

# 天麻活性成分减轻大鼠神经元氧糖剥夺/复糖复氧损伤的作用机制<sup>△</sup>

王锦<sup>1\*</sup>, 夏霜莉<sup>1</sup>, 杨媛<sup>2</sup>, 代蓉<sup>1#</sup> (1. 云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学第一附属医院临床药学中心, 昆明 650032)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)23-2886-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.23.12



**摘要** 目的 研究天麻活性成分3,4-二羟基苯甲醛(3,4-DD)对大鼠脑微血管内皮细胞(BMECs)-大鼠肾上腺嗜铬细胞PC12共培养体系氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)损伤的改善作用机制。方法 采用Transwell小室共培养BMECs与PC12细胞,然后分为对照组、模型组、丁苯酞组(阳性对照组,0.1 mmol/L)、3,4-DD组(0.1 μmol/L),除对照组外,其余各组共培养体系均复制OGD/R损伤模型。同时,共培养体系以相应药物或培养基干预BMECs 24 h,然后检测体系跨膜电阻(TEER)以及PC12细胞中乳酸脱氢酶(LDH)活性、脑源性神经营养因子(BDNF)水平以及TrkB、Plc-γ、Map-2、GAP-43 mRNA表达水平。结果 与对照组比较,模型组共培养体系TEER以及PC12细胞中LDH活性、BDNF水平均显著降低( $P<0.01$ ),PC12细胞中TrkB、Plc-γ、Map-2、GAP-43 mRNA表达水平均显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,3,4-DD组、丁苯酞组共培养体系TEER以及PC12细胞中LDH活性、BDNF水平和TrkB、Plc-γ、Map-2、GAP-43 mRNA表达水平均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论 3,4-DD可通过作用于BMECs减轻神经元OGD/R损伤,其作用机制可能与激活BDNF/TrkB信号通路有关。

**关键词** 3,4-二羟基苯甲醛;脑微血管内皮细胞;神经元;氧糖剥夺

## Mechanism of *Gastrodia elata* active ingredient reducing oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury in rat neuron

WANG Jin<sup>1</sup>, XIA Shuangli<sup>1</sup>, YANG Yuan<sup>2</sup>, DAI Rong<sup>1</sup> (1. School of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China; 2. Dept. of Clinical Pharmacy, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To study the improvement effect and mechanism of *Gastrodia elata* active ingredient 3,4-dihydroxybenzaldehyde (3,4-DD) on oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R) injury in rat primary brain microvascular endothelial cells (BMECs)-rat adrenal chromaffin cells PC12 co-culture system. **METHODS** The co-culture model of BMECs and PC12 cells was replicated in the Transwell chamber, and divided into control group, model group, butylphthalide group (positive control group, 0.1 mmol/L) and 3,4-DD group (0.1 μmol/L). OGD/R injury model of the co-culture system was induced in those groups except for the control group. After preventively intervention in BMECs with relevant medicine or culture medium for 24 h, cell transendothelial electronic resistance (TEER) value, lactate dehydrogenase (LDH) activity, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) level and mRNA expressions of TrkB, Plc-γ, Map-2, GAP-43 in PC12 cells was detected. **RESULTS** Compared with the control group, TEER of the co-culture model, LDH activity and BDNF level of PC12 cells were decreased significantly in the model group ( $P<0.01$ ), while mRNA expressions of TrkB, Plc-γ, Map-2 and GAP-43 in PC12 cells were increased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, TEER of the co-culture model, LDH activity, BDNF level, and the mRNA expressions of TrkB, Plc-γ, Map-2 and GAP-43 in PC12 cells were increased significantly in the 3,4-DD group and butylphthalide group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS** 3,4-DD can relieve the damage of neuronal OGD/R by acting on BMECs, the mechanism of which may be associated with activating the BDNF/TrkB signaling pathway.

**KEYWORDS** 3,4-dihydroxybenzaldehyde; brain microvascular endothelial cells; neuron; oxygen and glucose deprivation

<sup>△</sup>基金项目 云南省教育厅科学研究基金项目(No.2023Y0457)

\* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药药理与应用。E-mail: 281824748@qq.com

# 通信作者 副教授,硕士生导师。研究方向:中药药理与应用。E-mail:1647029626@qq.com

神经血管单元(neurovascular unit, NVU)主要包括神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞、脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)、细胞外基质等,各组成间相互协调,共同维持脑组织内环境的

整体稳态。脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemic reperfusion injury, CIRI)发生后, BMECs、胶质细胞被激活, 血脑屏障通透性发生改变, 神经元受损凋亡, 导致NVU的稳态失衡, 从而影响神经系统功能<sup>[1-2]</sup>。相关研究发现, 在NVU微环境中, BMECs不仅可为神经元提供突触间信号传递时所需要的能量, 还可在CIRI情况下通过释放脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)调控神经元活性, 发挥神经保护作用<sup>[3-4]</sup>。因此, 通过药物干预加强BMECs与神经元之间的信号联系以促进机体自身的内源性修复, 对CIRI的治疗具有重要的意义。

本课题组前期研究表明, 天麻主要活性成分3, 4-二羟基苯甲醛(3, 4-dihydroxybenzaldehyde, 3, 4-DD)具有减轻大脑中动脉闭塞再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型大鼠脑损伤, 保护受损神经元的作用<sup>[5-7]</sup>, 但作用机制尚不明确。目前常以神经元和BMECs共培养模拟NVU<sup>[8]</sup>, 但是由于原代神经元生长周期长, 无法进行传代, 故常用中分化型的大鼠肾上腺嗜铬细胞PC12代替神经元进行研究<sup>[9]</sup>。基于此, 本研究采用Transwell小室建立BMECs-PC12共培养氧糖剥夺/复糖复氧(oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)损伤模型, 探讨3, 4-DD对CIRI的改善作用及机制, 以期对CIRI的治疗药物开发提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

3111型CO<sub>2</sub>细胞培养箱、QuantStudio 5型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司; Ti-S型倒置相差显微镜购自日本Nikon公司; Infinite M200 PRO型酶标仪购自瑞士Tecan公司; ERS-2型细胞电阻仪、Transwell小室(孔径0.4 μm, 有效膜面积0.33 cm<sup>2</sup>)购自美国Millipore公司。

### 1.2 主要药品与试剂

3, 4-DD(批号256775)购于北京百灵威科技有限公司; 丁苯酞(NBP, 批号118170230)购于石药集团恩必普药业有限公司; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(批号AGH1533A)购自日本Takara公司; 0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(批号分别为03-050-1A、04-01-1A)购自以色列Biological Industries公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(批号033100g)购自美国Amresco公司; DMEM/F12培养基、DMEM/RPMI 1640培养基(批号分别为CLL330500B、58903)购自美国Gibco公司; 兔抗Ⅷ因子单克隆抗体(批号NB10091761Cy)购自美国Novus Biologicals公司; 山羊抗兔荧光单克隆抗体(二抗, 批号C2306)购自美国Sigma公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测

试盒(批号QS1001)购自南京建成生物工程研究所; BDNF酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号K2401874)购自武汉华美生物工程有限公司。酪氨酸激酶受体B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)、磷脂酶c-γ(phospholipase c-γ, Plc-γ)、微管蛋白2(microtubule associated protein-2, Map-2)、神经调节素43(growth associated protein-43, GAP-43)的引物由昆明硕擎生物技术有限公司合成, 具体信息见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列(5'-3')	扩增产物长度bp
GAPDH	上游:GATGGTGAAGGTCGGTGTGA	77
	下游:AACTTGCCGTGGGTAGAGTC	
TrkB	上游:ATCGATATCCGTGCCGGTTA	113
	下游:GGCTGCATGGTCTATACGC	
Plc-γ	上游:TACTCTACCGCACCCGGTTA	73
	下游:CGTACAGTTTCACATGGCG	
Map-2	上游:AGCCAGAACATACCACCAGC	123
	下游:CCTCTCGTCAGCCATCTTC	
GAP-43	上游:CAAGATGGTGTCAAACCCGGAG	157
	下游:TGGTGATCACCCCTTCTTCTC	

### 1.3 细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞PC12购自北京北纳创联生物技术研究院, 将其以DMEM/RPMI 1640培养基(含10%FBS, 40 U/mL青链霉素双抗)于37 °C、5%CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中进行培养。

### 1.4 动物

本研究所用动物为SPF级SD大鼠, 体重250~300 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物生产许可证号为SCXK(辽)2015-0001。取成年雌鼠1只、雄鼠2只进行合笼饲养, 于第2天观察鼠笼底层是否有阴栓, 于见到阴栓之日将雌鼠与雄鼠分开饲养, 等待雌鼠生产。饲养环境温度22~24 °C, 湿度50%~60%, 12 h明暗交替。动物实验均经云南中医药大学动物保护委员会批准(批准号为R-06202003)。

## 2 方法

### 2.1 原代BMECs分离、培养和鉴定

取出生7 d的乳鼠大脑皮质, 用无菌组织剪将皮层组织剪碎, 1 000 r/min离心3 min; 弃除上清液后按1:1的体积比加入BSA溶液, 并充分吹打混匀, 2 500 r/min离心8 min; 弃去上清液, 收集管底微血管段沉淀, 然后接种于DMEM/F12培养基(含20% FBS、40 U/mL青链霉素双抗)的明胶包被培养瓶中, 于37 °C细胞培养箱中进行培养; 24 h后更换新鲜培养液, 细胞生长状态稳定后每2 d换液1次。待细胞生长密度达90%, 进行传代纯化, 取传至第3代的细胞用于实验。取部分BMECs以Ⅷ因子抗体染色后在荧光显微镜下观察, 当出现Ⅷ因子阳性表达(呈红色)时, 则表明原代BMECs培养成功。

## 2.2 BMECs-PC12 共培养体系构建和 OGD/R 损伤模型的建立

分别取 PC12 细胞和 BMECs, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次, 加入 0.25% 胰酶置于 37 °C 培养箱中消化 5 min; 当 80% 细胞收缩变圆并漂浮时, 向 PC12 细胞中立即加入含 10% FBS 的 DMEM/RPMI 1640 培养基终止消化, 向 BMECs 中加入含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化; 将两种细胞以 1 000 r/min 离心 5 min, 收集管底细胞沉淀, 加入培养基重悬, 调整 PC12 细胞、BMECs 的密度分别至  $1.0 \times 10^6$ 、 $4.0 \times 10^5$  个/mL。将 PC12 细胞接种于 6 孔板中, 待其生长 1 d 后用于共培养实验。将 BMECs 接种于已提前包被好明胶的 Transwell 小室内侧, 将插入室放入已接种 PC12 细胞的 6 孔板中共培养 2 d。当两种细胞生长密度达 90% 时, 检测 BMECs-PC12 共培养体系的跨膜电阻 (transendothelial electronic resistance, TEER)、PC12 细胞中 LDH 活性; 当 BMECs-PC12 共培养体系的 TEER 和其中 PC12 细胞中 LDH 活性相较于两种细胞单独培养显著升高时, 则表明 BMECs-PC12 共培养体系构建成功<sup>[10]</sup>。

将上述 BMECs-PC12 共培养体系取出, 弃掉原培养基, 以 PBS 清洗细胞后, 换入无糖无血清培养基, 置于含 1% O<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温恒湿培养箱中进行氧糖剥夺; 8 h 后取出, 弃去无糖无血清培养基, 换入新鲜的完全培养基, 置于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温恒湿培养箱中进行复糖复氧 10 h; 复糖复氧结束后, 检测 BMECs-PC12 共培养体系 4 h 渗漏液面差、TEER、PC12 细胞中 LDH 活性, 当 4 h 渗漏液面差增大, TEER、PC12 细胞中 LDH 活性降低时, 表明 BMECs-PC12 共培养 OGD/R 损伤模型构建成功<sup>[10]</sup>。

## 2.3 分组与给药

将 BMECs-PC12 共培养体系分为对照组、模型组、NBP 组 (阳性对照组, 0.1 mmol/L, 浓度参考文献<sup>[11]</sup>设置)、3, 4-DD 组 (0.1 μmol/L, 浓度依据前期研究<sup>[7]</sup>设置), 每组均设置 4 个复孔。NBP 组和 3, 4-DD 组给予相应药物干预 Transwell 小室内侧 BMECs 24 h, 对照组和模型组以等量培养基代替, 然后除对照组外, 其余各组均按“2.2”项下方法复制 BMECs-PC12 共培养 OGD/R 损伤模型。

## 2.4 BMECs-PC12 共培养体系的 TEER 和 PC12 细胞中 LDH 活性的检测

氧糖剥夺 8 h/复糖复氧 10 h 后, 采用 ERS-2 型电阻仪检测 BMECs-PC12 共培养体系的 TEER, 取平均值。上述检测结束后, 取体系中部分 PC12 细胞进行裂解, 然后离心取上清液, 按试剂盒说明书方法操作, 测定 PC12

细胞中 LDH 活性。

## 2.5 PC12 细胞中 BDNF 水平的检测

“2.4”项下实验结束后, 取板底 PC12 细胞的培养液, 然后按 ELISA 试剂盒说明书方法操作, 检测 PC12 细胞中 BDNF 水平。

## 2.6 PC12 细胞中 TrkB、Plc-γ、Map-2、GAP-43 mRNA 表达水平的检测

采用荧光定量 PCR 法进行检测。“2.4”项下实验结束后, 取部分 PC12 细胞进行裂解, 然后用相应试剂盒提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 再以 cDNA 进行 PCR, 反应条件为: 50 °C 预处理 2 min; 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 7 min, 循环 40 次。以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法检测 PC12 细胞中 TrkB、Plc-γ、Map-2、GAP-43 mRNA 的表达水平。

## 2.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析; 符合正态分布且方差齐时, 组间两两比较采用 Dunnett's *t* 检验; 不符合正态分布时, 采用秩和检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

### 3.1 原代 BMECs 的分离鉴定结果

结果显示, 显微镜下 VIII 因子呈红色, 原代 BMECs 培养成功。结果见图 1。

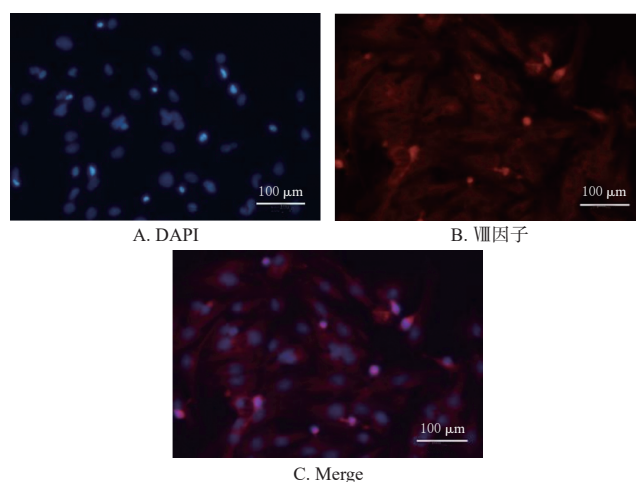


图1 原代 BMECs 的分离鉴定结果

### 3.2 3, 4-DD 对共培养体系 OGD/R 损伤模型的 TEER 以及 PC12 细胞中 LDH 活性及 BDNF 水平的影响

与对照组比较, 模型组 BMECs-PC12 共培养体系的 TEER 以及 PC12 细胞中 LDH 活性和 BDNF 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, NBP 组、3, 4-DD 组 BMECs-PC12 共培养体系中上述指标均显著逆转 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果见表 2。

表2 各组共培养体系的TEER以及PC12细胞中LDH活性和BDNF水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	TEER( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	LDH活性(U/g)	BDNF水平(ng/L)
对照组	364.8 ± 29.68	3.00 ± 0.30	4.29 ± 0.43
模型组	235.3 ± 26.27 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.52 ± 0.47 <sup>a</sup>
NBP组	289.3 ± 11.44 <sup>b</sup>	2.73 ± 0.17 <sup>b</sup>	4.38 ± 0.49 <sup>b</sup>
3,4-DD组	349.8 ± 18.79 <sup>c</sup>	3.18 ± 0.22 <sup>c</sup>	3.97 ± 0.55 <sup>c</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.01$ 。

### 3.3 3,4-DD对共培养体系OGD/R损伤模型PC12细胞中TrkB、Plc- $\gamma$ 、Map-2、GAP-43 mRNA表达的影响

与对照组比较, 模型组PC12细胞中TrkB、Plc- $\gamma$ 、Map-2、GAP-43 mRNA表达水平均显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, NBP组、3,4-DD组PC12细胞中上述指标表达水平均进一步显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结果见表3。

表3 PC12细胞中TrkB、Plc- $\gamma$ 、Map-2、GAP-43 mRNA表达水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	TrkB mRNA	Plc- $\gamma$ mRNA	Map-2 mRNA	GAP-43 mRNA
对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	8.18 ± 1.23 <sup>a</sup>	8.16 ± 1.21 <sup>a</sup>	8.83 ± 0.28 <sup>a</sup>	21.19 ± 1.29 <sup>a</sup>
NBP组	13.63 ± 1.60 <sup>b</sup>	14.73 ± 0.88 <sup>b</sup>	12.38 ± 1.23 <sup>b</sup>	26.83 ± 1.45 <sup>b</sup>
3,4-DD组	11.55 ± 1.85 <sup>c</sup>	12.61 ± 2.17 <sup>c</sup>	10.35 ± 0.82 <sup>c</sup>	26.05 ± 1.68 <sup>b</sup>

a: 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ ; c: 与模型组比较,  $P < 0.05$ 。

## 4 讨论

CIRI的发生是由NVU中多种细胞相互作用导致的级联反应,可引起神经炎症的发生、BMECs间紧密连接破坏、脑微环境稳态失调、神经功能受损。BMECs是血脑屏障的结构基础,其产生的BDNF可作用于轴突,为神经元提供营养<sup>[12]</sup>。TEER是评价紧密连接功能和血脑屏障细胞旁转运的方法<sup>[13]</sup>;LDH存在于所有细胞中,当细胞膜损伤时可快速释放至细胞培养液中,因此常作为衡量细胞是否完整的重要指标<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, BMECs-PC12共培养体系经OGD/R后,TEER、PC12细胞中LDH活性和BDNF水平均降低,提示BMECs-PC12共培养体系的屏障功能被破坏,PC12细胞受损;经3,4-DD干预后,共培养体系的TEER以及PC12细胞中LDH活性和BDNF水平均升高,表明3,4-DD可减轻BMECs-PC12共培养体系的OGD/R损伤,并促进BMECs、PC12细胞生成并释放BDNF。

BMECs的旁分泌功能可通过调控BDNF/TrkB信号通路,增加神经元细胞膜上Plc- $\gamma$ 、Map-2、GAP-43蛋白的表达,其中Plc- $\gamma$ 可介导蛋白激酶C调节突触可塑性<sup>[15]</sup>;Map-2是组成神经元细胞骨架的重要组成部分,其表达水平能反映神经元树突的破坏情况<sup>[16]</sup>;GAP-43可参与神经细胞外生长及突触发育形成和神经细胞再生,能

调节轴突的延伸作用,增强与G蛋白偶联的受体的转运作用<sup>[17]</sup>。促进Plc- $\gamma$ 、Map-2、GAP-43的表达可维持神经元轴突和树突的生长,恢复神经元间信号的传导,减轻神经元的损伤<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, BMECs-PC12共培养体系经OGD/R后,PC12细胞中TrkB、Plc- $\gamma$ 、Map-2、GAP-43 mRNA表达水平升高,提示共培养体系在受到OGD/R刺激后,细胞自身触发内源性修复作用;经3,4-DD干预后,PC12细胞中上述指标表达水平均进一步升高,提示3,4-DD可通过作用于Transwell小室上层BMECs,促进BDNF分泌,启动BDNF/TrkB信号通路,调节PC12的突触可塑性,增强BMECs与神经元之间的信号联系以促进内源性修复,进而保护神经元。

综上所述,3,4-DD可通过作用于BMECs减轻神经元OGD/R损伤,其作用机制可能与激活BDNF/TrkB信号通路有关。由于本实验无法充分反映细胞间和细胞外基质的相互作用,后续还需要观察多个细胞之间的相互作用,进一步探讨3,4-DD保护神经元的作用机制。

## 参考文献

- [1] 刘抒雯,杨丽华,马春,等. 中医药保护脑缺血再灌注损伤后神经血管单元的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 225-234.  
LIU S W, YANG L H, MA C, et al. Effect of neurovascular unit after cerebral ischemia-reperfusion injury treated by traditional Chinese medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2018, 24(23): 225-234.
- [2] LE R, ESQUENAZI S. Astrocytes mediate cerebral cortical neuronal axon and dendrite growth, in part, by release of fibroblast growth factor[J]. Neurol Res, 2002, 24(1): 81-92.
- [3] 夏霜莉,杨媛,廖陈,等. 3,4-二羟基苯甲醛作用星形胶质细胞减轻脑微血管内皮细胞和神经元氧糖剥夺/再灌注损伤[J]. 上海中医药大学学报, 2021, 35(4): 67-72, 100.  
XIA S L, YANG Y, LIAO C, et al. 3,4-Dihydroxybenzaldehyde attenuates oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in brain microvascular endothelial cells and neurons by acting on astrocytes[J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med, 2021, 35(4): 67-72, 100.
- [4] 吴雄枫,袁绘,沈红健,等. 静脉溶栓治疗反复短暂性脑缺血发作的疗效分析[J]. 第二军医大学学报, 2022, 43(1): 55-59.  
WU X F, YUAN H, SHEN H J, et al. Efficacy of intravenous thrombolysis for treatment of repeated transient ischemic attack[J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2022, 43(1): 55-59.

- [5] 何芳雁. 天麻对MCAO/R模型大鼠血脑屏障的保护作用及机制研究[D]. 昆明:云南中医学院,2015.  
HE F Y. Protective effect and mechanisms of the *Gastrodia elata* Blume. on the blood-brain barrier of MCAO/R model rats[D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine,2015.
- [6] 颜汉文. 天麻酚性成分对神经血管单元的保护作用[D]. 昆明:云南中医学院,2017.  
YAN H W. Protective effects of the phenolic component from *Gastrodia elata* Blume. on the neurovascular unit [D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine,2017.
- [7] 吴盛友. 天麻酚性成分对PC12细胞及胎鼠皮层神经元OGD/R损伤保护作用的研究[D]. 昆明:云南中医学院,2013.  
WU S Y. Protective effects of phenols from *Gastrodia elata* Blume on PC12 cell and cortical neurons of fetal rats after OGD/R[D]. Kunming: Yunnan University of Traditional Chinese Medicine,2013.
- [8] 李长香. 精制清开灵及其组分对体外神经血管单元的保护作用及机制的研究[D]. 北京:北京中医药大学,2019.  
LI C X. Study on the protective effect and mechanism of refined Qingkailing and its components on neurovascular units *in vitro*[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine,2019.
- [9] APPELT-MENZEL A, CUBUKOVA A, GÜNTHER K, et al. Establishment of a human blood-brain barrier coculture model mimicking the neurovascular unit using induced pluri- and multipotent stem cells[J]. Stem Cell Reports,2017,8(4):894-906.
- [10] 薛强. “脑神经血管单元”体外模型的成模性研究[D]. 重庆:西南大学,2013.  
XUE Q. The study of the brain neurovascular unit model *in vitro*[D]. Chongqing: Southwest University,2013.
- [11] 李静. 丁苯酞活化AMPK调控线粒体生成对脑缺血/再灌注损伤的保护作用[D]. 沈阳:中国医科大学,2022.  
LI J. Protective effect of mitochondrial biogenesis regulated by butylphthalide activating AMPK in cerebral ischemia/reperfusion injury[D]. Shenyang: China Medical University,2022.
- [12] LIU F D, DUAN H M, HAO F, et al. Biomimetic chitosan scaffolds with long-term controlled release of nerve growth factor repairs 20-mm-long sciatic nerve defects in rats[J]. Neural Regen Res,2022,17(5):1146-1155.
- [13] NAKAGAWA S, DELI M A, NAKAO S, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells[J]. Cell Mol Neurobiol,2007,27(6):687-694.
- [14] KUMAR P, NAGARAJAN A, UCHIL P D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay[J]. Cold Spring Harb Protoc,2018,2018(6):465-468.
- [15] KISS BIMBOVA K, BACOVA M, KISUCKA A, et al. Activation of three major signaling pathways after endurance training and spinal cord injury[J]. Mol Neurobiol,2022,59(2):950-967.
- [16] YOONJU K, YOU-NA J, JI-YOUNG K, et al. Microtubule-associated protein 2 mediates induction of long-term potentiation in hippocampal neurons[J]. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol, 2020, 34(5):6965-6983.
- [17] LIU D, LIU Z, LIU H X, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes vesicular glutamate transporter 3 expression and neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons through the activation of the transcription factors Etv4 and Etv5[J]. Brain Res Bull,2016,121:215-226.
- [18] LEAL G, COMPRIDO D, DUARTE C B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity[J]. Neuropharmacology,2014,76:639-656.

(收稿日期:2023-04-22 修回日期:2023-08-19)

(编辑:唐晓莲)