

翟羽佳,穆寒露,何蓉蓉,等. 光照血栓中风模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 135-141.
Zhai YJ, Mu HL, He RR, et al. Advances in research of photothrombotic stroke models [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 135-141.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.022

光照血栓中风模型的研究进展

翟羽佳^{1,2,3}, 穆寒露^{2,3}, 何蓉蓉^{2,3}, 李怡芳^{2,3*}

(1.广州市妇女儿童医疗中心药学部,广州 510623; 2.暨南大学药学院,广州 510632;
3.广东省疾病易感性及中医药研发工程技术研究中心,广州 510632)

【摘要】 中风具有高致死率、致残率及复发率的特点,一直是人类未能攻克疾病。中风主要分为出血性中风和缺血性中风,后者占有中风事件的百分之八十。科学家们一直致力于开发有效的预防治疗中风的药物,方便实用的模型是病理机制研究和药物的筛选过程中非常重要的支撑和保障。在众多缺血性中风模型中,光照血栓模型以操作简便且创伤性小、不需要开颅手术、死亡率低。等独特的优势得到了越来越多的认可。该模型可通过调整激光照射大脑区域内的位置来控制血栓形成的部位,通过调整造模染料的剂量及激光照射的强度和时长来控制缺血灶形成的位置,适合于缺血性中风过程中神经退行性病变,神经保护和神经再生的细胞和分子机制研究及抗中风药物的开发。本文对光照血栓性中风模型的原理、优缺点以及在药物开发中的应用进行了叙述。

【关键词】 光照血栓;光化学血栓;中风模型;中风(脑卒中)
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0135-07

Advances in research of photothrombotic stroke models

ZHAI Yujia^{1, 2, 3}, MU Hanlu^{2, 3}, HE Rongrong^{2, 3}, LI Yifang^{2, 3*}

(1. Department of Pharmacy, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, 510623, China.
2. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632. 3. Guangdong Engineering Research
Center of Chinese Medicine & Disease Susceptibility, Guangzhou 510632)

【Abstract】 Stroke is characterized by high mortality, disability, and recurrence rate, and is a disease with unsatisfactory therapies. Hemorrhage and ischemic strokes are the two main types of stroke, with the latter accounting for 80% of all cases. Research has been conducted on the development of effective drugs to prevent and treat stroke, and the establishment of a convenient and practical model is an important part of pathologic mechanism research and the drug screening process. Among ischemic stroke models, the photothrombotic stroke model is increasingly used because of its unique advantages such as its simple operation, very low mortality rate, no requirement for craniotomy, and the fact that it is less traumatic than other models. It can adjust the position of the region of the brain where the laser light strikes to control the location of blood clots, change the dosage of the photosensitizing dye, and the intensity and time of laser irradiation to affect the size of focal ischemic formation. It is also suitable for research into the cellular and molecular mechanisms of neurodegeneration, neuroprotection, and neurogenesis during ischemic stroke, and the development of anti-stroke agents. This paper summarizes the mechanisms, advantages, and disadvantages of the photothrombotic stroke model and its applications in drug development.

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81573675);广东省自然科学基金(2017A030306004)。
【作者简介】 翟羽佳(1987—),男,博士,专业:中药药理学,研究方向:神经药理学。E-mail: yuz007@stu2014.jnu.edu.cn
【通信作者】 李怡芳(1985—),女,副教授,博士生导师,研究方向:免疫与神经药理学。E-mail: liyifang706@jnu.edu.cn

【Keywords】 photothrombotic; photochemical; stroke model; stroke

中风又称为脑卒中,是一种影响大脑内部血管和神经的疾病。全球每年约有 1500 万人中风,500 万人死于中风^[1]。中风主要分为出血性中风和缺血性中风,一般缺血性中风影响大脑和大脑内的动脉血管,占有中风事件的 80%。如果与其他脑血管疾病分开考虑,中风是仅次于心脏病、癌症、慢性下呼吸道疾病和意外伤害的第五大致死因素。缺血性中风俗称脑梗死,一般是由血栓阻塞血管导致的。血管阻塞后致使血流无法通过导致组织无法得到氧气及糖分等营养物质,ATP 产生紊乱,金属离子通道打开引起钠、钾、钙等离子流动紊乱,级联兴奋性氨基酸的释放、自由基的产生、线粒体的损伤等进而引起神经细胞的死亡。血脑屏障的破坏导致外周物质进入脑内而加剧损伤过程,其中又有炎症反应的参与。近些年来,研究人员利用实验模型对几千个化合物进行了研究,进行了数以百计的临床试验。即使有些化合物在体外实验及动物体内实验中显示出了抗中风的效果,但在临床试验中效果并不理想。迄今为止,组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, tPA)是迄今为止唯一被美国 FDA 批准作为缺血性中风的临床治疗用药。然而, tPA 做为一种溶栓剂在实际使用中受到治疗窗的限制,临床上只有少数患者可以接受 tPA 的治疗^[2-3]。同时,在中风的科学研究中,合适的中风研究模型对于病理机制和药物研发是非常重要的支撑和保障,目前最常用的缺血中风模型有栓线法、栓子注射法及光照血栓法。本文阐述了光照血栓中风模型的特点及应用,并与其他中风模型进行了对比(表 1)。

1 常见的几种脑缺血中风模型

目前,许多脑缺血中风动物模型被用于研究脑缺血损伤的细胞和分子机制以及抗中风药物的研发,其中包括神经保护剂的研发及改善血脑屏障通透性药物的研发。啮齿类动物中风模型被应用的最为广泛,不同的啮齿类动物中风模型只能部分地从不同方面模拟人类的中风过程,但不能模拟全部类型。常用的局灶性脑缺血动物模型包括栓子注射法、线栓法、光照血栓法(光化学法)等^[4]。栓子注射法局灶性脑缺血血栓栓塞模型是从颈内动脉注射外源性凝血酶凝块或合成凝血酶阻塞微球体(300 ~ 400 μm)或微球(< 50 μm)。此方法可以较好的模拟人类的中风过程,适用于对中风生理病理过程的研究和溶栓药物/神经保护药物的开发,但是模型对于中风的区域位置、大小和缺血持续时间等很难控制,重复性较差,造作过程中需要麻醉^[4]。

栓线法是制造局灶性缺血中风模型的常用方法,用来制造永久性大脑中动脉阻塞(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO),或者暂时性大脑中动脉阻塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)及缺血再灌注。在 MCAO 模型中,通常经颈外动脉缺口插入圆形硅胶包覆尖端的尼龙单丝线直到颈内动脉来制造单侧 MCAO 模型^[5]。MCAO 是通过在颅骨上安装激光多普勒血流仪探头,用于监测阻塞开始时皮质血流进而确定手术的有效性。栓子插入后可以一直放在脑中,形成的是 pMCAO 模型。对于 tMCAO 模型,栓子停留

表 1 几种缺血性中风模型的比较

Table 1 Comparison of several ischemic stroke models			
	栓线法模型 Thread ligation model	栓子注射法模型 Thromboembolic model	光照血栓模型 Photothrombotic model
优点 Advantages	较接近人类的中风 重复性好 适用于神经保护剂及血脑屏障 保护剂的研究可以制造及 控制缺血再灌注	最接近人类中风 可以用于神经保护药物或/ 和溶栓药物的研究	低创伤、低死亡率、重复性好且长期稳定 操作简单 血栓位置、大小可控 麻醉时间短 适用于神经保护剂
不足 Shortages	不可以用于溶栓药物研究 死亡率较高 有脑出血风险 手术技能要求高 需要麻醉时间长	栓子大小及位置不可控、重复性较差 死亡率较高 有脑出血的风险 需要麻醉时间较长	与临床实际情况出入较大 引起非典型性血管源性水肿 无或极小的缺血半暗带 损伤程度较轻

时间一般是 30~120 min,然后拔出栓子形成缺血后再灌注。MCAO 模型可以形成较大的缺血面积并且有缺血半暗带,可以很好的模拟人类的中风过程,重复性也较好^[6-7]。MCAO 模型在缺血性中风中的神经再生、炎症过程及血脑屏障损伤等的细胞分子机制研究和抗中风药物的开发中得到了广泛应用^[8]。但是,此模型对操作技术要求很高,这一点严重影响到了模型的成功率及动物术后的死亡率。同时,此模型在手术过程中需要大量的麻醉剂及较长的麻醉时间,还容易产生血管破裂和出血等。此外,此模型不适合溶栓药物的开发研究^[4]。

2 光照血栓模型

光照血栓模型又叫做光化学血栓模型,1985 年 Watson 等^[9]人将其作为大鼠局灶性脑梗死的一种技术,后来很多研究将其拓展应用于小鼠^[10-12]。此模型主要原理是静脉注射光敏感性染料,如孟加拉玫瑰染料之后在颅骨局部照射引起的光化学反应。光敏感性染料是水溶性的,并且不能透过血脑屏障,因此只能在血液中存在附着于内皮,结合血小板等血液细胞(图 1)。激光照射诱导孟加拉玫瑰染料局部活化,导致脑部小血管单线态氧等自由基形成,活性氧对血管内皮细胞造成的细胞膜氧化损伤导致内皮功能紊乱,使血小板聚集进而形成血栓,阻塞微小血管导致局部血栓形成,进一步造成大脑缺血和神经细胞的死亡及血脑屏障的开放^[13]。与其他脑中风动物模型相比,此模型相对制造简单,因为其不需要机械性操作脑血管或脑实质。病灶大小和位置可以通过改变辐照强度、曝光时间、光束位置及染料浓度来调节。除此之外,光照血栓性脑梗死可以长期存在,因此适合于脑中风的长期研究^[14-15]。

2.1 光照血栓模型的病理机制

光照血栓的病理过程与其它模型有共同点,也有本身的独特性。在激光照射后与血液内染料接

触,单态氧及自由基的产生可以迅速的导致血小板的凝集和纤维蛋白凝块的生成而形成血栓^[14, 16]。血管内血栓阻塞了血液的流动,导致氧气和葡萄糖的缺乏,进而是氧化磷酸化和 ATP 生成紊乱^[17],导致细胞离子通道的异常开放,如 Na^+ 的内流和 K^+ 的外流,致使细胞膜内外渗透压改变,诱导细胞水肿。同时谷氨酸大量释放与 NMDA 受体结合后级联下游效应。 Ca^{2+} 释放内流到细胞内,与线粒体和内质网结合,进一步的产生 ROS(包括 O^{2-} 、 ONOO^- 、 OH^- 等),开启程序性细胞死亡过程^[18]。此外,ATP 的匮乏、 Ca^{2+} 的内流和 ROS 都可以使细胞膜损伤,破坏细胞的构架,除了导致细胞死亡之外,还会影响到血脑屏障的稳定性^[19-21]。血脑屏障作为大脑的屏障,一旦受到破坏则使正常生理状态下大脑中不存在的物质进入大脑,加剧病理过程^[22]。 Ca^{2+} 可以激活内切核酸酶,与产生的 ROS 都可以导致细胞内 DNA 损伤^[23]。同时, Ca^{2+} 诱导的钙蛋白酶和组织蛋白酶的上调使细胞内多种蛋白降解,导致神经细胞死亡^[24-25]。ROS 可以激活 JNK/Bcl-2, NF- κ B 等信号导致细胞凋亡和坏死^[26-27]。另外,ROS 也可以引起铁凋亡^[28]。多种死亡形式可能同时发生在神经元、胶质细胞和毛细血管内皮细胞中。病理过程中炎症反应的参与,对于神经细胞的死亡及血脑屏障的破坏也有一定的促进作用^[29]。

光照血栓可以直接导致血管内皮细胞的损伤。微血管内皮细胞作为血脑屏障的骨架架构,损伤后直接导致血脑屏障通透性的增加,诱导细胞外水肿的形成^[30]。所以在光照血栓模型中,细胞水肿和血管源性细胞外水肿几乎同时在早期发生,这一点与 MCAO 模型及临床情况有所差别。图 2 为光照血栓中风损伤机制示意图。

2.2 光照血栓模型的优点

光照血栓性中风的主要特点是大脑小血管的阻塞。此模型的优势非常明显,主要有以下几点:第一,光照血栓可以预设特定的区域。与临床中

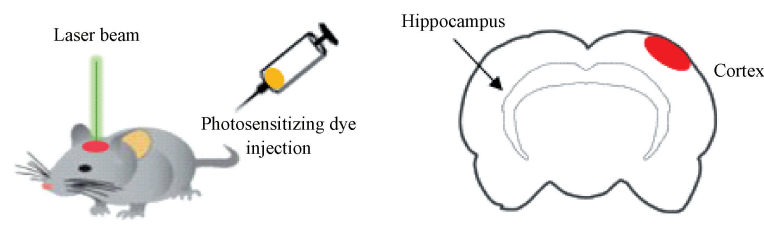


图 1 光照血栓中风模型示意图

Figure 1 Schematic diagram of the induction of photothrombotic stroke

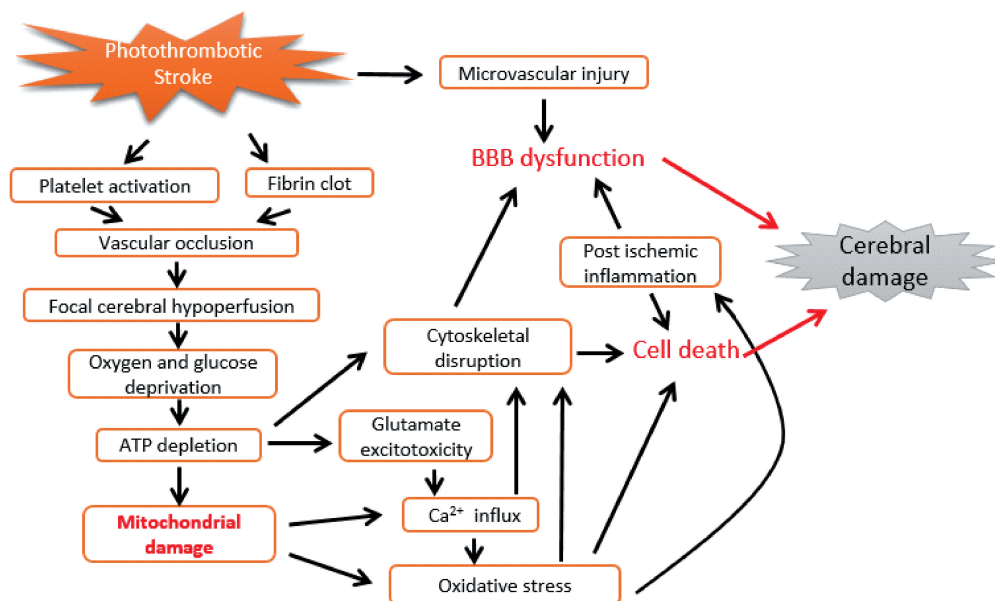


图2 光照血栓中风损伤机制示意图

Figure 2 Schematic diagram of the damaging mechanism of photothrombotic stroke

通常发生的脑中动脉阻塞中风不同,光照血栓形成在暴露于激光照射的区域内,在血管内的血液中形成栓子,同时损伤浅表血管及阻滞血液流动。因此调节激光的照射位置、强度、照射时间及血液中染料的剂量,可以对血栓及病灶部位、大小进行相应的控制^[12, 31]。第二,此模型的神经损伤分子机制与永久性脑中中风大体相似,都可以在脑中血管阻塞后引起糖氧剥夺,进而引起一系列反应导致损伤。因此适用于病理过程、神经保护、神经再生的细胞和分子机制研究,以及预防治疗中风药物的开发研究^[32-38]。第三,光照血栓模型的创伤性相对小,不需要开颅手术而只是需要打开被照射部位的皮肤及使颅骨变薄,因此操作简单。并且模型动物的死亡率低,通常低于 10%,远低于其它中风模型^[39]。第四,许多研究证明此模型所诱导的中风稳定性高、重复性好,相关神经功能障碍时间持续久,对于长期的实验观察验证具有优势^[31, 39]。第五,与其它模型相比,对血压和血管结构的遗传变异具有独立性,并且此模型可以凝集血小板,因此可以用于血小板的血栓相关炎症和凋亡的研究^[40]。第六,此模型使用的麻醉时间相对较短,可以尽可能少的减少麻醉剂对于实验结果的干扰^[4, 10]。

2.3 光照血栓模型的缺点

首先,光照血栓性梗死不仅仅阻塞血管,并且会严重损伤血管壁,在早期引起非典型血管源性水肿。这一点与实际临床中的中风发病过程有着较

大的差异,不能很好的模拟人类中风水肿生成情况。光照血栓可以同时引起细胞毒性诱导的细胞内水肿和细胞外的血管性水肿,是一个双重水肿几乎同时发生的过程。然而,临床中病人中风的特点是细胞毒性诱导的细胞内水肿首先发生,接下来几个小时逐渐生成血管性水肿^[41]。其次,与其它局灶性中风模型相比,光照血栓性的另一个缺点是由于细胞坏死和组织水肿的程度较重,导致此模型的局部缺血半暗带狭窄或缺失^[17, 30, 42],并且只有少量的或者观察不到局部侧支血流及缺血再灌注过程^[42]。由于逆转缺血半暗带是临床上神经保护治疗的主要目标之一,所以此模型在这一方面的应用不是十分理想。再次,与其它中风模型比较由于皮质部位病灶损伤区相对较小,动物的运动感觉功能损伤也相对较轻^[39]。另外,在临床实际情况中,典型的局灶性缺血性中风涉及大脑中动脉中特定节段的血栓阻塞,而不是在大脑皮质中众多小动脉和微血管中的血栓阻塞^[4]。

3 光照血栓中风模型在药物开发中的应用

无论是预防性给药还是造模后治疗性给药,已有许多针对缺血性中风的药物利用光照血栓模型进行了研究及验证。有些研究通过此模型寻找抑制钙通道、谷氨酸兴奋性毒性和氧化应激的化合物进而达到神经保护的目的。Lorrio 等^[43]人通过研究发现,化合物 ITH33/IQM9.21 可以通过减少钙超

载,保护线粒体并且具有抗氧化的作用而改善缺血性中风。Aerden 等^[34]发现地西洋做为钙离子通道阻滞剂,可以有效地减小大鼠光照血栓模型的脑梗死面积。有些研究通过一些相关酶或者受体的效应探讨一些药物的药效及作用机制^[44]。López-Valdés 等^[50]认为美金刚可以拮抗谷氨酸受体,起到改善中风的作用。Park 等^[38]发现二甲胺四环素强力霉素可以再光照血栓模型中抑制金属蛋白酶 9 (MMP-9),而 MMP-9 与紧密连接蛋白的调节有着重要的联系,影响血脑屏障。Wang 等^[45]发现烟酰胺在可以通过调节 NAD⁺/BDNF/TrkB 通路,减小光照血栓中风小鼠的脑缺血面积及改善行为学功能。Yan 等^[51]发现三七皂苷 Rb1 可以调节 Akt/mTOR/PTEN 通路改善光照血栓大鼠的中风症状。表 2 列举了部分利用光照血栓模型进行研究的药物。

4 结语

大脑小血管阻塞是光照血栓性中风模型的模式特点。与其它中风模型相比,其优势包括可以调整激光照射在特定的大脑区域内及控制激光照射强度和照射时间、控制血栓形成的部位和大小、创伤性小、操作简单并且动物的死亡率低。另外,该模型的中风相关神经功能障碍时间持续久并且稳

定,具有重复性好,稳定性高的特点。光照血栓性中风模型也有着一些劣势,例如脑水肿的形成与临床实际情况不符、缺血半暗带的形成面积很小或者几乎没有、神经功能的损伤相对其它模型轻微。综上所述,光照血栓性中风模型在缺血性中风的神经保护、神经再生的细胞和分子机制研究及寻找治疗中风的潜在药物研究中可以发挥一定的模型支撑作用。除此以外,有研究者利用此模型研究“心脑血管交互作用”,发现小鼠在中风后免疫细胞入侵心脏,导致了慢性心功能不全的症状出现^[61];也有研究报道光照血栓法还可以应用于心肌梗死及三叉神经痛等模型的建立^[62-63]。所以,尽管光照血栓模型有缺点和不足,但是其应用的优势更加的显著。在未来的应用中除了可以对化合物进行应用及研究,还可以应用于具有神经保护作用的具有抗中风潜力的中药及复方制剂的研究。作为有效的模型,除了应用于中风疾病模型外,也可以拓展应用于心血管疾病的缺血模型、肝脏缺血模型、肾脏缺血模型等。光照血栓模型可以在未来相应的机制研究和药物开发研究中提供有力的模型支撑。

参考文献:

[1] Macrez R, Ali C, Toutirais O, et al. Stroke and the immune

表 2 通过光照血栓模型研究的具有抗中风潜力的代表性药物
Table 2 Some representative anti-stroke drugs tested through photothrombotic stroke models

药物名称 Drugs	作用机制 Mechanisms	参考文献 References
ITH33/QM9. 21	抗氧化,保护线粒体,影响钙离子内流	Lorrio 等 ^[43]
地西洋	阻滞钙离子	Aerden 等 ^[34]
2,2'-dipyridyl	铁离子螯合剂,减少 ROS 产生,减少细胞凋亡	Demougeout 等 ^[47] , Hoecke 等 ^[48]
胱氨酸	抑制转谷氨酰胺酶	Li 等 ^[49]
二甲胺四环素强力霉素	抑制基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)	Park 等 ^[38]
美金刚	拮抗谷氨酸受体	López-Valdés 等 ^[50]
烟酰胺	调节 NAD ⁺ /BDNF/TrkB 通路	Wang 等 ^[46]
三七皂苷 Rb1	调节 Akt/ mTOR/PTEN 通路	Yan 等 ^[51]
纤维素酸	调节 Bcl-2/Bax	Liu 等 ^[52]
聚乙二醇化胰岛素样生长因子	促进神经再生	Parker 等 ^[53]
补体肽 C3a	调节神经可塑性	Stokowska 等 ^[54]
SR141716 A	激活 5HT1A 受体	Reichenbach 等 ^[55]
中国钩藤	抑制 TJs 及 MMP-9	Seo 等 ^[56]
Perlecan domain V	促进神经再生	Bix 等 ^[57]
贝普地尔	降低钙离子浓度	Lipsanen 等 ^[58]
K-134	抑制血小板聚集	Yoshida 等 ^[44]
胞二磷胆碱	促进神经再生	Diederich 等 ^[47]
阿魏酸钠/正丁烷/干细胞	调节 ERK1/2, Notch 及 AKT/mTOR 通路	Zhao 等 ^[59]
生长激素	调节 IGF-1, VEGF, SYN-1, MBP 等	Ong 等 ^[60]

- system; from pathophysiology to new therapeutic strategies [J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(5): 471-480.
- [2] Chiu D, Krieger D, Villar-Cordova C, et al. Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 1998, 29(1): 18-22.
 - [3] Saver JL, Fonarow GC, Smith EE, et al. Time to treatment with intravenous tissue plasminogen activator and outcome from acute ischemic stroke [J]. *JAMA*, 2013, 309(23): 2480-2488.
 - [4] Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose [J]. *NeuroRx*, 2005, 2(3): 396-409.
 - [5] Zhang T, Gu JB, Wu LM, et al. Neuroprotective and axonal outgrowth-promoting effects of tetramethylpyrazine nitron in chronic cerebral hypoperfusion rats and primary hippocampal neurons exposed to hypoxia [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 118:137-147.
 - [6] Chen YX, Bodhankar S, Murphy SJ, et al. Intraatrial B-cell administration limits infarct size after stroke in B-cell deficient mice [J]. *Metab Brain Dis*, 2012, 27(4): 487-493.
 - [7] 张宇燕, 万海同, 来丽丽, 等. 益气通络解毒胶囊抗脑缺血性再灌注损伤的作用及其机制 [J]. *药学报*, 2012, 47(9): 1153-1158.
 - [8] Sun K, Fan J, Han J. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 8-24.
 - [9] Watson BD, Dietrich WD, Busto R, et al. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis [J]. *Ann Neurol*, 1985, 17(5): 497-504.
 - [10] Seto A, Taylor S, Trudeau D, et al. Induction of ischemic stroke in awake freely moving mice reveals that isoflurane anesthesia can mask the benefits of a neuroprotection therapy [J]. *Front Neuroenergetics*, 2014, 6:1.
 - [11] Lee JK, Park MS, Kim YS, et al. Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model [J]. *Surg Neurol*, 2007, 67(6): 620-625.
 - [12] Labat-gest V, Tomasi S. Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies [J]. *J Vis Exp*, 2013, 76: e50370-e50370.
 - [13] Ishikawa M, Sekizuka E, Oshio C, et al. Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 194(1): 59-69.
 - [14] Uzdensky AB. Photothrombotic stroke as a model of ischemic stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(5): 437-451.
 - [15] 孙居仙, 张申. 光化学法啮齿类动物脑缺血模型分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(8): 58-61.
 - [16] Mami I, Eiichi S, Chikara O, et al. Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 194(1): 59-69.
 - [17] Hilger T, Blunk JA, Hoehn M, et al. Characterization of a novel chronic photothrombotic ring stroke model in rats by magnetic resonance imaging, biochemical imaging, and histology [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(7): 789-797.
 - [18] Levraut J, Iwase H, Shao ZH, et al. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 284(2): H549-H558.
 - [19] Tsai FC, Kuo GH, Chang SW, et al. Ca^{2+} Signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 409245.
 - [20] Fei Z, Zhang X, Wang XF, et al. Neuronal free Ca^{2+} and BBB permeability and ultrastructure in head injury with secondary insult [J]. *J Clin Neurosci*, 2001, 8(6): 561-563.
 - [21] Pun P B, Lu J, Moomhala S. Involvement of ROS in BBB dysfunction [J]. *Free Radic Res*, 2009, 43(4): 348-364.
 - [22] Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(3): C343-C356.
 - [23] Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(10): R453-R462.
 - [24] Lankiewicz S, Marc LC, Truc BN, et al. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(22): 17064-17071.
 - [25] Nakanishi H. Neuronal and microglial cathepsins in aging and age-related diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2003, 2(4): 367-381.
 - [26] Wang C, Chen K, Xia Y, et al. N-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion-induced apoptosis and autophagy in mouse liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108855.
 - [27] Kratsovnik E, Bromberg Y, Sperling O, et al. Oxidative stress activates transcription factor NF- κ B-mediated protective signaling in primary rat neuronal cultures [J]. *J Mol Neurosci*, 2005, 26(1): 27-32.
 - [28] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369-379.
 - [29] Michael S, Sebastian J, Guido S. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses [J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 117(1): 43-49.
 - [30] Lee VM, Burdett NG, Carpenter A, et al. Evolution of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. Magnetic resonance imaging and histology [J]. *Stroke*, 1996, 27(11): 2118-2119.
 - [31] Schmidt A, Hoppen M, Strecker JK, et al. Photochemically induced ischemic stroke in rats [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2012, 4(1): 13.
 - [32] Minnerup J, Kim JB, Schmidt A, et al. Effects of neural progenitor cells on sensorimotor recovery and endogenous repair mechanisms after photothrombotic stroke [J]. *Stroke*, 2011, 42(6): 1757-1763.
 - [33] Minnerup J, Seeger FH, Kuhnert K, et al. Intracarotid administration of human bone marrow mononuclear cells in rat photothrombotic ischemia [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2010, 2(1): 3.
 - [34] Aerden LA, Kessels FA, Rutten BP, et al. Diazepam reduces

- brain lesion size in a photothrombotic model of focal ischemia in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 367(1): 76–78.
- [35] Yang L, Qian S, Xiao JC, et al. Linolenic acid provides multi-cellular protective effects after photothrombotic cerebral ischemia in rats [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(9): 1797–1808.
- [36] Jang JY, Choi YW, Kim HN, et al. Neuroprotective effects of a novel single compound 1-methoxyoctadecan-1-ol isolated from *Uncaria sinensis* in primary cortical neurons and a photothrombotic ischemia model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85322.
- [37] Liang YZ, Cheung RT, Sirun L, et al. Melatonin reduces infarction volume in a photothrombotic stroke model in the wild-type but not cyclooxygenase-1-gene knockout mice [J]. *J Pineal Res*, 2010, 41(2): 150–156.
- [38] Park CH, Shin TK, Lee HY, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate neuroinflammation following focal cerebral ischemia in mice [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2011, 15(2): 115–122.
- [39] Macrae IM. Preclinical stroke research—advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(4): 1062–1078.
- [40] Ito H, Hashimoto A, Matsumoto Y, et al. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in hypertensive rats [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2010, 30(2): 343–351.
- [41] Dostovic Z, Dostovic E, Smajlovic D, et al. Brain edema after ischaemic stroke [J]. *Med Arch*, 2016, 70(5): 339–341.
- [42] Braeuninger S, Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia; procedural pitfalls and translational problems [J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2009, 1: 8.
- [43] Lorrio S, Gómez-Rangel V, Negredo P, et al. Novel multitarget ligand ITH33/IQM9. 21 provides neuroprotection in *in vitro* and *in vivo* models related to brain ischemia [J]. *Neuropharmacology*, 2013, 67: 403–411.
- [44] Yoshida H, Ashikawa Y, Itoh S, et al. K-134, a phosphodiesterase 3 inhibitor, prevents brain damage by inhibiting thrombus formation in a rat cerebral infarction model [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46432.
- [45] Wang C, Zhang Y, Ding J, et al. Nicotinamide administration improves remyelination after stroke [J]. *Neural Plast*, 2017, 2017:7019803.
- [46] Diederich K, Frauenknecht K, Minnerup J, et al. Citicoline enhances neuroregenerative processes after experimental stroke in rats [J]. *Stroke*, 2012, 43(7): 1931–1940.
- [47] Demougeot C, Van M, Bertrand N, et al. Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 311(3): 1080–1087.
- [48] Van Hoecke M, Prigent-Tessier A, Bertrand N, et al. Apoptotic cell death progression after photothrombotic focal cerebral ischaemia; effects of the lipophilic iron chelator 2, 2'-dipyridyl [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22(5): 1045–1056.
- [49] Li PC, Jiao Y, Ding J, et al. Cystamine improves functional recovery via axon remodeling and neuroprotection after stroke in mice [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(3): 231–240.
- [50] López-Valdés HE, Clarkson AN, Ao Y, et al. Memantine enhances recovery from stroke [J]. *Stroke*. 2014, 45(7): 2093–2100.
- [51] Yan YT, Li SD, Li C, et al. Panax notoginsenoside saponins Rb1 regulates the expressions of Akt/ mTOR/PTEN signals in the hippocampus after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 345: 83–92.
- [52] Liu QS, Deng R, Li S, et al. Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/ Bax expression [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017, 42(8): 855–860.
- [53] Parker K, Berretta A, Saenger S, et al. PEGylated insulin-like growth factor-I affords protection and facilitates recovery of lost functions post-focal ischemia [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 241.
- [54] Stokowska A, Atkins AL, Moran J, et al. Complement peptide C3a stimulates neural plasticity after experimental brain ischaemia [J]. *Brain*, 2017, 140(2): 353–369.
- [55] Reichenbach ZW, Li H, Ward SJ, et al. The CB1 antagonist, SR141716A, is protective in permanent photothrombotic cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 630: 9–15.
- [56] Seo HB, Kang BK, Kim JH, et al. Partially purified components of *Uncaria sinensis* attenuate blood brain barrier disruption after ischemic brain injury in mice [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 157.
- [57] Bix GJ, Gowing EK, Clarkson AN. Perlecan domain V is neuroprotective and affords functional improvement in a photothrombotic stroke model in young and aged mice [J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(5): 515–523.
- [58] Lipsanen A, Flunkert S, Kuptsova K, et al. Non-selective calcium channel blocker bepridil decreases secondary pathology in mice after photothrombotic cortical lesion [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60235.
- [59] Zhao YH, Liu NW, Ke CC, et al. Combined treatment of sodium ferulate, n-butylidenephthalide, and ADSCs rehabilitates neurovascular unit in rats after photothrombotic stroke [J]. *J Cell Mol Med*. 2019, 23(1): 126–142.
- [60] Ong LK, Chow WZ, TeBay C, et al. Growth hormone improves cognitive function after experimental stroke [J]. *Stroke*, 2018, 49(5): 1257–1266.
- [61] Yan T, Chen Z, Chopp M, et al. Inflammatory responses mediate brain-heart interaction after ischemic stroke in adult mice [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*. 2018 22;271678X18813317.
- [62] 郝春华, 王维亭, 宋书辉, 等. 光化学法诱导大鼠冠状动脉血栓模型的建立和应用 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(1): 143–146.
- [63] 崔悦, 赵佳, 王晔, 等. 一种光化学损伤诱导的三叉神经痛大鼠模型的建立 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(7): 1026–1030.