

tion of an endometrial tissue culture model for study of early implantation events [J]. *Fertil Steril*, 2012, 98(6): 1581–1589

11 Diedrich K, Fauser BC, Devroey P, *et al.* The role of the endometrium and embryo in human implantation [J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(4): 365–377

12 Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, *et al.* Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(6): 1427–1435

13 Scott R, Seli E, Miller K, *et al.* Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study [J]. *Fertil Steril*, 2008, 90(1): 77–83

14 Kim MR, Park DW, Lee JH, *et al.* Progesterone – dependent release of transforming growth factor – beta1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells [J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(11): 801–808

15 Bläuer M, Heinonen PK, Martikainen PM, *et al.* A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(4): 864–871

16 Glenister T. Organ culture as a new method for studying the implantation of mammalian blastocysts [J]. *Proc R Soc Lond Biol*, 1961,

154: 428–431

17 Tan Y, Tan D, He M, *et al.* A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72: 556–561

18 Fouladi – Nashta AA, Jones CJ, Nijjar N, *et al.* Characterization of the uterine phenotype during the peri – implantation period for LIF – null, MF1 strain mice [J]. *Dev Biol*, 2005, 281(1): 1–21

19 Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(24): 11408–11412

20 Cai LQ, Cao YJ, Duan EK. Effects of leukaemia inhibitory factor on embryo implantation in the mouse [J]. *Cytokine*, 2000, 12(11): 1676–1682

21 Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, *et al.* Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(15): 8680–8685

22 Kimber SJ. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology [J]. *Reproduction*, 2005, 130(2): 131–145

(收稿日期:2013–10–23)

(修回日期:2013–11–19)

## 不同海拔大鼠肺气肿模型肺组织 caspase – 3 水平比较

谌登珍 关 巍 冯喜英 崔金霞 时莹庆

**摘 要 目的** 观察不同海拔肺气肿大鼠肺组织 caspase – 3 表达水平,评估低氧对肺组织凋亡的影响。**方法** 40 只 Wistar 大鼠随机分为对照组(A 组,6 只)、中海拔盐水组(B 组,6 只)、中海拔肺气肿组(C 组,8 只)、高海拔盐水组(D 组,10 只)、高海拔肺气肿组(E 组,10 只)。A、B、C 3 组大鼠饲养于西宁,海拔 2260m。D 组和 E 组饲养于低压氧舱,模拟海拔 5500m。B 组和 D 组腹腔注射生理盐水、C 组和 E 组腹腔注射 CSE,饲养 4 周后,采集大鼠右肺组织,免疫组化法检测肺组织 caspase – 3 的表达。**结果** 与 A、B、D 3 组比较,C 组和 E 组肺实质破坏、部分肺泡破裂及肺泡腔扩大。5 组间 caspase – 3 细胞阳性率比较有统计学差异( $P < 0.001$ )。D 组高于 B 组及 A 组( $P < 0.001$ ),E 组高于 C 组( $P < 0.001$ ),C 组高于 B 组( $P < 0.001$ ),E 组高于 D 组( $P < 0.001$ )。**结论** 高原低氧加重了肺气肿大鼠的凋亡表达。

**关键词** 肺气肿 低氧 凋亡 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

**Comparison of Caspase 3 Lung Tissue on Rats Emphysema Model under Different Altitudes.** Chen Dengzhen, Guan Wei, Feng Xiying, *et al.* *Affiliated Hospital of Qinghai University, Qinghai 810001, China*

**Abstract Objective** To assess the effect of hypoxia on apoptosis of lung tissue by observing emphysema rat lung tissue caspase 3 expression level at different altitudes. **Methods** Forty wistar rats were randomly divided into comparison group (group A, 6), Medium Altitude saline group (group B, 6), medium altitude emphysema group (group C, 8), high altitude saline group (group D, 10), high

altitude pulmonary emphysema group (group E, 10). Rats of groups A, B and C were fed in Xining at 2260m altitude. Group D and group E were raised in low pressure oxygen tank, simulated 5500m altitude. Rats of group B and D were injected with saline, and group C and E were injected with CSE in their abdomens. After 4 weeks' feeding, immunity group collected the right lungs of the rats and did chemical test to check the expression of caspase 3 of the lung issue. Compared with groups A, B and D, lungs of rats of group C and E were almost damaged and part of the alveoli broke and alveolar space expanded. **Results** The results showed caspase 3 cell positive rate varies significantly among the 5 groups ( $P < 0.001$ ). Cell positive rate of group D was higher than group A and B ( $P < 0.001$ ), group E was higher than group C ( $P < 0.001$ ), group C was higher than that of group B ( $P < 0.001$ ), group E was higher than that of group D ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The plateau low oxygen accelerated apoptosis expression of rats with emphysema.

**Key words** Pulmonary emphysema; Hypoxia; Apoptosis; Caspase - 3

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种常见的呼吸系统疾病, 因其患病人数多、病死率高而备受关注。在高原环境下, COPD 病情如何, 目前国内外研究较少, 且存在矛盾。有研究证实, 长期居住高海拔地区的居民患 COPD 的风险增加, 海拔越高, COPD 的患病率越高<sup>[1~4]</sup>。Moore 等<sup>[2]</sup> 和格日力<sup>[3]</sup> 认为高原的低氧、寒冷等环境与平原相比, 人们更容易罹患严重的低氧血症。但 Laniado - Laborin 等<sup>[5]</sup> 调查显示, 高原地区的 COPD 患病率明显低于平原地区。COPD 的发生、发展与细胞凋亡相关<sup>[6]</sup>。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (caspase - 3) 被认为是细胞凋亡的最关键的凋亡蛋白酶, 在各种因素启动的凋亡程序中起最后的枢纽作用<sup>[7]</sup>。肺气肿是 COPD 最主要的病理生理表现和结果。本研究通过在不同海拔高度建立大鼠肺气肿模型, 测定肺组织 caspase - 3 的表达, 研究低氧对肺气肿形成的影响。

## 材料与方法

1. 实验动物与材料: (1) 实验动物: 健康清洁雄性 Wistar 大鼠 40 只, 购自甘肃中医学院实验动物中心, 体重 160 ~ 180g, 6 周龄。大鼠按随机数字表法随机分为对照组 (A 组, 6 只)、中海拔盐水组 (B 组, 6 只)、中海拔肺气肿组 (C 组, 8 只)、高海拔盐水组 (D 组, 10 只)、高海拔肺气肿组 (E 组, 10 只)。A、B、C 3 组大鼠饲养于青海大学医学院动物房, 自由摄食、饮水。D 组和 E 组饲养于青海大学医学院高原医学研究中心低压氧舱 (海拔 5500m, 压力 397.5mmHg, 氧分压 42mmHg, 温度: 17 ~ 25℃, 湿度: 37% ~ 50%)。连续 24h 饲养, 持续 28 天。(2) 仪器与试剂: 肺组织切片机、脱水机、包埋机、摊片机、烤片机 (德国 Leica 公司), 光学显微镜 (日本奥林巴斯公司), 4℃ 冰箱 (德国西门子), 万宝路香烟 (福建龙岩卷烟厂), 一次性三通管, 一次性注射器 (1ml、5ml、50ml), 500ml 注射用灭菌用水洁净空瓶, caspase3 多克隆抗体、抗兔二抗、免疫组化试剂盒 (上海泛柯实业有限公司)。

2. 香烟烟雾提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 溶液的制备: 0.01ml 的 PBS 缓冲剂加 DDH<sub>2</sub>O 至 2000ml, 搅拌均匀并

充分溶解后取 100ml 放入 4℃ 冰箱备用。抽取 PBS 缓冲液 1ml, 用注射用灭菌用水 1:10 稀释。1ml 一次性注射器吸取 PBS 稀释液 1ml 注入 500ml 清洁、干燥的注射用灭菌用水玻璃瓶中, 将 1 支万宝路香烟、50ml 一次性注射针管、500ml 洁净玻璃瓶用一次性三通管连接起来, 点燃香烟, 以 3 ~ 4 次/分的速度吸入香烟烟雾于瓶中, 香烟燃至过滤最前方 1cm 处将香烟弃去, 静置含 PBS 稀释液及香烟烟雾的玻璃瓶约 10min, 期间可轻轻晃动一次, 使烟雾与稀释液充分混合, CSE 溶液即配置完成。

3. 肺气肿模型的建立: A 组大鼠不予任何处理, B 组和 D 组大鼠分别于饲养的第 1 天、第 8 天、第 15 天、第 22 天腹腔注射 0.8ml 生理盐水, C 组和 E 组大鼠于相同的时间腹腔注射现配 CSE 溶液 0.8ml。

4. 动物处理与标本制备: 饲养的第 29 天及第 30 天处理大鼠。分批给 5 组大鼠腹腔内注射 250μg/ml 肝素钠 0.4ml/100g 进行抗凝, 25% 乌拉坦 0.5ml/100g 进行麻醉。大鼠麻醉之后, 分离出气管与左、右支气管, 止血钳夹闭右支气管, 气管插管后, 持续 20cmH<sub>2</sub>O 压力冲洗左肺。开放右支气管, 持续 20cmH<sub>2</sub>O 压力给左、右肺打气, 打至两肺边缘锐利, 结扎气管, 拔出气管插管。20cm 高支架上左边 4% 多聚甲醛溶液、右边生理盐水用三通管相接, 插管插入右心室再进入肺动脉, 左心房剪一小口, 让液体由右心室入, 从左心房出, 完成人工肺循环, 先灌生理盐水约 10min 至肺变白, 再灌多聚甲醛约 10min, 分离出左、右肺脏, 两肺各用 4% 多聚甲醛溶液于避光盒中固定 48h。肺组织包埋、切片。

5. 肺组织 caspase - 3 检测: 采用免疫组化法检测, 按试剂盒说明操作。以肺组织细胞胞质棕褐色为阳性表达, 每张切片随机观察 5 个视野, 并记录实验结果。

6. 统计学方法: 所有数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析处理, 数据结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间均数的比较采用单因素方差分析, 两组间均数比较用 LSD 法, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1.5 组间大鼠肺组织病理变化: 与 A 组及 B、D 组相比, C 组和 E 组肺实质破坏、部分肺泡破裂及肺泡腔扩大, 大鼠腹腔注射 CSE 成功建立肺气肿模型。

2. 各组间 caspase - 3 细胞阳性率变化。5 组间 caspase - 3 细胞阳性率比较有统计学差异 ( $P < 0.001$ )。D 组高于 B 组及 A 组 ( $P < 0.001$ ), E 组高于 C 组 ( $P < 0.001$ ), C 组高于 B 组 ( $P < 0.001$ ), E 组高于 D 组 ( $P < 0.001$ ), 详见表 1。

3. 各组大鼠肺组织 caspase - 3 表达: 免疫组化提示 caspase - 3 阳性在 E 组肺组织明显增多, C 组和 D 组 caspase - 3 阳性数较 E 组减少, A 组及 B 组表达极少, 详见图 1。

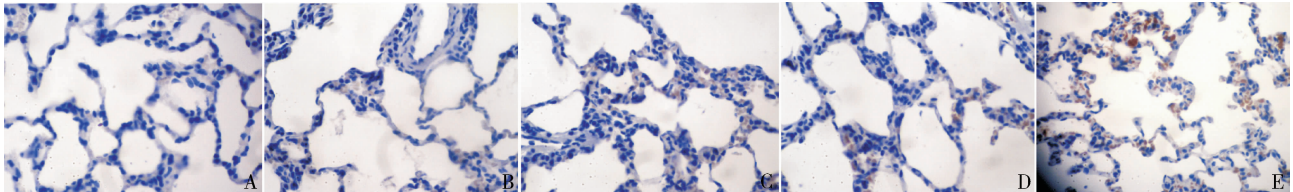


图 1 各组大鼠肺组织免疫组织 caspase - 3 表达 (SP, ×400)

讨 论

高原的气候特点与平原地区相差甚远, 表现为紫外线辐射强烈、气温低、冬季寒冷漫长、干燥、大风天气多、大气压和氧分压低, 其中最主要的特点是低压、低氧。有研究显示, 持续的低压、低氧环境下, 大鼠肺组织细胞凋亡呈增多趋势, 而活细胞数量逐渐下降<sup>[8]</sup>。当大鼠回到平原后, 随着脱离低压、低氧时间延长, 肺组织细胞凋亡被削弱, 并最终恢复。而目前国内对低压、低氧情况下肺组织 caspase - 3 的研究尚无报道, 本实验通过低压氧舱的舱内条件来模拟高原低压、低氧环境, 饲养高海拔盐水组 (D 组, 10 只) 大鼠 28 天后, 观察肺组织病理变化发现, 肺泡壁变薄, 部分肺泡破裂, 肺泡腔扩大, 检测 caspase - 3 阳性率明显高于 A、B 组, 提示 D 组肺组织凋亡增加, 说明高原低氧增加了肺组织的凋亡, 加重了组织损伤, 与 Littlefield<sup>[8]</sup> 研究结果相符。

COPD 的发病机制十分复杂, 病理学研究表明, COPD 患者存在着肺内细胞增殖和细胞死亡的平衡失调<sup>[9]</sup>。凋亡成为 COPD 发病的一个重要因素, 包括炎性细胞、肺实质及肺间质细胞的凋亡, 而 caspase - 3 处于凋亡执行者的核心位置<sup>[10]</sup>。凋亡在肺组织结构破坏中起着重要作用, Park 等<sup>[11]</sup> 研究证实, 与不吸烟者和吸烟者但未患 COPD 的人比较, COPD 患者肺组织与气道凋亡细胞的数量增加。在吸烟者和肺气肿患者都发现存在肺上皮细胞和内皮细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和肌细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。Luks 等<sup>[13]</sup> 研究显

| 表 1 各组间 caspase - 3 阳性细胞率 ( $\bar{x} \pm s$ ) |        |                       |
|-----------------------------------------------|--------|-----------------------|
| 组别                                            | 数量 (只) | caspase - 3 阳性细胞率 (%) |
| A 组                                           | 6      | 3.67 ± 1.45           |
| B 组                                           | 6      | 3.97 ± 0.49           |
| C 组                                           | 8      | 10.71 ± 1.07 *        |
| D 组                                           | 10     | 11.63 ± 0.81 *        |
| E 组                                           | 10     | 19.33 ± 0.92 * #      |
| F                                             |        | 345.375               |
| P                                             |        | < 0.001               |

与 A 组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 B 组比较, \*  $P < 0.001$ ; 与 C 组比较, #  $P < 0.001$ ; 与 D 组比较, #  $P < 0.001$

示, 长期居住在高原的 COPD 患者, 其肺心病的发生率和病死率增加。例如, 海拔每升高 95 米, 病死率便会增加  $1/10^5$ , 与海平面相比, 这类死亡病人年龄小、病程短。据 Araneda 等<sup>[14]</sup> 研究, 低氧环境下, 正常肺组织表现为蛋白质和脂质的氧化破坏, 细胞凋亡增加。此外, 肺泡低氧刺激引发炎症。此结论支持高海拔 COPD 患病率高的观点<sup>[1,4]</sup>。与以上结论相反的 1 例研究来自墨西哥, Coultas 等<sup>[15]</sup> 发现, 在墨西哥 COPD 的病死率并没有随海拔的增加而升高。这种差异可能是由职业暴露不同所致, 他们后期补充氧气的一组数据亦支持这种假设。以作者当前的知识, 关于低压、低氧环境下肺气肿肺组织凋亡类似的研究, 国内外均没有发布。本实验高海拔肺气肿组 (E 组) 比中海拔肺气肿组 (C 组) caspase - 3 阳性率增高, 凋亡增加, 说明低压、低氧状况下, 肺气肿模型肺组织的凋亡增加, 低氧加重肺气肿的形成。

本研究观察不同海拔肺气肿大鼠肺组织 caspase - 3 表达水平, 证实高原低氧加重了肺气肿大鼠的凋亡表达, 海拔越高, 肺气肿越严重。但是否存在其他因素参与本实验凋亡的发生, 还有待于进一步深入研究。

参考文献

1 Joshua OS, Andrew ML, Colin KG. Lung disease at high altitude[J]. Expert Rev Resp Med, 2009, 3(6): 639 - 641

2 Moore LG, Rohr AL, Maisenbach JK, et al. Emphysema mortality in Colorado residents at high altitude[J]. Am Rev Respir Dis, 1982, 126: 225 - 228

- 3 格日力. 高原与高原病[M]. 西宁: 青海医学院出版社, 2002
- 4 Andre's C, Carlos A. Torres - duque CJ. Prevalence of COPD in five colombian cities situated at low, medium, and high altitude (PREPO-COL Study)[J]. Chest, 2008, 133: 343 - 349
- 5 Laniado - Laborin R, Rendon A, Batiz F, *et al.* High altitude and chronic obstructive pulmonary disease prevalence: a casual or causal correlation? [J]. Arch Bronconeumol, 2012, 48(5): 156 - 160
- 6 张健全, 钟小宁, 白晶, 等. 国内慢性阻塞性肺病肺内细胞凋亡与增殖关系的实验研究[J]. 广西医学, 2006, 28(8): 1143 - 1145
- 7 韩若东. 丹参酮 II A 对大鼠脑缺血再灌注后细胞凋亡、Drp - 1 及 Caspase - 3 表达的影响[D]. 安徽医科大学, 2012, 08
- 8 Littlefield. Changes in lung tissue apoptosis of rat from high altitude pulmonary hypertension after returning to plains and the interference effect of 5 - HT inhibitors[J]. Medical Research, 2012, 6: 116
- 9 王晓园, 许西林. 慢性阻塞性肺疾病与细胞凋亡/抗凋亡的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12: 958 - 959
- 10 金寰, 潘贵书, 许家洲. 电针对海洛因成瘾大鼠 PAG 的细胞凋亡及 Caspase - 3 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2010, 26(6): 647 - 651
- 11 Park JW, Ryter SW, Choi AM. Functional significance of apoptosis in chronic obstructive pulmonary disease[J]. COPD, 2007, 4(4): 347 - 353
- 12 Platakis M, Tzortzaki E, Ryttilä P, *et al.* Apoptotic mechanisms in the pathogenesis of COPD[J]. Int J COPD, 2006, 1(2): 161 - 162
- 13 Luks AM, Swenson ER. Travel to high altitude with pre - existing lung disease[J]. ERJ, 2007, 29(4): 770 - 772
- 14 Araneda OF, Tuesta M. The physiologic basis of high - altitude disease [J]. Oxidative Medicine Cellular Longevity, 2012, 18: 856 - 860
- 15 Coultas DB, Samet JM, Wiggins CL. Altitude and mortality from chronic obstructive lung disease in New Mexico[J]. Arch Environ Health, 1984, 39: 355 - 359 (收稿日期: 2013 - 11 - 06)  
(修回日期: 2013 - 11 - 14)

## 紫甘薯花青素对高脂饮食导致小鼠 脑部炎症反应的保护作用

王 正 孙 晓 郑元林 唐宏兵

**摘 要** **目的** 本研究利用 HFD (high fat diet) 建立肥胖小鼠神经炎症模型, 探讨紫甘薯花青素 (purple sweet potato color, PSPC) 对 HFD 诱导的肥胖小鼠脑部神经炎症损伤的影响及分子机制。**方法** ICR (institute of cancer research) 雄性小鼠 100 只, 按随机数字表法随机分为 4 组, 每组 25 只, 分别为: 正常对照组、HFD 组、HFD + PSPC 组、PSPC 组。HFD + PSPC 组、PSPC 组灌喂 PSPC 700mg/(kg · d), 正常对照组、HFD 组灌喂同等体积的 0.9% 的生理盐水, 连续喂养灌喂 20 周, 每周两次称量小鼠空腹体重。于第 20 周进行行为学检测, 行为学检测之后立即断颈处死, 取脑, 分别检测海马与前脑皮质中的 COX - 2 (cyclo - oxygen - ase - 2) 在不同处理组的小鼠脑组织中的蛋白表达水平。**结果** HFD 处理的小鼠体重有显著的升高, 而 PSPC 能够有效改善上述症状, 显著改善 HFD 诱导的小鼠自发活动能力和学习记忆能力的下降, 显著抑制 HFD 诱导的小鼠海马和前脑皮质 COX - 2 的蛋白表达水平增加。**结论** 研究表明, 紫甘薯花青素具有神经保护作用, 可能的机制是抑制炎症相关蛋白的表达, 从而起到抗炎作用。

**关键词** 紫甘薯花青素 HFD 行为学检测 COX - 2

[中图分类号] R745 [文献标识码] A

**Protective Effect of Purple Sweet Potato Color On the Neuroinflammation Induced by High Fat Diet in T2DM Mice.** Wang Zheng, Sun Xiaojiao, Zheng Yuanlin, *et al.* Changzhou Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu 213000, China

**Abstract Objective** To investigate the effect of PSPC on the neuroinflammation in HFD - induced mouse brain and discuss the mechanism of the protective effect. **Methods** Male ICR mice were randomly divided into 4 groups, termed as group control, group HFD, group HFD + PSPC, and group PSPC. Mice in group PSPC and group HFD + PSPC were lavaged with purple sweet potato color in 0.9% saline containing 0.1% Tween 80 at a dose of 700mg/(kg · d) for 20 weeks, at the same time, mice in group control and group HFD served as control group were given saline (0.9%) orally at the same dose. The mice weight was recorded twice a week. In 20<sup>th</sup> week, the mice were used to behavior tests and protein assays. **Results** Mice in HFD group had significant increase in the body weight and glucose

作者单位: 213000 江苏省常州市疾病预防控制中心 (王正、唐宏兵); 江苏省常州市第二人民医院 (孙晓); 江苏省药用植物生物技术重点实验室 (郑元林)