

# 心肺复苏对心脏骤停大鼠脑线粒体功能的保护作用

符岳<sup>1</sup>, 姜骏<sup>1</sup>, 许婉华<sup>1</sup>, 罗银秋<sup>1</sup>, 毛小英<sup>1</sup>, 谭健韶<sup>1</sup>, 黄子通<sup>2\*</sup>

(1.中山大学附属佛山医院,广东佛山 528000;2.中山大学孙逸仙纪念医院,广东广州 510120)

**摘要:**【目的】探讨心肺复苏对心脏骤停大鼠脑神经元线粒体功能的保护作用。【方法】建立大鼠室颤法心脏骤停模型,缺血组心跳停止 15 min,不行心肺复苏,复苏组心跳停止 10 min,行 5 min 心肺复苏。15 min 末处死动物,分离提取海马脑组织线粒体,用 Clark 氧电极法检测线粒体呼吸功能,线粒体内、外膜试剂盒测定线粒体膜完整性,电镜观察线粒体超微结构。【结果】心脏骤停后,缺血组和复苏组的线粒体外膜完整率、内膜膜电位、呼吸控制率均较假手术组明显降低( $P < 0.01$ ),复苏组结果高于缺血组( $P < 0.01$ ),形态学比较各组间无显著差异。【结论】心脏骤停早期,神经元线粒体损伤以功能性为主,形态学改变不明显,心肺复苏可改善缺血神经元的线粒体功能,减轻脑线粒体损伤。

**关键词:**心肺复苏;心脏骤停;大鼠;线粒体

中图分类号:R54 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2013)04-0513-04

## Protective Effect of Cardiopulmonary Resuscitation on Brain Mitochondrial Function in a Rat Model of Cardiac Arrest

FU Yue<sup>1</sup>, JIANG Jun<sup>1</sup>, XU Wan-hua<sup>1</sup>, LUO Yin-qiu<sup>1</sup>, MAO Xiao-ying<sup>1</sup>, TAN Jian-shao<sup>1</sup>, HUANG Zi-tong<sup>2\*</sup>

(1.Department of Emergency Medicine, The Affiliated Foshan Hospital of Sun Yat-sen University, Foshan 528000, China;

2.Department of Emergency Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the protective effect of cardiopulmonary resuscitation (CPR) on brain mitochondrial function in a rat model of cardiac arrest. 【Methods】 Cardiac arrest rat model was established by electrical induced ventricular fibrillation. The SD rats were randomly divided into: ischemia group, in which 15 min of cardiac arrest was induced without CPR; CPR group, in which 10 min of cardiac arrest was performed followed by 5 min of CPR; and sham control group. The rats were sacrificed at the end of 15 min and hippocampal mitochondrion was isolated and extracted. Clark oxygen electrode was used to measure mitochondrial respiratory function. Mitochondrial membrane kits were used to examine the integrity of mitochondrion. Mitochondrial ultra structure was observed with transmission electron microscope. 【Results】 After cardiac arrest, the integrity of mitochondrial outer membrane, mitochondrial membrane potential and respiratory control rate in ischemia group and CPR group were significantly decreased than those in sham operation group ( $P < 0.01$ ). The result of CPR group was higher than that of ischemia group ( $P < 0.01$ ). There was no morphological difference between each group. 【Conclusion】 In the early stage of cardiac arrest, the brain mitochondrial impairment mainly manifested as functional damage rather than morphological injury. CPR could improve mitochondrial function and alleviate injury of ischemic neurons.

**Key word:** cardiopulmonary resuscitation; cardiac arrest; rat; mitochondrion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(4): 513-516]

心脏骤停是临床常见的急危重症,复苏后神经功能损害是影响患者存活率和远期生存质量的主要原因<sup>[1]</sup>。心脏骤停后全脑缺血损伤的病理生

理机制复杂,包括氧化应激、兴奋性中毒、钙离子超载、细胞凋亡及炎症性损伤等<sup>[2]</sup>,临床上缺乏有效的治疗手段。近年来,调节线粒体功能作为潜在

收稿日期:2013-01-05

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801081);广东省医学科研基金(A2009179)

作者简介:符岳,主治医师,临床医学博士,研究方向:心肺脑复苏,E-mail: fuyue75@yahoo.com.cn; \* 通信作者:黄子通,教授,博士生导师,E-mail: huangzt@yahoo.com.cn

有希望的靶点引起越来越多学者的关注<sup>[3]</sup>,线粒体作为最重要的细胞器,一方面通过氧化磷酸化产生 ATP,为机体提供能量;另一方面,当组织缺血缺氧时,其对细胞损伤的调控居于核心地位。本研究观察心肺复苏对心脏骤停后海马脑组织线粒体结构、功能的影响,为寻找脑复苏新的治疗方法提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

6 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 ( $400 \pm 50$ )g,购于中山大学动物实验中心(许可证号 SCXK(粤)2004-0011)。大鼠心肺复苏装置(中山大学心肺脑复苏研究所自行研制,国家发明专利号:ZL200610037154.3);Windaq 数据采集系统及分析软件购于 DATAQ 公司(USA);Clark 氧电极购于 Hansatech 公司(UK);透射电镜购于 FEI 公司(Holland)。线粒体内膜、外膜功能检测试剂盒购于上海杰美基因医药有限公司。

### 1.2 实验分组

成年健康雄性 SD 大鼠 33 只,随机分为 3 组。假手术组 11 只:仅行麻醉、气管插管、动静脉置管,不诱导室颤;单纯缺血组 11 只:室颤诱发心脏骤停 15 min,不行心肺复苏(CPR);CPR 组 11 只:室颤诱发心脏骤停 10 min,行 5 min 心肺复苏。

### 1.3 复苏模型制备

参照本实验室既往研究方法<sup>[4]</sup>。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。左股动脉置入 23 号 PE-50 聚乙烯管监测主动脉压,右颈静脉置 3F 鞘管送入前端弯曲的指引钢丝(正极)到达右心室内膜,皮下插入针头(负极)形成回路以诱发室颤。持续监测肢体 II 导联心电图;持续监测肛温,保持动物体温在 ( $37.0 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。以 3 mA 电流、60 Hz 频率的交流电诱导室颤持续 3 min,再维持室颤 7 min。CPR 组利用心肺复苏装置进行频率为 200 次/分的胸外按压和 100 次/min 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 5 min;单纯缺血组不复苏。15 min 末各组动物立即处死行相关检测。

### 1.4 脑线粒体分离

大鼠断颈取头,分离新鲜的海马脑组织,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(230 mmol/L 甘露醇,70 mmol/L 蔗糖,1 mmol/L EDTA,0.25% BSA,Tris-HCl 调 pH 至 7.4),匀浆 10 次至无脑组织块。800 g 低温离心 4 min,取上清液;再以 16000 g 低温离心 15 min,弃上清,沉淀即为提取的线粒体。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 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴中进行。

### 1.5 线粒体呼吸功能测定

采用 Clark 氧电极法<sup>[5]</sup>。反应槽内加入 2.5 mL 反应介质(225 mmol/L 甘露醇,70 mmol/L 蔗糖,1 mmol/L EDTA,0.1% BSA,10 mmol/L 磷酸钾, pH 为 7.4,温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ),充分搅拌使基础氧浓度达到 240 nmol/mL 稳定状态。加入 20  $\mu\text{L}$ (约 2 mg)线粒体悬液孵育 1 min。加入 20  $\mu\text{L}$ 底物(4 mmol 琥珀酸二钠),测得的氧消耗率为 IV 态呼吸(R4)。再加入 20  $\mu\text{L}$ 二磷酸腺苷(ADP,50 mmol/L),测得氧消耗率为 III 态呼吸(R3)。线粒体呼吸控制率(RCR)=R3/R4。

### 1.6 电镜形态观察

大鼠处死后立即用预冷的戊二醛和多聚甲醛混合固定液灌注,摘取大脑,分别分离海马 CA1 区和皮层区,按照电镜标本常规制备程序后固定、脱水、环氧树脂包埋,超薄切片后装上铜载网格,行铅铀双染,置于透射电镜下观察超微结构并拍照。

### 1.7 线粒体膜完整性测定

新鲜提取的线粒体,按照上海杰美基因医药有限公司线粒体内膜、外膜功能检测试剂盒说明书进行检测。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多个样本均数间比较采用单因素方差分析,多个样本均数的两两比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 各组大鼠生理参数比较

三组大鼠的基础体质量、复苏前心率、平均动脉压(MAP0)比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具有可比性;而复苏过程中三组平均动脉压(MAP1)差异显著( $P < 0.01$ ;表 1)。

表1 各组大鼠生理参数比较

Table 1 Comparison of physiological parameters between rats in each group

 $(n = 8, \bar{x} \pm s)$ 

Group	Mass/g	Heart rate/min <sup>-1</sup>	MAP <sub>0</sub> /mmHg	MAP <sub>1</sub> /mmHg
Sham group	409.56 ± 35.42	298.75 ± 18.60	140.76 ± 13.35	139.25 ± 12.29
Ischemia group	403.23 ± 29.64	302.34 ± 20.54	144.28 ± 14.32	8.88 ± 1.81 <sup>1)</sup>
CPR group	398.79 ± 32.76	300.68 ± 19.42	145.06 ± 16.78	30.50 ± 2.73 <sup>1)2)</sup>

MAP<sub>0</sub>: basal mean arterial pressure; MAP<sub>1</sub>: mean arterial pressure during cardiopulmonary resuscitation; The MAP<sub>1</sub> data was analyzed after logarithmic transformation because of the heterogeneity of variance. 1)  $P < 0.01$  vs Sham group; 2)  $P < 0.01$  vs Ischemia group

表2 各组大鼠线粒体呼吸功能和线粒体膜完整性比较

Table 2 Comparison of mitochondrial respiratory function and membrane integrity between rats in each group ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Group	R3	R4	RCR	Out membrane/%	Inner membrane
Sham	64.20 ± 4.95	13.80 ± 1.13	4.68 ± 0.54	66.13 ± 5.11	2.02 ± 0.08
Ischemia	28.49 ± 2.96 <sup>2)</sup>	12.54 ± 1.37 <sup>1)</sup>	2.30 ± 0.39 <sup>2)</sup>	31.38 ± 4.03 <sup>1)</sup>	1.40 ± 0.07 <sup>1)</sup>
CPR	46.15 ± 3.49 <sup>2)3)</sup>	11.90 ± 1.06 <sup>2)</sup>	3.91 ± 0.51 <sup>2)3)</sup>	45.38 ± 4.44 <sup>1)2)</sup>	1.74 ± 0.08 <sup>1)2)</sup>

R3, R4 unit: nmol/L·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>. 1)  $P < 0.05$  vs Sham group; 2)  $P < 0.01$  vs Sham group; 3)  $P < 0.01$  vs Ischemia group

## 2.2 线粒体呼吸功能比较

Clark 氧电极测定呼吸功能结果显示,缺血组和 CPR 组的线粒体呼吸功能均较假手术组明显下降,主要表现为 R3 和 RCR 值显著降低 ( $P < 0.01$ );但 CPR 组的 R3 和 RCR 高于缺血组 ( $P < 0.01$ ),提示心肺复苏对大鼠海马线粒体的呼吸功能具有保护作用(表 2)。

## 2.3 神经元超微结构观察

三组神经元细胞器结构均未见明显损伤,胞体及细胞器无肿胀,胞核圆形透明,核仁明显,线粒体结构完整,嵴丰富,排列整齐,基质电子密度均匀,内质网结构清晰,核糖体丰富,形态学上无显著差异(图 1)。

## 2.4 线粒体内、外膜完整性比较

缺血组和 CPR 组的海马神经元线粒体外膜完整率、内膜膜电位荧光比值均显著低于假手术组 ( $P < 0.01$ );CPR 组外膜完整率、内膜荧光比值均

高于缺血组 ( $P < 0.01$ ),提示心肺复苏对于保护神经元线粒体结构完整性,维持其功能具有积极意义(表 2)。

## 3 讨论

线粒体是真核生物氧化磷酸化、产生 ATP 的主要场所,为生命活动提供约 95% 的能量,有“细胞动力工厂”之称<sup>[6]</sup>。除氧化供能外,线粒体在脑缺血缺氧过程中发挥重要调控作用。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<sup>[7]</sup>。另一方面,钙超载和缺血造成的氧化应激引起线粒体膜通透性转变,膜间隙内的多种凋亡调节蛋白如细胞色素 C、凋亡诱导因子

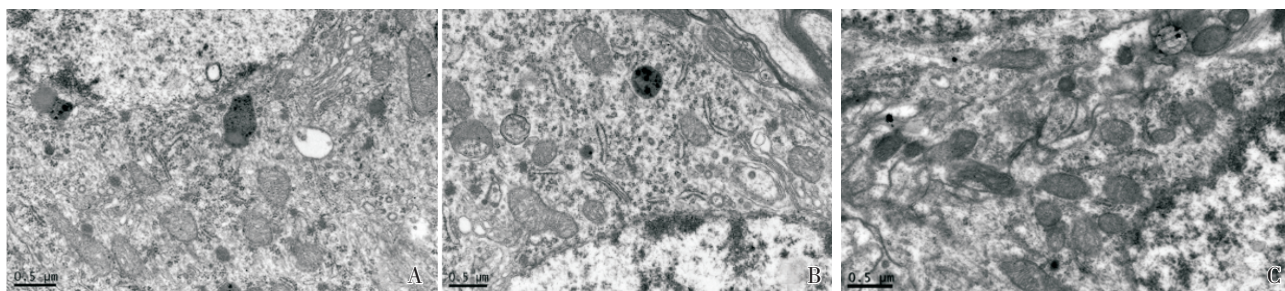


图1 各组大鼠海马神经元电镜超微结构改变

Fig.1 The ultra-structure changes of hippocampal neurons between rats in each group

A: Sham group; B: Ischemia group; C: CPR group; ×23000

(AIF)、caspase 共激活子 Smac 等释放入细胞质,激活下游相关蛋白和级联反应,诱发神经元凋亡<sup>[8]</sup>。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、一氧化氮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<sup>[9]</sup>。

近年来,有关线粒体的研究得到越来越多国内外学者重视,然而在心肺脑复苏领域进展缓慢。本实验观察心脏骤停后全脑缺血损伤对海马神经元线粒体结构、功能的影响,探讨心肺复苏对大鼠脑线粒体功能的保护作用,为寻找脑复苏新的干预靶点提供依据。研究表明,单纯缺血组神经元线粒体内、外膜完整性受到损害,膜电位破坏,RCR 下降,氧化磷酸化功能降低,但电镜显示包括线粒体在内的细胞器形态无明显损伤,提示在心脏骤停缺血早期,神经元线粒体功能受损,形态学改变不明显。心肺复苏组 MAP 水平较缺血组明显升高,线粒体膜电位水平、RCR 值亦显著增高,显示 CPR 可改善缺血神经元线粒体功能,减轻脑线粒体损伤。膜电位是反映线粒体功能和代谢活性的重要指标,膜电位破坏是引发钙超载、氧化应激,最终造成线粒体呼吸链功能障碍的重要因素<sup>[10]</sup>。国外研究表明,心脏骤停大鼠在心肌线粒体结构、功能均产生破坏的情况下,通过有效的 CPR 仍能保护线粒体功能,部分逆转形态学损害<sup>[11]</sup>。本实验结果显示,心脏骤停后 15 min 大鼠脑线粒体结构并未见破坏,CPR 可以改善损伤的线粒体功能。我们和国外的结果联合证实:心脏骤停早期,有效的 CPR 可以保护脑、心脏等重要脏器线粒体功能,对提高复苏效果、保护器官功能具有重要意义。

传统观点认为,心脏骤停 5 min 脑组织将产生不可逆性损伤。而我们的实验结果显示:心脏骤停后 15 min,神经元细胞器并未出现严重的结构破坏,线粒体损伤以功能性为主,CPR 可改善逆转其功能障碍。2010 年国际心肺复苏指南强调高质量持续 CPR 的重要性<sup>[12]</sup>,尽管闭合胸外按压只能产生相当于生理状况时 30%的前向血流,但对于保护脏器功能具有非常重要的意义。本实验佐证了早期心肺复苏的益处和效果,同时表明线粒体作为脑缺血损伤的始动单元,与多种损伤机制相关,以其作为脑复苏治疗靶点可能产生良好的干预效果。

#### 参考文献:

- [1] Busl KM, Greer DM. Hypoxic-ischemic brain injury: pathophysiology, neuropathology and mechanisms [J]. *Neurorehabilitation*, 2010, 26(1): 5-13.
- [2] Polderman KH. Induced hypothermia and fever control for prevention and treatment of neurological injuries [J]. *Lancet*, 2008, 371(9628): 1955-1969.
- [3] Ayoub IM, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. Targeting mitochondria for resuscitation from cardiac arrest [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(11 Suppl): S440-S446.
- [4] 符岳,方向韶,王彤,等. 新型大鼠心跳骤停和复苏的机械装置[J]. *中华急诊医学杂志*, 2007, 16(4): 387-389.  
Fu Y, Fang X, Wang T, et al. A novel mechanical device for the resuscitation of cardiac arrest in the rat model of CPR [J]. *Chin J Emerg Med*, 2007, 16(4): 387-389.
- [5] Clark JB, Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization [J]. *J Biol Chem*, 1970, 245(18): 4724-4731.
- [6] Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 481-490.
- [7] Gouriou Y, Demareux N, Bijlenga P, et al. Mitochondrial calcium handling during ischemia - induced cell death in neurons [J]. *Biochimie*, 2011, 93(12): 2060-2067.
- [8] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 92-99.
- [9] Moro MA, Almeida A, Bolaños JP, et al. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39(10): 1291-1304.
- [10] Weis SN, Pettenuzzo LF, Krolow R, et al. Neonatal hypoxia - ischemia induces sex - related changes in rat brain mitochondria [J]. *Mitochondrion*, 2012, 12(2): 271-279.
- [11] Yeh ST, Lee HL, Aune SE, et al. Preservation of mitochondrial function with cardiopulmonary resuscitation in prolonged cardiac arrest in rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 47(6): 789-797.
- [12] Field JM, Hazinski MF, Sayre MR, et al. 2010 American Heart Association Guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care [J]. *Circulation*, 2010, 122(18 Suppl 3): S640-933.

(编辑 孙慧兰)