

## • 综述 •

## 急性心肌缺血/再灌注损伤过程中的线粒体信号转导机制

孙明 褚俊 朱红军 韩永生

## 一、线粒体与细胞死亡途径

大量文献已证明多种细胞死亡途径都涉及线粒体的调节,其中主要两种形式,一种是以凋亡和细胞自噬为代表细胞程序性死亡,其主要通过激活调解途径导致细胞死亡,一种为不可逆转的、非调控过程的细胞坏死<sup>[1]</sup>。细胞凋亡在急性心肌缺血/再灌注引起的细胞损伤中起着重要的作用,尽管引起心肌缺血/再灌注损伤细胞及分子机制还未完全阐明<sup>[2]</sup>。介导细胞凋亡的信号途径可分为两种途径,一种为与特殊肿瘤坏死因子受体家族(aTNF)或Fas受体结合介导的细胞死亡途径——外源性途径<sup>[3]</sup>;一种是由线粒体参与的凋亡途径,线粒体可能启动或者增强凋亡途径,以此应对细胞内各种病理生理机制的改变<sup>[4]</sup>。凋亡途径的启动可激活“pro-caspases”,最终引起细胞内蛋白的水解,线粒体的减少,细胞核DNA的分裂。

线粒体与凋亡细胞内的内质网应激通路的交互作用已渐渐被人们所认识。线粒体既作为ROS(活性氧)产生的场所又是细胞凋亡调控中心。目前在凋亡中涉及线粒体和ROS已是无可争议的事实。实验表明了细胞色素C从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤,释放到细胞质的细胞色素C在dATP存在的条件下能与凋亡相关因子1(Apaf-1)结合,使其形成多聚体,并促使caspase-9与其结合形成凋亡小体,caspase-9被激活,被激活的caspase-9能激活其它的caspase如caspase-3等,从而诱导细胞凋亡。此外,线粒体还释放凋亡诱导因子,如诱导凋亡因子(apoptosis inducing factor, AIF),参与激活caspase。实验证明,用解偶联剂mCICCP会导致淋巴细胞凋亡,而如果稳定线粒体跨膜电位就能防止细胞凋亡,这过程可能涉及两条途径,一是不稳定的线粒体跨膜电引起线粒体膜渗透性改变,随后通过激活Cyt.C(细胞色素C)、Apaf等诱导Caspases激活,从而启动细胞凋亡程序<sup>[5]</sup>;另一个是线粒体的PTP诱导AIF产生,潜在的链道酶在它的作用下被活化,从而启动凋亡程序<sup>[5]</sup>。

## 二、线粒体膜渗透性改变(MPT)与心肌缺血/再灌注损伤

经过大量的细胞及分子水平的研究证实对线粒体功能有损伤作用包含多种因子,线粒体作为细胞凋亡途径过程中的关键细胞器,可通过改变ATP产生、钙离子稳态、ROS的产生以及改变膜渗透性等应对各种细胞因子及介质的作用。这些损伤线粒体的因子和介质包括钙离子负荷、ROS、蛋白激酶C- $\delta$ (PKC- $\delta$ )、钙蛋白酶以及促细胞凋亡的BCL-2家族(Bax/Bak和Bid、Bnip 3、Nix等)<sup>[6-7]</sup>。线粒体膜渗透性改变(MPT)在

细胞凋亡信号转导机制中起着关键作用<sup>[8]</sup>。上述因子及介质可单独或相互作用于线粒体,改变线粒体渗透性转化性孔道(MPTP)。MPTP的打开使线粒体基质增加,线粒体肿胀。基质膨胀可使线粒体内膜平整,同时释放促细胞凋亡因子,减少ATP的产生,增强酶促反应。本文通过几个重要细胞因子来进一步阐明线粒体在心肌缺血再灌注损伤中作用机制。

1. 钙离子负荷与MPTP及细胞凋亡的关系:在心肌缺血的早期,由于无氧糖酵解和ATP减少,释放的H<sup>+</sup>导致细胞内PH值急剧下降<sup>[9]</sup>。心肌缺血的大部分过程以及再灌注早期,细胞内Na<sup>+</sup>持续增加,导致细胞内Na<sup>+</sup>超载,其中缺血期主要通过Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase功能降低和Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向载体(NHE)和Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub>转运蛋白的激活<sup>[10]</sup>,再灌注期主要通过相邻细胞间缝隙连接<sup>[11]</sup>。持续研究证实心肌缺血期及再灌注早期钙离子伴随Na<sup>+</sup>升高而持续增加,直至使胞质内钙离子超载。同时又证实NCX载体在胞质内钙离子超载发挥着重要作用。Ca<sup>2+</sup>超载所引起的后果在缺血期和再灌注期不尽相同。在缺血期Ca<sup>2+</sup>超载主要引起细胞间解耦联<sup>[12]</sup>、连接蛋白半管的开通<sup>[13]</sup>以及钙蛋白酶向细胞膜转移<sup>[14]</sup>。在再灌注期Ca<sup>2+</sup>超载主要引起肌浆网驱动的钙离子震荡<sup>[15]</sup>和超痉挛,同时增强钙蛋白酶介导的蛋白水解作用,进而导致细胞死亡。线粒体在调节细胞内钙离子超载发挥着重要作用,一方面通过吸收胞浆内钙离子起到延缓胞浆钙离子过快增长;另一方面恢复氧供是肌浆网驱动的钙离子震荡和超痉挛必备条件<sup>[16]</sup>。胞浆内钙离子超载使线粒体内钙离子水平提高,进而引发MPTP,减少ATP合成<sup>[17]</sup>;而MPTP也可以引起肌浆网驱动的钙离子震荡、超痉挛以及细胞死亡<sup>[18]</sup>。根据前面所述,Ca<sup>2+</sup>超载可以通过引起细胞超痉挛和激活钙蛋白酶水平直接导致心肌细胞死亡。另一方面Ca<sup>2+</sup>超载也可以通过引起MPTP,促进细胞凋亡。目前认为Ca<sup>2+</sup>超载需要在活性氧(ROS)支持下诱导MPTP的产生。

2. 活性氧(ROS)与MPTP及心肌细胞凋亡的关系:另一种影响线粒体功能因子为活性氧(ROS),正常生理状态下线粒体可以产生少量ROS<sup>[19]</sup>,但在心肌再灌注期因为细胞氧供突然恢复而导致产生大量ROS<sup>[20]</sup>。一个功能受损的线粒体可能诱发相邻的线粒体释放大量的ROS及膜电位大量减少,这就是“ROS诱导ROS”现象。ROS可结合氧化心磷脂,进而损害复合酶I的激活,同时诱导产生细胞色素C<sup>[21]</sup>,后者促进细胞凋亡的关键因素。现已证实ROS不但可以诱导MPT,同时由于心肌细胞不稳定的电活动可导致组织内电传导的缺失,进而可诱发心律失常的产生<sup>[22-23]</sup>。所以线粒体既是ROS产生源,又是ROS“受害者”<sup>[24]</sup>。

3. Bcl-2家族蛋白与MPTP及心肌缺血再灌注损伤的关系:大量文献已证实Bcl-2家族蛋白(包括促凋亡蛋白Bax/Bak和

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.16.039

基金项目:安徽省卫生厅基金(09A091)

作者单位:230001 合肥,安徽医科大学附属医院心血管内科(孙明、褚俊、朱红军),急诊内科(韩永生)

通讯作者:褚俊, Email: chujun1964@yahoo.com.cn

Bid, 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-x1) 在调节心肌细胞凋亡过程中发挥着关键作用。在各种病理过程如心肌缺血状态下, 促凋亡蛋白比率增大<sup>[25]</sup>。在正常细胞里, Bax 蛋白位于细胞质里, 病理状态下, Bax 作为细胞凋亡的信号分子迅速转移至线粒体, 而 Bak 是位于线粒体内的一种完整膜蛋白<sup>[26]</sup>。文献报道在心肌细胞氧化应激下, Bax 可被激活<sup>[27]</sup>, 被激活后的 Bax 蛋白经过构象改变等一系列变化后, 与线粒体外膜结合, 诱导线粒体膜通透性改变, 释放细胞色素 C 和激活 caspase-3<sup>[25]</sup>。有趣的是, Bcl-2 蛋白通过阻止 Bax/Bak 蛋白的激活调节 MPTP<sup>[28]</sup>, 同时 Bcl-2 蛋白也可通过阻断孔道开放来提高钙离子超载诱导的 MPTP 的开放的门槛<sup>[29]</sup>。Bcl-2 蛋白还可以阻断由 P53 诱导的心肌细胞凋亡<sup>[30]</sup>。文献报道 Bcl-2 转基因大鼠在缺血/再灌注损伤状态下可大量表达 Bcl-2 蛋白, 心肌细胞凋亡及坏死面积都较对照组有显著减少<sup>[31]</sup>。

### 三、线粒体与细胞“自我防御”机制

1. 线粒体分裂、融合和自噬: 近年来有文献证实心肌保护过程中发现有线粒体融合的现象<sup>[32]</sup>, 尽管对线粒体的分裂和融合机制目前还没有十分明确。目前考虑可能为线粒体融合改变了面积-体积比, 进而提高了由于钙离子超载诱导 MPTP 开放的门槛。线粒体自噬是清除受损线粒体的重要机制, 目前认为线粒体分裂是线粒体自噬之前必备条件。线粒体去极化可能是线粒体选择性去除的一个诱发因素, 同时也是扣押和隔离受损线粒体的重要因素<sup>[33-34]</sup>。而扣押和隔离受损线粒体在心肌缺血/再灌注损伤中具有保护作用。在心肌再灌注期线粒体 ATP 敏感性的 K 离子通道开放可能导致线粒体去极化。

2. 再灌注损伤挽救激酶信号通路和心肌再灌注损伤的保护: 再灌注损伤激酶 (RISK) 通路是一组促存活蛋白激酶包括 PI3K-Akt 和细胞外 Erk1/2<sup>[35]</sup>以及后来发现的下游靶点 p70s6K 和糖原酶激酶-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )。大量文献证实机械干预 (如缺血预适应和缺血后处理) 和药物干预 (如他汀, 腺苷, 心房钠尿肽等) 均能激活 RISK 信号通路, RISK 具有强大的心肌保护作用。其中的机制可能是 Akt 可以使内皮细胞一氧化氮合成酶 (eNOS) 磷酸化, 促进一氧化氮 (NO) 生成, 后者可抑制 MPTP 的开放<sup>[36]</sup>, 最终抑制心肌细胞再灌注损伤。所以线粒体通透性转化孔道 (mPTP) 可能是 RISK 信号通路的重要效应器, 是机械干预和药物干预心肌保护作用的关键共同通路。但 RISK 通路仍有很多分子机制仍不十分明确。

3. 线粒体 ATP 敏感性的 K 离子通道与心肌缺血/再灌注损伤的保护: 在心肌预适的自我防御机制中开放 ATP 敏感性的钾离子通道起着重要作用<sup>[37]</sup>。K-ATP 通道开放可能提高正常心肌细胞能量代谢的效率, 而且也可加速缺血再灌注的心肌细胞 ATP 浓度的迅速恢复。大量文献已证实缺血预适应或药物预适应实验中使用 K-ATP 通道阻滞剂, 心肌坏死面积与对照组无显著学差异<sup>[38]</sup>。其机制可能是 K-ATP 通道开放可增加活性氧的生成<sup>[37]</sup>, 后者是被认为诱导心肌细胞保护性预适应信号传导通路的重要诱因<sup>[39]</sup>。

### 四、结语

综上所述, 线粒体在心肌缺血/再灌注损伤及心肌细胞保护

的信号转导通路中具有关键作用。这种作用具有双向性, 时效性, 空间性。所涉及的分子及信号通路非常复杂。尽管目前有大量临床及基础实验通过各个方面验证线粒体的重要性, 但仍有很多机制需要进一步阐明。比如氧化应激对细胞凋亡具有促进作用, 抗氧化剂具有保护细胞损伤作用, 但目前大规模临床实验还没有获得令人信服的结果, 尽管在体外细胞水平上已经得出显著获益。这也需要我们进一步说明体外细胞实验和动物实验、基础实验和临床实验的一致性。

### 参 考 文 献

- [1] Loos B, Engelbrecht AM. Cell death: A dynamic response concept. *Autophagy*, 2009, 5: 590-603.
- [2] Prasad A, Stone GW, Holmes DR, et al. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the 'dark side' of reperfusion. *Circulation*, 2009, 120: 2105-2112.
- [3] Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol*, 2003, 22: 15-20.
- [4] Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis*, 2009, 14: 536-548.
- [5] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, 2006, 116: 1793-1801.
- [6] Logue SE, Gustafsson AB, Samali A, et al. Ischemia/ reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38: 21-33.
- [7] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 292: C45-C51.
- [8] Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, et al. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366: 79-94.
- [9] Smith GL, Donoso P, Bauer CJ, et al. Relationship between intracellular pH and metabolite concentrations during metabolic inhibition in isolated ferret heart. *J Physiol*, 1993, 472: 11-22.
- [10] ten Hove M, van Emous JG, van Echteld CJ. Na<sup>+</sup> overload during ischemia and reperfusion in rat hearts: comparison of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange blockers EIPA, cariporide and eniporide. *Mol Cell Biochem*, 2003, 250: 47-54.
- [11] Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, et al. Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na(+) through gap junctions. *Circ Res*, 1999, 85: 280-287.
- [12] Peracchia C. Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1662: 61-80.
- [13] Thimm J, Mechler A, Lin H, et al. Calcium-dependent open/closed conformations and interfacial energy maps of reconstituted hemichannels. *J Biol Chem*, 2005, 280: 10646-10654.
- [14] Molinari M, Carafoli E. Calpain: a cytosolic proteinase active at the membranes. *J Membr Biol*, 1997, 156: 1-8.
- [15] Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, et al. Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*, 1997, 96: 4372-4379.
- [16] Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inseste J, et al. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res*, 2012, 94: 168-180.
- [17] Garcia-Perez C, Hajnoczky G, Csordas G. Physical coupling supports the local Ca<sup>2+</sup> transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle. *J Biol Chem*, 2008, 283: 32771-32780.
- [18] Ruiz-Meana M, Abellan A, Miro-Casas E, et al. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297: H1281-H1289.

- [19] Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, 70: 200-214.
- [20] Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al. Occurrence of oxidative stress during myocardial reperfusion. *Mol Cell Biochem*, 1992, 111: 61-69.
- [21] Nomura K, Imai H, Koumura T, et al. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J*, 2000, 351: 183-193.
- [22] Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, et al. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*, 2000, 192: 1001-1014.
- [23] Aon MA, Cortassa S, Marban E, et al. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 2003, 278: 44735-44744.
- [24] Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*, 2007, 100: 460-473.
- [25] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19: 488-496.
- [26] Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 2002, 111: 331-342.
- [27] Kumar D, Jugdutt BI. Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med*, 2003, 142: 288-297.
- [28] Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292: C45-C51.
- [29] Zhu L, Yu Y, Chua BH, et al. Regulation of sodium-calcium exchange and mitochondrial energetics by Bcl-2 in the heart of transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33: 2135-2144.
- [30] Kirshenbaum LA, de Moissac D. The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation*, 1997, 96: 1580-1585.
- [31] Brocheriou V, Hagege AA, Oubenaissa A, et al. Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med*, 2000, 2: 326-333.
- [32] Ong SB, Subrayan S, Lim SY, et al. Inhibiting mitochondrial fission protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 2010, 121: 2012-2022.
- [33] Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*, 2005, 8: 3-5.
- [34] Gottlieb RA, Carreira RS. Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299: C203-C210.
- [35] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*, 2004, 61: 448-460.
- [36] Balakirev MY, Khramtsov VV, Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem*, 1997, 246: 710-718.
- [37] O'Rourke B. Myocardial K (ATP) channels in preconditioning. *Circ Res*, 2000, 87: 845-855.
- [38] du Toit EF, Genis A, Opie LH, et al. A role for the RISK pathway and KATP channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *Br J Pharmacol*, 2008, 154: 41-50.
- [39] Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, et al. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 1998, 273: 18092-18098.

(收稿日期: 2013-06-27)

(本文编辑: 张岚)

孙明, 褚俊, 朱红军, 等. 急性心肌缺血/再灌注损伤过程中的线粒体信号转导机制 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(16): 7509-7511.

中华医学会