

线粒体移植在治疗线粒体缺陷疾病中的研究进展*

杨世锋^{1,2)*} 孙超^{2,3)**} 王玉佩^{2,3)} 陈玉红^{2,3)}

张倩婧^{2,3)} 张红^{1,2,3)***}

(¹) 兰州大学药学院, 兰州 730000; (²) 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000; (³) 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 线粒体是真核细胞中重要的细胞器, 是高等生命体赖以生存的能量来源。线粒体异常可引起细胞甚至器官发生病变, 越来越多的疾病被证实与线粒体功能障碍有关。线粒体移植是从患者正常组织分离线粒体然后注入线粒体损伤或缺失的部位, 使损伤细胞得到救治、器官功能得以恢复的全新干预技术。线粒体移植作为一种新兴治疗方案在一些疾病干预的基础研究中崭露头角, 尤其是在保护心脏缺血再灌注损伤领域已经发展到临床试验阶段。本文从线粒体起源出发, 总结了仍处于实验阶段的几种线粒体移植方法, 概述了线粒体移植在脑缺血引起神经元损伤保护领域、心肌缺血再灌注损伤保护领域和肿瘤治疗领域的研究进展, 从分子层面探讨了线粒体损伤及线粒体移植修复的机理, 并提出研发患者专属的“线粒体移植治疗生物制剂”的设想, 旨在为线粒体缺陷有关疾病的治疗研究提供新的视角。

关键词 线粒体移植, 线粒体功能障碍, 脑缺血, 心肌缺血再灌注损伤, 肿瘤

学科分类号 Q25, Q28

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0222

线粒体(mitochondria)是负责真核细胞能量合成的重要细胞器, 是细胞内氧化磷酸化和三羧酸循环的主要场所, 是腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)产生的主要部位, 所以有细胞“动力工厂”之称。除了为细胞提供能量外, 线粒体还参与诸如细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等生理病理过程, 并拥有调控细胞生长和细胞周期的能力^[1]。

研究表明, 急性缺血缺氧、辐射、药物毒副作用、环境污染及乏氧肿瘤微环境等多种因素都能引起线粒体损伤或缺失^[2]。线粒体损伤或缺失导致细胞呼吸功能障碍, 最终引起器官的功能异常、机体发生病变^[3]。线粒体起源的经典假说认为, 线粒体起源于内共生, 古线粒体作为一种需氧细菌的形式被原始真核细胞吞噬, 在长期互利共生中演化形成了现在的线粒体细胞器^[4]。如果这个假说成立, 那么线粒体至今是否仍然保持与细胞融合的能力, 进行跨细胞转移? 许多学者就此进行研究, 并给出了肯定的答案。试验证明, 从患者其他部位得到正常的线粒体然后直接注入线粒体异常的组织部位就可以代替损伤线粒体, 损伤细胞得到救治, 器官功能恢复正常, 这样的干预治疗方式被命名为线粒体移

植(mitochondrial transplantation)^[5-7]。本文就线粒体移植的方法和其在细胞和动物层面的研究以及临床治疗进展进行综述。

1 线粒体移植的方法

线粒体移植技术目前主要有共培养法、显微注射法、脂质体转染法和小肽标记法。所谓共培养法就是将线粒体游离纯化后与目的细胞共培养, 自发完成线粒体跨细胞转移。有研究人员将肝巨噬细胞(Kupffer cell)饥饿处理 2 h 后加入游离纯化的肝细胞线粒体, 在共培养 30 min 后可以观察到游离线粒体被吞噬进入到 Kupffer 细胞内, 帮助细胞快速供能、渡过饥饿难关^[8]。共培养线粒体移植技术操作简单, 但是受到细胞内吞效应的限制, 移植效率

* 国家自然科学基金联合基金重点项目(U1432248), 科技部国家重点研发项目(2016YFC0904600)和国家自然科学基金青年基金项目(11505245)资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0931-4969344, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

收稿日期: 2017-06-14, 接受日期: 2017-12-21

较低. 显微注射法则可以将大量游离线粒体一次性注射到目的细胞内, 有效提高移植效率. Pinkert 等^[9]研究人员将正常 *Mus spretus* 鼠的肝细胞内线粒体分离纯化, 并利用显微注射器将纯化线粒体注射到超数排卵处理过的雌性小鼠 (*M. musculus domesticus*) 的受精卵细胞中. 结果显示, 在总共 217 个受精卵中有 67 个存活, 在培养 4.5 d 后最终有 23 个受精卵发育至囊胚阶段. 但是使用这种方法进行移植时, 组织中每个细胞均需接受注射, 对技术和设备的要求较高, 在临床上困难较大. 有研究报道使用线粒体靶向荧光探针 MitoTracker Red CMXRos 对从小鼠肝脏分离纯化的线粒体进行标记, 再利用脂质体对标记的线粒体进行包裹, 可以在荧光显微镜下观察到用脂质体合成物包裹的线粒体成功转移至细胞中, 证明了外源线粒体可以通过脂质体合成物途径移植到细胞^[10]. 此外, 最新文献报道利用小肽标记的方法也可以实现线粒体跨细胞移植. 研究人员发现, 将游离线粒体与细胞膜穿透肽 Pep-1 在 37℃ 孵育后可形成线粒体 - Pep-1 复合体, 复合体与受体细胞共同培养 48 h 后, 可以观察到外源性线粒体在 Pep-1 介导下进入受体细胞内. 相比于常规共培养法, 这种小肽标记移植方案不受内吞效应限制, 转移效率能得到大幅度提高^[11].

2 线粒体移植治疗线粒体缺陷性疾病

2.1 线粒体移植保护脑缺血引起神经元损伤

脑缺血是一种因血管病变引起的急慢性神经退行性病变, 由于血液供应不足, 常伴有大脑神经元

细胞损伤. 现代神经科学的研究资料已经证明, 谷氨酸是中枢神经系统中介导快速兴奋性突触反应的重要神经递质, 其在高浓度情况下会引起大脑严重的神经毒性^[12]. 在脑缺血过程中, 大脑皮层、海马以及杏仁核等区域常出现高浓度谷氨酸并结合于神经元细胞膜上的 N 甲基 -D- 天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)型受体(图 1a-b). NMDA 受体是一种对钙离子高度通透的配体门控离子通道, 谷氨酸与 NMDA 受体结合可以有效开启钙通道^[13], 导致钙离子异常流入细胞内(图 1b-c, d)^[14]. 高浓度的钙离子导致线粒体内膜的膜电位降低^[15]、ATP 产生减少并在线粒体膜上形成线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)(图 1b-e). 在 MPTP 形成过程中, 水分子可以通过渗透梯度进入高度浓缩的基质, 导致线粒体肿胀和线粒体膜破裂(图 1b-f), 从而释放活性氧(ROS)、钙离子和细胞色素 c 等多种凋亡诱导因子^[16]. 当内源性的 ROS 过载时, 会攻击周围线粒体的膜蛋白以及线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA), 周围线粒体也将形成 MPTP, 导致神经元细胞内越来越多的线粒体出现损伤, 直到细胞死亡(图 1b-h).

通过移植方法用正常线粒体代替受损的线粒体, 可以减少细胞内的 ROS 产生(图 1c-i), 为受损 mtDNA 提供外源性的新碱基(图 1c-j), 增加 ATP 的产生(图 1c-k), 并减缓钙离子的流入速度(图 1c-l). 线粒体移植可以为细胞提供足够的能量去激活线粒体靶向性自噬^[17], 完成神经元细胞自我修复.

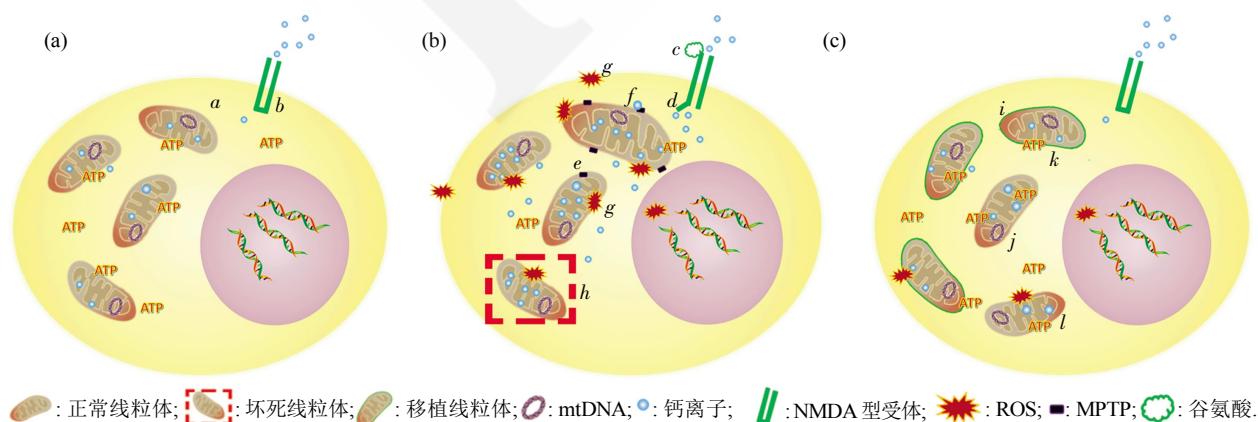


Fig. 1 Schematic depiction of how mitochondrial transplantation after injury may promote cell survival

图 1 线粒体移植恢复损伤细胞功能示意图

(a) 在正常的细胞中, 线粒体将钙离子整合在基质内产生 ATP (a), 而 NMDA 受体保持闭合 (b). (b) 细胞损伤后, 谷氨酸介导 NMDA 受体活化 (c), 使大量钙离子进入细胞 (d) 并被摄入线粒体, 线粒体膜电势崩溃形成线粒体通透性转换孔 (MPTP) 并伴有线粒体肿胀 (e), 随后线粒体外膜破裂释放钙离子、ROS 和凋亡因子 (f). ROS 氧化攻击膜脂质、mtDNA、电子传递链蛋白 (g), 导致相邻线粒体受损 (h). (c) 健康线粒体移植到损伤的细胞中后, 可增强细胞抗氧能力、减少 ROS 的释放 (i), 为受损线粒体供应正常 mtDNA (j), 线粒体移植还可以为受损细胞快速提供 ATP (k) 并缓解钙离子的流入速度 (l), 促进细胞存活.

2016 年《自然》(*Nature*)发表论文, 健康的星形胶质细胞的线粒体可以通过共培养的方式移植到受损神经元, 并可以通过直接注射的方式进入受损脑组织^[18]. 研究人员首先采用基因工程技术提高 C57 小鼠体内 CD38 蛋白表达量, 并体外培养动物来源的星形胶质细胞, 发现这种细胞可以释放正常线粒体. 然后将含有丰富线粒体的培养基加入由于饥饿受损伤的神经元细胞的培养皿中. 结果发现, 在 24 h 内受损伤神经元能摄取来自培养基的线粒体并生长出新的突起, 细胞内 ATP 水平增高, 磷酸化 AKT 和 BCL-XL 抗凋亡蛋白表达升高, 神经元细胞存活时间延长. 然后, 研究人员利用尼龙线阻断大脑中动脉复制 C57 小鼠局灶性脑缺血模型, 并在缺血引起的脑损伤位点注射分离自星形胶质细胞的正常线粒体. 大脑形态学分析结果表明, 注入的线粒体能够进入缺血部位神经元细胞内, 脑组织内 ATP 含量增多, 轴突膜蛋白 GAP43 表达增多促进神经元发育和再生, 神经元标志物 NeuN 和 MAP2 数量增多, 脑组织梗死面积减小, 表明线粒体移植对急性脑缺血具有较好的保护作用. 更进一步的研究发现, 星形胶质细胞释放线粒体的过程以及神经元细胞内吞线粒体的过程都需要 CD38 和环腺苷二磷酸核糖(cyclic ADP ribose, cADPR)的参与. CD38 是一种单链 II 型跨膜糖蛋白, 它可以催化 NAD⁺ 生成 cADPR, 然后以同源二聚体的形式, 将胞外产生的 cADPR 转运进细胞内^[19-20]. cADPR 在细胞内的信号级联反应中充当第二信使, 可以介导胞浆内 Ca²⁺ 的释放而调节细胞骨架变化, 发生细胞内吞或者外排作用, 这可能是线粒体跨细胞转移的机理所在. 通过 siRNA 干扰 CD38 表达后, 星形胶质细胞释放线粒体的数量以及移植进入神经元细胞的线粒体数量都明显减少, 对脑缺血的保护效果降低^[18]. 除上述研究以外, McEwen 课题组^[21]同样发现外源线粒体成功移植到大鼠挫伤型急性脊髓损伤模型, 有效缓解脊髓损伤程度. 线粒体跨细胞移植能力为中枢神经系统以及外周神经系统的保护开辟了新的途径.

线粒体移植促进损伤组织修复、改善异常的组织功能, 这一现象不仅在脑内以及神经系统被发现, 而且在机体的其他受损部位也得到了验证, 如肺上皮细胞^[22]、心肌细胞等^[6-7].

2.2 线粒体移植治疗心肌缺血再灌注损伤

心脏是一个高度需氧的器官, 细胞内线粒体超过 30%, 线粒体状态直接影响到心肌细胞的命运^[23-26].

文献表明, 心肌缺血再灌注引起线粒体基质增多、脊的面积和形态异常^[27]. 此外, 缺血还会使线粒体复合体活性降低、细胞色素氧化酶 IV 和线粒体钙离子堆积增多^[28]. 蛋白质组学分析表明, 缺血会引起线粒体脂肪酸、糖代谢、ATP 生物合成和氧化还原酶蛋白发生显著改变^[5]. 线粒体在心肌缺血再灌注损伤中扮演着一个至关重要的角色.

James 课题组利用离体兔心脏左前降支动脉结扎方式制造心肌缺血再灌注损伤模型, 并对线粒体移植保护功能进行了评价. 心肌缺血 29 min 后, 在缺血区域注入浓度为 $(7.7 \pm 1.5) \times 10^6$ /ml 的正常线粒体进行干预. 结果显示, 再灌注 120 min 后, 线粒体移植处理组的左心室舒张压和收缩后收缩分别显著提高至正常状态下的 75% 和 83%, 趋于正常水平. TTC 染色显示线粒体移植处心肌梗死面积较模型组明显减小, 保护效果显著^[29]. 随后, 又有人在兔和猪体内心脏模型中进行验证, 均发现线粒体移植在心脏缺血 / 再灌注损伤保护中有明显效果^[6-7].

更加深入的研究发现, 移植入心脏组织的线粒体可以同时胞内和胞外发挥作用. 注入线粒体 10 min 后, 组织内 ATP 含量就会显著升高, 胞外线粒体快速改善异常的心肌功能. 1 h 后可检测到线粒体通过肌动蛋白依赖的内吞作用进入胞内. 线粒体进入细胞后, 可持续增加胞内 ATP 的生成, 维持受损细胞内环境稳态, 发挥长效心肌保护作用^[5]. 线粒体移植除增强心肌损伤区域的能量供给之外, 还可以启动一些血管生成、免疫调节、抗凋亡、加强血液回收等与心肌功能恢复相关的细胞因子如表皮生长因子(EGF)、生长调节致癌基因(GRO)、白介素 6(IL-6)和单核细胞趋化蛋白 3(MCP-3)^[30]. 心肌缺血再灌注的过程中, EGF 通过刺激心肌细胞生长、增殖和迁移能够有效保持心肌内膜的完整性^[31-32]. 心肌梗塞后, GRO 和 IL-6 同时作为诱导因子促进梗塞区域血管新成、抵抗细胞凋亡^[33]. 上述细胞因子与 MCP-3 共同作用还能够心肌梗死后, 通过非心肌细胞再生途径快速改善心脏重塑^[34]. 除此之外, 移植的线粒体可通过线粒体融合方式, 用自身携带正常状态 mtDNA 替换心脏缺血 / 再灌注损伤的 mtDNA, 从线粒体基因组水平上发挥心肌细胞保护功能^[35].

线粒体移植首次运用于 5 名儿童开展心脏保护的临床研究, 患者因局部缺血再灌注造成心功能不全, 而无法脱离体外膜氧合治疗. 患者接受 10 次

来自自身腹直肌的正常线粒体的定位注射, 每次 100 μ l (约 1×10^7 个线粒体), 心室功能可以在 4~6 天后恢复正常, 其中 4 名儿童由缺血引起的冠状动脉梗阻和 1 名儿童由心膜下缺血引起的左心室肥大均有明显好转. 现在, 同样的方法已经被运用于心肌缺血再灌注损伤的成人, 随着提取技术的发展, 从自身肌肉组织获取线粒体并进行纯化只需 20~30 min^[36], 大大提高了线粒体移植治疗急性心肌缺血再灌注损伤的时效性.

2.3 线粒体移植在肿瘤治疗领域的基础研究

线粒体就像细胞内的“核电站”为机体源源不断地供应着能量, 造福细胞. 但是“核电站”一旦发生事故, 对细胞造成的将是毁灭性的破坏. 作为“能量工厂”的线粒体内部储存着大量的细胞致死因素, 如: ROS、钙离子、细胞色素 c 等. 除此之外, 作为动物细胞唯一的核外遗传物质, mtDNA 由于没有组蛋白包被, 完全裸露在胞质中, 其 DNA 聚合酶 γ 纠错、校对能力差^[37]. 因此, mtDNA 与核 DNA 相比, 更容易受到射线、ROS 以及化学药物等的攻击. 中国科学院近代物理研究所研究人员利用重离子束辐照肝癌 HepG2 细胞后发现, 辐射诱导 NADPH 氧化酶活化产生快速 ROS 率先攻击 mtDNA^[38]. mtDNA 受损后影响其编码的与呼吸链功能相关蛋白表达异常, 引起细胞电子传递受阻, 大量 ROS 泄露^[39]. 新生成 ROS 又会继续攻击 mtDNA, 最终在活性氧与 mtDNA 之间形成恶性循环损伤, 导致细胞持续氧化胁迫, 走向死亡^[40-42]. 诱导肿瘤细胞内线粒体损伤可能成为肿瘤治疗的理想靶点.

早在 20 世纪二三十年代, Warburg 就已经发现多数恶性肿瘤细胞能量代谢方式发生转变, 采用不依赖于线粒体的有氧糖酵解方式进行供能, 其主要原因为多数肿瘤细胞内线粒体缺陷造成能量代谢方式重编程, 这就是著名的“瓦博格效应”^[43-44]. 近几年, 研究人员在多种肿瘤细胞, 如肝癌 AS-30D、人乳腺癌 MDA-MB-231、人神经胶质瘤 U87 等细胞以及肝癌、乳腺癌组织中都检测到 mtDNA 拷贝数减少、D-loop 区域突变、mtDNA 4 977 bp 缺失以及线粒体皱缩、数量减少^[45-48]. 线粒体缺失的肿瘤细胞常伴有对放化疗治疗手段敏感性的降低现象^[49].

靶向肿瘤细胞的正常线粒体移植将有望提高恶性肿瘤对放化疗治疗手段敏感性. Elliott 等^[50]将正常乳腺上皮细胞 MCF-12A 的线粒体分离纯化, 并

与乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231 和 NCI/ADR-Res 共培养. 结果发现, 正常线粒体可以自发进入多药耐药的乳腺癌细胞中, 通过拮抗肿瘤细胞糖酵解途径使 ATP 的产生速率减慢, 使其能量供给速度和恶性增殖速度不能同步, 显著抑制肿瘤细胞的增殖扩散. 同时, 线粒体进入细胞能够迅速引起 Bad 脱磷酸化, 从而使 Bax 蛋白在线粒体中再分布^[51], 促进细胞色素 c 释放, 激活 Caspase 依赖的线粒体凋亡通路, 促进细胞大量凋亡, 增强乳腺癌细胞对多柔比星、紫杉醇和卡铂的敏感性. 然而, 将线粒体与正常乳腺上皮细胞 MCF-12A 共培养后, 未发现外源性线粒体进入到 MCF-12A 细胞中^[50], 正常线粒体这种选择性植入或许与乳腺癌细胞自身线粒体缺陷状态有关.

乏氧性是公认的肿瘤恶性标志之一^[52], 也是恶性肿瘤对放化疗治疗手段产生耐受性的原因之一. 乏氧肿瘤细胞内高水平的糖酵解不但为肿瘤细胞快速提供能量, 而且其代谢物乳酸的产生也营造了肿瘤细胞更为适应的酸性环境. 有研究人员利用溴化乙锭处理构建线粒体稳定缺失的肺癌 A549p^o 细胞株. 将人骨髓间充质干细胞(hMSCs)与肺癌 A549p^o 细胞共培养, 发现 A549p^o 与 hMSCs 细胞通过局部膜融合完成线粒体跨细胞转移. 移植进入 A549p^o 细胞内的外源线粒体重新表达 mtDNA 调控的与呼吸链功能相关基因(如: 细胞色素氧化酶 I、II、III 亚基, NADH 脱氢酶的 ND 1-6 亚基, 细胞色素 b 以及 ATP 酶 6、8 亚基). 通过线粒体移植最终在肺癌 A549p^o 细胞内重新塑造线粒体依赖的氧化磷酸化供能方式, 降低肿瘤细胞乏氧水平, 改善其恶性程度^[53].

3 总结与展望

本文综述了线粒体移植作为潜在的治疗手段对多种疾病干预的最新研究进展. 外源线粒体进入不同的细胞后, 会根据不同的代谢需要为受损细胞提供新的支持. 现有证据表明, 线粒体移植在多种线粒体缺陷以及功能障碍有关疾病治疗中已经崭露头角, 这种治疗手段为神经保护开辟了新的途径, 在保护心脏缺血再灌注急性损伤领域的研究已经发展到临床试验阶段, 在肿瘤治疗领域的基础研究也获得了令人满意的效果. 此外, 诸如阿尔茨海默病^[54]、帕金森病^[55-56]、肌营养不良^[57]、与衰老相关的神经病变^[58]、创伤性神经症及脑震荡等多种病理过程^[2]也与线粒体功能障碍有关. 线粒体移植在临

床中的应用将会越来越普遍、高效。其独特的治疗方案符合“用自身物质治疗自身疾病”的精准医学理念。如能将患者自身健康线粒体研发成为自体的“线粒体生物制剂”, 其特异性高、个体化强、无免疫排斥等优势, 是其他治疗线粒体功能障碍生物制剂所无法媲美的。线粒体移植在肿瘤治疗领域的基础研究表明, 游离线粒体选择性进入线粒体缺陷的恶性肿瘤细胞, 而对机体正常细胞则没有植入作用^[50]。在增强化疗药物对肿瘤组织杀伤作用的同时并没有提高对正常细胞的毒性, 这为研发新型、靶向、低毒抗肿瘤药物提供了一个合理思路。

当然, 线粒体移植研究毕竟还处于起步阶段, 还有一些深入机理没有被完全阐明。多数学者认为, 内吞作用是外源性线粒体进入目标细胞的主要途径^[59-63], 但是其与细胞之间是通过什么信号交互作用来启动内吞完成线粒体跨细胞转移的还不清楚。一些研究发现, 细胞共培养过程中胞间形成的隧道纳米管在线粒体胞间转移的过程中必不可少^[64]; Pacak 等^[35]用细胞松弛素 D 阻断肌动蛋白聚合, 发现肌动蛋白聚合行为在受损心肌组织内化自身线粒体的过程中发挥重要作用; 而 Kitani 研究组^[63]则利用荧光实时成像技术来跟踪转基因标记 DsRed 的线粒体进入间充质细胞的运动过程, 并报道大孔蛋白是体外线粒体内化所必需的。由此可以推断, 不同细胞对不同来源线粒体的内化机制可能有所差异。另外, 宿主细胞的损伤类型是能否进行移植的关键因素, 细胞应激、mtDNA 缺陷或呼吸链损伤或许是受损细胞吞噬外源线粒体的重要条件。除此之外, 移植进入的外源线粒体在新的细胞微环境中, 其自身功能只是暂时发挥作用还是能够长期存活下来, 稳定地完成调控 mtDNA 复制、功能相关蛋白表达以及线粒体分裂、融合等正常生理过程, 目前也还未揭示透彻, 深入阐明这些机理将对线粒体移植理论的发展和线粒体缺陷疾病治疗方案的完善具有重要的指导意义。我们相信在未来几年内, 随着线粒体移植基础研究领域的短板逐个攻破, 线粒体移植技术在治疗线粒体缺陷的疾病中将得到广泛应用。

参 考 文 献

- [1] 赵云罡, 徐建兴. 线粒体, 活性氧和细胞凋亡. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28**(2): 168-171
Zhao Y G, Xu J X. Prog Biochem Biophys, 2001, **28**(2): 168-171
- [2] McCully J D, Cowan D B, Emani S M, *et al.* Mitochondrial transplantation: From animal models to clinical use in humans. Mitochondrion, 2017, **34**: 127-134
- [3] Durhuus J A, Desler C, Rasmussen L J, *et al.* Mitochondria in health and disease - 3rd annual conference of society for mitochondrial research and medicine - 19-20 December 2013 - Bengaluru, India. Mitochondrion, **20**(2015): 7-12
- [4] 王金发. 细胞生物学. 北京: 科学出版社, 2003
Wang J F. Cell Biology. Beijing: Science Press, 2003
- [5] Masuzawa A, Black K M, Pacak C A, *et al.* Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, **304**(7): H966-H982
- [6] Cowan D B, Yao R, Akurathi V, *et al.* Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection. PLoS One, 2016, **11**(8): e0160889.
- [7] Kaza A K, Wamala I, Friehs I, *et al.* Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion. J Thorac Cardiovasc Surg. 2017, **153** (4): 934-943
- [8] Rieder H, Decker K. Phagocytosis of hepatocyte mitochondria by rat Kupffer cells *in vitro*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 1984, **365**(2): 175-184
- [9] Pinkert C A, Irwin M H, Johnson L W, *et al.* Mitochondria transfer into mouse ova by microinjection. Transgenic Research, 1997, **6**(6): 379-383
- [10] Shi J, Irwin M, Pinkert C. Mitochondria transfer into fibroblasts: liposome-mediated transfer of labeled mitochondria into cultured cells. Ethn Dis, 2008, **18**: S143-S144
- [11] Liu C S, Chang J C, Kuo S J, *et al.* Delivering healthy mitochondria for the therapy of mitochondrial diseases and beyond. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014, **53**(2014): 141-146
- [12] Olney J W, Sharpe L G. Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. Science, 1969, **166** (3903): 386-388
- [13] MacDermott A B, Mayer M L, Westbrook G L, *et al.* NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. Nature, 1986, **321**(6069): 519-522
- [14] Choi D W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. Neurosci Lett, 1985, **58**(3): 293-297
- [15] Rottenberg H, Scarpa A. Calcium uptake and membrane potential in mitochondria. Biochemistry, 1974, **13**(23): 4811-4817
- [16] Hunter D R, Haworth R A, Southard J H. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. J Biol Chem, 1976, **251**(16): 5069-5077
- [17] Ding W X, Yin X M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles and analysis. Biol Chem, 2012, **393**(7): 547-564
- [18] Hayakawa K, Esposito E, Wang X, *et al.* Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. Nature, 2016, **535**(7613): 551-555
- [19] Takasawa S, Tohgo A, Noguchi N, *et al.* Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP. J Biol Chem, 1993, **268**(35): 21111-21116

- 26052–26054
- [20] Tohgo A, Takasawa S, Noguchi N, *et al.* Essential cysteine residues for cyclic ADP-ribose synthesis and hydrolysis by CD38. *J Biol Chem*, 1994, **269**(46): 28555–28557
- [21] McEwen M L, Sullivan P G, Rabchevsky A G, *et al.* Transplanted mitochondria significantly maintain cellular respiration after acute contusion spinal cord injury. *Neurotrauma*, 2011, **8**(2): 168–179
- [22] Mohammad N I, Shonit R D, Memet T E, *et al.* Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med*, 2012, **18**(5): 759–765
- [23] Faulk E A, McCully J D, Tsukube T, *et al.* Myocardial mitochondrial calcium accumulation modulates nuclear calcium accumulation and DNA fragmentation. *Ann Thorac Surg*, 1995, **60**(2): 338–344
- [24] Toyoda Y, Friehs I, Parker R A, *et al.* Differential role of sarcolemmal and mitochondrial K⁺ (ATP) channels in adenosine-enhanced ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **279**(6): H2694–H2703
- [25] Toyoda Y, Levitsky S, McCully J D. Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels enhances cardioplegic protection. *Ann Thorac Surg*, 2001, **71**(4): 1281–1288
- [26] McCully J D, Levitsky S. The mitochondrial KATP channel and cardioprotection. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2003, **75**(2): S667–S673
- [27] McCully J D, Rousou A J, Parker R A, *et al.* Age- and gender-related differences in mitochondrial oxygen consumption and calcium with cardioplegia and diazoxide. *Ann Thorac Surg*, 2007, **83**(3): 1102–1109
- [28] Faulk E A, McCully J D, Hadlow N C, *et al.* Magnesium cardioplegia enhances mRNA levels and the maximal velocity of cytochrome oxidase I in the senescent myocardium during global ischemia. *Circulation*, 1995, **92**(9 Suppl): II405–II412
- [29] McCully J D, Cowan D B, Pacak C A, *et al.* Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, **296**(1): H94–H105
- [30] Roche S, D'Ippolito G, Gomez L A, *et al.* Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system *in vivo*. *Int J Pharm*, 2013, **440**(1): 72–82
- [31] Somers P, Cornelissen R, Thierens H, *et al.* An optimized growth factor cocktail for ovine mesenchymal stem cells. *Growth Factors*, 2012, **30**(1): 37–48
- [32] Lorita J, Soley M, Ramirez I. Epidermal growth factor protects the heart against low-flow ischemia-induced injury. *J Physiol Biochem*, 2010, **66**(1): 55–62
- [33] Kocher A A, Schuster M D, Bonaros N, *et al.* Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro/CXC chemokines. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, **40**(4): 455–464
- [34] Schenk S, Mal N, Finan A, *et al.* Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells*, 2007, **25**(1): 245–251
- [35] Pacak C A, Preble J M, Kondo H, *et al.* Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. *Biol Open*, 2015, **4**(5): 622–666
- [36] Emani S M, Piekarski B L, Harrild D, *et al.* Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2017, **154**(1): 286–289
- [37] Ong S B, Hausenloy D J. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 2010, **88**(1): 16–29
- [38] Sun C, Wang Z, Liu Y, *et al.* Carbon ion beams induce hepatoma cell death by NADPH oxidase-mediated mitochondrial damage. *J Cell Physiol*, 2014, **229**(1): 100–107
- [39] Hernández-García D, Wood C D, Castro-Obregón S, *et al.* Reactive oxygen species: A radical role in development? *Free Radic Biol Med*, 2010, **49**(2): 130–143
- [40] Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, *et al.* Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, 2008, **320**(1): 1–11
- [41] Puceat M. Role of Rac-GTPase and reactive oxygen species in cardiac differentiation of stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 2005, **7**(11–12): 1435–1439
- [42] Gurusamy N, Mukherjee S, Lekli I, *et al.* Inhibition of ref-1 stimulates the production of reactive oxygen species and induces differentiation in adult cardiac stem cells. *Antioxid Redox Signal*, 2009, **11**(3): 589–599
- [43] Ferreira L M. Cancer metabolism: The Warburg effect today. *Experimental and Molecular Pathology*, 2010, **89**(3): 372–380
- [44] Warburg O. Tests on surviving carcinoma cultures. *Biochem Z*, 1923, **142**: 317–333
- [45] Yu M, Shi Y, Wei X, *et al.* Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells. *Toxicol Lett*, 2007, **170**(1): 83–93
- [46] Kukat A, Kukat C, Brocher J, *et al.* Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(7): e44
- [47] Cavalli L R, Varella B C, Garcia M, *et al.* Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ*, 1997, **88**(11): 1189–1198
- [48] Davermann D, Martinez M, McKoy J, *et al.* Impaired mitochondrial function protects against free radical-mediated cell death. *Free Radic Biol Med*, 2002, **33**(9): 1209–1220
- [49] Tang Z, Iqbal M, Cawthon D, *et al.* Heart and breast muscle mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome in broilers (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2002, **132**(3): 527–540
- [50] Elliott R L, Jiang X P, Head J F. Mitochondria organelle transplantation: introduction of normal epithelial mitochondria into human cancer cells inhibits proliferation and increases drug sensitivity. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2012, **136**(2): 347–354

- [51] Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria as targets for chemotherapy. *Apoptosis*, 2009, **14**(4): 624–640
- [52] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, **144**(5): 646–674
- [53] Spees J L, Olson S D, Whitney M J *et al.* Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(5): 1283–1288
- [54] Swerdlow R H, Khan S M. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, 2004, **63**(1): 8–20
- [55] Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, *et al.* Deficiencies in Complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989, **163**(3): 1450–1455
- [56] Winklhofer K F, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2010, **1802**(1): 29–44
- [57] Onopiuk M, Brutkowski W, Wierzbicka K, *et al.* Mutation in dystrophin-encoding gene affects energy metabolism in mouse myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, **386**(3): 463–466
- [58] Lin M T, Beal M F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006, **443**(7113): 787–795
- [59] Le P U, Benlimame N, Lagana A, *et al.* Clathrin-mediated endocytosis and recycling of autocrine motility factor receptor to fibronectin fibrils is a limiting factor for NIH-3T3 cell motility. *J Cell Sci*, 2000, **113**(Pt 18): 3227–3240
- [60] Bereiter H J, Vöth M, Mai S, *et al.* Structural implications of mitochondrial dynamics. *Biotechnol J*, 2008, **3**(6): 765–780
- [61] Lou E, Fujisawa S, Morozov A, *et al.* Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma. *PLoS One*, 2012, **7**(3): e33093
- [62] Huang X, Sun L, Ji S, *et al.* Kissing and nanotunneling mediate intermitochondrial communication in the heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(8): 2846–2851
- [63] Kitani T, Kami D, Matoba S, *et al.* Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis. *J Cell Mol Med*, 2014, **18**(8): 1694–1703
- [64] Wang X, Gerdes H H. Transfer of mitochondria *via* tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. *Cell Death Differ*, 2015, **22**(7): 1181–1191

Advances of Mitochondrial Transplantation Therapy for The Mitochondrial Deficiency Diseases*

YANG Shi-Feng^{1,2)**}, SUN Chao^{2,3)**}, WANG Yu-Pei^{2,3)}, CHEN Yu-Hong^{2,3)},
ZHANG Qian-Jing^{2,3)}, ZHANG Hong^{1,2,3)***}

⁽¹⁾ School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

⁽²⁾ Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

⁽³⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Mitochondrion are one of the most important organelles in eukaryotic cells, the main function of which is to provide energy for the survival of cells. The abnormal mitochondrial can cause lesions in cells and even organs, and a growing number of diseases have been linked to mitochondrial defects. Mitochondrial transplantation, an intrusive therapy, which isolated the mitochondria from the normal parts of the patient and then inject it into the damaged or absent areas, so that the injured cells can be treated and the organ functions return to normal. As a novel therapeutic strategy, the manner has emerged in the basic research of some diseases, especially in the field of acute myocardial ischemia reperfusion injury, which has been developed to the clinical trial stage. Based on the origin of mitochondria, several feasible methods of mitochondrial transplantation in the experimental phase were summarized. In addition, the protection of cerebral ischemia/induced neuronal injury and tumor therapy by mitochondria transplantation were also introduced. Moreover, the molecular mechanisms of mitochondrial damage and mitochondrial transplantation were discussed, and put forward the research ideas for developing targeted therapeutic biological agents for mitochondrial transplantation. The paper aims to provide a new perspective for curing of mitochondrial deficiency diseases.

Key words mitochondrial transplantation, mitochondrial dysfunction, cerebral ischemia, myocardial-ischemia-reperfusion injury, tumor

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0222

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of the Joint Fund Key Projects(U1432248), Ministry of Science and Technology Key National R & D Projects(2016YFC0904600), The National Natural Science Foundation of China Youth Fund Project(11505245).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-931-4969344, E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

Received: June 14, 2017 Accepted: December 21, 2017