

## • 基础研究 •

## 实验性阻塞型睡眠呼吸暂停综合征小型猪的氧化应激反应

张文莉 王士雯 朱庆磊 薛桥 刘谟焯 杨洁

**【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氧化应激反应,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(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黄嘌呤氧化酶(XOD)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)。结果 (1)实验后,OSA 组 XOD 水平明显升高,前后分别为(3.71±0.07)U/L 和(4.82±0.08)U/L,两者相比差异有统计学意义,对照组 XOD 水平无明显变化。实验后 OSA 组与对照组 XOD 值相比差异有统计学意义。(2)实验后,OSA 组的 SOD 水平明显降低,前后分别为(142.33±6.82)NU/ml 和(121.21±1.93)NU/ml,两者相比差异有统计学意义;MDA 水平明显升高,前后分别为(3.66±0.47) $\mu$ mol/L 和(5.59±0.75) $\mu$ mol/L,两者相比差异有统计学意义。对照组 SOD 水平及 MDA 水平无明显变化,实验后 OSA 组与对照组二指标相比差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 实验性阻塞型睡眠呼吸暂停使动物机体处于氧化应激状态,产生了大量的氧自由基,增多的氧自由基介导了一系列病理生理反应,促进了动脉粥样硬化的发生和发展。

**【关键词】** 睡眠呼吸暂停,阻塞性;动脉粥样硬化;氧化性应激;模型,动物

## Oxidative stress reaction in miniature pigs with experimental obstructive sleep apnea syndrome

ZHANG Wenli, WANG Shiwen, ZHAO Yusheng, et al

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

**【Abstract】** Objective To explore the possible mechanism of sleep apnea causing atherosclerosis by observe the oxidative stress reaction in the animal models with experimental obstructive sleep apnea syndrome. Methods Sixteen Chinese miniature pigs were equally divided into obstructive sleep apnea (OSA) group and control group. Animal models were made by gel injection method in OSA group. Before surgery and 12 weeks after surgery, venous blood was obtained from experimental animals to measure xanthine oxidase (XOD), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Results (1) After surgery, the level of XOD was obviously elevated in OSA group, increasing from(3.71±0.07) to (4.82±0.08) U/L. Significant difference existed in the XOD level between before and after surgery. No significant change in the level of XOD was found in control group after surgery. There was significant difference in the XOD level between OSA and control groups after surgery. (2) After surgery, the level of SOD depressed from (142.33±6.82) to (121.21±1.93) NU/ml in OSA group. Significant difference existed in the SOD level between before and after surgery. The level of MDA was obviously elevated in OSA group after surgery, increasing from (3.66±0.47) to (5.59±0.75)  $\mu$ mol/L. Significant difference existed in the MDA level between before and after surgery. In control group, there were no significant changes in the levels of SOD and MDA after surgery. Significant differences existed in SOD and MDA between OSA and control groups after surgery( $P<0.05$ ). Conclusion Experimental obstructive sleep apnea can put the animals into oxidative stress state and produce a large amount of oxygen free radicals. Increased oxygen free radicals induce a series of pathophysiological reactions and promote the initiation and development of atherosclerosis.

收稿日期:2008-10-27

基金项目:国家自然科学基金项目(30873412)

基金项目:军队“十五”重点资助项目(02Z009)

作者单位:100853 北京市,中国人民解放军总医院老年心血管病研究所。E-mail: zhangela@263.net

**【Key words】** sleep apnea, obstructive; atherosclerosis; oxidative stress; model, animal

一些临床研究表明睡眠呼吸暂停与动脉粥样硬化密切相关<sup>[1,2]</sup>,但其发病机制却不清楚。近年来随着对氧自由基研究的深入,发现氧化应激反应在动脉粥样硬化的发生发展过程起到了非常重要的作用<sup>[3]</sup>。那么氧化应激反应在睡眠呼吸暂停与动脉粥样硬化的关系中又扮演了一个怎样的角色呢?作者利用中国小型猪阻塞型睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea,OSA)模型<sup>[4]</sup>研究模型动物的氧化应激反应,并推测睡眠呼吸暂停与动脉粥样硬化相互关系的发病机制。

**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。小型猪单笼饲养并编号,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)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。在 3 个月,两组动物的平均体重分别为(34.26±2.32)kg 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 Respirationics 公司);低温高速离心机(BECKMAN CS-15R,美国);紫外分光光度仪(BECKMAN DU-640 型,美国);电热恒温水箱(北京长安科学仪器厂)。

**1.3 试剂** 医用聚丙烯酰胺水凝胶(奥美定,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);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

**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<sup>[4]</sup>,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,检测前肌注地西洋 2ml/kg,检测指标同上,监测 2h 后送回笼中。

**1.6 超氧化物歧化酶的测定** 采用黄嘌呤氧化酶法。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,分离血清 0.1ml,用紫外分光光度仪在 550nm 波长处测定吸光度。

**1.7 丙二醛的测定** 采用硫代巴比妥酸法。血清 0.1ml,取血及分离方法同上,用紫外分光光度仪在 532nm 波长处测定吸光度。

**1.8 黄嘌呤氧化酶的测定** XOD 可催化次黄嘌呤生成黄嘌呤,与此同时产生超阴离子自由基,当有电子受体及显色剂存在的情况下,生成紫红色结合物,根据后者生成量的多少可以推算出 XOD 的活力。血清 0.1ml,取血及分离方法同上,用紫外分光光度仪在 530nm 波长处测定吸光度。

**1.9 统计方法** 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,用配对 *t* 检验进行统计处理。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 组实验猪多导睡眠图正常。手术中实验猪逐渐出现鼾声,手术结束后出现呼吸暂停或低通气及血氧饱和度下降,1 周后复查上述指标,呼吸暂停时间、呼吸暂停指数均较手术当天明显增加,血氧饱和度明显下降(*P* < 0.05,表 1)。

表 1 OSA 组实验猪的睡眠呼吸情况

参数	术前	术后即刻	术后 1 周
暂停时间(s)	3.63±0.89	12.33±4.06*	53.94±6.51*
AHI	1.42±0.58	14.79±3.69*	44.44±6.09*
SaO <sub>2</sub> (%)	94.26±1.21	77.24±2.08*	68.58±4.42*

注: AHI=呼吸暂停指数; SaO<sub>2</sub>=血氧饱和度; 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

**2.2 影像学结果** 手术后 2 周行电子计算机断层扫描, OSA 组猪咽腔内可见到不规则形状环阴影,

咽喉呈明显狭窄状(图1)。



图1 OSA组实验猪咽喉内可见不规则环状阴影, 咽喉明显狭窄(如箭头所示)

2.3 组织学结果 12周后处死OSA组猪取冠状动脉前降支行HE染色,在光镜下观察血管结构的改变。可见冠状动脉前降支动脉粥样硬化的早期表现,既内膜不光滑,内皮细胞脱落,有泡沫细胞形成的脂纹(图2)。

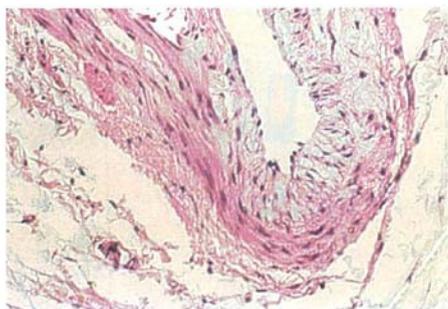


图2 动脉粥样硬化的早期病变——由泡沫细胞聚集形成的脂纹(x200)

2.4 两组动物实验前后黄嘌呤氧化酶活性的变化 结果见表2。实验前两组XOD值无明显差别。实验后,OSA组XOD水平明显升高,与实验前相比有显著性差异,对照组XOD水平无明显变化。实验后OSA组与对照组相比有显著性差异。

2.5 两组动物实验前后超氧化物歧化酶活性和丙

二醛含量的变化 见表2。实验前,两组的SOD活性和MDA含量无差别。实验后,OSA组的SOD水平明显降低,MDA水平明显升高,与实验前相比有显著性差异;对照组SOD水平及MDA水平无明显变化,实验后OSA组与对照组二指标相比有显著性差异。

### 3 讨论

睡眠呼吸暂停发作时最主要的特征是睡眠中间断发生的低氧,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<sup>[5]</sup>。缺血/再灌注被认为是一种氧化应激,在这个过程中,大量的氧自由基生成,因而造成了缺血/再灌注损伤。基于此,可以假设睡眠呼吸暂停时发生的低氧/再复氧是另一种类型的氧化应激,它也可以产生大量的氧自由基。Schultz等<sup>[6]</sup>报道了OSA综合征患者中性粒细胞产生的氧自由基增多,经持续气道正压治疗后氧自由基迅速下降。还有人报道睡眠呼吸暂停患者循环血中一氧化氮(NO)水平下降,经持续气道正压治疗后可以恢复至正常水平<sup>[7]</sup>。这些研究证明了上述假设,但是,增多的氧自由基与睡眠呼吸暂停患者的病理改变之间有何关系还不清楚。Dyugovskaya等<sup>[8]</sup>发现睡眠呼吸暂停患者单核细胞中CD15和CD11c的表达增强,这两个分子与细胞内活性氧的产生相关,而且,黏附分子的表达和活性氧的水平均与单核细胞与内皮细胞之间的黏附性升高有关,重要的是,持续气道正压治疗可以使黏附分子的表达下调并降低活性氧的产生。国内亦有研究表明黏附分子参与了睡眠呼吸暂停综合征的病理生理过程<sup>[9]</sup>。因为黏附分子表达增强与动脉粥样硬化相关,因此笔者有理由推测由睡眠呼吸暂停导致的氧化应激与动脉粥样硬化的发病机制有关。

对于动脉粥样硬化的发病机制,研究者曾提出多个学说,目前多数学者认为,继发于内皮损伤的内皮通透性、黏附性、血液凝固性改变及所释放大量的细胞因子及生长因子将导致动脉粥样硬化的一系列

表2 两组动物XOD、SOD及MDA水平

组别	XOD(U/L)		SOD(NU/ml)		MDA(μmol/L)	
	前	后	前	后	前	后
OSA组	3.71±0.07	4.82±0.08*#	142.33±6.82	121.21±1.93*#	3.66±0.47	5.59±0.75*#
对照组	3.77±0.07	3.85±0.05	139.11±4.91	136.19±4.51	3.79±0.46	3.88±0.51

注:与实验前相比,\*P<0.05;实验后与对照组相比,#P<0.05

连锁反应,其中内皮损伤被认为是重要的始动环节,随着对内皮细胞功能认识的提高,人们更重视“非剥脱性内皮功能性损伤”的意义<sup>[10]</sup>,并发现自由基对内皮细胞有损伤作用。

自由基是氧化应激反应的产物。氧化应激态是指机体内氧化增强剂-抗氧化剂之间的平衡向氧化增强的方向变化,衡量机体氧化应激程度通常可测定氧化作用的产物、抗氧化剂水平及反应过程中相关酶的变化。本实验测定了两组动物的 XOD、MDA 及 SOD 水平,发现实验组的 XOD 及 MDA 水平明显升高,SOD 水平明显降低。XOD、MDA 及 SOD 是用于判断机体氧化应激状态的常用指标<sup>[11]</sup>。

在生物有机体内氧的代谢过程中,黄嘌呤或次黄嘌呤在 XOD 的作用下,可通过将单电子或双电子给予氧的方式而氧化成尿酸,并释放氧自由基<sup>[12]</sup>。XOD 主要存在于毛细血管的内皮细胞内,正常情况下只有 10% 呈氧化型存在,当组织缺氧时由于 ATP 减少,膜泵功能失常,钙离子进入细胞激活依赖于钙离子的蛋白水解酶,使还原型嘌呤酶变为氧化型嘌呤酶。另外,组织缺氧时,ATP 降解为 ADP→AMP→腺苷→次黄嘌呤,当复氧时,XOD 可催化次黄嘌呤生成尿酸,并在此过程中释放大量的氧自由基。本实验中,动物血浆中 XOD 水平升高说明睡眠呼吸暂停所致的反复缺氧/再复氧过程已使机体产生了过多的 XOD,在 XOD 所介导的酶促反应中产生了大量的氧自由基,使有睡眠呼吸暂停的个体处于一种氧化应激的状态,并由此引发一系列的病理性反应。

MDA 是脂质过氧化物(lipid peroxide,LPO)的最终代谢产物,可以反映机体内脂质氧化的程度。增多的 MDA 与低密度脂蛋白(LDL)结合,产生 MDA-LDL,因此血浆中 MDA-LDL 含量增多,MDA-LDL 与天然的 LDL 相比,其理化特性发生改变,有细胞毒性。它还参与泡沫细胞的形成,LDL 有一种受体即所谓“清道夫受体”,直接参与动脉粥样硬化中泡沫细胞的形成<sup>[13]</sup>。MDA-LDL 较天然的 LDL 带负电荷更多,更易与清道夫受体结合;另一方面,MDA-LDL 在细胞中代谢释放的游离胆固醇不易被清除,又进一步使巨噬细胞、内皮细胞及血管平滑肌细胞中的胆固醇酯增加,引起后者在这些细胞中堆积,结果使上述细胞转变为泡沫细胞。MDA-LDL 又抑制巨噬细胞的移动,引起巨噬细胞在内皮下堆积,后者又使 LDL 发生氧化修饰,由此产生恶性循环,形成了动脉粥样硬化的早期病变。

万方数据

MDA-LDL 对内皮细胞的毒性效应实际上是其所含有的 LPO 的作用<sup>[14]</sup>,LPO 致动脉粥样硬化的机制主要有以下几个方面:(1)直接造成内皮细胞生物膜损伤及平滑肌细胞增生、坏死;(2)抑制前列腺素 I<sub>2</sub>(PGI<sub>2</sub>)合成酶,减少 PGI<sub>2</sub> 产生,激活血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)合成酶,增加 TXA<sub>2</sub> 的合成;(3)抑制抗凝血酶 III 的活性,凝血酶的产生增加,促进血凝;(4)降低细胞膜脂质的流动性,抑制膜结合酶的活性;(5)促进血小板凝集;(6)促进氧化型 LDL(Ox-LDL)的生成,Ox-LDL 具有强烈的致动脉粥样硬化作用。

SOD 是生物体内最重要的抗氧化酶,它可以清除超氧化物自由基,防止对机体直接或间接的损伤作用,并且可以调节细胞内的 NO 水平,保护细胞免受损伤,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用。血浆 SOD 水平下降说明 SOD 的合成减少或消耗增加。Fukai 等<sup>[15]</sup>发现 NO 可以调节血管细胞外 SOD 的水平,提高动脉平滑肌细胞 SOD 的表达,当内皮功能损伤,NO 水平下降时,自然会影响到 SOD 的表达,因此降低了机体的抗氧化能力,使氧自由基增多,导致一系列的病理反应,包括动脉粥样硬化。

由上所述,实验性 OSA 综合征动物体内反映其氧化应激状态的指标发生了显著的变化,组织学结果亦显示除其他混淆因素后,实验动物冠状动脉出现了动脉粥样硬化的早期病变,由此笔者认为,睡眠呼吸暂停通过氧化应激反应介导了动脉粥样硬化的发生。推测睡眠呼吸暂停促使冠状动脉粥样硬化发生发展的部分机制如下:(1)睡眠呼吸暂停所致反复的低氧/再氧化过程类似于心肌梗死时的缺血/再灌注,它使机体处于一种氧化应激状态,因此血浆中 XOD 水平升高。(2)在 XOD 介导的酶促反应中产生了大量的氧自由基,氧自由基可以直接损伤内皮细胞。(3)氧自由基增多和内皮功能损伤使机体的抗氧化能力降低,脂质氧化的程度加重,经氧化修饰的 LDL 对机体有一系列的毒性作用,它可以导致内皮细胞的凋亡、促进平滑肌细胞的增生,可以抑制 NO 的合成及直接灭活 NO,同时刺激内皮素的分泌,促使了动脉粥样硬化的发生和发展。其他可能的机制还有 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 平衡的破坏,血浆中同型半胱氨酸水平升高的作用等。笔者在其他研究中将进一步叙述。

总之,氧化应激反应在睡眠呼吸暂停致动脉粥样硬化的形成过程中起到了关键的作用,扮演了重

(下转第 363 页)

- sion. 1997, 30; 1029-1034.
- [12] Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, et al. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension*, 1998, 32; 280-286.
- [13] Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, et al. Uncoupling protein 2, *in vivo* distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem*, 2001, 276; 8705-8712.
- [14] 黄兆琦, 江时森, 吕磊, 等. 解耦联蛋白-2与诱导型一氧化氮合酶在大鼠缺血预适应保护机制中的作用. *医学研究生学报*, 2007, 20; 1159-1162.
- [15] Mills EM, Xu D, Fergusson MM, et al. Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem*, 2002, 277; 27385-27392.
- [16] Bodyak N, Rigor DL, Chen YS, et al. Uncoupling protein 2 modulates cell viability in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293; 829-835.
- [17] Bechmann I, Diano S, Warden CH, et al. Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64; 363-367.

(上接第 358 页)

要的角色,如何阻止或延缓这一过程的发生为今后的研究工作提出了新的问题和思路。

#### 参 考 文 献

- [1] Hayashi M, Fujimoto K, Urushibata K, et al. Nocturnal oxygen desaturation correlates with the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *Chest*, 2003, 124; 936-941.
- [2] Nachtmann A, Stang A, Wang YM, et al. Association of obstructive sleep apnea and stenotic artery disease in ischemic stroke patients. *Atherosclerosis*, 2003, 169; 301-307.
- [3] Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287; R1014-R1030.
- [4] 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.
- [5] Dean RT, Wilcox I. Possible atherogenic effects of hypoxia during obstructive sleep apnea. *Sleep*, 1993, 16; S15-S22.
- [6] 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.
- [7] Ip MSM, Lam B, Chan LY, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162; 2166-2171.
- [8] Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165; 934-939.
- [9] 李延忠, 张万荣, 王廷础, 等. 黏附分子在阻塞型睡眠呼吸暂停低通气综合征全并高血压发病中的作用. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, 27; 511-514.
- [10] Collins P, Fox K. The pathogenesis of atheroma and the rationale for its treatment. *Eur Heart J*, 1992, 13; 560-566.
- [11] 黎建. 氧化应激在周围动脉硬化疾病发生过程中的作用. *中华老年医学杂志*, 2007, 26; 328.
- [12] Mittel CK, Murad F. Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanidine 3, 5-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74; 4360-4364.
- [13] Steinbrecher UP, Zhang H, Loughheed M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 1990, 9; 155-168.
- [14] 周玫, 陈瑗. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化. *中华心血管病杂志*, 1990, 18; 248-252.
- [15] Fukui T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *J Clin Invest*, 2000, 105; 1631-1639.