

· 论著 ·

山莨菪碱对心搏骤停家猪线粒体途径
心肌细胞凋亡的保护作用

刘亚华 周满红 代正 张杰 朱海燕 李玉华 尹雪莲 张维 沈洪

【摘要】 目的 探讨山莨菪碱对心搏骤停(CA)家猪心肌线粒体损伤的保护作用及其机制。**方法** 23 只雄性家猪按随机数字表法分为肾上腺素组($n=9$)、山莨菪碱组($n=9$)、对照组($n=5$)，用交流电刺激法诱发心室纤颤(室颤)建立 CA 模型。于 CA 前基础状态、CA 8 min 及自主循环恢复(ROSC)即刻、30 min 和 24 h 留取血标本，ROSC 24 h 处死动物留取心肌组织。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆和心肌细胞色素 C(Cyt C)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)的蛋白含量；透射电镜下观察心肌超微结构改变；荧光染色法检测心肌细胞凋亡。**结果** 山莨菪碱组 ROSC 率较肾上腺素组提高了 22.22%(77.78%比 55.56%, $P>0.05$)，复苏成功的动物均存活 24 h。随着 ROSC 时间的延长，肾上腺素组和山莨菪碱组血浆 Cyt C 和 caspase-3 蛋白含量明显增高，且高于对照组；其中山莨菪碱组 ROSC 30 min、24 h 血浆 Cyt C 蛋白含量(nmol/L)较肾上腺素组明显减少(48.68 ± 19.50 比 77.51 ± 29.87 , 48.98 ± 20.26 比 82.11 ± 25.09 , 均 $P<0.05$)；两复苏组间 ROSC 后各时间点心肌 Cyt C 及血浆和心肌 caspase-3 蛋白含量比较差异均无统计学意义。肾上腺素和山莨菪碱均能明显减轻心肌细胞线粒体损伤，减少心肌细胞凋亡；以山莨菪碱组作用更好，细胞凋亡率明显下降[(0.15 ± 0.04)%比(0.37 ± 0.04)%, $P<0.01$]。**结论** 山莨菪碱可能通过减少 Cyt C 蛋白表达量及减轻复苏后心肌线粒体损伤程度来保护心肌细胞、抑制线粒体途径的心肌细胞凋亡。

【关键词】 心搏骤停；心肺复苏；山莨菪碱；凋亡；细胞色素 C；天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3

Protective effect of anisodamine against myocardial cell apoptosis through mitochondria impairment in cardiac arrest in pigs LIU Ya-hua*, ZHOU Man-hong, DAI Zheng, ZHANG Jie, ZHU Hai-yan, LI Yu-hua, YIN Xue-lian, ZHANG Wei, SHEN Hong. *Department of Emergency, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: SHEN Hong, Email: shenhong@em120.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of anisodamine on myocardial mitochondrial damage in cardiac arrest (CA) in pigs. **Methods** Twenty-three male pigs were randomly divided into three groups, epinephrine group ($n=9$), anisodamine group ($n=9$) and control group ($n=5$). CA following ventricular fibrillation (VF) was induced by alternating current. The blood samples were collected before CA, 8 minutes after CA and instantly after recovery of spontaneous circulation (ROSC), and 30 minutes and 24 hours later. Hearts were obtained at 24 hours after ROSC. The changes in Cytochrome C (Cyt C) and caspase-3 in plasma and myocardium were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The myocardial specimens were observed by transmission electron microscopy for ultrastructural changes, and apoptosis was assessed with Hoechst 33258 staining. **Results** The ROSC rate of the anisodamine group was elevated by 22.22% compared with the epinephrine group (77.78% vs. 55.56%, $P>0.05$). All animals with resumption of ROSC survived up to 24 hours. The plasma contents of Cyt C and caspase-3 in the epinephrine group and the anisodamine group gradually increased after ROSC, and were significantly higher than those in the control group. But the plasma Cyt C (nmol/L) level in the anisodamine group was lower than that in the epinephrine group at 30 minutes and 24 hours after ROSC (48.68 ± 19.50 vs. 77.51 ± 29.87 , 48.98 ± 20.26 vs. 82.11 ± 25.09 , both $P<0.05$). There was no significant difference in protein contents of both Cyt C and caspase-3 in plasma and myocardium between two resuscitate groups. Both epinephrine and anisodamine could mitigate cardiac mitochondrial damage after CA, but the anisodamine showed better effect. The myocardium apoptosis ratio in the anisodamine group was lower than that of the epinephrine group [(0.15 ± 0.04)% vs. (0.37 ± 0.04)%, $P<0.01$]. **Conclusion** By decreasing the protein content of Cyt C, and reducing the extent of damage to myocardial mitochondria, anisodamine can protect the myocardial ultrastructure, and restrain the mitochondria-induced cell apoptosis after resuscitation.

【Key words】 Cardiac arrest; Cardiopulmonary resuscitation; Anisodamine; Apoptotic; Cytochrome C; Caspase-3

DOI:10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2013.02.009 基金项目:卫生部全国卫生行业基金科研专项(201002011)

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科(刘亚华、代正、朱海燕、李玉华、沈洪);遵义医学院附属医院干部保健病房(周满红);武警总医院外科监护室(张杰);北京同仁医院急诊科(尹雪莲);解放军总后司令部管理保障局第一门诊部(张维)

通信作者:沈洪, Email: shenhong@em120.com

心搏骤停(CA)及心肺复苏(CPR)领域研究与实践的进展提高了复苏效果,但患者出院存活率远低于初始的自主循环恢复(ROSC)率,复苏后心功能不全都是影响存活率的重要因素之一^[1-2]。有研究认为线粒体途径的心肌细胞凋亡是 CA 及复苏后心功能改变的关键病理机制,该途径通过释放线粒体内外膜间的细胞色素 C(Cyt C)以及随后激活的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases)凋亡“瀑布”效应引发了心肌细胞凋亡^[3]。山莨菪碱可减轻复苏后心肌组织线粒体膜电位降低水平,并抑制线粒体膜通透性增加,从而对心肌线粒体结构完整性具有保护作用^[4],但其是否可以通过保护线粒体,减少凋亡信使 Cyt C 的释放和随后的凋亡链式反应,从而影响心肌凋亡,尚未见报道。本研究中通过观察 CA 动物 CPR 后血液及心肌中 Cyt C、caspase-3 蛋白含量的变化,对比心肌线粒体超微结构改变和心肌细胞凋亡程度,探讨山莨菪碱对线粒体途径心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:3~4 月龄雄性家猪 23 只,体质量 25~27 kg,由解放军总医院动物实验中心提供。按随机数字表法将动物分为肾上腺素组($n=9$)、山莨菪碱组($n=9$)和对照组($n=5$)。

1.2 CA 动物模型复制:采用交流电刺激法诱发心室纤颤(VF)建立猪 CA 模型^[5]。诱发 CA 成功标准:有创血压监测显示平均动脉压(MAP) <10 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),伴有正常动脉搏动消失,心电图显示 VF 波形或室性逸搏心律(无脉性电活动)或呈一条直线。对照组动物麻醉及 VF 诱发前准备过程同两个实验组,但不诱发 VF 和进行 CPR。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 复苏方法:在 CA 诱导成功即刻开始计时,持续 9 min 后开始 CPR。采用呼吸机控制呼吸,容量控制模式,吸入氧浓度 1.00,通气频率 16 次/min,潮气量 15 ml/kg。胸外心脏按压频率 >100 次/min,按压幅度为胸廓前后径 1/4。复苏开始即经右颈外静脉推注肾上腺素 45 μ g/kg(肾上腺素组)^[6],或者肾上腺

素 45 μ g/kg + 山莨菪碱 0.4 mg/kg(山莨菪碱组)^[7]。按压 2 min 后行体外电除颤(双相波能量 150 J)^[5],如未复苏成功,继续胸外按压 2 min,给予第 2 次电除颤(2 min 1 次),每隔 3 min 重复推注复苏药物。CPR 30 min 后仍未实现 ROSC 者停止 CPR。

1.4 ROSC 判定标准:停止心脏按压后,动物出现室上性节律(包括窦性、房性或交界性心律)伴 MAP >60 mm Hg 或脉压 >20 mm Hg,并且持续时间超过 10 min^[5]。ROSC 后监护 1 h,拔除气管插管及所有静脉通路,放置于笼中观察 24 h。

1.5 标本留取及指标检测方法:在 CA 前的基础状态、CA 8 min 及 ROSC 即刻、30 min 和 24 h 时各取血 3 ml。乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,混匀后于 4 $^{\circ}$ C、1000 $\times g$ 离心 10 min,取血浆备用。所有复苏成功的动物及对照组动物均在 24 h 后处死,即刻留取左心室心肌,一部分制备组织匀浆备用;另一部分常规包埋后进行组织切片备用。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆和组织中 Cyt C、caspase-3 含量。组织切片采用 Hoechst 33258 荧光染色,在荧光显微镜下观察心肌细胞凋亡情况,计算平均阳性细胞率(阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$);采用双片染色,透射电镜下观察组织超微结构。

1.6 统计学方法:采用 SPSS 16.0 进行数据分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本间比较行单因素方差分析和 LSD- t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROSC 率:山莨菪碱组 ROSC 率(77.78%)较肾上腺素组(55.56%)提高了 22.22%($P>0.05$),复苏成功的动物均存活 24 h。

2.2 血浆及心肌 Cyt C 含量变化(表 1):肾上腺素组和山莨菪碱组 CA 及复苏后各时间点血浆 Cyt C 蛋白含量均明显高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);山莨菪碱组 ROSC 30 min、24 h 时血浆 Cyt C 蛋白含量较肾上腺素组明显减少(均 $P<0.05$)。肾上腺素组和山莨菪碱组 ROSC 24 h 心肌 Cyt C 蛋白含量高于对照组,但 3 组间无差异(均 $P>0.05$)。

表 1 不同复苏药物各组 CA 猪复苏前后血浆 Cyt C 及 ROSC 24 h 心肌组织 Cyt C 蛋白含量的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血浆 Cyt C(nmol/L)					心肌 Cyt C (nmol/L)
		基础值	CA 8 min	ROSC 即刻	ROSC 30 min	ROSC 24 h	
对照组	5	10.82 $\pm$ 2.98	11.04 $\pm$ 5.20	13.30 $\pm$ 3.99	13.42 $\pm$ 3.81	11.87 $\pm$ 3.75	41.75 $\pm$ 16.66
肾上腺素组	5	10.96 $\pm$ 2.84	37.07 $\pm$ 15.61 ^a	55.10 $\pm$ 29.78 ^a	77.51 $\pm$ 29.87 ^a	82.11 $\pm$ 25.09 ^a	67.37 $\pm$ 33.74
山莨菪碱组	7	11.64 $\pm$ 4.09	41.28 $\pm$ 12.52 ^a	49.90 $\pm$ 20.13 ^b	48.68 $\pm$ 19.50 ^{bc}	48.98 $\pm$ 20.26 ^{ac}	60.33 $\pm$ 36.44

注:CA:心搏骤停,Cyt C:细胞色素 C,ROSC:自主循环恢复;与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与肾上腺素组比较,^c $P<0.05$

表 2 不同复苏药物各组 CA 猪复苏前后血浆 caspase-3 及 ROSC 24 h 心肌组织 caspase-3 蛋白含量的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血浆 caspase-3(pmol/L)					心肌 caspase-3 (pmol/L)
		基础值	CA 8 min	ROSC 即刻	ROSC 30 min	ROSC 24 h	
对照组	5	7.84 ± 3.46	8.27 ± 2.89	8.31 ± 3.28	9.46 ± 3.41	11.13 ± 4.42	16.52 ± 4.41
肾上腺素组	5	8.20 ± 3.39	12.72 ± 4.64	20.68 ± 6.17 ^a	20.51 ± 9.64 ^b	34.29 ± 14.77 ^a	39.01 ± 14.56 ^a
山莨菪碱组	7	8.58 ± 4.18	11.99 ± 4.51	17.21 ± 5.45 ^b	21.96 ± 7.27 ^b	32.68 ± 10.54 ^b	32.68 ± 10.55 ^b

注:CA:心搏骤停;caspase-3:天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3,ROSC:自主循环恢复;与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$

2.3 血浆及心肌 caspase-3 含量变化(表 2):肾上腺素组和山莨菪碱组 ROSC 即刻、30 min、24 h 血浆 caspase-3 蛋白及 ROSC 24 h 心肌 caspase-3 蛋白含量均较对照组明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。肾上腺素组和山莨菪碱组间血浆和心肌 caspase-3 蛋白含量差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.4 复苏后 24 h 心肌超微结构变化:对照组心肌细胞完整,纤维明暗带排列规则;线粒体规律分布于肌节周围,形态及结构正常,嵴排列整齐、密集(图 1a)。肾上腺素组心肌纤维排列不齐,肌原纤维部分溶解;线粒体聚集、分布紊乱,形态不规则,嵴排列不齐,部分溶解、断裂(图 1b)。山莨菪碱组心肌纤维排列较肾上腺素组规整,细胞保存良好,肌丝区无异常;线粒体嵴尚完整,但仍有聚集和形态不规则(图 1c)。

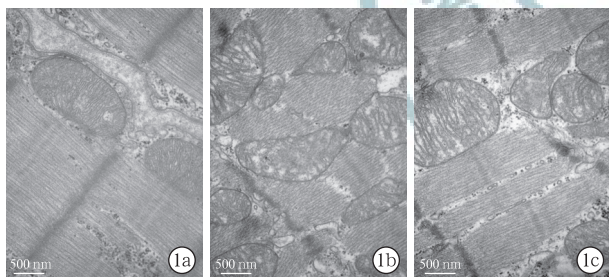


图 1 电镜下观察心搏骤停家猪复苏后 24 h 心肌超微结构改变 对照组(a)心肌纤维结构致密,由粗肌丝组成的明暗带排列规整,线粒体形态、结构及分布正常,糖原丰富;肾上腺素组(b)肌原纤维肿胀、部分溶解,线粒体形态分布异常,内膜肿胀、断裂,线粒体嵴排列紊乱;山莨菪碱组(c)心肌纤维结构及排列较规整,线粒体轻度聚集,嵴较完整 醋酸铀-柠檬酸铅双染 $\times 20\,000$

2.5 复苏后 24 h 心肌细胞凋亡情况(图 2):凋亡的心肌细胞在荧光显微镜下显示亮蓝色密集的细胞核和染色质片段,非凋亡细胞及凋亡细胞的细胞核均能被染色而发出蓝色荧光,未发生凋亡时细胞核大而染色均匀,凋亡的细胞核则显示出细胞核浓缩或呈现碎片状、染色不均匀、亮度高。肾上腺素组和山莨菪碱组心肌细胞凋亡率均较对照组显著增加[(0.37 ± 0.04)%、(0.15 ± 0.04)%比 (0.05 ± 0.01)%],均 $P<0.01$],但山莨菪碱组较肾上腺素组显著减少($P<0.01$)。

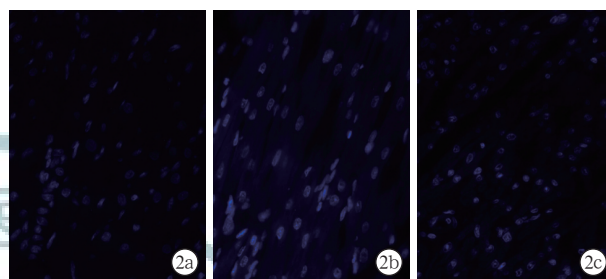


图 2 荧光显微镜下观察心搏骤停家猪复苏后 24 h 心肌细胞凋亡情况 对照组(a)细胞核均呈蓝色,非凋亡细胞的细胞核大而染色均匀,染色不均匀的凋亡细胞核较少;肾上腺素组(b)呈蓝色、高亮、碎片状的凋亡细胞核明显增多;山莨菪碱组(c)蓝色荧光染色的细胞核浓缩,染色不均匀,呈碎片状,凋亡细胞数介于前两组之间 Hoechst 33258 荧光染色 高倍放大

3 讨论

有研究显示山莨菪碱对临床某些危重症具有调节改善作用^[8]。本课题组系列研究发现,CA 大鼠采用肾上腺素联用山莨菪碱复苏较单纯肾上腺素可明显提高 ROSC 成功率(67%比 33%)^[4,9];本实验中山莨菪碱组 CA 家猪的 ROSC 率较肾上腺素组提高了 22.22%,说明山莨菪碱对不同种系动物的复苏效果是相同的,未能显示出的统计学差异可能与本组动物数少有关。

CA 复苏后缺血/再灌注损伤是导致心脏功能障碍的主要原因^[10],大量心肌细胞凋亡使心肌细胞数量丧失而加重心肌结构破坏和功能障碍^[11]。本研究结果显示,CA 模型动物心肌细胞凋亡率显著增加,应用山莨菪碱和肾上腺素均能显著减少心肌细胞凋亡率,而以山莨菪碱的抑制作用更加明显。电镜下观察细胞超微结构也显示,山莨菪碱组心肌超微结构的改变较肾上腺素组轻,尤其是线粒体的损伤明显减轻。其机制是否通过线粒体内外膜间的 Cyt C 释放而引发了心肌细胞凋亡?

有文献报道,线粒体途径细胞凋亡是重要的凋亡通路之一,其中 Cyt C 释放和 caspases 激活是关键生物化学途径,凋亡信号使线粒体内外膜之间的 Cyt C 从线粒体释放至细胞液,与凋亡蛋白酶激活因子-1 (Apaf-1)结合后促使后者形成多聚体,该

多聚体激活 caspase-9 并与之结合形成凋亡小体,同时被激活的 caspase-9 能够激活其他的 caspases 如 caspase-3 等,从而诱导细胞凋亡^[12]。因此,Cyt C 的释放是线粒体途径心肌细胞凋亡的始动点^[13],而 caspase-3 是细胞凋亡的主要效应子和最重要的凋亡执行者^[14]。

山莨菪碱具有改善微循环、对抗缺血/再灌注损伤、减轻炎症反应、保护线粒体、增加氧代谢的作用^[15]。本课题组前期研究显示,山莨菪碱可减轻复苏后心肌组织线粒体膜电位降低水平,抑制线粒体膜通透性增加,对心肌线粒体结构的完整具有保护作用^[4]。本研究中观察到,CA 后各时间点血浆 Cytochrome C 蛋白含量明显高于对照组,ROSC 24 h 到达最高水平,表明组织损伤及细胞破坏程度随再灌注时间延长而加重;但山莨菪碱组血浆 Cytochrome C 蛋白含量较肾上腺素组明显减少,可能是山莨菪碱具有抑制 Cytochrome C 升高的作用,从而减少了细胞结构的损害。两复苏组心肌 Cytochrome C 蛋白含量无明显差异可能与本实验未将线粒体和胞质 Cytochrome C 分别提取检测有关。

两复苏组 ROSC 24 h 时血浆 caspase-3 蛋白含量达峰值,与本课题组前期研究心肌蛋白质免疫印迹法(Western blotting)测定结果^[16]一致。虽然两复苏组间各时间点血浆及心肌 caspase-3 蛋白含量无明显差异,但与对照组相比,山莨菪碱组 caspase-3 蛋白含量的增加幅度小于肾上腺素组,如增加样本数可能会有统计学差异。

有研究显示,复苏后血中 Cytochrome C 含量变化既能衡量线粒体损伤程度,还能作为复苏存活的预测因子^[17-18],血浆与组织一样能够反映缺血损伤。本研究中不同时间点血浆 Cytochrome C 和 caspase-3 的蛋白含量动态测定结果显示,山莨菪碱可通过线粒体途径减少促凋亡蛋白 Cytochrome C 及凋亡执行蛋白 caspase-3 的表达,抑制心肌细胞凋亡,可能对 CA 后缺血/再灌注损伤的心肌有保护作用。

参考文献

- [1] Hagihara A, Hasegawa M, Abe T, et al. Prehospital epinephrine use and survival among patients with out-of-hospital cardiac arrest. *JAMA*, 2012, 307: 1161-1168.
- [2] 张明月. 细胞凋亡与心肺复苏后心肌功能障碍的研究进展. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 638-640.
- [3] Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26: 390-397.
- [4] 杨扬. 山莨菪碱对心脏复苏大鼠心肌线粒体功能保护作用的研究. 北京: 军医进修学院, 2010.
- [5] Zhou M, Ran Q, Liu Y, et al. Effects of sustained abdominal aorta compression on coronary perfusion pressures and restoration of spontaneous circulation during cardiopulmonary resuscitation in swine. *Resuscitation*, 2011, 82: 1087-1091.
- [6] Lurie KG, Zielinski T, McKnite S, et al. Use of an inspiratory impedance valve improves neurologically intact survival in a porcine model of ventricular fibrillation. *Circulation*, 2002, 105: 124-129.
- [7] 高维道, 盛志勇, 郭振荣, 等. 烧伤早期山莨菪碱对胃肠保护作用的实验研究. *解放军医学杂志*, 1995, 20: 88-91.
- [8] 徐杰, 邓梦华, 张斌, 等. 大黄联合山莨菪碱对重度创伤患者胃黏膜酸度的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14: 278-280.
- [9] 孙菁, 孟凡山, 陈威, 等. 山莨菪碱对心搏骤停大鼠复苏的影响. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 721-723.
- [10] 李银平, 秦俭, 范振兴, 等. 自主循环恢复后轻度低温对心室纤颤兔心功能和心肌结构的影响. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 743-748.
- [11] Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 2000, 190: 255-266.
- [12] Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther*, 2001, 89: 29-46.
- [13] Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35: 559-567.
- [14] Golstein P. Controlling cell death. *Science*, 1997, 275: 1081-1082.
- [15] 徐杰, 张斌, 于娜, 等. 大黄联合山莨菪碱对严重脓毒症患者免疫功能的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19: 65-67.
- [16] Yin XL, Shen H, Zhang W, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by anisodamine protects against myocardial injury after cardiac arrest and resuscitation in rats. *Am J Chin Med*, 2011, 39: 853-866.
- [17] Crouser ED, Gadd ME, Julian MW, et al. Quantitation of cytochrome c release from rat liver mitochondria. *Anal Biochem*, 2003, 317: 67-75.
- [18] Radhakrishnan J, Wang S, Ayoub IM, et al. Circulating levels of cytochrome c after resuscitation from cardiac arrest: a marker of mitochondrial injury and predictor of survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H767-775.

(收稿日期: 2012-09-10) (本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

对高危儿童父母进行心肺复苏培训: 救命的法宝

患有慢性疾病的儿童更容易发生心搏骤停,如果能及时进行有效的心肺复苏(CPR),心搏骤停患儿的预后将会明显改善。为此,最近有学者进行了一项研究,以评价一个 CPR 培训软件(CPR Anytime™ Kit)的培训效果。在患儿出院前,研究人员向患儿父母提供此软件,并在出院后 1、3、6 个月和 1 年进行电话随访,评估父母对 CPR 相关知识及技术的掌握程度。共有 117 个家庭参加了此次研究,其中有 82% 的父母在患儿出院后至少使用过该软件 1 次,79% 的父母与至少 2 个家庭成员或朋友分享过该软件,97% 的父母对该培训方式感到满意,父母对 CPR 知识的掌握程度明显提高。因此,研究人员认为, CPR Anytime™ Kit 能够提高高危患儿父母对 CPR 知识的掌握程度。

罗红敏, 编译自《J Healthc Qual》, 2013, 35(1): 9-17; 胡森, 审校