

脑络欣通和左归丸药物血清对体外培养的大鼠神经干细胞增殖分化的作用

唐 巍¹ 王 健¹ 王又闻² 倪朝民³ 陈业农¹ 唐照亮¹
管叶明¹ 俞丽华¹ 李晓民⁴ 胡建鹏¹

摘要 目的 探讨脑络欣通药物血清和左归丸药物血清对体外培养的大鼠胚胎神经干细胞 (neural stem cell, NSC) 增殖分化的作用。**方法** 分别采用含 10% 脑络欣通药物血清和含 10% 左归丸药物血清的培养基培养大鼠胚胎 NSC, 观察其促增殖效应和诱导分化效应, 应用相差显微镜和免疫荧光染色对其进行比较观察。**结果** 脑络欣通药物血清和左归丸药物血清均可诱导绝大多数 NSC 分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。此外, 两者还能在一定程度上促进培养的 NSC 生长。前者诱导 NSC 分化的进程虽比后者要慢, 但诱导 NSC 向神经元方向分化的比率较高, 其分化的神经元在细胞形态学上与发育成熟的神经元更为接近; 后者促进 NSC 生长的效应较为显著。**结论** 脑络欣通和左归丸均能促进体外培养的 NSC 生长和分化, 两者作用有一定差异; 益气活血治法和补肾生髓治法对 NSC 进行诱导分化具有一定的可行性。

关键词 神经干细胞; 药物血清; 增殖; 脑络欣通; 左归丸

Effects of Drug-contained Sera of Naoluo Xintong and Zuogui Pill on the Proliferation and Differentiation of *In vitro* Cultured Neural Stem Cells in Rats TANG Wei, WANG Jian, WANG You-wen, et al *Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei (230038)*

ABSTRACT Objective To investigate the effects of drug-contained sera (DCS) of Naoluo Xintong (NLXT) and Zuogui Pill (ZGP) on the proliferation and differentiation of *in vitro* cultured embryonic neural stem cells (NSCs) in rats. **Methods** Rat's embryonic NSCs were cultured in medium supplemented with 10% DCS with NLXT and ZGP separately, the effects of DCS in enhancing proliferation and inducing differentiation were observed and compared by phase contrast microscopy and immunofluorescence staining. **Results** Majority of NSCs were induced to neurons, astrocytes or oligodendrocytes in medium supplemented with either DCS-NLXT or DCS-ZGP, with the growth of them promoted to some extent. However, DCS-NLXT induced the differentiation rather slowly but with the differentiated neurons more resemble to the mature neuron in morphology, while DCS-ZGP promoted the stem cell growth more effectively. **Conclusion** Both NLXT and ZGP could promote the differentiation and growth of *in vitro* cultured NSCs, but with exiguous difference. It is feasible to induce the proliferation and differentiation of NSCs by way of using Chinese medicine drug-therapy for supplementing qi and activating blood circulation as well as that for tonifying Shen to generate marrow.

KEYWORDS neural stem cells; drug contained serum; proliferation; Naoluo Xintong; Zuogui Pill

依据中医脑髓理论和气血相关理论, 肾精、气血对脑髓的生成、充满、化生起至关重要的作用。神经干细

胞 (neural stem cell, NSC) 的增殖、分化是胚胎发育期及其后成体神经细胞形成的源泉, 与脑髓有一定的相关性。益气活血治法和补肾生髓治法可以加强肾精、气血对脑髓的化生作用, 其对 NSC 的增殖与分化有无影响? 作用有无差异? 我们既往的研究结果表明, 具有益气活血功效的中药复方脑络欣通可以促进缺血性脑卒中神经功能恢复⁽¹⁾, 是否可能通过影响 NSC 的增殖分化从而发挥修复作用? 目前尚不清楚。为此, 本课题用细胞培养和血清药理学的方法, 比较观察了中药复方脑络欣通药物血清和左归丸药物血清对体外培

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30672592, No. 30873293); 安徽省自然科学基金项目 (No. 050430904, No. 070413125); 安徽省教育厅自然科学基金项目 (No. 2006KJ382B)

作者单位: 1. 安徽中医学院 (合肥 230038); 2. 上海中医药大学; 3. 安徽医科大学附省属立医院; 4. 安徽省淮北市人民医院

通讯作者: 王 健, Tel: 0551 - 5169179, E-mail: wangjian6301@163.com

养的大鼠胚胎 NSC 生长和分化的影响,探讨具有益气活血功效的中药复方脑络欣通和具有补肾生髓功效的左归丸对培养的 NSC 进行诱导分化的可行性,为中医药干预中枢神经系统(central nervous system, CNS)的再生和功能重建研究提供理论基础。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 孕 14 天的 Wistar 大鼠 2 只,清洁级,由中国科学技术大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠 20 只,清洁级,体质量 280~350 g,由河南省实验动物中心提供,合格证号:4104035。

1.2 主要试剂 细胞培养基 DMEM/F12(1:1)、胎牛血清(Hyclone);重组人碱性成纤维细胞生长因子(recombinant human basic fibroblast growth factor, rhbFGF)、重组人表皮生长因子(recombinant human epidermal growth factor, rhEGF)(Chemicon);无血清培养添加剂 B27(Gibco);5-溴脱氧尿苷嘧啶(5-Bromodeoxyuridine, BrdU)及小鼠抗 BrdU 单克隆抗体(Sigma);兔抗胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多克隆抗体(武汉博士德);小鼠抗巢蛋白(nestin)、抗微管相关蛋白(microtubule-associated protein, MAP-2)、抗半乳糖脑苷脂(galactocerebroside, Gal-C)单克隆抗体、Cy3 标记的羊抗鼠 IgG(Cy3-conjugated goat anti-mouse IgG)、FITC 标记的羊抗兔 IgG(FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG, Chemicon)。

2 方法

2.1 药物血清制备 大鼠用药剂量按成人临床日用量与体重折算系数比,计算出相当于中剂量的用药量,脑络欣通为 8.54 g/(kg·d),左归丸为 2.1 g/(kg·d)。脑络欣通中药汤剂(主要由黄芪 30 g 川芎 10 g 三七 4 g 蜈蚣 2 条等组成)由安徽中医学院中药制剂室制备,相当于原生药 5 g/mL;左归丸(由熟地、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、菟丝子、鹿角胶、龟板胶等组成)为河南省宛西制药股份有限公司生产,加 ddH₂O 配制成全含左归丸 0.2 g/mL 的混悬液。用时将制剂按一定标准(大鼠每次灌服中药量:1 mL/200 g 体重)稀释。1 日剂量于固定时间每天灌胃 2 次,每次间隔 4 h;给药时间为 3 天,第 3 天采血前禁食 12 h,于第 2 次给药 2 h 后麻醉,无菌条件下腹主动脉取血,分离血清。56 ℃ 灭活 30 min,220 nm 滤膜滤过除菌,-20 ℃ 保存备用。另设对照组取空白血清,予等量生理盐水灌胃,余方法同上。

2.2 NSC 的分离、培养和鉴定 方法采用唐巍的方法^[2]。

2.3 分组 实验按培养基中所含血清成分的不同共分 3 组,各组培养基均为含 10% 终浓度大鼠不同血清成分的 DMEM/F12 基础培养基(不含 B27、rhEGF 和 rhbFGF),3 组分别为空白血清对照组,培养基中含 10% 空白血清;脑络欣通组,培养基中含 10% 脑络欣通药物血清;左归丸组,培养基中含 10% 左归丸药物血清。

2.4 NSC 增殖及生长状态观察 离心收集传代培养 8 代的 NSC,吸管机械吹打,分离制备单细胞悬液,显微镜下计数。将细胞接种于 12 孔培养板,接种密度为 2×10^5 个/mL,培养基分别为上述 3 组含 10% 不同血清成分的培养基,每 4 孔为同一血清成分培养液。培养第 5 天,在相差显微镜下观察已贴壁的 NSC 球生长状态,每孔随机取 10 个视野摄片,用 SPOT 软件测量 NSC 球自球体中心发出细胞突起的长度,取平均值。培养 7 天后,拟分孔收集呈球形悬浮生长的细胞,再次机械分离制备单细胞悬液,显微镜下细胞计数。实验重复 3 次。

2.5 NSC 诱导分化观察 离心收集传代培养 8 代呈球形悬浮生长的 NSC,吸管机械吹打分离成约含 10 数个细胞的干细胞小球,分别接种于预先铺有多聚赖氨酸盖玻片的 12 孔培养板,培养基分别为上述 3 组含 10% 不同血清成分的培养基,每 4 孔为同一血清成分培养液,诱导 NSC 分化。实验重复 3 次。

2.6 免疫荧光染色 细胞贴壁培养 7 天后,取各组盖玻片上的细胞,经磷酸盐缓冲液(PBS)洗后,4% 多聚甲醛固定 30 min,后接常规免疫荧光染色步骤。一抗分别为抗 MAP-2(1:500)、抗 GFAP(1:100)抗体,空白对照用 PBS 代替一抗;每一玻片在 IX71 荧光显微镜(OLYMPUS 公司)下取相互不重叠的 10 个随机视野,计算分化后 MAP-2、GFAP 阳性细胞在总细胞中所占的比例。阳性细胞率(%)计算:阳性率 = 阳性细胞/(阳性细胞 + 阴性细胞) - 对照组中的非特异结合率。

3 统计学方法 数据统计采用 SPSS 12.0 软件,进行单因素方差分析,两两间均值比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。

结 果

1 NSC 的鉴定 在上述条件下,从胎鼠大脑皮质及皮质下分离的组织,经原代和传代培养形成细胞克隆、细胞增殖,表达神经上皮干细胞蛋白(巢蛋白)抗

原和增殖细胞抗原;在血清诱导下,分化后的细胞表达 3 种神经细胞(神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞)的特异性抗原,以上提示所培养的细胞为 NSC^[2]。

2 各组 NSC 增殖及生长状态观察 在相差显微镜下,细胞接种于 12 孔培养板后,最初 2 天内,各组细胞形成了数量不等、大小不一的悬浮的细胞团,空白血清组细胞死亡较多,两药物血清组看不出明显差异,死亡细胞尚少。有少量细胞球贴壁,无明显突起,各组 nestin 抗体免疫荧光染色均呈阳性(图 1)。第 3 天开始,各组大部分细胞呈球形并开始贴壁,呈辐射状发出众多细小的突起, nestin 抗体免疫荧光染色仍呈阳性(图 2)。3 组开始贴壁时间比较,以左归丸组贴壁最早,且贴壁细胞球最多,也最先出现大量细胞从细胞球向周围迁移并发出突起的现象;空白血清组和脑络欣通组贴壁时间基本同步,略迟于左归丸组,但脑络欣通组贴壁细胞球较空白血清组多。另外,3 组均有少部分细胞仍呈集落样悬浮生长,两药物血清组悬浮细胞球数量多于空白血清组。随后几天,各组均镜下可见细胞球体中心为密集排列的圆形细胞,从细胞球向周围迁移出来的大量辐射状的细胞突起并逐渐延长,相邻干细胞球之间的突起相互连接,构成细胞网络(图 3)。空白血清组细胞贴壁不牢,突起较少,生长较缓慢;两药物血清组突起较多,生长较迅速。各组突起长度不等,以左归丸组最长,脑络欣通组次之,空白血清组最短(图 4~6)。各组细胞球突起长度测量比较结果差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。但由于各组陆续还有 NSC 球贴壁,悬浮生长的 NSC 球较前并未见明显增多。到第 7 天,各组大部分 NSC 球已贴壁,空白血清组悬浮的 NSC 球极少且细胞球发暗、崩解,两药物血清组悬浮的 NSC 球数目较前几天亦明显减少,只是脑络欣通组悬浮的 NSC 球体较小,左归丸组球体相对偏大。因 3 组悬浮生长的 NSC 球数目较少,不再行显微镜下细胞计数比较。两药物血清组干细胞迁移的距离和发出突起的长度已看不出明显差异。同时,3 组均可见一些细胞呈明显的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的形态,一般分布在细胞网络的边缘。

表 1 NSC 培养 5 天时各组细胞球突起平均长度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞球突起平均长度(μm)
空白血清	10	71.30 \pm 6.04
脑络欣通	10	116.40 \pm 8.95 [*]
左归丸	10	138.80 \pm 6.83 ^{*Δ}

注:与空白血清组比较,^{*} $P < 0.01$;与脑络欣通组比较, ^{Δ} $P < 0.01$

3 各组 NSC 诱导分化观察 细胞接种于预先铺有多聚赖氨酸盖玻片的 12 孔培养板后,各组贴壁分化趋势较未铺盖玻片者明显。药物血清组在细胞接种后

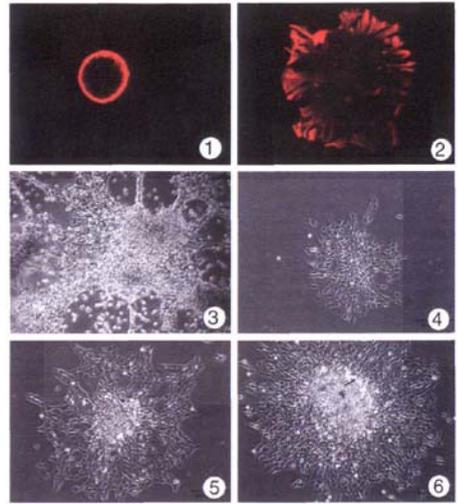


图 1 第 2 天,NSC 球无突起, nestin 抗体免疫荧光染色阳性(Cy3, 20 \times 10) 图 2 第 3 天,NSC 球向周围发出较短突起, nestin 抗体免疫荧光染色阳性(Cy3, 20 \times 10) 图 3 第 5 天,从细胞球向周围迁移出大量辐射状细胞突起,相邻干细胞球之间的突起相互连接,构成细胞网络(相差显微镜, 20 \times 10) 图 4 空白血清组,第 5 天,NSC 贴壁生长状态,突起较少较短(相差显微镜, 20 \times 10) 图 5 脑络欣通组,第 5 天,NSC 贴壁生长状态,突起较多较长(相差显微镜, 20 \times 10) 图 6 左归丸组,第 5 天,NSC 贴壁生长状态,突起更多更长(相差显微镜, 20 \times 10)

24 h 内逐渐贴壁,部分细胞长出突起,长达数微米,以左归丸组贴壁和发出突起的时间为早;24 h 后贴壁细胞数增加,突起增多增长,左归丸组诱导 NSC 分化的进程比脑络欣通组要快;空白血清组细胞生长相对较慢,突起长度小于药物组。3 天后突起分支进一步增多增长,相互连接成网状;到贴壁 7 天,各组均可见到 3 种神经细胞形态:两种神经元样细胞,或为多极神经元样细胞,胞核呈圆形或椭圆形,具有多个树突和明显的轴突,轴突较长,可见分支;或为双极样细胞,两极呈细长突起;星形胶质细胞样细胞,胞体大而扁平,形状不规则,胞核较大,具有多个粗、长突起,常紧贴底部;少突胶质细胞样细胞,细胞胞体体积较小,突起较少、有分枝,一般分布在细胞球的周边。其中,空白血清组可见为数不多的星形胶质细胞样细胞和神经元样细胞;左归丸组可见明显的神经元样细胞,细胞突起较少,星形胶质细胞样细胞数量较多;脑络欣通组多极神经元样细胞更为多见,细胞突起长度较左归丸组为长,星形胶质细胞样细胞数量亦较多。

4 各组免疫荧光染色结果 贴壁 7 天后,经免疫

荧光染色,各组均可见 MAP-2、GFAP、Gal-C 阳性细胞,提示浓度为 10% 的大鼠血清诱导,NSC 分别分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,且上述 3 种神经细胞的形态与相差显微镜下观察的结果基本一致。

各组 NSC 分化为 MAP-2 (代表神经元细胞)、GFAP (代表星形胶质细胞) 细胞率比较 (表 2); 空白血清组诱导分化的 MAP-2、GFAP 阳性细胞率低于两药物血清组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 脑络欣通组较左归丸组 MAP-2 阳性细胞率高 ($P < 0.05$), 提示 NSC 向神经细胞方向分化的比率更高,可见细胞数目明显增多,且形态较典型,突起较长,具有二、三级以上的细小分支,发育普遍较为成熟; 两药物血清组 GFAP 阳性细胞率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示两组分化成星形胶质细胞的比例一致。

表 2 各组 NSC 分化为 MAP-2、GFAP 阳性细胞率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	MAP-2 阳性细胞率	GFAP 阳性细胞率
空白血清	10	19.54 ± 2.20	28.67 ± 3.85
脑络欣通	10	39.77 ± 3.44*	47.41 ± 4.29*
左归丸	10	35.45 ± 3.46* ^Δ	51.56 ± 5.52*

注:与空白血清组比较,* $P < 0.01$;与脑络欣通组比较,^Δ $P < 0.05$

讨 论

1 神经干细胞的增殖分化 自我更新和多向分化潜能是 NSC 的两个基本属性^[3]。大量离体和在本实验结果表明,成年哺乳动物脑中存在 NSC,既能够自我分裂增殖,又可在多种外界环境因素诱导下分化成神经细胞和神经胶质细胞^[4],这些特性使其对缺血性脑卒中等疾病导致的神经功能损伤或丧失可能具有代偿和修复作用。因此,深入了解 NSC 增殖分化的确切机制,并定向诱导其分化成所需类型的神经细胞,是目前 NSC 研究的新热点。但迄今为止,NSC 增殖、分化的机制仍不十分清楚,它与体内不同基因的顺序表达、各种因子的分泌和相互作用、各种因子与不同受体的结合、周围环境与细胞间相互作用、细胞与细胞间相互作用等都密切相关。

体外培养的 NSC 必须在丝裂原 (mitogen) 刺激下才能维持干细胞的特性,据 NSC 对丝裂原反应性的不同,可分为表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 反应性神经干细胞和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 反应性神经干细胞。将丝裂原从培养液中撤除后,NSC 即开始进入分化阶段。EGF 对培养的 NSC 有明显的刺激增殖作用,可以促进神经存活和突起生长,其子代细胞可向神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞分化。EGF 敏感的

NSC 生成神经元非常少 (< 1%), 绝大多数是星形胶质细胞^[5]。成纤维细胞生长因子 (FGF) 能使神经元比例增加,但随着培养时间延长和传代次数增多,神经元的比例逐渐下降^[6]。

NSC 的诱导分化更为复杂,在不同因子、不同环境条件下其分化方向不同。有资料表明,FGF^[7], 脑源性神经营养因子 (BDNF)^[8]、睫状神经营养因子 (CNTF)^[6]、神经营养素-3 (NT-3)^[9]、骨形成蛋白 (BMP)^[10]、细胞黏附分子 (CAM) 和细胞外基质 (ECM)^[11,12] 等均能影响 NSC 的增殖与分化。还有某些未知因子,如一些存在于细胞条件培养液中的因子^[13],对其可能的作用目前尚知之甚少。

2 不同治法药物血清对神经干细胞增殖、生长、分化的影响 依据中医脑髓理论和气血相关理论,肾精对脑髓的生成和充满起至关重要的作用,气血是化生脑髓的重要源泉。NSC 与脑髓有一定的相关性,其增殖并向神经元或胶质细胞分化是胚胎发育期及其后成体神经细胞形成的源泉,因而是维持脑髓正常功能和结构的重要组成单位。益气活血治法和补肾生髓治法可以加强肾精、气血对脑髓的化生作用,本课题即是探讨上述两种中医治法对培养的 NSC 促增殖和进行诱导分化的可行性。其对 NSC 的增殖与分化有无影响? 本课题采用细胞培养和中药血清药理学的方法,利用分离培养的大鼠胚胎 NSC,在培养基中分别加入一定量的脑络欣通药物血清和左归丸药物血清,观察其对 NSC 增殖分化的影响,探讨益气活血治法和补肾生髓治法对培养的 NSC 促增殖和进行诱导分化的可行性。

本实验用 EGF、bFGF 作为有丝分裂原培养大鼠胚胎 NSC,在去除丝裂原加入药物血清后,NSC 并没有马上转入分化状态,而是保持了增殖倾向,由分散的单细胞增殖为大小不等的 NSC 球,两药物血清组无明显差异。这可能与脑络欣通药物血清和左归丸药物血清里均含有一定量的某种促 NSC 增殖的生长因子,从而作为一定的信号刺激,促使 NSC 增殖有关。只是,在本实验中,由于在培养基中添加的血清浓度较高 (终浓度为 10%), 而血清本身对 NSC 即有一定的促分化作用,妨碍了对 NSC 增殖现象的进一步观察。有关中药复方脑络欣通和左归丸对 NSC 的增殖作用的影响,尚需结合动物的体内实验加以证实,这也是我们下一步所要研究探讨的内容。同时,本实验观察到,药物血清成分的不同,促 NSC 生长的作用有一定的差异,以左归丸药物血清促进 NSC 生长的效应较为显著。

另外,经培养基中加入不同的血清诱导,干细胞向

星形胶质细胞和神经元方向分化的比率存在明显的差异。空白血清组诱导分化的星形胶质细胞和神经元的比率均较低;药物血清组诱导分化的星形胶质细胞和神经元比率较高,脑络欣通组较左归丸组 NSC 向神经细胞方向分化的比率更大,且形态较典型,突起较长,具有二、三级以上的细小分支,发育较为成熟。

上述结果表明,一方面,脑络欣通药物血清和左归丸药物血清均能够促进 NSC 生长、诱导 NSC 分化。那么,药物血清里是否含有对 NSC 的增殖、分化有重要作用的已知细胞因子或未知因子?是何种单一因子或是多种因子联合作用?又是通过何种单一信号效应或几种信号综合作用?对此本研究虽没有进行相关观察,但对此值得进行更进一步的探讨。另一方面,不同成分的药物血清对 NSC 的增殖、分化作用各异:脑络欣通药物血清促 NSC 分化成神经元的作用明显,且使其分化的神经元更加成熟,说明脑络欣通药物血清营造的微环境更适宜诱导 NSC 向神经细胞分化,且分化表型上更加成熟。左归丸药物血清促 NSC 生长的效应较为显著,说明左归丸药物血清营造的微环境更适宜促进 NSC 生长。两药物组作用的差异是否与不同的药物血清里所含有效成分不同有关?可能是哪一种或哪几种药物血清的成分在起主要作用?这些问题都有待于下一步探讨。但综合以上实验结果,至少说明了益气活血治法和补肾生髓治法对体外培养的 NSC 具有促进其生长和诱导其分化的可行性。

中医药疗法在缺血性脑损伤后的神经元保护和修复方面显示了一定作用,缺血性脑卒中后,中药复方能促进 NSC 的增殖分化,以达到神经功能恢复或重建,目前对此研究尚少。且目前对本病的整体水平研究较多,从离体细胞层次上研究很少,而从 NSC 角度报道更少。应用体外培养的细胞进行研究具有干扰因素少,处理因素易于控制等特点,NSC 的体外分离、培养成功,为进行此类研究提供了良好的细胞模型。另外,本研究还采用了中药血清药理学研究方法,即是指动物灌胃给予中药及制剂,经吸收进入机体血液循环,在一定时间内采取血液,分离所得血清(必定含有一定量的该药物成分,此时的血药浓度反映了机体的真实血药浓度),以此血清加入到体外细胞培养体系,观察其药理作用的体外实验方法^[14],这是中药复方研究的重要方法之一,解决了中药复方粗制剂直接应用于离体实验的困难,为中药药理学研究提供了一条新的途径。虽然血清药理学方法仍处在探索阶段,离体实验的结果也远不能拟合在体 NSC 的发育分化实际,但在复杂的体内多因素影响尚未明了之前,对体外单一

影响因素的认识是 NSC 分化研究早期阶段所必须经历的过程。结合了细胞培养技术和中药血清药理学研究方法进行的本项研究,即是对中药复方干预离体培养的 NSC 增殖分化特性研究的一种初步尝试。但其中可能涉及到最佳血药浓度、有效作用物质含量、血清本身的促诱导分化作用等一系列复杂问题,值得今后进一步思考和探索。

综上,本研究初步观察了具有不同功效的中药复方制剂脑络欣通和左归丸药物血清促进体外培养的 NSC 生长分化的作用,以及两种药物血清作用的差异,今后的研究还有必要从功能上验证分化的神经细胞的成熟程度,如电生理活动和合成神经递质的能力等,进一步分析测定血清中药物成分的含量,并试图从药物血清中进一步分离和纯化诱导干细胞分化和发育成熟的物质,使中药药效与中药成分的研究更能协调一致,为今后应用益气活血治法和补肾生髓治法定向诱导 NSC 分化治疗缺血性脑卒中等疾病提供实验依据,为中医药干预缺血性脑损伤后 CNS 的再生和功能重建研究奠定一定的理论基础。

(本课题在中国科学技术大学生命科学学院神经退行性疾病实验室、安徽省针灸基础与技术重点实验室培育基地、安徽省中药研究与开发重点实验室、国家中医药管理局中药药科研二级实验室——细胞和分子生物学(脑病)实验室、神经生物学(针灸)实验室完成,特此致谢)

参 考 文 献

- [1] 王键,许冠荪,李玉梅,等. 脑络通对脑缺血损伤防治作用的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(2):26-28.
Wang J, Xu GS, Li YM, et al. Experimental study on effect of Naoluo Tong in prevention and treatment of cerebral ischemic injury[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med, 2001, 7(2):26-28.
- [2] 唐巍,王键,胡建鹏,等. 大鼠胚胎脑源性神经干细胞的分离培养和鉴定[J]. 中国临床康复, 2006, 10(11):36-38.
Tang W, Wang J, Hu JP, et al. Isolation, culture and identification of brain-derived neural stem cells from rat's embryos[J]. J Clin Rehabil Tissue Engineering Res, 2006, 10(11):36-38.
- [3] Kirschenbaum B, Nedergaard M, Preuss A, et al. In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain[J]. Cereb Cortex, 1994, 4(6):576-589.
- [4] Snyder EY, Yoon C, Flax JD, et al. Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse-neocortex[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(21):11663-11668.

- [5] Carpenter MK, Cui X, Hu ZY, et al. *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells [J]. *Exp Neurol*, 1999, 158(2):265-278.
- [6] Johe KK, Hazel TC, Muller T, et al. Single factor direct the differentiation of stem cell from the fetal and adult central nervous system[J]. *Genes Dev*, 1996, 10(24):3129-3140.
- [7] Otto D, Frotscher M, Unsicker K. Basic fibroblast growth factor and nerve growth factor administered in gel foam rescue medial septal neurons after fimbria fornix transection [J]. *J Neurosci Res*, 1989, 22(1):83-91.
- [8] Shimazaki T, Arsenijevic Y, Ryan AK, et al. A role for the POU-III transcription factor Brn-4 in the regulation of striatal neuron precursor differentiation [J]. *EMBO J*, 1999, 18(2):444-456.
- [9] Ghosh A, Greenberg ME. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis [J]. *Neuron*, 1995, 15(1):89-103.
- [10] Bartlett PF, Brooker GJ, Faux CH, et al. Regulation of neural stem cell differentiation in the forebrain[J]. *Immunol Cell Biol*, 1998, 76(5):414-418.
- [11] Martini R, Schachner M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve [J]. *J Cell Biol*, 1988, 106(5):1735-1746.
- [12] Bunge MB, Bunge RP, Kleiman N. Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cells function and in neurite regeneration[J]. *Dev Neurosci*, 1989, 11(4-5):348-360.
- [13] Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, et al. Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum[J]. *Exp Neurol*, 1997, 145(2):342-360.
- [14] 张永祥主编. 中药药理学新论[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:96-97.
- Zhang YX, ed. *New theory of Chinese medicine pharmacology*[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004:96-97.

(收稿:2008-11-26 修回:2009-11-19)

第一次全国中西医结合男科学青年学术会议征文通知

为了促进我国中西医结合男科学的发展,总结并交流学术经验和近年来所取得的临床与科研成果,为中青年男科工作者搭建交流的平台,中国中西医结合学会男科专业委员会拟于2010年5月在成都召开第一次全国中西医结合男科学青年学术会议。现将会议征文有关事项通知如下。

1 征文内容 (1) 历代男科文献的继承、发掘与整理。(2) 中西医结合、中医男科研究的新思路、新方法、新技术。(3) 中医男科辨证规律、治则与治法的研究。(4) 中药单方、复方的基础研究与应用。(5) 中药新药治疗男科疾病临床试验与开发。(6) 精液的处理与辅助生殖技术的研究。(7) 前列腺疾病、男性不育症、勃起功能障碍(阳痿)、早泄、阴茎异常勃起、性传播疾病等男科疾病的中西医实验与临床研究。(8) 新仪器与新方法在诊治男科疾病中的应用。(9) 男科疾病的康复与保健。

2 征文要求 (1) 来稿应为800~1000字的论文摘要,包括研究目的、方法、结果和结论等内容,请勿写成过于简短的“内容提要”形式,不要附图、表。(2) 摘要按“论文题目、作者单位、邮编、姓名、正文”的顺序排列,并注明联系地址、电话。(3) 本次会议全部采用网上投稿,论文请用word格式排版,作为附件E-mail发至:qnnkfirst@126.com;主题注明为“男科学征文”。(4) 征文截稿日期:2010年3月31日(以邮件发送时间为准)。(5) 录取论文的第一作者,将发给参加会议通知。

3 联系方式 通讯地址:成都中医药大学附属医院男科(邮编:610072),联系人:吴天浪,常德贵;联系电话:吴天浪:13881861503,高坪:13880400116。