

The Effects of Different Doses of HOE-642 for the Protection of Neuronal Mitochondrial Function after Cardiac Arrest in Rats

Lanying Wei, Wenshuai Zhao, Xifan Wang, Yanan Hu, Fei Han*

Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin Heilongjiang
Email: weilanying355@sina.com, *fh.feih@yahoo.com

Received: Mar. 28th, 2018; accepted: Apr. 19th, 2018; published: Apr. 26th, 2018

Abstract

Objective: This study was to explore the effects of different doses of HOE-642 for the protection of neuronal mitochondrial function after cardiac arrest in rats. **Methods:** Cardiac arrest was induced by 8 min of asphyxia in rats. Six groups were included: N group, normothermia; HOE groups, HOE-642 1 or 5 mg/kg, iv, when initiating CPR; Hypo group, mild hypothermia ($33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) induced following the return of spontaneous circulation; Hypo + HOE groups, HOE-642, 1 or 5 mg/kg, plus mild hypothermia. Survival and NDS were evaluated after 24 h of resuscitation. Mitochondrial function of the hippocampus was detected. **Results:** Survival in the Hypo + HOE 1 mg group was the best and significantly higher than in the N and HOE 1 mg groups ($P < 0.05$). NDS in the Hypo + HOE 1 mg group was significantly lower than in the N group ($P < 0.05$). The mitochondrial function in the Hypo + HOE 1 mg group was better than in the Hypo + HOE 5 mg group. **Conclusions:** HOE-642 1 mg/kg was beneficial compared to HOE-642 5 mg/kg used when initiating resuscitation for the protection of neuronal mitochondrial function after cardiac arrest.

Keywords

CPR, Cardiac Arrest, HOE-642, Ischemia/Reperfusion, Mitochondria

评价不同剂量的HOE-642对大鼠心脏骤停后神经线粒体功能的保护作用

魏兰瓔, 赵文帅, 王喜繁, 胡亚楠, 韩 非*

哈尔滨医科大学附属第三医院麻醉科, 黑龙江 哈尔滨
Email: weilanying355@sina.com, *fh.feih@yahoo.com

收稿日期: 2018年3月28日; 录用日期: 2018年4月19日; 发布日期: 2018年4月26日

*通讯作者。

文章引用: 魏兰瓔, 赵文帅, 王喜繁, 胡亚楠, 韩非. 评价不同剂量的 HOE-642 对大鼠心脏骤停后神经线粒体功能的保护作用[J]. 临床医学进展, 2018, 8(2): 238-246. DOI: 10.12677/acm.2018.82041

摘要

目的：评价不同剂量的HOE-642对大鼠心脏骤停后神经线粒体功能的保护作用。方法：大鼠采用窒息性心脏骤停，8 min后进行心肺复苏。共分为6组：常温组(N组)；HOE-642用药组(HOE组)，在开始复苏前分别静脉注射HOE-642 1 mg/kg或5 mg/kg；低温组(Hypo组)，在恢复血流后采用中度低温($33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)治疗；低温复合HOE-642用药组(Hypo + HOE组)，在开始进行复苏前分别静脉注射HOE-642 1 mg/kg或5 mg/kg，并在循环恢复后采用中度低温治疗。成功复苏后24 h，计算大鼠的存活率，并进行神经功能损伤的评估(NDS)。其后提取大鼠的海马组织并分离线粒体以测量线粒功能。结果：在复苏24 h后，大鼠的存活率在Hypo + HOE 1 mg组明显比N组和HOE 1 mg组高($P < 0.05$)；NDS在Hypo + HOE 1 mg组明显比N组低($P < 0.05$)；线粒体的功能在Hypo + HOE 1 mg组明显优于Hypo + HOE 5 mg组。结论：相比于HOE-642, 5 mg/kg的剂量，在开始复苏时静注HOE-642, 1 mg/kg的剂量对神经线粒体的功能更有益。

关键词

心肺复苏，心脏骤停，HOE-642，缺血/再灌注，线粒体

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

脑缺血后导致神经线粒体损伤，加剧氧化应激反应，氧化应激活性氧(Reactive oxygen species, ROS)生成增加[1] [2]。线粒体损伤的主要特征为线粒体膜蛋白(Mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi\text{m}$)减少，线粒体膜通透性转换孔(Mitochondrial permeability transition pore, mPTP)不可逆性开放，线粒体内细胞色素 C(Cytochrome c, Cyt c)释放，并向细胞质中释放毒性蛋白[3] [4]。这一系列机制都会加剧脑缺血后神经细胞凋亡及神经功能障碍。

Na^+/H^+ 交换体 1 型(Na^+/H^+ exchanger isoform 1, NHE1)是存在于细胞表面的一种膜蛋白，通过调节细胞内外 H^+ 和 Na^+ 的交换以维持细胞正常 pH 值和稳定细胞容积[5]。在诸多心肌缺血再灌注动物模型中，抑制 NHE 的活性已显示出明显保护效应，改善心肌功能恢复，维持细胞正常超微结构，抑制细胞凋亡[6]-[11]。HOE-642，一种选择性 NHE1 型抑制剂，在室颤复苏前使用 1 mg/kg 的剂量，已证明也可以提高复苏后血流动力学的恢复，改善复苏后心脏效能[12] [13] [14]。在脑缺血的猪模型中，使用 HOE-642 5 mg/kg 的剂量，也可以防止神经功能损伤[15]。现阶段还没有研究证明 HOE-642 在心脏骤停模型中应用对神经线粒体功能的影响，所以，本研究主要探索不同剂量的 HOE-642 对大鼠心脏骤停后神经线粒体功能的影响。

2. 材料和方法

2.1. 实验动物

本研究选用健康雄性 Wistar 大鼠，体重 240 g~340 g，年龄 8~10 周，购自哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心，不限制其饮食和饮水，鼠笼内饲养。实验中所有动物操作都严格遵循哈尔滨医科大

学实验动物保护和使用的有关规定,并取得了哈尔滨医科大学附属第三医院动物保护与使用委员会的批准。

2.2. 实验分组

本实验共分为 6 组:常温组(N 组),该组大鼠行窒息性心脏骤停后 8 min 开始进行心肺复苏(Cardiopulmonary resuscitation, CPR),待自主循环恢复(Return of spontaneous circulation, ROSC)后,维持鼓膜及直肠温度为 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; HOE 1 mg 组, HOE 5 mg 组,这两组大鼠在行 CPR 前分别静脉注射 HOE-642 1 mg/kg 和 HOE-642 5 mg/kg,待 ROSC 后,维持鼓膜及直肠温度为 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$;低温组(Hypo 组),该组大鼠在心脏骤停后行 CPR,待 ROSC 后立即进行低温处理,维持鼓膜及直肠温度为 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,并持续 1 h,随后开始恢复体温至 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,并持续 1 h;HOE 1 mg 复合低温组(Hypo + HOE 1 mg 组),HOE 5 mg 复合低温组(Hypo + HOE 5 mg 组),这两组大鼠在行 CPR 前分别静脉注射 HOE-642 1 mg/kg 和 HOE-642 5 mg/kg,待 ROSC 后立即进行低温处理,维持鼓膜及直肠温度位 $33^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 并持续 1 h,随后开始恢复体温至 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$,并持续 1 h。

2.3. 实验方案

对实验大鼠用 4% 的异氟烷麻醉后行气管内插管,插管成功后连接呼吸机(Harvard-683, 美国 Harvard 仪器)进行机械通气,呼吸频率为 40 次/min,并进行呼气末正压($5\text{ cmH}_2\text{O}$)通气,吸呼比 I:E = 1:1,吸入氧分数 $\text{FiO}_2 = 0.5$ 。维持呼吸末二氧化碳分压在 35~45 mmHg 之间并以此为根据调节潮气量的大小(8~12 ml/kg),用 2% 的异氟烷进行麻醉维持。应用加热毯使大鼠鼓膜温度及直肠温度维持在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。动静脉穿刺后开始记录动脉血压,并维持平均动脉压(MAP),心率(HR)及血气值在正常范围内。待大鼠的各项生命体征保持平稳后,静脉给予 2 mg/kg 的维库溴胺,夹闭气管导管,以诱导窒息性心脏骤停。当 $\text{MAP} < 20\text{ mmHg}$ 时视为大鼠窒息性心脏骤停,大鼠窒息期间维持体温在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。窒息发生 8 min 后开始进行 CPR,在复苏开始之前,静脉给予 0.01 mg/kg 的肾上腺素,并根据不同的组别要求静注不同剂量的 HOE-642,复苏即刻开始进行胸外按压,按压频率为 200~300 次/min,并打开呼吸机进行纯氧吸入。待 ROSC 后,根据不同的组别要求应用加热毯或冰水维持相应的体温。所有实验组动物在复苏成功后均进行机械通气 1 h,并维持 MAP 在 50 mmHg 以上,如果 $\text{MAP} < 50\text{ mmHg}$,静注 1 μg 的肾上腺素。若胸外按压 3 min 后仍未恢复自主循环,则再给予一次 0.01 mg/kg 肾上腺素,若胸外按压超过 5 min 仍未恢复自主循环,则视为复苏失败。复苏成功的大鼠存活 24 h 后,对其进行神经功能损伤程度评估,该项评估使用神经缺损评分量表(Neurologic deficit score, NDS),共分为 5 部分,分别为呼吸功能,运动功能,感觉,意识和反应能力,每一部分 100 分,共 500 分,0 分为正常,500 分为脑死亡[16]。其后在深麻醉下将大鼠断头,提取大脑海马组织,分离海马组织的线粒体,用以检测线粒体的膜电位,肿胀,ROS 的产生,以及线粒体复合物 I 和 III 的活性。

2.4. 海马线粒体的分离

将断头后的大鼠分离脑组织,识别并夹取出两侧的海马组织。海马线粒体的分离采用组织线粒体分离试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology),将海马组织的匀浆液在 4°C , 1000 g 条件下进行第一次离心,离心 5 min 以去除细胞核及破损的细胞残片;将上清液在 4°C , 3500 g 条件下进行第二次离心,离心 10 min 以获得高纯度线粒体。以上所有操作步骤均在冰浴条件下进行。

2.5. 线粒体膜电位的检测

线粒体膜电位的检测采用荧光探针 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)以

及荧光酶标仪(Infinite®M1000),所有操作均在避光条件下进行。将线粒体(1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$)加入 JC-1 染色工作液中,立即用荧光酶标仪检测。激发光波长为 490 nm,发射光波长为 530 nm,以检测加样孔中 JC-1 聚合物的量;激发光波长为 525 nm,发射光波长为 590 nm,以检测加样孔中 JC-1 单体的量。聚合物与单体的比值即为膜电位的大小,比值越大,膜电位越高。

2.6. 线粒体肿胀的测定

线粒体肿胀的测定采用线粒体肿胀光度法测定试剂盒(美国 GENMED SCIENTIFICS 公司)。线粒体的肿胀是因线粒体膜的 mPTP 开放,线粒体外的离子或大分子物质通过 mPTP 进入线粒体内引起的,以致线粒体的吸光度减少。将线粒体(200 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)加入缓冲液中,混匀,即刻用酶标仪检测,波长为 520 nm,得初始吸光度值。室温下静置 1 min 后,加入肿胀触发液 CaCl_2 ,即刻用酶标仪检测,波长为 520 nm,动态记录 10 min 吸光度值的变化,每 1 min 记录一次。计算加入 CaCl_2 之前和之后线粒体吸光度的下降比即代表线粒体的肿胀程度,下降越大,肿胀越明显。

2.7. 线粒体 ROS 产生的测定

线粒体 ROS 产生的测定采用线粒体 ROS 初级荧光测定试剂盒(美国 GENMED SCIENTIFICS 公司)。在线粒体(50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$)中加入缓冲液及染色液后置于 37°C 温箱中孵育 15 min。然后放入荧光酶标仪中检测,激发波长为 490 nm,发射波长为 530 nm,测定其荧光强度,即代表 ROS 的产生量。以上所有操作均在避光条件下进行。

2.8. 线粒体呼吸链链复合物 I 和 III 活性的比色法定量检测

2.8.1. 复合物 I(NADH-辅酶 Q 还原酶)的活性

线粒体呼吸链复合物 I 催化线粒体内电子由供体 NADH 传递到内膜上辅酶 Q 受体的能量转移反应,同时 NADH 转化为 NAD,在分光光度计 340 nm 波长下产生吸收峰值的变化,复合物 I 的活性即取决于 NADH 的氧化量。采用复合物 I 活性比色法定量检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),将 100 μl 浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的线粒体蛋白以及 900 μl 的反应液加入比色皿中,用分光光度计检测在 340 nm 波长下吸光度的变化,用鱼藤酮敏感的抑制剂以验证检测的特异性。通过计算 NADH 的氧化率即为复合物 I 的活性(nmol NADH oxidized/min/mg protein)。

2.8.2. 复合物 III(辅酶 Q-Cyt c 还原酶)的活性

线粒体呼吸链复合物 III 催化线粒体内电子由供体还原型辅酶 Q 传递到 Cyt c 上的能量转移反应,同时氧化型 Cyt c 被还原为还原型 Cyt c,在分光光度计 550 nm 波长下产生吸收峰值的变化,复合物 III 的活性即取决于氧化型 Cyt c 的还原量。采用复合物 III 活性比色法定量检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),将 100 μl 浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的线粒体蛋白以及 900 μl 的反应液加入比色皿中,用分光光度计检测在 550 nm 波长下吸光度的变化,用抗霉素 A 抑制剂以验证检测的特异性。通过计算氧化型 Cyt c 的还原率即为复合物 III 的活性(nmol ferricytochrome c reduced/min/mg protein)。

2.9. 统计分析

研究数据用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。除非另有说明的数据外,其他所有数据均以平均数 \pm 标准差表示。符合正态分布的计量资料,各组组间比较采用单因素方差分析,两两比较选用 LSD 检验。各组存活率的分析采用 χ^2 检验,NDS 的比较采用 Kruskal-Wallis 检验和 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

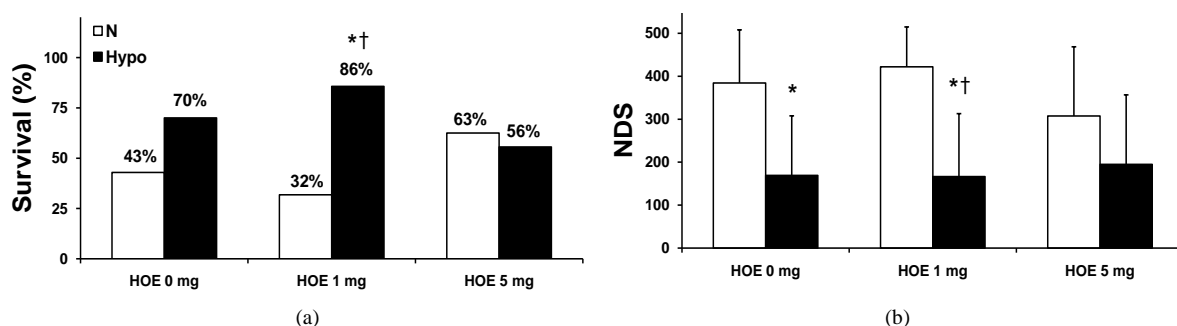
3. 结果

3.1. 生理学参数和血流动力学数据

各组的一般资料,包括动物体重,体温,心率,血气值均无明显差异。各组 CPR 所用时间在 N 组(35.5 ± 4.3 s)和 HOE-642 1 mg/kg 用药组(36.4 ± 3.3 s)明显比 HOE-642 5 mg/kg 用药组(44.3 ± 7.0 s, $P < 0.05$)低。复苏率在 N 组(84.4%),HOE-642 1 mg/kg 用药组(79.3%),和 HOE-642 5 mg/kg 用药组(82.3%)无明显差异。MAP 的值如表 1 所示,在 ROSC 后的 20 min 到 60 min 时间段内,HOE 1 mg 组和 HOE 5 mg 组的 MAP 分别比 Hypo + HOE 1 mg 组和 Hypo + HOE 5 mg 组明显偏低($P < 0.05$);N 组的 MAP 和所有的 HOE-642 用药组相比没有统计学差异。

3.2. 存活率和神经功能评估

复苏成功后 24 h 的存活率如图 1(a)所示,存活率在 Hypo + HOE 1 mg 组(85.7%)明显比 N 组(42.9%)和 HOE 1 mg 组(31.8%)高, $P < 0.05$;存活率在 N 组, Hypo 组(70%), HOE 1 mg 组, HOE 5 mg 组(62.5%)和 Hypo + HOE 5 mg 组(55.6%)无明显差异。NDS 评分如图 1(b)所示,NDS 评分在 Hypo 组和 Hypo + HOE



Note: * $P < 0.05$ vs. the N group; † $P < 0.05$ vs. the HOE 1 mg group. NDS, neurological deficit scores; N, normothermia; Hypo, hypothermia; HOE, HOE-642V. 注: *表示与 N 组比较, $P < 0.05$; †表示与 HOE 1 mg 组比较, $P < 0.05$ 。NDS 代表神经损伤功能评估; N 代表常温; Hypo 代表低温; HOE 代表实验用药 HOE-642。

Figure 1. Survival and NDS at 24 h after resuscitation

图 1. 复苏后 24 h 的存活率和神经功能损伤评估

Table 1. MAP during the course of the experiment

表 1. 各组动物实验期间平均动脉压的情况

	ROSC				
	Baseline	Asphyxia	20 min	40 min	60 min
N, n = 35	102.6 ± 38.4	106.8 ± 41.3	71.4 ± 14.9	69.9 ± 14.4	75.5 ± 15.5
Hypo, n = 10	94.3 ± 15.1	95.8 ± 15.3	99.0 ± 9.9*	84.4 ± 8.9*	89.0 ± 7.9*
HOE 1 mg, n = 22	99.1 ± 13.1	89.5 ± 16.9	66.6 ± 15.2	64.1 ± 14.5	69.3 ± 15.9
Hypo+HOE 1 mg, n = 7	99.3 ± 8.4	108.7 ± 10.1	95.3 ± 18.6*†	76.4 ± 14.1*†	78.9 ± 13.9*†
HOE 5 mg, n = 8	103.7 ± 6.2	99.2 ± 7.1	76.0 ± 7.0	79.3 ± 4.2	80.7 ± 4.7
Hypo+HOE 5 mg, n = 9	92.8 ± 5.9	94.9 ± 7.0	94.2 ± 16.6*†	91.7 ± 6.7*†	92.8 ± 9.1*†

Note: Data are expressed as mean ± SD. * $P < 0.05$ vs. the N group at the same time point; † $P < 0.05$ vs. the HOE 1 mg group at the same time point; † $P < 0.05$ vs. the HOE 5 mg group at the same time point. MAP, mean arterial pressure, mmHg; ROSC, return of spontaneous circulation; N, normothermia; Hypo, hypothermia; HOE, HOE-642. 注: 数据用均数±标准差表示。*表示与 N 组比较 $P < 0.05$; †表示与 HOE 1 mg 组比较 $P < 0.05$; †表示与 HOE 5 mg 组比较 $P < 0.05$ 。MAP 代表平均动脉压; ROSC 代表自主循环恢复; N 代表常温; Hypo 代表低温; HOE 代表实验用药 HOE-642。

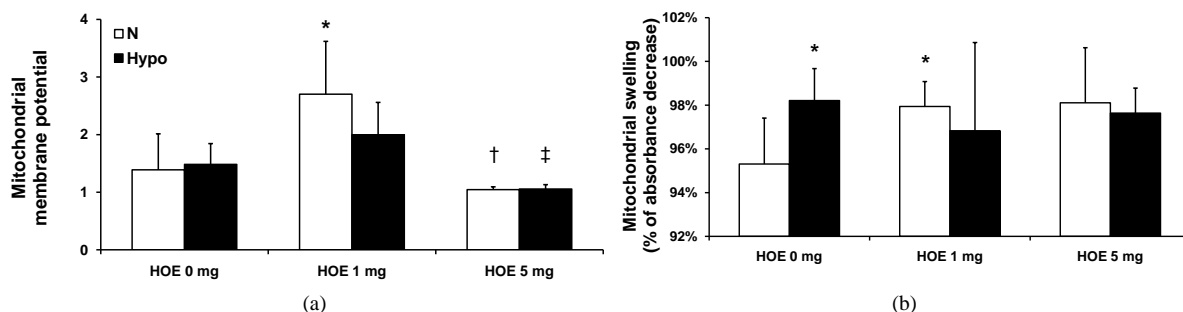
1 mg 组明显比 N 组的低($P < 0.05$); 在 Hypo + HOE 1 mg 组明显比 HOE 1 mg 组的低($P < 0.05$); 在 N 组, HOE 1 mg 组, HOE 5 mg 组和 Hypo + HOE 5 mg 组没有统计学差异。

3.3. 线粒体膜电位和肿胀

线粒体膜电位如图 2(a)所示, $\Delta\Psi_m$ 在 HOE 1 mg 组明显比 N 组和 HOE 5 mg 组高($P < 0.05$); 在 Hypo + HOE 1 mg 组明显比 Hypo + HOE 5 mg 组高($P < 0.05$); $\Delta\Psi_m$ 在 N 组, Hypo 组, HOE 5 mg 组和 Hypo + HOE 5 mg 组没有明显的差异。线粒体的肿胀如图 2(b)所示, 线粒体肿胀程度在 N 组比 Hypo 组, HOE 1 mg 组更严重($P < 0.05$); 肿胀度在 Hypo 组, HOE 1 mg 组, Hypo + HOE 1 mg 组, HOE 5 mg 组和 Hypo + HOE 5 mg 组没有明显的统计学差异。

3.4. 线粒体 ROS 的产生

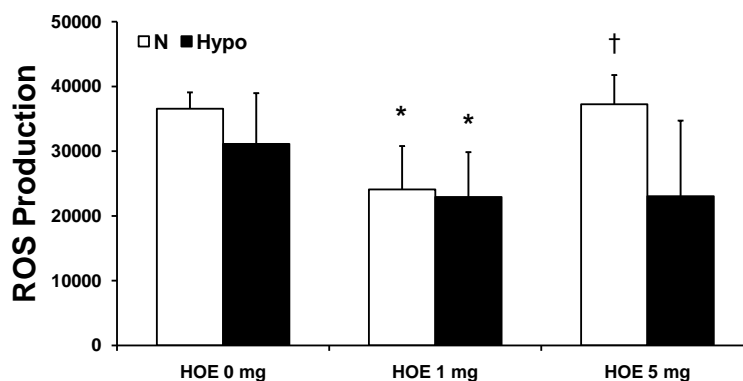
线粒体 ROS 的产生如图 3 所示。ROS 的产生在 N 组明显比 HOE 1 mg 组和 Hypo + HOE 1 mg 组增多($P < 0.05$); 在 HOE 5 mg 组明显比 HOE 1 mg 组增多($P < 0.05$); 在 Hypo 组, HOE 1 mg 组, Hypo + HOE 1 mg 组和 Hypo + HOE 5 mg 组的无明显统计学意义。



Note: Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5 - 7$ /group. * $P < 0.05$ vs. the N group; † $P < 0.05$ vs. the HOE 1 mg group; ‡ $P < 0.05$ vs. the Hypo + HOE 1 mg group. N, normothermia; Hypo, hypothermia; HOE, HOE-642. 注: 数据用均数 \pm 标准差表示, 每组 5~7 例。*表示与 N 组比较 $P < 0.05$; †表示与 HOE 1 mg 组比较 $P < 0.05$; ‡表示与 Hypo + HOE 1 mg 组比较 $P < 0.05$ 。N 代表常温; Hypo 代表低温; HOE 代表实验用药 HOE-642。

Figure 2. Mitochondrial transmembrane potential and swelling

图 2. 线粒体膜电位和线粒体的肿胀程度



Note: Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5 - 7$ /group. * $P < 0.05$ vs. the N group; † $P < 0.05$ vs. the HOE 1 mg group. ROS, reactive oxygen species; N, normothermia; Hypo, hypothermia; HOE, HOE-642. 注: 数据用均数 \pm 标准差表示, 每组 5~7 例。*表示与 N 组比较 $P < 0.05$; †表示与 HOE 1 mg 组比较 $P < 0.05$ 。N 代表常温; Hypo 代表低温; HOE 代表实验用药 HOE-642。

Figure 3. Mitochondrial ROS production

图 3. 线粒体氧化应激活性氧的产生

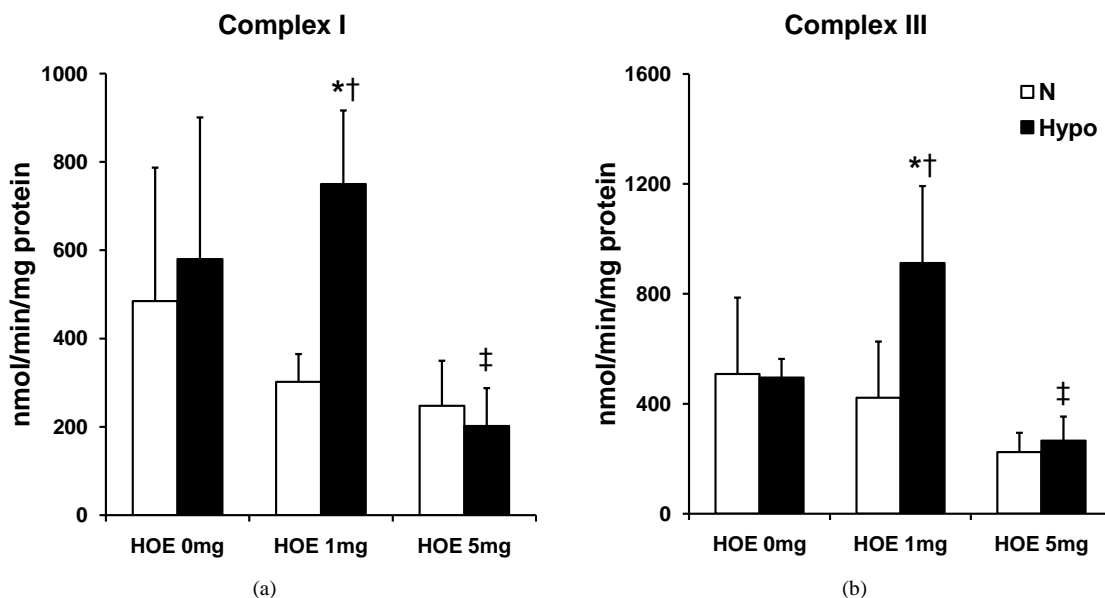
3.5. 复合物 I 和 III 的活性

线粒体复合物的活性如图 4 所示。复合物 I 的活性在 Hypo + HOE 1 mg 组明显比 N 组, HOE 1 mg 组和 Hypo + HOE 5 mg 组高($P < 0.05$, 见图 4(a)); 复合物 III 的活性在 Hypo + HOE 1 mg 组明显比 N 组, HOE 1 mg 组和 Hypo + HOE 5 mg 组高($P < 0.05$, 见图 4(b))。

4. 讨论

有很多报道都已经证明 HOE-642 在缺血/再灌注损伤中是有保护效应的[13] [14] [17], 然而, HOE-642 不同的剂量在心脏骤停模型中对神经线粒体功能所产生保护效应目前还不清楚。我们的数据表明, 相比于 N 组和 HOE-642 5 mg/kg 用药组, HOE-642 1 mg/kg 用药组对复苏后神经线粒体功能更有益。此外, 复苏前静注 HOE-642 1 mg/kg 的剂量并复合低温, 相比于单独采用低温或单独静注 HOE-642, 提高了复苏后 24 h 的存活率, 以及神经功能的恢复。HOE-642 1 mg/kg 复合低温显示出了有利的效应, 而 HOE-642 5 mg/kg 的剂量复合低温并没有显示出其保护效应。而且还有一点, 复苏前静注 HOE-642 5 mg/kg 的剂量延长了心脏骤停后复苏时间, 但对复苏率并没有影响。

已有研究指出, 脑皮质神经元细胞 NHE1 活性的激活, 将导致细胞内 Na^+ 超载, 继而触发细胞外的 Ca^{2+} 通过细胞膜上的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 反向交换模式涌入细胞内, 从而导致细胞内或线粒体内 Ca^{2+} 超载[18]。线粒体内 Ca^{2+} 超载是线粒体死亡途径的主要触发机制, 主要表现为线粒体的膜蛋白缺失, 膜电位下降, mPTP 开放, 线粒体内的 Cyt c 释放, 以及 ROS 的产生增加[19] [20]。所以, 抑制 NHE1 的激活, 可以防止细胞内和线粒体内的 Ca^{2+} 超载, 从而减低 Ca^{2+} 所介导的一系列有害事件。在本研究中, 我们发现复苏前静注 HOE-642 1 mg/kg 的剂量, 增加了膜电位, 以及预防线粒体的肿胀, 减少了线粒体 ROS 的产生。而复苏前静注 HOE-642 5 mg/kg 的剂量, 展现出了明显不利的结果。也许是因为相比于使用 HOE-642 1 mg/kg



Note: Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5 - 7$ /group. * $P < 0.05$ vs. the N group; † $P < 0.05$ vs. the HOE 1 mg group; ‡ $P < 0.05$ vs. the Hypo + HOE 1 mg group. N, normothermia; Hypo, hypothermia; HOE, HOE-642. 注: 数据用均数 \pm 标准差表示, 每组 5~7 例。*表示与 N 组比较 $P < 0.05$; †表示与 HOE 1 mg 组比较 $P < 0.05$; ‡表示与 Hypo + HOE 1 mg 组比较 $P < 0.05$ 。N 代表常温; Hypo 代表低温; HOE 代表实验用药 HOE-642。

Figure 4. Electron transport chain complex I and complex III activities in mitochondria
图 4. 线粒体呼吸链复合物 I 和复合物 III 的活性

的剂量, 使用 5 mg/kg 这样高剂量的 HOE-642 更明显的抑制了 NHE1 的活性。而且已证实, NHE1 不仅是一个脑缺血出现细胞内酸中毒后, 细胞内酸性物质排除的重要机制, 也是一个重要的信号分子[21] [22]。复苏前静注了 HOE-642 5 mg/kg 剂量的大鼠, 因 NHE1 活性被明显抑制, 在心脏骤停脑缺血, 出现细胞内酸性物质堆积时, 不能进行细胞内正常的 pH 调节, 也会引起大脑不同区域某些基因的表达, 这些都会加剧神经元细胞的坏死和凋亡, 反过来削弱了 HOE-642 所能产生的神经保护效应。

心脏骤停导致血流中断, 大脑和全身系统氧供减少, 有氧代谢活动急剧下降, 即使无氧代谢增加, 也不能为机体提供充足的 ATP。线粒体呼吸链受损, 导致线粒体氧化磷酸化障碍[23]。据报道, 细胞内高达 90% 的 ROS 都产生于线粒体电子传递链中, 尤其是在复合物 I 和复合物 III 传递的环节, 通常是由于发生电子漏出[24]。也有其他研究指出, 复合物 I 和复合物 III 是 ROS 产生的主要部位, 而且比起其他电子传递链的复合物, 复合物 I 和复合物 III 的活性在发生缺血时更易受损[23] [25] [26]。在本研究中, 我们发现, 复苏前静注 1 mg/kg 剂量的 HOE-642 并且复合低温明显的减少了 ROS 的产生; 同时 HOE-642 1 mg/kg 的剂量复合低温明显的增加了线粒体复合物 I 和复合物 III 的活性。这一结果与前面探讨的 HOE-642 1 mg/kg 的剂量复合低温, 相比于 HOE-642 5 mg/kg 的剂量, 提高了复苏后的生存率以及神经功能的恢复是一致的。

综上所述, 心脏骤停后, 复苏前静注 HOE-642 1 mg/kg 的剂量比静注 HOE-642 5 mg/kg 的剂量对神经线粒体的功能更有益。此外, 静注 HOE-642 1 mg/kg 的剂量并复合中度低温也展现出更有益的结果, 提高了复苏后的存活率, 改善了神经功能的恢复, 保护了线粒体的功能; 而 HOE-642 5 mg/kg 的剂量复合低温并没有展现出明显有益的结果。

致 谢

所有作者由衷地感谢哈尔滨医科大学附属第二医院麻醉与危重病学重点实验室各位老师对实验技术以及实验条件的支持与帮助。

基金项目

黑龙江省留学归国人员科学基金(LC2012C40); 哈尔滨医科大学附属第三医院海燕基金重点项目(JJZD2014-02)。

参考文献

- [1] Chan, P.H. (2005) Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress as Determinants of Cell Death/Survival in Stroke. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1042**, 203-209. <https://doi.org/10.1196/annals.1338.022>
- [2] Jaiswal, A.K. (2004) Nrf2 Signaling in Coordinated Activation of Antioxidant Gene Expression. *Free Radical Biology & Medicine*, **36**, 1199-1207. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.074>
- [3] Teshima, Y., Akao, M., Jones, S.P., *et al.* (2003) Cariporide (HOE642), a Selective Na⁺-H⁺ Exchange Inhibitor, Inhibits the Mitochondrial Death Pathway. *Circulation*, **108**, 2275-2281. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093277.20968.C7>
- [4] Hausenloy, D.J., Maddock, H.L., Baxter, G.F., *et al.* (2002) Inhibiting Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening: A New Paradigm for Myocardial Preconditioning? *Cardiovascular Research*, **55**, 534-543. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00455-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00455-8)
- [5] Wang, Y., Luo, J., Chen, X., *et al.* (2008) Gene Inactivation of Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1 Attenuates Apoptosis and Mitochondrial Damage Following Transient Focal Cerebral Ischemia. *The European Journal of Neuroscience*, **28**, 51-61. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06304.x>
- [6] Karmazyn, M. (1996) The Sodium-Hydrogen Exchange System in the Heart: Its Role in Ischemic and Reperfusion Injury and Therapeutic Implications. *The Canadian Journal of Cardiology*, **12**, 1074-1082.
- [7] Scholz, W., Albus, U., Counillon, L., *et al.* (1995) Protective Effects of HOE642, a Selective Sodium-Hydrogen Ex-

- change Subtype 1 Inhibitor, on Cardiac Ischaemia and Reperfusion. *Cardiovascular Research*, **29**, 260-268. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(96\)88579-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(96)88579-8)
- [8] Myers, M.L. and Karmazyn, M. (1996) Improved Cardiac Function after Prolonged Hypothermic Ischemia with the Na⁺/H⁺ Exchange Inhibitor HOE 694. *The Annals of Thoracic Surgery*, **61**, 1400-1406. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(96\)00088-4](https://doi.org/10.1016/0003-4975(96)00088-4)
- [9] Avkiran, M. (1996) Sodium-Hydrogen Exchange in Myocardial Ischemia and Reperfusion: A Critical Determinant of Injury? *Myocardial Ischemia: Mechanisms, Reperfusion, Protection*, **76**, 299-311. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8988-9_18
- [10] Frolich, O. and Karmazyn, M. (1997) The Na-H Exchanger Revisited: An Update on Na-H Exchange Regulation and the Role of the Exchanger in Hypertension and Cardiac Function in Health and Disease. *Cardiovascular Research*, **36**, 138-148. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00200-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00200-9)
- [11] Chakrabarti, S., Hoque, A.N. and Karmazyn, M. (1997) A Rapid Ischemia-Induced Apoptosis in Isolated Rat Hearts and Its Attenuation by the Sodium-Hydrogen Exchange Inhibitor HOE 642 (Cariporide). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **29**, 3169-3174. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1997.0561>
- [12] Ayoub, I.M., Kolarova, J., Yi, Z., et al. (2003) Sodium-Hydrogen Exchange Inhibition during Ventricular Fibrillation: Beneficial Effects on Ischemic Contracture, Action Potential Duration, Reperfusion Arrhythmias, Myocardial Function, and Resuscitability. *Circulation*, **107**, 1804-1809. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000058704.45646.0D>
- [13] Kolarova, J.D., Ayoub, I.M. and Gazmuri, R.J. (2005) Cariporide Enables Hemodynamically More Effective Chest Compression by Leftward Shift of Its Flow-Depth Relationship. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, **288**, H2904-H2911. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01181.2004>
- [14] Ayoub, I.M., Kolarova, J. and Gazmuri, R.J. (2010) Cariporide Given during Resuscitation Promotes Return of Electrically Stable and Mechanically Competent Cardiac Activity. *Resuscitation*, **81**, 106-110. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2009.09.013>
- [15] Castella, M., Buckberg, G.D. and Tan, Z. (2005) Neurologic Preservation by Na⁺-H⁺ Exchange Inhibition Prior to 90 Minutes of Hypothermic Circulatory Arrest. *The Annals of Thoracic Surgery*, **79**, 646-654; discussion 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2004.07.007>
- [16] Liakopoulos, O.J., Allen, B.S., Buckberg, G.D., et al. (2010) Resuscitation after Prolonged Cardiac Arrest: Role of Cardiopulmonary Bypass and Systemic Hyperkalemia. *The Annals of Thoracic Surgery*, **89**, 1972-1979. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2010.02.052>
- [17] Gazmuri, R.J., Ayoub, I.M., Hoffner, E., et al. (2001) Successful Ventricular Defibrillation by the Selective Sodium-Hydrogen Exchanger Isoform-1 Inhibitor Cariporide. *Circulation*, **104**, 234-239. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.2.234>
- [18] Luo, J., Chen, H., Kintner, D.B., et al. (2005) Decreased Neuronal Death in Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform 1-Null Mice after *in Vitro* and *in Vivo* Ischemia. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 11256-11268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3271-05.2005>
- [19] Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., et al. (2004) Calcium, ATP, and ROS: A Mitochondrial Love-Hate Triangle. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, **287**, C817-C833. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
- [20] Cao, G., Xiao, M., Sun, F., et al. (2004) Cloning of a Novel Apaf-1-Interacting Protein: A Potent Suppressor of Apoptosis and Ischemic Neuronal Cell Death. *The Journal of Neuroscience*, **24**, 6189-6201. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1426-04.2004>
- [21] Zhou, D., Xue, J., Gavrialov, O., et al. (2004) Na⁺/H⁺ Exchanger 1 Deficiency Alters Gene Expression in Mouse Brain. *Physiological Genomics*, **18**, 331-339. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00076.2004>
- [22] Cox, G.A., Lutz, C.M., Yang, C.L., et al. (1997) Sodium/Hydrogen Exchanger Gene Defect in Slow-Wave Epilepsy Mutant Mice. *Cell*, **91**, 139-148. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)80016-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)80016-7)
- [23] Gong, P., Li, C.S., Hua, R., et al. (2012) Mild Hypothermia Attenuates Mitochondrial Oxidative Stress by Protecting Respiratory Enzymes and Upregulating MnSOD in a Pig Model of Cardiac Arrest. *PLoS ONE*, **7**, e35313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035313>
- [24] Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005) Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, **120**, 483-495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>
- [25] Busl, K.M. and Greer, D.M. (2010) Hypoxic-Ischemic Brain Injury: Pathophysiology, Neuropathology and Mechanisms. *NeuroRehabilitation*, **26**, 5-13.
- [26] Almeida, A., Allen, K.L., Bates, T.E., et al. (1995) Effect of Reperfusion Following Cerebral Ischaemia on the Activity of the Mitochondrial Respiratory Chain in the Gerbil Brain. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 1698-1703. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041698.x>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2161-8712，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：acm@hanspub.org