DOI:10.16016/j.1000-5404.201910153

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

段晨阳,向鑫明,匡 磊,刘良明,李 涛 400042 重庆,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

[摘要] **目的** 探究缺氧后活化 Drp1 对线粒体能量代谢和有氧呼吸的调控机制。**方法** 在心肌细胞(H9C2)、血管平滑肌细胞系(vascular smooth muscle cells,VSMC)、肠上皮细胞系(intestinal epithelial cells,IEC)中通过免疫共沉淀、免疫荧光方法观察多种细胞类型缺氧后 Drp1 活性变化及与线粒体损伤的关系;利用 ZDOCK 方法建立 Drp1 与同源激酶 LRRK2 蛋白互作模型,验证缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联情况;以 VSMC 细胞为代表,通过 Drp1 点突变 T595A 破坏缺氧后 Drp1-LRRK2 的偶联,分别检测了培养基酸化程度、细胞外乳酸含量等反映无氧呼吸的指标和线粒体膜电位、ATP 生成量等反映有氧呼吸的指标。**结果** 缺氧后 Drp1 的 Thr 磷酸化水平增高、线粒体损伤明显。进一步研究发现缺氧后 Drp1 蛋白与 LRRK2 蛋白界面残基间存在大量氢键,导致缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联从而影响线粒体功能。具体表现为糖酵解过程中乳酸生成的增多和线粒体有氧呼吸过程中膜电位的减低。**结论** 缺氧后活化 Drp1 可通过偶联 LRRK2 破坏线粒体能量代谢和有氧呼吸,加重多器官组织线粒体损伤。

[关键词] 缺氧;Drp1;LRRK2;线粒体;能量代谢;有氧呼吸

[中图法分类号] R341;R363.21;R364.4 [文献标志码] A

Activated mitochondrial dynamin-related protein 1 couples with LRRK2 to cause mitochondrial dysfunction in hypoxic cells

DUAN Chenyang, XIANG Xinming, KUANG Lei, LIU Liangming, LI Tao State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of War Wound Shock and Blood Transfusion, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the mechanism of activated mitochondrial dynamin-related protein 1 (Drp1) in regulating mitochondrial energy metabolism and aerobic respiration after hypoxia. **Methods** We observed the changes of Drp1 activity and its relationship with mitochondrial damage by coimmunoprecipitation and immunofluorescence in cardiac myocyte line H9C2, vascular smooth muscle cells (VSMCs) and intestinal epithelial cells (IECs). The protein interaction model of Drp1 and LRRK2 was established using ZDOCK and verified by coimmunoprecipitation. A point mutation (T595A) was introduced in Drp1 gene to disrupt the coupling of Drp1 and LRRK2 in VSMCs, and the acidification of the culture medium, extracellular lactate content, mitochondrial membrane potential and ATP production of the cells were examined. **Results** Hypoxia caused significantly increased level of Thr phosphorylation in Drp1 and obvious mitochondrial damage in the cells. After hypoxia, numerus hydrogen bonds were found between the interface residues of Drp1 and LRRK2 proteins, which resulted in close binding between them to cause mitochondrial dysfunction, manifested by an increased lactate production during glycolysis and a decreased mitochondrial membrane potential during mitochondrial aerobic respiration. **Conclusion** Activated Drp1 causes impairment of mitochondrial energy metabolism and aerobic respiration by coupling with LRRK2 to aggravate mitochondrial damage in multiple tissues and organs after hypoxia.

[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科学基金(81700429)

[通信作者] 李 涛,E-mail:lt200132@163.com

[**Key words**] hypoxia; dynamin-related protein 1; LRRK2; mitochondria; energy metabolism; aerobic respiration

Supported by the Key Project of National Natural Science Foundation of China (81730059) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars (81700429). Corresponding author: LI Tao, E-mail: lt200132@163.com

缺氧是多种心脑血管疾病(如心肌缺血[1]、脑出血[2]、失血性休克[3]等)和肠道疾病(如肠系膜缺血[4]、结肠癌[5]、肠扭转等)病程发生、发展的共同通路。严重缺氧和持续缺氧会引起器官功能紊乱或障碍,甚至危及生命。在缺氧状态下,细胞的生物合成、生物降解、氧化还原等一系列需氧生化过程都会受到影响,严重时可造成细胞水肿、结构破坏,甚至变性坏死。线粒体作为对氧浓度变化最敏感的细胞器,在线粒体部位氧分压降到临界点 0.1 kPa 时,可出现肿胀、嵴崩解、外膜破裂等病变[6]。而 Drp1(mitochondrial dynamin-related protein 1)作为重要的线粒体动力相关蛋白,其活性改变在缺氧后线粒体功能调节中具有重要意义[7]。近年研究显示:在神经退行性变和心肌梗死等疾病中,Drp1 可以与多种蛋白(如 LRRK2、Filamin A 等)通过蛋白互作的方式影响神经元的发育以及心肌细胞的衰老[8-9]。但是,这种 Drp1 蛋白互作模式是否参与了缺氧后多器官线粒体功能障碍的调节,目前尚不清楚。为此,本研究通过观察缺氧后多种细胞类型中 Drp1 活性变化、Drp1 蛋白互作情况以及线粒体损伤情况,初步探究 Drp1 蛋白互作是否参与缺氧,多器官线粒体损伤过程;同时,利用点突变干预 Drp1 蛋白互作后观察缺氧后线粒体呼吸等功能指标,深入探究其调控机制,为探讨缺氧后线粒体损伤提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

心肌细胞系(H9C2)、血管平滑肌细胞系(vascular smooth muscle cells, VSMC)、肠上皮细胞系(intestinal epithelial cells, IEC)来源于中国科学院上海细胞库,传代并液氮保存于本室。Drp1 抗体、LRRK2 抗体、JC-1 荧光探针检测试剂盒均购于美国 Abcam 公司;Thr 磷酸化(p-Thr)修饰抗体、线粒体染料(MitoTracker Deep Red FM)均购于美国 Cell signaling 公司;免疫共沉淀试剂盒购于美国 Sino Biological 公司;乳酸含量检测试剂盒、ATP 含量检测试剂盒均购于北京索莱宝公司。Drp1 点突变质粒(Drp1 T595A)由上海和元生物科技有限公司协助设计包装。Drp1 蛋白互作模型建立由广州殷赋信息科技有限公司和天津智盖生物科技有限公司协助完成。共聚焦显微镜(Leica TCS SP5,美国);双色红外荧光成像系统(Odyssey,美国)。

1.2 细胞缺氧处理

将细胞接种在培养皿中,待贴壁完全、细胞覆盖率在 70%以上后,置于 37 ℃密封罐中,进行缺氧处理。缺氧步骤为先通入缺氧气体(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%,并维持缺氧状态 4 h 后取出进行观察或处理。

1.3 免疫共沉淀实验

取 50 μL protein A/G 免疫磁珠加入 1.5 mL 离心管,置于磁力架上,待磁珠贴壁后吸去上清。用 200 μL PBST 稀释 10 μg 的 Drp1 抗体装入带有免疫磁珠的离心管中,室温孵育 10 min 后,置于磁力架上待磁珠贴壁后吸去上清。再用 200 μL PBST 洗涤磁珠 3 次。然后加入 1 000 μL 的含有细胞裂解液的细胞悬液,用移液器吹打混匀。37 ℃孵育 15 min 使抗原和结合有抗体的免疫磁珠结合后置于磁力架上待磁珠贴壁后吸去上清。用 200 μL PBS 洗涤免疫磁珠-抗体-抗原复合物 3 次。洗涤完后用 100 μL PBS 重悬磁珠,进行后续的免疫印迹验证与 Drp1 结合的 p-Thr 或者 LRRK2 的表达量。

1.4 免疫荧光观察线粒体形态

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。

1.5 ZDOCK 蛋白互作建模

采用 SWISS-MODEL 服务器(https://swissmodel.expasy.org/)的同源模建方法构建 LRRK2(1900-2090)和 Drp1 蛋白的三维结构。通过序列比对,分别为 LRRK2 和 Drp1 找到模板蛋白 1FVR(同源性 37.08%)和 4BEJ(同源性 98.69%)。两蛋白均选择 A 链进行建模,构建了目标蛋白的三维结构。采用 ZDOCK 3.0.2 预测 LRRK2 和 DRP1 蛋白复合物结构。LRRK2 定义为配体,Drp1 定义为受体,输出最多 50 个模型。根据能量打分,选取第 1 个模型在 UCSF Chimera 中进

行进一步能量优化。最后采用 PyMOL 程序作图分析[10-11]。

1.6 线粒体膜电位检测

将细胞接种在共聚焦培养皿中,贴壁后干预处理。PBS 洗涤后,加入 0.1% 的 JC-1 染色工作液,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。正常情况下 JC-1 多以复合体形式存在呈现红色荧光,激发波为 633 nm;JC-1 单体形式呈现绿色荧光,激发波为 488 nm。

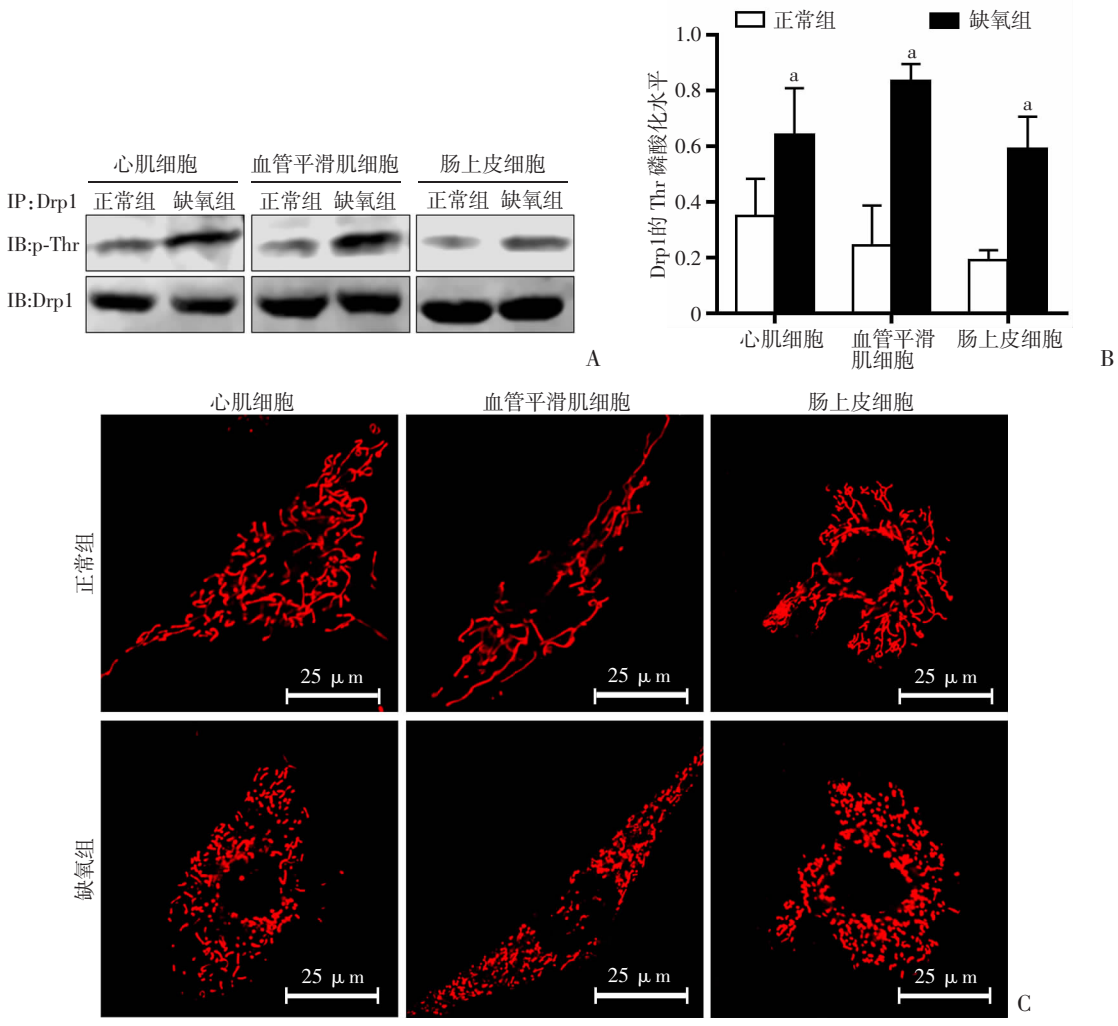
1.7 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件。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,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 缺氧后 Drp1 的 Thr 活性变化与线粒体损伤的关系

对多种组织类型细胞进行缺氧处理后,利用免疫共沉淀将 Drp1 蛋白抽提取出来,观察其活性改变,主要关注 p-Thr 修饰变化(图 1A)。结果显示:缺氧后心肌细胞中 Drp1 的 Thr 磷酸化水平提高了 80%($P<0.05$),血管平滑肌细胞中 Drp1 的 Thr 磷酸化水平提高 3 倍($P<0.05$),肠上皮细胞中 Drp1 的 Thr 磷酸化水平提高近 2 倍($P<0.05$),提示缺氧会引起多种器官中线粒体 Drp1 的 Thr 磷酸化水平明显增高(图 1B)。利用共聚焦显微镜观察缺氧后多种细胞类型中线粒体形态变化,发现缺氧后线粒体损伤明显,线粒体碎片化程度与 Drp1 的 Thr 活化程度呈正相关($R^2=0.941$,$P<0.05$),提示缺氧后 Drp1 的 Thr 磷酸化水平增高可能参与了缺氧后多器官线粒体损伤(图 1C)。



A:免疫共沉淀检测缺氧后多种细胞类型线粒体 Drp1 的 Thr 磷酸化水平;B:A 图灰度扫描统计分析($n=3$) a:$P<0.05$,与正常组比较;C:共聚焦显微镜观察缺氧后多种细胞类型线粒体形态变化

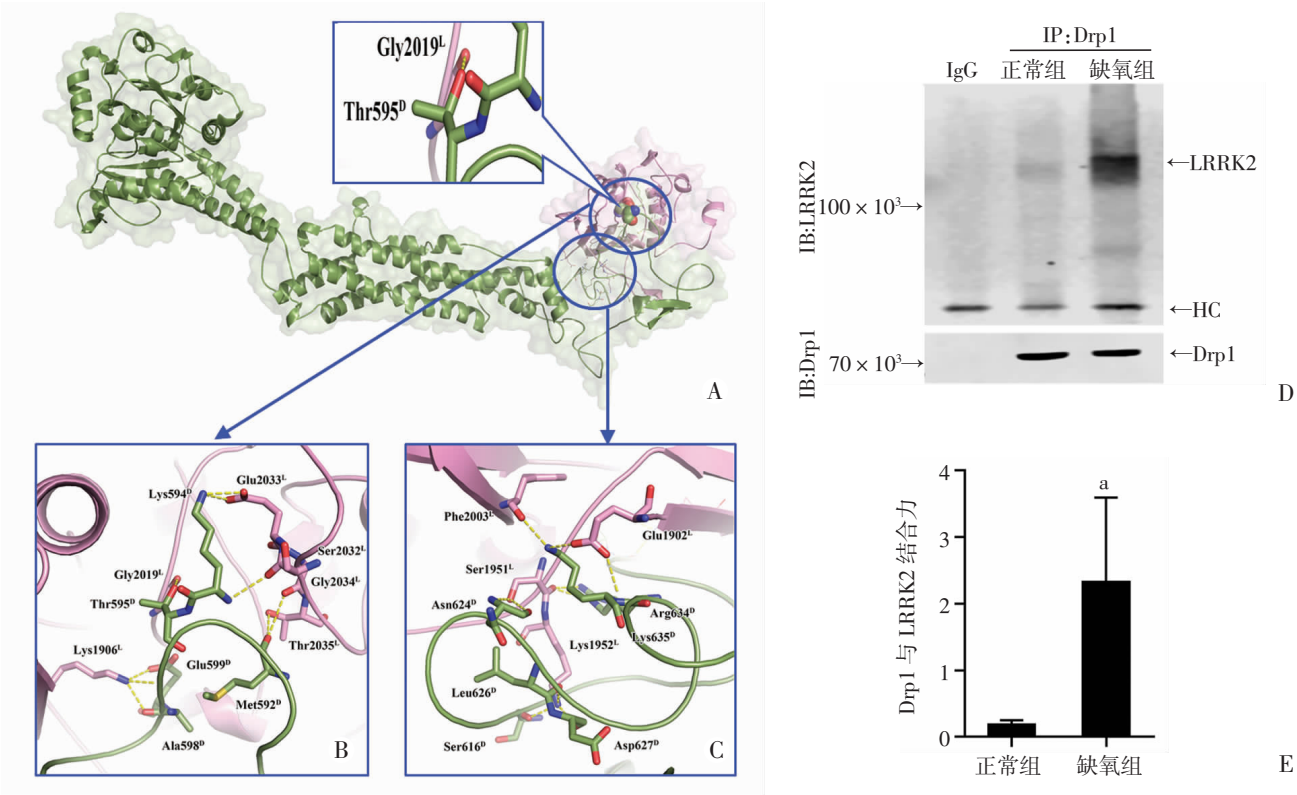
图 1 缺氧后多种细胞类型中 Drp1 的 Thr 活性变化和线粒体损伤情况

2.2　缺氧后活化 Drp1 与 LRRK2 的偶联情况

利用 ZDOCK 技术对缺氧情况下 Drp1 与其他蛋白如 LRRK2 的蛋白互作情况进行建模(图 2A)。从程序输出的前 10 个模型中选取第 1 个(即打分最好的)模型进行分析研究(表 1)。结果表明:缺氧后 Drp1 蛋白和 LRRK2 蛋白正面区域残基间存在大量氢键结合,其中 Drp1 T595 位点和 LRRK2 G2019 位点的结合最为显著。邻近界面的残基间也存在氢键相互作用,如 $Lys594^{D}$-$Glu2033^{L}$、$Lys594^{D}$-$Ser2032^{L}$、$Met592^{D}$-$Thr2035^{L}$、$Ala598^{D}$-$Lys1906^{L}$ 和 $Glu599^{D}$-$Lys1906^{L}$。这些残基大部分位于环区,很好地相互契合(图 2B)。在背面区域,两蛋白间也存在大量氢键,包括 $Phe2003^{L}$ 与 $Lys635^{D}$、$Glu1902^{L}$ 与 $Arg634^{D}$ 和 $Lys635^{D}$、$Ser1951^{L}$ 与 $Arg634^{D}$、$Lys635^{D}$ 和 $Asn624^{D}$、$Lys1952^{L}$ 与 $Ser616^{D}$、$Leu626^{D}$ 和 $Asp627^{D}$ 等(图 2C),提示缺氧后活化 Drp1 与 LRRK2 存在偶联。以血管平滑肌细胞为代表,进一步通过免疫共沉淀方法验证缺氧后 Drp1 与 LRRK2 的结合情况,结果显示:缺氧后 Drp1 与 LRRK2 的结合力是正常情况的 10 倍($P<0.05$,图 2D、E),提示缺氧后活化 Drp1 与 LRRK2 的蛋白互作可能参与了缺氧后多器官线粒体损伤调节。

表 1　ZDOCK 蛋白对接输出模型的打分情况

模型	ZDOCK 打分
1	1 330.963
2	1 313.107
3	1 306.986
4	1 303.910
5	1 302.771
6	1 292.298
7	1 285.426
8	1 281.605
9	1 241.610
10	1 239.095



A:ZDOCK 蛋白互作模型模拟缺氧后 Drp1 与 LRRK2 结合情况,LRRK2 以粉色表示,Drp1 以泥绿色表示,关键残基以相应颜色棒状表示,黄色虚线表示氢键相互作用;B:缺氧后 Drp1 与 LRRK2 蛋白界面残基间氢键结合正面图;C:缺氧后 Drp1 与 LRRK2 蛋白界面残基间氢键结合背面图;D:免疫共沉淀检测缺氧后 Drp1 与 LRRK2 结合情况;E:D 图灰度扫描统计结果($n=3$)
a:$P<0.05$,与正常组比较

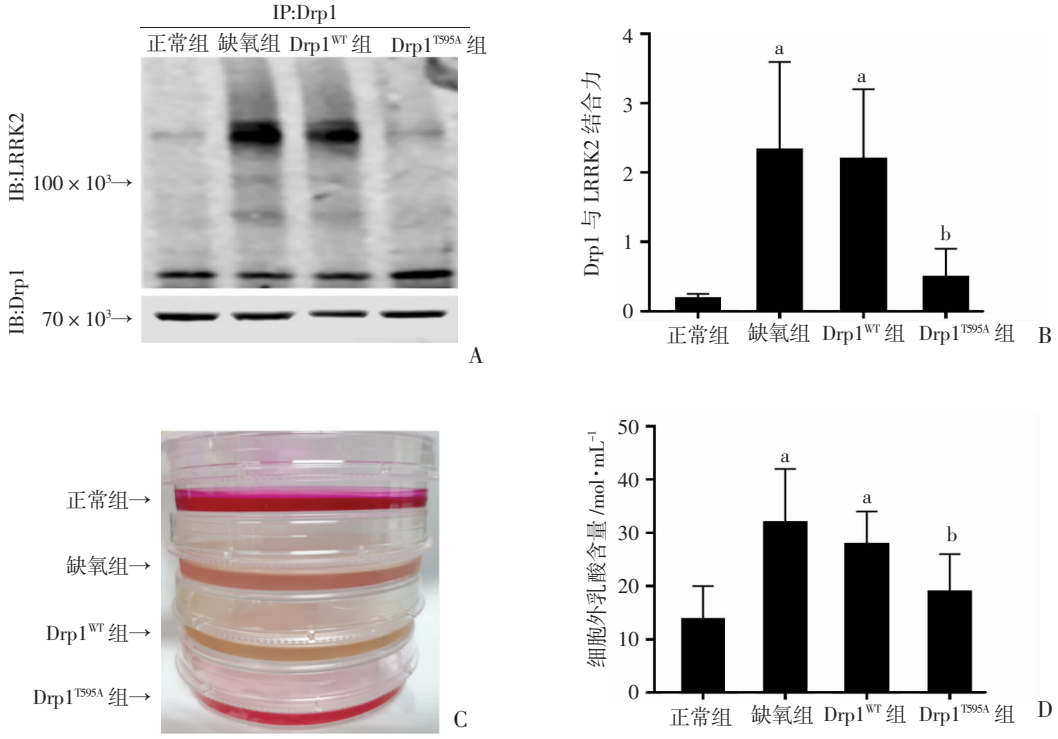
图 2　缺氧后活化 Drp1 与 LRRK2 的蛋白互作情况

2.3 缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联对线粒体能量代谢的影响

为了探究缺氧后活化 Drp1 与 LRRK2 的结合对于线粒体损伤的具体影响,通过点突变 Drp1 与 LRRK2 的结合位点(Drp1 T595A),破坏缺氧后活化 Drp1 与 LRRK2 的偶联(图 3A)。免疫共沉淀结果显示:与野生型对照组($Drp1^{WT}$)相比,点突变 Drp1 T595A 会导致缺氧后 Drp1 与 LRRK2 结合力减少 75%($P<0.05$),证实了点突变 Drp1 对于缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联的破坏作用(图 3B)。同时,在缺氧过程中发现:在缺氧组和野生型对照组的细胞培养基中,观察到培养基的强酸化(呈黄色),但是正常组和点突变 Drp1 组($Drp1^{T595A}$)并未出现同等情况(图 3C)。进一步对细胞外的乳酸生成进行了定量测定,结果表明:正常情况下检测细胞外乳酸含量为(14.13±6.02)nmol/mL,缺氧后细胞外乳酸含量明显升高[(32.14±9.83) nmol/mL, $P<0.05$],野生型对照组乳酸生成量与缺氧组比较差异无统计学意义,而点突变 Drp1 组细胞外乳酸含量明显改善[(19.14±6.64) nmol/mL, $P<0.05$, 图 3D]。上述结果表明:缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联可加速缺氧后糖酵解的乳酸生成过程。

2.4 缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联对线粒体有氧呼吸的影响

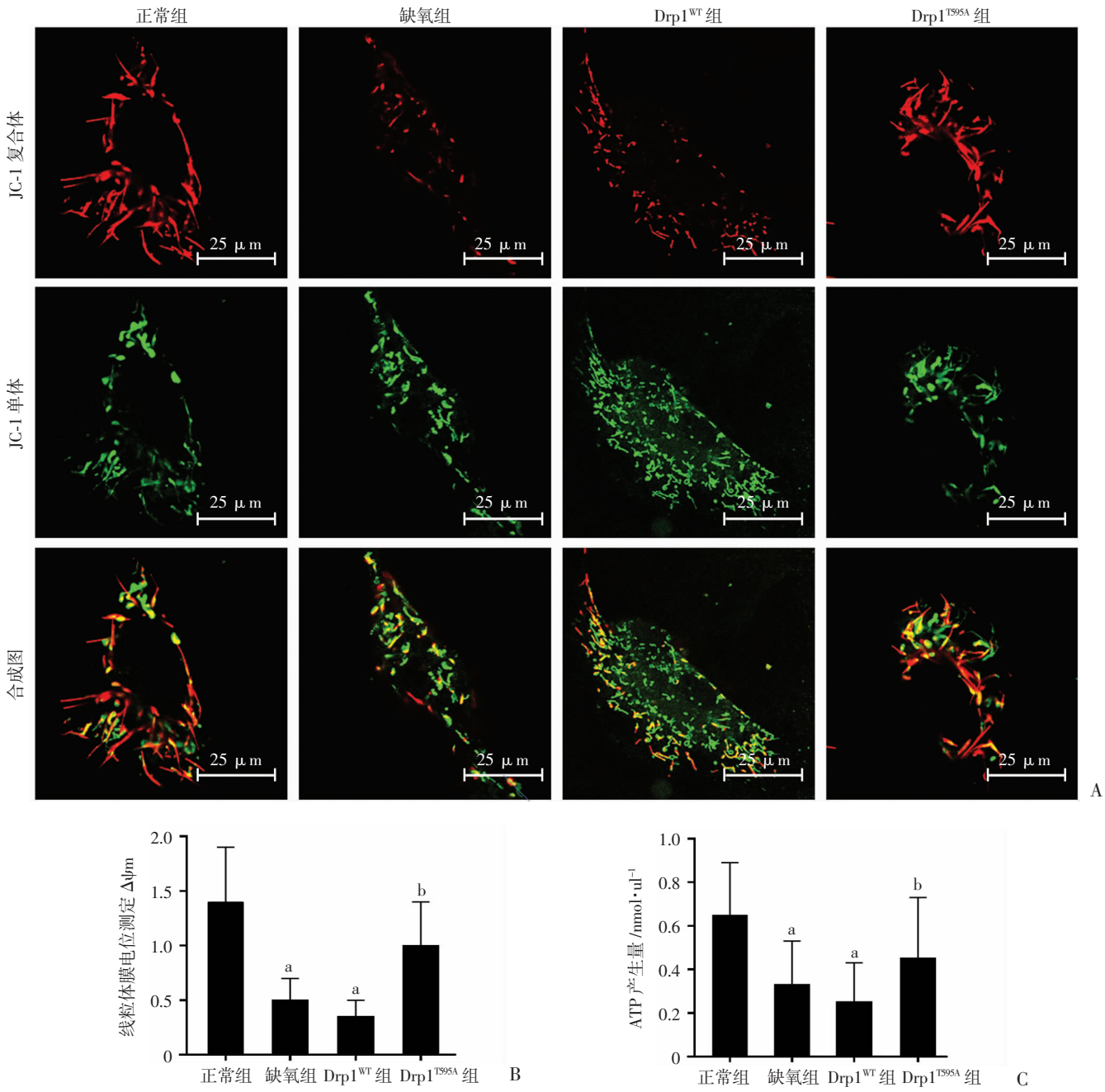
利用 JC-1 荧光复合探针检测点突变 Drp1 后线粒体膜电位变化(图 4A),结果显示:正常情况下 JC-1 多以复合体形式存在,而缺氧后 JC-1 多以单体形式存在,提示缺氧后线粒体膜电位明显减低($P<0.05$)。野生型对照组($Drp1^{WT}$)乳酸生成量与缺氧组比较差异无统计学意义,而点突变 Drp1 组($Drp1^{T595A}$)的 JC-1 复合体/单体的比例是缺氧组的 2.5 倍($P<0.05$,图 4B),提示破坏缺氧后 Drp1-LRRK2 的偶联可明显改善缺氧后线粒体膜电位。进一步对细胞有氧呼吸指标进行测定,结果显示:缺氧后 ATP 生成减少了 53%,而点突变 Drp1 破坏 Drp1-LRRK2 偶联后,ATP 产生量提高 43%(图 4C)。上述结果表明缺氧后 Drp1-LRRK2 的偶联降低了线粒体氧化磷酸化水平、抑制了线粒体的有氧呼吸。



a: $P<0.05$,与正常组比较; b: $P<0.05$, 与缺氧组比较

A:免疫共沉淀检测点突变 Drp1 对缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联的影响; B: A 图灰度扫描统计结果($n=3$); C: 培养基酸化实验结果;D: 细胞外乳酸测定结果($n=3$)

图 3 破坏缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联可抑制缺氧后糖酵解的乳酸生成



a: $P<0.05$,与正常组比较;b: $P<0.05$,与缺氧组比较

A:共聚焦显微镜观察线粒体膜电位 JC-1 荧光探针变化; B: A 图灰度扫描统计分析($n=3$); C: ATP 生成量检测($n=3$)

图 4 破坏缺氧后 Drp1-LRRK2 偶联可改善缺氧后线粒体有氧呼吸

3 讨论

缺氧是多种危重症的共同通路,与肿瘤、糖尿病、炎症和多器官功能障碍等多种疾病的发生、发展密切相关。破坏缺氧后 Drp1-LRRK2 的偶联会导致糖酵解过程受抑制,这可能与细胞有氧呼吸过程受到保护有关[12],而线粒体膜电位($\Delta\Psi m$)是细胞进行正常能量代谢、产生 ATP、维持氧化磷酸化的重要基础[13]。过去几十年的研究强调了缺氧对线粒体和线粒体代谢的影响[14],包括线粒体分裂和融合、线粒体自噬[15]、线粒体氧化磷酸化(OXPHOS)以及相关的信号转导机制。但是对于“线粒体在功能、结构和代谢等方面如何应对急性和/或慢性缺氧”及“如何通过替换呼吸链复合体上不同蛋白质产生适应性调节的机制[6]”方面还需要深入探究。本研究发现缺氧后线粒体相关蛋白 Drp1 发生 Thr 活化,并通过与 LRRK2 激酶的

蛋白互作效应抑制线粒体的有氧呼吸功能,加速糖酵解过程中乳酸的生成,进而加重多器官线粒体功能损伤。

以往研究显示 Drp1 的活性改变在多种细胞类型的线粒体功能调节中具有重要意义。在缺血再灌注损伤的心肌细胞中,Drp1 Ser616 磷酸化水平的上调和 Ser637 磷酸化水平的减低会引起 ROS 产生增加和线粒体过度分裂[16]。在高血糖(hyperglycemia)刺激下的内皮细胞中,Drp1 Ser600 磷酸化水平上调会引起 Drp1 的线粒体转位[17]。此外,Drp1 的其他修饰变化还包括:亚硝基化(S-nitrosylation)、苏木化(SUMOylation)、泛素化(ubiquitination)、糖基化(O-GlcNAcylation)[18]。研究显示 Drp1 泛素化可以促进细胞分裂后的线粒体网的重建,当泛素化受到抑制时,细胞因子合成减少,线粒体分布迅速不均匀[19]。Drp1 苏木化(SUMOylation)可以促进 Drp1 与线粒体外膜的结合,同时影响线粒体与内质网之间的钙交换、线粒体嵴的重构以及细胞色素 C 的释放[20]。本研究发现缺氧后 Drp1 的 Thr 磷酸化修饰可以调节线粒体呼吸功能,这可能与 Drp1 可以受多种 Ser/Thr 激酶调控有关。ZHANG 等[21]在神经退行性变的研究中发现:PKA(protein kinase A)作为一种 Ser/Thr 激酶可以通过与线粒体支架锚定蛋白 APAP121 形成复合物导致 Drp1 磷酸化,对维持线粒体稳态和神经元的发育至关重要。JIN 等[22]在前列腺癌的研究中发现:干预 Drp1 招募蛋白 INF2 的 Thr 序列可以影响 Drp1 到线粒体和内质网的定植。LIU 等[23]在帕金森疾病中的研究发现:同样作为线粒体 Ser/Thr 激酶的 PINK1 可以通过调节 Drp1 导致线粒体呼吸链组装异常,影响能量代谢。本研究进一步证实了 Drp1 的活性改变在线粒体功能调控中的重要作用,同时对于缺氧后 Drp1 发生转录后修饰变化的磷酸化位点提供了更多的实验依据。

此外,本研究还发现缺氧后 Drp1 的 Thr 位点不仅发生磷酸化,可以在 Thr 595 位点与同样含有 GTPase 结构域的同源激酶 LRRK2 产生偶联反应,形成 Drp1-LRRK2 蛋白互作。对于 Drp1 与其他蛋白的结合情况,以往也有一定研究。NISHIMURA 等[8]在心肌梗死的研究中发现:缺氧后 Drp1 的 GTPase 结构域可以与肌动蛋白细胞骨架 Filamin A 相互作用,并以肌动蛋白结合依赖的方式增加 Drp1 的活性,加速了心肌梗死后心脏的脆弱性和心肌细胞的衰老。WANG 等[9]在帕金森疾病中同样发现了 Drp1 与 LRRK2 的结合作用,并且使用线粒体分裂抑制剂 P110 可以阻断 LRRK2 诱导的线粒体碎片化、线粒体功能障碍以及神经元毒性。与本研究在缺氧模型中点突变 Drp1 蛋白互作位点后观察到的现象一致。

线粒体膜电位是维持线粒体进行氧化磷酸化和产生 ATP 的先决条件,膜电位的稳定有利于维持细胞的正常生理功能[24]。细胞在不同刺激作用下导致线粒体电子传递链组装异常时,线粒体膜电位也会出现不同程度的下降,因此,线粒体膜电位常被作为反映线粒体有氧呼吸功能的指标之一[25]。本研究发现缺氧后 Drp1-LRRK2 的偶联会影响线粒体复合体的组装、改变氧化磷酸化过程中电子传递的速率,线粒体膜电位和 ATP 生成都明显降低,说明细胞有氧呼吸受到了极大的破坏。而与此同时,细胞外培养基酸化程度明显,乳酸含量显著升高,提示缺氧后 Drp1-LRRK2 的偶联反应可能会通过影响复合体组装和氧化磷酸化系统使得细胞能量代谢从 OXPHOS 转向糖酵解。

综上所述,本研究发现缺氧后 Drp1 的 Thr 活化位点可以与 LRRK2 发生偶联反应,通过影响线粒体电子传递链复合体的组成,使得细胞能量代谢从 OXPHOS 转向糖酵解,乳酸生成增高,破坏线粒体能量代谢,加重多器官组织线粒体损伤。本研究进一步证实了缺氧条件下线粒体动力相关蛋白 Drp1 会发生明显改变,同时初步阐明了 Drp1 调控线粒体功能尤其是线粒体呼吸过程的相关机制。至于缺氧后活化 Drp1 如何调节电子传递链复合体组成和影响线粒体代谢变化,还需要后续深入研究。

参考文献:

[1] 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. DOI: 10.18632/aging.101751.

[2] LIU Z Q, ZENG X, DUAN C Y. Neuropsychological rehabilitation and psychotherapy of adult traumatic brain injury patients with depression: a systematic review and meta-analysis[J]. J Neurosurg Sci, 2018, 62(1): 24-35. DOI: 10.23736/S0390-5616.17.03953-4.

[3] DUAN C Y, CHEN K, YANG G M, *et al*. HIF-1α regulates Cx40-dependent vasodilatation following hemorrhagic shock in rats[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 1277-1286.

[4] 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. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000457.

[5] 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. DOI: 10.1093/annonc/mdw264.

[6] FUHRMANN D C, BRÜNE B. Mitochondrial composition

and function under the control of hypoxia[J]. Redox Biol, 2017, 12: 208-215. DOI: 10.1016/j.redox.2017.02.012.

[7] MARSBOOM G, TOTH P T, RYAN J J, *et al*. Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension [J]. Circ Res, 2012, 110(11): 1484-1497. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.263848.

[8] NISHIMURA A, SHIMAUCHI T, TANAKA T, *et al*. Hypoxia-induced interaction offilamin with Drp1 causes mitochondrial hyperfission-associated myocardial senescence[J]. Sci Signal, 2018, 11(556): eaat5185. DOI: 10.1126/scisignal.aat5185.

[9] WANG X L, YAN M H, FUJIOKA H, *et al*. LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(9): 1931-1944. DOI: 10.1093/hmg/dds003.

[10] DILIP A, LEŠNIK S, ŠTULAR T, *et al*. Ligand-based virtual screening interface between PyMOL and LiSiCA[J]. J Cheminform, 2016, 8(1): 46. DOI: 10.1186/s13321-016-0157-z.

[11] PIERCE B G, HOURAI Y, WENG Z P. Accelerating protein docking in ZDOCK using an advanced 3D convolution library[J]. PLoS ONE, 2011, 6(9): e24657. DOI: 10.1371/journal.pone.0024657.

[12] YAN X, SHI Z F, XU L X, *et al*. Glutamate impairs mitochondria aerobic respiration capacity and enhances glycolysis in cultured rat astrocytes[J]. Biomed Environ Sci, 2017, 30(1): 44-51. DOI: 10.3967/bes2017.005.

[13] TORRES M J, KEW K A, RYAN T E, *et al*. 17β-estradiol directly lowers mitochondrial membranemicroviscosity and improves bioenergetic function in skeletal muscle[J]. Cell Metab, 2018, 27(1): 167-179.e7. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.10.003.

[14] 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(1): 50-58. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201907139.
DUAN C Y, XIANG X M, KUANG L, *et al*. Role of activated dynamin-related protein 1-mediated glutathione metabolism in regulation of mitochondrial dysfunction after hemorrhagic shock[J]. J Third Mil Med Univ, 2020, 42(1): 50-58. DOI:10.16016/j.1000-5404.201907139.

[15] FUHRMANN D C, WITTIG I, HEIDE H, *et al*. Chronic hypoxia alters mitochondrial composition in human macrophages[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834(12): 2750-2760. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.09.023.

[16] ZAJA I, BAI X W, LIU Y N, *et al*. Cdk1,PKCδ and calcineurin-mediated Drp1 pathway contributes to mitochondrial fission-induced cardiomyocyte death[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(4): 710-721. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.144.

[17] WANG W J, WANG Y, LONG J Y, *et al*. Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation inpodocytes and endothelial cells[J]. Cell Metab, 2012, 15(2): 186-200. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.01.009.

[18] HU C X, HUANG Y, LI L J. Drp1-dependent mitochondrial fission plays critical roles in physiological and pathological progresses in mammals[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(1): E144. DOI: 10.3390/ijms18010144.

[19] HORN S R, THOMENIUS M J, JOHNSON E S, *et al*. Regulation of mitochondrial morphology by APC/CCdh1-mediated control of Drp1 stability[J]. Mol Biol Cell, 2011, 22(8): 1207-1216. DOI: 10.1091/mbc.E10-07-0567.

[20] PRUDENT J, ZUNINO R, SUGIURA A, *et al*. MAPL SUMOylation of Drp1 stabilizes an ER/mitochondrial platform required for cell death[J]. Mol Cell, 2015, 59(6): 941-955. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.08.001.

[21] ZHANG J D, FENG J C, MA D, *et al*. Neuroprotective mitochondrial remodeling by AKAP121/PKA protects HT22 cell from glutamate-induced oxidative stress[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(8): 5586-5607. DOI: 10.1007/s12035-018-1464-3.

[22] JIN X F, WANG J, GAO K, *et al*. Dysregulation of INF2-mediated mitochondrial fission in SPOP-mutated prostate cancer[J]. PLoS Genet, 2017, 13(4): e1006748. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006748.

[23] LIU W, ACIN-PEREZ R, GEGHMAN K D, *et al*. Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery *via* mitochondrial fission[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(31): 12920-12924. DOI: 10.1073/pnas.1107332108.

[24] 杨玲, 刘若兰, 牛欢, 等. 低表达线粒体蛋白 ISCA2 对线粒体功能影响的机制研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(7): 1120-1129.
YANG L, LIU R L, NIU H, *et al*. Elucidation of roles of protein ISCA2 in the control of mitochondrial function[J]. Chin J Cell Biol, 2018, 40(7): 1120-1129.

[25] SUMI C, OKAMOTO A, TANAKA H, *et al*. Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner[J]. PLoS ONE, 2018, 13(2): e0192796. DOI: 10.1371/journal.pone.0192796.

(**收稿**:2019-10-22;**修回**:2019-12-02)

(编辑 邓强庭)