

游离线粒体DNA的释放及其与心力衰竭进程中炎症的关系

郭 谭¹, 方五旺^{1*}

(1.南京中医药大学第二附属医院, 江苏省南京市, 210019; *通讯作者, 175745804@qq.com)

摘要:心力衰竭是各种心脏疾病的严重表现或晚期阶段, 死亡率和再住院率居高不下。而线粒体功能损伤在心衰发生发展中产生重要作用。心衰患者心肌细胞内超微结构发生改变, 线粒体内环境遭受破坏, 大量自由基破坏线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 引起mtDNA释放成为cf-mtDNA (circulating free-cell mitochondrial DNA, cf-mtDNA), 而cf-mtDNA释放的可通过多种通路诱发炎症反应, 从而加重心衰。文章从mtDNA被动、主动释放成为cf-mtDNA的过程, 及其与心力衰竭患者炎症的关系, 探讨其作为慢性心力衰竭患者治疗靶点的意义及可行性。

关键词:心力衰竭; 线粒体DNA; 游离线粒体DNA; 炎症

引言

心力衰竭是多种原因导致心脏结构和/或功能的异常改变, 使心室收缩和/或舒张功能发生障碍, 从而引起的一组复杂临床综合征, 是各种心脏疾病的严重表现或晚期阶段, 死亡率和在住院率居高不下。2012—2015年的中国高血压调查数据显示, ≥35岁成年人中, 心衰患病率为1.3%, 即约有1370万心衰患者, 较2000年增加了0.4% [1]。在我国人口老龄化加剧, 各种慢性病的发病率呈现上升的趋势的背景下, 慢性心力衰竭的患病率也呈持续升高的趋势。

神经内分泌系统的激活导致心肌重构是引起心衰发生和发展的关键因素; 心肌代谢、炎症、脂肪因子和细胞因子在心衰发生发展中也有重要作用; 而线粒体功能损伤也是心衰发生发展的重要因素之一 [2]。线粒体内的mtDNA在各种因素作用下成为cf-mtDNA, 并诱发慢性心力衰竭患者体内炎症反应进而加重心衰。深入了解线粒体DNA释放的具体过程, 及其在心衰患者炎症中的作用, 或可为慢性心力衰竭的治疗提供新的思路。

1. cf-mtDNA的来源

cf-mtDNA来源于细胞内的线粒体DNA, 而线粒体是除细胞核之外唯一含有DNA的细胞器, 每个线粒体含有多个拷贝数的mtDNA。mtDNA是位于线粒体基质中的环状双链DNA。mtDNA通常局限在线粒体基质内, 包装在类核中 [3], 不受免疫细胞接触。而线粒体完整性的丧失会致使mtDNA存在于胞质溶胶中或细胞外。在各种损伤因子的作用下, 缺乏保护组蛋白及修复机制的mtDNA会被释放到线粒体基质以外的空间中 [4]。

mtDNA从细胞的线粒体基质中释放, 并进一步成为cf-mtDNA的过程与cfDNA (circulating free-cell) DNA类似。体液中存在多种形式的cf-mtDNA, 包括暴露的cf-mtDNA片段、囊泡或微粒中包含的mtDNA以及挤出的整个线粒体 [5]。目前, 人们越来越关注cfmtDN作为心力衰竭患者的潜在生物标志物和死亡预测因子。

2. cf-mtDNA释放的途径

2.1. 被动释放

细胞的死亡、裂解以及随后的细胞内容物释放到细胞外环境中的这几个过程, 都可能导致mtDNA被释放到循环之中, 如创伤、败血症、缺血/再灌注或是慢性疾病等 [6]。有研究表明, 血液中的cf-mtDNA含量与观察到的坏死损伤程度呈正相关, 间接表明mtDNA通过机械损伤造成的细胞膜破裂从坏死细胞自由释放的周围环境中。在急性心肌缺血/再灌注的患者体内, cf-mtDNA在AMI发作后上调了将近四倍, 并且与TNF- α 、IL-6和CRP等炎性细胞因子的水平呈正相关 [7]。ST段抬高型心肌梗死患者的cf-mtDNA也明显高于稳定性心绞

痛的患者。除了mtDNA，在组织损伤过程中还会释放许多其他DAMP（危险信号分子）和ROS（活性氧），这些DAMP和ROS同时也会损害临近的细胞，导致了细胞进一步的坏死以及随后的mtDNA的释放。这些类型的mtDNA释放被认为代表机械损伤导致细胞膜破裂而不受控制的mtDNA从线粒体释放到细胞外间隙，这是机械损伤所致的mtDNA的主要来源，但仍有其他途径可以使mtDNA从线粒体释放到胞外间隙，例如说细胞的主动释放。

2.2. 主动释放

2.2.1. 微泡/囊泡途径的主动释放

微粒/囊泡是从细胞中释放出来的，由质膜包裹的小结构，他们被证明含有线粒体原件，包含mtDNA。György等人的研究表明 [8]，当小鼠心脏中的溶酶体受损时，线粒体可以在源自内体系统的大型EV（大细胞外囊泡）中释放，同时当溶酶体降解受到抑制时，线粒体可以在大型EV中通过内体途径被消除。而外泌体在细胞之间的通讯中的作用被越来越多的研究所证实。外泌体在免疫反应、细胞凋亡、血管生成、炎症中起重要作用 [9]，并在心肌纤维化、心肌肥大、心肌凋亡方面发挥重要作用 [10]。

2.2.2. 胞吐作用

血小板能将线粒体作为游离细胞器排泄到细胞外空间 [11]。无独有偶，当细胞对肿瘤坏死 α （TNF- α ）的刺激作出反应时，可以将线粒体DNA释放到细胞间隙，这是细胞坏死性凋亡（受调节的坏死）的一部分，释放的线粒体会触发免疫细胞的促炎变化。鉴于TNF- α 与再灌注损伤有关，这种现象可能发生在再灌注损伤中 [12]。同样有证据指出，线粒体可以在坏死性凋亡期间主动分泌 [13]。

2.2.3. 中性粒细胞胞外杀菌网络（Nets）

细胞外有部分mtDNA来自中性粒细胞。在细菌PAMP（Pathogen-Associated Molecular Patterns）的刺激下，中性粒细胞释放由去浓缩的染色质、胞质和颗粒蛋白组成的高度组织化的网状结构，称为中性粒细胞胞外杀菌网络（NET）。此过程可能携带线粒体DNA片段进入细胞外空间，参与炎症反应。

3. cf-mtDNA 与炎症

线体系来源于细菌进化而来的内共生体，含有DNA类似的mtDNA，具有免疫原性，包含许多未甲基化的CpG基序，并可以引发炎症。而mtDNA与心肌组织无菌性炎症之间的相关性，是当前研究的热点。心脏无菌性炎症通常是指缺血损伤或心力衰竭引起的心肌损伤的继发反应。在缺血性心脏损伤后的心力衰竭中，炎症反应导致了进一步的损伤和心脏收缩和舒张功能障碍，从而加重了心衰。

TLR是免疫系统的重要参与者，它们可以识别不同类型的配体。在人体内已知的TLR家族中，TLR1~TLR10存在基因表达，并且可以与不同配合结合。其中，TLR9可识别含有非甲基化的胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸的细胞DNA碎片，然而这些细胞DNA碎片仅仅存在于细菌和病毒DNA，在脊椎动物的基因组中并不常见。但脊椎动物基因组中存在的线粒体DNA包含此序列，并被认为可以激活TLR9通路 [14]。Ueda等人发现，心肌释放的线粒体DNA可以作为激活TLR9，同时靶向TLR9的药物可以作为预防和治疗心衰的新方向 [15]。除此之外，Guescini M的研究阐述了携带了mtDNA的外泌体可以由星形胶质细胞和胶质母细胞瘤细胞分泌，它们在慢性心力衰竭患者血浆中的水平显著升高，并通过TLR9-NF- κ B通路触发炎症反应，加重心衰 [16]。其他学者证实了血浆源性的携带了mtDNA的外泌体激活了TLR9-核因子 κ B（NF- κ B）通路，并触发心力衰竭患者的炎症反应 [17]。尽管有许多报道证实了TLR9的激活对心脏的负面影响，但仍有研究表明TLR9的激活对心脏结构产生了有益作用。Velten等人表明，TLR9激动剂反而可减轻压力超负荷诱导的炎症和心脏肥大 [18]。同时TLR9缺陷可能导致纤维生成和血管生成减少以增加细胞凋亡，从而导致心肌梗死后心脏破裂及死亡增加 [19]。这些研究强调了TLR9的保护作用，如此两种相反的结论可能揭示了干预时间点不同，所产生的影响也是不同的。

mtDNA也被证明可通过TLR4触发核因子NF κ B的激活，导致TNF- α ，IL1 β 和IL-6等促炎细胞因子的。Oka等的研究显示 [20]，在血流动力学压力超负荷的情况下，逃逸了自噬降解的mtDNA能够作用于TLR4，诱导心肌细胞产生促炎细胞因子，并与后续的心肌炎症以及扩张性心肌疾病、心衰相关。

总而言之，心衰患者的心肌细胞内的线粒体存在功能障碍，mtDNA损伤并通过主动或被动的方式逃逸；而线粒体的功能受损又可加快心肌细胞坏死、凋亡、裂解，进一步释放mtDNA。释放至胞外的mtDNA可被中性粒细胞或巨噬细胞表面的TLR相关受体所识别，刺激其通过NF κ B/IL-6通路释放炎症因子加重炎症，诱导心肌细胞死亡，从而加重心衰 [17]。

4. 结语与展望

慢性心力衰竭的进展和恶化预后与促炎细胞因子的增加密切相关 [21]。而mtDNA可以通过被动或以主动的方式进入到胞外、循环中以激活炎症,是由于它包含许多可以导致炎症的非甲基化的CpG二核苷酸重复序列。正如前文所述,mtDNA不仅仅是线粒体自身的基因组,与此同时也是多种炎症机制调节的关键参与者。在慢性心力衰竭的患者中,由于多种生理病理因素的影响,cf-mtDNA水平增加,并通过TLR9、NLRP3和STING等多种通路诱导炎症以加重心衰。而相反地,抑制这些途径又可以限制mtDNA介导的炎症,从而减缓心衰发展的进程。尽管有许多研究报告了炎症的激活对心脏具有有害影响,但仍有研究表明TLR9通路的激动对心脏的结构和功能具有有益作用,这些不同的结果可能提示了干预时间点的重要性。尽管mtDNA的释放及其在炎症调节间的作用已经取得了巨大进展,但是仍有许多问题亟待解决。例如mtDNA具体是如何进行运输调节的、其在血液循环中是否产生生化反应、允许mtDNA释放的详细的并确切的机制、不同来源的mtDNA在cf-mtDNA中的占比等等。总而言之,心衰患者体内线粒体能量代谢存在异常,cf-mtDNA水平也会随之改变,而cf-mtDNA又可以参与调节心衰患者体内的炎症反应,与此同时cf-mtDNA又是相对稳定的,因此其具有作为慢性心力衰竭干预靶点及生物标志物的潜力,并具有一定的研究价值。

参考文献

- [1] GUANG H, XIN W, ZUO C, et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in China: the China Hypertension Survey, 2012-2015. [J]. *European journal of heart failure*, 2019, 21(11): 1329-1337.
- [2] ROSCA MG, TANDLER B, HOPPEL CL. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 5(5): 31-41
- [3] FARGE G, FALKENBERG M. Organization of DNA in Mammalian Mitochondria [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2770.
- [4] PATIL V, CUENIN C, CHUNG F, AGUILERA JRR, FERNANDEZ-JIMENEZ N, ROMERO-GARMENDIA I, BILBAO JR, CAHAIS V, ROTHWELL J, HERCEG Z. Human mitochondrial DNA is extensively methylated in a non-CpG context [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(19): 10072-10085.
- [5] THURAIRAJAH K, BRIGGS GD, BALOGH ZJ. The source of cell-free mitochondrial DNA in trauma and potential therapeutic strategies [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2018, 44(3): 325-334.
- [6] KACZMAREK A, VANDENABEELE P, KRYSKO DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance [J]. *Immunity*, 2013, 38(2): 209-23.
- [7] BLIKSØEN M, MARIERO LH, OHM IK, HAUGEN F, YNDESTAD A, SOLHEIM S, SELJEFLOT I, RANHEIM T, ANDERSEN G, AUKRUST P, VALEN G, VINGE LE. Increased circulating mitochondrial DNA after myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 158(1): 132-4.
- [8] GYÖRGY B, SZABÓTG, PÁSZTÓI M, PÁL Z, MISJÁK P, ARADI B, LÁSZLÓV, PÁLLINGER E, PAP E, KITTEL A, NAGY G, FALUS A, BUZÁS EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(16): 2667-88.
- [9] JANOWSKA-WIECZOREK A, WYSOCZYNSKI M, KIJOWSKI J, MARQUEZ-CURTIS L, MACHALINSKI B, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(5): 752-60.
- [10] RECORD M, CARAYON K, POIROT M, SILVENTE-POIROT S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(1): 108-20.
- [11] BOUDREAU LH, DUCHEZ AC, CLOUTIER N, SOULET D, MARTIN N, BOLLINGER J, et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation [J]. *Blood*, 2014, 124(14): 2173-2183.
- [12] MAEDA A, FADEEL B. Mitochondria released by cells undergoing TNF-alpha-induced necroptosis act as danger signals [J]. *Cell Death Dis*, 2014(5): 1312.
- [13] ZHU M, BARBAS AS, LIN L, SCHEUERMANN U, BISHAWI M, BRENNAN TV. Mitochondria Released by Apoptotic Cell Death Initiate Innate Immune Responses [J]. *Immunohorizons*, 2018, 2(11): 384-397.
- [14] SHEPARD CR. TLR9 in MAFLD and NASH: At the Intersection of Inflammation and Metabolism [J]. *Front Endocrinol(Lausanne)*, 2021(11): 613639.
- [15] UEDA H, YAMAGUCHI O, TANEIKE M, AKAZAWA Y, WADA-KOBAYASHI H, SUGIHARA R, YORIFUJI H, NAKAYAMA H, OMIYA S, MURAKAWA T, SAKATA Y, OTSU K. Administration of a TLR9 Inhibitor Attenuates the Development and Progression of Heart Failure in Mice [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2019, 4(3): 348-363.
- [16] GUESCINI M, GENEDANI S, STOCCHI V, AGNATI LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA [J]. *J Neural Transm(Vienna)*, 2010, 117(1): 1-4.

- [17] YE W, TANG X, YANG Z, LIU C, ZHANG X, JIN J, LYU J. Plasma-derived exosomes contribute to inflammation via the TLR9-NF- κ B pathway in chronic heart failure patients [J]. *Mol Immunol*, 2017, 8(7): 114-121.
- [18] DUERR GD, HEINE A, HAMIKO M, ZIMMER S, LUETKENS JA, NATTERMANN J, RIEKE G, ISAAK A, JEHLE J, HELD SAE, WASMUTH JC, WITTMANN M, STRASSBURG CP, BROSSART P, COBURN M, TREEDE H, NICKENIG G, KURTS C, VELTEN M. Parameters predicting COVID-19-induced myocardial injury and mortality [J]. *Life Sci*, 2020, 26(4): 118400.
- [19] LIU FY, FAN D, YANG Z, TANG N, GUO Z, MA SQ, MA ZG, WU HM, DENG W, TANG QZ. TLR9 is essential for HMGB1-mediated post-myocardial infarction tissue repair through affecting apoptosis, cardiac healing, and angiogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 480.
- [20] OKA T, HIKOSO S, YAMAGUCHI O, TANEIKE M, TAKEDA T, TAMAI T, OYABU J, MURAKAWA T, NAKAYAMA H, NISHIDA K, AKIRA S, YAMAMOTO A, KOMURO I, OTSU K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure [J]. *Nature*, 2012, 485(7397): 251-5.
- [21] MANN DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future [J]. *Circ Res*, 2002, 91(11): 988-98.