

线粒体与急性肺损伤

尚涛 李立萍 张建新

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指严重感染、创伤、休克后,出现以肺泡毛细血管损伤导致的肺水肿和肺不张为病理特征的一种肺部炎症与通透性增加综合征,临床表现为呼吸窘迫和顽固性低氧血症^[1]。近年来发现线粒体(mitochondria)功能异常在急性肺损伤的过程中起着重要作用。目前研究表明急性肺损伤导致的线粒体呼吸功能障碍和酶活性改变、线粒体氧自由基的产生、线粒体钙超载及线粒体通透性转换有关。本文就线粒体功能与急性肺损伤的关系进行综述。

1 线粒体功能障碍对 ALI 的影响

肺脏既是气体交换的唯一脏器,又是接受全部心输出血量的唯一器官,有丰富的毛细血管内皮细胞(PVEC)和肺泡上皮细胞。从呼吸系统或循环系统入侵机体的有害物质,最早损伤上述两种靶细胞。同时,线粒体是一个结构和功能复杂而敏感的重要的细胞器。ALI可引起线粒体结构和功能的异常,而线粒体的异常往往会引起其它细胞器和整个细胞的改变,从而加重ALI的程度。有研究表明在肺动脉内皮细胞中(PAECs),氧自由基对其线粒体DNA的损伤在ALI过程中起着重要作用^[2]。

线粒体作为细胞的能量亚单位,当受到外界影响时,导致产能功能障碍,可能是肺脏损伤的重要环节。内毒素血症参与了ALI的发展过程。有人认为内毒素损害线粒体结构,影响ATP酶和氧化磷酸化偶联过程,使能量代谢发生障碍;改变机体免疫功能;直接破坏单核吞噬细胞系统细胞内的溶酶体膜,而造成细胞损害;并能使机体发生一系列的病理改变:血管舒缩功能、血小板及白细胞下降等。线粒体功能障碍在ALI中发挥着重要作用,改善线粒体功能可能是ALI治疗的重要手段。

2 线粒体损伤机制

2.1 线粒体与细胞凋亡 细胞凋亡(apoptosis)有三条途径:外源性途径、内源性途径和不依赖Caspase的凋亡诱导因子(AIF)途径^[3]。在三条凋亡途径中,内源性途径和凋亡诱导因子途径与线粒体直接相关。外源性途径也与线粒体有联系,因此线粒体在细胞凋亡中起重要作用。

许多损伤性刺激并非直接杀死细胞,而是触发细胞凋亡信号的瀑布样传递过程。细胞凋亡存在两条不同的方式:其一是经过受体介导的凋亡;其二是线粒体依赖性的凋亡。细胞凋亡是在基因调控下细胞发生的程序性细胞死亡(PCD),线粒体损伤为启动凋亡的关键因素^[4]。宋勇等^[5]报道,在LPS诱导ALI时肺血管内皮细胞凋亡增多,这可能是急性肺损伤的重要发病因素。同时,在ALI时,免疫效应细胞异常,LPS、TNF、IL-6均可导致多形核白细胞(polymorphonuclear leucocytes, PMN)凋亡延迟,致使PMN在炎症部位聚集,并释放一氧化氮(NO)、氧自由

基(OR)、活性氧等造成组织细胞损伤;肺泡巨噬细胞在LPS、TNF作用下,细胞凋亡率增加,严重影响其功能,对凋亡PMN及组织细胞的吞噬功能下降,导致这些细胞继发性死亡,因而进一步加重组织损伤。通过大鼠肺泡巨噬细胞(AM)在老年多器官功能衰竭(MOFE)肺启动形成过程中的作用的研究,模型组与对照组相比,细胞内游离钙浓度增加,而线粒体膜电位 m 降低。结论:老年MOFE大鼠模型的AM的凋亡率大于青年大鼠模型,这可能是MOFE肺部感染后炎症不易控制以及肺部感染或肺损伤后容易引起MOFE的重要原因。AM胞内 Ca^{2+} 浓度和线粒体膜电位的改变很可能是导致AM凋亡增加的重要原因^[6]。肺泡型上皮细胞(alveolar type cell, AT_{II}细胞)是肺泡上皮细胞的干细胞,AT_{II}细胞的凋亡在ALI的病理过程中至关重要^[7]。凋亡是使AT_{II}细胞保持正常生理功能和动态平衡的一种形式,在正常肺组织的发生、成熟以及在ALI病理过程中,AT_{II}细胞都伴随着凋亡过程。

线粒体跨膜电位的耗散与细胞凋亡有密切关系。近年来陆续有报道说明线粒体跨膜电位的耗散早于核酸酶的激活,也早于磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面。而一旦线粒体跨膜电位耗散,细胞就会进入不可逆的凋亡过程。线粒体解耦的呼吸链会产生大量活性氧,氧化线粒体内膜上的心磷脂。实验证明,用解耦联剂mCCCP会导致淋巴细胞凋亡。而如果稳定线粒体跨膜电位就能防止细胞凋亡。因此,如能在ALI发病早期阻断靶细胞的凋亡,则可减轻组织和器官的损伤;ALI恢复其调节靶细胞的凋亡速率,将有助于肺组织重构。

2.2 线粒体与氧自由基的产生 健全的线粒体功能取决于线粒体呼吸链上电子传递、氧化磷酸化、酶和线粒体基因组的正常运行。在线粒体氧化还原网络中自由基的介导作用是必不可少的。在线粒体的呼吸链电子传递过程中产生氧自由基(oxygen free radicals, OR),其中包括在进入呼吸链之前从丙酮酸通过几步氧化还原反应将电子转导至NADH时,线粒体化合物中的还原型泛醌通过氧化还原环,细胞色素b和细胞色素氧化酶缺失,电子漏的形成都可使线粒体内OR产生增加。活性氧产生既起调节作用,也会对线粒体膜和核产生损伤作用。在线粒体内抗氧化防御体系功能下降时,损伤产物再次促使ROS(活性氧)产物增多,形成恶性循环的氧化还原网络。氧自由基主要包括超氧阴离子 O_2^- 、过氧化氢 H_2O_2 和羟自由基OH,OH也是重要的炎症介质之一,它可使多形核白细胞(PMN)向炎症区游走、聚集、激活并释放溶酶体酶,损伤血管内皮,引起血管通透性增加。OR对机体除直接损伤外,还与花生四烯酸(arachidonic, AA)、蛋白酶等起协同作用,引起脂质过氧化反应,形成新的脂质过氧化产物、大量丙二醛(MDA)及新生的OR。Chapman等^[8]证实机械通气时造成的ALI有大量OR参与。

2.3 线粒体与脂质过氧化 脂质过氧化(lipid peroxidation)是指生物膜上的多烯脂肪酸受到氧化,产生酸败变性(rancide),是脂质膜的完整性受到损害。线粒体具有双层由磷脂层构成的生

项目来源:国家人事部回国留学人员重点资助项目(编号:9900789);

河北省博士基金课题资助项目(编号:99547015D)

作者单位:050021 石家庄市,河北省医学科学院药物研究所

物膜。自由基可使其中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应：(1) 不饱和脂肪酸破坏；(2) 脂质过氧化反应主要产物 MDA 与膜上蛋白的游离氨基酸或磷脂分子缩合生成无生物活性的大分子产物。这些均使膜流动性下降，通透性增加。Hackenbrock 和 Stater 早在 70、80 年代就提出呼吸链上电子传递过程和偶联磷酸化过程均依赖于呼吸链成份在内膜中的侧向扩散和碰撞即膜流动性。因此，膜流动性下降及因膜通透性增加而造成的细胞色素丢失，都将使线粒体氧化磷酸化功能受损，能量生成障碍。线粒体功能受损时，又通过单价渗漏 (univalent leak) 产生更多的 O_2^- ，从而造成肺脏细胞的损害。

随着年龄的增长，机体抗氧化系统功能逐渐下降，导致体内自由基及其代谢中间产物大量堆积，攻击生物膜磷脂生成。D-半乳糖诱导细胞老化机制为 D-半乳糖在半乳糖氧化酶的作用下参与氧化反应，生成二醛糖和过氧化氢，在这一反应过程中使活性氧增多，脂质过氧化亢进，产生超氧阴离子自由基，自由基不仅损害生物膜系统，它还损害核酸及蛋白质的代谢，使细胞的转录水平降低，蛋白质合成减少，造成细胞的结构改变和功能退化。脂质过氧化产物 MDA 降低膜的流动性，导致膜功能的降低甚至丢失，从而影响到整个细胞代谢、功能、结构的改变，最终引起细胞的老化、死亡，进而导致整个机体的衰老。线粒体因其特殊的呼吸功能及携氧功能而更易遭受自由基的侵袭，发生膜的脂质过氧化反应。LPO 及 MDA 大量积聚破坏生物膜的正常结构和功能是导致细胞衰老的一个重要原因。

2.4 线粒体与一氧化氮 近年来研究表明，NO 参与了许多疾病的病理生理过程^[9]，其中包括肺损伤^[10]，但 NO 对 LPS 所致的肺损伤中究竟起何作用，对 ALI 大鼠肺脏线粒体有何影响，尚未明了，有待探索研究。NO 被认为是一种内皮衍化的松弛因子，能使血管平滑肌松弛。它在血液中能很快与血红蛋白结合而丧失活性，生物半衰期只有 10 ~ 15 s。近 2 年，通过研究发现，NO 本身即为一种短效的细胞毒性物质。内源性的 NO 主要由巨噬细胞和白细胞分泌，会损伤 DNA 物质，影响线粒体的呼吸功能，灭活 Sulfhydryl-enzyme，破坏细胞膜，甚至诱发 ALI。正常对照组细胞中细胞色素 C (CytC) 定位于线粒体中。经 NO 供体硝普钠 (2.0 mmol/L) 处理 3 h 后，CytC 开始在细胞质中呈弥散性分布，并随着硝普钠处理时间延长，细胞质中的 CytC 浓度增加，同时伴有线粒体的形态变化和细胞的凋亡样形态改变。实验表明^[11]，内毒素脂多糖可诱导 NO 产生增多，导致线粒体内容物 (如细胞色素 C) 和活性氧释放，引起细胞凋亡。

有研究显示^[12-14]，ALI 后肺实质细胞损伤、毛细血管通透性增加及肺动脉高压等表现均与过量生成的 NO 有关，外源性吸入高浓度 NO 也可诱导或加重肺损伤，因此认为 NO 参与了 ALI 的发生、发展过程。肺血管内皮细胞损伤是内毒素引起 ALI 的主要发病学环节，然而内毒素导致内皮细胞损伤的直接或间接机制迄今尚未完全阐明。研究显示，内源性 NO 介导了内毒素的主要成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 对培养猪胸主动脉内皮的细胞毒性作用^[9]。在拟似体内条件下，NO 和超氧阴离子 (superoxide anion, O_2^-) 可发生快速非酶促化学反应，生成强氧化剂过氧亚硝基阴离子 (peroxynitrite, ONOO⁻)^[15]。实验证实，LPS 入血可诱导大鼠肺组织生成 ONOO⁻，外源性 ONOO⁻ 可导致肺微血管壁通透性增高和离体肺动脉的反应性出现异常变

化^[16,17]。LPS 诱导内皮源性 ONOO⁻ 可能导致血管内皮细胞自身损伤，构成内毒素引起内皮细胞损伤的新机制。NO 引起的毒性作用主要通过产生大量的羟自由基 ($\cdot OH$) 和二氧化氮自由基 ($NO_2 \cdot$)，造成蛋白质、核酸、膜脂质的损伤及抑制各种与线粒体电子传递有关的酶类，最终抑制线粒体的呼吸^[18]。

2.5 线粒体的钙超载 近年来的研究已对线粒体的钙转运及其在细胞代谢中的作用有了较全面的认识和进展。现在认为：线粒体具有一套完整的 Ca^{2+} 转运系统，包括两条摄取途径和三条释放途径。生理条件下，它们在细胞胞质与线粒体钙稳态维持以及细胞能量代谢中起重要作用，线粒体从胞质摄取的 Ca^{2+} 可激活某些 Ca^{2+} 敏感的呼吸酶和代谢过程。病理条件下，线粒体 Ca^{2+} 转运发生紊乱，通过线粒体通透性转换导致细胞坏死或凋亡。

维持细胞内低浓度的 Ca^{2+} 是细胞正常与否的一个重要标志，20 世纪 70 年代后期，人们已经注意到细胞内钙失调与细胞损伤的关系，认为细胞内钙的超负荷是导致细胞变性坏死的重要因素。细胞内钙稳态 (calcium homeostasis) 是一个复杂的生理过程，其依赖于质膜、内质网、线粒体等对 Ca^{2+} 转运的调节。在正常情况下，细胞内总钙量的 70% ~ 80% 存在于线粒体。线粒体对 Ca^{2+} 的摄取和释放胞浆钙离子浓度的调节起重要作用。缺氧、感染、内毒素等损伤因素可因引起细胞膜破坏和膜上 Ca^{2+} -ATPase 受抑细胞外高浓度 Ca^{2+} 顺化学梯度大量涌入，线粒体代偿性摄入 Ca^{2+} 。线粒体内膜上存在着直径为 20A (2 nm) 的 Ca^{2+} 依赖性小孔。该小孔具有非选择性通透作用。 Ca^{2+} 的摄入常伴随线粒体膜的去极化和 H^+ 的排出，还有线粒体内 Ca^{2+} 浓度的增加，当 Ca^{2+} 摄入量过量时，这些因素均促使内膜小孔开放，其结果线粒体膜对离子通透性升高， Ca^{2+} 流入胞浆，线粒体膜电位降低和氧化磷酸化的脱偶联。钙稳态失调通过下列途径引起肺损伤：(1) Ca^{2+} 激活与肺细胞膜有关的磷脂酶，产生溶血卵磷脂和花生四烯酸引起生物膜结构的破坏；(2) Ca^{2+} 激活蛋白酶，使黄嘌呤脱氢酶变为黄嘌呤氧化酶，促进氧自由基生成；(3) Ca^{2+} 激活 Ca^{2+} -ATPase 使线粒体摄入过量 Ca^{2+} ，导致 ATP 能量耗竭；(4) Ca^{2+} 激活核酸内切酶引起 DNA 断裂。

2.6 线粒体通透性转换 线粒体通透性转换孔是 Hunter 与 Haworth (1980) 在对线粒体进行体外研究时发现的一种 Ca^{2+} 释放途径，它的实质是一种通道复合体，由腺苷转运酶 (adenine nucleotide translocase, ANT) 和线粒体基质中的亲环素 D (cyclophilin D, CyP-D) 构成。PT 孔道由线粒体各部分的蛋白质与细胞质中蛋白质联合构成。这包括细胞液蛋白：己糖激酶，线粒体外膜蛋白：外周苯并二嗪 (benzodiazepine) 受体与电压依赖阴离子通道，线粒体膜间隙蛋白：肌酸激酶，线粒体内膜蛋白：ADP-ATP 载体，线粒体基质蛋白：亲环蛋白 D (cyclophilin D) 等。凡是能够专一作用于线粒体诱导 PT 孔道生成的物质，例如苯并二嗪受体的配基原卟啉 IX 等都能引起细胞凋亡。

PT 孔道有开放与关闭二种构象。PT 孔道开放导致细胞凋亡。而 PT 孔道关闭能防止细胞凋亡。当 PT 孔道与环孢菌素 A (cyclosporin A) 或 SH，或米酵菌酸 (bongkrek acid) 结合时 PT 孔道被关闭。在 PT 孔道开放时线粒体释放细胞凋亡诱导因子 (AIF)。AIF 可能是一种蛋白水解酶，位于线粒体膜间隙，它可能被蛋白酶抑制剂如 N-苄氧羰基-缬氨酸-丙氨酸-门冬氨酸

甲基酮 (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) 所抑制。此外从线粒体释放的细胞色素 C 也是一种细胞凋亡诱导因子^[19]。虽然苍朮苷与米酵菌酸都是 ADP-ATP 载体的抑制剂,但是它们对 PT 孔道的作用并不相同。苍朮苷促进 PT 通道开放。这可能与二种抑制剂和 ADP-ATP 载体的结合部位不同有关。苍朮苷只能与 ADP-ATP 载体的胞液侧结合而米酵菌酸可与 ADP-ATP 载体的胞液及基质二侧结合。

线粒体通透性转换孔的高通透状态即所谓的线粒体通透性转换 (mitochondrial permeability transition, MPT), 它与细胞死亡调节有关。当发生 MPT 时, 线粒体允许分子量 < 5000 Da 的物质自由进出, Ca^{2+} 全部释放, 膜电位完全、永久消失, 线粒体肿胀, 它受 Ca^{2+} 、ADP、氧化应激及高 pH 诱导, 而环孢素 A (Cyclosporin A, CsA)、 FLA_2 抑制剂、低 pH 可抑制 MPT 发生。关于它发生的机制, 目前认为主要是 CyP-D 与 ANT 结合后, ANT 发生构象改变所致, 但具体机制尚有待于进一步的研究。

3 线粒体的保护与 ALI 的治疗展望

线粒体的保护剂主要有以下几类: (1) 抗氧化剂和酶系统: 如 VitE、VitC、SOD 等。(2) 影响 ATP 生成与降解的药物。(3) 降低线粒体膜通透性药物: 如环孢霉素 (CsA)。(4) 铁依赖脂质过氧化作用抑制剂。(5) Ca^{2+} 阻滞剂和 Ca^{2+} 依赖蛋白酶抑制剂。(6) 中药保护剂: 实验证明, 多种中药制剂, 如热毒清、心脉灵、脑益嗪等具有线粒体保护作用。实验表明, 热毒清对 ALI 的病理生理过程具有阻止作用, 确有明显的保护效果, 其作用机制是降低 TNF- α 、IL-1、IL-8 和 NO 等水平, 阻止白细胞和 PMN 的过度游出、聚集和活化; 稳定或减少溶酶体酶、蛋白水解酶等次级炎性介质的过度释放; 清除体内氧自由基和抑制脂质过氧化损伤; 保护细胞线粒体^[20], 从而抑制炎症反应, 减轻肺组织损伤。对内毒素引起的肺损伤有明确的保护作用, 其机制可能是有稳定溶酶体膜和抑制溶酶体酶释放的作用, 从而减轻内毒素对肺脏的损伤; 能够显著降低肺过氧化脂质 (LPO) 含量和提高 SOD 水平, 增强组织抗自由基能力和抑制脂质过氧化反应, 从而防止组织细胞的损伤。中药热毒清能减弱或消除 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8 和 NO 的作用。内毒素可致肺组织细胞损伤, 能使细胞的溶酶体和线粒体及微粒体的结构和功能发生病理改变。因此, 对这些病理改变的防治可能是中药防治 ALI 的机制之一。研究表明, 热毒清、人参、心脉灵等对上述的变化有明显的改善作用。此外, 异丙酚可直接作用于细胞膜成分, 从而抑制线粒体内膜通透性增高, 稳定膜结构^[21]; 内毒素血症时, 褪黑激素 (N-乙酰-5-氧基色胺, Melatonin) 可以抑制线粒体合酶的活性, 减少其表达, 阻止 OR NO 对线粒体的损坏, 保护线粒体电子传递链^[22]。

总之, 通过对肺脏线粒体与 ALI 的深入研究, 可以进一步阐明线粒体与 ALI 病理生理过程的相互关系, 从而进一步明确影响和危害肺脏线粒体诸多因素及其作用机理, 为临床上探索有效治疗方法以缓解和控制 ALI 提供了一个新的途径, 对 ALI 的防治具有一定的理论和实践意义。

参考文献

1 Moss M, Godman FL, Heinig M, et al. Establish the relative accuracy of three new definitions of the adult respiratory distress syndrome. Crit Care Med, 1995,

23:1629-1637.

2 Ruchko M, Grodny O, LeDoux SP, et al. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial dysfunction and apoptosis in oxidant-challenged lung endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288:530-535.

3 Cao G, Minami M, Pei W, et al. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21:321-333.

4 Shi Y. A structural view of mitochondrial-mediated apoptosis. Nature, 2001, 8:394-401.

5 Song Y (宋勇), Mao BL, Qian GS, et al. Expression of Fas/FasL system and apoptosis in lung tissues of ALI rats. Natl Med J China (中华医学杂志), 1999, 79:230-232 (Chinese).

6 钱小顺, 朱庆磊, 杨洁, 等. 老年和青年大鼠肺泡巨噬细胞凋亡的初步研究 (Apoptosis of pulmonary alveolar macrophages in aged and adult rats: a comparative study). 中华医学杂志, 2005, 8:253-256.

7 Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature, 2000, 407:770-776.

8 Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, et al. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005 Nov, 289:834-841.

9 Moncade S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev, 1991, 43:109-112.

10 Mulligan MS, Warren JS, Smith CW, et al. Lung injury after deposition of IgA immune complexes. Relevance for CD18 and L-arginine. J Immunol, 1992, 298:3086-3092.

11 Tang PS, Tsang ME, Lodyga M, et al. Lipopolysaccharide accelerates caspase independent but cathepsin B dependent death of human lung epithelial cells. J Cell Physiol, 2006, 209:457-67.

12 邱海波, 陈德昌. 一氧化氮生物作用的两面性与多器官功能障碍综合征. 基础医学与临床, 1998, 18:11-14.

13 Razavi HM, Werhun R, Scott JA, et al. Effects of inhaled nitric oxide in an mouse model of sepsis-induced acute lung injury. Crit Care Med, 2002, 30:868-873.

14 Isobe H, Okajima K, Uchida M, et al. Antithrombin prevents endotoxin induced hypotension by inhibiting the induction of nitric oxide synthase in rats. Blood, 2002, 99:1638-1645.

15 Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite. Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87:1620-1624.

16 Gu ZY (谷振勇), Ling YL, Cong B, et al. Peroxynitrite-mediated acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats. Natl Med J China (中华医学杂志), 2000, 80:58-61 (Chinese, English abstract).

17 Gu ZY (谷振勇), Ling YL, Xu XH, et al. Effect of peroxynitrite on the reactivity of rabbit pulmonary arteries in vitro. Acta Physiol Sci (生理学报), 2003, 55:469-474 (Chinese, English abstract).

18 Dahi K, Ohtaki H, Inn R, et al. Peroxynitrite and caspase-3 expression after ischemia reperfusion in mouse cardiac arrest model. Acta Neurochir Suppl, 2003, 86:87-91.

19 Suzuki T, Moraes TJ, Vachon E, et al. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33:231-247.

20 李鸣真, 叶望云, 皇甫永穆, 等. 热毒清抗内毒素所致溶酶体和线粒体的实验研究. 中西医结合杂志, 1989, 9:412-414.

21 吴新军, 孙艳红, 王俊科, 等. 异丙酚对大鼠小肠缺血再灌注后肺损伤磷脂酶 A2 变化的影响. 中国医科大学学报, (J Chin Med Univ), 2004, 33:118-120.

22 Escames G, Leon J, Macias M, et al. Melatonin counteracts lipopolysaccharide induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. FASEB J, 2003, 17:932-934.

(收稿日期:2006-11-18)