

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.11.010
文章编号: 1005-8982 (2022) 11-0057-05

实验研究·论著

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征对大鼠海马神经细胞 线粒体自噬相关蛋白表达的影响*

卢亚凤, 殷梅

(昆明医科大学第二附属医院 神经内科, 云南 昆明 650101)

摘要: 目的 观察阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAS)大鼠海马细胞线粒体自噬相关蛋白的表达。**方法** 将24只成年雄性SD大鼠随机分为对照组和实验组。实验组进行OSAS模型复制,复制成功后继续饲养,按饲养时长分为2周组、4周组和6周组;对照组无特殊处理。每组6只。Western blotting检测大鼠海马细胞线粒体自噬相关蛋白LC3(LC3 II/LC3 I)、p62、PINK1及Parkin蛋白相对表达量;用透射电子显微镜观察其线粒体的变化。

结果 实验组大鼠模型复制前后最低血氧饱和度和平均血氧饱和度的比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),即OSAS模型复制成功。与对照组比较,2周组、4周组和6周组大鼠海马神经细胞LC3、LC3 II/LC3 I、PINK1及Parkin蛋白相对表达量均高于对照组,p62蛋白相对表达量低于对照组($P < 0.05$);进一步两两比较,4周组LC3、LC3 II/LC3 I、PINK1及Parkin蛋白相对表达量均高于2周组,p62蛋白相对表达量低于2周组($P < 0.05$);6周组LC3、LC3 II/LC3 I、PINK1及Parkin蛋白相对表达量均高于4周组,p62蛋白相对表达量低于4周组($P < 0.05$)。透射电镜观察,与对照组比较,2周组、4周组和6周组大鼠海马区可见被双层或多层磷脂双分子层包裹的线粒体自噬体。**结论** OSAS可致大鼠海马神经细胞发生线粒体自噬,其自噬程度随饲养时间延长而加重。

关键词: 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征;线粒体自噬;海马神经元

中图分类号: R742;R741.02

文献标识码: A

Effect of obstructive sleep apnea syndrome on expression of nerve cell mitophagy-related protein in hippocampus of rats*

Ya-feng Lu, Mei Yin

(Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China)

Abstract: Objective To observe the expression of mitophagy-related proteins in hippocampal CA1 neurons of rats with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). **Methods** Twenty-four adult male SD rats were randomly divided into control group and experimental group. OSAS model was prepared for rats in experimental group. After successful model construction, the rats were divided into 2-week group, 4-week group, and 6-week group, according to the length of continuous feeding. The rats in control group were not modeled and only fed under normal conditions. 6 rats were divided into each group. The expression of mitophagy-related proteins LC3 (LC3 II/LC3 I), p62, PINK1, and Parkin in the hippocampus of rats in each group was detected by Western blot. The changes of mitochondria in the hippocampus of rats were observed by transmission electron microscopy. **Results** The oxyhemoglobin saturation of rats in the experimental group after model establishment was lower than that before model establishment, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The OSAS model was made

收稿日期: 2021-12-06

* 基金项目: 云南省卫生科技计划项目(No. 2017NS289)

[通信作者] 殷梅, E-mail: yinmeisl@sina.com

successfully. The expression of LC3 (LC3 II/LC3 I), PINK1, and Parkin protein in the hippocampus in the 2-week group, 4-week group, and 6-week group that was higher than that in the control group. The expression of p62 was lower than that in the control group. And the rats in the 4-week group was higher than that in the 2-week group, and the rats in the 6-week group was higher than that in the 4-week group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). With the extension of feeding time, the expression of LC3 (LC3 II/LC3 I), PINK1, and Parkin protein increased, and the expression of p62 showed a trend of decreasing, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed that mitochondrial autophagosome encapsulated by bilayer or multilayer phospholipid bilayers were observed in the hippocampus of rats in the 2-week, 4-week, and 6-week groups compared with the control group. **Conclusions** OSAS can induce mitophagy in rat hippocampal neurons, and the degree of autophagy increases with the prolongation of continuous feeding time.

Keywords: sleep apnea, obstructive; mitophagy; hippocampal neuron

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea syndrome, OSAS) 是一种睡眠呼吸相关性疾病, 可导致全身多系统损伤, 特别是认知损害。有文献^[1]综述了中国、美国、西班牙、印度、韩国、日本及瑞典在 1993 年—2013 年的 11 项基于人口的 OSAS 患病率的调查发现, 男性 OSAS 患病率为 22%, 女性为 17%, 且患病率随时间延长而升高。有研究^[2]表明, 合并 OSAS 脑卒中患者的认知障碍更严重。OSAS 患者存在轻度认知障碍已被明确肯定^[3], 但其具体机制未明。OSAS 治疗方法主要为持续性正压通气, 能有效改善认知障碍^[4], 但要求患者有较高的依从性, 其他治疗手段及疗效有限。因此, OSAS 致认知障碍的研究任重而道远。另一方面, 早在 2005 年, LEMASTERS 等^[5]提出, 缺氧、饥饿、能量匮乏等刺激能诱导细胞产生线粒体自噬。有研究^[6]也提出, 一定程度的缺氧能诱发细胞产生线粒体自噬异常。慢性间歇性缺氧是 OSAS 主要的病理生理机制^[7], 而海马对缺氧的敏感性高^[8]。本研究拟检测 OSAS 模型大鼠海马神经细胞的线粒体变化。其中, LC3 及 LC3 II/LC3 I 反映了细胞自噬小体的数量及线粒体自噬活性, 而 p62 蛋白含量与其自噬活性成反比^[9-10]; PINK1-Parkin 途径是线粒体自噬过程中最主要的分子机制之一^[11-12], 也是线粒体质量控制途径^[13-14]。目前国内外关于线粒体自噬与 OSAS 的相关性研究较少。本研究拟通过检测上述相关蛋白的表达, 探讨线粒体自噬在 OSAS 模型大鼠海马神经细胞中的变化, 可能为研究 OSAS 导致的认知障碍开辟新的方向。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂和仪器

成年雄性 SD 大鼠 24 只, 体重 180 ~ 230 g/只, 购自昆明医科大学实验动物学部 [生产许可证: SCXK (滇) K2015-0002]。LC3、p62、PINK1、Parkin 抗体及 β -actin 抗体均购自美国 CST 公司, 透明质酸钠凝胶购自上海其胜生物制剂公司, RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (6X) 均购自广州碧云天公司, 蛋白酶抑制剂 cocktail、Phostop 磷酸化蛋白酶抑制剂购自罗氏公司, PVDF 膜 (0.22 μm 及 0.45 μm)、ECL 显色液购自密理博 (上海) 贸易有限公司, 2.5% 戊二醛、乙醇、醋酸双氧铀硝酸铅、Epon812 环氧树脂均购自西陇化工。多参数神经监护仪购自上海诺诚医疗器械公司, 光学显微镜、JEM-1011 TEM 透射电子显微镜购自日本 JEOL 公司。

1.2 模型复制

将 24 只 SD 大鼠随机分为对照组 (6 只) 和实验组 (18 只)。实验组复制 OSAS 模型, 对照组无特殊处理。

1.2.1 OSAS 大鼠模型复制 在 YU 等^[15]学者的研究基础上, 参照周赵德等^[16]的方法进行模型复制: 模型复制前, 用多参数神经监护仪监测大鼠的血氧饱和度, 然后用 10% 水合氯醛腹腔麻醉后, 于大鼠舌根、咽腭弓、舌腭弓处, 多点注射透明质酸钠凝胶, 3 mL/只。注射完成后将大鼠按组别分笼饲养于 SPF 实验动物房, 实验前适应性喂养 1 周, 每日光照 12 h, 室内温度 20 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$, 颗粒饲料自由饮食, 每日更换垫料 1 次, 保持饲养环境卫生。

1.2.2 模型复制成功标准 正常大鼠活动正常,反应灵敏,警觉性高,进食正常;模型复制成功后的大鼠反应慵懒,警觉性差,进食减少,偶有呼吸节律不规则等。实验组大鼠观察4周后再次进行血氧饱和度的监测,比较模型复制前后的最低血氧饱和度及平均血氧饱和度,如果差异有统计学意义,可判定模型复制成功。

1.2.3 实验取材 实验组大鼠模型复制成功后分别于2、4、6周脱颈处死,即为2周组、4周组和6周组,每组6只;对照组直接脱颈处死。酒精消毒,暴露并剔除颅骨取脑,在冰面上快速分离出海马组织,一半置于EP管中放入-80℃冰箱冷冻保存备Western blotting检测,一半置于2.5%戊二醛中避光后放入4℃冰箱中保存备行透射电子显微镜观察。

1.3 Western blotting 检测大鼠海马神经细胞 LC3、LC3 II/LC3 I、p62、PINK1 及 Parkin 的蛋白相对表达量

取大鼠海马组织,每100 mg组织中加入500 μL的RIPA裂解液(含50 μL蛋白酶抑制剂),用无菌眼科剪剪碎后,冰浴环境下,用超声细胞破碎仪匀浆20 s,冰浴上静置裂解20 min。4℃下,12 000 r/min离心10 min,收集上清液。用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定浓度,然后灌胶与上样,进行SDS-PAGE电泳,用湿转模法转膜;再将PVDF膜置于5%的牛血清白蛋白中,室温(20~30℃)封闭1 h,于脱色摇床上,TBST漂洗3次,每次5 min,尽量吸干BSA液,加入一抗5 mL,装入杂交袋中,将剪好的PVDF膜置于其中,捆绑于静音混合仪上,放置4℃冰箱中过夜;去除一抗,加入TBST缓冲液洗膜3次,每次10 min;加入酶标二抗,室温孵育2 h;洗膜后进行ECL显色。采集图像,用Image J软件测定海马神经细胞LC3、LC3 II/LC3 I、p62、PINK1及Parkin蛋白相对表达量。 β -actin为内参。

1.4 透射电子显微镜观察

取2.5%戊二醛4℃固定的海马组织,用PBS缓冲液冲洗3次,每次10 min;用钨酸固定后进行乙醇系列梯度脱水,即用30%、50%、70%、90%、100%浓度的乙醇脱水,每次10 min,其中用100%的酒精进行2次脱水;再用Epon812环氧树脂包埋,分别在37℃、45℃、65℃的温箱固化,每级温度固化24 h;然后用UltracutE超薄切片机制片,再用醋

酸双氧铀硝酸铅染色后上机测试;最后用JEM-1011 TEM透射电子显微镜观察并采集图像。

1.5 统计学方法

数据分析采用SPSS 24.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组比较用 t 检验,多组比较采用方差分析,进一步两两比较用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OSAS对大鼠血氧饱和度的影响

实验组大鼠模型复制前后最低血氧饱和度和平均血氧饱和度比较,采用配对 t 检验,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。说明OSAS大鼠模型复制成功。

表1 实验组大鼠模型复制前后最低血氧饱和度和平均血氧饱和度比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

时间	最低血氧饱和度	平均血氧饱和度
模型复制前	87.1 \pm 2.2	94.9 \pm 1.6
模型复制后	75.2 \pm 1.7	84.8 \pm 2.3
t 值	19.242	19.116
P 值	0.000	0.000

2.2 OSAS对大鼠海马神经细胞线粒体自噬相关蛋白表达的影响

对照组、2周组、4周组和6周组大鼠的海马神经细胞LC3、LC3 II/LC3 I、p62、PINK1及Parkin蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较,2周组、4周组和6周组大鼠的海马神经细胞LC3、LC3 II/LC3 I、PINK1及Parkin蛋白相对表达量均高于对照组($P < 0.05$),p62蛋白相对表达量低于对照组($P < 0.05$);4周组LC3、LC3 II/LC3 I、PINK1及Parkin蛋白相对表达量高于2周组($P < 0.05$),p62表达均低于2周组($P < 0.05$);6周组LC3、LC3 II/LC3 I、PINK1及Parkin蛋白相对表达量高于4周组($P < 0.05$),p62表达低于4周组($P < 0.05$)。见表2和图1。

2.3 OSAS对大鼠海马神经细胞线粒体的影响

与对照组比较,2周组、4周组和6周组大鼠海马区可见被双层或多层磷脂双分子层包裹的线粒体自噬体(见图2及图中箭头所指)。

表 2 4 组大鼠海马神经细胞线粒体自噬相关蛋白的相对表达量比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	LC3	LC3 II / LC3 I	p62	PINK1	Parkin
对照组	0.764 ± 0.030	0.713 ± 0.087	0.997 ± 0.075	0.645 ± 0.124	0.623 ± 0.052
2周组	0.912 ± 0.062 ^①	0.931 ± 0.066 ^①	0.859 ± 0.024 ^①	0.859 ± 0.031 ^①	0.802 ± 0.072 ^①
4周组	1.056 ± 0.067 ^{①②}	1.117 ± 0.025 ^{①②}	0.712 ± 0.041 ^{①②}	1.043 ± 0.102 ^{①②}	0.949 ± 0.062 ^{①②}
6周组	1.193 ± 0.056 ^{①③}	1.343 ± 0.182 ^{①③}	0.500 ± 0.051 ^{①③}	1.251 ± 0.054 ^{①③}	1.121 ± 0.135 ^{①③}
F 值	15.502	10.044	60.305	24.201	8.440
P 值	0.004	0.012	0.000	0.001	0.018

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与2周组比较, P<0.05; ③与4周组比较, P<0.05。

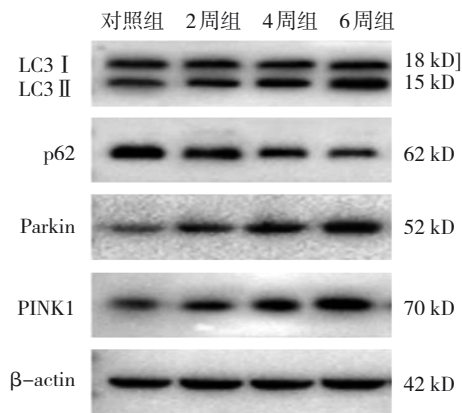


图 1 各组大鼠海马神经细胞线粒体自噬相关蛋白的表达

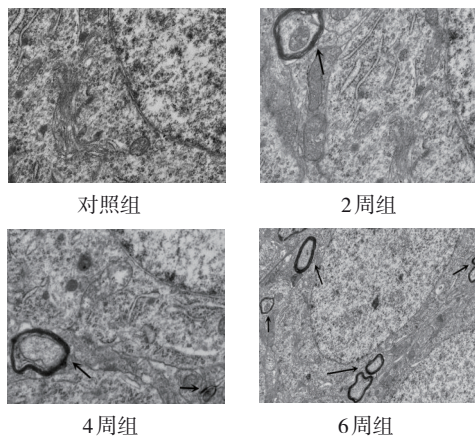


图 2 各组大鼠海马神经细胞线粒体透射电镜图 (× 20 000)

3 讨论

慢性间歇性缺氧可致大鼠海马神经细胞受损, 破坏海马结构^[17], 而海马在机体情绪和认知中发挥重要作用^[18]。本课题组前期研究^[16]表明, 咽腔注射透明质酸钠凝胶的方法可复制 OSAS 大鼠模型, 且 OSAS 可致大鼠空间记忆力损害, 饲养时间越长受损程度越重。可见, OSAS 对认知功能造成的影响不容

忽视。本研究从 OSAS 最主要的病理机制——慢性间歇性缺氧出发, 运用同样的方法复制 OSAS 大鼠模型, 结果显示, 模型复制后的 OSAS 大鼠反应迟钝, 警觉性较差, 且血氧饱和度低于对照组, 说明模型复制成功。

另一方面, 线粒体自噬, 俗称“自己吃自己”, 能通过自噬迅速清除自身功能失调线粒体和已损坏的细胞器^[19]。在人体内, 衰老、局部活性氧的积累、暴露于毒素、缺氧等条件下均可发生线粒体损伤^[14]; 本研究在电镜下观察到 OSAS 大鼠海马细胞被双层或多层磷脂双分子层包裹的线粒体自噬体, 进一步检测其自噬相关蛋白的表达, 结果显示, 与对照组比较, 2 周组、4 周组、6 周组 LC3、LC3 II / LC3 I、PINK1 及 Parkin 蛋白表达均升高, p62 表达均下降, 说明模型复制后继续饲养时间越长, OSAS 大鼠线粒体自噬相关蛋白 LC3、LC3 II / LC3 I、PINK1 及 Parkin 的表达越高, p62 蛋白表达越低, OSAS 引起细胞自噬活性增加, 自噬体生成增多, 这和电镜下观察到的自噬小体增多的结果一致, 证实了 OSAS 引起大鼠海马神经细胞出现线粒体自噬, 这也与缺氧引起细胞线粒体自噬存在一致性。

一定程度的缺氧能导致线粒体产生大量的活性氧^[20], 而活性氧的过量积累会破坏细胞结构, 引起多脏器细胞的损伤^[21], 而神经细胞突触部分的能量需求来源于线粒体网^[22-23], 这对神经元的影响较为显著。并且, 线粒体自噬异常(线粒体过度自噬或缺失), 均会损伤神经细胞, 导致神经细胞的凋亡, 最终损害中枢神经系统^[24]。在本研究中, 模型复制后继续饲养时间越长, OSAS 大鼠线粒体自噬相关蛋白 LC3、LC3 II / LC3 I、PINK1 及 Parkin 的表达越高, p62 蛋白表达越低, 表明其线粒体自噬程度随饲养时间延长而加重。这不排除随着模型复制后时间的延

长,可能在线粒体的过度自噬,这种自噬异常有可能损伤神经系统。

线粒体自噬也被称为自噬-溶酶体途径,自噬体的明显增多可能是过度自噬,也可能是损害了自噬-溶酶体途径^[25],了解线粒体自噬过程中具体的分子机制及其在神经元动态平衡中的具体影响至关重要^[14]。而本研究不足之处在于未能检测其他自噬途径及相关蛋白,但不可否认的是,本研究也为进一步研究线粒体自噬与 OSAS 大鼠海马受损的相关性开辟了新的方向。

参 考 文 献 :

- [1] FRANKLIN K A, LINDBERG E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population-a review on the epidemiology of sleep apnea[J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(8): 1311-1322.
- [2] MCKAY M P. Fatal consequences: obstructive sleep apnea in a train engineer[J]. *Ann Fam Med*, 2015, 13(6): 583-586.
- [3] MU L, PENG L P, ZHANG Z J, et al. Memory and executive screening for the detection of cognitive impairment in obstructive sleep apnea[J]. *Am J Med Sci*, 2017, 354(4): 399-407.
- [4] RICHARDS K C, GOONERATNE N, DICICCO B, et al. CPAP adherence may slow 1-year cognitive decline in older adults with mild cognitive impairment and apnea[J]. *J Am Geriatr Soc*, 2019, 67(3): 558-564.
- [5] LEMASTERS J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging[J]. *Rejuvenation Res*, 2005, 8(1): 3-5.
- [6] ANZELL A R, MAIZY R, PRZYKLENK K, et al. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2547-2564.
- [7] LABARCA G, GOWER J, LAMPERTI L, et al. Chronic intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea: a narrative review from pathophysiological pathways to a precision clinical approach[J]. *Sleep Breath*, 2020, 24(2): 751-760.
- [8] QAID E, ZAKARIA R, SULAIMAN S F, et al. Insight into potential mechanisms of hypobaric hypoxia-induced learning and memory deficit - lessons from rat studies[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2017, 36(12): 1315-1325.
- [9] SPRINGER M Z, MACLEOD K F. In brief: mitophagy: mechanisms and role in human disease[J]. *J Pathol*, 2016, 240(3): 253-255.
- [10] KIRKIN V. History of the selective autophagy research: how did it begin and where does it stand today[J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(1): 3-27.
- [11] 梁丹阳, 戴汉川. PINK1/Parkin 通路在线粒体自噬氧化损伤中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(1): 116-123.
- [12] 黄健, 林冬静, 田洪艳, 等. Pink1/Parkin 介导线粒体融合发生线粒体自噬的研究进展[J]. *解剖学杂志*, 2019, 42(1): 77-80.
- [13] WEI L M, WANG J F, CHEN A J, et al. Involvement of PINK1/parkin-mediated mitophagy in ZnO nanoparticle-induced toxicity in BV-2 cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 1891-1903.
- [14] EVANS C S, HOLZBAUR E L F. Quality control in neurons: mitophagy and other selective autophagy mechanisms[J]. *J Mol Biol*, 2020, 432(1): 240-260.
- [15] YU M S, JUNG N R, CHOI K H, et al. An animal model of obstructive sleep apnea in rabbit[J]. *Laryngoscope*, 2014, 124(3): 789-796.
- [16] 周赵德, 容伟, 李春艳, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征致大鼠认知障碍及其机制研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2019, 21(9): 976-980.
- [17] GAO X L, WU S J, DONG Y T, et al. Role of the endogenous cannabinoid receptor 1 in brain injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats[J]. *Int J Neurosci*, 2018, 128(9): 797-804.
- [18] LAVIE L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia-revisited-the bad ugly and good: implications to the heart and brain[J]. *Sleep Med Rev*, 2015, 20: 27-45.
- [19] 欧阳梦琪, 王庆松. 线粒体内质网结构偶联在认知障碍相关神经系统疾病中的作用及研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2019, 46(2): 190-194.
- [20] 冯茜茜, 刘素晓, 王小晓, 等. 线粒体介导产生的活性氧在血管紧张素 II 诱导的肾脏损害中的作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(2): 13-18.
- [21] LIOCHEV S I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 1-4.
- [22] MISGELD T, SCHWARZ T L. Mitostasis in neurons: maintaining mitochondria in an extended cellular architecture[J]. *Neuron*, 2017, 96(3): 651-666.
- [23] 刘慧, 张自弘, 鲍秀琦, 等. 线粒体动力学和线粒体自噬的分子机制及其在神经退行性疾病中的作用[J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(5): 337-341.
- [24] BELLOU V, BELBASIS L, TZOULAKI I, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: an umbrella review of meta-analyses[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016, 23: 1-9.
- [25] BOWLING J L, SKOLFIELD M C, RILEY W A, et al. Temporal integration of mitochondrial stress signals by the PINK1: parkin pathway[J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2019, 20(1): 33.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 卢亚凤, 殷梅. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征对大鼠海马神经细胞线粒体自噬相关蛋白表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(11): 57-61.

Cite this article as: LU Y F, YIN M. Effect of obstructive sleep apnea syndrome on expression of nerve cell mitophagy-related protein in hippocampus of rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(11): 57-61.