

# 红景天苷促进脑缺血/再灌注后内源性神经再生的作用涉及神经营养因子

张继州, 蒋 畅, 韩 静\*

福建省中医药科学院药物研究所, 福建 福州

收稿日期: 2024年3月19日; 录用日期: 2024年5月20日; 发布日期: 2024年5月31日

## 摘 要

背景: 红景天苷是红景天的主要生物活性物质和药理活性物质, 有报道称其对脑缺血/再灌注(I/R)具有神经保护作用。然而, 红景天苷是否可以增强脑I/R后的神经再生尚不清楚。本研究探讨了红景天苷对脑I/R后内源性神经再生的影响及相关机制。方法: 通过短暂性大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)诱导大鼠局灶性I/R。为了评估神经元的存活率, 对缺血半球中的神经核抗原(NeuN)进行免疫组织化学染色。此外, 对缺血半球侧脑室下区(SVZ)和纹状体中的增殖性神经祖细胞生物标志物进行免疫荧光双标或三标染色, 以研究神经再生情况。此外, 使用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和酶联免疫吸附测定(ELISA)检测神经营养因子(NTFs)脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)的表达。结果: 红景天苷使I/R损伤后NeuN阳性细胞的损失得以恢复。脑I/R损伤显著增加了5-溴脱氧尿苷(BrdU)和doublecortin(DCX)的表达, 增加了SVZ中BrdU/Nestin/DCX共同标记细胞的数量, 以及纹状体中BrdU/Nestin/胶质纤维酸性蛋白(GFAP)共同标记细胞的数量。红景天苷治疗进一步促进了BrdU/DCX标记的神经母细胞和BrdU/Nestin/GFAP标记的活性星形胶质细胞的增殖。此外, 红景天苷还提高了缺血周边区域BDNF和NGF的mRNA表达和蛋白浓度。结论: 红景天苷可促进脑I/R后的内源性神经再生, 其作用机制可能涉及对BDNF/NGF的调节。

## 关键词

红景天苷, 脑缺血/再灌注, 缺血性中风, 神经再生, BDNF

# The Effect of Salidroside in Promoting Endogenous Neural Regeneration after Cerebral Ischemia/Reperfusion Involves Neurotrophic Factors

Jizhou Zhang, Chang Jiang, Jing Han\*

\*通讯作者。

文章引用: 张继州, 蒋畅, 韩静. 红景天苷促进脑缺血/再灌注后内源性神经再生的作用涉及神经营养因子[J]. 中医学, 2024, 13(5): 1013-1025. DOI: 10.12677/tcm.2024.135156

## Abstract

**Background:** Salidroside is the major bioactive and pharmacological active substance in *Rhodiola rosea* L. It has been reported to have neuroprotective effects on cerebral ischemia/reperfusion (I/R). However, whether salidroside can enhance neural regeneration after cerebral I/R is still unknown. This study investigated the effects of salidroside on the endogenous neural regeneration after cerebral I/R and the related mechanism. **Methods:** Focal cerebral I/R was induced in rats by transient middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R). To evaluate the survival of neurons, immunohistochemical staining of Neuronal Nuclei (NeuN) in the ischemic hemisphere were conducted. Also, immunofluorescence double or triple staining of the biomarkers of proliferating neural progenitor cells in Subventricular Zone (SVZ) and striatum of the ischemia hemisphere were performed to investigate the neurogenesis. Furthermore, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the expression of neurotrophic factors (NTFs) brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF). **Results:** Salidroside treatment ameliorated I/R induced neurobehavioral impairment, and reduced infarct volume. Salidroside also restored NeuN positive cells loss after I/R injury. Cerebral I/R injury significantly increased the expression of 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) and doublecortin (DCX), elevated the number of BrdU/Nestin/DCX triple-labeled cells in SVZ, and BrdU/Nestin/glial fibrillary acidic protein (GFAP) triple-labeled cells in striatum. Salidroside treatment further promoted the proliferation of BrdU/DCX labeled neuroblasts and BrdU/Nestin/GFAP labeled reactive astrocytes. Furthermore, salidroside elevated the mRNA expression and protein concentration of BDNF and NGF in ischemia periphery area, as well. **Conclusions:** Salidroside enhances the endogenous neural regeneration after cerebral I/R. The mechanism of the effect may involve the regulation of BDNF/NGF.

## Keywords

Salidroside, Cerebral Ischemia/Reperfusion, Ischemic Stroke, Neural Regeneration, BDNF

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

中风是工业化国家死亡率和发病率的主要原因[1], 缺血性中风占有所有中风病例的近 85% [2]。该疾病的极高残疾率和死亡率给家庭和社会带来了极其沉重的负担。组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)是目前美国食品和药物管理局(FDA)批准用于缺血性中风治疗的唯一治疗药物。然而, 它的治疗时间窗仅为发病后 3~4.5 小时[3], 以至于大量患者无法在第一时间得到救治。减少梗死体积和促进受损大脑中新神经元的产生是中风治疗的关键方法。然而, 目前尚未开发出有效的药物。越来越多的证据表明, 在特定的脑区如室管膜下区(SVZ)和海马齿状回存在神经干细胞, 它们具有自我更新和多能性[4]。据报道, 缺血/缺氧等刺激

会增强这些区域的神经发生[5]。促进内源性神经再生已成为中风治疗的关键策略[6]。

红景天苷是从红景天的根和根茎中提取的主要活性成分,在其他物种中如女贞[7]、桂花[8]、和非洲榭寄生[9]等也有发现。近年来,红景天苷因其在许多器官系统中具有广泛的药理作用而越来越受到关注[10][11][12][13]。特别是,体外或体内实验证实,红景天苷对神经系统疾病有很好的治疗作用[14]。近年来,许多研究人员报道了红景天苷对脑缺血损伤的影响。研究发现,红景天苷对缺血/再灌注(I/R)损伤具有高度的神经保护作用,治疗时间窗较宽[15][16],主要通过抗氧化和抗炎作用对脑缺血发挥神经保护作用[17][18][19][20]。在我们之前的研究中,我们也报道了 Nrf2 通路参与红景天苷对脑缺血损伤的抗氧化作用[21]。我们还发现,红景天苷的神经保护作用与多巴胺能系统的调节有关[22]。

值得注意的是,有证据表明红景天苷可以促进阿尔茨海默病大鼠模型的神经发生[23][24]。它诱导间充质干细胞(MSCs)分化为多巴胺能神经元[25]。此外,发现红景天苷可以保护大鼠神经干细胞免受缺氧诱导的损伤[26]。这些事实表明,红景天苷可能具有促进神经发生的作用。然而,到目前为止,红景天苷对脑缺血后内源性神经再生的影响尚未见报道。

本研究探讨了红景天苷对局灶性脑 I/R 大鼠模型神经康复和内源性神经再生的影响,并探讨了其相关机制。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 动物

雄性 Sprague-Dawley 大鼠(8~10 周龄),体重 280~350 g,动物在 12 小时的光/暗循环下被关在笼子里,自由获得标准饮食和水。本研究方案符合国际动物实验法,并经福建省中医药科学院伦理委员会批准。(批准号: FJATCM-IAC2021008)

### 2.2. 短暂性大脑中动脉闭塞(MCAO)模型

根据我们先前研究[13]修改的方法进行局灶性脑 I/R。大鼠用 2%~3%异氟烷麻醉。麻醉后,在小型动物麻醉机上用 1%~2%异氟烷维持动物。在颈部进行垂直中线切口,暴露并分离右颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。对 ECA 的分支进行解剖、凝固和切割。将具有硅涂层尖端的尼龙线(对于 280~350 g 的大鼠,直径为 0.38 mm)通过 ECA 残端插入 ICA 中,直到感觉到轻度阻力。此时,缝合线已向颈动脉分叉远端推进约 17~18 mm,并闭塞大脑中动脉(MCA)。120 分钟后,将缝线从 ICA 中取出,以允许 MCA 再灌注。然后立即对远端 ICA 进行凝固。在手术过程中,通过直肠监测体温,并使用加热垫将体温保持在 36.5°C 至 37.0°C 之间。假手术组的大鼠接受了所有的手术,但没有栓塞。

为了确认 MCAO 模型的成功,在再灌注后立即通过以下 5 点评分系统评估神经行为: 0, 无缺陷; 1) 难以完全伸展对侧前肢; 2) 难以直线行走; 3) 向对侧旋转; 4) 向对侧倾斜。评分低于 3 分的大鼠被纳入以下测试,并根据其行为评分进行分组,以确保实验开始时神经损伤水平的一致性。

### 2.3. 实验分组和 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)注射

为了评估红景天苷对神经行为恢复的影响,将 52 只大鼠分为 5 组:假手术组(Sham, n = 12)、载体组(IscVeh, n = 12)和 3 个红景天苷治疗组(分别为 IscSal20、IscSal40 和 IscSal80, n = 8、12 和 8)。在脑 I/R 后第 7 天处死它们以进行进一步分析。另外 15 只大鼠分为 3 组:假手术组(Sham, n = 5)、溶剂载体组(IscVeh, n = 5), 和红景天苷治疗组(IscSal40, n = 5)。在手术后第 3 天处死它们,制备脑切片用于免疫荧光和免疫组织化学染色,以检测红景天苷对脑 I/R 后神经再生的影响。IscSal20、IscSal40 和 IscSal80 组的大鼠腹腔内给药 20、40、80 mg/kg 红景天苷,每天一次,在脑 I/R 后立即开始,并持续指定的时间段。同时,

溶剂载体组和假手术组大鼠给予生理盐水。

对于用于检测神经再生的大鼠，在 I/R 后第 1 天和第 2 天腹腔注射 BrdU (Sigma, 50 mg/kg)，以标记增殖细胞。

## 2.4. 荧光和免疫组织化学染色

再灌注后 3 或 7 天，最后一次红景天苷给药结束后 2 小时，用异氟烷对动物进行深度麻醉，然后用 0.9% 生理盐水和 4% 多聚甲醛溶液从左心室灌注，直到四肢静止。取出大脑，在 4% 多聚甲醛中后固定，并在蔗糖梯度中脱水至少 48 小时。然后，用冷冻切片机将 30  $\mu\text{m}$  厚的冷冻冠状切片切片，置于防冻缓冲液中，在  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存，然后染色。

免疫荧光和免疫组织化学染色使用我们先前研究[14]中的方法进行。选择包含皮层、SVZ 和纹状体的切片(前囟 $-2.0$  至  $-1.0$  mm; Paxinos 和 Watson, 2005)。在漂浮切片上进行免疫荧光染色。对于 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)染色，切片在含有 10% 甲酰胺的  $2 \times \text{SSC}$  溶液中在  $65^{\circ}\text{C}$  下孵育 2 小时。在  $2 \times \text{SSC}$  溶液中冲洗后，将切片在 2 N 盐酸中于  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 分钟，并在 0.1 M 硼酸溶液(pH 8.5)中冲洗两次。在 0.01M 磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤后，将切片在封闭试剂(0.01M PBS 与 5% 牛血清白蛋白和 0.5% Triton X-100)中在室温下孵育 1 小时以阻断非特异性结合。之后，用抗 BrdU 抗体和特定细胞标志物的抗体对切片进行双重标记。将脑切片在稀释的抗体中孵育，将其在 0.01M PBS 中用封闭试剂在  $4^{\circ}\text{C}$  下稀释过夜。然后，用 PBS 洗涤切片，并在第二抗体中在  $37^{\circ}\text{C}$  的加湿室中孵育 1 小时。在共聚焦激光扫描显微镜上观察载玻片。

为了定量，选择每只大鼠的 2 个不连续的切片，并拍摄每个切片的 5 个不重叠的视野进行测量。BrdU 和 DCX 的免疫荧光强度用整张照片的积分光密度(IOD)表示，使用 Image-J 1.51K 软件对其进行分析。根据大鼠所有照片的平均 IOD 计算一只大鼠的免疫荧光强度。BrdU+/Nestin+/DCX+或 BrdU+/-Nestin+/GFAP+ 细胞数的定量由对实验分组不知情的观察者进行。

对于免疫组织化学染色，将切片在 3% 过氧化氢酶中孵育 10 分钟以抑制内源性过氧化物酶活性。之后，用 NeuN 抗体在  $4^{\circ}\text{C}$  下标记切片过夜。然后将切片与 HRP-聚合物抗兔 IgG 工作溶液孵育 15 分钟，并用二氨基联苯胺(DAB)染色 5 分钟。之后，用二甲苯清洗切片，用中性树胶固定在载玻片上。在倒置显微镜上观察。为了定量，选择每只大鼠的 2 个不连续的切片，并拍摄每个切片的 5 个不重叠的视野进行测量。使用 Image-J 1.51K 软件对 NeuN+ 细胞数进行计数。

## 2.5. 酶联免疫吸附测定法

为了确定红景天苷对脑组织神经营养因子的影响，在脑 I/R 后 7 天处死大鼠。在冰上解剖梗死周围区域的脑组织，并在盐水中匀浆(10% w/v)。脑源性神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)的浓度根据制造商的说明书使用 ELISA 试剂盒测量。将所有样品装载在 96 孔板中，并在  $37^{\circ}\text{C}$  下孵育 40 分钟。然后洗涤孔板，用生物素化抗体处理，然后在  $37^{\circ}\text{C}$  下用链霉亲和素-HRP 处理。最后加入 TMB 基质并使用硫酸(2N)停止反应。使用酶标仪在 450 nm 处测量孔的吸光度。

## 2.6. 实时逆转录定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)分析

使用超纯 RNA 试剂盒从脑梗塞周围区域的脑组织中提取总 RNA。在 NanoDrop 2000 中测量总 RNA 的浓度和纯度。使用 HiFi-MMLV cDNA 试剂盒产生互补 DNA (cDNA)。将 RNA 稀释至最终浓度为 100~500 ng/ $\mu\text{l}$ 。定量 RT-PCR 在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 装置上使用 UltraSYBR 混合物(With ROX)试剂盒进行。扩增程序设置如下： $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 分钟，( $95^{\circ}\text{C}$  15 秒  $\rightarrow$   $60^{\circ}\text{C}$  60 秒)  $\times$  45 圈和  $65^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$   $95^{\circ}\text{C}$  (每

15s 升温 0.3°C)进行溶出曲线测定。NCBI BLAST 设计的寡核苷酸引物序列如下: BDNF (152 bp), 正向: CTACGAGACAAGTGTAATC, 反向: TTATGAATCGCCAGCCAAT; NGF (226 bp), 正向: GAGCGCATCGCTCCTT, 反向: GAGCGCATCGCTCCTT; GADPH (138 bp), 正向: TGGAGTCTACTGGCGTCTT, 反向: TGTCATATTTCTCGTTCA。对所有样品进行三次分析, 并使用 2- $\Delta\Delta$ CT 方法对相对基因表达进行量化, 使用 GADPH 作为内参基因。

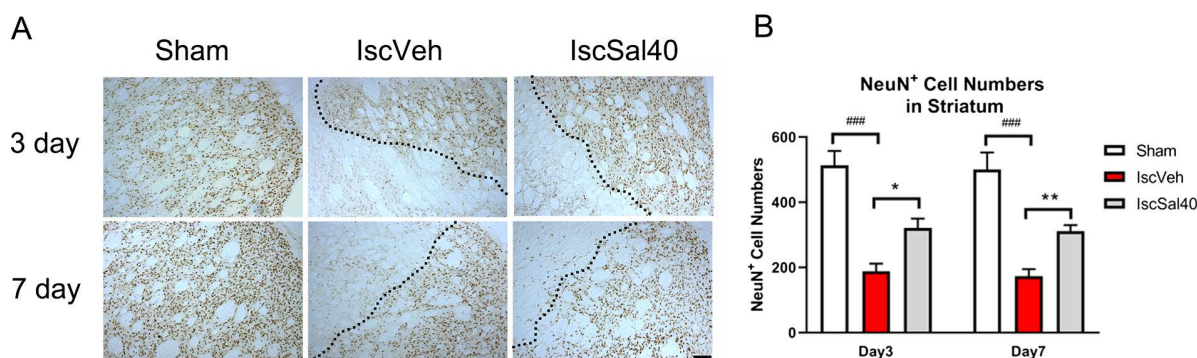
## 2.7. 统计分析

数据以平均值  $\pm$  SEM 表示。所有分析均使用 SPSS 20.0 软件进行。多组比较通过单向方差分析进行评估, 然后在数据正态分布且符合方差同质性时进行 LSD 检验。当数据正态分布且不符合方差齐性时, 采用 Games-Howell 后热检验。p 值小于 0.05 被认为具有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 红景天苷提高神经元的存活率

NeuN 是一种神经元特异性核蛋白, 可在整个神经系统的大多数类型的神经元细胞中观察到其表达。因此, 我们使用 NeuN 作为生物标志物来研究神经元细胞的总体存活率(图 1)。MCAO 手术后, 缺血性纹状体中的 NeuN<sup>+</sup>细胞数量显著减少, NeuN 表达的阳性区域缩小(图 1(A), 图 1(B),  $p < 0.001$ )。在红景天苷处理后, NeuN<sup>+</sup>细胞数量显著增加。此外, 与 IscVeh 组相比, NeuN 表达的阳性区域扩大(在不同时间点  $p < 0.05$  或  $p < 0.01$ )。这些结果表明, 红景天苷可能促进脑 I/R 后神经元细胞的存活。

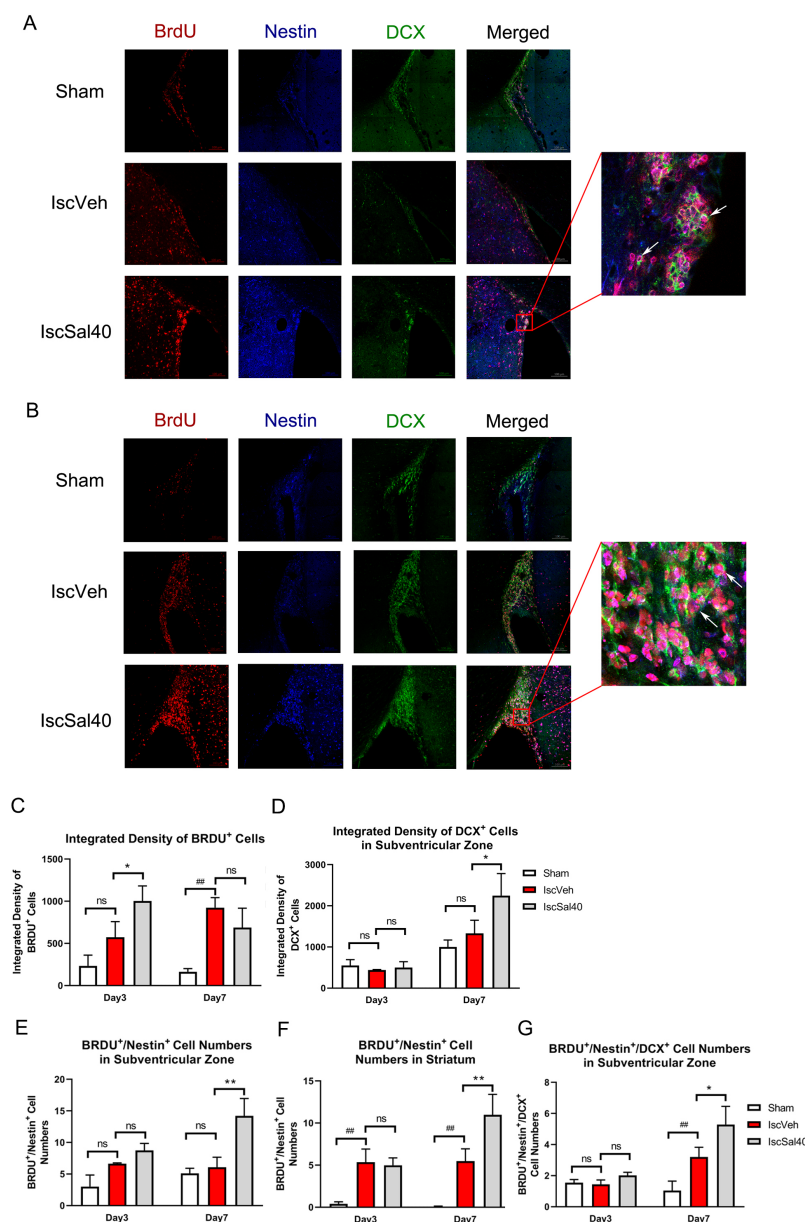


**Figure 1.** Salidroside increased the numbers of NeuN<sup>+</sup> cells, and the immunoreactivity area of NeuN expression in ischemic striatum after MCAO. (A) NeuN IHC staining in striatum, 3 days or 7 days after MCAO. The dotted line showed the barrier of NeuN<sup>+</sup> areas. Scale bar, 100  $\mu$ m; (B) NeuN<sup>+</sup> cell numbers. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$  in the sham, IscVeh, IscSal40 groups). Multiple group comparisons were assessed by one-way analysis of variance, followed by LSD-t test. ###:  $p < 0.001$  compared to the sham group. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , compared to the IscVeh group

**图 1.** 红景天苷增加 MCAO 后缺血性纹状体中 NeuN<sup>+</sup>细胞的数量和 NeuN 表达的阳性面积。(A) MCAO 后 3 天或 7 天纹状体 NeuN-IHC 染色。虚线显示了 NeuN<sup>+</sup>区域的边界。比例尺: 100  $\mu$ m。(B) NeuN<sup>+</sup>细胞数。数据表示为平均值  $\pm$  SEM (假手术组、IscVeh 组和 IscSal40 组中  $n = 5$ )。通过单因素方差分析和 LSD-t 检验评估多组比较。###: 与假手术组相比  $p < 0.001$ 。\*: 与 IscVeh 组相比,  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

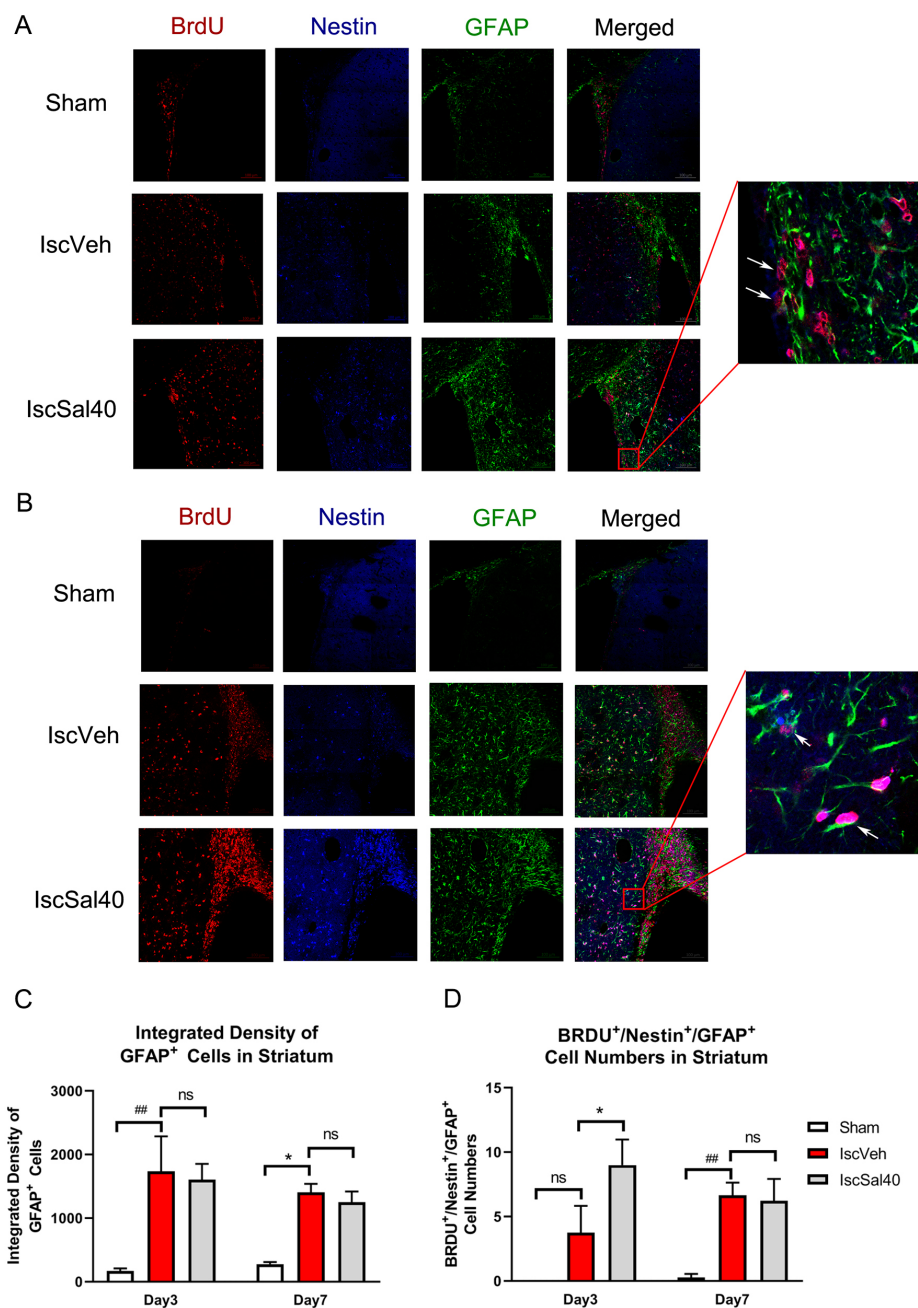
### 3.2. 红景天苷促进 I/R 后神经再生

一些生物标志物可以用来显示神经再生和分化的情况。5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)可以识别增殖细胞, 巢蛋白被认为是神经干/祖细胞标志物, 而双皮质素(DCX)是神经前体细胞的生物标志物, 胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是星形胶质细胞的生物标记物。我们研究了标记细胞, 特别是双/三标记共定位细胞在缺血性纹状体和邻近的室下区(SVZ)中的表达和定位(图 2、图 3)。



**Figure 2.** Effect of salidroside on BrdU/Nestin/DCX immunoreactivity in ischemic hemisphere. Red fluorescence from Cy3 indicates BrdU, blue fluorescence from FITC indicates Nestin, and green fluorescence from Alexa Fluor 488 indicates DCX. The arrows show the co-localization of BrdU/Nestin/DCX. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  and 500  $\mu\text{m}$  for enlarged images. (A) 3 days after MCAO; (B) 7 days after MCAO; (C) Quantification of immunofluorescence intensity of BrdU<sup>+</sup> cells in the ischemic hemisphere; (D) Quantification of immunofluorescence intensity of DCX<sup>+</sup> cells in the SVZ; (E) Numbers of BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup> cells in SVZ; (F) Numbers of BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup> cells in the striatum; (G) Numbers of BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> cells in SVZ. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  in the sham,  $n = 5$  in IscVeh, IscSal40 groups). Multiple group comparisons were assessed by one-way analysis of variance, followed by LSD-t test. #:  $p < 0.05$ , ###:  $p < 0.01$ , compared to the sham group. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , compared to the IscVeh group. ns: no significance

**图 2.** 红景天苷对缺血半球 BrdU/Nestin/DCX 免疫反应性的影响。Cy3 通道的红色荧光表示 BrdU, FITC 通道的蓝色荧光表示 Nestin, Alexa Fluor 488 通道的绿色荧光表示 DCX。箭头显示 BrdU/Nestin/DCX 的共同定位。比例尺: 放大图像为 100  $\mu\text{m}$  和 500  $\mu\text{m}$ 。(A) MCAO 后 3 天。(B) MCAO 后 7 天。(C) 缺血半球 BrdU<sup>+</sup> 细胞免疫荧光强度的定量。(D) SVZ 中 DCX<sup>+</sup> 细胞免疫荧光强度的定量。(E) SVZ 中 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup> 细胞的数量。(F) 纹状体中 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup> 细胞的数量。(G) SVZ 中 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup> 细胞的数量。数据表示为平均值  $\pm$  SEM (假手术组  $n = 3$ , IscVeh 组  $n = 5$ , IscSal40 组)。通过单因素方差分析和 LSD-t 检验评估多组比较。#: 与假手术组相比,  $p < 0.05$ , ###:  $p < 0.01$ 。\*: 与 IscVeh 组相比,  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ 。ns: 没有显著性差异



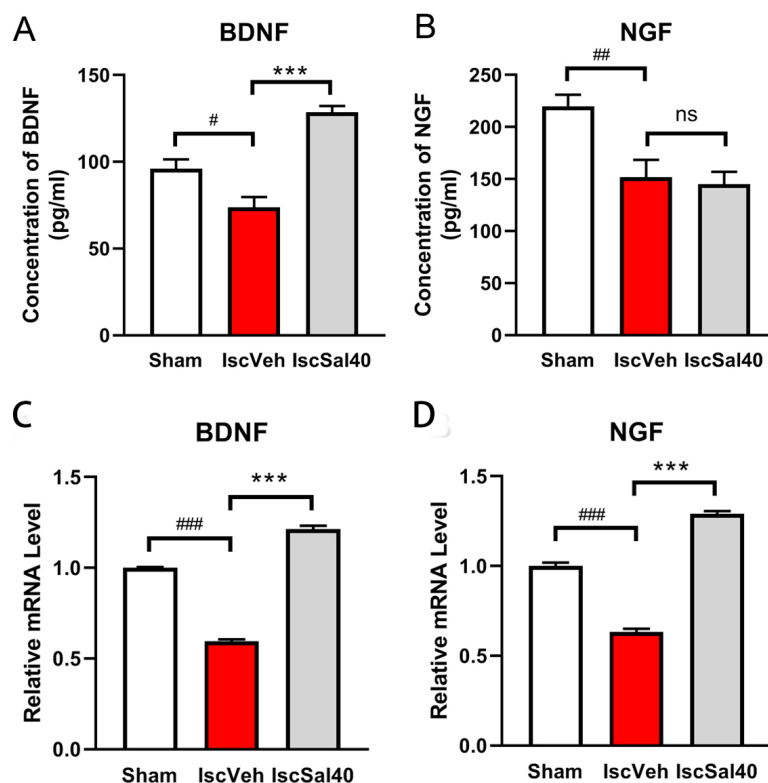
**Figure 3.** Effect of solidoside on BrdU/Nestin/GFAP immunoreactivity in ischemic hemisphere. Red fluorescence from Cy3 indicates BrdU, blue fluorescence from FITC indicates Nestin, and green fluorescence from Alexa Fluor 488 indicates GFAP. The arrows show the co-localization of BrdU/Nestin/GFAP. Scale bars: 100  $\mu$ m. (A) 3 days after MCAO; (B) 7 days after MCAO; (C) Quantification of immunofluorescence intensity of GFAP<sup>+</sup> cells in striatum; (D) Quantification of numbers of BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> cells in striatum. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 3 in the sham, n = 4 in IscVeh, IscSal40 groups). Multiple group comparisons were assessed by one-way analysis of variance, followed by LSD-t test. ##: p < 0.01 compared to the sham group. \*: p < 0.05 compared to the IscVeh group. ns: no significance

**图 3.** 红景天苷对缺血半球 BrdU/Nestin/GFAP 免疫反应性的影响。Cy3 通道的红色荧光表示 BrdU, FITC 通道的蓝色荧光表示 Nestin, Alexa Fluor 488 通道的绿色荧光表示 GFAP。箭头显示 BrdU/Nestin/GFP 的共同定位。比例尺: 放大图像为 100  $\mu$ m 和 500  $\mu$ m。(A) MCAO 后 3 天。(B) MCAO 后 7 天。(C) 纹状体中 GFAP<sup>+</sup> 细胞免疫荧光强度的定量。(D) 纹状体中 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> 细胞数量的定量。数据表示为平均值  $\pm$  SEM (假手术组 n = 3, IscVeh 组 n = 5, IscSal40 组)。通过单因素方差分析和 LSD-t 检验评估多组比较。#: 与假手术组相比, p < 0.05, #: p < 0.01。\*: 与 IscVeh 组相比 p < 0.01。ns: 没有显著性差异

SVZ 是大脑中的“干细胞生态位”之一。假手术组 SVZ 内存在少量 BrdU<sup>+</sup>细胞。I/R 后, 纹状体中出现一些 BrdU<sup>+</sup>细胞。MCAO 手术后 3 天, 纹状体和 SVZ 中 BrdU 免疫反应强度均增加(图 2(A)、图 2(B)、图 2(C)), 与假手术组相比, 这意味着脑 I/R 后神经细胞的增殖增强。一些巢蛋白阳性神经上皮细胞也在脑 I/R 前增殖。在 IscVeh 组中, BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>细胞数显著增加(图 2(A)、图 2(B)、图 2(E),  $p < 0.01$ )与假手术组相比。

DCX 阳性神经前体细胞, 即所谓的未成熟神经元, 仅分布在 SVZ 中。这些细胞具有向再生神经元细胞发育的能力。MCAO 后 7 天, 它们的光密度积分值略有增加(图 2(A)、图 2(B)、图 2(D)), 与假手术组相比。同时, 在 MCAO 后 7 天, SVZ 中的 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>细胞数量增加(图 3(A)、图 3(B)、图 3(F),  $p < 0.01$ )。

给予红景天苷后, MCAO 后 7 天 BrdU<sup>+</sup>的强度显著增强(图 2(A)、图 2(B)、图 2(C),  $p < 0.05$ )。类似地, 与 IscVeh 组相比, 红景天苷治疗后 7 天, DCX 免疫反应性增加(图 2(A)、图 2(B)、图 2(D),  $p < 0.01$ )。在再灌注后 7 天, 与 IscVeh 组相比, 红景天苷处理增强了 SVZ 和纹状体中的 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>细胞数量(图 2(A)、图 2(B), 图 2(E), 图 2(F),  $p < 0.01$ ), 以及 SVZ 中的 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>细胞数量。总之, 红景天苷治疗可以通过增强神经前体细胞和干细胞增殖来增强神经再生。



**Figure 4.** Salidroside increased the protein level and mRNA expression of BDNF and NGF at 7 days after MCAO. Concentration of BDNF (A) and NGF (B) in peri-infarct area were determined by ELISA. Relative mRNA levels of BDNF (A) and NGF (B) in ischemic area were determined by RT-PCR. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$  in each group). Multiple group comparisons were assessed by one-way analysis of variance, followed by LSD-t test. #:  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$ , ###:  $p < 0.001$  compared to the sham group. \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , compared to the IscVeh group

**图 4.** 通过 ELISA 测定 MCAO 后 7 天, 红景天苷增加了 BDNF 和 NGF 的蛋白水平和 mRNA 表达。RT-PCR 检测缺血区 BDNF(A)和 NGF(B)的相对 mRNA 水平。数据表示为平均值  $\pm$  SEM (每组  $n = 7$ )。通过单因素方差分析和 LSD-t 检验评估多组比较。#: 与假手术组相比,  $p < 0.05$ , ##:  $p < 0.01$ , ###:  $p < 0.001$ 。\*: 与 IscVeh 组相比,  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$



星形胶质细胞在脑损伤后被激活, 结果, MCAO 后 GFAP 免疫反应强度显著增强(图 3(A)~(C)),  $p < 0.01$ )。脑 I/R 后, 一些 GFAP<sup>+</sup>细胞也被 BrdU 和 Nestin 标记, 这主要在纹状体和 SVZ 中观察到。红景天苷处理不影响 GFAP 的表达(图 3(A)~(C)), 但与 IscVeh 组相比, 它可以在 I/R 后 3 天进一步增加 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>细胞数量(图 3(A)、图 3(B)、图 3(D)),  $p < 0.01$ )。总之, 尽管红景天苷不影响缺血性损伤后 GFAP 的上调, 但它可能会增加表达增殖标志物 BrdU 和干细胞标志物如 Nestin 的增殖反应性星形胶质细胞的数量。

### 3.3. 红景天苷对脑 BDNF 和 NGF 蛋白水平及 mRNA 表达的影响

BDNF 和 NGF 是常见的神经营养因子, 调节神经系统的发育、维持和功能。通过 ELISA 对神经营养因子的蛋白质水平进行定量(图 4)。MCAO 后 BDNF 和 NGF 蛋白水平均下降(图 4(A), 图 4(B)),  $p < 0.05$ )。与 IscVeh 组相比, 红景天苷治疗显著提高了 BDNF 和 NGF 水平(图 4(A), 图 4(B)),  $p < 0.05$ )。同时测定 BDNF 和 NGF 的 mRNA 表达。MCAO 手术后, 两种神经营养因子的相对 mRNA 水平急剧下降(图与假手术组相比, 图 4(C), 图 4(D)),  $p < 0.001$ )。红景天苷治疗后, BDNF 和 NGF 的 mRNA 水平显著升高(图与 IscVeh 组相比, 图 4(C), 图 4(D)),  $p < 0.001$ )。基于这些结果, 结合 BDNF 和 NGF 的蛋白水平变化, 红景天苷可能有助于脑 I/R 后神经营养因子的分泌。

## 4. 讨论

在本研究中, 我们研究了红景天苷对脑 I/R 的神经保护作用及其对神经再生的活性免疫组织化学和双标记荧光染色分析显示, 红景天苷促进 SVZ 神经母细胞(以 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>共染色表示)和缺血周围区反应性星形胶质细胞(以 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>共染色显示)的增殖。此外, 红景天苷提高了 BDNF/NGF 的 mRNA 水平、BDNF 的蛋白水平, 这可能参与了红景天苷促进神经发生的机制。

红景天苷对脑缺血损伤的作用以前已有文献记载。先前的研究报道, 红景天苷以剂量依赖的方式在 20~100 mg/kg 的剂量下对脑 I/R 大鼠发挥神经保护作用[16] [18] [27] [28] [29]。我们目前的研究结果表明, 在 40 mg/kg 和 80 mg/kg 剂量的红景天苷治疗中, 脑缺血再灌注损伤引起的神经行为损伤具有一定的剂量依赖性。这与其他报道一致。由于 40 mg/kg 剂量的红景天苷已经显示出显著的治疗效果, 我们在随后的实验中使用该剂量来评估红景天苷促进脑缺血后神经再生的作用。

DCX 是一种在新生神经元中表达的微管相关蛋白[30], 通常用作神经前体细胞的标志物。巢蛋白是神经上皮干细胞和放射状胶质细胞中的一种中间丝蛋白, 是胚胎神经干细胞的标志物, 其表达一直持续到星形胶质细胞发育。本研究发现, 缺血性损伤后 SVZ 区出现大量 BrdU<sup>+</sup>增殖细胞。它们中的许多与 DCX 共存。同时, Nestin 掺入 BrdU<sup>+</sup>细胞也在损伤区域进行标记。BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>和 BrdU<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>细胞位于不同但重叠的区域, 表明脑缺血刺激了内源性神经母细胞的明显增殖。这一现象与许多其他文献报道一致[31]。红景天苷可增加 SVZ 区 BrdU<sup>+</sup>/Nestin<sup>+</sup>/DCX<sup>+</sup>细胞的数量, 提示红景天苷可促进脑缺血后神经母细胞的增殖。

星形胶质细胞参与了脑缺血损伤的病理过程。它们对脑缺血损伤的反应是通过变得肿胀和 GFAP 的上调, 这种常见现象被称为反应性星形胶质细胞增生。反应性星形胶质细胞被证明对脑缺血后的神经行为恢复有益影响[32]。使用某些试剂抑制星形胶质细胞或敲除 GFAP 基因会损害或延迟神经功能恢复[33]。此外, 反应性星形胶质细胞不仅在形态上发生了变化, 而且其中一些还增殖了。大约 15%~40% 的星形胶质细胞变为增殖星形胶质细胞, 通过 GFAP 和 BrdU 双重染色进行标记。此外, 在纹状体的损伤周围区域, 大多数增殖的星形胶质细胞被 Nestin 标记, 这表明被缺血损伤激活的星形胶质瘤恢复了祖细胞标记。其他研究人员先前也观察到了这种现象[34]。缺血性脑损伤后, 在神经细胞分化因子 NeuroD1

作用后,纹状体星形胶质细胞转分化为功能成熟神经元[35]。这是身体对损伤的自发修复机制,有助于功能恢复。星形胶质细胞能够转分化为神经元的能力被用于中风的治疗。一项针对非人类灵长类动物的研究已经实现了操纵星形胶质细胞到神经元的转化[36],表明该疗法具有很好的前景。在本研究中,尽管没有发现红景天苷对 GFAP 表达的影响,但红景天苷的治疗显著增加了反应性星形胶质细胞的增殖,这些细胞表达祖细胞标志物,这表明红景天苷可能具有促进内源性星形胶质细胞向神经元转化的潜在作用。

BDNF 和 NGF 是神经营养因子家族的成员。它们是参与神经元发育、分化和存活的内源性蛋白质。BDNF 在促进神经再生、调节突触可塑性和脑缺血后功能恢复方面发挥重要作用[37]。许多研究报告称,中风后 BDNF 水平下降[38],提高 BDNF 水平的治疗或药物已被证明有助于中风后的康复[39] [40]。NGF 在调节神经系统中神经群体的生长、发育和可塑性方面发挥着重要作用。NGF 可提高神经细胞在体内和体外的存活率。它具有保护脑缺血后延迟神经元死亡的能力[41]。与 BDNF 类似,脑 I/R 后 NGF 表达下调,在缺血后早期给予外源性 NGF 可减轻脑梗死并改善神经行为评估[42]。NGF 可以诱导星形胶质细胞迁移,但不影响增殖[43]。本研究发现红景天苷能促进 BDNF 和 NGF 的转录。此外,红景天苷处理也提高了它们的蛋白质水平。研究表明,红景天苷对 BDNF 敲除小鼠脑缺血损伤的保护作用受到抑制[44]。另一项研究表明,红景天苷在抑郁症小鼠模型中上调 BDNF 基因[45]。红景天苷通过调节神经营养因子(BDNF、GDNF 和 CNTF)影响施旺细胞生长[46]。这些研究和我们目前的发现表明, BDNF 和 NGF 等神经营养因子的上调可能是红景天苷发挥多种神经保护作用的重要机制。

## 5. 结论

我们目前的工作表明,红景天苷可以增强神经祖细胞和反应性星形胶质细胞的增殖。其机制可能涉及红景天苷提高 BDNF/NGF 表达。本研究增加了对红景天苷神经保护作用机制的理解。

## 基金项目

本研究得到福建省自然科学基金项目(2021J01910)的资助。

## 参考文献

- [1] Paul, S. and Candelario-Jalil, E. (2021) Emerging Neuroprotective Strategies for the Treatment of Ischemic Stroke: An Overview of Clinical and Preclinical Studies. *Experimental Neurology*, **335**, Article ID: 113518. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113518>
- [2] Sarmah, D., Agrawal, V., Rane, P., Bhute, S., Watanabe, M., Kalia, K., Ghosh, Z., Dave, K.R., Yavagal, D.R. and Bhattacharya, P. (2018) Mesenchymal Stem Cell Therapy in Ischemic Stroke: A Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **103**, 990-998. <https://doi.org/10.1002/cpt.927>
- [3] Schmidt, A. and Minnerup, J. (2016) Promoting Recovery from Ischemic Stroke. *Expert Review of Neurotherapeutics*, **16**, 173-186. <https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1134324>
- [4] Tanaka, Y., Tanaka, R., Liu, M., Hattori, N. and Urabe, T. (2010) Cilostazol Attenuates Ischemic Brain Injury and Enhances Neurogenesis in the Subventricular Zone of Adult Mice after Transient Focal Cerebral Ischemia. *Neuroscience*, **171**, 1367-1376. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.008>
- [5] Fisch, U., Brégère, C., Geier, F., Chicha, L. and Guzman, R. (2020) Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rat Elicits a Region-Specific Neurotrophic Response in SVZ Microglia. *Journal of Neuroinflammation*, **17**, Article No. 26. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-1706-y>
- [6] Haupt, M., Gerner, S.T., Bahr, M. and Doeppner, T.R. (2023) Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke-Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article No. 4334. <https://doi.org/10.3390/ijms24054334>
- [7] Kim, H., Kong, C.S. and Seo, Y. (2022) Salidroside, 8(E)-Nuezhenide, and Ligustroside from *Ligustrum japonicum* Fructus Inhibit Expressions of MMP-2 and -9 in HT 1080 Fibrosarcoma. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article No. 2660. <https://doi.org/10.3390/ijms23052660>
- [8] Jiang, Y., Mao, S., Huang, W., Lu, B., Cai, Z., Zhou, F., Li, M., Lou, T. and Zhao, Y. (2016) Phenylethanoid Glycoside Profiles and Antioxidant Activities of *Osmanthus fragrans* Lour. Flowers by UPLC/PDA/MS and Simulated Di-

- gestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**, 2459-2466. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03474>
- [9] Agbo, M.O., Odimegwu, D.C., Okoye, F.B.C. and Osadebe, P.O. (2017) Antiviral Activity of Salidroside from the Leaves of Nigerian Mistletoe (*Loranthus micranthus* Linn) Parasitic on *Hevea brasiliensis* against Respiratory Syncytial Virus. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **30**, 1251-1256.
- [10] Tian, X., Huang, Y., Zhang, X., Fang, R., Feng, Y., Zhang, W., Li, L. and Li, T. (2022) Salidroside Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury via AMPK-Induced Suppression of Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Fission. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **448**, Article ID: 116093. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116093>
- [11] Jiang, S., Fan, F., Yang, L., Chen, K., Sun, Z., Zhang, Y., Cairang, N., Wang, X. and Meng, X. (2022) Salidroside Attenuates High Altitude Hypobaric Hypoxia-Induced Brain Injury in Mice via Inhibiting NF-KappaB/NLRP3 Pathway. *European Journal of Pharmacology*, **925**, Article ID: 175015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175015>
- [12] Luan, X., Cui, C., Jiang, J., Wang, C., Li, L., Li, H., Xu, C., Li, L., Chi, Y. and Yan, G. (2022) Salidroside Mitigates Airway Inflammation in Asthmatic Mice via the AMPK/Akt/GSK3beta Signaling Pathway. *International Archives of Allergy and Immunology*, **183**, 326-336. <https://doi.org/10.1159/000519295>
- [13] Yao, F., Jiang, X., Qiu, L., Peng, Z., Zheng, W., Ding, L. and Xia, X. (2022) Long-Term Oral Administration of Salidroside Alleviates Diabetic Retinopathy in Db/Db Mice. *Frontiers in Endocrinology*, **13**, Article ID: 861452. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.861452>
- [14] Han, J., Zhang, J.Z., Zhong, Z.F., Li, Z.F., Pang, W.S., Hu, J. and Chen, L.D. (2018) Gualou Guizhi Decoction Promotes Neurological Functional Recovery and Neurogenesis Following Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion. *Neural Regeneration Research*, **13**, 1408-1416. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235296>
- [15] Lai, W., Zheng, Z., Zhang, X., Wei, Y., Chu, K., Brown, J., Hong, G. and Chen, L. (2015) Salidroside-Mediated Neuroprotection Is Associated with Induction of Early Growth Response Genes (EGRS) across a Wide Therapeutic Window. *Neurotoxicity Research*, **28**, 108-121. <https://doi.org/10.1007/s12640-015-9529-9>
- [16] Wei, Y., Hong, H., Zhang, X., Lai, W., Wang, Y., Chu, K., Brown, J., Hong, G. and Chen, L. (2017) Salidroside Inhibits Inflammation through PI3K/Akt/HIF Signaling after Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Inflammation*, **40**, 1297-1309. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0573-x>
- [17] Hu, H., Li, Z., Zhu, X., Lin, R. and Chen, L. (2014) Salidroside Reduces Cell Mobility via NF-KappaB and MAPK Signaling in LPS-Induced BV2 Microglial Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, **2014**, Article ID: 383821. <https://doi.org/10.1155/2014/383821>
- [18] Lai, W., Xie, X., Zhang, X., Wang, Y., Chu, K., Brown, J., Chen, L. and Hong, G. (2018) Inhibition of Complement Drives Increase in Early Growth Response Proteins and Neuroprotection Mediated by Salidroside after Cerebral Ischemia. *Inflammation*, **41**, 449-463. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0701-7>
- [19] Liu, X., Wen, S., Yan, F., Liu, K., Liu, L., Wang, L., Zhao, S. and Ji, X. (2018) Salidroside Provides Neuroprotection by Modulating Microglial Polarization after Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroinflammation*, **15**, Article No. 39. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1081-0>
- [20] Wang, Y., Su, Y., Lai, W., Huang, X., Chu, K., Brown, J. and Hong, G. (2020) Salidroside Restores an Anti-Inflammatory Endothelial Phenotype by Selectively Inhibiting Endothelial Complement after Oxidative Stress. *Inflammation*, **43**, 310-325. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01121-y>
- [21] Han, J., Xiao, Q., Lin, Y.H., Zhong, Z.Z., He, Z.D., Hu, J. and Chen, L.D. (2015) Neuroprotective Effects of Salidroside on Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Involve the Nuclear Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway. *Neural Regeneration Research*, **10**, 1989-1996. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.172317>
- [22] Zhong, Z.F., Han, J., Zhang, J.Z., Xiao, Q., Chen, J.Y., Zhang, K., Hu, J. and Chen, L.D. (2019) Neuroprotective Effects of Salidroside on Cerebral Ischemia/Reperfusion-Induced Behavioral Impairment Involves the Dopaminergic System. *Frontiers in Pharmacology*, **10**, Article No. 1433. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01433>
- [23] Qu, Z.Q., Zhou, Y., Zeng, Y.S., Lin, Y.K., Li, Y., Zhong, Z.Q. and Chan, W.Y. (2012) Protective Effects of a Rhodiola Crenulata Extract and Salidroside on Hippocampal Neurogenesis against Streptozotocin-Induced Neural Injury in the Rat. *PLOS ONE*, **7**, E29641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029641>
- [24] Ha, X.Q., Yang, B., Hou, H.J., Cai, X.L., Xiong, W.Y. and Wei, X.P. (2020) Protective Effect of Rhodiololide and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Infected with HIF-1-Expressing Adenovirus on Acute Spinal Cord Injury. *Neural Regeneration Research*, **15**, 690-696. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.266920>
- [25] Zhao, H.B., Ma, H., Ha, X.Q., Zheng, P., Li, X.Y., Zhang, M., Dong, J.Z. and Yang, Y.S. (2014) Salidroside Induces Rat Mesenchymal Stem Cells to Differentiate into Dopaminergic Neurons. *Cell Biology International*, **38**, 462-471. <https://doi.org/10.1002/cbin.10217>
- [26] Yan, R., Xu, H. and Fu, X. (2018) Salidroside Protects Hypoxia-Induced Injury by Up-Regulation of MiR-210 in Rat Neural Stem Cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **103**, 1490-1497. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.184>

- [27] Zuo, W., Yan, F., Zhang, B., Hu, X. and Mei, D. (2018) Salidroside Improves Brain Ischemic Injury by Activating PI3K/Akt Pathway and Reduces Complications Induced by Delayed TPA Treatment. *European Journal of Pharmacology*, **830**, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.04.001>
- [28] Chen, T., Ma, Z., Zhu, L., Jiang, W., Wei, T., Zhou, R., Luo, F., Zhang, K., Fu, Q., Ma, C., et al. (2016) Suppressing Receptor-Interacting Protein 140: A New Sight for Salidroside to Treat Cerebral Ischemia. *Molecular Neurobiology*, **53**, 6240-6250. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9521-7>
- [29] Coviello, S., Gramuntell, Y., Klimczak, P., Varea, E., Blasco-Ibanez, J.M., Crespo, C., Gutierrez, A. and Nacher, J. (2022) Phenotype and Distribution of Immature Neurons in the Human Cerebral Cortex Layer II. *Frontiers in Neuroanatomy*, **16**, Article ID: 851432. <https://doi.org/10.3389/fnana.2022.851432>
- [30] Yu, B., Yao, Y., Zhang, X., Ruan, M., Zhang, Z., Xu, L., Liang, T. and Lu, J. (2021) Synergic Neuroprotection between Ligusticum Chuanxiong Hort and Borneol against Ischemic Stroke by Neurogenesis via Modulating Reactive Astrogliosis and Maintaining the Blood-Brain Barrier. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, Article ID: 666790. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.666790>
- [31] Ding, Z.B., Song, L.J., Wang, Q., Kumar, G., Yan, Y.Q. and Ma, C.G. (2021) Astrocytes: A Double-Edged Sword in Neurodegenerative Diseases. *Neural Regeneration Research*, **16**, 1702-1710. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.306064>
- [32] Liu, Z., Li, Y., Cui, Y., Roberts, C., Lu, M., Wilhelmsson, U., Pekny, M. and Chopp, M. (2014) Beneficial Effects of Gfap/Vimentin Reactive Astrocytes for Axonal Remodeling and Motor Behavioral Recovery in Mice after Stroke. *Glia*, **62**, 2022-2033. <https://doi.org/10.1002/glia.22723>
- [33] Shen, S.W., Duan, C.L., Chen, X.H., Wang, Y.Q., Sun, X., Zhang, Q.W., Cui, H.R. and Sun, F.Y. (2016) Neurogenic Effect of VEGF Is Related to Increase of Astrocytes Transdifferentiation into New Mature Neurons in Rat Brains after Stroke. *Neuropharmacology*, **108**, 451-461. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.012>
- [34] Duan, C.L., Liu, C.W., Shen, S.W., Yu, Z., Mo, J.L., Chen, X.H. and Sun, F.Y. (2015) Striatal Astrocytes Transdifferentiate into Functional Mature Neurons Following Ischemic Brain Injury. *Glia*, **63**, 1660-1670. <https://doi.org/10.1002/glia.22837>
- [35] Ge, L.J., Yang, F.H., Li, W., Wang, T., Lin, Y., Feng, J., Chen, N.H., Jiang, M., Wang, J.H., Hu, X.T., et al. (2020) *In Vivo* Neuroregeneration to Treat Ischemic Stroke through NeuroD1 AAV-Based Gene Therapy in Adult Non-Human Primates. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**, Article ID: 590008. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.590008>
- [36] Xiong, L.L., Chen, J., Du, R.L., Liu, J., Chen, Y.J., Hawwas, M.A., Zhou, X.F., Wang, T.H., Yang, S.J. and Bai, X. (2021) Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Related Enzymes and Receptors Play Important Roles after Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Neural Regeneration Research*, **16**, 1453-1459. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.303033>
- [37] Casas, S., Perez, A.F., Mattiazzi, M., Lopez, J., Folgueira, A., Gargiulo-Monachelli, G.M., Gonzalez Deniselle, M.C. and De Nicola, A.F. (2017) Potential Biomarkers with Plasma Cortisol, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Nitrites in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Current Neurovascular Research*, **14**, 338-346. <https://doi.org/10.2174/1567202614666171005122925>
- [38] Yu, K.W., Wang, C.J., Wu, Y., Wang, Y.Y., Wang, N.H., Kuang, S.Y., Liu, G., Xie, H.Y., Jiang, C.Y. and Wu, J.F. (2020) An Enriched Environment Increases the Expression of Fibronectin Type III Domain-Containing Protein 5 and Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Cerebral Cortex of the Ischemic Mouse Brain. *Neural Regeneration Research*, **15**, 1671-1677. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.276339>
- [39] Gao, Y., Ya, B., Li, X., Guo, Y. and Yin, H. (2021) Myricitrin Ameliorates Cognitive Deficits in MCAO Cerebral Stroke Rats via Histone Acetylation-Induced Alterations of Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **476**, 609-617. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03930-4>
- [40] Li, C., Sun, T. and Jiang, C. (2021) Recent Advances in Nanomedicines for the Treatment of Ischemic Stroke. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **11**, 1767-1788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.11.019>
- [41] Yang, J., Wu, S., Hou, L., Zhu, D., Yin, S., Yang, G. and Wang, Y. (2020) Therapeutic Effects of Simultaneous Delivery of Nerve Growth Factor mRNA and Protein via Exosomes on Cerebral Ischemia. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, **21**, 512-522. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.06.013>
- [42] Cragolin, A.B., Montenegro, G., Friedman, W.J. and Masco, D.H. (2018) Brain-Region Specific Responses of Astrocytes to an *in Vitro* Injury and Neurotrophins. *Molecular and Cellular Neurosciences*, **88**, 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.02.007>
- [43] Zhang, X., Du, Q., Yang, Y., Wang, J., Liu, Y., Zhao, Z., Zhu, Y. and Liu, C. (2018) Salidroside Alleviates Ischemic Brain Injury in Mice with Ischemic Stroke through Regulating BDNF Mediated PI3K/Akt Pathway. *Biochemical Pharmacology*, **156**, 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.08.015>
- [44] Chai, Y., Cai, Y., Fu, Y., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Zhu, L., Miao, M. and Yan, T. (2022) Salidroside Ameli-

- 
- orates Depression by Suppressing NLRP3-Mediated Pyroptosis via P2X7/NF-KappaB/NLRP3 Signaling Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article ID: 812362. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.812362>
- [45] Liu, H., Lv, P., Zhu, Y., Wu, H., Zhang, K., Xu, F., Zheng, L. and Zhao, J. (2017) Salidroside Promotes Peripheral Nerve Regeneration Based on Tissue Engineering Strategy Using Schwann Cells and PLGA: *In Vitro* and *in Vivo*. *Scientific Reports*, **7**, Article No. 39869. <https://doi.org/10.1038/srep39869>
- [46] Li, J., Zhang, Y., Yang, Z., Zhang, J., Lin, R. and Luo, D. (2020) Salidroside Promotes Sciatic Nerve Regeneration Following Combined Application Epimysium Conduit and Schwann Cells in Rats. *Experimental Biology and Medicine*, **245**, 522-531. <https://doi.org/10.1177/1535370220906541>