二氮嗪对心肺复苏后脑线粒体的影响

吴海东[1]，王 鹏[1]，黄 勇[2]，吴满辉[1]，林嘉莉[1]，黄子通[1]
（1. 中山大学孙逸仙纪念医院急诊科/中山大学心肺脑复苏研究所，广东 广州 510120；2. 南海狮山华立医院，广东 南海 528200）

摘 要：【目的】探讨二氮嗪能否通过开放线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitoKATP)起到抗氧化应激和保护线粒体的结构和功能，减轻缺血再灌注引起的脑细胞损伤。【方法】经窒息诱导的心脏停搏(CA)和心肺复苏(CPR)成功的雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 24 只，恢复自主循环(ROSC)后 30 min，用抽签法随机分为 3 组，每组 8 只，分别为载体(Vehicle)组：给予 0.1 mol/L 二甲基亚砜(DMSO) 1 mL 腹腔注射；二氮嗪(DZ)组：给予 DZ(10 mg/kg)腹腔注射(DZ 溶解在 0.1 mol/L DMSO 1 mL 中，下组相同)；DZ+5-羟基癸酸盐(DZ+5-HD)组：给予 DZ(10 mg/kg)腹腔注射，同时给予 5-HD(5 mg/kg)腹腔注射。另设假手术组(Sham)5 只。手术后或复苏后 24 h 处死各组动物，取脑皮质进行丙二醛(MDA)、活性氧族(ROS)和超氧化物歧化酶 2(SOD2)检测，提取线粒体测定呼吸控制率(RCR)和用电子显微镜观察脑皮质超微结构。【结果】复苏后 24 h 脑组织 MDA 和 ROS 浓度升高，SOD2 活性下降，RCR 下降，线粒体结构出现损坏；DZ 干预后 MDA 和 ROS 浓度下降，SOD2 活性上升，RCR 上升，线粒体结构得到保护；但经 5-HD 共同干预后 DZ 的保护作用被取消。【结论】DZ 通过开放 mitoKATP 通道可起到抗氧化应激损伤、保护线粒体结构和功能的作用，减轻复苏后脑损伤。

关键词：心肺复苏；脑损伤；线粒体 ATP 敏感性钾通道；二氮嗪
中图分类号：R459.7 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-3554(2016)05-0686-06

Effect of Diazoxide on Cerebral Mitochondrion after Cardiopulmonary Resuscitation

WU Hai-dong[1], WANG Peng[1], HUANG Yong[2], WU Man-hui[1], LIN Jia-li[1], HUANG Zi-tong[1]
(1.Department of Emergency, Sun-Yat-Sen Memorial Hospital, Sun-Yat-Sen University; Institute of Cardiopulmonary Cerebral Resuscitation, Sun-Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Huali hospital of Nanhai Shishan, Nanhai 528200, China)
Corresponding to: HUANG Zi-tong; E-mail: syxhzt@163.com

Abstract: 【Objective】 To investigate whether postresuscitation neuroprotective effects of diazoxide (DZ) is by opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel to anti-oxidative stress and to protect the mitochondria structure and function. 【Methods】 Asphyxias cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation (CPR) animal model were established in SD rats. Five male rats in sham group were only received sham operation but not induced cardiac arrest for control. After experienced cardiac arrest and CPR, 24 male rats that return of spontaneous circulation (ROSC) were randomly assigned to 3 groups (n=8) and followed by intraperitoneal injected of 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO)1 mL, DZ 10 mg/kg or DZ 10mg/kg co-treatment with 5-hydroxydecanoate (5-HD) 5mg/kg respectively. The brains were quickly excised after ROSC 24h. Methane dicarboxylic aldehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) content and activity of manganese superoxide dismutase (SOD2) were also detected by ELISA. Mitochondrial respiratory control ratio (RCR) was detected; ultrastructure of brain cells was observed by Transmission

收稿日期：2016-01-25
基金项目：广东省科技计划社会发展项目(2012B031800084，2014A020212624)
作者简介：吴海东，主治医师，医学博士，研究方向：心肺脑复苏，E-mail: wywhd@163.com；黄子通，通信作者，教授，博士生导师，E-mail：syxhzt@163.com

Electron Microscopy.【Results】After resuscitation 24h, the contents of MDA and ROS of cerebral tissue of rat increased, activity of SOD2 decreased, RCR decreased and the ultrastructure of mitochondrial was damaged. After administration of DZ, the contents of MDA and ROS of cerebral tissue of rat decreased, activity of SOD2 increased, RCR increased and the ultrastructure of mitochondrial was integrity. But the effects of DZ were abrogated by co-treatmented with 5-HD.【Conclusion】Diazoxide attenuates postresuscitation brain injury by opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel to anti-oxidative stress and to protect the mitochondria structure and function.

Key words: cardiopulmonary resuscitation; brain injury; mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; diazoxide

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2016,37(5):686-691]

心脏停博（cardiac arrest,CA）经心肺复苏（cardiopulmonary resuscitation,CPR）后，由于缺血和再灌注损伤导致明显的脑神经功能损害，而复苏后神经功能损害将影响患者存活率和远期生存质量。复苏后脑功能能否恢复是评价心肺脑复苏是否成功的最重要指标。目前对复苏后脑损伤临床上仍缺乏有效的治疗手段。低温可改善心脏骤停后脑损伤患者的预后，但由于存在多种并发症而影响了其在临床的使用[1]。而近年来研究发现线粒体在缺血再灌注损伤中有重要的作用，是一个非常有潜能的治疗靶点[2]。二氮嗪（diazoxide，DZ）通过开放线粒体钾通道可起到抗氧化和保护线粒体的结构和功能，可减轻缺血再灌注引起的脑细胞损伤[3]。本研究拟通过 DZ 复苏后给药，观察 DZ 对心脏骤停复苏后脑组织线粒体结构和功能的影响，为寻找脑复苏新的治疗方法提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂

雄性 SD 大鼠，身体质量（300±50）g，由中山大学动物实验中心提供（许可证号 SCXK（粤）2012—0081）。本研究所自行研制的大鼠 CPR 装置（中山大学心肺脑复苏研究所，国家发明专利号：ZL200610037154.3）；Spacelab（美国）多参数生理参数监护仪；呼气末二氧化碳（$PETCO_2$）分析仪（CAPSTAR-100，CWE Inc.）；Hansatech 公司（UK）Clark 氧电极；FEI 公司（Holland）透射电子显微镜。

1.2　复苏模型制备

参照本实验室既往研究方法[4]。SD 大鼠术前晚禁食但不禁水，戊巴比妥钠 45 mg/kg 腹腔内麻醉，备皮，仰卧位固定，经口直视插入 14 号气管鞘管，气管插管末端连接 $PETCO_2$ 分析仪监测 $PETCO_2$。左股动脉置入 23 号 PE-50 聚乙烯管监测主动脉压。持续监测肢体Ⅱ导联心电图；用加热灯维持肛温在（36.5 ± 0.5）℃，并持续监测肛温。手术操作完成后 30 min 夹闭气管插管诱导 CA，CA 持续 6 min 不处理后利用 CPR 装置进行频率为 250 min^{-1} 的胸外按压和 50 min^{-1} 的同步机械通气。按压深度为胸廓前后径的 1/3，吸入氧浓度为 100%，复苏持续约 3 ~ 6 min 直至恢复自主循环。

1.3　实验分组和复苏后处理

雄性 SD 大鼠 35 只，随机分为 4 组。Sham 组 5 只：仅行麻醉、气管插管、动静脉置管，不诱导窒息 CA 和进行 CPR；其余 30 只窒息诱发 CA，其中 24 只经过 CPR 成功，ROSC 30 min 用抽签法随机分为 3 组，每组 8 只，Vehicle 组：给予 0.1 mol/L DMSO 1 mL 腹腔注射；DZ 组：给予 DZ（10 mg/kg）（DZ 溶解在 0.1 mol/L DMSO 中，下组相同）腹腔注射。DZ+5-HD 组：给予 DZ（10 mg/kg）腹腔注射，同时给予 5-HD（5 mg/kg）（溶解于生理盐水中）腹腔注射。复苏后继续机械通气和持续监测血压和心率 2 h，如果生命体征平稳则停止机械通气和拔除各种导管，放回笼中观察。手术后或复苏后 24 h 处死各组动物行相关检测。

1.4　MDA、ROS 和 SOD2 检测

大鼠断头取脑，分离新鲜的脑组织，放入-80 ℃冰箱集中保存检测。脑组织丙二醛（MDA）和活性氧族（ROS）浓度用商用的大鼠检测试剂盒（由南京建成生物工程研究生产）依照操作说明书按酶联免疫法（ELISA）进行检测。SOD2 活性用Cusabio 大鼠 SOD2 ELISA 试剂盒依照操作书说明进行检测。

1.5 脑线粒体分离和线粒体呼吸功能测定

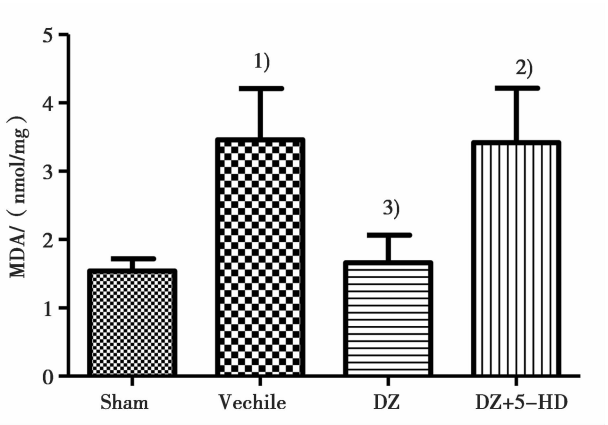
大鼠断头取脑后,立即分离新鲜的脑组织,称重后放入预冷的 Dounce 匀浆器。按 1:10 体积加入线粒体分离介质匀浆 10 次至无脑组织块。低温离心提取线粒体。按 1:0.4 体积加入分离介质重悬线粒体,置于冰槽保存待检。整个操作在 0 ~ 4 ℃冰浴中进行。采用 Clark 氧电极法检测提取的线粒体的Ⅳ态呼吸(R4)、Ⅲ态呼吸(R3)和计算线粒体呼吸控制率(RCR)=R3/R4。

1.6 电镜形态学观察

处死动物后,迅速剪取大脑皮质组织,浸泡入预冷的戊二醛固定液中固定。在固定液环境中将组织块修剪成绿豆大小。更换固定液,密封小瓶封装,4 ℃保存。按照电镜标本常规制备程序进行后固定、脱水、环氧树脂包埋,超薄切片后行铅铀电子染色,置于透视电镜下观察超微结构并拍照,观察线粒体的结构和形态改变。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数间比较采用单因素方差分析, 如方差分析有统计学意义,再进行组间两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



1):$P < 0.05$ vs Sham Group,2):$P < 0.05$ vs Vechile Group,3):$P < 0.05$ vs DZ Group.

图 1 复苏后脑皮质 MDA 浓度

Fig.1 The concentration of MDA of cortex after CPR

2 结 果

2.1 各组大鼠复苏前后心率(HR)和平均动脉压(MAP)比较

各组大鼠的基础 HR 和 MAP 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。复苏后血压有短暂下降,但各时间点上三组 HR 和 MAP 比较差

表 1 复苏前后 HR 变化

Table 1 Heart rate before and after resuscitation

Group	Baseline	PR 30 min	PR 60 min	PR 90 min	PR 120 min
Sham(n = 5)	310 ± 15	312 ± 14	305 ± 14	314 ± 15	308 ± 13
Vehicle(n = 8)	312 ± 12	302 ± 14	309 ± 14	316 ± 12	307 ± 14
DZ(n = 8)	309 ± 13	298 ± 13	304 ± 14	301 ± 13	306 ± 14
DZ+5-HD(n = 8)	303 ± 13	302 ± 14	311 ± 13	314 ± 14	308 ± 13

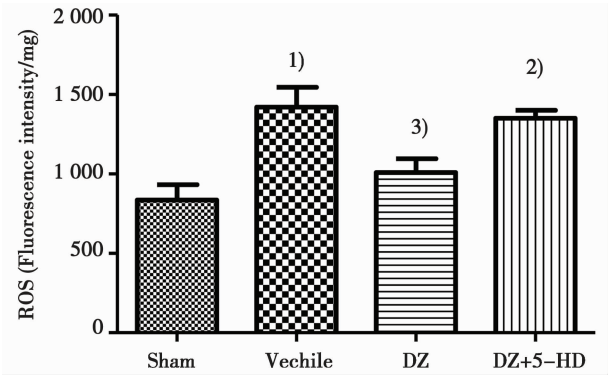
HR: Heart rate (beat/min),PR: Post-Resuscitation

表 2 复苏前后 MAP 变化

Table 2 Mean arterial pressure before and after resuscitation

Group	Baseline	PR30 min	PR60 min	PR90 min	PR120 min
Sham(n = 5)	112 ± 10	113 ± 9	110 ± 9	114 ± 9	115 ± 10
Vehicle(n = 8)	114 ± 9	91 ± 8	97 ± 9	106 ± 10	111 ± 9
DZ(n = 8)	113 ± 10	90 ± 9	96 ± 9	103 ± 9	108 ± 10
DZ+5-HD(n = 8)	115 ± 9	92 ± 9	98 ± 9	105 ± 9	112 ± 10

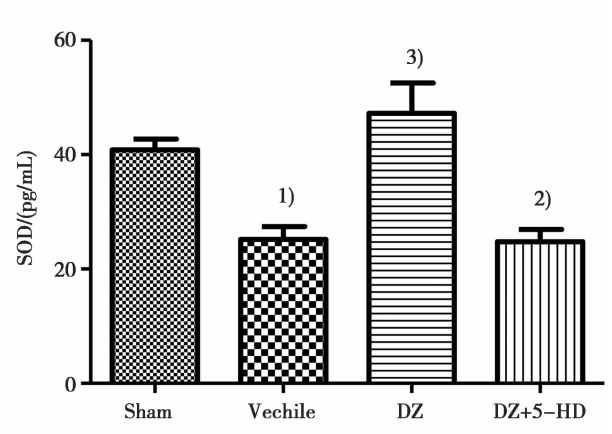
MAP (mmHg): Mean arterial pressure,PR: Post-Resuscitation



1)$P < 0.01$ vs Sham Group, 2)$P < 0.01$ vs Vechile Group, 3)$P < 0.01$ vs DZ Group.

图 2　复苏后脑皮质 ROS 浓度

Fig.2　The concentration of ROS of cortex after CPR



1)$P < 0.01$ vs Sham Group, 2)$P < 0.01$ vs Vechile Group, 3)$P < 0.01$ vs DZ Group.

图 3　复苏后脑皮质 SOD2 活性

Fig.3　The activity of SOD2 of cortex after CPR

异无统计学意义($P > 0.05$)，表明 DZ 对复苏后大鼠 HR 和 MAP 没有明显影响(表 1，表 2)。

2.2　脑组织内 MDA 变化

复苏后 24 h 脑皮质 MDA 浓度升高，经 DZ 处理后，MDA 浓度下降，但这种作用被 5-HD 共同作用所抵消(图 1)。

2.3　脑组织内 ROS 变化

复苏后 24 h 脑皮质 ROS 浓度增加，经 DZ 处理后，ROS 浓度下降，但这种作用被 5-HD 共同作用所抵消(图 2)。

2.4　脑组织内 SOD2 活性变化

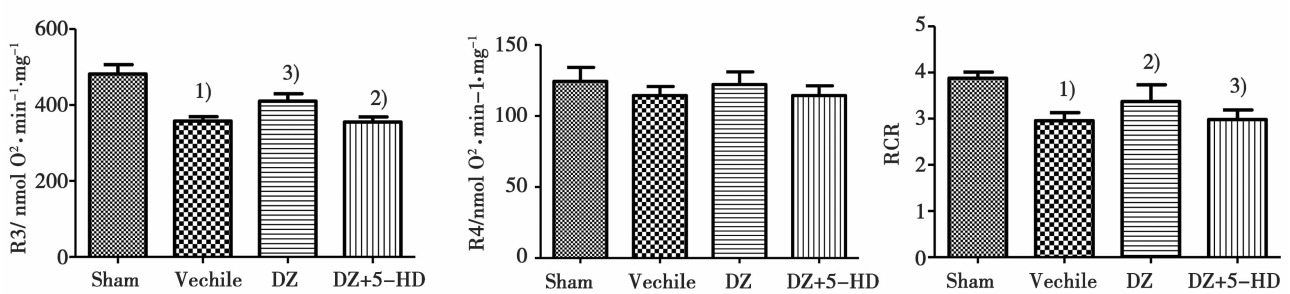
复苏后 24 h 脑皮质 SOD2 活性下降，经 DZ 处理后，SOD2 活性增加，但这种作用被 5-HD 共同作用所抵消(图 3)。

2.5　线粒体呼吸功能变化

呼吸功能测定结果显示：Vehicle 组和 DZ+5-HD 组的线粒体呼吸功能均较 Sham 组明显下降，主要表现为 R3 和 RCR 值显著降低($P < 0.01$)；但 DZ 组的 R3 和 RCR 高于 Vehicle 组($P < 0.01$)。提示 DZ 对大脑皮质线粒体的呼吸功能具有保护作用，但这种作用被 5-HD 所取消(图 4)。

2.6　DZ 干预减轻线粒体超微结构损伤

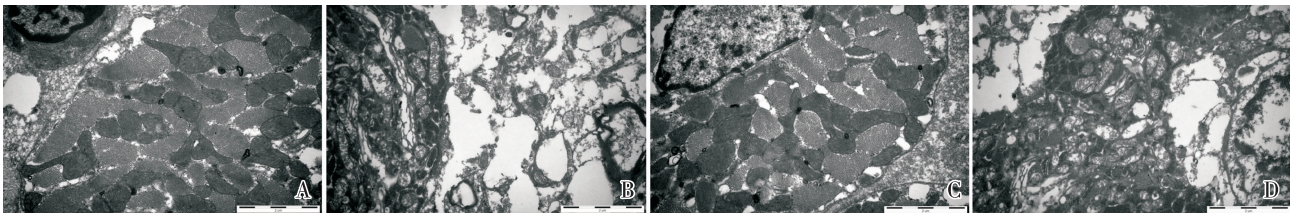
电子显微镜显示 CPR 后线粒体结构出现明显的损伤，用 DZ 干预后线粒体结构受到明显的保护，但这种作用被 5-HD 所取消(图 5)。



R3：Four groups compare：Repeated measure ANOVA，$F = 44.42$，$P < 0.001$；1)$P < 0.001$ vs Sham Group，2)$P = 0.0009$ vs Vechile Group，3)$P = 0.0009$ vs DZ Group. R4：Four groups compare：Repeated measure ANOVA，$F = 2.53$，$P = 0.52$；RCR = R3/R4：Four groups compare：Repeated measure ANOVA，$F = 41.72$，$P < 0.0001$；1)$P = 0.001$ vs Sham Group，2)$P = 0.019$ vs Vechile Group，3)$P = 0.024$ vs DZ Group.

图 4　复苏后脑皮质线粒体呼吸功能

Fig 4　The change of mitochondrial respiratory function of cortex after CPR



A(sham): The mitochondria are irregular in shape, and compact with a higher electron dense matrix. The mitochondrial cristae are aligned nicely. B(Vechile): The mitochondria are prominently swollen with reduced matrix density and vacuole; mitochondrial cristae are broken. C(DZ): The majority of mitochondria have mild swelling with slightly reduced matrix density; mitochondrial cristae are aligned nicely. D (DZ+5-HD): The mitochondria are prominently swollen with reduced matrix density and vacuole; mitochondrial cristae are broken. × 21 000

图 5 各组复苏后脑皮质细胞超微结构变化

Fig.5 Transmission electron micrographs of cerebral cortex among groups after CPR. (A) Sham

3 讨 论

线粒体是真核生物细胞内合成三磷酸腺苷(ATP)的主要场所,是“细胞的动力工厂”,另外,线粒体在脑缺血缺氧过程中亦发挥重要调控作用[5]。由于脑细胞的特殊结构,无糖原储备,能量主要来自血中葡萄糖的有氧氧化,因而对缺血缺氧和低血糖非常敏感。脑组织缺血时,氧、糖等代谢底物缺乏,随着高能磷酸化合物耗竭,细胞膜电位不能维持,神经元去极化,造成电压依赖性钙通道开放,钙离子内流形成钙超载,胞质内增多的钙离子进入线粒体,降低其产生 ATP 的效能。此外,线粒体还是机体内源性活性氧的最重要来源。脑细胞缺血时,线粒体钙超载、自由基产生等病理生理因素抑制线粒体电子传递链复合物的功能,呼吸链形成“电子漏”,导致活性氧基团产生增多,自由基氧化攻击线粒体膜磷脂,进一步加剧细胞能量代谢障碍,形成恶性循环[6]。

近年来,有关线粒体在 CPR 后脑损伤的研究越来越受到重视,线粒体及其钾通道有可能成为治疗复苏后脑损伤的靶点[3]。本研究所之前的研究发现,CA 可引起线粒体的结构和功能损伤,而 CPR 可改善心和脑复苏后线粒体的结构和功能[7-8]。过去研究表明,二氮嗪作为线粒体 ATP 敏感性钾通道的开放剂,通过预处理或后处理,可减轻缺血和再灌注引起的器官损伤,维持细胞功能[9]。

本实验观察 CA 后全脑缺血损伤对脑皮质神经细胞线粒体结构和功能的影响。探讨 DZ 后处理对大鼠脑线粒体功能的保护作用,为寻找脑复苏新的治疗策略提供依据。研究结果表明,CA 后 CPR,恢复自主循环后,脑组织经历了一次缺血再灌注过程,脑组织内的过氧化物如 MDA、ROS 等含量明显增加,SOD2 活性下降,线粒体 RCR 明显下降,线粒体结构也出现了明显的破坏。MDA 和 ROS 是反映细胞氧化应激水平的重要指标,SOD2 是 SOD 的一个亚型,主要存在于线粒体内,其活性主要反映线粒体对过氧化物的清除能力。而 RCR 是反映线粒体呼吸功能的敏感指标,其数值降低意味着细胞能量代谢出现障碍,其下降幅度提示着线粒体的缺血缺氧程度。之前报道 CPR 后脑细胞线粒体形态结构变化不明显[7,10],但该研究采用的是室颤模型,脑细胞的缺血时间较短,线粒体的损害程度可能较轻,而本研究采用窒息模型,脑缺氧时间较长,因而线粒体的损害程度可能较重有关。

用 DZ 干预后,脑组织内的 MDA、ROS 含量明显下降,SOD2 活性提高,线粒体 RCR 明显上升,线粒体结构基本保持完好,表明 DZ 对复苏后脑线粒体结构和功能有保护作用,可防止脑损伤加重。而合用特异性 mitoKATP 通道阻滞剂 5-HD 可取消 DZ 的这种保护作用,表明 DZ 的保护作用与开放 mitoKATP 通道有关。

关于 DZ 是如何通过开放 mitoKATP 通道保护细胞功能的机制目前仍不清楚,可能的机制有:① DZ 干预后通过开放 mitoKATP 改善线粒体呼吸链

电子传递链，可减少 MDA 和 ROS 等过氧化物生成，同时可激活 SOD2 等过氧化物清除酶的活性，从而起到抗氧化应激的作用[9]。② mitoKATP 开放后钾离子内流，线粒体膜电位下降（去极化），增加线粒体基质容积，抑制钙离子内流，减轻钙超载，提高氧代谢率和促进线粒体呼吸，改善 ATP 代谢[11]。此外，开放 mitoKATP 通道的保护作用可能还与抑制细胞凋亡、激活蛋白激酶 C 和基因表达调控有关[12-13]。

DZ 经静脉注射可快速降低血压，但在本实验中，虽然看到复苏后血压出现了小幅度暂时性下降，但给予 DZ 干预组和未给予 DZ 干预组在各时间点上无明显差异，可能与本研究采用腹腔注射给药，药物进入血液的速度较慢，对血压的影响较小有关。但 DZ 在复苏后应用于临床尚未见有报道，在临床上使用仍须谨慎。寻找对血压影响较小的 mitoKATP 通道开放剂有可能有更好的脑保护前景。

综上所述，DZ 通过开放 mitoKATP 通道可起到抗氧化应激损伤、保护线粒体结构和功能的作用，减轻复苏后脑损伤。

参考文献

[1] ORBO M, ASLAKSEN PM, LARSBY K, et al. Determinants of cognitive outcome in survivors of out-of-hospital cardiac arrest[J]. Resuscitation, 2014, 85(11): 1462-1468.

[2] AYOUB IM, RADHAKRISHNAN J, GAZMURI RJ. Targeting mitochondria for resuscitation from cardiac arrest[J]. Crit Care Med, 2008, 36(11 Suppl): S440-S446.

[3] BUSIJA DW, LACZA Z, RAJAPAKSE N, et al. Targeting mitochondrial ATP-sensitive potassium channels--a novel approach to neuroprotection [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2004, 46(3): 282-294.

[4] ZHAO S, LIN Q, LI H, et al. Carbon monoxide releasing molecule2 attenuated ischemia/reperfusioninduced apoptosis in cardiomyocytes via a mitochondrial pathway[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(2): 754-762.

[5] FENG ZC, SICK TJ, ROSENTHAL M. Oxygen sensitivity of mitochondrial redox status and evoked potential recovery early during reperfusion in post-ischemic rat brain[J]. Resuscitation, 1998, 37(1): 33-41.

[6] MORO MA, ALMEIDA A, BOLANOS JP, et al. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(10): 1291-1304.

[7] JIANG J, FANG X, FU Y, et al. Impaired cerebral mitochondrial oxidative phosphorylation function in a rat model of ventricular fibrillation and cardiopulmonary resuscitation[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 192769. doi:10.1155/2014/192769

[8] FANG X, HUANG Z, ZHU J, et al. Ultrastructural evidence of mitochondrial abnormalities in postresuscitation myocardial dysfunction [J]. Resuscitation, 2012, 83(3): 386-394.

[9] FARAHINI H, AJAMI M, MIRZAY RJ, et al. Nitric oxide is necessary for diazoxide protection against ischemic injury in skeletal muscle [J]. Iran J Pharm Res, 2012, 11(1): 375-381.

[10] 符岳，姜骏，许婉华，等. 心肺复苏对心脏骤停大鼠脑线粒体功能的保护作用[J]. 中山大学学报（医学科学版），2013，34(4)：513-516.
FU Y, JIANG J, XU WH, et a1. Protective effect of cardiopulmonary resuscitation on brain mitochondrial function in a rat model of cardiac arrest[J]. J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci), 2013, 34(4): 513-516.

[11] HEUSCH G, MUSIOLIK J, GEDIK N, et al. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion[J]. Circ Res, 2011, 109(11): 1302-1308.

[12] ZHANG L, GAO X, YUAN X, et al. Mitochondrial calcium uniporter opener spermine attenuates the cerebral protection of diazoxide through apoptosis in rats [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2014, 23(5): 829-835.

[13] WANG Y, TAKASHI E, XU M, et al. Downregulation of protein kinase C inhibits activation of mitochondrial K(ATP) channels by diazoxide[J]. Circulation, 2001, 104(1): 85-90.

（编辑　孙慧兰）