

不同缺血再灌注时间对脑梗死大鼠运动及认知功能的影响*

孙 巨¹ 温红梅^{1,2} 李 超¹ 孙瑞芳¹ 邹淑怡¹ 胡昔权¹ 窦祖林¹

摘要

目的:比较不同缺血再灌注时间对短暂性大脑中动脉闭塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)大鼠的运动及认知功能的影响。

方法:取穿梭箱主动回避率超过70%的大鼠60只随机分为4组:根据Bederson评分及存活率缺血再灌注60min组(n=8)、90min组(n=11)、120min组(n=7)及假手术组(n=7)纳入最终行为学研究。术后28天行TTC染色计算梗死体积。于术后第1、3、7、14、21、28天进行改良神经功能缺损程度(mNSS)评分,第3、7、14、21、28天进行前肢抓握力测试;于术后第14、21、28天进行穿梭箱测试。

结果:缺血再灌注时间越长,大鼠的生存率越低($\chi^2=12.694, P=0.005$);梗死体积随缺血再灌注时间增加而增大($F=14.056, P=0.01$)。缺血时间越长, mNSS评分越高($F=9.100, P=0.001$);梗死组较假手术组抓握力量减小($F=11.630, P<0.05$);穿梭箱实验显示各时间点90min组主动回避率较假手术组降低($P<0.05$), 120min组第14、21天时较假手术组主动回避率降低($P<0.05$)。

结论:tMCAO大鼠随缺血再灌注时间延长,运动功能障碍严重程度增加,缺血60min再灌注不出现认知功能障碍,且因运动功能自发性恢复速度快,不适用于认知功能及长期运动功能行为学测试。缺血90min、120min出现认知功能障碍。

关键词 短暂性大脑中动脉闭塞;缺血再灌注;运动;认知

中图分类号:R743.3, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-05-0495-06

Effects of different duration of ischemia reperfusion on transient middle cerebral artery occlusion rats' motor and cognitive function/SUN Ju, WEN Hongmei, LI Chao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(5):495—500

Abstract

Objective: To compare effects of different duration of ischemia reperfusion on transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) rats' motor and cognitive function.

Method: Sixty Sprague-Dawley rats with 70% active avoidance response rate (AARR) were randomly divided into four groups: 60min group(n=8), 90min group(n=11), 120min group(n=7) and sham group(n=7) were included in the final behavioral study according to Bederson score and the survival rate. Infarcted volume ratio was calculated by TTC staining. Each group was assessed with modified neurological severity scores(mNSS) on days 1, 3, 7, 14, 21 and 28 after operation; Forelimb grip strength test was carried out on days 3, 7, 14, 21 and 28 after operation; Shuttle box test was assessed on days 14, 21 and 28 after operation.

Result: With the duration of ischemia reperfusion became longer, the survival rate decreased ($\chi^2=12.694, P=0.005$). The infarct volume was larger with the extended reperfusion time ($F=14.056, P=0.01$). The mNSS was

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.05.001

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81472156;81672259)

1 中山大学附属第三医院康复科,广州,510630; 2 通讯作者

作者简介:孙巨,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-10-04

higher in longer ischemic duration groups ($F=9.100$, $P=0.001$). There was a significant difference in the forelimb grip strength between ischemia groups and the sham group ($F=11.630$, $P<0.05$). 90min group had a lower AARR at every time point compared to the sham group ($P<0.05$). AARR was lower in 120min group than that in the sham group on days 14 and 21 ($P<0.05$).

Conclusion: The severity of motor dysfunction was associated with the duration of ischemia in tMCAO rats. 60min ischemia reperfusion do not induce cognitive dysfunction with rapid motor function recovery, which may not be suitable for cognitive and long-term motor behavior tests. 90min and 120min ischemia reperfusion can induce cognitive dysfunction.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630

Key word transient middle cerebral artery occlusion; ischemia reperfusion; motor; cognition

我国每年有新发脑卒中患者约200万人,脑卒中已成为我国的主要致残病因^[1],脑卒中后常见的问题包括运动、吞咽、言语、认知功能障碍等。卒中后认知功能障碍(post stroke cognitive impairment, PSCI)的发病率高达64%且长期存在^[2],严重影响其他功能的康复,因而对认知障碍的研究尤为重要。目前脑卒中相关动物模型有多种,但大多数是针对运动功能障碍,而认知功能障碍动物模型较少。短暂性大脑中动脉闭塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)能很好地模仿人类因血管闭塞引起的脑梗死这一疾病发病模式^[3],常被用于认知功能相关研究,但tMCAO模型是否会出现认知功能障碍仍有一定争议,且各实验室对缺血再灌注时间的选择不一,具有一定随意性,常见的缺血时间为120min、90min、60min^[4],不同缺血再灌注时间对tMCAO大鼠的运动及认知的影响有何区别,少有研究涉及。本研究就不同缺血再灌注时间对大鼠的运动及认知功能的影响进行研究,为今后tMCAO模型相关实验的缺血再灌注时间选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: SPF级雄性SD大鼠60只,体重235—255g,由广东中医药大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK(粤)2013-0034,所有动物均饲养于中山大学(生命科学学院中药与海洋药物实验室)SPF级实验环境中,许可证号:SYXK(粤)2014-0020,采用已消毒颗粒型大鼠饲料喂养,饮用消毒灭菌水,环境温度控制在20—25℃。

1.1.2 主要仪器与试剂: YLS-13A大小鼠抓力测试

仪(上海嘉适科学仪器有限公司),XR-XC105型(上海欣软信息科技有限公司)穿梭实验视频分析系统(Shuttlebox system),4—0硅胶包被线栓(直径 $0.37\pm 0.02\text{mm}$)(深圳瑞沃德生命科技有限公司),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,美国Sigma)。

1.2 实验方法

1.2.1 穿梭箱实验: 采用XR-XC105型穿梭实验视频分析系统,穿梭箱内部($226\times 213\times 350\text{mm}$),底部设不锈钢栅栏,使用电流作为非条件刺激,电击动物足底部。顶部设噪声发生器(铃声)及两侧各有一光源作为条件刺激。适应5min消除探究反射后予光声刺激5s,继予电击10s,间隔10s后进入下一轮。若在铃声刺激5s内大鼠逃向安全区,则为主动回避反应,系统自动停止当次训练;如果在铃声刺激5s内大鼠未逃向安全区,则给予0.5mA交流电刺激10s,在电击后逃向安全区为被动回避反应阳性,否则为无反应。每只大鼠测试20次,系统自动记录主动回避反应次数(active avoidance response, AAR)、被动回避反应次数(positive avoidance response, PAR)、总回避反应(general avoidance response, GAR)为AAR+PAR, AAR与总测试次数的比值为主动回避率(active avoidance response rate, AARR)。SD大鼠预训练5天,每天20次,选择最后2天主动回避率超过70%的进行下一步实验,并于术后14、21、28天测试,以AARR为检测指标^[5],反映大鼠的学习记忆能力及执行决策能力。

1.2.2 实验动物模型制作: 将预训练达标的SD大鼠,予以10%的水合氯醛(4ml/kg)腹腔注射麻醉,局部消毒备皮,颈部正中切口2—2.5cm,分离颈总动脉(CCA),预置缝线备用,沿左侧CCA分离颈外

(ECA)、颈内动脉(ICA),结扎并游离ECA及CCA近心端。微血管夹夹闭CCA远心端,于CCA两端之间处剪一小口,将制备好的直径为0.375mm尼龙线沿切口轻轻插入,松开微血管夹并将尼龙线轻轻插入ICA,直到稍感阻力,若尼龙线插入深度为10mm,则考虑线栓插入翼腭窝,往后退一点,稍提起ECA,使之成直线,再往里插线栓,直到再次感觉到阻力,结扎CCA远心端,将尼龙线外留1cm以备拔线栓时使用,根据分组不同随机分为线栓插入60min、90min、120min后拔出。假手术组大鼠麻醉同上,但只暴露、分离结扎血管,而不插线栓。

1.2.3 模型评价:采用改良的Bederson评分方法进行神经功能评分^[6]:0分:无神经功能缺失体征;1分:提尾时损伤对侧前肢屈曲;2分:前肢屈曲及对侧抵抗力下降;3分:向对侧转圈;4分:向对侧转圈及意识障碍;5分:死亡。神经功能评分1—3分的大鼠纳入本研究,最终60min组8只,90min组11只,120min组7只,假手术组7只纳入研究。

1.2.4 改良大鼠神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)^[7]:该评分包括运动功能、感觉功能和反射缺失3大项,共计18小项。未能完成该项检查或反射缺失计1分。10—18分为严重损伤,5—9分为中度损伤,1—4分为轻度损伤,于术后第1、3、7、14、21、28天进行评分。

1.2.5 抓握力测试:采用YLS-13A大小鼠抓力测定仪测试大鼠的抓力,将大鼠放置在抓力板上,抓住鼠尾轻轻向后牵拉,待大鼠抓牢抓力板后,均匀用力后拉,致使动物松爪,仪器自动记录大鼠的最大抓力,将仪器与PC机联机读取数据进行处理。评价右侧瘫痪前肢抓力的强度时,要用胶带包裹左侧未瘫痪前肢。每次测试抓力5次,取平均值,于术后第3、7、14、21、28天进行测试。

1.2.6 TTC染色:于第28天取大鼠水合氯醛(4ml/kg)腹腔注射麻醉固定,开胸暴露心脏,从心尖处插入导管,先快后慢灌注生理盐水200ml,置于-80℃冰箱5min,再于脑槽中取冠状面均匀切成2mm厚脑片,取5片放入2%的TTC溶液(37℃)避光中染色20min,4%甲醛缓冲液固定。24h后用相机拍照,其中粉红区为正常脑组织,白色区为梗死区(见图2)。采用Image-Pro Plus 6软件计算梗死体积分数,计算

公式为梗死体积/(梗死体积+未梗死体积)×100%。

1.3 统计学分析

应用SPSS 20.0进行数据分析,mNSS、抓握力量结果以平均值±标准差表示,穿梭箱实验结果以平均值±标准误表示。mNSS、抓握力量、穿梭箱实验采用重复测量设计的方差检验,若有交互效应,各时间点进行单因素方差分析,各时间点各组之间用LSD-*t*检验进行两两组间比较,脑梗死体积采用单因素方差分析,各组之间用LSD-*t*检验进行两两组间比较,各组生存率采用log-rank检验分析比较。

2 结果

2.1 生存率比较

实验大鼠随缺血再灌注时间的延长,生存率降低($\chi^2=12.694, P=0.005$),见图1。死亡主要集中在造模后的前7天,死亡原因包括蛛网膜下腔出血、癫痫、进食障碍等。因死亡、Bederson评分不达标最终每组入组大鼠数量不同,见表1。

2.2 梗死体积的比较

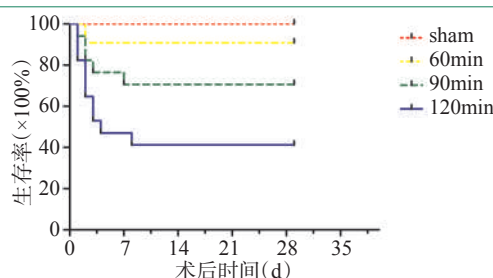
实验组大鼠随缺血再灌注时间延长,梗死体积变大($F=14.056, P=0.01$),90min、120min组与60min组比较有显著性差异($P<0.05$)(见图2),90min、120min组多为皮质及皮质下梗死,而60min组多为皮质下基底核区梗死。

2.3 改良神经功能缺损程度评分结果

缺血再灌注各组均有不同程度的运动、感觉功能障碍,缺血时间越长,mNSS评分越高($F=9.10, P=0.001$),各组随观察时间的延长,运动、感觉功能逐渐改善($F=187.87, P<0.01$),前7天恢复最快,后恢复速度减缓(见表1,图3)。

2.4 缺血再灌注时间对大鼠患侧前肢抓握力量的影响

图1 各组大鼠生存率的比较



造模后缺血再灌注各组患侧前肢抓握力均有不同程度降低($F=11.630, P<0.01$), 随时间缓慢恢复($F=120.780, P<0.01$), 缺血时间越长, 恢复所需要的时间越长, 60min组在第7天即恢复正常, 与假手术组比较差异无显著性意义($P>0.05$), 90min组第28天与假手术组比较差异无显著性意义(见表2, 图4)。

2.5 穿梭箱实验结果

重复测量方差分析各组之间比较($F=3.516, P<0.05$), 无时间、交互效应($P>0.05$)。进一步两两比较, 与假手术组相比, 90min组主动回避率在各时间点都有明显降低($P<0.05$), 而120min组也较假手术组有降低, 在第14、21天时差异有显著性意

义($P<0.05$), 第28天时差异无显著性意义($P=0.052$), 60min组在各时间点与假手术组无显著性差异($P>0.05$), 见图5。

图3 脑梗死大鼠改良神经功能缺损评分结果

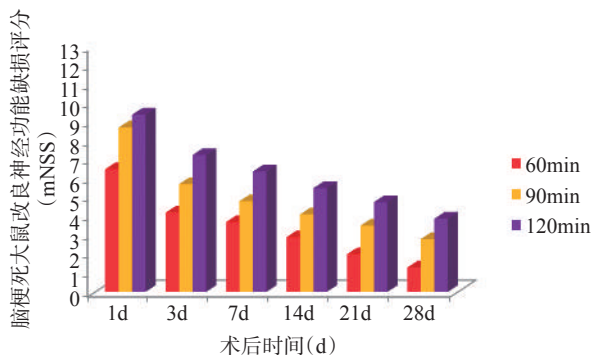


图4 缺血再灌注时间对大鼠患侧前肢抓握力量的影响

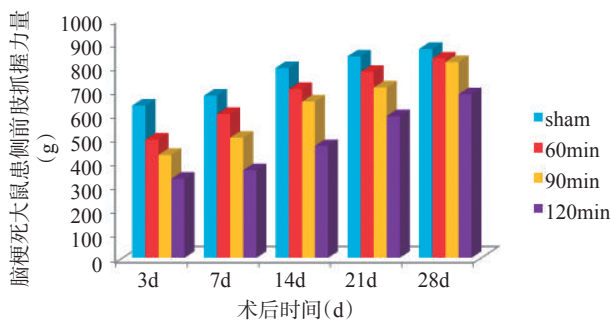


图5 各组穿梭箱主动回避率比较

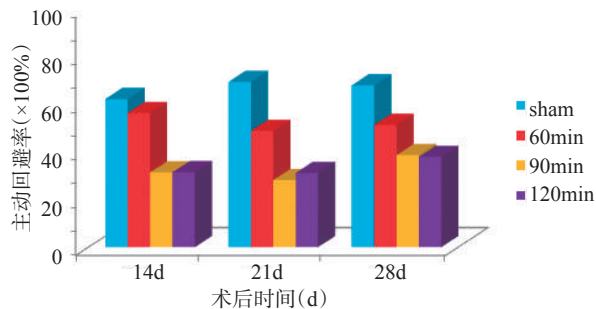


图2 不同缺血再灌注时间大鼠脑梗死情况 (TTC染色)

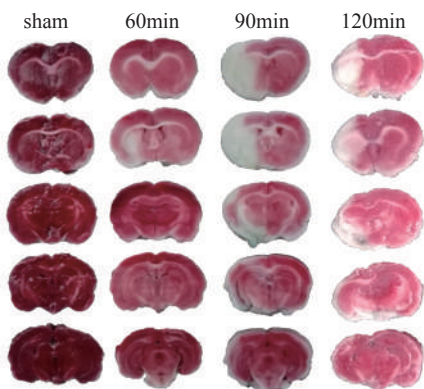


表1 脑梗死大鼠改良神经功能缺损评分 ($\bar{x}\pm s$)

时间(d)	tMCAO-60min组 (n=8)	tMCAO-90min组 (n=11)	tMCAO-120min组 (n=7)
1	6.50±2.01	8.70±2.11 ^①	9.38±1.84 ^①
3	4.20±1.23	5.70±1.57 ^①	7.25±1.28 ^{①②}
7	3.70±1.34	4.80±1.40 ^①	6.38±2.46 ^{①②}
14	2.90±1.37	4.10±1.52	5.50±1.60 ^{①②}
21	2.00±1.25	3.50±1.65 ^①	4.75±2.06 ^{①②}
28	1.30±0.67	2.80±1.75 ^①	3.88±1.90 ^①

与同时间 tMCAO-60min 组比较: ① $P<0.05$; 与同时间 tMCAO-90min 组比较: ② $P<0.05$

表2 脑梗死大鼠患侧前肢抓握力量 ($\bar{x}\pm s, g$)

时间(d)	假手术组(n=7)	tMCAO-60min组(n=8)	tMCAO-90min组(n=11)	tMCAO-120min组(n=7)
3	636.55±51.32	494.31±83.93 ^①	431.13±116.61 ^①	331.24±90.56 ^{①②③}
7	678.83±74.32	601.65±62.67	502.80±141.07 ^①	366.69±116.88 ^{①②③}
14	794.31±53.19	705.94±126.06	653.45±126.24 ^①	467.88±191.50 ^{①②③}
21	842.35±55.02	777.75±70.24	712.40±83.65 ^①	593.07±167.00 ^{①②③}
28	873.80±83.95	833.68±93.76	819.17±74.53	684.20±114.15 ^{①②③}

与同时间假手术组比较: ① $P<0.05$; 与同时间 tMCAO-60min 组比较: ② $P<0.05$; 与同时间 tMCAO-90min 组比较: ③ $P<0.05$

3 讨论

大鼠MCAO模型问世已经超过三十年,应用越来越广泛。线栓法大脑中动脉梗死模型因其与人类因血管闭塞引起的脑梗死发病模式最类似、可重复性好等优点,成为近年来神经实验最常用的模型之一,在脑梗死后神经保护研究中有超过40%采用了线栓法大脑中动脉梗死模型^[8],而不同的缺血再灌注时间对于运动、认知功能的影响有何区别尚不清楚。本研究采用行为学实验对不同缺血再灌注时间tMCAO大鼠的运动、感觉、认知功能进行了4周的检测,为今后tMCAO大鼠相关行为学检测实验,特别是认知功能行为学检测选择缺血再灌注时间及检测时间提供参考。

本研究发现tMCAO大鼠的缺血再灌注时间越长,mNSS评分越高,患侧前肢的抓握力量越差,提示tMCAO大鼠运动、感觉功能损伤程度受缺血再灌注的时间的影响,与既往研究一致^[9],梗死大鼠运动功能术后1周内改善的速度较快,随后速度逐渐减慢,与人类卒中的恢复类似,且缺血再灌注时间越长所需要恢复到正常水平的时间越长。60min组在1周后运动功能改善接近于假手术组,可能的原因是缺血时间短,损伤程度轻,其次可能是缺血60min后再灌注大部分是皮质下基底核区梗死,而皮质下梗死的恢复速度也更快^[10],因而60min缺血再灌注时间不适用于对大鼠长期运动功能相关的行为学实验。

人类脑梗死3个月后有62.6%出现血管性认知功能障碍^[11],而大鼠的MCAO模型是否会出现认知功能障碍及其可能的机制仍然未明确。有研究认为MCAO模型仅会有运动功能障碍而不会出现认知功能障碍^[12],多数研究显示MCAO模型大鼠存在认知功能障碍^[13-14],亦有分析认为,运动功能障碍影响了大鼠在行为学实验中的表现,从而出现认知功能障碍的假阳性结果^[15]。记忆在认知功能中有着举足轻重的作用,一般认为与记忆密切相关的海马主要由大脑后动脉供血,理论上MCAO不会造成海马的损伤,但实际研究发现,线栓法MCAO会在一定程度上减少海马的血流量,造成一定的损伤^[16]。此外由于梗死后颅内压增高、水肿、炎症等原因海马神经元会发生迟发性死亡,且随时间的进展,神经元死亡的数量增加^[17],这也在某种程度上解释了为什么认

知功能障碍出现的较晚,且进展性加重。也有研究认为^[18],tMCAO模型海马 γ -氨基丁酸抑制性神经元的上升,细胞外调节蛋白激酶激活的下调,导致长时程增强受到抑制,因而出现认知功能障碍并呈进展性。某些皮质损伤,如新皮质、额叶皮质,也是认知功能障碍出现的原因。部分由梗死灶单独解释不了的认知功能障碍,可能是因为双侧大脑的N-甲基-D-天冬氨酸受体的长期的下调和内存所导致的^[19]。

既往对MCAO大鼠认知功能研究多采用水迷宫检测大鼠的空间记忆能力^[13,15,20],但对大鼠的运动功能及体能要求较高,且浸入水中可能引起内分泌或其他应激效应,与脑损害或药理学操作间的相互作用具有不确定性,而穿梭箱实验主要研究大鼠的学习记忆能力及执行决策能力^[21-22],相比水迷宫对大鼠的运动功能要求相对较小,抗外界环境干扰能力强。本研究显示缺血90min、120min后再灌注的大鼠的穿梭箱主动回避率降低,提示大鼠出现学习记忆相关认知功能的损害,但并没出现明显的认知功能进行性下降,与既往研究不完全一致^[18,23-24]。出现这种差异的原因可能是认知功能评定的方法和时间不同,上述研究中采用Morris水迷宫测试,本研究采用穿梭箱实验,并进行了强化性预训练,检测时间仅为4周,且为重复测量设计,而研究显示重复测量能改善tMCAO大鼠功能障碍^[13]。

本实验发现,大鼠tMCAO后死亡主要集中在术后1周,死亡原因有多种,包括蛛网膜下腔出血、窒息、癫痫、肠胀气等,但最重要的原因是术后大鼠运动功能差,无法正常进食,进而体质下降,最终死亡。本研究也证实运动功能差的120min组生存率明显低于60min组,因而为了降低死亡率,术后的食物选择、进食方式及护理显得尤为重要。

研究发现^[25],SD大鼠的梗死体积对缺血再灌注时间敏感,缺血时间长梗死体积大,与本研究结果一致。研究认为^[25],梗死体积与早期的行为学有相关关系,而与晚期的行为学表现不相关,可能原因是梗死大鼠对侧大脑半球会产生适应性反应,发出运动感觉纤维跨越中线,从而出现运动感觉功能自发性恢复。

本研究就不同缺血再灌注时间进行研究,通过多种行为学方法对tMCAO大鼠的运动、感觉及认知功能进行综合评价,认为缺血60min再灌注不出

现认知功能障碍,且运动功能自发性恢复的速度快,因而不适用于认知功能相关的实验研究及长期运动功能相关的行为学检测。缺血 90min、120min 再灌注组出现认知功能障碍,适用于认知功能相关研究,但为最大程度地排除运动功能障碍带来干扰,认知功能相关行为学检测最好安排在术后较长的时间范围(28 天),运动功能恢复到一定程度。值得一提的是,缺血再灌注时间并不是 MCAO 模型唯一影响因素,动物种属、线栓的类型及插入深度等都是 tMCAO 模型成功的关键,相关因素的问题有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 张通.中国脑卒中康复治疗指南(2011 完全版)[J].中国康复理论与实践,2012,(4):301—318.
- [2] 高艳玲,赵世刚.脑卒中及其危险因素与脑卒中后认知功能障碍[J].医学综述,2014,(11):2004—2006.
- [3] Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia[J]. ILAR J, 2003, 44(2):85—95.
- [4] Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, (9):3445—3454.
- [5] 张彦文,安晓静,谢燕,等.微波辐照对大鼠学习记忆行为和海马 LTP 影响[J].中国公共卫生,2007,(2):190—192.
- [6] Tan F, Li H, Ma M, et al. Protective effect of treatment with low-dose gliclazide in a model of middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats[J]. Brain Research, 2014, (1560):83—90.
- [7] Gao Y, Chen T, Lei X, et al. Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(6):5481—5488.
- [8] Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(8):1412—1431.
- [9] Zvejniece L, Svalbe B, Liepinsh E, et al. The sensorimotor and cognitive deficits in rats following 90- and 120-min transient occlusion of the middle cerebral artery[J]. J Neurosci Methods, 2012, 208(2):197—204.
- [10] 张乾,毛善平,李涛,等.线栓法制作大鼠脑缺血模型不同类型神经功能缺损特点的研究[J].疑难病杂志,2011,(4):282—284.
- [11] Yu KH, Cho SJ, Oh MS, et al. Cognitive impairment evaluated with vascular cognitive impairment harmonization standards in a multicenter prospective stroke cohort in Korea[J]. Stroke, 2013, 44(3):786—788.
- [12] Gupta YK, Sinha K, Chaudhary G. Transient focal ischemia induces motor deficit but does not impair the cognitive function in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats[J]. J Neurol Sci, 2002, (203—204):267—271.
- [13] Yousuf S, Atif F, Sayeed I, et al. Long-term behavioral deficits and recovery after transient ischemia in middle-aged rats: Effects of behavioral testing[J]. Restor Neurol Neurosci, 2015, 33(3):251—261.
- [14] Zhou J, Zhuang J, Li J, et al. Long-term post-stroke changes include myelin loss, specific deficits in sensory and motor behaviors and complex cognitive impairment detected using active place avoidance[J]. PloS One, 2013, 8(3):e57503.
- [15] Bingham D, Martin SJ, Macrae IM, et al. Watermaze performance after middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of sensorimotor versus memory impairments[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(6):989—999.
- [16] El Amki M, Clavier T, Perzo N, et al. Hypothalamic, thalamic and hippocampal lesions in the mouse MCAO model: Potential involvement of deep cerebral arteries?[J]. J Neurosci Methods, 2015, (254):80—85.
- [17] Wang W, Redecker C, Bidmon HJ, et al. Delayed neuronal death and damage of GDNF family receptors in CA1 following focal cerebral ischemia[J]. Brain Research, 2004, 1023(1):92—101.
- [18] Li W, Huang R, Shetty RA, et al. Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model[J]. Neurobiol Dis, 2013, (59):18—25.
- [19] Dhawan J, Benveniste H, Nawrocky M, et al. Transient focal ischemia results in persistent and widespread neuroinflammation and loss of glutamate NMDA receptors[J]. Neuroimage, 2010, 51(2):599—605.
- [20] Liu F, Jiang YJ, Zhao HJ, et al. Electroacupuncture ameliorates cognitive impairment and regulates the expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax in rats with cerebral ischaemia-reperfusion injury[J]. Acupunct Med, 2015, 33(6):478—484.
- [21] 孙竹梅,赵雅宁,李建民,等.不同强度运动对脑缺血再灌注大鼠学习能力及氧自由基代谢的影响[J].中国康复理论与实践,2015,(1):26—30.
- [22] 王戈,唐启盛,李小黎,等.脑卒中后大鼠行为学的动态变化及中药颞颥解郁方的干预作用[J].四川中医,2012,(10):33—35.
- [23] Roof RL, Schielke GP, Ren X, et al. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats[J]. Stroke, 2001, 32(11):2648—2657.
- [24] Karhunen H, Pitkanen A, Virtanen T, et al. Long-term functional consequences of transient occlusion of the middle cerebral artery in rats: a 1-year follow-up of the development of epileptogenesis and memory impairment in relation to sensorimotor deficits[J]. Epilepsy Res, 2003, 54(1):1—10.
- [25] Encarnacion A, Horie N, Keren-Gill H, et al. Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke[J]. J Neurosci Methods, 2011, 196(2):247—257.