

• 基础研究 •

睡眠呼吸暂停综合征致高脂饮食老年大鼠动脉粥样硬化的研究

王璋 司良毅

【摘要】 目的 探讨睡眠呼吸暂停综合征对动脉粥样硬化(AS)早期老年大鼠动脉平滑肌细胞增生及细胞间黏附分子(ICAM-1)表达的影响。方法 选取 Wistar 雄性青年大鼠[3月龄,体重(250±30)g]与老年大鼠[20月龄,体重(450±50)g]各24只。各组随机分为对照组、高脂组及缺氧组,每组8只。实验时间12周,实验终点电镜观察胸主动脉内皮平滑肌细胞的特征、免疫细胞化学方法评价 AS 早期大鼠动脉增殖细胞核抗原(PCNA)及 ICAM-1 蛋白表达的改变。结果 (1)高脂组与缺氧组均出现高脂血症。(2)高脂组出现轻度内皮损伤,老年缺氧组内皮病理损伤较高脂组严重,形成典型的 AS 早期病变,包括内皮细胞脱落,平滑肌细胞增殖、迁移,吞噬脂质空泡等。(3)高脂组动脉内膜 PCNA 及 ICAM-1 蛋白表达积分光密度值均显著增加,缺氧组较高脂组血管壁 PCNA 及 ICAM-1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$),老年高脂组及缺氧组较相同条件青年组 PCNA 及 ICAM-1 表达均显著增高 ($P < 0.01$)。结论 睡眠呼吸暂停综合征可加速高脂血症大鼠 AS 早期病变的进程,其机制可能与缺氧诱导的动脉内皮 ICAM-1 蛋白表达增加,促进动脉平滑肌细胞增殖有关,从而可能在 AS 发生发展过程中起重要作用。

【关键词】 动脉粥样硬化;睡眠呼吸暂停综合征;增殖细胞核抗原

Effect of sleep apnea syndrome on atherosclerosis of cholesterol-fed old rat

WANG Zhang, SI Liangyi

Geriatric Department of South west Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】 Objective To investigate effects of sleep apnea syndrome on expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) in a cholesterol-fed rat model of early atherosclerosis. Methods Twenty-four male young Wistar rats[3 months old, (250±30)g]and twenty-four senile Wistar rats [20 months old, (450±50)g] were randomly divided into 3 groups ($n=8$). The first group was fed with normal diet as blank control, the second group was fed with high cholesterol diet as cholesterol-fed control group,the third group was fed with high cholesterol diet and got simulated sleep apnea syndrome by chronic intermittent hypoxia exposure. The thoracic aorta was examined by electron microscopy at the end of experiment. Expression of PCNA and ICAM-1 protein on artery endotheliocyte were detected by immunohistochemistry. Results (1) Rats of both groups 2 and 3 showed hyperlipemia. Statistical analysis showed an obvious difference as compared with blank control group($P < 0.01$). (2)Mild lesion of arterial endothelium was observed in the cholesterol-fed groups. The typical early lesion of atherosclerosis was observed only in the group (3)The changes included significant endothelial exfoliation, proliferation and migration of smooth muscle cells, accumulation of lipid and cholesterol in the cells. 3. The expression of PCNA and ICAM-1 protein in sleep apnea syndrome group was significantly increased as compared with control group ($P < 0.01$). Conclusion Sleep apnea syndrome caused by chronic intermittent hypoxia exposure induces typical thoracic aorta atherosclerosis, vascular ICAM-1 expression and smooth muscle cells proliferation in the cholesterol-fed rats.

【Key words】 atherosclerosis; sleep apnea syndrome; PCNA

收稿日期:2006-12-27

基金项目:中央保健局保健专项资金资助(项目编号:渝 A040)

作者单位:400038 重庆市,第三军医大学西南医院老年病科

作者简介:王璋,男,1974年4月生,四川南充市人,医学硕士,主治医师,讲师。Tel:023-68765233;E-mail:wzhlgr@sohu.com

通讯作者:司良毅,Tel:023-68754150

万方数据

睡眠呼吸暂停综合征(sleep apnea syndrome, SAS)主要病理生理改变是导致低氧血症、高碳酸血症。有研究证实长期反复间歇性缺氧会导致血管平滑肌细胞的增生,而动脉中层平滑肌的肥厚与增生、向内膜移行并吞噬氧化的低密度脂蛋白是动脉粥样

硬化(atherosclerosis, AS)关键的病理基础^[1]。因此,笔者认为SAS的慢性缺氧损伤可能是AS发生发展的重要因素之一。本研究旨在通过建立SAS动物模型,观察间歇性缺氧对动脉内皮细胞的影响,探讨SAS与AS发生的关系及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

健康雄性Wistar 3月龄青年大鼠,体重(250±30)g与20月龄老年大鼠,体重(450±50)g各24只。各组随机分为对照组(普通饮食、不缺氧)、高脂组(高脂饮食、不缺氧)及缺氧组(高脂饮食、间歇性缺氧),每组8只。高脂饮食:在普通大鼠饲料基础上加入2%胆固醇、0.2%丙基硫氧嘧啶、3%猪油。

间歇性缺氧实验:按照文献^[2]所述方法制作模拟SAS间歇性低氧特征的大鼠模型。压缩空气与混合气体(90% N₂+10% O₂)在电磁阀控制下分别以2L/min的流速输入低氧舱,间隔30s,1min 1循环,每天8h,其余时间置大鼠饲养笼,室温、空气、正常摄食、水,累积缺氧时间12周。对照组每日同时置相同规格有机玻璃舱内,空气输入,无缺氧。

1.2 研究方法

(1)血脂检测:实验结束当日,采12h空腹大鼠动脉血,离心分离出血清,采用全自动生化分析仪,检测血胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。(2)电镜标本制作:以pH 7.4PB(含4%多聚甲醛和2.5%戊二醛)左心室插管灌注固定,切取胸主动脉,剪取5mm长度,置同一固定液中继续后固定24h,1%锇酸固定1h,梯度酒精脱水,包埋、超薄切片,Philips TECAI10型透射电镜观察。(3)免疫化学实验:各组实验结束当日取胸主动脉石蜡包埋、每间隔5mm做连续切片,免疫细胞化学链霉菌亲和素-生物素-过氧化酶复合物法检测血管增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen,

PCNA)表达;新鲜胸主动脉冰冻切片,免疫荧光法检测血管壁细胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)蛋白表达,光镜及荧光显微镜观察染色结果,采用Image-pro Plus4.5高清晰彩色病理图像分析系统测定积分光密度值(IOD)。每个标本计数5张切片,以每张切片的PCNA阳性表达IOD表示增生状态,ICAM-1荧光染色IOD表示其蛋白表达强度。

1.3 统计学分析

实验数据采用SPSS10.0软件进行统计分析。统计方法为单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间分析用独立样本t检验,以P<0.05为差异有统计学意义。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 SAS与高脂饮食对血脂的影响

各实验组血脂及组分的变化见表1。单纯高脂饲料饲养的青年、老年大鼠均可形成高脂血症。高脂组与缺氧组空腹血清TG、TC、LDL-C均显著高于同龄对照组(P<0.01),HDL-C较同龄对照组无显著差异(P>0.05)。缺氧组血脂各组分水平较高脂组差异无显著性(P>0.05)。老年组血脂各组分水平平均高于青年组,但无显著差异(P>0.05)。

2.2 透射电镜观察

透射电镜下观察,青年、老年对照组均可见内膜完整平坦,内皮细胞形态正常;高脂组可见内皮细胞肿胀、突向管腔,细胞核电子密度变浅,核增大,基底膜完整。老年高脂组内皮表面部分破溃,内皮下层平滑肌细胞增多,可见向内膜迁移的平滑肌细胞。缺氧组内膜损伤和增生明显:内皮细胞肿胀,部分脱落,并可观察到平滑肌细胞迁移至内皮下,吞噬脂质空泡(图1);中膜可见增生的平滑肌细胞。

2.3 动脉壁PCNA的表达

实验结果显示,PCNA阳性染色部位在胞核,胞核被染成棕黄色颗粒,阳性表达多位于病变血管壁内膜及中膜内层细胞核中。

表1 各组大鼠血脂水平比较($\bar{x} \pm s$;mmol/L)

组别		TC	LDL-C	HDL-C	TG
青年组	对照组	1.65 ± 0.42	1.13 ± 0.31	1.24 ± 0.31	0.87 ± 0.15
	高脂组	8.76 ± 1.46*	7.05 ± 1.12*	1.72 ± 0.42	2.61 ± 0.41*
	缺氧组	10.56 ± 2.31*	9.36 ± 1.86*	1.49 ± 0.17	3.02 ± 0.59*
老年组	对照组	1.76 ± 0.35	1.31 ± 0.42	1.04 ± 0.37	0.95 ± 0.14
	高脂组	11.54 ± 1.85*	9.10 ± 1.67*	1.58 ± 0.34	3.15 ± 0.52*
	缺氧组	12.92 ± 2.89*	10.76 ± 3.16*	1.95 ± 0.35	3.32 ± 0.65*

注:与同龄对照组比较,*P<0.01



图1 老年缺氧组:平滑肌细胞迁移至内皮下,吞噬脂质空泡(透射电镜,×10 000)

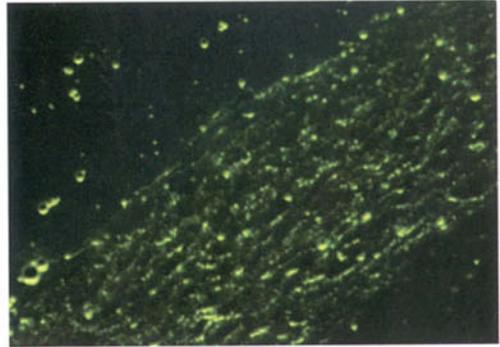


图2 老年高脂组:ICAM-1 蛋白表达较对照组明显增高(×200)

对照组可见 PCNA 较低表达。青年、老年高脂组 PCNA 组织 IOD 较对照组均明显增高,缺氧组 PCNA 表达则更高($P < 0.01$,表 2)。老年高脂组及缺氧组较相同条件青年组 PCNA 表达显著增高($P < 0.01$)。

2.4 动脉壁 ICAM-1 的表达 实验结果显示, ICAM-1 阳性染色切片在荧光显微镜下观察呈亮绿色。阳性表达以内膜及中膜内层为主,外膜仅有少量表达。对照组可见微量 ICAM-1 蛋白表达,青年、老年高脂组 ICAM-1 蛋白表达 IOD 较对照组均明显增高(表 2、图 2),缺氧组 ICAM-1 蛋白表达则更高($P < 0.01$,图 3)。老年高脂组及缺氧组较相同条件青年组 ICAM-1 蛋白表达显著增高($P < 0.01$)。



图3 老年缺氧组:ICAM-1 蛋白显示高表达(×200)

表 2 动脉壁 PCNA 与 ICAM-1 的表达(IOD)

组别	PCNA	ICAM-1
青年组 对照组	0.027±0.011	0.059±0.014
高脂组	0.116±0.029*	0.176±0.031*
缺氧组	0.188±0.038*#	0.275±0.045*#
青年组 对照组	0.039±0.017	0.078±0.021
高脂组	0.198±0.041*△	0.364±0.048*△
缺氧组	0.285±0.032*#△	0.572±0.105*#△

注:与同龄对照组比较,* $P < 0.01$;与高脂组比较,# $P < 0.01$;与青年组比较,△ $P < 0.01$

3 讨论

AS 始发部位是动脉内皮细胞,内皮细胞受损、平滑肌细胞增生与向内膜下迁移是 AS 发生过程中重要的病理改变^[3],血管平滑肌细胞及巨噬细胞吞噬氧化、超氧化脂质形成的“泡沫细胞”是粥样斑块形成的基础。而各种病理因素作用下,多种黏附分子的表达,然后白细胞在黏附分子的作用下与内皮细胞发生粘附,释放一些炎症介质及杀伤性细胞因

子,导致内皮和内皮下组织受到损伤,则是刺激中膜平滑肌细胞增生、向内皮下迁移,吞噬脂质变成泡沫细胞的重要诱因^[4]。

大量研究已证实高胆固醇血症可以损害内皮细胞,本实验中高脂组即可见内皮细胞肿胀,老年高脂组还可见内皮表面部分破溃,内皮下层平滑肌细胞增生;而缺氧组不仅出现内皮细胞部分脱失,还可观察到平滑肌细胞迁移至内皮下、吞噬脂质空泡,中膜平滑肌细胞增生等早期 AS 形成的典型特征。通过检测血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 发现高脂组与缺氧组血脂各组分水平并无显著差异。

本实验还观察到高脂饮食大鼠早期 AS 时血管壁内膜与中膜内层 PCNA 阳性细胞明显增多,而间歇性缺氧则可进一步增加血管壁 PCNA 的表达,从而导致平滑肌细胞增殖;在相同实验条件下,老年组血管壁 PCNA 的表达均明显高于青年组。实验结果提示,SAS 特征性的间歇性缺氧可显著促进早期 AS 时血管平滑肌细胞的增殖,老年大鼠血管平滑肌细胞增生比青年大鼠更为活跃。Yoshida 等^[5]研

究发现血管壁 ICAM-1 表达增高是 AS 病变发生早期重要的表现之一。正常饮食饲养的大鼠动脉壁 ICAM-1 表达水平低,高脂饮食饲养的大鼠动脉内皮细胞表达 ICAM-1 增加,本实验结果显示,在间歇性缺氧及衰老条件下,高脂饮食饲养的大鼠动脉壁 ICAM-1 蛋白表达可进一步显著增加。

在血脂水平接近的条件下缺氧组内皮病理改变明显重于高脂组的实验结果提示,内皮损伤的因素除高胆固醇血症外,SAS 特征性的间歇性缺氧也参与了内皮损伤的过程,其机制可能与间歇性缺氧诱导 ICAM-1 等炎症介质的表达,促进单核巨噬细胞向内皮黏附、诱导血管平滑肌细胞增殖有关,从而加速 AS 发生发展的进程;此外,从实验结果可以看出,衰老也是 AS 内皮损伤的易患因素。因此,笔者认为,衰老及 SAS 与 AS 的形成具有某种内在联系,但需进一步研究以阐明其机制。

参 考 文 献

- [1] Murakami T, Yamada N. Modification of macrophage function and effects on atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 1996, 7: 320-323.
- [2] 王璋,司良毅,廖友斌. 睡眠呼吸暂停综合征动物模型的建立. *中国实验动物学报*, 2006, 15: 40-43.
- [3] Aboyans V, Lacroix P, Virot P, et al. Sleep apnoea syndrome and the extent of atherosclerotic lesions in middle-aged men with myocardial infarction. *Int Angiol*, 1999, 18: 70-73.
- [4] Steffens S, Mach F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz*, 2004, 29: 741-748.
- [5] Yoshida N, Manabe H, Terasawa Y, et al. Inhibitory effects of vitamin E on endothelial-dependent adhesive interactions with leukocytes induced by oxidized low density lipoprotein. *Biofactors*, 2000, 13: 279-288.

(上接第 177 页)

参 考 文 献

- [1] Jaup T, Allemann Y, Urban P, et al. The Magnum wire for percutaneous coronary balloon angioplasty in 723 patients. *J Invasive Cardiol*, 1995, 7: 259-264.
- [2] Black HR. Management of older hypertensive patients: is there a difference in approach? *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2003, 5: 11-16.
- [3] Bonow RO, Bohannon N, Hazzard W. Risk stratification in coronary artery disease and special populations. *Am J Med*, 1996, 101: 4A17S-4A22S.
- [4] Eckart RE, Shry EA, Simpson DE, et al. Percutaneous coronary intervention in the elderly: procedural success and 1-year outcomes. *Am J Geriatr Cardiol*, 2003, 12: 366-368.
- [5] Abizaid AS, Mintz GS, Abizaid A, et al. Influence of patient age on acute and late clinical outcomes following Palmaz-Schatz coronary stent implantation. *Am J Cardiol*, 2000, 85: 338-343.
- [6] Graham MM, Ghali WA, Faris PD, et al. Survival after coronary revascularization in the elderly. *Circulation*, 2002, 105: 2378-2384.
- [7] Cheitlin MD. Risk stratification in the elderly patient with known or suspected coronary artery disease: is it useful; who should have it? *Am J Geriatr Cardiol*, 1998, 7: 49-53.
- [8] Meier B. Coronary angioplasty in chronic total occlusion. *Rev Port Cardiol*, 1999, 18 (Suppl 1): I55 - I60.
- [9] Bell MR, Berger PB, Bresnahan JF, et al. Initial and long-term outcomes of 354 patients following coronary balloon angioplasty of total coronary artery occlusions. *Circulation*, 1992, 85: 1003-1011.