

γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 改善斑马鱼焦虑样行为及五羟色胺合成的作用机制

朱西平¹, 崔春^{2,3*}, 王炜², 王顺民¹, 陶瑾¹, 郭玉峰¹

(1. 安徽工程大学生物与食品工程学院, 安徽芜湖 241000) (2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (3. 广东巍微生物科技有限公司, 广东广州 510640)

摘要: 该研究探讨了 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp (EnW) 及其四种肽单体 (γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp) 改善斑马鱼焦虑样行为和五羟色胺 (Serotonin, 5-HT) 合成的作用机制。EnW 及其肽单体均采用水溶给药的方式处理斑马鱼 (低剂量 56 μ g/mL、高剂量 500 μ g/mL), 各供试品处理 2 周后开始行为学和生化指标测试。与正常对照组相比, 行为学研究结果表明 EnW 及其肽单体均能够增加斑马鱼黑白偏好实验中明区停留时间百分比、新鱼缸实验中上下穿梭次数和鱼缸上半部分停留时间百分比, 其中 γ -Glu-Trp 组斑马鱼明区停留时间百分比 (41.66%)、上下穿梭次数 (25.83 次) 和鱼缸上半部分的停留时间百分比 (38.95%) 增加最显著 ($p < 0.05$); 此外, 生化指标测定结果表明 EnW 及其肽单体增加了斑马鱼大脑组织色氨酸 (Trp) 浓度、色氨酸羟化酶活性和 5-HT 水平。综上所述, EnW 及其肽单体作为 Trp 的直接来源改善斑马鱼焦虑样行为的可能作用机制是通过增加大脑组织 Trp 浓度, 上调 Trp-5-HT 代谢途径进而增加神经递质 5-HT 的合成而发挥作用, 从而证明膳食补充 EnW 及其肽单体具有预防和改善焦虑的作用。

关键词: γ -谷氨酰色氨酸肽; 焦虑; 五羟色胺; 行为学; 色氨酸代谢

文章编号: 1673-9078(2022)06-28-36

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0997

Mechanism of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp to Improve Anxious-like Behavior and Serotonin Synthesis in Zebrafish Model

ZHU Xiping¹, CUI Chun^{2,3*}, WANG Wei², WANG Shunmin¹, TAO Jin¹, GUO Yufeng¹

(1.College of Biological and Food Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

(2.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3.Guangdong Weiwei Technology Co. Ltd., Guangzhou 510640, China)

Abstract: The mechanism of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomers (γ -Glu-Trp, γ -[Glu]₂-Trp, γ -[Glu]₃-Trp, and γ -[Glu]₄-Trp) on anxiety-like behavior and serotonin synthesis was investigated using a zebrafish model. The anxiety-like behaviors (increased time in the light area in light-dark test, number of up-and-down shuttles in novel tank test) were reduced two weeks after administration of 56 μ g/mL γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and 500 μ g/mL of each monomer. γ -Glu-Trp was most effective (41.66% of time in light, 25.83% up-and-down shuttles). γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer induced up-regulation of tryptophan-serotonin (Trp-5-HT) metabolism by increasing Trp concentration and tryptophan hydroxylase activity in zebrafish. The *in vivo* findings demonstrate that γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer have significant anti-anxiety effects as evidenced by reduced anxiety-like behavior, increased 5-HT level, and induced up-regulation of Trp-5-HT metabolism pathway in zebrafish treated with γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer compared to that in the control group. These results suggest that dietary γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer may induce beneficial effects for anxious behavior.

引文格式:

朱西平,崔春,王炜,等. γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 改善斑马鱼焦虑样行为及五羟色胺合成的作用机制[J].现代食品科技,2022,38(6):28-36

ZHU Xiping, CUI Chun, WANG Wei, et al. Mechanism of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp to improve anxious-like behavior and serotonin synthesis in zebrafish model [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 28-36

收稿日期: 2021-09-07

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (2108085QC142); 广东省科学技术研究基金项目 (2017A010105002); 安徽工程大学引进人才科研启动项目 (2020YQQ049)

作者简介: 朱西平 (1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 1056234811@qq.com

通讯作者: 崔春 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: cuichun@scut.edu.cn

Key words: γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp; anxious; serotonin; behaviors; Trp metabolism

焦虑症 (Anxiety disorders) 又名焦虑性神经症, 是当今世界上最为常见的全球性精神卫生问题之一, 严重影响着人们的生活质量^[1,2]。目前关于焦虑症的发病机制涉及以下几种假说: 神经递质假说、免疫系统假说、HPA 轴假说、脑源性神经营养因子假说、遗传学假说等^[3,4]。其中单胺类神经递质五羟色胺 (5-HT) 分泌异常在精神类疾病的诊断和治疗中扮演着非常重要的角色, 是目前最为公认的发病机制假说之一^[5]。研究表明合成和分泌 5-HT 的中枢神经系统与调节情绪的脑区 (如海马、前额叶皮层) 有着密切的突触联系, 构成了单胺类神经递质 5-HT 参与精神类疾病调节的生理基础^[6]。近几年越来越多的学者开始关注 5-HT 在焦虑障碍中所发挥的作用, 此外临床上用于治疗焦虑症的药物的作用机制和靶点也多数是通过调节突触间隙神经递质 5-HT 的水平来发挥作用^[7-9], 但是这些药物均具有其自身的局限性 (用药时间长、起效慢、副作用明显、复发率高和症状缓解不彻底等特点), 其作用机理也有待进一步明确^[10]。随着人们对生活质量的要求越来越高, 单纯通过药物调节中枢神经系统 5-HT 水平的治疗已经无法满足人们的需求, 因此营养干预在精神类疾病中的作用越来越受到重视。

色氨酸 (Trp) 是 5-HT 合成的直接前体物质, 5-HT 又是抑制大脑产生焦虑情绪的神经递质, 因此膳食补充 Trp 及其衍生物可增加机体 Trp 浓度进而提高 5-HT 的水平^[11]。流行病学和临床研究表明, Trp 及其衍生物营养干预能够有效降低精神类疾病的发病率, 并且有学者建议 Trp 可作为改善精神健康的饮食进行补充^[12-15]。由于 Trp 肽比 Trp 具有更优的吸收机制和更强的生物活性, 近几年 Trp 肽营养干预在精神类疾病中的研究不断增加, Orosco 等^[13]和 Zhu 等^[14,15]研究表明通过膳食补充乳清蛋白源色氨酸寡肽可增加实验动物中枢神经系统 5-HT 的释放, 具有抗焦虑的作用。 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 已被证明具有改善焦虑性抑郁症小鼠的焦虑样行为作用, 但是关于其改善斑马鱼焦虑样行为的研究尚处于空白。 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 是以谷氨酰胺 (Glutamine, Gln) 和 Trp 为反应底物在解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶 (L-Glutaminase) 的催化下定向合成的系列产物, 由 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 四种寡肽组成^[15], 但是关于 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 分别作用改善和预防焦虑症的研究尚处于空白。因此, 本文以 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp、 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 为供试品, 利用斑马鱼模

式生物研究其改善焦虑样行为和促进 5-HT 合成的作用, 再结合生化指标探究其改善焦虑症的作用机制, 筛选出改善焦虑效果最优的肽单体。旨在为 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体预防和改善焦虑症的作用机制提供方法指导和理论依据, 这些研究对促进 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体的未来实际应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

成年斑马鱼 (野生型 AB 品系), ♀♂比为 1:1, 2 月龄由华南理工大学医学院斑马鱼实验室培育; 解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶 (100 U/g) 购买于天野酶中国有限公司 (中国上海); L-色氨酸和 L-谷氨酰胺两种氨基酸 (纯度≥95%) 购买于上海伯奥生物科技有限公司 (中国上海); γ -Glu-Trp (γ -EW)、 γ -[Glu]₂-Trp (γ -EEW)、 γ -[Glu]₃-Trp (γ -EEEW)、 γ -[Glu]₄-Trp (γ -EEEEW) (纯度≥95%) 四种商业合成色氨酸肽单体均由南京肽业生物科技有限公司 (中国南京) 合成; 解剖剪、镊子、铝箔纸、一次性过滤器、研钵、离心管、移液器等均购于广州精科化玻仪器公司 (中国广州); 生化指标测定所需的试剂盒均购买于上海江莱生物科技有限公司 (中国上海)。

1.2 实验方法

1.2.1 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 的制备

酶法定向合成 γ -谷氨酰色氨酸肽 (γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp, EnW) 的方法参照 Yang 等^[16], 稍有改进。以 Gln 为酰基供体、Trp 为酰基受体、Gln:Trp=300 mmol/L:100 mmol/L、底物浓度为 0.2 mol/L、酶添加量为 0.15% (*m/V*) 在 37 °C 和 pH 10.0 的条件下利用解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶催化反应 180 min。然后利用沸水浴的方法灭酶处理 15 min 以终止反应, 冷冻干燥, -20 °C 保存, 待用。采用 UPLC-ESI-MS/MS 对整个反应产物进行序列和结构鉴定, UPLC-ESI-MS/MS 相关参数设定如下: 干燥气温度 180 °C、流速 8.0 L/min; 扫描范围质荷比 (*m/z*) 50~1000; 毛细管电压 4500 V; 四级杆电子能量为 4.0 eV, 碰撞诱导裂解能为 8.0 eV。采用电喷雾离子源 ESI⁺ 模式下扫描, ESI⁺ 雾化器压力为 1.5 bar; 采用 Data analysis 4.1 软件对原始数据进行手动 *de novo* 分析得到反应产物中多肽序列, 测定的多肽实际分子质量应

与其理论值相匹配, 偏差在 300×10^{-6} 以内, 然后根据 Yang 等^[17]采用离子峰萃取的方法对鉴定的系列产物进行定量分析。

1.2.2 供试品的最大耐受浓度 (MTC) 测定

斑马鱼饲养在华南理工大学医学院斑马鱼实验室, 参照王丽娟^[18]的方法进行, 并有所改进。供试品的最大耐受浓度 (MTC) 测定方案经华南理工大学斑马鱼实验室批准, 并遵循中国试验动物护理和使用指南。EnW、 γ -EW、 γ -EEW、 γ -EEEEW、 γ -EEEEEW 五个供试品均按照不同的浓度分为 6 个组 (一个正常组和 5 个浓度梯度组), 共计 30 个组别, 每组 30 尾斑马鱼, 然后随机选取 900 尾斑马鱼于 6 孔板中 (温度 28.5 ± 0.2 °C、pH 值 7.5 ± 0.02) 开始供试品最 MTC 测定。上述供试品 (EnW、 γ -EW、 γ -EEW、 γ -EEEEW、 γ -EEEEEW) 均按照如下浓度梯度测试: 0、125、250、500、1000 和 2000 $\mu\text{g/mL}$ 。供试品处理 24 h 后, 观察斑马鱼状态, 记录并统计各实验组斑马鱼的毒性情况与死亡数量, 确定上述五种供试品的 MTC。

1.2.3 动物分组

依据 1.2.2 的结果得到 EnW、 γ -EW、 γ -EEW、 γ -EEEEW、 γ -EEEEEW 的 MTC, 选取各供试品的 MTC 和 1/9 MTC 为实验的高剂量组和低剂量组, 同时设置一个正常对照组, 共计 11 个组别, 每个组 30 尾斑马鱼。330 尾斑马鱼 (温度 28.5 ± 0.2 °C、pH 值 7.5 ± 0.02 、鱼缸容积 3 L、14/10 h 光暗循环, 电导率 450~550 $\mu\text{S/cm}$; 系统水为循环水, 每日自动更新 10%, 并有紫外灯实时净水消毒), 利用斑马鱼独立养殖系统养殖斑马鱼, 每日喂食两次, 食物为丰年虾卵。试验方案经华南理工大学斑马鱼实验室批准, 并遵循中国试验动物护理和使用指南。330 尾斑马鱼随机分为 11 组, 分别为正常对照组 (NC); EnWL (EnW 低剂量组 56 $\mu\text{g/mL}$)、EnWH (高剂量组 500 $\mu\text{g/mL}$); γ -EWL (γ -EW 低剂量组 56 $\mu\text{g/mL}$)、 γ -EWH (γ -EW 高剂量组 500 $\mu\text{g/mL}$); γ -EEWL (γ -EEW 低剂量组 56 $\mu\text{g/mL}$)、 γ -EEWH (γ -EEW 高剂量组 500 $\mu\text{g/mL}$); γ -EEEEWL (γ -EEEEW 低剂量组 56 $\mu\text{g/mL}$)、 γ -EEEEWH (γ -EEEEW 高剂量组 500 $\mu\text{g/mL}$); γ -EEEEEWL (γ -EEEEEW 低剂量组 56 $\mu\text{g/mL}$)、 γ -EEEEEWH (γ -EEEEEW 高剂量组 500 $\mu\text{g/mL}$)。供试品处理前将斑马鱼移入一个 3 L 的鱼箱中适应 3 d, 适应期结束后供试品处理 14 d。每天供试品处理时将实验斑马鱼从饲养鱼缸中捞出, 放入浸有相对浓度供试品的鱼水中, 浸泡 30 min, 然后再转入饲养鱼缸中。在第 15 d 供试品处理结束后一天将受试斑马鱼放入干净的测试鱼箱中, 进行行为学测试。

1.2.4 行为学实验

供试品以水溶给药的方式处理 14 d 后, 在白天 (早 7:00~晚 17:00) 对所有实验组斑马鱼进行焦虑样行为测试。为了确保获得准确的结果必须使整个行为学测试过程在一个安静和平稳的环境下进行, 此外, 且整个测试过程中保持水温、水质与正常饲养条件一致。

1.2.4.1 黑白偏好实验

黑白偏好实验模型为长 \times 宽 \times 高 (18 cm \times 9 cm \times 7 cm) 的鱼箱, 通过可控式隔板把鱼箱分为两个相等的部分, 一侧四周均被黑色包绕, 另一色则被白色包绕。斑马鱼黑白偏好实验根据蒋湘云^[19]报道的方法, 并有所改进, 供试品处理 14 d 后, 将正常饲养鱼水 (温度 28.5 ± 0.2 °C、pH 值 7.5 ± 0.02) 装入黑白偏好实验测试装置中, 水深约 3~4 cm, 并保证斑马鱼能在整个测试过程中自由游动。实验开始前, 先将受试鱼转移至行为学检测所用场地, 并给予受试鱼 30 min 时间来适应周围环境。测试开始时, 首先将斑马鱼轻柔且迅速的放入明区, 然后打开阀门, 点击开始按钮, 开始一个 6 min 的测试。整个测试过程中采用 Zebralab 3.3 斑马鱼行为轨迹分析仪 (法国 Viewpoint 公司) 系统跟踪和记录斑马鱼的运动和和行为。试验结束后, 将斑马鱼从水中取出并放回饲养鱼缸中。整个实验采集数据, 再分析斑马鱼在明区的停留时间, 计算明区停留时间百分比见公式 (1)。

$$\text{明区停留时间百分比} / \% = \frac{\text{明区停留时间}}{\text{总测试时间}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4.2 新鱼缸实验

新鱼缸实验模型为底面长 \times 宽 \times 高 \times 顶面长 (22.5 cm \times 7.1 cm \times 15.2 cm \times 27.9 cm) 的梯形鱼箱, 将新鱼缸装上鱼水, 水面距离上顶面约 2~3 cm。将斑马鱼从饲养鱼缸转移至测试新鱼缸中, 测试过程中光照强度与平时饲养条件相同, 实验开始前, 先将受试鱼转移至行为学检测所用场地, 并给予受试鱼 30 min 时间来适应周围环境。适应结束后点击开始按钮, 开始一个 6 min 的测试。整个测试过程中采用 Zebralab 3.3 斑马鱼行为轨迹分析仪 (法国 Viewpoint 公司) 系统跟踪和记录斑马鱼的运动和和行为。试验结束后, 将斑马鱼从水中取出并放回饲养鱼缸中。整个实验采用先采集数据, 后分析斑马鱼 6 min 内在新鱼缸中的上下穿梭次数和鱼缸上半部分停留时间百分比。

1.2.5 生化指标测定

行为学结束后, 立即在冰上快速分离受试斑马鱼脑组织, 用 4 °C 的生理盐水冲洗 3~5 次后用吸水纸吸干斑马鱼脑组织, 再加入 9 倍体积的磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS), 然后用均质仪将组织样品匀浆, 最后 4 °C、3000 r/min 离心 20 min 取

上清液, 将上清液分装后, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 待用。斑马鱼脑组织中 Trp 浓度、TPH 活性、吲哚胺-2,3-双加氧酶 (Indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) 活性、犬尿氨酸 (Kynurenine, KYN) 和 5-HT 水平等生化指标测定根据试剂盒说明书采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附试验 (Elisa) 方法。整个测定方法简述如下: 首先将试剂盒取出室温 ($25\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) 平衡 20 min, 往包被单抗的微孔中分别依次加 Trp、TPH、IDO、KYN 和 5-HT, 形成抗体-抗原-酶标抗体复合物, 经过彻底洗涤后加底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色, 然后用分光光度法在 450 nm 波长下测定 OD 值, 根据 OD 值计算斑马鱼脑组织中 Trp 浓度、TPH 活性、IDO 活性、KYN 和 5-HT 水平。

1.2.6 数据处理

实验数据采用 Excel、OriginPro 8.5.1、SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 等统计分析软件进行分析和作图; 所有实验均重复三次并采用“平均值 \pm 标准偏差”的形式来表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和两两比较采用 Duncan's post-hoc 检测, $p<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 酶促反应体系中 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 的表征

表 1 酶促反应体系中 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 的表征特性

Table 1 The characterization of identified γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp in the reaction system

理论 m/z [M+H ⁺]	实际 m/z [M+H ⁺]	y 离子碎片	化学式	肽序列	产率/%
334.14	334.14	205.09	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₅	γ -Glu-Trp	30.82
463.18	463.18	205.09、334.13	C ₂₁ H ₂₇ N ₄ O ₈	γ -[Glu] ₂ -Trp	10.36
592.22	592.22	205.09、334.13、463.18	C ₂₆ H ₃₄ N ₅ O ₁₁	γ -[Glu] ₃ -Trp	3.51
721.27	721.27	205.09、334.13、463.18、592.22	C ₃₁ H ₄₁ N ₆ O ₁₄	γ -[Glu] ₄ -Trp	1.03

表 2 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体的浓度对斑马鱼的影响

Table 2 The effect of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer concentration on zebrafish

浓度/($\mu\text{g/mL}$)	EnW	γ -EW	γ -EEW	γ -EEEEW	γ -EEEEEW
0	正常	正常	正常	正常	正常
125	正常	正常	正常	正常	正常
250	正常	正常	正常	正常	正常
500	正常	正常	正常	正常	正常
1000	6.6%死亡	16.6%死亡	3.3%死亡	6.6%死亡	10.0%死亡
2000	83.3%死亡	90.0%死亡	73.3%死亡	66.6%死亡	70.0%死亡

2.2 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体的最大耐受

浓度

特性

为进一步探究以 Gln 为供体、Trp 为受体, 在解淀粉芽孢杆菌源 L-谷氨酰胺酶催化作用下获得的酶促反应液, 采用 UPLC-ESI-MS/MS 对酶促反应液进行定性定量分析和结构鉴定。原始数据通过 Data analysis 4.1 软件中的手动 *de novo* 分析后, 结果如表 1 所示。从该酶促反应液中共鉴定出四种 γ -谷氨酰胺肽: γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp、 γ -[Glu]₄-Trp。在正离子[M+H⁺]模式中质核比 (m/z) 为 334.14、463.18、592.22、721.27 分别对应多肽 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp、 γ -[Glu]₄-Trp 的理论 m/z (334.14、463.18、592.22、721.27) (Error $\leq 300\times 10^{-6}$)。然后采用离子峰萃取的方法对 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 酶促反应液中 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp、 γ -[Glu]₄-Trp 进行定量分析, 分析结果可知 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 的总转化率达到 45.72% (m/m), 其中 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp、 γ -[Glu]₄-Trp 的产率分别为 30.82%、10.36%、3.51%和 1.03% (m/m)。综上所述, 以 Gln 为酰基供体、Trp 为酰基受体, 在 L-谷氨酰胺酶催化作用下能够定向合成 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp、 γ -[Glu]₄-Trp 系列产物, 从分析结果来看, 该酶促合成方法中 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 合成率较高。

EnW、 γ -EW、 γ -EEW、 γ -EEEEW、 γ -EEEEEW 设置的浓度分别为 0、125、250、500、1000 和 2000 $\mu\text{g/mL}$ 。供试品处理 24 h 后, 观察斑马鱼行为状态, 各实验组斑马鱼的死亡数量与毒性情况分析如表 2 所示, 由表

2 可知各供试品浓度在 2000 $\mu\text{g/mL}$ 时每组半数以上的斑马鱼出现死亡,各供试品浓度在 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时各组斑马鱼均出现少数死亡,但死亡率明显下降,各供试品浓度在 125、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 时各组斑马鱼均未出现死亡。综上所述, MTC 确定为 500 $\mu\text{g/mL}$, 且为各供试品的高剂量组; 1/9 MTC 为 56 $\mu\text{g/mL}$, 为低剂量组。

2.3 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼黑

白偏好实验的影响

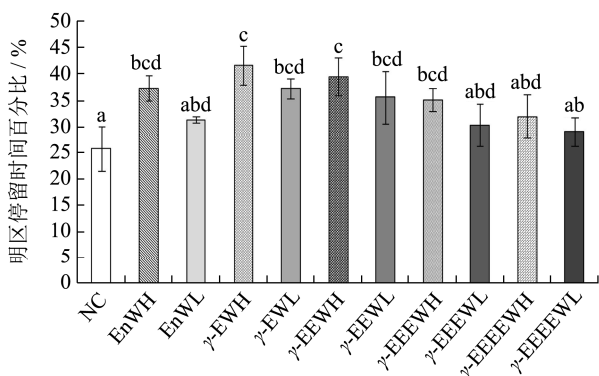


图 1 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼黑白偏好实验的影响

Fig.1 The effect of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer on light/dark test of zebrafish

注: 同组数据上小写字母不同表示差异性显著, $p < 0.05$ 。

斑马鱼黑白偏好实验 (Light-dark test) 作为一种焦虑症应激模型, 是抗焦虑药物筛选和斑马鱼焦虑模型建立与评价的经典方法, 广泛应用于应激反应、精神药理学或神经药理学的基础研究^[20,21]。其实验原理是动物具有畏惧白亮区域的特性, 其活动会选择在偏黑暗的区域 (趋避性), 但是面对新奇区域 (白亮区域) 的刺激又会产生探究的冲动行为, 这就造成了探究/趋避的矛盾心理, 从而产生焦虑行为。供试品处理 14 d 后, 各组斑马鱼黑白偏好实验结果如图 1 所示, 从图 1 可以看出各供试品处理后斑马鱼的明区停留时间百分比均高于正常对照组 (NC) 斑马鱼, EnWH、 γ -EWH、 γ -EWL、 γ -EEWH、 γ -EEWL 和 γ -EEEEWH 供试品处理组斑马鱼明区停留时间百分比显著 ($p < 0.05$) 高于 NC 组 (25.70%), 其中 γ -EWH (41.66%) 和 γ -EEWH (39.54%) 供试品处理组明区停留时间百分比最高。EnWL、 γ -EEEEWL、 γ -EEEEWH 和 γ -EEEEWL 供试品处理组斑马鱼明区停留时间百分比虽然也高于 NC 组, 但是不具有统计学意义 ($p > 0.05$)。四种肽单体之间相比, γ -EWH 和 γ -EEWH 组斑马鱼明区停留时间百分比显著 ($p < 0.05$) 高于 EnWL (31.36%)、

γ -EEEEWL (30.35%)、 γ -EEEEWH (32.03%) 和 γ -EEEEWL (29.07%) 组斑马鱼; γ -EWH 和 γ -EEWH 组斑马鱼明区停留时间百分比虽然高于 EnWH、 γ -EWL、 γ -EEWL 和 γ -EEEEWH 组斑马鱼, 但是差异不显著 ($p > 0.05$)。根据前人研究^[21]可知明区停留时间百分比越高说明小鼠探索欲望越强烈, 探究/趋避的矛盾行为越少, 焦虑症状越低。因此以上结果表明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体均具有降低斑马鱼黑白偏好实验中焦虑样行为的作用, 其中二肽和三肽高剂量组的效果最好。

2.4 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼新

鱼缸实验的影响

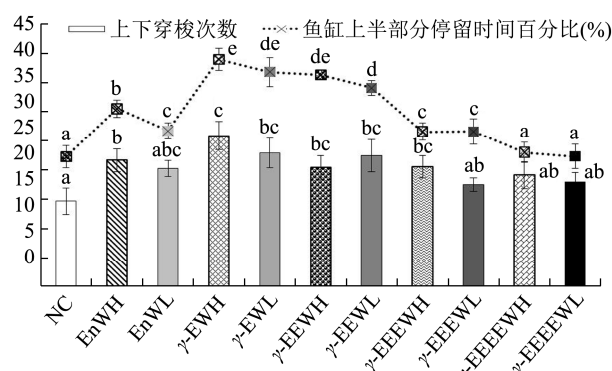


图 2 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼新鱼缸实验的影响

Fig.2 The effect of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer on novel tank test of zebrafish

斑马鱼新鱼缸实验结果如图 2 所示, 结果表明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理组斑马鱼在新鱼缸实验中的上下穿梭次数均高于正常对照组 (图 2 柱状图), EnWL、 γ -EEEEWL、 γ -EEEEWH 和 γ -EEEEWL 供试品处理组斑马鱼的在鱼缸中的上下穿梭次数略高于 NC 组 (14.57 次), 不具有统计学意义 ($p > 0.05$), 但是 EnWH、 γ -EWH、 γ -EWL、 γ -EEWH、 γ -EEWL 和 γ -EEEEWH 供试品处理组斑马在鱼缸中上下穿梭次数显著 ($p < 0.05$) 高于 NC 组, 其中 γ -EWH (25.83)、 γ -EWL (22.89) 和 γ -EEWL (22.40) 组斑马鱼在鱼缸中的上下穿梭次数最多。 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理组斑马鱼在新鱼缸实验中的上半部分停留时间百分比 (%) 也均高于正常对照组 (图 2 折线图), 其中 γ -EEEEWH、 γ -EEEEWL 和 NC 组之间没有显著差异 ($p > 0.05$), 但是其余各供试品处理组均显著高于 NC 组 (22.19%)。 γ -EW 二肽鱼缸上半部分停留时间百分比最高 (高剂量组 38.95% 和低剂量组 36.81%), 其次为 γ -EEW 三肽 (高剂量组 36.30% 和低剂量组

34.07%)。Hawkey 等^[22]研究表明,新鱼缸实验是一种直接、可重复的测量斑马鱼焦虑样行为的方法,当被引入一个新的鱼缸时,斑马鱼通常会潜入鱼缸的底部(趋避性),但是面对新奇区域(鱼缸的上部)的刺激又会产生探究的冲动,常被用来评价斑马鱼的焦虑行为。根据已有研究分析可知 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理后,斑马鱼趋避行为降低、探索行为增加,焦虑样行为降低。膳食补充 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体能够预防和改善新鱼缸实验中斑马鱼焦虑样行为的作用,其中的 γ -EW 二肽和 γ -EEW 三肽效果较好。

2.5 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼大脑 TPH 酶活性和 5-HT 水平的影响

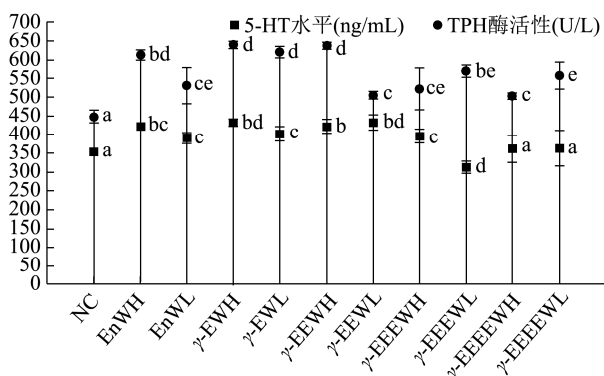


图3 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼大脑组织 TPH 酶活性和 5-HT 水平的影响

Fig.3 The effect of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer on TPH activation and 5-HT level of zebrafish

大脑组织突触间隙 5-HT 水平异常是焦虑症产生的主要原因, Trp 作为 5-HT 的主要前体物质,其在大脑组织中的水平及其生物利用度直接影响中枢神经系统 5-HT 水平^[23]。因此研究了 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼体内 5-HT 水平的影响, γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理后 2 周后各组斑马鱼大脑组织匀浆中 5-HT 水平如图 3 所示(黑色方格), EnWH、EnWL、 γ -EWH、 γ -EWL、 γ -EEWH、 γ -EEWL 和 γ -EEEEWH 处理组斑马鱼大脑组织 5-HT 水平均显著 ($p<0.05$)高于 NC(352.07 ng/mL)组,其中 γ -EEEEWH 和 γ -EEEEWL 处理组斑马鱼 5-HT 水平虽然也高于 NC 组,但是不具有统计学意义 ($p>0.05$)。 γ -EEEEWL 处理组斑马鱼大脑组织 5-HT 水平显著 ($p<0.05$) 低于 NC 组。目前已知临床上用的抗焦虑症的药物的作用机制大部分是通过增加大脑组织突触间隙 5-HT 水平进而影响神经信息传递而发挥作用^[24]。研究结果与药物改善焦虑症的效果一致,表明膳食补充 Trp 肽可以增加大脑组织 5-HT 水平,进而起到预防和改善焦虑

症的作用。TPH 酶是促进 5-HT 合成的关键限速酶,其活性和基因表达异常均可导致 5-HT 合成混乱,进而引发中枢神经系统相关疾病^[25,26]。斑马鱼大脑组织中 TPH 酶活性测定结果如图 3 所示(红色圆圈),结果表明与 NC 组(447.03 U/L)相比,各供试品处理组斑马鱼 TPH 酶活性均显著 ($p<0.05$)降低。各供试品处理组斑马鱼 TPH 活性在 630 U/L 以上的组分按照依次降低的顺序可描述为为: γ -EWH (637.95 U/L) > γ -EEWH (636.67 U/L) > γ -EWL (620.41 U/L) > EnWH(612.50 U/L)。综上所述, γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体均能够增加斑马鱼 TPH 酶活性和提高中枢神经系统 5-HT 水平,其中 γ -EW 和 γ -EEW 的改善效果明显优于 γ -EEEEW、 γ -EEEEWL。因此 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体可能是改善焦虑症状的潜在膳食补充剂。

2.6 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼大脑 IDO 酶活性和 KYN 水平的影响

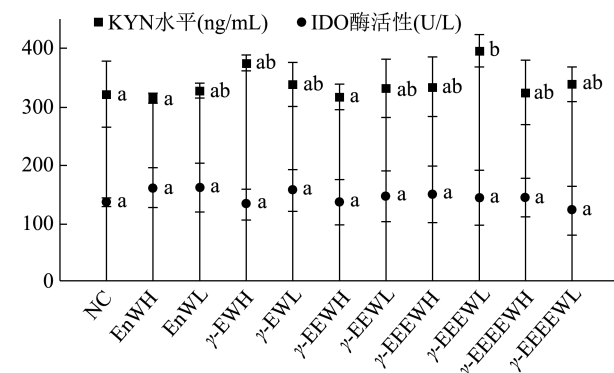


图4 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼大脑组织 IDO 酶活性和 KYN 水平的影响

Fig.4 The effect of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer on IDO activation and KYN level of zebrafish

IDO 酶是 KYN 合成的关键限速酶、也是 Trp 向 KYN 代谢途径转化的关键限速酶,研究表明机体在炎症和感染状态下由肝外组织分泌的 IDO 酶被激活而发挥作用,进而增加 KYN 的合成^[27],造成 Trp 耗竭,降低神经递质 5-HT 的合成和 Trp 的生物利用度。斑马鱼大脑组织 IDO 酶活性和 KYN 水平测定结果如图 4 所示,结果表明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理后斑马鱼大脑组织 IDO 酶活性与正常对照组之间没有显著差异 ($p>0.05$),不具有统计学意义。除了 γ -EEEEWL 组外,其余各供试品处理组斑马鱼大脑组织 KYN 水平均与正常组之间没有显著差异 ($p>0.05$)。研究表明 KYN 可进一步被代谢为具有神经毒性作用的 3-羟基犬尿氨酸和喹啉酸,并且 KYN 及其代谢产

物水平异常与焦虑症密切相关^[28]。综上所述, 研究结果表明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理后对斑马鱼大脑组织 IDO 酶活性和 KYN 水平的影响均不显著, 说明正常机体膳食补充 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体后对机体大脑组织中 IDO 酶活性和 KYN 水平没有明显的影响。

2.7 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼大脑 Trp 代谢途径的影响

表 3 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼 Trp 代谢途径的影响

Table 3 The effect of γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp and its peptide monomer on Trp metabolism of zebrafish

分组	Trp浓度/(pg/mL)	5-HT/Trp 值	KYN/Trp 值
NC	221.85±20.18 ^a	1586.98±70.28 ^a	1454.79±155.49 ^a
EnWH	257.29±30.73 ^{bc}	1635.82±84.03 ^b	1224.80±184.95 ^b
EnWL	243.34±19.23 ^b	1600.40±140.06 ^{ab}	1345.39±118.96 ^c
γ -EWH	248.36±29.92 ^b	1734.37±91.60 ^c	1205.85±131.29 ^b
γ -EWL	281.75±16.48 ^c	1423.65±78.09 ^d	1202.27±137.25 ^b
γ -EEWH	245.09±30.67 ^b	1722.13±189.75 ^c	1299.93±154.21 ^c
γ -EEWL	266.22±20.26 ^{bc}	1619.57±93.37 ^{ab}	1246.85±49.37 ^{bc}
γ -EEEEWH	279.79±9.54 ^c	1414.36±174.93 ^d	1198.09±150.33 ^b
γ -EEEEWL	234.51±31.01 ^a	1329.93±154.75 ^e	1687.52±127.43 ^c
γ -EEEEWH	226.25±16.78 ^a	1599.45±90.77 ^{ab}	1437.66±54.09 ^a
γ -EEEEWL	250.71±20.75 ^b	1455.41±147.09 ^d	1352.72±129.00 ^c

注: 表中数据均为平均值±标准差, 同一竖行内的不同字母表示存在显著差异 ($p<0.05$)。

中枢神经系统 5-HT 的水平除了取决于大脑组织 Trp 的浓度外还取决于 Trp 的生物利用度, 但是 Trp 的生物利用度受到其代谢途径的影响, 根据 Trp 代谢产物的不同可将其分为 Trp-KYN 代谢途径和 Trp-5-HT 代谢途径^[29,30]。研究 5-HT 与 Trp 的比值 (5-HT/Trp) 可以间接反应 Trp 向 5-HT 代谢途径的转化率, 研究 KYN 与 Trp 的比值 (KYN/Trp) 可以间接反应 Trp 向 KYN 代谢途径的转化率。由表 3 可知, 与 NC 组相比, γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理 2 周后斑马鱼大脑组织 Trp 浓度均有所增加, 其中 EnW、 γ -EW 和 γ -EEW 高低剂量组、 γ -EEEEWH 和 γ -EEEEWL 处理组显著增加 ($p<0.05$), 但是 γ -EEEEWL 和 γ -EEEEWH 处理组斑马鱼大脑组织 Trp 浓度也高于 NC 组, 但是差异不显著 ($p>0.05$)。EnWH、 γ -EWH、 γ -EWL、 γ -EEWH 供试品处理组 5-HT/Trp 值显著 ($p<0.05$) 高于 NC 组 (1586.98) 斑马鱼, 其中 γ -EWH (1734.37) 和 γ -EEWH (1722.13) 组的 5-HT/Trp 值

最高, 显著 ($p<0.05$) 高于其余各组, 说明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体能够上调 Trp-5-HT 代谢途径。 γ -EEEWL 和 γ -EEEEWH 处理组除外, 与 NC 组相比, 各供试品处理组斑马鱼大脑组织 KYN/Trp 值均显著 ($p>0.05$) 降低, 其中 γ -EWH (1205.85) 和 γ -EEWH (1202.27) 组的 KYN/Trp 值最低, 说明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体能够下调 Trp-KYN 代谢途径。综上所述, γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体供试品处理后, 斑马鱼的大脑组织 Trp 浓度和 5-HT/Trp 值增加, KYN/Trp 值降低, 说明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体膳食补充后改善斑马鱼焦虑样行为可能是通过提高 Trp 浓度和上调 Trp-5-HT 代谢途径, 进而增加 Trp 的生物利用度而发挥作用。

3 结论

本研究以 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp、 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp (肽单体) 作为膳食补充剂, 研究 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体对斑马鱼焦虑样行为的改善作用。结果表明, 与正常对照组相比, 膳食补充 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体后, 斑马鱼新鱼缸实验和黑白偏好实验中的焦虑样行为均出现不同程度的下降, 其中 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 处理组焦虑样行为降低的最为显著 ($p<0.05$)。生化指标测定结果表明 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp、 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 供试品处理后斑马鱼大脑组织 Trp 浓度、TPH 酶活性和 5-HT 水平均显示不同程度的增加。此外, γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体可诱导 Trp-5-HT 代谢途径上调。分析其作用机制可能是 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体膳食补充后作为 Trp 的直接来源增加了机体 Trp 的浓度, 又通过增加 TPH 酶活性诱导 Trp-5-HT 代谢途径上调, 增加 Trp 的生物利用度, 提高大脑组织 5-HT 水平。综上所述, 与正常对照组斑马鱼相比, γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp 及其肽单体处理的斑马鱼具有抗焦虑、增加大脑组织 Trp 浓度、TPH 酶活性和 5-HT 水平, 上调 Trp-5-HT 代谢途径的作用, 从而证明膳食补充 γ -[Glu]_(1≤n≤4)-Trp、 γ -Glu-Trp、 γ -[Glu]₂-Trp、 γ -[Glu]₃-Trp 和 γ -[Glu]₄-Trp 具有预防和改善焦虑症的作用, 其中 γ -Glu-Trp 和 γ -[Glu]₂-Trp 的作用最为显著。

参考文献

- [1] 桑标, 赛李阳, 潘婷婷, 等. 不同情绪刺激强度下的情绪调节策略选择[J]. 中国临床心理学杂志, 2018, 26(1): 56-59
- SANG Biao, SAI Liyang, PANG Tingting, et al. Emotion intensity influence the emotion regulation choice between

- reappraisal and distraction [J]. Chinese Journal of Clinical Psychology, 2018, 26(1): 56-59
- [2] Ashlen Sng, Abbott Mareej. The effect of negative, positive, and neutral self-imagery on symptoms and processes in social anxiety disorder [J]. Cognitive Therapy & Research, 2016, 40(4): 479-495
- [3] Duclot Florian, Kabbaj Mohamed. Epigenetic mechanisms underlying the role of brain-derived neurotrophic factor in depression and response to antidepressants [J]. Journal of Experimental Biology, 2015, 218(1): 21-31
- [4] Coryell William, Young Elizabeth, Carroll Bernard. Hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and mortality in major depressive disorder [J]. Psychiatry Research, 2006, 142(1): 99-104
- [5] 赵爱玲,赵靖平.多巴胺和 5-羟色胺受体基因多态性与抗精神病药反应[J].国际精神病学杂志,2002,29(2):101-104
ZHAO Ailing, ZHAO Jingping. Dopamine and 5-hydroxytryptamine receptor gene polymorphisms and antipsychotic responses [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Psychiatry), 2002, 29(2): 101-104
- [6] 陈鹏宇,胡泽卿.5-羟色胺能系统在抑郁症中的研究进展[J].神经疾病与精神卫生,2008,8(4):325-327
CHEN Pengyu, HU Zeqing. Research progress of 5-hydroxytryptamine energy system in depression [J]. Journal of Neuroscience and Mental Health, 2008, 8(4): 325-327
- [7] April Slee, Nazareth Irwin, Bondaronek Paulina, et al. Pharmacological treatments for generalised anxiety disorder: a systematic review and network meta-analysis [J]. The Lancet, 2019, 393(10173): 768-777
- [8] Magalhaes Anac, Holmes Kevind, Dale Lianneb, et al. CRF receptor 1 regulates anxiety behavior *via* sensitization of 5-HT₂ receptor signaling [J]. Nature Neuroscience, 2010, 13(5): 622-629
- [9] 杨一帆.焦虑症发病机制与治疗方法研究[J].运动精品(学术版),2018,37(8):95-96
YANG Yifan. Study on pathogenesis and treatment of anxiety disorder [J]. Physical Education Review, 2018, 37(8): 95-96
- [10] Malcolm Lader Andre Tylee, John Donoghue J. Withdrawing benzodiazepines in primary care [J]. CNS Drugs, 2009, 23(1): 19-34
- [11] Yousefzadeh S-aryana, Jarah Mostafa, Riazi Gholam-hossein. Tryptophan improves memory independent of its role as a serotonin precursor: potential involvement of microtubule proteins [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2020, 70(2): 559-567
- [12] LI, Mengyu, Kwok Manki, Fong Shirleysuming, et al. Effects of tryptophan, serotonin, and kynurenine on ischemic heart diseases and its risk factors: a Mendelian randomization study [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2020, 74: 613-621
- [13] Orosco Martine, Rouch Claude, Beslot Francoise, et al. Alpha-lactalbumin-enriched diets enhance serotonin release and induce anxiolytic and rewarding effects in the rat [J]. Behavioural Brain Research, 2004, 148(1): 1-10
- [14] ZHU Xiping, TAO Qian, Sun-Waterhouse Dongxiao, et al. γ -[Glu]n-Trp ameliorates anxiety/depression-like behaviors and its anti-inflammatory effect in an animal model of anxiety/depression [J]. Food & Function, 2019, 10(9): 5544-5554
- [15] ZHU Xiping, Sun-Waterhouse Dongxiao, TAO Qian, et al. The enhanced serotonin (5-HT) synthesis and anti-oxidative roles of Trp oligopeptide in combating anxious depression C57BL/6 mice [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 67: 103859
- [16] Yang Juan, Sun-Waterhouse Dongxiao, Cui Chun, et al. γ -Glu-Met synthesised using a bacterial glutaminase as a potential inhibitor of dipeptidyl peptidase IV [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 53(5): 1166-1175
- [17] Yang Juan, Sun-Waterhouse Dongxiao, Cui Chun, et al. Synthesis and sensory characteristics of kokumi γ -[Glu]n-Phe in the presence of glutamine and phenylalanine: glutaminase from bacillus amyloliquefaciens or *Aspergillus oryzae* as the catalyst [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2017, 65(39): 8696-8703
- [18] 王丽娟.DNA 甲基化对斑马鱼 *gabrb2* 基因表达的调控:正常发育调控及在 MET 诱导构建的精神分裂症模型中的失调现象[D].广州:南方医科大学,2016
WANG Lijuan. DNA methylation regulates *gabrb2* mRNA expression: developmental variations and disruptions in L-methionine-induced zebrafish model with schizophrenia-like symptoms [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2016
- [19] 蒋湘云.TSPO 选择性配体 YL-IPA08 的抗焦虑、抗抑郁作用机制研究[D].张家口:河北北方学院,2017
JIANG Xiangyun. Anti-anxiety and anti-depression mechanism of TSPO selective ligand YL-IPA08 [D]. Zhangjiakou: Hebei North University, 2017
- [20] Facciol Amanda, Iqbal Mahrukh, Eada Aishwarya, et al. The light-dark task in zebrafish confuses two distinct factors:

- interaction between background shade and illumination level preference [J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2019, 179: 9-21
- [21] Mezzomo Nathanaj, Silveira Ariane, Giuliani Giulies, et al. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: a comparative study using the novel tank and the light-dark tasks [J]. *Neuroscience Letters*, 2016, 613: 19-24
- [22] Hawkey Andrewb, Hoeng Julia, Peitsch Manuelc, et al. Subchronic effects of plant alkaloids on anxiety-like behavior in zebrafish [J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2021, 207(2): 173223
- [23] 徐凯,陈秀玲,罗仁瀚. 电针四神聪穴对抑郁症患者血清 5-HT、DA 含量影响的临床观察[J]. *新中医*, 2011, 43(4): 94-96
- XU Kai, CHEN Xiuling, LUO Renhan. Effects of electroacupuncture at Sishencong (Ex-HN1) on 5-hydroxytryptamine and dopamine in serum of depression patients [J]. *Journal of New Chinese Medicine*, 2011, 43(4): 94-96
- [24] John Moraros, Chijioke Nwankwo, Scottb Patten, et al. The association of antidepressant drug usage with cognitive impairment or dementia, including Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis [J]. *Depress Anxiety*, 2017, 34(3): 217-226
- [25] Francisco Lopezmunoz, Cecilio Alamo. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15(14): 1563-1586
- [26] 杨艳杰,王琳,乔正学,等. 色氨酸羟化酶与抑郁症及自杀行为研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(3): 371-372
- YANG Yanjie, WANG Lin, QIAO Zhengxue, et al. Research progress of tryptophan hydroxylase and depression and suicidal behavior [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2010, 26(3): 371-372
- [27] Guillemin Gillesj, Smythe George, Takikawa Osamu, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons [J]. *Glia*, 2005, 49(1): 15-23
- [28] Leipnitz Guilhian, Schumacher Cristiana, Dalcin Karinab, et al. *In vitro* evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain [J]. *Neurochemistry International*, 2007, 50(1): 83-94
- [29] Sophie Erhardt, Lilly Schwieler, Sophie Imbeault, et al. The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 112(Pt B): 297-306
- [30] Fukuda Katsuhiko. Etiological classification of depression based on the enzymes of tryptophan metabolism [J]. *Bmc Psychiatry*, 2014, 14(1): 1-8
-
- (上接第 295 页)
- [26] 白秋月,杨春亮,叶剑芝,等. 碳量子点荧光探针的设计及其在农残检测中的应用进展[J]. *分析测试学报*, 2019, 38: 488-494
- BAI Qiuyue, YANG Chunliang, YE Jianzhi, et al. Design of carbon quantum dot fluorescent probe and its application progress in pesticide residue detection [J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2019, 38: 488-494
- [27] GB 1886.220-2016, National Food Safety Standard Food Additive Carmine [S]
- [28] Bourlinos A B, Trivizas G, Karakassides M A, et al. Green and simple route toward boron doped carbon dots with significantly enhanced non-linear optical properties [J]. *Carbon*, 2015, 83: 173-179
- [29] Yang Z, Xiu M H, Liu Y, et al. Nitrogen-doped, carbon-rich, highly photoluminescent carbon dots from ammonium citrate [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(3): 1890-1895
- [30] Su A M, Wang D, Shu X, et al. Synthesis of fluorescent carbon quantum dots from dried lemon peel for determination of carmine in drinks [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2018, 34(2): 164-168
- [31] Hu Q, Sun H J, Liu L F, et al. Development of an ultrasensitive spectrophotometric method for carmine determination based on fluorescent carbon dots [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2021, 38(5): 731-740
- [32] Bian W, Wang X, Wang Y K, et al. Boron and nitrogen co-doped carbon dots as a sensitive fluorescent probe for the detection of curcumin [J]. *Luminescence*, 2018, 33(1): 174-180
- [33] Liu Y, Gong X J, Dong W J, et al. Nitrogen and phosphorus dual-doped carbon dots as a label-free sensor for curcumin determination in real sample and cellular imaging [J]. *Talanta*, 2018, 183: 61-69