基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0681-04

慢性间歇性缺氧对大鼠血糖及其胰岛 B 细胞超微结构的影响

桂明才,李 兵,邱昌明,张 涛,赵 维
(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:制作可应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 对大鼠血糖的影响及其胰岛 B 细胞超微结构变化的研究。方法:大鼠分别给予空气[对照组(Unhandled,control),UC 组]、间断低氧 4 周(CIH 组)及复氧 4 周[复氧组(Restore hypoxia),RH 组]处理后测定各组大鼠血糖,胰岛素,C 肽,计算胰岛素抵抗指数,同时用电镜观察胰腺 B 细胞超微结构变化。结果:与 UC 组、RH 组比较,CIH 组的血糖升高,存在胰岛素抵抗,胰腺 B 细胞超微结构发生轻微缺氧损伤改变,UC 组和 RH 组无明显改变。结论:CIH 致使大鼠胰岛 B 细胞损伤及功能紊乱,大鼠调节血糖功能降低,同时 CIH 组存在胰岛素抵抗,使血糖升高,RH 能使其恢复正常。

【关键词】慢性间歇性缺氧;血糖;胰岛素;大鼠
【中国图书分类法分类号】R766.49 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-02

The effect of chronic intermittent hypoxia on blood glucose and pancreatic islets B-cell ultrastructure in rats

GUI Ming-cai, et al
(*Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To set up the rat model of chronic intermittent hypoxia under normal pressure and study its effect on the level of blood glucose and pancreatic islet B-cells, ultrstructure. *Methods*: Rats were respectively exposed to room air 4 weeks (unhandled control, UC), intermittent hypoxia 4 weeks (chronic intermittent hypoxia, CIH), intermittent hypoxia 4 weeks and then

作者介绍:桂明才(1977-),男,硕士,
研究方向:耳鼻咽喉头颈外科。
通讯作者:李 兵,男,副教授,E-mail:dclibing@sina.com.cn。
基金项目:重庆市卫生局科研项目(编号:2008-2-38)。

本实验还发现,法舒地尔治疗组大鼠基底动脉痉挛在 3 d、7 d 时较蛛血组明显减轻(管腔扩张、平滑肌增厚缓解),提示在血管痉挛高峰期,法舒地尔具有明确的治疗作用。在建模后 3 d、7 d 和 14 d,eNOS 在法舒地尔治疗组大鼠的基底动脉上表达较蛛血组显著增强,提示增加 eNOS 在血管壁上的表达可能是法舒地尔减轻脑血管痉挛的重要机制之一,而且该机制在血管痉挛缓解期仍然发挥作用。

综上所述,eNOS 表达降低可能在 SAH 后 CVS 的起始和发展中发挥了重要作用。法舒地尔可以有效缓解 SAH 后的脑血管痉挛,除了抑制钙敏化效应外,增加 eNOS 在动脉管壁上的表达可能是其重要的作用机制之一。

参 考 文 献

[1] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1767-1775.

[2] Suzuki Y, Shibuya M, Satoh S, et al. Safety and efficacy of fasudil monotherapy and fasudil-ozagrel combination therapy in patients with subarachnoid hemorrhage: sub-analysis of the post-marketing surveillance study[J]. Neurol Med Chir (Tokyo), 2008, 48(6): 241-248.

[3] Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiolog[J]. J Mol Med, 2002, 80(10): 629-638.

[4] Murthy K S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 345-374.

[5] Oruckaptan H H, Caner H H, Kilinc K, et al. No apparent role for neutrophils and neutrophil-derived myeloperoxidase in experimental subarachnoid haemorrhage and vasospasm: a preliminary study[J]. Acta Neurochir (Wien), 2000, 142(1): 83-90.

[6] Dankbaar J W, Rijsdijk M, van der Schaaf I C, et al. Relationship between vasospasm, cerebral perfusion, and delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neuroradiology, 2009, 51(12): 813-819.

[7] Hino A, Tokuyama Y, Weir B, et al. Changes in endothelial nitric oxide synthase mRNA during vasospasm after subarachnoid hemorrhage in monkeys[J]. Neurosurgery, 1996, 39(3): 562-568.

[8] Onoue H, Tsutsui M, Smith L, et al. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in canine basilar artery after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1959-1966.

[9] Rikitake Y, Kim H H, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection[J]. Stroke, 2005, 36(10): 2251-2257.

(责任编辑:冉明会)

room air 4 weeks (restore hypoxia, RH). To test the fasting blood glucose of rats in each group, the fasting blood insulin and C-peptid, and then get the insulin resistance index, and observe the pancreatic islet B-cells under transmission electron microscope. ***Results***: The level of blood glucose of the rats in the CIH group increased significantly compared with those in the UC group and RH group. There was insulin resistance and slight alteration of pancreatic islet B-cells in the CIH group, but there was no difference between UC group and RH group. *Conclusion*: Chronic intermittent hypoxia can lead to the pancreatic islet B-cell damage and its function disturbance, There was also insulin resistance, which causes the increased level of blood glucose of the rats in the CIH group to increase.

【Key words】Chronic intermittent hypoxia; Blood glucose; Insulin; Rat

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(Obstructive sleep apnea-hypopnea syidrone, OSAHS)是重要的睡眠呼吸疾病,睡眠中的慢性间歇性缺氧(Chronic intermittent hypoxia, CIH)是导致一系列病理生理改变的重要原因。在成年人中其发病率为 2 %～4 %,以男性患者多见。OSAHS 患者可以出现多种内分泌改变[1,2],包括胰岛素分泌升高及胰岛素抵抗等,但其原因机制尚不清楚,为此我们建立了 CIH 的大鼠模型,通过测定其血糖,胰岛素及 C 肽含量的变化,观察胰岛 B 细胞超微结构改变来初步探讨其发生糖尿病的一些可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 成年雄性 SD 大鼠 24 只, 体重(230 ± 15) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,随机数字法分为 3 组, 每组 8 只。UC 组正常饲养 4 周,CIH 组及 RH 组放于低氧动物舱内间歇缺氧 4 周,RH 组再复氧 4 周。

1.1.2 试剂及仪器 血糖生化检测试剂盒购自上海科华公司;胰岛素,C- 肽检测试剂盒购自美国拜尔公司;多聚甲醛,戊二醛购自重庆化学试剂厂;环氧树脂购自上海化学试剂总厂;日立 7600 全自动生化分析仪;自动血气分析仪;美国拜尔公司 Access-180 电化学发光仪;日立 Hitachi-7500 透射电镜;中国,航天航空大学,北京 301 医院研发北航 CM-2000 图像分析软件。德国 Leica 公司 Leica2065 型切片机。

1.2 方法

1.2.1 CIH 大鼠模型的建立 参照 Fagan KA、Kuwahira I 、王璋等[3-5]的方法并加以改进,低氧动物舱:选用 4 mm 厚有机玻璃制成 65 cm × 40 cm × 25 cm 长方体舱 (第三军医大学解剖教研室制作),侧壁中央取直径为 5 mm 的孔两个,分别用于输入氮气与空气, 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,侧壁装有风扇便于混匀气体,实验过程中舱内 CO_2 与水蒸气分别用生石灰与硅胶干燥剂吸收,缺氧过程中动物活动自由,不进食、水。气体控制通路:设计由单片机程序控制电磁阀开关的电路,分别调节氮气与空气的输入。CIH 实验:每天 9:00 AM- 5:00 PM 将大鼠放入低氧舱内, 关闭舱门,向低氧舱内循环充入氮气和压缩空气, 每一循环为 60 s, 即 30 s 充入氮气, 随之 30 s 充入压缩空气, 由测氧仪监测间歇性低氧舱中的氧浓度,调节气体流量, 使每一循环低氧舱内的最低氧浓度达到 4%～6%, 然后再逐渐恢复至 21% 。间歇性低氧实验过程中随机采样送气体分析及大鼠动脉血行血气分析,自动检测血氧饱和度波动在 79.3%至 90.8%之间。

1.2.2 采血及切取胰腺组织 UC 组正常饲养 4 周后,CIH 组间歇缺氧 4 周后,RH 组间歇缺氧 4 周再 RH 4 周后杀鼠。实验于 3:00 PM～4:00 PM 进行,用 20%乌拉坦麻醉(10 ml/kg)腹腔注射(20 mg/kg),麻醉成功后,抽取空腹股静脉约 6 ml (保持无菌操作),各约 3 ml 分别注入血糖试管和胰岛素 C 肽试管中待用。快速开胸暴露心脏,由左室插入静脉针头至升主动脉,剪开右心耳,快速灌注肝素生理盐水,直至右心耳流出的液体清凉透明,再以 4%多聚甲醛灌注约 30 min,至鼠尾发黄、变硬,用量约 100 ml。随即开腹取胰腺尾部组织约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小多块于 2.5%的戊二醛进行固定,4℃保存备用。

1.2.3 血糖、胰岛素、C 肽测定 空腹血血糖试管送附一院采用日立 7600 全自动生化分析仪测定; 胰岛素、C 肽应用 Access-180 电化学发光仪,采用化学发光法测定,其所有操作严格按照所提供的说明书进行。根据稳态模型方法计算 IRI(胰岛素抵抗指数)=[FINS(空腹胰岛素) × FBG(空腹血糖)]/22.5。

1.2.4 胰腺组织透射电镜标本制作 将取好的胰腺组织用磷酸缓冲液漂洗,再用 pH7.4 的 1%锇酸固定液固定约 2 h,然后用不同浓度的丙酮梯度脱水,常规将组织块包埋在多孔橡胶包埋模板中,然后置烤箱烘干,在 45℃(12 h)、60℃(36 h)烤箱内加温,使之聚合硬化,形成包埋块,将包埋块夹在特制的夹持器上,放在解剖显微镜下,用锋利的刀片先削去表面的包埋剂,露出组织,然后在组织的四周以和水平面成 45° 的角度削去包埋剂,修成锥体形。利用超薄切片机切厚度为 1 ～10 μm 的切片,将切下的片子用镊子转移到干净的事先滴有蒸馏水的载玻片上,加温,使切片展平,干燥后经甲苯胺蓝染色,光学显微镜观察定位,最后透射电镜观察、记录、拍片。

1.3 统计学方法

实验数据计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,3 组间比较用方差分析及 SNK-q 检验,以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠血糖测定结果

与 UC 组及 RH 组比较 CIH 组大鼠血糖(P<0.01)明显升高,而 UC 组和 RH 组无统计学差异(表 1)。

2.2 各组大鼠胰岛素、血糖及胰岛素抵抗指数比较

与 UC 组及 RH 组比较 CIH 组大鼠胰岛素抵抗指数(P<0.01)明显升高,而 UC 组和 RH 组无统计学差异(表 2)。

2.3 各组大鼠胰岛 B 细胞透射电镜结果

大鼠胰岛 B 细胞超微结构显示在 CIH 组细胞内均出现轻微缺氧改变,出现较多髓样体结构(图 1);线粒体轻度肿胀空化改变(图 2);高尔基复合体形态及数量无明显变化;内质网扩张,分泌颗粒空晕增大,数量无明显改变(图 3)。而 UC 组和 RH 组无明显异常(图 4~6)。

3 讨 论

OSAHS 是一种发病率高,具有潜在危险的源头性疾病。不仅是高血压、冠心病、脑血管等疾病的重要促发因素,还可以通过多种机制作用于内分泌系统,引起内分泌紊乱,包括

表 1 不同组别大鼠血糖的测定结果比较(FBG mmol/l, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	血糖
UC	8	7.58 ± 0.29
CIH	8	8.91 ± 0.43
RH	8	7.65 ± 0.39

注:3 组间方差分析 P<0.01,组间比较 UC 比 CIH P<0.01,UC 比 RH P>0.05,CIH 比 RH P<0.01

表 2 大鼠各组胰岛素、血糖及胰岛素抵抗指数比较(FINS U/L,CP ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	N	FINS(U/L)	CP(ng/ml)	IRI
UC	8	9.20 ± 2.80	1.42 ± 0.31	3.10 ± 0.80
CIH	8	16.80 ± 5.00	3.00 ± 0.99	6.80 ± 2.80
RH	8	10.50 ± 2.70	2.06 ± 0.96	3.50 ± 0.90

注:FINS 值 3 组间方差分析 P<0.01,组间比较 UC 比 CIH P<0.01,UC 比 RH P>0.05,CIH 比 RH P<0.01;CP 值 3 组间方差分析 P<0.01,组间比较 UC 比 CIH P<0.01,UC 比 RH P>0.05,CIH 比 RH P<0.01;IRI 值 3 组间方差分析 P<0.01, 组间比较 UC 比 CIH P<0.01,UC 比 RH P>0.05,CIH 比 RH P<0.01

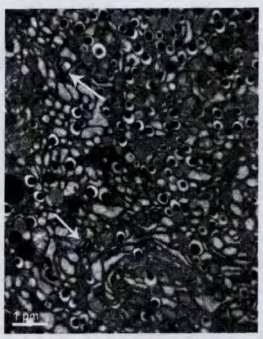


图 1 CIH 组胰岛 B 细胞胞内出现髓样体结构改变(×12 000)(箭头所示)

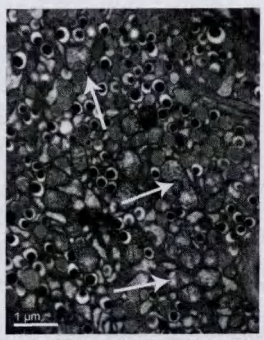


图 2 CIH 组胰岛 B 细胞胞内出现线粒体轻度肿胀空化改变(×10 000)(箭头所示)

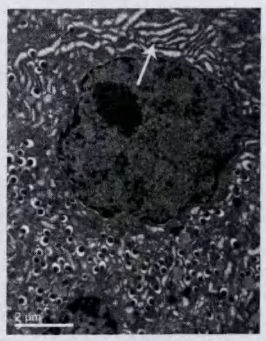


图 3 CIH 组胰岛 B 细胞中出现内质网扩张(×20 000)(箭头所示)

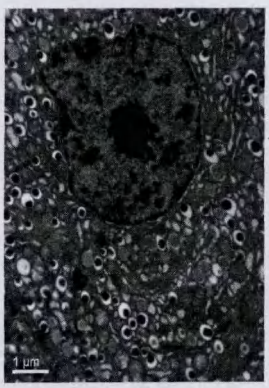


图 4 对照组正常的胰岛 B 细胞(×12 000)

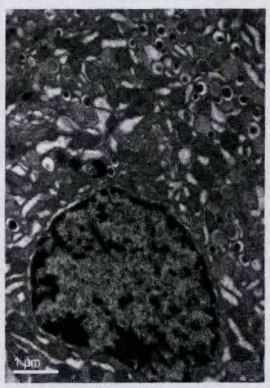


图 5 RH 组正常的胰岛 B 细胞(×12 000)

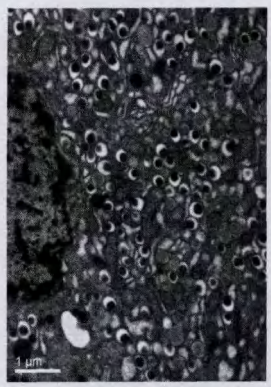


图 6 RH 组正常的胰岛 B 细胞(×12 000)

血糖升高，诱发糖尿病[6,11]。KatsumtaK 等[12]在 12 787 名普通人群中发现有 40 名患有 OSAHS，在这 40 名中做口服葡萄糖耐量试验，有 13 名符合 DM 诊断，均为 2 型 DM。有研究对 31 例主诉打鼾的 2 型糖尿病患者进行夜间睡眠多导仪检测，发现其中 22 例（70%）存在轻一中度阻塞型睡眠呼吸暂停，经鼻持续气道正压通气治疗改善睡眠呼吸紊乱的同时，降低了胰岛素抵抗程度，也进一步证实了 OSAHS 参与 2 型糖尿病发病的观点[10]。据研究发现 OSAHS 患者糖尿病发病率与普通人群相比有明显的增加，OSAHS 也可加重原有的糖尿病；Ipmary 等[7]调查 122 例 OSAHS 患者中合并 DM 的占 10%。还发现 DM 患者中 OSAHS 的患病率是普通人群的 3～4 倍，Brook 等[8]报道 DM 合并 OSAHS 的为 12.3%（22/179）。因此，充分认识 OSAHS 与 2 型 DM 的关系，有着十分重要的意义。OSAHS 与糖尿病一些相关研究发现 DM 和 OSAHS 存在着共同相关的危险因素，如肥胖、高血压、冠心病、心律失常、缺血性脑血管疾病和代谢紊乱。

OSAHS 患者血氧饱和度下降，可以引起胰岛素及类胰岛素因子等代谢调节激素分泌异常，使血液循环中的胰岛素水平升高，提示可能由于长期间歇性缺氧导致出现胰岛素抵抗及高胰岛素血症，引发糖尿病[9,13]。国外学者 Stoohs[14]研究发现 OSAHS 患者睡眠低通气事件≥10/11 者较健康对照组有较高的胰岛素水平及胰岛素抵抗性，进一步表明，晨起空腹胰岛素水平与 AHI 密切相关。王宁和范洁[9]对 66 例无心血管疾病及 DM 的老年 OSAHS 患者，进行糖耐量试验、胰岛素及 C- 肽测定，结果发现，OSAHS 组存在糖耐量减低、高胰岛素血症和胰岛素抵抗。另有学者用[8]经鼻持续气道正压（Contiunious positive airway pressure，CPAP）通气对 10 例中、重度 OSAHS 合并 2 型 DM 的患者进行治疗，治疗 4 个月后，发现患者的氧减指数由治疗前 20.2 ± 17.2 升至 3.0 ± 2.1，而胰岛素反应性提高了 28%，从而证实了 OSAHS 患者存在对胰岛素反应性下降或者出现胰岛素抵抗，最终导致高血糖。OSAHS 导致血糖增高的另一个可能原因是由于反复的呼吸暂停使交感神经周期性兴奋，儿茶酚胺分泌增加，从而使肝糖元释放增加，血糖升高，发生糖尿病。

CIH 能引起患者发生糖尿病，在临床上已有较多研究；我们的试验从建立 CIH 的大鼠模型出发（建模期间随机采样进行血气分析测定及监测大鼠血氧饱和度来判断试验成功与否，本实验试验期间大鼠血氧饱和度波动在 79.3%～90.8%，符合 OSAHS 患者轻～中度低氧血症）然后通过测定模型大鼠的空腹血糖，胰岛素及 C- 肽值来研究是否存在血糖升高和胰岛素抵抗，其结果显示 CIH 组较 UC 组及 RH 组血糖（$P<0.05$）明显升高，并且胰岛素抵抗指数存在明显差异（$P<0.01$）；说明 CIH 造成大鼠低氧血症后可引起一系列病理生理的改变，模型大鼠胰岛素抵抗使胰岛素的利用存在缺陷，由此引起高胰岛素血症和血糖升高。而在大鼠复氧 4 周后由于缺氧状态改变，其胰岛素抵抗指数减低，血糖下降，说明了 CIH 在引起血糖升高中的作用。CIH 组大鼠胰岛 B 细胞出现轻度损伤，主要表现细胞中出现髓样体，分泌颗粒空晕增加，内质网扩张，而在 UC 和 RH 组未出现此现象，说明 CIH 造成胰岛 B 细胞的损伤，而复氧能使之恢复。因此 OSAHS 患者及时的 CPAP 或手术治疗对其糖尿病的预防或治疗是有必要的和有效的，但由于我们的实验时间等原因的限制，更长时间或者缺氧程度更严重的 CIH 对大鼠血糖的影响以及复氧后是否可逆有待进一步研究，OSAHS 引起糖尿病的发生发展是否有更深刻的机制也需更多的基础的研究。

参 考 文 献

[1] Saresranta T, Polo O. Sleep-disordered breathing and hormones[J]. Eur RespirJ, 2003, 22: 161-172.

[2] Bassiri A G, Guillerminault C. Clinical features and evaluation of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome[M]. In: Kriger MH, Roth T, Dement WC, eds. Principles and practice of sleep medicine. Philadelphia: Saunders, 2000. 869-878.

[3] Fagan K A. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(6): 2502-2507.

[4] Kuwahira I, Kamiya U, Iwamoto T, et al. Splenic contraction-induced reversible increase in hemoglobin concentration in intermittent hypoxia[J]. J Appl Physiol, 1999, 86(1): 181-187.

[5] 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.

[6] Vgontzas A N, Papanicolaou D A, Bixler E O, et al. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance and hypereytokinemia[J]. J Clin Endocr Metab, 2000, 85(4): 1151.

[7] Ipmary M S, Lain B, Ng M M, et al. Obstructive sleep apnea is independently associated with insulin resistance[J]. Am J RespirCrit Care Med, 2002, 165(5): 670.

[8] Brooks B, Cistulli P A, Borkman M, et al. Obstructive sleep apnea in obese noninsulin-dependent diabetic patients: efect of continuous positive airway pressure treatment on insulin responsiveness[J]. J Clin Endocrinal Metab, 1994, 79: 1681-1685.

[9] 王 宁，范 洁. 老年人阻塞性睡眠呼吸暂停与血糖及胰岛素抵抗[J]. 北京医学，2004, 26: 179-182.

[10] Harsch J A, Schahin S P, Martin RT, et al. Continuous positive airway pressure treatment rapidly improves insulin sensitivity in patients with obstructive sleep apnea syndrome[J]. AM J Respir Crlt Care Med, 2004, 169: 156-162.

[11] Sakakibara H, Hirata M, Matsushita K, et al. Diabetes mellitus and sleep apnea syndrome[J]. Nippon Rinsho, 2000, 58: 1707-1710.

[12] Katsumata K, Okada T, Miyao M, et al. High incidence of sleep apnea syndrome in a male diabetic population[J]. Diabetes Res Clin Pract, 1991, 13: 45-51.

[13] Punjabi N M, Sorkin J D, Karzel L I, et al. Sleep-disordered breathing and insulin resistance in middle-aged and overweight men[J]. AM J Respir Crit Care Med, 2002, 165: 677-682.

[15] Stoohs R A, Facchini F, Guilleminauh C. Insulin resistance and sleep-disordered brealthy inhealthy humans[J]. AM JRespir Crit Care Med, 1996, 154: 170-174.

（责任编辑：关蕴良）