

“日钟阴阳方”对不同光环境下兔眼球发育的干预作用研究

宗霞 王育良

(南京中医药大学, 江苏南京 210029)

摘要 目的:探讨“日钟阴阳方”对不同光环境下幼兔眼球发育的干预作用。方法:1月龄健康无眼病新西兰幼兔72只,雌雄兼备,随机分入4周检测组和12周检测组,每组又随机分成6组,每组6只。自然光组饲养在自然光线环境下,LED灯组饲养在LED灯环境下,全光谱灯组饲养在全光谱灯环境下,另外3组分别饲养在上述3种光线环境下并加用“日钟阴阳方”,每日10:00予补阳方,22:00予补阴方,均按成人临床用量折算后的剂量进行灌胃。4周检测组、12周检测组分别在4周、12周测定并比较各组幼兔血清和视网膜多巴胺(DA)水平。结果:4周和12周时,与自然光组比较,LED灯组幼兔血清和视网膜DA水平明显降低($P<0.01$);LED灯中药组幼兔血清DA含量显著高于LED灯组($P<0.01$)。而中药对自然光 and 全光谱灯环境下幼兔血清和视网膜多巴胺含量无影响($P>0.05$)。结论:LED灯对幼兔视网膜及血清多巴胺水平具有一定的影响,全光谱灯对眼球发育的影响与自然光相似,“日钟阴阳方”可能对视网膜发育有一定程度的保护作用。

关键词 光环境 视网膜 多巴胺 日钟补阴方 日钟补阳方 新西兰幼兔 实验研究

中图分类号 R289.58

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2016)05-0076-04

从古至今,人类生活基本依靠自然光,遵循自然界昼夜节律,日出而作,日落而息。随着科技的发展,人工光源开始出现,极大地改变了人类固有的正常昼夜交替的生物节律。现代人处于LED灯等低强度人工光环境下的时间越来越长。视网膜作为接受光能形成视觉的重要组织结构之一,如果接受的光照强度或持续时间等超过了视网膜自身的耐受力,就会造成视网膜的光损伤^[1]。视网膜中有多巴胺神经元及其受体,有研究显示,多巴胺神经元及其受体与形觉剥夺性近视眼有关^[2-5]。中医学“整体观”认为,人是一个有机整体,人与环境之间存在着不可分割的联系,强调个体本身以及个体与外界环境之间的统一和谐^[6]。在长期的进化过程中,人体产生了与自然节律相同步的自身运动规律。如若顺应自然规律,将中药药性特点与人生理活动以及自然环境的昼夜节律相同步,阳长时补阳,阴长时补阴,将起到事半功倍的效果。本研究选择新西兰幼兔作为研究模型,探讨人工光环境及中药干预对幼兔视网膜多巴胺含量的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 1月龄健康无眼病新西兰幼兔72只,体重400~600g,雌雄兼备,均为清洁级动物,由

青龙山实验动物中心提供,实验动物使用许可证:SCXK(苏)2012-0008。

1.2 仪器与试药

1.2.1 主要实验设备 光照控制架,由南京理工大学及东南大学研制,规格1.5m×0.5m×1.7m。LED灯架:安装数排多个小功率LED灯便于照明度调节,安装感光自动调节照明装置,可根据外界光强度的变化自动调节照明度,使LED灯架照明节律与自然光一致。全光谱灯箱:安装全光谱灯(最接近日光色的光源);LED灯选用正白光LED灯,型号RJP-P1W140P1-130T,色温6000~6500K,深圳瑞佳鸿光电有限公司;全光谱灯选用SOLUX石英卤素灯,型号Q35MR16/CG/47/36,色温6000~6500K,美国EIKO公司。BDS C18色谱柱(4.6mm×150mm, 5μm),大连依利特公司;岛津高效液相色谱仪:LC-20AB泵和RF-20A荧光检测器,日本岛津公司;Allgra 64R冷冻高速离心机,德国BECKMAN公司;酶标仪,Bio Tek公司;微量加样器,Thermo公司。

1.2.2 主要实验试剂 多巴胺(DA)ELISA检测试剂盒,IBL公司;anti-Dopamine receptor 2 antibody,美国LSBio;台式恒温振荡器,CRYSTAL公司;

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373696,81173306)

0.1mol/L 高氯酸溶液、磷酸缓冲盐溶液 (PBS, pH5.8)、甲醇、去离子水。

1.2.3 中药 日钟补阴方:归芍地黄汤加减,当归 10g、赤芍 10g、白芍 10g、山药 10g、山茱萸 9g、炒丹皮 10g、茯苓 10g、川断 10g、生地 10g、甘草 3g。日钟补阳方:健固汤加减,党参 15g、杜仲 12g、川断 10g、紫河车 10g、鹿角霜 10g、炒白术 10g、茯苓 10g、炒丹皮 10g、甘草 3g。药物饮片由江苏省中医院中药房供应,煎剂由江苏省中医院药房代煎,150mL/包。

2 实验方法

2.1 分组与给药 72 只幼兔随机分入 4 周检测组和 12 周检测组,每组又随机分成 6 组,每组 6 只,即自然光组、LED 灯组、全光谱灯组、自然光中药组、LED 灯中药组和全光谱灯中药组。自然光组:饲养在正常自然光线照射的环境中;LED 灯组:饲养在 LED 灯环境中;全光谱灯组:饲养在全光谱灯环境中。各中药组:饲养在相应的光环境中,分别同时采用“日钟阴阳方”灌胃,补阳方于每日 10:00 灌入,补阴方于每日 22:00 灌入。幼兔服药剂量参照徐书云主编《药理实验学》中人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值进行换算,幼兔每次 3.5mL 针管灌胃。自然光组、LED 灯组、全光谱灯组未予以灌胃,正常饲养。4 周检测组和 12 周检测组分别连续给药 4 周、12 周。

2.2 样品收集和检测 4 周检测组和 12 周检测组分别于给药结束后,从兔耳缘静脉抽取 2mL 静脉血,3000g/min 离心 15min。取 1mL 血清保留并贮存在-4℃下备用。随后使用 0.05%盐酸氯胺酮 120mg/kg 肌肉注射麻醉幼兔,每只兔子随机选取一侧眼球,切除视网膜并立即冻结在-70℃液氮中,注意在低温和低价下采集样品。

2.3 指标检测 采用 ELISA 及 HPLC 检测幼兔血清和视网膜多巴胺水平。

2.3.1 Elisa 检测血清多巴胺水平 肝素抗凝管取兔外周血若干微升,室温静置 10min,3000r/min 离心 10min,小心取出上层血清备用。配置标准品 9ng/mL,按 300μL 标准品液+600μL 稀释液稀释标准液,最低标准液为 0.037ng/mL。小心取出密封保存的酶标板,擦干水渍,于酶标板中依次加入 50μL 标准品、空白品、待测样品,每孔立即加入检测溶液 A 工作液 50μL,轻轻振动,混匀,覆膜,于台式恒温振荡器 37℃温育 1h。弃去孔内液体,每孔用 350μL 洗涤液洗板 3 次,每孔加检测溶液 B 工作液 100μL,覆膜,于台式恒温振荡器 37℃温育 30min。再次洗板 5 次,每孔加底物 90μL,覆膜,37℃条件下避光显色。最后

每孔加终止溶液 50μL 终止反应,酶标仪提前 30min 开启预热,以保证结果的稳定性,450nm 波长测量各孔的光密度值(OD 值)。OD 值和对应的标准品的浓度,用 ELISA Calc 软件做标准曲线,样品 OD 值带入标准曲线计算样品浓度。

2.3.2 HPLC 检测视网膜多巴胺分泌 配制 1.0mg/mL 的多巴胺原液,溶剂为 0.1mol/L 高氯酸溶液,对多巴胺原液进行逐级稀释,溶剂也均为 0.1mol/L 高氯酸溶液,配制多巴胺浓度分别为 5.0、10.0、25.0、50.0、100、1000ng/mL 的标准溶液,使用高效液相色谱仪(HPLC)进行测定,使用 C18 色谱柱,流动相为 10mmol/L 磷酸缓冲盐溶液 (PBS, pH5.8) 与甲醇 (98:2),等度洗脱,流速为 1mL/min,进样量为 20μL,激发波长 290nm,发射波长 330nm,数据通过 LC-solution 软件采集,每个相同保留时间对应峰的峰面积即代表着样品的浓度。称取约 20mg 组织于 2mL EP 管中,加入 150μL 的 0.1mol/L 高氯酸,于冰上匀浆 1~2min,冰上孵育 30min,每 10min 涡旋 1 次。将匀浆液于 4℃,10000r/min 离心 15min,取上清,再将上清置于 4℃,10000r/min 离心 10min,取上清。上清中多巴胺的测定采取上述标准曲线测定法,在室温下进行色谱分离。

2.4 统计学方法 所有数据均采用 (mean±SD) 表示,采用 GraphPad Prism 6 软件的 2-tailed Student's t-test 进行统计,而多组之间的比较利用 1-way ANOVA 统计, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

4 周、12 周实验结束时 LED 灯组幼兔血清、视网膜多巴胺含量明显低于自然光组、全光谱灯组 ($P<0.01$),而全光谱灯组幼兔血清、视网膜多巴胺含量与自然光组比较无统计学差异 ($P>0.05$)。给予“日钟阴阳方”4 周、12 周,LED 灯中药组幼兔血清、视网膜多巴胺含量显著高于 LED 灯组 ($P<0.01$),而中药对自然光组和全光谱灯组幼兔血清、视网膜多巴胺含量无影响 ($P>0.05$)。见表 1。

4 讨论

近年来研究发现,多巴胺是调控眼球生长的主要神经活性物质,与眼球的生长发育存在着极大的联系,在形觉剥夺性近视形成以及眼球异常增长中起了重要的作用^[7]。研究表明,多巴胺是一种与神经节细胞放电率有关的抑制性神经递质,可以减少神经节细胞的自发和光诱发放电,对视网膜周边部位杆体传导为主的神经通路有极强的抑制作用^[8]。在正常生理条件下,视网膜多巴胺通过 D1 和 D2 受体在视觉发生时参与了光偶联和传导作用,并参与调节眼球内节律,从而对眼球的生

长和发育进行调控。也有研究推测,多巴胺可能通过释放视网膜色素上皮层的生物调节因子来调控眼球生长^[9]。

本研究结果显示,与自然光组和全光谱灯组相比,LED灯组幼兔视网膜和血清多巴胺在第4周时含量显著减少,并且在第12周时差异更加明显。张厚亮等^[10]研究发现,光照不会损害RPE分泌多巴胺的功能,

多巴胺的分泌(基础分泌)不需要光照的刺激,光照刺激24h后可以增加多巴胺的分泌。而吴晓敏^[11]研究发现,相同光照时间条件下,光照强度并不会成为影响眼球屈光发育的因素。而本实验所用的LED灯和全光谱灯光照强度皆在正常强度,并未加大光照强度,推测正常的室内LED灯可以影响幼兔发育过程中视网膜和体内的多巴胺等激素的合成和分泌。

中医学强调“整体观”及“天人相应”,据此夏桂成教授提出了阴阳钟理论,具体为:子时为半夜,阴中之阴;午时为日中,阳中之阳;卯时阳出于阴;酉时阴出于阳。因时制宜,适时服用相对应的方药,滋阴补阳,即于阴时(子时前)血中补阴,方用归芍地黄汤加减;阳时(午时前)采用气中补阳的原则,给予健固汤加减,脾肾双补,维持阳气增长^[12]。根据夏桂成教授的阴阳钟理论,王育良教授提出“阴阳日钟调节法”的构想,在顺应子午流注规律的前提下服用相对应的方药,调节生物节律紊乱,从而纠正因节律失调引起的内分泌紊乱,达到治未病的效果。

补阴方选用归芍地黄汤加减,方中生地、丹皮滋阴生津、凉血止血,山茱萸、当归、白芍、川断补肝养肾而涩精,山药健脾而固精,茯苓利水渗湿。归芍地黄汤最早见于《病因脉治》,由当归、白芍、生地、山药、茯苓、泽泻、山茱萸、牡丹皮组成,此方以六味地黄汤为基础,易熟地为生地,加当归、白芍而来,因肝肾同源,肝血不足亦可导致肾阴亏损,并且肝藏血,目得血而能视。现代药理研究表明,归芍地黄汤的组成方药具有抗炎、抗损伤、抗衰老、调节免疫等多种作用^[13]。补阳方原方由人参15g、白茯苓9g、白术30g、巴戟天15g、薏苡仁9g组成,全方健脾温肾化湿。方中参、苓、术、苡仁益气健脾化湿;巴戟天补肾气,助命门之火,“善走肾经血分,能温肾助阳,强阴固精,散寒起萎,调经止血”^[14]。

本研究探寻“阴阳日钟调节法”干预的作用节

表1 各组幼兔血清和视网膜中多巴胺水平比较

组别	4周检测组			12周检测组		
	动物数(只)	血清	视网膜	动物数(只)	血清	视网膜
自然光组	6	0.12±0.03	0.13±0.03	6	0.13±0.03	0.14±0.03
自然光中药组	6	0.12±0.02	0.13±0.03	6	0.14±0.03	0.15±0.04
LED灯组	6	0.08±0.02**	0.08±0.02**	6	0.07±0.01**	0.06±0.02**
LED灯中药组	6	0.13±0.03 ^{##}	0.11±0.02 ^{##}	6	0.11±0.03 ^{##}	0.12±0.02 ^{##}
全光谱灯组	6	0.13±0.04	0.14±0.03	6	0.12±0.03	0.15±0.03
全光谱灯中药组	6	0.13±0.04	0.14±0.03	6	0.13±0.03	0.16±0.02

注:与同时间自然光组、全光谱灯组比较,** $P<0.01$,与同时间同种光环境组比较,^{##} $P<0.01$ 。

点,结果显示经中药干预LED灯中药组幼兔血清和视网膜多巴胺含量较LED灯组明显增加,表明中药干预可能逆转了LED灯对多巴胺分泌的抑制,对幼兔视网膜发育有一定程度的保护作用。其机制可能是中药组方根据“阴阳日钟法”,顺应了自然节律,抑制了视网膜中DA合成的减少,进一步起到对视网膜的保护作用。

综上,相对于人造光源,自然光与全光谱灯更适合作为人类使用的光源,建议减少身处室内时间,多处于自然光环境下,或使用全光谱灯替换日光灯作为人工光源。本实验研究结果将有利于我们对光照与视网膜发育关系的进一步思考,对于以后寻找绿色光源具有重要的指导作用。

参考文献

- [1] 周跃华.视网膜光损伤机制的实验研究[J].国外医学眼科学分册,1998,22(3):182.
- [2] 毛俊峰,刘双珍,秦文娟,等.豚鼠形觉剥夺性近视视网膜、脉络膜多巴胺代谢的变化[J].眼视光学杂志,2009,11(1):33.
- [3] 高前应,高如尧,王培杰,等.多巴胺对兔实验性形觉剥夺性近视形成的影响[J].第四军医大学学报,2001,22(2):105.
- [4] XIAO L,LIU D,CHEN R.Autoradiography on correlation of dopamine receptor and myopia [J].Journal of Optometry & Ophthalmology,1999,1(2):80.
- [5] DONG F,AN J H,REN Y P,et al.Expression of dopamine receptor D2 and adenosine receptor A2A in human retinal pigment epithelium [J]. Zhonghua Yan Ke Za Zhi, 2007,43(12):1110.
- [6] 孙广仁.中医基础理论[M].北京:中国中医药出版社,2007:60.
- [7] 肖林.视网膜多巴胺神经系统研究与近视基础研究现状与展望[J].国外医学眼科学分册,1997,21(5):306.
- [8] 阎洪禄,于秀敏.眼生理学[M].北京:人民卫生出版社,2001:338.
- [9] ROHRER B,SPIRA A W,STELL W K.Apomorphine blocks form-deprivation myopia in chickens by a

山楂叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠血糖血脂和抗氧化能力的影响

周少英¹ 苏 静² 阚敏宸¹ 史延卿¹ 梁 伟¹

(1.邯郸市中心医院东区急诊科,河北邯郸 056001; 2.邯郸市鸡泽县医院内科,河北邯郸 056000)

摘 要 目的:研究山楂叶总黄酮(Hawthorn Leaves Flavonoids,HLF)对 2 型糖尿病大鼠调节血脂和抗氧化能力的改善作用。方法:采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ,60mg/kg)破坏胰岛 β 细胞的方法诱导制备实验性 2 型糖尿病大鼠模型,取 80 只模型大鼠根据血糖水平随机分为模型组、盐酸二甲双胍(200mg/kg)治疗组和 HLF 低、中、高剂量(50、100、200mg/kg)组,并另设正常对照组。认定造模成功后,各治疗组大鼠每天灌胃给药 1 次,疗程 6 周。给药前和给药后每 2 周测定血糖;6 周后,检测血清血脂指标;通过苏木精-伊红(HE)染色观察肝脏和心肌组织形态结构变化,测定肝脏和心肌组织中抗氧化酶活性和丙二醛(MDA)含量。结果:与模型组比较,治疗后 BLF 中、高剂量组大鼠空腹血糖水平显著降低($P<0.05$, $P<0.01$),血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),肝脏和心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性明显提高($P<0.05$, $P<0.01$),MDA 含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);治疗后 BLF 高剂量组大鼠血清高密度脂蛋白(HDL-C)含量显著升高($P<0.05$),肝脏和心肌组织中 GSH-Px 活性显著提高($P<0.05$);治疗后 HLF 各剂量组大鼠肝脏和心肌组织病变呈不同程度减轻,其中以 HLF 高剂量组效果最为显著。结论:HLF 能够有效改善 2 型糖尿病大鼠血糖血脂和抗氧化能力。

关键词 山楂叶总黄酮 2 型糖尿病 血脂 血糖 抗氧化酶活性 丙二醛 SD 大鼠 实验研究

中图分类号 R587.10.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)05-0079-04

糖尿病(Diabetes Mellitus,DM)是一种常见的具有遗传特征的慢性代谢系统疾病,其发病率已仅次于恶性肿瘤和心脑血管疾病居第三位^[1]。糖尿病晚期患者常伴有多个组织器官并发症,包括肝脏、心脏、肾脏等,极大地影响患者的生活质量,已引起广大医药工作者的广泛关注。近年来,随着病理学研究的深入,发现糖脂代谢异常以及氧自由基过剩而引发的氧化应激损伤是糖尿病及其并发症发生发展的重要病理机制^[2-3],其中肝脏和心脏组织对氧

化应激非常敏感^[4]。所以,糖尿病患者除了应注重控制血糖外,还应辅助调节血脂、抗氧化损伤,并关注肝功能和心功能。山楂叶总黄酮(Hawthorn leaves flavonoids,HLF)是指从山楂叶中提取的一类黄酮类化合物,具有明显的抗氧化、调节血脂、抗组织缺血等多种生物活性^[5-7]。本实验通过高脂高糖饮食加腹腔注射 STZ 破坏胰岛细胞的方法诱导制备的糖尿病大鼠模型,研究山楂叶总黄酮对糖尿病大鼠的降糖调脂和抗氧化作用。

dopamine D2-receptor mechanism acting in retina or pigmented epithelium[J].Vis Neurosci,1993,10(3):447.

- [10] 张厚亮,任惠民,王坚,等.光照对视网膜色素上皮细胞分泌多巴胺功能的影响[J].中国临床神经科学,2007,15(2):123.
- [11] 吴晓敏.光照时间和强度对小鼠眼球发育和屈光状态的影响[D].温州:温州医学院,2008.
- [12] 夏桂成.妇科方药临证心得[M].北京:人民卫生出版社,2006:13.
- [13] 刘安,郑永征,曹明芳,等.归芍地黄汤联合经瞳孔温热疗法对 MMP-2 和 MMP-9 抑制作用的实验研究[J].中国

中医眼科杂志,2008,18(6):317.

- [14] 白玉兰.傅老“二方”当今活用[J].黄河医学,1994,3(1):29.
- [15] 赵颖熙,陈露,瞿小妹.光照度对豚鼠屈光发育的影响[J].中国实验动物学报,2011,19(5):400

第一作者:宗霞(1990—),女,医学硕士,中医眼科专业。

通讯作者:王育良,医学博士,教授,博士研究生导师。wyl0601@126.com

收稿日期:2015-11-20

编辑:吴 宁