

· 论 著 ·

产 γ -氨基丁酸的复合益生菌制品对睡眠的改善作用

李玲¹, 杨玲¹, 路江浩¹, 孙策¹, 仵红岩¹, 鄢梦洁¹, 齐世华¹, 何方^{1,2}, 顾文源³, 赵林森¹

1. 河北一然生物科技股份有限公司研发中心, 河北 石家庄 050000;

2. 四川大学华西公共卫生学院; 3. 河北省动物疫病预防控制中心

摘要: 目的 探讨由产 γ -氨基丁酸(GABA)的特性菌株制得的复合益生菌制品对睡眠的改善作用。**方法** 将产 GABA 的特性菌株按照一定比例进行复配作为发酵剂, 经长时发酵后得到益生菌及其代谢产物的混合物, 喷雾干燥后制得复合益生菌制品。非靶标代谢组学检测复合益生菌制品中的代谢产物种类, 再通过人群试验验证复合益生菌制品对睡眠的改善作用。招募患有睡眠障碍人群, 设置复合益生菌制品作为试验组, 同等剂量的 GABA 作为对照组, 每组 50 人, 干预时间为 2 周, 通过匹斯堡睡眠指数量表(PSQI)和睡眠症状改善情况(包括入睡时间、半夜醒来次数及再次入睡情况、睡眠总时长)对受试人群进行干预前后对比。**结果** 经非靶标代谢组学检测复合益生菌制品的代谢产物非常丰富, 除神经递质类物质 GABA 外, 还有抗氧化物质如谷氨酰胺、脯氨酸、甜菜碱等, 乙酸、丁酸盐类等短链脂肪酸及各种氨基酸、维生素类。这些成分在神经调节过程中发挥着重要的作用。人群试验经 2 周的干预后, 试验组 PSQI 评分显著下降($t=6.120, P<0.0001$), 第 1 周下降了 34.6%, 第 2 周下降了 42.0%; 对照组 PSQI 评分也显著下降($t=2.716, P<0.0100$), 第 1 周下降了 16.0%, 第 2 周下降了 22.2%。**结论** 综合 PSQI 评分和睡眠症状改善情况, 都表明了复合益生菌制品的干预效果优于同等剂量的 GABA。推测复合益生菌制品可能通过肠道菌群及代谢产物-肠-脑轴的互动, 进而影响免疫和神经内分泌起到调节神经的作用, 从而改善睡眠。**关键词:** 睡眠障碍; 复合益生菌制品; 代谢产物; γ -氨基丁酸
中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-376X (2022) 09-1006-07
DOI 编码: 10.13381/j.cnki.cjm.202209003

Effect of compound probiotics with GABA production for sleep improvement

LI Ling*, YANG Ling, LU Jiang-hao, SUN Ce, WU Hong-yan, YAN Meng-jie,

QI Shi-hua, HE Fang, GU Wen-yuan, ZHAO Lin-sen

*Hebei Inatural Biotech Co., Ltd. R & D Center, Shijiazhuang, Hebei 050000, China

Corresponding author: ZHAO Lin-sen, E-mail: zhaolinsen@yrs-w.cn

Abstract: Objective To observe the effects of compound probiotics prepared from a characteristic strain with high γ -aminobutyric acid (GABA) production for sleep improvement. **Methods** The strain with high yield of GABA was mixed in a certain proportion as the starter to obtain the mixture of probiotics and its metabolites through long-time fermentation. The compound probiotics were prepared by spray drying of the mixture. The metabolites in the compound probiotics were detected with non-target metabolomics method, and the improvement effect of the compound probiotics on sleep was verified through population test. Individuals with sleep disorders were enrolled and divided into compound probiotics group and GABA control group, 50 people in each group. The intervention period was 2 weeks. Pittsburgh Sleep Index Scale (PSQI) and improvement in sleep symptoms (including time to fall asleep, times of waking up and falling asleep again in the middle of the night, and total sleep duration) were compared before and after the intervention. **Results** The metabolites of the compound probiotics contained rich components by non-target metabolomics. Besides neurotransmitter substance GABA, there were antioxidant substances (such as glutamine, proline and betaine, etc.), acetic acid, butyrate and other short chain fatty acids, as well as various amino acids and vitamins. These components play an important role in neuroregulation. After 2 weeks of intervention, the PSQI in the probiotics group decreased significantly($t=6.120, P<0.0001$)

基金项目: 河北省农业高质量发展关键共性技术攻关专项项目(21322804D)

作者简介: 李玲(1983-), 女, 硕士, 工程师, 从事营养与食品卫生学研究, E-mail: 694854613@qq.com

通信作者: 赵林森(1969-), 男, 硕士, 经济师, 从事经营管理工作, E-mail: zhaolinsen@yrs-w.cn

by 34.6% in the first week and 42.0% in the second week; The PSQI in the control group also significantly decreased ($t=2.716$, $P<0.010$), 16.0% in the first week and 22.2% in the second week. **Conclusion** The overall PSQI and improvement in sleep symptoms showed that the intervention effect of compound probiotics is better than that of the same dose of GABA. It is speculated that the complex probiotics products may affect the immune system and neuroendocrine to regulate the nerves through the interaction of intestinal flora and metabolites-gut-brain axis, thus improving sleep.

Keywords: Sleep disorder; Compound probiotic products; Metabolites; γ -aminobutyric acid

睡眠是一种重要的生理现象, 不仅是基本的自主神经功能调节过程, 也是身体体能恢复、记忆整合及巩固等过程的重要环节。睡眠障碍是指睡眠质和量的异常, 以及在睡眠过程中发生的一系列临床症状^[1-5]。长期的睡眠障碍会对个人身体、心理及社会功能造成损害, 不仅影响个体的生活质量, 而且还会诱发精神类疾病、心脑血管疾病等^[6-7]。目前, 市面上有很多 γ -氨基丁酸类的助睡眠产品, γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)由谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸而来, 是人体中枢神经系统中一种重要的抑制性神经递质, 具有很多重要的生理功能, 它能够抑制交感神经系统的兴奋, 起到催眠、镇静和抗焦虑等作用^[8]。

人体胃肠道内定居着数量庞大的微生物群, 这些微生物寄居在肠道内, 与机体形成了稳定的共生关系^[9]。随着微生物代谢组学的发展, 越来越多的研究发现肠道菌群及其代谢产物参与了人类多种疾病的发生、发展^[3-5], 近年来人们开始关注肠道菌群与中枢神经系统之间的关系, 肠道菌群及其代谢产物可通过多种途径与大脑相互作用, 形成菌-肠-脑轴^[10]。睡眠是由大脑调节的, 肠道菌群及其代谢产物可能在睡眠调节中发挥着重要的作用^[11-12]。

本实验室前期筛选出了 3 株高产 GABA 的特性菌株, 分别为瑞士乳杆菌 L551、副干酪乳杆菌 L578、嗜热链球菌 S709, 本研究将 3 株菌按照一定比例组成发酵剂, 经长时发酵后收集包含菌体及代谢产物的发酵液, 喷雾干燥后制得复合益生菌制品。非靶标代谢组学检测分析后得知, 复合益生菌制品代谢产物非常丰富, 其中不仅包含抑制性神经递质 GABA, 还有抗氧化物质如谷氨酰胺、脯氨酸、甜菜碱等, 以及其他物质如乙酸、丁酸盐等及各种氨基酸、维生素类。由益生菌及代谢产物参与睡眠调节的相关途径和作用机制的深入研究, 将会为睡眠障碍的治疗提供一条新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜热链球菌 S709、副干酪乳杆菌 L578、

瑞士乳杆菌 L551 分离自西藏那曲传统乳制品, 经中国科学院微生物研究所鉴定。

1.1.2 主要试剂 甲醇(LC-MS级)、乙腈(LC-MS级)、乙酸铵(LC-MS级)、氨水(LC-MS级)、 γ -氨基丁酸标准品(阿拉丁)均购自 CNW Technologies 公司, 稀盐酸(0.2 mol/L, pH 值 2.3 左右, 茂名市润景化工有限公司生产), 衍生剂: 1% 的 2,4-二硝基氟苯(DNFB)乙腈溶液(美国 Sigma 公司生产), NaHCO₃ 水溶液(0.5 mol/L, pH 值 9.0, 国药集团化学试剂有限公司生产), 脱脂奶粉[恒天然商贸(上海)有限公司生产], 葡萄糖(西王集团生产), 纯净水(娃哈哈集团生产)。

1.1.3 主要设备 超高效液相色谱仪(Vanquish), 高分辨质谱仪(Q Exactive HFX), 离心机(Heraeus Fresco17), 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 天平(BSA124S-CW)购自 Sartorius 公司; 研磨仪(JXFST-PRP-24)购自上海净信科技有限公司; 超声仪(PS-60AL)购自深圳市雷德邦电子有限公司; 高效液相色谱仪(1260 Infinity II)购自 Agilent Technologies 公司; 离心机(TG16-WS)购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 水浴锅(HWS26 型)购自上海一恒科技有限公司; 高压均质机(YJGY-70-80)购自天津市特思达食品机械有限公司; 高速离心喷雾干燥塔购自无锡市林洲干燥设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 检测菌株产 GABA 含量

1.2.1.1 发酵培养基(鲜牛奶 920 g、白砂糖 80 g) 50 °C~60 °C 搅拌化料 15 min, 17~20 MPa 高压均质后, 置于 1 L 的三角瓶中 95 °C 灭菌 5 min, 再降温至 42 °C, 嗜热链球菌 S709、副干酪乳杆菌 L578、瑞士乳杆菌 L551 三株乳酸菌菌粉, 分别按照单菌株、两两复配、三株复配形式接种至发酵培养基中, 接种量均为 0.003%(w/w), 42 °C 发酵 10 h 后终止, 4 °C 保藏备用。

1.2.1.2 (1)标准溶液的制备: 准确称取 0.01、0.02、0.05、0.08、0.10 g GABA 标准品(准确至 0.000 1 g), 分别用水溶解定容至 100 mL, 制作 0.1、0.2、0.5、0.8、1.0 mg/mL 的标准溶液。(2)样品溶液的制备:

准确称取上述发酵样品 0.5 g 加少量水溶解, 加稀盐酸 200 μL , 用水定容至 4 mL, 消旋震荡 1 min, 8 500 r/min(离心半径 6.34 cm)室温离心 10 min, 取上清液。(3)柱前衍生化: 取上清液(或标准溶液)1 mL 置 10 mL 棕色瓶中, 加 NaHCO_3 水溶液 1 mL 震荡, 再加 1 mL 衍生剂(避光操作), 震荡混匀; 水浴锅中 60 $^{\circ}\text{C}$ 暗反应 1 h; 冷却后震荡, 过 0.22 μm 水系滤膜, 进样。(4)高效液相色谱分析条件: 流动相 A 为 50% 乙腈(量取 500 mL 乙腈加 500 mL 娃哈哈水, 充分摇匀, 过有机系滤膜, 超声脱气 20~30 min), 流动相 B 为乙酸铵水溶液(20 mmol/L)(精密称取乙酸铵 15.4 g, 加娃哈哈纯净水溶解并定容至 1 000 mL, 用冰醋酸调节 pH 值至 7.0, 搅拌均匀, 过水系滤膜, 超声脱气 20~30 min)。采用梯度洗脱: 0~20 min, 82%~20% B; 21~42 min, 20%~82% B。流动相流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积 20 μL , 检测波长 360 nm。(5)标准曲线: 分别准确吸取 1 mL 各浓度的标准溶液, 进行色谱分析, 以峰面积—标准溶液的进样量作图, 绘制标准曲线和回归方程, 线性相关系数 R 应为 0.999 0 以上。

1.2.2 制备复合益生菌制品 经筛选得到的瑞士乳杆菌 L551、副干酪乳杆菌 L578、嗜热链球菌 S709 三株乳酸菌菌粉按照一定比例复配成发酵剂, 发酵培养基(脱脂奶 80 g/L、葡萄糖 50 g/L、纯水 870 g/L)55 $^{\circ}\text{C}$ 化料, 经 20 min 水合后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 灭菌, 降温至 42 $^{\circ}\text{C}$, 接种发酵剂, 接种量为 0.003%(w/w), 42 $^{\circ}\text{C}$ 保温发酵 30 h 后终止, 收集发酵液, 喷雾干燥制得复合益生菌制品, 具体参数为进风温度 170 $^{\circ}\text{C}$ 、出风温度 100 $^{\circ}\text{C}$ 、流量 200 kg/h。

1.2.3 非靶标代谢组学检测

1.2.3.1 称取复合益生菌制品, 加入 4 mL 提取液[甲醇:乙腈:水=2:2:1(v/v), 含同位素标记内标混合物], 震荡 30 s 混匀, 冰水浴超声 5 min; -40 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min(离心半径 6.34 cm)室温离心 15 min; 取上清液备用, 另取等量上清液混合成 QC 质控样品上机检测^[13]。

1.2.3.2 液相色谱柱: 2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm ; 流动相 A: 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水等体积混合, 流动相 B: 纯乙腈。梯度洗脱: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~7.0 min, 95%~65% B; 7.0~8.0 min, 65%~40% B; 8.0~9.0 min, 40% B; 9.0~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12.0 min, 95% B。流速: 0.5 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 样品盘温度: 4 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积: 2 μL ^[14]。质谱条件: 鞘气流速为 50 Arb, 辅助气流速为 10 Arb, 离子传输管温度为 320 $^{\circ}\text{C}$, 全扫描分辨率为 60 000, 二级质谱

分辨率为 7 500, 碰撞能为 10/30/60(NCE 模式), 喷雾电压为 3.5 kV(正模式)或 -3.2 kV(负模式)^[15]。**1.2.3.3 通过峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理**, 于 BiotreeDB(v2.1)软件自建二级质谱数据库匹配进行物质注释, 算法打分的 Cutoff 值设为 0.3^[16]。

1.3 统计量表

1.3.1 匹兹堡睡眠质量指数量表(pittsburgh sleep quality index, PSQI)^[17] 睡眠质量评估的自评量表, 量表包括主观睡眠评价、入睡时间、睡眠时长、睡眠效率、睡眠障碍、安眠药物的使用情况、日间功能等 7 个组成部分, 每个部分按 0~3 分来计分, 累积各项得分为 PSQI 总分, 总分范围为 0~21 分^[18]。PSQI 总分越高, 说明睡眠质量越差。

1.3.2 睡眠情况统计 包括入睡时间、半夜醒来次数及再次入睡情况、睡眠总时长, 主要对睡眠障碍相关症状进行统计。

1.4 诊断标准 采用《中国精神障碍分类与诊断标准第三版(精神障碍分类)》^[19]中对失眠的诊断标准, 包括入睡困难、睡眠维持困难、早醒、日间功能障碍等, 每周发生 3 次以上, 并且持续 1 个月以上, 非其他疾病引起的。

1.5 纳入标准 PSQI 得分为 8 分及以上的患有睡眠障碍的 18 岁以上人群作为观察对象, 随机分为 2 组, 每组 50 人, 复合益生菌制品为试验组, 同等剂量的 GABA 作为对照组, 2 组人群在性别和年龄上差异无统计学意义, 具有可比性。

1.6 排除标准 (1)心肝肾等功能异常者;(2)患有严重精神类疾病者;(3)入组前 1 周接受其他药物治疗者;(4)酗酒者^[20];(5)在试验期内不能遵守试验规定或中途服用其他助睡眠产品者。

1.7 产品组成及干预方式 试验组: 复合益生菌制品、麦芽糊精, 6 g/袋; 对照组: 同等剂量的 GABA(GABA 含量为 100 mg/袋)、麦芽糊精, 6 g/袋。干预剂量及服用方式: 每天 1 袋, 晚饭后服用, 温水(低于 37 $^{\circ}\text{C}$)冲服, 服用周期为 2 周。

1.8 统计学分析 每周收集受试人群 PSQI 和睡眠症状统计量表, 采用统计学软件 SPSS 17.0 分析数据。计数资料以率(%)表示, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 GABA 标准曲线 以峰面积为纵坐标, GABA 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见图 1、图 2。

2.2 菌株产 GABA 含量 由各单株及复配后的菌株

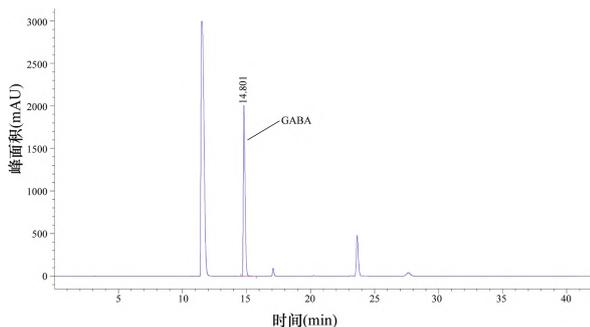


图1 γ -氨基丁酸标准品(50 $\mu\text{g/g}$)液相色谱图

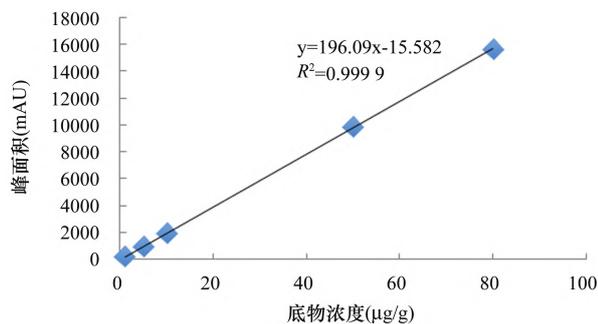


图2 γ -氨基丁酸标准曲线

组合 GABA 检测结果得知, 3 株菌按照一定的比例复配后, 产生的 GABA 在同等条件下发酵得到的最多。见图 3、表 1。

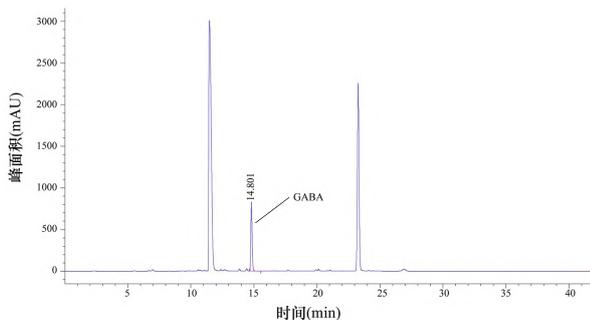


图3 复合益生菌制品液相色谱图

表 1 各单菌株及复配后 γ -氨基丁酸含量

发酵菌株	产 γ -氨基丁酸量 ($\mu\text{g/g}$)
瑞士乳杆菌 L551	112.27 \pm 1.36
副干酪乳杆菌 L578	21.78 \pm 1.13
嗜热链球菌 S709	5.08 \pm 0.41
瑞士乳杆菌 L551+副干酪乳杆菌 L578	113.38 \pm 3.08
瑞士乳杆菌 L551+嗜热链球菌 S709	394.92 \pm 13.40
副干酪乳杆菌 L578+嗜热链球菌 S709	10.93 \pm 1.34
瑞士乳杆菌 L551+副干酪乳杆菌 L578+嗜热链球菌 S709	595.64 \pm 8.14

2.3 UHPLC-QE-MS 非靶标代谢组学检测 采用高通量、高灵敏度的 UPLC-QTOF-MS 技术分别对正离子及负离子模式下的复合益生菌制品进行信息采集, 生成基峰色谱图。由于正负离子模式下离子的响应相差不大, 后续实验将主要采用正离子采集模式对数据处理过程进行分析。通过非靶标代谢组学的检测结果可知, 复合益生菌制品代谢产物的种类很多, 其中不仅包含抑制性神经递质 GABA, 还有抗氧化物质如谷氨酰胺、脯氨酸、甜菜碱等, 以及其他物质如乙酸、丁酸盐等及各种氨基酸、维生素类。见图 4、表 2。

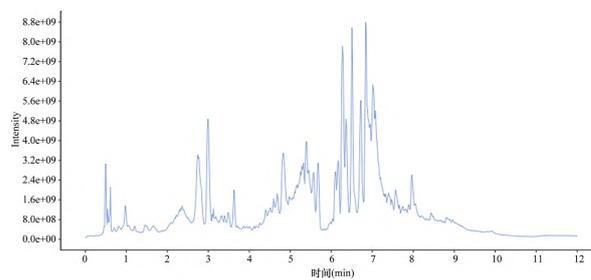


图4 复合益生菌制品 UHPLC-QE-MS 检测正离子模式 TIC 图

2.4 干预前 2 组数据 PSQI 对比 干预前 PSQI 评分对照组 (11.760 0 \pm 0.513 3, $n=50$)和试验组 (12.280 0 \pm 0.497 7, $n=50$)比较差异无统计学意义 ($t=0.721 6$, $P=0.472 3$)。

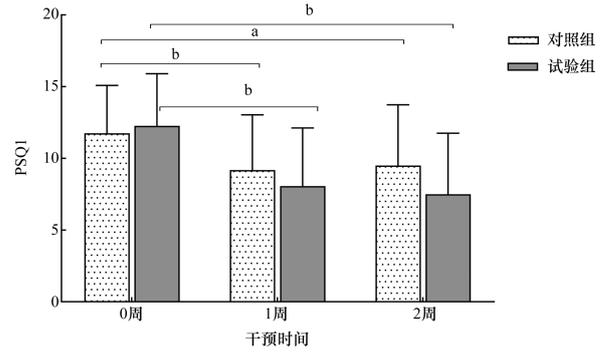
2.5 PSQI 统计 经 2 周干预后, 试验组 PSQI 评分显著下降 ($t=6.120 0$, $P<0.000 1$), 第 1 周下降了 34.6%, 第 2 周下降了 42.0%; 对照组 PSQI 评分也显著下降 ($t=2.716 0$, $P=0.008 1$), 第 1 周下降了 16.0%, 第 2 周下降了 22.2%。见图 5。

2.6 入睡时间统计 统计干预前后能在 30 min 内入睡的人群占比, 干预 2 周后, 与干预前相比, 试验组入睡时间差异有统计学意义 ($t=5.185 0$, $P<0.000 1$), 能在 30 min 内入睡的人数占比由原来的 23.0% 增加至 77.0%; 对照组干预前后入睡时间差异有统计学意义 ($t=2.168 0$, $P=0.033 0$), 能在 30 min 内入睡的人数占比由原来的 17.0% 增加至 38.0%。见图 6。

2.7 半夜醒来情况统计 干预 2 周后, 与干预前相比, 试验组半夜醒来次数差异有统计学意义 ($t=3.020 0$, $P=0.003 2$), 一觉到天亮的人数占比由原来的 11.0% 增加至 25.0%, 半夜醒来不能很快入睡的人数占比由原来的 57.0% 降至 19.0%; 而对照组干预前后半夜醒来次数差异无统计学意义 ($t=0.514 5$, $P=0.608 3$), 一觉到天亮的人数占比干预前后没有变化, 半夜醒来不能很快入睡的人数占比由原来的 50.0% 降至 29.0%。见图 7。

表 2 复合益生菌制品主要代谢产物信息表

编号	化合物	类别	CAS	平均响应值
1	海藻糖	糖类	99-20-7	0.02
2	D-脯氨酸	氨基酸	344-25-2	0.74
3	肌酐	氨基酸	60-27-5	184.91
4	L-脯氨酸	氨基酸	147-85-3	77.59
5	L-组氨酸	氨基酸	71-00-1	0.50
6	L-苯丙氨酸	氨基酸	63-91-2	0.39
7	肌酸	氨基酸	57-00-1	0.17
8	L-天冬酰胺	氨基酸	70-47-3	0.05
9	牛磺酸	有机酸	107-35-7	0.11
10	胞嘧啶	核苷	71-30-7	29.92
11	胆碱	其他有机氮化合物	62-49-7	126.18
12	烟酰胺	维生素类	98-92-0	1.17
13	甜菜碱	生物碱	107-43-7	8.31
14	腺苷	核苷	58-61-7	1.01
15	茶碱	生物碱	58-55-9	0.26
16	左旋肉碱	其他有机氮化合物	541-15-1	92.33
17	L-丙氨酸	氨基酸	56-41-7	6.47
18	焦谷氨酸	氨基酸	98-79-3	1.18
19	水苏碱	氨基酸	471-87-4	9.87
20	核黄素	维生素类	83-88-5	0.26
21	酪氨酸	氨基酸	492-27-3	0.09
22	缬氨酸	氨基酸	72-18-4	0.83
23	3-氨基异丁酸	氨基酸	144-90-1	0.93
24	L-苏氨酸	氨基酸	72-19-5	0.92
25	L-色氨酸	氨基酸	73-22-3	1.18
26	瓜氨酸	氨基酸	372-75-8	0.36
27	L-赖氨酸	氨基酸	56-87-1	2.24
28	磷酸胆碱	其他有机氮化合物	626 852	3.21
29	乳糖 6-磷酸	有机氧化合物	6 665-00-5	0.01
30	3-氨基己酸	氨基酸	91 298-66-7	0.37
31	4-氨基丁酸	氨基酸	56-12-2	13.18
32	小檗碱	生物碱	2 086-83-1	0.05
33	吡多素	有机杂环化合物	65-23-6	0.32
34	泛酸	维生素	79-83-4	0.41
35	硫胺素	维生素	59-43-8	0.11
36	甲基咪唑乙酸		2 625-49-2	0.21
37	L-精氨酸	氨基酸	17 035-90-4	0.17
38	甘油磷酸酯	甘油磷脂类	20 883	0.00
39	甘磷酸胆碱	甘油磷脂类	28 319-77-9	126.25
40	L-酪氨酸	氨基酸	60-18-4	0.36
41	咖啡因	生物碱	21 399	0.34
42	L-蛋氨酸	氨基酸	63-68-3	0.98
43	L-组氨酸	氨基酸	4 836-52-6	0.30
44	L-亮氨酸	氨基酸	61-90-5	0.33
45	透明质酸		9 004-61-9	23.37
46	高丝氨酸	氨基酸	672-15-1	1.07
47	叶黄素 B	维生素	34 323-07-4	1.30
48	吡哆胺	有机杂环化合物	85-87-0	0.15
49	乙酰高丝氨酸	氨基酸	7 540-67-2	11.02
50	DL-3-氨基-n-丁酸	氨基酸	541-48-0	0.54
51	4-三甲基氨基丁酸	脂肪酸类	407-64-7	0.08
52	L-谷氨酰胺	氨基酸	56-85-9	0.69
53	D-塔格糖	糖类	87-81-0	0.44



注：a、b 代表经比较差异有统计学意义， $P < 0.05$ 。

图 5 干预前后 2 组受试人群 PSQI 评分统计

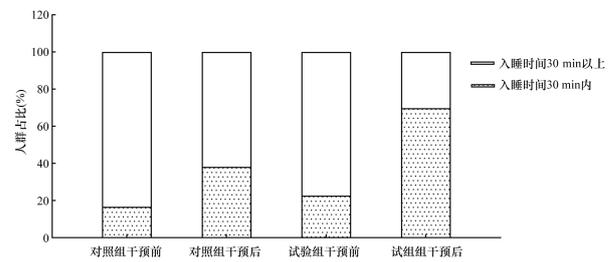


图 6 干预前后 2 组受试人群入睡时间统计

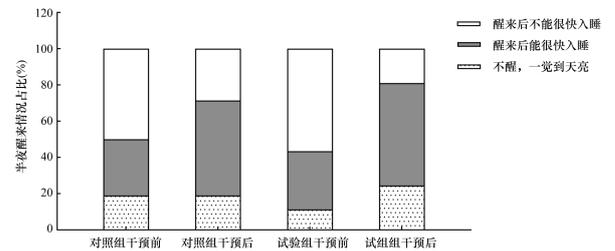


图 7 干预前后 2 组受试人群半夜醒来情况统计

2.8 睡眠总时长统计 干预 2 周后，与干预前相比，试验组睡眠时长差异有统计学意义 ($t=3.967 0$, $P=0.000 1$)，睡眠总时长在 7 h 以上的人数占比由原来的 4.0% 增加至 23.0%；对照组干预前后睡眠时长差异有统计学意义 ($t=2.584 0$, $P=0.011 5$)，睡眠总时长在 7 h 以上的人数占比由原来的 7.0% 增加至 19.0%。见图 8。

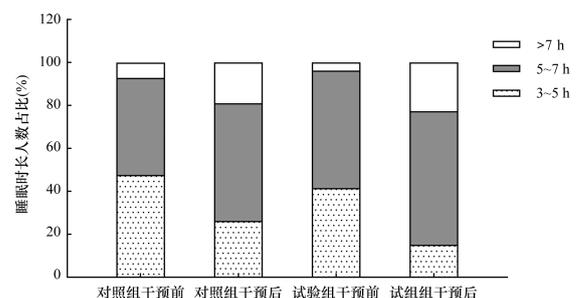


图 8 干预前后 2 组受试人群睡眠时长统计

综上, 试验组和对照组对于睡眠障碍人群的改善效果、PSQI 评分、入睡时间、半夜醒来情况及睡眠总时长进行对比, 结果表明服用复合益生菌制品对睡眠的改善效果优于服用同等剂量的 GABA。

3 讨论

3.1 菌-肠-脑轴的作用机制 肠道菌群是脑肠轴中的重要参与者, 可通过多种途径与睡眠发生相互作用^[21-22], 包括神经内分泌、免疫、代谢等途径^[23]。神经内分泌途径: 宿主和微生物中存在许多相同的神经递质, 如 GABA、乙酰胆碱、多巴胺、血清素等, 并且微生物产生的这些神经递质类物质与宿主体内的生物化学途径完全相同^[24]。由肠道微生物产生的神经递质既可以从肠道吸收, 进入门静脉循环, 也可以直接与肠神经系统的受体结合, 从而影响大脑功能。因此, 由宿主和微生物产生的神经递质可以作为肠道菌群-肠-脑轴内调节大脑与认知行为的一种机制^[25]。免疫途径: 肠道菌群与宿主的免疫系统相互影响, 该途径是通过菌群的代谢产物及迷走神经等在肠道与大脑之间的双向信号通路实现的^[26]。肠道菌群及其代谢产物可通过调节炎症因子影响睡眠, 与睡眠相关的炎症因子有 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等^[27]。其中 TNF- α 具有调节神经内分泌的功能, 可通过促进脑组织中血清素的分泌来增加慢波睡眠^[28]。代谢途径: 生物钟的紊乱及长期睡眠不足都会导致生理应激反应, 从而打破肠道微生物种群平衡, 继而发生细菌易位及脂多糖(LPS)增加, 导致肠上皮屏障通透性增强^[29], 引发一系列慢性炎症反应, 致使代谢功能紊乱^[30-31]。动物实验中发现^[32], 睡眠剥夺后的小鼠不仅肠道菌群发生了改变, 并且导致小鼠体内代谢紊乱, 如胰岛素抵抗及脂肪组织的炎症变化。

3.2 实验结果分析 睡眠剥夺会提升机体的氧化应激水平, 加大细胞的代谢负担, 破坏多种生物大分子, 特别是 DNA^[33]。有研究表明^[34], 睡眠剥夺后小鼠肝脏组织中 SOD 活性显著下降, MDA 活性显著升高。说明睡眠剥夺后 ROS 堆积, 小鼠肝脏的抗氧化能力下降, 而 MDA 活性升高表明机体细胞受到了 ROS 的攻击, 引起了细胞的损伤。说明睡眠剥夺后打破了机体的氧化和抗氧化系统的平衡。本实验将高产 GABA 的特性菌株复配作为发酵剂, 经长时发酵后得到益生菌及其代谢产物的混合物, 制得复合益生菌制品。复合益生菌制品经非靶标代谢组学检测后, 发现其代谢产物非常丰富, 包括神经递质类物质(如 GABA), 抗氧化物质(如谷氨酰胺、脯氨

酸、甜菜碱等)以及其他物质(如乙酸、丁酸盐类等短链脂肪酸及各种氨基酸、维生素类), 这些物质与神经调节有密切的关系。

通过人群试验验证复合益生菌制品对睡眠的改善作用, 结果显示: 无论是 PSQI 评分, 还是睡眠症状(入睡时间、半夜醒来情况、睡眠总时长)的改善, 复合益生菌都优于同等剂量的 GABA。这说明复合益生菌不是单物质(GABA)发挥助睡眠的功效, 而是与其他代谢产物, 如抗氧化物质、短链脂肪酸及维生素、氨基酸等协同发挥作用。

3.3 总结 目前对睡眠障碍的治疗方法包括药物治疗、心理治疗和中医疗法等, 安眠药物有着不同程度的不良反应, 患者长期服用会产生依赖性和耐受性, 一旦停止使用, 可能会产生戒断反应, 而心理治疗和中医疗法优点是简便、经济、安全, 几乎无不良反应, 但缺点是需要长期治疗, 见效较慢。

近几年来, 研究者对菌-肠-脑轴高度关注, 通过调节肠道菌群来改善睡眠, 已逐渐被人们所接受。通过益生菌及其代谢产物抑制肠道中的有害菌, 修复肠道黏膜屏障, 提升机体免疫力, 调节代谢平衡, 从而影响机体的内分泌功能, 达到健康的睡眠状态。

本研究针对复合益生菌制品改善睡眠调节只进行了初步探讨, 其机制尚未完全明确, 推测可能是: (1)通过补充外源的 GABA 被肠道吸收, 与体内受体结合, 从而影响大脑功能; (2)通过降低机体氧化应激水平, 抑制肠道中的有害菌, 修复肠道黏膜, 提高信号传导水平, 进而影响神经内分泌调节。今后还需进行大规模的随机双盲临床研究, 更深入地解析复合益生菌制品改善睡眠障碍特征及特点, 确认其起效剂量范围和适用人群, 同时详细分析服用期间的各项生理生化指标及肠道菌群的变化, 更全面地明确改善睡眠障碍的相关作用机制, 以保证此复合益生菌制品的有效性和安全性。

参考文献

- [1] 吴朝虹, 徐莎. 2 型糖尿病病人睡眠质量及其影响因素的研究[J]. 护理研究, 2011, 25(19): 1732-1733.
WU Zhao-hong, XU Sha. Study on sleep quality and its influence factors of 2 type diabetes mellitus patients[J]. Chin Nurs Res, 2011, 25(19): 1732-1733. (in Chinese)
- [2] So D, Whelan K, Rossi M, et al. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Clin Nutr, 2018, 107(6): 965-983.
- [3] Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease[J]. Circ Res, 2017, 120(7): 1183-1196.
- [4] Kugelberg E. Microbiota: diet can protect against type 1 diabetes[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(5): 279.
- [5] Zhu WH, Winter MG, Byndloss MX, et al. Precision editing of the gut

- microbiota ameliorates colitis[J]. *Nature*, 2018, 553(7687): 208-211.
- [6] 洪兰, 马彦, 林颖娜, 等. 睡眠障碍与抑郁、焦虑关系的研究[J]. 国际中医中药杂志, 2009, 31(2): 154-156.
HONG Lan, MA Yan, LIN Ying-na, et al. Correlation study of depression, anxiety and sleep disturbance[J]. *Int J Trad Chin Med*, 2009, 31(2): 154-156. (in Chinese)
- [7] 洪兰, 魏慧军, 马彦, 等. 综合医院抑郁症的常见表现形式研究[J]. 国际中医中药杂志, 2010, 32(3): 259-361.
HONG Lan, WEI Hui-jun, MA Yan, et al. Manifestation study on depression in comprehensive hospitals[J]. *Int J Trad Chin Med*, 2010, 32(3): 259-361. (in Chinese)
- [8] 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 Jie, ZHAO Bai-xiao, HA Lue, et al. Effects of different wave form electroacupuncture on the 5-HT, Glu and GABA contents of the hypothalamus in rats with PCPA-induced insomnia[J]. *Shanghai J Acupuncture*, 2015, 34(7): 678-681. (in Chinese)
- [9] Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body[J]. *PLoS Biol*, 2016, 14(8): e1002533.
- [10] Fung TC, Olson CA, Hsiao EY. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease[J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(2): 145-155.
- [11] Bathgate CJ, Edinger JD, Krystal AD. Insomnia patients with objective short sleep duration have a blunted response to cognitive behavioral therapy for insomnia[J]. *Sleep*, 2017, 40(1): 1-12.
- [12] 彭维, 申治富, 王亚楠, 等. 肠道菌群对睡眠调节的研究进展[J]. 重庆医学, 2019, 48(19): 3346-3350.
PENG Wei, SHEN Zhi-fu, WANG Ya-nan, et al. Advances in intestinal flora in sleep regulation[J]. *Chongqing Med*, 2019, 48(19): 3346-3350. (in Chinese)
- [13] Cai YP, Weng K, Guo Y, et al. An integrated targeted metabolomic platform for high-throughput metabolite profiling and automated data processing[J]. *Metabolomics*, 2015, 11(6): 1575-1586.
- [14] 李静, 李亮, 杨萍, 等. 气虚证模型大鼠尿液代谢组学特征[J]. 中医杂志, 2021, 62(6): 516-522.
- [15] Wang JL, Zhang T, Shen XT, et al. Serum metabolomics for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma by UHPLC-QTOF/MS[J]. *Metabolomics*, 2016, 12(7): 1-10.
- [16] Smith CA, Want EJ, O'Maille G, et al. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(3): 779-787.
- [17] 刘贤臣, 唐茂芹, 胡蕾, 等. 匹兹堡睡眠质量指数的信度和效度研究[J]. 中华精神科杂志, 1996, 29(2): 103-107.
LIU Xian-chen, TANG Mao-qin, HU Lei, et al. Reliability and validity of the Pittsburgh Sleep Quality Index[J]. *China J Psychiatry*, 1996, 29(2): 103-107. (in Chinese)
- [18] 王道阳, 戴丽华, 殷欣. 大学生的睡眠质量与抑郁、焦虑的关系[J]. 中国心理卫生杂志, 2016, 30(3): 226-230.
WANG Dao-yang, DAI Li-hua, YIN Xin. Relation of sleep quality to depression and anxiety in college students[J]. *Chin Mental Health J*, 2016, 30(3): 226-230. (in Chinese)
- [19] 中华医学会精神病学分会. 中国精神障碍分类与诊断标准第三版(精神障碍分类)[J]. 中华精神科杂志, 2001, 34(3): 184-188.
- [20] 刘晨曦. 加味酸枣仁汤联合西药治疗失眠 42 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(9): 36-38.
- [21] Hindson J. Multiple sclerosis: a possible link between multiple sclerosis and gut microbiota[J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(12): 705-709.
- [22] Tremlett H, Waubant E. The gut microbiota and pediatric multiple sclerosis: recent findings[J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(1): 102-108.
- [23] Reynolds AC, Broussard J, Paterson JL, et al. Sleepy, circadian disrupted and sick: could intestinal microbiota play an important role in shift worker health?[J]. *Mol Metab*, 2017, 6(1): 12-13.
- [24] Lyte M. Microbial endocrinology: host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior[J]. *Gut Microbes*, 2014, 5(3): 381-389.
- [25] 韩啸. 乳杆菌产 γ -氨基丁酸能力分析及其发酵乳改善睡眠效果评价[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
HAN Xiao. The discrepancy analysis on γ -aminobutyric acid production ability among *Lactobacillus* and its fermented milk used in sleep improvement[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019. (in Chinese)
- [26] Erny D, Hrabě de Angelis A, Prinz M. Communicating systems in the body: how microbiota and microglia cooperate[J]. *Immunology*, 2017, 150(1): 7-15.
- [27] Krueger JM, Opp MR. Sleep and microbes[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2016, 131: 207-225.
- [28] Karatas G, Bal A, Yuceege M, et al. Evaluation of sleep quality in patients with ankylosing spondylitis and efficacy of anti-TNF- α therapy on sleep problems: a polysomnographic study[J]. *Int J Rheum Dis*, 2018, 21(6): 1263-1269.
- [29] Forsyth CB, Voigt RM, Burgess HJ, et al. Circadian rhythms, alcohol and gut interactions[J]. *Alcohol Fayettev N Y*, 2015, 49(4): 389-398.
- [30] Reynolds AC, Paterson JL, Ferguson SA, et al. The shift work and health research agenda: considering changes in gut microbiota as a pathway linking shift work, sleep loss and circadian misalignment, and metabolic disease[J]. *Sleep Med Rev*, 2017, 34: 3-9.
- [31] Parekh PJ, Oldfield EC, Johnson DA. The effects of sleep on the commensal microbiota: eyes wide open?[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2018, 52(3): 204-209.
- [32] Poroyko VA, Carreras A, Khalyfa A, et al. Chronic sleep disruption alters gut microbiota, induces systemic and adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35405.
- [33] 贾丽妍, 王钰雯, 黄佳琦, 等. 睡眠剥夺对哺乳动物消化系统的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(4): 1179-1187.
JIA Li-yan, WANG Yu-wen, HUANG Jia-qi, et al. Effects of sleep deprivation on the digestive system of mammal[J]. *China Anim Husband Vet Med*, 2021, 48(4): 1179-1187. (in Chinese)
- [34] 纪光, 李丽, 刘孟琦, 等. 长期慢波睡眠剥夺对大鼠肝功能和形态及氧化应激的影响[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(11): 959-961.
JI Guang, LI Li, LIU Meng-qi, et al. Effect of long term partial slow-wave sleep deprivation on morphology, function and oxidative stress of liver in rats[J]. *J Environ Health*, 2018, 35(11): 959-961. (in Chinese)