

线粒体移植在心肌缺血再灌注损伤中的作用

陈迪 程德琴 刘晓红 徐志云

【摘要】 线粒体移植是可改善线粒体功能障碍导致的心肌损伤、维持心脏稳态的新兴技术。该文总结了线粒体移植产生心肌保护的作用机制,介绍了线粒体内化、来源、移植方法以及线粒体移植在心肌缺血再灌注损伤中的应用。线粒体移植为心肌缺血再灌注损伤的临床治疗提供了新思路。

【关键词】 线粒体移植;线粒体功能障碍;心肌缺血再灌注损伤

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.02.002

急性心肌梗死多由冠状动脉闭塞引起,目前主要通过药物、冠状动脉旁路移植术以及经皮冠状动脉介入术(PCI)等恢复血流供应的手段治疗急性心肌梗死。心肌缺血再灌注损伤是指由于各种原因导致心肌缺血损伤,在恢复血流供应后再次引起心肌损伤^[1]。线粒体在维持心肌持续收缩和调节细胞内稳态中起着重要作用^[2]。在心肌缺血再灌注损伤中,引起心肌细胞损伤的生物化学改变主要起源于线粒体功能障碍^[3]。线粒体功能障碍导致三磷酸腺苷(ATP)合成减少,活性氧(ROS)生成增加^[4-5]。ATP合成减少导致心肌细胞功能障碍^[6],过量的ROS引起心肌细胞损伤和凋亡^[7],最终引起心力衰竭^[8-9]。

对线粒体功能障碍发生机制中的某个环节进行干预可以使心功能得到明显改善,这提示线粒体替换是心脏保护的重要途径^[10]。线粒体移植是指从健康细胞或组织中分离出功能完好的线粒体替代受损的线粒体,减轻因线粒体功能障碍导致的心肌损伤,为心脏提供充足的能量,维持心脏稳态^[11]。

1 线粒体移植产生心肌保护的机制

移植的线粒体具有细胞内和细胞外的心肌保护作用。超声心动图和压力容积测量实验显示,线粒体进入心脏 10 min 后即可改善心功能^[12]。蛋白质组学分析表明,在线粒体移植后,心肌细胞的能量代谢产物和细胞呼吸前体代谢物增加,心肌细胞活力增强^[12-13]。移植后 10 min 至 1 h,线粒体通过肌动蛋白依赖的内吞作用转移至心肌细胞中^[14]。

进入心肌细胞后,移植的线粒体可进一步增加心肌细胞 ATP 水平并上调心肌保护性细胞因子^[12]。后者通过刺激细胞生长、增殖、迁移^[15]及促进血管形成,减少心肌细胞凋亡,促进心功能恢复^[16],改善心肌重构,此过程不依赖于心肌细胞再生。研究发现移植后的线粒体可完整取代受损的线粒体从而挽救心肌细胞^[17]。

研究表明,移植的线粒体可使心肌细胞的活力和功能至少维持 28 d,线粒体移植后未发生心律失常,未发生自身免疫反应^[12,18],炎性细胞因子水平也未明显提高^[19]。

2 线粒体的内化、来源和移植方法

细胞中的线粒体可以从一个细胞转移到另一个细胞中^[20]。关于线粒体的内化机制有多种假说,如肌动蛋白介导的内吞作用^[14]、巨胞饮作用^[21]等。采用针对这些机制的特异性抑制剂对心肌细胞进行研究,发现抑制肌动蛋白聚合的特异性抑制剂降低了线粒体内化,表明直接注射的线粒体可能通过肌动蛋白介导的内吞作用转移至心肌细胞内^[14]。

线粒体的来源主要有心室肌^[22]、骨骼肌^[12]、腹直肌^[23]、胸大肌^[11]和腓肠肌^[24]。研究发现,移植间充质干细胞来源的线粒体可成为治疗组织损伤的新策略^[25]。同等质量的不同组织提供的线粒体数量不同,肝脏提供的最多,其次是骨骼肌,再次是心肌。从不同组织分离的线粒体在被细胞摄取的方式和对细胞的保护作用上没有显著差异^[13,17]。线粒体移植对心脏的保护作用高度依赖于完整的、功能完好的线粒体^[17],未存活的线粒体、线粒体组分(蛋白质、复合物 I-V)、线粒体 DNA 和 RNA、外源性 ATP 均不具有细胞保护作用^[21]。Preble 等^[26]

以标准化的商用组织分离器代替手动操作,使用差异过滤代替差异离心法,可在 30 min 内快速分离和高度纯化线粒体,获得完整的、功能完好的线粒体。

线粒体移植的方法目前有共培养法^[27]、小肽标记法^[28]、离心转移法^[29]、微注射法^[30]、直接注射法^[22-23]和经血管输注法^[18,24]等。其中,直接注射法和经冠状动脉输注法是研究线粒体移植对心脏保护作用的主要方法,两者均可以将大量的游离线粒体一次性输注到目的区域,显著提高移植效率。在早期研究中,从正常家兔左心室中分离出功能完好的线粒体,通过注射器直接注射到离体心脏缺血区,发现移植了健康线粒体的缺血心脏 ATP 水平增加,心肌细胞活力和心肌收缩功能显著增强^[12-22]。此外,线粒体可以通过冠状动脉输注,与直接注射相比,经冠状动脉输注的线粒体在整个心肌中的分布更为迅速和广泛,目标区域的线粒体浓度更高,在 10 min 内就可提供心脏保护作用,明显增加了线粒体移植的临床治疗潜力^[18]。

3 线粒体移植的心肌保护作用

3.1 线粒体移植在动物模型中的心肌保护作用

Mccully 等^[22]于 2009 年在离体灌注的兔缺血心脏中首次进行线粒体移植实验,该研究从兔心室肌中分离出浓度为 $(7.7 \pm 1.5) \times 10^6/\text{mL}$ 的线粒体,直接注射到心脏局部缺血 30 min 的部位,发现血清肌酸激酶同工酶和心肌肌钙蛋白 I 显著降低,提示线粒体移植可使心肌损伤减轻。同时,该研究发现线粒体移植后心肌细胞的 ATP 水平增加,心肌细胞凋亡减少,心肌梗死面积缩小,提示心肌缺血后线粒体移植具有显著的心肌保护作用。

在另一项对兔缺血再灌注心脏进行线粒体移植的研究中,研究人员从兔骨骼肌中分离出浓度为 $(9.7 \pm 1.7) \times 10^6/\text{mL}$ 的线粒体,分别向 8 个心肌缺血区直接注射,24 h 内发现线粒体进入心肌细胞周围的间隙。线粒体移植 4 周后,心肌细胞凋亡减少,心肌梗死面积没有增加,超声心动图显示线粒体移植后心脏舒张压和收缩压均恢复至正常水平,提示线粒体移植增强了心肌细胞的功能,减少了心肌细胞的凋亡和坏死^[12]。在对猪缺血再灌注心脏进行线粒体移植的实验研究中,从猪胸大肌中分离出浓度为 $(9.93 \pm 1.43) \times 10^7/\text{mL}$ 的线粒体,分别向 8 个心肌缺血区直接注射。注射 4 周后,在心脏中检测到移植的线粒体,线粒体移植后未发生明显的心肌超微结构的异常改变^[11]。

在心脏移植缺血再灌注损伤小鼠模型中,供体心脏在切除后和移植到受体 5 min 后,均经冠状动脉注入 0.5 mL 含 1×10^8 个线粒体的缓冲液。接受线粒体移植后,小鼠移植后心脏的左室射血分数和左室缩短率明显增加,心肌细胞坏死和中性粒细胞浸润明显减少,提示线粒体移植缓解了心脏移植后发生的缺血再灌注损伤,为心脏移植后心功能改善提供了新的治疗方式^[24]。另一研究在缺血再灌注发生 2 h 后进行线粒体移植,结果显示线粒体移植同样减少了心肌梗死面积,使局部和整体心肌功能增强^[31]。

3.2 线粒体移植在人体中的心肌保护作用

2017 年美国波士顿儿童医院首次在 5 例患儿中开展临床试验,其中 4 例患儿因冠状动脉梗阻、1 例因左室扩张伴心内膜下缺血而出现心功能障碍,且均无法脱离体外膜氧合(ECMO)支持。该研究在 20~30 min 内从患儿腹直肌提取功能完好的线粒体,在超声心动图定位下直接注射到 10 余个心肌缺血部位,每个部位注射线粒体悬液 50~100 μL ,每名患儿接受约 1×10^9 个线粒体。线粒体移植后,患儿未发生与线粒体注射有关的不良反应,如心律失常、心肌内血肿或疤痕,所有患儿的心肌收缩功能均有明显改善。线粒体移植后第 2 天,除 1 例患儿因肾衰竭并发症发生多器官衰竭,其余患儿均成功脱离 ECMO 支持。超声心动图显示,治疗前患儿均有中至重度心脏收缩功能障碍伴局部运动功能减退,线粒体移植 4~6 d 后,患儿心功能均有改善。线粒体移植 10 d 后,患儿心脏收缩功能均恢复正常,无局部运动障碍^[23]。

4 小结与展望

线粒体移植有望成为治疗心脏缺血再灌注损伤的新技术。线粒体移植对缺血再灌注损伤的心肌有保护作用。线粒体内化机制和移植的适宜剂量目前尚不明确。线粒体移植在心脏缺血再灌注损伤保护领域中开展的临床试验有限,样本量少,还需要进一步研究其长期安全性和有效性。随着对线粒体移植的深入研究,有望研发出具备高特异性、无免疫排斥性的线粒体生物制剂。

参 考 文 献

- [1] Wu S, Chang G, Gao L, et al. Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy[J]. J Mol Med (Berl), 2018, 96(8):791-806.
- [2] Payne B, Chinnery PF. Mitochondrial dysfunction in aging: much progress but many unresolved questions[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1847(11):1347-1353.

- [3] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 298;229-317.
- [4] Kiyuna LA, Albuquerque R, Chen CH, et al. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: challenges and opportunities[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 129;155-168.
- [5] Scheiber D, Zweck E, Jelenik T, et al. Reduced myocardial mitochondrial ROS production in mechanically unloaded hearts[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2019, 12(2);107-115.
- [6] Santulli G, Xie WJ, Reiken SR, et al. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(36);11389-11394.
- [7] Ikeda Y, Shirakabe A, Brady C, et al. Molecular mechanisms mediating mitochondrial dynamics and mitophagy and their functional roles in the cardiovascular system[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 78;116-122.
- [8] Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production[J]. *Circ Res*, 2013, 113(6);709-724.
- [9] Moe GW, Marín-García J. Role of cell death in the progression of heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(2);157-167.
- [10] Von HA, Maack C. Mitochondrial therapies in heart failure[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, 243;491-514.
- [11] Kaza AK, Wamala I, Friehs I, et al. Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 153(4);934-943.
- [12] Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304(7);H966-H982.
- [13] Thomas RL, Gustafsson AB. Mitochondrial autophagy—an essential quality control mechanism for myocardial homeostasis[J]. *Circ J*, 2013, 77(10);2449-2454.
- [14] Pacak CA, Preble JM, Kondo H, et al. Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function[J]. *Biol Open*, 2015, 4(5);622-626.
- [15] Loria J, Soley M, Ramírez I. Epidermal growth factor protects the heart against low-flow ischemia-induced injury[J]. *J Physiol Biochem*, 2010, 66(1);55-62.
- [16] Kocher AA, Schuster MD, Bonaros N, et al. Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40(4);455-464.
- [17] Kukat A, Kukat C, Brocher J, et al. Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(7);e44.
- [18] Cowan DB, Yao R, Akurathi V, et al. Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8);e0160889.
- [19] Rose NR. Critical cytokine pathways to cardiac inflammation[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(10);705-710.
- [20] Hayakawa K, Chan SJ, Mandeville ET, et al. Protective effects of endothelial progenitor cell-derived extracellular mitochondria in brain endothelium[J]. *Stem Cells*, 2018, 36(9);1404-1410.
- [21] Kitani T, Kami D, Matoba S, et al. Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(8);1694-1703.
- [22] McCully JD, Cowan DB, Pacak CA, et al. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296(1);H94-H105.
- [23] Emani SM, Piekarski BL, Harrild D, et al. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 154(1);286-289.
- [24] Moskowitzova K, Shin B, Liu K, et al. Mitochondrial transplantation prolongs cold ischemia time in murine heart transplantation[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2019, 38(1);92-99.
- [25] Wang J, Li H, Yao Y, et al. Stem cell-derived mitochondria transplantation: a novel strategy and the challenges for the treatment of tissue injury[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1);106.
- [26] Preble JM, Pacak CA, Kondo H, et al. Rapid isolation and purification of mitochondria for transplantation by tissue dissociation and differential filtration[J]. *J Vis Exp*, 2014(91);e51682.
- [27] Jiang D, Gao F, Zhang Y, et al. Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(11);e2467.
- [28] Liu CS, Chang JC, Kuo SJ, et al. Delivering healthy mitochondria for the therapy of mitochondrial diseases and beyond[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 53;141-146.
- [29] Kim MJ, Hwang JW, Yun CK, et al. Delivery of exogenous mitochondria via centrifugation enhances cellular metabolic function[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1);3330.
- [30] Oktay K, Baltaci V, Sonmezer M, et al. Oogonial precursor cell-derived autologous mitochondria injection to improve outcomes in women with multiple IVF failures due to low oocyte quality: a clinical translation[J]. *Reprod Sci*, 2015, 22(12);1612-1617.
- [31] Blitzer D, Guariento A, Doulamis IP, et al. Delayed transplantation of autologous mitochondria for cardioprotection in a porcine model[J]. *Ann Thorac Surg*, 2020, 109(3);711-719.

(收稿;2020-01-11 修回;2020-12-26)

(本文编辑:胡晓静)