

魏嵘, 王振, 李怀平, 等. 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠的改善睡眠作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(7): 359-366. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050374

WEI Rong, WANG Zhen, LI Huaiping, et al. Study on the Effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* Powder and Soybean Peptide Powder on Improving Sleep in Insomnia Model Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(7): 359-366. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050374

· 营养与保健 ·

# 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠的改善睡眠作用

魏 嵘<sup>1</sup>, 王 振<sup>2</sup>, 李怀平<sup>2</sup>, 郭 豫<sup>3,\*</sup>, 赵 建<sup>3,\*</sup>

(1.北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心, 北京 100191;

2.金诃藏药(山东)健康产业有限公司, 山东济南 250104;

3.北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191)

**摘要:**目的: 研究酸枣仁茯苓粉和大豆肽粉对对氯苯丙氨酸(PCPA)诱导的失眠模型小鼠的睡眠改善作用。方法: 180只SPF级雄性BALB/c小鼠, 先选取90只随机分为6组(正常对照组, 模型对照组, 酸枣仁茯苓粉低、中、高剂量组, 大豆肽粉组), 进行戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠实验, 另选90只随机分为6组(分组同上), 进行旷场实验并测定下丘脑5-羟色胺(5-HT)、5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)、去甲肾上腺素(NE)以及海马中的 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)和谷氨酸(Glu)的含量。正常对照组和模型对照组均灌胃无菌水; 酸枣仁茯苓粉低、中、高剂量组分别灌胃0.67、1.33、4.00 g/kg BW的受试物; 大豆肽粉组灌胃1.15 g/kg BW的受试物, 小鼠的灌胃体积均为20 mL/kg BW。睡眠实验共计灌胃36 d, 旷场实验共计灌胃37 d。在灌胃的第29和30 d时, 除正常对照组外, 其余小鼠通过腹腔注射PCPA(350 mg/kg BW)诱导失眠模型, 之后两批动物分别再继续灌胃6、7 d。结果: 与模型对照组相比酸枣仁茯苓粉能显著缩短戊巴比妥钠诱导的睡眠潜伏期, 延长睡眠时间, 降低失眠模型小鼠自主活动能力, 包括减少水平得分、垂直得分、修饰得分, 显著提高下丘脑5-HT、5-HIAA含量, 降低NE含量, 降低海马中Glu含量, 提高海马中GABA含量, 调节海马中Glu/GABA比值, 保持Glu/GABA平衡。大豆肽粉能显著延长睡眠时间, 保持Glu/GABA平衡。结论: 酸枣仁茯苓粉对失眠模型小鼠睡眠具有一定地改善作用, 主要通过提高失眠小鼠下丘脑组织中的单胺类神经递质5-HT含量, 降低NE含量, 促使失眠小鼠的睡眠-觉醒状态向正常恢复, 调节海马中Glu和GABA含量, 维持Glu和GABA的稳态平衡。

**关键词:**酸枣仁, 茯苓, 大豆肽, 改善睡眠, 5-羟色胺,  $\gamma$ -氨基丁酸

中图分类号: R151.4<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)07-0359-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050374



本文网刊:

## Study on the Effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* Powder and Soybean Peptide Powder on Improving Sleep in Insomnia Model Mice

WEI Rong<sup>1</sup>, WANG Zhen<sup>2</sup>, LI Huaiping<sup>2</sup>, GUO Yu<sup>3,\*</sup>, ZHAO Jian<sup>3,\*</sup>

(1. Testing Center of Health Food Function Determination, College of Arts and Science, Beijing Union University, Beijing 100191, China;

2. Arura Tibetan Medicine (Shandong) Health Industry Co., Ltd., Jinan 250104, China;

3. Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

**Abstract:** Objective: To study the sleep-improving effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder and soybean peptide powder on insomnia model mice induced by p-chlorophenylalanine (PCPA). Methods: One hundred eighty SPF male BALB/c mice were purchased. First, ninety of them were randomly divided into six groups (normal control group,

收稿日期: 2022-06-02

作者简介: 魏嵘(1981-),女,本科,工程师,研究方向:保健食品功能与安全评价,E-mail: 564907327@qq.com。

\* 通信作者: 郭豫(1970-),男,本科,工程师,研究方向:食品科学,E-mail: gyanling9408@sohu.com。

赵建(1972-),男,本科,工程师,研究方向:保健食品功能与安全评价,E-mail: 386681913@qq.com。

model control group, low, medium and high dose groups of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder, soybean peptide powder group) for the pentobarbital sodium-induced sleep test. The remaining 90 mice were randomly divided into six groups (same group as above) for the open field test, the contents of hypothalamic 5-hydroxytryptamine (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and norepinephrine (NE) in the hypothalamus were measured and the contents of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and glutamic acid (Glu) in the hippocampus were measured. The normal control group and the model control group were administered with sterile water while the low, medium and high dose groups of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder were administered with 0.67, 1.33, 4.00 g/kg BW solution and the soybean peptide powder group was administered with 1.15 g/kg BW solution. The gavage volume of rats was 20 mL/kg BW. The sleep test lasted for 36 days and the open field test lasted for 37 days. On the 29th and 30th day, except the normal control group, the other mice were given intraperitoneal injection of PCPA (350 mg/kg BW) to construct an insomnia model and then continued to be administered for 6, 7 d. Results: Compared with the model control group, *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder could significantly shorten the sleep latency induced by pentobarbital sodium, prolong sleep time, reduce horizontal score, vertical score and modified score, significantly increase the contents of 5-HT and 5-HIAA in the hypothalamus, reducing NE content, reduce Glu content in the hippocampus, improve the hippocampal GABA content, regulate the Glu/GABA ratio and maintain Glu/GABA balance in the hippocampus. Soybean peptide powder could significantly prolong sleep time and maintain Glu/GABA balance. Conclusion: *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder has a certain ameliorative effect on sleep in insomnia model mice by elevating monoamine neurotransmitter 5-HT content and reducing NE content in the hypothalamic of insomnia mice, promoting the sleep wake state of insomnia mice toward normal recovery. It also can regulate Glu and GABA content in the hippocampal and maintain the homeostatic balance of Glu and GABA.

**Key words:** *Ziziphi spinosae Semen*; *Poria cocos*; soybean peptide; sleep improvement; 5-HT; GABA

失眠是最常见的精神障碍,其主要特征为难以开始或维持睡眠,其发病原因复杂,可能与压力、焦虑、睡眠不规律、睡眠环境差、精神类或器质性疾 病等有关<sup>[1]</sup>。美国国立卫生研究院将失眠障碍定义为 由睡眠障碍引起的睡眠稳态失调、睡眠不足、睡眠碎 片化、睡眠质量或数量受损<sup>[2]</sup>。睡眠不足不仅会影响 生活质量,也影响患者的心理和身体健康,对个人和 社会都会产生不利影响<sup>[3]</sup>。据报道,中国有近 15% 的人口符合失眠的标准,因此治疗失眠以及改善睡眠 质量已经成为人们需要广泛关注的问题<sup>[4]</sup>。

中医对睡眠的研究起源于先秦时期的《黄帝内 经》,在此基础上,历代许多著名医家对失眠进行过论 述。现代中医继承了古代医家理论,建立了脏腑学 说、魂魄学说、脑主睡眠学说等多种学说<sup>[5]</sup>。由于处 方庞杂且缺乏一个统一的药效评价体系,疗效往往难 以确定。现代西方医学研究发现,引起睡眠障碍的机 制可能与其相关的多靶点-通路有关<sup>[6]</sup>,如 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)<sup>[7]</sup>、去甲肾上腺素(Nore- pinephrine, NE)<sup>[8]</sup>、 $\gamma$ -氨基丁酸(Gamma-aminobutyric acid, GAMA)等<sup>[9]</sup>。目前,治疗失眠障碍主要通过药 物治疗,西药成分单一、靶点单一,并会引起各种不 良反应,如果长期使用还会产生耐受性。传统中医药 具有多种活性物质,可作用于多种靶点,因此在治疗 失眠方面有其独特的优势。

本实验以酸枣仁提取物、茯苓提取物为主料,刺 五加提取物、大豆肽粉及多种低聚糖为辅料,混合制 备成酸枣仁茯苓粉。酸枣仁最初载于《金匱要略·血 痹虚劳病脉证并治第六》:“虚劳虚烦不得眠,酸枣仁 汤主之”<sup>[10]</sup>。《雷公炮制药性解》中对其也有一定描 述:“枣仁味酸,本入肝经,而心则其所生者也,脾则

其所制者也,胆又其相依之腑也,宜并入之”<sup>[11]</sup>。酸枣 仁含有酸枣仁总皂苷、黄酮类和生物碱等多种镇静 催眠的功效成分<sup>[12-13]</sup>。研究发现,酸枣仁总皂苷及生 物碱能够调节大脑皮质及海马中 Glu、GABA 以及 5-HT 含量<sup>[14-15]</sup>;黄酮类物质可与  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA) 受体/苯二氮草类受体结合,调节 GABA 的含量<sup>[16]</sup>; 活性成分斯皮诺素可以通过调节 5-羟色胺(5-HT)进 而降低去甲肾上腺素(NE)含量,起到镇静催眠功 效<sup>[17-18]</sup>。茯苓中含有三萜酸(PA)及多糖类,PA 可以 通过提高  $\gamma$ -氨基丁酸受体的  $\alpha$  和  $\beta$ -亚基水平来降 低  $\gamma$ -亚基水平,延长戊巴比妥钠诱导下啮齿动物的 睡眠行为<sup>[19-20]</sup>。茯苓多糖具有协同戊巴比妥的中枢 神经系统抑制作用,起到催眠、安神功效<sup>[21]</sup>。《本草 纲目》中记载刺五加能扶正固本、益智安神,主治神 疲乏力、失眠健忘等症。周兰云等<sup>[22]</sup>研究发现,刺五 加总苷可提高快速动眼睡眠(rapid eye movement sleep, REMS)和慢波睡眠 2 期(2 phase of slow wave sleep, SWS2)时间,说明刺五加能够延长睡眠时间,改善睡 眠质量。目前大豆肽对啮齿类动物是否具有改善睡 眠的作用还未见报道。易国富等<sup>[23]</sup>观察了大豆肽对 果蝇睡眠的影响,发现大豆肽可以调节生物钟基因 (*tim*)和神经递质合成限速酶基因的表达,提高脑内 5-HT 的含量来延长果蝇的睡眠时间。目前尚未出现 以酸枣仁提取物、茯苓提取物为主料,刺五加提取 物、大豆肽粉等为辅料的产品改善睡眠方面的研究。

本研究在对氯苯丙氨酸(PCPA)建立的 BALB/c 小鼠睡眠剥夺模型基础上探究不同剂量的酸枣仁茯 苓粉以及其辅料单一组分大豆肽粉的改善睡眠作用, 从行为学与调节睡眠的神经递质变化两方面入手,并 探讨相关作用机制,为保健食品的研发提供数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

实验动物 180 只,体重 18~22 g 购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0008。所有动物饲养于北京联合大学应用文理学院 SPF 级动物房,实验动物使用许可证号:SYXK(京)2017-0038,饲养室温度为  $21\pm 2$  °C、相对湿度为 45%~65%。本研究动物实验设计和实施方案通过了北京联合大学伦理委员会审核和批准(实验动物伦理委员会意见书编号 20210903)。酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉 金诃藏药(山东)健康产业有限公司;戊巴比妥钠(34E10320) 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;对氯苯丙氨酸(PCPA)(S27337)

上海源叶生物科技有限公司;5-HT 试剂盒(2021.9)、5-HIAA 试剂盒(2021.9)、NE 试剂盒(2021.9)、GABA 试剂盒(2021.9)、Glu 试剂盒(2021.9) 上海酶联生物。

SPARK 酶标分析仪 TECAN 公司;T1000 电子天平 常熟市双杰测试仪器厂;BS223S 电子天平 赛多利斯公司;5804R 低温超高速离心机 德国 Eppendorf 公司;MS3 漩涡振荡器 德国 IKA 公司;UP10 超级应用型纯水器 美国 Millipore 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 酸枣仁茯苓粉的制备 以酸枣仁提取物、茯苓提取物为主料,刺五加提取物、大豆肽粉及多种低聚糖为辅料,混合制备成酸枣仁茯苓粉。

1.2.2 动物分组及分组处理 180 只健康雄性 BALB/c 小鼠,适应性饲养 7 d 后,随机分为 2 批,每批 90 只。实验一批进行戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠实验,实验二批进行旷场实验和神经递质指标测定。每批实验动物均分为正常对照组、模型对照组(PCPA, 350 mg/kg BW)、酸枣仁茯苓粉低、中、高剂量组、大豆肽粉组。依据《保健食品功能检验与评价方法(2022 年版)(征求意见稿)》设计动物实验剂量。酸枣仁茯苓粉的推荐剂量为 8 g/60 kg BW,实验设 5、10、30 倍依次为低、中、高剂量组(0.67、1.33、4.00 g/kg BW)。大豆肽粉推荐剂量为 6.9 g/60 kg BW,实验设 10 倍为大豆肽粉组(1.15 g/kg BW)。以上受试物均用无菌水混悬,正常对照组和模型对照组均给予无菌水,小鼠灌胃体积均为 20 mL/kg BW。睡眠实验连续灌胃 36 d,旷场实验连续灌胃 37 d。

1.2.3 对氯苯丙氨酸(PCPA)诱导小鼠失眠模型建立

给予受试物 29、30 d 时,正常对照组腹腔注射生理盐水(90 mg/kg BW),模型组、酸枣仁茯苓粉低、中、高剂量组和大豆肽粉组均腹腔注射 PCPA(350 mg/kg BW),每天 1 次,连续 2 d。当造模小鼠昼夜节律消失,整体观察与正常对照组明显不同时,表明模型建立成功<sup>[24]</sup>。此模型一般能维持 2 周左右<sup>[25]</sup>。

1.2.4 戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠实验 末次灌胃受

试物 30 min 后,采用腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)建立睡眠模型<sup>[26]</sup>。利用戊巴比妥钠诱导小鼠进入睡眠,翻正反射消失 1 min 以上即认定动物进入睡眠状态。腹腔注射至翻正反射消失的总时间即为睡眠潜伏期。翻正反射消失至小鼠恢复翻正的总时间即为睡眠时间。记录各组翻正反射消失与恢复的时间。

1.2.5 旷场实验 给予受试物第 37 d,进行旷场实验。测试时,实验室保持安静,室温恒定,光线均匀,将小鼠放于旷场场箱(25 cm×100 cm×100 cm,箱底由 25 个 5 cm×5 cm 小方格构成)正中央格,适应 1 min。将各组小鼠重新至于旷场场箱中央,观察并记录小鼠在 3 min 内的水平活动得分(穿越底面的方格数,三爪以上跨入即可,1 个方格数记 1 分)、垂直活动得分(前肢离地、后肢站立的次数,1 次记 1 分)、修饰活动得分(梳理毛发、抓耳挠腮等行为次数与粪便数之和,1 次记 1 分、1 粒粪便数记 1 分)。两次实验之间,清除小鼠粪便和尿液,并用 75% 酒精喷雾去除异味<sup>[27]</sup>。

1.2.6 神经递质指标测定 结束给药 24 h 后,脱颈处死小鼠,保留脑组织,于冰浴上迅速剥离小鼠海马、下丘脑组织,迅速置于-80 °C 冰箱备用。严格按照试剂盒操作步骤,测定 5-HT、5-HIAA、NE、GABA、Glu 含量。

### 1.3 数据处理

实验数据采用 Excel 软件进行计算及绘图、SPSS 软件进行数据分析。酸枣仁茯苓粉各剂量组与模型对照组或正常对照组比较,采用单因素方差分析。模型对照组与正常对照组以及大豆肽粉组与模型对照组两组之间比较采用独立样本 T 检验。各指标结果以  $\bar{x}\pm SD$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对 PCPA 诱导失眠模型小鼠睡眠潜伏期及睡眠时间的影响

神经递质含量和比例与睡眠-觉醒机制调节密切相关<sup>[28]</sup>,PCPA 能降低脑内 5-羟色胺(5-HT)含量,影响睡眠-觉醒周期<sup>[29]</sup>。有研究表明,以酸枣仁、茯苓为主的复方固体饮料可以显著缩短戊巴比妥钠诱导的正常小鼠睡眠潜伏期和延长戊巴比妥钠睡眠时间,其作用机制可能与脑内 5-HT、DA 和 GABA 含量的变化有关<sup>[30]</sup>。本实验是在 PCPA 诱导失眠模型的基础上,研究酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对模型小鼠睡眠指标的影响,结果见图 1。与正常对照组比较,模型对照组小鼠对戊巴比妥钠诱导的睡眠潜伏期极显著延长( $P<0.01$ )、睡眠时间显著减少( $P<0.05$ ),说明模型对照组小鼠兴奋性上升,模型建立成功。与模型对照组比较,酸枣仁茯苓粉中剂量组小鼠睡眠时间显著延长( $P<0.05$ );高剂量组小鼠睡眠潜伏期极显著缩短、睡眠时间极显著延长( $P<0.01$ ),剂量组间存在量效关系,表明酸枣仁茯苓粉对失眠小鼠睡眠具有改善作用。与模型对照组比较,大豆肽粉组小鼠睡眠潜伏

期有缩短趋势,但无显著差异( $P>0.05$ )、睡眠时间显著延长( $P<0.05$ ),表明大豆肽粉对失眠小鼠兴奋性有一定的缓解作用,虽无显著差异( $P>0.05$ ),但对小鼠的睡眠质量具有改善作用。

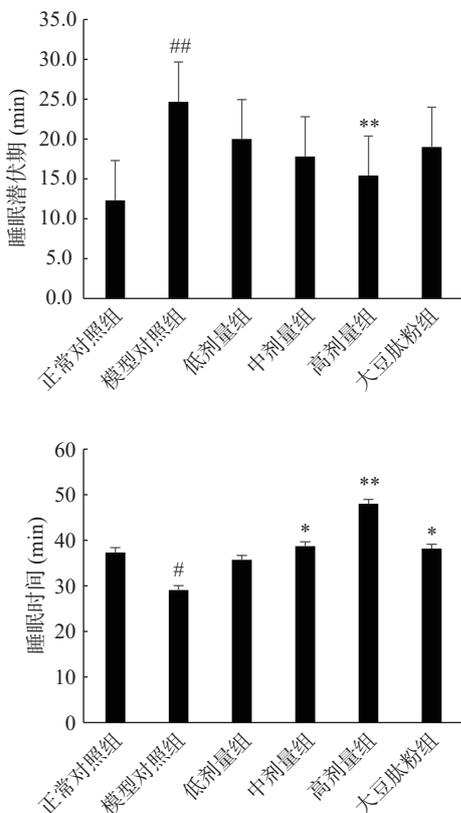


图1 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠睡眠潜伏期及睡眠时间的影响(n=15)

Fig.1 The effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder and soybean peptide powder on the sleep latency and sleep time in insomnia model mice (n=15)

注: #表示与正常对照组比较差异显著,  $P<0.05$ ; ##表示与正常对照组比较差异极显著,  $P<0.01$ ; \*表示与模型对照组比较差异显著,  $P<0.05$ ; \*\*表示与模型对照组比较差异极显著,  $P<0.01$ ; 图2、表1~表3同。

## 2.2 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对 PCPA 诱导失眠模型小鼠自主活动的影响

本研究给予受试物第 29、30 d 腹腔注射 PCPA 诱导失眠模型,第一次注射 30 h 后,给予 PCPA 的小鼠开始出现明显的失眠特征,与正常对照组相比,造模小鼠活动频繁,对外界刺激异常敏感、兴奋性增高、攻击性增强、昼夜节律紊乱,与文献报道一致<sup>[31]</sup>,表明急性失眠模型复制成功。第 37 d 进行旷场实验。实验结果见图 2,与正常对照组比较,模型对照组小鼠旷场实验的水平得分、垂直得分、修饰得分均极显著提高( $P<0.01$ ),说明模型对照组小鼠自主活动能力提高,兴奋性上升,模型建立成功。与模型对照组比较,酸枣仁茯苓粉中剂量组小鼠水平得分与修饰得分均极显著降低( $P<0.01$ );高剂量组小鼠水平得分、垂直得分均极显著降低( $P<0.01$ )、修饰得分显著降低( $P<0.05$ )。表明酸枣仁茯苓粉能够降低 PCPA

诱导的失眠小鼠兴奋性,对失眠小鼠起到一定的镇静作用。与模型对照组比较,大豆肽粉组小鼠水平得分、垂直得分、修饰得分均有下降,但均无显著差异( $P>0.05$ )。

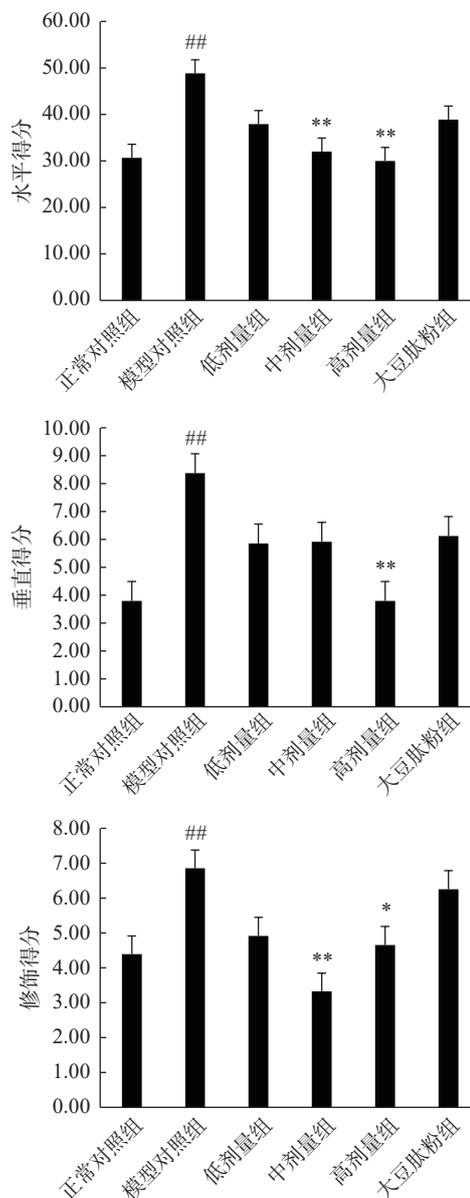


图2 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠自主活动的影响(n=15)

Fig.2 The effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder and soybean peptide powder on the autonomous activity in insomnia model mice (n=15)

## 2.3 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对 PCPA 诱导失眠模型小鼠脑组织神经递质的影响

### 2.3.1 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对 PCPA 诱导失眠模型小鼠下丘脑中 5-HT 和 5-HIAA 的影响

PCPA 诱导失眠模型的原理是抑制色氨酸羟化酶(TPH),阻碍 5-HT 合成。5-HIAA 是 5-HT 的代谢产物,能间接反映 5-HT 含量的变化<sup>[32]</sup>。有研究表明,以酸枣仁、五味子、刺五加、龙眼肉、远志、茯苓等为主要原料的滋阴养血安神方能升高 PCPA 诱导失眠模型小鼠脑

中海马 5-HT 的含量<sup>[33]</sup>。本实验探讨酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对相同模型小鼠下丘脑中 5-HT 和 5-HIAA 的影响, 结果见表 1。

表 1 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠 5-HT、5-HIAA 含量的影响(n=7)

Table 1 The effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder and soybean peptide powder on the content of 5-HT and 5-HIAA in insomnia model mice (n=7)

组别	5-HT(ng/g)	5-HIAA(ng/g)
正常对照组	407.5±28.8	1924.0±256.2
模型对照组	331.8±31.2 <sup>##</sup>	1463.9±170.7 <sup>##</sup>
低剂量组(0.67 g/kg BW)	367.6±42.4	1632.3±130.5
酸枣仁茯苓粉 中剂量组(1.33 g/kg BW)	376.2±29.9	1656.5±151.4
高剂量组(4.00 g/kg BW)	389.2±33.7*	1741.0±193.4*
大豆肽粉组(1.15 g/kg BW)	353.3±19.6	1580.1±142.9

由表 1 可见, 与正常对照组比较, 模型对照组小鼠下丘脑中 5-HT、5-HIAA 含量均极显著降低( $P<0.01$ ); 与模型对照组比较, 酸枣仁茯苓粉高剂量组小鼠下丘脑中 5-HT、5-HIAA 含量均显著升高( $P<0.05$ ); 大豆肽粉组小鼠下丘脑中 5-HT、5-HIAA 含量均略有升高, 但均无显著差异( $P>0.05$ )。

2.3.2 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对 PCPA 诱导失眠模型小鼠下丘脑中 NE 的影响 去甲肾上腺素(NE)与 5-羟色胺(5-HT)是中枢神经系统中重要的神经递质, 大脑中 5-HT 的增加可以促进睡眠的发生, NE 主要负责中枢神经兴奋和觉醒功能。有研究显示运动性失眠可以导致大鼠脑组织中 5-HT 含量明显降低而 NE 等含量升高, 加味酸枣仁汤干预后可提高脑组织中 5-HT 含量, 降低 NE 等的含量, 改善睡眠, 保护大脑<sup>[28]</sup>。本实验则是对酸枣仁、茯苓、大豆肽粉对 PCPA 诱导失眠模型小鼠下丘脑中 NE 的影响进行了相关研究, 实验结果见表 2。

由表 2 可见, 与正常对照组比较, 模型对照组小鼠下丘脑中 NE 含量显著升高( $P<0.05$ ); 与模型对照组比较, 酸枣仁茯苓粉中、高剂量组小鼠下丘脑中 NE 含量均显著降低( $P<0.05$ ); 大豆肽粉组小鼠下丘脑中 NE 含量有所降低, 但无显著差异( $P>0.05$ )。

2.3.3 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对 PCPA 诱导失眠模型小鼠海马中 GABA、Glu 的影响 失眠与中枢

表 2 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠 NE 含量的影响(n=7)

Table 2 The effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder and soybean peptide powder on the content of NE in insomnia model mice (n=7)

组别	NE(ng/g)
正常对照组	16.9±1.7
模型对照组	19.3±1.7 <sup>#</sup>
低剂量组(0.67 g/kg BW)	17.0±2.7
酸枣仁茯苓粉 中剂量组(1.33 g/kg BW)	16.4±1.8*
高剂量组(4.00 g/kg BW)	15.8±2.2*
大豆肽粉组(1.15 g/kg BW)	17.7±1.1

神经递质 Glu(谷氨酸)、GABA( $\gamma$ -氨基丁酸)的平衡失调密切相关。Glu 是兴奋性递质, 主要存在于神经末梢的突触囊泡内, 经过神经递质传递通路完成突触传递维持觉醒<sup>[34]</sup>。GABA 是中枢神经系统中一种重要的抑制性神经递质, 脑内 GABA 水平的升高与焦虑的缓解有关, 具有镇静催眠作用<sup>[35]</sup>。Glu 和 GABA 可相互转换, 维持其比值稳定, 有利于维持觉醒-睡眠的稳态, 本实验结果见表 3。

由表 3 可见, 与正常对照组比较, 模型对照组小鼠海马中 Glu 含量极显著升高( $P<0.01$ )、GABA 含量极显著降低( $P<0.01$ )、Glu/GABA 比值极显著升高( $P<0.01$ ), 酸枣仁茯苓粉低剂量组小鼠海马中 Glu 含量显著升高( $P<0.05$ )、Glu/GABA 比值显著升高( $P<0.05$ ), 中、高剂量组和大豆肽粉组小鼠海马中 Glu/GABA 比值均无显著变化( $P>0.05$ ); 与模型对照组比较, 酸枣仁茯苓粉低剂量组小鼠海马中 GABA 含量显著升高( $P<0.05$ )、Glu/GABA 比值极显著降低( $P<0.01$ ), 中剂量组小鼠海马中 Glu 含量极显著降低( $P<0.01$ )、Glu/GABA 比值极显著降低( $P<0.01$ ), 高剂量组小鼠海马中 Glu 含量、Glu/GABA 比值均极显著降低( $P<0.01$ )、GABA 含量极显著升高( $P<0.01$ ); 大豆肽粉组小鼠海马中 Glu 含量极显著降低( $P<0.01$ )、Glu/GABA 比值极显著降低( $P<0.01$ )。

### 3 讨论与结论

大小鼠啮齿类动物与人类存在相似的睡眠稳态和神经生化调节机制<sup>[34-35]</sup>, 被广泛应用于失眠症及催眠药物的研究。失眠动物模型建立方法主要分为物理法和化学法两大类, 其中, PCPA 化学法造模是目

表 3 酸枣仁茯苓粉、大豆肽粉对失眠模型小鼠 Glu 和 GABA 含量的影响(n=10)

Table 3 The effect of *Ziziphi spinosae Semen Poria cocos* powder and soybean peptide powder on the content of Glu and GABA in insomnia model mice (n=10)

组别	Glu( $\mu$ mol/L)	GABA( $\mu$ mol/L)	Glu/GABA
正常对照组	235.6±26.2	1.44±0.26	168.1±29.9
模型对照组	282.5±30.2 <sup>##</sup>	1.15±0.13 <sup>##</sup>	247.3±28.3 <sup>##</sup>
低剂量组(0.67 g/kg BW)	263.7±19.3 <sup>#</sup>	1.34±0.17*	200.3±29.1 <sup>##</sup>
酸枣仁茯苓粉 中剂量组(1.33 g/kg BW)	244.4±23.4 <sup>**</sup>	1.31±0.12	188.7±34.4 <sup>**</sup>
高剂量组(4.00 g/kg BW)	238.0±22.8 <sup>**</sup>	1.41±0.15 <sup>**</sup>	169.7±14.4 <sup>**</sup>
大豆肽粉组(1.15 g/kg BW)	233.9±29.7 <sup>**</sup>	1.25±0.16	188.8±29.0 <sup>**</sup>

前公认并广泛用于 5-HT 及与其他递质之间关系研究的经典动物模型<sup>[36]</sup>。该模型可以维持两周,在 5-HT 含量降低的同时,伴有下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 功能的紊乱<sup>[37]</sup>,从而导致某些神经递质如 5-HT、NE、GABA、Glu 等含量变化和比例失衡,诱发昼夜节律失调性睡眠觉醒障碍。本研究在 PCPA 失眠动物模型的基础上,进行了戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期和睡眠时间试验、旷场试验同时测定脑组织特定结构中的神经递质含量,进而论证酸枣仁茯苓粉与其辅料中单一组分大豆肽粉改善睡眠的作用。

睡眠实验以失眠小鼠为研究对象,证实了酸枣仁茯苓粉具有改善睡眠作用。比较《保健食品功能检验与评价方法(2022年版)(征求意见稿)》中该功能评价方法使用正常小鼠为对象,既验证了该模型的稳定性、灵敏性,也更接近于失眠人群,为改善睡眠评价方法提供动物模型的数据支持。

脑组织中 5-HT、NE、GABA、Glu 等神经递质含量测定作为改善睡眠评价指标已有大量研究。本实验以 PCPA 诱导的失眠小鼠为研究对象,证实酸枣仁茯苓粉能够显著提高其下丘脑中 5-HT 含量,这可能与酸枣仁茯苓粉可调控小鼠下丘脑 5-HT 含量及其受体表达有关<sup>[6]</sup>。在今后研究中,测定 5-HT<sub>(1A)</sub>RmRNA 与 5-HT<sub>(2A)</sub>RmRNA 的表达,从分子生物学角度解释其改善睡眠的机制。

综上所述,酸枣仁茯苓粉表现出改善失眠小鼠睡眠的作用,与戊巴比妥钠的协同作用较强。主要机理是通过升高失眠小鼠下丘脑组织中的单胺类神经递质 5-HT 含量,降低 NE 含量,促使失眠小鼠的睡眠-觉醒状态向正常恢复;调节海马组织中的 Glu 和 GABA 含量,维持 Glu 和 GABA 的稳态平衡,从而发挥改善失眠小鼠睡眠的作用。

虽然通过本次研究还未能确定酸枣仁茯苓粉辅料中大豆肽粉这一单一组分具有改善睡眠的作用,但观察到其对失眠小鼠睡眠时间有一定的延长,并在维持 Glu 和 GABA 的稳态平衡方面有一定效果。同时有文献报道,大豆肽含有人体所需的多种必需氨基酸,可抑制神经元细胞内氧化应激反应产生大量的活性氧簇及脂质过氧化产物,避免神经元细胞膜或细胞器受损而引发的细胞凋亡<sup>[38]</sup>。因此,在今后的研究中,加大大豆肽粉用量,从睡眠发生相关的中枢神经系统内特定的结构神经元细胞入手,探寻其对失眠模型动物神经元细胞损伤的改善机制,为其应用于改善睡眠保健食品提供数据支持。

### 参考文献

[1] 张鹏,李雁鹏,吴惠涓,等.中国成人失眠诊断与治疗指南(2017版)[J].中华神经科杂志,2018,51(5):324-335. [ZHANG P, LI Y P, WU H J, et al. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of insomnia in adults (2017 Edition)[J]. Chinese Journal of Neurology, 2018, 51(5): 324-335.]

[2] RIEMANN D, BAGLIONI C, BASSETTI C, et al. European guideline for the diagnosis and treatment of insomnia[J]. J Sleep Res, 2017, 26(6): 675-700.

[3] CAO X L, WANG S B, ZHONG B L, et al. The prevalence of insomnia in the general population in China: A meta-analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170772.

[4] RIEMANN D, NISSEN C, PALAGINI L, et al. The neurobiology investigation, and treatment of chronic insomnia[J]. Lancet Neurol, 2015, 14(5): 547-558.

[5] 贾玉,贾跃进,郑晓琳.中医对失眠认识的探讨及展望[J].中华中医药杂志,2015,30(1):163-166. [JIA Y, JIA Y J, ZHENG X L. Discussion and prospect on the knowledge of insomnia from traditional chinese medicine[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2015, 30(1): 163-166.]

[6] 章新友,王姝,唐琳萍,等.酸枣仁汤治疗失眠及作用机制研究进展[J].中华中医药学刊,2022,40(10):1-7. [ZHANG X Y, WANG S, TANG L P, et al. Research and progress of Suanzaoren Decoction in the treatment of insomnia and its mechanism[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2022, 40(10): 1-7.]

[7] 李文康.针刺对PCPA失眠大鼠海马5-HT递质、5-HT<sub>(1A)</sub>R(5-HT<sub>(2A)</sub>R)/AC信号通路与二者关联性影响研究[D].南宁:广西中医药大学,2020. [LI W K. Study on the effects of acupuncture on 5-HT transmitter, 5-HT<sub>(1A)</sub>R(5-HT<sub>(2A)</sub>R)/AC signal pathway in hypothalamus of rats with insomnia induced by PCPA[D]. Nanning: Guangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2020.]

[8] 梁悦.脑干蓝斑核至腹外侧视前区的去甲肾上腺素能神经环路调控睡眠-觉醒的功能及其机制的研究[D].合肥:安徽医科大学学报,2021. [LIANG Y. The function and mechanism of the Nergic circuit from locus coeruleus to ventrolateral preoptic area in regulating sleep-wake[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021.]

[9] SUHYEON K, KYUNGAE J, KI B H, et al. GABA and L-theanine mixture decreases sleep latency and improves NREM sleep[J]. Pharmaceutical Biology, 2019, 57(1): 65-73.

[10] 张琦.金匱要略讲义[M].上海:上海科学技术出版社,2008:76-77. [ZHANG Q. Synopsis of the golden chamber[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2008: 76-77.]

[11] 李中梓.雷公炮制药性解[M].北京:人民军医出版社,2013:124. [LI Z Z. The pharmaceutical solution of Lei Gong processing[M]. Beijing: People's Military Surgeon, 2013: 124.]

[12] 闫艳,张敏,崔小芳,等.酸枣仁化学成分体内过程及其质量标志物研究思路探讨[J].中草药,2019,50(2):299-309. [YAN Y, ZHANG M, CUI X F, et al. Discussion on research ideas for process of chemical compositions from Ziziphi spinosae Semen and its quality marker[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2019, 50(2): 299-309.]

[13] 李旭,和建政,陈彻,等.酸枣仁镇静催眠活性成分及药理作用研究进展[J].中华中医药学刊,2022,40(2):23-31. [LI X, HE J Z, CHEN C, et al. Research progress on sedative-hypnotic effect of active components in Suanzaoren[J]. Chinese Archives of TR Additonal Chinese Medicine, 2022, 40(2): 23-31.]

[14] CHEN C Y, CHEN Y F, TSAI H Y. What is the effective

component in suanzaoren decoction for curing insomnia? Discovery by virtual screening and molecular dynamic simulation[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2008, 26(1): 57-64.

[15] 杜晨晖, 崔小芳, 裴香萍, 等. 酸枣仁皂苷类成分及其对神经系统作用研究进展[J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1258-1268. [DU C H, CUI X F, PEI X P, et al. Research progress on *Ziziphi spinosae Semen* saponins and its biological action on nervous system[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2019, 50(5): 1258-1268.]

[16] 胡金颖, 代立霞, 张丹参, 等. 酸枣仁中黄酮类物质药理作用研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 785-786. [HU J Y, DAI L X, ZHANG D S, et al. Research progress on pharmacological effects of *Ziziphi spinosae semen*[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2021, 35(10): 785-786.]

[17] WANG L E, BAI Y J, SHI X R, et al. Spinosin, a C-glycoside flavonoid from *Ziziphi spinosae semen*, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system[J]. *Pharm Biochem Behav*, 2008, 90(3): 399-403.

[18] 王影, 蔡栋梁, 黄佳滨, 等. 酸枣仁提取物对失眠小鼠脑内 DA, NE 的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2016, 39(2): 23-24. [WANG Y, CAI D L, HUANG J B, et al. Effects of *Ziziphi spinosae semen* on DA and NE in the brain of insomnia mice[J]. *Heilongjiang Medicine And Pharmacy*, 2016, 39(2): 23-24.]

[19] 孙梦娜, 叶辉宇, 李强明, 等. 茯苓不同溶剂提取物改善小鼠睡眠作用的比较[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6): 43-49. [SUN M N, YE H Y, LI Q M, et al. Improved sleep in mice treated with *Wolfiporia extensa* extracts produced using different solvents[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(6): 43-49.]

[20] 赵天国. 茯苓多糖对小鼠镇静、催眠作用的研究[J]. *畜牧与饲料科学*, 2017, 38(4): 73-74. [ZHAO T G. Study on sedative and hypnotic effects of *Poria cocos* polysaccharide on mice[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2017, 38(4): 73-74.]

[21] 张清竹, 石达理, 许亮, 等. 刺五加和五加皮的本草考证[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2017, 15(18): 146-148. [ZHANG Q Z, SHI D L, XU L, et al. Examination and verification of *acanthopanax* and *cortex acanthopanax*[J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2017, 15(18): 146-148.]

[22] 周兰云, 张叶飞. 刺五加总苷对快速眼动睡眠剥夺小鼠学习记忆的作用研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(6): 703-706. [ZHOU L Y, ZHANG Y F. Effect of total glycosides of *acanthopanax senticosus* on learning and memory of young rats with rapid eye movement sleep deprivation[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2021, 37(6): 703-706.]

[23] 易国富, 张健, 李赫, 等. 大豆肽对果蝇睡眠的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2020, 36(4): 63-69. [YI G F, ZHANG J, LI H, et al. Effects of daidzein on *drosophila* sleep soybean peptide[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 36(4): 63-69.]

[24] 蒋洁, 赵百孝, 哈略, 等. 不同波形电针对 PCPA 致失眠大鼠下丘脑 5-HT 和 Glu, GABA 含量的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2015, 34(7): 678-681. [JIANG J, ZHAO B X, HA L, et al. Effects of electroacupuncture with different waveforms on the contents of 5-HT, Glu and GABA in hypothalamus of PCPA induced insomnia rats[J]. *Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion*,

2015, 34(7): 678-681.]

[25] 梁薇. 针刺对 PCPA 失眠模型大鼠行为学及下丘脑 5-HT、Glu、GABA 递质含量影响研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2019. [LIANG W. Effect of acupuncture on behavior and hypothalamic 5-HT, Glu, GABA transmitter content in PCPA insomnia model rats[D]. Nanning: Guangxi University of Chinese Medicine, 2019.]

[26] 程少冰. 针刺对不同时段睡眠剥夺所致失眠大鼠模型行为学及多种细胞因子水平的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010. [CHENG S B. Effects of acupuncture on behavior and cytokine levels of insomnia rat model induced by sleep deprivation in different periods[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2010.]

[27] STINO F K. Divergent selection for pentobarbital-induced sleeping times in mice[J]. *Pharmacology*, 1992, 44(5): 257-259.

[28] 郭海波, 王慧. 酸枣仁汤治疗失眠现代机制研究进展与探讨[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(12): 2963-2966. [GUO H B, WANG H. Mechanism and research progress of Suanzaoren decoction treating insomnia[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 37(12): 2963-2966.]

[29] 李悦, 王慧, 姚欣雨, 等. 酸枣仁汤对 PCPA 失眠大鼠学习记忆功能及海马突触可塑性相关蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(8): 12-20. [LI Y, WANG H, YAO X Y, et al. Effect of Suanzaoren Tang on learning, memory and expression of proteins related to hippocampal synaptic plasticity in PCPA-induced insomnia rat model[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2022, 28(8): 12-20.]

[30] 李欣坪, 牛延菲, 王蒙蒙, 等. 以酸枣仁、茯苓为主的复方固体饮料改善睡眠的作用研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(11): 4453-4458. [LI X P, NIU Y F, WANG M M, et al. Study on the effect of a compound solid beverage mainly composed of *semen Ziziphi Spinosae* and *poriacocos* on improving sleep[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(11): 4453-4458.]

[31] 夏天吉, 闫明珠, 王智, 等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(3): 428-435. [XIA T J, YAN M Z, WANG Z, et al. Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2022, 30(3): 428-435.]

[32] BUCHANAN-HUGHES A, PASHLEY A, FEUILLY M, et al. Carcinoid heart disease: Prognostic value of 5-hydroxyindoleacetic acid levels and impact on survival: A systematic literature review[J]. *Neuroendocrinology*, 2021, 111(1-2): 1-15.

[33] 孙延娜, 梁可, 李阳, 等. 滋阴养血安神方对 PCPA 诱导失眠小鼠睡眠的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(4): 944-947. [SUN Y N, LIANG K, LI Y, et al. Effect of Ziyinyangxueanshen decoction on sleep of mice models with insomnia induced by PCPA[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 37(4): 944-947.]

[34] 兰妮. 失眠大鼠电针后不同时间单胺类和氨基酸类递质的变化[D]. 广州: 暨南大学, 2010. [LAN N. Changes of monoamine and amino acid transmitters in insomnia rats at different times after electroacupuncture[D]. Guangzhou: Jinan University, 2010.]

[35] 陈鹏典, 杨卓欣, 黎杰运, 等. 针灸治疗失眠症的机制研究进

- 展[J]. 中国医药导报, 2015, 12(9): 43-46. [CHEN P D, YANG Z X, LI J Y, et al. Research progress on the mechanism of acupuncture and moxibustion in the treatment of insomnia[J]. China Medical Herald, 2015, 12(9): 43-46.]
- [36] 王振华. 枣参安神颗粒治疗失眠的药效学实验研究及机制探讨[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2011. [WANG Z H. Pharmacodynamic experimental study and mechanism of Zaoshen Anshen granule in the treatment of insomnia[D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2011.]
- [37] 张殿全, 孙忠人, 徐先伟. 针刺四神聪对失眠大鼠下丘脑内5-HT、5-HIAA含量的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(9): 1975-1977. [ZHANG D Q, SUN Z R, XU X W. Effect of acupuncture at Sishencong on the contents of 5-HT and 5-HIAA in hypothalamus of insomnia rats[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2009, 27(9): 1975-1977.]
- [38] 刘卫云, 程志国, 徐宛玲, 等. 大豆肽改善阿尔茨海默病小鼠学习记忆行为的抗氧化应激和抗凋亡机制[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40: 1727-1732. [LIU W Y, CHENG Z G, XU W L, et al. Soybean peptide ameliorating the cognitive function of mice with Alzheimer's disease induced by A $\beta$ 25-35 via anti-oxidative stress and apoptosis[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2020, 40: 1727-1732.]