

如意珍宝丸对斑马鱼神经损伤的保护及促再生作用研究

朱晓宇¹, 王红月², 李怀平², 王海苹², 兰小红¹, 宋如顺¹, 李春启¹

1. 杭州环特生物科技股份有限公司, 浙江 杭州 310051

2. 山东金诃药物研究开发有限公司, 山东 济南 250101

摘要: **目的** 观察如意珍宝丸对斑马鱼神经损伤的保护与促再生作用。**方法** 用吗替麦考酚酯诱导斑马鱼中枢神经损伤模型; 用乙醇诱导建立斑马鱼外周运动神经损伤及轴索损伤模型; 用溴化乙锭诱导建立斑马鱼髓鞘损伤模型。分别在荧光显微镜下观察高、中、低质量浓度(10.0、33.3和100.0 $\mu\text{g/mL}$)的如意珍宝丸对模型斑马鱼的中枢神经、轴索荧光强度、外周运动神经长度以及髓鞘荧光强度变化的影响, 利用 NIDS-Element's 软件分别进行图像分析, 计算如意珍宝丸对斑马鱼中枢神经、轴索的保护率、对外周运动神经及髓鞘再生的促进率。**结果** 质量浓度分别为10.0、33.3和100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的如意珍宝丸对斑马鱼中枢神经损伤保护率分别为-2%、24%和50% ($P < 0.001$); 轴索损伤的保护率分别为3%、29%和48% ($P < 0.05$); 外周神经再生促进率分别为44% ($P < 0.05$)、49% ($P < 0.01$)和93% ($P < 0.001$); 髓鞘再生促进率分别为36% ($P < 0.01$)、37% ($P < 0.001$)和41% ($P < 0.001$)。**结论** 如意珍宝丸对斑马鱼中枢神经及轴索损伤具有保护作用, 对斑马鱼外周运动神经损伤及髓鞘损伤具有促再生作用。

关键词: 如意珍宝丸; 神经损伤保护; 斑马鱼; 再生; 最大无可见不良反应浓度; 中枢神经; 轴索; 髓鞘

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)03-0307-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.004

Protective and regeneration-promoting effects of Ruyi Zhenbao Pill on nerve injury in zebrafish

ZHU Xiao-yu¹, WANG Hong-yue², LI Huai-ping², WANG Hai-ping², LAN Xiao-hong¹, SONG Ru-shun¹, LI Chun-qi¹

1. Hangzhou Hunter Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310051, China

2. Shandong ARURA Pharmaceutical R&D Co., Ltd, Jinan 250101, China

Abstract: **Objective** To observe the protective and regeneration-promoting effects of Ruyi Zhenbao Pill (RZP) on nerve injury in zebrafish. **Methods** The zebrafish model of central nervous injury was induced by mycophenolate mofetil, the model of peripheral motor nerve and axonal injury was induced by ethanol, and the model of myelin damage was induced by ethidium bromide. The variations of central nerve, axon and myelin sheath fluorescence intensity, and peripheral motor nerve length in zebrafish, which exposed to the different concentration (10.0, 33.3, and 100.0 $\mu\text{g/mL}$) of RZP, were observed with fluorescence microscope. The effective protection rates of RZP on zebrafish central nerve and axone, and the regeneration-promoting effect on peripheral motor nerve and myelin sheath were analyzed and calculated with the image processing software NIDS-Element's. **Results** In 10.0, 33.3, and 100.0 $\mu\text{g/mL}$ RZP groups, the zebrafish central nervous injury protective rates were 2%, 24%, and 50% ($P < 0.001$), respectively, the peripheral nerve regeneration promoting rates were 44% ($P < 0.05$), 49% ($P < 0.01$), and 93% ($P < 0.001$), the axonal injury recovery rates were 3%, 29% and 48% ($P < 0.05$), and the myelin sheath regeneration promoting rates were 36% ($P < 0.01$), 37% ($P < 0.001$), and 41% ($P < 0.001$), compared with model group. **Conclusions** RZP could not only protect the central nervous and axonal injury, but also promote the regeneration of peripheral nerve and myelin sheath in zebrafish.

Key words: Ruyi Zhenbao Pill; nerve injury protection; zebrafish; regeneration; NOAEL; central nerve; axone; myelin sheath

收稿日期: 2016-10-08

基金项目: 浙江省科技重大专项(2014C03009)

作者简介: 朱晓宇(1985-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 从事药理毒理学研究。

*通信作者 李春启, E-mail: jackli@zhunter.com

神经损伤是指神经传导功能障碍、神经轴索中断或神经断裂,导致躯干和四肢感觉、运动及交感神经功能障碍的一种临床病症^[1]。神经损伤可分为中枢性神经损伤和周围神经损伤,中枢神经损伤常表现为偏瘫、失语、智力障碍或昏迷,甚至死亡^[2];周围神经损伤主要表现为肢体运动感觉及营养功能障碍,有较高的致残率^[3]。目前,西医临床治疗神经损伤疾病的方法主要有外源性神经生长因子、神经节苷酯、维生素等^[1]。上述西医疗法虽取得一定进展,但作用靶点单一、神经损伤修复治疗效果不甚理想。因此,神经损伤性疾病仍然缺乏行之有效的治疗药物。

神经损伤基础研究离不开适宜的动物模型,目前常用的模型有卡压伤模型、牵拉伤模型、离断伤模型、缺血再灌注损伤模型以及体外神经细胞损伤模型等,上述模型虽各有优势,但仍存在不足^[4-5]。已有大鼠脑缺血再灌注损伤模型显示如意珍宝丸具有显著的神经损伤修复保护作用^[6-7],但大鼠模型实验操作复杂、实验周期长、重复性差、费用高。斑马鱼神经损伤模型实验操作简单,实验周期短、重复性好、费用低,本研究利用转基因神经荧光斑马鱼评价如意珍宝丸的神经保护作用更加直观,优势更加明显。斑马鱼是一种与人类同源性较高的脊椎动物,大脑具有典型脊椎动物脑部形态学特征^[8];其生长发育周期短,神经系统简单,能够控制诸如运动、捕食、逃避、学习等多种复杂的行为活动^[9]。斑马鱼作为整体动物能从宏观上反映在外来化合物作用下,神经系统功能失调引起的变化。在发育早期(2~3 d)内,斑马鱼通体透明,能够通过特殊染色在活体或完整的固定标本中快速检测出化合物对神经系统的器质性损伤^[10]。其次,由于髓鞘对于神经信息的传导有重要作用,髓鞘的破坏常导致神经冲动传导变慢,甚至无法传递^[2]。而斑马鱼髓鞘结构特征和少突胶质细胞分化过程与哺乳动物高度一致,受精后4 d(4 dpf)便形成髓鞘的非紧密性结构并出现鞘膜^[11]。因此,利用模式生物斑马鱼进行神经系统,尤其是髓鞘与再髓鞘化过程的研究越来越受到研究者的青睐^[12-14]。如意珍宝丸是治疗神经损伤疾病有效的传统药物,为深入探索其神经损伤保护作用,本研究通过诱导建立斑马鱼神经损伤模型,观察如意珍宝丸对斑马鱼中枢及周围神经损伤的保护及促再生作用,并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

如意珍宝丸(规格 0.5 g/丸,金诃藏药股份有限公司,批号 20150129);乙醇(杭州龙山精细化工有限公司,批号 64-17-5);吗替麦考酚酯(批号 128794-94-5)、还原型谷胱甘肽(批号 70-18-8)、T3/T4(批号 55-03-8)、阿司匹林(批号 G1220028),均购自上海晶纯实业有限公司。

1.2 主要仪器

解剖显微镜(SZX7, OLYMPUS, Japan);电动聚焦连续变倍荧光显微镜(AZ100, Nikon 公司);6孔板(Nest Biotech);甲基纤维素(Aladdin Shanghai, China)。

1.3 动物

AB系斑马鱼,年龄为1、2 dpf;转基因外周运动神经元荧光系斑马鱼,1 dpf。动物来源:杭州环特生物科技股份有限公司,实验动物使用许可证号为SYXK(浙)2012-0171。饲养于28℃的养鱼用水中(水质:每1 L反渗透水中加入200 mg速溶海盐,电导率为480~510 $\mu\text{S}/\text{cm}$;pH值为6.9~7.2;硬度为53.7~71.6 mg/L CaCO_3),饲养管理符合国际AAALAC认证的要求^[14-15]。

2 方法

2.1 最大无可见不良反应浓度(NOEL)的摸索

所用斑马鱼为1 dpf AB品系斑马鱼。除对照组之外,所有实验组的斑马鱼均用0.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 吗替麦考酚酯处理24 h,建立斑马鱼中枢神经损伤模型。对照组给予养鱼用水,实验组分别水溶给予如意珍宝丸100、250、500和1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理,每组处理30尾斑马鱼。处理24 h后,统计毒性反应情况和死亡率。

2.2 对中枢神经损伤的保护作用

所用斑马鱼为1 dpf AB品系斑马鱼。除对照组之外,所有实验组斑马鱼均用0.25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 吗替麦考酚酯处理24 h,建立斑马鱼中枢神经损伤模型。造模同时,谷胱甘肽(阳性对照)组水溶给予500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 还原型谷胱甘肽;对照组和模型组给予养鱼用水;如意珍宝丸组分别水溶给予如意珍宝丸10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理,每组处理30尾斑马鱼。处理结束后,用吖啶橙(AO)对斑马鱼进行染色,随机选择15尾斑马鱼在显微镜下观察并拍照,利用图像处理软件NIDS-Element's进行图像分析,定量中枢神经荧光强度(S);如意珍宝丸对中枢神经的

保护作用计算公式如下:

$$\text{神经保护率} = (S_{\text{模型}} - S_{\text{如意珍宝丸}}) / (S_{\text{模型}} - S_{\text{对照}})$$

2.3 对轴索损伤的保护作用

取 1 dpf AB 品系斑马鱼, 除对照组外, 用 1.5% 乙醇处理 48 h, 建立斑马鱼外周运动神经损伤模型。造模结束后, T3/T4 (阳性对照) 组水溶给予 T3/T4 0.04 $\mu\text{mol/L}$; 对照组和模型组给予养鱼用水; 如意珍宝丸组分别水溶给予 10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 如意珍宝丸, 每组处理 30 尾。处理 48 h 后, 用 Axon 特异性抗体对斑马鱼进行免疫组化染色, 随机选择 15 尾斑马鱼在荧光显微镜下观察并拍照, 利用图像处理软件 NIDS-Element's 进行图像分析, 定量轴索荧光强度 (S), 如意珍宝丸对轴索的保护作用计算公式如下:

$$\text{轴索损伤保护率} = (S_{\text{如意珍宝丸}} - S_{\text{模型}}) / (S_{\text{对照}} - S_{\text{模型}})$$

2.4 对外周运动神经元损伤的促再生作用

取 1 dpf 转基因外周运动神经元荧光系斑马鱼, 除对照组外, 用 1.5% 乙醇处理 48 h, 建立斑马鱼外周运动神经损伤模型。造模结束后, T3/T4 (阳性对照) 组水溶给予 T3/T4 0.04 $\mu\text{mol/L}$; 对照组和模型组给予养鱼用水; 如意珍宝丸组分别水溶给予 10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 如意珍宝丸处理 24 h, 每组处理 30 尾斑马鱼。处理结束后, 随机选择 15 尾斑马鱼在荧光显微镜下拍照; 利用图像处理软件 NIDS-Element's 进行图像分析, 定量外周运动神经长度 (L); 如意珍宝丸对外周运动神经保护作用计算公式如下:

$$\text{外周运动神经再生促进率} = (L_{\text{如意珍宝丸}} - L_{\text{模型}}) / L_{\text{对照}}$$

2.5 对髓鞘损伤的促再生作用

取 2 dpf AB 品系斑马鱼, 除对照组外, 用 75 $\mu\text{mol/L}$ 溴化乙锭处理 2 dpf AB 品系斑马鱼 96 h, 建立斑马鱼髓鞘损伤模型。造模结束后, T3/T4 (阳性对照) 组水溶给予 T3/T4 0.04 $\mu\text{mol/L}$; 对照组和模型组给予养鱼用水; 如意珍宝丸组分别水溶给予 10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 如意珍宝丸, 每组处理 30 尾。处理 96 h 后, 用特异性髓鞘荧光染料染色, 随机选择 15 尾斑马鱼在荧光显微镜下拍照; 利用图像处理软件 NIDS-Element's 进行图像分析, 定量髓鞘荧光强度 (S); 对髓鞘促再生作用计算公式如下:

$$\text{髓鞘再生促进率} = (S_{\text{如意珍宝丸}} - S_{\text{模型}}) / (S_{\text{对照}} - S_{\text{模型}})$$

2.6 统计学分析

统计学处理结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad

5.0 进行方差分析和 Dunnett's- t 检验。

3 结果

3.1 NOAEL

根据表 1, 用 OriginPro 8.0 软件拟合浓度-致死曲线 (图 1), 求得如意珍宝丸的最大非致死浓度 (MNLC) 为 444 $\mu\text{g/mL}$, 但在 444 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时斑马鱼出现轻微毒性 (心包水肿、血流减慢等)。因此降低如意珍宝丸浓度至 NOAEL, 约为 100 $\mu\text{g/mL}$, 药效学评价实验选取 10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 3 个浓度。

表 1 如意珍宝丸浓度-致死数据表

Table 1 Concentration-mortality data of RZP

如意珍宝丸/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	死亡数/尾	死亡率/%
100	0	0
250	0	0
500	0	0
1 000	15	50.0
1 500	28	93.3
2 000	30	100.0

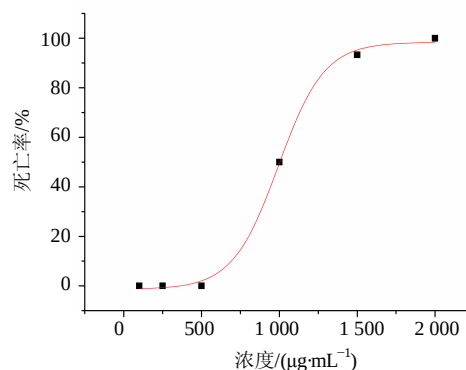


图 1 如意珍宝丸浓度-致死曲线

Fig. 1 Concentration-mortality curve of RZP

3.2 对中枢神经损伤的保护作用试验

与模型组比较, 如意珍宝丸 10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 组对斑马鱼中枢神经损伤保护率分别为 2%、24%、50% ($P < 0.001$), 表明 100 $\mu\text{g/mL}$ 如意珍宝丸对斑马鱼中枢神经损伤有保护作用。谷胱甘肽对斑马鱼中枢神经损伤保护率为 97% ($P < 0.001$)。结果见图 2、表 2。

3.3 对轴索损伤的保护作用

与模型组比较, 如意珍宝丸 10.0、33.3 和 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 组对斑马鱼轴索损伤保护率分别为 3%、29%和 48% ($P < 0.05$), 100 $\mu\text{g/mL}$ 组与模型

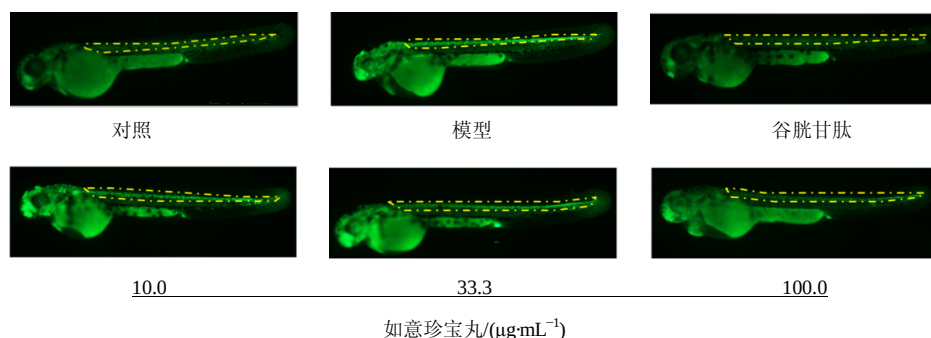


图2 如意珍宝丸对中枢神经损伤的保护作用表型图

Fig. 2 Protective effect of RZP on central nervous system injury

表2 如意珍宝丸对中枢神经损伤的保护作用 ($n=15$)
Table 2 Protective effect of RZP on central nervous system injury ($n=15$)

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	荧光强度/像素	中枢神经 保护率/%
对照	—	88 932 $\pm$ 3 028***	—
模型	—	21 0861 $\pm$ 11 873	—
谷胱甘肽	500	93 161 $\pm$ 5 155***	97
如意珍宝丸	10.0	213 564 $\pm$ 14 359	—2
	33.3	181 481 $\pm$ 12 054	24
	100.0	150 375 $\pm$ 5 839***	50

与模型组比较: *** $P<0.001$ *** $P<0.001$ vs model group

组比较, 斑马鱼轴索较完整、延伸较长, 说明如意珍宝丸 100 $\mu\text{g/mL}$ 对斑马鱼轴索损伤具有明显的保护作用。阳性对照药物 T3/T4 对斑马鱼轴索损伤保护率为 66% ($P<0.01$)。结果见图 3、表 3。

3.4 对外周运动神经元损伤的促再生作用试验

与模型组比较, 质量浓度为 10.0、33.3 和 100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的如意珍宝丸对斑马鱼外周神经再生促进率分别为 44% ($P<0.05$)、49% ($P<0.01$) 和 93% ($P<0.001$), 表明如意珍宝丸对斑马鱼外周神经再生有明显的促进作用。阳性对照药 T3/T4 对斑马鱼外周神经再生促进率为 46% ($P<0.01$)。结果见图 4、表 4。

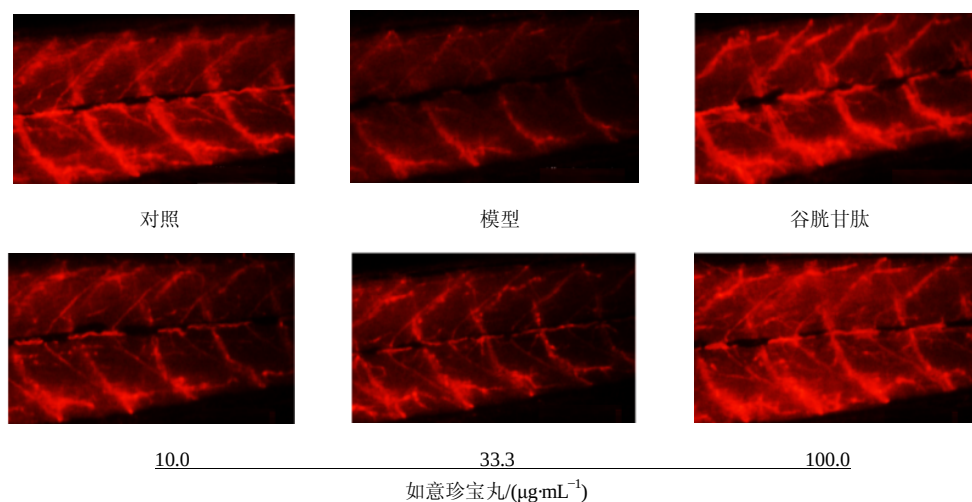


图3 如意珍宝丸对轴索损伤的保护作用表型图

Fig. 3 Protective effect of RZP on axon injury

3.5 对髓鞘损伤的促再生作用试验

与模型组比较, 给予如意珍宝丸 10.0、33.3、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 后, 斑马鱼髓鞘再生促进率分别为 36%

($P<0.01$)、37% ($P<0.001$)、41% ($P<0.001$), 表明如意珍宝丸对斑马鱼髓鞘再生有明显的促进作用。阳性对照药 T3/T4 对斑马鱼髓鞘再生促进率为

表3 如意珍宝丸对轴索损伤的保护作用 ($n=15$)Table 3 Protective effect of RZP on axon injury ($n=15$)

组别	浓度	荧光强度/像素	轴索损伤保护率/%
对照	—	78 136±2 433***	—
模型	—	61 509±1 919	—
T3/T4	0.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	73 734±2 680**	66
如意珍宝丸	10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	64 442±2 310	3
	33.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	67 791±1 652	29
	100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	70 328±2 164*	48

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group47% ($P<0.001$)。结果见图5、表5。

4 讨论

前已述及西药对于神经损伤性疾病的促再生能力尚不理想,随着传统医药学的发展,越来越多的学者更倾向于采用单味中药或复方来治疗神经损伤性疾病,并已取得了有效成果。如中药怀牛膝提取的有效组分神经再生素(NRF)能促进神经再生及功能恢复^[15];鹿茸提取物鹿茸多肽可以促进周围神经再生^[16];银杏叶提取物银杏酮酯EGb50可以促进损伤神经的再生^[17];补阳还五汤可促进神经细胞黏附分子、bFGF、NGF的表达,上调AKT/PKB信号转导的表达,促进VEGF和Flk-1的表达,调控神

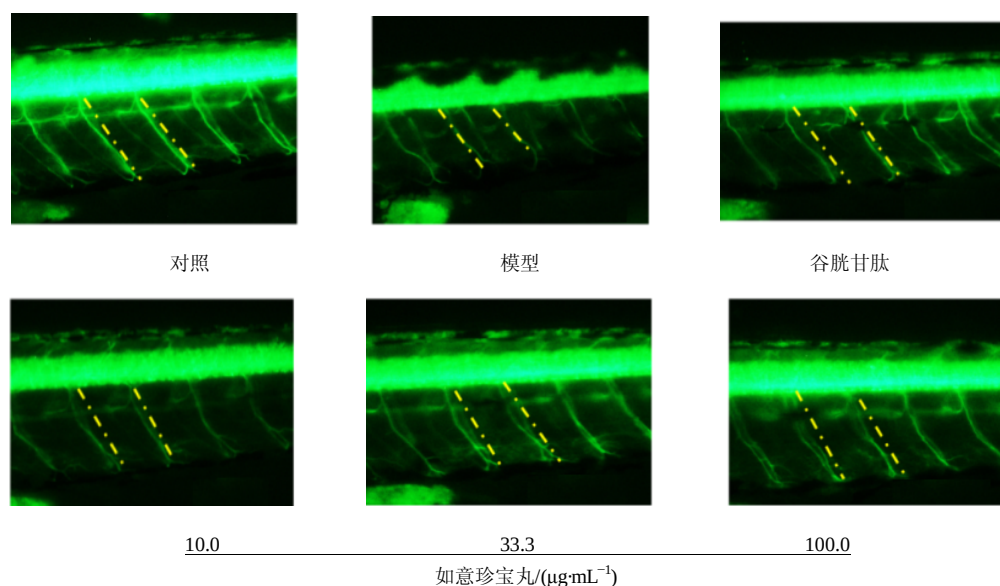


图4 如意珍宝丸对外周运动神经再生的促进作用表型图

Fig. 4 Promotion effect of RZP on peripheral motor neuron regeneration

表4 如意珍宝丸对外周运动神经再生的促进作用 ($n=15$)Table 4 Promotion effect of RZP on peripheral motor neuron regeneration ($n=15$)

组别	浓度	外周神经长度/像素	神经再生促进率/%
对照	—	309±4.40***	—
模型	—	263±4.78	—
T3/T4	0.04 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	284±5.74*	46
如意珍宝丸	10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	283±5.01*	44
	33.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	286±4.42**	49
	100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	306±3.87***	93

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

经细胞凋亡,促进神经细胞修复^[18-21];左归丸和右归丸均能减轻髓鞘碱性蛋白(MBP)诱导变态反应性脑脊髓炎大鼠轴突损伤及髓鞘脱失,其机制可能与促进轴突再生有关^[22]。

如意珍宝丸为传统藏药成方制剂,气微香,味苦、甘,临床用于治疗白脉病,相当于现代医学的神经损伤性疾病^[23-24]。多杰^[25]、蔡卓^[26]及陈涛等^[27]分别报道了如意珍宝丸治疗神经性疾病具有确切的临床疗效。传统医学认为,神经损伤属于萎证、瘫痪范畴,可出现肢体软弱、筋脉弛纵、肌肉萎缩等症状;治法以活血化瘀、清热、补虚、化痰等联合为主^[28],并不主张单纯的活血祛瘀或单纯补益之法。如意珍宝丸方中君药珍珠母、水牛角、金礞石、

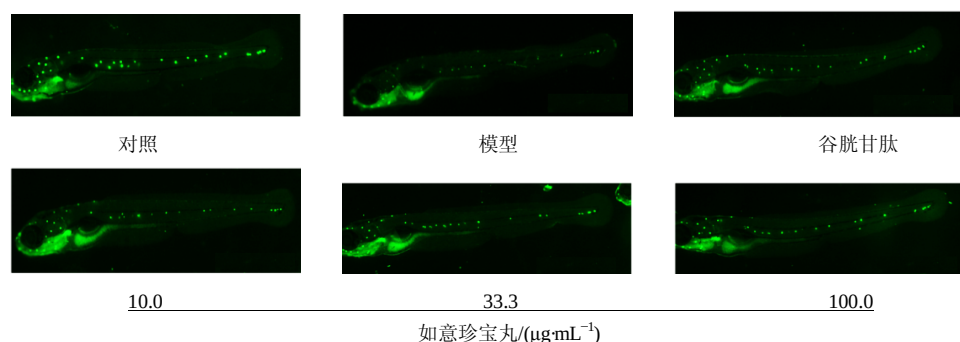


图5 如意珍宝丸对髓鞘再生的促进作用表型图

Fig. 5 Promotion effect of RZP on remyelination

表5 如意珍宝丸对髓鞘再生的促进作用 (n=15)

Table 5 Promotion effect of RZP on remyelination (n=15)

组别	浓度	荧光强度/像素	髓鞘再生 促进率/%
正常对照	—	221 415±11 268***	—
模型对照	—	109 137±3 160	—
T3/T4	0.04 μmol·L ⁻¹	162 279±5 643***	47
如意珍宝丸	10.0 μg·mL ⁻¹	149 233±7 317**	36
	33.3 μg·mL ⁻¹	151 196±9 140***	37
	100.0 μg·mL ⁻¹	155 395±3 921***	41

与模型对照组比较: **P<0.01 ***P<0.001

*P<0.01 **P<0.001 vs model control group

红花合用,既可熄风清火、豁痰镇惊,又可活血散瘀、保阴养筋;臣药人工麝香、牛黄、决明子、黄葵子、香早芹、降香、肉桂等除了助君药药效外,还可补火助阳,散寒止痛,温通经脉;佐药肉豆蔻、高良姜、丁香、藏木香、檀香等配合使用,可使脾气得升,胃气得降,寒气得温,湿气可化,既无生痰阻络之患,亦无痰郁化火之虞;最后辅以诃子、毛诃子、余甘子、甘草等调和诸药、缓和药性。全方药性平和,具有清热,醒脑开窍,舒经通络,干黄水之功效;既活血化瘀、清热化痰又兼补虚,可谓是针对神经损伤性疾病的病因病机与治则所设。

神经细胞属于非再生细胞,神经损伤后其神经元胞体被破坏便不能再生,其主导的相关功能也会不同程度受损。而目前所谓的神经再生是指轴突再生,包括轴突出芽、生长和延伸,与靶细胞重建突触联系,实现神经再支配,使功能恢复^[29]。一般情况下,中枢神经损伤后,不但将神经元之间的联系

破坏,而且还会导致细胞变性死亡,加之中枢神经再生能力弱,一旦受损,神经功能的恢复很棘手^[30]。而周围神经损伤后,部分神经近段端和所有远断端发生瓦勒变性,导致神经纤维和髓鞘发生变性和坏死,进而使神经功能出现障碍。本研究结果发现,如意珍宝丸对斑马鱼中枢神经损伤保护率为50%,对轴索损伤保护率为48%,对外周神经元损伤促再生率为93%,对髓鞘损伤促再生率为41%。表明如意珍宝丸不仅可以通过减少受损的神经细胞对斑马鱼的中枢神经损伤产生保护作用,而且还可通过保护斑马鱼轴索,促进髓鞘及外周运动神经再生作用来对抗斑马鱼的周围神经损伤,从而对受损神经元具有修复作用。

综上所述,如意珍宝丸对斑马鱼神经损伤具有明显保护及促再生作用,其作用机制多靶点多环节,可能与其营养修复髓鞘及轴索、调节神经生长因子(NGF)和脑源性神经营养因子(BDNF)^[13]、改善中枢神经系统微环境有关,与西药单一靶点比较优势凸显,后期本课题组将对其具体作用机制进行深入研究。

参考文献

- [1] 徐北辰. 神经损伤的药物治疗研究进展 [J]. 辽宁医学院学报, 2014, 35(4): 99-101.
- [2] 徐如祥. 中枢神经系统损伤后神经再生的策略 [J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(2): 109-112.
- [3] 李玲, 梅晓云, 陈文培. 补阳还五汤对夹伤神经再生的影响 [J]. 中医研究, 2007, 20(12): 9-10.
- [4] 王艳, 王茜. 周围神经损伤动物模型的研究进展 [J]. 中国康复理论与实践, 2014, 20(6): 537-539.
- [5] 郭建毅. 神经损伤体外模型的研究现状 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(2): 168-171.
- [6] 陈维武, 景小龙, 刘静, 等. 如意珍宝片对血管性痴

- 呆模型大鼠的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 220-223.
- [7] Wang T, Duan S, Wang H, et al. Neurological function following cerebral ischemia/reperfusion is improved by the Ruyi Zhenbao pill in rats [J]. Biomed Rep, 2016, 4(2): 161-166.
- [8] Tropepe V, Sive H L. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism [J]. Genes Brain Behav, 2003, 2(5): 268-281.
- [9] Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish [J]. Genes Brain Behav, 2004, 3(2): 63-74.
- [10] Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse [J]. Methods, 2006, 39(3): 262-274.
- [11] Brosamle C, Halpern M E. Characterization of myelination in the developing zebrafish [J]. Glia, 2002, 39(1): 47-57.
- [12] Farrar M J, Wise F W, Fetcho J R, et al. *In vivo* imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy [J]. Biophys J, 2011, 100(5): 1362-1371.
- [13] Buckley C E, Goldsmith P, et al. Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination [J]. Dis Model Mech, 2008, 1(4): 221-228.
- [14] 赵崇军, 田敬欢, 王金凤, 等. 斑马鱼在中药研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2635-2648.
- [15] 刘小君, 程 琼, 丁 斐. 牛膝提取物神经再生素促小鼠坐骨神经再生的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 16-18.
- [16] 路来金, 王克利, 李立军, 等. 鹿茸多肽对周围神经再生的影响 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(12): 1458-1461.
- [17] 林浩东, 王 欢, 陈德松, 等. 银杏酮酯促进大鼠坐骨神经再生的实验研究 [J]. 复旦学报医学版, 2006, 33(4): 467-469.
- [18] 刘 芳, 白雪松, 刘柏炎, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠碱性成纤维细胞生长因子的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1): 9-12.
- [19] 尹天雷, 蔡光先, 李勇敏, 等. 补阳还五汤对脑缺血模型大鼠脑组织 NGF 及 P13K/AKT 信号转导途径的影响 [J]. 中国中医药科技, 2008, 15(1): 24-25.
- [20] 朱传湘, 李武斌, 陈雪梅, 等. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑内神经细胞黏附分子表达的影响 [J]. 中国医药导报, 2009, 6(14): 33-35.
- [21] Cai G, Liu B, Liu W, et al. Buyang huanwu decoction can improve recovery of neurological function, reduce infarction volume, stimulate neural proliferation and modulate VEGF and Flk1 expressions in transient focal cerebral ischaemic rat brains [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 113(2): 292.
- [22] 王 蕾, 樊永平, 龚海洋, 等. 左归丸和右归丸对试验性变态反应性脑脊髓炎大鼠髓鞘及轴突再生的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(4): 42-44.
- [23] 黄三青, 田宏宽. 藏药如意珍宝丸治疗痛性疾病的临床观察 [J]. 中国民族医药杂志, 1999, 5(3): 16-16.
- [24] 王海苹. 藏药如意珍宝丸临床应用现状 [J]. 中国民族医药杂志, 2014, 29(1): 46-49.
- [25] 多 杰, 胡清文. 如意珍宝丸治疗白脉病(神经性疼痛) 219 例临床观察 [J]. 内蒙古中医药, 2009, 28(19): 17-18.
- [26] 蔡 卓. 藏药如意珍宝丸治疗三叉神经痛 56 例 [J]. 中国民族医药杂志, 2001, 7(1): 32-32.
- [27] 陈 涛, 梁丽贞, 严永兴, 等. 如意珍宝丸联合甲钴胺治疗糖尿病周围神经病变的疗效观察 [J]. 中国中医药科技, 2012, 19(3): 257-258.
- [28] 王美勇, 王润生, 韦宜山. 周围神经损伤的药物治疗研究进展 [J]. 神经损伤与功能重建, 2009, 4(4): 285-287.
- [29] 黄红云. 中枢神经修复学 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 7.
- [30] 王芹芹, 刘 伟. 中医药促进中枢神经损伤后神经功能恢复作用机制研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2012, 36(5): 457-459.