

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.19.013

实验研究

桂枝加龙骨牡蛎汤对肺不藏魄型不寐模型大鼠睡眠情况、血清及脑组织 5-羟色胺水平的影响

闫德祺, 张星平[✉], 张文慧, 王凯凯, 么嵌巍, 佟振鹏, 梁瑞宁, 陈旭

新疆医科大学第四临床医学院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区新医路 393 号, 830011

[摘要] **目的** 探讨桂枝加龙骨牡蛎汤对肺不藏魄型不寐的影响及可能作用机制。**方法** 48 只 SD 大鼠随机分为造模组 36 只和正常组 12 只。造模组大鼠采用长平台浅水环境法剥夺大鼠睡眠 42 天制备肺不藏魄型不寐大鼠模型。造模第 15 天造模组大鼠随机分为模型组、右佐匹克隆组、桂枝加龙骨牡蛎汤组, 每组 12 只, 继续进行造模 28 天, 同时桂枝加龙骨牡蛎汤组灌胃给予桂枝加龙骨牡蛎汤 7.6 g/(kg·d), 右佐匹克隆组灌胃给予右佐匹克隆片 0.105 mg/(kg·d), 模型组和正常组灌胃给予 0.5 ml/100 g 生理盐水。在给药第 22~28 天统计每日 8:00、12:00、16:00、20:00 时睡眠大鼠的数量; 28 天干预结束后第 2 天进行旷场实验统计大鼠站立次数、运动距离、静止时间, 监测并分别统计 8:00~20:00 期间大鼠非快速眼球运动 (NREM)、快速眼球运动 (REM) 睡眠时间以及清醒时间所占的比例; 旷场实验结束后采用液质法检测大鼠血清和脑额叶 5-HT 含量, 采用免疫组化法检测大鼠脑皮质、下丘脑和脑干 5-HT 表达。**结果** 与正常组比较, 模型组 8:00、12:00、16:00 时睡眠大鼠数量减少, 20:00 时睡眠大鼠数量增加, 旷场实验站立次数减少, NREM、REM 所占比例均下降、清醒时间所占比例增加, 血清和脑额叶 5-HT 含量升高, 脑皮质、下丘脑和脑干 5-HT 表达均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, 右佐匹克隆组在 8:00、12:00、16:00 时睡眠大鼠数量增加, 旷场实验站立次数增加, REM 所占比例升高 ($P<0.05$), 血清和脑组织 5-HT 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); 桂枝加龙骨牡蛎汤组在 8:00、16:00 时睡眠大鼠数量增加, 20:00 时减少, 旷场实验运动距离缩短, REM 所占比例升高, 血清和脑额叶 5-HT 含量下降, 脑皮质、下丘脑和脑干 5-HT 表达均下降 ($P<0.05$)。与右佐匹克隆组比较, 桂枝加龙骨牡蛎汤组旷场实验大鼠站立次数和运动距离均降低、静止时间增加, REM 所占比例升高 ($P<0.05$)。**结论** 桂枝加龙骨牡蛎汤能够改善肺不藏魄型不寐模型大鼠的睡眠情况, 恢复血清及脑组织中 5-HT 水平可能是其作用机制之一。

[关键词] 不寐; 睡眠剥夺; 桂枝加龙骨牡蛎汤; 5-羟色胺; 肺不藏魄

失眠即中医学“不寐”。课题组前期根据失眠的不同临床表现提出了依据失眠单一主诉症状确立五脏定位诊断的中医不寐五神分型诊断法^[1], 认为临床以睡眠轻浅易寤、闻声则醒为主诉者定位在肺, 机理为肺不藏魄。前期临床研究^[2-3]显示, 肺不藏魄型不寐的多导睡眠图特征 (PSG) 为快速眼球运动 (REM) 睡眠比例降低, 故 REM 睡眠比例

降低可以作为肺不藏魄型不寐的诊断标准之一。研究报道, REM 睡眠占正常人睡眠时间的 20%~25%^[4], 大鼠 REM 睡眠相对较少, 4 周龄大鼠 REM 睡眠约占总睡眠时间的 10%~14%^[5]。多平台水环境法能够剥夺大鼠 REM 睡眠^[6-7], 而其脑电图表现与临床肺不藏魄型不寐患者的脑电图特征吻合。5-羟色胺 (5-HT) 能够调节情绪, 影响睡眠^[8], 但睡眠剥夺动物模型实验结果中 5-HT 升高或降低均有报道^[8-9], 故需要进一步的实验检测。

桂枝加龙骨牡蛎汤出自《金匮要略》, 由桂枝、芍药、生姜、大枣、甘草、龙骨、牡蛎组成, 用于

基金项目: 国家自然科学基金 (82160873, 81960837, 81560762, 81260526); 新疆维吾尔自治区中医学重点学科 (1005); 新疆医科大学研究生创新创业项目 (CXC2021023)

✉ 通讯作者: xjzyxp@163.com, (0991) 5855139

治疗男子失精、女子梦交,有研究认为桂枝加龙骨牡蛎汤也可以治疗不寐^[10]。《医学衷中参西录》云:“牡蛎能强魄”^[11];《本草求真》记载:“龙骨功与牡蛎相同”而“有收敛止脱镇惊安魄之妙”^[12]。课题组由此推测,桂枝加龙骨牡蛎汤对肺不藏魄型不寐可能具有较好的疗效。本研究采用多组长平台浅水环境法通过剥夺大鼠REM睡眠建立肺不藏魄型不寐大鼠模型,以桂枝加龙骨牡蛎汤进行干预,并观察大鼠睡眠和血清及脑组织中5-HT水平表达情况,以期为临床应用桂枝加龙骨牡蛎汤治疗肺不藏魄型不寐提供实验依据。本研究经新疆医科大学第一附属医院动物伦理委员会(批件号:IACUC-20150225-118)及动物实验中心伦理委员会(批件号:IACUC-2021011507)批准。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠50只,体质量(240~280)g,10周龄,由新疆医科大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:65000700000940。饲养动物的环境温度为22~25℃,相对湿度为40%~60%,12h光照和12h黑暗交替。动物自由摄食、饮水。

1.2 药物与试剂

桂枝加龙骨牡蛎汤组成:桂枝9g,白芍9g,生姜9g,大枣9g,甘草6g,龙骨15g,牡蛎15g,中药饮片由新疆百草汇中药饮片有限公司生产,经新疆医科大学两名中药学鉴定专家鉴定为正品,水煎两次、过滤后,微火浓缩至每毫升药液含生药量1.52g;右佐匹克隆片(江苏天士力帝益药业有限公司,批号:H20070069)。5-HT盐酸盐标准品(上海源叶生物科技有限公司,批号:F25F7E10127);5-HT抗体(批号:AA03174526)、免疫组化二抗试剂盒(批号:SP-0023),北京博奥森生物科技有限公司;DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:1920D1212);甲醇(美国Sigma-aldrich公司,批号:WXBD3108V);乙腈(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:175935);HE染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号:0611A20);戊巴比妥钠(德国Merk公司,批号:p11011)。

1.3 仪器和图像处理软件

红外夜视摄像机(普联技术有限公司,型号:TL-IPC43AN-4墨黑);大鼠2EEG/1EMG检测系统(美国Pinnacle公司,8200-K2/4-SL);Sleep软件

Sirenia_2_2_2(美国Pinnacle Technology公司);荧光显微镜(日本NIKON公司,型号:ECLIPSE-Ni-U);超高液相三重四级杆质谱联用仪(美国Waters公司,型号:UPLC-XEVO TQ-S);石蜡切片机(德国LEICA公司,型号:RM2235);Image-Pro-Plus 6.0软件(美国Media Cybernetics公司);液氮钢瓶(新疆科源气体制造有限公司,型号:XA-36-9910221098);正压装置(美国Waters公司,型号:Positive Pressure-96 Processor);干式氮吹仪(上海力辰邦西仪器科技有限公司,型号:LC-DCY-24G);色谱柱(美国Waters公司,型号:ACQUITY UPLC®HSS PFP 1.8 μm);富集板(爱尔兰Waters分公司,型号:Oasis®WCX μElution Plate 30 μm);大鼠脑立体定位仪(美国Digital Stereotaxic Instrument公司,型号:51500);低速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,型号:KDC-2044);高速离心机(美国Beckman Coulter公司,型号:Allegra 64R centrifuge)。

1.4 模型制备、分组和干预

50只大鼠适应性喂养3天后,剔除体质量最大和最小的大鼠各1只。采用随机数字表法取36只作为造模组,剩余12只作为正常组饲养于正常笼中。造模组大鼠参照文献[6, 13]制备并评价肺不藏魄型睡眠剥夺大鼠模型:大鼠在多组长平台浅水环境(以大鼠体形相适应的木质狭长平台供大鼠仰卧、俯卧、侧卧、坐卧等不同姿势睡眠或休息,但大鼠在深睡眠翻身时容易落入水中而觉醒,造成睡眠轻浅易醒、睡眠维持障碍,而大鼠可以进行浅睡眠和一定时间的深睡眠及REM睡眠。本研究设置水深1.5cm,大鼠在笼内可以自由行走,保持身体在水面以上,不易导致全身皮毛水湿,便于大鼠入睡)笼中饲养,每笼3只,每天早晚各换水1次,每次换水时将大鼠放在正常笼中休息1h,共计42天。

造模第15天时将造模组大鼠按照随机数字表法分为模型组、右佐匹克隆组、桂枝加龙骨牡蛎汤组,每组12只。桂枝加龙骨牡蛎汤组给予7.6g/(kg·d)桂枝加龙骨牡蛎汤灌胃,以大鼠给药量为人的6.3倍进行换算^[14];右佐匹克隆组灌胃剂量为右佐匹克隆片0.105mg/kg;模型组和正常组大鼠给予0.5ml/100g生理盐水灌胃,各组均每天1次,共28天。

1.5 观察指标及方法

实验结束时造模的36只大鼠均存活。

1.5.1 睡眠观察 为便于观察，在给药第 22~28 天每组根据随机数字表选择 2 笼 6 只大鼠以红外夜视仪进行睡眠情况观察，记录每日 8:00、12:00、16:00、20:00 时睡眠大鼠的数量，计算第 22~28 天每个时间点均值，即为每个时间点的睡眠大鼠数量。

1.5.2 旷场实验 28 天干预结束后第 2 天每组根据随机数字表选取 6 只大鼠进行旷场实验，每只观察 300 s，统计大鼠站立次数、运动距离、静止时间。

1.5.3 睡眠监测 干预结束后第 2 天每组剩余 6 只大鼠以戊巴比妥钠（35 mg/kg）腹腔注射麻醉，借助大鼠脑立体定位仪手术安装电极：剪去大鼠颅顶部的毛发，75% 乙醇消毒皮肤，沿颅顶中线纵向切开皮肤约 1 cm，清除颅骨上的软组织，在矢状缝两侧各 2 mm、冠状缝前 2 mm、人字缝前 2 mm 处钻孔，落空后退出钻头，拧上焊接有银丝的螺丝钉。将头盔放在 4 个固定好的螺丝钉上，脑电电极在前，肌电电极在后。将已安装的螺丝钉上的银丝与头盔上对应的脑电电极焊接在一起；将两个肌电电极插入小针孔，以针刺穿大鼠颈部两侧肌肉，将两个肌电电极引入颈部两侧肌肉中。碘伏消毒后以牙科水泥将头盔封固于颅骨上。大鼠休息 1 天后，以 Sleep（Sirenia_2_2_2）软件进行 12 h 睡眠监测，并统计 8:00~20:00 期间非快速眼球运动（NREM）、REM 睡眠时间以及清醒时间所占的比例。

1.5.4 血清和脑额叶 5-HT 含量检测 旷场实验结束后以戊巴比妥钠（35 mg/kg）腹腔注射麻醉大鼠，腹主动脉采血，灌注 4% 多聚甲醛，取脑和脑干。液质法检测血清和脑额叶 5-HT 含量：取脑额叶组织 100 mg，以冰冷盐水冲去血点，以滤纸拭干，置 4 ml 离心管内，加 0.5 mol/L 甲酸水溶液 0.5 ml，超声匀浆 1 min 得额叶脑组织液。血液和额叶脑组织液 4℃ 静置 1 h，在 4℃、3000 r/min 离心 15 min（离心半径 16 cm），取上清再经 4℃、12 000 r/min 离心 20 min（离心半径 7.5 cm），取

200 μl 经富集板吸附富集、以 50 μl 2% 甲酸/85% 乙腈/15% 超纯水溶液溶解后装入进样小瓶上机检测，获得波峰面积，按照面积浓度曲线标准方程计算血清和脑额叶 5-HT 含量。

1.5.5 脑皮质、下丘脑和脑干 5-HT 表达检测 采用免疫组化法检测，以中段脑及脑干制备 4 μm 厚的石蜡切片，按照免疫组化染色试剂盒说明书进行染色，显微镜观察拍照，观察第一运动区脑皮质、下丘脑、脑干 5-HT 表达水平。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。本研究数据均符合正态分布且方差齐，以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，进行单因素方差分析，两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时点睡眠大鼠数量比较

表 1 示，与正常组比较，模型组 8:00、12:00、16:00 时睡眠大鼠的数量减少，20:00 时睡眠大鼠的数量增加 ($P < 0.05$)；右佐匹克隆组睡眠大鼠的数量仅在 8:00 减少 ($P < 0.05$)；桂枝加龙骨牡蛎汤组睡眠大鼠的数量在 8:00、16:00 均减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较，右佐匹克隆组睡眠大鼠的数量在 8:00、12:00、16:00 增加 ($P < 0.05$)；桂枝加龙骨牡蛎汤组睡眠大鼠的数量在 8:00、16:00 增加，在 20:00 减少 ($P < 0.05$)。与右佐匹克隆组比较，桂枝加龙骨牡蛎汤组睡眠大鼠的数量在各个时点差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠旷场实验站立次数、运动距离、静止时间比较

表 2 示，与正常组比较，模型组大鼠站立次数减少 ($P < 0.05$)，运动距离和静止时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；右佐匹克隆组大鼠运动距离延长、静止时间减少 ($P < 0.05$)；桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠站立次数减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较，右佐匹克隆组大鼠站立次数增加 ($P < 0.05$)，运动距离和静止时间差异无统计学意义

表 1 各组不同时点睡眠大鼠数量比较 (只, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	8: 00	12: 00	16: 00	20: 00
正常组	6	5.00±0.58	3.85±1.07	3.29±0.76	0.29±0.49
模型组	6	2.71±1.25 ^{a)}	1.43±1.13 ^{a)}	1.57±0.79 ^{a)}	1.29±0.95 ^{a)}
右佐匹克隆组	6	3.71±0.49 ^{a) b)}	3.14±2.04 ^{b)}	3.15±0.69 ^{b)}	0.86±0.69
桂枝加龙骨牡蛎汤组	6	3.86±1.21 ^{a) b)}	2.43±1.27	2.43±0.79 ^{a) b)}	0.43±0.53 ^{b)}

注：a) 与正常组比较， $P < 0.05$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠旷场实验站立次数、运动距离、静止时间比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	站立次数/次	运动距离/m	静止时间/s
正常组	6	11.17±3.54	32.11±7.66	128.07±16.46
模型组	6	4.83±2.31 ^{a)}	41.74.±10.83	104.63±38.64
右佐匹克隆组	6	13.00±5.40 ^{b)}	45.61±11.45 ^{a)}	68.33±30.25 ^{a)}
桂枝加龙骨牡蛎汤组	6	7.00±2.37 ^{a) c)}	26.83±5.92 ^{b) c)}	111.15±16.32 ^{c)}

注: a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与右佐匹克隆组比较, $P < 0.05$ 。

($P > 0.05$); 桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠运动距离缩短 ($P < 0.05$), 站立次数和静止时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与右佐匹克隆组比较, 桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠站立次数和运动距离均下降, 静止时间增加 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠睡眠监测指标比较

表3示, 与正常组比较, 模型组、右佐匹克隆组和桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠在8:00-20:00期间NREM、REM睡眠时间所占比例均降低, 清醒时间所占比例均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 右佐匹克隆组和桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠REM睡眠时间所占比例均升高 ($P < 0.05$), 两组NREM睡眠时间和清醒时间所占比例差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与右佐匹克隆组比较, 桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠REM睡眠时间所占比例升高 ($P < 0.05$), NREM睡眠时间和清醒时间所占比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠血清及脑额叶5-HT含量比较

表4示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清和脑额叶5-HT含量均升高 ($P < 0.05$); 右佐匹克隆组大鼠血清5-HT含量升高 ($P < 0.05$); 桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠血清和脑额叶5-HT含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 右佐匹克隆组大鼠血清和脑额叶5-HT含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠血清和脑额叶5-HT含量下降 ($P < 0.05$)。与右佐匹克隆组大鼠比较, 桂枝加龙骨牡蛎汤组血清和脑额叶5-HT含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表4 各组大鼠血清及脑额叶5-HT含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血清5-HT /ng·ml ⁻¹	脑额叶5-HT /ng·g ⁻¹
正常组	6	53.79±12.47	445.13±71.25
模型组	6	73.00±9.64 ^{a)}	543.46±66.67 ^{a)}
右佐匹克隆组	6	66.42±7.24 ^{a)}	514.44±70.28
桂枝加龙骨牡蛎汤组	6	59.36±9.86 ^{b)}	452.63±71.61 ^{b)}

注: 5-HT, 5-羟色胺。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠脑皮质、下丘脑和脑干5-HT表达比较

表5示, 与正常组比较, 模型组和右佐匹克隆组大鼠脑皮质、下丘脑和脑干5-HT表达均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 右佐匹克隆组脑皮质、下丘脑和脑干5-HT表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 桂枝加龙骨牡蛎汤组脑皮质、下丘脑和脑干5-HT表达均下降 ($P < 0.05$)。与右佐匹克隆组比较, 桂枝加龙骨牡蛎汤组脑皮质、下丘脑和脑干5-HT表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

临床上的睡眠维持困难型失眠主要表现为睡眠轻浅易醒。《灵枢·本神》云:“并精而出入者谓之魄。”由于气能并精出入, 且肺主气、司呼吸, 所以气、魄、肺同属于五行之金行, 因而有气魄、肺魄之称。《左传注疏》言:“耳目心识、手足运动、啼呼为声, 此则魄之灵也。”^[15]魄体现的是形体本能的“出入”, 即传出传入能力, “相当于效应器”^[16], 因而魄出现异常, 驭气功能下降, 魄易随气散, 则感觉、运动、反应均可出现异常^[17-18], 其

表3 各组大鼠8:00-20:00期间NREM、REM睡眠时间所占比例比较

(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NREM睡眠时间	REM睡眠时间	清醒时间
正常组	6	55.50±2.45	5.40±0.49	39.10±2.33
模型组	6	47.03±2.71 ^{a)}	1.55±0.48 ^{a)}	51.37±2.22 ^{a)}
右佐匹克隆组	6	46.48±3.08 ^{a)}	2.63±0.51 ^{a)b)}	49.22±4.49 ^{a)}
桂枝加龙骨牡蛎汤组	6	49.58±2.07 ^{a)}	3.68±0.47 ^{a)b)c)}	46.90±2.23 ^{a)}

注: NREM, 非快速眼球运动; REM, 快速眼球运动。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与右佐匹克隆组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 各组大鼠脑皮质、下丘脑、脑干 5-HT 表达比较 (IOD/Area, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脑皮质	下丘脑	脑干
正常组	6	0.305±0.011	0.355±0.011	0.350±0.023
模型组	6	0.337±0.010 ^{a)}	0.380±0.014 ^{a)}	0.390±0.014 ^{a)}
右佐匹克隆组	6	0.323±0.010 ^{a)}	0.375±0.010 ^{a)}	0.376±0.014 ^{a)}
桂枝加龙骨牡蛎汤组	6	0.315±0.011 ^{b)}	0.368±0.015 ^{b)}	0.368±0.015 ^{b)}

注：5-HT，5-羟色胺。
a) 与正常组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

中表现之一即肺不藏魄型不寐。桂枝加龙骨牡蛎汤中桂枝汤能够调和营卫，使肺卫之阳入于心营之阴而寐，加用龙骨、牡蛎有助于魄安于肺舍。以多平台水环境法建立的不寐大鼠模型表现为睡眠轻浅易醒、REM 减少^[19]，与“临床以睡眠轻浅易寤、闻声则醒”的主诉相似，具有肺不藏魄型不寐的特点，运用桂枝加龙骨牡蛎汤则方药对证。

本研究观察各组不同时点处于睡眠状态的大鼠数量，可以从动静状态上反映大鼠睡眠情况及活动状态，处于睡眠状态的大鼠数量多则说明睡眠多、活动少。本研究观察发现，正常组大鼠在 8：00、12：00、16：00 时以睡眠为主，20：00 时以活动为主；模型组在 8：00、12：00、16：00 时表现为睡眠大鼠的数量减少，在 20：00 时表现为活动大鼠的数量增加，呈现出“昼不瞑，夜不精”的状态；右佐匹克隆组干预后在以上睡眠时点睡眠大鼠的数量较模型组增加，表现为“昼较瞑”，而在活动时点与模型组比较差异无统计学意义，未达到“夜较精”的疗效；桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠在干预后睡眠改善，且能增加活动时点处于活动状态大鼠的数量，使大鼠能“昼较瞑，夜较精”。

旷场实验可用于评价焦虑心理状态^[20]。本研究结果显示，与正常组比较，模型组大鼠站立次数减少，提示模型组大鼠探究动机较弱，有焦虑样行为；运动距离及静止时间差异无统计学意义，说明模型组大鼠未达到焦虑症标准，该模型不属于焦虑模型。右佐匹克隆组大鼠站立次数较模型组增加，提示右佐匹克隆片对不寐大鼠焦虑样行为有改善作用。桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠站立次数较模型组虽无统计学意义但有改善的趋势；同时桂枝加龙骨牡蛎汤组运动距离短于模型组，提示桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠运动弱于模型组。这可能是由于旷场实验是在白天进行的，桂枝加龙骨牡蛎汤组大鼠处于正常睡眠节律时间段导致活动减少，模型大鼠处于失眠状态故而其运动距离相对较长。旷场实验结果说明桂枝加龙骨牡蛎汤在短时间内改善睡眠剥夺导致

的焦虑样症状的疗效有限，其效果较右佐匹克隆片差。另外，为排除睡眠需要本身对行为的影响，在此类实验中将旷场实验改为夜晚进行较好。

睡眠监测结果表明，模型组 NREM、REM 睡眠时间较正常组均缩短，清醒时间较正常组增加；桂枝加龙骨牡蛎汤组和右佐匹克隆组 NREM 和 REM 睡眠时间较正常组亦缩短、清醒时间增加，提示两组大鼠还需要继续治疗。桂枝加龙骨牡蛎汤组和右佐匹克隆组 REM 睡眠时间均较模型组增加，NREM 睡眠时间和清醒时间与模型组比较差异均无统计学意义，说明该模型的治疗侧重点不是 NREM 睡眠而是 REM 睡眠。桂枝加龙骨牡蛎汤组较右佐匹克隆组 REM 睡眠时间延长，提示桂枝加龙骨牡蛎汤在改善 REM 睡眠方面效果优于右佐匹克隆片。

5-HT 是参与脑干网状结构对脑皮质易化作用的神经调质，除了影响情绪外，还是合成褪黑素的前体物质，其升高或降低均可影响睡眠^[8-9]。研究^[21]表明，5-HT 在疾病状态中升高，可以与亲和力相对弱的 5-HT 2A 受体更多地结合，起到兴奋作用。本研究发现，5-HT 在大鼠模型血清、脑额叶中的含量以及在脑皮质、下丘脑和脑干中的表达均较正常组升高，提示模型大鼠出现了焦虑样心理变化及失眠症状；右佐匹克隆片干预后 5-HT 在血清及脑组织中的水平与模型组比较差异无统计学意义，提示右佐匹克隆片治疗失眠可能不是通过调节 5-HT 实现的；桂枝加龙骨牡蛎汤干预后 5-HT 在血清及脑组织中的水平均较模型组降低，体现了恢复 5-HT 的含量可能是桂枝加龙骨牡蛎汤治疗肺不藏魄型不寐的机制之一。

综上，桂枝加龙骨牡蛎汤可以显著改善肺不藏魄型不寐模型大鼠的睡眠情况与觉醒活动，增加 REM 睡眠时间并改善焦虑样心理变化，同时可使血清及脑组织 5-HT 水平趋于正常，可为临床治疗肺不藏魄型不寐提供实验依据。但本研究纳入观察分析的样本量较少，干预时间较短，没有排除白天大鼠的睡眠需要对旷场实验行为观察的影响，同时

对大鼠精神状态的理理解也有待进一步提高, 希望在后续研究中通过克服以上不足之处继续进行深入研究。

参考文献

- [1]张星平,范秀芳,邓宁,等. 中医不寐五神分型诊断法[J]. 中医杂志,2011,52(24):2092-2093.
- [2]魏小东,张星平,陈俊逾,等. 中医不寐五神分型肺不藏魄型与心不藏神型PSG睡眠结构参数特征研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(4):1510-1512.
- [3]徐争光,张星平,陈俊逾,等. 失眠症中医不寐五神分型肺不藏魄型与肾不藏志型PSG睡眠结构参数差异性研究[J]. 中华中医药杂志,2018,33(7):2795-2797.
- [4]童茂荣,裴兰,童茂清. 多导睡眠图学技术与理论[M]. 北京:人民军医出版社,2004:34.
- [5]刘学东,樊红琨,冯平福. 大鼠发育期睡眠/觉醒周期的神经调节[J]. 生理科学进展,2008,39(4):343-346.
- [6]孟玲欣,范贵民,王景涛. 改良多平台水环境法制作大鼠REM睡眠剥夺模型的研究[J]. 黑龙江医药科学,2013,36(2):99-100.
- [7]郭兴道,郝苗苗,李婷婷,等. 24 h快速眼动睡眠剥夺大鼠血清的蛋白质组学初步研究[J]. 天津医药,2016,44(5):577-581.
- [8]AZIZI H, HWANG J, SUEN V, et al. Sleep deprivation induces changes in 5-HT actions and 5-HT 1A receptor expression in the rat hippocampus [J]. Neurosci Lett, 2017, 655(8):151-155.
- [9]SUGANYA K, KAYALVIZHI E, YUVARAJ R, et al. Effect of Withania Somnifera on the antioxidant and neurotransmitter status in sleep deprivation induced Wistar rats[J]. Bioinformation,2020, 16(8):631-637.
- [10]芮娜,潘璐. 安效先运用桂枝加龙骨牡蛎汤治疗小儿

睡眠障碍经验[J]. 中医杂志,2019,60(24):2086-2088.

- [11]张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 北京:人民卫生出版社,2018:71.
- [12]黄宫绣. 本草求真[M]. 北京:人民卫生出版社,1987:57.
- [13]闫德祺,张星平,邓宁,等. 魄不安于肺不寐大鼠褪黑素及其相关受体的变化[J]. 中华中医药杂志,2022,37(5):2924-2928.
- [14]李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1063-1064.
- [15]左丘明. 左传注疏[M]. 杜预,注. 孔颖达,疏. 上海:上海古籍出版社,2017:5.
- [16]李思墨,于森,王浩田,等. 魄理论探讨[J]. 中医学报,2021,49(2):1-3.
- [17]朱金富,林贤浩. 医学心理学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2008:13-26.
- [18]杜渐,王昊,邵祺腾,等. “心主神明”内涵探析:“总统魂魄,兼赅意志”[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(1):11-13.
- [19]SHWETA T, SUSHIL KJHA. REM sleep deprivation alters learning-induced cell proliferation and generation of newborn young neurons in the dentate gyrus of the dorsal hippocampus [J]. ACS Chem Neurosci, 2022, 13(2):194-206.
- [20]王廷华,李力燕,李利华. 神经疾病动物模型制备理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2015:206.
- [21]CARHART-HARRIS RL, NUTT DJ. Serotonin and brain function: a tale of two receptors[J]. J Psychopharmacol, 2017, 31(9):1091-1120.

Effect of Guizhi Longgu Muli Decoction (桂枝加龙骨牡蛎汤, GLMD) on Sleep, Serum and Brain 5-HT Level in Insomnia Model Rats with Lung Failing to Store Corporeal Soul Syndrome

YAN Deqi, ZHANG Xingping, ZHANG Wenhui, WANG Kaikai, YAO Qianwei, TONG Zhenpeng, LIANG Ruining, CHEN Xu

The Fourth Clinical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, 830011

ABSTRACT Objective To investigate the effects of *Guizhi Longgu Muli Decoction* (桂枝加龙骨牡蛎汤, GLMD) on insomnia model rats with the syndrome of lung failing to store corporeal soul, and the underlying mechanism. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into modeling group (n=36) and normal group (n=12). Rats in the modeling group were raised in the shallow water environment with long platforms in it and were deprived of sleep for 42 days to prepare the insomnia model with lung failing to store corporeal soul syndrome. On the 15th day of modeling, the rats in the modeling group were further randomly divided into model group, eszopiclone group and GLMD group with 12 rats in each group. The modelling was continued for 28 days, and simultaneously 7.6 g/(kg·d) of GLMD and 0.105 mg/(kg·d) of eszopiclone tablets were given by gavage to the mice in the GLMD group and eszopiclone group, respectively, while 0.5 ml/100 g of normal saline by gavage was given to those in the model group and normal group. From the 22nd to the 28th day of the intervention, the number of sleeping rats was counted at 8:00,

12:00, 16:00 and 20:00 everyday with the help of a infrared night vision device. After 28-day intervention, the open field experiment and EEG/EMG monitoring were carried out on the next day to count the standing times, movement distance and resting time, and calculate the the proportion of non-rapid eye movement (NREM), rapid eye movement (REM) sleep time and awake time of the rats during the period from 8:00 to 20:00, respectively. The serum and brain 5-HT was detected by liquid mass spectrometry after the field experiment time, and the 5-HT expression in cerebral cortex, hypothalamus and brainstem was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared to those in the normal group, the number of sleeping rats at 8:00, 12:00 and 16:00 in the model group decreased, while the number of sleeping rats at 20:00 increased; moreover, the standing times, the NREM and REM sleep time from 8:00 to 20:00 decreased, while the awake time, serum and brain 5-HT, and the expression of 5-HT in cerebral cortex, hypothalamus and brainstem increased ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the number of sleeping rats at 8:00, 12:00 and 16:00, the standing times, and REM proportion increased ($P < 0.05$), with no significant difference in serum and brain 5-HT level in the eszopiclone group ($P > 0.05$); the number of sleeping rats at 8:00, 12:00 and 16:00 and the open field experiment movement distance significantly decreased in the GLMD group, while the REM proportion increased, and serum and brain 5-HT level and the expression of 5-HT in the cerebral cortex, hypothalamus and brainstem decreased ($P < 0.05$). GLMD group had decreased standing times and movement distance, increased resting time, and REM proportion than the eszopiclone group ($P < 0.05$). **Conclusion** GLMD can improve the sleep condition of insomnia model rats with lung failing to store corporeal soul syndrome, and the mechanism may be related to the restore of serum and brain 5-HT level.

Keywords insomnia; sleep deprivation; *Guizhi Longgu Muli Decoction* (桂枝加龙骨牡蛎汤); 5-HT; lung failing to store corporeal soul

(收稿日期: 2022-01-30; 修回日期: 2022-07-04)

[编辑: 王利芬]

广告

《中医杂志(英文版)》欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志(英文版)》] (ISSN 0255-2922, CN 11-2167/R, 双月刊) 由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志(英文版)》自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中的中国传统医学综合性学术期刊之一。

《中医杂志(英文版)》主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究, 思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcm.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010-64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。