

• 基础研究 •

实验性阻塞型睡眠呼吸暂停综合征小型猪的血浆同型半胱氨酸水平

张文莉 王士雯 赵玉生 高磊 徐斌 刘谟焯 高伟 李洪 朱庆磊

【摘要】 目的 利用动物模型观察实验性阻塞型睡眠呼吸暂停综合征小型猪的血浆同型半胱氨酸(Hcy)水平,以探讨睡眠呼吸暂停致动脉粥样硬化的可能机制。方法 中国小型猪 16 头,分为阻塞型睡眠呼吸暂停组(OSA组)和对照组,每组 8 头。OSA组用凝胶注射法制作动物模型。分别于制作模型前及 12 周后取实验动物静脉血检测血浆 Hcy、叶酸及维生素 B₁₂ 水平。结果 (1)造模后,OSA组 Hcy 水平明显升高,前后分别为(8.94±2.43)和(12.25±1.44)μmol/L,两者相比差异有统计学意义($P \leq 0.05$),对照组 Hcy 水平无明显变化。造模后 OSA组与对照组 Hcy 值相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。(2)两组动物叶酸及维生素 B₁₂ 水平实验后与实验前相比无明显变化。结论 实验性 OSA 使机体血浆中 Hcy 水平异常升高,促进机体动脉粥样硬化的发生和发展。

【关键词】 睡眠呼吸暂停,阻塞型;动脉粥样硬化;高半胱氨酸;模型,动物

Plasma homocysteine levels in miniature pigs with experimental obstructive sleep apnea syndrome

ZHANG Wenli, WANG Shiwen, ZHAO Yusheng, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To explore the possible mechanism of sleep apnea in causing atherosclerosis through observing plasma homocysteine levels in the animal models with experimental obstructive sleep apnea syndrome.

Methods Sixteen Chinese miniature pigs were divided into obstructive sleep apnea (OSA) group and control group, with 8 pigs in each group. Animal models were made by gel injection method in OSA group. Before injection and 12 weeks after injection, venous blood was obtained from experimental animals to measure homocysteine (Hcy), folic acid (Fol) and vitamin B₁₂ (VB₁₂). **Results** (1) After gel injection, the level of Hcy was obviously elevated in OSA group, increasing from(8.94±2.43)μmol/L to(12.25±1.44)μmol/L. Significant difference existed in the Hcy level between before and after gel injection ($P < 0.05$). No significant change in the level of Hcy was found in control group. There was significant difference in the Hcy level between OSA and control groups ($P < 0.05$). (2) In both groups, there were no significant changes in the levels of Fol and VB₁₂ before and after gel injection. **Conclusion** Experimental obstructive sleep apnea can increase the level of plasma homocysteine, which results in endothelial injury and dysfunction, and promotes the initiation and development of atherosclerosis.

【Key words】 sleep apnea, obstructive; atherosclerosis; homocysteine; model, animal

一些临床研究表明睡眠呼吸暂停与动脉粥样硬化的发生密切相关^[1,2],但其发病机制目前还不清楚。近年来对同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的研究发现,Hcy在动脉粥样硬化的发生发展过程中起到了非常重要的作用^[3],血浆总 Hcy 水平的轻度升高与早期冠状动脉疾病明显相关^[4],一项大规模的研究提示,高 Hcy 血症与高脂血症及吸烟同样是血管性疾病的独立危险因素^[5]。那么,Hcy在睡眠

呼吸暂停致动脉粥样硬化的关系中又扮演了一个怎样的角色呢?在此方面国际上尚无统一发现,一项研究表明 Hcy 水平在睡眠呼吸暂停综合征合并心血管疾病组及睡眠呼吸暂停综合征不合并心血管疾病组中是不同的^[6],另一项研究却认为 Hcy 并不是一个很好的预测睡眠呼吸暂停综合征患者发生动脉粥样硬化危险的指标^[7]。这些研究都是基于人的研究,可能会有无法去除的混淆因素。作者利用成功建立的中国小型猪阻塞型睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea, OSA)模型^[8],研究了该模型动物的 Hcy 变化,在动物实验基础上从 Hcy 的角度探讨睡眠呼吸暂停与动脉粥样硬化相互关系的发病机制。

收稿日期:2006-06-05

基金项目:军队“十五”重点资助项目(02Z009)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:张文莉,女,1969年6月生,内蒙古呼和浩特人,医学博士,副主任医师。E-mail: zhangela@263.net

1 材料和方法

1.1 动物与分组 中国小型猪 16 头,购自北京农业大学,雄性,平均体重(20.7±2.69)kg。动物购进后单笼饲养并编号,分为 OSA 组及对照组,每组 8 头,基础饲料(由北京农业大学提供)每只动物按 30g/(kg·d)分上、下午两次给予,自由饮水,根据体重变化调整饲料量。3 个月后,两组动物的平均体重分别为(34.26±2.32)和(33.81±2.04)kg,组间相比无显著性差异。

1.2 仪器与器械 多导睡眠仪(Alice 3,美国);荧光免疫偏振仪(Abbott IMx™ Homocysteine Assay,德国)、放射 γ 测量仪(SN-695B,上海);全自动生化分析仪(Hitach 75,日本);低温高速离心机(BECKMAN CS-15R,美国)。

1.3 试剂 奥美定(医用聚丙烯酰胺水凝胶,吉林省富华医用高分子材料有限公司,国药管械准字 2000 第 367183 号,生产批号:2001070103);叶酸、维生素 B₁₂ 放免试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免研究所)。

1.4 阻塞型睡眠呼吸暂停模型的制作 实验动物手术当天早晨禁食、禁水,测量体重,麻醉采用戊巴比妥钠 20mg/kg 耳静脉注射。麻醉后动物呈仰卧位,四肢固定。连接多导睡眠仪,测定动物的脑电图、口鼻气流、鼾声、胸式呼吸、腹式呼吸及血氧饱和度等指标。采用内部注射法^[8],将 5ml 奥美定稀释后混匀,用金属注射器将其注射入动物双侧咽腭弓及舌根部,术中密切观察实验动物的状态,防止窒息。

1.5 多导睡眠图检查 手术前用多导睡眠仪检测脑电图、口鼻气流、鼾声、胸式呼吸、腹式呼吸、血氧饱和度,术后再监测 2h,醒后送回笼中。1 周后复查多导睡眠图,检测前肌注安定 2ml/kg,检测指标同

上,监测 2h 后送回笼中。鉴于 OSA 的发病特点,一旦机体出现呼吸暂停,如果不加以有效的干预,症状及临床表现将不可能自行减轻,故本研究未在 12 周时重复行多导睡眠图检查。

1.6 血浆 Hcy 水平的测定 分别于制作模型前及 12 周后清晨空腹取实验动物静脉血 2ml 于预冷的 EDTA 抗凝管内,置于冰块中,在 2h 内分离血浆,送解放军总医院生化科用荧光免疫偏振仪测定。

1.7 叶酸、维生素 B₁₂ 水平的测定 取血浆方法同上,送解放军总医院放免中心以平衡法测定。

1.8 统计方法 计量资料用均数±标准差表示,用配对 t 检验对两组资料均数的比较进行统计处理。全部统计分析用 SPSS10.0 for Windows 统计软件包进行,以 P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多导睡眠图结果 术前 OSA 组与对照组多导睡眠图指标均在正常范围,两组呼吸暂停时间、呼吸暂停指数(apnea-hypopnea index,AHI)及动脉血氧饱和度相比无差异。手术中实验猪逐渐出现鼾声,手术结束后动物出现呼吸暂停或低通气及血氧饱和度下降,呼吸暂停时间为(12.33±3.04)s,AHI 为(14.79±3.18),血氧饱和度为(77.24±2.12)%。

1 周后复查上述指标,呼吸暂停时间(53.94±5.59)s,AHI(44.44±5.94)均较手术当天明显增加,血氧饱和度(68.58±4.34)%明显下降(P<0.05,表 1)。

2.2 两组动物实验前后同型 Hcy 及叶酸、维生素 B₁₂ 水平 实验前两组 Hcy、叶酸及维生素 B₁₂ 值无差别。表 2 表明实验后 OSA 组 Hcy 水平(12.25±1.44) μmol/L 较实验前(8.94±2.43) μmol/L 升高,与实验前相比有显著性差异;对照组 Hcy 水平前后相比无明显变化,分别为(8.13±2.75)和(9.41±

表 1 实验动物的睡眠呼吸情况

参数	术前	术后即刻	t 值	术后 1 周	t 值
暂停时间(s)	3.63±0.63	12.33±3.04*	-10.107	53.94±5.59 [#]	-42.977
AHI	1.42±0.45	14.79±3.18*	-10.458	44.44±5.94 [#]	-9.795
动脉血氧饱和度(%)	94.26±1.21	77.24±2.12*	49.134	68.58±4.34 [#]	10.485

注:术后即刻与术前相比,*P<0.05;术后 1 周与术后即刻相比,[#]P<0.05

表 2 两组动物实验前后 Hcy、叶酸及维生素 B₁₂ 情况

组别	Hcy(μmol/L)		叶酸(μg/L)		维生素 B ₁₂ (ng/L)	
	后	前	后	前	后	前
OSA	8.94±2.43	12.25±1.44* [#]	12.57±1.70	13.24±1.73	741.72±22.78	748.50±36.29
对照组	8.13±2.75	9.41±1.30	13.37±1.55	13.79±1.51	739.82±31.67	740.68±26.28

注:与实验前相比,*P<0.05;实验后与对照组相比,[#]P<0.05

1.30) $\mu\text{mol/L}$; 实验后 OSA 组 Hcy 水平(12.25 \pm 1.44) $\mu\text{mol/L}$ 与对照组 Hcy 水平(9.41 \pm 1.30) $\mu\text{mol/L}$ 相比有显著性差异($P < 0.05$)。两组动物叶酸及维生素 B₁₂ 水平实验后与实验前相比无明显变化。

3 讨论

本研究发现 OSA 综合征小型猪组的 Hcy 水平较对照组明显升高,且这种升高与叶酸与维生素 B₁₂ 的代谢无关,因为实验前后叶酸与维生素 B₁₂ 的水平没有变化。

Hcy 是一种含硫的氨基酸,轻度和慢性的 Hcy 水平升高所致内皮损伤及功能失调是血管栓塞性疾病发生和发展的主要机制。作者基于同一动物模型所做的研究证实,实验性阻塞型睡眠呼吸暂停可伴血管内皮受损。功能失调,Hcy 即是其中重要的介质之一。

Hcy 对血管内皮功能影响的机制包括两个方面:(1)氧化应激反应: Hcy 是一种反应性的分子,它在过氧化的过程中被自动氧化,并且 Hcy 对谷胱甘肽过氧化酶的活性有特别的抑制作用,导致过氧化氢的进一步增多^[3]。生理状态下,内皮细胞通过释放一氧化氮(NO),形成 NO 与 Hcy 的复合物来解除 Hcy 的毒性作用,当长期暴露在高浓度的 Hcy 中,内皮受到损伤时,NO 的释放受到限制,因此它对内皮的保护作用逐渐减少,使动脉粥样硬化成为可能。(2)NO 生物活性的丧失^[10]: Hcy 通过减少 NO 的合成降低了 NO 的生物活性,由于 NO 生成减少,对血小板黏附聚集功能的负反馈调节功能降低,血小板反应性增加,其黏附聚集功能增强。

有研究证实,OSA 综合征患者循环血液中 NO 水平下降,且经有效的持续气道正压(continuous positive airway pressure, CPAP)治疗可以得到逆转^[11]。另外,OSA 综合征个体血浆中内生的 NO 合成抑制剂——L-精氨酸水平升高,CPAP 治疗可以使其降低^[12],L-精氨酸被认为是一个新的动脉粥样硬化标志物。进一步的研究表明 OSA 与内皮功能失调有关^[13],OSA 综合征患者内皮依赖性的血管收缩功能受损,对血管紧张素 II 的血管收缩敏感性提高,对缓激肽的血管舒张反应下降。

OSA 发作时最主要的特征是睡眠中断发生的低氧,这种低氧与持续性低氧是不同的,它表现为反复发生的低氧/复氧的过程,与心肌梗死时的缺血/再灌注过程极其类似^[14]。缺血/再灌注被认为

是一种氧化应激,在这个过程中,有大量的氧自由基生成,因而造成了缺血/再灌注损伤。基于此,可以假设 OSA 时发生的低氧/再复氧是另一种类型的氧化应激,它也可产生大量的氧自由基。Schultz^[15] 报告了 OSA 综合征患者中性粒细胞产生的氧自由基增多,经 CPAP 治疗后氧自由基迅速下降。氧自由基的过度产生使 NO 失活,形成有毒的过氧化氢,并进一步阻止了 NO 与 Hcy 的结合,使得 Hcy 在血中的浓度升高,其毒性作用不能够得到解除,结果使 OSA 综合征个体处于发生动脉粥样硬化的危险之中。

由此可见,Hcy 在 OSA 综合征与动脉粥样硬化的关系中起到了很重要的作用,OSA 综合征个体因氧化应激反应增强及 NO 活性降低,使得血浆中 Hcy 水平异常升高,导致内皮受损及功能失调,促进了机体动脉粥样硬化的发生和发展。进一步的研究需确定 OSA 综合征个体 Hcy 水平异常升高的精确机制,以及通常用来治疗高 Hcy 血症的维生素(如叶酸、维生素 B₁₂、维生素 B₆)补充疗法对处于心血管病危险中的 OSA 综合征个体是否有效。

参考文献

- [1] Szabóová E, Tomori Z, Donic V, et al. Sleep apnoea inducing hypoxemia is associated with early signs of carotid atherosclerosis in males. *Respir Physiol Neurobiol*, 2007,155:121-127.
- [2] Saletu M, Nosiska D, Kapfhammer G, et al. Structural and serum surrogate markers of cerebrovascular disease in obstructive sleep apnea (OSA): association of mild OSA with early atherosclerosis. *J Neurol*, 2006, 253:746-752.
- [3] Rasouli ML, Nasir K, Blumenthal RS, et al. Plasma homocysteine predicts progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2005,181:159-165.
- [4] Gupa M, Sharma P, Garg G, et al. Plasma homocysteine; an independent or an interactive risk factor for coronary artery disease. *Clin Chim Acta*, 2005,352:121-125.
- [5] Graham IM, Daly EL, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease; the European concerted action project. *JAMA*,1997,277:1775-1781.
- [6] Kokturk O, Ciftci TU, Mollarecep E, et al. Serum homocysteine levels and cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea syndrome. *Respir Med*, 2006, 100:536-541.

- [7] Kumor M, Rubinsztajn R, Byskiniewicz K, et al. Serum concentration of homocysteine and the risk of atherosclerosis in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Pneumonol Alergol Pol*, 2006, 74:117-121.
- [8] 张文莉, 王士雯, 徐斌, 等. 中国小型猪阻塞型睡眠呼吸暂停模型的建立. *中国比较医学杂志*, 2004, 14: 286-289.
- [9] Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocysteinaemia. *J Clin Invest*, 1996, 98:5-7.
- [10] Upchurch GR, Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocysteine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 1997, 272:17012-17017.
- [11] Ip MSM, Lam B, Chan LY, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162:2166-2171.
- [12] Ohike Y, Kozaki K, Iijima K, et al. Amelioration of vascular endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea syndrome by nasal continuous positive airway pressure—possible involvement of nitric oxide and asymmetric NG, NG-dimethylarginine. *Circ J*, 2005, 69:221-226.
- [13] Itzhaki S, Lavie L, Pillar G, et al. Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea measured by peripheral arterial tone response in the finger to reactive hyperemia. *Sleep*, 2005, 28:594-600.
- [14] Dean RT, Wilcox I. Possible atherogenic effects of hypoxia during obstructive sleep apnea. *Sleep*, 1993, 16: S15-S22.
- [15] Schultz R, Mahmoudi S, Hattar K, et al. Enhanced release of superoxide from polymorphonuclear neutrophils in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162: 566-570.

(上接第 410 页)

的研究中;BNP>5000ng/L,则在出院后的3个月中死亡风险>60%。

在笔者的研究中,发现随着BNP水平的增加,死亡率明显增加,并且在BNP>5000ng/L后,在半年及2年的死亡率明显增加,2年时死亡率>60%,结果同时证明,BNP是影响生存率的一个独立危险因素,不受年龄和LVEF值的影响,其水平与死亡率明确相关,同Ueda和Wallon等^[8,7]的研究相似。

在本研究中,另有一显著的特点是BNP>5000ng/L的患者在近期及远期较其他住院患者死亡率显著升高,考虑其原因:(1)高龄;(2)病情重;(3)病情复杂;大多有多器官功能衰竭,多种疾病并存;(4)终末期患者。

本研究提示,血浆BNP浓度是死亡危险性增加的一个生化指标,BNP是影响患者预后的一个独立危险因素。

参 考 文 献

- [1] Maeda K, Tsutamoto T, Wada A, et al. High levels of plasma brain natriuretic peptide and interleukin-6 after optimized treatment for heart failure are independent risk factors for morbidity and mortality in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36: 1587-1593.
- [2] Nagagawa O, Ogawa Y, Itoh H, et al. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of BNP in cardiocyte hypertrophy: evidence for BNP as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest*, 1995, 96:1280-1287.
- [3] Maeda K, Takayoshi T, Wada A, et al. Plasma brain natriuretic peptide as a biochemical marker of high left ventricular end-diastolic pressure in patients with symptomatic left ventricular dysfunction. *Am Heart J*, 1998, 135:825-832.
- [4] Abraham WT, Lows BD, Ferguson DA, et al. Systemic hemodynamic, neurohormonal, and renal effects of a steady-state infusion of human brain natriuretic peptide in patients with hemodynamically decompensated heart failure. *J Card Fail*, 1998, 4:37-44.
- [5] Kellett J. Prediction of in-hospital mortality by brain natriuretic peptide levels and other independent variables in acutely ill patients with suspected heart disease. *Can J Cardiol*, 2004, 20:686-690.
- [6] Ueda R, Yokouchi M, Suzuki T, et al. Prognostic value of high plasma brain natriuretic peptide concentrations in very elderly persons. *Am J Med*, 2003, 114:266-270.
- [7] Wallen T, Landahl S, Hedner T, et al. Brain natriuretic peptide predicts mortality in the elderly. *Heart*, 1997, 77:264-267.