

一种牛乳酪蛋白肽粉复合物对睡眠的改善作用

宋玉¹, 曾志安¹, 刘果^{1,2}, 刘星雨¹, 朱秋轶¹, 陈洛瑶¹, 岑般若¹, 李俊³, 黄祥泓⁴, 曹庸^{1*}
(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东广州 510224)
(3. 广东华活之光生物科技有限公司, 广东肇庆 526238)
(4. 中食安泓(广东)健康产业有限公司, 广东广州 510620)

摘要: 该研究探讨一包含牛乳酪蛋白肽粉、酸枣仁、百合、 γ -氨基丁酸的复合物改善睡眠的功效。利用秀丽隐杆线虫模型研究复合物及复合物中各个功效成分改善睡眠的效果, 然后使用体内小鼠模型评价复合物改善睡眠作用, 并测定小鼠下丘脑中神经递质含量。与空白组相比, 复合物组显著延长线虫睡眠时间, 各指标均优于复合物中单个组分的作用结果。复合物低、中、高剂量组小鼠睡眠潜伏期分别提高18.18%、20.60%、25.60%, 睡眠时长分别提高34.54%、45.24%、47.29%, 入睡率分别提高25.00%、33.33%、33.33%。在旷场实验中复合物组运动总路程分别降低15.06%、13.96%、9.58%, 进入中央区域次数分别提高138.10%、114.29%、114.29%, 中央区域停留时间分别提高142.98%、176.89%、114.25%、静止总时间分别增加28.13%、44.42%、55.40%。与空白组相比, 低中高复合物剂量组小鼠下丘脑GABA含量显著提高34.74%、66.45%、76.99%, 5-HT含量显著提高32.67%、50.34%、79.72%, Glu含量显著降低33.41%、34.83%、39.55%。综上所述, 牛乳酪蛋白肽粉、酸枣仁、百合、 γ -氨基丁酸的复合物能够改善睡眠, 通过调节下丘脑神经递质水平来改善睡眠, 研究结果为新食品资源开发提供理论参考。

关键词: 牛乳酪蛋白酶解物; 促进睡眠; 秀丽隐杆线虫; 戊巴比妥; 神经递质

文章编号: 1673-9078(2024)11-12-20

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.11.1405

A Composite of Bovine Casein Peptide Powder for Sleep Improvement

SONG Yu¹, ZENG Zhian¹, LIU Guo^{1,2}, LIU Xingyu¹, ZHU Qiuyi¹, CHEN Luoyao¹, CEN Banruo¹, LI Jun³, HUANG Xianghong⁴, CAO Yong¹

(1.College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)(2.College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510224, China)
(3.Guangdong Huahuozhiguang Biotechnology Co. Ltd., Zhaoqing 526238, China)
(4.Sino Food Anhong (Guangdong) Health Industry Co. Ltd., Guangzhou 510620, China)

Abstract: In this study, the sleep-improving effect of a composite containing bovine casein peptide powder, wild jujube kernel, lily and γ -aminobutyric acid was investigated. The sleep-improving effects of the composite and each functional ingredient in the composite were studied using the *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) model, and then an *in vivo* mouse model was used to evaluate the sleep-improving effect of the composite and the neurotransmitter contents in the hypothalamus of the mice were determined. Compared with the blank group, the sleeping time of *C. elegans* in the

引文格式:

宋玉,曾志安,刘果,等.一种牛乳酪蛋白肽粉复合物对睡眠的改善作用[J].现代食品科技,2024,40(11):12-20.

SONG Yu, ZENG Zhian, LIU Guo, et al. A composite of bovine casein peptide powder for sleep improvement [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(11): 12-20.

收稿日期: 2023-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31972078); 中食安泓营养与健康研究院项目

作者简介: 宋玉(1998-), 女, 硕士生, 研究方向: 生物与医药, E-mail: zo0849@163.com

通讯作者: 曹庸(1966-), 男, 教授, 研究方向: 食品化学、天然产物化学, E-mail: caoyong2181@scau.edu.cn

composite group prolonged significantly, and all the indexes were superior to those subjected to the treatment with the single components in the composite. The mice in the low-, medium-, and high-dose groups of the composite experienced an increase in sleep latency (by 18.18%, 20.60%, and 25.60%, respectively), increase in the sleep duration (by 34.54%, 45.24% and 47.29%, respectively), and increase in the sleep rate (by 25.00%, 33.33% and 33.33%, respectively). In the open field experiment, the total distance of exercise in the composite group decreased by 15.06%, 13.96% and 9.58%, respectively, and the number of entering the central area increased by 138.10%, 114.29% and 114.29%, respectively, the stay duration in the central area increased by 142.98%, 176.89%, 114.25%, respectively, and the total rest time increased by 28.13%, 44.42% and 55.40%, respectively. Compared with the blank group, the contents of GABA and 5-HT in the hypothalamus of mice in the low-, medium- and high-dose composite groups significantly increased by 34.74%, 66.45% and 76.99%, and 32.67%, 50.34% and 79.72%, respectively, whilst the Glu content decreased significantly (by 33.41%, 34.83%, and 39.55%, respectively). In summary, the composite of bovine casein peptide powder, wild jujube kernel, lily and γ -aminobutyric acid can improve sleep by regulating the level of neurotransmitters in the hypothalamus. The results provide theoretical reference for the development of new food resources.

Key words: cow's milk casein hydrolysates; sleep promoting; *Caenorhabditis elegans*; pentobarbital; neurotransmitter

睡眠问题是人们广泛关注的社会热点, 随着社会的发展, 人们的个性因素、精神状态、身体疾病都会影响睡眠质量, 严重时会造成睡眠障碍^[1]。失眠是最常见的睡眠障碍, 且人群比例逐年增加^[2,3]。睡眠障碍对个人的家庭、工作、学业以及社会都会带来不同程度的损害。

牛乳含有丰富的营养物质, 牛乳中的蛋白质消化后形成的多种不同结构短肽, 参与各项生理功能^[4], 喝牛奶可以助眠^[5], 而直接饮用牛奶对治疗失眠收效甚微。Saint 等^[6]发现牛乳 α s1-酪蛋白水解物可以改善日本普通人群失眠症。Peña 等^[7]发现牛乳 α s1-酪蛋白具有促睡眠的功效, 表现为 150 mg/kg 剂量组显著增加戊巴比妥钠睡眠持续时间, 并显著增加慢波 (δ) 活动。酸枣仁是中医药治疗失眠主要的药物成分, 主要成分为酸枣仁皂苷类、黄酮类及生物碱类, 具有调节 GABA 能和 5-HT 能系统改善睡眠的作用^[8,9]。百合在中医中具有安心、定胆, 补中益气等广泛的作用^[10], 主要活性成分有皂苷类、酚酸甘油酯类、黄酮类、多糖类等化合物^[11,12], 具有抗衰老、抗氧化、调节免疫等广泛的药理作用^[13]。 γ -氨基丁酸作为一种重要的抑制性神经递质, 作用于脑组织, 口服可以调节睡眠^[14]。

目前临床治疗失眠的主要措施是采用苯二氮卓类、褪黑素类、抗抑郁药物等^[15]西药进行治疗, 但是这些药物存在依赖性、耐受性的问题^[16], 因此开发具有改善睡眠功能的食品资源可以很好满足市场的需求。在课题组前期成果的基础上选用牛乳酪蛋白酶解肽, 结合酸枣仁、百合两种药食同源成分以

及新资源食品成分 γ -氨基丁酸, 构成一款改善睡眠复合物食品, 该复合物目前尚无相关报道, 本研究利用秀丽隐杆线虫模型, 并按照《允许保健食品声称的保健功能目录非营养素补充剂》(2020年版) 中的要求, 结合旷场实验及神经递质含量检测, 共同评价复合物改善睡眠的效果, 为开发具有改善睡眠功能的新型食物资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、材料、设备

秀丽隐杆线虫野生型; 大肠杆菌 OP50; 健康清洁级 BALB/C 雄性小鼠, 体质量 (20 \pm 2) g, 由广东斯嘉景达生物科技有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (粤) 2020-0052; 牛乳酪蛋白肽粉 (肽含量 \geq 90%)、酸枣仁提取物 (斯皮诺素 4.06 mg/g, 酸枣仁皂苷 A 0.76 mg/g, 酸枣仁皂苷 B 0.28 mg/g)、百合粉 (总黄酮 3.98 mg/g, 总皂苷 1.57 mg/g)、 γ -氨基丁酸 (GABA \geq 95%), 均来自广东华活之光生物科技有限公司; 食品级麦芽糊精、麦芽糖醇、甘氨酸、三氯蔗糖、羟甲基纤维素钠、柠檬酸、硬脂酸镁、香精, 均购自河南万邦化工科技有限公司; 地西洋, 中山大学附属第一医院; 巴比妥钠和戊巴比妥钠 (分析纯), 美国 Sigma 公司; 生化分析试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; 其他试剂均为国产分析纯。

ME204 型电子分析天平, 上海梅特勒-托利多仪器公司; LRH 系列生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; EnSpire 酶标仪, 美国 PerkinElmer 公司;

体式显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; Wormlab 分析仪, 美国 mbf bioscience 公司; 5415R- 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 秀丽隐杆线虫的培养及同期化

本实验使用线虫生长固体培养基进行培养, 在培养基表面涂布大肠杆菌 OP50 喂养线虫。线虫放于 20 °C 生化培养箱进行培养。本实验采用经过同期化处理生长至 L4 时期的线虫, 参考 Wu 等^[17]的方法略作修改, 使用次氯酸钠和氢氧化钠混合溶液裂解线虫。

1.2.2 线虫给药途径

参考 Lin 等^[18]的方法并略作改动, 分组方法如表 1 所示, 每组分别配制 1 mg/mL, 过滤除菌后, 以质量比 1:9 与大肠杆菌 OP50 菌液混合均匀。吸取 100 μL 于线虫生长培养基平板上喂养线虫, 药物通过线虫摄食而进入到线虫体内。

表 1 实验线虫分组表

Table 1 Grouping table of experimental worms

组别	线虫数/只
空白组	30
辅料组	30
牛乳酪蛋白肽组	30
酸枣仁组	30
百合组	30
GABA 组	30
复合物组	30

1.2.3 线虫睡眠指标测定

参考 Niu 等^[19]的方法并略作改动, 使用 Wormlab 成像仪对线虫发育性睡眠 (DTS) 的睡眠时长和静止频率进行量化。实验分为空白组和实验组, 每组实验在实验前将即将进入睡眠期的 30 只线虫挑至琼脂表面上并重复三组。录制图像每 10 秒捕获一次, 持续 10~12 h, 通过与对照组相比, 记录睡眠时长并用 Wormlab 软件对视频进行统计分析, 得出静止频率及睡眠质量分数结果。

1.2.4 小鼠分组

参考 Hong 等^[20]的方法略作改动, 将 180 只健康清洁级 BALB/C 雄性小鼠 [体质量 (20±2) g] 适应性饲养 7 d 后, 随机分为 5 组, 每组 30 只。实验分为 A、B、C 共 3 批, 每批使用 10 只小鼠; A 批开展直接睡眠实验和延长戊巴比妥钠睡眠时间实

验; B 批开展戊巴比妥钠催眠实验; C 批开展睡眠潜伏期试验。

1.2.5 剂量设置

将牛乳酪蛋白肽粉、酸枣仁提取物、百合粉、γ-氨基丁酸 (125:100:125:1) 混合, 并混合辅料麦芽糊精、麦芽糖醇、甘氨酸、三氯蔗糖、羟甲基纤维素钠、柠檬酸、硬脂酸镁、香精, 按表 2 所示配置样品, 每日灌胃 0.2 mL/kg。低剂量组为最低有效摄入量, 中剂量组对标人体推荐服用量, 高剂量组按照复合物中牛乳酪蛋白肽组分含量 10 倍设置, 确认 3 个剂量组均安全无毒副作用, 并设定阳性对照组 (地西洋)。受试样品灌胃给予 35 d, 所有小鼠每周测量一次体质量。

表 2 实验小鼠灌胃剂量表

Table 2 Intra-gastric dose table for experimental mice

组别	小鼠个数/只	灌胃药品	剂量/(mg/kg)
空白对照组	30	生理盐水	0
阳性对照组	30	地西洋	3
辅料组	30	辅料样品	1 320
复合物低剂量组	30	复合物	100
复合物中剂量组	30	复合物	400
复合物高剂量组	30	复合物	1 320

注: 表中剂量以体质量为基准, 中剂量组相当于人体服用剂量, 另设低剂量和高剂量组。

1.2.6 旷场实验

参考实验^[21]并略作修改, 整个旷场实验需要在安静的环境下进行, 旷场反应箱高 50 cm, 底边长 50 cm, 在旷场顶端中心位置固定摄像头。实验人员每次操作需保持一致, 小鼠沿壁放入箱内适应 2 min 后开始测试, 每只小鼠测试 5 min, 通过摄像头记录其运动轨迹, 使用软件分析小鼠活动情况, 并记录小鼠运动总路程、运动总时间和平均速度指标。

1.2.7 直接睡眠实验

每天灌胃 60 min 后, 以翻正反射消失为标志^[22], 记录各组小鼠入睡情况, 观察受试样品的直接睡眠效应。

1.2.8 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验

参考文献^[23]方法, 预实验已确定戊巴比妥钠给药剂量为 40 mg/kg, 末次给予样品 30 min 后腹腔注射戊巴比妥钠, 注射量为 0.2 mL/20 g, 以翻正反射消失为指标, 记录样品延长小鼠戊巴比妥钠睡眠时间情况。

表 3 样品对线虫睡眠时间、静止持续时间、运动频率及运动平均持续时间的影响

Table 3 Effect of samples on sleep time, rest duration, motion frequency and mean duration of motion of *C. elegans*

组别	睡眠时间/min	静止持续时间/s	运动频率/(次/h)	运动平均持续时间/s
空白组	160.8 ± 26.62 ^d	65.33 ± 14.46 ^c	69.34 ± 7.48 ^a	31.83 ± 5.12 ^a
辅料组	167.4 ± 5.82 ^{cd}	73.78 ± 3.03 ^{bc}	69.05 ± 3.2 ^a	29.94 ± 9.1 ^a
牛乳酪蛋白肽组	186.9 ± 13.92 ^{bc}	87.11 ± 9.58 ^{ab}	58.04 ± 6.24 ^a	28.16 ± 1.62 ^a
酸枣仁组	184.5 ± 17.31 ^{bc}	93.39 ± 16.76 ^{ab}	61.62 ± 13.35 ^a	29.13 ± 1.51 ^a
百合组	184 ± 13.41 ^{bc}	86.33 ± 8.22 ^{ab}	63.07 ± 4.26 ^a	29.82 ± 1.96 ^a
GABA 组	190.1 ± 30.52 ^b	97.72 ± 5 ^a	56.34 ± 11.53 ^a	28.55 ± 1.79 ^a
复合物组	219 ± 23.72 ^a	100 ± 10.93 ^a	62.06 ± 9.5 ^a	27.51 ± 0.8 ^a

注: 同列右肩不同的小写字母表示组间有显著差异 ($P < 0.05$)。下表同。

1.2.9 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验

参考文献^[24]的方法, 预实验已确定戊巴比妥钠给药剂量为 25 mg/kg, 末次给予样品 30 min 后腹腔注射戊巴比妥钠最大阈下催眠剂量, 注射量为 0.2 mL/20 g, 记录动物在 30 min 内的入睡数 (翻正反射消失达 1 min 以上者)。

1.2.10 巴比妥钠睡眠潜伏期实验

参考文献^[24]的方法, 预实验已确定巴比妥钠给药剂量为 250 mg/kg, 最后一次给予样品 30 min 后腹腔注射巴比妥钠, 注射量为 0.2 mL/20 g, 以翻正反射消失为指标, 记录受试样品对巴比妥钠睡眠潜伏期的影响。

1.2.11 小鼠脏器指数检测实验

小鼠解剖时取肝脏、肾脏、胸腺、脾脏、肺、心脏, 称重后液氮速冻备用。所有标本放入 -80 °C 冰箱保存, 避免反复冻融。

1.2.12 神经递质 GABA、5-HT、Glu 检测实验

参考文献方法并略作改动, 解剖时在取出的下丘脑组织中加入 9 倍体积 4 °C 生理盐水, 珠磨仪研磨后 2 000~3 000 r/min 离心 20 min 取上清液, 用于测定 5-HT、GABA、Glu 的含量。

1.3 数据分析

实验均进行至少三次平行, 实验结果以平均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 采用 Graphpad Prism 9.0 绘制图表, 通过 SPSS 软件单因素方法分析进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 样品对线虫睡眠指标的影响

线虫发育性睡眠指的是线虫在幼年期会经历 L1~L4 四个时期^[25], 每个时期的最后都会进行定期的睡眠, 睡眠具有一定的周期性, 对应人体的昼夜节

律, 通过评价样品对线虫发育性睡眠的改善情况^[26], 可以评价样品的促睡眠效果。由表 3 可知, 各促睡眠活性物及复合物样品组对线虫发育性睡眠有较好的促进作用, 其中复合物组结果优于单独的活性物组, 复合物组线虫睡眠时间与其他组有显著性的提升, 与空白组相比静止持续时间显著升高, 睡眠期间的运动频率和运动平均持续时间有所降低。Niu 等^[19]发现相关睡眠功能缺失的线虫突变体表现出更短的总睡眠时间和静止持续时间, 以及更高的睡眠活动频率。

2.2 复合物对小鼠体质量的影响

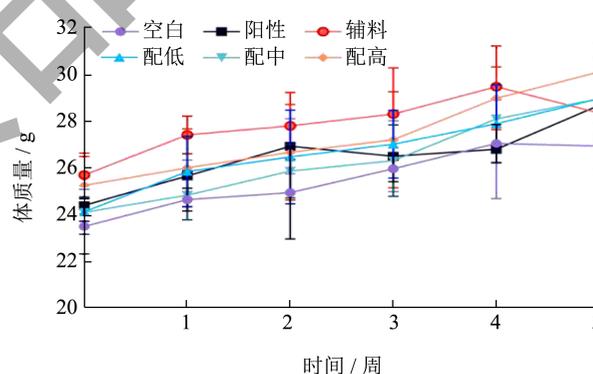


图 1 复合物对小鼠体质量的影响

Fig.1 Effects of compound samples on body weight of mice

对实验小鼠体质量进行分析, 由图 1 可知, 实验开始时, 每组小鼠的体质量无显著性差异; 灌胃干预后各组小鼠每周体质量仍无显著性差异, 说明不同剂量样品组对小鼠体质量无影响。

2.3 复合物对小鼠脏器毒理作用

脏器系数 (脏器质量 / 体质量 × 100%) 是反应实验动物功能状态的重要指标^[27], 正常情况下不会产生显著差异。剔除实验过程中注射戊巴比妥钠死亡的小鼠数据, 解剖小鼠数量为每组 8 只。由表 4 可知复合物低、中、高剂量组与空白组小鼠肝脏、心脏、肾脏、脾脏、肺、胸腺和下丘脑组织脏器系数无统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 4 复合物对小鼠脏器指数的影响

Table 4 Effects of compound samples on organ index in mice (mg/g, XS, n=8)

组别	胸腺	脾	肾	肝	心脏	肺
空白对照组	1.79 ± 0.80	2.62 ± 0.44	16.54 ± 1.90	43.85 ± 4.70	6.21 ± 0.66	8.86 ± 1.60
阳性对照组	1.65 ± 0.50	2.52 ± 0.50	14.97 ± 0.62	39.65 ± 2.48	5.99 ± 1.14	8.50 ± 1.52
辅料组	1.42 ± 0.44	2.36 ± 0.29	17.42 ± 0.75	41.35 ± 1.20	6.54 ± 0.30	9.10 ± 0.76
低剂量组	0.90 ± 0.26	2.58 ± 0.64	14.43 ± 1.50	36.04 ± 2.86	6.28 ± 0.28	7.70 ± 0.74
中剂量组	1.08 ± 0.32	3.23 ± 0.76	15.52 ± 1.54	38.53 ± 3.38	6.28 ± 1.32	7.83 ± 0.66
高剂量组	0.96 ± 0.48	2.62 ± 0.34	16.55 ± 0.98	39.21 ± 2.42	6.27 ± 0.90	7.74 ± 0.58

2.4 复合物对小鼠直接睡眠的影响

根据研究表明牛乳酪蛋白肽^[28]、酸枣仁^[29,30]、百合^[23,31]、GABA^[32,33]对小鼠均无直接睡眠的影响。记录灌胃后小鼠 60 min 内活动情况, 各组小鼠均活动正常并未出现睡眠情况, 入睡数量与时间均为 0, 可见各剂量组复合物对小鼠都不具有直接睡眠的作用, 说明样品并不是通过催眠来促进睡眠, 而是通过影响正常的睡眠过程来促进睡眠。

2.5 复合物对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠的影响

戊巴比妥钠常用来诱导翻正反应发生, 受试物与戊巴比妥钠有协同作用会改变睡眠潜伏期以及睡眠时长, 以此评价样品的催眠作用^[22]。戊巴比妥钠通过肝脏中的肝药酶代谢, 如果受试物可以抑制肝药酶活性, 会造成睡眠时长增长的假象, 通过戊巴比妥钠阈下剂量实验来排除这种情况, 使后续阈剂量实验有意义, 戊巴比妥钠阈剂量实验则是用来判断受试物是否具有镇静催眠作用的关键^[22]。由表 5 可知, 空白组小鼠在注射戊巴比妥钠阈下剂量后入睡率为 16.67%, 与空白组相比, 阳性对照组提升 58.33%, 复合物低、中、高剂量组分别提升 25.00%、33.33%、33.33%。相较于空白对照组, 阳性对照组和各剂量样品组的小鼠注射戊巴比妥钠溶液阈下剂量后的入睡率均有所提升。Qian 等^[28]研究表明, 阳性对照组、牛乳酪蛋白酶解物组和十肽组注射阈下剂量后的入睡率分别提升 33.34%、8.34%、16.67%。刘华荣等^[30]研究表明, 与对照组相比, 酸枣仁低、中、高剂量组注射阈下剂量后的入睡率分别提升 10.00%、30.00%、10.00%。康心茹等^[31]研究表明, 与对照组相比, 百合水提取物低、高剂量组注射阈下剂量后的入睡率分别提升 30.00%、50.00%; 百合乙醇提取物低、高剂量组阈下剂量后

的入睡率分别提升 40.00%、50.00%。李晓娜等^[33]研究表明, 阳性对照组、GABA 低、中、高剂量组注射阈下剂量后的入睡率分别提升 40.00%、6.70%、20.00%、33.40%。

表 5 复合物对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠的影响

Table 5 Effects of compound samples on hypnosis of mice under threshold dose of pentobarbital sodium

组别	动物数/只	入睡率/%
空白对照组	10	20
阳性对照组	10	90
辅料组	10	20
低剂量组	10	50
中剂量组	10	60
高剂量组	10	60

2.6 复合物对小鼠延长戊巴比妥钠睡眠时间的的影响

由表 6 可知, 各复合物均可以显著延长小鼠睡眠时间。相较于空白对照组, 阳性对照组提升 78.00% ($P < 0.01$), 复合物低剂量组提升 30.27% ($P < 0.05$), 复合物中剂量组提升 43.58% ($P < 0.01$), 复合物高剂量组提升 46.49% ($P < 0.01$), 随着复合物组剂量的提升小鼠的睡眠时间也在延长, 说明复合物与戊巴比妥钠配合使用, 可以显著延长小鼠睡眠时间。Yayeh 等^[34]发现 120、240 mg/kg 剂量的酪蛋白胰蛋白酶水解物可以显著延长小鼠戊巴比妥钠睡眠时间。刘华荣等^[30]发现酸枣仁提取物的 400、1 200 mg/kg 剂量能够明显地增加小鼠戊巴比妥钠的睡眠时间。康心茹等^[31]的研究也证实, 1 250 mg/kg 的百合水提取物和醇提取物也能有效地增加小鼠戊巴比妥钠的睡眠时间。李晓娜等^[33]发现 100 mg/kg 和 150 mg/kg 剂量的 GABA 能够明显地增加小鼠戊巴比妥钠的睡眠时间。

表 6 复合物对小鼠延长戊巴比妥钠睡眠时间的影响

Table 6 Effects of compound samples on prolonging sleep time of pentobarbital sodium in mice

组别	动物数/只	睡眠时间/min
空白对照组	10	41.30 ± 4.20 ^c
阳性对照组	10	72.6 ± 3.12 ^a
辅料组	10	41.50 ± 2.91 ^c
低剂量组	10	53.80 ± 4.69 ^b
中剂量组	10	59.30 ± 4.89 ^b
高剂量组	10	60.50 ± 5.25 ^b

2.7 复合物对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响

由表 7 可以看出, 相较于空白对照组, 阳性对照组下降 33.82% ($P < 0.01$), 复合物低剂量组降低 18.18% ($P < 0.05$), 复合物中剂量组降低 18.73% ($P < 0.01$), 复合物高剂量组降低 24.55% ($P < 0.01$), 随着复合物组剂量的提升小鼠的睡眠潜伏期也在降低。说明复合物能使小鼠睡眠潜伏期显著缩短。综合 2.5~2.7 小节结果可以说明复合物具有改善小鼠睡眠功效。陈子彤等^[24]使用酸枣仁、茶氨酸、GABA 复合物干预小鼠 30 d, 显著延长了小鼠戊巴比妥钠睡眠时间, 并且在戊巴比妥钠的阈值剂量下, 小鼠的入睡率有所提高, 同时睡眠的潜伏期也有所缩短。

表 7 复合物对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响

Table 7 Effects of compound samples on sleep latency of barbiturate sodium in mice

组别	动物数/只	睡眠时间/min
空白对照组	10	55.00 ± 3.62 ^a
阳性对照组	10	36.40 ± 3.19 ^c
辅料组	10	53.10 ± 1.86 ^a
低剂量组	10	45.00 ± 2.39 ^b
中剂量组	10	44.70 ± 2.69 ^b
高剂量组	10	41.50 ± 3.19 ^{bc}

2.8 复合物对小鼠行为学的影响

2.8.1 复合物对小鼠运动轨迹的影响

旷场实验为最为常见的评价药物镇静作用的自发活动实验^[22]。通过记录小鼠在旷场中的运动轨迹可以作为样品的镇静催眠作用的评价指标。图 2 为空白组、阳性对照组、复合物低、中、高剂量组的小鼠在旷场中的运动轨迹图。由图可知, 阳性对照组和不同剂量样品组的小鼠较空白组小鼠在旷场中

中央格子内运动次数增加, 说明不同剂量复合物样品组可以缓解小鼠在旷场中的焦虑感。

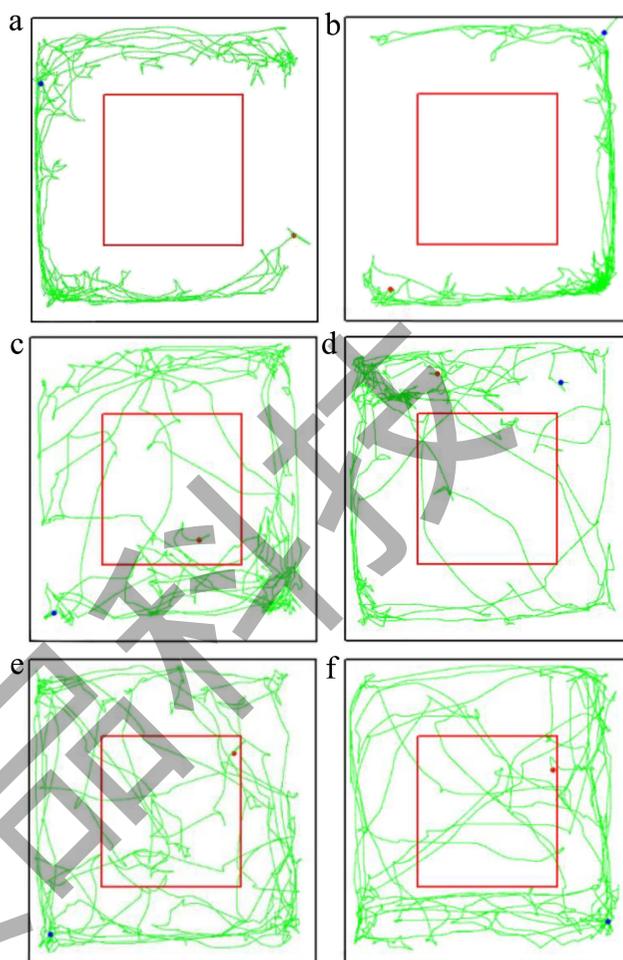


图 2 小鼠旷场实验轨迹图

Fig.2 Track map of mice open field experiment

注: (a) 空白组; (b) 辅料组; (c) 阳性对照组; (d) 低剂量组; (e) 中剂量组; (f) 高剂量组。

2.8.2 复合物对小鼠旷场运动情况的影响

旷场实验中小鼠在固定时间内的运动总路程、跨越格子次数、静止时间等指标用来考察样品的镇静作用。由表 8 可知, 与空白组相比, 阳性对照组的静止总时间、中央区域停留次数、中央区域停留时间均显著增加 ($P < 0.05$), 各剂量样品组的小鼠在旷场中的运动总路程减少, 静止总时间、中央区域停留次数及停留时间均增加, 但无显著性差异。该结果显示复合物在一定程度上缓解了小鼠在旷场中的焦虑情况。Peña 等^[7]发现牛乳胰蛋白水解物处理的小鼠在旷场中的移动距离呈下降趋势, 无显著性差异。刘昊等^[35]发现酸枣仁汤治疗后的小鼠进入旷场中央区域次数增加。

表 8 复合物对小鼠旷场运动的影响

Table 8 Effects of compound samples on open field movement of mice

组别	动物数/只	静止总时间/min	运动总路程/mm	中央区域停留次数/次	中央区域停留时间/s
空白对照组	10	66.01 ± 31.62 ^b	14 641.83 ± 4 555.68 ^a	2.1 ± 3.64 ^b	4.63 ± 5.08 ^b
阳性对照组	10	116.37 ± 45.09 ^a	11 336.55 ± 5 071.01 ^a	5.5 ± 2.51 ^a	12.58 ± 7.49 ^a
辅料组	10	66.64 ± 24.16 ^b	14 061.46 ± 4 256.6 ^a	2.2 ± 2.57 ^b	4.83 ± 5.39 ^b
低剂量组	10	84.58 ± 34.67 ^{ab}	12 436.06 ± 3 508.74 ^a	5 ± 3.37 ^{ab}	11.25 ± 9.28 ^{ab}
中剂量组	10	95.33 ± 36.31 ^{ab}	12 598.53 ± 4 495.21 ^a	4.5 ± 3.6 ^{ab}	12.82 ± 6.86 ^a
高剂量组	10	102.58 ± 43.86 ^{ab}	13 238.92 ± 3 182.64 ^a	4.5 ± 3.34 ^{ab}	9.92 ± 9.11 ^{ab}

表 9 复合物对小鼠下丘脑GABA、5-HT、脑Glu含量的影响

Table 9 Effects of compound samples on GABA, 5-HT, Glu content in hypothalamus of mice

组别	动物数/只	GABA 含量/(nmol/L)	5-HT 含量/(ng/mL)	Glu 含量/(μmol/g)
空白对照组	10	84.32 ± 23.85 ^c	13.07 ± 2.96 ^c	790.14 ± 397.99 ^a
阳性对照组	10	161.6 ± 76.63 ^a	25.27 ± 6.48 ^a	267.37 ± 155.26 ^c
辅料组	10	82.83 ± 24.51 ^c	13.25 ± 3.29 ^c	754.84 ± 340.51 ^a
低剂量组	10	113.61 ± 29.45 ^{bc}	17.34 ± 2.69 ^b	526.16 ± 188.95 ^b
中剂量组	10	140.35 ± 36.52 ^{ab}	19.65 ± 4.00 ^b	514.94 ± 131.9 ^b
高剂量组	10	149.24 ± 31.03 ^{ab}	23.49 ± 4.05 ^a	477.65 ± 200.19 ^{bc}

2.9 复合物对小鼠下丘脑神经递质含量的影响

本实验使用 ELISA 法测定了小鼠下丘脑中 GABA、5-HT、Glu 三种神经递质的含量，初步探索样品的促睡眠机制。由表 9 可知，与空白组小鼠相比，阳性对照组和不同剂量样品组均提升小鼠脑内 GABA、5-HT 含量，降低 Glu 含量。其中，中高剂量组的 GABA 含量分别显著提升 66.45%、76.99%；中高剂量组的 5-HT 含量分别显著提升 50.34%、79.72%；高剂量组的 Glu 含量显著降低 39.55%。已有研究表明，牛乳源酪蛋白水解物 Alpha_{s1} 大鼠下丘脑中 GABA_A 的 β₁ 受体亚基的蛋白表达增加^[34]。酸枣仁中的活性成分能够增加 GABA_A 受体的 α- 和 γ- 亚基的表达^[36]。百合知母汤可能通过调节单胺类神经递质水平、抗炎等方面起到镇静催眠的作用^[37]。外源摄入 GABA 可以通过肠-脑轴、脑组织通透性、代谢产物三个方面来改善睡眠质量^[38]。已有的实验表明牛乳源酪蛋白酶解物、酸枣仁、百合、GABA 复合物改善睡眠的机制与调节神经递质有关，但它们联合作用时起到关键功能的标志物还未明确，需要进一步的研究。

3 结论

本实验对牛乳酪蛋白肽、酸枣仁、百合粉、γ-氨基丁酸复合物的促睡眠活性进行初步研究，线虫睡

眠实验结果表明，该复合物改善睡眠的效果优于复合物中单个组分，说明复合物各组分具有协同作用。小鼠戊巴比妥钠睡眠实验表明，样品低中高剂量的小鼠戊巴比妥钠睡眠时间均显著延长，巴比妥钠睡眠潜伏期显著缩短，戊巴比妥钠阈下剂量入睡率显著提高，且具有剂量效应。旷场实验结果显示与空白组相比，不同剂量复合物可以减少小鼠在旷场中的运动总路程，提高静止总时间、中央区域进入次数、中央区域停留时间，但没有显著性差异，说明复合物没有明显镇静效果但具有抑制小鼠行动的趋势。不同剂量复合物与空白组相比，能提高小鼠下丘脑中 GABA 和 5-HT 含量，降低 Glu 含量。该复合物中的辅料部分不会对以上各项指标产生影响，复合物对小鼠体质量和脏器指数无显著性影响，给予受试物期间小鼠活动正常。综上，该复合物具有促睡眠作用，可能通过调节下丘脑神经递质起作用。

参考文献

- [1] K PAVLOVA M, LATREILLE V. Sleep disorders [J]. The American Journal of Medicine, 2019, 132(3): 292-299.
- [2] LI L, WANG Y Y, WANG S B, et al. Prevalence of sleep disturbances in Chinese university students: a comprehensive meta-analysis [J]. Journal of Sleep Research, 2018, 27(3): e12648.

- [3] LU L, WANG S B, RAO W, et al. The prevalence of sleep disturbances and sleep quality in older Chinese adults: a comprehensive Meta-analysis [J]. Behavioral Sleep Medicine, 2019, 17(6): 683-697.
- [4] NIELSEN S D H, LIANG N, RATHISH H, et al. Bioactive milk peptides: an updated comprehensive overview and database [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023: 1-20.
- [5] XU J, LAO J, JIANG Q, et al. Associations between milk intake and sleep disorders in Chinese adults: a cross-sectional study [J]. Nutrients, 2023, 15(18): 4079.
- [6] SAINT-HILAIRE Z DE, MESSAOUDI M, DESOR D, et al. Effects of a bovine alpha S1-casein tryptic hydrolysate (CTH) on sleep disorder in Japanese general population [J]. The Open Sleep Journal, 2009, 2(1): 26-32.
- [7] DELA PEÑA I J I, KIM H J, DE LA PEÑA 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.
- [8] HUA Y, XU X X, GUO S, et al. Wild jujube (*Ziziphus jujuba* var. *spinosa*): a review of its phytonutrients, health benefits, metabolism, and applications [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(26): 7871-7886.
- [9] SHERGIS J L, NI X, SARRIS J, et al. Ziziphus spinosa seeds for insomnia: A review of chemistry and psychopharmacology [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine, 2017, 34: 38-43.
- [10] 林夏静,郑景陆.从中医角度看药食同源之百合[J].光明中医,2008,4:512-513.
- [11] LUO L M, QIN L, PEI G, et al. Advances in studies on steroidal saponins and their pharmacological activities in genus *Lilium* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(7): 1416-1426.
- [12] ZHOU J, AN R, HUANG X. Genus *Lilium*: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 270: 113852.
- [13] 罗林明,裴刚,覃丽,等.中药百合化学成分及药理作用研究进展[J].中药新药与临床药理,2017,28(6):824-837.
- [14] YAMATSU A, YAMASHITA Y, PANDHARIPANDE T, et al. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans [J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(2): 547-551.
- [15] 李雁鹏,赵正卿,王雯雯,等.慢性失眠临床诊断与药物治疗研究现状[J].中国临床药理学与治疗学,2021,26(5): 487-490.
- [16] RHEL J, SCHIER A F. Sites of action of sleep and wake drugs: insights from model organisms [J]. Current Opinion in Neurobiology, 2013, 23(5): 831-840.
- [17] WU D, CHEN Y, WAN X, et al. Structural characterization and hypoglycemic effect of green alga *Ulva lactuca* oligosaccharide by regulating microRNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. Algal Research-Biomass and Bioproducts, 2020, 51: 102083.
- [18] LIN C, SU Z, LUO J, et al. Polysaccharide extracted from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja enhanced stress resistance in *Caenorhabditis elegans* via *skn-1* and *hsf-1* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 143: 243-254.
- [19] NIU L, LI Y, ZONG P, et al. Melatonin promotes sleep by activating the BK channel in *C. elegans* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(40): 25128-25137.
- [20] HONG K B, PARK Y, SUH H J. Sleep-promoting effects of the GABA/5-HTP mixture in vertebrate models [J]. Behavioural Brain Research, 2016, 310: 36-41.
- [21] ABDOLLAHNEJAD F, MOSADDEGH M, KAMALINEJAD M, et al. Investigation of sedative and hypnotic effects of *Amygdalus communis* L. extract: behavioral assessments and EEG studies on rat [J]. Journal of Natural Medicines, 2016, 70(2): 190-197.
- [22] 胡金,韦姗姗,邱祥玉,等.筛选镇静催眠药物的动物实验评价[J].中国比较医学杂志,2023,33(4):133-140.
- [23] 李峰杰,何萍,赵乐,等.酸枣仁、石菖蒲、夜交藤、百合、郁金5味中药对对氯苯丙氨酸致失眠模型大鼠睡眠作用的影响[J].中国药业,2017,26(6):1-4.
- [24] 陈子彤,陈希民,陈月晓,等.酸枣仁、茶氨酸、 γ -氨基丁酸联合使用改善睡眠作用研究[J].食品科技,2020,45(6): 81-85.
- [25] TROJANOWSKI N, RAIZEN D. Call it worm sleep [J]. Trends in Neurosciences, 2016, 39: 54-62.
- [26] ALLADA R, WHITE N E, SO W V, et al. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless [J]. Cell, 1998, 93(5): 791-804.
- [27] 刘福刚,关雪,杨昕蕾,等.不同周龄Balb/c小鼠脏器质量及其变化趋势分析[J].现代生物医学进展,2014,14(3):421-424.
- [28] QIAN J, ZHENG L, SU G, et al. Identification and screening of potential bioactive peptides with sleep-enhancing effects in bovine milk casein hydrolysate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(38): 11246-11258.
- [29] 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.
- [30] 刘华荣,陈卫英,黄宗锈.酸枣仁提取物改善小鼠睡眠的研

- 究[J].海峡药学,2016,28(12):14-16.
- [31] 康心茹,刘立科,傅容湛.百合水提物和乙醇提取物对小鼠睡眠的影响[J].食品研究与开发,2023,44(6):51-56.
- [32] 莫小叶,骆鹏飞,俞兰秀,等.富含 γ -氨基丁酸酸奶对小鼠睡眠的促进作用[J].现代食品科技,2020,36(11):29-35,129.
- [33] 李晓娜,赵庆华,王爱华,等. γ -氨基丁酸对小鼠睡眠的影响[J].产业与科技论坛,2018,17(11):68-69.
- [34] YAYEH T, LEEM Y H, KIM K M, et al. Administration of α_{s1} -casein hydrolysate increases sleep and modulates GABA_A receptor subunit expression [J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2018, 26(3): 268-273.
- [35] 刘昊,韩昌胜,迟显苏,等.酸枣仁汤对氯苯丙氨酸诱导失眠大鼠模型治疗机制的研究[J].山东科学,2021,34(6):32-40.
- [36] MA Y, HAN H, EUN J S, et al. Sanjoinine A isolated from *Zizyphi spinosi* semen augments pentobarbital-induced sleeping behaviors through the modification of GABA-ergic systems [J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(9): 1748-1753.
- [37] 李子雯,贾丹,党院霞,等.百合知母汤总皂苷调节5-HT功能治疗抑郁症的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(19):131-138.
- [38] 李科,俞兰秀,刘小雨,等. γ -氨基丁酸改善睡眠作用机制的研究进展[J].食品工业科技,2019,40(14):353-358.