

远程缺血后处理抑制心肺复苏后大鼠海马神经细胞自噬*

谢彪¹, 高旭辉¹, 黄洋¹, 周翔², 谭智天¹, 朱水波^{1△}
(中国人民解放军中部战区总医院¹心胸外科,²麻醉科, 湖北武汉 430070)

[摘要] 目的: 观察远程缺血后处理(RIPostC)对心肺复苏后(CPR)大鼠海马神经细胞自噬水平的影响。方法: 45只雄性SD大鼠随机分为假手术组(sham组)、心脏停搏(CA)/CPR组和RIPostC组, 每组15只。通过夹闭气管导管建立窒息性CA/CPR模型。在自主循环恢复(ROSC)后不同时点进行神经功能缺损评分(NDS), ROSC后24h处死大鼠并取出海马组织, Western blot法检测海马神经细胞LC3-II/LC3-I和beclin-1蛋白的表达, TUNEL法检测细胞凋亡, 免疫荧光观察LC3颗粒形成, 透射电镜观察细胞自噬小体和线粒体的超微结构形态学变化。结果: 与sham组相比, CA/CPR组NDS评分降低, LC3-II/LC3-I和beclin-1蛋白表达均升高($P < 0.05$), 神经细胞凋亡增多($P < 0.05$); 与CA/CPR组相比, RIPostC组的NDS评分升高, LC3-II/LC3-I和beclin-1表达下降($P < 0.05$), 神经细胞凋亡减少($P < 0.05$), LC3颗粒形成减少, 细胞内自噬小体减少, 线粒体结构损伤减轻。结论: 远程缺血后处理可改善心肺复苏后大鼠神经功能, 这可能与抑制海马神经细胞过度自噬有关。

[关键词] 心脏停搏; 心肺复苏; 海马; 自噬; 远程缺血后处理

[中图分类号] R541.7⁺8; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.09.014

Effect of remote ischemic postconditioning on autophagy of hippocampal neural cells after cardiopulmonary resuscitation in rats

XIE Biao¹, GAO Xu-hui¹, HUANG Yang¹, ZHOU Xiang², TAN Zhi-tian¹, ZHU Shui-bo¹

(¹Department of Thoracic Cardiovascular Surgery, ²Department of Anesthesiology, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan 430070, China. E-mail: zhutian29@sina.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To observe the effect of remote ischemic post-conditioning (RIPostC) on autophagy of hippocampal neural cells after cardiopulmonary resuscitation (CPR) in rats. **METHODS:** Male SD rats ($n = 45$) were randomly divided into sham operation group (sham group), cardiac arrest (CA)/CPR group and RIPostC group, with 15 rats in each group. A CPR model of asphyxiated CA was established by clamping the tracheal tube. Neurological deficit scoring (NDS) was performed at different time points after return of spontaneous circulation (ROSC). The rats were sacrificed 24 h after ROSC and hippocampal tissues were removed. Western blot was used to detect autophagy markers LC3-II/LC3-I and beclin-1 in the hippocampal tissues. The apoptosis was detected by TUNEL method. The formation of LC3 particles was observed by immunofluorescence. The ultrastructural changes of autophagosomes and mitochondria were observed under transmission electron microscope. **RESULTS:** Compared with sham group, the NDS scores of CA/CPR group were decreased, the protein expression of LC3-II/LC3-I and beclin-1 was increased ($P < 0.05$), and the apoptosis of the neural cells was increased ($P < 0.05$). Compared with CA/CPR group, the NDS scores in RIPostC group was increased, the protein expression of LC3-II/LC3-I and beclin-1 was decreased ($P < 0.05$), and the neural cell apoptosis was decreased ($P < 0.05$). The number of LC3 particles was decreased, intracellular autophagosome number was reduced, and the mitochondrial structure damage was alleviated. **CONCLUSION:** Remote ischemic post-conditioning improves neurological function in rats after CPR, which may be related to inhibition of excessive autophagy in hippocampus.

[KEY WORDS] Cardiac arrest; Cardiopulmonary resuscitation; Hippocampus; Autophagy; Remote ischemic post-conditioning

[收稿日期] 2018-12-13 [修回日期] 2019-04-08

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81471831)

△通讯作者 Tel: 027-50772378; E-mail: zhutian29@sina.cn

自噬 (autophagy) 是指细胞内的长寿命蛋白质以及受损的细胞器经溶酶体途径被降解的过程, 广泛参与生长发育、免疫、新陈代谢和老化等生理性过程, 普遍存在于真核细胞中。近期研究表明, 细胞自噬的过度激活可导致另一种程序性细胞死亡——自噬性细胞死亡。远程缺血后处理 (remote ischemic postconditioning, RIPostC) 是在远端器官或部位进行短暂的、非致死性缺血和再灌注的处理方式。大量研究表明, 这种处理方式可减轻心肺复苏 (cardiopulmonary resuscitation, CPR) 后神经功能障碍, 然而其诱导的内源性保护机制还不明确。本研究采用夹闭气管导管建立窒息性心脏停搏 (cardiac arrest, CA) / CPR 模型, 观察远程缺血后处理对心肺复苏后大鼠海马神经细胞自噬水平的影响, 并初步探讨其保护机制。

材 料 和 方 法

1 实验动物与分组

雄性清洁级 SD 大鼠 45 只, 体重 200 ~ 300 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 实验动物许可证为 SCXK (鄂) 2016-0009。随机分为 3 组, 即假手术组 (sham 组, $n = 15$)、CA/CPR 组 ($n = 15$) 和 RIPostC 组 ($n = 15$)。饲养室通风、恒温 23 °C, 标准鼠料饲养。

2 实验方法

2.1 大鼠窒息性 (CA/CPR) 模型的建立 实验大鼠术前禁食 12 h, 不禁水。2% 戊巴比妥钠 2 mL/kg 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定于操作台, 肢体导联连接监测心电图。右侧股动脉置入 24G 静脉留置管, 通过预充肝素的延长管连接压力换能器, 以 Powerlab 系统监测血压。左侧股静脉置入 24G 静脉留置管, 接输液装置, 以备输注急救药物。经口置入 16G 静脉留置针软管, 置管成功后作颈部正中切口, 分离气管予以粗线结扎, 以防止机械通气时漏气影响窒息时心跳骤停效果。连接小动物呼吸机行机械通气, 调节呼吸参数, 呼吸频率 60 min^{-1} , 潮气量 6 mL/kg, FiO_2 21%, 稳定 10 min。在呼气末夹闭气管导管, 密切观察大鼠血压和心电图变化, 以收缩压 (systolic blood pressure, SBP) ≤ 25 mmHg 作为心跳骤停标准。达到心跳骤停标准后开始计时, 持续 5 min 后开始机械通气, 呼吸频率 80 min^{-1} , 潮气量 6 mL/kg, FiO_2 21%, 同时依据节拍器节奏行快速、标准胸外按压, 按压频率 200 min^{-1} , 按压深度为大鼠胸廓前后径的 1/3, 先后经股静脉快速注射肾上腺素 (0.04 mg/kg) 和 1 mL 万汶 (羟乙基淀粉 130/0.4 氯化钠注射液), 并记录血压、心率和心电图。若出现自主心律, 且

SBP 高于 60 mmHg 并能维持 10 min, 则判定为自主循环恢复 (return of spontaneous circulation, ROSC), 若按压 3 min 仍未出现自主心律或 SBP 低于 60 mmHg 则放弃抢救, 视为复苏失败。复苏成功者继续呼吸机支持, 自主呼吸恢复满意即可停止机械通气, 结扎股动、静脉并缝合皮肤切口, 术后每 6 h 腹壁皮下注射 10% 葡萄糖 2 mL, 直至动物能自主饮水进食, 放入单独的鼠笼, 置入 23 °C 恒温鼠舍继续喂养。Sham 组大鼠仅行动、静脉插管和气管插管等操作。

2.2 远程缺血后处理 大鼠自主循环恢复后即刻用动脉夹夹闭左侧股动脉 5 min, 再释放 5 min, 依次重复 3 个循环。

2.3 神经功能缺损评分 (neurological deficit scoring, NDS) 由 1 名不清楚实验分组的人员于自主循环恢复后对实验动物进行 NDS 评分, 分别从一般行为、脑干反射、运动及感觉评估、行为学及癫痫发作等方面来评估神经功能, 范围为 0 ~ 80 分, 80 分为正常, 0 分为脑死亡。

2.4 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 和 beclin-1 的表达 大鼠处死后取新鲜海马组织, 经过裂解, 提取细胞总蛋白。测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE, 蛋白质转膜, 显色, 曝光, 扫描胶片, 结果用分析软件 ImageJ 进行处理, GAPDH 作为总蛋白内参照对比, 比值结果表示其蛋白的相对含量。

2.5 TUNEL 法检测神经细胞凋亡 石蜡包埋切片, 常规脱蜡, 滴加蛋白酶 K 工作液, 复染核, 封片, 荧光显微镜下观察并照相。大鼠海马 CA 区选择 3 个视野, 计算各组大鼠海马神经细胞凋亡率。

2.6 免疫荧光染色观察 LC3 颗粒 常规石蜡切片、脱蜡, 3% 的过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性, 高温柠檬酸盐缓冲液抗原修复, 加完 I 抗 LC3 (1:100; Abcam, Ab192890) 后于 4 °C 湿盒中孵育过夜。PBS 清洗 3 次, 滴加稀释好的荧光 (CY3) 标记羊抗兔 IgG (1:100; 武汉博士德生物工程有限公司, BA1032), 滴加 DAPI 对本标进行染核, 荧光显微镜下观察采集图像, Image-Pro Plus 6.0 半定量 LC3 的表达。

3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示多组样本均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 Bonferroni 校正的 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠复苏前后基本生理参数和相关指标

各组大鼠在 CA 前体重、心率和平均动脉压等的

差异无统计学显著性 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠复苏前后基本生理参数情况

Table 1. Comparison of resuscitation parameters among experimental groups

Item	Sham	CA/CPR	RIPostC
Total number	15	15	15
Weight (g)	267 ± 15	262 ± 20	255 ± 22
Mean arterial pressure (mmHg)	96 ± 5	95 ± 5	95 ± 6
Heart rate (min ⁻¹)	430 ± 22	430 ± 24	433 ± 22
The time from asphyxiay to SBP ≤ 25 mmHg (s)	—	243 ± 20	246 ± 23
The time of CPR (s)	—	88 ± 26	89 ± 16
Mechanical ventilation time (min)	—	45 ± 3	46 ± 3
Successful resuscitation [n(%)]	—	12(80)	12(80)
12 h survival rate [n(%)]	15(100)	10(66.6)	11(73.3)
24 h survival rate [n(%)]	15(100)	9(60)	11(73.3)

2 各组大鼠不同时点的 NDS 评分

CA/CPR 组各时点的 NDS 评分较对照组明显降低 ($P < 0.05$), 提示 CA/CPR 组复苏后神经功能下降, 存在脑组织损伤; 而 RIPostC 组的 NDS 评分增高 ($P < 0.05$), 提示远程缺血后处理可改善神经功能, 见表 2。

表 2 各组大鼠不同时点 NDS 评分比较

Table 2. Comparison of NDS scores of the rats in different groups at different time points (Mean ± SD. n = 9)

Group	12 h	24 h
Sham	78.9 ± 1.1	80.0 ± 0.0
CA/CPR	49.8 ± 3.4 [△]	57.1 ± 4.7 [△]
RIPostC	56.8 ± 3.8 [*]	64.0 ± 3.5 [*]

[△] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs CA/CPR group.

3 自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 和 beclin-1 的表达

与 sham 组比较, CA/CPR 组的 LC3-II/LC3-I 和 beclin-1 表达在 ROSC 后 24 h 明显升高 ($P <$

0.05); 与 CA/CPR 组比较, RIPostC 组的 LC3-II/LC3-I 和 beclin-1 表达在 ROSC 后 24 h 明显降低 ($P < 0.05$), 提示 RIPostC 抑制自噬相关蛋白的表达, 降低细胞自噬水平, 见图 1。

4 神经细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示 sham 组凋亡细胞少见, 凋亡率为 (2.53 ± 0.60)% ; CA/CPR 组可见较多凋亡细胞, 凋亡率为 (18.54 ± 3.67)% ; RIPostC 组凋亡率为 (9.78 ± 1.60)% , 较 CA/CPR 组显著降低 ($P < 0.05$), 见图 2。

5 免疫荧光结果分析

对照组 LC3 颗粒形成较少, 平均吸光度值为 (3.88 ± 0.72)% ; CA/CPR 组的海马神经细胞胞浆内可见明显 LC3 颗粒形成, 平均吸光度值为 (9.18 ± 1.11)% ; RIPostC 组的平均吸光度值为 (6.06 ± 0.34)% , 较 CA/CPR 组显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3。

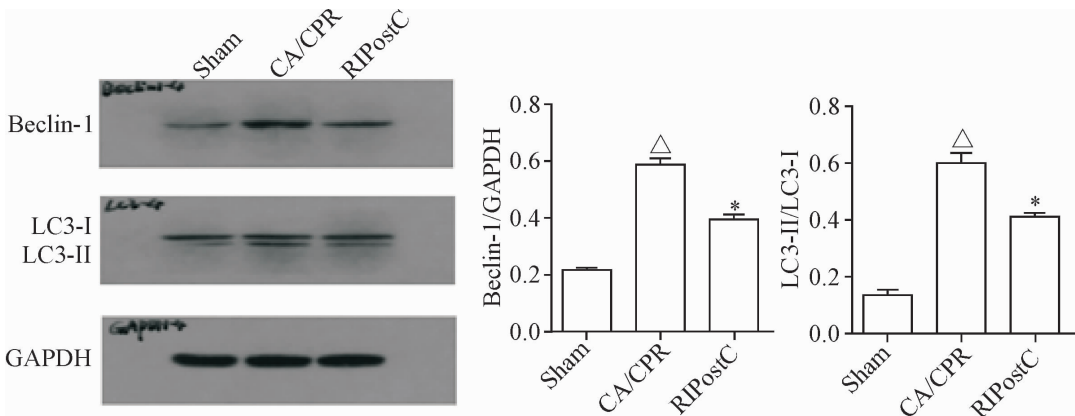


Figure 1. Comparison of relative protein expression levels of LC3-II/LC3-I and beclin-1 in each group of the neural cells. Mean ± SD. n = 5. [△] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs CA/CPR group.

图 1 各组神经细胞 LC3-II/LC3-I 和 beclin-1 相对蛋白表达水平比较

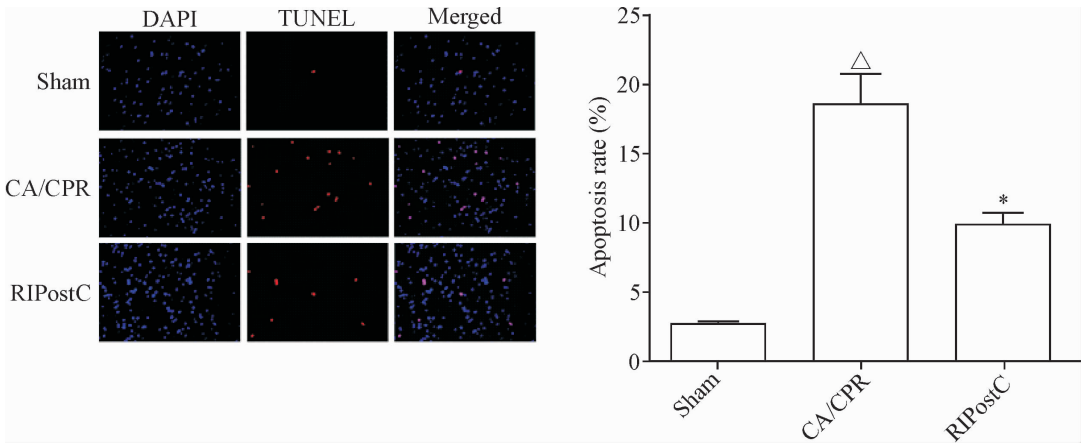


Figure 2. Comparison of apoptotic rate of neural cells in each group (×400). Mean ± SD. n = 3. $\Delta P < 0.05$ vs sham group; * $P < 0.05$ vs CA/CPR group.

图2 各组大鼠神经细胞凋亡率的比较

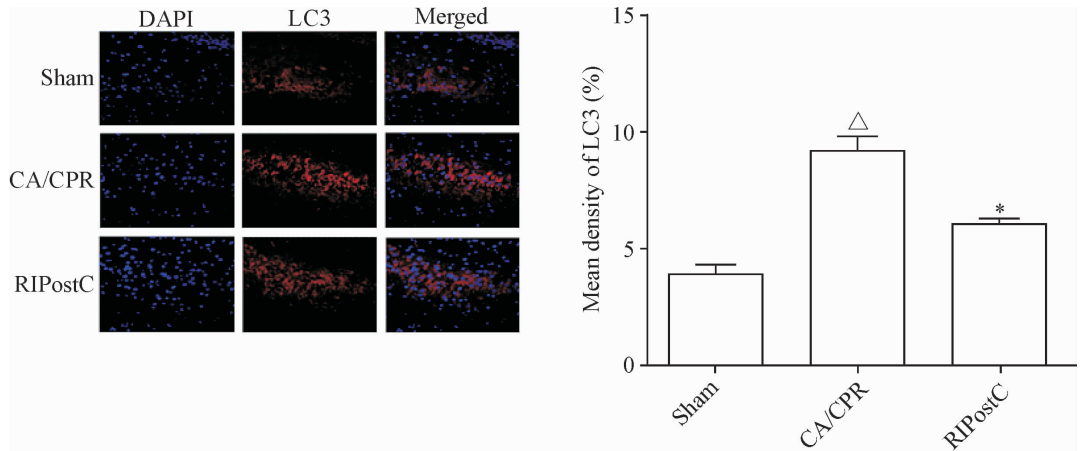


Figure 3. Formation of LC3 particles in rat neural cells in each group (×400). Mean ± SD. n = 3. $\Delta P < 0.05$ vs sham group; * $P < 0.05$ vs CA/CPR group.

图3 各组大鼠神经细胞胞浆 LC3 颗粒形成

6 透射电镜结果

Sham 组大鼠海马神经元内未见明显自噬体,线粒体外膜完整,嵴光滑清晰可见,基质均匀;CA/CPR 组的神经元内可见较多自噬泡(黑色箭头所示),线粒体体积缩小,嵴紊乱、粗糙,基质浓缩;RIPostC 组神经元内自噬泡较少(黑色箭头所示),线粒体体积略有缩小,嵴可分辨,基质浓度略不均匀,见图 4。

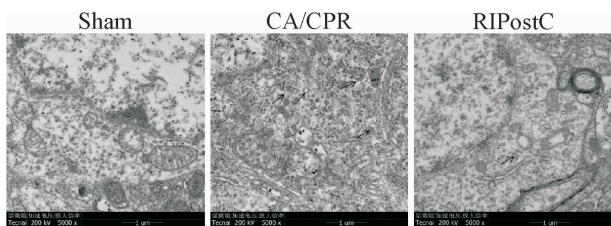


Figure 4. Autophagosome and mitochondrial ultrastructure of hippocampal neural cells in each group (×5 000).

图4 各组大鼠海马神经细胞自噬体和线粒体超微结构

讨 论

心脏停搏是严重危害人类健康与生存的急危重症之一,尽早恢复血液灌注是治疗心跳骤停最有效的措施,然而脑缺血一定时间恢复血液供应后,其功能不但未能恢复,却出现了更加严重的脑机能障碍,称之为脑缺血再灌注损伤^[1]。复苏后脑损伤是心跳骤停患者恢复自主循环后期死亡和致残最主要的原因^[2]。远程缺血处理是目前研究较为广泛的一种内源性神经保护策略,因其简单方便,可操作性强,具有较好的临床应用前景。在这项研究中,笔者发现远程缺血后处理可改善复苏后神经功能,并降低复苏后的海马神经细胞凋亡,是一种有效的脑保护策略,这与许多研究结果一致^[3-5],然而其机制仍不清楚。

自噬是真核细胞的一种自我保护机制,通过对

长半衰期蛋白及细胞器的降解和再利用来满足细胞代谢的需要,对维持细胞内稳态具有重要作用^[6-7]。LC3 定位于自噬体内外膜,参与自噬体的形成。其有 LC3- I 和 LC3- II 2 种存在形式,自噬发生时,LC3- I 经泛素样加工修饰并与自噬膜表面的脂酰乙醇胺结合形成 LC3- II,LC3- II/LC3- I 被通常用作检测哺乳动物自噬活性的重要指标^[8]。在生理状态下,beclin-1 与 Bcl-2 紧密结合,而缺血缺氧时,beclin-1 与 Bcl-2 分离并参与自噬体的形成以及调节其它自噬蛋白在自噬前体膜的定位,其表达水平与细胞自噬水平正相关,是调控自噬的重要靶点^[9]。近期研究表明适当自噬可以保护细胞,而自噬过度激活时,可引起自噬性细胞死亡。Shi 等^[10]在缺氧缺糖的体外细胞实验中证明过度的自噬可导致神经细胞的死亡;Cui 等^[11]在心跳骤停的动物模型上验证了自噬的激活介导复苏后期海马神经细胞死亡。因而我们推测远程缺血处理的保护机制可能与抑制复苏后海马组织的自噬有关。

本研究用 Western blot、免疫荧光和透射电镜的方法来判断大鼠心肺复苏后神经细胞自噬水平的变化。研究结果显示,ROSC 后 24 h 大鼠脑海马组织 LC3- II/LC3- I 和 beclin-1 表达相比 sham 组明显增加,免疫荧光检测提示海马神经细胞胞浆 LC3 颗粒形成增多,透射电镜检查可看见神经元出现明显的自噬泡,提示神经细胞存在自噬水平的激活,而 RIPostC 组降低了自噬相关蛋白的表达,减少 LC3 颗粒形成,提高心肺复苏后大鼠 NDS 评分,说明 RIPostC 组抑制了脑海马组织的自噬水平,减轻了神经细胞过度自噬而导致的脑损伤,这也进一步验证了我们的推测。远程缺血后处理的脑保护机制主要通过内源性的神经和体液机制来实现。Zhou 等^[4]研究发现,这种处理方式可以通过抑制线粒体通透性转换孔的开放来实现脑保护作用。另外 2 项研究表明,这种处理方式可能通过减少氧化应激和炎症反应来发挥神经保护机制^[12-13]。我们的研究主要从细胞自噬的角度进一步阐明了其内源性的神经保护机制。

综上所述,远程缺血后处理可以减轻心肺复苏后海马组织神经细胞凋亡,改善神经功能,这种保护作用可能与抑制脑海马神经细胞过度自噬有关,但调控自噬水平的具体分子机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Liu S, Zhang Y, Zhao Y, et al. Effects of hypothermia on S100B and glial fibrillary acidic protein in asphyxia rats af-

ter cardiopulmonary resuscitation[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(1):401-406.

- [2] Laver S, Farrow C, Turner D, et al. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest [J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(11):2126-2128.
- [3] Xu J, Sun S, Lu X, et al. Remote ischemic pre- and postconditioning improve postresuscitation myocardial and cerebral function in a rat model of cardiac arrest and resuscitation[J]. *Crit Care Med*, 2015, 43(1):e12-e18.
- [4] Zhou X, Yong L, Huang Y, et al. The protective effects of distal ischemic treatment on apoptosis and mitochondrial permeability in the hippocampus after cardiopulmonary resuscitation[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9):6902-6910.
- [5] 郭瑜,孙丽,陶蕾,等. 远隔缺血后处理对大鼠窒息性心脏停搏复苏后脑损伤的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(11):1326-1329.
- [6] Li X, Wang S, Chen Y, et al. miR-22 targets the 3'UTR of HMGB1 and inhibits the HMGB1-associated autophagy in osteosarcoma cells during chemotherapy [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(6):6021-6028.
- [7] van der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, et al. Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(8):829-837.
- [8] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2):151-175.
- [9] Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes [J]. *Biochimie*, 2008, 90(2):313-323.
- [10] Shi R, Weng J, Zhao L, et al. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2012, 18(3):250-260.
- [11] Cui D, Shang H, Zhang X, et al. Cardiac arrest triggers hippocampal neuronal death through autophagic and apoptotic pathways [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:27642.
- [12] Li P, Su L, Li X, et al. Remote limb ischemic postconditioning protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury via upregulating expression of Nrf2, HO-1 and NQO-1 in mice [J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(6):552-559.
- [13] Liu Q, Zhou S, Wang Y, et al. A feasible strategy for focal cerebral ischemia-reperfusion injury: remote ischemic postconditioning [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(15):1460-1463.