

酸枣仁提取物不同给药途径的入脑行为分析及镇静催眠作用比较

郑安祺, 王建香, 王艺斐, 胡方方, 贾 晔, 卢 闻*

西安交通大学医学部药学院, 陕西 西安 710061

摘要:目的 酸枣仁提取物经鼻、经口途径的体内、外入脑行为分析及镇静催眠作用比较。方法 建立 Calu-3/BMEC 和 Caco-2/BMEC 细胞模型, 分别从体外模拟酸枣仁指标成分斯皮诺素经鼻黏膜和经胃肠道吸收入血、入脑过程; 考察大鼠经鼻和 ig 给药, 指标成分在体内的血浆和脑组织分布过程; 进一步比较 2 种给药方式对酸枣仁提取物镇静、催眠作用的影响。结果 鼻腔的 Calu-3、肠道的 Caco-2 和血脑屏障的 BMEC 细胞层对斯皮诺素的跨细胞转运都有阻滞作用, 而且模拟体内的多细胞转运过程, 进一步加强了阻滞作用; 经鼻给药增加斯皮诺素的入血、入脑分布, 其药时曲线下面积 (area under curve, AUC_{0-t}) 分别是 ig 给药的 4.8 倍 (血浆) 和 5.1 倍 (脑组织); 与 ig 给药相比, 鼻腔给药显著减少了模型小鼠的运动距离 ($P < 0.05$), 延长了静止时间和睡眠持续时间 ($P < 0.05$)。结论 经鼻给药可通过直接、间接方式的多种入脑通路增加酸枣仁提取物入脑含量, 并增强其镇静催眠作用。

关键词: 酸枣仁; 经鼻给药; 经口给药; 入脑行为; 镇静催眠; 斯皮诺素

中图分类号: R285.61 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)23-8611-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.23.013

Analysis of behavior of *Zizyphi Spinosae Semen* extract penetrating brain via different administration routes and comparison of their sedative-hypnotic effects

ZHENG Anqi, WANG Jianxiang, WANG Yifei, HU Fangfang, JIA Ye, LU Wen

College of Pharmacy, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To analyze the behavior of Suanzaoren (*Zizyphi Spinosae Semen*) extract penetrating into brain *in vivo* and *in vitro* through intranasal and gavage administration, and compare the corresponding sedative-hypnotic effects. **Methods** Calu-3/BMEC and Caco-2/BMEC cell models were established to simulate the process of spinosin, an index component of *Zizyphi Spinosae Semen* extract, being absorbed into the bloodstream and brain through nasal mucosa and gastrointestinal tract *in vitro*, respectively. The distribution process of index component in the plasma and brain tissue of rats after intranasal and gavage administration was investigated. The effects of the two administration routes on the sedative and hypnotic action of *Zizyphi Spinosae Semen* extract were further compared. **Results** The cellular layers representing Calu-3 in the nasal cavity, Caco-2 in the intestinal tract and the BMEC in the blood-brain barrier all blocked the transcellular transport of spinosin. The multicellular transport process, which imitated *in vivo* physiological conditions, further strengthened the blocking effect. The distribution of spinosin in the blood and brain was increased when administered intranasally, and the area under curve (AUC_{0-t}) value was 4.8 times (plasma) and 5.1 times (brain tissue) higher than those of gavage administration, respectively. Compared with gavage administration, intranasal administration significantly reduced the movement distance ($P < 0.05$), prolonged the immobility time and sleep duration in the model mice ($P < 0.05$). **Conclusion** Intranasal administration could increase the brain uptake of *Zizyphi Spinosae Semen* extract through multiple brain entry pathways in a direct and indirect manner, and enhance its sedative and hypnotic effects.

Key words: *Zizyphi Spinosae Semen*; intranasal administration; oral administration; brain penetration; sedative-hypnotic; spinosin

酸枣仁是鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种

子^[1-2], 为古今常用的养心安神的药食两用中药。古有 19 部本草典籍明确记载酸枣仁具有治疗失眠的

收稿日期: 2025-08-05

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2024SF-YBXM-486)

作者简介: 郑安祺, 硕士研究生, 研究方向为药物体内作用过程分析。E-mail: zaq15185106129@163.com

*通信作者: 卢 闻, 教授, 博士生导师, 主要从事药物及给药系统体内作用过程分析。E-mail: lvlu2004@mail.xjtu.edu.cn

功效^[3],如《神农本草经》《本草纲目》《名医别录》等;现今治疗失眠的中药组方、改善睡眠的保健食品中酸枣仁的使用频次均居前列^[4]。现代药理学研究证实,酸枣仁中的皂苷和黄酮苷类成分是其发挥镇静催眠作用的关键成分,有研究报道酸枣仁中的黄酮苷类成分通过调节脑组织神经元细胞的谷氨酸代谢、5-羟色胺能系统和氨基丁酸能系统等,发挥镇静催眠作用^[5-8]。Zhang 等^[5]发现酸枣仁中黄酮成分斯皮诺素可通过特异性抑制睡眠-觉醒调控的关键脑区神经元活性,进而抑制促觉醒中枢功能,改善睡眠。然而,无论黄酮苷还是皂苷成分,其相对分子质量均在 600 以上,为不易入脑的低溶解度、低渗透性物质。大鼠 ig 斯皮诺素(20 mg/kg)绝对生物利用度仅为 2.20%^[9];Qiao 等^[10]通过 SD 大鼠尾 iv 斯皮诺素(5 mg/kg),于给药后 0.5 h 可在脑组织中检测到斯皮诺素,但 4 h 时脑组织质量浓度已低于定量限(0.8 ng/mL)。因此,探究酸枣仁有效成分的入脑屏障,寻找增加其脑内分布的方式,对于阐释酸枣仁养心安神的功效基础和新产品的研制具有重要意义。

口服给药是现有酸枣仁复方和相关产品的最主要服用方式。酸枣仁中的成分经胃肠道吸收入血,随血液循环进入脑组织需跨越生物系统的多层屏障,如胃肠道上皮细胞形成的屏障^[11],由脑血管内皮细胞、星形胶质细胞等组成的血脑屏障^[12]等。这些屏障必然会影响到酸枣仁有效成分进入脑组织。近年来,随着对鼻-脑通路研究的逐步深入,鼻腔给药成为增加药物入脑的可替代途径之一。进入鼻腔的药物可沿嗅神经、经嗅球直接入脑;或沿三叉神经通路直接入脑;分布于鼻腔呼吸区或进入气道、食道的药物可吸收入血再跨越血脑屏障,以间接途径传输到脑组织^[13]。为此,本研究选择酸枣仁中催眠镇静作用及机制研究较为深入的有效成分斯皮诺素为指标,构建能够模拟口服和鼻腔给药药物吸收屏障的体外模型,比较酸枣仁跨细胞屏障的转运行为;采用 ig 和滴鼻 2 种给药方式,分析酸枣仁指标成分的血浆和脑组织分布动力学;基于指标成分的脑组织分布差异,比较 2 种给药方式的镇静催眠效果。

1 材料

1.1 动物与细胞

清洁级雄性 SD 大鼠 80 只,体质量(200±20)g,购自西安交通大学实验动物中心,动物使用许可证

号 SYXK(陕)2023-004。动物实验获得西安交通大学医学部生物医学伦理委员会批准(批准号 XJTUAE 2024-1998)。

清洁级雄性 ICR 小鼠 100 只,5~6 周龄,体质量 20~24 g,购自西安交通大学医学部动物中心,动物使用许可证号 SYXK(陕)2023-004。动物实验获得西安交通大学动物实验伦理审查批准(批准号 XJTUAE 2024-1997)。

人肺腺癌 Calu-3 细胞购自江苏齐氏生物科技有限公司,人结肠癌 Caco-2 细胞购自江苏齐氏生物科技有限公司。

1.2 药材

酸枣仁(批号 8230219701)购自河北百合健康药业有限公司,经西安交通大学牛晓峰教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。

1.3 药品与试剂

斯皮诺素(批号 23021601,质量分数≥98%)购自成都普菲德生物技术有限公司;葛根素(批号 110752-201816,质量分数≥98%)购自中国食品药品检定研究院;Alican Blue 8GX(批号 69077549)购自上海金畔生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒(批号 0843512201)购自陕西中辉赫彩生物医药科技有限公司;E-cadherin 抗体(批号 20240811)、Occludin 抗体(批号 20240801)购自武汉三鹰生物技术有限公司;DAPI(批号 CR2101104)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 240003001)、Triton X-100(批号 T8200)购自北京索莱宝科技有限公司;对氯苯丙氨酸(*p*-chlorophenylalanine, PCPA,批号 106151)购自北京百灵威科技有限公司;地西洋注射液(批号 231101)购自太原市振兴制药有限责任公司;γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid, GABA)测定试剂盒(批号 WZ29V6H46959)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;其他试剂为市售分析纯。

1.4 仪器

Millcell® ERS-2 型跨膜细胞电阻仪(美国密理博公司);SuperMax-3000M2 型多功能酶标仪系统(上海闪谱生物科技有限公司);LC-2030 3D 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);HC-2518R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);101-1AB 型真空浓缩干燥仪(天津泰斯特仪器有限公

司); FDS-1000 型冷冻干燥机 (东京理化器械株式会社); PHY-III 型病理组织漂烘仪 (德国徕卡生物科技股份有限公司); CR-601S 型克拉泰石蜡切片机 (金华克拉泰仪器有限公司); OFT-100 型 TM-Vision 行为学实验系统、ZZ-6 型小鼠自主活动测试仪 (成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 酸枣仁提取物的制备及成分分析

2.1.1 酸枣仁提取物的制备 取酸枣仁 200.0 g, 粉碎, 加入 6 倍量石油醚脱脂, 60 °C 加热回流 4 h, 滤过, 收集石油醚液。药渣脱除溶剂, 加入 8 倍量 70% 乙醇回流提取 2 h, 滤过; 再加入 6 倍量 70% 乙醇回流提取 2 h, 滤过。合并 2 次滤液, 60 °C 减压浓缩、干燥, 按干膏-甲醇 (1:5) 的比例加入甲醇, 超声 30 min, 滤过, 回收甲醇至干, 即得酸枣仁提取物。

2.1.2 酸枣仁提取物中斯皮诺素含量测定 取酸枣仁提取物适量, 精密称定, 加甲醇制成 0.1 g/mL 的溶液, 采用 HPLC 测定酸枣仁提取物中斯皮诺素含量^[14]。色谱条件: Inert Sustain Swift™ C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A)-水 (B), 梯度洗脱: 0~10 min, 12%~19% A; 10~16 min, 19%~20% A; 16~22 min, 20%~90% A; 22~30 min, 90% A。体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL; 柱温为 40 °C; 检测波长为 335 nm。

2.2 酸枣仁提取物经 Calu3/脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMEC) 模型转运行为分析

2.2.1 Calu-3/BMEC 细胞模型的建立及表征 Calu-3 细胞以 3×10⁵ 个/mL 接种于 24 孔 Transwell 内插室膜 (聚碳酸酯膜, 孔径 0.4 μm), 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 待细胞单层汇合, 吸弃内插室培养基, 顶端暴露在空气中, 在气-液界面继续培养, 下室每天更换培养基, 采用跨膜细胞电阻仪监测跨膜电阻 (trans-epithelial electrical resistance, TEER) 值。当 Calu-3 细胞培养 9 d 时, 参照实验室已建立方法提取分离 BMEC 细胞^[15], 以 1×10⁵ 个/mL 接种于 12 孔 Transwell 内插室培养, 每天监测 TEER 值。当 Calu-3 细胞层 TEER 值大于 300 Ω·cm²、BMEC 细胞层大于 150 Ω·cm², 将 2 种细胞串联培养 3 h, 建立 Calu3/BMEC 细胞模型, 并测定串联培养前后模型 TEER 值。

$$TEER = (TEER_{\text{细胞}} - TEER_{\text{空白}}) \times A \quad (1)$$

TEER_{细胞} 为接种细胞的电阻值 (Ω), TEER_{空白} 为未接种细胞的电阻值 (Ω), A 为内插室膜面积 (cm²)

将 Calu-3 细胞内插室切膜后分成 2 组, 一组于 4% 多聚甲醛固定 12 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 制作切片, 脱蜡至水, 3% 醋酸液浸泡 2 min, 1% Alican Blue 8GX 染色 20 min, 苏木素-伊红 (HE) 复染, 中性树脂封片, 观察黏液分泌情况。另一组固定 20 min、0.2% Triton X-100 透膜, 2% 牛血清白蛋白封闭, 分别加入 E-cadherin、Occludin 一抗 (1:100), 4 °C 孵育过夜; 加入荧光素标记的二抗, 避光孵育 1 h, DAPI 试剂 (1 μg/mL) 染核后, 采用荧光显微镜成像。

检测苯酚红穿过细胞层的表观渗透系数 (apparent permeability coefficient, P_{app}) 值以评估细胞模型的通透性。将 Calu-3/BMEC 模型中接有 Calu-3 细胞的 Transwell 内插室取出置于 24 孔板, Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 洗涤 2 次, 上室加入 0.2 mL 苯酚红 HBSS (100 μg/mL), 下室加入 1.0 mL 空白 HBSS。置 37 °C、50 r/min 恒温培养摇床, 分别于各检测时间吸取内插室下室接收液 1.0 mL, 并补加同温同体积空白 HBSS。收集的接收液经真空浓缩仪 40 °C 浓缩至干, 甲醇复溶残渣, HPLC 检测苯酚红含量^[16]。色谱条件: 流动相为 0.2% 磷酸水溶液-甲醇 (50:50), 体积流量为 1 mL/min, 检测波长 426 nm, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 外标法计算接收液苯酚红浓度, 并计算 P_{app} 值。

$$Q_t = C_i \times V + \sum C_{i-1} \times V \quad (2)$$

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{AC_0} \quad (3)$$

Q_t 为不同时间的累积转运量 (μg), V 为接收液体积 (mL), C_i 为各检测时间苯酚红浓度 (μg/mL), dQ/dt 为单位时间内转运量 (μg/s), A 为内插室膜面积 (cm²), C_0 为初始浓度 (μg/mL)

同法测定 Calu-3/BMEC 模型中 BMEC 细胞层的苯酚红 P_{app} 值, 并与 Calu-3 和 BMEC 2 种单层细胞模型的苯酚红 P_{app} 值进行比较。

2.2.2 酸枣仁提取物经 Calu3/BMEC 细胞模型转运分析 酸枣仁提取物用无菌 HBSS 溶液配制成 20.0 mg/mL 的贮备液, 并稀释成系列质量浓度的溶液, 先以 CCK-8 法测定其对 Calu-3 及 BMEC 细胞活力影响。再取质量浓度为 2.0 mg/mL 的溶液 0.3 mL, 加入到 Calu-3/BMEC 细胞模型上层, 而中层、下层

分别加入 0.5、1.0 mL 空白 HBSS 溶液。置 37 ℃、50 r/min 恒温培养摇床,于各检测时间取下层接收液 1.0 mL,并补加 1.0 mL 相同温度的空白 HBSS 溶液。收集的接收液挥干后甲醇复溶,按“2.2.1”项下色谱条件测定 HPLC 测定,按照公式(2)计算累积转运量,进一步计算累积转运率(R_t =各时间的累积转运量/初始质量),按照公式(3)计算 P_{app} 值。同时设置 Calu-3 和 BMEC 的单层细胞模型作为对照。

2.3 酸枣仁提取物经 Caco-2/BMEC 细胞模型转运分析

2.3.1 Caco-2/BMEC 细胞模型的建立及表征 Caco-2 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔 Transwell 内插室膜,于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,并监测 TEER 值。当 Caco-2 细胞培养至第 7 天,分离 BMEC 于 12 孔 Transwell 内插室接种、培养、监测 TEER 值。待 Caco-2 和 BMEC 细胞层的 TEER 值分别大于 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 和 $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 时,将载有 2 种细胞的内插室串联培养 3 h,建立 Caco-2/BMEC 细胞模型并测定 TEER 值。参照“2.2.1”项下方法,测定 Caco-2/BMEC 细胞模型的苯酚红通透性。

2.3.2 酸枣仁提取物经 Caco-2/BMEC 细胞模型转运分析 于 Caco-2/BMEC 细胞模型上层加入 0.3 mL 酸枣仁提取物 HBSS 溶液 (2.0 mg/mL),参照“2.2.2”项下方法,测定并计算酸枣仁提取物中斯皮诺素的 R_t 和 P_{app} 值,同时设置 Caco-2 和 BMEC 单层模型作为对照。

2.4 酸枣仁提取物经鼻、经口途径的入脑行为分析

2.4.1 动物分组及给药 选取健康雄性 SD 大鼠 80 只,实验前禁食 12 h,自由饮水,按体质量随机分为酸枣仁提取物 ig 给药和鼻腔给药组,酸枣仁提取物给药剂量为 0.56 g/kg (即按斯皮诺素计 25

mg/kg),大鼠分别 ig 和鼻腔给予酸枣仁提取物 (0.5 g/mL)。其中鼻腔给药组大鼠 ip 2%戊巴比妥钠麻醉,仰卧位固定,头部略抬高并保持稳定,左右鼻孔交替给药,每侧鼻孔 75 μL 。

2.4.2 血浆及脑、嗅球组织中指标成分动力学分析 大鼠固定于固定器,颈前区剃毛、消毒,沿颈中线纵切口;分离皮下组织及肌内侧缘,暴露颈静脉。分别于给药前、给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、12 h 颈静脉取血,全血置于肝素化离心管中,离心、取上层血浆;采血完成后处死大鼠,迅速取出脑组织、嗅球,置 -20 ℃ 冰箱保存、备用。

血浆以 3 倍体积甲醇沉淀蛋白,涡旋、12 000 r/min 离心,取上清液,真空浓缩仪 37 ℃ 下挥干溶剂;脑及嗅球组织,加入 5 倍量生理盐水匀浆,经甲醇-醋酸乙酯混合溶剂 (8:2) 提取 2 次,合并提取液,挥干,生物样品残渣用 150 μL 甲醇溶解,离心取上清液, HPLC 测定。

采用酸枣仁提取物中有效成分斯皮诺素为指标成分,以分子结构、性质与斯皮诺素相似的葛根素作为内标物 (图 1),标准曲线法计算血浆、脑及嗅球组织中斯皮诺素含量。色谱条件: Inert Sustain Swift™ C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈 (A) -0.02% 甲酸水溶液 (B),梯度洗脱: 0~8 min, 10%~13% A; 8~13 min, 13% A; 13~16 min, 13%~20% A; 16~21 min, 20% A; 21~31 min, 20~80% A; 31~41 min, 80~10% A。体积流量为 1.0 mL/min,柱温为 30 ℃,检测波长为 335 nm。

血浆及组织样品中酸枣仁指标成分浓度与时间绘制药动力学曲线;采用 DAS 2.0 软件,非房室模型拟合得到药动力学参数。2 种给药方式的药动力学参数经 Student's *t* 检验分析。

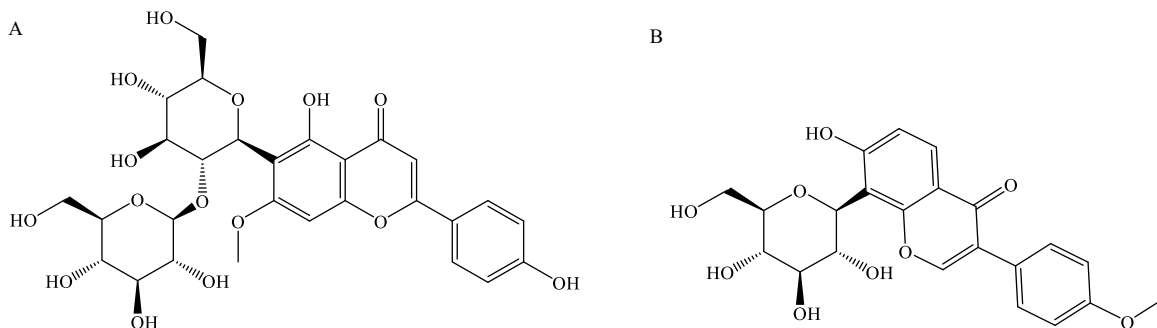


图 1 斯皮诺素 (A) 和葛根素 (B) 的分子结构式

Fig. 1 Structural formulas of spinosin (A) and puerarin (B)

2.5 酸枣仁提取物经鼻、经口给药镇静催眠作用比较

2.5.1 小鼠分组、造模与给药 ICR 小鼠适应性喂养 7 d 后, 按体重随机分为对照组、模型组、地西洋 (4 mg/kg) 组、ig 给药 (0.80 g/kg) 组、鼻腔给药 (0.80 g/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余小鼠 ip 30 mg/mL PCPA 生理盐水溶液 (300 mg/kg), 1 次/d, 连续 3 d。于第 11 天开始给药, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 地西洋组 ip 地西洋溶液, ig 给药组 ig 酸枣仁提取物 (10 mL/kg); 鼻腔给药组给予酸枣仁提取物, 左右侧鼻孔交替给药。各组小鼠每天给药 2 次, 每日 9:00 和 21:00 时各给药 1 次, 连续 7 d。

2.5.2 行为学检测 末次给药 30 min 后, 将小鼠置于自主活动测试仪反应格内, 适应环境 2 min, 启动系统记录 5 min 内的活动, 包括水平移动次数和垂直站立次数, 两者之和即为总自主活动次数。之后将小鼠放在正方形旷场箱 (100 cm×100 cm×50 cm) 中, 摄像头记录小鼠 5 min 内在箱中的行动轨迹, 通过 TM-Vision 行为学实验系统分析各组小鼠的运动距离、运动时间和静止时间。

2.5.3 指标检测 完成上述实验后, 每组小鼠均随机分成 2 组, 一组小鼠麻醉后, 于左心室心尖插入灌注针, 切开右心耳, 注入 30 mL 生理盐水, 再灌注 30 mL 4% 多聚甲醛, 至肝脏颜色泛白、四肢僵硬停止灌注。迅速分离脑组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 制成 4 μm 厚的冠状切片, HE 染色, 在光学显微镜下观察海马区形态学变化。另一组处死后剥取海马组织, 5 倍量生理盐水匀浆离心, 收集上清液, 按照试剂盒说明书检测 GABA 水平。

2.5.4 镇静催眠作用评价 另取 50 只小鼠同法造模并给药, 采用戊巴比妥钠协同睡眠实验评估药物镇静催眠作用。末次给药 30 min 后, 每组取 3 只, 共 15 只小鼠分别经 ip 25、30、35 mg/kg 戊巴比妥钠, 另取 15 只 ip 40、45、50 mg/kg 戊巴比妥钠, 每个剂量 5 只小鼠, 记录给予不同剂量戊巴比妥钠后 20 min 内小鼠入睡只数以确定剂量阈值, 阈下剂量定义为不诱发翻正反射消失 (≥60 s) 的最高剂量 (筛选范围为 25~35 mg/kg), 阈上剂量为诱导全部动物入睡的最低有效剂量 (筛选范围为 40~50 mg/kg)。继续给予酸枣仁提取物 3 d, 末次给药 30 min 后, 5 组小鼠均 ip 阈下剂量的戊巴比妥钠, 记录 30 min 内入睡只数并计算睡眠百分率 (睡眠百分

率=入睡小鼠只数/小鼠总只数)。再继续给药 3 d, 注射阈上剂量的戊巴比妥钠, 记录给药时间、翻正反射消失和恢复的时间, 计算睡眠潜伏期 (给药完毕至翻正反射消失时间) 和睡眠持续时间 (反射消失至恢复时间)。

2.6 统计学分析

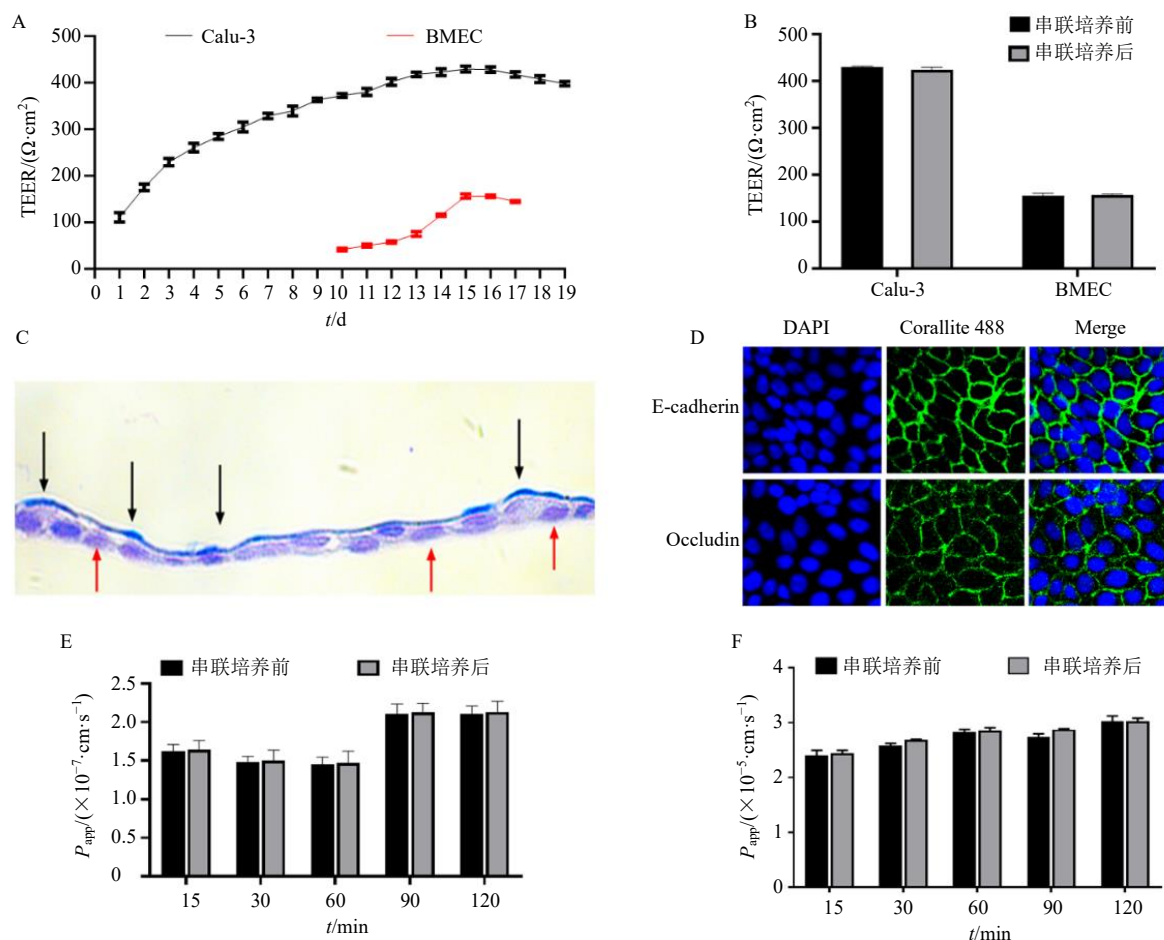
数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graphpad Prism 8 统计软件进行数据分析。两组间比较采用两独立样本 *t* 检验 (Student's *t*), 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 酸枣仁提取物经 Calu-3/BMEC 和 Caco-2/BMEC 细胞模型的转运行为分析

3.1.1 Calu-3/BMEC 模型表征及酸枣仁提取物转运行为分析 建立了模拟药物经鼻黏膜吸收入血、跨越血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 入脑的 Calu-3/BMEC 细胞模型。通过对 Calu-3 和 BMEC 细胞的生长曲线和 TEER 值监测 (图 2-A) 表明, Calu-3 在第 1 天快速生长, 可维持 19 d 的细胞活力; 其 TEER 值亦呈持续增加趋势, 至第 13 天达到 400~450 Ω·cm², 并维持在此范围内, 第 17 天有所下降。BMEC 可维持 8~9 d 的细胞生长期, 其 TEER 值在接种后第 6~7 天达到最大值 150 Ω·cm², 随后开始下降。因此, 于 24 孔 Transwell 内插室先接种、培养 Calu-3 细胞; 至第 9 天时, 于 12 孔 Transwell 内插室接种、培养 BMEC, 至第 16 天, 将 2 种细胞的 Transwell 内插室串联共培养 3 h, 即得 Calu-3/BMEC 细胞模型。通过对串联培养前后 TEER 值检测 (图 2-B), 表明 Calu-3、BMEC 细胞串联培养对细胞单层的完整性无影响。

分泌黏液是鼻黏膜细胞典型特性。图 2-C 显示了气-液界面层 Calu-3 细胞分泌黏液的情况, 细胞成单层排列, 顶端为被蓝色标记的分泌黏蛋白。从图 2-D 可观察到 Calu-3 细胞间的黏附连接蛋白 E-cadherin、紧密连接蛋白 Occludin 呈现连续、规则的分布, 在细胞轮廓和细胞间隙上形成相互连接的网状结构, 细胞核排列于网状结构内。测定了细胞渗透性标志物苯酚红的 *P*_{app} 值, 结果表明苯酚红在 Calu-3 细胞单层的 *P*_{app} 值为 (1.64±0.10)×10⁻⁷~(2.13±0.11)×10⁻⁷ cm/s, 120 min 内 *P*_{app} 值均小于 0.5×10⁻⁶ cm/s^[17]。BMEC 单层的 *P*_{app} 值为 (2.40±0.10)×10⁻⁵~(3.02±0.07)×10⁻⁵ cm/s, 与文献报道基本一致^[18]。进一步比较了串联共培养前后



A-Cal-3、BMEC 单层模型 TEER 值监测; B-Cal-3/BMEC 细胞模型串联培养前后的 TEER 值; C-Cal-3 细胞的黏液分布 (红色箭头指示细胞核, 黑色箭头指示黏液, $\times 200$); D-Cal-3 细胞间连接蛋白 E-cadherin、Occludin 的分布 ($\times 200$); E-Cal-3/BMEC 细胞模型串联培养前后 Calu-3 单层的苯酚红通透性; F-Cal-3/BMEC 细胞模型串联培养前后 BMEC 单层的苯酚红通透性。

A-TEER values of Calu-3 and BMEC monolayer model; B-TEER values of Calu-3/BMEC model before and after tandem culture; C-mucus distribution of Calu-3 cells (red arrow indicates nucleus, black arrow indicates mucus, $\times 200$); D-distribution of intercellular junction proteins E-cadherin and Occludin in Calu-3 cells ($\times 200$); E-phenol red permeability of Calu-3 cell layer before and after tandem culture of Calu-3/BMEC cell model; F-phenol red permeability of BMEC cell layer before and after tandem culture of Calu-3/BMEC cell model.

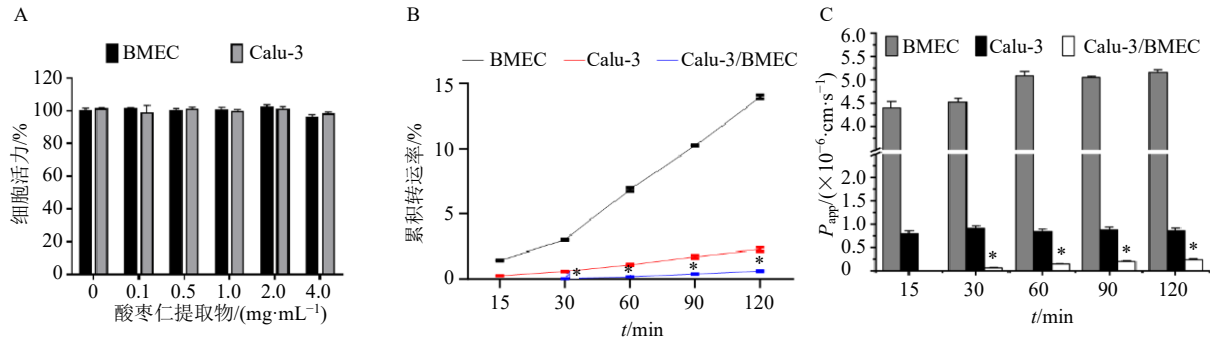
图 2 Calu-3/BMEC 细胞模型的性能表征 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Characterization of performance of Calu-3/BMEC cell model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

P_{app} 值 (图 2-E、F), Calu-3 和 BMEC 细胞层串联共培养前、后的 P_{app} 值相近, 均无显著性差异。以上结果表明 2 种细胞均呈现完整、紧密的细胞单层结构; Calu-3 细胞具备鼻黏膜细胞的特征, 且串联共培养对 Calu-3、BMEC 的细胞完整性、通透性无影响, 所建立的 Calu-3/BMEC 细胞模型可用于药物经鼻黏膜吸收、转运入脑的行为研究。

CCK-8 实验结果 (图 3-A) 显示, 0.1~4.0 mg/mL 酸枣仁提取物对 Calu-3 和 BMEC 的细胞存活率均无显著性影响。因此以 2.0 mg/mL 的酸枣仁提取物开展了细胞转运实验, 累积转运率结果 (图 3-B) 表明, 在 Calu-3/BMEC 细胞模型给药 30 min 后才

检测到有效成分斯皮诺素, 而 Calu-3 和 BMEC 单层模型 15 min 即可检测到斯皮诺素; 随着监测时间的延长, 累积转运率均逐渐增加, 但 Calu-3/BMEC 模型的累积转运率均低于 2 种单层细胞模型。进一步分析了各时间点的通透性参数 (图 3-C), 斯皮诺素在 Calu-3/BMEC 模型的 P_{app} 值显著低于 Calu-3 和 BMEC 单层模型 ($P < 0.05$), 120 min 时 Calu-3/BMEC 模型的 P_{app} 值分别是 Calu-3 模型和 BMEC 模型的 25.6% 和 4.3%。以上结果表明, 在经鼻入脑的途径中, Calu-3 和 BMEC 细胞层均会阻滞斯皮诺素的转运, 且其多细胞的跨膜转运会累加阻滞作用, 使其转运量进一步降低。



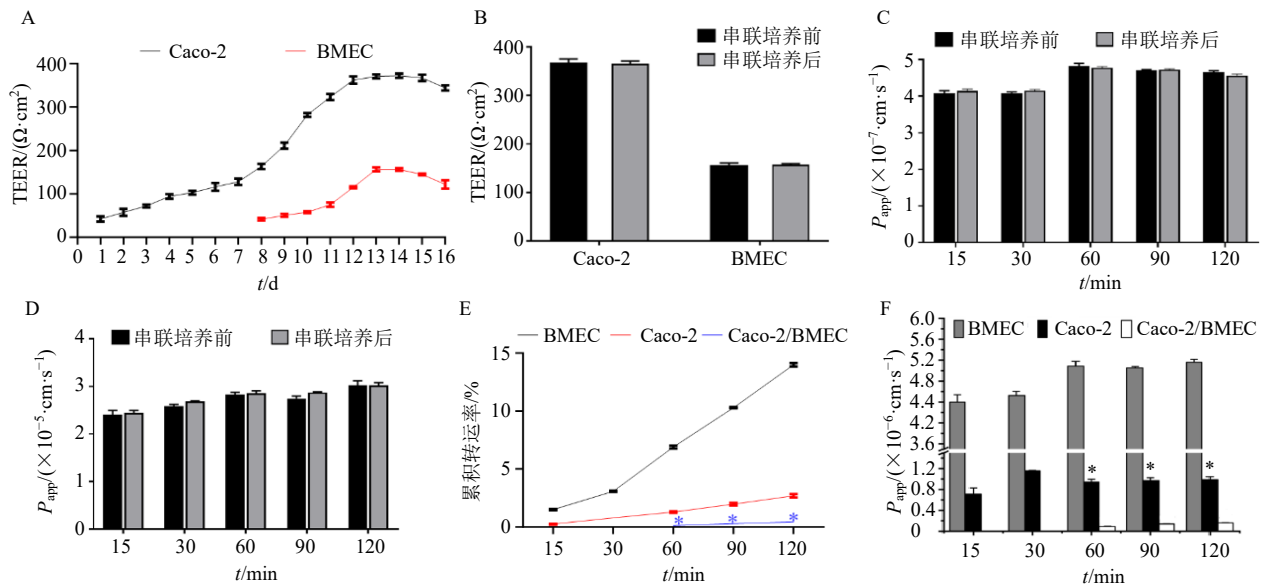
A-酸枣仁提取物对 Calu-3、BMEC 细胞活力的影响 ($n=6$); B-酸枣仁提取物指标成分斯皮诺素在 Calu-3、BMEC 和 Calu-3/BMEC 细胞模型的累积转运率 ($n=3$); C-斯皮诺素在 Calu-3、BMEC 和 Calu-3/BMEC 串联模型的 P_{app} ($n=3$); 与 Calu-3 或 BMEC 组比较: $*P<0.05$ 。
A-effect of *Zizyphi Spinosae Semen* extract on viability of Calu-3 and BMEC ($n=6$); B-accumulative transport rate of spinosin, an index component of *Zizyphi Spinosae Semen* extract, in Calu-3, BMEC and Calu-3/BMEC cell models ($n=3$); C- P_{app} of spinosin in Calu-3, BMEC and Calu-3/BMEC models ($n=3$); $*P<0.05$ vs Calu-3 or BMEC group.

图 3 酸枣仁提取物对细胞活力的影响及转运行为分析 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of *Zizyphi Spinosae Semen* extract on cell viability and analysis of transport behavior ($\bar{x} \pm s$)

3.1.2 Caco-2/BMEC 模型表征及酸枣仁提取物转运行为分析 以 Caco-2/BMEC 细胞模型模拟药物经胃肠道吸收入血、跨越 BBB 入脑的细胞转运过程。同样通过 TEER 值监测 (图 4-A、B), 当 Caco-

2 细胞在 Transwell 内插室培养 7 d 时, 在 12 孔 Transwell 内插室接种、培养 BMEC; 继续培养 6~7 d, Caco-2 细胞层的 TEER 值达到 $300 \sim 400 \Omega \cdot \text{cm}^2$, BMEC 细胞层的 TEER 值达到 $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$, 此时细



A-Caco-2、BMEC 单层模型 TEER 值监测; B-Caco-2/BMEC 细胞模型串联培养前后的 TEER 值; C-Caco-2/BMEC 细胞模型串联培养前后 Caco-2 单层的苯酚红通透性; D-Caco-2/BMEC 细胞模型串联培养前后 BMEC 单层的苯酚红通透性; E-酸枣仁提取物中斯皮诺素在 Caco-2、BMEC 单层、Caco-2/BMEC 细胞模型的累积转运率; F-斯皮诺素在 Caco-2、BMEC、Caco-2/BMEC 细胞模型的 P_{app} ; 与 Caco-2 或 BMEC 组比较: $*P<0.05$ 。

A-TEER values of Caco-2 and BMEC monolayer model; B-TEER values of Caco-2/BMEC model before and after tandem culture of Caco-2/BMEC cell model; C-phenol red permeability of Calu-3 cell layer before and after tandem culture of Caco-2/BMEC cell model; D-phenol red permeability of BMEC cell layer before and after tandem culture of Calu-3/BMEC cell model; E-accumulative transport rate of spinosin of *Zizyphi Spinosae Semen* extract in Caco-2, BMEC monolayer and Caco-2/BMEC cell models; F- P_{app} of spinosin in Caco-2, BMEC and Caco-2/BMEC cell models; $*P<0.05$ vs Calu-3 or BMEC group.

图 4 Caco-2/BMEC 细胞模型的性能表征及酸枣仁提取物转运行为分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Characterization of performance of Caco-2/BMEC cell model and analysis of transport behavior of *Zizyphi Spinosae Semen* extract ($\bar{x} \pm s, n=3$)

胞单层完整性良好, 将 2 种细胞串联共培养 3 h, 经测定串联培养前后细胞模型的 TEER 值无显著性差异。苯酚红通透性实验结果(图 4-C、D)表明, 苯酚红在 Caco-2 细胞模型的 P_{app} 值为 $4.02 \times 10^{-7} \sim 4.86 \times 10^{-7}$ cm/s, 120 min 内 P_{app} 值均小于 5×10^{-7} cm/s; 在 BMEC 细胞模型的 P_{app} 值为 $2.21 \times 10^{-5} \sim 3.17 \times 10^{-5}$ cm/s; 串联培养后 Caco-2 和 BMEC 细胞层 P_{app} 值均无显著性改变, 即串联培养对细胞单层通透性无影响。Caco-2/BMEC 模型较好保留了细胞的完整性和通透性, 可用于酸枣仁提取物的细胞转运实验研究。

0.1~4.0 mg/mL 酸枣仁提取物对 Caco-2 细胞的存活率亦无显著性影响。选择了细胞安全浓度范围内的酸枣仁提取物, 考察其在 Caco-2/BMEC 细胞模型转运行为。如图 4-E、F 所示, 与 Caco-2 和 BMEC 单层模型相比, 指标成分斯皮诺素累积转运率均明显低于 Caco-2、BMEC 模型, 给药后 60 min 才检测到斯皮诺素, 120 min 的转运率分别是 Caco-

2、BMEC 模型的 17.3%、3.1%; 同样, 检测终点时有效成分斯皮诺素在 Caco-2/BMEC 模型的 P_{app} 值分别比 Caco-2 和 BMEC 模型降低了 87.0%和 96.9%。

3.2 酸枣仁提取物 ig、经鼻给药途径的组织分布分析

采取 ig 和鼻腔 2 种给药途径给予酸枣仁提取物, 考察了其中指标成分斯皮诺素在大鼠体内的血浆和脑组织分布过程。从图 5-A、B 所示的药时曲线可知, ig 和鼻腔给药后, 血浆和脑组织中均可检测到酸枣仁指标成分斯皮诺素, 但 2 种给药方式的达峰时间(t_{max})、达峰浓度(C_{max})和滞留时间有较大差异。ig 给药在 5 min~4 h, 可监测到血浆和脑组织中斯皮诺素; 而鼻腔给药至给药 8 h, 血浆和脑组织仍可检测到指标成分。同时测定了嗅球组织中斯皮诺素的药时曲线(图 5-C), 鼻腔给药嗅球组织斯皮诺素具有较高的浓度和较长的滞留时间。

进一步分析了 2 种给药方式的主要药动力学参数(表 1), 在相同给药剂量下, ig 给药在血浆和脑组

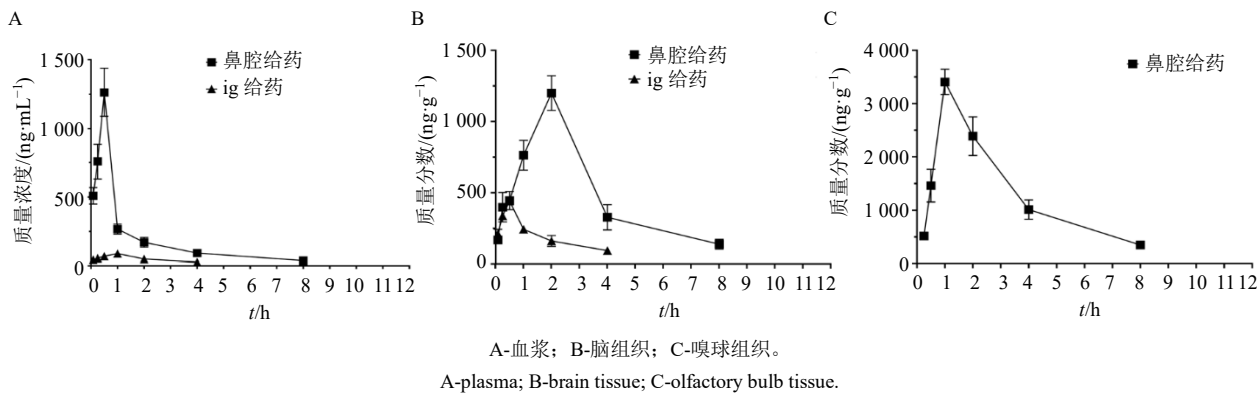


图 5 酸枣仁提取物 ig、经鼻给药后指标成分浓度-时间曲线
Fig. 5 Concentration-time curves of index component of *Zizyphi Spinosae Semen* extract after gavage and intranasal administration

表 1 酸枣仁提取物经 ig、鼻给药后血浆、脑、嗅球中斯皮诺素的药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Pharmacokinetic parameters of spinosin in plasma, brain and olfactory bulb after gavage and intranasal administration of *Zizyphi Spinosae Semen* extract ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

药动力学参数	单位	ig 给药		鼻腔给药		
		血浆	脑组织	血浆	脑组织	嗅球
C_{max}	ng·mL ⁻¹ 或 ng·g ⁻¹	106.93 ± 3.65*	441.91 ± 25.94*	1 306.48 ± 167.50	1 199.96 ± 121.93	3 405.17 ± 217.86
$AUC_{0 \sim t}$	ng·h·mL ⁻¹ 或 ng·h·g ⁻¹	335.94 ± 5.54*	774.95 ± 30.59*	1 616.96 ± 23.95	3 948.16 ± 383.14	6 296.20 ± 1 098.95
$AUC_{0 \sim \infty}$	ng·h·mL ⁻¹ 或 ng·h·g ⁻¹	795.10 ± 10.25*	1 017.25 ± 65.05*	2 635.04 ± 193.83	4 712.70 ± 269.51	10 007.10 ± 490.38
t_{max}	h	0.90 ± 0.20*	0.45 ± 0.10*	0.45 ± 0.10	1.80 ± 0.40	0.90 ± 0.20
$t_{1/2}$	h	4.71 ± 0.32*	1.85 ± 0.25*	1.51 ± 0.33	3.03 ± 0.27	2.78 ± 0.30
$CL_{z/F}$	L·h ⁻¹ ·kg	31.45 ± 0.61*	24.65 ± 1.53*	15.03 ± 0.44	1.06 ± 0.06	2.50 ± 0.12
$MRT_{0 \sim t}$	h	1.92 ± 0.06*	1.46 ± 0.08*	1.63 ± 0.12	2.73 ± 0.09	1.87 ± 0.07
$V_{z/F}$	L·kg ⁻¹	213.72 ± 12.41*	65.60 ± 6.50*	33.00 ± 6.75	5.08 ± 1.03	11.41 ± 2.58

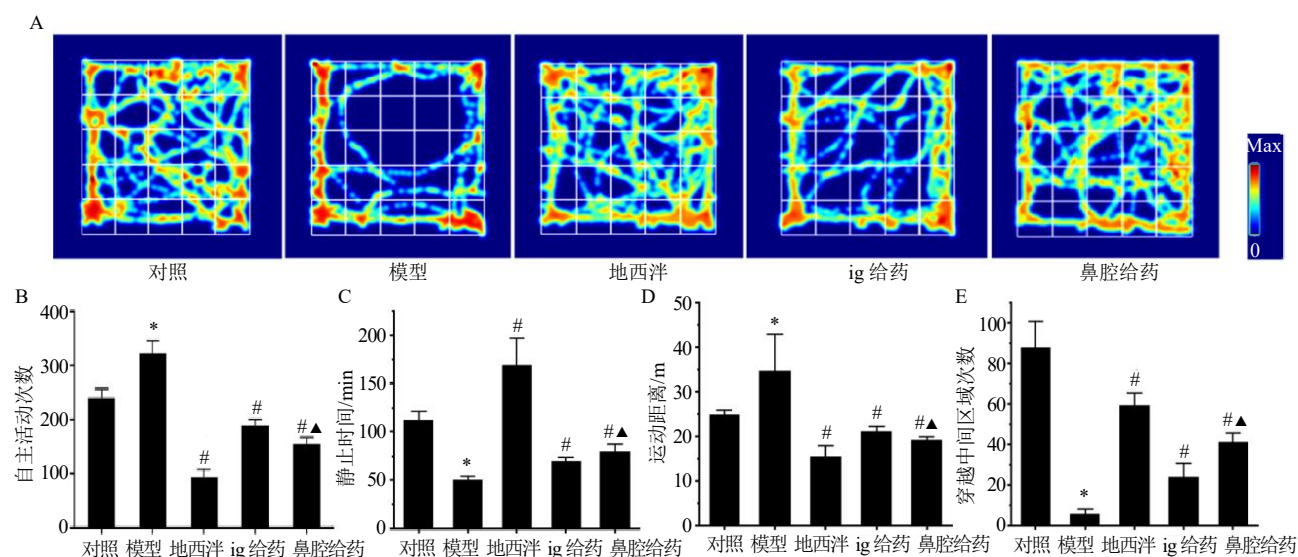
与鼻腔给药组比较: * $P < 0.05$ 。
* $P < 0.05$ vs nasal administration group.

织的 $C_{\max}$ 和药时曲线下面积 (area under curve, $AUC_{0\sim t}$) 都明显低于鼻腔给药, 表明经鼻给药可增加酸枣仁提取物中斯皮诺素的入血、入脑吸收。鼻腔方式的血浆吸收半衰期 ($t_{1/2}$) 低于 ig 给药, 相应地其 $t_{\max}$ 快于 ig 给药; 而在脑组织中, 鼻腔方式的 $t_{1/2}$ 大于 ig 给药, $t_{\max}$ 晚于 ig 给药。比较 2 种给药方式消除速率, 鼻腔给药方式的血浆清除率 (CL_{ZF}) 为 ig 给药的 47.8%, 脑组织 CL_{ZF} 为 ig 给药的 4.3%, 这与药时曲线呈现的趋势相一致。此外, 鼻腔给药方式在嗅球组织中检测到斯皮诺素较高的 $C_{\max}$ 和 $AUC_{0\sim t}$, 其中 $AUC_{0\sim t}$ 分别是血浆和脑组织的 3.9 和 1.6 倍, 提示鼻腔给药后部分提取物沿嗅球通路直接入脑。ig 给药方式中, 指标成分通常经胃肠道吸收入血, 再随血液循环至脑, 因此在嗅球组织中未检测到斯皮诺素。而鼻腔给药方式中, 血浆中的指标成分的分布可表明存在经鼻给药后吸收入血、入脑的方式, 嗅球组织中的分布可表明直接方式入脑, 即脑组织中的指标成分分布来自于间接和直接 2 种给药方式。

3.3 酸枣仁提取物 ig、经鼻给药的镇静催眠作用分析

进一步比较了 ig 和鼻腔 2 种给药方式对酸枣仁提取物镇静、催眠作用的影响。首先监测了实验动物的自主活动次数, 如图 6-B 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠自主活动次数明显升高 ($P<0.05$),

为自主活动亢进; 与模型组比较, 2 种途径给药均显著降低小鼠自主活动次数 ($P<0.05$), 且鼻腔给药组小鼠自主活动次数明显低于 ig 给药组 ($P<0.05$)。采用旷场实验精确记录实验动物的运动轨迹, 图 6-A 为轨迹热图, 与对照组比较, 模型组小鼠沿旷场四周运动, 穿越中间区域次数显著减少, 表现出中间区域回避倾向, 这是由于旷场环境的开放性和缺乏隐蔽处会导致动物表现出更多的探索行为和更高的警觉程度。正常健康动物会表现出典型的环境探索行为特征, 而失眠动物表现为焦虑样改变同时警觉性降低、认知功能下降, 更倾向于在场地边缘区域活动^[19-20]。给予地西洋和酸枣仁提取物干预后, 小鼠穿越中间区域次数明显增加, 且鼻腔给药组高于 ig 给药组。分析各组小鼠旷场实验中的静止时间、运动距离和穿越中间区域次数, 结果如图 6-C~E 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠静止时间和穿越中间区域次数显著减少 ($P<0.05$), 运动距离显著增加 ($P<0.05$); 与模型组比较, 给予地西洋和酸枣仁提取物后, 小鼠静止时间和穿越中间区域次数显著增加 ($P<0.05$), 运动距离显著减少 ($P<0.05$); 其中与 ig 给药组比较, 鼻腔给药组小鼠静止时间和穿越中间区域次数显著增加 ($P<0.05$), 运动距离显著减少 ($P<0.05$)。



A-旷场实验小鼠行动轨迹热图; B-小鼠自主活动次数; C-静止时间; D-运动距离; E-穿越中间区域次数; 与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与 ig 给药组比较: ^ $P<0.05$, 图 7 同。

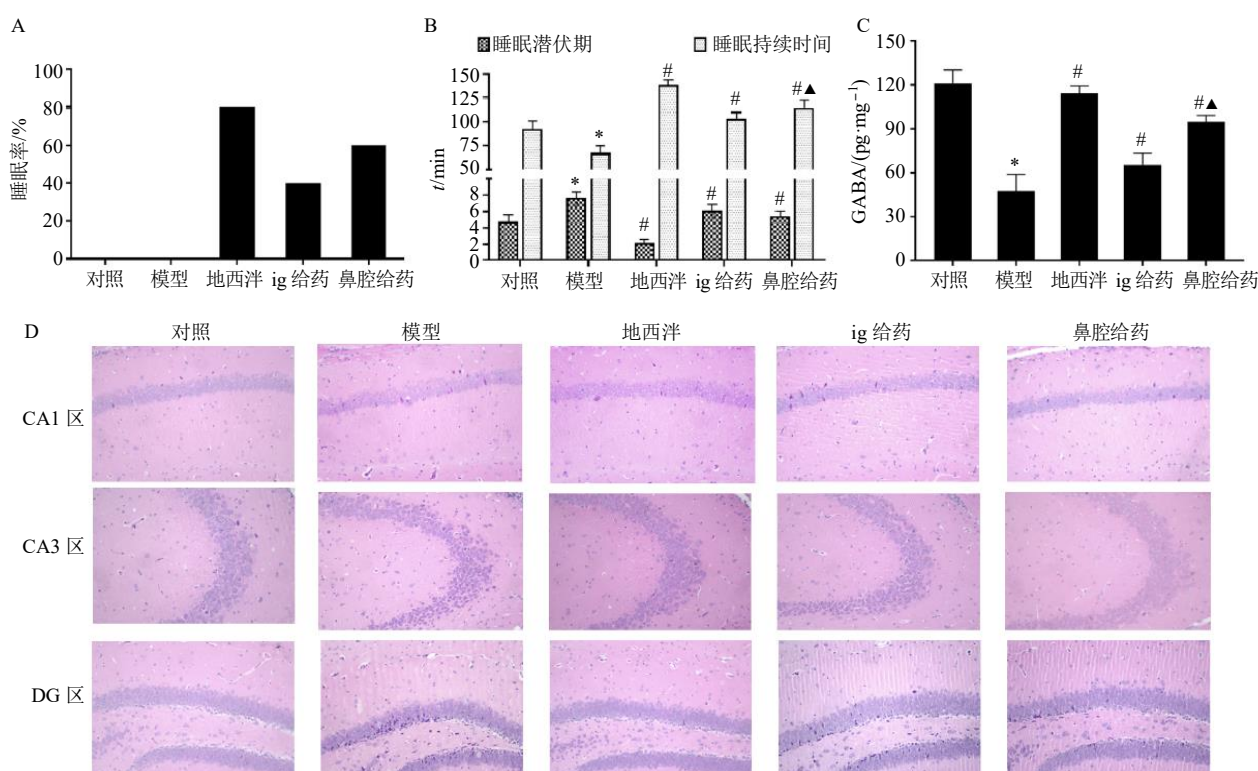
A-heatmap of movement trajectories of mice in open field test; B-number of spontaneous activities in mice; C-immobility time; D-traveled distance; E-number of traversing center zone; * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs model group; ^ $P<0.05$ vs ig administration group, same as Fig. 7.

图 6 酸枣仁提取物 ig、经鼻给药的镇静效果分析 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Analysis of sedative effect of Zizyphi Spinosae Semen extract after gavage and intranasal administration ($\bar{x} \pm s, n=10$)

采用戊巴比妥钠协同睡眠实验^[21]评估酸枣仁提取物的催眠作用。如图 7-A 所示, ip 阈下剂量的戊巴比妥钠 (30 mg/kg), 对照组和模型组小鼠的翻正反射未消失, 入睡小鼠只数为 0; 给予地西洋和酸枣仁提取物, 小鼠睡眠百分率均有增加, 地西洋组、ig 给药组和鼻腔给药组小鼠睡眠百分率分别为 80%、40%和 60%。如图 7-B 所示, ip 阈下剂量戊巴比妥钠 (45 mg/kg), 与对照组比较, 模型组小鼠睡眠潜伏期增加 ($P<0.05$), 持续时间减少 ($P<0.05$); 给予地西洋和酸枣仁提取物后, 小鼠睡眠潜伏期显著缩短 ($P<0.05$), 睡眠持续时间显著延长 ($P<0.05$), 且鼻腔给药组的睡眠持续时间较 ig 给药组显著延长 ($P<0.05$)。

如图 7-C 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马组织中 GABA 水平显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组 GABA 水平显著升高 ($P<0.05$), 且鼻腔给药组 GABA 水平较 ig 给药组升高了 44.6% ($P<0.05$)。海马组织的 HE 染色结果见图 7-D, 对照组小鼠海马 CA1、CA3、DG 区结构正常, 锥体细胞排列规则且紧密, 细胞圆润饱满, 核膜完好, 核仁清晰可见; 模型组海马组织损伤严重, 结构异常, 锥体细胞分布疏松紊乱, 大量细胞核深染, 出现神经元固缩现象, CA3、DG 区细胞核固缩情况较 CA1 区更明显; 与模型组比较, 地西洋组和不同途径的酸枣仁给药组锥体细胞排列趋于规律, 细胞形态完整, 不同程度地改善了海马组织结构异常情况。



A-小鼠睡眠百分率 ($n=10$); B-小鼠睡眠潜伏期及睡眠持续时间 ($n=10$); C-海马组织中 GABA 水平 ($n=5$); D-海马组织 HE 染色结果 ($\times 200$)。

A-sleep percentage of mice ($n=10$); B-sleep latency and sleep duration of mice ($n=10$); C-level of GABA in hippocampus ($n=5$); D-HE staining result of hippocampus ($\times 200$).

图 7 酸枣仁提取物 ig、经鼻给药的催眠效果评价 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 7 Evaluation of hypnotic effect of *Zizyphi Spinosae Semen* extract after gavage and intranasal administration ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

本研究分别采用 Calu-3/BMEC 和 Caco-2/BMEC 细胞模型模拟了酸枣仁经鼻间接途径入脑和经口途径入脑所需跨越的主要细胞屏障。肠道的 Caco-2、鼻腔的 Calu-3 和血脑屏障的 BMEC 对酸

枣仁提取物的跨细胞转运都有阻滞作用, 特别当细胞层串联后, 进一步增加了酸枣仁的跨细胞转运屏障。由此可知, 药物在进入体内到达目标部位前所需经历的多细胞跨膜过程都会阻滞药物的转运, 导致分布到目标部位的药物含量降低^[22]。而对于 2 种

串联细胞模型,酸枣仁中指标成分斯皮诺素经 Calu-3/BMEC 模型 120 min 的累积转运率为 0.60%, 稍高于经 Caco-2/BMEC 模型的相应累积转运率 (0.43%), 推测药物孵育一段时间后,经鼻吸收入脑的细胞阻滞作用稍弱于经口途径。

相同剂量的酸枣仁提取物经鼻给予大鼠后,指标成分斯皮诺素血浆 AUC_{0-t} 是 ig 给药的 4.8 倍,脑组织 AUC_{0-t} 是 ig 给药的 5.1 倍,这可能与经鼻给药有直接、间接多种途径吸收入血、入脑有关。经测定鼻腔方式中嗅球组织的酸枣仁指标成分含量明显高于血浆,可知嗅球直接入脑途径是脑组织中斯皮诺素浓集的主要贡献途径。药物进入鼻腔后,输送到嗅区、可被内吞进入嗅觉神经元的轴突;经囊泡沿嗅神经、到达嗅球;通过胞吐作用在嗅球中释放,然后传递到脑的吻侧区^[13]。考虑到酸枣仁提取物黏稠度,可增加其在嗅区的停留时间,相应地与嗅觉上皮细胞的相互作用时间增加,亦有利于酸枣仁在嗅区的蓄积和转运入脑^[23-24]。

酸枣仁发挥镇静催眠作用的靶区域在脑组织,而其在脑组织中的浓集将利于改善睡眠障碍。从不同给药途径对 PCPA 致失眠小鼠的药效实验结果可知,经鼻给药比 ig 给药呈现出更强的镇静催眠效果。脑组织中 GABA 作为抑制性神经递质可使神经细胞膜的 Cl^- 通透性增加,顺浓度差进入细胞内,增加细胞膜内负电位,实现超极化进而导致兴奋性下降,表现为镇静催眠作用^[25],GABA 含量测定结果表明酸枣仁提取物经鼻给药可显著上调海马组织 GABA 的含量,这与经鼻给药组的镇静催眠效果强于 ig 组的结果相一致。此外,研究表明睡眠障碍与海马体损伤之间存在着相互影响的复杂关联,二者形成了一种互为因果的病理循环^[26-27]。海马病理观察结果表明给予酸枣仁提取物后,海马组织结构异常现象显著减少,酸枣仁可改善由失眠引发的海马组织损伤,这与 Xiao 等^[28]的研究结果相一致,酸枣仁提取物能够通过改善 PCPA 致失眠大鼠海马的损害来改善睡眠质量。本研究结果表明作为可增加药物入脑的鼻腔给药途径,因其直接、间接的多种入脑通路,显著增加了酸枣仁提取物在脑组织中含量,进而产生了增强了镇静催眠作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] He S R, Zhao C B, Zhang J X, *et al.* Botanical and traditional uses and phytochemical, pharmacological,

pharmacokinetic, and toxicological characteristics of *Ziziphi Spinosae Semen*: A review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5861821.

- [2] 任佳丽, 卞田润, 陈佳宁, 等. 酸枣仁防治失眠症及其开发应用的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(18): 6823-6832.
- [3] 周畅. 酸枣仁治疗失眠用法的历代文献研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2023.
- [4] 黄晓欣, 毛怡宁, 李虹, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 代谢组学的不同产地酸枣仁化学成分差异性比较 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(12): 2077-2087.
- [5] Zhang J P, Liao D Q, Li L, *et al.* Reduced c-Fos expression in orexin neurons of the lateral hypothalamic area and the locus coeruleus following injection of spinosin into mice [J]. *Folia Morphol*, 2020, 79(3): 429-437.
- [6] 何灵, 张圣美, 陶宇, 等. 基于代谢组学与肠道菌群探讨炒酸枣仁治疗睡眠-觉醒昼夜节律障碍小鼠模型的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(18): 6208-6225.
- [7] Zhao W R, Zhang H M, Li L, *et al.* Spinosin enhances non-rapid eye movement sleep and alters c-Fos expression in sleep-wake regulatory brain regions in mice [J]. *Sleep Breath*, 2025, 29(1): 101.
- [8] Wang L E, Cui X Y, Cui S Y, *et al.* Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi Spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT(1A) receptors [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(6): 404-409.
- [9] Li Y J, Yao M C, Cheng S. Quantitative determination of spinosin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(4): 1169-1173.
- [10] Qiao L D, Liu Y, Chen X Y, *et al.* A HPLC-MS/MS method for determination of 6"-feruloylspinosin in rat plasma and tissues: Pharmacokinetics and tissue distribution study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 121: 77-83.
- [11] Yanamadala Y, Muthumula C M R, Khare S, *et al.* Strategies to enhance nanocrystal formulations for overcoming physiological barriers across diverse routes of administration [J]. *Int J Nanomedicine*, 2025, 20: 367-402.
- [12] Steyn J D, Haasbroek-Pheiffer A, Pheiffer W, *et al.* Evaluation of drug permeation enhancement by using *in vitro* and *ex vivo* models [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 18(2): 195.
- [13] Jeong S H, Jang J H, Lee Y B. Drug delivery to the brain via the nasal route of administration: Exploration of key targets and major consideration factors [J]. *J Pharm Investig*, 2023, 53(1): 119-152.
- [14] 郭秀洁, 李昊虬, 冯昊天, 等. 基于高效液相色谱定量

- 指纹图谱和液相色谱-质谱联用定量的酸枣仁提取物质量考察 [J]. 色谱, 2021, 39(9): 989-997.
- [15] 拓文静, 宋继红, 韩成坤, 等. 白芷香豆素成分对葛根素跨血脑屏障体内外转运的影响 [J]. 药学学报, 2023, 58(5): 1156-1164.
- [16] Ta W J, Wang J, Song J H, *et al.* Elucidation the mechanism of the active ingredient imperatorin promoting drug absorption in cell model [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2024, 76(5): 559-566.
- [17] Pan H Y, Bai M, Zheng W T, *et al.* Absorption and transport of polysaccharides from soybean seed coat in the Caco-2 cell model and their interaction with the MUC2 protein [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 309: 143039.
- [18] 鲍欢. 体外建立血脑屏障细胞模型及其屏障功能的建立 [D]. 苏州: 苏州大学, 2003.
- [19] Yang Y, Chen Z, Yan G L, *et al.* Mass spectrum oriented metabolomics for evaluating the efficacy and discovering the metabolic mechanism of Naoling Pian for insomnia [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 236: 115756.
- [20] Zhai S, Yin M M, Sun H Q, *et al.* The day-night differences in cognitive and anxiety-like behaviors of mice after chronic sleep restriction [J]. *FASEB J*, 2023, 37(7): e23034.
- [21] Ren A R, Wu T B, Wang Y R, *et al.* Integrating animal experiments, mass spectrometry and network-based approach to reveal the sleep-improving effects of *Ziziphi Spinosae Semen* and γ -aminobutyric acid mixture [J]. *Chin Med*, 2023, 18(1): 99.
- [22] 曹婉昕, 杨艺辉, 杨红, 等. 跨血脑屏障药物载体的研究进展 [J]. 药学学报, 2024, 59(12): 3222-3231.
- [23] 胡筱芸, 岳霄, 吴传斌, 等. 鼻腔药物递送的影响因素和提高递送效率的设计策略 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2023, 52(3): 328-337.
- [24] Wang G L, Zhai Z Z, Wang W H, *et al.* Tailored borneol-modified lipid nanoparticles nasal spray for enhanced nose-to-brain delivery to central nervous system diseases [J]. *ACS Nano*, 2024, 18(34): 23684-23701.
- [25] Li X Y, He C, Shen M, *et al.* Effects of aqueous extracts and volatile oils prepared from Huaxiang Anshen Decoction on *p*-chlorophenylalanine-induced insomnia mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117331.
- [26] 谭淑文, 王强, 翟茜. 睡眠障碍相关认知功能变化: 从宏观到微观 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2022, 43(4): 430-434.
- [27] 侯博宇, 范鹰. 睡眠障碍与常见神经系统疾病的关系 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2020, 22(3): 329-331.
- [28] Xiao F Q, Shao S, Zhang H Y, *et al.* Neuroprotective effect of *Ziziphi Spinosae Semen* on rats with *p*-chlorophenylalanine-induced insomnia via activation of GABAA receptor [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 965308.

[责任编辑 李亚楠]