

脑络欣通对神经干细胞增殖分化及 β -tubulin III/GFAP的影响

何玲¹, 石晓倩², 徐伟³, 谭辉¹, 王键¹

安徽中医药大学¹新安医学教育部重点实验室,²药学院,³医药信息工程学院,安徽 合肥 230021

摘要:目的 观察脑络欣通对 β -tubulin III/GFAP及神经干细胞(NSCs)增殖分化的影响。方法 将NSCs细胞株分为空白模型(MC)组、10%脑络欣通含药血清(NLXT组)、10%脑络欣通含药血清+抑制剂Y27632组(Y-27632组)。采用MTT法检测NSCs细胞活性,Transwell小室观察NSCs迁移,免疫印迹法观察 β -Tubulin III、GFAP、MAP-2蛋白表达。免疫荧光标记DCX、NEUN、 β -Tubulin III表达。结果 与MC组比较,1 d和3 d NLXT组、Y-27632组迁移细胞数增多($P<0.05$);7 d后NLXT组、Y-27632组细胞存活率及迁移细胞数显著增多($P<0.01$)。与MC组比较,第3天、第7天NLXT组和Y-27632组 β -tubulin III、MAP2、GFAP蛋白表达显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。NLXT组、Y-27632组脑组织 β -tubulin III/GFAP、BrdU/DCX、BrdU/NEUN标记细胞数目较MC组明显增多。结论 脑络欣通通过调节 β -tubulin III/GFAP促进NSCs增殖、分化。

关键词:微管蛋白;胶质纤维酸性蛋白;神经干细胞;脑络欣通

Effect of Naoluo Xintong on proliferation and differentiation of neural stem cells and β -tubulin III/GFAP

HE Ling¹, SHI Xiaoqian², XU Wei³, TAN Hui¹, WANG Jian¹

¹Key Laboratory of Xin'an Medical Education, Ministry of Education, ²College of Pharmacy, ³College of Information Engineering, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230021, China

Abstract: Objective To observe the effects of Naoluo Xintong on the expression of β -tubulin III and glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the proliferation and differentiation of murine neural stem cells (NSCs) *in vitro*. **Methods** An immortalized murine NSC line was divided into model control (MC) group, 10% Naoluo Xintong drug-containing serum group (NLXT group), and 10% Naoluo Xintong drug-containing serum with inhibitor Y27632 group (Y-27632 group) with corresponding treatments. The activity of the NSCs was detected after the treatments using MTT assay, and the migration of the cells was observed with Transwell assay. The expressions of β -tubulin III, GFAP and MAP-2 proteins in the cells were detected with immunoblotting, and the expressions of DCX, NEUN, and β -tubulin III were also detected with immunofluorescence assay. **Results** Compared with that in MC group, the number of migrated cells in NLXT group and Y-27632 group increased significantly at 1 day and 3 days after induction ($P<0.05$). The survival rate and the number of migrated cells in NLXT group and Y-27632 group increased significantly on day 7 ($P<0.01$). Compared with those in MC group, the expressions of β -tubulin III, MAP2 and GFAP protein in NLXT group and Y-27632 group were significantly increased on days 3 ($P<0.01$) and 7 ($P<0.05$). The numbers of β -tubulin III/GFAP, BrdU/DCX, and BrdU/NEUN labeled cells in the NLXT group and Y-27632 group were significantly greater than those in the MC group. **Conclusion** Naoluo Xintong promotes the proliferation and differentiation of murine NSCs *in vitro* by regulating the expressions of β -tubulin III/GFAP.

Keywords: tubulin; glial fibrillary acidic protein; neural stem cells; Naoluo Xintong

中风病是世界范围内主要的致残原因^[1-2]。神经干细胞(NSCs)在神经发育和修复受损神经组织中发挥重要作用^[3-6]。脑缺血病变后内源性NSCs的再生是机体实现自身修复的潜力。NSCs在脑缺血后增殖分化的速度与抑制其再生有关^[7-9]。当NSCs向损伤灶局部迁移时,其量及有效分化程度却明显不足,甚至失去迁移能

力^[10-11]。因此,对于缺血性中风NSCs增殖分化及其干预研究有重要意义。中药复方治疗缺血性中风病有较好疗效,中医药在治疗缺血性中风凸显重要作用^[12-13]。脑络欣通具有促进NSCs增殖的作用。脑络欣通可诱导NSCs分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,同时,脑络欣通能改善NSCs增殖的微环境^[14-18]。既往研究主要集中在脑络欣通对NSCs增殖、分化作用,而对NSCs增殖分化的特征性标志物及分化程度研究较少,且缺乏脑络欣通对NSCs分化过程的动态观察研究。而缺血性中风在疾病不同时期NSCs的增殖分化程度不同,故本文着重以脑络欣通对NSCs的不同时间节点观察,并动态观察缺血后内源性NSCs分化为神经元细

收稿日期:2018-12-19

基金项目:2018年度新安医学教育部重点实验室开放基金(2018xayx03);
国家中医药管理局“新安王氏内科流派传承工作室”建设项目(国中医药人教函[2012]228号);安徽中医药大学校级探索性科研项目(2016ts003)

作者简介:何玲,讲师,E-mail: helingtc@126.com

通信作者:王键,教授,博士生导师,E-mail: wangjian6301@163.com

胞和胶质细胞的共同标记物β-微管蛋白Ⅲ(β-tubulin Ⅲ)/胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的变化,以期更好地了解脑络欣通的作用靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和分组 C17.2小鼠永生生化NSCs细胞株(ATCC, zs100493)。将NSCs细胞株分为空白模型组(MC)、10%脑络欣通含药血清组(NLXT)、10%脑络欣通含药血清+Y27632组(以下简称Y-27632组)。

1.1.2 药物 含药血清:取10只大鼠并标记为NLXT组,中药材由安徽广印堂中药股份有限公司提供。按NLXT原方比例分别称取黄芪30 g(批号:160902),川芎10 g(批号:160901),三七6 g(批号:160901),天麻10 g(批号:160801),当归10 g(批号:160803),红花10 g(批号:160801),蜈蚣2条(批号:160801)。将称取的药材(除去蜈蚣)加入砂罐中,常规煎煮得出煎煮液。将煎煮液低速离心取上清液过滤,再用旋转蒸发器浓缩至1 mL含生药1 g。NLXT组按8.54g/(kg·d)灌胃共给药3 d,并于第3天最后一次灌胃后取血清备用。

1.1.3 主要试剂和仪器 Transwell小室(Corning, Cat.No:3422, Lot.No:26117004),胎牛血清(MRC, Cat.No:CCS30009.02, Lot.No:S171204F),NSCs成神经元诱导分化培养基(Cyagen, Cat.No:MUXNX-90081, Lot.No:T171206G001),DMEM(Hyclone, Cat.No:SH30022.01, Lot.No: AC13298765),DMEM/F12(Hyclone, Cat.No:SH30023.01, Lot.No: AC11256314),DMSO(Solarbio, Cat.No:D8370, Lot.No:11773002),MTT(Solarbio, Cat.No: D8370, Lot.No: 1172103),山羊抗兔-FITC二抗(Zsbio, Cat.No: ZF-0311, Lot.No: 1345863),TRITC二抗(Zsbio, Cat.No: ZF-0313, Lot.No: 133502),β-Actin(Zsbio, Cat.No: TA-09, Lot.No: 18AV0403),甘氨酸(Solarbio, Cat.No:G8200, Lot.No:109J063),Tris(Solarbio, Cat.No:G8060, Lot.No:117W074),Tween-20(Solarbio, Cat.No: T8200, Lot.No: 822I0424),预染蛋白 Marker

(Thermo, Cat.No: 26616G8060, Lot.No: 610351),PVDF膜(Millipore Cat.No: IPVH00010, Lot.No: R7JA4305G),ECL超敏反光试剂盒(Millipore Cat.No: 34094, Lot.No: SF249607),GFAP小鼠抗小鼠(Bioss, Cat.No: bsm-33065M, Lot.No: AH03084346),β-tubulin Ⅲ兔抗小鼠(Bioss, Cat.No: bs-2670R, Lot.No: AG09273217),BrdU诱导剂(Sigma, Cat.No: B5002, Lot.No: 11D037),BrdU小鼠抗小鼠(Bioss, Cat.No: bsm-0917M, Lot.No: AG08255316),双皮质素(DCX)兔抗小鼠(Bioss, Cat.No: bsm-33065M, Lot.No: AG08255429),NeuN兔抗小鼠(Bioss, Cat.No: bs-10394R, Lot.No: AG07113117)。

1.2 实验方法

1.2.1 NSCs特征性标志蛋白巢蛋白(Nestin)鉴定 将细胞悬液培养并予血清封闭。加一抗和相应种属二抗室温孵育50 min;细胞核复染并避光室温孵育。封片并镜检拍照。

1.2.2 NSCs细胞活性测定及细胞迁移观察 采用MTT法检测NSCs细胞活性。Transwell小室观察NSCs迁移。光学显微镜下观察并随机拍照5个视野,计算每视野的侵袭细胞数,计算平均值。视野中显示的细胞即为穿过transwell小室底膜的细胞。

1.2.3 免疫印迹法观察β-Tubulin Ⅲ、GFAP、MAP-2蛋白表达 收集细胞并提取细胞蛋白;蛋白上样与电泳(电泳浓缩胶和分离胶的配方见表1);转膜并封闭液封闭。4℃一抗孵育和二抗孵育;凝胶成像系统扫描并计算条带灰度值,以β-Tubulin Ⅲ、GFAP、MAP-2与β-actin灰度值比值为相对表达量。

1.2.4 免疫荧光标记DCX、NEUN、β-Tubulin Ⅲ表达 显色剂DAPI染核,呈蓝色;显色剂FITC标记DCX、NEUN、β-Tubulin Ⅲ,呈绿色;显色剂TRITC标记BrdU、GFAP,呈红色。

1.2.5 统计学分析 采用SPSS 22.0软件分析,数据用均数±标准差表示。组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

表1 电泳浓缩胶与分离胶的比例

Tab.1 Electrophoretic concentrated gel and separation gel ratio

Dormulation content	Concentrated gel (2 mL)	10% separation gel (5 mL)	6% separation gel (5 mL)
Double distilled water	1.4 μL	1.9 μL	2.6 μL
30% acrylamide mixture	330 μL	1.7 μL	1.0 μL
1.0 mol Tris (PH6.8)	250 μL	1.3 mL	1.3 μL
10% SDS	20 μL	50 μL	50 μL
10% AP	20 μL	50 μL	50 μL
TEMED	2 μL	2 μL	4 μL

2 结果

2.1 NSCs特征性标志蛋白Nestin鉴定

荧光显微镜下观察发现,当细胞出现明显的绿色荧

光和染细胞核的蓝色荧光,说明C17.2细胞株复苏、传代成功(图1)。

2.2 脑络欣通对NSCs活性、迁移的影响

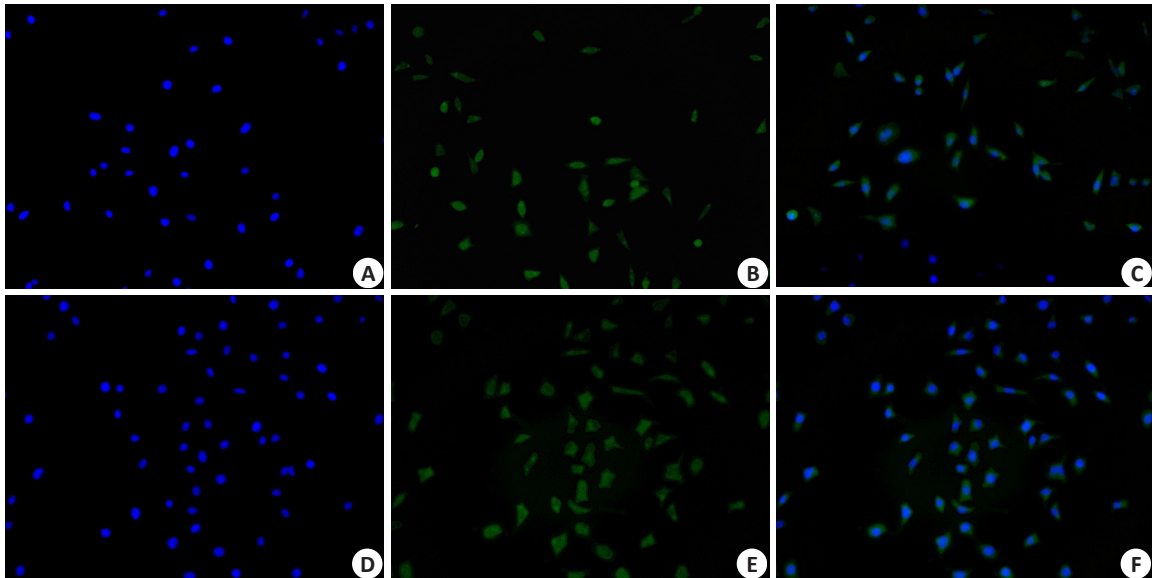


图1 C17.2细胞株复苏传代后nestin染色

Fig.1 Nestin staining of resuscitated of C17.2 cell line (Original magnification: ×100). A, B, C: Fluorescent staining of the cells before induction; D, E, F: Fluorescent staining of the cells at 1 day of induction.

MTT 检测结果显示,与MC组比较,第7天NLXT组和Y-27632组细胞存活率明显升高($P < 0.05$,图2)。transwell法观察NSCs迁移结果显示,与MC组比较,第1天和第3天NLXT组、Y-27632组迁移细胞数增多($P < 0.05$);第7天NLXT组、Y-27632组迁移细胞数显著增多($P < 0.01$,图3)。

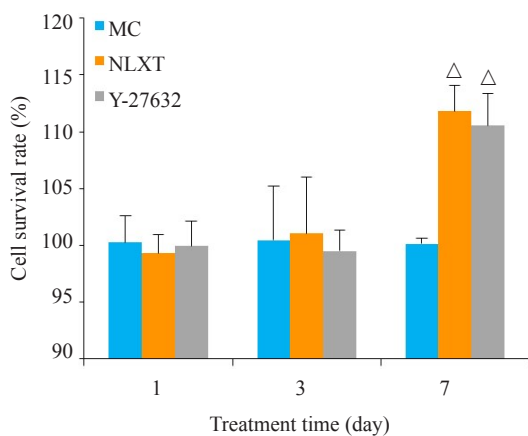


图2 脑络欣通对NSCs活性的影响

Fig.2 Effect of NLXT on the activity of NSCs. $\Delta P < 0.05$ vs MC group.

2.3 脑络欣通对 β -tubulin III、MAP-2和GFAP影响

第1天 β -tubulin III、MAP-2和GFAP在各组间比较

差异无统计学意义($P > 0.05$)。与MC组比较,第3天、第7天NLXT组和Y-27632组 β -tubulin III、MAP2、GFAP蛋白表达显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$,图4~6)。

2.4 脑络欣通能够增加 β -tubulin III/GFAP、BrdU/DCX表达

免疫荧光标记 β -tubulin III/GFAP表达观察发现, β -tubulin III阳性反应呈绿色,GFAP呈红色,MC组中星形胶质细胞少量表达。NLXT组在第1天,第3天和第7天 β -tubulin III阳性细胞明显增多,Y-27632组 β -tubulin III和GFAP阳性细胞明显增多,第7天达到最高峰且分布均匀(图7)。神经元新生特异性标记BrdU/DCX免疫荧光显示:MC组见极少量BrdU/DCX标记阳性细胞;NLXT组有少量标记阳性细胞,双染散在细胞数目有限,第1天,第3天与第7天比较未出现增多;Y-27632组BrdU/DCX标记阳性细胞增多,且第7天阳性细胞数比第1天,第3天明显增多(图8)。

2.5 脑络欣通对脑组织BrdU/NEUN标记的影响

BrdU/NEUN免疫荧光标记为分化成熟神经元特异性标记,MC组BrdU/NEUN标记阳性细胞呈富集性,分布均匀;NLXT组标记细胞数目较空白组明显增多,且逐渐分布规律;Y-27632组与空白组、NLXT组比较,BrdU/NEUN标记阳性细胞数目呈进一步增多,分化明显,分布均匀,细胞形态完好(图9)。

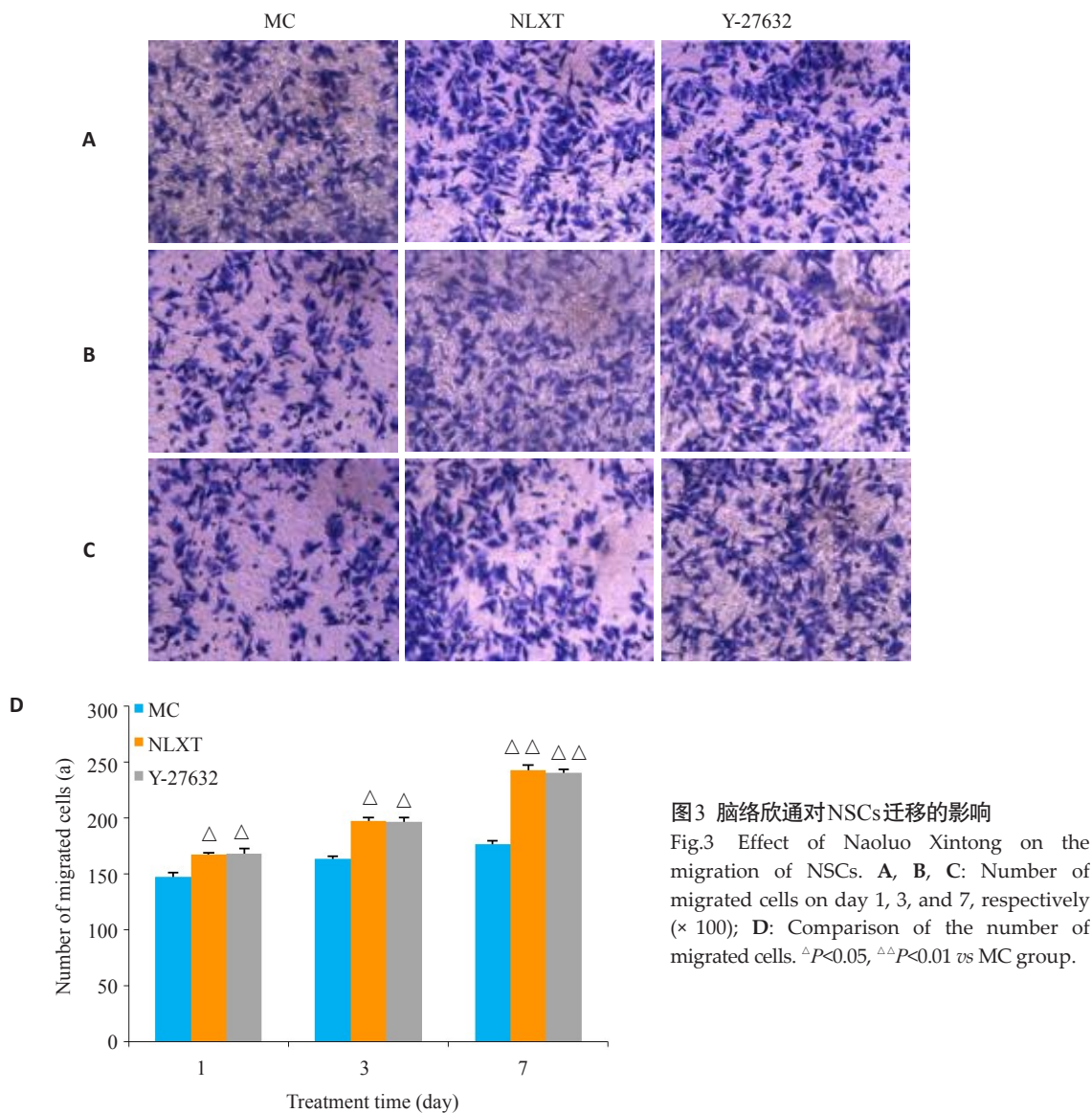


图3 脑络欣通对NSCs迁移的影响
Fig.3 Effect of Naoluo Xintong on the migration of NSCs. A, B, C: Number of migrated cells on day 1, 3, and 7, respectively ($\times 100$); D: Comparison of the number of migrated cells. $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs MC group.

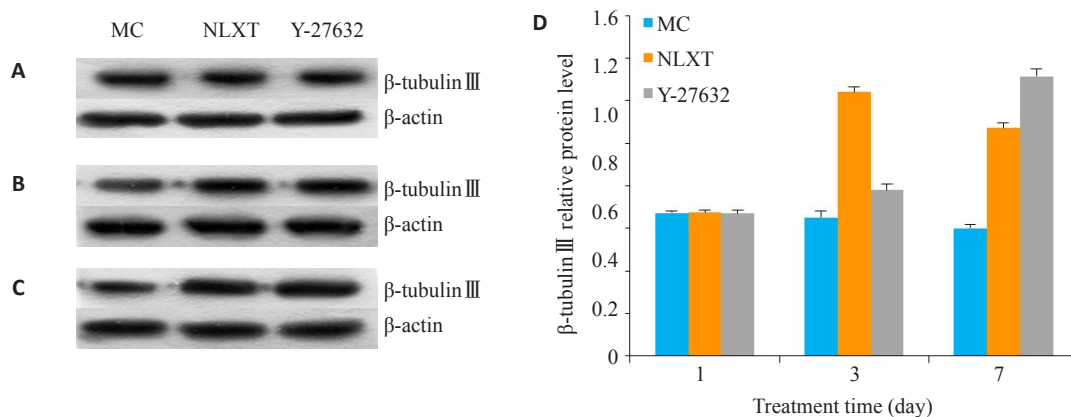


图4 β -tubulin III 的表达
Fig.4 Expression of β -tubulin III protein in the cells detected by Western blotting on day 1 (A), 3(B), and 7(C) with quantitative analysis (D). $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs MC.

3 讨论

脑缺血中风发生后脑组织可自发诱导 NSCs 增殖和分化, NSCs 对损伤脑组织进行修复, 脑组织缺血缺氧早期 NSCs 标志蛋白 Nestin 蛋白表达升高预示 NSCs 的

激活, 修复脑损伤^[19-20]。因此, Nestin 蛋白表达水平可作为判断中枢神经系统修复能力的指标, Nestin 可反映脑组织中 NSCs 变化。并且, NSCs 在脑缺血早期可有效进行神经功能维持和恢复, 显著降低脑组织损伤程度^[21-23]。

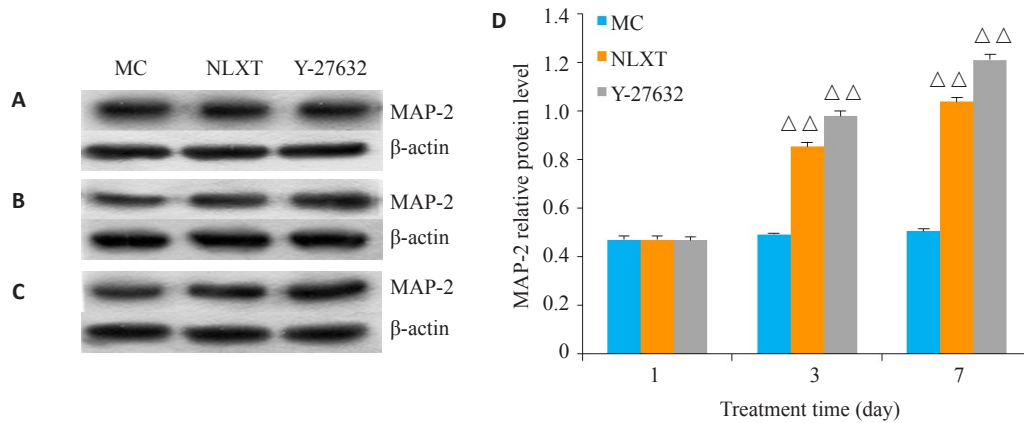


图5 MAP-2的表达

Fig.5 Expression of MAP-2 protein in the cells detected by Western blotting on day 1(A), 3 (B), and 7(C) with quantitative analysis (D). ^{△△}*P*<0.01 vs MC.

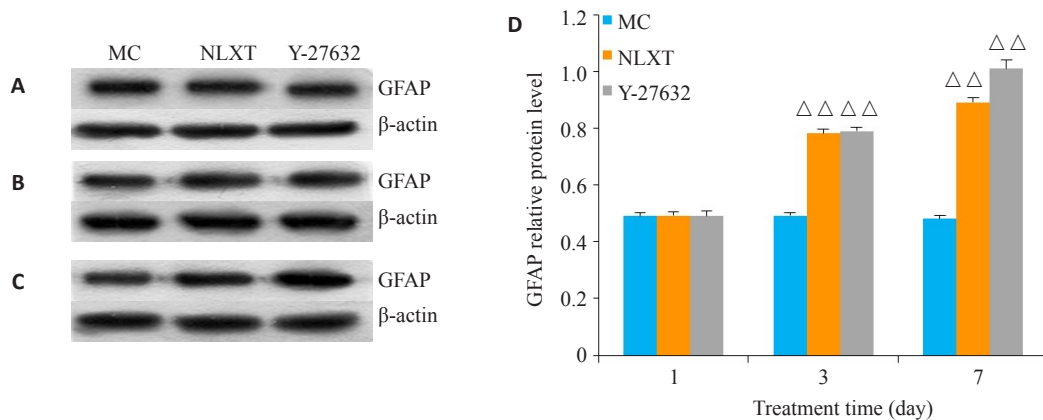


图6 GFAP的表达

Fig.6 Expression of GFAP protein in the cells detected by Western blotting on day 1 (A), 3(B), and 7(C) with quantitative analysis (D). ^{△△}*P*<0.01 vs MC.

本实验结果显示,空白模型组中在第1天,第3天可见少量表达Nestin标记阳性细胞,细胞体形态及排列不规整;第7天时Nestin阳性细胞数目进一步增多,反应更加强烈。脑络欣通组和阻滞剂组,脑缺血第1天时Nestin表达开始明显增加,第3天时Nestin表达显著增强,第7天时Nestin表达进一步增强。说明脑缺血中风发生后重塑NSCs再生,而脑络欣通能和抑制剂作用类似,可迅速促进NSCs的增殖,并进一步修复损伤细胞。

β微管蛋白在NSCs由圆形分化为有极性的神经元过程中发生变化。β微管蛋白具有七个同源体,其中β-微管蛋白-III具有神经元特异性,它是原始神经上皮中所表达的最早的神经元标志物之一。GFAP是神经胶质细胞标记物。本实验采用β-tubulin III/GFAP共同标记来观察脑缺血后内源性NSCs分化为神经元细胞和胶质细胞的变化,从而进一步观察脑络欣通对NSCs增殖、分化的影响。实验结果显示,第1天时β-tubulin III和GFAP阳性细胞明显增多,第3天,第7天呈现逐渐减少

趋势;脑络欣通组β-tubulin III阳性细胞都明显增多,GFAP阳性细胞变化不明显。阻滞剂组GFAP阳性细胞从第1天到第7天逐渐减少,β-tubulin III阳性细胞增多且分布较为规律,与时间呈现正相关性。DCX与神经元迁移和分化相关,采用免疫荧光标记DCX/BrdU反应神经再生过程中迁移的NSCs。BrdU/DCX免疫荧光标记为神经元新生特异性标记,通过观察BrdU/DCX免疫荧光标记阳性细胞变化,可反映脑缺血损伤后NSCs分化情况。实验结果显示空白模型组见极少量BrdU/DCX标记阳性细胞,空白模型组有少量标记阳性细胞。脑络欣通组和阻滞剂组BrdU/DCX标记阳性细胞增多,且第7天比第1天和第3天明显增多,且分布规律,呈集中分布。BrdU标记具有增殖迁移和分化能力的神经细胞。采用免疫荧光标记NeuN/BrdU反应神经再生过程中由NSCs新分化而来的神经元细胞。BrdU/NEUN免疫荧光标记为分化成熟神经元特异性标记,空白模型组标记阳性细胞数目明显减少,第3天减少最为

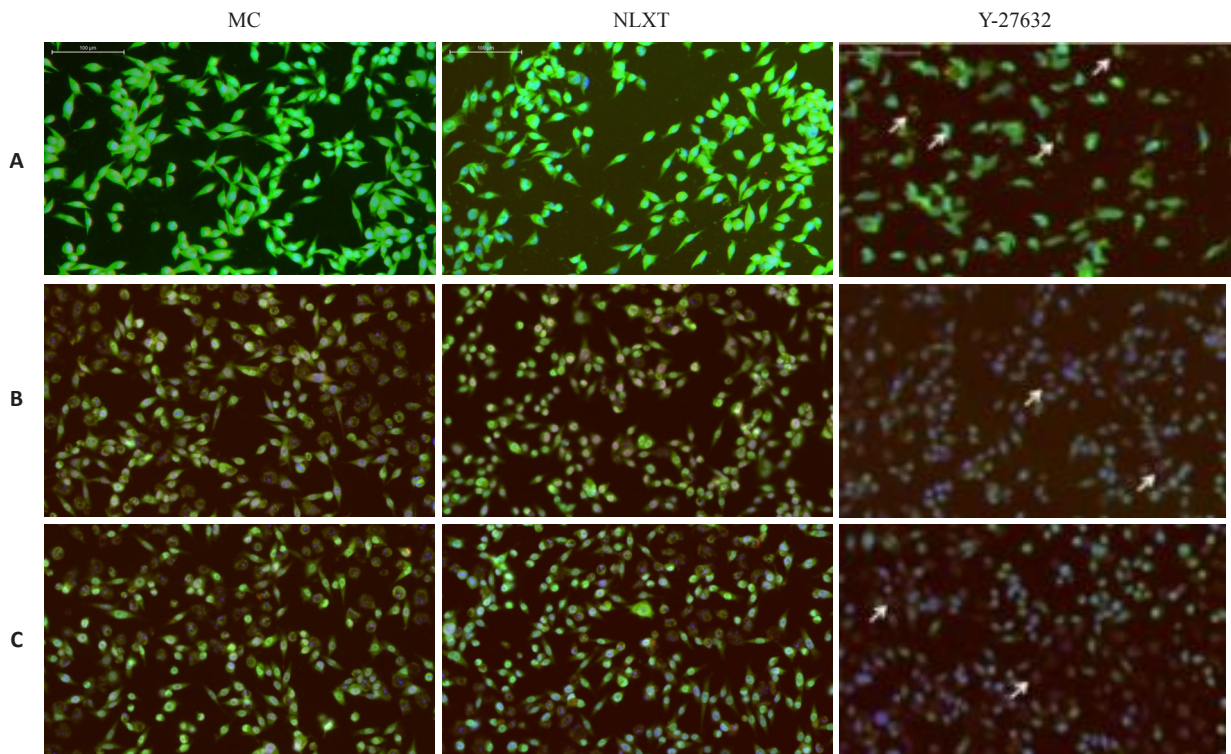


图7 β -tubulin III/GFAP 阳性细胞表达

Fig.7 Expression of β -tubulinIII/GFAP in the NSCs detected by immunofluorescence assay on day 1 (A), 3 (B), and 7 (C) ($\times 200$).

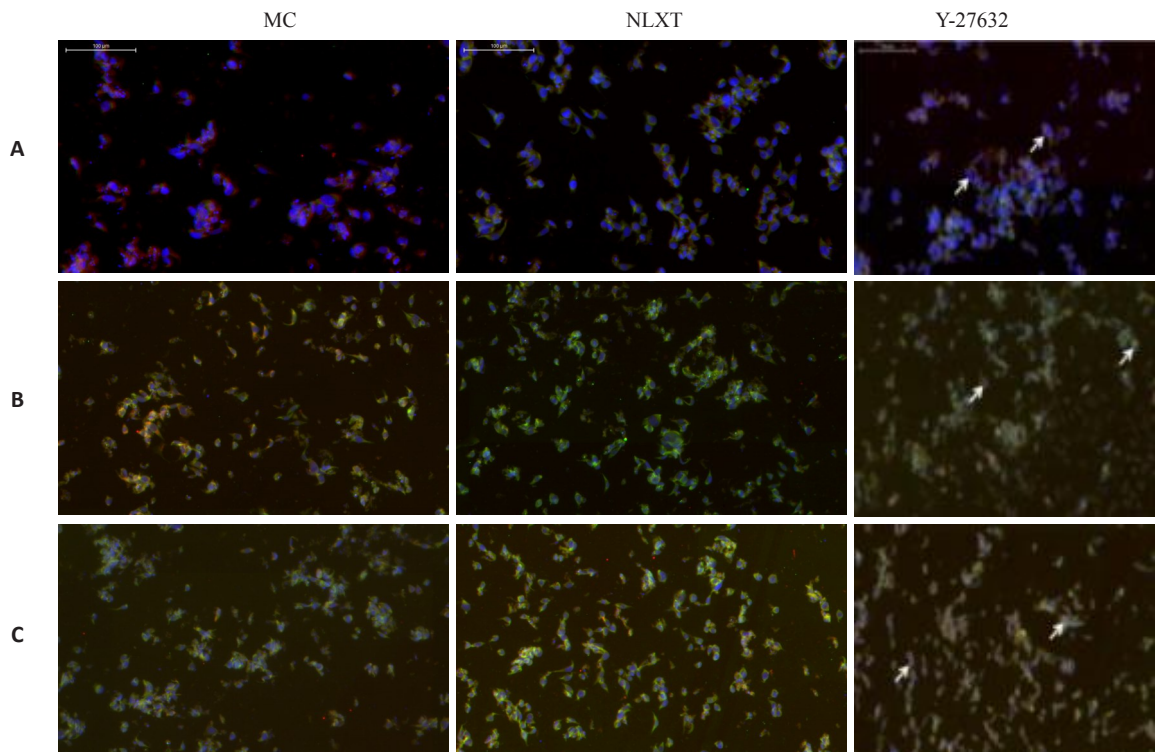


图8 BrdU/DCX 阳性细胞表达

Fig.8 Expression of BrdU/DCX in the NSCs detected by immunofluorescence assay on day 1 (A), 3 (B), and 7 (C) ($\times 200$).

明显;脑络欣通组和阻滞剂组标记阳性细胞数目较空白组明显增多,第7天增多明显且逐渐分布规律。以上研

究结果均提示脑络欣通具有类Y-27632样作用,能推动轴突再生促进神经干细胞的增殖,诱导分化。

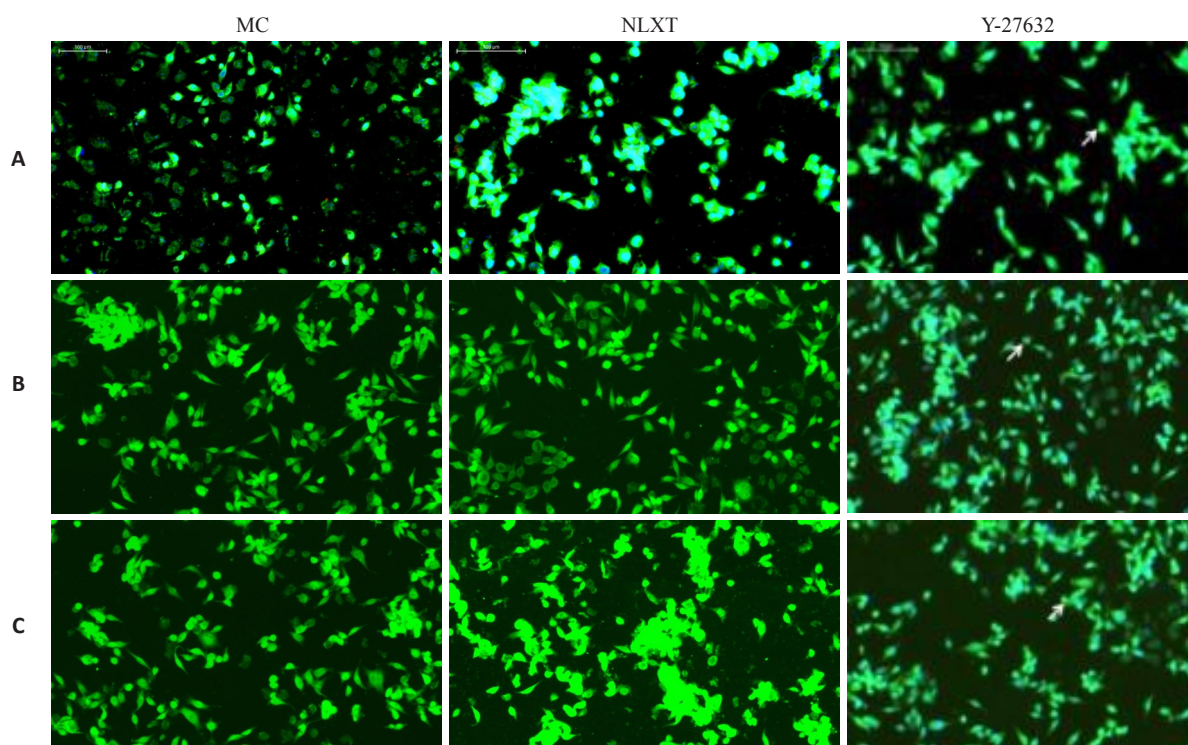


图9 BrdU/NEUN 阳性细胞表达

Fig.9 Expression of BrdU/NEUN in the NSCs detected by immunofluorescence assay on day 1 (A), 3 (B), and 7(C) (×200).

前期研究发现^[24-26]脑络欣通临床上治疗脑血管疾病疗效显著^[27-30]。元气充足,则气能摄血,血液贯通于脉络,使血液循环畅通,而血循脉道则血液上于脑窍,保证大脑组织血液和氧气供应充足。气旺以生新血使化生有源。因此,在治疗缺血性中风病气虚血瘀证时应予“益气活血通络”法^[32]。遵从“益气活血通络”法拟定的中药复方“脑络欣通”,全方由黄芪、川芎、三七、蜈蚣等组成。黄芪具有补气之功效,补气主要是改善机体功能状态,补气则消除脉中之瘀;气旺以生血活血,从而改善脑部血液循环。川芎具有活血、通络止痛功效。川芎活血而顺畅,使得机体气血渗灌脉络。三七具有活血化瘀之功;三七佐以蜈蚣则血脉疏通。脑络欣通全方扶正祛邪、攻补兼施,活血中寓以补气,使气贯经脉以助血行,营血流畅经脉得养。本研究通过脑络欣通对NSCs增殖和分化观察发现,脑络欣通干预后,GFAP阳性细胞从第1天到第7天逐渐减少,β-tubulin III 阳性细胞增多且分布较为规律,与时间呈现正相关性。说明脑络欣通能够促进NSCs向神经元细胞和胶质细胞分化,修复损伤细胞。

参考文献:

[1] Yu W, Jiang WJ. Stenting for intracranial stenosis: potential future for the prevention of disabling or fatal stroke [J]. Stroke Vasc Neurol, 2018, 3(3): 140-6.
 [2] Yu X, Wang X, Zeng S, et al. Protective effects of primary neural

stem cell treatment in ischemic stroke models [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 2219-28.
 [3] Zhang G, Chen L, Chen W, et al. Neural stem cells alleviate inflammation *via* neutralization of IFN-γ negative effect in ischemic stroke model [J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14(6): 1178-88.
 [4] Andres-Mach M, Haratym-Maj A, Zagaja M, et al. ACEA (a highly selective cannabinoid CB1 receptor agonist) stimulates hippocampal neurogenesis in mice treated with antiepileptic drugs [J]. Brain Res, 2015, 1624(15): 86-94.
 [5] Tahta A, Izgi N, Bagci-Onder T, et al. Assessment of the MRI and behavioral test results in a focal cerebral ischemia-reperfusion model in the rat after separate and combined use of mouse-derived neural progenitor cells, human-derived neural progenitor cells and atorvastatin [J]. Turk Neurosurg, 2018, 28(4): 571-81.
 [6] Jiang XC, Xiang JJ, Wu HH, et al. Neural stem cells transfected with reactive oxygen species-responsive polyplexes for effective treatment of ischemic stroke [J]. Adv Mater, 2019, 31(10): e1807591.
 [7] Huat TJ, Khan AA, Abdmllah JM, et al. Mirna expression profile of neural progenitor-like cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells under the influence of IGF-1, bFGF and EGF [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(5): 9693-718.
 [8] Machado VM, MI Morte, BP Carreira, et al. Involvement of calpains in adult neurogenesis: implications for stroke [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 22.
 [9] Yu X, Wang X, Zeng S, et al. Protective effects of primary neural stem cell treatment in ischemic stroke models [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 2219-2228.
 [10] Lee SH, N Lumelsky, L Studer, et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells

- [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(6): 675-9.
- [11] Boese AC, Le QE, Pham D, et al. Neural stem cell therapy for subacute and chronic ischemic stroke[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 154.
- [12] 张兰兰, 曹琼, 胡子有, 等. 槲皮素对成年大鼠局灶性脑缺血后侧脑室室管膜下区神经干细胞增殖的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(7): 1200-3.
- [13] 唐巍, 王键, 王又闻, 等. 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[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(2): 182-7.
- [14] 韩义皇, 王键. 脑络欣通对大鼠中动脉阻塞再灌注模型大鼠神经干细胞增殖分化的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2017, 36(6): 58-63.
- [15] 陈立铭, 裴磊. 脑络欣通和左归丸药物血清体外培养神经干细胞的增殖与分化[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(32): 4845-51.
- [16] 唐巍, 王键, 王又闻, 等. 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[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(2): 182-7.
- [17] 王键, 陈业农, 唐巍, 等. 脑络欣通对局灶性脑缺血/再灌注大鼠神经干细胞及相关调节因子影响的实验研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2008(11): 837-9.
- [18] 唐巍, 王键, 陈业农, 等. 脑络欣通药物血清对大鼠胚胎神经干细胞生长分化的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(1): 32-5.
- [19] Jimenez-Gonzalez A, García-Concejo A, León-Lobera F, et al. Morphine delays neural stem cells differentiation by facilitating nestin overexpression[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(3): 474-84.
- [20] Yan S, Li P, Wang Y, et al. Nestin regulates neural stem cell migration *via* controlling the cell contractility[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 78: 349-60.
- [21] Zhang T, Yang X, Liu T, et al. Adjudin-preconditioned neural stem cells enhance neuroprotection after ischemia reperfusion in mice[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 248.
- [22] Shen F, Walker EJ, Jiang L, et al. Coexpression of angiopoietin-1 with vegf increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(12): 2343-51.
- [23] Ye Q, Wu Y, Wu J, et al. Neural stem cells expressing bFGF reduce brain damage and restore sensorimotor function after neonatal hypoxia-ischemia[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(1): 108-18.
- [24] 谭辉, 尹婷婷, 王键, 等. 气虚血瘀证脑缺血再灌注病证结合大鼠模型的建立与评价[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(7): 832-7.
- [25] 何玲, 王键. 新安医家验方脑络欣通改善缺血性中风作用机制研究的思路与方法[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5): 1921-5.
- [26] 谭辉, 王键, 尹婷婷, 等. 益气活血方基于miR-124调控Wnt通路促进神经再生[J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(8): 1047-53.
- [27] 杨文明, 李祥, 王键, 等. 脑络欣通治疗脑梗死恢复期气虚血瘀证的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 12(12): 1424-6.
- [28] 陈城, 张桥, 杨文明. 脑络欣通颗粒对脑梗死急性期气虚血瘀证超氧化物歧化酶和丙二醛的影响[J]. *中医药临床杂志*, 2018, 30(3): 501-4.
- [29] 杨文明, 李祥, 汪瀚, 等. 脑络欣通对缺血性中风(脑梗死)恢复期气虚血瘀证血液流变学、P-选择素的影响[J]. *中医药临床杂志*, 2013, 25(11): 986-8.
- [30] 邓华. 脑络欣通颗粒治疗缺血性中风急性期气虚血瘀证临床研究[J]. *中外医学研究*, 2017, 15(7): 133-5.

(编辑:余诗诗)