

# 基于线粒体的缺血性脑卒中病理机制研究进展

姜辰 综述 叶建林 审校

无锡市儿童医院药剂科,江苏省无锡市 214023

**摘要:**缺血性脑卒中严重危害人类健康,其病理机制日益受到人们的广泛关注。线粒体作为细胞中参与能量代谢的重要细胞器,参与调节细胞内环境与稳态,在缺血性脑卒中的发生发展过程中发挥重要作用。本文从线粒体结构、功能、相关蛋白表达与活性出发,对其在缺血性脑卒中病理机制所涉及的能量障碍、氧化应激、神经炎症以及神经细胞死亡等方面进行综述,为缺血性脑卒中的治疗策略提供潜在的帮助。

**关键词:**线粒体;缺血性脑卒中;能量障碍;氧化应激;细胞死亡

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2017.03.023

缺血性脑卒中是严重危害人类健康的重大疾病,已成为继缺血性心脏病之后的第二大致死原因。据统计,中国每年发生脑中风的病人达数百万,且大部分病人丧失劳动力并存在生活无法自理现象<sup>[1]</sup>。然而,临床上尚缺乏理想的治疗药物,目前唯一被 FDA 批准的治疗急性缺血性脑中风的药物仅有重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)<sup>[2]</sup>,因此总结其病理机制并寻找新型治疗方案便尤为重要。研究表明,缺血性脑卒中并非简单的脑部缺血,而是由脑部缺血引起的一系列病理变化,如能量障碍、兴奋性氨基酸毒性、氧化应激、神经炎症以及神经细胞死亡等<sup>[3,4]</sup>,且各种病理机制之间相互关联,构成复杂的信号网络,最终导致级联性损伤。脑缺血再灌注损伤模型常常被用来模拟临床上的缺血性脑卒中,其损伤机制从时间上可分为三个阶段:急性缺血带来的脑部氧分压降低及能量剥夺,恢复供血后钙离子超载诱导的神经炎症以及再灌注后期神经细胞的死亡及再生<sup>[5]</sup>。

线粒体作为能量代谢的重要细胞器,广泛存在于除哺乳动物成熟红细胞以外的所有真核细胞,包括神经元和胶质细胞<sup>[6]</sup>。线粒体中富含大量酶类,如三羧酸循环基本酶类、呼吸链酶系以及 ATPase 复合体。这些酶不仅参与细胞氧化磷酸化和 ATP 合成,同时调节细胞内钙离子与活性氧,维持细胞稳态。当缺血性脑卒中发生时,线粒体维持的动态平衡被打破,相关信号通路被激活,最终诱导神经细胞级联性损伤<sup>[7]</sup>。

## 1 线粒体与能量障碍

能量障碍往往出现在脑缺血再灌注损伤的早期阶段,即急性缺血期。由于血管闭塞,神经细胞正常生理活动所需要氧气和能量物质不能被及时送达,细胞不能通过正常途径产生足够的 ATP 供能,从而导致代谢紊乱。因此,能量障碍往往被认为是线粒体发挥最直接且最重要作用的环节。脑缺血诱导的病理损伤在此阶段主要表现为线粒体结构损伤与酶功能异常。研究显示,在大鼠大脑中动脉闭塞模型中,线粒体出现明显肿胀,且伴随内外膜间隙变大,基质密度降低等现象<sup>[8]</sup>,同时线粒体膜流动性降低、通透性增大、膜电位呈降低趋势<sup>[9]</sup>。该现象不仅存在于体内模型中,在氧糖剥夺模型的原代大鼠神经细胞中同样得到了类似的发现<sup>[10]</sup>。

能量障碍不仅损伤线粒体结构,同时影响位于线粒体内膜的呼吸链复合体酶系与 ATPase 复合体。NADH-泛醌还原酶,作为参与电子传递第一步的复合体,在脑缺血早期,其活性受钙离子超载而被显著抑制。研究发现,钙离子可通过三条途径抑制 NADH-泛醌还原酶<sup>[11]</sup>:①直接作用于复合酶 I;②通过影响线粒体基质中  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  改变其渗透作用;③通过钙离子诱导的氧化应激抑制复合酶 I。然而,在脑缺血再灌注损伤条件下,复合酶 I 受到抑制的具体原因目前并未得到完全阐释。琥珀酸-泛醌还原酶在缺血性脑卒中的研究相对较少,但其重要性不可忽略。研究显示,琥珀酸-泛醌还

收稿日期:2016-11-24;修回日期:2017-03-13

作者简介:姜辰(1989-),女,药师,硕士,主要从事神经类药物作用机制研究。

通信作者:叶建林(1964-),男,副主任药师,本科,主要从事医院药学研究。E-mail:jiangch890503@126.com。

原酶亚基 b 缺失的果蝇即使呼吸链复合体中的其余复合酶完整无损,依然表现对氧气高度敏感,并且寿命减少<sup>[12]</sup>。细胞色素 c 还原酶组成线粒体呼吸链中第三个复合物。在细胞氧剥夺模型中,线粒体内的细胞色素 c 还原酶的活性受到显著抑制。除细胞色素 c 还原酶,泛醌-细胞色素 c 还原酶复合物还存在两个其它调节因子<sup>[13]</sup>:  $Q_{outer}$  和  $Q_{inner}$ , 通过使用  $Q_{inner}$  抑制剂 antimycin A 和  $Q_{outer}$  抑制剂 myxothiazol, Wu 等<sup>[13]</sup> 发现在受损大鼠皮质神经元中存在着不同类别的氧化剂以及 PKC 的同工酶参与连接  $Q_{inner}$  和  $Q_{outer}$  的抑制与电压门控型钙离子通道,证实了复合物 III 中这两个调节因子在脑损伤中对于维持线粒体正常功能的重要作用。细胞色素 c 氧化酶在缺血性脑卒中中同样显著被抑制。Racay 等<sup>[14]</sup> 研究发现,缺血再灌注损伤直接抑制大鼠海马区细胞中细胞色素 c 氧化酶的活性。上述结果同样在临床病例被证实,显示缺血时线粒体内膜呼吸链酶系平衡被打破,氧化磷酸化效率降低,从而导致线粒体功能受损<sup>[15]</sup>。除此之外,由于缺血导致 ATP 逐渐耗竭,水解 ATP 的 ATPase 活力亦显著下降。有研究学者通过药物改善 ATPase 发现可在一定程度上修复受损神经细胞<sup>[16]</sup>,这也为基于线粒体治疗缺血性脑卒中提供了思路。

## 2 线粒体与氧化应激

随着血流逐渐恢复供应,氧化应激代替能量障碍成为下一阶段的主要病理变化。正常情况下,线粒体产生的自由基维持在相对较低的水平。当出现脑缺血损伤时,受损神经细胞产生的过量氧自由基无法被超氧化物歧化酶和谷胱甘肽消除,氧化还原平衡被打破,导致线粒体膜的脂质过氧化并破坏线粒体膜结构,最终抑制呼吸链以及 ATP 的合成。

相比于永久性脑缺血,脑缺血再灌注引起的氧化应激更加严重。研究表明,大鼠前额叶短期缺血可降低胞内超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶以及谷胱甘肽还原酶等 3 种酶的活力。再灌注 24 h 后,线粒体中这三种酶的活力均出现更显著下降<sup>[17]</sup>,这一结果同样在体外实验中得以证实<sup>[18]</sup>。Noh 等<sup>[19]</sup> 研究如何调控脑缺血再灌注损伤诱导的线粒体氧化应激时发现,辅酶 Q10 作为电子传递链中重要的一个辅助因子,既可以阻断视神经乳头中胶质细胞的激活,又可显著降低超氧化物歧化酶 2 及血红素加氧酶 1 的蛋白表达,同时还可以增加线粒体数目、体积及密度,改善线粒体并修复氧化

应激损伤。机制研究表明,辅酶 Q10 改善线粒体氧化损伤的机制主要通过促进线粒体内膜蛋白 (mitofilin) 以及过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 的表达,从而增强线粒体的生物合成<sup>[19]</sup>。

## 3 线粒体与炎症

脑缺血再灌注损伤诱导的氧自由基的异常除了激活氧化应激,还破坏线粒体膜上的钙离子泵并造成钙离子的累积,从而导致神经细胞炎症。炎症是机体对于刺激的一种防御反应,当神经细胞钙离子超载时,星形胶质细胞与小胶质细胞被激活并释放促炎性细胞因子。促炎性细胞因子可被转移至脑上皮细胞并进一步破坏血脑屏障,造成更严重的脑损伤<sup>[20]</sup>。近年来,研究人员发现了许多与胶质细胞激活相关的线粒体膜蛋白。线粒体膜蛋白 TSPO (translocator protein 18 kDa) 就是其中一种,位于线粒体外膜,表达于小胶质细胞,随着小胶质细胞的激活而激活,临床上常见于缺血早期的梗死区<sup>[21]</sup>。除此之外,线粒体解偶联蛋白-2 (UCP-2) 同样被证明在脑缺血再灌注损伤诱导的炎症中发挥重要作用<sup>[22]</sup>。该蛋白是线粒体内膜蛋白,可消除线粒体内膜两侧的跨膜质子浓度差,减慢氧化磷酸化过程,从而降低 ROS 的生成。Haines 等<sup>[22]</sup> 发现,UCP-2 基因敲除的小鼠对于脑缺血诱导的损伤相比于野生型小鼠更严重,这与 UCP-2 所调节的下游抗氧化基因及炎症因子密切相关。

## 4 线粒体与细胞死亡

缺血性脑卒中诱导的另一损伤形式表现为细胞死亡,在根据不同时期不同脑区又可详细分为细胞坏死、细胞自噬及细胞凋亡。无论细胞自噬亦或细胞凋亡,线粒体功能缺失都是诱因之一。在局灶性脑缺血再灌注模型中,自噬细胞通常出现在 12 h 再灌注后的半影区<sup>[23]</sup>。随着再灌注时间的增加,细胞自噬减少而细胞凋亡增加。线粒体自噬是由溶酶体的膜直接包裹长寿命蛋白等,并使其在溶酶体内降解的过程,其主要特点为线粒体膜电位的变化。线粒体自噬选择性地受到某些自噬特异性基因的调控,如 Atg8、Atg32 及 Atg11 等<sup>[24]</sup>。脑缺血再灌注损伤后期,线粒体中 ATP 合成恢复,神经细胞自噬主要由 Atg6 的同源蛋白 Beclin1 所调节<sup>[25]</sup>。由于 Beclin1 的 BH3 结构域还可结合细胞凋亡调节因子 Bcl-2,减弱其与其它自噬相关蛋白的结合<sup>[26]</sup>,因此在一定程度上由 Beclin1 诱导的神经细

胞自噬可以看做是细胞凋亡的一种负向调节机制,通过平衡细胞自噬与细胞凋亡达到保护神经细胞的作用。然而,也有研究发现某些自噬抑制剂(如 3-甲基腺嘌呤)或自噬相关基因(Atg7)的敲除可以促进缺血再灌注损伤诱导的细胞色素 c 的释放及下游凋亡的激活<sup>[27]</sup>,具体机制尚未充分阐释。

相比于细胞自噬,细胞凋亡往往发生在脑损伤后期的缺血区与半影区<sup>[23]</sup>。通常情况,细胞凋亡由功能失调的线粒体产生的氧化自由基所诱导。明星分子 p53 在缺血性脑卒中里发挥重要作用<sup>[28]</sup>,可通过调控 Bax 通路,PUMA 通路以及 PIDD 通路影响线粒体依赖的细胞凋亡。Bax 作为 Bcl-2 的协同蛋白,是最经典的线粒体依赖的神经细胞凋亡通路。在脑缺血损伤诱导下,Bax 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著增加<sup>[29]</sup>,其转录受到 p53 与 JNK 的直接调控<sup>[30]</sup>。除此之外,线粒体中的 Bax 还可以通过与 Bcl-2 家族蛋白的相互作用,促进细胞色素 c 的释放,从而诱导细胞凋亡<sup>[31]</sup>。PUMA 信号通路在神经细胞凋亡中可受到 p53 的直接调控。通过 PUMA 上的 BH3 结构域,PUMA 与线粒体中 Bcl-2 家族成员相互作用,影响细胞凋亡<sup>[32]</sup>。PIDD 是 p53 的另一个下游通路,其 N 端与 C 端均可自溶解化,产生剪切体。PIDD 剪切体可直接激活 caspase-2,剪切 Bid,并破坏其与 Bax 的相互结合,最终影响凋亡<sup>[33]</sup>。值得指出的是,并不是所有的凋亡均受到 p53 转录水平的直接调控,事实上,有些调控并不依赖于转录水平的调节,如线粒体中的 p53 可直接与 Bcl-XL 及 Bcl-2 相互作用,促进细胞色素 c 的释放及 caspase 的激活<sup>[34]</sup>。除此之外,线粒体依赖的细胞凋亡中还存在着许多调控分子,如 CK2 和 NADPH 氧化酶等<sup>[35]</sup>。

综上所述,线粒体在缺血性脑卒中的不同阶段以及对级联反应中不同机制都发挥着重要的作用,从 ATP 的合成障碍到氧自由基的生成与释放,再到细胞死亡,线粒体的形态与功能都与脑损伤息息相关。因此,线粒体与缺血性脑卒中的相关性研究,不仅可以充分阐释脑卒中的发生发展机制,而且可以对脑卒中的创新性治疗策略提供潜在的指导与帮助。

#### 参 考 文 献

- [1] Yu F, Lu J, Li Z, et al. Correlation of Plasma Vascular Endothelial Growth Factor and Endostatin Levels with Symptomatic Intra- and Extracranial Atherosclerotic Stenosis in a Chinese Han Population [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017 [Epub ahead of print].
- [2] Chtaou N, Rachdi L, Midaoui AE, et al. Intravenous thrombolysis with rt-PA in stroke: experience of the moroccan stroke unit [J]. Pan Afr Med J, 2016, 24: 207.
- [3] Sanganalath SK, Gopal P, Parker JR, et al. Global cerebral ischemia due to circulatory arrest: insights into cellular pathophysiology and diagnostic modalities [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 426(1-2): 111-127.
- [4] Saad MA, Abdelsalam RM, Kenawy SA, et al. Ischemic preconditioning and postconditioning alleviates hippocampal tissue damage through abrogation of apoptosis modulated by oxidative stress and inflammation during transient global cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Chem Biol Interact, 2015, 232: 21-29.
- [5] Shen MH, Zhang CB, Zhang JH, et al. Electroacupuncture Attenuates Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Middle Cerebral Artery Occlusion of Rat via Modulation of Apoptosis, Inflammation, Oxidative Stress, and Excitotoxicity [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 9438650.
- [6] Ho MS. Neuroglial Crosstalk by Mitochondria [J]. Neurosci Bull, 2017, 33(1): 111-112.
- [7] Ham PB 3rd, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging [J]. Prog Neurobiol, 2016 [Epub ahead of print].
- [8] Li J, Yu W, Li XT, et al. The effects of propofol on mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Neuropharmacology, 2014, 77: 358-368.
- [9] Rau TF, Lu Q, Sharma S, et al. Oxygen glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures results in alterations in carnitine homeostasis and mitochondrial dysfunction [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e40881.
- [10] Li J, Ma X, Yu W, et al. Reperfusion promotes mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia in rats [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46498.
- [11] Borutaite V, Toleikis A, Brown GC. In the eye of the storm: mitochondrial damage during heart and brain ischaemia [J]. FEBS J, 2013, 280(20): 4999-5014.
- [12] Walker DW, Hajek P, Muffat J, et al. Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a Drosophila mitochondrial complex II mutant [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(44): 16382-16387.
- [13] Junemann S, Heathcote P, Rich PR. On the mechanism of quinol oxidation in the bc1 complex [J]. J Biol Chem, 1998, 273(34): 21603-21607.
- [14] Racay P, Tatarkova Z, Drgova A, et al. Ischemia-reperfusion induces inhibition of mitochondrial protein synthesis and

- cytochrome c oxidase activity in rat hippocampus [ J ]. *Physiol Res*, 2009, 58 ( 1 ) : 127-138.
- [ 15 ] Ilzecka J. Decreased cerebrospinal fluid cytochrome c levels in patients with amyotrophic lateral sclerosis [ J ]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2007, 67 ( 3 ) : 264-269.
- [ 16 ] Li LH, Tian XR, Hu ZP. The key target of neuroprotection after the onset of ischemic stroke: secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 1 [ J ]. *Neural Regen Res*, 2015, 10 ( 8 ) : 1271-1278.
- [ 17 ] Zhao P, Zhou R, Zhu XY, et al. Matrine attenuates focal cerebral ischemic injury by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in mice [ J ]. *Int J Mol Med*, 2015, 36 ( 3 ) : 633-644.
- [ 18 ] Li J, Qu Y, Chen D, et al. The neuroprotective role and mechanisms of TERT in neurons with oxygen-glucose deprivation [ J ]. *Neuroscience*, 2013, 252 : 346-358.
- [ 19 ] Noh YH, Kim KY, Shim MS, et al. Inhibition of oxidative stress by coenzyme Q10 increases mitochondrial mass and improves bioenergetic function in optic nerve head astrocytes [ J ]. *Cell Death Dis*, 2013, 4 : e820.
- [ 20 ] O'Donnell JC, Jackson JG, Robinson MB. Transient Oxygen/Glucose Deprivation Causes a Delayed Loss of Mitochondria and Increases Spontaneous Calcium Signaling in Astrocytic Processes [ J ]. *J Neurosci*, 2016, 36 ( 27 ) : 7109-7127.
- [ 21 ] Thiel A, Heiss WD. Imaging of microglia activation in stroke [ J ]. *Stroke*, 2011, 42 ( 2 ) : 507-512.
- [ 22 ] Haines BA, Mehta SL, Pratt SM, et al. Deletion of mitochondrial uncoupling protein-2 increases ischemic brain damage after transient focal ischemia by altering gene expression patterns and enhancing inflammatory cytokines [ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30 ( 11 ) : 1825-1833.
- [ 23 ] Tian F, Deguchi K, Yamashita T, et al. In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model [ J ]. *Autophagy*, 2010, 6 ( 8 ) : 1107-1114.
- [ 24 ] Tang YC, Tian HX, Yi T, et al. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia [ J ]. *Protein Cell*, 2016, 7 ( 10 ) : 699-713.
- [ 25 ] Liu W, Shang G, Yang S, et al. Electroacupuncture protects against ischemic stroke by reducing autophagosome formation and inhibiting autophagy through the mTORC1-ULK1 complex-Beclin1 pathway [ J ]. *Int J Mol Med*, 2016, 37 ( 2 ) : 309-318.
- [ 26 ] Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart [ J ]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95 : 19-25.
- [ 27 ] Zhang X, Yan H, Yuan Y, et al. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance [ J ]. *Autophagy*, 2013, 9 ( 9 ) : 1321-1333.
- [ 28 ] Hong LZ, Zhao XY, Zhang HL. p53-mediated neuronal cell death in ischemic brain injury [ J ]. *Neurosci Bull*, 2010, 26 ( 3 ) : 232-240.
- [ 29 ] Cheng X, Hou Z, Sun J, et al. Protective effects of Tongxinluo on cerebral ischemia/reperfusion injury related to Connexin 43/Calpain II/Bax/Caspase-3 pathway in rat [ J ]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198 : 148-157.
- [ 30 ] Niizuma K, Endo H, Chan PH. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival [ J ]. *J Neurochem*, 2009, 109 ( Suppl 1 ) : 133-138.
- [ 31 ] Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, et al. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96 ( 10 ) : 5752-5757.
- [ 32 ] Campbell ST, Carlson KJ, Buchholz CJ, et al. Mapping the BH3 Binding Interface of Bcl-xL, Bcl-2, and Mcl-1 Using Split-Luciferase Reassembly [ J ]. *Biochemistry*, 2015, 54 ( 16 ) : 2632-2643.
- [ 33 ] Wan C, Jiang J, Mao H, et al. Involvement of upregulated p53-induced death domain protein (PIDD) in neuronal apoptosis after rat traumatic brain injury [ J ]. *J Mol Neurosci*, 2013, 51 ( 3 ) : 695-702.
- [ 34 ] Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria [ J ]. *Mol Cell*, 2003, 11 ( 3 ) : 577-590.
- [ 35 ] Kim GS, Jung JE, Narasimhan P, et al. Release of mitochondrial apoptogenic factors and cell death are mediated by CK2 and NADPH oxidase [ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32 ( 4 ) : 720-730.