

基于 mPTP 对心肌缺血/再灌注损伤干预研究

李静远 黄秀兰

摘 要 线粒体通透性转移孔在心肌缺血再灌注损伤中具有重要作用,抑制 mPTP 开放对 I/R 损伤的心脏具有保护作用。本文就近年来心肌 I/R 中基于 mPTP 开放的干预研究做一综述。

关键词 心肌缺血/再灌注损伤 线粒体通透转移孔 心脏保护

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

心肌缺血一定时间后重新恢复血液供应,心肌不会马上恢复其正常功能和结构,反而出现心肌细胞损伤加重、心肌顿抑、心电不稳定,表现为心律失常、梗死面积扩大、持久性心室收缩功能低下等现象,即心肌缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤。I/R 损伤一般多发生于心脏外科手术、器官保存、心力衰竭、心肌梗死等情况^[1]。目前关于再灌注诱导细胞死亡的发生机制有多种解释,包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)形成、钙超载、线粒体能量障碍及线粒体通透性转移孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放等。近年来 mPTP 开放在心肌 I/R 损伤中的作用引起了广泛关注,逐渐成为研究 I/R 干预机制的一个重要靶点^[2]。

一、mPTP 结构及开放状态

mPTP 是由位于线粒体内、外膜上多种蛋白组成的非选择性复合孔道,其本质是一种跨膜多孔蛋白,这些蛋白通过构象改变调节通道的开放和关闭,准确的分子结构尚未完全探明。目前认为 mPTP 主要由 3 部分组成:内膜上的腺嘌呤核苷酸转移酶(adenine nucleotide translocase, ANT)、外膜上的电压依赖阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)和位于基质的亲环素 D(cyclophilin D, CyP-D)^[3]。ANT 通过改变线粒体能量代谢来影响 mPTP 的开放。VDAC 的生理功能为控制 ATP、ADP 以及其他一些代谢物质穿过线粒体外膜。VDAC 并非 mPTP 开放必需,但是能够影响 PT 孔对 Ca^{2+} 的敏感度。CyP-D 是 mPTP 开放所必需的结构,它属于一种肽酰-脯氨

酰-顺反式异构酶(peptidylprolyl isomerase, PPIase),可以催化线粒体肽链裂解以及蛋白质中肽酰脯氨酰键顺式反式异构体之间的相互转换。

目前认为, mPTP 是线粒体清除大量无机磷酸盐、高浓度 Ca^{2+} 等物质的重要通道。根据细胞所处环境的不同, mPTP 有 3 种状态:完全关闭状态、可逆的低水平开放状态和不可逆的高水平开放状态^[2]。生理情况下, mPTP 处于关闭状态;短暂、轻度缺血或慢性缺血状态下, mPTP 处于可逆的低水平开放状态;长期重度缺血,线粒体破坏达到一定程度时, mPTP 呈不可逆的高水平开放状态。mPTP 高水平开放可导致线粒体质子-电化学梯度耗散、离子稳态破坏、线粒体肿胀、ATP 水解,进而引起细胞色素 C 从线粒体释放,诱导细胞凋亡^[3, 4]。通过 2-脱氧葡萄糖俘获技术测量在体心脏中心肌细胞的 mPTP 开放,结果显示 mPTP 开放发生在再灌注期间而不是缺血期^[5]。

二、诱发 mPTP 开放的因素

诱发 mPTP 开放的因素很多,包括胞质和线粒体基质 Ca^{2+} 增加、ROS 生成增多、线粒体跨膜电位下降、能量耗竭(ATP、ADP 和 NADPH 减少)等,而细胞内 pH 值及某些 2 价阳离子如 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} 等的快速变化也影响 mPTP 开放,其中胞质和线粒体基质 Ca^{2+} 增加和 ROS 生成增多对 mPTP 开放的影响最大^[6]。

线粒体基质 Ca^{2+} 升高是诱发 mPTP 开放的主要因素。线粒体基质 Ca^{2+} 积聚到一定程度触发线粒体 mPTP 开放, Ca^{2+} 浓度增高促进 ANT 与 CypD 结合,使 ANT 构象改变,形成胞质构象后诱导 mPTP 开放。 Ca^{2+} 介导的 mPTP 开放具有一定的阈值,胞质中低浓度的 Ca^{2+} ($4\mu\text{mol/L}$)使线粒体内外膜连接点 VDAC-ANT 减少,游离 VDAC 增多,而高浓度的 Ca^{2+} ($\geq$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173656);国家民族事务委员会基金资助项目(10ZY08)

作者单位:100081 北京,中央民族大学中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室

通讯作者:黄秀兰,教授,博士生导师,电子信箱:hxlxun@126.com

10μmol/L)足以引起 mPTP 开放,膜电位崩解,大量细胞色素 C 释放进入胞质,此时如果不能及时供给 ATP,将出现细胞坏死^[7]。

在触发心肌细胞线粒体 mPTP 开放的诸多因素中,ROS 诱导的 ROS 释放(ROS - induced ROS release, RIRR)具有重要作用。ROS 主要在线粒体产生,通过氧化 ANT 硫醇基触发 mPTP 开放,引起线粒体膜电位降低和 ROS 生成增加,这种由 ROS 积聚诱导 mPTP 开放触发线粒体去极化随即引起 ROS 爆发的现象,称为 RIRR^[8]。RIRR 有助于线粒体氧化应激在更大范围扩散,加重线粒体损伤程度。

三、I/R 损伤中干预 mPTP 开放的药理学措施

抑制 mPTP 开放能够减轻 I/R 损伤,保护心肌细胞。根据作用部位不同,基于 mPTP 的药理学干预措施分为两类:直接作用于 mPTP,间接作用于 mPTP (表 1)^[9]。

表 1 mPTP 开放直接/间接的抑制因素和可能的作用机制

抑制部位	机制
直接作用于 mPTP	
CsA 及其类似物 NIM811, Debio - 025	抑制 CyP - D 与 PiC/ANT 的结合
SfA	抑制 CyP - D 上 PPIase 的活力
BKA, ADP	诱导 ANT 的“m”构象
H ⁺ 和 2 价阳离子 (Mg ²⁺ 、Mn ²⁺ 、Sr ²⁺ 、Ba ²⁺)	拮抗钙离子与 ANT 的结合
间接作用于 mPTP	
ROS 清除剂 (如异丙酚、丙酮酸盐、MCI - 186)	阻止 ROS 的堆积,氧化 ANT 重要的硫醇基
细胞内环境低 pH 值诱导剂 (NHE - 1 抑制剂卡立泊来德和类似物丙酮酸盐)	降低细胞内 pH 值,抑制钙离子与 ANT 的结合
辅酶 Q ₁₀ 类似物 (UQ ₀ 、Ro 68 - 3400)	尚不明确,可能是通过 complex I 或 ANT 与 PiC 结合
缺血预处理/后处理	阻止氧化应激,使线粒体代谢正常

1. 直接作用于 mPTP:直接抑制 mPTP 开放的药理机制分为两类:与 CyP - D 结合和与 ANT 结合。

与 CyP - D 结合直接抑制 mPTP 开放的药物主要有环孢素 A (ciclosporin A, CsA) 及其类似物 NIM811、生血素 A (sanglifehrinA, SfA) 和米醇菌酸盐 (bongkrekate, BKA) 等。CsA 是一种广泛应用于器官移植的免疫抑制剂,研究发现在心脏外科手术中,再灌注前应用 CsA 能够通过和 CyP - D 结合抑制 mPTP 开放,提高心肌细胞存活率,改善心脏收缩功能。严

重心肌梗死患者再灌注前给予 CsA,能使心肌梗死程度减轻大约 40%^[10]。CsA 的类似物 NIM811,是 CyP - D 活化的特异性抑制剂,能够减轻大鼠 I/R 引起的心功能障碍^[11]。在体外培养大鼠心肌细胞 I/R 模型中, SfA 不能抑制钙神经素活性,却可通过抑制 CyP - D 上 PPIase 的活力来封闭 mPTP,发挥心脏保护作用^[12]。

直接作用于 mPTP 的另一个靶标是 ANT,以此为代表的药物是 BKA 以及一些阳离子如 Mg²⁺、Mn²⁺、Sr²⁺、Ba²⁺ 等^[13]。ANT 通过线粒体内膜交换 ATP 和 ADP,使氧化磷酸化新合成的 ATP 及时供给能量到线粒体基质,在此过程中,ANT 从“c”构象变化为“m”构象。ANT 特异性抑制剂 BKA,通过固定“m”构象,使“c”构象不能及时转变为“m”构象,从而抑制 ANT 的活性。在大鼠心肌细胞, BKA 能够通过固定“m”构象防止低氧诱导的 mPTP 开放^[14]。尽管 BKA 能够抑制 mPTP 开放,但是其机制复杂,因为它可能也会抑制 ATP/ADP 转运体催化剂的活性。此外,一些阳离子如 Sr²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺、Na⁺、Mg²⁺ 等也能够通过影响基质内 Ca²⁺ 浓度或与 Ca²⁺ 竞争性与 ANT 结合影响 mPTP 开放^[14]。

2. 间接作用于 mPTP:抑制 mPTP 开放的间接策略主要包括减少钙超载、ROS 生成等诱导的受损线粒体堆积,和 (或) 提高细胞内抑制 MPTP 开放的 ATP、H⁺ 水平等。

卡立泊来德作为钙通道阻滞剂通过抑制 mPTP 开放保护心肌细胞。缺氧导致乳酸聚积和细胞内 pH 值下降,激活钠氢交换泵 (Na⁺/H⁺ exchanger - 1, NHE - 1),抑制 Na⁺/K⁺ - ATP 酶的活性,将 H⁺ 及时排出细胞外,导致细胞内 Na⁺ 浓度增加,Na⁺/Ca²⁺ 转运体活性受到抑制,细胞内钙超载。卡立泊来德是 NHE - 1 的抑制剂,通过抑制 NHE - 1,减少细胞内 Na⁺ 积累,限制 Na⁺/Ca²⁺ 交换诱导的钙超载从而阻止 mPTP 开放,极大程度地保护心肌细胞^[15]。

线粒体靶向的 ROS 清除剂能够阻止线粒体氧自由基的生成,有效抑制 mPTP 开放,发挥细胞保护作用。代表药物有二异丙酚,丙酮酸盐,依达拉奉 (edaravone, MCI - 186) 等^[16]。二异丙酚通过清除 ROS 减轻心肌细胞线粒体 mPTP 开放程度,在心脏外科手术中常用其作为麻醉剂,以促进失血性休克期心脏血流动力学的恢复^[17]。在体内体外 I/R 模型中,丙酮酸盐作为 ROS 清除剂和合成 ATP 能量底物的双重角色,通过抑制 mPTP 开放,改善心功能^[18]。MCI

-186 是一种新型的自由基清除剂,能够抑制脂质过氧化,减轻组织炎症,常用于急性缺血性脑卒中的治疗。研究发现 MCI-186 对心脏也有一定的保护作用。Rajesh 等^[19]研究发现,在心脏缺血后再灌注前,用 10mg/kg MCI-186 预处理,可使大鼠心肌梗死面积减少 61.6%。辅酶 Q₁₀ 类似物 UQ₀ 和 Ro68-3400 也间接作用于 mPTP,但详细机制目前尚不明确,可能是通过 complex I 或 ANT 与磷酸运载体(phosphate carrier, PiC)结合,从而抑制 mPTP 开放^[20]。在 I/R 期间,一些其他干预措施如预处理、后处理、低体温等,也可通过抑制 mPTP 开放起到心脏保护作用,其机制可能与减少氧化应激有关^[21]。

四、展 望

近年来,以 mPTP 为靶标的抗 I/R 研究受到越来越多的关注。随着 mPTP 结构和功能的进一步明确,基于 mPTP 的直接/间接干预机制的不断深入,研发以 mPTP 为靶标的新型药物如特异性的 CyP-D 抑制剂、线粒体靶向的 ROS 清除剂等,有望成为防治 I/R 损伤的新思路。同时针对 mPTP 的开放的一些有效干预措施如低体温、预处理等有可能在临床应用中具有潜在的价值。

参考文献

- Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling[J]. *Biochem J*, 2012, 441(2): 523-540
- Fantinelli JC, Pérez Núñez IA, González Arbeláez LF, *et al.* Participation of mitochondrial permeability transition pore in the effects of ischemic preconditioning in hypertrophied hearts: role of NO and mitoK(ATP)[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 166(1): 173-180
- Pasdois P, Parker JE, Griffiths EJ, *et al.* The role of oxidized cytochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation in ischaemia[J]. *Biochem J*, 2011, 436(2): 493-505
- Sato M, Yokoyama U, Fujita T, *et al.* The roles of cytochrome p450 in ischemic heart disease[J]. *Curr Drug Metab*, 2011, 12(6): 526-532
- Lemasters JJ, Theruvath TP, Zhi Z, *et al.* Mitochondrial Calcium and the permeability transition in cell death[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787(11): 1395-1401
- Penna C, Perrelli MG, Pagliaro P. Mitochondrial pathways, permeability transition pore, and redox signaling in cardioprotection: therapeutic implications[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(5): 556-599
- 冯阳, 刘建军, 黄钢. 线粒体膜通透性转换孔结构与功能研究进展[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2012, 32(3): 356-360

- Park J, Choi C. Contribution of mitochondrial network dynamics to intracellular ROS signaling[J]. *Commun Integr Biol*, 2012, 5(1): 81-83
- Javadov SA, Clarke S, Das M, *et al.* Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart[J]. *J Physiol*, 2003, 549(Pt 2): 513-524
- Gomez L, Li B, Mewton N, *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(2): 226-233
- Lim SY, Hausenloy DJ, Arjun S, *et al.* Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(11): 2443-2451
- Milerova M, Charvatova Z, Skarka L, *et al.* Neonatal cardiac mitochondria and ischemia/reperfusion injury[J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 335(1-2): 147-153
- Okuda K, Hasui K, Abe M, *et al.* Molecular design, synthesis, and evaluation of novel potent apoptosis inhibitors inspired from bongkrekic acid[J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25(10): 2253-2260
- Korge P, Yang L, Yang JH, *et al.* Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(40): 34851-34857
- Javadov S, Choi A, Rajapurohitam V, *et al.* NHE-1 inhibition-induced cardioprotection against ischaemia/reperfusion is associated with attenuation of the mitochondrial permeability transition[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(2): 416-424
- Khaliulin I, Halestrap AP, Suleiman MS. Temperature preconditioning is optimal at 26°C and confers additional protection to hypothermic cardioplegic ischemic arrest[J]. *Exp Biol Med*, Maywood, 2011, 236(6): 736-745
- Andrews DT, Royse C, Royse AG. The mitochondrial permeability transition pore and its role in anaesthesia-triggered cellular protection during ischaemia-reperfusion injury[J]. *Anaesth Intensive Care*, 2012, 40(1): 46-70
- Heather LC, Cole MA, Tan JJ, *et al.* Metabolic adaptation to chronic hypoxia in cardiac mitochondria[J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(3): 268
- Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, *et al.* Antioxidant MCI-186 inhibits mitochondrial permeability transition pore and upregulates Bcl-2 expression[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(5): H2171-H2178
- Halestrap AP. Mitochondria and reperfusion injury of the heart-a holey death but not beyond salvation[J]. *Bioenerg Biomembr*, 2009, 41(2): 113-121
- Maslov LN, IuB L, Emel'ianova TV, *et al.* Hypoxic preconditioning as novel approach to prophylaxis of ischemic and reperfusion damage of brain and heart[J]. *Angiol Sosud Khir*, 2011, 17(3): 27-36

(收稿日期:2014-03-05)

(修回日期:2014-03-14)