

# 川芎提取物阿魏酸诱导尿液干细胞神经分化

龚飞翔<sup>1\*</sup> 黄小飞<sup>1</sup> 丁聪<sup>1</sup> 黄依琴<sup>2</sup>

1 南昌大学第一附属医院 2 江西中医药大学

DOI:10.12238/fcmr.v6i3.9240

**[摘要]** 目的:探索川芎提取物阿魏酸钠体外诱导尿液干细胞(USCs)定向神经细胞分化,为中药在USCs定向分化中的应用提供实验依据。方法:采用条件培养基贴壁筛选法分离培养USCs,用四甲基噻唑蓝(MTT)法观察细胞1~7d生长活力;分别设USCs培养基实验组,浓度为1.0、1.5、2.0  $\mu\text{mol/L}$ 的阿魏酸钠进行诱导培养,用MTT法检测作用1~7d各组的细胞增殖能力;采用实时荧光定量PCR(q-PCR)检测浓度为1.5  $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠诱导前后细胞中Nestin、Sox2、GFAP、MAP2 mRNA的表达变化,并采用细胞免疫荧光染色检测Nestin、Sox2的表达变化。结果:1.5  $\mu\text{mol/L}$ 阿魏酸钠作用3~6d能显著促进hUSCs的增殖,增强其活力,诱导细胞7d后Nestin、Sox2、MAP2、GFAP表达分别上调 $8.08 \pm 0.95$ 、 $5.69 \pm 0.92$ 、 $5.12 \pm 0.46$ 、 $3.33 \pm 0.25$ 倍( $P < 0.05$ );细胞免疫荧光染色检测结果显示经神经诱导7d后Nestin、Sox2阳性细胞率分别为 $16.71 \pm 0.7\%$ 和 $12.15 \pm 0.49\%$ ( $P < 0.05$ )。结论:体外首次发现中药川芎提取物阿魏酸钠能够诱导USCs定向分化成神经细胞。

**[关键词]** 尿液干细胞; 川芎; 阿魏酸; 神经细胞; 诱导

中图分类号: Q421 文献标识码: A

## Differentiation of urine stem cells into nerve cells induced by ferulate extracted from ligusticum Chuanxiong

Feixiang Gong<sup>1\*</sup> Xiaofei Huang<sup>1</sup> Cong Ding<sup>1</sup> Yiqin Huang<sup>2</sup>

1 The First Affiliated Hospital of Nanchang University

2 Huang yiqin, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine

**[Abstract]** Objective: To explore the effect of sodium ferulate extract of ligusticum Chuanxiong on the differentiation of human urine stem cells in vitro, and to provide experimental basis for the application of Chinese medicine in the differentiation of human urine stem cells. Methods: hUSCs were isolated and cultured by conditioned medium adhesion screening, and their growth activity was observed by MTT assay at 1~7 days. The experimental group of hUSCs medium was cultured with 1.0, 1.5 and 2.0  $\mu\text{mol/L}$  sodium ferulate, and the cell proliferation ability of each group was detected by MTT method after 1 to 7 days. Real-time quantitative fluorescent PCR (q-PCR) was used to detect the mRNA expression changes of Nestin, Sox2, GFAP and MAP2 in cells before and after induction of sodium ferulate at a concentration of 1.5  $\mu\text{mol/L}$ , and the expression changes of Nestin and Sox2 were detected by cellular immunofluorescence staining. Result: Treating with 1.5  $\mu\text{mol/L}$  sodium ferulate for 3~6 days can significantly promote the proliferation and enhance the activity of hUSCs. After 7 days of induction, the expressions of Nestin, Sox2, MAP2 and GFAP were up-regulated by  $8.08 \pm 0.95$ ,  $5.69 \pm 0.92$ ,  $5.12 \pm 0.46$  and  $3.33 \pm 0.25$  times, respectively ( $P < 0.05$ ). The results of immunofluorescence staining showed that the positive rates of Nestin and Sox2 cells were  $16.71 \pm 0.7\%$  and  $12.15 \pm 0.49\%$ , respectively, after 7 days of neural induction ( $P < 0.05$ ). Conclusion: For the first time in vitro, sodium ferulate extract of ligusticum Chuanxiong can induce the directional differentiation of hUSCs into nerve cells.

**[Key words]** urine stem cells; ligusticum Chuanxiong; ferulate; nerve cells; induce

《中国脑卒中防治报告2021》<sup>[1]</sup>概要显示卒中是我国位居首位的成人致死、致残的病因,且具有高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率、高经济负担五大特点。卒中包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中发病率显著高于出血

性卒中。《中国卫生健康统计年鉴2022》<sup>[2]</sup>数据显示,2021年我国缺血性卒中出院患者人数为3885316人,出血性卒中为546930人。根据《中国急性缺血性脑卒中诊治指南2018》<sup>[3]</sup>中急性缺血性脑卒中的治疗,主要为静脉溶栓治疗、血管内治疗、双联抗血小板治疗。在临床中,部分患者病情较重或未及时诊治,病情进一步恶化,致神经细胞功能不可逆的损伤。因此,在缺血性卒中发生后及时修复受损的神经元、促进神经再生是非常重要的。目前,通过移植干细胞替代受损神经细胞继而重建神经功能的治疗方法越来越受到重视<sup>[4-6]</sup>。

对于干细胞的替代治疗,最早提出的是利用神经干细胞(Neural Stem Cells, NSCs)进行替代,但NSCs取材困难、对培养条件高、不易存活,且存在着较多的伦理学问题,于是不少学者将目光转向了其他干细胞<sup>[7]</sup>。间充质干细胞(Mesenchymal Stem Cells, MSCs)来源广泛、分离培养技术成熟、无伦理限制和低免疫原性<sup>[8-10]</sup>,但MSCs的获取手段多为有创的。尿液干细胞(urine-derived stem cells, USCs)作为细胞组织工程领域的前景较广的“种子细胞”,具备非侵入性、无限性,且连续培养后仍保持核型稳定和优越的端粒酶活性和细胞增殖性等,且在神经生物学特征及神经修复作用<sup>[11]</sup>。研究报道通过体内移植USC修复颅脑损伤观察到USCs可提高大鼠颅脑损伤后神经运动功能,抑制颅脑损伤后神经细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。基于课题组前期研究,USCs在体内实验诱导下,分化出神经细胞、神经胶质细胞等,但价格昂贵,获取细胞数量较少。一些单味中药及中药提取物研究发现对神经元具有保护作用,可以诱导间充质干细胞分化为神经细胞,且促进神经元的再生与修复<sup>[13]</sup>。阿魏酸钠为中药活血化瘀的川芎的一种有效单体成分,被广泛应用于脑血管疾病,具有多种药理作用,如抗血栓、抑制血小板聚集、血管保护及抗氧化等作用<sup>[14,15]</sup>。本研究通过体外实验的方法,初步探究川芎提取物阿魏酸钠诱导人尿液干细胞定向神经元分化研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品

阿魏酸钠,购自山东罗欣药业。

### 1.2 主要试剂与仪器

四甲基噻唑兰试剂盒(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)购自上海卓渝生物科技有限公司;B27和青链霉素购于Gibco公司;Tritonx-100购自上海时代生物科技有限公司;牛血清白蛋白购自Roche公司;人源碱性成纤维生长因子(human basic fibroblasts growth factor, h-bFGF)和人源表皮生长因子(human epidermal growth factor, h-EGF)购于sigma公司;倒置相差显微镜购自Olympus公司;CO2细胞培养箱、高速离心机购自Thermo公司,小鼠抗人nestin、GFAP抗体购自CST公司;逆转录试剂盒购自Fermentas公司;q-PCR试剂盒购自TOYOBO公司。

### 1.3 hUMSCs的分离培养

收集本实验研究者的无菌新鲜中段尿液200ml,加入5ml青

链霉素混匀,分装至4管50ml离心管,400转/min离心10min后弃上清,加入20ml的1%双抗的磷酸缓冲盐溶液(PBS)吹打混匀,继续400转/min离心10min,弃上清,hUSC培养基重悬后接种于0.1%明胶包被的6孔板中(2ml/孔),在37℃、5%CO2培养箱静置培养3天,通过倒置相差显微镜观察细胞形态及生长情况,将余下细胞悬液,放入培养基(含有bFGF、EGF和TGF-β等生长因子的混合培养基),并添加培养基1ml/孔,经7~10d培养,待原代hUSC融合率80%~90%时,使用0.25%胰蛋白酶消化传代,进行后续实验。

### 1.4 MTT法检测hUSCs生长活力及阿魏酸钠对hUSCs增殖能力的影响

采用MTT法检测取P4代细胞的生长活性情况,USCs经胰酶消化制成单细胞悬液,以5000/孔的密度接种在96孔板(设3个复孔),连续培养7d。每天定时更换为20 μL MTT溶液,继续在CO2体积分数为5%、37℃条件下孵育4h,用酶标仪在490nm波长处检测吸光值,并绘制USCs的时间-吸光度生长曲线。阿魏酸钠处理组细胞接种培养方法同上,培养24h后倒置相差显微镜下观察细胞贴壁并且生长良好时,去除培养基,分别加入含有1.0、1.5、2.0 μmol/L阿魏酸钠的培养基200 μL,在细胞培养箱中培养,作用时间为1~7d,处理同上。

### 1.5 体外诱导hUSCs向神经细胞分化及鉴定

目前文献报道,Nestin、Sox2、GFAP、MAP2等为神经细胞的特异性蛋白。Guan<sup>[16]</sup>等通过体外实验将hUSC诱导神经分化,采用NSC特异性标志物Nestin、Sox2、β-tubulin表达。姜之歆<sup>[17]</sup>等经鉴定Nestin、β3-tubulin、NF-200、S100等基因表达显著改变,来证实人尿液干细胞能向神经干细胞及胶质细胞亚群分化的可行性。本课题组前期研究表明,hUSCs中的Nestin、Sox2、GFAP、NSE、MAP2蛋白表达,与其神经元特异蛋白有关。因此,本研究首先选择Nestin、Sox2、GFAP、MAP2四种特异性蛋白作为判断神经细胞特异蛋白的检测指标。

选择生长良好的P4代hUSCs,以 $1 \times 10^5$ /ml的密度接种于6孔板中,待细胞贴壁生长至细胞密度50~60%时,吸弃原培养基,用适量PBS清洗后加入含有1.5 μmol/L阿魏酸钠的培养基,置于培养箱中进行诱导培养15d,每周换液2次,以未加阿魏酸钠诱导培养基的细胞培养孔作为对照组,倒置显微镜下观察细胞形态变化,并记录照片。

成神经诱导7d后,q-PCR检测神经干细胞特异性标志物Nestin、Sox2、GFAP、MAP2的表达变化,使用Fermentas逆转录试剂盒合成cDNA第一链,后用TOYOBO荧光定量试剂盒按以下反应体系进行q-PCR扩增反应:cDNA 2.5 μl、正向引物(10 μM) 1 μl、反向引物(10 μM) 1 μl、Plus Solution 2.5 μl、SYBR Green Realtime PCR Master Mix 12.5 μl,加无酶水至25 μl,不加模板为阴性对照组,将反应管置于ABI7900q-PCR system中进行扩增反应,反应条件为:95℃预变性60s,95℃变性15s,60℃退火15s,72℃延伸45s,40个循环,以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示基因的相对表达量,所有反应重复3遍【引物组合见表1】。

表1 定量引物(q-PCR) Table 1: Quantitative primer

靶基因	正向引物(5' to 3')	反向引物(5' to 3')	扩增子(bp)
Nestin	GCC CTG ACC ACT CCA GTT TA	GGA GTC CTG GAT TTC CTT CC	200
MAP2	TGG TGC CGA GTG AGA AGA AG	AGT GGT TGG TTA ATA AGC CGA AG	91
GFAP	AGG TCC ATG TGG AGC TTG AC	GCC ATT GCC TCA TAC TGC GT	85
SOX2	GCC GAG TGG AAA CTT TTG TCG	GGC AGC GTG TAC TTA TCC TTC T	157
GAPDH	ATC CCA TCA CCA TCT TCC	GAG TCC TTC CAC GAT ACC A	308

分别阿魏酸钠诱导7d后,对诱导分化的神经细胞进行免疫荧光染色观察诱导前后nestin、sox2的表达变化;

1.6 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件对实验数据进行统计学分析,所有数据均以(X±S)表示,不同实验组间采用t检验,P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 hUSCs的形态学观察

利用干细胞培养基培养hUSCs于接种后3-7d开始贴壁,7-10d细胞呈集落生长,10-15d不同细胞克隆呈现多种不同形态,如铺路石形、细长形或短梭形,经过2-3周的传代培养后P4代细胞形态呈较为均一的成纤维细胞样,细胞传至P10余代,仍然保持旺盛的增殖能力。

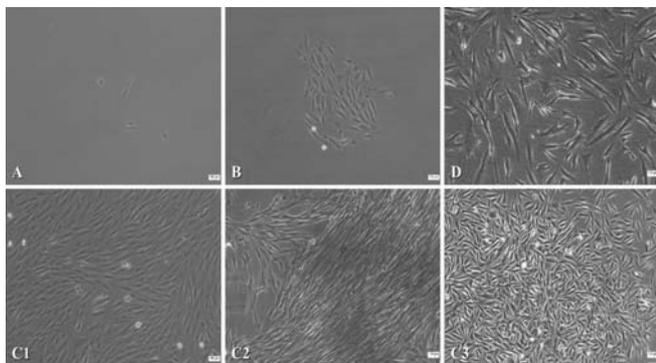


图1 原代hUSCs细胞贴壁后呈克隆样生长(图A/B),后呈现多种形态(图C1、C2、C3);P10代(图D)(x100)

2.2 hUSCs的细胞活性检测

MTT法检测P4代细胞增殖能力结果显示,第1~2d hUSCs增

殖缓慢,从第3d左右开始细胞数量逐渐增加,呈现指数增长,第6~7d以后细胞生长较前减缓,进入平台期后细胞增殖的速度明显变慢,生长曲线整体呈“S”形。(见图2)

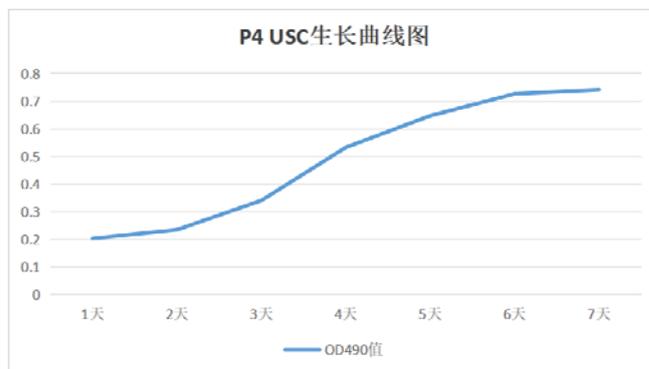


图2 P4代USC生长曲线图

2.3 阿魏酸钠对hUSCs活力的影响

MTT法检测1.0、1.5、2.0 μmol/L阿魏酸钠对hUSCs细胞活力的影响,结果如图3所示,3个浓度的阿魏酸钠对USC细胞活力均有影响。与对照组比较,阿魏酸钠给药浓度为1.5 μmol/L时,第1~6天细胞活力均升高;阿魏酸钠1.0 μmol/L浓度组,第1~4天细胞活力均升高,第6~7天时细胞活力均处于相对低水平状态;阿魏酸钠2.0 μmol/L浓度组,此组药物浓度对细胞生长有抑制作用。据此综合评估,后续实验选用浓度为1.5 μmol/L的阿魏酸钠进行定向诱导人尿液干细胞向神经细胞分化。

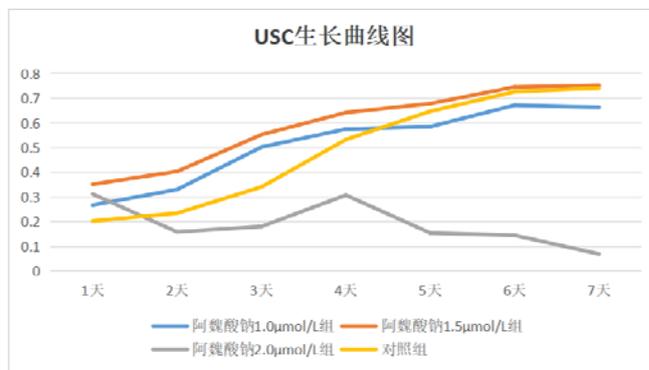


图3 不同药物浓度阿魏酸钠对hUSCs活力的影响

2.4 阿魏酸钠体外诱导hUSCs向神经细胞分化及鉴定

hUSCs经阿魏酸钠诱导培养7d后,细胞胞体回缩、折光度增加,呈现出典型的双极神经细胞样,部分细胞突起数增加并且细胞间通过突起互相连接。q-PCR结果显示hUSCs经过阿魏酸钠诱导培养后Nestin、Sox2、GFAP和MAP2的表达量均明显改变,诱导培养7d时Nestin、Sox2、GFAP、MAP2表达量分别增加8.08±0.95倍、5.69±0.92倍、3.33±0.25倍和5.12±0.46倍(P<0.05)(见图4)。q-PCR结果提示hUSCs经阿魏酸钠诱导后,呈现混合性细胞群落,包括神经干细胞、成熟神经元和神经胶质细胞。

细胞免疫荧光染色检测结果显示hUSCs经阿魏酸钠诱导后Nestin和Sox2表达均明显上调(见图5),对照组未见Nestin和Sox2阳性细胞,而诱导培养7d时Nestin和Sox2阳性细胞率分别为16.71±0.70%和12.15±0.49%( $P<0.05$ ) (见图6),细胞免疫荧光染色结果说明hUSCs经阿魏酸钠诱导后,神经干细胞标志物Sox2和Nestin表达均上调。结合上述结果表明hUSCs经阿魏酸钠诱导培养可分化为神经细胞。

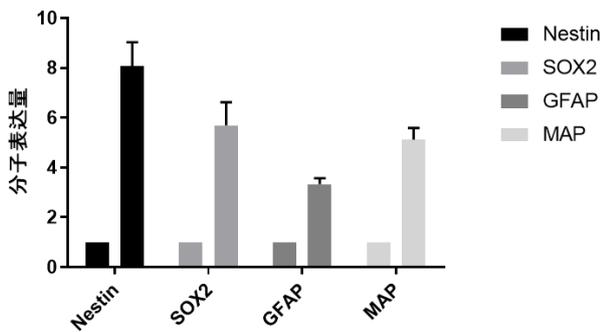


图4 阿魏酸钠诱导前后分子表达量变化

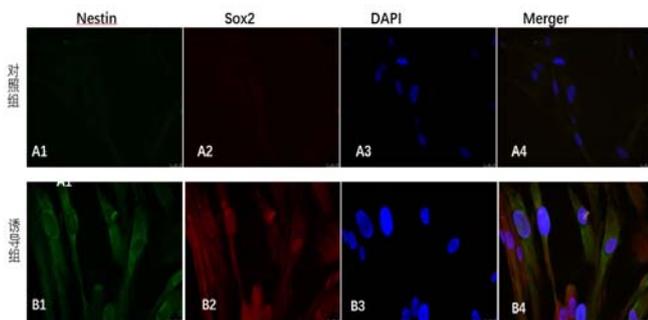


图5 1.5 μmol/L阿魏酸钠诱导尿液干细胞神经分化

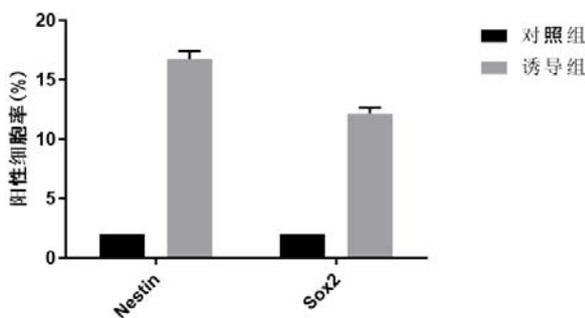


图6: 阿魏酸钠诱导USCs前后Nestin/Sox2阳性细胞率的变化

### 3 讨论

尿液干细胞作为成体干细胞之一,首次被Zhang<sup>[18]</sup>等从人体的尿液中采用常温离心分离培养获得一种细胞亚群,具有高

繁殖能力和多向分化能力等特点。本课题组<sup>[19]</sup>前期研究表明,人尿源性细胞具有间充质细胞的生物特性,hUSCs表面标志物CD44、CD73、CD90、CD29均为阳性,其为间充质干细胞特异标志物;hUSCs表面标志物CD34、CD45、CD133均为阴性,其为造血干细胞和内皮细胞特异标志物;具有多向分化潜能。hUSCs在特定的条件下诱导,可分化为神经细胞、心肌细胞、成骨细胞、平滑肌细胞等各种类型细胞,取材方便,易于分离,无创、经济,故hUSCs成为医学领域的研究热点。苏炜良<sup>[20]</sup>等通过人体核细胞(NPCs)诱导hUSCs分化为髓核样细胞的作用,可为椎间盘组织工程研究提供NPCs来源。邓明<sup>[21]</sup>等通过体外实验研究,采用经典成神经诱导液,将人尿液干细胞向成神经细胞分化诱导并利用β-tubulin 3免疫组织化学染色鉴定,对大鼠脊髓损伤有一定的修复作用。据此人尿液干细胞定向诱导剂不仅价格昂贵,且有创、培养过程十分复杂。本研究基于课题组实验研究成果及相关文献查阅,首次尝试从川芎提取物阿魏酸钠诱导下,使人尿液干细胞可能向神经细胞分化,并选择Nestin、Sox2、MAP2和GFAP标记物作为判断USCs分化为神经细胞的表面蛋白。

川芎为经典名方(四物汤、补阳还五汤、桃仁四物汤)的主要药物组成之一,来源伞形科植物川芎的干燥根茎,具有活血行气、祛风止痛。临床上常用于治疗脑血管疾病,如缺血性脑卒中、眩晕、高血压和偏头痛等,现代药理主要抗氧化、神经保护、抗炎等作用<sup>[22]</sup>。而阿魏酸钠为川芎主要活性成分之一,且早被批准用于临床,不良反应少、安全性高。阿魏酸钠不仅作为药物用于临床治疗,且可为诱导剂,其诱导间充质干细胞向神经细胞分化。汪泱<sup>[23]</sup>等采用阿魏酸钠对分离出大鼠骨髓间充质干细胞进行诱导,分化为神经细胞样形态,NF和NSE神经细胞特异性标志物呈阳性表达。阿魏酸钠对神经细胞保护作用,并对缺血性脑卒中神经损伤具有一定的修复作用,被用于临床治疗脑梗死、缺血性脑损伤等研究。娄远蕾<sup>[24]</sup>等采用阿魏酸钠定向诱导人骨髓间充质干细胞,通过体内移植到局灶性脑缺血大鼠的颅内,结果证实经诱导下细胞能存活在脑缺血内,并具有神经细胞分化的特性。林志坚<sup>[25]</sup>等采用低、中、高剂量阿魏酸钠对局灶性脑缺血大鼠进行治疗,提示中、高剂量阿魏酸钠对局灶性脑缺血大鼠神经具有修复作用,且减少脑梗死面积。

本研究分离和培养的人尿液干细胞传至第4代时,细胞形态较为均一的成纤维细胞样,将其细胞用阿魏酸钠进行诱导培养分化,结果显示USCs的细胞形态和基因表达水平均出现明显改变。实验组加入1.5 μmol/L阿魏酸钠7d诱导培养人尿液干细胞后,细胞回缩,出现不规则及双极神经样细胞状,部分细胞伸出突起增多,细胞之间连接成网状。为了评估细胞在阿魏酸钠诱导培养过程中的分化,本实验检测了Nestin、Sox2等细胞表达的特征性标记。巢蛋白(Nestin)表达起始胚胎早期神经前体细胞,其主要为神经干细胞的标记蛋白<sup>[26]</sup>。Sox2是转录因子之一,在神经外胚层中稳定表达,具有抑制神经元分化并维持祖细胞特征,其最早应用于神经干细胞的标志物。MAP-2是神经原骨架蛋

白,主要表达于中枢神经和周围神经的细胞;GFAP是胶质细胞特异性抗原标记,主要表达于星形胶质细胞,两者主要应用于成熟神经细胞的标志物。q-PCR结果显示诱导培养7d时Nestin和Sox2表达上调分别为 $8.08 \pm 0.95$ 和 $5.69 \pm 0.92$ 倍。而对照组中则未见神经细胞表面标志物,表明川芎提取物阿魏酸钠具有促进人尿液干细胞向神经元分化的潜能。目前多数研究采用经典神经诱导液,主要分为细胞生长因子和神经营养因子及抗氧化剂,包括BFGF、EGF、TTS等。谢辉<sup>[27]</sup>等研究证实活血、破血药对急性脑缺血大鼠基底动脉内皮细胞VEGF和bFGF表达明显改变,两者均能促进VEGF蛋白的表达,且破血药作用稍强;活血药可升高bFGF蛋白的表达,破血药却能降低bFGF蛋白的表达。可知,活血药可促进bFGF蛋白的表达。川芎提取物阿魏酸钠具有活血作用,笔者推测阿魏酸钠的体外诱导人尿液干细胞向神经细胞分化的机制可能与其促进bFGF表达及抗氧化有一定关系。

传统医学中中医经典著作《素问·金匱真言论》中提到:“夫精者,身之本也。”肾精是人体生命的本原物质,且分为先天之精和后天之精。先天之精来源于父母,化生机体脏腑清窍;后天之精来源于水谷精微,资先天维持生命活动物质。人尿液干细胞属间充质干细胞范畴,虽来源尿液,但属于成体干细胞。经研究报告,人尿液干细胞在特定诱导下可以增殖分化,成为再生和修复损伤组织作用。徐德成<sup>[28]</sup>等对肾精与现代医学的干细胞研究,认为肾精的现代医学本质主要体现为机体中所有干细胞及其周围微环境中的细胞外基质、细胞间信号分子和组织液等组成的集合体。由此可知,现代医学中干细胞和传统医学肾精的生理特性保持高度相似。张金生<sup>[29]</sup>等研究活血化瘀治法理论“祛瘀血”与“生新”层面与干细胞的增殖、分化的关系,认为活血化瘀法的“祛瘀血”层面通过“活血”调整气血关系达到生新的状态,为干细胞提供良好的微环境,且提出“活血化瘀”的肾属性的观点,强调其干细胞具有肾中所藏精气的特质,是活血化瘀法生新执行的主体。故活血化瘀中草药为干细胞提供了一定培养条件。基于中医基础理论中提出“精血同源”的观点,血液充盈可化生脏腑之精,以补充和滋养肾之所藏,使肾精旺盛。由此可知,从中医角度,活血化瘀法可促进肾精充盈;在现代医学中,川芎提取物阿魏酸钠可诱导干细胞增殖分化,两方面相吻合。故川芎提取物阿魏酸钠诱导人尿液干细胞向神经细胞分化是可行的。

总之,本研究采用体外实验,进行人尿液干细胞从新鲜中段尿液中分离和培养,通过MTT检测和q-PCR技术对川芎提取物阿魏酸钠诱导培养人尿源性细胞增殖活力及神经细胞分化,实验中既观察到阿魏酸钠具有促进人尿液干细胞增殖的现象,且观察细胞向神经细胞分化的现象。人尿液干细胞从取材、培养方面、移植免疫排斥方面,比神经干细胞更胜一筹。在实验中,诱导24h后的细胞未见明显的凋亡,说明阿魏酸钠作为诱导剂具有诱导效率高、毒副作用小、价格低的优点,为中药单体在人尿液干细胞定向分化中的应用提供理论和实验依据;为探索人尿液

干细胞在缺血性脑卒中治疗奠定了一定基础。经中药提取物阿魏酸钠诱导分化的神经元和神经胶质细胞能否在活体内存活及发挥生理功能,将进行下一步研究。

### [基金项目]

江西省中医药管理局科技计划课题(2020B0397)。

### [参考文献]

- [1]《中国脑卒中防治报告2021》编写组,《中国脑卒中防治报告2021》概要[J].中国脑血管病杂志,2023,20(11):783-793.
- [2]国家卫生健康委员会.中国卫生健康统计年鉴2022[M].北京:中国协和医科大学出版社,2022:117-118.
- [3]彭斌,吴波.中国急性缺血性脑卒中诊治指南2018[J].中华神经科杂志,2018,51(09):666-682.
- [4]Hao L,Zou Z,Tian H,Zhang Y,Zhou H,Liu L.Stem cell-based therapies for ischemic stroke.Biomed Res Int.2014;2014:468748.
- [5]Hayashi J,Takagi Y,Fukuda H, et al.Primate Embryonic Stem Cell-Derived Neuronal Progenitors Transplanted into Ischemic Brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2006,26(7).
- [6]李孔平,彭林辉,左夏林,等.神经干细胞移植在缺血性卒中治疗中的作用[J].中国脑血管病杂志,2022,19(11):778-782+801.
- [7]陈龙,李坤正,肖宗宇.不同组织源性干细胞向神经细胞分化的研究进展[J].中国医学创新,2016,13(13):144-148.
- [8]Friedenstein AJ,Piatetzky-Shapiro II,Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.J Embryol Exp Morphol,1966,16(3):381-90.
- [9]Lee OK,Kuo TK,Chen WM, et al.Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.Blood,2004,103(5):1669-75.
- [10]Sanchez-Ramos J,Song S,Cardozo-Pelaez F, et al.Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro.Exp Neurol,2000,164(2):247-56.
- [11]王姣,李岚,余昌胤.尿液干细胞神经生物学特性及神经修复的研究进展[J].贵州医药,2021,45(05):696-698.
- [12]赫为,朱琼瑶.人尿液干细胞定向移植治疗大鼠颅脑损伤.临床和实验医学杂志,2017,16(13):1258-1261.
- [13]蒋国鹏,李晶,马小愉,等.单味中药提取物及有效成分对骨髓间充质干细胞增殖和分化的研究进展[J].辽宁中医杂志,2023,50(06):247-250.
- [14]龚婉,陈晓玲,周莉,等.阿魏酸钠对大鼠脑缺血再灌注炎症损伤的保护作用及机制分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(03):94-99.
- [15]王立霞,王枫,陈欣,等.阿魏酸钠的心脑血管药理作用研究进展[J].中草药,2019,50(03):772-777.
- [16]Guan JJ,Niu X,Gong FX, et al. Biological characteristics of human-urine-derived stem cells:potential for cell-based

therapy in neurology[J].Tissue Eng Part A,2014,20(13-14):1794-1806.

[17]姜之歆,王从容.人尿液干细胞的分离培养及体外成神经细胞分化研究[J].中华老年多器官疾病杂志,2019,18(04):295-299.

[18]Zhang Y,McNeill E,Tian H,etal.Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction.J Urol.2008;180(5):2226-2233.

[19]龚飞翔.人尿液干细胞的分离培养及向神经细胞定向分化的体内外实验研究[D].南昌大学,2013.

[20]苏炜良,郭柱,吴晓淋,等.人髓核细胞诱导人尿液干细胞向髓核样细胞分化作用的研究[J].中国脊柱脊髓杂志,2020,30(11):1027-1036.

[21]邓明,谢萍,吴飞,等.人尿液干细胞体外向神经元样细胞诱导分化及对大鼠脊髓损伤的保护作用[J].中国组织工程研究,2020,24(01):93-98.

[22]张晓娟,张燕丽,左冬冬.川芎的化学成分和药理作用研究进展[J].中医药信息,2020,37(06):128-133.

[23]汪泱,邓志锋,赖贤良,等.阿魏酸钠诱导骨髓间充质干细

胞向神经细胞分化的初步研究.中草药,2004,(03):56-58.

[24]娄远蕾,涂伟,汪泱,等.经阿魏酸钠定向诱导的骨髓间充质干细胞在脑缺血大鼠体内移植研究.中国微侵袭神经外科杂志,2010,15(12):558-561.

[25]林志坚,董姣璇,程欣,等.阿魏酸钠对局灶性脑缺血大鼠神经功能及脑梗死面积的影响[J].医学研究杂志,2019,48(4):75-77+82.

[26]林进平,钱锁开.巢蛋白与神经干细胞[J].现代诊断与治疗,2009,20(06):348-351.

[27]谢辉,龙志江,朱久宜,等.活血、破血药对急性脑缺血大鼠基底动脉内皮细胞VEGF和bFGF表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(23):183-186.

[28]徐德成,马迎民,范吉平.中医“肾精”的现代医学内涵[J],2017,58(22):1891-1897.

[29]张金生,张宝霞,朱慧芳,等.干细胞、微环境与活血化瘀[J].中国组织工程研究,2016,20(23):3484-3490.

#### 通讯作者:

龚飞翔(1986--),男,汉族,江西南昌人,硕士,从事神经病学临床研究。