

富含 γ -氨基丁酸酸奶对小鼠睡眠的促进作用

莫小叶¹, 骆鹏飞², 俞兰秀², 吕乐¹, 李科¹, 刘冬¹, 孙海燕¹

(1. 深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院, 深圳市发酵精制检测系统重点实验室, 广东深圳 518055)

(2. 绿雪生物工程(深圳)有限公司, 广东深圳 518105)

摘要: 采用 ICR 小鼠体内实验探讨富含 GABA 酸奶对小鼠睡眠的促进作用及机制。通过戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验、延长戊巴比妥钠睡眠时长实验、巴比妥钠睡眠潜伏期实验研究富含 GABA 酸奶对小鼠睡眠的改善作用, 通过测定小鼠血清和脑组织中的 Gly、GABA、5-HT 和 Glu 的含量变化探讨富含 GABA 酸奶对 PCPA 所致小鼠失眠模型的改善机制。结果显示, 与阴性对照组比, 富含 GABA 酸奶 80 mg/kg、160 mg/kg 剂量组小鼠入睡率均由 0 显著提高至 60% ($p < 0.05$); 富含 GABA 酸奶 (80 mg/kg) 组能将小鼠睡眠时长由 43.40 min 显著延长至 156.20 min ($p < 0.05$); 但富含 GABA 酸奶各剂量组均无缩短小鼠睡眠潜伏期的作用。在失眠实验中, 与失眠模型组比, 富含 GABA 酸奶能够显著增加失眠小鼠脑组织中抑制性氨基酸 GABA 和 Gly 的含量 ($p < 0.05$), GABA 含量升至 1.10 ng/mL, Gly 含量升至 28.78 ng/mL。本研究结果显示, 富含 GABA 酸奶能够有效延长 ICR 小鼠的睡眠时长, 改善小鼠的失眠状态, 其机制与增加小鼠脑内抑制性递质 GABA 及 Gly 的含量有关。

关键词: γ -氨基丁酸; 睡眠实验; 失眠模型

文章编号: 1673-9078(2020)11-29-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.11.0484

Study on the Effect of High γ -aminobutyric Acid-enriched Yoghurt on Sleep and Its Mechanism on Insomnia in Mice

MO Xiao-ye¹, LUO Peng-fei², YU Lan-xiu², LYU Le¹, LI Ke¹, LIU Dong¹, SUN Hai-yan¹

(1. College of Applied Chemistry and Biotechnology, Shenzhen Key Laboratory of Fermentation, Purification and Analysis, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

(2. Green's Bioengineering (Shenzhen) Co. Ltd., Shenzhen 518105, China)

Abstract: The effect of high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt on sleep and its mechanism on insomnia was accessed by male ICR mice. Hypnosis test of pentobarbital sodium subthreshold, test of extended pentobarbital sodium sleep time and barbital sodium sleep latency test were conducted to determine the effect of high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt on sleep. PCPA insomnia model was used to explore the influence of high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt on insomnia. The changes of Gly, GABA, 5-HT and Glu in mice brain tissue and serum were measured to determine the mechanism. Compared with control group, 80 and 160 mg/kg high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt could improve 60% sleep rate of mice ($p < 0.05$). 80 mg/kg high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt could extent mice sleep time to 156.20 min ($p < 0.05$). 40, 80 and 160 mg/kg high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt did not affect mice sleep latency. In insomnia experiment, high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt increased the content of GABA and Gly in the brain tissue to 1.10 ng/mL and 28.78 ng/mL, respectively. In conclusion, high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt could improve sleep mainly by affecting the content of GABA and Gly in mice brain.

Key words: γ -aminobutyric acid; sleep experiment; insomnia model

引文格式:

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

MO Xiao-ye, LUO Peng-fei, YU Lan-xiu, et al. Study on the effect of high γ -aminobutyric acid-enriched yoghurt on sleep and its mechanism on insomnia in mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(11): 29-35

收稿日期: 2020-05-22

基金项目: 深圳市科技计划基础研究项目 (JCYJ20170818115059178)

作者简介: 莫小叶 (1994-), 女, 科研助理, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 孙海燕 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性成分

药效学及代谢组学

睡眠是重要的生理现象, 失眠是临床常见的症候之一。长期失眠会诱发焦虑和抑郁, 影响人们的工作及学习效率^[1,2]。失眠与日益增多的神经系统疾病、心血管疾病密切相关, 同时引起一系列社会问题^[3-6]。氨基酸类递质是广泛分布在神经系统内的一类递质, 其

中包括抑制性递质 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、甘氨酸 (Glycine, Gly) 和兴奋性递质谷氨酸 (Glutamic acid, Glu) 等。在生理条件下, 脑内神经系统的两类递质能够维持相对动态平衡。现代医学研究显示, 失眠与中枢神经系统兴奋性与抑制性氨基酸神经递质的平衡调节密切相关, 脑内约 30% 的突触部位以 GABA 为递质^[7-9]。GABA 参与脑内的许多生理活动, 具有改善睡眠、抗焦虑和抑郁等功能, 很多药物通过影响 GABA 通路来改善睡眠^[10-12]。

随着经济、社会的快速发展, 人们对自身健康的日益重视。GABA 因其在睡眠改善、降血压、调血脂、促进乙醇代谢等方面的益生特性获得了消费者的广泛关注, 关于产 GABA 菌株的筛选和富含 GABA 食品的研发也日益增多。日本在 GABA 食品产业化运用方面的研究相对较早, 在 1986 年, 开发出一款名为“Gabaron”的富含 GABA 的茶饮料。相较日本, 我国于 2009 年将 GABA 列入新资源食品原料目录, 并规定其可用于饮料、巧克力、烘焙类等食品的生产^[13]。目前也有学者研发出了具有镇静安神作用的富含 GABA 的水牛乳酸奶和富含 GABA 的胚芽产品^[14,15]。

目前失眠的治疗主要是方法是药物治疗, 如口服苯二氮卓类催眠药等, 长期应用这些药物容易产生成瘾性或戒断反应^[16-18]。寻找到或者开发出安全有效、能够促进或改善睡眠的保健食品意义重大。富含 GABA 酸奶为本实验室和绿雪生物工程(深圳)有限公司合作研发的发酵酸奶, 本研究旨在探索富含 GABA 酸奶对小鼠睡眠的影响和对失眠的改善机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料

SPF 级 ICR 雄性小鼠 190 只, 体质量 18~22 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SYXK(京)2016-0006, 实验动物使用许可编号 SYXK(粤)2015-0068; γ -氨基丁酸(色谱纯), 购于美国 Sigma 公司; 巴比妥钠、戊巴比妥钠, 均购于山东西亚化学股份有限公司; 地西洋片, 山东信谊制药有限公司(批号: 190203); 乳酸乳球菌 4043 号、干酪乳杆菌 1443 号均由绿雪生物工程(深圳)有限公司提供; MRS 肉汤培养基、M17 肉汤培养基, 均购于北京路桥技术有限公司; 脱脂奶粉, 市售; GABA 酸奶冻干粉(GABA 含量 34.4 g/kg) 于为本实验室自制; 邻苯二甲醛(OPA)分析纯, 购于上海麦克林生化科技有

限公司; β -巯基乙醇(AR), 购于加拿大 BioBasic 公司; 醋酸钠(AR)、三氯乙酸(AR)、氢氧化钠(AR)、三乙胺(AR)、乙酸(AR)、甲醇(LC)、乙腈(LC)、四氢呋喃(LC), 均购于天津市大茂化学试剂厂; 醋酸、硼酸, 分析纯, 均购于广东光华科技股份有限公司; 对氯苯丙氨酸(PCPA)、 γ -氨基丁酸纯品($\geq 99\%$), 均购于美国 Sigma 公司; γ -氨基丁酸、5-羟色胺、甘氨酸、谷氨酸试剂盒均购自上海玉博生物。

1.1.2 主要仪器

超净工作台(SW-CJ-IFD), 苏州安泰空气技术有限公司; 超纯水器(EPED-E2-20TS), 南京易普达科技发展有限公司; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱(DW-HW328), 中科美菱低温科技有限责任公司; 真空冷冻干燥机(ALPHA2-4), 德国 Martin Christ 公司; 高速冷冻离心机(5810R), 德国 Eppendorf 公司; 高效液相色谱(LC-20AT), 日本 Shimadzu 公司; 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18。

1.2 方法

1.2.1 富含 γ -氨基丁酸酸奶制备

10% (质量分数) 脱脂乳, 接种量 6% (体积分数) 乳酸乳球菌及干酪乳杆菌, 发酵时间 48 h, L-谷氨酸添加量 8 g/L, 发酵温度 32 $^{\circ}\text{C}$, 干酪乳杆菌和乳酸乳球菌比例为 3:1。在此发酵参数条件下, 得到酸奶中 γ -氨基丁酸含量可达 4.10 \pm 0.10 g/L。真空冷冻干燥(高效液相色谱法测定 γ -氨基丁酸含量为 34.4 g/kg), 酸奶粉真空包装, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 高效液相色谱测 γ -氨基丁酸的含量

1.2.2.1 流动相配制

流动相 A: 称取 2.04 g 醋酸钠, 加 1000 mL 纯水溶解, 加入 220 μL 三乙胺, 用 5% (体积分数) 醋酸溶液调至 PH 值 7.2 \pm 0.2, 加入 5 mL 四氢呋喃, 过 0.45 μm 水系滤膜, 超声脱气 20 min 备用。

流动相 B: 准确量取甲醇和乙腈各 500 mL 混合, 过 0.45 μm 有机系滤膜, 超声脱气 20 min 备用。

1.2.2.2 邻苯二甲醛(OPA)衍生剂的配制

硼酸钠缓冲溶液: 称取 2.47 g 硼酸于烧杯加 80 mL 纯水溶解, 用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调硼酸钠缓冲溶液 PH 值至 10.2 \pm 0.2, 用纯水定容至 100 mL 容量瓶, 充分摇匀置于室温备用。

邻苯二甲醛(OPA)衍生剂的配制: 称取 0.1 g 邻苯二甲醛(OPA)用 1 mL 甲醇充分溶解, 加入 160 μL 的 β -巯基乙醇, 用 PH 值为 10.2 \pm 0.2 的硼酸钠缓冲溶液定容至 10 mL 棕色容量瓶, 置于室温备用(临用现配)。

1.2.2.3 样品前处理

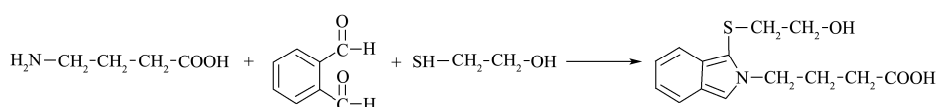
图1 γ -氨基丁酸衍生反应方程式

Fig.1 Derivative reaction process of GABA with derivating agent

酸奶冻干粉样品前处理：称取样品 0.500 g，定容到 100 mL，混匀，取 10 mL 酸奶冻干粉溶液，4 °C，8000 r/min 离心 10 min，取上清液 1 mL，加入衍生试剂 0.2 mL（其衍生化反应测定原理如图 1 所示），混匀，过 0.22 μ m 尼龙滤膜，HPLC 分析。 γ -氨基丁酸标准品浓度：5、10、20、50、100、200 μ g/mL；取标准品溶液 1 mL，按上述方法衍生，过 0.22 μ m 尼龙滤膜，HPLC 分析。

1.2.2.4 色谱条件

色谱柱：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18（4.6 mm \times 250 mm，5 μ m）；进样量：20 μ L；检测波长：334 nm。

表 1 高效液相色谱法梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution conditions of HPLC

时间/min	A 相/%	B 相/%	流速/(mL/min)	柱温/°C
0	89	11	1	40
15.5	68	32	1	40
26.5	20	80	1	40
27	20	80	1	40
29	89	11	1	40
30	89	11	1	40

1.2.3 对氯苯丙氨酸（PCPA）的溶解^[19]

用 5% NaHCO₃ 溶液调节 0.9% NaCl 溶液 pH 至 7~8，得碱性生理盐水。之后用碱性生理盐水配置 5% 的阿拉伯胶溶液，0.22 μ m 微孔滤膜过滤，加 PCPA 静置过夜，得 PCPA 混悬液。

1.2.4 富含 GABA 酸奶对小鼠睡眠的影响

参照《中华人民共和国卫生部保健食品检验与评价技术规范，2003》，将 150 只 ICR 雄性小鼠按体重随机分为 A、B、C、三批，每批 50 只，分别进行入睡率、睡眠时长和入睡潜伏期实验。每批小鼠随机均分阴性对照组（生理盐水）、含 GABA 酸奶低（40 mg/kg）、中（80 mg/kg）、高（160 mg/kg）剂量组和阳性对照组（地西洋 2 mg/kg），每组 10 只，灌胃体积 0.2 mL/10 g·BW，连续灌胃 30 d，观察各组小鼠体重变化情况。

1.2.5 富含 GABA 酸奶对失眠小鼠的影响

40 只 ICR 小鼠随机分为对照组（生理盐水）、失眠模型组（500 mg/kg PCPA）、富含 GABA 酸奶组（80 mg/kg）、阳性对照组（地西洋 2 mg/kg），每组 10

只，除了阴性对照组腹腔注射给予生理盐水，其余三组给予 PCPA，连续 2 d，使小鼠处于失眠状态。30 min 后阴性对照组和 PCPA 模型组灌胃给予等量的生理盐水，富含 GABA 酸奶组给予 80 mg/kg 酸奶、阳性对照组给予 2 mg/kg 地西洋。末次给药 4 h 后，摘眼球取血，分离血清，分离脑组织，制作脑组织匀浆。采用 Elasa 法测定小鼠脑组织及血清中 5-HT、GABA、Gly 和 Glu 的含量。

1.2.6 小鼠入睡判断标准^[20]

小鼠背卧达 1 min 不能翻正，则表小鼠翻正反射消失，表示小鼠入睡。以 30 s 内翻转达 3 次为翻正反射恢复，表示小鼠觉醒。从腹腔注射给药开始到翻正反射消失的时间为睡眠潜伏期，从翻正反射消失到翻正反射恢复的时间为睡眠时长。

1.2.7 戊巴比妥钠阈下剂量睡眠实验^[21]

按 1.2.4 动物分组后，A 批各组小鼠每日灌胃给予 1 次富含 GABA 酸奶，连续 30 d，于末次灌胃 30 min 后，各组小鼠腹腔注射戊巴比妥钠（32 mg/kg），注射体积为 0.1 mL/10 g·BW。根据 1.2.6 观察记录各组小鼠的入睡情况，计算入睡率。

1.2.8 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验^[22]

按 1.2.4 动物分组后，B 批各组小鼠每日灌胃给予富含 GABA 酸奶 1 次，连续 30 d，于末次灌胃 30 min 后，各组小鼠腹腔注射戊巴比妥钠（48 mg/kg），注射体积为 0.1 mL/10 g·BW。根据 1.2.6 观察记录各组小鼠的睡眠时长。

1.2.9 巴比妥钠睡眠潜伏期实验^[23]

按 1.2.4 动物分组后，C 批每组小鼠每日灌胃给予富含 GABA 酸奶 1 次，连续 30 d，末次灌胃 30 min 后，各组小鼠腹腔注射巴比妥钠（280 mg/kg），注射体积为 0.1 mL/10g·BW。根据 1.2.6 观察记录各组小鼠的睡眠潜伏期及睡眠时长。

1.3.0 数据处理分析

实验数据以 $\bar{x}\pm SD$ 表示，并采用 SPSS 16.0 统计软件分析，对数据进行 *t* 检验分析，（*p*<0.05）表示有统计学上有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验

表2 戊巴比妥钠阈下剂量催眠试验

Table 2 Hypnosis test of pentobarbital sodium subthreshold dose

组别	剂量/(mg/kg)	只数/n	入睡动物数/N	睡眠发生率/%
阴性对照组	-	10	1	10
富含GABA 酸奶低剂量组	40	10	2	20
富含GABA 酸奶中剂量组	80	10	6	60*
富含GABA 酸奶高剂量组	160	10	6	60*
阳性对照组	2	10	10	100**

注：与阴性对照组相比，*表示 $p < 0.05$ ，**表示 $p < 0.01$ 。

表2为各受试组小鼠对戊巴比妥钠阈下剂量催眠试验结果，富含GABA酸奶低（40 mg/kg）、中（80 mg/kg）、高（160 mg/kg）剂量组小鼠睡眠发生率分别为20%、60%、60%，且与剂量呈正相关。与阴性对照组比，富含GABA酸奶中（80 mg/kg）、高（160 mg/kg）剂量组和阳性对照组（地西洋2 mg/kg）小鼠入睡显著高于阴性对照组（ $p < 0.05$ ）。富含GABA各剂量受试组对小鼠睡眠发生率的提升效果均弱于阳性对照组。说明摄入富含GABA酸奶可以提高小鼠睡眠发生率。吴春兰等采用戊巴比妥钠阈下睡眠实验研究γ-氨基丁酸毛叶茶对小鼠睡眠的改善作用，结果显示γ-氨基丁酸毛叶茶低（0.83 g/kg·BW）、中（1.67 g/kg·BW）、高（3.33 g/kg·BW）剂量组均具有显著提高小鼠睡眠发生率作用，睡眠发生率分别为33.33%、16.67%、25.00% [24]。

2.2 延长戊巴比妥钠睡眠时长实验

表3 延长戊巴比妥钠睡眠时间试验

Table 3 Test of extended pentobarbital sodium sleep time

组别	剂量/(mg/kg)	只数/n	睡眠时长/min ($\bar{x} \pm SD$)
阴性对照组	-	10	43.40±20.40
富含GABA 酸奶低剂量组	40	10	39.00±15.43
富含GABA 酸奶中剂量组	80	10	156.20±96.06*
富含GABA 酸奶高剂量组	160	10	77.20±35.90
阳性对照组	2	10	231.50±82.50*

注：与阴性对照组相比，*表示 $p < 0.05$ 。表4同。

表3和图2为延长戊巴比妥钠睡眠时长实验结果。富含GABA酸奶低（40 mg/kg）、中（80 mg/kg）、高（160 mg/kg）剂量组的睡眠时长分别为39.00 min、156.20 min、77.20 min，与阴性对照组相比，富含GABA酸奶中剂量（80 mg/kg）能显著延长小鼠睡眠时长（ $p < 0.05$ ）；阳性对照组小鼠的睡眠时长为231.50

min，与阴性对照组相比也显著延长小鼠睡眠时长（ $p < 0.05$ ）。说明富含GABA酸奶中剂量（80 mg/kg）具有显著延长小鼠睡眠的作用。李晓娜等研究也表明，100和150 mg/kg的γ-氨基丁酸具有显著延长小鼠睡眠时长（ $p < 0.05$ ）的作用 [25]。吴春兰等的研究也提示γ-氨基丁酸毛叶茶能显著延长小鼠戊巴比妥钠睡眠时长 [24]。

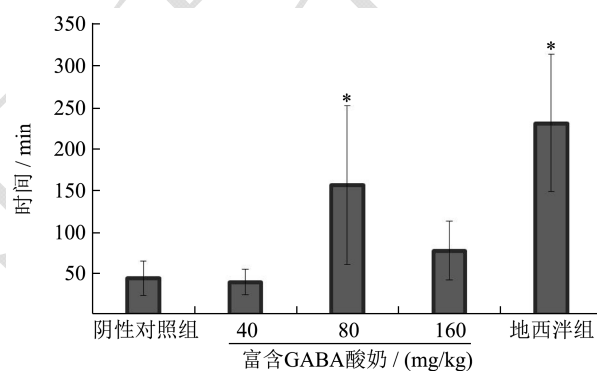


图2 延长戊巴比妥钠睡眠时间试验

Fig.2 Test of extended pentobarbital sodium sleep time

注：与阴性对照组相比，*表示 $p < 0.05$ 。

2.3 巴比妥钠睡眠潜伏期实验

表4 巴比妥钠睡眠潜伏期试验

Table 4 Test barbital sodium sleep latency ($\bar{x} \pm SD$)

组别	剂量/(mg/kg)	只数/n	睡眠潜伏期/min
阴性对照组	-	10	39.93±15.53
富含GABA 酸奶低剂量组	40	10	34.80±1.00
富含GABA 酸奶中剂量组	80	10	38.20±4.96
富含GABA 酸奶高剂量组	160	10	36.20±6.96
阳性对照组	2	10	25.20±6.37*

表4和图3为富含GABA酸奶对小鼠睡眠潜伏期实验结果。阴性对照组小鼠的睡眠潜伏期为39.93 min，富含GABA酸奶低（40 mg/kg）、中（80 mg/kg）、

高 (160 mg/kg) 剂量组的小鼠的睡眠潜伏期为 34.80 min、38.20 min、36.20 min, 与阴性对照组相比, 富含 GABA 酸奶低 (40 mg/kg)、中 (80 mg/kg)、高 (160 mg/kg) 剂量组对缩短小鼠睡眠潜伏期没有显著影响。李晓娜等研究也表明 γ -氨基丁酸低 (50 mg/kg)、中 (100 mg/kg)、高 (150 mg/kg) 剂量组均无缩短小鼠睡眠潜伏期的作用^[25]。

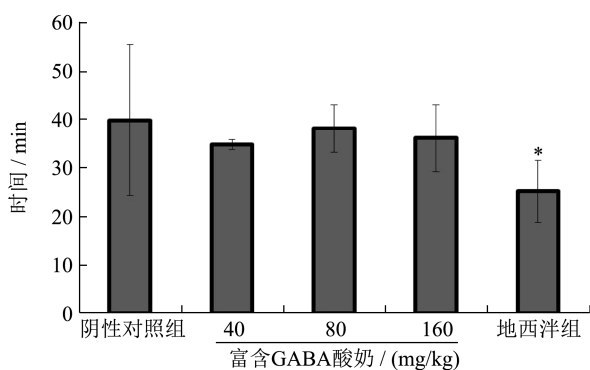


图3 巴比妥钠睡眠潜伏期试验

Fig.3 Test barbital sodium sleep latency

注: 与阴性对照组相比, *表示 $p < 0.05$ 。

2.4 各组小鼠灌胃给药 30 d 体重变化趋势

图4为各组小鼠连续灌胃 30 d 体重变化情况, 各组小鼠体重增长趋势一致, 说明富含 GABA 酸奶不影响小鼠的正常生长。

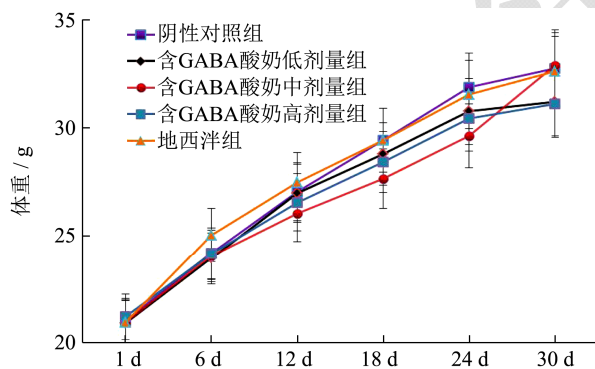


图4 各组小鼠 30 d 体重变化

Fig.4 Change in body weight of mice in 30 days

表5 小鼠脑组织中 Gly、GABA、5-HT 和 Glu 的含量比较

Table 5 Comparison of Gly, GABA, 5-HT, and Glu content in mouse brain ($\bar{x} \pm SD$)

递质	阴性对照组	PCPA 组	富含 GABA 酸奶组	地西洋组
Gly/(ng/mL)	34.82±1.65	24.16±0.065 ^{##}	28.78±2.28*	30.79±1.97**
GABA/(ng/mL)	1.11±0.067	1.01±0.028	1.10±0*	1.11±0.06
5-HT/(pg/mL)	42.51±0.66	37.23±2.79	38.69±5.32	41.60±1.26
Glu/(μ mol/L)	3.68±0.13	3.95±0.09 [#]	4.17±0.21	4.08±0.23

注: 与阴性对照组比, #表示 $p < 0.05$, ##表示 $p < 0.01$; 与 PCPA 组比, *表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$ 。表 6 同。

2.5 小鼠行为学改变

PCPA 是色氨酸羟化酶抑制剂, 能够阻断和耗竭脑内神经递质 5-HT, 导致失眠^[26]。使用腹腔注射 PCPA 建立失眠模型, 简单准确、效果确切, 在动物实验中被广泛使用和认可^[27]。相对于阴性对照组, 给予 PCPA 的小鼠出现明显的失眠特征, 饮水量及进食量均有所增加, 体重有所下降, 昼夜节律紊乱, 毛发微黄不光泽且有掉毛现象, 活动频繁, 整体上比较兴奋, 攻击性增加, 相互撕咬^[28,29]。由此说明小鼠失眠模型造模成功。

2.6 富含 GABA 酸奶对失眠小鼠脑组织中 Gly、GABA、5-HT 和 Glu 含量的影响

表 5 为 Elasa 法测定小鼠脑组织中 Gly、GABA、5-HT 和 Glu 的含量结果。与阴性对照组相比, PCPA 模型组小鼠脑组织中抑制性氨基酸 Gly 含量 (24.16 ng/mL) 显著下降 ($p < 0.01$), 兴奋性氨基酸 Glu 含量 (3.95 μ mol/L) 显著增加 ($p < 0.05$), GABA 和 5-HT 的含量无明显变化; 和 PCPA 模型组相比, 富含 GABA 酸奶组小鼠脑组织中抑制性氨基酸 Gly (28.78 ng/mL) 和 GABA (1.10 ng/mL) 的含量均显著增加 ($p < 0.05$), 5-HT 和 Glu 的含量无明显变化; 地西洋组也能够显著增加失眠小鼠脑组织中 Gly (30.79 ng/mL) 的含量 ($p < 0.05$), 但对其他三种递质无影响。表明富含 GABA 酸奶组可以显著提高小鼠脑组织中抑制性氨基酸 Gly 和 GABA 含量, 由此可看出富含 GABA 酸奶可以通过增加小鼠脑组织中抑制性递质 Gly 和 GABA 含量来改善小鼠睡眠。孙延娜等的研究显示滋阴养血安神方可通过增加失眠小鼠 Glu 和 GABA 含量及 Glu/GABA 比值影响 PCPA 诱导的失眠小鼠睡眠^[30]。游秋云等的研究也显示舒郁安神方能增强老年肝郁型失眠证候模型大鼠学习记忆能力, 其机理可能与大脑皮质及下丘脑 Glu 及 GABA 含量显著升高有关^[31]。

表6 四组小鼠血清中 Gly、GABA、5-HT、和 Glu 的含量比较

Table 6 Comparison of Gly, GABA, 5-HT, and Glu content in mouse serum ($\bar{x}\pm SD$)

递质	阴性对照组	模型组	富含 GABA 酸奶组	地西洋组
Gly/(ng/mL)	516.52±20.12	425.55±22.52 ^{##}	457.77±18.78	493.43±5.50*
GABA/(ng/mL)	21.97±0.19	20.76±0.61 [#]	21.43±0.90	21.71±1.20
5-HT/(pg/mL)	440.46±6.47	423.52±19.63	432.56±8.52	448.23±22.54
Glu/(μ mol/l)	74.44±1.44	76.24±5.29	74.40±3.44	77.70±3.92

2.7 富含 GABA 酸奶对失眠小鼠血清中 Gly、

GABA、5-HT 和 Glu 含量的影响

表6为Elasa法测定小鼠血清中 Gly、GABA、5-HT 和 Glu 的含量结果。与阴性对照组相比, PCPA 模型组小鼠血清中抑制性氨基酸 Gly 含量(425.55 ng/mL)显著降低($p<0.01$), GABA 含量(20.76 ng/mL)也显著降低($p<0.05$), 5-HT 和 Glu 的含量无明显变化; 和 PCPA 模型组相比, 富含 GABA 酸奶组能够增加失眠小鼠血清中的 Gly 含量, GABA 的含量也略有增多, 但均无显著性差异。与 PCPA 模型组相比, 地西洋组小鼠血清中 Gly 含量(493.43 ng/mL)显著增加($p<0.05$)。说明富含 GABA 酸奶对失眠小鼠血清中 Gly、GABA、5-HT 和 Glu 的含量无明显影响。

3 结论

本研究结果显示, 富含 GABA 酸奶对小鼠的正常生长没有影响。富含 GABA 酸奶可以改善小鼠睡眠情况, 增加小鼠入睡率, 延长小鼠的睡眠时长。PCPA 所致失眠小鼠实验显示, 富含 GABA 酸奶能够显著增加小鼠脑内抑制性递质 GABA 及 Gly 的含量, 但对失眠小鼠血液中的 GABA 及 Gly 等无影响。该结果提示富含 GABA 酸奶通过增加小鼠脑组织中抑制性氨基酸的含量发挥促进小鼠睡眠的作用, 更深入的机理有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Mellinger G D, Balter M B, Uhlenhuth E H. Insomnia and its treatment prevalence and correlates [J]. Archives of General Psychiatry, 1985, 42(3): 225-232
- [2] 邢亦夕. 中医传承辅助平台在中医药治疗失眠中的应用现状[J]. 世界睡眠医学杂志, 2018, 5(5): 558-563
XING Yi-xi. The application of assistant platform for inheritance of traditional chinese medicine in insomnia treated by traditional Chinese medicine [J]. World Journal of Sleep Medicine, 2018, 5(5): 558-563
- [3] Silva-costa A, Griep R H, Rotenberg L. Disentangling the

effects of insomnia and night work on cardiovascular diseases: a study in nursing professionals [J]. Braz J Med Biol Res, 2015, 48(2): 120-127

- [4] Mann-Jiles V, Thompson K, Lester J. Sleep impairment and insomnia in sickle cell disease: A retrospective chart review of clinical and psychological indicators [J]. Journal of the American Association of Nurse Practitioners, 2015, 27(8): 441-449
- [5] Matthew, Menza, Roseanne, et al. Treatment of insomnia in Parkinson's disease: A controlled trial of eszopiclone and placebo [J]. Movement Disorders, 2010, 25(11): 1708-1714
- [6] LIN YU-Fang, LIU Zhi-dan, et al. Hazards of insomnia and the effects of acupuncture treatment on insomnia [J]. Journal of Integrative Medicine, 2016, 14(3): 174-186
- [7] 高家荣, 季文博, 姜辉, 等. 酸枣仁-五味子药对醇水双提物对 PCPA 致失眠大鼠氨基酸类神经递质的影响[J]. 中药材, 2013, 36(10): 1635-1639
GAO Jia-rong, JI Wen-bo, JIANG Hui, et al. Effects of Extracts from *Ziziphi Spinosa* Semen and *Schisandrae Chinensis* Fructus on amino acid neurotransmitter in rats with insomnia induced by PCPA [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(10): 1635-1639
- [8] JIANG Jie, ZHAO Bai-xiao, LUE H A, et al. Effects of different waveform electroacupuncture on the 5-HT, Glu and GABA contents of the hypothalamus in rats with PCPA-induced insomnia [J]. Shanghai Journal of Acupuncture & Moxibustion, 2015, 34(7): 678-681
- [9] 丁玲, 汤显靖, 陈旭, 等. 重复经颅磁刺激对帕金森睡眠障碍患者血浆 Glu 和 GABA 水平的影响[J]. 中外医疗, 2018, 37(26): 7-9
DING Ling, TANG Xian-jing, CHEN Xu, et al. Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on plasma Glu and Gaba levels in patients with Parkinson's sleep disorder [J]. China & Foreign Medical Treatment, 2018, 37(26): 7-9
- [10] Abdullina A A, Vasileva E V, Kondrakhin E A, et al. The involvement of the serotonin, glutamate, and GABA receptors in the manifestation of the antidepressant-like effect of cyclopropylglycine [J]. Neurochemical Journal, 2019,

- 13(3): 249-255
- [11] Begum Z, Younus I. Hibiscus rosa sinensis mediate anxiolytic effect *via* modulation of ionotropic GABA-A receptors: possible mechanism of action [J]. *Metabolic Brain Disease*, 2018, 33(3): 823-827
- [12] LIU Hong-cai, CHEN Kai-hong. Relationship study between plasma Glu and GABA and sleep disorders in patients with parkinson's disease [J]. *Proceeding of Clinical Medicine*, 2018, 27(1): 27-29
- [13] 马燕,段双梅,赵明.富含 γ -氨基丁酸食品的研究进展[J].氨基酸和生物资源,2016,38(3):1-6
MA Yan, DUAN Shuang-mei, ZHAO Ming. Research progress of foods rich in Gamma-aminobutyric acid [J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2016, 38(3): 1-6
- [14] 张晖,姚惠源,姜元荣.富含 γ -氨基丁酸保健食品的研究与开发[J].食品与发酵工业,2002,28(9):69-72
ZHANG Hui, YAO Hui-yuan, JANG Yuan-rong. Development of the health food enriched with γ -aminobutyric acid (GABA) [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2002, 28(9): 69-72
- [15] 谢芳,杨承剑,唐艳,等.含 γ -氨基丁酸水牛酸奶对 SHR 大鼠血压、血脂及小鼠醉酒的影响[J].中国酿造,2015,34(9):97-100
XIE Fang, YANG Cheng-jian, TANG Yan, et al. Effects of γ -aminobutyric acid buffalo milk yogurt on blood pressure, blood lipids levels of SHR and drunkenness of mice [J]. *China Brewing*, 2015, 34(9): 97-100
- [16] Leucht S, Hackl H J, Steimer W, et al. Effect of adjunctive paroxetine on serum levels and side-effects of tricyclic antidepressants in depressive inpatients [J]. *Psychopharmacology*, 2000, 47(4): 378-383
- [17] ZHU Shao-tong, Noviello C M, TENG Jin-feng, et al. Structure of a human synaptic GABA_A receptor [J]. *Nature*, 2018, 559(7712): 67-72
- [18] 樊思恩,赵华.针刺治疗失眠研究进展[J].新疆中医药,2018, 36(2):133-136
FAN Si-en, ZHAO Hua. Research progress of acupuncture treatment of insomnia [J]. *Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 36(2): 133-136
- [19] 魏欲然,郑雪娜,裴芸,等.大鼠失眠模型造模中对氯苯丙氨酸混悬液改良法的探讨[J].湖南中医药大学学报,2018, 38(9):24-27
WEI Xin-ran, ZHENG Xue-na, PEI Yun, et al. An improved method for the preparation of para-chlorobenzalanine suspension in a rat model of insomnia [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan*, 2018, 38(9): 24-27
- [20] 王丹.参苓颗粒的处方配伍及制备工艺研究[D].武汉:湖北中医药大学,2019
WANG Dan. Study on decomposed recipes and preparation process of Shenling granules [D] Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2019
- [21] DENG Lei, SHI Ai-min, WANG Qiang. Sedative-hypnotic and anxiolytic effects and the mechanism of action of aqueous extracts of peanut stems and leaves in mice [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2018, 98(13): 4885-4894
- [22] Bulger W H, Wells P R, Roche E B. Pharmacological assessment of 3-tert-butylsydnone [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1976, 65(1): 109-111
- [23] LI Xin, TANG Zi-chen, FEI Dong-qing, et al. Evaluation of the sedative and hypnotic effects of astragalol isolated from *Eucommia ulmoides* leaves in mice [J]. *Natural Product Research*, 2017, 31(5): 2072-2076
- [24] 吴春兰,黄亚辉,赖幸菲,等. γ -氨基丁酸(GABA)毛叶茶品质成分分析及其改善睡眠作用的研究[C]. 2013 年广东省研究生学术论坛-园艺分论坛论文集.暨南大学,2013:508-521
WU Chun-lan, HUANG Ya-hui, LAI Xing-fei, et al. Study on quality components and sleep-promoting effect of GABA Maoyecha tea [C]// Jinan University. 2013 Guangdong Provincial Postgraduate Academic Forum-Proceedings of Horticulture Sub-forum. 2013: 508-521
- [25] 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
LI Xiao-na, ZHAO Qing-hua, WANG Ai-hua, et al. Effect of γ -aminobutyric acid on sleep in mice [J]. *Industrial & Science Tribune*, 2018, 17(11): 68-69
- [26] 牟宇.稀有人参皂苷的镇静催眠作用及机制探究[D].西安:西北大学,2019
MOU Ning. The sedative and hypnotic effects and mechanism of rare ginsenosides [D]. Xi'an: Northwest University, 2019
- [27] 肖成荣,马增春,李海静,等.PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J].毒理学杂志,2007,4:326
XIAO Cheng-rong, MA Zeng-chun, LI Hai-jing, et al. PCPA Making and mechanism of insomnia rat model [J]. *Journal of Health Toxicology*, 2007, 4: 326