

实验性阻塞型睡眠呼吸暂停综合征小型猪的血管内皮功能

张文莉, 王士雯, 赵玉生, 徐 斌, 朱庆磊, 杨 洁

(中国人民解放军总医院老年心血管病研究所, 北京市 100853)

[关键词] 病理学与病理生理学; 睡眠呼吸暂停综合征, 阻塞型; 动脉粥样硬化; 内皮素; 一氧化氮; 血管内皮; 模型, 动物

[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动物的血管内皮功能, 以探讨睡眠呼吸暂停综合征与冠状动脉粥样硬化的相互关系。方法 中国小型猪 16 头, 分为阻塞型睡眠呼吸暂停组 and 对照组, 每组 8 头。阻塞型睡眠呼吸暂停组用凝胶注射法制作动物模型。12 周后处死动物, 留取冠状动脉前降支制作电镜标本。两组动物制作模型前及 12 周时静脉取血检测内皮素及一氧化氮。结果 (1) 阻塞型睡眠呼吸暂停组的一氧化氮水平从实验前的 $57.46 \pm 4.55 \mu\text{mol/L}$ 下降到实验后的 $29.64 \pm 2.48 \mu\text{mol/L}$, 内皮素 1 水平从实验前的 $46.84 \pm 5.39 \text{ ng/L}$ 上升到实验后的 $71.24 \pm 6.13 \text{ ng/L}$, 一氧化氮与内皮素 1 的比值从实验前的 1.25 ± 0.17 下降到实验后的 0.42 ± 0.02 , 对照组的各项值无明显差别(一氧化氮实验前为 $60.94 \pm 3.28 \mu\text{mol/L}$, 实验后 $57.72 \pm 2.82 \mu\text{mol/L}$, 内皮素 1 实验前为 $49.24 \pm 5.13 \text{ ng/L}$, 实验后 $50.19 \pm 5.71 \text{ ng/L}$, 一氧化氮与内皮素 1 的比值实验前 1.25 ± 0.13 , 实验后 1.26 ± 0.06)。实验后两组比较, 一氧化氮和内皮素 1 及其他值的比值差异有显著性统计学意义 ($P < 0.05$)。 (2) 电镜下, 阻塞型睡眠呼吸暂停组动物血管内皮细胞由扁平变为不规则, 细胞变性, 核固缩, 部分内皮细胞脱落, 基膜不完整。结论 实验性阻塞型睡眠呼吸暂停使血管内皮损伤, 功能失调, 促进了动脉粥样硬化的发生和发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Functional Changes in Vascular Endothelium of Experimental Obstructive Sleep Apnea Syndrome in China Swine

ZHANG Wen-Li, WANG Shi-Wen, ZHAO Yu-Sheng, XU Bin, ZHU Qing-Lei, and YANG Jie

(Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

[KEY WORDS] Sleep Apnea Syndrome; Obstructive; Atherosclerosis; Endothelin; Nitric Oxide; Endothelium, Vascular; Animal Models

[ABSTRACT] **Aim** To observe the functional changes in vascular endothelium of obstructive sleep apnea syndrome (OSA) animal models and investigate the association between OSA and coronary atherosclerosis. **Methods** 16 China swine were divided into obstructive sleep apnea (OSA) group and control group. OSA group was treated by injecting polyacrylamide hydrogel. Animals were sacrificed after 12 weeks. The descending anterior branch of coronary were prepared for examination by transmission electron microscopy. The changes in plasma concentrations of endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) were tested before making animal models and after 12 weeks. **Results** (1) There was a significant lower NO level ($57.46 \pm 4.55 \mu\text{mol/L}$ vs. $29.64 \pm 2.48 \mu\text{mol/L}$), higher ET-1 level ($46.84 \pm 5.39 \text{ ng/L}$ vs. $71.24 \pm 6.13 \text{ ng/L}$) and lower ratio of NO/ET-1 (1.25 ± 0.17 vs. 0.42 ± 0.02) than those before experiment in OSA group. No difference was found in control group (NO level $60.94 \pm 3.28 \mu\text{mol/L}$ vs. $57.72 \pm 2.82 \mu\text{mol/L}$, ET-1 level $49.24 \pm 5.13 \text{ ng/L}$ vs. $50.19 \pm 5.71 \text{ ng/L}$, NO/ET-1 1.25 ± 0.13 vs. 1.26 ± 0.06). A marked difference ($P < 0.05$) was showed when these values were compared in two groups. (2) Under electron microscopy, endothelial cell in animals of OSA group became anomaly. Parts of them were degenerated and exfoliated. Basal lamina of endothelium was not in its integrity. **Conclusions** Experimental obstructive sleep apnea can injure endothelial cell of blood vessel and make them dysfunction, further initiate and accelerate the process of atherogenesis.

临床研究表明, 睡眠呼吸暂停综合征与冠心病

明显相关^[1,2], 而冠心病的病理基础是冠状动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)。因睡眠呼吸暂停综合征与冠心病有相同的危险因素, 如肥胖、年龄等, 在临床研究中, 这些混淆因素很难被排除, 因此利用动物实验来进行睡眠呼吸暂停综合征与冠心病相关的机制研究十分重要。本研究在成功建立了小型猪阻塞型睡眠呼吸暂停 (obstructive sleep apnea, OSA) 模型的基础上, 观察了模型动物的血管内皮功能, 以便探讨睡眠呼吸暂停综合征与冠状 As 相关的机制。

[收稿日期] 2006-04-18 [修回日期] 2007-06-23

[基金项目] 军队“十五”重点课题 (02Z009)

[作者简介] 张文莉, 博士, 副主任医师, 研究方向为睡眠呼吸障碍与心血管疾病, 联系电话 010-66936756, E-mail 为 zhangela@263.net。
通讯作者王士雯, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 中国工程院院士, 老年医学博士后流动站学术带头人, 老年心血管病研究所所长, 研究方向为老年心血管病, 联系电话 010-66936761。赵玉生, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 老年心血管病研究所副所长, 研究方向为老年心血管病, 联系电话 010-66936293。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

中国小型猪 16 头,购自北京农业大学,雄性,体重 20.7 ± 2.7 kg。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 $30 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 分上、下午两次给予,自由饮水,根据体重变化调整饲料量。三个月后,两组动物体重分别为 34.26 ± 2.32 kg 和 33.81 ± 2.04 kg,组间相比无显著性差异。

1.2 试剂与器械

Alice 3 型多导睡眠仪为美国 Respiromics 公司, BECKMAN CS-15R 型低温高速离心机与 BECKMAN DU-640 型紫外分光光度仪均为美国生产, Abbott IMxTM Homocysteine Assay 荧光免疫偏振仪和莱卡 1516 均为德国生产。放射 γ 测量仪, SN-695B 型上海病理切片机, TECNAI-10 电镜为飞利浦公司。奥美定(医用聚丙烯酰胺水凝胶)为吉林省富华医用高分子材料有限公司生产(国药管械准字 2000 第 367183 号,生产批号 2001070103),一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒购于南京建成生物工程研究所,内皮素 1 试剂盒购于解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所。

1.3 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 $20 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重耳静脉注射。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^[3],将 5 mL 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。术后监测多导睡眠图 2 h,一周后再复查多导睡眠图。术后二周用戊巴比妥钠静脉麻醉,行电子计算机断层扫描,部位为咽腭弓平面上下 5 cm。12 周后处死动物,分离冠状动脉前降支,在远端 1/3 处取 2 mm 立即用 3% 戊二醛磷酸缓冲液固定留取作电子显微镜标本,再留取约 5 mm 用福尔马林固定制作光学显微镜标本。

1.4 内皮素的测定

分别于制作模型前及 12 周后取动物静脉血 2 mL,注入含 10% EDTA 二钠 30 μL 和抑肽酶 40 μL 的试管中,混匀,低温离心机 4°C , 3 kr/min 离心 10 min,分离血浆, -70°C 保存,送我院放射免疫中心以放射免疫竞争法测定,批内变异系数 CV11.2%,批

间变异系数 CV11.8%。

1.5 一氧化氮的测定

一氧化氮(NO)化学性质活泼,在体内代谢很快转为 NO_2^- 和 NO_3^- ,而 NO_2^- 又进一步转化为 NO_3^- 。利用硝酸还原酶法特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- ,通过显色深浅测定其浓度的高低。分别于制作模型前及 12 周后取实验动物静脉血 2 mL,分离血清 0.1 mL,严格按照试剂盒说明书进行操作,用紫外分光光度仪在 550 nm 波长处测定吸光度,换算公式为:

$$\text{NO 含量}(\mu\text{mol/L}) = (\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \div (\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}) \times \text{样品测试前稀释倍数} \times 100 \mu\text{mol/L}。$$

1.6 统计方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用两样本均数的 t 检验对资料均数进行比较。全部统计分析用 SPSS10.0 统计软件包进行, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型情况

手术中实验组动物逐渐出现鼾声,手术结束后实验组动物出现呼吸暂停或低通气及血氧饱和度下降,一周后复查上述指标,呼吸暂停时间(手术中 12.33 ± 4.06 min,手术后一周 53.94 ± 6.51 min)、呼吸暂停指数(手术中 $14.79/\text{h} \pm 3.69/\text{h}$,手术后一周 $44.44/\text{h} \pm 6.09/\text{h}$)均较手术当天明显增加,血氧饱和度(手术中 $77.24\% \pm 2.08\%$,手术后一周 $68.58\% \pm 4.42\%$)明显下降($P < 0.05$)。手术后二周行电子计算机断层扫描,实验组动物可在咽腔内见到不规则环状阴影,咽腔呈明显狭窄状(图 1)。

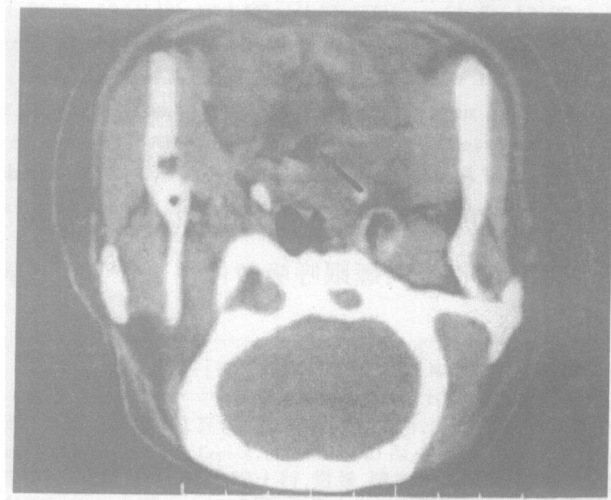


图 1. 模型动物咽部断层摄影照片 咽腔内可见不规则环状阴影,咽腔明显狭窄(箭头所示)。

2.2 二组动物实验前后内皮功能的变化

二组动物实验前后 NO 和内皮素 1 水平及其比值的动态变化见表 1。实验前,二组的 NO、内皮素 1 和 NO 与内皮素 1 比值无差别,实验后,OSA 组的 NO 水平明显降低($P < 0.05$),内皮素 1 水平明显升高($P < 0.05$),NO 与内皮素 1 比值明显下降($P < 0.05$),对照组的各项值无明显差别。

表 1. 二组动物内皮素 1 和一氧化氮水平变化

指 标	对照组		OSA 组	
	实验前	实验后	实验前	实验后
NO (μmol/L)	60.9 ± 3.3	57.7 ± 2.8	57.5 ± 4.5	29.6 ± 2.5 ^{ac}
内皮素 1 (ng/L)	49.2 ± 5.1	50.2 ± 5.7	46.8 ± 5.4	71.2 ± 6.1 ^{ac}
NO/内皮素 1	1.25 ± 0.13	1.26 ± 0.06	1.25 ± 0.17	0.42 ± 0.02 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与实验前比较。



图 2. 模型动物冠状动脉前降支电子显微镜图 ($\times 1850$)
内皮细胞由扁平变为不规则形状。



图 3. 模型动物冠状动脉前降支电子显微镜 ($\times 6200$)
可见内皮细胞变性,核固缩。

2.3 各组动物实验后电镜结果

实验后 OSA 组动物血管内皮细胞由扁平变为不规则,细胞变性,核固缩,部分内皮细胞脱落,基膜不完整(图 2 和图 3);对照组动物血管内皮细胞无

明显变化。

3 讨论

冠心病的关键问题是冠状动脉的粥样硬化,目前多数学者认为,继发于内皮损伤的内皮通透性、粘附性、血液凝固性改变及所释放的大量细胞因子和生长因子将导致动脉粥样硬化的一系列连锁反应,其中内皮损伤被认为是重要的始动环节^[4]。本研究结果提示睡眠呼吸暂停所导致的反复周期性缺氧可以使内皮损伤,功能失调,使动脉粥样硬化的发生成为可能。

内皮细胞是一种多功能细胞,是血管壁组织和血液之间的第一道通透性屏障,参与保持机体内环境和稳定,其结构和功能的损伤是动脉粥样硬化发病过程中重要的一环。内皮损伤的概念非常广泛,从内皮细胞坏死、剥脱到无形态改变的功能性损伤,最常见的一种损伤是个别内皮细胞的剥离,结果形成非剥脱性损伤^[5],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^[6],并发现自由基对内皮细胞有损伤作用。自由基增加可使内皮细胞膜磷脂中的多不饱和脂肪酸(PUFO)的脂质过氧化,使膜胆固醇含量增加,流动性降低,导致膜的稳定性和通透性异常,使单核/巨噬细胞粘附到内皮细胞,胆固醇在内膜沉积等^[7]。

内皮细胞能够合成和分泌内皮源性扩张因子(EDRF)^[8],后来证明这种物质是一氧化氮(NO)或能释放 NO 的有关物质^[9]。许多研究结果表明,NO 的活性降低(生成/释放减少或破坏加速),有致动脉粥样硬化作用,其机理可能有以下几方面: NO 是氧自由基清除剂,NO 的减少意味着超氧化物增多,促进脂质过氧化和细胞损伤;④NO 减少意味着动脉壁的多孔性降低,透壁运输的时间延长,脂质过氧化的机会增加;⑤对血小板的粘附、聚集的抑制作用减弱;⑥动脉壁的 cGMP 水平降低, cGMP 有抗血管平滑肌增殖的作用。因此 NO 是内皮细胞功能的保护因子^[10]。

内皮素是内皮细胞分泌的内皮源性血管收缩因子,其三个亚型中内皮素 1 的生物活性最强,是唯一存在于血管内皮细胞的内皮素,可因生理或病理情况而发生上调或下调^[11],缺氧及自由基作用可使其上调。内皮素 1 还与 NO 保持平衡与稳定^[12],内皮素 1 促进内皮细胞释放 NO,NO 的释放通过 cGMP 机制对内皮素 1 的生成产生负反馈调节。

生理情况下,内皮细胞释放的 NO 占优势,可抵

消内皮素 1 的缩血管作用,病理情况下,内皮功能失调,内皮的保护性机制被破坏,NO 和内皮素 1 释放失调,NO 水平下降,内皮素 1 分泌增加,NO 与内皮素 1 比值下降,从而可促进动脉粥样硬化的发生。有研究表明^[13],在冠状动脉粥样硬化部位,内皮素 1 受体密度明显增加,约为正常的两倍。

本研究中,对小型猪上气道阻塞三个月后,实验动物血浆 NO 水平明显降低,内皮素 1 水平显著升高,NO 与内皮素 1 比值明显减低,且电镜下可看到内皮细胞损伤的病理变化,说明睡眠呼吸暂停使内皮损伤,功能失调,其机制可能有二,一是缺氧的直接作用,缺氧使内皮细胞损伤,信号转导异常,抑制内皮细胞释放 NO,并使内皮素 1 分泌增加;二是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,长期处于氧化应激状态使机体内产生了大量的氧自由基,氧自由基通过脂质过氧化等过程进一步损伤内皮细胞,加速了动脉粥样硬化的发展。

本研究结果为流行病学调查及临床研究中发现的冠状动脉疾病在睡眠呼吸暂停综合征患者中易于发生和加重提供了进一步的依据,提示积极改善睡眠呼吸暂停综合征患者的缺氧情况可能会减少冠状动脉疾病及恶性心血管事件的发生。

[参考文献]

- [1] Leung RS, Bradley TD. Sleep apnea and cardiovascular disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **164** (12): 2 147-165.
- [2] Peker Y, Kraiczi H, Hedner J, Loth S, Johansson A, Bende M. An independent association between obstructive sleep apnea and coronary artery disease [J]. *Eur Respir J*, 1999, **14** (1): 179-184.
- [3] 张文莉,王士雯,徐斌,黄丽洁,苟鹏,高磊,等. 中国小型猪阻塞型睡眠呼吸暂停模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2004, **14** (5): 286-289.
- [4] Thomas WA, Kim DN. Atherosclerosis as a hyperplastic and/or neoplastic process [J]. *Lab Invest*, 1983, **48** (3): 245.
- [5] Collins P, Fox K. The pathogenesis of atheroma and the rationale for its treatment [J]. *Eur Heart J*, 1992, **13** (4): 560-566.
- [6] Rosenfeld ME. Inflammation, lipids, and free radicals: lessons learned from the atherogenic process [J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1998, **16** (3): 249-261.
- [7] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine [J]. *Nature*, 1980, **288** (27): 373-379.
- [8] Henderson AH. Endothelium in control [J]. *Br Heart J*, 1991, **65** (2): 116-121.
- [9] 景东樱. 一氧化氮系统功能障碍与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (2): 182-189.
- [10] Yanagisawa M. A novel potent vasoconstrictor peptides [J]. *Physiol Rev*, 1993, **73** (2): 375-383.
- [11] Luscher TF. Endothelium-derived contracting factors [J]. *Hypertension*, 1992, **19** (2): 117-125.
- [12] Ware JA. Platelet-endothelium interaction [J]. *N Engl J Med*, 1993, **328** (9): 628-638.
- [13] Webb DJ. Evidence for endothelin 1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure: Endothelin antagonism in heart failure [J]. *Circulation*, 1995, **92** (12): 3372.

(此文编辑 胡必利)