



中国医院药学杂志

Chinese Journal of Hospital Pharmacy

ISSN 1001-5213, CN 42-1204/R

《中国医院药学杂志》网络首发论文

题目：基于 PI3K/Akt 信号通路探讨小分子肽-SMT(S)改善失眠的分子作用机制
作者：李典育，房星宇，李辉，刘健，安昱，曹占鸿，白浩楠，杨擎，李娜
收稿日期：2023-10-18
网络首发日期：2024-04-11
引用格式：李典育，房星宇，李辉，刘健，安昱，曹占鸿，白浩楠，杨擎，李娜. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨小分子肽-SMT(S)改善失眠的分子作用机制[J/OL]. 中国医院药学杂志. <https://link.cnki.net/urlid/42.1204.R.20240410.2008.006>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于 PI3K/Akt 信号通路探讨小分子肽-SMT(S)改善失眠的分子作用机制

李典育¹, 房星宇¹, 李辉², 刘健¹, 安昱¹, 曹占鸿¹, 白浩楠¹, 杨擎¹,
李娜¹

(1. 长春中医药大学吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117; 2. 吉林省前卫医院普外科, 吉林 长春 130012)

*通信作者 李娜, 女, 博士后, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 中药分子药理学。

摘要 目的: 探讨 SMT(S)改善小鼠失眠及失眠引起的继发性认知障碍、焦虑、免疫低下的作用机制。方法: 应用 PCPA 建立失眠小鼠动物模型, 通过行为学实验以及检测血清中神经递质含量, 考察 SMT(S)的镇静催眠作用以及改善焦虑和学习记忆能力; 通过 NK 细胞杀伤实验和 T 淋巴细胞转化实验检测增强免疫功能的能力, 应用 Western Blotting 检测 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达情况。结果: SMT(S)可减少失眠小鼠在旷场中央格停留时间、移动距离及平均速度, 缩短在水迷宫中的上岸潜伏期及总路程; 增加血清中 5-HT 含量以及减少 DA 和 NE 的含量; 升高 NK 细胞杀伤率及淋巴细胞刺激指数; 增加了 PI3K、Akt、mTOR 蛋白在失眠小鼠脑组织中的表达。结论: SMT(S)可有效预防失眠, 明显改善失眠后小鼠的学习记忆能力及焦虑情况, 并增强小鼠的免疫功能, 其分子机制与调节 PI3K/Akt 信号通路相关。表明 SMT(S)通过调节 PI3K/Akt 信号通路治疗失眠及失眠引起的继发性认知障碍、焦虑、免疫力低下的作用。

关键词 SMT(S); 失眠; 免疫; PI3K/Akt

中图分类号 R285 文献标志码 A

Exploring the molecular mechanism of action of small molecule peptide-SMT(S) to improve insomnia based on PI3K/Akt signaling pathway

LI Dian-yu¹, FANG Xing-yu¹, LI Hui², LIU Jian¹, AN Yu¹, CAO Zhan-hong¹, BAI Hao-nan¹, YANG Qing¹, LI Na¹

(1. Jilin Ginseng Research Institute, Changchun University of Chinese Medicine, Jilin Changchun 130117, China; 2. General Surgery Department, Jilin Qianwei Hospital, Jilin Changchun 130012, China)

Abstract **OBJECTIVE** To investigate the mechanism of action of SMT(S) in ameliorating insomnia and insomnia-induced secondary cognitive impairment, anxiety, and immunodeficiency in mice. **METHODS** PCPA was applied to establish an animal model of insomnia mice, and the sedative-hypnotic effect of SMT(S) as well as the improvement of anxiety and the ability of learning and memory were investigated through behavioral experiments and the detection of neurotransmitter content in serum; the ability to enhance immune function was detected through NK cell killing assay and T-lymphocyte transformation assay, and Western Blotting was applied to detect the PI3K/Akt signaling pathway protein expression. **RESULTS** SMT(S) reduced the residence time, distance traveled, and average speed of insomniac mice in the central compartment of the open field, and shortened the latency to disembarkation and the total distance traveled in the water maze; increased the serum levels of 5-HT as well as reduced the levels of DA and NE; elevated the rate of NK-cell killing and the index of lymphocyte stimulation; and increased the expression of PI3K, Akt, and mTOR proteins in the brain tissues of insomniac mice. **CONCLUSION** SMT(S) effectively prevented insomnia, significantly improved learning memory ability and anxiety, and enhanced immune function in mice after insomnia, and its molecular mechanism was related to the regulation of PI3K/Akt signaling pathway. It suggests that SMT(S) treats insomnia and insomnia-induced secondary cognitive impairment, anxiety, and immunocompromise by regulating the PI3K/Akt signaling pathway.

收稿日期: 2023-10-18

作者简介: 李典育, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药分子药理学

网络首发时间: 2024-04-11 16:30:42 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/42.1204.R.20240410.2008.006>

Key words SMT(S); insomnia; immunity; PI3K/Akt

失眠主要表现为不能正常入睡,或入睡困难,睡眠时间不足,多梦等,严重者彻夜不眠。大量研究表明睡眠不足与认知功能障碍、免疫力下降密切相关,长期的睡眠障碍会导致许多身心疾病,如抑郁、焦虑等^[1]。SMT(S)来源于深海软体动物,是被水解成 6-19 个氨基酸组成的小分子肽,其相对分子质量低,消化吸收快,因此在食品、饮料、保健食品中广泛应用^[2]。目前已有多种研究表明肽类物质在失眠的防治中有广泛的应用^[3],且效果较好,可有效的应用在保健品等领域中。

失眠的作用机制与 PI3K/Akt 信号通路密切相关。在给药后可激活 PI3K/Akt 信号通路上相关蛋白的表达,对 PI3K/Akt 信号通路进行干预,可保护神经元,促进神经元修复,减轻失眠引起的学习和记忆受损,从而改善睡眠剥夺所致的认知障碍。

本研究通过 PCPA 建立失眠小鼠动物模型,应用 SMT(S)预防性干预,结合行为学、生化指标等检测,考察 SMT(S)对失眠的干预及失眠引起的继发性认知障碍、焦虑、免疫力的影响。为开发天然、健康提高睡眠质量的药食同源小分子肽提供良好的实验理论支持。

1 材料

1.1 实验仪器

InfiniteM200.PRO 酶标仪(瑞士 TECAN 公司); 5428EO3211859 离心机(德国 eppendorf 公司); ZS-001Morris 水迷宫系统(众实迪创公司)。

1.2 实验试剂

SMT(S)(新顺诚生物科技(大连)有限公司,批号 B/N220001); γ -氨基丁酸(郑州金诺生物科技,批号 SC10337172600130); L-4 氯苯丙氨酸(PCPA)(上海麦克林生化科技有限公司,批号 C15340402); 小鼠 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)酶联免疫吸附测定试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号 MM-0443M1); 小鼠多巴胺(dopamine, DA)酶联免疫吸附测定试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号 MM-0626M1); 去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)酶联免疫吸附测定试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号 MM-0627M1)。

1.3 实验动物与细胞

SPF 级 ICR 小鼠 50 只,3-8 周龄,雌雄各半,体质量(25 ± 1.5)g,购自长春亿斯实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(吉)2020-0002。所有实验均经长春中医药大学伦理委员会批准(伦理批准号:2023150)。人非小细胞肺癌细胞 A549(购自中国科学院上海细胞库)。

2 方法

2.1 SMT(S)理化性质检测

2.1.1 凯氏定氮法测定 SMT(S)蛋白含量

蛋白质含量 = $\frac{(V1 - V2) \times C \times 0.014}{(m \times V3 / 100) \times F} \times 100$; V1: 消耗的酸滴定液体积(mL); V2: 空白消耗的酸滴定液体积(mL); V3: 反应消化液的体积(mL); C: 酸标准液浓度($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 0.014:1.0mL 为盐酸标准滴定液相当的氮的质量(g); m: 试样质量(g); F: 采用 6.25 为氮换算为蛋白质系数^[4]。

2.1.2 SMT(S)多肽谱图分析

制备 SMT(S)样品: SMT(S)称取 5 mg,加入 0.1%三氟乙酸(TFA)水溶液 1.5 mL,置于冰浴中超声提取 10 min 后,离心,取上清。经处理后将洗脱液进行冷冻干燥制成粉末。将溶解后样品加入除盐柱内进行除盐,收集被洗脱下来的多肽洗脱溶液,再将收集的洗脱液冷冻干燥成粉末。采用 EASY-nLC1000 超高压纳升级液相色谱系统进行分离。样品在分析柱上进行色谱分离,使用 DENOVO 对质谱原始文件进行数据库检索^[5]。

2.2 动物分组与给药

取 50 只小鼠,适应性喂养后使用 Excel 的随机功能将小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,即空白组、模型组、阳性药组、SMT(S)低剂量组、SMT(S)高剂量组。空白组以蒸馏水按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃, SMT(S)低剂量组 ($33.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、SMT(S)高剂量组 ($268.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 每天灌胃给药 1 次,阳性药组给予 γ -氨基丁酸水溶液 ($65\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 灌胃,连续给药 45 d。空白组注射弱碱性生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,其余各组于给药第 40 天腹腔注射 PCPA $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 连续 2 d,制备失眠小鼠动物模型^[6]。

2.2.1 行为状态观察及生长曲线

末次注射 PCPA 混悬液后,观察小鼠的昼夜节律、攻击性、毛发光泽度等指标以诊断失眠模型成功建立的标准,并进行外观评分来评判小鼠的睡眠情况。评分标准:(1)精神状态及对外界的刺激反应;(2)眼睛眼裂变窄,嗜睡等;(3)面部、口鼻黏膜和爪;(4)食欲、体质量和消瘦程度;(5)皮毛毛色和光泽。按照 5 个等级进行积分,状态好的 5 分,状态差为 1 分,共计 25 分^[7]。

2.2.2 旷场实验

采用旷场实验,考察小鼠在陌生空旷环境中的焦虑程度。将小鼠依次放入敞口旷场箱中央区域,正上方为监控设备,拍摄记录每只小鼠 3 min 的活动总距离、平均速度及中央区活动总时间,并用 Tracking MasterV3.0 软件绘制相应的轨迹图^[8]。

2.2.3 Morris 水迷宫实验

采用 Morris 水迷宫实验,测试小鼠的学习和记忆能力。将水池分为四个象限,水加至超过平台 1 cm,水温保持在 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。将各组小鼠面壁逐个放入平台对侧象限,录像自动记录小鼠逃逸潜伏期及上岸总路程^[8]。

2.2.4 脏器指数计算

末次给药后,对小鼠进行麻醉,摘取小鼠眼球进行取血,将取出的血液静置 1 h 以 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后分离血清,将分离出的血清置于 -80°C 冰箱保存备用。并在 4°C 环境下立即将每只小鼠的脑、脾、胸腺进行解剖并称重,计算出相应的脏器指数。脏器指数 = (脏器质量/体质量) $\times 100\%$ 。

2.2.5 酶联免疫吸附法测定 5-HT、DA、NE 含量

将收集到的血清按相应的 ELISA 试剂盒说明书进行操作,分别测定小鼠血清中 5-HT、DA、NE 的含量,在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 (OD) 值。

2.2.6 NK 细胞杀伤实验与淋巴细胞转化实验

取小鼠新鲜的脾组织制成脾细胞悬液。用培养液将 ConA 配成 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。将脾细胞悬液加入细胞培养板中 $100\text{ }\mu\text{L}$ 每孔,再在相应的孔中加入 ConA 或 A549 $20\text{ }\mu\text{L}$ 每孔。将培养板放在培养箱中培养 48 h 后取出加 MTT,每孔 $20\text{ }\mu\text{L}$;再培养 4 h 后加 DMSO,每孔 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。置于摇床上摇匀 10 min 后测 OD 值。NK 杀伤率 (%) = $[1 - (\text{实验孔 A 值} - \text{效应细胞孔 A 值}) / \text{靶细胞孔 A 值}] \times 100\%$ ^[6]; T 淋巴细胞刺激指数 (SI) = ConA 刺激管的 A 值 / 对照管的 A 值^[9]。

2.2.7 Western Blot 检测 PI3K、Akt、mTOR 蛋白含量

提取各组样本组织中的总蛋白并测定蛋白浓度,配制 5%浓缩胶、8%分离胶,蛋白上样量 $20\text{ }\mu\text{g}$,在 200 mA 恒电流、冰浴条件下转膜 70 min,常温封闭孵育 5 h,洗膜,置于相应的一抗中 4°C 条件下孵育 1 夜,洗膜,再在二抗中常温孵育 1.5 h,洗膜,化学发光法显影,用 ImageJ 分析软件测定各个蛋白的灰度值含量,结果以目的蛋白与 β -actin 的比值表示。

2.3 统计学处理

采用 GraphPadPrism 8.0.1 和 SPSS Statistics 21 软件对数据进行差异性分析和作图, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 凯氏定氮法测定 SMT(S)蛋白含量测定

凯氏定氮法测定 SMT(S)中蛋白含量为 96.25%,如表 1 所示。

表 1 SMT(S)蛋白浓度
Tab 1 SMT(S) protein concentrations

样品名称	实验样品质量 m/g	消耗的酸滴定液 体积 V_1 /mL	空白消耗的酸 滴定液体积 V_2 /mL	反应消化液的 体积 V_3 /mL	酸标准液浓度 C /mol·L ⁻¹	总蛋白含量/%
SMT(S)	0.20	4.50	0.10	10.00	0.05	96.25

3.2 SMT(S)多肽谱图分析

通过 DENOVO 数据库进行分析，总共鉴定出 7 212 条多肽，其相对分子质量主要集中在 500-2000，如图 1；其氨基酸长度主要集中在 6-19AA，如图 2。

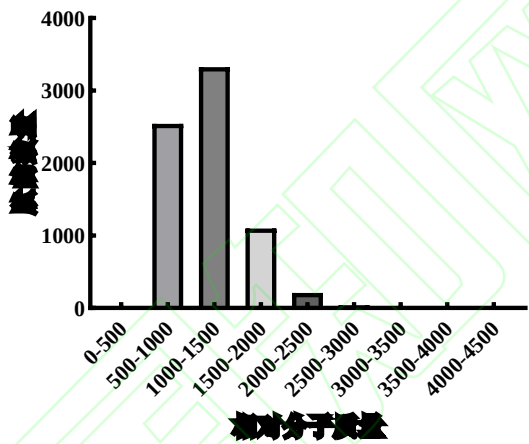


图 1 多肽分子量分布图
Fig 1 Molecular weight distribution of peptides

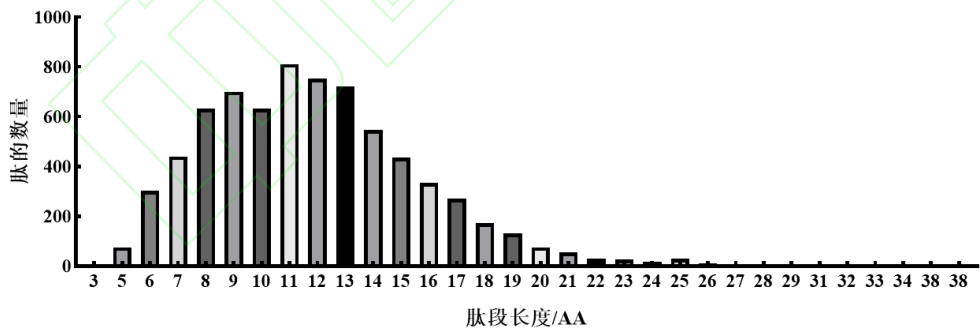
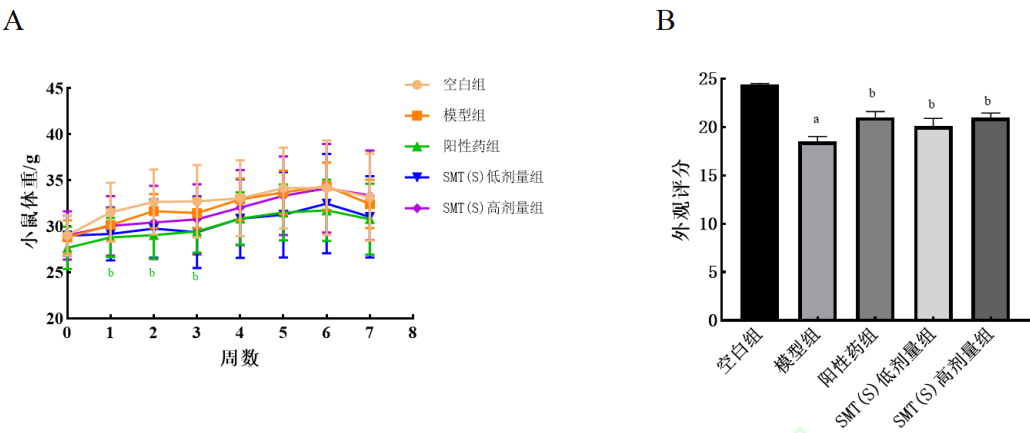


图 2 多肽长度分布图
Fig 2 Distribution of peptide length

3.3 SMT(S)对失眠小鼠一般行为学的影响

于末次注射 PCPA 后，模型组小鼠眼裂变宽，睡眠时间减少，易激惹，体质量增加缓慢，生长曲线如图 3A 所示，说明模型小鼠出现了失眠症状。SMT(S)对小鼠外观评分见图 3B，SMT(S)给药组较模型组的外观评分均显著升高，表明 SMT(S)对失眠后小鼠的一般状态有所改善。



A: SMT(S)对小鼠生长曲线的影响 (effect of SMT(S) on the growth curve of mice) ; B: SMT(S)对失眠小鼠的外观评分 (appearance scoring of insomniac mice by SMT(S)) ;

图 3 SMT(S)对失眠小鼠一般状态的影响
Fig 3 Effects of SMT(S) on the general state of insomniac mice

注 (note) : 与空白组相比 (vs.control group) , ^a*P*<0.05; 与模型组相比 (vs .model group) , ^b*P*<0.05

3.4 SMT(S)对失眠小鼠脏器指数的影响

如表 2 所示, 与空白组相比模型组脏器指数下降, 与模型组相比各给药组脏器指数均有显著升高 (*P*<0.05)。实验结果表明 SMT(S)可预防失眠小鼠的脑及免疫器官萎缩。

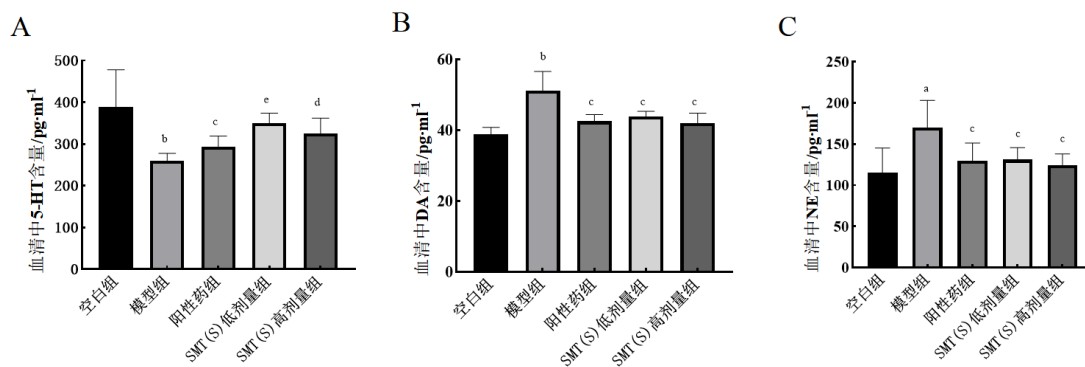
表 2 各组小鼠脏器指数 ($\bar{X} \pm s, n=10$)
Tab 2 Organ index of mice in each group ($\bar{X} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量/ (mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	动物只数/ 只	脑指数	胸腺指数	脾指数
空白组	—	10	1.71±0.21	0.20±0.06	0.41±0.07
模型组	300	10	1.48±0.13 ^a	0.13±0.04 ^a	0.31±0.07 ^a
阳性药组	65	10	1.65±0.14 ^b	0.19±0.07 ^b	0.40±0.08 ^b
SMT(S)低剂量组	33.6	10	1.69±0.20 ^b	0.18±0.04 ^b	0.38±0.05 ^b
SMT(S)高剂量组	268.8	10	1.69±0.17 ^b	0.19±0.04 ^b	0.41±0.07 ^b

注 (note) : 与空白组相比 (vs. control group) , ^a*P*<0.05; 与模型组相比 (vs .model group) , ^b*P*<0.05

3.5 SMT(S)对失眠小鼠血清中神经递质水平的影响

如图 4 所示, 与空白组比较模型组小鼠血清中 5-HT 的含量降低 (*P*<0.01)、DA 及 NE 含量升高 (*P*<0.05), 给予 SMT(S)可显著升高模型小鼠血清中的 5-HT 含量 (*P*<0.05), 降低 DA (*P*<0.05) 及 NE (*P*<0.05) 含量。表明失眠模型制备成功且 SMT(S)能预防失眠对神经递质的影响, 可改善失眠小鼠神经递质的水平。



A: 血清中 5-HT 含量 (serum 5-HT content); B: 血清中 DA 含量 (serum DA content); C: 血清中 NE 含量 (serum NE content)

图 4 SMT(S)对失眠小鼠神经递质水平的影响 (pg·ml⁻¹)
Fig 4 Effect of SMT(S) on neurotransmitter levels in insomniac mice (pg·ml⁻¹)

注 (note): 与空白组相比 (vs. control group), ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与模型组相比 (vs. model group), ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$, ^e $P<0.001$

3.6 SMT(S)对失眠小鼠焦虑状况的影响

如图 5 所示, 与空白组相比, 模型组小鼠在空旷场地运动频率更高, 运动轨迹更密集; 与模型组相比, SMT(S)组小鼠运动轨迹稀疏, 且在中央区停留时间、运动总路程及平均速度较模型组显著降低 ($P<0.05$)。表明失眠小鼠在空旷场地焦虑程度增加, SMT(S)可预防失眠小鼠的焦虑情况。

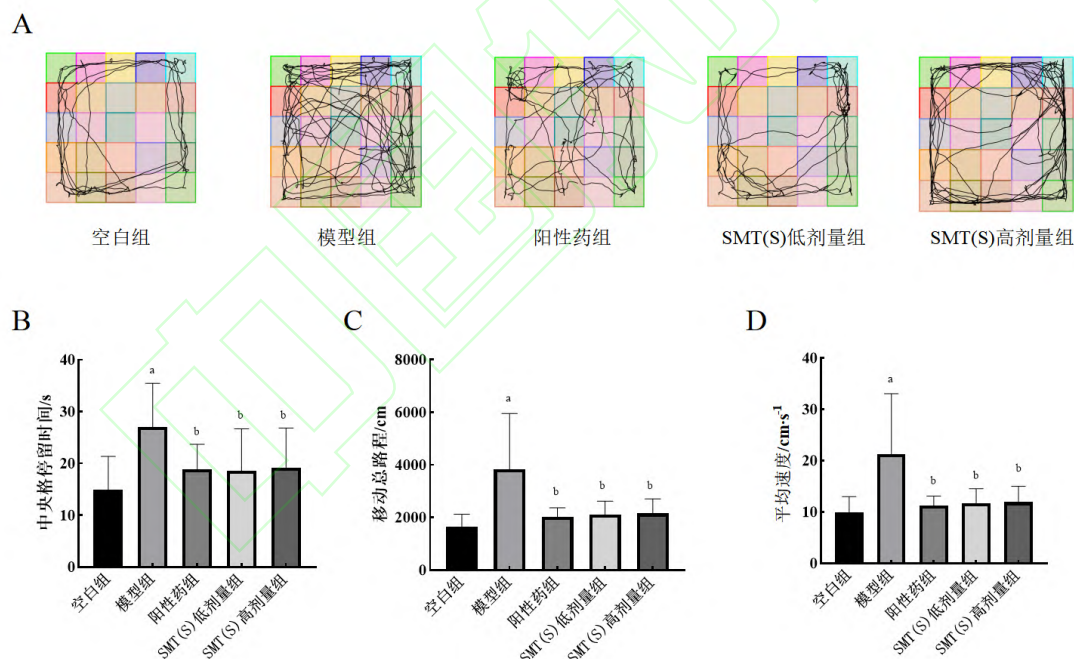


图 5 SMT(S)对小鼠失眠后焦虑情况的影响

A: 各组小鼠活动轨迹图; B 各组小鼠在中央区停留时间; C: 各组小鼠在旷场中移动总距离; D: 各组小鼠移动平均速度;

Fig 5 Effect of SMT(S) on anxiety after insomnia in mice

A: the activity trajectory diagram of each group of mice; B the residence time of each group of mice in the central area; C: the total distance moved by each group of mice in the open field; D: the average speed of the movement of each group of mice;

注 (note): 与空白组相比 (vs. control group), ^a $P<0.05$; 与模型组相比 (vs. model group), ^b $P<0.05$

3.7 SMT(S)对失眠小鼠学习和认知记忆能力的影响

如图 6 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠的潜伏期及总路程明显变长 ($P<0.05$); 与模型组相

比，SMT(S)组小鼠潜伏期显著减少（ $P<0.05$ ），总路程变短，结果表明小鼠在失眠状态下会出现空间和记忆认知障碍，经 SMT(S)干预后，可以提高失眠小鼠的学习和记忆能力。

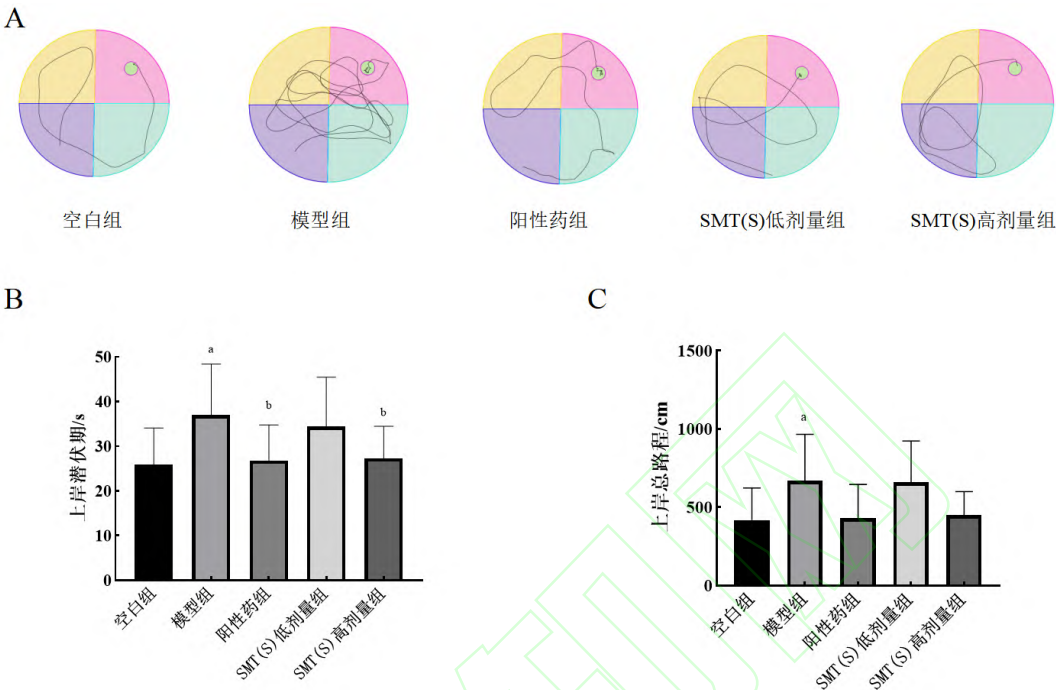


图6 SMT(S)对小鼠失眠后小鼠学习与认知能力的影响
A:各组小鼠活动轨迹图；B: 各组小鼠上岸潜伏期；C: 各组小鼠运动总路程；
Fig 6 Effect of SMT(S) on learning and cognitive ability of mice after insomnia in mice

A: activity trajectory diagram of mice in each group; B: latency to disembark in each group; C: total distance traveled by mice in each group;
注 (note) : 与空白组相比 (vs. control group) , ^a $P<0.05$; 与模型组相比 (vs .model group) , ^b $P<0.05$

3.8 SMT(S)对失眠小鼠免疫能力的影响

见图 7，与空白组相比，模型组 NK 细胞杀伤率及淋巴细胞刺激指数均有所降低（ $P<0.05$ ）；与模型组相比，经 SMT(S)干预的 NK 细胞杀伤率及 SI 有不同程度的升高，表明 SMT(S)可增加失眠小鼠的免疫功能。

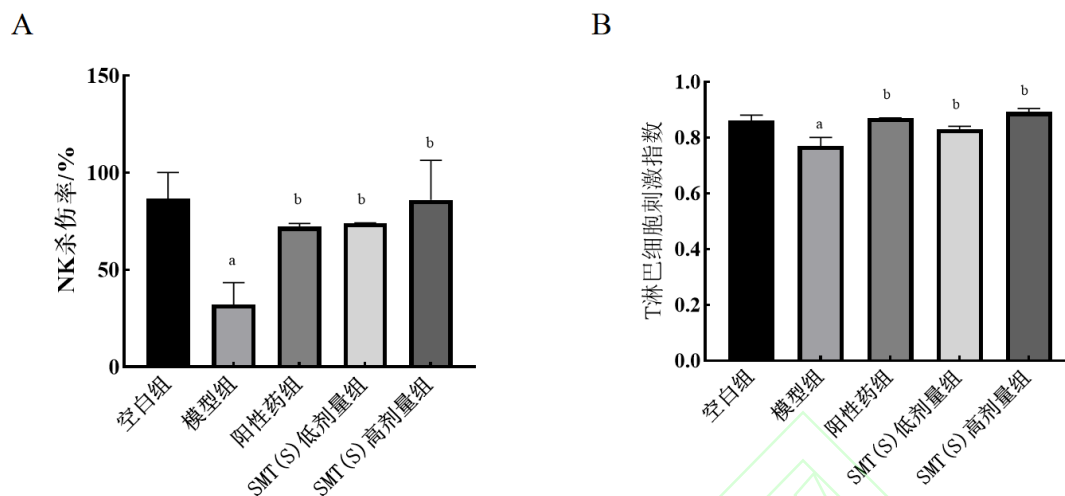


图7 SMT(S)对失眠小鼠免疫功能的影响

A: SMT(S)对NK细胞杀伤率的影响; B: SMT(S)对T淋巴细胞刺激指数的影响;

Fig 7 Effect of SMT(S) on immune function in insomniac mice

A: Effect of SMT(S) on NK cell killing rate; B: Effect of SMT(S) on T lymphocyte stimulation index;

注 (note): 与空白组相比 (vs. control group), ^a $P<0.05$; 与模型组相比 (vs. model group), ^b $P<0.05$

3.9 SMT(S)对失眠小鼠脑组织中PI3K/Akt信号通路蛋白表达的影响

如图8所示,与空白组相比,模型组小鼠脑组织中PI3K、Akt、mTOR表达量明显降低($P<0.05$);SMT(S)干预后小鼠脑组织中PI3K、Akt、mTOR表达量明显增高($P<0.05$)。表明SMT(S)可能是通过PI3K/Akt信号通路调节神经递质防治失眠。

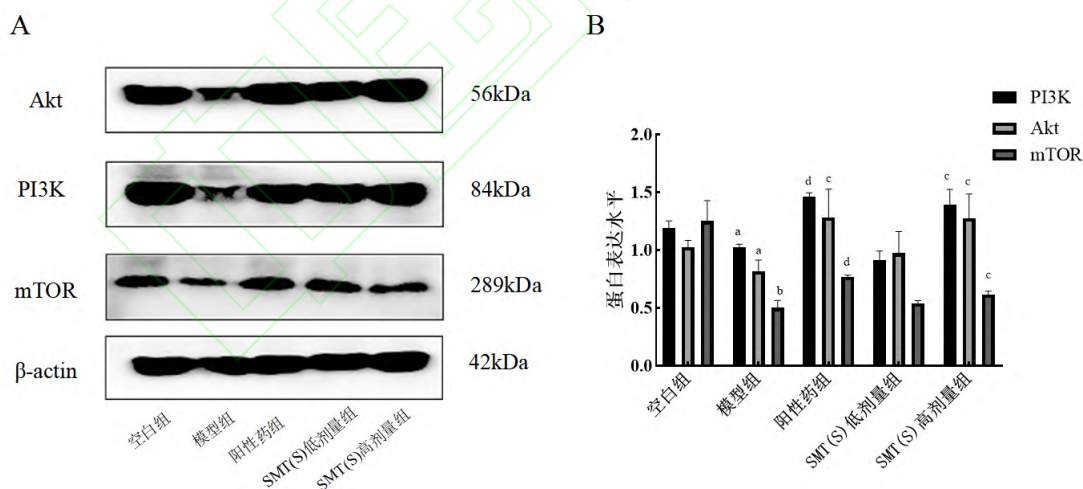


图8 SMT(S)对失眠小鼠PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达情况的影响

A: 各组小鼠脑中相关蛋白表达情况; B: 各组小鼠脑中相关蛋白相对表达量变化

Fig 8 Effect of SMT(S) on the expression of proteins related to PI3K/Akt signaling pathway in insomniac mice

A: Expression of related proteins in the brain of mice in each group; B: Changes in relative expression of related proteins in the brains of mice in each group;

注 (note): 与空白组相比 (vs. control group), ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$; 与模型组相比 (vs. model group), ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$

4 讨论

失眠是睡眠的始发和维持发生障碍,致使睡眠质量不能满足个体生理需要的一种睡眠障碍综合症,多受神经递质、免疫细胞因子等因素的影响^[10]。SMT(S)是从深海软体动物中提纯的小分子肽,其蛋白含量为 96.25%;肽段主要集中在 500-2000、6-19AA。通过腹腔注射 PCPA 复制失眠小鼠动物模型,当小鼠开始出现暴躁不安、具有攻击性、体质量减轻、昼夜节律紊乱等表现时并结合外观评分判定模型复制成功^[11]。

睡眠多受脑中特定神经递质等影响对大脑皮层产生抑制或易化。5-HT 能神经元能够促进下丘脑有催眠效应的肽类物质积累,同时与 NE、DA 等神经递质协同起效,诱导大脑进入睡眠状态^[12]。觉醒主要是通过强化中脑腹侧被盖区突触间的 DA 传递,易化突触后的 DA 受体功能而产生^[11]。存在于蓝斑头部的 NE 递质系统与脑电觉醒维持有关,脑内 NE 能神经元可抑制中缝核内 5-HT 神经元从而影响 NREM 睡眠^[13]。

神经递质的分泌与信号通路的激活有着密切的联系,有研究显示使用 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 阻断 PI3K/Akt 信号通路,细胞分泌的 5-HT、NE 等神经递质也随之减少,表明 PI3K/Akt 作为神经元细胞内重要的信号通路,是促进神经元细胞活性以及促进神经元细胞分泌神经递质的关键因素^[14]。研究显示经给药后可激活 PI3K/Akt 信号通路上相关蛋白的表达,对 PI3K/Akt 信号通路进行干预,可促进神经元修复^[15]。mTOR 是 PI3K 信号通路下游分子之一,主要的作用在于调节、控制细胞的自噬、消亡和新陈代谢等。已有大量的证据显示 mTOR 可以通过不同的分子机制来影响学习和记忆的形成^[16]。

综上所述,SMT(S)小分子肽可预防失眠后小鼠的认知能力下降以及焦虑情况,并能增强失眠后小鼠的免疫功能,其机制可能通过其中富含的酪氨酸、色氨酸等物质影响 5-HT、DA、NE 的生成继而影响了 PI3K/Akt 信号通路,从而改善了失眠症状。此研究为 SMT(S)在开发天然健康的防治失眠的保健品等提供实验室及理论基础。

参考文献:

- [1] Mellinger GD. Insomnia and its treatment[J]. Arch Gen Psychiatry, 1985, 42(3): 225.
- [2] 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.
Liang CW, Cao Y, Li J, et al. Milk-derived sleep-inducing peptides with extracts of *Semen ziziphi spinosae* and *Bulbus lili* improve sleep in rat models of insomnia[J]. Mod Food Sci Technol, 2021, 37(9): 1-7.
- [3] 易冲, 张泽坤, 王坤美, 等. 睡眠剥夺对小鼠氧化应激的影响及鳕寡肽 SEP-3 的干预作用[J]. 水产学报, 2022, 46(7): 1293-1303.
Yi C, Zhang ZK, Wang KM, et al. Effects of sleep deprivation on oxidative stress in mice and intervention of oligopeptide SEP-3 from skipjack (*Katsuwonus pelamis*)[J]. J Fish China, 2022, 46(7): 1293-1303.
- [4] 刘进, 王亚君. 基于凯氏定氮法测定鸡蛋蛋白质含量的研究分析[J]. 中国饲料, 2023(10): 74-77.
Liu J, Wang YJ. Study and analysis on determination of egg protein content based on Kjeldahl nitrogen determination method[J]. China Feed, 2023(10): 74-77.
- [5] 林嘉楠. 基于肾脑同治理论鹿茸改善衰老认知功能障碍的作用与物质基础研究[J]. 2023.
Lin JN. Study on the effect and material basis of deer antler to improve cognitive dysfunction in aging based on the theory of kidney-brain homoeopathy[J]. 2023.
- [6] 刘忠平, 庞慧民, 赵云霄, 等. 白头翁水提物对小鼠免疫功能影响[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(2): 211-212.
Liu ZP, Pang HM, Zhao YX, et al. Effect of aqueous extract of *Pulsatilla chinensis* on immune function in mice[J]. Chin J Public Health, 2009, 25(2): 211-212.
- [7] 郇红利, 涂星, 卢映, 等. 土家苗药夜关门对小鼠实验性失眠的疗效观察与机制初探[J]. 中成药, 2014, 36(2): 383-385.
Gao HL, Tu X, Lu Y, et al. Observation on the therapeutic effect and mechanism of Tujia Miao medicine Yeguanmen on experimental insomnia in mice[J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(2): 383-385.
- [8] 李璟怡, 黄俊山, 陈沁, 等. 松郁安神方对肝郁失眠大鼠行为学及 5-HT_{1A} 受体基因表达的影响[J]. 福建中医药, 2019, 50(6): 22-24, 29.
Li JY, Huang JS, Chen Q, et al. Effect of songyu Anshen prescription on behavior and gene expression of 5-HT_{1A} receptor in liver depression and insomnia rats[J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2019, 50(6): 22-24, 29.
- [9] 程强, 郭双双, 丁斌鹰, 等. 日粮中添加包被肉桂油对肉鸡非特异性免疫功能的影响[J]. 中国家禽, 2017, 39(18): 28-33.
Cheng Q, Guo SS, Ding BY, et al. Effects of dietary coated-cinnamon on non-specific immun function of broiler chickens[J]. China Poult, 2017, 39(18): 28-33.
- [10] 王瑞英, 苏丹, 李惠珍, 等. 生、酒五味子对失眠小鼠神经-内分泌-免疫网络的影响及机制[J]. 中国药房, 2023, 34(5): 525-530, 536.

- Wang RY, Su D, Li HZ, *et al.* Effects of raw and wine-processed *Schisandra chinensis* on neuro-endocrine-immune network in insomnia mice and its mechanism[J]. China Pharm, 2023, 34(5): 525-530, 536.
- [11] Oades R D, Halliday G M. Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity[J].
- [12] 李洁, 牟娜, 宋永祯等. 右佐匹克隆联合谷维素片治疗围绝经期女性焦虑性失眠的疗效及对相关神经递质的影响[J]. 中国医院药学杂志, : 1-7.
- LI J, Mou N, Song YZ, *et al.* Efficacy of dexzopiclone combined with ghrelin tablets in the treatment of anxiety insomnia in perimenopausal women and the effect on related neurotransmitters[J]. Chin J Hosp Pharm, : 1-7.
- [13] el Mansari M, Sakai K, Jouvet M. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats[J]. Exp Brain Res, 1989, 76(3): 519-529.
- [14] 刘淑梅, 李丽华, 鲁俊华, 等. PI₃k/Akt 信号通路在维生素 D 促进神经递质分泌中的作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2020, 40(11): 1597-1602.
- Liu SM, Li LH, Lu JH, *et al.* Mechanism of vitamin D promoting the secretion of neurotransmitters via PI₃k/Akt signaling pathway[J]. J Nanjing Med Univ Nat Sci, 2020, 40(11): 1597-1602.
- [15] 曲中原, 王淇璇, 周游, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和网络药理学方法探讨短梗五加改善失眠的潜在药效成分及作用机制[J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(24): 2629-2637.
- Qu ZY, Wang QX, Zhou Y, *et al.* Study on the potential pharmacodynamic components and mechanism of *Eleutherococcus sessiliflorus* in improving insomnia based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology[J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(24): 2629-2637.
- [16] 汝文娟, 唐少君, 钟翎. mTOR 信号通路及其与阿尔茨海默病的关系[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8): 70-75.
- Ru WJ, Tang SJ, Zhong L. The mTOR pathway and its relationship with Alzheimer's disease[J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(8): 70-75.