

PINK1 - parkin 途径及其与心肌缺血再灌注损伤的关系

任鹏鹏 韩冲芳 李浩甲 王文杰

摘要 自噬是细胞吞噬自身物质和细胞器并降解重新利用的过程。线粒体自噬是一种选择性自噬,通过特异性清除冗余、损伤和功能异常的线粒体,维持线粒体的平稳运行,包括受体介导的线粒体自噬和 PINK1 - parkin 途径介导的线粒体自噬。线粒体自噬对线粒体数量、质量的控制和细胞正常代谢意义非凡。PINK1 - parkin 途径作为线粒体自噬的重要通路之一,在心肌缺血/再灌注的过程中起到了重要的作用。本文综述了 PINK1 - parkin 途径及其与心肌缺血/再灌注损伤的关系,以期为中心肌梗死的治疗提供潜在的靶点。

关键词 线粒体自噬 心肌缺血/再灌注损伤 PINK1 Parkin

中图分类号 R54

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.07.039

根据《中国心血管病报告 2018》报道,由于人口老龄化等原因,我国心血管病发生率连续多年上升,目前患者人数将突破 2.9 亿^[1]。心血管病已经超越肿瘤等恶性疾病,成为中国城乡居民死亡的首位原因,对个人和社会的带来极大的负担,成为重大公共卫生问题。我国医疗水平发展迅速,但是由于高血压、糖尿病、高血脂、吸烟、肥胖、环境污染等高危因素的影响,心血管病的发生率和病死率仍然居高不下。心肌缺血时,尽快恢复心肌血液供应是治疗的最主要手段。然而不论是心肌梗死患者血管内溶栓、介入手术,或是心脏的外科手术,缺血的心肌组织恢复血流灌注时,复灌心肌损伤并未完全恢复,甚至会产生更加严重乃至不可逆的损伤,称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia - reperfusion injury, MIRI)。MIRI 的确切机制尚未明确,以往的研究多认为与炎症反应、线粒体膜通透性转换孔、细胞内钙超载及氧化应激损伤和凋亡相关机制等因素有关。目前,MIRI 被发现与线粒体的各种调节机制和信号途径的激活和失活关系密切。

线粒体是细胞的“发动机”。心肌细胞各种活动需要线粒体的氧化磷酸化作用生成 ATP 提供能量。心肌细胞内含有大量线粒体,在 MIRI 时,氧化磷酸化会产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)攻击自身的线粒体膜结构,造成了线粒体膜电位受损、结构和功能的损伤,心肌细胞功能受到影响。有

研究认为线粒体自噬与 MIRI 关系密切,特别是 PINK1 - parkin 途径所诱发的线粒体自噬,在 MIRI 中的作用越来越引起人们的重视。本文主要阐述 PINK1 - parkin 途径的机制及其与 MIRI 的关系。

一、细胞自噬与线粒体自噬

自噬是细胞回收过量或者有损伤的细胞质和细胞器,并为细胞和有机体生存提供所需的能量及底物的过程,参与细胞组分的常规更新、针对性识别和清除特殊的蛋白聚集,还参加了生物体的各种发育、分化和组织重塑过程^[2]。其大致过程为细胞质或细胞器被自噬体包裹,转运至溶酶体中分解,产物又回到胞质中重新合成代谢。自噬主要有 3 种类型,包括分子伴侣介导的自噬、巨自噬及微自噬。巨自噬发现最早,对其研究也较为深入。巨自噬与细胞存活和细胞死亡有着广泛的联系,适度自噬对细胞功能有重要作用,而过度自噬导致的细胞死亡。这种死亡方式已被证明是通过凋亡等途径导致细胞死亡^[3]。多年来,自噬被发现与包括心力衰竭、动脉粥样硬化、MIRI 等在内的多种心血管疾病的发生有关。根据被吞噬物有无特异性,巨自噬又分为选择性自噬和非选择性自噬。

线粒体自噬是一种选择性自噬。它可以特异性清除功能异常或结构受损的线粒体,对线粒体数量和质量进行调节,支持细胞的正常生理活动^[4]。自噬被发现已经由来已久,但是长期以来被认为是一项随机而非具有特异性的过程,而“线粒体自噬”这一概念在 2005 年才被提出。多年以来,研究者发现线粒体自噬与衰老、神经退行性疾病、糖尿病、肿瘤、炎症和缺血再灌注损伤等多种过程息息相关^[5]。在哺乳

基金项目:山西省科技厅自然科学基金资助项目(201601D011121)

作者单位:030000 太原,山西医科大学(任鹏鹏、李浩甲、王文杰);030000 太原,山西白求恩医院(韩冲芳)

通讯作者:韩冲芳,电子邮箱:hanchongfang2003@foxmail.com

动物中,调控线粒体自噬的主要信号通路有 PINK1/parkin 途径、BNIP3/NIX 途径和 FUNDC1 途径、内膜蛋白抗增殖蛋白 (prohibitin, PHB) 途径等,这些通路并非完全独立。

二、PINK1 - parkin 途径

1. PINK1 蛋白和 parkin 蛋白:PINK1 蛋白是一种丝/苏氨酸激酶,最早被发现与遗传性早发帕金森病有关,由 581 个氨基酸组成。细胞生理状态下,与之运转有关的酶有线粒体外膜移位酶 (translocase outer membrane, TOM) 复合物、内膜转运酶 23 (translocase of the inner membrane 23, TIM23) 和线粒体内膜早老素相关的菱形样 (presenilin - associated rhomboid - like, PARL) 蛋白。PINK1 蛋白在 TOM、TIM23 作用下进入基质,被线粒体内 PARL 蛋白快速切割其特定位置而降解,这使在健康的线粒体中 PINK1 水平非常低甚至无法检测到^[6]。

parkin 蛋白由 PAEK2 基因编码,广泛表达于各种组织,尤其在脑和肌肉细胞的细胞质内富集。人们发现其与 PINK1 蛋白位于同一途径之中,且位于下游。泛素化是指泛素对目标蛋白进行分类和修饰的过程。蛋白质泛素化过程需要 3 个酶,即泛素活化酶 (E1)、泛素交联酶 (E2) 和泛素连接酶 (E3)。parkin 蛋白末端含有 1 个与泛素 76 个氨基酸同源的泛素样结构域,是一种 E3 泛素连接酶。线粒体受损时,parkin 蛋白会从胞质中转移到线粒体外膜上,并协同 E1 和 E2 泛素化修饰受损线粒体的外膜蛋白。parkin 蛋白对底物的特异性要求较低,能泛素化修饰多种蛋白,如己糖激酶 1 (hexokinase, HK1)、电压依赖性阴离子通道 1 (voltage - dependent anion channel 1, VDAC1) 蛋白、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 等^[7]。

2. PINK1 - parkin 途径:PINK1 蛋白末端具有可被 TOM 识别的带有正电荷的特异性序列,由胞质进入线粒体内膜时有赖于正常的线粒体膜电位差驱动。在线粒体处于缺氧、高糖等不利条件下,线粒体去极化,TOM 和 TIM23 活性减弱,PINK1 蛋白不能由线粒体外进入内膜被分解,导致其在线粒体外密集分布。因此,PINK1 蛋白可被称为识别线粒体膜电位变化的生物“吹哨者”。线粒体膜电位降低或消失时,聚集在线粒体外膜的 PINK1 蛋白被磷酸化而被激活,其激活机制可能与其自身结构所致自我磷酸化有关^[6]。之后 PINK1 蛋白磷酸化线粒体外膜的泛素,磷酸化的泛素和 parkin 蛋白的之间有很高的亲和力,

促进了 parkin 蛋白的聚集和 E3 泛素连接酶的激活^[8]。parkin 被激活后使 HK1、VDAC1、Mfn1 和 Mfn2 等线粒体蛋白泛素化,这些在线粒体周围富集的泛素化蛋白又被 PINK1 磷酸化激活,从而在线粒体上形成了正反馈的放大激活机制。随后泛素化的蛋白被自噬受体蛋白 p62、OPTN、NBR1、Tax1BP1 和 NDP52 等识别。p62 是一种衔接蛋白,一端连接线粒体膜蛋白上的泛素链,另一端通过 LIR 结构域与微管相关蛋白轻链 3 (microtubule - associated protein light chain 3, LC3) 特异性结合。LC3 是自噬体上的受体蛋白,和 p62 等连接后激活自噬途径,随后线粒体被自噬体吞噬,形成新的混合结构进入溶酶体内降解。

以上经典 PINK1 - parkin 途径介导的线粒体自噬,可以概括为 4 步:(1) PINK1、parkin 蛋白的激活。(2) 线粒体膜蛋白泛素化。(3) 线粒体自噬体的形成。(4) 线粒体 - 自噬溶酶体形成:溶酶体吞噬于其中进行降解。也有研究者提出“两步走”模型,将线粒体自噬分为两个阶段:(1) 线粒体自噬相关蛋白的活化。(2) LC3 参与的自噬过程,线粒体被吞噬降解^[9]。

此外,PINK1 蛋白和 parkin 蛋白还参与线粒体活动的其他途径,研究者发现线粒体抗原递呈的机制可能与 PINK1 蛋白和 parkin 蛋白抑制的囊泡运输途径有关^[10]。有研究发现,对小鼠 PINK1 基因进行敲除,并且在使用线粒体解偶联剂处理后,parkin 蛋白仍然可以被受损线粒体招募和激活^[11]。由此可见 parkin 蛋白的激活并不完全依赖于 PINK1,两者之间或许存在某种补充机制。最近 Lee 等^[12]研究发现,由 AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 介导 parkin 蛋白激活的 AMPK - parkin 轴。除此以外,研究还发现了一种新型 E3 泛素连接酶,以和 parkin 蛋白类似的方式引起线粒体自噬,并且这一过程依赖于 PINK1 蛋白^[13]。在对 parkin 蛋白基因的敲除后,研究找到了由 PINK1 募集的自噬受体蛋白的存在^[14]。可见,除了经典的 PINK1 - parkin 途径之外仍有其他旁路的存在。

3. 线粒体动力学与线粒体自噬:正常细胞内线粒体不是始终不变的,而是处于高度变化的状态中。为适应生长发育的不同时期和环境条件,线粒体处在持续分裂和融合的动态平衡之中,称之为线粒体动力学。在细胞正常的生理条件下这种平衡可以对线粒体的数量、形态和功能进行限制和调节。细胞中负责调整线粒体分裂和融合的物质包括线粒体分裂相关蛋白和融合相关蛋白。

调控线粒体融合的蛋白包括视神经萎缩因子 1 (optic atrophy 1, OPA1)、粒体融合蛋白 1 (mitofusion1, Mfn1) 和 Mfn2。这些物质水解 GTP 获能并融合位置相近的线粒体,从而共享线粒体内核酸、蛋白质等物质。Mfn1/2 负责线粒体外膜融合,而 OPA1 则介导线粒体内膜的融合。线粒体分裂机制是线粒体融合蛋白抑制和线粒体分裂蛋白激活的统一。调控线粒体分裂的蛋白主要包括动力蛋白相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)、线粒体分裂因子 (mitochondrial fission factor, Mff) 和分裂因子 1 (fission 1, Fis1)。Drp1 位于胞质内,线粒体分裂过程中被募集到线粒体外膜,占主要作用,Mff、Fis1 起到辅助作用。线粒体融合、分裂过程的任何改变都可能对线粒体功能造成影响。在对小鼠 Mfn1、Mfn2 和 Drp1 基因三联敲除的实验中,小鼠心脏损伤并没有单一敲除的严重,从中可见“平衡”的重要性^[15]。

线粒体分裂在细胞分裂、线粒体移动、凋亡等活动的信号转导中起到重要作用。有研究指出,对小鼠 Drp1 基因敲除后心肌细胞线粒体形态改变、线粒体自噬被抑制,引起线粒体结构受损和功能障碍^[16]。线粒体融合和分裂的状态会影响线粒体自噬的水平:线粒体分裂使线粒体自噬向正方向发展,线粒体融合则减少线粒体自噬的发生。此外上文中提到 Mfn1、Mfn2 作为线粒体外膜蛋白是 parkin 蛋白泛素化修饰的底物之一,因此线粒体自噬的状态同样也会影响线粒体动力学。因此,线粒体自噬和线粒体动力学关系密切,两者相互影响。

三、PINK1-parkin 途径和 MIRI 的关系

健康状态下稳定而平衡的线粒体自噬在心肌细胞正常生命活动中占有不可替代的重要作用,另一方面线粒体自噬的失衡则会引发心肌各种病变。parkin 基因敲除小鼠的心肌细胞线粒体形态杂乱无章,较小且成簇,出现含有异常电子聚集的线粒体,并且随着时间的推移异常线粒体逐渐累积。parkin 对于心肌线粒体的成熟发育可能至关重要。parkin 基因敲除小鼠心功能较对照组降低,并且在第 3 周时陆续死亡^[17]。这些结果表明线粒体自噬在维持线粒体形态、稳定性方面发挥重要作用并且可能与心脏发育有关。在 MIRI 治疗的探索中,对心肌进行缺血预处理被认为是减轻 MIRI 的有效手段,可以减轻心肌细胞对再灌注损伤的敏感度。研究发现,这与线粒体膜电位上升导致加速线粒体 parkin 蛋白的转运、线粒体自噬被激活有关^[18]。许多对 MIRI 有治疗作用的药物

包括一些麻醉剂在内也被证明依赖 PINK1-parkin 途径发挥作用。

在 MIRI 中可以观察到线粒体内 PINK1 和 parkin 蛋白的激活,但是两者在其中的作用存在争议。在小鼠心脏 MIRI 的体外实验中,PINK1 基因敲除后的心肌细胞与对照组比较线粒体膜电位降低,线粒体呼吸被抑制,线粒体功能发生障碍,心脏对 MIRI 的脆弱性增加^[19]。在另一项关于 parkin 基因敲除研究中,发现实验组相较于对照组小鼠线粒体紊乱,体积明显变小,在 MIRI 中心肌损伤面积更大、小鼠生存率更低^[20]。因此,PINK1-parkin 途径可能在 MIRI 中起到了保护作用。

高糖抑制线粒体自噬。实验证明,糖尿病抑制了小鼠心肌细胞中 PINK1 和 parkin 蛋白的表达,线粒体自噬异常,使受损线粒体在细胞内堆积^[21]。最近研究证实,抑制 parkin 依赖性线粒体自噬会导致糖尿病心肌病^[22]。衰老是心肌细胞损伤的独立危险因素。有研究发现,衰老细胞中线粒体分裂和线粒体自噬被抑制^[23]。这说明在衰老、糖尿病等状态中,心肌易受损伤的原因可能与线粒体自噬被抑制导致的损伤线粒体积累有关。

另外有研究证明 PINK1-parkin 途径在 MIRI 过程中起到了负面的作用。例如,MIRI 中不同阶段给予 Drp1 抑制剂 mdivi-1 均能够改善小鼠线粒体功能和心肌功能,减少梗死面积和心律失常的发生,其中在缺血前使用效果最佳^[24]。G 蛋白偶联的雌激素受体 1 通过信号转导抑制了 MIRI 时 PINK1-parkin 途径,减少线粒体自噬,保护心肌免受 MIRI 影响^[25]。其原因可能与抑制了过度的线粒体自噬有关。

综上所述,线粒体自噬在 MIRI 中表现出了两面性。这种两者相对的结果可能是由于线粒体自噬水平、模型和处理条件不同引起的。因此不同模型缺血前线粒体自噬抑制或激活的状态和水平就变得至关重要。这也提示在 MIRI 的治疗中,不同的合并症应采取不同的策略。

四、展望

PINK1-parkin 途径对维持心肌细胞正常的功能和 MIRI 中的心肌保护具有重要作用,多种具有心肌保护作用的药物和手段也被认为是通过 PINK1-parkin 途径而发挥作用。然而这些方法在具体应用时却并非完全有效,其原因可能与心肌梗死患者的诸多合并症有关。不同合并症中线粒体自噬的水平不同,因此在 MIRI 的治疗切入点也不

尽相同。最近在阿尔兹海默症的研究中 parkin 蛋白过表达逆转了线粒体的受损,成为治疗该病的潜在方法之一^[26]。同样在 MIRI 中,根据具体情况调整线粒体自噬的程度,维持足量的健康的线粒体工作或许成为未来研究 MIRI 的方向。PINK1 – parkin 途径也有望为合并高龄、糖尿病等高危因素时 MIRI 的治疗提供新的思路和靶点。

参考文献

- 1 国家心血管病中心. 中国心血管病报告 2018[M]. 北京:中国大百科全书出版社,2018;12 – 16
- 2 Wong SQ, Kumar AV, Mills J, *et al.* Autophagy in aging and longevity[J]. *Human Genet*, 2020,139(3):277 – 290
- 3 Xiao B, Hong L, Cai X, *et al.* The true colors of autophagy in doxorubicin – induced cardiotoxicity [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18 (3): 2165 – 2172
- 4 Melser S, Lavie J, Bénard G. Mitochondrial degradation and energy metabolism[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Cell Res*, 2015, 1853(10): 2812 – 2821
- 5 Um JH, Yun J. Emerging role of mitophagy in human diseases and physiology[J]. *BMB Rep*,2017,50(6):299 – 307
- 6 Sekine S, Youle RJ. PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol[J]. *BMC Biol*,2018,16(1): 2 – 12
- 7 Koyano F, Yamano K, Kosako H, *et al.* Parkin recruitment to impaired mitochondria for nonselective ubiquitylation is facilitated by MITOL[J]. *J Biol Chem*, 2019,294(26):10300 – 10314
- 8 McWilliams TG, Prescott AR, Montava – Garriga L, *et al.* Basal mitophagy occurs independently of PINK1 in mouse tissues of high metabolic demand[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 439 – 449
- 9 Yoshii SR, Mizushima N. Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Cell Res*, 2015, 1853(10): 2797 – 2801
- 10 Baden P, Deleidi M. Mitochondrial antigen presentation; a vacuolar path to autoimmunity in parkinson’s disease[J]. *Trends Immunol*, 2016,37(11):719 – 721
- 11 Kubli DA, Cortez MQ, Moyzis AG, *et al.* PINK1 is dispensable for mitochondrial recruitment of parkin and activation of mitophagy in cardiac myocytes[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):1 – 16
- 12 Lee SB, Kim JJ, Han SA, *et al.* The AMPK – Parkin axis negatively regulates necroptosis and tumorigenesis by inhibiting the necrosome [J]. *Nat Cell Biol*, 2019,21(8):940 – 951
- 13 Villa E, Proïcs E, Rubio – Patiño C, *et al.* Parkin – independent mitophagy controls chemotherapeutic response in cancer cells[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(12): 2846 – 2859
- 14 Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy[J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 309 – 314
- 15 Song M, Franco A, Fleischer JA, *et al.* Abrogating mitochondrial dynamics in mouse hearts accelerates mitochondrial senescence[J]. *Cell Metab*, 2017,26(6):872 – 883
- 16 Ikeda Y, Shirakabe A, Maejima Y, *et al.* Endogenous Drp1 mediates mitochondrial autophagy and protects the heart against energy stress [J]. *Circulat Res*, 2015, 116(2): 264 – 278
- 17 Gong G, Song M, Csordas G, *et al.* Parkin – mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice [J]. *Science*, 2015, 350(6265):1220
- 18 Feng Y, Zhao J, Hou H, *et al.* WDR26 promotes mitophagy of cardiomyocytes induced by hypoxia through Parkin translocation[J]. *Acta Biochimicaet Biophysica Sinica*,2016, 48(12):1075 – 1084
- 19 Siddall HK, Yellon DM, Ong SB, *et al.* Loss of PINK1 increases the heart’s vulnerability to ischemia – reperfusion injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 240 – 250
- 20 Kubli DA, Zhang X, Lee Y, *et al.* Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(2): 915 – 926
- 21 Guo Y, Yu W, Sun D, *et al.* A novel protective mechanism for mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in type i diabetes – induced cardiac dysfunction; role of AMPK – regulated autophagy[J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Mol Basis Dis*, 2015, 1852(2): 319 – 331
- 22 Wang S, Zhao Z, Fan Y, *et al.* Mst1 inhibits Sirt3 expression and contributes to diabetic cardiomyopathy through inhibiting Parkin – dependent mitophagy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(7):1905 – 1914
- 23 D’Amico D, Mottis A, Potenza F, *et al.* The RNA – binding protein PUM2 impairs mitochondrial dynamics and mitophagy during aging [J]. *Mol Cell*, 2019,73(4):775 – 787
- 24 Maneechote C, Palee S, Kerdphoo S, *et al.* Differential temporal inhibition of mitochondrial fission by Mdivi – 1 exerts effective cardioprotection in cardiac ischemia/reperfusion injury [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018,132(15):1669 – 1683
- 25 Feng Y, Madungwe NB, da Cruz Junho CV, *et al.* Activation of G protein – coupled oestrogen receptor 1 at the onset of reperfusion protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury by reducing mitochondrial dysfunction and mitophagy[J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174(23):4329 – 4344
- 26 Wang H, Zhang T, Ge X, *et al.* Parkin overexpression attenuates A β – induced mitochondrial dysfunction in HEK293 cells by restoring impaired mitophagy[J]. *Life Sci*, 2020, 244(3):117 – 126

(收稿日期:2020 – 03 – 01)

(修回日期:2020 – 03 – 07)