

本文引用:谷争,侯田田,周度爽,等.脑黑质单侧注射鱼藤酮制备帕金森小鼠模型方法探讨[J].新乡医学院学报,2016,33(2):108-112. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.02.007.

【基础研究】

脑黑质单侧注射鱼藤酮制备帕金森小鼠模型方法探讨

谷 争, 侯田田, 周度爽, 董高攀, 赵二奇, 赵 营
(新乡医学院药学院,河南 新乡 453003)

摘要: **目的** 探讨应用鱼藤酮建立帕金森病小鼠模型的方法。**方法** 取30只清洁级国立卫生研究院(NIH)小鼠,随机分为正常组、溶媒组和实验组,每组10只。实验组采用立体定向微量注射法,将溶解于二甲基亚砜(DMSO)的鱼藤酮注射入小鼠脑右侧黑质致密区;溶媒组以同样的方法仅注射相同体积的DMSO,正常组不做任何处理。观察3组小鼠的行为变化,并采用免疫组织化学法分析黑质酪氨酸羟化酶(TH)水平。**结果** 建模前,3组小鼠体质量、爬杆实验得分、悬挂实验得分、水平和垂直自由活动得分比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。建模后,3组小鼠体质量均高于建模前($P<0.05$);实验组小鼠体质量明显低于对照组和溶媒组($P<0.05$);对照组和溶媒组小鼠体质量比较差异无统计学意义($P>0.05$)。建模后,正常组和溶媒组小鼠爬杆实验得分、悬挂实验得分、水平和垂直自由活动得分与建模前比较差异均无统计学意义($P>0.05$);实验组小鼠爬杆实验得分、悬挂实验得分、水平和垂直自由活动得分较建模前、正常组和溶媒组建模后明显下降($P<0.05$)。建模后,正常组和溶媒组小鼠两侧脑黑质中TH阳性神经元数量比较差异无统计学意义($P>0.05$);实验组小鼠右侧脑黑质中TH阳性神经元数量低于左侧($P<0.05$)。3组小鼠左侧阳性神经元数量比较差异均无统计学意义($P>0.05$);实验组右侧阳性神经元数量低于正常组和溶媒组($P<0.05$)。**结论** 鱼藤酮能选择性损毁黑质多巴胺能神经元,可较快建立稳定的、成功率较高的帕金森模型。

关键词: 鱼藤酮;脑黑质;多巴胺神经元;帕金森病

中图分类号: R747 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)02-0108-05

Establishment of Parkinson's disease model induced by rotenone in mice

GU Zheng, HOU Tian-tian, ZHOU Du-shuang, DONG Gao-pan, ZHAO Er-qi, ZHAO Ying
(Pharmacy College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the method of establishing Parkinson's disease model which were induced by rotenone in mice. **Methods** Thirty clean grade national institute of health (NIH) mice were randomly divided into experiment group, vehicle group and normal group, with 10 mice in each group. The rotenone was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and then was injected into the right substantia nigra pars compacta in brain of mice by stereotactic microinjection in experiment group. Mice in vehicle group were injected with the same volume of DMSO into the right substantia nigra pars compacta by stereotactic microinjection. Mice in normal group were not given any treatment. Behavioral changes of mice were observed in the three groups. The immunohistochemical method was taken to analyze the level of tyrosine hydroxylase (TH) in substantia nigra. **Results** There was no statistic difference of body weight, jungle pole scores, suspension test scores, horizontal swing and vertical swing test scores of mice before modeling among the normal group, vehicle group and experiment group ($P>0.05$). After modeling, the body weight of mice in normal group, vehicle group and experiment group were higher than those before modeling ($P<0.05$); the body weight of mice in experiment group was significantly lower than that in normal group and vehicle group ($P<0.05$); there was no statistic difference of body weight of mice between the normal group and vehicle group ($P>0.05$). There was no statistic difference of jungle pole scores, suspension test scores, horizontal swing and vertical swing test scores of mice before and after modeling in normal group and experiment group ($P>0.05$). After modeling, the jungle pole scores, suspension test scores, horizontal swing and vertical swing test scores of mice in experiment group were significantly lower than those before modeling of experiment group and after modeling normal group and vehicle group ($P<0.05$). After modeling, there was no statistic difference of the number of TH positive neuron between the left and right substantia nigra in normal group and vehicle group ($P>0.05$); the number of TH positive neuron of right substantia nigra was significantly lower than that of left substantia nigra in experiment group ($P<0.05$); there was no statistic difference of the number of TH positive neuron in

DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.02.007

收稿日期: 2015-09-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81100956); 国家级大学生创新创业训练项目(编号: 201310472003)。

作者简介: 谷 争(1980-), 女, 河南封丘人, 硕士, 研究方向: 神经精神药理。

通信作者: 赵 营(1974-), 女, 河南新蔡人, 博士, 教授, 研究方向: 神经精神药理; E-mail: zhaoyingxxmc@yahoo.com.cn。

left substantia nigra among normal group, vehicle group and experiment group ($P > 0.05$); the number of TH positive neuron of right substantia nigra in experiment group was significantly lower than that in normal group and vehicle group ($P < 0.05$).

Conclusion Rotenone can selectively damage dopaminergic neurons in the substantia nigra, and can quickly establish the Parkinson's disease model.

Key words: rotenone; substantia nigra; dopaminergic neuron; Parkinson's disease

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是第2大常见的神经退行性疾病,人群患病率0.3%,65岁以上人群患病率1%~3%,严重威胁中老年人的健康及生存质量^[1]。PD临床症状主要表现为静止性震颤、肌肉僵直、运动迟缓、姿势平衡障碍等,主要病理学特征是中脑黑质区多巴胺能神经元选择性缺失,从而导致纹状体中多巴胺含量降低^[2]。环境中的有害物质已被视为PD的重要致病因素之一^[3-5]。目前,国内外对PD的研究仍建立在动物PD模型基础上,如何模拟人类PD,建立理想的动物模型是研究者探索的目标。目前常用的由1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的PD动物模型具有抑制多巴胺能神经元线粒体复合体I的特点,但与PD患者全身线粒体复合体I抑制的特性不符,且既不能有效复制PD患者的Lewy小体病理特征,也不能复制PD患者病情进行性发展的特点^[6-7]。鱼藤酮对黑质多巴胺能神经元具有明显的神经毒性作用,其诱导的PD模型较MPTP诱导的PD模型能更有效地复制PD患者的病理特征,与PD患者病情进行性发展亦更为接近,因此,使用鱼藤酮建立PD模型已被众多研究者认可^[8-9]。另外,至今在国内外尚未见小鼠用黑质致密区立体定位注射制备PD模型报道。可能的原因是小鼠黑质致密区域较小,进行局部脑内注射比较困难。为探讨提高鱼藤酮建立PD小鼠模型成功率的方法,本研究将小剂量鱼藤酮单侧注射入小鼠脑区黑质致密区,结果表明可成功制作PD模型(持续时间大约6周),现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原(specific pathogen-free, SPF)级美国国立卫生研究院(national institute of health, NIH)小鼠30只,雌性,6周龄,体质量22~25 g,由河南省华兰生物有限公司小动物饲养中心提供,批号:41001700001416。

1.2 试剂与仪器 分析纯鱼藤酮(武汉三涇医药化工有限公司);阿扑吗啡(湖北科益药业股份有限公司,国药准字H20050970);兔抗酪氨酸羟化酶、免疫亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公

司);二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);ST-5ND-B型小鼠脑立体定向仪(成都仪器厂);ZH-GSZ型高级颅骨钻(安徽正华生物仪器设备有限公司);免疫组织化学成像系统(日本尼康ECLIPSE Ti-S)。

1.3 模型建立及动物分组 实验小鼠均给予正常饲养。将30只小鼠随机分为实验组、溶媒组和正常组,每组10只。经反复行为检测确认其无旋转行为后进行实验。实验组:腹腔注射水合氯醛 $350\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,将小鼠麻醉后,严格颅平位(使用耳栏在立体框架中稳定小鼠头部,前囟与后囟水平高度相差0.1 mm以下)固定于小鼠脑立体定向仪,用微量注射器抽取溶于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的鱼藤酮 $1\text{ }\mu\text{L}(0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1})$ 注射到脑右侧黑质致密区,注射速度为 $0.2\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$,缓慢进针至靶点,注射完毕留针5 min待药物充分弥散,缓慢匀速拔针。注射靶点坐标为:前囟门后3.0 mm,外侧向中线1.3 mm,头骨表面腹侧4.7 mm。给予碘附涂抹消毒,撒少量青霉素粉末,缝合伤口。术后碘附连续涂抹3 d,每日2次。溶媒组:小鼠固定方法及注射靶点同实验组,每只小鼠注射 $1\text{ }\mu\text{L DM-SO}$ 。正常组:不做任何处理,饲养方式同实验组和溶媒组。

1.4 行为检测及评分 术后4周给予3组小鼠颈后皮下注射阿扑吗啡($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)诱导旋转,等待小鼠适应环境5 min后,开始计时,记录小鼠10 min旋转圈数。模型建立成功判定标准:出现恒定转向左侧的自发性旋转行为且结果稳定,旋转圈数每小时 >210 ;有震颤、活动迟缓、嗅探、觅食、竖尾等异常表现。

1.5 爬杆实验 将一直径为25 cm的软木小球固定于一根长50 cm、粗1 cm的木杆顶端,木杆上缠以纱布防止打滑,将小鼠置于小球上,做如下记录:(1)小鼠从小球下来所用时间;(2)小鼠爬完上半根杆子所用时间;(3)小鼠爬完下半根杆子所用时间。计分标准:3 s内完成上述某一动作记3分;6 s内完成记2分;超过6 s记1分。

1.6 悬挂实验 将自制的有机玻璃悬挂于实验箱,水平放置的金属杆直径1.5 mm,距地面30 cm,金属杆上方1 cm加盖,以免小鼠翻坐于金属杆上,记

录落地前时间,评分标准:0~4 s 记 0 分;5~9 s 记 1 分;10~14 s 记 2 分;15~19 s 记 3 分;20~24 s 记 4 分;25~29 s 记 5 分;超过 30 s 记 6 分。

1.7 自由活动实验 选用 36 cm×36 cm×40 cm 的纸箱,箱底分为 9 个小方格(12 cm×12 cm),将小鼠置于中间的小格内,10 min 后记录 5 min 内的各项行为,并进行评分。评分标准:水平得分(穿梭距离):以规定时间内跑动的格子数表示(两爪以上跨入邻格为跑动 1 格);垂直得分(下肢站立):以双前肢抬起离地 1 cm 以上的次数表示。

1.8 免疫组织化学检测酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 变化 分别取实验组成功建模小鼠(旋转圈数应接近或等于成功模型小鼠的平均旋转圈数)、正常组小鼠、溶媒组小鼠各 6 只,水合氯醛麻醉后,经左心室行主动脉灌注固定,先用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)进行预灌注,以将其体内血液冲出,再用 40 g·L⁻¹ 多聚甲醛进行灌注固定,完整剥取脑组织,在同一固定液中再固定 12~16 h,从立体定位针孔处做冠状切,取材常规脱水,石蜡包埋。切 0.5 μm 切片。PBS 液中浸洗 3 次,每次 5 min;微波炉加热进行抗原修复;质量分数 3% 过氧化氢(H₂O₂)去除内源性过氧化物酶活性, PBS 浸洗 3 次,每次 5 min;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液封闭 30 min,加入 1:100 稀释的 TH 兔抗多克隆抗体,4℃ 过夜;PBS 浸洗 3 次,每次 5 min;加入生物素化山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 20 min, PBS 浸洗 3 次,每次 5 min。加入链霉亲和素生物素过氧化物酶复合物,37℃ 孵育 30 min, PBS 液浸洗;DAB 显色,脱水,

表 1 3 组小鼠建模前后体质量,爬杆实验、悬挂实验及自由活动得分比较

Tab.1 Comparison of body weight, jungle pole scores, suspension test scores, horizontal swing and vertical swing test scores of rats among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g	爬杆实验得分	悬挂实验得分	自由活动	
					水平得分	垂直得分
正常组						
建模前	10	22.95 ±0.94	7.12 ±0.99	4.20 ±0.63	113.12 ±16.87	34.21 ±8.64
建模后	10	40.20 ±0.94 ^{ab}	7.00 ±0.95 ^b	4.40 ±0.52 ^b	116.10 ±16.78 ^b	32.10 ±3.98 ^b
溶媒组						
建模前	10	22.61 ±74.70	7.41 ±0.84	4.10 ±0.57	116.80 ±21.13	34.22 ±7.85
建模后	10	39.73 ±0.71 ^{ab}	7.00 ±0.82 ^b	3.90 ±0.70 ^b	121.00 ±18.15 ^b	31.62 ±4.38 ^b
实验组						
建模前	10	22.93 ±0.87	7.75 ±1.28	4.10 ±0.53	123.38 ±13.50	30.20 ±5.04
建模后	8	28.82 ±1.32 ^a	4.75 ±0.71 ^a	0.88 ±0.57 ^a	80.50 ±9.82 ^a	6.63 ±2.77 ^a

注:与建模前比较^a*P*<0.05;与实验组建模后比较^b*P*<0.05。

2.3 3 组小鼠脑组织 TH 阳性神经元比较 结果见图 1、表 2。正常组和溶媒组小鼠脑黑质中 TH 染色细胞丰富,细胞着色均匀,突出丰富,左右 2 侧 TH 阳性神经元数量比较差异均无统计学意义(*P*>0.05)。实验组小鼠右侧脑黑质中 TH 染色细胞比

透明,封片,镜检。TH 阳性细胞呈棕黄色,仅显示细胞轮廓者为阴性细胞。每只小鼠取中脑 5 个切片断面计数黑质 TH 阳性神经元数量。使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行结果分析。

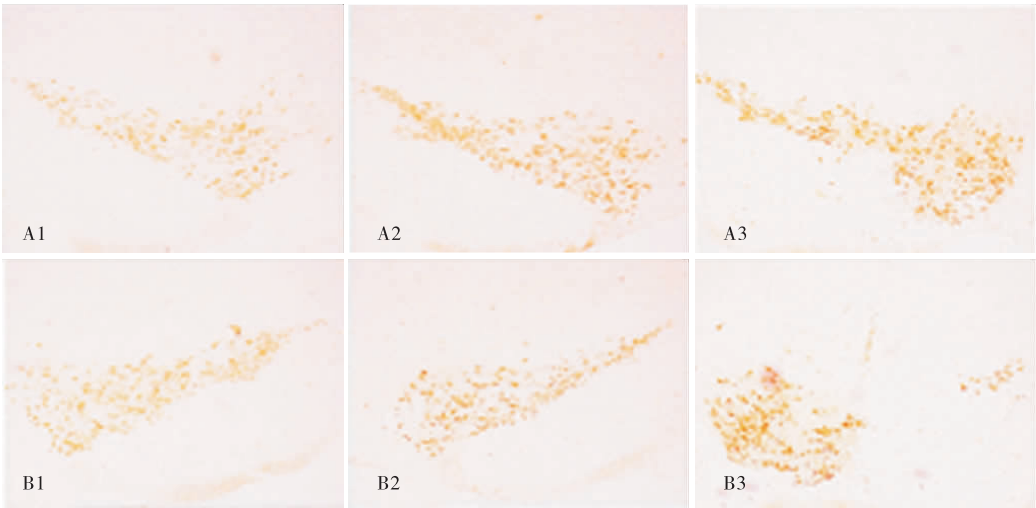
1.9 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料比较采用 χ^2 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组小鼠生存情况比较 溶媒组和正常组小鼠在 4 周观察期间均未见死亡,实验组小鼠在建模第 2 周和第 3 周分别死亡 1 只,至第 4 周实验组小鼠存活 8 只。3 组小鼠的病死率比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.2 3 组小鼠体质量,爬杆实验、悬挂实验及自由活动得分比较 结果见表 1。建模前,正常组、溶媒组和实验组小鼠体质量、爬杆实验得分、悬挂实验得分、水平和垂直自由活动得分比较差异均无统计学意义(*P*>0.05)。建模后,正常组、溶媒组和实验组小鼠体质量均高于建模前(*P*<0.05);实验组小鼠体质量明显低于对照组和溶媒组(*P*<0.05);对照组和溶媒组小鼠体质量比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。建模后,正常组和溶媒组小鼠爬杆实验得分、悬挂实验得分、水平和垂直自由活动得分与建模前比较差异均无统计学意义(*P*>0.05);实验组小鼠爬杆实验得分、悬挂实验得分、水平和垂直自由活动得分较建模前、正常组建模后和溶媒组建模后明显下降,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

例明显缺失,右侧 TH 阳性神经元数量低于左侧(*P*<0.05)。正常组、溶媒组和实验组左侧 TH 阳性神经元数量比较差异均无统计学意义(*P*>0.05);实验组 TH 右侧阳性神经元数量低于正常组和溶媒组(*P*<0.05)。



A1、A2、A3:分别为正常组、溶媒组、实验组左侧脑黑质致密区;B1、B2、B3:分别为正常组、溶媒组、实验组右侧脑黑质致密区。

图 1 3 组小鼠 TH 阳性神经元免疫组织化学染色结果(×100)

Fig.1 Results of TH positive neuron in the three groups stained by immunohistochemistry(×100)

表 2 3 组小鼠建模后脑黑质 TH 阳性神经元数量比较

Tab.2 Comparison of the number of TH positive neuron among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	左侧	右侧
正常组	6	170.00 ± 13.10	163.50 ± 11.04
溶媒组	6	172.33 ± 14.67	160.83 ± 14.85
实验组	6	170.67 ± 15.13 ^a	57.83 ± 11.77 ^{ab}

注:与左侧比较^a*P* < 0.05;与正常组和溶媒组右侧比较^b*P* < 0.05。

3 讨论

PD 是中老年人群常见的一种神经退行性疾病,近年来,PD 的发病率呈明显上升趋势,严重影响老年人群的生活质量,也给患者家庭带来巨大负担^[10]。关于 PD 的发病机制目前尚不完全清楚,主要认为选择性黑质多巴胺神经元缺失和泛素染色阳性的胞质中包涵体形成是导致 PD 的主要原因之一^[11-12]。PD 以药物治疗为主,但是,药物数量有限,因此,研发和筛选有效、安全地针对 PD 的新药成为急需解决的问题。临床前药物疗效的筛选主要在动物水平上进行,如何得到较好的 PD 动物模型对新药研发意义重大。目前大多数 PD 模型采用大鼠构建^[13-14],在小鼠中建模的报道较少,小鼠在基因上和人具有更高的同源性,在小鼠 PD 模型研究其发病机制和研发新药具有重要意义。

目前,用于建立 PD 动物模型的方法较多,以药物诱导的 PD 模型在临床前研究过程中应用较多,这些药物包括利血平^[15]、六羟基多巴胺^[16]和鱼藤酮^[17]等。鱼藤酮自 20 世纪 40 年代以来一直被认为是安全有效的杀虫剂,近年来发现其对机体神经功能具有一定的影响,长时间暴露于鱼藤酮者患

PD 的机会明显增加^[18]。鱼藤酮是一种脂溶性分子,具有较好的血脑屏障穿透力,很容易通过细胞膜,不依赖多巴胺运转体就可以直接进入细胞质,并选择性地聚集于线粒体等细胞体,抑制氧化磷酸化复合体 I 活性,进而发挥细胞毒作用^[19]。

本研究采用鱼藤酮建立小鼠 PD 模型,实验组所有小鼠出现了不同程度的 PD 症状,符合 PD 模型成功判断标准,正常组与溶媒组小鼠未出现 PD 症状。实验组小鼠在建模后死亡 2 只,正常组和溶媒组小鼠未见死亡,实验组小鼠死亡率高于正常组和溶媒组,但差异无统计学意义。说明鱼藤酮作为 PD 建模药物,如果在掌握药物剂量的前提条件下完全可以降低建模的死亡率。实验进一步对 PD 模型小鼠的行为进行了比较分析,以证实建模的成功性。结果显示,建模后实验组小鼠体质量、爬杆实验积分、悬挂实验得分、水平和垂直自由活动得分较正常组、溶媒组明显下降,同时较实验组术前明显下降。通过免疫组织化学分析显示,建模后 3 组小鼠脑黑质左侧 TH 阳性神经元数量比较差异无统计学意义,表明右侧脑黑质给药的方法不会引起脑黑质左侧的 TH 缺失。实验组小鼠建模后右侧脑黑质中 TH 阳性神经元数量较左侧下降,同时较正常组和溶媒组右侧显著下降,而正常组和溶媒组 TH 阳性神经元数量比较差异无统计学意义,表明适宜剂量的 DMSO 不会对脑黑质 TH 产生影响,而鱼藤酮能选择性地引起脑黑质 TH 水平下降,进而影响多巴胺神经元的数量。实验组小鼠脑黑质两侧 TH 阳性神经元数量差异有统计学意义,表明此方法能准确模仿 PD 的病理变化。

本研究结果显示,采用鱼藤酮定位给药建立 PD

小鼠模型,外周毒性小,死亡率低,成功率高,可获得与人类 PD 患者类似的行为变化及病理学变化,本研究为研发治疗 PD 的药物和研究 PD 发病机制奠定了基础。

参考文献:

[1] DE LAU L M,BRETELER M M. Epidemiology of Parkinson's disease[J]. *Lancet Neurol*,2006,5(6):525-535.

[2] 朱丰霞,常海敏,段琰,等. 人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠黑质中酪氨酸羟化酶及 ephrinB2 和磷酸化 c-Jun 表达的影响[J]. *新乡医学院学报*,2014,31(10):781-785.

[3] ALLCOCK L M,KENNY R A,BUM D J. Clinical phenotype of subjects with Parkinson's disease and orthostatic hypotension; autonomic symptom and demographic comparison [J]. *Mov Disord*, 2006,21(11):1851-1855.

[4] WONG S L,GILMOUR H,RAMAGE-MORIN P L. Parkinson's disease: prevalence, diagnosis and impact[J]. *Health Rep*,2014,25(11):10-14.

[5] LEHRNER J,KOGLER S,LAMM C,et al. Awareness of memory deficits in subjective cognitive decline, mild cognitive impairment, Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *Int Psychogeriatr*,2015,27(3):357-366.

[6] VON WRANGEL C,SCHWABE K,JOHN N,et al. The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: behavioral and electrophysiological findings[J]. *Behav Brain Res*,2015,279:52-61.

[7] TOY W A,PETZINGER G M,LEYSHON B J,et al. Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP) mouse model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*,2013,63:201-209.

[8] WU F,XU H D,GUAN J J,et al. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease[J]. *Neuroscience*, 2014,284:900-911.

[9] YUAN Y H,YAN W F,SUN J D,et al. The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation; emphasizing the role

of the calcium/GSK3 β pathway[J]. *Toxicol Lett*,2015,233(2):163-171.

[10] OLANOW C W,BRUNDIN P. Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder[J]. *Mov Disord*,2013,28(1):31-40.

[11] ORIMO S. Clinical and pathological study on early diagnosis of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies[J]. *Rinsho Shinkeigaku*,2008,48(1):11-24.

[12] 何莉. 老年帕金森病患者血浆同型半胱氨酸水平与认知障碍相关性分析[J]. *新乡医学院学报*,2014,31(6):432-434.

[13] CIUCCI M R,RUSSELL J A,SCHASER A J,et al. Tongue force and timing deficits in a rat model of Parkinson disease[J]. *Behav Brain Res*,2011,222(2):315-320.

[14] RUSSELL J A,CIUCCI M R,HAMMER M J,et al. Videofluorographic assessment of deglutitive behaviors in a rat model of aging and Parkinson disease[J]. *Dysphagia*,2013,28(1):95-104.

[15] JIANG C,WAN X,JANKOUIC J,et al. Dopaminergic properties and experimental anti-parkinsonian effects of IPX750 in rodent models of Parkinson disease[J]. *Clin Neuropharmacol*,2004,27(2):63-73.

[16] FAURE A,LEBLANC-VEYRAC P,MASSIOUI N. Dopamine agonists increase perseverative instrumental responses but do not restore habit formation in a rat model of Parkinsonism[J]. *Neuroscience*,2010,168(2):477-486.

[17] TANNER C M,KAMEL F,ROSS G W,et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease[J]. *Environ Health Perspect*,2011,119(6):866-872.

[18] CANNON J R,TAPIAS V,NA H M,et al. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*,2009,34(2):279-290.

[19] TAMILSELVAM K,BRAIDY N,MANIVASAGAM T,et al. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*,2013,2013:102741.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)

(上接第 107 页)

本实验采用均匀设计法对吴茱萸半仿生提取法工艺条件进行优选,以吴茱萸碱含量、总黄酮、挥发油量、干浸膏得率为指标,并对 4 个指标的数据进行标准化处理,以消除各指标之间的单位和量纲的不同,以及各标准变量范围相差悬殊所造成的影响,其结果根据各指标在工艺选择中的主次,给予不同的加权系数,确定综合评价 Y 值,并优选出半仿生提取法最佳条件;3 煎用水 pH 值依次为 6.00、6.50、9.00;煎煮时间依次为 188、95、47 min。结合生产实际,确定吴茱萸用半仿生提取法提取的工艺条件为:3 煎用水 pH 值依次为 6.00、6.50、9.00,煎煮时间依次为 3.0 h、1.5 h、40 min。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:118,946.

[2] 张学兰,徐萍. 均匀设计优选桂枝甘草汤的半仿生提取工艺条件[J]. *中成药*,2006,28(8):1116-1119.

[3] 程艳芹,孙秀梅,张兆旺,等. 均匀设计优选甘草的半仿生提取工艺条件[J]. *中药材*,2007,30(5):598-601.

[4] 李春雨,郭晓伟,王树,等. 均匀设计优选菟丝子半仿生提取工艺[J]. *中国医院药学杂志*,2011,31(10):813-816.

[5] 王群,刘文,宋信莉,等. 多指标优化吴茱萸的提取纯化工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(3):45-47.

[6] 鲍天冬,董宇,杨庆,等. 高效液相色谱法同时测定吴茱萸及其提取物中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯含量[J]. *中国实验方剂学杂志*,2007,13(6):1-3.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)