

563.

[18] ZHU W, WANG Y, CAO W, et al. In vitro evaluation of antimicrobial combinations against imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* of different MICs[J]. J Infect Public Health, 2018, 11(6): 856-860.

[19] PIPERAKI E T, TZOUVELEKIS L S, MIRIAGOU V, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: in pursuit of an effective treatment[J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(8): 951-957.

[20] BAE S, KIM M C, PARK S J, et al. In vitro synergistic activity of antimicrobial agents in combination against clinical isolates of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(11): 6774-6779.

[21] KHALILI H, SHOJAEI L, MOHAMMADI M, et al. Meropenem/colistin versus meropenem/ampicillin-sulbactam in the treatment of carbapenem-resistant pneumonia[J]. J Comp Eff Res, 2018, 7(9): 901-911.

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.12.041

[22] UNGTHAMMAKHUN C, VASIKASIN V, CHANGPRADUB D. Clinical outcomes of colistin in combination with either 6-g sulbactam or carbapenems for the treatment of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia with high MIC to sulbactam, a prospective cohort study[J]. Infect Drug Resist, 2019, 12(1): 2899-2904.

[23] TIPTON K A, CHIN C Y, FAROKHYFAR M, et al. Role of capsule in resistance to disinfectants, host Antimicrobials, and desiccation in *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(12): 1188-1190.

[24] CHIN C Y, TIPTON K A, FAROKHYFAR M, et al. A high-frequency phenotypic switch links bacterial virulence and environmental survival in *Acinetobacter baumannii* [J]. Nat Microbiol, 2018, 3(5): 563-569.

(收稿日期:2020-08-17 修回日期:2021-05-18)

线粒体通透性转换孔在 2 型糖尿病患者血小板高活性状态中的作用*

赵 玲¹, 彭玲玲², 王 智², 郭同兰² 综述, 梁 伟^{2△} 审校
1. 蚌埠医学院, 安徽蚌埠 233000; 2. 蚌埠医学院附属连云港市第二人民医院检验科, 江苏连云港 222000

关键词: 2 型糖尿病; 线粒体通透性转换孔; 血小板高活性
中图分类号: R587.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2021)12-1799-04

糖尿病是一种慢性、全身代谢性疾病, 其中心脑血管并发症是 2 型糖尿病(T2DM)患者最主要的死亡原因。已有研究表明, 糖尿病患者体内血小板处于高活性状态, 而线粒体通透性转换孔(MPTP)开放或激活在血小板高活性状态中发挥重要作用。本文主要综述 MPTP 在 T2DM 患者血小板高活性状态中作用。

1 MPTP 概述

1.1 MPTP 总体特征及其组成 有研究者报道, 当血小板线粒体暴露在高钙、磷酸盐、氧化或其他应激条件下, 血小板线粒体发生急性肿胀和解偶联, 在这种情况下可观察到线粒体肿胀并伴随着 MPTP 打开, 会导致线粒体膜电位的丧失、caspase 的激活及不可逆的细胞死亡^[1]。MPTP 通道是电压门控的非选择性通道, 除受基质钙超载和活性氧(ROS)激活外, 血小板 MPTP 的开放还受一些相关蛋白、离子及与这些蛋白和通道本身的控制^[2-3]。

近来研究发现, MPTP 是由腺嘌呤核苷酸转位酶

(ANT)、电压依赖性阴离子通道和亲环蛋白 D 蛋白(CypD)、磷酸盐载体、外膜转位蛋白、己糖激酶和 BCL-2 构成^[3]。每种组成 MPTP 结构的蛋白质敲除模型表明, 构成 MPTP 的这些蛋白质并不是引起 MPTP 活性所必需的, 这些被提议的组成 MPTP 的蛋白质成分中的大多数可能是 MPTP 调节者, 而不是引起 MPTP 通道活化的必要组成成分^[3-4]。有研究者认为 MPTP 传导核心是 ATP 合成酶的 c 亚基, 但也有一些研究者认为这可能是由于大的 ATP 合成酶二聚体形成了 MPTP 传导核心的另一种结构, 关于 MPTP 的主要成孔蛋白结构尚未确定, 而且 ATP 合成酶在 MPTP 中的作用目前尚存在争议^[5-7]。

1.2 MPTP 功能 线粒体是具有双层膜结构的真核细胞器, 其主要功能是通过氧化磷酸化为机体供能, 此外线粒体还参与多种细胞功能如 ROS 产生、脂肪酸 β 氧化、细胞内 Ca²⁺ 的平衡调节、胆固醇及激素的合成等^[8]。各种原因引起线粒体数目、结构、质量、功能的变化均可导致线粒体功能障碍^[9]。MPTP 是存

* 基金项目: 江苏省卫生健康委员会医学科研课题面上项目(H2018073); 安徽省教育厅重点项目(KJ2018A1008)。
△ 通信作者, E-mail: hslwys@163.com。
本文引用格式: 赵玲, 彭玲玲, 王智, 等. 线粒体通透性转换孔在 2 型糖尿病患者血小板高活性状态中的作用[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(12): 1799-1802.

在于线粒体内外膜之间的一种可诱导形成非选择性通道的内膜蛋白复合体。与线粒体功能障碍相关的现象之一是由于各种因素引起 MPTP 通道的开放,导致增加线粒体膜对离子和溶质的通透性及细胞色素 C 等膜内促凋亡因子大量释放入细胞质,从而引起线粒体途径介导的细胞凋亡。

BONORA 等^[10]研究认为,MPTP 开放不仅导致线粒体损伤和细胞死亡,而且也参与细胞的健康生理调节,如 MPTP 参与细胞正常的钙释放调节,这是人体新陈代谢调节所必需的生理活动,遗传学证据确实证明 MPTP 是一系列急慢性疾病的主要病因决定因素,其特征是有丝分裂后细胞的无端丧失。这些情况包括脑、心脏和肾脏的缺血/再灌注损伤、神经退行性疾病、中毒综合征,以及肌病/营养不良障碍。可见,细胞线粒体无论是在健康生理或在疾病病理过程中,均扮演重要角色,同时也突显了研究抑制 MPTP 的药物在治疗线粒体相关疾病的必要性。

2 MPTP 与 T2DM 患者血小板高活性的关系

2.1 糖尿病患者与血小板高活性状态的关系

GAIZ 等^[11]研究认为,T2DM 患者动脉粥样硬化的患病率比非糖尿病患者高,且多数患者最终死于心脑血管并发症,而绝大多数心脑血管事件都与血栓形成有关,在导致 T2DM 血栓前状态的因素如血小板聚集功能增强、纤维蛋白溶解受损、内皮细胞功能异常中,血小板功能障碍起着关键作用。血小板的高活性可导致血小板黏附、聚集功能增强,血栓形成能力增加,血小板表面特殊膜蛋白表达增加及血小板更新率增加^[12]。此外,肥胖、血脂异常等与糖尿病相关的代谢状况也可导致血小板活性升高。王志军等^[13]研究认为,与非糖尿病患者相比,合并冠心病的糖尿病患者使用抗血小板药物会有较高的药物抵抗和不良心血管事件发生。因此通过研究糖尿病患者引起血小板高活性的机制,还可以为抗血小板药物的研发提供理论依据。俞海珍等^[14]研究认为,T2DM 患者血小板活性增高可能与高血糖状态有关:血液中过多的葡萄糖渗透进入到血小板内而合成大量 ATP、血小板膜蛋白糖基化使血小板对促凝聚物呈高反应性,并使血小板呈激活状态,表现出很强的聚集活性及蛋白激酶 C 激活等机制增加血小板的活性。此外,高血糖还可能通过增加巨核细胞糖蛋白的产生而增强血小板的活性。

许文亮等^[15]研究认为,胰岛素抵抗与血小板高活性状态也有密切的联系,血小板发生胰岛素抵抗时,胰岛素增加血小板一氧化氮合成的能力降低,环磷酸鸟苷合成减少,血小板对前列环素 2 和一氧化氮抑制血小板聚集作用的敏感性下降,导致胰岛素抗血小板聚集作用减弱。范志佳等^[16]研究发现,胰岛素能抵消血小板激动剂的影响,因此,胰岛素抵抗或者其分泌的相对或绝对缺乏均会削弱胰岛素对血小板活化的

抑制作用,从而提高血小板活性。

2.2 MPTP 在 T2DM 患者血小板高活性中的作用

有研究报道,糖尿病患者中氧化应激水平的升高是由于 ROS 过度产生和抗氧化防御效率的降低所导致^[17]。正常情况下,线粒体会产生适度的 ROS,不会导致强烈的促凋亡信号,但足以触发各种机制,调整细胞过程,保护线粒体和细胞免受损害^[18]。MPTP 短时间且不频繁的开放,会触发保护通路,但增加 MPTP 开放频率和持续时间与更持久的氧化损伤有关,这可能导致衰老甚至细胞死亡。

线粒体呼吸链是产生 ROS 的主要场所,糖尿病相关的代谢紊乱产生的糖化或氧化的低密度脂蛋白(ox-LDL)会损害线粒体呼吸链复合体的酶活性^[19]。有研报道,氧化应激的生物标志物即氧化低密度脂蛋白和 F2-异前列腺素,被证明其与 T2DM 发病呈正相关,且随着患者体质量指数的变化而改变^[20]。

生理水平的 ROS 对于细胞的正常代谢状态是必不可少的,但在病理条件或氧化应激期间,会出现电子传输链功能障碍,从而导致过量的 ROS 积累和氧化损伤。正常状态下,细胞内 ROS 的产生与清除之间保持动态平衡,当 ROS 产生过多或 ROS 清除障碍时,细胞内 ROS 会过度堆积。T2DM 患者的线粒体会增加氧化应激并增强对 MPTP 开放的敏感性,这与暴露的巯醇基团增加引起 ANT 构象变化有关。由于大多数 ROS 产生于线粒体中,线粒体活性氧(MROs)过量产生与线粒体和细胞的氧化损伤、衰老和退行性疾病密切相关。

MPTP 的完全开放增加了 MROs 产量,并释放了大量的基质代谢物,这些因素导致了线粒体膜电位崩溃,氧化磷酸化和线粒体代谢受抑制,基质肿胀,长时间开放后导致外膜破裂,释放出膜间隙蛋白,最终导致细胞凋亡。此外,ROS、Ca²⁺、谷胱甘肽和其他代谢物释放到细胞质中会破坏细胞稳态,增加对蛋白质、离子通道、转运体和膜磷脂的氧化损伤。MPTP 激活不仅受到 MROs 诱导的线粒体保护通路的直接或间接调控,而且还受到 DNA 损伤诱导的促凋亡信号的调控。因为 MROs 也会对膜磷脂造成氧化损伤,所以有学者认为氧化的磷脂,尤其是氧化的心磷脂,会激活 MPTP^[20]。此外,氧化应激增强 MPTP 激活的蛋白质的转移。目前逐步形成一种共识,即 MROs 诱导的保护通路和细胞损伤诱导的凋亡通路之间的平衡以某种方式整合到线粒体中,决定衰老的进展和最终的细胞死亡。

2.3 T2DM 患者血小板高活性的分子机制 纤溶系统受损、内皮细胞受损、血小板微粒(PMPs)产生、高血糖与高凝状态、胰岛素缺乏、胰岛素抵抗、全身炎症反应增加、某些代谢异常、某些细胞紊乱、氧化应激增加、P2Y₁₂ 信号和血小板转换率增加等因素共同参与了 T2DM 血栓前状态的形成。在诸多因素中,内皮功

能障碍被认为是启动参与 T2DM 患者血管并发症等相关炎症的关键事件。谭芳等^[21]研究认为,糖尿病患者血小板活性增高多与信号通路失调有关,NO-GC-cGMP-PKG-VASP 和 PGI-AC-cAMP-PKA-VASP 两条信号通路在抑制血小板活化、维持血小板处于静息状态中起重要作用。YANG 等^[22]研究认为,T2DM 患者血小板功能亢进可能与胰岛素干扰 P2Y₁₂ 受体信号传递机制的缺陷所致有关。胰岛素与其受体结合后,通过酪氨酸磷酸化激活胰岛素受体 IRS-1,从而启动与 G α -亚基的结合。然后 G α 活性被抑制,并通过 P2Y₁₂ 减弱腺苷酸环化酶的抑制作用。有报道称,P2Y₁₂ 受体是血小板活化和血栓形成的主要受体,在糖尿病患者中表达增强或激活可能是糖尿病血栓前状态和抗血小板作用受损的原因^[23]。YANG 等^[22]报道人血小板中存在 microRNAs 异常表达,这些 miRNAs 调控与血小板激活、血小板形状改变和血小板昼夜反应性相关的基因表达。循环 miR-223 水平最近被证明是糖尿病患者缺血性卒中的危险因素^[24]。糖尿病患者由于血小板表面非酶糖基化作用使膜流动性降低,同时也使其黏附能力和血栓交联作用增强,导致了糖尿病患者血小板活性增高。此外,糖尿病患者的高血糖状态还通过抑制 ERK、p38 和 Akt 通路的激活,导致内皮细胞的增殖和迁移受损。

血小板凋亡主要涉及线粒体凋亡通路。T2DM 患者血小板凋亡的分子机制与线粒体外膜通透性有关,它通过形成一种称为线粒体凋亡诱导通道的外膜通道来激活促凋亡的 Bcl-2 家族成员,如 Bax,通过诱导由活化的寡聚促凋亡的 Bcl-2 蛋白组成的大的外膜孔,在其他促凋亡组分的辅助下调节线粒体外膜通透性。血小板凋亡的上游标志物包括线粒体膜电位的去极化和 bcl-2 家族蛋白 Bax 和 Bak 的激活。促凋亡蛋白寡聚在线粒体外膜上,最终将细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质,并激活 caspase-9,下游的凋亡事件包括血小板磷脂酰丝氨酸的外翻,进而触发 caspase-3 和 caspase-7 激活和微粒脱落。血小板发生凋亡时,PS 由细胞膜内侧转移到细胞膜外侧,位于细胞膜外侧的 PS 促进凝血酶原转化为凝血酶,进而促进血栓的形成。

另外,血小板发生凋亡时会释放 PMPs,PMPs 在血液止血、血栓形成、癌症和炎症中发挥类似于血小板的作用。LI 等^[25]研究发现,T2DM 组 PMPs 显著高于非糖尿病对照组,提示 PMPs 可能在 T2DM 及其并发症的发病机制中起一定作用。

在糖尿病患者引起血栓前状态诸多因素中,血小板功能异常发挥着重要作用,通过分析糖尿病患者血小板高活性的机制可为抗血小板药物的研发提供依据,但由于糖尿病及各种并发症的发生过程十分复杂,多种因素相互作用,导致引起血小板高活性的机制尚不清楚,需继续探索和完善。

3 结 语

MPTP 开放与许多疾病的发生发展相关,如在缺血-再灌注损伤、糖尿病、脑损伤、心血管疾病及神经变性疾病中,MPTP 开放可加重患者病情进展,而在肿瘤疾病中 MPTP 开放又可以缓解患者病情进展,许多直接作用于 MPTP 药物,如 CypD 有效抑制剂环孢素 A(CsA)等成为治疗疾病的一个新的方向,然而 CsA 与其他蛋白之间的相互作用是否会产生不良反应尚不明确,因此,探明 MPTP 分子结构及其在 T2DM 患者体内引起血小板高活性的机制十分必要,这将为 T2DM 等有关线粒体的疾病提供新的理论依据,并可进行抗血小板药物的研发提供实验室数据支撑。

参考文献

- [1] PEREZ M J,QUINTANILLA R A. Development or disease; duality of the mitochondrial permeability transition pore[J]. Dev Biol,2017,426(1):1-7.
- [2] ROTTENBERG H,HOEK J B. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore[J]. Aging Cell,2017,16(5):943-955.
- [3] BIASUTTO L,AZZOLINI M,SZABŐ I,et al. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016:an update[J]. Biochim Biophys Acta,2016,1863(10):2515-2530.
- [4] BONORA M,WIECKOWSK M R,CHINOPOULOS C,et al. Molecular mechanisms of cell death:central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition[J]. Oncogene,2015,34(12):1608.
- [5] MNATSAKANYAN N,BEUTNER G,PORTER G A,et al. Physiological roles of the mitochondrial permeability transition pore[J]. Bioenerg Biomembr,2017,49(1):13-25.
- [6] NARYZHNYA N V,MASLOV L N,OELTGEN P R. Pharmacology of mitochondrial permeability transition pore inhibitors[J]. Drug Dev Res,2019,80(8):1013-1030.
- [7] BERNARDI P,LIPPE G. Channel formation by F-ATP synthase and the permeability transition pore:an update[J]. Curr Opin Physiol,2018,20(3) 1-5.
- [8] MEHTA M M,WEINBERG S E,CHANDEL N S. Mitochondrial control of immunity:beyond ATP[J]. Nat Rev Immunol,2017,17(10):608-620.
- [9] MURPHY M P,HARTLEY R C. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies[J]. Nat Rev Drug Discov,2018,17(12):865-886.
- [10] BONORA M,PINTON P. A new current for the mitochondrial permeability transition[J]. Trends Biochem Sci,2019,44(7):559-561.
- [11] GAIZ A,MOSAWY S,COLSON N,et al. Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes: role of platelet hyperactivity[J]. Biomed Pharmacother,2017,94

(1):679-686.

[12] PRETORIUS L, THOMSON G J A, ADAMS R C M, et al. Platelet activity and hypercoagulation in type 2 diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1):141.

[13] 王志军, 张鹏宇, 周建芝, 等. 冠心病合并糖尿病患者联合抗血小板药物抵抗的相关研究[J]. 临床心血管杂志, 2016, 32(10):978-982.

[14] 俞海珍, 郭旭昌, 李立峰. 血小板平均体积在 2 型糖尿病患者初级预防保健中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(13):1851-1852.

[15] 许文亮, 丁华民, 杨璇, 等. 老年冠心病合并代谢综合征患者平均血小板体积的相关性研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, 16(1):42-45.

[16] 范志佳, 徐黎明, 王力, 等. 糖尿病患者血小板高活性状态研究进展[J]. 检验医学, 2018, 33(12):1144-1147.

[17] ELHAOUARI M. Platelet oxidative stress and its relationship with cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus patients [J]. Curr Med Chem, 2019, 26 (22): 4145-4165.

[18] ROTTENBERG H, HOEK J B. The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore[J]. Aging Cell, 2017, 16(5): 943-955.

[19] ODEGAARD A O, JACOBS D R, SANCHEZ O A, et al. Oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction

and incidence of type 2 diabetes[J]. Cardiovasc Diabetol, 2016, 15(1):51.

[20] KAUR R, KAUR M, SINGH J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies[J]. Cardiovasc Diabetol, 2018, 17(1):121.

[21] 谭芳, 李代渝. NO 和维生素 B6 抑制血小板活化和聚集的研究进展[J]. 重庆医学, 2011, 40(7):709-712.

[22] YANG S, ZHAO J, CHEN Y, et al. Biomarkers associated with ischemic stroke in diabetes mellitus patients[J]. Cardiovasc Toxicol, 2016, 16(3):213-222.

[23] HU L, CHANG L, ZHANG Y, et al. Platelets express activated p2y12 receptor in patients with diabetes mellitus [J]. Circulation, 2017, 136(9):817-833.

[24] PORDZIK J, JAKUBIK D, JAROSZ-POPEK J, et al. Significance of circulating microRNAs in diabetes mellitus type 2 and platelet reactivity: bioinformatic analysis and review[J]. Cardiovasc Diabetol, 2019, 18(1):113.

[25] LI S, WEI J, ZHANG C, et al. Cell-derived microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(6):2439-2450.

(收稿日期:2020-09-29 修回日期:2021-05-12)

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.12.042

循环肿瘤细胞的检测与临床应用

王 萍 综述, 井丰军 审校

芜湖市中医医院检验科, 安徽芜湖 241000

关键词: 循环肿瘤细胞; 检测; 富集
中图分类号: R730.4 **文献标志码:** A

文章编号: 1672-9455(2021)12-1802-04

循环肿瘤细胞(CTCs)是指由实体肿瘤原发病灶中脱落出来,进入血液循环和(或)淋巴系统的细胞,具有与原发肿瘤相似的特征,能够反映肿瘤发生发展情况并可能介导肿瘤转移。近年来,CTCs 的检测技术得到飞速发展。随着检测技术的提高,越来越多的研究发现,CTCs 在多种恶性肿瘤的诊断、治疗、疗效评估和预后方面有着重要作用。

1 CTCs 的富集和检测

1.1 CTCs 的富集 传统的肿瘤检测方法,是以组织活检获取病理标本,以查找到肿瘤细胞为“金标准”,标本获取困难,患者创伤较大,而 CTCs 存在于患者血液中,获取途径没有侵袭性,易于操作,是一种“液体活检”。CTCs 在外周血中数量极其稀少,因此,在检测之前需要先对 CTCs 进行富集。临床常用的富集技术,主要基于两方面:CTCs 的物理特性或 CTCs

表面生物特征。

1.1.1 基于 CTCs 的物理特性 根据大小、密度、电荷等方面差异将 CTCs 与正常的造血细胞区分开来。比如 MCA 系统根据 CTCs 与正常血液细胞在大小和变形能力上的差异,将 CTCs 特异性分离出来^[1]。物理富集过程相对简单,所需时间短,不依赖于 CTCs 特定表面标志物,但部分白细胞大小性质与 CTCs 相近,致使所获得 CTCs 特异性和纯度较低。

1.1.2 基于 CTCs 表面生物特性 主要根据抗原抗体特异性结合的原理。这种富集技术又分为正向富集:捕获 CTCs,洗脱健康血细胞;负向富集:捕获非目标细胞(即健康血细胞),洗脱目标细胞(即 CTCs)。正向富集通常根据 CTCs 表达的上皮细胞黏附分子(EpCAM)作为标记物,在免疫磁珠系统通过与磁珠结合的抗体来捕获抗原,然后,抗原-抗体复合物经由