

三七总皂苷对全脑缺血大鼠学习记忆的影响及其作用机制研究

贺旭^{1,2,3}, 刘英飞², 王伟², 孙秋敏², 潘爱华³, 葛金文^{1*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

2. 益阳医学高等专科学校 解剖教研室, 湖南 益阳 413000

3. 中南大学 人体解剖与神经生物学系, 湖南 长沙 410013

摘要:目的 探讨三七总皂苷(TSPN)对全脑缺血大鼠学习记忆的影响及其作用机制。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, 1 次/d, 模型组给予等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 14 d。再灌注 14 d 后采用 Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力, 免疫组织化学观察海马 CA1 区 NeuN(成熟神经元), 齿状回颗粒细胞下层(SGZ) DCX(微管蛋白)的表达, 免疫印迹技术检测海马 CA1 区 DCX 蛋白的表达。结果 与模型组相比, TSPN 组逃避潜伏期显著缩短($P < 0.05$), 跨越平台次数增加($P < 0.05$); TSPN 组海马 CA1 区 NeuN⁺细胞密度显著高于模型组($P < 0.01$); TSPN 组 SGZ 区 DCX⁺细胞和蛋白水平均显著多于模型组($P < 0.01$)。结论 TSPN 可以改善全脑缺血后大鼠的学习记忆能力, 其机制与促进海马神经再生有关。

关键词:三七总皂苷; 全脑缺血; 海马; 神经再生; Morris 水迷宫

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5521-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.020

Effect of total saponins of *Panax notoginseng* on learning and memory of global cerebral ischemia rats and its mechanism

HE Xu^{1,2,3}, LIU Ying-fei², WANG Wei², SUN Qiu-min², PAN Ai-hua³, GE Jin-wen¹

1. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Department of Anatomy, Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China

3. Department of Anatomy and Neurobiology, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To explore the effect of the total saponins of *Panax notoginseng* (TSPN) on learning and memory of global cerebral ischemia rats and its mechanism. **Methods** Using four-vessel occlusion method to establish the global cerebral ischemia model. Rats were divided into sham group, vehicle group, and TSPN group. The rats in the TSPN group were administered TSPN intraperitoneally 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 14 d after reperfusion. Rats in the vehicle group were treated with equal volume of 0.9% saline, one injection per day for 14 d. The Morris Water Maze was performed to test the learning and memory of rats and doublecortin (DCX) and NeuN expression in the hippocampus was assessed by immunohistochemistry. Furthermore, immunoblotting was adopted to test the protein level of DCX in the CA1 subfield of hippocampus. **Results** The escape latency in the vehicle group was longer than that in the TSPN group ($P < 0.05$). The times across the platform were less in the vehicle group than that in the TSPN group ($P < 0.05$). In comparison with the vehicle group, the number of the NeuN⁺ cells in the CA1 subfield and DCX⁺ cells in the SGZ of the TSPN group were significantly increased ($P < 0.01$); Moreover, the result of immunoblotting demonstrated that the protein level of DCX in the CA1 subfield of hippocampus of the TSPN group was significantly higher than that in the vehicle group ($P < 0.01$). **Conclusion** TSPN

收稿日期: 2019-05-29

基金项目: 益阳市科技局应用基础研究项目(2017YR02); 湖南省自然科学基金青年课题(2018JJ3517); 湖南省中医药管理局科研项目(201932); 湖南省教育厅优秀青年课题(16B269)

作者简介: 贺旭(1984—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为中药在治疗心脑血管疾病神经发生与神经再生中的作用。

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

*通信作者 葛金文(1965—), 男, 博士, 博士生导师, 教授, 主要从事脑血管病发病机制及中西医结合防治研究和中西医结合方法学研究。
Tel: (0731)88458761 E-mail: 40831556@qq.com

could improve the learning and memory of global cerebral ischemia rats and its mechanism may be related to the promotion of hippocampus neurogenesis.

Key words: total saponins of *Panax notoginseng*; global cerebral ischemia; hippocampus; neurogenesis; Morris Water Maze

脑卒中后患者的认知功能可遭到损害,表现为注意力、空间定位能力、学习记忆和思维能力下降^[1-2]。而认知功能在脑卒中患者的康复训练中起着重要作用,认知功能改善的程度与神经功能密切相关^[3]。海马齿状回的颗粒下层(subgranular zone, SGZ)是成年哺乳动物神经元最活跃的区域之一。SGZ 区的神经祖细胞或神经干细胞在正常生理条件下能不断更新,自我增殖、分化和迁移并整合到功能神经网络中。在某种病理条件下如缺血性脑卒中、创伤性脑外伤^[4]和癫痫^[5]等可加速脑内的神经再生,促进神经干细胞的增殖和分化为成熟神经元。临床上非致命性的全脑缺血后常伴有某种程度的恢复,这可能与脑的可塑性有关,表现为能自发地刺激内源性神经再生,动物实验表明局灶性脑缺血可刺激 SGZ 区的神经再生^[6],然而通过内源性神经祖细胞产生的新生神经元来替代凋亡或坏死的细胞是不够的,并且功能恢复不完全。因此通过外源性干预来加速脑自身神经再生,对改善脑缺血后的神经功能缺损体征有着重要意义。

三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎,气微,味苦、微甜,归肝、胃经。三七总皂苷(total saponins of *Panax notoginseng*, TSPN)是从三七中提取的由多种皂苷活性物质、多种微量元素、丰富的维生素以及多糖组成的复合物,是三七的主要活性组分。前期实验研究表明了 TSPN 可加速全脑缺血后大鼠侧脑室室管膜区(SVZ)的神经祖细胞的增殖分化^[7],减轻脑水肿^[8]而发挥神经保护作用。考虑到海马 SGZ 区与 SVZ 同为神经再生发生的 2 个主要区域,因此本研究探讨 TSPN 对全脑缺血后大鼠海马神经再生的影响,以及对脑缺血大鼠的学习记忆能力的改善作用,为 TSPN 的药物开发及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 250~290 g,鼠龄 8 周,购买于中南大学湘雅医学院实验动物中心,动物许可证号 SCXK(湘)2009-0012。大鼠适应环境 5 d 后开始实验,脑缺血模型制作过程中尽可能减少动物使用的数量和降低大鼠的痛苦。

1.2 仪器、药品与试剂

珊瑚冰冻切片机(Shan Don 公司);Kopf 脑立体定位仪(David KOPF Instruments 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 显微镜(奥林巴斯公司);TSPN(总皂苷质量分数≥98%,货号 12052901,四川成都麦卡希有限公司);Morris 水迷宫(上海吉量软件科技公司);Double-cortin 羊抗(Santa Cruz Biotechnology 公司);NeuN 鼠抗(Chemicon 公司);二氨基联苯胺(Sigma 公司)。

2 方法

2.1 实验分组和脑缺血模型制备

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制备全脑缺血模型^[9]。大鼠 ip 1%戊巴比妥钠麻醉,仰卧固定于 Kopf 脑立体定位仪台面;钝性分离双侧颈总动脉;俯卧位后电凝大鼠两侧椎动脉;第 2 天乙醚吸入麻醉,用外科缝线将颈总动脉拉出,采用微动脉夹闭颈总动脉 30 min^[10]。假手术组只分离双侧颈总动脉,不阻塞血管。模型组大鼠在全脑缺血 30 min 后 ip 等体积 0.9% NaCl, 1 次/d;TSPN 组全脑缺血大鼠 ip 给予 75 mg/kg 的 TSPN^[10],TSPN 溶解在 0.9% NaCl 中,质量浓度为 10 g/L, 1 次/d,连续给药 14 d。所有大鼠在全脑缺血再灌注 14 d 后进行 Morris 水迷宫实验。

2.2 水迷宫实验^[11]

2.2.1 定位航行实验 每天早上 9 点大鼠从 4 个不同象限入水,训练 4 次,连续 5 d。检测时间设置为 120 s,记录大鼠寻找并爬上柱状平台的时间即逃避潜伏期。每天计算各组大鼠从 4 个不同象限入水的逃避潜伏期,取均值。

2.2.2 空间探索实验 在定位航行实验结束后既第 6 天撤除圆形柱状平台,将大鼠分批从东南象限池壁弧形中点入水,记录各组大鼠在规定时间内(120 s)内穿越柱状平台位置的次数。

2.3 免疫组织化学染色

全脑缺血再灌注 14 d 后,大鼠麻醉后灌注取出脑组织。冠状位切片,组织厚度为 30 μm。采用 ABC-DAB 免疫组织化学方法染色:3% H₂O₂ 处理;5%马血清+0.1% tritonX-100 磷酸缓冲液孵育 2 h;

加入山羊抗 Doublecortin (微管蛋白, 1:1 000) 和鼠抗 NeuN (成熟神经元, 1:2 000), 4 °C 孵育过夜; 广谱生物素化二抗 (1:400) 处理 1 h; 在提前 30 min 配好的 ABC 溶液孵育 2 h; DAB 显色。

2.4 Western blotting 检测蛋白水平

10%水合氯醛麻醉后冰上迅速取出大鼠脑组织, 分离出海马 CA1 区。按照组织-蛋白提取剂 1 g:10 mL 的比例稀释后破碎组织。置于 4 °C 低温离心机中, 12 000 r/min 离心, 20 min, 收集上清液。根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 凝胶电泳, 每个泳道上载 50 μg 总蛋白。电泳分离蛋白转移至膜上, 转膜约 60 min。将膜与羊抗 DCX (1:1 000) 孵育, 4 °C 摇床过夜。1×TBST 溶液漂洗 3 次后和偶联 HRP 标记的兔抗山羊 IgG (1:5 000) 室温下作用 2 h。1×TBST 溶液漂洗, 采用 ECL 化学发光法显影, 使用 NIH Image J 分析蛋白条带, 计算 DCX 蛋白条带与内参 GAPDH 的平均吸光度比值。

2.5 统计学方法和分析

在目镜×10 下对免疫组化染色结果进行拍照, 每张组化片子取 5 个视野进行细胞计数, 取均值。

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用统计学软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析, 以单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较组间差异。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫实验结果

脑缺血后 14 d 进行水迷宫实验, 训练 1 d 后开始正式实验。与模型组相对应的时间点比较, TSPN 组在第 2、3、4、5 天的逃避潜伏期均显著缩短 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。空间探索实验结果表明全脑缺血后大鼠穿越平台次数较假手术组显著下降 ($P < 0.001$); 而给予 TSPN 干预后, 大鼠的穿越平台次数显著增加 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 TSPN 对海马 CA1 区 NeuN⁺细胞表达的影响

再灌注后 14 d 3 组大鼠海马 CA1 区 NeuN⁺细胞均有分布。与假手术组相比, 模型组 NeuN⁺细胞密度显著下降 ($P < 0.001$), 而给予 TSPN 干预后, NeuN⁺细胞密度显著上升 ($P < 0.01$)。见图 1。

3.3 TSPN 促进 SGZ 区 DCX⁺细胞的表达

DCX⁺细胞胞体沿着 SGZ 区分布, 从胞体发出许多突起, 伸向颗粒细胞层 GCL。全脑缺血 14 d 后 DCX⁺细胞大量增加, 与假手术组相比, 模型组

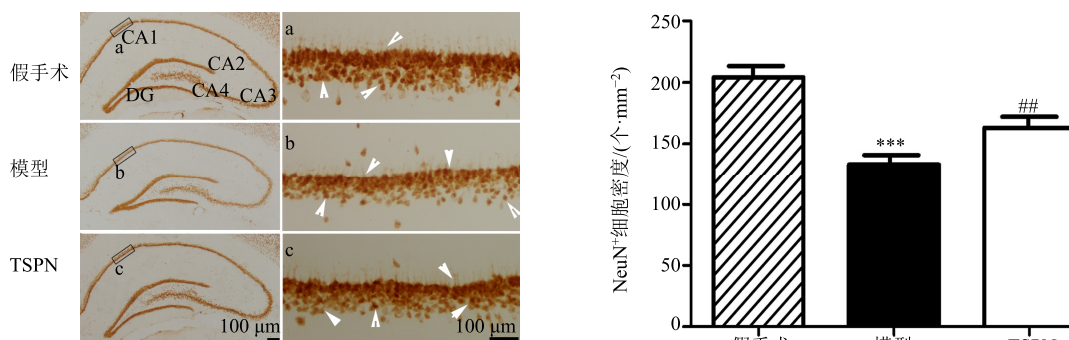
表 1 大鼠水迷宫实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Results of Morris Water Maze among three groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	逃避潜伏期/s					跨越平台次数 (第 6 天)
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
假手术	81.2±5.1	34.7±2.5	24.2±2.8	15.4±2.6	11.8±2.2	12.4±2.3
模型	84.6±4.5	70.0±5.6***	49.2±4.9***	25.6±3.8*	23.1±5.8*	7.6±1.4***
TSPN	82.8±5.7	46.2±4.5***###	37.0±5.1***###	17.8±3.7#	12.6±2.7##	11.0±1.9##

与假手术组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group



箭头所示为 NeuN⁺细胞, 与假手术组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

Arrow shows NeuN⁺, *** $P < 0.001$ vs Sham group; ## $P < 0.01$ vs model group

图 1 TSPN 对全脑缺血大鼠海马 CA1 区 NeuN⁺细胞密度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of TSPN on NeuN⁺ cells density followed by global cerebral ischemia injury in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

DCX⁺细胞显著增加 ($P < 0.001$)。给予 TSPN 干预后, DCX⁺细胞较模型组增加更为显著 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.4 TSPN 促进海马 CA1 区 DCX 蛋白水平的表达

免疫印迹技术结果表明全脑缺血后大鼠海马 CA1 区 DCX 蛋白水平显著上升 ($P < 0.001$), 而给予 TSPN 干预后, 全脑缺血大鼠海马 CA1 区 DCX 蛋白水平增加更为显著 ($P < 0.001$)。见图 3。

4 讨论

脑的可塑性可对外界的行为、环境或者伤害等刺激产生应答, 从而通过重组相关结构和功能来修复神经血管单元。大脑的修复是一种先天性的机制, 大脑受到伤害后能自发激活分子和细胞程序并维持数周到数周。作为一个补充的内源性进程, 缺血性脑卒中中能自发诱导成年灵长类动物中枢神经系统神经再生以替代凋亡或坏死的神经元, 从而改善神经功能缺损特征。

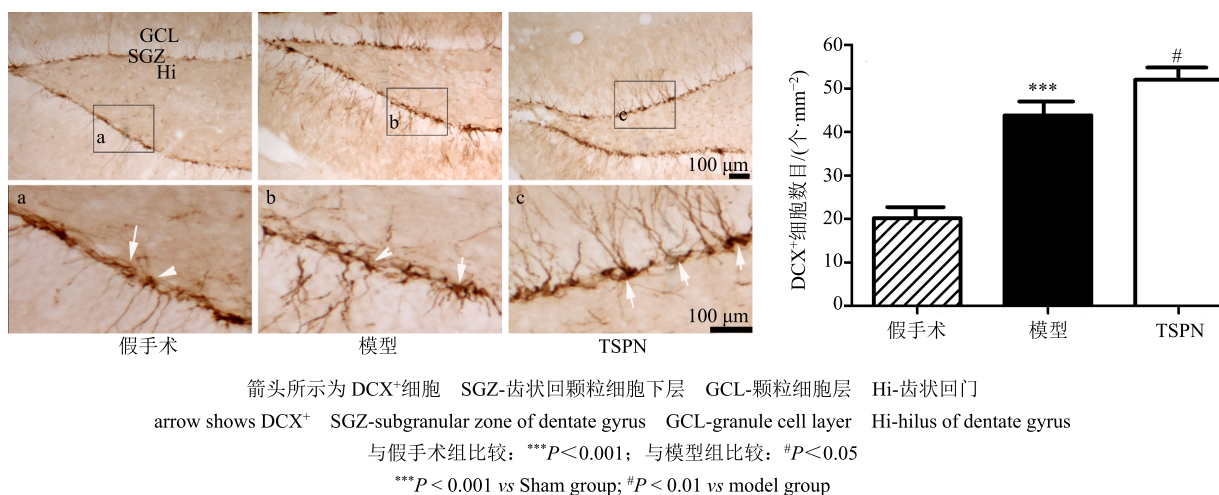


图 2 TSPN 促进全脑缺血大鼠 SGZ 区 DCX⁺细胞的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of TSPN on expression of DCX⁺ cells in rats following global cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

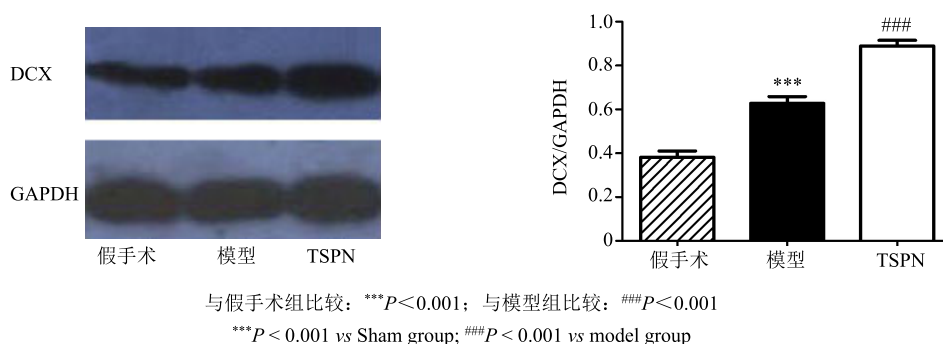


图 3 TSPN 促进全脑缺血后大鼠 CA1 区 DCX 蛋白水平的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 TSPN promoted expression of DCX protein level of CA1 subfield of rats following global cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

全脑缺血后海马、大脑皮层、下丘脑、前额叶皮质等脑区的神经元均遭到破坏, 临床研究表明缺血性脑卒中患者常存在包括记忆紊乱在内的认识障碍、精神运动速度和执行功能^[12-13]。大量的全脑缺血动物实验研究也证明这些脑区受到损伤后常伴随学习记忆能力和空间分辨学习能力的下降^[14-17]。海马属于旧皮质, 在学习和记忆中起着重要作用, 而海马的 CA1 区对脑缺血非常敏感, 短暂的全脑缺血可对 CA1 区神经元产生严重的损害, 并导致神经功

能损害^[9,18]。因此 CA1 区常作为研究神经元死亡情况的较为理想部位。有研究指出脑缺血后认识功能的紊乱与海马受损神经元的数目有密切关联^[19-21], 因此运用 Morris 水迷宫检测全脑缺血大鼠的学习记忆和空间定位能力。结果表明模型组逃避潜伏期延长, 跨越平台次数减少, 而给予 TSPN 治疗后, 大鼠的逃避潜伏期和跨越平台次数接近假手术组。这表明 TSPN 可改善脑缺血大鼠的学习记忆能力。同时 NeuN 的免疫组织化学表明全脑缺血再灌注后 14

d, TSPN 可显著增加海马 CA1 区 NeuN⁺细胞密度, 因此认知功能的提高有可能与海马 CA1 区的成熟神经元数目的增加有关联。前期研究证明 TSPN 能增加全脑缺血后大鼠海马 CA1 区锥体神经元密度^[10], 但 TSPN 是否也能通过促进海马神经再生产生新生神经元迁移到该部位从而分化为成熟神经元, 以及 TSPN 显著增加全脑缺血后海马 CA1 区 NeuN⁺细胞密度的原因需要深入探讨。

Doublecortin (DCX) 是一种微管相关蛋白, 相对分子质量为 40 000, 可作为未成熟神经元的标记物, 代表神经再生水平^[11,22-23]。DCX⁺细胞在成年大脑的表达主要局限在 SGZ 和 SVZ 以及吻侧迁移流, 在新大脑皮质第 II 层、纹状体、黑质以及杏仁核也有少量表达^[24-25]。脑缺血后成年神经再生过程中神经祖细胞产生后 DCX⁺细胞表达开始, 可在第 14 天达到高峰, 而后伴随成熟神经元 NeuN 的出现, DCX⁺细胞的表达开始下调^[26-27]。形态学实验结果显示全脑缺血后 SGZ 区 DCX⁺细胞的表达显著增加, 给予 TSPN 干预后可显著促进大鼠 DCX⁺细胞的表达进一步提高 ($P < 0.05$)。并且 SGZ 区的 DCX⁺细胞的胞体发出大量突起, 伸向颗粒细胞层, 这意味着 TSPN 可加速 SGZ 区神经元迁移到脑缺血部位且被整合到功能神经网络, 从而参与大脑的修复。为了更进一步确定脑缺血后 DCX⁺在海马 SGZ 区的表达, 采用 Western blotting 进行定量分析, 实验结果显示 TSPN 组海马 CA1 区 DCX 蛋白水平显著高于模型组 ($P < 0.05$)。这再次从分子水平和形态学方面证明全脑缺血后 TSPN 可提高 SGZ 区的神经再生水平。

综上所述, TSPN 可以改善全脑缺血后大鼠的学习记忆, 其作用机制可能是上调全脑缺血后大鼠海马的神经再生水平。

参考文献

- [1] Karussis D, Leker R R, Abramsky O. Cognitive dysfunction following thalamic stroke: A study of 16 cases and review of the literature [J]. *J Neurol Sci*, 2000, 172(1): 25-29.
- [2] Cengic L, Vuletic V, Karlic M, et al. Motor and cognitive impairment after stroke [J]. *Acta Clin Croat*, 2011, 50(4): 463-467.
- [3] Jokinen H, Melkas S, Ylikoski R, et al. Post-stroke cognitive impairment is common even after successful clinical recovery [J]. *Eur J Neurol*, 2015, 22(9): 1288-1294.
- [4] 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.
- [5] Parent J M, Valentin V V, Lowenstein D H. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone-olfactory bulb pathway [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(8): 3174-3188.
- [6] 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.
- [7] 贺旭, 葛金文, 黄俊, 等. 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 [J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1535-1540.
- [8] 贺旭, 刘英飞, 王伟, 等. 三七总皂苷对全脑缺血大鼠海马脑水肿及 GFAP 表达的影响 [J]. *中草药*, 2017, 48(22): 4695-4700.
- [9] Pulsinelli W A, Brierley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. *Stroke*, 1979, 10(3): 267-272.
- [10] 贺旭, 葛金文, 邓长青, 等. 三七总皂苷抑制大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元凋亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1337-1344.
- [11] 黄俊, 吴帆帆, 贺旭, 等. 丰富环境对血管性痴呆模型大鼠梨状皮质未成熟神经元表达的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(27): 4006-4012.
- [12] 周楷, 王群. 急性缺血性脑卒中中记忆障碍特点的研究 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(12): 1338-1339.
- [13] 倪帮乾. 脑卒中患者的记忆障碍观察分析 [J]. *华西医学*, 2010, 25(6): 1140-1141.
- [14] Cohan C H, Neumann J T, Dave K R, et al. Effect of cardiac arrest on cognitive impairment and hippocampal plasticity in middle-aged rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e124918.
- [15] Kiryk A, Pluta R, Figiel I, et al. Transient brain ischemia due to cardiac arrest causes irreversible long-lasting cognitive injury [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 219(1): 1-7.
- [16] Arnberg F, Lundberg J, Soderman M, et al. Image-guided method in the rat for inducing cortical or striatal infarction and for controlling cerebral blood flow under MRI [J]. *Stroke*, 2012, 43(9): 2437-2443.
- [17] 方莹莹, 王祎媛, 李晓文, 等. 全脑缺血再灌注对大鼠空间学习记忆的影响 [J]. *赣南医学院学报*, 2012, 32(1): 1-5.
- [18] Matute C, Domercq M, Perez-Samartin A, et al. Protecting white matter from stroke injury [J]. *Stroke*,

- 2013, 44(4): 1204-1211.
- [19] Li W, Huang R, Shetty R A, *et al.* Transient focal cerebral ischemia induces long-term cognitive function deficit in an experimental ischemic stroke model [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 59: 18-25.
- [20] Xuan A G, Chen Y, Long D H, *et al.* PPARalpha agonist fenofibrate ameliorates learning and memory deficits in rats following global cerebral ischemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(1): 601-609.
- [21] 方 桦, 刘合玉, 朱 宁, 等. 暴露丙烯酰胺对 Wistar 大鼠学习记忆及海马 CA1 区 c-Fos 表达的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(6): 699-704.
- [22] Gleeson J G, Lin P T, Flanagan L A, *et al.* Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons [J]. *Neuron*, 1999, 23(2): 257-271.
- [23] 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.
- [24] Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, *et al.* Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9(6): 779-786.
- [25] 李 明, 武志兵, 杨永强, 等. 幼犬脑组织 Doublecortin 的表达观测 [J]. *系统医学*, 2018, 3(22): 16-19.
- [26] 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.
- [27] Rao M S, Shetty A K. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(2): 234-246.