

基于 UPLC-MS/MS 联用微透析技术的三七总皂苷在帕金森病小鼠模型中的药动学和药效学研究

李新悦^{1,2}, 吴玉梅^{1,2#}, 任 静^{1,2}, 马 丽^{1,2}, 刘静静^{1,2}, 张 兵^{1,2}, 郭 盼^{1,2*}, 刘志东^{1,2*}

1. 天津中医药大学, 现代中药发现与制剂技术教育部工程中心, 天津 301617

2. 天津中医药大学, 天津市现代重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 天津 301617

摘 要: 目的 探究 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 诱导的帕金森病 (PD) 模型小鼠以三七总皂苷干预后, 脑微透析液中三七皂苷 R_1 (R_1)、人参皂苷 R_{g1} (R_{g1}) 和氨基酸神经递质的含量变化。方法 给小鼠 ip MPTP 造成 PD 小鼠模型, 经 iv 三七总皂苷 (PNS) 溶液后, 采用微透析技术采集脑微透析液。将样品分为 2 部分, 一部分采用 UPLC-MS/MS 对 R_1 和 R_{g1} 进行药动学研究, 另一部分采用氨基酸柱前衍生化和 HPLC-FLD 进行药效学研究。结果 小鼠 iv PNS 后, 脑微透析液中 R_1 的峰浓度 (C_{max}) 为 (35.48 ± 24.4) ng/mL, R_{g1} 的 C_{max} 为 (75.61 ± 41.35) ng/mL。 R_1 和 R_{g1} 的达峰时间 (t_{max}) 均为 1.75 h。 R_1 和 R_{g1} 的药时曲线下面积 (AUC) 分别为 (100.12 ± 84.29) ng·h/mL 和 (218.84 ± 144.73) ng·h/mL。且给予 PNS 后的 PD 模型小鼠体内天冬氨酸和谷氨酸浓度降低, 甘氨酸、牛磺酸和 γ -氨基丁酸浓度增加。结论 PNS 能一定程度透过血脑屏障 (BBB) 进入脑内, 调节 PD 模型小鼠体内氨基酸水平的失衡, 进而发挥神经保护作用。

关键词: 三七总皂苷; 药动学; 药效学; 帕金森病; 微透析技术; 氨基酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3119-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.018

Pharmacokinetics and pharmacodynamics study of *Panax notoginseng* saponins in mice with Parkinson's disease by using UPLC-MS/MS combined with microdialysis

LI Xin-yue^{1,2}, WU Yu-mei^{1,2}, REN Jing^{1,2}, MA Li^{1,2}, LIU Jing-jing^{1,2}, ZHANG Bing^{1,2}, GUO Pan^{1,2}, LIU Zhi-dong^{1,2}

1. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Province and Ministry Co-Established State Key Laboratory Cultivation Base, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the changes in the content of notoginsenoside R_1 (R_1), ginsenoside R_{g1} (R_{g1}) and amino acid neurotransmitters in brain micro dialysate after the treatment with *Panax notoginseng* saponins (PNS) solution in Parkinson's disease (PD) model mice induced by 1-methylmethyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Methods** Mice were injected intraperitoneally with MPTP to induce PD mice model. After intravenous injection of PNS solution, brain micro dialysate was collected by microdialysis technique. The sample was divided into two parts, one was subjected to pharmacokinetic study of R_1 and R_{g1} by UPLC-MS/MS, and the other part for pharmacodynamics study which was done by pre-column derivatization of the amino acids and HPLC-FLD analysis. **Results** After iv administration of PNS to the mice, the maximum CSF concentration was (35.48 ± 24.4) ng/mL for R_1 and (75.61 ± 41.35) ng/mL for R_{g1} . The time to reach maximum concentration was found 1.75 h both for R_1 and R_{g1} . The AUC value of R_1 and R_{g1} were (100.12 ± 84.29) ng·h/mL and (218.84 ± 144.73) ng·h/mL, respectively. Moreover, the levels of aspartic acid and glutamic acid were reduced, and glycine, taurine and γ -aminobutyric acid levels were increased in PD

收稿日期: 2018-12-28

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (16ZXLGX00170)

作者简介: 李新悦 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药剂学。Tel: 15122990167 E-mail: lixinyue036@163.com

*通信作者 刘志东, 博士生导师, 研究员, 主要从事中药新剂型与技术研究。E-mail: lonerliuzd@163.com

郭 盼, 助理研究员, 主要从事中药新剂型与技术研究。E-mail: gpandap@163.com

#共同第一作者 吴玉梅 (1991—), 女, 博士研究生, 研究方向为药剂学。Tel: 15285135654 E-mail: wym91116@163.com

model mice treated with PNS in comparison with model group. **Conclusion** PNS can enter the brain through the blood brain barrier (BBB) to some extent, and regulate the imbalance of amino acid level in PD model mice, so as to display the neuroprotective effect and its therapeutic value.

Key words: *Panax notoginseng* saponins; pharmacokinetics; pharmacodynamics; Parkinson's disease; microdialysis; amino acids

帕金森病 (PD) 是一种神经退行性疾病, 常见于中年人和 60 岁以上人群^[1-2]。临床上, PD 的主要特征是多巴胺神经元的退化和路易体的形成^[3], 表现为运动迟缓、静止性震颤、肌张力障碍和姿势平衡障碍加重, 严重影响患者的运动和生活能力, 甚至可导致残疾^[1]。众所周知, 多巴胺 (DA) 在 PD 的发病机制中起着至关重要的作用^[3]。还有研究表明脑中的其他氨基酸, 如谷氨酸 (Glu) 和 γ -氨基丁酸 (GABA), 通过干扰基底神经节回路平衡参与 PD 的发病机制^[4-5]。近期, Tong 等^[1]研究表明 PD 的非运动症状的出现可能与血浆中氨基酸水平的变化有关。

三七药用部位为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎, 主要用于治疗不同类型的出血性疾病^[6-7]。研究认为三七的生物活性成分主要为四环达玛烷的三萜皂苷^[8]。三七总皂苷 (PNS) 是三七提取物的主要组分, 包括人参皂苷 Rb₁ (Rb₁)、人参皂苷 Rg₁ (Rg₁)、人参皂苷 Rd (Rd)、人参皂苷 Re (Re) 和三七皂苷 R₁ (R₁) 等^[9]。研究报道, Rg₁ 可以通过不同的机制对 PD 模型发挥潜在的神经保护作用^[10-12], PNS 也具有神经保护作用^[13]。但目前关于 PNS 对 PD 模型动物脑中氨基酸水平的影响以及脑内药动力学的相关研究尚未见报道。微透析技术是一种将灌流取样和透析技术结合起来并逐渐完善的一种从生物活体内进行动态微量生化取样的技术, 具有活体连续取样、动态观察、定量分析、采样量小、组织损伤轻等特点, 可在麻醉或清醒的生物体上使用, 特别适合于深部组织和重要器官的活体生化研究。目前已成为实验神经生理学和神经化学的重要研究工具之一, 它可提供递质释放、摄取和代谢的必要信息。因此, 本实验通过 UPLC-MS/MS 联用微透析技术测定脑微透析液中 R₁ 和 Rg₁ 的含量来评价 PNS 的脑生物利用度, 并考察 PNS 对 PD 模型小鼠脑中氨基酸水平的调节作用, 为其新药开发及临床应用提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

C57BL/6 小鼠购于北京维通利华实验动物技术

有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2016-0011, 动物室温度 (25±2) °C, 相对湿度 (50±2) %, 相关研究遵照动物实验原则进行。

1.2 药品与试剂

PNS 原料药 (云南玉溪万方天然药物有限公司, 批号 021108, R₁、Rg₁ 和 Rb₁ 的质量分数分别为 13.79%、47.26%、24.55%); 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP, 美国 Sigma 公司, 批号 SLBS2977V); 生理盐水 (辰欣药业股份有限公司, 批号 1611280721); 对照品 R₁ (批号 110745-201318)、Rg₁ (批号 110703-201530)、Rb₁ (批号 110704-201424), 中国食品药品检定研究院, 质量分数≥99%; β -巯基乙醇 (Sigma-Aldrich St. Louis 公司); Glu、天冬氨酸 (Asp)、甘氨酸 (Gly)、 γ -GABA、牛磺酸 (Tau), Sigma 公司; 邻苯二甲醛 (OPA, 质量分数≥99%, Sigma-Aldrich 公司); 水合氯醛 (分析纯, 天津市瑞金特化学品有限公司); 乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 去离子水 (实验室自制); 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)。

1.3 仪器

超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪 (UPLC: Agilent 1290 型, QQQ: Agilent 6460 Triple Quad LC/MS); 脑立体定位仪 (Angle II, 美国); 玻璃离子水门汀 (上海市祥齿科材料有限公司); 高效液相系统荧光检测器 (日本岛津公司, 检测器 RF-10AXL); Milli-Q 超纯水系统 (Millipore 公司, 美国); PB-10 型赛多利斯 pH 计 (德国 Sartorius 公司); S0220-230V-EU 涡旋混合仪 (美国 Labnet 公司); XP205 十万分之一天平 (Mettler Toledo 公司); 离心机 (美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 PD 小鼠模型的制备与验证

2.1.1 动物分组与模型的制备 本实验选用 12 只小鼠, 自由饮水、取食, 于实验前适应性饲养 1 周。将小鼠随机分为对照组和模型组, 每组 6 只。模型组小鼠每天 ip MPTP (30 mg/kg), 连续 5 d, 对照组小鼠每天 ip 等量生理盐水, 连续 5 d。

2.1.2 PD 小鼠模型的验证 多巴胺 (DA) 是哺乳

动物中脑黑质多巴胺能神经元分泌的重要神经递质,与 PD 的发病密切相关^[14]。大脑中 DA 的含量非常高,约占全脑的 70%。当多巴胺能神经元减少 50% 时,DA 含量降低至正常值的 30%,这可能导致 PD 的发生^[15]。本实验主要以 DA 含量变化评价 PD 模型的成功与否^[16]。

2.1.3 DA 的测定^[16] 在 ip MPTP 5 d 后将动物断头取脑。在冰枕上分离出脑组织纹状体,于 -80 °C 冷冻保存。按纹状体-组织裂解液 (1 g : 7.5 mL) 加入组织裂解液,匀浆,冷冻离心 15 min (12 000 r/min)。上清液再离心 1 次,于 -80 °C 下保存,样品待测前先低温解冻,加入等体积的高氯酸沉淀剂,在冰浴中放置 10 min 后,冷冻离心 15 min (12 000 r/min),过 0.22 μm 滤膜,取续滤液进行测定。色谱条件:色谱柱为 Agilent C₁₈ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为柠檬酸-乙酸钠缓冲液 (pH 3.8, A) - 甲醇 (B),梯度洗脱程序: 0 ~ 10 min, 5% B; 10 ~ 15 min, 5% ~ 50% B; 15 ~ 20 min, 50% B; 激发波长 (EM) 330 nm,发射波长 (EX) 280 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL。

2.2 微透析实验

2.2.1 动物分组及给药 本实验选用 8 只小鼠,自由饮水、取食,于实验前适应性饲养 1 周。将小鼠随机分为模型组和 PNS 组 (每组 4 只),模型组与 PNS 组小鼠每天 ip MPTP (30 mg/kg),连续 5 d。PNS 组于造模过程的第 4 天提前尾 iv 给予 PNS 溶液 (100 mg/kg),1 h 后 ip MPTP (30 mg/kg),连续给药 3 d^[16]。模型组于造模过程的第 4 天提前尾 iv 给予等量生理盐水,连续 3 d。

2.2.2 人工脑脊液 (ACSF) 的制备 45 mmol/L NaCl、0.6 mmol/L KCl、1.0 mmol/L MgCl₂、1.2 mmol/L CaCl₂、0.2 mmol/L 维生素 C,用 NaOH 调 pH 值至 7.0,用时加入 0.04% 半胱氨酸,经 0.22 μm 滤膜滤过并超声处理 10 min 以除去气泡。

2.2.3 脑探针的植入及样品收集 在给药前 3 d 给小鼠植入脑探针套管,小鼠用 10% 水合氯醛麻醉 (350 mg/kg) 后,对小鼠头部进行备皮处理,头盖骨平行于矢状缝做一个 1 cm 的中线切口,暴露头顶颅骨,分离骨膜等软组织,将小鼠固定于脑立体定位仪,以前囟作为定位原点,坐标为 (左侧大脑) AP: +0.6 mm, ML: +2.0 mm, DV: -4.2 mm。定位后用颅钻钻一个直径 0.8 mm 的小孔,将脑部探针以硬脑膜为标准向腹侧垂直插入,用玻璃离子水

门汀将探针固定于小鼠纹状体。透析管插入后分别灌注灌流液,排除管路中的气泡,用 1.5 μL/min 体积流量平衡 2 h,以取得稳定的基础值。然后开始收集透析液标本,每间隔 30 min 收集 1 次,量约 45 μL,收集 3 份空白透析液作为阴性对照样品。恢复 3 d 后给药,给药组于末次给药后,立即开始收集样品,每次采样 30 min,连续取样 24 h。

2.2.4 探针回收率测定 (1) 体外回收率的测定:在恒温水浴 (37 ± 1) °C 条件下,将 50 mL 含有 R₁ 和 R_{g1} 的 ACSF 加入烧杯中。将探针置于烧杯中并固定,使透析窗完全浸没在溶液中。设置体积流量为 1.5 μL/min,使用一系列质量浓度的 ACSF 药物溶液 (R₁: 47.5、95.0、475.0、760.0、950.0 ng/mL 和 R_{g1}: 55、110、550、880、1 100 ng/mL) 作为灌注液。烧杯中的 R₁ 和 R_{g1} 的质量浓度分别为 475、550 ng/mL。灌注 30 min 后,开始每隔 30 min 收集 1 次样品,每次收集 30 min。结果取 3 次测量值的平均值。(2) 在体回收率的测定:微透析探针植入小鼠脑内后,平衡 2 h 后,以 ACSF 作为灌注液,冲洗脑部探针 30 min,冲洗后依次使用一系列质量浓度的 ACSF 药物溶液 (R₁: 47.5、95.0、475.0、760.0、950.0 ng/mL 和 R_{g1}: 55、110、550、880、1 100 ng/mL) 作为灌注液灌注,体积流量设定为 1.5 μL/min,收集各个灌注液浓度下的微透析液样品,每个浓度收集 3 次,测定透析液中的药物质量浓度。更换灌注液后,至少冲洗 0.5 h 才开始收集下 1 个样品。以测得的透析液样品中的药物质量浓度与灌注液中药物质量浓度的差值对灌注液中药物质量浓度作图,斜率即为回收率。

2.3 脑微透析液中 R₁ 和 R_{g1} 的测定

2.3.1 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI 源);扫描模式:正离子 (ESI⁺) 检测;检测方式:多反应离子监测 (MRM);电喷雾电压 5 kV,雾化气体 N₂,雾化气压 275.8 kPa (40 psi);离子源温度 350 °C;R₁ 定量特征反应 m/z 955.52 → 775.30,裂解电压 280 V,碰撞能量 42 eV;R_{g1} 定量特征反应 m/z 823.48 → 643.30,裂解电压 340 V,碰撞能量 50 eV。

2.3.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B),梯度洗脱: 0 ~ 2.5 min, 30% → 50% B; 2.5 ~ 3.0 min, 50% → 70% B,柱温 30 °C。

2.3.3 对照品溶液的配制 精密称取适量 R₁ 及 R_{g1}

对照品, 用甲醇溶解后配制成对照品贮备液。精密量取此贮备液适量, 用 ACSF 稀释配制成系列混合对照品溶液。

2.3.4 专属性考察 动物手术后植入探针, 平衡后收集空白透析液为阴性对照样品, 给药后分别收集脑微透析液样品, 进样分析。以确定脑微透析样品中的杂质及其他透析产物对药物峰有无明显干扰。

2.3.5 标准曲线的绘制 精密称取 R_1 对照品 2.72 mg、 R_{g1} 对照品 2.76 mg, 用甲醇溶解后配制质量浓度分别为 R_1 19 $\mu\text{g/mL}$ 、 R_{g1} 22 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液。精密量取此储备液适量, 用 ACSF 稀释配制成系列溶液, 进样测定后以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线。

2.3.6 精密度试验 取低、中、高 3 种质量浓度的混合对照品溶液进样测定, 1 d 内测定 5 次, 计算日内精密度; 该不同质量浓度的混合对照品溶液连续测定 3 d, 每天测定 5 次, 计算日间精密度。

2.3.7 稳定性试验 将低、中、高质量浓度的样品各 3 份, 考察 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h 的稳定性, 经 “2.3.1” “2.3.2” 项下的质谱及色谱条件进样测定。

2.3.8 检测限与定量限 取 R_1 、 R_{g1} 对照品溶液稀释后, 按以上色谱条件进样, 计算检测限与定量限。

2.4 脑微透析液中氨基酸类神经递质的测定

2.4.1 色谱条件 岛津 RF-10AXL 荧光检测器高效液相系统; 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB- C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 发射波长 350 nm, 激发波长 450 nm。流动相为磷酸二氢钾缓冲液 (0.05 mol/L, pH 6.0, A) - 甲醇-乙腈 (6:1, B)。梯度洗脱程序: 0~17.00 min, 28% B; 17.00~24.00 min, 28%~60% B; 24.01~30.00 min, 60% B; 30.01~35.00 min, 60%~28% B; 35.01~40.00 min, 28% B。

2.4.2 衍生剂的制备 精密称取邻苯二甲醛 (OPA) 10 mg 溶于 0.25 mL 甲醇中, 加入 20 μL β -巯基乙醇, 再加入 2 mL 0.2 mol/L 硼砂缓冲液 (pH 9.5), 混匀、离心, 避光存放 24 h 即可。隔天补加 10 μL β -巯基乙醇^[17]。衍生化反应: 取 5 μL 衍生剂于装有 15 μL 微透析样品的内衬管中混匀, 静置 2 min 后开始进样。

2.4.3 专属性考察 精确称取 Asp 2.28 mg、Glu 2.72 mg、Gly 2.57 mg、Tau 4.20 mg 和 γ -GABA 3.01 mg, 分别溶解在 100 mL ASCF 中作为贮备溶液。再分别用 ASCF 稀释并混匀, 经 HPLC-FLD 进样测定, 确定每种氨基酸的出峰位置。以确定脑微透析

液样品中的杂质及其他透析产物对 5 种氨基酸峰形有无明显干扰。

2.4.4 标准曲线的绘制 以贮备溶液进行倍比稀释, 得到一系列质量浓度的对照品溶液。将 15 μL 对照品溶液加入到 5 μL 衍生物中混匀, 反应 2 min 进样, 记录峰面积积分值。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。

2.4.5 精密度试验 于 1 d 内连续进样低、中、高质量浓度的对照品溶液 ($n=5$), 计算日内精密度。

2.4.6 检测限与定量限 取不同质量浓度的以上 5 种氨基酸对照品溶液稀释后, 按以上色谱条件进样, 计算检测限与定量限。

2.5 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 WinNolin 6.4 软件计算药动力学参数。利用 SPSS 软件采用单因素方差分析进行统计学分析, 考察不同组别间药动力学参数的差异。

3 结果

3.1 PD 模型的验证

经测定 PD 小鼠脑纹状体中 DA 水平, 对照组和模型组纹状体中 DA 的质量浓度分别为 (48.5 $\pm$ 17.3) ng/mL 和 (6.4 $\pm$ 2.7) ng/mL。模型组中 DA 含量显著降低 ($P<0.01$), 表明 PD 模型复制成功。

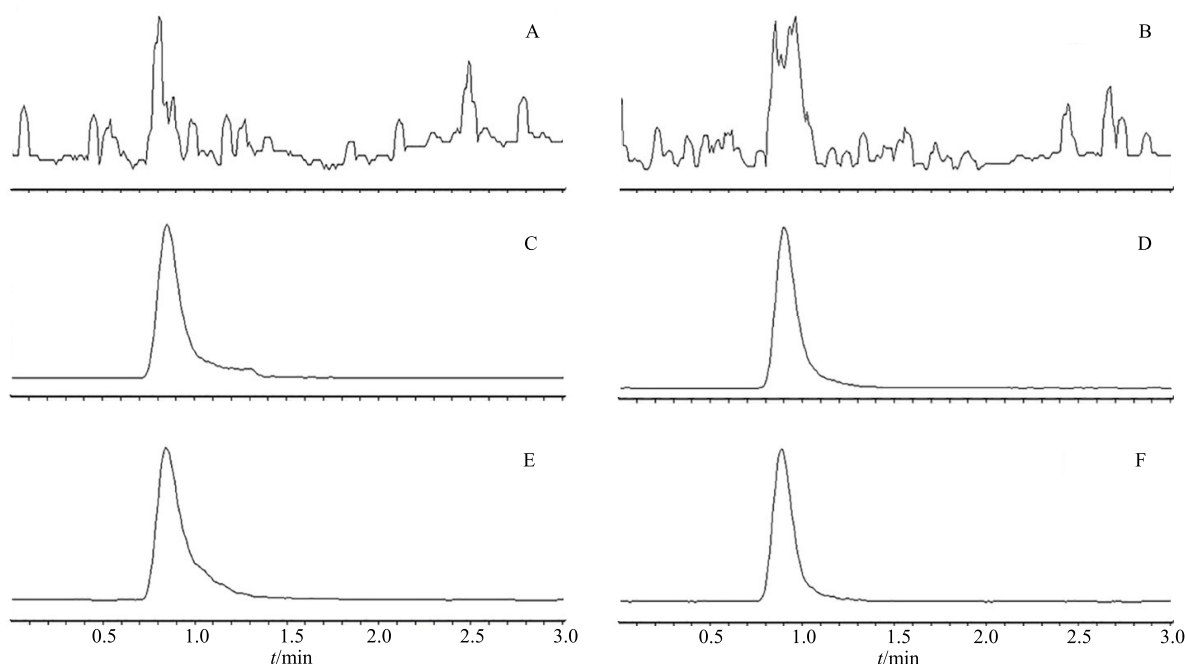
3.2 探针回收率的测定

以测得的透析液样品中的药物质量浓度与灌注液中药物质量浓度的差值对灌注液中药物质量浓度作图, 斜率即为回收率。 R_1 在体和体外回收率回归方程分别为 $Y=-0.420\ 2\ X+31.22$ ($r=0.999\ 7$), $Y=-0.455\ X+180.56$ ($r=0.998\ 8$), R_{g1} 在体和体外回收率回归方程分别为 $Y=-0.435\ 7\ X+237.75$ ($r=0.998\ 5$), $Y=-0.385\ 5\ X+26.036$ ($r=0.999\ 3$)。结果表明, R_1 在体、体外回收率分别为 42.02%、45.5%, R_{g1} 在体、体外回收率分别为 38.55%、43.57%。

3.3 脑微透析液中 R_1 和 R_{g1} 测定方法学考察结果

3.3.1 专属性 尾 iv PNS 溶液后, 使用 UPLC-MS/MS 联合微透析技术测定 0~24 h 内脑脊液 (CSF) 中 R_1 和 R_{g1} 的质量浓度。结果表明, 透析液中 R_1 和 R_{g1} 的保留时间分别为 0.86、0.93 min, 与对照品一致。透析液和其他透析产物对分析物峰没有显著干扰。空白透析液样品、对照品溶液和脑局部透析液样品色谱图如图 1 所示。

3.3.2 回归方程及线性范围 以质量浓度为横坐标



A-空白透析液 R_{g1} 的提取离子流图 B-空白透析液 R_{i1} 的提取离子流图 C-对照品 R_{g1} 的提取离子流图 D-对照品 R_{i1} 的提取离子流图 E-CSF 样品中 R_{g1} 的提取离子流图 F-CSF 样品中 R_{i1} 的提取离子流图

A-chromatogram of R_{g1} in blank ACSF B-chromatogram of R_{i1} in blank ACSF C-chromatogram of R_{g1} D-chromatogram of R_{i1} E-chromatogram of R_{g1} in CSF samples F-chromatogram of R_{i1} in CSF samples

图 1 空白透析液、对照品溶液和脑微透析液样品的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank, standards and brain micro dialysate samples

(X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得 R_{i1} 的回归方程为 $Y=11.58 X-1.269$, r 为 0.999 7; R_{g1} 的回归方程为 $Y=21.04 X-1.289$, r 为 0.999 8。 R_{i1} 在 0.475~950.000 ng/mL 内线性关系良好, R_{g1} 在 0.55~1 100.00 ng/mL 内线性关系良好。

3.3.3 精密度 低、中、高质量浓度对照品溶液的日内和日间精密度见表 1。由结果可知, R_{i1} 日内和日间精密度 RSD 分别在 0.91%~3.78%和 2.70%~5.96%; R_{g1} 日内和日间精密度 RSD 分别在 0.82%~2.45%和 3.90%~5.11%, 表明精密度良好。

3.3.4 稳定性 微透析液样品稳定性测定结果 (表 2) 表明, 将样本在 4 °C 放置 12 h, 测得低、中、高质量浓度样品的质量浓度的 RSD 均在 4.97% 以内, 说明微透析液样品稳定。

3.3.5 检测限与定量限 R_{i1} 、 R_{g1} 的最低检测限分别为 1.021、0.523 ng/mL, 定量限分别为 0.30、0.25 ng/mL。

3.4 脑微透析液样品中 5 种氨基酸测定的方法学考察结果

3.4.1 专属性 如图 2 所示, 脑微透析液中 5 种氨基酸在最佳色谱条件下出峰时间为: Asp 5.25

表 1 ACSF 中 R_{i1} 和 R_{g1} 的精密度 ($n=5$)

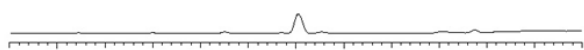
Table 1 Precision and accuracy of R_{i1} and R_{g1} in ACSF ($n=5$)

成分	$\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内精密度			日间精密度		
		$\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	RE/%	$\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	RE/%
R_{i1}	11.88	11.43 $\pm$ 0.10	0.91	-3.76	11.49 $\pm$ 0.31	2.70	-3.28
	475.00	486.89 $\pm$ 10.62	2.18	2.50	507.18 $\pm$ 16.47	3.25	6.77
	760.00	827.90 $\pm$ 31.28	3.78	8.93	838.51 $\pm$ 49.95	5.96	10.33
R_{g1}	13.75	14.25 $\pm$ 0.12	0.82	3.62	14.44 $\pm$ 0.56	3.90	5.02
	550.00	578.84 $\pm$ 14.20	2.45	5.24	587.57 $\pm$ 30.00	5.11	6.83
	880.00	949.30 $\pm$ 19.92	2.10	7.87	953.91 $\pm$ 43.54	4.56	8.40

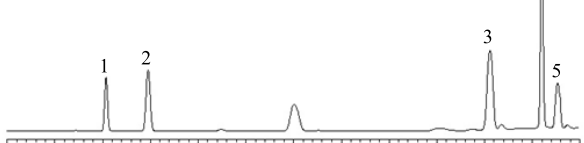
表 2 ACSF 中 R₁ 和 R_{g1} 的稳定性 (n = 5)Table 2 Stability of R₁ and R_{g1} in ACSF (n = 5)

成分	理论 $\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	测量值 $\rho/(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD/%	RE/%
R ₁	11.88	11.75 ± 0.53	4.52	-1.06
	475.00	516.85 ± 18.66	3.61	8.81
	760.00	846.26 ± 32.16	3.80	11.35
R _{g1}	13.75	13.83 ± 0.69	4.97	0.56
	550.00	601.20 ± 14.61	2.43	9.31
	880.00	968.53 ± 25.67	2.65	10.06

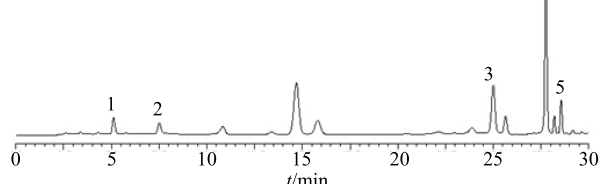
空白 ACSF



混合对照品



透析液样品



1-Asp 2-Glu 3-Gly 4-Tau 5-GABA

图 2 HPLC-FLD 分析的 5 种氨基酸

Fig. 2 HPLC-FLD analysis of five kinds of amino acids

min、Glu 7.40 min、Gly 25.27 min、Tau 27.90 min 和 GABA 28.87 min, 表明微透析液中其他杂质在目标峰处无干扰。

3.4.2 回归方程及线性范围 如表 3 所示, 所有氨基酸的 r 均 >0.999 , 表明该方法具有良好的线性关系。

3.4.3 精密度结果 结果表明, 5 种氨基酸 Asp、Glu、Gly、Tau 和 γ -GABA 峰面积的 RSD 分别为 3.0%、1.9%、2.8%、2.2%、2.0%, 表明精密度良好, 符合方法学测定的要求。

3.4.4 检测限与定量限 取不同质量浓度的 5 种氨基酸 Asp、Glu、Gly、Tau 和 γ -GABA 稀释后, 进样, 测得最低检测限分别为 1.68、6.04、5.71、3.11、6.69 ng/mL, 定量限分别为 4.04、18.14、17.14、9.34、20.06 ng/mL。

3.5 药动力学结果

使用 WinNolin 6.4 软件系统计算药时曲线下面积

表 3 5 种氨基酸的回归方程和线性范围

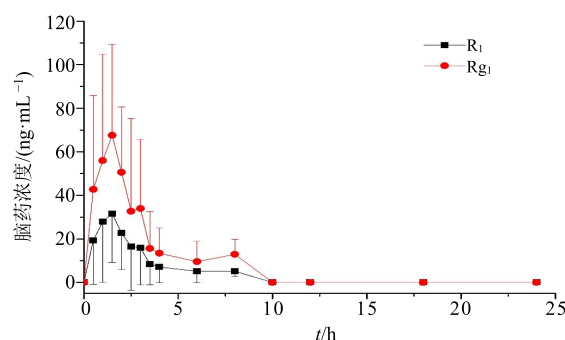
Table 3 Linearity and range of amino acid content

氨基酸	线性方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)
Asp	$Y=1\,158\,X+43\,550$	0.999 6	6.30~1\,140.00
Glu	$Y=1\,923.3\,X-48\,684$	0.999 8	22.67~1\,360.00
Gly	$Y=3\,183\,X+35\,103$	0.999 6	21.42~1\,285.00
Tau	$Y=3\,415.2\,X+300\,408$	0.999 8	11.67~2\,100.00
GABA	$Y=3\,201.1\,X-30\,675$	0.999 2	25.08~1\,505.00

(AUC)、峰浓度 ($C_{\max}$)、达峰时间 ($t_{\max}$)、半衰期 ($t_{1/2}$) 和表观消除速率常数 (K_e)。R₁ 和 R_{g1} 的脑药浓度-时间曲线如图 3 所示。表 4 显示了 CFS 中 R₁ 和 R_{g1} 的药动力参数。R₁ 和 R_{g1} 的 AUC 值分别为 (100.12 ± 84.29) ng·h/mL 和 (218.84 ± 144.73) ng·h/mL。R₁ 和 R_{g1} 的 $C_{\max}$ 值分别为 (35.48 ± 24.41) ng/mL 和 (75.61 ± 41.35) ng/mL。R₁ 和 R_{g1} 的 $t_{\max}$ 几乎相同, 为 1.75 h。图 3 中显示, R_{g1} 在 8 h 时间点浓度升高, 是由于个别样本在该时间点浓度较高, 导致浓度平均值升高, 可能是实验动物的个体差异所致。在尾 iv PNS 溶液 10 h 后, 无法检测到 R₁ 和 R_{g1}。

3.6 药效学研究

研究表明^[17], 与对照组相比, PD 组抑制性氨

图 3 R₁ 和 R_{g1} 在 CFS 中的浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 3 Concentration-time curve of R₁ and R_{g1} ($\bar{x} \pm s, n = 4$)表 4 CSF 中 R₁ 和 R_{g1} 的药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Table 4 Pharmacokinetics parameters of R₁ and R_{g1} in CSF ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

参数	单位	R ₁	R _{g1}
AUC	ng·h·mL ⁻¹	100.12 ± 84.29	218.84 ± 144.73
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	35.48 ± 24.41	75.61 ± 41.35
$t_{\max}$	h	1.75 ± 0.87	1.75 ± 0.87
K_e	h	0.21 ± 0.13	0.19 ± 0.12
$t_{1/2}$	h	3.91 ± 1.70	5.26 ± 3.98

氨酸 Gly、Tau 和 GABA 水平是有所下降的, 兴奋性氨基酸 Asp 和 Glu 水平是升高的, 此变化可能会引起神经兴奋性毒性, 使突触后膜去极化, 钙离子内流, 改变细胞内生理环境, 最终引起 DA 能神经元损伤, 导致 PD 的发生。本实验中, 尾 iv PNS 溶液后, 采用 HPLC-FLD 结合 OPA 技术检测与 PD 发病相关的 5 种氨基酸在小鼠脑微透析液中 0~24 h 的动态变化 (以 C_t/C_0 表示各氨基酸的相对含量, C_t 、

C_0 分别为 t 时刻微透析液中氨基酸浓度和给药前空白透析液中氨基酸浓度)。从图 4 中可以看出, 尾 iv PNS 后 6 h 内, 大部分氨基酸浓度达到最大值。在微透析过程中, 与 PD 模型组相比, PNS 组的 Asp 和 Glu 水平明显降低, Gly、Tau 和 GABA 水平均升高。结果显示 PNS 的干预能够降低 PD 小鼠脑微透析液中兴奋性氨基酸的水平, 升高抑制性氨基酸的水平, 进而起到神经保护作用。

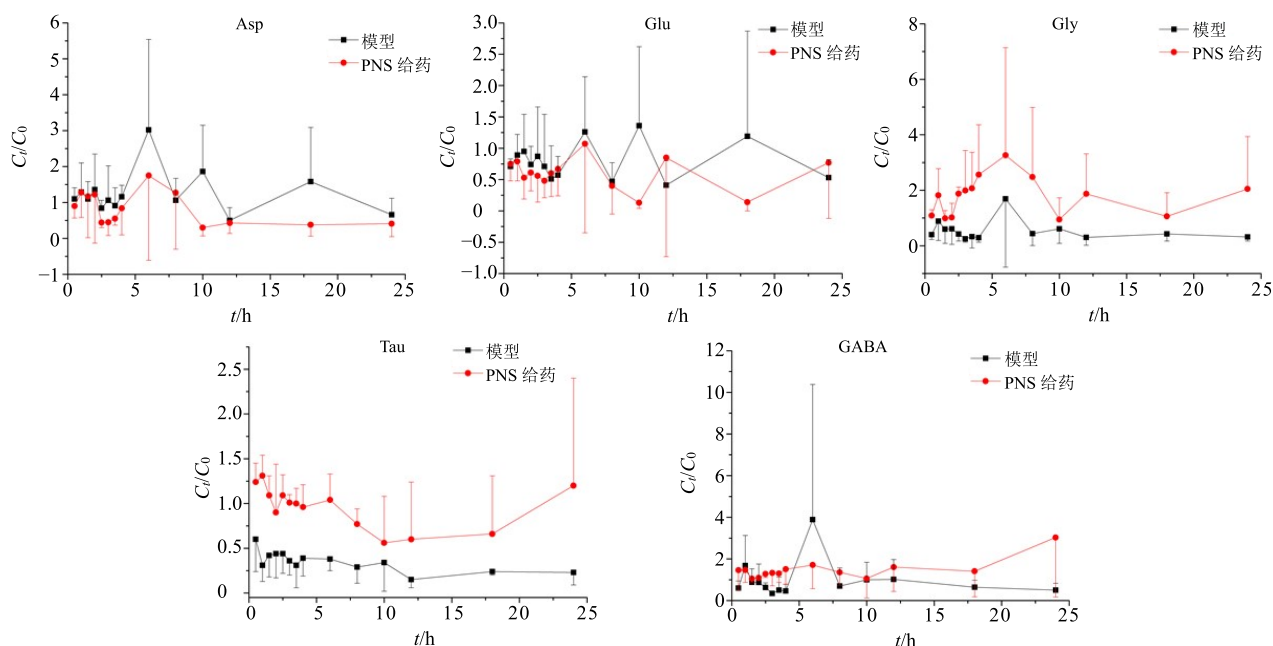


图 4 小鼠纹状体微透析液中 5 种氨基酸的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 4 Changes in five amino acid in dialysates of striatum in mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

4 讨论

三七在临床上具有广泛的用途, 目前已经应用于心脑血管系统、血液系统、神经系统以及免疫系统等疾病的临床治疗。最近, 有研究证明 PNS 可以降低动脉粥样硬化和血栓形成的几率, 具有预防抗氧化损伤、抑制钙超载、防止心肌缺血再灌注损伤、改善脑微循环、抗高血糖和保护神经细胞的作用^[9-11,18-19]。

迄今为止, PD 治疗方法主要为 DA 替代疗法, 但长期使用会使疗效降低, 并诱发一系列不良反应, 且不能预防或减缓病程进展。因此, 寻找替代治疗和预防策略迫在眉睫。

在本研究中, 建立了 MPTP 诱导 PD 模型, 目前多采用 DA 含量测定结合行为学观察对 PD 模型进行评价, 通过测定 DA 含量, 以及爬杆、悬尾、游泳实验等行为学评价对小鼠模型进行验证, 行为学部分结果已另文发表^[16]。在本研究中, 采用 MPTP

诱导 PD 模型来研究 PNS 的治疗效果, 应用脑局部微透析方法采集了 PD 模型鼠的脑微透析液, 并分别测定了脑微透析液中 R_1 、 R_{g1} 和 5 种氨基酸的含量。经过药动学参数及统计学分析, iv 给药 PNS 溶液后, CSF 中 R_1 和 R_{g1} 的浓度迅速升高, 表明 PNS 能一定程度透过血脑屏障进入脑内。

目前有证据表明 Glu 等兴奋性氨基酸似乎参与了 MPTP/MPP⁺诱导的神经元死亡的病理生理级联反应^[20], 推测氨基酸水平可以作为 PD 病程进展的生化标志物。并且有人提出 Glu 拮抗剂可能在 PD 中具有治疗价值^[21]。此外, Iwasaki 等^[22]指出 PD 患者的血浆中 Asp 和 Glu 水平显著升高。在本研究中结果表明 PNS 具有降低 Glu 和 Asp 水平的作用, 提示了 PNS 在 PD 治疗中具有潜在作用。此外, 许多研究表明, 与对照组相比, PD 患者脑部 GABA 水平有所下降^[23], PD 患者脑中 Tau 也显著降低^[24]。

本实验结果显示,与非治疗组相比,经 PNS 治疗的 PD 小鼠脑微透析液中的兴奋性氨基酸水平降低,抑制性氨基酸水平升高,表明了 PNS 能提高 PD 患者脑中抑制性氨基酸的浓度,进而起到神经保护作用。本实验为中药有效成分治疗 PD 提供新的思路,PNS 的脑内生物利用度的提高及新型的 PNS 给药系统有待进行深入研究。

参考文献

- [1] Tong Q, Xu Q, Xia Q, *et al.* Correlations between plasma levels of amino acids and nonmotor symptoms in Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm*, 2015, 122(3): 411-417.
- [2] Tysnes O, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm*, 2017, 124(8): 901-905.
- [3] Zhang Y, Feng T, Xu P, *et al.* Recent advance in the relationship between excitatory amino acid transporters and Parkinson's disease [J]. *Neural Plasticity*, 2016, 2016(3): 1-8.
- [4] Emir U E, Tuite P J, Öz, G. Elevated pontine and putamenal GABA levels in mild-moderate Parkinson disease detected by 7 tesla proton MRS [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30918.
- [5] Sun Z, Jia J, Gong X, *et al.* Inhibition of glutamate and acetylcholine release in behavioral improvement induced by electroacupuncture in parkinsonian rats [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 520(1): 32-37.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] Liang W, Leung P, Yew D. *Panax notoginseng*: A double-edged sword in haemostasis? [J]. *Altern Integr Med*, 2013, 2(9): e110.
- [8] Wu H, Liu H, Bai J, *et al.* Simultaneous determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re and 20(S) protopanaxatriol in beagle dog plasma by ultra high performance liquid mass spectrometry after oral administration of a *Panax notoginseng*, saponin preparation [J]. *J Chromatogr B*, 2015, 974: 42-47.
- [9] Uzayisenga R, Ayeka P A, Wang Y. Anti-diabetic potential of *Panax notoginseng* saponins (PNS): A review [J]. *Phytother Res: PTR*, 2014, 28(4): 510-516.
- [10] Ng T B. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 58(8): 1007-1019.
- [11] Xu L, Chen W F, Wong M S. Ginsenoside Rg₁ protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease through the IGF-I receptor signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 158(3): 738-748.
- [12] Song L, Xu M B, Zhou X L, *et al.* A preclinical systematic review of ginsenoside-Rg₁ in experimental Parkinson's disease [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2017, 2017(3): 1-14.
- [13] Huang X P, Tan H, Chen B Y, *et al.* Combination of total astragalus extract and total *Panax notoginseng* saponins strengthened the protective effects on brain damage through improving energy metabolism and inhibiting apoptosis after cerebral ischemia-reperfusion in mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(6): 445-452.
- [14] Vogt Weisenhorn D M, Giesert F, Wurst W. Diversity matters-heterogeneity of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon and its relation to Parkinson's disease [J]. *J Neurochem*, 2016, 139(S1): 8-26.
- [15] 武 倩, 叶 敏, 蒲小平. 中药提取物 CTE 对 MPTP 所致帕金森病小鼠模型的神经保护作用 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(4): 355-358.
- [16] 任 静, 吴玉梅, 马 丽, 等. 三七总皂苷微乳对帕金森模型小鼠行为学及纹状体多巴胺含量的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(3): 234-238.
- [17] Yang Z Z, Li J, Li S X, *et al.* Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136(1): 117-122.
- [18] 贺 旭, 刘英飞, 王 伟, 等. 三七总皂苷对全脑缺血大鼠海马脑水肿及 GFAP 表达的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4695-4700.
- [19] 贺 旭, 葛金文, 黄 俊, 等. 三七总皂苷对全脑缺血成年大鼠侧脑室室管膜区神经再生的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1535-1540.
- [20] Oster S, Radad K, Scheller D, *et al.* Rotigotine protects against glutamate toxicity in primary dopaminergic cell culture [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 724: 31-42.
- [21] Lange K W, Kornhuber J, Riederer P. Dopamine/glutamate interactions in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1997, 21(4): 393-400.
- [22] Iwasaki Y, Ikeda K, Shiojima T, *et al.* Increased plasma concentrations of aspartate, glutamate and glycine in Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 1992, 145(2): 175-177.
- [23] Jimenez-Jimenez F J, Alonso-Navarro H, Garcia-Martin E, *et al.* Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: Toward a potential search for biomarkers for this disease [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8(369): 1-31
- [24] Engelborghs S, Marescau B, Deyn P P D. Amino acids and biogenic amines in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease [J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(8): 1145-1150.