

# 微高压氧对脑缺血再灌注大鼠神经功能恢复及生长相关蛋白表达的影响

曹珺菲 陈莎 徐金勇 刘方宇 李光武

**摘要** 目的 研究微高压氧(Micro-HBO)干预对脑缺血再灌注大鼠神经功能及梗死面积的影响,探索 Micro-HBO 干预下梗死侧海马区生长相关蛋白(GAP43)的表达变化。方法 选用雄性 SD 大鼠并采用改良线栓法制备局灶性脑缺血再灌注(MCAO)模型,分为模型组(1、7 d)、Micro-HBO 组(1、7 d)、假手术组。各组接受行为学评估、2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色及 Western blot 检测 GAP43 表达变化。结果 ① 模型组和 Micro-HBO 组间在 1 d 组( $P < 0.05$ )和 7 d 组( $P < 0.05$ )中均存在行为学评分差异,但随着时间的增加,差异减少。② TTC 染色脑片的梗死面积百分比统计可见, Micro-HBO 组比模型组的脑梗死面积百分比更小( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ )。③ Western blot 检测发现,模型组和 Micro-HBO 组的 GAP43 含量显著高于假手术组。7 d 组的 GAP43 含量高于 1 d 组。干预后的个体 GAP43 含量高于未干预组( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ )。结论 Micro-HBO 干预有助于延长 MCAO 干预时间窗,帮助神经功能恢复并提升缺血处 GAP43 的蛋白表达以促进轴突再生。

**关键词** 脑缺血再灌注; 延迟干预; GAP43; 微高压氧

**中图分类号** R 493; R 459.6

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)06-0856-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.005

近几年缺血性中风越来越频繁的出现人们视线中<sup>[1]</sup>。有研究<sup>[2]</sup>将缺血再灌注后 6 h 内定为高压氧的黄金治疗时间。然而临床上错失黄金时间窗的情况屡有发生,因此探索合理延长治疗窗具有重要意义。氧增压治疗已被证实对脑缺血再灌注治疗有着潜在帮助<sup>[3]</sup>。微高压氧(micro-hyperbaric oxygen, Micro-HBO)<sup>[4]</sup>是利用高压氧原理在低于临床高压氧,即 1.2 绝对大气压(atmosphere absolute, ATA)的高压环境下给予个体富氧环境的技术。该研究建立大鼠短暂性大脑中动脉阻塞(transient middle cere-

bral artery occlusion, tMCAO)模型并设置 1 d 和 7 d 的 Micro-HBO 干预时间,以探索最佳干预方式,并通过评定神经功能水平,观察梗死面积变化,Western blot 检测生长相关蛋白 43 蛋白(growth associated protein-43, GAP43)含量表达,讨论 Micro-HBO 干预对 tMCAO 大鼠脑组织保护作用及与 GAP43 表达的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 实验相关试剂与设备** 主要实验试剂包括:2,3,5-三苯基氯化四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC) (17779-10X10ML-F) 购自美国 Sigma 公司; RIPA 裂解液; BCA 蛋白定量试剂盒((P0013B, P0012S) 购自上海碧云天公司; GAP43 抗体(ab16053) 购自美国 abcam 公司; beta actin(66009-1-Ig) 购自美国 Proteintech 公司。设备主要有:微高压氧舱购自上海知元医疗科技有限公司;超高速离心机购自美国 Thermo 公司;全自动化学发光成像系统 5200 购自上海 Tanon 公司。

**1.2 实验动物来源及分组** 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠共 57 只饲养于(25±2)℃、湿度 40%~60% 环境中,由安徽医科大学实验动物中心提供。随机分为脑缺血再灌注组和假手术组(10 只)。其中缺血再灌注组待清醒后根据 Zea-Longa 评分标准剔除 0 分及 4 分个体,并在补足分组数量后随机分为模型 1 d 组(10 只)、模型 7 d 组(10 只)、Micro-HBO 干预 1 d 组(10 只)、Micro-HBO 干预 7 d 组(10 只)。

**1.3 tMCAO 模型制作** 本实验参照 Longa et al<sup>[5]</sup>的方式采用线栓法制作 tMCAO 模型。大鼠于术前 12 h 禁食,仅提供饮水。0.235 mm 尼龙线前部涂硅胶制成线栓备用。大鼠麻醉后取仰卧位并固定,颈正中切口,钝性分离出一侧颈总动脉(common cerebral artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA)并挂线。结扎 ECA 和 CCA,栓线由 CCA 进入大脑中动脉。自 ICA 和 ECA 分叉开始计算 1.8~2 cm 为最佳进线深度,稍感阻塞后停止进栓,并结扎 ICA。大

2019-04-28 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81000589)

作者单位:安徽医科大学基础医学院神经生物研究所,合肥 230032

作者简介:曹珺菲,女,硕士研究生;

李光武,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: guang-

wuli@sina.com.cn

鼠于饲养箱中俯卧位直至苏醒。缺血 2 h 将线头拔至 CCA 处并剪去多余线头完成再灌注。术后大鼠单笼饲养 给予充足的水和食物。假手术组大鼠仅接受 CCA、ECA 结扎。

**1.4 Micro-HBO 干预** Micro-HBO 组大鼠在 tM-CAO 模型完成后于设定时间内进入微高压氧舱接受干预。其中 Micro-HBO 1 d 组于再灌注 24 h 后进入微高压氧舱接受 1 h 干预, Micro-HBO 7 d 组自再灌注 24 h 后每天接受 1 h 微高压氧舱干预, 连续 7 d。微高压氧舱设定压力为 1.2 ATA, 氧浓度为  $(93 \pm 3)\%$ 。各组大鼠均在最后一次干预后 24 h 过量麻醉处死并取材, 同一时期模型组的取材时间同干预组。

### 1.5 行为学评定

**1.5.1 Longa 评定** 术后 1 d 及 7 d 参照 Longa 4 分评定标准评估术后大鼠行为学表现。评分内容具体如下: 0 分: 无神经功能损伤症状; 1 分: 受损对侧前爪内收或不能完全伸展; 2 分: 对侧追尾转圈; 3 分: 对侧倾倒; 4 分: 行走困难、无意识。术后仅选取 1~3 分个体并随机划分为不同实验组。各实验组于干预后再行评定。采用盲法评定, 重复 3 次取均值。

**1.5.2 平衡木实验** 将大鼠放置于长 1 m, 宽 2 cm, 距地面高度为 1 m 的木杆上, 记录行走状态。受试个体于术前 1 d 学习平衡木实验, 并于术后 1 d 及 7 d 正式实验。具体评分如下: 0 分: 正常行走; 1 分: 跌倒概率小于 50%; 2 分: 跌倒概率大于 50%; 3 分: 可维持平衡; 4 分: 不能移动; 5 分: 从平衡木坠落。采用盲法评定, 重复 3 次取均值。

**1.6 TTC 染色及梗死灶体积百分比** 再灌注后 1、7 d 分别取每组大鼠 5 只, 过量麻醉处死, 并以生理盐水灌注后取脑, 冰冻 20 min 至硬后弃去嗅球、小脑及脑干进行 2 mm 厚度冠状切片, 放入 2% TTC 溶液中 37 °C 染色 30 min, 红染后拍照存入计算机。使用 ImageJ 软件测量、计算并统计梗死灶总面积。考虑梗死侧大脑受损后可能出现水肿, 因而采用对侧未受损的半脑作为对照。具体计算如下:  $(A - B) / A \times 100\%$ , 其中 A 为未梗死侧半脑面积, B 为梗死侧红染脑区面积, 全脑梗死灶总面积为各面梗死脑区面积比之和。

**1.7 脑组织蛋白提取** 大鼠过量麻醉后断头取脑, 于冰上矢状位将脑组织分为两半, 取梗死侧灰色海马组织。将海马组织剪碎加入 RIPA 裂解液后放于玻璃研磨器中均匀研磨, 并裂解 30 min, 12 000 r/

min 离心 15 min 后取上清液。以 BAC 蛋白质定量试剂盒测定浓度后调平并加入上样缓冲液。放置于 -20 °C 保存。

**1.8 蛋白免疫印迹检测** 配制 SDS-PAGE 凝胶, 其中浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 10%, 加入电泳液后进行上样, 每孔上样量为 10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 。80 V 电泳至分离胶处后转为 120 V, 直到溴酚蓝至底。将凝胶上的蛋白转移至 NC 膜后, 放入 10% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 次日取出条带室温孵育二抗 1 h, 最后显影拍照。图片结果采用 ImageJ 进行灰度值计算并录入统计。

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 进行统计分析, 采用单因素方差分析, Levene 检验方差齐性, 方差齐则采用 LSD 法进行多重比较。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 行为学评定

**2.1.1 Longa 评分** Longa 评分主要用于评价个体神经功能水平。单因素方差分析显示, Micro-HBO 1 d 组 ( $1.60 \pm 0.44$ ) 较模型 1 d 天组 ( $2.10 \pm 0.42$ ) 评分较优 ( $F_{(3,36)} = 7.005, P < 0.05$ )。Micro-HBO 7 d 组 ( $1.23 \pm 0.32$ ) 评分低于模型 7 d 组 ( $1.77 \pm 0.52$ ) 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。7 d 组与 1 d 组比较, 差异无统计学意义。见图 1A。

**2.1.2 平衡木评分结果** 平衡木实验多用于检测术后感觉运动功能的恢复情况。模型 1 d 组 ( $3.20 \pm 0.89$ ) 评分低于 Micro-HBO 1 d 组 ( $4.03 \pm 0.62$ ), 差异有统计学意义 ( $F_{(3,36)} = 13.079, P < 0.05$ )。Micro-HBO 7 d 组评分 ( $4.0 \pm 0.83$ ) 较模型 7 d 组 ( $5.20 \pm 0.45$ ) 评分更高 ( $P < 0.05$ )。7 d 组在平衡木中的得分均较 1 d 组的分数更高 ( $P < 0.05; P < 0.05$ )。见图 1B。

**2.2 TTC 染色判断梗死体积百分比** TTC 染色结果见图 2 除假手术组无梗死灶(全部红染)外, 其他各组均可见不同程度的苍白色梗死灶。模型 1 d 组梗死灶累及海马区且梗死面积较 Micro-HBO 1 d 组大。模型 7 d 组较 Micro-HBO 7 d 组梗死跨度更大。对梗死面积百分比统计可见, 7 d 组均较 1 d 组个体梗死面积比更小 ( $F_{(3,16)} = 10.57, P < 0.05$ )。Micro-HBO 干预组的梗死面积比低于模型组梗死面积比 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.3 Western blot 检测** Western blot 检测大鼠海

马内的 GAP43 含量见表 2,假手术组的 GAP43 显著低于各模型组和 Micro-HBO 组(  $F_{(4,20)} = 46.959, P < 0.05$  )。灰度值分析可以看出,1 d 内的 Micro-HBO 组 GAP43 表达较模型组显著提高(  $P < 0.05$  ), 7 d 组中微高压氧组的 GAP43 含量也较模型组有所提升(  $P < 0.05$  )。对不同时间点的大鼠海马内 GAP43 蛋白量分析发现 7 d 组均表现出较 1 d 组更高的 GAP43 蛋白表达(  $P < 0.05$  )。见图 3、表 2。

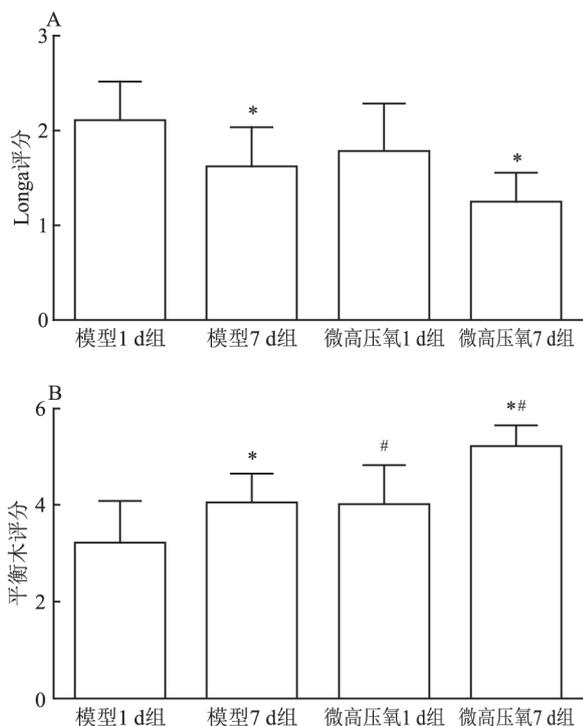


图 1 各组大鼠行为学评分

A: 各组大鼠 longa 检测后的评分; B: 各组大鼠平衡木检测后评分; 同一时间下模型组和 Micro-HBO 比较: \*  $P < 0.05$  ;同一干预方式下不同时间组比较: #  $P < 0.05$

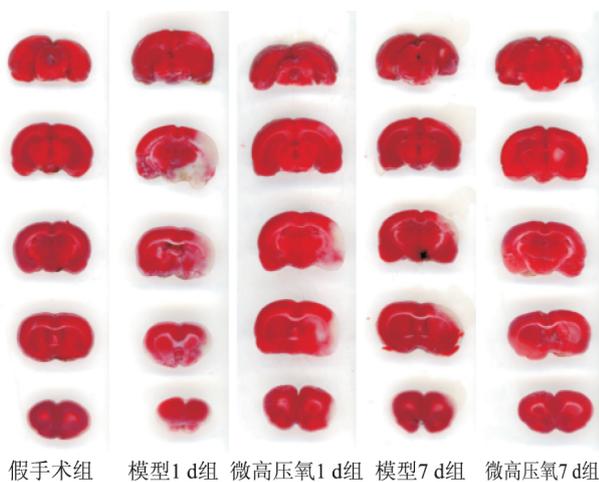


图 2 各组 TTC 染色脑片

图 2 各组 TTC 染色脑片

表 1 各组大鼠脑梗死面积占总体积比(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	样本量	TTC 梗死面积比
假手术	5	0.00 ± 0.00
模型 1 d	5	17.60 ± 3.47
微高压氧 1 d	5	10.47 ± 3.20#
模型 7 d	5	10.67 ± 5.11*
微高压氧 7 d	5	5.15 ± 0.91*#

与同一干预方式下 1 d 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 同一时间下模型组和微高压氧组比较: #  $P < 0.05$

表 2 各实验组大鼠海马区内 GAP43 蛋白表达(  $\bar{x} \pm s$  )

组别	样本量	灰度值
假手术	5	0.49 ± 0.09
模型 1 d	5	0.82 ± 0.22*
微高压氧 1 d	5	1.20 ± 0.26* <sup>△</sup>
模型 7 d	5	1.68 ± 0.13*#
微高压氧 7 d	5	1.94 ± 0.22*# <sup>△</sup>

与假手术组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与同一干预方式下 1 d 组比较: #  $P < 0.05$ ; 同一时间下模型组和微高压氧组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$

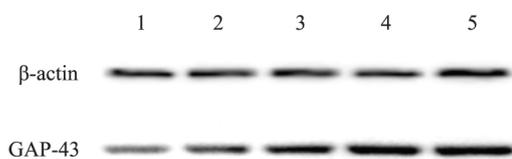


图 3 不同组大鼠海马 GAP43 的表达

1: 假手术组; 2: 模型 1 d 组; 3: Micro-HBO 1 d 组; 4: 模型 7 d 组; 5: Micro-HBO 7 d 组

### 3 讨论

1963 年 Jacobson et al<sup>[6]</sup> 以狗为实验对象建立脑梗死模型并在 2 ATA 下应用纯氧进行干预,以氧-压结合的方式为脑缺血的治疗开启思路。高压氧对脑缺血再灌注后可能产生的脑水肿、缺血组织处自由基损伤、氨基酸代谢变化等状况有着保护和治疗作用<sup>[7]</sup>。但高压氧治疗也存在诸多问题。Rusyniak et al<sup>[8]</sup> 研究表明,若梗死时长大于 6 h,高压氧干预会加重症状,这可能与高压引起的血脑屏障损伤或氧化应激有关。Sánchez<sup>[7]</sup> 在对多个案例回顾研究后发现,高压氧治疗中若将压力降低,则治疗时间窗可延长。因而 Micro-HBO 干预可能是干预 tMCAO 模型较为有效的方式。Dotsenko et al<sup>[9]</sup> 在尝试使用 1.2 ATA Micro-HBO 的干预后发现,这一方式可以明显降低氧化应激反应,并在心肌缺血模型中有较好的表现。多次氧-压延迟干预也有助于缓解由于脑缺血造成的损伤,且随着干预次数增加,梗死面积减少、神经功能改善<sup>[10]</sup>。因而在 1.2 ATA 下 Micro-HBO

环境可能有助于 tMCAO 模型的神经功能恢复并且避免高压引起的血脑屏障损伤和氧化应激。

成年个体中的 GAP43 多分布于海马齿状回区 9 或嗅球等神经发育活跃区域并在神经的发育和损伤时特异性表达,也作为鉴别突触重塑和神经功能恢复的指标之一<sup>[11]</sup>。不同于其他用于修饰髓鞘、神经纤维等结构的蛋白,GAP43 作用于突触后膜上,能特异性的参与轴突发育和修复<sup>[12]</sup>,常被用作观察轴突发育和恢复的重要指标<sup>[13]</sup>。GAP43 含量在梗死后随时间增加而上升,并在梗死后 7~14 d 处于峰值。提升 GAP43 可以帮助挽救 tMCAO 大鼠的半暗带并改善神经功能表现,但在难以恢复的永久梗死灶中较难检测。这表明 GAP43 对有逆转可能的部位(如半暗带)表达明显,而对于较为严重的梗死灶表达较差。

本研究初步探索了 Micro-HBO 对 MCAO 大鼠的神经功能和 GAP43 表达情况。研究结果显示 1 d 和 7 d 的 Micro-HBO 组均较模型组有更好的神经功能表现。Micro-HBO 组在感觉运动功能的恢复上较模型组更为明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。同时,模型组在 1 d 和 7 d 的平衡木评分存在差异并有统计学意义( $P < 0.05$ ),可能提示大鼠的感觉运动功能有自发修复的能力。TTC 染色结果显示 Micro-HBO 组的梗死面积百分比更低、累及脑区更少,表明 Micro-HBO 干预可能减小梗死脑区面积,同时这一结果也与行为学表现相互印证。Western blot 检测可见模型组和手术组的 GAP43 含量均高于假手术组( $P < 0.05$ ),证实再灌注损伤后 GAP43 被激活,而且在 Micro-HBO 干预下 GAP43 蛋白含量较模型组更高。表明较自然恢复的模型组, Micro-HBO 干预更有助于 GAP43 大量激活并参与到轴突的修复和保护中。

### 参考文献

[1] 李传文,张 嵘,侯 亮,等. SIRT1/NF- $\kappa$  通路参与白藜芦醇改善大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应[J]. 安徽医科大学学

报 2018, 53(1): 6-9

- [2] Xu Y, Ji R, Wei R, et al. The efficacy of hyperbaric oxygen therapy on middle cerebral artery occlusion in animal studies: a meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148324
- [3] Mu J, Ostrowski R P, Soejima Y, et al. Delayed hyperbaric oxygen therapy induces cell proliferation through stabilization of cAMP responsive element binding protein in the Rat model of MCAO-induced ischemic brain injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 51: 133-43.
- [4] 李光武,刘 述. 微增压富氧环境空间的构建方法: 中国, 201610658472.5 [P]. 2018-3-20
- [5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] Jacobson I, Lawson D D. The effect of hyperbaric oxygen on experimental cerebral infarction in the dog. With preliminary correlations of cerebral blood flow at 2 atmospheres of oxygen [J]. *J Neurosurg*. 1963, 20: 849-59.
- [7] Sánchez E C. Mechanisms of action of hyperbaric oxygenation in stroke: a review [J]. *Crit Care Nurs Q*, 2013, 36(3): 290-8.
- [8] Rusyniak D E, Kirk M A, May J D, et al. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: results of the hyperbaric oxygen in acute ischemic stroke trial pilot study [J]. *Stroke*, 2003, 34(2): 571-4.
- [9] Dotsenko E A, Nikulina N V, Salivonchik D P, et al. Low doses of hyperbaric oxygenation effectively decrease the size of necrotic zone in rats with experimental myocardial infarction [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2015, 158(6): 732-4.
- [10] Chen L F, Tian Y F, Lin C H, et al. Repetitive hyperbaric oxygen therapy provides better effects on brain inflammation and oxidative damage in rats with focal cerebral ischemia [J]. *J Formos Med Assoc*, 2014, 113(9): 620-8.
- [11] Smith S E, Figley S A, Schreyer D J, et al. Protein-energy malnutrition developing after global brain ischemia induces an atypical acute-phase response and hinders expression of GAP-43 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107570.
- [12] Gorup D, Bohacek I, Milicevic T, et al. Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after brain ischemic lesion in mouse [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597: 176-82.
- [13] Sandelius Å, Cullen N C, Källén Å, et al. Transient increase in CSF GAP-43 concentration after ischemic stroke [J]. *BMC Neurol*, 2018, 18(1): 202.

## Effects of micro – hypercapnia on neural function recovery and expression of growth – related proteins in rats with cerebral ischemia – reperfusion

Cao Junfei, Chen Sha, Xu Jinyong, et al

(*Institute of Neurobiology, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

**Abstract Objective** To investigate the effects of micro-hyperbaric oxygen intervention on neurological function

## 人脂肪干细胞对放射线损伤大鼠唾液腺的修复作用

李 辰<sup>1</sup> 阳宏林<sup>2</sup> 时 函<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨人脂肪干细胞(hADSCs)移植对于促进放射线损伤大鼠唾液腺分泌功能的修复作用。方法 选取8周龄的SD大鼠60只,随机分成实验组、放射组和对照组,每组各20只。其中,实验组和放射组腹腔麻醉后颌下腺区域接受18 Gy X射线照射,对照组只麻醉不照射。照射后第2天实验组接受hADSCs移植( $1 \times 10^6$ 个),放射组腺体内注射等体积的PBS溶液。照射后第8周测量各组颌下腺唾液流率,处死大鼠剖取颌下腺,4%多聚甲醛固定后制作石蜡切片,HE和TUNEL染色后镜下观察其组织形态。结果 放射8周后对照组大鼠唾液流率为( $20.77 \pm 5.16$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,放射组大鼠唾液流率为( $11.23 \pm 10.10$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$ ,实验组大鼠唾液流率为( $15.92 \pm 5.41$ )  $\mu\text{l}/\text{min}$ 。HE染色显示放射组颌下腺细胞变性水肿,部分细胞坏死,血管充血。实验组仅见部分细胞水肿和血管充血。TUNEL染色结果见放射组颌下腺内出现大量凋亡细胞,实验组颌下腺见少量凋亡细胞。结论

hADSCs移植能够促进放射线损伤大鼠唾液腺的分泌功能,其机制还需进一步研究。

**关键词** 人脂肪干细胞;唾液腺;放射线损伤

**中图分类号** R 780.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2019)06-0860-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.06.006

唾液在消化食物、润滑口腔、保持口腔内环境稳定以及抵抗各种有害物质和微生物中起着重要作用。根据国际流行病学研究机构统计,近年来我国头颈部肿瘤的发病率明显上升,年发病率达15.22/10万,约占全身恶性肿瘤的4.45%。放射治疗是头颈部肿瘤治疗的重要组成部分,放射野内唾液腺腺泡细胞(salivary gland acinar cells, SGACs)会遭受严重的不可逆性损伤,多数患者唾液腺实质组织几乎全部丧失<sup>[1]</sup>。因此,放疗会引起唾液腺(salivary gland, SG)分泌功能低下,导致患者出现口干症、吞咽困难、味觉减退、龋齿、真菌感染、营养不良、睡眠障碍等一系列症状,严重影响生存质量<sup>[2]</sup>。该实验采用头颈部局部放射建立SG损伤的大鼠模型后,通过腺体内局部注射人脂肪干细胞(human adipose tissue-derived stem cells, hADSCs),初步研究其对放射线损伤的大鼠SG修复作用。

2019-05-14 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:30901697)

作者单位:同济大学口腔医学院及附属口腔医院<sup>1</sup>牙体牙髓病二科,<sup>3</sup>口腔正畸科,上海市牙组织修复与再生工程技术研究中心,上海 200072

<sup>2</sup>安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

作者简介:李 辰,男,博士,主治医师;

时 函,女,博士,主治医师,责任作者,E-mail: shihan003@163.com

and infarct size in rats with transient middle cerebral artery occlusion(tMCAO) mode. Explore the expression changes of growth-related protein(GAP43) in the hippocampus of the infarcted side under Micro-Hypertension. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were used to prepare tMCAO models. They were divided into model group(1 day, 7 days), Micro-Hyperbaric oxygen group(1 day, 7 days), and sham group. Each group received behavioral assessment, TTC staining and Western blot was used to detect changes in GAP43 expression. **Results** ① There were significant differences in behavioral scores between the model group and the micro hypercapnia group in the 1 day group( $P < 0.05$ ) and the 7 day group( $P < 0.05$ ), but the difference decreased with time. ② The percentage of infarct size of TTC-stained brain slices showed that the percentage of cerebral infarct size was smaller in the micro-hypercapnia group than in the model group( $P < 0.05$ ). ③ Western blot analysis showed that the GAP43 content in the model group and the micro-hypercapnia group was significantly higher than that in the sham operation group( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ ). The GAP43 content of the 7-day group was higher than that of the 1 day group. The content of GAP43 in the intervention group was higher than that in the non-intervention group( $P < 0.05$ ;  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Micro-hypertensive oxygen intervention can prolong the time window of MCAO intervention, help nerve function recovery and enhance the protein expression of GAP43 in the ischemic area to promote axon regeneration.

**Key words** cerebral infarction; delayed intervention; GAP43; micro-hyperbaric oxygen