

线粒体活性氧在心肌缺血再灌注中的作用

吕磊 王永园 徐军

【摘要】 活性氧(ROS)的过度生成是心肌缺血再灌注损伤的主要机制之一。线粒体是 ROS 的主要来源,也是再灌注心肌保护策略的关键靶点。再灌注早期产生的大量 ROS 可损伤心肌,但少量的 ROS 对心脏保护的氧化还原信号至关重要。该文介绍了线粒体 ROS 在心肌缺血再灌注损伤和保护中的作用。

【关键词】 活性氧;线粒体;缺血再灌注损伤;线粒体电子传递链

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.06.005

活性氧(ROS)是有氧代谢中产生的含氧活性分子,线粒体是 ROS 的主要来源,也是氧化的主要目标。心肌缺血再灌注(IR)时,ROS 的过度生成在线粒体功能障碍中起核心作用,它能触发和导致心肌损伤,是心肌 IR 损伤的主要机制之一。然而,少量 ROS 对心脏保护的氧化还原信号至关重要。

1 线粒体 ROS 和心肌 IR 损伤

1.1 IR 心肌中线粒体 ROS 的产生

生理条件下,线粒体低浓度的 ROS 控制心肌细胞分化和兴奋-收缩偶联,有益于心血管功能。ROS 过度生成则触发线粒体 ROS 的产生,对蛋白、脂类和 DNA 造成氧化损伤,导致兴奋-收缩偶联受损、心律失常、心肌肥大、细胞凋亡坏死和纤维化等^[1]。

在心肌 IR 的缺血阶段,心肌细胞缺氧,线粒体电子传递链复合物大幅减少,产生超氧化物歧化酶阴离子。再灌注阶段,由于电子泄漏和线粒体解毒能力下降,超氧化物歧化酶及其下游的 ROS,主要是过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($OH\cdot$)和过氧亚硝基阴离子显著增加。此外,由于一氧化氮(NO)产生增加,过氧亚硝基阴离子过度合成以及相关蛋白的酪氨酸硝化增加,也会使 ROS 显著增加^[2]。

心肌 IR 时,ROS 的过度生成与线粒体电子传递链复合物 I 的氧化损伤有关。缺血后,心肌复合物 I 的酪氨酸发生硝化反应,导致复合物 I 失活。再灌注过程中,复合物 I 活性受损还能导致 ROS 诱导的线粒体磷脂和呼吸链超复合物损伤,进一步增

加了复合物 I 的电子泄漏,促使氧化应激的恶性循环,最终导致线粒体功能障碍。此外,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶是复合物 I 中超氧阴离子($\cdot O_2^-$)的主要来源之一,再灌注期间 NADH 脱氢酶活性恢复,也使 $\cdot O_2^-$ 生成增加^[3]。

复合物 III 也参与了缺血心肌线粒体 ROS 的产生。在短暂心肌缺血时,复合物 III 是生成 ROS 的主要位点,参与预处理心肌的保护效应。用线粒体 ATP 敏感的钾通道($mtioK_{ATP}$)开放剂二氮嗪预处理心肌,能促进复合物 III 在预处理期间短暂产生 ROS,大大减少复合物 I 产生的 ROS。研究者认为,复合物 III 产生的信号 ROS 与二氮嗪的心肌保护作用相关。复合物 III 还参与线粒体内膜磷脂的脂质过氧化。复合物 I 和复合物 II 的氧化损伤或蛋白质硝化减弱了它们与复合物 III 的相互作用,增加了缺血心肌线粒体中复合物 III 所生成的 $\cdot O_2^-$ ^[2]。缺血心肌中复合物 II 在 ROS 产生中的作用尚不清楚。有学者发现用阿拉霉素或钙离子诱导兔心脏线粒体通透性转换孔(mPTP)开放时,复合物 II 也能促进 ROS 的持续生成^[4]。

心肌缺血时,线粒体蛋白激酶 A(PKA)激活,线粒体中复合物 IV 过度磷酸化,活性下降,使 $\cdot O_2^-$ 大量生成,心肌 IR 损伤增加。在兔离体心肌 IR 模型中,心肌缺血时复合物 IV 活性下降,再灌注阶段复合物 IV 活性进一步下降。IR 过程中给予 β_1 -肾上腺素抑制剂能抑制 PKA,减少 PKA/环腺苷酸(cAMP)介导的复合物 IV 的过度磷酸化,减少 IR 损伤,说明 β_1 -肾上腺素抑制剂能减少 IR 过程中的 ROS 生成^[5]。

单胺氧化酶(MAO)也是一种线粒体来源的

ROS。MAO 位于线粒体外膜,有 MAO-A 和 MAO-B 两个亚型,MAO 含黄素腺嘌呤二核苷酸脱氢酶,能催化电子从生物胺转运到 O_2 ,并不断产生 H_2O_2 。在低浓度的生理条件下,MAO 来源的 H_2O_2 是首要的信号分子,但在氧化应激条件下, H_2O_2 大量产生导致机体损伤^[6]。MAO 在心肌 IR 时 $OH\cdot$ 的生成中也起重要作用。在大鼠心肌 IR 模型中, $OH\cdot$ 在心肌缺血 20~30 min 时增加,再灌注 30 min 时增加至最大,此后逐渐稳定,局部给予 MAO 抑制剂能使 $OH\cdot$ 在缺血期减少约 72%,再灌注期减少约 67%^[7]。

1.2 心肌 IR 的抗氧化策略

线粒体抗氧化系统包括 3 类:(1)超氧化物歧化酶和过氧化氢酶,能中和 ROS 的活性;(2)位于线粒体基质的过氧化氧化还原蛋白 3 和 5;(3)谷胱甘肽过氧化物酶 1、4 和谷氧还蛋白。后两类 ROS 清除剂依赖还原型辅酶 II^[8]。自由基爆发和氧化应激是心肌 IR 损伤的机制之一,因此推测抗氧化剂能减轻 IR 损伤。然而,临床试验和动物实验发现,抗氧化剂对减轻心肌 IR 损伤无效甚至有害,可能是因为抗氧化剂无法区分有害和有益的 ROS,且动物与人类病理模型可能存在差异^[9]。

近年来,线粒体靶向抗氧化剂成为研究热点。线粒体靶向的维生素 E(Mito VitE)和线粒体辅酶 Q(MitoQ)以三苯基膦分子作为载体,将具有抗氧化作用的分子在线粒体中跨膜转运至线粒体基质,清除 ROS。Mito VitE 能抑制心肌线粒体 H_2O_2 的生成,保护线粒体 DNA 的完整性。在暴露于氧化应激的牛主动脉内皮细胞中,Mito VitE 能显著降低 ROS 的生成,减少细胞凋亡^[10],然而 Mito VitE 的缺点是清除活性不可再生。MitoQ 由三苯基膦与辅酶 Q10 共价结合组成。MitoQ 进入线粒体基质后,辅酶 Q10 被线粒体呼吸链复合物 II 降解为具有抗氧化活性的泛醇,以清除 ROS,减少脂质过氧化所致的线粒体损伤。在啮齿类动物 IR 模型中,MitoQ 可在线粒体呼吸链复合物 II 的作用下不断还原再生,抑制线粒体氧化应激。CLEAR 试验^[11]入选 30 例慢性丙型肝炎患者,每位患者均口服 MitoQ 28 d,结果发现 MitoQ 能显著降低患者的血浆谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平,但目前尚无关于 MitoQ 对心肌 IR 影响的临床试验。另一个合成的线粒体清道夫是质体醌 SkQ1,低浓度的 SkQ1 即可减少大鼠 IR 所致的心肌梗死面积和心律失常^[12]。

2 线粒体 ROS 和 IR 心肌保护

缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)、缺血后适应(ischemic postconditioning, IPostC)、远隔器官预适应(remote ischemic preconditioning, RIC)是心肌 IR 的内源性保护措施,现普遍认为这些内源性保护措施都依赖于 ROS 的产生。适量的线粒体 ROS 通过改变细胞氧化还原状态,激活参与心肌保护作用的信号转导通路,从而保护心肌。

2.1 IPC

IPC 是最有效的心肌内源性保护机制。ROS 是 IPC 的第二信使,短暂的缺血循环和再灌注中产生的亚致死量的 ROS 能通过氧化保护性的细胞质激酶触发 IPC。预处理时产生的少量 ROS 能减少再灌注阶段有害 ROS 的生成,该现象称为“ROS 诱导的 ROS 减少”。给予外源性 ROS 也能诱导类似 IPC 的保护作用,在大鼠心肌 IPC 模型中,ROS 清除剂 N-2-巯基丙酰甘氨酸能减少或抵消 IPC 的心肌保护作用^[13-14]。

MitoK_{ATP} 开放后生成的 ROS 是 IPC 心肌保护作用的重要机制之一。IPC 时,mitoK_{ATP} 开放,钾离子内流到细胞质,常氧状态下呼吸链复合物 I 来源的 H_2O_2 生成增加,通过氧化硫醇基团而激活线粒体蛋白激酶 C epsilon (PKCε),并使 mitoK_{ATP} 处于持久的开放状态,提高 IPC 的最终效应器——线粒体 mPTP 的开放阈值,从而减少心肌 IR 损伤。研究者发现,mPTP 的组分亲环素对 IPC 心肌保护至关重要,它参与调节 mPTP 的开放,产生线粒体 ROS,通过激活再灌注损伤挽救激酶信号通路保护心肌。亲环素 D 抑制剂能减少 ROS 生成,并抵消 IPC 对心肌的保护作用,说明通过 mPTP 短暂开放产生的少量 ROS 在 IPC 心肌保护中起重要作用^[13, 15]。

再灌注期间,心肌细胞凋亡激活 MAO-A 产生低浓度的线粒体 H_2O_2 也是 IPC 心肌保护作用的机制之一。在离体大鼠心肌 IR 模型中,MAO 抑制剂能抵消 IPC 的心肌保护作用,但能促进缺血后心功能的恢复^[16]。

2.2 IPostC

IPostC 在缺血后实施,较 IPC 有更好的临床应用前景。ROS 是 IPostC 心肌保护作用的必要触发机制。再灌注开始时,给予 ROS 清除剂能消除 IPostC 的心肌保护作用。心肌保护作用也可能被 IPostC 循环中酸中毒抑制 mPTP 开放所介导,当其

他能够产生大量自由基的酶未被激活时,IR 中氧的间歇性爆发使线粒体产生足够的 ROS,激活 PKC 信号通路腺苷受体,抑制 mPTP 开放,保护心肌^[13]。IPostC 的心肌保护作用依赖于氧化还原信号,但 ROS 的类型、浓度和来源是触发再灌时心肌保护作用的关键因素^[17]。丹麦的一项小型临床试验对 118 例急性心肌梗死患者进行 4 个循环的 IPostC,每次缺血 30 s,再灌注 30 s,3 个月后用心脏磁共振评估心肌梗死面积,结果发现梗死面积减少 18%。但在一些采用缺血 60 s,再灌注 60 s 的小样本临床试验中并未证实 IPostC 的心肌保护作用。有学者认为这与 IPostC 每个循环的再灌注时间有关,再灌注 40 s 时组织 pH 恢复正常,每个循环再灌注 30 s 的 IPostC 能避免 pH 急剧上升,使组织有足够的时间产生 ROS,可在一定程度上保护心肌^[18]。

2.3 RIC

RIC 有 3 个相互关联的阶段:(1)IR 刺激诱导远程器官中保护因子的合成;(2)保护信号通过复杂的神经体液机制传递到靶器官;(3)产生靶器官的保护作用。与 IPC 和 IPostC 类似,ROS 的产生是 RIC 心肌保护信号转导的一部分。保护信号从远程器官传递到心脏,结合到细胞表面的 G 蛋白,并激活细胞内激酶的偶联受体 PKC ϵ 和其他信号分子,如 ROS 和 mitoK_{ATP} 通道。阻断大鼠腹主动脉 15 min 后再灌注 10 min,能使大鼠心肌梗死面积减少约 20%,ROS 清除剂能消除该保护作用。阻断大鼠肠系膜上动脉 15 min 后再灌注 15 min,ROS 清除剂能消除 RIC 对心肌的保护作用。RIC 的最终效应尚不清楚,有研究者认为,线粒体 ROS 介导的心肌保护作用可能与热休克蛋白 27 的磷酸化和张力纤维的稳定有关^[14]。

3 结语

线粒体功能障碍和由此产生的氧化应激在心肌 IR 损伤的发病机制中起关键作用,选择性线粒体靶向抗氧化治疗对减轻心肌 IR 损伤有重要的研究意义。然而,心肌 IR 诱导的线粒体功能障碍有多种,尚需进一步了解线粒体 ROS 在心肌 IR 中的作用。

参考文献

- [1] Angelova PR, Abramov AY. Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 100(11):81-85.
- [2] Bartz RR, Suliman HB, Piantadosi CA. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection[J]. Front Physiol, 2015, 6(10):291-298.
- [3] Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive

oxygen species generation[J]. Circ Res, 2014, 114(3):524-537.

- [4] Korge P, John SA, Calmettes G, et al. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex II [J]. J Biol Chem, 2017, 292(24):9896-9905.
- [5] Srinivasan S, Spear J, Chandran K, et al. Oxidative stress induced mitochondrial protein kinase A mediates cytochrome C oxidase dysfunction [J]. PLoS One, 2013, 8(10):e77129-e77144.
- [6] Duicu OM, Lighezan R, Sturza A, et al. Assessment of mitochondrial dysfunction and monoamine oxidase contribution to oxidative stress in human diabetic hearts[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:8470394.
- [7] Inagaki T, Akiyama T, Du CK, et al. Monoamine oxidase-induced hydroxyl radical production and cardiomyocyte injury during myocardial ischemia-reperfusion in rats[J]. Free Radic Res, 2016, 50(6):645-653.
- [8] Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential[J]. Pharmacol Ther, 2016, 172(12):50-62.
- [9] Hernández-Reséndiz S, Chinda K, Ong S-B, et al. The role of redox dysregulation in the inflammatory response to acute myocardial ischaemia-reperfusion injury - adding fuel to the fire [J]. Curr Med Chem, 2017, 24(42):28356034-28356044.
- [10] Yao X, Carlson D, Sun Y, et al. Mitochondrial ROS induces cardiac inflammation via a pathway through mtDNA damage in a pneumonia-related sepsis model[J]. PLoS One, 2015, 10(10):e0139416-e0139444.
- [11] Murphy MP. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(5):1219-1226.
- [12] Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning[J]. Redox Biol, 2014, 2(1):702-714.
- [13] Cohen MV, Downey JM. Signalling pathways and mechanisms of protection in pre- and postconditioning: historical perspective and lessons for the future[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(8):1913-1932.
- [14] Galagudza MM, Sonin DL, Vlasov TD, et al. Remote vs. local ischaemic preconditioning in the rat heart: infarct limitation, suppression of ischaemic arrhythmia and the role of reactive oxygen species[J]. Int J Exp Pathol, 2016, 97(1):66-74.
- [15] Andrienko T, Pasdois P, Rossbach A, et al. Real-time fluorescence measurements of ROS and [Ca²⁺] in ischemic/reperfused rat hearts: detectable increases occur only after mitochondrial pore opening and are attenuated by ischemic preconditioning [J]. PLoS One, 2016, 11(12):27907091-27907122.

- [23] Bruins Slot MH, Reitsma JB, Rutten FH, et al. Heart-type fatty acid-binding protein in the early diagnosis of acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis [J]. Heart, 2010, 96(24):1957-1963.
- [24] Kilcullen N, Viswanathan K, Das R, et al. Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality after acute coronary syndrome and identifies high-risk patients across the range of troponin values[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(21):2061-2067.
- [25] O'Donoghue M, de Lemos JA, Morrow DA, et al. Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes [J]. Circulation, 2006, 114(6):550-557.
- [26] Puls M, Dellas C, Lankeit M, et al. Heart-type fatty acid-binding protein permits early risk stratification of pulmonary embolism[J]. Eur Heart J, 2007, 28(2):224-229.
- [27] Dellas C, Puls M, Lankeit M, et al. Elevated heart-type fatty acid-binding protein levels on admission predict an adverse outcome in normotensive patients with acute pulmonary embolism[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(19):2150-2157.
- [28] Setsuta K, Seino Y, Mizuno K. Heart-type fatty acid-binding protein is a novel prognostic marker in patients with essential hypertension[J]. Int J Cardiol, 2014, 176(3):1323-1325.
- [29] Gedikli O, Ozturk S, Yilmaz H, et al. Relationship between arterial stiffness and myocardial damage in patients with newly diagnosed essential hypertension[J]. Am J Hypertens, 2008, 21(9):989-993.
- [30] Daidoji H, Arimoto T, Iwayama T, et al. Circulating heart-type fatty acid-binding protein levels predict ventricular fibrillation in Brugada syndrome[J]. J Cardiol, 2016, 67(3):221-228.
- [31] Murphy EJ, Owada Y, Kitanaka N, et al. Brain arachidonic acid incorporation is decreased in heart fatty acid binding protein gene-ablated mice[J]. Biochemistry, 2005, 44(16):6350-6360.
- [32] Veerkamp JH, Zimmerman AW. Fatty acid-binding proteins of nervous tissue[J]. J Mol Neurosci, 2001, 16(2/3):133-142; discussion 151-157.
- [33] Chiasserini D, Biscetti L, Eusebi P, et al. Differential role of CSF fatty acid binding protein 3, alpha-synuclein, and Alzheimer's disease core biomarkers in Lewy body disorders and Alzheimer's dementia[J]. Alzheimers Res Ther, 2017, 9(1):52.
- [34] Shioda N, Yabuki Y, Kobayashi Y, et al. FABP3 protein promotes alpha-synuclein oligomerization associated with 1-methyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity [J]. J Biol Chem, 2014, 289(27):18957-18965.
- [35] Tang Z, Shen Q, Xie H, et al. Elevated expression of FABP3 and FABP4 cooperatively correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Oncotarget, 2016, 7(29):46253-46262.

(收稿:2017-10-01 修回:2017-10-19)

(本文编辑:丁媛媛)

(上接第 340 页)

- [16] Dănilă MD, Privistirescu AI, Mirica SN, et al. Acute inhibition of monoamine oxidase and ischemic preconditioning in isolated rat hearts: interference with postischemic functional recovery but no effect on infarct size reduction[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(9):819-825.
- [17] Madungwe NB, Zilberstein NF, Feng Y, et al. Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart[J]. Am J Cardiovasc Dis, 2016, 6(3):93-108.
- [18] Lonborg JT. Targeting reperfusion injury in the era of primary percutaneous coronary intervention: hope or hype? [J]. Heart, 2015, 101(20):1612-1618.

(收稿:2017-07-20 修回:2017-09-10)

(本文编辑:丁媛媛)