基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0339-03

细胞色素 C 对大鼠睡眠呼吸暂停综合征模型的作用

李劲松,兰志红,方红雁,高明华
(重庆市第三人民医院耳鼻咽喉头颈外科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究细胞色素 C 对大鼠睡眠呼吸暂停综合征(Sleep apnea syndrom,SAS)动物模型的治疗作用,并探讨其可能的作用机制。方法:选取老年 SD 大鼠 40 只,分为模型组、0.25 mg 细胞色素 C 治疗组、0.5 mg 细胞色素 C 治疗组、正常对照组,每组 10 只。观察各组动物生命体征;取动脉血进行血气分析;取大脑皮层,应用 Western blot 法检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达。结果:治疗组动物生命体征较模型组平稳,较正常对照组差;模型组动脉血 pH 值、PO_2、SaO_2 最低,PCO_2 最高,依次为 0.25 mg 细胞色素 C 治疗组、0.5 mg 细胞色素 C 治疗组、正常对照组,各组差异具有统计学意义($P<0.05$);Western blot 法检测到凋亡相关基因 Bcl-2 表达在模型组中最低,在 0.25 mg 细胞色素 C 治疗组、0.5 mg 细胞色素 C 治疗组、正常对照组中的表达依次增强($P<0.05$),而 Bax 表达在模型组中最强,在 0.25 mg 细胞色素 C 治疗组、0.5 mg 细胞色素 C 治疗组、正常对照组中的表达依次减弱($P<0.05$)。结论:细胞色素 C 可提高大鼠睡眠呼吸暂停综合征动物模型脑组织对氧的利用率、改善血氧含量、保护脑细胞,其机制可能与上调 Bcl-2、下调 Bax 有关。

【关键词】睡眠呼吸暂停综合征;细胞色素 C;Bcl-2;Bax
【中国图书分类法分类号】R563.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

Effect of cytochrome C on rats with sleep apnea syndrom

LI Jing-song, et al
(*Department of Dtolaryngology Head and Neck Surgery, The Third People's Hospotial of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of cytochrome C on rats with sleep apnea syndrom and approach its possible mechanism. *Methods*: 40 old SD rats were randomly divided into 4 groups with 10 rats in each group: model group, 0.25 mg dose cytochrome C group, 0.5 mg dose cytochrome C group and control group. The vital signs of animals in each group were monitored every day, and blood gas analysis was performed by taking suction arterial blood, and Western Blot method was used to analyse Bcl-2 and Bax protein of cerebral cortex. *Results*: The vital signs of cytochrome C group were more stable than that of model group, but worse than that of control group. The values of pH, PO_2 and SaO_2 were lowest and the PCO_2 highest in model group and the change ranked as following order: model group, 0.25 mg dose cytochrome C group, 0.5 mg dose cytochrome C group and control group ($P<0.05$). Western Blot result showed that the protein expression of Bcl-2 was lowest in model group and it was increased in other groups ($P<0.05$), while Bax protein was highest in model group and was decreased in other groups ($P<0.05$). *Conclusion*: These results demonstrated that Cytochrome C could raise O_2 utilization rate in rats with sleep apnea syndrom, improve blood oxygen content, and protect brain cell. The action mechanism might be related with up-regulating Bcl-2 and dow-regulating Bax.

【Key words】Sleep apnea syndrom; Cytochrome C; Bcl-2; Bax

睡眠呼吸暂停综合征(Sleep apnea syndrom,SAS)是因气道阻塞或(和)中枢抑制引发阵发性呼吸暂停或通气不良的一种综合征,而就其病理生理机制而言实质上就是一个长期间歇性缺氧的过程。SAS 是一种具有潜在危险的高发性疾病,由于睡眠时发生低氧血症及高碳酸血症,最终可导致心、脑、肺、内分泌功能紊乱等一系列并发症。随着研究的不断深入,其疗法也不断完善。但对于老年患者,SAS 发展到后期常合并有肺性脑病,临床治疗较为困难。通过多年的临床观察发现,在传统疗法的基础上联合细胞色素 C 治疗 SAS 疗效显著,但机制不明。本研究采用大鼠 SAS 动物模型,从几个方面探讨细胞色素 C 对 SAS 合并肺性脑病的作用机制。

作者介绍:李劲松(1973-),男,硕士,主治医师,
研究方向:干燥性鼻炎的治疗。
通讯作者:方红雁,女,副教授,E-mail:guoSL999@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料

老年 SD 大鼠(20 月龄,雌雄各半),体重(415.5 ± 40.8)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(渝)20020001,饲养于重庆医科大学动物中心清洁级动物室;注

射用细胞色素 C（15 mg），成都天台山制药有限公司；5%葡萄糖注射液（250 ml），重庆莱美药业有限公司；Western blot 试剂盒、兔抗大鼠 Bcl-2 及 Bax 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司；CY-12C 型测氧仪（浙江电化分析仪器厂）；IL1620 型血气分析仪（美国 IL 公司）；压缩空气与低氧混合气体（90% N_2 +10% O_2，重庆朝阳气体公司）。

1.2 SAS 动物模型制备

参照 Fagan KA[1]及王璋等[2]的方法并加以改进：首先进行低氧舱制作，选用适宜厚度的有机玻璃制成 40 cm × 30 cm × 20 cm 长方体舱，一端取直径为 10 cm 的孔，加盖密封，便于缺氧试验过程中取放动物，侧壁中央取直径为 5 mm 的孔 2 个，分别用于输入低氧气体与空气，两侧壁及两端分别取直径为 0.5 mm 的小孔一个，用于气体采样及平衡舱内压力。实验过程中舱内 CO_2 与水蒸气分别用钠石灰与无水氯化钙吸收，缺氧过程中动物活动自由，不进饮食。气体控制通路制作，设计为单片机程序控制的电磁阀开关电路，分别调节低氧气体与空气的输入；控制系统一端经高压管接压缩气体钢瓶，一端经普通橡胶管接低氧动物舱。长期间歇性低氧实验时，压缩空气与混合气体（90%N_2+10%O_2）在电磁阀控制下分别以 2 L/min 的流速输入低氧舱，间隔 30 s，每分钟循环 1 次，每天 10 h（22:00 ~ 8:00），其余时间置大鼠饲养笼，室温、空气、正常饮食，共缺氧 12 周。经过 12 周的低氧实验多数动物出现活动度降低，运动协调性降低，嗜睡，进食量减少等现象，同时可观察到大鼠球结膜充血水肿等症状。

1.3 药物配制

用 5%葡萄糖注射液将注射用细胞色素 C 稀释成 0.1% 的溶液备用。

1.4 分组及治疗

选取体重基本一致的老年 SD 大鼠 40 只，雌雄各半，从中随机选取 30 只动物用于制备 SAS 动物模型，模型制备好后随机分为模型组、0.25 mg 细胞色素 C 治疗组、0.5 mg 细胞色素 C 治疗组，剩余 10 只动物设为正常对照组，饲养条件相同。模型组仅给予 5%葡萄糖注射液 0.5 ml，尾静脉注射，每日一次；0.25 mg 细胞色素 C 治疗组给于 0.25 mg 细胞色素 C，尾静脉注射，每日一次；0.5 mg 细胞色素 C 治疗组给于 0.5 mg 细胞色素 C，尾静脉注射，每日一次；对照组不做任何处理。共治疗 7 d，在治疗过程中低氧动物仍给于低氧处理，正常对照组每日同时置相同规格有机玻璃舱内，空气输入，无缺氧，所有动物在第 8 d 上午取材。

1.5 血气分析

采用心脏穿刺法取大鼠动脉血 2 ml，用于进行血气分析，检测 pH 值、氧分压（PO_2）、氧饱和度（SaO_2%）和二氧化碳分压（PCO_2），由重庆医科大学第一附属医院检验科完成。

1.6 动物取材及 Western blot 法检测

采血后断颈处死动物，低温操作台上快速解剖大脑，剥离大脑皮层，将动物大脑皮层收集起来，剪碎，按 1:5 的比例加入细胞裂解液裂解脑组织，并提取总蛋白，用双喹啉甲酸（Bicinchoninic acid，BCA）法检测样品的蛋白浓度，并计算出上样体积。样品中加入一定量的上样缓冲液，沸水浴 5 min，再进行变性 SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳，电转膜，丽春红 S 染膜，脱色，5%脱脂奶粉封闭，TBST 洗膜，然后加入 Bax 及 Bcl-2 一抗（1:200）4℃孵育过夜，TBST 洗膜后加入结合有辣根过氧化酶标记的 IgG 二抗（1:4 000）室温孵育 2 h，ECM 化学发光剂检测，显影，定影，以 β-actin 蛋白作为内参照。采用 Image Tool 凝胶图像分析系统进行分析，以获得各条带的平均光密度值（X），以 β-actin 的平均光密度值（A）作为内参照，计算基因的相对表达量（X/A）并进行半定量分析。

1.7 统计学处理

血气分析结果及 Western blot 所得各组蛋白平均光密度值以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，应用 SPSS13.0 软件进行统计分析，采用多个均数间多重比较的一维方差分析及 LSD-t 检验进行统计学分析，$P<0.05$ 差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物生命体征观察

模型组大鼠先后出现少动，反应迟钝，精神萎靡，嗜睡，食量减少，生长缓慢，毛发零乱、脱落、缺少光泽等表现。大小剂量组大鼠也出现少动，反应迟钝，食量减少，生长缓慢，毛发零乱、脱落、缺少光泽等表现，但程度较轻。正常对照组生命体征平稳，活动正常，反应灵敏，进食可，毛发光亮，无嗜睡等精神症状出现。

2.2 血气分析结果

具体结果见表 1。与模型组比较，0.25 mg 剂量组、0.5 mg 剂量组及对照组所得 pH 值、PO_2、SaO_2 都较高，且依次递增，同时各指标两两比较差异均具有统计学意义（$P<0.05$）；而模型组、0.25 mg 剂量组、0.5 mg 剂量组及对照组所得 PCO_2 值依次递减，组间两两比较差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.3 半定量 Western blot 法检测结果

各实验组的 Bax、Bcl-2 及 β-actin 蛋白表达见图 1，所获得的 Bax 及 Bcl-2 平均光密度值见表 2。可见模型组、0.25 mg 剂量组、0.5 mg 剂量组及对照组所得 Bax 蛋白表达依次减弱，组间两两比较差异均具有统计学意义（$P<0.05$）；而各组所得 Bcl-2 蛋白表达依次增强组间两两比较差异均具有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨 论

SAS，在病因、发病机制及临床诊断方面的研究已经很清楚了，但在治疗方面仍存在许多不足之处，常见的疗法如夜间呼吸机辅助呼吸，在应用的过程中有的患者会感到恐惧或不适；手术治疗对于某些患者或存在某些禁忌征或难以接受，都很难推广。而本病属慢性难治性疾病，因长期缺氧可引起许多并发症，如肺动脉高压、右心衰及肺性脑病，较严重的

表 1 各组血气分析结果比较($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	pH 值	PO_2(kPa)	PCO_2(kPa)	SaO_2(%)
模型组	7.20 ± 0.04	8.81 ± 0.39	5.32 ± 0.25	88.96
0.25 mg 剂量组	7.28 ± 0.02[a]	9.25 ± 0.37[a]	4.53 ± 0.17[a]	92.25[a]
0.5 mg 剂量组	7.34 ± 0.04[ab]	9.82 ± 0.26[ab]	4.12 ± 0.18[ab]	95.67[ab]
对照组	7.41 ± 0.03[abc]	10.65 ± 0.43[abc]	3.56 ± 0.21[abc]	98.13[abc]

a:与模型组比较，$P<0.05$；b:与 0.25 mg 剂量组比较，$P<0.05$；c:与 0.5 mg 剂量组比较，$P<0.05$

表 2 半定量 Western Blot 检测结果

组别	Bax 蛋白	Bcl-2 蛋白
模型组	1.07 ± 0.05	0.20 ± 0.02
0.25 mg 剂量组	0.82 ± 0.08[a]	0.62 ± 0.07[a]
0.5 mg 剂量组	0.56 ± 0.04[ab]	0.91 ± 0.10[ab]
对照组	0.19 ± 0.03[abc]	1.08 ± 0.09[abc]

a:与模型组比较，$P<0.05$；b:与 0.25 mg 剂量组比较，$P<0.05$；c:与 0.5 mg 剂量组比较，$P<0.05$

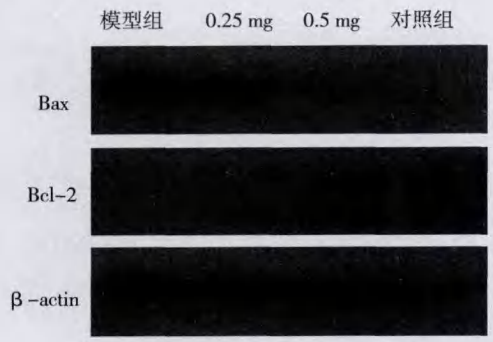


图 1 Bax、Bcl-2 及 β-actin 蛋白表达

还可能发生猝死。而当并发肺脑后，又是手术的绝对禁忌征，这时只能进行保守治疗，且同时要纠正脑缺氧，以保护脑细胞，治疗起来非常困难，现阶段国内外尚没有较好的治疗手段。本研究采用 SAS 大鼠模型，通过细胞色素 C 辅助治疗 SAS 引起的肺脑，为 SAS 的治疗探索出一条新的途径。本研究结果令人满意：治疗组大鼠较模型组大鼠生命体征较好，缺氧程度减轻；血气分析结果也显示治疗组大鼠缺氧情况有所好转；Western Blot 检测结果提示治疗组 Bcl-2 蛋白表达增强，而 Bax 蛋白表达有所减弱。

细胞色素 C 为细胞呼吸激活剂，在细胞呼吸过程中起着非常重要的作用，当脑组织缺氧时，脑细胞渗透性增高，本药可进入脑组织内，从而改善脑细胞呼吸与物质代谢，激活脑组织细胞的生理机能，特别是早期用药效果更为显著。因 SAS 是引起脑缺氧的常见疾病，故适时给予细胞色素 C 对保护脑细胞非常必要。当脑组织缺氧时，往往会引起神经元凋亡，这可能与 Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达有关，其中 Bc1-2 是凋亡抑制基因，Bc1-2 基因家族的成员 Bax 的作用与 Bcl-2 相反，是促凋亡基因，Bcl-2 和 Bax 的比例，决定细胞受到凋亡刺激信号后是存活还是凋亡，如 Bcl-2 蛋白表达占优势时细胞存活，而 Bax 蛋白表达占优势时细胞走向凋亡[3]。本实验结果显示：经细胞色素 C 治疗后，两个治疗组大鼠脑神经细胞 Bcl-2 蛋白表达较模型组增强，而 Bax 表达减弱；同时两个治疗组大鼠大脑神经细胞 Bcl-2 蛋白表达较正常对照组弱，而 Bax 表达较强。实验结果提示细胞色素 C 治疗 SAS 合并肺脑可在一定程度上减轻缺氧缺血性脑损伤，保护脑细胞，其机制可能与细胞色素 C 诱导了神经细胞 Bcl-2 蛋白的表达并下调 Bax 蛋白表达有关。

细胞色素 C 是呼吸链电子传递过程中必需的一类色素蛋白，定位于线粒体内膜上，由核基因编码，在胞浆核糖体中翻译生成细胞色素 C 前体并转移人线粒体内，与亚铁血红素基团共价结合形成完整结合状态的细胞色素 C[4]，细胞色素 C 除参与细胞有氧呼吸活动外，在激活和诱导细胞凋亡方面起着重要作用。细胞色素 C 治疗 SAS 也可能是通过减轻神经细胞线粒体超微结构的损伤而发挥作用。本实验 Western-blot 检测结果显示正常对照组 Bcl-2 蛋白表达较强，而细胞色素 C 大剂量组、细胞色素 C 小剂量组及模型组则依次减弱；模型组 Bax 蛋白表达较正常对照组明显增加，细胞色素 C 治疗后其表达降低，因而推测细胞色素 C 对缺氧缺血性脑损伤的抗凋亡机制可能与其改善了脑组织的能量代谢，反射性诱导了神经细胞抗凋亡基因 Bcl-2 的表达，稳定了线粒体结构，抑制了线粒体通透性转换通道（Mitochondrial permeability transition pores，MPTP）的开放有关，MPTP 是位于线粒体内外膜之间的一种非选择性通透性转变通道[5]，Bcl-2 通过 C 末端疏水性氨基酸锚定于线粒体外膜，而 Bax 则散布于基质中，一些研究者认为 MPTP 的形成是由 Bcl-2 家族蛋白与线粒体外的蛋白相互作用产生的，MPTP 的关闭是线粒体凋亡通路阻断的前提条件[6]。另外也有研究认为 Bcl-2 蛋白可以抑制 Ca^{2+} 从内质网中的释放，而 Bax 可促使 Ca^{2+} 从内质网中被释放，细胞色素 C 上调 Bcl-2、下调 Bax 就能拮抗线粒体中 Ca^{2+} 的释放，并抑制细胞凋亡[7]。

综上所述，细胞色素 C 可提高大鼠 SAS 动物模型脑组织对氧的利用率、改善血氧含量；细胞色素 C 治疗对缓解缺

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)03-0342-04

脑发育不同阶段甲醛暴露对大鼠学习记忆能力及海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达的影响

廖 双,蒋 莉,张晓萍
(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究低浓度甲醛吸入对脑发育不同阶段大鼠空间学习记忆能力、生长发育及海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达的影响。方法:选择生后 3 d、14 d、60 d(相当于新生儿期、幼年期、成年期)Wistar 大鼠,每年龄段随机分为对照组和染毒组各 8 只,采用吸入方式染毒(甲醛浓度为 0.5 mg/m³),2 h/d,连续 28 d;监测大鼠体重,用 Morris 水迷宫检测其空间学习记忆能力,免疫组织化学方法检测海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达。结果:所有染毒组大鼠较同龄对照组均出现体重增长落后($P<0.05$);新生鼠染毒组和幼年鼠染毒组在 Morris 水迷宫中定位航行实验逃避潜伏期比同龄对照组明显延长($P<0.05$);空间探索试验穿越平台次数也明显少于同龄对照组($P<0.05$);免疫组织化学检测海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达较同龄对照组下降($P<0.05$);而成年组除染毒组体重增长落后外,水迷宫逃避潜伏期、穿越平台次数及海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达两组均无显著性差异($P>0.05$)。结论:甲醛吸入染毒可能影响 Wistar 大鼠学习记忆能力,脑发育早期(新生儿期和婴幼儿期)对甲醛的神经毒性更为敏感;海马 CA3 区 CaMK Ⅱ表达下降可能是甲醛影响大鼠学习记忆的机制之一。

【关键词】甲醛;学习记忆;钙调蛋白依赖性蛋白激酶;发育期
【中国图书分类法分类号】R126.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-23

Effects of inhaled formaldehyde on learning and memory and expression of CaMK Ⅱ in hippocampus of Wistar rats of different ages

LIAO Shuang, et al
(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of inhaled low level formaldehyde on learning and memory, the body weight, and the expression of CaMK Ⅱ in hippocampus of Wistar rats of different ages. *Methods*: 48 Wistar rats including 16 neonatal rats (P3), 16 childhood rats (P14) and 16 adult rats (P60) were divided into control groups and formaldehyde exposure groups randomly according to their age. During 28 consecutive days, the experimental groups were exposed to the gaseous formaldehyde (0.5mg/m³) for 2 h/d. The Morris water maze test was conducted to investigate the spatial learning and memory of the rats. The expressions of CaMK Ⅱ were assayed by immunohistochemical techniques. *Results*: The body

作者介绍:廖 双(1980-),男,硕士,
研究方向:儿童脑发育与脑损伤。
通讯作者:蒋 莉,女,教授,E-mail:dr_jiangli@126.com。

血缺氧导致的神经细胞凋亡可能起着积极的作用;其机制可能与上调 Bcl-2、下调 Bax 有关,作者对其确切机制的研究仍在进行当中,随着研究的不断深入,细胞色素 C 有望成为治疗 SAS 的重要手段。

参 考 文 献

[1] Fagan K A.Selected contribution:Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia[J].J Appl physiol,2001,90(2):2502-2507.
[2] 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.
[3] Banerjee Partha P,Banerjee Subhadra, Brown Terry R. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobe [J]. Endocrinology, 2002,143(5):1825-1832.
[4] Yang J,Liu X,Bhalla K,et al.Prevention of apoptosis by Bcl-2:release of cytochrome C from mitochondria blocked[J].Science,1997,275(5303):1129-1133.
[5] Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, et al.Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Biol Chem, 1999, 274(32):22581-22585.
[6] Kubli D A,Ycaza J E,Gustafsson AB.Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak[J]. Biochem J,2007,405(3):407-415.
[7] Scorrano L,Oakes S A,Opferman J T,et al.BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+}: a control point for apoptosis[J].Science, 2003,300(5616):135-139.

(责任编辑:关蕴良)