

·实验核医学·

活体内线粒体功能评估

聂秀丽 赵士艳 管樑 石洪成 朱汇庆 严惟力

【摘要】 线粒体在维持人体正常生理功能中具有重要的作用,线粒体功能紊乱与多种疾病的发生和发展相关。活体内线粒体功能评估有助于更为完整、全面地了解其生物学功能,该文就活体内线粒体功能评估的方法作一综述。

【关键词】 线粒体;磁共振波谱学;正电子发射断层显像术;呼吸试验;体液和分泌物;外周血单核细胞

In vivo assessment of mitochondrial function NIE Xiu-li*, ZHAO Shi-yan, GUAN Liang, SHI Hong-cheng, ZHU Hui-qing, YAN Wei-li. *Department of Nuclear Medicine, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

Corresponding author: YAN Wei-li, Email: haishanghuakai1987@163.com

【Abstract】 Mitochondria play a major role in normal metabolism of the body. Therefore, mitochondrial dysfunction inevitably participates in or even determines the onset and progression of many diseases. Methods for in vivo assessment of mitochondrial function would help understand the biological function of mitochondria. This review focuses on the methods to assess mitochondrial function in vivo.

【Key words】 Mitochondria; Magnetic resonance spectroscopy; Positron-emission tomography; Breath tests; Fluids and secretions; Peripheral blood mononuclear cells

线粒体是生物体最为重要的细胞器之一,对维持人体正常生理功能具有重要的作用,线粒体功能紊乱与多种疾病的发生和发展相关。细胞培养或体外线粒体分离技术常用于评估外源性物质对线粒体的作用,但是这些方法不能准确反映体内各种因素的影响。活体内线粒体功能评估有助于更为完整、全面地了解其生物学功能;遗憾的是,到目前为止,仍没有一种评估方法被临床广泛认可,但是磁共振波谱(magnetic resonance spectroscopy, MRS)、PET、呼吸试验、血尿代谢组学评估以及替代细胞群[如外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)]等评估方式的出现对科研及临床工作都具有一定的指导意义。本文就活体内线粒体功能评估的方法作一综述。

1 MRS

MRS是根据核磁共振的原理检测强磁场内元素原子核的磁性,分析得到的光谱用以确定代谢物浓度的一种技术,可以非侵入性地研究多种组织代谢。利用 ^{31}P 饱和转移技术, ^{31}P -MRS可用于研究肌肉线粒体代谢中的ATP水平; ^{13}C -MRS能模拟肌肉线粒体中三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle)氧化过程^[1]。检测含 ^{13}C 或 ^{31}P 分子的浓度能够直接评估骨骼肌、心脏和大脑等组织中能量代谢物的浓度变化。 ^1H -MRS可用来评估组织细胞胞内及胞外的脂肪水平,这或许可用于评估单个组织中线粒体功能紊乱的程度。

^{31}P -MRS可用来检测无机磷酸盐、ATP和磷酸肌酸(phosphocreatine, PCr)的浓度,其他相关代谢物的浓度可通过这三者计算得到。三羧酸循环中的乙酸氧化可作为组织耗氧量的标志, ^{31}P -MRS和 ^{13}C -MRS的联合使用发现,其与ATP合成密切相关,并可用于计算线粒体耦联效率。心脏衰竭患者心肌中PCr/ATP比值处于持续的较低水平, ^{31}P -MRS与 ^1H -MRS的联合使用可用来检测心肌总肌酸,从而进一步探究肌酸激酶(creatine kinase)的反

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2011.02.001

基金项目:国家自然科学基金(30770599);上海教委科技创新项目(09Y782)

作者单位:200127,上海交通大学医学院附属仁济医院核医学科(聂秀丽,赵士艳,严惟力);200025,上海交通大学附属瑞金医院核医学科(管樑);200032上海,复旦大学附属中山医院核医学科(石洪成);200040上海,复旦大学附属华山医院核医学科(朱汇庆)

通信作者:严惟力(Email: haishanghuakai1987@163.com)

应。借助最新的 MRS 技术, ^{31}P 、 ^1H 、 ^{23}Na 和 ^{13}C 的 MRS 信号可提供健康心脏和患病心脏线粒体能量代谢的信息, ^{31}P -MRS 评估线粒体 ATP 合成时, 也可同时评估线粒体耦联效率^[2]。此外, van den Broek 等^[3]联合应用 ^1H -MRS 和 ^{31}P -MRS 研究发现: 长期高脂肪饮食喂养后, 大鼠肌肉内线粒体代谢功能增强, 以维持其正常的氧化能力并抵抗肌肉细胞内脂质累积, 从而显示了 ^1H -MRS 和 ^{31}P -MRS 联合应用在评估线粒体功能方面具有独特的优势。

通过 ^{31}P -MRS 检测运动后 PCr 的恢复、静息状态下 ATP 合成饱和转移, 可在活体内评估骨骼肌线粒体功能。van den Broek 等^[4]借助 ^{31}P -MRS 对大鼠线粒体功能紊乱模型进行研究发现: 与 ATP 合成相比, 运动后 PCr 水平的恢复与骨骼肌线粒体功能具有更直接的关系, 是活体内骨骼肌线粒体功能评估较为合适的方法。研究显示, 给予人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染者齐多夫定, PCr 消耗及运动后 PCr 恢复时间明显增加; 另外, 健康志愿者行短期给予司坦夫定后, 也会导致运动后 PCr 恢复率显著下降^[5], 因此, 利用 ^{31}P -MRS 检测药物治疗后 HIV 感染者骨骼肌中 PCr 消耗和恢复的变化, 能够反映线粒体功能的改变, 进而反映药物治疗不良反应。

随着年龄的增加, 线粒体的功能和形态随之改变。Forester 等^[6]使用 ^{31}P -MRS 探究了衰老对大脑灰质和白质脑化学的作用后发现: 通过检测线粒体高能磷酸盐 (high-energy phosphate) 浓度、pH 值和膜代谢的变化, ^{31}P -MRS 可以准确地评估线粒体能量代谢变化。

给予合适的底物, ^{13}C -MRS 能够通过底物能量的代谢途径来检测含碳分子的流动。例如, 静脉给予 ^{13}C 标记的葡萄糖、3-羟基丁酸或乙酸后, 通过跟踪糖酵解、酮体代谢或者三羧酸循环, 能够分别检测标记底物的流动速率。此外, 借助三羧酸循环乙酸消耗和氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 之间的化学计量关系可以估算代谢耗氧量。 ^1H -MRS 可用于检测不同临床和有抗反转录病毒史的 HIV 感染者的肝脏脂肪水平, 并同时探究其与胰岛素抵抗、身体脂肪分布和其他因素的联系^[7]。尽管该研究中没有检测明确的线粒体代谢靶点, 但是 ^1H -MRS 作为线粒体毒性的度量手段来评估组织脂肪水平可能是很有价值的。

2 PET

PET 可通过检测靶组织内示踪分子的摄取和清除动力学来反映靶组织的代谢, 示踪分子、代谢底物或者外源性物质通常用 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 等短半衰期的放射性核素标记。使用 PET 评估葡萄糖、乙酸和乳酸等代谢底物能量代谢方面的改变可能是很有用的。有文献报道, PET 可以检测大脑氧化代谢速率和葡萄糖代谢速率, 因此可用于研究早期未治疗的帕金森患者和正常对照人群的大脑线粒体的功能差异^[8]。PET 检测 ^{11}C -乙酸组织清除动力学常用来评价三羧酸循环和氧化磷酸化的速率。另外, Simons 等^[9]的研究表明, 联合使用 2-脱氧葡萄糖、过氧化氢代谢抑制剂和 ^{18}F -FDG PET 检测, 可用于评估肿瘤细胞线粒体, 并预测肿瘤治疗的作用。

^{18}F -氟苄基三苯基磷 (^{18}F -fluorobenzyl triphenylphosphonium, ^{18}F -FBnTP) 和 $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -MIBI 均可作为示踪剂用于心脏线粒体功能检测。 ^{18}F -FBnTP 和 $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -MIBI 属于亲脂性阳离子显像剂, 与线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 呈比例性在细胞中累积^[10], 因此其摄取和清除动力学可反映线粒体功能的完整性。研究发现, 心脏衰竭患者功能心肌退化、利尿钠肽增加、心脏事件增加等均与 $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -MIBI 清除速率增快有关, 因此 $^{99\text{Tc}}\text{m}$ -MIBI 的摄取和滞留可反映线粒体功能的改变^[11]。线粒体功能紊乱、能量代谢异常一直被认为是亨廷顿病的可能致病机制, 联合利用 PET 和核磁共振光谱发现: 线粒体内的突变以及功能异常都与亨廷顿病潜在的致病机制相关^[12]。

3 呼吸试验

甲硫氨酸和酮异己酸 (ketoisocaproic acid, KIC) 呼气试验常被用来评估肝脏线粒体功能。给予 ^{13}C 标记的甲硫氨酸或 KIC 后, 使用质谱仪连续检测呼出的 $^{13}\text{CO}_2$ 可定量评估肝功能。甲硫氨酸和 KIC 主要在肝脏线粒体中代谢, 因此 $^{13}\text{CO}_2$ 清除动力学可以反映肝细胞线粒体功能。虽然呼气试验与标准线粒体功能检测靶点的关系未被直接证实, 但已有实验结果表明, ^{13}C -甲硫氨酸呼气试验是一种安全、非侵入性、能够有效检测肝脏线粒体功能的方法, 可用来评估短肠综合征和肠外营养相关性肝病儿童的肝脏线粒体功能^[13]。

肝脏线粒体能量代谢和 KIC 或甲硫氨酸代谢的联系与氧化型和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸比值相关, 氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的增加引起 $^{13}\text{C}_2$ 呼出增加, 氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的减少引起 $^{13}\text{C}_2$ 呼出减少。乙醇和阿司匹林对线粒体功能的作用均可通过甲硫氨酸和 KIC 呼气试验评估, 大鼠和人类减少乙醇给予或者增加阿司匹林给予均使 $^{13}\text{C}_2$ 累积清除速率增加, 但是两者的机制却不相同: 肝脏中乙醇氧化导致细胞液和线粒体内可用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸增加 (氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的减少), 而阿司匹林是线粒体解耦联剂, 导致可用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸减少 (氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸增加)。

HIV 感染者用核酸反转录酶抑制剂 (nucleic acid reverse transcriptase inhibitors, NRTI) 治疗可引起线粒体毒性作用, ^{13}C -甲硫氨酸呼气试验结果发现, 该感染者 $^{13}\text{C}_2$ 排出量明显减少; 高乳酸血症患者 $^{13}\text{C}_2$ 排出量比正常乳酸患者减少很多; 与健康对照组、无症状患者相比, 正常乳酸患者中脂肪萎缩者 $^{13}\text{C}_2$ 排出量明显下降。Milazzo 等^[14]使用 ^{13}C -甲硫氨酸呼气试验对抗反转录病毒治疗相关脂肪萎缩 HIV 感染者的线粒体功能进行评估, 结果发现, 补充抗氧化剂可能对线粒体功能具有保护作用。Banasch 等^[15]使用非侵入性的 ^{13}C -甲硫氨酸呼气试验评估了 HIV 患者不同抗反转录病毒治疗方案对肝脏线粒体功能的长期作用。虽然这些研究表明呼气试验有助于评估 NRTI 治疗相关线粒体毒性, 但是呼气试验的可靠性仍有待进一步研究证实。

4 体液代谢组学

利用 MRS 或质谱仪对血液和尿液进行代谢组学检查可用于分析疾病机制、寻找合适的生物标记。血液和尿液中可用于线粒体功能紊乱预测的有价值代谢物包括葡萄糖、乳酸、丙酮酸、酮体、三羧酸循环中间产物和二羧酸等。Martin 等^[16]研究发现, 铁幼粒细胞性贫血大鼠线粒体内三羧酸循环和蛋白合成降低, 通过检测两者的代谢变化可以反映该大鼠模型的线粒体氧化功能。

线粒体功能的改变可引起生物体液代谢物的变化, 因此, 通过代谢组学可以检测外源性物质对线粒体的作用。例如: 给予大鼠烯丙基甲酸、对乙酰

氨基酚和抗血管生成化合物后, 三羧酸循环中间产物、乳酸、丙酮酸、葡萄糖、3-羟基丁酸和多种脂类代谢物均发生相应变化。利用 MRS 和新型质谱仪分析法研究能量、碳水化合物和脂类代谢的过程, 即可进一步了解缺氧导致的肿瘤细胞线粒体内氧化磷酸化和糖酵解的改变, 为临床选择潜在的治疗靶点。

体液代谢组学在线粒体功能评估中的应用一直受到限制, 其在诊断遗传性线粒体功能紊乱方面的效果也相当有限^[17]。虽然线粒体功能紊乱与多个化合物的毒性有关^[18], 但是尚无研究评估过它们对靶组织线粒体功能的共同作用, 这些化合物对线粒体的作用与生物体液反应之间的相关性也并不清楚。

5 替代细胞群

PBMC 线粒体已被研究作为 NRTI 相关毒性的替代标记, 但是其准确性尚待证实^[19]。目前几乎没有研究探讨过 NRTI 或其他线粒体毒性药物治疗后动物 PBMC 的改变。

检测 HIV 感染者 PBMC 内线粒体 DNA 水平可用来反映其与 NRTI 治疗、线粒体毒性导致临床事件之间的关系。研究显示, 不同 NRTI 组合治疗中, 第 12 个月线粒体 DNA 消耗与随后第 30 个月发生的脂肪代谢障碍相关^[20]。此外, 有研究表明, 糖尿病患者和对照组相比, 线粒体呼吸链功能未发现明显差异, 但是前者 PBMC 中线粒体 DNA 氧化损伤严重, 提示 PBMC 中线粒体 DNA 水平可反映疾病对线粒体功能的影响^[21]。

有时, 检测 PBMC 中线粒体的 MMP 和氧耗量可系统评估线粒体功能。给予 NRTI 或其他高线粒体毒性药物, HIV 感染者 PBMC 中的氧耗量下降。另一项研究结果提示, 经司坦夫定治疗的患者 PBMC MMP 低于未治疗者, 这与 HIV 对线粒体的直接作用一致, HIV 感染未治疗者与未感染者相比, 其 MMP 明显下降, 开始治疗后则明显增加^[22], 与已发现的线粒体 DNA 作用类似。

6 结论

活体内线粒体功能评估有助于进一步理解线粒体功能、功能紊乱及其毒性机制, 从而进一步探究疾病或者外源性物质对线粒体的作用, 也为线粒体

作用药物的安全研发提供有用信息。虽然目前这些评估方法仍然存在很大的局限性,在科研和临床中的推广也十分有限,但是随着对线粒体生物学功能了解的深入以及各种检测手段的发展,活体内线粒体功能评估的理论和实践将更趋于完善,使其能够更好的为科研和临床服务。

参 考 文 献

- [1] Befroy DE, Falk Petersen K, Rothman DL, et al. Assessment of in vivo mitochondrial metabolism by magnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol*, 2009, 457: 373-393.
- [2] Conley KE, Amara CE, Jubrias SA, et al. Mitochondrial function, fibre types and ageing: new insights from human muscle in vivo. *Exp Physiol*, 2007, 92(2): 333-339.
- [3] van den Broek NM, Ciapaitė J, De Feyter HM, et al. Increased mitochondrial content rescues in vivo muscle oxidative capacity in long-term high-fat-diet-fed rats. *FASEB J*, 2010, 24(5): 1354-1364.
- [4] van den Broek NM, Ciapaitė J, Nicolay K, et al. Comparison of in vivo postexercise phosphocreatine recovery and resting ATP synthesis flux for the assessment of skeletal muscle mitochondrial function. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(5): C1136-C1143.
- [5] Fleischman A, Johnsen S, Systrom DM, et al. Effects of a nucleoside reverse transcriptase inhibitor, stavudine, on glucose disposal and mitochondrial function in muscle of healthy adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(6): E1666-E1673.
- [6] Forester BP, Berlow YA, Harper DG, et al. Age-related changes in brain energetics and phospholipid metabolism. *NMR Biomed*, 2010, 23(3): 242-250.
- [7] Hadigan C, Liebau J, Andersen R, et al. Magnetic resonance spectroscopy of hepatic lipid content and associated risk factors in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2007, 46(3): 312-317.
- [8] Powers WJ. PET studies of cerebral metabolism in Parkinson disease. *J Bioenerg Biomembr*, 2009, 41(6): 505-508.
- [9] Simons AL, Mattson DM, Dornfeld K, et al. Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. *J Cancer Res Ther*, 2009, 5(Suppl 1): S2-S6.
- [10] Madar I, Ravert H, Nelkin B, et al. Characterization of membrane potential-dependent uptake of the novel PET tracer ¹⁸F-fluorobenzyl triphenylphosphonium cation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34(12): 2057-2065.
- [11] Matsuo S, Nakae I, Tsutamoto T, et al. A novel clinical indicator using Tc-99m sestamibi for evaluating cardiac mitochondrial function in patients with cardiomyopathies. *J Nucl Cardiol*, 2007, 14(2): 215-220.
- [12] Turner C, Schapira AH. Mitochondrial matters of the brain: the role in Huntington's disease. *J Bioenerg Biomembr*, 2010, 42(3): 193-198.
- [13] Duro D, Duggan C, Valim C, et al. Novel intravenous (13)C-methionine breath test as a measure of liver function in children with short bowel syndrome. *J Pediatr Surg*, 2009, 44(1): 236-240.
- [14] Milazzo L, Menzaghi B, Caramma I, et al. Effect of antioxidants on mitochondrial function in HIV-1-related lipodystrophy: a pilot study. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010, 26(11): 1207-1214.
- [15] Banasch M, Frank J, Serova K, et al. Impact of antiretroviral treatment on (13) C-methionine metabolism as a marker of hepatic mitochondrial function: a longitudinal study. *HIV Med*, 2011, 12(1): 40-45.
- [16] Martin FM, Xu X, von Löhneysen K, et al. SOD2 deficient erythroid cells up-regulate transferrin receptor and down-regulate mitochondrial biogenesis and metabolism. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16894.
- [17] Haas RH, Parikh S, Falk MJ, et al. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab*, 2008, 94(1): 16-37.
- [18] Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, et al. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem*, 2008, 283(20): 13565-13577.
- [19] Milinkovic A, Martinez E, López S, et al. The impact of reducing stavudine dose versus switching to tenofovir on plasma lipids, body composition and mitochondrial function in HIV-infected patients. *Antivir Ther*, 2007, 12(3): 407-415.
- [20] Chêne G, Amellal B, Pédrone G, et al. Changes in the peripheral blood mtDNA levels in naive patients treated by different nucleoside reverse transcriptase inhibitor combinations and their association with subsequent lipodystrophy. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23(1): 54-61.
- [21] García-Ramírez M, Francisco G, García-Arumí E, et al. Mitochondrial DNA oxidation and manganese superoxide dismutase activity in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*, 2008, 34(2): 117-124.
- [22] Sternfeld T, Schmid M, Tischleder A, et al. The influence of HIV infection and antiretroviral therapy on the mitochondrial membrane potential of peripheral mononuclear cells. *Antivir Ther*, 2007, 12(5): 769-778.

(收稿日期: 2011-01-05)