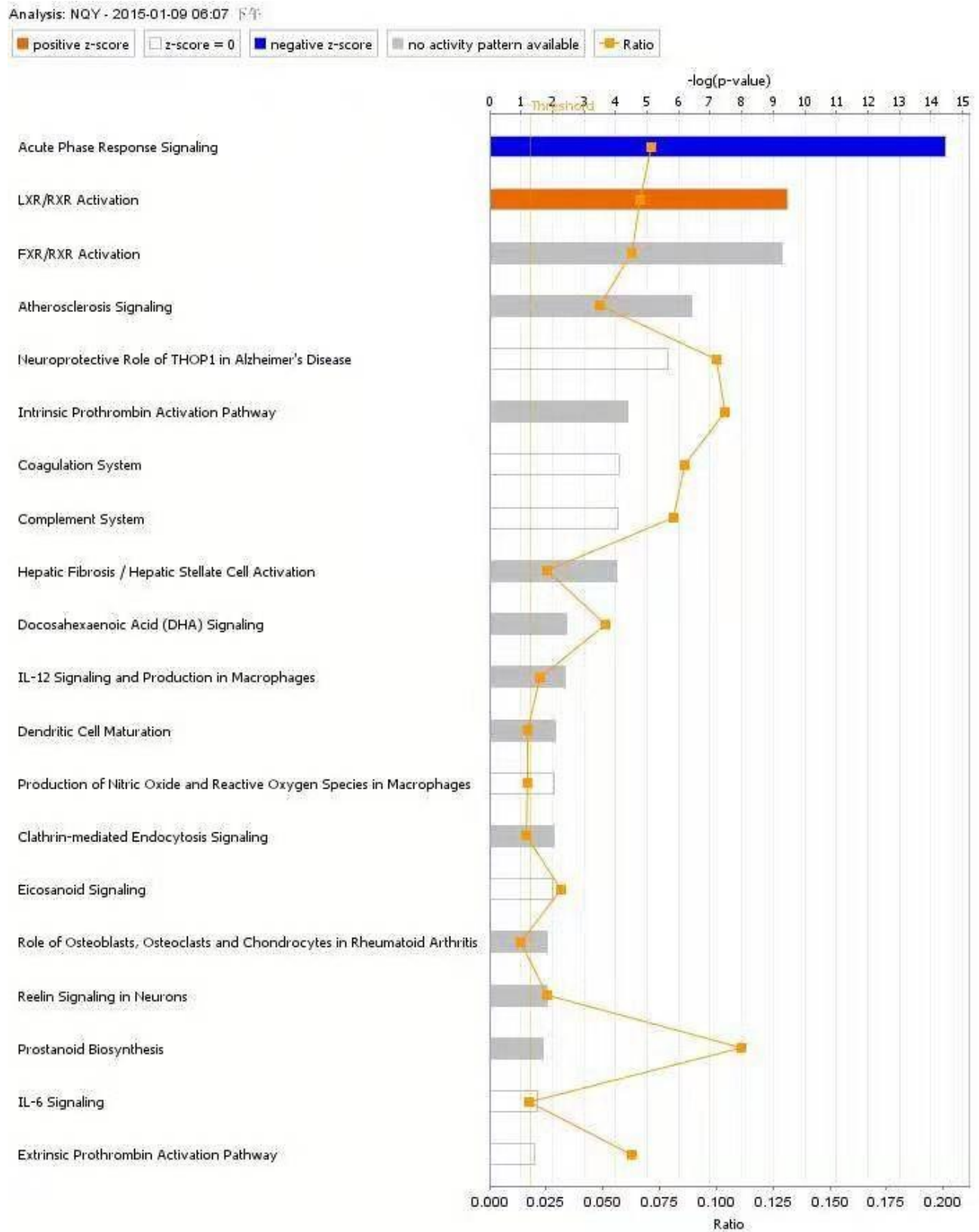


图6 囊腔液质谱分析(急性期反应信号通路)

胞也可通过损伤的血脑屏障渗入梗死区，与小胶质细胞共同介导梗死后免疫反应，吞噬清除坏死组织，最终在缺血坏死区形成囊腔样结构。这一过程可能需要数周时间。本研究显示，脑梗死后3周，梗死区即可形成形态稳定的囊腔，其内充满脑脊液样信号，提示囊腔内主要是液体成分。充裕的液体空间可为移植的神经干细胞提供类似于体外培养的液体环境，有利于细胞集落形成。

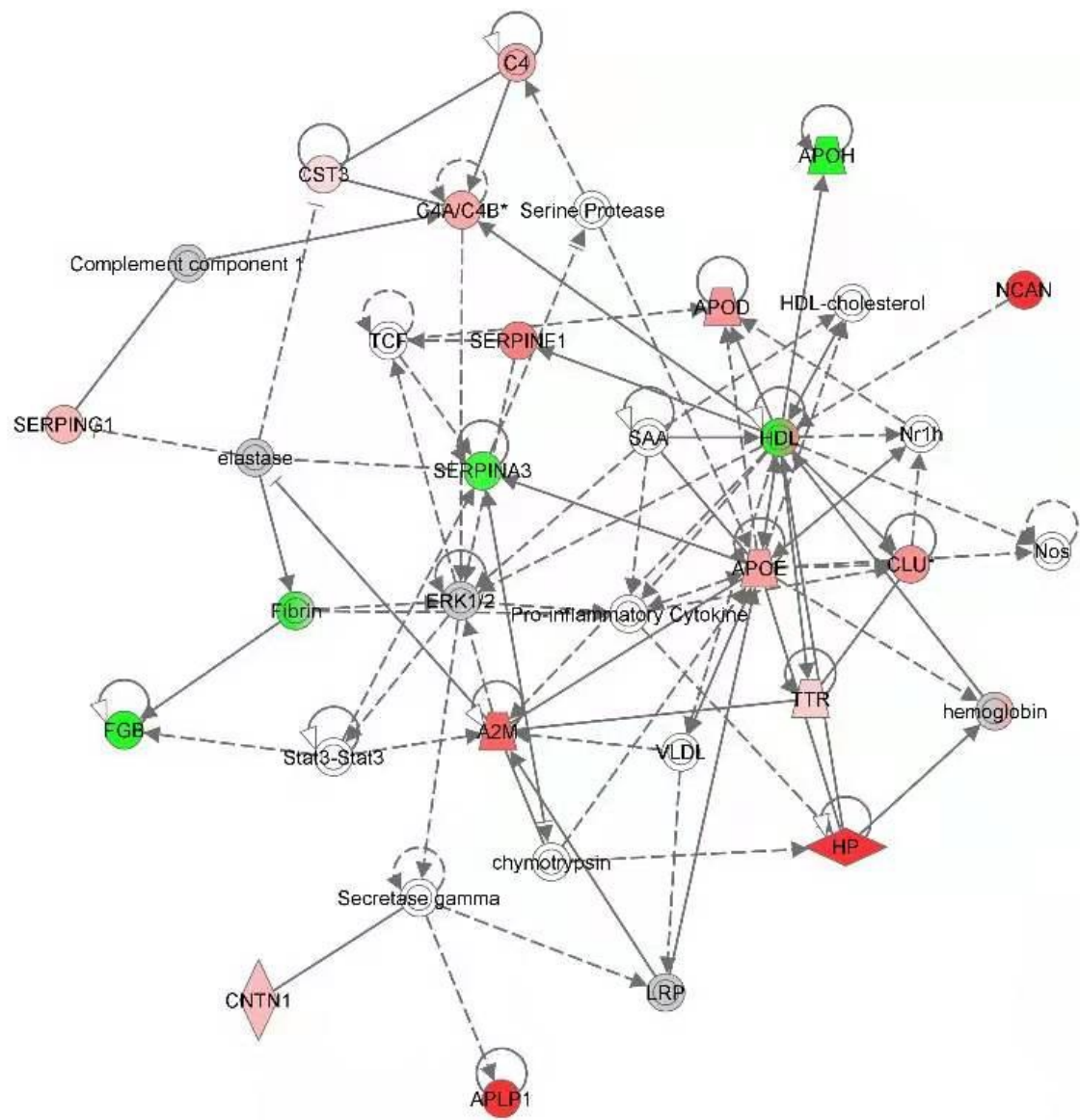
脑梗死急性期，小胶质细胞过度激活(M1表型)，可通过产生活性氧、一氧化氮，分泌大量炎症因子，导致神经细胞损伤，抑制神经干细胞分化。而在囊腔形成的慢性期，小胶质细胞适度激活(M2表型)，产生抗炎细胞因子，分泌神经营养因子，如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和胶质源性神经营养因子(glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF)等，发挥神经保护和神经营养作用，促进



注：蓝色为表达减少,橙色为表达增加

图7 囊腔液质谱分析结果(经典通路分析)

Network 1: NQY - 2015-01-09 06:07 □□ : NQY : NQY - 2015-01-09 06:07 □□



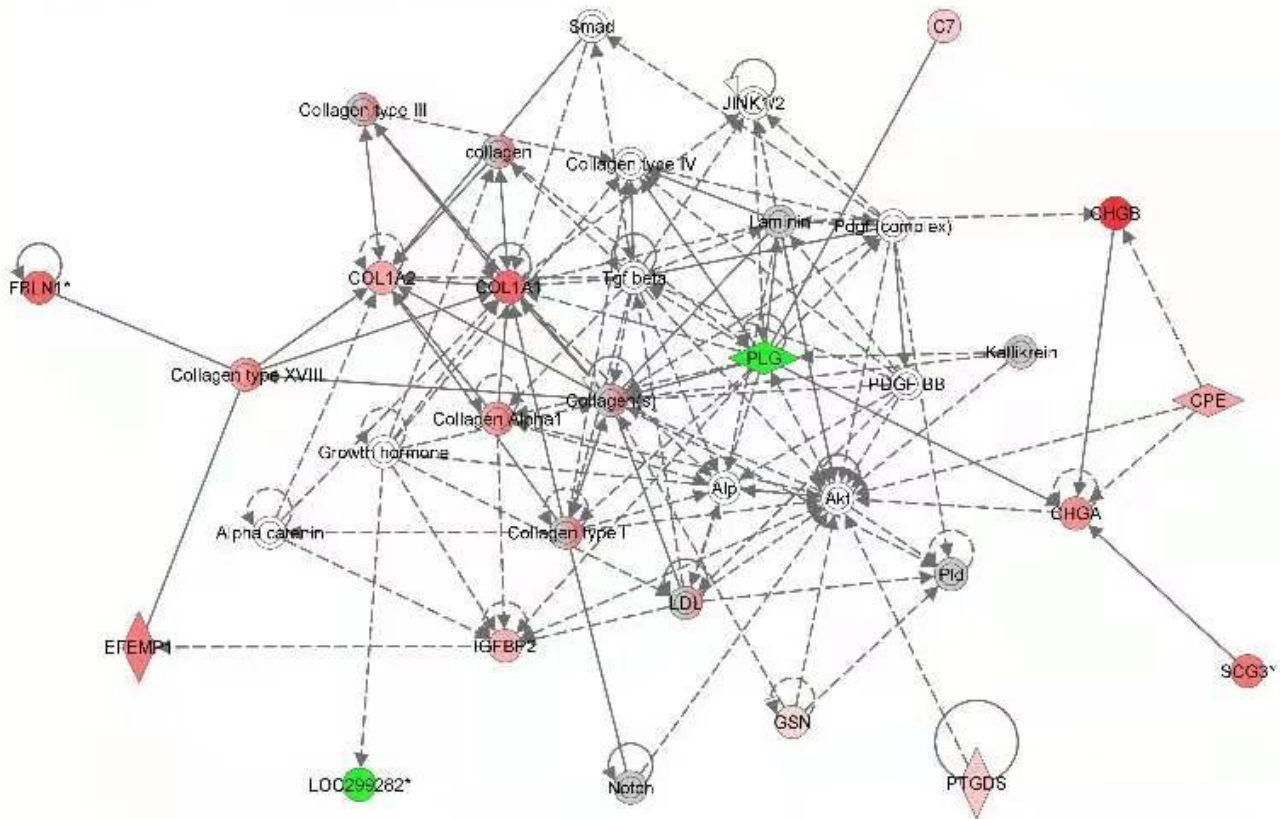
© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

图 8 重要相关网络 1(神经系统疾病、细胞聚集与组织形成、组织发育)

神经前体细胞增殖和神经母细胞迁移^[5,22]。脑梗死后激活后的免疫细胞可能发挥双向调节作用^[5]。本研究显示，脑梗死 3 周后，与脑脊液相比，囊腔内液参与急性炎症反应的蛋白表达减少，抗炎和抗凋亡相关蛋白表达增加，促进神经生长、黏附聚集和基质生成的相关蛋白表达增加，有利于移植神经干细胞存活。但应当注意，尽管囊腔内液对于干细胞移植有促进作用，但可能主要诱导神经干细胞向胶质细胞分化，这可能是目前外源性成熟神经元数低下的主要原因。

充足的血供是移植细胞存活、增殖、分化并产生神经功能的前提。本研究显示，囊腔周边脑组织和软脑膜内均存在大量血管。原因可能在于脑实质与脑膜分属两套供血系统，颈内动脉系统缺血导致脑实质梗死，而脑膜因其血供来源于颈外动脉系统而常常保持完整，且脑膜血管可能因脑组织缺血而发生代偿性扩张^[6,23-24]。此外，在脑梗死周边区域，缺血本身可诱导新生血管生成^[25-26]。脑梗死数小时后，梗死周边胶质细胞、血管内皮细胞等即可上调血管内皮生长因子

Network 2 - NQY - 2015-01-09 06:07 : NQY - NQY - 2015-01-09 06:07



© 2000-2015 QIAGEN. All rights reserved.

图9 重要相关网络2 (肿瘤、神经系统疾病、结缔组织紊乱)

(vascular endothelial growth factor, VEGF)、一氧化氮合酶等促血管因子和其受体表达,促进血管内皮细胞增殖、迁移和血管新生,在梗死后数天即可在梗死灶周边检测到新生血管,此促血管新生作用可持续数周^[27]。血管新生被认为是对脑梗死的代偿性反应,有助于减少脑梗死体积,并促进脑梗死后内源性神经发生和突触重塑,从而促进神经功能恢复。脑梗死后囊腔壁存在基本血液供应,可为贴壁的移植细胞提供养分支持。囊腔的相对封闭性可能允许对其进行外源性调控,如利用囊腔置管和液体置换调控囊腔微环境。可以进一步研究。

本研究从囊腔内液分子成分和血供两方面评价了囊腔微环境对神经干细胞移植的可能影响,但还存在一些局限性。首先因实验动物体型限制,抽取囊腔液体含量较少(每只大鼠 25~50 μ l),没有进行体外干细胞培养实验,不能直接判定囊腔内环境的影响。针对囊腔内缺乏细胞支架的缺点,可考虑利用聚乳酸-羟基乙酸共聚作为支架,促进移植的干细胞修复缺损组

织结构^[28-29]。

综上所述,脑梗死慢性期形成的囊腔作为一个相对封闭的液体空间,具备神经干细胞移植的基本条件,适宜移植细胞存活。但微环境中有关分子成分多促进神经干细胞向胶质细胞分化,还需要外源性手段干预,使其有利于移植细胞向神经元分化。

[参考文献]

[1] Katan M, Luft A. Global burden of stroke [J]. Semin Neurol, 2018, 38(2): 208-211.
[2] Guan T J, Ma J, Li M, et al. Rapid transitions in the epidemiology of stroke and its risk factors in China from 2002 to 2013 [J]. Neurology, 2017, 89(1): 53-61.
[3] Stemple D L, Anderson D J. Isolation of a stem-cell for neurons and glia from the mammalian neural crest [J]. Cell, 1992, 71(6): 973-985.
[4] Xing C, Arai K, Lo E H, et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke [J]. Int J Stroke, 2012, 7(5): 378-385.
[5] Wang X, Xuan W, Zhu Z Y, et al. The evolving role of neuro-

- immune interaction in brain repair after cerebral ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(12): 1100-1114.
- [6] Morris D C, Yeich T, Khalighi M M, et al. Microvascular structure after embolic focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Brain Res*, 2003, 972(1-2): 31-37.
- [7] Prakash R, Carmichael S T. Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury [J]. *Curr Opin Neurol*, 2015, 28(6): 556-564.
- [8] Hu G C, Chen Y M. Post-stroke dementia: epidemiology, mechanisms and management [J]. *Int J Gerontol*, 2017, 11(4): 210-214.
- [9] Kuo C L, Hu G C. Post-stroke spasticity: a review of epidemiology, pathophysiology, and treatments [J]. *Int J Gerontol*, 2018, 12(4): 280-284.
- [10] Thiel A, Zumbansen A. The pathophysiology of post-stroke aphasia: a network approach [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2016, 34(4): 507-518.
- [11] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9): 963-970.
- [12] Liao L Y, Lau B W M, Sanchez-Vidana D I, et al. Exogenous neural stem cell transplantation for cerebral ischemia [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(7): 1129-1137.
- [13] Chen L K, Qiu R, Li L S, et al. The role of exogenous neural stem cells transplantation in cerebral ischemic stroke [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, 10(11): 3219-3230.
- [14] de Feo D, Merlini A, Laterza C, et al. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection [J]. *Curr Opin Neurol*, 2012, 25(3): 322-333.
- [15] Huang H, Qian K, Han X, et al. Intraparenchymal neural stem/progenitor cell transplantation for ischemic stroke animals: a meta-analysis and systematic review [J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018: 1-10.
- [16] Wagner D, Schwarz S, Schmidt U, et al. Intravenous versus intrastriatal transplantation of human fetal neural stem cells in experimental stroke—a comparison of lesion development and sensorimotoric benefits [J]. *Cytotherapy*, 2006, 1: 8.
- [17] Pendharkar A V, Chua J Y, Wang N, et al. Intraarterial transplantation results in superior delivery of neural stem cells to the ischemic brain in contrast to intravenous infusion [J]. *Stroke*, 2010, 41(4): E300.
- [18] Wang Y, Gang X K, Liu Q, et al. Transplantation of X-box-binding protein-1 gene-modified neural stem cells in the lateral ventricle of brain ischemia rats [J]. *Neural Regen Res*, 2011, 6(1): 6-11.
- [19] Edwards D N, Bix G J. Roles of blood-brain barrier integrins and extracellular matrix in stroke [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(2): C252-C263.
- [20] Gautam J, Yao Y. Roles of pericytes in stroke pathogenesis [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(12): 1798-1808.
- [21] O'Donnell M E, Yuan J X. Pathophysiology of stroke: the many and varied contributions of brain microvasculature [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(3): C341-C342.
- [22] Uzdensky A, Demyanenko S, Fedorenko G, et al. Protein profile and morphological alterations in penumbra after focal photothrombotic infarction in the rat cerebral cortex [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(6): 4172-4188.
- [23] Beck H, Plate K H. Angiogenesis after cerebral ischemia [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(5): 481-496.
- [24] Ginsberg M D. The cerebral collateral circulation: relevance to pathophysiology and treatment of stroke [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 280-292.
- [25] Chopp M, Zhang Z G, Jiang Q. Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke [J]. *Stroke*, 2007, 38(2Suppl): 827-831.
- [26] Seto S W, Chang D, Jenkins A, et al. Angiogenesis in ischemic stroke and angiogenic effects of Chinese herbal medicine [J]. *J Clin Med*, 2016, 5(6): 56.
- [27] Geiseler S J, Morland C. The Janus face of VEGF in stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1362.
- [28] Bible E, Chau D Y, Alexander M R, et al. The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(16): 2985-2994.
- [29] Bible E, Qutachi O, Chau D Y S, et al. Neo-vascularization of the stroke cavity by implantation of human neural stem cells on vegf-releasing plga microparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(30): 7435-7446.

(收稿日期:2019-04-22 修回日期:2019-07-12)