

文章编号 1006-8147(2020)02-0114-04

论著

巴戟天提取物联合 GABA/茶氨酸改善小鼠睡眠作用的研究

周月, 刘欢

(天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 天津 300070)

摘要 目的: 研究巴戟天提取物联合 γ -氨基丁酸(GABA)/茶氨酸对小鼠睡眠的改善作用。方法: 18~20 g 健康雄性 ICR 种小鼠, 按体重随机分组, 每天经口灌胃不同剂量的 GABA/茶氨酸混合物、巴戟天/GABA/茶氨酸混合物或阴性对照物(蒸馏水), 30 d 后进行直接睡眠实验、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和巴比妥钠睡眠潜伏期实验。结果: GABA/茶氨酸、巴戟天/GABA/茶氨酸各剂量组均无直接睡眠作用, 也不能增加阈下剂量入睡动物数($P>0.05$); 巴戟天/GABA/茶氨酸两个剂量组的小鼠睡眠时间延长、睡眠潜伏期缩短($P<0.05$), GABA/茶氨酸低剂量组的睡眠时间和睡眠潜伏时间与正常对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$); GABA/茶氨酸高剂量组可延长戊巴比妥钠睡眠时间、缩短巴比妥钠睡眠潜伏期($P<0.05$)。结论: 巴戟天/GABA/茶氨酸改善睡眠功能的作用优于 GABA/茶氨酸。

关键词 巴戟天提取物; 改善睡眠; 小鼠

中图分类号 R151+R96

文献标志码 A

Study on the sleep improvement effect of Morinda officinalis combined with GABA/L-Theanine in mice

ZHOU Yue, LIU Huan

(Department of Nutrition and Food Science, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To study the effect of Morinda officinalis combined with gamma-amino butyric acid(GABA)/theanine on sleep improvement in mice. **Methods:** Healthy male ICR mice (18~20 g) were randomly divided into five groups according to their body weight and were given different doses of GABA/L-Theanine Mixture, Morinda officinalis/GABA/L-Theanine Mixture or negative control substance (distilled water) orally each day. After 30 days of consecutive administration, the direct sleep test, the sleep-extending test with sodium pentobarbital, the sleep-producing test with subthreshold dose of sodium barbital and the incubation period test with sodium pentobarbital were conducted. **Results:** There was no direct sleep effect in GABA/L-Theanine and Morinda officinalis/GABA/L-Theanine groups and no increase in the number of animals falling asleep at subthreshold dose ($P>0.05$); the sleep time of Morinda officinalis/GABA/L-Theanine groups was prolonged and the sleep latency was shortened ($P<0.05$); there was no significant difference in the sleep time and sleep latency between GABA/L-Theanine low dose group and normal control group ($P>0.05$). The sleep time of pentobarbital sodium was prolonged and the sleep latency of barbital sodium was shortened in the high dose group of GABA/L-Theanine ($P<0.05$). **Conclusion:** Morinda officinalis/GABA/L-Theanine has better effect on improving sleep function than GABA/L-Theanine.

Key words Morinda officinalis; sleep improvement; mice

我国茶叶资源丰富,但利用率较低,每年有大量中低档、春秋茶被废弃,而茶叶中含有的多种功能成分有较高的利用价值,其中 γ -氨基丁酸(gamma-amino butyric acid, GABA)和 L-茶氨酸(L-Theanine)对于睡眠有一定的改善作用。GABA 是一个四碳非蛋白氨基酸,广泛存在于动物、植物和微生物中,具有提神安宁以及提高睡眠质量和记忆力的作用^[1]。GABA 在食品及医药等方面已得到广泛应用,毒性评估支持其安全使用和作为功能性食品成分的潜在用途^[2]。茶氨酸是茶叶中重要的非必

需酰胺类生物活性氨基酸之一,在茶树新鲜重量中的平均含量在 1.2~6.2 mg/g^[3],具有维持正常睡眠、改善记忆功能、消除神经毒素的作用,在缓解压力、缓解疲劳方面也具有一定的作用^[4-5],而作用可能会有助于身心疲劳的恢复从而改善睡眠。有研究发现 GABA 和 L-茶氨酸混合物对睡眠质量和持续时间具有积极的协同作用^[6]。中药巴戟天(Morinda officinalis)为茜草科多年生藤植物,具有抗疲劳的作用^[7],其改善睡眠的文献报道较少。本实验旨在观察 GABA/茶氨酸联合干预以及添加巴戟天提取物后对小鼠睡眠的影响,探讨中药联合茶叶中活性成分对睡眠的改善作用。

作者简介 周月(1993-),女,硕士在读,研究方向:营养与慢性疾病;

通信作者: 刘欢, E-mail: liuhuan@tmu.edu.cn。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验对象 健康 ICR 种小鼠,单一雄性,SPF 级,体质量 18~20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006 号。实验动物饲养于中国医学科学院放射医学研究所动物实验中心。基础饲料由北京阜康生物科技股份有限公司提供。

1.1.2 药品与试剂 GABA/茶氨酸、巴戟天/GABA/茶氨酸混合物均为粉末状(实验前用蒸馏水溶解配置),其中 GABA、茶氨酸符合新食品原料要求,GABA 纯度 95%,茶氨酸纯度是 20%;巴戟天提取物采用水提工艺,购自广东青云山药业有限公司;戊巴比妥钠,进口分装,Sigma-Aldrich 提供;巴比妥钠,分析纯,成都西亚化工股份有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 240 只小鼠按体质量分层后,随机分为 5 个干预组,即对照组、GABA/茶氨酸低剂量组、GABA/茶氨酸高剂量组、巴戟天/GABA/茶氨酸低剂量组、巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组。对照组给予蒸馏水;GABA/茶氨酸低剂量组(GABA15 mg+茶氨酸 33 mg)/(kg·d);GABA/茶氨酸高剂量组(GABA45 mg+茶氨酸100 mg)/(kg·d);巴戟天/GABA/茶氨酸低剂量组(巴戟天提取物 250 mg+GABA 15 mg+茶氨酸 33 mg)/(kg·d),巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组(巴戟天提取物 250 mg+GABA45 mg+茶氨酸 100 mg)/(kg·d)。均为灌胃干预,干预时间 30 d。

各干预组中的小鼠再随机分为 4 组,分别进行直接睡眠实验,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和巴比妥钠睡眠潜伏期实验,每组 12 只。

1.2.2 直接睡眠实验 适应性饲养 1 周后,各组小鼠连续灌胃 30 d,最后一天结束直接观察小鼠睡眠情况。以翻正反射消失为睡眠(提起小鼠尾巴,将小鼠腹部朝上放置,超过 60 s 不能翻正者即认为翻正反射消失,进入睡眠),以翻正反射恢复为觉醒,翻正反射消失至恢复这段时间为小鼠睡眠时间,记录入睡小鼠只数及睡眠时间。

1.2.3 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验 末次灌胃 15 min 后腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg·bw(此剂量为预实验确定的使小鼠 100%入睡,但又不使睡眠时间过长的戊巴比妥钠剂量),注射量为 0.2 ml/20 g,以翻正反射消失为指标,记录戊巴比妥钠睡眠时间。

1.2.4 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验 末次灌胃 15 min 后腹腔注射戊巴比妥钠 28 mg/kg(此剂量为

预实验确定的戊巴比妥钠阈下催眠剂量,即 80%~90%小鼠翻正反射不消失的戊巴比妥钠最大阈下剂量),注射量为 0.2 ml/20 g,以翻正反射消失 1 min 以上为入睡标准,记录 30 min 内各组入睡的小鼠只数。

1.2.5 巴比妥钠睡眠潜伏期实验 末次灌胃 20 min 后腹腔注射巴比妥钠 260 mg/kg(此剂量为预实验确定的使动物 100%入睡,但又不使睡眠时间过长的巴比妥钠剂量),注射量为 0.2 ml/20 g,以翻正反射消失为指标,腹腔注射完成到翻正反射消失的这段时间为睡眠潜伏期,记录各组小鼠睡眠潜伏期。

1.3 结果判定 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、巴比妥钠睡眠潜伏期实验 3 项实验中两项阳性,且无明显直接睡眠作用,可判定具有改善睡眠功能作用。

1.4 统计学方法 采用 SPSS18.0 对实验数据进行单因素方差分析或卡方检验。睡眠时间及其睡眠潜伏时间采用单因素方差分析进行统计分析。入睡只数采用卡方检验进行统计分析,比较各组睡眠发生率是否相等。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 直接睡眠实验结果 GABA/茶氨酸剂量组、巴戟天/GABA/茶氨酸剂量组灌胃后均未直接出现睡眠现象,表明本实验相应的实验条件下两种混合物均无直接睡眠作用,见表 1。

表 1 各干预物对小鼠直接睡眠的影响

Tab 1 Effects of tested drugs on sleep-induced directly in mice

组别	动物数/只	入睡动物数/只	睡眠时间/min	睡眠发生率/%
对照组	12	0	0	0
GABA/茶氨酸低剂量组	12	0	0	0
GABA/茶氨酸高剂量组	12	0	0	0
巴戟天/GABA/茶氨酸低剂量组	12	0	0	0
巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组	12	0	0	0

2.2 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验结果 经单因素方差分析,GABA/茶氨酸高剂量组、巴戟天/GABA/茶氨酸两个剂量组的睡眠时间与对照组的睡眠时间比较显著延长,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),同时巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组睡眠时间比其低剂量组延长($P<0.05$),也明显长于 GABA/茶氨酸高剂量组($P<0.05$)。GABA/茶氨酸低剂量组的睡眠时间与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。说明两种混合物均能延长戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时间,但巴戟天/GABA/茶氨酸的联合作用优于 GABA/茶氨酸,见表 2。

表 2 各干预物对戊巴比妥钠睡眠时间的影响($\bar{x}\pm s$)Tab 2 Effects of tested drugs on pentobarbital sodium -induced sleep in mice($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 /只	入睡动物 数/只	睡眠时间/min
对照组	12	12	87.08±9.56
GABA/茶氨酸低剂量组	12	12	99.42±13.65
GABA/茶氨酸高剂量组	12	12	117.10±30.52 [*]
巴戟天/GABA/茶氨酸低剂量组	12	12	123.25±25.91 [*]
巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组	12	12	161.50±17.76 [*]

注:与对照组比较: * $P<0.05$;与巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组比较: [#] $P<0.05$

2.3 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验结果 经过多个样本率的卡方检验,各组与对照组之间比较睡眠发生率增加,但差异无统计学意义($P>0.05$),尚不能认为各干预物可提高阈下剂量戊巴比妥钠诱导的小鼠的睡眠率,见表 3。

表 3 各干预物对小鼠睡眠发生率的影响

Tab 3 Effects of tested drugs on sleep rate in mice

组别	动物 数/只	入睡 动物 数/只	睡眠 发生率 /%	χ^2	P
对照组	12	2	16.67	3.389	0.495
GABA/茶氨酸低剂量组	12	3	25.00		
GABA/茶氨酸高剂量组	12	4	33.33		
巴戟天/GABA/茶氨酸低剂量组	12	4	33.33		
巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组	12	6	50.00		

2.4 巴比妥钠睡眠潜伏期实验结果 经单因素方差分析,GABA/茶氨酸高剂量组、巴戟天/GABA/茶氨酸两个剂量组与正常对照组之间的睡眠潜伏时间比较显著缩短,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组的睡眠潜伏时间比其低剂量组缩短($P<0.05$),表现出一定的剂量反应关系,同时该组睡眠潜伏时间也短于 GABA/茶氨酸高剂量($P<0.05$),说明巴戟天/GABA/茶氨酸缩短巴比妥钠诱导的 ICR 小鼠睡眠潜伏期的作用优于 GABA/茶氨酸,见表 4。

表 4 各干预物对戊巴比妥钠睡眠潜伏期的影响($\bar{x}\pm s$)Tab 4 Effects of tested drugs on sodium barbital -induced sleep in mice($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/ 只	入睡动物 数/只	睡眠潜伏期/min
对照组	12	12	36.42±4.71
GABA/茶氨酸低剂量组	12	12	35.54±5.96
GABA/茶氨酸高剂量组	12	12	29.51±5.19 [*]
巴戟天/GABA/茶氨酸低剂量组	12	12	29.58±5.52 [*]
巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组	12	12	22.67±3.55 ^{**}

注:与对照组比较: * $P<0.05$;与巴戟天/GABA/茶氨酸高剂量组比较: [#] $P<0.05$

3 讨论

失眠是指持续的睡眠质或量令人不满意的状态,严重者甚至影响白天社会功能^[8]。正常的睡眠除了可以消除疲劳,使人产生新的活力外,还与提高免疫力、抵抗疾病的能力有着密切的关系^[9]。随着经济的快速发展,人们的生活及其精神压力增大,失眠现象日趋增多,严重影响着人们的精神状态甚至身体健康从而降低生活质量、学习或工作效率。

GABA 和茶氨酸均为茶叶中的功能性成分,已有研究发现 GABA 和茶氨酸联合对睡眠的积极作用。巴戟天作为具有抗抑郁作用的中药,已被批准可用于保健食品。观察三者联合干预对小鼠睡眠的影响,可为探讨中药联合食品功能性成分的保健作用提供科学依据。

目前笔者检索到的 GABA 改善小鼠睡眠作用的最低作用剂量为 100 mg/kg^[10];茶氨酸改善小鼠睡眠作用的最低作用剂量为 100 mg/kg^[11]。本研究中 GABA/茶氨酸的干预剂量均低于 100 mg/kg,其中高剂量组灌胃剂量为(GABA45 mg+茶氨酸 100 mg)/(kg·d),而根据原材料纯度换算 GABA 和茶氨酸实际含量为(42.75 mg 和 20 mg/kg)/(kg·d),此干预剂量即可延长小鼠睡眠时间并缩短睡眠潜伏期,说明两者具有联合改善小鼠睡眠的作用。而如果干预制剂中添加巴戟天提取物,GABA 和茶氨酸在实际含量分别为 14.25 mg/kg 和 6.7 mg/kg 下,即表现出改善睡眠的作用。巴戟天/GABA/茶氨酸三者联合也具有剂量反应关系,随着剂量增高,改善睡眠的作用也更加明显。在 GABA/茶氨酸剂量相同的条件下,巴戟天提取物的添加表现出了协同增效作用。

GABA 是中枢神经系统中很重要的抑制性神经递质,直接参与睡眠-觉醒过程的调节^[12]。可以抑制 ICR 小鼠的活动,减少能量的消耗,促进睡眠。GABA 作用的减弱会导致乙酰胆碱释放增加,促进快速眼动睡眠^[13]。某些研究中可以影响 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)和多巴胺(dopamine,DA)的浓度^[14]。GABA 特征的重复超低频磁场的连续多次经颅刺激可以兴奋正常大鼠脑内的 GABA、5-HT 与 DA^[15]。茶氨酸经肠道吸收以后,可以越过血脑屏障,增加脑内 GABA、5-HT 和 DA 的浓度^[16]。在抗抑郁研究中巴戟天提取物可提高抑郁患者体内 5-HT、DA 含量^[17]。5-HT 和 DA 是参与机体睡眠-觉醒过程重要的中枢神经递质,其中 5-HT 调节睡眠-觉醒周期,延长非快速眼动睡眠,从而抑制觉醒,增加深度睡眠并缩短入眠期和浅睡期。DA 具有维持觉醒和行为

兴奋的作用,正常含量下可减少觉醒次数,保证睡眠的完整度^[18]。因此推测 GABA、茶氨酸和巴戟天提取物改善睡眠的作用与改变体内单胺类神经递质有关,其具体机制尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 程传兴,刘晓飞,王薇. γ -氨基丁酸的生理功能及制备方法[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2017, 33(6): 693
- [2] Takeshima K, Yamatsu A, Yamashita Y, et al. Subchronic toxicity evaluation of gamma-aminobutyric acid (GABA) in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 68: 128
- [3] Adhikary R, Mandal V. L-theanine: A potential multifaceted natural bioactive amide as health supplement[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2017, 7(9): 842
- [4] 林智,吕海鹏,张盛. 茶叶活性成分的化学和药理作用[J]. 中国茶叶, 2018, 40(11): 1
- [5] 马晓冬. 茶叶的生物活性在医用保健产品开发中的应用[J]. 福建茶叶, 2018, 40(11): 31
- [6] Kim S, Jo K, Hong K B, et al. GABA and l-theanine mixture decreases sleep latency and improves NREM sleep[J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 65
- [7] Zhang H L, Li J, Li G, et al. Structural characterization and anti-fatigue activity of polysaccharides from the roots of Morinda officinalis[J]. Int J Biol Macromol, 2009, 44(3): 257
- [8] 雷蕾,欧阳亚楠,杨硕,等. 国内改善睡眠类保健食品现状分析[J]. 中国现代中药, 2015, 17(10): 1091
- [9] 程国良,钱彦方,李静,等. 失眠机制研究进展[J]. 世界睡眠医学杂志, 2016, 3(3): 174
- [10] Yamatsu A, Yamashita Y, Maru I, et al. The improvement of sleep by oral intake of GABA and apocynum leaf extract[J]. Nutr Sci Vita-minol, 2015, 61(2): 182
- [11] 李靛,林智,何普明,等. 茶氨酸改善小鼠睡眠状况的实验研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15): 214
- [12] 李晓娜,赵庆华,王爱华,等. γ -氨基丁酸对小鼠睡眠的影响[J]. 产业与科技论坛, 2018, 17(11): 68
- [13] Liang C L, Marks G A. GABA A receptors are located in cholinergic terminals in the nucleus pontis oralis of the rat: Implications for REM sleep control[J]. Brain Res, 2014, 1543: 58
- [14] 李珍,安书成,李江娜. 抑郁症发生中 γ -氨基丁酸与其它相关递质的关系[J]. 生理科学进展, 2014, 45(3): 190
- [15] 徐建兰,徐晓雪,蔡青,等. 连续多次 γ -氨基丁酸和多巴胺特征重复超低频经颅磁刺激对大鼠脑内神经递质功率的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2010, 25(2): 127
- [16] 刘婉如,徐海滨. 茶氨酸的生理活性及药理作用研究进展[J]. 国外医学(卫生学分册), 2006, 33(5): 287
- [17] 刘雯晶,李珂,胡健才. 巴戟天寡糖胶囊对冠心病抑郁患者神经递质及抑郁程度的影响[J]. 心脑血管病防治, 2018, 18(3): 243
- [18] 司井夫,刘峰,卜渊,等. 针刺推拿联合疏肝安神汤对失眠患者 5-HT、DA 水平及睡眠质量的影响[J]. 针灸临床杂志, 2018, 34(12): 21

(2019-03-30 收稿)

(上接第 113 页)

- [11] Sugimoto K, Moriyasu F, Takeuchi H, et al. Case study to assess the safety of irreversible electroporation near the heart[J]. Springer Plus, 2015, 4: 74
- [12] Deodhar A, Dickfeld T, Single G W, et al. Irreversible electroporation near the heart: ventricular arrhythmias can be prevented with ECG synchronization[J]. Am J Roentgenol, 2011, 196(3): W330
- [13] Arena C B, Sano M B, Rossmeisl J H Jr, et al. High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction[J]. Biomed Eng Online, 2011, 10: 102
- [14] Sano M B, Arena C B, DeWitt M R, et al. In-vitro bipolar nano- and microsecond electro-pulse bursts for irreversible electroporation therapies[J]. Bioelectrochemistry, 2014, 100: 69
- [15] Sano M B, Arena C B, Bittleman K R, et al. Bursts of bipolar microsecond pulses inhibit tumor growth [J]. Sci Rep, 2015, 5: 14999
- [16] Sano M B, Fan R E, Xing L. Asymmetric waveforms decrease lethal thresholds in high frequency irreversible electroporation therapies[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40747
- [17] Zhao Y, Bhonsle S, Dong S, et al. Characterization of conductivity changes during high-frequency irreversible electroporation for treatment planning[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2018, 65(8): 1810
- [18] Sahakian A V, Al-Angari H M, Adeyanju O O. Electrode activation sequencing employing conductivity changes in irreversible electroporation tissue ablation[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2012, 59(3): 604
- [19] Neal R E 2nd, Garcia P A, Robertson J L, et al. Experimental characterization and numerical modeling of tissue electrical conductivity during pulsed electric fields for irreversible electroporation treatment planning[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2012, 59(4): 1076
- [20] Davalos R V, Mir L M, Rubinsky B. Tissue ablation with irreversible electroporation[J]. Ann Biomed Eng, 2005, 33(2): 223
- [21] Siddiqui I A, Latouche E L, DeWitt M R, et al. Induction of rapid, reproducible hepatic ablations using next-generation, high frequency irreversible electroporation (H-FIRE) in vivo[J]. HPB, 2016, 18(9): 726
- [22] Rolong A, Schmelz E M, Davalos R V. High-frequency irreversible electroporation targets resilient tumor-initiating cells in ovarian cancer[J]. Integr Biol, 2017, 9(12): 979

(2019-10-29 收稿)