

酸枣仁百合睡眠肽复合物改善失眠模型大鼠的睡眠

梁曹雯¹, 曹庸^{1*}, 李俊¹, 刘果¹, 朱晓艾¹, 冯孔龙¹, 陈媛媛², 李赞², 罗珍²

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 无限极(中国)有限公司, 广东广州 510665)

摘要: 该实验在已经分离鉴定出牛乳源睡眠肽的基础上, 研究了酸枣仁、百合、睡眠肽 3 种物质复配制成的复合物对 DL-4-氯苯基丙氨酸 (PCPA) 致失眠大鼠的睡眠干预效果及作用机制。构建 PCPA 致大鼠失眠模型, 通过旷场试验 (OFT) 探究大鼠的行为学变化, 探究复合物对失眠大鼠的促睡眠效果。通过检测大鼠脑部的神经递质及代谢产物研究复合物的作用途径, 探究复合物的促睡眠机理。结果显示, 复合物组大鼠在中央停留次数、中央区停留时间、运动总路程分别为 11.00 次、15.01 s 和 3309.71 cm, 与失眠模型组有显著差异 ($p < 0.05$), 与空白组无显著差异 ($p > 0.05$)。复合物组 GABA (γ -氨基丁酸)、Glu (谷氨酸)、Gly (甘氨酸)、NE (去甲肾上腺素)、DA (多巴胺) 和 5-HT (5-羟色胺) 含量分别为 94.96 $\mu\text{g/mL}$ 、1508.42 $\mu\text{g/L}$ 、74.59 $\mu\text{g/L}$ 、37.36 $\mu\text{g/L}$ 、1.76 $\mu\text{g/L}$ 和 1.61 $\mu\text{g/L}$, 复合物组与失眠模型组相比, 大鼠下丘脑抑制性神经递质 GABA 含量显著上升 ($p < 0.05$); 兴奋性神经递质 NE、DA 含量显著下降 ($p < 0.05$), 表明复合物组可调节大鼠下丘脑中的神经递质。结果说明酸枣仁百合睡眠肽复合物能改善失眠大鼠行为学与睡眠。

关键词: 旷场实验; 行为学; 多肽; 神经递质

文章编号: 1673-9078(2021)09-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.0429

Milk-derived Sleep-inducing Peptides with Extracts of *Semen ziziphi spinosae* and *Bulbus lilii* Improve Sleep in Rat Models of Insomnia

LIANG Cao-wen¹, CAO Yong^{1*}, LI Jun¹, LIU Guo¹, ZHU Xiao-ai¹, FENG Kong-long¹, CHEN Yuan-yuan², LI Yun², LUO Zhen²

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Infinitus (China) Co. Ltd., Guangzhou 510665, China)

Abstract: The effect and mechanism of action of a mixture of sleep-inducing peptides isolated from cow milk and *Semen ziziphi spinosae* and *Bulbus lilii* extracts on para-chlorophenylalanine-induced (PCPA-induced) insomnia in rat models were investigated. The sleep-inducing effect of the mixture was evaluated by studying the behavioral changes of the rats using open-field tests. By measuring the levels of neurotransmitters and metabolites in the rat brains, the reaction pathway and sleep-inducing mechanism of the mixture were analyzed. There were significant differences between rats treated with the mixture and those in which insomnia had been induced ($p < 0.05$) but no significant differences between the treatment and control groups ($p > 0.05$). The number of stays in the central zone, the duration of the stays, and the total distances moved by the rats treated with the mixture were 11.00, 15.01 s, and 3309.71 cm, respectively. The concentrations of γ -aminobutyric acid (GABA), glutamic acid (Glu), glycine (Gly), noradrenaline (NE), dopamine (DA), and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the brains of the mixture-treated group were 94.96 $\mu\text{g/mL}$, 1508.42 $\mu\text{g/L}$, 74.59 $\mu\text{g/L}$, 37.36 $\mu\text{g/L}$, 1.76 $\mu\text{g/L}$, and 1.61 $\mu\text{g/L}$, respectively. In addition, the mixture-treated rats had significantly higher levels of hypothalamic inhibitory neurotransmitters, namely GABA, than the rats with insomnia ($p < 0.05$) but significantly lower levels of excitatory neurotransmitters, namely NE and DA ($p < 0.05$). The

引文格式:

梁曹雯, 曹庸, 李俊, 等. 酸枣仁百合睡眠肽复合物改善失眠模型大鼠的睡眠[J]. 现代食品科技, 2021, 37(9): 1-7

LIANG Cao-wen, CAO Yong, LI Jun, et al. Milk-derived sleep-inducing peptides with extracts of *Semen ziziphi spinosae* and *Bulbus lilii* improve sleep in rat models of insomnia [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 1-7

收稿日期: 2021-01-08

基金项目: 中国博士后面上项目 (2020M672651); 国家自然科学基金项目 (31972078); 广东省功能食品活性物重点实验室 (2018B030322010); 广东省现代农业产业技术体系创新团队项目 (2020KJ117); 广东高校国际科技合作创新平台项目 (2013gjh20003)

作者简介: 梁曹雯 (1995-), 女, 研究生, 研究方向: 食品科学, E-mail: lcw5495@163.com

通讯作者: 曹庸 (1966-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

results suggest that the mixture of cow-milk-derived sleep-inducing peptides and *Semen ziziphi spinosae* and *Bulbus lilii* extracts can regulate the release of hypothalamic neurotransmitters and improve the behavior and sleep of rat models of insomnia.

Key words: open-field test; behavioral sciences; peptides; neurotransmitter insomnia

多个研究已经证明牛乳中含有能促进睡眠的肽^[1,2]。2009年 Saint-Hilaire^[3]研究的结果证明牛乳源促睡眠肽对人睡眠也有促进作用,长期施用牛乳源酪蛋白水解肽在4周期间对睡眠的各个方面具有显著影响,用牛乳源酪蛋白水解肽治疗的受试者在治疗14d后显示出PSQI-J(匹茨堡睡眠质量指数量表)总得分显著降低,治疗28d后这种改善作用更大,并且在治疗停止一周后仍然可以察觉。2016年 Dela^[4]研究表明牛乳磷酸酪蛋白水解肽具有促进睡眠的特性,增强戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠。它还能促进慢波(δ)脑电图大鼠活动;指示睡眠或放松的模式。通过实验证明其促进睡眠的作用可能是通过介导的GABA(γ -氨基丁酸A型)受体-氯离子通道产生效果。有研究表明 α 酪蛋白能减轻猫的焦虑症状^[5]。

DL-4-氯苯基丙氨酸(PCPA)是色氨酸羟化酶(TDH)的抑制剂,TDH是5-HT(五羟色胺)合成的限速酶,PCPA致失眠大鼠模型复制成功后失眠大鼠脑内神经递质5-HT显著下降从而导致大鼠昼夜节律消失,导致大鼠失眠。酸枣仁与百合是两种具有镇静催眠作用的药食同源食材,常与其他有助眠作用的植物复配使用^[7]。研究证实酸枣仁提取物能减少小鼠自主活动次数,对中枢神经有抑制作用^[8],可提高小鼠神经中枢神经递质5-HT含量,更有研究认为酸枣仁提取物作用于GABA系统^[7];有研究表明百合提取物对5-HT通路起作用,对戊巴比妥钠诱导的睡眠时间有延长作用^[9,10]。

本实验室在前期研究中已经通过电生理膜片钳技术对牛乳酪蛋白酶解物进行活性鉴定,判定牛乳睡眠肽抑制大鼠下丘脑VLPO区(视前腹外侧核)神经细胞自发放电的体外活性;将分离出的牛乳促睡眠肽通过协同戊巴比妥钠实验判定牛乳促睡眠肽有协同戊巴比妥钠促睡眠的效果,验证了牛乳促睡眠肽大鼠体内的促睡眠活性^[4-6]。

本研究通过复制PCPA致大鼠失眠模型探究复合物对失眠大鼠睡眠的改善作用。复合物由牛乳促睡眠肽、酸枣仁提取物、百合提取物按照一定比例复配而成。经旷场实验探究复合物对失眠大鼠行为学影响,探讨复合物对失眠大鼠睡眠的改善作用;通过检测下丘脑中神经递质及其代谢产物变化探究复合物对失眠大鼠睡眠的调控机制。为牛乳促睡眠肽的助眠效果、抑制焦虑作用提供依据;同时将古方酸枣仁、百合这

两种药食同源物与促睡眠肽结合,通过多个神经递质通路联合改善失眠大鼠睡眠。

1 材料与方法

1.1 原料与仪器

1.1.1 实验材料

原料:酶解牛乳多肽由广州绿萃生物科技有限公司提供。

实验动物:32只体重约为150~200g健康的雄性成年SPF级SD大鼠,购自南方医科大学,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2016-0041。基础饲料适应性喂养7d后,按体重平均随机分成4组(n=8)。试验期间,每天早上9:00观察动物皮毛色泽、行为活动等情况,每天测量体重、摄食量各1次。实验期间,各组动物单笼饲养,室内温度 22 ± 2 ℃,湿度 $50\%\pm 10\%$,饲养环境实行12h光照、12h黑暗自动控制,期间动物自由摄食饮水。

主要试剂:乙腈(质谱级)、甲醇(质谱级)、甲酸(质谱级),美国Fisher公司; γ -氨基丁酸(GABA)标准品、5-羟色胺酸(5-HT)标准品、5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)标准品、L-去甲肾上腺素(NE)标准品、多巴胺盐酸盐(DA)标准品、二羟苯乙酸(DOPAC)标准品,源叶生物;对氯苯丙氨酸(PCPA)标准品,美国Sigma公司。

1.1.2 主要仪器设备

AB SCIEX 4500三重四极杆质谱仪,美国SCIEX公司;LC-30A液相色谱,日本岛津公司;SMART v3.0.05动物行为学视频采集与分析系统,美国Panlab Harvard Apparatus公司;Centrifuge 5415R高速冷冻离心机,德国Eppendorf公司;XW-80A漩涡混合器,上海精科实业有限公司,DW-86L388立式超低温保存箱,青岛海尔特种电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 低温连续相变萃取促睡眠活性物

低温连续相变萃取酸枣仁促睡眠活性物:将酸枣仁清理除杂后粉碎,把粉碎过20目筛后的酸枣仁装进连续相变萃取装置的50L萃取釜中。参考前期研究的结果,在原料堆密度0.39kg/L、萃取温度70℃、萃取压力0.7MPa、75L/h流速、萃取时间3h的条

件下进行低温连续相变用 70%乙醇萃取一次; 萃取温度 70 °C、萃取压力 0.2 MPa、75 L/h 流速、萃取时间 3 h 的条件下用三级水进行低温连续相变萃取第二次^[9,10]。

将提取液在 60 °C 条件下减压浓缩至固形物含量为 30%，利用喷雾干燥技术干燥浓缩液得到酸枣仁提取物。喷雾干燥参数：进风温度 150 °C，出风温度 90 °C，转速 12000 r/min，进料速度 3 L/h。

低温连续相变萃取百合促睡眠活性物：将百合清理除杂后粉碎，将粉过 10 目筛。因百合原料较硬，提取前需先用 70%乙醇浸泡 12 h 至原料变软后再提取。将百合原料及浸泡液装进连续相变萃取装置的 50 L 萃取釜中，参考前期研究结果，在原料堆密度 0.40 kg/L、萃取温度 70 °C、萃取压力 0.2 MPa、75 L/h 流速、萃取时间 3 h 的条件下进行低温连续相变用 70%乙醇萃取一次; 萃取温度 70 °C、萃取压力 0.2 MPa、100 L/h 流速、萃取时间 3 h 的条件下用三级水进行低温连续相变萃取第二次^[10]。

将提取液在 60 °C 条件下减压浓缩至固形物含量为 30%，利用喷雾干燥技术干燥浓缩液得到百合提取物。喷雾干燥参数：进风温度 150 °C，出风温度 90 °C，转速 12000 r/min，进料速度 3 L/h。

1.2.2 构建 PCPA 致大鼠失眠模型

大鼠适应 7 d 后除正常对照组外，其余各组大鼠每日上午 8:00~8:30 腹腔注射 PCPA 300 mg/kg，灌胃量为 10 mL/kg，每日灌胃 1 次，连续注射 2 d，正常对照组腹腔注射与 PCPA 同体积的弱碱性 0.9%氯化钠注射液。

1.2.3 给药方法

大鼠失眠模型复制成功后，给药组每天上午 8:00 给予样品灌胃，将酸枣仁提取物、百合提取物、睡眠肽 (2:2:1) 复配成复合物给药剂量为 600 mg/kg·d；地西洋对照组给药剂量为 3 mg/kg·d。连续给药 7 d，最后一次 (给药第 7 d) 给药前禁食 12 h。最后一次给药后观察自主活动，于灌胃后 60 min 用 10%水合氯醛 0.3 g/kg 剂量进行腹腔注射后取大鼠脑用以检测。

1.2.4 大鼠行为学实验

本研究用旷场实验来评价大鼠在新环境中的焦虑度、自主及探究行为。通过以大鼠在旷场中某些行为发生的次数以及持续的时间来反应检测指标。旷场反应箱高 50 cm，底边长 50 cm，将旷场内部区域设为 4×4 的方格，中间 4 格联合为中央区域，外周方格联合为周边区域。将旷场摆放在白炽灯正下方，调整相机位置于旷场正上方。旷场实验于安静的环境下进行。实验人员将动物由统一角度放入箱内底面中心后进行摄

像和计时。通过摄像头自发记录大鼠活动情况。每只大鼠测试 10 min，测试后清洁旷场擦拭、清洗方箱内壁及底面防止留下气味及排泄物等。

测试指标包括：大鼠旷场运动总路程、大鼠旷场中央停留次数、中央停留时间等^[11-15]。

1.2.5 超高效液相色谱-串联质谱法测定神经递质

动物样品前处理：在低温手术台上取大鼠下丘脑部位，置于 5 mL 离心管中按每 20 mg 脑 400 μL 组织裂解液的比例加入组织裂解液，于冷冻珠磨机内匀浆，放于 -20 °C 冰箱中孵育 20 min，冷冻离心 20 min (13200 r/min, 4 °C)，用 0.22 μm 滤膜过滤，供分析。

试剂配制：脑组织裂解液：甲醇:乙腈:甲酸为 1:9:0.02。

色谱条件：色谱柱为上海月旭 welch ultimate C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相：0.1%甲酸水 (A) 和乙腈 (B)。

梯度洗脱程序：流速 0.5 mL/min，柱温 30 °C，进样量 20 μL。2% B 0.1~2.5 min；2% B~30% B 2.5~8 min。

质谱条件^[16-21]气帘气 (CUR) 压力：40.0 psi；碰撞气体：N₂；喷雾电压：5500 V；离子源温度：500 °C；GS1：50 psi，GS2：50 psi；气体流速：12 L/min。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 21.0 软件处理数据，数据用平均值±方差 (x±s) 表示，*p*<0.05 则有统计学意义，说明有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 复合物对 PCPA 致失眠大鼠行为学的影响

2.1.1 复合物对大鼠运动轨迹的影响

图 1、图 2 为空白组大鼠、失眠模型组大鼠、复合物与阳性对照组的大鼠 2D 及 3D 运动轨迹图，由图 1 可知，失眠模型组大鼠较空白组大鼠在旷场中的运动更频繁，运动轨迹更密集，说明失眠大鼠在旷场焦虑感上升。失眠大鼠在经过复合物及阳性药物干预之后，运动轨迹相对失眠模型组稀疏，说明其在旷场中的焦虑感明显减少。

2.1.2 复合物对 PCPA 致失眠大鼠旷场指标的影响

由表 1，失眠模型组大鼠在中央停留次数、中央区停留时间、运动总路程分别为 18.67、37.88 s、5013.24 cm，与空白组有显著差异 (*p*<0.05)，失眠模型组大

鼠总静止时间 222.68 s 与空白组的 145.05 s 无显著差异 ($p>0.05$), 以上指标在一定的程度上反映了失眠模型大鼠在旷场中比较紧张、活动增加。复合物组大鼠在中央停留次数、中央区停留时间、运动总路程分别为 11.00、15.01 s、3309.71 cm, 与失眠模型组相比有显著差异 ($p<0.05$), 与空白组相比无显著差异

($p>0.05$)。阳性药物组与失眠模型组大鼠在旷场中央停留次数有显著差异 ($p<0.05$), 该结果提示, 复合物能改善失眠大鼠在旷场中央停留次数、中央区停留时间、运动总路程, 复合物与阳性药物均能改善大鼠因失眠导致的在旷场中的焦虑状况。

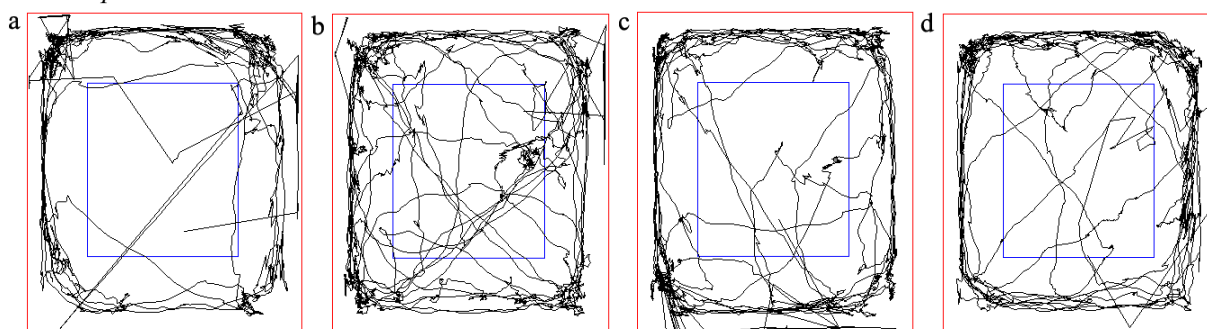


图1 大鼠运动轨迹 2D 图

Fig.1 Plan of rat trajectory

注: a: 空白组; b: 失眠模型组; c: 阳性对照组; d: 复合物组。下图同。

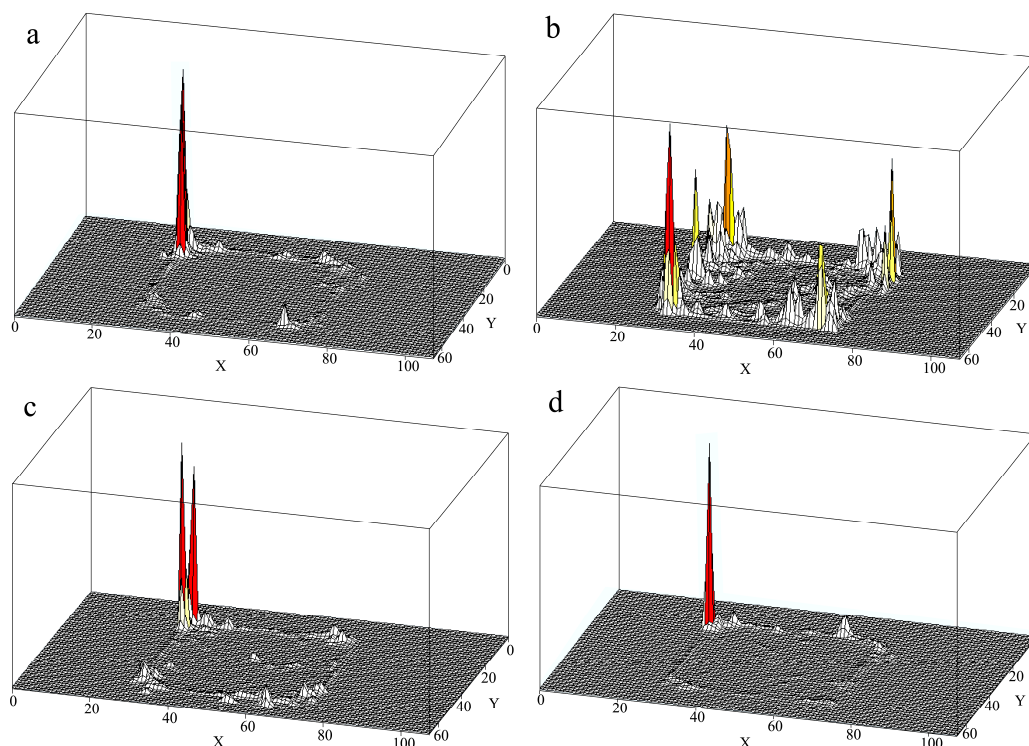


图2 大鼠运动轨迹 3D 图

Fig.2 3D map of rat trajectory

表 1 复合物对 PCPA 致失眠大鼠旷场运动影响

Table 1 Effect of compound on open field exercise of insomnia rats

组别	中央停留次数	中央区停留时间/s	总静止时间/s	运动总路程/cm
复合物组	11.00±2.65 [#]	15.01±11.68 [#]	233.03±28.84	3309.71±1205.46 [#]
失眠模型组	18.67±1.53	37.88±12.36	222.68±31.49	5013.24±65.02
空白组	10.67±4.04 [#]	13.28±10.24 [#]	145.05±30.43	3819.99±732.16 [#]
阳性对照组	12.33±0.57 [#]	18.04±1.86 [#]	153.76±17.17	3588.40±19.24 [#]

注: 与失眠模型组比较, [#] $p<0.05$, ^{##} $p<0.01$; 与空白组比较, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

表2 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中神经递质的影响

Table 2 Effect of compound on neurotransmitters in hypothalamus of insomnia rats

组别	GABA/($\mu\text{g/mL}$)	Glu/($\mu\text{g/L}$)	Gly/($\mu\text{g/L}$)	NE/($\mu\text{g/L}$)	DA/($\mu\text{g/L}$)	5-HT/($\mu\text{g/L}$)
复合物组	94.96 \pm 6.51 [#]	1508.42 \pm 193.34	74.59 \pm 2.46	37.36 \pm 5.29 [#]	1.76 \pm 0.21 [#]	1.61 \pm 0.15
失眠模型组	78.54 \pm 13.75 [*]	1514.56 \pm 128.21	68.95 \pm 3.60	53.94 \pm 1.09 ^{**}	2.18 \pm 0.37 [*]	1.42 \pm 0.26 [*]
空白组	98.44 \pm 8.65 [#]	1589.09 \pm 166.08	75.03 \pm 6.53	29.69 \pm 2.57 ^{###}	1.72 \pm 0.07 [#]	2.17 \pm 0.38 [#]
阳性对照组	101.75 \pm 8.62 [#]	1448.69 \pm 270.78	77.02 \pm 9.49	39.42 \pm 1.65 [#]	1.72 \pm 0.24 [#]	1.63 \pm 0.07 [*]

注: GABA (γ -氨基丁酸), Glu (谷氨酸), Gly (甘氨酸), NE (去甲肾上腺素), DA (多巴胺), 5-HT (5-羟色胺)。与失眠模型组比较, [#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.01$; 与空白组比较, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ 。下表同。

2.2 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中神经递质的影响

2.2.1 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中神经递质的影响

PCPA 是色氨酸羟化酶 (TDH) 的抑制剂, 通过阻断 5-HT 合成, 导致大鼠脑内 5-HT 含量降低, 从而昼夜节律消失。由表 2 结果可知, 与空白组相比失眠模型组大鼠下丘脑中 5-HT 含量显著降低 ($p < 0.05$) 提示 PCPA 致大鼠失眠模型复制成功。失眠模型组大鼠与复合物组大鼠 5-HT 无显著差异 ($p > 0.05$), 空白组与复合物组 5-HT 无显著差异 ($p > 0.05$)。

失眠大鼠 GABA、Glu、Gly、NE、DA、5-HT 含量为 78.54 $\mu\text{g/mL}$ 、1514.56 $\mu\text{g/L}$ 、68.95 $\mu\text{g/L}$ 、53.94 $\mu\text{g/L}$ 、2.18 $\mu\text{g/L}$ 、1.42 $\mu\text{g/L}$; 失眠模型组神经递质 GABA 含量显著下降 ($p < 0.05$)、DA 的含量均显著上升 ($p < 0.05$), Glu、Gly 无显著变化 ($p > 0.05$), 兴奋性神经递质 NE 显著上升 ($p < 0.05$)。给予灌胃给药一周后, 复合物组 GABA、Glu、Gly、NE、DA、5-HT 含量为 94.96 $\mu\text{g/mL}$ 、1508.42 $\mu\text{g/L}$ 、74.59 $\mu\text{g/L}$ 、37.36 $\mu\text{g/L}$ 、1.76 $\mu\text{g/L}$ 、1.61 $\mu\text{g/L}$ 。复合物组与阳性对照组, 与失眠模型组相比大鼠下丘脑抑制性神经递质 GABA 含量显著上升 ($p < 0.05$), 兴奋性神经递质 NE、DA 含量显著下降 ($p < 0.05$); 表明复合物组可通过调节大鼠下丘脑中的神经递质, 从而达到镇静催眠的效果。

2.2.2 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中神经递质及其代谢产物的影响

2.2.2.1 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中5-HT及其代谢产物5-HIAA的影响

由表 3 结果可知, 失眠模型组大鼠下丘脑中 5-HIAA 含量 14.13 $\mu\text{g/L}$, 与空白组相比显著降低 ($p < 0.05$); 与复合物组大鼠无显著差异 ($p > 0.05$), 空白组 5-HIAA 含量 28.69 $\mu\text{g/L}$, 与复合物组、牛乳睡眠肽组、阳性药物组相比, 5-HIAA 含量显著降低, 有显著差异 ($p < 0.05$)。

由表 3 空白组 5-HIAA/5-HT 为 13.06, 与其他各组 5-HIAA/5-HT 都有显著差异 ($p < 0.05$); 复合物组 5-HIAA、5-HT 含量分别为 11.85 $\mu\text{g/L}$ 、1.42 $\mu\text{g/L}$, 5-HT 与空白组无显著差异 ($p > 0.05$); 5-HIAA 与空白组相比显著下降 ($p < 0.05$)。说明复合物影响了 5-HT 及其代谢产物从而改善睡眠。

表3 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中5-HT、5-HIAA的影响
Table 3 Effect of complex on 5-HT and 5-HIAA in hypothalamus of insomnia rats

组别	5-HIAA/($\mu\text{g/L}$)	5-HT/($\mu\text{g/L}$)	5-HIAA/5-HT
复合物组	11.85 \pm 2.17 [#]	1.61 \pm 0.15	8.79 \pm 0.38 [*]
失眠模型组	14.13 \pm 1.71 [*]	1.42 \pm 0.26 [*]	9.88 \pm 0.08 [*]
空白组	28.69 \pm 1.90 [#]	2.17 \pm 0.38 [#]	13.06 \pm 0.50 [#]
阳性对照组	14.86 \pm 3.01 [#]	1.63 \pm 0.07 [*]	9.15 \pm 0.41 [*]

2.2.2.2 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中GABA及其代谢产物的影响

表4 复合物对PCPA致失眠大鼠下丘脑中GABA、Glu的影响

Table 4 Effects of compound on GABA and Glu in hypothalamus of insomnia rats

组别	GABA/($\mu\text{g/mL}$)	Glu/($\mu\text{g/L}$)	Glu/GABA
复合物组	94.96 \pm 6.51 [#]	1508.42 \pm 193.34	1.58 \pm 0.13
失眠模型组	78.54 \pm 13.75 [*]	1514.56 \pm 128.21	1.93 \pm 0.23
空白组	98.44 \pm 8.65 [#]	1589.09 \pm 166.08	1.63 \pm 0.33
阳性对照组	101.75 \pm 8.62 [#]	1448.69 \pm 270.78	1.45 \pm 0.45 [#]

Glu 脱羧后的代谢产物为 GABA, GABA 被认为在中枢神经系统中是一种重要的抑制性递质; 而 Glu 则是一种兴奋性神经递质。大鼠被剥夺睡眠后, 失眠模型组 GABA、Glu 含量分别为 78.54 $\mu\text{g/mL}$ 、1514.56 $\mu\text{g/L}$ 。Glu 在失眠模型组与空白组中相差无显著性 ($p > 0.05$), GABA 在失眠模型组与空白组中有显著性 ($p < 0.05$), 给予阳性药物及复合物后 GABA 含量在各样品组中均上升。复合物组 GABA、Glu 含量分别为 94.96 $\mu\text{g/mL}$ 、1508.42 $\mu\text{g/L}$; 阳性药物组 GABA、Glu 含量、Glu/GABA 值分别为 101.75 $\mu\text{g/mL}$ 、1448.69 $\mu\text{g/L}$ 、1.45, 复合物组 Glu/GABA 比值在与模型组、空白组比值无显著差异 ($p > 0.05$)。阳性对照组 Glu/GABA

值相比失眠模型组有显著变化 ($p<0.05$), 说明阳性药物对 GABA 及其代谢速率有影响, 复合物能影响大鼠下丘脑内 GABA, 但对其代谢无显著影响。

2.2.2.3 复合物对 PCPA 致失眠大鼠下丘脑中 DA 及其代谢产物 DOPAC 的影响

DA 的代谢产物为 DOPAC。由表 5 可知, 失眠模型组 DA、DOPAC、DAPOC/DA 分别为 2.18 $\mu\text{g/L}$ 、66.96 $\mu\text{g/L}$ 、31.79; 与空白组相比, 失眠模型组大鼠下丘脑中 DOPAC 含量降低, 不具有显著性差异 ($p>0.05$)。复合物组 DA、DOPAC、DAPOC/DA 分别为 1.76 $\mu\text{g/L}$ 、75.71 $\mu\text{g/L}$ 、41.78; 空白组与复合物组相比, 下丘脑中 DOPAC 含量无显著差异 ($p>0.05$)。阳性药物组 DOPAC 含量相对于空白组降低 ($p<0.05$)。提示复合物能降低 DA 含量, 但对其代谢速率无显著影响 ($p>0.05$)。

表 5 复合物对 PCPA 致失眠大鼠下丘脑中 DA、DOPAC 的影响

Table 5 Effect of compound on DA and DOPAC in hypothalamus of insomnia rats

组别	DA($\mu\text{g/L}$)	DOPAC($\mu\text{g/L}$)	DAPOC/DA
复合物组	1.76 \pm 0.21 [#]	75.71 \pm 4.73	41.78 \pm 5.96
失眠模型组	2.18 \pm 0.37 [*]	66.96 \pm 3.45	31.79 \pm 9.68
空白组	1.72 \pm 0.07 [#]	77.34 \pm 5.05	44.86 \pm 2.78
阳性对照组	1.72 \pm 0.24 [#]	57.74 \pm 5.12 [*]	33.49 \pm 5.87 [*]

3 结论

3.1 动物的行为学及脑内神经递质含量在一定程度上反映了其生理状况, 这也是改善失眠实验研究的主要入手方向, 通过腹腔注射 PCPA 复制失眠模型, 腹腔注射 PCPA 48 h 后, 大鼠开始暴躁不安、体重减轻、白天也活动不停且具有攻击性由此判定模型复制成功^[22]。

3.2 在酸枣仁百合睡眠肽复合物的干预下, 失眠大鼠在旷场中的中央停留次数、中央区停留时间、运动总路程降低, 差异具有统计学意义 ($p<0.05$), 说明复合物可以减轻失眠大鼠在旷场中的焦虑感。在复合物干预大鼠下丘脑中 5-HT 分别升高, 兴奋性神经递质 DA、NE, 抑制性神经递质 GABA 含量升高 ($p<0.05$), DA、GABA 代谢速率无显著变化 ($p>0.05$), 5-HT 代谢产物 5-HIAA 代谢途径速率加快 ($p<0.05$), 说明复合物能通过影响大鼠下丘脑中神经递质改善失眠大鼠的睡眠及焦虑。酸枣仁与百合为传统治疗失眠的药食同源物质, 其有效促眠活性物质为酸枣仁皂苷、百合皂苷等物质, 且其助眠机制与主要助眠活性成份为近期研究热点。本研究将酸枣仁、百合促睡眠活性物与睡眠肽复配成复合物。结果表明酸枣仁百合复合物能改善失眠大鼠行为学与神经递质, 复合物对下丘脑神

经递质的调节作用可能是其改善睡眠的作用机制。综上所述, 复合物能有效改善失眠大鼠睡眠并为促睡眠肽改善睡眠提供了理论依据。

参考文献

- [1] Shah, Nagendra P. Effects of milk-derived bioactives:an overview [J]. British Journal of Nutrition, 2012, 84(S1): S3-S10
- [2] Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications [J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(2): 177-187
- [3] Saint-Hilaire Z D, Messaoudi M, Desor D, et al. Effects of a bovine alpha S1-casein tryptic hydrolysate (CTH) on sleep disorder in Japanese general population [J]. Open Sleep Journal, 2009, 2(1): 26-32
- [4] Dela Pea IJI, Kim HJ, de la Pea J B, et al. A tryptic hydrolysate from bovine milk α s1-casein enhances pentobarbital-induced sleep in mice via the GABAA receptor [J]. Behavioural Brain Research, 2016, 313: 184-190
- [5] Beata C, Beaumont-Graff E, Coll V, et al. Effect of alpha-casozepine (Zylkene) on anxiety in cats [J]. Journal of Veterinary Behavior Clinical Applications & Research, 2007, 2(2): 40-46
- [6] 王贺超,张宏,张会宗,等.综合评价安眠方剂对小白鼠戊巴比妥钠催眠,阈下催眠量影响随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志,2013,27(9):34-37
- [7] Shi M, Piao J, Xu X, et al. Chinese medicines with sedative-hypnotic effects and their active components [J]. Sleep Medicine Reviews, 2016, 29: 108-118
- [8] Fu JW, Qiao W, Chen ZH. Study on sedative and hyponotic effect of total alkaloid from Semen 391 Zizyphi Spinosae [J] Tianjin Med Univ 2005, 11: 52-54
- [9] 李海龙,高淑怡,高英,等.百合知母皂苷镇静催眠的药效学研究[J].北方药学,2012,9(10):34-35
Li Hailong, Gao Shuyi, Gao Ying, et al. Pharmacodynamic study on sedation and hypnosis of total saponins of Lily Anemarrhena asphodeloides [J]. Northern pharmacy, 2012, 9(10): 34-35
- [10] 郭秋平,高英,李卫民.百合有效部位对抑郁症模型大鼠脑内单胺类神经递质的影响[J].中成药,2009,31(11):1669-1672
Guo Qiuping, Gao Ying, Li Weimin. Effects of effective parts of Lily on monoamine neurotransmitters in the brain of depression model rats [J]. Chinese Patent Medicine, 2009, 31(11): 1669-1672
- [11] 蔡淑英.通督醒神针刺法治疗早产儿脑白质损伤的临床及

- 实验研究[D].广州:广州中医药大学,2017
- CAI Shu-ying. Study on acupuncture therapy of dredging governor vessel for awakening mentality in premature infant with white matter damage [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017
- [12] 胡文卓.蛇床子香豆素类成分对失眠大鼠催眠作用及神经递质的影响[D].太原:山西省中医药研究院,2017
- HU Wen-zhuo. Effects of *Cnidii fructus* coumarin constituent on hypnotic activity and the levels of neurotransmitters on insomnia rats [D]. Taiyuan: Shanxi Provincial Institute of TAM, 2017
- [13] 刘松林.钩藤总生物碱的抗抑郁作用及其血清药物化学初步研究[D].广州:广东药科大学,2017
- LIU Song-lin. Preliminary study on antidepressant effect of total alkaloids from *Uncaria* and its serum pharmacology [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017
- [14] 刘洁.基于HPA轴及BDNF-ERK-ECS信号通路探讨酸枣仁-五味子药对的抗焦虑作用及其机制[D].北京:北京中医药大学,2018
- LIU Jie. Based on the HPA axis and the BDNF-ERK-ECS signaling pathway, the anti-anxiety effect and mechanism of *Zizyphus jujube* kernel and *Schisandra chinensis* were discussed [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018
- [15] 郑竹宏.百合地黄汤治疗失眠的作用机制研究[D].北京:北京中医药大学,2019
- ZHEN Zhu-hong. Study on Baihe Dihuang decoction of the mechanism of insomnia treatment [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019
- [16] Song P, Mabrouk O S, Hershey N D, et al. *In vivo* neurochemical monitoring using benzoyl chloride derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2011, 84(1): 412-419
- [17] Huang F, Li J, Shi H, et al. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC-MS/MS [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2014, 229: 8-14
- [18] Wei B, Li Q, Fan R, et al. Determination of monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in rat brain samples by UFLC-MS/MS for the study of the sedative-hypnotic effects observed during treatment with *S. chinensis* [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 88: 416-422
- [19] 郑春月,俞仲毅.UPLC-MS/MS同时测定大鼠血浆12种神经递质和激素的方法学研究及对寒性中药的应用分析[J].上海中医药大学学报,2018,32(5):78-85
- ZHENG Chun-yue, YU Zhong-yi. Methodology study on simultaneous determination of 12 kinds of neurotransmitters and hormones in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application in cold-natured Chinese medicine [J]. Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2018, 32(5): 78-85
- [20] 郭玲,付朝晖,周兴藩,等.HPLC-MS/MS同时快速检测大鼠血浆中7种神经递质[J].中国医药导刊,2018,20(2):93-96
- GUO Ling, FU Zhao-hui, ZHOU Xin-fan, et al. Rapid and simultaneous determination of seven kinds of neurotransmitters in rat plasma by HPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Medical Guide, 2018, 20(2): 93-96
- [21] 薛海斯,唐惠儒.氨基类神经递质的N-乙基化法UHPLC-MS/MS定量分析技术[J].上海交通大学学报(医学版),2018, 38(11):1300-1305
- XUE Hai-si, TANG Hui-ru. N-ethylation facilitates simultaneous quantification of amino neurotransmitters using UHPLC-MS/MS [J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science), 2018, 38(11): 1300-1305
- [22] 郑竹宏,赵仁云,丁玉婷,等.百合地黄汤对失眠模型大鼠行为学及不同脑区单胺类神经递质的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(3):529-534
- ZHENG Zhu-hong, ZHAO Ren-yun, DING Yu-ting, et al. Effects of Baihe Dihuang decoction on ethology and monoamine neurotransmitter in different brain regions of insomnia model rats [J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2019, 21(3): 529-534