文章编号:1000-5404(2007)13-1311-02

论著

急性缺氧诱导C57BL/6J小鼠瘦素表达增加

刘 茜[1],吴亚梅[2],徐 玲[2],唐 超[3],种银保[3] ([1]重庆市第三人民医院老年呼吸科,重庆 400014;[2]重庆医科大学附属第一医院肺科,重庆 400016;[3]第三军医大学新桥医院设备科,重庆 400037)

提 要:目的 观察缺氧后小鼠血清和中枢神经系统瘦素水平的变化。**方法** 以C57BL/6J小鼠为研究对象,利用医学自动测控缺氧仓(XQ-I型)复制机体常压缺氧状态,分为正常组、缺氧24 h组、缺氧48 h组,收集小鼠血清、脑脊液和脑组织(去除大脑和小脑后)匀浆标本,利用放射免疫方法检测瘦素浓度。**结果** 缺氧24、48 h组小鼠血清、脑脊液和脑组织内的瘦素水平均显著高于未缺氧小鼠($P<0.05$),但缺氧24 h组和缺氧48 h组之间没有明显差别($P>0.05$)。**结论** 缺氧可作为一种独立的诱导因素促进小鼠脂肪组织瘦素的表达,同时使进入中枢神经系统内的瘦素水平亦明显增加。

关键词:缺氧;瘦素;呼吸
中图法分类号:R341;R364.4;R446.1 **文献标识码**:A

Influence of hypoxia on leptin expression in C57BL/6J mice

LIU Xi[1], WU Ya-mei[2], XU Ling[2], TANG Chao[3], ZHONG Yin-bao[3] ([1]Department of Geratology, The Third People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014; [2]Department of Lung Diseases, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [3]Department of facility, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of hypoxia on leptin expression in serum, CSF and brain tissue of C57BL/6J mice. **Methods** C57BL/6J mice were divided into 3 groups: the normal control, 24-hour hypoxia group and 48-hour hypoxia group. The latter two groups exposed to hypoxia in the man-made auto pressure and hypoxia control cabin (XQ-I). Radioimmunoassay was used to detect the leptin level. **Results** The leptin level in the serum, CSF and brain tissue of mice exposed to hypoxia were higher than that of normal control, but no difference was found between 24-hour hypoxia group and 48-hour hypoxia group. **Conclusion** Hypoxia probably induces the increasing of leptin expression in fat tissue, as well as in the central nervous system.

Key words: hypoxia; leptin; respiration

缺氧在呼吸系统疾病中极为常见,对缺氧后机体相关调控机制的研究一直是呼吸科研究领域的重要组成部分。瘦素是新近发现的一种主要参与机体能量代谢的蛋白质类激素,国外有研究表明瘦素具有正向改善呼吸的作用[1]。我们在以前的研究中发现单独的缺氧刺激能够诱导小鼠白色脂肪组织瘦素基因表达增加,且对大脑脉络丛微血管转运性受体(Ra、Rc)和功能性Rb受体基因亦有明显的促进表达作用[2],提示缺氧可能作为一种独立的因素反馈性使瘦素表达增加,后者通过刺激呼吸中枢逆转低通气。为进一步证实缺氧和瘦素的关系,本研究直接观察了缺氧后小鼠血清及脑组织瘦素蛋白水平的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

3周龄健康C57BL/6J小鼠30只,雄性,体质量17~19 g,购自第三军医大学实验动物中心,按照随机数字表法分为未缺氧组、缺氧24 h组、缺氧48 h组,每组10只。

1.2 小鼠缺氧模型的建立[3]

利用医学自动测控缺氧仓(XQ-I型)复制机体常压缺氧状态:将小鼠装笼,给予足够新鲜食物、水,置缺氧仓中,依靠仓内传感器、MCGS控制软件及仓外控制计算机使舱内条件保持基本恒定:氧气浓度(9.8±0.2)%,CO_2浓度(0.3±0.1)%。到达处理时间后,从仓中取出小鼠,迅速采集实验标本。

1.3 小鼠脑脊液、血清及脂肪标本的采集

将实验小鼠预先剃去头顶部的毛发,到达缺氧的处理时间后立即人工固定,在顶枕骨交接缝处小心穿刺,针尖方向朝后下并与水平线成30°左右,有落空感时回抽,获得的透明液体即为脑脊液,离心后-20 ℃保存。采集脑脊液后立即将小鼠断颈处死,头部置于冰盒中保存;同时收集血清,并采集小鼠双侧

作者简介:刘 茜(1974-),女,贵州省贵阳市人,硕士,主治医师,主要从事老年呼吸系统疾病方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)63511494,E-mail:liuxi_cq@163.com
通讯作者:吴亚梅,电话:(023)68898698
收稿日期:2006-10-12;修回日期:2006-11-21

附睾、腹股沟皮下脂肪。

1.4 脑干、间脑等混合脑组织匀浆的采集

将小鼠头部从冰盒中取出，剪除头部皮肤，采集完整脑组织于湿润的无菌纱布上。去除硬脑膜、表面大血管、大脑、小脑，保留完整脑干和间脑，置于 EP 管中。将获得脑组织用冰 D-Hanks 溶液洗 3 次，然后用锋利手术刀切碎至体积约 1 mm^3，置于玻璃匀浆器中（冰水中），加入 1 mol/L HCl 1 ml，匀浆，4 ℃离心 15 min。吸取上清液，加入 1 mol/L NaOH 1 ml 混匀、离心，吸取上清液，-20 ℃冰箱保存待测。

1.5 血清瘦素检测

利用放射免疫方法，具体按说明书进行。试剂盒为美国 Assay Design 公司产品。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SAS 6.12 统计软件行 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 缺氧对小鼠皮下脂肪含量的影响

小鼠附睾、腹股沟皮下脂肪垫含量较多，取材方便，容易保持完整和称量。本实验分别采集了 3 个不同处理组小鼠的双侧脂肪垫，每组 10 只。结果显示，小鼠缺氧 24、48 h 后其双侧附睾、腹股沟皮下脂肪垫的含量分别为（228.38 ± 71.27）g 和（221.14 ± 39.26）g，与未缺氧处理小鼠（240.46 ± 56.32）g 相比虽然有所减轻，但统计学分析结果表明并没有显著性差别（$P>0.05$）。

2.2 缺氧对小鼠血清瘦素表达的影响

正常未缺氧小鼠血清瘦素水平为（7.69 ± 1.33）ng/ml，缺氧 24、48 h 后血清瘦素分别为（18.77 ± 2.07）ng/ml 和（23.21 ± 1.64）ng/ml，均显著高于未缺氧小鼠血清瘦素水平（$P<0.05$）。但缺氧 24 h 组和缺氧 48 h 组之间的血清瘦素水平并无显著性差异（$P>0.05$），提示随缺氧时间延长和缺氧程度加深，血清瘦素并不能继续有意义的升高，与缺氧后脂肪组织瘦素基因的表达变化曲线类似[2]。

2.3 缺氧后小鼠脑脊液和混合脑组织瘦素水平的变化

血清瘦素必须经受体转运进入脑脊液与功能性受体结合才能发挥对呼吸中枢的调节作用[4]，因此我们观察了小鼠脑脊液和脑组织内（呼吸中枢和瘦素功能性受体主要位于脑干和间脑，因此去除大脑和小脑）的瘦素浓度变化。结果显示，正常未缺氧小鼠的脑脊液和脑组织中均存在较高浓度的瘦素，缺氧处理后，二者瘦素浓度均显著升高（$P<0.05$），但时间变化曲线具有差异：脑脊液的瘦素水平随缺氧时间延长继续升高，而缺氧 24 h 和缺氧 48 h 的脑组织内的瘦素浓度并没有显著性差异（$P>0.05$）。见表 1。

表 1 缺氧处理前后小鼠脑脊液和脑组织匀浆瘦素水平的变化（ng/ml，$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	脑脊液	混合脑组织匀浆
未缺氧组	6	12.04 ± 5.72	22.17 ± 13.84
缺氧 24 h 组	7	28.63 ± 7.59[a]	43.14 ± 10.30[a]
缺氧 48 h 组	7	39.21 ± 6.11[ab]	47.42 ± 7.92[a]

a：$P<0.05$，与未缺氧组比较；b：$P<0.05$，与缺氧 24 h 组比较

3 讨论

瘦素（leptin）由 ob 基因编码、脂肪组织表达的蛋白质类激素，由 166 或 167 个氨基酸组成[1]。瘦素具有广泛的生理学作用，而瘦素和呼吸功能的关系最近几年才陆续有少量报道。国外对 ob/ob 小鼠（一种基因缺陷鼠）的呼吸监测和瘦素替代研究表明瘦素能够提高小鼠基线通气量、增强小鼠对 CO_2 刺激的反应能力[5]，说明瘦素可直接刺激 ob/ob 小鼠呼吸控制中枢逆转低通气，改善呼吸功能。但是目前为止，缺氧能否作为一种独立的刺激因素诱导瘦素表达增加还不清楚。为深入明确二者的关系，本实验我们进一步直接观察了缺氧小鼠血清和中枢神经系统内瘦素蛋白的表达变化。

因有研究提示血清瘦素表达水平及其作用机制具有明显性别相关性[6]，本实验以雄性小鼠为研究对象。实验结果显示，缺氧可使小鼠血清、脑脊液和脑组织内的瘦素水平显著增加，通过对缺氧前后所采集的小鼠双侧附睾、腹股沟皮下脂肪标本的精确定量，显示短时间的缺氧并没有明显影响小鼠皮下脂肪的质量，提示小鼠缺氧刺激是通过促进瘦素表达增加其血清浓度，而与脂肪质量变化无关。现初步认为：对正常机体，低氧状态可直接刺激白色脂肪组织瘦素表达，增加血清内的瘦素浓度，后者通过表达增加的大脑脉络膜血管 Ra、Rc 受体的转运，使进入脑脊液的瘦素增加，然后与呼吸中枢的功能性受体 Rb 结合，兴奋呼吸中枢，最终在一定程度上逆转机体低氧状态。在后续研究中，我们拟通过小鼠脑室内注射瘦素和瘦素拮抗剂，观察缺氧小鼠血氧饱和度的变化，以期进一步明确瘦素对正常机体呼吸功能的调控作用。

参考文献：

[1] 刘蓉蓉，姬长友. OSAHS 对血浆咽部组织中 Leptin 及其受体表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(24)：2242-2244.

[2] 刘 茜，吴亚梅，徐 玲，等. 缺氧对 C57BL/6J 小鼠瘦素及其受体基因表达的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志，2005，28(3)：173-175.

[3] 种银保，齐悦国，钱桂生，等. 全自动低氧高二氧化碳饲养舱的研制与临床应用[J]. 中国医疗器械杂志，2001，25(1)：36-38.

[4] Bjorbaek C, Kahn B B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery[J]. Recent Prog Horm Res, 2004, 59: 305-331.

[5] Shimura R, Tatsumi K, Nakamura A, *et al*. Fat accumulation, leptin, and hypercapnia in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome[J]. Chest, 2005, 127(2): 543-549.

[6] Polotsky V Y, Wilson J A, Smaldone M C, *et al*. Female gender exacerbates respiratory depression in leptin-deficient obesity[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(8 Pt 1): 1470-1475.

（编辑 王小寒）