



慢性间断性缺氧伴二氧化碳潴留小鼠模型的建立

刘海林 张子彦 郭云云 李景春 宋永斌 徐江涛

(兰州军区乌鲁木齐总医院神经内科, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 建立慢性间断性缺氧伴二氧化碳潴留(chronic intermittent hypoxia with carbon dioxide retention, CIH-CR)小鼠模型。方法 选取雄性昆明小鼠22只,随机分为常氧组(normal control group, NC)和CIH-CR组,每组11只。CIH-CR组小鼠每天CIH-CR处理8h,共4周,实验期间监测箱内O₂和CO₂浓度及小鼠尾部末端血氧饱和度(SO₂)。实验终点测定右室肥厚指数并观察心、肺、肾、脑组织病理改变。结果 CIH-CR组箱内O₂浓度、CO₂浓度和小鼠尾部末端SO₂随实验仓的关闭和开启出现周期性的变化;与NC组相比CIH-CR组右心室明显肥大($P < 0.01$);小鼠心、肺、肾和脑组织均出现明显缺氧改变。结论 成功建立了CIH-CR小鼠模型。

【关键词】 慢性间断性缺氧; 二氧化碳潴留; 睡眠呼吸暂停综合征; 模型, 动物

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0062-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.01.014

A Mice Mode of Chronic Intermittent Hypoxia with Carbon Dioxide Retention

LIU Hai-lin, ZHANG Zi-yan, GUO Yun-yun, LI Jing-chun, SONG Yong-bin, XU Jiang-tao

(Department of Neurology, Urumqi General Hospital, Lanzhou Command, PLA, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 Objective To establish a chronic intermittent hypoxia with carbon dioxide retention (CIH-CR) model in mice. **Methods** 22 male Kun Ming mice were divided into the normal control (NC) group and CIH-CR group. The mice of CIH-CR group suffered 8 hours intermittent hypoxia everyday for 4 weeks. The concentration of O₂ and CO₂ in the cabin was detected by oxygen analyzer and Carbon dioxide detector, meanwhile, the blood oxygen saturation were detected by blood oximeter. At the end of the experiment, weight of right and left ventricles was measured. The general pathological changes of myocardium, pulmonary, kidney and brain were observed by HE staining. **Result** The concentration of O₂ and CO₂ in the cabin and the SO₂ in the empennage of mouse accord with the cyclical change process. Compared with the NC group, the right ventricular hypertrophy were increased in the CIH-CR groups ($P < 0.01$). The tissue of myocardium, pulmonary, kidney and brain were shown obvious hypoxic change in CIH-CR group. **Conclusion** A CIH-CR animal model were be established successfully.

【Key words】 Chronic intermittent hypoxia; Carbon dioxide retention; Sleep apnea syndrome; Model animal

睡眠呼吸暂停综合征(sleep apnea syndrome, SAS)的病理生理机制本质上是一个慢性间断性缺氧伴二氧化碳潴留(chronic intermittent hypoxia with

carbon dioxide retention, CIH-CR)的过程。大量的研究表明,SAS是多种疾病的独立危险因素,可导致心、肺、肾、脑及血液等器官或系统损害^[2]。建立理

[基金项目]兰州军区医药卫生科研项目(LXH-2009024)。

[作者简介]刘海林,男(1982-)硕士研究生,研究方向:睡眠医学,E-mail:liuhailin0516@126.com。

[通讯作者]徐江涛,男(1959-)主任医师。E-mail:xujiangtao1959@163.com。

想的 SAS 动物模型对研究其发病机制及治疗有重要意义。本研究旨在建立一种成本低廉、操作简便、易于推广、符合 SAS 病理生理学特征 CIH-CR 的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级健康雄性昆明种小白鼠,购自新疆医科大学实验动物中心,动物合格证[SCXK(新)2003-0001],体重 18~22g,共 22 只。分为常氧(normal control, NC)及 CIH-CR 组,每组 11 只。

1.2 实验仪器

自制实验仓(包括:有机玻璃、继电器、微动电极、牵引器、不锈钢套管);CY212C 型测氧仪(浙江电化分析仪器厂),EM-21 型便携式二氧化碳检测仪(连云港金升科技有限公司),PC-68B 血氧饱和度仪(深圳市科瑞康实业有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CIH-CR 实验仓及其工作原理:本实验仓规格为 45.3×22.0×4.9 cm。仓底部有通气孔并与打好孔的不锈钢套管相连,通过两个牵引器控制通气孔的开启与关闭,关闭(缺氧处理)与开启(复氧处理)时间由两个继电器控制,开启与关闭时间可依实验需要调整,达到给予小鼠反复缺氧/复氧自动循环的目的。二氧化碳检测仪固定于仓内,实验仓顶端预留测氧孔。实验期间小鼠活动自如,自由饮食。

实验仓工作原理:关闭实验仓时,小鼠呼吸仓内有限的 O₂ 排出 CO₂ 造成低 O₂ 和 CO₂ 潴留,然后使实验仓与外界相通形成复氧,O₂ 和 CO₂ 浓度迅速恢复正常水平。循环时间由继电器自动控制,每次循环 150s,其中关闭时间为 120s,开启时间为 30

s,每天 8 h(10:00~18:00),其余时间置小鼠饲养笼,室温、空气、正常饮食。NC 组每日同时置相同规格有机玻璃箱内,箱内开放,不形成缺 O₂ 和 CO₂ 潴留。间断性缺氧实验过程中箱内气体浓度由二氧化碳检测仪和测氧仪监测。

为了验证实验仓的效果,测定 10 只小鼠在此间断缺氧条件下尾部末端 SO₂ 变化情况,方法为:先将小鼠用苯巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,放入实验仓中,尾部通过预留孔伸出仓外,使用血氧饱和度仪测尾部末梢 SO₂。

1.3.2 右室肥厚指数计算:实验小鼠腹腔内注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 体重,直接开胸切取心脏,在房室瓣水平去除心房、大血管和心包组织,沿室间隔分离左心室(包括室间隔)和右心室,冰盐水平冲洗干净,清洁滤纸吸干水份后称左心室(含室间隔)湿重和右心室湿重,计算右心室湿重/左心室(含室间隔)湿重(RV/LV+S),即为右心室心肌肥厚指数^[3]。

1.3.3 病理观察:实验终点取小鼠心、肺、肾、脑组织以 10% 的甲醛固定、石蜡切片、常规 HE 染色,光镜观察。

1.4 统计学处理

实验数据应用 SPSS16.0 统计软件处理,采用均数±标准差(x±s)表示,两独立样本 t 检验,以 P<0.05 为差异有显著性。

2 实验结果

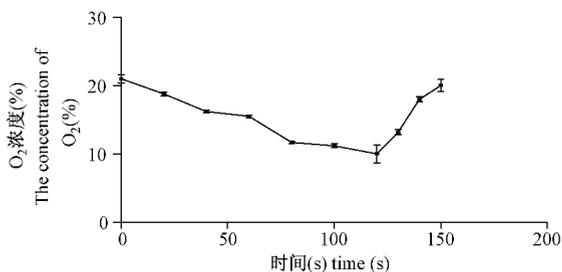
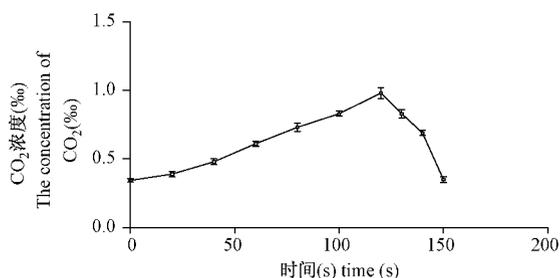
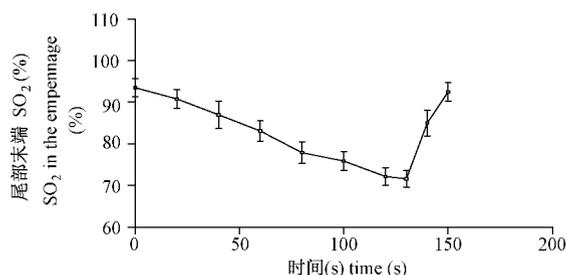
2.1 CIH-CR 实验仓内 O₂ 浓度、CO₂ 浓度和小鼠尾部末端 SO₂ 周期性变化动态测定结果

实验仓内 O₂ 浓度、CO₂ 浓度和小鼠尾部末端 SO₂ 见表 1 及图 1,图 2,图 3。

表 1 10 个循环周期中缺氧箱内各个时间点 O₂ 浓度(%)、CO₂ 浓度(%)及小鼠尾部末端 SO₂(%)

Tab.1 The concentration of O₂,CO₂ and the SO₂ in the empennage of mouse in the cabin in 10 cycle

时间点(s) Time(s)	O ₂ 浓度(%) The concentration of O ₂ (%)	CO ₂ 浓度(%) The concentration of CO ₂ (%)	尾部末端 SO ₂ (%) SO ₂ in the empennage(%)
0	21.0±0.6	343.6±12.8	93.5±2.2
20	18.8±0.3	391.8±19.4	90.8±2.3
40	16.2±0.2	483.1±19.3	87.0±3.3
60	15.5±0.2	612.7±17.4	83.1±2.4
80	11.7±0.2	734.6±29.7	77.9±2.6
100	11.2±0.3	827.8±23.2	75.9±2.3
120	10.0±1.3	979.7±39.8	72.2±2.1
130	13.2±0.4	830.8±26.6	71.6±2.0
140	18.0±0.4	687.6±16.3	85.0±3.1
150	20.0±0.9	345.6±17.5	92.5±3.4

图1 箱内 O₂ 浓度变化趋势Fig. 1 The change trend of O₂ concentration in the cabin图2 箱内 CO₂ 浓度变化趋势Fig. 2 The change trend of CO₂ concentration in the cabin图3 小鼠尾部末端血 SO₂ 变化趋势Fig. 3 The change trend of the SO₂ in the empennage of mouse in the cabin

2.2 CIH-CR 组小鼠右室肥厚指数的影响

NC 组和 CIH-CR 组小鼠右室肥厚指数分别为 0.21 ± 0.03 和 0.30 ± 0.02 , 与 NC 组相比, CIH-CR 组小鼠右心肥厚指数明显升高 ($P < 0.01$)。

2.3 心、肺、肾和脑组织 HE 染色结果

2.3.1 小鼠心肌组织病理学改变: NC 组小鼠心肌组织结构正常, 肌纤维排列规则, 间质无明显水肿。CIH-CR 组小鼠心肌细胞可见核肿胀, 间质水肿, 偶见轻度嗜酸性变, 见封 3 图 4~5。

2.3.2 小鼠心组织病理学改变: NC 组组胞壁薄, 血管壁较光滑, 与对照组比较, CIH-CR 组小鼠肺泡腔体积变小, 血管扩张充血, 肺间质增多, 肺泡间质毛细血管增多, 见封 3 图 6~7。

2.3.3 小鼠肾脏组织病理学改变: NC 组肾小球、肾小管细胞及上皮细胞排列整齐, 胞浆均匀; CIH-CR 组肾小球肾小管上皮肿胀, 管腔消失, 部分肾小管内有蛋白管型, 见封 3 图 8~9。

2.3.4 小鼠脑组织病理学改变: NC 组神经元大小、形态正常; CIH-CR 组性神经元明显增加, 细胞肿胀突出, 胞浆空泡增大, 细胞皱缩, 胞体深染, 见封 3 图 10~11。

3 讨论

目前, 在已发表的 SAS 动物模型中, 不同的实验缺氧-复氧循环时间 30~300 s 不等, 每天总缺氧时间 5~8 h 不等, 缺氧累计天数 14~70 d 不等, 最低 O₂ 浓度 3%~10% 不等。对二氧化碳是否滞留观点不一^[4-8], 不同研究者的实验方案重复性和可比性较差。造成低氧的方式主要是向缺氧装置中冲入氮气或压缩空气与混合气体^[7,9], 可以对缺氧时间及程度精确控制, 但仪器成本较高, 不利于推广。

本实验采用小鼠作为 CIH-CR 模型的实验动物, 根据小鼠昼伏夜出的习性, 每天间断缺氧在日间进行(10:00~18:00)。在间断缺氧箱密闭后, 由于小鼠呼吸箱内有限 O₂, 排出 CO₂, 箱内 O₂ 浓度逐渐降至 $10\% \pm 1.3\%$, CO₂ 浓度逐渐升至 $979.7 \pm 39.8\%$ 。给予通气后箱内 O₂ 浓度在 120 s 左右迅速升高至 $20\% \pm 0.9\%$, CO₂ 浓度降至 $343.6 \pm 12.8\%$ 。同时检测血氧饱和度发现, 缺氧最低点时 SO₂ 为 $71.2 \pm 2.1\%$, 当恢复至正常氧浓度时 SO₂ 为 $93.5 \pm 2.2\%$, 类似于 SAS 患者血氧浓度变化曲线, 说明该模型能模拟 SAS 的血氧特点。本实验结果显示, 4 周后模型组小鼠右心室明显肥大 ($P < 0.01$), 提示 4 周的 CIH-CR 循环可模拟 SAS。并且组织病理学表现符合低氧后改变, 进一步从形态学角度说明本研究制备了可靠的 SAS 小鼠模型。

我们的实验是通过小鼠的自主呼吸耗竭 O₂, 产生 CO₂, 符合 SAS 逐渐缺氧和高 CO₂ 的生理过程。本实验箱通过电控阀控制箱的开启和闭合, 可调节缺氧时间, 从而可根据需要制作不同程度的 SAS 模型。实验箱在电极转换调控阀门时产生一定的声

音,不断干扰小鼠的睡眠,符合 SAS 对睡眠结构产生影响的过程。箱内刚好容纳 22 只小鼠,此空间小鼠耐受良好,便于观察小鼠呼吸及自主运动情况,且可以成批复制小动物模型。本模型设计简单,成本低廉,易于推广。

总之,虽该实验箱存在一些缺点,但因其符合 SAS 病理过程,设计简单,成本低廉,不失为一种理想的 SAS 模型实验箱。

参考文献:

- [1] 郭彦红,姬秋和,张丙芳. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征与 IL-6 关系的研究[J]. 西北国防医学杂志,2002,23(1):21-22.
- [2] 李景春,徐江涛. 睡眠呼吸暂停综合征啮齿动物模型的研究进展[J]. 现代生物医学进展 2009,9(12):2377-2379.
- [3] Nattie EE, Doble EA. Threshold of intermittent hypoxia-induced right ventricular hypertrophy in the rat [J]. Respir Physiol. 1984,56(2):253-259.
- [4] Fletcher EC, Lesske J, Qian W, et al. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats [J]. Hypertension,1992,19(6Pt1):555-561.
- [5] Fagan KA. Selected Contribution: Pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia[J]. J Appl Physiol,2001,90(6):2502-2507.
- [6] Park AM, Suzuki YJ. Effects of intermittent hypoxia on oxidative stress-induced myocardial damage in mice [J]. J Appl Physiol. 2007,102(5):1806-1814.
- [7] McGuire M, MacDermott M, Bradford A. The effects of chronic episodic hypercapnic hypoxia on rat upper airway muscle contractile properties and fiber-type distribution[J]. Chest. 2002,122(4):1400-1406.
- [8] XU W, Chi L, ROW BW, et al. Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea [J]. Neuroscience, 2004,126(2):313-323.
- [9] Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, et al. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007,293(5):2971-2976.

(修回日期)2011-07-29

(上接第 68 页)

- [2] 张石革,孙定人. 治疗勃起功能障碍药物的研究与应用进展[J]. 中国药房 2001,1(1):50-51.
- [3] Benassi-Benelli A, Ferrari F, Quarantotti BP. Penile erection induced by apomorphine and N-nopropyl-norapomorphine in rats. Arch Int Pharmacodyn 1979; 242: 241-247.
- [4] El-Thaher TS, Matalka KZ, Taha HA, et al. Ferula harmonis 'zallouh' and enhancing erectile function in rats: efficacy and toxicity study. Int J Impot Res 2001; 13: 247-251.
- [5] El-Thaher TS, Khatib S, Saleem M, Shnoudeh A, et al. A novel compound JPM8: in vivo penile activity promotion in rats, effect on the relaxation and cGMP/cAMP accumulation in isolated rabbit corpora cavernosa. Int J Impot Res 2002; 14: 453-461.
- [6] 潘建春,阿地力江·伊明. 勃起功能障碍实验动物模型的研究进展[J]. 新疆医科大学报 2010,33(11):1290-1292.
- [7] Burnett AL. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology [J]. J Urol 1997,157: 320-324.
- [8] Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, et al. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes [J]. The Journal of Urology, 1998, 159(6): 2164-2171.
- [9] Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, et al. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction [J]. N Engl J Med. 1998 May 14; 338(20): 1397-404.
- [10] Moreland RB, Goldstein I, Traish A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells [J]. Life Sci, 1998, 62(20): 309-318.

(修回日期)2011-10-27

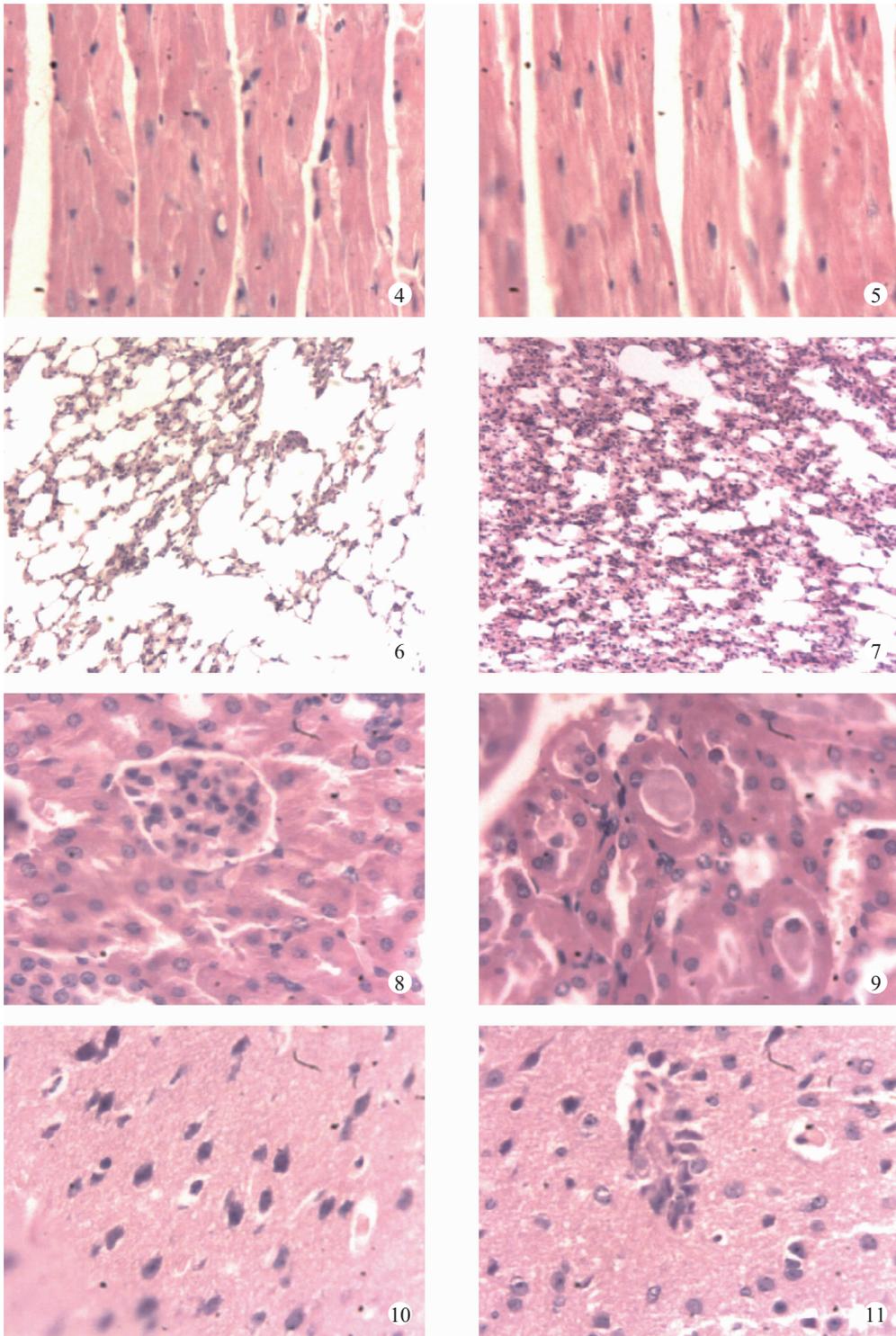


图 4 NC 组 图 5 CIH-CR 组 图 6 NC 组 图 7 CIH-CR 组

图 8 NC 组 图 9 CIH-CR 组 图 10 NC 组 图 11 CIH-CR 组

Fig. 4 NC group Fig. 5 CIH-CR group Fig. 6 NC group Fig. 7 CIH-CR group
Fig. 8 NC group Fig. 9 CIH-CR group Fig. 10 NC group Fig. 11 CIH-CR group