

神经干细胞迁移研究平台的建立及补阳还五汤的干预影响

覃清霞^{1,2}, 仲米存², 吴宣², 孔祥英^{2*}, 林娜^{1,2*}

(1. 福建中医药大学, 福州 350122; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**建立体外神经干细胞(neural stem cells, NSCs)迁移研究的平台,并通过经典名方补阳还五汤对此平台进行适用性验证。**方法:**分离、培养大鼠脑胚胎 NSCs,利用 NSCs 放射性迁移、划痕修复动态检测以及 Transwell 趋化性迁移检测的方法,建立体外 NSCs 迁移研究平台。利用此平台评价经典名方补阳还五汤(300, 600 mg·L⁻¹),有效单体川芎嗪(10, 50 mg·L⁻¹)以及阳性对照基质细胞衍生因子-1(stromal-derived factor 1, SDF-1)等对 NSCs 迁移的影响。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测放射性迁移系统及 Transwell 培养上清液中 SDF-1 及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的含量。**结果:**经过不同时间点的观察,放射性迁移、划痕修复动态检测以及 Transwell 趋化性迁移均可见不同程度的 NSCs 的迁移;与空白组比较,补阳还五汤及川芎嗪能够明显促进放射性迁移体系中 NSCs 的迁移,还能够显著增加向 Transwell 下室迁移的细胞数,且具有剂量依赖性($P < 0.05$, $P < 0.01$),此外还可显著提高 NSCs 培养上清中 SDF-1, VEGF 的含量($P < 0.01$),其中对 SDF-1 含量上调作用高于 VEGF;给予 AMD3100 预处理后,600 mg·L⁻¹补阳还五汤及 10, 50 mg·L⁻¹川芎嗪促进 Transwell 向下室迁移的细胞数显著降低。**结论:**该研究建立的 NSCs 迁移研究平台动态、多维,能模拟不同临床病理生理过程,且经济实用、简便易行,可供中药复方和单体成分活性筛选之用。

[关键词] 补阳还五汤; 神经干细胞; 迁移; 基质细胞衍生因子-1; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0131-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060131

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1135.034.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 11:35

Establishment of Platform for Neural Stem Cells Migration *in Vitro* and Effect of Buyang Huanwu Tang on Migration

QIN Qing-xia^{1,2}, ZHONG Mi-cun², WU Xuan², KONG Xiang-ying^{2*}, LIN Na^{1,2*}

(1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a migration platform for neural stem cells (NSCs) *in vitro* and verify the applicability of this platform by using Buyang Huanwu Tang, a Chinese classical formula. **Method:** NSCs were isolated from rat embryos, and used in establishing a migration platform for neural stem cells *in vitro* by radial cell migration assay, scratch repair dynamic detection, and Transwell chemotaxis system. Then this platform was used to evaluate the effects of Buyang Huanwu Tang (300, 600 mg·L⁻¹), Tetramethylpyrazine (10, 50 mg·L⁻¹), as well as stromal-derived factor 1 (SDF-1) on NSCs migration. ELISA assay was used to detect the contents of migration regulatory factor SDF-1 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the radial cell migration and transwell system. **Result:** NSCs migration in varying degrees was observed at different time points in radial migration, scratch repair dynamic detection and transwell chemotaxis system. As compared with the blank group,

[收稿日期] 20160905(019)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673630, 30873394);北京市自然科学基金面上项目(7162139)

[第一作者] 覃清霞,在读硕士,从事中药药理研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: qqxyifan@163.com

[通讯作者] *林娜,博士,研究员,博士生导师,从事药性理论研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: linna888@163.com;

*孔祥英,博士,副研究员,从事中药药理研究, E-mail: kongu0051@163.com

Buyang Huanwu Tang and Tetramethylpyrazine could significantly promote NSCs migration in radio migration system, but also significantly increase the number of NSCs migrated to lower chamber in Transwell system ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in a dose-dependent manner. Additionally, Buyang Huanwu Tang and Tetramethylpyrazine could promote the expression levels of SDF-1 and VEGF in NSCs culture supernatant ($P < 0.01$), where the up-regulation effect on SDF-1 was higher than that on VEGF. We also found that the effect of Buyang Huanwu Tang ($600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and Tetramethylpyrazine ($10, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were inhibited after AMD3100 pretreatment, where the number of NSCs migrated to lower champ was reduced significantly. **Conclusion:** The NSCs migration research platform established in this study is dynamic and multi-dimensional. It can simulate different clinical pathophysiological processes, and in addition, this platform is economical, practical and easy to operate.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; neural stem cells; migration; stromal-derived factor 1; vascular endothelial growth factor

随着人们对神经系统可塑性及干细胞认识的逐渐深入,干细胞已被应用于神经系统疾病的实验与临床研究^[1-2]。众多研究表明激活内源性神经发生可以显著促进脑缺血和神经退行性疾病的功能恢复^[3],而调节内源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的动员与迁移是其发挥治疗作用的关键^[4]。建立简单、经济、便捷的体外 NSCs 迁移研究平台,对于快速筛选促进 NSCs 迁移以防治神经系统疾病的有效候选药物极为重要,但迄今尚未见相关的研究报道。

目前中医药特别是中药复方如补阳还五汤等经典名方在中风性疾病治疗中体现出明显的优势^[5-6]。补阳还五汤出自清代王清任著《医林改错》一书,由黄芪、川芎、赤芍、当归、红花、桃仁、地龙组成,具有保护脑组织、减轻神经缺失症状的作用。前期的研究也显示补阳还五汤可以显著促进脑缺血大鼠脑内 NSCs 向缺血区迁移,从而发挥抗脑缺血作用^[7]。最近有学者报道补阳还五汤的引经入脑药川芎的主要活性成分之一川芎嗪具有和复方一样的促进脑缺血大鼠脑内缺血区 NSCs 增加的作用,还可提高骨髓干细胞分泌干细胞迁移主要调控因子基质细胞衍生因子-1(SDF-1)的分泌,提示川芎嗪可能具有促进干细胞迁移的作用^[8-9]。为了有利于神经发生障碍性疾病的中药新药发现,本研究拟通过 NSCs 的分离、体外培养,建立放射性迁移、划痕修复以及 Transwell 趋化性迁移等体外 NSCs 迁移评价方法,并利用此评价方法验证补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs 迁移的影响并进行相关机制的初步探讨。

1 材料

1.1 动物 妊娠 14 ~ 15 d(阴栓出现日作为 0 d) SD 大鼠,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK(京)2011-0012。本研

究获得中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准[中药科服字(2013)D12]。

1.2 药物及试剂 黄芪、川芎、赤芍、当归、红花、桃仁、地龙等均购自北京同仁堂;川芎嗪(中国食品药品检定研究院,批号 110817-201006);SDF-1 和血管内皮细胞生长因子(VEGF)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(德国 R&D 公司,批号分别为 BM-E30218, BM-E30564);重组大鼠碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),表皮细胞生长因子(EGE),SDF-1(美国 Pepro Tech 公司,批号分别为 400-29, 400-25, 400-32A);AMD3100 和结晶紫(美国 Sigma 公司,批号分别为 A5602, C3886);B27 培养基, N2 培养基,胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号分别为 17504044, 17502048, 25200-072);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 RVIO control 型旋转蒸发仪(德国 KIA 公司), TD5A-WS 型低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司), XDS-1B 型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司), BX50 型正置显微镜及 CKX31 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司), MK3 型全自动酶标仪及 371 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 补阳还五汤提取液的制备 补阳还五汤组成:黄芪 120 g, 川芎 3 g, 赤芍 4.5 g, 当归 6 g, 红花 3 g, 桃仁 3 g, 地龙 3 g。常规水提醇沉法制成含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液,再经过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤得提取液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.2 NSCs 的分离 将孕鼠麻醉, 75% 乙醇消毒 5 min 后, 剖开腹腔, 取出胚胎置于含预冷培养基的培养皿中, 依次打开胚胎颅腔、除去脑膜、分离出大脑皮层, 置于另一含预冷培养基培养皿中, 剪成小碎片, 并用枪轻轻吹打使之成为细胞悬液; 加入含有

B27, N2, bFGF, EGF, 青霉素和链霉素(各 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 DMEM/F-12 完全培养基, 转移至 25 cm^2 培养瓶中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养, 每 3 d 进行半量换液。

2.3 NSCs 单细胞制备 待神经细胞球中心出现黑色不透明状态时, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清; 加入细胞消化液, 消化 5 min, 轻轻吹散; DMEM/F-12 培养基悬浮吹打, 将上层细胞液移至培养瓶, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养, 此后隔天换液。

2.4 放射性迁移 选取第 2~4 代、直径为 $100 \sim 150 \text{ }\mu\text{m}$, 生长状态良好的神经干细胞球, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, DMEM/F-12 培养基重悬, 取 $10 \text{ }\mu\text{L}$ 接种于含有纤维连接蛋白包被过的圆玻片的 24 孔板中, 加入 $500 \text{ }\mu\text{L}$ DMEM/F-12 培养基, 轻轻晃动使神经细胞球分散, 分别加入不同质量浓度药物(补阳还五汤 $300, 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 川芎嗪 $10, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 空白组加入同等体积培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养 24 h, 倒置显微镜下观察各组神经干细胞球迁移情况。以干细胞球心到放射状迁移细胞边缘的平均距离为迁移距离。

2.5 Transwell 迁移 将 NSCs 单细胞悬液接种于孔径为 $8 \text{ }\mu\text{m}$ 的 Transwell 板上室, 在有或无 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AMD3100 的条件下, 分别加入含不同质量浓度药物(补阳还五汤 $300, 600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 川芎嗪 $10, 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 DMEM/F-12 培养基, 下室加入 DMEM/F-12 培养基, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱培养 8 h, 湿润棉球擦去膜上未迁移细胞, 4% 多聚甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 随机选取 5 个高倍视野进行迁移细胞计数。

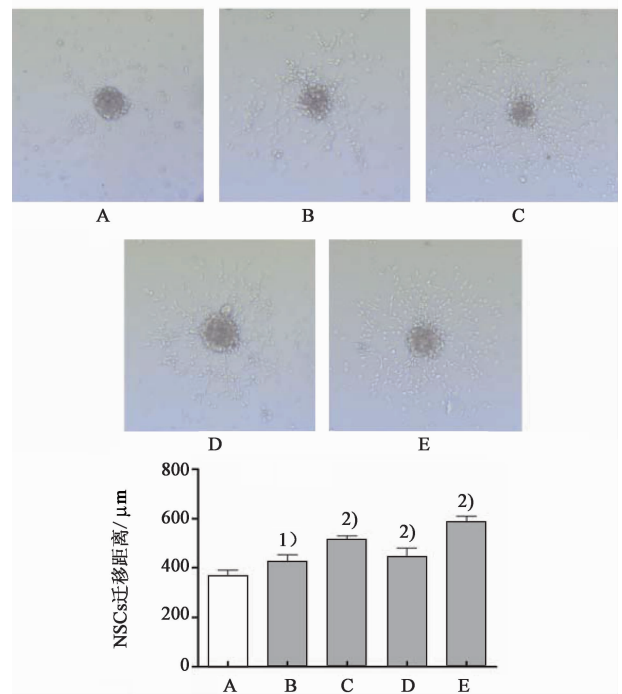
2.6 划痕修复性迁移 将 NSCs 单细胞悬液接种于培养皿中, 待细胞贴壁并达到 $70\% \sim 80\%$ 融合度时, 用无菌黄色枪头沿皿中心在平铺的细胞层上划一条直线, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, 加入不同质量浓度药物或阳性药 SDF-1(终浓度为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 置培养箱中培养 12 h, 在迁移前以及迁移后 12 h 观察细胞迁移情况并进行图像采集。

2.7 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 收集上述放射性迁移系统中培养上清液及 Transwell 下室培养液, 按照 ELISA 试剂盒说明书进行 SDF-1 及 VEGF 检测。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 20.0 数据软件进行统计分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs 放射性迁移的影响 基础状态下, 接种于纤维连接蛋白玻片上的干细胞球培养 24 h 后, 部分 NSCs 脱离干细胞球团向四周扩散, 平均迁移距离为 $(370.3 \pm 20.5) \text{ }\mu\text{m}$, 提示 NSCs 可以进行放射状的迁移。补阳还五汤及川芎嗪作用后迁移距离明显增加, 其中 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 补阳还五汤组达到 $(515.3 \pm 14.5) \text{ }\mu\text{m}$, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 川芎嗪组达到 $(587.3 \pm 21.9) \text{ }\mu\text{m}$ 。结果提示补阳还五汤与川芎嗪均具有促进神经干细胞球向边缘迁移的作用, 且迁移距离随着药物浓度的增加而增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1。



A. 空白组; B. 补阳还五汤 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 补阳还五汤 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. 川芎嗪 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; E. 川芎嗪 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组(图 2, 4, 5 同)。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 2~5 同)

图 1 补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs 放射性迁移的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of Buyang Huanwu Tang and tetramethylpyrazine on radial migration of NSCs($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs Transwell 迁移的影响 迁移上室中的 NSCs 迁移通过 Transwell 膜后, 黏附在 Transwell 膜下室面, 经结晶紫染色后计数。空白组有少量细胞由上室向下室迁移, 提示此系统可见 NSCs 的迁移; 与空白组比较, 补阳还五汤组及川芎嗪组中迁移细胞数目明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且随着药物浓度的增加而增加, 呈现出一定的剂量依赖性。提示补阳还五汤及川芎嗪可促进 NSCs 迁移。见图 2。

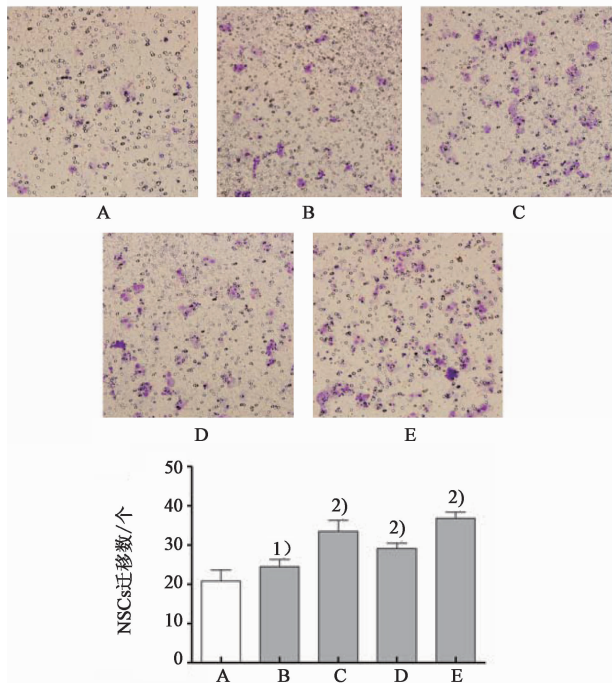


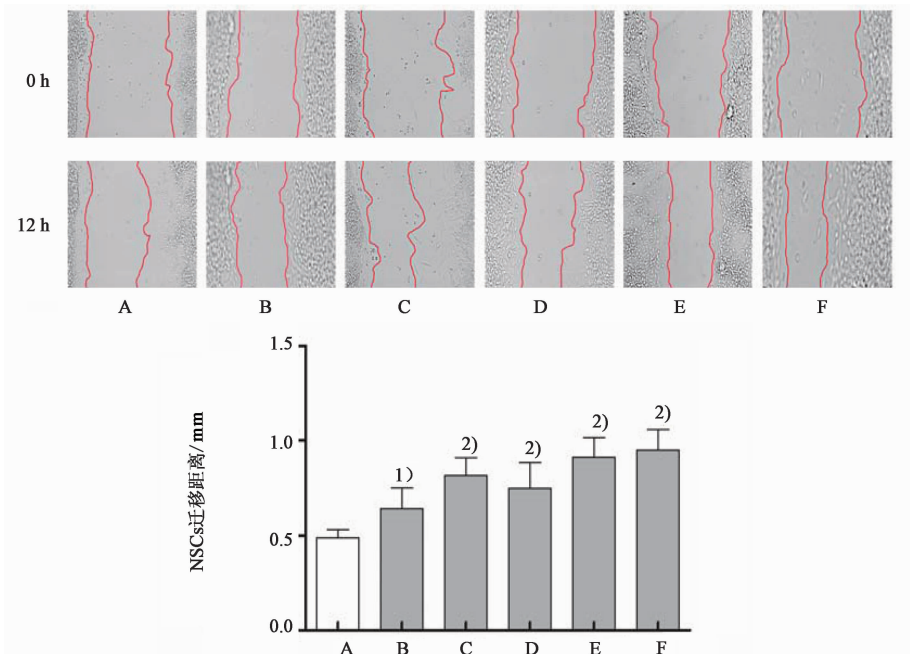
图 2 补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs Transwell 迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Effect of Buyang Huanwu Tang and tetramethylpyrazine on Transwell migration of NSCs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs 划痕修复的影响 趋化因子在 NSCs 迁移过程中的重要作用已经得到广泛认同。SDF-1 是目前已知的 CD34⁺ 细胞最强大的趋化剂,因此本研究设为阳性对照。划痕后 12 h NSCs 可以自发迁移一定的距离;300, 600

mg·L⁻¹ 补阳还五汤及 10, 50 mg·L⁻¹ 川芎嗪作用 12 h 能够显著促进 NSCs 的迁移,与空白组对比也具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中川芎嗪 50 mg·L⁻¹ 组作用效果最好,接近于阳性药 SDF-1 组。见图 3。

3.4 补阳还五汤及川芎嗪对培养上清 SDF-1, VEGF 含量的影响 基础状态下 NSCs 可以分泌一定水平的细胞因子以及趋化因子,经 ELISA 检测,培养上清液中 SDF-1 的质量分数为 ($1\ 824.1 \pm 202.8$) ng·L⁻¹, VEGF 为 (563.9 ± 25.3) ng·L⁻¹。补阳还五汤和川芎嗪均可不同程度促进 SDF-1 和 VEGF 的分泌,且对 SDF-1 的促分泌作用更为显著 ($P < 0.01$)。见图 4。提示补阳还五汤及川芎嗪可能主要通过提高 SDF-1 的分泌促进 NSCs 迁移的。

3.5 AMD3100 作用后补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs 迁移的影响 与空白组比较,AMD3100 共孵育后由 Transwell 上室向下室迁移的 NSCs 细胞个数明显减少 ($P < 0.01$),提示 AMD3100 可以显著抑制 NSCs 的迁移。600 mg·L⁻¹ 补阳还五汤及 50 mg·L⁻¹ 川芎嗪作用后 NSCs 迁移个数可显著升高 ($P < 0.01$),再次验证了补阳还五汤与川芎嗪可促进 NSCs 的迁移;而当 AMD 3100 与补阳还五汤及川芎嗪共孵育后,NSCs 迁移数目显著下降 ($P < 0.01$),提示补阳还五汤及川芎嗪通过作用于 SDF-1 进而影响 NSCs 的迁移。见图 5。



A. 空白组; B. 补阳还五汤 300 mg·L⁻¹ 组; C. 补阳还五汤 600 mg·L⁻¹ 组; D. 川芎嗪 10 mg·L⁻¹ 组; E. 川芎嗪 50 mg·L⁻¹ 组; F. SDF-1 组
图 3 补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs 划痕修复的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of Buyang Huanwu Tang and tetramethylpyrazine on wound scratch migration of NSCs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

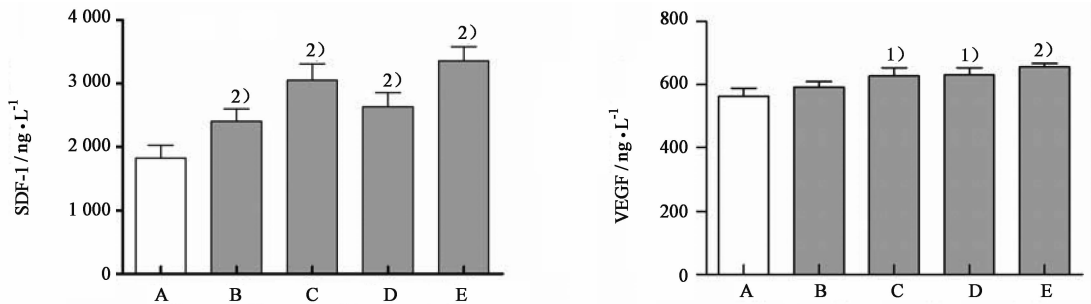
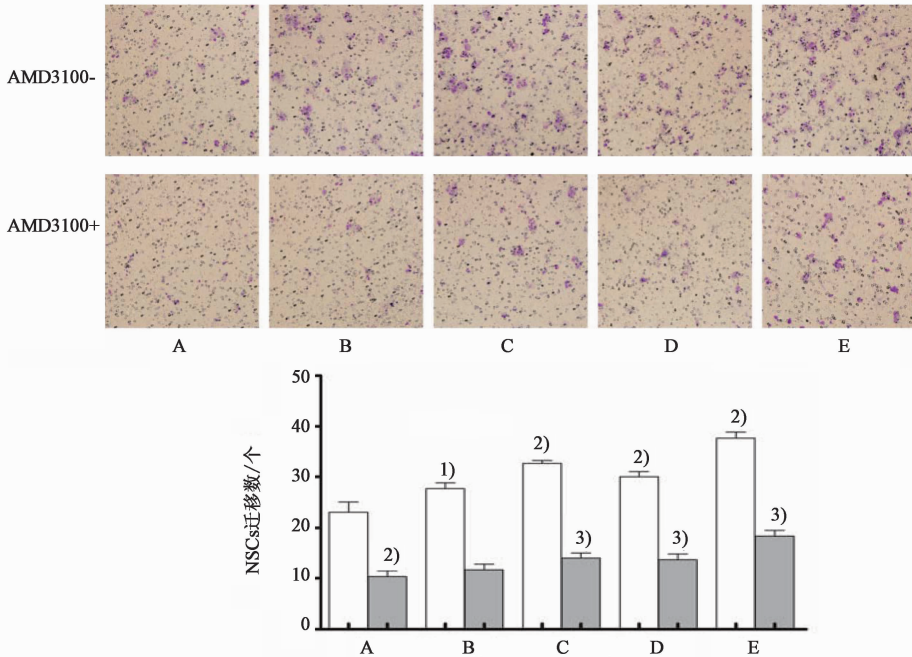


图 4 补阳还五汤及川芎嗪对培养上清 SDF-1, VEGF 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Buyang Huanwu Tang and tetramethylpyrazine on SDF-1, VEGF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与相应单独药物组比较³⁾ $P < 0.01$

图 5 AMD3100 作用后补阳还五汤及川芎嗪对 NSCs 迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of Buyang Huanwu Tang and tetramethylpyrazine on NSCs migration with AMD3100 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

内源性神经发生正常情况下维持在相对静止状态,主要分布于海马齿状回颗粒下层(subgranular zone, SGZ)和侧脑室壁的脑室下区(subventricular zone, SVZ)。但当神经系统发生损伤时,SGZ 及 SVZ 区的 NSCs 被显著激活,大量增殖并向神经损伤区域迁移。遗憾的是,NSCs 自发迁移到损伤区的细胞量以及存活率都极为有限^[10-11]。可见,诱导 NSCs 迁移到损伤区,是提高 NSCs 发挥治疗作用的关键,但至今为止还没有诱导干细胞迁移的有效方法用于临床。因此建立适用于大规模筛选的体外 NSCs 迁移平台,对于调控 NSCs 的药物研发具有重要作用。

生理以及病理条件下,NSCs 迁移主要有 2 种迁移模式,即放射性迁移和正切迁移^[12]。放射性迁移为神经细胞沿着放射状胶质细胞纤维迁移,此迁移模式对于大脑皮层正常发育过程中有着重要意义;

正切迁移不依赖胶质细胞纤维的引导,能够沿吻侧迁移流迁移至嗅球,迁移至神经损伤区域,细胞间的连接性与复杂性在此迁移模式中有很好的体现。生理状态下这些 NSCs 独特的迁移途径和方式为研究 NSCs 迁移机制提供了有益的提示。因此,体外细胞迁移模型的建立,对于以 NSCs 迁移为调控靶点的药物或治疗方面的研究可提供良好的平台。

本研究建立了体外 NSCs 的放射状迁移模型、划痕修复模型以及 Transwell 迁移模型。放射状迁移模型是以辐射状方式向确定部位进行迁移,此方法主要关注细胞间的突触联系,比较好地模拟了体内放射状迁移,如在大脑皮层中迁移过程;划痕修复性迁移因具有与包括活细胞成像在内的显微镜系统兼容、一定程度上模拟了体内损伤修复过程细胞迁移的特点,常运用于细胞间相互作用的研究,尤其在损伤修复性迁移中具有较好的可用性;Transwell 趋

化性迁移,主要应用不同孔径、具有通透性的滤膜,建立生物屏障以及细胞趋化迁移,确定细胞迁移能力,其体现细胞穿过生物膜发生迁移的过程,尤其在一定趋化因子的诱导下,比较好地模拟了损伤区域局部产生的高浓度的趋化因子对细胞的趋化作用。此 3 种研究方法对设备要求较低,方法操作简便,具有较好的可控性和重复性,是评价体外细胞迁移的良好平台。经过中药经典名方补阳还五汤提取物及有效单体川芎嗪验证后,发现无论是复方还是单体药物,均可在此平台观察到不同程度的促进 NSCs 迁移的作用,提示了此平台的普适性。

NSCs 的迁移往往会受到多种细胞因子的影响,如 SDF-1, VEGF。其中 SDF-1 及其受体 CXCR4 对神经干细胞迁移的调控作用是目前最公认的调控体系^[13]。本研究中, SDF-1 能够明显增加 NSCs 的迁移距离,结果与相关报道相符^[14]。补阳还五汤及川芎嗪作用 NSCs 后,培养上清液中 SDF-1 的含量升高, NSCs 的迁移也随之增加;而在加入 CXCR4 抑制剂 AMD3100 后, NSCs 的迁移明显受到了抑制,以上结果提示 SDF-1/CXCR4 在补阳还五汤及川芎嗪促 NSCs 的迁移作用中具有关键性作用。VEGF 能够通过其受体 VEGF-R2 发挥促进血管及神经再生作用而参与到神经系统的保护,除此之外也可通过促进 NSCs 胞浆内支架蛋白的表达参与 NSCs 的迁移^[15]。本研究结果显示,补阳还五汤以及川芎嗪作用后 NSCs 培养上清液中 VEGF 含量有所升高, NSCs 迁移能力增强,提示 VEGF 可能是影响 NSCs 迁移的相关因子之一。补阳还五汤以及川芎嗪对 NSCs 迁移干预作用相关机制的探讨,进一步验证了此平台的适用性。

综上所述,本研究成功建立了体外放射性迁移、划痕修复以及 Transwell 迁移模型,通过补阳还五汤及川芎嗪等药物进行了此平台的适用性验证,并初步探索了其迁移机制与 SDF-1 有关。本平台模型具有动态、多维性,能模拟不同临床病理生理过程,且此平台经济实用、简便易行,可供中药复方和单体成分活性筛选,对于以 NSCs 迁移为调控靶点的药物或治疗方面的研究将具有一定的参考价值。

[参考文献]

[1] CHEN L, ZHANG G, Khan A A, et al. Clinical efficacy and meta-analysis of stem cell therapies for patients with brain ischemia [J]. *Stem Cells Int*, 2016, doi:10.1155/2016/6129579.
[2] Simberlund J, Ferretti C J, Hollander E. Mesenchymal stem cells in autism spectrum and neurodevelopmental

disorders: pitfalls and potential promises [J]. *World J Biol Psychia*, 2015, 16(6): 1-8.
[3] Rodrigues M C, Voltarelli J, Sanberg P R, et al. Recent progress in cell therapy for basal ganglia disorders with emphasis on menstrual blood transplantation in stroke [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(1): 177-190.
[4] LIU H H, XIANG Y, YAN T B, et al. Functional electrical stimulation increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of rats with stroke [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(12): 2361-2367.
[5] 张琳琳, 周震, 郭家奎, 等. 中药应用于内源性神经干细胞的实验研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 284-287.
[6] 龙建飞, 张秋霞, 王蕾, 等. 补阳还五汤治疗缺血性中风药理作用机制的研究进展 [J]. *世界中医药*, 2015, 10(5): 805-807.
[7] KONG X, SU X, ZHU J, et al. Neuroprotective effect of Buyang Huanwu Tang on rat ischemic/reperfusion brain damage by promoting migration of neural precursor cells [J]. *Rejuvenation Res*, 2014, 17(3): 264-275.
[8] 高海军, 白焕焕, 雷廷, 等. 川芎嗪在脑缺血再灌注损伤中的保护作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(17): 5019-5023.
[9] 戴儒丽, 闫福曼, 周乐全, 等. 川芎嗪对大鼠骨髓间充质干细胞 SDF-1 表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2011, 27(5): 29-31.
[10] LI X, LIU X, ZHAO W, et al. Manipulating neural-stem-cell mobilization and migration *in vitro* [J]. *Acta Biomater*, 2012, 8(6): 2087-2095.
[11] DAI J, LI S Q, QIU Y M, et al. Migration of neural stem cells to ischemic brain regions in ischemic stroke in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 552(1): 124-128.
[12] 刘靖, 曲静, 徐晓静, 等. 神经干细胞迁移的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(3): 201-211.
[13] LI M, Hale J S, Rich J N, et al. Chemokine CXCL12 in neurodegenerative diseases; an SOS signal for stem cell-based repair [J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(10): 619-628.
[14] CUI C, WANG P, CUI N, et al. Sulfated polysaccharide isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus* promotes the SDF-1 α /CXCR4 axis-induced NSC migration via the PI3K/Akt/FOXO3a, ERK/MAPK, and NF- κ B signaling pathways [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 616: 57-64.
[15] LIU J, WEI Y, CHEN Y, et al. Differentiation of neural stem cells influences their chemotactic responses to vascular endothelial growth factor [J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(8): 1173-1184.

[责任编辑 周冰冰]