

- [10] Lai YJ, Tsai JC, Tseng YT, et al. Small G protein Rac GTPases regulate the maintenance of glioblastoma stem-like cells in vitro and in vivo[J]. *Oncotarget*, 2017,8(11):18031-18049.
- [11] Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition[J]. *Clin Cancer Res*, 2013,19(3):598-609.
- [12] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002,99(19):12293-12297.
- [13] Pahne-Zepfenfeld J, Schröder N, Walch-Rückheim B, et al. Cervical cancer cell-derived interleukin-6 impairs CCR7-dependent migration of MMP-9-expressing dendritic cells[J]. *Int J Cancer*, 2014,134(9):2061-2073.
- [14] Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy[J]. *Cancer Sci*, 2017,108(10):1947-1952.
- [15] Skirnisdottir I, Åkerud H, Seidal T. Clinical significance of growth factor receptor EGFR and angiogenesis regulator VEGF-R2 in patients with ovarian cancer at FIGO stages I-II[J]. *Int J Oncol*, 2018,53(4):1633-1642.
- [16] Horbach L, Sinigaglia M, Da Silva CA, et al. Gene expression changes associated with chemotherapy resistance in ewing sarcoma cells[J]. *Mol Clin Oncol*, 2018,8(6):719-724.
- [17] Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes[J]. *Nature*, 2012,491(7424):399-405.
- [18] Zhu Y, Zhang X, Wang L, et al. FENDRR suppresses cervical cancer proliferation and invasion by targeting miR-15a/b-5p and regulating TUBA1A expression[J]. *Cancer Cell Int*, 2020,20:152.
- [19] Tian TV, Tomavo N, Huot L, et al. Identification of novel TMPRSS2: ERG mechanisms in prostate cancer metastasis; involvement of MMP9 and PLXNA2[J]. *Oncogene*, 2014,33(17):2204-2214.
- [收稿日期 2020-06-01][本文编辑 韦所苏 刘京虹]

#### 本文引用格式

余展鹏,彭亮,姜巧. 卵巢癌发生发展关键基因的生物信息学筛选[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(2): 174-180.

## 论著

# 深低温停循环后大鼠海马线粒体通透性转换孔开闭情况研究

帅永孝, 刘嘉, 张力引

作者单位: 611130 四川,成都市第五人民医院神经外科(帅永孝,刘嘉); 611130 成都,四川省八一康复中心神经内科(张力引)

作者简介: 帅永孝(1988-),男,医学硕士,主治医师,研究方向:低温脑保护。E-mail:530073830@qq.com

通讯作者: 张力引(1988-),女,医学学士,主治医师,研究方向:神经康复。E-mail:249889225@qq.com

**[摘要]** 目的 通过对深低温停循环大鼠海马线粒体通透性转换孔(MPTP)开闭情况的研究,从亚细胞水平探讨深低温脑保护的机制。方法 取成年SD大鼠33只,3只作为供血动物,剩余30只随机分为深低温停循环组( $n=10$ )、常温停循环组( $n=10$ )、正常对照组( $n=10$ )。采用闭胸式体外插管法建立大鼠体外循环模型。其后采用断头取脑法迅速取出大鼠双侧海马组织,提取线粒体后应用蛋白印记法测量线粒体内细胞色素C(CytC)研究MPTP的开闭情况。结果 常温停循环组的MPTP较正常对照组、深低温停循环组的开放明显增加( $P<0.05$ );正常对照组的MPTP开放较深低温停循环组的开放少( $P<0.05$ )。结论 缺血缺氧可导致MPTP开放;深低温可抑制MPTP开放,保证了细胞的正常代谢活动从而起到脑保护的作用。

**[关键词]** 深低温; 脑保护; 线粒体通透性转换孔; 细胞色素C

**[中图分类号]** R 714 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2021)02-0180-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2021.02.14

**A study on the opening and closing situations of mitochondrial permeability transition pore in rat hippocampus after deep hypothermic circulatory arrest** SHUAI Yong-xiao, LIU Jia, ZHANG Li-yin. Department of Neurosurgery, Chengdu Fifth People's Hospital, Sichuan 611130, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effects of deep hypothermia on brain at subcellular level by studying the opening and closing situations of mitochondrial permeability transition pore(MPTP) in rat hippocampus

after deep hypothermic circulatory arrest. **Methods** Thirty-three adult Sprague-Dawley (SD) rats were taken. Three of them were used as the blood-supply animals and the other 30 rats were randomly divided into three groups: deep hypothermic circulatory arrest group ( $n = 10$ ), normal temperature circulatory arrest group ( $n = 10$ ) and normal control group ( $n = 10$ ). The cardiopulmonary bypass (CPB) rat model was established using closed-chest external intubation. Decapitation was performed on the rats and their bilateral hippocampal tissues were quickly removed from the brains to extract mitochondria, and then cytochrome C (CytC) in mitochondria was measured by Western blot to investigate the opening and closing situations of MPTP. **Results** The opening degree of MPTP in the normal temperature circulatory arrest group was significantly greater than that in the normal control group and the deep hypothermic circulatory arrest group ( $P < 0.05$ ). The opening degree of MPTP in the normal control group was significantly less than that in the deep hypothermic circulatory arrest group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ischemia and hypoxia can lead to the opening of MPTP. Deep hypothermia can inhibit the opening of MPTP, which ensures the normal metabolic activity of cells and thus plays a role in brain protection.

[**Key words**] Deep hypothermia; Cerebral protection; Mitochondrial permeability transition pore (MPTP); Cytochrome C (CytC)

脑组织是人体代谢率最高的器官之一,其对血液供应的依赖非常强,对缺血缺氧也是非常敏感,在常温条件下脑组织血流完全中断数秒就会出现意识障碍,完全中断 5~8 min 就会产生不可逆的脑损伤<sup>[1]</sup>。低温的医学应用已有百余年的历史,低温的脑保护作用也得到了广泛的认可,但低温脑保护的作用机制尚未完全阐明。研究<sup>[2]</sup>表明随着温度的降低,脑保护作用也越明显。不同神经细胞对缺血缺氧的敏感性存在差异,海马区的神经元高度集中,对缺血缺氧性刺激非常敏感,因此本研究选择海马组织作为我们缺血缺氧研究的目标组织。线粒体是真核细胞中重要的细胞器,线粒体的功能障碍在脑缺血后神经损伤中起着关键作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,低温脑保护作用的关键是通过线粒体实现的,线粒体的功能障碍与线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 密切相关。本研究选取海马线粒体 MPTP 作为研究对象探讨在不同温度条件下缺血缺氧相同的时间时各实验组 MPTP 的开放状态的差异,从 MPTP 的角度阐明深低温脑保护的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 昆明医科大学动物实验中心提供健康成年清洁级 SD 大鼠 33 只,雌 16 只,雄 17 只,3 只作为体外循环 (cardiopulmonary bypass, CPB) 供血动物,30 只按随机数字表法随机分为正常对照组、常温停循环组和深低温停循环组,每组 10 只。

**1.2 主要仪器与试剂** 蠕动泵 (江苏常州普瑞流体技术有限公司, BL-100 型), 大鼠膜式氧合器 (东莞科威医疗器械有限公司), 便携式心电监护仪、动物肛温表、全自动变温水箱 (昆明医科大学动物实验

中心), 各类手术器械 (昆明医科大学第二附属医院神经外科), 透射电镜 (日本 JEOL 公司 JEM-100CX)、细胞色素 C (cytochrome C, CytC) 一抗 (美国 Millipore 公司)。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 CPB 的建立** CPB 沿用上海交通大学附属仁济医院神经外科田鑫等<sup>[5]</sup>建立的大鼠深低温 CPB 模型。在建立 CPB 前、中、后都进行监测,记录实验过程中大鼠的生理指标。正常对照组:CPB 建立成功后,使大鼠肛温维持在  $36.8 \sim 37.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 不进行降温 and 停循环,在正常体温水平下进行 CPB 20 min。常温停循环组:在  $36.8 \sim 37.0\text{ }^{\circ}\text{C}$  进行 CPB 10 min, 停循环 10 min。深低温停循环组:在  $\leq 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , CPB 10 min, 维持在深低温水平停循环 10 min。

**1.3.2 海马组织提取与保存** CPB 结束后,迅速用断头取脑法提取大鼠双侧海马组织,作好标记放入液氮罐中固定 ( $-178\text{ }^{\circ}\text{C}$ )。

**1.3.3 线粒体验证与分析** 各实验组 CPB 全部结束后,分别提取各组海马组织线粒体。选取提纯的线粒体约 0.1 g, 送电镜室进行检测鉴定。另取适量线粒体用 RIPA 裂解液裂解,提取线粒体蛋白,用免疫印迹 (Western blot) 法以  $\beta$ -actin 作为内参蛋白测定海马线粒体内 CytC, 结果通过 Image Lab 软件分析灰度值。CytC 含量越少, MPTP 开放越多。

**1.4 统计学方法** 应用 SPSS19.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 线粒体电镜验证结果** 提纯后的线粒体用电

镜进行验证提示线粒体纯度非常高,非线粒体成分很少。正常对照组线粒体超微结构正常,呈椭圆形,大小正常,电子密度一致,线粒体膜和嵴清晰可见;深低温停循环组线粒体出现轻微肿胀,部分嵴断裂,膜结构较为完整,少数线粒体呈空泡改变;常温停循环组线粒体数目减少,明显肿胀,大量的嵴扭曲变形断裂,内外膜可见到破损,少数线粒体的基质中出现致密、边界不清的絮状物。见图 1。

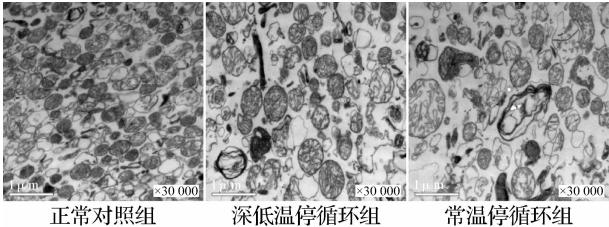


图 1 各组大鼠线粒体电镜扫描图(铅铀染色,×30 000)

**2.2 Western blot 法检测各组大鼠线粒体 CytC** 正常对照组 CytC 灰度值较深低温停循环组和常温停循环组高,深低温停循环组 CytC 灰度值较常温停循环组高,各组间灰度值差异明显。见图 2。

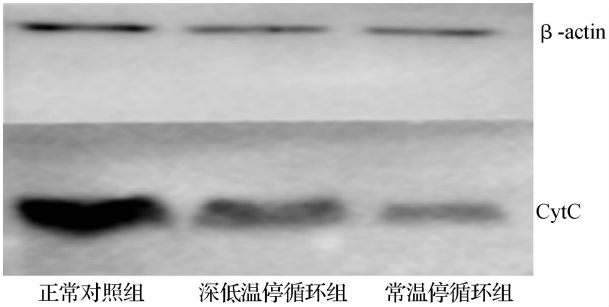


图 2 Western blot 检测各组大鼠线粒体 CytC 结果图

**2.3 各组大鼠线粒体内 CytC 检测结果灰度值比** 比较 各组灰度值比(灰度值比=CytC 灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值)比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。正常对照组、深低温停循环组、常温停循环组之间两两比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。提示常温停循环组的 MPTP 较正常对照组、深低温停循环组的开放明显增加( $P<0.05$ );正常对照组的 MPTP 开放较深低温停循环组的开放少( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠线粒体内 CytC 检测结果灰度值比比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组 别     | 例数 | 灰度值比                                   |
|---------|----|----------------------------------------|
| 正常对照组   | 10 | 23.21 $\pm$ 1.80                       |
| 深低温停循环组 | 10 | 16.76 $\pm$ 1.40 <sup>*</sup> $\Delta$ |
| 常温停循环组  | 10 | 11.84 $\pm$ 1.50 <sup>*</sup>          |

注:三组比较, $F=129.385, P=0.000$ ;与正常对照组灰度值比比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ;与常温停循环组灰度值比比较, $\Delta P<0.05$

3 讨论

**3.1 脑是人类最重要的器官**,常温条件下人脑能耐受的缺血缺氧时间为 5~8 min,超过耐受极限时间将引起不可逆的神经功能损害。脑部温度的降低将降低脑组织的代谢率,提高脑对缺血缺氧的耐受性,脑温下降 1℃,代谢率下降 6%~7%<sup>[6]</sup>。低温通过抑制细胞内需氧酶的活性,降低组织代谢,减少组织耗氧;抑制脑缺血诱导的兴奋性毒性作用,减少自由基产生和过氧化物的合成,对维持血脑屏障和细胞膜的稳定,起到良好的脑保护作用<sup>[7,8]</sup>。大量动物实验及临床研究<sup>[9,10]</sup>均证实深低温能减轻脑损伤后的病理损害程度,促进神经功能恢复,其保护作用的机制研究也由生化、代谢水平深入至分子水平,学者开始尝试从分子水平阐述深低温脑保护的作用机制。

**3.2 线粒体是真核细胞重要的细胞器**,有细胞的“能量工厂”之称,线粒体在脑缺血缺氧后神经元损伤中起关键作用,是缺血缺氧性损伤的主要目标细胞器,线粒体的功能障碍和 MPTP 有着密切的关系<sup>[11,12]</sup>。MPTP 是位于线粒体膜上由多种蛋白组成的非选择性复合孔道,MPTP 功能的发挥是通过其不同的开放状态来实现的<sup>[13]</sup>。在生理状态下 MPTP 呈可逆性的间断开放,这便于  $Ca^{2+}$  从线粒体基质中释放,从而维持胞浆  $Ca^{2+}$  的平衡。MPTP 处于关闭状态是维持线粒体内膜低通透性、合成三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)的必要条件。在缺血、缺氧状态下,MPTP 高水平开放将直接导致线粒体质子电化学梯度耗散,离子稳态打破、细胞质中分子量 $<1.5$  KD 的物质都可以通过内膜进入线粒体基质,而基质中合成 ATP 底物流失到胞质,致使线粒体基质肿胀,膜电位崩溃,呼吸链解耦联,ATP 合成减少,外膜破裂 CytC 释放,最终导致细胞凋亡或者坏死<sup>[14,15]</sup>。

**3.3 本研究通过电子显微镜对提取的线粒体纯度进行鉴定并观察各实验组线粒体**,结果显示提取的线粒体纯度很高,含少量杂质;线粒体大体结构显示各组间存在明显差异。采用间接法通过检测 CytC 来间接证明 MPTP 的开闭情况。在正常情况下 CytC 存在于线粒体内、外膜之间的腔隙中,MPTP 开放时,线粒体发生肿胀外膜破裂,CytC 将从线粒体内释放入胞质中,所以 MPTP 开放的越多,线粒体内含的 CytC 就越少。可应用原位免疫荧光技术或免疫组化技术检测细胞质或线粒体内 CytC 含量变化间接反映 MPTP 开放情况。通过对线粒体内 CytC 半定量检测证明了缺血缺氧可致使 MPTP 开放,而深低温可抑制 MPTP 开放保持线粒体结构和功能的完整,保证了细胞的

正常代谢活动从而起到脑保护的作用。

参考文献

[1] Mnatsakanyan N, Beutner G, Porter GA, et al. Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore [J]. J Bioenerg Biomembr, 2017, 49(1):13-15.

[2] Li F, Wang X, Deng Z, et al. Dexmedetomidine reduces oxidative stress and provides neuroprotection in a model of traumatic brain injury via the PGC-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. Neuropeptides, 2018, 72(1):58-64.

[3] 郭士佳, 俞春江, 陈立杰. 线粒体功能障碍与脑缺血的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(24):3964-3966.

[4] Ge YL, Li X, Gao JU, et al. Beneficial effects of intravenous dexmedetomidine on cognitive function and cerebral injury following a carotid endarterectomy [J]. Exp Ther Med, 2016, 11(3):1128-1134.

[5] 田鑫, 江基尧, 邱永明, 等. 大鼠深低温停循环复苏模型的建立 [J]. 中华神经外科杂志, 2004, 20(5):417-420.

[6] 金曼, 吴娟, 黎笔熙. 线粒体膜通透性转换孔在细胞凋亡中的作用 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32(11):1222-1227.

[7] Dou C, Han M, Zhang B, et al. Chrysotoxene induces apoptosis of human hepatoblastoma HepG2 cells in vitro and in vivo via activation of the mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2018, 15(4):4611-4618.

[8] Suzuki H, Nishikawa H, Kawakita F. Matricellular proteins as possible biomarkers for early brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neural Regen Res, 2018, 13(7):1175-1178.

[9] 蔡莹, 孔凡丛, 丁庆庆, 等. 线粒体通透性转换孔在神经退行性疾病中的作用研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2020, 37(2):172-174.

[10] Gonçalves B, Turon R, Mendes A, et al. Effect of early brain infarction after subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis [J]. World Neurosurg, 2018, 115:e292-e298.

[11] Szczygielski J, Müller A, Mautes AE, et al. Selective brain hypothermia mitigates brain damage and improves neurological outcome after post-traumatic decompressive craniectomy in mice [J]. J Neurotrauma, 2017, 34(8):1623-1635.

[12] Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system [J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17(5):333-340.

[13] 周宏, 罗涵, 马李杰. 线粒体蛋白在缺血性心脏病活性氧生成中的作用 [J]. 西部医学, 2019, 31(3):485-489.

[14] 李雪峰, 王建村, 胡观成. 动脉瘤性蛛网膜下腔出血后延迟性脑缺血的研究进展 [J]. 中国临床新医学, 2020, 13(5):532-536.

[15] Sugimoto K, Shirao S, Koizumi H, et al. Continuous monitoring of spreading depolarization and cerebrovascular autoregulation after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016, 25(10):e171-e177.

[收稿日期 2020-07-04][本文编辑 韦所苏 刘京虹]

本文引用格式

帅永孝, 刘嘉, 张力引. 深低温停循环后大鼠海马线粒体通透性转换孔开闭情况研究 [J]. 中国临床新医学, 2021, 14(2):180-183.

《中国临床新医学》杂志作者在线投稿操作说明

操作步骤如下:

- 1 在浏览器中输入 **www.zglcxyxzz.com**; 或通过浏览器搜索“中国临床新医学”, 点击具有“官网”认证标识的《中国临床新医学》官方网站, 进入主页的“作者在线投稿”。
- 2 进行网站注册, 申请成为《中国临床新医学》杂志的作者(新用户请牢记注册邮箱账号和密码, 忘记密码时可通过填写的邮箱索取密码)。
- 3 进入投稿系统, 点击菜单栏中的【提交新稿】, 按照投稿要求填写完善相关内容。
- 4 点击“完成”, 投稿成功。
- 5 投稿成功后, 系统会自动将相关投稿信息回复至作者所注册邮箱, 作者根据相关提示尽快完成后续的相关内容和步骤。
- 6 作者投稿后可在系统中进行稿件处理状态查询、与编辑部编辑在线沟通及稿件退修的修改补充等。
- 7 本刊微信公众号: 中国临床新医学杂志; 联系电话: 0771-2186013。