

OSAHS 患者缺氧诱导因子 1 α 与血清肺表面活性蛋白水平的变化及意义*

赵丹¹, 赵远琴², 邵松军², 刘维佳¹, 张程¹, 张湘燕^{1 Δ}

(1. 贵州省人民医院呼吸与危重症医学科/贵州大学医学院, 贵阳 550000;

2. 贵州医科大学在读研究生, 贵阳 550000)

[摘要] **目的** 探讨阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)患者缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)与血清肺泡表面活性蛋白-A(SP-A)、肺泡表面活性蛋白-D(SP-D)水平的影响及意义。**方法** 选择 2016 年 8 月至 2017 年 2 月贵州省人民医院门诊及住院行睡眠监测患者 83 例,分为对照组 20 例、轻度 OSAHS 组 20 例、中度 OSAHS 组 23 例、重度 OSAHS 组 20 例。检测 HIF-1 α 与核因子(NF)- κ B mRNA 水平及蛋白表达水平,血清肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、SP-A 和 SP-D 水平。**结果** 重度 OSAHS 组 HIF-1 α mRNA、NF- κ B mRNA 水平及蛋白表达水平, TNF- α 、IL-6 水平明显高于对照组($P < 0.05$);中、重度 OSAHS 组 SP-A、SP-D 水平明显高于对照组($P < 0.05$);血清 SP-A 水平与 HIF-1 α mRNA 相对表达水平呈正相关($P < 0.05$)。**结论** 缺氧可激活 HIF-1 α 信号通路,释放 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 等炎症因子,并引起 SP-A、SP-D 水平升高。

[关键词] 睡眠呼吸暂停,阻塞性;缺氧诱导因子 1;氧化应激;炎症因子;肺表面活性蛋白

[中图分类号] R441.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)19-2556-04

Changes and significance of levels of hypoxia induced factor 1 alpha and serum pulmonary surface active protein in OSAHS patients*

ZHAO Dan¹, ZHAO Yuanqin², SHAO Songjun², LIU Weijia¹, ZHANG Cheng¹, ZHANG Xiangyan^{1 Δ}

(1. Department of Respiration and Critical Care Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital/ Medical College, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550000, China;

2. Postgraduate, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and significance of serum hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and alveolar surfactant protein A (SP-A) and alveolar surfactant protein D (SP-D) levels in the patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS). **Methods** Eighty-three patients undergoing the sleep monitoring in the outpatient and inpatient departments of the Guizhou Provincial People's Hospital from August 2016 to February 2017 were selected and divided into the control group (20 cases), mild OSAHS group (20 cases), moderate OSAHS group (23 cases) and severe OSAHS group (20 cases) according to the OSAHS diagnosis and treatment guideline. The levels of HIF-1 α , TNF- α , NF- κ B mRNA and protein were measured by adopting real time PCR and Western blot. The levels of TNF- α , IL-6, SP-A and SP-D were detected by using ELISA. **Results** The expression levels of HIF-1 α mRNA, NF- κ B mRNA and protein in the severe OSAHS group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α and IL-6 in the severe OSAHS group were significantly higher than those in the control group. The levels of SP-A and SP-D in the moderate and severe OSAHS groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The serum SP-A level was positively correlated with HIF-1 α mRNA related expression level ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxia can activate HIF-1 α signaling pathway, releases the inflammatory factors of NF- κ B, TNF- α , IL-6, etc. and causes the increase of SP-A and SP-D level in OSAHS patients.

[Key words] sleep apnea, obstructive; hypoxia-inducible factor 1; oxidative stress; inflammatory factor; pulmonary surfactant protein

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(OSAHS)是常见的睡眠相关呼吸障碍疾病,男性患病率 22%,女性

* 基金项目:贵州省科技合作计划资助项目(黔科合 LH 字[2015]7127 号);贵州省人民医院青年基金资助项目(GZSYQN[2016]16 号);贵州省科技支撑计划社会发展攻关项目(黔科合 SY 字[2009]3052)。作者简介:赵丹(1980—),主治医师,在读博士,主要从事呼吸与危重症的研究。 Δ 通信作者, E-mail: zxy35762@126.com。

17%^[1]。其特点是睡眠过程中反复发生的间歇性低氧^[2]，由于氧化应激反应激活炎症通路，可导致心、脑血管等多系统损害^[3-4]。缺氧条件下缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)激活可导致肝纤维化、心脏炎症细胞凋亡和纤维化^[5-6]。此外，OSAHS 患者亦存在亚临床肺损伤^[7]。在本课题组既往的研究中发现，OSAHS 患者肺泡表面蛋白高于正常对照人群，但具体机制仍不甚清楚。本研究拟阐明 OSAHS 患者 HIF-1 α 信号传导通路上调，启动炎症反应，导致下游的炎症因子释放，引起肺泡上皮细胞损伤，以期揭示 OSAHS 患者亚临床肺损伤的机制，现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2016 年 8 月至 2017 年 2 月贵州省人民医院门诊及住院就诊的睡眠监测患者 83 例，其中男 38 例、女 25 例，年龄 22~76 岁，平均(47.52 \pm 14.43)岁；依据 OSAHS 诊治指南(2011 年修订版)^[8]的诊断标准，分为对照组 20 例、轻度 OSAHS 组 20 例、中度 OSAHS 组 23 例、重度 OSAHS 组 20 例。均排除慢性阻塞性肺疾病、哮喘、肺间质纤维化、恶性肿瘤、结缔组织病、结核病、严重心力衰竭、代谢性疾病及肝、肾功能不全。该研究获贵州省人民医院医学伦理委员会批准，所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 日间爱波沃斯嗜睡评分(ESS)评分 正式进行多导睡眠监测(PSG)前，在安静环境中，运用 ESS 评估患者白天嗜睡程度。

1.2.2 PSG 采用美国飞利浦 Alice 5 PSG 系统，监测内容包括：脑电图、眼电图、下颌肌电图、心电图、口鼻气流、胸腹部呼吸运动、血氧饱和度(SPO₂)、体位、鼾声、胫前肌电图等。监测时间自 21:00 至次日 06:00 共 9 h。

1.2.3 RNA 提取及逆转录 PSG 后的次日 06:00，空腹抽取外周静脉血 4 mL，注入肝素抗凝管，Ficoll 密度梯度法分离单个核细胞，Trizol 一步法提取 RNA。测定 RNA 浓度，按 dNTP Mix. 2.5 nmol/L Each 4 μ L, Primer Mix 2 μ L, RNA Template 2 μ L, 5 \times RT Buffer 4 μ L, DTT 2 μ L, HiFScript, 200 U/ μ L 1 μ L, RNase-Free Water up to 20 μ L, 总反应体系 20 μ L 逆转录为 cDNA。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 检索 GenBank, 上海生工设计合成引物: NF- κ B 上游 5'-GCG AGA GGA GCA CAG ATA CC-3', 下游 5'-CTG ATA GCC TGC TCC AGG TC-3'。HIF-1 α 上游 5'-GAA AGC GCA AGT CCT CAA AG-3', 下游 5'-TGG GTA GGA GAT GGA GAT GC-3'。内参 GAPDH 上游 5'-CAG GAG GCA TTG CTG ATG AT-3', 下游 5'-GAA GGC TGG GGC TCA TTT-3'。PCR 反应体系: cDNA 模板 2 μ L, 25 μ L 2 \times UltraSYBR Mixture

(High Rox)上游、下游引物各 1 μ L, ddH₂O 21 μ L, 总反应体系 50 μ L。在 PCR 基因扩增仪上进行热循环。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 以 DL-2000 为标准分子量对照鉴定 PCR 产物。

1.2.5 Western blot 法检测 PSG 后的次日 06:00 时, 空腹抽取外周静脉血 4 mL, 注入肝素抗凝管, Ficoll 密度梯度法分离单个核细胞, 裂解液 30 μ L 裂解样品, 超声波裂解 3~5 次, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液加入 Buffer: DTT, 煮沸 10 min。5 μ L 上样, 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转膜, 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 经牛奶封闭后, 用一抗(PBS 1:1 000 稀释), 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜后用 HRP 标记的羊抗鼠/兔 IgG 二抗(PBS 1:5 000 稀释)室温下孵育 1 h。Milliore 公司的显影液显影并拍照分析。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 行 PSG 后的次日 06:00 时, 空腹抽取外周静脉血 4 mL, 注入非抗凝管中, 室温静置 30 min 后, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min, 留取血清。按 ELISA 试剂盒说明书, 从室温平衡 20 min 后的铝箔袋中取出所需板条, 设置标准品和标本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L, 标本孔中加入待测标本 50 μ L, 空白对照孔不加。除空白孔外, 标准品孔和标本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体[肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6(IL-6), II 型肺泡细胞表面抗原(KL-6), 肺泡表面活性蛋白-A(SP-A), 肺泡表面活性蛋白-D(SP-D)]100 μ L, 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱温育 60 min。弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加 350 μ L 洗涤液, 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 如此重复洗板 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min, 每孔加入 50 μ L 终止液, 在酶标仪上测定 450 nm 处的吸光度值 A₄₅₀。

1.3 统计学处理 数据使用 GraphPad 5.0 处理并作图。采用 SPSS18.0 统计软件进行处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用 Pearson 相关分析法, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线比较 各组性别、年龄、颈围、胸围、腰围、BMI、ESS 指标比较, 随着 OSAHS 严重程度的增加, 轻、中、重度 OSAHS 组颈围逐渐增大, 高于对照组; 重度 OSAHS 组胸围、腰围、BMI 高于对照组 ($P<0.05$)。年龄、性别、ESS 评分差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 1。

2.2 各组 NF- κ B、HIF-1 α mRNA 表达水平 采用荧光定量 PCR 检测, 中、重度 OSAHS 组 NF- κ B 表达水平明显高于对照组, 重度 OSAHS 组 HIF-1 α mRNA 表达水平明显高于对照组 ($P<0.05$), 见图 1、2。

表 1 各组性别、年龄、ESS、颈围、胸围、腰围、BMI 比较

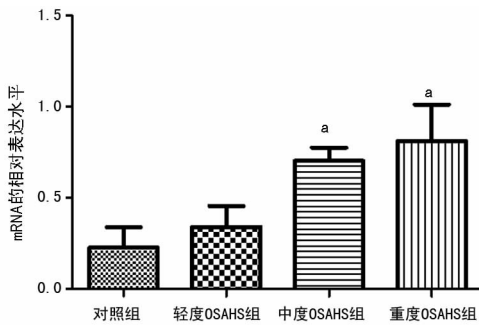
组别	男/女(n/n)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	颈围($\bar{x}\pm s$,cm)	胸围($\bar{x}\pm s$,cm)	腰围($\bar{x}\pm s$,cm)	BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	ESS($\bar{x}\pm s$,分)	AHI($\bar{x}\pm s$,次/h)
对照组	11/9	50.98±12.14	34.12±2.98	95.00±6.48	90.25±7.98	24.01±3.14	7.86±3.46	1.92±1.42
轻度 OSAHS 组	13/7	50.16±11.23	38.54±3.12 ^a	97.27±7.50	97.31±6.72 ^a	26.74±3.84 ^a	8.55±4.94	10.41±3.43 ^a
中度 OSAHS 组	11/12	51.23±10.26	39.87±3.27 ^a	97.83±6.84	96.36±8.02	26.04±40.00	7.47±3.99	22.75±4.66 ^{ab}
重度 OSAHS 组	14/6	51.87±10.91	40.62±3.85 ^{ab}	100.73±6.57 ^a	101.30±7.84 ^a	27.93±3.56 ^{abc}	10.64±6.46	60.96±11.02 ^{abc}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与轻度 OSAHS 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与中度 OSAHS 组比较

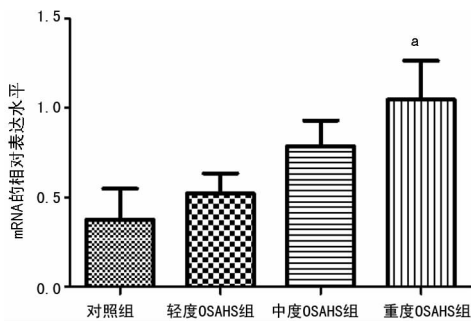
表 2 各组 TNF- α 、IL-6、SP-A、SP-D 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	SP-A(ng/L)	SP-D(μ g/L)
对照组	280.21±12.38	13.02±4.17	142.45±28.12	36.17±8.53
轻度 OSAHS 组	342.16±26.54	16.64±4.18	188.23±34.51 ^a	39.82±9.48
中度 OSAHS 组	421.20±34.26 ^a	16.82±5.63	200.32±42.18 ^{ab}	44.58±7.88 ^{ab}
重度 OSAHS 组	487.82±42.61 ^a	18.79±6.70 ^a	220.59±48.39 ^{ab}	48.09±9.45 ^{abc}

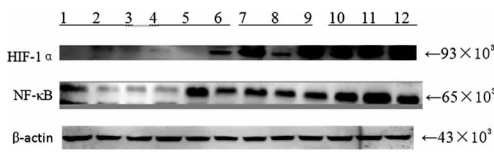
^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与轻度 OSAHS 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与中度 OSAHS 组比较



^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 1 各组血清中 NF- κ B mRNA 表达水平

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 2 各组血清中 HIF-1 α mRNA 表达水平

1~3 泳道: 对照组; 4~6 泳道: 轻度 OSAHS 组; 7~9 泳道: 中度 OSAHS 组; 10~12 泳道: 重度 OSAHS 组

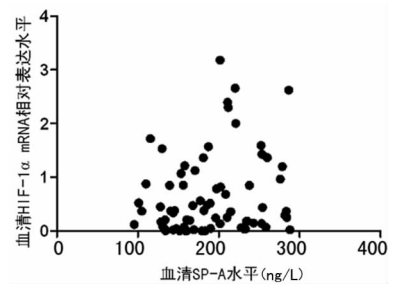
图 3 Western blot 检测 NF- κ B、HIF-1 α 蛋白表达水平

2.3 NF- κ B、HIF-1 α 蛋白表达水平 采用 Western blot 法检测, 与对照组比较, 重度 OSAHS 组 NF- κ B、HIF-1 α 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 TNF- α 、IL-6、SP-A、SP-D 水平比较 采用 ELISA 检测, 与对照组比较, 中、重度 OSAHS 组

TNF- α 升高, 重度 OSAHS 组 IL-6 升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 轻、中、重度 OSAHS 组 SP-A 升高, 中、重度 OSAHS 组 SP-D 升高 ($P < 0.05$)。与轻度 OSAHS 组比较, 中、重度 OSAHS 组 SP-A、SP-D 升高 ($P < 0.05$)。与中度 OSAHS 组比较, 重度 OSAHS 组 SP-D 升高 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.5 相关性分析 血清 SP-A 水平与 HIF-1 α mRNA 相对表达水平呈正相关 ($r = 0.197, P < 0.05$)。其余 TNF- α 、IL-6、SP-D 水平与 HIF-1 α mRNA 及 NF- κ B mRNA 相对表达水平的相关性分析差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4。

图 4 血清 SP-A 水平与 HIF-1 α mRNA 表达水平相关性

3 讨论

OSAHS 被认为是一个复杂的、多因素和基因疾病, 主要的病理生理机制是睡眠时反复发生的上呼吸道塌陷阻塞, 导致慢性间断性低氧。重复性缺氧和再氧化引起线粒体和内质网功能障碍, 过度活化的 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶和解偶联一氧化氮合酶, 诱导前氧化物与抗氧化剂之间的不平衡, 引起氧化应激和炎症反应增强, 导致局部和全身炎症^[9-10]。本研究发现, 重度 OSAHS 患者血清 HIF-1 α mRNA、NF- κ B mRNA 水平及蛋白质水平均高于对照组, 血清 TNF- α 、IL-6 水平也随之增加。考虑与 OSAHS 患者体内间断低氧, 激活 HIF-1 α 及 NF- κ B 等相关的炎症通路, 导致下游炎症介质和细胞因子表达增加

有关^[11-13]。

血清肺表面活性蛋白 SP-A、SP-D 的水平可作为多种疾病潜在生物标志物,包括间质性肺纤维化(IPF)、慢性阻塞性肺疾病、肺气肿和睡眠呼吸暂停,能有效反映肺损伤程度^[14-18]。本研究发现,重度 OSAHS 患者血清中 SP-A、SP-D 水平均升高。其机制可能与 OSAHS 患者夜间间断缺氧及再氧合损伤肺泡屏障、致肺泡部位内皮细胞、II 型肺泡上皮细胞损伤,局部血管内皮通透性升高,从而使肺组织 SP-A、SP-D 渗出到血液中,引起血清中 SP-A、SP-D 水平增加。同时血清 SP-A、SP-D 水平与 OSAHS 严重程度相关。此外,本研究发现血清 SP-A 水平与 HIF-1 α mRNA 相对表达水平呈正相关。考虑血清中 SP-A 的表达水平升高,可能与 HIF-1 α 通路激活后,大量炎症因子释放,导致肺泡内皮细胞、II 型肺泡上皮细胞等损伤有关。

综上所述,OSAHS 患者在间歇性低氧下,可能通过激活 HIF-1 α 信号通路,释放 NF- κ B、TNF- α 、IL-6 等炎症因子,导致 OSAHS 患者血清肺表面活性蛋白水平升高,可能参与亚临床肺损伤的发生。

参考文献

- [1] FRANKLIN K A, LINDBERG E. Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population—a review on the epidemiology of sleep apnea[J]. *J Thorac Dis*, 2015, 7(8): 1311-1322.
- [2] AZAGRA-CALERO E, ESPINAR-ESCALONA E, BARRERA-MORA J M, et al. Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) Review of the literature[J]. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal*, 2012, 17(6): e925-e929.
- [3] VRINTS H, SHIVALIKAR B, HILDE H, et al. Cardiovascular mechanisms and consequences of obstructive sleep apnoea[J]. *Acta Clin Belg*, 2013, 68(3): 169-178.
- [4] CHIRINOS J A, GURUBHAGAVATULA I, TEFF K, et al. CPAP, weight loss, or both for obstructive sleep apnea[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(24): 2265-2275.
- [5] MESARWI O A, SHIN M K, BEVANS-FONTI S, et al. Hepatocyte hypoxia inducible factor-1 mediates the development of liver fibrosis in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168572.
- [6] WEI Q, PING Y E, FUCHAO B, et al. Chronic intermittent hypoxia induces cardiac inflammation and dysfunction in a rat obstructive sleep apnea model[J]. *J Bio Res*, 2016, 30(6): 490-495.
- [7] AIHARA K, OGA T, CHILHARA Y, et al. Comparison of biomarkers of subclinical lung injury in obstructive sleep apnea[J]. *Respir Med*, 2011, 105(6): 939-945.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸障碍学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(2011年修订版)[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(1): 9.
- [9] GEMEL J, SU Z, GILELES-HILLEL A, et al. Intermittent hypoxia causes NOX2-dependent remodeling of atrial connexins[J]. *BMC Cell Biol*, 2017, 18(1): 7.
- [10] THUNSTROM E, GLANTZ H, FU M, et al. Increased inflammatory activity in nonobese patients with coronary artery disease and obstructive sleep apnea[J]. *Sleep*, 2015, 38(3): 463-471.
- [11] LU D, LI N, YAO X, ZHOU L. Potential inflammatory markers in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2017, 17(1): 47-53.
- [12] SARADA S K S, VEERAMOHAN P H, MATHEW T, et al. Nifedipine inhibits hypoxia induced transvascular leakage through down regulation of NF- κ B[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 183(1): 26-34.
- [13] GREENBERG H, YE X, WILSON D, et al. Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappa B in cardiovascular tissues in vivo[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(2): 591-596.
- [14] SIMS M W, BEERS M F, AHYA V N, et al. Effect of single vs bilateral lung transplantation on plasma surfactant protein D levels in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Chest*, 2011, 140(2): 489-496.
- [15] EL-DEEK S E, MAKHLOUF H A, SALEEM T H, et al. Surfactant protein D, soluble intercellular adhesion molecule-1 and high-sensitivity C-reactive protein as biomarkers of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Med Princ Pract*, 2013, 22(5): 469-474.
- [16] ATKINSON J J, LUTEY B A, SUZUKI Y, et al. The role of matrix metalloproteinase-9 in cigarette smoke-induced emphysema[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(7): 876-884.
- [17] AIHARA K, OGA T, HARADA Y, et al. Comparison of biomarkers of subclinical lung injury in obstructive sleep apnea[J]. *Respir Med*, 2011, 105(6): 939-945.
- [18] NISHIKIORI H, CHIBA H, ARIKI S, et al. Distinct compartmentalization of SP-A and SP-D in the vasculature and lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *BMC Pulm Med*, 2014, 14(12): 196.

(收稿日期:2017-10-22 修回日期:2018-01-24)