

- 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 张建全, 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 Plataki M ,Tzortzaki E ,Rytala 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 - oxygenase - 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 Xiao, 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 20th 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)

level, compared with the control group. PSPC could significantly reverse the impairment of motor and exploration behavior induced by HFD in the open field tasks, and also improve learning and memory ability in step-through tests, could markedly decrease the high level expression of COX-2 in hippocampus and frontal cortex of brain that treated with HFD. **Conclusion** The results above showed that PSPC had anti-inflammatory property. The possible mechanism is that PSPC decreases the expression of inflammatory protein COX-2.

Key words PSPC; HFD; Behavior test; COX-2

随着现代人们生活质量的提高,脂肪在饮食中的含量不断增多,加之不健康的生活习惯,肥胖逐渐成为日常生活中最常见的代谢疾病。肥胖是因机体能量代谢失衡,热量摄入长期超过消耗而导致体内脂肪过度积聚、体重超过一定范围的一种营养障碍性疾病,它在2型糖尿病和代谢综合征中起到重要的诱导作用^[1]。大量研究表明脂肪组织不仅是一个储存能量和释放能量的结构,还是一个高度活跃的内分泌器官^[2]。脂肪细胞可通过释放肿瘤坏死因子- α 、白介素6、游离脂肪酸及瘦素等物质参与外周胰岛素抵抗的发生,可以导致机体发生炎症以及细胞寿命变短,可以使小鼠大脑皮质出现氧化应激和炎症反应^[3,4]。学习记忆是大脑的高级功能,是人脑职能的要素之一,它伴随有复杂的神经生理、生化机制,涉及多种物质,特别是中枢神经起着重要的作用,而且组织中的炎症对学习记忆的损伤也扮演着重要角色。

紫甘薯花青素(anthocyanidin)属于类黄酮化合物,是一种广泛存在于植物中的重要水溶性天然色素,具有抗氧化功能和清除自由基功能,抗炎功能,以及抗肿瘤和抗突变功能^[5,6]。本研究利用高脂饮食建立肥胖小鼠神经炎症模型,探讨紫甘薯花青素(PSPC)对高脂饮食诱导的肥胖小鼠脑部神经炎症损伤的保护作用。

材料与方法

1. 动物及试剂:小鼠:ICR雄性小鼠100只(8周龄),体重 30 ± 1 g,北京华阜康生物科技股份有限公司。高脂饲料:蛋白质20kcal%,脂肪60kcal%,碳水化合物20kcal%,购自Research Diets公司;紫甘薯花青素:青岛鹏远天然色素研究所。COX-2抗体、 β -actin抗体、羊抗兔二抗:Santa Cruz。

2. 仪器:自发开场实验仪器与设备,一次性被动回避实验仪器与设备(淮北正华生物设备有限公司);立式电泳仪,转膜电泳仪(BOI-RAD公司)。

3. 造模及体重统计:将小鼠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(control组)、HFD组、HFD+PSPC治疗组、PSPC单独处理组,HFD+PSPC治疗组和PSPC单独处理组每天灌喂700mg/kg的紫甘薯花青素,正常对照组和HFD组每天灌喂等量灭菌生理盐水(0.9% NaCl),饲养20周^[7]。每周分别于周三和周日上午两次称量记录小

鼠空腹体重。

4. 行为学检测:(1)开场实验(open field test):实验开始前,先将小鼠放入箱内,让其适应1min后记录小鼠在5min内由底面中央开始跑动穿越的路径、速度、站立、贴壁次数以及理毛次数,比较小鼠在新异环境下的自发行为与探究活动变化。(2)一次性被动回避反应(step through test):将小鼠背对着洞口放在暗箱的踏板上,待小鼠进入暗箱,记录其在踏板上停留的时间。若没有进入,将小鼠送入暗箱,然后实施电击,持续5s。24h后对小鼠进行记忆力的检测,同样将小鼠背对暗室放在踏板上,当小鼠进入暗室后,记录小鼠从开始到进入暗室的时间。5min内未进入暗室的小鼠其潜伏期按300s计算。

5. 蛋白的测定:将小鼠断颈处死,取脑称重,提取蛋白,定量SDS-PAGE转膜,封闭,杂交,显色。

6. 统计学方法:各组数据使用SPSS 16.0软件处理,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用Tukey's honestly significant difference(HSD) post hoc test进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 紫甘薯花青素对小鼠体重的影响:实验开始前,4组小鼠体重均无差异。HFD组在第4周时,体重与其他组相比出现了明显的增长,到第20周试验结束为止,HFD组与正常对照组、HFD+PSPC治疗组、PSPC单独处理组的体重差异非常明显(图1)。

2. 紫甘薯花青素对小鼠自发活动能力的影响:实验结果显示,HFD小鼠,在总路程、速度、理毛、贴壁和站立等4个方面与对照组相比,都有显著的降低,这说明HFD喂养处理后显著的影响了小鼠的运动能力,而HFD+PSPC组小鼠的运动能力显著提高,这说明紫甘薯花青素可以改善炎症引起的运动能力损伤(图2)。

3. 紫甘薯花青素对小鼠学习记忆能力的影响:实验结果显示,4组小鼠自然潜伏期没有明显差异;通过5s电击24h之后,HFD组与对照组相比,记忆保持潜伏期显著降低,经PSPC灌喂的HFD处理小鼠与HFD组相比,记忆保持潜伏期显著增高,炎症小鼠的记忆保持能力有所恢复(图3)。

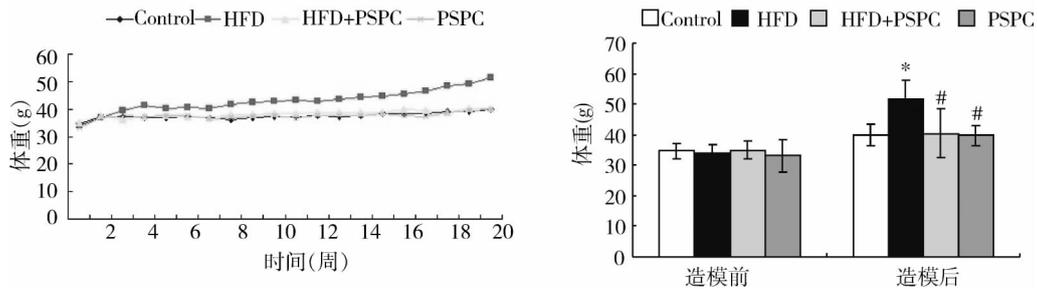


图1 实验前后小鼠的体重变化
与正常对照组相比, * $P < 0.001$; 与 HFD 组相比, # $P < 0.001$

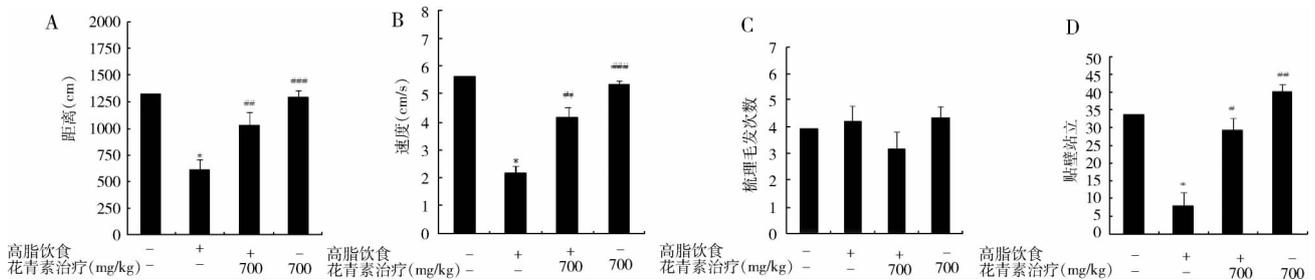


图2 紫甘薯花青素对小鼠自发活动能力的影响

A. 小鼠在开放场实验中运动的路程; B. 小鼠在自发实验中的速度; C. 小鼠在自发实验中的理毛次数;
D. 小鼠在自发实验中的站立和贴壁数。与正常对照组相比, * $P < 0.01$; 与 HFD 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

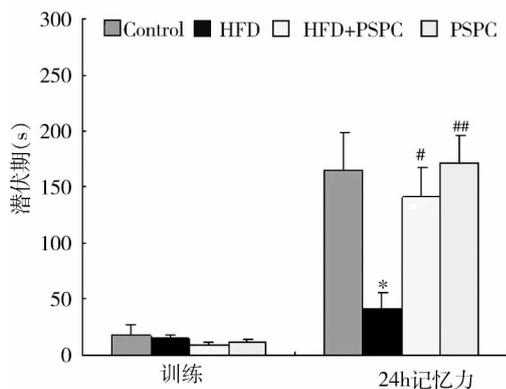


图3 PSPC 对 HFD 小鼠的避暗行为能力的影响 ($n = 8$)
开场运动实验,自然潜伏期和记忆保持潜伏期。Control 作为对照。与 Control 组相比, * $P < 0.001$; 与 HFD 组相比, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$

4. 紫甘薯花青素对小鼠脑组织炎症标志蛋白 COX-2 表达的影响: Western blot 检测结果显示,小鼠经长期 HFD 喂养后,小鼠脑组织中的 COX-2 蛋白表达水平显著的升高,说明 HFD 造成了小鼠脑组织炎症,而紫甘薯花青素显著抑制了 HFD 诱导的小鼠脑组织中的 COX-2 的蛋白表达(图 4)。

讨 论

学习记忆是高等动物和人类最具特色的生理特性之一,中枢神经系统在学习记忆中起着非常重要的

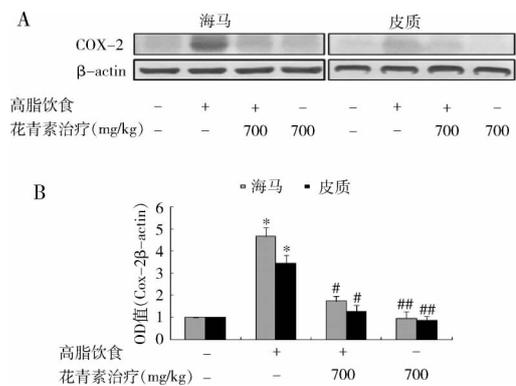


图4 PSPC 对 HFD 诱导的小鼠脑部海马与皮质 COX-2 蛋白表达的影响

A. 通过 Western blot 检测小鼠海马和皮质中的 COX-2 的表达情况; B. COX-2 蛋白带相对灰度值分析。β-actin 作为对照。与正常对照组相比, * $P < 0.01$; 与 HFD 组相比, # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$

作用,随着年龄的增长或者受到炎症、氧化应激等影响,中枢神经系统会发生退行性病变,主要临床表现为反应迟钝,动作协调性差,学习记忆能力出现减退。

紫甘薯花青素属于黄酮类化合物,已有大量报道证明黄酮类化合物具有神经元保护作用,能够促进学习记忆,改善认知能力^[8,9]。

本实验采用高脂饮食诱导肥胖小鼠动物模型的

方法,在动物模型中模拟人类肥胖的发生发展,造模过程一般为 5~6 个月^[10]。在本研究中,高脂饮食组小鼠体重持续增加,腹部及内脏脂肪大量堆积,已具备成模标准。这说明,长期高脂高热量饮食,能够使小鼠的体重发生明显增长,同时,PSPC 能够有效的降低肥胖小鼠的体重。开场实验是检测动物在特定环境下的运动能力和探究行为从而反映动物中枢神经系统兴奋状态的一种方法。一次性被动回避实验模型,是被广泛使用的研究学习记忆的模式。

本实验发现,在开场实验中,HFD 喂养的小鼠,其自发活动、空间学习记忆能力明显下降,与空白对照组有统计学差异,而通过紫甘薯花青素的治疗,小鼠的自发活动、学习记忆能力有所改善。在避暗实验中,HFD 喂养的小鼠,其记忆保持潜伏期明显低于空白对照组的小鼠,而紫甘薯花青素灌喂的 HFD 喂养小鼠,比单独以 HFD 喂养的小鼠的记忆保持潜伏期有明显提高,这说明紫甘薯花青素在一定程度上改善了小鼠学习记忆的退化。

COX-2 是一种十分敏感的诱导型酶,在正常健康的组织中是无法检测到的,但当受到内毒素或炎症细胞因子如 IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 诱导之后会大量表达,因此可将 COX-2 作为炎症检测的标志蛋白^[11,12]。本研究中,HFD 组小鼠相对其他组别,海马和皮质中 COX-2 蛋白表达水平显著的升高,说明其脑部已经出现炎症,推测与行为学异常有关,而 HFD+PSPC 组小鼠脑组织中的 COX-2 蛋白表达水平明显受到抑制,推测与行为学异常的改善有关。综上所述,紫甘薯花青素能显著改善 HFD 诱导的小鼠自发活动能力和学习记忆能力的下降,说明紫甘薯花青素具有神经保护作用,其机制可能是抑制 HFD 诱导的小鼠海马和前脑皮质中 COX-2 蛋白水平的上调,显示紫甘薯花青素具有抗炎作用,具有非常广阔的药用价值和开发前景。

参考文献

- 1 Meissburger B, Ukropec J, Roeder E, et al. Adipogenesis and insulin sensitivity in obesity are regulated by retinoid-related orphan receptor gamma[J]. *EMBO Mol Med* 2011, 3(11): 637-651
- 2 赵季耘,李秀钧. 糖尿病诊治研究新理念[J]. *中国实用内科杂志*, 2005, 25(4): 302-304
- 3 Gerrits AJ, Gitz E, Koekman CA, et al. Induction of insulin resistance by the adipokines resistin, leptin, plasminogen activator inhibitor-1 and retinol binding protein 4 in human megakaryocytes[J]. *Haematologica* 2012, 97(8): 1149-1157
- 4 Guri AJ, Hontecillas R. Dietary abscisic acid ameliorates glucose tolerance and obesity-related inflammation in db/db mice fed high-fat diets[J]. *Clinical Nutrition* 2007, 26(1): 107-116
- 5 贺炜,王征. 紫甘薯花青素提取物抗氧化能力的稳定性[J]. *现代生物进展* 2009, 9(7): 1268-1271
- 6 Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2005, 43(10): 1557-1566
- 7 Wang YJ, Zheng YL, Lu J, et al. Purple sweet potato color suppresses lipopolysaccharide-induced acute inflammatory response in mouse brain. [J]. *Neurochemistry International* 2010, 56: 424-430
- 8 Frye CA, Alicia A. Progesterone enhances performance of aged mice in cortical or hippocampal tasks[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 437(2): 116-120
- 9 Cai W, Zhu Y, Furuya K, et al. Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage[J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(2): 127-138
- 10 Wong C, Wang Z. Prevalence of type 2 diabetes mellitus of Chinese populations in Mainland China, Hong Kong, and Taiwan[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006, 73(2): 126-134
- 11 Jain NK, Ishikawa T, Spigelman I, et al. COX-2 expression and function in the hyperalgesic response to paw inflammation in mice[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008, 79(6): 183-190
- 12 Kogiso M, Shinohara T, Kathleen Dorey C, et al. Role of PPAR γ in COX-2 activation in mycobacterial pulmonary inflammation[J]. *Inflammation* 2012, 35(5): 1685-1695

(收稿日期: 2013-11-04)

(修回日期: 2013-11-27)

欢迎订阅 2014 年《医学研究杂志》

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》)于 1972 年创刊,是由国家卫生和计划生育委员会主管、中国医学科学院主办的国家级医学学术刊物。中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊。世界卫生组织太区医学索引(WPRIM)收录期刊。月刊。CN11-5453/R,ISSN1673-548X。

本杂志信息量大,装帧精美。每册定价 10 元,全年 120 元(含邮费)。国内外公开发售。邮发代号:2-590。编辑部电话:010-52328677,010-52328678,010-52328679;传真:010-65230946。E-mail:xyz85637883@126.com。投稿网址: <http://www.yxyjzz.cn>。编辑部地址:北京市朝阳区雅宝路 3 号(邮编:100020)

《医学研究杂志》编辑部