线粒体中无机物种的探测与线粒体功能的干预

郝忆岗¹, 王晓勇^{2*}, 何卫江¹, 郭子建¹

1. 配位化学国家重点实验室; 南京大学化学化工学院, 南京 210023

2. 医药生物技术国家重点实验室; 南京大学生命科学学院, 南京 210023

*通讯作者, E-mail: boxwxy@nju.edu.cn

收稿日期: 2016-09-20; 接受日期: 2016-12-14; 网络版发表日期: 2017-01-23

国家重点基础研究发展计划(编号: 2015CB856300)和国家自然科学基金(编号: 21271101, 31570809)资助项目

摘要 线粒体是细胞内微小的细胞器, 它通过产生ATP为细胞运转提供几乎全部所需的能量. 线粒体广泛参与信号传导、能量代谢、自噬凋亡等细胞过程, 对维持生物体正常生理功能至关重要. 同时, 其功能损伤也与癌症、阿尔兹海默症等多种疾病的发生和发展密切相关. 线粒体功能需要在多种蛋白质和无机物种共同参与下才能完成, 所以及时了解这些物种的分布和变化情况对维护线粒体生理功能非常重要. 线粒体功能又可利用金属配合物的独特理化性质来进行干预或调控, 从而实现预防或治疗疾病的目的. 本文以探测线粒体无机物种和调控线粒体功能为主题, 综述了近年来我国研究者在该领域取得的一些代表性研究成果, 同时提出了发展中存在的问题和面临的挑战.

关键词 线粒体, 功能分子, 金属配合物, 分子探针, 功能调控

1 引言

线粒体作为细胞的“能量工厂”存在于绝大多数真核细胞中. 目前认为, 线粒体可能是15亿年前好氧细菌侵入原核或真核细胞中共生进化而形成的. 正因为如此, 线粒体具有独特的双层膜结构和相对独立的遗传物质, 由其编码的13种线粒体氧化磷酸化蛋白可为细胞提供能量; 同时, 线粒体又是许多细胞凋亡通路的重要调节器, 当促凋亡蛋白从线粒体基质释放到细胞质中时, 即可诱导细胞发生凋亡^[1].

线粒体丰富的功能通常由多种蛋白质合作完成, 其中金属离子不仅起传递电子和催化反应的作用, 而且还在稳定蛋白质结构方面起重要的作用^[2]. 除金属离子之外, 其他很多无机物种, 如氢离子(H^+)、活性氧

(ROS)和硫化氢(H_2S)等, 在调节线粒体氧化磷酸化速率、信号传递、刺激细胞生长和提供能量等方面也发挥积极的作用^[3]. 大量研究表明, 线粒体中无机物种含量异常及功能紊乱是导致衰老、阿尔兹海默症及肿瘤等健康问题的重要原因^[4]. 因此, 通过生物无机化学手段及时监测这些物种的变化, 并对其功能进行干预和调控可能是预防和治疗线粒体相关疾病最直接有效的方法. 例如, 三氧化二砷(As_2O_3)在临床治疗急性早幼粒细胞白血病中表现出很好的疗效, 挽救了无数人的生命. 它就是通过干扰电子传递链, 刺激线粒体产生过量的超氧根阴离子及过氧化氢, 导致线粒体膜电位降低, 进而诱导细胞发生凋亡而发挥治疗作用的^[5].

总之, 无机小分子不仅在维持线粒体正常功能中

引用格式: 郝忆岗, 王晓勇, 何卫江, 郭子建. 线粒体中无机物种的探测与线粒体功能的干预. 中国科学: 化学, 2017, 47: 220–232
Hao Y, Wang X, He W, Guo Z. Detection of inorganic species and modulation of physiological functions relevant to mitochondria. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 220–232, doi: 10.1360/N032016-00183

起重要作用,其含量与功能异常又可能与多种疾病的发生、发展有关,研究线粒体中无机物种的变化及其生物效应对更好地认识生命过程和更有效地治疗各种线粒体疾病具有重要意义. 如图1所示,本文将围绕靶向线粒体的策略、线粒体中无机物种的探测以及无机物种对线粒体形态和功能的影响等问题,简要介绍近年来取得的一些研究成果和有待解决的问题.

2 靶向线粒体的策略

为了实现靶向线粒体的探测和干预,需要将探针或功能干预分子选择性地富集于线粒体中. 尽管线粒体外膜具有丰富的压敏阴离子通道蛋白(voltage-dependent anion channel protein),通透性良好,但线粒体内膜上不含此蛋白,而是富含一种特殊的心磷脂(phospholipid cardiolipin),导致其通透性很差,因此多数分子和离子一般无法自由进出线粒体基质. 细胞自身克服线粒体膜通透性差的办法是在蛋白质的N端链接一段线粒体靶向多肽,通过内膜转运蛋白(transporter inner membrane, TIM)/外膜转运蛋白(transporter outer membrane, TOM)复合物将蛋白转运到线粒体内外膜或基质中. 该多肽序列通常是由一段富含正电荷的疏水氨基酸链形成的^[6].

但是,目前广泛采用的线粒体靶向策略并非利用上述转运机制,而是将靶向基团连接到功能分子上,利用线粒体膜电位来实现对线粒体的特异性作用(图2). 线粒体靶向基团通常具有两大特点:带离域正电荷、脂溶性好. 这主要是因为线粒体电子传递链可在内膜两侧产生极高的膜电势,它可以对带正电荷的结构团产生强吸引力,从而实现在线粒体中的富集^[7]. 同时,为了降低膜间质中氢离子等正电荷物种与带正电的靶向基团间的排斥力,需要将所带正电荷分散在一个较大的共轭体系中. 此外,好的脂溶性有助于分子跨

图1 生物无机探针与药物在线粒体研究中的应用

图2 膜电位依赖性线粒体靶向机理

越磷脂双分子层,提高其在线粒体中的富集程度.

在脂溶性阳离子基团中,结构最简单的常见基团为三苯基磷盐(triphenylphonium, TPP). 另外,一些具有荧光性质的脂溶性阳离子,如罗丹明123 (rhodamine 123)、JC-1和F16等(图3)也具有很好的线粒体靶向能力^[8]. 利用电荷作用不仅可以使化合物在线粒体中的浓度提高至胞浆中的数百倍甚至上千倍,而且还可以利用肿瘤细胞线粒体膜电位比正常细胞高的特点,在一定程度上实现对肿瘤细胞的选择性. 某些脂溶性阳离子化合物还具有一定的抗肿瘤活性,如含硫花青染料MKT-077曾进入I期临床试验,但由于严重的肾毒性而最终被取消^[5b]. 某些肽链亦可通过改变电性和疏水性达到靶向线粒体的目的. 这些肽链上通常连有含胍基的氨基酸,可以利用胍基自身的离域正电荷起到靶向线粒体的作用. 此外,某些配合物本身即可特异性地在线粒体区域富集,如部分Au^I(Au(I)-NHC)、Au^{III}配合物. 这些配合物不仅带有正电荷,而且Au周围的配体具有很好的脂溶性,所以可以利用膜电位实现靶向线粒体的目的^[9].

除了基于线粒体膜电位的靶向基团外,还有一些线粒体膜电位非依赖性靶向基团. 例如,部分荧光基团可以利用分子自身对线粒体中某种特定组分的强亲和力和实现靶向. 图3中的壬基吖啶橙(nonyl acridine orange, NAO)染料就是利用分子对线粒体内膜所特有的心磷脂的强亲和力和来实现线粒体靶向性的^[10];而线粒体绿色荧光探针(mito-tracker green, MTG)则是通过与某些线粒体蛋白半胱氨酸残基上的巯基反应形成共价键而靶向线粒体的^[11]. 此外还有一些肽,如Szeto-Schiller

图3 线粒体靶向基团

短肽(SS peptides)也可以选择性地富集于线粒体内膜上^[12]。此类短肽通常是由带芳香基团的氨基酸以及碱性氨基酸所组成。尽管在生理条件下,这些短肽通常带有3个正电荷并有较好的脂溶性,但其并非主要依赖线粒体膜电位来实现靶向。细胞实验结果显示,在加入解偶联剂羰基氰对三氟甲氧基苯胺(FCCP)消除线粒体膜电位后,短肽依然能富集于线粒体。目前认为,其靶向机理可能与线粒体中的 μ -型阿片受体有关^[13]。

3 线粒体中无机物种的探测

探测和跟踪线粒体中无机物种的分布和变化对理解线粒体中进行的各种生理过程具有重要意义。例如,氧化磷酸化是在线粒体中进行的一个非常重要的生命过程,包括氢离子、活性氧、硫化氢以及金属离子在内的多种无机物种都在该过程中起重要作用,而这些物种的紊乱则会极大影响氧化磷酸化的效率,并

能导致多种线粒体疾病的产生。近年来,靶向线粒体的荧光探针是生物无机化学的研究热点之一,这类探针具有实时、原位、灵敏等优点,非常适合于线粒体无机物种的探测。下面将简要介绍几种由我国研究者发展的探测线粒体中重要无机物种的新方法。

3.1 线粒体中pH (pH_m)的探测

线粒体基质中pH约为8,而在膜间质中pH约为7.2,因此在线粒体内膜两侧存在氢离子浓度梯度,其大小在一定程度上决定着氧化磷酸化的速率。较高的氢离子浓度梯度不仅能帮助线粒体更有效地摄取丙酮酸等有氧呼吸的反应底物,同时可以促进ATP合成酶合成更多的ATP^[14]。此外, pH_m 的微小变化还会对线粒体中活性氧产生、钙离子平衡以及细胞凋亡等产生巨大影响。

发展靶向线粒体的pH荧光探针是实现实时探测 pH_m 的基础,目前国内外已有较多报道。我国科学家在该领域也做了很多尝试,如比例计量型 pH_m 探针CP,它能靶向线粒体并对pH具有专一性响应,但是由于其线性响应范围不包含正常 pH_m ,应用受到限制^[15]。本课题组^[16]将pH敏感的荧光素与pH不敏感的花青素染料相杂合,构建了pH荧光探针1(图4)。该探针通过花青素上的离域正电荷实现线粒体靶向,利用两种染料对pH的不同响应,实现了双激发双发射的比例计量型检测,其pH线性响应范围为6.15~8.38,正好覆盖 pH_m 的变化范围。利用该探针进行荧光共聚焦成像,实现了对外界刺激下活细胞 pH_m 变化的定量检测。利用该探针通过流式细胞技术可以观察到大量细胞中 pH_m 的变化,从而获得更具代表性的 pH_m 信息。利用该探针还观察到解偶联剂羰基氰化物间氯苯胺(CCCP)或能引起氧化应激的佛波酯(PMA)所引起的线粒体迅速酸化的现象(图5)。

化合物2(图6)也是一种比例计量型荧光探针,可以用来研究温度和 H_2O_2 对肿瘤细胞和正常细胞中 pH_m 的影响^[17]。该探针在低pH时发出520 nm荧光,在高pH时脱质子,荧光发射红移到588 nm,其比例响应可用于测定 pH_m 的波动。实验发现,当温度高于或低于37℃时, pH_m 都会出现明显降低。这种酸化现象可能与细胞的自我保护机制有关。除温度以外,还发现随着 H_2O_2 浓度的增加,无论是正常细胞还是肿瘤细胞中的 pH_m 都出现升高,只是肿瘤细胞中 pH_m 的升高速率更快。

化合物3是一例近红外pH荧光探针^[18]。该探针除

图4 线粒体pH荧光探针CP和1的结构及其荧光响应原理

图5 (a~c) 探针1染色的MCF-7细胞药物刺激前后的双通道比例荧光成像图; (d) 以上过程中测得的 pH_m 随药物刺激时间的变化曲线; (e) 药物刺激30 min后流式细胞术测得的双通道荧光比值分布图(网络版彩图)

了具有良好的光稳定性和低毒性外, 还表现出极大的 Stokes位移. 细胞共定位结果显示, 该探针能有效分布在线粒体中, 并能对酸性环境、细胞凋亡以及免疫应激所引起的线粒体酸碱性变化进行准确检测. 由于其具有近红外发射的特点, 在斑马鱼活体荧光成像中发现其在心脏区域的荧光信号最强, 可能是由于心脏组织中线粒体浓度较高所致^[12]. 而在腹腔炎症小鼠模型

试验中发现, 在加入脂多糖(LPS)模拟炎症的部位, 探针所测得的pH低于非炎症情况下该部位的pH (图7).

3.2 线粒体中活性氧的探测

在线粒体氧化磷酸化过程中, 氧气通常会被还原成水, 但当 O_2 在线粒体呼吸链中不完全还原时, 通常会先产生超氧根阴离子(O_2^-), 然后迅速被超氧化物歧化酶(SOD)转变为 H_2O_2 . H_2O_2 在酶作用下生成其他活性氧物种(reactive oxygen species, ROS) (图8)^[19]. 适量的ROS能作为信号分子调控多种生命过程并在抵御细菌和病毒入侵中起积极作用; 过量的ROS则会引起氧

图6 化合物2的结构及pH响应机理

图7 (a~c) 利用探针3进行的腹腔炎症模型鼠的活体成像图及(d)荧光强度柱状图(网络版彩图)

图8 线粒体中ROS的形成(网络版彩图)

化应激,使细胞发生不可逆损伤.这些氧化损伤是导致衰老、糖尿病、神经退行性疾病以及肿瘤等的原因之一^[20,21].对它们的原位荧光跟踪有助于理解ROS在生理和病理过程中的作用方式.

研究表明,ROS能损伤线粒体DNA(mtDNA),导致其编码的呼吸链相关蛋白缺失,引起线粒体功能紊乱,进而导致与衰老相关的疾病^[22].最近发现,荧光分子4(图9)可实时检测mtDNA周围H₂O₂的含量^[23].该探针由1个对DNA有强亲和力的多肽与2个荧光基团组成.仅有DNA存在时,4只发出红色荧光;仅有双氧水存在时,4只发出绿色荧光.而在DNA和H₂O₂同时存在时,4发出红绿两种荧光,从而可实现对DNA周围H₂O₂浓度的比例计量型响应.细胞试验验证了该探针的线粒体靶向能力,并实现了对mtDNA周围H₂O₂含量的比例计量型成像.

次氯酸(HOCl或HClO)具有对抗炎症、杀死病原体的作用^[24].新近报道,将罗丹明硫代内脂与线粒体靶向基团三苯基磷阳离子连接,可获得一种增强型HOCl荧光探针5^[25],其荧光响应机制如图10所示.该探针靶向线粒体能力强、响应速度快、选择性好、检测限低(9 nM).用该探针研究不同细胞中HOCl的分布及含量变化,发现在RAW264.7巨噬细胞中HOCl的浓度是HeLa细胞中的19倍.如果用大肠杆菌感染的RAW264.7巨噬细胞进行试验,发现除了吞噬小体外,线粒体也可能会在细菌感染时产生HOCl.

此外,还有一些可用于活体成像的活性氧探针^[26],如次氯酸探针6^[27],它与HOCl作用产生荧光增强响应,其响应机制如图11所示.该探针具有选择性好、检测限低(0.33 nM)以及响应时间短等特点,它不仅能够对药物刺激巨噬细胞所产生的内源性HOCl进行检测,而且还能对不同发育阶段的斑马鱼胚胎中HOCl含量进行检测.从荧光成像图看出,随着时间的增加,斑马鱼体内的荧光亮度不断增强,这与斑马鱼受精卵在发育最初几天内组织分化越来越复杂的趋势相吻合,表明HOCl在胚胎发育分化过程中起一定的作用.

探针7对ClO⁻具有专一性响应并具有比例计量的

图9 荧光分子4的化学结构

图10 RAW264.7巨噬细胞未感染大肠杆菌(a)及大肠杆菌感染1 h(b)、3 h(c)、7 h(d)后的细胞造影图及相应的平均荧光强度柱状图(e)(网络版彩图)

特点^[28],其响应机制如图12所示.在细胞试验中,该探针表现出很强的线粒体靶向能力.在裸鼠模型动物试验中,探针7能够检测在脂多糖刺激模拟急性炎症下活体内源性HOCl的变化情况.该方法实现了小型哺乳动物的HOCl活体成像,突破了前一研究仅能在透明动物上成像的局限性.

除了有机分子外,由Ru^[29]、Ir^[30]、Eu^[31]等金属所形成的配合物也具有磷光发射或双光子吸收等性质,也是一类重要的ROS检测探针.例如,双光子铕配合

图11 斑马鱼受精后3 d内HOCl的荧光成像图(网络版彩图)

图12 模拟急性炎症裸鼠的荧光成像图(网络版彩图)

物8(图13)就能实现对 ClO^- 的增强型荧光检测^[32]. 在细胞试验中, 该探针表现出很强的线粒体靶向能力, 可检测HeLa细胞中的外源性 ClO^- 及RAW264.7细胞中的内源性 ClO^- . 在三维肿瘤模型中, 探针8的双光子成像深度达到120 μm , 是其自身单光子成像深度的3倍. 利用该探针的双光子特性对斑马鱼进行成像研究, 发现由LPS刺激所产生的 ClO^- 主要集中在斑马鱼的肝脏部位. 以上具有优秀线粒体靶向及活体成像能力的ROS探针将成为深入研究活性氧生物学意义, 理解其在生命体系特别是线粒体中相互关系和功能的有力工具.

3.3 线粒体中硫化氢的探测

细胞中有多种含硫物质调控活性氧的含量, 其中 H_2S 不仅可作为还原物质直接与ROS反应, 还可作为信号分子通过抑制线粒体细胞色素氧化酶, 激活超氧化物歧化酶, 提高谷胱甘肽等还原剂的含量来降低ROS^[33]. 此外, H_2S 还在血管舒张、抗凋亡及抗炎症等过程中发挥重要作用^[34]. 但是由于缺少检测内源性 H_2S 的工具, 长期以来对其在生物学中的作用缺乏深入的了解.

由于 H_2S 在体内的半衰期特别短, 因此需要探针针对 H_2S 具有极快的响应速度, 但是目前常见探针的响应时间需要20 min~2 h不等^[35], 无法满足实时检测的需求. 本课题组^[36]尝试将香豆素与吡啶通过双键连接, 构建了比例计量型 H_2S 荧光探针9, 其响应机制如图14所示. 该探针的最大优势是对 H_2S 的响应速度极快, 整个反应可以在30 s内完成, 是目前反应最快的 H_2S 探针. 同时该探针具有良好的线粒体靶向性能, 因此非常适合于检测生物体中的 H_2S . 利用该探针发现, MCF-7细胞中加入NaHS后, 线粒体中 H_2S 含量会迅速提高, 并在80 s内达到平衡. 可见, 细胞对于 H_2S 含量改变的响应十分迅速.

根据荧光共振能量转移(FRET)机理, 以罗丹明叠氮化物前体与香豆素偶联设计的比例计量型荧光探针10(图15)可用于研究不同手性半胱氨酸对线粒体内 H_2S 生成能力的影响^[37]. 利用该探针发现D型半胱氨酸(D-cysteine)比L型半胱氨酸(L-cysteine)更能刺激线粒体产生 H_2S . 同时还发现, 作为半胱氨酸的类似物, 炔丙基甘氨酸(PPG)抑制 H_2S 产生的能力也与手性相关, L-PPG对由L-cysteine所产生的 H_2S 具有更强的抑制能力, 而D-PPG对由D-cysteine所产生的 H_2S 具有更强的抑制能力.

图 13 铱配合物8检测ClO⁻的发光机理 图 14 探针9对H₂S的响应速度(网络版彩图) 图 15 比例计量型荧光探针10对H₂S的响应机理

3.4 线粒体中锌离子(Zn²⁺)的探测

锌离子是人体内含量第2的过渡金属元素, 在神经信号传递、酶活性调控以及细胞凋亡等诸多过程中起至关重要的作用. 研究发现, 线粒体在细胞内Zn²⁺转运和存储中起重要作用, 同时, Zn²⁺又是线粒体呼吸

链中许多酶促反应的结构因子, Zn²⁺过量会导致过度产生ROS, 破坏线粒体的正常功能^[2]. 因此, 实时准确地检测线粒体中的Zn²⁺将有助于了解其在神经信号传递、酶活性调控和细胞凋亡等过程中的作用.

本课题组^[38]曾基于分子内电荷转移(ICT)机理设计了一种靶向线粒体的比例计量型Zn²⁺荧光探针11. 该分子由荧光团4-氨基-7-磺酰胺基苯并噻二唑(ASBD)、螯合团TPEA以及线粒体靶向基团三苯基磷3部分组成. 该探针具有Zn²⁺特异性激发比例响应能力. 细胞试验表明, 该探针可以在线粒体中有效富集, 并对线粒体中的Zn²⁺进行比例计量型成像. 此外, 我们还运用双激发模式探究了外源性物质对线粒体中锌离子含量的影响, 发现用H₂O₂刺激时能迅速释放锌离子(图16(a)), 而用亚硝基半胱氨酸(S-nitrosocysteine, SNO)刺激时, 线粒体响应较为迟缓, 需要10~15 min Zn²⁺浓度才会出现明显上升(图16(b)), 而且释放Zn²⁺的能力更强, 这种释放速度和能力的差异可能是由于不同的刺激释放机理所致.

利用三苯基磷作为线粒体靶向基团, 将BPA与喹啉相连作为Zn²⁺螯合基团所设计的探针12(图17)具有

图 16 H₂O₂和SNO刺激对探针11荧光强度的影响(网络版彩图)

图17 锌离子探针**12**的荧光响应机理

单激发、双发射的比例计量特点^[39]. 该探针对 Zn^{2+} 具有较好的选择性, 其质子化后与 Zn^{2+} 配位发射波长会发生蓝移, 从而可对线粒体中 Zn^{2+} 进行比例计量型成像, 并对线粒体中的内源性 Zn^{2+} 浓度进行实时检测.

此外, 比例型荧光探针 **13** (图18) 具有较好的双光子荧光特性^[40], 该分子在细胞中具有双光子成像的能力, 能很好地富集于线粒体中, 并实现对内、外源 Zn^{2+} 的双通道成像.

4 无机物种对线粒体形态和功能的影响

近年来研究发现, 线粒体功能紊乱与癌症、糖尿病和神经退行性疾病等多种疾病的发生有密切联系. 通过生物无机化学手段对线粒体形貌和功能进行干预, 为预防和治疗相关疾病带来了新希望^[41]. 以下将简要介绍国内学者利用无机物干预线粒体形貌、膜电位、活性氧以及蛋白质功能的部分最新工作进展.

4.1 线粒体形态的干预

线粒体形态是随细胞环境实时变化的, 当细胞受损时, 线粒体的数量、大小和形状都会随之发生变化. 同时, 线粒体形态的改变又与细胞中许多生理功能密

图18 荧光探针**13**对锌离子的成像机理

切相关^[42]. 有研究显示, 肿瘤细胞中的线粒体形态就与正常细胞的线粒体形态不同^[43], 并且通过影响线粒体形貌或膜完整性可调控线粒体的功能^[44]. 例如, 靶向线粒体的三苯基铈配合物**14**就能对线粒体形貌产生很大影响^[45]. 通过透射电镜可观察到用该配合物刺激后, HeLa细胞出现线粒体肿胀、嵴结构消失的现象, 并在细胞质中产生大量空泡. 随着时间的延长, 空泡数量更多、尺寸也变得更大. 同时化合物对核膜也产生了一定的影响, 但并未破坏细胞核的完整性, 呈现出典型的非凋亡性细胞程序性死亡的形貌变化特点(图19).

配合物**15a~15c** (图20)是近期合成的3个具有磷光性质的金属铈配合物^[46], 它们都具有很好的线粒体共定位能力, 并可在改变线粒体形态的同时, 利用自身光学性质对线粒体形态变化进行实时跟踪与监测.

4.2 线粒体膜电位的干预

研究表明, 线粒体膜电位的高低与线粒体氧化磷酸化效率直接相关. 与正常细胞相比, 肿瘤细胞中线粒体膜电位更高. 因此干预线粒体膜电位不但可以调控细胞氧化磷酸化的速率, 而且有可能成为治疗肿瘤的一种新方法. 包括铈配合物^[47]、铜配合物^[48]和钆配合物^[49]等在内的多种具有线粒体靶向能力的金属配合物都能通过降低线粒体膜电位诱导细胞发生凋亡. 例如, 手性多吡啶钆配合物**16** (图21)在0.5 h内就能使线粒体膜电位发生去极化现象^[49], 当刺激6 h后, JC-1染

图 19 配合物**14**的结构及其对线粒体形貌影响的电镜图

图 20 配合物**15**的化学结构

料在细胞内明显呈现绿色荧光, 而12 h后膜电位就降到最低, 进而释放出细胞色素c等, 诱导细胞发生凋亡。

除了金属配合物刺激外, 改变线粒体中一氧化氮的含量也能引起膜电位降低。例如, 将亚硝化巯基(-SNO)和三苯基磷基团连接到碳量子点上, 亚硝化巯基可以在光照下释放NO, 而三苯基磷则可以实现

NO在线粒体区域的可控释放^[50]。细胞试验发现, 无线粒体靶向功能的Cdot-SNO和有线粒体靶向功能的Cdot-TPP-SNO均能使HeLa细胞的线粒体膜电位降低, 但连接了靶向基团TPP的纳米颗粒对线粒体膜电位的破坏更大, 能明显诱导细胞发生凋亡(图22)。

4.3 线粒体中活性氧的干预

金属配合物自身的氧化还原变化, 能导致线粒体内ROS含量的改变。2014年, 本课题组^[48]报道了一例带有线粒体靶向基团TPP的三联吡啶合铜配合物**17**(图23)。该配合物能通过产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)切割DNA; 在细胞试验中发现, 该配合物能明显提高细胞中

图 21 手性多吡啶钌配合物**16**的结构

图 22 (a) 基于C-dot的线粒体靶向性NO-释放纳米体系(Cdot-TPP-SNO)对癌细胞的作用示意图; (b) Cdot-TPP-SNO纳米体系的结构以及光或热辐射后NO的释放(网络版彩图)

图23 可产生ROS的铜配合物17和金配合物18的结构

ROS的含量. 金配合物18a和18b (图23)也能增加线粒体中ROS的产生.

某些用于光动力疗法的配合物也会产生大量的ROS. 例如, 具有磷光性质的卡宾铱配合物19a~19c (图24)^[47], 它们能富集于细胞线粒体区域, 并在光照条件下产生单线态氧($^1\text{O}_2$). 配合物中产生 $^1\text{O}_2$ 的能力随着R基链长的增加而不断增强, 其中配合物19c能在光照射下显著提高HeLa细胞中的ROS含量, 进而大幅度提高其细胞毒活性. 但是这些光敏剂的吸收波长较短, 组织穿透深度有限, 难以用于治疗侵袭较深或体积较大的肿瘤. 相比而言, 具有线粒体靶向和双光子光疗功能的多吡啶钌配合物20a~20d (图24)^[51]则更具优势. 这些配合物利用双光子激发波长长、组织穿透能力强的特点, 可在三维肿瘤模型的深处产生单线态氧, 特别是配合物20d在双光子光疗下表现出比单光子更好的治疗效果.

除了上述通过化合物直接提高ROS水平外, 抑制线粒体中超氧化物歧化酶SOD2的活性也是提高线粒体ROS水平的有效方法. 最近报道, 用靶向线粒体的介孔硅纳米材料(mtMSN)包载SOD2抑制剂2-甲氧基雌二醇(2-ME)可提高线粒体中ROS的含量^[52]. 激光共聚焦实验显示, 与单独的2-ME和介孔硅纳米材料相比, 连接线粒体靶向肽的2-ME/mtMSN能更好地在线粒体区域富集, 进而选择性地抑制SOD2, 显著提高线粒体内ROS的含量, 并最终以此方式提高2-甲氧基雌二醇(2-ME)的抗肿瘤活性(图25).

4.4 线粒体中蛋白功能的干预

线粒体膜蛋白Bak和Bax的大量表达会增加膜通

图24 可产生单线态氧的铱配合物19和钌配合物20的结构

图25 mtMSN的构成(上)以及通过mtMSN中负载的2-ME靶向抑制SOD2, 从而提高线粒体中ROS(下)的示意图(网络版彩图)

透性, 导致细胞色素c等促凋亡蛋白的释放. 而Bcl-2、Bcl-x_L和Mcl-1蛋白则可以与Bak和Bax蛋白作用, 抑制细胞发生凋亡. 肿瘤细胞中通常会过表达这些抑制

细胞凋亡的Bcl-2蛋白^[53]。因此,降低Bcl-2、Bcl-x_L和Mcl-1蛋白的表达或提高Bak和Bax蛋白的表达对肿瘤治疗相当重要。钌配合物**16**^[49]及其类似物就具有调控Bcl-2家族蛋白含量的能力^[54],Western blot实验发现,它能明显降低Bcl-x_L和Bcl-2蛋白的含量,而对促凋亡蛋白Bax的含量影响不明显。该配合物还能破坏线粒体外膜的完整性,进而释放细胞色素c,激活caspase通路,诱导HeLa细胞发生线粒体途径的凋亡。在A549顺铂耐药株中,配合物**16**表现出优于顺铂的细胞毒活性。

除了Bcl-2家族蛋白外,线粒体中的组蛋白去乙酰化酶(HDAC7)对调控肿瘤细胞增殖和凋亡也有重要作用。线粒体靶向性三羧基铈配合物**14**因连接HDAC抑制剂SAHA的类似物**14L**而对HDAC具有一定的抑制力,进而其抑制细胞增殖的能力也得到提升^[45]。该分子的特殊结构使其能诱导细胞发生不同于顺铂和HDAC抑制剂诱发的非凋亡性细胞程序性死亡。

硫氧还蛋白还原酶(TrxR)作为一种NADPH依赖的含硒酶在多种肿瘤中都有过度表达,并在肿瘤快速繁殖中起重要作用。研究发现,多吡啶钌配合物**21a~21d**(图26)对线粒体中的TrxR具有抑制能力^[55]。随着配体平面共轭体系的增大,配合物对TrxR的抑制能力也逐

渐增强。除了Ru配合物外,Au(I)和Au(III)配合物也具有很强的抑制TrxR活性^[9],如3价金卟啉配合物**22**(图26)^[56]。该化合物不仅能抑制TrxR的活性,而且还可以通过激活p38^{MARK}蛋白促进细胞发生凋亡^[57]。利用多种化学生物学实验还证明,线粒体中的热休克蛋白60(Hsp60)是该配合物类似物的作用靶点^[58]。构效关系研究发现,金属中心Au和配体卟啉都对抑制Hsp60的活性有重要作用。

5 结论

线粒体参与多种细胞代谢过程,不仅在维持生命体的正常生理功能中发挥重要作用,而且与衰老和肿瘤等多种疾病的发生有密切关系。线粒体中的无机物种虽然含量不高,但对线粒体的功能影响巨大,因此研究它们的变化规律及生物效应,对深入认识生命过程和防治线粒体疾病具有重要意义。近年来有关线粒体中无机物种的探测已经得到长足发展,荧光法检测无机物种的灵敏性和准确性也有了大幅提高,实现了对线粒体中氢离子、活性氧、硫化氢以及金属离子等物种的检测,并初步研究了这些物种在线粒体中的作用。与此同时,以线粒体为靶标的治疗研究也受到广泛关注和重视,通过对金属配合物的巧妙设计实现了对线粒体形貌、膜电位、活性氧和蛋白功能的干预,并在抗肿瘤方面表现出良好的应用潜力。但是在线粒体靶向药物输送方面仍存在一些挑战,如线粒体靶向与肿瘤靶向的兼顾问题。由于线粒体广泛存在于各种细胞中,如何避免线粒体靶向载体的非特异性输送,即如何避免线粒体靶向药物对正常细胞线粒体的伤害是目前还没有充分考虑的问题。所以未来的研究需要更多地关注多重靶向策略的开发和利用。另外,如何选择有效的作用靶点也是需要深入探讨的问题。线粒体中有多种潜在的作用靶点,如线粒体膜、线粒体DNA、电子传递链中的酶等,选择什么靶点更高效目前并无定论,这需要从调控目的和可行性方面加以考虑。最后是载体的靶向效率问题。如何保证药物输送系统进入细胞并经内溶体或溶酶体逃逸后,或药物离解释放后依然保持线粒体靶向功能,并克服胞内生物大分子等的各种阻碍继续靶向线粒体,这是目前尚未涉及的复杂问题,在今后的研究设计中应该引起重视。简言之,未来对线粒体中无机物种的探测需要加强与生物医学的联系,以便深入挖掘这些物种的生物

图26 硫氧还蛋白还原酶抑制剂**21**和**22**的结构

学意义和了解生物医学的实际需求. 在线粒体功能干预方面需要更多地关注金属配合物在线粒体中的作

用靶点和作用机理, 进而为相关疾病的诊断和治疗提供帮助.

参考文献

- Friedman JR, Nunnari J. *Nature*, 2014, 505: 335–343
- Atkinson A, Winge DR. *Chem Rev*, 2009, 109: 4708–4721
- (a) Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2943–2948; (b) Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. *Apoptosis*, 2007, 12: 913–922
- Wallace DC. *Science*, 1999, 283: 1482–1488
- (a) Pelicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P. *J Biol Chem*, 2003, 278: 37832–37839; (b) Wang F, Ogasawara MA, Huang P. *Mol Aspects Med*, 2010, 31: 75–92
- Rin Jean S, Tulumello DV, Wisnovsky SP, Lei EK, Pereira MP, Kelley SO. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 323–333
- Weinberg SE, Chandel NS. *Nat Chem Biol*, 2014, 11: 9–15
- Cottet-Rousselle C, Ronot X, Leverve X, Mayol JF. *Cytometry*, 2011, 79A: 405–425
- Barnard PJ, Berners-Price SJ. *Coord Chem Rev*, 2007, 251: 1889–1902
- Rodriguez ME, Azizuddin K, Zhang P, Chiu S, Lam M, Kenney ME, Burda C, Oleinick NL. *Mitochondrion*, 2008, 8: 237–246
- Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA. *J Chromatogr B*, 2003, 793: 141–150
- Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, Fink MP, Kagan VE. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 87–97
- Skulachev VP. *IUBMB Life*, 2005, 57: 305–310
- Santo-Domingo J, Demareux N. *J Gen Physiol*, 2012, 139: 415–423
- Wu MY, Li K, Liu YH, Yu KK, Xie YM, Zhou XD, Yu XQ. *Biomaterials*, 2015, 53: 669–678
- Chen Y, Zhu C, Cen J, Bai Y, He W, Guo Z. *Chem Sci*, 2015, 6: 3187–3194
- Cao L, Zhao Z, Zhang T, Guo X, Wang S, Li S, Li Y, Yang G. *Chem Commun*, 2015, 51: 17324–17327
- Li P, Xiao H, Cheng Y, Zhang W, Huang F, Zhang W, Wang H, Tang B. *Chem Commun*, 2014, 50: 7184–7187
- Winterbourn CC. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 278–286
- Murphy MP. *Biochem J*, 2009, 417: 1–13
- Si F, Liu Y, Yan K, Zhong W. *Chem Commun*, 2015, 51: 7931–7934
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van Remmen H, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindrich R, Leeuwenburgh C, Prolla TA. *Science*, 2005, 309: 481–484
- Wen Y, Liu K, Yang H, Liu Y, Chen L, Liu Z, Huang C, Yi T. *Anal Chem*, 2015, 87: 10579–10584
- Whiteman M, Chu SH, Siau JL, Rose P, Sabapathy K, Schantz JT, Cheung NS, Spencer JPE, Armstrong JS. *Cell Signal*, 2007, 19: 705–714
- Zhou J, Li L, Shi W, Gao X, Li X, Ma H. *Chem Sci*, 2015, 6: 4884–4888
- Li P, Zhang W, Li K, Liu X, Xiao H, Zhang W, Tang B. *Anal Chem*, 2013, 85: 9877–9881
- Hu JJ, Wong NK, Lu MY, Chen X, Ye S, Zhao AQ, Gao P, Yi-Tsun Kao R, Shen J, Yang D. *Chem Sci*, 2016, 7: 2094–2099
- Xiao H, Li J, Zhao J, Yin G, Quan Y, Wang J, Wang R. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 1633–1638
- Cao L, Zhang R, Zhang W, Du Z, Liu C, Ye Z, Song B, Yuan J. *Biomaterials*, 2015, 68: 21–31
- Li G, Lin Q, Ji L, Chao H. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 7918–7926
- Sun J, Song B, Ye Z, Yuan J. *Inorg Chem*, 2015, 54: 11660–11668
- Li G, Lin Q, Sun L, Feng C, Zhang P, Yu B, Chen Y, Wen Y, Wang H, Ji L, Chao H. *Biomaterials*, 2015, 53: 285–295
- Kimura Y, Goto YI, Kimura H. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12: 1–13
- Wallace JL, Wang R. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14: 329–345
- (a) Yuan L, Zuo QP. *Chem Asian J*, 2014, 9: 1544–1549; (b) Zhang C, Wei L, Wei C, Zhang J, Wang R, Xi Z, Yi L. *Chem Commun*, 2015, 51: 7505–7508
- Chen Y, Zhu C, Yang Z, Chen J, He Y, Jiao Y, He W, Qiu L, Cen J, Guo Z. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 1688–1691
- Wei L, Yi L, Song FB, Wei C, Wang BF, Xi Z. *Sci Rep*, 2014, 4: 4521
- Liu Z, Zhang C, Chen Y, He W, Guo Z. *Chem Commun*, 2012, 48: 8365–8367
- Xue L, Li G, Yu C, Jiang H. *Chem Eur J*, 2012, 18: 1050–1054

- 40 Ning P, Jiang J, Li L, Wang S, Yu H, Feng Y, Zhu M, Zhang B, Yin H, Guo Q, Meng X. *Biosens Bioelectron*, 2016, 77: 921–927
- 41 Fulda S, Galluzzi L, Kroemer G. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 447–464
- 42 Gomes LC, Scorrano L. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833: 205–212
- 43 Arismendi-Morillo G. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 2062–2068
- 44 Green DR, Kroemer G. *Science*, 2004, 305: 626–629
- 45 Ye RR, Tan CP, Lin YN, Ji LN, Mao ZW. *Chem Commun*, 2015, 51: 8353–8356
- 46 Ye RR, Tan CP, Ji LN, Mao ZW. *Dalton Trans*, 2016, 45: 13042–13051
- 47 Li Y, Tan CP, Zhang W, He L, Ji LN, Mao ZW. *Biomaterials*, 2015, 39: 95–104
- 48 Zhou W, Wang X, Hu M, Zhu C, Guo Z. *Chem Sci*, 2014, 5: 2761–2770
- 49 Wang JQ, Zhang PY, Qian C, Hou XJ, Ji LN, Chao H. *J Biol Inorg Chem*, 2014, 19: 335–348
- 50 Xu J, Zeng F, Wu H, Hu C, Yu C, Wu S. *Small*, 2014, 10: 3750–3760
- 51 Liu J, Chen Y, Li G, Zhang P, Jin C, Zeng L, Ji L, Chao H. *Biomaterials*, 2015, 56: 140–153
- 52 Zhang Y, Hu Z, Xu G, Gao C, Wu R, Zou H. *Nano Res*, 2014, 7: 1103–1115
- 53 Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. *Mitochondrion*, 2013, 13: 199–208
- 54 Chen T, Mei WJ, Wong YS, Liu J, Liu Y, Xie HS, Zheng WJ. *Med Chem Commun*, 2010, 1: 73–75
- 55 Luo Z, Yu L, Yang F, Zhao Z, Yu B, Lai H, Wong KH, Ngai SM, Zheng W, Chen T. *Metallomics*, 2014, 6: 1480–1490
- 56 Che CM, Sun RWY, Yu WY, Ko CB, Zhu NY, Sun HZ. *Chem Commun*, 2003, 1718–1719
- 57 Wang Y, He QY, Che CM, Tsao SW, Sun RWY, Chiu JF. *Biochem Pharmacol*, 2008, 75: 1282–1291
- 58 Hu D, Liu Y, Lai YT, Tong KC, Fung YM, Lok CN, Che CM. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 1387–1391

Detection of inorganic species and modulation of physiological functions relevant to mitochondria

Yigang Hao¹, Xiaoyong Wang^{2*}, Weijiang He¹, Zijian Guo¹

¹ State Key Laboratory of Coordination Chemistry; School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210023, China

² State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023, China

*Corresponding author (email: boxwxy@nju.edu.cn)

Abstract: Mitochondria are small organelles in cells that can produce ATP to provide almost all the energy needed for cell survival. A number of cellular processes, such as signal transduction, energy metabolism, autophagy and apoptosis, are related to mitochondria, which are crucial for the organisms to maintain normal physiological functions. At the same time, the occurrence and development of a variety of illnesses such as cancers and Alzheimer's disease are closely associated with the dysfunction of mitochondria. Various proteins and inorganic species are required to accomplish the mitochondrial functions; therefore, to timely know the distribution and variation of these species in mitochondria is extremely important. On the other hand, the mitochondrial function could be intervened or modulated by making use of the unique physical and chemical properties of metal complexes, thereby to prevent or treat mitochondrial diseases. With the detection of mitochondrial inorganic species and the modulation of mitochondrial functions as the theme, this review summarizes some of the recent typical achievements made by Chinese scientists on the subject; in addition, it indicates the problems and challenges existing in the development of this field.

Keywords: mitochondrion, functional molecule, metal complex, molecular probe, functional modulation

doi: [10.1360/N032016-00183](https://doi.org/10.1360/N032016-00183)