

昼夜节律对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响

俞浩,张孝林

(安徽科技学院食品药品学院,安徽 蚌埠 233100)

【摘要】 目的 观察昼夜节律对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响。方法 将大鼠置人工光(6:00-18:00)暗(18:00-6:00)环境中,适应性饲养4周。然后将大鼠随机分为6:00组、12:00组、18:00组和24:00组,分别在相应的时间点采用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠模型。再灌注24 h后,观察昼夜节律对模型大鼠神经损伤症状,脑梗死范围,脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活性和MDA含量,脑细胞内游离Ca²⁺浓度,血清中内皮素(ET)和血管内皮细胞生长因子(VEGF),以及脑组织病理变化的影响。**结果** 各组大鼠均具有明显的神经损伤症状,其中24:00组大鼠的神经损伤症状明显轻于6:00组;6:00、12:00组大鼠脑梗死范围明显大于18:00、24:00组;18:00、24:00组大鼠SOD活性均显著高于6:00、12:00组,MDA含量均显著低于6:00组;24:00组大鼠脑细胞内游离Ca²⁺浓度显著低于6:00和12:00组,18:00组大鼠脑细胞内游离Ca²⁺浓度显著低于6:00;18:00、24:00组大鼠血清ET含量显著低于6:00组大鼠;24:00组大鼠血清VEGF含量显著低于6:00、12:00组;18:00、24:00组大鼠脑组织病理变化明显轻于6:00、12:00组。**结论** 昼夜节律对大鼠脑缺血再灌注损伤具有显著影响。

【关键词】 昼夜节律;脑缺血再灌注损伤;脑梗死范围;脂质过氧化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 01-0086-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.01.016

Effect of circadian rhythm on local cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

YU Hao, ZHANG Xiao-lin

(Anhui Science and Technology University, Bengbu 233100, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of circadian rhythm on local cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** One hundred SPF male SD rats (body weight 320 ± 20 g) were raised in light(6:00-18:00)-dark(18:00-6:00) cycle environment for 4 weeks. Then all rats were randomly divided into 6:00 group, 12:00 group, 18:00 group and 24:00 group. Rat models of cerebral ischemia-reperfusion injury were induced by middle cerebral artery occlusion at corresponding time points for each group. The neurological symptoms were evaluated, cerebral infarction area and SOD and MDA levels in brain tissue were determined, intracellular Ca²⁺ concentration of brain tissue was measured, the level of serum endothelin (ET) and VEGF were assayed, and the pathological changes of brain tissue at 24 h after ischemia-reperfusion were examined. **Results** All rats showed typical neurological symptoms, which were milder in the 24:00 group than that of the 6:00 group, and the cerebral infarction areas of the 6:00 group and 12:00 group were significantly larger than that of the 18:00 group and 24:00 group. The SOD activities of 18:00 group and 24:00 group were significantly higher than that of the 6:00 group and 12:00 group, and the MDA levels of 18:00 group and 24:00 group were significantly lower than that of the 6:00 group and 12:00 group. The concentration of intracellular Ca²⁺ of the 24:00 group was lower than that of 6:00 group and 12:00 group, and the concentration of intracellular Ca²⁺ of the 18:00 group was significantly lower than that of the 6:00 group. The contents of serum ET in the 18:00 group and 24:00 group were significantly lower than that in the 6:00 group. The content of serum VEGF of 24:00 group was obviously lower than that of the 6:00 group.

[基金项目]安徽省自然科学基金项目(编号:10040606Q13)。

[作者简介]俞浩(1975年-),博士,副教授,主要研究方向:中药时间药理学及药动学研究。E-mail: yhz_1230@163.com

and 12:00 group. The brain pathological changes of the 18:00 group and 24:00 group were obviously milder than that of the 6:00 group and 12:00 group. **Conclusion** Circadian rhythm may significantly influence the cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.

【Key words】 Circadian rhythm; Brain; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Infarction area; Lipid preoxidation

昼夜节律生物钟是机体内的定时系统,哺乳动物控制昼夜节律的时钟基因位于下丘脑视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN),时钟基因的节律性表达是昼夜节律产生和维持的分子基础^[1,2]。在时钟基因的调控下,人体各系统的生理活动与生化现象均具有明显的昼夜节律性。脑缺血是临床常见的脑血管疾病之一,缺血后尽快恢复缺血脑组织血供是主要的治疗措施,但恢复血供后又会导致再灌注损伤。研究表明,脑缺血发病亦具有明显的昼夜节律性,其中 6:00-12:00 为发病高峰期^[3]。线栓法是目前实验研究中最为常用的制备局灶性脑缺血再灌注损伤模型的方法,当前有关昼夜不同时间点制备的模型动物神经损伤症状及相关指标是否存在差异尚未见文献报道。本实验在 24 h 内不同时间点采用线栓法制备局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠模型,探讨昼夜节律对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品与试剂

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)(上海缘叶生物科技有限公司);SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20130627);MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20130627);ET 试剂盒(北京普尔伟业生物科技有限公司,批号 20130712);VEGF 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20130702);Fura-2/AM(Sigma 公司)。

1.2 主要仪器

电子分析天平(上海精科分析仪器厂);LXJ-IIB 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂生产);TU1810SPC 紫外分光光度计(北京普析通用仪器公司);HH-4 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);F-2000 型荧光分光光度计(日本 HITACHI 公司生产);Multiskan FC 型酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司,上海)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 100 只,体重(320 ± 20)g,由南京市江宁区青龙山动物繁殖场【SCXK(苏)2013-0011】提供。

1.4 方 法

1.4.1 动物分组

取大鼠,自由摄食、饮水条件下饲养,室温维持(25 ± 1)℃,相对湿度为(60 ± 10)%。采用人工方法制造光暗循环环境,光照强度为 200 lx,每天 6:00~18:00 为光照时间,18:00~6:00 为黑暗时间。将大鼠置于上述光照/黑暗环境中适应性饲养 4 周。4 周后分别于 6:00、12:00、18:00、24:00 复制脑缺血再灌注损伤大鼠模型,各时间点复制模型的时间长度控制在 1 h 之内,每个时间点取模型成功大鼠 20 只(神经损伤症状评分后,每组随机取 10 只大鼠用于其他指标的观察)。

1.4.2 模型制备

采用 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,参照文献方法并加以改良复制大鼠大脑中动脉线栓模型^[4,5],缝合肌肉和皮肤回笼饲养。缺血 90 min 后,将鱼线回抽至颈外动脉处进行再灌注。大鼠苏醒后出现血管栓塞的同侧 Horner 征(右侧瞳孔缩小);提起大鼠尾巴使大鼠悬空,出现左前肢不能完全伸展;在地面爬行时向左侧转圈或倾倒说明模型复制成功。分别于再灌注 24 h 后对各组大鼠进行神经损伤症状评分。

1.4.3 指标观察

(1) 神经损伤症状评分

分别于再灌注 24 h 后采用单盲法进行神经损伤症状评分,评定等级如下:左侧前爪不能完全伸展为 I 级;左侧前爪不能完全伸展,且向左侧转圈为 II 级;左侧前爪不能完全伸展,且向左侧倾倒为 III 级;意识丧失,不能自发行走为 IV 级。

(2) 脑梗死范围测定

再灌注 24 h 后,麻醉大鼠,打开颅腔,取大脑,置 -80℃ 冰箱速冻 5 min,将大脑作冠状切片,厚度约 5 mm,将脑片置 1% TTC 染色液中,37℃ 避光孵育 30 min,洗去染色液,用 4% 甲醛溶液固定。正常脑组织呈红色,梗死区呈白色。称取全脑重量,然后切取梗死区称重,计算脑梗死范围,脑梗死范围(%) = (梗死区脑重/全脑重) × 100%。

(3) 脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量测定

取缺血侧脑组织,称重后置玻璃匀浆器中,加

10% (m:V) 预冷的生理盐水于冰浴中匀浆,匀浆液 4200 r/min 离心 10 min,取上清 -80℃ 保存待测。按照试剂盒说明书操作方法,采用紫外分光光度法测定脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量。

(4) 游离 Ca^{2+} 测定

参考文献方法^[4,6],采用荧光分光光度法测定脑组织中游离 Ca^{2+} 浓度。计算公式如下: $[Ca^{2+}] = Kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ 计算细胞内游离 Ca^{2+} 浓度。 Kd 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数,为 224 nmol/L; F_{max} 为最大荧光强度; F_{min} 为最小荧光强度; F 为不同实验条件下测得的荧光强度。

(5) 血清中 ET 和 VEGF 含量测定

再灌注 24 h 后,麻醉大鼠,腹主动脉取血置试管内,静置 30 min 后,4200 r/min 离心 10 min,取血清 -80℃ 保存待测。按试剂盒说明书操作方法,放免法测定血清中 ET 水平,ELISA 法测定血清中 VEGF 含量。

(6) 病理组织学检查

取缺血侧海马区脑组织,4% 中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,乙醇梯度脱水,HE 染色,光镜观察大鼠缺血侧海马区脑组织病理变化。

1.5 结果统计与处理

等级资料统计采用 Ridit 检验;多组间均数比较采用单因素方差分析,数据处理采用 SPSS 17.0 for Windows 软件。

2 结果

2.1 神经损伤症状评定结果

由表 1 可知,再灌注 24 h 后,6:00、12:00 组大鼠神经损伤症状较严重,18:00、24:00 组大鼠神经损伤症状相对较轻。其中 6:00 组大鼠神经损伤症状最为严重,与 24:00 组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。其余各组比较差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

2.2 对脑梗死范围的影响

由表 2 可知,6:00、12:00 组大鼠脑梗死重量和梗死范围相对较大,18:00、24:00 组大鼠脑梗死重量和梗死范围相对较小。其中 18:00、24:00 组大鼠脑梗死重量和梗死范围明显小于 6:00 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);18:00、24:00 组大鼠脑梗死范围亦明显小于 12:00 组 ($P < 0.05$)。

2.3 对脑组织 SOD 活性、MDA 含量及脑细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

由表 3 可知,6:00、12:00 组大鼠脑组织 SOD 活

性相对较低,18:00、24:00 组大鼠脑组织 SOD 活性相对较高,其中 18:00、24:00 组大鼠 SOD 活性均显著高于 6:00、12:00 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。6:00、12:00 组大鼠脑组织 MDA 含量相对较高,18:00、24:00 组大鼠脑组织 MDA 含量活性相对较低,其中 18:00、24:00 组大鼠脑组织 MDA 含量均显著低于 6:00 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。6:00、12:00 组大鼠脑细胞内游离 Ca^{2+} 浓度相对较高,18:00、24:00 组大鼠脑细胞内游离 Ca^{2+} 浓度相对较低,其中 18:00 组大鼠脑细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著低于 6:00 组 ($P < 0.05$),24:00 组大鼠脑细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著低于 6:00 和 12:00 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 昼夜节律对脑缺血再灌注大鼠神经损伤症状的影响 ($n = 20$)

Tab. 1 Effect of circadian rhythm on neural symptoms in cerebral ischemia-reperfusion injury rats

组别 Groups	神经损伤等级 Neural injury degree				P
	I	II	III	IV	
6:00	1	7	8	4	
12:00	2	9	6	3	
18:00	4	10	4	2	
24:00	5	9	4	2	<0.05

注:各组分别与 6:00 组比较。

Note. Each group vs. the 6:00 group.

表 2 昼夜节律对脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死范围的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Effect of circadian rhythm on brain infarction area in the cerebral ischemia-reperfusion injury rats

组别 Groups	梗死重量 /mg Infarcted tissue weight	梗死范围/% Infarction area
	6:00	26.46 ± 4.70
12:00	24.09 ± 6.95	20.26 ± 3.85
18:00	21.63 ± 5.56 ¹⁾	16.27 ± 5.10 ¹⁾³⁾
24:00	19.53 ± 3.03 ²⁾	15.55 ± 3.88 ²⁾³⁾

注:各组分别与 6:00 组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; 各组分别与 12:00 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

Note. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs. the 6:00 group; ³⁾ $P < 0.05$ vs the 12:00 group.

2.4 对血清中 ET 和 VEGF 含量的影响

由表 4 可知,6:00、12:00 组大鼠血清 ET 含量相对较高,18:00、24:00 组大鼠血清 ET 含量相对较低,其中 18:00、24:00 组大鼠血清 ET 含量显著低于 6:00 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。6:00、12:00 组大鼠血清 VEGF 含量相对较高,18:00、24:00 组大鼠血清 VEGF 含量相对较低,其中 24:00 组大鼠血清 VEGF 含量显著低于 6:00、12:00 组 ($P < 0.05$)。

表 3 昼夜节律对脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD 活性、MDA 含量及脑细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Effect of circadian rhythm on SOD activity, MDA content and intracellular Ca²⁺ in the brain tissue in the cerebral ischemia-reperfusion injury rats

组别 Groups	SOD/U/mL	MDA/nmol/mL	Ca ²⁺ /nmol/L
6:00	218.95 ± 27.86	9.09 ± 1.01	142.31 ± 19.21
12:00	226.88 ± 28.26	8.49 ± 1.27	133.54 ± 24.79
18:00	254.25 ± 21.65 ²⁾³⁾	7.82 ± 0.98 ¹⁾	118.25 ± 20.05 ¹⁾
24:00	259.88 ± 34.84 ²⁾³⁾	7.60 ± 0.89 ²⁾	114.40 ± 15.40 ²⁾³⁾

注: 各组分别与 6:00 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 各组分别与 12:00 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

Note. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs the 6:00 group; ³⁾ $P < 0.05$ vs the 12:00 group.

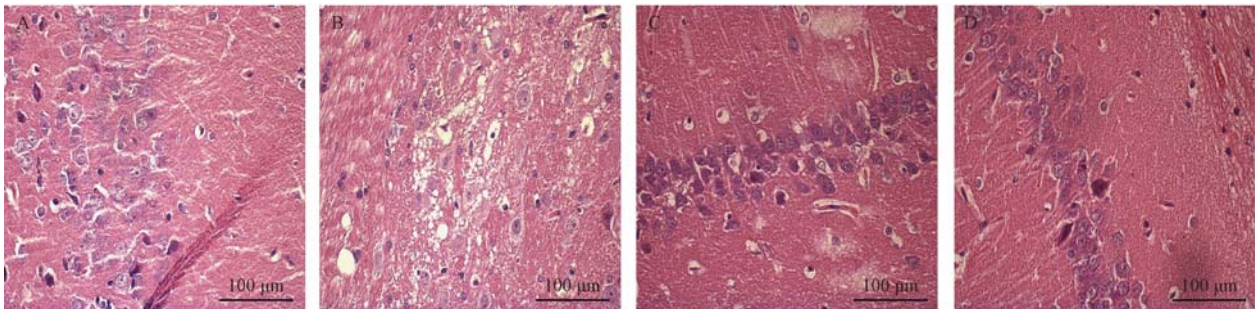
表 4 昼夜节律对脑缺血再灌注大鼠血清中 ET 和 VEGF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Effect of circadian rhythm on the serum ET and VEGF levels in the cerebral ischemia-reperfusion injury rats

组别 Groups	ET/pg/mL	VEGF/pg/mL
6:00	185.90 ± 24.61	52.79 ± 8.45
12:00	170.57 ± 19.00	50.57 ± 8.64
18:00	158.28 ± 26.60 ¹⁾	46.05 ± 5.76
24:00	153.72 ± 24.48 ²⁾	42.99 ± 7.34 ²⁾³⁾

注: 各组分别与 6:00 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 各组分别与 12:00 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

Note. ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs. the 6:00 group; ³⁾ $P < 0.05$ vs. the 12:00 group.



注: A. 6:00 组, B. 12:00 组, C. 18:00 组, D. 24:00 组。

图 1 大鼠脑组织病理图 ($\times 400$)

Note. A. 6:00 group; B. 12:00 group; C. 18:00 group; D. 24:00 group.

Fig. 1 Histopathological changes in the brain tissues of cerebral ischemia-reperfusion injury rats

3 讨论

时钟基因的节律性表达是昼夜节律产生和维持的分子基础,在时钟基因的调控下,人体的基础代谢、体温、血糖和激素等变化具有明显的昼夜节律性。有研究报道,脑梗死患者发病的高峰期在上午 4:00 ~ 8:00,脑卒中发病高峰期在上午 8:00 ~ 11:00^[7]。可见,缺血性脑血管病发病率亦具有明显的昼夜节律性。血压的节律性波动是脑缺血发病的关键因素,午夜至清晨血压最低,脑血管疾病患者由于血管反射及血压自动调节功能障碍,当血压下降至一定程度时可致脑血流量下降,进而诱发脑梗死。本实验研究结果表明,造模 24 h 后,各组大鼠

2.5 对缺血侧脑组织病理变化的影响

由图 1 可知,6:00 大鼠海马锥体细胞排列紊乱疏松,细胞间隙明显增大,细胞结构模糊,体积缩小,胞核形态异常,细胞周围出现较大空隙,神经胶质明显水肿,胶质细胞胞质深染,胞核模糊,大部分出现变性(图 1A)。12:00 组大鼠海马区神经胶质呈现明显的水肿和空泡变性,神经元锥体细胞排列紊乱,层次模糊,胞体肿胀,细胞核体积缩小,胞核模糊,且大部分细胞核消失,细胞质也出现空泡变性,核小深染,成圆形的细胞增生(图 1B)。18:00 组大鼠海马区锥体细胞排列较紧密,层次基本清晰,但细胞体积有所变小,胞核形态不规则,神经胶质水肿,胶质细胞出现空泡,细胞核固缩,神经元体积变小,数量减少(图 1C)。24:00 组大鼠海马区锥体细胞排列较疏松,层次较紊乱,细胞体积明显变小,胞核形态不规则,出现固缩现象,神经胶质轻微水肿,胶质细胞数量明显减少(图 1D)。

病理组织学检查结果显示,18:00、24:00 组大鼠缺血区脑组织病变程度明显轻于 6:00、12:00 组。

均具有明显的神经损伤症状,但 18:00、24:00 组大鼠的神经损伤症状轻于 6:00、12:00 组,其中 24:00 组大鼠的神经损伤症状明显轻于 6:00 组。脑梗死范围和病理组织学检查显示,6:00、12:00 组大鼠脑梗死重量、梗死范围明显大于 18:00、24:00 组大鼠;病理组织学检查结果亦显示,6:00、12:00 组大鼠脑组织病变程度较 18:00、24:00 组大鼠严重。结果表明,不同时间点制备的大鼠脑缺血再灌注损伤模型,神经损伤症状、脑组织病变程度具有明显差异,说明昼夜节律对大鼠脑缺血再灌注损伤具有显著影响。

脑缺血再灌注导致机体自由基生成与清除系统失去平衡,脂质过氧化作用增强,致使大量的自由基无法有效清除,进而大量集聚,造成细胞膜结构受

损^[8,9]。脑组织内源性的自由基清除剂 SOD 等活性下降,自由基清除能力降低,导致 MDA 等脂质过氧化代谢产物集聚又进一步损伤细胞膜的流动性和通透性。同时,脑缺血再灌注时会引起 Ca^{2+} 内流,造成细胞内 Ca^{2+} 超载, Ca^{2+} 沉积于线粒体使能量产生障碍;胞内 Ca^{2+} 超载还会导致胞浆内或溶酶体内 Ca^{2+} 依赖性酶类和磷脂酶类大量激活,使细胞结构分解,神经元受损,导致细胞死亡;另外,胞内 Ca^{2+} 超载还可产生大量的游离脂肪酸,进一步加重缺血引起的细胞损伤^[9]。本实验研究发现,昼夜不同时间点复制的脑缺血再灌注模型大鼠,脑组织内 SOD 活性、MDA 含量及游离 Ca^{2+} 浓度存在差异,其中 18:00、24:00 组大鼠的脑组织 SOD 活性较高,MDA 含量和游离 Ca^{2+} 浓度较低,6:00、12:00 组则与上述情况相反。18:00、24:00 组大鼠 SOD 活性均显著高于 6:00、12:00 组;18:00、24:00 组大鼠 MDA 含量均显著低于 6:00 组;24:00 组大鼠脑细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著低于 6:00 和 12:00 组,18:00 组大鼠脑细胞内游离 Ca^{2+} 浓度显著低于 6:00。实验结果表明,再灌注损伤发生的时间不同,机体自由基清除系统功能及细胞内 Ca^{2+} 浓度存在差异,对细胞及神经元的损伤亦存在明显的差异,说明昼夜节律对缺血再灌注损伤大鼠自由基清除系统和细胞内 Ca^{2+} 浓度具有显著影响。

机体内的激素、神经递质的分泌存在明显的昼夜节律性。清晨血浆 ET、肾上腺激素的分泌处于高峰时间段,会加剧神经元的缺血缺氧,同时这些神经递质分泌增加使微血管的通透性增加,加重缺血区水肿。ET 是一种具有强烈缩血管作用的血管活性肽,其在脑缺血后合成、释放增加,ET 浓度升高会减少脑血流量,使脑缺血进一步加重^[10]。VEGF 是一种分泌性的促细胞分裂因子,也是一种强有力的血管通透因子。正常情况下,人和动物脑内 VEGF 表达量较少,但脑损伤后 VEGF 表达量会明显增加,进而诱发 NO 合成与释放增加,并激活可溶性鸟苷酸合成酶,使脑缺血进一步加重^[11]。本实验研究发现,6:00、12:00 组大鼠血清 ET 含量相对较高,18:00、24:00 组大鼠血清 ET 含量相对较低,其中 18:00、24:00 组大鼠血清 ET 含量显著低于 6:00 组大鼠。6:00、12:00 组大鼠血清 VEGF 含量相对较高,18:00、24:00 组大鼠血清 VEGF 含量相对较低,其中 24:00 组大鼠血清 VEGF 含量显著低于 6:00、12:00 组。结果表明,不同时间点复制的脑缺血再灌注损伤大鼠模型,血清中 ET、VEGF 水平存在差异,说明昼夜节律对脑缺血再灌注损伤大鼠血管内皮功能具有显著影响。

综上,6:00、12:00 大鼠神经损伤程度较 18:00、

24:00 组严重,脑梗死范围亦明显大于 18:00、24:00 组。病理组织学检查结果显示,6:00、12:00 组大鼠海马区脑组织病变程度明显重于 18:00、24:00 组,说明昼夜节律对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显影响。进一步研究显示,6:00、12:00 组大鼠脑组织 SOD 活性明显低于 18:00、24:00 组,脑组织 MDA 含量和脑细胞游离 Ca^{2+} 以及血清中 ET、VEGF 含量均显著高于 18:00、24:00 组,说明昼夜不同时间点大鼠体内抗氧化酶活性及血管内皮功能存在差异,对血管内皮细胞细胞膜的流动性和通透性影响程度不同,造成不同时间点大鼠脑缺血再灌注损伤程度存在差异,其具体机制有待于进一步深入研究。同时,本实验结果亦提示采用脑缺血再灌注损伤大鼠模型进行新药研究或其他研究工作时,造模时间应保持一致,从而避免昼夜节律因素对实验造成的干扰。

参 考 文 献

- [1] Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(2): R271 - 277.
- [2] Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian clock rhythms [J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63:647 - 676.
- [3] 郭国际. 急性脑卒中发病与时辰、围周日及季节相关性探讨 [J]. *同济医科大学学报*, 2001, 30(5): 473 - 475.
- [4] 俞浩, 刘汉珍, 周国梁. 环维黄杨星-D 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(7): 623 - 626.
- [5] 牛陵川, 张燕虹, 李长清, 等. cAMP/PKA-pCREB 信号通路介导康复训练促进脑缺血大鼠运动功能恢复的探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(3): 24 - 29.
- [6] 谢宸宸, 罗勇, 高祥, 等. 电针对局灶脑缺血/再灌注模型大鼠缺血海马区血管再生的影响及其机制 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(4): 41 - 46.
- [7] 张振服, 刘启德, 杨蕾. 血压昼夜节律特征及其分子调控机制 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(6): 1181 - 1183.
- [8] Holladay CA, Duffy AM, Chen X, et al. Recovery of cardiac function mediated by MSC and interleukin-10 plasmid functionalised scaffold [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1303 - 1314.
- [9] Wakade C, Khan MM, De Sevilla LM, et al. Tamoxifen neuroprotection in cerebral ischemia involves attenuation of kinase activation and superoxide production and potentiation of mitochondrial superoxide dismutase [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(1): 367 - 379.
- [10] Sharkey J, Butcher SP. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery [J]. *J Neurosci Methods*, 1995, 60(1/2): 125 - 131.
- [11] Jae K, James G. VEGF receptor antagonist Cyclo-VEG1 reduces inflammatory reactivity and vascular leakiness and is neuroprotective against acute excitotoxic striatal insult [J]. *J Neuroinflamm*, 2008, 5: 18.