

慢性间歇低氧/复氧对大鼠骨代谢的影响

张刘生¹ 李正芳¹ 张英育¹ 蒙雁飞¹ 井燕河¹ 刘维英^{2*}

1. 兰州大学第一临床医学院, 兰州 730000

2. 兰州大学第一医院, 兰州 730000

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 05-0536-04

摘要: 目的 建立间歇低氧/复氧模型, 观察间歇低氧/复氧暴露对 SD 大鼠骨代谢的影响并探讨其可能的发病机制。方法 将 20 只 8 周龄 SD 雄性大鼠随机分为间歇低氧(IH)组和常氧对照(NC)组, 每组 10 只放入间歇低氧模拟舱进行间歇低氧/复氧造模, 8 周后处死, 测定骨代谢指标骨矿盐含量、血清 B-ALP、各部位骨密度(BMD), 氧化应激指标超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平, 炎症反应指标 IL-6 和 TNF- α 表达水平。结果 与 NC 组相比, IH 组 B-ALP 含量升高, 全身 BMD、股骨 BMD 和骨矿盐含量降低, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); SOD 水平降低, MDA 水平升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$); IL-6 和 TNF- α 表达水平升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 慢性间歇低氧/复氧条件下可能诱导 SD 大鼠体内发生氧化应激状态和炎症反应, 引起大鼠骨质和相关代谢指标的变化。

关键词: 慢性间歇低氧/复氧 骨代谢 骨密度

Effect of chronic intermittent hypoxia /rexygen on bone metabolism in rats

ZHANG Liusheng¹, LI Zhengfang¹, ZHANG Yingyu¹, MENG Yanfei¹, JING Yanhe¹, LIU Weiyang²

1. The First Clinical Medical College of Lanzhou University;

2. The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: LIU Weiyang, Email: Lwy70828@126.com

Abstract: Objective To establish a model of intermittent hypoxia/rexygen and to observe the effect of exposure to intermittent hypoxia/rexygen on bone mineral density in SD rats and its possible pathogenesis. **Methods** Twenty eight-week-old male SD rats were randomly divided into intermittent hypoxia (IH) group and normal oxygen control (NC) group, with 10 rats in each group. Rats were put into the intermittent hypoxia simulation chamber to build intermittent hypoxia/rexygen model and were killed in 8 weeks. The bone metabolism indexes, including bone mineral content, serum B-ALP, bone mineral density (BMD) of each part, oxidative stress index superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), and inflammation response indicators IL-6 and TNF- α were determined. **Results** Compared to those in NC group, in IH group B-ALP level increased, but BMD of the whole body and the femur and bone mineral contents decreased, with significant difference ($P < 0.05$); SOD level decreased but MDA level increased, with significant difference ($P < 0.05$); The expression levels of IL-6 and TNF- α increased, with significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Chronic intermittent hypoxia/rexygen induces the oxidative stress and inflammatory response in SD rats and the change of bone and related metabolic parameters in rats.

Key words: Intermittent hypoxia/rexygen; Bone metabolism; BMD

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合症(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)患者睡眠时体内反复发生低氧/复氧损伤过程, 使机体长期处于

氧化应激状态, 氧化与抗氧化体系失调, 导致氧自由基及其代谢产物过量聚集^[1]。近年来, OSAHS 患病率在我国逐渐升高, 已成为心血管系统发病率升高的独立因素^[2]。氧化应激通过破坏成骨细胞和破骨细胞之间的平衡来影响骨代谢, 进而引发骨质疏松^[3]。间歇低氧作为骨质疏松的危险因素已受到高度关注, 但间歇低氧诱发骨代谢指标改变的机制和动物实验鲜有报道。本研究通过间歇低氧/复氧

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(1506RJZA253); 甘肃省卫计委科研管理项目(GWGL2010-15); 甘肃省中医药科研项目(GZK-2012-39)

* 通讯作者: 刘维英, Email: Lwy70828@126.com

模型的建造,测定间歇低氧/复氧条件下大鼠骨代谢指标骨矿盐含量、血清 B-ALP、各部位 BMD,氧化应激指标 SOD、MDA 水平,炎症反应指标 IL-6、TNF- α 表达水平来探讨间歇低氧/再氧可能诱发骨代谢改变的发病机制,为临床了解 OSAHS 患者继发骨质疏松的病理特征及其预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 20 只,体质量 180 ~ 220 g,由甘肃省中医学院动物中心提供。随机分为 IH 组和 NC 组,每组 10 只,用苦味酸分别对两组大鼠进行标记。

1.2 主要实验器材及试剂

1.2.1 实验器材:动物饲养舱(苏州市冯氏实验动物设备有限公司),ASD-3D 爱华电子计重秤(深圳爱华衡器有限公司),气体减压阀(上海沃原阀门有限公司),电磁式空气压缩机(浙江森森实业有限公司),H48S-S 数显时间继电器(上海一开集团日科电器),电磁阀(浙江德力西电气有限公司),气体流量计(安徽桐城有机玻璃仪器制品有限公司),测氧仪(浙江新安江分析仪器二厂),双能 X 线骨密度仪(General Electric Company WI53717-1915 USA),全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司),日本日立 716 全自动生化仪, r-911 全自动放免计数仪(中国科技大学实业总公司生产)。

1.2.2 实验试剂:大鼠骨碱性磷酸酶酶联免疫试剂盒(美国 ADL 公司),动物饲料(北京科澳协力饲料有限公司),医用氮气,纯度 > 99% (兰州荣成有限责任公司),医用氧气(兰州方圆建化有限责任公司),戊巴比妥钠盐溶液(上海静融生物科技有限公司),血浆 TNF- α 、IL-6 试剂盒(北京华英技术研究所),血浆 SOD、MDA 试剂盒(北京华英技术研究所)。

1.3 造模方法

将 IH 组放入间歇低氧模拟舱内,向舱内循环充入氧气,氮气和压缩空气,循环周期为 120 s,输入纯氮气 30 s,静息 10 s,输入纯氧气 20 s,输入压缩空气 60 s,氮气、氧气、压缩空气和静息期的转换由时间计电器定时控制电磁阀来完成。低氧时舱内氧浓度最低 6 ~ 7%,维持 30s;复氧后舱内氧浓度维持在 20 ~ 21%,维持 60 秒。实验时间设置为每天 8 h (9am - 17 pm),每周 7 天,共 8 周。将 NC 组大鼠在每天相同时间置入相同规格的动物饲养舱内,舱内

通入相同流量的压缩空气,维持舱内氧浓度 20-21%。所有动物饲养舱内设置饮食设备,实验期间大鼠正常饮食。每天观察大鼠饮食、睡眠、精神、活动情况,每天采用 ASD-3D 爱华电子计重秤分别称重 IH 组和 NC 组大鼠体重^[4]。

1.4 试验方法

间歇低氧/复氧造模 8 周后,用戊巴比妥钠盐溶液麻醉,打开胸腔,右心房取血,血液离心后取上清液保存于 -80℃ 的冰箱,利用全自动生化分析仪测定血清 B-ALP 水平,日本日立 716 全自动生化仪比色法检测血浆 SOD、MDA, r-911 全自动放免计数仪放射免疫法检测血浆 TNF- α 、IL-6;去除骨骼附着的肌肉和结缔组织,液氮冷存送检,利用双能 X 线骨密度仪分别测定全身 BMD、股骨 BMD 及骨矿盐含量。

1.5 统计学处理

统计学处理采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,测定符合正态分布的数据结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间计量资料的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠骨代谢指标水平变化

与 NC 组相比, IH 组血清 B-ALP 水平升高 ($P < 0.05$),骨矿盐含量水平显著降低 ($P < 0.01$),都有统计学差异。见表 1。

表 1 两组大鼠骨代谢指标水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of bone metabolism index in rats ($\bar{x} \pm s$).

组别	n	B-ALP(U/L)	骨矿盐含量(g)
NC 组	10	171.25 $\pm$ 21.46	2.02 $\pm$ 1.69
IH 组	10	200.40 $\pm$ 49.41 *	0.47 $\pm$ 0.04 **

注:与 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Compared to NC group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 大鼠各部位 BMD 水平变化

与 NC 组相比, IH 组全身 BMD 降低 ($P < 0.05$),股骨 BMD 显著降低 ($P < 0.01$),差异都有统计学差异。见表 2。

表 2 IH 组和 NC 组 SD 大鼠各部位 BMD 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of BMD in different parts of rats in IH and NC groups ($\bar{x} \pm s$).

组别	n	全身 BMD(g/cm ²)	股骨 BMD(g/cm ²)
NC 组	10	0.214 $\pm$ 0.027	0.208 $\pm$ 0.030
IH 组	10	0.179 $\pm$ 0.020 *	0.148 $\pm$ 0.002 **

注:与 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Compared to NC group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 大鼠血清氧化应激指标水平变化

与 NC 组相比, IH 组 SOD 水平显著降低 ($P < 0.05$), MDA 水平升高, 差异均具有统计学意义。见表 3。

表 3 两组大鼠血清氧化应激指标水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Changes of serum oxidative stress index in rats ($\bar{x} \pm s$).

组别	n	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)
NC 组	10	67.37 $\pm$ 6.48	5.16 $\pm$ 0.31
IH 组	10	52.78 $\pm$ 6.24 *	6.94 $\pm$ 0.33 **

注: 与 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Compared to NC group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 大鼠血清炎症反应指标水平变化

与 NC 组相比, IH 组 IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$), 差异均具有统计学意义。见表 4。

表 4 大鼠血清炎症反应指标水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Changes of serum inflammatory reaction index in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
NC 组	10	166.34 $\pm$ 30.65	58.16 $\pm$ 10.12
IH 组	10	261.21 $\pm$ 34.44 *	76.24 $\pm$ 7.72 **

注: 与 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Compared to NC group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

OSAHS 是最常见的呼吸睡眠呼吸疾病, 多数患者存在肥胖或上呼吸道如鼻咽部位的狭窄, 长期间歇性低氧引起低氧血症和高碳酸血症及睡眠结构紊乱, 进而使机体发生一系列病理生理改变和靶器官功能受损, 如心血管系统受损、脑卒中、代谢综合征、心理异常、情绪障碍等疾病, 目前已引起临床高度重视。大量研究表明, OSAHS 引起的间歇低氧与高血压、冠心病、糖尿病视网膜病变等都有良好的相关性^[5], 金常娥^[6]等研究显示, OSAHS 与骨质疏松有良好的相关性。Utting JC 等^[7]的研究表明, 长期低氧可以诱发机体骨代谢平衡失调, 影响成骨细胞增殖和促进破骨细胞吸收, 骨量降低, 骨结构发生变化, 进而继发骨质疏松症。而间歇低氧/复氧可以诱导机体产生氧化应激状态和炎症反应, 使机体发生一系列代谢紊乱, 因此笔者推测间歇低氧/复氧产生的氧化应激状态和炎症反应可能是造成 OSAHS 患者发生骨质疏松的重要原因。

本研究通过建立大鼠间歇低氧/复氧模型, 模拟 OSAHS 患者在睡眠呼吸过程中发生的间歇低氧/复氧过程, 旨在探究慢性间歇低氧/复氧对骨代谢的影响和引起骨代谢变化的机制。结果表明, IH 组大鼠

全身 BMD、股骨 BMD 和骨矿盐含量显著低于 NC 组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明间歇低氧/复氧过程使大鼠骨代谢发生变化, 增加了骨质疏松的危险性, 这和 Kulak 等^[8]对于 OSAHS 患者的研究结果一致; IH 组血清 B-ALP 高于 NC 组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 证实了间歇低氧/复氧可以诱导 SD 大鼠骨代谢平衡失调, 破骨细胞吸收增强, 成骨细胞活性降低, 导致释放血清 B-ALP 水平升高, 和 Htomiya R 等^[9]研究结果一致。长期慢性间歇低氧/复氧过程, 骨组织骨矿盐含量流失, 骨密度降低, 进而出现骨质疏松症。

目前许多国内外研究报道间歇低氧/复氧引起的氧化应激状态是 OSAHS 患者机体发生损伤的关键因素, 长期间歇低氧/复氧使机体线粒体减少, 导致活性氧自由基 (ROS) 在体内堆积, 同时引起氧化能力增强, 抗氧化能力下降, 氧化与抗氧化失衡^[10], 从而引起机体损伤。有研究显示间歇低氧暴露后大鼠体内炎症标志物 TNF- α 、IL-6 升高, 抗氧化剂 SOD 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 显著降低^[4], 表明间歇低氧/复氧使机体氧化物堆积和抗氧化能力减弱, 引发氧化应激反应。实验结果显示, IH 组大鼠氧化应激指标 SOD 水平显著降低, MDA 水平升高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 炎症反应指标 IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.05$), 差异均具有统计学意义, 这和上述研究结果一致, 表明慢性间歇低氧/复氧大鼠体内发生了氧化应激和炎症反应。相关研究表明, 氧化应激与炎症反应有一定相关性, OSAHS 患者体内含有大量 ROS, ROS 可以上调控制炎症反应的转录因子, 引起炎症因子和细胞毒性 T 细胞产生, TNF- α 、IL-6、IL-8 产生增加^[11]。Yokoe 等^[12]表明, OSAHS 患者体内 IL-6 和 hs-CRP (超敏 C 反应蛋白) 水平升高, 且与间歇低氧/复氧呈正相关, 持续正压通气治疗有效。

综上所述: 慢性间歇低氧/复氧诱发机体产生的氧化应激和炎症反应可能是机体骨代谢发生变化的重要机制。但是间歇低氧/复氧引发机体骨代谢机制相当复杂, 有期刊曾报道内分泌失调如甲亢、甲减、糖尿病、绝经等可引起机体骨代谢失衡、B-ALP 和 BMD 发生变化, 进而增加了骨质疏松的危险性, 因此对于间歇低氧/复氧诱发机体骨代谢的原因仍需进一步深入探究。

总之, 间歇低氧/复氧大鼠体内存在氧化应激和炎症反应可能是骨密度降低, 骨量流失, 发生骨质疏松的重要机制, 也可能是 OSAHS 患者体内发生一系

列代谢紊乱的基础。通过干预 OSAHS 患者低氧状态和炎症反应,对 OSAHS 患者骨质疏松症的预防和治疗具有指导作用。

【参 考 文 献】

- [1] Yamauchi M, Kimura H. Oxidative stress in obstructive sleep apnea: putative pathways to the cardiovascular complications[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10(4): 755-768.
- [2] Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, et al. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnea-hypopnea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study[J]. *Lancet*, 2005, 365: 1046-1053.
- [3] Arnett TB. hypoxia and bone[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 503: 103-109.
- [4] Li LF, Liu WY, Yang TT, et al. Reductive glutathione on intermittent hypoxia rat hypothalamus-Intervention ultrastructure and function of the adrenal axis-pituitary. *Chinese Journal of tuberculosis and respiratory*, 2015, 2: 138 - 140.
- [5] Sánchez M, Campos-Bodriguez F, Barbé Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease[J]. *Lancet Respir Med*, 2013(1): 61-72.
- [6] Jin CE, Wu D, He ZQ, et al. Analysis of the relationship between obstructive sleep apnea-hypopnea and osteoporosis. *chinese Journal of Osteoporosis*, 2015, 1(29): 63-66.
- [7] Utting JC, Robins SP, Brandao-Burch A, et al. Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts [J]. *Experimental Cell Res*, 2006, 312(10): 1693-1702.
- [8] Kulak CA, Borba VC, Jorgetti V, et al. Skeletal microstructural abnormalities in postmenopausal women with chronic obstructive pulmonary disease. *J Bone Res*, 2010, 25(9): 1931-1940.
- [9] Htomiya R, Okazaki D, Inoue H, et al. Link between obstructive sleep apnea and increased bone resorption in men [J]. *Osteoporos Int*, 2008, 19: 1185-1192.
- [10] Atkeson A, Yeh SY, Malhotra A, et al. Endothelial function in obstructive sleep apnea[J]. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009, 51(5): 351-362.
- [11] Alberti A, Sarchielli P, Gallinella E, et al. plasma cytokine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study[J]. *J Sleep Res*. 2003, 12(4): 305-11.
- [12] Sauvet F, Leftheriotis G, Gomez-Merino D, et al. Effect of acute sleep deprivation on vascular function in healthy subjects[J]. *J Appl physiol* (1985). 2010, 108(1): 68-75.

(收稿日期: 2015-11-23)

(上接第 531 页)

本实验从红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖、碱性磷酸酶活性、骨钙素以及矿化等四方面进行了研究,结果显示红车轴草总异黄酮含药血清不仅可以增加 MC3T3-E1 成骨样细胞的增殖率,提升碱性磷酸酶的活性,还可以促进 MC3T3-E1 成骨样细胞的骨钙素分泌,进而提高成骨样细胞的矿化水平。

综上所述,本实验在细胞水平观察了红车轴草总异黄酮含药血清对 MC3T3-E1 成骨样细胞代谢调控的影响,发现其具有促进 MC3T3-E1 成骨样细胞增殖、促进细胞分化成熟、以及促进细胞矿化的作用,从而为红车轴草总异黄酮应用于临床治疗骨质疏松症提供了理论和实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] Long Y, Zheng YC. Research progress of red clover. *China Medical Herald*, 2009, 6(13): 10-11. (in Chinese).
- [2] Yang LZ. Effect of red clover isoflavones on menopausal female rats B-endorphin neuron. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2007, 35(4): 28-30. (in Chinese).
- [3] Li Y, Xue CK, He XB, et al. Investigation of red clover isoflavones on prevention and treatment in rat without ovarian. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2005, 11(4): 509-511. (in Chinese).
- [4] Ren HF, Ren HY, Li X, et al. Effects of intermedin on proliferation, apoptosis and the expression of OPG/RANKL/MCSF in the MC3T3E1 osteoblast cell line. *Mol Med Report*, 2015, in press, DOI: 10.3892/mm. 2015. 4328.
- [5] Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1276-1287.
- [6] King RA, Bursill DB. Plasma and urinary kinetics of the isoflavone daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67: 867-872.
- [7] Watanabe S, Yamaguchi M, Sobue T, et al. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J Nutr*, 1998, 128: 1710-1715.
- [8] Kulling SE, Honig DM, Simat TJ. Oxidative *in vitro* metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 4963-4972.
- [9] Kulling SE, Honig DM, Manfred M. Oxidative metabolism of the soy isoflavone daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem*, 2001; 49: 3024-3033.

(收稿日期: 2015-10-19)