

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00680

持续气道正压通气对阻塞性睡眠呼吸暂停综合征小型猪血浆 NO、ET 浓度及心肌结构的影响

赵黎明¹, 李兵^{1*}, 修清玉¹, 沈俊², 张慧², 刘秋红²

1. 第二军医大学长征医院呼吸内科, 上海 200003

2. 海军医学研究所航空医学研究室, 上海 200433

[摘要] **目的:**观察持续气道正压通气(CPAP)对阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAS)小型猪血清 NO、血浆 ET 浓度及心肌组织结构的影响。**方法:**24 只雄性成年中国小型猪随机分为正常对照组、OSAS 模型组、CPAP 治疗组及阳性对照组共 4 组($n=6$)。后 3 组均给予 22 d、6 h/d 的间歇性低氧处理制备 OSAS 模型, CPAP 治疗组给予连续 30 d、6 h/d 的 CPAP 治疗, 阳性对照组制模成功后继续饲养 30 d 后与 CPAP 治疗组同时处死, 正常对照组与 OSAS 模型组同时处死。各组处死前行睡眠监测和血浆 ET、血清 NO 浓度测定, 死后取心肌组织行病理学检查。**结果:**CPAP 治疗组较 OSAS 模型组、阳性对照组低通气指数(AHI)显著降低($P<0.05$)、血氧饱和度(SpO_2)显著上升($P<0.05$); 较正常对照组 AHI 显著增高($P<0.05$), SpO_2 无统计学差异。正常对照组、OSAS 模型组、CPAP 治疗组及阳性对照组猪血清 NO 浓度($\mu\text{mol/L}$)分别为: 0.221 ± 0.062 、 0.110 ± 0.033 、 0.115 ± 0.061 、 0.077 ± 0.043 , 血浆 ET 浓度(pg/ml)分别为: 40.2 ± 4.8 、 99.8 ± 22.4 、 67.1 ± 18.5 、 103.7 ± 30.1 。CPAP 治疗组较阳性对照组 NO 浓度上升、ET 浓度下降, 较模型组 ET 浓度下降(P 均 <0.05)。心肌组织病理: 模型组、CPAP 治疗组、阳性对照组心肌组织较正常对照组均发生低氧缺血损害; CPAP 治疗组心肌组织病变程度较模型组、阳性对照组轻, 较正常对照组重。**结论:**30 d 的 CPAP 治疗可以改善 OSAS 小型猪睡眠监测指标, 血浆 ET、血清 NO 浓度, 及心肌组织的病变。

[关键词] 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征; 持续气道正压通气; 动物模型; 内皮素; 一氧化氮; 心肌; 病理学

[中图分类号] R 56 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0680-04

Effect of continuous positive airway pressure on myocardial structure and plasma NO and ET in mini pigs with obstructive sleep apnea syndrome

ZHAO Li-ming¹, Li Bing^{1*}, XIU Qing-yu¹, SHEN Jun², ZHANG Hui², LIU Qiu-hong²

1. Department of Respiratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Aeromedicine Laboratory, Institute of Naval Medicine, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of continuous positive airway pressure (CPAP) on serum NO and plasma ET and myocardial structure in mini pigs with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS). **Methods:** Twenty-four male mini pigs were evenly randomized into 4 groups: normal control group (group A), OSAS model group (group B), CPAP treated group (group C) and positive control group (group D). Animals in group A were not treated and those in the other 3 groups were treated with intermittent hypobaric hypoxia 6 h daily for 22 d. Animals in groups C was also given further CPAP treatment 6 h daily for 30 d. The animals in group D were raised for 30 d and were sacrificed together with those in group C; the animals in group A and group B were sacrificed simultaneously. Sleep monitoring and determination of serum NO and plasma ET were performed before execution and pathological examination of myocardial structure after execution. **Results:** The apnea-hypopnea index (AHI) of group C was significantly lower than those of group B and D and higher than that of group A ($P<0.05$); the SpO_2 of group C was significantly higher than those of group B and D ($P<0.05$), and was similar to that of group A. The levels of NO in group A, B, C, and D were (0.221 ± 0.062), (0.115 ± 0.061), (0.110 ± 0.033), (0.077 ± 0.043) $\mu\text{mol/L}$, respectively, and the levels of ET were (40.2 ± 4.8), (99.8 ± 22.4), (67.1 ± 18.5), and (103.7 ± 30.1) pg/ml , respectively. Group C had significantly higher NO level and lower ET level compared with group D ($P<0.05$). The ET level in group C was significantly lower than that in group B ($P<0.05$). Pathological examination showed that the myocardial structure in group B,

[收稿日期] 2008-11-07 **[接受日期]** 2009-01-04

[基金项目] 国家自然科学基金(30370378). Supported by National Natural Science Foundation of China (30370378).

[作者简介] 赵黎明, 硕士, 讲师、主治医师. E-mail: 1976zlm@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885322, E-mail: lbxwzhao@yahoo.com.cn

C, and D all had hypoxia and ischemia damage compared with group A; the damage in group C was slighter than that in group B and D, but severer than that in group A. **Conclusion:** Thirty day-treatment with CPAP can improve the sleeping indices, plasma ET and serum NO level, and myocardial structure of OSAS mini pigs.

[KEY WORDS] obstructive sleep apnea syndrome; continuous positive airway pressure; animal model; endothelin; nitric oxide; cardiac muscle; pathology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6): 680-683]

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea syndrome, OSAS) 是临床最常见的睡眠呼吸疾病。该病在中年人群中的发病率男性为 4%、女性为 2%^[1]。OSAS 最严重的并发症是心血管疾病, 直接威胁生命的主要因素是急性心血管事件, 如卒中、心肌梗死和夜间猝死, 慢性心血管并发症包括高血压、冠心病和心力衰竭等。OSAS 患者的高血压发病率是普通人群的 2 倍, 缺血性心脏病发病率是普通人群的 2~3 倍, 总的心血管疾病病死率是非 OSAS 健康人群的 2.7 倍^[1]。McNicholas 等^[2] 研究认为低氧导致的多种因素如交感神经系统亢进、选择性炎症通路激活、内皮功能紊乱及代谢紊乱等诸多因素可能与 OSAS 心血管并发症相关。但目前缺乏 OSAS 对心肌结构影响的相关研究。

我们前期研究^[3-4] 应用低压低氧法成功诱导 OSAS 大鼠和 OSAS 小型猪, 并对 OSAS 小型猪实施了持续气道正压通气 (continuous positive airway pressure, CPAP) 治疗, 发现 CPAP 能改善其上气道结构、功能。本研究拟通过观察 CPAP 治疗前后 OSAS 小型猪血浆内皮舒张因子 (EDRF/NO)、内皮素 (ET) 浓度及心肌组织学的变化, 探讨 OSAS 患者心血管并发症发生的可能机制以及 CPAP 治疗的效果。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 大型双室低压氧舱由海军医学研究所航空医学研究室自行研制; 睡眠初筛仪为北京东方万泰公司产品; Trend110 型 CPAP 呼吸机为德国豪富公司产品; SN-697 型双探头 γ 计数器为上海原子核研究所日环仪器一厂产品; 752 型紫外分光光度计为上海精密科学仪器厂产品。ET 检测试剂盒由北京华英生物技术研究所提供; NO 测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 动物分组及处理

1.2.1 动物分组 雄性成年 (16 个月龄) 中国小型猪 24 只, 体质量 (8.5 ± 0.7) kg, 购自第二军医大学实验动物中心。小型猪随机分为 4 组 ($n=6$): 正常对照组, OSAS 模型组, CPAP 治疗组, 阳性对照组。

1.2.2 模型制备 小型猪适应性饲养 1 周后, 阳性对照组、OSAS 模型组、CPAP 治疗组每天置入低压

氧舱一室, 关闭舱门, 抽气降低气压, 按 10~15 m/s 速率降低至海拔 (5 000 ± 50) m 高度压力水平, 压力约 53.9 kPa (氧含量 10%~11.2%) 条件下, 停留 6 h, 而后按相同的速率, 上升至相当于海平面高度的气压水平。依此法连续 22 d。正常对照组置于低压氧舱二室, 不关舱门, 舱内气压维持海平面水平, 压力约为 101.3 kPa (氧含量 21%)。

1.2.3 CPAP 治疗 模型制备后, CPAP 治疗组开始 6 h/d, 连续 30 d 的 CPAP 治疗。小型猪麻醉 (戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射, 使小型猪处于安静状态, 呼吸均匀, 对强刺激有反应, 以此模拟睡眠状态) 后进行 CPAP 治疗, 以婴儿型鼻面罩罩于小型猪口鼻部, 压力水平为 5~8 cm H₂O (1 cmH₂O = 0.098 kPa), 使小型猪血氧饱和度 (SpO₂) 维持在 94% 以上。阳性对照组不进行 CPAP 治疗, 继续饲养 30 d 后与 CPAP 组同时处死。

1.3 睡眠监测 小型猪麻醉后固定仰卧位, 依次连接胸、腹部运动探测带, 鼻气流探头 (鼻前庭)、夹指型 SpO₂ 探测器 (右前肢足趾), 并依序连接各导联至睡眠初筛仪。初筛仪连接计算机, 记录小型猪胸部运动、腹部运动、鼻呼吸气流曲线, 记录 SpO₂、心率等均值。小型猪麻醉起效后开始监测, 觉醒后停止。以“睡眠初筛”软件分析原始数据, 得出各组低通气指数 (apnea hyponea index, AHI)、SpO₂, 并进行组间比较。

1.4 血 NO、ET 浓度测定 小型猪晨起后抽血, 2 ml 注入空试管中待凝固后, 取血清用于 NO 检测; 另抽血 2 ml 注入含 10% EDTA-Na₂ 30 μ l 和抑肽酶 40 μ l 的试管中, 混匀, 4℃ 1 000 × g 离心 15 min, 分离血浆用于 ET 检测; 血清、血浆均 -70℃ 保存, 测定前冰水复融。检测步骤及方法按试剂盒说明书进行。

1.5 心肌组织病理学观察 完成上述各项检查后麻醉小型猪, 放 (股动脉) 血处死小型猪, 取心尖部 0.5 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 肌肉组织置于 10% 甲醛溶液中, 常规石蜡包埋, H-E 染色, 读片。正常对照组及 OSAS 模型组在 OSAS 模型组完成低压低氧处理进行睡眠监测、取血后处死; CPAP 治疗组及阳性对照组在 CPAP 治疗组完成 CPAP 治疗后进行睡眠监测、取血后处死。

1.6 统计学处理 数据利用 SAS 9.1 统计软件以组间 *t* 检验方法进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睡眠监测 正常对照组、OSAS 模型组、CPAP 治疗组及阳性对照组监测时间分别为 145.5、140.7、154.2、170.6 min。结果(表 1)表明:模型组、CPAP 治疗组、阳性对照组 AHI 较正常对照组均显著增高 ($P < 0.05$);模型组、阳性对照组 SpO₂ 较正常对照组

下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CPAP 治疗组较模型组、阳性对照组比较,AHI 显著降低 ($P < 0.05$),SpO₂ 则显著上升 ($P < 0.05$)。

2.2 NO、ET 浓度 结果(表 1)表明:模型组、CPAP 治疗组、阳性对照组 NO 浓度较正常对照组均显著降低 ($P < 0.05$),ET 浓度有显著升高 ($P < 0.05$)。CPAP 治疗组与阳性对照组比较,NO 浓度显著升高、ET 浓度显著下降 ($P < 0.05$);CPAP 治疗组与模型组比较,ET 浓度显著降低 ($P < 0.05$),NO 浓度差异无统计学意义。

表 1 4 组睡眠监测结果及 NO、ET 浓度比较

Tab 1 Comparison of sleep monitoring results and levels of NO and ET in 4 groups

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	AHI f/h^{-1}	SpO ₂ (%)	NO $c_B/(\mu\text{mol} \cdot L^{-1})$	ET $\rho_B/(\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$
Normal control	2.3 ± 1.6	94.5 ± 1.8	0.221 ± 0.062	40.2 ± 4.8
OSAS model	16.1 ± 8.3*	86.7 ± 3.6*	0.110 ± 0.033*	99.8 ± 22.4*
CPAP treated	6.4 ± 3.8* [△]	91.7 ± 2.1 [△]	0.115 ± 0.061*	67.1 ± 18.5* [△]
Positive control	17.7 ± 7.6* [▲]	86.2 ± 4.3* [▲]	0.077 ± 0.043* ^{△▲}	103.7 ± 30.1* [▲]

* $P < 0.05$ vs normal control group; [△] $P < 0.05$ vs OSAS model group; [▲] $P < 0.05$ vs CPAP treated group

2.3 心肌组织病理 正常对照组(图 1A):心肌排列规整,横纹清楚;模型组(图 1B):心肌细胞水肿,纤维排列不整,间质有小灶性出血;CPAP 治疗组(图 1C):心肌组织排列尚规整,少量炎症细胞浸润,部分横纹不清;阳性对照组(图 1D):心肌有小灶性

出血,肌纤维排列紊乱,炎症细胞浸润。模型组、CPAP 治疗组、阳性对照组心肌组织较正常对照组均发生低氧缺血损害。CPAP 治疗组心肌组织病变程度较模型组、阳性对照组轻,较未接受低压低氧处理的正常对照组重。

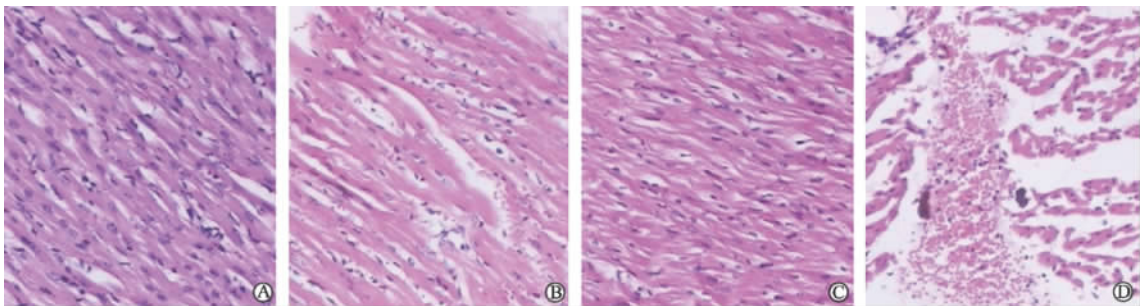


图 1 各组猪心肌组织病理学观察结果

Fig 1 Results of myocardial structure in 4 groups(H-E staining)

A: Normal control group; B: OSAS model group; C: CPAP treated group; D: Positive control group. Original magnification: ×100

3 讨论

OSAS 是一种严重危害人类健康的疾病,保守估计我国大陆地区 OSAS 的发病率为 3.62%^[5]。OSAS 临床诊断主要依据多导睡眠图(PSG)结果,经 PSG 监测提示每夜 7 h 睡眠中,呼吸暂停及低通气反复发作在 30 次以上,或 AHI 大于或等于 5 次/h。对疑似患者,一般采用初筛仪进行筛选。Mizuma 等^[6]研究发

现,白天 3 h 的睡眠监测对于确定 OSAS 诊断和严重性都有一定作用。本研究利用初筛仪对实验小型猪进行了 2.5 h 左右的睡眠监测,确定低压低氧处理后的小型猪 AHI 达到 OSAS 的诊断标准。

心血管疾病是 OSAS 最常见、最严重的并发症^[2]。NO 是人体血管内皮细胞合成的重要物质之一,具有强大的舒张血管、抑制血管平滑肌细胞增殖,抗血小板凝集、黏附和释放活性物质的作用,可

防止血管痉挛和血栓形成。ET 是血管内皮细胞分泌的最强大的缩血管因子,可引起各种血管收缩,其中冠状动脉最敏感。OSAS 患者由于其反复呼吸暂停引起的反复间歇性低氧可导致反复的睡眠唤醒、交感神经兴奋,患者会出现心率加快、血压波动,导致血流流速波动,使血管内皮细胞不仅承受反复的低氧-再氧合刺激,而且还要承受反复的血流切应力变化的刺激,导致内皮功能损害^[7]。

本研究发现模型组、CPAP 治疗组、阳性对照组 AHI 较正常对照组明显增高,平均 SpO₂ 下降;同时 3 组与正常对照组比较,NO 浓度均显著降低,ET 浓度则显著上升。提示 OSAS 小型猪由于睡眠期间反复发生的呼吸暂停和低通气导致内皮系统损害。而血管病变是心血管疾病的病理基础,这可能是 OSAS 患者心血管并发症高发的原因之一。心肌组织病理学检查发现,模型组、阳性对照组、CPAP 治疗组心肌受到不同程度的损害,以阳性对照组最重。这些改变可能是血管内皮系统损害后导致血管功能改变引起的继发性变化。

CPAP 是目前 OSAS 患者有效治疗方法之一,可以显著改善 OSAS 患者的反复低氧及睡眠间断、夜间间歇性低氧状态,降低心血管系统并发症的发生率和病死率^[8-9]。本研究发现 CPAP 治疗组小型猪 AHI、SpO₂ 均较模型组、阳性对照组显著改善 ($P < 0.05$),其 SpO₂ 与正常对照组小型猪差异无统计学意义。这说明 CPAP 治疗改善了 OSAS 小型猪的夜间间歇低氧状态,提示 CPAP 治疗能改善 OSAS 对内皮组织的损害。研究结果还发现 CPAP 治疗组与阳性对照组比较,NO、ET 浓度差异有统计学意义 ($P < 0.05$);CPAP 治疗组 ET 浓度较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。结果提示内皮系统的功能得到了部分改善,发生了趋向于正常的改变。

本研究发现,CPAP 治疗组心肌组织病变程度较模型组、阳性对照组轻。CPAP 治疗可以降低 OSAS 患者的血压,尤其是夜间血压的波动^[10],其机制可能是通过去除患者的夜间间歇性低氧,降低其血浆去甲肾上腺素水平,降低交感神经兴奋性,稳定其心律和夜间血压变化^[11]。本研究发现 CPAP 治疗后的 OSAS 小型猪体内 NO、ET 浓度发生趋于正常的变化。这些变化可能改善了血管的持续收缩状态,使心肌组织供血得到改善,从而使 CPAP 治疗组心肌损害较阳性对照组、模型组减轻。

Li 等^[12] 研究发现呼吸低氧气体诱导大鼠产生肺动脉高压,导致肺动脉血管发生重建;而在恢复呼吸正常氧浓度气体后,动脉血管可发生部分可逆性

变化。本研究发现 CPAP 治疗可以改善 OSAS 小型猪的 AHI、SpO₂,从而改善血管内皮组织的功能,使心肌组织病理改变减轻。但其能否逆转 OSAS 小型猪的血管组织病理变化,消除 OSAS 心血管并发症的基础,尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults[J]. *N Engl J Med*, 1993, 328: 1230-1235.
- [2] McNicholas W T, Bonsignore M R, Management Committee of EU COST ACTION B26. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities[J]. *Eur Respir J*, 2007, 29: 156-178.
- [3] 李兵, 赵黎明, 王海青, 修清玉, 沈俊, 张慧. CPAP 对 OSAS 小型猪上气道结构和功能的影响[J]. *生物医学工程杂志*, 2007, 24: 631-635.
- [4] 李兵, 赵黎明, 王海青, 王桂芳, 修清玉. 低压低氧诱导大鼠阻塞性睡眠呼吸暂停综合征后咽部肌肉结构和功能的改变[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 396-399.
Li B, Zhao L M, Wang H Q, Wang G F, Xiu Q Y. Structural and functional changes of pharyngeal muscle in rats with altitude hypoxia-induced obstructive sleep apnea syndrome[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2006, 27: 396-399.
- [5] 李敏, 李庆云, 倪瑾华, 刘嘉琳, 曹蓓, 李善群, 等. 上海市医学会呼吸病学分会睡眠呼吸疾病学组. 上海市 30 岁以上人群阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征流行病学调查[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26: 268-272.
- [6] Mizuma H, Sonnenschein W, Meier-Ewert K. Diagnostic use of daytime polysomnography versus nocturnal polysomnography in sleep apnea syndrome[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 1996, 50: 211-216.
- [7] Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome-an oxidative stress disorder[J]. *Sleep Med Rev*, 2003, 7: 35-51.
- [8] Gordon P, Sanders M H. Sleep, 7: positive airway pressure therapy for obstructive sleep apnoea/hypopnoea syndrome[J]. *Thorax*, 2005, 60: 68-75.
- [9] Doherty L S, Kiely J L, Swan V, McNicholas W T. Long-term effects of nasal continuous positive airway pressure therapy on cardiovascular outcomes in sleep apnea syndrome[J]. *Chest*, 2005, 127: 2076-2084.
- [10] Heitmann J, Ehlenz K, Penzel T, Becker H F, Grote L, Voigt K H, et al. Sympathetic activity is reduced by nCPAP in hypertensive obstructive sleep apnoea patients[J]. *Eur Respir J*, 2004, 23: 255-262.
- [11] Dursunoglu N, Dursunoglu D, Cuhadaroglu C, Kiliçaslan Z. Acute effects of automated continuous positive airway pressure on blood pressure in patients with sleep apnea and hypertension[J]. *Respiration*, 2005, 72: 150-155.
- [12] Li Z, Huang W, Jiang Z L, Gregersen H, Fung Y C. Tissue remodeling of rat pulmonary arteries in recovery from hypoxic hypertension[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 11488-11493.