[12] 丁文彬. GFP 转染的骨髓来源神经元样细胞桥接修复坐骨神经长距离缺损的研究[D]. 上海:第二军医大学,2013.
[13] 高 峰,田玉科,杨 辉,等. 鞘内移植 hPPE 修饰 INPC 对大鼠慢性神经病理性疼痛的镇痛效应[J]. 中华麻醉学杂志,2007,27(3):264 - 267.
[14] Neuhuber B, Timothy HB, Shumsky JS, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations [J]. Brain Res, 2005, 1035(1):73 - 85.
[15] Chen SH, Wanq JJ, Chen CH, et al. Umbilical cord blood-derived CD34 + cells improve outcomes of traumatic brain injury in rats by stimulating angiogenesis and neurogenesis [J]. Cell Transplant, 2014, 23(8):959 - 979.
[16] 张 威,周明武,幸超峰,等. NT-3 转染的 BMSCs 联合异体去细胞神经移植修复大鼠坐骨神经缺损[J]. 实用医药杂志,2013,30(10):907 - 911.
[17] 陈解元,孙 怡,赵国栋. 神经病理性痛大鼠鞘内注射人前脑啡肽原基因修饰骨髓间充质干细胞的镇痛效果[J]. 中华麻醉学杂志,2010,30(12):1437 - 1439.
[18] 杨劲松,陈峥嵘. 携带胶质细胞源性神经营养因子基因的骨髓间充质干细胞移植对兔坐骨神经缺损的治疗作用[J]. 中华创伤杂志,2010,26(11):1030 - 1034.
[19] 郑明辉,张志坚,黄东煜,等. 脑源性神经营养因子基因修饰骨髓间充质干细胞治疗坐骨神经损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(1):120 - 124.
[20] Ding P, Yang Z, Wang W, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells enhances infiltration and survival of CNP and Schwann cells to promote axonal sprouting following complete transection of spinal cord in adult rats[J]. Am J Transl Res, 2014, 6(3):224 - 235.
[21] Dadon-Nachum M, Ben-Zur T, Srugo I, et al. herapeutic effect of myogenic cells modified to express neurotrophic factors in a rat model of sciatic nerve injury[J]. J Stem Cells Regen Med, 2012, 8(1):21 - 27.

(编辑:周小林)

线粒体通透性转换孔与心肌缺血再灌注损伤

Mitochondrial permeability transition pore and myocardial ischemia-reperfusion injury

杨新征[1],于 飞[2] (1. 解放军第 222 医院病理科,吉林 吉林 132011;2. 解放军第 222 医院特诊科,吉林 吉林 132011)

[关键词] 线粒体通透性转换孔;心肌;缺血再灌注
[中图分类号] R541 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)06-0668-03

线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,MPTP)是位于线粒体内、外膜之间的非特异性孔道,是由多种线粒体蛋白构成的复合体。目前,国内外研究已经证实,MPTP 开放所引起的线粒体通透性变化在细胞凋亡过程中发挥了重要作用[1]。随着研究的深入,人们发现缺血、缺氧、氧化应激等刺激因素都可能引起 MPTP 开放,使线粒体通透性发生改变,从而对多种疾病的发生、发展过程产生影响[2]。本文就 MPTP 及其与心肌缺血再灌注损伤的关系进展情况作一综述。

1 MPTP 的结构与功能

1.1 MPTP 的结构

迄今为止,研究人员仍未能完全阐明 MPTP 的具体结构。目前通常认为 MPTP 是由多种蛋白组合而成的复合体,其成分主要包括电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel,VDAC)、腺嘌呤核苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase,ANT)、亲环蛋白 D(cyclophilin D,Cyp D)等。

1.1.1 VDAC 电压依赖性阴离子通道(VDAC)位于线粒体外膜,具有阴离子选择性和电压依赖性。VDAC 能够形成亲水性的电压依赖通道,调控细胞浆和线粒体间的物质交换和能量代谢,在细胞的生长及凋亡过程中发挥着重要作用[3]。通常情况下,VDAC 处于稳定开放状态,对带负电荷的阴离子具有优先选择性。VDAC 的电压依赖性表现为低电压时的高通透性和高电压时的低通透性。当跨膜电压突然大幅度升高或降低时,VDAC 开放被抑制,对阴离子的通透性明显降低。VDAC 结构和功能的变化直接影响了细胞的物质交换,从而损伤线粒体的呼吸功能,引起能量代谢异常。因此,VDAC 又被称为线粒体功能的调控者。

1.1.2 ANT 腺苷酸转位酶(ANT)是线粒体内膜上含量最多的蛋白,其功能是将线粒体内合成的 ATP 运送至细胞浆,同时将细胞浆中的 ADP 运送至线粒体内,完成胞浆与线粒体的 ADP 与 ATP 交换[4]。进入线粒体基质的 ADP 不仅参与线粒体的磷酸化作用,也对线粒体的氧化呼吸功能起到刺激作用。ANT 存在多种异构体,其分布具有明显的组织特异性,ANT 的不同表型在组织中的特异性表达可能与不同组织的能量需求有关。人类主要有 ANT1、ANT2、ANT3,大鼠只有 ANT1、ANT2 两种。

1.1.3 Cyp D 亲环蛋白 D(Cyp D)位于线粒体基质,是具有 MPTP 关闭作用的环孢素 A(CsA)的结合位点。当发生缺血再灌注时,Cyp D 的构型产生变化,从而影响线粒体转换孔的形成。研究显示,在心肌细胞中,Cyp D 和线粒体通透性改变是 Ca^{2+} 超载和氧化损伤引起细胞死亡的关键因素[5]。Tsujimoto

doi:10.11659/jjssx.01E015033
[收稿日期] 2015-07-28 [修回日期] 2015-09-15

等[6]报道,敲除 Cyp D 基因后,Ca^{2+}超载诱导 MPTP 开放的作用受到明显的抑制,证明了 Cyp D 是 MPTP 的重要组成部分或影响 MPTP 开放的重要因素。

1.1.4 其他成分 除了 VDAC、ANT、Cyp D 之外,参与构成 MPTP 的重要组成还包括外周型苯二氮卓类受体和 Bcl-2 家族蛋白、己糖激酶以及肌酸激酶等。外周型苯二氮卓类受体(peripheral benzodiazepine receptor,PBR)主要位于线粒体外膜,其结构中含有蛋白激酶作用的序列和磷酸化位点,具有信号传导功能。PBR 能够与 VDAC 和 ANT 联合,并通过改变相邻蛋白的构象来影响 MPTP 的功能状态[7],是 MPTP 的重要调节蛋白。

Bcl-2 家族既参与 MPTP 的构成,也是线粒体介导的细胞凋亡途径的主要调节因子之一。Bcl-2 家族可以分为两大类,一类促进细胞凋亡,包括 Bax、Bak 和 Bok 等;另一类则抑制细胞凋亡,包括 Bcl-2、Bcl-xl 等。Bax 和 Bcl-2 主要作用于线粒体外膜,可以引起线粒体的通透性发生改变,促进或抑制细胞凋亡促进因子的释放,如细胞色素 C、凋亡诱导因子等[8]。

1.2 MPTP 的功能

MPTP 是线粒体进行氧化应激、细胞呼吸、合成 ATP 等生命活动的必要条件,是线粒体与细胞质之间进行物质交换和信号传导的重要通道,也是影响线粒体稳定性和细胞功能的关键因素[9]。在正常生理情况下,MPTP 通常处于关闭或低通透性状态,只允许一些小分子物质通过。当发生损伤应激或受到不良刺激后,例如缺血缺氧、氧化应激、酸中毒等,MPTP 大量开放,线粒体膜通透性增高,从而引起基质蛋白的渗透压升高,线粒体膜电位下降,细胞色素 C 等促细胞凋亡物质释放,进而引起细胞死亡。MPTP 的开放程度与细胞死亡的方式密切相关。外界刺激较弱且短暂时,MPTP 少量、短暂开放,ATP 含量维持在较高水平,可能引起细胞凋亡;刺激较强且持续时间较长时,MPTP 发生不可逆的广泛开放,能量产生发生严重障碍,则可引起细胞坏死[10]。细胞凋亡与细胞坏死常常同时存在。

2 MPTP 的调节因素

MPTP 的调节因素主要包括 Ca^{2+}、无机磷酸盐(inorganic phosphate,Pi)、活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)、pH 和膜电压及核苷酸等。

2.1 Ca^{2+}

Ca^{2+}是十分重要的第二信使,与细胞的信号传导密切相关。线粒体基质中的 Ca^{2+}水平对 MPTP 的开闭起着重要的调节作用[11],是引起线粒体通透性变化的关键因素之一。相关文献报道,线粒体基质或者细胞质中的 Ca^{2+}浓度改变都可能引起线粒体通透性随之发生变化[11]。线粒体基质中的 Ca^{2+}浓度增加可引起 MPTP 的短暂开放,其他二价阳离子,如 Sr^{2+}、Mn^{2+}、Ba^{2+}和 Mg^{2+}则可能通过与 Ca^{2+}竞争性与 ANT 结合,或者影响基质内的 Ca^{2+}浓度,从而抑制 MPTP 的开放。

2.2 无机磷酸盐

在 MPTP 开放的调节过程中,无机磷酸盐可能发挥着双向作用,一方面,它可以和 Ca^{2+}形成非晶体的基质沉淀物,降低 MPTP 的开放能力;另一方面,它也可以成为维持 pH 的良好缓冲剂,刺激 MPTP 开放[12]。Siemen 等[13]认为,Pi 对 MPTP 的激活作用可以拮抗 MPTP 关闭剂的抑制作用。Varanyuwatana 等[14]的研究显示,当 MPTP 关闭剂抑制了通道开放后,Pi 仍可激活 MPTP 开放。

2.3 活性氧簇

活性氧簇既可作为 MPTP 开放的诱导剂,也可作为关闭剂抑制 MPTP 开放,其作用取决于所处的代谢环境。活性氧簇可以通过氧化不同位点而调节 MPTP 开放,例如 ANT 的 Cys 160 和 Cys 56。另外,活性氧簇可以增加 Ca^{2+}浓度水平,Ca^{2+}又可以通过氧化磷酸化促进活性氧簇生成,当达到阈值时,Ca^{2+}即可引起 MPTP 的短暂开放,诱导线粒体中活性氧簇产生,通过级联反应启动程序性细胞死亡[15]。

2.4 pH 和膜电压

MPTP 开放对 pH 和膜电压的依赖性很早就已被证实[16]。高水平的内部负电位使 MPTP 处于关闭状态,而线粒体膜电位降低将使 MPTP 开放。有研究报道,促使 MPTP 开放的最适 pH 是 7.4,pH 升高或降低都将影响孔道的开放状态,当 pH 大于 7 时,质子可以通过与 Ca^{2+}竞争性结合调节位点来调节 MPTP 开放[17]。

2.5 核苷酸

研究发现,MPTP 开放能够被 ATP、ADP 抑制,但是不能被其他核苷酸(AMP、GDP、GTP)抑制。相关研究认为,腺苷酸发挥作用的靶点可能是 ANT[16]。Varanyuwatana 等[14]推测,核苷酸可能是通过作用于 ANT 的膜电位依赖性 ADP 结合位点来调节 MPTP 的开放。

3 抑制 MPTP 开放在心肌缺血再灌注损伤中的作用

研究证实,在心肌急性缺血再灌注损伤中,Ca^{2+}、无机磷酸盐、氧化应激等因素引起的 MPTP 开放是引起细胞死亡的关键环节[18]。因此,抑制 MPTP 开放已成为心肌缺血再灌注损伤研究中心肌保护的新靶点[19]。

3.1 成人心肌缺血再灌注损伤

成人心肌缺血缺氧损伤常见于冠状动脉阻塞引起的心肌梗死,当心肌缺血后恢复供血时又可能发生再灌注损伤,缺血或再灌注损伤都可导致心肌细胞凋亡或坏死。若能有效缓解这些损伤,减轻心肌细胞凋亡或坏死程度,将对改善疾病的预后起到积极作用。Argaud 等[20]将成年家兔的冠状动脉左旋支夹闭 30 min后恢复供血 4 h,并在缺血处理前 10 min 或恢复供血前 1 min,通过静脉给予 MPTP 关闭剂,结果显示,给药组的心肌梗死面积明显小于未给药组,心肌细胞凋亡程度也轻于未给药组。Piot 等[21]将 MPTP 关闭剂用于成人心肌梗死后的临床治疗,核磁共振成像结果提示患者的心肌梗死面积明显缩小。这些试验结果提示抑制 MPTP 开放可能成为成人冠状动脉性心脏病治疗的有效靶点。

3.2 儿童心肌缺血再灌注损伤

儿童的心肌缺血再灌注损伤常见于先天性心脏畸形的外科手术中。在先天性心脏病外科手术中,实施心肺分流时,心脏停

跳将导致全心缺血;当心肺分流结束,恢复心肌供血时,又可能发生缺血再灌注损伤。儿童心脏手术中的心肌损伤呈弥漫性,而成人心肌梗死时,心肌损伤只发生在与病变血管相关的局部区域。Oka 等[22],对 14 日龄的小猪实施心肺分流术时,在心脏停跳液中加用 MPTP 关闭剂有助于维持心肌细胞线粒体结构的完整性,改善线粒体功能。Leung 等[23]对新生家兔进行了心脏停跳后复苏实验,结果也证实,在心脏手术中预先给予 MPTP 关闭剂可有效减轻手术过程中引起的心肌损伤。

新生儿作为一个特殊的群体,其心肌缺血再灌注损伤常发生于新生儿窒息的救治过程。新生儿窒息引起进行性低氧血症,血氧过低将导致全心缺血缺氧,而复苏治疗时又可能出现弥漫性的心肌再灌注损伤。有研究报道,约 50% ~80% 的患儿有心功能异常的表现[24]。Gill 等[25]采用新生小猪模型进行了急性窒息再复氧实验,结果表明在复氧起始阶段给予不同剂量的 MPTP 关闭剂,可以增加动物的心输出量,改善心功能。

由此可见,尽管心肌的发育成熟程度不同,引起心肌缺血再灌注损伤的原因亦不同,MPTP 关闭剂对心肌缺血再灌注损伤都表现出了较好的保护效果。但是,在临床治疗中,关于 MPTP 关闭剂的适用范围、适宜剂量和使用时机等问题,还需要更深入的研究来验证。

[参考文献]

[1] Elrod JW, Molkentin JD. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore[J]. Circ J, 2013, 77(5): 1111 – 1122.

[2] 雷 艳,董兆君. 环孢素 A 对大鼠缺血缺氧后酸碱平衡的调节作用[J]. 局解手术学杂志,2013,22(4):374 – 376.

[3] Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, et al. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis[J]. Cell, 2012, 149(7): 1536 – 1548.

[4] Vogelpohl I, Vetter R, Heger J, et al. Transgenic overexpression of heart-specific adenine nucleotide translocase 1 positively affects contractile function in cardiomyocytes[J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(2): 121 – 128.

[5] Yarana C, Sripetchwandee J, Sanit J, et al. Calcium-induced cardiac mitochondrial dysfunction is predominantly mediated by cyclosporine A-dependent mitochondrial permeability transition pore[J]. Arch Med Res, 2012, 43(5): 333 – 338.

[6] Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1757(9 – 10): 1297 – 1300.

[7] Joo HK, Lee YR, Lim SY, et al. Peripheral benzodiazepine receptor regulates vascular endothelial activations via suppression of the voltage-dependent anion channel-1[J]. FEBS Lett, 2012, 586(9): 1349 – 1355.

[8] De Giorgi M, Voisin Chiret AS, Rault S. Targeting the BH3 domain of Bcl-2 family proteins. A brief history from natural products to foldamers as promising cancer therapeutic avenues[J]. Curr Med Chem, 2013, 20(24): 2964 – 2978.

[9] Shalbueva N, Mareninova OA, Gerloff A, et al. Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2013, 144(2): 437 – 446.

[10] Pereira C, Silva RD, Saraiva L, et al. Mitochondria-dependent apoptosis in yeast[J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2008, 1783(7): 1286 – 1302.

[11] Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+}-dependent apoptosis and necrosis[J]. Cell Calcium, 2011, 50(3): 222 – 233.

[12] Li B, Chauvin C, De Paulis D, et al. Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1817(9): 1628 – 1634.

[13] Siemen D, Ziemer M. What is the nature of the mitochondrial permeability transition pore and what is it not[J]. IUBMB Life, 2013, 65(3): 255 – 262.

[14] Varanyuwatana P, Halestrap AP. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore[J]. Mitochondrion, 2012, 12(1): 120 – 125.

[15] Vianello A, Casolo V, Petrussa E, et al. The mitochondrial permeability transition pore (PTP): an example of multiple molecular exaptation[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1817(11): 2072 – 2086.

[16] Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporine-a-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient-evidence that the pore can be opened by membrane depolarization[J]. J Biol Chem, 1992, 267(13): 8834 – 8839.

[17] Hou T, Zhang X, Xu J, et al. Synergistic triggering of superoxide flashes by mitochondrial Ca^{2+} uniport and basal reactive oxygen species elevation[J]. J Biol Chem, 2013, 288(7): 4602 – 4612.

[18] 赵志芳,崔 炜. 线粒体通路与心肌缺血再灌注损伤[J]. 心血管病学进展,2014,35(5):572 – 576.

[19] 周 涛,秦国伟,向道康. 心脏不停跳瓣膜置换手术对心肌线粒体通透性转换孔的影响[J]. 广东医学,2014,35(9):1348 – 1351.

[20] Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38(2): 367 – 374.

[21] Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2008, 359(5): 473 – 481.

[22] Oka N, Wang L, Mi W, et al. Cyclosporine A prevents apoptosis-related mitochondrial dysfunction after neonatal cardioplegic arrest[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135(1): 123 – 130.

[23] Leung CH, Wang L, Fu YY, et al. Transient mitochondrial permeability transition pore opening after neonatal cardioplegic arrest[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 141(4): 975 – 982.

[24] Leone TA, Finer NN. Shock: a common consequence of neonatal asphyxia[J]. J Pediatr, 2011, 158(2): e9 – e12.

[25] Gill RS, Bigam DL, Cheung PY. The role of cyclosporine in the treatment of myocardial reperfusion injury[J]. Shock, 2012, 37(4): 341 – 347.

(编辑:魏 源)