

不同节气对松果腺摘除大鼠褪黑素的影响

袁卫玲¹ 马淑然^{2*} 郭霞珍² 顾晓静² 徐巍华² 赵树宏² 苏 微²

(1. 天津中医药大学中医学院, 天津市南开区鞍山西道 312 号, 300193; 2. 北京中医药大学基础医学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672567); 教育部科学技术重大研究项目(105030);

国家中医药管理局立项课题(04-05JL01)

* 通讯作者: mashurai64@sina.com, (010) 64287011

[摘要] **目的** 探讨节气与松果腺-褪黑素的相关性。 **方法** 96 只 Wistar 大鼠分别于春分、秋分、夏至、冬至前 40 天随机分为生理组、手术组和伪手术组, 每组各 8 只。手术组于春分、秋分、夏至、冬至(简称二分、二至)前 1 个月制备松果腺动物摘除模型, 伪手术组只进行手术操作但不摘除松果腺, 3 组大鼠在相同条件下饲养到二分、二至当日 20:00 后取材检测四季血清和肺组织褪黑素(Mel)含量。 **结果** 生理组大鼠血清 Mel 春分显著高于其他 3 个季节($P < 0.01$); 夏至低于秋分和冬至($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。肺组织 Mel 春分显著高于其他 3 个季节($P < 0.01$); 冬至高于夏至($P < 0.05$)。血清 Mel 春分、夏至生理组高于伪手术组($P < 0.05$); 夏至手术组高于伪手术组($P < 0.05$)。肺组织 Mel 春分伪手术组显著高于生理组、手术组($P < 0.01$)。 **结论** 全年生理状态下大鼠血清和肺组织 Mel 呈现出春分最高, 夏至最低的季节变化特点。松果腺作为重要中介物质, 参与中医“肺应秋”的调控机制。

[关键词] 肺应秋; 松果腺; 褪黑素; 节气

Effect of Different Solar Terms on Melatonin of Pineal Gland Removed Rats

YUAN Weiling¹, MA Shuran², GUO Xiaozhen², GU Xiaojing², XU Weihua², ZHAO Shuhong², SU Wei²

(1. College of Chinese Medical Sciences, Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. College of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To investigate the correlation between different solar terms in immunoregulation and the melatonin (Mel) - pineal gland. **Methods** Forty days before vernal equinox, autumn equinox, summer solstice, and winter solstice respectively, 96 Wistar rats were randomized into normal group, operation group, and sham operated group, with 8 in each. The operation group was made models with pineal gland extracted one month before the vernal equinox, autumn equinox, summer solstice, and winter solstice respectively. The sham operated group was given operation but the pineal gland was not removed. Three groups were fed under the same condition to the day of vernal equinox, autumn equinox, summer solstice, and winter solstice, and were killed at 20 o'clock for measuring the Mel content of serum and lung tissues in the four seasons. **Results** In the normal group, the Mel content in serum in spring was significantly higher than in summer, autumn and winter ($P < 0.01$). It was significantly lower in summer than in autumn ($P < 0.05$) and in winter ($P < 0.01$). The Mel content in the lung tissues in spring was significantly higher than in the other three seasons ($P < 0.01$). It was significantly higher in winter than in summer ($P < 0.05$). The serum Mel content of the normal group in spring and summer was significantly higher than in the sham operated group ($P < 0.05$), and the Mel of the operation group was higher than that of the sham operated group in summer ($P < 0.05$). It was significantly higher in the sham operated group in spring than in the normal and operation groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Under the normal condition, the Mel content in serum and lung tissues of rats is the highest in spring and lowest in summer. Being the important medium, the pineal gland joins the regulation mechanism of "lung corresponding to autumn" theory in TCM.

Key Words lung corresponding to autumn; pineal gland; melatonin; solar terms

“肺应秋”是中医肺藏象理论的重要组成部分, 体现了“天人相应”的整体观念, 也是脏腑适应性调控的体现。它是指人体的肺脏与秋季的阴阳消长变化相通、相应, 肺脏的生理病理变化具有季节易感性。现代研究表明, 松果腺分泌的褪黑素(Mel)既具有季节节律性, 又能对肺脏发生直接或间接的调节作用^[1]。基于此, 本实验采用松果腺动物摘除模型,

观察血清和肺组织 Mel 在不同节气变化状态及探讨松果腺-Mel 在中医“肺应秋”调节机制中的地位。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠(SPF 级), 雄性 96 只, 体重 150 ~ 170 g, 分别于春分、秋分、夏至、冬至前 40 d 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[实验动物许可

证号:SCXK(京)2007-0002]。按简单随机法分为生理组、手术组和伪手术组,每组各8只。手术组、伪手术组分别于春分、秋分、夏至、冬至(简称二分、二至)前1个月施行手术造模,与生理组动物在相同条件下饲养到二分、二至当日20:00以后处死取材。饲养条件:自然光照,室温,自由摄取水及饲料。

1.2 主要仪器和试剂

BIO RAD 550 酶标仪(国博乐公司生产);HY-2调速多用振荡器(金坛市金城国胜实验仪器厂生产);三氯甲烷、甲醇(购自北京化学试剂公司);Mel试剂盒(购自北京博惠嘉业生物技术有限公司RD进口分装);小牛血清白蛋白(购自北京骏腾生物技术有限公司)。

1.3 模型制备

1.3.1 松果腺摘除动物模型 参考文献[2]进行制备:10%水合氯醛3~4ml/kg腹腔注射麻醉,固定,消毒,头顶皮肤切口约2cm,暴露颅骨矢状缝和人字缝。在人字缝和矢状缝两侧用牙科钻切割矩形骨片,暴露矢状静脉(SSV)、横向静脉窦(TS),沿SSV两侧纵向切开硬脑膜,双侧结扎SSV,剪断,向后翻转断端靠近窦汇(CS)端,用眼科镊摘取出松果腺,把SSV放回原位,止血清创。术后注射青霉素注射液3d。

1.3.2 伪手术动物模型 操作过程同上,只是向后翻转SSV断端后,不摘除松果腺,也不将镊子尖端伸入窦汇下,以避免对松果腺及其神经纤维的损伤。

1.4 样本收集

分别于二分、二至当日20:00,将大鼠麻醉固定,腹主动脉取血,收集血液,4℃,3000r/min,离心15min,取上清液,分装,备用。开胸摘取右肺第三叶,

液氮冷冻,备用。

1.5 血清和肺组织Mel的测定

采用酶联免疫吸附实验(ELISA)法,按试剂盒说明书进行操作。

1.6 统计学方法

采用SPSS 12.0 统计分析软件,计量数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

表1、表2示,与同一季节比较:血清Mel春分、夏至生理组显著高于伪手术组($P < 0.05$),秋分、冬至生理组与伪手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);夏至手术组显著高于伪手术组($P < 0.05$)。肺组织Mel夏至、秋分和冬至生理组与伪手术组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);春分伪手术组显著高于生理组、手术组($P < 0.01$)。

不同季节之间比较:血清Mel:生理组春分高于其他3个季节($P < 0.01$);夏至显著低于秋分和冬至($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);手术组春分手术组显著高于其他3季手术组($P < 0.01$),冬至显著高于夏至($P < 0.05$);伪手术组春分显著高于夏至和秋分($P < 0.01$)。肺组织Mel:生理组春分显著高于其他3个季节($P < 0.01$),冬至显著高于夏至($P < 0.05$);伪手术组肺组织Mel春分显著高于其他3个季节($P < 0.01$)。

3 讨论

考虑到松果腺摘除手术操作过程可能会对实验结果造成影响,如应激反应,故专门设立伪手术组以作对照。由于松果腺分泌的Mel不仅具有季节节律,还有昼夜节律,血液Mel含量白天低而夜间高,且最

表1 各组大鼠四季血清Mel含量比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	春分	夏至	秋分	冬至
生理组	8	28.15±6.74	9.10±4.50▲	14.49±4.33△▲	18.97±4.87△△▲
手术组	8	25.81±5.16	9.07±4.05▲	12.35±4.49▲	14.50±4.06△▲
伪手术组	8	21.93±3.31*	4.43±2.32*#▲	12.14±2.94▲	19.64±7.76

注:与同一季节生理组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同一季节手术组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;同一项目中与春分比较,▲ $P < 0.01$;同一项目中与夏至比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表2 各组大鼠四季肺组织Mel含量比较(pg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	春分	夏至	秋分	冬至
生理组	8	36.96±2.72	22.52±4.01▲	24.98±4.16▲	27.69±3.10▲△
手术组	8	33.02±11.97	27.13±3.06	26.34±2.75	26.16±1.71
伪手术组	8	31.05±7.86	28.58±4.18▲	28.79±8.66▲	26.32±1.46▲

注:与同一季节生理组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同一季节手术组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;同一项目中与春分比较,▲ $P < 0.01$;同一项目中与夏至比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

高含量值出现在2:00~3:00,为了使手术组和伪手术组更明显、更准确地与生理组比较,故在二分、二至当日20:00后取材。

本研究显示,生理组大鼠血清Mel全年呈现春分>冬至、秋分>夏至的变化特点,肺组织Mel全年呈现春分>冬至>秋分、夏至的变化特点,但无论血清还是肺组织Mel均以春分最高,夏至最低显著。这表明在生理状态下,四时光照不同,机体血清及肺组织中Mel含量具有一定季节性变化特点。本实验中冬至血清Mel含量明显高于夏至的变化特点与以往文献报告一致^[2],然而本实验所见的Mel春分最高、夏至最低的节律特点与本课题组在前期实验中所测定的血清和肺组织Mel冬夏高于春秋的变化特点不一致^[3]。这可能与不同种属动物及采集样本的时间有关。本次实验采用Wistar大鼠与前期采用的SD大鼠在种属上有差别。

另外,国外也有报告显示,冬季、早春、晚春、夏季、早秋、深秋来测定山羊血清Mel的季节性变化,发现早春和晚春,早秋和深秋的Mel的分泌水平不一致。对于内源性血清Mel分泌可见晚春和夏季分泌的水平相近,而早春和冬季相近^[4]。本研究在春分时取材在时间上属于早春,此时光照时间仍较短,故可见Mel分泌相对晚春较多;秋分取材在时间上属于早秋,此时光照时间相对较长,所以Mel分泌相对晚秋较少。另有研究表明,红雌鹿在春分和冬至深夜Mel水平明显高于夏至和秋分^[5]。本实验还发现,正常肺组织中Mel含量在夏季、秋季无明显的变化,两者在同一水平上,由此推断,肺组织中的Mel含量变化与血清中Mel含量的变化规律可能会不一样,其机制尚需进一步研究。

松果腺作为机体内重要的神经内分泌器官,其主要分泌的Mel具有季节和昼夜的节律性,其含量变化与环境中光照信号的周期性改变同步。本实验采用松果腺摘除动物模型,是为了研究松果腺对血清和肺组织Mel含量季节性变化的影响。结果显示,摘除松果腺后血清Mel含量手术组均较生理组有下降趋势,但其节律仍然存在,与生理组一致。而肺组织Mel含量手术组与生理组比较,节律消失,在春分、冬至有下降趋势,但夏至、秋分有上升趋势,且夏秋两季手术组与伪手术组相比无显著差异,说明夏秋两季摘除松果腺或手术创伤,易引起机体的应激反应。可见,虽然Mel主要来源于松果腺,但松果腺不是Mel合成和分泌的惟一来源^[6]。

机体免疫功能状态存在季节性变化趋势,四季气候环境变化也影响着Mel的分泌,Mel和免疫物质亦具有相关性。结合前期有关中医“肺应秋”免疫实验研究^[7]发现,无论肺脏局部还是机体全身免疫均存在季节节律性,其中以秋季免疫力低下为主,这与血清、肺组织Mel秋季含量较低相吻合,且摘除松果腺后肺脏局部免疫力下降,而全年Mel含量也以降低为主。可见松果腺作为“授时因子”,既能感受光照刺激,又可高位调节人体免疫功能,节气与松果腺的中介调节密切相关。研究节气与松果腺-褪黑素的相关性,对于揭示“肺应秋”理论内涵及脏腑适应性调控机制具有重要的意义。

除光照外,温度也影响着松果腺分泌Mel的生理效应,进而影响肺脏免疫功能。肺脏免疫功能季节性变化节律的形成受影响的因素也非常多。Mel作为神经内分泌激素之一,与免疫系统有十分密切的联系。两者之间的节律性变化是否有某种内在的联系,及其作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1]许筱颖.褪黑素及其合成限速酶在肾藏象调控理论中作用和地位的探讨与研究[D/OL].北京:北京中医药大学,2007. <http://epub.cnki.net/grid2008/detail.aspx?QueryID=77&CurRec=1>
- [2]Rusak B, Guang DY. Regulation of melatonin sensitivity and firing-rate rhythm of hamster suprachiasmatic nucleus neurons: pinealectomy effect [J]. Brain Res, 1993, 602(2): 200-204.
- [3]邱新萍.季节气候变化对松果腺褪黑素及相关免疫物质影响的文献及实验研究[D/OL].北京:北京中医药大学,2006. <http://epub.cnki.net/grid2008/detail.aspx?QueryID=4&CurRec=1>
- [4]Alila-Johansson A, Eriksson L, Soveri T, et al. Seasonal variation in endogenous serum melatonin profiles in goats: a difference between spring and fall? [J]. J Biol Rhythms, 2001, 16(3): 254-263.
- [5]Garcia A, Landete-Castillejos T, Zarazaga L, et al. Seasonal changes in melatonin concentrations on in female Iberian red deer [J]. J Pineal Res, 2003, 34(3): 161-166.
- [6]马淑然,吴同玉,刘晓燕,等.中医“肺应秋”与褪黑素相关性的实验研究[J].辽宁中医杂志,2006,33(11):1512.
- [7]袁卫玲.“肺应秋”生理机制的实验研究——四季变化对大鼠肺脏免疫功能的影响[D/OL].北京:北京中医药大学,2008. <http://epub.cnki.net/grid2008/detail.aspx?QueryID=6&CurRec=1>

(收稿日期:2010-03-16;修回日期:2010-09-01)