

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.008

慢性间歇性缺氧对大鼠食管及其白介素-6、超敏 c-反应蛋白表达的影响

杨 湘, 李 兵, 李 洁

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 重庆 400016)

【摘要】目的:制作可用于常压慢性间歇性缺氧(Chronic intermittent hypoxia, CIH)研究的动物模型。探讨 CIH 与胃食管反流病(Gastroesophageal reflux disease, GERD)的关系及 CIH 对食管白介素-6(Interleukin-6, IL-6),超敏 C-反应蛋白(High sensitivity-C reactive protein, hs-CRP)表达的影响。方法:将 24 只成年雄性 SD 大鼠随机分成 3 组,即空白对照(Unhandled control, UC)组(正常饲养 4 周),CIH 组,建立 CIH 模型(饲养 4 周)和复氧(Removal of hypoxia group, RH)组(CIH 4 周后正常饲养 4 周),所有大鼠均在实验结束后测定各组食管下段 pH 值,观察食管病理变化,检测食管组织 IL-6 及 hs-CRP 的表达水平。结果:CIH 组食管组织发生明显炎症改变,UC 组和 RH 组炎症不明显。pH 值明显下降($P<0.05$),IL-6 及 hs-CRP 的表达明显增高($P<0.01$),RH 组与 UC 组比较均无明显差异($P>0.05$)。结论:CIH 可致食管发生炎症改变,IL-6 及 hs-CRP 参与了 CIH 胃食管反流(Gastroesophageal reflux, GER)的发生。

【关键词】慢性间歇性缺氧;胃食管反流;白细胞介素-6;超敏 C-反应蛋白

【中国图书分类法分类号】R766.49

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-06

Effect of chronic intermittent hypoxia on esophagus and expressions of IL-6, hs-CRP in rats

YANG Xiang, LI Bing, LI Jie

(Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To set up the rat model of chronic intermittent hypoxia (CIH) in normal pressure, to study the relationships between CIH and gastroesophageal reflux disease (GERD) and to explore the effect of CIH on expression of interleukin-6 (IL-6) and high sensitivity-C reactive protein (hs-CRP) in rat. **Methods:** Twenty-four sex maturation rats were randomly divided into unhandled control group (UC group, normal feeding for 4 weeks), CIH group (CIH for 4 weeks), removal of hypoxia group (RH group, normal feeding for 4 weeks after CIH for 4 weeks). The pH values and the expressions of IL-6 and hs-CRP in the inferior esophageal segment were determined and observed. **Results:** The inflammation was more obvious in CIH group than in UC group and RH group. The pH values were significantly lowered ($P<0.05$) and the expressions of IL-6 and hs-CRP were significantly elevated ($P<0.01$), with no difference between UC group and RH group ($P>0.05$). **Conclusions:** CIH may induce the inflammation change of esophagus and IL-6 and hs-CRP participate in GERD's development.

【Key words】chronic intermittent hypoxia; gastroesophageal reflux; interleukin-6; high sensitivity-C reactive protein

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS) 和胃食管反流病 (Gastroesophageal reflux disease, GERD) 均为临床上常见病、多发病,二者发病率相似,且常同时存在,Green 等^[1]研究证实 OSAHS 患者 62% 左右有病理性胃食管反流,而二者的因果关系一直是近年来的研究热点。OSAHS 作为一种源头性疾病导

致全身多器官系统疾病的产生,其基本病理生理表现为慢性间歇性缺氧 (Chronic intermittent hypoxia, CIH),主要分子信号域为氧化应激和炎症^[2]。研究表明 OSAHS 有着高水平的炎症介质,OSAHS 本身是一个慢性炎症过程,OSAHS 全身多器官,多系统疾病的发生、发展均与全身炎症反应存在密切的关系,细胞因子白介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 及超敏 C-反应蛋白 (High sensitivity-C reactive protein, hs-CRP) 等在 OSAHS 患者体内血液及局部升高,可以在一定程度上反应 OSAHS 的严重程度和预后。GERD 是指胃、十二指肠内容物反流入食管,其病因

作者介绍:杨 湘(1984-),女,硕士,

研究方向:耳鼻咽喉科学。

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

基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(项目编号:2008-2-38)。

主要包括酸性胃液或酸性胃液加胆汁反流对食管黏膜的腐蚀作用、食管的清除能力下降、局部组织的防御能力减弱、胃排空障碍等。GERD 的病理特点是炎症细胞对食管黏膜的浸润,故炎症细胞因子在食管炎症的发生和发展中也可能起到重要作用^[3]。慢性炎症反应在 OSAHS 和 GERD 的发生发展中均起到重要作用,IL-6、CRP 均是炎症反应的敏感标志物,为反映机体氧化应激和炎症反应的重要指标,也可作为判断 OSAHS 及 GERD 患者疾病严重程度的辅助指标。故对细胞因子 IL-6 和 hs-CRP 的研究具有重要意义。OSAHS 患者并发 GERD 经鼻持续气道正压通气(Nasal continuous positive airway pressure, nCPAP)治疗后不仅呼吸暂停症状减轻,而且反流症状也明显减轻,已从临床上证实了 GERD 的发生发展与 OSAHS 的关系密切,但关于 OSAHS 和 GERD 关系的基础研究甚少。本文通过构建 CIH 大鼠模型,检测食管 pH 值,观察食管病理变化及用 ELISA 法检测食管 IL-6 及 hs-CRP 表达水平来探讨 CIH 与 GERD 的关系及炎症反应在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级雄性成年 SD 大鼠 24 只(重庆医科大学动物中心提供),随机分成 3 组,每组 8 只,空白对照组(Unhandled control, UC)组,(正常饲养 4 周),CIH 组(饲养 4 周),复氧(Removal of hypoxia, RH)组(CIH 4 周后正常饲养 4 周)。

1.2 实验仪器及试剂

pH 检测计(Digitrapper Mk11 I 型)。大鼠 IL-6 及 hs-CRP 酶联免疫检测试剂盒由南京建成生物医学工程研究所提供。

1.3 实验方法

1.3.1 CIH 模型的建立 参照王璋等^[4]的方法加以改进:用有机玻璃制作一壁厚 4 mm,长、宽、高分别为 40、25、15 cm 的长方体舱,舱体一侧壁中央留有 2 个直径为 5 mm 小孔分别充入空气及氮气。舱体另一侧壁安装有一小风扇以混匀舱内气体。舱体各侧壁分别留有一直径 0.5 mm 小孔以方便采集气体及平衡舱内气压。舱体顶壁为一可抽拉的密闭盖以方便缺氧前后动物的取放,实验过程中产生的 CO₂ 及水用生石灰及硅胶吸收。实验过程中不休息、不进食、水,但活动自由。实验于每天 9:00–17:00 进行,将 CIH 组大鼠放入低氧舱,循环通入压缩空气和氮气,此循环过程通过单片机程序控制电磁阀开关实现每一循环周期为 60 s,即前 30 s 通入压缩氮气,后 30 s 通入压缩空气,使每一循环低氧舱内最低氧浓度由 21%降至 4%~6%,再逐渐恢复至 21%,如此循环。实验过程中随机采集气体样本,由测氧仪监测低氧舱中的氧浓度。行大鼠动脉血气分析,自动检测血氧饱和度波动在 79.3%~90.8%之间。

1.3.2 样本采集 实验完成后杀鼠,10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射,麻醉成功后将大鼠平卧固定于操作台,腹

部正中切口 3 cm,纵形剖开食管,放置 pH 检测探针于胃食管交界以上约 1.5 cm 处,待读数稳定后读取 pH 值。肉眼观察大体标本后自胃食管交界处向上取一段长约 2 cm 的食管,纵向平分为两份,一半置于 4%甲醛中固定,HE 染色后光镜观察病理改变,另一半放置于 -70 °C 冰箱保存,制作组织匀浆后用酶联免疫吸附法(ELISA)进行 IL-6 及 hs-CRP 水平检测。

1.3.3 数据处理 采用 SPSS 18.0 统计学软件统计分析;数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示;组间比较采用方差分析,方差齐性分析采用 Levene 检验,方差不齐采用 *q* 检验。根据 *F* 值、*q* 值与 *P* 值作出检测结果判断,*P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 食管 pH 值

与 UC 组比较,CIH 组 pH 值明显降低(*P* < 0.01),RH 组与 UC 组比较 pH 值差异不明显(*P* > 0.05)见表 1。

表 1 3 组食管组织 pH 值、IL-6、hs-CRP 表达情况比较($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 pH value, IL-6 and hs-CRP of the esophageal tissue among three groups($\bar{x} \pm s$)

组别	pH 值(<i>n</i> =8)	IL-6 (ng/ml)	hs-CRP (μg/ml)
UC	5.89 ± 0.19	167.79 ± 14.31	2.36 ± 0.49
CIH	4.06 ± 0.23	193.54 ± 17.69	2.96 ± 0.26
RH	5.78 ± 0.12	169.22 ± 11.25	2.43 ± 0.38

注:1. pH 值:Levene 检验方差齐性,*F* = 4.597, *P* = 0.022 < 0.05,方差不齐,用 *q* 检验。UC 组与 CIH 组比较:*P* = 0.000 < 0.01; RH 组与 UC 组比较, *P* = 0.265 > 0.05; RH 与 CIH 组比较, *P* = 0.000 < 0.01; 2. IL-6: Levene 检验方差齐性, *F* = 4.424, *P* = 0.019 < 0.05,方差不齐,用 *q* 检验。UC 组与 CIH 组比较: *P* = 0.000 < 0.01; RH 组与 UC 组比较, *P* = 0.811 > 0.05; RH 与 CIH 组比较, *P* = 0.000 < 0.01。3. hs-CRP 值:Levene 检验方差齐性, *F* = 6.731, *P* = 0.003 < 0.05,方差不齐,用 *q* 检验。UC 组与 CIH 组比较: *P* = 0.000 < 0.01; RH 组与 UC 组比较, *P* = 0.659 > 0.05; RH 与 CIH 组比较, *P* = 0.000 < 0.01

2.2 病理表现

肉眼观察大体标本可见 UC 组黏膜完整、光滑、呈白色, CIH 组黏膜不同程度发红及糜烂, RH 组黏膜完整、光滑。各组标本 HE 染色后光镜下表现如图 1~3 所示: UC 组除了上皮层内少量炎性细胞外未见其它异常, CIH 组可见鳞状上皮增生、细胞排列紊乱、黏膜固有层乳头延伸、炎症细胞浸润, RH 组上皮细胞排列整齐,少量炎症细胞浸润。

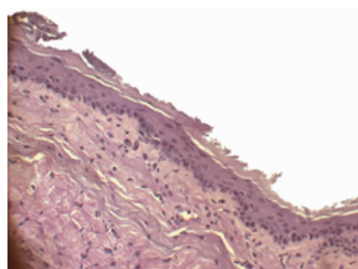


图 1 UC 组食管组织 HE 染色表现 (10 × 40)

Fig.1 HE staining of UC group's esophageal tissue (10 × 40)

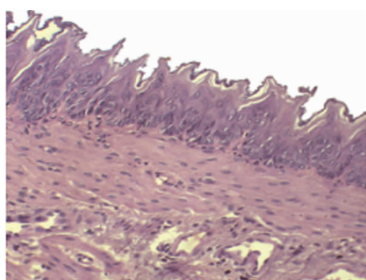


图 2 CIH 组食管组织 HE 染色表现 (10×40)

Fig.2 HE staining of CIH group's esophageal tissue (10×40)

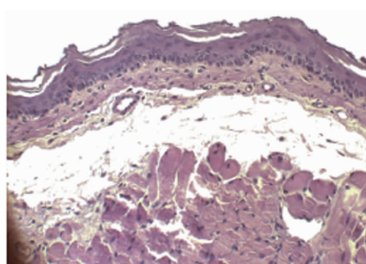


图 3 RH 组食管组织 HE 染色表现 (10×40)

Fig.3 HE staining of RH group's esophageal tissue (10×40)

2.3 各组 IL-6 及 hs-CRP 表达水平

如表 1 所示:CIH 组与 UC 组比较 IL-6 及 hs-CRP 表达均明显升高,差别有统计学意义($P<0.05$),RH 组与 UC 组比较 IL-6 及 hs-CRP 表达均无明显差异,差别无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

OSAHS 的主要特点是 CIH 和睡眠片段化,其病理生理表现为氧化应激和炎症反应。临床和实验研究结果均显示间歇性低氧可以引发系统性炎症,可将 OSAHS 看作一种与氧化应激相关的系统炎症性疾病。而本实验结果显示 CIH 组食管组织 IL-6 及 hs-CRP 表达显著高于 UC 组,也从动物实验的角度证实 CIH 可使机体产生炎症反应。

各组 pH 值比较结果显示,CIH 组 pH 值明显低于 UC 组,RH 组与 UC 组无差异,说明 CIH 可致食管 pH 值下降,CIH 组有酸性反流发生。各组食管病理学比较可发现,肉眼观察 CIH 组食管黏膜有发红和糜烂,而 UC 组和 RH 组黏膜完整、光滑,呈白色。光镜下发现 CIH 组黏膜上皮鳞状细胞增生,细胞排列紊乱,炎症细胞浸润明显,UC 组和 RH 组仅可见少量炎症细胞。CIH 组病理表现已符合 GERD 的病理特点,即食管上皮炎症细胞浸润,表明 CIH 在 GERD 的发生中起到重要作用,CIH 状态的纠正有助于 GERD 的改善。而这也与临床研究结果:OS-

AHS 患者并发 GERD 经 nCPAP 治疗后不仅呼吸暂停症状减轻,而且反流症状也明显减轻相一致。其原因可能为:(1)OSAHS 患者在睡眠中反复发生的呼吸暂停,使胸腔负压显著增加,造成食管腔内负压加大,当其超过胃食管下括约肌张力时,由于“吸吮”作用而使胃内容物反流入食管。(2)OSAHS 系统性炎症在食管局部的表现:随着炎症因子 IL-6 表达的增高,单个细胞间连接蛋白减少^[9],食管上皮间缝隙增宽,细胞间连接松散,对反流物的防御及清除能力下降,更易致 GER 的发生。(3)夜间呼吸运动紊乱导致食管下括约肌功能不全和频繁觉醒引起植物神经功能紊乱等都可能与 GERD 发病有关。

张敏艳等^[6]报道与对照组比较 OSAHS 患者血清 CRP 及 IL-6 水平增高,经 nCPAP 治疗后,二者水平均显著减低,验证了 OSAHS 与炎症的关系和炎症反应的系统性。而课题组研究比较各组 IL-6 及 hs-CRP 的表达水平发现 CIH 组食管局部炎症因子表达增加显著,与张敏艳等的研究结果相符。因此可以认为 CIH 组的食管炎症反应是 OSAHS 系统性炎症在食管的局部表现。

综上所述,OSAHS 患者睡眠中反复出现的 CIH 和复氧可产生类似于缺血-再灌注的损伤,促使白细胞活化,白细胞内活性氧持续过量生成,产生过多的超氧化物自由基等,引起各种炎症因子的释放,直接或间接介导患者体内的炎症反应^[7]。然而 OSHAS 呼吸暂停时的另一生理变化是反复的微觉醒引起的睡眠片段化。这种慢性部分睡眠剥夺也与炎症标志物 CRP^[8],IL-6^[9]的增加有关。因此炎症因子 IL-6 和 hs-CRP 能够反应 OSAHS 病情及其全身和局部炎症的严重程度。本实验成功制作了 CIH 大鼠模型,而 CIH 组食管 pH 值及黏膜病理表现符合 GERD 的特点,CIH 组食管组织 IL-6、hs-CRP 表达明显增加,可以认为 CIH 是 GERD 发生的重要因素。OSAHS 夜间反复发生的呼吸暂停使胸腔负压增加,超过食管压力时,胃、十二指肠内容物便反流入食管,同时 CIH 所致的全身及食管局部炎症反应使食管上皮细胞间连接松散,黏膜对反流物的通透性增加,对反流物防御及抵抗能力下降,而炎症反应是一个级联放大的“瀑布”效应,更多的炎症细胞向食管黏膜上皮细胞内浸润,在食管黏膜上表现为食管 pH 值下降,上皮细胞内炎症浸润而符合 GERD 的病理表现。但有研究认为^[10],OSAHS 与 GRED 是发病率相似,互相独立的疾病,二者之间不存在发病原因上的相关性。也有人认为是 GERD 引起 OS-

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.009

YAP 基因及蛋白在肾癌中的表达及意义

李兴森¹, 黄 飏¹, 王德林², 唐 伟²

(1. 重庆市綦江区人民医院泌尿外科, 重庆 401420; 2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘 要】目的: 观察 Yes 相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)基因及蛋白在肾癌组织中的表达情况及其意义。方法: 采用 RT-PCR 技术及免疫组化检测 42 例肾癌组织和癌旁正常肾组织中 YAP 基因及蛋白的表达情况。结果: YAP 基因在肾癌组织中阳性表达率为 88.10%, 而在癌旁正常组织中仅为 14.29%。YAP 蛋白在肾癌组织中阳性率也高于癌旁正常组织(95.23% vs. 30.95%), 两者相比有统计学差异($P < 0.05$)。结论: YAP 可能与肾癌的发生发展密切相关, YAP 在肾癌中的异常表达可为肾癌的诊断、治疗提供实验依据, 尤其为诱导细胞凋亡和基因治疗肾癌打下基础。

【关键词】肾癌; Yes 相关蛋白; 逆转录聚合酶链反应; 免疫组化

【中国图书分类法分类号】R737

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-22

作者介绍: 李兴森(1963-), 男, 副主任医师,

研究方向: 泌尿肿瘤。

通信作者: 王德林, 男, 教授, Email: dlwang1968@sina.com。

AHS 的发生, 其机制可能是: ①下食管括约肌功能不全、食管廓清能力下降、食管内 pH 下降等均可反射性引起迷走神经兴奋, 导致气管收缩及呼吸抑制; ②食管内酸刺激引起气管高反应性或改变气管迷走神经张力。此外, 胃酸反流会引起喉炎和喉水肿, 这也会加重上呼吸道阻塞。因此, OSAHS 与 GERD 的关系, 目前仍有争议, 仍需要进一步探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] Green B T, Broughton W A, O' Connor J B. Maked improvement in nocturnal gastroesophageal reflux in a large cohort of patients with obstructive sleep apnea treated with continous positive airway pressure[J]. Arch Intern Med, 2003, 163(1): 41-45.
- [2] 郭超花, 王 蓓. OSAHS 的可能发病机制、对人体的危害及诊疗新进展[D]. 太原: 山西医科大学, 2010.
- Guo C H, Wang B. The pathogenesis, effect, diagnosis and treatment of the OSAHS[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2010.
- [3] 许 哲, 钟英强. 食管炎与细胞因子[J]. 国际内科学杂志, 2007, 34(3): 139-142.
- Xu Z, Zhong Y Q. Esophagitis and cytokines[J]. International Journal of Internal Medicine, 2007, 34(3): 139-142.
- [4] 王 璋, 司良毅, 廖友斌. 大鼠睡眠呼吸暂停综合征动物模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(1): 40-43.
- Wang Z, Si L Y, Liao Y B. Establishment of sleep apnea syndrome model in rats[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2006, 14(1): 40-43.
- [5] 徐兆军, 张振玉, 黄文斌, 等. 胃食管反流病患者食管上皮 Occludin 的表达及细胞间隙的改变[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(27): 2835-2839.
- Xu Z J, Zhang Z Y, Huang W B, et al. Expression of tight junction protein Occludin and changes in intercellular space in the esophageal epithelium in patients with gastroesophageal reflux disease[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2009, 17(27): 2835-2839.
- [6] 张敏艳, 刘卓拉, 张秀兰. 血清白介素-6、C-反应蛋白在阻塞性睡眠呼吸暂停通气综合征及其合并冠心病患者体内的水平变化[J]. 中国医药与临床, 2011, 11(1): 34-37.
- Zhang M Y, Liu Z L, Zhang X L. Variation of serum interleukin-6 and C-reactive protein levels in obstructive sleep apnea hypoventilation syndrome with or without accompanying CAD[J]. Chinese Remedies & Clinics, 2011, 11(1): 34-37.
- [7] Ryan S, Taylor C T, McNicholas W T. Predictors of elevated nuclear factor-kappaB-dependent genes in obstructive sleep apnea syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(7): 824-830.
- [8] Meier-Ewert H K, Ridker P M, Rifai N, et al. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(4): 678-683.
- [9] Vgontzas A N, Zoumakis E, Bixler E O, et al. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(5): 2119-2126.
- [10] 肖高辉, 王智凤, 柯美云, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与胃食管反流的关系及对抗反流治疗的效果[J]. 中华内科杂志, 1999, 38(1): 33-36.
- Xiao G H, Wang Z F, Ke M Y, et al. The relationship between obstructive sleep apnea and gastroesophageal reflux and the effect of antireflux therapy[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 1999, 38(1): 33-36.

(责任编辑: 关蕴良)