

# $\alpha$ -乳白蛋白及其组合物对秀丽隐杆线虫睡眠的改善作用

黎卓斌<sup>1</sup>, 邓怡玲<sup>2</sup>, 陈彩凤<sup>1</sup>, 吴桐<sup>2</sup>, 侯艳梅<sup>2</sup>, 张亚丽<sup>1</sup>, 陈韵<sup>1</sup>, 谢奎<sup>2</sup>, 曹庸<sup>1</sup>, 陈运娇<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642) (2. 海普诺凯营养品有限公司, 湖南长沙 410011)

**摘要:** 失眠的发病率逐年升高, 亟需开发具有改善睡眠功效的活性物。该研究利用秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 从  $\alpha$ -乳白蛋白、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-茶氨酸和百合提取物四种活性物中筛选出改善睡眠效果最佳的物质并探究其改善睡眠的机制, 最后将其开发成具有改善睡眠功效的复合组合物。结果表明, 四种活性物均能降低与线虫睡眠相关的活性氧水平, 且  $\alpha$ -乳白蛋白改善线虫与睡眠相关的氧化应激效果最佳。经  $\alpha$ -乳白蛋白干预后, 线虫线粒体损伤减少了 65.00% ( $P<0.05$ ), 并且应激胁迫下线虫最大寿命显著延长了 4.10% ( $P<0.05$ )。最后, 含  $\alpha$ -乳白蛋白复合组合物促睡眠效果最佳的配方不仅能将线虫发育阶段睡眠的睡眠时长和睡眠频率分别提高 7.97% ( $P<0.05$ ) 和 59.43% ( $P<0.05$ ), 还能显著降低线虫应激诱导睡眠的运动速率。综上所述, 四种活性物中, 改善线虫睡眠相关氧化应激效果最佳的是  $\alpha$ -乳白蛋白并且其改善睡眠的机制与线粒体修复有关, 含  $\alpha$ -乳白蛋白复合组合物具有改善线虫睡眠的作用。

**关键词:**  $\alpha$ -乳白蛋白; 秀丽隐杆线虫; 睡眠; 线粒体; 神经元

文章编号: 1673-9078(2024)06-85-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0761

## Effect of $\alpha$ -Lactalbumin and Its Composition on Improving Sleep in *Caenorhabditis elegans*

LI Zhuobin<sup>1</sup>, DENG Yiling<sup>2</sup>, CHEN Caifeng<sup>1</sup>, WU Tong<sup>2</sup>, HOU Yanmei<sup>2</sup>, ZHANG Yali<sup>1</sup>, CHEN Yun<sup>1</sup>,  
XIE Kui<sup>2</sup>, CAO Yong<sup>1</sup>, CHEN Yunjiao<sup>1\*</sup>

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

(2. Hyproca Nutrition Co. Ltd., Changsha 410011, China)

**Abstract:** With the incidence of insomnia increasing each year, there is an urgent need to develop active substances that can improve sleep. *Caenorhabditis elegans* was used to screen substances with the best sleep-improving effect from among four natural active substances ( $\alpha$ -lactalbumin,  $\gamma$ -aminobutyric acid, L-theanine, and lily extract), and the mechanisms underlying their sleep-improving effects were examined. Finally, composites with sleep-improving effects were developed

引文格式:

黎卓斌, 邓怡玲, 陈彩凤, 等.  $\alpha$ -乳白蛋白及其组合物对秀丽隐杆线虫睡眠的改善作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(6): 85-95.

LI Zhuobin, DENG Yiling, CHEN Caifeng, et al. Effect of  $\alpha$ -lactalbumin and its composition on improving sleep in *Caenorhabditis elegans* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 85-95.

收稿日期: 2023-06-21

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2023A1515011266)

作者简介: 黎卓斌 (1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 利用模式动物评价物质促睡眠作用及机制, E-mail: lizhuobinnnnn@163.com; 共同第一作者: 邓怡玲 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: dylfighting@163.com

通讯作者: 陈运娇 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物活性成分及功能评价, E-mail: yunjiaochen@scau.edu.cn

using these active substances. The results showed that all four natural active substances could reduce the levels of sleep-related reactive oxygen species in *C. elegans*, and that  $\alpha$ -lactalbumin had the best effect on improving sleep-related oxidative stress. *Caenorhabditis elegans* subjected to  $\alpha$ -lactalbumin administration showed a 65.00% reduction in mitochondrial damage ( $P<0.05$ ) and 4.10% increase in maximum lifespan under *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 stress ( $P<0.05$ ). Finally, the  $\alpha$ -lactalbumin-containing composite with the best sleep-improving effect significantly increased sleep duration by 7.97% ( $P<0.05$ ) and sleep frequency by 59.43% ( $P<0.05$ ) during developmentally timed sleep, and reduced the movement speed of stress-induced sleep in *C. elegans*. In conclusion,  $\alpha$ -lactalbumin had the strongest effect among the four active substances tested on improving sleep-related oxidative stress in *C. elegans*, and the mechanism of improving *C. elegans* sleep was related to mitochondrial repair. Composites containing  $\alpha$ -lactalbumin showed sleep-improving effects in *C. elegans*.

**Key words:** lifespan; mitochondria; neuron; reactive oxygen species; stress

睡眠对人体健康非常重要,良好的睡眠可以调节人体机能和维持大脑正常功能<sup>[1]</sup>。近年来,随着工作节奏的加快和生活压力的增大,失眠的发病率不断升高。失眠会导致大脑功能紊乱,免疫力下降,严重影响身心健康<sup>[2]</sup>。有研究表明,失眠期间体内血清和大脑的氧化应激水平升高,还可能引起认知障碍<sup>[3]</sup>。此外,长期失眠的动物大脑中会积累更高水平的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)。而睡眠与氧化应激有着密切的关联,良好的睡眠对身体和大脑都起到抗氧化剂的作用<sup>[4,5]</sup>,因此,ROS清除能力和抗氧化胁迫能力是评价睡眠质量的可靠指标。

$\alpha$ -乳白蛋白属于乳清蛋白。羊乳和牛乳中 $\alpha$ -乳白蛋白的含量均在0.1~0.2 g/100 g。 $\alpha$ -乳白蛋白不仅营养价值高,而且具有调节炎症反应和延缓衰老等活性功能<sup>[6,7]</sup>。王瑶等<sup>[8]</sup>通过研究发现 $\alpha$ -乳白蛋白具有延缓衰老等功效。张一帆等<sup>[9]</sup>通过往婴幼儿配方奶粉添加 $\alpha$ -乳白蛋白和色氨酸,能显著增加大鼠肠道有益菌的丰度和脑中血清素的水平,对肠道和神经发育有潜在益处。关于牛乳和羊乳改善睡眠的功效已有不少研究报道<sup>[10,11]</sup>。因此, $\alpha$ -乳白蛋白作为牛乳和羊乳中的一种重要的蛋白,对其促睡眠潜力进行挖掘和筛选是很有必要的。此外, $\gamma$ -氨基丁酸作为动物体内的一种神经递质,在机体睡眠过程发挥重要作用<sup>[12]</sup>;L-茶氨酸是绿茶中的活性成分,因其具有镇静安神的特性,在改善睡眠方面的研究逐渐增多<sup>[13]</sup>;百合提取物作为传统的中药材,已在改善睡眠方面广泛应用<sup>[14]</sup>。因此,本研究选取 $\alpha$ -乳白蛋白、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-茶氨酸和百合提取物四种有促睡眠潜力的活性物进行促睡眠效果的评价。

秀丽隐杆线虫作为经典的生物学模型,已经在抗氧化和抗衰老研究领域得到广泛的应用。秀丽隐杆线虫具有生命周期短、繁殖能力强和易于培养等

优点,并且与人类基因有80%的同源性<sup>[15,16]</sup>。当线虫进入睡眠状态时,会出现静止行为、对外界刺激反应减少、特殊的姿势和神经元活动减少等情况,并且存在两种睡眠行为状态:发育阶段睡眠和应激诱导睡眠<sup>[17]</sup>。在睡眠障碍患者中普遍存在线粒体功能障碍,线粒体功能障碍在线虫中可通过荧光标记观察。因此线虫是研究活性物促睡眠功效的优秀模式生物。

本研究先用睡眠相关的氧化应激为指标评价 $\alpha$ -乳白蛋白、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-茶氨酸和百合提取物等四种天然活性物中促睡眠效果最佳的化合物,并进一步评价其改善秀丽线虫睡眠能力的作用,最后综合评价四种活性物加酪蛋白磷酸肽(一种乳源活性肽)制备成的组合物对睡眠的影响作用。研究结果为 $\alpha$ -乳白蛋白的深度利用开发提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

$\alpha$ -乳白蛋白,美国Hilmar企业; $\gamma$ -氨基丁酸,天津世纪天龙生物科技有限公司;L-茶氨酸,浙江天草生物科技股份有限公司;百合提取物,陕西嘉禾生物科技股份有限公司;酪蛋白磷酸肽,新西兰大拓乳业合作企业;荧光探针H<sub>2</sub>DCF-DA,美国Sigma-Aldrich公司;其他试剂均为国产分析纯。实验中使用到的线虫株有N2,PD4251和LX929,均购于秀丽隐杆线虫遗传学中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)。绿脓杆菌PA14由周庆华教授(暨南大学)惠赠,绿脓杆菌PAO1由张炼辉教授(华南农业大学)惠赠。

EnSpire酶标仪,美国PerkinElmer公司;LRH系列生化培养箱,上海一恒科技有限公司;SMZ-T4

体视显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; LSM880 激光共聚焦荧光显微镜, 德国卡尔蔡司光学有限公司; Wormlab 线虫视频采集系统, 美国 MBF Bioscience 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 线虫的培养

以涂有大肠杆菌 *E. coli* OP50 (大肠杆菌 OP50) 的标准培养基 (Nematome Growth Medium, NGM) 培养线虫, 培养温度 20 °C, 根据线虫生长状况定期将线虫转移到新的涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基中。

不同药物处理的浓度设置:  $\alpha$ -乳白蛋白设定了 7 个不同质量浓度 (250、500、750、1 000、2 000、3 000、4 000 mg/L),  $\gamma$ -氨基丁酸设定了 4 个不同质量浓度 (400、600、800、1 000  $\mu$ g/L), L-茶氨酸设定了 5 个不同质量浓度 (1、2、3、4 和 5 mg/L), 百合提取物设定了 6 个不同质量浓度 (50、100、150、200、300、400 mg/L), 均使用 OP50 菌液稀释至终浓度。

### 1.2.2 线虫的同步化

用 M9 缓冲溶液将处于产卵器的成虫冲洗至无菌 EP 管中, 将一级水、氢氧化钠和 10 wt.% 次氯酸钠按体积比 1:1:1 混合作为秀丽线虫裂解液, 将待裂解线虫与裂解液在 EP 管中混合, 震荡后置于低速离心机上 3 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 再用 M9 冲洗线虫 2 次, 离心弃上清后用移液枪吸取 EP 管底部虫卵滴于涂菌后的 NGM 培养基上, 约 48 h 后裂解的线虫体内的受精卵基本发育成 L4 期幼虫, 完成同步化。

### 1.2.3 ROS含量的测定

使用文献报道的方法进行 ROS 测定<sup>[18]</sup>, 线虫从卵开始经上述不同质量浓度的样品处理 4 d 后, 暴露于 10 mmol/L 百草枯 24 h。把线虫 (150 个个体) 转移到 NGM 上去除大肠杆菌 OP50, 再把线虫转移到含有 50  $\mu$ L 的 PBS 缓冲液的 96 孔板中, 各孔同时加入 50  $\mu$ L 用 PBS 缓冲液配置的 100  $\mu$ mol/L 的荧光探针 H<sub>2</sub>DCF-DA 溶液。使用 EnSpire 多功能酶标仪在 25 °C 下每间隔 30 min 进行一次荧光强度测量, 共 5 h (激发波长: 485 nm; 发射波长: 535 nm), 结果表示为平均面积积分, 并使用不含线虫的 H<sub>2</sub>DCF-DA 溶液的孔作对照孔, 至少进行三次独立重复实验。

### 1.2.4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>氧化胁迫寿命测定

使用文献报道的方法进行 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化胁迫寿命测定<sup>[19]</sup>, 采用高氯酸钠裂解法对线虫进行同期化处理, 从卵开始用样品处理 3 d 后, 每组挑选 60 条线虫到含有 10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 NGM 中, 每半个小时记录线虫的存活率并及时移走死亡的线虫, 对轻微机械刺激没有反应的线虫个体视为死亡。试验至少进行三次独立重复实验。线虫的中位寿命是指存活率等于 50% 的时间; 线虫的最大寿命是指存活率等于 0% 的时间; 线虫的平均寿命计算公式为:

$$L = \frac{1}{n} \sum_j \frac{x_{j-1} + x_j}{2} \times d_j \quad (1)$$

式中:

$L$ ——平均寿命。

$j$ ——年龄小时数 (h) 或天数 (d);

$d_j$ ——死于年龄区间 ( $x_{j-1}$ ,  $x_j$ ) 线虫的数量;

$n$ ——线虫的总数。

$x_j$ ——第  $j$  天 (第  $j$  小时) 观察线虫死亡的天数 (小时数)。

### 1.2.5 绿脓杆菌PAO1应激对线粒体损伤的测定

在 PD4251 线虫中, 所有体壁肌肉细胞中线粒体与绿色荧光蛋白 (Green Fluorescence Protein, GFP) 共表达。因此, 可以利用转基因线虫 PD4251 的 GFP 标记的荧光可见物来观察线粒体形态的变化<sup>[20]</sup>。对照组全程喂养大肠杆菌 OP50, PAO1 组全程喂食绿脓杆菌 PAO1, PAO1+ $\alpha$ -LA 组全程喂食含 750 mg/L  $\alpha$ -乳白蛋白的绿脓杆菌 PAO1, 各组均从卵开始喂养至第 7 天后拍照。至少 15 只线虫被麻醉 (麻醉剂为 1% 叠氮化钠) 并固定在载玻片上, 使用激光共聚焦荧光显微镜放大 400 倍拍摄, 观察并记录不同形态线粒体分布情况, 至少进行三次独立重复实验。

### 1.2.6 绿脓杆菌PA14应激对胆碱能神经元影响的测定

在 LX929 线虫中, 胆碱能神经元与 GFP 共表达。因此, 可以利用转基因线虫 LX929 的 GFP 标记的荧光可见物来观察胆碱能神经元的变化。对照组全程喂养 OP50, PA14 组全程喂食绿脓杆菌 PA14, PA14+ $\alpha$ -LA 组全程喂食含 750 mg/L  $\alpha$ -乳白蛋白的绿脓杆菌 PA14, 各组均从卵开始喂养至第 7 天后拍照。至少 15 只线虫被麻醉 (麻醉剂为 1% 叠氮化钠) 并固定在载玻片上, 使用激光共聚焦荧光显微镜放大 400 倍拍摄, 观察并记录不同形态神经元肿胀情况, 至少进行三次独立重复实验。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Orthogonal experimental factor levels

水平	对照	$\gamma$ -氨基丁酸 ( $\mu\text{g/L}$ )	L-茶氨酸 ( $\text{mg/L}$ )	$\alpha$ -乳白蛋白 ( $\text{mg/L}$ )	酪蛋白磷酸肽 ( $\mu\text{g/L}$ )	百合提取物 ( $\text{mg/L}$ )
1	大肠杆菌 OP50	400	2	200	1 000	200
2		600	3	750	1 500	300
3		800	4	1 000	2 000	400

### 1.2.7 绿脓杆菌PAO1感染应激寿命的测定

采用高氯酸钠裂解法对线虫进行同期化处理, 对照组全程喂养大肠杆菌 OP50, PAO1 组全程喂食绿脓杆菌 PAO1, PAO1+ $\alpha$ -LA 组全程喂食含 750 mg/L  $\alpha$ -乳白蛋白的绿脓杆菌 PAO1。每隔 24 h 记录生存、死亡线虫数, 直至线虫全部死亡, 至少进行三次独立重复实验。线虫的中位寿命、最大寿命和平均寿命的计算方法见 1.2.3 中的描述。

### 1.2.8 含 $\alpha$ -乳白蛋白组合物的制备方法

首先将百合提取物过 50 目筛, 将  $\alpha$ -乳白蛋白和百合提取物在 25  $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 下搅拌 20 min; 然后加入酪蛋白磷酸肽于 25  $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 下搅拌 20 min; 最后加入  $\gamma$ -氨基丁酸和 L-茶氨酸于 25  $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 下搅拌混合均匀即得。

### 1.2.9 含 $\alpha$ -乳白蛋白组合物的正交实验设计

结合四种促睡眠物质 ROS 实验的结果以及前期对促睡眠活性物质酪蛋白磷酸肽的研究, 我们选取五种促睡眠活性物 ( $\alpha$ -乳白蛋白、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-茶氨酸、百合提取物和酪蛋白磷酸肽) 的三个水平设计正交实验 (表 1), 以发育阶段睡眠的睡眠时长和睡眠频率为考察指标, 优化出组合物中五种物质的最佳组合。正交因素实验设计如表 2 所示。

### 1.2.10 发育阶段睡眠指标的测定

对线虫进行同期化处理, 从卵开始用样品处理 50 h 至 L4 中期, 挑取 30 条大小相同的线虫放于含样品且用于拍摄录像的 NGM 中, 静止 30 min。利用 Wormlab 线虫视频采集系统以 10 s/帧的间隔录像 12 h, 然后使用 Wormlab 行为分析软件 (MBF Bioscience, USA) 分析所采集的视频, 评价线虫的活动状态。对于每一次录像, 线虫移动速率小于 0.5  $\mu\text{m/s}$  便判定为睡眠状态, 总睡眠时长是睡眠起点到睡眠终点的持续时间, 睡眠判定起点为连续三帧为睡眠状态即为进入睡眠状态, 当静止状态结束时则被判定为睡眠终点。发育阶段睡眠主要通过睡眠时长和睡眠频率两个指标进行评价。

睡眠时长是睡眠起点到睡眠终点的持续时间; 睡眠频率为总睡眠时长所对应的帧数中移动速率小于 0.5  $\mu\text{m/s}$  的帧数与总帧数之比。通过 Wormlab 行为分析软件测定线虫睡眠时长及睡眠频率评价活性物对线虫发育阶段睡眠质量的影响, 至少进行三次独立重复实验。

表 2 五因素三水平正交试验设计表

Table 2 Five factor three level orthogonal design of experiments

试验号	样品				
	A	B	C	D	E
1	2	1	1	3	1
2	3	2	1	1	2
3	1	2	3	2	1
4	2	2	1	1	3
5	2	1	2	2	2
6	1	3	1	3	2
7	1	3	1	2	3
8	3	3	2	1	1
9	3	1	1	2	1
10	1	1	1	1	1
11	1	1	2	1	3
12	1	2	2	3	1
13	3	1	3	3	3
14	1	1	3	1	2
15	1	1	1	1	1
16	2	3	3	1	1

注: A:  $\gamma$ -氨基丁酸; B: L-茶氨酸; C:  $\alpha$ -乳白蛋白; D: 酪蛋白磷酸肽; E: 百合提取物。

### 1.2.11 应激诱导睡眠指标的测定

对线虫进行同期化处理, 从卵开始用样品处理 3 d。实验通过急性热休克触发线虫的静默状态。将成年线虫在 33  $^{\circ}\text{C}$  的水浴中热休克 30 min, 在热休克结束后每隔 30 min 检测线虫 5 min 的运动速率变化情况, 以此来评价线虫应激诱导睡眠期间

的睡眠状态。以 5 min 内整体平均运动速率反映线虫应激后的运动情况，整体运动速率越低，应激诱导睡眠的强度越深。以上实验至少进行三次独立重复实验。

### 1.3 数据分析

使所有实验均至少重复三次，结果以平均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示，并通过 SPSS 25.0 软件采用单因素方差分析法进行显著性分析， $P$  值小于 0.05 为显著差异。其中，生存曲线使用 Graphpad Prism 软件进行 log-rank 检验分析显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 四种活性物对线虫睡眠相关的 ROS 水平的的影响

在长期睡眠剥夺的情况下，动物在大脑中会积累更高的 ROS 水平，对急性氧化应激很敏感；长期睡眠剥夺还可能会引起肠道 ROS 大量积累进而损害机体健康<sup>[4,5]</sup>。因此，ROS 清除能力的大小是评价睡眠质量的一个可靠指标。首先通过 ROS 清除能力筛选到四种活性物 ( $\alpha$ -乳白蛋白、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-茶氨酸、百合提取物) 的最佳促睡眠作用质量浓度范围。

如图 1 所示， $\alpha$ -乳白蛋白给药处理后，250、750、1 000 和 2 000 mg/L 质量浓度  $\alpha$ -乳白蛋白处理组的线虫体内 ROS 均受到显著抑制 (图 1a,  $P < 0.05$ )，但 500、3 000、4 000 mg/L 质量浓度处理未能显著降低 ROS，可能是该质量浓度下对抗氧化酶有抑制作用。因此，选择 250、750、1 000 和 2 000 mg/L 四个质量浓度进一步分析其促睡眠效果。 $\gamma$ -氨基丁酸给药处理后，线虫体内的 ROS 水平显著降低 (图 1b,  $P < 0.01$ )，尤其 800  $\mu$ g/L 剂量处理下降幅度高达 34.40%，其次是 400、600 和 1 000  $\mu$ g/L 剂量。因此，选择 400、600、800、1 000  $\mu$ g/L 四个质量浓度进一步分析其促睡眠效果。L-茶氨酸给药处理后，2、3、4 和 5 mg/L 剂量处理组的线虫 ROS 水平显著减少 (图 1c,  $P < 0.05$ )，而 1 mg/L 处理组反而促进 ROS 的积累增加。因此，选择 2、3、4、5 mg/L 四个质量浓度进一步研究 L-茶氨酸促睡眠效果。百合提取物给药处理后，200、400 mg/L 能够显著抑制线虫体内 ROS (图 1d,  $P < 0.05$ )，但其他质量浓度无显著影响。因此，选择 150、200、300、400 mg/L 四个质量浓度进一步分析百合提取物促睡眠效果。

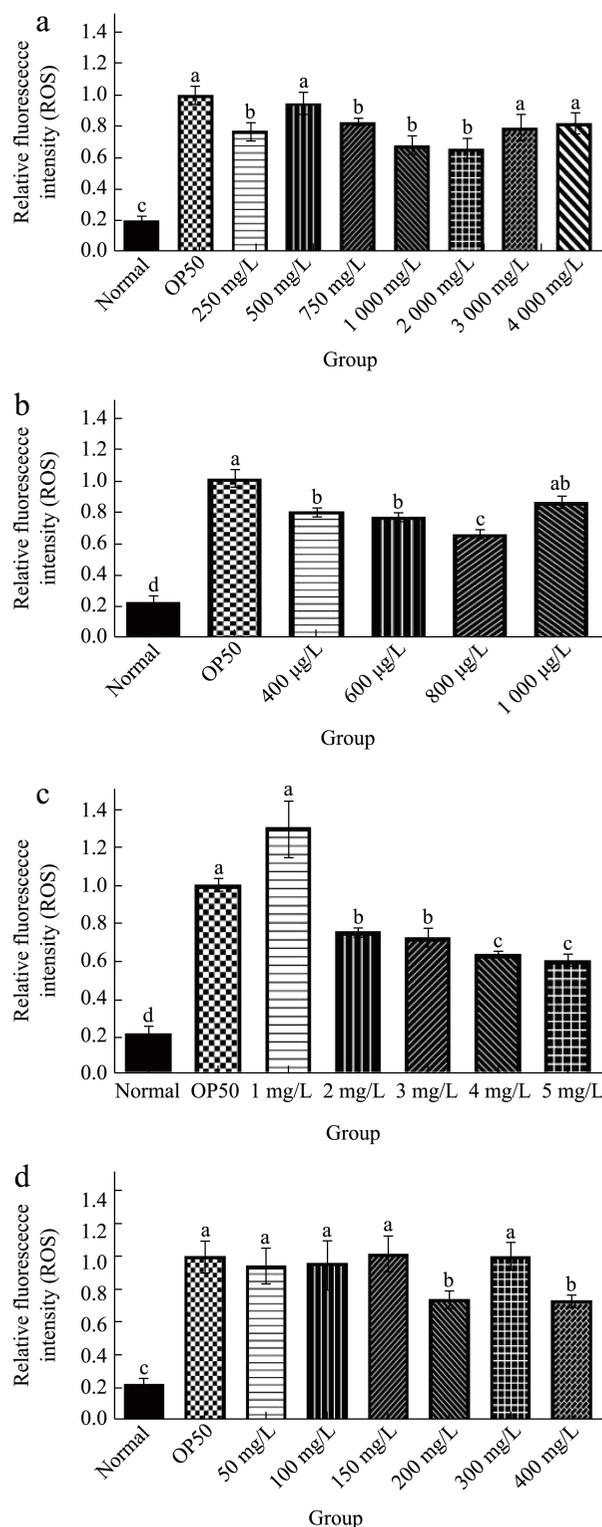


图 1 四种活性物对线虫体内 ROS 积累的影响

Fig.1 Effects of four active substances on ROS accumulation in *C. elegans*

注：(a)  $\alpha$ -乳白蛋白；(b)  $\gamma$ -氨基丁酸；(c) L-茶氨酸；(d) 百合提取物。Normal 指线虫不经百草枯处理组，OP50 组指线虫经百草枯处理且无药物处理组。不同组间同列小写英文字母不同表示差异性显著 ( $P < 0.05$ )。

## 2.2 四种活性物对线虫睡眠相关的氧化应激的影响

睡眠与氧化应激有着密切的关联,睡眠对身体和大脑都起到抗氧化剂的作用。因此,在使用 ROS 清除能力初步筛选活性物作用质量浓度的基础上,进一步使用  $H_2O_2$  急性氧化胁迫实验来筛选四种活性物的最佳促睡眠作用质量浓度。如图 2a 所示,250 mg/L 和 750 mg/L 的  $\alpha$ -乳白蛋白处理组线虫的平均寿命均为 6.17 h,两个质量浓度下线虫平均寿命均显著提高 90.35% ( $P<0.05$ ),中位寿命分别显著提高 68.54% 和 62.17%,最大寿命均显著提高 54.25%。而 1 000 mg/L 和 2 000 mg/L  $\alpha$ -乳白蛋白组线虫的平均寿命分别提高了 57.46% 和 52.63%,中位寿命均提高了 31.09%,最大寿命均提高了 25.00%。如图 2b 所示,与对照组相比,不同剂量的  $\gamma$ -氨基丁酸(400、600、800、1 000  $\mu$ g/L)均能使线虫寿命显著延长。其中 800  $\mu$ g/L 剂量组效果最佳,线虫平均寿命较对照组显著延长了 47.00% ( $P<0.01$ ),中位寿命和最大寿命分别提高了 15.77% 和 27.27% ( $P<0.01$ )。其次是 1 000  $\mu$ g/L 剂量组,线虫平均寿命显著延长了 41.00%,中位寿命和最大寿命分别提高了 15.77% 和 20.00%。而 400 及 600  $\mu$ g/L 剂量组线虫平均寿命分别延长了 37.05% 和 27.88% ( $P<0.01$ ),中位寿命分别提高了 31.09%、18.73%,最大寿命分别提高了 16.75%、20.75%。如图 2c 所示,不同质量浓度的 L-茶氨酸均促进了线虫生存曲线的显著右移 ( $P<0.01$ ),4 mg/L 的 L-茶氨酸处理组显效果最佳,且其平均寿命、中位寿命和最大寿命分别提高了 66.53%、68.54% 和 37.5%。而 2、3、5 mg/L L-茶氨酸处理后,线虫的平均寿命提高了 28.63%~35.88%,中位寿命提高了 18.72%~31.09%,最大寿命提高了 12.50%~25.00%。如图 2d 所示,与对照组相比,经过百合提取物处理的线虫不仅生存曲线显著右移,而且平均寿命、中位寿命和最大寿命都得到延长,150、200、300 和 400 mg/L 百合提取物平均寿命分别延长了 29.51%~60.65%,中位寿命提高了 18.73%~37.45%,最大寿命提高了 12.50%~54.25%。综上所述, $\alpha$ -乳白蛋白和百合提取物均能使线虫的最大寿命延长至最高的 6 h,比  $\gamma$ -氨基丁酸和 L-茶氨酸都要高;此外, $\alpha$ -乳白蛋白延长线虫平均寿命的效果比百合提取物高 10.71%。因此,将重点研究  $\alpha$ -乳白蛋白的促睡眠和抗应激胁迫活性。

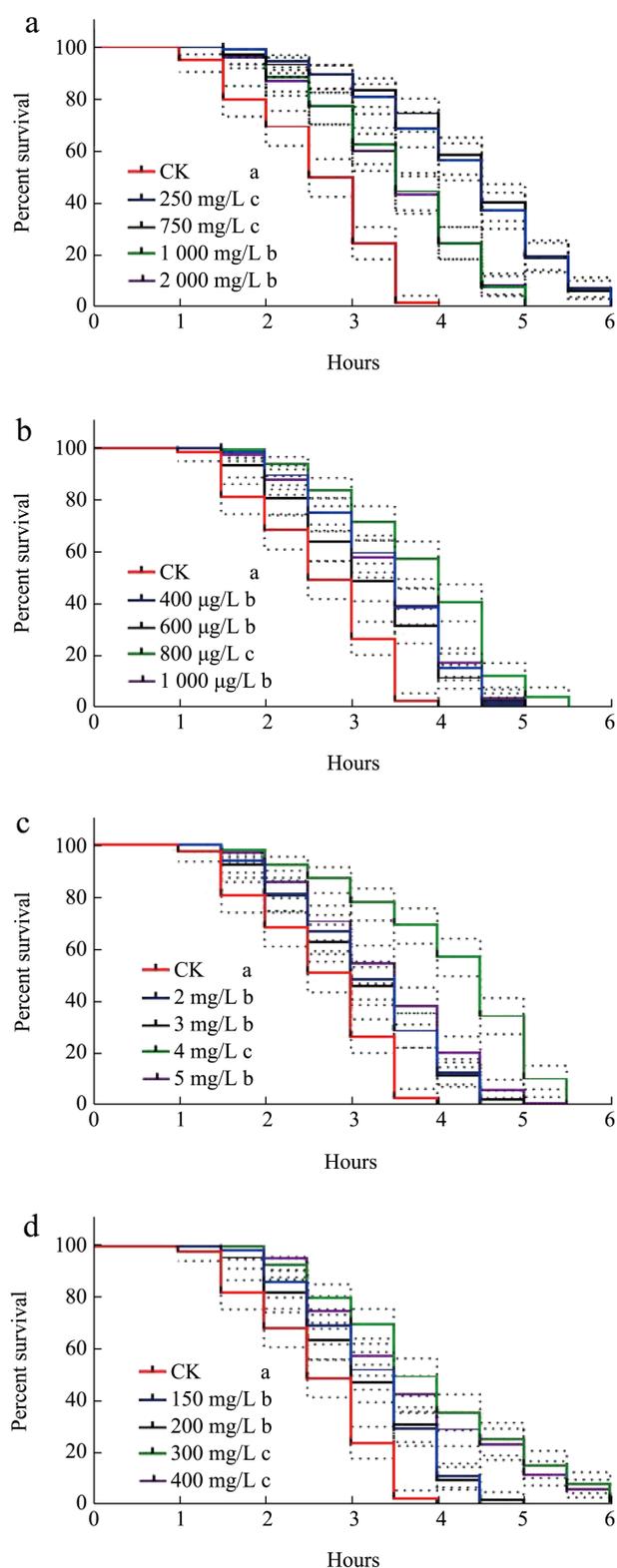


图 2 四种活性物对线虫  $H_2O_2$  氧化应激胁迫下寿命的影响

Fig.2 Effects of four active substances on the lifespan of *C. elegans* under oxidative stress by  $H_2O_2$

注:(a) $\alpha$ -乳白蛋白;(b) $\gamma$ -氨基丁酸;(c)L-茶氨酸;(d)百合提取物。不同组间同列小写英文字母不同表示差异性显著 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PAO1 应激下线虫线粒体形态的影响

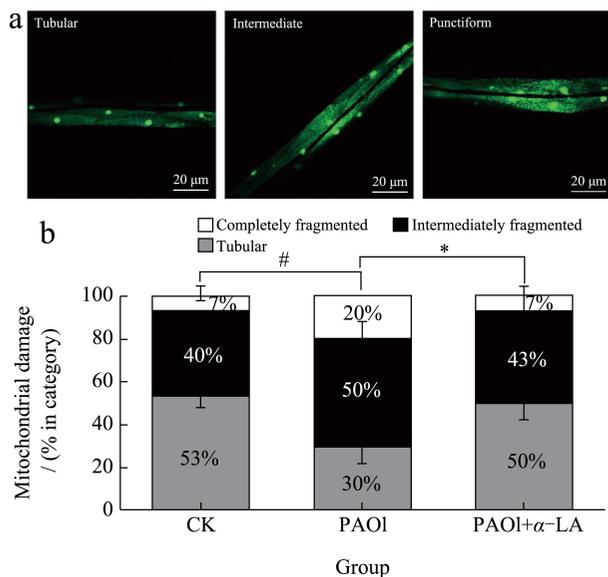


图3  $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PAO1 应激下线虫线粒体形态的影响

Fig.3 Effect of  $\alpha$ -lactalbumin on mitochondrial morphology of *C. elegans* under stress of PAO1

注: (a) PD4251 线虫中线粒体和 GFP 共表达的正常的管状线粒体、异常膨胀的、点状线粒体和中间状态的线粒体代表性荧光图; (b) 不同处理组线粒体形态的分析结果, # 表示 CK 组与 PAO1 组之间完全损伤线粒体比例有显著差异, \* 表示 PAO1 组与 PAO1+ $\alpha$ -LA 组之间完全损伤线粒体比例有显著差异。

线粒体是多功能细胞器, 具有产生细胞能量和调节细胞死亡的功能。然而, 线粒体受到应激胁迫等损伤后会影蛋白质折叠环境并损害它们的功能。线粒体功能障碍通常与机体适应性降低有关, 机体必须有适当的修复措施来保护线粒体功能并促进应激时的恢复<sup>[21]</sup>。有报道证明, 在睡眠障碍患者中普遍存在线粒体功能障碍, 线粒体在睡眠生理学和病理学中起着关键作用<sup>[22]</sup>。由于线粒体与睡眠有关, 本文研究了  $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PAO1 应激后的线虫线粒体损伤的保护作用。图 3a 为正常管状线粒体、中间状态线粒体和异常破碎线粒体的代表性图片。实验结果如图 3b 所示, 与空白对照组相比, 绿脓杆菌 PAO1 应激处理组的线虫中正常管状线粒体数量显著减少, 而异常的破碎线粒体和中间状态线粒体的比例显著增加 ( $P < 0.05$ )。这表明绿脓杆菌 PAO1 应激能够构建线粒体损伤模型。 $\alpha$ -乳白蛋白处理组与模型组相比, 异常破碎线粒体显著减少了 65.00% ( $P < 0.05$ ), 且正常管状线粒体的比例

有上升趋势, 表明  $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PAO1 应激后线虫的保护作用和促睡眠功效的作用机制可能与线粒体的恢复有关。

### 2.4 $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PA14 应激下胆碱能神经元的影响

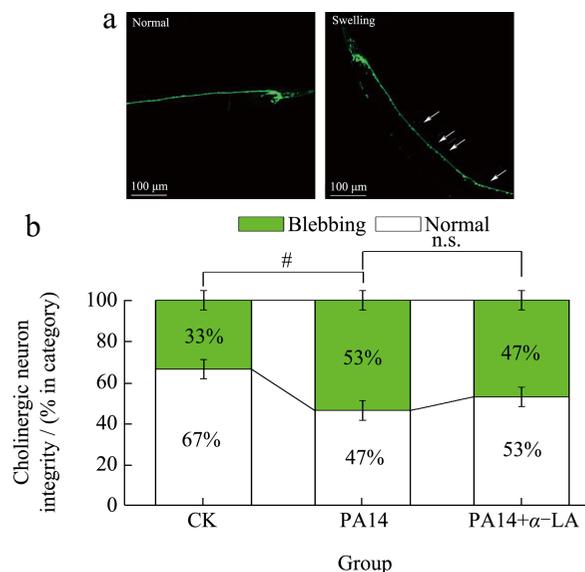


图4  $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PA14 应激下线虫胆碱能神经元的影响

Fig.4 Effect of  $\alpha$ -lactalbumin on *C. elegans* cholinergic neurons under stress of PA14

注: (a) LX929 线虫正常胆碱能神经元以及肿胀胆碱能神经元的代表性图片; (b) 不同处理组线虫中胆碱能神经元肿胀的分析结果。# 表示 CK 组与 PA14 组之间肿胀神经元比例有显著差异, n.s. 表示 PA14 组与 PA14+ $\alpha$ -LA 组之间肿胀神经元比例没有显著差异。

据伍文彬等<sup>[23]</sup>的研究表明, 抗炎活性物黄连治疗神经退行性疾病的作用机制与激活机体的胆碱能抗炎通路有关。由于胆碱能神经元相关通路与炎症应激和睡眠调节之间存在着密切关系<sup>[24]</sup>, 我们进一步探究了  $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PA14 应激损伤后的线虫胆碱能神经元的保护作用。图 4a 为正常胆碱能神经元和异常肿胀的胆碱能神经元的代表性图片。实验结果如图 4b 所示, 与空白对照组相比, 绿脓杆菌 PA14 应激处理组的线虫中正常胆碱能神经元数量明显减少, 而异常的肿胀的胆碱能神经元的比例显著增加 ( $P < 0.05$ )。这表明绿脓杆菌 PA14 应激成功构建了胆碱能神经元损伤模型。 $\alpha$ -乳白蛋白处理组与模型组相比正常胆碱能神经元的比例没有显著变化, 说明  $\alpha$ -乳白蛋白对胆碱能神经元的修复效果不显著。综上所述,  $\alpha$ -乳白蛋白对睡眠的改善作用可能不是由胆碱能神经元介导的。

## 2.5 $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌胁迫后线虫寿命的影响

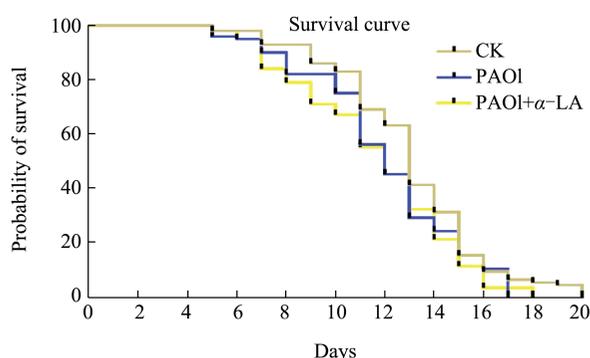


图5  $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌 PAO1 应激下线虫生存曲线影响

Fig.5 Effect of  $\alpha$ -lactalbumin on survival curve of *C. elegans* under PAO1 stress

表3  $\alpha$ -乳白蛋白对绿脓杆菌PAO1应激培养下的寿命统计分析 (d)

Table 3 Statistical analysis of life span of  $\alpha$ -lactalbumin under stress culture of PAO1

处理方式	平均寿命	中位寿命	最大寿命
CK	12.94±0.32 <sup>a</sup>	11.67±0.47 <sup>a</sup>	19.00±0.00 <sup>a</sup>
PAO1	11.99±0.15 <sup>b</sup>	10.67±0.47 <sup>a</sup>	16.33±0.47 <sup>b</sup>
PAO1+ $\alpha$ -LA	11.62±0.17 <sup>b</sup>	11.33±0.47 <sup>a</sup>	17.00±0.00 <sup>c</sup>

注: 不同组间同列小写英文字母不同表示差异性显著 ( $P < 0.05$ )。

$\alpha$ -乳白蛋白具有保护肠道、调节免疫和延缓衰老等多种生物学活性。Shi 等<sup>[25]</sup>发现小鼠摄入糖基化酪蛋白后能够调节免疫系统。于是利用绿脓杆菌 PAO1 进行应激, 探究  $\alpha$ -乳白蛋白对线虫应激胁迫下生存情况的影响。如图 5 和表 3 所示, 经绿脓杆菌 PAO1 应激后, 线虫的平均寿命和最大寿命均显著缩短; 经过  $\alpha$ -乳白蛋白给药处理后, PAO1+ $\alpha$ -乳白蛋白处理组与 PAO1 组相比,  $\alpha$ -乳白蛋白处理后线虫的最大寿命提高了 4.10% ( $P < 0.05$ ), 线虫的平均寿命和中位寿命无显著变化, 说明  $\alpha$ -乳白蛋白对应激胁迫下的线虫有一定的保护作用。

## 2.6 通过正交实验优化出含 $\alpha$ -乳白蛋白的组合物配方

发育阶段睡眠是指线虫从 L1 期发育到成虫期的过程中, 每一幼虫期结束并向下一阶段发育时线虫均会蜕皮, 此时线虫有 2~3 h 进入到睡眠状态<sup>[17]</sup>, 这个发育睡眠阶段称为“Lethargus”<sup>[26]</sup>。应激诱导睡眠是秀丽隐杆线虫暴露于外界环境刺激后恢复所必需的行为<sup>[27]</sup>, 线虫应激诱导睡眠强度越深, 修复状态越好, 活性物对应激诱导睡眠的改善效果越

好<sup>[28]</sup>。睡眠时长和睡眠频率是评价发育阶段睡眠质量的重要指标。为了研究含  $\alpha$ -乳白蛋白组合物的最佳促睡眠配方, 使用睡眠时长和睡眠频率为指标进行了正交实验。正交实验的结果如表 4 所示, 由极差分析可知, 各因素对睡眠时长的影响程度依次为: D (酪蛋白磷酸肽) > C ( $\alpha$ -乳白蛋白) > A ( $\gamma$ -氨基丁酸) > E (百合提取物) > B (L-茶氨酸), 因此提高睡眠时长的最佳组合为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub> (组合物 1)。各因素对睡眠频率的影响程度依次为: A ( $\gamma$ -氨基丁酸) > D (酪蛋白磷酸肽) > B (L-茶氨酸) > C ( $\alpha$ -乳白蛋白) > E (百合提取物)。因此改善睡眠频率的最佳组合为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub> (组合物 2)。通过对比发现, 组合物 1 与组合物 2 中仅有  $\gamma$ -氨基丁酸与  $\alpha$ -乳白蛋白浓度存在差异,  $\alpha$ -乳白蛋白对睡眠时长的影响较大,  $\gamma$ -氨基丁酸对睡眠频率的影响较大, 综合两者的最佳作用浓度得到了一个新组合 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub> (组合物 3)。

## 2.7 含 $\alpha$ -乳白蛋白组合物对线虫睡眠的影响作用

通过正交实验得到了三款含有  $\alpha$ -乳白蛋白的复合配方组合物 1、组合物 2 和组合物 3 (见表 5)。为了提高  $\alpha$ -乳白蛋白组合物的综合利用价值, 采用线虫模型评价三款组合物对线虫睡眠的影响。如图 6a 和 6b 所示, 与对照组相比, 三款组合物对线虫的发育阶段睡眠的睡眠时长与睡眠频率均有显著性提高。组合物 1 的睡眠时长和睡眠频率分别为 121.20 min 和 0.73, 与空白组相比睡眠时长提高 7.76%, 睡眠频率提高 42.10%。组合物 2 的睡眠时长和睡眠频率分别为 119.80 min 和 0.63, 与空白组相比睡眠时长提高 6.49%, 睡眠频率提高 22.52%。组合物 3 的睡眠时长和睡眠频率分别为 121.50 min 和 0.82, 与空白组相比睡眠时长提高 7.97%, 睡眠频率提高 59.43%。因此, 组合物 3 改善发育阶段睡眠效果最好, 其次是组合物 1, 最后是组合物 2。在应激诱导睡眠阶段, 三款组合物作用下线虫第 60~180 min 的运动速率均低于对照组, 且 60~120 min 期间组合物 3 作用下线虫整体运动速率最低, 应激诱导睡眠深度最大 (图 6c)。因此, 组合物 3 改善应激诱导睡眠的效果最好, 其次是组合物 2, 最后是组合物 1。综合发育阶段睡眠的睡眠时长和睡眠频率以及应激诱导睡眠运动速率变化的实验结果, 组合物 3 的促睡眠效果最佳, 最终选定组合物 3 为最佳促睡眠组合物配方。

表 4 正交实验结果分析

Table 4 Analysis of orthogonal experiment results

实验号	因素水平					睡眠时长/min	睡眠频率
	A	B	C	D	E		
1	2	1	1	3	1	115.50 ± 5.76	0.56 ± 0.15
2	3	2	1	1	2	116.30 ± 7.84	0.60 ± 0.10
3	1	2	3	2	1	116.80 ± 6.35	0.43 ± 0.05
4	2	2	1	1	3	116.10 ± 7.98	0.48 ± 0.13
5	2	1	2	2	2	114.30 ± 5.99	0.49 ± 0.09
6	1	3	1	3	2	117.70 ± 6.39	0.60 ± 0.10
7	1	3	1	2	3	116.50 ± 8.48	0.59 ± 0.09
8	3	3	2	1	1	117.30 ± 5.98	0.60 ± 0.09
9	3	1	1	2	1	115.10 ± 8.73	0.73 ± 0.06
10	1	1	1	1	1	117.90 ± 8.16	0.60 ± 0.10
11	1	1	2	1	3	116.20 ± 7.36	0.57 ± 0.09
12	1	2	2	3	1	118.50 ± 5.59	0.66 ± 0.10
13	3	1	3	3	3	119.50 ± 8.78	0.65 ± 0.10
14	1	1	3	1	2	117.50 ± 6.98	0.54 ± 0.10
15	1	1	1	1	1	118.70 ± 5.01	0.54 ± 0.11
16	2	3	3	1	1	119.40 ± 8.21	0.59 ± 0.11
<hr/>							
睡眠 时长	$K_1$	117.47	116.84	116.73	117.42	117.40	因素主次: D>C>A>E>B
	$K_2$	116.32	116.92	116.57	115.67	116.45	
	$K_3$	117.05	117.72	118.3	117.80	117.07	
	$R$	1.15	0.89	1.73	2.12	0.95	
<hr/>							
睡眠 频率	$K_1$	0.57	0.58	0.59	0.56	0.59	因素主次: A>D>B>C>E
	$K_2$	0.53	0.54	0.58	0.56	0.56	
	$K_3$	0.64	0.60	0.55	0.62	0.57	
	$R$	0.11	0.05	0.04	0.06	0.03	

注: A:  $\gamma$ -氨基丁酸; B: L-茶氨酸; C:  $\alpha$ -乳白蛋白; D: 酪蛋白磷酸肽; E: 百合提取物。

表 5 含 $\alpha$ -乳白蛋白的促睡眠组合物配方Table 5 Sleep promoting composition formula containing  $\alpha$ -lactoalbumin

组合物组别	$\alpha$ -乳白蛋白/(mg/L)	$\gamma$ -氨基丁酸/( $\mu$ g/L)	L-茶氨酸/(mg/L)	百合提取物/(mg/L)	酪蛋白磷酸肽/( $\mu$ g/L)
组合物 1	1 000	400	4	200	2 000
组合物 2	250	800	4	200	2 000
组合物 3	1 000	800	4	200	2 000

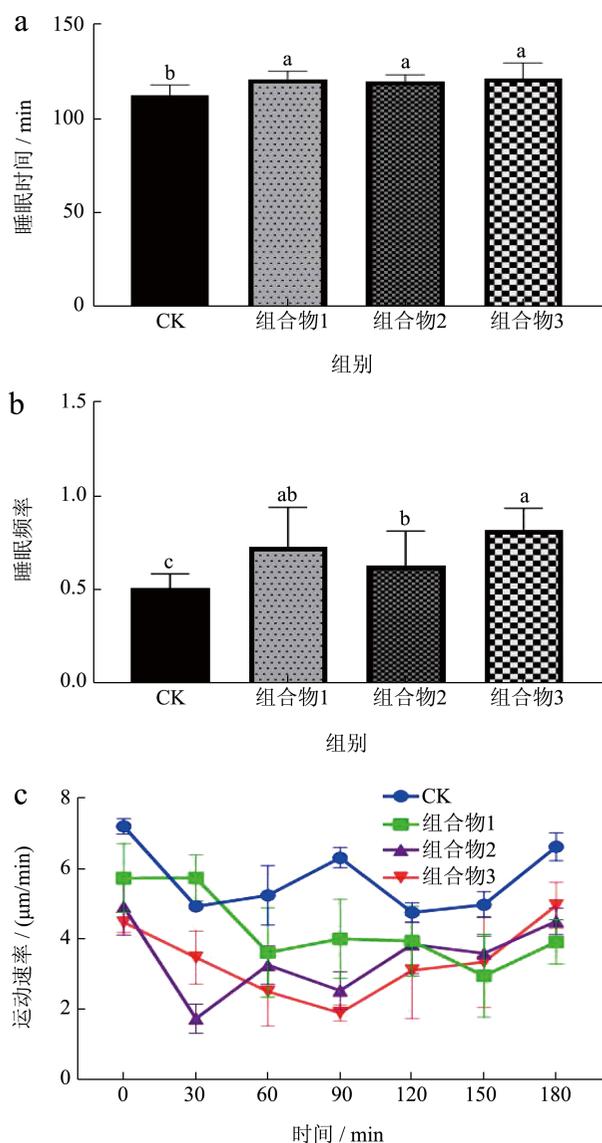


图6 不同组合物对线虫发育阶段睡眠和应激诱导睡眠的影响  
Fig.6 Effects of different compositions on developmentally timed sleep and stress-induced sleep in *C. elegans*

### 3 结论

本研究利用秀丽隐杆线虫模型从 $\alpha$ -乳白蛋白、 $\gamma$ -氨基丁酸、L-茶氨酸和百合提取物等四种天然活性物中筛选得到改善睡眠最佳的活性物,评价其促睡眠作用机制并将其开发为促睡眠组合物。结果表明,通过ROS水平和 $H_2O_2$ 氧化应激实验,从四种天然活性物中筛选得到延长线虫最大寿命和平均寿命效果最佳的活性物为 $\alpha$ -乳白蛋白,从而确定改善睡眠最佳的活性物是 $\alpha$ -乳白蛋白。进一步研究发现喂食 $\alpha$ -乳白蛋白的线虫线粒体损伤减少了65.00%,应激胁迫下的最大寿命提高了4.10%。最后发现含 $\alpha$ -乳白蛋白的三种组合物对线虫发育阶段睡眠和应激诱导睡眠的相关指标均有显著改善效果,其中效果最

好的一款组合物能将线虫睡眠时长提高7.97%,睡眠频率提高59.43%,且运动速率在三种组合物中最低。综上所述,四种天然活性物中,改善与线虫睡眠相关的氧化应激损伤效果最佳的是 $\alpha$ -乳白蛋白, $\alpha$ -乳白蛋白能改善线虫应激胁迫下的线粒体损伤并延长最大寿命,含 $\alpha$ -乳白蛋白复合组合物具有改善睡眠的作用。本研究为含 $\alpha$ -乳白蛋白复合组合物的综合利用和深度开发提供了理论依据和实验基础。

### 参考文献

- [1] 孙从永.助眠天然活性成分丁香酸脂质的制备及体内外评价研究[D].镇江:江苏大学,2017.
- [2] GUO R, SHI A M, DENG L, et al. Flavonoid-like components of peanut stem and leaf extract promote sleep by decreasing neuronal excitability [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2021, 66(1): 1-18.
- [3] LU C, WANG Y, LV J, et al. Ginsenoside Rh2 reverses sleep deprivation-induced cognitive deficit in mice [J]. Behavioural Brain Research, 2018, 349: 109-115.
- [4] VILLAFUERTE G, MIGUEL P A, RODRÍGUEZ E, et al. Sleep deprivation and oxidative stress in animal models: a systematic review [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2015, 2015: 1-15.
- [5] VANESSA M, REED M, GUNTER B, et al. A bidirectional relationship between sleep and oxidative stress in *Drosophila* [J]. PLoS Biology, 2018, 16(7): 1-22.
- [6] LÖNNERDAL B, LIEN E. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants [J]. Nutrition Reviews, 2003, 61(9): 295-305.
- [7] 邵鑫洋,樊振江,张莉杰,等. $\alpha$ -乳白蛋白对秀丽隐杆线虫寿命、繁殖力与活力的影响[J].食品安全质量检测学报,2022,13(15):4787-4793.
- [8] 王瑶,杨宇.乳清蛋白用于结肠癌营养不良患者的研究进展[J].中华老年多器官疾病杂志,2018,17(2):150-152.
- [9] 张一帆,逢金柱,米丽娟,等.添加 $\alpha$ -乳白蛋白和色氨酸的婴儿配方奶粉对新生大鼠脑发育的影响[J].中国食品学报,2022,22(5):129-136.
- [10] IRENE J, HEE J, JUNE B, et al. A tryptic hydrolysate from bovine milk  $\alpha$ s1-casein enhances pentobarbital-induced sleep in mice via the GABA<sub>A</sub> receptor [J]. Behavioural Brain Research, 2016, 313: 184-190.
- [11] 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(6):1-9.
- [12] 卢悦,赵国杰,吴芳杉,等. $\gamma$ -氨基丁酸对昼夜节律紊乱型小鼠睡眠干预研究[J].营养学报,2023,45(2):139-147.
- [13] 张颖,王鑫,刘雅娟,等. L-茶氨酸改善睡眠作用研究进展[J].食品工业科技,2021,42(16):361-366.
- [14] 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.
- [15] LIN C X, ZHANG X Y, XIAO J, et al. Effects on longevity extension and mechanism of action of carnosic acid in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food and Function, 2019, 10(3): 1398-1410.
- [16] 林春秀,林伊梓,沈少丹,等. 苦瓜青钱柳复合茶对秀丽线虫的抗氧化作用[J]. 食品与发酵工业,2020,46(23):178-183.
- [17] 杨永昌. 低温及其信息素烟碱对松材线虫睡眠的影响[D]. 太原:山西农业大学,2019.
- [18] ZHANG X Y, LI W, TANG Y Z, et al. Mechanism of pentagalloyl glucose in alleviating fat accumulation in *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(51): 14110-14120.
- [19] LIN C X, ZHANG X Y, ZHUANG C T, et al. Healthspan improvements in with traditional Chinese herbal tea [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020: 1-13.
- [20] CHEN Y, QIN Q, ZHAO W, et al. Carnosol reduced pathogenic protein aggregation and cognitive impairment in neurodegenerative diseases models via improving proteostasis and ameliorating mitochondrial disorders [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70 (34): 10490-10505.
- [21] DODGE J, BROWDER N, PELLEGRINO M. Mitochondrial recovery by the UPRmt: Insights from *C. elegans* [J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2024, 154(15): 59-68.
- [22] BRUNETTI V, DELLA M, SERVIDEI S, et al. Sleep disorders in mitochondrial diseases [J]. Current Neurology and Neuroscience Reports, 2021, 21(7): 1-9.
- [23] 伍文彬,梁静涛,李斌,等. 黄连解毒汤激活 $\alpha 7nAChR$ 对 $A\beta$ 诱导神经炎症AD小鼠胆碱能通路作用机制研究. 四川省,成都中医药大学附属医院(四川省中医医院)[Z]. 鉴定日期:2021-08-12
- [24] 刘彤,徐淑梅. 睡眠剥夺对大鼠学习能力和海马乙酰胆碱含量的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2007,3: 12-13.
- [25] SHI J, ZHAO X H. *In vitro* immuno-modulatory ability of tryptic caseinate hydrolysate affected by prior caseinate glycation using the Maillard reaction or transglutaminase [J]. Food and Agricultural Immunology, 2017, 28(6): 1029-1045.
- [26] RAIZEN D, ZIMMERMAN J, MAYCOCK M, et al. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state [J]. Nature, 2008, 451(7178): 569-U6.
- [27] RONY S, DESIREE L, CHERYL V. NPR-1 Modulates plasticity in *C. elegans* stress-induced sleep [J]. iScience, 2019, 19: 1037-1047.
- [28] ANDREW J, RICHARD M, JESSIE M, et al. Cellular stress induces a protective sleep-like State in *C. elegans* [J]. Current Biology, 2014, 24(20): 2399-2405.