

运动与心肌细胞凋亡的线粒体机制

张琳, 邓树勋, 郝选明

(华南师范大学 体育科学学院, 广东 广州 510006)

摘 要: 综述了线粒体的结构功能及心肌细胞凋亡过程与线粒体的密切关系, 探讨其参与运动诱导心肌细胞凋亡的可能机制。线粒体在心肌细胞凋亡中起关键的作用, 细胞凋亡过程中许多重要事件的发生都与线粒体密切相关, 包括线粒体通透转变孔道(mPTP)的开放、线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的丧失、线粒体内外膜间隙促凋亡蛋白的释放、细胞内氧化还原状态的改变、 Ca^{2+} 超载、Bcl-2 家族促进和抑制凋亡蛋白的参与等。

关 键 词: 运动医学; 线粒体通透转变孔道; 线粒体膜间隙; 运动; 心肌; 细胞凋亡; 综述
中图分类号: G804.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7116(2010)03-0092-07

Mechanisms of mitochondria on cardiocyte apoptosis induced by exercise

ZHANG Lin, DENG Shu-xun, HAO Xuan-ming

(School of Physical Education, South China Normal University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: More and more evidence indicated that mitochondria play the key role in cardiocyte apoptosis. Many events happened in apoptotic process have been tightly related to mitochondria, including mitochondrial permeability transition pore(mPTP) open, the depletion of mitochondrial membrane potential (mitochondrial $\Delta\Psi_m$), mitochondrial intermembrane space pro-apoptotic protein release, alteration of redox state, Ca^{2+} overloading, participation of Bcl-2 family and so on. The mitochondrial structure and function and its tight relation to apoptosis were reviewed, the possible mechanism of mitochondria on cardiocyte apoptosis induced by exercise were also summarized in the article.

Key words: sports medicine; mitochondrial permeability transition pore(mPTP); mitochondrial intermembrane space; exercise; cardiocyte; apoptosis; overview

凋亡, 即细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD), 是一种由基因控制的细胞主动性死亡过程, 以 DNA 早期降解为特征。由于凋亡时出现典型的细胞核的变化, 前期研究主要定位于核内。从 1996 年发现细胞色素 C 的释放, 近年来的研究热点已从细胞核转向线粒体, 不断有学者提出线粒体是凋亡控制的中心。线粒体在细胞凋亡中的作用日益受到关注。心肌是终末分化细胞, 故一定程度的细胞凋亡可能会使心肌遭受严重的损伤并导致永久性的功能障碍。如何避免心肌损伤已成为运动医学领域的一项重要研究内容。

1 线粒体的结构功能特点及在凋亡中的地位

线粒体犹如细胞的动力工厂, 三羧酸循环和氧化

磷酸化都在线粒体内进行。线粒体有两层膜结构: 内膜与外膜。两层膜之间为膜内腔, 内膜内侧为基质。三羧酸循环位于基质内, 而电子传递链和氧化磷酸化的部位则位于内膜, 两者紧密相连。电子传递链也称呼吸链, 由许多可以传递 H^+ 或电子的蛋白质按一定顺序组成, 目前发现有 5 种主要的呼吸链复合体: 复合体 I(NADH-泛醌还原酶)、复合体 II(琥珀酸-泛醌还原酶)、复合体 III(泛醌-细胞色素 C 还原酶)、复合体 IV(细胞色素 C 氧化酶, COX) 和复合体 V(ATP 合酶)。

线粒体参与了凋亡的调控过程, 并在其中起重要作用^[1]。Decaudin 等^[2]提出了如下 4 个证据: ①在凋亡信号的刺激下, 线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)的下降出现在凋亡的特征性细胞核改变之前, 而 $\Delta\Psi_m$ 下降必定引起

凋亡^[3]。②分离的线粒体或可溶性的线粒体成分能诱导细胞核出现凋亡的特征性变化。③从凋亡的细胞中提取的线粒体可引起离体的细胞核凋亡,表明线粒体可将凋亡信号从一种细胞传递至另一种细胞。④ $\Delta \Psi_m$ 的稳定剂可阻止细胞凋亡的发生。

细胞凋亡以线粒体模型可分为3个阶段:(1)线粒体前阶段,即凋亡启动阶段:多种凋亡刺激信号激发多条凋亡路径;(2)线粒体阶段,即效应或决定阶段:线粒体膜的完整性消失,线粒体释放多种促凋亡因子;(3)线粒体后阶段,即降解或执行阶段:线粒体释放的促凋亡因子激活胱天蛋白酶和核酸内切酶,切割重要的蛋白底物,引发凋亡。运动训练是人体重要的应激源,在运动应激下会诱发心肌细胞的凋亡,并且随着运动形式的不同而有所变化。动力学数据显示在凋亡典型信号开始表现之前,线粒体在细胞膜的完整性方面执行主要的改变。线粒体膜的完整性发生的这些重大的变化,涉及到线粒体内外膜的一系列连锁反应,包括mPTP开放、跨膜电位变化、促凋亡蛋白通过外膜释放等。

2 线粒体通透转变孔道(mPTP)的开放

mPTP(mitochondrial permeability transition pore)是20世纪70年代Hunter和Haworth^[4]在分离的线粒体上首先发现的,是横跨在线粒体内外膜之间高电导性非选择性通道。在研究的早期也称为线粒体巨型通道(megachannel),它主要由电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)、腺嘌呤核苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase, ANT)和环孢菌素A受体D(cyclophilin-D, CyP-D)所组成。ANT位于线粒体内膜,VDAC位于线粒体外膜,CyP-D存在于线粒体基质。VDAC和ANT并在线粒体内外膜的相对接触位点上,它们三者通过相互之间的亲和力,而连接成一个稳定的复合体结构。同时还结合己糖激酶、肌酸激酶和其它一些蛋白质。

在不同的细胞环境,mPTP可有3种功能状态:第1种是完全关闭状态,线粒体跨膜电位完整;第2种是可逆的低水平开放状态,仅允许分子质量低于300 u的物质通过,线粒体跨膜电位可逆性降低,其功能是转导电信号和钙信号;第3种是不可逆的高水平开放状态,使得分子质量小于1500 u的物质可以通过线粒体内膜,导致线粒体跨膜电位不可逆地降低,此状态曾被认为是凋亡早期的一个必需步骤。多种因素可调节mPTP开放,细胞氧化还原水平、能量代谢水平、胞浆 Ca^{2+} 和其他二价金属离子、环孢菌素A(cyclosporine A, CsA)、米酵菌酸(bongkrek acid, BA)

等药物均可调节mPTP开放。其中研究最多的是Bcl-2家族对mPTP开放的调控,促凋亡蛋白Bax可与ANT或VDAC相互作用促进mPTP开放,抗凋亡蛋白Bcl-2则可与ANT相互作用或阻止Bax与ANT的相互作用而抑制mPTP开放^[5-6]。mPTP高水平开放的直接效应是导致线粒体质子、电化学梯度耗散,离子稳态被打破,线粒体肿胀和ATP水解,这些效应至少可以通过以下机制致细胞凋亡:即细胞ATP水平下降、胞浆 Ca^{2+} 水平上升、膜间隙的促凋亡蛋白释放等,其中线粒体内外膜间隙促凋亡蛋白从线粒体释放是mPTP调控细胞凋亡的关键。

3 线粒体内外膜间隙促凋亡蛋白的释放

当细胞受到凋亡刺激时,在凋亡信号的刺激下(如氧自由基增多、钙过负荷、缺血、缺氧),线粒体功能发生障碍。能障的发生和mPTP密切相关,mPTP开放导致线粒体通透性转换(mitochondrial permeability transition, MPT),线粒体基质高度膨胀、内膜的嵴伸展,进而外膜破裂,释放出位于膜间隙的促凋亡因子如Cyt c、AIF(凋亡诱导因子)、Smac/DIABLO(一种新型线粒体蛋白)、核酸内切酶(Endo G)、Htra2/Omi等,它们转位至细胞核(核转位)或细胞浆(胞浆转位),通过caspase依赖和(或)非caspase依赖通路机制促使细胞凋亡。

3.1 细胞色素C(cytochrome c, Cyt c)

Cyt c是一分子质量为15 ku、由105个氨基酸组成的多聚肽,是线粒体电子传递链的重要组成部分。在多种死亡模型中细胞色素C从线粒体释放至胞质是引发凋亡的关键步骤,其意义不只是线粒体呼吸活性的丧失,更重要的是细胞色素C释放后可引发caspase活化级联,导致细胞凋亡。Cyt c释放到胞浆中后与凋亡蛋白酶激活因子(Apaf-1)的羟基端WD-40重复序列结合,同时胞浆中的dATP和(或)ATP与Apaf-1的核苷酸结合结构域结合,从而促进Apaf-1构象变化并发生同源寡聚化。Apaf-1与procaspase-9结合而使procaspase-9募集。Cyt c、dATP、Apaf-1和procaspase-9组成聚合物,称为凋亡体(apoptosome)。凋亡体使procaspase-9激活,procaspase-9一旦激活就能激活其下游的procaspase-3进入内源性和外源性凋亡途径的最后通路,最终导致细胞死亡^[7-8]。

3.2 凋亡诱导因子(AIF)

1996年,Susin等^[9]利用非细胞体系证实了AIF(apoptosis-inducing factor)是线粒体释放的一种凋亡诱导蛋白。在细胞正常的生理状态下,作为线粒体氧化还原酶,能催化细胞色素C(Cyt c)和NAD之间的

电子传递,当细胞受到凋亡刺激后,就从膜间隙释放到细胞质中,并通过其核定位信号序列(nuclear localization sequence, NLS)进入细胞核内,引起染色体核周边凝集和 DNA 呈大片段断裂(约 50 kb),进而引发不依赖于 caspase 的细胞凋亡。AIF 的促凋亡作用还体现在其自身形成的正反馈机制,即释放入细胞质的 AIF 可以再作用于其他的线粒体,使之通透性增加而进一步促进 AIF 的释放^[10]。同时还能促进细胞色素 C 的释放^[11],最终激活 caspase-3 而引起细胞凋亡。

3.3 核酸内切酶 G(Endo G)

Endo G(Endonuclease G)是在进化上非常保守的由细胞核基因编码的存在于线粒体膜间隙的一种 DNA 酶,在细胞凋亡时,它会转位到细胞核内,在 DNA fragmentation 中起酶切作用。研究证实,在特定的凋亡因素诱导下,Endo G 以 caspase 非依赖的方式切割 DNA^[12]。遗传分析显示,在 *C. elegans* 内,Endo G 参与构成 DNA 降解复合物,从而在 DNA fragmentation 和细胞凋亡中发挥作用,也可单独对 DNA 发生切割作用^[13]。这些研究说明,Endo G 参与了一条源自线粒体的细胞凋亡信号传导通路。

3.4 Smac/DIABLO

2000 年 7 月, Wang 实验小组^[14]首次报道从 HeLa 细胞中分离出一种新型线粒体蛋白质,命名为第 2 个线粒体衍生的胱氨酸蛋白酶激活剂,即 Smac(Second mitochondria-derived activator of caspase)。同时, Vaux 实验小组^[15]报道从 293T 细胞中分离出一种蛋白质,命名为低等电点凋亡抑制蛋白(IAPs)直接结合蛋白(direct IAP binding protein with low PI, DIABLO)。经过对比分析,Smac 和 DIABLO 完全等同,合并称为 Smac/DIABLO。当细胞受到凋亡刺激(包括抗癌药物、电离辐射、化学信号和 DNA 损伤)时,伴随细胞色素 C 由线粒体释放到胞质中,与抑制 caspase 活性的凋亡抑制蛋白家族(IAPs)作用,达到促进凋亡的作用。Smac/DIABLO 可与现已发现的所有 IAPs 作用,使其丧失抑制 caspase 活性的作用^[16]。

3.5 Omi/HtrA2

HtrA2(High temperature requirement A)是细菌体内一种蛋白质分子,属于丝氨酸蛋白酶家族,其含义最初是指这种蛋白质在细菌的耐热特性中发挥重要作用^[17]。2000 年, Faccio 等^[18]从哺乳动物体内分离出一种与 HtrA 同源的新的丝氨酸蛋白酶,并将其命名为 Omi。Omi/HtrA2 在凋亡信号刺激下与细胞色素 C、Smac 等促凋亡因子一起由线粒体释放入胞浆并经过自身酶切转变为成熟形式^[19]。Omi/HtrA2 诱导细胞凋亡存在 caspase 依赖途径和非 caspase 依赖途径。Omi/HtrA2

可通过其 N 端 4 残基 IAP 结合区(4 residues IAP-binding motif, IBM)与凋亡蛋白抑制因子(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)相结合,解除 IAPs 对半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspases)的阻抑而激发凋亡;同时还可借自身的酶切割、降解 IAPs,从而显示强且不可逆的 IAPs 抑制效应^[20]。Omi/HtrA2 还可直接依靠其自身的丝氨酸蛋白酶活性促发不依赖 caspases 通路的凋亡反应^[21], HtrA2 含有丝氨酸蛋白酶结合域,其 C-末端含有 PDZ 结合域,PDZ 结合域通过调节丝氨酸蛋白酶的活性诱导细胞凋亡。

线粒体膜间隙促凋亡因子从线粒体释放可参与各种心肌细胞凋亡的过程。但在运动心脏中的实验研究不多,细节知之甚少。通过联机检索收录的国内外关于训练和心肌细胞凋亡的研究论文不足 10 篇。不过,就在这为数不多的论文中,亦可发现一些线粒体膜间隙分子在心肌细胞凋亡中的作用。张钧等^[22]研究表明:过度训练组大鼠心肌组织中细胞色素 C 含量明显升高,并通过激活 Caspase-3 活性引起心肌细胞凋亡增加。2004 年, Siu P M 等^[23]在研究有氧运动对骨骼肌和心肌细胞凋亡的影响时发现,有氧运动可降低骨骼肌和心肌细胞凋亡水平,运动组和对照组心室肌 AIF 蛋白水平无显著性差异。2007 年, Siu P M, 等^[24]研究发现,线粒体膜间隙分子 AIF、Endo G、HtrA2/Omi 在运动组表达,与 6 周高盐组和有氧运动组心室肌样本间没有差异;然而从 S-100 细胞浆组分析结果看,心衰组心室肌 AIF、HtrA2/Omi 蛋白含量显著提高,Endo G 在各组中均无显著性升高。Siu P M 研究小组进一步应用激光共聚焦免疫荧光证实了 AIF 在细胞凋亡时从线粒体转位到细胞浆和细胞核。这些研究结果提示,线粒体膜间隙分子在心肌细胞凋亡中的作用可能不在于是否表达,很可能与其表达位置有关,也就是说,是否出现了核转位或胞浆转位。因此,研究细胞膜间隙分子的转位及其调控机制可能是今后研究应关注的方向之一。

4 活性氧(ROS)在运动诱导心肌细胞凋亡中的作用

近年来,大量研究表明,运动产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)与细胞凋亡的关系密切^[25-27]。剧烈运动会产生很高水平的活性氧,活性氧可能来自于:(1)从线粒体电子传递链中溢出;(2)由于 ATP 消耗的增加而导致黄嘌呤氧化酶反应;(3)中性粒细胞激活。活性氧有和其它分子相互作用的强烈趋势,因此,会损害多种细胞的组成成分。一般而言,在运动期间,肌肉代谢增加,线粒体产生的活性氧也随之增多。氧自由

基可使 DNA 受损,改变抑制或触发细胞凋亡的蛋白表达,直接导致细胞凋亡。氧自由基也可攻击细胞膜结构生成脂质过氧化物,造成膜损伤诱发细胞凋亡;另一方面,脂质过氧化物可以刺激细胞外 Ca^{2+} 进入胞内,也可导致线粒体和内质网或肌浆网内存储的 Ca^{2+} 释放,胞内 Ca^{2+} 增加激活细胞凋亡的信号传导途径。

运动锻炼或训练可提高机体清除自由基的能力,减少其对组织、器官的损害。但运动强度增大、运动时间延长或因某此疾病,体内的自由基会急剧增多,由此引起的脂质过氧化对机体产生损害。Jin^[28]对大鼠进行 13 周的慢速跑台运动实验,在运动的第 4 天、第 10 天、第 13 周末对心肌细胞凋亡情况进行检测,未发现心肌细胞凋亡。张钧等^[29]观察中等强度运动训练、过度训练和一次性力竭运动模型心肌细胞凋亡,结果表明过度训练和力竭运动可造成心肌细胞凋亡增加而中等强度运动训练不造成大鼠心肌细胞凋亡的增加。韩立明等^[30]在研究 70 min 游泳对小白鼠心肌组织的影响时发现,心肌组织的 SOD 活性较运动前变化不明显,但呈升高趋势,丙二醛(MDA)明显低于运动前。常芸等^[31]对大鼠进行为期 16 周的运动训练,大鼠急性运动后 24 h 心室内膜下心肌组织出现缺氧引起变性改变。金其贯等^[32]在进行过度训练的研究时,发现大鼠心肌组织和血清中 SOD 活性显著下降、MDA 含量显著增加。Kavazis A N 等^[33]研究认为,中等强度的耐力运动可阻止心肌细胞凋亡,其机制可能与运动增加抗凋亡酶和蛋白的活性,减少细胞色素 C 的释放有关。

上述研究表明,ROS 与细胞凋亡的关系密切。但有关 ROS 如何通过细胞内的信号分子发挥调控作用尚未阐明。有研究认为:凋亡信号调节激酶 1(apoptosis signaling regulation kinase 1, ASK1)可能是 ROS 诱导细胞凋亡的重要途径之一。ASK1 是细胞内参与应激诱导细胞凋亡的一个重要蛋白激酶,ASK1 属丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)家族成员,被确认为氧敏感性 MAPKKK。

ASK1 在 MAPK 信号通路中位于 JNK、p38 的上游,其活化能够直接激活 MAPKK 从而进一步激活 JNK 和 p38 引起细胞凋亡^[34]。很多刺激因素,如 TNF、ROS、机械牵张等都可通过 ASK1 诱发心肌细胞的凋亡,Wang Y 等^[35]研究认为,长期超负荷可以激活 p38 丝裂素蛋白激酶(p38MAPK)介导心肌细胞凋亡。已知的 ASK1 诱导凋亡的机制主要有:压力激活蛋白激酶(JNK、p38)的活化、细胞色素 C 从线粒体的释放、Caspase 通路的激活、细胞核的碎裂以及与 Fas 结合蛋白 Daxx 的交互作用等。Hikoso 等^[36]认为抑止 ASK1 的基因表达可以减缓心力衰竭的进程,有望成为治疗心力

衰竭的新的靶点。在体外细胞培养中发现蛋白激酶 D1(Protein kinase D1, PKD1)可能介入 H_2O_2 -ASK1-JNK 信号转导途径^[37]。PKD1 在 H_2O_2 的激活下磷酸化,从细胞膜移位到胞浆,和 ASK1 形成复合物,使 ASK1 的活性发生改变,传递信号到下游蛋白,激活 JNKs 和 p38 MAPK,诱导细胞凋亡。然而,PKD1 和 ASK1 表达是否与运动性心肌损伤有关,在运动过程中是否能诱导心肌细胞凋亡尚无文献报道。

5 Ca^{2+} 与心肌细胞凋亡

Ca^{2+} 诱导细胞凋亡的调节机制获得较可靠的证明,基本可归纳为以下几方面:(1) Ca^{2+} 可激活核酸内切酶,在细胞凋亡过程中核酸内切酶可被持续升高的胞内 Ca^{2+} 激活^[38]。(2) Ca^{2+} 可激活蛋白激酶 C(PKC),PKC 激活后引起原癌基因如 c-myc、c-fos、c-jun 的表达,参与细胞凋亡^[39]。(3)调节线粒体 PTP 而参与细胞凋亡^[40]。(4) Ca^{2+} 可调节磷脂酶活性,磷脂酶的激活与 Ca^{2+} 启动的细胞凋亡有关^[41]。(5)通过钙调节蛋白影响细胞凋亡^[42],钙调节蛋白(calmodulin, CaM)及钙结合蛋白(calbindin) D-28K 的过度表达可通过结合 Ca^{2+} 而在某些细胞系统中显示抑制细胞凋亡的作用。

钙转运包括钙的摄取和释放。生理状态下线粒体内保持钙摄取和释放的动态平衡。运动强度过大、持续时间过长时,线粒体内 Ca^{2+} 调节就会失去平衡,从而引发线粒体 ATP 的生成障碍,引起运动性疲劳。丁树哲等^[43]实验表明,急性运动能引起大鼠心肌线粒体的肿胀、嵴断裂,使膜脂质过氧化、膜流动性下降、钙反常,说明急性运动使线粒体形态机能都发生了改变。Fernstrom M 等^[44]研究表明急性运动能够在线粒体通透性转换孔开放之前增强线粒体的钙聚积,慢性运动能增强线粒体对钙聚积的抗性,对钙抗性的增强可能阻止线粒体的降解。刘铁民等^[45]对过度训练时心肌组织损伤的实验研究发现,过度训练状态下大鼠心肌线粒体内钙含量明显增加,表明过度训练后心肌细胞可能发生了损伤。王长青等^[46]对大鼠进行定量游泳实验发现,运动后 40 min,大鼠肌细胞中线粒体 Ca^{2+} 浓度较安静对照组显著升高。陈英杰等^[47]对剧烈运动大鼠心肌线粒体的研究发现,心肌线粒体内钙在运动后即刻显著性增高,运动后 24 h 后心肌线粒体内钙进一步增加,因此剧烈运动对心肌线粒体以及细胞的损伤不止是在运动后即刻,还可造成延迟性损害。

6 Bcl-2 家族蛋白与运动诱导的心肌细胞凋亡

Bcl-2 家族蛋白是线粒体途径的关键调节因素。目前已经发现的 Bcl-2 家族蛋白有 20 多种,根据其功

能上的不同,可以分为促凋亡蛋白和抑凋亡蛋白两大类。促凋亡蛋白包括 Bcl-xs、Bax、Bak、Bid、Bad、Bim 等,又称为 Bax 组蛋白;而抑凋亡蛋白包括 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w 等,又称为 Bcl-2 组蛋白。

Bax 蛋白有促凋亡的活性,含有 BH1 到 BH3 三个结构域,分布于线粒体外膜,通过作用于线粒体引起细胞凋亡。Bax 蛋白以非活性形式存在于胞质中,在凋亡诱导因素作用下发生构型变化,从胞质移位到线粒体膜与 Bcl-2 形成异源二聚体抑制 Bcl-2 的活性,使 mPTP 不可逆开放,启动和维持细胞凋亡的“线粒体途径”。Bax 能作用与 mPTP 的腺嘌呤核苷酸转运体(ANT)和(或)电压依赖性阴离子通道(VDAC),与 ANT 和(或)VDAC 结合,促使 PTP 开放,使 Cyt c 和 AIF 释放入胞质。此外, Bax 也可在线粒体外膜形成一个允许 Cyt c 释放的特异性通道,使得在外膜不破裂的情况下, Cyt c 溢出,促进细胞凋亡。

现已明确 Bcl-2 蛋白具有稳定 mPTP 的作用,使 mPTP 的功能保持正常,维持 $\Delta \Psi_m^{[51]}$ 。Bcl-2 蛋白分布于线粒体外膜的浆膜面、内质网及核膜。它含有 BH1 到 BH4 四个结构域,具有稳定线粒体膜的功能,阻止线粒体释放 caspase 及活性因子 AIF、Cyt c 等。Bcl-2 能抑制 Bax 和 Bad 等从胞质向线粒体膜的移位;抑制 Bax 形成异源二聚体和寡聚体,抑制 Bax 与 VDAC 的相互作用,阻断 Bax 的成孔活性^[48]。Bcl-2 还可以抑制胞内 Ca^{2+} 重新分布、减少内质网 Ca^{2+} 释放或者阻止核内 Ca^{2+} 浓度持续上升,从而干扰 Ca^{2+} 信号传导以及抑制细胞凋亡。Bcl-2/Bax 比值决定了细胞凋亡的发生与否,当该比值增加或不变时抑制细胞凋亡,而该比值下降时则促进细胞凋亡。

Leri 等^[49]的研究表明牵张心肌细胞可引起 Ang II 的分泌,并通过心肌细胞膜上的 AT1 受体途径激活 p53,引起 Bcl-2/Bax 的比率下降,最终导致心肌细胞凋亡。张钧等^[50]报道,过度训练的大鼠心肌细胞中凋亡调控基因 Bcl-2 mRNA 表达下降,凋亡调控基因 Bax 和 p53 mRNA 表达显著升高,Bcl-2/Bax 比值显著下降;而中等运动强度的训练则可见大鼠心肌细胞中凋亡调控基因 Bcl-2 mRNA 表达明显增加,凋亡的调控基因 Bax 和 Bcl-2/Bax 比值未见有显著性改变。金其贯等^[32]报道,过度训练大鼠心肌组织中 Bcl-2 蛋白表达下降、Fas 蛋白表达增强,说明过度训练可抑制 Bcl-2 蛋白表达,促进 Fas 蛋白表达,进而促进心肌细胞的凋亡。

7 结语

运动对细胞凋亡的影响备受运动医学界的关注^[51],近年来对运动诱导细胞凋亡机制的研究取得一些进

展,但仍有许多问题没有得到很好的解决。线粒体是细胞内氧的主要消耗者,其对运动时氧耗也最为敏感,长期运动将会引起线粒体在结构和功能上产生相应的变化,因此线粒体在运动与心肌细胞凋亡的研究中应占十分重要的地位。运动引起心肌损伤发生的因素有很多,参与线粒体诱导心肌细胞凋亡的机制错综复杂,除了上述 mPTP 的开放,线粒体内外膜间隙促凋亡蛋白的释放,通过 caspase 依赖和(或)非依赖通路机制促使细胞凋亡、ROS、 Ca^{2+} 超载及 Bcl-2 家族调节外,其它因素还有很多,如线粒体内 KATP 通道的改变、运动中产生的 NO、乳酸的积累引起酸中毒及 ATP 下降使细胞功能障碍、中性粒细胞浸润等。这些方面并不是孤立的,而是相互联系互为补充的。例如,细胞内 ATP 浓度维持在较高水平时,各种离子转运功能才能正常运行,使 Ca^{2+} 得以大量重吸收,胞内 Ca^{2+} 下降, Ca^{2+} 超载减轻;同样,ROS 生成减少使细胞内膜结构受损害程度降低,特别是线粒体膜受损降低,可大大提高运动过程中氧化磷酸化酶的活性,生产更多的 ATP 供给细胞使用。对线粒体与心肌细胞凋亡的研究方兴未艾,但其中许多细节和机制尚不清楚,如运动时线粒体氧耗与能量生成的关系对心肌细胞凋亡的影响;运动中产生的活性氧对心肌细胞凋亡影响的信号传导机制还缺乏更深层次的研究;线粒体钾离子循环与钙超载的关系;线粒体内膜电位的稳定与维持;运动对线粒体自身 DNA 的复制、转录、损伤和修复的调节;运动影响线粒体呼吸的机制并以何种方式及在呼吸链的哪个环节发挥作用等等都有待于进一步深入的研究。

参考文献:

- [1] Nieminen A L. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria[J]. *Int Rev Cytol*, 2003, 224: 29-55.
- [2] Decaudin D, Geley S, Hirsch T, et al. Bcl-2 and Bcl-XL antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(1): 62-67.
- [3] Kluck R M, Bossy-Wetzel E, Green D R, et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis[J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1132-1136.
- [4] Hunter D R, Haworth R A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria I. The protective mechanisms[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1979, 195(2): 453-459.

- [5] Ravagnan L, Marzo I, Costantini P, et al. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2 inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore[J]. *Oncogene*, 1999, 18(16): 537-546.
- [6] Brenner C, Cadiou H, Vieira H L, et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator[J]. *Oncogene*, 2000, 19(3): 329-336.
- [7] Acehan D, Jiang X, Morgan D G, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation[J]. *Mol Cell*, 2002, 9(2): 423-432.
- [8] Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(40): 31199-31203.
- [9] Susin S A, Zamzami N, Castedo M, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease[J]. *J Exp Med*, 1996, 184(4): 1331-1341.
- [10] Susin S A, Lorenzo H K, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. *Nature*, 1999, 397(6718): 441-446.
- [11] Ferri K F, Jacotot E, Blanco J, et al. Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(8): 1081-1092.
- [12] Li L, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria[J]. *Nature*, 2001, 412(6842): 95-99.
- [13] Parrish J, Li L, Klotz K, et al. Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*[J]. *Nature*, 2001, 412(6842): 90-94.
- [14] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. *Cell*, 2000, 102(1): 33-42.
- [15] Verhagen A M, Ekert P G, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. *Cell*, 2000, 102(1): 43-53.
- [16] Zobel K, Wang L, Varfolomeev E, et al. Design, synthesis, and biological activity of a potent Smac mimetic that sensitizes cancer cells to apoptosis by antagonizing IAPs[J]. *ACS Chem Biol*, 2006, 19, 1(8): 525-533.
- [17] Faccio L, Fusco C, Chen A, et al. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2581-2588.
- [18] Vaux D L, Silke J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304(3): 499-504.
- [19] Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death[J]. *Mol Cell*, 2001, 8(3): 613-621.
- [20] Yang X, Xing H, Gao Q, et al. Regulation of HtrA2/Omi by X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in human ovarian cancer cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 97(2): 413-421.
- [21] Lee S H, Lee J W, Kim H S, et al. Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer[J]. *APMIS*, 2003, 111(5): 586-590.
- [22] 张钧, 许豪文, 杨小英. 运动对心肌线粒体钙和细胞色素C的影响[J]. *体育科学*, 2003, 23(2): 130-133.
- [23] Siu P M, Bryner R W, Martyn J K, et al. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles[J]. *FASEB J*, 2004, 18(10): 1150-1152.
- [24] Siu P M, Bae S, Bodyak N, et al. Response of caspase-independent apoptotic factors to high salt diet-induced heart failure[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(3): 678-686.
- [25] Yoshifumi Umaki, Takao Mitsui, Itsuro Endo, et al. Apoptosis-related changes in skeletal muscles of patients with mitochondrial diseases[J]. *Acta Neuropathol*, 2002, 103: 163-170.
- [26] Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise[J]. *Med, Sci Sports Exerc*, 2001, 33(3): 393-396.
- [27] Adam Steensberg, Jason Morrow, Anders Dyhr Toft, et al. Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2002, 87: 38-42.
- [28] Jin H. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rates[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(6): H2994-3002.
- [29] 张钧, 许豪文, 杨小英. 运动对心肌细胞凋亡的影响[J]. *体育科学*, 2002, 22(5): 93-95.
- [30] 韩立明. 70分钟游泳对小白鼠脑、心、肝、肾、肌组织MDA水平及SOD活性的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 1996, 15(1): 69.

- [31] 常芸. 运动训练对内膜下心肌组织的影响[J]. 中国运动医学杂志, 1992, 11(1): 29-32.
- [32] 金其贯, 邓荣华, 李宁川, 等. 过度训练对大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2000, 19(4): 356-359.
- [33] Kavazis A N, McClung J M, Hood D A, et al. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(2): H928-935.
- [34] Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis[J]. *EMBO Rep*, 2001, 2(3): 222-228.
- [35] Wang Y. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(4): 2161-2168.
- [36] Hikoso S, Ikeda Y, Yamaguchi O, et al. Progression of heart failure was suppressed by inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 via transcortical gene transfer[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(5): 453-462.
- [37] 张微. 蛋白激酶D1在H₂O₂介导的ASK1-JNK信号传导通路中的作用及其机制研究[D]. 杭州: 浙江大学医学院, 2007.
- [38] Lu H, Wei G, Wang D, et al. Posttreatment with the Ca²⁺-Mg²⁺-dependent endonuclease inhibitor aurintricarboxylic acid abolishes genotoxic agent-induced nuclear condensation and DNA fragmentation and decreases death of astrocytes[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(13): 2925-2931.
- [39] Vichalkovski A, Kotevic I, Gebhardt N, et al. Tyrosine kinase modulation of protein kinase C activity regulates G protein-linked Ca²⁺ signaling in leukemic hematopoietic cells[J]. *Cell Calcium*, 2006, 39(6): 517-528.
- [40] Cardoso S, Santos R X, Carvalho C, et al. Doxorubicin increases the susceptibility of brain mitochondria to Ca²⁺-induced permeability transition and oxidative damage[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(10): 1395-1402.
- [41] Kinsey G R, Blum J L, Covington M D, et al. Decreased iPLA2 gamma expression induces lipid peroxidation and cell death and sensitizes cells to oxidant-induced apoptosis[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(7): 1477-1487.
- [42] Berggård T, Miron S, Onnerfjord P, et al. Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca²⁺ sensor[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(19): 16662-16672.
- [43] 丁树哲. 疲劳运动后大鼠心肌线粒体的研究[J]. 中国运动医学杂志, 1992, 11(1): 22.
- [44] Fernstrom M, Tonkonogi M, Sahlin K. Effects of acute and chronic endurance exercise on mitochondrial uncoupling in human skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2004, 554(3): 755-763.
- [45] 刘铁民. 过度训练对大鼠心肌组织损害的实验研究[J]. 中国体育科技, 2003, 39(2): 31-34.
- [46] 王长青. 运动性疲劳时Ca²⁺、线粒体膜电位的改变与细胞凋亡[J]. 体育科学, 2000, 20(3): 59-65.
- [47] 陈英杰, 彭长虹, 郭庆芳, 等. 剧烈运动后大鼠心肌线粒体内钙、心肌酸性磷酸酶和葡萄糖醛酸酶的动态变化[J]. 中国运动医学杂志, 1998, 17(1): 4-7.
- [48] Yi X L, Yin X M, Dong Z. Inhibitor of Bid2 induced apoptosis by Bcl-2[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 19922-19999.
- [49] Leri A. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the bcl-2 to bax protein ratio in the cell[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101: 1326-1342.
- [50] 张钧, 许豪文, 黄叔怀. 运动对心肌细胞凋亡的影响及其凋亡调控基因的调控作用[C]//2002年全国运动医学学术会议论文摘要汇编, 2002: 226.
- [51] 张钧, 许豪文. 运动对细胞凋亡的影响(综述)[J]. 体育学刊, 2002, 9(6): 45-48.