

四逆散、六味地黄丸诱导神经干细胞增殖 及对 c-myc mRNA, CyclinD1 mRNA 表达的影响

陈攀^{1,2}, 徐志伟^{1*}, 敖海清¹, 吉云鹏¹, 周江霞¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510405; 2. 广西中医药大学, 南宁 530200)

[摘要] 目的: 观察四逆散、六味地黄丸对体外培养神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖的影响。方法: 选取第3代 NSCs 作为分组造模对象。空白对照组: 采用 DMEM/F12(1:1)培养。四逆散低剂量组: 采用 DMEM/F12(1:1)培养基加入四逆散低浓度煎剂(终浓度含生药量 $0.133 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。四逆散高剂量组: 采用 DMEM/F12(1:1)培养基加入四逆散高浓度煎剂(终质量浓度含生药量 $0.267 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。六味地黄丸低剂量组: 采用 DMEM/F12(1:1)培养基加入六味地黄丸低浓度煎剂(终质量浓度含生药量 $0.208 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。六味地黄丸高剂量组: 采用 DMEM/F12(1:1)培养基加入六味地黄丸高煎剂(终质量浓度含生药量 $0.416 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。各组细胞隔天30%换液1次, 培养4 d。采用5-Bromo-2-deoxy Uridine(BrdU)荧光免疫细胞化学技术标记法检测细胞增殖及 Real time-PCR 法检测各组细胞 c-myc 及 CyclinD1 mRNA 表达。结果: 各组细胞在1~4 d内均处于增殖状态, 其中六味地黄丸高、低剂量组增殖最明显, 均比其他各组高($P < 0.01$); 而六味地黄丸低、高剂量组之间没有显著差异; 空白对照组、四逆散低剂、高剂量组之间比较没有显著差异。c-myc, CyclinD1 mRNA 在六味地黄丸低、高剂量组表达最高, 与空白对照组、四逆散低、高剂量组比较有显著差异($P < 0.01$); 而六味地黄丸低、高剂量组之间没有差异; 空白对照组、四逆散低、高剂量组之间比较没有差异。结论: 与四逆散比较, 六味地黄丸对体外培养 NSCs 增殖有明显促进的效应, 可上调 NSCs c-myc, CyclinD1 mRNA 表达。

[关键词] 神经干细胞; 六味地黄丸; 四逆散

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0137-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230137

[收稿日期] 20140405(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173144); 教育部2010年度新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-100088)

[第一作者] 陈攀, 医学博士, 副教授, 从事中医学、民族医学基础理论研究, Tel: 0771-3134025, E-mail: 1007965808@qq.com

[通讯作者] * 徐志伟, Tel: 020-36585390, E-mail: gzxxw@126.com

[参考文献]

- [1] 陈文华, 黄国栋, 方承康. 溃疡性结肠炎现代医学研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(7): 51.
- [2] Marchiando A M, Shen L, Graham W V, et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation *in vivo* [J]. J Cell Biol, 2010, 189(1): 11.
- [3] Lakatos L, Lakatos P L. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe[J]. Postgrad Med J, 2006, 82(967): 332.
- [4] 桑力轩, 刘汉立, 姜敏. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20): 2249.
- [5] 饶桂雄. 中药牛耳枫生物碱类化学成分及活性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2009: 2.
- [6] 郭小明. 枫蓼肠胃康的化学物质基础研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2005: 6.
- [7] 黄烈军. 中药广藿香化学及生物活性成分研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2008: 7.
- [8] 陈晓萍, 张长林. 白术不同化学成分的药理作用研究概况[J]. 中医药信息, 2011, 28(2): 124.
- [9] 黎君友, 吕艺, 付小兵, 等. 二胺氧化酶在创伤后肠道损伤中变化及意义[J]. 中华危重病急救医学, 2000, 12(8): 483.
- [10] 时松, 黄振, 罗熠, 等. 白芨多糖对小鼠溃疡性结肠炎的治疗作用[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(6): 536.
- [11] 孙芳美. 溃疡性结肠炎的发病机制与治疗进展[J]. 中国医药指南, 2012, 10(12): 445.
- [12] 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(6): 370.
- [13] Evans M J, Von Hahn T, Tschern D M, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry[J]. Nature, 2007, 446(7137): 801.
- [14] Bazzoni G, Martinez-Estrada O M, Orsenigo F, et al. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20520.
- [15] Rincon-Choles H, Vasylyeva T L, Pergola P E, et al. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2006, 55(4): 894.

[责任编辑 周冰冰]

Expression of c-myc mRNA, CyclinD1 mRNA and Proliferation of Neural Stem Cells Induced by Sini San or Liuwei Dihuang Wan

CHEN Pan^{1,2}, XU Zhi-wei^{1*}, AO Hai-ying¹, JI Yun-peng¹, ZHOU Jiang-xia¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] Objective: To observe the effects of Sini San and Liuwei Dihuang Wan on the proliferation and the expression of c-myc mRNA and CyclinD1 mRNA of neural stem cells (NSCs) *in vitro*. **Method:** NSCs of the third generation in good condition were resuspended, blew, struck and cultured in medium with the density of 1×10^5 /mL and in incubator with 5% CO₂ and 95% humidity at 37 °C. The cultured NSCs were divided into five groups: the normal control group, the low doses of and the high doses of Sini San group, the low doses of and the high doses of Liuwei Dihuang Wan group. All NSCs in five groups were cultivated with DMEM/F12 (1:1) medium for 4 days. The culture medium was changed 30% every other day. The low concentration of Sini San decoction with 0.133 g crude drug per liter, the high concentration of Sini San decoction with 0.267 g crude drug per liter, the low concentration of Liuwei Dihuang Wan decoction with 0.208 g crude drug liter and the high concentration of Liuwei Dihuang Wan decoction with 0.416 g crude drug per liter were added respectively into the medium in the low doses of Sini San group, the high doses of Sini San group, the low doses of Liuwei Dihuang Wan group and the high doses of Liuwei Dihuang Wan group. The proliferation of cells was detected by 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) labeling fluorescence immunocytochemistry every day. The relative expression of c-myc mRNA and cyclinD1 mRNA was detected by fluorescence real-time quantitative PCR in each group. **Result:** The results of BrdU labeling fluorescence immunocytochemistry: the proliferation of cells in the low and high doses of Liuwei Dihuang Wan group was more obvious than that in the low doses of Sini San group and the high doses of Sini San group ($P < 0.01$). There was no obvious difference in the proliferation of cells between the low doses of Sini San group, the high doses of Sini San group and normal control group. Results of fluorescence real-time quantitative PCR: the relative expression of c-myc mRNA and CyclinD1 mRNA in the low doses of Liuwei Dihuang Wan group and the high doses of Liuwei Dihuang Wan group was higher obvious than that in the low doses of Sini San group and the high doses of Sini Powder group ($P < 0.01$). There was no obvious difference in the relative expression of c-myc mRNA and CyclinD1 mRNA between the low doses of Sini San group, the high doses of Sini San group and normal control group. **Conclusion:** Compared with Sini San, Liuwei Dihuang Wan has a significant stimulative effect on the proliferation of NSCs or the expression of c-myc mRNA and CyclinD1 mRNA.

[Key words] neural stem cells; Liuwei Dihuang Wan; Sini San

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖是中枢神经系统生长发育及受损神经细胞修复替代及功能重建的保障。目前尚未明确 NSCs 增殖的具体机制,激活启动 NSCs 增殖程序的因素很多,其中一些细胞生长因子、生长激素等可能参与启动了细胞增殖程序^[1]。六味地黄丸是中医补肾经典名方,具有滋补肝肾,填精益髓功效,现代药理研究报道,该方可对神经中枢系统的多种神经递质系统、生长因子、神经肽、细胞膜上的受体及各种酶、激素等产生影响^[2-3]。四

逆散是疏肝基础方,具有疏肝和脾功效,其效应非常广泛,也可涉及全身各个部位,其中对应激中枢多种神经递质及其合成酶、神经肽、激素、环核苷酸系统等有明显影响^[4]。那么六味地黄丸、四逆散对 NSCs 的增殖是否产生影响,目前鲜有这方面的报道,本研究拟在 NSCs 层面,分别观察四逆散、六味地黄丸对体外培养海马 NSCs 增殖的影响。

1 材料

1.1 方剂组成 四逆散:柴胡 12 g,枳实 12 g,芍药

12 g,炙甘草 12 g。六味地黄丸:熟地黄 24 g,山茱萸 12 g,牡丹皮 9 g,淮山药 12 g,茯苓 9 g,泽泻 9 g。

1.1.1 药液提取处理 分别将四逆散、六味地黄丸用 500 mL 清水浸泡方药 30 min,然后煎药机煎煮 1 h,保留药渣,提取药液。再加清水 500 mL 煎煮 1 h,提取药液。收集前后 2 次的药液混合,采用旋蒸仪将药液浓缩为 2 种浓度的药液。四逆散低浓度药液含生药量 $1.33 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、高浓度药液含生药量 $2.67 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$;六味地黄丸低浓度药液含生药量 $2.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、高浓度药液含生药量 $4.16 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。调整药液 pH 为 7.15 ~ 7.25。将药液经 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌,存放 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。用时,用 NSCs 培养基(DMEM/F12)稀释到所需的浓度。

1.1.2 试剂 5-Bromo-2-deoxy Uridine(BrdU, Sigma 公司), BrdU 抗体(博士德公司), Trizol Reagent, SYBR Green qPCR SuperMix(Invitrogen 公司)。

1.1.3 仪器 细胞培养箱(Thermo 公司),分光光度计(Eppendorf 公司),倒置相差显微镜,Real time-PCR 仪,Real time-PCR 分析软件(均为 Bio Rad 公司)。

1.2 NSCs 取材动物 新生 24 h 内、清洁级 SD 大鼠,雌雄不限,10 只,实验动物由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2008-0020。

2 方法

2.1 NSCs 培养与鉴定 按照沈红等^[5]分离乳鼠海马组织 NSCs 的方法提取 NSCs,细胞接种密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,采用含终质量浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 bFGF 和 EGF,2% B27 添加剂,1% 双抗,1% L-谷氨酰胺的 DMEM/F12(1:1)培养基培养,细胞培养箱培养设置 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 ,隔天 30% 换液 1 次。每天定期倒置显微镜观察 NSCs 生长状况,并将原代神经球进行 Nestin 鉴定。

2.2 分组处理 原代 NSCs 接种培养每隔 4 d 传代 1 次。选择第 3 代 NSCs,进行分组造模。各组细胞以 DMEM/F12(1:1)培养基作为基本培养液,空白组:不添加任何药物,四逆散低剂量组(SNSDJL 组)加入四逆散低浓度煎剂(终质量浓度含生药量 $0.133 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),四逆散高剂量组(SNSGJL 组)加入四逆散高浓度煎剂(终质量浓度含生药量 $0.267 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),六味地黄丸低剂量组(LMDHWDJL 组)加入六味地黄丸低浓度煎剂(终质量浓度含生药量 $0.208 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),六味地黄丸高剂量组(LMDHWGJL 组)加入六味地黄丸高煎剂(终质量浓度含生药量 $0.416 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。各组细胞隔天 30% 换液 1 次,培

养 4 d。

2.3 BrdU 免疫细胞荧光化学标记法 在检测前 1 d 将各组细胞制成单细胞悬液,添加浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BrdU 进行标记。采用免疫细胞荧光化学技术法,检测 BrdU 抗体表达,每隔 24 h 检测 1 次。细胞增殖率的计算方法:Brdu 抗体表达阳性细胞即为增殖细胞;细胞总数采用 DAPI 染核细胞数表示;Brdu 阳性细胞数量/DAPI 染核细胞数即为神经干细胞的增殖率。Brdu 表达阳性细胞及 DAPI 染核细胞均在倒置显微镜下,选择 5 个视野进行计算,取平均值。

2.4 Real time-PCR 检测 c-myc 及 CyclinD1 mRNA 表达

2.4.1 总 RNA 抽提、纯度检测及逆转录 收集各组细胞,分别采用 1 mL Trizol 进行细胞裂解提取 RNA,然后将 1 μL RNA 样品稀释 50 倍,检测吸光度 >1.8 ,说明 RNA 无污染。将获得的 RNA 在逆转录酶的作用下合成 cDNA。

2.4.2 荧光定量 Real-time PCR 内参片段: β -actin-150 bp(NM_031144.2);目的片段:c-myc-247 bp(NM_012603.2) CyclinD1-181 bp(NM_171992.4)。设计的引物: β -actin-F1: 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACAT-3'; β -actin-R1: 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'; c-myc-F1: 5'-TGTAGTAATTCCAGCGAGAG-3'; c-myc-R1: 5'-CGCAGATTGTAAGTTCCAG-3'; CyclinD1-F1: 5'-CCATGTCTGAGAGACTGGTCT-3'; CyclinD1-R1: 5'-GCAAGAATGTGCCAGACTCA-3'。反应溶液总体积 20 μL ,其中上、下游引物各占 2.5%,cDNA Template 占 25%, dH_2O 占 20%, $2 \times \text{SYBR Green qPCR SuperMix}$ 占 50%。反应条件: $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 32 s 读板,40 cycles。融解曲线分析:温度 $60 \sim 95 \text{ }^\circ\text{C}$ 。每个样本重复 3 次

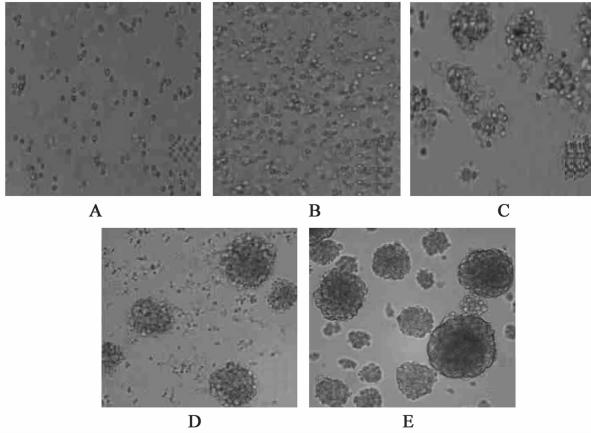
2.5 基因表达量计算 $\Delta C_t = (\text{目的基因 } C_t - \text{内参 } C_t)$ 的平均值 \pm 标准偏差; $\Delta\Delta C_t = (\text{待测样品中目的基因 } \Delta C_t - \text{参照样品中目的基因 } \Delta C_t)$ 的平均值 \pm 标准偏差(若无参照样品则选择 ΔC_t 最大的样品为参照进行计算);相对表达量 = $(2^{-\Delta\Delta C_t})$ 的平均值 \pm 标准偏差^[6]。

2.6 统计学分析 数据采用 PEMS 3.1 统计软件进行统计分析,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 原代 NSCs 培养与鉴定 原代 NSCs 接种后,细胞不断增殖,并悬浮生长,培养 2 d 后,逐渐形成

许多悬浮的神经球,随着时间推移,神经球体积较前明显增大,4 d 后,多数球体的直径在 100 μm 左右,球体透光性较好,显示出良好的生长状态,见图 1。NSCs 特异性标志物 Nestin 表达的鉴定结果阳性,见图 2。



A. 原代 NSCs 培养 0 h; B. 原代 NSCs 培养 24 h; C. 原代 NSCs 培养 2 d; D. 原代 NSCs 培养 3 d; E. 原代 NSCs 培养 4 d

图 1 原代细胞不同时间段的生长形态(×100)



图 2 Nestin 表达(×200)

3.2 Brdu 免疫细胞荧光化学标记法检测结果 各组细胞在 1~4 d 内均处于增殖状态,其中六味地黄丸高、低剂量组增殖最明显,均比其他各组高($P < 0.01$),四逆散高、低剂量组及空白对照组之间比较无明显差异。见表 1。

表 1 四逆散、六味地黄丸对外培养神经干细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	终质量浓度 /g·L ⁻¹	细胞增殖率/%			
		1 d	2 d	3 d	4 d
LWDHW	0.208	52.0 ± 2.2 ¹⁾	63.4 ± 3.1 ¹⁾	62.4 ± 2.1 ¹⁾	72.6 ± 1.7 ¹⁾
	0.416	55.8 ± 5.4 ¹⁾	63.6 ± 3.5 ¹⁾	62.4 ± 2.1 ¹⁾	72.8 ± 2.4 ¹⁾
SNS	0.133	44.6 ± 1.1	51.0 ± 1.7	50.6 ± 0.6	62.4 ± 3.4
	0.267	42.8 ± 1.5	51.6 ± 1.1	51.6 ± 1.5	62.8 ± 3.1
空白	-	42.2 ± 1.9	50.6 ± 1.5	49.0 ± 5.3	61.2 ± 0.8

注:与同时时间点空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 各组细胞 c-myc, CyclinD1 mRNA 相对表达量 c-myc, CyclinD1 mRNA 在 LWDHWDJL 组、LWDHWGJL 组表达最高,与空白对照组、SNSDJL 组及 SNSGJL 组比较有显著差异($P < 0.01$),而 LWDHWDJL 组与 LWDHWGJL 组之间比较没有差异,空白对照组、SNSDJL 组及 SNSGJL 组之间比较没有差异。见表 2。

表 2 各组细胞 c-myc, CyclinD1 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	终质量浓度 /g·L ⁻¹	c-myc /2 ^{-ΔΔC_t}	CyclinD1 /2 ^{-ΔΔC_t}
LWDHW	0.208	1.37 ± 0.05 ¹⁾	1.45 ± 0.06 ¹⁾
	0.416	1.39 ± 0.05 ¹⁾	1.48 ± 0.04 ¹⁾
SNS	0.133	1.07 ± 0.02	1.10 ± 0.01
	0.267	1.06 ± 0.03	1.08 ± 0.01
空白	-	1.01 ± 0.01	1.08 ± 0.03

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

Brdu 是胸腺嘧啶的类似物,是检测体内外细胞增殖及示踪的理想指标^[7]。在细胞培养中加入 Brdu,目的是取代胸腺嘧啶在细胞 DNA 合成期 S 期掺入到新合成 DNA 中,新分裂增殖的细胞 DNA 中携带 Brdu,利用抗 Brdu 单克隆抗体,进行免疫细胞化学染色,即可检测出含有 Brdu 的细胞。c-myc 基因是 myc 基因大家族中重要的亚型基因之一,存在细胞核,属于下游基因或靶基因,可受到多种物质及多种细胞信号转导途径的调节,被激活后,可启动细胞分裂增殖的程序,促进细胞增殖,c-myc 基因的表达可是细胞不断分裂增殖,相反 c-myc 基因的表达不足,细胞增殖则受到抑制^[8]。Cyclin D1 是促进细胞分裂增殖的基因,在细胞从 G₁ 期向 S 期过度中发挥着重要的调控作用,其表达增加可促进细胞增殖。研究表明,体外 NSCs 实验中,细胞增殖与 Cyclin D1 基因表达上调有关^[9],Cyclin D1 表达增强可促进 NSCs 增殖而抑制其分化^[10]。细胞增殖与 c-myc, Cyclin D1 基因表达密切相关,在一定程度上,可反映细胞的增殖情况。

六味地黄丸是中医补肾经典名方,具有滋补肝肾,填精益髓功效。中医理论认为,精生髓,脑为髓海,“脑髓”包括各种神经细胞,补肾中药可通过调节神经内分泌免疫网络发挥抗应激性损伤的作用,为 NSCs 的增殖分化,实现神经功能重建提供可能^[11]。在临床上,采用应用六味地黄丸治疗一些中枢神经系统退行性病变可获得满意的临床疗

效^[12-13]。现代药理研究报道,六味地黄丸可增强免疫力、抗疲劳、抗衰老、促进新陈代谢等作用^[14],可对神经中枢系统的多种神经递质系统、各种生长因子、神经肽、细胞膜上的受体及各种酶、激素等产生影响^[2-3]。本研究实验结果提示,六味地黄丸高、低剂量组均可明显促进体外培养的 NSCs 的增殖及上调 c-myc, CyclinD1 mRNA 表达水平。实验结果显示,六味地黄丸可促进体外培养 NSCs 的增殖,其作用机制可能与其广泛的药效作用有关,可能影响一些相关的细胞因子,进而激活与 NSCs 增殖相关的信号转导通路,最终促进 NSCs 增殖。但由于本实验研究是利用六味地黄丸水提取物直接作用于离体 NSCs 反应系统,在实验过程中,尽管实验前笔者已对方药煎剂进行过滤及 pH 值的调整等处理,但实验结果也可能受到该水提取物中的鞣质、无机盐离子等非特异性理化因素的影响,还需进一步实验研究排除这种特异性的影响。

四逆散疏肝和脾基础方剂,具有疏肝解郁功效。肝主疏泄功能作用部位也体现在大脑边缘系统,特别是海马区^[15],采用疏肝解郁的方药可以干预神经干细胞的增殖分化。5-羟色胺可影响神经干细胞增殖、分化、迁移、突触形成和新生神经元存活等^[16],四逆散或四逆散加减不但能改善抑郁大鼠的行为,也能提高抑郁症大鼠脑内的 5-羟色胺含量^[17]。此外,四逆散对应激中枢多种神经递质及其合成酶、神经肽、激素、环核苷酸等有明显影响^[4]。但本实验结果提示,四逆散对体外 NSCs 增殖不明显,与空白对照组的作用没有明显的区别。此实验结果是否因给药浓度太低所致,这有待进一步实验研究。

[参考文献]

[1] 刘睽,王忠诚,张亚卓. 神经干细胞研究现状及应用展望[J]. 中华神经外科杂志,2000,16(6):396.
 [2] 张伟伟,刘银辉,孙启新,等. 六味地黄丸对老年大鼠神经系统的抗衰老作用[J]. 陕西中医,2010,31(9):1264.
 [3] 马锋,田建英. 六味地黄丸对脑脊液神经保护作用的实验研究[J]. 宁夏医学杂志,2006,28(3):165.

[4] 覃朗. 四逆散抗抑郁机制研究[J]. 当代医学,2010,16(14):29.
 [5] 沈红,林志国,孟然,等. 大鼠海马干细胞分化的神经元内钙离子浓度的测定[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志,2004,17(5):277.
 [6] 周朝明,林志超,李汉权,等. GPC3 在肝癌患者血清、癌组织和肝癌细胞株中的表达[J]. 广州医学院学报,2013,31(4):367.
 [7] 王永志,陈二涛,冯福东,等. Wnt3a 影响大鼠海马神经干细胞增殖的体外研究[J]. 蚌埠医学院学报,2012,37(1):1.
 [8] 姜艳芳,谭岩,赵平伟,等. c-myc 基因在乳腺癌、膀胱癌和肾癌组织中的扩增研究[J]. 实用癌症杂志,2000,15(5):458.
 [9] 柴丽娟,钟佩茹,周志焕,等. 黄芪甲苷对体外神经干细胞增殖作用影响的研究[J]. 中国药理学通报,2010,26(5):670.
 [10] Megason S G, McMahon A P. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS[J]. Development,2002,129:2087.
 [11] 王立新,蔡业峰,孙景波. 从中医学角度认识脑缺血损伤后内源性神经干细胞的增殖分化[J]. 南京中医药大学学报,2008,24(4):221.
 [12] 薛红,魏周科,刘璇. 六味地黄丸对帕金森患者自主神经功能的影响[J]. 中医学报,2010,25(2):283.
 [13] 王俊锋,江若霞,李爱春. 六味地黄丸联合美多巴治疗帕金森病临床研究[J]. 中国药物经济学,2013(4):141.
 [14] 傅万山,杨解人,丁伯平,等. 六味地黄丸对肾上腺皮质激素型阴虚小鼠的药效学研究[J]. 皖南医学院学报,2002,21(1):11.
 [15] 岳广欣,陈家旭,王竹风. 肝主疏泄的生理学基础探讨[J]. 北京中医药大学学报,2005,28(2):1.
 [16] Darrick T B, Irwin L. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications and contribution to disease pathology[J]. Neurosci Biobehav R,2009,33(3):232.
 [17] 畅洪昇,王国庆,石任兵,等. 四逆散活性成分对抑郁症大鼠慢性应激模型行为学及脑内单胺类神经递质的影响[J]. 北京中医药大学学报,2003,26(5):42.

[责任编辑 聂淑琴]