

DOI: 10.13376/j.cblls/2023063

文章编号: 1004-0374(2023)04-0538-08

## 线粒体移植治疗心血管疾病研究进展

黄 涯<sup>#</sup>, 孙晓垒<sup>#</sup>, 孙爱军<sup>\*</sup>, 葛均波

(复旦大学附属中山医院心内科, 上海市心血管病研究所, 上海 200032)

**摘要:** 心血管疾病的发病率和死亡率逐年升高, 且在世界范围内的疾病负担中占据首位。线粒体功能异常可引起细胞到组织的病变, 多种心血管疾病被证实与线粒体功能障碍有关。线粒体移植 (mitochondria transplantation, MTP) 是一种新兴的治疗手段, 用于治疗因线粒体功能障碍引起的组织损伤。经过十多年从基础实验到临床试验的发展, MTP 在心血管疾病中的治疗作用逐渐被证实, 并且备受关注。该文就 MTP 的研究基础及其在心血管疾病中的研究进展进行综述。

**关键词:** 线粒体; 线粒体移植; 线粒体功能障碍; 心血管疾病

**中图分类号:** Q55; R363.2; R54 **文献标志码:** A

## Advances in research about mitochondria transplantation therapy for cardiovascular disease

HUANG Ya<sup>#</sup>, SUN Xiao-Lei<sup>#</sup>, SUN Ai-Jun<sup>\*</sup>, GE Jun-Bo

(Department of Cardiology, Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract:** The increasing morbidity and mortality of cardiovascular diseases are emerging as the major burden of diseases in the world. Mitochondrial dysfunction induces pathological changes from cell to tissue, which is proved to regulate various cardiovascular diseases. Mitochondria transplantation (MTP) represents a new therapeutic strategy used to treat tissues injury caused by mitochondrial dysfunction. With the development from basic experiments to clinical trials for last decade, MTP has gradually been verified as an efficient therapeutic strategy for cardiovascular diseases, attracting considerable attention. This article reviews the research basis of MTP and its application in cardiovascular diseases.

**Key words:** mitochondria; mitochondria transplantation; mitochondrial dysfunction; cardiovascular disease

心血管疾病是当前最主要的社会健康负担之一, 在全中国乃至全世界都极大地危害着人类的健康和生存<sup>[1]</sup>。当前, 临床上对于心血管疾病治疗的手段尚不能完全满足需求, 需探索更多的治疗方法。线粒体作为细胞的能量源和信号转导中心, 在细胞的损伤中发挥了非常核心的作用; 线粒体功能障碍与细胞损伤互为因果, 与数百种临床疾病有关; 对线粒体功能障碍进行有效干预从而促进细胞的健康和生存, 已经被证明是一种可靠的治疗手段<sup>[2]</sup>。新兴的线粒体移植 (mitochondrial transplantation, MTP) 疗法, 将新鲜的具备呼吸能力的健康线粒体移植到受体细胞中, 从而挽救因线粒体功能障碍而产生的

细胞损伤<sup>[3]</sup>。这种治疗手段从诞生伊始就备受关注和争议, 但随着研究的深入, 线粒体移植作为一种治疗线粒体损伤相关疾病的治疗方法, 逐步显现出重要的应用价值和广阔的应用前景。本文就线粒体移植的研究基础及其在心血管疾病中的研究进展进

收稿日期: 2022-11-09; 修回日期: 2022-12-29

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(81725002); 国家自然科学基金面上项目(82270264); 国家自然科学基金基础科学中心项目(T2288101)

<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup>通信作者: E-mail: sun.aijun@zs-hospital.sh.cn

行综述。

## 1 线粒体移植的研究基础

线粒体移植是指用健康的线粒体替代或补偿受损细胞内的线粒体, 从而达到影响细胞代谢和信号转导、促进细胞生存的治疗手段<sup>[4]</sup>。线粒体无疑是十分重要的细胞器, 它在细胞中的功能和地位决定了其是细胞器移植中最受关注的主体。成功的线粒体移植需要考虑诸多方面的影响因素, 例如如何保持线粒体的活性、如何使线粒体内化等。因此, 研究者必须了解线粒体的功能与调节机制, 以及线粒体分离纯化、保存和移植的研究方法等。

### 1.1 线粒体生理及病理生理学研究进展

#### 1.1.1 线粒体的功能

线粒体是真核细胞中的重要细胞器, 由内、外两个独立完整的膜结构组成<sup>[5]</sup>, 并包含一个母系遗传的基因组<sup>[6]</sup>。线粒体的功能多种多样且相互关联。线粒体是能量感知和生成中心, 也是代谢信号中心<sup>[7]</sup>。线粒体内膜上的电子呼吸传递链在氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 作用下生成细胞所需 90% 的 ATP<sup>[8]</sup>。除了 ATP 的产生外, 由 OXPHOS 产生的膜内电化学电位也是细胞器的一个重要特征。膜电位用于其他必要的线粒体功能, 如线粒体蛋白输入或用于触发分子水平上的变化, 通过改变线粒体行为以应对线粒体功能障碍<sup>[9]</sup>。线粒体呼吸也会产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 能够影响信号通路稳态, 以控制细胞增殖和分化, 并有助于适应性应激信号通路的激活, 如缺氧等<sup>[10]</sup>。线粒体在动态分裂融合中参与了细胞自噬、凋亡等<sup>[11-12]</sup>, 并与内质网一起调控细胞内钙稳态<sup>[13]</sup>。线粒体在细胞内是一个动态的网络, 并与细胞内其他体系密切关联<sup>[14]</sup>。

#### 1.1.2 线粒体功能障碍及其影响

线粒体功能障碍一方面源于先天的线粒体 DNA 突变, 先天的线粒体缺陷毫无疑问会导致各种各样复杂的疾病, 自 1950 年首例诊断以来, 临床上始终未能寻找到解决人类线粒体缺陷性遗传疾病的有效治疗手段<sup>[15]</sup>, 如神经退行性疾病、心肌病、遗传性代谢综合征、癌症和肥胖等。另一方面, 线粒体功能障碍源于后天的压力应激性损伤, 应激损伤通常来自理化因素, 如缺血缺氧、高糖等<sup>[16]</sup>。应激压力会导致线粒体质量减少, 从而能量衰竭, 同时, 被破坏的电子呼吸传递链生成过量的 ROS, 对细胞内的关键成分如脂质、核酸、蛋白质等产生损

伤, 最终导致细胞的整体损失。此外, 线粒体作为信号转导中心, 受损时激活自噬或凋亡信号, 促进细胞死亡<sup>[17]</sup>。

#### 1.1.3 线粒体质量控制机制

线粒体在细胞器网络中占据核心地位, 细胞内已经进化出一整套成熟的质量控制机制来保证线粒体网络的正常运转。线粒体质量控制包括蛋白质检查点和细胞器检查点两个方面<sup>[18]</sup>。蛋白质检查点是指构成和维持线粒体自身的生物发生和正常功能的蛋白质, 主要是指 1 000 多种核编码的线粒体相关蛋白。这些蛋白前体在转位进入线粒体前, 受到内质网质量控制体系的监控, 例如, 蛋白质的合成代谢受到内质网相关降解 (endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD)、线粒体相关降解 (mitochondria associated degradation, MAD)、泛素 - 蛋白酶体系统 (ubiquitin proteasome system, UPS) 的调控等。细胞器检查点则着重于维持线粒体在细胞器水平上的稳态, 调控线粒体的分裂融合、受损线粒体的清除等。目前的研究结果认为, 受损线粒体的清除主要依赖于线粒体自噬和线粒体分泌囊泡的作用, 在细胞应激可逆状态下, 受损线粒体被排出胞外<sup>[19]</sup>。

#### 1.2 自发细胞间线粒体转移

线粒体可以在细胞之间转移已经成为共识<sup>[20]</sup>。最初, 研究者在外泌体蛋白质组中发现了线粒体来源的蛋白; 后续研究认为, 细胞利用囊泡分泌受损线粒体可能是线粒体的质量控制机制。随着研究的逐步发展, 线粒体的细胞间转移现象被证实。研究发现间充质干细胞移植中存在线粒体从干细胞向靶器官的细胞转移, 并且这种现象可能是间充质干细胞移植发挥主要机制之一; 同时, 线粒体的自发转移被证实增强了线粒体功能障碍的间充质干细胞的修复<sup>[21-22]</sup>。随后, 在肥胖疾病模型中发现, 脂肪细胞和巨噬细胞利用细胞间线粒体转移作为免疫代谢串扰的机制, 调节代谢稳态, 而肥胖减少了从脂肪细胞到巨噬细胞的细胞间线粒体转移<sup>[23]</sup>。脂肪细胞还通过快速有效地释放小的细胞外囊泡 (sEV) 来响应线粒体压力, sEV 含有具有呼吸能力但被氧化损伤的线粒体颗粒, 这些颗粒进入循环并被心肌细胞吸收, 引起 ROS 应激反应, 从而导致心脏中的补偿性抗氧化信号转导, 保护心肌细胞免受急性氧化应激损伤<sup>[24]</sup>。血小板也能通过囊泡分泌线粒体从而挽救受损组织器官<sup>[25]</sup>。多项研究都证实肿瘤细胞和非肿瘤细胞之间的线粒体转移现象<sup>[26]</sup>。最新研究发现肿瘤细胞能够使用纳米管“偷走”免

疫细胞的线粒体, 削弱免疫应答, 增强免疫逃逸, 从而增强了自身的生存和侵袭性<sup>[27-28]</sup>。缺血会导致星形胶质细胞线粒体转移到神经元中, 并与小鼠的神经保护作用增强相关<sup>[29]</sup>。这些研究充分表明, 线粒体的细胞间自发转移是广泛存在的, 并且涉及细胞连接、细胞融合、囊泡、纳米管等多种机制。此外, 有研究者发现在血液中存在游离的线粒体<sup>[30]</sup>, 但这一研究存在争议, 证据还不充分。但无论如何, 线粒体在细胞间的运输已经被证实。

### 1.3 外源性线粒体的内化

线粒体可以在细胞间转移并不能作为外源性线粒体被细胞内化并整合进受体细胞线粒体网络中的直接证据。线粒体移植研究的一个关键问题就是如何证明外源性线粒体可被内化, 并在被内化过程中保持活性, 在内化以后能发挥保护性作用。Masuzawa等<sup>[31]</sup>为了验证线粒体的内化, 使用单克隆抗人线粒体抗体通过免疫反应实验来区分实验动物自身的线粒体和移植的人源线粒体, 并且检测到线粒体没有与任何溶酶体或自噬体标志物共定位, 初步证明了外源性线粒体的内化。Pacak等<sup>[32]</sup>的研究则提示线粒体内化是心肌细胞肌动蛋白依赖性的, 他们通过使用药物阻滞剂选择性地阻断网格蛋白介导的内吞作用和肌动蛋白介导的内吞、大型胞饮、隧道纳米管机制, 证实移植的线粒体通过肌动蛋白依赖的途径内化, 从而挽救细胞功能, 并且能够取代宿主细胞中受损的线粒体DNA。

### 1.4 线粒体移植的方法

#### 1.4.1 线粒体的分离纯化

差速离心对细胞器的分离作用和线粒体体外分离基础缓冲体系的构建, 使得线粒体的纯化分离和体外保存越来越容易。在通常情况下, 研究者使用剪刀对组织进行切碎; 也有实验室报道称, 为了尽量缩短线粒体体外分离的时间, 需要改进这一程序, 即使用更高效的切片机对组织进行分离。在缓冲体系中, 研究者力求保证线粒体外膜的完整性并维持线粒体的呼吸能力。所有分离线粒体的方法的共同点是所有等渗分离缓冲液(均质缓冲液和洗涤缓冲液)使用非常低的离子强度, 并使用高浓度的 $Mg^{2+}$ 等物质以避免线粒体聚集。此外, 所有缓冲液都需要使用高纯度的反应物和具有导电性的双蒸水, 并应用钙离子的螯合剂, 使得缓冲体系中的钙污染降到最低。线粒体纯化分离技术的飞速进步给体外线粒体移植提供了可能<sup>[33]</sup>。线粒体分离后的计数使用血细胞计数法或者灵敏度较高的计数器, 由于线粒

体的体积较小, 很难精确定量, 故而在研究过程中, 进行2~3次的定量实验后, 可以通过对线粒体来源的组织或者细胞进行定量从而确定一个较为稳定的数量范围<sup>[34]</sup>。

#### 1.4.2 线粒体的标记追踪

进行线粒体相关研究需要标记线粒体以通过成像的方式追踪线粒体的动态变化。线粒体移植研究通过对线粒体的标记, 以最终确认外源性移植线粒体是否被整合进受体细胞的能量网络。目前, 最常用的线粒体标记法就是使用Invitrogen市售的线粒体特异性荧光染料MitoTracker进行单独的或者多重标记。MitoTracker大致分为两种: 一种利用线粒体膜电位标记活细胞内的线粒体, 类似于罗丹明等; 另一种则具有化学反应性, 与线粒体中的硫醇基团相连, 能永久地与线粒体结合, 因此在细胞死亡或被固定后仍然存在。不同的MitoTracker染料可用于标记活细胞和固定细胞中的线粒体<sup>[35]</sup>。此外, 有研究报道过使用 $^{18}F$ -罗丹明6G和氧化铁纳米颗粒标记线粒体<sup>[36]</sup>。检测ROS生成的线粒体超氧化物指示剂MitoSox也不失为一种有效的线粒体标记方法, 利用病毒载体转染荧光标记的线粒体蛋白也是标记线粒体的一种更加稳定、减少争议的方法<sup>[36]</sup>, 但这类方法可能需要更高的成本。

#### 1.4.3 线粒体的移植方式

线粒体人工移植技术是指将新鲜分离的线粒体移植到受损组织或细胞中, 使其能够替换受损的线粒体, 发挥健康线粒体的正常功能, 以促进细胞的生存。线粒体的人工移植在递送方式和移植时间上均有差异, 应根据实际应用选择合适的方式。在时间上存在缺血前注射<sup>[37]</sup>、缺血后再灌注前注射<sup>[38]</sup>、缺血再灌注后延迟注射<sup>[39]</sup>的差异。已有的几项研究表明不同的注射时间对于线粒体移植的治疗效果似乎并无较大影响, 但这种结论的正确性仍有待验证。事实上, 有无血流恢复对于区域内不同细胞的周期、增殖和代谢的影响有着显著差异。线粒体移植在时间上的差异效应有可能被移植部位、移植方式的影响所掩盖。在递送方式上, 原位注射、静脉输注、冠脉输注等方式都能够使分离的线粒体移植到相应组织中, 并且不同的移植方式触发不同的保护效应。例如, 冠脉输注的线粒体独立地保护了内皮功能, 从而发挥了改善血流的作用<sup>[38]</sup>。此外, 还有报道显示线粒体可经鼻给药<sup>[40]</sup>。近期的研究发现, 靶向肽装载的线粒体移植也具有明显的缺血损伤修复作用<sup>[41]</sup>。线粒体似乎能从各种途径接触组织

细胞, 并被迅速内化, 这种线粒体内化的机制尚不完全明确。在体外实验中, 使分离的线粒体间接或直接与细胞进行共孵育, 确实出现明显的细胞内吞现象。但值得注意的是, 通过不同方式递送线粒体时, 是否存在效率和疗效上的差异尚无确切研究证据, 在推进临床转化时应该进一步深入研究。

## 2 线粒体移植与心血管疾病

线粒体的功能决定了线粒体在高耗能器官(如心、脑、肾等)中的重要地位, 线粒体功能障碍与心脑血管疾病紧密相关, 因此, 线粒体移植研究最先应用在这些器官损伤中。2021年, Hayashida等<sup>[42]</sup>对线粒体移植的在体实验研究进行了一项荟萃分析, 发现自2009年首次应用在新西兰兔缺血再灌注心脏模型上之后, 研究者们在小鼠和大鼠中建立了5个针对脑损伤的实验模型, 包括4个局灶性脑缺血模型和1个创伤性脑损伤模型; 在猪、家兔和小鼠中建立了9个心脏缺血再灌注实验模型, 包括8个局灶性缺血模型和1个全心缺血模型; 在猪和大鼠中建立了2个肾局灶性缺血实验模型。在其他实验模型中也有线粒体移植的研究, 包括急性肢体缺血<sup>[43]</sup>、急性肺损伤<sup>[44-45]</sup>、肾脏缺血再灌注损伤<sup>[46]</sup>、脊髓缺血后的神经损伤<sup>[47]</sup>。此外, 线粒体移植在器官移植缺血再灌注损伤中的作用也受到关注<sup>[48]</sup>。这些研究包含的移植类型有自体、同种异体移植和异种移植。总之, 线粒体移植在各个脏器和不同疾病中的应用仍然在不停拓展, 下文仅就线粒体移植在常见心血管疾病中的应用进行总结。

### 2.1 线粒体移植与心肌缺血再灌注

心肌缺血使线粒体受损, 因而当冠脉血流恢复时, 已经受损的线粒体不能再正常代谢恢复的氧气和底物。心肌缺血导致的线粒体功能障碍在再灌注时进一步加重了细胞的损伤, 最终致使细胞死亡。2009年, McCully团队在兔缺血损伤心脏模型中首次验证了线粒体移植的保护作用。他们在兔心脏缺血后、再灌注前, 从供体兔的健康左心室组织中分离出有活力的、有呼吸能力的线粒体, 然后注射到离体心脏的缺血区, 从而使得缺血心脏的ATP含量增加, 梗死面积减少, 心肌细胞损失减少和心脏功能改善<sup>[3]</sup>。2013年, Masuzawa等<sup>[31]</sup>再次使用新西兰兔制备心肌缺血再灌注损伤模型, 并成功移植人源线粒体, 其研究结果证实移植的线粒体被心肌细胞内化, 且移植的线粒体增强了心肌耗氧量、高能磷酸盐的合成、细胞因子的诱导, 这些机制对保持

心肌能量、细胞活力和增强梗死后心脏功能非常重要。2016年, Cowan等<sup>[36]</sup>再次使用兔心肌缺血再灌注模型进行线粒体移植的研究, 这项研究除直接向缺血心肌注射线粒体外, 增加了在再灌注开始时通过冠状动脉进行血管灌注的线粒体移植方式, 相对于原位注射较为聚集的线粒体分布, 后者在短时间内使线粒体扩散到整个心脏; 研究结果证实, 无论是直接注射还是血管灌注都能够使得自体线粒体移植发挥心脏保护作用; 相比较而言, 原位注射使得目标缺血区域有更高浓度的线粒体, 而血管灌注线粒体具有更小的侵入性, 能够减少医源性损伤。2017年, Kaza等<sup>[49]</sup>为推进线粒体移植的临床应用, 对约克郡猪进行了左侧小型开胸手术, 切除胸大肌并取出骨骼肌组织用于分离自体线粒体, 通过暂时结扎回旋支制造心肌缺血危险区, 随后注射了自体线粒体; 4周后的检测结果显示, 线粒体移植显著减轻了梗死面积和心肌酶的异常表达。2019年, Shin等<sup>[38]</sup>再次使用猪缺血再灌注模型探索了冠状动脉内移植的方式, 他们对麻醉状态的动物建立了进入左冠状动脉(LCA)的血管造影通路, 并进行一系列关于安全性和有效性的实验探索后, 成功进行了冠脉内导管注射的线粒体输送移植, 其研究结果表明冠状动脉内线粒体传递可显著改善心肌功能和梗死面积, 并独立作用于内皮系统发挥了恢复血流、增强灌注的保护作用。2020年, Blitzer等<sup>[39]</sup>在上一项研究的基础上, 在约克郡猪模型中证实缺血再灌注后延迟性冠状动脉内注射自体线粒体可明显减少心肌梗死面积, 增加局部和整体心肌功能。同年, Guariento等<sup>[37]</sup>的研究结果显示, 在约克郡猪模型中进行缺血前的冠状动脉内自体线粒体移植发挥了同样的心脏保护作用。2021年, 我们团队的研究也显示乙醛脱氢酶2(ALDH2)激活剂Alda-1显著增强了线粒体移植对小鼠心肌缺血再灌注的疗效, 表明ALDH2的激活能增强移植的线粒体功能<sup>[50]</sup>。

在基础实验研究的基础上, McCully和Emani团队领衔开展了线粒体移植治疗心肌缺血再灌注损伤的临床试验研究。在2017年发表的首次临床应用, 因缺血再灌注相关的心肌功能障碍而无法脱离体外膜肺氧合(ECMO)支持的5名危重患者接受了从自身腹直肌分离的线粒体移植治疗<sup>[51]</sup>。此次临床试验结果显示, 在接受线粒体移植的5名患者中, 4名受试者显示心室功能改善, 并在第二天成功脱离了ECMO支持, 该研究表明线粒体移植在改善

人类缺血再灌注损伤后的心肌功能障碍中的潜在作用。2021年,该团队再次发表了自体线粒体移植治疗儿童难治性心源性休克的研究<sup>[52]</sup>,纳入的心脏手术后儿童患者在冠状动脉损伤后进行了成功的血运重建,但因缺血再灌注损伤仍然需要ECMO支持,而线粒体移植能使患者脱离ECMO支持,再次表明自体线粒体移植与ECMO成功分离和心室应变增强显著相关。

## 2.2 线粒体移植与糖尿病心脏病

2型糖尿病可引起线粒体功能障碍,增加心肌对缺血-再灌注损伤的易感性,McCully团队使用Zucker糖尿病脂肪(ZDF fa/fa)大鼠进行体外缺血再灌注模型构建,在再灌注前,通过主动脉插管输送不同来源的线粒体到冠状动脉中,ZDF鼠和非ZDF鼠的自体线粒体都发挥了保护作用,其中非ZDF鼠的保护效应更为显著<sup>[53]</sup>。这项研究表明线粒体移植显著增强了糖尿病大鼠心脏缺血后心肌功能的恢复,显著减轻了糖尿病大鼠心脏心肌细胞的损伤。此外,另一项研究表明,线粒体在不同性别中具有明显的二态性,妊娠晚期糖尿病大鼠的新生儿后代心肌细胞在应答健康心肌细胞线粒体移植时,其呼吸能力显著增强,但只有雄性新生鼠的心肌细胞凋亡被线粒体转移抑制<sup>[54]</sup>。这项研究为线粒体移植的探究方向提供了新的视角,性别、年龄、危险因素等更多的方面应该在以后的研究中被考虑到。

## 2.3 线粒体移植与心力衰竭

右心室肥厚和心脏功能衰竭是导致心脏发病和死亡的主要原因。线粒体功能障碍导致的心肌细胞凋亡是向右心室肥厚和衰竭进展的一个关键事件。Friehs实验室试图通过局部心肌内注射健康肌肉自体线粒体治疗心力衰竭,他们发现在猪的右心衰模型中注射取自小腿的自体线粒体能延长受压力负荷的右心室的生理适应,并通过减少心肌细胞凋亡来保持心肌的收缩力<sup>[55]</sup>。事实上,线粒体功能障碍在心力衰竭中普遍存在,例如,线粒体呼吸链复合体I的柠檬酸合酶标准化活性在终末期衰竭心肌中降低了28%<sup>[56]</sup>;此外,在非缺血性心力衰竭和阿霉素诱导的心肌损伤中,也存在典型的线粒体紊乱<sup>[56]</sup>。研究发现,M2样巨噬细胞的适应性转移对非缺血性心力衰竭有益作用,其作用可能与线粒体转移有关;在体外,可以通过直接和间接共培养M2样巨噬细胞方法将线粒体转移到心肌细胞上,促进心肌损伤的修复<sup>[57]</sup>。

## 3 线粒体移植发挥作用的可能机制

线粒体移植在心血管方面的主要应用是对缺血再灌注损伤的保护。在作用机制方面,目前认为,移植的线粒体会增加细胞ATP含量和耗氧量,而外源性的ATP并不能产生这一效应,并且外源性ATP的治疗作用也十分有限,远远达不到线粒体移植的效果,这可能与ATP的特性有关——ATP在体外非常不稳定、在体内的半衰期也很短。基于此,有理由认为缺血区域ATP产生的增加是移植的线粒体整合进受体细胞线粒体网络的结果<sup>[36,58]</sup>。同时,研究表明线粒体移植后受体细胞的线粒体融合蛋白表达升高<sup>[36]</sup>,这进一步支持之前研究中所论证的线粒体移植可以取代受损的线粒体DNA并挽救细胞功能<sup>[32]</sup>。同时,线粒体移植后心肌蛋白质组学的变化和差异表达蛋白的增加反映了能量水平和代谢恢复的增加。兔缺血后心肌组织蛋白质组学和富集分析的研究表明,与对照组相比,线粒体移植心脏的线粒体蛋白质组、能量代谢物的生成和细胞呼吸均显著增加<sup>[31]</sup>。线粒体移植也被证明会导致炎症细胞因子的下调和趋化因子的上调,这些趋化因子在血管生成、细胞迁移、抑制心肌细胞凋亡和增强心脏功能恢复中发挥关键作用。与正常心肌组织相比,在自体线粒体移植治疗的局部缺血的兔心脏组织中,肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、IL-10、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和高敏C反应蛋白(hsCRP)等炎症标志物水平显著降低<sup>[3,31]</sup>。

## 4 线粒体移植存在的问题

线粒体移植治疗心肌缺血再灌注损伤的研究问世于2009年,这项开创性的研究发表在美国生理学会旗下《心脏与循环生理学》杂志上,该杂志是国际最权威的专业期刊之一,完成该项研究工作的James D. McCully团队来自享誉全球的哈佛医学院波士顿儿童医院。尽管如此,这项研究在近十年来仍然遭受了多次尖锐的质疑<sup>[59-64]</sup>。以Bertero等<sup>[63]</sup>为代表的学者们基于两个方面对线粒体移植研究提出了质疑。首先,质疑者认为,线粒体无法在细胞外液的钙浓度中生存下来。钙是人体内第五大元素,钙离子是细胞内第二信使,在细胞内或者细胞间传递生命活动信号,参与细胞收缩、运动、分裂等过程的调控。人体中绝大部分的钙(99%)存在于骨骼和牙齿之中,剩余1%左右的溶解钙以游离钙的形式存在于细胞内外<sup>[65]</sup>。然而,钙离子在细胞内外的

解离程度差异巨大, 细胞外液(组织间液、血浆、淋巴、脑脊液等)中约 50% 的钙被解离, 而细胞内液中仅有 0.1% 甚至更少的钙解离, 因此, 细胞外液的钙离子浓度通常  $> 1 \text{ mmol/L}$ , 比细胞内液中的钙离子浓度 ( $< 100 \text{ nmol/L}$ ) 大约高 10 000 倍<sup>[66]</sup>。这种巨大的浓度差使得细胞对于钙离子的浓度变化极其敏感, 也使得钙离子的调节作用通过其浓度的变化来实现<sup>[67]</sup>。在细胞膜和细胞器等多种钙离子维持机制的参与下, 细胞内的钙离子浓度和分布保持着动态平衡, 也被称为钙稳态<sup>[68]</sup>。细胞应激会打破钙稳态, 细胞内钙库内质网在应激压力下大量释放钙离子, 会引起线粒体渗透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放。mPTP 是位于线粒体膜上由多种蛋白组成的非选择性通道, 在正常生理情况下, 呈间断性开放, 且具有可逆性, 这使得线粒体内膜除了一些选择性的小分子代谢物和离子外, 对其他物质是没有通透性的。但是当 mPTP 持续开放时, 线粒体内膜允许分子量小于 1.5 kDa 的任何分子自由通过, 线粒体内膜屏障破坏, 线粒体渗透性水肿, 内膜破裂, 引起细胞死亡<sup>[69]</sup>。由此可见, 钙稳态平衡的打破对于线粒体而言可能是一场灭顶之灾。

其次, 质疑者认为, 即使线粒体能在细胞外环境中存活, 那么又如何保证移植的线粒体能够产生供心肌细胞利用的足以支持细胞收缩的 ATP 呢? 毕竟, 直接给予外源性 ATP 对于心肌损伤并无显著作用<sup>[3]</sup>。因此, 要保证线粒体移植的显著效果必须使足够多的线粒体通过细胞膜来促进宿主细胞产生 ATP, 而到目前为止, 所有证明线粒体在保持活性的状态下被吞入细胞内部的实验证据, 都不能完全使人信服。这里存在的主要质疑是, 目前的线粒体标记技术并不能直接证明被吞入细胞内部的线粒体还保持着活性, 只能通过定位和功能学检测来间接证明。

针对上述质疑, McCully 团队作出了回应, 除了重申自己的实验证据以外, 他们回应中最关键的反驳证据是一项研究发现在血液中存在具有活性的游离线粒体<sup>[30]</sup>, 证明线粒体可以在高钙离子环境中存活。随后, 另一项研究对此进行了验证, 证实血液中确有游离线粒体存在, 但其功能是否完整仍有待商榷<sup>[70]</sup>。此外, 另有一些较早期的研究证据支持线粒体的确在高钙离子环境中受损, 但并非完全不能存活, 且其损伤程度受到时间等其他因素的影响<sup>[71-74]</sup>。线粒体的移植时间和条件都是可修饰改变

的, 因此, 线粒体移植作为一种治疗手段仍然具备其合理性, 值得进一步的探索。

## 5 结论与展望

线粒体是一种特殊的细胞器, 充当代谢中枢和信号平台, 参与一系列重要的细胞过程, 如 OXPHOS、ATP 合成、脂肪酸氧化、钙缓冲、磷脂合成等。当线粒体受损时, 线粒体功能障碍会促进细胞的死亡。减少线粒体损伤, 或者调控线粒体损伤后的相关机制, 或者移植健康的线粒体都可能是改善靶器官损伤, 产生更加有效的干预方式的研究方向。关于分离线粒体能否在移植环境中存活并保持活性, 从而最终实现有效移植, 仍然需要更多的实验证据来支持。但是, 线粒体自然转移的广泛发生, 提示线粒体人工转移的可行性值得进一步被探索。在线粒体自然转移现象的基础上, 使用成熟的线粒体分离和移植技术, 提升线粒体资源再配置的效率, 具有极大的临床治疗潜力和应用开发价值。

### [参 考 文 献]

- [1] Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 2020, 396: 1204-22
- [2] Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in health and disease. *Cells*, 2019, 8: 680
- [3] McCully JD, Cowan DB, Pacak CA, et al. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296: H94-105
- [4] Park A, Oh M, Lee SJ, et al. Mitochondrial transplantation as a novel therapeutic strategy for mitochondrial diseases. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 4793
- [5] Montes de Oca Balderas P. Mitochondria-plasma membrane interactions and communication. *J Biol Chem*, 2021, 297: 101164
- [6] Sasaki T, Sato M. Degradation of paternal mitochondria via mitophagy. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2021, 1865: 129886
- [7] Chandel NS. Evolution of mitochondria as signaling organelles. *Cell Metab*, 2015, 22: 204-6
- [8] Judge A, Dodd MS. Metabolism. *Essays Biochem*, 2020, 64: 607-47
- [9] Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, et al. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*, 2018, 552: 50-9
- [10] Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2018, 1859: 940-50
- [11] Chan DC. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 235-59
- [12] Yoo SM, Jung YK. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Mol Cells*, 2018, 41: 18-26

- [13] Szymanski J, Janikiewicz J, Michalska B, et al. Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1576
- [14] Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, et al. Mitochondria as a cellular hub in infection and inflammation. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 11338
- [15] Sharma P, Sampath H. Mitochondrial DNA integrity: role in health and disease. *Cells*, 2019, 8: 100
- [16] Ham PB 3rd, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging. *Prog Neurobiol*, 2017, 157: 92-116
- [17] Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21: 85-100
- [18] Ng MYW, Wai T, Simonsen A. Quality control of the mitochondrion. *Dev Cell*, 2021, 56: 881-905
- [19] Towers CG, Wodetzki DK, Thorburn J, et al. Mitochondrial-derived vesicles compensate for loss of LC3-mediated mitophagy. *Dev Cell*, 2021, 56: 2029-42.e5
- [20] Valenti D, Vacca RA, Moro L, et al. Mitochondria can cross cell boundaries: an overview of the biological relevance, pathophysiological implications and therapeutic perspectives of intercellular mitochondrial transfer. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 8312
- [21] Paliwal S, Chaudhuri R, Agrawal A, et al. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. *J Biomed Sci*, 2018, 25: 31
- [22] Wang J, Liu X, Qiu Y, et al. Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Hematol Oncol*, 2018, 11: 11
- [23] Brestoff JR, Wilen CB, Moley JR, et al. Intercellular mitochondria transfer to macrophages regulates white adipose tissue homeostasis and is impaired in obesity. *Cell Metab*, 2021, 33: 270-82.e8
- [24] Crewe C, Funcke JB, Li S, et al. Extracellular vesicle-based interorgan transport of mitochondria from energetically stressed adipocytes. *Cell Metab*, 2021, 33: 1853-68.e11
- [25] Ma H, Jiang T, Tang W, et al. Transplantation of platelet-derived mitochondria alleviates cognitive impairment and mitochondrial dysfunction in db/db mice. *Clin Sci (Lond)*, 2020, 134: 2161-75
- [26] Zampieri LX, Silva-Almeida C, Rondeau JD, et al. Mitochondrial transfer in cancer: a comprehensive review. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 3245
- [27] Yu Z, Hou Y, Zhou W, et al. The effect of mitochondrial transplantation therapy from different gender on inhibiting cell proliferation of malignant melanoma. *Int J Biol Sci*, 2021, 17: 2021-33
- [28] Saha T, Dash C, Jayabalan R, et al. Intercellular nanotubes mediate mitochondrial trafficking between cancer and immune cells. *Nat Nanotechnol*, 2022, 17: 98-106
- [29] Sun C, Liu X, Wang B, et al. Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. *Theranostics*, 2019, 9: 3595-607
- [30] Al Amir Dache Z, Otandault A, Tanos R, et al. Blood contains circulating cell-free respiratory competent mitochondria. *FASEB J*, 2020, 34: 3616-30
- [31] Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 304: H966-82
- [32] Pacak CA, Preble JM, Kondo H, et al. Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. *Biol Open*, 2015, 4: 622-6
- [33] Rendon DA. Important methodological aspects that should be taken into account during the research of isolated mitochondria. *Anal Biochem*, 2020, 589: 113492
- [34] Kubat GB, Ulger O, Akin S. Requirements for successful mitochondrial transplantation. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35: e22898
- [35] Chazotte B. Labeling mitochondria with MitoTracker dyes. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011, 2011: 990-2
- [36] Cowan DB, Yao R, Akurathi V, et al. Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection. *PLoS One*, 2016, 11: e0160889
- [37] Guariento A, Blitzer D, Doulamis I, et al. Preischemic autologous mitochondrial transplantation by intracoronary injection for myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2020, 160: e15-29
- [38] Shin B, Saeed MY, Esch JJ, et al. A novel biological strategy for myocardial protection by intracoronary delivery of mitochondria: safety and efficacy. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4: 871-88
- [39] Blitzer D, Guariento A, Doulamis IP, et al. Delayed transplantation of autologous mitochondria for cardioprotection in a porcine model. *Ann Thorac Surg*, 2020, 109: 711-9
- [40] Alexander JF, Seua AV, Arroyo LD, et al. Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits. *Theranostics*, 2021, 11: 3109-30
- [41] Sun X, Chen H, Gao R, et al. Intravenous transplantation of an ischemic-specific peptide-TPP-mitochondrial compound alleviates myocardial ischemic reperfusion injury. *ACS Nano*, 2023, 17: 896-909
- [42] Hayashida K, Takegawa R, Shoaib M, et al. Mitochondrial transplantation therapy for ischemia reperfusion injury: a systematic review of animal and human studies. *J Transl Med*, 2021, 19: 214
- [43] Orfany A, Arriola CG, Doulamis IP, et al. Mitochondrial transplantation ameliorates acute limb ischemia. *J Vasc Surg*, 2020, 71: 1014-26
- [44] Pang YL, Fang SY, Cheng TT, et al. Viable allogeneic mitochondria transplantation improves gas exchange and alveolar-capillary permeability in rats with endotoxin-induced acute lung injuries. *Int J Med Sci*, 2022, 19: 1036-46
- [45] Moskowitsova K, Orfany A, Liu K, et al. Mitochondrial transplantation enhances murine lung viability and recovery after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 318: L78-88

- [46] Doulamis IP, Guariento A, Duignan T, et al. Mitochondrial transplantation by intra-arterial injection for acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2020, 319: F403-13
- [47] Fang SY, Roan JN, Lee JS, et al. Transplantation of viable mitochondria attenuates neurologic injury after spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 161: e337-47
- [48] Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int*, 2004, 66: 514-7
- [49] Kaza AK, Wamala I, Friehs I, et al. Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 153: 934-43
- [50] Sun X, Gao R, Li W, et al. Alda-1 treatment promotes the therapeutic effect of mitochondrial transplantation for myocardial ischemia-reperfusion injury. *Bioact Mater*, 2021, 6: 2058-69
- [51] Emani SM, Piekarski BL, Harrild D, et al. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 154: 286-9
- [52] Guariento A, Piekarski BL, Doulamis IP, et al. Autologous mitochondrial transplantation for cardiogenic shock in pediatric patients following ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 162: 992-1001
- [53] Doulamis IP, Guariento A, Duignan T, et al. Mitochondrial transplantation for myocardial protection in diabetic hearts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2020, 57: 836-45
- [54] Louwagie EJ, Larsen TD, Wachal AL, et al. Mitochondrial transfer improves cardiomyocyte bioenergetics and viability in male rats exposed to pregestational diabetes. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 2382
- [55] Weixler V, Lapusca R, Grangl G, et al. Autogenous mitochondria transplantation for treatment of right heart failure. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 162: e111-21
- [56] Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, et al. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40: 2174-81
- [57] Liu Y, Wu M, Zhong C, et al. M2-like macrophages transplantation protects against the doxorubicin-induced heart failure via mitochondrial transfer. *Biomater Res*, 2022, 26: 14
- [58] Shin B, Cowan DB, Emani SM, et al. Mitochondrial transplantation in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 982: 595-619
- [59] Chernyak BV. Mitochondrial transplantation: a critical analysis. *Biochemistry (Mosc)*, 2020, 85: 636-41
- [60] Ibanez B, Villena-Gutierrez R. Cardiac mitochondrial transplantation: the force awakens. *J Am Coll Cardiol*, 2021, 77: 1089-92
- [61] Bertero E, Maack C, O'Rourke B. Mitochondrial transplantation in humans: "magical" cure or cause for concern? *J Clin Invest*, 2018, 128: 5191-4
- [62] Abdullah M, Kaushal S. Commentary: recharging cellular batteries of the failing right heart: mitochondrial transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2021, 162: e128-9
- [63] Bertero E, O'Rourke B, Maack C. Mitochondria do not survive calcium overload during transplantation. *Circ Res*, 2020, 126: 784-6
- [64] Bertero E, O'Rourke B, Maack C. Response by Bertero et al to letter regarding article, "Mitochondria do not survive calcium overload". *Circ Res*, 2020, 126: e58-9
- [65] Endo M. Calcium ion as a second messenger with special reference to excitation-contraction coupling. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100: 519-24
- [66] Bagur R, Hajnoczky G. Intracellular  $Ca^{2+}$  sensing: its role in calcium homeostasis and signaling. *Mol Cell*, 2017, 66: 780-8
- [67] Baird GS. Ionized calcium. *Clin Chim Acta*, 2011, 412: 696-701
- [68] Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*, 2007, 131: 1047-58
- [69] Bonora M, Pinton P. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front Oncol*, 2014, 4: 302
- [70] Stier A. Human blood contains circulating cell-free mitochondria, but are they really functional? *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2021, 320: E859-63
- [71] Clark MA, Shay JW. Mitochondrial transformation of mammalian cells. *Nature*, 1982, 295: 605-7
- [72] King MP, Attardi G. Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell*, 1988, 52: 811-9
- [73] Katrangi E, D'Souza G, Boddapati SV, et al. Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human rho0 cells can improve respiratory function. *Rejuvenation Res*, 2007, 10: 561-70
- [74] Kesner EE, Saada-Reich A, Lorberboum-Galski H. Characteristics of mitochondrial transformation into human cells. *Sci Rep*, 2016, 6: 26057