

三种补肾中药有效成分对 AD 小鼠胚胎神经干细胞自我更新及神经元样分化作用研究

张玉莲¹ 张琳琳¹ 宋宛珊² 韩文文¹ 黄建华³ 周震¹

摘要 **目的** 观察三种补肾中药补骨脂、女贞子、何首乌各自有效成分补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷对 $A\beta_{25-35}$ 介导的神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 自我更新及向神经元方向分化的调控作用。**方法** 取孕 14 天昆明小鼠体外分离、培养其胚胎神经干细胞, 并随机分为对照组、 $A\beta_{25-35}$ 组、 $A\beta_{25-35}$ + 补骨脂素组、 $A\beta_{25-35}$ + 齐墩果酸组、 $A\beta_{25-35}$ + 二苯乙烯苷组, 其中 $A\beta_{25-35}$ 干预浓度为 $25 \mu\text{mol/L}$, 中药有效成分的干预浓度均为 10^{-7}mol/L , 通过 NSCs 计数法观察 NSCs 增殖能力; 采用 Western blot 及免疫荧光法观察神经元标志物 Tubulin 蛋白表达。计算 Tubulin⁺/DAPI 比值。**结果** 与对照组比较, $A\beta_{25-35}$ 组 NSCs 球的形态破坏, NSCs 计数、Tubulin 蛋白表达及 Tubulin⁺/DAPI 均降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, 3 个给药组 NSCs 计数、Tubulin 蛋白表达及 Tubulin⁺/DAPI 均升高 ($P < 0.01, P < 0.05$)。**结论** $25 \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 可抑制 NSCs 自我更新及神经元样分化, 而补骨脂素、二苯乙烯苷及齐墩果酸能促进 NSCs 的自我更新, 并能促进其向神经元方向分化。

关键词 补肾中药有效成分; β 淀粉样蛋白; 神经干细胞; 神经元; 调控作用

Effective Components of Three Kinds of Shen-supplementing Chinese Medicine on Self-renewal and Neuron-like Differentiation of NSCs in AD Mouse Embryos: an Experimental Research
ZHANG Yu-lian¹, ZHANG Lin-lin¹, SONG Wan-shan², HAN Wen-wen¹, HUANG Jian-hua³, and ZHOU Zhen¹ 1 Department of Encephalopathy, Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin (300150), China; 2 Postgraduate School, Tianjin University of TCM, Tianjin (300193), China; 3 Institute of Integrative Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040), China

ABSTRACT **Objective** To observe the regulatory effects of psoralen, oleanolic acid, and stilbene glucoside, three active components of psoralea fruit, glossy privet fruit and tuber fleeceflower root respectively, on $A\beta_{25-35}$ induced self-renewal and neuron-like differentiation of neural stem cells (NSCs). **Methods** Embryonic NSCs were *in vitro* isolated and cultured from Kunming mice of 14-day pregnancy, and randomly divided into the control group, the $A\beta_{25-35}$ group, the $A\beta_{25-35}$ + psoralen group, the $A\beta_{25-35}$ + oleanolic acid group, and the $A\beta_{25-35}$ + stilbene glucoside group. The intervention concentration of $A\beta_{25-35}$ was $25 \mu\text{mol/L}$, and the intervention concentration of three active components of Chinese medicine was 10^{-7}mol/L . The effect of three active components of Chinese medicine on the proliferation of NSCs was observed by counting method. The protein expression of Tubulin was observed by Western blot and immunofluorescence. The ratio of Tubulin⁺/DAPI was calculated. **Results** Compared with the control group, the sperical morphology of NSCs was destroyed in the $A\beta_{25-35}$ group, the counting of NSCs, the expression of Tubulin protein, and the ratio of Tubulin⁺/DAPI all decreased ($P < 0.01, P < 0.05$). Compared with the $A\beta_{25-35}$ group, the counting of NSCs, the expression of Tubulin protein, and the ratio of Tubulin⁺/DAPI all increased in the three Chinese medicine treated groups ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusions** $25 \mu\text{mol/L}$

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2010CB530405);国家自然科学基金资助项目(No. 81202654)

作者单位:1.天津中医药大学第二附属医院脑病科(天津 300150);2.天津中医药大学研究生院(天津 300193);3.复旦大学华山医院中西医结合研究所(上海 200040)

通讯作者:周震, Tel:13110057681, E-mail:zhouzhen7681@126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 10. 1245

$A\beta_{25-35}$ could inhibit self-renewal and neuron-like differentiating of NSCs. But psoralen, oleanolic acid, and stilbene glucoside could promote self-renewal of NSCs and neuron-like differentiation.

KEYWORDS effective components of Shen-supplementing Chinese medicine; β -amyloid; neural stem cell; neuron; regulatory effect

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)近年来严重威胁着人类的生命健康^[1]。据中国国家防控中心(CDC)统计,2010年我国AD患病人数已超过800万,60岁以上的老年人群中,年龄每增加5岁,AD的患病危险可增加1.85倍^[2]。AD已成为21世纪威胁人类的最严重疾病之一,寻找一种有效减缓其发展的治疗方法具有重要意义。

AD的病理特征主要包括A β 聚集形成的老年斑(senile plaque, SP)及tauons(Tau)蛋白异常磷酸化形成的纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)最终导致神经元的减少^[3]。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)为中枢神经系统中的原始细胞,具有自我更新和多潜能分化的特性,可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[4]。其中神经元为脑的主要成分,也是大脑产生功能的根本物质基础^[5]。神经元的丢失是神经系统退行性病变的主要致病因素与最终结果^[6],适当促进NSCs自我更新并调控其向神经元方向分化,将成为减缓AD进展的潜在治疗方法。

本研究以孕14天昆明小鼠胚胎NSCs为研究对象,采用A β_{25-35} 干扰建立AD细胞模型,借助NCSs成球生长的特点及神经元标志蛋白Tubulin,观察3种补肾中药补骨脂、女贞子及何首乌各自有效成分补骨脂素、齐墩果酸与二苯乙烯苷对A β_{25-35} 介导的NSCs自我更新及神经元样分化的影响,并探讨其作用机制。

材料与方法

1 动物 SPF级孕14天昆明小鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2007-0005。饲养条件:12 h/12 h明暗交替,室温23℃,湿度:75%~85%。

2 药物 补骨脂素(纯度>99%,批号:101223)、齐墩果酸(纯度>99%,批号:090910)、二苯乙烯苷(纯度>99%,批号:109010)购于上海友思生物有限公司,3种补肾中药有效成分分别溶于DM-SO溶液中,配制成 10^{-2} mol/L的母液,用基础培养基稀释成所需浓度,最终浓度均为 10^{-7} mol/L。

3 试剂及仪器 A β_{25-35} 购自美国AnaSpac公司,参照文献[7]方法将5 mg A β_{25-35} 溶于1 888 μ L蒸馏水中,震荡混匀,过滤,配制成浓度为2.5 mmol/L

母液,用基础培养基分别将其稀释为250 μ mol/L, -20℃保存;DMEM/F12(批号:12660-012)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF,批号:PHG0314)、成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF,批号:PHG0024)、StemPro Neural添加剂(StemPro Neural supplement,批号:A10508-01)、胎牛血清(FBS,批号:10099-141)购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素双抗(批号:L0022-100)购自法国Biowest公司;Anti-Tubulin betalll isoform(批号:MAB1637)购自美国Millipore公司;HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L,批号:MR-M100)购自中国MRBiotech公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(批号:P0012A)购自碧云天生物技术有限公司。超净工作台(美国, Thermo Fisher Scientific), CO₂恒温培养箱(美国, Themro Scientific Forma),光学显微镜(日本, Olympus),荧光显微镜(日本, Nikon),Biotek aQuant型全自动酶标仪(上海坤肯生物化工有限公司)。

基础培养基:DMED/F12、1%双抗、2% StemPro Neural添加剂。完全培养基:DMED/F12、1%双抗、2% StemPro Neural添加剂、1% EGF、1% FGF。增殖培养基:DMED/F12、1%双抗、2% StemPro Neural添加剂、1% EGF、1% FGF。分化培养基:DMED/F12、1%双抗、2% StemPro Neural添加剂、1% FBS。

4 原代NSCs取材 小鼠2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,于75%乙醇中浸泡2~3 min,无菌条件下剥离胎鼠大脑皮质,用眼科剪将其剪碎,离心管中反复吹打静置,取上清,此操作重复2~3次。收集所有上清液1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入完全培养基,于37℃、5% CO₂饱和湿度条件下进行原代培养,3~4天收集NSCs进行传代,实验所用细胞为第3代细胞。

5 分组 将细胞随机分为对照组、A β_{25-35} 组、A β_{25-35} +补骨脂素组、A β_{25-35} +齐墩果酸组、A β_{25-35} +二苯乙烯苷组。

6 干预方法及检测指标

6.1 NSCs计数 选取传代培养第二代的NSCs,用增殖培养基调整细胞浓度,按96孔板每孔500细胞/100 μ L接种,于37℃,饱和湿度,5% CO₂条

件下培养,24 h 后加入 $A\beta_{25-35}$ ($25 \mu\text{mol/L}$)^[8], 每组 10 孔,3 h 后分别加入补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷^[9],4 天后利用倒置显微镜,每孔随机选择 3 个视野,以 $30 \mu\text{m}$ 为标准对每孔中的细胞克隆球数进行计数。

6.2 Tubulin 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。按每孔 2×10^4 细胞/2 mL 浓度接种于事先包被有 $10 \mu\text{g/mL}$ 多聚赖氨酸的 6 孔板中,24 h 后更换为分化培养基,分别加入 $A\beta_{25-35}$ 和 3 种补肾中药有效成分干预,4 天后收集细胞,依照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳,上样量为 $30 \mu\text{g}$ 。电泳条件:常温,恒压 80 V 电泳约 2.5 h。转膜条件:采用孔径为 0.22 mol/L 的硝酸纤维素膜 (NC),常温,电流 20 V,转膜 16 h。封闭 1 h,加一抗 Tubulin (1:1 000),孵育过夜,加二抗 (1:5 000) 2 h。利用超敏 ECL 化学发光试剂盒,借助荧光成像仪观察相关蛋白的表达,得到图像结果后应用 image J 软件计算各组相对丰度值。

6.3 Tubulin⁺ 细胞数检测 采用免疫荧光法。将收集的神经干细胞球按 1×10^5 个/mL 的细胞浓度接种于事前包被有多聚赖氨酸的 96 孔板中,每组 3 个孔, $100 \mu\text{L}$ /孔,完全培养,4 h 后换分化液,分别加入 $A\beta_{25-35}$ 和 3 种补肾中药有效成分干预,48 h 后做免疫荧光。每孔加入固定液固定 15 min,洗涤 $5 \text{ min} \times 2$ 次。加入封闭液封闭 60 min 后加入一抗 Tubulin (1:500),室温 1 h。加入二抗 (1:500),室温避光 1 h。加入 DAPI 染色液, $250 \mu\text{L}$ /孔,室温避光 10 min,洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次,吸干后,荧光显微镜下观察拍照,每孔选择 3 个视野,计数并计算 Tubulin⁺/DAPI 比值。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 NSCs 计数比较(图 1,表 1) 与对照组比较, $A\beta_{25-35}$ 组 NSCs 颜色较深,球体松散,透明度差,并且培养基中出现了类似细胞碎片的杂质,NSCs 计数明显减少($P < 0.05$)。与 $A\beta_{25-35}$ 组比较,三个给药组 NSCs 计数明显增加($P < 0.05$)。

2 各组 Tubulin 蛋白表达比较(图 2,表 2) 与对照组比较, $A\beta_{25-35}$ 组 Tubulin 蛋白表达降低($P < 0.05$)。与 $A\beta_{25-35}$ 组比较,三个给药组 Tubulin 蛋白表达升高($P < 0.05$)。

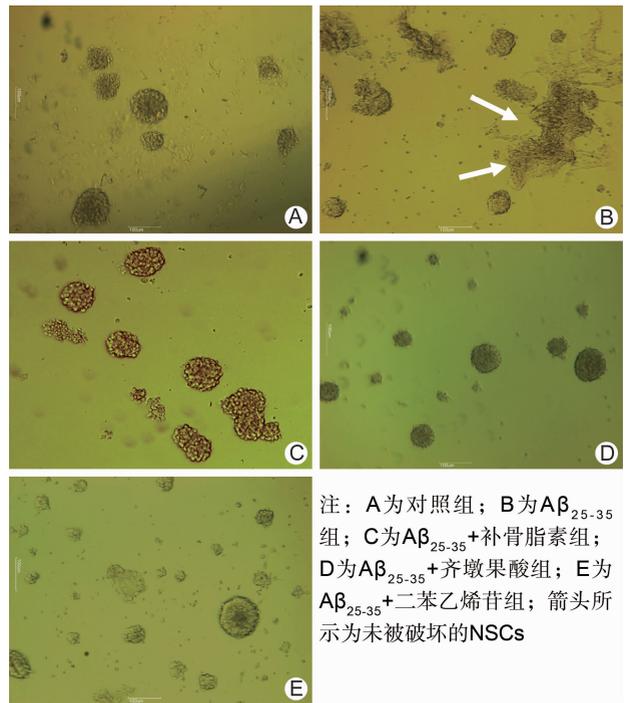
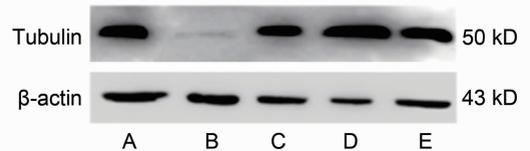


图 1 各组 NSCs 计数 (×400)

表 1 各组 NSCs 计数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	NSCs 计数
对照	3	73 ± 9 *
$A\beta_{25-35}$	3	23 ± 6
$A\beta_{25-35}$ + 补骨脂素	3	60 ± 4 *
$A\beta_{25-35}$ + 齐墩果酸	3	47 ± 5 *
$A\beta_{25-35}$ + 二苯乙烯苷	3	63 ± 5 *

注:与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, * $P < 0.05$



注:A 为对照组;B 为 $A\beta_{25-35}$ 组;C 为 $A\beta_{25-35}$ + 补骨脂素组;D 为 $A\beta_{25-35}$ + 齐墩果酸组;E 为 $A\beta_{25-35}$ + 二苯乙烯苷组

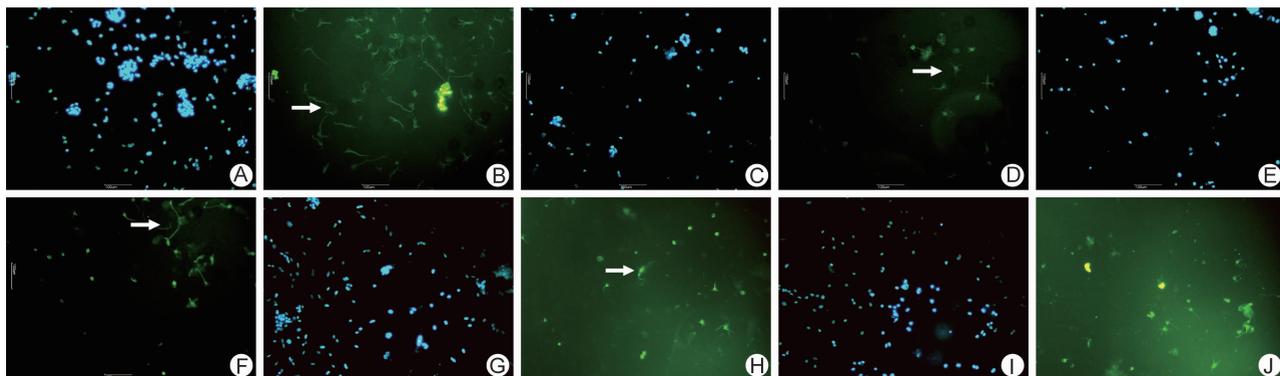
图 2 各组 Tubulin 蛋白表达

表 2 各组 Tubulin 蛋白表达比较 (相对灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Tubulin 蛋白表达
对照	3	1.50 ± 0.10 *
$A\beta_{25-35}$	3	0.34 ± 0.07
$A\beta_{25-35}$ + 齐墩果酸	3	1.80 ± 0.09 *
$A\beta_{25-35}$ + 二苯乙烯苷	3	4.80 ± 0.24 *
$A\beta_{25-35}$ + 补骨脂素	3	3.60 ± 0.20 *

注:与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, * $P < 0.05$

3 各组 Tubulin⁺/DAPI 比较(图 3) 与对照组比较, $A\beta_{25-35}$ 组 Tubulin⁺/DAPI 降低($P < 0.01$)。与 $A\beta_{25-35}$ 组比较,三个给药组 Tubulin⁺/DAPI 升高($P < 0.01$)。



注:蓝色为细胞核 DAPI 染色;绿色为 Tubulin 染色;A、B 为对照组;C、D 为 $A\beta_{25-35}$ 组;E、F 为 $A\beta_{25-35}$ + 补骨脂素组;G、H 为 $A\beta_{25-35}$ + 齐墩果酸组;I、J 为 $A\beta_{25-35}$ + 二苯乙烯苷组;箭头所示为 Tubulin⁺ 表达的神经

图 3 各组 Tubulin⁺ 细胞表达 (×400)

表 3 各组 Tubulin⁺/DAPI 比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Tubulin ⁺ /DAPI
对照	10	51 ± 4 *
$A\beta_{25-35}$	10	15 ± 4
$A\beta_{25-35}$ + 补骨脂素	10	40 ± 12 *
$A\beta_{25-35}$ + 齐墩果酸	10	23 ± 3 *
$A\beta_{25-35}$ + 二苯乙烯苷	10	37 ± 24 *

注:与 $A\beta_{25-35}$ 组比较, * $P < 0.01$

讨 论

AD 属中医学“痴呆”范畴,首见于明代《景岳全书》^[10]。《灵枢·海论》^[11]云:“脑为髓之海”,脑是精髓聚合之处。又云:“肾藏精”、“肾生髓通于脑”,因此只有肾气旺盛,肾精充足,才能生髓而上通于脑。一项流行病学调查分析表明,尽管心肝脾肺肾与 AD 的发病均有一定的关系,但心肾的功能失调更为明显,其中涉及肾的频次最高,占 87.76%^[12]。另一项可疑痴呆 (questionable dementia, QD) 的中医证候学调查发现,肾虚证所占比例高达 77.05%^[13]。可见肾虚精亏、髓海不足为 AD 形成的基本病机^[14],并贯穿该病的全过程^[15]。针对于此,在中医学“肾藏精”、“肾生髓通于脑”经典脏象理论的指导下,从肾虚浊毒入手,投入益肾化浊法方药治疗,切中病机。结合我院脑病中心近十年临床实际应用经验,以益肾化浊立法而组方治疗 AD,在临床上取得了满意疗效^[16]。

AD 的主要病理显示为神经的退行性变化,即神经元的不断缺失与补充不足,而神经干细胞的分化潜能可以补充 AD 所需的神经元,故有学者认为神经退行性的病变过程其实质是内源性神经再生失败的过程^[17]。Haughey N 等^[18]经研究发现,AD 的脑组织可以抑制来自大鼠 SVZ/CC 的 NSCs 和来自人胚的脑 NSCs 的增殖、分化,且诱导其凋亡。用 $A\beta$ 同样抑

制体外培养的 NSCs 增殖,分化,诱导凋亡^[19]。因此,内源性 NSCs 抑制与 AD 的病理过程有着密切关系。

以往国际上对 NSCs 的研究和应用大都着眼于移植和克隆。虽然克隆技术相对成熟,但克隆出的早期胚胎中,不仅胚胎干细胞数量少,同时还面临伦理与法律之争。而体外诱导多能干细胞植入存在排异反应,直接成为临床应用的瓶颈。目前越来越多的研究显示,中医药以其独有的特点可通过激活内源性神经干细胞而改善再生反应,为防治神经退行性病变另辟蹊径。现代研究显示:补骨脂可通过提高 NMDA 受体亚基 NR2B 的基因表达水平,改善痴呆大鼠的学习记忆^[20];女贞子能促进神经元细胞能量代谢和利用,激活内源性神经营养因子,促进神经元存活与再生^[21];何首乌主要成分二苯乙烯苷则可缩短学习记忆障碍模型小鼠在 Morris 水迷宫中的搜索时间和搜索距离,减少避暗的错误次数^[22],并能提高 D-gal 致衰大鼠海马内突触素的含量^[23]。

NSCs 体外培养为成球生长,NSCs 球的大小、多少能够反应其自我更新的能力。本实验中在体外培养的 NSCs 中加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$,所形成的球体颜色较深,透明度较差,细胞球体松散,并且培养基中出现了类似细胞碎片的杂质。随后通过神经干细胞球计数统计发现,25 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 能明显抑制神经干细胞球的形成,与对照组相比,差异显著,表明其抑制神经干细胞自我更新,具有一定的神经毒性。而加入补骨脂素、齐墩果酸与二苯乙烯苷均可以明显改善这一现象,以二苯乙烯苷效果最显著。同时通过对神经元标志蛋白 Tubulin 蛋白及 Tubulin⁺ 细胞数的检测发现,3 种补肾中药有效成分均可促进 NSCs 向神

经元方向分化。

本研究从 AD 主要发病机制出发,将调控 NSCs 自我更新及其向神经元分化为切入点,观察补肾中药有效成分的作用,为补肾中药防治 AD 的临床应用及作用机制提供了部分实验依据,但对其确切机制尚未做深入研究,NSCs 向神经元分化的过程会受到相关信号转导通路及转录因子的调控。神经元素 1 (Neurogenin1, Ngn1) 作为碱性 - 螺旋 - 环 - 螺旋基因 (proneuronal basic helix-loop-helix, bHLH) 家族成员之一,在 NSCs 分化过程中具有竞争性调控其向神经元分化的关键作用^[22],而补肾中药是否通过对 Ngn1 的靶向作用进一步调控 NSCs 分化,是我们下一步的主要研究工作。

参 考 文 献

- [1] Papon MA, Whittington RA, El-Khoury NB, et al. Alzheimer's disease and anesthesia [J]. *Front Neurosci*, 2011, 31(4): 272.
- [2] Cummings JL, Ringman J, Metz K, et al. Mary S. Easton Center of Alzheimer's Disease Research at UCLA: advancing the therapeutic imperative [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2010, 19(2): 375-388.
- [3] Querfurth HW, La Ferla FM. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2010, 36(2): 329-344.
- [4] Simón AM, Frechilla D, del Río J. Perspectives on the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease [J]. *Rev Neurol*, 2010, 50(11): 667-675.
- [5] Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(R1): R4-R11.
- [6] Wang JM, Sun CY. Calcium and neurogenesis in Alzheimer's disease [J]. *Neuroscience*, 2010, 2(4): 194.
- [7] López-Toledano MA, Shelanski ML. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(23): 5439-5444.
- [8] 韩文文,张玉莲,周震,等. 二苯乙烯苷对 A β_{25-35} 致神经干细胞损伤的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11): 160-163.
- [9] 张琳琳,周震,黄建华,等. 5 种补肾中药单体对不同浓度 A β_{25-35} 介导的 NSCs 增殖分化作用研究 [A]. 中国细胞生物学会干细胞分会 2011 年会论文集 [D]. 北京: 中国社会科学出版社, 2011.
- [10] 张介宾著,李继明,王大淳,等整理. 中医临床必读丛书—景岳全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 43.
- [11] 郭嵩春主编. 黄帝内经灵枢校注语译 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 27.
- [12] 杨柏灿,林水森,刘仁人,等. Alzheimer 痴呆的中医病因病机探析 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 1999, 5(1): 51.
- [13] 田金洲,杨承芝,盛彤,等. 可疑痴呆人群中阿尔茨海默氏病临床前的认识损害特征及其与中医证候的关系 [J]. *湖北中医学院学报*, 1999, 1(4): 49-54.
- [14] 郭振球. 老年期痴呆的证治学研究 [J]. *中医药研究*, 1991, 8(1): 16.
- [15] 傅仁杰,罗社文. 中医药治疗老年性呆病的临床研究述评 [J]. *北京中医药大学学报*, 1994, 17(3): 2.
- [16] 傅凯丽,林翠茹,张玉莲,等. “益肾化浊方”治疗轻度阿尔茨海默病 15 例临床研究 [J]. *江苏中医药*, 2012, 44(8): 28-29.
- [17] Gendreau KL, Hall GF. Tangles, toxicity, and tau secretion in AD - new approaches to a vexing problems [J]. *Front Neurol*, 2013, 21(4): 160.
- [18] Haughey N, Liu D, Nath A, et al. Disruption of neurogenesis in the sub-ventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Neuromolec Med*, 2002, 1(2): 125-135.
- [19] Haughey NJ, Nath A, Chan SL, et al. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease [J]. *Neurochemistry*, 2002, 83(6): 1509-1524.
- [20] 郑里翔,邓科穗,乔玉丹,等. 补骨脂汤对血管性痴呆大鼠海马内雌激素受体- β 、NMDAR2B 基因表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(9): 1496-1498.
- [21] 卢晓沅,陈志良,王春霞. 女贞子化学成分及其药理作用研究概况 [J]. *中药材*, 2006, 6(10): 15-18.
- [22] 叶翠飞,魏海峰,张丽,等. 二苯乙烯苷对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9(48): 190-192.
- [23] 汤晓丽,张鹏霞,魏晓东,等. 何首乌对 D-gal 致衰大鼠学习记忆能力及海马内突触素含量的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2004, 24(12): 1189-1190.
- [24] Miller FD, Gauthier AS. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007, 54(3): 357-368.

(收稿:2013-04-15 修回:2014-01-20)