

土的宁对多巴胺能神经元的保护作用

杨洋¹,周德生^{2*},Wolf-Dieter RAUSCH³,黄政德¹,胡华²,柯立芝¹

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第一附属医院神经内科 长沙 410007;
3. Department of Biomedical Sciences Veterinary Medical University Vienna Veterinaerplatz,
1 A-1210 Vienna, Austria)

〔摘要〕 目的:选择 2 种神经毒物 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)和谷氨酸在体外诱导多巴胺能神经元退行性损伤,并检测土的宁对此细胞的药理毒理作用,及对其退行性损伤的协同作用或拮抗作用。方法:采用孕 14 d 小鼠,取出胎鼠中脑,分离出多巴胺能神经元,调整细胞密度 7.5×10⁵/mL,于 5% CO₂,37℃,100% 湿度条件培养,于体外培养的第 10 天分别加入土的宁 0.1、1、5、10 μmol·L⁻¹,MPP⁺ 10 μmol·L⁻¹,谷氨酸 500 μmol·L⁻¹作用 48 h,第 12 天染色。选取细胞数,神经元树突长度和数量作为观察指标,并做出分析。结果:土的宁对未损伤的多巴胺能神经元在 48 h 培养过程中无毒性影响。在 10 μmol·L⁻¹土的宁作用下,多巴胺能神经元数量明显高于对照组(P<0.05);在 5~10 μmol·L⁻¹土的宁作用下,树突数量与对照组相比也有明显提高(P<0.05)。土的宁(10 μmol·L⁻¹)和 MPP⁺ 共同培养 48 h 后,细胞计数明显高于 MPP⁺ 单独培养组(P<0.05);这种保护作用更为明显的表现在细胞形态学变化方面,在 10 μmol·L⁻¹的土的宁剂量下,神经树突长度明显高于 MPP⁺ 单独培养组(P<0.05);神经树突的数量在 5 μmol·L⁻¹土的宁作用下与 MPP⁺ 单独培养组相比有明显增加(P<0.05)。在对谷氨酸(500 μmol·L⁻¹)诱导的神经元损伤模型中,与谷氨酸组相比,10 μmol·L⁻¹的土的宁对所有的观察指标的数值都有递增影响(P<0.05)。结论:首次证实土的宁具有可在体外刺激中脑分离出的多巴胺能神经元的生长,并且对此神经元退行性损伤有保护作用。

〔关键词〕 土的宁;1-甲基-4-苯基吡啶离子;谷氨酸;神经退行性病变;神经保护

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)24-0223-05

〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.0908.001.html>

〔网络出版时间〕 2012-10-12 9:08

Protective Effect of Strychnine on Dopaminergic Neurons

YANG Yang¹, ZHOU De-sheng^{2*}, Wolf-Dieter RAUSCH³, HUANG Zheng-de¹, HU Hua², KE Li-zhi¹

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Changsha 410007, China;

〔收稿日期〕 20120606(010)

〔基金项目〕 中国奥地利合作项目(CN:18/2007)

〔第一作者〕 杨洋, 博士生, 医师, 从事神经系统疾病的中西医结合防治研究, Tel:13508485937, E-mail:antonyyangool@126.com

〔通讯作者〕 *周德生, 博士, 主任医师, 教授, 从事神经系统疾病的中西医结合防治研究, Tel:13755102347, E-mail:Zds1101@tom.com

[5] 陈聪,马成,肖璐. 柴胡葛根配伍对发热大鼠体温和血清 IL-1β 含量、MPO 活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 207.

[6] 韩东,廖福龙,李文,等. 补阳还五汤及拆方对血栓形成大鼠梗塞灶、血管损伤半暗区、血浆 t-PA、PAI 活性及 ET 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(2): 21.

[7] 吴朝栋,李鸣真,龚非力. 内毒素诱生的细胞因子及其作用研究进展[J]. 国外医学:免疫学分册, 1995, 12(1): 11.

[8] 黄芬,刘沛. 肿瘤坏死因子在急性感染性疾病中的研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 1994, 14(3): 171.

[9] 张顺财. 内毒素基础与临床[M]. 北京:科学出版社, 2003: 76.

[10] Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice[J]. Prog Lipid Res, 2000, 39: 289.

[11] 梁卫,蔡鹰,张丽玲,等. 清热化痰滋阴方对狼疮患者外周血淋巴细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 116.

〔责任编辑〕 聂淑琴

2. Department of Neurology The first Affiliated Hospital of Hunan University of TCM, Changsha 410007, China;
3. Department of Biomedical Sciences Veterinary Medical University Vienna Veterinaerplatz,
1 A-1210 Vienna, Austria)

[Abstract] Objective: In this study two substances 1-methyl-4-phenyl pyridineion (MPP⁺) and glutamate (Glu) were used to induce neurotoxicity and degenerative change in dopaminergic neurons in primary cell culture. By additional applying strychnine in such cellular toxic models we tested the pharmacological and toxicological influence of strychnine on neurodegenerative processes. Method: the pregnant OF1/SPF mice were choose, the midbrains were collected, the primary cells of dopaminergic neurons were cultured at 5% CO₂, 37 ℃ , 100% humidity conditions in incubator. On the day *in vitro* (DIV) 10, strychnine at concentration of 0. 1, 1, 5, 10 μmol · L⁻¹, MPP⁺ 10 μmol · L⁻¹, Glu 500 μmol · L⁻¹ was added for 48 h and performed staining on DIV 12. numbers of dopaminergic neurons, numbers of processes and length of processes were measured and analyzed. Result: The results demonstrated that strychnine at all range of concentrations (1-10 μmol · L⁻¹) had no significant toxic effect on normal dopaminergic neuron cells in 48 hours without MPP⁺ or glutamate. However, a significant stimulating effect on neuron occured, namely, in which under treatment of strychnine at dose 10 μmol · L⁻¹ cell number was enhanced compared with control (*P* < 0. 05); the value of length of neuronal processes also increased by 10 μmol · L⁻¹ strychnine (*P* < 0. 05); as well as number of neuronal processes elevated in the range of 5-10 μmol · L⁻¹ (*P* < 0. 05). When neurons were treated by MPP⁺ (10 μmol · L⁻¹), strychnine played anti-neurodegenerative effect. Under concentration 10 μmol · L⁻¹ of strychnine, the number of neurons was higher than that in MPP⁺ treatment (*P* < 0. 05); the value of length of neuronal processes was increased by strychnine at 10 μmol · L⁻¹ (*P* < 0. 05); the number of neuron processes under 5 μmol · L⁻¹ strychnine was also higher than that in MPP⁺ treatment group (*P* < 0. 05). In Glu (500 μmol · L⁻¹) induced neurotoxicity, strychnine showed significant neuroprotective action, which indicated by recovery of morphology or the number of dopaminergic neurons 10 μmol · L⁻¹ (*P* < 0. 05). Conclusion: The present results demonstrate that strychnine stimulated *in vitro* the growth of dopaminergic neurons from substantia nigra par compacta, and played the neuronal protective effect against neurodegenerative damage *in vitro*.

[Key words] strychnine; MPP⁺; glutamate; neurodegenerative diseases; neuroprotection.

神经退行性变在其病理发展过程中,神经细胞经历了凋亡和坏死,最终导致神经细胞的死亡。近年对神经退行性病变的离体研究中,利用胎鼠中脑原代神经细胞培养模型可以在生物化学和形态学上来鉴定各种毒物和药物对神经细胞损伤的作用^[1-2]。

近些年来,很多物质被证明可以通过氧化应激和兴奋性毒性造成神经细胞损伤^[3-4]。本研究的目的在于探讨土的宁对离体中脑酪氨酸羟化酶阳性神经细胞形态学的影响,特别是揭示土的宁对此细胞退行性变是否具有保护作用。

1 材料

1.1 动物 孕 14 dOF1/SPF 小鼠,由奥地利 Himburg 医科大学动物中心提供。

1.2 仪器 尼康数码相机 (Japan), 5410 型孵育箱 (NAPCO, Germany), 倒置显微镜 (Nikon, Japan), SMZ-1B 型解剖显微镜 (Nikon Japan), 层流式工作

台 (Holten Laminair, Denmark), 水浴箱 (GFC, Germany)。

1.3 试剂 土的宁 (Sigma-Aldrich), 二氨基联苯胺 (DAB) 试剂盒 (Sigma-Aldrich), ABC 免疫组化试剂盒 (Vector laboratories, USA), DMEM 高糖培养基 (Sigma-Aldrich, Germany), DPBS (Invitrogen, UK), 胎牛血清 (Sigma-Aldrich, Germany), 赫佩斯缓冲液 (Sigma-Aldrich, Germany), 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺, RBI-Research Biochemicals International), 胰蛋白酶 (Invitrogen, UK), 胰蛋白酶抑制剂 (Invitrogen, UK)。

2 方法

2.1 原代细胞的分离与培养 对孕鼠 (OF1/SPF, Himberg, Austria) 的饲养和实验,在欧洲联盟理事会 (86/609/EU) 的指导方针下进行。CO₂ 处死孕 14 d 小鼠, 70% 乙醇消毒后, 打开腹腔, 游离子宫, 解

剖显微镜下取出中脑,去除血管和脑膜,加入胰酶和 DNase,37 ℃ 水浴箱内 7 min。取出加入 2 mL 胰酶抑制剂终止消化,750 r·min⁻¹ 离心 4 min,移除上清液,加入培养基和 6 μL DNase,火焰抛光后的吸管吹打,使细胞分散,静置 10 min 取上清液移至锥形瓶中,重复 3 次。细胞计数调整细胞浓度至 7.5 × 10⁵/mL。取四孔培养皿,DPBS 溶液洗涤后,每孔加 750 μL 细胞溶液,放置于 5% CO₂,37 ℃,100% 湿度条件下孵育箱内培养。48 h 后首次换液。

2.2 药物配制 土的宁溶液用含有 N-4 medium 的 DMSO 溶液稀释,浓度为 0.1,1,5,10 μmol·L⁻¹,MPP⁺ 用 N-4 medium 稀释,浓度为 10 μmol·L⁻¹,谷氨酸用 N-4 medium 稀释,浓度为 500 μmol·L⁻¹。

2.3 诱导原代多巴胺神经元细胞损伤 在多巴胺能神经元体外培养的第 10 天,将土的宁,MPP⁺ 和谷氨酸加入到培养皿中。由于药物成分溶解度不同,药物试剂配制时加入 0.01% 的 DMSO 以确保药物的溶解

2.4 分组 于实验第 10 天,对数生长期细胞,分为 3 组:土的宁组,土的宁,MPP⁺ 混合培养组和土的宁,谷氨酸混合培养组(*n* = 100)。土的宁组:将浓度为 1,5,10 μmol·L⁻¹ 的土的宁加入到培养皿中,未加土的宁为对照组。土的宁溶液用含有 N-4 medium 的 DMSO 溶液稀释,于 5% CO₂,37 ℃,100% 湿度条件下孵育箱内培养 48 h。土的宁,MPP⁺ 混合培养组:将 MPP⁺ 用 N-4 medium 稀释,浓度为 10 μmol·L⁻¹。将土的宁(浓度同上组)加入到培养皿中,未加 MPP⁺ 及土的宁的为对照组,于 5% CO₂,37 ℃,100% 湿度条件下孵育箱内培养 48 h。

土的宁,谷氨酸混合培养组:谷氨酸用 N-4 medium 稀释,浓度为 500 μmol·L⁻¹。将浓度为 0.1,1.0,10 μmol·L⁻¹ 的土的宁加入到培养皿中,未加谷氨酸及土的宁为对照组,于 5% CO₂,37 ℃,100% 湿度条件下孵育箱内培养 48 h。

2.5 免疫组化鉴定酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞 体外培养第 12 天,移除培养液,PBS(pH 7.2)洗涤,

每孔加入可溶性聚四氟乙烯(PFA)0.4 mL,4 ℃ 保存 20 min,BPS 溶液洗涤,2 min 后加入 X-100 溶液室温下保存 30 min,BPS 洗涤,加马血清孵育 90 min。加一抗(兔抗鼠多克隆抗体)4 ℃ 过夜。PBS 洗涤,加二抗(生物标记的山羊抗兔抗体)室温保存 1.5 h。PBS 洗涤,加 ABC-Kit Mouse 试剂盒,室温下 1.5 h。二氨基联苯(DAB)避光室温 10 ~ 15 min。移除 DAB,BPS 洗涤后 Kaiser's 甘油明胶固定。细胞膜或胞浆内出现棕色产物的细胞为 TH 阳性细胞,为多巴胺能神经元。

2.6 多巴胺能神经元细胞计数 在倒置显微镜 100 × 下记录 TH⁺ 细胞个数,每孔选择 20 个视野。

2.7 测量多巴胺能神经元轴突树突长度 TH 染色后测量多巴胺能神经元树突长度。使用 Moticam 1000 相机 200 × 倒置显微镜每孔选择 10 个细胞,照片规格为长 340 μm,宽 270 μm,应用软件 Moti Images Plus 2.0 测量轴突树突长度。

2.8 多巴胺能神经元轴突树突计数 200 × 倒置显微镜下记录多巴胺能神经元轴突树突数量,每孔选择 10 个细胞。

2.9 统计学分析 应用 SPSS 16.0 和 Excel 统计数据并作图。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验,方差分析。多组间均数比较检验采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 土的宁对中脑多巴胺能神经元的影响 将浓度为 1 ~ 10 μmol·L⁻¹ 土的宁加入到培养细胞中作用 48 h,细胞显示出良好的耐受状态,与对照组神经元计数相比,浓度为 10 μmol·L⁻¹ 土的宁细胞计数升高 12%,有统计学意义 *P* < 0.05;在对单多巴胺能神经元树突长度的测量发现,在 10 μmol·L⁻¹ 的土的宁组,细胞树突长度比对照组高 41% 左右,变化具有统计学意义 *P* < 0.05;5 ~ 10 μmol·L⁻¹,细胞树突的数量有增多的趋势,分别为 6.8% 和 24%,统计学具有显著差异 *P* < 0.05,(表 1)。

3.2 土的宁对 MPP⁺ 诱导中脑多巴胺能神经元损

表 1 土的宁对多巴胺能神经元作用($\bar{x} \pm s, n = 100$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	细胞数/个/孔	树突长度/μm	树突数量/个/孔
空白	-	1 074.37 ± 36.78	583.96 ± 17.97	4.17 ± 0.13
土的宁	1	1 079.76 ± 37.29	500.24 ± 20.81	4.41 ± 0.13
	5	1 145.34 ± 116.89	757.45 ± 75.08	4.45 ± 0.23 ¹⁾
	10	1 226.19 ± 88.01 ¹⁾	826.48 ± 49.51 ¹⁾	5.20 ± 0.25 ¹⁾

注:与空白组相比¹⁾ *P* < 0.05。

伤的影响 MPP⁺对神经元的损伤,导致神经元的退行性改变,数量降低了 40% 左右。加入土的宁后,土的宁 1 ~10 μmol·L⁻¹显示出对此毒性的拮抗作用,在 10 μmol·L⁻¹是这种作用效果最强,与对照组相比增加 64% ,具有统计学差异;MPP⁺对神经的损伤造成了细胞树突长度 60% 的降低,10 μmol·L⁻¹土的宁的作用下,细胞树突长度增加,与 MPP⁺对照组相比细胞树突长度明显升高,具有统计学差异,*P* <0. 05;10 μmol·L⁻¹的 MPP⁺在树突数量对细胞表现出毒性作用,与对照组相比,MPP⁺使树突的数量至少减少了 40%。保护作用在 5 μmol·L⁻¹作用明显,相比 MPP⁺组,土的宁加 MPP⁺组树突数增加了 29. 3% ,并且这种变化具有统计学意义,*P* <0. 05(表 2)。

3. 3 土的宁对谷氨酸诱导中脑多巴胺能神经元损伤的影响 500 μmol·L⁻¹的谷氨酸使多巴胺能神经元数量减少了 56%。土的宁在 10 μmol·L⁻¹时对神经细胞显示出保护作用。与谷氨酸对照组比较细胞数量多出 50% ,具有统计学意义 *P* <0. 05;细胞在树突长度上保护作用随着土的宁浓度的增加而增加,在 10 μmol·L⁻¹达到最大,增加了约 25% ,其变化具有统计学意义 *P* <0. 05;土的宁对多巴胺能神经元树突数量的影响与对树突长度的影响相似,10 μmol·L⁻¹增加了约 12% ,变化具有统计学意义, *P* <0. 05(表 3)。

4 讨论

马钱子在中医被广泛的应用于临床^[5],在中医中更是作为一味常用的药物来治疗神经系统等疾病^[6],在神经系统疾病方面,有研究应用炙马钱子治疗格林巴利综合症过程中,患者临床症状,特别是肌力的改善比较明显^[7],鉴于这个原因,马钱子也被应用于治疗重症肌无力中^[8]。马钱子在治疗中风的过程中也体现出了良好的效果^[9]。马钱子在对急性脊髓炎^[10]治疗过程中也显示出了很好的抗炎作用。

土的宁为马钱子中主要的活性生物碱成分,大剂量的土的宁可造成致命的毒性损伤,引起全身肌肉强直性惊厥,大幅升高血压,甚至导致死亡。小剂量的土的宁可以刺激中枢神经系统,升高血压,加快脉搏,使呼吸加深^[11-12],还可兴奋迷走神经,出现心动过缓^[13]。土的宁的治疗报道土的宁穴位注射对微创手术后肢体偏瘫有着良好的疗效^[14],另外硝酸土的宁穴位注射在治疗顽固性面瘫和视神经萎缩的过程中也显示出较好的效果^[15-16]。土的宁在很多神经递质受体的药理作用也受到了广泛的关注,土的宁为竞争性甘氨酸受体拮抗剂,通常称为土的宁敏感的甘氨酸受体^[17]。

有研究表明土的宁甘氨酸识别位点对于调控 NMDA 受体上的位点是非常重要的合作型激动剂,阻止受体位点结合,起到负性调节反馈作用^[18]。另

表 2 土的宁抗 MPP⁺诱导多巴胺能神经元损伤保护作用($\bar{x} \pm s, n = 100$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	细胞数/个/孔	树突长度/μm	树突数量/个/孔
空白	-	1 074. 37 ± 36. 78	583. 96 ± 17. 97	4. 17 ± 0. 13
MPP ⁺	10	604. 56 ± 34. 58	243. 40 ± 12. 02	2. 48 ± 0. 08
MPP ⁺ + 土的宁	10 + 1	541. 68 ± 37. 49	297. 96 ± 17. 45	2. 43 ± 0. 08
	10 + 5	830. 93 ± 103. 34	343. 42 ± 30. 86	2. 95 ± 0. 16 ¹⁾
	10 + 10	992. 63 ± 116. 05 ¹⁾	445. 70 ± 31. 21 ¹⁾	2. 58 ± 0. 15

注:与 MPP⁺组相比¹⁾*P* <0. 05。

表 3 土的宁抗 Glu 诱导多巴胺能神经元损伤保护作用($\bar{x} \pm s, n = 100$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	细胞数/个/孔	树突长度/μm	树突数量/个/孔
空白	-	709. 66 ± 59. 30	692. 92 ± 35. 69	4. 83 ± 0. 23
Glu	500	291. 95 ± 37. 75	557. 69 ± 30. 53	4. 35 ± 0. 21
Glu ⁺ + 土的宁	500 + 0. 1	363. 81 ± 1. 57	582. 12 ± 30. 98	4. 15 ± 0. 18
	500 + 1	341. 36 ± 38. 72	595. 70 ± 29. 92	4. 45 ± 0. 21
	500 + 10	565. 93 ± 47. 76 ¹⁾	693. 40 ± 35. 68 ¹⁾	5. 30 ± 0. 24 ¹⁾

注:与 Glu 组相比¹⁾*P* <0. 05。

一项研究表明,土的宁可以阻断甘氨酸诱导的神经抑制,土的宁降低了甘氨酸引起的多巴胺的释放,并且使其代谢至少减少了 90%,这暗示了土的宁受体参与了这一系列的调节过程。在体外甘氨酸刺激 [^3H]-乙酰胆碱释放,并且在大脑脚腹侧刺激 [^3H]-多巴胺的释放,土的宁可以阻止甘氨酸的作用^[19]。

在体外神经细胞培养的过程中,土的宁相对对照组使存活神经细胞增加,浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 土的宁所表现出的对神经细胞生长的刺激作用和对 MPP^+ 损伤后的细胞的保护作用却很显著,其机制可能为拮抗 MPP^+ 对细胞线粒体的损伤和具有某些抗氧化的作用。这种迹象同样出现在谷氨酸模型当中,在甘氨酸和谷氨酸受体之间存在着相互作用,甘氨酸的拮抗作用使谷氨酸受体(NMDA)活性减低,从而可能对谷氨酸受体的过度表达有一定的抑制作用。

虽然在本次实验中并没有得到土的宁毒性的表现,但并不能说明土的宁不存在毒性,体外实验并不能模拟体内药物的积累效应,另外在试验中使用的剂量虽然很大,换算成成人口服剂量后并不能用于使用,但根据大量的临床调查,对于内服马钱子治疗神经系统疾病,是从小剂量开始,逐渐加量,并且有服药间歇期,待体内药物积累到一定浓度是才会发挥作用。所以体外细胞模型的药物实验剂量不能直接延伸用于临床帕金森病的治疗剂量。此研究结果显示的土的宁对神经损伤的保护作用有待在动物体内实验模型中再次验证。

[参考文献]

- [1] Moldzio R, Pacher T, Krewenka C, et al. Effects of cannabinoids $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol, $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiol in MPP^+ affected murine mesencephalic cultures[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(8/9): 819.
- [2] Radad K, Moldzio R, Rausch W D. Ginsenosides and their CNS targets[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2011, 17(6): 761.
- [3] Gandhi S, Abramov A Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 428010.
- [4] 刘新, 邹典定, 王大斌, 等. 海马神经元兴奋性毒性模型的建立及其意义[J]. *卒中与神经病*, 2006, 13

- (3): 138.
- [5] 张小军, 金日显, 陈燕军. 马钱子及其制剂的药理学研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(1): 75.
- [6] The Committee of the Pharmacopoeia of the Ministry of Health of the People's Republic of China, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, vol. 1[M]. Chemical Industry Press, Beijing, 2000: 38.
- [7] 杨扬, 范振林. 赵建军教授应用炙马钱子治疗格林-巴利综合征经验[J]. *吉林中医药*, 2008, 28(3): 166.
- [8] 裘涛, 陈眉. 炙马钱子胶囊治疗重症肌无力 31 例临床观察[J]. *中国中医药科技*, 2008, 15(3): 219.
- [9] 辛永洙, 曹峰昊. 马钱子合补阳还五汤治疗气虚血瘀型中风[J]. *吉林中医药*, 2007, 27(11): 25.
- [10] 方小华, 李小珍. 浅谈马钱子在治疗急性脊髓炎的疗效[J]. *当代医学*, 2008, 14(24): 165.
- [11] Wang C, Han D, Wang Z, et al. Analysis of strychnos alkaloids in traditional Chinese medicines with improved sensitivity by sweeping micellar electrokinetic chromatography[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 527: 190.
- [12] 屈艳格, 陈军, 蔡宝昌. 土的宁的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(24): 247.
- [13] 许凤全冯兴华. 马钱子中毒及其安全使用[J]. *药物不良反应杂志*, 2008, 10(6): 426.
- [14] 周安运, 马开彦等. 土的宁合剂穴位封闭治疗微创术后肢体瘫痪 20 例临床观察[J]. *中华实用医学*, 2003, 5(24): 69.
- [15] 宋仁芳, 杨继艳. 硝酸土的宁穴位封闭治疗顽固性面瘫 54 例[J]. *JCAL*, 2001, 17(10): 6.
- [16] 徐虹, 许洁玻. 硝酸土的宁穴位注射治疗视神经萎缩[J]. *眼科新进展*, 1993, 13(2): 31.
- [17] Liu Y, Hu C, Tang Y, et al. Clozapine inhibits strychnine-sensitive glycine receptors in rat hippocampal neurons[J]. *Brain Res*, 2009(1278): 27.
- [18] Laube B, Maksay G, Schemm R, et al. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, 23, 519.
- [19] Jensen A A, Gharagozloo P, Birdsall Nigel J, et al. Pharmacological characterisation of strychnine and brucine analogues at glycine and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 539(1/2): 27.

[责任编辑 聂淑琴]