

http://www.journals.zju.edu.cn/med

## 淫羊藿素诱导小鼠胚胎干细胞体外 定向分化为神经细胞

朱丹雁,张翔南,杜悦,陈燕,王志强,楼宜嘉

(浙江大学药学院 药理毒理与生化药学研究所,浙江 杭州 310058)

**[摘要]** 目的:采用淫羊藿素(icaritin, ICT)改变小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)体外培养微环境,论证ICT提高ES细胞体外定向分化为神经细胞的效应。方法:采用拟胚体培养法,评价ICT对ES细胞体外定向分化为神经细胞的诱导作用;并利用RT-PCR法和免疫荧光法鉴定神经细胞特异基因和蛋白表达谱。结果:ICT在 $10^{-7}$  mol/L浓度时,对ES细胞定向分化为神经细胞表型呈现最佳诱导效应,在分化d 8+8时,分化率高达80%( $P < 0.001$ ),并呈良好的量效和时效关系。分化神经表型者表达神经元特异性微管蛋白( $\beta$ -tubulin III)基因和神经胶质细胞特异性胶质纤维酸性蛋白(GFAP)基因,同时伴有神经前体细胞特异性标志蛋白(nestin)及 $\beta$ -tubulin III和GFAP特异性蛋白阳性表达。结论:应用拟胚体培养微环境调控法,ICT可诱导小鼠ES细胞定向分化为神经细胞,并与神经发育依赖性特异基因和蛋白表达呈正相关。

**[关键词]** 淫羊藿/药理学; 神经元; 干细胞; 细胞,培养的; 细胞分化/药物作用; 荧光免疫测定

**[中图分类号]** R 966 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)03-0217-07

### Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into neuronal cells induced by icaritin *in vitro*

ZHU Dan-yan, ZHANG Xiang-nan, DU Yue, et al (Institute of Pharmacology & Toxicology and Biochemical Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the inductive effects of icaritin (ICT) on the directed differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells into neuronal cells *in vitro*. **Methods:** ES cells were cultured with embryoid body (EB) formation cultures, ICT in different concentrations was added in the cultural media and the cells were harvested in several differentiation phases. The expression spectrums of neuronal cell-specific genes and proteins were verified by semi-quantitative RT-PCR and immunocytochemistry analysis, respectively. **Results:** Differentiation of neurocyte phenotype from ES cells was promoted by ICT in a concentration- and time- dependent manner. ICT at  $10^{-7}$  mol/L significantly enhanced the differentiation toward neuronal cells, and up to 80% of EBs outgrowth in d 8+8 incubation. The gene expressions of  $\beta$ -tubulin III in neuron and GFAP in glial cells were detected in neuronal cell phenotype derived from EBs. Furthermore,

收稿日期: 2007-03-04 修回日期: 2007-04-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30600762, No. 30672564); 浙江省自然科学基金项目 (No. Y206473); 浙江省中医药科技计划项目 (No. 2006Y009); 中国博士后科学基金资助项目 (No. 2005038640).

作者简介: 朱丹雁(1977-), 女, 博士后, 讲师, 主要从事干细胞生物学研究; Email: zdyzxb@zju.edu.cn.

nestin was detected in precursor cells,  $\beta$ -tubulin III and GFAP were detected in the generated precursor neurocytes immunocytochemically. **Conclusion:** Directed differentiation of neurons is facilitated by ICT in EB formation culture, which is associated with the expression of developmental-dependent gene and protein.

[Key words] EPIMEDIUM BREVICORNUM/pharmacol; Neurons; Stem cells; Cells, cultured; Cell differentiation/drug eff; Fluoroimmunoassay

[ J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(3):217-223. ]

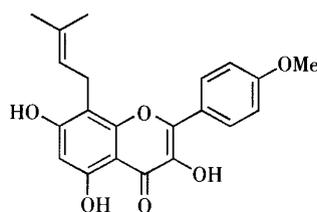
小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)系能在体外不断自我更新,并具有多种分化潜能。合适的微环境可使ES 细胞分化成外胚层,进而定向分化为神经元和神经胶质细胞。该分化潜能用于中枢神经系统退行性病变的细胞替代治疗及药物介入细胞替代治疗的前景已引起关注<sup>[1]</sup>。经典的ES 细胞定向分化为神经细胞有拟胚体形成法和单层黏附培养法<sup>[2-3]</sup>。维 A 酸(retinoic acid, RA)作为工具药,常用于诱导神经细胞分化<sup>[4]</sup>;另外,基质细胞诱导<sup>[5]</sup>和遗传工程<sup>[6]</sup>均可促进ES 细胞向神经细胞分化。鉴于ES 细胞自发定向分化神经细胞率较低,探索药物改善分化所需微环境,促进ES 细胞定向分化为神经细胞,无论对阐明药物诱导分化过程关键基因和蛋白表达谱,还是发现新型促神经细胞分化剂均具有重要意义。

淫羊藿素(icaritin, ICT)为 5,7-二羟基-4'甲氧基-8-异戊烯基黄酮(图 1),具有雌激素样活性和抗氧化活性<sup>[7]</sup>,尚能通过抗凋亡作用保护大鼠原代培养神经细胞免受 A $\beta$  肽损伤<sup>[8]</sup>,具有防治神经退行性改变的作用。为论证其是否也具有潜在的诱导 ES 细胞定向分化为神经细胞的作用,本研究采用拟胚体培养法,利用 ES 细胞对微环境变化非常敏感的特征,通过 ICT 改变 ES 细胞培养的微环境,探索 ICT 介导 ES 细胞体外定向分化为神经细胞的效应,阐明 ICT 在诱导分化过程中关键基因和蛋白的表达谱,为其可能成为促神经细胞分化剂提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 细胞系: ES-D3 细胞株购自 American



淫羊藿素

(5,7-二羟基-4'甲氧基-8-异戊烯基黄酮)

图 1 ICT 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of ICT

Type Culture Collection.

1.1.2 药物: ICT 按文献<sup>[9]</sup>制备,纯度  $\geq 99\%$ ; RA 为 Sigma (St. Louis, MO, USA) 公司产品。

1.1.3 主要试剂: 高糖 DMEM、DMEM/F12、胎牛血清、N2 和 B27 为 Gibco (Burlington, Ontario, Canada) 公司产品; 丝裂霉素 C 为日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司产品 (Tokyo, Japan); PCR 相关试剂均购自上海生物工程技术服务有限公司; 小鼠白血病抑制因子 (leukaemia inhibitory factor, LIF)、单克隆小鼠抗 nestin (clone number MAB353) 和单克隆小鼠抗 GFAP (GFAP, clone number MAB360) 均为 Chemicon 公司产品;  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -Me)、多聚鸟氨酸及层粘连蛋白、单克隆小鼠抗  $\beta$ -tubulin III (clone number T2200) 为 Sigma 公司产品; 异硫氰酸荧光素标记山羊抗小鼠 IgG 和罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG 为 Rockland 公司产品。

1.1.4 主要仪器: CO<sub>2</sub> 孵箱 (Forma 3111), 超净工作台 (Forma 1851), PCR 仪 (BIO RAD),

凝胶成像系统(BIO RAD),ECP3000 三恒电泳仪(北京六一仪器厂),荧光倒置显微镜(LEICA MPS 30型)。

1.2 方法

1.2.1 ICT 诱导 ES 细胞分化培养: 常规法进行 ES 细胞支持培养和传代<sup>[10]</sup>。ES 细胞用分化培养液 I (含糖 DMEM、非必需氨基酸、10% 胎牛血清、不含 LIF) 制成单细胞悬液, 按约 600 个/30  $\mu$ l 细胞接种于培养皿盖内表面, 翻转后形成悬滴, 置于培养箱中 3 d。将已形成拟胚体 (embryoid bodies, EBs) 的悬滴转入盛有 10 ml 分化培养液 I 的培养皿内, 继续悬浮培养 1 d。第二天加入受试药物与 EBs 悬浮共培养 4 d, 分组如下: ICT 终浓度分别为  $10^{-7}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、 $10^{-8}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>、 $10^{-9}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 组, 阳性对照组为 RA  $5 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 阴性对照组为 0.1% DMSO 溶剂。再将 EBs 转入预铺多聚鸟氨酸及层粘连蛋白的 96 孔板内 (每孔放置 1 个 EB), 每孔加入 100  $\mu$ l 分化培养液 II (含 DMEM/F12、N2/B27、1% 胎牛血清, 不含 LIF) 及受试药物 (图

2)。此时开始用倒置显微镜每天观察细胞, 以捕获出现神经样细胞 (细胞突起长度为胞体直径的 5 倍以上) 的最初时间。将 ES 细胞脱离饲养层进行悬滴培养当天记为 d 0, EBs 转移到 96 孔板贴壁培养时为 d 8, 此后依次以 d 8+n (n=0~10) 表示不同分化时间点。拍摄不同分化阶段细胞形态学照片。用结晶紫活细胞染色: 吸弃上清液, 以 37  $^{\circ}$ C, pH 7.4 的 PBS 洗涤 3 次, 加入 0.2% 结晶紫溶液 (内含 0.2% 乙醇) 染色 1 min, 洗涤后, 在倒置显微镜下观察细胞形态, 摄片。按以下公式计算神经细胞分化率<sup>[11]</sup>: 神经细胞分化百分率 = (出现神经样细胞 EBs 个数/EBs 总个数)  $\times$  100%, 并以此百分率和时间做出量效关系和时效关系曲线, 作为评价 ICT 对 ES 细胞定向分化为神经细胞诱导效应的指标。上述实验重复 6 次。

1.2.2 RT-PCR 法检测神经细胞特异基因: 收集分化 d 8+2、d 8+6 时, 经不同浓度药物处理的神经细胞, 按照 Trizol reagent 说明书提取总 mRNA。引物序列<sup>[11]</sup>与实验条件见表 1。

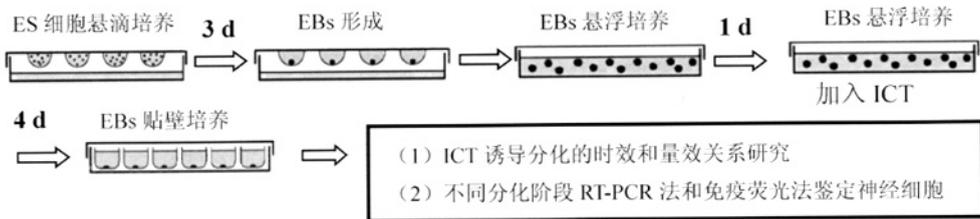


图 2 ICT 诱导 ES 细胞定向分化为神经细胞的实验流程

Fig. 2 Procedure of directed differentiation of neurons from mouse ES cells induced by ICT

表 1 引物序列和 PCR 反应条件

Table 1 Primers and conditions for RT-PCR

目的基因	引物序列 (5'-3')	产物长度/bp	退火温度/ $^{\circ}$ C	循环数
$\beta$ -actin	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA CTAGAAGCATTGTGCGGTGGACGATGGAGGG	660	55	30
$\beta$ -tubulin III	GGTGTCGGAGTACCAGCAGT GAAGAGCACCAGAGACCCAG	233	58	40
GFAP	AAGCTCCAAGATGAAACCAACCTGA GCAAACCTTAGACCGATACCACTC	326	58	40

PCR 反应体系: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s,  $\beta$ -tubulin III、GFAP、 $\beta$ -actin 退火温度分别是

58  $^{\circ}$ C、58  $^{\circ}$ C、55  $^{\circ}$ C, 分别循环 40、40、30 轮, 末次循环后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 冷却保存。PCR

产物1.5%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察及拍照分析。

**1.2.3 免疫荧光法检测神经细胞特异蛋白表达:**采用免疫荧光法鉴定神经前体细胞特异性标志蛋白nestin,神经元特异性蛋白 $\beta$ -tubulin III和神经胶质细胞特异性蛋白GFAP的表达。根据PCR结果,收集分化d 8+2和d 8+6的 $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ICT组细胞样本,用纯冷甲醇固定10 min,再用牛血清封闭30 min,然后加入一抗:单克隆鼠抗nestin,1:100稀释;单克隆鼠抗GFAP,1:200稀释;单克隆鼠抗 $\beta$ -tubulin III,1:100稀释,4℃孵育过夜。第二天加入二抗:异硫氰酸荧光素标记的抗小鼠IgG或罗丹明标记的抗小鼠IgG,1:1000稀释,37℃孵育1.5 h。无荧光甘油封片后用荧光显微镜观察,拍照记录。

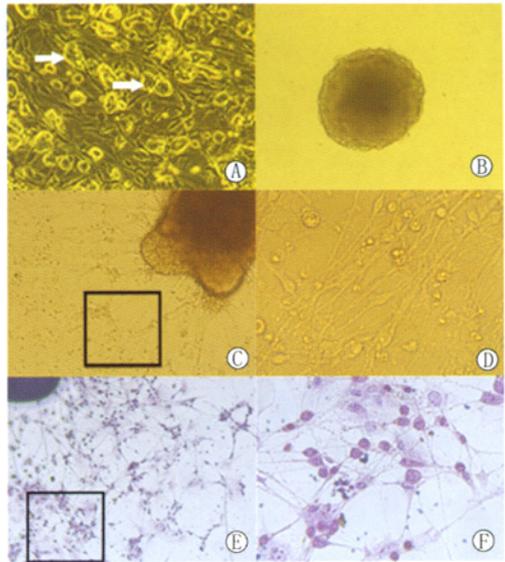
**1.3 统计方法** 采用SPSS 10.0 for Windows统计软件,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用one-way ANOVA分析,若有差异两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 为有统计学显著性差异。

**2 结果**

**2.1 分化过程不同时相细胞形态学** ES细胞呈集落状贴壁生长,未分化克隆呈长梭形或卵圆形,形似鸟巢或岛屿,排列紧密,细胞之间界限不清(图3A)。经分化培养后形成的EBs呈立体球形结构(图3B)。EBs贴壁培养后,从克隆边缘分化出神经样细胞,细胞胞体小,呈短梭形,三角形,折光性强,细胞大多伸展,形成细长的细胞突起,相互交织成网状。当细胞突起的长度为胞体直径5倍以上时,将其认定为神经样细胞表型(图3C、D),供计算分化率用。活神经细胞结晶紫染色呈紫色(图3E、F)。

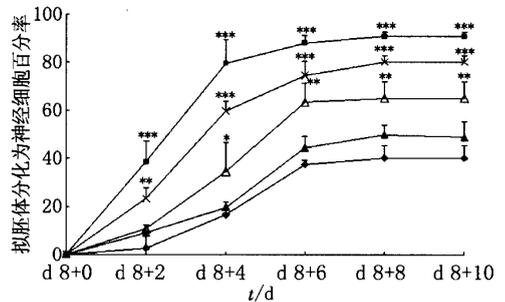
**2.2 ICT 诱导定向分化效应** ICT能显著提高ES细胞定向分化为神经细胞,且具有一定量效和时效关系。当EBs分别与 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ICT共培养后,在d 8+0~d 8+10分化时相内,神经细胞分化率不断提高,在d 8+8时分化率最高,分别为80%、65%、50%,均显著高于溶剂对照组(40%)。其中 $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ICT组在分化d 8+2时与阴性对照组比有显著性差异( $P < 0.01$ ,图4)。

**2.3 ICT 诱导神经元特异基因表达** 结果显



A: ES细胞在小鼠胚胎成纤维细胞上形成的克隆(箭头所示);B:悬浮的拟胚体;C和D:由拟胚体分化成神经细胞(D图放大取自C图矩形框区域);E和F:结晶紫染色神经细胞(F图放大取自E图矩形框区域)。A、B、C、E×100,D、F×400

**图3** ES细胞分化神经细胞过程形态特征  
**Fig. 3** Morphogenesis characteristics during the course of neuronal cell differentiation from mouse ES cells



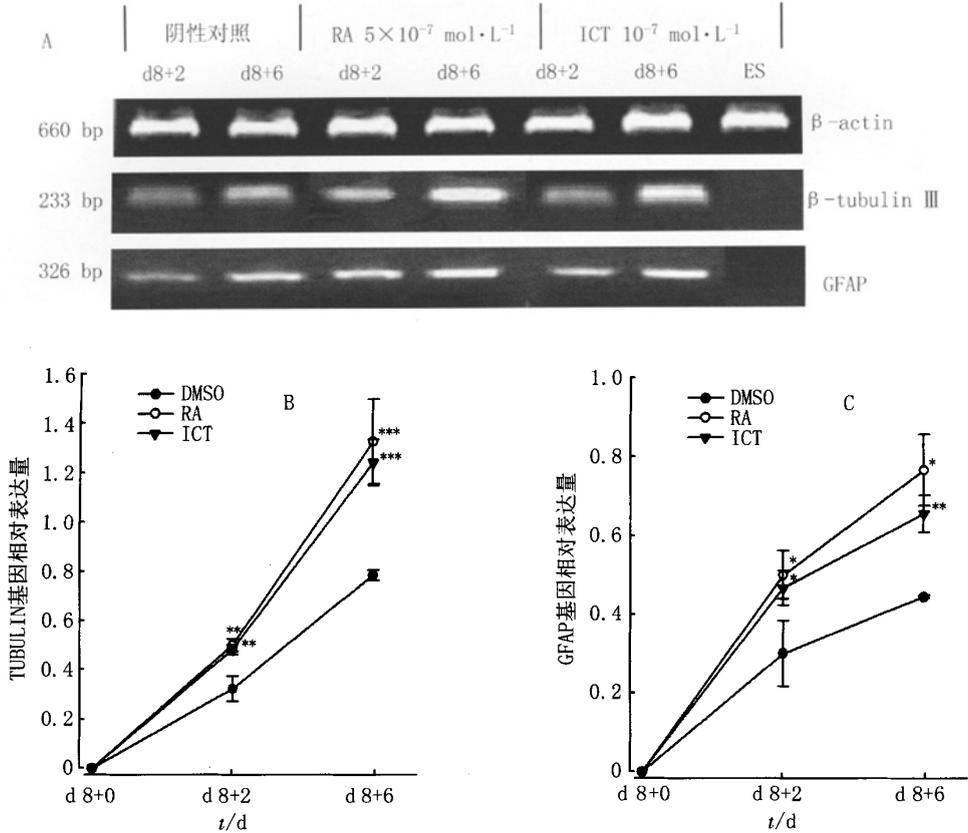
×:  $10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ICT组 ( $n=121$  EBs); △:  $10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ICT组 ( $n=127$  EBs); ▲:  $10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ICT组 ( $n=112$  EBs); ■:  $5 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  RA组 ( $n=99$  EBs)为阳性对照; ◆: 0.1% DMSO溶剂组 ( $n=109$  EBs)为阴性对照( $\bar{x} \pm s$ )。vs 阴性对照组, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

**图4** ICT诱导ES细胞体外定向分化为神经细胞的量效和时效关系

**Fig. 4** Dose- and time-effect relationships of ICT on the directional differentiation of ES cells into neuronal cells

示,在分化d 8+2时β-tubulin III和GFAP基因开始表达,表达量呈分化时间依赖性。当10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> ICT或5×10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> RA分别与

EBs共孵育后,在d 8+2时β-tubulin III和GFAP表达量与阴性对照组比较明显增加,表达量随分化时间延长而增加(P<0.05,图5)。



A:PCR产物凝胶电泳图;B和C:β-tubulin III和GFAP mRNA相对表达半定量分析,以β-actin为内参(n=3, x̄±s)。vs 阴性对照组,\*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001

图5 ES细胞源的神经细胞β-tubulin III和GFAP mRNA表达

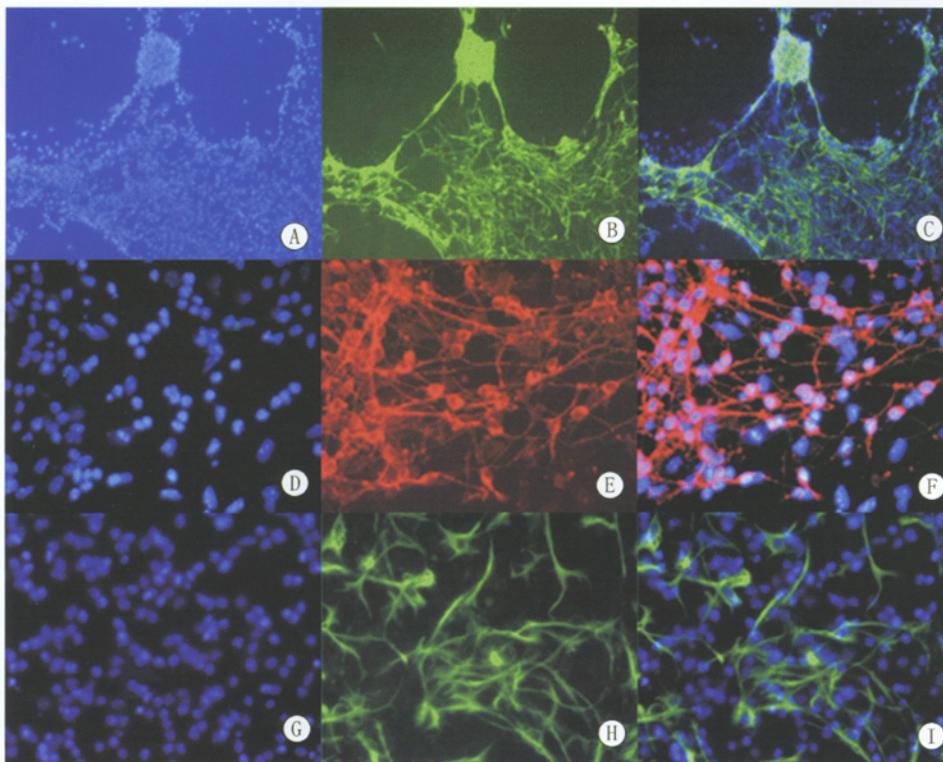
Fig. 5 Expressions of β-tubulin III and GFAP mRNA of EBs analyzed by semi-quantitative RT-PCR

**2.4 ICT诱导神经细胞特异蛋白表达** 当EBs贴壁培养2 d时,10<sup>-7</sup> mol·L<sup>-1</sup> ICT组绝大部分细胞nestin表达阳性,证明该细胞具有神经前体细胞特性。至分化d 8+6,出现有GFAP阳性的神经胶质细胞及β-tubulin III阳性的神经元,其中以β-tubulin III阳性细胞最为多见,呈现红色荧光,多分布于克隆边缘,胞体为圆形、椭圆形,突起为一个至数个,长度基本为胞体5倍以上,其细长突起彼此相连交织成复杂

的网状,提示为不同分化阶段的神经元;少数细胞表达神经胶质细胞标志物GFAP,呈现绿色荧光,上述结果确证呈神经细胞表型者为不同类型神经细胞(图6)。

### 3 讨论

ES细胞体外分化为神经细胞的潜能用于中枢神经系统退行性改变的细胞替代治疗以及药物介入细胞替代治疗的前景已引起关注<sup>[1]</sup>。



A、D、G:DAPI 核染;B:分化d 8+2 神经前体细胞标志蛋白 nestin 阳性表达;C:A、B 图叠加;E:分化d 8+6 神经元特异性蛋白 $\beta$ -tubulin Ⅲ 阳性表达;F:D、E 图叠加。H:分化d 8+6 神经胶质细胞特异性蛋白 GFAP 阳性表达;I:G、H 图叠加(A、B、C $\times$ 100;D、E、F、G、H、I $\times$ 400)

**图 6** ICT( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )诱导 ES 细胞分化为神经细胞表型的特异蛋白阳性表达谱

**Fig. 6** Positive immunostaining of neurocytes directed differentiation from EBs treated with ICT  $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

主要研究成果集中在使诱导步骤逐渐简化,诱导时间逐渐缩短,神经细胞发生途径越来越接近体内神经细胞分化<sup>[12]</sup>,但药物诱导上述分化过程的报道甚少。为此,本研究采用拟胚体培养法,利用 ES 细胞对微环境变化非常敏感特征,探索 ICT 诱导 ES 细胞体外定向分化为神经细胞效应,同时评价 ICT 诱导分化过程关键基因和蛋白的表达谱,为其可能成为促神经细胞分化剂提供实验依据。

本实验体系控制在适合药效评价环境,使神经细胞自发分化率达 40% 左右,有利于药物诱导分化作用充分体现。以细胞突起长度为胞体直径 5 倍以上的神经样细胞表型作为形态学评价指标,同时评价相应分化过程的关键基因和蛋白表达谱。结果表明,ICT 诱导 ES 细胞定

向分化为神经细胞呈良好的量效关系,在  $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度下具有最佳诱导效应,提示以该浓度的 ICT 改变培养微环境,可获得促进 ES 细胞定向分化神经细胞的满意效果。时效关系研究表明,EBs 贴壁 2 d 后 ICT 即能显著诱导其定向分化为神经细胞,且在贴壁培养 8 d 时达到最大分化率,提示在 EBs 贴壁培养后的第 1~8 天,是 ICT 诱导分化的最佳时间。

本研究除鉴定神经细胞表型常规指标(细胞突起的长度为胞体直径 5 倍以上)外,还根据神经细胞表型形成过程,分别检测了分化早期(d 8+2)和分化后期(d 8+6)的神经细胞特异性基因和蛋白表达谱。结果显示神经细胞在分化过程中分别表达了神经前体细胞(d 8+2)、神经元和神经胶质细胞(d 8+6)特异性标志基

因和蛋白,呈现严格的发育时相依赖关系。上述特征符合胚胎外胚层神经发育过程,经前体细胞,继而以神经元为主,辅以少量胶质细胞的特征<sup>[1]</sup>。在分化培养过程用ICT处理后,能增加神经细胞特异性基因的表达,多数ES细胞可转变为神经元表型细胞,多个神经元之间可形成网络,少数是神经胶质细胞。这提示ICT诱导神经元表型细胞分化,是基于诱导神经特异基因和蛋白表达上调所致。上述结果为进一步研究相关机制提供了依据。

### References:

- [1] YAN Y, YANG D, ZAMOWSKA ED, et al. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 781-790.
- [2] BAIN G, KITCHENS D, YAO M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro* [J]. *Dev Biol*, 1995, 168(2): 342-357.
- [3] YING Q L, STAVRIDIS M, GRIFFITHS D, et al. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(2): 183-186.
- [4] WOBUS A M, GROSSE R, SCHONEICH J. Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 223(3): 691-694.
- [5] KAWASAKI H, MIZUSEKI K, NISHIKAWA S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell derived inducing activity [J]. *Neuron*, 2000, 28: 31-40.
- [6] CHUNG S, SOONTAG K C, ADERSON T, et al. Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by *Nurr1* enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16: 1 829-1 838.
- [7] WANG Z Q, WEBER N, LOU Y J, et al. Prenylflavonoids as non-steroidal phytoestrogen and related structure-activity relationships [J]. *Chem Med Chem*, 2006, 1(4): 482-488.
- [8] ZHANG X N, WANG H H, WANG Z Q, et al (张翔南,王欢欢,王志强,等). Protective effect of icaritin on apoptosis of primarily cultured rat neuronal cells induced by A $\beta_{25-35}$  peptide [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报:医学版), 2007, 36(3): 224-228. (in Chinese)
- [9] YE Hai-yong, LIU Jian, LOU Yi-jia (叶海涌,刘健,楼宜嘉). Preparation of two derivatives from icaritin and investigation of their estrogen-like effects [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报:医学版), 2005, 34(2): 131-136. (in Chinese)
- [10] SPECTOR D L, GOLDMAN R D, LEINWAND L A. Cells a laboratory manual (细胞实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 2001, 27-31. (in Chinese)
- [11] QIN Mao-lin, CAI Wen-qin, YAO Zhong-xiang (秦茂林,蔡文琴,姚忠祥). Effect of retinoic acid on differentiation of embryonic stem cell line MESPU35 [J]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* (第三军医大学学报), 2003, 25(8): 653-656. (in Chinese)
- [12] STRUBING C, AHNERT-HILGER G, SHAN J, et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons [J]. *Mech Dev*, 1995, 53(2): 275-287.
- [13] ZHU Dan-yan, LOU Yi-jia. Icaritin-mediated expression of cardiac genes and modulation of nitric oxide signaling pathway during differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes *in vitro* [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006, 27(3): 311-320.
- [14] ZHU Dan-yan, QU Lin-hai, ZHANG Xiang-nan, et al. Icaritin-mediated modulation of cell cycle and p53 during cardiomyocyte differentiation in embryonic stem cells [J]. *European J Pharmacology*, 2005, 514: 99-110.
- [15] DING Ling, LIANG Xing-guang, ZHU Dan-yan, et al. Icaritin promoted expression of PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , and NRF-1 during cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells *in vitro* [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007, (in press).

[责任编辑 黄晓花]