

线粒体移植的研究进展

王一川, 刘小静*, 叶峰, 杨雪亮, 陈娜, 吴剑华, 李彦霖

(西安交通大学第一附属医院 感染科, 陕西 西安 710016)

摘要: 线粒体提供细胞生命活动的大部分能量,其功能异常可导致多种疾病。基于线粒体能够在细胞间转移的机制,线粒体移植成为治疗线粒体功能障碍的一种创新思路。在动物实验中被证明是一种治疗包括心脏、肝脏、肺和大脑在内的各种组织的线粒体功能障碍的方法。在临床试验中,这项技术有待广泛应用。

关键词: 线粒体移植; 线粒体治疗

中图分类号: R318.11; R459.9 文献标志码: A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2021.12.025

Research progress of mitochondrial transplantation

WANG Yi-chuan, LIU Xiao-jing*, YE Feng, YANG Xue-liang, CHEN Na, WU Jian-hua, LI Yan-lin

(Department of Infection, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710016, China)

Abstract: Mitochondria provides most of the energy to drive cell function, and its dysfunction can lead to a variety of disease. Since mitochondria has been proved to be able to transfer between cells, mitochondrial transplantation has become an innovative idea for the treatment of mitochondrial dysfunction and this technology has been supported by evidences from animal experiments. The transplantation of mitochondrial is potentially applied in the treatment of disease of various tissues including heart, liver, lung and brain.

Key words: mitochondrial transplantation; mitochondrial therapy

线粒体提供细胞生命活动的大部分能量,其功能障碍与人类疾病有关,包括神经和肌肉退化、心血管疾病、肥胖、糖尿病、衰老和罕见的线粒体疾病。线粒体移植治疗是从正常组织细胞分离线粒体,然后注入患者线粒体损伤或缺失的部位,使损伤细胞获得救治、器官功能得以恢复的全新干预技术。在动物实验中,线粒体移植作为治疗包括心脏、肝脏、肺和大脑在内的各种组织的线粒体损伤的有效性已经有报道。在临床试验中,这种方法仅在一项改善先天性心脏病的心肌缺血再灌注损伤的研究被报道^[1],尚未广泛应用。因此,本文总结了线粒体移植的研究现状,希望能对研究者有所启发。

1 线粒体的结构、功能和病理状态

线粒体由双层膜结构套叠而成,将线粒体内部空间分成两个膜性空间。线粒体外层单位膜光滑平整,由1/2的脂类和1/2的蛋白质组成。线粒体内膜比外膜稍薄,将内膜基质分成膜间腔和基质腔两个部分,内膜上大量向基质腔凸起的结构形成嵴,这样的结构扩大了线粒体内膜面积,提高了线粒体内化学反应的效率。线粒体DNA是裸露在基质或附着于内膜的双链环状分子,编码线粒体的少部分RNA和蛋白质。功能上,外膜上有大量物质进出线粒体的通道蛋白和特异性受体负责转运。内膜的电

收稿日期: 2021-03-12 修回日期: 2021-07-12

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划(2017JM8083)

* 通信作者(corresponding author): xiaojing406@163.com

子传递链与内膜表面附着的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合酶复合体共同完成氧化磷酸化和ATP的合成。线粒体基质则是各种有机物进行最后氧化过程的场所。只有经过三羧酸循环,有机物才能完全氧化,产生比无氧酵解所提供的更多能量。

线粒体的形态、大小、数量和排列分布根据细胞的类型和生理状态而不同。线粒体应对氧化应激损伤时,启动mtDNA转录程序缓解应激、将部分线粒体转移到线粒体衍生囊泡、激活线粒体自噬^[2]以及诱导细胞死亡等机制;在结构上表现为线粒体肿胀破裂,内膜结构液化消失等。这些病理状态下线粒体功能异常,导致细胞产生代谢障碍,引起肌肉、神经、心肌疾病和凋亡等。现有的治疗措施主要基于分子水平,包括补充辅酶,减少对缺陷线粒体的排斥和替代缺陷mtDNA等。

2 线粒体转移的机制

2.1 线粒体细胞间转移机制

线粒体起源的内共生学说认为,古线粒体作为一种需氧菌被原始真核细胞吞噬,在长期互利共生中演化成了现在的线粒体细胞器。这个假说提示了细胞具有触发细胞器交换的机制,以响应来自受累细胞的损伤信号。然而,启动这一过程的分子线索仍然不明。以神经元为例,当大鼠皮层神经元受到缺氧葡萄糖剥夺时,细胞内ATP水平下降,神经元活力下降;当添加星形胶质细胞细胞外线粒体颗粒后,神经元活力恢复^[3]。目前的动物器官缺血再灌注模型大多通过血管输送或直接注射的方法快速有效地完成移植。经腹腔静脉注射后,外源性线粒体分布于小鼠脑、肝、肾、肌肉、心脏等多种组织。然而细胞间线粒体转移途径,外源性线粒体通过生理屏障(如血脑屏障)的机制依然有待研究。

细胞间转移的机制主要由隧道纳米管(tunneling nanotube, TNT)、间隙连接和细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)的释放等发挥作用。TNT是由与靶细胞相连的丝状细胞膜突起产生的纳米管状的动态结构。每个细胞的膜延伸融合在一起,从而形成一个紧密连接的桥,它不是固定在膜上,而是悬浮在细胞外空间。TNT参与肺上皮细胞、心肌细胞和急性髓细胞白血病细胞等的线粒体转运、修复细胞损伤、激活增强免疫反应和细胞代谢重编程。ROS诱导的

氧化应激调节磷脂肌醇3-激酶也与连接蛋白通道的打开有关^[4]。供体细胞释放的EVs可以与接收细胞融合或吞噬来释放其中的线粒体。动脉内注射骨髓间充质干细胞来源的EVs可减轻局灶性脑损伤引起的神经炎症反应^[5]。在糖尿病心肌缺血的大鼠模型中证实了肌动蛋白在线粒体细胞间转移的重要性^[6]。

2.2 移植线粒体的来源和移植后免疫反应

干细胞有强大的再生潜力,因此被认为是可靠的线粒体来源。不同供体细胞的线粒体也有不同的功能。基于细胞对低氧的不同反应,将大鼠从股动脉分离出的线粒体与低氧的肺动脉段共孵育培养发现,低氧时肺动脉平滑肌细胞线粒体产生的ROS要远远多于股动脉平滑肌细胞线粒体。股动脉平滑肌线粒体移植能抑制低氧引起的肺循环阻力升高^[7]。

免疫排斥方面,通过观察小鼠自体 and 同种异体的线粒体移植产生的免疫排斥反应发现,不管是单次注射还是连续注射,不管是自体细胞还是异体细胞线粒体注射,与空白对照组相比,血清炎症标志物都无明显差异^[8]。结合古线粒体内共生来源学说,外源性线粒体移植不易引起明显免疫排斥反应的现象有助于扩大线粒体供体源,为推广异体线粒体移植治疗提供可能。

线粒体移植机制的研究为临床应用提供了理论基础,也对线粒体移植的应用提供了更多思路。

3 线粒体移植的临床探索

3.1 线粒体移植改善缺血/再灌注损伤

3.1.1 心脏缺血/再灌注损伤:缺血/再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)是导致线粒体损伤最常见的原因,也是大多数实验的模型机制。在心肌缺血再灌注动物模型中初步验证了心肌源性线粒体的治疗作用^[9]。结扎兔冠状动脉左前降支,缺血后将供体兔左心室的线粒体直接注射到心脏缺血的部位,发现心肌梗死标志物水平显著降低。随后验证了自体线粒体移植的策略,即从骨骼肌中提取的健康自体线粒体移植到损伤的心肌中,观察到的线粒体移植组梗死范围比空白对照组显著减少^[10]。超声心动图显示整体功能无明显差异。组织化学和透射电镜显示,在对照组心肌组织受损,而在线粒体组则不明显。用同样方法提取的线粒体注入糖尿病大鼠冠状动脉也被证实能够改善心肌缺血的损伤^[11]。

线粒体移植在再灌注过程中,而不是在再灌注前立即给予冠状动脉的问题更接近实际^[11]。超声心动图分析显示,再灌注时,局部 I/RI 后接受线粒体移植的心脏射血分数、左室短轴缩短率和梗死面积/危险区域(infarct size/area at risk IS/AAR) 都有明显改善。再灌注结束时,两组在左室舒张末期压和左室压升高速率等整体左室功能测量值上存在差异。两组之间在危险区域没有发现显著差异。与对照组相比,接受线粒体移植的 IS/AAR 明显减小。

循环死亡后捐献(donation after circulatory death, DCD) 提供了另一种异体心脏移植来源,但由于缺血的影响而受到限制。研究表明线粒体移植增强 DCD 心脏心肌功能的效果^[12]。停止机械通气使约克猪循环衰竭,热缺血 20 min 后,给予心脏停搏液。然后在离体血液灌注系统进行心脏再灌注,15 min 后,心脏接受溶剂或含有自体线粒体的注射液,实验组在离体心脏灌注 2 h 后接受第二次线粒体注射。与溶剂组相比,接受线粒体注射液组的左心室/心室峰值发展压力、最大左心室/心室压力升高,左室缩短分数和心肌耗氧量显著增加,心肌梗死面积明显缩小。这一研究表明线粒体移植显著地保留了 DCD 心脏的心肌功能和耗氧量,从而为扩大心脏供体池提供了可能的选择。

对先天性心脏病手术干预和体外膜肺氧合(extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 支持没有改善的患儿从自体腹直肌中分离出线粒体,然后从心外膜注入超声心动图提示有缺血再灌注损伤的心肌中^[1]。所有患者均无与心外膜注射相关的心律失常或出血,5 例患者中,4 例心室功能改善,并成功脱离 ECMO 支持。注射前和注射后全身炎症反应综合征的标志物(稳定的呼吸和肾脏状态) 无明显差异,这与动物研究数据一致。其中一例患者的尸检显示在注射部位没有炎性或排斥的迹象,白细胞计数没有临床相关变化,提示自体线粒体移植不会引起明显的炎症反应。然而,选择这组患者是因为 ECMO 支持后心肌功能未恢复,而且心室功能的恢复也希望渺茫。评估不同治疗时机,确定线粒体的剂量和不同给药方法仍有待研究。

3.1.2 肺缺血/再灌注损伤: 缺血/再灌注损伤是导致急性肺损伤(acute lung injury, ALI) 最常见的原因之一。体外气体交换、体外循环和机械通气均可导致

I/RI。I/RI 对肺功能和细胞活力有深远影响,并显著增加儿童和成人患者的发病率和病死率。线粒体损伤在 ALI 中起着重要作用,为肺 I/RI 的治疗提供策略。

用雄性 C57BL/6J 小鼠研究了线粒体移植在小鼠肺 I/RI 模型中的效果。通过开胸手术在左肺门部应用微血管钳夹闭 2 h 诱发短暂性缺血^[13]。再灌注后,小鼠通过肺动脉血管或吸入气管气雾剂给药,给小鼠注射含有线粒体的载体或空白载体。假对照组小鼠开胸不夹闭肺门。24 h 后,评估肺力学参数并收集肺部组织进行分析。结果表明,再灌注 24 h 后,与相应的溶剂组相比,线粒体吸入组的动态顺应性和吸气量显著增加,阻力、组织阻尼、弹性和吸气峰压(仅动脉注射组) 显著降低;与假对照组相比,线粒体移植组中性粒细胞浸润、间质水肿和凋亡明显减少。各组间细胞因子和趋化因子无明显差异。这些结果表明,血管输送或雾化吸入线粒体移植都可以改善肺机械功能,减少肺组织损伤。

3.1.3 骨骼肌缺血/再灌注损伤: 骨骼肌也是富含线粒体的重要器官。在小鼠的左后肢急性缺血模型中,用止血带引起缺血 2 h 后,恢复后肢再灌注。将空白对照或线粒体溶液直接注射到后肢的所有肌肉中。线粒体以不同浓度梯度被注射到每块肌肉。假性对照组不接受缺血或注射,但麻醉 2 h 后恢复。在后肢再灌注 24 h 后,线粒体移植组小鼠腓肠肌、比目鱼肌和股内侧肌的梗死面积比空白对照组明显减少,后肢的站立能力明显增强,站立能力与非缺血组无明显差异^[14]。

3.1.4 肾脏缺血/再灌注损伤: 肾脏的线粒体含量和耗氧率仅次于心脏。由于线粒体的功能和生存能力依赖于血液输送的稳定氧气供应,氧气输送的中断或停止以及由此产生的 I/RI 严重损害线粒体的能量生产,导致肾功能不全或衰竭。以猪双侧肾缺血再灌注损伤为模型研究线粒体移植的肾脏作用^[15]。用球囊导管对雌性约克郡猪进行经皮双侧肾动脉暂时闭塞术,缺血 60 min 后,将球囊导管放气,以单次给药的方式将线粒体输送至肾动脉。注入的线粒体迅速被肾脏吸收,分布在皮质和髓质的管状上皮细胞中。再灌注 24 h 后,与溶剂组相比,线粒体治疗组血尿素氮明显降低。大体解剖、病理组织学分析、急性肾小管坏死评分和透射电镜显示,溶剂组的肾皮质主要是近端小管发生广泛的凝固性

坏死,而线粒体移植肾仅表现为斑片状轻度急性肾小管损伤。与接受线粒体移植的肾脏相比,溶剂处理的肾脏的肾皮质 IL-6 表达显著增加。这些结果表明,动脉内注射线粒体可保护肾脏免受缺血再灌注损伤,显著增强肾功能,减轻肾损害。

3.2 线粒体移植改善代谢功能

线粒体功能障碍导致肝细胞脂质堆积,是引起非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的一个重要机制。外源性线粒体对高脂肪饮食诱导的小鼠脂肪肝有治疗作用^[16]。他们用小鼠随机分为4组(每组12只)。第一组为正常对照组,其余3组灌胃给予高脂高胆固醇饲料。线粒体治疗1组小鼠3d内静脉注射从肝癌细胞中分离的线粒体,共3次;治疗2组小鼠接受线粒体6次。脂肪肝组给予等量0.9%氯化钠溶液。用GFP标记线粒体,观察静脉注射后外源性线粒体在体内的分布。小鼠注射2h后,肝、肺、脑、肌、肾出现荧光,表明荧光蛋白标记的线粒体可进入小鼠组织细胞。线粒体治疗组血清转氨酶活性和胆固醇水平呈剂量依赖性下降。同时减少了脂肪肝小鼠的脂质积累和氧化损伤,提高能量的产生,从而恢复肝细胞功能。线粒体移植治疗策略为NAFLD的治疗提供了一种新的潜在的治疗途径。

3.3 线粒体移植改善神经功能

神经元和胶质细胞通过不同的细胞内和细胞间信号机制维持中枢神经系统的稳态,线粒体的跨细胞转移已经成为这种交流的一个重要例子。大量证据表明线粒体功能的损伤对于帕金森的疾病进展有重要作用^[17]。然而由于线粒体蛋白和DNA结构的不稳定,线粒体靶向药物只能提供有限的神经保护。在小鼠强迫游泳试验中,补充线粒体组的小鼠耐力增强;而在帕金森病模型小鼠中,线粒体移植通过增加电子传递链的活性、降低活性氧水平、防止细胞凋亡和坏死来阻止帕金森病的实验进展^[17]。

在一种短暂局部脑缺血模型中,用星形胶质细胞来源的细胞外线粒体,注射到局灶性脑缺血小鼠模型的梗死周围区域后,可被神经元获取,这表明线粒体注射可能是治疗卒中的一种新的治疗方法^[3]。从进一步研究发现,在接受高压氧预处理从星形胶质细胞中转移线粒体可以减轻大鼠神经元的缺血死亡^[18]。脑脊液mtDNA减少是神经退行性疾病的一个特征,如帕金森病、阿尔茨海默病(Alzheimer's dis-

ease, AD) 和多发性硬化症^[19]。一项阿尔茨海默病生物标志候选物的蛋白质组学筛选中发现的潜在AD信号中59%是线粒体蛋白,强调了线粒体功能障碍在AD中的重要地位^[20]。然而,线粒体功能障碍是否存在于所有神经退行性疾病中,以及它与神经退行性病变的关系有待进一步研究。

小胶质细胞活化和线粒体功能障碍是脓毒症引起脑功能障碍的两个主要因素。线粒体功能障碍可改变小胶质细胞的免疫特性,使其趋向促炎性表型。线粒体治疗通过增强从M1表型到M2表型的小胶质细胞极化和抑制小胶质来源的炎性细胞因子的释放来提供神经保护,改善了脓毒症幸存者的认知障碍,支持了外源性线粒体移植疗法的潜在应用。

3.4 线粒体移植对肿瘤细胞的影响

癌相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)能重塑癌细胞的线粒体网络和基因组表达,从而使癌细胞产生耐药性。在前列腺癌^[21]和急性淋巴细胞白血病^[22]中,初级CAF已经被证明通过TNT将线粒体转移到癌细胞。从CAF水平转移功能性线粒体可提高前列腺癌细胞线粒体的质量和活性,从而进一步促进恶性肿瘤的发生^[21]。在骨髓微环境中,抗肿瘤药物可以刺激胞吞作用的线粒体转移,黏附于骨髓基质细胞的急性髓细胞白血病细胞的ATP含量增加,从而产生阿糖胞苷药物的抗性^[23]。线粒体转移相关信号分子可能成为新的化疗药物作用靶点。

从星形胶质细胞中提取的线粒体移植入人神经胶质瘤细胞中能有效地加剧辐射诱导的细胞核DNA损伤,通过对mtDNA缺失的细胞模型的构建,发现肿瘤细胞内移植的外源线粒体能够在增强X线损伤肿瘤细胞核DNA的过程中起到至关重要的作用^[24]。

4 问题与展望

随着研究的深入,对线粒体的认识已经不局限于产生能量维持细胞功能,在清除自由基,延缓衰老,促进代谢方面的作用也逐渐得到重视,但机制还不明确。线粒体移植为许多疾病开辟了新的视野,相关的动物模型和临床研究还有待完善。线粒体功能障碍威胁细胞的稳态,干扰能量生产,最终导致细胞死亡和疾病。为了治疗更多的患者,强烈需要相关药物开发以扩大线粒体移植治疗的使用范围。

参考文献:

- [1] Emani SM , Piekarski BL , Harrild D , *et al.* Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg* ,2017 ,154: 286-289.
- [2] 马家玲 ,高艳平. miR-183 靶向 Bnip3L 对缺氧/复氧的小鼠海马神经元细胞线粒体自噬的影响 [J]. *基础医学与临床* ,2021 ,41: 698-703.
- [3] Hayakawa K , Esposito E , Wang X , *et al.* Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke [J]. *Nature* ,2016 ,535: 551-555.
- [4] Mistry JJ , Marlein CR , Moore JA , *et al.* ROS-mediated PI3K activation drives mitochondrial transfer from stromal cells to hematopoietic stem cells in response to infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,2019 ,116: 24610-24619.
- [5] Dabrowska S , Andrzejewska A , Strzemecki D , *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate neuroinflammation evoked by focal brain injury in rats [J]. *J Neuroinflammation* ,2019 ,16: 216. doi: 10.1186/s12974-019-1602-5.
- [6] Doulamis IP , Guariento A , Duignan T , *et al.* Mitochondrial transplantation for myocardial protection in diabetic hearts [J]. *Eur J Cardiothorac Surg* ,2020 ,57: 836-845.
- [7] Zhu L , Zhang J , Zhou J , *et al.* Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Oncotarget* 2016 ,7: 48925-48940.
- [8] Ramirez-Barbieri G , Moskowitsova K , Shin B , *et al.* Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria [J]. *Mitochondrion* ,2019 ,46: 103-115.
- [9] 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: H94-H105.
- [10] 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: 934-943.
- [11] 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: 711-719.
- [12] Guariento A , Doulamis IP , Duignan T , *et al.* Mitochondrial transplantation for myocardial protection in *ex-situ*-perfused hearts donated after circulatory death [J]. *J Heart Lung Transplant* ,2020: S1053-2498(20) 31625-9. doi: 10.1016/j.healun.2020.06.023.
- [13] Moskowitsova K , Orfany A , Liu K , *et al.* Mitochondrial transplantation enhances murine lung viability and recovery after ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2020 ,318: L78-L88.
- [14] Orfany A , Arriola CG , Doulamis IP , *et al.* Mitochondrial transplantation ameliorates acute limb ischemia [J]. *J Vasc Surg* ,2020 ,71: 1014-1026.
- [15] Doulamis IP , Guariento A , Duignan T , *et al.* Mitochondrial transplantation by intra-arterial injection for acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* ,2020 ,319: F403-F413.
- [16] Fu A , Shi X , Zhang H , *et al.* Mitotherapy for fatty liver by intravenous administration of exogenous mitochondria in male mice [J]. *Front Pharmacol* ,2017 ,8: 241. doi: 10.3389/fphar.2017.00241.
- [17] Shi X , Zhao M , Fu C , *et al.* Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease [J]. *Mitochondrion* 2017 34: 91-100.
- [18] Gonzales-Portillo B , Lippert T , Nguyen H , *et al.* Hyperbaric oxygen therapy: a new look on treating stroke and traumatic brain injury [J]. *Brain Circ* ,2019 ,5: 101-105.
- [19] Lowes H , Kurzawa-Akanbi M , Pyle A , *et al.* Post-mortem ventricular cerebrospinal fluid cell-free-mtDNA in neurodegenerative disease [J]. *Sci Rep* ,2020 ,10: 15253. doi: 10.1038/s41598-020-72190-5.
- [20] Wang H , Dey KK , Chen PC , *et al.* Integrated analysis of ultra-deep proteomes in cortex , cerebrospinal fluid and serum reveals a mitochondrial signature in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener* ,2020 ,15: 43. doi: 10.1186/s13024-020-00384-6.
- [21] Ippolito L , Morandi A , Taddei ML , *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer [J]. *Oncogene* ,2019 ,38: 5339-5355.
- [22] Burt R , Dey A , Aref S , *et al.* Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress [J]. *Blood* ,2019 ,134: 1415-1429.
- [23] Moschoi R , Imbert V , Nebout M , *et al.* Protective mitochondrial transfer from bone marrow stromal cells to acute myeloid leukemic cells during chemotherapy [J]. *Blood* ,2016 ,128: 253-264.
- [24] 杨世锋 ,孙超 ,王玉佩 ,等. 线粒体移植增强人神经胶质瘤 U87 细胞的辐射敏感性 [J]. *中国生物化学与分子生物学报* 2018 34: 1299-1306.