

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.07.018

# 左归丸、右归丸对失眠和多睡模型大鼠血浆中单胺类神经递质的影响

曾雪爱, 周春权, 王秀峰, 张瑜, 张一帆, 黄俊山\*

(福建省中医药研究院/福建省中医睡眠医学重点实验室, 福建省福州市五四路 282 号, 350003)

**摘要** 目的 探讨左归丸、右归丸改善睡眠失衡状态的可能作用机制。方法 25 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、失眠模型组、多睡模型组、左归丸组、右归丸组, 每组 5 只。失眠模型组和左归丸组大鼠给予中缝背核内微量注射 1A 型 5-羟色胺 (5-HT<sub>1A</sub>) 受体阻断剂 WAY 100635 建立失眠模型, 多睡模型组和右归丸模型组大鼠微量注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂 8-OH-DPAT 建立多睡模型, 正常对照组中缝背核微量注射等量的生理盐水, 连续 3 天。于末次注射 2h 后左归丸组大鼠给予左归丸溶液 17.5 g/(kg·d) 灌胃, 右归丸组给予右归丸溶液 18.5 g/(kg·d) 灌胃, 其余 3 组大鼠给予 10 ml/(kg·d) 蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 共 7 天。采用高效液相色谱法检测各组大鼠血浆中单胺类神经递质多巴胺 (DA)、二羟基苯乙酸 (DOPAC)、5-羟色胺 (5-HT)、5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 的含量, 并计算 5-HIAA/5-HT。结果 与正常对照组比较, 失眠模型组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 升高 ( $P < 0.01$ ); 多睡模型组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与失眠模型组比较, 左归丸组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 均降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与多睡模型组比较, 右归丸组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 升高 ( $P < 0.05$ )。各组大鼠血浆 5-HT 含量差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 左归丸能有效降低失眠大鼠兴奋性神经递质, 右归丸能有效升高多睡大鼠兴奋性神经递质, 二者可能通过平衡神经递质改善睡眠失衡状态。

**关键词** 睡眠障碍; 左归丸; 右归丸; 阴阳理论; 寤寐理论; 单胺类神经递质

睡眠和觉醒是人一生中反复交替的两种生理状态, 随着生活节奏的加快, 睡眠与觉醒的平衡常常被破坏, 引起失眠或多睡。中医阴阳寤寐理论认为, 觉醒与睡眠的寤寐变化符合阴阳的对立、互根、消长与转化规律。根据中医理论, 失眠多为阴虚, 当以滋阴为主; 多睡以阳虚为主, 治以补阳为上。左归丸主治真阴不足, 治以滋阴补肾, 填精益髓, 且育阴涵阳, 阳中求阴。右归丸主治肾阳不足, 治以温补肾阳, 填精益髓, 阴阳兼顾, 阴中求阳。因此, 本研究对大鼠中缝背核内注射 1A 型 5-羟色胺 (5-HT<sub>1A</sub>) 受体激动剂和抑制剂, 诱发大鼠失眠和多睡模型, 观察左归丸和右归丸对大鼠血浆中睡眠相关的单胺类神经递质多巴胺 (DA)、二

羟基苯乙酸 (DOPAC)、5-羟色胺 (5-HT)、5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA) 的调节作用, 为阴阳寤寐理论用于指导临床提供实验依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 25 只, 2 月龄, 体重 (250 ± 10) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2007-0005。

### 1.2 药物

中药组成依据《方剂学》<sup>[1]</sup> 中经方比例配置。左归丸: 熟地黄 24 g, 山药 12 g, 枸杞子 12 g, 山萸肉 12 g, 川牛膝 9 g, 鹿角胶 12 g, 龟甲胶 12 g, 菟丝子 12 g; 右归丸: 熟地黄 24 g, 山药 12 g, 山萸肉 9 g, 枸杞子 9 g, 菟丝子 12 g, 鹿角胶 12 g, 杜仲 12 g, 肉桂 6 g, 当归 9 g, 炮附片 6 g。中药饮片均购自福建省中医药研究院中药房, 药物经煎煮

基金项目: 国家自然科学基金 (81704072); 福建省中医药科研项目 (2017FJZYJC101); 福建省科技厅公益类科研院所基本科研专项 (2017R1035-2)

\* 通讯作者: hjs0825@163.com, (0591) 83570705

及过滤浓缩后获得浓度为 1.6 g/ml 的左归丸药液和浓度为 1.99 g/ml 的右归丸药液。

### 1.3 主要试剂与仪器

DA(批号 1417536)、DOPAC(批号 0001451791)、5-HT(批号 091M5163V)、5-HIAA(批号 BCBG7644V)、2,6-二羟基苯甲酸(DHBA,批号 04429MO)试剂盒, Sigma 公司; 甲醇(色谱纯,批号 1519507004), MerK 公司; 戊巴比妥钠(批号 F20021216), 中国医药上海化学试剂公司; 8-OH-DPAT(货号: 0529)、WAY 100635(货号: 4380) Tocris 公司。

e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); 2465 电化学检测器(美国 Waters 公司); 68003 脑立体定位仪、注射套管(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

### 1.4 核团内导管埋置手术

大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(50 mg/kg) 进行麻醉后, 头部固定在脑立体定位仪上, 暴露骨膜, 用双氧水去除骨膜, 暴露人字缝和前囟, 生理盐水清洗颅骨表面。根据相关文献<sup>[2]</sup>及大鼠脑立体定位图谱<sup>[3]</sup>, 精确定位大鼠中缝背核定位点(-7.8 mm, 0.0 mm, -6.4 mm)。钻孔后插入外径为 0.64 mm 的注射套管, 深度为 6.4 mm。将套管粘合固定于颅骨上, 缝合颅骨表面皮肤, 在创伤处涂抹少量红霉素软膏消炎。手术后, 每只大鼠单独放置一个饲养笼中, 让其恢复 7 天。

### 1.5 造模方法

参考文献<sup>[4]</sup>方法, 于大鼠术后第 8 天进行中缝背核内微量注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂 8-OH-DPAT 50 ng 建立多睡大鼠模型, 中缝背核内微量注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体阻断剂 WAY 100635 50 ng 建立失眠大鼠模型。动物在清醒状态下, 用内径 0.25 mm 的微量进样器, 向预先埋置的注射导管内注射药物 0.4 μl, 进样速度 0.1 μl/min, 进样后留针 1 min 防止药液漏出。微量注射于每天同一时间进行, 连续注射 3 天。

### 1.6 动物分组及干预方法

大鼠按随机数字表法分成正常对照组、失眠模型组、多睡模型组、左归丸组、右归丸组, 每组 5 只。失眠模型组和左归丸组大鼠建立失眠模型, 多睡模型组和右归丸模型组大鼠建立多睡模型, 正常对照组中缝背核微量注射等量的生理盐水。于末次中缝背核微量注射 2 h 后左归丸组大鼠给予左归丸药液 17.5 g/(kg·d) 灌胃, 右归丸组给予右归丸药

液 18.5 g/(kg·d) 灌胃, 正常对照组和失眠模型组、多睡模型组大鼠给予 10 ml/(kg·d) 蒸馏水灌胃, 均每天 1 次, 共 7 天。

### 1.7 观察指标及方法

第 7 天灌胃 2h 后腹主动脉取血, 置于 EDTA 抗凝管中, 3000 r/min、4℃ 离心 10 min, 取出上层血浆, 加入 2 倍体积甲醇, 混匀, 10000 r/min、4℃ 离心 20 min, 去除大分子物质, 取上清液进行检测。采用高效液相色谱-电化学检测(HPLC-ECD)法测定 DA、DOPAC、5-HIAA、5-HT 含量, 选择 DHBA 作为内标, 色谱条件为: 流动相: 无水乙酸钠 2.0 g, 柠檬酸 5.5 g, EDTA·2Na 0.06 g, 氯化钠 0.5844 g, 1.0 mmol/L 庚烷磺酸钠 2 ml, 甲醇 2.5 ml, 用蒸馏水定容至 500 ml, pH=3.5。Empower2 工作站, Waters-Nova-Pak C18 色谱柱(3.9 mm×150 mm, 粒径 4 μm), 工作电压 0.8 V, 柱温 30℃, 流速 1 ml/min, 进样体积 10 μl。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 单胺类神经递质分离的保留时间、回归方程及相关系数

将混合标准品稀释成不同浓度梯度, 以标准品浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行回归, 得到回归方程和相关系数, 绘制标准曲线。结果显示, 单胺类神经递质的浓度与其峰面积呈现良好的线性关系(表 1)。标准品和血浆样品色谱图显示各组分离良好(图 1)。

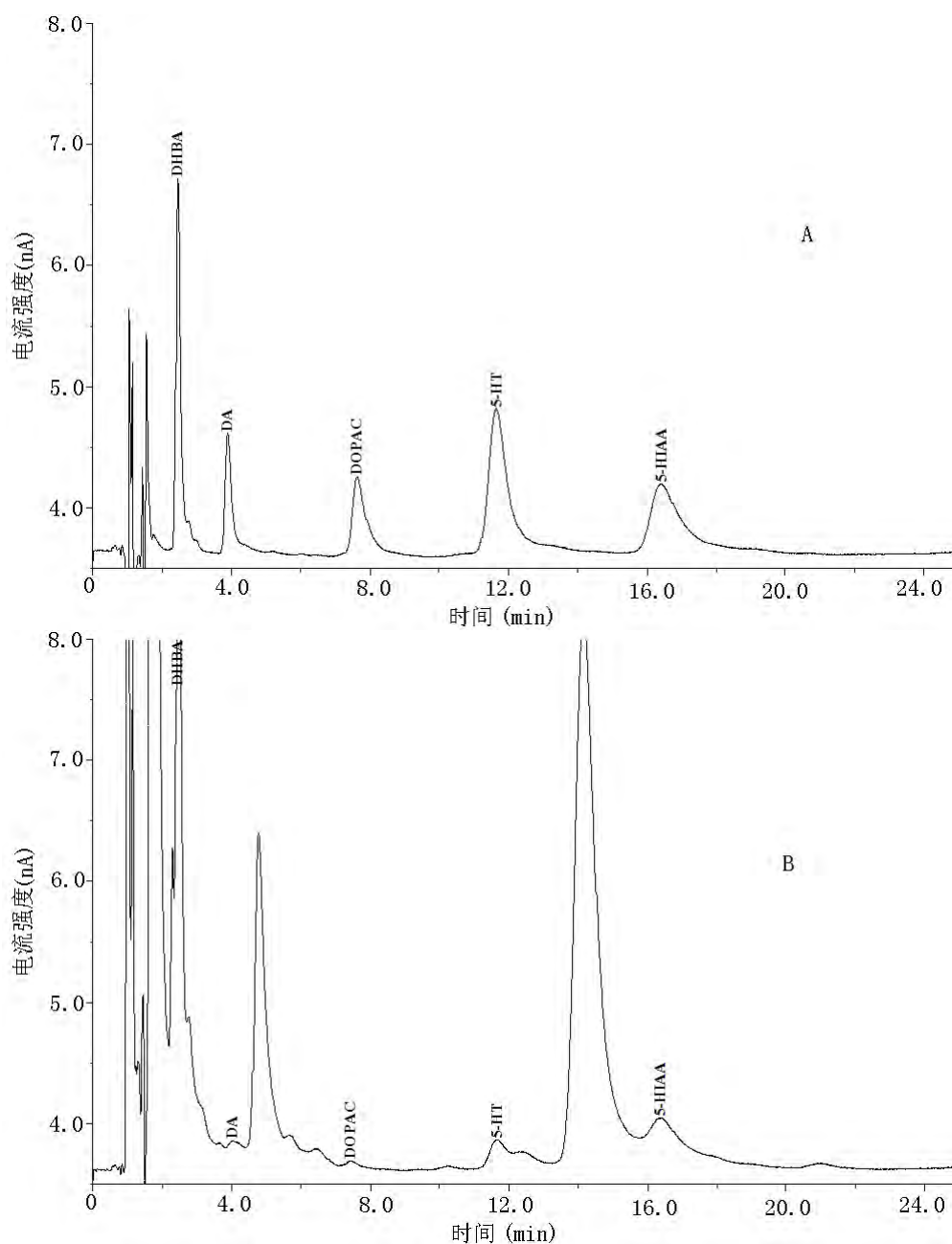
表 1 各神经递质的回归方程及保留时间

| 神经递质   | 回归方程                   | r 值    | 保留时间 (min) |
|--------|------------------------|--------|------------|
| DA     | $Y = 1.6931X - 0.1866$ | 0.9990 | 3.89       |
| DOPAC  | $Y = 1.0027X - 0.0166$ | 0.9993 | 7.63       |
| 5-HT   | $Y = 2.3816X - 0.0651$ | 0.9993 | 11.64      |
| 5-HIAA | $Y = 4.1774X - 0.2043$ | 0.9995 | 16.41      |

注: DA, 多巴胺; DOPAC, 二羟基苯乙酸; 5-HT, 5-羟色胺; 5-HIAA, 5-羟吲哚乙酸

### 2.2 各组大鼠血浆中单胺类神经递质含量比较

表 2 示, 与正常对照组比较, 失眠模型组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 升高( $P < 0.01$ ); 多睡模型组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 降低( $P <$



注: DA, 多巴胺; DOPAC, 二羟基苯乙酸; 5-HT, 5-羟色胺; 5-HIAA, 5-羟吲哚乙酸;

A, 混合标准品色谱图; B, 正常组大鼠血浆单胺类神经递质色谱图

图1 标准品和正常组大鼠血浆各神经递质色谱图

表2 各组大鼠血浆中单胺类神经递质含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | DA (ng/ml)                    | DOPAC (ng/ml)                 | 5-HT (ng/ml)  | 5-HIAA (ng/ml)                | 5-HIAA/5-HT (%)               |
|-------|----|-------------------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照组 | 5  | 25.80 ± 3.85                  | 14.48 ± 2.09                  | 71.66 ± 8.09  | 32.54 ± 1.67                  | 45.77 ± 4.26                  |
| 失眠模型组 | 5  | 40.08 ± 6.95 **               | 22.16 ± 4.33 **               | 74.44 ± 6.07  | 41.02 ± 2.96 **               | 54.59 ± 5.45 **               |
| 左归丸组  | 5  | 29.28 ± 3.15 $\Delta\Delta$   | 18.28 ± 1.57 $\Delta$         | 72.30 ± 5.60  | 34.76 ± 3.14 $\Delta$         | 48.21 ± 4.45 $\Delta$         |
| 多睡模型组 | 5  | 19.39 ± 2.80 *                | 8.55 ± 1.19 **                | 77.89 ± 6.98  | 28.90 ± 0.97 *                | 36.24 ± 2.12 **               |
| 右归丸组  | 5  | 25.14 ± 3.58 $\blacktriangle$ | 12.64 ± 1.70 $\blacktriangle$ | 73.41 ± 10.06 | 32.06 ± 2.21 $\blacktriangle$ | 44.29 ± 6.20 $\blacktriangle$ |

注: DA, 多巴胺; DOPAC, 二羟基苯乙酸; 5-HT, 5-羟色胺; 5-HIAA, 5-羟吲哚乙酸; 与正常对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与失眠模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与多睡模型组比较,  $\blacktriangle P < 0.05$

0.05 或  $P < 0.01$ )。与失眠模型组比较,左归丸组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 均降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );与多睡模型组比较,右归丸组大鼠血浆 DA、DOPAC、5-HIAA 含量及 5-HIAA/5-HT 升高 ( $P < 0.05$ )。各组大鼠血浆 5-HT 含量差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

中医阴阳寤寐理论认为,阴阳相合,寤寐调适,阴阳失调,寤寐失常。现代医学研究发现,睡眠-觉醒节律与脑内及血液中神经递质的改变有关,抑制性神经递质和兴奋性神经递质的相互作用影响着睡眠的发生,二者处于相互制约状态,当兴奋性神经或抑制性神经递质出现显著性增多或减少时,并且不能依赖自身修护时,就表现为失眠或者多睡<sup>[8]</sup>。左归丸和右归丸为明代医家张景岳名方,是补肾阴和补肾阳的代表方剂。左归丸在熟地黄、枸杞子、山茱萸、龟甲胶等大剂滋阴药中加鹿角胶、菟丝子甘温助阳。右归丸虽以附子、肉桂温补命门,扶植阳气,但方中更以大补阴精、滋培肾水的熟地黄、枸杞子为前提,从而使附子、肉桂补其阳而不损阴。左归丸滋阴不离扶阳,阳中求阴,右归丸补阳不忘滋阴,阴中求阳,体现了阴阳一体、阴阳互根的思想<sup>[9]</sup>。

DA、5-HT 是参与睡眠-觉醒调节的经典神经递质<sup>[10]</sup>。DA 在维持觉醒中起着极其重要的作用,属于兴奋性神经递质,若其含量增加,则动物觉醒增加,睡眠减少,反之则觉醒减少,睡眠增加<sup>[8-9]</sup>。5-HT 是引起睡眠发生的重要神经递质,其受体功能紊乱可引起失眠,脑内 5-HT 神经元主要集中于中缝核<sup>[11]</sup>。本实验选用中缝背核微量注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂 8-OH-DPAT 使大鼠睡眠增加,用其阻断剂 WAY 100635 使大鼠睡眠减少。由于 DOPAC 和 5-HIAA 分别是 DA 和 5-HT 的代谢产物,其含量变化反映了 DA 和 5-HT 的合成和代谢变化,也是间接反映大鼠睡眠状况的指标之一<sup>[11-12]</sup>。血浆中单胺类神经递质的变化可以在一定程度上反映大鼠的睡眠状况,可作为诊断失眠的临床辅助指标<sup>[13]</sup>。

本研究结果显示,大鼠中缝背核微量注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体激动剂,血浆中兴奋性神经递质 DA 及其代谢产物 DOPAC 含量减少,同时伴随 5-HT 代谢产物 5-HIAA 的减少及 5-HIAA/5-HT 降低。相反,微量注射 5-HT<sub>1A</sub> 受体阻断剂,DA、DOPAC、

5-HIAA 的含量增加,5-HIAA/5-HT 也升高。左归丸和右归丸均可使血浆中 DA、DOPAC、5-HIAA、5-HIAA/5-HT 水平趋于正常。本研究结果说明左归丸、右归丸能够平衡血浆中神经递质的失衡,最终达到阴阳的平衡,提示对失眠予以滋阴,而多睡予以补阳的治疗方法具有一定的可行性。

### 参考文献

- [1] 段富津. 方剂学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 133, 142.
- [2] MONTI JM, JANTOS H. Differential effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist flesinoxan given locally or systemically on REM sleep in the rat [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 478 (2-3): 121-130.
- [3] SCHÖBER W. The rat cortex in stereotaxic coordinates [J]. J Hirnforsch, 1986, 27 (2): 121-143.
- [4] MONTI JM, JANTOS H, MONTI D. Increased REM sleep after intra-dorsal raphe nucleus injection of flesinoxan or 8-OHDPAT: prevention with WAY 100635 [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2002, 12 (1): 47-55.
- [5] 祝玲, 刘诗翔. 失眠症的神经递质研究 [J]. 临床病学与神经康复学杂志, 2011, 8 (1): 51-53.
- [6] 喻嵘, 吴勇军, 陈大舜. 明清医家对张景岳阴阳互济法及其左、右归方的探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6 (3): 49-51.
- [7] 江帆, 颜崇淮, 沈晓明. 与睡眠相关的中枢单胺类递质 [J]. 国外医学: 精神病学分册, 2001, 28 (1): 55-58.
- [8] HUNSLEY MS, PALMITER RD. Altered sleep latency and arousal regulation in mice lacking norepinephrine [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2004, 78 (4): 765-773.
- [9] MONTI JM, MONTI D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking [J]. Sleep Med Rev, 2007, 11 (2): 113-133.
- [10] PORTAS CM, BJORVATN B, URSIN R. Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies [J]. Prog Neurobiol, 2000, 60 (1): 13-35.
- [11] 王慧, 王旭, 唐卉凌, 等. 针刺神门穴及命门穴对大鼠中缝背核 5-羟色胺和 5-羟吲哚乙酸含量的影响 [J]. 中医杂志, 2011, 52 (12): 1038-1040.
- [12] MURILLO-RODRIGUEZ E, ARIAS-CARRION O, ZAVALA-GARCIA A, et al. Basic sleep mechanisms: an integrative review [J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2012, 12 (1): 38-54.
- [13] 史敏, 杨东东, 赵欢. 糖郁疏治疗痰热扰心证型失眠 100 例临床研究 [J]. 中成药, 2014, 36 (7): 1386-1389.

# Impact of *Zuogui Wan* (左归丸) and *Yougui Wan* (右归丸) on Plasma Monoamine Neurotransmitter in Insomnia and Sleepiness Model Rats

ZENG Xueai, ZHOU Chunquan, WANG Xiufeng, ZHANG Yu, ZHANG Yifan, HUANG Junshan

(Fujian Institute of Chinese Medicine/Fujian Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Sleep Medicine, Fuzhou, 350003)

**ABSTRACT Objective** To explore the potential mechanism of *Zuogui Wan* (左归丸) and *Yougui Wan* (右归丸) in improving sleep imbalance. **Methods** Twenty-five Sprague Dawley (SD) rats were randomized into the normal control group, the insomnia model group, the sleepiness model group, the *Zuogui Wan* group and the *Yougui Wan* group, with 5 rats in each group. Rats in the insomnia model group and the *Zuogui Wan* group were made insomnia models by type 1A 5-hydroxytryptamine (5-HT<sub>1A</sub>) receptor blocker WAY 100635 microinjection into dorsal raphe nucleus. Rats in the sleepiness model group and the *Yougui Wan* group were made sleepiness models by 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT microinjection. The normal control group was given equivalent normal saline microinjection into dorsal raphe nucleus, for 3 days. Two hours after the last injection, rats in the *Zuogui Wan* group was given *Zuogui Wan* solution 17.5 g/(kg·d) by gavage. The *Yougui Wan* group was given *Yougui Wan* solution 18.5 g/(kg·d) by gavage. Rats in the other 3 groups were given 10 ml/(kg·d) distilled water by gavage, once every day, for 7 days. The levels of monoamine neurotransmitter dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in rats' plasma in each group were determined by high performance liquid spectrum method; 5-HIAA/5-HT was calculated. **Results** Compared with the normal control group, the levels of plasma DA, DOPAC and 5-HIAA as well as 5-HIAA/5-HT in the insomnia model group increased ( $P < 0.01$ ); while those in the sleepiness model group decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the insomnia model group, the levels of DA, DOPAC and 5-HIAA as well as 5-HIAA/5-HT in the *Zuogui Wan* group decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with the sleepiness model group, the levels of DA, DOPAC and 5-HIAA as well as 5-HIAA/5-HT in the *Yougui Wan* group increased ( $P < 0.01$ ). The difference of 5-HT level in rats' plasma in each group was not significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** *Zuogui Wan* might reduce the excitatory neurotransmitters in insomnia rats, while *Yougui Wan* might increase the excitatory neurotransmitters in sleepiness rats. Both might improve sleep imbalance by balancing neurotransmitters.

**Keywords** sleep disorder; *Zuogui Wan*; *Yougui Wan*; Yin-Yang theory; sleeping-awakening theory; monoamine neurotransmitter

(收稿日期: 2017-08-08; 修回日期: 2018-01-15)

编辑: 邓 媛

## 欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000 年合订本 85 元, 2001 年合订本 95 元, 2002 年合订本 105 元, 2003 年合订本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每年 140 元。2011(缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014(缺 21 期)—2017 年(缺 3、5、15、18 期)每册 15 元。2011—2013 年合订本(每年 4 本), 每年 280 元, 2014、2015、2016、2017 年合订本(每年 4 本), 每年 400 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号中医杂志社读者服务部, 或关注《中医杂志》官方微信购买。

邮编: 100700, 电话: (010) 64089195; 微信号: zyzzgzh。

## 欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951—1986 年(4 张光盘) 480 元; 1987—1994 年(1 张光盘) 260 元; 1995—2004 年(1 张光盘) 280 元; 2005—2013 年(1 张光盘) 300 元。

光盘合订本为计算机用数据光盘, 收入了同期出版的全部《中医杂志》内容, 可对所有文章进行任意字检索, 方便实用。

汇款地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社北京医海林音像书店, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632

网址: <http://www.jtcm.net.cn>