

## 综述

## 活性氧介导心肌缺血再灌注损伤的研究进展

韦亚忠, 薛晓梅, 何 斌

上海交通大学附属胸科医院重症医学科, 上海 200092

**[摘要]** 经皮冠状动脉介入治疗技术广泛开展, 使得急性心肌梗死得到有效治疗, 但由此引发的心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 却严重影响着患者的预后。在急性心肌梗死的缺血再灌注期, 氧化应激反应可严重损害心脏功能。过量的线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) 可影响线粒体的通透性, 造成其内部特定分子的氧化损伤, 是导致 MIRI 的主要驱动因素。同时, mtROS 还可以促进心肌梗死后的炎症信号转导、调控心肌细胞凋亡并参与心肌梗死后的心肌重塑。该文就心肌梗死缺血再灌注期 mtROS 的产生机制及降低 mtROS 在心肌梗死治疗中的临床价值与应用前景进行综述。

**[关键词]** 心肌缺血再灌注损伤; 线粒体; 活性氧

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.06.021 **[中图分类号]** R541.4 **[文献标志码]** A

## Research progress in myocardial ischemia-reperfusion injury mediated by mitochondrial reactive oxygen species

WEI Ya-zhong, XUE Xiao-mei, HE Bin

Department of Critical Care Medicine, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200092, China

**[Abstract]** With the development of percutaneous coronary intervention technology, acute myocardial infarction has been effectively treated, but the myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) has seriously affected the prognosis of patients. During the ischemia-reperfusion period of acute myocardial infarction, oxidative stress can seriously damage cardiac function. Excessive mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) can affect mitochondrial permeability, and cause oxidative damage of specific molecules inside the mitochondria, which is the main driving factor for MIRI. In addition, mtROS can promote the signal transduction of inflammatory after myocardial infarction, regulate myocardial cell apoptosis, and participate in myocardial remodeling after myocardial infarction. This article reviews the mechanism of mtROS production in MIRI period and the clinical value and application prospect of reducing mtROS in the treatment of myocardial infarction.

**[Key words]** myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI); mitochondria; reactive oxygen species (ROS)

在全球, 每年有数百万人发生急性心肌梗死, 该疾病是导致慢性心力衰竭的首要原因。尽管冠状动脉介入手术和搭桥手术已广泛开展于临床, 但由再灌注治疗本身引发的心肌损伤严重影响着患者的预后<sup>[1]</sup>。恢复冠状动脉血流后心肌组织遭受的损害被称为心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)。研究<sup>[2]</sup>显示, 急性心肌梗死后的心脏损害是由缺血和 MIRI 共同作用, 其中 MIRI 对心脏的损伤甚至可能远高于缺血。目前, 临床上还没有针对 MIRI 的有效干预策略。因此, 深入探究 MIRI 的分子机制, 发现其新型靶向标志物, 进而开发新的治疗策略、改善心肌梗死患者的预后成为研究者关注的焦点。有研究<sup>[3]</sup>发现, 线粒

体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) 能够调节线粒体的功能、代谢和翻译后修饰, 而线粒体结构与功能的改变在 MIRI 发病机制中发挥了重要作用。基于此, 本文就 mtROS 在 MIRI 中的产生和作用机制, 及其在心肌梗死治疗中的临床价值与应用前景进行综述。

## 1 mtROS 稳态的调控

在心肌细胞中, 线粒体体积占比 30%~40%, 是活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的主要来源<sup>[4]</sup>。mtROS 是线粒体中细胞呼吸与代谢的副产物, 包括羟基

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (82072199); 上海申康医院发展中心第二轮临床三年行动计划 (SHDC2020CR3084B)。

**[作者简介]** 韦亚忠 (1995—), 男, 硕士生; 电子信箱: weiyazhong@sjtu.edu.cn。

**[通信作者]** 何 斌, 电子信箱: bin\_he@sjtu.edu.cn。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82072199); Clinical Research Plan of Shanghai Hospital Development Center (SHDC2020CR3084B)。

**[Corresponding Author]** HE Bin, E-mail: bin\_he@sjtu.edu.cn。

**[网络首发]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210524.0953.004.html> (2021-05-25 19:05:06)。



自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )、超氧阴离子 ( $\text{O}_2^-$ ) 自由基等自由基成分和  $\text{H}_2\text{O}_2$  等非自由基成分。在线粒体氧化磷酸化过程中, 大部分  $\text{O}_2$  通过四电子还原转化为  $\text{H}_2\text{O}$ , 而少量  $\text{O}_2$  通过单电子还原转化为超氧化物, 后经超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 转化为  $\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。超氧化物并非强氧化性分子, 但可使铁硫簇相关酶失活并释放出游离铁, 还可通过芬顿反应将  $\text{H}_2\text{O}_2$  转化为氧化性最强的  $\cdot\text{OH}$ 。此外,  $\text{O}_2^-$  自由基由过量电子与分子氧反应生成, 被认为是 ROS 的初始形式, 可促进  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\cdot\text{OH}$  等其他形式的 mtROS 生成<sup>[3]</sup>。

抗氧化剂介导的 mtROS 分解, 对调节 mtROS 的稳态具有重要作用。如  $\text{O}_2^-$  自由基可先由心脏线粒体中大量的锰超氧化物歧化酶转化为  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 而后再经谷胱甘肽过氧化物酶分解为  $\text{H}_2\text{O}$ 。除上述抗氧化剂外, 过氧化氢酶、非酶活性 ROS 清除剂细胞色素 C 和辅酶 Q 也可发挥清除 mtROS 的作用。研究<sup>[5]</sup>显示, 线粒体抗氧化剂系统中酶的活性取决于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP) 的氧化还原状态, 因此线粒体内的氧化代谢情况和 ROS 稳态密切相关。

## 2 调控 mtROS 在心肌梗死后 MIRI 中产生的关键分子

局部微环境缺氧导致的线粒体改变是心肌缺血再灌注期间 mtROS 过度产生的主要原因, 但是其产生的确切机制及生物拓扑特性仍然有待探索, 具体总结与讨论如下。

### 2.1 P66SHC

P66SHC 为哺乳动物原癌基因 *Shc* 编码的蛋白, 在调节细胞凋亡、线粒体功能和促进 mtROS 生成中发挥着重要作用。P66SHC 广泛表达于心肌细胞的胞质、内质网和线粒体中。P66SHC 可氧化细胞色素 C, 抑制单分子氧还原反应, 促进生成 mtROS<sup>[6]</sup>。除了产生 mtROS 外, 它还可以抑制抗氧化酶的转录表达, 进一步促进 mtROS 在线粒体内的蓄积<sup>[7]</sup>。对 *Shc* 敲除小鼠心肌缺血再灌注模型进行观察后发现, 心肌细胞内乳酸脱氢酶的表达减少, 心肌组织脂质过氧化物的水平降低。研究<sup>[8]</sup>显示, 抗氧化剂和 *Shc* 的小分子干扰 RNA 可阻断 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶诱导的内皮细胞 ROS 生成, 并减轻内皮细胞舒缩反应损伤, 继而进一步证实 P66SHC 是调控心脏氧化应激反应的关键蛋白。

### 2.2 NADPH 氧化酶 4

NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4) 是一种表达于线粒体外膜的跨膜结合酶, 可通过跨膜转运电子消耗氧分子产生 ROS。研究<sup>[9]</sup>提示, NOX4 与心肌细胞中的 mtROS 生成密切相关。在整体敲除 *Nox2* 和 *Nox4* 表达的小鼠心肌缺血再灌注模型中发现, 小鼠缺血再灌注后心肌损伤有明显缓解<sup>[10]</sup>。此外, 特异性敲除小鼠心肌细胞 *Nox4*, 可减少再灌注后心肌 mtROS 的生成、缩减心肌梗死面积<sup>[11]</sup>; 相反, 在 NOX4 过表达的转基因小鼠心肌缺血再灌注模型中, 再灌注后的氧化应激反应加剧、心肌梗死面积增加<sup>[12]</sup>。上述研究表明, NOX4 可特异性作用于心肌细胞, 介导 mtROS 的生成并加剧 MIRI。

### 2.3 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1

聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 (poly ADP-ribose polymerase, PARP-1) 是存在于真核细胞内的一种蛋白质翻译后修饰酶。轻度激活该酶可促进 DNA 修复, 而过度的氧化应激反应引起的线粒体 DNA 损伤可导致 PARP-1 过度活化, 继而使细胞内大量的  $\text{NAD}^+$  和 ATP 被消耗。研究<sup>[13]</sup>证实, 在 MIRI 期间基因损伤和氧化应激反应能够通过激活 PARP-1 促进 mtROS 的生成; 同时, ROS 可诱导线粒体膜转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 开放, 进而激活 PARP-1。此外, 在 MIRI 期间线粒体钙蛋白酶介导的凋亡诱导因子的释放, 也能够激活 PARP-1, 从而加剧线粒体的氧化应激反应。另研究<sup>[14]</sup>发现, 抑制 PARP1 的表达能够抑制丝裂原活化蛋白激酶通路的活化, 并抑制 mtROS 的产生, 从而稳定线粒体的膜电位, 保护线粒体的功能。

## 3 mtROS 在 MIRI 中的作用

在发生心肌梗死后, 心肌细胞氧合不足首先会抑制线粒体呼吸链的电子传递, 损害细胞氧化代谢和磷酸化过程, 从而导致 mtROS 迅速增加; ATP 生成不足会抑制 ATP 依赖的离子交换过程, 影响  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交换体的反向作用, 从而导致缺血过程中心肌细胞胞质  $\text{Ca}^{2+}$  含量增加。同时, 线粒体钙单向转运蛋白异常活化也会导致线粒体内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度上升。在高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  和 mtROS 的作用下, mPTP 将异常开放, 使线粒体内膜通透性突然增加。上述情况将导致线粒体膜电位下降, ATP 合成酶水解以及 mtROS 和促细胞凋亡因子释放入胞质, 进而使线粒体发生肿胀、外膜破裂, 最终导致细胞死亡<sup>[15]</sup>。

释放入胞质的 mtROS 还可激活临近线粒体的 mPTP 和阴离子通道。mPTP 的开放会触发线粒体外膜破裂, 导致膜内细胞色素 C、细胞凋亡诱导因子和核酸内切酶 G 等释放入胞质, 进一步促进心肌细胞的凋亡<sup>[16]</sup>。此外, 在心肌缺血发生后, 增加的 mtROS 可诱导 mPTP 开放, 从而进一步促进了 mtROS 的产生。研究<sup>[17]</sup>显示, mtROS 可导致再灌注损伤期间的线粒体裂变, 引起 mtROS 释放、细胞自噬、细胞凋亡和坏死等一系列后果。

综上所述, 在 MIRI 中 mtROS 被认为是恶性氧化应激反应循环的主要驱动因子。因此, 靶向 mtROS 的治疗策略不仅可以抑制其直接破坏作用, 还可以进一步抑制其恶性扩增效应, 是治疗 MIRI 的有效策略。

## 4 调控 mtROS 的治疗策略

随着对线粒体生理机制的不断揭示, 研究人员发现靶向线粒体在治疗氧化应激相关疾病中具有较广阔的应用前景。根据已揭示出的 mtROS 在 MIRI 发病机制中的作用, 科研人员通过抑制氧化应激反应来探索改善再灌注损伤后心脏功能的有效疗法。

### 4.1 直接靶向线粒体抗氧化, 清除 mtROS

研究<sup>[18]</sup>显示, 呼吸链的辅酶 Q10 可改善心肌梗死后心脏的收缩功能, 降低 ATP 的消耗。而在一项使用辅酶 Q10 治疗心肌梗死的人体临床试验中, 并未观察到肌酸激酶水平的显著降低<sup>[19]</sup>。为了提高辅酶 Q10 在线粒体内的生物利用度, 研究者开发了作为靶向线粒体的抗氧化剂, 即将与辅酶 Q10 抗氧化活性相同的泛醌与亲脂性的磷酸三苯酯偶联。与单纯的辅酶 Q10 相比, 此抗氧化剂在线粒体内蓄积增加约 100 倍, 可大大提高 mtROS 的清除效率。动物实验证实, 该抗氧化剂可显著缓解大鼠心肌梗死后心脏功能障碍、线粒体损害以及心肌细胞死亡<sup>[20]</sup>。

SS-31 是一种能够渗透入细胞线粒体的多肽, 可发挥 mtROS 清除作用; 同时, SS-31 还可与心磷脂结合, 抑制由 mtROS 诱导的心磷脂氧化<sup>[21]</sup>。多项动物实验表明, SS-31 预处理动物在 MIRI 期间具有一定的保护作用。如在大鼠心肌缺血再灌注模型中, 与对照组相比, MIRI 期间连续注射 SS-31 的大鼠心肌梗死面积减小了 6%<sup>[22]</sup>。

### 4.2 抑制 mPTP 开放, 缓解 MIRI

mPTP 可作为减轻线粒体氧化应激反应、缓解 MIRI

的另一潜在靶点。多项动物研究表明, 环孢霉素 A (cyclosporine A, CsA) 可调控 mPTP, 改善线粒体功能和心脏功能。然而, 在一项大型多中心双盲随机 III 期临床试验中发现, CsA 的治疗并不能缩小急诊经皮冠状动脉介入治疗患者的心肌梗死面积, 也不能缓解其左心室重构<sup>[23]</sup>。

动物实验表明, 吗啡缺血后处理能够通过激活蛋白激酶 C 通路, 抑制线粒体 mPTP 开放, 以缓解心肌细胞的缺血再灌注损伤<sup>[24]</sup>。另有研究<sup>[25]</sup>显示, 盐酸苯乙奎定预处理缺氧复氧 H9C2 细胞, 可缓解胞内钙离子超载、抑制 mPTP 开放, 保护细胞正常功能。

### 4.3 其他

多项临床前研究已证实, 在 MIRI 期间, 白藜芦醇可通过活化线粒体乙酰化酶 3, 激活锰超氧化物歧化酶, 发挥降解 mtROS 的作用。多项动物实验证实, 对动物预先给予白藜芦醇可减少其心肌梗死后的梗死面积<sup>[26]</sup>。同时, 白藜芦醇的安全性、耐受性以及治疗心肌梗死的效果已在人体临床试验中得到证实<sup>[27]</sup>。此外, 向缺血再灌注损伤小鼠注射 NAD<sup>+</sup>前体可激活组蛋白去乙酰化酶 1 (sirtuin 1, Sirt1) 通路, 缓解 MIRI 期间 NAD<sup>+</sup>的耗竭、减轻氧化应激反应, 进而减轻 MIRI<sup>[28]</sup>。目前, NAD<sup>+</sup>前体已进入了临床测试阶段, 就其安全性、体内代谢及对心血管功能的影响进行研究。

## 5 结论与展望

综上所述, 本文讨论了 mtROS 在 MIRI 中的产生和作用机制。在心肌缺血再灌注过程中, mtROS 的水平会持续升高, 通过干预 mtROS 的生成可缩小心肌梗死面积并改善该类患者的预后, 因此 mtROS 或可成为治疗缺血性心脏病的潜在靶点。

尽管在多项研究中已成功使用各种抗氧化剂靶向清除 mtROS 来缓解 MIRI, 但将此类靶向 mtROS 的治疗手段转化到心血管疾病治疗的临床实践中仍面临巨大挑战。除了动物和人类在解剖学和生理上的差异之外, 动物模型与人体在疾病的发生机制、药物耐受等方面还存在不可预知的差异。因此, 仍需要更多的研究来探讨再灌注期间 mtROS 的调控机制, 开发降低 mtROS 的治疗新策略; 同时, 还应优先选用大型动物模型, 对减轻梗死心肌氧化应激反应的途径进行剖析, 以增加在人体试验中的成功概率。

## 参·考·文·献

- [1] Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis[J]. *Circ Res*, 2016, 119(1): 91-112.
- [2] Maeda H, Kami D, Maeda R, et al. TAT-dextran-mediated mitochondrial transfer enhances recovery from models of reperfusion injury in cultured cardiomyocytes[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9): 5007-5020.
- [3] Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS[J]. *Nature*, 2014, 515(7527): 431-435.
- [4] Kasai, Shimizu S, Tataru Y, et al. Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): E320.
- [5] Bertero E, Maack C. Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria[J]. *Circ Res*, 2018, 122(10): 1460-1478.
- [6] Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. Electron transfer between cytochrome c and P66SHC generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis[J]. *Cell*, 2005, 122(2): 221-233.
- [7] Boengler K, Bornbaum J, Schlüter KD, et al. P66SHC and its role in ischemic cardiovascular diseases[J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(4): 29.
- [8] Xiao YJ, Xia JJ, Cheng JQ, et al. Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase induces endothelial dysfunction via epigenetic regulation of P66SHC-mediated oxidative stress pathway[J]. *Circulation*, 2019, 139(19): 2260-2277.
- [9] Wang JN, Yang Q, Yang C, et al. Smad3 promotes AKI sensitivity in diabetic mice via interaction with p53 and induction of NOX4-dependent ROS production[J]. *Redox Biol*, 2020, 32: 101479.
- [10] Matsushima S, Kuroda J, Ago T, et al. Broad suppression of NADPH oxidase activity exacerbates ischemia/reperfusion injury through inadvertent downregulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ [J]. *Circ Res*, 2013, 112(8): 1135-1149.
- [11] Zhang YX, Murugesan P, Huang K, et al. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(3): 170-194.
- [12] Siu KL, Lotz C, Ping P, et al. Netrin-1 abrogates ischemia/reperfusion-induced cardiac mitochondrial dysfunction via nitric oxide-dependent attenuation of NOX4 activation and recoupling of NOS[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 78: 174-185.
- [13] Jannetti SA, Zeglis BM, Zalutsky MR, et al. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) inhibitors and radiation therapy[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 170.
- [14] Hocsak E, Szabo V, Kalman N, et al. PARP inhibition protects mitochondria and reduces ROS production via PARP-1-ATF4-MKP-1-MAPK retrograde pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 770-784.
- [15] Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, et al. The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(7): 1316-1322.
- [16] Cadenas S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89.
- [17] Shimizu Y, Lambert JP, Nicholson CK, et al. DJ-1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury by regulating mitochondrial fission[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97: 56-66.
- [18] Akbulut A, Keseroglu BB, Koca G, et al. Scintigraphic evaluation of renoprotective effects of coenzyme Q10 in a rat renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Nucl Med Commun*, 2019, 40(10): 1011-1021.
- [19] Khan A, Johnson DK, Carlson S, et al. NT-pro BNP predicts myocardial injury post-vascular surgery and is reduced with CoQ10: a randomized double-blind trial[J]. *Ann Vasc Surg*, 2020, 64: 292-302.
- [20] Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. *FASEB J*, 2005, 19(9): 1088-1095.
- [21] Machiraju P, Wang X, Sabouny R, et al. SS-31 peptide reverses the mitochondrial fragmentation present in fibroblasts from patients with DCMA, a mitochondrial cardiomyopathy[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2019, 6: 167.
- [22] Cho J, Won K, Wu D, et al. Potent mitochondria-targeted peptides reduce myocardial infarction in rats[J]. *Coron Artery Dis*, 2007, 18(3): 215-220.
- [23] Cung TT, Morel O, Cayla G, et al. Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(11): 1021-1031.
- [24] Wang M, Liu S, Wang H, et al. Morphine post-conditioning-induced up-regulation of lncRNA TINCR protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via inhibiting degradation and ubiquitination of FGF1[J]. *QJM*, 2020, 113(12): 859-869.
- [25] Zi C, Zhang C, Yang Y, et al. Penicillamine hydrochloride protects against anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes through ATP-sensitive potassium channels, and the Akt/GSK-3 $\beta$  and Akt/mTOR signaling pathways[J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(6): 1353-1362.
- [26] Mao ZJ, Lin H, Hou JW, et al. A meta-analysis of resveratrol protects against myocardial ischemia/reperfusion injury: evidence from small animal studies and insight into molecular mechanisms[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5793867.
- [27] Dyck G, Raj P, Zieroth S, et al. The effects of resveratrol in patients with cardiovascular disease and heart failure: a narrative review[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(4): 904.
- [28] Yamamoto T, Byun J, Zhai P, et al. Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD<sup>+</sup> synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98972.

[收稿日期] 2020-07-13

[本文编辑] 邢宇洋

