

[文章编号] 1000-4718(2007)09-1782-04

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征外周血 IGF-2 及其 mRNA 水平变化的初步研究

刘辉国, 林 玫, 管 频, 徐永健

(华中科技大学同济医学院附属同济医院呼吸内科, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的: 观察阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)患者胰岛素样生长因子-2(IGF-2)水平的变化,并探讨其与 OSAHS 及其并发的心血管疾病的关系。方法: 选择 40 例 OSAHS 患者作为病例组,20 例正常人为对照组,病例组再根据血压水平分为正常血压及高血压组,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测外周血清中 IGF-2 水平,用 RT-PCR 技术检测受试者外周血单个核细胞胰岛素样生长因子-2mRNA(IGF-2 mRNA)水平,并对病例组中 15 例呼吸暂停低通气指数(AHI) > 40 次/h 的患者进行经鼻持续气道正压通气(nCPAP)治疗 1 月后,重复以上过程。结果: OSAHS 患者血清 IGF-2 水平及外周血单个核细胞 IGF-2 mRNA 水平明显高于对照组($P < 0.05$),并与血压升高水平相关。进一步分析与患者 AHI 呈正相关,与小于 90% 血氧饱和度时间占总睡眠时间百分比呈正相关,与呼吸暂停时间占总睡眠时间百分比呈正相关,与平均血氧饱和度、最低血氧饱和度呈负相关。经 nCPAP 治疗后,重度 OSAHS 患者血清 IGF-2 水平及外周血单个核细胞 IGF-2 mRNA 水平明显降低,差异有显著意义。结论: OSAHS 患者 IGF-2 水平明显增高,增高的 IGF-2 可能参与 OSAHS 的病理过程,特别是 OSAHS 引发心血管疾病的相关病理生理过程。

[关键词] 睡眠呼吸暂停综合征; 胰岛素样生长因子 II

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Change of insulin-like growth factor-2 in obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome

LIU Hui-guo, LIN Mei, GUAN Pin, XU Yong-jian

(Department of Respiratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China. E-mail: hgliu@tjh.tjmu.edu.cn)

[ABSTRACT] AIM: To observe the change of insulin-like growth factor-2 (IGF-2) in patients with obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS), and to explore the relationship of IGF-2, OSAHS and cardiovascular disease complicated with it. METHODS: The level of serum IGF-2 in 40 OSAHS patients and 20 healthy controls was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of IGF-2 mRNA in peripheral blood mononuclear cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). RESULTS: The serum level of IGF-2 and the expression of IGF-2 mRNA in peripheral blood mononuclear cells were significantly higher in OSAHS group than those in control group ($P < 0.05$) and IGF-2 related with severity of OSAHS. There was a positive correlation between IGF-2 level and apnea hypopnea index(AHI) as well as average angiostenia. Also, there was a positive correlation between IGF-2 level and percentage of time spend when oxygen saturation was lower than 90% (SLT90%), and so did between IGF-2 level and the ratio of apnea time over total sleep time. There was a negative correlation between IGF-2 and average saturation of blood oxygen as well as lowest saturation of blood oxygen. After nCPAP, the level of IGF-2 in OSAHS patients reduced significantly. CONCLUSION: The level of IGF-2 in OSAHS increases, and it may play a role in the pathophysiology of OSAHS and the formation of cardiovascular disease complicated with it.

[KEY WORDS] Sleep apnea syndromes; Insulin-like growth factor II

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS) 是一种睡眠时呼吸障碍性疾病,其机制较为复杂,近年来的研究发现多种细胞因子可能参与了其病理生理过程,有

[收稿日期] 2005-12-30 [修回日期] 2006-07-13

E-mail: hgliu@tjh.tjmu.edu.cn

些细胞因子可能与睡眠障碍有关,有些细胞因子可能参与了其靶器官损害的过程。胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factor, IGF-2)是1957年由Salmon等^[1]发现的由67个氨基酸组成的多肽,在肌肉和脂肪中表现出与胰岛素相似的作用,IGF-2亦可诱导内皮细胞迁移、增生,促进内皮细胞形成血管管腔^[2]及平滑肌细胞的移行,且已证实IGF-2是受HIF-1调控的基因产物之一,但与其与OSAHS的关系尚未见报道。本研究拟测定40例OSAHS患者及20例正常对照者血清IGF-2及外周血单核细胞IGF-2 mRNA水平的变化,旨在探讨IGF-2与OSAHS及其并发的心血管疾病的关系。

材 料 和 方 法

1 研究对象

本实验征得所有研究对象的知情同意,程序符合华中科技大学附属同济医院人体试验伦理学委员会的标准,并得到其批准。受试对象共计60例,分为2组。OSAHS组为2004年9月-2005年9月在本院就诊的病例40例,其中男39例,女1例,经全夜多导睡眠仪(polysomnography, PSG)监测,按国际标准确诊为OSAHS^[3],根据患者血压水平,按国际统一血压分级标准再将病例组分为正常血压组、高血压组。对照组为健康体检者20例,经PSG排除OSAHS,其中男19例,女1例。所有研究对象均排除肝炎、肝纤维化、骨折、肿瘤、妊娠等疾病。

2 方法

2.1 多导睡眠仪检查 被检查者检查前两天之内不服用镇静药、饮酒、饮茶及咖啡等。2周内未患上呼吸道感染疾病。用多导睡眠监护仪对受试者自晚21时至次日晨7时行多导睡眠图(PSG)监测至少7h,监测项目:脑电图、眼动图、颏舌肌肌电图、心电图、手指血氧饱和度、口鼻气流、胸腹运动、体位、鼾声等,同时测定身高、体重、颈围、腰围、臀围,各组所测情况见表1。于次日晨7时测血压。病例组中15例重度患者(AHI>40)自晚21时至次日晨7时经nCPAP治疗的同时行多导睡眠仪(PSG)监测,并重复以上过程。

2.2 IGF-2及mRNA水平检测 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测受试对象清晨血清IGF-2水平,试剂盒购自武汉大风生物公司,严格按照说明书操作,绘制标准曲线,求出样品中IGF-2含量。

用RT-PCR技术检测IGF-2 mRNA水平。取5 mL肘静脉血,加入Ficoll淋巴细胞分离液(天津灏洋生物公司),4℃、200 r/min离心20 min,仔细吸

出中间PBMC层,用Hanks液洗涤2次后,依次加入Trizol、氯仿、异丙醇、75%乙醇提取总RNA。

逆转录反应步骤为:加入寡聚脱氧核苷酸Oligo-dt(15)(奥科生物公司合成)2 μL,再加入2 μg RNA,70℃ 5 min后立即置冰上。再加入dNTPS、RNA酶抑制剂、M-MLV逆转录酶,37℃ 60 min。

PCR反应体系为:RT产物2.5 μL,引物(10 μmol/L)各2 μL(奥科生物公司合成),dNTPS(10 mmol/L)2 μL,TaqDNA聚合酶(2.5×10⁶ U/L)1 μL,镁离子4 μL。PCR反应条件为95℃ 5 min,94℃ 1 min,56.3℃ 1 min,72℃ 1 min,30个循环,72℃延伸10 min。引物序列如下,IGF-2:上游引物5'-CCC CTG ATT GCT CTA CCC A-3',下游引物5'-GTT TGA AGA TGC TGC TGT GCT-3';β-actin:上游引物5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3',下游引物5'-ACT CGT CAT ACT CCT GCT TG-3'。IGF-2扩增片段大小为288 bp,β-actin扩增片段大小为546 bp。所得产物经琼脂糖凝胶电泳,并在凝胶成像系统中观察,结果见图1。底片在计算机内贮存,用凝胶分析软件测灰度值,以目的基因与内对照基因灰度面积比值作为目的基因相对表达量。

对病例组中15例重度OSAHS患者进行nCPAP治疗1个月后重复以上过程。

3 统计学处理

结果经SPSS 11.0统计软件处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异的显著性检验采用t检验,同一组别不同参数之间的相关分析采用直线相关分析。

结 果

1 病例组与对照组一般资料及PSG监测结果见表1,重度OSAHS患者经nCPAP治疗前后PSG监测结果见表2。

表1 受试对象临床资料

Tab 1 Clinical data of research subjects ($\bar{x} \pm s$)

	OSAHS group (n=40)	Control group (n=20)
Age(years)	45.91 ± 5.56	44.45 ± 8.34
BMI	27.35 ± 3.30	25.97 ± 2.94
Neck circumference(cm)	38.62 ± 5.24	38.10 ± 3.04
AHI(times/h)	46.16 ± 23.76**	3.10 ± 1.65
Time of SaO ₂ ≤ 90%/total sleep time(%)	40.75 ± 11.73**	1.39 ± 0.81
Lowest SaO ₂ (%)	64.63 ± 12.20**	93.60 ± 1.75
Average SaO ₂ (%)	82.31 ± 6.24**	97.27 ± 0.95
Mean arterial pressure(mmHg)	133.15 ± 18.89**	101.18 ± 16.29

**P<0.01 vs control group.

表2 重度 OSAHS 患者治疗前后临床资料

Tab 2 Clinical data of severe OSAHS before and after nCPAP ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

	Before nCPAP	After nCPAP
AHI(times/h)	57.16 ± 13.76**	18.34 ± 2.65
Time of SaO ₂ ≤ 90% / total sleep time(%)	45.65 ± 15.33**	2.19 ± 0.11
Lowest SaO ₂ (%)	60.63 ± 11.30**	90.40 ± 1.25
Average SaO ₂ (%)	80.11 ± 7.96**	93.26 ± 1.97
Mean arterial pressure (mmHg)	153.25 ± 17.81**	123.18 ± 15.21

** $P < 0.01$ vs after nCPAP.

2 病例组与对照组 IGF - 2 水平的比较

OSAHS 患者血清 IGF - 2 水平及外周血单个核细胞 IGF - 2 mRNA 水平明显高于正常对照组。经相关分析发现,OSAHS 患者血清 IGF - 2 水平与患者平均血氧饱和度、最低血氧饱和度呈负相关,相关系数分别为 $r = -0.515$ 、 $r = -0.596$, 均 $P < 0.05$; 与 AHI、小于 90% 血氧饱和度时间占总睡眠时间百分比、呼吸暂停时间占总睡眠时间百分比呈正相关,相关系数分别为 $r = 0.516$ 、 $r = 0.637$ 、 $r = 0.681$, 均 $P < 0.05$; 与颈围、腰臀围比(WHR)、BMI 无显著相关;OSAHS 患者外周血单个核细胞 IGF - 2 mRNA 水平与患者平均血氧饱和度、最低血氧饱和度呈负相关,相关系数分别为 $r = -0.598$ 、 $r = -0.543$, 均 $P < 0.05$, 与 AHI、小于 90% 血氧饱和度时间占总睡眠时间百分比、呼吸暂停时间占总睡眠时间百分比呈正相关,相关系数分别为 $r = 0.591$ 、 $r = 0.636$ 、 $r = 0.651$, 均 $P < 0.05$; 与颈围、腰臀围比(WHR)、BMI 无显著相关。

3 病例组内 IGF - 2 水平的比较

病例组内 2 组间血清 IGF - 2 水平及外周血单个核细胞 IGF - 2 mRNA 水平存在差异, 经直线相关分析发现, 高血压组 IGF - 2 浓度及外周血单个核细胞 IGF - 2 mRNA 水平与患者平均动脉压呈正相关, 相关系数分别为 $r = 0.599$ 、 $r = 0.627$, 均 $P < 0.05$ 。

4 重度 OSAHS 患者治疗前后 IGF - 2 及 IGF - 2 mRNA 水平的变化

重度 OSAHS 患者治疗后血清 IGF - 2 水平及外周血单个核细胞 mRNA 水平明显低于治疗前, 见图 1。但与正常对照组比较仍有显著差异, 见表 5。

讨 论

OSAHS 是一种常见的慢性睡眠呼吸障碍疾患。现已明确 OSAHS 不仅影响患者的生活质量, 殃及公众健康, 而且还是高血压病、动脉硬化、肺动脉高压、

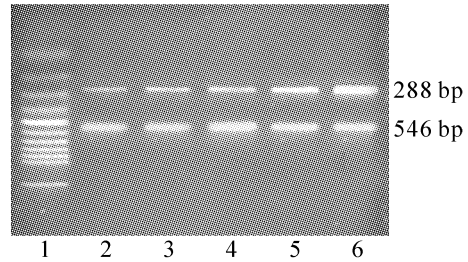


Fig 1 Expression of IGF - 2 mRNA in different groups. Lane 1: 100bp ladder DNA marker; Lane 2: normal control group; Lane 3: OSAHS with normal blood pressure; Lane 4: severe OSAHS after nCPAP; Lane 5: OSAHS with hypertension group; Lane 6: severe OSAHS before nCPAP.

图 1 不同组别 IGF - 2 mRNA 水平

表 3 2 组 IGF - 2 水平的比较

Tab 3 Comparison of serum IGF - 2 level and expression between two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Serum IGF - 2 (ng/L)	IGF - 2 mRNA
Cases	40	694.40 ± 114.24*	1.09 ± 0.26*
Control	20	298.70 ± 56.59	0.41 ± 0.15

* $P < 0.01$ vs control group.

表 4 2 组 IGF - 2 水平的比较

Tab 4 Comparison of serum IGF - 2 level and expression between two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Serum IGF - 2 (ng/L)	IGF - 2 mRNA
OSAHS with normal blood pressure	16	607.88 ± 73.55	0.80 ± 0.13
OSAHS with hypertension	24	752.08 ± 99.61*	1.14 ± 0.22*

* $P < 0.01$ vs OSAHS with normal blood pressure.

表 5 重度 OSAHS 患者治疗前后 IGF - 2 的变化

Tab 5 Change of IGF - 2 of severe OSAHS before and after nCPAP ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Serum IGF - 2 (ng/L)	IGF - 2 mRNA
Before nCPAP	15	778.67 ± 100.84* [△]	1.19 ± 0.25* [△]
After nCPAP	15	526.51 ± 51.38*	0.65 ± 0.16*
Control	20	298.70 ± 56.59	0.41 ± 0.15

* $P < 0.01$ vs control; [△] $P < 0.01$ vs after nCPAP.

心肌梗死、脑梗死和脑卒中等疾病的独立危险因素, 严重者甚至可在睡眠中诱发心源性猝死。但其具体机制尚不清楚。目前 OSAHS 包括其合并存在的高血压与氧化还原敏感转录因子及其下游基因产物的关系成为国内外研究的热点。大量研究表明发生于 OSAHS 反复的间断缺氧使得活性氧分子产生增多, 表明 OSAHS 病人存在增加的氧化应激水平, 活化的氧化还原敏感的转录因子如 HIF - 1、NF - κB、AP - 1、EGR - 1、SP - 1 等, 通过促进相应下游基因

产物的表达而在 OSAHS 的病理过程中发挥重要作用^[5]。目前已有大量的研究表明 OSAHS 病人血清中受这些转录因子调控的 VEGF、ET-1、EPO、IL-6、TNF- α 、ICAM-1、PAI-1 等明显上调,表明这些睡眠相关因子在 OSAHS 的病理过程中起一定作用^[6-9]。现已证实 IGF-2 是受 HIF-1 调控的因子之一^[5],因此,OSAHS 患者 IGF-2 水平可能会有一定程度升高。

胰岛素样生长因子由 IGF-1 和 IGF-2 这 2 种同源的相关性多肽组成,在肌肉和脂肪组织中具有胰岛素样作用,主要生物效应为促进细胞有丝分裂,并具有胰岛素样作用^[10]。IGF-2 促进合成代谢,具有促进心肌细胞肥大等作用。IGF-2 还可促进细胞内信号传递,促进腺苷进入细胞核内,使 DNA 合成增加。IGF-2 亦可使肌细胞进入高分泌状态促进弹性蛋白合成,并以自分泌/旁分泌的作用方式刺激血管平滑肌细胞和血管内皮细胞生长,调节动脉壁的厚度^[4],诱导内皮细胞迁移、增生,促进内皮细胞形成血管管腔^[2]及平滑肌细胞的移行,这些均为引起血压升高的关键环节。相关研究表明:高血压病患者 IGF-2 水平明显升高,且与病情严重程度相关^[11]。

本实验结果提示 OSAHS 患者 IGF-2 水平明显升高,与病情严重程度相关,且 OSAHS 合并高血压组 IGF-2 水平明显高于非合并组,重度患者经 nC-PAP 治疗后 IGF-2 水平明显下调。结合过去文献及本次研究结果,我们认为 IGF-2 在 OSAHS 的病理过程,特别是 OSAHS 引发心血管疾病的过程中起了重要作用,推测其机制如下:① OSAHS 患者反复夜间睡眠呼吸暂停低通气导致夜间氧饱和度降低;②缺氧诱导 HIF-1DNA 结合活性, HIF-1 与 IGF-2 增强子结合后使 IGF-2 的转录和表达增强;③ IGF-2 促进细胞内信号传递,促进腺苷进入细胞核内,使 DNA 合成增加,促进细胞有丝分裂;④ IGF-2 诱导内皮细胞迁移、增生,促进内皮细胞形成血管管腔及平滑肌细胞的移行;⑤ IGF-2 使肌细胞进入高分泌状态,并以自分泌/旁分泌的作用方式刺激血管平滑肌细胞和血管内皮细胞生长。

本实验对了解 OSAHS 患者病理生理改变的特点有一定的意义,对于阐明阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征及间歇缺氧与心血管疾病的关系和病理

生理学机制有一定意义。并且本实验发现,通过测血清 IGF-2 浓度,可以反映患者病情及缺氧的程度及反映心血管功能状态,进一步研究 OSAHS 与心血管疾病之间的关系, IGF-2 可能是一个有前途的突破点。

[参 考 文 献]

- [1] Salmon WD Jr, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*[J]. J Lab Clin Med, 1957, 49(6): 825-836.
- [2] Smith LE, Shen W, Perruzzi C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor [J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1390-1395.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会睡眠呼吸疾病学组. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征诊治指南(草案)[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(8): 594-597.
- [4] Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(26): 9833-9838.
- [5] Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome - an oxidative stress disorder[J]. Sleep Med Rev, 2003, 7(1): 35-51.
- [6] Lavie L, Kraiczi H, Hefetz A, et al. Plasma vascular endothelial growth factor(VEGF) in sleep apnea syndrome: effects of Ncpap treatment [J]. Am J respir Crit Care Med, 2002, 165(6): 1624-1628.
- [7] Winnicki M, Shamsuzzaman A, Lanfranchi P, et al. Erythropoietin and obstructive sleep apnea[J]. Am J Hypertens, 2004, 17(9): 783-786.
- [8] Moller DS, Lind P, Strunge B, et al. Abnormal vasoactive hormones and 24-hour blood pressure in obstructive sleep apnea[J]. Am J Hypertens, 2003, 16(4): 274-280.
- [9] Kanagy NL, Walker BR, Nelin LD. Role of endothelin in intermittent hypoxia-induced hypertension [J]. Hypertension, 2001, 37(1): 511-515.
- [10] 梁立阳, 杜敏联, 夏焱, 等. 胰岛素对长骨成骨细胞的影响及受体后机制的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(11): 2251-2255.
- [11] 季乃军, 李付远, 王成尧, 等. 高血压病患者血清胰岛素样生长因子 II、生长激素和胰岛素变化的探讨[J]. 福建医药杂志, 2004, 26(3): 17-19.