

申栋帅,陆璐,王红义,等. 不同低氧胁迫方式下 SD 大鼠急进高原模型的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(8): 1001-1011.

SHEN D S, LU L, WANG H Y, et al. Comparative study on SD rat models of rapid high-altitude entry under different hypoxia stress modes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(8): 1001-1011.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.08.006

不同低氧胁迫方式下 SD 大鼠急进高原模型的比较研究

申栋帅^{1,2}, 陆璐^{1,2}, 王红义^{1,2}, 张梅^{1,2}, 陈克明^{1,2}, 牛廷献^{1,2}, 肖攀^{1,2*}

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室, 兰州 730050;
2. 甘肃省干细胞与基因药物重点实验室, 兰州 730050)

【摘要】 目的 对 SD 大鼠在高原实地和模拟高原环境这 2 种低氧胁迫方式下建立的急进高原模型进行比较研究,进而鉴定模拟高原实验舱的可靠性。**方法** 将 SD 大鼠分别急进模拟高原动物实验舱(4000 m)或高原实地实验室(4010 m)来建立大鼠急进高原模型,在暴露 24 h 或 72 h 后采集并测定高原生理病理变化相关指标,主要包括血常规、血生化、血气、氧化损伤指标((超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px))、炎症指标((白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β))、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ))、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)和白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6))、病理组织分析和低氧敏感基因((低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , Hif-1 α) and 血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, Vegfa))等,最终对结果进行差异性分析,得出差异性评估报告。**结果** 相同海拔高度下,高原实地或模拟高原暴露 72 h 后均可以产生明显的肺部和脑部损伤。相同暴露时间下,动物机体的血常规、血生化和血气结果相近,炎症指标(IL-6, IL-1 β , MCP-1 和 IFN- γ)、氧化损伤指标(MDA, SOD 和 GSH)和脑部低氧敏感基因(Hif-1 α 和 Vegfa)等检测结果无显著性差异。但是,模拟 72 h 组的二氧化碳分压(partial pressure of carbon dioxide, PaCO₂)和碱剩余(base excess, BE)显著高于其他低氧处理组、模拟 72 h 组的肺部低氧敏感基因(Hif-1 α 和 Vegfa)与空白对照组无显著性差异,以及高原实地处理组脑系数显著高于模拟高原处理组等结果提示高原实地和模拟高原环境可能存在细微区别。**结论** 模拟高原实验舱在 4000 m 海拔可成功建立急进高原动物模型,最优暴露时间应大于 24 h 但略短于 72 h。模拟高原实验舱具有良好的可靠性,但条件允许情况下应尽量前往高原实地来建立急进高原动物模型。

【关键词】 SD 大鼠;高原实地;模拟高原实验舱;急进高原;差异性研究

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 08-1001-11

Comparative study on SD rat models of rapid high-altitude entry under different hypoxia stress modes

SHEN Dongshuai^{1,2}, LU Lu^{1,2}, WANG Hongyi^{1,2}, ZHANG Mei^{1,2}, CHEN Keming^{1,2}, NIU Tingxian^{1,2}, XIAO Pan^{1,2*}

(1. Basic Medicine Laboratory, the 940th Hospital of Joint Logistic Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China; 2. Gansu Key Laboratory of Stem Cells and Genetic Drug, Lanzhou 730050, China)

Corresponding author: XIAO Pan. E-mail: 997078955@qq.com

【基金项目】 军队实验动物专项科研课题(SYDW [2020] 27 号, SYDW [2018] 12 号), 甘肃省自然科学基金实验动物专项(22JR5RA023, 23JRRA536, 24JRRA010)。

Funded by Military Experimental Animal Special Research Project(SYDW [2020] 27, SYDW [2018] 12), Experimental Animal Special Project of Gansu Natural Science Foundation(22JR5RA023, 23JRRA536, 24JRRA010)。

【作者简介】 申栋帅,男,在读博士研究生,技师,研究方向:人类疾病动物模型研制和应用研究。Email: shends1992@163.com

【通信作者】 肖攀,男,本科,主管技师,研究方向:人类疾病模型的构建及发病机制研究。Email: 997078955@qq.com

[Abstract] Objective A comparative study was conducted on rapid high-altitude models established in SD rats under two hypoxic stress modes, namely, a high-altitude field and simulated high-altitude environment, to evaluate the reliability of the simulated high-altitude test chamber. **Methods** SD rats were placed in a simulated rapid high-altitude animal experimental chamber (4000 m) or rapid high-altitude field laboratory (4010 m) to establish a rapid high-altitude rat model. After 24 or 72 h of exposure, physiological and pathological indicators related to high-altitude changes were collected and measured, mainly routine blood parameters, blood biochemistry, blood gas, oxidative damage indicators (superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px)), and inflammation indicators (interleukin 1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and interleukin 6 (IL-6)), and pathological tissue analysis and hypoxia sensitive gene (hypoxia inducible factor-1 α (*Hif*-1 α) and vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*)) testing were performed. Finally, differential analysis was conducted on the result to obtain a differential evaluation report. **Results** At the same altitude, both high-altitude field and simulated high-altitude exposure for 72 h caused significant lung and brain damage. Under the same exposure time, the routine blood parameter, blood biochemistry, and blood gas result for the rats were similar. There were no significant differences in the detection of inflammation indicators (IL-6, IL-1 β , MCP-1, and IFN- γ), oxidative damage indicators (MDA, SOD, and GSH), or hypoxia-sensitive gene expression (*Hif*-1 α and *Vegfa*) in the brain. However, partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂) and base excess (BE) were significantly higher in the simulated-72 h group than the other treatment group. The lung hypoxia-sensitive genes (*Hif*-1 α and *Vegfa*) in the simulated-72 h group showed no significant expression difference with control group, and the brain coefficient of the high-altitude field treatment group was significantly higher than that of the simulated high-altitude treatment group. These result indicate that there may be slight differences between models prepared in high-altitude field and simulated high-altitude environments. **Conclusions** The simulated high-altitude animal experimental chamber can successfully establish a rapid high-altitude animal model. The simulated altitude can be appropriately increased on the basis of 4000 m. If an altitude of 4000 meters is used, the exposure time should be greater than 24 h but slightly shorter than 72 h. The simulated high-altitude experimental module has good reliability, but it is advisable to use plateaus for on-site experiments as much as possible, if conditions permit.

[Keywords] SD rats; high altitude field; simulated high altitude experimental module; rushing into the plateau; differential research

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高原一般是指海拔 2500 m 以上的高海拔地区, 低压性缺氧是其核心特点, 表现为吸入空气中氧分压的降低, 例如海拔 4500 m 的大气氧分压大约只有平原地区的 40%^[1]。随着交通条件的进步, 越来越多的人由于采矿、旅游、军事部署等原因急进高原时, 会产生一系列生理病理反应^[2]。一方面, 缺氧可引起继发性红细胞增多, 造成血液黏稠和外周循环阻力增加; 另一方面, 低压性缺氧导致代偿性肺动脉高压, 心脏射血和静脉回心血液受阻, 常见表现为头痛、疲劳、厌食等症状, 严重者甚至发展为肺水肿和脑水肿等急性高原病^[3-5]。

急进高原研究需要标准、可信的高原缺氧动物模型, 目前的造模方式主要是高原实地和模拟高原环境实验舱两种方式。前往高原实地进行实验不容置疑是制备高原疾病动物模型最标准方法, 但存在路途遥远、周期长且实验人员需克服高原反应等困难。因此, 近年来多个高原医学研究单位在属地建设模拟高原环境的动物实验舱, 以求在平原地区

模拟高原环境。但是, 模拟高原实验舱能否准确无误地模拟包括氧分压、温度、湿度和压强等真实的高原环境, 其与高原实地建立的动物模型间是否存在显著差异仍不得而知。

为探究高原实地与模拟高原实验舱所建立动物模型间是否存在显著性差异, 本研究采用同批次的 SD 大鼠, 同时在同海拔的两种平台(高原实地实验室和模拟高原实验舱)暴露 24 h 或 72 h 来建立急进高原动物模型。最终, 对相同参数进行差异性分析, 得出差异性评估报告, 以期为急进高原模型建立提供参考, 鉴定模拟高原实验舱的可靠性, 助力高原医学研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

50 只 SD 大鼠 (SPF 级, 雄性, 8 周龄, 180 ~ 220 g) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司

【SCXK(京)2019-0008】。大鼠饲养于中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室实验动物中心屏障环境【SYXK(甘)2023-0007】。每 5 只大鼠饲养于 1 个标准大鼠饲养笼盒(50 cm × 35 cm × 20 cm),可自由活动及饮食饮水。屏障环境恒温恒湿(温度:20 ~ 25 ℃,相对湿度:40% ~ 60%),每日光照与黑暗各 12 h。本动物实验过程均严格按照“3R”原则设计和操作,方案通过中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院科研伦理委员会审查(2022KYLL020)。

1.1.2 主要试剂与仪器

0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业,批号:230824);4%多聚甲醛固定液(北京 BIOSHARP 生物,批号:22217909);异氟烷麻醉剂(青岛博方医药科技,批号:153717015);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为:20230630, 20230628, 20230629);白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、 γ 干扰素(interferon- γ , IFN- γ)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)和白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:202307);氯仿、无水乙醇、双蒸水和异丙醇购于上海生工生物工程股份有限公司;TRIzol(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);RT Master Mix 和 SYBR II Premix Ex Taq(TaKaRa 公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*)和低氧敏感基因(低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , *Hif-1 α*)和血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, *Vegfa*))的实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

L550 台式离心机(湖南湘仪,出厂编号:F1840 0013050086);模拟高原低压低氧动物实验舱(贵州风雷航空军械有限公司);Cobas-b-123 全自动血气分析仪(瑞士 Roche,出厂编号:44096)及配套试剂包(瑞士 Roche,批号:21437073);BC-6800 五分类血液细胞分析仪(深圳 Mindray,出厂编号:SH-3A001034);Vet-Test8008 血生化分析仪(美国

IDEXX,出厂编号:GXT3-1000RT230)及试剂片(美国 IDEXX,批号:96-20423-US);LP-1500 低压低氧舱(上海玉研,出厂编号:Y655650705);全波长酶标仪(美国 Thermo Scientific,出厂编号:ZY2014000006)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备

50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分别为空白对照组、高原实地处理组(实地 24 h 组和实地 72 h 组)和模拟高原处理组(模拟 24 h 组和模拟 72 h 组),除空白对照组外的 4 个组均需经过低氧环境处理,因此也统称为低氧处理组。上述各组到达中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室实验动物中心后,自由饮食和饮水,适应环境 1 周。1 周后,实地 24 h 组和实地 72 h 组急进青海玉树巴塘的全军高原环境损伤防治重点实验室(海拔 4010 m),运送途中果冻补水,抵达高原后自由获取食水,分别缺氧暴露 24 h 或 72 h 后开始实验。与此同时,将模拟 24 h 组和模拟 72 h 组置于模拟高原动物实验舱,调整模拟海拔高度至 4000 m,分别缺氧暴露 24 h 或 72 h,期间自由饮食饮水;空白对照组在实验动物中心饲养,自由饮食和饮水。

1.2.2 样本采集

暴露时间结束后,使用异氟烷进行麻醉,使用血气针进行腹主动脉采血,使用肝素钠抗凝管或促凝管进行腹主静脉采血。在麻醉状态处死大鼠后,采集大鼠的心脏、脑、肺,用冰冷等渗氯化钠溶液冲洗,称重并收集,用多聚甲醛固定液固定,使组织充分展开,并置于 4%多聚甲醛进行固定。空白对照组样本同步进行样本采集,采集方式与上述各组相同。

1.2.3 大鼠主要组织病理切片的制备和观察

切除心脏、脑、肺组织,用冰冷等渗氯化钠溶液冲洗,称重并收集,用多聚甲醛固定液固定,使组织充分展开。组织固定好后切成 4 μ m 切片,洗涤,脱水,并透明化处理,石蜡包埋后苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,脱水,最后树脂封片。

HE 染色后封片,显微镜观察并对肺损伤进行评分。双盲法根据肺泡毛细血管充血、肺泡腔面积、炎性细胞浸润、肺泡壁厚度 4 项评分:0 分,无损伤;1 分,轻度损伤(病变范围 < 25%);2 分,中度损伤(病变范围 25% ~ 50%);3 分,重度损伤(病变范围 51% ~ 75%);4 分,极重度损伤(病变范围 > 75%),肺损伤评分为 4 项指标分数相加。

HE 染色后封片,显微镜观察并对脑损伤进行评分。双盲法根据海马区细胞排列紊乱程度、细胞间隙大小、水肿、细胞空泡化和核固缩 5 项评分:0 分,无损伤;1 分,轻度损伤(病变范围 < 25%);2 分,中度损伤(病变范围 25% ~ 50%);3 分,重度损伤(病变范围 51% ~ 75%);4 分,极重度损伤(病变范围 > 75%),脑损伤评分为 5 项指标分数相加。

1.2.4 大鼠血气指标测定

将血气针采集的动脉血立即使用血气分析仪进行检测。主要血气指标有:动脉血二氧化碳分压(partial pressure of carbon dioxide, PaCO₂)、血液酸碱度(pondus hydrogenii, pH)、动脉血氧分压(partial pressure of oxygen, PaO₂)、钙离子浓度(Ca²⁺)和碱剩余(base excess, BE)等。

1.2.5 大鼠血常规指标测定

将肝素钠采集的抗凝血立即使用血常规分析仪进行检测。主要测定指标有:红细胞计数(red blood cell, RBC)、白细胞计数(white blood cell, WBC)、红细胞分布宽度(red blood cell distribution width, RDW)、血小板分布宽度(platelet distribution width, PDW)和血小板计数(platelet count, PLT)。

1.2.6 大鼠血生化指标测定

将促凝管采集的血液于 3000 r/min 离心 15 min,收集血清立即进行血生化分析。主要测定指标有:天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、AST/ALT、间接胆红素(indirect bilirubin, IBIL)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、葡萄糖(glucose, Glu)和肌酐(creatinine coefficient, Cr)。

1.2.7 大鼠脏器系数测定

实验开始前将大鼠进行称重,采血结束后经异氟烷麻醉并处安乐死。此时采集大鼠的心脏、脑、肺,用冰冷等渗氯化钠溶液冲洗,滤纸吸水后称重。最终计算脏器系数,计算公式为:脏器系数 = 脏器重量/体重。

1.2.8 大鼠血清炎症因子的测定

大鼠麻醉后采血,离心后获得血清,采用大鼠 IL-1β、IFN-γ、MCP-1 和 IL-6 的 ELISA 试剂盒来测定血清炎症因子。

1.2.9 大鼠氧化损伤指标测定

大鼠麻醉后采血,离心后获得血清,使用 ELISA 试剂盒测定血清总 SOD 活力、MDA 含量和 GSH 含量。

1.2.10 qPCR 检测

大鼠部分脑和肺组织,提取组织样本的总 RNA,酶标仪检测 RNA 浓度,以 1 μg 的 RNA 总量进行反转录,以此 cDNA 为模板进行 qPCR,反应体系(20 μL):H₂O 6 μL,10 μmol/L 的上下游引物各 0.8 μL,2 × TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10 μL, cDNA 2 μL。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 35 s,共循环 40 次。在 Applied Biosystems 7500 荧光定量 PCR 仪中进行 qPCR 反应,所得数值均用内参 *Gapdh* 进行标准化。qPCR 结果采用 2^{-ΔΔCt} 运算方法进行分析。引物序列如表 1 所示。

表 1 qPCR 引物
Table 1 qPCR primers

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	引物长度/bp Product size/bp
<i>Hif-1α</i>	F: CTTTCTCTGCGGTGAGGAC	20
	R: TCGACGTTCGGAACATCATCC	20
<i>Vegfa</i>	F: GCACATAGGAGAGATGAGCTTCC	23
	R: CGCCTTGGCTTGTCACATTT	20
<i>Gapdh</i>	F: CAATCCTGGGCGGTACAAC	20
	R: ATGAGACGAGGCTGCTGAAC	20

1.3 统计学分析

用 Graphpad Prism 9.3.1 软件进行数据分析,本实验所有数据均为定量资料,符合正态分布的数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不服从正态分布采用中位数和四分位数间距(M, IQ)表示。符合正态分布且方差齐性的多组间比较采用单因素方差分析或重复测量方差分析,两两比较采用 Turkey 法。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心脏病理分析

如图 1 所示,HE 染色结果说明各组大鼠心脏组织心肌细胞结构正常、形态完整、排列整齐、细胞间隙致密,未观察到明显异常的病变。

2.2 大鼠肺病理分析

空白对照组和模拟 24 h 组肺组织结构完整,肺泡呈空泡状薄壁结构且未见液体渗出,肺泡壁光滑,无普遍的明显病变,病理组织评分两组无显著性差异。与空白对照组相比,实地 24 h 组肺泡壁普遍明显增厚,肺损伤评分升高。实地 72 h 组和模拟 72 h 组与空白对照组相比均表现出不同程度的损伤,肺泡壁增厚明显、肺泡腔缩小、肺泡扩张及塌陷,并伴有炎性细胞浸润,肺损伤评分升高,但这两

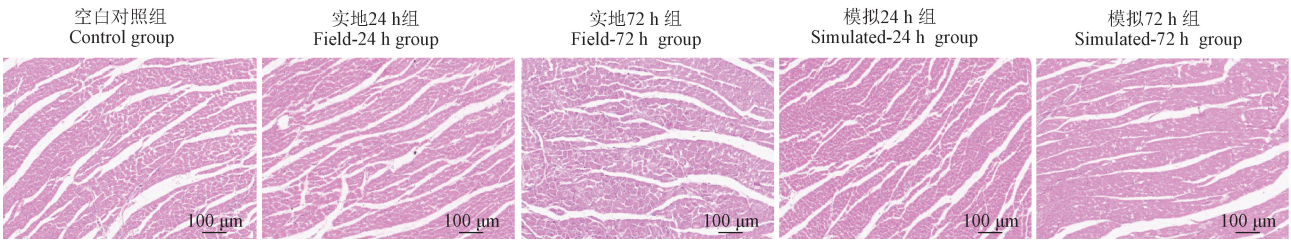


图 1 大鼠心脏 HE 染色切片结果($n = 10$)
Figure 1 HE staining section results of rat heart($n = 10$)

组间肺损伤评分无显著性差异。见图 2。

2.3 大鼠大脑病理分析

如图 3 所示,空白对照组和模拟 24 h 组大鼠脑组织细胞结构正常、形态完整,细胞间隙致密无水肿,海马区细胞排列整齐,未观察到普遍的明显异常病变,两组脑病理损伤分无显著性差异。实地 24 h 组、实地 72 h 组和模拟 72 h 组表现出不同程度的胶质细胞增生、海马细胞排列紊乱和细胞空泡化等病变,脑病理损伤分显著升高。见图 3。

2.4 大鼠血气分析检测结果

如表 2 所示,相比于空白对照组,4 个低氧处理组的 PCO_2 和 PO_2 均显著降低,实地 24 h 组、实地 72 h 组和模拟 24 h 组的 BE 显著降低,实地 72 h 组 Ca^{2+} 显著升高。相比于实地 24 h 组,模拟 72 h 组的 PCO_2 和 BE 显著升高, Ca^{2+} 显著降低;实地 72 h 组

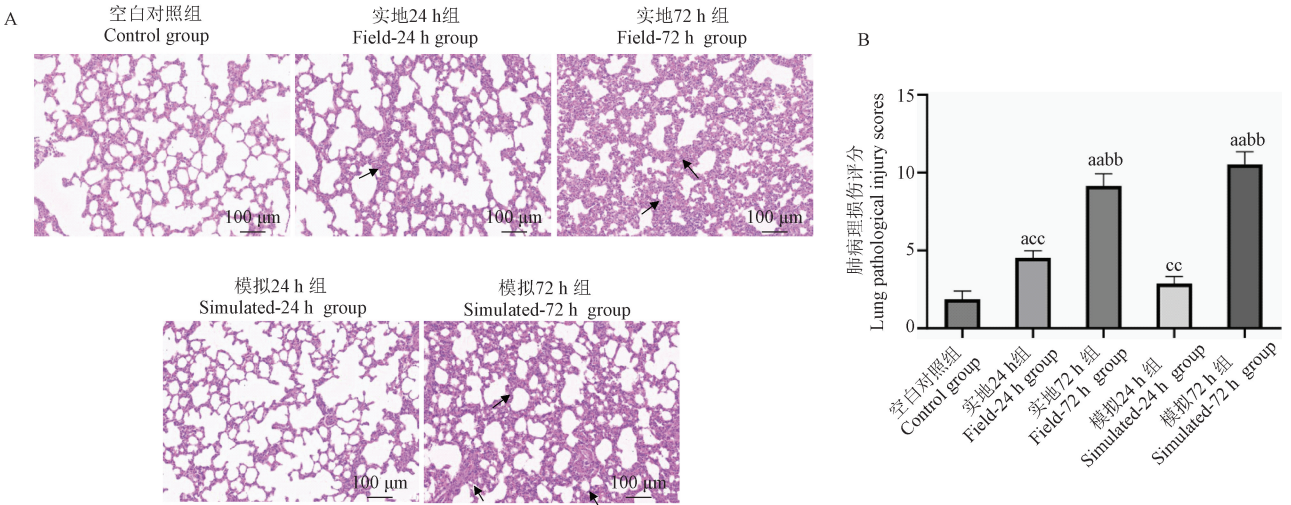
和模拟 24 h 组的 BE 和 Ca^{2+} 显著降低。

2.5 血常规分析结果

如表 3 所示,相比于空白对照组,实地 24 h 组和模拟 24 h 组 WBC、PLT 和 PDW 显著升高;实地 72 h 组和模拟 72 h 组 WBC、RBC、RDW、PLT 和 PDW 均显著升高。相比于实地 24 h 组,实地 72 h 组 RDW 和 PDW 显著升高,模拟 24 h 组 RBC 和 PLT 显著降低,模拟 72 h 组的 WBC 和 PLT 显著降低,RBC 和 RDW 显著升高。相比于实地 72 h 组,模拟 24 h 组的 PLT 和 PDW 显著降低,模拟 72 h 组的 WBC、PLT 和 PDW 显著降低。

2.6 血生化分析结果

如表 4 所示,相比于空白对照组,4 个低氧处理组的 ALT、Glu 和 UREA 均显著降低,AST/ALT、IBIL 和 Cr 均显著升高,AST 均无显著差异。实地 24 h

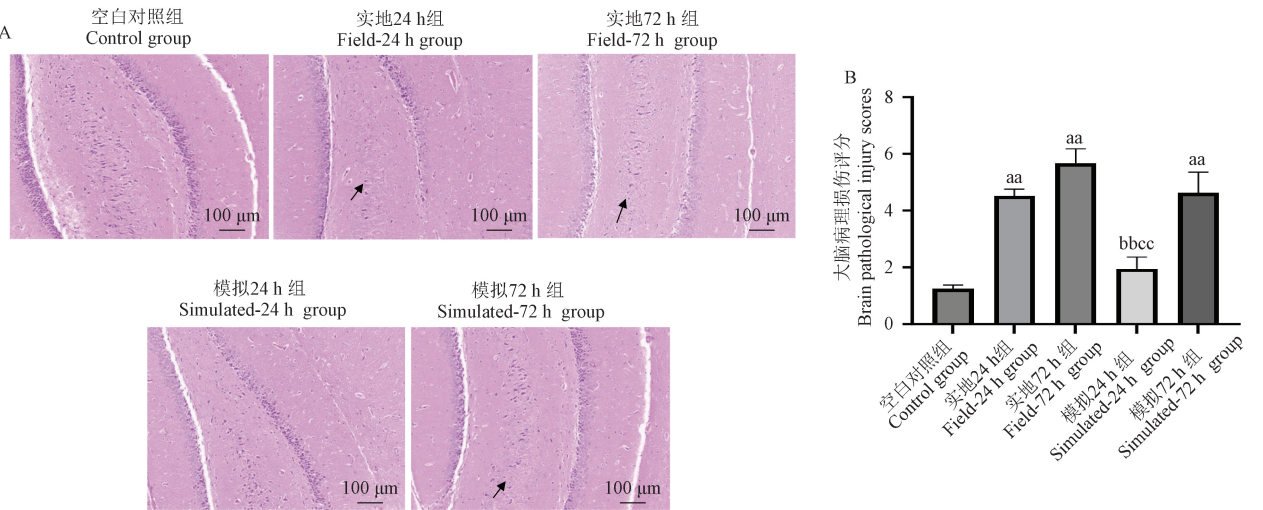


注:A:大鼠肺部 HE 染色切片结果;B:大鼠肺部病理损伤评分;与空白对照组相比, $^aP < 0.05$, $^{aa}P < 0.01$;与实地 24 h 组相比, $^{bb}P < 0.01$;与实地 72 h 组相比, $^{cc}P < 0.01$ 。(下图/表同)

图 2 大鼠肺病理分析($n = 10$)

Note. A. HE staining section results of rat lung. B. Lung pathological injury scores of rat lung. Compared with control group, $^aP < 0.05$, $^{aa}P < 0.01$. Compared with field-24 h group, $^{bb}P < 0.01$. Compared with field-72 h group, $^{cc}P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Pathological analysis of rat lung($n = 10$)



注:A:大鼠大脑 HE 染色切片结果;B:大鼠大脑病理损伤评分。

图 3 大鼠大脑病理分析($n = 10$)

Note. A. HE staining section results of rat brain. B. Lung injury scores of rat brain.

Figure 3 Pathological analysis of rat brain($n = 10$)

表 2 大鼠血气指标测定结果($n = 10$)

Table 2 Measurement results of blood gas indicators in rats($n = 10$)

指标 Index	空白对照组 Control group	实地 24 h 组 Field-24 h group	实地 72 h 组 Field-72 h group	模拟 24 h 组 Simulated-24 h group	模拟 72 h 组 Simulated-72 h group
血液酸碱度 pH	7.37 ± 0.05	7.39 ± 0.02	7.34 ± 0.05	7.36 ± 0.07	7.40 ± 0.04 ^c
血二氧化碳分压 PCO ₂	48.20 ± 8.89	35.96 ± 2.75 ^{aa}	34.18 ± 3.38 ^{aa}	34.84 ± 5.50 ^{aa}	41.73 ± 5.53 ^{abcc}
血氧分压 PO ₂	78.76 ± 11.52	54.55 ± 9.32 ^{aa}	48.51 ± 9.27 ^{aa}	53.84 ± 10.92 ^{aa}	52.11 ± 6.23 ^{aa}
钙离子浓度 Ca ²⁺	1.09 ± 0.01	1.28 ± 0.02	1.19 ± 0.03 ^{aab}	1.08 ± 0.12 ^{bb}	1.10 ± 0.09 ^{bb}
碱剩余 BE	1.24 ± 1.43	-3.27 ± 0.76 ^{aacc}	-6.51 ± 2.72 ^{aabb}	-5.41 ± 2.49 ^{aab}	0.42 ± 1.48 ^{bbee}

注:与实地 24 h 组相比,^b $P < 0.05$;与实地 72 h 组相比,^c $P < 0.05$ 。(下图/表同)

Note. Compared with field-24 h group, ^b $P < 0.05$. Compared with field-72 h group, ^c $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

组的 ALP 显著高于空白对照组,其他 3 个低氧处理组的 ALP 与空白对照组无显著差异。相比于实地 24 h 组,实地 72 h 组的 ALP 和 Glu 显著降低,模拟 24 h 组的 IBIL 和 ALP 显著降低,模拟 72 h 组 IBIL、Glu 和 ALP 显著降低。相比于模拟 24 h 组,模拟 72 h 组的 IBIL 显著降低。

2.7 脏器指数分析结果

如表 5 所示,相比于空白对照组,实地 24 h 组肺系数和脑系数显著升高,实地 72 h 组肺系数、心系数和脑系数显著升高,模拟 72 h 组肺系数和脑系数显著升高。相比于实地 24 h 组,模拟 24 h 组的肺系数和脑系数显著降低,模拟 72 h 组的脑系数显著降低。相比于实地 72 h 组,模拟 24 h 组的肺系数和

脑系数显著降低,模拟 72 h 组的脑系数显著降低。

2.8 氧化应激指标分析对比

如图 4 所示,相比于空白对照组,实地 24 h 组的 MDA 显著升高,GSH 显著降低;模拟 24 h 组的 SOD 和 GSH 显著降低;实地 72 h 组和模拟 72 h 组的 MDA 显著升高,SOD 和 GSH 显著降低。相比于实地 24 h 组,模拟 72 h 组的 GSH 显著降低,MDA 显著升高。

2.9 血清炎症因子分析对比

如图 5 所示,相比于空白对照组,实地 24 h 组的 IL-6 和 IL-1 β 显著升高,IFN- γ 显著降低;实地 72 h 的 IL-6、IL-1 β 和 MCP-1 显著升高,IFN- γ 显著降低;模拟 24 h 的 IL-6 和 IL-1 β 显著升高,IFN- γ 显

著降低;模拟 72 h 的 IL-6、IL-1β 和 MCP-1 显著升高,IFN-γ 显著降低。相比于实地 24 h 组,实地 72 h 组的 MCP-1 显著升高。

2.10 大鼠低氧敏感基因检测结果

如图 6 所示,相比空白对照组,实地 24 h 组、实地 72 h 组和模拟 24 h 组的脑部与肺部 *Hif-1α* 和

表 3 大鼠血常规指标测定结果(*n* = 10)

Table 3 Determination results of blood routine indicators in rats (<i>n</i> = 10)					
指标 Index	空白对照组 Control group	实地 24 h 组 Field-24 h group	实地 72 h 组 Field-72 h group	模拟 24 h 组 Simulated-24 h group	模拟 72 h 组 Simulated-72 h group
白细胞计数 WBC	2.05 ± 1.11	10.55 ± 1.05 ^{aa}	8.28 ± 3.67 ^{aa}	9.54 ± 3.91 ^{aa}	4.91 ± 0.71 ^{abbc}
红细胞计数 RBC	7.77 ± 0.35	8.23 ± 0.66	9.41 ± 0.58 ^{aa}	8.15 ± 0.39 ^b	8.85 ± 0.50 ^{aab}
红细胞分布宽度 RDW	30.02 ± 1.64	31.70 ± 2.11	39.30 ± 2.89 ^{aabb}	31.32 ± 0.49	36.28 ± 1.47 ^{aabb}
血小板计数 PLT	783.00 ± 59.41	1140.75 ± 228.51 ^{aa}	1035.00 ± 150.21 ^{aa}	849.40 ± 96.48 ^{aabbc}	851.67 ± 89.52 ^{aabbc}
血小板分布宽度 PDW	14.77 ± 0.10	15.13 ± 0.10 ^{aac}	15.34 ± 0.17 ^{aab}	15.10 ± 0.16 ^{aacc}	15.07 ± 0.11 ^{aacc}

表 4 大鼠血生化指标测定结果(*n* = 10)

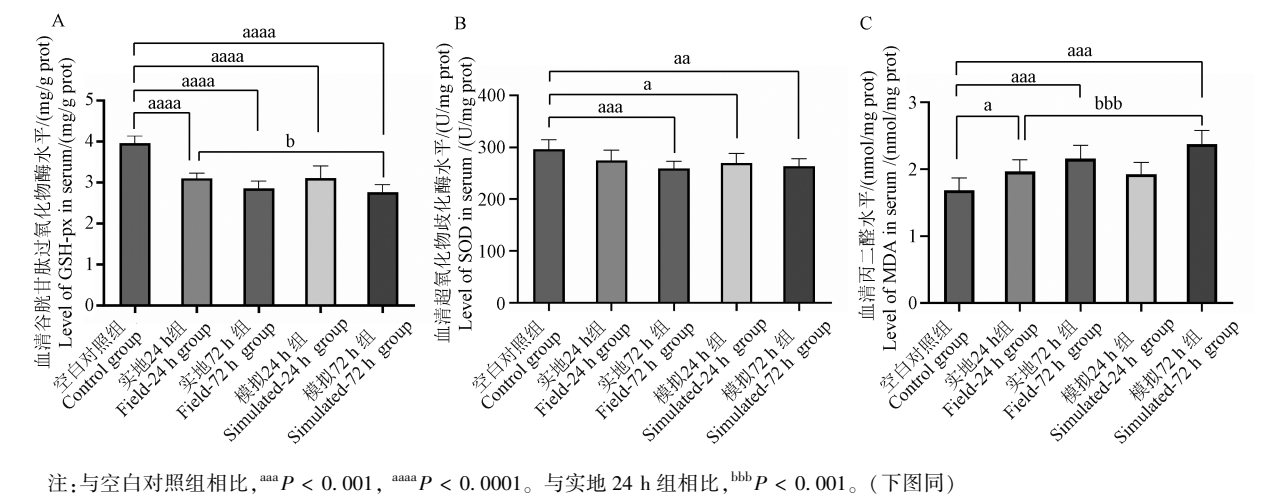
Table 4 Measurement results of biochemical indicators in rat blood (<i>n</i> = 10)					
指标 Index	空白对照组 Control group	实地 24 h 组 Field-24 h group	实地 72 h 组 Field-72 h group	模拟 24 h 组 Simulated-24 h group	模拟 72 h 组 Simulated-72 h group
天门冬氨酸转氨酶 AST	166.20 ± 63.97	191.33 ± 99.36	153.56 ± 63.21	125.17 ± 12.46	161.67 ± 30.61
丙氨酸氨基转移酶 ALT	101.60 ± 28.81	49.83 ± 10.01 ^{aa}	39.56 ± 15.06 ^{aa}	42.17 ± 5.46 ^{aa}	43.00 ± 9.55 ^{aa}
AST/ALT	1.63 ± 0.33	3.85 ± 1.05 ^{aa}	4.18 ± 0.83 ^{aa}	3.00 ± 0.40 ^{aac}	3.86 ± 0.82 ^{aa}
间接胆红素 IBIL	-2.29 ± 1.10	0.08 ± 0.13 ^{aa}	0.08 ± 0.13 ^{aa}	-0.94 ± 0.47 ^{aabbc}	-1.15 ± 0.18 ^{aabbc}
碱性磷酸酶 ALP	230.80 ± 125.00	324.00 ± 57.80 ^{ac}	232.00 ± 54.23 ^b	147.17 ± 36.84 ^{bbc}	172.00 ± 57.23 ^{bb}
葡萄糖 Glu	18.27 ± 4.03	12.04 ± 3.04 ^{aacc}	5.81 ± 2.07 ^{aabb}	9.94 ± 0.60 ^{aacc}	8.16 ± 0.86 ^{aabb}
尿素 UREA	10.05 ± 1.82	6.35 ± 2.01 ^{aa}	5.68 ± 1.05 ^{aa}	6.24 ± 0.66 ^{aa}	5.95 ± 0.49 ^{aa}
肌酐 Cr	17.80 ± 6.53	28.67 ± 6.62 ^{aa}	29.89 ± 7.24 ^{aa}	31.95 ± 5.62 ^{aa}	31.10 ± 3.76 ^{aa}

表 5 大鼠脏器系数测定结果(*n* = 10)

Table 5 Measurement results of organ coefficient in rats (<i>n</i> = 10)					
指标 Index	空白对照组 Control group	实地 24 h 组 Field-24 h group	实地 72 h 组 Field-72 h group	模拟 24 h 组 Simulated-24 h group	模拟 72 h 组 Simulated-72 h group
肺系数/% Lung coefficient/%	0.51 ± 0.09	0.62 ± 0.06 ^{aa}	0.66 ± 0.04 ^{aa}	0.53 ± 0.03 ^{bbc}	0.61 ± 0.07 ^{aa}
心系数/% Heart coefficient/%	0.31 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.01
脑系数/% Brain coefficient/%	0.58 ± 0.03	0.94 ± 0.05 ^{aa}	0.96 ± 0.04 ^{aa}	0.53 ± 0.03 ^{bbc}	0.64 ± 0.07 ^{aabbc}

Vegfa 基因相对表达量均显著升高;模拟 72 h 组脑部的 Hif-1α 和 Vegfa 基因相对表达量均显著升高。

模拟 72 h 组肺部的 Hif-1α 和 Vegfa 基因相对表达量显著低于实地 24 h 组。



注:与空白对照组相比,^{aaa} $P < 0.001$,^{aaaa} $P < 0.0001$ 。与实地 24 h 组相比,^{bbb} $P < 0.001$ 。(下图同)

图 4 血清氧化应激相关指标检测结果($n = 10$)

Note. Compared with control group,^{aaa} $P < 0.001$,^{aaaa} $P < 0.0001$. Compared with field-24 h group,^{bbb} $P < 0.001$. (The same in the following figure)

Figure 4 Detection results of serum oxidative stress-related indicators($n = 10$)

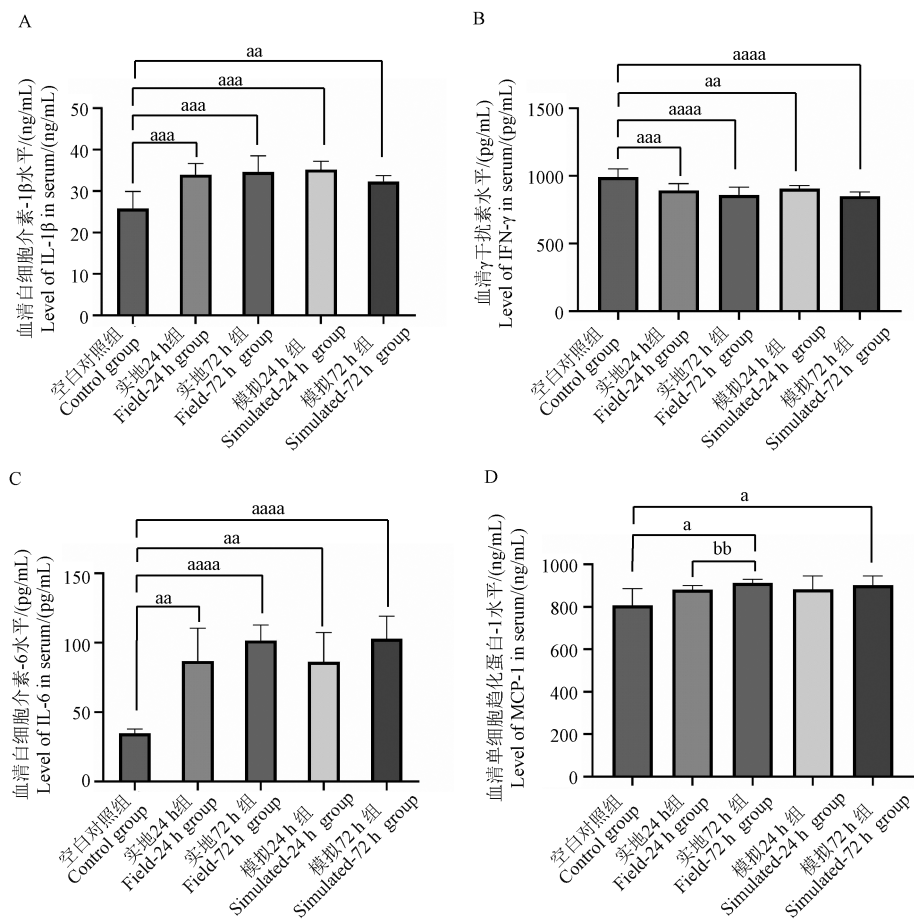


图 5 血清炎症因子检测结果($n = 10$)

Figure 5 Detection results of serum inflammatory factors($n = 10$)

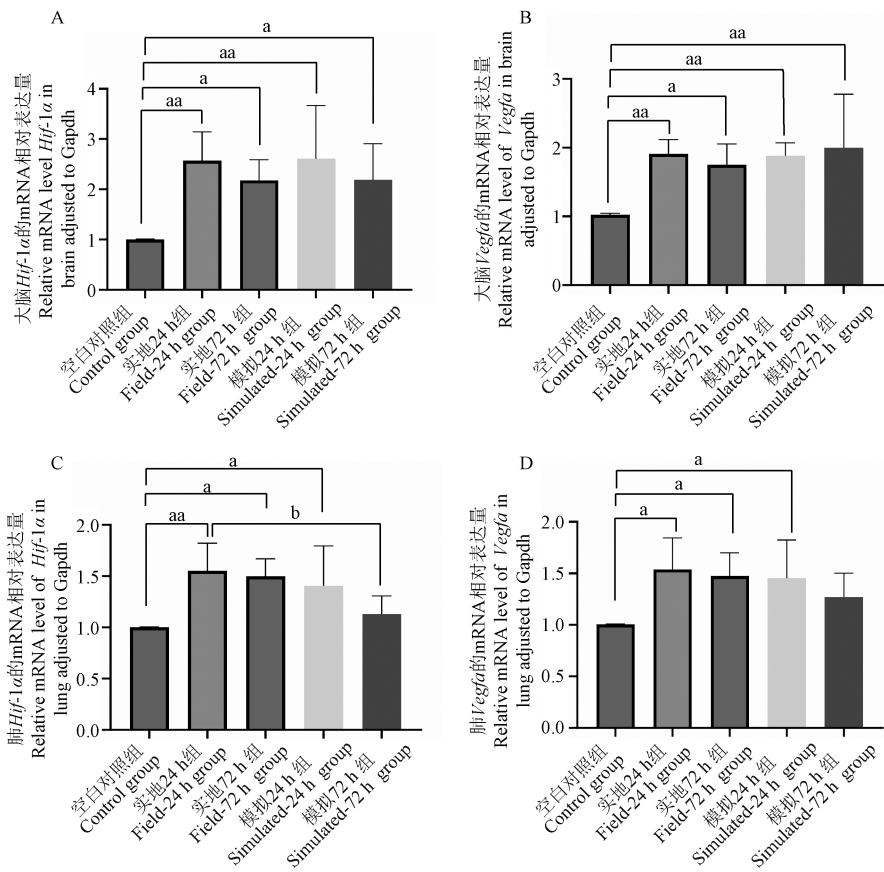


图 6 大鼠低氧敏感基因检测结果($n = 10$)
Figure 6 Detection results of hypoxia sensitive genes in rats($n = 10$)

3 讨论

急进高原医学研究需要稳定可靠的实验动物模型,模拟高原动物实验舱与高原实地实验室同时作为高原医学研究的动物模型构建平台,但两者进行实验之间的差异性国内外至今鲜有研究报道。本研究中,空白对照组饲养于兰州市(海拔 1500 m)进行实验,实地 24 h 组和实地 72 h 组大鼠从兰州出发急进玉树市(海拔 4010 m)进行实验,模拟 24 h 组和模拟 72 h 组在兰州使用模拟高原实验舱将大鼠缓慢升至 4000 m 海拔。暴露 24 h 或 72 h 后,对血气等指标进行测定,并针对同一指标进行统计学分析,观察是否存在显著性差异。

血气检测主要测定人体血液的 H^+ 浓度和溶解在血液中的气体(主要指 CO_2 、 O_2),高原环境中氧分压显著降低,机体与低氧空气不断进行气体交换,血气指标随之发生变化,进而导致全身组织器官的摄氧量受到影响,血气指标反映了低氧环境对机体影响的“第一步”^[6-7]。低氧暴露后,低氧处理组的 PCO_2 和 PO_2 显著降低,说明机体出现氧合不

足和血氧饱和度下降。各低氧处理组 BE 均显著低于空白对照组,继而证实缺氧影响了机体肺氧合功能并出现呼吸性碱中毒合并代谢性酸中毒,使动脉血酸碱度下降。各组间 PO_2 无显著性差异, PCO_2 、 PO_2 和 BE 的变化趋势相同证实了模拟高原动物实验舱与高原实地的环境较为接近。前期研究指出^[8],机体通常在急进高原后 1 ~ 3 d 内发生急进高原反应,3 d 后随着机体对高原环境的适应,高原反应会逐渐缓解。模拟 72 h 组的 PCO_2 和 BE 显著高于其他低氧处理组,说明动物机体在模拟高原动物实验舱暴露 72 h 后 PCO_2 和 BE 有“回弹”迹象,这可能与对高原环境逐渐适应有关,但这一结果的出现明显早于高原实地,提示 2 种平台的环境并非完全相同。

血常规通过观察血细胞的数量变化及形态分布从而判断血液状况及疾病的检查,通常可分为 3 大系统,即红细胞系统、白细胞系统和血小板系统,对机体高原缺氧损伤程度的严重程度进行整体评价具有重要意义^[9-10]。机体急进高原缺氧后,应激反应会使大量 WBC 活化,进而引发脂质过氧化反

应以及白细胞大量渗出等病理变化,导致炎症反应产生。实地 24 h 组、实地 72 h 组和模拟 24 h 组 WBC 显著升高,与上述情况一致。各组 PLT 和 PDW 均显著升高,说明缺氧可能导致机体凝血系统被激活,与前期研究结果相符^[11]。机体缺氧后,血液中的红细胞会代偿性升高,血常规结果中 RBC 和 RDW 在低氧暴露 24 h 后无明显变化,而在暴露 72 h 后显著升高,指示随着暴露时间的延长,红细胞的代偿在显著升高。

生化分析是评价机体血液中的各种糖类、蛋白质以及各种酶等多种代谢产物含量变化的方法^[12]。由生化结果可知,各低氧处理组的 Cr 均显著升高,UREA 均显著降低,说明低氧暴露后大鼠的肾功能受到了损伤。各低氧处理组的 Glu 时间依赖性地显著降低,且 IBIL 显著升高,ALT 显著降低,说明随着低氧暴露时间延长,大鼠机体的内分泌和代谢功能可能逐渐紊乱,证实了机体的虚弱状态。结合实际观察,低氧暴露期间大鼠精神萎靡、不思食欲,这也可能是造成血糖逐渐降低的重要原因。

脏器系数是指脏器重量占大鼠体重的比例,当缺氧导致的心脏、脑、肺等器官炎性渗出、水肿、淤血甚至出现血栓时,会导致器官重量增加,脏器系数升高。结果表明,除模拟 24 h 组外的其他低氧处理组的肺系数和脑系数显著升高,值得注意的是高原实地暴露后的脑系数均显著高于模拟高原动物实验舱,说明同海拔下模拟高原动物实验舱对大鼠脑部的影响可能与高原实地存在差异。这一结果与病理检测结果中实地 24 h 组、实地 72 h 组和模拟 72 h 组的脑部与肺部表现出不同程度的损伤相吻合。

机体从平原进入高原后,组织内血液缺氧,导致氧自由基和活性氧的释放增多等氧化应激过程,引起内皮细胞脂质过氧化和酶羟基化,从而损伤内皮细胞,使炎症因子生成增多。SOD 的生成和活性受到炎症因子的抑制,又和 GSH 一起在清除氧自由基时大量消耗,因此 SOD 和 GSH 的含量和活性降低,而 MDA 的含量增加^[13-14]。MCP-1、IL-6 和 IL-1 β 是重要的促炎因子,而 IFN- γ 具有明显的缓解炎症反应的效果,活性的高低可以提示机体的炎症损伤情况^[15-17]。低氧暴露 24 h 或 72 h 后,各低氧处理组均出现了不同程度的 MDA 升高或 SOD 和 GSH 降低的结果。实地 24 h 组和模拟 24 h 组的 IL-6 和 IL-1 β 显著升高,IFN- γ 显著降低;实地 72 h 和模拟

72 h 组的 IL-6、IL-1 β 和 MCP-1 显著升高,IFN- γ 显著降低。因此,上述结果说明了 2 种胁迫方式下的低氧环境导致机体相似的氧化损伤和炎症反应过程。

病理切片和脏器系数等结果证实了急进高原对大鼠肺部和脑部的影响,本研究团队继而测定了各组大鼠的脑部和肺部组织中 *Hif-1 α* 和 *Vegfa* 的表达。缺氧诱导因子-1 α (*Hif-1 α*) 是一种低氧诱导结合蛋白,研究证实 *Hif-1 α* 是人体对缺氧反应的主要开关,在高原低氧脑损伤的机制中发挥着重要的作用^[18],其受到细胞内氧分压的精细调节^[19],正常状况下很少表达,但缺氧情况下其表达明显上调^[20]。*Hif-1 α* 发挥其生理作用主要是作为调节氧稳态的一种关键转录因子,通过对其下游基因如 *Vegfa*、一氧化氮合酶(NO)、内皮素 1(ET-1)等的转录活性的调控,进而参与缺氧相关疾病。*Hif-1 α* 下游基因中的 *Vegfa* 是一种血管源性生长因子,在缺氧环境中即能提高血管通透性,迁移血管内皮细胞,并可使细胞外基质变性^[21]。本文对各组大鼠脑部和肺部组织中的 *Hif-1 α* 和 *Vegfa* 基因进行比对分析,各低氧处理组大鼠脑部的 *Hif-1 α* 和 *Vegfa* 基因相比空白对照组大鼠显著升高,证实低氧环境下大鼠脑部受到了显著影响。模拟 72 h 组肺部的 *Hif-1 α* 和 *Vegfa* 基因相比空白大鼠无显著性变化,与上述“回弹”结果一致,但该组脑部 *Hif-1 α* 和 *Vegfa* 基因仍显著高于空白对照组,原因可能与肺部和外界空气直接接触,受外界影响更加直接和迅速有关。其余各组大鼠肺部的 *Hif-1 α* 和 *Vegfa* 基因相比空白大鼠显著升高,证实其肺部此时处于明显的缺氧状态。各低氧处理组脑部两基因无显著性差异,模拟 72 h 组肺部两基因显著低于实地 24 h 组,与实地 72 h 组无显著性差异,这些结果说明模拟高原实验舱与高原实地差异较小。

综上所述,在上述 2 种低氧胁迫方式下暴露 24 h 或 72 h 后,大部分检测指标趋势相同且无显著性差异,证明急进 4000 m 海拔的模拟高原动物实验舱可建立与急进高原实地相近的急进高原模型,证实了同海拔状况下模拟高原动物实验舱在很大程度上模拟了高原实地环境,具有良好的可靠性。但是,急进 4000 m 海拔的模拟高原动物实验舱 24 h 的病理分析结果证明其对脑部和肺的影响较小,而暴露 72 h 后部分指标出现了回弹,指示在模拟高原动物实验舱(4000 m)急进高原模型建立的最佳时

间应大于 24 h 但略短于 72 h,后期可对 36、48、60 h 等进行实验探讨,确定最佳造模时间。实验室前期使用大鼠在 6000 m 模拟海拔暴露 72 h 后 PCO₂ 未出现指标“回弹”现象,指示可能实验结果与海拔的强相关性,急进高原模型的建立也可以适当提高模拟海拔,不同模拟海拔的影响值得进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] LUKS A M, SWENSON E R, BÄRTSCH P. Acute high-altitude sickness [J]. Eur Respir Rev, 2017, 26(143): 160096.

[2] BOTTURA R M, LIMA G H O, HIPOLIDE D C, et al. Association between ACTN3 and acute mountain sickness [J]. Genes Environ, 2019, 41: 18.

[3] GARRIDO E, BOTELLA DE MAGLIA J, CASTILLO O. Acute, subacute and chronic mountain sickness [J]. Rev Clin Esp, 2021, 221(8): 481-490.

[4] FRANK F, KALTSEIS K, FILIPPI V, et al. Hypoxia-related mechanisms inducing acute mountain sickness and migraine [J]. Front Physiol, 2022, 13: 994469.

[5] DERSTINE M, JEAN D, BEIDLEMAN B A, et al. Acute mountain sickness and high altitude cerebral edema in women; a scoping review-UIAA medical commission recommendations [J]. High Alt Med Biol, 2023, 24(4): 259-267.

[6] JIA Z, ZHAO X, LIU X, et al. Impacts of the plateau environment on the gut microbiota and blood clinical indexes in Han and Tibetan individuals [J]. mSystems, 2020, 5(1): e00660-e00619.

[7] LUO B, WANG R, LI W, et al. Pharmacokinetic changes of norfloxacin based on expression of MRP2 after acute exposure to high altitude at 4300 m [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 1078-1085.

[8] 吴天一. 吴天一高原医学 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社; 2020.

WU T Y. Wu Tianyi high altitude medicine [M]. Wuhan: Hubei Science and Technology Press; 2020.

[9] AJUWON B I, ROPER K, RICHARDSON A, et al. Routine blood test markers for predicting liver disease post HBV infection: precision pathology and pattern recognition [J]. Diagnosis, 2023, 10(4): 337-347.

[10] SUN H, YIN C Q, LIU Q, et al. Clinical significance of routine blood test-associated inflammatory index in breast cancer patients [J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 5090-5095.

[11] 王宁, 马慧萍, 武柠子, 等. 急性缺氧对大鼠部分生理病理变化的影响 [J]. 中南药学, 2017, 15(7): 883-888.

WANG N, MA H P, WU N Z, et al. Effect of acute hypoxia on

the physiological and pathological changes in rats [J]. Cent South Pharm, 2017, 15(7): 883-888.

[12] 次仁曲珍. 血生化指标检测对高原移居者出现高原病症状诊断的意义 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(5): 109-110.

CIREN Q Z, The significance of blood biochemical index detection in the diagnosis of symptoms of altitude disease in high-altitude immigrants [J]. World Latest Med Inform, 2016, 16(5): 109-110.

[13] YUHAI G U, ZHEN Z. Significance of the changes occurring in the levels of interleukins, SOD and MDA in rat pulmonary tissue following exposure to different altitudes and exposure times [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(3): 915-920.

[14] 于前进, 孔佩艳. 与高原红细胞增多症有关的血清炎症因子的研究进展 [J]. 西南国防医药, 2014, 24(9): 1026-1027.

YU Q J, KONG P Y. Research progress of serum inflammatory factors related to high altitude polycythemia [J]. Med J Natl Defending Forces Southwest Chin, 2014, 24(9): 1026-1027.

[15] THOMPSON M, BRITT R D Jr, PABELICK C M, et al. Hypoxia and local inflammation in pulmonary artery structure and function [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 967: 325-334.

[16] ALCHIKH M, CONRAD T, HOPPE C, et al. Are we missing respiratory viral infections in infants and children? Comparison of a hospital-based quality management system with standard of care [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(3): 380.

[17] LUNDEBERG J, FEINER J R, SCHOBBER A, et al. Increased cytokines at high altitude; lack of effect of ibuprofen on acute mountain sickness, physiological variables, or cytokine levels [J]. High Alt Med Biol, 2018, 19(3): 249-258.

[18] TANG B, QU Y, MU D. Research progress of hypoxia inducible factor 1alpha in hypoxic-ischemic injury [J]. Chin J Reparative Reconstr Surg, 2009, 23(6): 755-758.

[19] KE Q, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HiF-1) [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(5): 1469-1480.

[20] ROWLAND K J, YAO J, WANG L, et al. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha and hemodynamic responses following massive small bowel resection [J]. J Pediatr Surg, 2013, 48(6): 1330-1339.

[21] WANG Z W, CHEN L, HAO X R, et al. Elevated levels of interleukin-1β, interleukin-6, tumor necrosis factor-α and vascular endothelial growth factor in patients with knee articular cartilage injury [J]. World J Clin Cases, 2019, 7(11): 1262-1269.