

运动训练对脑梗死大鼠梗死边缘区神经细胞自噬及凋亡的影响*

张丽颖¹ 胡昔权^{1,2} 郑海清¹ 陈曦¹ 李莉莉¹ 罗婧¹

摘要

目的:研究运动训练对脑梗死急性期大鼠神经功能恢复及梗死边缘区皮质神经细胞自噬及凋亡的影响。

方法:建立大脑中动脉闭塞再灌注模型,并分成运动训练组、对照组和假手术组。运动训练组大鼠给予运动训练;对照组与假手术组则不予以任何针对性训练。造模术后第3、7、14d采用改良神经损伤程度评分(mNSS)对各组大鼠进行功能评估,同时以尼氏染色法测量脑梗死体积,免疫荧光方法观察梗死边缘区皮质自噬标志物LC3-II及凋亡标志物TUNEL的表达情况。

结果:造模术后14d运动训练组大鼠mNSS及脑梗死体积均优于对照组,差别具有显著性意义($P<0.05$)。运动训练组大鼠梗死边缘区皮质LC3-II阳性细胞数在造模后14d少于对照组($P<0.05$)。相关性分析结果显示LC3-II阳性细胞数与mNSS($r=0.901, P<0.001$)及梗死体积($r=0.832, P<0.001$)成正相关。TUNEL阳性细胞数在造模后7、14d均少于对照组($P<0.001$),且44.6%的LC3-II与TUNEL存在共定位。

结论:运动训练能够促进脑梗死急性期大鼠神经功能恢复,其机制可能与其减少梗死边缘区神经细胞自噬及凋亡有关。

关键词 脑梗死;运动训练;自噬;凋亡;大鼠

中图分类号:R743;R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-08-0863-06

Physical exercise mitigates autophagy and apoptosis after MCAO in rats/ZHANG Liying, HU Xiquan, ZHENG Haiqing, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(8): 863—868

Abstract

Objective:To investigate the effects of exercise training on neurological function, autophagic cell death and apoptosis in cortex of peri-infarct region after transient left middle cerebral artery occlusion(MCAO) in rats.

Method:A total of 30 male Sprague-Dawley rats were subjected to tMCAO and randomly divided into three groups: the rehabilitative training group (n=10), took running exercise everyday since 3 days after tMCAO; the control group (n=15) and sham-operated group (n=5, filament was not inserted into the artery), fed in standard cages with no special exercise training and served as controls. The animals were given behavioral tests with modified neurological severity scores(mNSS) to assess functional outcome. Nissl staining was performed to evaluate the infarct volume, and Immuno-fluorescence staining was employed to investigate autophagy, apoptosis in cortex of peri-infarct region at 3, 7, 14days after tMCAO, respectively.

Result:The mNSS and infarct volume were much lower in rehabilitative training group than that in control group at 14 days after tMCAO ($P<0.05$). Immuno-fluorescence staining showed that autophagosomes, as labeled by microtubule-associated protein 1A light chain 3-II (LC3-II), were evident in cortex of peri-infarct region at 3 days after tMCAO. The number of LC3-II positive cells was significantly lower in rehabilitative training

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.08.002

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81372107),广东省自然科学基金重点项目(S2013020012648)

1 中山大学附属第三医院康复医学科,广州,510630; 2 通讯作者

作者简介:张丽颖,女,硕士,住院医师; 收稿日期:2016-07-27

group than in control group at 14 day after tMCAO ($P<0.05$). In addition, physical exercise significantly decreased the number of TUNEL positive cells at 7, 14days after tMCAO($P<0.001$). Moreover, 44.6% of LC3- II positive cells were also stained with TUNEL.

Conclusion: The present results demonstrate that physical exercise enhances neurological function possibly by reduction of autophagosome accumulation, and apoptosis in cortex of peri-infarct region after tMCAO in rats.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou,510630

Key word cerebral infarction; physical exercise; autophagy; apoptosis; rat

急性缺血性脑卒中是神经功能障碍的主要原因,给社会及家庭带来沉重的负担。早期开展康复训练可以改善脑卒中患者的神经功能,提高患者的生存质量。康复治疗的有效性已得到一致认可,但其作用机制尚未完全明确。急性脑卒中引起神经细胞死亡一直是研究的热点,以往的研究认为,急性脑卒中引起神经细胞的凋亡及坏死是两种主要的细胞死亡方式,如今自噬作为另一种重要的细胞死亡方式被广泛关注^[1]。本研究将通过观察运动训练对脑梗死急性期大鼠神经功能、脑梗死体积及梗死边缘区皮质神经细胞自噬及凋亡的影响,探讨脑梗死后神经功能障碍恢复的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型建立与分组

实验采用 SPF 级成年 SD 雄性大鼠 50 只,体重(280±20)g,由广东省医学实验动物中心提供[合格证号 SCXK(粤)2003-0002 粤监证字 2006A015]。随机选取 40 只,以 3.5%水合氯醛(350mg/kg)行腹腔注射麻醉,参照 Zea-Longa 线栓法制作大鼠左侧大脑中动脉闭塞再灌注(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)模型^[2]。剔除麻醉及手术意外死亡的大鼠,于 tMCAO 术后 6h 采用 Bederson 标准进行神经功能评分,具体评分标准: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,前肢屈曲及侧推时对侧抵抗力下降;3 分,向对侧转圈;4 分,向对侧转圈及意识障碍。评分为 0 分大鼠无功能障碍,评分为 4 分大鼠存在意识障碍,因此选取分值为 1—3 分的大鼠纳入本研究^[3-5],将符合入组标准的成模大鼠 25 只再随机分为运动训练组和对照组(研究中途各组有出现死亡脱落的也遵循随机原则给予补充完整),运动训练组按手术后

7、14d 随机分为 2 个亚组,对照组按手术后 3、7、14d 随机分为 3 个亚组。运动训练组与对照组每个亚组各 5 只。假手术组大鼠共 5 只,只暴露、分离血管与神经,缝合皮肤后置于普通笼内饲养,于上述各组相应时间点固定、取材进行匹配观察。

1.2 脑梗死大鼠运动训练方法

各组大鼠手术或假手术后均置于普通笼内饲养(3—4 只/笼)。运动训练组于造模术后第 3 天开始采用自行研发的实验动物跑笼训练器进行主动运动训练^[3-5]。跑笼直径 20cm,长度 40cm,由电动马达带动,控制器设定转速、时间或路程,转速分为低(5r/min)、中(10r/min)、高(15r/min)三个等级。训练组的大鼠造模第 3 天后开始进行训练,随着大鼠术后身体状况的逐渐恢复,采用阶梯式递增训练法,初始转速为 5rev/min,20min,每日 2 次;至造模后第 7 天训练量增加为 10r/min,20min,每日 2 次;造模后第 14 天训练量增加为 15r/min,20min;每日 2 次,7d/周。对照组和假手术组的大鼠不予上述任何针对性强化训练,但可以在笼内饮水、进食、自由活动。

1.3 脑梗死大鼠神经功能评分方法

分别于造模术后 3、7、14d,采用 mNSS 进行评估^[3-5],该评分方法包括运动功能测试、感觉功能测试、平衡能力和反射缺失和异常运动四大部分,每部分又细分为若干小项,总计 18 分。总分 1—6 分为轻度损伤,7—12 分为中度损伤,13—18 分为重度损伤。

1.4 脑组织取材

大鼠以 3.5%水合氯醛(350mg/kg 体重)行腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,0.2ml 肝素抗凝,用 4℃生理盐水 150ml 快速冲洗,4%多聚甲醛固定液先快后慢灌注固定 30min。灌注后的脑组织置于 4℃的 4%多聚甲醛后固定 8—12h,再依次置于 20%、30%的蔗糖溶液中,至沉底取出,包埋并制作冰冻切片,切片

厚度为10 μ m。

1.5 尼氏染色

选取每只大鼠从前囟+4.0到-6.0mm的冰冻切片,每隔12片取1片,进行尼氏染色,用于计算梗死灶的体积^[6]。将冰冻切片从低温冰箱中取出后放在室温下恢复温度,组化笔划圈,将冰冻切片置于染缸中进行梯度水化:95%乙醇10min、70%乙醇2min、50%乙醇2min、蒸馏水2min、0.1%焦油紫染液染色15min、蒸馏水漂洗1min;50%乙醇1min;70%冰醋酸乙醇2min;酒精梯度脱水:95%乙醇3min、无水乙醇I 3min、无水乙醇II 3min。二甲苯透明:二甲苯I,二甲苯II各3min。中性树胶封片,自然干燥后保存。BX51系统生物显微镜和AZ100型体视光学显微镜下观察、拍照。

1.6 免疫荧光

选取每只大鼠从前囟+4.0到-6.0mm的冰冻切片,每隔24片取1片,用于检测梗死边缘区皮质LC3-II、TUNEL的表达。阴性对照只加抗体稀释液,不加一抗。将冰冻切片恢复至室温、组化笔划圈后,用0.01M PBS水化5min。滴加0.3%Triton X-100,室温孵育30min,增加抗体对细胞膜的通透性;0.01M PBS漂洗1次,5min;滴加正常山羊血清,室温下孵育1h,不漂洗,封闭非特异性结合位点;滴加一抗(用抗体稀释液稀释):LC3-II(1:400)4℃孵育过夜(约20h);0.01M PBS漂洗3次,每次5min;滴加二抗(抗体稀释液稀释):Dylight™ 488 山羊抗小鼠IgG(1:1000),室温避光孵育1h;0.01M PBS漂洗3次,每次5min。为检测LC3-II/TUNEL共定位情况,在LC3-II孵育的荧光切片继续进行TUNEL染色。防荧光淬灭封片剂封片,避光自然晾干;BX51荧光显微镜下观察并拍照。

1.7 图像分析和计数

梗死灶体积计算参照文献报告的方法^[6]。选取每只大鼠从前囟+4.0到-6.0mm的冰冻切片,每隔12片取1片,进行尼氏染色,然后使用AZ100型体视光学显微镜进行拍照,输入电脑用Image Pro Plus 图像分析软件(Media Cybernetics, Sliver Spring, MD, 美国)计算每一切片梗死灶对侧半球的面积和梗死灶同侧半球的剩余面积,将相邻两个切片的面积平均,乘以切片距离1.2mm,累加后可得梗死灶对

侧半球脑组织的体积(VA)和梗死灶同侧半球的剩余体积(VB),最后计算梗死灶占对侧半球脑组织体积的百分比 $[(VA - VB)/VA \times 100\%]$ 。选取每只大鼠从前囟+4.0到-6.0mm的冰冻切片,每隔24片取一片,取梗死边缘区3—4个不相邻视野于400倍镜相同曝光强度下拍照,输入电脑用Image Pro Plus 图像分析软件(Media Cybernetics, Sliver Spring, MD, 美国)进行定量计算。

1.8 统计学分析

所有数值资料均以均数 $\pm$ 标准差表示。神经功能评分采用重复测量的方差分析,神经功能评分及梗死体积的组内比较采用非参数检验。两组间比较采用 t 检验。所有数据均采用SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, 美国)进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 运动训练促进脑梗死急性期大鼠神经功能的恢复

见表1。假手术组大鼠麻醉苏醒后,Bederson及mNSS评分均为0分,说明麻醉及假手术均未对大鼠的神经功能产生影响。造模术后第7天,运动训练组与对照组mNSS评分差异无显著性意义($P > 0.05$),14d时,运动训练组大鼠mNSS评分优于对照组($P < 0.05$)。

2.2 运动训练减小脑梗死急性期大鼠的脑梗死体积

见表2,图1。假手术组术后未见梗死灶。对照组术后7、14d的梗死体积均明显小于术后3d($P < 0.05$)。和对照组相比,运动训练组大鼠的脑梗死体积在术后14d($P < 0.05$)明显减小,但术后7d两组大鼠的脑梗死体积间差异没有显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 运动训练减少神经细胞自噬

免疫荧光检测LC3的表达来观察梗死边缘区自噬体的聚集。LC3又分为LC3-I和LC3-II两个亚型,在自噬发生的过程中,胞浆中的LC3会聚集形成LC3-II并锚定在自噬体膜上,LC3的免疫荧光在自噬诱导前显示为散在的分布于胞浆中,自噬诱导后则变为颗粒分布。在本实验中我们发现假手术组或梗死大鼠的非梗死半球的脑组织中,LC3散在

分布于胞浆,但tMCAO术后,梗死边缘区可见大量的颗粒状的LC3-Ⅱ聚集(图2)。LC3-Ⅱ阳性细胞数于术后3d达到高峰,之后逐渐下降(图3)。运动训练组的LC3-Ⅱ阳性细胞数于术后7、14d均少于对照组,其中14d差异有显著性意义($P<0.001$,图3)。相关性分析结果显示LC3-Ⅱ阳性细胞数与神经功能评分($r=0.901$, $P<0.001$)及梗死体积($r=0.832$, $P<0.001$)成正相关。

2.4 运动训练减少神经细胞的凋亡

假手术组术后未见凋亡标志物TUNEL的表达。术后第3天在梗死边缘区可见凋亡标志物TUNEL阳性细胞数量的增加(图2),第7、14天,TUNEL阳性细胞数量逐渐减少(图4)。在7、14d,运动训练组TUNEL阳性细胞数均明显少于对照组($P<0.001$,图4)。

为了进一步研究自噬及凋亡的相互关系,采用免疫荧光双标的方法检测LC3-Ⅱ与TUNEL的共定位表达。44.6%的LC3-Ⅱ阳性细胞与TUNEL阳性细胞共定位表达(图2),且运动训练组的LC3-Ⅱ与TUNEL的共定位细胞数明显少于对照组($P<0.05$)。

表1 各组大鼠造模术后不同时间点mNSS的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	3d	7d	14d
运动训练组	10	-	4.2±1.1	1.8±0.4 ^①
对照组	15	8.4±0.4	5.2±0.8	3.8±0.4

注:①与对照组比较 $P<0.05$

表2 各组大鼠脑梗死体积的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	3d	7d	14d
运动训练组	10	-	30.5%±2.3%	16.8%±1.9% ^①
对照组	15	57.5%±1.1%	35.1%±2.5%	31.5%±1.2%

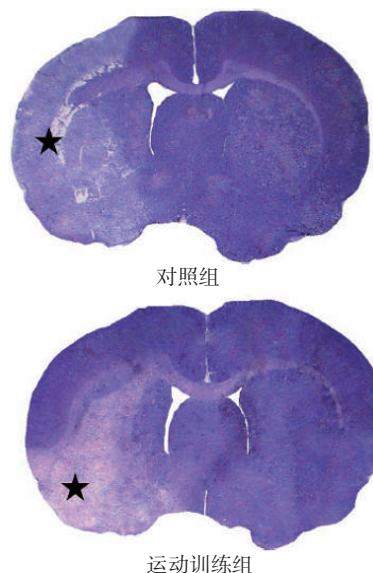
注:①与对照组比较 $P<0.05$

3 讨论

本实验研究观察了运动训练对脑梗死急性期大鼠梗死边缘区皮质神经细胞自噬及凋亡的作用。研究发现脑梗死急性期神经细胞会发生自噬及凋亡,运动训练能够减少神经细胞的自噬、凋亡,进而改善脑梗死引起的神经功能障碍。

我们前期的研究发现^[3-5,7],运动训练能够促进脑梗死急性期大鼠的神经功能恢复,本研究发现,造模术后第7、14天,运动训练组的脑梗死大鼠神经功

图1 脑梗死大鼠术后14d脑梗死体积比较



能评分均优于对照组,且第14天差异有显著性意义。同时我们发现造模术后第7、14天,运动训练大鼠的脑梗死体积较对照组减小,且第14天差异有显著性意义。以上结果再次证实,运动训练能够改善脑梗死引起的神经功能障碍,且减小脑梗死体积,同时延长运动训练时间更有利于改善功能障碍及减小梗死体积。

脑梗死引起神经细胞死亡参与神经功能障碍的发生,其中凋亡及坏死是脑梗死急性期两种主要的细胞死亡方式,如今自噬作为发生于脑梗死急性期的另一种重要的细胞死亡方式被广泛关注^[1,8-9]。自噬是细胞将细胞内长寿命的蛋白和细胞器运送至溶酶体降解和回收利用的途径^[10],根据细胞内物质运送到溶酶体的方式,自噬分为三种类型:分子伴侣介导的自噬、小自噬和大自噬^[11]。大自噬是自噬的主要形式,因此本文所指的自噬均为大自噬,在自噬的过程中,一个双层或多层膜结构非选择性地包裹细胞质内的大量蛋白和细胞器,形成自噬体或自噬囊泡。随后,自噬体的外膜与溶酶体膜结合形成自噬溶酶体。在溶酶体水解酶的作用下,自噬溶酶体的内膜和包裹的细胞质成分被分解和重新利用^[6,10-11]。自噬在神经系统疾病中的作用尚不明确^[12-13],目前的研究认为缺血性脑血管病导致脑内自噬体聚集,过量的自噬促使细胞发生一系列病理改变进而引起

图2 脑梗死边缘区LC3-Ⅱ和TUNEL免疫荧光结果

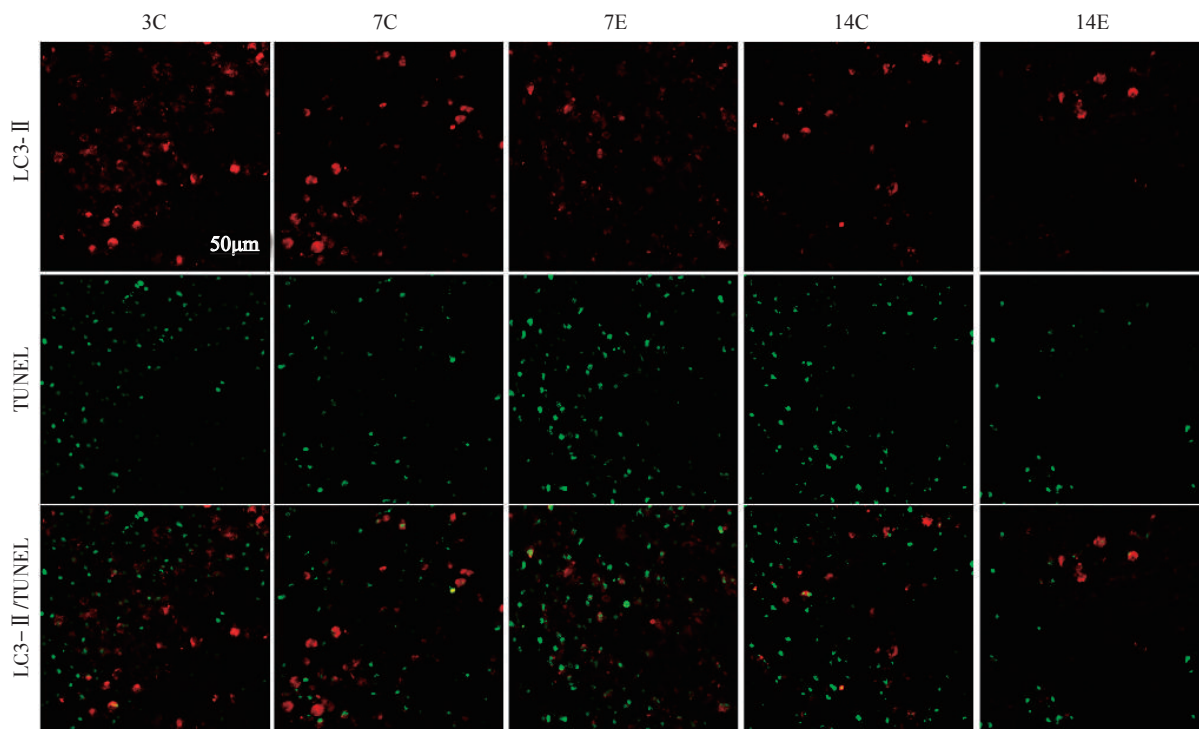
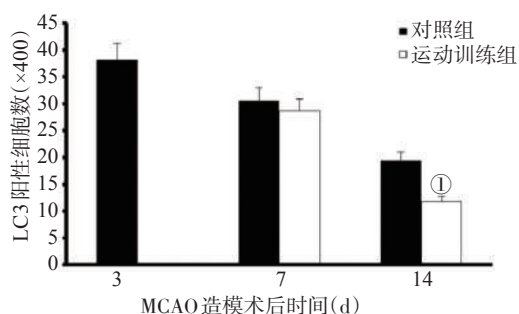
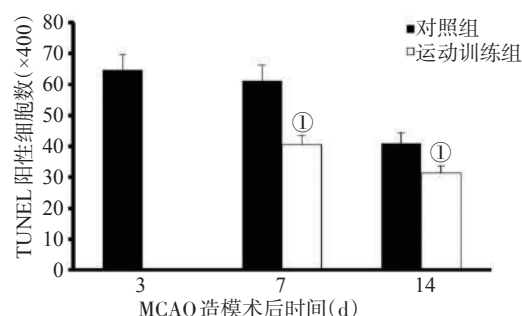


图3 脑梗死边缘区LC3-Ⅱ阳性细胞数比较



注:与对照组比较,① $P<0.05$

图4 脑梗死边缘区TUNEL阳性细胞数比较



注:与对照组比较,① $P<0.05$

细胞死亡^[1,14-17],而减少自噬可以减少神经细胞死亡^[15,17]。我们的研究发现,脑梗死急性期梗死边缘区可见神经细胞自噬,其中梗死后3d自噬表达最多,术后14d表达最少,说明神经细胞自噬主要在脑梗死急性期起作用。运动训练是临床上常用的康复治疗手段,Quindry等^[18]的实验发现,心肌梗死前的预训练可以维持基础的自噬量,从而对缺血后的心肌起保护作用。Chen等^[19]的实验认为,心肌梗死后大鼠的运动训练可以减少梗死后的自噬,改善心肌功

能。我们以往的^[3-4]及本次研究均发现,于造模术后第3天即开始运动训练,可以改善脑梗死后的神经功能障碍,然而运动训练促进梗死急性期的功能恢复与梗死后细胞自噬之间的关系尚不清楚。本研究发现,脑梗死后第3天,大鼠梗死边缘区可见大量自噬体的聚积,造模术后14d,运动训练组大鼠脑梗死边缘区自噬体聚集较对照组减少,说明脑梗死急性期给予大鼠运动训练,可以减少自噬体聚积。相关性分析显示LC3-Ⅱ阳性细胞数与神经功能评分及

梗死体积成正相关,说明脑梗死急性期运动训练对神经功能的改善作用与其对于自噬的调节有关。

脑梗死急性期的神经细胞凋亡是神经功能损伤的主要因素之一^[20],神经细胞凋亡参与缺血半暗带区的神经细胞死亡^[5,20]。细胞凋亡即程序性细胞死亡,它是一个主动过程,涉及一系列蛋白的激活、表达以及调控等。我们的研究发现,脑梗死急性期梗死边缘区可见神经细胞凋亡,且梗死后3d凋亡数量最多,术后14d凋亡数量最少。脑梗死急性期即给予运动训练,可以减少梗死边缘区的神经细胞凋亡^[5]。研究表明,脑梗死后神经细胞的自噬及凋亡同时发生,且自噬相关蛋白与凋亡相关蛋白间存在相关性^[21-22],我们的研究同样发现,自噬与凋亡存在共定位表达,提示自噬与凋亡间存在相互作用^[21-22]。细胞自噬和细胞凋亡之间的关系非常复杂,在不同的条件下,自噬与凋亡间的相互作用也不同^[22]。Shang等^[22]研究认为,脑梗死急性期神经细胞自噬及凋亡是神经细胞死亡的重要方式,抑制神经细胞自噬及凋亡有利于神经功能恢复。本研究中,我们同样发现脑梗死大鼠梗死边缘区可见神经细胞自噬及凋亡,且自噬和凋亡可在同一细胞内表达。而运动训练可以减少脑梗死后神经细胞的自噬及凋亡,且改善神经功能,说明减少脑梗死急性期的神经细胞自噬和凋亡,有利于神经功能的改善。

综上所述,本研究表明运动训练可以通过对脑梗死急性期大鼠梗死边缘区神经细胞自噬的调节,减少凋亡,改善受损的神经功能。

参考文献

- [1] Zheng YQ, Liu JX, Li XZ, et al. RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(7):919—927.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84—91.
- [3] Zheng HQ, Zhang LY, Luo J, et al. Physical exercise promotes recovery of neurological function after ischemic stroke in rats[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6):10974—10988.
- [4] Luo J, Hu XQ, Zhang LY, et al. Physical exercise regulates neural stem cells proliferation and migration via SDF-1 α /CXCR4 pathway in rats after ischemic stroke[J]. Neurosci Lett, 2014, 578:203—208.
- [5] 李莉莉, 胡昔权, 张丽颖, 等. 运动训练对脑缺血大鼠神经功能及梗死边缘区细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(6):528—532.
- [6] Zhang J, Zhang Y, Li J, et al. Autophagosomes accumulation is associated with β -amyloid deposits and secondary damage in the thalamus after focal cortical infarction in hypertension rats[J]. J Neurochem, 2012, 120(4):564—573.
- [7] 郑海清, 胡昔权, 方杰, 等. 运动训练对脑梗死大鼠梗死边缘区突触可塑性的影响[J]. 中华医学杂志, 2012, 92(9):628—633.
- [8] Wen YD, Sheng R, Zhang LS, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways[J]. Autophagy, 2008, 4(6):762—769.
- [9] Puyal J, Vaslin A, Mottier V, et al. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy[J]. Ann Neurol, 2009, 66(3):378—389.
- [10] Mortimore GE, Schworer CM. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver[J]. Nature, 1977, 270(5633):174—176.
- [11] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182):1069—1075.
- [12] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698):990—995.
- [13] Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, et al. Autophagy: for better or for worse[J]. Cell Res, 2012, 22(1):43—61.
- [14] Adhami F, Liao G, Morozov YM, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy[J]. Am J Pathol, 2006, 169(2):566—583.
- [15] Degterev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(2):112—119.
- [16] Puyal J, Clarke PG. Targeting autophagy to prevent neonatal stroke damage[J]. Autophagy, 2009, 5(7):1060—1061.
- [17] Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury[J]. Am J Pathol, 2008, 172(2):454—469.
- [18] Quindry JC, Miller L, McGinnis G, et al. Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis[J]. J Appl Physiol, 2012, 113(3):498—506.
- [19] Chen CY, Hsu HC, Lee BC, et al. Exercise training improves cardiac function in infarcted rabbits: involvement of autophagic function and fatty acid utilization[J]. Eur J Heart Fail, 2010, 12(4):323—330.
- [20] Zurita M, Vaquero J, Zurita I. Presence and significance of CD-95 (Fas/APO1) expression after spinal cord injury[J]. J Neurosurg, 2001, 94(2 Suppl):257—264.
- [21] Zhu C, Wang X, Xu F, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(2):162—176.
- [22] Shang J, Deguchi K, Yamashita T, et al. Antiapoptotic and anti-autophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. J Neurosci Res, 2010, 88(10):2197—2206.