

[文章编号] 1000- 4718(2006)02- 0352- 03

缺血预处理对大鼠缺血性脑损伤 线粒体钙 细胞色素 C 水平的影响

王淑秋, 丛阿鹏, 李永毅, 付春芳, 张建华, 王淑湘, 路雅真
(佳木斯大学病理生理教研室, 黑龙江 佳木斯 154007)

[摘要] 目的: 观察缺血预处理对大鼠缺血性脑损伤后线粒体钙、细胞色素 C 水平的影响。方法: 用大鼠右侧大脑中动脉阻制成局灶性脑缺血模型。24 只大鼠, 每组 8 只, 随机分为缺血预处理组、模型组和假手术组。缺血预处理组于 3 d 前给予 30 min 预缺血及 72 h 再灌注, 实验时行 2 h 缺血 4 h 再灌注。用张均田的改良方法测定细胞色素 C 含量。用火焰原子吸收法检测线粒体钙含量。结果: 缺血预处理组动物的细胞色素 C、线粒体钙与假手术组相比差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$), 缺血预处理组与模型组相比差异显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 缺血预处理减少线粒体释放细胞色素 C, 维持线粒体钙稳态。

[关键词] 脑缺血; 线粒体; 细胞色素 C; 钙

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effect of ischemic preconditioning on contents of cytochrome C and mitochondrial calcium in rats after focal cerebral ischemic- reperfusion

WANG Shu- qiu, CONG A- peng, LI Yong- yi, FU Chun- fang, ZHANG Jian- hua, WANG Shu- xiang, LU Ya- zhen

(Department of Pathophysiology, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[ABSTRACT] AIM: To observe the effect of ischemic preconditioning on contents of cytochrome C and mitochondrial calcium in rats after focal cerebral ischemic- reperfusion. METHODS: Focal cerebral ischemic model was made by occlusion of right middle artery in Wistar rats (ischemia for 2 h and reperfusion for 4 h). Rats were randomly divided into three groups: ischemia pretreatment, model and sham operation. Rats in ischemic pretreatment group were undergone transient ischemic preconditioning (30 min) and reperfusion (72 h). The contents of cytochrome C were measured according to Zhangjuntian's improved methods. The contents of mitochondrial calcium were detected by flame atom absorption. RESULTS: The contents of mitochondrial cytochrome C and calcium in model group were significantly lower than those in sham operation ($P < 0.05, P < 0.01$), whereas the contents of plasma cytochrome C were markedly higher ($P < 0.05, P < 0.01$). The change in ischemic pretreatment group was obviously difference as compared with the model group. CONCLUSION: Ischemic preconditioning reduces the release of mitochondrial cytochrome C and maintain mitochondrial calcium homeostasis.

[KEY WORDS] Brain ischemia; Mitochondria; Cytochrome C; Calcium

脑缺血耐受(cerebral ischemic tolerance, CIT)由 Katagawa 等^[1] 1990 年在沙土鼠前脑缺血模型中发现,对随后的缺血脑组织产生保护作用,虽然研究较晚,但是保护作用明确,从而为人们对脑缺血防治的认识,开辟了新的领域。本研究用 Longa 等^[2]改良方法制成局灶性脑缺血模型(MCAO),观察缺血预处理对线粒体钙、细胞色素 C(CytC)的影响,进一步探讨缺血预处理(IP)发生机制。为缺血性脑血管疾病的防治提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 24 只,体重(260±30)g,由佳木斯实验动物中心提供。动物随机分为 3 组:缺血预处理组,在缺血再灌注前 3 d 行 30 min 的预缺血;模型组,缺血 2 h 再灌注 4 h;假手术组。

2 方法

2.1 局灶性脑缺血模型(MCAO) 大鼠术前禁食

12 h, 禁水 4 h。10% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉, 用烤灯维持直肠温度在 37–37.5 °C。颈正中切口, 暴露、剥离颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉, 结扎颈总动脉、颈外动脉, 于颈总动脉下方剪一切口。将预先制作前端钝圆的鱼线, 置入颈内动脉 (18.0 ± 0.5) mm, 直至大脑前动脉近端, 有轻微阻力感为止。阻闭完成后鱼线抽出 1 cm 以恢复再灌注。

2.2 神经功能损伤评分 动物麻醉苏醒后, 回笼, 自由饮食。采用 Zealanga 评分法, 0 分: 无神经系统功能缺失症状, 活动正常者; 1 分: 不能完全伸展对侧前爪者; 2 分: 爬行时出现向左转圈者; 3 分: 行走时身体向偏瘫侧倾倒者; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失者。评分为 0 分和 4 分者均被剔除。

2.3 脑线粒体的制备 动物用乙醚深麻醉, 断头处死, 取出脑组织, 冷生理盐水冲洗, 滤纸擦干。每克脑组织加入 9 mL 预冷的分离介质 (0.1 mol/L Tris-HCl pH=7.4, 1 mmol/L KCl, 0.25 mol/L 蔗糖)。用电动玻璃匀浆机匀浆后, 制成 10% 匀浆, 低温离心 (600 × g, 4 °C) 15 min, 取上清液低温离心 (18 000 × g, 4 °C) 15 min, 上清液为胞浆, 留样品细胞色素 C (CytC) 测定, 沉淀加少量 0.1 mol/L Tris-HCl pH=7.4, 1 mmol/L KCl 制成线粒体悬液。用双缩脲法测定线粒体蛋白含量, 各管蛋白均稀释成 0.2 g/L。

2.4 CytC 的测定 采用改良的张均田^[3]法测定。标准曲线测定, 取 0.1 mmol/L CytC 标准品 (上海维思化学试剂有限公司) 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 加蒸馏水至 1.5 mL, 再加几毫克磷二亚硫酸钠, 520 nm 测吸光度 (A) 值, 绘制标准曲线。样品吸光度 (A) 值根据标准曲线计算其浓度。(胞浆直接测定, 线粒体悬液破膜后测定)。

2.5 线粒体钙测定 采用火焰原子吸收法。取线粒体悬液 1.5 mL, 置于 10 mL 加盖刻度试管中, 加入浓硝酸 5 mL, 阴暗处消化 1 周。然后烘箱加热, 使硝酸尽量分解蒸发, 加入 1% 氯化镧至 10 mL, 混匀, 测定吸光度值, 由标准曲线计算浓度。

3 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用方差分析判断均数差异显著性。

结 果

1 神经功能缺陷评分

缺血 2 h 后再灌注 4 h, 进行神经功能缺陷评分。预处理组与模型组神经功能缺陷评分为 1 分、2 分、3 分, 两者差异显著 ($P < 0.05$), 见表 1。

2 两组实验动物胞浆 CytC、线粒体 CytC 和线粒体钙含量

模型组胞浆 CytC 显著升高, 线粒体 CytC 相应降低。线粒体钙预处理组和假手术组均有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 假手术组与预处理组无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 各组神经功能评分的比较

Tab 1 Comparison of neurological scores in groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Grade
Sham	0
Model	1.9 ± 0.6
IP	1.3 ± 0.5*

* $P < 0.05$ vs model group.

表 2 各组胞浆 Cyt C、线粒体 Cyt C、线粒体钙的比较

Tab 2 Comparison of the contents of mitochondrial cytochrome C, mitochondrial calcium and plasma cytochrome C after focal ischemia for 2 h and reperfusion for 4 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Plasma Cyt C ($\mu\text{mol/L}$)	Mitochondrial Cyt C ($\mu\text{mol/L}$)	Mitochondrial Ca ($\mu\text{mol}/100 \text{ mg protein}$)
Sham	282.71 ± 33.95	12.57 ± 3.67	127.43 ± 33.17
Model	346.19 ± 37.72 [#]	8.82 ± 1.82 [#]	76.53 ± 17.58 [#]
IP	286.39 ± 27.59 ^{**}	12.08 ± 2.60 [*]	112.38 ± 20.03 ^{**}

[#] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

讨 论

IP 是短暂缺血诱导出机体内源性保护机制, 从而加强缺血耐受的能力^[4,5]。已有报道, 实施预处理 30 min 最易诱导缺血耐受, 耐受产生于预处理后 1 d, 持续 5–7 d。其保护作用不仅表现在形态上, 也表现在功能上。脑 IP 的机制涉及基因的表达, 新蛋白的合成, 还有一些损伤因子的作用, 它们可在一定程度、一定时间上表现出抗损伤作用。调控机制的阐明对缺血缺氧性脑损伤的防治有重要意义。脑缺血性损伤中, 坏死与凋亡是脑细胞死亡的两种形式, 两者同时参与了脑损伤, 而线粒体在调控细胞凋亡/死亡中占有重要地位, 是细胞死亡的调控中心之一。

本研究显示: 脑缺血 2 h, 再灌注 4 h, 胞浆 CytC 的浓度升高, 而线粒体 CytC 浓度相应降低, 这与 Fujimura 等^[6]报道相一致。迟发性脑细胞死亡及脑缺血损伤边缘区, 细胞的死亡形式以凋亡为主^[7]。脑缺血细胞凋亡的引发与线粒体 CytC 移位至胞质相对应^[8]。线粒体 CytC 可通过膜通透转运孔 (permeability transition pore, PTP) 开放所致的外膜破裂而释放, 或

[参 考 文 献]

者通过较大的电压依赖性阴离子通道(VDAC)而释放。CytC的再分布是caspase激活和DNA裂解的上游事件。IP时热休克蛋白HSP70显著增高,其可抑制CytC和dATP启动的凋亡蛋白酶活化因子(apoptosis protease activating factor, Apaf-1)与caspase-9复合物的形成,可以有效抑制细胞凋亡。IP时促进凋亡和抑制凋亡基因均上调。Bcl-2可促进或抑制VDAC的开放,从而调控CytC的释放和线粒体钙流而影响细胞凋亡^[9],Ca²⁺作为第二信使,其信号在胞浆、内质网、胞核和线粒体间传递,引发生物学效应,几乎参与一切调控细胞功能的信息转化过程,同时也是细胞内代谢活动的重要元素,因此维持胞浆、细胞器、细胞核Ca²⁺浓度对生命活动是至关重要的。已证实,IP时短暂细胞内钙升高,对后续的缺血产生神经保护作用。较温和的细胞内钙升高易发生细胞凋亡。胞浆内钙离子浓度的升高是细胞凋亡的重要启动因素,其主要作用是能激活Ca²⁺/Mg²⁺依赖的核酸内切酶,导致DNA于核小体间断裂,还能激活谷氨酰胺转移酶、蛋白酶等引起凋亡相关基因的表达。线粒体是细胞的钙储存库和调节器,线粒体内、外膜之间的通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)由Bcl-2形成的通道及线粒体膜上的转运体起维持线粒体钙稳态的作用。PTP在调节基质内Ca²⁺方面起重要作用。PTP呈低传导率开放,允许Ca²⁺通过,调节线粒体钙稳态;当线粒体跨膜电位在各种凋亡诱导因素的作用下降低时PTP开放,导致线粒体膜通透性增大,使细胞凋亡启动因子如:细胞色素C、凋亡蛋白酶活化因子(Apaf)、凋亡诱导因子(AIF)等从线粒体释放出来。细胞色素C与Apaf相互作用可激活caspase-9。许多使PTP开放的因素都要求有Ca²⁺存在^[10,11]。研究证实阻止线粒体膜通透性的改变可防止细胞凋亡,因而阻止凋亡启动因子从线粒体向外释放切断了细胞凋亡级联式反应中的关键性环节,所以具有很强的抗细胞凋亡的作用。由此我们认为,调节线粒体释放细胞色素C,维持线粒体钙稳态是IP发挥脑保护作用的主要机制。阐明IP的保护机制,为防治缺血性脑血管疾病提供理论依据。

- [1] Katagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain[J]. *Brain Res*, 1990, 528(1): 21-24.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1998. 1228-1229.
- [4] 贾瑞莉, 张连元, 门秀丽, 等. 缺血预适应在大鼠肢体缺血再灌注后胃粘膜损伤中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(8): 1468-1471.
- [5] 桑韩飞, 梅其柄, 程虹, 等. 缺血预处理快速效应对家兔急性缺血脊髓的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(11): 2011-2015.
- [6] Fujimura M, Morita Fujimura Y, Murckami K, et al. Cytosolic redistribution of cytochrome C after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *J Cere Blood Flow Metab*, 1998, 18(11): 1239-1247.
- [7] Sai K, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in kidney[J]. *Semin Nephrol*, 2003, 23(6): 511-521.
- [8] Sugawara T, Fujimura M, Morita Fujimura Y, et al. Mitochondrial release of cytochrome C corresponds to selective vulnerability of hippocampal CA1 neurons in rats after transient global cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(22): Rc3-Rc9.
- [9] Yan C, Chen D. Over expression of the cell death suppressor Bcl-w in ischemic brain: implications for a neuroprotective role via the mitochondrial pathway[J]. *J Cere Blood Flow Metab*, 2000, 20(3): 620-630.
- [10] Li M, Xia T. Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondrial which possibly involved in cadmium triggered apoptosis[J]. *Toxicology*, 2003, 194(1-2): 19-33.
- [11] Browkes PS, Darley Usmar VM. Role of calcium and superoxide dismutase in sensitization mitochondria to peroxynitrite induced permeability pore[J]. *Am J Physiol*, 2004, 286(1): H39-H46.