

• 药理与临床 •

三七总皂苷对全脑缺血成年大鼠侧脑室室管膜区神经再生的影响

贺旭^{1,2}, 葛金文³, 黄俊^{1,4*}, 潘爱华¹, 李志远¹

1. 中南大学基础医学院 人体解剖与神经生物学系, 湖南 长沙 410013
2. 益阳医学高等专科学校 解剖教研室, 湖南 益阳 413000
3. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208
4. 邵阳医学高等专科学校 解剖教研室, 湖南 邵阳 422000

摘要: **目的** 探讨三七总皂苷(TSPN)对全脑缺血后成年大鼠侧脑室室管膜区(SVZ)神经再生的影响。**方法** 采用四血管阻断法制作全脑缺血模型。大鼠分成假手术组、模型组和TSPN组。TSPN组大鼠全脑缺血后30 min ip给予剂量为75 mg/kg的TSPN,每天1次,模型组给予等体积的生理盐水,连续14 d。分别于再灌注1、3、7、14 d处死大鼠,免疫组织化学染色观察SVZ区BrdU和微管相关蛋白Doublecortin(DCX)的表达,免疫荧光双标观察SVZ区BrdU/DCX、DCX/Ki67、GFAP/DCX的共表达情况。**结果** TSPN组SVZ区7、14 d的BrdU⁺细胞数目均显著高于模型组对应的时间点($P < 0.01$ 、 0.001); TSPN组和模型组SVZ区DCX⁺细胞的平均光密度值在7、14 d有统计学差异($P < 0.01$ 、 0.001); TSPN组SVZ区14 d的BrdU/DCX细胞,均显著多于模型组($P < 0.01$); TSPN组SVZ区Ki67/DCX细胞在7、14 d的表达多于模型组,差异显著($P < 0.01$ 、 0.001);两组SVZ区GFAP/DCX细胞与DCX的比值在3、7、14 d差异显著($P < 0.05$ 、 0.001)。**结论** TSPN促进全脑缺血后大鼠SVZ区神经再生,加速全脑缺血后大鼠SVZ区神经祖细胞增殖和分化,促进全脑缺血后大鼠SVZ区星形胶质细胞转化新生未成熟神经元。

关键词: 三七总皂苷; 侧脑室室管膜区; 神经再生; 迁移; 全脑缺血

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)09-1535-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.015

Effect of total saponins of *Panax notoginseng* on neuroregeneration in subventricle zone of rats with global cerebral ischemia

HE Xu^{1,2}, GE Jin-wen³, HUANG Jun^{1,4}, PAN Ai-hua¹, LI Zhi-yuan¹

1. Department of Anatomy and Neurobiology, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha 410013, China
2. Department of Anatomy, Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China
3. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. Department of Anatomy, Shaoyang Medical College, Shaoyang 422000, China

Abstract: Objective To explore the effect of total saponins of *Panax notoginseng* (TSPN) on the neuroregeneration in subventricle zone (SVZ) in rats with global cerebral ischemia. **Methods** Using four-vessel occlusion method to build the global cerebral ischemia model. Rats were divided into Sham group, vehicle group, and TSPN group. The rats in TSPN group were ip administered with TSPN 30 min post-brain ischemia. The dose of TSPN (75 mg/kg) was suspended in 0.9% saline (10 g/L), once per day for 1, 3, 7, 14 days after reperfusion. While rats in the vehicle group were treated with equal volume of 0.9% saline, one injection per day until the rats were sacrificed at either 1, 3, 7, and 14 days after brain ischemia. The BrdU and Doublecortin (DCX) expression in SVZ was assessed by immunohistochemistry and

收稿日期: 2015-11-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81171037/H0903); 湖南省科技厅创新平台与人才计划项目(2015JC3129); 湖南省博士创新科研课题(CX2014B099); 湖南省教育厅课题(13C958); 邵阳市科技局课题(2015JH51); 益阳市科技局课题(2015JZ42)

作者简介: 贺旭(1984—), 男, 在读博士, 讲师, 主要研究方向为中药在心脑血管疾病神经发生与神经再生的研究。

Tel: 13787196994 E-mail: Hexu0628@163.com

*通信作者 黄俊(1982—), 男, 在读博士, 讲师, 主要从事中枢神经系统疾病的基础研究。Tel: 13574963615 E-mail: 26324782@qq.com

applying the immunofluorescence double-labelling to detect the BrdU/DCX, DCX/Ki67, and GFAP/DCX in SVZ. **Results** In comparison with the vehicle group, the number of BrdU⁺ cells in SVZ of TSPN group was significantly higher on days 7 and 14 ($P < 0.01, 0.001$); Statistical meaning existed in two groups on days 7 and 14 about the mean optical density of DCX⁺ cells in SVZ ($P < 0.01, 0.001$). In comparison with the vehicle group, the number of the BrdU-labeled cells co-expressing DCX in the SVZ on day 14 of TSPN group was significantly different ($P < 0.01, 0.001$). There was statistical meaning in comparison of the number of colocalization of DCX with Ki67 on days 7 and 14 in SVZ between the TSPN group and vehicle group ($P < 0.01, 0.001$). The ratio of GFAP/DCX to DCX in SVZ of two groups were statistically different on days 2, 7, and 14 ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** TSPN could promote the neuroregeneration, drive the proliferation and differentiation of neural progenitor cells, and enhance the differentiation of gliosis into newborn immature neurons in SVZ of rats with global cerebral ischemia.

Key words: total saponins of *Panax notoginseng*; SVZ; neuroregeneration; migration; global cerebral ischemia

侧脑室的室管膜下层 (Subventricular zone, SVZ) 是神经再生的主要区域之一, 当受到脑缺血等外界病理性刺激时, SVZ 区神经再生能力大大增强, 所产生的新生神经元可迁移到受损皮质参与修复和构建新的突触联系。脑缺血后这种通过神经元替代的自我修复方式可促进某种程度的恢复, 但是内源性神经干细胞神经再生能力有限, 产生的新生神经元数量难以完全替代丢失的细胞。例如在局灶性脑缺血模型中, 新生的神经元只能替代纹状体 0.2% 凋亡神经元^[1]。因此寻找一种可靠药物或者其他治疗方案来放大或者加速脑自身神经干细胞的增殖、分化、迁移、成熟和存活, 对开展全脑缺血后的恢复性治疗有着重要意义。

三七是我国名贵中药材, 又称田七、参三七, 为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎。三七总皂苷 (total saponins of *Panax notoginseng*, TSPN) 是三七的主要活性成分^[2], 一项多中心临床研究证实 TSPN 治疗脑梗死安全而有效^[3]。前期研究发现剂量为 75 mg/kg 的 TSPN 可促进全脑缺血后大鼠嗅球新生的未成熟神经元的神经发生^[4]。TSPN 也可抑制缺氧复氧后大脑皮层神经元凋亡^[5], 发挥神经保护作用^[6]。体外实验表明 TSPN 可调节大鼠海马神经干细胞的增殖和分化, 提高分化为神经元的比例^[7]。然而目前国内外关于 TSPN 是否能促进大鼠全脑缺血后 SVZ 区的神经再生鲜有报道, 因此本研究通过四血管阻断法建立全脑缺血模型, 观察全脑缺血后 TSPN 对 SVZ 区神经再生的影响, 探讨 TSPN 在全脑缺血中的神经保护作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 250~290 g, 8 周龄, 由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供,

合格证号 SCXK (湘) 2009-0012。所有动物适应环境 5 d 后开始实验, 模型制作过程中尽可能减少动物的痛苦和动物使用的数, 整个实验程序都通过中南大学伦理委员会的批准。

1.2 仪器、药品与试剂

Kopf 脑立体定位仪 (David KOPF Instruments 公司); 珊顿冰冻切片机 (Shan Don 公司); GX.SS.22-3 手术显微镜 (上海医疗器械股份有限公司); Olympus BX67 荧光显微镜 (奥林巴斯); TSPN (HPLC 测得总皂苷质量分数 $\geq 98\%$, 四川成都麦卡希化工有限公司, 批号 12052901); BrdU 生化试剂 (Sigma 公司); 微管相关蛋白 Doublecortin (DCX) 羊抗 (Santa Cruz Biotechnology 公司); BrdU 抗体 (Serotec 公司); Ki67 (Vector 公司)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP, Sigma-Aldrich 公司)。

2 方法

2.1 实验分组、全脑缺血模型的制备及给药

大鼠随机分成假手术组、模型组和 TSPN 组。通过四动脉血管阻断法建立全脑缺血模型^[4,8]: 大鼠 ip 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 仰卧固定于 Kopf 脑立体定位仪台面; 钝性分离两侧颈总动脉; 俯卧位, 电凝两侧椎动脉; 过夜, 乙醚吸入麻醉, 外科缝线拉出颈总动脉, 微动脉夹阻塞血管 30 min。模型制作过程中, 维持直肠温度和大鼠体温在 $(37.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 。假手术组组只分离两侧血管, 不夹闭动脉。模型组在脑缺血后 30 min ip 等体积生理盐水, 每天 1 次, TSPN 组 ip 给予大鼠 75 mg/kg 的 TSPN^[9], 每天 1 次, 连续 14 d。模型组和 TSPN 组分别于再灌注 1、3、7、14 d 给药 1 h 后大鼠 ip 给予 BrdU (50 mg/kg, 终质量浓度为 50 mg/mL), 连续注射 3 次, 每次间隔 8 h。假手术组行假手术后以相同方式注射 BrdU。模型组和 TSPN 组在再灌注 1、3、7、14 d 分别处死 5 只大鼠, 假手术组在

全脑缺血后 14 d 处死大鼠作为参照。

2.2 组织处理及染色

深度麻醉大鼠，灌注取出脑组织，4 °C 固定过夜，梯度沉糖，以防冰晶出现。恒低温冰冻切片机进行冠状位切片。采用邻切法切片，首先按顺序切 12 张（1 套）30 μm 切片放入组织培养板中，然后切 12 张（1 套）6 μm 切片贴在镀阳离子玻片上，接着弃取 12×30 μm 切片，然后再收集下一轮脑片。

2.2.1 免疫组织化学染色 采用 ABC-DAB 免疫组织化学方法染色。DCX 的实验步骤：脑片以 3% H₂O₂ 处理 30 min 以消除内源性过氧化物酶；5% 马血清 + 0.1% tritonX-100 磷酸缓冲液孵育 2 h；加入山羊抗 DCX（1：1 000），4 °C 孵育过夜；经广谱生物素化二抗（1：400）处理，反应 1 h 后在提前 30 min 配好的 ABC 溶液孵育 2 h，免疫反应产物经 DAB 显色。BrdU 的实验步骤：甲醇-30% H₂O₂-磷酸钠缓冲溶液（7：1：2）处理脑片 15 min；放入 50% 甲酰胺和柠檬酸钠（pH 值 6.0）液体中，65 °C 水浴进行抗原修复 1 h，50% 甲酰胺与柠檬酸钠的比例为 1：1；室温 2 mol/L HCl 处理组织 30 min；0.01 mol/L Tris-HCl 反应 10 min；5% 山羊血清 + 0.1% tritonX-100 孵育 2 h；加入大鼠抗 BrdU（1：2 000）4 °C 孵育过夜；经生物素化山羊抗大鼠 IgG 二抗（1：400）处理；反应 1 h 后在提前 30 min 配好的 ABC 溶液孵育 2 h，免疫反应产物经 DAB 显色。阴性对照：用正常马血清代替一抗，以排除二抗的非特异性染色，结果为阴性。

2.2.2 免疫荧光双标染色法 选取 6 μm 切片染色。5% 驴血清 + 0.1% tritonX-100 磷酸盐缓冲液室温孵育 2 h，以抑制非特异性抗体结合；将脑片与以下 2 组抗体孵育：山羊抗 DCX（1：1 000）与兔抗 GFAP（1：2 000）、山羊抗 DCX（1：1 000）与兔抗 Ki67（1：1 000）。大鼠抗 BrdU（1：1 000）与山羊抗 DCX（1：1 000）的共表达实验需经过以下处理：将脑片挑入装有 50% 甲酰胺和 1× 柠檬酸钠（pH = 6.0）的 1 mL EP 管中，放入 65 °C 水浴 1 h 进行抗原修复（甲酰胺-柠檬酸钠 1：1）；室温 2 mol/L HCl 处理组织 30 min；0.01 mol/L Tris-HCl 反应 10 min；5% 驴血清 + 0.1% tritonX-100 孵育 2 h；加入一抗过夜。Alexa Fluor 488 与 Alexa Fluor 594 偶联驴抗大鼠、驴抗兔及驴抗山羊 IgG（1：200）室温孵育 2 h；双苯酰亚胺（Bisbenzimidazole, 1：5 000）染核，10 min；贴片，50% 甘油封片。

2.3 成像和统计学分析

免疫组织化学片子在目镜（×10）下拍照，每套组化片子取相同的部位进行细胞计数，取均值。考虑到侧脑室的 DCX 聚集成团状，采用 NIH Image J 测量平均光密度值。免疫荧光双标图片分析：选用一套 6 μm 厚度的 SVZ 区的脑片，每个动物挑选 4 张片子，图像在目镜（×20）下拍照。每张片子拍照 4 个视野，记录每张片子 4 个视野总细胞数目和共表达细胞的数目，然后统计 4 张脑片的细胞数量（1 只大鼠的细胞数量总和），每个时间点挑选 5 只大鼠，计算各个时间点各类细胞总数量。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用统计学软件 Prism GraphPad 5.0 进行统计分析，通过双因素方差分析或者配对 *t* 检验比较组间差异。

3 结果

3.1 对 SVZ 区 DCX 和 BrdU 阳性细胞表达的影响

全脑缺血后 SVZ 区 DCX 阳性细胞（DCX⁺，呈深棕色团状）和 BrdU 阳性细胞（BrdU⁺，呈棕黄色颗粒状）密集，尤其在 SVZ 区后角大量的 DCX⁺ 细胞聚集成团状。见图 1。用平均光密度值来测量 DCX 的免疫阳性产物，阳性产物越高，平均光密度值也越高。与假手术组比较，模型组 DCX⁺ 和 BrdU⁺ 细胞大量增加，给予 TSPN 干预后，这 2 种细胞增加更为显著（*P* < 0.05），见图 1。与模型组比较，TSPN 组 DCX⁺ 的平均光密度值在 7、14 d 显著升高（*P* < 0.001）。

3.2 对 SVZ 区 BrdU/DCX 共表达的影响

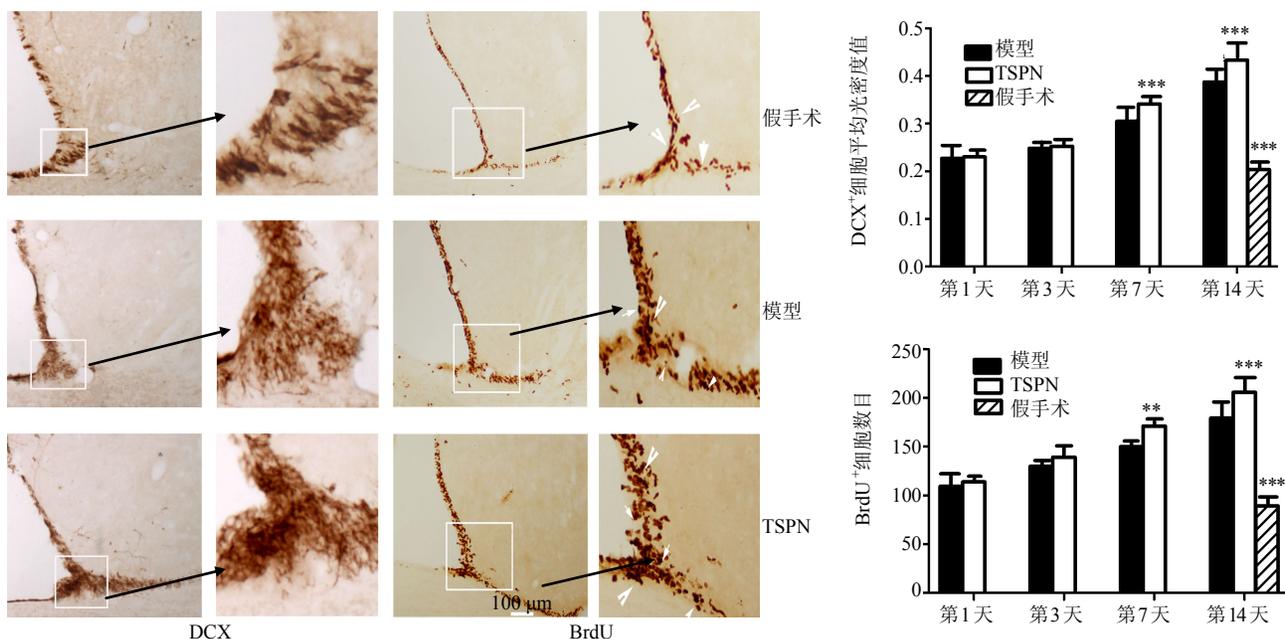
从“3.1”项结果可知，与 1、3、7 d 相比，模型组与 TSPN 组大鼠 SVZ 区 14 d 时 BrdU⁺ 细胞表达最多。考虑到 BrdU 是外源性细胞增殖标记物，因此探讨 SVZ 区神经祖细胞增殖和转化未成熟神经元的情况。实验结果显示 TSPN 组在 14 d 时 BrdU/DCX 共表达的细胞数量明显高于模型组（*P* < 0.01）。见图 2。

3.3 对 SVZ 区 Ki67 和 DCX 共表达的影响

全脑缺血后 SVZ 区大量的 Ki67 分裂成与 DCX 共表达。TSPN 组这种共表达现象更加明显，并且沿着侧脑室的下角成线状迁移到纹状体。在再灌注 7、14 d，TSPN 组与模型组 SVZ 区 Ki67 与 DCX 的共表达细胞差异显著（*P* < 0.05、0.001），且 TSPN 组 Ki67 与 DCX 细胞数量增加较模型组更快。见图 3。

3.4 TSPN 促进全脑缺血后 SVZ 区 GFAP/DCX 细胞的表达

先统计模型组和 TSPN 组各个时间点（1、3、7、14 d）GFAP/DCX 共表达细胞的数目，再统计 2 组相应时间点 DCX 阳性表达的数目，以 GFAP/DCX 共表



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below

图 1 TSPN 对全脑缺血后大鼠 SVZ 区 DCX⁺和 BrdU⁺细胞表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of TSPN on expression of DCX⁺ and BrdU⁺ cells in SVZ of rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

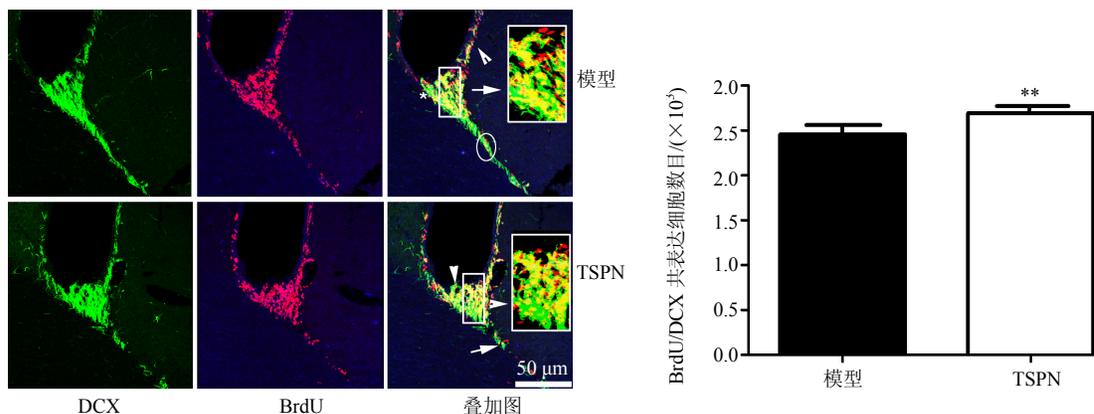


图 2 TSPN 对全脑缺血后大鼠 SVZ 区 BrdU 与 DCX 共表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effects of TSPN on BrdU/DCX co-labeled cells in SVZ of rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

达的细胞数目与 DCX 阳性表达细胞数目的比值代表神经干细胞的分化。2 组全脑缺血大鼠 SVZ 区 GFAP 与 DCX 的共表达主要位于胞浆, 呈“小环形”, 见图 4。TSPN 组与模型组比较, SVZ 区 GFAP/DCX 共表达细胞数目与 DCX 阳性表达细胞数目比值在再灌注后 3、7、14 d 显著提高 ($P < 0.05, 0.001$), 见图 5。

4 讨论

当前经典的检测成年神经再生方法是注入 BrdU 渗入分裂细胞的 DNA 合成期的 S 期并进行标记, 同时观察 BrdU 标记的阳性细胞与成熟神经元标记物的共表达情况。但考虑到 BrdU 有一定神经细胞毒性,

抑制了部分神经组细胞的增殖分化, 同时 BrdU 的注射常在活体, 不适合用来标记人类神经祖细胞的有丝分裂^[10]。DCX 是一种微管蛋白, 相对分子质量为 40 000, 是未成熟神经元和神经再生的标记物^[11-12], 参与神经突的外生和突触发生^[13]。因此, 目前研究神经再生常联用这 2 种方法。

4.1 TSPN 促进全脑缺血后大鼠 SVZ 区神经再生

本实验结果表明 SVZ 区 BrdU⁺细胞数目在第 2 周达到峰值, 这与先前报道一致^[14]。给予 TSPN 治疗后, 全脑缺血后 SVZ 区 BrdU⁺细胞显著增加。这表明 TSPN 可促进全脑缺血后 SVZ 区神经祖细胞发

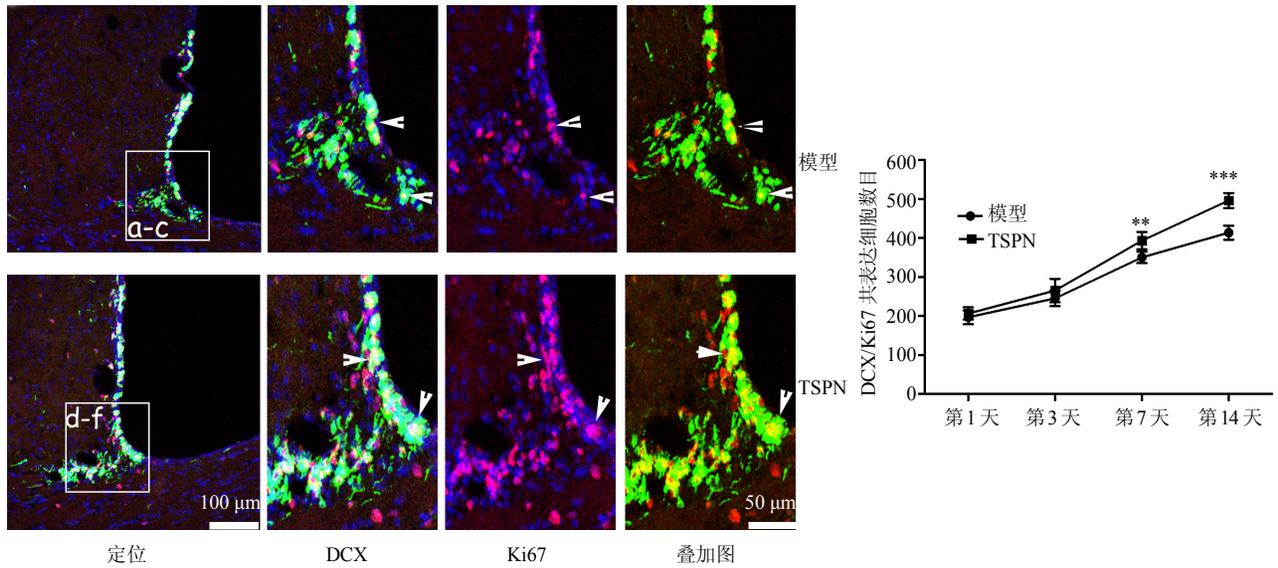


图 3 TSPN 对全脑缺血后大鼠 SVZ 区 Ki67 与 DCX 共表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of TSPN on Ki67/DCX co-labeled cells in SVZ of rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

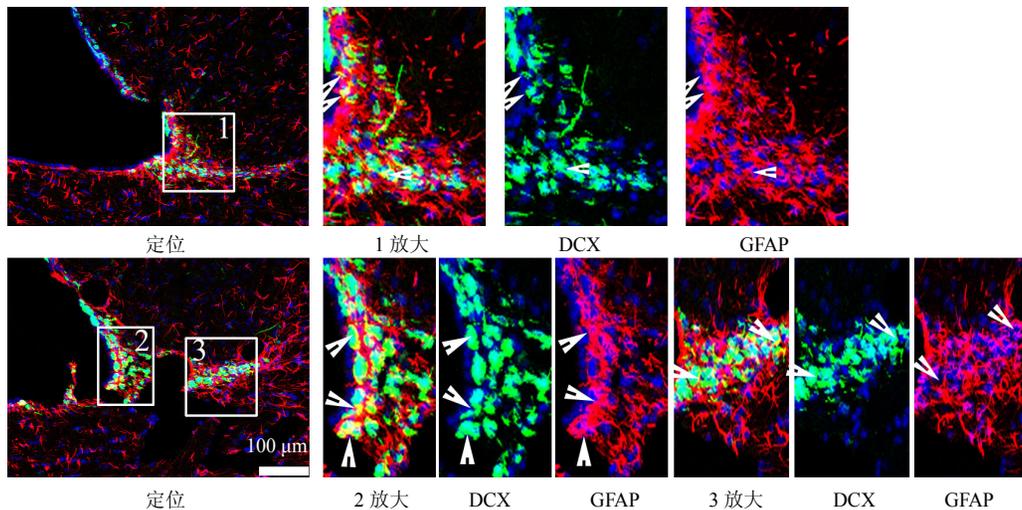


图 4 全脑缺血后 14 d 大鼠 SVZ 区 GFAP/DCX 共表达免疫荧光图

Fig. 4 Representative immunofluorescent pictures of GFAP/DCX expression in SVZ of rats with global cerebral ischemia injury

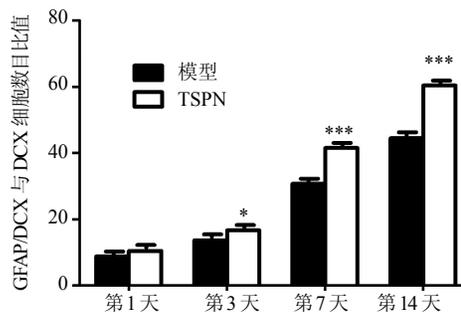


图 5 TSPN 对全脑缺血后大鼠 SVZ 区 GFAP/DCX 共表达细胞数目与 DCX 阳性表达细胞数目比值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of TSPN on ratio of GFAP-labeled cells co-expressing DCX to DCX in SVZ of rats with global cerebral ischemia injury ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

生增殖, 产生更多的新生神经元。在成年神经再生过程中, DCX 的表达开始于神经祖细胞的产生, 在第 2 周神经元的表达达到高峰, 随后随着成熟神经元 NeuN 的出现, DCX 的表达开始下调^[14]。DCX 的免疫组织化学结果显示全脑缺血后 SVZ 区 DCX 的表达在 14 d 最多, 而给予 TSPN 治疗, 可显著促进大鼠 SVZ 区 DCX 的表达, 并且迁移到纹状体。这说明 TSPN 可加速 SVZ 区神经元迁移到脑缺血区域, 并且这些未成熟和迁移神经元被整合到神经网络, 参与大脑的修复且在迁移过程中保持细胞分裂的能力^[15-17]。

4.2 TSPN 加速 SVZ 区细胞增殖和分化

Ki67 是一种核蛋白质, 参与调控细胞的有丝分

裂,在细胞增殖 G₁、S、G₂和 M 期中均有表达,可作为标记细胞处于增殖状态的一个标记物。由于 Ki67 的半衰期为 1 h,所以在细胞静止期(G₀)不表达。全脑缺血后 2 组大鼠 SVZ 区 1、3、7、14 d DCX 与 Ki67 均有表达,SVZ 在脑缺血 14 d 共表达的细胞最多。这说明全脑缺血后 SVZ 区新生的未成熟神经元中有部分处于增殖状态,并且 TSPN 可使更多新生的未成熟神经元发生增殖。BrdU 是标记细胞增殖和分裂的外源性标记物,全脑缺血 14 d SVZ 区 BrdU/DCX 细胞表达最多,这说明脑缺血刺激了 SVZ 区神经祖细胞分裂成新生的未成熟神经元^[18-19],而全脑缺血大鼠经 TSPN 治疗后,SVZ 区 BrdU/DCX 细胞较模型组更多(P<0.01),这表明 TSPN 在神经祖细胞的分裂活动中起强有力的驱动作用。

4.3 TSPN 刺激 SVZ 区星形胶质细胞转化成新生未成熟神经元

星形胶质细胞有神经干细胞的属性,是成年神经再生的主要“龕”,脑缺血可引起星形胶质细胞活化增生且分化成新生神经元^[20-21]。免疫荧光双染色结果显示全脑缺血后 SVZ 区 GFAP/DCX 细胞与 DCX 的比值在 14 d 最高,这提示脑缺血的确可刺激星形胶质细胞分化成新生的具有迁移功能的未成熟神经元,并且在脑缺血早期阶段这种现象不断加强。而给予 TSPN 干预后,这种现象更明显,这表明全脑缺血后 TSPN 可刺激增生的星形胶质细胞进一步分化。

综上所述,TSPN 可以促进全脑缺血后大鼠 SVZ 区的神经再生,加速全脑缺血后大鼠 SVZ 区细胞增殖和分化以及刺激全脑缺血后大鼠 SVZ 区星形胶质细胞转化成新生未成熟神经元。

参考文献

- [1] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9): 963-970.
- [2] 王莹,褚扬,李伟,等.三七总皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [3] 白羽,张淑瑶,任杰,等.三七总皂苷注射液治疗脑梗死的多中心研究 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2001, 20(4): 257-259.
- [4] He X, Deng F, Ge J, et al. Effects of total saponins of *Panax notoginseng* on immature neuroblasts in the adult olfactory bulb following global cerebral ischemia/ reperfusion [J]. *Neural Regeneration Res*, 2015, 10(9): 1450-1456.
- [5] 康立源,周志焕,张萌,等.三七总皂苷对缺氧复氧致皮质神经元损伤细胞凋亡相关基因及蛋白表达的影响 [J]. *天津中医药大学学报*, 2010, 29(1): 22-25.
- [6] 唐婧姝,裴清华.三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(15): 210-213.
- [7] 张建平,司银楚,朱培纯.三七总皂苷对体外培养的大鼠海马神经干细胞增殖分化的作用 [J]. *解剖学报*, 2010, 41(3): 362-366.
- [8] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267-272.
- [9] 贺旭,葛金文,邓长青,等.三七总皂苷上调 Bcl-2/Bax 的比率抑制大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元的凋亡 [J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1337-1344.
- [10] Cooper-Kuhn C M, Kuhn H G. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 134(1-2): 13-21.
- [11] Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(1): 1-14.
- [12] Manohar S, Paolone N A, Bleichfeld M, et al. Expression of doublecortin, a neuronal migration protein, in unipolar brush cells of the vestibulocerebellum and dorsal cochlear nucleus of the adult rat [J]. *Neuroscience*, 2012, 202(2012): 169-183.
- [13] Francis F, Koulakoff A, Boucher D, et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons [J]. *Neuron*, 1999, 23(2): 247-256.
- [14] Jin K, Minami M, Lan J Q, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8): 4710-4715.
- [15] Brown J P, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn C M, et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 467(1): 1-10.
- [16] 李鑫,毕桂南,石胜良,等.微管相关蛋白和 NF-κB 在大鼠脑缺血预处理中的神经保护作用 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2011, 8(7): 362-366.
- [17] Otero L, Zurita M, Bonilla C, et al. Endogenous neurogenesis after intracerebral hemorrhage [J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(3): 303-315.
- [18] Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus [J]. *Stroke*, 2001, 32(8): 1890-1896.
- [19] Tanaka Y, Tanaka R, Liu M, et al. Cilostazol attenuates ischemic brain injury and enhances neurogenesis in the subventricular zone of adult mice after transient focal cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2010, 171(4): 1367-1376.
- [20] Robel S, Berninger B, Gotz M. The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(2): 88-104.
- [21] Pan A, Li M, Gao J Y, et al. Experimental epidural hematoma causes cerebral infarction and activates neocortical glial and neuronal genesis in adult guinea pigs [J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(2): 249-261.