

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.007

自噬对慢性间歇性低氧大鼠颞舌肌损伤的作用及机制*

江丽斌¹ 秦文¹ 刘文佳² 邵金陵¹ 郭涛^{1△}

(1 第四军医大学口腔医院正颌科军事口腔医学国家重点实验室 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学口腔医院组织工程研究中心军事口腔医学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨自噬在慢性间歇性低氧状态下大鼠颞舌肌损伤中的作用及其机制。**方法:**将 36 只 SD 大鼠随机均分为对照组,慢性间歇性低氧组(chronic intermittent hypoxia, CIH 组),慢性间歇性低氧+氯喹组(CIH+CQ 组)。苏木素-伊红(HE)染色观察颞舌肌组织形态学变化;激光共聚焦显微镜下观察自噬标记物 LC3 在颞舌肌中的表达;免疫组织化学染色法观察组织中细胞色素 c (cytochrome, Cyt c) 的表达。**结果:**激光共聚焦结果显示,对照组颞舌肌中未见明显 LC3 表达,CIH 组中 LC3 的平均荧光强度较对照组明显增强($P<0.05$),CIH+CQ 组中 LC3 的平均荧光强度较 CIH 组显著增加($P<0.05$)。免疫组织化学结果显示:CIH 组中 Cyt c 的阳性表达较对照组增加($P<0.05$),CIH+CQ 组中 Cyt c 表达与 CIH 组相比显著增加($P<0.05$)。**结论:**慢性间歇性低氧引起颞舌肌线粒体损伤,触发细胞凋亡,同时诱发自噬。抑制自噬加重线粒体损伤,促进细胞凋亡。说明自噬可能通过抑制凋亡而在慢性间歇性低氧状态下的大鼠颞舌肌中起维护肌肉功能的作用。

关键词: 自噬;慢性间歇性低氧;颞舌肌;阻塞性睡眠呼吸暂停

中图分类号: Q95-3; R78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)19-3624-04

The Effect and Mechanism of Autophagy on Genioglossus Muscle Injury in Chronic Intermittent Hypoxia*

JIANG Li-bin¹, QIN Wen¹, LIU Wen-jia², SHAO Jin-ling¹, GUO Tao^{1△}

(1 State Key Laboratory of Military Stomatology, Department of Orthodontics, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 State Key Laboratory of Military Stomatology, Center for Tissue Engineering, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect and mechanism of autophagy on rats genioglossus muscle injury caused by chronic intermittent hypoxia. **Methods:** 36 SD rats were randomly divided into three groups, control group, chronic intermittent hypoxia group (CIH group) and chronic intermittent hypoxia plus chloroquine group (CIH+CQ group). The morphological changes of genioglossus muscle were observed by HE staining. Laser confocal microscopy was used to observe the expression of LC3 protein. Immunohistochemistry was used to observe the expression of Cyt c protein. **Results:** There is no obvious expression of LC3 and Cyt c protein in control group. In CIH group, the mean fluorescence intensity of LC3 and the positive rate of Cyt c were higher than that in control group ($P<0.05$). In CIH+CQ group, the mean fluorescence intensity of LC3 and the positive rate of Cyt c apparently increased compared with that in CIH group ($P<0.05$). **Conclusions:** Chronic intermittent hypoxia may cause mitochondrial damage and trigger early apoptosis in genioglossus muscle. Meanwhile, it can induce the autophagy in genioglossus muscle. Inhibition of autophagy may aggravate the mitochondrial damage and promote apoptosis. This suggests that autophagy may protect genioglossus muscle from the damage which caused by chronic intermittent hypoxia through inhibiting apoptosis.

Key words: Autophagy; Chronic intermittent hypoxia; Genioglossus muscle; Obstructive sleep apnea

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3624-04

前言

阻塞性睡眠呼吸暂停(Obstructive sleep apnea, OSA)是一种常见的睡眠呼吸障碍^[1,2]。研究显示,OSA 与心力衰竭、心律失常、中风等疾病密切相关,显著增加了患病人群的并发症发

病率及猝死风险^[3,4]。OSA 的主要病因在于睡眠时上呼吸道反复发生阻塞引起机体慢性间歇性缺氧。而作为最重要的口咽腔扩张肌,颞舌肌对上呼吸道通畅的维持起到了关键性作用^[5]。

自噬是生物体清除代谢废物,维护细胞内环境稳态的重要调节机制^[6]。诸多研究均证实,自噬可由低氧诱发^[7]。近年来,自

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81100058)

作者简介:江丽斌(1988-),女,医学硕士,主要研究方向:口腔正畸基础与临床研究,电话:18229019290, E-mail: jlb16800168@163.com

△ 通讯作者:郭涛(1977-),男,主治医师,博士,主要研究方向:口腔正畸基础与临床研究,电话:029-84776135, E-mail: freegt@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2015-02-12 接受日期:2015-03-02)

噬已成为众多医学领域的研究热点。然而,有关自噬在 OSA 方面的研究报道甚少。因此,我们通过建立慢性间歇性低氧大鼠模型模拟 OSA,初步探讨自噬在慢性间歇性低氧状态下的大鼠颊舌肌中可能的作用及机理,为更好的改进 OSA 的治疗方法提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂与器材

健康雄性 SD 大鼠 36 只,体重约 170~200 g,购于第四军医大学实验动物中心;兔抗鼠 LC3 单克隆抗体(Cell Signaling 公司);兔抗鼠 Cyt c 多克隆抗体(Bioworld 公司);氯喹(sigma 公司);免疫组化检测试剂盒、DAB 显色剂(北京中杉金桥生物有限公司);低氧舱(第四军医大学生理学教研室);倒置显微镜、激光共聚焦显微镜(OLYMPUS)。

1.2 实验分组与模型建立

将 36 只 SD 大鼠随机分为对照组,慢性间歇性低氧组(CIH 组),慢性间歇性低氧+氯喹组(CIH+CQ 组),每组 12 只,实验持续 4 周。(1)对照组:正常环境下常规饲养;(2)CIH 组:将大鼠放置于低氧舱内,向低氧舱内循环充入氮气与氧气,每循环为 2 min,60 s 充入氮气,60 s 充入氧气,维持氧浓度最低在 $(10 \pm 0.5)\%$,随后复氧至氧浓度为 $(21 \pm 0.5)\%$ 。采用电磁转换器调控舱内气体交替,测氧仪监测并记录低氧舱内氧浓度。在低氧舱底部铺设适量氯化钙与碱石灰以吸收舱内二氧化碳与水蒸气。每天 8:00-16:00 低氧 8 h,持续 4 周。(3)CIH+CQ 组:低氧条件同 CIH 组,在间歇性低氧处理第 4 周开始,大鼠在放入低氧舱前 1 h 用生理盐水配制氯喹 40 mg/(kg·d) 进行腹腔注射。建模期间,各组大鼠均给予自然光照,并可自由饮食饮水。在建模 4 周后,以 CIH 组末次低氧结束为时间标志,各组大鼠脱颈处死,剪取颊舌肌,置入 4%多聚甲醛中固定 24 h,20%蔗糖溶液 4℃脱水过夜,然后进行石蜡包埋。

1.3 HE 染色

取出石蜡标本,切成 5 μm 薄片,贴片。60℃烤片 20 min,依次脱蜡、水化处理,PBS 清洗 3 遍,苏木素染色 5 min,流水清洗 3 s,浸入 1%盐酸乙醇 3 s,PBS 清洗 1 min,0.5%伊红液染色 2 min,PBS 冲洗 3 遍,脱水、脱蜡处理。中性树胶封片,切片风

干后置于倒置显微镜下观察颊舌肌组织细胞形态。

1.4 免疫组织荧光染色

将石蜡标本切片,60℃烤片 20 min,脱蜡、水化,抗原修复(枸橼酸缓冲液高压 2 min),自然冷却,PBS 清洗 3 遍,灭活内源性过氧化物酶(3%过氧化氢室温孵育 15 min),PBS 清洗 3 遍,羊血清 37℃封闭 30 min,不洗,直接滴加一抗(LC3,1:300 稀释),37℃孵育 80 min,PBS 清洗 3 遍,滴加 FITC 标记的二抗,37℃避光孵育 80 min,PBS 清洗 3 遍,Hoechst 避光染核 5 min,50%甘油封片,采用激光共聚焦显微镜观察颊舌肌组织中 LC3 蛋白的荧光表达。

1.5 免疫组织化学染色

将石蜡标本切片,一抗孵育前步骤同免疫组织荧光染色,随后滴加一抗(Cyt c,1:300 稀释),37℃孵育 90 min,PBS 清洗 3 遍,滴加生物素标记的二抗,37℃避光 30 min,PBS 清洗 3 遍,滴加 ABC 复合物,室温孵育 30 min,PBS 清洗 3 遍,DAB 显色,光镜下时刻观察变色情况,一旦变色,立即用 PBS 清洗,苏木素复染 80 s,PBS 清洗 2 遍,脱水、脱蜡处理,中性树胶封片,风干后置于倒置显微镜下观察颊舌肌组织中细胞色素 c 的表达情况。

1.6 统计学方法

采用 Image J 图像分析软件,各组中每张切片在高倍镜下($\times 400$)随机选取 5 个视野,测定颊舌肌组织显色阳性区域的平均吸光度,取其平均值作为所测蛋白相对表达量,所有数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用方差分析法,应用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠颊舌肌组织形态学变化

光镜下观察肌束横切面,HE 染色结果(见图 1)显示,对照组大鼠颊舌肌细胞呈钝角多边形,形态规则,边界清晰,细胞间距均匀。CIH 组细胞肿胀,多数细胞边界圆钝,角度消失,细胞间距不均等。CIH+CQ 组细胞肿大,几乎全部呈类圆形,形态边界不清,细胞间距变窄。

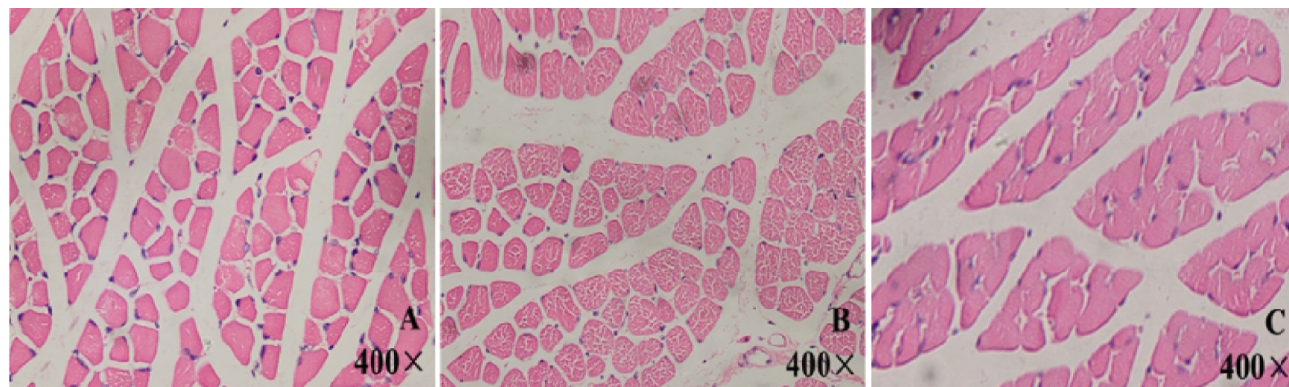


图 1 各组颊舌肌组织 HE 染色

(A.对照组;B.慢性间歇性低氧组;C.慢性间歇性低氧+氯喹组)

Fig. 1 The HE staining images showed varying degrees of genioglossus damage in each group

(A. control group; B. CIH group; C. CIH + CQ group)

2.2 各组大鼠颊舌肌中自噬标记蛋白 LC3 的表达

LC3 主要表达于颊舌肌细胞胞质,激光共聚焦显微镜下呈现绿色荧光,细胞核呈现蓝色荧光。结果(见图 2)显示,在对照组中,LC3 荧光表达(5.68 ± 0.43)微弱。在 CIH 组中,LC3 表达

(33.66 ± 0.44)较对照组明显增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示 CIH 组自噬水平上调。增加氯喹处理后,LC3 表达(54.58 ± 0.52)较 CIH 组显著增强($P < 0.05$),提示氯喹成功阻断了自噬体降解通路,LC3 大量累积,自噬受到抑制。

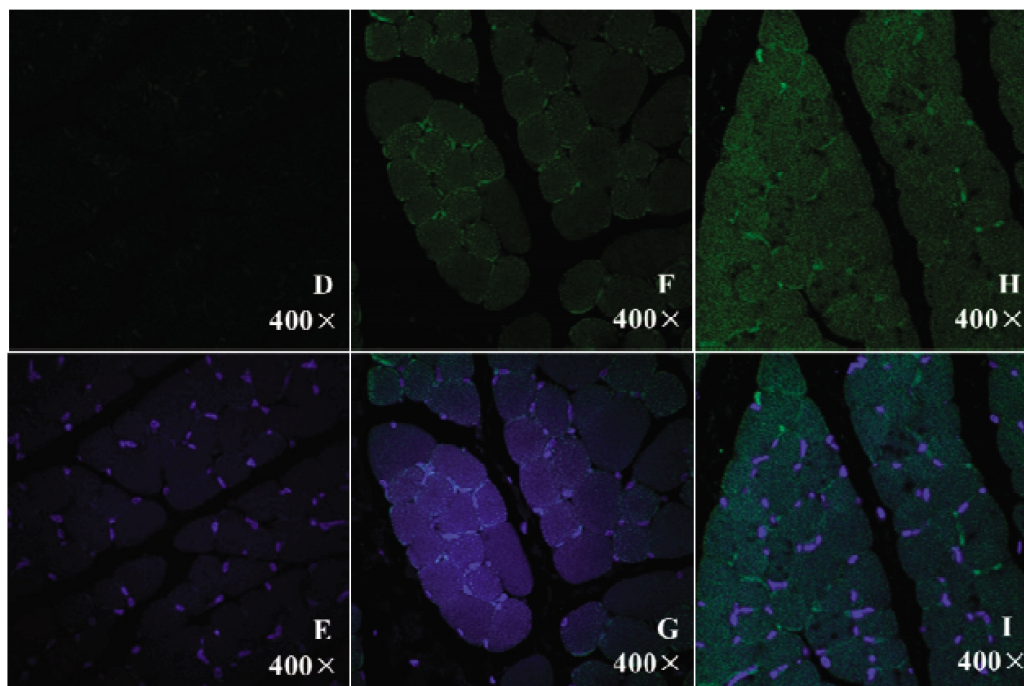


图 2 免疫组织荧光法检测各组颊舌肌中 LC3 的表达
(D、E.对照组;F、G.慢性间歇性低氧组;H、I.慢性间歇性低氧 + 氯喹组)

Fig. 2 The immunofluorescence histochemistry showed varying degrees of LC3 protein in genioglossus muscles of each group
(D、E. control group; F、G. CIH group; H、I. CIH + CQ group)

2.3 细胞色素 c 在各组大鼠颊舌肌中的表达

Cyt c 通常仅少量存在于组织细胞线粒体外膜。当组织细胞损伤后,其大量产生并释放进入细胞质。Cyt c 在免疫组化标本中常显示为褐色颗粒状物。结果(见图 3)显示,在对照组中,Cyt c 的表达(29.7 ± 1.05)很少。在 CIH 组中,Cyt c 的表达

(69.9 ± 1.18)较对照组明显增强,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示慢性间歇性低氧可诱发颊舌肌细胞线粒体损伤,触发早期凋亡。CIH+CQ 组 Cyt c 表达(204.76 ± 1.22)较 CIH 组显著增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示自噬受到抑制后线粒体损伤明显加重,进而促进了细胞凋亡。

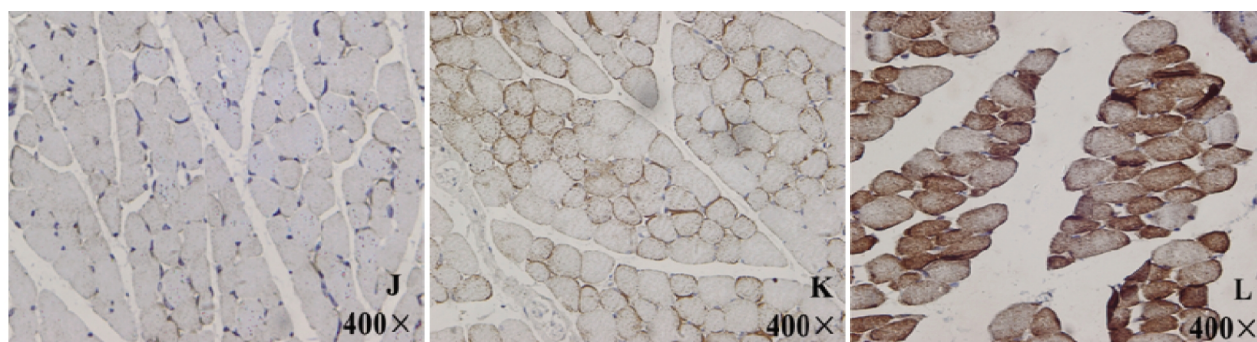


图 3 免疫组织化学法检测各组颊舌肌中细胞色素 c 的表达
(J.对照组;K.慢性间歇性低氧组;L.慢性间歇性低氧 + 氯喹组)

Fig. 3 The immunohistochemistry showed varying degrees of varying degrees of Cyt c protein in genioglossus of each group
(J. control group; K. CIH group; L. CIH + CQ group)

3 讨论

慢性间歇性低氧是 OSA 典型的病理生理学特征^[8]。而造成

慢性间歇性低氧发生的重要原因是颊舌肌功能异常^[9]。颊舌肌起于下颌髁棘,止于舌,其抗疲劳性下降常引起睡眠时舌体后坠,阻塞上呼吸道,导致机体内反复缺氧,从而引发阻塞性睡眠

呼吸暂停甚至窒息的发生^[10,11]。有研究表明, 颊舌肌收缩性改变的机制与线粒体功能损伤直接相关。在慢性间歇性低氧条件下, 线粒体内膜脂质过氧化物增加, 膜流动性下降, 通透性增加, 细胞色素 c 还原酶活性下降, 细胞色素 c 释放, 致使线粒体出现缺氧损伤性改变^[12,13], 维持颊舌肌收缩力量的产能方式由有氧代谢变为糖酵解, 产能效率低, 从而使得颊舌肌活性下降, 而其副产物乳酸, 又导致肌肉组织疲劳性增加, 由此形成恶性循环, 进一步加重上气道阻塞现象^[14,15]。

除了影响线粒体能量代谢之外, 缺氧还可激活自噬^[16,17]。近年来, 探讨各类缺氧损伤与自噬相关性的研究层出不穷, 然而, 很少有研究探讨自噬在颊舌肌功能异常型 OSA 中的作用及其机制。自噬是机体组织细胞通过溶酶体途径清除代谢废物、净化自身多余的物质或受损的细胞器, 并借此维持自身蛋白代谢平衡及细胞内环境的稳定的过程^[6,18]。为了进一步探索自噬对颊舌肌线粒体功能的影响, 本实验应用低氧舱模拟慢性间歇性低氧环境, 并采用自噬抑制剂氯喹阻断自噬体降解通路^[19], 通过检测大鼠颊舌肌组织内自噬标志蛋白 LC3 的荧光表达强度以评价细胞自噬水平^[20], 另一方面通过检测细胞色素 c 的免疫组化显色来初步推断组织内线粒体损伤程度。研究结果发现, 在 CIH 组中, 颊舌肌组织细胞内 LC3 与 Cyt c 表达均较对照组增加, 提示 CIH 能够诱发自噬, 并且 CIH 在一定程度上引起了颊舌肌线粒体损伤, 触发细胞早期凋亡。而在 CIH+CQ 组中, LC3 的表达较 CIH 组骤增, 提示自噬体累积, 自噬活动受到抑制; 同时, 其 Cyt c 表达也显著高于 CIH 组, 提示细胞早期凋亡活动活跃, 颊舌肌损伤加重。由此, 我们推断, 自噬可能通过减少线粒体损伤, 抑制细胞凋亡, 从而减轻慢性间歇性低氧对大鼠颊舌肌造成的损伤。

参考文献(References)

- [1] Trzepizur W, Gagnadoux F. Epidemiology of obstructive sleep apnoea syndrome[J]. Rev Mal Respir, 2014, 31(6): 568-577
- [2] Guralnick A S. Obstructive sleep apnea: incidence and impact on hypertension?[J]. Curr Cardiol Rep, 2013, 15(11): 415
- [3] Lurie A. Obstructive sleep apnea in adults: epidemiology, clinical presentation, and treatment options[J]. Adv Cardiol, 2011, 46: 1-42
- [4] Drager L F, Togeiro S M, Polotsky V Y, et al. Obstructive sleep apnea: a cardiometabolic risk in obesity and the metabolic syndrome [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(7): 569-576
- [5] Edge D, McDonald F B, Jones J F, et al. Effect of chronic intermittent hypoxia on the reflex recruitment of the genioglossus during airway obstruction in the anesthetized rat[J]. Prog Brain Res, 2014, 209: 147-168
- [6] Awan M U, Deng Y. Role of autophagy and its significance in cellular homeostasis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(12): 5319-5328
- [7] Maeda H, Nagai H, Takemura G, et al. Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(8): 1159-1166
- [8] Zhou J, Liu Y. Effects of genistein and estrogen on the genioglossus in rats exposed to chronic intermittent hypoxia may be HIF-1alpha dependent[J]. Oral Dis, 2013, 19(7): 702-711
- [9] Huang J, Pinto S J, Yuan H, et al. Upper airway collapsibility and genioglossus activity in adolescents during sleep [J]. Sleep, 2012, 35(10): 1345-1352
- [10] 李婷, 王伟, 孔德磊, 等. 间歇低氧对大鼠颊舌肌运动皮质区经颅磁刺激反应的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(4): 283-285
- [11] Li Ting, Wang Wei, Kong De-lei, et al. Effects of intermittent hypoxia on the responses of genioglossus motor cortex to transcranial magnetic stimulation in rats [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2012, 35(4): 283-285
- [12] Zhang H, Ye J Y, Hua L, et al. Inhomogeneous neuromuscular injury of the genioglossus muscle in subjects with obstructive sleep apnea[J]. Sleep Breath, 2014[Epub ahead of print]
- [13] 刘月华, 齐娟, 贾珊珊. 雌激素对慢性间歇性低氧大鼠颊舌肌线粒体细胞色素 C 氧化酶活性及其亚基表达的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 2008, 43(10): 604-607
- [14] Liu Yue-hua, Qi Juan, Jia Shan-shan. Effects of estrogen on activity and subunits expression of cytochrome C oxidase in mitochondria from genioglossus of rats subjected to chronic intermittent hypoxia[J]. Chinese Journal of Stomatology, 2008, 43(10): 604-607
- [15] Pathi B, Kinsey S T, Locke B R. Influence of reaction and diffusion on spatial organization of mitochondria and effectiveness factors in skeletal muscle cell design [J]. Biotechnol Bioeng, 2011, 108(8): 1912-1924
- [16] Chemello F, Bean C, Cancellara P, et al. Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16807
- [17] Schaller A, Desetty R, Hahn D, et al. Impairment of mitochondrial tRNA^{Ala} processing by a novel mutation associated with chronic progressive external ophthalmoplegia[J]. Mitochondrion, 2011, 11(3): 488-496
- [18] Zhao Y, Chen G, Zhang W, et al. Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1alpha/BNIP3 signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(2): 639-648
- [19] Ni H M, Bhakta A, Wang S, et al. Role of hypoxia inducing factor-1beta in alcohol-induced autophagy, steatosis and liver injury in mice[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115849
- [20] Papackova Z, Cahova M. Important role of autophagy in regulation of metabolic processes in health, disease and aging [J]. Physiol Res, 2014, 63(4): 409-420
- [21] Yang Y P, Hu L F, Zheng H F, et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(5): 625-635
- [22] Chen Y, Gibson S B. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy?[J]. Autophagy, 2008, 4(2): 246-248