

凝血酶体外诱导模拟脑室出血后大鼠蛛网膜细胞纤维化的实验研究

陈晓宇¹, 肖格磊^{1,2**}, 詹潮鸿^{1,2}, 张向阳³, 张治平^{1,2}, 刘景平^{1,2}

1. 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南省长沙市 410008

2. 中南大学湘雅医院脑积水诊疗中心, 湖南省长沙市 410008

3. 中南大学湘雅医学院临床医学系, 湖南省长沙市 410078

摘要:目的 观察凝血酶(thrombin)刺激体外培养大鼠蛛网膜细胞后纤维化程度的变化,探讨其与脑室出血(intraventricular hemorrhage, IVH)后大鼠慢性脑积水形成的关系。方法 采用SD大鼠蛛网膜细胞,经不同浓度凝血酶刺激,在体外模拟脑室出血(IVH)后慢性脑积水大鼠的蛛网膜细胞纤维化的病理生理过程。细胞免疫化学法(immunocytochemistry, ICC)鉴定传代培养的SD大鼠蛛网膜细胞标志物细胞角蛋白(CK 8/18)和桥粒蛋白(Desmoplakin)的表达。qRT-PCR与Western Blot检测细胞纤维化因子(Col-I、Col-III、TGF- β 1、 α -SMA)的表达,观察其纤维化程度,同时检测比较各组细胞的表达差异。结果 (1)培养的蛛网膜细胞标志物Cytokeratin和Desmoplakin表达阳性。(2)凝血酶可诱导蛛网膜细胞纤维化,在50 u/ml浓度下,蛛网膜细胞纤维化程度最明显。(3)实验组较对照组细胞纤维化程度明显。结论 体外可以稳定培养大鼠蛛网膜细胞。凝血酶诱导的蛛网膜细胞各种纤维化指标明显高于正常组,提示纤维化模型构建成功。构建成功的纤维化蛛网膜细胞有利于下一步深入研究脑室出血后慢性脑积水的机制。

关键词:脑积水;蛛网膜细胞;纤维化;凝血酶

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2019.05.002

An experimental study of simulating fibrosis of rat arachnoid cells after intraventricular hemorrhage by thrombin stimulation in vitro

CHEN Xiao-Yu¹, XIAO Ge-Lei^{1,2}, ZHAN Chao-Hong^{1,2}, ZHANG Xiang-Yang³, ZHANG Zhi-Ping^{1,2}, LIU Jing-Ping^{1,2}. 1. Department of Neurosurgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China. 2. The Medical center of hydrocephalus at Xiangya Hospital, Changsha 410008, Hunan, China. 3. Department of Clinical Medicine, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China

Corresponding author: XIAO Ge-lei, E-mail: xiaogelei@csu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the change in the fibrosis degree of cultured rat arachnoid cells in vitro after being stimulated by thrombin, and to explore its relationship with the development of chronic hydrocephalus after intraventricular hemorrhage (IVH) in rats. **Methods** We used different concentrations of thrombin to stimulate the arachnoid cells of Sprague-Dawley (SD) rats, simulating in vitro the pathophysiological process of fibrosis of arachnoid cells in rats with chronic hydrocephalus after IVH. Immunocytochemistry was used to identify the expression of the markers of subcultured SD rat arachnoid cells, i. e., cytokeratin (CK 8/18) and desmoplakin. The mRNA and protein expression of fibrosis factors (Col-I, Col-III, TGF- β 1, and α -SMA) in arachnoid cells was measured by quantitative real-time PCR and Western blot, respectively. Those factors were measured for indicating fibrosis degree, and they were compared between different groups. **Results** (1) Cultured arachnoid cells showed positive expression of the markers cytokeratin and desmoplakin. (2) Thrombin induced fibrosis of arachnoid cells, with the most significant fibrosis degree at 50 u/ml. (3) The experimental group had a higher fibrosis degree than the control group. **Conclusions** Rat arachnoid cells can be stably cultured in vitro. Thrombin-stimulated arachnoid cells have significantly higher levels of various fibrosis indicators than the control cells, suggesting the successful establishment of fibrosis model. This arachnoid cell fibrosis model can help to further investigate the mechanism of chronic hydrocephalus after IVH.

Key words: Hydrocephalus; Arachnoid cell; Fibrosis; Thrombin

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2019JJ50949),湖南省卫健委科研项目(B2019187)

收稿日期:2019-06-15;修回日期:2019-08-19

作者简介:陈晓宇(1988-),男,经治医师,博士,主要从事神经外科基础与临床研究。

通信作者:肖格磊(1985-),男,主治医师,博士,主要从事脑积水基础与临床研究。E-mail: xiaogelei@csu.edu.cn

慢性脑积水多数发生于颅脑外伤、脑出血、颅内炎症及颅脑手术后,发病率在 0.41% ~ 2.9% 之间^[1]。前期研究发现出血后脑积水 (posthemorrhagic hydrocephalus, PHH) 发生于出血 3 周以后,脑实质原发损伤较大时,间质纤维结缔组织将大量增生对缺损组织进行修复,脑积水脑脊液循环通路发生病理改变,包括小胶质细胞的炎症反应及蛛网膜细胞纤维化,造成的脑脊液吸收障碍^[2]。近年研究表明,脑脊液循环通路梗阻、脉络丛过度分泌及蛛网膜颗粒吸收障碍影响脑脊液动力学,促进 PHH,同时,脑脊液循环通路末梢纤维化也参与 PHH 的发生和发展^[3,4]。纤维化 (fibrosis) 是指由于炎症等多种因素导致器官实质细胞发生坏死,组织内细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 异常增多和过度沉积的病理过程。ECM 的沉积和基质金属蛋白酶活性的增加,是纤维化疾病的共同病理特征。研究表明,PHH 发生时同样存在 ECM 的过度沉积^[5]。为深入研究慢性脑积水发病机制,目前多采用犬、猪及大鼠作为模型动物,通过脑室内注入自体血或高岭土等手段闭塞脑脊液循环或影响脑脊液吸收造模^[6]。通常取模型动物的小胶质细胞做细胞模型,但小胶质细胞模型无法模拟蛛网膜纤维化的情况,因此对于蛛网膜纤维化致蛛网膜下腔循环障碍的机制可能阐述不清^[7]。凝血酶是出血性疾病如脑室出血、蛛网膜下腔出血的常用诱导剂^[8]。本文体外培养大鼠蛛网膜细胞,建立稳定的传代体系。采用凝血酶刺激体外培养的蛛网膜细胞,模拟脑室出血后慢性脑积水大鼠的蛛网膜细胞纤维化的病理生理过程。观察不同浓度凝血酶体外诱导蛛网膜细胞纤维化水平,为后续研究大鼠脑室出血后慢性脑积水病理生理过程提供研究载体,有利于下一步深入研究脑室出血后慢性脑积水的发病机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

选取健康 1 ~ 2 d SD 大鼠 10 只购于湖南铠毕实验动物公司,凝血酶购于武汉海特生物,DMEM 等常规细胞培养基、胎牛血清 (FBS) 购于 ThermoFisher,

Col-I 抗体、Col-III 抗体购于 Santa Cruz 公司,TGF-β1 抗体、α-SMA 抗体、山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 647)、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 488) 购自 Abcam 公司,酶联免疫试剂盒购于武汉博士德,化学发光试剂盒购于中山金桥。

1.2 大鼠蛛网膜细胞的培养

参照 Xin 等的方法培养大鼠蛛网膜细胞^[9]。取 10 只 1 ~ 2 d SD 大鼠。常规消毒,组织剪断头处死,钝性剥离头部皮肤,从后凶门沿骨缝剪开颅骨。大脑剥离后显微镜下剥取蛛网膜,PBS 冲洗,剪碎后浸入 FBS 10 分钟,转移至培养瓶中,取 0.1 ml 培养液,浸没组织块,移入 37℃,5% CO₂ 培养箱孵育,每 3d 换完全培养液 1 次,2 周后即可见细胞铺满培养瓶底总面积 70% 左右即可传代。以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,待细胞大部分脱落后加入完全培养液终止消化,吹打后制成细胞悬液,按需传代使用。

1.3 鉴定大鼠蛛网膜细胞 (ICC 检测)

通常以 CK 8/18 及 Desmoplakin 作为蛛网膜细胞标志物^[10]。铺片培养传代的蛛网膜细胞,当细胞长满盖玻片面积的 60% ~ 70% 时取出,4% 多聚甲醛固定液固定 5 分钟,PBS 冲洗,4℃ 下 BSA 封闭 FC 段受体 90 分钟,每张盖玻片滴加 200 μl 一抗:小鼠抗 CK 8/18 单抗,兔抗 Desmoplakin 单抗,4℃ 过夜。PBS 冲洗后滴加 200 μl 二抗:山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 647),山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 488),室温避光 1 h,PBS 冲洗。荧光显微镜下观察培养细胞 CK 8/18 及 Desmoplakin 表达情况以鉴定蛛网膜细胞。

1.4 凝血酶诱导大鼠蛛网膜细胞纤维化

取生长至第 3 天时的第 3 代传代细胞加入 24 孔培养板培养,加入凝血酶并调节至不同浓度 (10、50、100 U/ml),对照组加生理盐水孵育。

1.5 检测实验组及对照组蛛网膜细胞的纤维化指标

1.5.1 qRT-PCR 测定 以 Col-I、Col-III、TGF-β1、α-SMA 为蛛网膜细胞纤维化指标,引物序列设计见表 1。

表 1 引物表

基因	上游引物	下游引物
COL-I	5' AGAGGCATAAAGGGTCATCGTG3'	5' CAGGTTGCAGCCTTGTTAGG3'
COL-III	5' GTCGGAGGAATGGGTGGCTAT3'	5' CATTGCGTCATCAAAGCCTC3'
TGF-β1	5' ATGGAACAGAAGCCAAGCAA 3	5' TTAGACTTCCTGATCCTCA3'
α-SMA	5' CGGGAGAAAATGACCCAGAT3'	5' CCAGAGTCCAGCACAATACCA3'
B-ACTIN	5' CGTAAAGACCTCTATGCCAACAA3'	5' AGCCACCAATCCACACAGAG3'

先提取蛛网膜细胞 mRNA。向 24 孔培养板中每孔加 Trizol 1 ml, 吹打后静置, 加入 200 μ l 氯仿, 震荡离心后取上层水相, 加入 500 μ l 异丙醇, 再次离心后弃去上清液, 加入 1 ml 75% 乙醇洗涤, 离心去上清液, 干燥后加入 50 μ l DEPC 于 -80°C 保存。依照试剂盒操作步骤构建反应体系反转录合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板扩增 Col-I、Col-III、TGF- β 1、 α -SMA 的基因片段, 以大鼠 β -actin 为内参, 条件如下: 93°C 预变性 30 s; 94°C 变性 5 s, 60°C 退火 30 s, 35 个循环; 延伸 5 min。

1.5.2 Western Blot 检测 Col-I、Col-III、TGF- β 1、 α -SMA 表达 PCR 结果提示 50 U/ml 凝血酶刺激大鼠蛛网膜细胞后细胞纤维化标志物提高差异最明显, 因此以生理盐水为对照组, 以 50 U/ml 凝血酶刺激为实验组 Western Blot 检测 Col-I、Col-III、TGF- β 1、 α -SMA 表达。以 RIPA 裂解液滴入 24 孔培养板, 裂解各组细胞。将裂解液 12 000 rpm, 4°C 条件下离心 15 分钟, 收集上层清液。以 BCA 试剂盒检测并调整各组蛋白浓度, 使之一致。取 30 μ g 总蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转印至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。将兔抗 Col-I 抗

体 (1:1 000)、兔抗 Col-III 抗体 (1:1 000)、兔抗 TGF- β 1 抗体 (1:600)、兔抗 α -SMA 抗体 (1:1 000) 一抗加入封闭液, 4°C 孵育过夜, 回收一抗后洗膜 3 次。加入山羊抗兔二抗 (1:2 000), 继续孵育 1 小时, 再次洗膜后用化学发光试剂盒显影。扫描蛋白条带后采用 Quantity One 软件分析。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 24 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析及 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

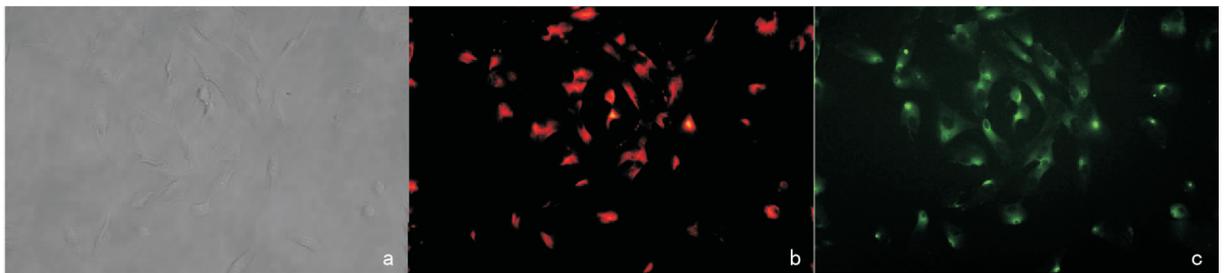
2 结果

2.1 大鼠蛛网膜细胞的培养

体外培养的大鼠蛛网膜细胞形状为多极形, 胞核大, 体积较大, 细胞间紧密连接, 折光性较好。培养至 20 日左右细胞生长速度减慢, 表现出接触抑制。

2.2 大鼠蛛网膜细胞鉴定

ICC 可见 95% 以上细胞 CK 8/18 表达阳性, 丝状分布于胞浆内, 胞核未见表达。95% 以上细胞 Desmoplakin 表达阳性, 丝状分布于胞浆内, 胞核未见表达 (图 1)。



(a: 接种培养 1 周后观察蛛网膜细胞形态, 200 倍; b: 荧光染色, 细胞 CK8/18 表达阳性, 200 倍; c: 荧光染色, 细胞 Desmoplakin 表达阳性, 200 倍)

图 1 体外培养大鼠蛛网膜细胞

2.3 两组细胞的纤维化指标比较

采用 10、50、100 U/ml 凝血酶刺激大鼠蛛网膜细胞 120 h 后, Col-I、Col-III、TGF- β 1、 α -SMA 的 mRNA 相对表达水平与生理盐水对照组相比均有升高, 50 U/ml 凝血酶刺激升高幅度更大, 提示 50 U/ml 凝血酶刺激效果较好 (图 2)。

Western Blot 结果: 50 U/ml 凝血酶刺激后, Col-I、Col-III、TGF- β 1、 α -SMA 蛋白表达均有所上调, 大鼠蛛网膜细胞纤维化明显 (图 3)。

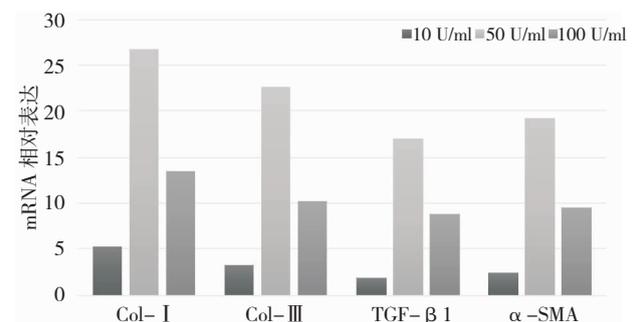


图 2 不同浓度凝血酶刺激大鼠蛛网膜细胞 5 日后纤维化标志物 Col-I、Col-III、TGF- β 1、 α -SMA 相对表达水平

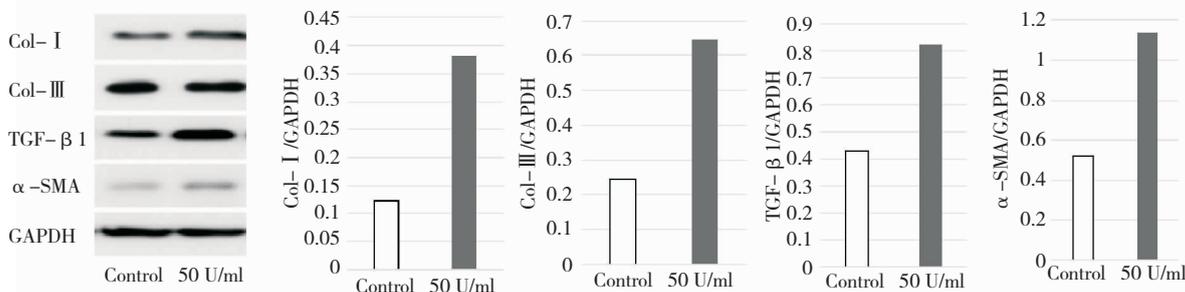


图3 50 U/ml 凝血酶刺激大鼠蛛网膜细胞5日对 Col-I、Col-III、TGF-β1、α-SMA 表达水平的影响

3 讨论

蛛网膜介于硬脑膜与软脑膜之间，是一层不含血管及神经的半透明纤维薄膜。蛛网膜内外表面附着有扁平的间皮，间皮细胞在应激时可脱落游走成为巨噬细胞。蛛网膜向下以蛛网膜小梁附着于软脑膜表面，这些小梁使蛛网膜下隙呈网眼状，脑脊液容纳于蛛网膜与软脑膜间的蛛网膜下隙，使蛛网膜不至于贴附于脑表面。蛛网膜疏松的包裹脑部，在脑底或巨大沟裂附近的蛛网膜往往增厚，可容纳更多的脑脊液，形成脑池。蛛网膜在硬膜静脉窦附近形成很多突入硬膜窦的绒毛样突起，即蛛网膜颗粒，脑脊液经此吸收入静脉窦。健康的蛛网膜容纳并维持脑脊液循环，为脑组织提供缓冲。

离体大鼠蛛网膜细胞的结构与功能均与人蛛网膜细胞类似，已有成熟的永生化大鼠蛛网膜细胞株，由于人蛛网膜细胞的培养仍存在多次传代后细胞衰退的弊端，我们将以大鼠蛛网膜细胞为实验对象。CK8/18 及 Desmoplakin 作为上皮细胞特有的标志物，可用来标记蛛网膜细胞，同时，我们以 Col-I、Col-III、TGF-β1、α-SMA 评估蛛网膜细胞纤维化水平。

有文献认为在小剂量凝血酶(0.1、10、50 U/ml)刺激下，小胶质细胞纤维化水平与凝血酶浓度正相关，呈浓度依赖性。我们的实验证明，当凝血酶浓度进一步增大时，蛛网膜细胞纤维化水平反而可能降低。这可能是由于小胶质细胞与蛛网膜细胞间存在差异，也可能是由于凝血酶浓度继续增大时，影响了蛛网膜细胞的生长，降低了其纤维化水平。

PHH 的发生主要由脑室出血引起，脑室出血过程中的血管内皮受损和组织因子释放，能够激活各种凝血因子，使血液呈高凝状态或形成血栓。其中，凝血酶是参与此过程的重要凝血因子之一。研究表明，凝血酶在 PHH 的发生和发展中具有促进的作用，利用凝血酶直接注入大鼠脑室可以成功诱

导 PHH 模型^[11,12]。除发挥凝血功能外，凝血酶在细胞纤维化病理过程中发挥重要的作用^[13]。例如在肝脏星状细胞中，凝血酶与蛋白激活受体 1 (PAR-1) 结合，激活下游信号通路，使细胞产生纤维化的表型^[14]。此外凝血酶还可以促进肝脏内纤维蛋白凝块的形成，并催化可溶性纤维蛋白原转化为纤维蛋白单体，从而加剧肝脏的纤维化^[15]。然而，对出血后脑积水的研究主要集中于脑脊液循环通路梗阻、脉络丛过度分泌及蛛网膜颗粒吸收障碍对脑脊液动力学的影响。多种动物模型均已证实出血后脑积水中存在蛛网膜病理性纤维化的现象，提示蛛网膜纤维化可能在脑积水进展过程中发挥一定的作用。目前尚缺乏合适的蛛网膜纤维化细胞模型进行进一步研究。凝血酶诱导脑积水的具体机制尚不清楚，凝血酶导致蛛网膜纤维化是否参与 PHH 过程尚无研究。转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 活化可能参与了凝血酶诱导的蛛网膜纤维化。TGF-β1 是已知的可导致纤维化的重要因子。TGF-β1 最初是从血小板中分离的一种细胞因子，正常情况下基本不表达，在某些病理情况下，其表达量成倍增加并释放至 CSF，发挥其致纤维化作用^[16-17]。研究发现，将 TGF-β1 注入大鼠颅内可诱导大量的胶原纤维沉积在柔脑膜的细胞间隙和蛛网膜凸面，沿脑干周围形成脑膜纤维化^[18]。另外，TGF-β1 在出血性脑积水较非出血性脑积水中的表达水平更高^[19-20]。SAH 及 IVH 时，脑脊液中凝血酶水平与出血程度、病情进展密切相关^[21]。

前期通过凝血酶脑室注射建立大鼠脑积水模型时注意到转化生长因子-β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1) 在脑积水大鼠中均有不同程度增高，研究发现凝血酶在激活其受体 PAR-1 后可以诱导 TGF-β1 活化从而激活 TGF-β1 信号通路^[22]。实验证实经 3 种剂量的凝血酶分别刺激离

体蛛网膜细胞 5 日后, TGF- β 1 与 Col-I、Col-III、 α -SMA 等纤维化指标同步升高, 提示 TGF- β 1 可能参与凝血酶刺激蛛网膜细胞纤维化过程, 从而参与 PHH 的发生。

采用离体大鼠蛛网膜细胞进行培养, 可以培养出稳定的蛛网膜细胞, 经凝血酶刺激后, 可诱导蛛网膜细胞成纤维化, 为研究蛛网膜纤维化致循环障碍致脑积水的机制研究提供了良好的载体。至于 TGF- β 1 通路在这一过程中是否活化, 仍需要更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] 张建波, 陈志, 张渊等. 脑出血后脑积水形成机制研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(23): 4589-4591.
- [2] Chen Q, Feng Z, Tan Q, et al. Post-hemorrhagic hydrocephalus: Recent advances and new therapeutic insights[J]. J Neurol Sci. 2017, 375: 220-230.
- [3] Cherian S, Whitelaw A, Thoresen M, et al. The pathogenesis of neonatal post-hemorrhagic hydrocephalus [J]. Brain Pathol, 2004, 14(3): 305-311.
- [4] Dong C, Ming X, Ye Z, et al. Icariside ii attenuates chronic hydrocephalus in an experimental subarachnoid hemorrhage rat model[J]. J Pharm Pharm Sci, 2018, 21(1): 318-325.
- [5] Zhang S, Chen D, Huang C, et al. Expression of hgf, mmp-9 and tgf-beta1 in the csf and cerebral tissue of adult rats with hydrocephalus [J]. Int J Neurosci, 2013, 123(6): 392-399.
- [6] 张绍林, 刘锋, 王占祥等. 侧脑室内促肝细胞生长素对脑积水大鼠的干预作用[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2013, 39(9): 513-518.
- [7] Chen Q, Zhang J, Guo J, et al. Chronic hydrocephalus and perihematomal tissue injury developed in a rat model of intracerebral hemorrhage with ventricular extension [J]. Transl Stroke Res. 2015, 6(2): 125-132.
- [8] Tan Q, Guo P, Zhou J, et al. Targeting neutrophil extracellular traps enhanced tPA fibrinolysis for experimental intracerebral hemorrhage[J]. Transl Res. 2019, 211: 139-146.
- [9] Xin ZL, Wu XK, Xu JR, et al. Arachnoid cell involvement in the mechanism of coagulation-initiated inflammation in the subarachnoid space after subarachnoid hemorrhage [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2010, 11(7): 516-523.
- [10] Lam CH, Hansen EA, Hubel A. Arachnoid cells on culture plates and collagen scaffolds: phenotype and transport properties [J]. Tissue Eng Part A. 2011, 17(13-14): 1759-1766.
- [11] Gao F, Liu F, Chen Z, et al. Hydrocephalus after intraventricular hemorrhage: The role of thrombin [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34(3): 489-494.
- [12] Huang W, Huang Y, Huang RQ, et al. SIRT3 Expression Decreases with Reactive Oxygen Species Generation in Rat Cortical Neurons during Early Brain Injury Induced by Experimental Subarachnoid Hemorrhage [J]. Biomed Res Int. 2016, 2016: 8263926.
- [13] Dhar A, Sadiq F, Anstee QM, et al. Thrombin and factor xa link the coagulation system with liver fibrosis [J]. BMC Gastroenterol, 2018, 18(1): 60.
- [14] Nault R, Fader KA, Kopec AK, et al. From the cover: Coagulation-driven hepatic fibrosis requires protease activated receptor-1 (par-1) in a mouse model of tcd4-elicited steatohepatitis [J]. Toxicol Sci, 2016, 154(2): 381-391.
- [15] Vilaseca M, Garcia-Caldero H, Lafoz E, et al. The anticoagulant rivaroxaban lowers portal hypertension in cirrhotic rats mainly by deactivating hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2017, 65(6): 2031-2044.
- [16] Lin IY, Chiou YS, Wu LC, et al. Ccm111 prevents hepatic fibrosis via cooperative inhibition of tgf-beta, wnt and stat3 signaling pathways [J]. J Food Drug Anal, 2019, 27(1): 184-194.
- [17] Dai WJ, Qiu J, Sun J, et al. Downregulation of microrna-9 reduces inflammatory response and fibroblast proliferation in mice with idiopathic pulmonary fibrosis through the ano1-mediated tgf-beta-smad3 pathway [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2552-2565.
- [18] Tada T, Zhan H, Tanaka Y, et al. Intraventricular administration of hepatocyte growth factor treats mouse communicating hydrocephalus induced by transforming growth factor beta1 [J]. Neurobiol Dis, 2006, 21(3): 576-586.
- [19] Douglas MR, Daniel M, Lagord C, et al. High csf transforming growth factor beta levels after subarachnoid haemorrhage: Association with chronic communicating hydrocephalus [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009, 80(5): 545-550.
- [20] Zhang S, Chen D, Huang C, et al. Expression of HGF, MMP-9 and TGF- β 1 in the CSF and cerebral tissue of adult rats with hydrocephalus [J]. Int J Neurosci. 2013, 123(6): 392-399.
- [21] Zhang J, Shi X, Chen Z, et al. Edaravone Reduces Iron-Mediated Hydrocephalus and Behavioral Disorder in Rat by Activating the Nrf2/HO-1 Pathway [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2018, 27(12): 3511-3520.
- [22] Bae JS, Kim IS, Rezaie AR. Thrombin down-regulates the tgf-beta-mediated synthesis of collagen and fibronectin by human proximal tubule epithelial cells through the epcr-dependent activation of par-1 [J]. J Cell Physiol, 2010, 225(1): 233-239.