

黄连水提物对秀丽隐杆线虫毒性效应评价

苗祥贞, 张 潇, 袁炎炎, 张亚丽, 高 简, 刘永刚*, 谭 鹏*

北京中医药大学, 北京 102488

摘要: **目的** 评价不同质量浓度黄连水提物对秀丽隐杆线虫的毒性效应。**方法** 制备黄连水提物, 以秀丽隐杆线虫为模式生物, 通过测定不同质量浓度的黄连水提物对秀丽隐杆线虫死亡率、最长寿命与半数致死时间、个体发育、产卵数和运动行为的影响, 评价黄连水提物对秀丽隐杆线虫的毒性效应。**结果** 与对照组相比, 黄连水提物 0.5、1.0、2.5 mg/mL 可使秀丽隐杆线虫的死亡率显著提高 ($P < 0.01$), 最长寿命与半数致死时间显著降低 ($P < 0.01$); 在个体发育方面, 黄连水提物 1.0、2.5 mg/mL 能显著抑制线虫生长 ($P < 0.01$); 生殖行为方面, 3 个质量浓度的黄连水提物均能显著降低秀丽隐杆线虫产卵数 ($P < 0.001$), 且具有一定的浓度依赖性; 在运动行为方面, 3 个质量浓度的黄连水提物均能显著降低秀丽隐杆线虫头部摆动频率 ($P < 0.01$), 黄连水提物 0.5、1.0 mg/mL 组线虫身体弯曲频率无显著性差异, 黄连水提物 2.5 mg/mL 组线虫身体弯曲频率极显著降低 ($P < 0.01$); 3 个质量浓度的黄连水提物组线虫向前摆动、向后摆动和 Ω /U 摆动频率均无显著性差异。**结论** 黄连水提物对秀丽隐杆线虫具有明显的毒性作用, 为以秀丽隐杆线虫为模式生物评价黄连不同炮制品毒性提供了依据, 为中药毒性的生物评价提供了新的思路和方法。

关键词: 黄连; 秀丽隐杆线虫; 死亡率; 寿命; 运动行为; 毒性评价

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)04-0874-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.020

Toxicity evaluation of water extracts of *Coptidis Rhizoma* on *Caenorhabditis elegans*

MIAO Xiang-zhen, ZHANG Xiao, YUAN Yan-yan, ZHANG Ya-li, GAO Jian, LIU Yong-gang, TAN Peng

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To evaluate the toxic effects of different concentrations of *Coptidis Rhizoma* extract on *Caenorhabditis elegans*.

Methods *Coptidis Rhizoma* was extracted by water, and then selected some indicators to evaluate the toxic effects of *Coptidis Rhizoma* by using *C. elegans* as model organism. The effects of different concentrations of water extracts of *Coptidis Rhizoma* on lethality, maximum lifespan and median lethal time, individual development, spawning number and locomotion behavior were measured to evaluate the toxic effects on *C. elegans*. **Results** Compared with the control group, the lethality of *C. elegans* was significantly increased by water extracts of *Coptidis Rhizoma* at 0.5, 1.0, and 2.5 mg/mL ($P < 0.01$), and maximum lifespan and median lethal time were significantly decreased ($P < 0.01$). In the aspect of individual development, *Coptidis Rhizoma* extract at 1.0 and 2.5 mg/mL significantly inhibited the growth of *C. elegans* ($P < 0.01$). Three concentration extracts could significantly reduce the number of spawning in a certain dose-dependent manner in the aspect of reproductive behavior ($P < 0.001$), and the head swing frequency of *C. elegans* ($P < 0.01$) in the aspect of locomotion behavior, respectively. There was no significant difference in body bending frequency between the 0.5 and 1.0 mg/mL exposed group, of which the lowest bending frequency was 2.5 mg/mL exposed group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the frequency of forward swing, backward swing and Ω /U swing of three exposed groups. **Conclusion** The water extracts of *Coptidis Rhizoma* had obvious toxic effects on *C. elegans*, which provided the basis for the biological evaluation of the toxicity of different processed products of *Coptidis Rhizoma* by using *C. elegans* as a model organism, and provided new ideas and methods for the biological assessment of toxicity of Chinese medicinal materials.

Key words: *Coptidis Rhizoma*; *Caenorhabditis elegans*; lethality; lifespan; locomotion behavior; toxicity evaluation

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、
三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或

云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎^[1], 味苦性寒,
是常用的清热类中药, 最早记载于《神农本草经》,

收稿日期: 2017-09-18

基金项目: 北京中医药大学青年教师项目 (2017-JYB-JS-056); 白及等 4 种中药饮片标准化建设 (ZYBZH-Y-HUB-20)

作者简介: 苗祥贞 (1994—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药炮制机制研究。Tel: 18810820863 E-mail: miaoxiangzhen@bucm.edu.cn

*通信作者 谭 鹏 (1980—), 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药炮制机制研究。Tel: (010)84738616 E-mail: tanpengtcm@163.com
刘永刚 (1981—), 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为新药研发。E-mail: liuyg0228@163.com

且被列为上品, 历代本草中均有记载。《中国药典》2015 年版规定黄连的用量为 2~5 g, 但临床上黄连每日单剂量范围极宽, 为 1.5~40 g^[2]。因黄连不恰当的使用而出现的不良反应常有报道, 因此, 近年来对黄连安全性问题颇有争议。

对中药进行毒性评价, 目前主要是采用动物实验, 以生化指标和组织形态学的改变为依据。不仅成本高、周期长, 而且中药的化学成分复杂, 传统化学药物的毒理学评价方法难以阐明中药的致毒机制^[3]。因此需要一种简单、快速、可靠的方法来评价中药的毒性。秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (以下简称线虫) 是一种经典的小型整体模式生物, 它具有结构简单、生命周期短、基因图谱明确, 易于在实验室培养等优点, 在生命科学领域中解决了许多复杂的问题。Meyer 等^[4]将线虫暴露于具有神经毒性的农药中, 测定的指标包括运动行为、觅食行为、产卵数、生长、寿命和细胞死亡的变化, 结果表明, 线虫可以用于评估神经毒性药物的作用, 阐明毒性机制。Charão 等^[5]以线虫为模式动物, 评价了纳米胶囊的毒性和功效。Anderson 等^[6]研究了线虫的急性行为测试在化学物质毒性评价中的应用。李贞景等^[7]研究了 4 种有毒中药对线虫死亡率和产卵数的影响, 说明了线虫可以用于有毒中药的毒性评价。杨再昌等^[8]以线虫细菌感染模型评价中药的体内抗菌作用, 用铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌分别感染线虫, 筛选结果得出水麻叶、黄连、大接骨丹、知母、茯苓、当归、桃仁、山豆根、白虎汤对感染细菌的线虫显示出较好的保护效果, 证明了线虫作为药物筛选的可行性。魏巍等^[9]以线虫为模式动物评价了蓖麻碱的毒性, 发现蓖麻水提取物可以使线虫的生殖能力降低或丧失。许云等^[10]研究了芫花素对线虫的毒性作用, 发现芫花素对线虫具有一定的毒性作用, 主要表现为运动行为抑制, 其机制可能与损伤 γ -氨基丁酸 (GABA) 能神经元有关。基于以上优点, 线虫广泛地应用于环境科学、生态毒理学、药物筛选的研究中, 在中药毒性评价中也有少量报道, 黄连水提取物对线虫的毒性效应尚未见报道。

本实验通过测定不同质量浓度的黄连水提取物对线虫的死亡率、最长寿命与半数致死时间、个体发育、产卵数和运动行为的影响, 对黄连水提取物对线虫的毒性效应进行初步评价, 探讨其可能的毒性机制, 以为黄连临床合理用药提供依据, 为线虫在中药毒效快速评价中的应用提供参考。

1 材料

1.1 动物

线虫 (品系为野生型 N2, *C. elegans* of wild-type strain)、大肠杆菌 OP50 均由中国科学院遗传与发育生物学研究所惠赠。

1.2 仪器与试剂

生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 超净工作台 (Thermo 公司); 体视显微镜 (Nikon 公司); 立式高压蒸汽灭菌器 (上海云泰仪器仪表有限公司); 数控超声波清洗器 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司); 电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 微量移液器 (Eppendorf 公司); 电陶炉 (佛山艾诗凯奇电气有限公司)。

琼脂粉、胰蛋白胍购自 Solarbio 公司; 胆固醇购自 Sigma 公司; 硫酸镁、氯化钠、氯化钙、酵母粉、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、盐酸、氢氧化钠、氯化钾、乙醇、次氯酸钠、氯化钙等均为国产分析纯。

1.3 药材

黄连购自北京市双桥燕京中药饮片厂, 产地为湖北, 批号 1604084, 经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎。

2 方法

2.1 黄连水提物的制备

黄连水提物的制备参考文献方法^[11], 黄连粉碎后, 加 10 倍量的水在电陶炉上煎煮 2 次, 每次 30 min, 合并 2 次水煎液, 滤过后将滤液水浴加热挥干, 得到黄连水提取物, HPLC 测得药根碱、非洲防己碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀、小檗碱质量分数分别为 1.78%、1.50%、3.72%、5.82%、5.49%、22.62%, 4 °C 下保存, 使用时用去离子水配成所需质量浓度。

2.2 线虫的基本培养

线虫培养于 22 °C 恒温培养箱中, 在涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上生长发育。约 3 d 转板 1 次, 防止线虫过老或处于饥饿抑制状态, 同时要保证线虫干净。

2.3 线虫的同步化处理

在无菌条件下, 挑取 70~80 条正处于产卵期的成虫于 1 个新的铺有大肠杆菌 OP50 的培养基平板上, 产卵 2 h 后将全部成虫挑走。将产卵板置于 22 °C 无菌生化培养箱中培养 2 d, 便得到同步化处于 L₄ 时期的线虫。

2.4 暴露实验

暴露实验采用直径为 6 cm 的灭菌培养皿, 配制黄连水提物质量浓度为 0.5、1.0、2.5 mg/mL 的培养基 (质量浓度是根据前期实验设置), 每个培养皿接种同步化处理后的 L₄ 时期线虫, 在 22 °C 下暴露 24 h。对照组加入正常培养基。暴露结束后, 用于后续实验。

2.5 线虫死亡率的测定

将 30 条同步化处于 L₄ 时期的线虫分别挑至 0.5、1.0、2.5 mg/mL 黄连水提物的 NGM 培养板中。22 °C 下培养, 每隔 24 h 观察并记录线虫死亡及丢失的数目, 为了排除被测试线虫与其新产生幼虫的混杂, 每隔 24 h 将活着的线虫挑到新的含相同药物质量浓度的培养板上继续培养, 直至所有线虫全部死亡。线虫死亡标准为虫体本身丧失运动能力, 多次触碰没有反应。每个质量浓度进行 3 组平行实验。

2.6 线虫最长寿命与半数致死时间的测定

将经过不同质量浓度黄连水提物暴露 24 h 后的 30 条线虫再置于正常的 NGM 培养基上培养, 每隔 24 小时记录死亡及丢失的线虫数目。在线虫产卵期内, 每隔 24 小时将测试的线虫转移到新的培养板上。当线虫的存活数目为 15 时, 记录下测试天数, 即为半数致死时间。当最后一条线虫死亡时, 记录下的时间即为最长寿命, 进行 3 组平行实验。

2.7 线虫体长测定

将经过不同质量浓度黄连水提物暴露 24 h 的线虫 50 °C 处理 5 min, 杀死线虫, 在体式显微镜下观察并拍照, 利用 Image J 软件测量线虫体长, 每个质量浓度组测量 45 条。

2.8 线虫产卵数的测定

将经过不同质量浓度黄连水提物暴露 24 h 的线虫各 12 条分别挑至新的 NGM 培养板中, 每个 NGM 培养板培养 1 条, 每 24 小时转移 1 次, 直至线虫产卵期结束。产卵板在 22 °C 下培养 24 h 后记录子代数。每条线虫在产卵期子代数总和即为该线虫的产卵数。

2.9 线虫头部摆动频率测定

根据文献报道的测定方法^[12], 在未添加大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上滴加 60 μL K-medium 后, 挑取 30 条经过不同质量浓度黄连水提物暴露 24 h 的线虫。经过 1 min 恢复后, 记录线虫在 1 min 内头部摆动的次数 (线虫头部从一侧摆向另一侧再摆回来)。

2.10 线虫身体弯曲频率测定

根据文献报道的测定方法^[12], 将经过不同质量

浓度黄连水提物暴露 24 h 的 30 条线虫放入未添加大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上, 记录 20 s 内其身体弯曲的次数 (线虫相对于身体长轴方向上的 1 个波长的移动作为 1 次身体弯曲)。

2.11 线虫向前、向后和 Omega/U 摆动次数测定

根据文献报道的测定方法^[13], 将经过不同质量浓度黄连水提物暴露 24 h 的 30 条线虫放入未添加大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上, 记录线虫在 20 s 内向前、向后和进行 Omega/U 运动的数目。

2.12 统计学方法

所有实验平行重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 软件分析数据, 组间差异用 *t* 检验分析。

3 结果与分析

3.1 黄连水提物对线虫死亡率的影响

不同培养时间下, 黄连水提物不同质量浓度组对线虫死亡率的影响结果如图 1 所示。在 8 d 内, 与对照组比较, 黄连水提物不同质量浓度组线虫的死亡率明显上升 ($P < 0.01$), 表明黄连水提物对线虫具有较强的毒性。其中, 黄连水提物质量浓度为 2.5 mg/mL 时的毒性作用最强, 在第 3 天已导致 84.4% 的线虫死亡。同时, 随着培养时间的延长, 线虫的死亡率也明显增加, 表明线虫对黄连水提物的毒性具有时间累加效应。

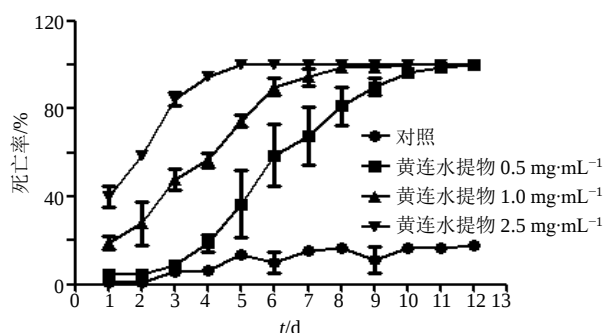


图 1 黄连水提物对线虫死亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Fig. 1 Effects of *Coptidis Rhizoma* extract on lethality of *C. elegans* ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

3.2 黄连水提物对线虫最长寿命的影响

结果如表 1 所示, 线虫在含有黄连水提物的培养基中的半数致死时间集中在 1~5 d, 最长寿命明显降低, 与对照组比较均差异显著 ($P < 0.01$)。其中黄连水提物质量浓度为 2.5 mg/mL 时, 线虫的半数致死时间为 1 d。上述结果表明黄连水提物对线虫有较强的毒性作用。

3.3 黄连水提物对线虫个体发育的影响

如图 2 所示, 对照组线虫体长为 (1.33 ± 0.03) mm,

表 1 黄连水提物对线虫的半数致死时间和寿命的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 1 Effects of *Coptidis rhizoma* extract on median lethal time and maximum lifespan of *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	半数致死时间/d	最长寿命/d
对照	—	14.7±0.6	22.3±1.6
黄连水	0.5	7.0±2.0**	14.3±2.1**
提物	1.0	4.7±2.5**	10.3±0.6**
	2.5	1.0±0.0**	8.0±1.0**

与对照组比较: ** $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group, same as below

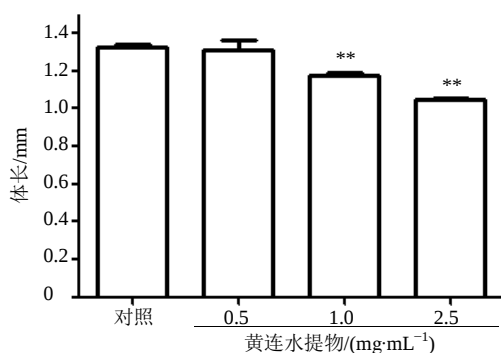


图 2 黄连水提物对线虫体长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 45$)

Fig. 2 Effects of *Coptidis Rhizoma* extract on body length of *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 45$)

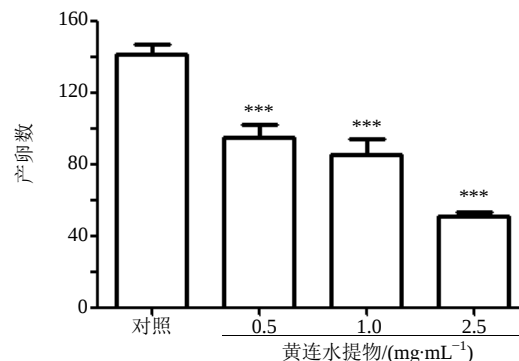
黄连水提物 0.5、1.0、2.5 mg/mL 组线虫体长分别为 (1.31±0.09)、(1.18±0.02)、(1.05±0.01) mm。与对照组比较, 黄连水提物 0.5 mg/mL 组线虫体长无显著差别, 黄连水提物 1.0、2.5 mg/mL 组线虫的体长显著减小 ($P < 0.01$)。

3.4 黄连水提物对线虫产卵数的影响

结果如图 3 所示, 与对照组比较, 黄连水提物不同质量浓度组线虫产卵数显著减少 ($P < 0.001$)。此外, 黄连水提物对线虫的生殖毒性作用随着药物质量浓度的提高而呈上升趋势, 表明黄连水提物对线虫生殖能力的影响具有一定的浓度依赖性。

3.5 黄连水提物对线虫运动行为的影响

头部摆动频率、身体弯曲频率及向前、向后、Omega/U 摆动作为反映神经系统基本功能的指标, 已经被广泛用于神经毒性、有机化合物毒性的分析。对照组线虫头部摆动频率为每分钟 (135.6±7.8) 次, 身体弯曲频率为每 20 秒 (23.2±0.9) 次, 向前摆动频率为每 20 秒 (9.9±0.5) 次, 向后摆动频率为每 20 秒 (1.0±0.2) 次, Omega/U 摆动频率为每 20 秒 (1.4±0.4) 次 (图 4)。与对照组比较, 3 个质量浓度的黄连水提物组线虫头部摆动频率均显著降低



与对照组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs control group

图 3 黄连水提物对线虫产卵数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Effects of *Coptidis Rhizoma* extract on spawning number of *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

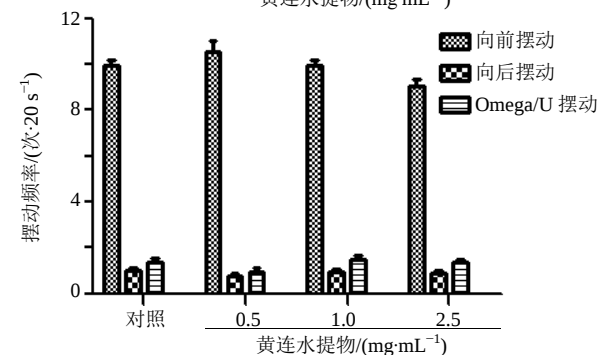
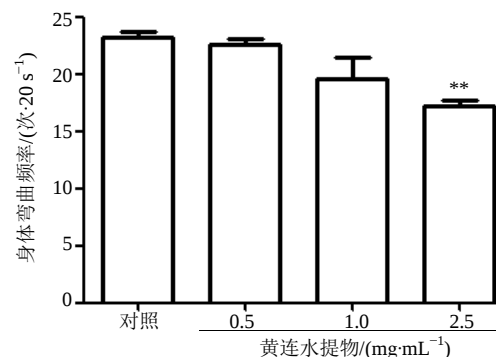
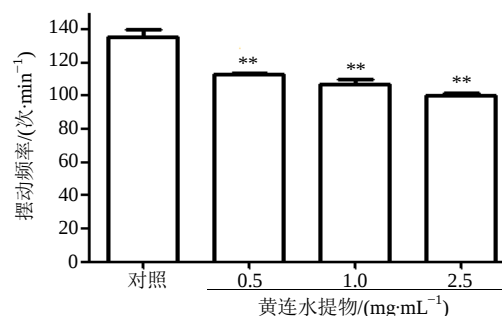


图 4 黄连水提物对线虫头部摆动频率、身体弯曲频率及运动行为的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Fig. 4 Effects of *Coptidis Rhizoma* extract on head swing frequency, body bending frequency, and locomotion behavior of *C. elegans* ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

($P < 0.01$)；黄连水提物 0.5、1.0 mg/mL 组线虫身体弯曲频率无显著性差异，黄连水提物 2.5 mg/mL 组线虫身体弯曲频率显著降低 ($P < 0.01$)；3 个质量浓度的黄连水提物组线虫向前摆动、向后摆动和 Omega/U 摆动频率均无显著差异。

4 讨论

线虫具有结构简单、生命周期短、全基因组序列已知、与人类基因保守性较高、细胞谱系和分子通路清楚、测试周期短、易于重复等优点。线虫的毒性评价指标有死亡率、最长寿命与半数致死天数、细胞凋亡、发育、生殖、运动行为、乙酰胆碱酯酶活性、学习行为、记忆行为、转基因品系、突变体与基因表达模式等。死亡率、最长寿命与半数致死时间、细胞凋亡是研究衰老与致死的基本手段；运动行为、乙酰胆碱酯酶活性、学习行为、记忆行为主要用于研究神经毒理；发育与生殖评估参数主要用于研究发育毒理与生殖毒理^[14]。线虫对毒性刺激时所产生的行为学特征，可以为毒理学初期评价提供了很好的支持。

黄连的主要化学成分为小檗碱、黄连碱、巴马汀、表小檗碱，其中以小檗碱的含量最高^[15]。贾鹰珏等^[16]探讨黄连单味药及其复方黄连解毒汤对小鼠的急性毒性，单味黄连水煎液的半数致死量(LD₅₀)为 18.826 g/kg (以含黄连生药量计)，毒性靶器官为脑、肝、脾、肺、肾。本实验引入了模式动物线虫对黄连水提物的毒性效应进行了评价，结果发现黄连水提物能显著增加线虫的死亡率，降低其最长寿命和产卵数，抑制其生长，并能对其运动行为造成缺陷，这说明黄连水提物能对线虫的发育、生殖、神经方面造成毒性效应。蔡薇^[17]发现黄连的毒性与乙酰胆碱酯酶有关，乙酰胆碱酯酶在线虫中枢和外周神经系统表达。Opperman 等^[18]发现一些农药能通过抑制线虫乙酰胆碱酯酶活性而导致其运动能力丧失，黄连水提物对线虫的毒性机制可能与抑制乙酰胆碱酯酶活性有关，其具体机制有待进一步探讨。

本实验采用线虫生理水平指标评价黄连水提取物的毒性，测定了不同质量浓度的黄连水提物对线虫死亡率、最长寿命与半数致死时间、个体发育、产卵数和运动行为的影响，发现黄连水提物对线虫有明显的毒性作用，可以与传统动物毒理实验相结合，更准确、快速的评价中药的毒性效应，阐明中药毒性的机制，为中药毒性的生物评价提供了新的思路和方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 武胜萍, 徐立鹏, 刘洪兴, 等. 黄连的临床应用及其用量探究 [J]. 中国临床医生杂志, 2015, 43(2): 92-94.
- [3] 林志, 吕建军, 霍桂桃, 等. 临床前药物安全性评价中的毒性病理学 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(4): 450-454.
- [4] Meyer D, Williams P L. Toxicity testing of neurotoxic pesticides in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Toxicol Env Heal B*, 2014, 17(5): 284-306.
- [5] Charão M F, Souto C, Brucker N, et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative *in vivo* model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage [J]. *Inter J Nanomed*, 2015, doi: 10.2147/IJN.S84909.
- [6] Anderson G L, Cole R D, Williams P L. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans* [J]. *Env Toxicol Chem*, 2004, 23(5): 1235-1240.
- [7] 李贞景, 张金阳, 王昌禄, 等. 4 种有毒中药对秀丽隐杆线虫致死率和产卵数的影响 [J]. 毒理学杂志, 2013, 27(4): 297-299.
- [8] 杨再昌, 马小彦, 乐意, 等. 用秀丽隐杆线虫观察 43 种中药的体内抗菌药效 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(5): 1174-1175.
- [9] 魏巍, 王昌禄, 王玉荣, 等. 以秀丽线虫为模式生物评价蓖麻碱毒性的研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2012, 34(1): 54-56.
- [10] 许云, 阮秦莉, 纪蕾蕾, 等. 芫花素对模式生物秀丽隐杆线虫的毒性作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(5): 414-421.
- [11] 郑金凤, 夏坤, 李国辉. 黄连及黄连解毒汤水煎剂的稳定性实验研究 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(13): 1161-1164.
- [12] Tsalik E L, Hobert O. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Neurobiol*, 2003, 56(2): 178-197.
- [13] Murakami H, Bessinger K, Hellmann J, et al. Aging dependent and-independent modulation of associative learning behavior by insulin insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(47): 10894-10904.
- [14] 张燕芬, 王大勇. 利用模式动物秀丽线虫建立环境毒物毒性的评估研究体系 [J]. 生态毒理学报, 2008, 3(4): 313-322.
- [15] 卿大双, 罗维早, 孙建彬, 等. 一测多评法测定黄连及其炮制品中 6 种生物碱 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 324-329.
- [16] 贾鹰珏, 李国辉, 张平. 黄连及黄连解毒汤对小鼠的急性毒性实验研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(18): 1399-1404.
- [17] 蔡薇. 中药黄连毒性及其影响因素分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(17): 84-85.
- [18] Opperman C H, Chang S. Nematode acetylcholinesterases: Molecular forms and their potential role in nematode behavior [J]. *Parasitol Today*, 1992, 8(12): 406-411.