

· 综 述 ·

线粒体通透性转换孔与老年心肌的研究进展

孙燕华, 吉冰洋

(北京协和医学院, 中国医学科学院, 阜外心血管病医院体外循环科, 北京 100037)

【摘 要】随着人体的衰老进程, 心肌细胞的结构、功能均会发生变化, 这就使得老年心肌细胞对缺血缺氧等应激事件较年轻心肌细胞更为敏感, 且耐受性差, 因此, 心血管疾病已经成为老年人群中最致命的杀手。线粒体通透性转换孔 (mPTP) 是一种非选择性的线粒体膜通道, mPTP 的启闭在心肌细胞的保护中具有重要作用。在老年心肌中, 对于 mPTP 开放的调节存在着一定的特殊性: 一些抑制其开放的药物对年轻心肌具有保护作用, 而对老年心肌保护作用却不明显。另外, mPTP 的开放反过来也影响着细胞的衰老进程。因此, 研究老年心肌的 mPTP 的结构和功能对提高老年人心血管疾病治疗水平有重要意义。

【关键词】线粒体通透性转换孔; 老年人; 心肌; 心肌保护

【中图分类号】 R654.1

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00224

Mitochondrial permeability transition pore and aged myocardium: a systematic review

SUN Yanhua, JI Bingyang

(Department of Cardiopulmonary Bypass, State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

【Abstract】 With the ageing process, structural and functional changes of myocardium occur, so the elderly become more sensible and vulnerable to hypoxic-ischemic damage than the young. Thus cardiovascular disease has already become the most deadly disease in the elderly, as well as a threat to their life quality. The mitochondrial permeability transition pore (mPTP) is a non-selective membrane channel, and the opening of mPTP leads to irreversible cell injury. Consequently, its opening regulation plays an important role in cardioprotection. Evidences indicated that the mPTP regulation of the aged myocardium is special. For example, cardioprotection drugs, which were effective to inhibit the opening of mPTP in the young, showed a decreased efficacy in the elderly. Moreover, it is noticed that the mPTP influences the aging process. Therefore, to improve diagnosis and treatment of cardiovascular disease in the elderly, further researches on the structure and function of mPTP in aged myocardium are essential.

【Key words】 mitochondrial permeability transition pore; aged; myocardium; myocardial protection

随着人口的老龄化急速发展, 心血管疾病已成为老年人群最致命的杀手。目前研究证实, 年龄是心血管相关疾病发病率和死亡率升高的一个主要的独立危险因素。在人体衰老过程中, 心肌细胞的结构与功能均会产生一系列变化, 并且老年心肌细胞会表现出对缺血缺氧等心血管应激事件更强的敏感性和较差的耐受性。在心肌衰老过程中, 线粒体作为对各种损伤最为敏感的细胞器之一, 近年来备受关注。线粒体是细胞内氧化磷酸化和合成三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的主要场所, 是为细胞活动提供能量的源泉。线粒体结构、功能的损伤程度既是衡量心肌细胞受损的指标, 又是细胞

死亡调控的关键环节。因此, 对线粒体结构和功能的保护, 是优化心肌保护策略、提升老年人心血管疾病诊疗水平的重要途径。存在于线粒体膜上的线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 是一种非选择性通道, 它的启闭影响着线粒体结构功能损伤, 乃至细胞坏死、凋亡。近年来的大量研究表明, mPTP 开放的调节在老年心肌细胞中具有一定的特殊性, 而它的开放也对心肌细胞的衰老进程起到非常重要的作用。

1 mPTP 结构及开放

目前, mPTP 的结构尚未完全确定, 较经典的

模型包括如下组分:线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channel, VDAC)、内膜的腺苷酸转移酶(adenine nucleotide translocase, ANT)、基质的亲环蛋白D(cyclophilin D, CyP-D)及一些其他调控蛋白,如Bax^[1],外周苯二氮卓受体(peripheral benzodiazepine receptor, PBR),己糖激酶(hexokinase, HK)和肌酸激酶(creatine kinase, CK)。在线粒体基质游离钙离子的激发下,CyP-D与ANT的结合会开放mPTP,而这又会反过来增加mPTP对钙的敏感性^[2]。然而,ANT或VDAC缺失的线粒体,其mPTP仍可被诱导开放^[3,4],这提示ANT和VDAC并非mPTP开放所必需的,只是可以调控对诱导mPTP开放因素的敏感性^[5]。另有研究指出,线粒体磷酸盐载体(phosphate carrier, PiC)可能也是mPTP的重要组分,并提出一种模型:由钙触发,CyP-D辅助导致PiC构象变化,从而开放mPTP^[6]。

正常生理情况下,mPTP处于关闭状态,钙离子决定它的开放频率。生理性的mPTP短暂开放能防止线粒体钙超载,从而保护线粒体乃至整个细胞^[7]。而在应激条件下,mPTP的持续开放,导致线粒体膜电位破坏,氧化磷酸化失调、ATP耗竭,进而影响到泵功能,加重钙超载等离子紊乱,还可引起线粒体基质渗透性水肿,外膜破裂,引发细胞色素C等促凋亡因子释放,引起细胞凋亡及坏死等不可逆损伤,出现缺血再灌注损伤的临床表现。

2 mPTP 开放诱因

已知的引起mPTP开放因素,包括钙超载、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)、能量耗竭、线粒体跨膜电位下降、无机磷酸盐增加、游离脂肪酸增加等细胞内不稳定因素^[8],其中钙超载和氧化应激最为重要。

2.1 钙与 mPTP

钙超载可以诱导线粒体内膜ANT变成“C”构象,即细胞基质开放构象^[9]。同时,钙超载还触发线粒体基质的CyP-D与ANT结合使mPTP开放,并扩大其开放程度、增加mPTP对钙的敏感性。现有的钙离子引发mPTP开放的结论,多由分离出的线粒体水平实验得到,而在细胞水平实验中钙引发mPTP开放的作用机制仍存在争议,Kim等^[10]发现细胞钙超载出现在mPTP开放以后,得出引发mPTP开放的物质是ROS的结论。而在一项研究完整心脏mPTP开放的实验中,在mPTP开放之前,就测得了缓慢移动、高度局域化的钙波。这种钙波与组织

氧化一起引发mPTP开放。氧化应激常引起钙超载,而在这项实验中发现:ROS并不使整个细胞内的钙浓度发生显著变化,而只是引起缓慢移动、高度局域化的钙波。此外,该胞浆钙波还可以传递到邻近的细胞并促进其mPTP开放^[11]。

有研究表明,老年大鼠mPTP开放对钙的诱发作用敏感性增加,这可能归因于氧化心磷脂的水平随衰老的进展而增高。心磷脂遍布线粒体内膜,六个心磷脂分子结合于一个ANT分子上,它们对保持ANT的正常转运活性有重要作用。衰老心肌氧化的心磷脂比例升高,增加了mPTP对钙离子的敏感性。而长期的褪黑素治疗[10 mg/(kg·d)持续约2个月]可抑制老年大鼠心肌对钙离子的敏感度升高,这对减轻老年心肌缺血再灌注损伤有提示作用^[12]。

2.2 ROS 与 mPTP

造成氧化应激的ROS,包括自由基,如过氧化物、羟基自由基、单线态氧以及非基团类如过氧化氢。ROS具有高反应性并能损伤细胞组分如蛋白、脂质和核酸。ROS的增加通过耗竭还原状态的谷胱甘肽或还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(还原型辅酶Ⅱ)可使mPTP开放。一氧化氮(nitric oxide, NO)与超氧阴离子作用时产生过氧硝酸,NO和过氧硝酸盐通过使ANT中的巯基氧化,使之载体功能丧失,开放mPTP^[13,14]。

老年心肌线粒体功能减弱,导致ROS积累增多,反过来加剧线粒体功能的损害^[15]。超氧化物歧化酶可清除自由基,保护细胞。在细胞衰老过程中,超氧化物歧化酶活性降低,这可能会增加mPTP的开放率和时间^[16]。老年心肌电子传递链复合体功能的下降与氧化应激相关^[17],并且这导致的能量代谢不足促使mPTP开放。很多钙离子通道由氧化还原反应调控,因此,氧化应激还可进一步扰乱钙离子的内平衡^[18]。

3 衰老心肌 mPTP 的保护

目前发现的一些药物可以抑制mPTP开放,用以保护心肌细胞,然而其中一部分对老年心肌并不起保护作用,明确其相应的机制才能推动更有利于老年心肌保护药物的研制和开发。

3.1 失效的保护作用

环孢素A(cyclosporine A, CsA)可与线粒体基质的CyP-D结合,使CyP-D不能结合线粒体内膜的ANT,抑制mPTP开放,进而保护心肌,减小梗

死面积。在 Liu 等^[19]的一项研究中, CsA 可以显著降低年轻大鼠(3~5 个月)心肌缺血再灌注后梗死面积, 减少 NAD^+ 从 mPTP 的漏出量, 延长缺血再灌注引起的 mPTP 开放所需的时间。而对老年大鼠(20~24 个月)的心肌, 则不能发挥上述心肌保护作用。

既往研究发现, 在年轻心肌可以通过阻断糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 抑制 mPTP 开放, 保护心肌对抗缺血再灌注损伤。然而, Zhu 等^[20]在研究中发现: 老年心肌的蛋白激酶 B/GSK-3 β 通路对 mPTP 开放的抑制作用已经在衰老过程中激活, 再用异氟烷激活这一保护途径观察不到更为明显的保护效果。另一研究揭示, 在缺血再灌注损伤中, GSK-3 β 抑制剂 SB-216763 (SB) 的心肌保护作用存在年龄差异。SB 可以磷酸化 GSK-3 β 第九位丝氨酸, 从而使其失活达到阻断效果; 缺血再灌注后, SB 提高了年轻心肌中磷酸化 GSK-3 β 与非磷酸化 GSK-3 β 的比值, 显著抑制了 mPTP 的开放; 而在老年心肌中, 磷酸化 GSK-3 β 与非磷酸化 GSK-3 β 的比值并没有显著上升, 且发现老年组中未用 SB 的对照组本身磷酸化 GSK-3 β 含量就很高。据以往研究结果推断: 在心肌衰老进程中, 氧化应激的累积效应使 GSK-3 β 磷酸化对 mPTP 开放的抑制作用达到极限, 因此, 老年心肌对 GSK-3 β 阻滞剂已经不再敏感^[21]。

随着衰老的进展以及氧化应激等各种损伤性因素长期作用的累积, 老年心肌在对抗短期缺血缺氧等应激事件时与年轻心肌不同, 可能对年轻心肌具有保护效力的方式并不适用于老年心肌, 而保护作用的缺失与应用心肌保护药物的剂量是否相关, 以及导致老年心肌保护效应缺失的不同方式是否存在共同通路还需要进一步的探究。

3.2 探寻有效靶点

在 Bopassa 等^[22]的一项关于心肌保护的研究中, 作者发现雌激素受体通过细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, Erk) 通路抑制 mPTP 开放, 起到心肌保护作用。然而, 另一项来自于 Lancaster 等^[23]的研究发现, 对于老年女性心肌, 雌激素的保护作用降低, 这一结果提示: 在减轻老年女性心肌对缺血再灌注损伤方面, 还需要一种更为有效的疗法。研究人员深入研究了 PKC ϵ 在老年、缺乏雌二醇的大鼠心脏中介导的心肌保护作用时, 发现 PKC ϵ 可与线粒体膜上的 VDAC、ANT 和 HK II 形成复合物, 进而磷酸化细胞色素 C 氧化

酶的 IV 亚基, 激活线粒体的 ATP 敏感钾离子通道 (mKATP 通道) 致 mPTP 关闭, 起到心肌保护作用^[24]。研究揭示了激活的 PKC ϵ 可以在老年心肌保护中发挥作用, 并发现了三种新的在老年心肌中发挥保护作用的线粒体靶点: 抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶、锰超氧化物歧化酶 (manganese super oxygen dehydrogenases, MnSOD) 和热休克蛋白 10, 这为治疗绝经期后老年妇女以及年龄相关的雌二醇减少者的急性心肌缺血提供了新思路^[23]。

线粒体乙酰化酶 3 (又名长寿蛋白 3, Sirtuins3, SIRT3) 是一种 NAD^+ 依赖性去乙酰化酶, 可脱去 CyP-D 第 166 位赖氨酸的乙酰基, 阻断 CyP-D 异构酶的活性。当 CyP-D 的活性高时, mPTP 易于开放, 通过上述途径, SIRT3 抑制 mPTP 的开放。其机制可能是该乙酰化位点与 CyP-D 阻滞剂 CsA 的结合位点相毗邻, 可以使 CyP-D 与 ANT1 的相互作用得到解除^[25]。SIRT3 敲除的小鼠心肌细胞线粒体随着年龄的增加表现出对钙离子敏感性的升高, 同时还出现心肌衰老加速的迹象, 例如 13 月龄的 SIRT3 敲除小鼠的心肌细胞出现肥大和纤维化, 并对腹主动脉缩窄导致的心脏应激高度敏感^[26]。乙醇可抑制 SIRT3 的活性, 从而提高 CyP-D 的活性, 进而促进 CyP-D 与 ANT1 (心肌中存在的一种 ANT 异构体的主要形式^[27]) 的相互作用, 加强 mPTP 的开放。另有研究表明, 乙醇对 SIRT3 的这种抑制作用可被 AMP 激活的蛋白激酶逆转^[28]。

4 总结与展望

目前, 关于心肌细胞 mPTP 的研究仍有很多问题尚待解决, 例如 mPTP 的分子构成、钙离子对 mPTP 开放的触发作用的分子机制尚不明确。此外, 目前很多文献的结论是在动物实验的基础上得出的, 然而衰老过程在不同种属之间有着较强差异性^[29,30], 这些结论是否也适用于人类的心肌细胞并没有定论。因此, 阐明 mPTP 在衰老心肌细胞中的开放调节机制将为开发更好的、更有效的心肌保护药物、优化心肌保护策略、提升老年人心血管疾病诊疗水平提供坚实的理论依据。

【参考文献】

- [1] Capano M, Crompton M. Biphasic translocation of bax to mitochondria[J]. Biochem J, 2002, 367(Pt1): 169-178.
- [2] Miura T, Nishihara M, Miki T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3beta (GSK-3beta)-mediated signal transduction pathway: role of GSK-3beta in

- myocardial protection against ischemia/reperfusion injury[J]. J Pharmacol Sci, 2009, 109(2): 162-167.
- [3] Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, *et al.* The adp/atp translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore[J]. Nature, 2004, 427(6973): 461-465.
- [4] Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, *et al.* Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(5): 550-555.
- [5] Lee J, Schriener SE, Wallace DC. Adenine nucleotide translocator 1 deficiency increases resistance of mouse brain and neurons to excitotoxic insults [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787(5): 364-370.
- [6] Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition[J]. J Biol Chem, 2008, 283(39): 26312-26323.
- [7] Feissner RE, Skalska J, Gaum WE, *et al.* Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS[J]. Front Biosci, 2009, 14: 1197-1218.
- [8] Penzo D, Petronilli V, Angelin A, *et al.* Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca^{2+} -dependent apoptosis through the mitochondrial pathway[J]. J Biol Chem, 2004, 279(24): 25219-25225.
- [9] Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection[J]. Biochem Soc Trans, 2010, 38(4): 841-860.
- [10] Kim JS, Jin Y, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca^{2+} overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(5): H2024-2034.
- [11] Davidson SM, Yellon DM, Murphy MP, *et al.* Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation[J]. Cardiovasc Res, 2011, 93(3): 445-453.
- [12] Petrosillo G, Moro N, Paradies V, *et al.* Increased susceptibility to Ca^{2+} -induced permeability transition and to cytochrome C release in rat heart mitochondria with aging: effect of melatonin[J]. J Pineal Res, 2010, 48(4): 340-346.
- [13] 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]. J Biol Chem, 2003, 278(45): 44735-44744.
- [14] Sun HY, Wang NP, Kerendi F, *et al.* Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ros generation and intracellular Ca^{2+} overload[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(4): H1900-1908.
- [15] Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging[J]. Physiol Rev, 1997, 77(2): 425-464.
- [16] 赵淑琴, 王秀静, 张世忠, 等. 随年龄增长心肌线粒体 PT 孔开放改变及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(2): 143-144, 162.
- [17] Tatarkova Z, Kuka S, Racay P, *et al.* Effects of aging on activities of mitochondrial electron transport chain complexes and oxidative damage in rat heart[J]. Physiol Res, 2011, 60(2): 281-289.
- [18] Davidson SM, Duchon DM. Calcium microdomains and oxidative stress[J]. Cell Calcium, 2006, 40(5-6): 561-574.
- [19] Liu L, Zhu J, Brink PR, *et al.* Age-associated differences in the inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by cyclosporine A[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2011, 55(5): 622-630.
- [20] Zhu J, Rebecchi MJ, Tan M, *et al.* Age-associated differences in activation of akt/gsk-3beta signaling pathways and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening in the rat heart[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010, 65(6): 611-619.
- [21] Zhu J, Rebecchi MJ, Glass PS, *et al.* Cardioprotection of the aged rat heart by gsk-3beta inhibitor is attenuated: age-related changes in mitochondrial permeability transition pore modulation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 300(3): H922-930.
- [22] Bopassa JC, Eghbali M, Toro L, *et al.* A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(1): H16-23.
- [23] Lancaster TS, Jefferson SJ, Korzick DH. Local delivery of a PKCε-activating peptide limits ischemia reperfusion injury in the aged female rat heart [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 301(5): R1242-1249.
- [24] Gucek M, Murphy E. What can we learn about cardioprotection from the cardiac mitochondrial proteome[J]? Cardiovasc Res, 2010, 88(2): 211-218.
- [25] Shulga N, Wilson-Smith R, Pastorino JG. Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria[J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 6): 894-902.
- [26] Hafner AV, Dai J, Gomes AP, *et al.* Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy[J]. Aging (Albany NY), 2010, 2(12): 914-923.
- [27] Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis[J]. Cardiovasc Res, 2011, 94(2): 181-189.
- [28] Shulga N, Pastorino JG. Ethanol sensitizes mitochondria to the permeability transition by inhibiting deacetylation of cyclophilin-D mediated by sirtuin-3[J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 23): 4117-4127.
- [29] Greaves LC, Barron MJ, Campbell-Shiel G, *et al.* Differences in the accumulation of mitochondrial defects with age in mice and humans[J]. Mech Ageing Dev, 2011, 132(11-12): 588-591.
- [30] Sheydina A, Riordon DR, Boheler KR. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(8): 315-329.

(编辑: 王雪萍)