

微透析技术联用 UPLC-Q/TOF-MS 的大脑中动脉栓塞大鼠代谢组学研究

韦园诗¹, 朱黎霞², 黄星星¹, 张英丰^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 南方医科大学珠江医院 中医科, 广东 广州 510282

摘要:目的 研究大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠的脑纹状体代谢组学特征。方法 采用线栓栓塞大脑中动脉以复制 MCAO 大鼠模型, 脑纹状体植入微透析探针, 清醒、自由活动状态下采集脑微透析样品, 正、负离子模式下超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF-MS)测定脑微透析样品, 多元统计建立代谢组学模型。结果 成功进行了微透析技术的脑靶向性代谢组学研究, 代谢组学模型可明显区分对照组和模型组, 发现并鉴定了 7 个差异代谢物。结论 MCAO 大鼠脑代谢特征发生了明显改变, 基于微透析技术的代谢组学研究丰富了代谢组学的研究方法。

关键词: 大脑中动脉栓塞; 微透析技术; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 纹状体; 代谢组学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3155-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.023

Metabonomics study of MCAO rats based on microdialysis technique combined with UPLC-Q/TOF-MS

WEI Yuan-shi¹, ZHU Li-xia², HUANG Xing-xing¹, ZHANG Ying-feng¹

1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Zhujiang Hospital, South Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: **Objective** To study the brain striatum metabolomics characteristics of middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats. **Methods** The middle cerebral artery was occluded by monofilament to establish the MCAO rat model. The microdialysis probe was implanted into the striatum, and the brain microdialysis samples were collected under awake and free activity condition and were measured by UPLC-Q/TOF-MS in positive and negative ion mode respectively. Multivariate statistics were used to establish the metabonomics model. **Results** Brain-targeted metabolomics studies based on microdialysis samples were successfully performed. Metabolomics models could clearly distinguish normal and model rats, and seven differential metabolites were identified. **Conclusion** The brain metabolism characteristics of MCAO rats had changed significantly. The metabolomics research based on microdialysis technology enriches the research methods of metabolomics.

Key words: MCAO; microdialysis technique; UPLC-Q/TOF-MS; striatum; metabonomics

缺血性脑卒中是多种机制共同参与的复杂病理生理学过程, 成为中老年人健康的一大威胁^[1], 其较高的发病率和致残率严重降低了中老年人的生活质量, 早发现、早预防、早治疗有重要意义。代谢组学借助现代化分析仪器对相对分子质量小于 1 000 的内源性小分子物质进行全面检测^[2], 通过对比缺血性脑卒中代谢物的整体轮廓, 借助多元统计方法, 有助于发现生物标志物, 用于其早期诊断、预后判断、药效评价、代谢轨迹分析等, 成为缺血性脑卒

中的有力研究手段。

脑组织是缺血性脑卒中的直接发病部位, 也是主要影响部位, 以其进行代谢组学研究能直接反映发病过程对内源性代谢物的影响。鉴于直接进行人脑组织代谢组学研究的高难度和高风险, 目前常采用动物模型进行缺血性脑卒中研究, 大脑中动脉栓塞(MCAO)^[3]大鼠模型是缺血性脑卒中的理想动物模型。

微透析技术是新型生物采样技术, 借助于立体

收稿日期: 2019-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673889); 国家自然科学基金资助项目(81873227); 广东省科技计划项目(2014A020221102)

作者简介: 韦园诗, 女, 硕士研究生。E-mail: gzytcm2016@163.com

*通信作者 张英丰, 男, 副教授。Tel: (020)39358043 E-mail: zyfeng-2006@163.com

定位仪将微透析探针精准植入到脑某一特定位点,能够直接获取脑组织细胞外液的代谢物样本,具有常规代谢组学方法所不具备的独特优势,在代谢组学领域具有极大的应用潜力,目前国内基于微透析技术的代谢组学研究报道较少。

本研究将微透析采样技术与超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF-MS)分析技术相结合,借助非靶向代谢组学研究策略开展了正常大鼠与 MCAO 模型大鼠脑组织中的差异代谢组研究。通过线栓植入大鼠大脑中动脉以复制 MCAO 大鼠模型,脑纹状体微透析采样,UPLC-Q/TOF-MS 测定微透析样品,研究正常与模型组大鼠脑局部的代谢组学特征的差异性,以期缺血性脑卒中研究提供借鉴。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q/TOF-MS,日本岛津 LC-30AD 超高效液相,含 SIL-30AC 自动进样器,CTO-20AC 柱温箱;AB SCEIX Triple™ TOF 5600⁺飞行时间质谱,美国 AB/SCEIX 公司,含 Analyst TF 1.7 工作站,PeakView、MarkerView 软件);脑微透析采样系统[含灌注泵、大鼠单臂脑立体定位仪、颅钻、动物体温维持装置、清醒动物活动装置、低温自动收集装置,CMA 12 脑微透析探针(膜长 4 mm,相对分子质量截留值 20 000)],瑞典 CMA 公司;MDFC8V -80 °C 超低温冰箱(日本 Panasonic 公司)。

1.2 试剂

乙腈(色谱纯,霍尼韦尔公司);实验用超纯水通过 MILLI-Q 系统获得。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠购于广州中医药大学动物实验中心,体质量 300~350 g,动物生产许可证号 SCXK(粤)2013-0020。

2 方法

2.1 大鼠分组与脑部植入微透析探针引导管

300~350 g 雄性 SD 大鼠 12 只,随机分为对照组和模型组各 6 只。大鼠水合氯醛麻醉后转移至脑立体定位仪,固定大鼠头部,动物体温维持装置保持大鼠体温 37 °C。暴露颅骨骨缝,按大鼠脑立体定位图谱,以十字形前囟为定位基点,定位坐标:右侧大脑纹状体,AP -0.2 mm;ML +3.0 mm。定位后用颅钻打直径 1.2 mm 的小孔,并在打孔处周围

续钻 2 个孔使成三角形,后 2 孔各植入 1 枚螺钉,将引导管固定在立体定位仪垂直臂上,以硬脑膜为标准向下垂直插入至规定深度(DV -3.2 mm)。玻璃水门汀固定引导管干燥硬结后,缝合皮肤,注射青链霉素防止感染,将大鼠放于清醒活动装置中适应性饲养。

2.2 大鼠 MCAO 模型制备

根据文献方法^[4-6],模型组大鼠大脑中动脉植入线栓以复制 MCAO 模型。给予青链霉素抗感染并采取营养支持措施,以度过术后危险期。模型组大鼠造模全部成功,神经行为学评分在 1~2 分,随即进行脑微透析采样。

2.3 大鼠脑微透析采样

造模后第 7 天,对照组和模型组大鼠禁食 12 h,自由饮水,拔出微透析引导管管心针,将脑探针植入并固定于大鼠纹状体,大鼠转移至清醒动物活动装置内,调整杆臂角度使其可自由活动,人工脑脊液以 1.5 μ L/min 恒速灌流,弃去前 1 h 透析液,4 °C 下继续收集透析液约 90 μ L。对照组无需造模,在相同时间点亦收集脑纹状体微透析液约 90 μ L, -80 °C 冻存。实验结束后验证探针植入位置,并进行脑组织 TTC 染色观察脑梗死区,以造模成功及探针插入部位准确者作为有效样本。本研究对照组和模型组有效样本均为 6 只。

2.4 MCAO 大鼠脑微透析样品的代谢组学研究

2.4.1 液质联用条件

(1) UPLC 色谱条件: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m, 含保护柱)。柱温 30 °C,样品室温度 4 °C。流动相 A: 水(含 0.1%甲酸),B: 乙腈(含 0.1%甲酸)。体积流量 0.3 mL/min;梯度条件: 0~3 min, 80%~65% A; 3~5 min, 65%~55% A; 5~8 min, 55%~40% A; 8~10 min, 40% A; 10~12 min, 40%~80% A; 12~15 min, 80% A。

(2) 质谱条件: 在全扫获得一级谱图的同时进行数据相关采集模式(IDA)获得二级谱图。正、负离子模式一级质谱扫描范围为 m/z 100~2 000,质量偏差为 0.05,二级质谱采用 high sensitivity 模式,扫描范围为 m/z 50~2 000。正、负离子模式一、二级质谱离子源雾化气 GS1 和辅助气 GS2 压力均为 55 Pa,气帘气压力均为 35 Pa,温度均为 500 °C。正离子模式一、二级质谱喷雾电压(ISVF)为 4 500 V,去簇电压(DP)均为 100 V,一级质谱碰撞能

(CE) 为 10 eV, 二级质谱碰撞能为 45 eV。负离子模式一、二级质谱 ISVF 为-4 500 V, DP 均为-100 V, 一级质谱 CE 为-10 eV, 二级质谱 CE 为-45 eV。

(3) 样品分析: 脑微透析样品无需前处理, 直接进样分析。4 °C 自然解冻后, 置于内插管中, 正、负离子模式下各进样 3 μ L。

2.4.2 代谢组学数据处理 采用 PeakView Software、MarkerView 软件进行代谢组学数据前处理, 生成正、负离子模式下的样品名-(质荷比-保留时间数据对)-离子强度的三维矩阵。正离子模式得到 5 375 个变量, 负离子模式得到 3 731 个变量。导入 SIMCA-P14.1 软件 (瑞典 Umetrics 公司), 采用 Hotelling's T2 及 DModX 模型筛选异常样本。

采用 Pareto 标度法对对照组和模型组数据拟合正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模型, 提取主成分, 以 R^2 (cum) (表示所解释的模型差异)、 Q^2 (cum) (表示所预测的模型差异) 作为代谢组学模型优劣的标准, 结合得分图及层次聚类分析 (HCA) 图, 评价两组之间的差异性。

经过代谢组学数据分析, 以变量重要性投影值 (VIP) > 1、Jack-knife 不确定区间不跨越零点、S 型图 (S-plot) 中与第一主成分的皮尔逊相关系数 $|P_{corr}|$ 超过临界值为差异代谢物的入选标准。通过 S-plot、VIP 图, 识别差异代谢物。采用 SPSS 24 软件 (美国 IBM 公司) 进行差异代谢物的 Student's t -test 分析, 以 $P < 0.05$ 视为具有显著性, 并计算变异倍数 (FC)。

依据偶氮原则和精确 m/z 匹配外, 结合二级质谱解析、正负离子交互验证模式、同位素比对等信息鉴定差异代谢物结构, 并检索 Lipidmaps、HMDB、METLIN 等互联网数据库。

3 结果

3.1 大鼠脑微透析样品纹状体代谢物的分离

大鼠脑微透析样品纹状体代谢物分离良好, 正、负离子模式下对照组与模型组间存在差异。由于代谢组学研究所测定的绝大部分为无差异的内源性物质, 具有生物标志物潜力的差异代谢物为极少部分, 相同离子模式下色谱图具有相似性。UPLC-Q/TOF-MS 总离子流图见图 1、2。

3.2 差异样本筛选

Hotelling's T2 图纵坐标反映了每个样本与模型得分空间的距离, 以超越 95% 临界值 [T2Crit (95%)] 为可疑, 以超越 99% 临界值 [T2Crit (99%)]

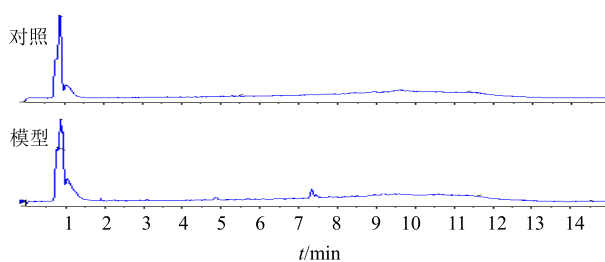


图 1 大鼠脑微透析样品正离子模式 UPLC-Q/TOF-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of rat brain microdialysis sample under positive ion mode

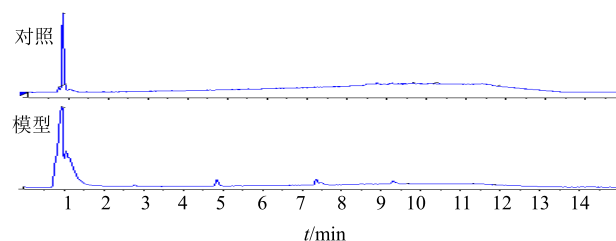


图 2 大鼠脑微透析样品负离子模式 UPLC-Q/TOF MS 总离子流图

Fig. 2 Total ion flow diagram of rat brain microdialysis sample under negative ion mode

为高度可疑。DModX 图以超过临界值 [Dcrit (0.05)] 2 倍可判定为异常值。结果表明, 正、负离子模式下对照组和模型组各样本均不超越 [T2Crit (95%)], [Dcrit (0.05)] 等临界值, 样本质量较高, 模型复制、探针植入等流程操作细节得到了严格控制, 不存在异常样本, 研究结果真正体现了缺血与否对大鼠脑纹状体内源性代谢物的影响。故对照组和模型组大鼠各 6 只均参与建立代谢组学模型。结果见图 3、4。

3.3 代谢组学分析

正、负离子模式下模型组与对照组样本代谢组学数据进行 OPLS-DA 处理, 按照 R^2 (cum) > 0.5、 Q^2 (cum) > 0.5, 充分提取了组间的差异信息, 成功建立代谢组学模型。得分图 (图 5) 显示正、负离子模式下对照组与模型组样本分别位于得分空间两侧, 组内样本相对集中, 组间样本显著分离, 显示 MCAO 造模对大鼠脑纹状体产生了实质性损伤, 引发了内源性代谢物在脑纹状体内的紊乱与失衡。HCA (图 6) 显示, 正、负离子模式下对照组和模型组组内样本代谢特征较为接近, 样本变异与波动较小, 组间距离较远, 明显分为 2 类, 且正离子模式略优于负离子模式。S-plot (图 7) 是 OPLS-DA 模型的

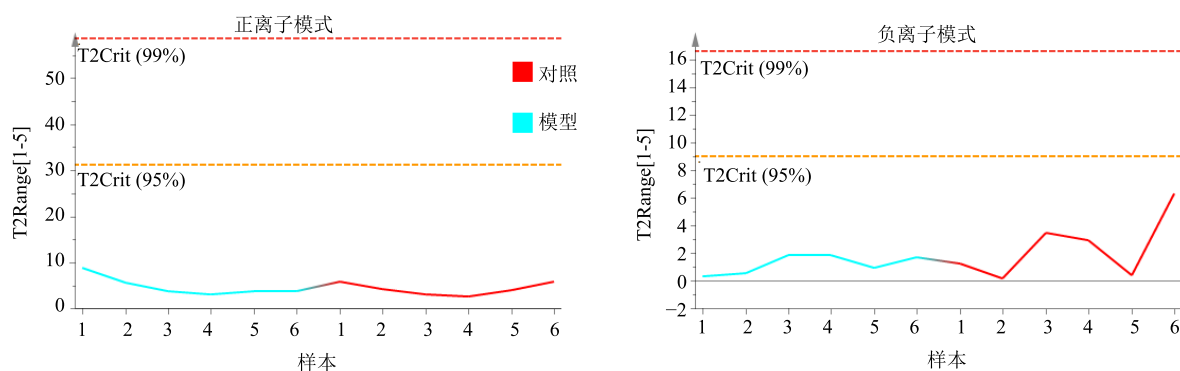


图 3 大鼠脑微透析样品代谢组学 Hotelling's T2 图

Fig. 3 Metabonomics Hotelling's T2 diagram of rat brain microdialysis sample

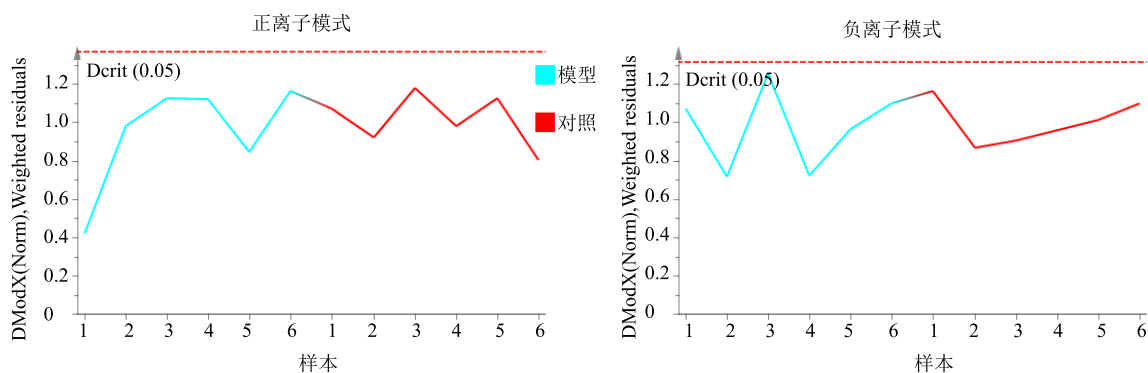


图 4 大鼠脑微透析样品代谢组学 DModX 图

Fig. 4 Metabonomics DModX diagram of rat brain microdialysis sample

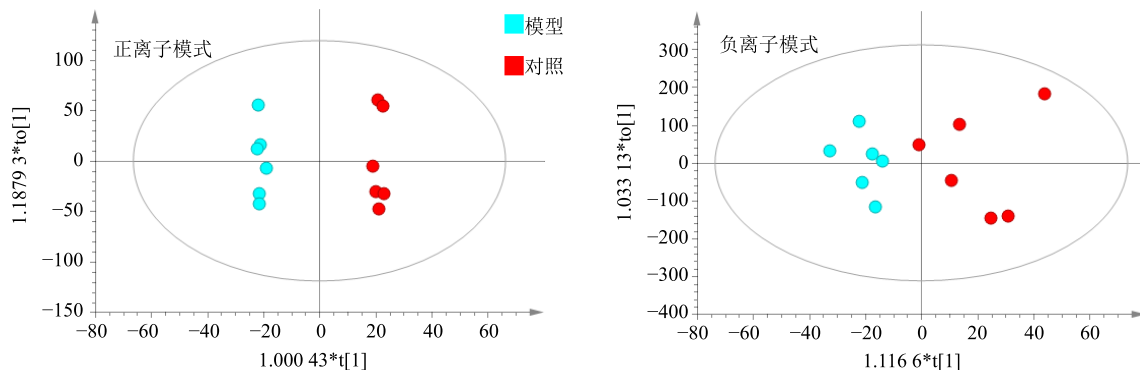


图 5 大鼠脑微透析样品代谢组学得分图

Fig. 5 Metabonomics scores plot of rat brain microdialysis sample

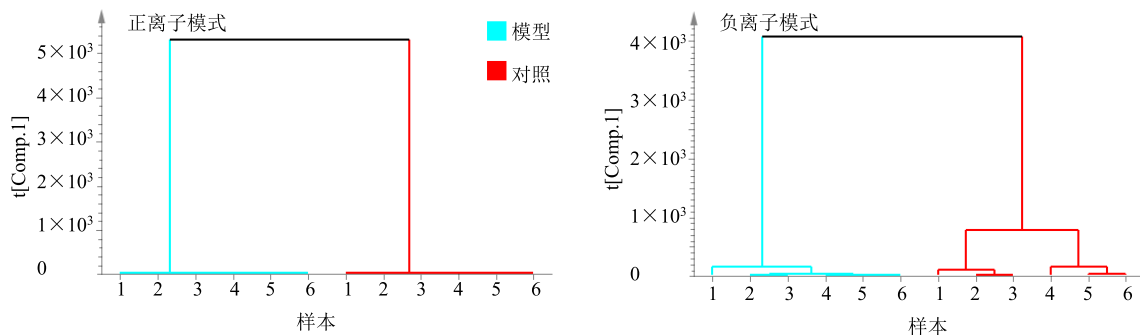


图 6 大鼠脑微透析样品代谢组学层次聚类分析图

Fig. 6 Metabonomics hierarchical clustering analysis plot of rat brain microdialysis sample

特征性分析图,也是对差异代谢物判断最有价值和帮助的分析图。代谢物距离 S-plot 中心越远越有可能是对 MCAO 大鼠模型脑纹状体代谢特征紊乱贡献最大的代谢物,也是显著区分对照组与模型组的差异代谢物,据此初步筛选出差异代谢物。VIP 图(图 8)以

VIP 值为纵坐标,所检测到的代谢物为横坐标,根据其 VIP 值大小依次绘制而得,VIP>1 是差异代谢物的判断标准之一,通过多指标综合分析筛选出差异代谢物。代谢组学分析结果见图 5~8,模型组与对照组的差异代谢物见表 1。

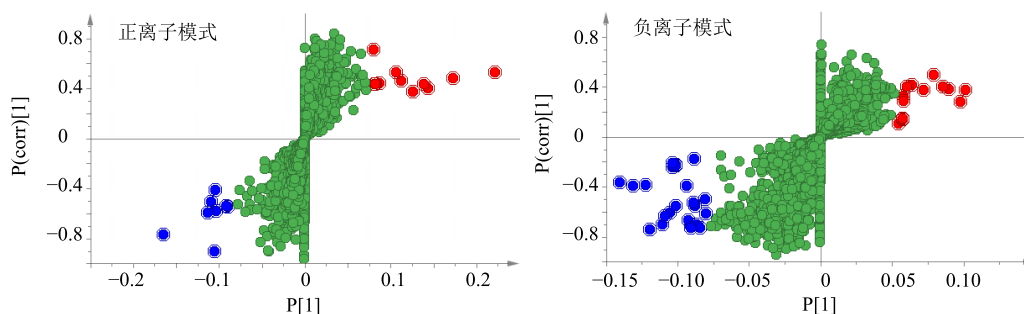


图 7 大鼠脑微透析样品代谢组学 S-plot

Fig. 7 Metabonomics S-plot of rat brain microdialysis sample

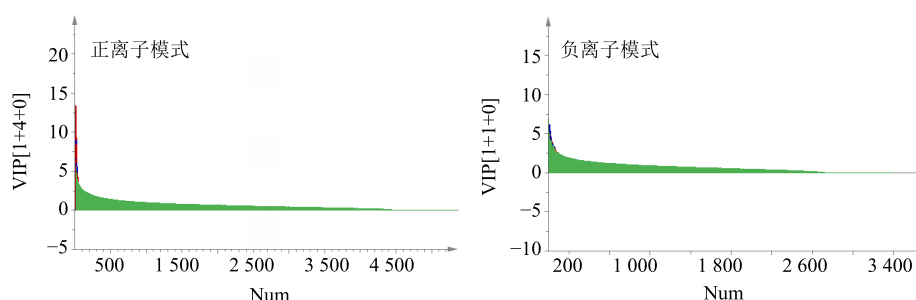


图 8 大鼠脑微透析样品代谢组学 VIP 图

Fig. 8 Metabonomics VIP plot of rat brain microdialysis sample

表 1 基于 UPLC-Q/TOF-MS 鉴定的差异代谢物

Table 1 Differential metabolites identified by UPLC-Q/TOF-MS

模式	t/min	质荷比 (m/z)		偏差/ ($\times 10^{-6}$)	分子式	差异代谢物	加合离子	$ P_{corr} $	VIP	变化 倍数	趋势*
		实测	理论								
正离子 模式	7.78	241.140 4	241.141 6	-4.97	$C_{14}H_{18}O_3$	(2Z)-7-hydroxy-2-(phenylmethylidene) heptanoate	$[M+Li]^+$	0.55	7.95	0.064	↓
	1.46	132.101 3	132.101 9	-4.54	$C_6H_{13}NO_2$	leucine	$[M+H]^+$	0.59	7.19	2.345	↑
	10.43	318.299 4	318.300 3	-2.83	$C_{18}H_{40}NO_3$	phosphatidylcholine	$[M+H]^+$	0.90	6.55	16.905	↑
	7.33	354.119 6	354.118 3	3.67	$C_{16}H_{16}O_8$	3-O-caffeoylshikimic acid	$[M+NH_4]^+$	0.70	8.15	49.331	↑
	9.66	274.273 2	274.274 0	2.91	$C_{16}H_{36}NO_2$	C16 sphinganine	$[M+H]^+$	0.63	6.84	68.585	↑
负离子 模式	3.10	123.045 9	123.045 2	5.69	$C_7H_8O_2$	1-(2-furanyl)-1-propanone	$[M-H]^-$	0.67	3.23	0.126	↓
	9.90	242.175 3	242.176 2	-3.72	$C_{13}H_{25}NO_3$	N-undecanoylglycine	$[M-H]^-$	0.61	3.41	0.535	↓

*模型组与对照组比较

*model group vs control group

4 讨论

由于人脑研究的伦理学制约和巨大的现实困难及不可控制的风险,难以直接采用脑组织进行研究,目前临床上多采用脑成像技术等非创伤性方法。大鼠 MCAO 法通过一定规格的线栓植入大鼠大脑中动脉阻塞脑组织血液和养分供应,导致缺血缺氧损

伤并激活炎症因子、细胞凋亡、焦亡、自噬,继而激活各种信号通路引发一系列脑缺血症状。MCAO 大鼠因其发病机制、病理生理学特征及疾病症状与人的高度相似性成为缺血性脑卒中研究常用的动物模型。通过线栓规格、前处理及植入手法的标准化,精细的术后护理和完善的营养支持措施大大提高了

MCAO 大鼠模型成功率。

脑微透析技术能够对脑组织特定定位点进行组织靶向性代谢组学研究。研究过程中,脑引导管及探针植入细节非常关键,由于脑探针前端为较柔软,需要提前植入引导管,在其保护下小心植入探针。在立体定位仪的引导下,引导管的硬质前端刚刚触及纹状体表面而未引起任何损伤,相当于位于脑组织间隙,故完全不影响大鼠生理功能,可以存活数月甚至更久。探针植入后,探针膜从引导管前端探出,整体没入纹状体中,从而有效采集纹状体的组织间液。本研究为了避免植入引导管影响代谢组学特征,故需提前植入引导管。

代谢组学研究的样本有血液^[7]、尿液^[8]、粪便^[9]、组织液、各种组织器官、细胞培养液^[10]等。血液、尿液因其易于获取、机体影响较小等原因成为当前应用最广泛的生物样本,代表了机体在特定时间点、特定功能状态下机体的整体轮廓,其所含丰富的代谢物通常可体现机体的整体状态。频繁采血存在血容量减少及带来的应激创伤可能影响代谢轮廓的制约,尿液受到机体排泄速率的限制,无法以较高频率实现采样,对于动物实验更是如此,难以准确控制采样间隔。

进行代谢组学研究时生物样本的代表性极为关键。不同的疾病类型、不同的机体状态生物样本的代表性不一样。进行泌尿系统疾病的代谢组学研究时,泌尿系统产生的代谢物随尿液排出,与血液相比与疾病的联系更加紧密。神经系统疾病脑脊液比血液、尿液具有代表性,与病患部位的关联性更高。研究发现抑郁症患者海马、黑质、纹状体等脑组织多种脑神经递质明显紊乱,而血液中无论神经递质的含量还是种类,变化的程度远远低于脑组织。内源性代谢物的产生受到病变局部的直接影响,病变局部产生的代谢物与病变存在高度相关性。代谢物经转运、输送并出现在血液和尿液中,代谢物浓度、种类、相对含量发生了改变,相当于受到组织滤过其变化趋势更加平滑,甚至存在滞后效应。对于发病部位在局部、影响部位在局部的疾病,局部组织及组织液的代谢组学相比血液、尿液更能反映疾病发生、发展及药物干预的总体变化。对于存在血脑屏障、与机体其他部位物质交换相对受限、整体环境相对封闭的脑组织而言,脑组织代谢组学对于脑病研究更有意义。

微透析技术是具有“实时、活体、动态、微创”

特征的新型生物采样技术^[11-12],通过将具有类似“人工血管”性质的微透析探针植入到特定部位,内部灌流液与组织液组成、离子强度、渗透压、pH 值高度相似的灌流液,模拟物质在血液-组织间穿越血管壁的物质交换过程,被采样物质借助于组织液-灌流液的浓度差,以浓度梯度为扩散原动力穿越具有半透膜特性的探针膜,被灌流液带出,从而实现采样目的。微透析技术自诞生之初主要应用于脑组织采样,尽管目前其应用范围、采样对象有了极大的延伸或拓展,但脑微透析采样是最基本也是最成熟的应用领域^[13-14]。

良好的空间分辨率决定了微透析技术最突出的优点是部位特异性采样,而且是在对机体内环境扰动最小的背景下实现。所采用的水性灌流液与机体内源性代谢物高极性特征一致,意味着其不仅能实现神经递质等内源性物质、药物等外源性物质采样,也能够进行种类多样、组成复杂的代谢组学研究采样,在代谢组学领域内具有极高的应用价值。基于微透析技术的代谢组学研究能够实现组织靶向性代谢组学研究^[15-19],具有血液、尿液样品及组织活检等方法所难以比拟的巨大优势,国内尚少有开展此类研究的报道。

本研究将微透析技术应用于 MCAO 大鼠脑纹状体采样,结合 UPLC-Q/TOF-MS 成功地进行了微透析样品的代谢组学研究。得分图及层次聚类分析图显示对照组和模型组的代谢组学特征存在明显差异,表明 MCAO 严重改变了脑组织的代谢物成分的相对含量,据此发现的差异代谢物有可能是缺血性脑卒中的生物标志物,为后续药动学-药效学结合模型(PK-PD)研究奠定了基础。造模后大鼠体质量急剧下降,5~6 d 后体质量止跌趋稳,意味着脑缺血带来的损伤经过急性期过度到稳定期,生命体征在新的基础上达到平衡,在此时间点进行代谢组学研究,结果具有代表性。由于微透析样品高盐分的制约,本研究只比较了造模后第 7 天对照组与模型组的差异性。在后续研究中,通过去除微透析样品中盐分,比较造模后不同时间点的代谢组学特征,能够获得缺血性脑卒中特定脑区代谢轮廓的变化趋势。

参考文献

- [1] 樊文香. 缺血性脑卒中的机制研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(6): 751-759.
- [2] Nicholson J K, Wilson I D. Understanding ‘global’

- systems biology: Metabonomics and the continuum of metabolism [J]. *Nat Rev Drug Dis*, 2003, doi: 10.1038/nrd1157.
- [3] 陈国仙, 钱大青, 柴智明, 等. 三种线栓制备大鼠 MCAO 模型的比较 [J]. 包头医学院学报, 2018, 34(7): 72-74.
- [4] Rousselet E, Kriz J, Seidah N G. Mouse model of intraluminal MCAO: Cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining [J]. *J Visual Exp*, 2012, doi: 10.3791/4038.
- [5] Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, *et al.* Modeling stroke in mice-middle cerebral artery occlusion with the filament model [J]. *J Visual Exp*, 2011, doi: 10.3791/2423.
- [6] Belayev L, Alonso O F, Busto R Z, *et al.* Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model [J]. *Stroke*, 1996, 27(9): 1616-1622.
- [7] Rocha C M, Carrola J, Barros A S, *et al.* Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabonomics of blood plasma [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(9): 4314-4324.
- [8] Wang Y F, Sun W T, Zheng J L, *et al.* Urinary metabonomic study of patients with acute coronary syndrome using UPLC-QTOF/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1100(15): 122-130.
- [9] Chen R Q, Liao C B, Guo Q, *et al.* Combined systems pharmacology and fecal metabonomics to study the biomarkers and therapeutic mechanism of type 2 diabetic nephropathy treated with astragalus and leech [J]. *RSC Adv*, 2018, doi: 10.1039/C8RA04358B.
- [10] Liu M C, Gong X H, Quan Y Y, *et al.* A cell-based metabonomics approach to investigate the varied influences of chrysophanol-8-O- β -D-glucoside with different concentrations on L-02 cells [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01530.
- [11] Margareta H U. Microdialysis as an important technique in systems pharmacology-a historical and methodological review [J]. *AAPS J*, 2017, 19(5): 1294-1303.
- [12] Nandi P, Lunte S M. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 651(1): 1-14.
- [13] Yusuke M, Yuki F, Sakiko N. Brain microdialysis study of vancomycin in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration in mice [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2019, doi: 10.1208/s12249-018-1232-8.
- [14] Oddo M, Hutchinson P J. Understanding and monitoring brain injury: The role of cerebral microdialysis [J]. *Int Care Med*, 2018, 44(11): 1945-1948.
- [15] Bongaerts J, De Bundel D, Mangelings D, *et al.* Sensitive targeted methods for brain metabolomic studies in microdialysis samples [J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2018.08.043.
- [16] Olga H, Michael A S, Perera P R, *et al.* Application of metabonomics to investigate the process of human orthotopic liver transplantation: A proof-of-principle study [J]. *J Integr Biol*, 2010, 14(2): 143-150.
- [17] Price K E, Lunte C E, Larive C K. Development of tissue targeted metabonomics. Part 1. Analytical considerations [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(4): 737-747.
- [18] Price K E, Vandaveer S S, Lunte C E, *et al.* Tissue targeted metabonomics: Metabolic profiling by microdialysis sampling and microcoil NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, doi: 10.1016/j.jpba.2005.02.034.
- [19] Price K E, Larive C K, Lunte C E. Tissue-targeted metabonomics: Biological considerations and application to doxorubicin-induced hepatic oxidative stress [J]. *Metabonomics*, 2009, 5(2): 219-228.