

靶向抑制线粒体程序性坏死通路的抗子宫内膜细胞缺血再灌注损伤作用和机制

李书平, 韩 慧, 胥红斌

(江苏省常州市第二人民医院 产科, 江苏 常州, 213164)

关键词: 线粒体程序性坏死通路; 子宫内膜细胞; 缺血再灌注损伤

中图分类号: R 711.32 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2018)09-129-04 DOI: 10.7619/jcmp.201809038

众所周知,缺血再灌注损伤是组织在缺血后又恢复供血,由氧自由基攻击相应组织细胞等多种机制引起的更为严重的损伤。自1977年, Hearse首次提出这一概念后,对其的研究主要集中在心、脑、肝、肾等脏器,对子宫内膜细胞的研究还十分不足。子宫内膜细胞缺血再灌注损伤在临床实践中屡见不鲜,越来越受到科研工作者和临床医生的重视。本研究从抑制线粒体程序性坏死通路出发,探讨缺血再灌注损伤在子宫内膜细胞中的潜在防治可能和理论基础,现综述如下。

1 缺血再灌注损伤的定义

缺血所引起的组织损伤是疾病致死的主要原因之一。缺血再灌注损伤是指组织器官经过一定时间缺血再恢复血液灌注后其代谢、功能和结构的损伤反而加重,甚至出现不可逆损伤的现象。在缺血性疾病抢救和治疗过程中,科学家们渐渐发现,对组织造成损伤的主要因素,不是缺血本身引起的,而是恢复血液供应后,过量的自由基攻击这部分重新获得血液供应的组织内的细胞而造成的,这种损伤,称为缺血再灌注损伤(I/R)^[1]。

尽管血流恢复对于防止组织死亡是绝对必要的,但将氧合血液再灌注到缺氧区域这件事本身可能会增加组织损伤,且超过单独局部缺血所产生的组织损伤^[2]。在外科手术、器官移植、创伤性休克、烧伤、冻伤和血栓等血液循环障碍时,都会出现缺血后再灌注损伤,并且具有潜在的危害和致残后果。

2 缺血再灌注损伤在妇产科的重要性

任何有创检查、妇产科手术,都有可能发生子宫内膜细胞缺血再灌注损伤,并进而影响子宫的生殖功能。妇产科手术中,缺血再灌注损伤更是造成子宫大出血、子宫坏死和败血症等严重并发症的主

要因素之一^[3-9]。而临床常用的子宫收缩药,如缩宫素催产和引产及产后出血,均有可能造成子宫收缩止血或阻断血管止血的同时,造成子宫缺血再灌注损伤^[10-12]。由此可得,减少或防治子宫缺血再灌注损伤是妇产科临床实践中的重要一环。

目前对于缺血再灌注损伤的研究多集中在对心、脑血管、肝、肾等疾病的研究上,其对于生殖器官影响的研究较少^[13-15]。子宫缺血再灌注损伤是临床妇产科常见的一种病理生理变化,近年来研究表明细胞凋亡与组织器官缺血再灌注损伤有关。抗子宫内膜细胞缺血再灌注损伤作用和研究,寻找高效、靶向的药物,是产科的前沿问题,更为临床防治子宫内膜细胞缺血再灌注损伤提供了潜在可能性和理论依据。

3 子宫内膜细胞缺血再灌注损伤的作用机制

缺血再灌注损伤的发病机制比较复杂,其过程是多因素的,涉及多种机制。以往研究^[16-21]认为与氧自由基的产生、能量代谢障碍、细胞内钙超载以及炎性细胞激活并释放炎性细胞因子等因素有关。

缺血再灌注时,细胞线粒体ATP生成减少,伴随呼吸链电子传递减弱,导致线粒体膜电位(MMP)下降和活性氧簇(ROS)大量生成,引起氧化应激,触发线粒体通透性转换孔(mPTP)开放,诱导细胞色素C(CytoC)等线粒体蛋白释放,最终导致细胞损伤^[17, 22-26]。

mPTP由蛋白电压依赖性阴离子通道(VDAC,位于线粒体外膜)、腺苷酸转位子-1(ANT-1,位于线粒体内膜)及亲环蛋白D(CyPD,位于线粒体基质)组成^[27-28]。线粒体通透性转换孔是在生理条件下封闭的非选择性、大电导通道。mPTP的打开导致线粒体功能的消

除,是缺血/再灌注导致的心肌细胞坏死的主要机制,并且可以通过使用药理学或遗传操作直接抑制 mPTP 开放限制了体内梗死面积。

多个促生存信号通路通常靶向抑制 mPTP 开放。尽管 mPTP 的分子结构尚未建立,但最近的研究^[29]已经表明了,每个 mPTP 亚基的作用和几种与 mPTP 直接相互作用的蛋白质的功能。Cell 等^[30-31]杂志发表的论文证实, P53 在调节线粒体 mPTP 通道开放中起核心作用。mPTP 的开放导致线粒体内膜电位的丧失, ATP 产生的破坏, ROS 产生增加, 细胞器肿胀, 线粒体功能障碍以及随之而来的坏死。

亲环蛋白 D 以及腺嘌呤核苷酸转运体和磷酸盐载体被认为是参与 mPTP 开放的重要调节剂。ROS 的产生增加可以进一步触发其他通过 PARP1 等分子介导的坏死途径, 导致不可逆的细胞损伤^[32]。多种应激诱导 P53 磷酸化激活, 后者转位到线粒体并和 CyPD 耦联, 介导 mPTP 开放及细胞坏死^[30, 33]。有趣的是, 该通路并不介导细胞凋亡, 因此该通路又被称之为“程序性坏死通路”^[30, 34-35]。

最新的研究^[36-37]结果证实, 该线粒体“程序性细胞坏死”通路同样介导了氧糖剥夺后复氧 (OGDR, 一种体外缺血再灌注模型) 诱导的子宫内膜细胞损伤。在人 T-HESC 子宫内膜细胞中, OGDR 诱导细胞程序性坏死, 具体表现为: 线粒体内 CyPD-p53-ANT1 耦联, 线粒体去极化, MMP 下降, 并伴随着 ROS 生成, 细胞色素 C 释放及乳酸脱氢酶 (LDH) 胞外释放。

4 亲环蛋白 D 抑制剂靶向抑制线粒体程序性坏死

亲环蛋白 D 抑制剂环孢菌素 A (CsA)^[38] 及 shRNA 敲减亲环蛋白 D 均能显著抑制 OGDR 诱导的子宫内膜细胞损伤^[39]。与此同时, 研究人员还发现, 中药单体人参 Rh2 (GRh2) 亦能显著抑制该程序性细胞坏死通路而保护子宫内膜细胞免受 OGDR 损伤。

目前已知的亲环蛋白 D 抑制剂有环孢菌素 A/CsA, Debio 025, SCY-635, NIM 811 及新型小分子抑制剂 Compound 19 等, 下面将分别介绍这些亲环蛋白 D 抑制剂。

4.1 环孢菌素 A

环孢菌素 A (CsA) 是一种从丝状真菌

(*tolypocladium inflatum*) 培养液中分离出的由 11 个氨基酸组成的环肽。从 20 世纪 80 年代开始, 环孢菌素 A 就作为免疫抑制剂用于临床。它在器官移植治疗中发挥了重大作用, 奠定并推动了器官移植的发展。作为免疫抑制剂它还被应用于一些自身免疫性疾病的治疗, 如对类风湿关节炎及白塞病 (Behet's disease, 贝赫切特综合征), 取得了较为满意的疗效。对 1 型糖尿病、牛皮癣和寄生虫病如疟疾、血吸虫等有一定疗效。此外, 环孢菌素 A 还具有广泛的其他生物学活性, 如抗真菌、抗寄生虫、抗 HIV、抗炎、逆转肿瘤细胞多药耐药等作用。

近年来, 科学家们发现环孢菌素 A 在许多细胞和体内模型中显示出细胞保护性能, 这可能取决于亲环蛋白 A 与钙调磷酸酶或亲环蛋白 D 与线粒体通透性转换 (PT) 孔的相互作用的干扰。这一通路和组织缺血再灌注损伤的通路不谋而合。故近年来环孢菌素 A 已被提出用于预防急性心肌梗死 (MI) 再灌注损伤的治疗。根据一项 Meta 分析^[40]发现, 与安慰剂相比, 环孢素对梗死面积有不同程度的影响, 这为缺血再灌注损伤的防治提供了潜在的可能性。但是, 由于其存在比较严重的肝毒性、肾毒性、神经系统毒性、常见的厌食、恶心、呕吐等胃肠道反应以及溶解性差, 治疗指数窄, 生物利用度低等缺点, 影响了它在这些领域的进一步应用。人们开始尝试对其结构进行改造, 合成了一系列化合物, 并从中寻找毒副作用低的免疫抑制剂, 或虽然无免疫抑制活性, 但毒性低, 具有其他生物学活性的衍生物。

4.2 Debio025

不同于环孢菌素 A, Debio 025 是一种没有免疫抑制活性的亲环素抑制剂。它是一种合成的环孢菌素, 虽不具有免疫抑制能力, 但对亲环蛋白 A (CypA) 相关的顺式-反式脯氨酰异构酶 (PPIase) 活性具有高抑制效力。在体外和体内都证实了与环孢菌素相比缺乏免疫抑制作用^[41]。它可与亲环蛋白 D 形成二元复合物, 使线粒体通透性毛细孔脱落, 并随后导致细胞坏死^[42-43]。因此, Debio 025 只是选择性地与亲环蛋白 D 结合, 而没有环孢菌素 A 那样强烈的不良反应。临床试验证实, Debio 025 的安全性来源于总患者人数约 1 800 例, 这支持了第三阶段关键临床试验的启动^[44]。但 Debio 025 与亲环蛋白 D 形成二元复合物, 与环孢菌素 A 相比, 二元复合物对钙调

磷酸酶的亲和力显著降低。因此,其治疗效果也相应不足。

4.3 SCY-635

SCY-635 是一种新型非免疫抑制性环孢菌素类似物。SCY-635 以纳摩尔浓度抑制亲环蛋白的肽基脯氨酰异构酶活性,但在浓度高达 2 $\mu\text{mol/L}$ 时未显示出可检测到的钙调磷酸酶磷酸酶活性的抑制^[45]。同 Debio 025 相似, SCY-635 也没有免疫抑制性,但与环孢菌素 A 相比, SCY-635 与亲环蛋白 D 形成二元复合物,二元复合物对钙调磷酸酶的亲和力显著降低,在提高浓度的情况下,仍难以达到预期疗效。

4.4 NIM811

NIM811 是一种线粒体通透性转换抑制剂,也被称为 N-甲基-4-异亮氨酸环孢菌素,它是一种结合亲环蛋白的四取代的环孢菌素类似物,它与亲环蛋白以高于环孢菌素的亲和力结合,然而这种二元复合物不能结合钙调磷酸酶,因此缺乏免疫抑制活性。也有研究^[46]认为, NIM 811 对凋亡的抑制作用与 CsA 相当,但在较高浓度下 CsA 失去效力,而 NIM 811 没有。从而认为 NIM 811 可抑制线粒体通透性转换,对其所引起的细胞凋亡和坏死细胞死亡有一定的作用。

然而, NIM 811 和 SCY-635 的临床试验仅限于探索性的 I 期和 II 期临床试验,纳入小型、相对明确的患者群体。因此,这些化合物的完整临床安全性尚待确定。无论是环孢菌素 A 这一经典的亲环蛋白 D 抑制剂,还是 Debio 025, SCY-635, NIM 811 这些新型非免疫抑制性环孢菌素类似物,由于这些亲环蛋白 D 抑制剂存在所需浓度高、特异性差、水溶性差、毒副作用大等原因,成药性差,故临床应用前景并不乐观^[44, 47-48]。

4.5 Compound 19

为了进一步改进和研发亲环蛋白 D 抑制剂, Shore 等^[49]根据亲环蛋白 D 的分子机构,研发了多种可能的亲环蛋白 D 选择性抑制剂,并鉴定 Compound 19(化合物 19, C19)为高效的、选择性的亲环蛋白 D 小分子抑制剂^[50]。化合物 19 介导的细胞保护需要与亲环蛋白 D 结合,因为当亲环蛋白 D 被靶向的 shRNA 沉默时,化合物 19 就不能进一步保护细胞免受缺血再灌注损伤。化合物 19 几乎阻断缺血再灌注损伤诱导的 p53-CyPD 线粒体缔合, mPTP 开放和随后的细胞色素 C 释放。进一步的研究表明,化合物 19 抑制紫外线诱导的

活性氧(ROS)产生,脂质过氧化和 DNA 损伤。化合物 19 可能通过沉默亲环蛋白 D 从而调节线粒体死亡途径。因此,化合物 19 可能是可以用于治疗子宫内膜细胞缺血再灌注损伤等疾病的先导化合物^[50]。根据该研究的方法,便可人工合成该小分子化合物。

随后,科研工作者的初步研究结果证实,低浓度的化合物 19(1 $\mu\text{mol/L}$)能显著抑制 OGDR 诱导的子宫内膜细胞程序性坏死。其活性要显著优于传统的亲环蛋白 D 抑制剂 CsA。因此,通过体内、外系统观察新型亲环蛋白 D 抑制剂化合物 19 抗子宫内膜细胞缺血再灌注损伤作用,解析其作用的分子机制,可能是临床实践中抗子宫内膜细胞缺血再灌注损伤的新思路、新工具。

通过对近年来科研工作的汇总,作者认为 L/R(体外则为 OGDR 模型)诱导子宫内膜细胞 p53 线粒体转位^[51]后者亲环蛋白 D(线粒体 mPTP 组成蛋白)耦联,从而介导线粒体 mPTP 开放,细胞色素 C 释放, ROS 生成,细胞程序性坏死。该机制可能是 L/R 诱导子宫内膜细胞损伤的核心分子机制。而通过药理学(如化合物 19)手段,便可靶向阻断该线粒体通路而抑制缺血再灌注诱导的子宫内膜细胞死亡。

参考文献

- [1] LH Toledo-Pereyra. Advances in Ischemia and Reperfusion [J]. Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research, 2015, 28(5): 233 - 235.
- [2] Halladin N L. Oxidative and inflammatory biomarkers of ischemia and reperfusion injuries[J]. Dan Med J, 2015, 62(4): B5054 - B5063.
- [3] Van de Velde M, Diez C, Varon AJ. Obstetric hemorrhage [J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2015, 28(2): 186 - 190.
- [4] Mullins T L, Miller R J, Mullins E S. Evaluation and Management of Adolescents with Abnormal Uterine Bleeding[J]. Pediatr Ann, 2015, 44(9): e218 - e222.
- [5] Deering S, Rowland J. Obstetric emergency simulation[J]. Semin Perinatol, 2013, 37(3): 179 - 188.
- [6] Bennett A R, Gray SH. What to do when she's bleeding through: the recognition, evaluation, and management of abnormal uterine bleeding in adolescents[J]. Curr Opin Pediatr, 2014, 26(4): 413 - 419.
- [7] Mullins T L, Miller RJ, Mullins E S. Evaluation and Management of Adolescents with Abnormal Uterine Bleeding[J]. Pediatr Ann, 2015, 44(9): e218 - e222.
- [8] Levy-Zauberman Y, Pourcelot A G, Capmas P, et al. Update on the management of abnormal uterine bleeding[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2017, 46(8): 613 - 622.

- [9] Pecchioli Y, Oyewumi L, Allen LM, et al. The Utility of Routine Ultrasound in the Diagnosis and Management of Adolescents with Abnormal Uterine Bleeding[J]. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2017, 30(2): 239–242.
- [10] Clark S L. Obstetric hemorrhage[J]. *Semin Perinatol*, 2016, 40(2): 109–111.
- [11] Le Gouez A, Mercier F J. Major obstetric hemorrhage[J]. *Transfus Clin Biol*, 2016, 23(4): 229–232.
- [12] AJ Friedman. Obstetric hemorrhage[J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2013, 27(Suppl 4): 674–679.
- [13] Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(14): 1454–1471.
- [16] Kalogeris T, Bao Y, Korthuis R J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning[J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 702–714.
- [17] Javadov S, Kuznetsov A. Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin d[J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 76–83.
- [19] Tsujimoto Y, Nakagawa T, Shimizu S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(9/10): 1297–1300.
- [20] Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 835–840.
- [21] Jobe S M, Wilson K M, Leo L, et al. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis[J]. *Blood*, 2008, 111(3): 1257–1265.
- [22] Halestrap A P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die[J]. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 2): 232–237.
- [23] Ong S B, Gustafsson A B. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 190–196.
- [24] Hausenloy D J, Yellon D M. Ischaemic conditioning and reperfusion injury[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13(4): 193–209.
- [28] Votyakova T V, Reynolds IJ. DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria[J]. *J Neurochem*, 2001, 79(2): 266–277.
- [29] Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 181–189.
- [30] Vaseva A V, Marchenko N D, Ji K, et al. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis[J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1536–1548.
- [31] Elrod J W, Molkentin J D. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Circ J*, 2013, 77(5): 1111–1122.
- [32] Ying Y, Padanilam B J. Regulation of necrotic cell death; p53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(11/12): 2309–2324.
- [33] Komarov P G, Komarova E A, Kondratov R V, et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy[J]. *Science*, 1999, 285(5434): 1733–1737.
- [38] Uchino H, Ishii N, Shibasaki F. Calcineurin and cyclophilin D are differential targets of neuroprotection by immunosuppressants CsA and FK506 in ischemic brain damage[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2003, 86: 105–111.
- [39] Fayaz S M, Raj Y V, Krishnamurthy R G. CypD: The Key to the Death Door[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2015, 14(5): 654–663.
- [41] Ptak R G, Gally P A, Jochmans D, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells by Debio-025, a novel cyclophilin binding agent[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(4): 1302–1317.
- [42] Reutenauer J, Dorchies O M, Patthey-Vuadens O, et al. Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(4): 574–584.
- [43] Wissing E R, Millay D P, Vuagniaux G, et al. Debio-025 is more effective than prednisone in reducing muscular pathology in mdx mice[J]. *Neuromuscul Disord*, 2010, 20(11): 753–760.
- [44] Hopkins S, Gally P. Cyclophilin inhibitors: an emerging class of therapeutics for the treatment of chronic hepatitis C infection[J]. *Viruses*, 2012, 4(11): 2558–2577.
- [45] Hopkins S, Scoreaux B, Huang Z, et al. SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(2): 660–672.
- [47] Dunsmore C J, Malone K J, Bailey K R, et al. Design and synthesis of conformationally constrained cyclophilin inhibitors showing a cyclosporin-A phenotype in *C. elegans*[J]. *ChemBiochem*, 2011, 12(5): 802–810.
- [48] Akao M, Takeda T, Kita T, et al. Serofendic acid, a substance extracted from fetal calf serum, as a novel drug for cardioprotection[J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2007, 25(4): 333–341.
- [49] Shore E R, Awais M, Kershaw N M, et al. Small Molecule Inhibitors of Cyclophilin D To Protect Mitochondrial Function as a Potential Treatment for Acute Pancreatitis[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(6): 2596–2611.
- [50] Xie L, Cheng L, Xu G, et al. The novel cyclophilin D inhibitor compound 19 protects retinal pigment epithelium cells and retinal ganglion cells from UV radiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(4): 807–812.
- [51] Fayaz S M, Rajanikant G K. Modelling the molecular mechanism of protein-protein interactions and their inhibition: CypD-p53 case study[J]. *Mol Divers*, 2015, 19(4): 931–943.