

网络出版时间: 2017-7-20 23:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.006.html>

间歇性低氧对离体小鼠胸主动脉舒张功能的影响

程文慧 范一菲 沈帆 沈兵 钟明奎

摘要 目的 研究不同时间的间歇性低氧对离体小鼠胸主动脉舒张功能的影响。方法 将离体的胸主动脉分为对照组和间歇性低氧组(IH组),分别放入正常培养箱和IH培养箱内培养。应用血管张力测定技术,观察间歇性低氧6、12、24 h对离体培养的小鼠胸主动脉舒张功能的影响。结果 与对照组相比,间歇性低氧6 h的血管内皮舒张功能差异无统计学意义;间歇性低氧12 h和24 h的血管内皮依赖性舒张明显减弱($P < 0.01$),内皮非依赖性舒张低浓度($1 \sim 10$ mmol/L)表现减弱,增大硝普钠浓度,内皮非依赖性舒张差异无统计学意义。结论 长时间间歇性低氧培养血管可以使离体血管内皮功能紊乱和血管平滑肌受损。

关键词 间歇性低氧;血管培养;血管内皮功能障碍

中图分类号 R 331.33;R 363.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)09-1284-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.006

阻塞性睡眠呼吸综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)是一种常见的睡眠呼吸障碍性疾

2017-04-01 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070066);安徽省教育厅自然科学重点科研项目(编号:KJ2010A176);安徽医科大学博士科研基金(编号:XJ201221)

作者单位:安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:程文慧,女,硕士研究生;

钟明奎,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: mingkuizhong@ahmu.edu.cn

病,由于睡眠过程中反复发生的低通气和呼吸暂停,使机体处于一种间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)与再氧合交替出现的特殊内环境状态,OSAS患者的重要损伤机制及主要病理生理学特点是发生IH和呼吸中断,IH被认为是引起一系列心血管疾病的危险因素^[1]。血管内皮细胞在参与物质交换、血管形成、防止血小板聚集和血栓形成方面具有重要作用。血管内皮障碍的发生也与高血压、动脉粥样硬化等多种心血管疾病密切相关^[2]。该研究旨在通过对离体血管进行不同时间的IH培养,观察IH对离体血管内皮功能的影响,为防治IH导致的血管内皮功能障碍提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性昆明种小鼠 25~30 g,清洁级,由安徽医科大学实验动物中心提供。自由摄食和饮水,通风良好,室温维持在 $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ 。

1.1.2 仪器与主要试剂 DMT myograph 610 M张力测定系统(丹麦DMT公司);CO₂培养箱(上海一恒仪器公司);IH控制仪(上海鑫野半导体科技有限公司);胎牛血清(美国Clark公司);DMEM培养液(美国Gibco公司);青霉素链霉素溶液(上海碧云天生物技术有限公司);U46619、乙酰胆碱(ace-

kinase-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6) in human colon cancer. **Methods** Curative tissues of colon cancer and tumor-adjacent tissues more than 5 cm away from lesioned tissues were collected from the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology from September. PERK and ATF6 mRNA level was detected by real-time quantitative PCR (RT-PCR), immunohistochemistry (IHC) and Western blot were used to detect protein levels of PERK and ATF6. The relationship of the clinical pathological features of these patients with expression of PERK or ATF6 was analyzed. **Results** PERK and ATF-6 mRNA were down-regulated in cancer tissues compared to their corresponding tumor-adjacent tissues ($P < 0.05$). In consistent with gene expression, PERK and ATF6 protein were also down-regulated in colon cancer ($P < 0.05$). IHC showed that PERK and ATF6 were mainly located in the cytoplasm of colonic epithelial cells. **Conclusion** ER stress was involved in the tumorigenesis of colon cancer.

Key words activating transcription factor 6; colon cancer; endoplasmic reticulum stress; pancreatic ER kinase-like ER kinase; unfolded protein response

tylcholine, ACh)、硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)(美国 Sigma 公司); Krebs 液(NaCl 118 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25.2 mmol/L 和 glucose 11.1 mmol/L)、高钾溶液(NaCl 58 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、KCl 60 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25.2 mmol/L 和 glucose 11.1 mmol/L)、PBS 缓冲液(NaCl 136.75 mmol/L、KCl 2.68 mmol/L、KH₂PO₄ 1.47 mmol/L、Na₂HPO₄ · 12H₂O 25.60 mmol/L)。

1.2 方法

1.2.1 血管环的制备 用 CO₂ 吸入法处死小鼠,迅速取出胸主动脉,置于灭菌 PBS 液中,并持续通入混合气体(95% O₂ 和 5% CO₂)。在解剖显微镜下,用消毒过的手术剪和手术镊小心去除血管环周围的脂肪组织和结缔组织,然后沿血管纵轴剪成长约 2 mm 的血管环。

1.2.2 离体血管培养 将游离出来的血管环经无菌 PBS 洗 2 次后放入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,放进正常培养箱或间歇性低氧培养箱培养,分别在 6、12、24 h 后从培养箱取出血管环进行离体血管张力实验。

1.2.3 离体血管 IH 模型的建立 参考文献^[3]的方法,在现有动物模型的基础上进行改进,间歇性低氧培养箱采用氮气稀释氧浓度的原理^[4],向 CO₂ 培养箱里循环充入氮气和氧气,每一个循环为 30 min。充入氮气 10 min,调节充气速度,使箱内氧浓度降至 5% 左右并维持 10 min;随之充入纯氧 5 min,氧浓度逐渐恢复至 21% 左右并维持 5 min,整个循环 CO₂ 浓度维持在 5%,培养箱内的氧浓度通过 KY-2F 控氧仪监测,培养箱内氮气和氧气的切换通过定时电路程序控制。将离体的血管置于间歇性低氧培养箱内培养, IH 组血管予以 6、12、24 h 间歇性的低氧刺激;对照组血管置于正常 CO₂ 培养箱培养相同的时间。

1.2.4 离体血管张力实验 将培养的血管环固定于 DMT Myograph 的浴槽内^[5],浴槽内预置 5 ml 的 Krebs 液,持续通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体保持 pH 在 7.4,温度维持 37 °C。拉伸血管环,给予血管环 2 mN 的前负荷,利用 Powerlab 系统记录血管张力的变化。平衡 30 min 后,加入 60 mmol/L 的高钾溶液激活血管 2 次,待达到最大收缩效应时,吸出高钾溶液,用 Krebs 液洗 3 次,每次 5 min。然后加入 10 nmol/L U46619 预收缩血管,收缩达到稳定值

后加入 ACh (10⁻⁸ ~ 10⁻⁵ mol/L) 或 SNP (10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ mol/L),检测血管内皮依赖性或非依赖性舒张功能。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的比较采用 *t* 检验,定性资料的比较采用方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IH 对血管内皮依赖性舒张的影响 与正常培养相比, IH 6 h 后,小鼠胸主动脉内皮依赖性舒张差异无统计学意义; IH 12 h 和 24 h 后,血管内皮依赖性舒张明显减弱 (*F* = 56.30、121.76, *P* < 0.01)。胸主动脉离体 IH 培养 6 h, 10 μmol/L ACh 引起的最大舒张程度 (64.34 ± 5.99)% 较对照组 (79.37 ± 5.65)% 差异无统计学意义, IH 分别培养血管 12 h 和 24 h 后, 10 μmol/L ACh 引起的最大舒张反应 [(34.76 ± 3.88)%、(29.23 ± 3.16)%] 均较对照组 [(65.97 ± 4.94)%、(60.98 ± 4.39)%] 减弱 (*t* = 3.87、3.955, *P* < 0.01),表明 IH 培养离体血管 12 h 和 24 h 可以使其内皮舒张功能失调。见图 1。

2.2 IH 对内皮非依赖性舒张的影响 IH 6 h,胸主动脉内皮非依赖性舒张较对照组差异无统计学意义, IH 培养胸主动脉 12 h 后, 1 nmol/L SNP 引起的舒张作用较对照组明显减弱 (*t* = 10.68, *P* < 0.01)。IH 培养胸主动脉 24 h 后, 1 nmol/L 和 10 nmol/L SNP 引起的舒张作用较对照组明显减弱 (*t* = 3.43、4.70),增加 SNP 浓度,内皮非依赖性舒张较对照组差异无统计学意义。见图 2。

3 讨论

正常的血管内皮可以通过内皮细胞分泌一系列活性物质来调节血管张力、调控血管的内皮功能和平滑肌的增殖。各种损伤性刺激可引起内皮细胞的损伤,使其形态、结构及分泌的各种物质发生改变,最终导致其功能的改变,主要是血管内皮功能受损。血管内皮功能紊乱提示血管的自身稳定功能失衡,其特征就是舒张功能减退、收缩功能增强、慢性血栓性倾向以及炎症细胞激活等,这些功能障碍与动脉血管损伤及动脉粥样硬化等心血管疾病的发生进展密切相关^[2]。

NO 是内皮细胞释放的最重要的血管活性物质之一,在维持血管张力及生理活性方面具有积极的作用^[6]。NO 的生物利用度降低是内皮功能紊乱的

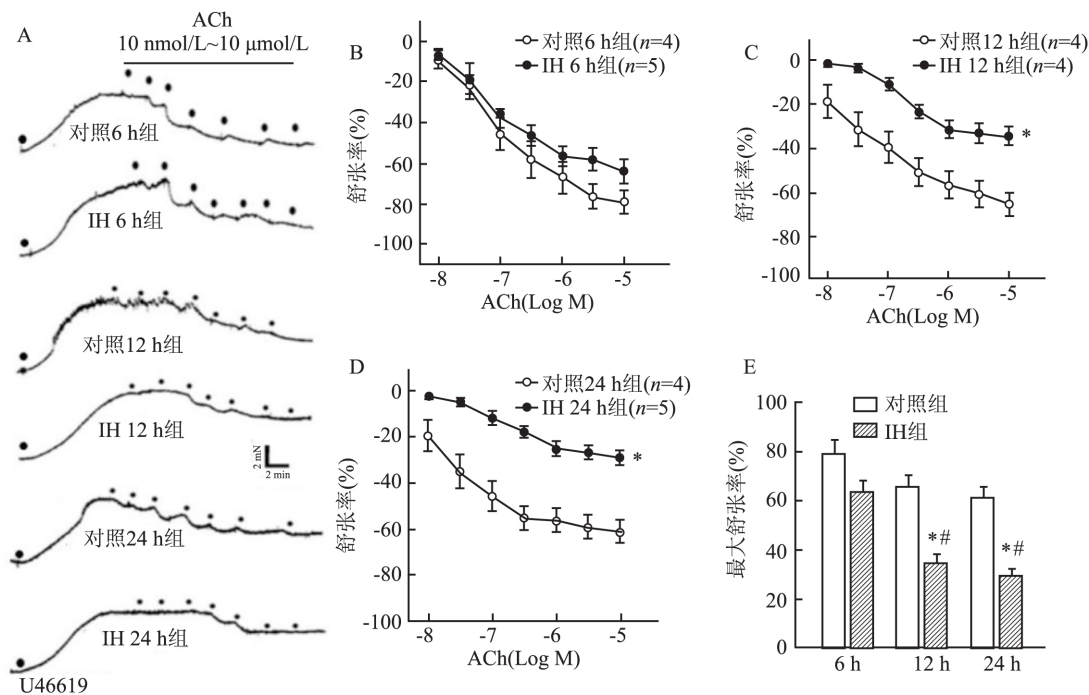


图1 血管张力检测胸主动脉内皮依赖性舒张功能

A:不同培养条件下离体血管张力原始图;B:IH 6 h 血管内皮依赖性舒张变化情况;C:IH 12 h 内皮依赖性舒张变化情况;D:IH 24 h 血管内皮依赖性舒张变化情况;E:不同 IH 时间,ACh 引起的最大舒张效应;与对照组比较: * $P < 0.01$;与 IH 6 h 组比较: # $P < 0.01$

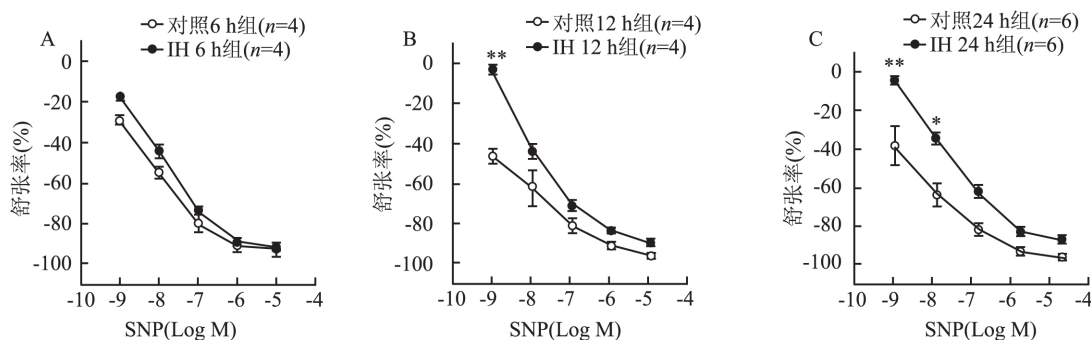


图2 血管张力检测胸主动脉内皮非依赖性舒张功能

A:IH 培养 6 h 胸主动脉内皮非依赖性舒张反应;B:IH 培养 12 h 胸主动脉内皮非依赖性舒张反应;C:IH 培养 24 h 胸主动脉内皮非依赖性舒张反应;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

特征,NO 由细胞内 L-精氨酸脱羧基反应产生,在 NO 合酶的催化作用下,可激活血管平滑肌鸟苷酸环化酶,生成环磷酸鸟苷,使平滑肌细胞内 Ca^{2+} 水平降低而导致血管平滑肌舒张^[7]。

本研究应用离体血管培养的方法探讨 IH 对小鼠胸主动脉舒张功能的影响,结果显示 IH 处理 6 h 后,胸主动脉 ACh 引起的内皮依赖性舒张和 SNP 引起的内皮非依赖性舒张差异均无统计学意义,说明短时间的 IH 处理没有使血管功能受损。随着时间的延长,IH 处理 12 h 和 24 h 后,胸主动脉内皮依赖性舒张明显减弱,说明 IH 导致离体培养的血管内皮功

能障碍;外源性 NO 供体 SNP 的浓度在 1 nmol/L 和 10 nmol/L 时,IH 组胸主动脉内皮非依赖性舒张反应明显低于对照组,增加 SNP 浓度,两组内皮非依赖性舒张反应差异无统计学意义,提示有部分平滑肌受损。

血管内皮功能障碍是 OSAS 增加心血管风险的关键因素^[8]。OSAS 导致血管内皮功能障碍的机制尚未完全阐明,可能与氧化应激^[9]和细胞活性物质 NO 减少^[10-11]有关。建立稳定的血管培养体系是研究 IH 导致的血管功能紊乱的关键,本研究对离体血管进行急性 IH 处理,模拟 IH 导致血管功能紊乱

的过程,模型可以使 IH 12 h 和 24 h 后,胸主动脉内皮依赖性舒张显著减弱,提示血管功能受到障碍,与很多动物模型水平上研究 IH 导致内皮功能紊乱结果一致^[12],可以通过 IH 血管培养体系,快速建立模型,为研究 IH 导致血管功能障碍的具体机制打下基础。该模型的特点是:相对于整体实验可以缩短 IH 导致血管内皮损伤的周期,从分子水平角度更加方便地研究其损伤机制,取材简单,节省造模时间,方便给药处理。

参考文献

- [1] Mc Nicholas W T, Bonsignore M R. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence basic mechanisms and research priorities [J]. *Eur Respir J*, 2007, 29 (1): 156–78.
- [2] Vasudevan H, Nagareddy P R, McNeill J H. Gonadectomy prevents endothelial dysfunction in fructose-fed male rats: a factor contributing to the development of hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291(6): H3058–64.
- [3] Li R C, Haribabu B, Mathis S P, et al. Leukotriene B4 receptor-1 mediates intermittent hypoxia-induced atherogenesis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(1): 124–31.
- [4] 唐志强, 范一菲, 汪金丽, 等. 室旁核中血管紧张素 II 通过活性氧介导慢性间歇性低氧大鼠的升压作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(4): 472–6.
- [5] Huang Y, Chan F L, Lau C W, et al. Roles of cyclic AMP and Ca^{2+} -activated K^{+} channels in endothelium-independent relaxation by urocortin in the rat coronary artery [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(3): 824–33.
- [6] Kemi O J, Haram P M, Hoydal M A, et al. Exercise training and losartan improve endothelial function in heart failure rats by different mechanisms [J]. *Scand Cardiovasc J*, 2013, 47(3): 160–7.
- [7] Bian K, Doursout M F, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2008, 10(4): 304–10.
- [8] Bruno R M, Rossi L, Fabbri M, et al. Renal vasodilating capacity impaired in patients with obstructive sleep apnea syndrome and nontraditional cardiovascular risk factors [J]. *J Hypertens*, 2013, 31(7): 1456–64.
- [9] He Y, Chen R, Wang J, et al. Neurocognitive impairment is correlated with oxidative stress in patients with moderate-to-severe obstructive sleep apnea hypopnea syndrome [J]. *Respir Med*, 2016, 120: 25–30.
- [10] Channon K M. Tetrahydrobiopterin: a vascular redox target to improve endothelial function [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2012, 10(6): 705–8.
- [11] Jelic S, Lederer D J, Adams T, et al. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea [J]. *Circulation*, 2010, 121(8): 1014–21.
- [12] Wang B, Yan B, Song D, et al. Chronic intermittent hypoxia down-regulates endothelial nitric oxide synthase expression by an NF- κ B-dependent mechanism [J]. *Sleep Med*, 2013, 14(2): 165–71.

Effect of intermittent hypoxia on the diastolic function of isolated thoracic aorta in mice

Cheng Wenhui, Fan Yifei, Shen Fan, et al

(Dept of Physiology, College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of varying degrees of intermittent hypoxia (IH) on the vasodilation of isolated thoracic aorta in mice. **Methods** The the thoracic aorta *in vitro* were divided into control group and intermittent hypoxia (IH) group, which were cultured in normal incubator and intermittent hypoxia incubator, respectively. Then the diastolic effect of the thoracic aorta in IH condition (6, 12, 24 h) *in vitro* were observed by the vascular tension measurement (myography). **Results** Compared with the control groups, the endothelium-dependent vasodilation of thoracic aorta that exposed to IH 6 h was not changed while IH 12 h and 24 h were significantly decreased ($P < 0.01$). However the endothelium-dependent vasodilation induced by sodium nitroprusside (SNP) at low concentrations (1 ~ 10 nmol/L) were decreased. With the increasing concentration of SNP, there was no difference in endothelium independent relaxation between the IH groups and control groups. **Conclusion** The isolated thoracic aorta that exposed to prolonged intermittent hypoxia can cause vascular abnormality due to the dysfunction of endothelium and vascular smooth muscle.

Key words intermittent hypoxia; vascular culture; vascular endothelial dysfunction