

· 基础研究 ·

人工光环境对雌性豚鼠生殖内分泌的影响及日钟阴阳方的干预作用

施加裕¹ 谈 勇²

摘要 **目的** 研究人工光环境对雌性豚鼠生殖内分泌的影响及日钟阴阳方对雌性豚鼠下丘脑中吻素 Kisspeptin 及吻素受体 (KISS1R) 的作用机制。**方法** 将 3 月龄雌性豚鼠按体重的大小从 1 到 36 编号, 获取随机数字, 按余数分为 6 组, 分别为自然光组、自然光食疗组、LED 灯组、LED 灯食疗组、荧光灯组和荧光灯食疗组, 每组 6 只。用日钟阴阳方对自然光食疗组、LED 灯食疗组、荧光灯食疗组进行干预 12 周。饲养 12 周后, 于动情前期取材, HE 染色, 电镜下观察卵巢形态; ELISA 测定豚鼠血清中雌二醇 (E_2)、促黄体生成素 (LH)、促卵泡生成素 (FSH)、睾酮 (T)、抗苗勒氏管激素 (AMH)、泌乳素 (PRL) 水平; Western Blot 测定豚鼠卵巢内雄激素受体 (AR)、促黄体生成素受体 (LHR)、促卵泡生成素受体 (FSHR) 及下丘脑中 KISS1R 的蛋白含量及逆转录聚合酶链式反应法 (RT-PCR) 测定豚鼠卵巢内 AR、LHR、FSHR mRNA 及下丘脑中 KISS1R mRNA 表达水平。**结果** (1) 自然光照组及自然光食疗组可见结构完整的卵母细胞, 未见明显病理变化; 荧光灯组及 LED 灯组卵巢卵母细胞消失, 见大量炎性细胞浸润; 荧光灯食疗组及 LED 灯食疗组卵巢可见卵母细胞, 但卵母细胞周围粒细胞排列疏松, 间隙增大。(2) 与自然光照组比较, 自然光食疗组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量下降, 下丘脑内 KISS1R 及卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白含量下降 ($P<0.05$); 与荧光灯组比较, 荧光灯食疗组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量下降, 下丘脑内 KISS1R 及卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白含量下降 ($P<0.05$); 与 LED 灯组比较, LED 灯食疗组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量均下降, 下丘脑内 KISS1R 及卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白含量下降 ($P<0.05$); 与自然光照组比较, 荧光灯、LED 灯组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量上升, 下丘脑内 KISS1R 及卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白含量上升 ($P<0.05$); 与自然光食疗组比较, 荧光灯食疗、LED 灯食疗组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量上升, 下丘脑内 KISS1R 及卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白含量上升 ($P<0.05$)。**结论** 人工光环境的改变会对豚鼠生殖内分泌造成影响, 日钟阴阳方可有效改善豚鼠生殖内分泌紊乱的结局。其可能机制与通过调控豚鼠下丘脑内 KISS1R 的表达, 影响 Kisspeptin 的分泌有关。

关键词 光环境; 日钟阴阳方; 性激素水平; 吻素; 吻素受体

Effect of Artificial Light Environment on Reproductive Endocrine of Female Guinea Pigs and Intervention of Rizhong Yinyang Formula SHI Jia-yu¹ and TAN Yong² ¹ First Clinical Medical College, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029); ² Department of Reproductive Medicine, Affiliated Hospital, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210001)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of artificial light environment on reproductive endocrine of female guinea pigs and to observe the intervention effect of Rizhong Yinyang Formula (RZYF) on Kisspeptin and its receptor KISS1R in hypothalamus of female guinea pigs. **Methods** The 3-month-old female guinea pigs were numbered from 1 to 36 according to their body weight, and the random numbers were obtained. They were divided into 6 groups according to the remainder: natural light group, natural light diet group, LED light group,

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No.81873333, No.81674012); 江苏省科教强卫工程项目 (No.YXZXB2016006)

作者单位: 1. 南京中医药大学第一临床医学院 (南京 210029); 2. 南京中医药大学附属医院生殖医学科 (南京 210001)

通讯作者: 谈 勇, Tel: 025-86617141, E-mail: xijun1025@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210929.366

LED light diet group, fluorescent light group, and fluorescent light diet group, 6 guinea pigs in each group. The natural light diet group, LED light diet group, and fluorescent light diet group were intervened for 12 weeks. After feeding for 12 weeks, the materials were taken in the pre estrus period, stained with HE, and the morphology of ovary was observed under electron microscope. The hormone levels of estradiol (E_2), luteinizing hormone (LH), follicle stimulating hormone (FSH), testosterone (T), anti-Müllerian hormone (AMH) and prolactin (PRL) in guinea pig serum were measured by ELISA. The protein contents of androgen receptor (AR), luteinizing hormone receptor (LHR), follicle stimulating hormone receptor (FSHR) in guinea pig ovary and KISS1R in hypothalamus were measured by Western Blot, and mRNA expression levels of AR, LHR, FSHR in guinea pig ovary and KISS1R mRNA in hypothalamus were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results (1) Oocytes with complete structure were observed in natural light group and natural light diet group, and no obvious pathological changes were found. In the fluorescent lamp group and LED lamp group, ovarian oocytes disappeared and a large number of infiltrated inflammatory cells were seen. Oocytes could be seen in the ovaries of the two groups, but the arrangement of granulocytes around the oocytes was loose and the gap was enlarged. (2) Compared with the natural light group, the contents of serum E_2 , LH, FSH, T, AMH, and PRL in the natural light diet group decreased, and the protein contents of KISS1R in hypothalamus and LHR, FSHR and AR in ovary decreased ($P<0.05$). Compared with the fluorescent lamp group, the contents of serum E_2 , LH, FSH, T, AMH, and PRL in the fluorescent lamp diet group decreased, and the protein contents of KISS1R in hypothalamus and LHR, FSHR, and AR in ovary decreased ($P<0.05$). Compared with the LED light group, the contents of serum E_2 , LH, FSH, T, AMH, and PRL in the LED light diet group decreased, and the protein contents of KISS1R in hypothalamus and LHR, FSHR and AR in ovary decreased, except AMH in the LED light diet group ($P<0.05$). Compared with natural light group, the contents of serum E_2 , LH, FSH, T, AMH, and PRL in fluorescent lamp and LED lamp group increased, and the contents of KISS1R in hypothalamus and LHR, FSHR and AR in ovary increased ($P<0.05$). Compared with the natural light diet group, the contents of serum E_2 , LH, FSH, T, AMH, and PRL in the fluorescent light diet group and LED light diet group increased, and the contents of KISS1R in hypothalamus and LHR, FSHR and AR protein in ovary increased in the fluorescent light diet group and LED light diet group ($P<0.05$).

Conclusions The changes of artificial light environment will affect the reproductive endocrine of guinea pigs. RZYYF effectively improved the outcomes of reproductive endocrine disorders of guinea pigs. The possible mechanism might be through regulating the expression of KISS1R in the hypothalamus of guinea pigs, which might be related to regulating KISS1R expression in hypothalamus of guinea pigs and affecting the secretion of Kisspeptin.

KEYWORDS light environment; Rizhong Yinyang Formula; sex hormone level; Kisspeptin; Kisspeptin receptor

近年来,大量人工光源出现,其光谱与自然光源的光谱大不相同,这打破了人类原本已经适应的光环境。光环境的改变使人体所接受到的光信号发生改变,人体原有的生物节律发生变化。有研究发现,生物节律失调人群,如习惯熬夜、上夜班的女性月经周期紊乱、排卵障碍、不孕等疾病的比例要高于一般女性^[1]。本团队前期研究表明,持续光照会导致雌性大鼠动情周期的紊乱及内分泌紊乱,而中药具有诱导雌性大鼠周期重建及诱导排卵和黄体支持的作用^[2]。Kisspeptin 信号可通过刺激下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经元释放促性腺激素释放激素,起到调节下丘脑—垂体—卵巢(hypothalamus-pituitary-ovary, HPO)轴的功能,发挥调控机体生殖功能的关键性作用^[3]。

日钟阴阳方是根据国医大师夏桂成教授阴阳时辰钟理论创立而成,其机制以调节阴阳以达到机体平衡。时辰钟理论主要来源于子午流注学说以及运气学说,月经周期及生殖节律的阴阳变化于时辰钟关系密切。根据时辰钟理论提出的月经调周法在妇科疾病,尤其是优生优育方面效果显著^[4]。本团队前期临床研究中,将 80 例多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)行试管婴儿治疗的不孕症患者随机分为试管常规长方案组及补肾调周联合试管常规长方案组,研究表明,补肾调周联合常规长方案组患者原核细胞数、优质胚胎数、子宫内膜容受性、最终妊娠结局均优于常规长方案组^[5]。在治疗妇科疾病方面,夏桂成教授提倡阴时用阴药,阳时用阳药,顺应一日阴阳消长之变化,以便药物达到更好的治疗

效果^[6]。

本实验以人工光源作为造模条件,观察人工光环境对豚鼠生殖内分泌的影响,以日钟阴阳方作为干预药物的调节作用,通过检测下丘脑内吻素受体(Kisspeptin receptor, KISS1R)的蛋白表达量及KISS1R mRNA的表达水平,探讨其作用机制。

材料与方法

1 动物及分组 健康雌性豚鼠 36 只,3 月龄,体重 250~300 g,由江苏省南京市青龙山动物养殖场提供,动物生产许可证号:SCXK(苏)2017-001;本实验通过南京中医药大学动物伦理委员会审查(No.201811A022)。按豚鼠体重的大小从 1~36 编号,获取随机数字,按余数分为 6 组,分别为自然光照组(N 组)、自然光食疗组(NM 组)、LED 灯组(L 组)、LED 灯食疗组(LM 组)、荧光灯组(Y 组)、荧光灯食疗组(YM 组),每组 6 只。

2 药物 日钟阴阳方:子时养阴方:珍珠粉(货号:2 10405) 10 g 龟板粉(货号:200501) 10 g 银耳(货号:A598302) 10 g 百合(货号:A503985) 10 g,午时补阳方:核桃粉(货号:A590234) 10 g 板栗粉(货号:A503424) 10 g 黑小豆(货号:A504672) 10 g 羊肉(货号:A510094) 10 g。日钟阴阳方的制作方法:根据体表面积法,按成人 70 kg 体表面积等效剂量进行折算。公式: a 动物的体表面积/ b 动物的体表面积= a 动物的给药量/ b 动物的给药量,计算出动物所需药量^[7];根据豚鼠每只每日每顿喂食量为 20 g,计算出食疗方动物所需总的饲料量;将总药量与豚鼠常规饲料原材料混合制成特制食疗方,制成的总量同豚鼠 12 周所需常规饲料量。

3 试剂及仪器 豚鼠雌二醇(estradiol, E₂;货号:ADGu40038)、豚鼠促黄体生成素(luteinizing hormone, LH;货号:ADGu40602)、豚鼠促卵泡生成素(follicle-stimulating hormone, FSH;货号:ADGu40007)、豚鼠睾酮(testosterone, T;货号:ADGu46657)、豚鼠泌乳素(prolactin, PRL;货号:ADGu40014)、豚鼠抗苗勒氏管激素(anti-Müllerian hormone, AMH;货号:ADGu46621)酶联免疫试剂盒,均购自扬州鑫磊科技贸易有限公司;Tubulin 抗体(货号:10094-1-AP)、抗 LHCGR(货号:26424-1-AP)购自武汉三鹰生物科技有限公司;抗 Androgen(Abcam;货号:ab198394)、抗 KISS1R(货号:bs-2501R)、抗 FSHR(货号:bs-0895R),购自北京博奥森科技生物有限公司;RIPA 裂解液(货

号:G2002)、PMSF(货号:G2008)、HE 染色液(货号:G1005)、分化液(货号:G1005-3)、返蓝液(货号:G2005-4)、RNA 提取液(货号:G303)、DEPC 水(货号:G2039)、购自武汉塞维尔生物科技有限公司;无水乙醇(货号:10009218)、二甲苯(货号:10023418)、中性树胶(货号:10004160)、异丙醇(货号:80109218)、三氯甲烷(货号:10006818)购自国药集团化学试剂有限公司;反转录试剂盒(Takara;货号:RR047A)、LHR 上游引物(货号:2512383856)、LHR 下游引物(货号:2512383857)、FSHR 上游引物(货号:2512383858)、FSHR 下游引物(货号:2512383859)、AR 上游引物(货号:2512383860)、AR 下游引物(货号:2512383861)、Tubulin 上游引物(货号:2512383862)、Tubulin 下游引物(货号:2512383863)、KISS1R 上游引物(货号:2512383864)、KISS1R 下游引物(货号:2512383865)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;AceQqPCR SYBR Green Master Mix(Vazyme;货号:Q131-02)、脱水机(型号:JJ-12J)、包埋机(型号:JB-P5)、冻台(型号:JB-L5)购自武汉俊杰有限公司;酶标仪(赛默飞;型号:352 型)、洗板机(雷勃;型号:AC8)、微量高速离心机(湘仪集团;型号:TG16W)、病理切片机(上海徕卡有限公司;型号:RM2016)、组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-P)、烤箱(上海慧泰仪器制造有限公司;型号:DHG-9140A)、匀浆仪(康涛科技;型号:KZ-II)、荧光定量 PCR 仪(ABI;型号:Stepone plus)。

4 方法

4.1 光照动物模型制作 参照徐金华^[8]光照模型的制作方法,将 N 组饲养在自然光线的环境下, L 组饲养在 LED 灯光线的环境下、Y 组饲养在荧光灯光线的环境下,由定时开关控制光照时间为 6:00~19:00(本实验在南京夏季进行,自然光照的昼夜时间大约为 13 h/11 h)。NM 组饲养在自然光线的环境下并每日喂予日钟阴阳方, LM 组饲养在 LED 灯光线的环境下并每日喂予日钟阴阳方、YM 组饲养在荧光灯光线的环境下并喂予日钟阴阳方。实验室内温度控制在 22~24 ℃。实验观察时间为 12 周。

4.2 给药方法 由青龙山动物养殖场加工饲料,将日钟阴阳方焙干研粉,制成特制饲料的子时养阴方和午时补阳方。给药方式参考文献[9]。实验开始后, N、Y、L 组上午 10:00 及晚上 10:00 予常规饲料, NM、YM、LM 组上午 10:00 予以午时补阳方、晚上

10:00 予以子时养阴方。成年豚鼠每只每日每顿喂食方 20 g。

4.3 取材 饲养 12 周后, 每日动态观察豚鼠阴道脱落细胞, 若阴道涂片提示动情周期紊乱即造模成功^[10]。阴道涂片观察见大量有核细胞则为动情前期^[11], 选取动情前期取材, 3% 戊巴比妥钠按 40~50 mg/kg 麻醉, 腹主动脉取血 5~8 mL, 3 500 r/15 min 离心后取血清, -80 °C 保存; 取下丘脑及一侧卵巢 -80 °C 保存, 另一侧卵巢 4% 多聚甲醛固定。

4.4 检测指标及方法

4.4.1 各组豚鼠卵巢形态学观察 将多聚甲醛中固定的卵巢组织制作成石蜡切片, 厚 3~5 μ m。于二甲苯中脱蜡 2 次, 每次 10 min。脱蜡后依次加入无水乙醇、90% 无水乙醇、80% 无水乙醇、70% 无水乙醇、双蒸水各 2 min。HE 染色 5 min, 染色后冲去多余的染色液, 双蒸水再次洗涤, 持续数秒。分化数秒, 冲洗。切片依次放入 85%、95% 乙醇中脱水, 各持续 5 min; 伊红染液染色 5 min。切片放入无水乙醇各 3 次, 每次持续 5 min, 二甲苯 2 次, 每次持续时间 5 min, 直至透明, 中性树胶封片。电镜下观察结果。

4.4.2 各组豚鼠 E_2 、LH、FSH、T、PRL、AMH 含量的检测 采用 ELISA 法检测。取出 -80 °C 保存的血清, 配置标准品溶液, 96 孔板分别设置空白孔、标准孔、待测样品孔, 其中空白孔不加样品及酶标试剂。加样后 37 °C 温育 30 min, 温育结束后洗板 5 次, 洗板 5 次后, 弃去废液, 轻轻甩干, 加入酶标试剂, 37 °C 温育 30 min, 再次洗板 5 次, 加入显色液 A、B, 37 °C 显色 10 min。10 min 后加入终止液, 加入终止液 15 min 后于酶标检测仪中读取 OD 值, 算取每组平均值及标准差。

4.4.3 各组豚鼠下丘脑中 KISS1R、卵巢中 FSHR、LHR、AR 蛋白表达水平的检测 采用 Western Blot 法测定。取出 -80 °C 保存的下丘脑组织 RIPA+PMSF 裂解, 在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 配制蛋白标准品, 计算标准曲线, 99 °C 10 min 使蛋白变性。SDS-PAGE 电泳分离, PVDF 膜半干转膜, 3% BSA 封闭 1 h, 抗原抗体反应, 显色曝光。用 Image J 软件分析灰度值。

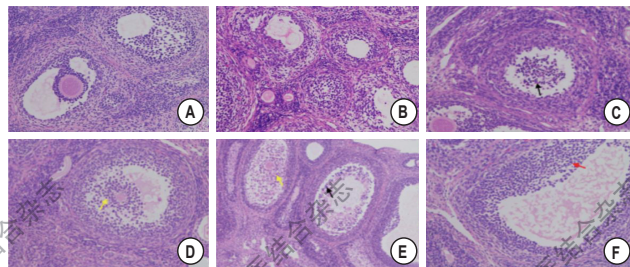
4.4.4 各组豚鼠下丘脑内 KISS1R、卵巢中 FSHR、LHR、AR mRNA 表达水平检测 采用逆转录聚合酶链式反应法 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测。取出 -80 °C 中冻存组织 50~100 mg, 于液氮中迅速敲

碎, 后转移至离心管中。加入 1 mL 的 Trizol, 于匀浆器中匀浆, 于离心机 4 °C 条件下 12 000 r/10min, 收集上清液。常温放置 5 min 后加入氯仿, 剧烈震荡至粉红色, 常温放置 2 min 后, 4 °C 条件下 12 000 r/15 min 离心, 取上清液。常温放置 10 min, 4 °C 条件下 15 000 r/15 min 离心。弃去上清液, 加入 75% 乙醇沉淀, 4 °C 条件下 12 000 r/10min 离心, 控干乙醇, 加入 DEPC 水, 至浓度在 500~1 000 ng/mL。将提取后的 RNA 溶液与 5 $\times$ PrimeScrip RT Master Mix、RNase Free DH20 混合后进行逆转录反应, 将逆转录反应后的 cDNA 溶液与 SYBR qPCR Master Mix 溶液、PCR Forward Primer、PCR Reverse Primer、DEPC 混合配置 PCR 反应液, PCR 反应。最后导出曲线, 计算结果。

5 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用独立样本 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组豚鼠 HE 染色结果 (图 1) N 组视野中部分卵泡中卵母细胞外可见多层粒膜细胞分布, 形成卵丘结构; 卵泡周围由多层纤维细胞包裹; 组织形态结构正常, 未见明显病理变化。NM 组视野中可见多层粒细胞排列组成的卵泡壁结构; 卵泡周围由多层纤维细胞包裹, 各卵泡排列紧密, 间隙大小均匀; 组织形态结构正常, 未见明显病理变化。L 组视野中部分卵泡中卵母细胞消失, 可见大量炎性细胞灶性浸润, 如黑色箭头所示。LM 组视野中可见部分卵泡内卵母细胞周围粒细胞间隙增大, 排列疏松, 如黄色箭头所示。Y 组视野中部分卵泡内卵母细胞消失, 并可见大量炎性细胞浸润; 部分卵泡中卵母细胞周围粒细胞排列重度紊乱, 细胞间隙增大, 如黄色箭头所示。YM 组视野中部分卵泡壁颗粒细胞层局部细胞排列疏松, 细胞间隙增大, 如红色箭头所示。



注: A 为 N 组; B 为 NM 组; C 为 L 组; D 为 LM 组; E 为 Y 组; F 为 YM 组; 箭头表示卵母细胞结构

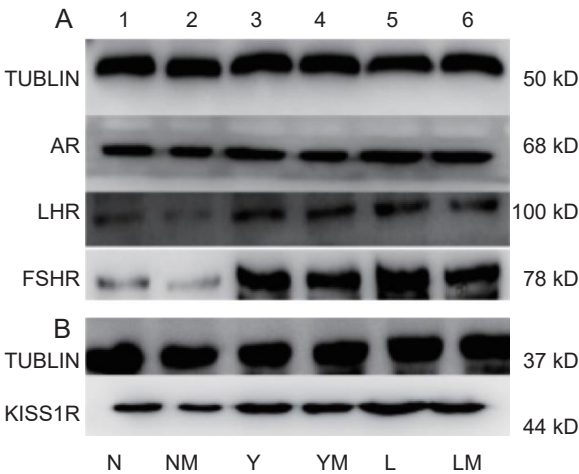
图 1 各组豚鼠卵巢组织 HE 染色结果 ($\times 200$)

2 各组豚鼠 E_2 、LH、FSH、PRL、T、AMH 含量水平比较 (表 1) 与 N 组比较, NM 组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量均下降 (t 值分别为 0.019、0.000、0.000、0.000、0.000、0.003), 差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 Y 组比较, YM 组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量均下降 (t 值分别为 0.002、0.000、0.000、0.008、0.04、0.000), 差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 L 组比较, LM 组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量均下降 (t 值分别为 0.003、0.013、0.000、0.009、0.301、0.000), 差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 N 组比较, Y 组、L 组较血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量均上升 (F 值分别为 0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000), 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 NM 组比较, YM 组、LM 组血清 E_2 、LH、FSH、T、AMH、PRL 含量均上升 (F 值分别为 0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000), 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

3 各组豚鼠卵巢内 AR、LHR、FSHR 及下丘脑中 KISS1R 蛋白表达水平比较 (图 2, 表 2) 与 N 组比较, NM 组下丘脑内 KISS1R、卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白表达均下降 (t 值分别为 0.047、0.048、0.046、0.041), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); Y 组比较, YM 组下丘脑内 KISS1R、卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白表达均下降 (t 值分别为 0.043、0.045、0.049、0.018), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 L 组比较, LM 组下丘脑内 KISS1R、卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白表达均下降 (t 值分别为 0.030、0.049、0.032、0.047), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 N 组比较, Y 组、L 组下丘脑内 KISS1R、卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白表达均上升 (F 值分别为 0.047、0.005、0.003、0.017、0.033、0.017、0.010、0.020),

差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 NM 组比较, YM 组、LM 组下丘脑内 KISS1R、卵巢内 LHR、FSHR、AR 蛋白水平均上升 (F 值分别为 0.147、0.018、0.005、0.012、0.009、0.023、0.018、0.053), 差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

4 各组豚鼠卵巢内 AR、LHR、FSHR mRNA



注: A 为卵巢内 LHR、FSHR、AR 的蛋白含量表达; B 为下丘脑内 KISS1R 的蛋白含量表达; 1 为 N 组; 2 为 NM 组; 3 为 Y 组; 4 为 YM 组; 5 为 L 组; 6 为 LM 组

图 2 各组豚鼠 AR、LHR、FSHR、KISS1R 蛋白表达免疫印迹图

比较及下丘脑中 KISS1R mRNA 基因表达水平比较 (表 3) 与 N 组比较, NM 组下丘脑内 KISS1R mRNA、卵巢内 LHR、FSHR、AR mRNA 的基因表达下调 (t 值分别为 0.000、0.018、0.025、0.033), 差异有统计学意义 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 Y 组比较, YM 组下丘脑内 KISS1R mRNA、卵巢内 LHR、FSHR、AR mRNA 基因表达下调 (t 值分别为 0.000、0.000、0.000、0.000), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 L 组比较, LM 组下丘脑内 KISS1R mRNA、卵巢内 LHR、FSHR、AR mRNA 基因表达下调 (t 值分别为 0.015、0.000、0.000、0.000), 差异有统计

表 1 各组豚鼠 E_2 、LH、FSH、PRL、T、AMH 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2 (ng/L)	LH (ng/L)	FSH (IU/L)	T (nmol/L)	AMH (ng/mL)	PRL (ng/L)
N	6	23.56 $\pm$ 1.55	1730.00 $\pm$ 44.71	7.60 $\pm$ 0.16	111.58 $\pm$ 2.21	10.85 $\pm$ 0.24	197.22 $\pm$ 10.98
NM	6	21.19 $\pm$ 1.39 *	1461.00 $\pm$ 70.66 **	6.41 $\pm$ 0.27 **	102.12 $\pm$ 3.80 **	8.66 $\pm$ 0.18 **	178.26 $\pm$ 5.22 **
Y	6	34.23 $\pm$ 1.50 $\circ$	2281.68 $\pm$ 49.14 $\circ$	11.24 $\pm$ 0.42 $\circ$	145.16 $\pm$ 8.65 $\circ$	15.02 $\pm$ 1.11 $\circ$	290.05 $\pm$ 12.53 $\circ$
YM	6	30.30 $\pm$ 1.95 Δ •	1952.01 $\pm$ 115.66 Δ •	8.91 $\pm$ 0.38 Δ •	132.80 $\pm$ 3.07 Δ •	13.85 $\pm$ 0.58 Δ •	236.61 $\pm$ 4.11 Δ •
L	6	36.19 $\pm$ 2.36 $\circ$	2264.38 $\pm$ 182.87 $\circ$	11.27 $\pm$ 0.21 $\circ$	151.04 $\pm$ 7.17 $\circ$	16.03 $\pm$ 1.21 $\circ$	273.78 $\pm$ 10.20 $\circ$
LM	6	30.96 $\pm$ 2.40 Δ ••	2009.98 $\pm$ 97.66 Δ •	9.40 $\pm$ 0.58 Δ ••	135.36 $\pm$ 9.56 Δ ••	15.47 $\pm$ 0.38 •	243.07 $\pm$ 6.54 Δ ••

注: 与 N 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Y 组比较, Δ $P<0.05$, Δ • $P<0.01$; 与 L 组比较, Δ • $P<0.05$, Δ •• $P<0.01$; 与 N 组比较, $\circ$ $P<0.01$; 与 NM 组比较, • $P<0.01$

表 2 各组豚鼠 KISS1R、AR、LHR、FSHR 蛋白相对表达含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	KISS1R	LHR	FSHR	AR
N	6	1.05 ± 0.11	0.25 ± 0.08	0.88 ± 0.10	0.86 ± 0.07
NM	6	0.70 ± 0.18*	0.08 ± 0.06*	0.67 ± 0.09*	0.73 ± 0.03*
Y	6	1.32 ± 0.03 [○]	0.53 ± 0.13 ^{○○}	1.40 ± 0.19 [○]	1.12 ± 0.09 [○]
YM	6	0.98 ± 0.20 [△]	0.28 ± 0.06 ^{△●●}	1.07 ± 0.07 ^{△●●}	0.88 ± 0.05 ^{△●}
L	6	1.53 ± 0.14 ^{○○}	0.46 ± 0.09 [○]	1.31 ± 0.17 [○]	1.15 ± 0.11 [○]
LM	6	1.20 ± 0.10 ^{▲●}	0.31 ± 0.03 ^{▲●}	0.94 ± 0.09 ^{▲●}	0.93 ± 0.07 [▲]

注: 与 N 组比较, * $P < 0.05$; 与 Y 组比较, [△] $P < 0.05$; 与 L 组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 N 组比较, [○] $P < 0.05$, ^{○○} $P < 0.01$; 与 NM 组比较, [●] $P < 0.05$, ^{●●} $P < 0.01$

表 3 各组豚鼠 KISS1R、AR、LHR、FSHR mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	KISS1R mRNA	LHR mRNA	FSHR mRNA	AR mRNA
N	6	0.48 ± 0.04	0.80 ± 0.06	0.71 ± 0.07	0.76 ± 0.08
NM	6	0.36 ± 0.04**	0.72 ± 0.05*	0.59 ± 0.08*	0.66 ± 0.07*
Y	6	1.57 ± 0.14 [○]	9.64 ± 0.67 [○]	3.75 ± 0.72 [○]	1.24 ± 0.09 [○]
YM	6	1.07 ± 0.06 ^{△●}	3.44 ± 0.80 ^{△●}	1.72 ± 0.25 ^{△●}	0.88 ± 0.09 ^{△●}
L	6	1.32 ± 0.36 [○]	8.00 ± 0.73 [○]	5.59 ± 0.65 [○]	1.28 ± 0.07 [○]
LM	6	0.88 ± 0.05 ^{▲●}	4.52 ± 1.11 ^{▲▲●}	1.74 ± 0.28 ^{▲▲●}	1.01 ± 0.09 ^{▲▲●}

注: 与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Y 组比较, [△] $P < 0.01$; 与 L 组比较, [▲] $P < 0.05$, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 N 组比较, [○] $P < 0.01$; 与 NM 组比较, [●] $P < 0.01$

学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与 N 组比较, Y 组、L 组下丘脑内 KISS1R mRNA、卵巢内 LHR、FSHR、AR mRNA 基因表达上调 (F 值分别为 0.000、0.003、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.000), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 NM 组比较, YM 组、LM 组下丘脑内 KISS1R mRNA、卵巢内 LHR、FSHR、AR mRNA 基因表达上调 (F 值分别为 0.000、0.000、0.000、0.000、0.000、0.006、0.001), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

讨 论

光信号的改变使人类固有的日节律模式发生紊乱。导致多种疾病发病的风险日益增加, 尤其是在生殖内分泌方面^[12]。有研究表明, 光信号对人体的影响主要有两条神经通路: 光照通过视网膜将信号传导至大脑皮层, 其一是通过内膝状体联结视觉皮层, 形成影像视觉功能的神经通路, 是视觉信息通路。二是经过视交叉上核联结松果体, 传递非视觉信息的通路^[13]。非视觉信号通路与应激、代谢、情绪、感知等息息相关, 具有光照生物效应。光照以非视觉信息的模式影响哺乳动物的昼夜节律及与光环境的同步的观点在视神经节细胞被发现后逐渐得到重视^[14]。

Kisspeptin 是一种由 Kiss1 基因编码的神经肽, 它最初于 1996 年被发现^[15]。有学者证实 GPR54/KISS1R 是 Kisspeptin 的受体^[16]。GPR54/KISS1R

是一种 G 蛋白耦联受体, 属于视黄素家族蛋白, 其在大脑组织和外周组织中均有表达, 同时在胎盘、垂体、睾丸、卵巢和脊髓中也被发现高度表达^[17]。Kisspeptin 在青春期启动及排卵中起着关键作用^[18]。有研究表明, 低促性腺功能减退的人类具有 KISS1R 的失活突变, 并且在小鼠模型中靶向 KISS1R 缺失显示不育表型^[19]。国内有学者以禽类为模型, 研究表明 Kisspeptin 及其受体 GPR54/KISS1R 通过光信号通路接受光照的调控, 调节 GnRH 的分泌, 进而调节禽类的生殖机能^[20]。Kisspeptin 信号可通过影响刺激下丘脑 GnRH 神经元释放促性腺激素释放激素, 起到调节 HPO 轴的功能, 从而发挥调控机体生殖功能的关键性作用^[21]。HPO 轴功能异常或靶细胞效应异常导致的一系列疾病。在生殖轴的工作过程中, 下丘脑分泌 GnRH, GnRH 作用于垂体前叶, 引起垂体前叶分泌 FSH 及 LH, FSH 和 LH 作用于卵巢, FSH 可刺激卵巢的生长及促进卵泡的发育, LH 可促进卵泡最后成熟, 且起到促发排卵, 形成黄体的功能, FSH 和 LH 相互作用, 促进卵巢分泌雌激素、孕激素、雄激素^[22,23]。AMH 主要由窦前卵泡及小窦卵泡分泌, 是评估卵巢储备功能的敏感指标^[24]。PRL 由垂体前叶泌乳素细胞合成及分泌, 临床研究中, 泌乳素分泌紊乱会导致一系列生殖障碍性疾病的发生^[25]。

日钟阴阳方是基于阴阳时辰钟理论创立而成, 其与圆运动生物钟节律密切相关^[26]。日钟即日节律,

昼夜之间循环,按阴阳消长转化规律运行。子时阴中之阴,午时为阳中之阳,卯时阳出于阴,酉时阴出于阳^[27]。于一日之中的阳时予补阳药物,阴时予补阴药物,顺应日节律特征,阳时用阳药,阴时用阴药。该用药理念是夏桂成教授根据《周易》的阴阳学说凝练而成,其顺应自然环境的阴阳变化,调整机体阴阳消长的相对平衡,达到预防及治疗因阴阳失衡导致的一系列生殖障碍性疾病的目的。

本实验所用药物既可作为药物,也可作为日常食物。午时补阳方选用羊肉、核桃粉、板栗粉、黑小豆。羊肉性温味甘,在元代已出现大量以羊肉为主的食疗方^[28]。中医学认为,羊肉具有助元阳、补精血、疗肺虚、益劳损的功能。核桃性温,味甘平,具有温肾利尿,补气养血之功,可用于治疗肾阳亏虚所致疾病^[29]。板栗性甘温,有补肾、壮腰、强筋等功效。黑小豆,味甘性平,具有补血安神、补肾益阴的作用。本方中羊肉大补元阳,核桃、板栗平补肾阳,佐以黑小豆,阴中求阳。子时养阴方选用龟板粉、珍珠粉、银耳、百合。龟板粉味咸,性甘平,有滋阴潜阳、益肾健骨、补血养心的作用,长于滋补肾阴,兼能滋养肝阴^[30]。珍珠粉味甘咸,性寒,有镇心安神,养阴熄风的作用。银耳味甘淡,性平,有滋阴润肺的作用。百合味微寒,性平,有养阴清肺的功效。《素问》中提到“毒药攻邪,五谷为养,五果为助,五畜为益,五菜为充,气味合而服之,以补血益气”“谷肉果菜,食养尽之,无使过之,伤其正也”“食宜同法”^[31],其均体现了药食同源、食中求疗的思想。

本课题组前期已证实持续光照会造成大鼠生殖节律紊乱及排卵障碍,而中药可达到重建周期,改善光损伤大鼠结局的作用^[32]。本实验以光谱改变为切入点,基于 Kisspeptin 探讨人工光环境对豚鼠生殖内分泌的影响及日钟阴阳方的干预作用。本实验研究结果表明光谱的改变会造成豚鼠生殖内分泌的紊乱,主要表现在人工光源环境下卵巢卵母细胞结构遭到破坏,外周血清 E₂、LH、FSH、T、AMH、PRL 的改变,下丘脑内 KISS1R、卵巢内 LHR、FSHR、AR 的蛋白表达及基因表达异常,其机制可能是光照影响了 Kisspeptin 的分泌,进而导致 HPO 轴异常工作,豚鼠生殖内分泌发生改变。本实验还证实了食疗方的正面作用,各项数据表明可利用中医药的微环境调整作用,减轻因大环境改变而造成的平衡紊乱现象。本实验采用由阴阳时辰钟理论所研制的食疗方,旨在证实顺应自然规律,调整阴阳平衡,可抑制降低不良光照带来的损害。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 辜荣飞,张慧,刘志民,等.人卵巢褪黑素受体的鉴定及卵巢癌组织褪黑素受体的改变[J].第二军医大学学报,2001,12(11):1075-1077.
- [2] 陈文俊,李慧芳,谈勇.持续光照对大鼠生殖节律的影响及中药干预作用的研究[J].医学研究生学报,2018,31(2):124-128.
- [3] Patel R, Smith JT. Novel actions of kisspeptin signaling outside of GnRH-mediated fertility: a potential role in energy balance[J]. Domes Animl Endocrinol, 2020, 73(12):107-114.
- [4] 夏桂成,殷燕云.从太极八卦时辰钟结合图探析生殖节律[A].中华中医药学会中医药学术发展大会论文集[C].浙江:中华中医药学会糖尿病分会,2005:1.
- [5] 童星丽,谈勇,殷燕云,等.补肾调周联合长方案对辅助生殖技术中多囊卵巢综合征不孕症患者临床结局干预的研究[J].吉林中医药,2017,37(11):1114-1117.
- [6] 夏桂成.从太极八卦时辰钟结合图探析生殖节律(续3)[J].南京中医药大学学报,2007,15(3):137-138,140.
- [7] 徐叔云主编.药理试验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1982:363.
- [8] 徐金华.人工光环境对视系统及性激素的影响及中药干预作用的研究[A].第九届全国中西医结合眼科学术交流会暨第八次东北亚国际眼科学术会论文汇编[C].北京:中国中西医结合学会,2010:2.
- [9] 朱彦婷.“时相调节对方”对豚鼠光源性近视化干预的研究[D].南京:南京中医药大学,2020.
- [10] 王伟,唐明德,易义珍,等.甲醛对雌性小鼠动情周期及卵巢的影响[J].实用预防医学,2002,14(6):641-643.
- [11] 刘艳,邢进,王珑.豚鼠性周期阴道细胞变化的研究[J].实验动物科学,2010,27(6):26-28.
- [12] 徐金华.人工光环境对视系统及性激素的影响及中药干预作用的研究[D].南京:南京中医药大学,2008.
- [13] Berson David M, Dunn Felice A, Mohar T. Phototransduction by Retinal ganglion cells that set the circadian clock[J]. Science, 2002, 295(5557):109-117.
- [14] Stone PT. The effects of environmental illumination on melatonin, bodily rhythms and mood states: a

- review[J]. *Lighting Res Technol*, 1999, 31 (3): 71–79.
- [15] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88 (23): 1731–1737.
- [16] Lee DK, Nguyen T. Discovery of receptor related to the galanin receptors[J]. *FEBSL*, 1999, 416 (1): 103–107.
- [17] Dudek M, Kołodziejcki P, Pruszyńska-Oszmałek E, et al. Effects of high-fat diet-induced obesity and diabetes on Kiss1 and GPR54 expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and peripheral organs (fat, pancreas and liver) in male rats[J]. *Neuropeptides*, 2016, (56): 41–49.
- [18] Stathaki M, Stamatiou ME, Magioris G, et al. The role of kisspeptin system in cancer biology[J]. *Crit Rev Oncol/Hemat*, 2019, 142 (2): 130–140.
- [19] Trevisan CM, Montagna E, Oliveira R, et al. Kisspeptin/GPR54 system: what do we know about its role in human reproduction[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49 (4): 1259–1276.
- [20] 刘海斌, 吴占福, 张立永, 等. 光照强度对 Kisspeptin 及其受体 GPR54 在鸡脑表达的影响[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39 (3): 497–506.
- [21] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KISS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. *Nature*, 2001, 411 (6837): 613–617.
- [22] Tilbrook AJ, Turner AJ, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in nonrodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences [J]. *Rev Reprod*, 2000, 5 (2): 105–113.
- [23] Christensen A, Bentley GE, Cabrera R, et al. Hormonal regulation of female reproduction [J]. *Horm Metab Res*, 2012, 44 (8): 587–591.
- [24] 邱玲, 李丹丹, 程歆琦. 抗缪勒管激素的临床应用[J]. *协和医学杂志*, 2017, 8 (2): 229–234.
- [25] 蒋志梅. 中西医治疗高泌乳素血症的研究进展[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2019, 17 (18): 145–147.
- [26] 夏桂成. 夏桂成中医妇科诊疗手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 13–14.
- [27] 夏桂成主编, 殷燕云. 从太极八卦时辰钟结合图探析生殖节律[J]. *南京中医药大学学报*, 2006, 1 (4): 250–251.
- [28] 元·忽思慧撰. 黄斌校注. 饮膳正要[M]. 北京: 中国书店, 1993: 16.
- [29] 李玉红. 食疗佳品核桃[J]. *新农村*, 2009, 3 (2): 33–34.
- [30] 明·方广撰. 丹溪心法附余[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 5–6.
- [31] 清·张志聪(隐庵)著; 王宏利, 吕凌校注; 吴少祯主编. 黄帝内经素问集注[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2014: 22–23, 224–225, 259–260.
- [32] 邹奕洁. 持续人工光照对雌性大鼠生殖内分泌的影响及滋阴补阳中药干预作用的实验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- (收稿: 2021-03-01 在线: 2021-11-17)
责任编辑: 段碧芳
英文责编: 张晶晶