

· 实验研究 ·

Shh/Gli1 信号通路在异氟醚后处理减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤中的作用

彭莉 林晓峰 王胜 殷姜文 葛明月

【摘要】 目的 评价 Shh/Gli1 信号通路在异氟醚后处理减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤中的作用。方法 清洁级健康雄性 SD 大鼠 44 只, 6~8 周龄, 体重 220~280 g, 采用随机数字表法将其分为四组: 假手术组(S 组)、缺血-再灌注组(IR 组)、缺血-再灌注+异氟醚后处理组(ISO 组)和环巴胺+缺血-再灌注+异氟醚后处理组(CYC 组), 每组 11 只。采用线栓法栓塞大脑中动脉 90 min, 再灌注 24 h 制备脑缺血-再灌注损伤模型。ISO 组大鼠在再灌注即刻吸入 1.5% 异氟醚。CYC 组大鼠在缺血前 30 min 腹腔注射 Shh/Gli1 信号通路特异性抑制剂环巴胺 10 mg/kg。再灌注 24 h 后, 所有大鼠进行神经行为学评分, 采用 TTC 法测定脑梗死体积, HE 染色和尼氏染色观察病理学改变, TUNEL 染色观察海马 CA1 区细胞凋亡, 免疫荧光和 Western blot 法测定 Shh 和 Gli1 蛋白含量。结果 与 S 组比较, IR 组、ISO 组和 CYC 组大鼠神经行为学评分明显升高, 脑梗死体积明显增大, 坏死和凋亡细胞明显增多, 组织病理学损伤严重, Shh 和 Gli1 蛋白含量明显增加 ($P < 0.05$)。与 IR 组比较, ISO 组神经行为学评分和脑梗死体积明显降低, 坏死和凋亡明显减少, 组织病理学损伤明显减轻, Shh 和 Gli1 蛋白含量明显增加 ($P < 0.05$)。与 ISO 组比较, CYC 组神经行为学评分明显升高, 脑梗死体积明显增大, 坏死和凋亡细胞明显增多, 组织病理学损伤明显加重, Shh 和 Gli1 蛋白含量明显减少 ($P < 0.05$)。结论 Shh/Gli1 信号通路激活参与了异氟醚后处理减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤的过程。

【关键词】 Shh 蛋白; Gli1 蛋白; 异氟醚后处理; 缺血-再灌注损伤

Role of Shh/Gli1 signaling pathway in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury after isoflurane post-conditioning in rats PENG Li, LIN Xiaofeng, WANG Sheng, YING Jiangwen, GE Mingyue. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China

Corresponding author: WANG Sheng, Email: iamsheng2006@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the role of the Shh/Gli1 signaling pathway in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion (IR) injury after isoflurane post-conditioning in rats. **Methods** Forty-four healthy male Sprague-Dawley rats, 6-8 weeks, weighing 220-280 g, were randomly divided into 4 groups ($n=11$ for each group): sham operation group (group S), ischemia-reperfusion group (group IR), ischemia-reperfusion+isoflurane post-conditioning group (group ISO) and cyclopamine+ischemia-reperfusion+isoflurane post-conditioning group (group CYC). Rats were subjected to middle cerebral artery occlusion for 90 min and reperfusion for 24 h. Group ISO received 1.5% isoflurane post-conditioning when reperfusion was initiated. In group CYC, the specific inhibitor of the Shh/Gli1 signaling pathway, cyclopamine, was injected at a dose of 10 mg/kg, 30 min before ischemia intraperitoneally. The neurobehavioral score was performed 24 hours after reperfusion. The cerebral infarction volume was determined by TTC method. The pathological results were observed by HE staining and Nissl staining. The apoptosis of hippocampus CA1 was observed by TUNEL staining. The expression levels of Shh and Gli1 were determined by immunofluorescence and Western blot. **Results** Compared with group S, the neurobehavioral scores, cerebral infarction volume, necrosis and apoptosis were significantly increased, histopathological damage was more severe, and Shh and Gli1 expression was significantly up-regulated in the groups IR, ISO and CYC ($P < 0.05$). Compared with group IR, the neurobehavioral scores and cerebral infarction volume were reduced significantly, necrosis and apoptosis were decreased, and the histopathological damage was further attenuated accompanying the highest expression levels of Shh and Gli1 in group ISO ($P < 0.05$). Compared with group ISO,

DOI: 10.12089/jca.2020.04.015

基金项目: 国家自然科学基金(81860249, 81360203)

作者单位: 475000 开封市, 河南大学第一附属医院麻醉科(彭莉); 独山子人民医院麻醉科(林晓峰); 中国科学技术大学附属第一医院麻醉科(王胜); 石河子大学医学院第一附属医院麻醉科(殷姜文、葛明月)

通信作者: 王胜, Email: iamsheng2006@163.com

neurobehavioral scores and cerebral infarction volume were raised significantly, necrosis and apoptosis were increased significantly, histopathological damage was aggravated significantly, as well as Shh and Gli1 expression levels were down-regulated significantly in group CYC ($P < 0.05$). **Conclusion** Activation of the Shh/Gli1 signaling pathway is involved in the treatment of cerebral IR injury after isoflurane post-conditioning in rats.

【Key words】 Shh protein; Gli1 protein; Isoflurane post-conditioning; Ischemia-reperfusion injury

目前脑卒中呈现出年轻化趋势,以大脑中动脉栓塞为主的脑缺血性损伤高达 70%~80%^[1]。早期血流再通是治疗的关键,然而,一定时间后血流的恢复可能会加重局部脑损伤和功能障碍,这种现象称为缺血-再灌注损伤^[2]。异氟醚是临床常用的吸入麻醉药,可通过抑制凋亡相关信号通路逆转组织细胞受损,减轻脑缺血-再灌注损伤^[3]。Shh/Gli1 信号通路参与多种组织损伤的修复过程,可通过抗凋亡、抗氧化应激、保护血脑屏障、促进神经血管再生等多种机制保护脑组织。研究表明,Shh 通路激动剂可增强脑缺血性损伤后运动功能和认知功能的恢复^[4],抑制 Shh 信号通路则加剧了缺血性脑损伤并抑制脑重塑^[5-6]。本实验采用大脑中动脉栓塞模型,探讨 Shh/Gli1 信号通路是否参与异氟醚后处理大鼠脑缺血-再灌注损伤及其发挥的作用。

材料与方 法

实验分组 清洁级健康雄性 SD 大鼠 44 只,6~8 周龄,体重 220~280 g,由石河子大学实验动物中心提供,采用随机数字表法将其分为四组:假手术组(S 组)、缺血-再灌注组(IR 组)、缺血-再灌注+异氟醚后处理组(ISO 组)和环巴胺+缺血-再灌注+异氟醚后处理组(CYC 组),每组 11 只。ISO 组大鼠在再灌注的即刻吸入 1.5%异氟醚 60 min。CYC 组大鼠在缺血前 30 min 腹腔注射 Shh/Gli1 信号通路特异性抑制剂环巴胺 10 mg/kg(批号:S114612)。

脑缺血-再灌注损伤模型制作 采用文献[7]的方法制备模型。腹腔注射氯胺酮 60 mg/kg 麻醉大鼠,仰卧位固定,活力碘消毒颈部皮肤,行颈部正中切口,分离皮下组织,暴露并分离右颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。结扎颈外动脉和颈总动脉近心端,在距动脉分叉约 0.5 mm 处剪一个小口,插入 3-0 尼龙缝线进入颈内动脉直至遇到阻力,若到达大脑中动脉,此时缝线前端距动脉分叉处 18~20 mm,否则可能误入翼腭动脉,调整缝线直至进入大脑中动脉。闭塞 1.5 h 后,小心拉出尼龙线即造成再灌注。Sham 组进行相同的实验步骤,但线栓进入深度为距颈总动脉分叉 10 mm。本研究排除术后死

亡(非蛛网膜下腔出血)大鼠 5 只、手术失败 7 只,蛛网膜下腔出血大鼠 3 只,随机补充 16 只大鼠。

神经行为学评分 再灌注 24 h 进行改良 Longa 评分^[8],评分如下:0 分,没有缺陷;1 分,难以完全伸展对侧前肢;2 分,无法伸展对侧前肢;3 分,轻度转圈;4 分,严重转圈;5 分,向对侧倾倒。评分后将大鼠断头处死,迅速获取脑组织标本并用于进一步的实验。

脑梗死体积测定 -20℃冰箱冷冻脑组织标本 15 min,以 2 mm 的间隔由前向后快速冠状切片。将切片在 37℃下用 2%TTC 溶液中染色 30 min,然后在 4%多聚甲醛中固定 24 h。用佳能数码相机对染色切片拍照,并使用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量梗死体积。根据 Swanson 方法测量梗死体积:梗死体积(%)=(对侧半球体积-非损伤的同侧半球体积)/对侧半球体积×100%。

凋亡细胞计数 使用细胞凋亡试剂盒根据说明书进行 TUNEL 实验检测海马 CA1 区的细胞凋亡。凋亡阳性细胞染色后细胞核呈棕黄色或棕褐色,正常细胞细胞核为蓝色。神经元凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数/总细胞数)×100%。

脑组织病理形态观察 再灌注 24 h 后,先后用生理盐水和 4%多聚甲醛溶液经心脏灌注大鼠,取出鼠脑,在 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 后进行石蜡包埋。用切片将组织切成 4 μm 厚的冠状切片,常规脱蜡脱水后进行 HE 染色和尼氏染色。受损神经元(%)=(CA1 海马中每 1 mm 长度总锥体神经元数量-CA1 海马中每 1 mm 长度存活锥体神经元数量)/CA1 海马中每 1 mm 长度总锥体神经元数量×100%。神经元密度为 CA1 海马中每 1 mm 长度存活的锥体神经元的数量^[9]。

Shh 和 Gli1 表达荧光检测 将石蜡切片常规脱蜡、脱水、抗原修复、消除内源性过氧化物酶,再用 0.3%Triton X-100 和 10%牛血清白蛋白(BSA)封闭破膜 1 h;将切片分别与抗 Shh 抗体(稀释度 1:100)和抗 Gli1 抗体(稀释度 1:100)4℃过夜;PBS 洗涤后,用山羊抗小鼠荧光二抗(稀释度 1:50)孵育 1 h,然后在黑暗中用碘化丙啶溶液染色 5 min,将细胞核

染为红色荧光用于定位, PBS 洗涤后封片, 使用共聚焦激光扫描显微镜获取图像并用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量平均荧光(绿色)强度量化蛋白含量。

脑组织 Shh 和 Gli1 蛋白含量测定 使用裂解缓冲液从海马组织中分离蛋白, BCA 法测蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳上样量为 6 μg, 电泳分离蛋白后恒流电转至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 将膜分别与抗 Shh 抗体和抗 Gli1 抗体(稀释度 1:1 000)和 β-Actin(稀释度 1:1 000)4 °C 过夜。TBST 洗涤 3 次后, 将膜与二抗(1:20 000)在室温孵育 2 h, 然后用 ECL 试剂显影, 用 Image J 软件测定条带灰度值。目的蛋白含量为目的蛋白条带的灰度值与内参灰度值的比值。

统计分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验; 等级资料的组间比较采用秩和检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

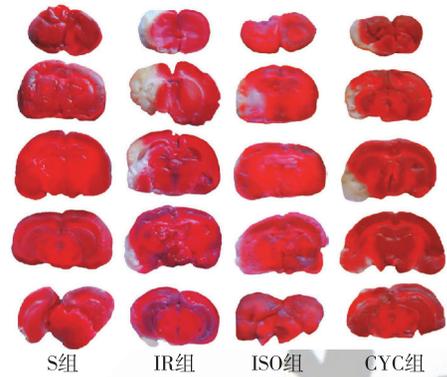
与 S 组比较, IR 组、ISO 组和 CYC 组大鼠神经行为学评分明显升高, 脑梗死体积明显增加, 凋亡指数明显增高(P<0.05)。与 IR 组比较, ISO 组大鼠神经行为学评分明显降低, 脑梗死体积明显减小, 凋亡指数明显下降(P<0.05)。与 ISO 组比较, CYC 组大鼠神经行为学评分明显升高, 脑梗死体积明显增大, 凋亡指数明显增高(P<0.05)(表 1, 图 1—2)。

表 1 四组大鼠神经行为学评分、脑梗死体积和凋亡指数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	神经行为学评分(分)	脑梗死体积(%)	凋亡指数(%)
S 组	8	0	0	9.9±1.8
IR 组	8	3.6±0.7 ^a	27.5±1.5 ^a	53.5±1.3 ^a
ISO 组	8	2.3±0.7 ^{ab}	15.7±1.1 ^{ab}	30.7±2.4 ^{ab}
CYC 组	8	3.5±1.2 ^{ac}	28.1±2.6 ^{ac}	58.3±2.6 ^{ac}

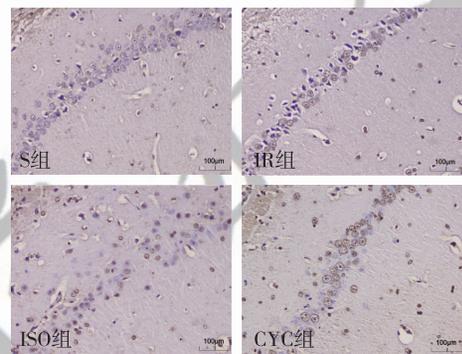
注:与 Sham 组比较, ^aP<0.05; 与 I/R 组比较, ^bP<0.05; 与 ISO 组比较, ^cP<0.05

HE 染色: S 组大鼠海马 CA1 区锥体神经元排列整齐, 细胞结构完整, 边界清晰; IR 组锥体神经元排列紊乱、稀疏、中断, 大量神经元胞核深染、固缩,



注:红色部分为正常脑组织,白色部分为梗死脑组织

图 1 四组大鼠脑组织 TTC 染色结果



注:阳性细胞为棕黄色或棕褐色,正常细胞为蓝色

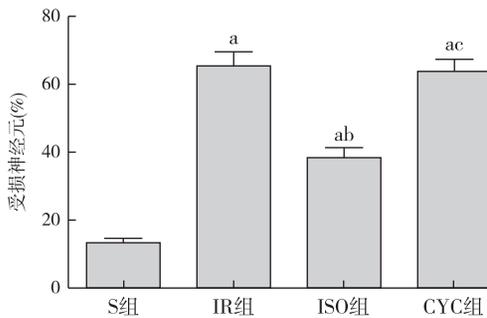
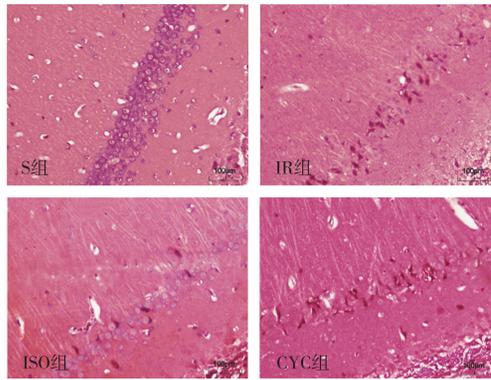
图 2 四组大鼠脑组织 TUNEL 染色结果(200 倍)

仅见少量正常神经细胞; ISO 组形态正常神经元数目较 IR 组增多, 椎体神经元排列较密, 仅少量胞核深染、固缩的神经元; CYC 组椎体神经元排列紊乱, 出现大量不规则细胞及空泡现象, 胞核固缩、深染, 细胞周围间隙增宽。尼氏染色: S 组大鼠海马 CA1 区存在大量神经元, 神经元内有较多的尼氏小体; IR 组 CA1 区神经元数目减少, 胞浆内尼氏小体减少; ISO 组受损神经元较 IR 组减少, 尼氏小体增多; CYC 组神经元损伤严重, 仅存少量神经元和尼氏小体(图 3—4)。

免疫荧光: Shh 位于细胞膜和细胞质中, Gli1 表达于细胞质和细胞核(图 5—6)。Western blot: 与组比较, IR 组 Shh 和 Gli1 蛋白含量明显增加(P<0.05); 与 IR 组比较, ISO 组 Shh 和 Gli1 的蛋白含量明显增加(P<0.05); 与 ISO 组比较, CYC 组 Shh 和 Gli1 蛋白含量明显降低(P<0.05)(图 7—8)。

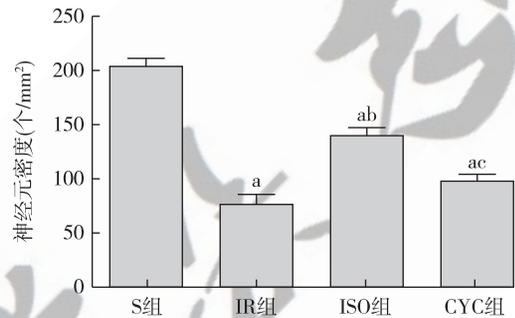
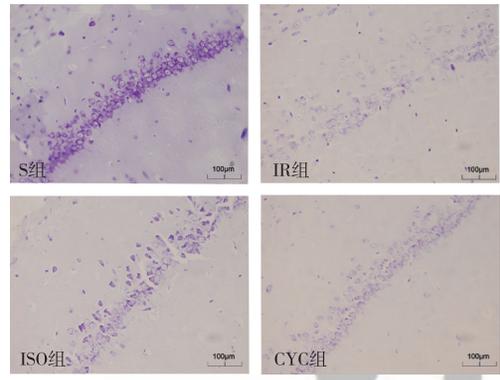
讨 论

异氟醚在脑卒中 MCAO 模型缺血的急性期具有神经保护作用, 但具体机制尚未完全阐明。本研



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与 ISO 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 四组大鼠脑组织 HE 染色结果 (×200) 及受损神经元百分比的比较



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与 ISO 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 四组大鼠脑组织尼氏染色结果 (×200) 及神经元密度的比较

究采用大脑中动脉栓塞 90 min 再灌注 24 h 的方法制备大鼠卒中模型,实验结果表明,大鼠大脑中动脉栓塞后神经行为学评分、脑梗死体积和凋亡指数均升高,提示模型制备成功。免疫荧光和 Western blot 结果表明,异氟醚后处理显著增加了 Shh 和 Gli 蛋白含量,而给予 Shh/Gli1 信号通路特异性抑制剂环巴胺后,Shh 和 Gli 蛋白含量均明显减少,提示异氟醚后处理可能通过 Shh/Gli1 信号通路发挥脑保护作用。

大鼠海马 CA1 区对缺血性损伤最敏感^[10],并且在缺血性脑损伤后于海马 CA1 区发现了新生神经元^[11],提示海马 CA1 区与脑组织的损伤修复密切相关,故本实验选择观察海马 CA1 区的锥体神经元。前期的研究已经证明,1.5%异氟醚后处理对局灶性脑缺血-再灌注损伤大鼠提供强大的神经保护作用,且 DMSO 对缺血-再灌注损伤没有明显影响^[12],故本研究选择 1.5%异氟醚进行实验。

目前临床上尚无治疗缺血-再灌注损伤的有效措施,如何减轻缺血-再灌注损伤已成为临床研究的重点。近年来大量研究显示,一些与细胞的增殖、存活、分化和凋亡相关的信号通路,如 Shh/Gli

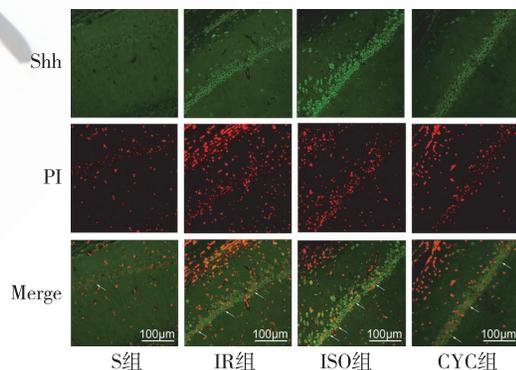


图 5 四组大鼠海马 Shh 蛋白免疫荧光图

信号通路^[13]、JAK2/STAT3 信号通路^[14]、Nrf2/ARE 信号通路^[15]等,参与了组织缺血-再灌注损伤后的病理过程。

Shh 蛋白是 Hh 蛋白家族成员之一,Shh 信号通路是生物进化中最为保守的信号通路之一,参与了脊椎动物和非脊椎动物胚胎发育的多个过程,对神经系统的发育和器官的形成和构建至关重要。在经典的 Shh 信号传导中,Shh 蛋白以自分泌或旁分泌方式与 Patched 受体结合,解除 Patched 对 Smoothed 受体的抑制作用,使 Gli1、Gli2 和 Gli3 进

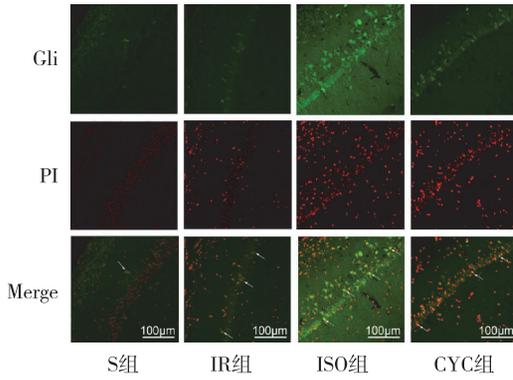
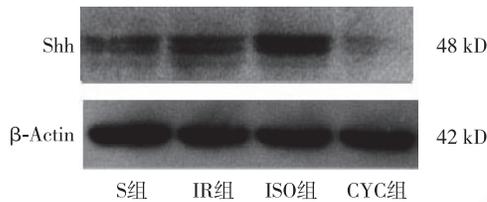


图 6 四组大鼠海马 Gli1 蛋白免疫荧光图



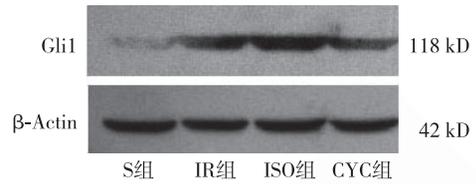
注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 ISO 组比较, ^c $P < 0.05$

图 7 四组大鼠脑组织 Shh 蛋白相对含量的比较

入细胞核并启动控制细胞生长、存活和分化的一系列靶基因的表达,从而完成各种生物学作用^[16]。

以前的研究认为 Shh 信号通路仅在胚胎发育阶段发挥作用,但近年来的研究表明,即便是在成年大脑中这一信号通路仍非常有效力^[17]。在缺血性脑损伤后,海马神经元中 Shh 蛋白的表达水平显著上调,而使用环巴胺抑制了海马神经干细胞的增殖^[18]。给予外源性重组 Shh 蛋白可显著改善脑缺血-再灌注损伤大鼠的神经行为学评分、减少脑梗死体积、促进缺血周围组织的血管生成和神经干细胞的定植,而给予抑制剂环巴胺消除了 Shh 蛋白的神经保护作用^[19]。

Gli1 蛋白的高水平表达是 Shh 信号通路激活的明确标志^[20]。在本研究中,IR 组 Shh 和 Gli1 表达上调,表明缺血-再灌注损伤激活了脑组织中的



注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 ISO 组比较, ^c $P < 0.05$

图 8 四组大鼠脑组织 Gli1 蛋白相对含量的比较

Shh/Gli1 信号通路,这与前期其他学者的研究结果一致^[21]。ISO 组 Shh 和 Gli1 的表达进一步上调,表明异氟醚后处理促进了 Shh/Gli1 信号通路的进一步激活。同时 ISO 组神经行为学评分、脑梗死体积和凋亡指数的降低以及脑组织病理学损伤的减轻,表明异氟醚后处理增强 Shh 和 Gli1 蛋白表达,抑制细胞凋亡,减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤。因此,异氟醚后处理的脑保护作用与 Shh/Gli1 信号通路的激活有关。

环巴胺属于异甾体类生物碱,主要作用于 Smoothed 蛋白,通过改变 Smoothed 蛋白的空间结构特异性抑制 Shh 信号通路,本研究参考文献^[22]选择 10 mg/kg 环巴胺于缺血前 30 min 腹腔注射。与 ISO 组比较,CYC 组神经行为学评分、脑梗死体积和凋亡指数升高,脑组织病理学损伤严重,Shh 和 Gli1 蛋白表达下调,Gli1 核移位减少,表明环巴胺促进了细胞凋亡,消除了异氟醚后处理的神经保护作用,Shh/Gli1 信号通路的抑制加剧了大鼠的脑缺血-再灌注损伤,继而证明了异氟醚对缺血-再灌注损伤的保护作用可能是通过激活 Shh/Gli1 信号通路介导的。

综上所述,异氟醚后处理能够降低神经行为学评分、减少脑梗死体积、抑制细胞凋亡、改善组织病理学损伤减轻脑缺血-再灌注损伤,其机制可能与 Shh/Gli1 信号通路的激活有关,但 Shh/Gli1 信号通路对异氟醚后处理脑保护作用的详细机制有待进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] Durai Pandian J, Padma V, Vijaya P, et al. Stroke and thrombolysis in developing countries. *Int J Stroke*, 2007, 2(1): 17-26.
- [2] Li D, Ni H, Rui Q, et al. Mst1: function and mechanism in brain and myocardial ischemia reperfusion injury. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(9): 1358-1364.
- [3] 章放香, 赵倩, 张竞超, 等. 异氟醚后处理对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33(8): 993-996.
- [4] Jin Y, Barnett A, Zhang Y, et al. Poststroke sonic hedgehog agonist treatment improves functional recovery by enhancing neurogenesis and angiogenesis. *Stroke*, 2017, 48(6): 1636-1645.
- [5] Ding X, Li Y, Liu Z, et al. The sonic hedgehog pathway mediates brain plasticity and subsequent functional recovery after bone marrow stromal cell treatment of stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(7): 1015-1024.
- [6] Zhang L, Chopp M, Meier DH, et al. Sonic hedgehog signaling pathway mediates cerebrolysin-improved neurological function after stroke. *Stroke*, 2013, 44(7): 1965-1972.
- [7] Belayev L, Alonso OF, Busto R, et al. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*, 1996, 27(9): 1616-1622.
- [8] Ding Y, Li J, Rafols JA, et al. Prereperfusion saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 2002, 33(10): 2492-2498.
- [9] Gong SJ, Chen LY, Zhang M, et al. Intermittent hypobaric hypoxia preconditioning induced brain ischemic tolerance by up-regulating glial glutamate transporter-1 in rats. *Neurochem Res*, 2012, 37(3): 527-537.
- [10] 温相如, 关秋华, 张光毅. 大鼠脑缺血/再灌注后海马 CA1 区 HSP90 的表达. *徐州医学院学报*, 2008, 28(12): 774-775.
- [11] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, 2002, 110(4): 429-441.
- [12] Wang S, Yin J, Ge M, et al. Transforming growth-beta 1 contributes to isoflurane postconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 2016, 78: 280-290.
- [13] Yu P, Wang L, Tang F, et al. Resveratrol pretreatment decreases ischemic injury and improves neurological function via sonic hedgehog signaling after stroke in rats. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(1): 212-226.
- [14] 赵博, 冷燕, 吴晓静, 等. JAK2/STAT3 信号通路在糖尿病大鼠心肌缺血再灌注诱发脑损伤中的作用. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(2): 211-213.
- [15] 杜文娟, 王海英, 李小娟, 等. 乳化异氟醚后处理对大鼠心肌缺血再灌注时 Nrf2-ARE 信号通路的影响: 离体实验. *中华麻醉学杂志*, 2015, 35(5): 632-636.
- [16] Álvarez-Buylla A, Ihrie RA. Sonic hedgehog signaling in the postnatal brain. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 33: 105-111.
- [17] Farmer WT, Therése Abrahamsson, Chierzi S, et al. Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Science*, 2016, 351(6275): 849-854.
- [18] Sims JR, Lee SW, Topalkara K, et al. Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke*, 2009, 40(11): 3618-3626.
- [19] Huang SS, Cheng H, Tang CM, et al. Anti-oxidative, anti-apoptotic, and pro-angiogenic effects mediate functional improvement by sonic hedgehog against focal cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol*, 2013, 247: 680-688.
- [20] Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev*, 2008, 22(18): 2454-2472.
- [21] Chechneva OV, Mayrhofer F, Daugherty DJ, et al. A Smoothed receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1481.
- [22] Zhang Y, Zhang X, Cui L, et al. Salvianolic Acids for Injection (SAFI) promotes functional recovery and neurogenesis via sonic hedgehog pathway after stroke in mice. *Neurochem Int*, 2017, 110: 38-48.

(收稿日期: 2019-03-30)