

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.006

慢性间隙性缺氧对大鼠心肌氧化应激影响

邱昌明¹, 李 洁², 李 兵², 杨 湘², 莫海兰², 谭 健²

(1. 四川省乐山市人民医院耳鼻喉科, 乐山 614000; 2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科, 重庆 400016)

【摘 要】目的: 通过建立模拟阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS) 的慢性间歇缺氧 (Chronic intermittent hypoxia, CIH) 的大鼠动物模型, 观察 CIH 对大鼠心肌氧化应激 (Oxidative stress, OS) 的损伤及复氧后的改变。方法: 建立 16 只慢性间隙性缺氧大鼠模型, 其中 8 只缺氧后复氧, 采用比色法、免疫印迹等方法测定其心肌还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH)、蛋白质羰基化 (Protein carbonylation, PC), 并与 8 只正常大鼠进行比较。结果: 慢性间隙性缺氧模型大鼠心肌还原型谷胱甘肽明显低于对照组 ($P < 0.05$), 蛋白质羰基化水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); 复氧组大鼠心肌还原型谷胱甘肽, PC 水平与对照组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。结论: 慢性间隙性缺氧模型的大鼠心肌 OS 水平升高, 并伴有蛋白质 OS 损伤, 复氧后 OS 水平降低。

【关键词】慢性间隙性缺氧; 谷胱甘肽; 蛋白质羰基化; 氧化应激

【中国图书分类法分类号】R766.49

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-16

Effect of chronic intermittent hypoxia on oxidative stress
in the myocardial muscles of ratsQIU Changming¹, LI Jie², LI Bing², YANG Xiang², MO Hailan², TAN Jian²

(1. Department of Otolaryngology, the People's Hospital of Leshan in Sichuan Province; 2. Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish the chronic intermittent hypoxia (CIH) rat animal model by simulation of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS), and to observe the effect of CIH on oxidative stress in rat myocardial injury and reoxygenation. Methods: Chronic intermittent hypoxia rat model with 16 rats were established, in which eight rats were reoxygenated after hypoxia. Glutathione (GSH) and protein carbonylation of heart muscles were determined with the method of Western blot, and then were compared with those of eight normal rats. Results: The glutathione of myocardial muscles were significantly decreased in chronic intermittent hypoxia group compared with that in control group ($P < 0.05$). However, the protein carbonylation levels were significantly higher ($P < 0.05$). Compared with those in the control group, the glutathione and protein carbonylation levels of the reoxygenation group had no significant difference ($P > 0.05$). Conclusion: Oxidative stress level increase and modification of proteins takes place in myocardial muscle of rats with chronic intermittent hypoxia. After reoxygenation, the oxidative stress level returns to normal.

【Key words】chronic intermittent hypoxia; glutathione; protein carbonylation; oxidative stress

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (Obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS) 是一种机体慢性间歇性缺氧 (Chronic intermittent hypoxia, CIH) 的过程^[1]。在低氧状态下机体产生系统性的氧化应激 (Oxidative stress, OS)^[2] 已为很多研究证明。通常情况下肌肉中产生的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)^[3] 水平很低, 而且多为产生收缩力所利用。但是在 OS 状态下的肌肉活性氧平衡破坏, 产生过量的 ROS, 此时肌肉收缩力降低。研究表明许多疾病的发生发展都涉及

OS, 其与心血管疾病密切相关^[4]。因此, 本实验旨在建立 CIH 模拟 OSAHS 的大鼠动物模型, 探索大鼠心肌是否存在 OS 及其可能的进一步损害。

1 材料与方法

1.1 研究对象分组及模型的建立

24 只 200~220 g SD 雄性大鼠, 按照随机数字法分为对照组、缺氧组及复氧组 3 个组, 每组各 8 只。将缺氧组及复氧组于每天 9 时至 17 时至于密闭实验箱中, 实验箱外接压缩空气和氮气。每 30 s 交替通入氮气或空气, 使箱内氧气浓度由最低 4%~8% 逐渐增加到最高 21%, 60 s 1 次循环不间断通

作者介绍: 邱昌明 (1981-), 男, 硕士,

研究方向: 耳鼻喉科基础与临床研究。

通信作者: 李 兵, 男, 副教授, Email: dclibing@sina.com。

基金项目: 重庆市卫生局资助项目 (编号: 2008-2-38)。

入。中间随机抽取大鼠静脉血送血气分析。如此 30 d, 模拟 OSAHS 大鼠模型建立。模型建立后将缺氧组和对照组大鼠各取心肌 0.4~0.5 g。复氧组大鼠正常饲养 30 d, 再取心肌 0.4~0.5 g。

1.2 心肌蛋白质提取物制备

将采集的新鲜心脏肌肉样品用生理盐水简单清洗后称重, 利用液氮、研钵粉碎心肌组织块。加入 RIPA 缓冲液(每克组织 3 ml RIPA), 苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)(每克组织 30 μ l, 10 mg/ml PMSF), 利用 Polytron 进一步匀浆(15 000 r/min)维持 4 $^{\circ}$ C。再加入 PMSF(每克组织 30 μ l, 10 mg/ml PMSF), 冰上孵育 30 min。4 $^{\circ}$ C 离心机 13 000 r 离心 15 min。上清液为细胞裂解液, 收集上清液置于冰上, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。此上清液直接用于免疫印迹或超低温(-20 $^{\circ}$ C)保存。其他肌肉样品参照具体试剂盒的手册制备。

1.3 免疫印迹

按常规方法制备 10% SDS-PAGE 胶。将含 60 μ g 蛋白质的上清液与适量的 5 上样缓冲液混匀。于 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 后加样到 SDS-PAGE 胶。70 伏电压电泳至溴酚蓝刚跑出胶的末端。使用半干转膜器将电泳分离后的蛋白质在 4 $^{\circ}$ C 过夜转移至 PVDF 膜; 3% 脱脂奶粉(溶于 TBST 缓冲液)室温下封闭 1 h; TBST 摇动洗涤 35 min; 4 $^{\circ}$ C 条件下与一抗孵育, 轻轻震动液; TBST 摇动洗涤 35 min; 相应的二抗室温轻轻震荡孵育 1 h; TBST 摇动洗涤 35 min; ECL 发光试剂 1 ml/膜, 1 min 后。富士 LAS-3000 图像分析系统扫描。采用 Image Pro 软件对免疫印迹图片作量化分析。再使用 GAPDH 作为内部参照, 以确定蛋白质样品上样的量是否均等。

1.4 其他试剂

还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)测定试剂盒购自中国生命科学实验技术联盟威斯腾生物技术服务中心。按照使用手册用比色法测定; 蛋白质羰基化(Protein carbonylation, PC)测定: 采用美国鼎金生物技术公司蛋白氧化试剂盒, 将 5 g 蛋白质与 2,4-二硝基苯肼(Dinitrophenylhydrazine, DNP)共同孵育, 蛋白质的羰基被 DNP 标记而形成 DNP 衍生物。用 SDS-PAGE 胶分离蛋白质并将蛋白质转移至 PVDF 膜上以后。按照上述免疫印迹方法使用抗 DNP 抗体和相应的二抗探测含有羰基的蛋白质, GAPDH 作为内部参照。

1.5 统计学分析

对 GSH 含量及 PC 的量化结果进行数据分析, 采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析, 两组间方差齐性采用 Levene 检验, 方差齐时两独立样本均数采用 t 检验; 方差不齐采用 t' 检验。统计数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 比较 t 值与 P 值, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GSH

3 组大鼠心肌中 GSH 的水平见表 1, 结果显示: 与对照

组比较, 缺氧组 GSH 水平明显降低, 差异具有统计学意义 $P = 0.012$; 复氧组与对照组相比, $P = 0.207$, 差异没有统计学意义。

表 1 心肌中 GSH 及 PC 水平 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab.1 Level of GSH and PC of heart muscles ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	GSH (μ mol/g)	PC (相对值)
缺氧组	37.65 $\pm$ 6.54	47.44 $\pm$ 6.59
复氧组	44.42 $\pm$ 5.42	35.34 $\pm$ 4.62
对照组	49.58 $\pm$ 9.49	34.58 $\pm$ 5.42

注: 与对照组 GSH 比较, F 值分别为 5.58、8.81 $> F_{0.102(7,7)}$, 故方差不齐, P 值采用 t' 检验, 缺氧组、复氧组 P 值分别为 0.012、0.207; 与对照组 PC 比较, F 值分别为 1.455、0.738 $< F_{0.102(7,7)}$, 故方差不齐, P 值采用 t 检验, 缺氧组、复氧组 P 值分别为 0.001、0.707

2.2 PC

各组大鼠心肌中 PC 见图 1, 图中显示: 对照组与复氧组相比无明显差别, 缺氧组含量明显升高。采用 Image Pro 软件对免疫印迹图片作量化分析的相对值结果见表 1。缺氧组与对照组相比, $P = 0.001$, 差异具有统计学意义, 复氧组与对照组比较, $P = 0.707$, 差异没有统计学意义。

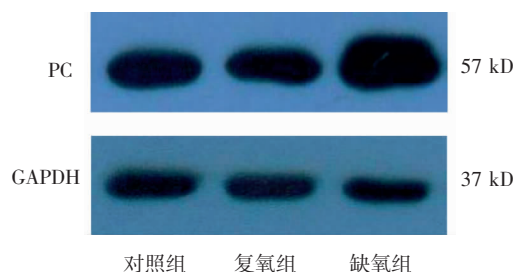


图 1 心肌中 PC 免疫印迹图片

Fig. 1 Western blot picture of PC in heart muscles

3 讨论

关于 OSAHS 的动物模型, 有多种方式。有学者采取 1 d 内连续缺氧 1~23 h, 继而复氧的方法; 也有学者采取短时间缺氧-复氧过程交替循环 1~8 h/d 的方法, 本实验所采取的就是后一种方法。越来越多的实验研究证实, 前一种相对连续性缺氧的方法在相同条件下对机体的缺氧性损伤重于后者。而后者反复短暂的缺氧复氧过程不仅可以缓解或消除缺氧所带来的不利影响, 而且可以更好的激发机体的适应性保护机制。实验结果证实, 此改进的模型是较理想的 CIH 动物模型。

OS 是指体内氧化系统与抗氧化系统平衡破坏, 倾向于氧化, 导致中性粒细胞炎症浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物。OS 是由自由基在体内产生的一种负面作用, 并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。研究表明, 抗氧化剂可以减缓 OS 带来的危害。OS 破坏了强氧化剂和抗氧

化剂的平衡导致的潜在伤害,氧化剂、抗氧化剂平衡的破坏是细胞损伤的主要原因。OS 的指示剂包括损伤的 DNA 碱基、蛋白质氧化产物、脂质过氧化产物^[6]。反应性氧化(Reactive oxidative species,ROS)是血管细胞增长的重要细胞内信号。OS 过度的 ROS 活性状态,与血管疾病状态(如高血压、动脉粥样硬化)有关 ROS 家族的一个重要成员是过氧化物。大量研究表明在冠状动脉疾病状态 OS 由于血管细胞外超氧化物歧化酶减少而加剧,而超氧化物歧化酶在正常情况下是对抗超氧化物阴离子的重要保护性酶,OS 在高血压、动脉粥样硬化中扮演重要角色。

GSH 在维持 ROS 平衡中起着非常重要的作用。GSH 是抗氧化剂,它能释放 1 个电子给高活性的 ROS 而清除 ROS。从而保护蛋白质等大分子不被 ROS 氧化。正常细胞中,GSH 通常占谷胱甘肽总量的 90%左右。GSH 或 GSH/氧化型 GSH (GSSG)的比值被视为 OS 的指标。本实验观察到缺氧大鼠心肌的 GSH 水平明显低于对照组($P<0.05$),提示缺氧大鼠心肌处于 OS 状态,而复氧大鼠心肌的 GSH 水平提高,与缺氧组比较($P<0.05$)。为进一步探索处于 OS 状态下的心肌的蛋白质被氧化状态,测试了心肌 PC。ROS(包括脂质过氧化产物)可以直接与蛋白质氨基酸作用引起 PC^[7]。PC 常被作为 OS 的生物指标。PC 会改变蛋白质的降解速率,显著降低其生物活性。因此,一旦细胞中多种蛋白质大量地被羰基化,细胞的某些生物学功能(如肌纤维收缩)将会受到损害。本试验中观察到了缺氧大鼠心肌的 PC 水平明显高于复氧组与对照组($P<0.05$)。这说明缺氧大鼠已经存在心肌蛋白质的过度羰基化。本实验结果表明,CIH 大鼠心肌存在 OS 状态并引起心肌 PC,而复氧后 OS 水平降低,由此可测想 OSAHS 患者心肌亦可能存在 OS 状态并引起心肌 PC^[8]。但由于我们的实验时间和条件的限制,没有设立复氧组的同期对照,也缺乏更长时间的 CIH 及更复杂的睡眠呼吸阻塞对心肌 OS 的损伤是否可逆有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 乔 华,王广发,丁翠敏.氧化应激与睡眠呼吸暂停综合征[J].国外医学:呼吸系统分册,2005,25(8):571-573.
- [2] Carlson J,Hedner J,Pettersson A.Increased plasma concentration of ADMA a naturally occurring nitric oxide synthesis inhibitor in OSA patients[J].Am J Respir Crit Care Med,1997,155:A869.
- [3] 康 健,王赞峰.炎症、氧化应激与阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(4):226-227.
- [4] Kang J,Wang Z F.Inflammation,Oxidative stress and obstructive sleep apnoea syndrome[J].Chin J Tuberc Respir Dis,2006,29(4):226-227.
- [5] Chermiack N S.New mechanisms for the cardiovascular effects of sleep apnea[J].Am J Med,2000,109(7):592-594.
- [6] Spector A.Review:Oxidative stress and disease[J].Ocul Pharmacol Ther,2000,16(2):193-201.
- [7] 张洁心,殷国勇,陆 甘.阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与氧化应激研究进展[J].江苏医药,2008,34(11):1152-1154.
- [8] Zhang J X,Yin G Y,Lu G.Studies on obstructive sleep apnoea syndrome and oxidative stress[J].Jiangsu Med J,2008,34(11):1152-1154.
- [9] 陈 萍,邓茂先,黄文婷.睡眠呼吸暂停患者肋间外肌氧化应激的研究[J].中国现代医药杂志,2008,10(4):38-40.
- [10] Chen P,Deng M X,Huang W T.Studies on oxidative stress in the external inter costal muscles of patients with obstructive sleep apnoea syndrome[J].M M J C,2008,10(4):38-40.
- [11] Dyugovskaya L,Lavie P,Lavie L.Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients[J].Am J Respir Crit care Med,2002,165(7):934-939.

(责任编辑:冉明会)

《中华医学教育探索杂志》

欢迎赐稿、订阅

在线投稿网站:yxjyts.alljournals.ac.cn

邮发代号:78-127