

基于斑马鱼帕金森模型研究牡丹籽油 微囊粉的抗帕金森病活性

郝广萍¹, 靳梦², 张姗姗², 刘可春², 宋善友³

(1. 山西医科大学汾阳学院 检验系, 山西 汾阳 032200; 2. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 生物研究所, 济南 250103; 3. 山西医科大学汾阳学院 卫生信息管理系, 山西 汾阳 032200)

摘要: 为了探究牡丹籽油微囊粉是否具有抗帕金森病活性, 实验分正常对照组、50 $\mu\text{mol/L}$ MPTP 处理组、50 $\mu\text{mol/L}$ MPTP 与不同质量浓度(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 牡丹籽油微囊粉共处理组, 将受精后 1 d 的转基因斑马鱼 *Vmat:GFP*、*Fli1:GFP* 胚胎和野生型斑马鱼 AB 胚胎做对应处理。受精后 3 d 时荧光显微镜观察并记录转基因斑马鱼 *Vmat:GFP* ($n=8$) 多巴胺神经元的发育情况和转基因斑马鱼 *Fli1:GFP* ($n=8$) 脑部血管的发育情况; 受精后 5 d 时用 Zebabox 斑马鱼行为分析仪分析野生型斑马鱼 AB ($n=8$) 行为, 通过 qRT-PCR 检测野生型斑马鱼 AB ($n=40$) 帕金森病相关基因 ($\alpha\text{-syn}$ 、*parkin*、*pink1*) 的表达变化。结果显示: 与正常对照组比较, MPTP 处理组的斑马鱼多巴胺神经元缺失, 脑部血管损伤, 出现帕金森病行为, 帕金森病相关基因表达异常; 与 MPTP 处理组比较, 不同质量浓度的牡丹籽油微囊粉与 MPTP 共处理组的斑马鱼表现出多巴胺神经元缺失减少, 脑部血管损伤降低, 帕金森病行为缓解, 相关基因异常表达趋于正常, 且随着牡丹籽油微囊粉质量浓度的增加, 其效果愈加显著。结果表明, 牡丹籽油微囊粉具有抗帕金森病活性, 并具有剂量依赖性。

关键词: 牡丹籽油; 牡丹籽油微囊粉; 斑马鱼; 帕金森病

中图分类号: TS225.1; TS221 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)08-0045-06

Anti-Parkinson's activity of peony seed oil microcapsule powder based on zebrafish Parkinson's disease model

HAO Guangping¹, JIN Meng², ZHANG Shanshan², LIU Kechun², SONG Shanyou³

(1. Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi, China; 2. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China; 3. Department of Health Information Management, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, Shanxi, China)

Abstract: In order to investigate whether peony seed oil microcapsule powder had anti-Parkinson's activity, different experiment groups were set including the control group, 50 $\mu\text{mol/L}$ MPTP treatment group, and co-treatment groups (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) of peony seed oil microcapsule powder with 50 $\mu\text{mol/L}$ MPTP. Transgenic zebrafish *Vmat:GFP*, *Fli1:GFP* embryos, and wild-type zebrafish AB embryos were treated at 1 day after fertilization (1 dpf). At 3 dpf, the development of dopaminergic neurons of transgenic zebrafish *Vmat:GFP* ($n=8$) and the brain blood vessels development of transgenic zebrafish *Fli1:GFP* ($n=8$) were observed and recorded by fluorescence. At 5 dpf, the behavior of wild-type zebrafish AB ($n=8$) was analyzed by

Zebabox zebrafish behavior analyzer, and the expression of genes ($\alpha\text{-syn}$, *parkin*, *pink1*) involved in Parkinson's disease (PD) in wild-type zebrafish AB ($n=40$) was detected by qRT-PCR. Compared with the control group, MPTP treatment group exhibited loss of dopaminergic neurons, damaged blood vessels in the brain, existence of PD-like

收稿日期: 2019-10-16; 修回日期: 2020-04-16

基金项目: 山东省重点研发计划(2017YYSP032); 山西医科大学汾阳学院人才引进启动金基金项目(2016D03)

作者简介: 郝广萍(1987), 女, 讲师, 硕士, 主要从事免疫学教学、免疫治疗方面研究工作 (E-mail) haoguangping@163.com。

behavior, and abnormal expression of PD-related genes. Compared with the MPTP treatment group, co-treatment groups reduced dopaminergic neurons loss and the damage of blood vessels in the brain, as well as relieved PD-like behavior and abnormal expression of PD-related genes, and these effects were strengthened with the increase of peony seed oil concentration. The results showed that peony seed oil microcapsule powder had anti-Parkinson's disease activity and was dose-dependent.

Key words: peony seed oil; peony seed oil microcapsule powder; zebrafish; Parkinson's disease

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是第二大常见的神经退行性疾病,临床症状主要为震颤、肌肉僵直、行为迟缓^[1],主要病理特征为大脑黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)神经元进行性损伤后大量减少, α -突触核蛋白聚集形成“路易小体”^[2]。尽管目前PD发病机制仍不明确,但是越来越多的研究证实DA神经元损伤与大脑内大量活性氧和活性氮自由基的产生密切相关^[3]。也有报道指出PD的发生与PD相关基因(α -syn、parkin、pink1)的异常表达有关, α -syn过表达产生聚集的 α -突触核蛋白、parkin失活后过度积累的Parkin底物蛋白及pink1发生缺失使得线粒体功能障碍后产生的自由基均会损伤DA神经元,诱发PD^[4-5]。近年来PD的发生也被广泛认为与自噬功能紊乱有着密切关系,自噬功能缺陷会导致蛋白质的积累与沉淀,诱发PD^[6];激活自噬功能,可缓解PD相关症状^[7-9]。

近年来研究发现牡丹籽油含有丰富的生物活性营养物质,其中不饱和脂肪酸占90%左右。体外模型和体内实验均证明牡丹籽油中的不饱和脂肪酸能够有效清除自由基,具有较强抗氧化作用^[10]。大量研究证实抗氧化剂或具有抗氧化活性的物质能够有效清除活性自由基,从而具有神经保护作用,在PD模型中有良好的疗效^[11]。不饱和脂肪酸能够通过激活Nrf2-ARE信号通路,在小鼠PD模型中缓解PD^[12]。牡丹籽油可以抗氧化,具有神经元保护作用,但其是否具有抗PD活性仍未知。目前治疗PD的传统药物主要包括左旋多巴、多巴胺受体激动剂及单胺氧化酶B抑制剂等,长期服用均会出现不良反应,如左旋多巴类对控制PD最有效,但长期用药会引起患者出现胃肠道不适等不良反应,且不能延缓病情发展^[13],多巴胺受体激动剂能有效改善DA效应及DA受体兴奋性,但会导致发作性睡眠等不良反应^[14],单胺氧化酶B抑制剂能延缓PD病情,但对酶抑制作用选择性不强、副作用大^[15]。牡丹籽油属于食品级植物油,毒副作用小,若具有抗PD活性,可为牡丹籽油的进一步开发利用提供科学依据。

斑马鱼因个体小、繁殖快、产卵多、成本低、易于饲养且通体透明,无需解剖即可观察组织器官的发育等诸多优势,已成为研究神经退行性疾病的最佳模式生物^[16]。Vmat、Fli1分别特异性表达于斑马鱼DA神经元与脑血管中,因此转基因斑马鱼Vmat:GFP、Fli1:GFP常用于分别评价DA神经元、脑部血管的发育状况^[17-18]。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶盐酸盐(MPTP)是一种神经毒性物质,已被广泛用于PD模型的诱导^[19]。

本研究将牡丹籽油制成水溶性的牡丹籽油微囊粉,选用斑马鱼帕金森病模型作为研究对象,受精后1d的转基因斑马鱼Vmat:GFP、Fli1:GFP胚胎和野生型斑马鱼AB胚胎,分别用不同方式分组处理,分析不同处理组斑马鱼的DA神经元与脑血管发育情况、行为学、PD相关基因表达,探究牡丹籽油微囊粉是否具有抗PD活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

转基因斑马鱼Vmat:GFP、转基因斑马鱼Fli1:GFP、野生型斑马鱼AB品系,均由山东省科学院生物研究所药物筛选平台提供。

牡丹籽油,菏泽尧舜牡丹生物科技有限公司;1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶盐酸盐(MPTP)、1-苯基-2-硫脲(PTU)、亚甲基蓝,美国Sigma公司;RN2802RNA试剂盒,北京艾德莱生物科技有限公司;RR036A反转录试剂盒,Takara公司;RR091A荧光定量PCR试剂盒,Takara公司。

斑马鱼养殖饲养系统,北京爱生科技公司;SZX-16型奥林巴斯体视荧光显微镜,日本Olympus公司;Zebbox斑马鱼行为分析仪,Viewpoint公司;实时荧光定量PCR仪,罗氏诊断产品有限公司;C1000 Touch梯度PCR仪,Bio-Rad公司;超微量分光光度计。

1.2 实验方法

1.2.1 牡丹籽油微囊粉的制备

酪蛋白、乳糖和葡萄糖按质量比2:1:1混合均匀,加蒸馏水溶解至质量浓度90 g/L,用NaOH溶液调pH至8.5,105℃反应3 h,冰水浴中冷却至室温,终止反应,即制得具有抗氧化活性的复合壁材。取

45 g 牡丹籽油,用 45 mL 无水乙醇充分溶解,制成芯材乳浊液,缓慢滴加到上述壁材水溶液中。壁芯材按质量比 2:1 混合,高速分散器 18 000 r/min 下分散 1.5 min,于 35 MPa 下高压均质 3 次,然后喷雾干燥得牡丹籽油微囊粉。喷雾干燥条件为:入口温度 180 °C,出口温度 100 °C,气体流速 7.5 L/min,分流速度 80%,进样转速 36 r/min。根据文献[20]所述方法,测得牡丹籽油微囊粉包埋率为 95.97%。

1.2.2 斑马鱼培养及胚胎的准备

成年雌雄斑马鱼分开培养于斑马鱼养殖饲养系统中,水温 26 °C,照明 14 h/黑暗 10 h 交替进行,每日定时喂人工颗粒状饲料和刚孵出的卤虫无节幼体 (*Artemia nauplii*)。选择成熟斑马鱼按雌雄比例 1:1,于傍晚时放入产卵缸中,次日 8:30 抽取隔板,2 h 后收取受精卵,剔除死胚,养殖水反复冲洗 3 次,移入含 2 mg/L 亚甲基蓝的养殖水中^[21],置于 26 °C 培养箱中孵化。

1.2.3 实验分组及处理

将受精后 1 d 的转基因斑马鱼 *Vmat:GFP*、*Fli1:GFP* 胚胎和野生型斑马鱼 AB 胚胎于 6 孔板中,每孔 20 个胚胎,每孔加适量养殖水,分为正常对照组、50 μmol/L MPTP 处理组,不同质量浓度 (25、50、100 μg/mL) 的牡丹籽油微囊粉与 50 μmol/L MPTP 共处理组 (将牡丹籽油微囊粉母液与 MPTP 母液同时加入斑马鱼养殖水中,二者分别达到最终工作浓度,共同孵育),每孔终体积 5 mL,另外每孔按 0.03 mg/mL 加入 PTU 以抑制黑色素生成。加药后放入培养箱培养,每天换药。

1.2.4 多巴胺神经元及脑血管的检测

受精后 3 d 时 DA 神经元基本发育完全^[22]。因此,受精后 3 d 时,将不同实验组的转基因斑马鱼 *Vmat:GFP* 和 *Fli1:GFP* 在奥林巴斯体视荧光显微

镜下分别观察 DA 神经元与脑部血管发育情况。

1.2.5 行为学监测

受精后 5 d 时,将不同实验组野生型斑马鱼 AB 幼鱼 ($n=8$) 转移至 48 孔板,1 条/孔,加 1 mL 养殖水。将 48 孔板放入 Zebrabox 斑马鱼行为分析仪暗箱中,使其适应环境。适应 15 min 后开始行为学检测,检测时间设置为 20 min。运用 Zeblab 软件进行数据处理,计算运动总距离和平均速度。

1.2.6 荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 PD 相关基因的表达

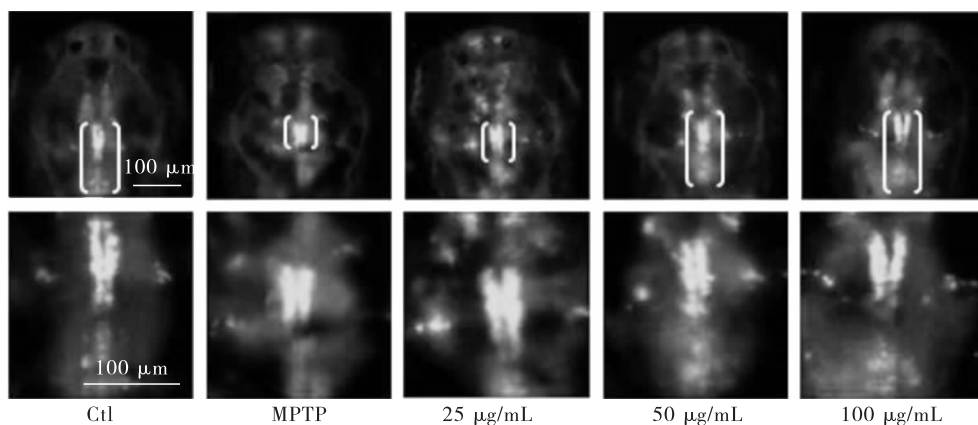
取受精后 5 d 不同实验组的野生型斑马鱼 AB 幼鱼 ($n=40$) 进行 qRT-PCR。RNA 的提取参照试剂盒说明书进行,利用超微量分光光度计测定 RNA 浓度,控制 A_{260}/A_{280} 在 2.0~2.5 之间;RNA 反转录为 cDNA 参照反转录试剂盒说明书进行;Real-time PCR 参照实时荧光定量 PCR 说明书进行。 $\alpha-syn$ 引物序列:上游 5' - ATGGATGTTTTTATGAAGGGGC - 3',下游 5' - ACGCTGTCCTTGGTCTTGCT - 3'。*parkin* 引物序列:上游 5' - GCGAGTGTGTCTGAGCTGAA - 3',下游 5' - ATCACAGCCCTGAAGTGTGG - 3'。*pink1* 引物序列:上游 5' - GGCAATGAAGATGATGTGGAAC - 3',下游 5' - ATCACGTTGGGATGAGCACT - 3'。Real-time PCR 扩增结束后输出对照组和待测组目的基因 CT 值及内参基因 *rpl13a* 的 CT 值,以相对定量法用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各组基因的相对表达量,并与正常对照进行比较。

1.2.7 数据处理

结果采用单因素方差分析,使用 Graphpad prism 软件进行 Dunnett-t 检验,并以平均值表示, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 牡丹籽油微囊粉对斑马鱼 *Vmat:GFP* DA 神经元的影响 (见图 1)



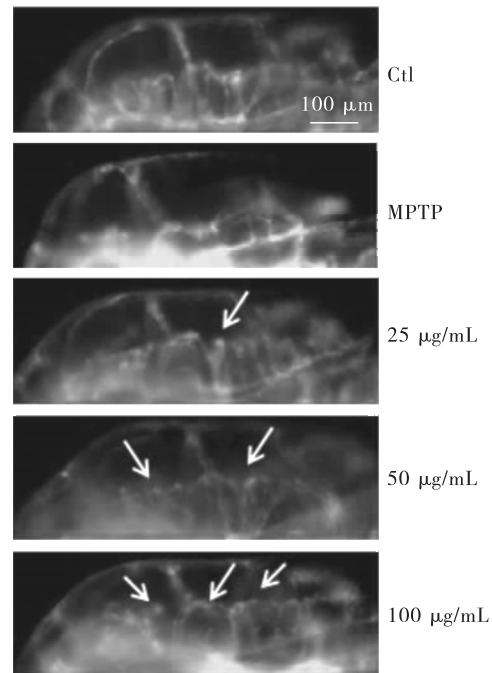
注:Ctl 为正常对照组,MPTP 为 50 μmol/L MPTP 处理组,25、50、100 μg/mL 分别为相应质量浓度的牡丹籽油微囊粉与 50 μmol/L MPTP 共处理组,下同。白色括号指示 DA 神经元。

图 1 牡丹籽油微囊粉对斑马鱼 *Vmat:GFP* DA 神经元的保护作用

由图 1 可见:受精 3 d 后,正常对照组中斑马鱼 DA 神经元荧光面积大,MPTP 处理组荧光面积小,DA 神经元明显缺失;与 MPTP 处理组相比,不同质量浓度的牡丹籽油微囊粉与 MPTP 共处理组中 DA 神经元缺失不同程度减少,且减少程度与牡丹籽油微囊粉有一定剂量关系。研究表明,牡丹籽油微囊粉对 DA 神经元具有保护作用,且呈现剂量依赖性。

2.2 牡丹籽油微囊粉对斑马鱼脑血管损伤的影响 (见图 2)

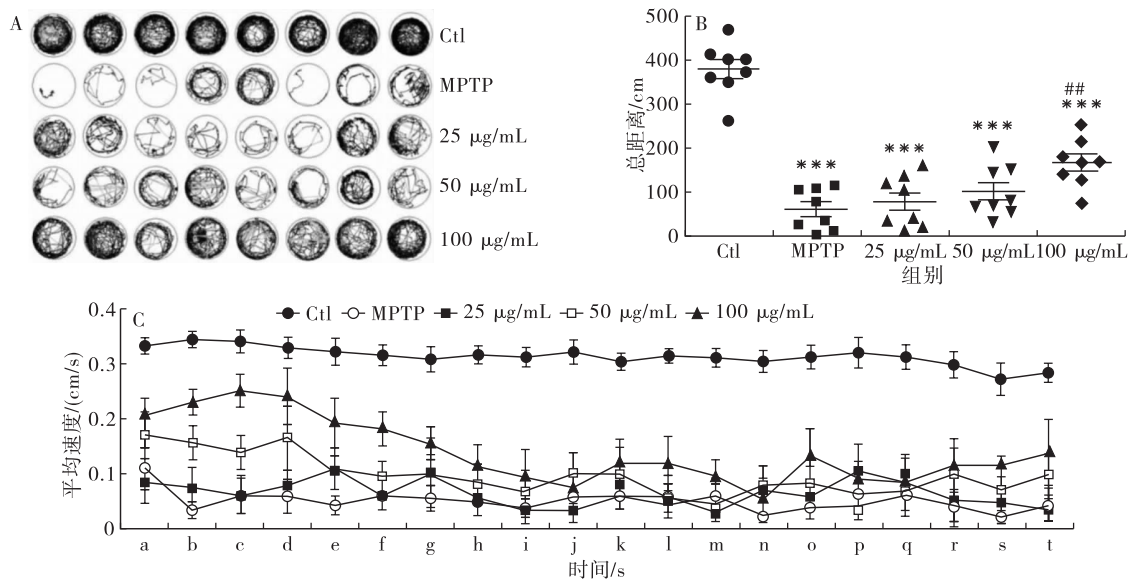
由图 2 可见,受精后 3d 时,正常对照组中斑马鱼脑血管清晰可见,MPTP 处理组中斑马鱼脑血管严重损伤,数量显著减少,牡丹籽油微囊粉与 MPTP 共处理组中斑马鱼脑血管数量随着牡丹籽油微囊粉质量浓度的增加逐渐增加,其中 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡丹籽油微囊粉与 MPTP 共处理组拯救回的脑血管数量最多。研究表明,牡丹籽油微囊粉可以拯救由 MPTP 引起的脑血管损伤,并且在一定范围内,质量浓度越高拯救效果越显著。



注:白色箭头指示拯救回的脑血管。

图 2 牡丹籽油微囊粉对斑马鱼 *Fil1:GFP* 脑血管的影响

2.3 牡丹籽油微囊粉对斑马鱼帕金森病行为的影响 (见图 3)



注:A. 运动轨迹;B. 运动总距离;C. 运动平均速度;与正常对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 MPTP 处理组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; a. 0 ~ 60; b. 60 ~ 120; c. 120 ~ 180; d. 180 ~ 240; e. 240 ~ 300; f. 300 ~ 360; g. 360 ~ 420; h. 420 ~ 480; i. 480 ~ 540; j. 540 ~ 600; k. 600 ~ 660; l. 660 ~ 720; m. 720 ~ 780; n. 780 ~ 840; o. 840 ~ 900; p. 900 ~ 960; q. 960 ~ 1 020; r. 1 020 ~ 1 080; s. 1 080 ~ 1 140; t. 1 140 ~ 1 200。

图 3 牡丹籽油微囊粉对斑马鱼帕金森病行为的影响

由图 3 可见,相比于正常对照组,MPTP 处理组斑马鱼的运动能力下降,运动总距离明显减少,平均速度变慢。与 MPTP 处理组比较,牡丹籽油微囊粉与 MPTP 共同处理组斑马鱼的运动能力恢复,运动总距离增加,平均速度变快,并且随着牡丹籽油微囊粉质量浓度的提高,各项行为指标变化愈加显著。

研究表明,牡丹籽油微囊粉可以缓解 MPTP 造成的斑马鱼帕金森病行为,且具有一定剂量依赖性。

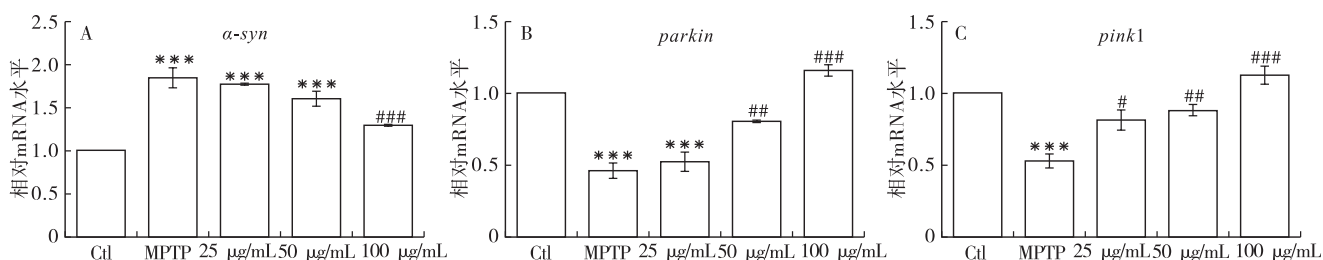
MPTP 可以诱导斑马鱼 PD 模型,具体表现为斑马鱼活动减少,行为受到抑制^[23],此外还出现血管缺陷和血液循环减少的现象^[24]。本研究采用斑马鱼为动物模型,MPTP 处理后,斑马鱼出现了 DA 神

经元缺损严重,脑部血管大幅减少,运动能力下降等表现,与以前研究中MPTP对斑马鱼的作用一致,这些变化符合PD特征,表明MPTP有效诱导了斑马鱼PD模型。牡丹籽油微囊粉与MPTP共处理组结果显示:随着牡丹籽油微囊粉质量浓度的增加,斑马鱼DA神经元缺损逐渐减少、脑血管数量逐渐增加、运动能力明显恢复、运动总距离增加、平均速度变快。各项检测指标均有不同幅度缓解,均趋向于正常对照组,表明牡丹籽油微囊粉具有抗PD活性。其中100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡丹籽油微囊粉与MPTP共处理组对PD的缓解作用最为显著。

2.4 牡丹籽油微囊粉对PD相关基因表达的影响

近些年来PD发病机制研究取得了重大进展,研究结果证明 $\alpha\text{-syn}$ 表达上调,*parkin*、*pink1*表达下调均会诱发PD^[4-5]。为了进一步研究牡丹籽油微囊粉抗PD活性的机制,采用qRT-PCR检测不同实验组PD相关基因 $\alpha\text{-syn}$ 、*parkin*、*pink1*表达水平,结果见图4。由图4可见,与正常对照组相比,

MPTP处理组 $\alpha\text{-syn}$ 表达上调,*parkin*、*pink1*表达下调,差异具有统计学意义($P < 0.001$),进一步证实MPTP诱导PD模型成功。与MPTP处理组相比,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡丹籽油微囊粉与MPTP共处理组 $\alpha\text{-syn}$ 表达水平显著下降(见图4A),50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牡丹籽油微囊粉与MPTP共处理组*parkin*表达水平明显上升(见图4B),牡丹籽油微囊粉3个质量浓度组*pink1*表达上调且均有统计学意义(见图4C)。结果表明,不同浓度的牡丹籽油微囊粉可以调节3种基因的异常表达,使 $\alpha\text{-syn}$ 异常高表达水平降低,*parkin*、*pink1*异常低表达水平回升,推测牡丹籽油微囊粉可能通过调节这3个关键基因的表达从而减少 $\alpha\text{-syn}$ 突触核蛋白聚集、Parkin底物蛋白的积累和线粒体功能障碍所产生的活性自由基,进一步减轻对DA神经元损伤,缓解PD。随着牡丹籽油微囊粉质量浓度的增加,效果愈加显著。根据研究结果可推测牡丹籽油微囊粉对PD的缓解作用可能与调控PD相关基因的异常表达有关。



注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与MPTP处理组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

图4 牡丹籽油微囊粉对 $\alpha\text{-syn}$ 、*parkin*、*pink1*表达水平的影响

*pink1*和*parkin*是参与线粒体自噬的两个重要基因,*pink1*和*parkin*突变会导致线粒体自噬功能障碍,出现病理蛋白异常聚集,诱发PD^[25]。有研究证实艾灸可以通过增强*pink1*和*parkin*基因表达,缓解PD^[26]。目前,已有研究证实尼洛替尼、姜黄素、雷帕霉素等化合物能够在PD模型中通过激活自噬缓解PD^[7-9]。本研究发现MPTP处理组的斑马鱼,*pink1*和*parkin*表达显著下调,推测MPTP抑制了线粒体自噬,导致斑马鱼体内病理蛋白聚集,诱发致PD相关症状。相较MPTP处理组,牡丹籽油微囊粉与MPTP共处理组的*pink1*和*parkin*基因表达上调,推测牡丹籽油微囊粉能够通过促进自噬相关基因表达,激活线粒体自噬,使病理蛋白聚集减少,PD症状得到缓解。故牡丹籽油微囊粉的抗PD活性可能是通过激活线粒体自噬来实现的,具体机制有待于进一步研究。

3 结论

牡丹籽油微囊粉具有抗PD活性(包括有效减少多巴胺神经元损伤、保护脑部血管、缓解PD行为、调控PD相关基因的异常表达),且具有剂量依赖性,其作用机制可能与激活线粒体自噬相关。

参考文献:

- [1] CROTTY G F, ASCHERIO A, SCHWARZSCHILD M A, et al. Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease [J]. *Exp Neurol*, 2017, 298: 210-224.
- [2] 文婷, 付永莉, 罗婷, 等. $\alpha\text{-}$ 苯基-N-叔丁基硝酮对MPP+/MPTP诱发帕金森病模型的神经保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(7): 940-946.
- [3] RIZOR A, PAJARILLO E, JOHNSON J, et al. Astrocytic oxidative/nitrosative stress contributes to Parkinson's disease pathogenesis: the dual role of reactive astrocytes [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 265-284.
- [4] KO H S, COELLEN B V, SRIRAM S R, et al. Accumulation

- of the authentic parkin substrate aminoacyl - tRNA synthetase cofactor, p38/JTV - 1, leads to catecholaminergic cell death[J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 25(35): 7968 - 7978.
- [5] 方堃,董强,崔梅. *PINK1* 基因突变增强帕金森病相关毒物神经毒性作用的线粒体机制[J]. *神经损伤与功能重建*, 2012, 7(3): 180 - 185.
- [6] 潘一格. 自噬与神经退行性疾病[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2019, 22(8): 917 - 921.
- [7] HEBRON M L, LONSKAYAL I, MOUSSA C E. Nilotinib reverses loss of dopamine neurons and improves motor behavior via autophagic degradation of α - synuclein in Parkinson's disease models[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(16): 3315 - 3328.
- [8] JIANG T F, ZHANG Y J, ZHOU H Y, et al. Curcumin ameliorates the neurodegenerative pathology in A53T α - synuclein cell model of Parkinson's disease through the downregulation of mTOR/p70S6K signaling and the recovery of macroautophagy[J]. *J Neuroimm Pharmacol*, 2013, 8(1): 356 - 369.
- [9] PAN T, KONDO S, ZHU W, et al. Neuroprotection of rapamycin in lactacystin - induced neurodegeneration via autophagy enhancement [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(1): 16 - 25.
- [10] YANG X, ZHANG D, SONG L M, et al. Chemical profile and antioxidant activity of the oil from peony seeds (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 6: 1 - 11.
- [11] GUO B, XU D, DUAN H, et al. Therapeutic effects of multifunctional tetramethylpyrazine nitron on models of Parkinson's disease in vitro and in vivo [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(2): 274 - 285.
- [12] 韩民兴. *n* - 3 不饱和脂肪酸通过激活 Nrf2 - ARE 信号通路对 6 - OHDA 及 α - synuclein 帕金森病模型小鼠的保护作用[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [13] 哈崇. 左旋多巴联合恩他卡朋治疗帕金森病的临床疗效[J]. *中国药物经济学*, 2019, 14(9): 87 - 89, 93.
- [14] 吴俊霖. 多巴胺受体激动剂治疗帕金森病的临床疗效及安全性[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(3): 75 - 76.
- [15] 孙楷, 孙凡, 朱亮. 单胺氧化酶抑制剂在临床方面的应用[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(6): 1180 - 1182.
- [16] SAGER J J, BAI Q, BURTON E A. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases [J]. *Brain Struct Funct*, 2010, 214(2/3): 285 - 302.
- [17] WEN L, WEI W, GU W C, et al. Visualization of monoaminergic neurons and neurotoxicity of MPTP in live transgenic zebrafish[J]. *Dev Biol*, 2008, 314(1): 84 - 92.
- [18] LAWSON N D, WEINSTEIN B M. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2002, 248(2): 307 - 318.
- [19] 高桂珍, 汪俊博, 姜芳, 等. 硫酸化茯苓多糖对 MPTP 诱导帕金森小鼠的神经保护作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(12): 1699 - 1704.
- [20] 张正周, 张驰松, 郑旗, 等. 牡丹籽油微胶囊制备工艺的研究[J]. *农业与技术*, 2016, 36(1): 181 - 183.
- [21] CHEREEN C, GINE P, CHRISTINE L, et al. Evaluation of 5 cleaning and disinfection methods for nets used to collect zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2014, 53(6): 657 - 660.
- [22] MCKINLEY E T, BARANOWSKI T C, BLAVO D O, et al. Neuroprotection of MPTP - induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons[J]. *Mol Brain Res*, 2005, 141(2): 128 - 137.
- [23] 王荣春, 程丽芳, 韩利文, 等. 芪智消渴颗粒对 MPTP 诱导斑马鱼神经损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(6): 873 - 877.
- [24] YAO L, PENG S X, XU Y D, et al. Unexpected neuroprotective effects of loganin on 1 - methyl - 4 - phenyl - 1, 2, 3, 6 - tetrahydropyridine - induced neurotoxicity and cell death in zebrafish [J]. *Cell Biochem*, 2017, 118(3): 615 - 628.
- [25] GEISLER S, HOLMSTROM K M, TREIS A, et al. The PINK1/Parkin - mediated mitophagy is compromised by PD - associated mutations [J]. *Autophagy*, 2010, 6(7): 871 - 878.
- [26] 翁晓彦. 艾灸对帕金森病模型大鼠脑黑质 PINK1/Parkin 通路的影响研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2019.