

丹参注射液对胎鼠大脑皮质神经干细胞增殖和分化的影响

吴利¹ 汪俊帮² 罗玉萍^{1,2*}

(¹南昌大学生命科学学院, 南昌 330031; ²上海市同济医院, 上海 200065)

摘要 该文旨在探索丹参注射液对胎鼠大脑皮质神经干细胞(neural stem cells, NSCs)体外增殖和分化的影响。以丹参注射液丹参生药(1.5 mg/mL)作为计算药物浓度; 体外培养NSCs, 将其分为正常对照组和丹参注射液处理组, 用Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂、Bromodeoxyuridine(BrdU)试剂、共聚焦高内涵分析系统和RT-PCR技术分别检测丹参注射液对NSCs增殖与分化的影响。CCK-8试剂检测结果显示, 经1.17 $\mu\text{g/mL}$ 丹参注射液处理的NSCs细胞, 其增殖能力[光度值为(0.408 \pm 0.006)]较对照组[光度值为(0.216 \pm 0.003)]显著升高($P<0.01$); BrdU检测结果显示, 经1.17 $\mu\text{g/mL}$ 丹参注射液处理的NSCs细胞增殖能力较对照组可提高40.83%($P<0.01$); 共聚焦高内涵分析结果显示, 经0.59 $\mu\text{g/mL}$ 丹参注射液处理的NSCs向神经元方向分化效率较对照组可提高28.73%($P<0.01$); RT-PCR结果表明, 经丹参注射液处理的NSCs分化7天后, 神经元相关基因*NeuroD1*、*Tuj1*等表达量显著上升。结果显示, 丹参注射液不仅可提高NSCs的增殖能力, 同时可促进其向神经元方向的分化。

关键词 丹参注射液; 神经干细胞; 细胞增殖; 神经元方向分化

Effects of Salvia Miltiorrhiza Injection on Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells Derived from Cerebral Cortex of Fetal Mice

Wu Li¹, Wang Junbang², Luo Yuping^{1,2*}

(¹School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China; ²Shanghai Tongji Hospital, Shanghai 200065, China)

Abstract Purpose of this study is to investigate the effects of Salvia miltiorrhiza injection on the proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) derived from cerebral cortex of fetal mouse. The drug concentration was calculated from the concentration of crude drug of Salvia miltiorrhiza injection (1.5 mg/mL). The cortex neural stem cells were cultured *in vitro* and divided into control group and Salvia miltiorrhiza injection treatment group. The drug effects on the proliferation and differentiation of NSCs were detected by cell proliferation assay CCK-8, Brdu, confocal high-content analysis system and RT-PCR. Results of CCK-8 and BrdU detection showed that treating with 1.17 $\mu\text{g/mL}$ of Salvia miltiorrhiza injection, the NSCs' capacity of proliferation can be significantly improved than that of the control group ($P<0.01$); Confocal high-content analysis result indicated that the Salvia miltiorrhiza injection can apparently promote the differentiation of NSCs into neurons ($P<0.01$); RT-PCR results also demonstrated that the neuron-specific gene expression, such as *NeuroD1* and *Tuj1*, increased significantly when NPC cells were pre-treated with Salvia miltiorrhiza injection. From the results, it can be concluded that

收稿日期: 2019-01-17 接受日期: 2019-04-25

国家自然科学基金(批准号: 31660324)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13761197735, E-mail: luoyuping@163.com

Received: January 17, 2019 Accepted: April 25, 2019

This work was supported by the National Natural Foundation of China (Grants No.31660324)

*Corresponding author. Tel: +86-13761197735, E-mail: luoyuping@163.com

网络出版时间: 2019-08-12 15:00:30

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1500.016.html>

Salvia miltiorrhiza injection can promote the proliferation of neural stem cells and also enhance their capacity of differentiation into neurons.

Keywords Salvia miltiorrhiza injection; neural stem cells; proliferation; differentiation into neurons

近年来随着神经科学与脑科学研究的迅猛发展, 与神经干细胞相关的研究成果屡次成为世人瞩目的焦点。研究证明, 神经干细胞(neural stem cells, NSCs)可自发分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等细胞类型^[1-3]。神经元的损伤与缺失是导致大多数神经退行性疾病的重要原因^[4-5], 因此寻找能够有效促进NSCs增殖和定向分化为神经元的中药成分是一项具有十分重要意义的研究。

丹参注射液的成分是丹参。丹参为唇形科植物, 味苦、性微寒, 具有活血祛瘀、养血安神、调经止痛的功效, 临床上常用于治疗心绞痛、心肌梗塞和脑卒中等心脑血管疾病^[6,8]。本研究以体外培养扩增的胚胎小鼠大脑皮质NSCs为模型, 用浓度梯度稀释的丹参注射液来诱导刺激NSCs, 观察其对NSCs增殖和分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 孕12.5天健康昆明鼠, 由同济大学动物实验中心提供。

1.1.2 细胞培养试剂 DMEM/F12、Fibronectin (FN)、B27 Supplement、Penicillin-Streptomycin(P/S)、TrypLE™ Express和D-HBSS均购自Gibco公司; 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、Poly-L-Ornithine(PO)购自Sigma公司; 丹参注射液购自四川升和药业股份有限公司; 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自PeproTech公司。

1.1.3 抗体及其他试剂 Nestin抗体、MAP2抗体、PLP抗体均购自Abcam公司; GFAP抗体购自DAKO公司; Olig2抗体购自Merch公司; Alexa Flour 488、Alexa Flour 594购自Invitrogen公司; 牛血清白蛋白BSA购自Miltenyi公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自Sigma公司; CCK-8购自同仁化学研究所; BrdU试剂盒购自Roche公司; 反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.1.4 实验仪器 细胞培养箱、光学显微镜、共聚焦荧光显微镜、酶标仪、CQ1双转盘共聚焦高内涵分析系统(Yokogawa)、QuantStudio™ 6 Flex实时

定量PCR系统。

1.2 方法

1.2.1 神经干细胞的培养与鉴定 无菌条件下分离胎鼠大脑皮质组织, 制成单细胞悬液, 离心去上清液, 加入含有2% B27的DMEM/F12完全培养基重悬细胞, 计数后按照 2×10^5 个/mL接种在预先包被好PO(15 $\mu\text{g/mL}$)和FN(10 $\mu\text{g/mL}$)的10 cm细胞培养皿中, 每皿10 mL培养液, 静置于37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养5~7天^[9-11]。培养期间, 需每天补充细胞营养因子bFGF 10 ng/mL, 隔3~4天半量换液, 7天左右可以传代。

收集第二代NSCs, 以 5×10^4 个/孔接种于PO/FN包被好的4孔板中, 将细胞分为正常增殖组和自发分化组(不添加bFGF)。静置培养7天后, 按照免疫荧光染色标准程序, 用抗体Nestin鉴定NSCs是否维持干细胞特征, 用抗体MAP2、PLP和GFAP鉴定NSCs的三系分化潜能^[12-13]。

收集第二代NSCs, 以 1×10^4 个/孔接种于PO/FN包被好的96孔板中, 培养2天后, 撤除bFGF, 选取不同时间点(24 h、48 h、72 h、96 h和120 h)对细胞进行免疫荧光染色, 观察细胞自发分化过程中神经元和胶质细胞的分化情况。

1.2.2 细胞增殖检测 该组检测使用CCK-8检测和BrdU标记2种方法分别进行。将细胞分为对照组和丹参注射液处理组, 对照组不添加丹参注射液, 实验组加入2倍浓度梯度稀释的丹参注射液, 每种浓度设置5个复孔。

传代后的NSCs以 1×10^4 个/孔接种于PO/FN包被好的96孔板中, 在培养上清液中添加不同浓度的丹参注射液, 总体积为200 μL /孔。细胞分为对照组和丹参注射液处理组(丹参注射液的终浓度分别为37.50、18.75、9.38、4.69、2.34、1.17、0.59、0.29、0.15 $\mu\text{g/mL}$), 每组重复5个孔, 置于37 °C、5% CO₂饱和湿度培养箱中培养48 h, 根据两种检测方法分别做如下处理: (1)吸弃上清液, 每孔添加90 μL 新鲜完全培养基和10 μL CCK-8溶液, 继续培养4 h, 用Multiskan MK3酶标仪检测各孔450 nm波长处的吸光度(D)值^[14]。(2)每孔添加20 μL BrdU标记液, 在培养箱中孵育2 h; 弃上清

液,加入200 μL 固定液FixDenat,室温孵育30 min;弃固定液,加100 μL anti-BrDU-POD工作液,室温孵育90 min;弃工作液,用磷酸缓冲液(PBS)清洗细胞3遍后,加入100 μL 底物工作液进行15 min显色反应;最后使用Multiskan MK3酶标仪检测各孔492 nm波长处的吸光度(D)值。

1.2.3 CQ1共聚焦高内涵系统检测 将NSCs以 2.5×10^4 个/mL接种于PO/FN包被好的96孔板,在培养上清液中添加细胞营养因子bFGF 10 ng/mL和浓度梯度稀释的丹参注射液,培养液体积为200 μL 每孔。将培养板静置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养7天,隔3~4天半量换液,此次换液无需添加bFGF,但丹参浓度需与换液前保持一致。以4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定细胞20 min,经过漂洗、透膜、封闭等步骤后,加入一抗MAP2和Olig2,室温孵育2 h或4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜^[15-16]。经PBS漂洗3次后加入相应二抗和DAPI混合液,室温孵育2 h,最后以PBS漂洗3次。可立即使用CQ1双转盘共聚焦高内涵分析系统进行微孔板图像采集和数据分析,若不能及时处理,1周内可将微孔板置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。

1.2.4 Real time-PCR检测 将NSCs分为自发分化组和丹参注射液分化组进行相关基因检测^[17-18],实验组的丹参注射液终浓度以CCK-8实验结果为参考。将NSCs以 2.5×10^4 个/mL接种于PO/FN包被好的4孔板中,在培养上清液中添加bFGF 10 ng/mL,实验组另需添加终浓度为1.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丹参注射液,培养液体积为500 μL 每孔。将培养板静置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养7天,隔3~4天半量换液,

换液时无需添加bFGF。

用TRIzol裂解细胞,提取细胞总RNA。使用Clontech逆转录试剂盒合成cDNA。通过荧光定量PCR,以GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)为内参检测Tuj1(Tubulin Beta 3 Class III)、NeuroD1(Neurogenic differentiation 1)、Syn1(Synapsin 1)、MAP2 (microtubule associated protein 2)和MBP(Myelin Basic Protein)的相对表达量。荧光定量PCR反应所用引物序列见表1,反应体系为10 μL ,分别为2 \times master mix 5 μL 、50 \times ROX 0.2 μL 、正向引物0.25 μL (10 μM)、反向引物0.25 μL (10 μM)、反转录产物4 μL ,无核酸酶水补齐至10 μL ;反应条件为50 $^{\circ}\text{C}$ 10 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,经历40个循环,根据荧光定量PCR结果计算Tuj1、NeuroD1、Syn1、MAP2和MBP相对表达量。

1.2.5 统计学处理 数据用SPSS 23.0统计学软件进行处理,计算资料均用($x \pm s$)表示。各组间均数的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCs的鉴定

体外培养原代NSCs,传代后经Nestin和DAPI染色可证明该细胞能高表达NSCs的标志蛋白Nestin。撤除bFGF,将NSCs自发分化7天后,经抗体MAP2、PLP、GFAP分别和DAPI共染,结果证明,该批次原代NSCs具有自发分化为成熟神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞的潜能(图1)。

表1 神经元、少突胶质细胞RT-PCR引物序列

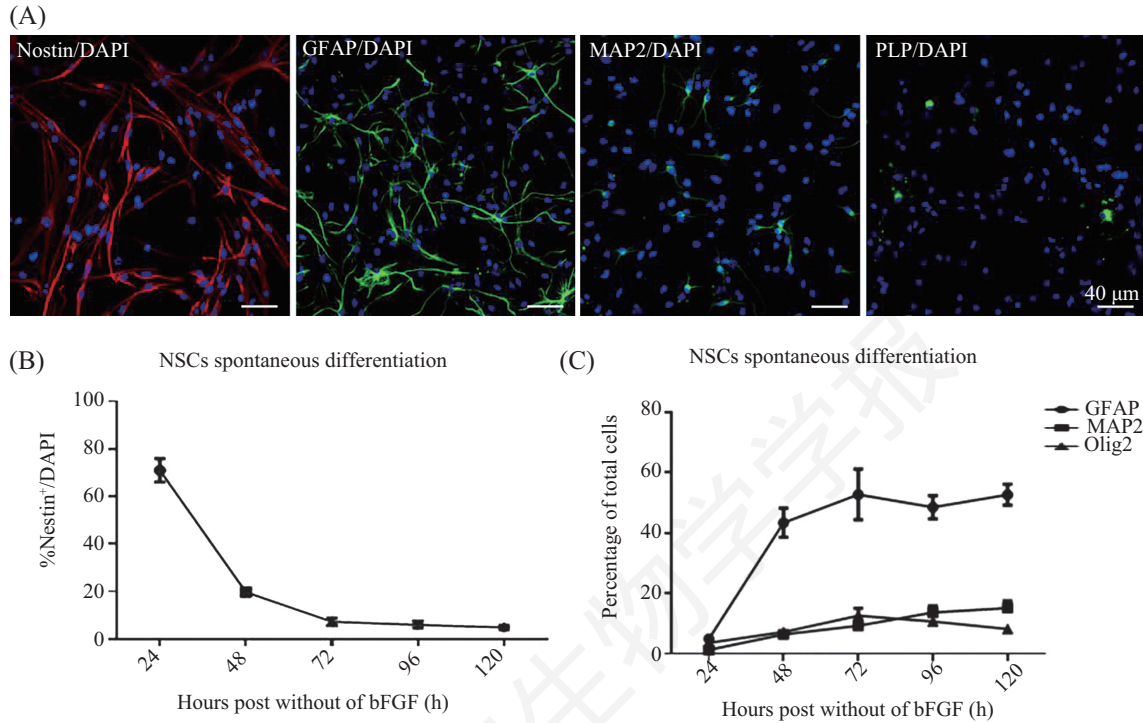
Table 1 RT-PCR primers for expression of neuronal and glial genes

| 基因 | 引物 | 引物序列(5'→3') |
|---------|-----------|---------------------------------|
| Gene | Primer | Sequences of promoter (5'→3') |
| GAPDH | GAPDH-F | CCT CGT CCC GTA GAC AAA ATG |
| | GAPDH-R | TCT CCA CTT TGC CAC TGC AA |
| Tuj1 | Tuj1-F | CAG ACT TGC TCC GCA TTG T |
| | Tuj1-R | CCT CGC TGG CTG ATG TAA G |
| NeuroD1 | NeuroD1-F | TCA ACC CTC GGA CTT TCT TG |
| | NeuroD1-R | GCA GTC AGT TAG GGG GCT TT |
| Syn1 | Syn1-F | CCC AGC CAG GAT GTG CCA |
| | Syn1-R | AGG CAT TGG TCA GAG ACT GGG ATT |
| MAP2 | MAP2-F | ACT GCC GGA CCT GAA GAA TG |
| | MAP2-R | ATT TGT ACA TTT CCG CCC CC |
| MBP | MBP-F | ACA TTG TGA CAC CTC GAA CAC C |
| | MBP-R | GCC AAA TCC TGG CTT CTG C |

2.2 丹参注射液对NSCs增殖的影响

经CCK-8试剂盒检测, 1.17 $\mu\text{g/mL}$ 丹参注射液处理的NSCs增殖能力[吸光度值为(0.408 \pm 0.006)]较对照组[吸光度值为(0.216 \pm 0.003)]显著升高($P < 0.01$),

而浓度高于9.38 $\mu\text{g/mL}$ 的丹参注射液处理组较对照组无明显差异, 可能是因为高浓度的丹参注射液会对细胞产生一定的毒性(表2和图2A)。BrdU试剂检测结果显示, 经1.17 $\mu\text{g/mL}$ 丹参注射液处理的NSCs



A: NSCs未分化状态下用干细胞标记物Nestin(红色荧光)与DAPI(蓝色荧光)进行免疫荧光染色, NSCs自发分化7天, 将其分别用星形胶质细胞标记物GFAP(绿色荧光)、成熟神经元标记物MAP2(绿色荧光)和少突胶质细胞标记物PLP(绿色荧光)与DAPI共染, 检测NSCs的多向分化潜能; B: 撤除bFGF, NSCs自发分化5天过程中Nestin阳性细胞百分比变化; C: 撤除bFGF, NSCs自发分化5天过程中GFAP、MAP2和Olig2阳性细胞百分比变化

A: NSCs were immunofluorescent stained with stem cell markers Nestin(red) and DAPI(blue) in undifferentiated state, after spontaneously differentiated for 7 days, NSCs were stained with astrocyte marker GFAP (green), mature neuronal marker MAP2 (green) and oligodendrocyte marker PLP (green); B: withdrawal of bFGF, percentage of Nestin positive cells changed during NSC differentiation for 5 days; C: withdrawal of bFGF, percentage of GFAP, MAP2 and PLP positive cells changed during NSC differentiation for 5 days.

图1 免疫荧光染色鉴定神经干细胞

Fig.1 Identification of NSCs by immunofluorescence staining

表2 CCK-8检测不同浓度丹参注射液对NSCs增殖的影响

| Table 2 Effects of Salvia miltiorrhiza injection on the proliferation of NSCs measured by CCK-8 | | |
|---|-----------------|--------------------------|
| 浓度 Concentration | 个案数 <i>n</i> | D_{450} 值 D_{450} |
| Control | 5 | 0.216 \pm 0.003 |
| 0.15 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.272 \pm 0.003 |
| 0.29 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.322 \pm 0.005 |
| 0.59 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.340 \pm 0.003 |
| 1.17 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.408 \pm 0.006 |
| 2.34 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.252 \pm 0.002 |
| 4.69 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.247 \pm 0.004 |
| 9.38 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.205 \pm 0.002 |
| 18.75 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.197 \pm 0.001 |
| 37.50 $\mu\text{g/mL}$ | 5 | 0.192 \pm 0.001 |

增殖能力较对照组最多可升高40.83% ($P < 0.01$, 图2B)。

2.3 丹参注射液可促进NSCs向神经元方向分化

共聚焦高内涵系统分析结果显示, 不同浓度丹参注射液对NSCs的增殖和分化可产生不同的影响: 当丹参注射液终浓度高于2.34 $\mu\text{g/mL}$ 时会对细胞产生毒性, 且毒性随浓度升高而增加, 可导致细胞增殖和分化能力显著降低; 当丹参注射液终浓度为0.59 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可显著提高NSCs的增殖能力 ($*P < 0.05$); 当丹参注射液终浓度介于0.15至1.17 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可促进NSCs向神经元方向分化。分析结果同时表明, 丹参注射液对NSCs向少突胶质细胞分化没有显著影响(图3)。

2.4 丹参注射液可显著上调神经元相关基因表达

RT-PCR结果显示, 1.17 $\mu\text{g/mL}$ 丹参注射液处理的NSCs经分化7天后, 神经元相关基因*NeuroD1*、*Tuj1*等相对表达量显著提高, 而少突胶质细胞的标志基因*MBP*无显著变化(图4)。

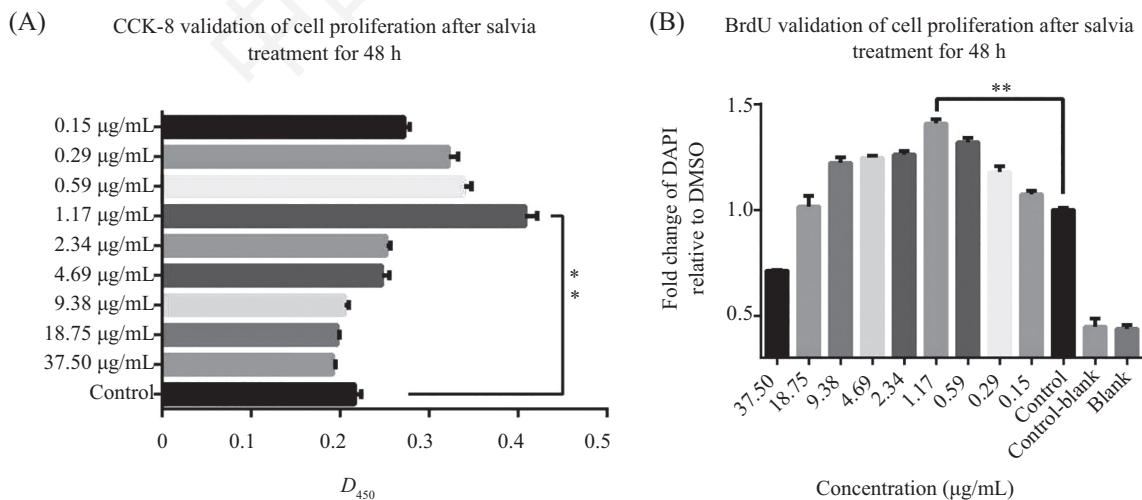
3 讨论

丹参是我国传统的中药材之一, 其根茎部分具有极高药用价值, 有效组分包含水溶性和脂溶性成分。丹参注射液是丹参的水溶性复合物, 其主要成分是丹参素和丹酚酸B^[19-21], 目前在临床上广泛应用于治疗和预防心脑血管疾病^[22], 同时也可能成为修复受损神经组织结构和功能的潜在药物。

神经干细胞是神经系统内未分化的原始细胞,

具有无限增殖、自我更新和多向分化潜能, 在适宜条件下, 可分化成神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞等类型。巢蛋白Nestin是一种中间丝类型的蛋白, 能够特异性地表达在神经上皮干细胞上, 为神经干细胞的特征性标志物^[23-24]; 微管相关蛋白Map2是一种磷蛋白质, 主要存在于神经元的胞体、树突和树突棘, 是成熟神经元特异性标志物^[25-26]; 髓磷脂髓鞘蛋白PLP是构成中枢神经系统髓磷脂的两种主要膜蛋白之一, 可用来标记少突胶质细胞^[27-28]; 胶质纤维酸性蛋白GFAP主要分布于中枢神经系统的星形胶质细胞, 广泛用于标记星形胶质细胞^[29-30]。本研究使用免疫荧光染色方法, 通过对Nestin、MAP2、PLP和GFAP这4个标志性蛋白进行分时检测, 结果证明这批用于实验的NSCs不仅具有干细胞自我增殖更新的能力, 同时还具有向神经元和胶质细胞分化的潜能。

神经干细胞可分泌多种细胞营养因子来发挥其生物学功能, 也可通过启动分化程序来替代受损细胞。本实验主要是从细胞水平和分子水平两个方面来验证丹参注射液对NSCs细胞增殖和分化的影响。从细胞水平来看, CCK-8、BrdU和DAPI染色的实验结果证明了有效浓度的丹参注射液能够显著提高NSCs的增殖能力, 最适有效浓度为1.17 $\mu\text{g/mL}$, 可提升幅度为40.83%; 共聚焦高内涵分析系统的结果同样验证了适当浓度的丹参注射液可以促进NSCs增殖, 同时还可以提高NSCs向神经元分化的能力, 其

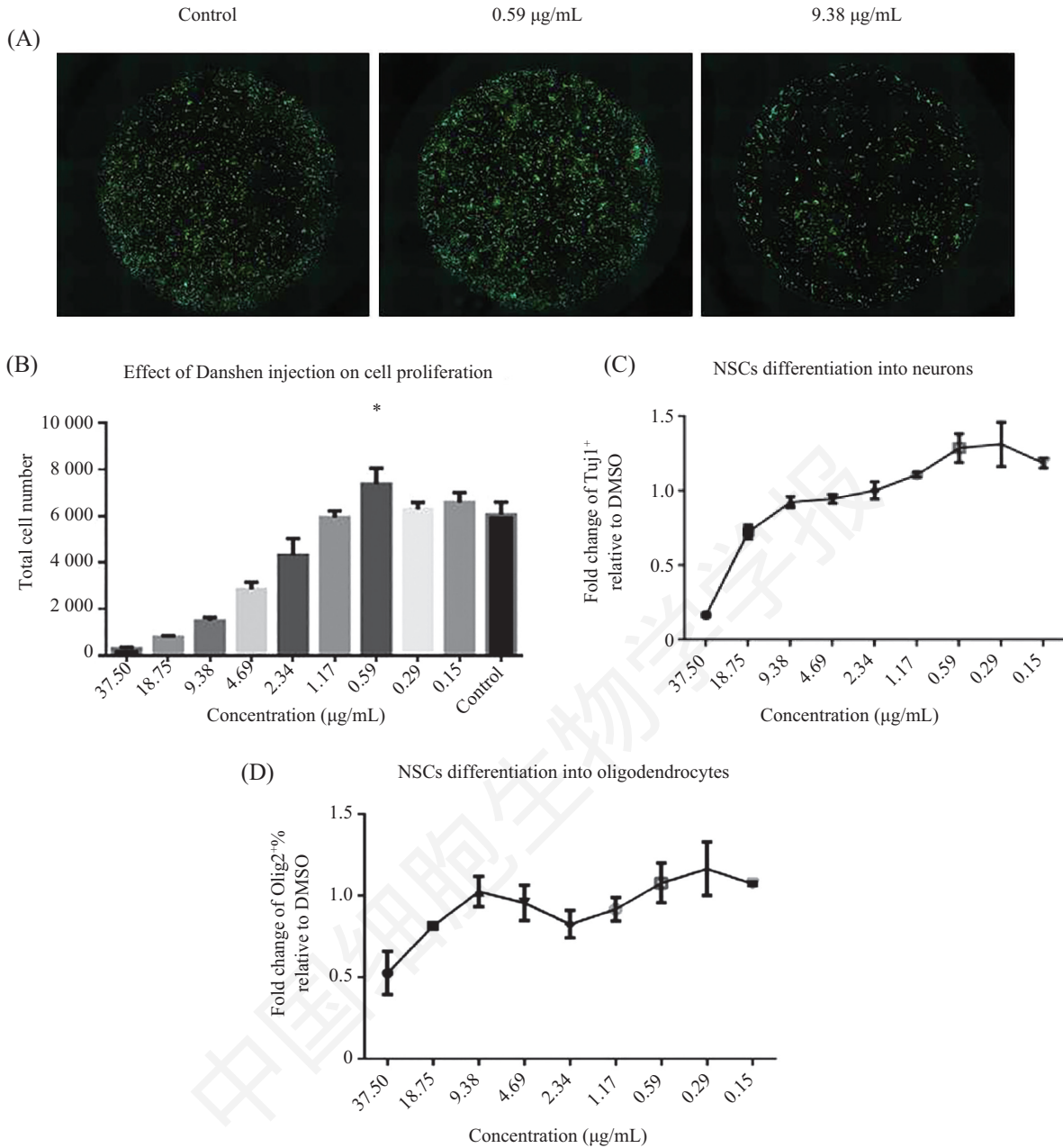


A: CCK-8法检测NSCs增殖情况; B: 用BrdU法检测NSCs增殖情况。** $P < 0.01$ 。

A: measuring cell proliferation with CCK-8 kit; B: measuring cell proliferation with BrdU methods. ** $P < 0.01$.

图2 不同浓度丹参注射液对NSCs细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of Salvia miltiorrhiza injection on the proliferation of NSCs



A: CQ1共聚焦高内涵系统成像结果, 染色抗体为MAP2(绿色荧光)和Olig2(红色荧光); B: DAPI染色所显示的细胞数目变化情况, * $P < 0.05$, 与Control组比; C: MAP2染色所显示的神经元细胞数目变化情况; D: Olig2染色所显示的少突胶质细胞数目变化情况。

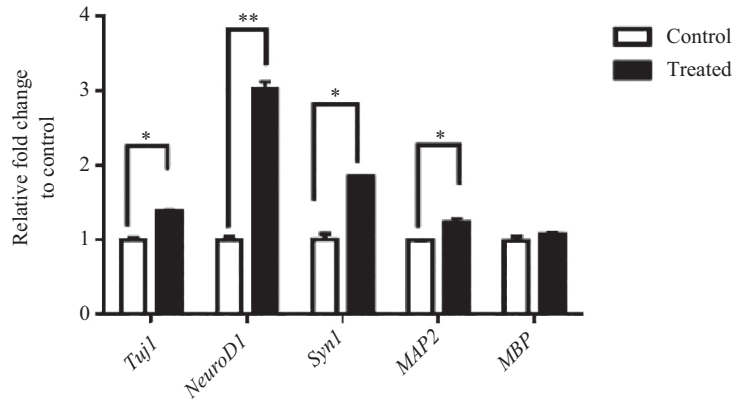
A: imaging of CQ1 confocal high-content system, the primary antibodies were MAP2 (green) and Olig2 (red); B: staining with DAPI showed changes in total cell number, * $P < 0.05$ compared with Control; C: staining with MAP2 indicated changes in the number of neurons; D: staining with Olig2 illustrated changes in the number of oligodendrocytes.

图3 CQ1共聚焦高内涵分析系统检测结果

Fig.3 Results of CQ1 confocal high-content analysis system

中最适生药浓度为0.59 µg/mL, 提高幅度为28.73%, 而高浓度的丹参注射液则会产生毒性, 引起严重的细胞凋亡; 共聚焦高内涵分析系统的结果同时提示了0.29 µg/mL丹参注射液可提高NSCs向少突胶质细胞分化的能力, 提高幅度为13.00%, 鉴于其他浓度的升高幅度皆小于7.00%, 所以无法得出丹参注射液可

促进NSCs向少突胶质细胞分化的结论。从分子水平来看, RT-PCR结果提示, 有效浓度的丹参注射液可显著提升神经元细胞相关基因*NeuroD1*等的表达水平, 而少突胶质细胞相关基因*MBP*的表达水平则无显著差异, 这与共聚焦高内涵分析系统的结果是一致的。



丹参注射液预处理的NSCs经分化7天后,神经细胞相关基因*Tuj1*、*NeuroD1*、*Syn1*、*MAP2*和*MBP*的表达水平检测结果。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。
The expression levels of neuronal cell-related genes *Tuj1*, *NeuroD1*, *Syn1*, *MAP2* and *MBP* were detected after 7 days of differentiation of NSCs pre-treated with *Salvia miltiorrhiza* injection. $*P<0.05$, $**P<0.01$.

图4 RT-PCR检测细胞分化结果

Fig.4 RT-PCR validation of NSCs differentiation

综上所述,本研究为丹参注射液具有促进NSCs增殖和向神经元分化作用提供了有效的实验数据,但目前关于丹参保护和诱导NSCs向神经元分化的具体机制,及其在体内的药物效应和相关信号通路仍有待进行更深入的研究。

参考文献 (References)

- Kim HJ. Regulation of neural stem cell fate by natural products. *Biomol Ther (Seoul)* 2019; 27(1): 15-24.
- Inestrosa NC, Varela-Nallar L. Wnt signalling in neuronal differentiation and development. *Cell Tissue Res* 2015; 359(1): 215-23.
- Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. Neuronal differentiation in schwann cell lineage underlies postnatal neurogenesis in the enteric nervous system. *J Neurosci* 2015; 35(27): 9879-88.
- Atapour N, Worthy KH, Lui LL, Yu HH, Rosa MGP. Neuronal degeneration in the dorsal lateral geniculate nucleus following lesions of primary visual cortex: comparison of young adult and geriatric marmoset monkeys. *Brain Struct Funct* 2017; 222(7): 3283-93.
- Tan RH, Yang Y, Halliday GM. Multiple neuronal pathologies are common in young patients with pathologically proven frontotemporal lobar degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2018; 44(5): 522-32.
- 赵仁霞. 丹参的现代药理研究及临床应用. *中国医药指南 (Zhao Renxia. Modern pharmacological research and clinical application of *Salvia miltiorrhiza*. Guide of China Medicine)* 2011; 9(12): 291-2.
- 李卫祥. 丹参的药理作用与临床应用. *北方药学 (Li Weixiang. Pharmacological effects and clinical application of *Salvia miltiorrhiza*. Journal of North Pharmacy)* 2013; (3): 34-5.
- 柏杨. 丹参在心血管方面的临床应用. *中国医药指南 (Bai Yang. Clinical application in cardiovascular Danshen. Guide of China Medicine)* 2017; 15(15): 189-90.
- Kim KJ, Wang J, Xu X, Wu S, Zhang W, Qin Z, *et al.* A Chemical genomics screen to discover genes that modulate neural stem cell differentiation. *J Biomol Screen* 2012; 17(2): 129-39.
- Ge H, Yu A, Chen J, Yuan J, Yin Y, Duanmu W, *et al.* Poly-L-ornithine enhances migration of neural stem/progenitor cells via promoting α -actinin 4 binding to actin filaments. *Sci Rep* 2016; 6: 37681.
- 刘利, 林志国, 沈红, 车彦军, 张帆, 白云龙, 等. 神经元和胶质细胞共培养方法的建立. *中华神经外科疾病研究杂志 (Liu Li, Lin Zhiguo, Shen Hong, Che Yanjun, Zhang Fan, Bai Yunlong, *et al.* Establishment of co-culture of neurons and astrocytes. Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research)* 2006; 5(4): 317-20.
- 朱琼, 皋月娟, 高顺记, 陈重, 刘政, 徐亚丽, 神经干细胞的培养鉴定及分化. *中国组织工程研究 (Zhu Qiong, Yan Yuejuan, Gao Shunji, Chen Zhong, Liu Zheng, Xu Yali. Cultivation identification and differentiation of neural stem cells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research)* 2017; 21(17): 2708-13.
- 章翔, 李侠, 吴景文, 王占祥, 许汉鹏, 杨大莉. 小鼠神经干细胞的分离和培养及其鉴定. *中华医学杂志 (Zhang Xiang, Li Xia, Wu Jingwen, Wang Zhanxiang, Xu Hanpeng, Yang Dali. Isolation, cultivation and identification of stem cells from cerebral cortex of mouse embryo. National Medical Journal of China)* 2002; 82(12): 832-5.
- 彭正午, 薛芬, 王磊, 杨帆, 乔昱婷, 谭庆荣. 帕罗西汀对脂多糖损伤的海马神经干细胞的保护作用. *中华精神科杂志 (Peng Zhengwu, Xue Fen, Wang Lei, Yang Fan, Qiao Yuting, Tan Qingrong. Protective effects of paroxetine on the lipopolysaccharide injured hippocampal-derived neural stem cell. Chinese Journal of Psychiatry)* 2013; 46(3): 169-73.
- 梁维, 刘洲, 许志恩, 林力峰, 方洪明. 细胞传代对骨髓间充质干细胞向神经干细胞分化的影响. *中国组织工程研究 (Liang Wei, Liu Zhou, Xu Zhien, Lin Lifeng, Fang Hongming. Effect of cell passage on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neural stem cells. Chinese Journal of Tissue Engineering Research)* 2016; 20(41): 6092-97.
- Zhao S, Zhu Y, Xue R, Li Y, Lu H, Mi W. Effect of midazolam on the proliferation of neural stem cells isolated from rat hippocampus. *Neural Regen Res* 2012; 7(19): 1475-82.
- Guo G, Li B, Wang Y, Shan A, Shen W, Yuan L, *et al.* Effects

- of salvianolic acid B on proliferation, neurite outgrowth and differentiation of neural stem cells derived from the cerebral cortex of embryonic mice. *Sci China Life Sci* 2010; 53(6): 653-62.
- 18 刘强, 翁亚光, 唐敏, 罗敏. 骨髓间充质干细胞*Hey1*基因表达水平荧光定量RT-PCR方法的建立. 重庆医科大学学报(Liu Qiang, Weng Yaguang, Tang Min, Luo Min. Development of fluorescent quantitative RT-PCR method for detection of *Hey1* in bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Chongqing Medical University*) 2010; 35(6): 897-9.
- 19 宋永贵, 冯育林, 欧阳辉, 张武岗, 李志锋, 苏丹, 等. 丹参活血化瘀有效组分的提取纯化工艺研究. 江西中医药大学学报(Song Yonggui, Feng Yulin, Ouyang Hui, Zhang Wugang, Li Zhifeng, Su Dan, *et al.* Extraction and purification study of blood-activating and stasis-removing components from *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine*) 2012; 24(5): 52-5.
- 20 关丹, 高建梅, 王何, 付绍平, 金凤变, 鱼红闪. 丹参中水溶性成分提取新方法的研究. 大连工业大学学报(Guan Dan, Gao Jianmei, Wang He, Fu Shaoping, Jin Fengqi, Yu Hongshan. Extraction of water-soluble ingredients in *Radix salvia miltiorrhiza*. *Journal of Dalian Polytechnic University*) 2007; 26(3): 193-5.
- 21 谢凯, 赵磊磊, 姜红宇, 朱盛山. 近年来丹参提取工艺的研究概况. 中国实验方剂学杂志(Xie Kai, Zhao Leilei, Jiang Hongyu, Zhu Shengshan. Review on extraction methods of *Radix salviae miltiorrhizae*. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*) 2007; 13(10): 67-70.
- 22 金丽杰, 谢敬东. 丹参注射液临床应用及不良反应. 中国当代医药(Jin Lijie, Xie Jingdong. Review on clinical application and adverse reactions of Danshen injection. *China Modern Medicine*) 2011; 18(7): 67.
- 23 Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci* 2015; 106(7): 803-11.
- 24 林进平, 钱锁开. 巢蛋白与神经干细胞. 现代诊断与治疗(Lin Jinping, Qian Shukai. Nestin and neural stem cells. *Modern Diagnosis & Treatment*) 2009; 20(6): 348-51.
- 25 Usui T, Sakurai M, Kawasaki H, Ohama T, Yamawaki H, Sato K. Establishment of a novel three-dimensional primary culture model for hippocampal neurogenesis. *Physiol Rep* 2017; 5(12): pii: e13318.
- 26 刘正清, 马志健. 微管相关蛋白2与神经元可塑性调节. 中国现代医学杂志(Liu Zhengqing, Ma Zhijian. Microtubule-associated protein II and regulation of neuronal plasticity. *China Journal of Modern Medicine*) 2003; 13(9): 51-4.
- 27 刘驰, 肖岚. 少突胶质细胞发育分化的表观遗传学调控研究进展. 生命科学(Liu Chi, Xiao Lan. Progress of epigenetic regulation in the differentiation of oligodendrocyte. *Chinese Bulletin of Life Sciences*) 2011; 23(3): 279-82.
- 28 邓莉, 袁琼兰. 胶质纤维酸性蛋白(GFAP)在神经系统中的研究进展. 西南医科大学学报(Deng Li, Yuan Qionglan, *Advances in research of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the nervous system. Journal of Luzhou Medical College*) 2005; 28(2): 189-92.
- 29 刘霞, 秦雪. 胶质纤维酸性蛋白的生物学特性及临床研究进展. 国际检验医学杂志(Liu Xia, Qin Xue. *Advances in biological characteristics and clinical research of glial fibrillary acidic protein. International Journal of Laboratory Medicine*) 2015; (18): 2716-17.
- 30 余淼, 蒋涛, 阴洪, 田永阳, 李邦银, 任先军. CXCL12/CXCR4介导少突胶质前体细胞髓鞘化的作用及调控机制. 中国矫形外科杂志(Yu Miao, Jiang Tao, Yin Hong, Tian Yongyang, Li Bangyin, Ren Xianjun. CXCL12/CXCR4 induced myelination of oligodendrocyte precursor cells in vitro. *Orthopedic Journal of China*) 2017; 25(10): 926-31.