DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20241015.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20241015.1324.004

日钟食疗方对不同光源下豚鼠眼球发育及视网膜内RA、DA水平和RAR-β、CRABP-Ⅰ、DRD2表达的影响

李林芳[1],袁检宝[2],樊 艺[1],陈珮雯[1],王育良[3]✉
(1.南京中医药大学,江苏 南京 210023;2.江苏卫生健康职业学院仪征市人民医院临床学院眼科,江苏 扬州 211400;3.南京中医药大学附属医院眼科,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的**:探究日钟食疗方对不同光源下豚鼠眼球发育及视网膜组织中视黄酸(RA)、多巴胺(DA)水平和相关受体表达的影响。**方法**:选取2周龄三花豚鼠64只,随机分为8组,分别为光照组(自然光组、LED灯组、荧光灯组、仿自然光灯组)及光照食疗组(自然光食疗组、LED灯食疗组、荧光灯食疗组、仿自然光灯食疗组),每组8只,其中LED灯组、荧光灯组、仿自然光灯组为人工光源组。光照组予以常规饲料喂养,光照食疗组予以日钟食疗方特制饲料喂养。实验开始后每隔2周测量各组豚鼠双眼的眼轴长度,每隔4周测量屈光度,12周后采用HE染色观察视网膜组织形态,高效液相色谱法(HPLC)测定各组豚鼠视网膜组织内RA、DA含量。Western blot和RT-PCR检测视网膜组织内视黄酸受体β(RAR-β)、细胞视黄酸结合蛋白Ⅰ(CRABP-Ⅰ)、多巴胺D2受体(DRD2)的蛋白和mRNA表达情况。**结果**:与自然光组相比,LED灯、荧光灯组豚鼠眼轴明显延长,在第4、6、8、10、12周均有统计学差异($P<0.05$),屈光状态向近视偏移,分别在第4、8周出现差异且在12周呈近视状态($P<0.05$)。人工光源组视网膜组织内RA含量增多,DA含量减少,RAR-β、CRABP-Ⅰ的mRNA和蛋白表达量升高($P<0.01$),DRD2的mRNA和蛋白表达量降低($P<0.01$)。日钟食疗方干预后,LED灯食疗组、荧光灯食疗组豚鼠眼轴长度小于LED灯组、荧光灯组,在第4、6、8、10、12周均有统计学差异($P<0.05$),远视屈光度下降缓慢,分别在第4、8周出现差异且在12周仍为远视状态($P<0.01$)。与同光源光照组相比,各食疗组视网膜组织内RA含量减少,DA含量增多,RAR-β、CRABP-Ⅰ的mRNA和蛋白表达量显著降低($P<0.01$),DRD2的mRNA和蛋白表达量显著升高($P<0.01$)。视网膜HE染色结果表明,与自然光组相比,人工光源组豚鼠视网膜组织变薄,神经节细胞稀疏且空泡化明显,内外核层细胞分布间隙大,数量减少且排列紊乱。日钟食疗方干预后,人工光源食疗组与同光源光照组相比视网膜组织增厚,神经节细胞及内外核层细胞数量增多且排列相对整齐。**结论**:LED及荧光灯光源可造成豚鼠近视化发展,日钟食疗方可降低豚鼠视网膜内RA的水平,提高DA含量,调节RAR-β、CRABP-Ⅰ、DRD2的表达,改善视网膜组织结构,抑制眼轴增长,从而延缓近视的发展。

[关键词] 近视;日钟食疗方;视网膜;多巴胺;视黄酸
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2025)13-0961-09

Effects of Rizhong dietotherapy formula on ocular development, the levels of RA, DA and expression of RAR-β, CRABP-Ⅰ and DRD2 in the retina of guinea pigs under different light sources

LI Linfang[1], YUAN Jianbao[2], FAN Yi[1], CHEN Peiwen[1], WANG Yuliang[3]✉
(1. *Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210023, *China*; 2. *Department of Ophthalmology*, *Clinical College of Yizheng People's Hospital*, *Jiangsu Health Vocational College*, *Yangzhou* 211400, *China*; 3. *Department of Ophthalmology*, *Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine*, *Nanjing* 210029, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by National Natural Science Foundation of China* (8207150787), *School-level Scientific*

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(8207150787);江苏卫生健康职业学院校级科研项目(YJXTY202301);国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目[国中医药人教函(2022)75号]

[作者简介] 李林芳,E-mail:llf867536849@163.com。
[通讯作者] 王育良,教授,博士生导师,E-mail:wyl0601@126.com。

[收稿日期] 2024-07-13 [修回日期] 2024-10-05 网络出版时间:2024-10-15 14:43:26

Research Project of Jiangsu Health Vocational College (*YJXTY*202301), *Seventh Batch of National Academic Experience Inheritance Project for Senior Traditional Chinese Medicine Experts by the State Administration of Traditional Chinese Medicine* (*National Medical Education Letter* [2022] *No.* 75)

[*Author*]: *LI Linfang*, *E-mail*: *llf*867536849@163.*com*.

[*Correspondence to*]: *WANG Yuliang*, *Professor*, *Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *wyl*0601@126.*com*.

Received: 2024-07-13 *Revised*: 2024-10-05 *JHMU*, 2025;31(13):961-969

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To explore the effects of Rizhong dietotherapy formula on ocular development, retinoic acid (RA) and dopamine (DA) levels and expression of related receptors in guinea pigs under different light sources. **Methods**: A total of 64 2-week-old guinea pigs were randomly divided into 8 groups: the light groups (natural light group, LED light group, fluorescent light group, simulated natural light group) and light diet groups (natural light diet group, LED light diet group, fluorescent light diet group, simulated natural light diet group) with 8 guinea pigs in each group. Among them, the LED group, the fluorescent group and the simulated natural light group were called the artificial light source groups. The light groups were fed with conventional feed, and the light diet groups were fed with special feed from the Rizhong dietotherapy formula. The eye axis of each group of guinea pigs was measured every 2 weeks, the diopter was measured every 4 weeks. After 12 weeks, the morphological changes of retinal tissues were observed after H & E staining and the content of RA and DA in the retinal tissues of guinea pigs in each group was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The protein and mRNA expressions of retinoic acid receptor β(RAR-β), cellular retinoic acid binding protein I (CRABP-Ⅰ) and dopamine D2 receptor(DRD2) in retinal tissues were detected by Western blot and RT-PCR. **Results**: Compared with the natural light group, the eye axis of guinea pigs in LED and fluorescent light groups was significantly extended, and there were statistical differences at the 4th, 6th, 8th, 10th and 12th weeks ($P<0.05$). The refractive state shifted towards myopia, with differences appearing at the 4th and 8th weeks, and reaching a myopic state by the 12th week ($P<0.05$). The content of RA in retinal tissue of guinea pigs increased, the content of DA decreased, the mRNA and protein expressions of RAR-β and CRABP-I increased ($P<0.01$), and the mRNA and protein expressions of DRD2 decreased in the artificial light source groups ($P<0.01$). After the intervention of the Rizhong dietotherapy formula, the axial length of guinea pigs in the LED light diet group and the fluorescent light diet group was smaller than that of the LED light group and the fluorescent light group, and there were statistical differences in the 4th, 6th, 8th, 10th, and 12th weeks ($P<0.05$). The diopter of hyperopia decreased slowly, which was different at the 4th and 8th weeks respectively, and was still in a hyperopic state at 12 weeks ($P<0.01$). Compared with the same light source illumination group, the content of RA in retinal tissue decreased, the content of DA increased, the mRNA and protein expressions of RAR-β and CRABP-I decreased significantly ($P<0.01$), the mRNA and protein expressions of DRD2 increased significantly in light diet groups ($P<0.01$). The results of retinal H & E staining showed that compared with natural light group, the retinal tissue of guinea pig in the artificial light source groups was thinner, the ganglion cells were sparse and vacuolated, and the distribution gap between the inner and outer nuclear cells was large, the numbers were reduced and the arrangement was disordered. After the intervention of Rizhong dietotherapy formula, the retinal tissue in the artificial light diet groups was thickened compared with the same light source light groups, the numbers of ganglion cells and inner and outer nuclear cells increased and arranged relatively neatly. **Conclusion**: LED and fluorescent light can cause the development of myopia in guinea pigs, and the Rizhong dietotherapy formula can reduce the level of RA, increase the content of DA in the retina of guinea pigs, regulate the expression of RAR-β, CRABP-I and DRD2, improve the tissue structure of the retina, and inhibit the growth of the eye axis, thereby delaying the progression of myopia.

[Key words] Myopia; Rizhong dietotherapy formula; Retina; Dopamine; Retinoic acid

现代传媒技术的发展,使人们长时间近距离的使用人工光源,导致近视出现低龄化和普遍化,进一步造成高度近视的高发[1],而高度近视带来的视网膜脱离、视网膜脉络膜萎缩、视神经病变严重损坏了我们的视力[2]。在东亚国家中,中国学生近视患病率尤其严重,据预测,3~19岁儿童和青少年的近视患病率到2050年可能高达84%[3],近视防控已经成为刻不容缓的任务。自然光是具有节律性、光谱连续而平缓、覆盖了从紫外线到红外线的宽光谱光源,然而人工光源的广泛使用改变了环境的照明强度和光谱特性,干扰了自然光的节律,破坏了自然界生物钟变化,这不仅影响儿童和青少年视力发育,也不利于人体健康和情绪的发展[4]。眼轴的长度和近视密切相关,而眼轴增长的过程是不可逆的,因此在视觉发育的初期就应该采取措施来预防近视的发生,王育良教授根据国医大师夏桂成教授的"阴阳时辰钟理论"和临证经验,并结合中医"药食同源"的思想,提出防控近视的"时相调节对方"能够有效抑制幼兔眼轴的延长,对屈光发育起到保护作用[5],日钟食疗方则是建立在时相调节对方的

科学基础上，遵循《黄帝内经》中“药以祛之，食以随之”的理念，充分考量药物药性和营养价值，筛选出更适合融入日常饮食中的药物，使其更具有适口性、简便性、持久性且能达到整体调理的优势。因此，本实验研究了日钟食疗方对不同光源下豚鼠视网膜内RA、DA水平以及RAR-β、CRABP-Ⅰ、DRD2的mRNA和蛋白表达的影响，探讨其抑制豚鼠眼轴延长，保护视网膜组织的作用机制，为中医食疗治疗近视提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

2周龄普通级三花豚鼠64只，雌雄各半[许可证号：SYXK(苏)2023-0076]，体重100～150 g，购自江苏省南京市青龙山养殖场，采用检眼镜和A超检查排除眼底异常、先天高度近视的豚鼠，饲养在室温22 ℃～25 ℃，湿度为50%～70%的环境中。保证豚鼠在实验期间自由饮水和充足的维生素C，实验遵循南京中医药大学附属医院动物管理委员会的动物福利伦理要求，伦理批号：2022DW-49-01。

1.2 药物

日钟食疗方：午时补阳方(核桃粉10 g、板栗粉10 g、阿胶10g、黑小豆10 g、绿豆10 g)，子时养阴方(猪脊髓粉30 g、龟板粉10 g、枸杞子20 g、菊花10 g、银耳10 g、百合20 g、莲子10 g、粟米20 g)。所有药材由南京中医药大学附属医院提供。

1.3 主要试剂及仪器

复方托吡卡胺滴眼液(河北永光制药有限公司，H20066782)，盐酸奥布卡因滴眼液(参天制药有限公司，B2113)，2.5%戊二醛溶液(武汉赛维尔科技生物有限公司，G1102-100)，CRABP-Ⅰ抗体(12588-1-AP)、DRD2抗体(55084-1-AP)、GAPDH(10494-1-AP)、兔抗鼠/兔二抗(SA00001-2)均购自于武汉三鹰生物科技有限公司，RAR-β抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司，A1603)，盐酸多巴胺(180307)、视黄酸(CFS201702)均购自于南京森贝伽生物科技有限公司，RNA酶抑制剂(Y9240L)、MMLV反转录酶(P7040L)均购自于默瑞生物科技有限公司，逆转录引物(生工生物工程股份有限公司)，LED灯、仿自然LED灯均由莱亚照明电器有限公司提供，三基色环形荧光灯(飞利浦照明工业有限公司，TL5C)，带状检影镜(苏州六六视觉科技股份有限公司，YZ24)，眼科A型超声测量仪(法国光太医疗公司，Axis Nano)，高液相色谱仪(沃特世科技有限公司，E2695)，光学显微镜(卡尔蔡司光学有限公司，Axioplan 2 imaging)，电泳仪、垂直电泳槽、凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.4 分组及模型建立

参照本课题组前期实验造模方式[6]，选取2周龄豚鼠64只，随机分为光照组(自然光组、LED灯组、荧光灯组、仿自然光灯组)及光照食疗组(自然光食疗组、LED灯食疗组、荧光灯食疗组、仿自然光灯食疗组)，每组8只。将自然光组、自然光食疗组饲养在靠南有自然光进入的窗边。其余组别建立在无其他光源照射的房间内，不同光照组别间用遮光布遮挡，人工光源组用定时器进行开关控制，时间设定为06:00～18:00，实验观察时间为12周。

1.5 给药剂量与方法

日钟食疗方使用剂量按成人70 kg体表面积折算的等效剂量比值计算，豚鼠每2周称重，将每2周所需的药物总量烘干打碎成粉，与豚鼠基础饲料混合，加工为特制的颗粒饲料，分别为“午时补阳方”和“子时养阴方”特制饲料(由青龙山动物养殖场加工)，所有组别每天喂养2次，时间分别为10:00和22:00，光照组予以常规饲料喂养，食疗组上午予以午时补阳方特制饲料喂养，晚上予以子时养阴方特制饲料喂养，连续12周。

1.6 各组豚鼠眼轴及屈光度的测量

各组豚鼠分别于实验前及实验后每2周采用A超进行眼轴长度测量，A超探头对准瞳孔，垂直于角膜平面，避免压迫，选取波形稳定，波峰清晰的图形，记录双眼5次数据获取平均值。使用带状光检眼镜于实验前及实验后每4周进行屈光度测量，检查前双眼点滴托吡卡胺滴眼液，间隔5 min滴1次，共3次，于暗室中进行检影验光。按等效球镜原则(散光度数的一半计入球镜)确定最终屈光度数，记录双眼3次数据获取平均值。

1.7 标本采集及处理

饲养12周后，使用20%乌拉坦溶液(0.6 mL/100 g)腹腔过量注射麻醉处死各组豚鼠后取出眼球，每组随机选取3只眼球于2.5%戊二醛溶液固定，其余冰上进行眼球解剖，去除眼前节、玻璃体组织，在显微镜下剥离出视网膜，置于－80 ℃冰箱中保存。

1.8 H&E染色观察各组豚鼠视网膜组织形态

取出眼球固定液中的豚鼠眼球，逐级脱水，石蜡包埋，沿视神经以3 μm厚度连续纵向切片，脱蜡至水，苏木精染色10 min，盐酸酒精分化10 s，温水返蓝后流水冲洗，伊红染色5 min，酒精梯度脱水，中性树胶封片，在显微镜下观察视网膜组织结构并拍照。

1.9　高效液相检测视网膜内多巴胺、视黄酸含量

每组精密称取视网膜组织100 mg，加入甲醇∶乙酸乙酯∶冰醋酸（1∶3∶0.01）2 mL提取，涡旋5 min，于4 ℃，10 000 r/min离心10 min，取上清液1.8 mL，N_2吹干，加入200 μL 50%甲醇-1%醋酸水复溶，再次离心10 min，取上清液转移至自动进样器样品瓶中，进样量取20 μL，流动相：甲醇-水-冰醋酸（50∶50∶1），流速：1.0 mL/min，柱温：30 ℃。采用高效液相色谱仪同时进行280 nm（多巴胺）、340 nm（视黄酸）双波长检测，分析图像并建立标准曲线，计算峰面积。

1.10　Western bolt检测视网膜中RAR-β、cRABP-Ⅰ、DRD2蛋白相对表达水平

取各组视网膜组织，加入裂解液并研磨，于冰水中裂解30 min后12 000 r/min离心5 min，取上清液，采用BCA试剂盒检测蛋白浓度，将提取的蛋白上清按照4∶1体积比与蛋白上样缓冲液混合，100 ℃沸水浴10 min后冷却至室温，电泳，转模，封闭，加入一抗4 ℃孵育过夜，洗膜，二抗4 ℃孵育2 h，洗去多余二抗，选择化学发光，进行显影曝光，用Image J软件分析灰度值。

1.11　RT-PCR检测视网膜内RAR-β、cRABP-Ⅰ、DRD2的mRNA表达水平

采用Trizol法提取各组豚鼠视网膜组织总RNA，加入RT混合反应液后进行逆转录反应，合成cDNA，以cDNA为模板进行PCR扩增，GAPDH为内参基因，所有的指标均按以下程序进行：95 ℃，10 min；40个PCR循环（95 ℃，10 s；60 ℃，60 s）。为了建立PCR产物的熔解曲线，扩增反应结束后，按照（95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；95 ℃，15 s），并从60 ℃缓慢加热到95 ℃，由Primer 5.0软件设计引物序列，数据采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法进行分析。引物序列见表1。

表1　引物序列

Tab 1　Primer sequences

Primer	Forward primer（5′～3′）	Reverse primer（5′～3′）
RARβ	ACACCACGAATTCCAGTGCT	AGGCAGATGGCACTGAGAAG
CRABP-I	TGAACGCCATGCTGAGGAA	GGCGCCAAATGTCAGGATTA
DRD2	ACCTCCAGCATGGATGAGAC	TGACAGGAAACAGGCTGTCA
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

1.12　统计学处理

采用SPSS 27.0软件进行统计学分析，Prism Graphpad 9.5软件完成统计图，数据结果以（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　各组豚鼠眼轴长度比较

实验前各组豚鼠眼轴长度差异无统计学意义（$P>0.05$），实验后，各组豚鼠眼轴均有增长，LED灯、荧光灯组豚鼠眼轴增长迅速，在实验第4周大于自然光组（$P<0.05$），并在第6、8、10、12周均具有统计学差异（$P<0.05$）。日钟食疗方干预后，LED灯食疗组、荧光灯食疗组眼轴增长趋势变缓，长度小于LED灯组、荧光灯组（$P<0.05$），在第4、6、8、10、12周均具有统计学差异（$P<0.05$）。在实验的12周内，仿自然光灯组眼轴长度与自然光组间无统计学差异（$P>0.05$），仿自然光灯组、自然光组与仿自然光灯食疗组、自然光食疗组无统计学差异（$P>0.05$）。见表2。

2.2　各组豚鼠屈光度比较

实验前各组豚鼠屈光度无统计学差异（$P>0.05$），实验4周后，各组豚鼠远视屈光度均不同程度下降，LED组最为明显，并与自然光组间出现差异（$P<0.05$）；实验8周后，荧光灯组与自然光组间屈光度差异显著（$P<0.01$），LED灯组出现近视化趋势；实验第12周，LED灯组、荧光灯组出现不同程度的近视，与自然光组间差异显著（$P<0.01$），仿自然光灯组屈光度与自然光组相比各周均无统计学差异（$P>0.05$）。食疗方干预后，LED灯食疗组、荧光灯食疗组向近视偏移程度明显减轻，分别在实验第4、8周与LED灯组、荧光灯组间出现差异（$P<0.01$），且在实验第12周仍处于远视状态；仿自然光灯食疗组、自然光食疗组屈光度与仿自然光灯组、自然光组无统计学差异（$P>0.05$）。见表3。

2.3　H&E染色观察各组豚鼠视网膜组织形态

H&E染色结果显示，实验12周后，自然光组豚鼠视网膜各层排列整齐，神经节细胞层分布均匀，内外核层细胞排列紧密，与自然光相比，人工光源组豚鼠视网膜组织不同程度变薄，神经节细胞层稀疏、空泡化明显，内外核层细胞数量减少，细胞分布

表2 各组豚鼠眼轴长度比较（n=8，$\bar{x}\pm s$，mm）

Tab 2 Comparison of eye axis length of guinea pigs in each group（n=8，$\bar{x}\pm s$，mm）

组别	第0周	第2周	第4周	第6周	第8周	第10周	第12周
自然光组	7.67±0.15	7.84±0.18	7.94±0.18	8.04±0.14	8.17±0.15	8.24±0.18	8.37±0.17
自然光食疗组	7.65±0.12	7.80±0.17	7.92±0.20	8.05±0.17	8.16±0.16	8.25±0.18	8.30±0.14
LED灯组	7.69±0.19	7.89±0.17	8.17±0.20**	8.30±0.23**	8.45±0.16**	8.59±0.19**	8.69±0.23**
LED灯食疗组	7.72±0.20	7.83±0.17	7.96±0.15$^{\#\#}$	8.11±0.13$^{\#\#}$	8.23±0.14$^{\#\#}$	8.32±0.15$^{\#\#}$	8.49±0.16$^{\#\#}$
荧光灯组	7.73±0.17	7.86±0.16	8.09±0.17*	8.26±0.20**	8.38±0.15**	8.44±0.24*	8.58±0.19*
荧光灯食疗组	7.66±0.20	7.89±0.14	7.95±0.17$^{\triangle}$	8.12±0.16$^{\triangle}$	8.20±0.10$^{\triangle\triangle}$	8.29±0.16$^{\triangle}$	8.42±0.20$^{\triangle}$
仿自然灯组	7.70±0.17	7.82±0.20	7.92±0.15	8.07±0.15	8.20±0.17	8.28±0.16	8.41±0.16
仿自然灯食疗组	7.69±0.19	7.82±0.13	7.92±0.21	8.08±0.21	8.18±0.20	8.25±0.15	8.35±0.18
F	0.52	0.43	8.04	8.18	10.37	11.13	10.05

注：与自然光组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与LED灯组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与荧光灯组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

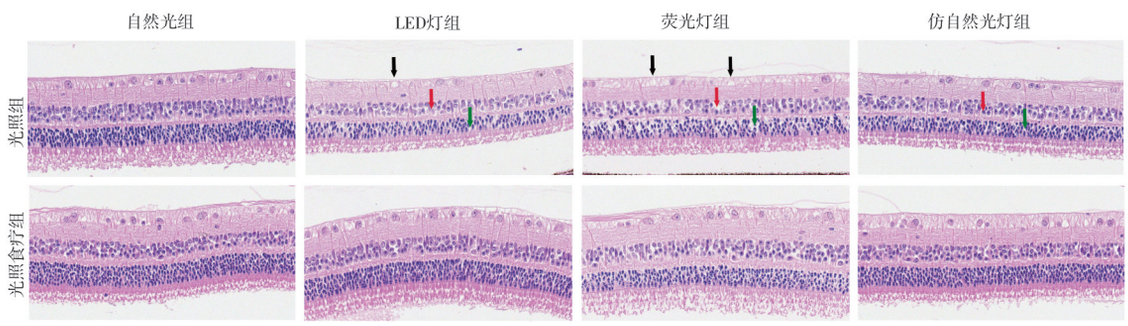
表3 各组豚鼠屈光度比较（n=8，$\bar{x}\pm s$，D）

Tab 3 Comparison of diopter of guinea pigs in each group（n=8，$\bar{x}\pm s$，D）

组别	第0周	第4周	第8周	第12周
自然光组	3.58±0.85	2.31±0.63	1.50±0.66	0.80±0.47
自然光食疗组	3.56±0.87	2.77±0.77	1.72±0.49	1.02±0.53
LED灯组	3.55±0.48	1.63±0.72*	−0.42±0.76**	−1.64±0.65**
LED灯食疗组	3.44±0.63	2.23±0.37$^{\#\#}$	1.05±0.39$^{\#\#}$	0.45±0.41$^{\#\#}$
荧光灯组	3.44±0.74	2.14±0.66	0.20±0.87**	−0.63±0.79**
荧光灯食疗组	3.56±0.93	2.42±0.66	1.36±0.66$^{\triangle\triangle}$	0.50±0.58$^{\triangle\triangle}$
仿自然光灯组	3.61±0.43	2.48±0.50	1.30±0.53	0.69±0.52
仿自然光灯食疗组	3.69±1.21	2.38±0.86	1.44±0.71	0.73±0.60
F	0.17	5.54	25.68	55.96

注：与自然光组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与LED灯组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与荧光灯组比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$。

间隙增大且排列紊乱。食疗方干预后，人工光源食疗组与同光源光照组相比视网膜组织增厚，神经节细胞空泡化现象改善，神经节细胞、内外核层细胞数量明显增多，内外核层细胞排列相对整齐。见图1。



黑色箭头：神经节细胞空泡化，红色箭头：视网膜内核层，绿色箭头：视网膜外核层

图1 各组豚鼠视网膜组织形态对比（×400，标尺=50 μm）

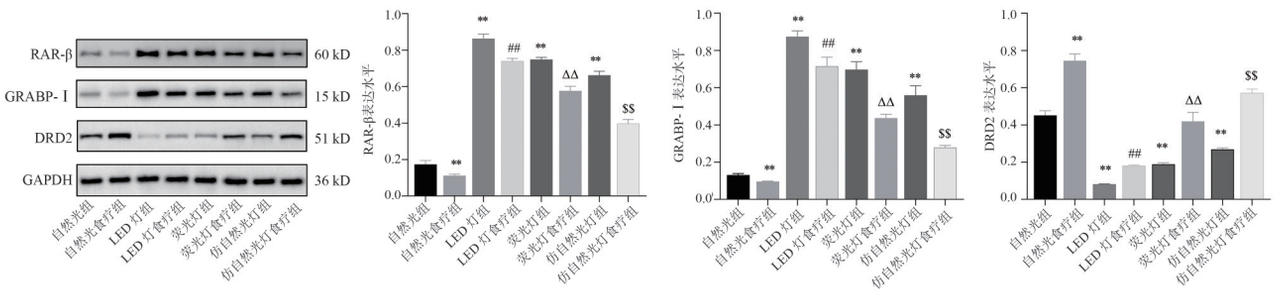
Fig 1 Comparison of retinal morphology of guinea pig in each group（×400，bar=50 μm）

2.4 高效液相色谱法检测结果

实验12周后，各人工光源组豚鼠的视网膜组织中RA水平均高于自然光组（$P<0.05$），DA水平显著低于自然光组（$P<0.01$）。经食疗方干预后，各食疗组的视网膜DA水平均较同光源光照组明显提高（$P<0.05$），RA水平较同光源光照组明显下降（$P<0.05$）。见表4。

2.5 各组豚鼠视网膜内RAR-β、CRABP-Ⅰ、DRD2蛋白表达结果

实验12周后，与自然光组比较，各人工光源组



与自然光组比较，$^{**}P<0.01$；与LED灯组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与荧光灯组比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与仿自然光灯组比较，$^{\$\$}P<0.01$

图2　各组豚鼠视网膜内RAR-β、CRABP-Ⅰ、DRD2蛋白的相对表达量

Fig 2　The relative expression levels of RAR-β, CRABP-Ⅰ and DRD2 proteins in the retina of guinea pigs in each group

表4　各组豚鼠视网膜组织中RA、DA的含量比较（$\bar{x}\pm s$，μg/g）

Tab 4　Comparison of RA and DA contents in retinal tissues of guinea pigs in each group（$\bar{x}\pm s$，μg/g）

组别	RA	DA
自然光组	0.75±0.02	7.06±0.57
自然光食疗组	0.57±0.14*	9.47±0.24**
LED灯组	4.16±0.15**	1.04±0.14**
LED灯食疗组	2.52±0.68$^{\#\#}$	2.46±0.30$^{\#\#}$
荧光灯组	2.70±0.73**	2.83±0.42**
荧光灯食疗组	1.37±0.23$^{\triangle}$	4.12±0.45$^{\triangle}$
仿自然光灯组	1.79±0.17*	3.85±0.11**
仿自然光灯食疗组	1.09±0.14$^{\$\$}$	7.30±0.46$^{\$\$}$
F	42.34	144.1

注：与自然光组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与LED灯组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与荧光灯组比较，$^{\triangle}P<0.05$；与仿自然光灯组比较，$^{\$\$}P<0.01$。

的豚鼠视网膜组织内RAR-β、cRABP-Ⅰ蛋白表达水平均显著增高（$P<0.01$），DRD2蛋白表达水平显著下降（$P<0.01$）。食疗方干预后，各食疗组的豚鼠视网膜组织内RAR-β、CRABP-Ⅰ蛋白表达水平较同光源光照组均显著下降（$P<0.01$），DRD2蛋白表达水平较同光源光照组均显著上升（$P<0.01$）。见图2。

2.6　各组豚鼠视网膜内*RAR-β*、*CRABP-*Ⅰ、*DRD2* mRNA表达结果

实验12周后，与自然光组比较，各人工光源组的视网膜内*RAR-β*、*CRABP-*Ⅰ的mRNA表达水平均显著升高（$P<0.01$），*DRD2*的mRNA表达水平均显著降低（$P<0.01$）。食疗方干预后，各食疗组的豚鼠视网膜组织内*RAR-β*、*CRABP-*Ⅰ的mRNA表达水平与同光源光照组比较均显著降低（$P<0.01$），*DRD2*的mRNA表达水平与同光源光照组均显著升高（$P<0.01$）。见表5。

表5　各组豚鼠视网膜内*RAR-β*、*CRABP-*Ⅰ、*DRD2* mRNA表达结果（$\bar{x}\pm s$）

Tab 5　mRNA expression of *RAR-β*, *CRABP-*Ⅰ and *DRD2* in the retina of guinea pigs in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	*RAR-β* mRNA	*CRABP-1* mRNA	*DRD2* mRNA
自然光组	1.01±0.03	1.03±0.03	1.01±0.02
自然光食疗组	0.65±0.03**	0.79±0.02**	1.27±0.02**
LED灯组	1.87±0.09**	2.99±0.12**	0.80±0.01**
LED食疗组	1.52±0.03$^{\#\#}$	2.08±0.04$^{\#\#}$	0.59±0.01$^{\#\#}$
荧光灯组	1.55±0.03**	2.03±0.06**	0.59±0.01**
荧光灯食疗组	1.27±0.02$^{\triangle\triangle}$	1.53±0.03$^{\triangle\triangle}$	1.04±0.02$^{\triangle\triangle}$
仿自然灯组	1.39±0.04**	1.71±0.01**	0.90±0.01**
仿自然灯食疗组	1.17±0.04$^{\$\$}$	1.24±0.01$^{\$\$}$	1.16±0.01$^{\$\$}$
F	92.79	284.7	661.3

注：与自然光组比较，$^{**}P<0.01$；与LED灯组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与荧光灯组比较，$^{\triangle\triangle}P<0.01$；与仿自然光灯组比较，$^{\$\$}P<0.01$。

3　讨论

近视已经成为一个全球性的健康问题，特别是在COVID-19疫情之后，近视上升趋势更加显著[7]，尽管遗传异常被证实破坏正视化并赋予近视一定程度的遗传性[8,9]，但近视流行率快速上升的主要原因在于环境因素的变化而不是基因遗传所驱动[10-12]，尤其是全球近视增加的拐点发生在日益城市化和广泛采用人工光源的时期，这提示环境和视觉习惯的转变在近视的形成和加剧过程中有重要影响。目前应用于儿童和青少年近视防控的方法主要有光学矫正、药物控制及手术干预[13]，以上方法对近视防控具有一定效果，但仍存在一定的局限性[14,15]，中医认为近视的发病与先天禀赋不足、肝血亏虚、阴阳失调有关[16]，《东垣十书》中记载："能近视不能远视者，阳气不足，阴气有余，乃气虚而血盛也"。阴阳双方的相互依存、相互制约是维持人体

脏腑气血功能正常运转的前提，阳气不足，血行不畅，血脉瘀阻，目失所养，神光不得发越于远处，或为肝肾亏虚，精血不足以致神光衰微，光华不能远及，在治疗近视时，中医强调从整体出发，通过调整气血阴阳平衡，使机体阴阳与自然相顺应，达到阴平阳秘的状态，则气有所养，血有所摄，故而目视清明，神光发越。夏桂成教授将中医的太极阴阳、八卦理论以及子午流注学说相结合，总结出阳时服阳药，阴时服阴药的“阴阳时辰钟理论”不仅在调节生殖内分泌节律上有显著效果[17]，还可以调整生物节律有利于眼压的生理性恢复[18]。日钟食疗方在此理论基础上，根据一天中不同时辰的阴阳属性来选择性味相应、药食同源的药物，通过午时服用温补阳气之品、子时服用滋养阴津之物来调和阴阳，同时结合张介宾“阴中求阳、阳中求阴”之法，补阳方中配伍阿胶，补阴药中配伍枸杞，使阳得阴助而生化无穷，阴得阳升而泉源不竭。为了验证日钟食疗方在防控近视方面的有效性，本研究选择了眼球结构、功能和发育与人类相似的豚鼠为实验动物，采用了生活中广泛使用的几种人工光源，建立日钟食疗方喂养的干预组，结果显示，LED灯、荧光灯照明下的豚鼠眼轴增长迅速，在第4周眼轴已长度大于自然光组，并在第6～12周持续显著增长，LED灯组近视化发展先于荧光灯组，在第8周已呈轻度近视状态，第12周时，荧光灯组呈现近视状态，LED灯组近视程度进一步加重。H&E染色可见人工光源组视网膜组织不同程度变薄，细胞减少，排列紊乱，这些结果表明人工光环境可造成豚鼠光源性近视并损伤视网膜组织结构，而经日钟食疗方喂养后，LED灯食疗组、荧光灯食疗组眼轴增长趋势变缓，远视屈光度下降缓慢，在12周仍为远视状态，视网膜组织增厚，细胞增多，排列相对整齐，说明日钟食疗方能够通过调整阴阳平衡来延缓豚鼠光源性近视的发生发展，保护视网膜组织结构。

视网膜中的DA是参与调节屈光发育和眼部生长的关键神经递质[19]，在许多动物模型中显示出能够抑制近视的发展[20,21]，被称为近视的“终止信号”，DA的信号传递主要是通过与其受体结合来介导，包括D1类受体（D1和D5）和D2类受体（D2、D3和D4），众多研究表明，通过刺激D2受体可以使形觉剥夺性近视（FDM）被抑制[22-24]。相反，RA可能与眼轴的过快生长，促进近视的发展相关联，研究发现，给予外源性RA的FDM豚鼠和小鼠，其眼轴增长速度和近视程度更为显著，并且加剧了FDM豚鼠视网膜的变薄趋势[25,26]。RA具有不稳定性和脂溶性，必须通过与特定的视黄酸受体（RARs）结合发挥作用，RAR-β是RA核受体蛋白之一，与细胞的生长分化有密切的联系[27]，RARβ与RA结合后，能够促使视网膜色素上皮细胞（RPE）分泌转化生长因子β2（TGF-β2），而TGF-β2可调控细胞外基质的合成与分泌，引起巩膜重塑，从而促进眼轴的延长[28]。CRABP-I在RA的信号传导中发挥着重要作用，它通过与RA代谢酶CYP26的相互作用，对细胞内RA水平进行精细调控[29]，这种调控对于维持细胞内RA稳态和其生物学功能至关重要。基于此，研究DA、RA在不同光源下豚鼠眼生长发育中的水平，探究其视网膜组织中CRABP-I、RAR-β和DRD2的表达是否与豚鼠眼的屈光状态和眼轴生长速率相关。研究结果显示，各人工光源组豚鼠与自然光相比视网膜内DA含量下降，RA含量增多，DRD2的mRNA和蛋白表达量均降低，RAR-β、CRABP-Ⅰ的mRNA和蛋白表达水平均增高，而应用日钟食疗方后，各光照食疗组豚鼠视网膜组织中DA含量均明显上升，RA水平明显下降，DRD2的mRNA和蛋白表达量均增多，RAR-β、CRABP-Ⅰ的mRNA和蛋白表达水平均下降，尽管在12周的研究期间内，仿自然光灯组豚鼠在眼轴长度和屈光度上与自然光环境下的豚鼠相比没有统计学差异，但在信号分子层面已经观察到了不同，这表明模拟自然光照条件对减缓人工光源引起的近视发展有一定的帮助，但这种模拟光环境并不能完全取代自然光的作用。自然光食疗组在眼轴和屈光度上与自然光组间无统计学差异，但DA、RA含量与自然光组差异显著，说明眼球的发育首先受到视网膜中DA和RA的刺激，从而改变眼内局部环境，影响巩膜的生长，最终控制眼轴的长度[30]。

综上，日钟食疗方能够下调RAR-β、CRABP-Ⅰ的mRNA和蛋白表达水平，上调DRD2的mRNA和蛋白表达水平，降低豚鼠视网膜内RA含量，提高DA含量，在延缓眼轴增长、抑制近视发展、保护视网膜组织结构方面发挥积极作用。总的来说，采用光谱连续、接近自然光的照明灯具，可以提供更舒适和健康的光环境，有助于减少不适宜光源对视觉健康的影响。将日钟食疗方制作为方便、美味的点心形式，不仅便于青少年日常食用，对视力发育和整体健康具有潜在益处。通过改善照明环境和结

合中医食疗，可以作为一种全面的近视防控策略，对于提升青少年的视觉健康具有重要的意义。

作者贡献度说明：

李林芳：实验实施、数据分析、文章撰写；袁检宝、樊艺、陈珮雯：实验实施、数据收集及整理；王育良：实验设计及文章审校。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Medina A. The cause of myopia development and progression: Theory, evidence, and treatment[J]. Survey Ophthalmol, 2022, 67(2): 488-509.

2 Du Y, Meng J, He W, et al. Complications of high myopia: An update from clinical manifestations to underlying mechanisms[J]. Adv Ophthalmol Pract Res, 2024, 4(3): 156-163.

3 Han X, Liu C, Chen Y, et al. Myopia prediction: A systematic review[J]. Eye (London, England), 2022, 36(5): 921-929.

4 王智德，袁景玉，姚胜，等. 夜间人工照明光污染研究现状[J]. 照明工程学报，2021，32(3)：94-99.
Wang ZD，Yuan JY，Yao S，et al. Research status of light pollution caused by artificial lighting at night[J]. Chin Illuminat Eng J, 2021, 32(3): 94-99.

5 朱彦婷，王育良，张传伟. 时相调节对方对不同光环境下兔眼正视化的影响及其作用机制[J]. 中华中医药杂志，2020，35(4)：1751-1754.
Zhu YT, Wang YL, Zhang CW. Mechanism and effects of Shixiang Yinyang formulas on emmetropization of rabbits in different light environments[J] Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(4): 1751-1754.

6 宗霞，王育良. “日钟阴阳方”对不同光环境下兔眼球发育的干预作用研究[J]. 江苏中医药，2016，48(5)：76-79.
Zong X, Wang YL, Effects of "Rizhong Yinfang Formula" on rabbit eyeball development under different light environments[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2016, 48(5): 76-79.

7 Liang J, Pu Y, Chen J, et al. Global prevalence, trend and projection of myopia in children and adolescents from 1990 to 2050: A comprehensive systematic review and meta-analysis[J]. Br J Ophthalmol, 2024: bjo-2024-325427.

8 Tedja MS, Haarman AEG, Meester-Smoor MA, et al. IMI - myopia genetics report[J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2019, 60(3): M89-M105.

9 Wang YM, Lu SY, Zhang XJ, et al. Myopia genetics and heredity[J]. Children (Basel, Switzerland), 2022, 9(3): 382.

10 Dolgin E. The myopia boom[J]. Nature, 2015, 519(7543): 276-278.

11 Goldschmidt E, Jacobsen N. Genetic and environmental effects on myopia development and progression[J]. Eye (London, England), 2014, 28(2): 126-133.

12 Biswas S, El Kareh A, Qureshi M, et al. The influence of the environment and lifestyle on myopia[J]. J Physiological Anthropol, 2024, 43(1): 7.

13 国家卫生健康委办公厅. 近视防治指南(2024年版)[J]. 眼科新进展，2024，44(8)：589-591.
Opinions of the general office of the national health. Commission guidelines for the prevention and treatment of myopia (2024 edition)[J]. Recent Adv Ophthalmol, 2024, 44(8): 589-591.

14 Hiraoka T. Myopia control with orthokeratology: A review[J]. Eye Contact Lens, 2022, 48(3): 100-104.

15 Ha A, Kim SJ, Shim SR, et al. Efficacy and safety of 8 atropine concentrations for myopia control in children: A network meta-analysis[J]. Ophthalmology, 2022, 129(3): 322-333.

16 李华宏. 中医治疗近视方案的研究新进展[J]. 现代医学与健康研究电子杂志，2018，2(13)：153，155.
Li HH. New progress in the research of traditional Chinese medicine treatment of myopia[J]. J Mod Med Health Res Electronic J, 2018, 2(13): 153, 155.

17 施加裕，谈勇. 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[J]. 中国中西医结合杂志，2021，41(12)：1468-1475.
Shi JY, Tan Y. Effect of artificial light environment on reproductive endocrine of female guinea pigs and intervention of Rizhong Yinyang Formula[J]. Chin J Int Tradit West Med, 2021, 41(12): 1468-1475.

18 柏玉洁，王育良. 人工光环境对大鼠眼压的影响及应用中医阴阳钟理论进行干预的实验研究[J]. 中国中医眼科杂志，2011，21(6)：312-315.
Bai YJ, Wang YL. Experimental study of artificial long light on rats' intraocular pressure and the influence of yin-yang clock[J]. Chin J Chin Ophthalmol, 2011, 21(6): 312-315.

19 Liu H, Schaeffel F, Trier K, et al. Effects of 7-methylxanthine on deprivation myopia and retinal dopamine release in chickens[J]. Ophthalmic Res, 2020, 63(3): 347-357.

20 Mao J, Liu S. Different roles of retinal dopamine in albino guinea pig myopia[J]. Neurosci Lett, 2017, 639:

94-97.

21 Zhou X, Pardue MT, Iuvone PM, et al. Dopamine signaling and myopia development: What are the key challenges[J]. Prog Retinal Eye Res, 2017, 61: 60-71.

22 Thomson K, Karouta C, Ashby R. Form-deprivation and lens-induced myopia are similarly affected by pharmacological manipulation of the dopaminergic system in chicks [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2020, 61 (12): 4.

23 Ward AH, Siegwart JT, Frost MR, et al. Intravitreally-administered dopamine D2-like (and D4), but not D1-like, receptor agonists reduce form-deprivation myopia in tree shrews[J]. Visual Neurosci, 2017, 34: E003.

24 Huang F, Shu Z, Huang Q, et al. Retinal dopamine D2 receptors participate in the development of myopia in mice [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2022, 63 (1): 24.

25 Wu Y, Feng Y, Yang J, et al. Effects of exogenous retinoic acid on ocular parameters in guinea pigs with form deprivation myopia[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1160897.

26 Brown DM, Yu J, Kumar P, et al. Exogenous all-trans retinoic acid induces myopia and alters scleral biomechanics in mice[J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2023, 64 (5): 22.

27 Caron V, Chassaing N, Ragge N, et al. Clinical and functional heterogeneity associated with the disruption of retinoic acid receptor beta [J]. Genet Med, 2023, 25 (8): 100856.

28 陈子成, 吴君舒, 余颖鑫, 等. 视黄酸-AP-1信号通路对视网膜色素上皮细胞分泌TGF-β2的调控机制[J]. 中山大学学报(医学版), 2019, 40(5): 673-682.
Chen ZC, Wu JS, Yu YX, et al. Mechanisms of retinoic Acid-AP-1 signaling pathway modulating secretion of TGF-β2 by retinal pigment epithelial cells [J]. J Sun Yat-sen Univ (Medical Sciences), 2019, 40 (5): 673-682.

29 Yabut KCB, Isoherranen N. CRABPs alter all-trans -retinoic acid metabolism by CYP26A1 *via* protein-protein interactions[J]. Nutrients, 2022, 14(9): 1784.

30 Landis EG, Park HN, Chrenek M, et al. Ambient light regulates retinal dopamine signaling and myopia susceptibility [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2021, 62 (1): 28.

[**本文编辑**] 宋睿璞 邹 洲 朱 昊