

藁本内酯对神经干细胞/祖细胞的增殖作用及机制研究

王敏^{1,2}, Hideki Hayashi², 刘建勋^{1*}, Norio Takagi^{2*}, 任钧国¹

1. 中国中医科学院 西苑医院基础医学研究所, 北京 100091

2. 东京药科大学 应用生化研究室, 东京 192-0392

摘要:目的 研究藁本内酯对神经干/祖细胞(neural stem/progenitor cells, NS/PCs)的增殖作用及机制。方法 孕14 d Wistar大鼠脱颈椎处死,分离胎鼠脑皮层部位NS/PCs,采用悬浮法原代培养7 d。采用WST-1法检测藁本内酯对NS/PCs存活率的影响;采用Western blotting法检测藁本内酯对NS/PCs增殖相关蛋白磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-Akt)、Akt、磷酸化糖原合成酶激酶(phosphorylated glycose synthase kinase 3 β , p-GSK3 β)、GSK3 β 和active- β -catenin表达;给予藁本内酯第1~3天,观察NS/PCs神经球生长状态并测量其直径;分化培养基诱导NS/PCs分化5 d后,采用免疫荧光法检测藁本内酯对NS/PCs分化类型的影响,并采用WST-1法检测藁本内酯对分化细胞存活率的影响。结果 藁本内酯(25 μ mol/L)显著促进NS/PCs存活率($P < 0.05$),显著上调增殖相关蛋白p-Akt/Akt和active- β -catenin表达($P < 0.05$);给予藁本内酯第1~3天,可增加NS/PCs神经球直径,但无统计学差异;藁本内酯对神经元、星型胶质细胞方向分化无显著影响,但分化后细胞存活率显著升高($P < 0.05$)。结论 藁本内酯可促进NS/PCs增殖,其作用机制与Akt/ β -catenin通路有关。藁本内酯可能对神经元、星型胶质细胞以外的其他分化类型细胞有干预作用。

关键词:藁本内酯;脑缺血;神经干/祖细胞;神经修复;Akt/ β -catenin

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6261-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.016

Effect and mechanism of ligustilide on proliferation of neural stem/progenitor cells

WANG Min^{1,2}, Hideki Hayashi², LIU Jian-xun¹, Norio Takagi², REN Jun-guo¹

1. Institute of Basic Medicine, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

2. Department of Applied Biochemistry, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Tokyo 192-0392, Japan

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of ligustilide on proliferation of neural stem/progenitor cells (NS/PCs). **Methods** Wistar rats were sacrificed on 14th day of pregnancy, NS/PCs in cerebral cortex of fetal rats were isolated and cultured in suspension for 7 d. WST-1 method was used to detect the effect of ligustilide on survival rate of NS/PCs; Western blotting was used to detect the effect of ligustilide on proliferation-related protein, including phosphorylated protein kinase B (p-Akt), Akt, phosphorylated glycose synthase kinase 3 β (p-GSK3 β), GSK3 β and active- β -catenin expressions in NS/PCs; Ligustilide was given to cells for 1st to 3rd day, growth status of neurospheres in NS/PCs was observed and their diameter was measured; After 5 d of differentiation of NS/PCs induced by differentiation medium, immunofluorescence method was used to detect the effect of ligustilide on differentiated type of NS/PCs, and WST-1 method was used to detect the survival rate of differentiated cells. **Results** Ligustilide (25 μ mol/L) significantly promoted the survival rate of NS/PCs ($P < 0.05$), and up-regulated the expressions of proliferation-related proteins p-Akt/Akt and active- β -catenin ($P < 0.05$); Administration of ligustilide on 1st to 3rd day, diameter of neurospheres was increased in NS/PCs, but there was no statistical difference; Ligustilide had no significant effect on differentiation of neurons and astrocytes, but the survival rate of cells after differentiation was significant increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Ligustilide can

收稿日期: 2021-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81873041); 国家自然科学基金资助项目(82030124)

作者简介: 王敏(1991—),女,博士,研究方向为脑血管药理。E-mail: minbjzyy@163.com

*通信作者: Norio Takagi(1967—),男,博士,教授,研究方向为脑血管病理及药理。E-mail: takagi@toyaku.ac.jp

刘建勋(1955—),男,博士,研究员,研究方向为中药药理。E-mail: liujx0324@sina.com

promote the proliferation of NS/PCs, and its mechanism is related to Akt/ β -catenin pathway. Ligustilide may has an intervening effect on other differentiated cells rather than neurons and astrocytes.

Key words: ligustilide; cerebral ischemia; neural stem/progenitor cells; neurorepair; Akt/ β -catenin

藁本内酯为川芎和当归中的内酯类化合物^[1], 具有抗炎、抗氧化应激^[2]、改善学习记忆^[3]、保护血脑屏障^[4]、保护神经元^[5]、抗肿瘤^[6]等药理作用。中医理论记载, 川芎能够“上行头目”, 且川芎为临床治疗脑缺血处方中常见配伍药味之一, 藁本内酯为川芎挥发油中含量较大的成分^[7-8]。研究显示, 大鼠 *po* 藁本内酯后, 其在脑中的分布较其他组织中多, 表明藁本内酯具有较好的脑靶向性^[9], 在治疗脑相关疾病中具有潜在的优势。

脑缺血后, 由于溶栓不及时, 瘫痪、偏瘫、失语以及学习记忆障碍等神经损伤症状为脑缺血常见的后遗症, 严重影响患者的生活质量和寿命, 目前尚无公认的针对缺血后神经修复治疗的制剂上市。神经干/祖细胞 (neural stem/progenitor cells, NS/PCs) 的增殖对于脑缺血后神经元的修复、神经网络的重构以及后期神经功能的恢复至关重要^[10]。本课题组前期研究发现川芎提取物对脑缺血后大鼠体内的神经祖(母)细胞具有增殖作用^[11], 本研究拟在此基础上考察川芎中的主要活性成分藁本内酯对体外 NS/PCs 的增殖作用。

1 材料

1.1 动物

孕 14 d Wistar 大鼠购自日本 SLC 公司, 饲养于 (23±1) °C、湿度 (55±5)% 的环境中, 自由进食饮水。动物实验经东京药科大学动物伦理委员会批准 (批准号 P20-02)。

1.2 药品与试剂

藁本内酯对照品 (质量分数为 86%, 批号 111737-201608) 购自中国食品药品检定研究院; β -actin 抗体 (批号 A5441)、Vimentin 抗体购自美国 Sigma 公司; Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS, 批号 14175-095)、DMEM/F12 培养基 (批号 11320-033)、B27 因子 (批号 17504-044) 购自美国 Gibco 公司; Accutase 细胞消化液 (批号 A11105-01)、Alexa Fluor 488 标记亲和纯化山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 A11037)、Alexa Fluor 594 标记亲和纯化山羊抗鼠 IgG 抗体 (批号 A11029) 购自美国 Invitrogen 公司; DNase I (批号 LK003170) 购自美国 Worthington Biochemical 公司; 100× 双抗

(批号 168-23191)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF, 批号 059-07873)、D-PBS (批号 045-29795) 购自日本 Wako 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 166717)、Percoll 细胞分离液 (批号 17-0891-02) 购自美国 GE Healthcare 公司; 神经细胞培养添加剂 N2 MAX Media Supplement (批号 AR009) 购自美国 RD System 公司; 成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF, 批号 031908) 购自美国 Peprotech 公司; 磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 抗体 (批号 4060S)、Akt 抗体 (批号 2920S)、磷酸化糖原合成酶激酶 (phosphorylated glycose synthase kinase 3 β , p-GSK3 β) 抗体 (批号 5558S)、GSK3 β 抗体 (批号 9315S)、active- β -catenin 抗体 (批号 8814S)、 β 3-tubulin 抗体 (批号 5741S)、 β -actin 抗体购自美国 CST 公司; WST-1 检测试剂 (批号 346-06454)、Hoechst 细胞核染料 (批号 346-07951) 购自日本 DojinDo 公司; HRP 标记的二抗购自美国 Pierce Biotechnology 公司。

1.3 仪器

培养瓶 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 解剖显微镜 (日本 Olympus 公司); 6200 型离心机 (日本 Kobota 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 细胞过滤器 (美国 Falcon 公司)。

2 方法

2.1 原代大鼠 NS/PCs 的分离培养

取孕 14 d 大鼠, 脱颈椎处死, 腹部以 75% 乙醇消毒, 快速打开腹腔, 取出子宫, 以预冷的 HBSS 溶液清洗 2 次, 转移至含 HBSS 溶液的无菌培养皿中, 再转移至无菌分离操作台, 于解剖显微镜下打开子宫, 取出胎鼠, 剪下胎鼠头, 剥离脑膜, 分离双侧皮层, 无菌手术刀切碎组织 (整个操作过程尽量控制在 15~20 min 完成, 以保证较好的细胞活性)。加入 6 mL PBS 溶液悬浮组织, 转移至离心管中, 静置 5 min, 弃去上清液; 加入 2.5 mL 含 500 μ L 胰酶、400 μ L DNase I 的 PBS 溶液, 混匀, 于 37 °C 水浴中温育 25 min; 弃上清, 加入 5 mL 含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基, 反复吹打, 经细胞过滤器 (40 μ m) 滤过, 收集滤液; 离心, 弃

上清, 加入 35% Percoll 分离液, 将沉淀物转移至离心管中, 混合均匀, 离心; 加入 65% Percoll 分离液, 离心; 转移上清液至新的离心管中, 加入 DMEM/F12 培养基, 混匀, 离心; 弃上清, 再加入 DMEM/F12 培养基, 吹打至肉眼不可见漂浮物, 离心; 弃上清液, 加入 N2 plus DMEM/F12 培养基, 吹打均匀后, 进行细胞计数。

细胞接种于培养瓶中, 分别加入 EGF、FGF (20 ng/mL), 轻轻混匀, 于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。培养 3~4 d, 更换培养液; 培养 6~7 d, 收集细胞悬浮液, 离心, 弃上清液, 加入 Accutase 细胞分离液消化, 加入 DMEM/F12 培养基, 吹打至肉眼不可见漂浮物, 离心; 弃上清液, 加入 N2 plus DMEM/F12 培养基, 细胞计数后, 按照所需细胞密度接种于培养瓶或培养板中。

2.2 藁本内酯对 NS/PCs 存活率的影响

NS/PCs 以 5×10^4 /孔接种于 24 孔板中, 适应 30 min。设置对照组和藁本内酯 (12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 $\mu\text{mol/L}$) 组, 各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h, 按 WST-1 试剂说明书检测各组细胞存活率。

2.3 藁本内酯对 NS/PCs p-Akt、Akt、p-GSK3 β 、GSK3 β 和 active- β -catenin 蛋白表达的影响

NS/PCs 以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板中, 设置溶剂组和藁本内酯 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组加入药物, 溶剂组加入 0.006% 二甲基亚砜 (DMSO), 培养 24 h。收集细胞, 以 PBS 溶液洗涤, 弃去上清液, 加入 110 μL 含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液 (含 50 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、0.1% 脱氧胆酸钠、1% TritonX-100), 于冰水浴中超声裂解。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度, 加入上样缓冲液, 95 °C 加热 5 min 使蛋白变性, 放置至室温后, 于 -80 °C 保存。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h, 分别加入 p-Akt、Akt、p-GSK3 β 、GSK3 β 、active- β -catenin、 β -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜; 以 TBST 溶液洗涤, 加入 HRP 标记的二抗 (1:5000), 室温孵育 1 h; 以 TBST 溶液洗涤, 加入 ECL 发光试剂反应 1 min, 于成像系统仪中曝光, 使用 CS Analyzer 4. Version 2.1.2 软件进行定量分析。

2.4 藁本内酯对 NS/PCs 神经球直径的影响

NS/PCs 以 5×10^5 /孔接种于 25 cm² 培养瓶中,

培养 4 d。设置溶剂组和藁本内酯 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组加入药物, 溶剂组加入 0.006% DMSO。分别于给药后第 1、2、3 天, 于显微镜下拍照, 随机选取 5 张照片, 使用显微镜自带的软件测量视野下神经球的直径 (直径 < 40 μm 不计入)。

2.5 藁本内酯对 NS/PCs 分化类型的影响

NS/PCs 原代分离培养 7 d, 消化后加入分化培养基 (含 2% B27、0.5% FBS、1% 双抗的 DMEM/F12 培养基), 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 以 2×10^4 /孔接种于 24 孔板中 (培养板预先用 poly-D-lysine 溶液包被), 设置对照组、溶剂组和藁本内酯 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组加入 100 μL 药物, 溶剂组加入等体积 0.006% DMSO, 对照组加入不含药物的培养基, 分化 3 d 时更换新鲜培养基, 分化 5 d 进行细胞免疫荧光染色。

以 PBS 溶液洗涤, 弃去洗液, 加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 10 min; 弃去固定液, 以 PBS 溶液洗涤, 加入 0.2% TritonX-100, 室温透化 10 min; 弃去上清液, 加入封闭液, 室温封闭 30 min; 弃去封闭液, 分别加入 β 3-tubulin 抗体 (1:500)、vimentin 抗体 (1:2000), 4 °C 孵育过夜; 以 PBS 溶液洗涤, 加入山羊抗兔或鼠 IgG 抗体 (1:200) 孵育 1 h; 弃去溶液, 加入含细胞核染料 Hoechst33342 (1:2000) 的 PBS 溶液清洗 3 次, 弃去洗液, 封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.6 藁本内酯对分化细胞存活率的影响

NS/PCs 以 5×10^4 /孔接种于 24 孔板中, 设置溶剂组和藁本内酯 (25 $\mu\text{mol/L}$) 组, 按“2.5”项下方法处理细胞, 分化 3 d 时更换新鲜培养基, 分化 5 d 按 WST-1 试剂说明书检测各组细胞存活率。

2.7 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SAS 8.2 软件进行单因素方差分析, Tukey's 检验作事后分析。

3 结果

3.1 藁本内酯对 NS/PCs 存活率的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 25 $\mu\text{mol/L}$ 藁本内酯可显著增加 NS/PCs 存活率 ($P < 0.05$)。

3.2 藁本内酯对 NS/PCs p-Akt、Akt、p-GSK3 β 、GSK3 β 和 active- β -catenin 蛋白表达的影响

如图 2 所示, 与溶剂组比较, 藁本内酯可显著上调 NS/PCs 中 p-Akt/Akt、active- β -catenin 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 但对 p-GSK3 β /GSK3 β 蛋白表达无明显影响。

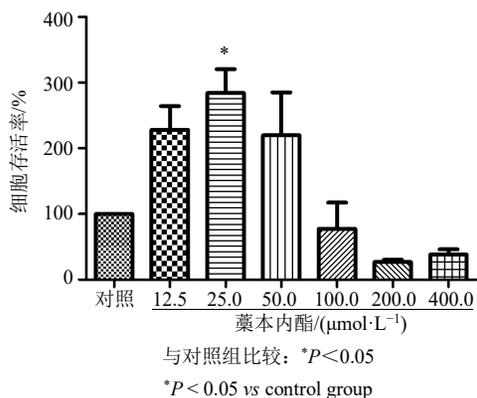
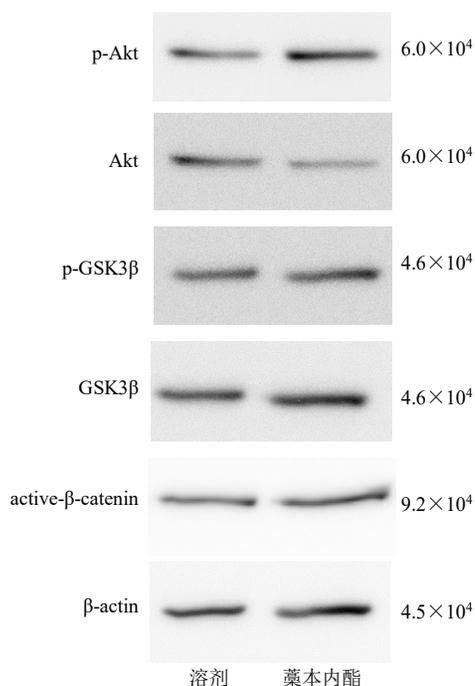


图1 藜本内酯对 NS/PCs 存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
 Fig. 1 Effect of ligustilide on survival rate of NS/PCs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与溶剂组比较: *P < 0.05
 *P < 0.05 vs vehicle group

图2 藜本内酯对 NS/PCs p-Akt、Akt、p-GSK3β、GSK3β 和 active-β-catenin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig. 2 Effect of ligustilide on p-Akt, Akt, p-GSK3β, GSK3β and active-β-catenin protein expressions in NS/PCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 藜本内酯对 NS/PCs 神经球直径的影响

如图 3 所示, 随着培养时间的增加, NS/PCs 神经球直径逐渐增大; 连续给予藜本内酯 1~3 d, 与溶剂组比较, NS/PCs 神经球直径有所增加, 但无统计学差异。

3.4 藜本内酯对 NS/PCs 分化类型的影响

以 β3-tubulin 标记神经元, vimentin 标记星型胶质细胞, Hoechst33342 标记细胞核。如图 4 所示, 藜本内酯对神经元和星形胶质细胞的分化均无显著影响。

3.5 藜本内酯对分化细胞存活率的影响

如图 5 所示, 与溶剂组比较, 藜本内酯显著提高分化细胞的存活率 (P < 0.05)。

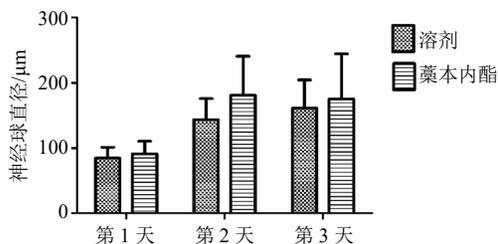
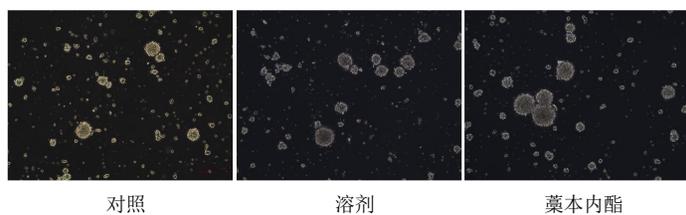
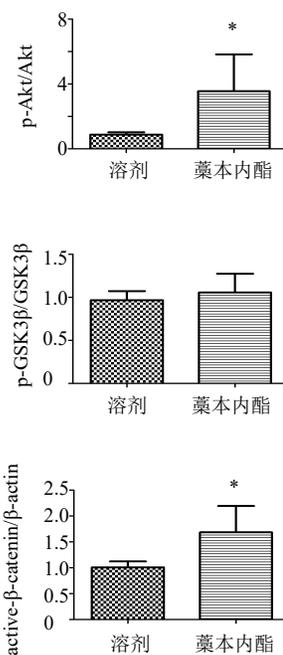


图3 藜本内酯对 NS/PCs 神经球直径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of ligustilide on diameter of neurospheres in NS/PCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

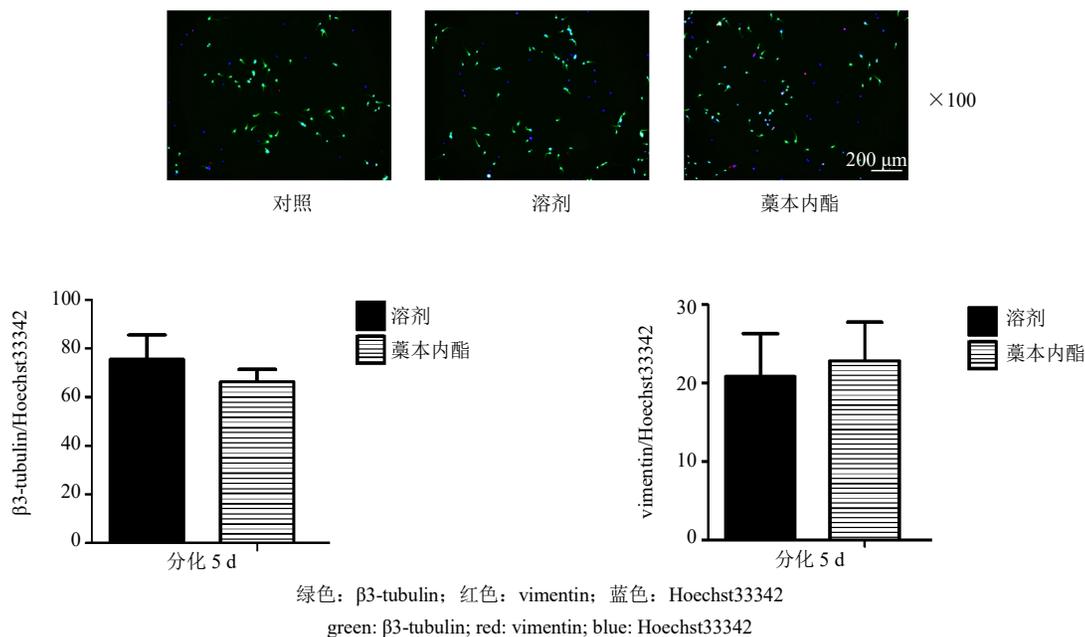


图 4 藁本内酯对 NS/PCs 分化类型的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 4 Effect of ligustilide on differentiated type of NS/PCs ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

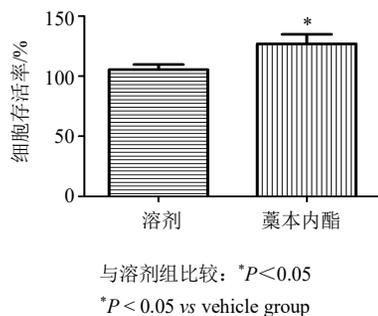


图 5 藁本内酯对分化细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of ligustilide on survival rate of differentiated cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

脑缺血后神经元大量死亡, 刺激内源性的神经干细胞开始分化, 但由于缺血后内环境的恶化, 导致新生的 NS/PCs 逐渐死亡, 影响后期的分化和神经单元的重构。因此, 维持脑缺血后早期阶段 NS/PCs 的持续增殖和存活是后期神经元和神经功能恢复的基础^[12]。本研究采用课题组前期建立的 NS/PCs 分离培养方法^[13], 获得生长状态良好、较稳定的神经球, 可用于药物的研究。由于 NS/PCs 自我更新和多功能的特性, 孕鼠状态、分离时间、温度、培养基、操作等细节均会影响细胞悬浮状态或生长, 因此, 严格控制实验条件, 对于获得状态较稳定的细胞至关重要。

细胞的增殖和分化是神经干细胞的 2 个重要特

性。本研究首先检测了藁本内酯对 NS/PCs 增殖的影响, WST-1 法为检测细胞数量与活力的方法之一, 结果显示, 25 $\mu\text{mol/L}$ 藁本内酯可促进 NS/PCs 增殖, 且呈非线性关系。查阅文献, 部分学者报道, 藁本内酯在体内的药动学研究呈非线性^[14], 藁本内酯对缺氧缺糖神经细胞 PC12 具有双向调节作用^[15], 提示对藁本内酯进行研究时, 应关注剂量对药理作用的影响。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-Akt 为神经干细胞增殖、存活、分化、迁移中的重要通路^[16-17], Akt、p-GSK3 β 、active- β -catenin 为 PI3K 介导的通路中的关键蛋白^[18], Akt 可直接激活 β -catenin 或通过 GSK3 β 间接激活 β -catenin^[19]。正常状态下, 细胞质中的 β -catenin 与 GSK3 β 、APC 等形成蛋白复合体, 磷酸化后最终通过泛素化-蛋白酶系统降解; 而非磷酸化的 β -catenin 则转移至细胞核, 与转录因子结合, 参与细胞的增殖、分化等^[20-21]。本研究结果显示, 藁本内酯可通过激活 PI3K-Akt/ β -catenin 通路促进 NS/PCs 增殖。

神经元和星型胶质细胞是 NS/PCs 主要的 2 种分化类型, vimentin 为星型胶质细胞早期标志物, β 3-tubulin 为神经元早期标志物^[22]。结果显示, 藁本内酯对星型胶质细胞和神经元细胞分化均无显著影响, 但分化细胞活力却有所提高; 镜下观察, 未被 vimentin 或 β 3-tubulin 标记的细胞有所增加, 推测藁本内酯可能促进其他类型细胞的分化 (图 6)。

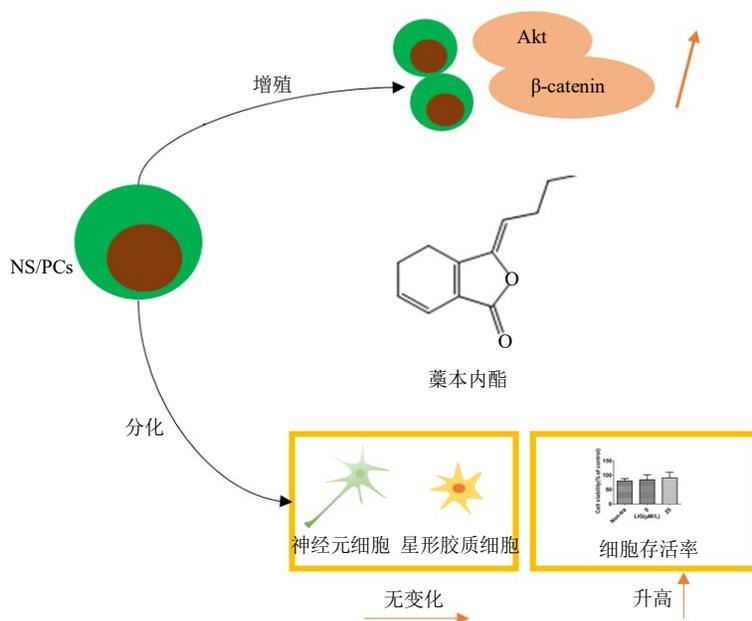


图6 藁本内酯对 NS/PCs 可能的作用机制

Fig. 6 Proposed mechanisms of ligustilide on NS/PCs

以往对藁本内酯治疗脑缺血损伤的研究主要集中于改善血流或神经保护,对促进神经元修复研究较少。本课题组前期研究发现,川芎提取物对脑缺血后大鼠海马区神经母细胞增殖具有促进作用。因藁本内酯为川芎中含量较大的成分之一,并且体外筛选其表现出较好的神经药理活性,故选择藁本内酯这一研究对象,从促进神经干细胞增殖这一新的角度,阐释了藁本内酯通过激活 Akt/ β -catenin 通路促进 NS/PCs 增殖,提示藁本内酯为神经修复治疗的潜在药物之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xie Q X, Zhang L L, Xie L, *et al.* Z-ligustilide: A review of its pharmacokinetics and pharmacology [J]. *Phytother Res*, 2020, 34(8): 1966-1991.
- [2] Choi E S, Yoon J J, Han B H, *et al.* Ligustilide attenuates vascular inflammation and activates Nrf2/HO-1 induction and, NO synthesis in HUVECs [J]. *Phytomed*, 2018, 38: 12-23.
- [3] Zhu W L, Zheng J Y, Cai W W, *et al.* Ligustilide improves aging-induced memory deficit by regulating mitochondrial related inflammation in SAMP8 mice [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3175-3189.
- [4] Wu S P, Wang N, Li J, *et al.* Ligustilide ameliorates the permeability of the blood-brain barrier model *in vitro* during oxygen-glucose deprivation injury through HIF/VEGF pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019, 73(5): 316-325.
- [5] Wu Q, Mao Z G, Liu J, *et al.* Ligustilide attenuates ischemia reperfusion-induced hippocampal neuronal apoptosis via activating the PI3K/Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 979.
- [6] Jiang X F, Zhao W, Zhu F, *et al.* Ligustilide inhibits the proliferation of non-small cell lung cancer via glycolytic metabolism [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 410: 115336.
- [7] Zhang H, Han T, Yu C H, *et al.* Analysis of the chemical composition, acute toxicity and skin sensitivity of essential oil from rhizomes of *Ligusticum chuanxiong* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 791-796.
- [8] 左爱华, 王莉, 肖红斌. 藁本内酯药理学和药代动力学研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(22): 3350-3353.
- [9] Shi Y F, He L C, Wang S C. Determination of ligustilide in rat blood and tissues by capillary gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20(10): 993-998.
- [10] Leker R R. Fate and manipulations of endogenous neural stem cells following brain ischemia [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(9): 1117-1125.
- [11] Wang M, Yao M J, Liu J X, *et al.* *Ligusticum chuanxiong* exerts neuroprotection by promoting adult neurogenesis and inhibiting inflammation in the hippocampus of ME cerebral ischemia rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112385.
- [12] Koh S H, Park H H. Neurogenesis in stroke recovery [J]. *Transl Stroke Res*, 2017, 8(1): 3-13.

- [13] Kiso H, Hayashi H, Arai M, *et al.* Possible involvement of PI3-K/Akt-dependent GSK-3 β signaling in proliferation of neural progenitor cells after hypoxic exposure [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(3): 1946-1956.
- [14] Yan R, Ko N L, Li S L, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of ligustilide, a major bioactive component in *Rhizoma Chuanxiong*, in the rat [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(2): 400-408.
- [15] Qi H Y, Han Y F, Rong J H. Potential roles of PI3K/Akt and Nrf2-Keap1 pathways in regulating hormesis of Z-ligustilide in PC12 cells against oxygen and glucose deprivation [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(4): 1659-1670.
- [16] Choi N Y, Kim J Y, Hwang M, *et al.* Atorvastatin rejuvenates neural stem cells injured by oxygen-glucose deprivation and induces neuronal differentiation through activating the PI3K/Akt and ERK pathways [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(4): 2964-2977.
- [17] Koh S H, Lo E H. The role of the PI3K pathway in the regeneration of the damaged brain by neural stem cells after cerebral infarction [J]. *J Clin Neurol*, 2015, 11(4): 297-304.
- [18] Castañeda A, Serrano C, Hernández-Trejo J A, *et al.* pVHL suppresses Akt/ β -catenin-mediated cell proliferation by inhibiting 14-3-3 ζ expression [J]. *Biochem J*, 2017, 474(16): 2679-2689.
- [19] Bengoa-Vergniory N, Kypka R M. Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(21): 4157-4172.
- [20] Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998, 14: 59-88.
- [21] Braunschweig L, Meyer A K, Wagenführ L, *et al.* Oxygen regulates proliferation of neural stem cells through Wnt/ β -catenin signalling [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 67: 84-92.
- [22] Zhang J, Jiao J W. Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 727542.

[责任编辑 李亚楠]