

实验研究

黄芪多糖对 C17.2 神经干细胞定向分化的调控作用

叶 妮 马金昀 程晓东

(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院临床免疫研究所,上海,200437)

摘要 目的:观察黄芪多糖(APS)对 C17.2 神经干细胞体外定向分化的调控作用。方法:建立 C17.2 神经干细胞的体外培养体系及分化模型,设置 APS 干预组及 PBS 对照组。诱导分化 4 d 后,通过细胞免疫荧光染色的方法检测 2 组细胞中神经干细胞的标志蛋白巢蛋白(Nestin)、星形胶质细胞的标志蛋白胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、少突胶质细胞的标志蛋白髓鞘碱性蛋白(MBP)及神经元的标志蛋白神经元特异性核心抗原(NeuN)的表达水平。结果:与 PBS 对照组比较,APS 干预组细胞的 Nestin 及 GFAP 蛋白表达水平明显下调,MBP 及 NeuN 蛋白表达水平明显上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。APS 下调了分化模型中的细胞 Nestin 蛋白的表达水平;APS 下调了 GFAP 蛋白的表达水平,上调了 MBP 及 NeuN 蛋白的表达水平。结论:APS 可抑制 C17.2 神经干细胞向星形胶质细胞的定向分化,促进向少突胶质细胞及神经元的定向分化,APS 可抑制 C17.2 神经干细胞的干性维持,促进其进入分化状态,有可能成为治疗神经退行性疾病的潜在药物。

关键词 神经干细胞;定向分化;黄芪多糖;少突胶质细胞;神经元;星形胶质细胞;神经退行性疾病;体外研究

Experimental Study on Regulating Directional Differentiation of C17.2 Neural Stem Cells by Astragalus Polysaccharide in Vitro

Ye Ni, Ma Jinyun, Cheng Xiaodong

(Institute of Clinical Immunology, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

Abstract Objective: To observe regulatory effects of Astragalus Polysaccharide (APS) on directional differentiation of C17.2 neural stem cells in vitro. **Methods:** Cultivation system and differentiation model of C17.2 neural stem cells were established in vitro. APS intervention group and PBS control group were set up. Immunofluorescence staining was used to detect expression levels of Nestin, GFAP, MBP and NeuN, the symbolic marker proteins of neural stem cells, astrocytes, oligodendrocytes and neurons, so as to explore the regulatory effects of APS on directional differentiation of C17.2 neural stem cells. **Results:** Compared with the PBS control group, the expression levels of Nestin and GFAP proteins in the APS intervention group were down-regulated while the expression levels of MBP and NeuN proteins were up-regulated. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). APS down-regulated the expression level of Nestin protein in the differentiation model, which meant it could inhibit the stemness maintenance of C17.2 neural stem cells and lead them to enter the differentiation state. APS down-regulated the expression level of GFAP protein, and up-regulated the expression levels of MBP and NeuN proteins, which meant it could promote C17.2 neural stem cells to differentiate into oligodendrocytes and neurons directionally, and inhibit them to differentiate into astrocytes. **Conclusion:** APS can effectively regulate the directional differentiation of C17.2 neural stem cells in vitro, which suggests that it might be a potential drug for the treatment of neurodegenerative diseases.

Key Words Neural stem cells; Directional differentiation; Astragalus polysaccharides; Oligodendrocytes; Neurons; Astrocytes; Neurodegenerative diseases; Study in vitro

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.10.012

神经干细胞(Neural Stem Cell, NSC)是指一类细胞及神经元细胞,广泛存在于胚胎及成年哺乳动物可以自我更新,主要分化为星形胶质细胞、少突胶质物的中枢神经系统中^[1]。由于具有多向分化的潜

基金项目:国家自然科学基金项目(81673669,81703782);上海市交叉学科“中医临床免疫学”建设项目(30304113598);上海中医药大学高峰学科建设项目(30304114323);上海中医药大学研究生创新培育项目(JX61.02.03.55)

作者简介:叶妮(1992.02—),女,博士研究生在读,研究方向:中医药调控神经免疫性疾病的作用机制, E-mail:everlast_cat@foxmail.com

通信作者:程晓东(1965.09—),男,博士,教授,博士研究生导师,研究方向:神经免疫学、肿瘤免疫学和中医临床免疫学, E-mail:xdcheng_8@yeah.net

能,神经干细胞自 1992 年发现以来便备受关注,有望成为治疗神经退行性疾病(Neurodegenerative Diseases,ND)的种子细胞^[2]。随后的研究发现,在体外自然分化状态下,神经干细胞绝大多数分化为星形胶质细胞,分化为神经元的比例次之,最小一部分分化为少突胶质细胞^[3]。在 ND 的动物模型体内移植研究中也发现,移植的神经干细胞往往不能有效分化为目标细胞群^[4]。因此,适当调控神经干细胞的定向分化,促进目标细胞的再生,或可成为治疗 ND 的有效手段。C17.2 神经干细胞是美国哈佛大学 Snyder 教授将 V-myc 基因转入到小鼠小脑原代神经干细胞中,而构建的永生化细胞系。它具有神经干细胞的所有特征,是用来研究中枢神经系统细胞再生的理想工具^[5]。巢蛋白(Nestin)、胶质纤维酸性蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein,GFAP)、髓鞘碱性蛋白(Myelin Basic Protein,MBP)、神经元特异性核心抗原(Neuron Specific Nuclear Protein,NeuN)分别是公认的神经干细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞及神经元的标志性蛋白^[6-8]。本研究通过检测 Nestin、GFAP、MBP、NeuN 蛋白的表达水平,探讨中药黄芪的主要活性成分——黄芪多糖(Astragalus Polysaccharide,APS)对 C17.2 神经干细胞体外定向分化的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 C17.2 神经干细胞由上海交通大学纳米生物医学工程研究所提供。

1.1.2 药物 黄芪多糖(UV $\geq$ 98%)购自上海源叶生物科技有限公司。黄芪多糖粉末用 PBS 缓冲液配成 5 mg/mL 母液,0.22 μ m 滤器过滤后 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM 高糖培养基、马血清、青链霉素、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;胎牛血清、磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 HyClone 公司;一抗:Nestin 小鼠单抗(ab11306)、GFAP 山羊多抗(ab53554)、MBP 兔多抗(ab40390)、NeuN 兔多抗(ab128886)购自英国 Abcam 公司;荧光二抗:山羊抗小鼠 IgG-Cy3(115-165-003)、兔抗山羊 IgG-Cy3(305-165-003)、山羊抗兔 IgG-Cy3(111-165-003)购自美国 Jackson 公司;多聚甲醛、Triton-X、牛血清白蛋白(BSA)、DAPI 水溶液、抗淬灭封片剂等为国产。荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 实验设置黄芪多糖干预

组及 PBS 对照组。参照 Li 等^[9]的方法建立 C17.2 神经干细胞的体外培养体系及分化模型。增殖培养液:84% DMEM 高糖 + 10% 胎牛血清 + 5% 马血清 + 1% 双抗。分化培养液:98.5% DMEM 高糖 + 0.5% 胎牛血清 + 1% 双抗。培养条件:37 $^{\circ}$ C,5% CO₂。体外培养体系的建立:使用增殖培养液以 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度将细胞接种至培养瓶,待细胞长到底部 80%~90% 融合度时按 1:5 比例传代。分化模型的建立:取体外培养体系中处于对数生长期的细胞,使用增殖培养液将细胞以 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种至铺有专用细胞爬片的 6 孔板,培养 24 h 后吸弃原培养液,换分化培养液。每 2 天换新的分化培养液,培养 4 d 以建立分化模型。

1.2.2 给药方法 依据文献查阅和本实验室的前期研究结果,将黄芪多糖的作用浓度设定为 0.1 mg/mL^[10-11]。黄芪多糖干预组使用分化培养液将黄芪多糖母液稀释至 0.1 mg/mL;PBS 对照组在分化培养液中加入与黄芪多糖母液等体积的 PBS。诱导分化 4 d 后,进行细胞免疫荧光染色,检测 Nestin、GFAP、MBP 及 NeuN 蛋白的表达水平,该实验独立重复 3 次。

1.2.3 检测指标与方法 取体外培养体系中 C17.2 神经干细胞,使用增殖培养液将细胞以 $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种至铺有专用细胞爬片的 6 孔板。培养 48 h 后,进行细胞免疫荧光染色检测神经干细胞的标志性蛋白 Nestin、星形胶质细胞的标志性蛋白 GFAP、少突胶质细胞的标志性蛋白 MBP 及神经元的标志性蛋白 NeuN 的表达水平,以鉴定该细胞处于未分化状态。

取出 6 孔板,吸弃培养液,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 清洗 1 次。4% 多聚甲醛室温固定 30 min 后,PBS 清洗 3 次。0.3% Triton-X 破膜 10 min,PBS 清洗 3 次。1% BSA 封闭 1 h,吸弃 BSA。加入 95% PBS + 5% 胎牛血清稀释的一抗工作液,稀释比例: Nestin (1:100)、GFAP (1:200)、MBP (1:180)、NeuN (1:200),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 替代一抗工作液作为阴性对照。次日早晨吸弃一抗工作液,PBS 清洗 3 次,加入 95% PBS + 5% 胎牛血清稀释的二抗工作液,稀释比例均为 1:1 000,室温避光孵育 1 h。吸弃二抗工作液,PBS 清洗 3 次后,加入 DAPI 水溶液,室温避光孵育 10 min,PBS 清洗 3 次。将细胞爬片从 6 孔板中取出,滴加少量抗淬灭封片剂后盖于载玻片上,荧光显微镜下观察。每张细胞爬片随机取 5 个无重叠的高倍镜(200 倍)视野拍照,记录阳性细胞

数及总细胞数,计算阳性细胞比例。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,先行正态分布及方差齐性检验,服从正态分布且方差齐者,采用独立样本 *t* 检验;不服从正态分布或方差不齐者,采用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞鉴定 经细胞免疫荧光染色检测发现,处于体外培养体系的 C17.2 神经干细胞几乎全部表达 Nestin 蛋白,占(98.62 ± 3.51)%,极少表达 GFAP、MBP、NeuN 蛋白,表明此时 C17.2 细胞处于未分化状态,可以用于下游分化实验。见图 1。

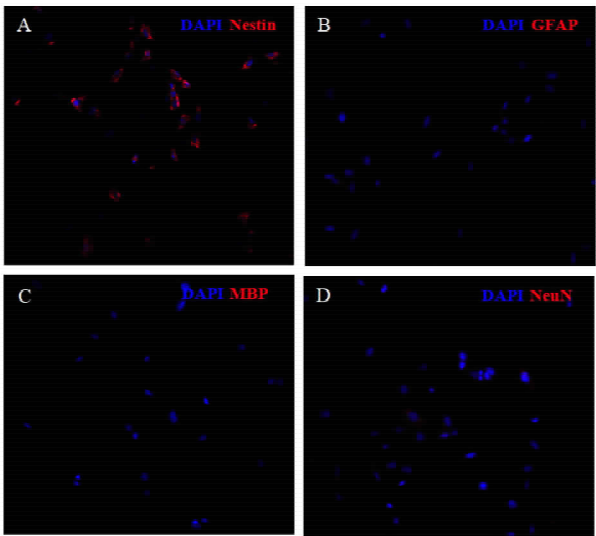


图 1 体外培养体系中的 C17.2 神经干细胞 Nestin、GFAP、MBP 及 NeuN 蛋白的表达情况(免疫荧光染色×200)
注:A:Nestin 蛋白;B:GFAP 蛋白;C:MBP 蛋白;D:NeuN 蛋白

2.2 黄芪多糖对 C17.2 神经干细胞干性维持的影响 经细胞免疫荧光染色检测发现,分化模型中的 PBS 对照组细胞表达的 Nestin 蛋白水平较在体外培养体系有所下调。分化模型中的黄芪多糖干预组细胞表达的 Nestin 蛋白水平较 PBS 对照组进一步下调,PBS 对照组中表达 Nestin 蛋白的细胞占(19.38 ± 6.50)%,黄芪多糖干预组中表达 Nestin 蛋白的细胞占(11.09 ± 4.32)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪多糖下调了分化模型中的细胞表达 Nestin 蛋白的水平。见图 2。

2.3 黄芪多糖对 C17.2 神经干细胞向星形胶质细胞定向分化的影响 经细胞免疫荧光染色检测发现,分化模型中的黄芪多糖干预组细胞表达的 GFAP 蛋白水平较 PBS 对照组明显下调,PBS 对照组中表达 GFAP 蛋白的细胞占(43.22 ± 12.21)%,黄芪多

糖干预组中表达 GFAP 蛋白的细胞占(8.00 ± 2.72)%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪多糖下调了分化模型中的细胞表达 GFAP 蛋白的水平。见图 3。

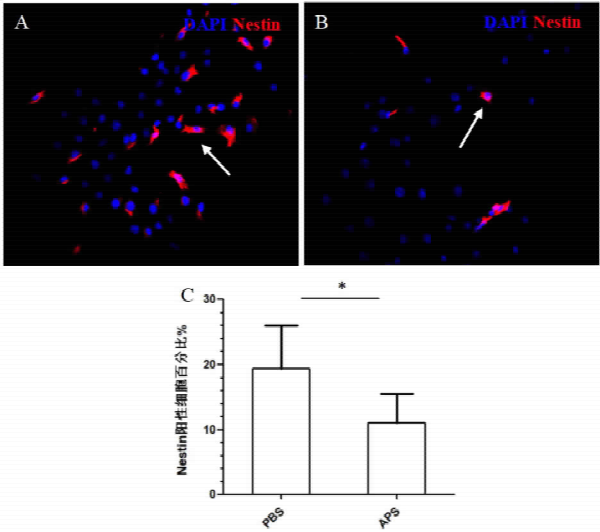


图 2 黄芪多糖对神经干细胞标志性蛋白 Nestin 表达的影响(免疫荧光染色×200)

注:A:PBS 对照组;B:黄芪多糖干预组;C:2 组阳性细胞比例比较(与对照组比较,* $P < 0.05$)

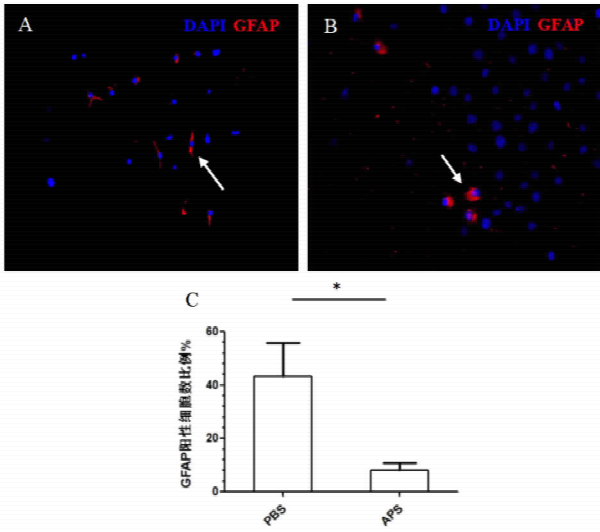


图 3 黄芪多糖对星形胶质细胞标志性蛋白 GFAP 表达的影响(免疫荧光染色×200)

注:A:PBS 对照组;B:黄芪多糖干预组;C:2 组阳性细胞比例比较(与对照组比较,* $P < 0.05$)

2.4 黄芪多糖对 C17.2 神经干细胞向少突胶质细胞定向分化的影响 经细胞免疫荧光染色检测发现,分化模型中的黄芪多糖干预组细胞表达的 MBP 蛋白水平较 PBS 对照组明显上调,PBS 对照组中表达 MBP 蛋白的细胞占(6.55 ± 3.26)%,黄芪多糖干预组中表达 MBP 蛋白的细胞占(28.73 ± 8.95)%,

差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪多糖上调了分化模型中的细胞表达 MBP 蛋白的水平。见图 4。

2.5 黄芪多糖对 C17.2 神经干细胞向神经元定向分化的影响 经细胞免疫荧光染色检测发现,分化模型中的黄芪多糖干预组细胞表达的 NeuN 蛋白水平较 PBS 对照组明显上调,PBS 对照组中表达 NeuN 蛋白的细胞占 $(7.79 \pm 3.29)\%$,黄芪多糖干预组中表达 NeuN 蛋白的细胞占 $(16.36 \pm 5.02)\%$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪多糖上调了分化模型中的细胞表达 NeuN 蛋白的水平。见图 5。

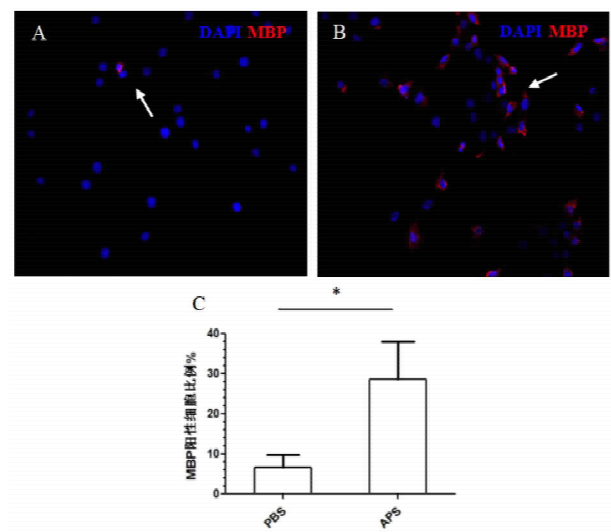


图4 黄芪多糖对少突胶质细胞标志性蛋白 MBP 表达的影响(免疫荧光染色 $\times 200$)
注:A:PBS 对照组;B:黄芪多糖干预组;C:2 组阳性细胞比例比较(与对照组比较,* $P < 0.05$)

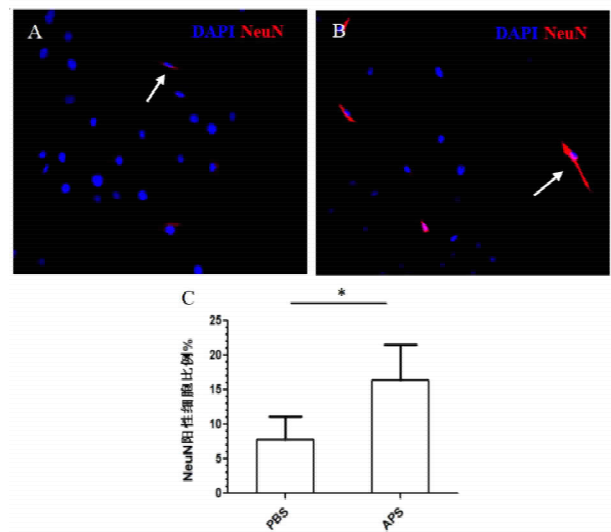


图5 黄芪多糖对神经元标志性蛋白 NeuN 表达的影响(免疫荧光染色 $\times 200$)
注:A:PBS 对照组;B:黄芪多糖干预组;C:2 组阳性细胞比例比较(与对照组比较,* $P < 0.05$)

3 讨论

神经退行性疾病(Neurodegenerative Diseases, ND)是指一类由慢性进行性中枢神经组织退行性变而引起的疾病,包括以神经元变性、死亡为特征的阿尔茨海默病(Alzheimer Disease, AD)、帕金森病(Parkinson Disease, PD)、脑卒中(Stroke)等,以及以少突胶质细胞死亡为特征的多发性硬化(Multiple Sclerosis, MS)、脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)、佩梅病(Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD)等^[12]。目前,临床上治疗 ND 的药物仅可以有限地延缓神经退变进程,不能有效地修复死亡的细胞^[13]。如何在不同病理特征的 ND 中,获得大量缺失的细胞,已成为神经科学领域的研究热点。近年的研究发现,ND 中均伴有星形胶质细胞的异常激活和增殖,它们可分泌大量的炎性反应递质,促进疾病的发展,以及形成致密的胶质瘢痕,阻碍抗炎细胞因子修复病灶^[14]。适度地抑制星形胶质细胞的产生,促进神经元或少突胶质细胞的再生,便可以有效地治疗 ND。20 世纪 90 年代,发育生物学证明,星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元均由神经干细胞发育分化而来^[2]。在成年健康脑中,神经干细胞处于相对静止的状态;在疾病状态下,神经干细胞被激活,根据微环境的诱导而增殖、迁移、分化为缺失的细胞,以修复病灶^[15]。在 ND 动物模型的研究中发现,此时激活的神经干细胞大多分化为星形胶质细胞,分化为少突胶质细胞或神经元的比例很低,这与体外研究的结论一致^[3,4]。本研究也发现,体外低血清培养可诱导 C17.2 神经干细胞自然分化。因此,适度调控神经干细胞的定向分化,便可促进少突胶质细胞或神经元的再生,同时又可抑制星形胶质细胞的过度增殖,这已成为治疗 ND 的新思路。

黄芪多糖是中药黄芪的主要活性成分之一,也是主要发挥免疫调节作用的成分^[16]。本实验室已经发现,黄芪多糖具有明显的神经保护作用,在体内可有效缓解 MS 的动物模型——实验性自身免疫性脑脊髓膜炎(EAE)小鼠的神经功能障碍,抑制脊髓脱髓鞘,抑制外周和中枢免疫系统中过度的炎性反应;在体外可有效抑制脂多糖诱导的 BV-2 神经小胶质细胞的活化,抑制炎性反应递质的分泌^[11]。有研究发现,黄芪多糖可以促进大鼠原代神经干细胞的增殖,并保护其免受缺氧诱导的细胞损伤^[17-18]。在 PD、脑缺血、脑出血以及缺血后再灌注的动物模型研究中,黄芪多糖被证明还有抑制神经元凋亡的作用^[19-22]。然而,其对于神经干细胞的定向分化是否

具有调控作用,能否促进少突胶质细胞或神经元的再生,至今仍不清楚。研究采用 Nestin、GFAP、MBP、NeuN 分别作为神经干细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞及神经元的标志性蛋白,通过细胞免疫荧光染色的方法检测其表达水平,探讨黄芪多糖对 C17.2 神经干细胞体外定向分化的调控作用。本研究发现,黄芪多糖在 0.1 mg/mL 的浓度下可有效调控 C17.2 神经干细胞的定向分化。黄芪多糖干预后,分化模型中的细胞表达 Nestin 蛋白水平明显下调,表明此时神经干细胞已不能维持其产生与亲代细胞相同的子代细胞的能力,失去了干细胞的特征,而进入分化状态。已分化的细胞中有 $(28.73 \pm 8.95)\%$ 分化为少突胶质细胞, $(16.36 \pm 5.02)\%$ 分化为神经元,分化为星形胶质细胞的比例下降至 $(8.00 \pm 2.72)\%$,与 PBS 对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明黄芪多糖可以抑制 C17.2 神经干细胞的干性维持,促进其进入分化状态,促进少突胶质细胞和神经元的再生,抑制星形胶质细胞的产生。

综合分析 ND 的发病机制、少突胶质细胞和神经元再生的相关分子信号以及黄芪多糖的作用特点,以下机制可能参与了黄芪多糖调控神经干细胞的定向分化过程。1) 抗氧化应激。ND 患者均伴有明显的中枢神经系统氧化还原失衡现象,而少突胶质细胞和神经元对活性氧物质(Reactive Oxygen Species, ROS)、活性氮物质(Reactive Nitrogen Species, RNS)及各级代谢产物尤为敏感,极易引起死亡和变性^[23]。有研究发现,黄芪多糖在四氯化碳诱导的肝大鼠模型中,有明显的抗氧化应激作用^[24]。因此,抗氧化应激可能是其发挥调控作用的机制之一。2) 调节神经免疫反应。中枢神经系统内过度的免疫反应是 ND 的另一病理特点,例如在 AD 和 MS 患者脑中都存在神经小胶质细胞、T 细胞的异常激活,它们可形成强大的免疫级联,互相活化,分泌大量的炎性反应递质和炎性趋化因子,引发少突胶质细胞和神经元的大面积凋亡^[25]。黄芪多糖已被证明有显著的调节神经免疫反应的作用,例如它可以有效抑制脂多糖诱导神经小胶质细胞的活化,抑制炎性反应递质白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 、核因子- κ B 的分泌^[11,26]。因此,调节神经免疫反应或成为黄芪多糖调控神经干细胞定向分化的潜在机制之一。3) 调控神经发育相关的信号通路。有研究证明,TGF- β /Smad、Sonic Hedgehog、Notch、Wnt/ β -catenin、MAPK 等是参与胚胎时期神经组织发育的主要

信号通路^[27]。具体地,TGF- β /Smad 等通路主要影响星形胶质细胞的发育,Sonic Hedgehog 等通路主要影响少突胶质细胞的生长,Wnt/ β -catenin 等通路主要影响神经元的生长。黄芪多糖有可能是通过调节这些信号通路的活性,从而促进少突胶质细胞和神经元的再生,抑制了星形胶质细胞的产生。

本研究通过体外实验,发现黄芪多糖可有效地调控 C17.2 神经干细胞的定向分化,有可能成为治疗 ND 的潜在药物。在此基础上,本研究将进一步探讨黄芪多糖调控神经干细胞定向分化的细胞分子机制,以及完善动物实验,以期能为临床上治疗 ND 提供新的方法。

参考文献

- [1] Kameda T, Imamura T, Nakashima K. Epigenetic regulation of neural stem cell differentiation towards spinal cord regeneration[J]. Cell Tissue Res, 2018, 371(1): 189-199.
- [2] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052): 1707-1710.
- [3] Davis AA, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex[J]. Nature, 1994, 372(6503): 263-266.
- [4] Xie C, Liu YQ, Guan YT, et al. Induced Stem Cells as a Novel Multiple Sclerosis Therapy[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2016, 11(4): 313-320.
- [5] Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, et al. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum[J]. Cell, 1992, 68(1): 33-51.
- [6] Lo Furno D, Mannino G, Giuffrida R, et al. Neural differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells induced by glial cell conditioned media[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(10): 7091-7100.
- [7] Salouci M, Antoine N, Shikh Al Sook MK, et al. Developmental profiles of GFAP-positive astrocytes in sheep cerebellum[J]. Vet Res Commun, 2014, 38(4): 279-285.
- [8] Sharma K, Singh J, Pillai PP. MeCP2 Differentially Regulate the Myelin MBP and PLP Protein Expression in Oligodendrocytes and C6 Glioma[J]. J Mol Neurosci, 2018, 65(3): 343-350.
- [9] Li M, Tsang KS, Choi ST, et al. Neuronal differentiation of C17.2 neural stem cells induced by a natural flavonoid, baicalin[J]. ChemBiochem, 2011, 12(3): 449-456.
- [10] Shi L, Yin F, Xin X, et al. Astragalus Polysaccharide Protects Astrocytes from Being Infected by HSV-1 through TLR3/NF- κ B Signaling Pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 285356.
- [11] 马金响, 王金英, 孙宇, 等. 黄芪多糖抑制小鼠 EAE 及调控 BV-2 神经小胶质细胞活化的实验研究[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(3): 381-387.
- [12] Chung CG, Lee H, Lee SB. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(17): 3159-3180.

(下接第 2608 页)

- 国医学创新,2009,6(29):14-16.
- [13] 韩梅,高晟,赵凯. 100 方降脂中药治疗高脂血症用药规律[J]. 中医药临床杂志,2017,29(2):217-219.
- [14] Dan H, Wu J, Peng M, et al. Hypolipidemic effects of *Alismatis rhizome* on lipid profile in mice fed high-fat diet[J]. *Saudi Med J*, 2011,32(7):701-707.
- [15] 曹柳,赵军宁,王晓宇,等. 不同加工方法对不同产地姜黄、郁金药材中姜黄素类成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(4):50-56.
- [16] 靳庆霞. 浅析山楂的化学成分及药理作用[J]. 内蒙古中医药,2014,33(36):62.
- [17] 田芳,胡晋红. 不同促透剂对姜黄素凝胶体外透皮作用的影响[J]. 药学服务与研究,2015,15(5):357-360.
- [18] 孙伟卫,王秀环,季新燕,等. 不同促透剂对蛇床子素微乳体外经皮渗透效果的影响[J]. 山西中医学院学报,2015,16(2):23-24.
- [19] Choon Fu Goh, Jonathan G. Moffat, Duncan Q. M. Craig, et al. Nano-thermal imaging of the stratum corneum and its potential use for understanding of the mechanism of skin penetration enhancer[J]. *Thermochimica Acta*, 2017,655:278-283.
- [20] 孙占学,李曰庆,张丰川,李元文. 中医外治法源流[J]. 中华中医药杂志,2016,31(11):4416-4419.
- [21] 王新,催一喆,张秀英. 氮酮对中药透皮软膏体外透皮作用的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2010,13(7):142-144.
- [22] 徐瑾. 透皮吸收促进剂对消痛灵巴布剂中延胡索乙素经皮吸收量的影响[J]. 中国民族民间医药,2010,19(10):51.
- [23] 王晓颖,张金俊,叶梦屏. 3 种促透剂对天麻体外透皮吸收的影响[J]. 福建中医学院学报,2010,20(1):33-35.
- [24] 王晓颖,叶梦屏. 3 种促透剂对钩藤体外透皮吸收的影响[J]. 中国现代应用药学,2010,27(7):623-625.
- [25] 张春风,战伟,杨中林,等. 双环单萜促透剂对川芎嗪透皮吸收的影响[J]. 药科学报,2010,45(11):1452-1458.
- [26] Hassan K, Bhalla V, El RME, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a comprehensive review of a growing epidemic[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(34):12082-12101.
- [27] 乐微,章军建,王琼. 电针对高脂血症大鼠血液流变学及炎症反应相关因子的影响[J]. 武汉大学学报:医学版,2015,36(6):872-875.
- [28] 张安邦,高杰,李令根,等. 相关炎症反应因子与动脉粥样硬化的关系[J]. 中国中西医结合外科杂志,2014,29(5):563-566.
- [29] 方海洋,陈琦,项建,等. 高脂血症大鼠主动脉 HSP22、TNF- α 和 eNOS 的表达及阿托伐他汀的影响[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(10):1873-1878.
- [30] McLaren JE, Ramji DP. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009,20(2):125-135.
- [31] 朱哲蓓,姜红菊,李润智,等. 冠心病患者动脉粥样硬化斑块特征与 Th 细胞漂移的关系[J]. 中国动脉硬化杂志,2012,20(7):643-646.

(2019-04-19 收稿 责任编辑:王明)

(上接第 2602 页)

- [13] Stoker TB, Barker RA. Regenerative Therapies for Parkinson's Disease; An Update[J]. *BioDrugs*, 2018,32(4):357-366.
- [14] Phatnani H, Maniatis T. Astrocytes in neurodegenerative disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015,7(6):pii:a020628.
- [15] Grégoire CA, Goldenstein BL, Floriddia EM, et al. Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury[J]. *Glia*, 2015,63(8):1469-1482.
- [16] 李钦,胡继宏,高博,等. 黄芪多糖在免疫调节方面的最新研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):199-206.
- [17] Si YC, Li Q, Xie CE, et al. Chinese herbs and their active ingredients for activating xue (blood) promote the proliferation and differentiation of neural stem cells and mesenchymal stem cells[J]. *Chin Med*, 2014,9(1):13.
- [18] Zheng Z, Zhao B. Astragalus polysaccharide protects hypoxia-induced injury by up-regulation of miR-138 in rat neural stem cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018,102:295-301.
- [19] Liu H, Chen S, Guo C, et al. Astragalus Polysaccharide Protects Neurons and Stabilizes Mitochondrial in a Mouse Model of Parkinson Disease[J]. *Med Sci Monit*, 2018,24:5192-5199.
- [20] 颜玲,周庆华. 黄芪多糖对缺血性脑损伤大鼠的神经保护作用及其机制研究[J]. 中国应用生理学杂志,2012,28(4):373-377, 390.
- [21] 朱世杰,张艳,唐中生,等. 黄芪多糖对大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤的治疗作用[J]. 解剖学报,2017,48(5):526-531.
- [22] 颜玲,黄德彬,刘锦红,等. 黄芪多糖对局部缺血/再灌注所致大鼠大脑皮层 c-fos 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(12):1769-1771.
- [23] Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of Chronic Oxidative Stress on Neuroinflammatory Response Mediated by CD4 + T Cells in Neurodegenerative Diseases[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018,12:114.
- [24] Hamid M, Liu D, Abdulrahim Y, et al. Amelioration of CCl₄-induced liver injury in rats by selenizing Astragalus polysaccharides: Role of proinflammatory cytokines, oxidative stress and hepatic stellate cells[J]. *Res Vet Sci*, 2017,114:202-211.
- [25] Stephenson J, Nutma E, van der Valk P, et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases[J]. *Immunology*, 2018,154(2):204-219.
- [26] Luo T, Qin J, Liu M, et al. Astragalus polysaccharide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglial cells: regulation of protein kinase B and nuclear factor- κ B signaling[J]. *Inflamm Res*, 2015,64(3-4):205-212.
- [27] Navarro Quiroz E, Navarro Quiroz R, Ahmad M, et al. Cell Signaling in Neuronal Stem Cells[J]. *Cells*, 2018,7(7):E75.

(2018-09-06 收稿 责任编辑:杨觉雄)