

参葛补肾胶囊中葛根素和淫羊藿苷小鼠体内动力学 脑海马分布及其相关蛋白动态表达的相关性研究*

王卫华^{1,2}, 雷帆¹, 李成功³, 孙虹⁴, 胡时先³, 邢东明¹, 任宾³, 郝娟³, 杜力军^{1**}

(1. 清华大学 生命科学学院, 北京 100084; 2. 清华大学 药学技术中心, 北京 100084; 3. 新疆华春生物药业股份有限公司 药业研发中心, 乌鲁木齐 830000; 4. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100094)

摘要 目的:研究参葛补肾胶囊中葛根素和淫羊藿苷在小鼠血浆及脑内海马核团动力学和海马抑郁症相关蛋白表达的变化,探讨参葛补肾胶囊体内药代动力学变化及其与海马相关蛋白表达的相关性。**方法:**运用 UPLC-MS/MS-ABSCIEX QTRAP 5500 三重四极杆串联线性离子阱质谱方法,采用 Waters ACQUITY HSS T3 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱,以 0.05% 甲酸水-含 0.05% 甲酸的乙腈甲醇溶液(1:1)为流动相梯度洗脱,流速 0.2 mL · min⁻¹,采用电喷雾离子源,在负离子模式下对正常小鼠灌胃后不同时间点的血浆及海马中葛根素、淫羊藿苷测试分析。用 Western blot 方法表达海马蛋白。**结果:**口服给药后血浆和海马均检测到葛根素和淫羊藿苷,其中血浆葛根素半衰期($t_{1/2}$)为 2.45 h,淫羊藿苷 $t_{1/2}$ 为 3.59 h;海马葛根素 $t_{1/2}$ 为 4.37 h,淫羊藿苷 $t_{1/2}$ 为 8.5 h。葛根素血浆浓度占给药量的 27.3%,淫羊藿苷血浆浓度占给药量的 1.34%。海马葛根素占吸收入血葛根素的 2.47%,海马淫羊藿苷占吸收入血淫羊藿苷的 73.56%。给药后海马神经元限制性沉默因子(NRSF)、脑源性神经营养因子(BDNF)及其下游原肌球蛋白相关激酶受体 B(TrkB)、溶质载体转运体 6a4(SLC6A4)、糖皮质激素受体(GR)、μ 阿片受体(MOR)等蛋白表达出现不同程度的上调,其中淫羊藿苷与 NRSF 表达呈现明显负相关,葛根素与 BDNF-TrkB、MOR 表现出明显正相关,GR 则无明显相关性。**结论:**小鼠口服参葛补肾胶囊后,葛根素和淫羊藿苷均能进吸收进入血液且分布于海马,淫羊藿苷较葛根素更易透过血脑屏障并在海马分布。海马相关蛋白表达与葛根素、淫羊藿苷浓度变化呈现一定的相关性,提示 2 个成分的作用靶点与这些蛋白有关。本研究为参葛补肾胶囊药代动力学及其抗抑郁作用的物质基础提供了重要的实验依据。

关键词:葛根素;淫羊藿苷;药代动力学;海马;蛋白表达;超高效液相色谱-质谱联用;参葛补肾胶囊;抗抑郁

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)11-1909-14

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0423

Study on the pharmacokinetics and the correlation between distribution of puerarin-icariin and dynamic expression of proteins in mouse hippocampus after oral administration of Shenge Bushen capsules*

WANG Wei-hua^{1,2}, LEI Fan¹, LI Cheng-gong³, SUN Hong⁴,
HU Shi-xian³, XING Dong-ming¹, REN Bin³, HAO Juan³, DU Li-jun^{1**}

(1. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Center of Pharmaceutical Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 3. Center of Pharmaceutical R&D, Xinjiang Huachun Pharmaceutical Company, Urumqi 830000, China; 4. Institute of Medicinal Plant and Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract Objective: To study the dynamic changes of puerarin and icariin in plasma and hippocampus of mice,

* 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09731020)

** 通信作者 Tel:13810460205;E-mail:lijundu@mail.tsinghua.edu.cn

第一作者 Tel:13683065406;E-mail:huaweiwang@mail.tsinghua.edu.cn

to observe the changes of depression – related protein expression in hippocampus, and to explore the pharmacokinetic changes of Shenge Bushen capsules (SBC) and its correlation with the changes of hippocampus – related protein expression. **Methods:** Puerarin and icariin in plasma and hippocampus of normal mice were analyzed by UPLC – MS/MS – ABSCIEX QTRAP 5500 triple quadrupole series linear ion trap mass spectrometry method using Waters Acquity HSS T3 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column with 0.05% formic acid water – acetonitrile – methanol (1:1) containing 0.05% formic acid as mobile phases gradient elution at a flow rate of 0.2 mL · min⁻¹ and electrospray ion source under negative ion model. The proteins in hippocampus were expressed by Western blot assay. **Results:** Puerarin and icariin were detected in plasma and hippocampus after the oral administration, including plasma puerarin $t_{1/2}$ 2.45 h, icariin $t_{1/2}$ 3.59 h, hippocampus puerarin $t_{1/2}$ 4.37 h and icariin $t_{1/2}$ 8.5 h. The plasma concentration of puerarin accounts for 27.3% and that of icariin accounts for 1.34% of the dosage taken. Puerarin in hippocampus accounts for 2.47% of puerarin absorbed into blood, while icariin in hippocampus accounts for 73.56% of icariin absorbed into blood. The expressions of restrictive silencing factor (NRSF), brain – derived neurotrophic factor (BDNF) and its downstream protein tyrosine kinase B (TrkB), solute carrier transporter 6a4 (SLC6A4), glucocorticoid receptor (GR) and μ opioid receptor (MOR) in hippocampus were all up – regulated after SBC administration, in which icariin was negatively correlated with NRSF expression, puerarin was positively correlated with BDNF – TrkB and MOR, and GR had no obvious correlation with the proteins. **Conclusions:** Puerarin and icariin can be absorbed into the blood and distributed in the hippocampus after oral administration of SBC in mice. Icariin was easier to pass through the blood – brain barrier and distribute in the hippocampus than puerarin. The expression of hippocampus – related proteins was related to the changes of puerarin and icariin concentrations, suggesting that the targets of the two components as well as SBC were related to these proteins. This study provides an important experimental basis for the pharmacokinetic study of SBC and also provides a material basis of its antidepressant effect.

Keywords: puerarin; icariin; pharmacokinetics; hippocampus; protein expression; UPLC – MS/MS; Shenge Bushen capsules; antidepressant

抑郁症是现代社会的一大类神经精神类疾病^[1-2],其发病机制虽尚未完全清晰,但是脑神经核团海马是精神类功能活动的重要神经核团,其中5 – 羟色胺(5 – HT)的改变是其主要发病机制之一^[3-5]。目前上市的抗抑郁药中,许多都是通过提高突触间隙5 – HT浓度而起作用的靶向药物^[6-7]。此外,神经元功能变化及其神经突触可塑性的改变,也能够引起脑功能尤其是海马功能的变化^[8],慢性应激则通过下丘脑 – 垂体 – 肾上腺(HPA)轴及其糖皮质激素(GC)影响海马神经元的GC受体,进而影响海马神经元的可塑性,出现抑郁症,因此,对于慢性应激影响这些神经元功能调控因子的研究也逐渐被人们所重视^[9-10]。

参葛补肾胶囊是新获批上市的中药1.1类新药,主治轻中度抑郁症,主要由太子参多糖、葛根淫羊藿总黄酮等组成,葛根素和淫羊藿苷是其主要活

性成分及质量控制成分。前期研究表明,该药具有明显的抗抑郁作用,其作用机制主要通过调控NRSF/NRSE(限制性神经抑制因子结合元件)元件,上调TPH2(色氨酸羟化酶2)表达,进而升高脑内5 – HT,最终防治抑郁症^[11]。但是,参葛补肾胶囊口服后体内动力学过程及其脑内分布尚不太清楚,为更好地了解该药的体内过程,本文选择其主要成分葛根素和淫羊藿苷,对小鼠灌胃后体内动力学以及脑海马分布等变化进行研究。

研究表明,葛根素对脑缺血再灌注损伤有较好的保护作用^[12],临床用其静脉注射液治疗脑梗死病症^[13],对于实验性大鼠脑缺血损伤所并发的卒中后抑郁均有较好的保护作用^[14],同时对于不可控因素所诱导的实验性大鼠抑郁样行为也有一定的改善作用^[15],其作用机制与抑制炎症因子^[16]、上调BDNF表达^[17]及调节肠道菌群代谢^[18]等有关;淫羊藿苷对

多种因素诱导的实验性抑郁样行为动物模型均有明显的调控作用,其作用机制与抗炎抗凋亡^[19-20]、上调脑内单胺类递质^[21]、上调 BDNF - TrkB 信号转导通路^[22-23]和磷脂酰肌醇激酶(PI3K) - 蛋白激酶 B (Akt)信号转导通路^[24]、促进海马神经元生成^[25]等有关。可见,葛根素和淫羊藿苷均具有明确的抗抑郁活性。

此外,葛根素(80 mg · kg⁻¹)小鼠腹腔注射后,利用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测发现,葛根素可以分布在脑皮质、海马和纹状体,提示其脑功能作用的物质基础^[26]。成年男性健康志愿者口服葛根提取物(2.56 g),血中葛根素达峰时间(T_{max})为1.18 h,半衰期($t_{1/2}$)为4.48 h^[27]。大鼠灌胃葛根素(100 mg · kg⁻¹)后 T_{max} 为1.46 h, $t_{1/2}$ 为1.60 h。与含等量葛根素的葛根黄酮提取物相比,提取物更能提高葛根素的生物利用度^[28]。P-糖蛋白可能是葛根素肠道吸收的逆转运体,影响其吸收^[29]。但是,体外 MDCK(狗肾细胞系)细胞模型血脑屏障实验表明,葛根素经被动扩散透过血脑屏障,它不是P-糖蛋白的底物,给药后无明显外排现象,冰片和芍药苷对促进葛根素透过血脑屏障有促进作用^[30],冰片可以通过腺苷受体促进葛根素透过血脑屏障^[31]。

给小鼠静脉注射淫羊藿苷(15 mg · kg⁻¹),血中可检测到原型物;灌胃淫羊藿苷,血中只能检测到其代谢物淫羊藿次苷 II (icariside II)^[32]。有报道大鼠连续7 d灌胃淫羊藿苷(50 mg · kg⁻¹ · d),最后1次给药后0.17 h,血中即可检测到淫羊藿苷, T_{max} 为1 h, $t_{1/2}$ 为1.68 h^[33]。大鼠灌胃淫羊藿苷,分布相半衰期($t_{1/2\alpha}$)为11 min,消除相半衰期($t_{1/2\beta}$)为51.35 min,并在脑中有分布^[34]。大鼠灌胃淫羊藿总黄酮(0.69 g · kg⁻¹),血浆淫羊藿苷 $t_{1/2}$ 为3.149 h,同时0.25 h脑内即可检测到淫羊藿苷, T_{max} 为0.5 h,雄性大鼠脑内分布多于雌性大鼠^[35]。大鼠灌胃淫羊藿苷元(10 mg · kg⁻¹),血浆 T_{max} 为0.292 h, $t_{1/2}$ 为0.812 h,并能在脑内分布^[36]。淫羊藿苷元口服通过被动扩散和主动转运2种机制吸收,其中被动扩散能力弱,主动转运包括外排转运蛋白BCRP(乳腺癌耐药蛋白)的外排和摄入转运蛋白OATP2B1(有机阴离子转运多肽2B1)共同介导,且对肠道外排转运蛋白无诱导表达功能^[37]。由此可见,无论是淫羊藿苷,还是总黄酮提取物,灌胃后均可以在血及脑内测到淫羊

藿苷。

基于以上报道,本文对参葛补肾胶囊给小鼠灌胃后血中葛根素和淫羊藿苷的动力学变化、海马分布,以及海马 NRSF、BDNF、SLC6A4 等与抑郁相关功能蛋白表达进行了研究,为探讨参葛补肾胶囊药物代谢动力学及其抗抑郁作用的机制提供参考。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

二月龄雄性 ICR 小鼠,体质量(22.41 ± 0.18)g,北京大学医学部(实验动物科学部),合格证号 SCXK(京)2019-0010。实验小鼠饲养于清华大学实验动物中心,12 h/12 h 固定明暗周期,相对湿度 50% ± 5%,温度(22 ± 2)℃。实验方案经清华大学实验动物伦理委员会审定(23-XDMI-230308)。

1.2 试药与试剂

参葛补肾胶囊(批号 21002,规格为每粒 0.32 g,其中每粒含葛根素 21.9 mg、淫羊藿苷 2.8 mg),由新疆华春生物药业股份有限公司提供,用时以蒸馏水配制成相应浓度。葛根素(批号 752-200108)、淫羊藿苷(批号 0737-9910)的对照品均购自中国食品药品检定研究院;内标尼莫地平(货号 6608-59-4)购自 Sigma-Aldrich 上海分公司。NRSF 一抗(货号 BS2590R)购自北京博奥森生物技术公司;SLC6a4(货号 YT6176)一抗购自 ImmunoWay 苏州生物科技分公司;MOR(货号 ab134054)、BDNF(货号 ab108319)、TrkB(货号 ab187041)、GR(货号 ab183127)等一抗均购自 Abcam 上海分公司; β -actin(β -肌动蛋白)(货号 SC-4778)购自北京 Santa Cruz 科技公司。用于二抗的羊抗鼠 IgG-HRP(货号 A0216)和羊抗兔 IgG-HRP(货号 80931120)试剂均购自北京中杉金桥生物公司。RIPA(放射免疫沉淀法)蛋白裂解液(货号 P0013D)和超敏发光液均购自上海碧云天生物技术有限公司,二氟乙酰膜(PVDF)购自墨西哥 BioTrace 生物公司。甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯,购自 Thermo Fisher Scientific 上海分公司。

1.3 仪器

Bio-Rad 电泳仪和转膜仪(BioRad 公司),FR 凝胶成像仪(上海复日科技有限公司),Eppendorf 低温高速离心机(Eppendorf 公司);OSE-PRO(0~100℃)金属浴(北京天根生化科技公司);UP-LC-MS/MS(配有 ABSCIEX Exion LC AD)超高效液相色谱及 ABSCIEX QTRAP 5500 三重四级杆串联线

性离子阱质谱(SCIEX公司)。

2 方法与结果

2.1 生物样品处理

取小鼠血浆(300 $\mu\text{L} \cdot \text{只}^{-1}$),加入甲醇1.2 mL,涡旋震荡30 s后超声(800 W, 50 Hz)30 min,12 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (4 $^{\circ}\text{C}$)离心10 min,取上清置于金属浴45 $^{\circ}\text{C}$ 挥干,即得血浆样品,备用。分别称取小鼠脑海马组织(50 $\text{mg} \cdot \text{只}^{-1}$),于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存以备蛋白表达所用,其余的进行合并(由于海马组织较少,故以组为单位进行合并)后,称量,将其置于玻璃匀浆器内,每样加入4倍(w/v)甲醇,同时加入内标,匀浆,将匀浆液置于离心管内,12 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (4 $^{\circ}\text{C}$)离心10 min,取上清,沉淀部分再用相同体积的甲醇匀浆,离心(条件同前),取上清并与前次上清合并,置金属浴45 $^{\circ}\text{C}$ 挥干甲醇,即得海马样品,备测。

血浆样品加入50%甲醇溶液60 μL ,海马样品加入50%甲醇溶液100 μL ,分别涡旋3 min后,800 W,50 Hz超声10 min,取上清于离心管内,将离心管置于

离心机,13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ (4 $^{\circ}\text{C}$)离心10 min,定量吸取上清液(每份血浆样品加甲醇45 μL ,每份海马样品加甲醇65 μL)放入干净的样品瓶中进行检测。

2.2 色谱-质谱条件及检测结果

采用Waters ACQUITY HSS T3(50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱,流动相A为含有0.05%的乙腈甲醇溶液(1:1),流动相B为含有0.05%甲酸的水溶液,梯度洗脱(0~3 min,20% A \rightarrow 60% A;3~5 min,60% A \rightarrow 100% A;5~7 min,100% A \rightarrow 100% A;7~10 min,100% A \rightarrow 20% A),流速0.2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样体积5 μL ,柱温40 $^{\circ}\text{C}$,自动进样器温度10 $^{\circ}\text{C}$ 。

电喷雾离子源(ESI),根据化合物采用负离子模式,多反应监测总离子流(MRM),离子源温度500 $^{\circ}\text{C}$,气帘气207 kPa,碰撞气(CAD)为9 V,离子电压为-4 500 V,喷雾气和辅助加热气分别为379 kPa。质谱参数见表1。质谱数据采用Analyst Software 1.6.3软件进行化合物采集,采用SCIEX OS1.6.1软件(SCIEX公司)进行定量数据分析。

表1 内标及其检测成分的质谱参数

Tab. 1 Mass spectrometry parameters of internal standard and the detected components

成分 (component)	母离子 (parent ion) m/z	碎片离子 (fragmention) m/z	去簇电压 (de-clustering voltage)/V	碰撞能 (collision energy)/V
内标尼莫地平[nimodipine(internal standard)]	417.3	122.1	-120	-25
葛根素(puerarin)	415.2	295	-130	-1
淫羊藿苷(icarrin)	675.3	513.2	-130	-22

对葛根素和淫羊藿苷的一级和二级质谱进行检测的结果表明(图1),葛根素母离子 m/z 为415.2,碎片离子 m/z 为295.1;淫羊藿苷母离子 m/z 为675.3,碎片离子 m/z 为513.2;内标尼莫地平母离子 m/z 为417.3,碎片离子 m/z 为122.1。葛根素对照品和血浆样品在相同保留时间出现检测峰,血浆空白样品无干扰峰(图2-A),淫羊藿苷对照品和血浆样品在相同保留时间出现检测峰,空白对照则无干扰峰(图2-B)。在相同保留时间内,葛根素对照品和海马样品均出现检测峰,空白对照则无干扰峰(图3-A);淫羊藿苷对照品和海马样品均在相同保留时间出现检测峰,空白对照无干扰峰(图3-B)。

2.3 线性关系考察

分别取空白血浆样品和空白海马样品,加入葛根素、淫羊藿苷和内标对照品,使空白血浆样品中葛

根素终质量浓度为1、2、5、10、20、50、200、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,空白海马样品中葛根素终质量浓度为1、2、5、10、20、50、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,空白血浆样品中淫羊藿苷终质量浓度为1、2、5、10、20、50、100、200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,空白海马样品中淫羊藿苷终质量浓度为1、2、10、20、50、100、200、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,内标对照品终质量浓度为5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。按照“2.2”项下方法进行样品处理并定容,采用内标法定量检测。以所测化合物的峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,浓度与内标浓度的比值为横坐标,进行加权线性回归。取进样量10倍信噪比的比值为定量限(LOQ),结果见表2。

2.4 分析方法考察

参考文献[38],血浆取0.3、15、400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,海马取0.3、15、160 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,对该药血药浓度及其海马组织分布检测的相关方法学进行考察。

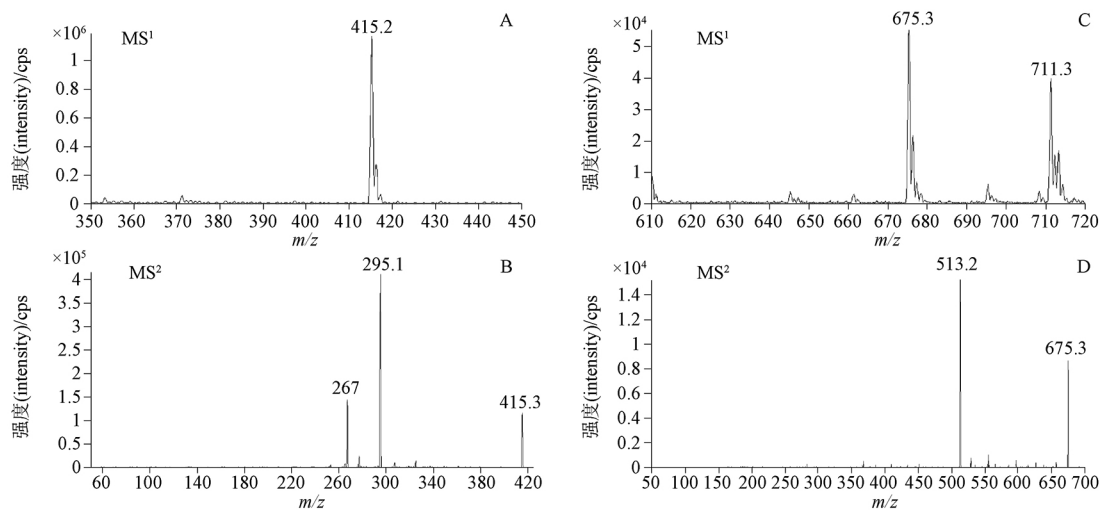
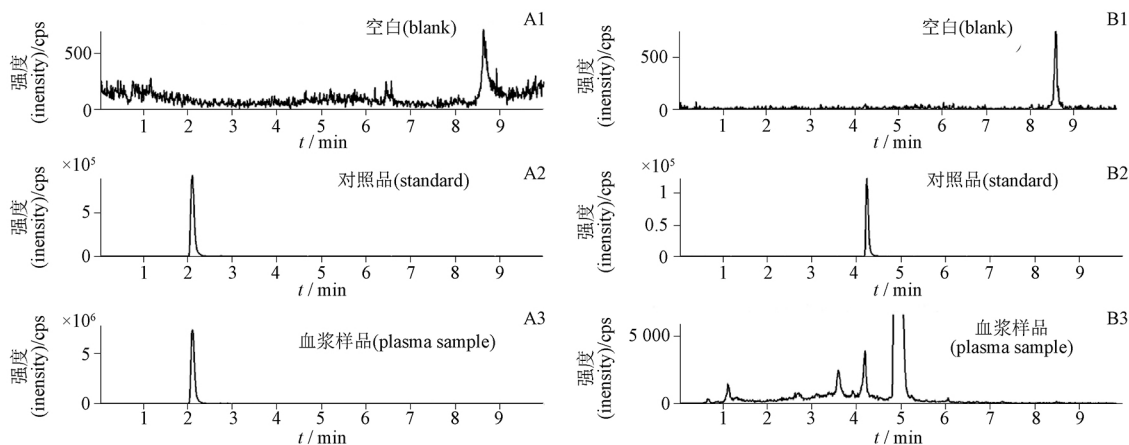


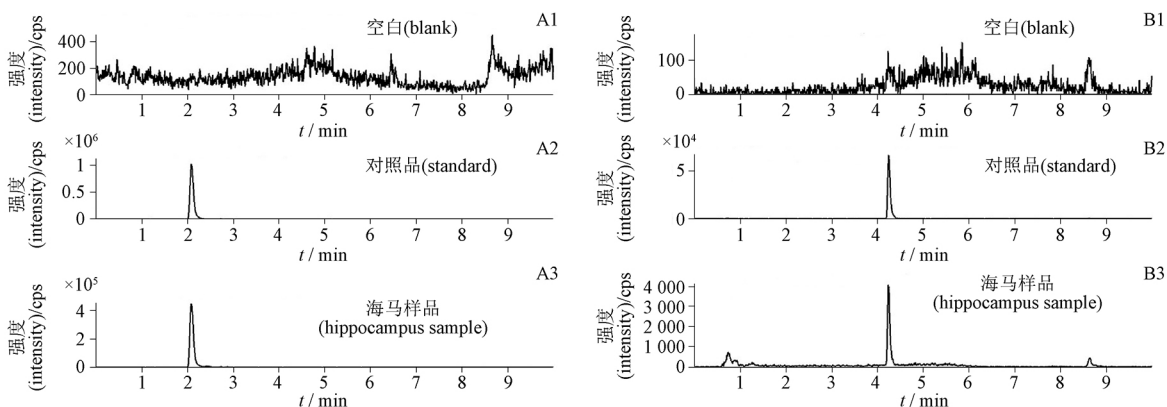
图 1 葛根素 (A,B) 和淫羊藿苷 (C,D) 的一级 (MS¹) 和二级 (MS²) 质谱图
Fig. 1 The mass spectra of puerarin (A,B) and icarrin (C,D)



1. 空白(blank) 2. 对照品(reference substance) 3. 样品(sample)

图 2 血浆中葛根素 (A) 和淫羊藿苷 (B) 总离子流图

Fig. 2 MRM of puerarin (A) and icarrin (B) in the blood plasma



1. 空白(blank) 2. 对照品(reference substance) 3. 样品(sample)

图 3 海马中葛根素 (A) 和淫羊藿苷 (B) 总离子流图

Fig. 3 MRM of puerarin (A) and icarrin (B) in hippocampus

表 2 血浆、海马中葛根素、淫羊藿苷标准曲线方程等相关参数

Tab. 2 Standard curve equation and other parameters of puerarin and icariin in plasma and hippocampus

样品 (sample)	成分 (component)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/(ng · mL ⁻¹)	LOQ/ (ng · mL ⁻¹)
血浆 (plasma)	葛根素 (puerarin)	$Y = 0.073\ 91X + 0.003\ 75$	0.998 1	0.099 ~ 436.14	0.099
	淫羊藿苷 (icariin)	$Y = 0.006\ 83X + 0.000\ 471\ 843$	0.998 0	1.0 ~ 188.012	1
海马 (hippocampus)	葛根素 (puerarin)	$Y = 0.169\ 35X + 0.033\ 24$	0.993 6	0.946 ~ 86.945	0.946
	淫羊藿苷 (icariin)	$Y = 0.009\ 4X + 0.001\ 8$	0.997 5	0.985 ~ 456.915	0.985

分别取空白血浆和海马组织,按“2.1”项下方法进行样品处理,进样,测定并计算基质样品中待测物和内标峰面积与对照溶液中相应峰面积的比值,分别得到测试物和内标的基质因子,进一步计算得到内标归一化的基质因子[峰面积比值(含基质)/平均峰面积比值(无基质)]。取空白血浆和海马组织样品,加入定量对照品,同法处理样品后测试,计算

提取回收率。每个浓度样品连续测定 6 次,计算均数和标准差,进一步计算相对误差,确定精密密度。稳定性考察则是在精密密度考察基础上,分别测试低温溶化后 24 h 样品含量变化及其相对误差。葛根素和淫羊藿苷在小鼠血浆及海马等生物样品中的基质效应和提取回收率见表 3,准确度(回收率)和精密密度结果见表 4。

表 3 血浆、海马中葛根素和淫羊藿苷基质效应及提取回收率的数据($n = 6$)

Tab. 3 Matrix effect and extraction recovery data of puerarin and icariin in plasma and hippocampus

样品 (sample)	成分 (component)	标示浓度 (marked concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	基质效应(内标校正) [matrix effect (internal standard correction)]		提取回收率 (extraction recovery)	
			效应因子 (effect factor)	RSD/ %	百分率 (percentage)/%	RSD/ %
血浆 (plasma)	葛根素 (puerarin)	0.3	0.68 ± 0.054 4	8.0	82.8 ± 3.99	4.8
		15	0.83 ± 0.033 0	4.0	79.8 ± 1.09	1.1
		400	0.75 ± 0.04	5.4	79.3 ± 0.81	1.0
	淫羊藿苷 (icariin)	0.3	0.90 ± 0.090 5	10.1	83.1 ± 2.90	3.5
		15	0.88 ± 0.044 2	5.0	81.5 ± 3.38	4.1
		400	0.89 ± 0.505	5.7	81.1 ± 5.46	6.7
海马 (hippocampus)	葛根素 (puerarin)	0.3	1.42 ± 0.091 2	6.4	94.5 ± 2.64	2.8
		15	1.29 ± 0.051 8	4.0	96.9 ± 4.04	4.2
		160	1.01 ± 0.049 8	4.7	99.8 ± 1.45	1.5
	淫羊藿苷 (icariin)	0.3	0.92 ± 0.087 7	9.5	96.3 ± 8.26	8.6
		15	0.88 ± 0.060 4	6.9	95.4 ± 5.30	5.6
		160	0.88 ± 0.031 4	3.6	96.8 ± 6.23	6.4

2.5 动物分组给药及药代动力学参数

取小鼠随机分为 8 组,每组 5 只,每组为一个采样时间点,分别为空白对照组(标为给药 0 h)和给药后 0.5、1、2、4、6、8、12 h 采样组。灌胃给药,剂量为 800 mg · kg⁻¹,体积为 20 mL · kg⁻¹。于给药后不同时间在小鼠眼眶静脉丛采血(1%肝素抗凝),11 000 r · min⁻¹离心 10 min 分离血浆,冻存备用。同时分离各小鼠脑海马核团, - 80 °C 冻存备

用。药代动力学参数拟合用 3P87 软件(中国药理学学会)处理。

由图 4 可见,口服给药后小鼠血浆葛根素在 1 h 达峰,淫羊藿苷则在给药后 2 h 达峰。随后 2 个成分血药浓度下降,葛根素在给药后 8 h 血药浓度降到最低值;淫羊藿苷在给药后 6 h 血药浓度降到最低值,随后反弹上升,至给药后 12 h(图 4 - A)。小鼠脑海马测试结果表明,口服给药后 30 min,海马中葛根素

表 4 血浆、海马中葛根素和淫羊藿苷回收率和精密度验证数据 (n=6)

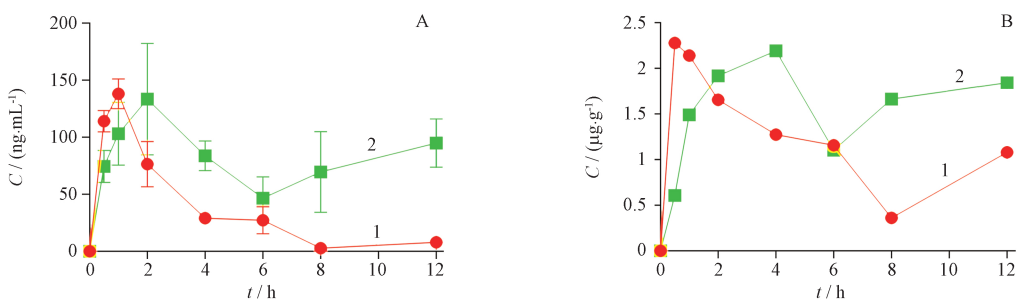
Tab. 4 Recovery and precision verification data of puerarin and icaritin in plasma and hippocampus

样品 (sample)	成分 (component)	标示浓度 (marked concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	实测浓度 (measured concentration)/ (ng · mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/ %	精密度 (precision) RSD/%
血浆 (plasma)	葛根素 (puerarin)	0.3	0.259 ± 0.003	86.3	1.1
		15	14.08 ± 0.273	93.9	1.9
		400	395.2 ± 7.401	99.0	1.9
	淫羊藿苷 (icaritin)	0.3	0.31 ± 0.021	103.3	6.7
		15	15.4 ± 0.521	102.7	3.4
		400	397.7 ± 11.12	99.4	2.8
海马 (hippocampus)	葛根素 (puerarin)	0.3	0.30 ± 0.016	100.0	4.8
		15	14.9 ± 0.387	99.3	2.6
		160	149.2 ± 4.232	93.0	2.8
	淫羊藿苷 (icaritin)	0.3	0.31 ± 0.021	103.3	6.8
		15	14.0 ± 0.777	93.3	5.6
		160	153.2 ± 6.959	96.0	4.6

注 (note): 条件为自动进样器 (8 °C, 24 h) [the test stability condition is automatic sampler (8 °C, 24 h)]

即达到峰值, 随后持续下降, 至给药后 8 h 降至最低; 海马中淫羊藿苷则在给药后 4 h 升至峰值, 随后下降, 但略有反弹 (图 4 - B)。对测试结果进行药代动力学数据处理并得相关参数 (表 5)。表 5 中计算的药物代谢参数显示: 血浆葛根素 $t_{1/2}$ 为 2.45 h, 明显快于血浆淫羊藿苷 ($t_{1/2}$ 为 3.59 h); 海马葛根素 $t_{1/2}$ 为

4.37 h, 慢于血浆葛根素; 海马淫羊藿苷 $t_{1/2}$ 为 8.5 h, 明显慢于血浆淫羊藿苷。提示脑内的代谢速率要慢于血浆。以血浆葛根素浓度为横坐标, 血浆淫羊藿苷浓度为纵坐标进行相关性分析, 其相关系数 $r = 0.2601$ ($P = 0.197$), 即二者血药浓度变化没有明显相关性 (图 5)。



1. 葛根素 (puerarin) 2. 淫羊藿苷 (icaritin)

图 4 血浆 (A) 和海马 (B) 中葛根素和淫羊藿苷经时变化 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) (B 为 5 只小鼠海马合并后测试结果)

Fig. 4 The contents of puerarin and icaritin in the blood plasma (A) and hippocampus (B) with time ($\bar{x} \pm s, n = 5$, Fig. 4 - B shows the test results after merging the hippocampus of 5 mice)

2.6 蛋白表达及考察

2.6.1 海马蛋白表达及数据分析方法 参考文献 [39-40], 采用 Western blot 方法对海马中 NRSF、BDNF、TrkB、GR、SLC6a4 等蛋白进行表达。称取海马组织 50 mg, 加入 RIPA 蛋白裂解液 (pH 6.8)

0.8 mL, 匀浆, 加入 5 × 载样缓冲液 (pH 8.8) 0.2 mL, 摇匀, 100 °C 水浴 20 min 使蛋白凝固, 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清冻存备用。将各组蛋白样品 (上样量 5 µL) 加入 10% 蛋白电泳凝胶孔中, 在 SDS - PAGE 缓冲液 (pH 8.3) 条件下电泳

表 5 药代动力学参数
Tab. 5 The pharmacokinetic parameters

参数 (parameter)	血浆 (plasma)		海马 (hippocampus)	
	葛根素 (puerarin)	淫羊藿苷 (icarrin)	葛根素 (puerarin)	淫羊藿苷 (icarrin)
T_{max}/h	0.42	2.32	0.86	4.2
C_{max}	138.03 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.53 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.28 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	0.35 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
$t_{1/2}/h$	2.45	3.59	4.37	8.5
AUC_{0-12}	334.56 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	8.27 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	1.53 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

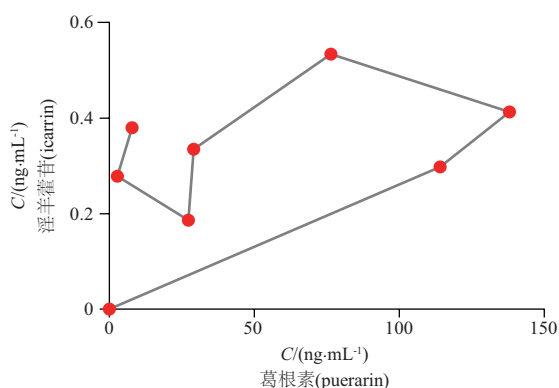


图 5 血浆中葛根素和淫羊藿苷经时变化的相关性分析

Fig. 5 Coefficient between puerarin and icarrin of plasma

(恒压 160 V, 60 min)使蛋白分离,取电泳后的凝胶进行 PVDF 转膜(20 V, 40 min),取已转运好的 PVDF 膜以含 5% 蛋白磷酸缓冲液(pH 7.4)封闭 4 ℃ 过夜,继之以所测蛋白一抗封膜 4 ℃ 过夜,取膜以 TPBS (1% Tween20 磷酸缓冲液, pH 7.4)洗膜 3 次(每次 5 min),继以二抗封膜室温 2 h 后,以 TPBS 洗膜 3 次(每次 5 min),最后以超敏发光液进行标记,在凝胶成像仪中对发光蛋白条带进行成像,并对成像蛋白条带进行面积积分,以积分值与内参 β -actin 成像积分值计算比值(目的蛋白条带积分值/ β -actin 蛋白条带积分值)并做统计学分析。蛋白条带灰度积分用 Quality One 软件(BioRad 公司)处理。相关性分析用 Microsoft Office 2013 Excel 软件(微软公司)处理。其他所得数据经 GraphPad Prism 8.0 软件(GraphPad 公司)统计处理并作图,蛋白表达采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及 t 检验。所得数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为有显著性统计学意义。

2.6.2 口服给药后小鼠海马相关功能蛋白表达的经时变化 为了实时动态观察海马的葛根素和淫羊藿苷与海马功能的相关性,表达了海马的有关脑功

能的蛋白。结果表明,给药后不同时间检测的 6 个相关功能蛋白均有不同程度的变化,其中, NRSF 在给药后 4 h 表达明显下调,并一直持续到 12 h; BDNF 及其下游蛋白 TrkB 均在给药后 1 h 表达明显上调, TrkB 还持续到 6 h; 与儿茶酚胺类神经递质如 5-HT 转运相关的 SLC6a4 在给药后 30 min 即表达上调,并持续到 2 h; GR 则在给药后 1 h 表达明显下调,并在 6 ~ 12 h 持续表达下调; MOR 在给药后 30 min 表达明显上调, 1 h 表达上调最强,之后下降(图 6)。

2.6.3 小鼠海马功能蛋白表达与葛根素淫羊藿苷变化的相关性分析 为了进一步分析葛根素和淫羊藿苷与海马蛋白表达的相关性,对 2 个成分浓度变化与蛋白表达的经时关系进行了分析。葛根素与各蛋白表达具有一定的相关性,其中相关性较高的有 BDNF、SLC6a4 和 MOR 等, r 分别为 0.732 ($P = 0.039$)、0.778 ($P = 0.023$)、0.782 ($P = 0.022$) 等。与 NRSF、TrkB 和 GR 表达的 r 较低,分别为 0.501、0.522 和 0.011 ($P > 0.05$) (图 7)。淫羊藿苷与 NRSF 表达变化的 r 为 -0.438 ($P < 0.05$),与 BDNF、TrkB、SLC6a4、GR、MOR 等蛋白表达变化的 r 分别为 0.272、0.055、-0.075、-0.138 ($P > 0.05$) (图 8),表明淫羊藿苷与这些蛋白表达变化之间没有明显相关性。已知 NRSF 是 TPH2 基因启动区的负性调控因子的结合蛋白,其表达对于 TPH2 的基因表达呈抑制作用,淫羊藿苷与 NRSF 表达呈负相关,即随着淫羊藿苷浓度的升高则 NRSF 表达下调,提示淫羊藿苷是 NRSF 下调的主要活性成分。前期工作显示淫羊藿苷体外试验中可以直接下调神经细胞 NRSF 蛋白表达,也可以以此印证^[11]。

3 讨论

本研究发现参葛补肾胶囊主要成分葛根素和淫羊藿苷口服后可以吸收入血并在海马神经核团

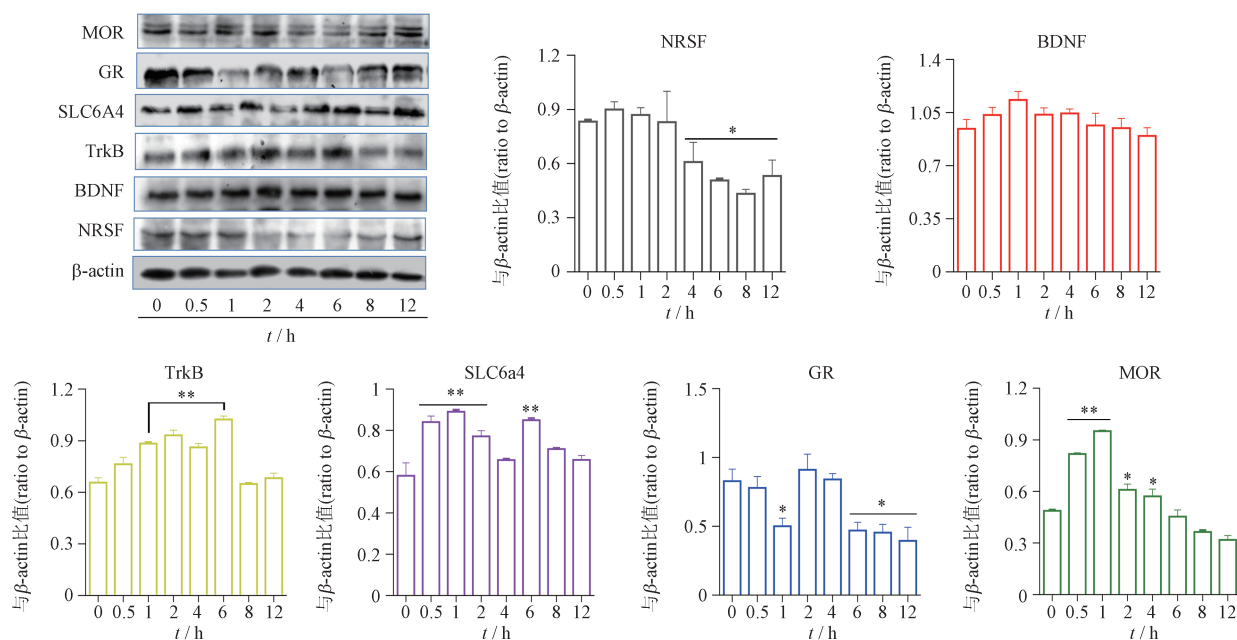


图6 给药后不同时间海马中相关蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$) (与给药前0 h时间点相比, *, ** $P < 0.05, P < 0.01$)

Fig. 6 The protein expressions at time – course after the administration (compared with the zero time – point, *, ** $P < 0.05, P < 0.01$)

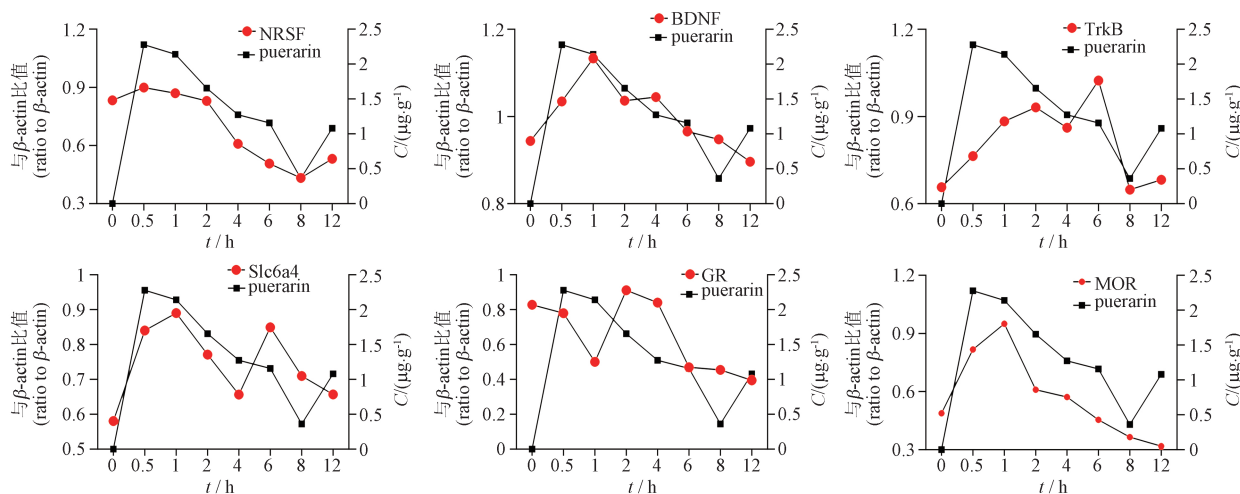


图7 海马中葛根素与相关蛋白表达变化的相关性

Fig. 7 The correlations between puerarin and the expression of the proteins in mouse hippocampus

分布,为该药的抗抑郁作用奠定了物质基础。除此之外,与葛根素相比,淫羊藿苷尽管入血率较低,但是由血到海马的过程呈现出一定的富集现象,即口服吸收入血成分大部分都分布到了海马。2个活性成分对于海马与脑神经元及其5-HT递质的相关蛋白表达呈现一定的相关性,提示2个成分对海马神经元具有调控作用。

3.1 葛根素和淫羊藿苷吸收入血和脑的分析

已知参葛补肾胶囊($320 \text{ mg} \cdot \text{粒}^{-1}$)中含葛根素

21.9 mg,淫羊藿苷 2.8 mg,则葛根素含量占比为6.84%,淫羊藿苷含量占比为0.875%。本文中小鼠给药量为 $800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (药效学大剂量^[11]),小鼠平均体质量 22.41 g,因此,每只小鼠实际口服参葛补肾胶囊 17.93 mg,其中葛根素 1.227 mg,淫羊藿苷 0.156 8 mg。如以此实际给药量为准,对血浆药物浓度和海马药物浓度进一步分析发现,葛根素吸收速率为 $328.64 (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) \cdot \text{h}^{-1} (C_{\text{max}}/T_{\text{max}})$,其血浆浓度占给药量的 27.3% (血浆葛根素 $\text{AUC } 334.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}/$

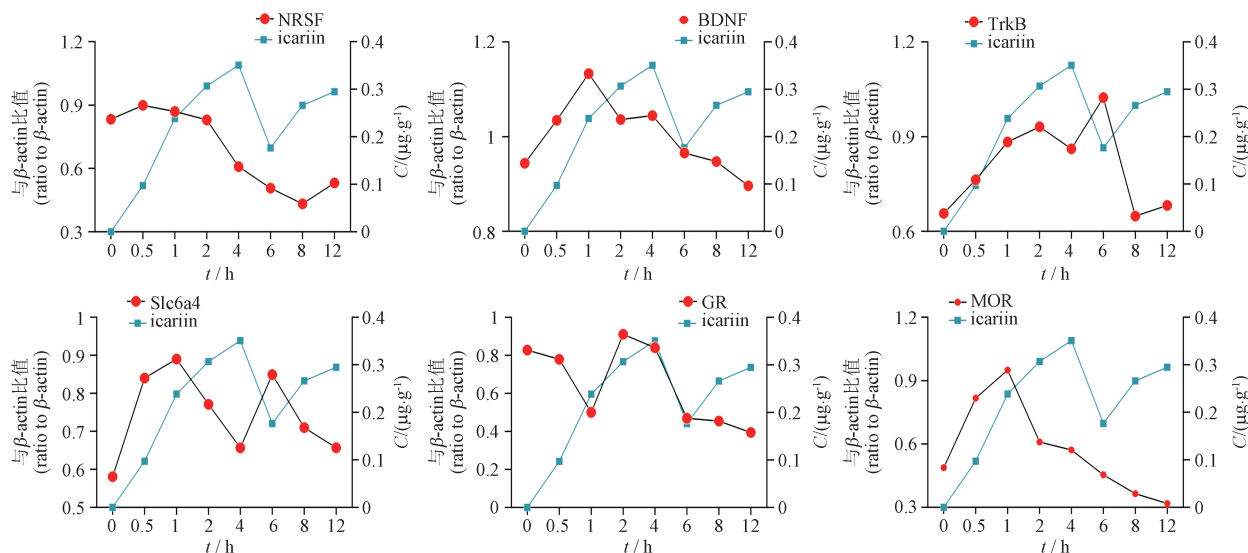


图8 淫羊藿苷与相关蛋白表达变化的相关性

Fig 8 The correlations between icariin and the expression of the proteins in mouse hippocampus

葛根素实际给药量 $1\ 227\ \mu\text{g}$);淫羊藿苷吸收速率为 $0.228\ (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) \cdot \text{h}^{-1}$ ($C_{\text{max}}/T_{\text{max}}$),其血浆浓度占给药量的 1.34% (血浆淫羊藿苷 $\text{AUC}\ 2.08\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ /淫羊藿苷实际给药量 $156.8\ \mu\text{g}$)。无论是吸收速率,还是进入血液百分率,葛根素均明显高于淫羊藿苷。

血浆葛根素 AUC 为 $334.56\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,海马葛根素 AUC 为 $8.27\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,海马葛根素占吸收入血的 2.47% ($8.27/334.56$);血浆淫羊藿苷 AUC 为 $2.08\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,海马淫羊藿苷 AUC 为 $1.53\ \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,海马淫羊藿苷占吸收入血的 73.56% ($1.53/2.08$)。提示在由血入脑的过程中,淫羊藿苷入脑量明显高于葛根素,表明淫羊藿苷较易通过血脑屏障且主要分布于脑,由此在一定程度上弥补了胃肠吸收入血量偏低的不足。

3.2 葛根素和淫羊藿苷海马含量与相关蛋白表达相关性分析

NRSF 为限制性神经抑制因子,其结合于基因转录区的 NRSE 对基因转录起抑制作用^[41-44]。参葛补肾胶囊可以下调抑郁小鼠海马 NRSF 的表达,从而减少其对于 5-HT 生成限速酶 TPH2 基因转录的抑制,最终升高脑内 5-HT 含量^[11]。本工作显示海马淫羊藿苷含量与 NRSF 表达呈现负相关性,即随着海马淫羊藿苷的升高,NRSF 表达下调,提示淫羊藿苷是下调 NRSF 的主要成分。

BDNF-TrkB 信号通路对神经元表现出多方面的作用,该通路可以激活下游 MAPK(丝裂原活化

蛋白激酶)、PI3K 和 PLC(磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C)等通路,产生增强神经细胞突触可塑性、细胞生存和增殖等作用,从而维持神经元的正常生理活性^[45-48]。因此,该信号通路在多种神经精神类疾病中扮演重要的角色^[49-50]。小鼠口服参葛补肾胶囊后,海马葛根素含量与 BDNF 和 TrkB 表达呈正相关性,即随着葛根素浓度的升高,BDNF 和 TrkB 表达也明显上调,提示葛根素是 2 种蛋白表达的主要活性成分。有文献报道葛根素可以调节高糖合并抑郁样行为小鼠海马 GLP-1R(胰高血糖素样肽-1 受体)/BDNF/TrkB 信号传导,是为佐证^[51]。

细胞膜表达一类超家族膜蛋白溶质载体蛋白(solute carrier, SLC),该类蛋白对于体内一些介质的膜转运和膜稳定等起着重要的作用^[52]。其中 SLC6a4 主要转运神经递质 5-HT,因此在抑郁症中 SLC6a4 的高表达将有助于突触间 5-HT 转运,维持神经细胞的正常功能^[53-54]。口服参葛补肾胶囊后,小鼠海马 SLC6a4 表达上调,且这种表达上调的动态变化与葛根素的变化呈正相关性,提示葛根素是 SLC6a4 表达上调的主要活性成分。

GR 蛋白表达于胞浆内,与 GC 结合并定位于多种基因的转录区,从而调控这些基因转录和蛋白表达^[55-57]。慢性应激(例如创伤性应激障碍)可使 HPA 轴激活,海马糖皮质激素升高,负反馈性地下调了海马神经元的相关 GR 表达,从而使得 GR 后信号

转导系统功能受到影响,导致神经元可塑性发生变化,从而影响突触间神经递质传递,影响到神经回路间信息沟通与传导,最终影响神经精神功能活性,产生抑郁症等精神障碍^[58]。小鼠口服参葛补肾胶囊后海马 GR 表达呈现波动性,且与葛根素和淫羊藿苷未表现出明显的相关性,提示该药抗抑郁不是通过 GR 而起作用。

阿片受体主要由 μ 、 κ 、 δ 3 种亚型组成,其中 μ 亚型 (MOR) 是重要的阿片受体^[59]。一般来说, MOR 主要介导细胞膜性阳离子,影响神经细胞的兴奋性,从而产生因兴奋性升高所出现的各种神经精神方面的作用^[60]。近年来的研究表明, MOR 还能介导神经细胞增殖和生存等作用,激活神经回路及其网络调控,提高神经突触间联系,对于因抑郁所引起的神经兴奋性降低有一定的调控作用^[61-62]。小鼠口服参葛补肾胶囊 0.5 h 后,海马 MOR 表达明显上调,且持续至给药后 4 h。这一作用与海马葛根素浓度的变化呈明显正相关性,提示葛根素对 MOR 表达有一定调控作用。

3.3 对参葛补肾胶囊体内药代动力学过程的表征

如何表征中药复方药代动力学(简称中药复方药代)是一个需要不断探讨的问题。目前对中药复方药代研究都是将所测试成分进行直接表征,而不是对所测成分进行综合分析后,再对中药复方的药代动力学行为进行表征,如此一来,中药复方药代无异于单体成分的药代动力学。诚然,中药复方药代研究存在着一个测试多少成分、以及根据所测成分如何表征整体复方体内药代动力学行为的问题。中药复方的成分复杂,不可能对其中每个成分进行检测,因此就存在着测 1 个成分与测 n 个成分的选择的问题^[63-64]。即在测几个成分的前提下,能够在多大程度上反映受试中药复方的整体的体内过程。其实,中药复方药代测试指标的选择与中药的质量控制指标的选择原则上是一致的,即基于这样一个假设前提:即所测试的成分与复方中的其他成分含量的变化存在着正相关性,如此,这种以有限指标进行测试才有实际意义。因此,中药复方药代研究所选择的测试指标至少应该与质量控制指标一致,在此基础上再根据实际情况增加可测试成分。本文选取的葛根素和淫羊藿苷均是参葛补肾胶囊中的质量控制指标,分别代表葛根和淫羊藿。结果表明,将 2 个成分的血浆浓度进行相关性分

析,其相关系数较低 ($r = 0.481, P > 0.05$), 提示 2 个成分体内过程不完全相同。因此,在表征参葛补肾胶囊药代动力学特征时不能以单一成分或者各成分的简单加和进行表述,应以多个所测成分的变化区间进行表述,而且所表述的指标尽量用相对值(例如达峰时间,半衰期等)。结果参葛补肾胶囊体内药物 T_{max} 应在 0.42 ~ 2.32 h, $t_{1/2}$ 在 2.45 ~ 3.59 h。

4 小结

综上所述,参葛补肾胶囊小鼠口服后,葛根素和淫羊藿苷都能被吸收入血且分布于海马,其中淫羊藿苷由血入海马呈现一定的富集现象。海马 NRSF 表达下调, SLC6a4 表达升高,两者共同维持神经细胞 5-HT 浓度,从而起到抗抑郁作用;此外, BDNF - TrkB 和 MOR 表达上调,有助于神经元维持生理功能。上述蛋白表达中,淫羊藿苷与 NRSF 呈负相关性,葛根素则与其他蛋白表达呈正相关性,提示 2 个成分为参葛补肾胶囊的主要活性成分。本实验只是做了初步的研究,2 个活性成分对靶蛋白的作用尚需要更多的实验进行确证。

参考文献

- [1] HUDA A, ERIC JN. The neurobiology of stress: vulnerability, resilience, and major depression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120 (49): e2312662120
- [2] 苏健婷, 韦再华, 高燕琳, 等. 2010 年北京市抑郁症疾病负担研究 [J]. 首都公共卫生, 2018, 12(1): 34
SU JT, WEI ZH, GAO YL, et al. Disease burden of depressive disorders in Beijing, 2010 [J]. Cap J Public Health, 2018, 12(1): 34
- [3] SHOKRI - MASHHADI N, DARAND M, ROUHANI MH, et al. Effects of melatonin supplementation on BDNF concentrations and depression: a systematic review and meta - analysis of randomized controlled trials [J]. Behav Brain Res, 2023, 436: e114083
- [4] MONCRIEFF J, COOPER RE, STOCKMANN T, et al. The serotonin theory of depression: a systematic umbrella review of the evidence [J]. Mol Psychiatry, 2023, 28 (8): 3243
- [5] THOMPSON SM, KALLARACKAL AJ, KVARTA MD, et al. An excitatory synapse hypothesis of depression [J]. Trends Neurosci, 2015, 38 (5): 279
- [6] TEOH CXW, THNG M, LAU S, et al. Dry mouth effects from drugs used for depression, anxiety, schizophrenia and bipolar mood disorder in adults: systematic review [J]. Bipsych Open, 2023, 9 (2): A63
- [7] COVINGTON HE, VIALOU V, NESTLER EJ. From synapse to nucleus: novel targets for treating depression [J]. Neuropharmacology, 2010, 58 (4 - 5): 683

- [8] BOLCHAKOV AP, ROZOV AV. Mechanisms of facilitation and depression in CNS synapses: presynaptic and postsynaptic components [J]. *Neurochem J*, 2014, 8 (4): 238
- [9] VON WERNE BAES C, DE CARVALHO TOFOLI SM, MARTINS CMS, *et al.* Assessment of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress – a systematic review [J]. *Acta Neuropsychiatr*, 2012, 24 (1): 4
- [10] ANACKER C, ZUNSZAIN PA, CARVALHO LA, *et al.* The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2011, 36 (3): 415
- [11] YU X, WANG X, LEI F, *et al.* The antidepressive effect of the complex consisting of Radix Pseudostellariae, Radix Pueraria and Herba Epimedii: the involvement of NRSF/NRSE – TPH2 signaling [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2021, 30 (1): 27
- [12] 潘平康,张超,吴海琴,等. 葛根素对大鼠脑缺血后海马中 EPO 和 STAT – 5 表达的影响 [J]. *卒中与神经疾病*, 2013, 20 (3): 137
PAN PK, ZHANG C, WU HQ, *et al.* Effects of puerarin on the expression of erythropoietin and STAT – 5 in the hippocampus of cerebral ischemia injured in rat[J]. *Stroke Nerv Dis*, 2013, 20 (3): 137
- [13] 夏友华. 葛根素治疗脑梗死的临床效果 [J]. *中国农村卫生*, 2020, 12 (12): 31
XIA YH. Clinical effect of puerarin on cerebral infarction [J]. *Chin Rural Health*, 2020, 12 (12): 31
- [14] 史文珍,王倩,熊婧,等. 葛根素改善卒中后抑郁大鼠行为学的研究 [J]. *临床医学研究与实践*, 2019, 4 (10): 1
SHI WZ, WANG Q, XIONG J, *et al.* Study of puerarin on behaviour of rats with post – stroke depression [J]. *Clin Res Pract*, 2019, 4 (10): 1
- [15] GAO LN, YAN M, ZHOU L, *et al.* Puerarin alleviates depression – like behavior induced by high – fat diet combined with chronic unpredictable mild stress via repairing TLR4 – induced inflammatory damages and phospholipid metabolism disorders [J]. *Front Pharmacol*, 2021,12:e767333
- [16] 张聪,胡楚璇,李穗华,等. 葛根素对慢性不可预知温和刺激大鼠抑郁行为的影响及其机制 [J]. *药学学报*, 2018, 53 (2): 220
ZHANG C, HU CX, LI SH, *et al.* Anti – depressant effects of puerarin on depression induced by chronic unpredicted mild stress in rats[J]. *Acta Pharm Sin*, 2018, 53 (2): 220
- [17] LIU R, LI Y, WANG Z, *et al.* Puerarin mitigates symptoms of depression in ovariectomized female rats by regulating hippocampal cAMP – CREB – BDNF signaling pathway[J]. *Trop J Pharm Res*, 2021, 20 (7): 1403
- [18] SONG X, WANG W, DING S, *et al.* Puerarin ameliorates depression – like behaviors of with chronic unpredictable mild stress mice by remodeling their gut microbiota[J]. *J Affective Disord*, 2021, 290: 353
- [19] LIU B, XU C, WU X, *et al.* Icariin exerts an antidepressant effect in an unpredictable chronic mild stress model of depression in rats and is associated with the regulation of hippocampal neuroinflammation[J]. *Neuroscience*, 2015, 294:193
- [20] WU X, ZHANG X, SUN L, *et al.* Icariin prevents depression – like behaviors in chronic unpredictable mild stress – induced rats through Bax/cytoplasm C/caspase – 3 axis to alleviate neuronal apoptosis[J]. *Cell Mol Biol*, 2023, 69 (7): 196
- [21] 张聪,卢慧勤,胡楚璇,等. 淫羊藿苷对慢性不可预知温和刺激诱导的大鼠抑郁行为和神经递质水平的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53 (15): 1280
ZHANG C, LU HQ, HU CX, *et al.* Effect of icariin on behavior and monoamine neurotransmitters in rats with depression induced by chronic unpredicted mild stress[J]. *Chin Pharm J*, 2018, 53 (15): 1280
- [22] DI X, WAN M, BAI YN, *et al.* Exploring the mechanism of Icariin in the treatment of depression through BDNF – TrkB pathway based on network pharmacology[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024,397 (1): 463
- [23] GONG MJ, HAN B, WANG SM, *et al.* Icariin reverses corticosterone – induced depression – like behavior, decrease in hippocampal brain – derived neurotrophic factor (BDNF) and metabolic network disturbances revealed by NMR – based metabolomics in rats[J]. *J Pharm Biom Anal*, 2016, 123: 63
- [24] CAO LH, QIAO JY, HUANG HY, *et al.* PI3K – AKT signaling activation and icariin: the potential effects on the perimenopausal depression – like rat model [J]. *Molecules*, 2019, 24 (20): e3700
- [25] ZENG NX, LI HZ, WANG HZ, *et al.* Exploration of the mechanism by which icariin modulates hippocampal neurogenesis in a rat model of depression[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17 (3): 632
- [26] KONG H, WANG X, SHI R, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution kinetics of puerarin in rats using indirect competitive ELISA[J]. *Molecules*, 2017, 22 (6): e939
- [27] JUNG HR, KIM SJ, HAM SH, *et al.* Simultaneous determination of puerarin and its active metabolite in human plasma by UPLC – MS/MS: application to a pharmacokinetic study[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 971: 64
- [28] ZHANG G, JI J, SUN M, *et al.* Comparative pharmacokinetic profiles of puerarin in rat plasma by UHPLC – MS/MS after oral administration of pueraria lobata extract and pure puerarin [J]. *J Anal Methods Chem*, 2020. doi:10.1155/2020/e4258156
- [29] LIAO ZG, LIANG XL, ZHU JY, *et al.* Transport properties of puerarin and effect of extract of Radix Angelicae Dahuricae on puerarin intestinal absorption using *in situ* and *in vitro* models[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(9):1288
- [30] YANG B, DU S, LU Y, *et al.* Influence of paeoniflorin and menthol on puerarin transport across MDCK and MDCK – MDR1 cells as blood – brain barrier *in vitro* model[J]. *J Pharm Pharmacol*,

- 2018, 70(3): 349
- [31] WU JY, LI YJ, YANG L, *et al.* Borneol and a-asarone as adjuvant agents for improving blood-brain barrier permeability of puerarin and tetramethylpyrazine by activating adenosine receptors [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25 (1): 1858
- [32] LIU W, LI X, LI N, *et al.* UPLC-MS/MS method for icariin and metabolites in whole blood of C57 mice: development, validation, and pharmacokinetics study [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: e1195525
- [33] 张双庆,何梦洁,黄振武. 超高效液相色谱-串联质谱法研究淫羊藿苷在大鼠体内药代动力学 [J]. *卫生研究*, 2016, 45(5): 807
- ZHANG SQ, HE MJ, HUANG ZW. UPLC-MS/MS for the pharmacokinetics of icariin in rats [J]. *Health Res*, 2016, 45(5): 807
- [34] 叶丽卡,陈济民,刘四海,等. 淫羊藿苷在大鼠体内的药代动力学 [J]. *中国药学杂志*, 1999, 34(1): 35
- YE LK, CHEN JM, LIU SH, *et al.* Pharmacokinetics of icariin in rats [J]. *Chin Pharm J*, 1999, 34(1): 35
- [35] XU S, YU J, ZHAN J, *et al.* Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism study of icariin in rat [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: e4684962
- [36] 王敏,谷元,周宇,等. 淫羊藿苷元在大鼠体内的血浆动力学和组织分布研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(10): 3030
- WANG M, GU Y, ZHOU Y, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of icaritin after intragastric administration in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(10): 3030
- [37] 慈小燕,孙英辉,武卫党,等. 淫羊藿苷元的肠道跨膜转运机制研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(9): 2747
- CI XY, SUN YH, WU WD, *et al.* Study on transmembrane transport mechanism of icariin in intestine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(9): 2747
- [38] 梁媛,葛若衡,舒畅. 基于LC-MS/MS方法的大鼠血浆中舒必利的血药浓度检测及药代动力学研究 [J]. *中南药学*, 2023, 21(11): 2875
- LIANG Y, GE RH, SHU C. Determination of sulpiride concentration in rat plasma and pharmacokinetics by LC-MS/MS [J]. *Cent South Pharm*, 2023, 21(11): 2875
- [39] 李俊,余冬,王木兰,等. 基于线粒体氧化呼吸链相关调节基因探讨二甲双胍对皮质酮致小鼠抑郁样行为的作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(8): 95
- LI J, YU D, WANG ML, *et al.* Effect of metformin on corticosterone-induced depression-like behavior in mice involves genes of the mitochondrial respiratory chain [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(8): 95
- [40] YUAN Z, LU X, LEI F, *et al.* Novel effect of *p*-Coumaric acid on hepatic lipolysis: inhibition of hepatic lipid droplets [J]. *Molecules*, 2023, 28(12): e4641
- [41] SOGA T, NAKAJIMA S, KAWAGUCHI M, *et al.* Repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) in social stress and depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 104: e110053
- [42] WANG XF, YU PP, LU PH. NRSE, NRSF and their modulatory effects on the expression of neuronal-specific genes [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2005, 32(7): 595
- [43] THOMPSON R, CHAN C. NRSF and its epigenetic effectors: new treatments for neurological disease [J]. *Brain Sci*, 2018, 8(12): e226
- [44] SONG Z, ZHAO D, ZHAO H, *et al.* NRSF: an angel or a devil in neurogenesis and neurological diseases [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(1): e131
- [45] PISANI A, PACIELLO F, DEL VECCHIO V, *et al.* The role of BDNF as a biomarker in cognitive and sensory neurodegeneration [J]. *J Pers Med*, 2023, 13(4): e652
- [46] DU X, WU YC, HILL RA, *et al.* BDNF-TrkB signaling as a therapeutic target in neuropsychiatric disorders [J]. *J Recept Ligand Channel Res*, 2014, 7: 61
- [47] GUO W, NAGAPPAN G, LU B. Differential effects of transient and sustained activation of BDNF-TrkB signaling [J]. *Dev Neurobiol*, 2018, 78(7): 647
- [48] CORREIA AS, CARDOSO A, VALE N. BDNF unveiled: exploring its role in major depression disorder serotonergic imbalance and associated stress conditions [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(8): e2081
- [49] JIN W. Regulation of bdnf-trkb signaling and potential therapeutic strategies for Parkinson's disease [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(1): e257
- [50] TEJEDA GS, DIAZ-GUERRA M. Integral characterization of defective BDNF/TrkB signalling in neurological and psychiatric disorders leads the way to new therapies [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): e268
- [51] LIU Y, HU Z, WANG J, *et al.* Puerarin alleviates depressive-like behaviors in high-fat diet-induced diabetic mice via modulating hippocampal GLP-1R/BDNF/TrkB signaling [J]. *Nutr Neurosci*, 2023, 26(10): 997
- [52] HONG M. Biochemical studies on the structure-function relationship of major drug transporters in the ATP-binding cassette family and solute carrier family [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 116: 3
- [53] MORIYA Y, KASAHARA Y, SHIMADA M, *et al.* Role for μ -opioid receptor in antidepressant effects of δ -opioid receptor agonist KNT-127 [J]. *J Pharmacol Sci*, 2023, 151(3): 135
- [54] REN F, MA Y, ZHU X, *et al.* Pharmacogenetic association of bi- and triallelic polymorphisms of SLC6A4 with antidepressant response in major depressive disorder [J]. *J Affective Disord*, 2020, 273: 254
- [55] RHEN T, CIDLOWSKI JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(16): 1711
- [56] SIONOV RV, KFIR S, ZAFRIR E, *et al.* Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor

- translocation to the mitochondria [J]. *Cell Cycle*, 2006, 5 (10): 1017
- [57] LU NZ, CIDLOWSKI JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity [J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16 (6): 301
- [58] HERMAN JP, SEROOGY K. Hypothalamic – pituitary – adrenal Axis, glucocorticoids, and neurologic disease [J]. *Neurol Clin*, 2006, 24 (3): 461
- [59] WANG Y, ZHUANG Y, DIBERTO JF, *et al.* Structures of the entire human opioid receptor family [J]. *Cell*, 2023, 186 (2): 413
- [60] SHIRAKI A, SHIMIZU S. The molecular associations in clathrin – coated pit regulate β – arrestin – mediated MAPK signaling downstream of μ – opioid receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 640:64
- [61] GAMBLE MC, WILLIAMS BR, SINGH N, *et al.* μ – opioid receptor and receptor tyrosine kinase crosstalk; implications in mechanisms of opioid tolerance, reduced analgesia to neuropathic pain, dependence, and reward [J]. *Front Syst Neurosci*, 2022, 16: e1059089
- [62] MORIYA Y, KASAHARA Y, SHIMADA M, *et al.* Role for μ – opioid receptor in antidepressant effects of δ – opioid receptor agonist KNT – 127 [J]. *J Pharmacol Sci*, 2023, 151 (3): 135
- [63] 卢弘, 李敏, 邢东明, 等. 对中药复方药代动力学研究中血药浓度测定方法的评述与思考 [J]. *世界科学技术 – 中医药现代化*, 2000, 3(4): 22
- LU H, LI M, XING DM, *et al.* Comment on the test method of plasma concentration in pharmacokinetics of Chinese herbal compound [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med*, 2000, 3 (4): 22
- [64] 杜力军, 邢东明, 炎彬, 等. 对葛根素与葛根黄酮体内动力学关系的探讨 – 兼论中药药代动力学研究方法 [J]. *世界科学技术 – 中医药现代化*, 2004, 6(6): 26
- DU LJ, XING DM, YAN B, *et al.* Exploration of relationship between *in vivo* dynamics of puerarin and flavone of root of *Kutzuvine* and a discussion on study method of pharmacokinetics of Chinese medicines [J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med*, 2004, 6 (6): 26

(本文于2024年6月25日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。