

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.19.001

· 基础研究 ·

不同组织细胞线粒体数量及功能的休克敏感性研究*

段晨阳 向鑫明 匡磊 刘良明 李涛[△]

(陆军军医大学(第三军医大学)野战外科研究所战伤休克与输血研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室 重庆 400042)

摘要 目的:探究不同组织细胞线粒体数量及功能的休克敏感性差异。**方法:**在整体和细胞水平模拟失血性休克和脓毒性休克模型,通过 mtDNA 检测、线粒体形态分析和线粒体 ROS 检测观察休克不同时相点肠组织(肠上皮细胞)、血管组织(血管平滑肌细胞)和心肌组织(心肌细胞)中线粒体数量和功能的变化。**结果:**对于失血性休克(缺氧)刺激,肠组织线粒体数量的休克敏感性明显强于血管和心肌组织($P<0.05$)。肠、血管、心肌组织中线粒体数量明显增多分别开始于失血性休克后 0.5 小时、1 小时和 2 小时。对于脓毒性休克(LPS)刺激,肠组织线粒体数量的休克敏感性明显弱于血管和心肌组织($P<0.05$)。肠、血管、心肌组织中线粒体数量明显增多分别开始于脓毒性休克后 9 小时、6 小时和 3 小时。只有高浓度长时间 LPS 刺激才会引起肠上皮细胞线粒体数量的明显增高。各组织细胞线粒体功能对各类休克刺激的敏感性和反应程度虽然存在差异,但都晚于线粒体数量异常的发生($P<0.05$)。**结论:**各型休克的组织器官敏感性差异可能与不同组织细胞中线粒体的休克敏感性不同有关。线粒体数量异常增加是引起休克后线粒体损伤和细胞功能障碍的始动环节,不同组织细胞线粒体的休克敏感性差异也是影响休克组织器官损伤差异的重要原因之一。

关键词:失血性休克;脓毒性休克;线粒体数量;线粒体功能;休克敏感性

中图分类号:R-33;R631.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)19-3601-08

The Sensitivity of Mitochondrial Quantity and Function from Different Types of Tissue to Hemorrhagic/septic Shock Stress*

DUAN Chen-yang, XIANG Xin-ming, KUANG Lei, LIU Liang-ming, LI Tao[△]

(State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 2, Institute of Surgery Research, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China)

ABSTRACT Objective: To explore the difference of shock sensitivity in mitochondrial quantity and function from different types of tissues. **Methods:** The hemorrhagic shock and septic shock models were simulated at animal and cellular levels. mtDNA detection, mitochondrial morphology observation and ROS detection were undertaken to observe mitochondrial quantity and function in intestinal, vascular as well as myocardial tissues at different times of hemorrhagic/septic shock. **Results:** Under hemorrhagic shock or hypoxia stimulation, the sensitivity of mitochondrial quantity in intestinal tissue was significantly higher than that in vascular and myocardial tissues ($P<0.05$). The number of mitochondria in intestine, vascular and heart increased significantly from 0.5 h, 1 h and 2 h after hemorrhagic shock, respectively. Under septic shock or LPS stimulation, the sensitivity of mitochondrial quantity in intestinal tissue was much lower than that in vascular and myocardial tissues ($P<0.05$). The number of mitochondria in intestine, vascular and heart increased significantly from 9 h, 6 h and 3 h after septic shock, respectively. Only high concentration of LPS stimulation for a long time may increase the number of mitochondria in intestinal epithelial cells obviously. There were differences in sensitivity and response degree of mitochondrial function from different types of tissue to various types of shock stimulation, but they were all later than the increase in mitochondrial quantity. **Conclusions:** The different tissue sensitivity to various types of shock may be related to the different shock sensitivity of mitochondria in different types of tissue. The abnormal increase of mitochondrial number is the initial link of mitochondrial damage and cell dysfunctions after shock. The different shock sensitivity of mitochondria in different tissues is also one of the important causes of different injury degrees of various tissues after shock.

Key words: Hemorrhagic shock; Septic shock; Mitochondrial quantity; Mitochondrial function; Shock sensitivity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)19-3601-08

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(81730059);国家自然科学基金青年项目(81700429)

作者简介:段晨阳(1991-),男,博士,主要研究方向:创伤休克心血管功能障碍及缺血缺氧损伤线粒体功能障碍,

E-mail: duanchenyang1991@sina.com

[△] 通讯作者:李涛(1971-),女,博士生导师,研究员,主要研究方向:战创伤休克救治及机制研究,

E-mail: lt200132@163.com,电话:86-023-68757420

(收稿日期:2020-06-03 接受日期:2020-06-28)

前言

休克是指机体在严重失血、感染、创伤等强烈致病因子的作用下,有效循环血量急剧减少,组织血流量严重不足,引起细胞缺血缺氧,以致各重要器官的功能、代谢障碍和结构损伤的全身性危重病理过程^[1,2]。根据休克病因具体分为失血性休克、脓毒性休克等。由于始动环节各异,各型休克具有各自的特点。研究显示,休克后最先发生变化的细胞器是线粒体,线粒体质量失衡(包括线粒体数量变化和线粒体功能变化)会严重影响细胞功能^[3,4],这也是休克时各器官功能障碍的共同基础。尽管我们前期研究发现不同组织器官对于失血性休克和脓毒性休克的敏感性是不同的^[5],但具体机制并未完全阐明,这也是严重制约休克后器官功能救治效果的关键问题。而不同组织器官休克敏感性差异是否与细胞中休克敏感细胞器线粒体的质量变化有关目前尚不清楚。因此,本研究以大鼠急性失血和细胞缺氧的方式模拟失血性休克模型,以大鼠盲肠结扎穿孔(CLP, Cecal ligation and puncture)和细胞 LPS 刺激的方式模拟脓毒性休克模型,在整体和细胞水平观察各型休克不同时相点各组织细胞的线粒体数量和线粒体功能变化规律,深入探究不同组织细胞线粒体质量的休克敏感性差异,为组织器官休克敏感性差异提供理论支撑,为休克不同阶段器官功能保护提供新思路和新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

肠上皮细胞系(IEC, intestinal epithelial cells)、血管平滑肌细胞系(VSMC, vascular smooth muscle cells)和心肌细胞系(H9C2)来源于中国科学院上海细胞库,传代并液氮保存于陆军特色医疗中心。活细胞线粒体标记染料 MitoTracker Deep Red FM(货号:M22426)购于美国 Thermo 公司。ROS 荧光探针试剂盒(货号:ab113851)购于美国 Abcam 公司。mtDNA 检测所需 PCR 引物(货号:4331182)MTND2(目录号:Rn03296765_s1)和 GAPDH(目录号:Rn01775763_g1)以及 DNA 提取试剂盒(PureLink™ Genomic DNA Mini Kit 货号:K182001)购于美国 Invitrogen 公司。脂多糖(LPS, 货号:ST1470-50mg)购于上海碧云天公司。共聚焦显微镜(Leica TCS SP5, 美国);双色红外荧光成像系统(Odyssey, 美国);通用 PCR 仪(Bio-rad c1000, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验分组 取 36 只 SD 雌鼠(8 周龄, 200 g), 18 只进行失血性休克不同时相点处理(正常, 休克 0.5 小时, 休克 1 小时, 休克 2 小时, 休克 3 小时, 休克 4 小时), 每个时相点重复 3 只。18 只进行脓毒性休克不同时相点处理(正常, CLP 1 小时, CLP 3 小时, CLP 6 小时, CLP 9 小时, CLP 12 小时), 每个时相点重复 3 只。提取每只动物模型的结肠组织、肠系膜上动脉以及心肌组织用于后续 mtDNA 检测和线粒体 ROS 检测。

1.2.2 急性失血模型及细胞缺氧模型制备 我们采用急性失血模型在整体动物水平模拟失血性休克^[6]。制备方法是在大鼠股动脉位置剪一切口并在显微镜下用止血钳对股动脉和股静脉进行钝性分离, 动脉插管后使用三通旋塞连接血压计, 15

min 放血至血压 40 mmHg, 然后维持休克不同时相点。我们采用细胞缺氧模型在细胞水平模拟失血性休克。制备方法是细胞接种在培养皿中待贴壁后, 置于 37℃ 密封罐中, 先通入缺氧气体(95%氮气和 5%二氧化碳)15 min 后关闭通气阀, 10 min 后重新开启通入缺氧气体, 重复 4 次直到密封罐内氧气浓度低于 0.2%, 密封开始计时, 进行缺氧不同时相点处理。

1.2.3 CLP 模型及 LPS 刺激模型制备 我们采用 CLP 模型在整体动物水平模拟脓毒性休克。制备方法是大鼠术前禁食 12 小时, 自由饮水, 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 无菌条件下开腹暴露盲肠, 将粪便集中至盲肠末端, 距末端约 0.6 cm 处用无菌线结扎, 用锥形器在盲肠末端贯通穿刺, 将盲肠复位后逐层缝合伤口, 腹腔注射生理盐水 5 mL, 放回笼中正常饲养。观察大鼠平均动脉压(MAP, mean arterial blood pressure), 当 MAP 下降 30% 以上代表建模成功并开始进行脓毒性休克不同时相点计时。我们采用 LPS 刺激模型在细胞水平模拟脓毒性休克。制备方法是使用浓度为 1 μg/mL 的 LPS 处理细胞并开始计时不同时相点。

1.2.4 线粒体 mtDNA 检测 将组织样本使用 DNA 提取试剂盒分离出来, 然后通过定量 PCR 方法检测线粒体 DNA 标记引物 MTND2 和细胞核 DNA 标记引物 GAPDH 含量。线粒体 mtDNA 拷贝数通过 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 计算得到, 其中 $\Delta Ct = Ct_{MTND2} - Ct_{GAPDH}$, 而 $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样本}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ ^[6]。

1.2.5 线粒体形态观察 将细胞接种在共聚焦培养皿中, 待贴壁完全细胞覆盖率在 50% 左右时, 用 PBS 清洗 3 次后, 加入用无血清培养基稀释 Mitotracker Deep Red FM 染料(1:10 000), 37℃ 孵育 30 min, 然后用无钙台式液清洗 3 次后, 在共聚焦显微镜下观察细胞中线粒体形态。红色荧光激发波为 633 nm, 可见范围为 655~670 nm。

1.2.6 线粒体 ROS 检测 (1)组织水平: 将组织样本放入预冷 PBS 中清洗, 用眼科剪将组织剪碎后放在预冷的 PBS 中进一步漂洗, 加入适量酶消化液, 37℃ 恒温水浴消化 30 min, 期间进行间断震荡和吹打细胞。用冷 PBS 终止消化, 收集细胞用 500× G 离心 10 min 后去上清, 并用 PBS 洗 1~2 次, 重悬制备细胞悬液。加入 1% 的 ROS 荧光探针, 37℃ 孵育 30 min, 用 PBS 洗涤 1~2 次, 离心收集细胞沉淀物用于 ROS 荧光检测。(最佳激发波长 500 nm、最佳发射波长 525 nm)。(2)细胞水平: 将细胞接种在共聚焦培养皿中, 贴壁后进行缺氧/LPS 不同时相点处理。PBS 洗涤后, 加入 1% 的 ROS 荧光探针, 37℃ 孵育 30 min。孵育结束后用 PBS 重复洗涤 3 次后, 将培养皿置于共聚焦显微镜下观察(绿色荧光激发波 488 nm, 红色荧光激发波 633 nm)。

1.3 统计学处理

统计软件使用 SPSS 17.0 分析软件。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用独立样本 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 当方差分析结果有统计学意义时, 再采用 SNK 法或者 LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 失血性休克不同时相点各组织细胞线粒体数量变化

我们分别提取失血性休克后 0.5 至 4 小时的肠组织(部分

结肠)、血管组织(肠系膜上动脉)和心肌组织(左心室心尖部位)检测线粒体 mtDNA 拷贝数来反映不同组织线粒体数量的失血性休克敏感性变化规律(图 1A)。结果显示:在失血性休克 0.5 小时后肠组织线粒体数量即明显增高,线粒体 mtDNA 拷贝数是正常组的 1.8 倍($P<0.05$)。在失血性休克 1 小时后血管组织中线粒体数量开始发生变化,线粒体 mtDNA 拷贝数是正常组的 2.2 倍($P<0.05$),而心肌组织中线粒体 mtDNA 拷贝数与正常组比较仍未发现明显差异($P>0.05$)。在失血性休克 2 小时后心肌组织中线粒体数量才明显增高($P<0.05$),提示在失血性休克条件下心肌组织中线粒体数量变化的发生要晚于肠和血管组织。在失血性休克 4 小时后同时检测各组织 mtDNA 拷贝数变化,发现心肌组织 mtDNA 增长 3.5 倍,而肠和血管组织

mtDNA 分别增长 2.5 和 2.3 倍,提示在失血性休克终末期心肌组织线粒体数量变化幅度要大于肠和血管组织($P<0.05$)。

为了在细胞水平对上述结果进行验证,我们对肠上皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞进行不同时相点缺氧处理并计数共聚焦显微镜下观察的 MitoTracker 标记的线粒体骨架数量(图 1B-C),趋势与整体动物水平结果一致。共聚焦结果显示,肠上皮细胞线粒体碎片化开始于缺氧 0.5 小时,血管平滑肌细胞线粒体碎片化开始于缺氧 1 小时,心肌细胞线粒体碎片化开始于缺氧 2 小时。并且在缺氧 4 小时后,心肌细胞线粒体骨架数量(103.2 ± 9.8 个/细胞)明显高于肠上皮细胞和血管平滑肌细胞线粒体骨架数量(肠上皮细胞: 64.3 ± 12.9 个/细胞;血管平滑肌细胞: 61.4 ± 10.3 个/细胞)。

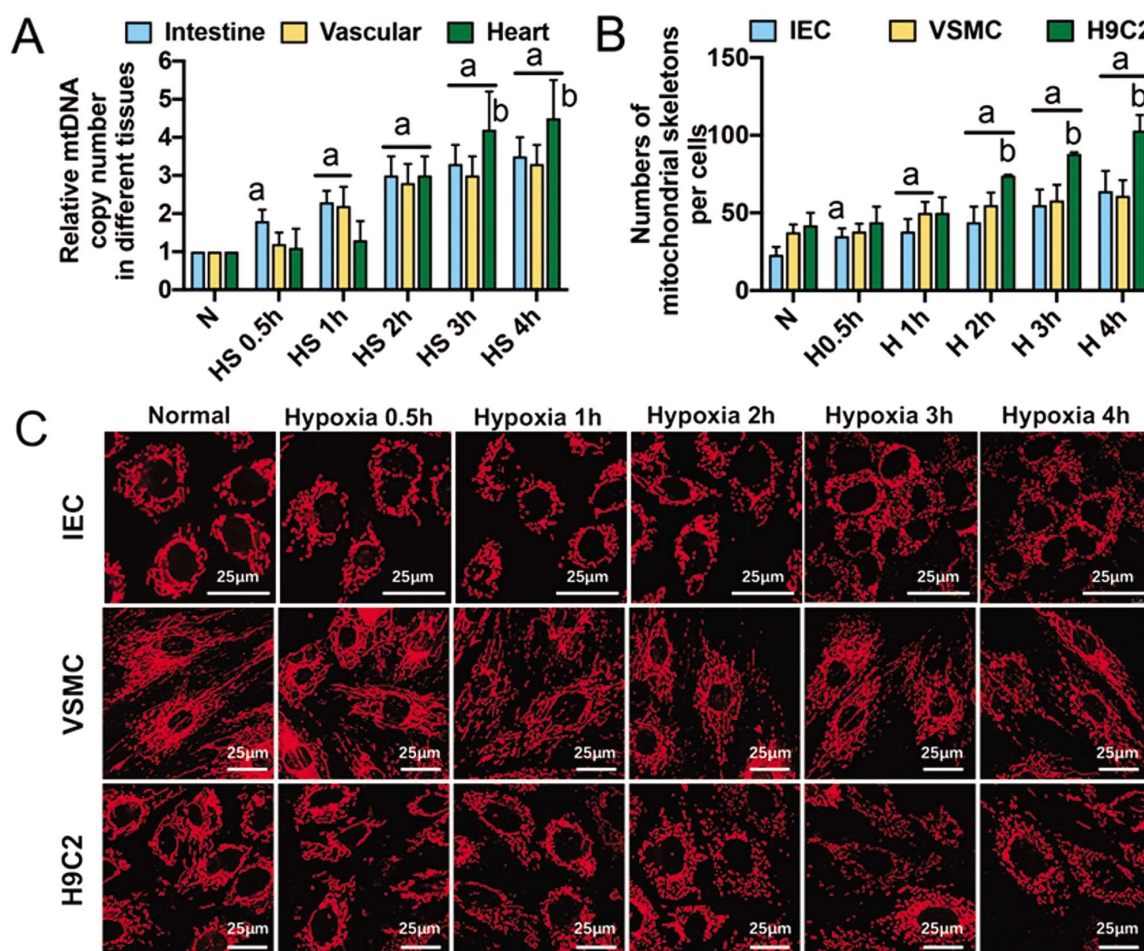


图 1 失血性休克 / 缺氧不同时相点各组织细胞线粒体数量变化

注:A: 失血性休克不同时相点肠、血管、心肌组织线粒体 mtDNA 拷贝数变化($n=8$); B: 缺氧不同时相点各组织细胞线粒体骨架数量变化($n=8$); C: 共聚焦显微镜观察缺氧不同时相点各组织细胞线粒体骨架变化 a: $P<0.05$, 与正常组相同组织细胞比较有统计学差异; b: $P<0.05$, 与同一相点不同组织细胞比较有统计学差异

Fig.1 Changes of mitochondrial numbers in different tissues/cells at different time points of hemorrhagic shock/hypoxia

Note: A: The relative mtDNA copy number in different tissues at different time points of hemorrhagic shock ($n=8$); B: Numbers of mitochondrial skeletons in different cell lines at different time points of hypoxia ($n=8$); C: Confocal images of MitoTracker-labeled mitochondrial skeletons in different cell lines at different time points of hypoxia. HS: Hemorrhagic shock, H: Hypoxia. a: $P<0.05$ represents significant difference when compared with the same tissue or cell lines in normal group, b: $P<0.05$ represents significant difference when compared with different tissue or cell lines at the same time point.

2.2 失血性休克不同时相点各组织细胞线粒体功能变化

我们分别提取失血性休克不同时相点的肠、血管和心肌组织检测线粒体 ROS 含量来反映不同组织线粒体功能的失血性

休克敏感性变化规律(图 2A)。结果显示:在失血性休克 2 小时后肠和血管组织的线粒体 ROS 开始出现明显升高($P<0.05$),而心肌组织的线粒体 ROS 含量在失血性休克 3 小时后才出现

升高的趋势 ($P<0.05$)。在失血性休克 4 小时后肠组织线粒体 ROS 探针荧光强度增高 2.8 ± 0.5 倍 ($P<0.05$)，血管组织线粒体 ROS 探针荧光强度增高 3.1 ± 0.6 倍 ($P<0.05$)，而心肌组织线粒体 ROS 探针荧光强度仅增高 1.8 ± 0.5 倍 ($P<0.05$)，明显低于肠和血管组织 ($P<0.05$)。

在细胞水平，我们对肠上皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞进行不同时相点缺氧处理并检测 DCFH-DA 标记的 ROS

荧光强度变化(图 2B-C)，趋势与整体动物水平结果一致。共聚焦结果显示，缺氧 2 小时后肠上皮细胞和血管平滑肌细胞 ROS 荧光强度明显增高 ($P<0.05$)，而心肌细胞缺氧 3 小时后 ROS 含量才出现变化并且升高幅度较弱 ($P<0.05$)。通过时相性分析，我们发现，尽管各组织细胞线粒体功能变化对失血性休克刺激的敏感性和反应程度不同，但是都基本上在线粒体数量变化 1 小时后出现显著差异。

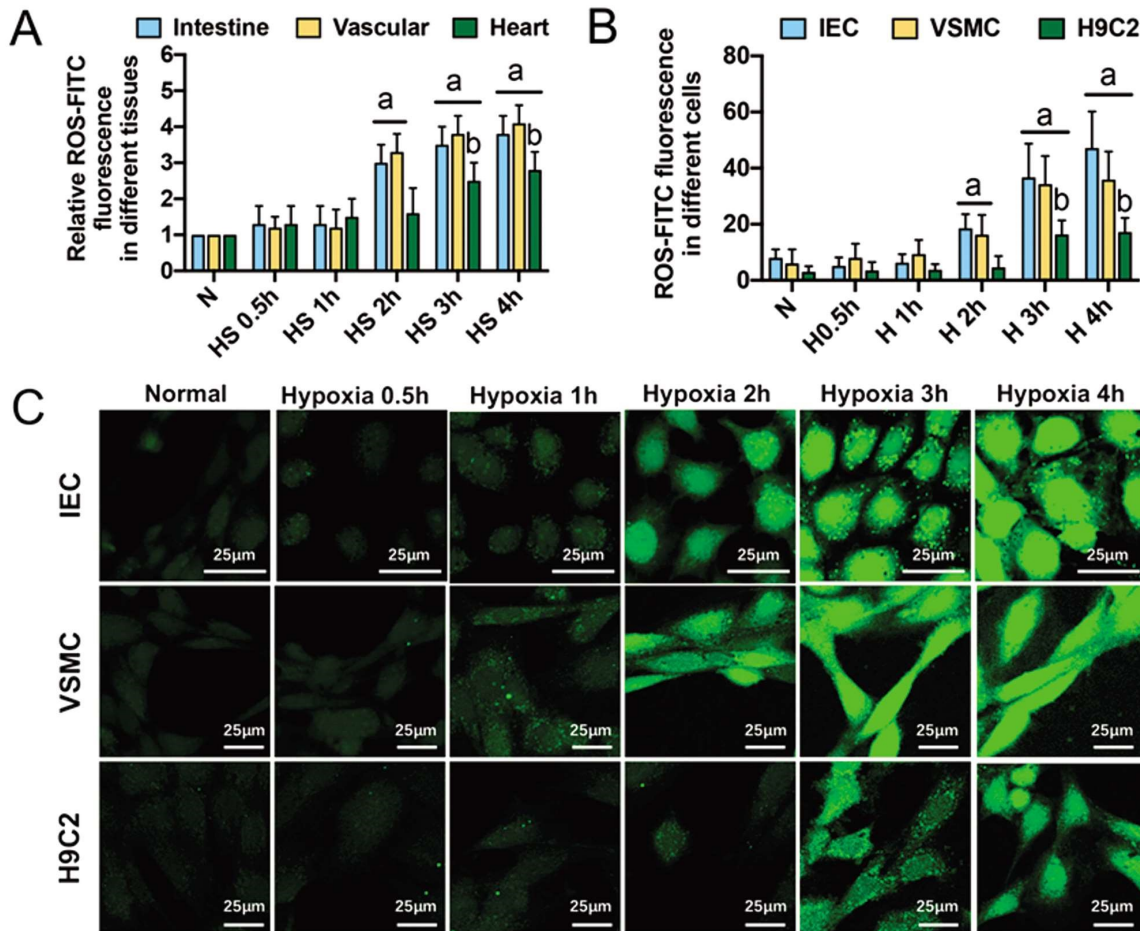


图 2 失血性休克 / 缺氧不同时相点各组织细胞线粒体 ROS 含量变化

注: A: 失血性休克不同时相点肠、血管、心肌组织线粒体 ROS 荧光强度变化 ($n=8$); B: 缺氧不同时相点各组织细胞线粒体 ROS 荧光强度变化 ($n=8$); C: 共聚焦显微镜观察缺氧不同时相点各组织细胞线粒体 ROS 荧光强度 ($n=8$) a: $P<0.05$, 与正常组相同组织细胞比较 $P<0.05$; b: $P<0.05$, 与同一时相点不同组织细胞比较 $P<0.05$ 。

Fig.2 Changes of mitochondrial ROS levels in different tissues/cells at different time points of hemorrhagic shock/hypoxia

Note: A: The relative ROS-FITC fluorescence in different tissues at different time points of hemorrhagic shock ($n=8$); B: ROS-FITC fluorescence in different cell lines at different time points of hypoxia ($n=8$); C: Confocal images of ROS DCFH-DA probes in different cell lines at different time points of hypoxia. HS: Hemorrhagic shock, H: Hypoxia. a: $P<0.05$ represents significant difference when compared with the same tissue or cell lines in normal group, b: $P<0.05$ represents significant difference when compared with different tissue or cell lines at the same time point.

2.3 脓毒性休克不同时相点各组织细胞线粒体数量变化

我们采用盲肠结扎穿孔模型 (CLP, Cecal ligation and puncture) 在整体动物水平模拟脓毒性休克不同时相点 (1、3、6、9、12 小时)，分别提取肠、血管和心肌组织，检测线粒体 mtDNA 拷贝数来反映不同组织线粒体数量的脓毒性休克敏感性变化规律 (图 3A)。结果显示：在脓毒性休克 3 小时后血管组织线粒体数量即明显增高，线粒体 mtDNA 拷贝数是正常组的 2.4 倍 ($P<0.05$)。在脓毒性休克 6 小时后心肌组织中线粒体数量开始发生变化，线粒体 mtDNA 拷贝数是正常组的 3 倍 ($P<0.05$)，而

肠组织中线粒体 mtDNA 拷贝数在脓毒性休克 9 小时后才明显增高 ($P<0.05$)，提示在脓毒性休克条件下肠组织中线粒体数量变化的发生要晚于血管和肠组织。在脓毒性休克 12 小时后各组织 mtDNA 拷贝数均明显增高，并且未发现器官差异性 ($P>0.05$)，提示在脓毒性休克终末期各组织线粒体数量均明显增高且不同于失血性休克存在器官差异性。

为了在细胞水平对上述结果进行验证，我们首先使用 $1 \mu\text{g/mL}$ 浓度的 LPS 刺激肠上皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞并记录刺激不同时间段后各组织细胞线粒体骨架数量 (图

3B-C)。共聚焦结果显示, 血管平滑肌细胞线粒体在 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 3 小时后出现明显碎片化 ($P<0.05$), 心肌细胞线粒体在 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 6 小时后出现明显碎片化 ($P<0.05$), 而肠上皮细胞在 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 9 小时后才出现明显碎片化 ($P<0.05$)。我们进一步使用高浓度 LPS 刺激心肌细胞和肠上皮细胞, 结果发现心肌细胞线粒体在 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 3 小

时后即出现明显变化 ($P<0.05$) (图 3D), 而肠上皮细胞在 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 6 小时和 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 3 小时即出现明显变化 ($P<0.05$) (图 3E), 提示肠上皮细胞线粒体数量对脓毒性休克的敏感性弱于血管平滑肌细胞和心肌细胞, 高浓度长时间 LPS 刺激才会引起肠上皮细胞线粒体数量的明显增高。

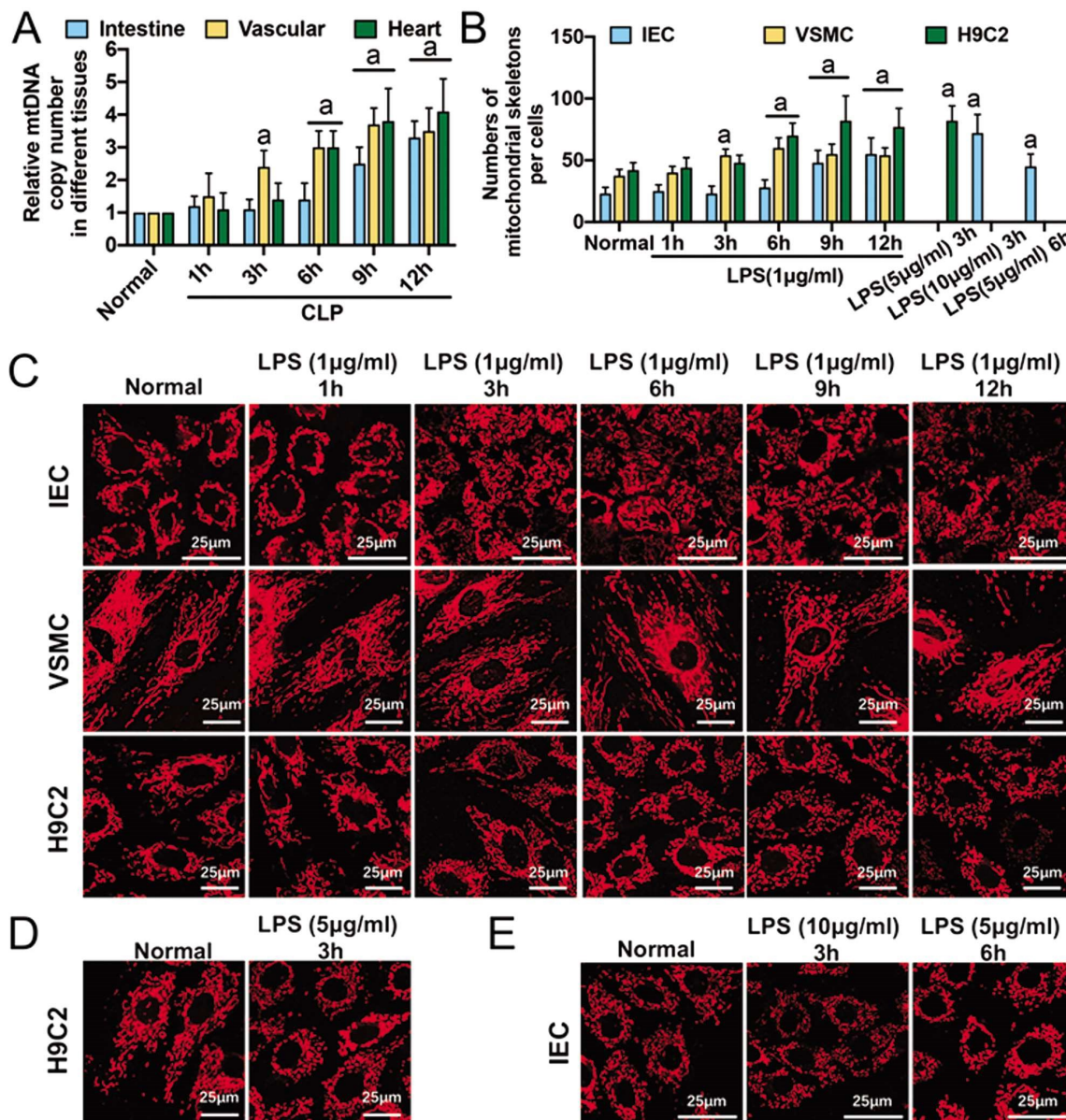


图3 脓毒性休克/LPS不同时相点各组织细胞线粒体数量变化

注: A: 脓毒性休克不同时相点肠、血管、心肌组织线粒体 mtDNA 拷贝数变化 ($n=8$); B: LPS 刺激不同时相点各组织细胞线粒体骨架数量变化 ($n=8$); C: 共聚焦显微镜观察 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激不同时相点各组织细胞线粒体骨架变化 ($n=8$); D: 共聚焦显微镜观察 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 3 小时后心肌细胞线粒体骨架变化; E: 共聚焦显微镜观察 LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 3 小时和 LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 6 小时后肠上皮细胞线粒体骨架变化
a: $P<0.05$, 与正常组比较 $P<0.05$ 。

Fig.3 Changes of mitochondrial numbers in different tissues/cells at different time points of sepsis shock/LPS

Note: A: The relative mtDNA copy number in different tissues at different time points of CLP ($n=8$); B: Numbers of mitochondrial skeletons in different cell lines at different time points of LPS ($n=8$); C: Confocal images of MitoTracker-labeled mitochondrial skeletons in different cell lines at different time points of LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). D: Confocal images of mitochondrial skeletons in H9C2 cells at 3h incubation of LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). E: Confocal images of mitochondrial skeletons in IEC cells at 3h incubation of LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 6h incubation of LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). a: $P<0.05$ represents significant difference when compared with the same tissue or cell lines in normal group.

2.4 脓毒性休克不同时相点各组织细胞线粒体功能变化

我们分别提取脓毒性休克不同时相点的肠、血管和心肌组

组织检测线粒体 ROS 含量来反映不同组织线粒体功能的脓毒性休克敏感性变化规律(图 4A)。结果显示:在脓毒性休克 6 小时后血管组织的线粒体 ROS 开始出现明显升高($P<0.05$),而心肌组织和肠组织的线粒体 ROS 含量在脓毒性休克 9 小时后才出现升高的趋势($P<0.05$)。在脓毒性休克 12 小时后各组织线粒体 ROS 均明显升高,并且未发现器官差异性($P>0.05$),提示在脓毒性休克终末期各组织线粒体功能均明显异常且不同于失血性休克存在器官差异性。

在细胞水平,我们使用 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度的 LPS 刺激肠上皮

细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞并检测 DCFH-DA 标记的 ROS 荧光强度变化(图 4B-C),趋势与整体动物水平结果一致,即各组织细胞线粒体 ROS 变化均晚于线粒体数量变化。但不同于失血性休克终末期心肌细胞线粒体 ROS 升高幅度弱于肠上皮细胞和血管平滑肌细胞,脓毒性休克终末期($1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度 LPS 刺激 12 小时)心肌细胞线粒体 ROS 同样明显升高,与肠上皮细胞和血管平滑肌细胞线粒体 ROS 升高幅度无明显差异($P>0.05$)。

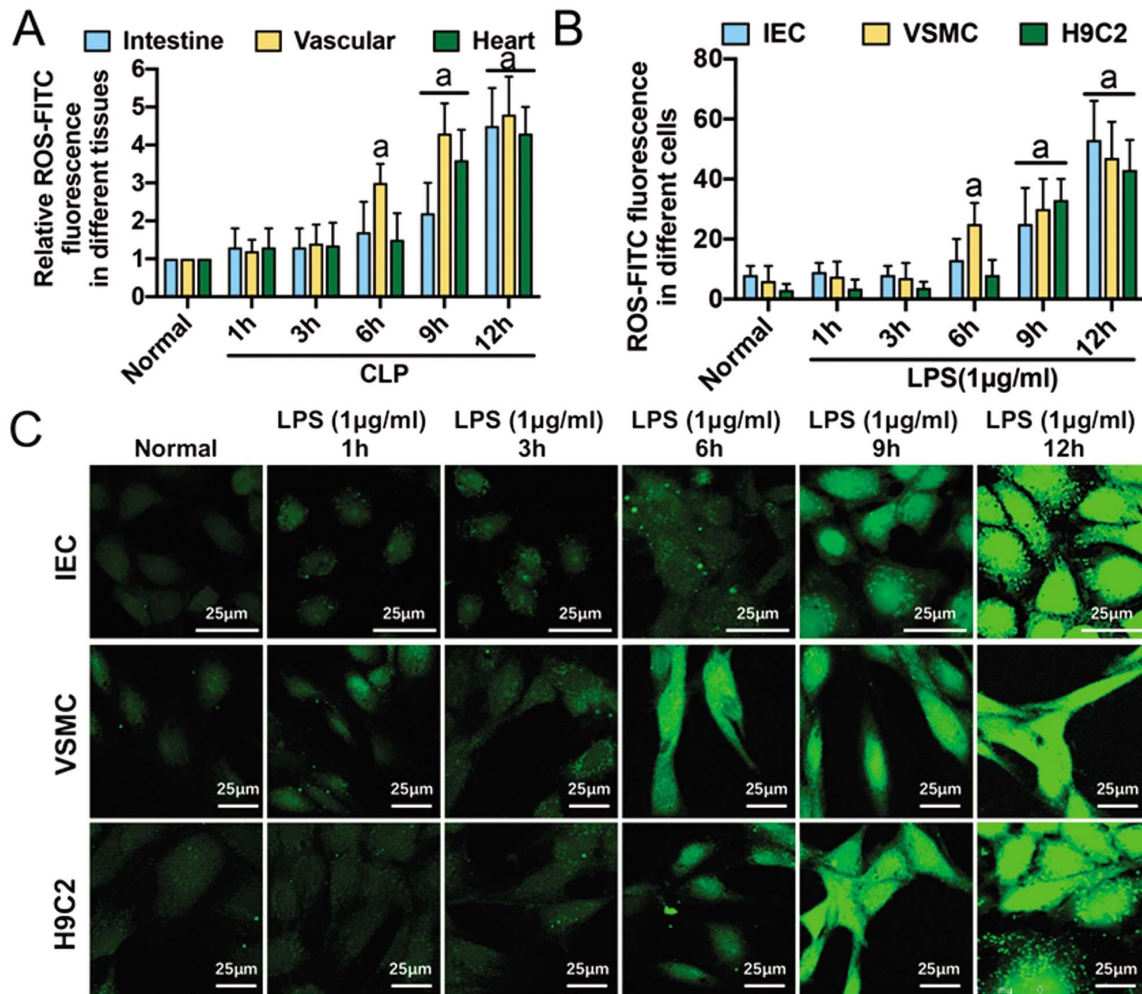


图 4 脓毒性休克 /LPS 不同时相点各组织细胞线粒体 ROS 含量变化

注:A:脓毒性休克不同时相点肠、血管、心肌组织线粒体 ROS 荧光强度变化($n=8$);B:LPS($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)刺激不同时相点各组织细胞线粒体 ROS 荧光强度变化($n=8$);C:共聚焦显微镜观察LPS($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)刺激不同时相点各组织细胞线粒体 ROS 荧光强度($n=8$) a: $P<0.05$,与正常组比较 $P<0.05$

Fig.4 Changes of mitochondrial ROS levels in different tissues/cells at different time points of sepsis shock/LPS

Note: A: The relative ROS-FITC fluorescence in different tissues at different time points of CLP ($n=8$); B: ROS-FITC fluorescence in different cell lines at different time points of LPS ($n=8$); C: Confocal images of ROS DCFH-DA probes in different cell lines at different time points of LPS. a: $P<0.05$ represents significant difference when compared with the same tissue or cell lines in normal group.

3 讨论

失血性休克是指急性大量失血引起机体微循环缺血缺氧,常见于创伤失血、食管静脉曲张出血、产后大出血等^[2]。脓毒性休克是指细菌、真菌等病原微生物感染所引起的休克,细菌所释放的内毒素即脂多糖(LPS,Lipopolysaccharides)是其重要的致病因子,常见于细菌性痢疾、大叶性肺炎、腹膜炎等严重感染

性疾病^[1]。由于引起休克的病因和始动环节不同,各型休克的发生发展规律也很有很大差别。本研究发现,各型休克的组织器官敏感性差异可能与不同组织细胞中线粒体的休克敏感性不同有关。对于失血性休克(缺氧)刺激,肠组织线粒体数量的休克敏感性强于血管和心肌组织。对于脓毒性休克(LPS)刺激,肠组织线粒体数量的休克敏感性弱于血管和心肌组织。而各组织细胞线粒体功能对各型休克刺激的敏感性和反应程度虽然存

在差异,但都晚于线粒体数量异常的发生,提示不同组织细胞线粒体数量的休克敏感性差异是引起休克后线粒体损伤和细胞功能障碍的始动环节,也是影响休克各组织器官损伤差异的重要原因之一。

以往研究显示,失血性休克的发展过程基本上遵循缺血性缺氧期、瘀血性缺氧期、微循环衰竭期这典型的三期微循环变化。在失血性休克早期易并发急性肾衰^[7]和肠源性内毒素血症^[8,9]。我们前期研究结果认为这可能是由于大量失血后血容量迅速减少,为保证心脑血管血液供应,血液发生重新分配导致的^[2,10]。而本文的研究发现提示,失血性休克早期即发生肠损伤可能与肠上皮细胞线粒体对缺血缺氧刺激的敏感性较高有关,在失血性休克早期肠上皮细胞线粒体数量急剧增加进而影响线粒体 ROS 大量堆积^[11,12],导致线粒体质量稳态迅速失衡,造成肠上皮细胞损伤,破坏肠屏障功能,引起肠源性内毒素移位及细菌移位等^[8,13]。而心肌组织线粒体对缺血缺氧刺激的敏感性较弱,这可能与心肌线粒体动力变化不如肠上皮和血管平滑肌细胞中线粒体动力变化频繁有关^[14,15]。研究显示心肌细胞线粒体更新周期约 2-3 天^[6],而肠上皮细胞和血管平滑肌细胞线粒体更新周期只需 2-3 小时^[17]。而当微循环缺血期发展到微循环淤血期,失血性休克既由代偿期进入了失代偿期^[18,19]。在这个阶段心肌线粒体数量增加的幅度要明显高于肠和血管组织,这可能是由于心肌细胞线粒体数量明显多于其他组织细胞^[20]。心肌细胞中线粒体占总细胞体积约 40%,而其他细胞只有 10-20%^[21,22]。在失血性休克失代偿期心肌线粒体质量的“跳崖式”失衡会导致心肌细胞收缩力减弱,引起循环衰竭和无复流现象,如不及时有效治疗,失血性休克将进入难治期^[23,24]。

脓毒性休克的发展过程较失血性休克相比更加复杂,感染灶中病原微生物及其释放的毒素可刺激细胞释放大炎症介质,促进休克的发生发展^[25,26]。RAMOS CJ 等的研究显示 VEGF 和 TNF- α 等细胞因子或血管活性物质可增加血管通透性,使大量血浆外渗,导致有效循环血量减少^[27]。JUNG M 等的研究显示 IL-10 等细胞毒素及炎症介质可直接损伤心肌细胞,造成心泵功能障碍^[28]。我们的研究发现血管平滑肌细胞和心肌细胞中线粒体数量变化对脓毒性休克的敏感性强于肠上皮细胞中线粒体,这也可能是脓毒性休克易造成心血管损伤的重要原因之一。而只有高浓度长时间 LPS 刺激才会引起肠上皮细胞线粒体数量的明显增高,这可能与肠组织长期与肠道菌群与病原微生物共生导致的细胞特异性有关。

无论是失血性休克还是脓毒性休克,线粒体功能变化都晚于线粒体数量变化,但是不同组织细胞的线粒体功能的休克敏感性同样存在差异,主要体现在休克终末期心肌细胞活性氧(ROS)升高幅度的不同。在失血性休克终末期,线粒体数量的异常增加会导致内部嵴结构的破坏、氧化磷酸化过程受损,各组织均会产生大量氧自由基^[29]。而心肌细胞 ROS 升高幅度弱于血管平滑肌细胞和肠上皮细胞可能与后两者细胞中大量存在的黄嘌呤氧化酶形成增多有关^[30],具体机制还有待深入探究。而在脓毒性休克终末期,除了缺氧损伤外,炎症反应过度激活会生成大量趋化因子与细胞因子,细胞耗氧量进一步增加,氧自由基堆积进一步加重,出现“氧爆发(oxygen burst)”效应^[31],进一步造成各组织细胞的线粒体损伤。因此在脓毒性休克终末

期心肌细胞、血管平滑肌细胞和肠上皮细胞的线粒体 ROS 含量均明显增高。

综上所述,本研究发现不同组织细胞线粒体数量及功能存在明显的休克敏感性差异,对于失血性休克,肠组织线粒体的休克敏感性强于血管和心肌组织,而对于脓毒性休克,血管和心肌组织线粒体的休克敏感性较强。我们的研究从各组织细胞线粒体休克敏感性不同的角度解释了休克损伤后的组织差异性,为深入探究休克不同阶段的多种器官保护措施提供实验参考和理论依据。

参考文献(References)

- [1] DUAN C Y, ZHANG J, WU H L, et al. Regulatory mechanisms, prophylaxis and treatment of vascular leakage following severe trauma and shock[J]. *Mil Med Res*, 2017, 4: 11
- [2] DUAN C Y, YANG G M, LI T, et al. Advances in vascular hyporeactivity after shock: the mechanisms and managements [J]. *Shock*, 2015, 44(6): 524-534
- [3] 段晨阳, 向鑫明, 匡磊, 等. 活化 Drp1 介导谷胱甘肽代谢调节失血性休克后线粒体功能的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(01): 50-58
- [4] DUAN C Y, KUANG L, XIANG X M, et al. Drp1 regulates mitochondrial dysfunction and dysregulated metabolism in ischemic injury via Clec16a-, BAX-, and GSH- pathways [J]. *Cell Death and Disease*, 2020, 251(11): 1-19
- [5] DUAN C Y, CHEN K, YANG G M, et al. HIF-1 α regulates Cx40-dependent vasodilatation following hemorrhagic shock in rats [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 1277-1286
- [6] ZHANG H, BOSCH M M, SHIMODA L A, et al. Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(16): 10892-10903
- [7] CHEN G, SONG X, YIN Y, et al. C-type natriuretic peptide prevents kidney injury and attenuates oxidative and inflammatory responses in hemorrhagic shock[J]. *Amino Acids*, 2017, 49(2): 347-354
- [8] DUAN C Y, KUANG L, XIANG X M, et al. Activated Drp1-mediated mitochondrial ROS influence the gut microbiome and intestinal barrier after hemorrhagic shock [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (2): 1397-1416
- [9] MEI Z B, DUAN C Y, LI C B, et al. Prognostic role of tumor PIK3CA mutation in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(10): 1836-1848
- [10] DUAN C Y, LI T, LIU L M. Efficacy of limited fluid resuscitation in patients with hemorrhagic shock: a meta-analysis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(7): 11645-11656
- [11] 段晨阳, 向鑫明, 匡磊, 等. 缺氧后活化 Drp1 通过偶联 LRRK2 影响多组织细胞线粒体功能的机制研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(4): 326-333
- [12] WANG J, XUE X, LIU Q, et al. Effects of duration of thermal stress on growth performance, serum oxidative stress indices, the expression and localization of ABCG2 and mitochondria ROS production of skeletal muscle, small intestine and immune organs in broilers [J]. *J Therm Biol*, 2019, 85(1): 102420
- [13] AVIELLO G, KNAUS UG. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract [J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11 (4): 1011-1023

- [14] DUAN C Y, CAO Z Z, TANG F Q, et al. MiRNA-mRNA crosstalk in myocardial ischemia induced by calcified aortic valve stenosis[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(2): 448-466
- [15] BOENGLER K, KOSIOL M, MAYR M, et al. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2017, 8(3): 349-369
- [16] LEACH J P, HEALLEN T, ZHANG M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction[J]. Nature, 2017, 550(7675): 260-264
- [17] VAN L I, MIRAMS G R, WALTER A, et al. An integrative computational model for intestinal tissue renewal [J]. Cell Proliferation, 2009, 42(5): 617-636
- [18] CANNON J W. Hemorrhagic Shock[J]. N Engl J Med, 2018, 378(4): 370-379
- [19] TORRES F I. Hemorrhagic Shock and the Microvasculature[J]. Compr Physiol, 2017, 8(1): 61-101
- [20] TIAN R, COLUCCI W S, ARANY Z, et al. Unlocking the Secrets of Mitochondria in the Cardiovascular System: Path to a Cure in Heart Failure-A Report from the 2018 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop[J]. Circulation, 2019, 140(14): 1205-1216
- [21] OLGAR Y, DEGIRMENCI S, DURAK A, et al. Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance[J]. Exp Gerontol, 2018, 110: 172-181
- [22] YU P, QI W, HUWATIBIEKE B, et al. Temperature dependence of mitoflash biogenesis in cardiac mitochondria [J]. Arch Biochem Biophys, 2019, 666: 8-15
- [23] CHU X, SCHWARTZ R, DIAMOND M P, et al. A Combination Treatment Strategy for Hemorrhagic Shock in a Rat Model Modulates Autophagy[J]. Front Med (Lausanne), 2019, 6(1): 281
- [24] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379
- [25] CECCONI M, EVANS L, LEVY M, et al. Sepsis and septic shock[J]. Lancet, 2018, 392(10141): 75-87
- [26] VALLABHAJOSYULA S, AHMED A M, SUNDARAGIRI P R, et al. Role of echocardiography in sepsis and septic shock[J]. Ann Transl Med, 2020, 8(5): 150
- [27] RAMOS C J, LIN C, LIU X, et al. The EPAC-Rap1 pathway prevents and reverses cytokine-induced retinal vascular permeability[J]. J Biol Chem, 2018, 293(2): 717-730
- [28] JUNG M, MA Y, LYER R P, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation[J]. Basic Res Cardiol, 2017, 112(3): 33
- [29] BENNETTS P, SHEN Q, THIMMESCH A R, et al. Effects of ubiquinol with fluid resuscitation following haemorrhagic shock on rat lungs, diaphragm, heart and kidneys [J]. Exp Physiol, 2014, 99(7): 1007-1015
- [30] OZBEK N, BALI E B, KARASU C, et al. Quercetin and hydroxytyrosol attenuates xanthine/xanthine oxidase-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by regulation of oxidative stress and stress-sensitive signaling pathways[J]. Gen Physiol Biophys, 2015, 34(4): 407-414
- [31] BARRETT C D, HSU A T, ELLSON C D, et al. Blood clotting and traumatic injury with shock mediates complement-dependent neutrophil priming for extracellular ROS, ROS-dependent organ injury and coagulopathy[J]. Clin Exp Immunol, 2018, 194(1): 103-117

(上接第 3662 页)

- [21] Chen Z, Liu J, Sun F, et al. Effect of Improving Volume Overload on Home Blood Pressure Variability in Hemodialysis Patients[J]. Therapeutic Apheresis and Dialysis, 2020, 24(2): 163-168
- [22] Sakanoue M, Higashi Y, Kanekura T. Inhibition of Inflammatory Cytokines and Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells by the Effects of Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis [J]. Therapeutic Apheresis & Dialysis, 2017, 21(6): 628-634
- [23] Kucheryavykh LY, Dávila-Rodríguez, Josué, Rivera-Aponte DE, et al. Platelets are responsible for the accumulation of β -amyloid in blood clots inside and around blood vessels in mouse brain after thrombosis[J]. Brain Research Bulletin, 2017, 128(Complete): 98-105
- [24] 赵燕, 郝玉贵, 刘继国. 血浆置换联合激素、免疫抑制剂对血栓性血小板减少性紫癜患者的临床疗效分析[J]. 重庆医学, 2019, 48(1): 86-88+92
- [25] Juratli MA, Menyaev YA, Sarimollaoglu M, et al. Noninvasive label-free detection of circulating white and red blood clots in deep vessels with a focused photoacoustic probe [J]. Biomedical Optics Express, 2018, 9(11): 5667-5677
- [26] Kausar S, Khan W. Immunopathological response of leukocytes against microfilariae and adult worms in white rats infected with Setaria cervi[J]. Veterinary World, 2017, 10(5): 562-568
- [27] Kucheryavykh LY, Dávila-Rodríguez, Josué, Rivera-Aponte DE, et al. Platelets are responsible for the accumulation of β -amyloid in blood clots inside and around blood vessels in mouse brain after thrombosis[J]. Brain Research Bulletin, 2017, 128(Complete): 98-105
- [28] Boada, Mercè, Anaya F, Ortiz P, et al. Efficacy and Safety of Plasma Exchange with 5% Albumin to Modify Cerebrospinal Fluid and Plasma Amyloid- β Concentrations and Cognition Outcomes in Alzheimer's Disease Patients: A Multicenter, Randomized, Controlled Clinical Trial[J]. J Alzheimers Disease, 2017, 56(1): 129-143
- [29] Tovar T, Deitschel S, Guenther C. The use of therapeutic plasma exchange to reduce serum bilirubin in a dog with kernicterus [J]. J Veterinary Emergency Critical Care, 2017, 27(4): 458-464
- [30] Benvenga S, Di Bari F, Vita R. Undertreated hypothyroidism due to calcium or iron supplementation corrected by oral liquid levothyroxine[J]. Endocrine, 2017, 56(1): 138-145
- [31] Hofmeyr GJ, Manyame S. Calcium supplementation commencing before or early in pregnancy, or food fortification with calcium, for preventing hypertensive disorders of pregnancy [J]. Cochrane Database Systematic Reviews, 2017, 9(3): 13-18