

•基础研究•

线粒体细胞外裂解规律及环孢霉素 A 对其抑制作用的实验研究

常玉立¹, 刘宏², 温建民³, 孙天胜²

(1.解放军医学院,北京 100800; 2.北京军区总医院,北京 100700; 3.中国中医科学院望京医院,北京 100102)

【摘要】 目的:观察线粒体细胞外裂解规律及环孢霉素 A (cyclosporine A, CsA) 对其抑制作用, 探讨创伤后 SIRS 的发病机制与缓解策略。**方法:**选取 10 只 60~70 日龄, 体重 240~280 g 的雄性 SD 大鼠, 用于细胞线粒体的分离。新鲜分离大鼠线粒体随机分为 2 组, 分别在添加或不添加 CsA 的血浆环境下培养 8 h, 每 30 min 通过 ELISA 方法检测培养液中线粒体特征性蛋白 COX、MDH 浓度。大鼠 NR8383 巨噬细胞系随机分为 6 组, 对照组(A 组): 常规培养液培养; NR8383+CsA 共培养组(B 组): 培养液中含 10 mmol/L CsA; NR8383+完整线粒体共培养组(C 组): 培养液中添加完整线粒体(mtDNA=5 μg/ml); NR8383+完整线粒体+CsA 共培养组(D 组): 培养液中添加完整线粒体(mtDNA=5 μg/ml)与 10 mmol/L CsA; NR8383+裂解线粒体共培养组(E 组): 培养液中添加裂解的线粒体(mtDNA=5 μg/ml); NR8383+裂解线粒体+CsA 共培养组(F 组): 培养液中添加裂解线粒体(mtDNA=5 μg/ml)与 10 mmol/L CsA。在培养 1、3 和 5 h 时, 通过 ELISA 方法检测上清中 TNF-α 及 IL-6 的浓度。**结果:**在线粒体血浆培养中, MDH 与 COX 水平随时间延长而升高, 并在 3 h 与 3.5 h 时达到峰值, 而 CsA 使其峰值均延迟到 4.5 h; 在巨噬细胞不同培养条件下, A 组与 B 组的 TNF-α 与 IL-6 在不同时间点基本稳定, 其他组间 TNF-α 与 IL-6 存在差异。培养 1 h 时, 与 C 组比较, D 组的 TNF-α 与 IL-6 无显著差异, E 组 TNF-α 与 IL-6 显著增高; 培养 3 h 时, 与 C 组相比, D 组的 TNF-α 及 IL-6 水平均显著降低, E 组 TNF-α 与 IL-6 水平显著增高; 培养 5 h 时, 与 C 组相比, D 组 TNF-α 及 IL-6 水平仍显著降低, E 组 TNF-α 与 IL-6 无显著变化。F 组与 E 组的 TNF-α 与 IL-6 水平无显著差异。**结论:**线粒体在血浆中随时间而逐渐裂解, 进一步激活巨噬细胞, CsA 对线粒体的裂解具有抑制作用, 从而抑制其对巨噬细胞的激活效应。

【关键词】 线粒体; 细胞分裂; 环孢霉素 A; 创伤和损伤; 动物, 实验; 大鼠, Sprague-Dawley

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.11.013

Extracellular splitting pattern of mitochondria and the depressant effects of CsA on the process CHANG Yu-li, LIU Hong, WEN Jian-min, and SUN Tian-sheng*. *Beijing Military Region General Hospital, Beijing 100700, China

ABSTRACT Objective: To investigate extracellular splitting pattern of mitochondria and the depressant effects of CsA on the process and explore the mechanism of post-traumatic SIRS and its therapeutic strategy. **Methods:** Ten male SD rats with 60 to 70 days age and 240 to 280 g weight were used for mitochondrial isolation. Freshly isolated mitochondria were randomly divided into two groups, which were cultured in blood plasma with or without CsA respectively for 8 h. COX and MDH were assayed by ELISA every 30 min. Meanwhile, Rat macrophage cell line NR8383 were treated as follows, control (group A): cultivation with normal medium; NR8383+CsA co-culture group (group B): culture medium was supplemented with CsA of 10 mmol/L; NR8383+intact mitochondria co-culture group (group C): culture medium was supplemented with intact mitochondria (mtDNA=5 μg/ml); NR8383+intact mitochondria+CsA co-culture group (group D): culture medium was supplemented with intact mitochondria (mtDNA=5 μg/ml) and CsA of 10 mmol/L; NR8383+disrupted mitochondria co-culture group (group E): culture medium was supplemented with disrupted mitochondria (mtDNA=5 μg/ml); NR8383+disrupted mitochondria+CsA co-culture group (group F): culture medium was supplemented with disrupted mitochondria (mtDNA=5 μg/ml) and CsA of 10 mmol/L. TNF-α and IL-6 concentrations in supernatant were assessed at 1, 3, 5 h after culture. **Results:** In the mitochondria plasma cultures, MDH and COX levels were increased with the time and peaked at about 3 h and 3.5 h; CsA can delay the appearance of peak to 4.5 h. Among different treated groups, there was no significant difference in TNF-α and IL-6 between group A and group B; there was significant difference in TNF-α and IL-6 other groups. After 1 h culture, compared with group C, no significant difference of TNF-α and IL-6 was observed in group D, while TNF-α and IL-6 were significant higher in group E; after 3 h culture, compared with group C, TNF-α and IL-6 were significantly lower in group D, while TNF-α and IL-6 were significantly higher in group E; after 5 h culture, compared with group C, TNF-α and IL-6 were significantly lower in

通讯作者: 孙天胜 E-mail: suntiansheng@163.com

Corresponding author: SUN Tian-sheng E-mail: suntiansheng@163.com

group D, while no significant difference of TNF- α and IL-6 were observed in group E. At each time point, there was no significant difference in TNF- α and IL-6 between group F and group E. **Conclusion:** Mitochondria can split in serum with time, which will further activate macrophages. CsA has depressant effect to mitochondrial splitting on the process and will therefore inhibit the activation of macrophages.

KEYWORDS Mitochondria; Cell division; Cyclosporine A; Wounds and injuries; Animals, laboratory; Rats, Sprague-Dawley

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(11): 1037-1041 www.zggszz.com

随着社会经济的发展,各种创伤的发生率逐渐升高、损伤程度也日益严重,由此引发的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和进一步发生的多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)越来越多,已经成为青壮年人群死亡的主要原因之一^[1-2]。研究发现^[3],创伤导致的无菌性 SIRS 与感染性 SIRS 临床表现无显著差异,尽管无病原体感染,但损伤组织产生的某些细胞组织或代谢产物作为损伤相关模式分子(damage-associated molecular patterns, DAMPs)在结构上与病原体表达的特征性模式分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)相似,可激活巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞识别 PAMPs 的受体,从而引发 SIRS。现已明确,细胞损伤释放的线粒体是 DAMPs 的重要来源^[4-5],其内部的 DNA(mtDNA)^[6]与甲酰胺^[7]是 DAMPs 的主要成分。线粒体引发 SIRS 的主要原因是其与细菌同源,当细胞破损后进入细胞外,被免疫系统错认为细菌^[4,8]。完整线粒体具有独立的内膜和外膜,其脱离细胞后由完整到破裂的规律及其对免疫细胞的影响对于创伤后 SIRS 的发生发展具有重要意义。基于此,本研究拟将新分离的线粒体在离体血浆中培养,观察线粒体脱离细胞后随培养时间破裂的规律;同时分别将完整线粒体及破裂线粒体与巨噬细胞共培养,揭示线粒体对巨噬细胞的影响。此外,通过在不同实验分组中给予药物 CsA,探索 CsA 对线粒体破裂以及后续时间的干预效应。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

主要试剂:组织线粒体提取试剂盒(北京凯诺春天科技有限公司,批号:KNSM0020-100),线粒体 DNA 提取试剂盒(北京凯诺春天科技有限公司,批号:KNSD0020-100),大鼠 IL-6 定量 ELISA 试剂盒及大鼠 TNF- α 定量 ELISA 试剂盒(北京凯诺春天科技有限公司,批号:KNER1005、KNER1011),大鼠 COX 定量 ELISA 试剂盒、MDH 定量 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司),胎牛血清、F12-K 培养基及 CsA(美国 Sigma 公司)。主要仪器:台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:Centrifuge 5424R),CO₂

培养箱(德国 Heraeus 公司),分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司,型号:ND8000),酶标仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:MD-EMAX),96 孔酶联板(Costar 公司),紫外分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司,型号:UV-2000),Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司,型号:ABI 7500)。

1.2 实验动物

选取 60~70 日龄雄性 SD 大鼠 10 只,体重 240~280 g,由中国预防医学科学院提供,SPF 级。实验大鼠通过北京军区总医院伦理委员会审核通过,清洁级标准饲养,观察无异常者入组实验。

1.3 实验方法与分组

1.3.1 线粒体提取线粒体碎片及 mtDNA 制备 采用组织线粒体提取试剂盒,按说明书操作。全程置于冰面无菌操作。提取的线粒体分为两部分,一部分采用线粒体 DNA 提取试剂盒,按说明提取线粒体 DNA,并采用 qPCR 法测定 mtDNA 浓度;另一部分加 STE 缓冲液使之悬浮,加入蛋白抑制剂 Cocktail(1:100)置于冰上,采用声裂法处理(100% 振幅,10 次,30 s/次,间隔 30 s),4℃ 条件下离心 2 次(第 1 次 15 000 g,10 min;第 2 次 100 000 g,30 min),取上清得线粒体碎片(MTD),采用 qPCR 法测定 mtDNA 浓度,-80℃ 保存。制备的 mtDNA 用紫外分光光度计(UV)测定 A260/A280 介于 1.6~2.0 之间可用于实验,-80℃ 保存。

1.3.2 线粒体离体血浆培养及分组 实验前 24 h 禁食,饮蒸馏水。10%水合氯醛麻醉后,无菌操作下用肝素化采血管经腹主动脉采血,离心(1 000 g,4℃,15 min)制备血浆。将新分离的完整线粒体加入到新鲜血浆中,每孔 mtDNA 终浓度为 100 μ g/ml,随后分两组:(1)CsA 处理组:血浆中添加 10 mmol/L 的 CsA 进行培养;(2)对照组:不添加任何药物进行培养。两组培养物分别置于 48 孔培养板内,于 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下进行培养。

1.3.3 大鼠巨噬细胞培养及分组 采用大鼠 NR8383 巨噬细胞系,按本研究所常规方法培养。按照每培养孔 1×10^6 个细胞置入 48 孔培养板,于 37℃、含 5% CO₂ 及饱和湿度条件下进行培养。根据实验内容,随机分 6 组,对照组(A 组):常规培养液

培养; NR8383+C_sA 共培养组(B组):培养液中含 10 mmol/L C_sA; NR8383+完整线粒体共培养组(C组):培养液中添加完整线粒体(mtDNA=5 μg/ml); NR8383+完整线粒体+C_sA 共培养组(D组):培养液中添加完整线粒体(mtDNA=5 μg/ml)与 10 mmol/L C_sA; NR8383+裂解线粒体共培养组(E组):培养液中添加裂解的线粒体 (mtDNA=5 μg/ml); NR8383+裂解线粒体+C_sA 共培养组(F组):培养液中添加裂解线粒体(mtDNA=5 μg/ml)与 10 mmol/L C_sA。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 COX 和 MDH 的测定 线粒体离体血浆培养时, C_sA 处理组及对照组每 30 min 于 48 孔板各取 5 孔上清以定量 ELISA 试剂盒按说明分别检测 COX、MDH 浓度, 共 16 个连续时点。具体操作简述如下: 在酶标包被板上标准品稀释与加样后, 加入待测样品, 温育 30 min 后弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 拍干。然后每孔加入酶标试剂 50 μl, 空白孔除外。之后再经温育、洗涤后每孔先加入显色剂 A 50 μl, 再加入显色剂 B 50 μl, 轻轻震荡混匀, 37 °C 避光显色 15 min。然后每孔加终止液 50 μl, 终止反应。以 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值), 最后按标准曲线换算出具体浓度。

1.4.2 TNF-α 及 IL-6 浓度的测定 大鼠巨噬细胞培养中, 各组分别在 1、3、5 h 时取上清以定量 ELISA

法检测 TNF-α 及 IL-6 浓度, 每组每个时点 8 孔。操作方法同 COX、MDH 的测定。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计数资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, COX 与 MDH 在 C_sA 处理组及对照组两组之间的比较采用成组设计定量资料的 *t* 检验, TNF-α 及 IL-6 浓度的比较采用方差分析, 多组间两两比较采用 *q* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 COX 及 MDH 浓度变化

新鲜分离的完整线粒体与大鼠血浆共培养, ELISA 法检测显示随着培养时间的延长, 血浆中 COX 与 MDH 浓度逐渐增高(表 1)。培养 3 h 后, 血浆中 MDH 浓度达到峰值(32.10±3.44) ng/ml; 培养 3.5 h 后, 血浆中 COX 浓度达到峰值(1.35±0.06) ng/ml; 当线粒体在添加 C_sA 的血浆中培养时, 相应不同时间点的 COX 与 MDH 浓度均显著降低, 且峰值浓度的出现也显著延迟, 其中 MDH 浓度峰值延迟至 4.5 h (*t*=3.615, *P*=0.0112), COX 峰值也延迟到 4.5 h (*t*=2.561, *P*=0.0429)。

2.2 TNF-α 与 IL-6 浓度检测

分别在培养 1、3、5 h 时, A 组与 B 组的 TNF-α 与 IL-6 浓度基本保持稳定, 两组差异无统计学意义。其他各组与 A 组比较, TNF-α 与 IL-6 浓度在培

表 1 线粒体在血浆培养过程中 MDH 及 COX 浓度变化($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

Tab.1 MDH and COX concentration during cultivation of mitochondria in plasma($\bar{x} \pm s$, ng/ml)

培养时间 (h)	MDH 浓度				COX 浓度			
	血浆培养组	血浆+C _s A 培养组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	血浆培养组	血浆+C _s A 培养组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
0.0	8.57±1.16	8.46±1.25	0.129	0.9016	0.83±0.02	0.85±0.02	-1.249	0.2581
0.5	11.40±1.58	10.92±1.67	0.418	0.6908	0.88±0.02	0.86±0.02	1.414	0.2070
1.0	15.74±1.96	13.25±1.89	1.829	0.1172	0.96±0.05	0.88±0.03	2.744	0.0336
1.5	20.12±1.12	16.93±2.05	-2.649	0.0381	1.10±0.04	0.91±0.04	7.600	0.0003
2.0	24.00±2.76	18.23±2.44	3.133	0.0203	1.20±0.06	0.93±0.04	7.488	0.0030
2.5	28.71±3.07	19.15±2.82	4.587	0.0037	1.14±0.06	0.96±0.04	4.992	0.0025
3.0	32.10±3.44	20.42±2.97	5.140	0.0021	1.25±0.05	1.04±0.04	8.043	0.0002
3.5	26.12±3.20	21.36±2.10	2.487	0.0473	1.35±0.06	1.06±0.04	4.417	0.0045
4.0	25.10±2.81	22.52±2.54	1.362	0.2220	1.15±0.07	1.11±0.05	0.930	0.3883
4.5	23.67±2.61	24.60±2.32	-0.533	0.6134	1.22±0.06	1.25±0.05	-0.768	0.4715
5.0	22.65±2.42	22.21±2.57	0.249	0.8115	1.19±0.05	1.22±0.04	-0.937	0.3849
5.5	23.12±2.16	21.66±2.60	0.864	0.4209	1.24±0.05	1.20±0.05	1.131	0.3011
6.0	24.15±2.43	22.65±2.86	0.799	0.4545	1.19±0.04	1.19±0.05	0.0000	0.9998
6.5	23.37±2.56	21.65±2.31	0.998	0.3570	1.14±0.05	1.21±0.05	-2.186	0.0714
7.0	23.80±2.43	22.70±2.22	0.668	0.5287	1.23±0.05	1.18±0.04	1.562	0.1694
7.5	24.01±2.11	22.47±1.99	1.062	0.3691	1.18±0.05	1.15±0.05	-0.849	0.4287
8.0	23.33±2.49	21.20±2.37	0.844	0.4141	1.15±0.05	1.20±0.04	-1.562	0.1694

表 2 不同时间点各组 TNF-α 水平变化($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

Tab.2 Levels of TNF-α among 6 groups at different culture times($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

组别	样本量	培养时间		
		1 h	3 h	5 h
对照组(A组)	8	2.31±0.50	2.40±0.55	2.29±0.45
NR8383+Csa组(B组)	8	2.22±0.38	2.13±0.44	2.34±0.57
NR8383+完整线粒体组(C组)	8	3.20±0.71 ^{*1}	4.12±0.81 ^{△3}	5.73±0.92 ^{△6}
NR8383+完整线粒体+Csa组(D组)	8	2.81±0.58	3.32±0.62 ^{*2○1}	4.23±0.70 ^{△7#5}
NR8383+裂解线粒体组(E组)	8	4.84±0.91 ^{△1#1}	6.22±0.82 ^{△4#2}	5.18±0.75 ^{△8}
NR8383+裂解线粒体+Csa组(F组)	8	4.26±0.78 ^{△2}	5.55±0.85 ^{△5}	4.64±0.90 ^{△9}
F值	-	20.4317	45.3665	31.1451
P值	-	0.0000	0.0000	0.0000

注:与 A 组相比, ^{*1} $q=3.77$, ^{*2} $q=3.72$, $P<0.05$; ^{△1} $q=10.72$, ^{△2} $q=8.27$, ^{△3} $q=6.96$, ^{△4} $q=15.46$, ^{△5} $q=12.75$, ^{△6} $q=13.06$, ^{△7} $q=7.47$, ^{△8} $q=11.13$, ^{△9} $q=9.05$, $P<0.01$ 。与 C 组相比, ^{○1} $q=3.23$, $P<0.05$; ^{#1} $q=6.95$, ^{#2} $q=8.5$, ^{#3} $q=5.78$, $P<0.01$

Note: Compared with group A, ^{*1} $q=3.77$, ^{*2} $q=3.72$, $P<0.05$; ^{△1} $q=10.72$, ^{△2} $q=8.27$, ^{△3} $q=6.96$, ^{△4} $q=15.46$, ^{△5} $q=12.75$, ^{△6} $q=13.06$, ^{△7} $q=7.47$, ^{△8} $q=11.13$, ^{△9} $q=9.05$, $P<0.01$. Compared with group C, ^{○1} $q=3.23$, $P<0.05$; ^{#1} $q=6.95$, ^{#2} $q=8.5$, ^{#3} $q=5.78$, $P<0.01$

表 3 不同时间点各组 IL-6 水平变化($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

Tab.3 Levels of IL-6 among 6 groups at different culture times($\bar{x}\pm s$, ng/ml)

组别	样本量	培养时间		
		1 h	3 h	5 h
正常培养组(A组)	8	15.31±4.15	14.45±3.92	16.01±4.65
NR8383+Csa组(B组)	8	14.26±3.53	15.02±4.58	13.97±3.93
NR8383+完整线粒体组(C组)	8	21.09±5.26 ^{*1}	31.47±7.30 ^{△3}	46.12±10.52 ^{△6}
NR8383+完整线粒体+Csa组(D组)	8	18.10±4.89	23.29±6.18 ^{*2○1}	35.63±8.41 ^{△7○3}
NR8383+裂解线粒体组(E组)	8	29.34±7.32 ^{△1#1}	41.37±10.51 ^{△4○2}	52.40±12.00 ^{△8}
NR8383+裂解线粒体+Csa组(F组)	8	27.25±6.84 ^{△2}	38.62±9.26 ^{△5}	48.11±11.19 ^{△9}
F值	-	10.2944	20.0118	27.5733
P值	-	0.0000	0.0000	0.0000

注:与 A 组相比, ^{*1} $q=3.12$, ^{*2} $q=3.40$, $P<0.05$; ^{△1} $q=7.21$, ^{△2} $q=6.14$, ^{△3} $q=6.55$, ^{△4} $q=10.36$, ^{△5} $q=9.30$, ^{△6} $q=9.45$, ^{△7} $q=6.15$, ^{△8} $q=11.42$, ^{△9} $q=10.07$, $P<0.01$ 。与 C 组相比, ^{○1} $q=3.15$, ^{○2} $q=3.81$, ^{○3} $q=3.29$, $P<0.05$; ^{#1} $q=4.24$, $P<0.01$

Note: Compared with group A, ^{*1} $q=3.12$, ^{*2} $q=3.40$, $P<0.05$; ^{△1} $q=7.21$, ^{△2} $q=6.14$, ^{△3} $q=6.55$, ^{△4} $q=10.36$, ^{△5} $q=9.30$, ^{△6} $q=9.45$, ^{△7} $q=6.15$, ^{△8} $q=11.42$, ^{△9} $q=10.07$, $P<0.01$. Compared with group C, ^{○1} $q=3.15$, ^{○2} $q=3.81$, ^{○3} $q=3.29$, $P<0.05$; ^{#1} $q=4.24$, $P<0.01$

养过程中均显著升高(见表 2-3)。

培养 1 h 后, C 组与 E 组的 TNF-α、IL-6 浓度水平显著增高; 培养 3 h 后, C、D 组 TNF-α 和 IL-6 水平均显著降低, E 组 TNF-α、IL-6 水平显著升高; 培养 5 h, C、D 组 TNF-α、IL-6 水平仍显著降低。F 组与 E 组的 TNF-α 与 IL-6 水平在培养的 1、3、5 h 时均无显著差异。

3 讨论

临床实践发现, 创伤、感染、中毒、缺血/再灌注损伤等因素所致 SIRS 尽管无细菌感染, 但其临床表现与感染性 SIRS 具有高度的相似性。因而众多学者推断, 无菌性 SIRS 可能存在类似于细菌等病原体的炎症启动因子。然而, 这一启动因子是什么? 是长久以来研究人员探索的重要问题。近年来的研究发现,

组织细胞损伤后释放的线粒体裂解产生 DAMPs 是联接创伤、炎症到 SIRS 的关键因素^[4,9], 受到研究人员的广泛关注。因此, 揭示线粒体释放到细胞外后的裂解规律, 具有重要意义。

3.1 线粒体细胞外裂解规律及其研究意义

线粒体的裂解与 DAMPs 的产生密切相关, 对炎症由局部扩展到全身具有直接影响, 在损伤早期维持线粒体完整性对于降低 SIRS 风险具有重要价值。明确线粒体在细胞外的裂解规律, 一方面将为揭示 SIRS 形成机制提供重要线索, 另一方面, 也将为寻找有效治疗策略提供参考, 具有重要的临床及基础研究意义。MDH 是线粒体基质内的特征性蛋白, COX 是线粒体内膜的特征性蛋白, 因此 COX 的水平代表了线粒体外膜损伤的程度, 而 MDH 的浓度则代

表示了线粒体内膜损伤的程度。本研究观察到线粒体在血浆中培养过程中 MDH、COX 水平随培养时间而升高,MDH 峰值出现于完整线粒体释放后 3 h,COX 峰值在 3.5 h,达到峰值后 MDH 及 COX 浓度大致恒定,表明线粒体在血浆中的裂解是随时间逐渐发生的过程,且 3~3.5 h 裂解将达到最大程度。DAMPs 主要由裂解的线粒体释放,进而可能引起 SIRS。这些现象提示,在机体损伤后,线粒体裂解或完全裂解之前,通过适当的干预手段抑制线粒体的裂解,将减少 SIRS 的释放,从而降低 SIRS 发生的风险或严重程度。本研究观察到线粒体在细胞外随着培养时间而逐渐裂解,经过一定时间后裂解达到峰值(本研究观察为 3~3.5 h)。结果表明线粒体释放到细胞外后的裂解是一个渐进过程,并非到细胞外迅速全部膨胀裂解,从而为这一过程的干预提供了有利时机。在进一步的研究中,笔者将线粒体与巨噬细胞共培养,并在线粒体裂解前与裂解后给予 CsA 干预,结果显示线粒体裂解前给予 CsA 干预显著降低了巨噬细胞炎性因子 TNF- α 与 IL-6 的分泌(D 组与 C 组比较),提示 CsA 干预对线粒体诱导的巨噬细胞激活具有抑制作用;然而,向裂解后的线粒体中给予 CsA 干预对巨噬细胞炎性因子分泌并无明显影响(F 组与 E 组比较)。上述结果表明,由线粒体细胞外裂解导致的病理过程中(如创伤后 SIRS),干预措施的实施具有一定的时机性,线粒体裂解程度最低时可能是最有效的干预时机。

3.2 CsA 对线粒体裂解的干预效应与意义

在线粒体破裂过程中,线粒体通透性转换孔(the mitochondrial permeability transition pore,MPT)是其重要影响因素之一。研究表明,MPT 开放将引起线粒体膜电位降低,进一步导致线粒体肿胀以致内外膜的破裂^[10-11]。CsA 是线粒体 MPT 的特异性抑制剂^[12],能够抑制 MPT 的开放。本研究观察了 CsA 对线粒体细胞外裂解具有显著的抑制效应,表明线粒体脱离细胞后在血浆中的裂解与 MPT 的开放具有直接关系,这在一定程度上反映了 CsA 减轻线粒体裂解以及临床上有望缓解 SIRS 的作用机制。

此外,本研究发现,即使在破碎线粒体+巨噬细胞培养物中加入 CsA,也能一定程度降低 TNF- α 及 IL-6 水平。由此可见,除抑制线粒体裂解、减少 DAMPs 产生外,CsA 本身也能抑制巨噬细胞的激活作用,这可能与 CsA 免疫抑制剂的作用有关^[13],值得进一步研究。这些数据提示,CsA 可通过多种途径抑

制线粒体参与的免疫细胞活化作用,从而对创伤后 SIRS 产生缓解作用,具有重要临床参考价值。

综上,细胞损伤使线粒体释放至细胞外,逐渐发生裂解,于 3~3.5 h 达到峰值;裂解的线粒体将活化免疫细胞,促进炎性因子的产生。CsA 作为一种有效的干预药物,不仅能够抑制线粒体的裂解,减少 DAMPs 的释放,还能通过免疫抑制作用减轻巨噬细胞的激活。细胞损伤的早期,应用 CsA 干预有望降低 SIRS 风险或减轻 SIRS 症状。

参考文献

- [1] Valparaiso AP, Vicente DA, Bograd BA, et al. Modeling acute traumatic injury[J]. J Surg Res, 2015, 194(1): 220-232.
- [2] 付常国. 骨盆型严重多发伤的损伤控制复苏[J]. 中国骨伤, 2015, 28(5): 399-403.
Fu CG. Damage control resuscitation of severe multiple trauma in the pelvic fractures[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(5): 399-403. Chinese with abstract in English.
- [3] Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, et al. Danger signals activating the immune response after trauma[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012: 315941.
- [4] Zhang Q, Raouf M, Chen Y, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury[J]. Nature, 2010, 464(7285): 104-107.
- [5] van der BR, Boes M. Mitochondria in autoinflammation: cause, mediator or bystander[J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(5): 263-271.
- [6] Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase[J]. Shock, 2010, 34(1): 55-61.
- [7] Raouf M, Zhang Q, Itagaki K, et al. Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1[J]. J Trauma, 2010, 68(6): 1328-1335.
- [8] Manfredi AA, Rovere-Querini P. The mitochondrion-a Trojan horse that kicks off inflammation[J]. N Engl J Med, 2010, 362(22): 2132-2134.
- [9] Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility[J]. Cell, 2015, 160(5): 816-827.
- [10] Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 835-840.
- [11] Brenner C, Moulin M. Physiological roles of the permeability transition pore[J]. Circ Res, 2012, 111(9): 1237-1247.
- [12] Bernardi P. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondrial channel involved in cell death[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1275(1-2): 5-9.
- [13] Tábara LC, Poveda J, Martín-Cleary C, et al. Mitochondria-targeted therapies for acute kidney injury[J]. Expert Rev Mol Med, 2014, 16: e13.

(收稿日期:2015-07-19 本文编辑:李宜)