

·综述·

脓毒症和线粒体功能障碍

龚平 李春盛

目前虽然脓毒症的研究已取得了很大进展^[1],但脓毒症引起多器官功能障碍综合征(MODS)的病理生理机制仍不明确^[2]。脓毒症的一个主要特征是细胞病理性缺氧,组织器官线粒体氧化磷酸化障碍,导致氧利用障碍,能量产生下降^[3],而线粒体功能降低是细胞氧利用障碍的根本原因,这在 MODS 发生发展及功能恢复中均起关键性作用^[4]。由此,以线粒体为靶向的治疗逐渐受到关注^[5-7]。但是,在研究线粒体靶向治疗策略之前,我们需要更多地了解器官线粒体功能变化与脓毒症发生发展的关系。

1 脓毒症早期的线粒体变化

1.1 线粒体功能的变化:脓毒症代谢异常根本不是缺氧或缺乏底物引起的,而是线粒体功能降低引起的氧利用障碍。在脓毒症大鼠模型上发现心肌代谢及线粒体功能均降低,存在着与冬眠相同的生化变化^[8],如葡萄糖转运和糖原储备增加,这也可能是“冬眠样反应”,是脓毒症急性期一种可能的防御策略。在脓毒症早期线粒体功能明显下降^[9-10],尤其是在时间长(>12 h)的脓毒症模型上^[9];但在时间短(<6 h)的脓毒症模型上也有线粒体功能增加的^[11],或是先增加后降低的^[12],或是没有明显变化的^[13]。出现结果不一致的原因可能主要与研究对象、动物模型制作方法、脓毒症持续时间长度和严重程度、取材的器官或细胞不同、是否液体复苏或线粒体分离方法不同等有关。另外,线粒体功能降低的程度还与预后有关^[10]。线粒体功能障碍发生机制有以下几方面。

1.1.1 内毒素:内毒素可直接损害线粒体功能,抑制电子传递^[14],损害线粒体复合物 I 呼吸,使呼吸控制率显著下降,ATP 产生减少^[15]。

1.1.2 活性氮(RNS):RNS 包括一氧化氮(NO)及过氧亚硝酸盐(ONOO⁻),在线粒体功能障碍中发挥关键作用^[7]。在脓毒症早期,线粒体诱导型一氧化氮合酶(mt-iNOS)被激活,NO 大量产生^[16]。NO 主要作用是 O₂ 竞争性结合复合物 IV 的亚铁细胞色素 a₃ 位点,可逆性地抑制复合物 IV 活性^[17],从而抑制线粒体功能。低氧环境下,低浓度的 NO 能可逆性抑制线粒体呼吸链功能,下调 ATP 供应和氧耗,使细胞能产生缺氧适应性的“冬眠样反应”而存活下来^[18]。但高浓度 NO 能不可逆性中断线粒体功能,其原因是高浓度的 NO 使线粒体内的锰超氧化物歧化酶(MnSOD)失活,并和超氧阴离子(O₂⁻)反应产生 ONOO⁻,不可逆性抑制线粒体呼吸。在脓毒症中 O₂⁻ 和

NO 同时大量产生(增加 1000 倍),可使 ONOO⁻ 的产量增加 100 万倍^[19]。

ONOO⁻ 的毒性作用包括:①与电子传递链大部分组分发生反应,主要是可逆性抑制复合物 IV 和不可逆性抑制复合物 I,导致线粒体功能障碍^[20]。②激活 mt-iNOS 后可大量产生 NO,并增加呼吸链电子漏,使活性氧(ROS)产生增加。③损伤线粒体内外膜,增加膜通透性,尤其是内膜通透性转换孔(MPTP)开放,各种细胞凋亡诱导物[如细胞色素 C、第二个线粒体来源的胱氨酸酶激活剂(Smac)、凋亡诱导因子(AIF)、核酸内切酶 G(EndoG)和线粒体丝氨酸蛋白酶(Omi/HtrA2)]流出线粒体,介导细胞凋亡,而且释放质子,使线粒体膜电位消失,中止电子传递和 ATP 产生^[21-22]。④损伤 DNA,激活 DNA 修复酶聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1[Poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1],当 DNA 受损严重时,PARP-1 过表达耗竭还原型辅酶 I(NADH),引起细胞内 ATP 储备明显下降,导致细胞功能障碍或死亡(即 DNA 不可逆性受损后的“自杀假说”)^[7]。⑤直接氧化巯基,如还原型谷胱甘肽。

1.1.3 ROS:线粒体是 ROS 产生的主要场所,除了活化的炎性细胞中还还原型辅酶 II(NADPH)氧化酶产生一部分 ROS 之外,细胞内超过 90% 的 ROS 是由电子传递链电子漏形成的^[23]。复合体 I 和复合体 III 是线粒体电子漏的发生之处^[23]。脓毒症时线粒体中 ROS 大量产生^[24],直接损害膜脂、膜蛋白、DNA(也可激活 PARP-1)等大分子,引起线粒体功能障碍,导致细胞损伤或死亡。此外,ROS 还有“细胞信号分子”和“基因表达开关”的积极作用。当出现缺氧时线粒体电子传递链通过释放 ROS 发挥 O₂ 感受器的作用^[25]。

1.1.4 炎症介质:其他炎症介质也可直接损害线粒体功能。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)能增加线粒体 ROS 的产生^[26],并且 TNF-α 对线粒体的损害可介导 TNF-α 的其他细胞毒性。TNF-α 能在细胞色素 C 氧化酶水平抑制氧化磷酸化反应,主要使细胞色素 C 氧化酶亚单位 I 上的酪氨酸磷酸化^[27]。

1.1.5 线粒体相关基因表达下调:在脓毒症中线粒体多个基因被激活、转录,基因表达有的上调、有的下调^[28]。给健康志愿者体内注射内毒素后发现,在内毒素血症的症状表现出来之前,编码中性粒细胞线粒体呼吸酶的基因表达即下调^[29]。Callahan 和 Supinski^[30]在给大鼠注射内毒素后发现,膈肌线粒体电子传递链呼吸酶亚单位消失,并且线粒体功能障碍、氧耗降低,提示编码这些呼吸酶亚单位蛋白的基因表达可能降低。线粒体功能下降可能与呼吸链相关基因表达下调有关,但是具体调控机制不明。

1.2 线粒体结构的变化:脓毒症早期就存在线粒体超微结构异常^[4,31-32]。各个器官线粒体超微结构变化与线粒体功能变化

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.022

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972806)

作者单位:116011 辽宁,大连医科大学附属第一医院急诊科(龚平);100020 北京,首都医科大学附属北京朝阳医院急诊科(李春盛)

通信作者:李春盛,Email:lcscyy@163.com

密切相关,损伤轻重不一,但一般都表现为线粒体肿胀、内外膜完整性破坏、嵴紊乱,形态学定量分析发现,嵴的膜表面密度和膜间空隙明显增加,基质密度降低。另外,线粒体内膜和外膜受损机制不同,内膜受损可能与线粒体 MPTP 开放有关,而外膜受损可能与线粒体通透转换无关,初步证据显示 Bax 可能参与外膜损害^[31],但这需要进一步研究证实。

1.3 ATP 水平:ATP 水平可反映能量产生和利用之间的平衡,但是不能准确反映 ATP 合成或消耗的增减。脓毒症早期,某些器官可能代谢增加,线粒体产生 ATP 随之增加,ATP 水平维持不变。随着代谢适应性下降(即“冬眠样反应”)及线粒体功能的降低,对 ATP 的需求和产生均下降,ATP 水平仍能维持^[33]。但是当线粒体功能严重受损时,导致 ATP 产生明显减少,从而不能满足机体需求,ATP 水平就明显下降^[9,34],甚至耗竭,引起 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶等 ATP 依赖的酶功能障碍,导致线粒体内钙超载,并且 MPTP 开放,线粒体肿胀、膜破裂,细胞死亡,所以 ATP 水平下降提示预后很差^[10]。

在脓毒症中 ATP 水平还受线粒体 F₀-F₁-ATP 合成酶复合体及其抑制蛋白 ATP 合成酶 F₁ 亚单位抑制剂(IF₁)的影响,IF₁ 表达抑制与随后的 F₀-F₁-ATP 酶活性升高可促进 ATP 浓度下降^[2]。

1.4 氧耗:氧耗是指单位时间全身组织消耗氧的总量,它决定于机体组织的代谢状态。脓毒症早期,氧耗明显增加并依赖于氧供^[12]。但随着脓毒症持续加重,氧耗下降,主要原因是线粒体功能下降,使氧利用率下降,提示患者预后很差,病死率增加。

1.5 氧分压:组织氧分压反映局部氧供和氧耗之间的平衡,间接反映组织是否缺氧。在脓毒症中,无论是高动力型还是低动力型,只要给予充足的液体复苏,组织氧分压都是升高的^[4],这是因为线粒体功能降低,氧利用明显降低,组织细胞对氧的摄取率及氧耗随之降低引起。所以,脓毒症中组织大多不是缺氧,而是氧利用障碍^[3]。

2 脓毒症 MODS 期的线粒体变化

随着脓毒症持续加重,机体发展至 MODS 阶段。目前认为,MODS 是机体为了适应过度炎症反应而发生的一种由内分泌介导的代谢反应^[35],这是一种潜在的保护性机制。线粒体功能降低是 MODS 发病的关键因素^[9]。在脓毒症早期,由于 ROS、RNS、炎症介质等损害线粒体的结构,引起线粒体数量及功能均下降^[36]。并且线粒体功能和代谢相互影响,使代谢、能量消耗及线粒体能量产生均降低,形成一个新的平衡,以应付机体内环境恶化以及强烈的有害刺激,从而增加存活机会。这种适应性的反应使细胞功能降低或关闭,器官功能降低(即 MODS)。MODS 一个主要特征是既没有细胞凋亡,也没有坏死^[37],如果机体存活下来,大多数器官功能(不是所有)几乎能完全恢复^[38]。Singer^[41]认为,脓毒症 MODS 的这种适应性非细胞死亡的休眠样状态可能就是一种保护性的变化。目前这种“冬眠样反应”的基因调控机制不清楚,可能与低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)^[39]或 AMP-活化蛋白激酶调控有关^[40]。

但是,如果严重脓毒症持续时间太长,线粒体结构和功

能将呈现不可逆性的改变。细胞色素 C 氧化酶的血红素 a、a₃ 和亚单位 I 的水平降低可使细胞色素 C 氧化酶不可逆性受到抑制^[41]。NO 和 ONOO⁻ 大量增加使其对电子传递链复合物的抑制变得不可逆;线粒体膜通透性增加,尤其是 MPTP 开放,质子梯度消失,膜电位消失,结果是 ATP 能量合成停止(解耦联),而电子和质子转运持续不减,使电子传递链电子漏增加,线粒体中 ROS 和 RNS 的产生急剧增加。并且细胞可释放自身 DNA 结合蛋白——高迁移率族蛋白 B1(HMGB1, 一种晚期促炎因子),加重炎症级联反应^[42]。各种因素相互影响,恶性循环,最后导致线粒体功能障碍,细胞能量衰竭,引起器官功能衰竭。

3 脓毒症恢复阶段的线粒体变化

虽然脓毒症发展到 MODS 阶段存在明显的生理功能障碍和生化指标异常,病死率很高,但是存活下来的严重脓毒症患者受累器官功能在数天至数周内几乎都能恢复到正常水平,甚至是再生能力很差的器官^[43]。患者临床康复取决于线粒体功能的恢复及线粒体的快速再生。在恢复阶段,由于组织代谢增加^[4],各器官氧耗反弹性升高^[44],提示线粒体氧利用能力增强。

NO 在线粒体的快速再生中起关键作用^[45],可使线粒体蛋白硝化,极大地加快了新线粒体蛋白的周转^[46]。因此,持久的 NO 过量产生在脓毒症初期可使线粒体功能抑制,而在恢复期又可刺激线粒体功能复原。

在脓毒症恢复期,受损的线粒体 DNA 结构和功能恢复正常的一个重要原因是促进线粒体再生和生物合成的基因核呼吸因子(NRF1、NRF2)表达上调,并且过氧化物酶增殖物激活受体 γ 辅激活蛋白 1 α (PGC-1 α)强烈激活线粒体生物合成^[39,47],使细胞内线粒体数量和功能增加。但目前 NRF1 和 NRF2 等表达上调的上游调控机制不清楚。

4 总结

线粒体变化在脓毒症 MODS 发病和受累器官功能恢复中起关键作用。由于线粒体功能抑制和 MODS 可能是机体的适应性反应,所以脓毒症治疗最有效的措施之一应该是尽可能地减缓机体对外界刺激的过度反应。

但是脓毒症及 MODS 发病机制很复杂,到现在还没完全弄清楚。线粒体功能变化在脓毒症及 MODS 发病机制中的确切作用及调控机制仍然存在很多争议^[2]。可喜的是,线粒体在脓毒症进展中的重要作用及线粒体靶向治疗已受到关注。相信在不久的将来,线粒体靶向治疗可能为脓毒症 MODS 的临床治疗带来革新性的变化。

参考文献

- [1] 李志军,王东强,田永超,等. 2010 德国脓毒症指南解读——关于脓毒症的预防、诊断、治疗及后续护理. 中国危重病急救医学, 2011, 23: 257-262.
- [2] Exline MC, Crouser ED. Mitochondrial dysfunction during sepsis: still more questions than answers. Crit Care Med, 2011, 39: 1216-1217.
- [3] Fink MP. Bench-to-bedside review: cytopathic hypoxia. Crit Care, 2002, 6: 491-499.
- [4] Singer M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus

- multiple organ failure. *Crit Care Med*, 2007, 35: S441-448.
- [5] Rocha M, Herance R, Rovira S, et al. Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis. *Infect Disord Drug Targets*, 2012, 12: 161-178.
- [6] Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, et al. Targeting mitochondria. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 87-97.
- [7] Andrades ME, Morina A, Spasić S, et al. Bench-to-bedside review: sepsis - from the redox point of view. *Crit Care*, 2011, 15: 230.
- [8] Levy RJ, Piel DA, Acton PD, et al. Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med*, 2005, 33: 2752-2756.
- [9] Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 286: R491-497.
- [10] Brealey D, Brand M, Hargreaves I, et al. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, 2002, 360: 219-223.
- [11] Fredriksson K, Fläring U, Guillet C, et al. Muscle mitochondrial activity increases rapidly after an endotoxin challenge in human volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2009, 53: 299-304.
- [12] Rosser DM, Manji M, Cooksley H, et al. Endotoxin reduces maximal oxygen consumption in hepatocytes independent of any hypoxic insult. *Intensive Care Med*, 1998, 24: 725-729.
- [13] Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 316: 70-76.
- [14] Vanasco V, Magnani ND, Cimolai MC, et al. Endotoxemia impairs heart mitochondrial function by decreasing electron transfer, ATP synthesis and ATP content without affecting membrane potential. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44: 243-252.
- [15] Porta F, Bracht H, Weikert C, et al. Effects of endotoxin and catecholamines on hepatic mitochondrial respiration. *Inflammation*, 2009, 32: 315-321.
- [16] Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*, 2011, 107: 57-64.
- [17] Torres J, Darley-Usmar V, Wilson MT. Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem J*, 1995, 312: 169-173.
- [18] Bateman RM, Sharpe MD, Goldman D, et al. Inhibiting nitric oxide overproduction during hypotensive sepsis increases local oxygen consumption in rat skeletal muscle. *Crit Care Med*, 2008, 36: 225-231.
- [19] Li H, Hu J, Xin W, et al. Production and interaction of oxygen and nitric oxide free radicals in PMA stimulated macrophages during the respiratory burst. *Redox Rep*, 2000, 5: 353-358.
- [20] Beltrán B, Mathur A, Duchon MR, et al. The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 14602-14607.
- [21] 刘亚华, 沈洪. 线粒体膜通透性转运孔的研究进展及其心肌保护策略. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 381-384.
- [22] 马宇洁, 杨兴易, 林兆奋, 等. 心肺复苏后大鼠脑线粒体通透性转换孔开放对线粒体呼吸功能的影响. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 645-648.
- [23] Gong P, Li CS, Hua R, et al. Mild hypothermia attenuates mitochondrial oxidative stress by protecting respiratory enzymes and upregulating MnSOD in a pig model of cardiac arrest. *PLoS One*, 2012, 7: e35313.
- [24] 邵婧, 王国兴, 金明, 等. 中药 912 液对脓毒症大鼠心肌细胞线粒体抗氧化防御体系酶的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17: 163-165.
- [25] Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*, 2006, 91: 807-819.
- [26] Corda S, Laplace C, Vicaut E, et al. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24: 762-768.
- [27] Samavati L, Lee I, Mathes I, et al. Tumor necrosis factor α inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*, 2008, 283: 21134-21144.
- [28] Crouser ED, Julian MW, Huff JE, et al. A proteomic analysis of liver mitochondria during acute endotoxemia. *Intensive Care Med*, 2006, 32: 1252-1262.
- [29] Calvano SE, Xiao W, Richards DR, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*, 2005, 437: 1032-1037.
- [30] Callahan LA, Supinski GS. Sepsis induces diaphragm electron transport chain dysfunction and protein depletion. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172: 861-868.
- [31] Crouser ED, Julian MW, Huff JE, et al. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med*, 2004, 32: 478-488.
- [32] 鹿中华, 王锦权, 陶晓根, 等. 川芎嗪对脓毒症大鼠肝细胞线粒体保护作用的实验研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15: 85-88.
- [33] Levy RJ. Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock*, 2007, 28: 24-28.
- [34] 陈德昌, 李红江, 乔林, 等. 大黄对创伤后脓毒症大鼠肝细胞线粒体功能的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9: 9-11.
- [35] Singer M, De Santis V, Vitale D, et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*, 2004, 364: 545-548.
- [36] Watts JA, Kline JA, Thornton LR, et al. Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36: 141-150.
- [37] Vanhorebeek I, De Vos R, Mesotten D, et al. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. *Lancet*, 2005, 365: 53-59.
- [38] Rudiger A, Stotz M, Singer M. Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly*, 2008, 138: 629-634.
- [39] Carré JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1777: 763-771.
- [40] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J Cell Sci*, 2004, 117: 5479-5487.
- [41] Levy RJ, Vijayasarathy C, Raj NR, et al. Competitive and noncompetitive inhibition of myocardial cytochrome C oxidase in sepsis. *Shock*, 2004, 21: 110-114.
- [42] 张柳, 安友仲. 脓毒症的阶段性生物标志物. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 509-512.
- [43] Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*, 2007, 35: 1599-1608.
- [44] Rusavy Z, Sramek V, Lacigova S, et al. Influence of insulin on glucose metabolism and energy expenditure in septic patients. *Crit Care*, 2004, 8: R213-220.
- [45] Nisoli E, Falcone S, Tonello C, et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16507-16512.
- [46] Elfering SL, Haynes VL, Traaseth NJ, et al. Aspects, mechanism, and biological relevance of mitochondrial protein nitration sustained by mitochondrial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286: H22-29.
- [47] Haden DW, Suliman HB, Carraway MS, et al. Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176: 768-777.

(收稿日期: 2012-11-05) (本文编辑: 李银平)