

羊乳酪蛋白酶解物的改善睡眠作用

朱秋轶¹, 刘果¹, 龙明芳², 刘星雨¹, 乔子骄³, 宋玉¹, 曾志安¹, 殷光玲², 曹素芳⁴, 曹庸^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 华南农业大学财务处, 广东广州 510642) (3. 汤臣倍健股份有限公司, 广东广州 510663) (4. 澳优乳业(中国)有限公司, 湖南长沙 410200)

摘要: 该文研究了羊乳酪蛋白酶解物 (Goat Milk Casein Hydrolysates, GMCH) 促进睡眠的功效及作用机制。采用保健食品规范方法 (睡眠实验、巴比妥钠睡眠潜伏期实验、延长戊巴比妥钠睡眠时间实验、戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验) 判定 GMCH 高、中、低剂量组 (700、400、100 mg/kg) 改善小鼠睡眠的功效。进一步通过旷场实验深入探究 GMCH 对小鼠行为学的影响, 最后测定小鼠下丘脑中睡眠相关神经递质分泌含量。结果表明, GMCH 无直接睡眠作用, 与空白组相比, GMCH 低、中、高剂量组小鼠睡眠潜伏期分别缩短 42.86%、56.63%、91.18%, 睡眠时间分别延长 34.46%、48.83%、63.19%, 入睡率分别提高 20.00%、60.00%、80.00%。在旷场中的运动总路程缩短, 中央停留次数、中央停留时间和静止总时间均增加。下丘脑中 GABA 含量显著升高 64.72%、41.16%、56.19%, 5-HT 含量显著升高 25.87%、33.50%、43.67%、DA 含量显著降低 7.02%、12.85%、13.72%, NE 含量显著降低 18.73%、23.37%、29.41%。综上, GMCH 具有改善小鼠睡眠的作用, 有一定镇静作用, 可能通过调节小鼠下丘脑中的神经递质水平起到促睡眠作用。

关键词: 羊乳酪蛋白酶解物; 改善睡眠; 旷场实验; 神经递质

文章编号: 1673-9078(2023)11-11-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1524

Sleep-improving Effects of Goat Milk Casein Hydrolysates

ZHU Qiuyi¹, LIU Guo¹, LONG Mingfang², LIU Xingyu¹, QIAO Zijiao³, SONG Yu¹, ZENG Zhian¹,
YIN Guangling², CAO Sufang⁴, CAO Yong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Finance Office of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (3. By-Health Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)
(4. Ausnutria Dairy (China) Co. Ltd., Changsha 410200, China)

Abstract: The effects of goat milk casein hydrolysates (GMCH) on sleep promotion and the underlying mechanisms were investigated. Health food standardized methods (sleep test, sodium barbital sleep latency test, prolonged pentobarbital sleep time test, and subthreshold dose sodium pentobarbital hypnosis test) were used to determine the efficacies of high-dose, medium-dose, and low-dose GMCH groups (700, 400, 100 mg/kg) in improving sleep in mice. Open-field experiments were used to explore further the effects of GMCH on mouse behaviors, and finally the levels of sleep-related neurotransmitters secreted in the hypothalamus of mice were measured. The results showed that GMCH had no direct effect on sleep. Compared with the blank group, the sleep latency of the mice in low-, medium- and high-dose GMCH groups was shortened by 42.86%, 56.63% and 91.18%, respectively; the sleep time was extended by 34.46%, 48.83% and 63.19%, respectively; and the rate of falling asleep increased by 20%, 60% and 80%, respectively. In the open field experiments, the total movement distance was shortened, and the number of central stay, the central stay duration and total rest time increased. The GABA content in the hypothalamus significantly increased (by 64.72%, 41.16% and 56.19%, respectively), the 5-HT content significantly increased (by 25.87%, 33.50% and 43.67%, respectively), and the DA content significantly decreased (by 7.02%, 12.85% and 13.72%, respectively). The NE content significantly decreased (by 18.73%, 23.37% and 29.41%, respectively). In conclusion, GMCH can improve the sleep of mice and has a certain sedative effect, which may play a

引文格式:

朱秋轶, 刘果, 龙明芳, 等. 羊乳酪蛋白酶解物的改善睡眠作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(11): 11-17

ZHU Qiuyi, LIU Guo, LONG Mingfang, et al. Sleep-improving effects of goat milk casein hydrolysates [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 11-17

收稿日期: 2022-11-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31972078); 第 67 批中国博士后面上项目 (2020M672651); 创新平台与人才计划 (2019TP2066)

作者简介: 朱秋轶 (1998-), 男, 硕士生, 研究方向: 食品科学, E-mail: 1842424908@qq.com

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

sleep-promoting role through regulating the level of neurotransmitters in the hypothalamus of mice.

Key words: goat milk casein hydrolysates; sleep-improving; open field test; neurotransmitter

人类一生中大约有三分之一的时间处于睡眠状态^[1], 睡眠质量与身心健康密切相关。在现代的快节奏生活中, 慢性压力^[2]、焦虑^[3]、抑郁^[4]、轮班工作^[5]和营养不良^[6]等环境因素严重影响睡眠质量, 睡眠障碍会导致各种健康问题, 包括肥胖^[7]、糖尿病^[8]和高血压^[9]等疾病。

我国超 3 亿人存在睡眠障碍^[10], 使用安眠药和镇静抗抑郁药对慢性失眠进行药物治疗已被广泛采用, 但是长期使用这些合成药物常常伴随耐受性、依赖性 etc 不可忽视的副作用, 包括睡眠质量较差、觉醒次数增多、快速眼动睡眠受损或受到抑制等^[11]。因此, 挖掘副作用小或无副作用的新型助眠物质成为近年来的研究热点和难点。

生物活性肽是从蛋白质衍生的片段, 在人体中发挥多种生理功能。乳蛋白中包含丰富的生物活性肽, 已经从乳蛋白中分离出了具有促睡眠作用的活性肽^[12-15]。Dela 等^[12]研究发现牛乳酪蛋白酶解物 (150 mg/kg) 能够延长戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠, 同时大鼠脑电波记录结果表明, 牛乳酪蛋白酶解物 (150 mg/kg) 显著增强大鼠的慢波睡眠时长。Yayeh 等^[14]使用脑电波信号监控大鼠睡眠期间的清醒、非快速眼动睡眠和快速眼动睡眠状态, 结果表明, 牛乳酪蛋白酶解物 (300 mg/kg) 显著延长大鼠的睡眠时长并减少睡眠-觉醒周期次数。Kim 等^[15]在临床研究发现牛乳酪蛋白酶解物可以改善睡眠质量并且具有良好的耐受性, 长期给药可能会产生累积的促睡眠效果。

随着人们对羊乳质量和营养认知度的不断提高, 羊乳产品越来越流行。市场上的羊乳产品主要有鲜羊乳、羊奶粉、酸羊乳和羊奶酪等, 但是羊乳资源的深度开发不足。因此, 对羊乳蛋白进行酶解, 挖掘对人体健康有益的生物活性肽符合现阶段羊乳制品深加工的需求。据报道, 羊乳蛋白的酶解过程可以产生具有抗高血压、抗氧化、降糖、抗炎、抗菌、阿片类或免疫调节活性的多肽^[16-20], 但羊乳酪蛋白及其酶解产物的促睡眠活性却鲜有研究。本实验对 GMCH 改善小鼠睡眠的功能进行研究, 并初步探究其改善睡眠的作用及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周 BALB/c 近交性小鼠, 雄性, 体质

量均为 18~22 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, 环境温度 25~30 °C, 湿度 35%~50%, 实验方案经华南农业大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 材料与设备

羊乳酪蛋白, 澳优乳业有限公司; 戊巴比妥钠、巴比妥钠, 美国 Sigma 公司; 5-HT、GABA、NA 和 DA 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 地西洋, 山东信宜制药有限公司。

EnSpire 酶标仪, 美国 PerkinElmer 公司; 万分之一天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; Supermaze 动物行为学分析软件, 上海欣软信息科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 GMCH 的制备

称取适量酪蛋白置于烧杯中, 以料液比 1:10 加入超纯水, 胰蛋白酶添加量为 0.4% (m/m), 酶解 2.5 h, 使用 2 mol/L 的 NaOH 溶液调节酶解液 pH, 酶解过程中 pH 值维持在 8.0, 酶解温度控制为 40 °C。酶解完成后, 加热至 95 °C, 维持 10 min 以使胰蛋白酶失活。随后冷却到室温, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液冻干, 得到 GMCH 干粉。

1.3.2 动物分组及处理

将 200 只小鼠分四批进行实验, 每批 50 只, 随机分为 5 组, 分别为空白组、GMCH 低剂量组、GMCH 中剂量组、GMCH 高剂量组和地西洋阳性组, 每组 10 只。GMCH 低、中、高剂量组的给药剂量分别为 100、400、700 mg/kg, 地西洋阳性组的给药剂量为 3 mg/kg, 灌胃容量均为 0.2 mL/20 g, 空白组灌胃同等体积蒸馏水, 每天灌胃一次, 连续灌胃 4 周。

1.3.3 直接睡眠实验

末次给药 1 h 后观察小鼠是否进入睡眠状态, 睡眠状态的判断取决于翻正反射是否消失。将小鼠于背卧位放置 60 s, 期间动物如果没有翻转则判定翻正反射消失, 翻正反射消失至恢复期间认为动物处于睡眠状态^[21]。

1.3.4 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验

参考文献^[22]的方法并略作改动, 通过预实验确定戊巴比妥钠的给药剂量为 40 mg/kg, 在各组小鼠末次给药 1 h 后腹腔注射戊巴比妥钠, 注射量为 0.2 mL。记录各组小鼠睡眠时间, 观察不同受试样品对小鼠戊

巴比妥钠睡眠时间的影响。

1.3.5 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验

参考文献^[22]的方法并略作改动,通过预实验确定戊巴比妥钠的给药剂量为 25 mg/kg。在各组小鼠末次给药 1 h 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,认为翻正反射消失 1 min 以上的动物进入睡眠状态,记录动物注射完成后在 30 min 内的入睡只数。

1.3.6 巴比妥钠睡眠潜伏期实验

参考文献^[22]的方法并略作改动,通过预实验确定巴比妥钠的给药剂量为 250 mg/kg。在各组小鼠末次给药 1 h 后腹腔注射巴比妥钠,注射量为 0.2 mL,注射完成至翻正反射消失期间为入睡潜伏期,记录各组小鼠入睡潜伏期,观察不同受试样品对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响。

1.3.7 旷场实验

参考文献^[23,24]的方法并略作改动,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,底部中心区域为 25 cm×25 cm,其余部分为边缘区域。实验人员每次操作需保持一致,由固定角度将小鼠沿壁放入箱内适应 1 min 后,开始进行摄像和计时。通过摄像头记录小鼠活动情况,每只小鼠测试 5 min 并记录其运动轨迹,旷场实验完成后,清洁旷场箱,避免旷场箱内壁及底面留下气味及排泄物等。记录小鼠运动总路程、静止总时间,平均运动速度、中央停留次数。

1.3.8 下丘脑神经递质的含量测定

参考文献^[25]的方法并略作改动,实验小鼠测试观察完毕后,使用 CO₂ 麻醉,心脏取血后冰浴开颅取出大脑,分离出下丘脑,称重后放入液氮保存备用,随后按照 1:9 的比例添加生理盐水,在 4 °C 条件下匀浆,匀浆液在 3 000 r/min, 4 °C 条件下冷冻离心 15 min,取上清液到 2 mL 离心管中。放于 -80 °C 冰箱备用。分别取下丘脑上清液按照试剂盒操作说明测定 5-HT、GABA、DA 和 NE 的含量。

1.4 数据分析

所有实验均至少重复三次,实验结果以平均数±标准差 (mean±SD) 表示,通过 SPSS 25.0 软件采用单因素方差分析法进行显著性分析, $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果与讨论

2.1 GMCH 对小鼠体质量与脏器系数的影响

动物体内各个脏器质量与动物体质量的比值为脏

器系数,在正常情况下脏器系数一般不会有明显差异。由下表可知,相较于空白对照组,阳性对照组和 GMCH 低、中、高剂量组小鼠的体质量与脏器系数均无显著差异,表明低、中、高剂量 GMCH 并未对小鼠产生器质性的影响。

表 1 小鼠体质量与脏器系数表

Table 1 Body weight and organ coefficient of mice

组别	体质量/g	心/%	肝/%	脾/%
空白组	27.90±1.45	0.63±0.10	4.20±0.34	1.62±0.10
阳性组	27.50±1.35	0.62±0.12	3.97±0.20	1.58±0.14
低剂量组	28.10±0.88	0.52±0.06	4.45±0.10	1.62±0.06
中剂量组	26.80±1.40	0.57±0.05	4.15±0.34	1.63±0.09
高剂量组	28.10±0.74	0.60±0.05	4.10±0.27	1.59±0.05

2.2 GMCH 改善小鼠睡眠的试验评价

2.2.1 GMCH 对小鼠直接睡眠的影响

各组小鼠在给予相应的受试样品后,1 h 内均未发生翻正反射消失的现象,说明 GMCH 对小鼠无直接睡眠作用。

2.2.2 GMCH 对小鼠延长戊巴比妥钠睡眠时长的影响

表 2 GMCH 对小鼠戊巴比妥钠睡眠时长的影响

Table 2 Effects of goat milk casein hydrolysates on sleep duration of sodium pentobarbital in mice

组别	注射剂/(mg/kg)	样本量 <i>n</i>	睡眠时间/min
空白组	40	10	38.30±13.86 ^a
阳性组	40	10	65.50±16.00 ^b
低剂量组	40	10	51.50±14.81 ^{ab}
中剂量组	40	10	57.00±12.06 ^b
高剂量组	40	10	62.50±22.72 ^b

注:不同字母表示组间比较差异有显著性, $P < 0.05$; 下同。

通过戊巴比妥钠睡眠实验验证 GMCH 具有改善睡眠的作用。戊巴比妥钠和巴比妥钠是已知的 GABA_A 受体激动剂,当 GABA 或 GABA_A 受体激动剂与 GABA_A 受体结合时,Cl⁻ 离子通道打开,导致细胞超极化,细胞兴奋性降低,睡眠发生^[26]。具有促进睡眠作用的受试物可以延长巴比妥类药物引起的睡眠时间^[27]。由表 2 可知,GMCH 可以显著延长戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时长。与空白组相比,阳性组睡眠时间延长 71.02% ($P < 0.05$),GMCH 低、中、高剂量组小鼠睡眠时间分别延长 34.46%、48.83% ($P < 0.05$)、63.19% ($P < 0.05$),随着给药剂量的提升,小鼠的睡眠时间也在延长。说明 GMCH 与戊巴比妥钠有协同作用,可以显著 ($P < 0.05$) 延长小鼠睡眠时间。Dela 等^[12]发现 150 mg/kg 和 300 mg/kg 的牛乳酪蛋白酶解

物可以显著延长戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时长。

2.2.3 GMCH 对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠的影响

由表 3 可知，空白组小鼠注射戊巴比妥钠溶液阈下剂量后的入睡率为 10%，阳性组小鼠入睡率较空白组提升 70.00%，GMCH 低、中、高剂量组的小鼠入睡率较空白组分别提升 20.00%、60.00%、80.00%，样品组小鼠入睡率随着 GMCH 剂量的提升而增加。Qian 等^[28]的研究表明，与对照组（58.33%）相比，酪蛋白酶解物组（100 mg/kg, 66.67%）、十肽组（2 mg/kg, 75.00%）和阳性组（1 mg/kg, 91.67%）的睡眠率均有所提高。

表 3 GMCH 对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量入睡率的影响

Table 3 Effect of goat milk casein hydrolysates on sleep rate of mice with sodium pentobarbital subthreshold dose

组别	注射剂量/(mg/kg)	样本量 <i>n</i>	入睡率/%
空白组	25	10	10
阳性组	25	10	80
低剂量组	25	10	30
中剂量组	25	10	70
高剂量组	25	10	90

2.2.4 GMCH 对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响

表 4 GMCH 对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响

Table 4 Effect of goat milk casein hydrolysates on sleep latency of sodium barbitone in mice

组别	注射剂量/(mg/kg)	样本量 <i>n</i>	入睡潜伏期/min
空白组	250	10	13.00±4.08 ^a
阳性组	250	10	5.40±1.84 ^c
低剂量组	250	10	9.10±3.35 ^b
中剂量组	250	10	8.30±3.09 ^{bc}
高剂量组	250	10	6.80±2.66 ^{bc}

由表 4 可知，与空白组相比，阳性组入睡潜伏期缩短 140.74% ($P < 0.05$)，低剂量组入睡潜伏期缩短 42.86% ($P < 0.05$)，中剂量组入睡潜伏期缩短 56.63% ($P < 0.05$)，高剂量组入睡潜伏期缩短 91.18% ($P < 0.05$)，随着 GMCH 剂量的提升小鼠的睡眠潜伏期也在缩短。结果表明，GMCH 与戊巴比妥钠有协同作用，可以显著缩短小鼠的睡眠潜伏期。结合 2.2.1~2.2.3 节的结果，说明 GMCH 具有改善小鼠睡眠的作用。黄远英等^[29]经口灌胃给予小鼠不同浓度酪蛋白水解物与 γ -氨基丁酸复配剂后，200、600 mg/kg 剂量组较空白组睡眠时长显著延长 12.23%、10.08%，入睡潜伏期显著缩短 7.50%、6.32%，受试物无直接睡眠作用。Chen 等^[30]使用核桃肽和 γ -氨基丁酸组合治疗小

鼠 30 d，结果显示，小鼠睡眠时长呈剂量依赖性增加，分别增加 21.74%，20.23%和 28.10%，中、高剂量组小鼠入睡率显著增加，入睡潜伏期显著减少。

2.3 GMCH 对小鼠行为学的影响

2.3.1 GMCH 对小鼠运动轨迹的影响

为了判断 GMCH 对小鼠是否有镇静作用，设置旷场实验观察小鼠行为学变化。由图 1 可知，与阳性组和 GMCH 样品组相比，空白组小鼠在旷场中的活动区域主要分布在边缘且运动轨迹更为密集，这表明 GMCH 和阳性药物能够减轻小鼠在旷场中的焦虑感。

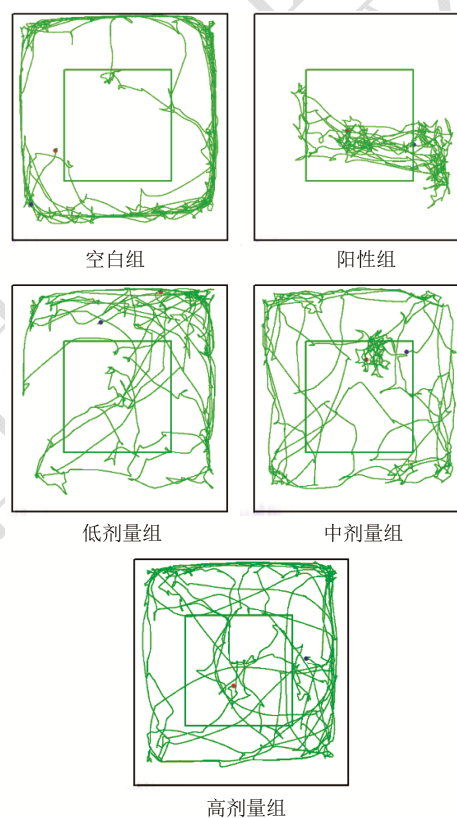


图 1 小鼠运动轨迹图

Fig.1 Mouse motion track

2.3.2 GMCH 对小鼠旷场指标的影响

旷场实验用于测试动物的自发活动和探索行为，中央区停留时间以及进入中央区的次数可作为评价动物焦虑状态的指标^[31,32]，动物在旷场中的活动越少表明药物的镇静作用越强^[12]。由表 5 可知，空白组小鼠在旷场中的中央停留次数、平均运动速度、静止总时间、运动总路程分别为 5.80、31.88 mm/s、87.41 s、9 560.30 cm，与空白组相比，GMCH 低、中、高剂量组小鼠在旷场中的运动总路程有所减少，中央停留时间、中央停留次数和静止总时间均增多，但无显著差异，阳性组小鼠在旷场中的中央停留时间、中央停留次数和静止总时间与空白组相比有显著增多

($P<0.05$), 以上指标在一定的程度上反映了 GMCH 有改善小鼠在旷场中的焦虑状况的趋势。梁曹雯等^[23]的研究表明, 酸枣仁百合睡眠肽复合物处理后, 大鼠在中央停留次数、中央区停留时间、总静止时间增加,

运动总路程减少, 但无显著性差异。Dela 等^[12]分别以 75、150、300、500 mg/kg 的牛乳酪蛋白酶解物灌胃小鼠, 与空白组相比, 小鼠的运动总路程有减少的趋势, 但没有显著性差异。

表 5 GMCH 对小鼠旷场运动的影响

Table 5 Effect of goat milk casein hydrolysates on open field movement in mice

组别	中央停留次数/次	中央停留时间/s	静止总时间/s	运动总路程/mm
空白组	5.80±4.59 ^a	21.53±17.02 ^a	87.41±21.56 ^a	9560.30±2631.74 ^a
阳性组	15.30±6.04 ^b	76.96±21.36 ^b	118.99±40.89 ^b	7669.35±1640.24 ^a
低剂量组	7.70±4.19 ^a	40.10±19.13 ^a	106.42±21.78 ^{ab}	8898.72±2727.74 ^a
中剂量组	7.00±7.13 ^a	42.20±26.66 ^a	109.15±45.07 ^{ab}	8194.05±3453.97 ^a
高剂量组	10.00±6.86 ^a	39.27±20.55 ^a	116.17±17.40 ^{ab}	8492.23±3244.84 ^a

表 6 GMCH 对小鼠下丘脑 5-HT、GABA、DA、NE 含量的影响 (ng/g)

Table 6 Effects of goat milk casein hydrolysates on the contents of 5-HT, GABA, DA and NE in mouse hypothalamus (ng/g)

组别	样本量 <i>n</i>	5-HT 含量	GABA 含量	DA 含量	NE 含量
空白组	10	78.60±13.73 ^a	158.40±14.00 ^a	659.40±31.37 ^a	129.20±13.16 ^a
阳性组	10	144.50±21.99 ^c	312.00±19.15 ^d	538.90±27.55 ^d	68.40±13.91 ^d
低剂量组	10	98.70±16.11 ^b	213.50±18.00 ^b	613.70±21.36 ^b	105.10±10.14 ^b
中剂量组	10	105.20±13.23 ^b	223.40±21.64 ^{bc}	574.80±24.63 ^c	99.00±13.52 ^b
高剂量组	10	113.20±14.19 ^b	247.60±15.86 ^c	568.50±19.59 ^c	91.20±9.70 ^c

2.4 GMCH 对小鼠下丘脑中神经递质含量的影响

为了初步探讨 GMCH 改善睡眠的作用机制, 本实验采用 ELISA 法测定了小鼠下丘脑中的 5-HT、DA、GABA、NE 的含量。由表 6 可知, 空白组小鼠下丘脑中 GABA、5-HT、DA 和 NE 的含量分别为 78.60、158.40、659.40、129.20 ng/g。与空白组相比, GMCH 低、中、高剂量组均能明显升高小鼠脑内 GABA 和 5-HT 含量 ($P<0.05$), GABA 含量分别增加 64.72%、41.16%、56.19%, 5-HT 分别增加 25.87%、33.50%、43.67%。随着 GMCH 剂量的提升, 小鼠下丘脑中 GABA 和 5-HT 的含量也在增加, 但次于阳性组; GMCH 低、中、高剂量组小鼠下丘脑中 DA 和 NE 的含量较空白组显著降低 ($P<0.05$), DA 含量分别降低 7.02%、12.85%、13.72%, NE 含量分别降低 18.73%、23.37%、29.41%, 低、中、高剂量 GMCH 对小鼠下丘脑中 DA 和 NE 的降低作用与给药剂量呈负相关。这些结果在相关文献中有类似的报道^[23,33-35]。

下丘脑是调节睡眠-觉醒模式的中心枢纽, 同时分布着唤醒区域和睡眠区域。下丘脑中的神经递质系统已经在实验动物中进行了广泛的研究^[36], 如 5-HT、NE、腺苷、DA、GABA、组胺、下丘脑素等, 这些系统在对睡眠障碍治疗的应用中有巨大潜力^[37,38]。DA

能神经元分布在相对较少的小大脑区域, 包括腹侧盖区 (VTA)、黑质致密部 (SNpc)、腹侧导水管周围灰质 (VPAG) 和一些下丘脑区域^[39]。DA 是一种兴奋性神经递质, 在调节运动控制、认知和唤醒方面具有重要作用^[40]。GABA 是一种非蛋白氨基酸, 作为一种主要的抑制性神经递质存在于哺乳动物大脑中, 也是改善睡眠障碍的已知药物^[41]。GABA_A 受体上的 BZD 结合位点是大多数镇静催眠药的靶点。5-HT 是最早被证明与睡眠-觉醒周期相关的神经递质之一, 有研究表明, 5-HT 参与睡眠的准备、触发和维持^[42]。抑制 5-HT 能神经元的活性会导致失眠, 这种失眠可以通过在视前区注射 5-羟色氨酸来逆转, 这表明 5-羟色胺在大脑结构中是睡眠所必需的^[43]。NE 在中枢神经系统中主要由蓝斑 (Locus Coeruleus, LC) 产生, NE 能神经元活性在清醒时高, 在 NREM 阶段降低, 在 REM 睡眠期间几乎沉默^[44]。NE 能神经元在清醒时抑制 VLPO 区域 (诱导睡眠), 而 VLPO 区域的抑制解除是睡眠的关键前提^[45]。本研究的结果表明, GMCH 降低了下丘脑中兴奋性神经递质 DA、NE 的含量, 提高了下丘脑中抑制性神经递质 GABA、5-HT 的含量。已有的实验结果显示, GMCH 改善睡眠的作用似乎与调节中枢神经系统多神经递质途径有关, 但 GMCH 是否参与到神经递质的转运及与不同类型受体的结合过程, 以及在 GMCH 中起到核心作用的标志性物质还未被筛选出来, 这些内容都需要进一步的研究。

3 结论

本课题组对 GMCH 的生物活性进行了筛选,发现 GMCH 具有改善睡眠的作用。在戊巴比妥钠诱导的睡眠实验中,地西洋和不同剂量的 GMCH 均可延长戊巴比妥钠睡眠时长、提高戊巴比妥钠阈下剂量入睡率、缩短睡眠潜伏期,其中 GMCH 的促睡眠功效随着给药浓度的增加而增强,在 700 mg/kg 时达到峰值。观察不同剂量 GMCH 对小鼠在旷场中自主活动的影响,结果表明,不同剂量组 GMCH 减少了小鼠在旷场中的运动总路程同时增多中央停留次数、中央停留时间和静止总时间,但与空白组相比均无显著性差异,GMCH 在旷场实验中有抑制动物活动的趋势,但没有明确的镇静作用。神经递质测定结果表明,GMCH 各剂量能提高小鼠下丘脑中 5-HT 和 GABA 的含量同时减少 DA 和 NE 的含量。综上,GMCH 具有较好的改善睡眠作用,其作用途径可能与其调节下丘脑中神经递质水平有关。

参考文献

- [1] Chauveau F, Claverie D, Lardant E, et al. Neuropeptide S promotes wakefulness through the inhibition of sleep-promoting ventrolateral preoptic nucleus neurons [J]. *Sleep*, 2020, 43(1): 1-40.
- [2] Radwan B, Yanez Touzet A, Hammami S, et al. Prolonged exposure to social stress impairs homeostatic sleep regulation [J]. *Frontiers of Neuroscience*, 2021, 1(1): 1-13.
- [3] 王道阳,戴丽华,殷欣.大学生的睡眠质量与抑郁、焦虑的关系[J].*中国心理卫生杂志*,2016,30(3):226-230.
- [4] Xu W Q, Lin L H, Ding K R, et al. The role of depression and anxiety in the relationship between poor sleep quality and subjective cognitive decline in Chinese elderly: Exploring parallel, serial, and moderated mediation [J]. *Journal of Affective Disorders*, 2021, 294(7): 464-471.
- [5] Tait J L, Chambers T P, Tait R S, et al. Impact of shift work on sleep and fatigue in maritime pilots [J]. *Ergonomics*, 2021, 64(7): 856-868.
- [6] Datta S, Patterson E H, Vincitore M, et al. Prenatal protein malnourished rats show changes in sleep/wake behavior as adults [J]. *Journal of Sleep Research*, 2000, 9(1): 71-79.
- [7] Castellucci B, Barrea L, Laudisio D, et al. Improving sleep disturbances in obesity by nutritional strategies: Review of current evidence and practical guide [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2021, 72(5): 579-591.
- [8] Fernández-Torres R, Ruiz-Muñoz M, Pérez-Belloso A J, et al. Is there an association between sleep disorders and diabetic foot? A scoping review [J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2021, 10(11): 2530.
- [9] Makarem N, Alcántara C, Williams N, et al. Effect of sleep disturbances on blood pressure [J]. *Hypertension*, 2021, 77(4): 1036-1046.
- [10] 张芳铭,郑慧,郑淘,等.改善睡眠功能的食药资源及保健食品应用[J].*食品科学*,2020,41(23):303-310.
- [11] Uzun S, Kozumplik O, Jakovljević M, et al. Side effects of treatment with benzodiazepines [J]. *Psychiatria Danubina*, 2010, 22(1): 90-93.
- [12] Dela Peña I J I, Kim H J, de la Peña J B, et al. A tryptichydrolysate from bovine milk α s1-casein enhances pentobarbital-induced sleep in mice via the GABA_A receptor [J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 313(7): 184-190.
- [13] Guesdon B, Messaoudi M, Lefranc-Millot C, et al. A tryptichydrolysate from bovine milk α s1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress [J]. *Peptides*, 2006, 27(6): 1476-1482.
- [14] Yayeh T, Leem Y H, Kim K M, et al. Administration of α s1-casein hydrolysate increases sleep and modulates GABAA receptor subunit expression [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2018, 26(3): 268-273.
- [15] Kim H J, Kim J, Lee S, et al. A double-blind, randomized, placebo-controlled crossover clinical study of the effects of α -s1 casein hydrolysate on sleep disturbance [J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1466.
- [16] Ahmed A S, El-Bassiony T, Elmalt L M, et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins [J]. *Food Research International*, 2015, 74: 80-88.
- [17] Du X J, Jing H J, Wang L, et al. Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases [J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2022, 159: 113257.
- [18] Hernandez-Ledesma B, Ramos M, Angel Gomez-Ruiz J. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey [J]. *Small Ruminant Research*, 2011, 101: 196-204.
- [19] Rohmah R N, Hardiyanti F, Fatchiyah F. Inhibition on JAK-STAT3 signaling transduction cascade is taken by bioactive peptide α -S2 casein protein from goat ethawah breed milk [J]. *Acta Informatica Medica*, 2015, 23(4): 233-238.
- [20] Ibrahim H R, Ahmed A S, Miyata T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from

- caseins and whey proteins of goat milk [J]. *Journal of Advanced Research*, 2017, 8(1): 63-71.
- [21] 王蒙蒙,李桦军,李欣坪,等.以酸枣仁、天麻为主的复方口服液改善睡眠作用机制研究[J].*辽宁中医药大学学报*,2023,25(2):68-72.
- [22] 珠娜,郝云涛,刘欣然,等.核桃低聚肽改善睡眠作用及机制[J].*中国生育健康杂志*,2020,31(2):147-150,173.
- [23] 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.
- [24] 周正,宋美慧,褚光辉,等.GABA_B受体激动剂巴氯芬对小鼠空间识别记忆能力的影响[J].*生命科学研究*,2022,26(3):213-218.
- [25] 张婷,秦小明,章超桦,等.牡蛎酶解产物改善睡眠作用效果研究[J].*大连海洋大学学报*,2021,36(3):430-436.
- [26] Choi J J, Oh E H, Lee M K, et al. Gastrodia rhizoma ethanol extract enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors and rapid eye movement sleep via the activation of GABA_A-ergic Transmission in Rodents [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 426843.
- [27] Zhang Y, Jia X, Chen X, et al. L-theanine and neumentix mixture improves sleep quality and modulates brain neurotransmitter levels in mice [J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(4): 4572-4581.
- [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] 黄远英,袁根良.酪蛋白水解物与 γ -氨基丁酸复配制剂改善睡眠功能的研究[J].*食品安全质量检测学报*,2016,7(1):351-355.
- [30] Chen X, Jia X, Zhang Y, et al. The combined use of gamma-aminobutyric acid and walnut peptide enhances sleep in mice [J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(10): 11074-11082.
- [31] Damjuti W, Fuangfoo T, Palanuvej C, et al. *Leptocarpus disjunctus* prolongs sleeping time and increases nonrapid eye movement sleep with additional anxiolytic capacity [J]. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 2017, 8(3): 97-101.
- [32] Ko Y H, Shim K Y, Lee S Y, et al. Evodiamine reduces caffeine-induced sleep disturbances and excitation in mice [J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2018, 26(5): 432-438.
- [33] Liu H, Yang L, Wan C, et al. Exploring potential mechanism of ciwujia tablets for insomnia by UPLC-Q-TOF-MS/MS, network pharmacology, and experimental validation [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 990996.
- [34] 李树根,刘坤东,王浩楠,等.沉香提取物对 PCPA(对氯苯丙氨酸)致失眠大鼠的镇静催眠作用[J].*现代食品科技*,2021,37(6):35-42,19.
- [35] 张婷,秦小明,章超桦,等.牡蛎酶解产物改善睡眠作用效果研究[J].*大连海洋大学学报*,2021,36(3):430-436.
- [36] Boes A D, Fischer D, Geerling J C, et al. Connectivity of sleep- and wake-promoting regions of the human hypothalamus observed during resting wakefulness [J]. *Sleep*, 2018, 41(9): zsy108.
- [37] Mignot E, Taheri S, Nishino S. Sleeping with the hypothalamus: Emerging therapeutic targets for sleep disorders [J]. *Nature Neuroscience*, 2002, 5: 1071-1075.
- [38] Pace-Schott E F, Hobson J A. The neurobiology of sleep: Genetics, cellular physiology and subcortical networks [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, 3(8): 591-605.
- [39] Moore R Y, Bloom F E. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 1979, 2: 113-168.
- [40] Dauvilliers Y, Tafti M, Landolt H P. Catechol-O-methyltransferase, dopamine, and sleep-wake regulation [J]. *Sleep Medicine Reviews*, 2015, 22: 47-53.
- [41] Khan S, Duan P, Yao L, et al. Shiftwork-mediated disruptions of circadian rhythms and sleep homeostasis cause serious health problems [J]. *International Journal of Genomics*, 2018, 2018: 8576890.
- [42] Cespuglio R. Serotonin: Its place today in sleep preparation, triggering or maintenance [J]. *Sleep Medicine*, 2018, 49: 31-39.
- [43] Python A, Steimer T, de Saint Hilaire Z, et al. Extracellular serotonin variations during vigilance states in the preoptic area of rats: A microdialysis study [J]. *Brain Research*, 2001, 910(1-2): 49-54.
- [44] España R A, Scammell T E. Sleep neurobiology from a clinical perspective [J]. *Sleep*, 2011, 34(7): 845-858.
- [45] Broese M, Riemann D, Hein L, et al. α -Adrenergic receptor function, arousal and sleep: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2012, 45(6): 209-216.