

酪蛋白源肽TPTLN助睡眠作用及其机制

邓世洁¹, 刘 玲², 黄 菊^{1,*}, 冯凤琴^{2,*}, 赵敏洁², 杜 鹃³

(1.浙江海洋大学食品与药学学院, 浙江 舟山 316000; 2.浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310000;

3.杭州康源食品科技有限公司, 浙江 杭州 310003)

摘 要: 目的: 明确酪蛋白源肽TPTLN的助睡眠作用并探究其可能的作用机制。方法: 将30只小鼠平均分成3组, 实验组灌胃酪蛋白源肽TPTLN (剂量为5 mg/kg m_b), 阳性组腹腔注射地西洋 (剂量为1 mg/kg m_b), 对照组灌胃灭菌水 (剂量为5 mg/kg m_b), 所有实验小鼠每日称质量, 连续给药7 d后进行戊巴比妥钠诱导睡眠行为学实验, 评估睡眠质量, 再继续给药4 d后进行解剖取样; 通过酶联免疫吸附试验测定小鼠血清和脑组织中5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、5-羟基吲哚乙酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)、谷氨酸 (glutamate, Glu)、 β -内啡肽 (β -endorphin, β -EP)、皮质醇、去甲肾上腺素 (noradrenaline, NE) 的质量浓度以及对GABA/Glu值进行评估; 实时荧光定量聚合酶链式反应分析TPTLN对下丘脑中 γ -氨基丁酸A型受体 $\alpha 1$ 亚单位 (γ -aminobutyric acid A receptor $\alpha 1$, $GABA_A-\alpha 1$) 和5-羟色胺受体1A (5-hydroxytryptamine receptor 1A, 5-HT1A) mRNA相对表达水平的影响。结果: 相比于对照组, TPTLN在戊巴比妥钠的协同下可以提高小鼠的入睡率至100%, 睡眠潜伏期显著缩短31.7% ($P < 0.05$), 睡眠时长延长1.1倍 ($P < 0.05$); 血清和脑组织中GABA/Glu的比值分别提高了68.8%和19.3%, 明显改善了GABA/Glu抑制/兴奋代谢失衡 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$), 血清中GABA的质量浓度高度显著提高了49.4% ($P < 0.001$), 脑组织中5-HT的水平上升了7.6%, 脑组织中皮质醇、NE的含量分别显著降低了24.3%和23.4% ($P < 0.05$); 显著上调了 $GABA_A-\alpha 1$ 和5-HT1A基因表达水平 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 分别是对照组的1.5倍和1.3倍。结论: 酪蛋白源肽TPTLN具有良好的助睡眠作用, 其机制可能与调控 $GABA_A-\alpha 1$ 、5-HT1A的水平及脑内神经递质GABA、Glu、5-HT、皮质醇、NE的含量有关。

关键词: 酪蛋白肽; 助睡眠; 神经递质; 作用机制

Sleep-Aiding Effect of Casein-Derived Peptide TPTLN and Its Underlying Mechanism

DENG Shijie¹, LIU Ling², HUANG Ju^{1,*}, FENG Fengqin^{2,*}, ZHAO Minjie², DU Juan³

(1. Food and Pharmacy College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;

2. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310000, China;

3. Hangzhou Kangyuan Food Technology Co. Ltd., Hangzhou 310003, China)

Abstract: Objective: To investigate the sleep-aiding effect of casein-derived peptide TPTLN and explore its possible mechanism of action. Methods: Thirty mice were divided equally into three groups, an experimental, a positive control and a blank control group, which were gavaged with TPTLN at a dose of 5 mg/kg m_b , intraperitoneally injected with diazepam at a dose of 1 mg/kg m_b , and gavaged with sterilized water at a dose of 5 mg/kg m_b , respectively. The body mass of all the mice was recorded every day. After 7 days of continuous administration, a sodium pentobarbital-induced sleep test was carried out to evaluate sleep quality. Following 4 more days of administration, the mice were euthanized and dissected to collect blood and tissue samples for analysis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), γ -aminobutyric acid (GABA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), glutamate (Glu), β -endorphin (β -EP), cortisol, norepinephrine (NE) in the serum and brain tissue, and the GABA/Glu ratio was evaluated. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the effect of TPTLN on the mRNA relative

收稿日期: 2024-06-17

第一作者简介: 邓世洁 (2001—) (ORCID: 0009-0001-3342-9458), 女, 硕士研究生, 研究方向为食源性活性肽。

E-mail: DDengshijie@163.com

*通信作者简介: 黄菊 (1983—) (ORCID: 0009-0008-3562-0177), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产品相关功能产品及其开发。E-mail: qiuqiu20130621@163.com

冯凤琴 (1964—) (ORCID: 0000-0002-5528-9310), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术、功能性食品开发。E-mail: fengfq@zju.edu.cn

expression levels of γ -aminobutyric acid A receptor $\alpha 1$ ($GABA_A-\alpha 1$) and 5-hydroxytryptamine receptor 1A ($5-HT1A$) in the hypothalamus. Results: Compared with the control group, TPTLN and sodium pentobarbital synergistically increased the sleep onset rate to 100%, significantly shortened the sleep latency by 31.7% ($P < 0.05$), and extended the sleep duration 2.1 times ($P < 0.05$); increased the GABA/Glu ratio in the serum and brain tissue by 68.8% and 19.3%, respectively and significantly improved the excitation/inhibition imbalance ($P < 0.001$, $P < 0.000 1$) as evidenced by a 49.4% increase in the serum GABA level ($P < 0.001$), a 7.6% increase in the brain 5-HT level, and a 24.3% and 23.4% decrease in the brain levels of cortisol and NE ($P < 0.05$); and significantly up-regulated the expression levels of the $GABA_A-\alpha 1$ and $5-HT1A$ genes 1.5 and 1.3 times, respectively ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion: Casein-derived peptide TPTLN exhibited a favorable sleep-aiding effect, and the underlying mechanism may be associated with the regulation of $GABA_A-\alpha 1$ and $5-HT1A$ expression levels, as well as the modulation of neurotransmitter contents including GABA, Glu, 5-HT, cortisol and NE in the brain.

Keywords: casein-derived peptide; sleep aid; neurotransmitters; mechanism of action

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240617-111

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2025) 03-0119-09

引文格式:

邓世洁, 刘玲, 黄菊, 等. 酪蛋白源肽TPTLN助睡眠作用及其机制[J]. 食品科学, 2025, 46(3): 119-127. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240617-111. <http://www.spkx.net.cn>

DENG Shijie, LIU Ling, HUANG Ju, et al. Sleep-aiding effect of casein-derived peptide TPTLN and its underlying mechanism[J]. Food Science, 2025, 46(3): 119-127. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240617-111. <http://www.spkx.net.cn>

经济快速发展伴随着社会竞争加剧, 睡眠障碍已成为普遍的健康问题。睡眠不足可能伴有疲劳、攻击性和焦虑的症状, 还会增加肥胖、高血压等患病风险^[1-3]。睡眠障碍通常需要药物治疗^[4], 目前有效治疗和改善睡眠的化学药物主要有两类: 苯二氮卓类和非苯二氮卓类。苯二氮卓类的药物是临床上使用较多的镇静催眠类的药物, 如地西泮。非苯二氮卓类药物包括佐匹克隆、多塞平等。虽然它们具有起效快、疗效明显等优点, 但长期使用可能会导致成瘾、耐药等不良副作用^[5-6]。因此, 开发寻找一种辅助睡眠的天然食药资源对失眠人群大有裨益。

长期以来, 牛奶一直被认为是天然的助眠剂。有研究表明, 摄入夜间采集的牛奶对小鼠具有镇静和促进睡眠的作用, 其助眠效果与苯二氮卓药物相当, 这主要是因其含有极高的色氨酸和褪黑素^[7]。此外, 牛奶的主要蛋白质成分酪蛋白也有助于促进睡眠。研究表明, 酪蛋白酶解会产生具有多种生物活性的肽^[8-10]。目前已经有多项研究表明, 牛乳酪蛋白来源的生物活性肽可以起到安神助眠的功效^[11]。睡眠-觉醒是一个复杂的生理过程, 受大脑多个区域活动的调控, 其中神经递质系统起着非常重要的作用^[12-13]。有研究表明, 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、谷氨酸 (glutamate, Glu) 等神经递质水平及其相应受体蛋白的功能调控对睡眠有一定的影响^[14-16]。Dela Peña等^[17]已证实牛乳 α_{s1} -酪蛋白的胰蛋白酶水解产物通过 γ -氨基丁酸A型受体 (γ -aminobutyric acid A receptor, $GABA_A$) 促进戊巴比

妥钠诱导的小鼠睡眠, 水解产物中含有一种具有助睡眠功能活性的十肽YLGYLEQLLR。Qian Jingjing等^[18]证明了牛乳酪蛋白水解物可以显著促进戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠, 且酪蛋白水解产物中的六肽YPVEPF (5 mg/kg) 具有显著的促小鼠睡眠功效。Chen Yuanyuan等^[19]从牛乳酪蛋白水解物中鉴定了4条 α_{s1} -酪蛋白来源具有助睡眠活性的肽段序列 (HQGLPQEVLENLLR、YKVPQLEIVPNSAEER、HPIKHQGLPQEVLENLLR和VPQLEIVPNSAEER), 并利用线虫模型验证了它们的助眠活性。本课题组前期通过液相色谱-串联质谱分析, 并利用Schrodinger软件将分析得到的肽段与 $GABA_A$ 受体蛋白6HUO进行批量分子对接, 最终发现了诺衍®酪蛋白水解物中有一种具有助睡眠活性的五肽TPTLN。前期研究表明, 苯二氮卓位点主要由6个主要的氨基酸残基 (His102、Asn60、Phe100、Tyr58和Tyr160) 组成^[20]。氢键和亲脂性接触是形成稳定的肽- $GABA_A$ 受体复合物的主要相互作用力, 研究表明酪蛋白水解物来源的YPVEPF和YFYPEL激活GABA的能力主要依赖于N端的酪氨酸和 $GABA_A$ 受体中的His102、Ser205以及Thr142残基形成重要的氢键^[18]。分子对接结果显示, TPTLN与 $GABA_A$ 受体的结合位点分别为Ser205、Asn60、Tyr210、Glu138、Thr207、Lys156、Asn103和Ser195 (图1), 根据结果推测其可能具有潜在的助睡眠功效。因此, 本研究通过合成五肽TPTLN, 以地西泮为阳性对照, 对比验证TPTLN的助睡眠活性, 并探究其可能的作

用机理。旨在为开发乳源酪蛋白水解物相关的助睡眠功能性食品提供实验依据,为酪蛋白源肽的实际应用奠定基础。

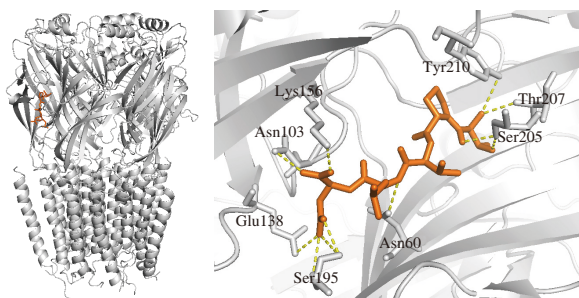


图1 GABA_A受体6HUO与TPTLN的分子对接示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the molecular docking between GABA_A receptor 6HUO and TPTLN

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

五肽TPTLN(纯度98%)委托吉尔生化(上海)有限公司合成。

实验动物选用8周龄雄性ICR小鼠,平均体质量为 (20 ± 2) g,购自上海斯莱克实验动物有限公司(动物生产许可证号:SCXK(沪)2022-0004),经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会审核批准,批准编号IACUC-20220124-03,于浙江中医药大学动物实验研究中心开展实验,实验操作严格按照实验动物福利伦理的原则和规范进行;普通饲料购自江苏协同生物科技有限公司。

生理盐水(0.09%氯化钠溶液)、氯仿 国药集团化学试剂有限公司;地西洋片 天津力生制药股份有限公司;戊巴比妥钠 北京化学试剂研究所有限责任公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) 大连美仑生物技术有限公司;酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒 武汉基因美生物科技有限公司;异丙醇 上海麦克林生化科技股份有限公司;逆转录试剂(HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper))、TRIzol、实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)试剂(chamQ SYBR Color qPCR Master Mix) 南京诺唯赞生物科技股份有限公司;5-羟色胺受体1A(5-hydroxytryptamine receptor 1A, 5-HT1A)、GABA_A-α1基因引物 浙江尚亚生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

KZ-III研磨仪 武汉赛维尔生物科技有限公司;H750K冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;LBA0-150H鼓风干燥箱 施都凯仪器设备(上海)

有限公司;Infinite M200 PRO Nanoquant酶标仪 瑞士Tecan公司;Nanodrop one超微量紫外-可见分光光度计 美国Thermo Fisher Scientific公司;lightCycler480®II荧光定量PCR仪 瑞士Roche公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与饲养

8周龄雄性ICR小鼠于 $18 \sim 26$ °C、相对湿度 (50 ± 10) %的屏障环境中饲养,自由采食和饮水,在实验前所有小鼠先适应环境7 d。将小鼠分为3组,分别为对照组、地西洋组、TPTLN组,每组10只。对照组小鼠每日灌胃灭菌水,剂量为 $5 \text{ mg/kg } m_b$;地西洋组(生理盐水溶解地西洋)给药剂量为 $1 \text{ mg/kg } m_b$,每日给药2次,上午下午各1次,给药方式为腹腔注射;TPTLN组(灭菌水溶解TPTLN)每日灌胃剂量为 $5 \text{ mg/kg } m_b$ 。所有给药体积均为 $0.1 \text{ mL}/10 \text{ g } m_b$ 。

1.3.2 戊巴比妥钠诱导小鼠行为学实验

所有小鼠按上述连续给药7 d,末次给药0.5 h后,腹腔注射戊巴比妥钠(42 mg/kg ,生理盐水溶解)。同时记录注射时间 T_1 ,待小鼠翻正反射消失时,记录翻正反射消失时间 T_2 ,即为小鼠入睡时间,待小鼠翻正反射恢复,即为小鼠醒来时间 T_3 。分别计算小鼠的入睡率、睡眠潜伏期和睡眠时长,入睡率越高、睡眠潜伏期越短、睡眠时长越长,说明肽的助睡眠效果越好。按式(1)、(2)分别计算各组小鼠的睡眠潜伏期和睡眠时长:

$$\text{睡眠潜伏期}/s = T_2 - T_1 \quad (1)$$

$$\text{睡眠时长}/s = T_3 - T_2 \quad (2)$$

待睡眠记录结束后,继续按照上述剂量给药4 d,末次早晨给药1 h后,将小鼠安乐死,眼球取血,收集血液,在 $3\,000 \text{ r/min}$ 、 4 °C条件下离心10 min,收集血清,冻存于 -80 °C冰箱用于后续分析。同时收集小鼠的脑和下丘脑等组织,冻存于 -80 °C冰箱用于后续分析。

1.3.3 血清及脑组织中神经递质的含量测定

从 -80 °C冰箱中取出脑组织(右半脑),准确称质量。将组织放入离心管中,加入2颗钢珠和1 mL PBS(提前预冷),随后用研磨仪进行研磨(研磨仪上的铁块需预先放入 -20 °C的冰箱中预冷,样品放置时需注意配平),按照预设参数(频率 60 Hz 、时间 60 s 、暂停时间 5 s)研磨2次。研磨完后 4 °C静置5 min,随后 $12\,000 \text{ r/min}$ 离心5 min。取上清液用于神经递质的检测,为避免样品反复冻融,将样品分装后做好标记。使用ELISA试剂盒测定小鼠血清和脑组织中神经递质的含量。

1.3.4 qPCR分析

用TRIzol试剂将各组小鼠的下丘脑粉碎,然后在 4 °C、 $12\,000 \text{ r/min}$ 条件下离心10 min,取上清液。依次加入氯仿和异丙醇提取总RNA,使用超微量紫外-可见分光光度计测定组织中RNA的浓度和纯度后,将RNA逆转录成cDNA,所有操作均在冰上进行。设计

目的基因5-*HT1A*、*GABA_A-α1*引物，以β-*actin*为内参基因，配制反应体系进行扩增。PCR扩增反应体系：5 μL 2×qPCR Mix，1 μL反转录产物cDNA，2.5 μL ddH₂O；基因引物体系：1.5 μL。在相同的反应条件下同时扩增目的基因和内参基因。使用qPCR仪lightCycler 480®II系统进行分析。以β-*actin*为内参，计算5-*HT1A*和*GABA_A-α1*亚基的mRNA水平，以2^{-ΔΔC_t}计算产物的相对表达量。内参基因和目的基因引物序列见表1。

表1 内参基因和目的基因的引物设计
Table 1 Primers designed for amplification of reference genes and target genes

基因	引物序列
5- <i>HT1A</i>	F: 5'-TACTCCACTTTTCGGCGCTTT-3' R: 5'-GGCTGACCATTCAGGCTCTT-3'
<i>GABA_A-α1</i>	F: 5'-CATGACAGTGCTCCGGCTAA-3' R: 5'-GCTCTCACGGTCAACCTCAT-3'
β- <i>actin</i>	F: 5'-GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3' R: 5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3'

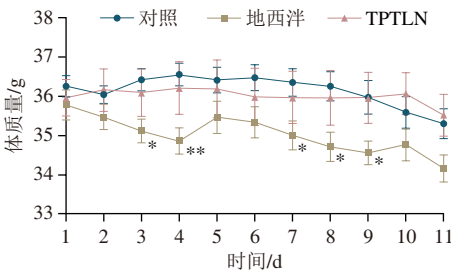
1.4 数据统计与分析

所有数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Graphpad Prism version 9.5.1软件对数据进行单因素方差分析（One-way ANOVA）和Dunnett多重检验评估统计学显著性。

2 结果与分析

2.1 TPTLN对小鼠体质量的影响

小鼠体质量在一定程度上能反映小鼠的生长状况。适应期称质量后，将30只小鼠分配至6个笼子中，5只/笼，使每笼小鼠体质量均等，给药期间每天称质量（给药前）。如图2所示，给药期间小鼠的状态正常、精神状态良好，进食量、饮水量稳定，给药前各组体质量无显著差异。给药期间地西洋组体质量出现明显的下降趋势，其中第3、4、7、8、9天与对照组相比具有显著差异（ $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ）。这可能是由于地西洋的助眠作用导致小鼠睡眠时长延长，进食时间缩短，从而使其体质量下降。TPTLN组小鼠体质量与对照组相比无显著差异。



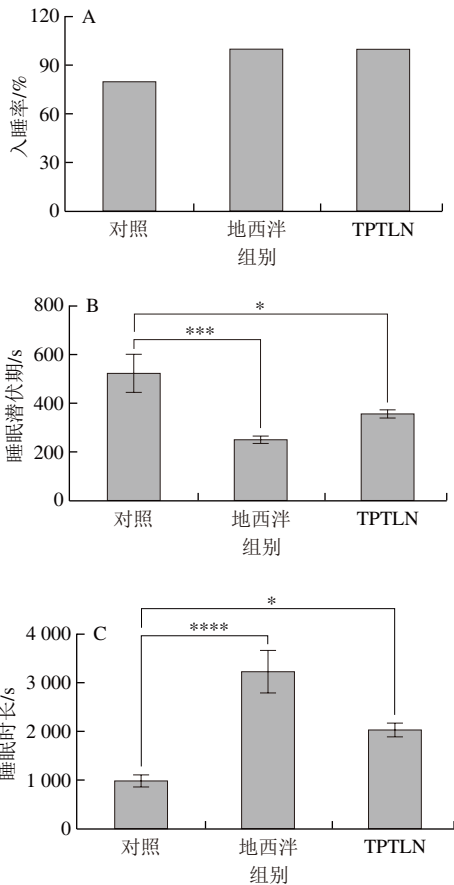
*、**、***. 分别为与对照组相比，差异显著（ $P < 0.05$ ）、差异极显著（ $P < 0.01$ ）； $n = 10$ 。下同。

图2 TPTLN对小鼠体质量的影响

Fig. 2 Effect of TPTLN on body mass of mice

2.2 TPTLN对戊巴比妥钠诱导睡眠行为的影响

通过戊巴比妥钠睡眠行为学实验探究TPTLN协同戊巴比妥钠对小鼠睡眠的影响，结果如图3所示。地西洋组的睡眠潜伏期（ 251.0 ± 14.0 s）相比于对照组（ 524.4 ± 76.7 s）高度显著缩短52.1%（ $P < 0.001$ ）（图3B）；同时延长睡眠时长至（ 3247.0 ± 422.5 s）（ $P < 0.0001$ ），是对照组（ 973.8 ± 128.5 s）的3.3倍（图3C）。此外，TPTLN组小鼠的入睡率达到100%，与地西洋组的效果相当（图3A）；同时与对照组相比，TPTLN也显著缩短小鼠的睡眠潜伏期至（ 358.3 ± 14.7 s）（ $P < 0.05$ ），相比对照组缩短了31.7%（图3B）；TPTLN显著延长小鼠睡眠时长至（ 2054.0 ± 125.5 s）（ $P < 0.05$ ），是对照组的2.1倍（图3C）。结果表明，TPTLN具有良好的助睡眠功能。



A.入睡率；B.睡眠潜伏期；C.睡眠时长。***、****.分别为与对照组相比，差异高度显著（ $P < 0.001$ ）、差异极其显著（ $P < 0.0001$ ），下同。

图3 TPTLN对戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠行为的影响

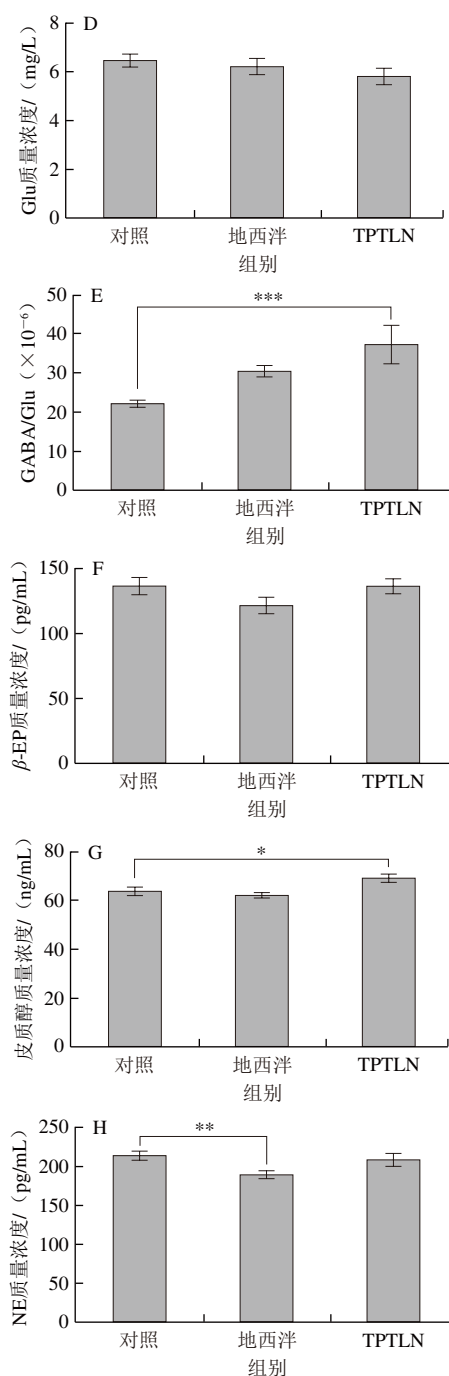
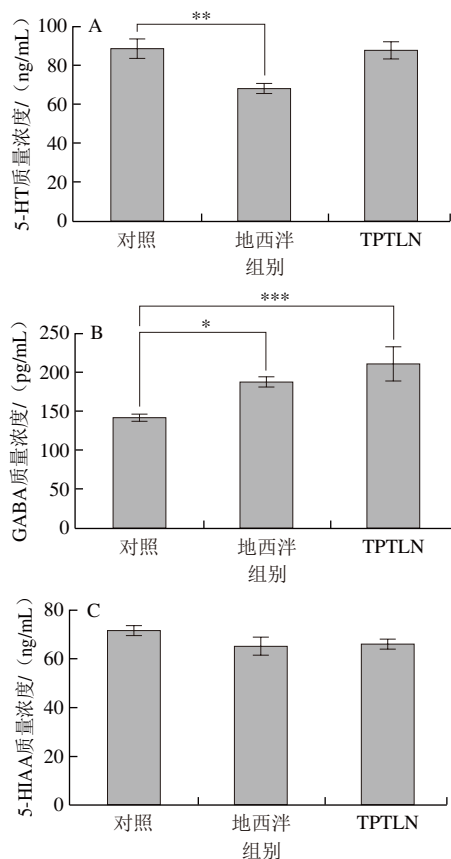
Fig. 3 Effects of TPTLN on pentobarbital sodium-induced sleep behavior of mice

2.3 TPTLN对小鼠血清中神经递质含量的影响

如图4A所示，在TPTLN的干预下，小鼠血清中的5-HT质量浓度与对照组相比无显著差异，但地西洋却极显著下调了血清中5-HT的质量浓度（ $P < 0.01$ ），相比

于对照组下调了23.3%。如图4B所示,与对照组相比,地西洋和TPTLN均显著提高了小鼠血清中的GABA质量浓度($P<0.05$, $P<0.001$),其中TPTLN组小鼠血清中的GABA质量浓度达到(211.5 ± 20.9) pg/mL,提高了49.4%。如图4C所示,5-HT的代谢产物5-羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA)的质量浓度变化趋势与5-HT相似,地西洋组、TPTLN组的5-HIAA质量浓度均略有下降,但无显著差异。此外,小鼠血清中Glu的质量浓度在地西洋和TPTLN的干预下均有所下降,相比于对照组分别下降了3.5%和10.0%(图4D)。如图4E所示,在TPTLN的干预下,GABA/Glu比值相比于对照组高度显著升高了68.8%($P<0.001$),地西洋组相对对照组也有上升的趋势,但无显著差异。

另一方面,与对照组相比,地西洋组小鼠血清中 β -内啡肽(β -endorphin, β -EP)的质量浓度有所下降,而TPTLN组小鼠血清中 β -EP的质量浓度与对照组持平(图4F)。皮质醇作为一种周期性、节律性分泌的激素,在血清中的浓度于凌晨达到最低、早晨达到峰值。如图4G所示,小鼠血清中皮质醇的质量浓度在TPTLN的干预后有所升高,相比于对照组上升了8.5%,这可能与皮质醇的复杂昼夜分泌节律有关。此外,小鼠血清中去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)的质量浓度在TPTLN的干预后未发生显著变化,在地西洋干预后极显著下降了11.6%($P<0.01$)(图4H)。



A. 5-HT; B. GABA; C. 5-HIAA; D. Glu; E. GABA/Glu; F. β -EP; G. 皮质醇; H. NE。图5同。

图4 TPTLN对小鼠血清中神经递质的影响

Fig. 4 Effect of TPTLN on neurotransmitter levels in serum of mice

2.4 TPTLN对小鼠脑组织中神经递质含量的影响

在神经元水平上,脑中的特定区域如下丘脑、脑干和丘脑,与5-HT、GABA等神经递质相互作用,进而促进或抑制睡眠^[21-22]。与对照组相比,地西洋未能提高小鼠脑组织中5-HT、GABA的质量浓度,在TPTLN干预后小鼠脑组织中5-HT、GABA的质量浓度分别升高了7.6%和10.6%,但并无显著差异(图5A、B)。在地西洋、

TPTLN的干预下, 5-HT代谢产物5-HIAA的质量浓度呈现与5-HT相似的趋势, 也与对照组无明显差异(图5C)。如图5D、E所示, 经地西泮、TPTLN干预后Glu的质量浓度均有所下降, 尤其是TPTLN组相比于对照组下降了7.5%; 同时小鼠脑组织中GABA/Glu的比值也均有所升高, 尤其是TPTLN组相比于对照组明显升高了19.3% ($P<0.0001$)。

如图5G、H所示, 相比于对照组, TPTLN显著降低了小鼠脑组织中皮质醇和NE的质量浓度 ($P<0.05$), 分别下降了24.3%和23.4%。而各组小鼠脑上清中 β -EP的质量浓度无明显差异(图5F)。因此可以推测, TPTLN的协同助睡眠作用可能主要是通过改善GABA/Glu的抑制/兴奋代谢失衡、调节5-HT的合成与代谢、降低皮质醇和NE的水平实现。

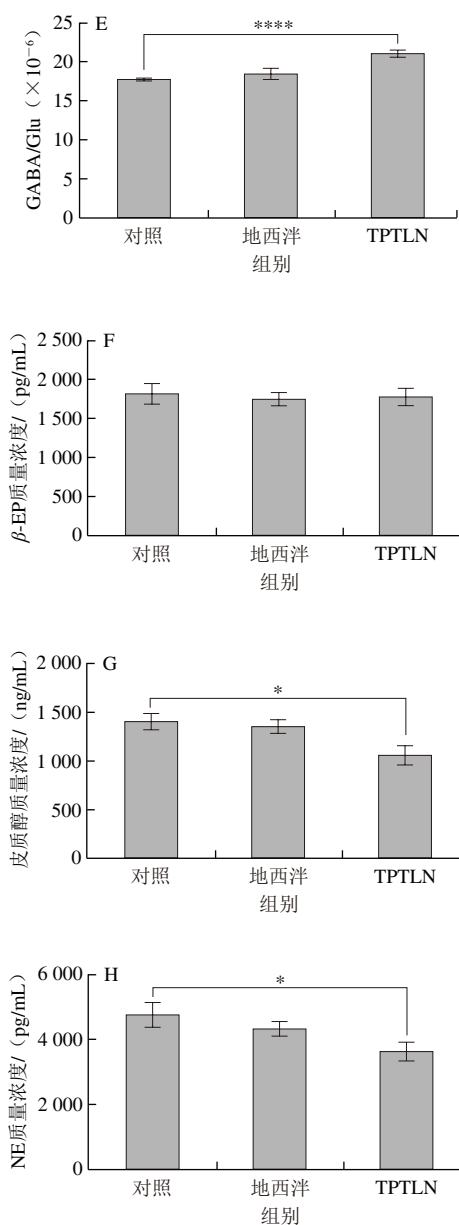
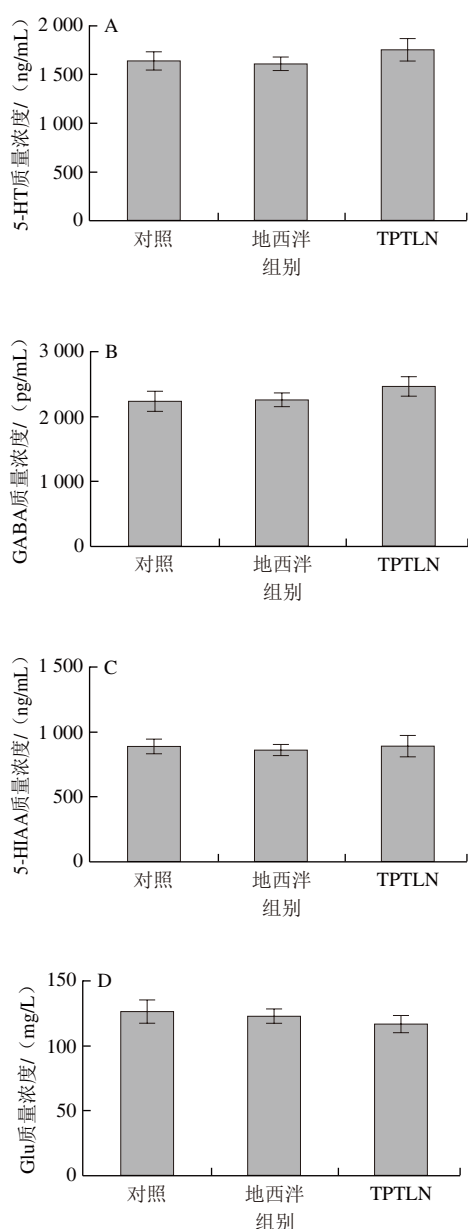
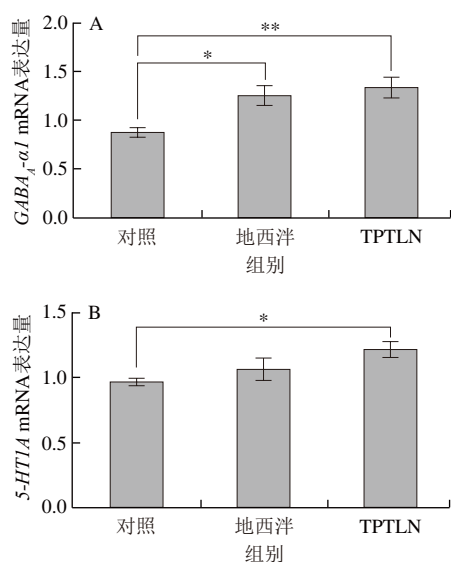


图5 TPTLN对小鼠脑组织中神经递质的影响

Fig. 5 Effect of TPTLN on neurotransmitter levels in brain tissue of mice

2.5 TPTLN对小鼠下丘脑中mRNA表达水平的影响

为了进一步探究TPTLN调节相关神经递质的机制, 从基因层面测定GABA_A受体和5-HT受体mRNA的表达水平, 以检测TPTLN是否影响转录过程。如图6A所示, 与对照组相比, 在TPTLN的干预下GABA的转录水平极显著升高 ($P<0.01$), 是对照组的1.5倍。如图6B所示, 5-HT的转录水平也在TPTLN的干预下显著升高 ($P<0.05$), 是对照组的1.3倍。根据实验结果推测TPTLN可能通过提高GABA_A- $\alpha 1$ 和5-HT1A表达水平抑制神经元细胞的激动, 以实现助睡眠功能和神经调控。



A. $GABA_A-\alpha 1$ mRNA表达量; B. $5-HT1A$ mRNA表达量。

图6 TPTLN对小鼠下丘脑中 $GABA_A-\alpha 1$ 和 $5-HT1A$ mRNA的影响

Fig. 6 Effect of TPTLN on mRNA expression of $GABA_A-\alpha 1$ and $5-HT1A$ in the hypothalamus of mice

3 讨论与结论

本研究通过戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠实验探究酪蛋白源五肽TPTLN的助睡眠活性。有研究表明,增强戊巴比妥钠诱导睡眠的物质具有中枢作用的促进睡眠特性^[23]。在戊巴比妥钠诱导的行为学实验中,地西洋提高了小鼠的入睡率,同时显著缩短了睡眠潜伏期、延长了睡眠时间。TPTLN也显著缩短了小鼠的睡眠潜伏期、延长了睡眠时间,且其干预后的小鼠入睡率与地西洋组相当,达到了100%。结果表明,TPTLN具有良好的助睡眠活性。

为了进一步探究TPTLN协同戊巴比妥钠助睡眠的作用机制,通过ELISA对小鼠血清和脑组织中神经递质的含量进行测定。 $5-HT$ 、 $GABA$ 、 Glu 等神经递质的水平以及 $GABA/Glu$ 的平衡可用于评估睡眠状况^[24]。本研究结果表明,与对照组相比,TPTLN高度显著提高了小鼠血清中 $GABA$ 的质量浓度,降低了 Glu 的质量浓度,同时明显提高了小鼠血清和脑组织中 $GABA/Glu$ 的比值,而在地西洋的干预下, $GABA/Glu$ 的比值虽有升高,但无显著变化。 $GABA$ 是主要的抑制性神经递质,大脑中几乎所有的神经元都对 $GABA$ 有反应^[25]。在中枢神经系统中, Glu 是主要的兴奋性神经递质,在保持神经系统的兴奋及觉醒方面起关键作用。谷氨酸脱羧酶可以促使体内的兴奋性神经递质 Glu 转化为抑制性神经递质 $GABA$,因此 $GABA$ 与 Glu 之间的平衡,与睡眠质量关系密切^[26]。TPTLN上调了小鼠脑组织中 $5-HT$ 的水平,而血清中并未发现明显差异,这样的趋势在 $5-HIAA$ 的检测中也同样存

在。 $5-HT$ 是另一种重要的抑制性神经递质,缺乏 $5-HT$ 可能导致失眠^[27-28]。但也有研究表明, $5-HT$ 可参与上行激活系统^[29-30],抑制快速眼动睡眠,且高水平的 $5-HT$ 可导致失眠^[31]。另有研究发现 $5-HT$ 受体激动剂会促进失眠模型大鼠觉醒,抑制快速眼动睡眠和非快速眼动睡眠,且不同区域的 $5-HT$ 神经元对睡眠的影响不同^[32]。因此, $5-HT$ 在睡眠的作用机制方面还有待深入研究。 $5-HIAA$ 是 $5-HT$ 的主要代谢产物,其含量的改变也反映了 $5-HT$ 的变化^[33]。与对照组相比,TPTLN显著降低了小鼠脑组织中 NE 的质量浓度,但在小鼠血清中并无明显差异。 NE 是一种单胺类神经递质,可调节睡眠和觉醒^[34],其水平呈现周期性波动,大脑中 NE 的浓度与快速眼动睡眠的持续时间呈负相关^[35]。同时与对照组相比,TPTLN显著降低了脑组织中皮质醇的水平,说明TPTLN具有良好镇静、助眠、调节昼夜节律的作用。但值得注意的是,TPTLN组小鼠血清中的皮质醇水平显著升高。皮质醇是一种因压力而释放的肾上腺激素,它是睡眠剥夺或昼夜节律紊乱时的生物标志物^[36]。觉醒后30 min皮质醇急剧增加和出现峰值的现象被称为皮质醇觉醒反应(cortisol awakening response, CAR)^[37],由此推测小鼠血清中的皮质醇升高可能是由CAR引起。同时也有研究表明,总睡眠时间与清醒时的皮质醇水平无关,也与CAR无关^[38-39]。 $\beta-EP$ 是一种内源性吗啡样物质,血清中的 $\beta-EP$ 可以穿过血脑屏障,使小鼠产生类似阿片的镇静效果。 $\beta-EP$ 含量的增加可以起到一定的助睡眠作用。但在本实验小鼠血清和脑组织中 $\beta-EP$ 的检测中,其质量浓度并未发现明显变化。由此可以推测,TPTLN的助睡眠作用可能主要是通过调控 $GABA$ 和 Glu 的动态平衡、调节 $5-HT$ 的合成与代谢、降低脑内 NE 、皮质醇的水平介导。

基于以上实验结果,推测地西洋与TPTLN的作用靶点不同。 $GABA_A$ 是 $GABA$ 信号通路的关键靶点。 $GABA$ 与其受体结合后,可增强氯化物在神经细胞膜上的通透性^[40]。这种氯离子的流入会诱导膜超极化^[41],随后降低兴奋性水平,同时产生镇静、催眠和抗焦虑作用^[42]。这种抑制作用可以抵消觉醒神经递质和神经元兴奋,最终改善睡眠质量^[43-44]。 $GABA_A-\alpha 1$ 亚基和 $5-HT1A$ 对调节大脑中的神经递质系统至关重要^[45]。有研究表明,地西洋主要通过作用于 $GABA_A-\alpha 2$ 亚基影响睡眠和脑电模式,而不是 $GABA_A-\alpha 1$ 亚基^[46]。此外, $5-HT$ 受体是大脑血清素系统中的关键蛋白质,能够调节 $5-HT$ 和其他神经递质的释放^[47-48], $5-HT1A$ 是脑内分布最广的 $5-HT$ 受体亚型。有研究表明, $5-HT1A$ 可以通过抑制神经元 Glu 介导的兴奋信号通路,同时提高神经元 $GABA$ 受体的基因转录水平,以达到镇静和催眠作用^[49-53]。因此,本研究进一步通过qPCR检测TPTLN是否影响 $GABA_A$ 、 $5-HT1A$ 基因的表达。结果显示,TPTLN显著提高了小鼠下丘脑中 $GABA_A-\alpha 1$ 和

5-HT1A的mRNA表达水平。由此表明,与地西洋不同,TPTLN可以通过作用于GABA_A- α 1、5-HT1A抑制神经元的激动,发挥其镇静助眠的作用。

值得注意的是,具有良好助睡眠作用的酪蛋白源肽TPTLN的N端并不是酪氨酸。Chen Yuanyuan等^[19]报道了4条新酪蛋白水解物来源的助睡眠肽段,其中有3条肽的序列中不含有酪氨酸。因此推测,酪蛋白源的助睡眠肽N端酪氨酸并不一定起决定作用。

参考文献:

- [1] SPIEGEL K, LEPROULT R, VAN CAUTER E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function[J]. *The Lancet*, 1999, 354(9188): 1435-1439. DOI:10.1016/S0140-6736(99)01376-8.
- [2] MISHIMA K. Sleep problem as a prodrome and risk factor for dementia[J]. *Brain and Nerve*, 2016, 68(7): 779-791. DOI:10.11477/mf.1416200510.
- [3] TOBALDINI E, COSTANTINO G, SOLBIATI M, et al. Sleep, sleep deprivation, autonomic nervous system and cardiovascular diseases[J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2017, 74: 321-329. DOI:10.1016/j.neubiorev.2016.07.004.
- [4] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200614-192.
- [5] PAGEL J F, PANDI-PERUMAL S R, MONTI J M. Further potential of the GABA receptor in the treatment of insomnia[J]. *Sleep Science and Practice*, 2018, 2(1): 5. DOI:10.1186/s41606-018-0025-z.
- [6] DE SAINT-HILAIRE Z, MESSAOUDI M, DESOR D, et al. Effects of a bovine alpha S1-casein tryptic hydrolysate (CTH) on sleep disorder in Japanese general population[J]. *The Open Sleep Journal*, 2009, 2(1): 26-32. DOI:10.2174/1874620900902010026.
- [7] DELA PEÑA I J I, HONG E, DE LA PEÑA J B, et al. Milk collected at night induces sedative and anxiolytic-like effects and augments pentobarbital-induced sleeping behavior in mice[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2015, 18(11): 1255-1261. DOI:10.1089/jmf.2015.3448.
- [8] BAUM F, FEDOROVA M, EBNER J, et al. Analysis of the endogenous peptide profile of milk: identification of 248 mainly casein-derived peptides[J]. *Journal of Proteome Research*, 2013, 12(12): 5447-5462. DOI:10.1021/pr4003273.
- [9] CHABANCE B, MARTEAU P, RAMBAUD J C, et al. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt[J]. *Biochimie*, 1998, 80(2): 155-165. DOI:10.1016/s0300-9084(98)80022-9.
- [10] MICLO L, PERRIN E, DRIOU A, et al. Characterization of alpha-casozepine, a tryptic peptide from bovine alpha(s1)-casein with benzodiazepine-like activity[J]. *FASEB Journal*, 2001, 15(10): 1780-1782. DOI:10.1096/fj.00-0685fje.
- [11] GUESDON B, MESSAOUDI M, LEFRANC-MILLOT C, et al. A tryptic hydrolysate from bovine milk α _{s1}-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress[J]. *Peptides*, 2006, 27(6): 1476-1482. DOI:10.1016/j.peptides.2005.10.001.
- [12] NISHINO S. Neurotransmitters and neuropharmacology of sleep/wake regulations[M]//KUSHIDA C A. *Encyclopedia of sleep and circadian rhythms* (second edition). Oxford: Academic Press, 2023: 17-29. DOI:10.1016/B978-0-12-822963-7.00291-7.
- [13] YAN M Z, CHANG Q, ZHONG Y, et al. Lotus leaf alkaloid extract displays sedative-hypnotic and anxiolytic effects through GABA_A receptor[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(42): 9277-9285. DOI:10.1021/acs.jafc.5b04141.
- [14] 弓宝, 王灿红, 王新腾, 等. 沉香线香燃香吸入助睡眠作用及机制探究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(4): 1567-1574. DOI:10.11842/wst.20210414002.
- [15] 王灿红, 陈细钦, 弓宝, 等. 沉香薰香吸入给药镇静促睡眠作用及机制研究[J]. *中国药理学杂志*, 2022, 57(19): 1628-1635. DOI:10.11669/cpj.2022.19.006.
- [16] SUN M Z, LI M N, CUI X W, et al. Terpenoids derived from semen ziziphi spinosae oil enhance sleep by modulating neurotransmitter signaling in mice[J]. *Heliyon*, 2024, 10(5): e26979. DOI:10.1016/j.heliyon.2024.e26979.
- [17] DELA PEÑA I J I, KIM H J, DE LA PEÑA J B, et al. A tryptic hydrolysate from bovine milk α _{s1}-casein enhances pentobarbital-induced sleep in mice via the GABA_A receptor[J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 313: 184-190. DOI:10.1016/j.bbr.2016.07.013.
- [18] QIAN J J, ZHENG L, SU G W, 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. DOI:10.1021/acs.jafc.1c03937.
- [19] CHEN Y Y, XU L, LAN Y Q, et al. Four novel sleep-promoting peptides screened and identified from bovine casein hydrolysates using a patch-clamp model *in vitro* and *Caenorhabditis elegans in vivo*[J]. *Food & Function*, 2023, 14(13): 6142-6156. DOI:10.1039/d3fo01246h.
- [20] MASIULIS S, DESAI R, UCHAŃSKI T, et al. GABA_A receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology[J]. *Nature*, 2019, 565(7740): 454-459. DOI:10.1038/s41586-018-0832-5.
- [21] MENDELSON W B. Neurotransmitters and sleep[J]. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 2001, 62(Suppl 10): 5-8.
- [22] SIEGEL J M. The neurotransmitters of sleep[J]. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 2004, 65(Suppl 16): 4-7.
- [23] MA H, KIM C S, MA Y, et al. Magnolol enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors: possible involvement of GABAergic systems[J]. *Phytotherapy Research*, 2009, 23(9): 1340-1344. DOI:10.1002/ptr.2773.
- [24] 张飞燕, 李晶晶, 周莹, 等. 安神类中药及其有效成分对神经递质镇静催眠机制的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(23): 4320-4327. DOI:10.4268/cjcm20162305.
- [25] SOMOGYI P, TAMÁS G, LUJAN R, et al. Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex 1 published on the World Wide Web on 3 March 1998.1[J]. *Brain Research Reviews*, 1998, 26(2/3): 113-135. DOI:10.1016/S0165-0173(97)00061-1.
- [26] BATESON A N. Further potential of the GABA receptor in the treatment of insomnia[J]. *Sleep Medicine*, 2006, 7: S3-S9. DOI:10.1016/j.sleep.2006.03.001.
- [27] BONAVENTURE P, KELLY L, ALUISIO L, et al. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₂ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007, 321(2): 690-698. DOI:10.1124/jpet.107.119404.
- [28] DUGOVIC C, WAUQUIER A, LEYSEN J E, et al. Functional role of 5-HT₂ receptors in the regulation of sleep and wakefulness in the rat[J]. *Psychopharmacology*, 1989, 97(4): 436-442. DOI:10.1007/BF00439544.
- [29] PERLIS M L, CORBITT C B, KLOSS J D. Insomnia research: 3Ps and beyond[J]. *Sleep Medicine Reviews*, 2014, 18(3): 191-193. DOI:10.1016/j.smrv.2014.01.003.

- [30] 薛兴, 范坤, 张晓兰. 丙泊酚对大鼠大脑睡眠-觉醒相关核团c-fos蛋白表达的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(5): 503-506.
- [31] 许贵军, 车明微, 隋金婷, 等. 针药结合对失眠大鼠血液中单胺类神经递质的影响[J]. 针灸临床杂志, 2017, 33(4): 58-61. DOI:10.3969/j.issn.1005-0779.2017.04.018.
- [32] MONTI J M, JANTOS H, SILVEIRA R, et al. O-17-5 Sleep and waking in 5,7-DHT-lesioned or (-)-pindolol-pretreated rats after administration of buspirone, ipsapirone, or gepirone[J]. European Neuropsychopharmacology, 1996, 6: 137-138. DOI:10.1016/0924-977X(96)87940-5.
- [33] MICLO L, PERRIN E, DRIOU A, et al. Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α_{s1} -casein with benzodiazepine-like activity[J]. The FASEB Journal, 2001, 15(10): 1780-1782. DOI:10.1096/fj.00-0685fj.
- [34] MITCHELL H A, WEINSHENKER D. Good night and good luck: norepinephrine in sleep pharmacology[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 79(6): 801-809. DOI:10.1016/j.bcp.2009.10.004.
- [35] MALLICK B N, MAJUMDAR S, FAISAL M, et al. Role of norepinephrine in the regulation of rapid eye movement sleep[J]. Journal of Biosciences, 2002, 27(5): 539-551. DOI:10.1007/BF02705052.
- [36] MÜLLER M B, HOLSBOER F, KECK M E. Genetic modification of corticosteroid receptor signalling: novel insights into pathophysiology and treatment strategies of human affective disorders[J]. Neuropeptides, 2002, 36(2/3): 117-131. DOI:10.1054/npep.2002.0896.
- [37] GUO K G, ZHAO X L, LUO J H, et al. Relationship of sleep with diurnal cortisol rhythm considering sleep measurement and cortisol sampling schemes[J]. Psychoneuroendocrinology, 2024, 162: 106952. DOI:10.1016/j.psyneuen.2023.106952.
- [38] ZEIDERS K H, DOANE L D, ADAM E K. Reciprocal relations between objectively measured sleep patterns and diurnal cortisol rhythms in late adolescence[J]. Journal of Adolescent Health, 2011, 48(6): 566-571. DOI:10.1016/j.jadohealth.2010.08.012.
- [39] VAN LENTEN S A, DOANE L D. Examining multiple sleep behaviors and diurnal salivary cortisol and alpha-amylase: within- and between-person associations[J]. Psychoneuroendocrinology, 2016, 68: 100-110. DOI:10.1016/j.psyneuen.2016.02.017.
- [40] OLSEN R W, SIEGHART W. International union of pharmacology. LXX. subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. update[J]. Pharmacological Reviews, 2008, 60(3): 243-260. DOI:10.1124/pr.108.00505.
- [41] DELA PEÑA I J I, HONG E, KIM H J, et al. *Artemisia capillaris* Thunberg produces sedative-hypnotic effects in mice, which are probably mediated through potentiation of the GABA_A receptor[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2015, 43(4): 667-679. DOI:10.1142/S0192415X1550041X.
- [42] SUCCOL F, FIUMELLI H, BENFENATI F, et al. Intracellular chloride concentration influences the GABA_A receptor subunit composition[J]. Nature Communications, 2012, 3: 738. DOI:10.1038/ncomms1744.
- [43] GOTTESMANN C. GABA mechanisms and sleep[J]. Neuroscience, 2002, 111(2): 231-239. DOI:10.1016/S0306-4522(02)00034-9.
- [44] YAMATSU A, YAMASHITA Y, PANDHARIPANDE T, et al. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans[J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(2): 547-551. DOI:10.1007/s10068-016-0076-9.
- [45] LV Y B, ZHOU Q, YAN J X, et al. Enzymolysis peptides from *Mauremys mutica* plastron improve the disorder of neurotransmitter system and facilitate sleep-promoting in the PCPA-induced insomnia mice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 274: 114047. DOI:10.1016/j.jep.2021.114047.
- [46] KOPP C, RUDOLPH U, LÖW K, et al. Modulation of rhythmic brain activity by diazepam: GABA(A) receptor subtype and state specificity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(10): 3674-3679. DOI:10.1073/pnas.0306975101.
- [47] WANG L, ZHANG Y M, DU X, et al. Review of antidepressants in clinic and active ingredients of traditional Chinese medicine targeting 5-HT_{1A} receptors[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 120: 109408. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109408.
- [48] RICHARDSON-JONES J W, CRAIGE C P, GUIARD B P, et al. 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants[J]. Neuron, 2010, 65(1): 40-52. DOI:10.1016/j.neuron.2009.12.003.
- [49] ZHANG M, NING G M, SHOU C H, et al. Inhibitory effect of jujuboside A on glutamate-mediated excitatory signal pathway in hippocampus[J]. Planta Medica, 2003, 69(8): 692-695. DOI:10.1055/s-2003-42786.
- [50] LU Y J, ZHOU J, ZHANG S M, et al. Inhibitory effects of jujuboside A on EEG and hippocampal glutamate in hyperactive rat[J]. Journal of Zhejiang University. Science. B, 2005, 6(4): 265-271. DOI:10.1631/jzus.2005.B0265.
- [51] MAIER P J, MARIN I, GRAMPP T, et al. Sustained glutamate receptor activation down-regulates GABA_B receptors by shifting the balance from recycling to lysosomal degradation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(46): 35606-35614. DOI:10.1074/jbc.M110.142406.
- [52] GASSMANN M, BETTLER B. Regulation of neuronal GABA_B receptor functions by subunit composition[J]. Nature Reviews Neuroscience, 2012, 13: 380-394. DOI:10.1038/nrn3249.
- [53] YOU Z L, XIA Q, LIANG F R, et al. Effects on the expression of GABA_A receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128(2): 419-423. DOI:10.1016/j.jep.2010.01.034.