

心肺复苏后大鼠脑线粒体通透性转换孔变化在细胞能量代谢障碍中的作用及机制

马宇洁 杨兴易 林兆奋 缪明永 张 雷 宁 波 李一粟 刘 涛 刘 磊

摘 要 **目的** 研究大鼠心跳骤停/心肺复苏后神经细胞线粒体通透性转换孔的变化在能量代谢障碍中的作用及可能机制。**方法** 首先建立窒息联合冰氯化钾致大鼠心跳骤停、心肺复苏的动物模型,断头后提纯大脑皮质组织内线粒体,采用分光光度法测定线粒体 MPTP 在不同时相的开放程度,应用高效液相法测定脑细胞 ATP、ADP 和 AMP 含量。**结果** 心跳骤停/心肺复苏后大鼠神经细胞线粒体功能明显受损,ROSC 后神经细胞 MPTP 持续处于开放状态,开放程度并不是瞬间增至最大,而是具有时间依赖性。ROSC 后 6h 内神经细胞 MPTP 开放程度保持低水平,6h 以后开始迅速大量开放,12h 开放程度达到最大,24h 开放程度略有缩小,表明线粒体开始收缩,至 48h 开放程度再次加大,72h 又明显缩小,但未达到正常水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。ROSC 后各组 ATP 含量较对照组均下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),72h 较对照组略有升高,但无统计学意义,各组比较线粒体合成 ATP 能力在 CA/CPR 并 ROSC 后呈双相变化即在 ROSC 后 3h 和 24h 分别出现两个合成低谷。**结论** CPR 后 MPTP 开放是加重神经细胞能量代谢障碍的主要原因,线粒体能量代谢和氧化磷酸化功能严重受损,导致 ATP 产生短时内骤降;促使了 MPTP 的进一步开放。

关键词 大鼠 心肺复苏 线粒体 通透性转换 能量代谢障碍

The Role of MPTP in Energy Dysmetabolism of Neural Cells post Cardiopulmonary Resuscitation in Rats. Ma Yujie, Yang Xingyi, Lin Zhaofen, et al. Intensive Care Unit, General Air Army Hospital, PLA, Beijing 100142, China

Abstract Objective To investigate the opening degree and rules of neurocyte mPTP post Cardiopulmonary resuscitation, and study the relationship between the mitochondria energy dysmetabolism and the MPTP. **Methods** Sprague Dawley rats' cardiac arrest was induced by asphyxiation and ice - cold for 5 minutes of no circulation. 56 male Sprague Dawley rats were randomly divided into 7 groups with each group of 8 rats. After cardiopulmonary resuscitation, the rats were allowed to reperfuse spontaneously for 3h, 6h, 12h, 24h, 48h and 72h. The rats were killed by decapitation and the brains were removed, weighed and processed for isolation of mitochondria. Determinations of the mitochondrial permeability transition were based on the absorbance changes of the mitochondrial suspension at 540nm. The levels of ATP(adenosine triphosphate), ADP(adenosine diphosphate) and AMP(adenosine monophosphate) in brain tissue were determined by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Results** Mitochondrial respiratory function was severely injured after CA/CPR. MPTP of T Neural cells always remained opening post ROSC. The opening degree of MPTP did not reach the peak instantly, while its change depended on time. It remained low level within 6h post ROSC, then rapidly opened, till 12h reached the peak, and at 24h post ROSC slightly shrunken. All these suggested that mitochondria started to shrink. While at 48h the opening degree largen again, shrunken once more at 72h, but did not reach the normal level($P < 0.05$ or $P < 0.01$). While there existed two low point at 3hour and 24hour post cardiopulmonary resuscitation respectively. **Conclusion** The opening of mPTP is the main cause of neurocyte energy dysmetabolism. It is critical to take measure to inhibit the opening of mPTP within 12h post ROSC.

Key words Rats; Cardiopulmonary resuscitation; Mitochondria; Mitochondrial permeability transition pore; Energy dysmetabolism

脑组织对缺氧极为敏感,心跳骤停/心肺复苏(CA/CPR)所引起的能量代谢障碍主要与线粒体的

结构与功能受损有关,线粒体功能障碍是中枢神经系统损伤的重要机制^[1]。线粒体是细胞能量代谢的中心,线粒体中分布着三羧酸循环和电子传递系统,是细胞氧化磷酸化反应产生 ATP 的重要场所,有细胞“动力厂”之称,调控着细胞能量代谢和凋亡通路。保持线粒体自身稳定和生物能量转换的正常进行对于神经细胞显得尤为重要,因为它们几乎完全依赖线

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500173)

作者单位:100142 北京,空军总医院重症监护科(马宇洁、宁波、李一粟、刘涛、刘磊);上海,第二军医大学附属长征医院急救科(杨兴易、林兆奋、张雷);上海,第二军医大学基础部生物化学与分子生物学线粒体功能室(缪明永)

粒体产生 ATP,维持正常功能。线粒体呼吸功能和 ATP 合成能力代表着线粒体的正常功能,其功能降低意味着细胞能量代谢出现障碍,脑缺血再灌后细胞能量代谢的恢复是细胞其他功能恢复的基础,若细胞能量代谢障碍持续存在,则必然导致细胞最终死亡(凋亡或坏死)^[2,3]。对肝脏和心脏的大量研究表明线粒体通透性转换的形成(MPT)是细胞损伤结局凋亡或坏死的共同通路^[4~6]。近年来对局灶性脑缺血模型研究表明 MPT 也发生于神经细胞中,对严重全脑缺血再灌注损伤,如心跳骤停导致的神经细胞能量代谢障碍中 MPTP 开放发挥怎样的作用,是同时出现亦或因果关系^[7];MPTP 开放程度与细胞能量代谢障碍严重程度是否具有相关性;心肺复苏后神经细胞 MPTP 开放的时间变化曲线如何等问题值得深入研究,因为这决定着心肺复苏后脑损伤靶位及治疗的最佳时间窗。

材料与方法

1. 动物模型制备及分组:健康成年雄性 Sprague Dawley (SD)大鼠 56 只。实验动物由第二军医大学实验动物中心提供。随机分为 7 组,每组 8 只,对照组即假手术组、ROSC 后 3h 组、ROSC 后 6h 组、ROSC 后 12h 组、ROSC 后 24h 组、ROSC 后

48h 组、ROSC 后 72h 组。动物分别在各时相点断头处死,采集标本,在处死时相之前发生死亡的,则该动物的实验数据宣布无效,另外进行补充实验,保证在处死时相每组 8 只动物。对照组:仅进行股动、静脉及气管插管等手术操作,不进行心跳骤停和心肺复苏。窒息合并冰氯化钾停跳液制备大鼠心跳骤停心肺复苏模型,停跳 5min 后开始心肺复苏^[8]。所有实验参数设计和记录均参照复苏实验研究的 Utstein 模式^[9]。

2. 脑线粒体的分离:将称重后脑组织迅速放入玻璃匀浆器中,采用差速离心法分离线粒体^[10]。

3. 大鼠神经细胞 MPT 的测定:分光光度法对反应体系的吸光度进行扫描,就可获得线粒体渗透转换能力变化,间接反映了 MPT 的能力,参照文献稍作改良^[11]。

4. ATP、ADP、AMP 的测定:高效液相及紫外检测法(HPLC)测定脑细胞 ATP、ADP 和 AMP 含量。按文献的方法加以改良^[12]。

5. 统计学处理:采用 SPSS11. 5for Windows 统计软件分析。实验数据计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验和相关分析, $P < 0.05$ 为相差有显著性意义, $P < 0.01$ 为相差非常显著, $P > 0.05$ 为无显著性差异。

结 果

1. 各组大鼠间 CA/CPR 的基本参数比较:各组间体重、 T_{CA} 和 T_{ROSC} 的参数比较无显著差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各组大鼠体重及复苏参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体重(g)	T_{CA} (s)	T_{ROSC} (s)
对照组	8	302 ± 5	—	—
ROSC - 3h	8	292 ± 26	137.3 ± 10.2	64.4 ± 9.3s
ROSC - 6h	8	301 ± 11	141.8 ± 12.5	68.2 ± 10.7
ROSC - 12h	8	297 ± 15	132.4 ± 6.4	61.4 ± 7.8
ROSC - 24h	8	296 ± 27	137.4 ± 10.0	62.9 ± 7.3
ROSC - 48h	8	305 ± 16	138.6 ± 12.7	62.3 ± 11.2
ROSC - 72h	8	296 ± 19	136.5 ± 12.9	67.4 ± 9.2

2. CA/CPR 大鼠 ROSC 后不同时相神经细胞 MPTP 开放的变化:心肺复苏大鼠 ROSC 后不同时相内,神经细胞线粒体 D_{540} 均低于对照组,但 ROSC 后 3h 和 6h D_{540} 下降迅速极其缓慢,其后下降速度加快,至 12h 降至最低,以后缓慢上升,ROSC 后 48h 再次下降,出现一个小的波谷,以后逐渐上升,72h 达到高峰,但仍显著低于对照组 ($P < 0.01$)。这表明 ROSC 后神经细胞线粒体 MPTP 持续处于开放状态,开放程度并不是瞬间增至最大,而是表现为时间依赖性,具体表现为在 ROSC 后 6h 以内开放程度保持低水平,6h 以后开始迅速大量开放,直至 12h 开放程度达到最大。但并没有一直维持这一水平,而是在 ROSC 后 24h 开放程度略有缩小,表明线粒体开始收缩,至 48h

开放程度再次加大,72hMPTP 明显缩小,但未达到正常水平,见表 2、图 1。

表 2 CA/CPR 大鼠 ROSC 后不同时相神经细胞 MPTP 开放的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值	<i>n</i>
对照组	0.49 ± 0.06	8
3h	0.47 ± 0.08	8
6h	0.48 ± 0.09	8
12h	0.22 ± 0.06 *	8
24h	0.33 ± 0.05 *	8
48h	0.30 ± 0.05 *	8
72h	0.38 ± 0.03 *	8

与对照组比较, * $P < 0.05$

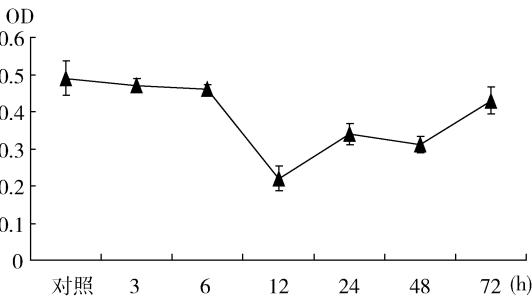


图 1 心肺复苏 ROSC 后各组 MPTP 的变化曲线

3. 心肺复苏 ROSC 后各组 ATP、ADP、AMP 的变化:ROSC 后各组 ATP 含量较对照组均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),72h 较对照组略有升高,但无统计学意义,可见缺氧可显著降低大鼠脑线粒体内 ATP 的含量,这与缺氧使线粒体 ATP 的合成能力降低有关,各组比较线粒体合成 ATP 能力在 CA/CPR 并 ROSC 后呈双相变化即在 ROSC 后 3h 和 24h 分别出现两个合成低谷见表 4。

表 4 心肺复苏 ROSC 后各组 ATP、ADP、AMP 变化 (单位: $\mu\text{mol/g}, \bar{x} \pm s$)

组别	ATP	ADP	AMP
对照组	2.16 ± 0.40	2.35 ± 0.40	6.86 ± 1.09
R-3h	1.78 ± 0.19 *	3.27 ± 0.28 *	8.96 ± 1.15 *
R-6h	1.49 ± 0.30 **	2.87 ± 0.44 *	6.59 ± 1.67
R-12h	1.70 ± 0.18 *	2.89 ± 0.23 *	7.90 ± 1.67
R-24h	1.52 ± 0.18 **	3.20 ± 0.74 *	8.16 ± 2.94 *
R-48h	1.58 ± 0.06 **	2.57 ± 0.33	6.54 ± 3.70
R-72h	3.02 ± 0.61	5.34 ± 0.76 *	7.82 ± 3.46

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, 明显差别; ** $P < 0.01$, 显著差别

讨 论

目前研究认为 MPT 的启动是细胞受损后死亡或凋亡的共同通路。而位于线粒体内膜的 MPT 孔的开放形成了 MPT。MPT 的结构分子组成尚未完全确定,通常认为是一种蛋白复合体,组成包括位于线粒体内膜的腺嘌呤核苷酸转位酶 (adenine nucleotide translocase, ANT)、位于线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道 (voltage dependent anion channel, VDAC) 和位于线粒体基质的环孢菌素 A 受体 D (cyclophilinD, CyPD) 所组成^[13]。影响 MPT 的因素很多,MPTP 主要是通过线粒体内膜电位的变化、氧化应激和激动剂与拮抗剂之间的相互作用来进行调控^[14]。脑缺血再灌注后细胞能量代谢的恢复是细胞其他功能恢复的基础,若细胞的能量代谢障碍持续存在则必然导致细

胞最终死亡。线粒体的能量储备在细胞死亡中起着决定性的作用;细胞是死亡还是存活,ATP 起到“刻度尺”的作用,而线粒体则起到“转换器”的作用^[15];如果损伤程度相对轻微,线粒体合成 ATP 的能力得以保留以提供细胞凋亡或存活所需的能量,则发生凋亡或存活;若损伤严重,线粒体合成的 ATP 急剧耗竭,则细胞坏死。Aukarcrona 等^[16]的研究表明,细胞内 ATP 水平耗竭在 25% ~ 70% 细胞将以凋亡的形式死亡,而大于 70% 时将以坏死的形式死亡;而 Richter 等^[17]则认为细胞内 ADP/ATP 为 0.2 是所有细胞存活或凋亡的决定因素,即大于此值时细胞发生凋亡,相反,低于此值时,细胞将存活。能量衰竭是引发脑缺血后损伤机制的关键步骤。ATP 作为重要的供能物质,是直接反映脑能量代谢的指标。

本实验研究结果表明:ROSC 后神经细胞线粒体 MPTP 持续处于开放状态,开放程度并不是瞬间增至最大,而是一个渐变的过程,具体表现为在 ROSC 后 6h 以内开放程度保持低水平,6h 以后开始迅速大量开放,直至 12h 开放程度达到最大。但并没有一直维持这一水平,而是在 ROSC 后 24h 开放程度略有缩小,表明线粒体开始收缩,至 48h 开放程度再次加大,72hMPTP 明显缩小,但未达到正常水平。有研究表明分离的正常脑线粒体,与肝线粒体比较 MTPT 不容易被 Ca^{2+} 诱导^[18],但当神经细胞线粒体被部分去极化后,MPTP 被激活,并且能够被 CsA 所阻断^[19]。少量的 Ca^{2+} 负载能够为神经细胞线粒体所缓冲,被线粒体隔离的 Ca^{2+} 能够通过 MPTP 释放^[20]。另外,不同脑区域的能量代谢障碍的线粒体对 PT 的敏感性也是不同的。例如海马区线粒体对 Ca^{2+} 诱导的 PT 更敏感,而小脑区域的线粒体则不敏感,有意思的是海马区也是缺血和低血糖后最容易受损的脑区域之一。由于神经细胞的高代谢率,自由基很容易在神经细胞线粒体内产生,因此在病理情况下,MPTP 会持续存在。

心肺复苏 ROSC 后神经细胞线粒体出现钙超载,自由基产生骤增,出现再灌注损伤,从而诱导 MPTP 的产生。通过本实验我们可以看到,ROSC 后神经细胞 MPTP 出现较早,但直至 12h 开放到最大,这可能提示 MPTP 在早期神经细胞坏死中已开始发挥,如果此刻能够应用有效抑制 MPTP 开放的药物,将难免神经细胞进一步坏死发生。大鼠心跳骤停后,经心肺复苏 ROSC 后呼吸功能在较短时间内迅速被破坏,而且程度较严重,经历了 ROSC 后 6h 脑水肿最严重的

阶段后,细胞功能开始恢复,而此刻 MPTP 开始逐渐开放,释放超载的钙离子,细胞色素 C 等诱导细胞的凋亡。我们同时也发现,ROSC 后 ATP 合成较对照组明显下降,以 6h 组为最低,12h 组出现反弹是小高峰,24h 组及 48h 组开始略有回降,至 72h 代偿明显甚至高于正常对照组,但这种升高没有统计学意义。说明由于神经细胞缺氧严重,线粒体能量代谢和氧化磷酸化功能严重受损,导致 ATP 产生短小时内骤降;这也促使了 MPTP 的进一步的开放,72h 组 ATP 高于对照组,考虑缺血再灌注 48h 后线粒体功能开始恢复,并代偿性增高。我们实验表明再灌注期虽然氧的供应恢复,但线粒体功能在多种损伤因素如自由基病理、细胞内酸中毒、钙稳态破坏和游离脂肪酸等攻击下没有得到恢复有关。

我们的研究表明细胞能量代谢障碍先于 MPTP 的开放,但 MPTP 的开放会加剧能量代谢障碍,表现为线粒体 R3 值在 ROSC 后 24h 再次出现下降趋势,ATP 的合成能力也表现为双相,即在 ROSC 后开始 3h 和 24h 两个合成低峰,可能的解释是 ATP 的降低促进了 MPTP 的开放,当损伤达到促使 MPTP 的开放程度后,又进一步抑制了 ATP 的合成,使损伤加剧。如果在 ROSC 后早期能够及时应用抑制 MPTP 开放的药物,可形成正循环,使神经细胞的功能朝着良性的方向发展,为神经功能的恢复赢得机会。

参考文献

- 1 Kann O, Kovacs R, Njunting M, *et al.* DMetabolic dysfunction during neuronal activation in the ex vivo hippocampus from chronic epileptic rats and humans. [J]. Brain, 2005, 128 (Pt 10): 2396 - 2407
- 2 Bustamante J, Czerniczyniec A, Lores - Arnaiz S. Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function [J]. Front - Biosci, 2007, 12 (1): 1034 - 1040
- 3 Mancuso C, Scapagini G, Curro D, *et al.* Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders[J]. Front - Biosci, 2007, 12 (1): 1107 - 1123
- 4 Kim JS, He L, Qian T, *et al.* Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304 (3): 463 - 470
- 5 Clarke S J, McStay G P, Halestrap A P, *et al.* Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin - D at a different site from cyclosporin A [J]. Biol. Chem, 2002, 277 (38): 34793 - 34799

- 6 Martin C. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. [J]. Biochem J, 1999, 341 (Pt2): 233 - 249
- 7 Nieminen AL, Petrie TG, Lemasters JJ, *et al.* Cyclosporin A delays mitochondrial depolarization induced by N2methyl2 - aspartate in cortical neurons: evidence of the mitochondrial permeability transition [J]. Neuroscience, 1996, 75 (4): 993 - 997
- 8 马宇洁, 杨兴易, 林兆奋, 等. 心搏骤停后脑复苏研究的动物模型 [J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16 (9): 957 - 960
- 9 Ahamed H, Idris, Lance B Becker, *et al.* Utstein - style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research [J]. Resuscitation, 1996, 33 (1): 69 - 84
- 10 林兆奋, 缪明永, 王学敏, 等. 一氧化氮合酶抑制剂对鼠脑缺血再灌注后线粒体呼吸功能的保护作用 [J]. 中华神经科杂志, 1998, 31 (2): 109 - 111
- 11 Kristal BS, Brown AM. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition [J]. Biol Chem, 1999, 274 (33): 23169 - 23175
- 12 K. Le Quoc, D Le Quoc. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium - induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site [J]. Arch. Biochem. Biophys, 1988, 265 (2): 249 - 257
- 13 Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, *et al.* Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. Biochim [J]. Biophys. Acta, 1998, 1366 (1 - 2): 79 - 94
- 14 G. Kroemer, J C Reed. Mitochondrial control of cell death [J]. Nat. Med, 2000, 6 (5): 513 - 519
- 15 Richter C, Schweizer M, Cossarizza A, *et al.* Control of apoptosis by the cellular ATP level [J]. FEBS Letters, 1996, 378 (2): 107 - 110
- 16 Ankarcrone M, Dypbukt JM, Bonfoco E, *et al.* Glutamate - induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function [J]. Neuron, 1995, 15 (6): 961 - 973
- 17 Escuret E. Cerebral ischemic cascade [J]. Ann Fr Anesth Reanim, 1995, 14 (1): 103 - 113
- 18 Berman SB, Watkins SC, Hastings TG. Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria [J]. Exp Neurol, 2000, 164 (2): 415 - 425
- 19 Brustovetsky N, Dubinsky JM. Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria [J]. J Neurosci, 2000, 20 (22): 8229 - 8237
- 20 Murchison D, Griffith WH. Mitochondria buffer non - toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/ calcium exchanger in rat basal forebrain neurons [J]. Brain Res, 2000, 854 (1 - 2): 139 - 151

(收稿: 2010 - 05 - 19)