

光照变化对小鼠褪黑素影响的实验研究

肖遥 蒲晓田 王明哲 覃骊兰 米雪峰 单体亮 马淑然

【摘要】 目的 从光照变化对小鼠褪黑素影响,探索昼夜阴阳消长与生物节律的关联性。**方法** 雄性昆明小鼠 144 只,随机分为正常组、长光照组、长黑暗组 3 组,每组各 48 只。适应性饲养 7 天,光照控制干预 6 周后开始试验取材,分别于 0:00,4:00,8:00,12:00,16:00,20:00 共 6 个时间点分组取血,检测血中褪黑素。对各组各时间点小鼠褪黑素数据进行方差分析确定昼夜节律的存在;并分析不同光照条件下小鼠褪黑素节律的不同。用 LSD 方法对各时间点数据进行两两比较分析,分析昼夜节律对小鼠褪黑素的影响。**结果** (1)同组小鼠不同时间点血清褪黑素含量有统计学差异($P < 0.05$),但其节律性随着光照不同呈现不同的特点。(2)正常组小鼠血清褪黑素含量 4:00 最高。20:00~4:00 是血清褪黑素含量升高的转折时段,4:00~8:00 是血清褪黑素含量降低的转折时段。(3)长光照组小鼠血清褪黑素含量 0:00,4:00,8:00 这 3 个时间点含量较高,三者比较差异无统计学意义。12:00,16:00,20:00 这 3 个时间点含量较低,三者比较差异无统计学意义。8:00~12:00 是血清褪黑素含量明显降低的转折时段,20:00~0:00(24:00)是血清褪黑素含量明显升高的转折时段。(4)长黑暗组小鼠血清褪黑素含量 0:00,4:00 两个时间点较高,两者比较差异无统计学意义。8:00,12:00,16:00,20:00 这 4 个时间点含量较低,四者比较差异无统计学意义。在 4:00~8:00 时间段是血清褪黑素含量明显下降的转折时段,在 20:00~0:00 点时间段是血清褪黑素含量明显上升的转折时段。(4)长光照组褪黑素含量均值与正常组进行组间比较,小鼠血清褪黑素整体水平上升, $P < 0.05$,差异有统计学意义;长黑暗组褪黑素含量与正常组进行组间比较,小鼠血清褪黑素整体水平无明显变化, $P > 0.05$,差异无统计学意义。**结论** (1)昼夜不同光照改变,可以影响小鼠褪黑素的昼夜节律,导致其昼夜相位或整体含量的改变,这可能是现代光照条件下节律紊乱性疾病发生的重要因素之一。(2)中医关于昼夜阴阳消长对人体生理病理影响的天人相应理论具有客观物质基础和科学内涵。

【关键词】 昼夜阴阳消长; 天人相应; 小鼠; 褪黑素

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.07.001

Experimental study on illumination changes affecting melatonin of mice XIAO Yao, PU Xiao-tian, WANG Ming-zhe, et al. School of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: MA Shu-ran, E-mail: mashuran64@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the relationship between the wax and wane of Yin and Yang during night and day and biological rhythm through illumination changes affecting melatonin of mice. **Methods** 144 male kunming mice were randomly divided into normal group, long light group and long dark group, 48 mice each group. Adaptive breeding for 7 days, after intervention with lighting control six weeks, taking sample of blood in six time points (0:00, 4:00, 8:00, 16:00, 12:00, 20:00) respectively and detecting the content of melatonin. Using ANOVA variance analysis to determine the existence of circadian rhythm, and analysing the different illumination conditions, different mouse melatonin rhythm. Use LSD method to analyse each time point of data for the two two comparative analysis, analyse of the impact of cir-

基金项目:北京中医药大学自主课题(201210026066);北京中医药大学气化学说与藏象理论研究创新团队项目(522/0100603001);北京市中医管理局刘燕池名医传承工作站建设项目

作者单位:100029 北京中医药大学基础医学院[肖遥(本科生)、王明哲(本科生)、蒲晓田(硕士研究生)、米雪峰(硕士研究生)、单体亮(硕士研究生)、覃骊兰(博士研究生)、马淑然]

作者简介:肖遥(1992-),2010 级在读本科生。研究方向:中医基础医学。E-mail:sumire.yk@gmail.com

通讯作者:马淑然(1964-),女,博士,教授,博士生导师。研究方向:天人相应理论与实验研究。E-mail:mashuran64@sina.com

cadian rhythm of melatonin in mice. **Results** (1) There were significant differences in the same group at different time points in serum melatonin content ($P < 0.05$), but the rhythm with the light show different characteristics are different. (2) The normal mice serum melatonin content is highest at 4:00, 20:00 ~ 4:00 is a turning period of elevated serum melatonin content, 4:00 ~ 8:00 is the turning period of decreased serum melatonin content. (3) The 3 time point of mice serum melatonin content in long photoperiod group at 0:00, 4:00, and 8:00 is high, no statistically significant difference between the three. 12:00, 16:00, 20:00 this 3 time points, serum melatonin content is low, no statistically significant difference between the three. 8:00 ~ 12:00 is a turning period of serum melatonin content decreased, 20:00 ~ 0:00 (24:00) is a turning period of serum melatonin levels markedly increased. (4) As for comparison of average concentration of melatonin between the long photoperiod group and the normal group, the overall level of serum melatonin increased in mice, $P < 0.05$, the difference is statistically significant; Compared with melatonin content between long dark group and normal controls group, no significant change in the overall level of serum melatonin in mice, $P > 0.05$, no significant difference. **Conclusion** (1) The circadian change of different illumination influencing the circadian rhythm of melatonin in mice and leading to changes in the circadian phase or the whole content, which may be one of important factors inducing rhythm disorder disease owing to modern light exposure. (2) The human-heaven corresponding theory of Chinese medicine on the effect of circadian growth and decline of yin and yang to human physiology and pathology has the objective material basis and scientific connotation.

【Key words】 Wax and wane of Yin and Yang during day and night; Relevant adaptation of the human body to natural environment; Mice; Melatonin

1 材料与方法

1.1 动物与分组

雄性昆明小鼠共 144 只, 体重 15 ~ 20 g, 3 ~ 4 月龄, 由北京维通利华动物研究中心提供。合格证号 0291049, 许可证编号 SCXK(京)2012-0001。

适应性饲养 7 天后, 随机分为长光照组、正常组、长黑暗组三组, 每组各 48 只。各组光照干预条件如下:

长光照组: 给予 24 小时不间断光照; 此造模法模拟现代人生活夜晚灯光照射时间长, 甚至睡眠剥夺。

正常组: 给予 12 小时光照, 12 小时黑暗的光照条件; 利用倒班黑箱及自动定时开关于每日 6:00 ~ 18:00 给予日光灯照射, 18:00 ~ 次日 6:00 给予黑暗条件。

长黑暗组: 给予 24 小时全黑暗条件。

饲养条件: 室温(控制在 20 ~ 23℃ 之间)。每日投食一次, 自由摄取水及饲料, 饲料为普通鼠全价颗粒饲料(北京实验动物研究中心提供)。于实验第 6 周末开始试验取材。

1.2 主要仪器和试剂

4℃ 低温离心机(美国 BECKMAN 公司)。小鼠褪黑素酶联免疫检测试剂盒, 均购自北京瑞格博科

技发展有限公司。

1.3 取血

实验第 6 周末最后一天, 分别于 0:00、4:00、8:00、12:00、16:00、20:00 共 6 个时间点分组取血。每个时间点每组随机取 8 只小鼠取材, 即每个时间点取血样 24 个。

取血时的光照条件与饲养过程中某时刻的光照条件一致, 分别为: 长光照组 6 个时间点均在正常光源下取血; 正常组 0:00、4:00、16:00、20:00 这 4 个时间点在红光灯下排除其他光线干扰取血, 8:00、12:00 这 2 个时间点在正常光源下取血; 长黑暗组 6 个时间点均在红光灯下排除其他光线干扰取血。

取血方法: 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 摘眼球取血, 血样静置 30 分钟后, 4℃ 3000 r/min 离心分离血清, 取上清低温贮存备测相关指标。

1.4 检测指标与方法

小鼠血清褪黑素采用酶联免疫检测法检测, 检测步骤按照试剂盒使用说明书严格操作。比较同组小鼠不同时间点血清褪黑素含量数据, 以求验证昼夜节律的存在。比较同时间点各组小鼠血清褪黑素含量数据, 以求探索光照对小鼠褪黑素节律的影响。

1.5 统计分析

结果用 SPSS 17.0 统计软件包分析。实验数据

表 1 三组小鼠昼夜各时间点血清褪黑素含量比较($\bar{x} \pm s$, ng/L, $n = 8$)

分组	0:00 点	4:00 点	8:00 点	12:00 点	16:00 点	20:00 点	昼夜整体均值
长光照组	216.26 ± 18.81	213.42 ± 15.29	203.59 ± 14.71	184.55 ± 8.93	189.40 ± 21.26	185.70 ± 15.28	198.72 ± 20.21
正常组	178.68 ± 20.25	203.67 ± 11.18	150.59 ± 17.20	158.23 ± 16.86	164.11 ± 15.24	160.92 ± 11.92	169.37 ± 23.13
长黑暗组	194.44 ± 18.80	199.84 ± 15.02	166.42 ± 12.25	157.18 ± 19.72	168.83 ± 18.40	151.32 ± 10.75	173.95 ± 23.80

表 2 正常组、长光照组、长黑暗组褪黑素含量组间节律变化比较($n = 48$)

时间点	含量较高时段	含量较低时段	含量降低时段	含量升高时段
正常组	0:00 ~ 4:00 点	8:00 ~ 20:00 点	4:00 ~ 8:00 点	20:00 ~ 4:00 点
长光照组	0:00 ~ 8:00 点	12:00 ~ 20:00 点	8:00 ~ 12:00 点	20:00 ~ 0:00 点
长黑暗组	0:00 ~ 4:00 点	8:00 ~ 20:00 点	4:00 ~ 8:00 点	20:00 ~ 0:00 点

均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。同组小鼠不同时间点血清褪黑素含量数据比较和同时间点各组小鼠血清褪黑素含量数据比较应用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用 LSD 方法进行数据的两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 同组小鼠不同时间点血清褪黑素含量比较

同组小鼠不同时间点血清褪黑素含量有统计学差异,进行方差分析,差异有显著性($P < 0.05$),见表 1、图 1。但其节律性随着光照不同呈现不同的特点。

正常组小鼠血清褪黑素含量 4:00 最高,次高点是 0:00。这 2 个时间点分别与其他时间点比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。8:00、12:00、16:00、20:00 这 4 个时间点含量较低,这 4 个时间点数据间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1 和图 1。20:00 点 ~ 4:00 点是血清褪黑素含量升高的转折时段, ($P < 0.05$); 4:00 点 ~ 8:00 点是血清褪黑素含量降低的转折时段($P < 0.05$),见表 2 和图 1。

长光照组小鼠血清褪黑素含量 0:00、4:00、8:00 这 3 个时间点较高,三者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。12:00、16:00、20:00 这 3 个时间点含量较低,三者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。8:00 点 ~ 12:00 点是血清褪黑素含量明显降低的转折时段($P < 0.05$), 20:00 点 ~ 0:00 点(24:00 点)是血清褪黑素含量明显升高的转折时段($P < 0.01$),见表 2。

长黑暗组小鼠血清褪黑素含量 0:00、4:00 两个时间点较高,两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

8:00、12:00、16:00、20:00 这 4 个时间点含量较低,四者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。8:00 点、12:00 点、16:00 点、20:00 点褪黑素含量低于 0:00 点、4:00 点褪黑素含量,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1 和图 1。在 4:00 ~ 8:00 点时间段是血清褪黑素含量明显下降的转折时段($P < 0.05$),在 20:00 点 ~ 0:00 点时间段是血清褪黑素含量明显上升的转折时段($P < 0.05$),见表 2。

2.2 同时间点各组小鼠血清褪黑素含量比较

三组小鼠血清褪黑素含量昼夜整体均值比较,长光照组褪黑素含量最高,经方差分析, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。用 LSD 方法进行数据的两两比较,长光照组褪黑素含量均值与正常组的组间比较,小鼠血清褪黑素整体水平上升, $P < 0.05$, 差异有统计学意义。长黑暗组褪黑素含量与正常组的组间比较,小鼠血清褪黑素整体水平无明显变化, $P > 0.05$, 差异无统计学意义。见表 1。

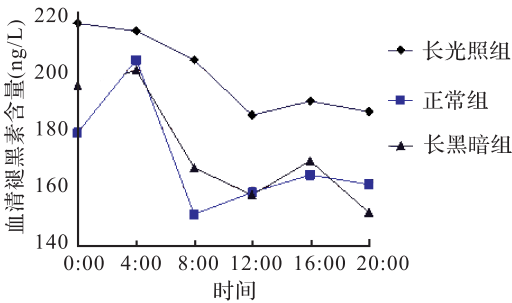


图 1 小鼠血清褪黑素变化曲线图

3 讨论

生物昼夜节律的形成是在生物长期进化过程中与生存环境互动的结果,它有一定的内源稳定性,以

内源性自律系统的控制为基础,再加上外界环境周期性变化作为授时因子被生物感知,使得生命活动的节律与环境的周期变化同步,其中同步作用最强的是昼夜光照条件的周期性明暗变化。众多实验研究表明,光照强度、光照时间长短以及光谱的组成对机体的昼夜节律都有不同程度的影响。

松果体分泌的褪黑素是传递外界环境光周期变化的信号激素。在人体及动物血中褪黑素的浓度呈脉冲性分泌,表现出昼低夜高的分泌规律,啮齿类动物褪黑素在白天维持在一个很低的水平,入夜后逐渐上升,到 3:00~4:00 分泌高峰出现,然后逐渐降低,形成一个分泌周期,实验所观察到的正常光照组变化趋势基本与之相符。

持续黑暗组小鼠血清褪黑素分泌表现出不受光照引导的自由节律,与正常光照条件下相比,褪黑素含量升高的时相点前移。在持续光照条件下,小鼠血清褪黑素含量在高水平与低水平之间变化的时相点发生了变化,下降的时相点后移,而上升的时相点前移。尤其在 0:00 点、8:00 点时刻:正常光照条件下 8:00 点时血清褪黑素为低水平含量,持续光照条件下 8 点时刻褪黑素水平仍维持在与 4 点时无显著差异的高水平含量;正常光照条件下 0:00 点血清褪黑素含量较低,0:00 点~4:00 点逐渐上升,到 4:00 点方达到高峰,在持续光照条件下 0:00 点血清褪黑素含量即达到较高水平。因此在长期持续光照条件下小鼠血清褪黑素的分泌节律出现了紊乱,而作为机体内部感知外界环境昼夜光周期变化的信号激素,这有可能是现代光污染导致睡眠—觉醒节律障碍,进而引起一系列生理节律紊乱的基础。

现代研究普遍认为,光照对于褪黑素的分泌具有抑制作用。但众多实验由于光照条件及实验对象的不同,实验结果也不尽相同,并且大多数研究的焦点集中在光照波长和光照强度的影响作用上,对光照持续时间的影响至今仍未发现普遍一致的规律。

有早期实验发现不管是对于人还是动物,在夜间突然给予 1 分钟以上的强光照可快速降低血液内及其他组织内的褪黑素含量^[2]。有实验对大鼠采用 24 小时持续光照 30 天后,测得 2:00 血清褪黑素含量与正常光照组相比有所降低(正常组褪黑素含量为 27.4534 ± 2.6061 ng/ml,持续光照组为 24.9920 ± 2.3152 ng/ml),14:00 血清褪黑素含量在持续光照下有降低趋势,但无显著差异($P > 0.05$)^[3]。另外有实验在夜间无自然光照下对小鼠采用人工光照持续照射 45 天,于饲养结束后分别于一个昼夜周期

的 6 个时间点取血,用放射免疫法测定血清褪黑素含量,发现一天内小鼠褪黑素含量整体均值持续光照组大于正常光照组,但对此结果未作分析^[4]。在本实验结果中发现,长期持续光照条件下,小鼠一个昼夜周期的褪黑素整体均值含量较正常光照组有显著升高,另外,在前期预实验中,亦发现经过 6 周持续光照后,小鼠一天内褪黑素含量整体均值较正常组有升高趋势。所以,结合实验结果推测,光照对褪黑素分泌的抑制作用主要表现在,暗期动物突然暴露于光照条件下时褪黑素含量急剧降低,以及短期持续光照条件下褪黑素含量降低。但当动物长期处于持续的光照条件下时(比如在实验中持续时间在 6 周以上),机体对于长期持续的光照环境作出适应性的调整,通过某种代偿机制使得褪黑素整体水平上升,这种代偿机制可能与松果体的自身调节相关,也可能与其他组织细胞代偿性分泌褪黑素相关^[5]。

中医天人相应理论认为,随着光照的变化,自然界阳气存在着生长化收藏的变化过程,在此基础上形成了昼夜的阴阳消长变化,机体阳气与自然界昼夜阴阳消长变化相应对各种生理病理变化有重要影响。本实验研究证实,通过昼夜不同光制改变,可以影响小鼠褪黑素的昼夜节律,导致其昼夜相位或整体含量的改变,这可能是现代光照条件下节律紊乱性疾病发生的重要因素之一,其机制有待于进一步深入探讨。在实验中,褪黑素指标表现出昼夜节律的变动,同时在不同光制的影响下,其昼夜节律发生了改变,该结果说明了中医关于昼夜阴阳消长对人体生理病理的影响具有客观物质基础,初步证明了中医天人相应理论具有科学内涵。

参 考 文 献

- [1] 马淑然,袁卫玲. 肺脏疾病季节性发作与褪黑素相关性的理论探讨[J]. 中华中医药杂志,2010,25(10):1545-1547.
- [2] 叶百宽,石琼. 松果体与健康—褪黑素的奇妙功能[M]. 北京:人民军医出版社,2008:139.
- [3] 堵吉. 持续光照对雌性大鼠生殖内分泌节律的影响及滋阴补阳序贯中药干预作用的实验研究[D]. 南京:南京中医药大学,2012.
- [4] 徐静. 时间序列分析方法在光-褪黑素生物转导信号研究中的应用[D]. 北京:北京中医药大学,2012.
- [5] 刘志民. 松果体激素及其受体研究现状及展望[J]. 解放军医学杂志,2003,28(3):212-213.

(收稿日期:2013-10-22)

(本文编辑:董历华)