

· 基础研究 ·

慢性间歇性缺氧引起大鼠舌下神经核超微结构损伤的初步研究

朱 华^{1,2}, 曹 芮¹, 李佳宸¹, 史雅文¹, 殷 敏^{1*}

¹南京医科大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 江苏 南京 210029; ²南京农业大学医院, 江苏 南京 210095

[摘要] 目的:通过大鼠造模,探讨慢性间歇性缺氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)状态下,大鼠舌下神经元超微结构损伤的情况。方法:将12只雄性SD大鼠(8周龄,体重180~200 g)随机均分为CIH组和常氧对照组,每组各6只。CIH组6只大鼠饲养于氧浓度5%~21%之间循环的低氧舱中,每天8 h,持续35 d;对照组大鼠饲养箱的氧浓度保持在21%,持续35 d。5周后在电镜下观察两组大鼠舌下神经元超微结构损伤的情况。结果:电镜结果显示常氧组大鼠舌下神经元细胞膜完整,核膜平滑,染色质均匀,细胞器丰富。而CIH组细胞膜呈不连续性;细胞核膜内陷,胞核呈不规则形;神经元内出现水肿空泡化;线粒体肿胀,外膜模糊不清,有破损情况;高尔基体和滑面内质网出现肿胀扩张现象;还可见脂褐素。结论:慢性间歇性缺氧可诱导大鼠舌下神经核损伤,可在电镜下观察到舌下神经核一系列超微结构变化。

[关键词] 慢性间歇性缺氧;舌下神经核;超微结构

[中图分类号] R329.24

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)02-187-04

doi:10.7655/NYDXBNS20190205

Preliminary study on ultrastructural damage of hypoglossal nucleus in rats caused by chronic intermittent hypoxia

Zhu Hua^{1,2}, Cao Rui¹, Li Jiachen¹, Shi Yawen¹, Yin Min^{1*}

¹Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ²Nanjing Agricultural University Hospital, Nanjing 210095, China

[Abstract] **Objective:** To study chronic intermittent hypoxia (CIH)-induced ultrastructural damage of hypoglossal motor nucleus in modeling rat. **Methods:** Twelve adult male Sprague-Dawley (SD) rats (8 weeks old, weighing 180-200 g) were randomly and meanly divided into two groups (the CIH group and the control group), with 6 rats in each group. The control group was fed in atmosphere environment cabins with 21% oxygen. And the rats of CIH group were fed in low oxygen cabins for 8 hours a day for 35 days with 5% to 21% oxygen. We study the ultrastructural damage of hypoglossal motor nucleus in rat under electron microscope. **Results:** Electron microscopy showed that the cell membrane of the hypoglossal neurons in the normoxic group was continuous, the nuclear membrane was smooth, the chromatin was homogeneous, and the organelles were abundant. In the CIH group, the cell membrane was discontinuous, the shape of nucleus was irregular, and its membrane was invaginated. There were some areas of edema vacuolization in the neurons. The mitochondria are swollen, and its outer membrane is ambiguous; the Golgi body and the smooth endoplasmic reticulum appear to be swollen and dilated; and lipofuscin is also observed. **Conclusion:** CIH can induce sublingual nucleus damage in rats, so that a series of ultrastructural changes in the hypoglossal nucleus can be observed under electron microscope.

[Key words] chronic intermittent hypoxia; hypoglossal nucleus; ultrastructural

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02): 187-190]

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金(KYYL201703),江苏省高层次卫生人才“六个一工程”(LGY2017070)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: simisodo@hotmail.com

上呼吸道的狭窄塌陷引发睡眠过程中打鼾和呼吸暂停的关键环节,而上呼吸道的开放和闭合受颊舌肌等上呼吸道肌群控制^[1]。既往研究发现,颊舌肌功能障碍在阻塞性睡眠呼吸暂停的发生发展

中发挥重要作用^[2]。以颏舌肌为代表的上呼吸道肌群大多受舌下神经及舌下神经核的调控,睡眠过程中反复发生的呼吸道塌陷,必然存在舌下神经核的调控机制。而因此探讨睡眠呼吸暂停对舌下神经核的影响,有助于进一步阐明睡眠呼吸暂停的病理生理机制。

睡眠呼吸暂停导致的直接后果是慢性间歇性缺氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)。既往研究提示,CIH环境下,有较多神经递质发挥了作用,如5-HT、NE、NO、H₂S、雌激素等^[3-7],这些调节通路可能发挥激动作用,也有些可能发挥保护性作用。而本课题组观察到,在CIH环境下,大鼠舌下神经核5-HT受体的表达在腹侧和背侧核不一致,提示了舌下神经核损伤和代偿性调控同时存在^[3]。

舌下神经核在CIH环境下引发较多神经递质作用下的功能性反应,那么与之相适应的结构变化如何,尚且缺乏关注。初步研究表明,CIH环境下的舌下神经核,在光镜下可以观察到部分尼氏小体的崩解和细胞质淡染。本研究继而对CIH大鼠舌下神经核电镜下超微结构的变化进行了分析研究,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

取12只8周龄的清洁级健康雄性Sprague Dawley(SD)大鼠,体重180~200 g,由江苏省动物实验中心提供。参考文献[8]将12只大鼠按随机对照原则分为间歇性低氧组(CIH组)和常氧对照组(Control组)。每日8:30将CIH组大鼠放入低氧箱中开始周期性通入氮气和空气,持续至16:30,维持低氧舱中的氧浓度在5%~21%之间循环,每个循环为120 s,前60 s充入氮气使低氧箱中氧浓度逐渐降低至5%,后60 s充入压缩空气使低氧箱内氧浓度逐渐上升至21%。16:30实验结束后将箱内CIH大鼠取出,放回常氧环境中饲养。CIH造模时间每天连续8 h,持续35 d。对照组一直置于常氧环境中饲养。两组大鼠自由摄食、进水,饲养环境、条件相同,饲养于南京医科大学动物中心SPF环境中。本实验方案由南京医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 方法

以2%戊巴比妥钠(4 mg/100 g)麻醉后将大鼠固定于手术板上,暴露胸腔并游离心脏,灌注针经左心室插入升动脉,剪开右心耳,先用37℃的生理盐水快速灌注60 mL以移除血液,直至肝脏呈现发白

状态,然后用400~500 mL的4%多聚甲醛从灌注针进行灌注固定,直至大鼠尾巴僵直,完成灌注并立即断头,快速将脑干分离,取出脑干延髓部,将左右两侧舌下神经核组织分离出。根据Paxinos和Watson大鼠脑图谱找到舌下神经核所在的横断面,用微穿刺针提取舌下神经核组织,放入4%戊二醛中并置于4℃冰箱过夜(不超过24 h),然后进行下一步实验。

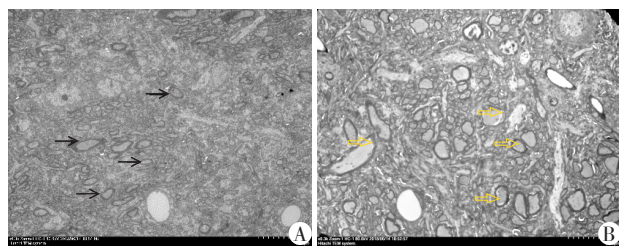
透射电镜制片过程。取材固定:新鲜组织确定取材部位,尽量减小牵拉、挫伤与挤压等机械损伤,组织体积一般不超过1 mm×1 mm×1 mm,迅速投入电镜固定液(G1102,武汉谷歌生物)4℃固定2~4 h。细胞离心至管底可以看到绿豆大小的细胞团块,弃去培养液加入电镜固定液4℃固定2~4 h。0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)漂洗3次,每次15 min。再固定:1%的锇酸和0.1 mol/L PBS(pH7.4)室温(20℃)固定2 h。0.1 mol/L PBS(pH7.4)漂洗3次,每次15 min。脱水:组织依次入50%、70%、80%、90%、95%、100%、100%酒精上行脱水,每次15 min。渗透:丙酮(国药集团化学试剂有限公司):812包埋剂(90529-77-4, SPI)=1:1混合液渗透过夜,纯812包埋剂渗透过夜。包埋:60℃聚合48 h。切片:切片60~80 nm超薄切片。染色:铀铅双染色(2%醋酸铀饱和水溶液,枸橼酸铅,各染色15 min),切片室温干燥过夜。透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

2 结果

与常氧对照组相比,在CIH组神经元髓鞘观察到明显的脱髓鞘病变(图1)。常氧对照组舌下神经电镜图片显示细胞膜完整,核膜平滑,染色质均匀,细胞器丰富(图2A);CIH组神经元细胞膜呈不连续性,细胞核膜内陷,胞核呈不规则形,神经元内出现水肿空泡化;神经髓鞘变形,出现脱髓鞘现象,出现板层分离,可见空泡形成,同心圆结构模糊(图2B)。CIH组线粒体肿胀,外膜模糊不清,有破损情况,高尔基体和滑面内质网出现肿胀扩张现象,还可见脂褐素(图3)。

3 讨论

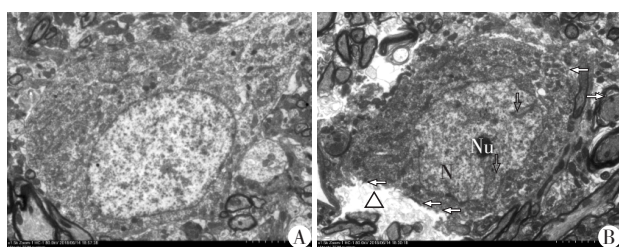
上呼吸道反复塌陷和开放是阻塞性睡眠呼吸暂停的特征性表现^[2]。上呼吸道肌群根据其功能亦分为开放和闭合两大类,但大多接受舌下神经/舌下神经核的支配。一方面睡眠时肌张力下降,上呼吸道趋于塌陷,这是一个被动的过程。另一方面随着呼吸道阻塞,引起睡眠中的微觉醒,从而肌张力得



A:常氧对照组,神经髓鞘正常(→:神经元髓鞘);B:CIH组,可见明显脱髓鞘病变。

图1 常氧对照组与CIH组中大鼠舌下神经元髓鞘($\times 1\,000$)

Figure 1 Myelin sheath of hypoglossal neurons in the normal and the CIH group($\times 1\,000$)



A:常氧对照组;B:CIH组(←:细胞膜不连续性;↓:细胞核膜内陷;△:神经元内水肿空泡化;→:脱髓鞘现象,出现板层分离,空泡形成,同心圆结构模糊;N:细胞核;Nu:核仁)。

图2 常氧对照组与CIH组中大鼠舌下神经元整体观($\times 1\,500$)

Figure 2 Overall view of hypoglossal neurons in the normal and the CIH group($\times 1\,500$)



A:常氧对照组;B、C:CIH组(△:CIH组神经元内水肿空泡化;↑:线粒体肿胀,外膜不清;↓:高尔基体扩张;□:滑面内质网肿胀;←:脂褐素)。

图3 常氧对照组与CIH组中大鼠舌下神经元局部观($\times 5\,000$)

Figure 3 Local view of hypoglossal neurons in the normal and the CIH group($\times 5\,000$)

维持开放的神经反射基础。但这种放电活性长时程易化可被5-HT 2A受体抑制剂终止。另一方面我们的前期研究^[3]也发现,CIH大鼠舌下神经核c-fos的表达增高,提示了舌下神经核细胞受到CIH的损伤。舌下神经支配的众多呼吸肌中,颏舌肌因其重要的功能被称为“安全肌”^[2]。舌下神经核腹侧神经元表明5-HT 2A受体表达增高,以颏舌肌为代表的开放肌群活性增强。这提示了放电活性长时程易化、CIH过程中代偿机制的基础是5-HT作用通路。当然,除了5-HT以外,既往相关研究也表明较多兴奋性递质在CIH过程中发挥作用^[5]。但支持这些调

到部分恢复,气道重新开放,这一过程是主动调节过程。因此,机体对于呼吸暂停的反应,首先是保护性的代偿反应。而调控上呼吸道肌群活性的舌下神经核,一方面可能因间歇性缺氧而受到损失,另一方面可由于保护性调节而存在代偿。

CIH可以导致中枢损伤。本课题组前期研究^[3]发现,一方面CIH大鼠舌下神经核运动神经元尼氏小体崩解,细胞质淡染。同时舌下神经元c-fos的表达增高,提示舌下神经核细胞受到CIH的损伤。本研究进一步针对舌下神经核运动神经元的超微结构进行投射电镜观察,发现CIH组神经元细胞减少、脱髓鞘病变,同时细胞核与细胞器均有结构上的损伤。这些变化趋势与既往研究一致,同时也有研究报道在CIH大鼠舌下神经核发现了凋亡小体存在。这些超微结构的变化均提示了CIH对舌下神经核内的直接损伤反应。

然而针对CIH的损伤亦存在代偿反应。一方面,前期研究在舌下神经观察到了呼吸长时程易化^[12],后者是在舌下神经可塑性的一种表现形式。CIH刺激大鼠后,舌下神经放电活性出现持续性异常增强。即使消除CIH刺激,该反应仍然可以保持较长时间。这被认为可能是睡眠呼吸暂停过程中呼吸道

节过程的超微结构基础会发生何种变化,尚且缺乏关注。

本研究仅观察到超微结构的损伤性反应,亦可能受CIH程度和时间的影 响。通过5周8h的CIH造模发现,H₂S合成相关酶的表达下降^[10],而有研究通过2周6h的CIH造模发现了相反结果^[11]。这提示CIH与代偿间的平衡,对研究结果有明显影响。本研究中CIH的程度更重,可能使机体处于相对失代偿状态。大量研究表明,多种重要的心脑血管疾病如高血压、冠心病等都与睡眠呼吸暂停综合征有直接关系,甚至阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(ob-

structive sleep apnea syndrome, OSAS)可成为独立危险因素,是引起中年人致死的重要原因之一^[12]。因此治疗睡眠呼吸暂停综合征需要更多更有效的治疗方法,而刺激舌下神经核使其放电增强,也为临床上治疗睡眠呼吸暂停提供了一定的理论依据^[13]。CIH刺激舌下神经核运动神经元所致损伤及其代偿的平衡点在哪里,进而对整体而言何种程度睡眠呼吸暂停引起的损伤是机体失代偿的开始,值得基础和临床研究关注。

本研究限于条件,研究样本量尚有不足,未能观察不同部位中枢的超微结构变化。在今后研究中,将进一步针对CIH引起损伤和代偿的机制展开讨论和研究。

[参考文献]

- [1] Jordan AS, White DP. Pharyngeal motor control and the pathogenesis of obstructive sleep apnea[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2008, 160(1):1-7
- [2] 薛荣,张希龙. 咽部肌肉和结构与阻塞性睡眠呼吸暂停的关系[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2016, 30(5):9-12
- [3] 张敏娟,殷敏,焦成,等. 慢性间歇性缺氧状态舌下神经核5-HT及5-HT 2A受体的变化[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2015, 23(2):89-93
- [4] Stettner GM, Fenik VB, Kubin L. Effect of chronic intermittent hypoxia on noradrenergic activation of hypoglossal motoneurons[J]. *J Appl Physiol*, 2012, 112(2):305-312
- [5] Yuan X, Guo X, Deng Y, et al. Chronic intermittent hypoxia-induced neuronal apoptosis in the hippocampus is attenuated by telmisartan through suppression of iNOS/NO and inhibition of lipid peroxidation and inflammatory responses[J]. *Brain Res*, 2015, 1596(1):48-57
- [6] Li M, Nie L, Hu Y, et al. Chronic intermittent hypoxia promotes expression of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in adult rat medulla oblongata[J]. *Auton Neurosci*, 2013, 179(1-2):84-89
- [7] Lu Y, Liu Y, Li Y. Comparison of natural estrogens and synthetic derivative on genioglossus function and estrogen receptors expression in rats with chronic intermittent hypoxia[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 140(1):71-79
- [8] 汤思,周秀芳,胡克. 阻塞性睡眠呼吸暂停动物模型的研究现状[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(1):54-58
- [9] Edge D, O'Halloran KD. Chronic intermittent hypoxia blunts the expression of ventilatory long term facilitation in sleeping rats[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 860(3):335-342
- [10] 李佳宸,殷敏,史雅文,等. CIH对舌下神经核中H2S合成酶影响的初步研究[J]. *中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*, 2018, 26(4):245-249
- [11] Li M, Nie L, Hu Y, et al. Chronic intermittent hypoxia promotes expression of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in adult rat medulla oblongata[J]. *Auton Neurosci*, 2013, 179(1-2):84-89
- [12] 侯慧敏,李佳名,陈侠,等. 老年人阻塞性睡眠呼吸暂停综合征致高血压研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(9):4330-4332
- [13] Schwartz AR. Hypoglossal nerve stimulation - optimizing its therapeutic potential in obstructive sleep apnea[J]. *J Neurol Sci*, 2014, 346(1-2):1-3

[收稿日期] 2018-08-27