

DOI: 10.13376/j.cbls/2022080

文章编号: 1004-0374(2022)06-0702-09

脑缺血再灌注损伤中线粒体动力学的研究进展

莫燕资¹, 袁张莉¹, 谢露², 陈蒙华^{1,2*}

(1 广西医科大学第二附属医院, 南宁 530007; 2 广西医科大学, 南宁 530021)

摘要: 脑缺血再灌注损伤的发生机制十分复杂, 伴随着钙超载以及 ROS 生成爆发导致线粒体形态和功能异常。线粒体动力学(融合、分裂)是维持线粒体正常形态和功能的关键, 该过程主要由线粒体融合蛋白和分裂蛋白调控。线粒体融合/分裂失衡与脑缺血再灌注损伤的发生发展密切相关, 研究表明 Ca²⁺ 超载和 ROS 通过影响线粒体动力学蛋白而调控线粒体融合和分裂, 决定神经元的存亡。该文就脑缺血再灌注损伤中涉及的线粒体动力学相关分子及相关机制的研究作一综述, 为临床上减轻脑损伤疾病提供新的思路。

关键词: 线粒体动力学; 脑缺血再灌注损伤; 钙超载; 活性氧; 凋亡; 自噬

中图分类号: R741.02; R743.3 **文献标志码:** A

Research progress of mitochondrial dynamics in cerebral ischemia/reperfusion injury

MO Yan-Zi¹, YUAN Zhang-Li¹, XIE Lu², CHEN Meng-Hua^{1,2*}

(1 Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China;

2 Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Cerebral ischemia/reperfusion injury occurs by complex mechanisms, with calcium overload and bursts of ROS production leading to abnormal mitochondrial morphology and function. Mitochondrial dynamics (fusion, fission) are critical for maintaining normal mitochondrial morphology and function, and the process is mainly regulated by mitochondrial fusion and fission proteins. Mitochondrial fusion/fission imbalance is closely related to the development of cerebral ischemia/reperfusion injury, and studies have shown that Ca²⁺ overload and ROS regulate mitochondrial fusion and fission by affecting mitochondrial kinetic proteins, which determine neuronal survival. This paper presents a review of studies involving molecules related to mitochondrial dynamics and related mechanisms in cerebral ischemia/reperfusion injury to provide new ideas for clinical mitigation of brain injury diseases.

Key words: mitochondrial dynamics; cerebral ischemia/reperfusion injury; calcium overload; reactive oxygen species; apoptosis; autophagy

脑卒中是全世界引起死亡和致残的主要原因。大脑是能量需求极高且对缺血缺氧极其敏感的特殊器官, 恢复血流灌注是目前临床治疗卒中的主要治疗手段, 但随之会引起脑缺血再灌注 (ischemia/reperfusion injury, I/R) 损伤。近几十年来, 人们已经对脑 I/R 损伤的病理机制进行了大量的研究, 例如过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生、Ca²⁺ 体内平衡失调、兴奋性毒性作用、细胞凋亡以及线粒体自噬等, 其中 Ca²⁺ 超载和 ROS 的爆发发

生于神经细胞损伤的早期^[1-2], 由此引起细胞凋亡和自噬等多种细胞死亡方式的发生。脑 I/R 损伤仍是临床上亟待解决的难题。因此, 寻找其精准靶点是治疗与预后的关键。

收稿日期: 2021-11-08; 修回日期: 2022-01-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860333); 广西青年科学基金项目(2018GXNSFBA281045)

*通信作者: E-mail: cmhnn@sina.com

作为真核生物中高度动态变化的双层膜细胞器, 线粒体在脑 I/R 损伤中发挥重要作用。正常生理条件下, 线粒体通过不断地融合和分裂保持动态平衡以维持线粒体稳态和功能, 包括能量代谢、钙缓冲、ROS 生成和凋亡调节, 也影响线粒体在细胞内的运动和合理分布^[3-4], 称之为线粒体动力学。值得注意的是, Ca^{2+} 超载和 ROS 爆发诱导线粒体融合蛋白下调和分裂蛋白上调, 导致融合减少和分裂增多, 加剧线粒体功能障碍和 ROS 的产生, 从而导致恶性循环, 最终引起细胞自噬或凋亡^[1-5]。由此可见, Ca^{2+} 超载和 ROS 爆发与线粒体动力学相互影响共同决定脑 I/R 中的细胞存亡。因此, 阐明脑 I/R 中线粒体动力学异常变化的研究将有助于更好地了解缺血性脑卒中后恢复血流灌注引起的脑再灌注损伤疾病的发病机制, 并可能有助于推进治疗策略以保护神经元结构和随后的认知功能。

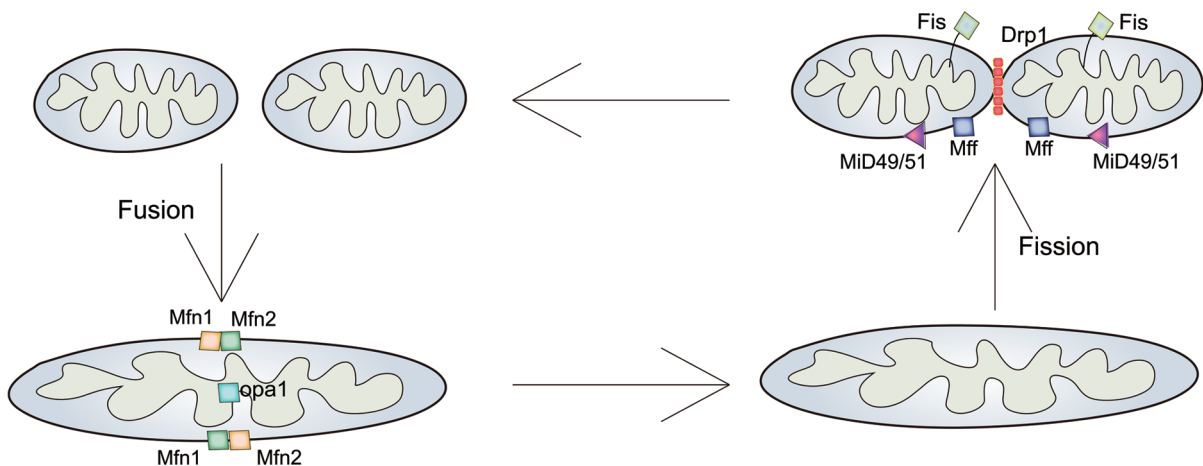
1 脑缺血再灌注损伤概述

脑 I/R 损伤是指在脑组织缺血后一定时间恢复血液供应时出现的更加严重的脑功能障碍现象^[6], 多发生在缺血性脑卒中以及心脏骤停/心肺复苏等疾病中。缺血性脑卒中和心脏骤停均具有极高的伤残率以及死亡率, 但组织缺血后再次恢复血流灌注时, 脑组织损伤并无减轻反而进一步加重, 其原因十分复杂。目前, 研究证据表明, 脑 I/R 后神经元钙超载、ROS 启动的反应网络涉及线粒体损伤、凋亡、自噬、兴奋性氨基酸毒性、内质网应激、炎症

以及其他机制^[1,6]。以上因素相互关联, 彼此重叠, 最终导致缺血区细胞凋亡或自噬, 导致脑机能发生故障。研究表明, 脑 I/R 损伤的始动因素是脑组织的缺血、缺氧^[7-8]。在缺血期, 缺血、缺氧导致 ATP 的合成减少, 细胞内酸性代谢产物和嘌呤碱增多, 细胞内钙离子浓度升高; 再灌注恢复供氧后, 由于 ROS 爆发, 使线粒体严重受损, 继而导致神经细胞死亡^[2]。线粒体介导的凋亡途径是引发细胞早期凋亡的关键因素^[9]。线粒体膜的完整性在经典凋亡信号出现之前就已经开始改变, 出现线粒体膜电位崩解, 凋亡诱导因子与细胞色素 C 的释放等。自噬被认为是一种关键的细胞损伤清除机制, 适度的自噬可降解不必要的或受损的细胞器和蛋白质以维持细胞体内平衡^[5,10], 但线粒体功能障碍则引起过度自噬, 促进细胞的死亡。在 Ca^{2+} 超载和 ROS 产生过多的内环境中, 线粒体介导的级联反应既可能引发细胞凋亡、自噬, 也可能正反馈加重钙超载和 ROS 产生, 因此线粒体损伤是脑 I/R 损伤机制环路的中心, 其中, 调控线粒体稳态的线粒体动力学是一个非常重要的切入点。

2 线粒体动力学及相关蛋白功能

线粒体通过持续的融合和分裂改变自身形态来适应各种应激条件以满足细胞的能量代谢及其他生物学需求, 这种生物学过程被称为线粒体动力学 (mitochondrial dynamics)^[11]。线粒体融合和分裂主要通过线粒体融合蛋白和分裂蛋白来调控 (图 1)。



线粒体通过Mfn1和Mfn2介导线粒体外膜融合, 通过Opa1介导线粒体内膜融合, 将两个线粒体融合成一个线粒体; Mff、Fis1和MiD49/51将Drp1募集到线粒体外膜介导线粒体分裂, 线粒体分裂成两个子线粒体。Fusion: 线粒体融合; Mfn1: 线粒体融合蛋白1; Mfn2: 线粒体融合蛋白2; Opa1: 视神经萎缩蛋白1; Fission: 线粒体分裂; Drp1: 动力相关蛋白1; Mff: 线粒体分裂因子; MiD49/51: 49/51kDa的线粒体动力学蛋白; Fis: 分裂因子。

图1 线粒体融合和分裂

2.1 线粒体融合蛋白

线粒体融合蛋白主要包括线粒体融合蛋白 1 (mitofusin 1, Mfn1)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, Mfn2) 以及视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1)。Mfn1/2 属于与动力学相关的 GTP 酶蛋白, 位于线粒体外膜, 通过其疏水区的 HR2 结构域与另一线粒体外膜上的 HR2 结构域相互作用形成 Mfn1 或 Mfn2 同源或 Mfn1/Mfn2 异源二聚体, 进而 GTP 酶结构域水解 GTP, 引起膜构象变化, 最终使两线粒体的外膜融合^[12]。在缺乏 Mfn1 或 Mfn2 的细胞中, 线粒体融合水平显著降低。当 Mfn1 和 Mfn2 同时缺乏时, 线粒体融合完全消失, 导致线粒体小管结构完全丧失, 线粒体功能不佳^[13-14]。OPA1 位于线粒体内膜, 也属于 GTP 酶蛋白, 通过 N- 端的跨膜结构域锚定在线粒体内膜上, 它的 GTP 结合域和 GTP 酶功能域都暴露于膜间隙^[15]。OPA1 功能依赖于 Mfn1 而不是 Mfn2^[16]。缺失 OPA1 不仅会导致线粒体融合能力减弱, 使得线粒体呈现片段化, 而且也会导致线粒体内膜结构畸变发生异常^[14,17]。因此, OPA1 参与了线粒体内膜的融合、线粒体嵴的形成和线粒体的能量代谢。

2.2 线粒体分裂蛋白

在哺乳动物中, 调控线粒体分裂的蛋白主要包括动力相关蛋白 1 (dynamins-related protein 1, Drp1)、分裂因子 1 (fission 1, Fis1) 和线粒体分裂因子 (mitochondrial fission factor, Mff)。线粒体分裂促进线粒体受损部分与其完整部分分离, 在细胞分裂和细胞器沿着神经轴突的运输和再分配中也发挥作用。Drp1 存在于胞浆中。线粒体分裂时, Mff、Fis1 以及线粒体动态蛋白 Mid49/51 可以作为受体将 Drp1 募集到线粒体外膜, Drp1 在线粒体外膜上聚集形成螺旋环状, 通过 GTP 酶结构域水解 GTP 将线粒体分裂成两个子线粒体^[18]。Drp1 在线粒体外膜聚集增加, 线粒体过度分裂发生片段化, 可引起胞内 Ca^{2+} 超载和细胞凋亡^[19]。此外, Drp1 还可以通过磷酸化、泛素化、S- 亚硝基化或小泛素化修饰等来影响线粒体的分裂过程, 其中以磷酸化为主, 如 Drp1 第 616 位丝氨酸磷酸化后, 线粒体发生分裂, 而 Drp1 第 637 位或 656 位丝氨酸磷酸化则使 Drp1 失活, 抑制线粒体分裂, 促进线粒体融合^[20-24]。Fis1 是一种分布在线粒体外膜上的小分子锚定蛋白, 当细胞接收到外界刺激信号后, Fis1 招募 Drp1 定位在线粒体外膜, 促进线粒体分裂; Fis1 还可以阻止线粒体伸长, 从而使细胞周期延迟或停止, 导致衰

老^[25]。Mff 是一个新的分子适配体, 招募介导线粒体初始收缩过程的蛋白, 或与 Fis1 共同形成裂解复合体参与分裂^[26-27]。

3 线粒体动力学与脑缺血再灌注损伤的病理生理机制

3.1 线粒体动力学与钙超载

Ca^{2+} 超载是脑 I/R 中最关键的病理学改变^[6]。其机制为: 缺血时, 受酸中毒影响, 细胞质膜中的 Na^+/H^+ 交换器激活, 继而促进 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换, 使 Ca^{2+} 进入胞质增多^[27-28]; 再灌注时, 酸中毒进一步加速 Na^+/H^+ 交换器, 加速 Ca^{2+} 入胞^[27] 和肌浆网钙 ATP 酶受损, 从胞质吸收 Ca^{2+} 受限, 以及内质网肌醇 1,4,5- 三磷酸受体 (IP3R) 和 Ryanodine 受体 (RyR) 介导 Ca^{2+} 外流增强^[29], 引起胞质钙超载。此外, 线粒体钙单向转运蛋白是 Ca^{2+} 从胞质进入线粒体基质的重要通道^[30], 线粒体从胞质中吸收过多 Ca^{2+} 可引起线粒体钙超载 (图 2)。

脑 I/R 损伤后 Ca^{2+} 超载导致神经损伤的具体机制尚不清楚。值得注意的是, 导致细胞内钙浓度病理性增加的疾病, 如心脏骤停, 会引起 Drp1 的激活^[31]。Liang 等^[32] 发现, 在脑 I/R 损伤中, 线粒体钙单向转运蛋白通过调节线粒体 Ca^{2+} 摄取与线粒体分裂有关, 线粒体钙单向转运蛋白抑制剂钆红可减轻与脑 I/R 损伤有关的线粒体 Ca^{2+} 超载。笔者课题组前期发现: 在局灶性大鼠脑 I/R 损伤后, 胞质发生 Ca^{2+} 超载^[33]; 在局灶性和全脑 I/R 损伤后, 线粒体 Drp1 表达升高、Mfn2 表达减少^[34]。这表明线粒体动力学平衡可能参与脑 I/R 损伤中线粒体和胞质 Ca^{2+} 超载的病理生理过程。Yu 等^[35] 发现, 在体外使用线粒体钙单向转运蛋白的另一种抑制剂 Ru360, 可以改善神经母细胞瘤细胞氧糖剥夺 / 再复氧后的线粒体形态、功能稳定性和细胞活力, 显著降低线粒体分裂。同样地, 在体内使用 Ru360 可以降低脑 I/R 损伤中线粒体 Ca^{2+} 浓度, 抑制线粒体分裂蛋白 Drp1、Fis1 和线粒体延伸因子 1 的表达, 从而显著改善线粒体形态, 减轻海马神经元 I/R 损伤^[36]。这些研究表明脑 I/R 损伤中细胞内 Ca^{2+} 超载与线粒体融合 / 分裂失衡同步出现, 提示 Ca^{2+} 作为细胞信号转导的第二信使可能影响了线粒体融合 / 分裂蛋白的表达和活性。

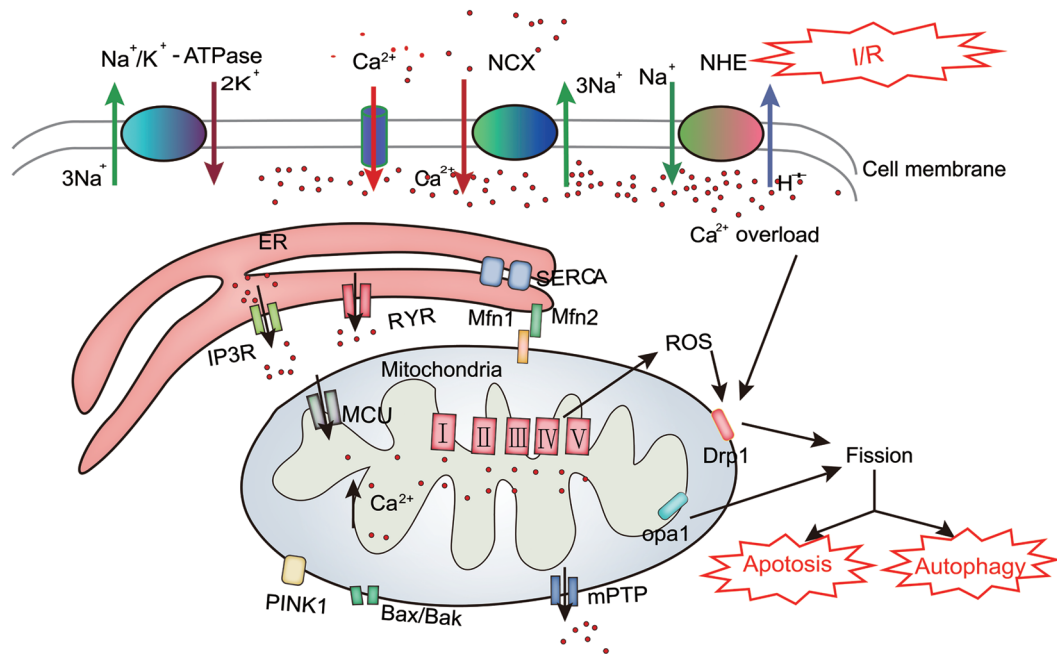
此外, Ca^{2+} 超载影响融合 / 分裂蛋白质的修饰。研究发现, 线粒体 Ca^{2+} 信号通过 Drp1 的磷酸化和去磷酸化调节线粒体的分裂, 抑制线粒体 Ca^{2+} 的摄

取可能减少线粒体分裂^[37-38]。使用钆红不仅减轻与脑 I/R 损伤有关的线粒体 Ca^{2+} 超载, 还抑制了 Drp1 的去磷酸化和线粒体分裂, 防止细胞内 Ca^{2+} 超载以减少线粒体分裂, 从而保护大脑皮层免受 I/R 损伤^[32]。Wang 等^[39]发现, 脑 I/R 损伤后细胞内 Ca^{2+} 超载可激活钙调磷酸酶, 引起 Drp1 Ser637 的磷酸化及其向线粒体的易位与 Fis1 结合, 导致线粒体的分裂。使用异丙酚可部分逆转上述 Ca^{2+} 超载引起的线粒体分裂并下调 Drp1 Ser637 和 Fis1 的表达, 减轻神经元损伤。此外, Drp1 抑制剂 Mdivi-1 通过 Drp1 无关的机制调节脑 I/R 线粒体功能和细胞内 Ca^{2+} 信号, 防止兴奋性胞质 Ca^{2+} 超载和细胞坏死, 减轻线粒体分裂, 减轻 N-甲基-D-天冬氨酸诱导的兴奋性毒性, 从而减轻脑 I/R 损伤^[40]。这表明线粒体分裂可能以不依赖 Drp1 的方式在神经元中发生, 可能是通过 Fis1 的激活, 引起脑 I/R 损伤。因此, 脑 I/R 损伤中线粒体动力学平衡与 Ca^{2+} 超载密切相关, 相互影响, 减轻 Ca^{2+} 超载促进线粒体稳态维持,

有助于保护神经功能。

3.2 线粒体动力学与ROS

ROS 在脑 I/R 后过量生成, 在 I/R 损伤中起着关键作用^[10]。在缺血期间, 产生 ROS 的酶 (如黄嘌呤氧化酶、NADPH 氧化酶、单胺氧化酶和一氧化氮合酶等) 被激活, 而线粒体电子传递链功能障碍, 其复合物 I 和 III 处的泄漏是产生 ROS 的主要来源^[41-42], 并为再灌注后 ROS 的爆发创造条件; 炎症刺激物的表达和炎症细胞激活导致 ROS 生成^[43]; 吞噬细胞 NADPH 氧化酶 2 的激活导致超氧化物的呼吸爆发^[44]。在再灌注过程中, 过多的 ROS 生成促进了线粒体通透性转换孔的开放, 从而引起细胞色素 C 和吡啶核苷酸的释放, 又反过来抑制了呼吸链, 利于 ROS 的形成, 即 ROS 诱导的 ROS 释放^[44]。目前, 脑 I/R 中 ROS 生成爆发导致细胞损伤的具体机制仍不清楚。研究发现, 脑 I/R 损伤导致线粒体分裂增多, 大量破碎的线粒体使氧化磷酸化功能降低和 ROS 产生增加^[45-46]。



在脑 I/R 损伤中, 一方面, 受酸中毒影响, 细胞膜上钠/氢交换器(NHE)激活, 进而激活钠/钙交换器(NCX)逆向运输以及加速钙泵, 导致大量 Ca^{2+} 入胞; 另一方面, 内质网肌醇 1, 4, 5-三磷酸受体(IP3R)和 Ryanodine 受体(RyR)释放 Ca^{2+} 入胞, 发生胞质 Ca^{2+} 超载。内质网通过肌浆网钙ATP酶(SERCA)吸收胞质 Ca^{2+} 缓解胞质 Ca^{2+} 超载, 细胞内过量的钙也可以通过线粒体钙单向转运蛋白(MCU)被线粒体吸收, 导致线粒体 Ca^{2+} 超载, 诱导线粒体通透性转换孔(mPTP)释放 Ca^{2+} 以及细胞色素 C。 Ca^{2+} 超载和 ROS 的爆发诱导线粒体动力学蛋白失衡, 加剧线粒体功能障碍和 ROS 的产生, 引起细胞自噬或凋亡。 Na^+/K^+ -ATPase: 钠/钾-ATP酶; NCX: 钠/钙交换器; NHE: 钠/氢交换器; I/R: 缺血再灌注; ER: 内质网; IP3R: 肌醇1,4,5-三磷酸受体; RYR: Ryanodine受体; SERCA: 肌浆网钙ATP酶; ROS: 活性氧; Mitochondria: 线粒体; MCU: 线粒体钙单向转运蛋白; Mfn1: 线粒体融合蛋白1; Mfn2: 线粒体融合蛋白2; Opa1: 视神经萎缩蛋白1; Drp1: 动力相关蛋白1; Fission: 线粒体分裂; mPTP: 线粒体通透性转换孔; PINK1: PTEN诱导的推定激酶1; Bax/Bak: Bcl-2相关X蛋白/ Bcl-2拮抗剂/杀伤剂。

图2 线粒体动力学与细胞内钙超载和ROS的调节

脑 I/R 损伤后, Mfn2 和 OPA1 的下调导致线粒体融合中断, 同时 Drp1 翻译后修饰导致线粒体过多分裂, 两者均导致线粒体碎片化^[47]。氧化应激使线粒体 Drp1 表达上调, 导致线粒体分裂和融合失衡, 从而导致线粒体功能障碍和结构碎片化, 以及细胞死亡^[48]。Drp1 敲低后, 线粒体 ROS 产生减少^[49-50]。同样地, 使用 Mdivi-1 通过抑制 ROS 启动的线粒体通路, 减轻 I/R 引起的氧化损伤^[51]。此外, 细胞质磷酸酶 DUSP6 过表达或小泛素化修饰可抑制 Drp1-S616 过度磷酸化引起的线粒体分裂, 保护脑 I/R 免受氧化损伤^[52]。在线粒体融合方面, 线粒体丝氨酸蛋白酶 Omi/HtrA2 上调线粒体应激蛋白, 并与线粒体嵴重塑蛋白 OPA1 相互作用, 促进 OPA1 由长的 L-OPA1 断裂成短的 S-OPA1, 加重大鼠脑 I/R 损伤及体外氧化应激损伤^[45]。研究发现, 保护性的 L-OPA1 过表达通过增强抗氧化成分超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性, 增加还原型/氧化型谷胱甘肽比值, 以及降低脑 I/R 诱导的过多 ROS 和丙二醛的生成, 发挥脑保护作用^[53]。这些结果表明, 维持线粒体动力学平衡可能是抑制 I/R 后 ROS 引起的氧化应激造成的神经元损伤的一个有吸引力的靶点。

3.3 线粒体动力学与自噬

线粒体自噬在体内和体外脑 I/R 过程中被激活。研究表明, 在缺血阶段激活自噬对脑损伤具有保护作用, 改善神经预后^[54], 而抑制再灌注诱导的过度自噬可减轻脑 I/R 损伤^[55-56]; 与之相反的是, 有研究认为 PINK1/parkin 介导的自噬激活在脑 I/R 损伤后是有益的^[54,57-58]。虽然一系列研究着重区分自噬在缺血阶段和再灌注阶段的作用, 但线粒体自噬在脑 I/R 损伤中的功能和机制仍不清楚。Shen 等^[10]认为, 线粒体自噬主要在再灌注阶段发挥保护作用, 而 Drp1 介导的线粒体分裂被认为是线粒体自噬的先决条件, 线粒体 Drp1 的招募在线粒体分裂和线粒体自噬过程中起着重要作用。Feng 等^[59-60]研究发现, 过氧亚硝酸盐可以诱导 Drp1 的硝基化, 并引发 Drp1、PINK1 和 parkin 转位到线粒体以激活线粒体自噬, 加重脑 I/R 损伤。Zhang 等^[61]发现, 雷公藤多苷抑制 PINK1、parkin 和 Drp1 向线粒体的转移, 并降低了线粒体部分和细胞膜部分的 LC3-II/LC3-I 的比率, 减轻自噬从而保护脑 I/R 损伤。这与我们之前的研究结果一致: 细胞外信号激酶 ERK 抑制剂 PD98059 可通过抑制 Drp1 表达及其磷酸化, 抑制线粒体介导的神经细胞自噬, 减轻心脏

骤停大鼠脑 I/R 损伤^[34]。这表明抑制线粒体分裂从而减轻自噬有助于脑 I/R 损伤的保护。

在线粒体融合对自噬的影响方面也有一些发现。例如, Mfn2 通过增加自噬体的形成和促进自噬体与溶酶体的融合来改善 I/R 损伤。相反, 下调 Mfn2 通过抑制自噬体的形成和自噬体与溶酶体的融合, 加重了脑 I/R 损伤。此外, 过表达 Mfn2 不会导致 I/R 诱导的自噬溶酶体积累^[62], 表明 Mfn2 主要通过促进自噬来改善脑 I/R 损伤。Mfn2 的过表达也通过 AMPK/Sirt3 信号通路, 抑制氧化应激, 激活线粒体自噬, 并抑制线粒体凋亡^[63]。核受体亚家族 4 群 A 成员 1 (NR4A1) 通过抑制 Mfn2 介导的线粒体自噬和灭活 MAPK/ERK/CREB 信号通路促进脑缺血再灌注损伤^[64]。此外, 辅酶 Q10 和胰岛素预处理可显著降低再灌注脑内高血糖诱导的 Fis1 高表达和 Mfn2 低表达, 减少自噬, 减轻神经再灌注损伤^[65]。由此可见, 增强线粒体融合可能是通过激活自噬保护脑 I/R 损伤。尽管存在争议, 至少说明线粒体动力学可以通过调节线粒体自噬从而减轻脑损伤。

3.4 线粒体动力学与凋亡

线粒体介导脑 I/R 损伤的凋亡反应^[5,66]。在细胞凋亡的早期, 线粒体网络解体, 导致线粒体破碎。线粒体形态变化受多种蛋白的控制, 其中 Drp1 是线粒体分裂的主要调控因子^[67]。Kumar 等^[68]描述了神经元 I/R 损伤后线粒体分裂的两个不同阶段: 氧糖剥夺期间的分裂有助于通过线粒体自噬消除受损的线粒体, 在这个阶段没有发现细胞凋亡的激活和 caspase 的释放; 而复氧后的过度线粒体分裂与特定的细胞凋亡事件密切相关。在体内研究中, 脑缺血时线粒体融合发生减少; 大脑再灌注后, 观察到线粒体分裂的增加和线粒体融合的减少, 线粒体动力学受损引起脑细胞凋亡, 从而导致神经元细胞死亡^[68-69]。

到目前为止, 多项研究都描述了 Drp1 介导的分裂在脑 I/R 损伤中的不利影响^[36,70-73]。例如, 在大鼠大脑皮质细胞氧糖剥夺/再复氧实验中, Guo 等^[72]发现 Drp1 去泛素化增强, 与线粒体结合增加, 导致线粒体分裂, 细胞凋亡。内源性 Drp1 抑制剂 A 激酶锚定蛋白 1 (AKAP1) 的缺失, 引起线粒体中 Drp1 定位增加, 小线粒体增多, 最终导致再灌注大脑中动脉栓塞后梗死体积增加^[74]。Drp1 缺失可减轻糖剥夺/再复氧诱导的线粒体损伤和凋亡, parkin 通过促进 Drp1 的降解来保护小鼠神经母细胞瘤细

胞免于氧糖剥夺 / 再复氧损伤^[75]。抑制线粒体分裂的 miR-668 通过降低 Drp1 蛋白磷酸化水平和调节 NLPR3 信号转导, 改善 I 卒中大鼠再灌注后 caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达来减少神经元凋亡^[76]。采取亚低温^[77]或 PPAR γ 激动剂^[78]抑制 Drp1 的激活, 减少 Drp1(p-Drp1 S616)和细胞色素 C 的释放, 从而保持了神经细胞的完整性, 减少了 I/R 损伤造成的神经元坏死和凋亡。这些结果表明, 脑 I/R 损伤的神经保护作用与抑制线粒体分裂相关蛋白的激活以减少凋亡有关。值得注意的是, 多项研究证实, Mdivi-1 或坏死性凋亡抑制剂 necrostatin-1 抑制 Drp1 从细胞质到线粒体的易位, 上调 Bcl-2 表达、下调 Bax 和细胞色素 C 表达, 减轻脑 I/R 损伤中的线粒体分裂^[51,79-81]。Mdivi-1 抑制 Drp1 可以抑制心脏骤停引起的细胞色素 C 释放、凋亡诱导因子转运和 caspase-3 的激活, 减少复苏后脑 I/R 损伤的梗死体积和神经功能缺损^[82]。此外, 异丙酚通过降低 Drp1 和 p-Drp1(Ser637) 的表达以及 Drp1 与 Fis1 的结合抑制线粒体分裂^[39]。双特异性磷酸酶 -1 过表达通过 JNK-Mff 途径抑制 Mff 磷酸化, 从而抑制线粒体过度分裂, 减弱 I/R 损伤引起的神经元死亡^[83]。在线粒体融合方面, 褪黑素预处理通过抑制 Mst1-Hippo 途径激活 Mfn2 相关的融合, 最终维持线粒体功能并减轻再灌注介导的脑损伤^[84]。此外, 脑 I/R 损伤与 OPA1 相关线粒体融合缺陷密切相关^[84]。褪黑素补充通过激活 Yap-Hippo 通路增强了 OPA1 相关的线粒体融合, 最终降低脑再灌注应激^[84]。Lai 等^[53]研究证实, L-OPA1 的过度表达通过增强 Bcl-2 和减少 Bax 和 caspase-3 的激活减轻神经元凋亡, 改善线粒体形态和功能, 抑制线粒体生物功能缺陷和氧化, 保持线粒体完整性, OPA1-v1S1 处理减轻脑 I/R 对线粒体超微结构的破坏作用^[53]。上调 miR-326-5p 或下调信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 可通过上调 Mfn2 表达来抑制神经元凋亡, 减轻脑 I/R 损伤^[85]。因此, I/R 损伤的神经保护作用与线粒体动力学平衡和凋亡执行密切相关, 有望成为有效的治疗靶点。

4 研究展望

线粒体动力学对线粒体质量控制和线粒体稳态维持至关重要, 研究线粒体动力学涉及的疾病病理机制, 实质上就是探索分裂 / 整合蛋白在病理因素刺激下的功能变化与细胞结构、功能病变的相关性, 以揭示治疗的分子靶标。脑 I/R 损伤后发生的 Ca²⁺

超载以及 ROS 过量产生可引起分裂蛋白 / 融合蛋白失衡以及活性改变, 导致线粒体稳态失调, 后者又反馈性地促进前者的病理进程, 由此共同启动细胞自噬和凋亡程序, 造成难逆性脑损伤预后。因此, 研究线粒体动力学病理变化与脑 I/R 因素的联系, 寻求维持线粒体融合 / 分裂平衡的治疗入口, 将对提高脑 I/R 损伤治疗效果具有积极意义。

[参 考 文 献]

- [1] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia/reperfusion. *Compr Physiol*, 2016, 7: 113-70
- [2] Pundik S, Xu K, Sundararajan S. Reperfusion brain injury: focus on cellular bioenergetics. *Neurology*, 2012, 79: S44-51
- [3] Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, et al. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol*, 1998, 143: 351-8
- [4] Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, et al. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem*, 2004, 279: 18792-8
- [5] Wu M, Gu X, Ma Z. Mitochondrial quality control in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol*, 2021, 58: 5253-71
- [6] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46: 1650-67
- [7] Shi H, Liu K. Cerebral tissue oxygenation and oxidative brain injury during ischemia and reperfusion. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2007, 12: 1318-28
- [8] Schaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24: 351-71
- [9] Zhang W, Petrovic JM, Callaghan D, et al. Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1 β (IL-1 β) in astrocyte cultures. *J Neuroimmunol*, 2006, 174: 63-73
- [10] Shen L, Gan Q, Yang Y, et al. Mitophagy in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 687246
- [11] Whitley BN, Engelhart EA, Hoppins S. Mitochondrial dynamics and their potential as a therapeutic target. *Mitochondrion*, 2019, 49: 269-83
- [12] Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 79-99
- [13] Cerveny KL, Tamura Y, Zhang Z, et al. Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol*, 2007, 17: 563-9
- [14] Gao S, Hu J. Mitochondrial fusion: the machineries in and out. *Trends Cell Biol*, 2021, 31: 62-74
- [15] Alexander C, Votruba M, Pesch UE, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*, 2000, 26: 211-5
- [16] Cipolat S, Martins De Brito O, Dal Zilio B, et al. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion.

- Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 15927-32
- [17] Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*, 2009, 89: 799-845
- [18] Losón OC, Song Z, Chen H, et al. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 2013, 24: 659-67
- [19] Ortiz-Sandoval CG, Hughes SC, Dacks JB, et al. Interaction with the effector dynamin-related protein 1 (Drp1) is an ancient function of Rab32 subfamily proteins. *Cell Logist*, 2014, 4: e986399
- [20] Breitzig MT, Alleyn MD, Lockey RF, et al. A mitochondrial delicacy: dynamin-related protein 1 and mitochondrial dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315: C80-C90
- [21] Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ. The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol*, 2007, 178: 71-84
- [22] Zunino R, Braschi E, Xu L, et al. Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem*, 2009, 284: 17783-95
- [23] Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, et al. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*, 2007, 282: 11521-9
- [24] Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*, 2009, 18: R169-76
- [25] James DI, Parone PA, Mattenberger Y, et al. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*, 2004, 279: 36166
- [26] Gandre-Babbe S, van der Blik AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 2402-12
- [27] Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104: 181-8
- [28] Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda)*, 2008, 23: 115-23
- [29] Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 2010, 47: 122-9
- [30] Saotome M, Safiulina D, Szabadkai G, et al. Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 20728-33
- [31] Atkins K, Dasgupta A, Chen KH, et al. The role of Drp1 adaptor proteins MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission: implications for human disease. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130: 1861-74
- [32] Liang N, Wang P, Wang S, et al. Role of mitochondrial calcium uniporter in regulating mitochondrial fission in the cerebral cortexes of living rats. *J Neural Transm (Vienna)*, 2014, 121: 593-600
- [33] Qin T, Li N, Tan XF, et al. Works on heart, how about brain? Effect of hyperkalemia on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22: 2839-46
- [34] Zheng JH, Xie L, Li N, et al. PD98059 protects the brain against mitochondrial-mediated apoptosis and autophagy in a cardiac arrest rat model. *Life Sci*, 2019, 232: 116618
- [35] Yu S, Zheng S, Leng J, et al. Inhibition of mitochondrial calcium uniporter protects neurocytes from ischemia/reperfusion injury via the inhibition of excessive mitophagy. *Neurosci Lett*, 2016, 628: 24-9
- [36] Zhao L, Li S, Wang S, et al. The effect of mitochondrial calcium uniporter on mitochondrial fission in hippocampus cells ischemia/reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461: 537-42
- [37] Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins De Brito O, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 15803-8
- [38] Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP -dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep*, 2007, 8: 939-44
- [39] Wang H, Zheng S, Liu M, et al. The effect of propofol on mitochondrial fission during oxygen-glucose deprivation and reperfusion injury in rat hippocampal neurons. *PLoS One*, 2016, 11: e0165052
- [40] Ruiz A, Alberdi E, Matute C. Mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) protects neurons against excitotoxicity through the modulation of mitochondrial function and intracellular Ca²⁺ signaling. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 3
- [41] Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*, 2014, 2: 702-14
- [42] Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol*, 2015, 6: 524-51
- [43] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 298: 229-317
- [44] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS -induced ROS release. *Physiol Rev*, 2014, 94: 909-50
- [45] You H, Jin Y, Kang J, et al. Mitochondrial serine protease Omi/HtrA2 accentuates brain ischemia/reperfusion injury in rats and oxidative stress injury *in vitro* by modulating mitochondrial stress proteins CHOP and ClpP and physically interacting with mitochondrial fusion protein OPA1. *Bioengineered*, 2020, 11: 1058-70
- [46] Li S, Sun X, Xu L, et al. Baicalin attenuates *in vivo* and *in vitro* hyperglycemia-exacerbated ischemia/reperfusion injury by regulating mitochondrial function in a manner dependent on AMPK. *Eur J Pharmacol*, 2017, 815: 118-26
- [47] Klacanova K, Kovalska M, Chomova M, et al. Global brain ischemia in rats is associated with mitochondrial release and downregulation of Mfn2 in the cerebral cortex, but not the hippocampus. *Int J Mol Med*, 2019, 43: 2420-8

- [48] Wu S, Zhou F, Zhang Z, et al. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS J*, 2011, 278: 941-54
- [49] Kobashigawa S, Suzuki K, Yamashita S. Ionizing radiation accelerates Drp1-dependent mitochondrial fission, which involves delayed mitochondrial reactive oxygen species production in normal human fibroblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414: 795-800
- [50] Ferrari LF, Chum A, Bogen O, et al. Role of Drp1, a key mitochondrial fission protein, in neuropathic pain. *J Neurosci*, 2011, 31: 11404-10
- [51] Wang J, Wang P, Li S, et al. Mdivi-1 prevents apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in primary hippocampal cells via inhibition of reactive oxygen species-activated mitochondrial pathway. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23: 1491-9
- [52] Ma R, Ma L, Weng W, et al. DUSP6 SUMOylation protects cells from oxidative damage via direct regulation of Drp1 dephosphorylation. *Sci Adv*, 2020, 6: eaaz0361
- [53] Lai Y, Lin P, Chen M, et al. Restoration of L-OPA1 alleviates acute ischemic stroke injury in rats via inhibiting neuronal apoptosis and preserving mitochondrial function. *Redox Biol*, 2020, 34: 101503
- [54] Li Q, Zhang T, Wang J, et al. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444: 182-8
- [55] Tao J, Shen C, Sun Y, et al. Neuroprotective effects of pinocembrin on ischemia/reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 1003-10
- [56] Feng J, Chen X, Lu S, et al. Naringin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibiting peroxynitrite-mediated mitophagy activation. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 9029-42
- [57] Shen Z, Zheng Y, Wu J, et al. PARK2-dependent mitophagy induced by acidic postconditioning protects against focal cerebral ischemia and extends the reperfusion window. *Autophagy*, 2017, 13: 473-85
- [58] Wang H, Chen S, Zhang Y, et al. Electroacupuncture ameliorates neuronal injury by Pink1/Parkin-mediated mitophagy clearance in cerebral ischemia-reperfusion. *Nitric Oxide*, 2019, 91: 23-34
- [59] Feng J, Chen X, Shen J. Reactive nitrogen species as therapeutic targets for autophagy: implication for ischemic stroke. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21: 305-17
- [60] Feng J, Chen X, Guan B, et al. Inhibition of peroxynitrite-induced mitophagy activation attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 6369-86
- [61] Zhang Y, He Y, Wu M, et al. Rehmapicroside ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via attenuating peroxynitrite-mediated mitophagy activation. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 526-39
- [62] Peng C, Rao W, Zhang L, et al. Mitofusin 2 exerts a protective role in ischemia reperfusion injury through increasing autophagy. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46: 2311-24
- [63] Liu M, Li X, Huang D. Mfn2 overexpression attenuates cardio-cerebrovascular ischemia-reperfusion injury through mitochondrial fusion and activation of the AMPK/Sirt3 signaling. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 598078
- [64] Zhang Z, Yu J. NR4A1 promotes cerebral ischemia reperfusion injury by repressing Mfn2-mediated mitophagy and inactivating the MAPK-ERK-CREB signaling pathway. *Neurochem Res*, 2018, 43: 1963-77
- [65] Lu CJ, Guo YZ, Zhang Y, et al. Coenzyme Q10 ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury in hyperglycemic rats. *Pathol Res Pract*, 2017, 213: 1191-9
- [66] Achanta G, Sasaki R, Feng L, et al. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol γ . *EMBO J*, 2005, 24: 3482-92
- [67] Li MX, Dewson G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. *F1000Prime Rep*, 2015, 7: 42
- [68] Kumar R, Bukowski MJ, Wider JM, et al. Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 76: 68-75
- [69] Quintana DD, Garcia JA, Sarkar SN, et al. Hypoxia-reoxygenation of primary astrocytes results in a redistribution of mitochondrial size and mitophagy. *Mitochondrion*, 2019, 47: 244-55
- [70] Zhang Z, Yu J. Nurr1 exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury via modulating YAP-INF2-mitochondrial fission pathways. *Biochem Cell Biol*, 2018, 104: 149-60
- [71] Zhao H, Luo Y, Chen L, et al. Sirt3 inhibits cerebral ischemia-reperfusion injury through normalizing Wnt/ β -catenin pathway and blocking mitochondrial fission. *Cell Stress Chaperones*, 2018, 23: 1079-92
- [72] Guo C, Hildick KL, Luo J, et al. SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J*, 2013, 32: 1514-28
- [73] Geng C, Wei J, Wu C. Yap-Hippo pathway regulates cerebral hypoxia-reoxygenation injury in neuroblastoma N2a cells via inhibiting ROCK1/F-actin/mitochondrial fission pathways. *Acta Neurol Belg*, 2020, 120: 879-92
- [74] Flippo KH, Gnanasekaran A, Perkins GA, et al. AKAP1 protects from cerebral ischemic stroke by inhibiting Drp1-dependent mitochondrial fission. *J Neurosci*, 2018, 38: 8233-42
- [75] Tang J, Hu Z, Tan J, et al. Parkin protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion insult by promoting Drp1 degradation. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 8474303
- [76] He J, Zhang X. miR-668 inhibitor attenuates mitochondrial membrane potential and protects against neuronal apoptosis in cerebral ischemic stroke. *Folia Neuropathol*, 2020, 58: 22-9
- [77] Tang Y, Liu X, Zhao J, et al. Hypothermia-induced ischemic tolerance is associated with Drp1 inhibition in cerebral ischemia-reperfusion injury of mice. *Brain Res*, 2016, 1646: 73-83
- [78] Chuang YC, Lin TK, Yang DI, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ dependent pathway

- reduces the phosphorylation of dynamin-related protein 1 and ameliorates hippocampal injury induced by global ischemia in rats. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 44
- [79] Zhang N, Wang S, Li Y, et al. A selective inhibitor of Drp1, mdivi-1, acts against cerebral ischemia/reperfusion injury via an anti-apoptotic pathway in rats. *Neurosci Lett*, 2013, 535: 104-9
- [80] Li Y, Wang M, Wang S. Effect of inhibiting mitochondrial fission on energy metabolism in rat hippocampal neurons during ischemia/reperfusion injury. *Neurol Res*, 2016, 38: 1027-34
- [81] Ma X, Xie Y, Chen Y, et al. Post-ischemia mdivi-1 treatment protects against ischemia/reperfusion-induced brain injury in a rat model. *Neurosci Lett*, 2016, 632: 23-32
- [82] Li Y, Wang P, Wei J, et al. Inhibition of Drp1 by Mdivi-1 attenuates cerebral ischemic injury via inhibition of the mitochondria-dependent apoptotic pathway after cardiac arrest. *Neuroscience*, 2015, 311: 67-74
- [83] Xu P, Zhang G, Sha L, et al. DUSP1 alleviates cerebral ischaemia reperfusion injury via inactivating JNK-Mff pathways and repressing mitochondrial fission. *Life Sci*, 2018, 210: 251-62
- [84] Wei N, Pu Y, Yang Z, et al. Therapeutic effects of melatonin on cerebral ischemia reperfusion injury: role of Yap-OPA1 signaling pathway and mitochondrial fusion. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 203-12
- [85] Huang Y, Wang Y, Duan Z, et al. Restored microRNA-326-5p inhibits neuronal apoptosis and attenuates mitochondrial damage via suppressing STAT3 in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Nanoscale Res Lett*, 2021, 16: 63