

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.13.005

文章编号: 1005-8982(2017)13-0024-04

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征模型大鼠心肌氧化应激的损伤及复氧后的变化

田培燕¹, 陈应康², 谢福珊¹, 杨顺茂³

(黔南民族医学高等专科学校 1.生理教研室, 2.病理学教研室 贵州 黔南 558000;

3.贵州医科大学第三附属医院 老年科 贵州 黔南 558099)

摘要:目的 通过复制阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAHS)的间歇缺氧(IH)大鼠模型,观察 IH 对大鼠心肌氧化应激的损伤及其复氧后的变化情况。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组,对照组(A 组)10 只,复制 30 只阻塞性睡眠呼吸暂停综合征的间歇缺氧大鼠模型,其中 10 只缺氧组(B 组),10 只缺氧后复氧组(C 组),另外 10 只持续缺氧组(D 组)。检测各组大鼠血清中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性,以及心肌组织中还原型谷胱甘肽(GSH)活性。**结果** 与对照组大鼠比较,IH 模型大鼠 MDA 含量增高,SOD 活性降低,心肌组织 GSH 活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);复氧组大鼠 MDA、SOD 和心肌组织 GSH 活性恢复正常,差异无统计学意义($P > 0.05$);而 D 组大鼠 MDA 含量增高,SOD 活性降低,心肌组织 GSH 活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** OSAHS 存在氧化应激,严重损伤心肌组织,缺氧时 MDA 含量、SOD 和 GSH 活性改变,复氧后有所恢复。血清 MDA 含量、SOD 活性及心肌组织 GSH 活性可以反应氧化应激的严重程度。

关键词: 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征;间歇缺氧;持续缺氧;心肌氧化应激

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Myocardial oxidative stress injury and changes after reoxygenation in rat model of obstructive sleep apnea syndrome

Pei-yan Tian¹, Ying-kang Chen², Fu-shan Xie¹, Shun-mao Yang³

(1. Department of Physiology, 2. Department of Pathology, Qiannan Medical College for Nationalities, Qiannan, Guizhou 558000, China; 3. Department of Geriatrics, the Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Qiannan, Guizhou 558099, China)

Abstract: Objective To establish obstructive sleep apnea syndrome (OSAHS) rat model by intermittent hypoxia (IH) and to observe the myocardial oxidative stress injury and changes after reoxygenation. **Methods** In this study, 10 untreated rats were enrolled into control group (group A). Through 30-d IH, obstructive sleep apnea syndrome model was established in 30 rats. among which 10 rats had examination of venous blood and myocardial tissues just after model establishment (group B), 10 rats had reoxygenation immediately after model establishment (group C) and their venous blood and myocardial tissues were examined after 30-d normal feeding, still 10 rats had IH for additional 30 days (group D) before examination of their venous blood and myocardial tissues. The content of serum malondialdehyde (MDA), the activity of serum superoxide dismutase (SOD), and the activity of glutathione (GSH) in myocardial tissue were detected and compared between the groups. **Results** Compared with the group A, the serum MDA content increased, the serum SOD activity and the activity of glutathione (GSH) in myocardial tissue decreased in the group B ($P < 0.05$); the indexes returned to normal in the group C ($P > 0.05$); however, in the group D, the myocardial GSH activity and the serum SOD activity were significantly decreased, and the serum MDA content was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusions** Oxidative stress appears in OSAHS, and causes severe injury of

myocardial tissue. Hypoxia can change MDA content, and SOD and GSH activity which will recover after reoxygenation. Hence, serum MDA content and SOD and GSH activity can reflect the severity of oxidative stress in myocardial tissues.

Keywords: obstructive sleep apnea syndrome; intermittent hypoxia; rat; myocardial oxidative stress injury

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea hyperpnoea syndrome, OSAHS), 是一种严重危害人类健康的常见性呼吸系统疾病, 发病率日趋升高, 日益受到医学界的重视^[1-2]。OSAHS 是指患者在睡眠时引发通气不足和呼吸暂停, 伴随睡眠结构紊乱、打鼾等, 继而引发一系列生理病理改变和临床并发症^[3-4]。OSAHS 患者多表现为白天嗜睡, 夜间反复发生低氧血症和高碳酸血症, 睡眠时打鼾并伴有呼吸浅表和呼吸暂停。OSAHS 患者在呼吸暂停、组织缺氧后, 又发生高通气血氧恢复, 该过程产生过多的氧自由基进而改变氧平衡, 导致氧化应激 (oxidative stress, OS) 发生, 氧化和抗氧化能力失衡^[5-6]。研究证实诸多疾病的发生发作都与 OS 相关, 尤其与心血管疾病有密切联系。因此, 本研究复制 OSAHS 的间歇缺氧 (intermittent hypoxia, IH) 大鼠模型, 探讨是否存在氧化应激及其可能导致的损伤。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 实验动物 40 只清洁级雄性 SD 大鼠 (由重庆市中药研究院实验动物研究所提供), 体重 200 ~ 220 g, 随机分为 4 组, 即对照组 (A 组)、缺氧组 (B 组)、缺氧复氧组 (C 组) 和持续缺氧组 (D 组), 每组 10 只。所有动物均由统一饲料喂养。

1.1.2 实验试剂 戊巴比妥钠购自北京普博斯生物科技有限公司, 青霉素购自山西振东泰盛制药有限公司, 丙二醛 (Malonaldehyde, MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒、还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物模型的复制

选用一个长方体箱, 在侧壁中央取两个孔, 分别输入空气和氮气。再在两端及两侧壁取小孔, 便于气体采样和平衡舱内压力。实验过程中采用生石灰和硅胶干燥剂吸收舱内 CO₂ 和水蒸气。每天 10:00 ~ 18:00 将 B 组、C 组和 D 组大鼠放置于低氧舱内, 关闭舱门, 间歇性地向舱内充入压缩空气和氮气, 30 s 充入氮气, 随后 30 s 充入压缩空气, 以此 60 s

循环一次。采用测氧仪实时监测舱内氧浓度, 调节气体流量, 保证每次循环时舱内的最低氧浓度为 4% ~ 6%, 之后逐步恢复至 21%。如此持续 30 d 即成功复制大鼠 OSAHS 模型。中间随机取 B 组大鼠静脉血和心肌组织送检。C 组大鼠取出低氧舱后正常饲养 30 d, 取静脉血和心肌组织送检。D 组大鼠继续依照上述方法在低氧舱内处理 30 d, 随后抽取静脉血和心肌组织送检。

1.3 标本采集和处理

1.3.1 检测血清 MDA 含量和 SOD 活性 各组大鼠均抽取静脉血 2 ml 送检。所得静脉血在 1 800 r/min 下离心 10 min 后获取血清, 按照试剂盒说明书检测 MDA 含量和 SOD 活性。SOD 活性采用邻苯三酚自氧化法检测, MDA 含量采用硫代巴比妥酸法检测。

1.3.2 检测心肌组织 GSH 活性 各组大鼠取心肌组织 0.5 g 送检。将心肌组织放入清水中洗净, 滤纸吸干, 称重后剪碎匀浆, 以 3 500 r/min 低温离心 15 min。取上清液用以检测 GSH 酶活性。按照试剂盒说明书采用比色法测定。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS17.0 进行分析处理, 计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组样本间差异比较采用方差分析, 组间两两比较采用 *F* 检验, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 行为变化

复制模型成功后观察大鼠的行为变化, 大鼠在白天即表现出精神不佳, 反应迟钝的情况, 在夜间睡眠时打鼾 (类似于喉鸣音)、呼吸暂停伴随胸腹式反常呼吸运动。对照组大鼠未出现上述情况。

2.2 血清 MDA 含量及 SOD 活性

4 组大鼠血清 MDA 含量和 SOD 活性见表 1。结果表明, 与 A 组大鼠比较, B 组大鼠 MDA 含量增高, SOD 含量降低, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05); C 组大鼠 MDA 和 SOD 含量恢复正常, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05); D 组大鼠 MDA 含量增高, SOD 含量降低, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1。

2.3 心肌组织 GSH 活性

4 组大鼠的心肌组织 GSH 活性见表 2。结果表

明,与 A 组大鼠比较,B 组大鼠心肌组织 GSH 活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);C 组大鼠心肌组织 GSH 活性恢复正常,差异具有统计学意义($P > 0.05$);D 组大鼠心肌组织 GSH 活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 4 组大鼠血清 MDA 和 SOD 值比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA/($\mu\text{mol/g}$)	F 值	P 值	SOD/(IU/g)	F 值	P 值
A 组	3.09 ± 0.51			443.08 ± 32.19		
B 组	3.91 ± 0.61	3.261	0.004	381.51 ± 28.74	4.512	0.000
C 组	3.21 ± 0.54	0.511	0.615	438.11 ± 31.52	0.349	0.731
D 组	4.52 ± 0.87	4.484	0.000	337.56 ± 31.32	7.430	0.000
F 值	8.256			12.291		
P 值	0.000			0.000		

表 2 4 组大鼠心肌 GSH 水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	GSH/($\mu\text{mol/g}$)	F 值	P 值
A 组	50.21 ± 9.32		
B 组	40.37 ± 6.12	2.791	0.012
C 组	48.75 ± 8.62	0.364	0.720
D 组	32.78 ± 5.98	4.978	0.000
F 值	8.115		
P 值	0.000		

3 讨论

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征具有高发病率的特点,严重危害人体多个系统,已成为近年来的研究热点。国外发病率约为 2%~4%,国内发病率约为 3.5%~4.8%,其中,中老年人群中患病率随年龄的增加而增高。OSAHS 的病理学特征为睡眠高阻力性呼吸。睡眠时胸腔负压增大,咽部扩张肌收缩活动减弱,进一步加重上气道解剖狭窄,直至完全闭合。目前,针对 OSAHS 研究的常用复制模型方法包括单纯间歇性改变氧浓度、偶发缺氧、低压低氧诱导、限制通气、上气道机械压力性震动、气管阻塞、睡眠剥夺等。OSAHS 动物模型尚无公认的评价标准,主要观察动物模型和人类 OSAHS 疾病的特征是否符合,指标包括^[7]:①症状:鼻鼾、睡眠紊乱、呼吸暂停等;②咽部解剖结构:咽腔径线、咽壁软组织、咽部肌肉电生理情况;③多导睡眠图(Polysomnography, PSG):动物呼吸紊乱指数和睡眠分期。目前认为,检测 PSG 是 OSAHS 诊断的“金标准”:每晚 7 h 睡眠中反复发作呼吸暂停和低通气 30 次以上,或睡眠呼吸暂停低通气指数(AHI)≥5 次/h 即可确诊。

OSAHS 患者引发心血管疾病的主要病理过程是缺氧、高碳酸血症等因素持续存在,导致交感神经兴奋异常增强,其中,呼吸气流停止反复发作引起的 IH 是最核心原因。缺血/低氧阶段,细胞自我调节以适应低氧环境;再灌注/复氧阶段,细胞内氧气含量急剧增加,该现象称之为缺氧/再氧合(hypoxia/reoxygenation),导致 ROS 生成,促进氧化应激发生。OSAHS 患者的严重程度与氧化应激的发生密切相关^[8]。氧化应激是指机体在受到有害刺激时,体内的高活性分子过度生成,氧化程度超出了氧化物的清除能力,氧化和抗氧化系统失衡,从而导致机体损伤^[9-10]。氧化应激可由若干标志物的含量来反应,主要包括脂质过氧化物,氧化蛋白,如 MDA、SOD、GSH 等。

本研究发现,OSAHS 复制模型成功后,大鼠 MDA 含量增高,SOD 活性降低,心肌组织 GSH 活性降低,表明反复的阻塞性呼吸暂停会导致氧化应激反应发生,使氧化和抗氧化作用失衡,从而引起一系列生理过程异常。大鼠在复氧后 MDA 含量、SOD 活性和心肌组织 GSH 活性恢复正常,与对照组比较差异无统计学意义。持续缺氧大鼠 MDA 含量增高,SOD 活性降低,心肌组织 GSH 活性降低,表明大鼠心肌功能已严重受损。究其原因可能是:持续性缺氧导致中性粒细胞结构改变,变形性降低,引起中性粒细胞在肺内聚集、激活,大量活性氧由此释放,从而严重损伤组织和细胞。

OSAHS 患者在睡眠中由于反复上气道阻塞的发生,多数会出现间断的缺氧和复氧过程,这类类似于缺血过程中的再灌注过程中出现的病理性改变,产生过多的活性氧,从而引起机体的氧化应激状态的改变。本研究中成功复制了阻塞性睡眠呼吸暂停综合征大鼠模型,观察到了 IH 对大鼠心肌氧化应激的损伤及其复氧后的变化情况,对于阻塞性睡眠呼吸暂停综合征的发病机制有了清晰的认识,可帮助找到治疗人类 OSAHS 患者的突破点,对于预防和治疗阻塞性睡眠呼吸暂停综合征有着一定的临床指导意义。

综上所述,OSAHS 存在氧化应激,严重损伤心肌组织,缺氧时 MDA 含量、SOD 和 GSH 活性改变,而复氧后恢复。血清 MDA 含量和 SOD 活性及心肌组织 GSH 活性可以反应氧化应激的严重程度。

参 考 文 献:

- [1] WOLF J, NARKIEWICZ K. Obstructive Sleep Apnea[M]. Special Issues in Hypertension, 2012: 121-131.
- [2] BADR M S. Central Sleep Apnea [M]. Essentials of Sleep Medicine, 2012: 219-232.
- [3] MAKRI S D, NTALAPASCHA M, ZAKYNTHINOS E. The association between oxidative stress and obstructive sleep apnea syndrome[J]. Sleep and Breathing, 2012, 16(1): 1.
- [4] 宋凯英,徐平,史艳红. OSAS 大鼠模型的实验研究[J]. 遵义医学院学报, 2012, 35(3): 189-192.
- [5] WANG W, HE J, LU X. Animal model of obstructive sleep apnea with New Zealand rabbit [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head, and Neck Surgery, 2012, 26(12): 555.
- [6] CROSSLAND R F, DURGAN D J, LLOYD E E, et al. A new rodent model for obstructive sleep apnea: effects on ATP-mediated dilations in cerebral arteries[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2013, 305(4): 334-342.
- [7] EPSTEIN L J. Clinical guidelines for the evaluation of adults with obstructive sleep apnea[J]. Sleep Loss and Obesit, 2012, 59(7): 191-202.
- [8] 平芬,李琪,韩书芝,等. 氧化应激与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的相关性研究进展[J]. 河北医药, 2012, 34(20): 3130-3132.
- [9] 董万里. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与氧化应激研究进展[J]. 中国综合临床, 2013, 29(6): 670-672.
- [10] 邱昌明,李洁,李兵,等. 慢性间歇性缺氧对大鼠心肌氧化应激影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(3): 209-211.

(张蕾 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 期刊号 ISSN1005-8982/CN43-1225/R, 旬刊(2017 年 7 月开始), 系中国科技论文统计源期刊、北大中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发行人。本刊是中华人民共和国教育部主管的国家级综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学肝胆肠外科研究中心主办, 中南大学湘雅医院承办。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在 3000 字以内; 病例报告类论文字数控制在 800 字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件 2 个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志 2 本。

投 稿 细 则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词 3~5 个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小 5 cm × 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用 10 条以上, 以近 5 年文献为主。引用期刊的格式为: 作者. 文题. 刊名, 年, 卷(期): 起止页码; 引用书籍的格式为: 著者. 书名. 版次. 出版地: 出版社, 年份: 起止页码; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过 3 名者, 则在 3 名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5. 英文格式: SZEMAN B, NAGY G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil, 2012, 153(9): 323-329.
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明, 并注明综述人、审校人字样(参考文献 35 条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 论著、临床论著、新进展研究需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500 个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863 计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。