

# 定量研究石斛醇提取物对酵母朊病毒的治愈作用

刘宴村<sup>a</sup>, 李 辉<sup>a</sup>, 张 艳<sup>a</sup>, 窦 爽<sup>a</sup>, 张 波<sup>a</sup>, 宋有涛<sup>a, b\*</sup>

(辽宁大学 a. 生命科学院, 辽宁省动物资源与疫病防治重点实验室; b. 环境学院, 中国辽宁 沈阳 110036)

**摘要:**为研究石斛醇提取物的抗朊病毒作用, 借助酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]表型系统分析石斛醇提取物对酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]表型的作用, 引入半变性琼脂糖凝胶电泳技术在蛋白质水平分析石斛醇提取物对酵母朊病毒的治疗效果。结果显示, 石斛醇提取物浓度在 15 g/L 时, 作用酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]细胞 5 d 的治愈率为 5%; 并且石斛醇提取物浓度在 5~20 g/L 范围内时, 药物剂量与酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]表型治疗效果呈现较好正相关性。蛋白水平试验表明石斛醇提取物作用酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]细胞 5 d 后红色菌落的朊病毒聚集体大小与[psi<sup>-</sup>]相似。

**关键词:**石斛醇提取物; 酵母朊病毒; [PSI<sup>+</sup>]; 治愈

中图分类号:S859.3

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2014)04-0344-05

## Quantitative Research of the Curing Effects of Alcohol Extract from Dendrobium on Yeast Prion [PSI<sup>+</sup>]

LIU Yan-cun<sup>a</sup>, LI Hui<sup>a</sup>, ZHANG Yan<sup>a</sup>, DOU Shuang<sup>a</sup>, ZHANG Bo<sup>a</sup>, SONG You-tao<sup>a, b\*</sup>

(a. College of Life Science; Province Key Laboratory of Animal Resource and Epidemic Disease Prevention;

b. School of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, Liaoning, China)

**Abstract:** In order to study the anti-prion effects of alcohol extract from dendrobium, the phenotype system of yeast prion [PSI<sup>+</sup>] was used to assay effects of dendrobium on [PSI<sup>+</sup>], and the semi-denaturing agarose gel electrophoresis technique was introduced to detect the effects of dendrobium on yeast prion at the protein level. The results showed that the curing rate of [PSI<sup>+</sup>] cells were 5% after 5 days treatment with dendrobium at the concentration of 15 g/L; and the concentration of dendrobium had a positive relationship to its curing effects on yeast prion [PSI<sup>+</sup>] phenotype at the concentration range of 5~20 g/L. Protein experiments showed that the aggregation status of red phenotype cells in 5 days dendrobium treated cells were similar to those in [psi<sup>-</sup>] cells.

**Key words:** alcohol extract from dendrobium; yeast prion; [PSI<sup>+</sup>]; curing

(Life Science Research, 2014, 18(4): 344~348)

朊病毒是一类能在人和哺乳动物中引起可传染性海绵状组织脑病 (transmissible spongiform encephalopathies, TSEs) 的病原体, 由于其致病机理的复杂性, 迄今为止对于朊病毒疾病仍缺乏有效的治疗药物<sup>[1-3]</sup>。我国的中医、中药学对于阿尔茨海默症和帕金森病等与朊病毒疾病发病机理相似的疾病的治疗有悠久的历史, 而且有研究显

示在绿茶和姜黄提取物中存在具有抗朊病毒活性的成分<sup>[4, 5]</sup>, 暗示着中药在筛选抗朊病毒药物中的巨大潜力。

近年来, 抗朊病毒药物筛选模型是国际上筛选抗朊病毒候选药物的热点<sup>[6]</sup>; 由于动物朊病毒细胞模型不具备明显的细胞表型; 并且存在着与哺乳类动物内朊病毒交叉传染的危险性, 使得实验

收稿日期: 2014-03-12; 修回日期: 2014-04-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970152)

作者简介: 刘宴村 (1989-), 女, 山东省招远人, 硕士研究生, 主要从事疯牛病发病机理与防治研究, E-mail: liuyancun1989@163.com; \* 通讯作者: 宋有涛 (1973-), 男, 辽宁沈阳人, 辽宁大学教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事疯牛病发病机理与防治研究, Tel/Fax: 024-62202682, E-mail: ysong@lnu.edu.cn。

成本昂贵、操作繁杂,严重限制了该领域的研究进展<sup>[7-11]</sup>;而酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]具有易于检测的遗传表型及其与动物具有严格种间屏障的优势,因此基于酵母细胞的抗朊病毒候选药物筛选模型在大规模筛选上具有经济、安全和易实现高通量筛选等特性,而越来越受到关注<sup>[12,13]</sup>;而且利用酵母模型 Bach 等从近 4 000 种小分子化合物中筛选发现了 11 种可以治愈酵母朊病毒细胞的化合物,并且证实 KP16-氨基菲啶和胍那苄等 3 种化合物能够在动物细胞模型中清除聚集状态的哺乳动物朊病毒<sup>[9,10]</sup>。本研究借助酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]模型并结合表型实验和半变性琼脂糖凝胶电泳技术(semi-denaturing detergent-agarose gel electrophoresis, SDD-AGE),研究石斛醇提取物对酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]的治愈作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*): MAT $\alpha$  kar1 SUQ5 ade2-1 his3 $\Delta$ 202 leu2 $\Delta$ 1 trp1 $\Delta$ 63 ura3-52 erg6::KanMX, [PSI<sup>+</sup>].

#### 1.1.2 培养基

1/2YPD 液体培养基: 0.5%酵母浸出粉、2%蛋白胨、2%葡萄糖,葡萄糖单独灭菌。

1/2YPD 固体培养基: 0.5%酵母浸出粉、2%蛋白胨、2%葡萄糖、2%琼脂粉, pH 天然,葡萄糖单独灭菌。

YPAD 固体培养基: 1%酵母浸出粉、2%蛋白胨、0.04%腺嘌呤、2%葡萄糖、2%琼脂粉,葡萄糖单独灭菌。

SD-Ade 固体培养基: 0.7% YNB-AA、2%葡萄糖、2%琼脂粉, pH 天然,葡萄糖单独灭菌。倒平板前加入氨基酸 His、Ura、Trp、Leu 分别为 20、20、20、60 mg/L。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

石斛购于辽宁省沈阳市国大药房;腺嘌呤、尿嘧啶、色氨酸等购于北京市鼎国技术有限公司;羊抗 Sup35 抗体与 HRP 标记的驴抗羊 IgG 购于圣克鲁斯生物技术公司(美国);琼脂糖水平电泳槽(DYCO-31DN, 北京六一公司);转膜仪(Bio-Rad 公司, 美国);珠磨破碎仪(Bio spec 公司, 美国);旋转蒸发器(RE52CS-2, 上海亚荣生化仪器厂)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 石斛醇提取物的制备

称石斛粉末 10 g, 加入 8 倍体积的 80%乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并 3 次的提取液<sup>[14]</sup>, 60 °C减压蒸发, 浓缩至 50 mL, 然后烘干至恒重, 用 5% DMSO (二甲基亚砷)溶解成 200 g/L 的提取液备用。

#### 1.2.2 石斛醇提取物对酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]治愈作用的研究

[PSI<sup>+</sup>]酵母细胞在 24 °C过夜活化培养后, 调整菌液光密度 OD<sub>600</sub> 为 0.2 左右, 按 10%接种量分别接种到含有不同浓度石斛醇提取物的 1/2 YPD 液体培养基中, 所有体系于 24 °C振荡培养 5 d, 每隔 24 h 更换培养基和石斛醇提取物;分别在 1、3、5 d 取培养液稀释后涂布于 1/2 YPD 固体平板, 平板于 24 °C恒温培养 7 d, 观察菌落颜色变化, 统计阳性菌落的比例<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.3 石斛水提取物的制备及对酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]作用的研究

称石斛粉末 10 g, 加入 100 mL 蒸馏水回流提取 3 h, 用滤液配制 1/2 YPD 液体培养基, 灭菌后备用。[PSI<sup>+</sup>]酵母细胞在 24 °C过夜活化后, 到菌液光密度 OD<sub>600</sub> 为 0.2 左右时, 按 10%接种量接种到含有石斛水提取物的 1/2 YPD 液体培养基内, 并于 24 °C培养, 每天更换培养基;5 d 后稀释培养液并涂布于 1/2 YPD 固体平板, 平板于 24 °C培养, 观察菌落颜色变化<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.4 遗传表型实验分析石斛醇提取物对酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]的治疗效果

采用表型分析法分析中药作用酵母朊病毒后的假阳性与假阴性结果;随机挑取石斛醇提取物治愈酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>] 后的红色菌落划线于 1/2 YPD 平板上, 分别影印到 SD-Ade、1/2 YPD 和 YPAD 固体平板上, 24 °C培养 5 d 后记录实验结果。

#### 1.2.5 半变性琼脂糖凝胶电泳结合蛋白质免疫印迹技术分析石斛醇提取物对酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>] 的治疗效果

挑取石斛醇提取物治愈酵母朊病毒后的红色菌落活化, 接种到 YPD 液体培养基中 30 °C培养约 16 h, 到菌液 OD<sub>600</sub>=1.5 左右时停止培养, 离心收集细胞, 加入裂解缓冲液, 用珠磨仪裂解细胞, 离心收集上清得到蛋白样品;然后采用 SDD-AGE/Western blot, 首先进行 1.5%的琼脂糖凝胶

电泳,电泳结束后用在 0 ℃、恒流 0.35 A 条件下转膜 1 h,将蛋白转移到 PVDF 膜上,羊抗 Sup35 抗体孵育 1 h,4 ℃过夜,HRP 标记的驴抗羊 IgG 孵育 1 h 后,洗膜,采用 ECL 发光试剂盒对其进行放射自显影检测,获得图像信息<sup>[13,15]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 石斛醇提取物和水提取物对酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>]治愈作用的研究

酿酒酵母的 *ade2-1* 等位基因在 *ADE1* (或 *ADE2*) 营养缺陷型标记编码基因的开放阅读框 (ORF) (该基因编码酵母合成腺嘌呤途径所必须的 *ade1* 酶) 起始处有一个乳白终止密码子<sup>[16]</sup>。在 [PSI<sup>+</sup>] 细胞中,Sup35p 聚集形成淀粉样蛋白,导致无义突变抑制,产生终止密码子通读现象,合成腺嘌呤,使 [PSI<sup>+</sup>] 细胞在缺乏腺嘌呤的培养基上生长为白色菌落;在 [psi<sup>-</sup>] 细胞中,其 Sup35p 主要以单体形式存在,非无义抑制的 *ade2-1* 突变株需要在含有腺嘌呤的培养基上生长,由于累积腺嘌呤合成途径中的副产物,细胞因而形成红色菌落如图 1 (注:因为是黑白印刷,所以在本文的图中根据红色深浅显示为深灰色或黑色),这个颜色指示系统可用来初步分析酵母朊病毒的存在状态<sup>[17,18]</sup>。根据实验结果,石斛水提取物作用酵母朊病毒 5 d 后,无红色菌落出现,石斛水提取物不能治愈酵母朊病毒。所以研究 5、10、15、20 g/L 石斛醇提取物对酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>] 表型的治疗作用,如图 2 所示

石斛醇提取物浓度为 15 g/L 时,对酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>] 具有明显的治愈效果,治愈率为 5%,但是当石斛醇提取物浓度为 20 g/L 时,出现抑菌性。

### 2.2 遗传表型实验分析石斛醇提取物对酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>] 的治疗效果

为了进一步验证 15 g/L 的石斛醇提取物表型上的治愈效果是否是假阳性,随机选取 15 g/L 的石斛醇提取物治愈的酵母朊病毒平板上出现的红色菌落划线于 1/2 YPD 固体平板上,分别影印到 YPAD、SD-Ade 和另一个 1/2 YPD 平板上。由图 3 可以看出,被石斛醇提取物治愈的酵母细胞在 1/2 YPD 培养基上为红色,在 YPAD 为白色菌落,而在缺乏 Ade 的培养基上不生长(由于黑白印刷,所以在本文中红色为深灰色,白色还是白色)。

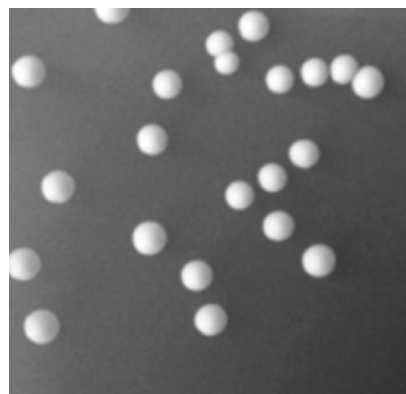


图 1 石斛水提取物对酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>] 的作用效果

Fig.1 Effect of aqueous extract from *Dendrobium* on yeast prion [PSI<sup>+</sup>]

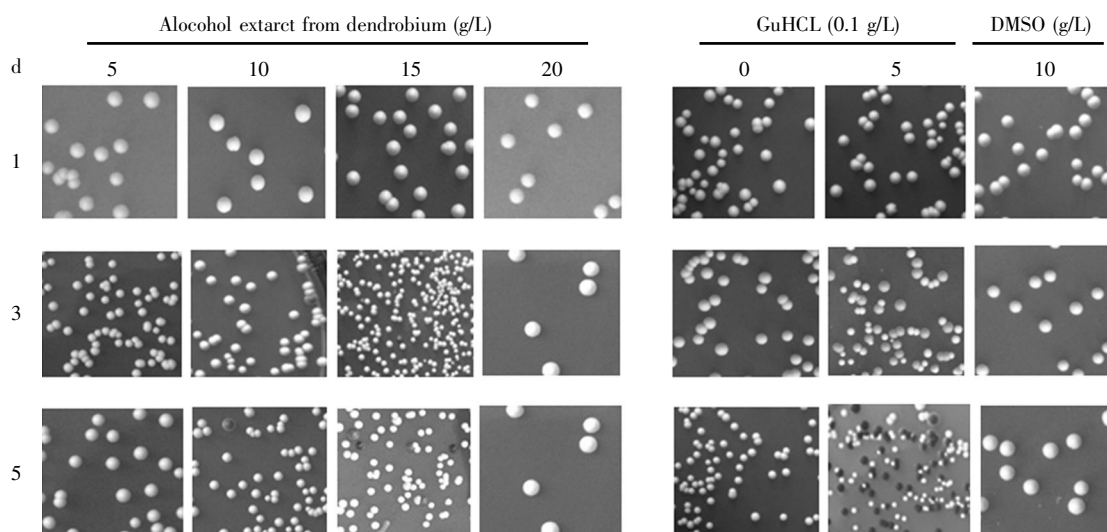


图 2 不同浓度石斛醇提取物和不同培养时间对酵母朊病毒 [PSI<sup>+</sup>] 的治愈效果

Fig.2 Curing results of alcohol extract from *dendrobium* with different concentrations and different incubation time on yeast prion [PSI<sup>+</sup>]

因此,在表型水平上的结果表明 15 g/L 的石斛醇提取物对酵母朊病毒有一定的治愈效果。

### 2.3 半变性琼脂糖凝胶电泳结合蛋白质免疫印迹技术分析石斛醇提取物对酵母朊病毒 [*PSI<sup>+</sup>*] 的治疗效果

在酵母朊病毒中, *ADE1* 或 *ADE2* 的突变都会导致中间产物 AIR 的聚集, 从而导致红色素的聚集。而在这个合成途径的较早步骤如果发生突变的话, 例如 *ADE4*、*ADE5*、*ADE8*、*ADE6* 或者 *ADE7*, 就会在 AIR 合成之前阻断该途径并且阻止红色素的聚集, 从而无论朊病毒的状态如何都会出现白色菌落。因此基于表型判定朊病毒状态的方法虽然直观, 并且大部分时候是准确的, 仍然不能排除假阳性实验结果的出现。所以, 需进一步在蛋白水平上研究石斛醇提取物对酵母朊病

毒的治愈效果。

聚集体的相对分子质量大小是反应酵母朊病毒聚集程度的重要指标, 而 SDS-PAGE/Western blot 技术仅能分析朊病毒是否发生聚集, 近年来发展的半变性琼脂糖凝胶电泳 (SDD-AGE) 结合 Western blot 技术能够精确检测朊病毒聚集体大小<sup>[14]</sup>。所以本研究采用 SDD-AGE/Western blot 比较了不同表型菌落 Sup35p 蛋白的聚集状态。本实验随机分析了石斛醇提取物 15 g/L 作用 5 d 后出现的红色菌落朊蛋白聚集体大小。如图 4 所示对照的 [*PSI<sup>+</sup>*] 细胞朊病毒 Sup35p 蛋白主要以聚集体形式存在, 而在 [*psi<sup>-</sup>*] 细胞中, Sup35p 主要以单体形式存在。石斛醇提取物 15 g/L 培养条件下治愈酵母朊病毒后其红色菌落为可溶的单体形式, 说明石斛醇提取物作用后的红色菌落已被治愈。

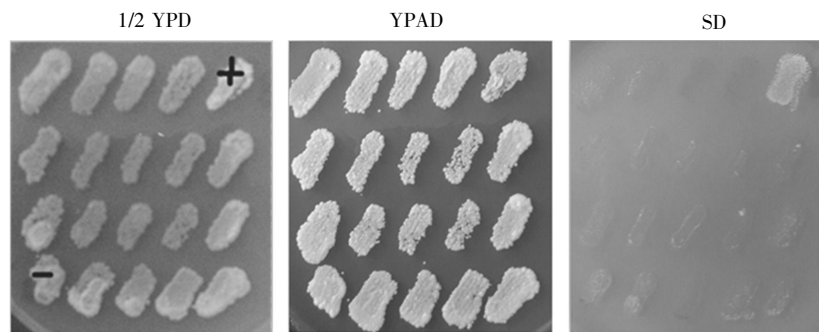


图3 利用表型实验分析假阳性结果

Fig.3 Phenotypic analysis of false-positive results

## 3 讨论

借助本实验室构建独有的抗酵母朊病毒药物筛物筛选平台, 采用酵母朊病毒 [*PSI<sup>+</sup>*] 表型和半变性琼脂糖凝胶电泳结合免疫印迹技术分析石斛醇提取物抗朊病毒作用; 研究结果表明, 石斛水提取物不能治愈酵母朊病毒 [*PSI<sup>+</sup>*], 而石斛醇提取物对酵母朊病毒 [*PSI<sup>+</sup>*] 具有明显的治疗效果, 表明石斛中含有能够治疗酵母朊病毒的成分, 而且它存在于醇提取物中。石斛属是兰科中最大的一个属, 是一种传统中草药具有驱解虚热、益精强阴的作用, 现代药理研究表明石斛还有抗衰老、提高免疫力和抗肿瘤等作用。石斛中的有效成分为生物碱类、酚类、多糖类、苯类极其衍生物等。有文献表明石杉中的生物碱石杉碱甲是一种可逆的胆碱酯酶抑制剂, 对乙酰胆碱酯酶有较强的抑制作用, 是一种可用于治疗阿尔茨海默病的药物<sup>[19]</sup>, 石斛中同样含有生物碱, 所以推测石斛中的生物碱

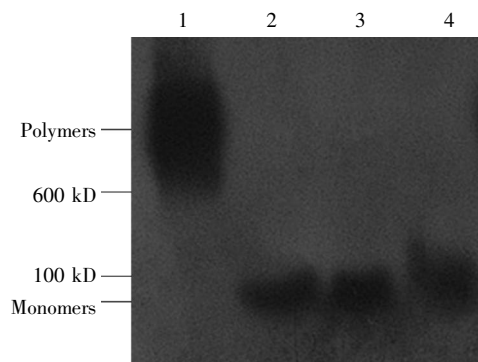


图4 半变性琼脂糖凝胶电泳结合蛋白质免疫印迹技术分析石斛醇提取物对酵母朊病毒 [*PSI<sup>+</sup>*] 的作用

Fig.4 Analysis effects of alcohol extract from dendrobium on yeast prion [*PSI<sup>+</sup>*] cells with semi denaturing detergent agarose gel electrophoresis and Western blot

1: [*PSI<sup>+</sup>*]; 2: [*psi<sup>-</sup>*]; 3, 4: Alcohol extract from dendrobium.

类有治疗酵母朊病毒的作用, 但是这需要后续实验证实。近几年来无论从中药有效成分的提取到天然药物的开发都得到了很大的进展, 中药以其毒副作用小, 疗效确切占据独特优势<sup>[20]</sup>, 相继发现

了何首乌<sup>[23]</sup>、人参皂苷<sup>[22]</sup>、积雪草酸<sup>[24]</sup>、银杏<sup>[21]</sup>、两面针<sup>[1]</sup>等极具前景的抗阿尔茨海默病活性成分。本研究显示了传统中药石斛的醇提物具有良好的治疗酵母朊病毒活性,表明在中药领域存在具有抗朊病毒活性的物质,对于研究和开发抗哺乳动物朊病毒的中药制剂具有重要的意义,同时也有利于国际社会对中药的认同,加快中药的国际化。

### 参考文献(References):

- [1] 钟正伟. 两面针水提对酵母朊病毒作用研究[J]. 动物医学进展 (ZHONG Zheng-wei. Study on effects of aqueous extract from *Zanthoxylum nitidum* on yeast prion [PSI<sup>+</sup>][J]. Progress in Veterinary Medicine), 2013, 34(4): 133-136.
- [2] JOYNER P M, CICHWICZ R H. Bringing natural products into the fold-exploring the therapeutic lead potential of secondary metabolites for the treatment of protein-misfolding-related neurodegenerative diseases[J]. RSC Publishing, 2011, 28(1): 26-47.
- [3] WANG Yi-qian, BUELL A K, WANG Xin-yu, *et al.* Relationship between prion propensity and the rates of individual molecular steps of fibril assembly[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(14): 12101-12107.
- [4] ROBERTS B E, DUENNWALD M L, WANG Huan, *et al.* A synergistic small-molecule combination directly eradicates diverse prion strain structures[J]. Nature Chemical Biology, 2009, 5(12): 936-946.
- [5] HARVEY B S, MUSGRAVE I F, OHLSSON K S, *et al.* The green tea polyphenol-epigallocatechin-3-gallate inhibits amyloid- $\beta$  evoked fibril formation and neuronal cell death *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1729-1736.
- [6] GHAEMMAGHAMI S, MAY B C, RENSLO A R, *et al.* Discovery of 2-aminothiazoles as potent anti-prion compounds[J]. Journal of Virology, 2010, 84(7): 3408-3412.
- [7] SIM V L, CAUGHE Y B. Recent advances in prion chemotherapeutics[J]. Infect Disord Drug Targets, 2009, 9(1): 81-91.
- [8] ADRIANO A, CONNOR T O. Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2010, 9(3): 237-248.
- [9] BACH S, TALAREK N, ANDRIEU T, *et al.* Isolation of drugs active against mammalian prions using a yeast-based screening assay[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(9): 1075-1081.
- [10] COUPLANA E, AIYARB R S, KUCHARCZYK R, *et al.* A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders [J]. Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 2011, 108(29): 11989-11994.
- [11] BARBEZIER N, CHARTIER A, BIDEY Y, *et al.* Anti-prion drugs 6-aminophenanthridine and guanabenz reduce PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy[J]. EMBO Molecular Medicine, 2011, 3(1): 35-49.
- [12] SONG Y T, WU X Y, HE X R. Development of the model for anti-prion drug screening[J]. Liaoning University Natural Sciences, 2009, 37(4): 289-293.
- [13] HALFMANN R, LINDQUIST S L. Screening for amyloid aggregation by semi-denaturing detergent-agarose gel electrophoresis[J]. Journal of Visualized Experiments, 2008, 17(1): 1-4.
- [14] 魏小勇, 马伟凤, 高欣欣, 等. 不同极性石斛生物碱的提取分离工艺研究 [J]. 现代中药研究与实践 (WEI Xiao-yong, MA Wei-feng, GAO Xing-xing, *et al.* Study on extraction process of noble dendrobium alkaloid [J]. Chinese Medicine Research and Practice), 2010, 24(3): 58-59.
- [15] 钟正伟, 王莉洁, 谢辉, 等. 定量研究菲啉对酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]的治愈作用[J]. 生物工程学报(ZHONG Zheng-wei, WANG Li-jie, XIE Hui, *et al.* Quantification of the curing effects of phenanthridine on yeast prion [PSI<sup>+</sup>][J]. Chinese Journal of Biotechnology), 2012, 28(6): 737-746.
- [16] COX B S. PSI, a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast[J]. Heredity, 1965, 20: 505-521.
- [17] ALBERTI S, HALFMANN R, KING O, *et al.* A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins[J]. Cell, 2009, 137(1): 20-22.
- [18] 王莉洁. Cl<sup>-</sup>/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>的金属盐胁迫诱导酵母朊病毒[PSI<sup>+</sup>]形成的研究[D]. 沈阳: 辽宁大学研究生院(WANG Li-jie. Research on Cl<sup>-</sup>/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>-Metal Salt Stress Induced Yeast Prion [PSI<sup>+</sup>] Formation[D]. Liaoning: Graduate School of Liaoning University), 2012.
- [19] 任晓蕾, 韩冬, 李玉珍. 阿尔茨海默病的药物治疗进展[J]. 中国执业药师(REN Xiao-lei, HAN Dong, LI Yu-zhen. Advances in drug therapy for Alzheimer's disease [J]. China Licensed Pharmacist), 2010, 7(7): 3-8.
- [20] 王淑云. 中药治疗老年性痴呆的研究进展[J]. 黑龙江科学(WANG Shu-yun. Research progress of traditional Chinese herb treatment of Alzheimer's disease [J]. Heilongjiang Science), 2013, 4(4): 66-67.
- [21] 谢超敏, 郑桂兰. 中药银杏叶对老年痴呆症小鼠记忆能力的影响[J]. 中国比较医学杂志(XIE Chao-min, ZHENG Gui-lang. Effect of ginkgo leaf on learning and memory in Alzheimer's disease mice[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine), 2010, 20(9): 26.
- [22] 张丹参, 张均田. 人参总皂苷对 $\beta$ -淀粉样肽致小鼠记忆障碍的影响[J]. 中国药理学通报 (ZHANG Dan-shen, ZHANG Jun-tian. Effect of total ginsenoside on memory impairment induced by  $\beta$ -amyloid peptide [J]. Chinese Pharmacological Bulletin), 2000, 18(4): 422-424.
- [23] 吴晓青. 何首乌化学成分与药理活性的研究进展[J]. 时珍国医国药(WU Xiao-qing. Progress of polygonum chemical composition and pharmacological activity[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research), 2009, 20(1): 146-147.
- [24] WU J, PAN Z, CHENG M, *et al.* Ginsenoside Rg1 facilitates neural differentiation of mouse embryonic stem cells via GR-dependent signaling pathway[J]. Neurochemistry International, 2013, 62(1): 92-102.