

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.003176

缺氧后线粒体 Drp1 通过 LRRK2–HK2 诱导 mPTP 过度开放的机制研究

段晨阳

(重庆医科大学第二附属医院麻醉科,重庆 400010)

【摘要】目的: 探究缺氧后线粒体动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, Drp1)对线粒体膜通透性转换通道(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放的调控机制。**方法:** 在血管平滑肌细胞中通过免疫荧光方法观察缺氧后 mPTP 开放情况;通过超速离心法分离线粒体和细胞质成分蛋白;使用 Co-IP 和 Western blot 检测缺氧或者干预 Drp1、干预己糖激酶-2(hexokinase-2, HK2)后 Drp1 的表达分布情况、HK2 与电压依赖性阴离子通道蛋白(voltage dependent anion channel, VDAC)结合情况、Drp1 与富含亮氨酸重复激酶 2(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)结合情况;使用蛋白分子对接和蛋白芯片方法筛选 Drp1 的潜在结合蛋白及结合位点;使用 Drp1 抑制剂和点突变法用于相应机制探究。**结果:** 缺氧后 Drp1 发生线粒体转位促使 mPTP 过度开放($P<0.05$)。使用 Mdivi-1 减少线粒体 Drp1 表达后可抑制 mPTP 开放,减少细胞色素 C(cytochrome C, CytC)释放($P<0.05$)。缺氧后 HK2-Thr473 磷酸化水平减低引起的 HK2 线粒体分离会导致 mPTP 结构破坏,通过 HK2 T473D 点突变恢复 HK2 活性后, HK2 与线粒体结合情况及 mPTP 开放情况明显改善($P<0.05$)。Drp1 蛋白芯片结果发现缺氧后 Drp1 可以与 LRRK2 结合并封闭其活性位点,通过 Drp1 T595A 点突变破坏 Drp1-LRRK2 结合后, HK2 活力及 HK2 线粒体分离情况明显改善($P<0.05$), mPTP 开放情况明显减少($P<0.05$)。**结论:** 缺氧后线粒体 Drp1 通过封闭激酶 LRRK2 活性位点导致 HK2 Thr473 磷酸化水平减低及其线粒体分离,最终诱导 mPTP 过度开放。

【关键词】缺氧;动力相关蛋白 1;富含亮氨酸重复激酶 2;己糖激酶-2;线粒体;线粒体膜通透性转换通道

【中图分类号】R364

【文献标志码】A

【收稿日期】2021-08-20

Mechanisms of mitochondrial Drp1 inducing excessive opening of mPTP channel through LRRK2–HK2 after hypoxia

Duan Chenyang

(Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】**Objective:** To explore the regulatory mechanisms of mitochondrial dynamin-related protein 1 (Drp1) on excessive opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) after hypoxia. **Methods:** The opening of mPTP after hypoxia was observed by immunofluorescence in vascular smooth muscle cells (VSMCs). Mitochondrial and cytoplasmic fractions were separated by ultracentrifugation. Co-IP and Western blot methods were used to detect the expression and distribution of Drp1, the binding of hexokinase-2 (HK2) to voltage dependent anion channel (VDAC), and the binding of Drp1 to leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2). The potential binding proteins and binding sites of Drp1 were screened by protein molecular docking and protein chip. Mdivi-1, a Drp1 inhibitor, and mutation methods were used to explore the corresponding mechanisms. **Results:** Mitochondrial translocation of Drp1 caused mPTP excessive opening in VSMCs after hypoxia ($P<0.05$). Reducing mitochondrial Drp1 expression by Mdivi-1 could inhibit mPTP opening and reduce the release of cytochrome C (CytC) ($P<0.05$). The mitochondrial separation of HK2 caused by the decrease of HK2-Thr473 phosphorylation after hypoxia led to the destruction of mPTP structure. After restoring HK2 activity by HK2 T473D mutation, the binding of HK2 to mitochondria and the opening of mPTP after hypoxia were significantly improved ($P<0.05$). The results of Drp1 protein chip showed that Drp1 could bind to kinase LRRK2 and block its active site after hypoxia. After the combination of Drp1-LRRK2 was

作者介绍:段晨阳,Email:duanchenyang1991@sina.com,

研究方向:危重症多器官功能损害与线粒体保护机制研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81700429);中国博士后科学基金资助项目(编号:2021MD703924);重庆市博士后创新人才支持计划资助项目(编号:CQBX2021018)。

优先出版:[\(2023-02-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1046.R.20230227.1635.006.html)

broken by the site mutation of Drp1 T595A, the activity of HK2 and the mitochondrial separation of HK2 were obviously improved ($P < 0.05$), and the opening of mPTP channel was obviously reduced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Mitochondrial Drp1 may reduce HK2-Thr473 phosphorylation and cause HK2 mitochondrial separation by binding and blocking the active site of kinase LRRK2, which finally induces the excessive opening of mPTP after hypoxia.

[Key words] hypoxia; dynamin-related protein 1; leucine-rich repeat kinase 2; hexokinase-2; mitochondrion; mitochondrial permeability transition pore

缺氧损伤是指机体血流灌注和血氧供应不足导致的组织细胞损伤^[1],是失血休克、脓毒症、心肺衰竭等多种危重症发生发展的共同通路。线粒体作为细胞有氧呼吸的主要场所,是缺血缺氧后较早发生损害的细胞器之一^[2]。既往研究发现,缺氧损伤后血管组织中存在明显的线粒体损伤,主要表现为线粒体形态异常和线粒体功能障碍^[3-5]。动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, Drp1)作为一种线粒体分裂相关GTPase,是影响线粒体形态改变的经典蛋白。正常情况下,大部分Drp1游离于细胞质中。缺氧损伤后活化Drp1会从细胞质转位到线粒体表面完成线粒体分裂,导致线粒体形态碎片化^[6]。然而发生线粒体转位的Drp1在调控线粒体形态后下一步如何发展、是否能够进一步调控线粒体功能目前尚不清楚。线粒体膜通透性转换通道(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)是一个贯穿线粒体内外膜的孔道。当mPTP持续开放时,离子流动选择性丧失会引起线粒体膜电位减低,细胞色素C(cytochrome C, CytC)大量释放,加重线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)堆积,最终导致细胞死亡。因此,mPTP过度开放又被认为是线粒体功能改变的先决条件。既往研究表明,在缺氧损伤后,活化Drp1除了介导线粒体分裂外,还可以通过多种线粒体分裂非依赖途径调控ROS产生和线粒体代谢等线粒体功能^[7-8],那么缺氧后Drp1是否可以直接调控mPTP的开放目前尚未见相关报道。本文在前期研究^[9]基础上探究了缺氧损伤后血管平滑肌细胞中线粒体Drp1对mPTP开放的调控机制,提出Drp1发生线粒体转位后下一步的功能调控机制,为缺氧后线粒体损伤机制探讨和Drp1靶点干预提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

血管平滑肌细胞系(vascular smooth muscle cells, VSMC)来源于中国科学院上海细胞库,传代并液氮保存于陆军特色医疗

中心。Drp1一抗、CytC一抗、BAX一抗、VDAC一抗、CK一抗、ANT一抗、PiC一抗、CypD一抗、ATPase一抗、LRRK2一抗、 β -actin一抗、Tubulin一抗、COX IV一抗均购于美国 Abcam 公司;己糖激酶-2(hexokinase-2, HK2)一抗、线粒体染料(MitoTracker Deep Red FM)购于美国 Cell signaling 公司;HK2 Thr473 磷酸化抗体购于武汉 Abclonal 公司;免疫共沉淀 Co-IP 试剂盒购于美国 Sino Biological 公司;Drp1 点突变、HK2 点突变、Drp1 重组蛋白芯片由上海吉凯生物公司协助完成;Drp1 抑制剂 Mdivi-1 购于美国 BioTek 公司;钙黄绿素 Calcein 购于上海碧云天公司;线粒体分离试剂盒购于北京 Invent 公司。共聚焦显微镜(Leica TCS SP5, 美国);双色红外荧光成像系统(Odyssey, 美国)。

1.2 细胞缺氧(再常氧)处理

将血管平滑肌细胞接种在培养皿中,待贴壁完全、细胞覆盖率在 70% 以上后,置于 37℃ 缺氧罐中(94% N₂、5% CO₂、1% O₂, 通气量 3 L/min)缺氧处理 3 h 后,再置于常氧状态下 4 h。再进行观察或处理。

1.3 线粒体 mPTP 开放检测

将细胞接种于共聚焦培养皿中。使用 2 μ mol/L 的 Calcein 和 100 nmol/L 的 MitoTracker 于 37℃ 避光孵育 30 min。37℃ PBS 清洗 2 次,每次 5 min。使用 2 mmol/L 的 CoCl₂ 于 37℃ 避光孵育 5 min,再用 37℃ PBS 清洗 2 次,每次 5 min。使用共聚焦显微镜观察 Calcein(绿色激发波为 488 nm, 可见范围为 501~563 nm)和 MitoTracker(红色激发波为 633 nm, 可见范围为 655~670 nm)的荧光强度。mPTP 开放后,CoCl₂ 将 Calcein 绿色荧光淬灭掉。因此,Calcein 平均荧光强度弱或者 MitoTracker/Calcein 荧光强度比增高则表示 mPTP 开放增多。

1.4 线粒体和细胞质分离提取

采用 Invent Minute TM 线粒体分离试剂盒。低速离心(500~600g, 5 min)收集(5~40)×10⁶ 个细胞。用预冷的 PBS 清洗 1 次细胞,弃去上清,加入 250 μ L 缓冲液 A 涡旋震荡重悬细胞。冰上孵育 5~10 min, 涡旋大力震荡 20~30 s, 将细胞悬液转入离心管柱中。加入 250 μ L 的缓冲液 A, 16 000g 离心 1 min, 弃去离心管柱, 涡旋震荡重悬沉淀。将上清液转移到新的 2 mL 离心管中。加入 400 μ L 缓冲液 B, 涡旋震荡 10 s 混合溶液。离心(16 000g, 10 min), 收集上清液, 即为细胞质成分。向沉淀中加入 200 μ L 缓冲液 B, 涡旋震荡 10 s 重悬沉淀。离心(7 800g, 5 min)。将上清液转移到新的 2 mL 离心

管中,加入1.6 mL预冷的PBS,离心(16 000g,15 min),弃去上清液保存沉淀,沉淀即为分离出的线粒体成分。

1.5 免疫共沉淀 Co-IP

取50 μL protein A/G 免疫磁珠加入1.5 mL离心管,置于磁力架上,待磁珠贴壁后吸去上清。用200 μL PBST稀释10 μg Drp1抗体装入带有免疫磁珠的离心管中,室温孵育10 min后,置于磁力架上待磁珠贴壁后吸去上清。再用200 μL PBST洗涤磁珠3次。然后加入1 000 μL含有细胞裂解液的细胞悬液,用移液器吹打混匀。37°C孵育15 min使抗原和结合有抗体的免疫磁珠结合后置于磁力架上待磁珠贴壁后吸去上清。用200 μL PBS洗涤免疫磁珠-抗体-抗原复合物3次。洗涤完后用100 μL PBS重悬磁珠,进行后续的免疫印迹验证。

1.6 细胞免疫荧光

将细胞接种于共聚焦培养皿中。用4%多聚甲醛室温固定20 min。用PBS清洗3次,每次5 min。用0.3% Triton室温孵育1 min。37°C、5% BSA封闭1 h。用PBS清洗3次,每次5 min。孵育一抗(一抗:BSA=1:200),4°C孵育过夜。用PBS清洗3次,每次5 min。孵育二抗,37°C孵育1 h。选择对应一抗种属的荧光二抗,用PBS清洗3次,每次5 min。避光DAPI孵育5 min。用PBS清洗3次,每次5 min。共聚焦显微镜观察。

1.7 Western blot 检测

收集细胞加入10 μL裂解液后冰上剪碎。4°C静置30 min后,4°C条件下1 200g离心15 min,取上清加入上样缓冲液混匀后,105°C加热6 min使蛋白变性,冰上降温后放入蛋白盒-20°C

保存。制备蛋白样品后使用10% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白。湿转法将蛋白转移到PVDF膜上。用5%脱脂奶粉封闭2 h后,用TBST洗涤3次,一抗4°C孵育过夜,TBST洗涤3次后,二抗室温孵育1 h,TBST洗涤4次后,使用Odyssey双色红外成像系统检测膜上蛋白表达变化。

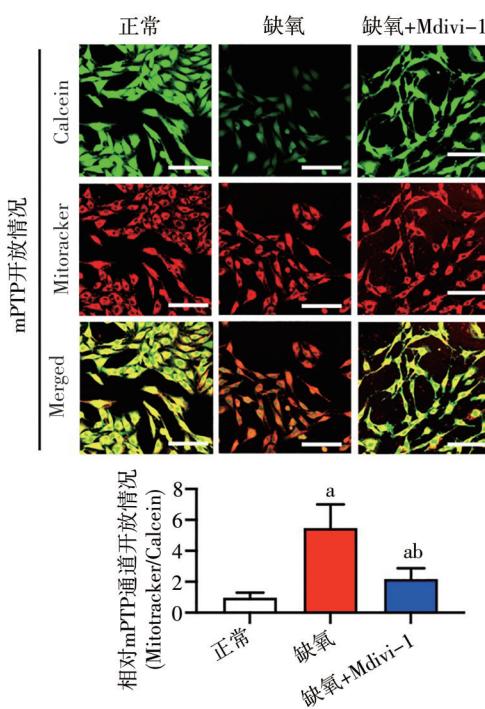
1.8 统计学处理

使用SPSS 17.0统计软件。定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2组间均数比较采用独立样本t检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,当方差分析结果有统计学意义时,再采用SNK法或者LSD法进行多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

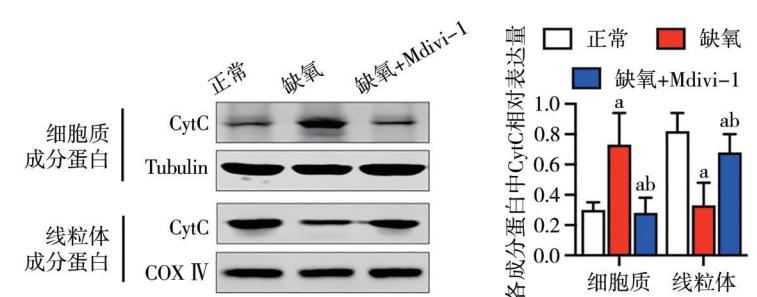
2 结 果

2.1 缺氧后线粒体 Drp1 增多导致 mPTP 过度开放

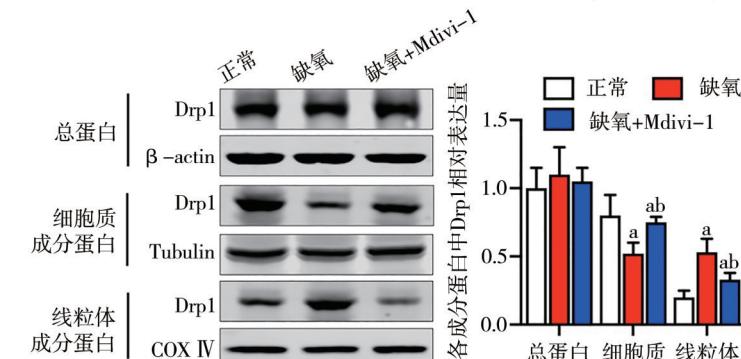
利用Mitotracker和Calcein荧光标记观察缺氧后血管平滑肌细胞中mPTP开放情况,结果发现缺氧后线粒体Calcein荧光淬灭明显($P<0.05$)(图1A)。Western blot结果显示,缺氧后通过mPTP释放到细胞质中的CytC含量明显增多($P<0.05$)(图1B),上述结果均表明缺氧后线粒体膜上mPTP过度开放。使用Drp1抑制剂Mdivi-1处理后,缺氧诱导的Drp1线粒体转位情况明显减少($P<0.05$)(图1C),线粒体Calcein荧光强度显著提高,通过mPTP释放到细胞质中的CytC含量明显减少($P<0.05$)(图1C),提示减少线粒体Drp1表达可改善缺氧后mPTP的开放情况。



A. 共聚焦观察缺氧和Mdivi-1处理后血管平滑肌细胞线粒体Calcein荧光强度($n=3$, bar=100 μm)



B. Western blot检测缺氧和Mdivi-1处理后细胞质和线粒体成分CytC表达情况($n=3$)



C. Western blot检测缺氧和Mdivi-1处理后总蛋白、细胞质和线粒体成分Drp1表达情况 ($n=3$)

注:a,与正常组比较, $P<0.05$;b:与缺氧组比较, $P<0.05$

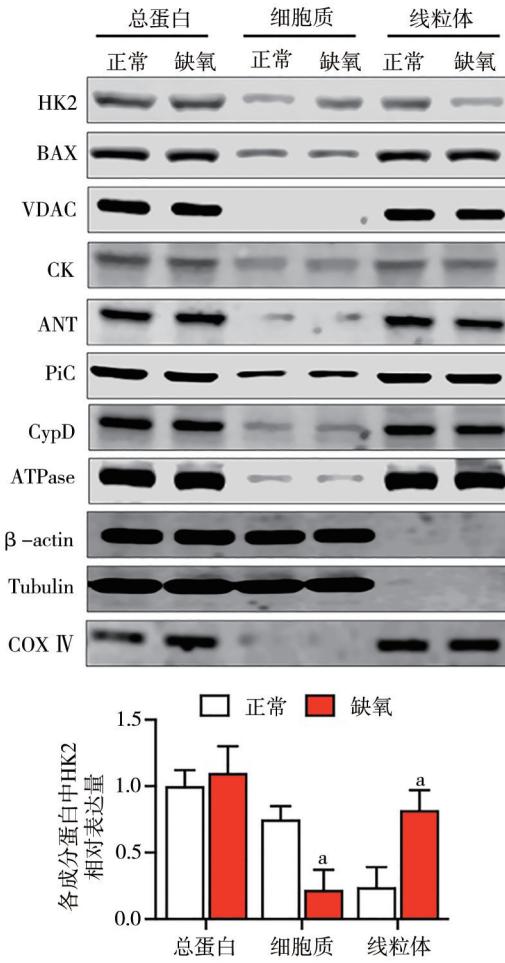
图1 Mdivi-1减少线粒体Drp1表达对缺氧后mPTP开放的影响

2.2 缺氧后 Drp1 通过分离 HK2 破坏 mPTP 结构

对缺氧后 mPTP 结构蛋白的表达进行检测(图 2A)。Western blot 结果显示,缺氧后细胞质 HK2 表达明显增加,线粒体 HK2 表达明显减低($P<0.05$)(图 2A、B),提示缺氧后位于外膜上的 mPTP 结构蛋白 HK2 可能发生了线粒体分离。Co-IP 结果显示,缺氧后 HK2 与相邻 mPTP 结构蛋白 VDAC 的结合力明显减低($P<0.05$),而使用 Mdivi-1 抑制 Drp1 线粒体转位后,HK2 与 VDAC 结合力明显增强($P<0.05$)(图 2C),提示缺氧后 HK2 的线粒体分离可能与线粒体 Drp1 增多有关。共聚焦结果显示,缺氧后线粒体与 HK2 共定位情况明显减低($P<0.05$),使用 Mdivi-1 抑制 Drp1 线粒体转位后,线粒体与 HK2 共定位情况明显增加($P<0.05$)(图 2D)。上述结果更加直观地反映了缺氧后线粒体 Drp1 对 HK2 线粒体分离的重要影响。

2.3 缺氧后 HK2 线粒体分离与 HK2-Thr473 活性减低有关

Western blot 结果显示,HK2 会发生活性改变,主要表现为



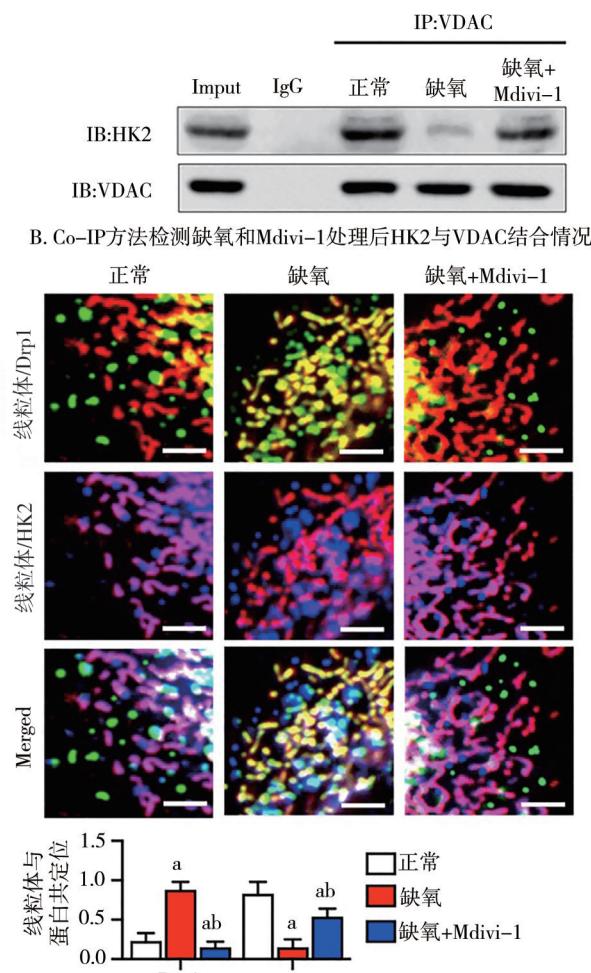
A. Western blot 检测缺氧后总蛋白、细胞质和线粒体成分中所有 mPTP 结构蛋白表达情况(总蛋白内参: β -actin, 细胞质内参: Tubulin, 线粒体内参: COX IV, $n=3$)

注:a, 与正常组比较, $P<0.05$; b, 与缺氧组比较, $P<0.05$

HK2-Thr473 磷酸化水平减低($P<0.05$)(图 3A)。通过 HK2 T473D 点突变恢复 HK2 活性后(图 3B),HK2 与 VDAC 结合力较缺氧组和隐性对照组(缺氧+HK2^{WT}组)相比提高 50% 以上($P<0.05$),与正常组比较无统计学差异($P>0.05$)(图 3C),提示缺氧后 HK2 的线粒体分离可能与 HK2-Thr473 活性减低有关。进一步观察发现,HK2 T473D 点突变后,线粒体 Calcein 荧光强度较缺氧组和隐性对照组相比明显改善(图 3D),提示 HK2 活性改变对缺氧后 mPTP 开放具有重要影响。

2.4 缺氧后线粒体 Drp1 通过结合 LRRK2 诱导 HK2 失活

进一步使用 Biotin 标记的 Drp1 重组蛋白进行蛋白芯片高通量测序,筛选缺氧后与 Drp1 存在潜在互作关系的激酶或磷酸酶。芯片结果显示,缺氧后 Drp1 与 LRRK2 之间可能存在较强的互作关系(图 4A)。Co-IP 结果证实缺氧后 Drp1 与 LRRK2 结合明显增加($P<0.05$),并且结合仅发生在线粒体上,游离在细胞质中的 Drp1 几乎不与 LRRK2 发生结合



C. 共聚焦观察缺氧和 Mdivi-1 处理后线粒体与 Drp1 和 HK2 的共定位情况 Calcein 荧光强度($n=3$, bar=5 μm)

图 2 缺氧后 Drp1 对 mPTP 结构的影响

(图 4B)。通过蛋白分子对接方法发现缺氧后 Drp1-Thr595 位点与 LRRK2-Gly2019 位点间可能存在结合(图 4C)。通过 Drp1 T595A 点突变破坏结合位点后(图 5A),线粒体 Drp1 与 LRRK2 结合力明显弱于缺氧组和和隐性对照组(缺氧+Drp1^{WT} 组)(P<0.05)(图 5B)。Drp1 T595A 点突变后, HK2 Thr473 磷酸化水平明显上调(P<0.05),HK2 线粒体分离情况

明显减少(P<0.05)(图 5C),提示缺氧后线粒体 Drp1-LRRK2 结合对 HK2 活力及其线粒体分离具有重要影响。Drp1 T595A 点突变后,mPTP 开放情况较缺氧组和隐性对照组明显减少(P<0.05)(图 5D)。上述结果表明,缺氧后线粒体 Drp1 通过封闭激酶 LRRK2 活性位点导致 HK2 Thr473 磷酸化水平减低及其线粒体分离,最终诱导 mPTP 过度开放。

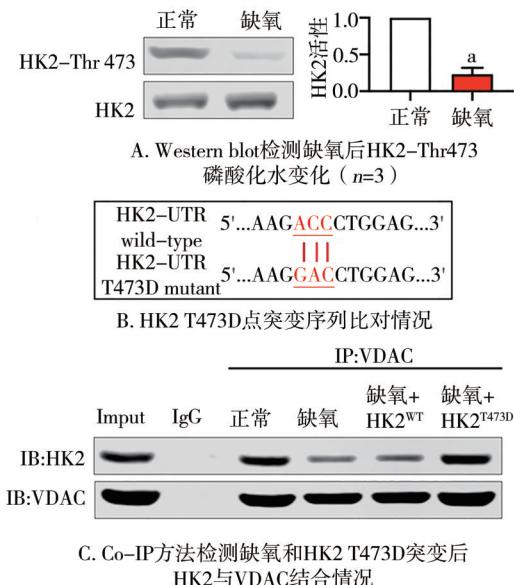


图 3 缺氧后 HK2 活性及与 mPTP 开放的关系

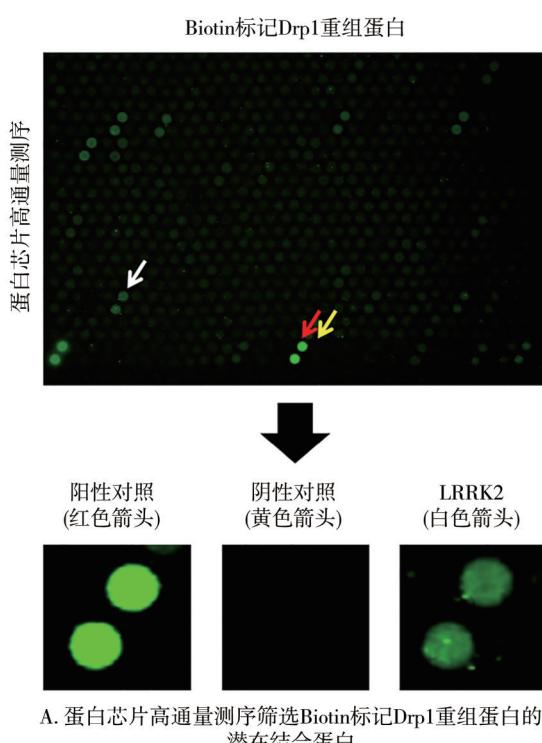
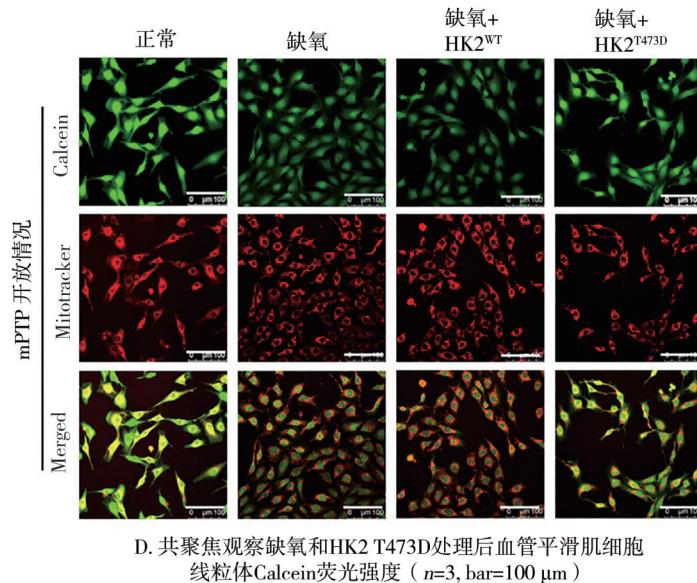


图 4 缺氧后 Drp1 与 LRRK2 的结合情况

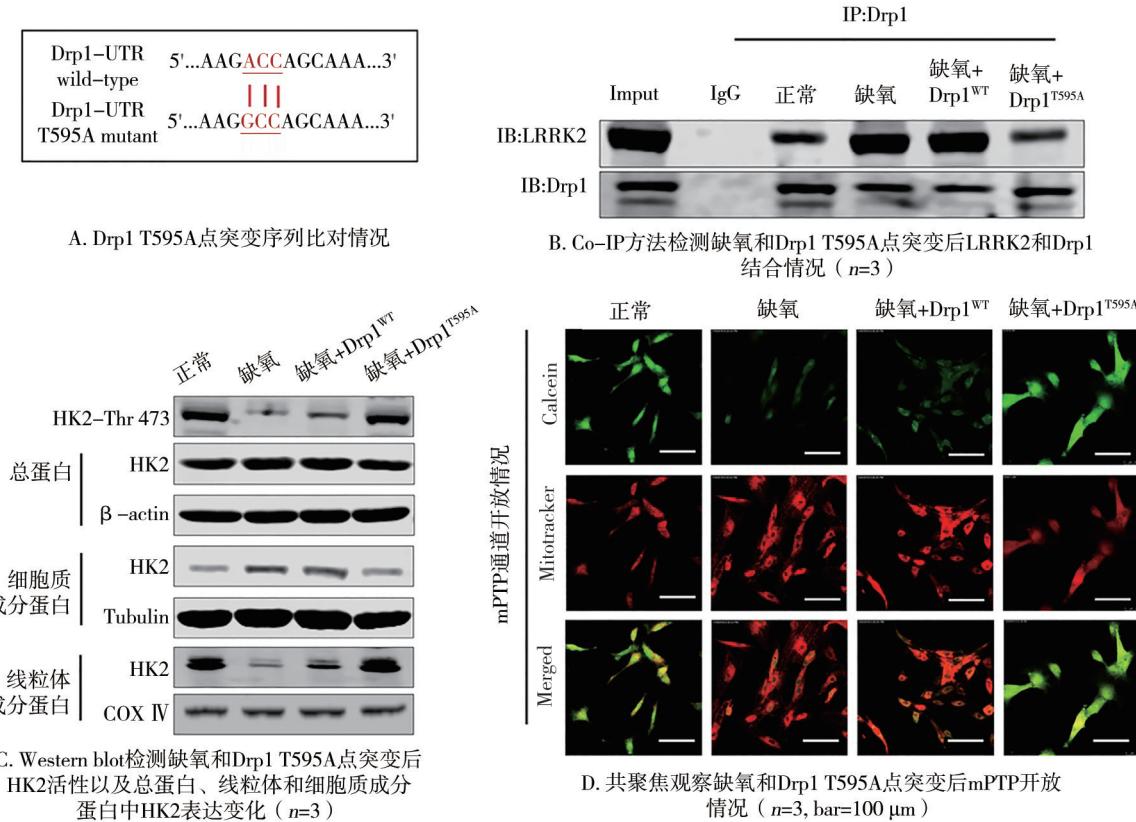


图 5 点突变 Drp1-LRRK2 结合位点对 HK2 活性及 mPTP 影响

3 讨 论

在线粒体质量调控相关研究中,线粒体形态与线粒体功能之间的调控关系一直是研究的热点。Han Y 等^[10]的研究显示,缺氧诱导的宫颈癌细胞 ROS 堆积可以通过下调 Drp1 Ser637 磷酸化水平促进线粒体分裂的发生。Zhang D 等^[11]的研究显示,缺氧诱导的胰岛 β 细胞中 Drp1 Ser616 活化会触发 CytC 的释放和 Caspase 的激活,最终导致胰岛 β 细胞凋亡。上述研究提示 Drp1 作为一种机械化学酶很可能在缺氧后线粒体形态与功能的双重调控中起枢纽的作用。Dhingra A 等^[12]在心肌缺血的研究中显示,缺氧后 Drp1 活化的同时伴随有 mPTP 开放和线粒体膜电位减低,与本研究结果一致。但是 Dhingra A 等^[12]的研究并未阐明缺氧后 Drp1 对 mPTP 的影响及具体调控机制。本文详细阐述了缺氧后线粒体 Drp1 通过 LRRK2-HK2 识别并直接调控线粒体膜上 mPTP 开放,加重线粒体损伤和细胞死亡。本研究强调 Drp1 在线粒体形态与线粒体功能双重

调控中的关键作用,并提出缺氧后 Drp1 参与线粒体质量调控的新机制。

调控 mPTP 开放的因素有很多,比如钙超载、氧化应激、pH 异常、无机磷酸盐增加等。此外,mPTP 存在自身结构调控。HK2 作为 mPTP 结构蛋白是近年来被提出的^[13]。以往认为 HK2 仅影响葡萄糖代谢转化为 6-磷酸葡萄糖的过程。近年研究发现长时间缺血缺氧后 6-磷酸葡萄糖堆积和 pH 减低会影响线粒体 HK2 分离,加强 HK2 与线粒体外膜的结合可以改善缺血缺氧引起的心肌损伤^[14]。在肿瘤细胞中,Akt 活化后可以诱导 HK2-Thr473 位点磷酸化,增强 HK2 对线粒体外膜的结合力^[15]。在心肌病中,GSK3β 诱导 HK2 去磷酸化可以引起线粒体 HK2 分离^[16],说明 HK2 活性改变是影响线粒体 HK2 表达及转位的关键因素。前期在心肌缺血再灌注损伤中有研究提出 Drp1 对 HK2 线粒体转位的影响^[17],但是并没有阐明其发生机制。本研究发现缺氧后线粒体 Drp1 对 HK2 活性及转位的影响主要与 Drp1 募集 LRRK2 蛋白并导致其激酶结构域突变有关,关键互作位点发生在 Drp1 Thr595 和 LRRK2 G2019 之间。

本研究为后续干预 mPTP 开放研究提供了新的靶点。前期在帕金森研究中同样观察到 Drp1 与 LRRK2 之间存在相互作用^[18]。LRRK2 异常会引起 F-actin 过度稳定和 Drp1 的错误定位,诱导帕金森病中微管结合蛋白 Tau 的神经毒性^[18]。此外,以往有研究显示 LRRK2 在缺氧线粒体动力调节中有重要意义^[19]。最新研究显示,LRRK2 本身也可以调节线粒体稳态,LRRK2 可以破坏线粒体上 Drp1 与 Parkin 的相互作用,抑制线粒体自噬^[20]。本研究进一步诠释了 LRRK2 蛋白在线粒体动力和功能调控中的作用,并且该调节过程与 Drp1 密切相关。

综上所述,本研究发现缺氧损伤活化 Drp1 发生线粒体转位后,除了通过经典的线粒体分裂依赖途径调节线粒体形态外,还可以促使 mPTP 过度开放。具体调控机制为:线粒体 Drp1 通过封闭激酶 LRRK2 活性位点导致 HK2 Thr473 磷酸化水平减低及其线粒体分离,最终诱导 mPTP 过度开放。

参 考 文 献

- [1] Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology[J]. Cell Metab, 2018, 27(2): 281–298.
- [2] Bargiela D, Burr SP, Chinnery PF. Mitochondria and hypoxia: metabolic crosstalk in cell-fate decisions[J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(4): 249–259.
- [3] Duan CY, Kuang L, Xiang XM, et al. Drp1 regulates mitochondrial dysfunction and dysregulated metabolism in ischemic injury via Clec16a-, BAX-, and GSH-pathways[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 251.
- [4] Duan CY, Kuang L, Xiang XM, et al. Activated Drp1-mediated mitochondrial ROS influence the gut microbiome and intestinal barrier after hemorrhagic shock[J]. Aging, 2020, 12(2): 1397–1416.
- [5] Duan CY, Cao ZZ, Tang FQ, et al. miRNA-mRNA crosstalk in myocardial ischemia induced by calcified aortic valve stenosis[J]. Aging, 2019, 11(2): 448–466.
- [6] Fonseca TB, Sánchez-Guerrero Á, Milosevic I, et al. Mitochondrial fission requires DRP1 but not dynamins[J]. Nature, 2019, 570(7761): E34–E42.
- [7] Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, et al. Changes in the mitochondrial permeability transition pore in aging and age-associated diseases[J]. Mech Ageing Dev, 2013, 134(1/2): 1–9.
- [8] Zhou H, Hu SY, Jin QH, et al. Mff-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(3): e005328.
- [9] Duan CY, Wang L, Zhang J, et al. Mdivi-1 attenuates oxidative stress and exerts vascular protection in ischemic/hypoxic injury by a mechanism independent of Drp1 GTPase activity[J]. Redox Biol, 2020, 37: 101706.
- [10] Han Y, Kim B, Cho U, et al. Mitochondrial fission causes cisplatin resistance under hypoxic conditions via ROS in ovarian cancer cells[J]. Oncogene, 2019, 38(45): 7089–7105.
- [11] Zhang D, Liu YF, Tang Y, et al. Increased mitochondrial fission is critical for hypoxia-induced pancreatic beta cell death[J]. PLoS One, 2018, 13(5): e0197266.
- [12] Dhingra A, Jayas R, Afshar P, et al. Ellagic acid antagonizes Bnip3-mediated mitochondrial injury and necrotic cell death of cardiac myocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 112: 411–422.
- [13] Wang QL, Zhang M, Torres G, et al. Metformin suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via the inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission[J]. Diabetes, 2017, 66(1): 193–205.
- [14] Zhou H, Zhang Y, Hu SY, et al. Melatonin protects cardiac microvasculature against ischemia/reperfusion injury via suppression of mitochondrial fission-VDAC1-HK2-mPTP-mitophagy axis[J]. J Pineal Res, 2017, 63(1): e12413.
- [15] Yu XF, Wang RK, Zhang YN, et al. Skp2-mediated ubiquitination and mitochondrial localization of Akt drive tumor growth and chemoresistance to cisplatin[J]. Oncogene, 2019, 38(50): 7457–7472.
- [16] Xue YN, Yu BB, Li JL, et al. Zinc and p53 disrupt mitochondrial binding of HK2 by phosphorylating VDAC1[J]. Exp Cell Res, 2019, 374(1): 249–258.
- [17] Wang XL, Yan MH, Fujioka H, et al. LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(9): 1931–1944.
- [18] Su YG, Qi X. Inhibition of excessive mitochondrial fission reduced aberrant autophagy and neuronal damage caused by LRRK2 G2019S mutation[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(22): 4545–4561.
- [19] Nguyen APT, Moore DJ. Understanding the GTPase activity of LRRK2: regulation, function, and neurotoxicity[J]. Adv Neurobiol, 2017, 14: 71–88.
- [20] Liu HF, Ho PWL, Leung CT, et al. Aberrant mitochondrial morphology and function associated with impaired mitophagy and DNM1L-MAPK/ERK signaling are found in aged mutant Parkinsonian LRRK2R1441G mice[J]. Autophagy, 2021, 17(10): 3196–3220.

(责任编辑:周一青)