

# 线粒体电压依赖性阴离子通道及其调控功能

汤新慧<sup>1,2</sup> 高静<sup>1\*</sup> 徐强<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 南京大学医学院药物研究所, 南京 210093; <sup>2</sup> 盐城师范学院生物系, 盐城 224002;

<sup>3</sup> 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京 210093)

**摘要** 电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)是存在于线粒体外膜上的 31 kDa 膜蛋白, 能在膜上形成亲水性通道, 调控阴离子、阳离子、ATP 以及其他代谢物进出线粒体, 在调节细胞代谢、维持胞内钙稳态, 调节细胞凋亡和坏死等过程中发挥重要功能。现就 VDAC 的结构、特性、活性调节及对细胞功能的调控作一综述。

**关键词** 线粒体; 电压依赖性阴离子通道; 钙稳态; 凋亡和坏死

近来发现, 线粒体不仅控制机体的能量代谢, 而且在维持细胞钙稳态、调节细胞凋亡或坏死等过程中起着决定性作用<sup>[1]</sup>。线粒体外膜作为线粒体与胞浆的分界结构, 已成为线粒体与胞浆之间物质交换的屏障以及细胞内化学或电生理信号的作用位点, 因而在调节线粒体代谢、遗传及与细胞的其他部分之间复杂的相互关系中起着关键作用<sup>[2]</sup>。尤其是线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)控制着离子和代谢物的转运, 影响一些生理及病理过程, 已引起重视。

VDAC 于 1975 年首次被发现, 它是存在于线粒体外膜上的 31 kDa 膜蛋白, 能在膜上形成亲水性电压门控通道。作为一种转运阴离子、阳离子、ATP 以及其他代谢物进出线粒体的通道蛋白, 它通过与  $\text{Ca}^{2+}$ 、ATP、谷氨酸(Glu)、NADH 以及不同蛋白质相互作用, 调节着线粒体外膜的通透性, 从而控制着线粒体的功能, 在维持线粒体及细胞活性方面发挥重要功能<sup>[3]</sup>。VDAC 研究的一个重大进展是认识到 VDAC 参与调控细胞生存和死亡。

## 1 VDAC 结构

已有学者从植物、动物、真菌、原生生物中分离到 VDAC 基因。发现许多物种均含有多种 VDAC 基因, 除存在一种功能上高度保守的原型 VDAC(VDAC1)外, 还存在 VDAC 的异构体, 标志着 VDAC 功能和靶向的多样性。已发现酵母只有 1 种表型, 但高等的真核生物中却表达出多种表型, 人类、鼠、兔等均有 3 种 VDAC<sup>[4, 5]</sup>。对人类 VDAC 基因编码的异构体进行波谱分析, 发现人类 3 种

VDAC 的同源性为 75%~94%。VDAC 的保守性并不体现在其一级结构, 而取决于二级结构<sup>[6]</sup>。VDAC 的氨基酸链以极性、非极性交替排列为  $\beta$  折叠方式, 从而将孔道内部极性环境与非极性的膜区域分开, 此时, 带电基团埋藏在亲水性孔道的内部。对 VDAC 氨基酸序列的计算机模拟认为 VDAC 跨膜部分可由 1 个  $\alpha$  螺旋和 13、16 或 19 个  $\beta$  折叠所组成。然而 VDAC 拓扑学研究则表明<sup>[7]</sup>, VDAC 由 1 个  $\alpha$  螺旋和 13 个  $\beta$  折叠所组成, 这些  $\beta$  折叠由几段分布在膜两侧的不同长度的肽段相连。

## 2 VDAC 特性

VDAC 具单通道传导性、选择性、电压依赖性, 而且这些性质在所有真核生物中都是高度保守的。

将分离纯化的 VDAC 重新组装到人工双层脂质膜中, 运用膜片钳进行研究, 发现随着跨膜电压的改变, 其传导性和离子选择性发生改变。在低电压(低于 30 mV)时, VDAC 直径约为 4 nm, 此时, VDAC 处于高传导状态, 为阴离子选择性, 对小离子及大的阴离子如 ATP、Glu 等通透; 而当跨膜电压高于 30 mV 时, VDAC 直径减少为 2 nm, 此时, VDAC 处于阳离子选择性的低传导状态, 只允许小离子通过, ATP 等的流动被阻断。电压依赖性传导性的变化自然伴随着 VDAC 结构的变化, 但到目前为止, VDAC 结构改变的本质尚不清楚。不同实验

收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-11-26

\* 通讯作者。Tel: 025-83593374, Fax: 025-83686559, E-mail:

jinggao@nju.edu.cn

结果均提示,在电压门控过程中,一带正电荷的环移动至孔道表面<sup>[8]</sup>。高分子化合物,如葡聚糖,不能透过此孔,但可增加VDAC的电压敏感性。在葡聚糖存在时,即使在低电压(10 mV)条件下,VDAC也呈低传导、阳离子选择性。据推测,这是由内外膜接触点处两膜电压的偶联造成的<sup>[9]</sup>。

在分离的线粒体中,内外膜间隙的酶,如腺苷酸激酶,在VDAC抑制剂Konig's多聚阴离子的影响下,不能接近外部的腺苷酸,从而使得孔道呈低传导状态<sup>[9]</sup>。大多数VDAC处于低通透性状态,即通道关闭时,VDAC的带电基团发生移动,在内部形成一个较小的通道,允许阳离子通透<sup>[6]</sup>,此时,VDAC对ATP、ADP及其他阴离子代谢物不通透。

VDAC的上述门控特性为其调控线粒体代谢物的转运提供了物质基础。在特定情况下,此通道可被完全或几乎完全关闭。而一般情况下,此门控通道直径比高通透开放状态要小,只为高通透开放时的50%~60%左右,且选择性不同,只对阳离子通透。而在高通透性状态,即开放状态时,VDAC对阴离子通透,此特性对于VDAC作为代谢物的通道来说非常重要,因为线粒体的代谢物(ATP、ADP、Glu等)基本都是阴离子。

### 3 VDAC活性的调节

许多证据表明,线粒体外膜上VDAC的活性可能受到体内多种因素的影响。

#### 3.1 不通透的高分子化合物

线粒体内不通透的高分子化合物的存在有利于VDAC低通透状态的维持。这些不通透的高分子化合物因其与环境中的相反电性的离子之间的相互作用促进孔道管腔的缩小,有利于通道的关闭。已观察到加入非电解质聚合物葡聚糖等,显著抑制线粒体外膜对ADP的通透性<sup>[10]</sup>。

#### 3.2 小分子化合物

一些小分子影响着VDAC的门控过程。将分离纯化的VDAC组装入脂质膜,发现VDAC具ATP结合位点,ATP通过与VDAC的结合,调节VDAC的活性<sup>[11]</sup>。近来,有学者使用ATP类似物[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]BzATP,发现VDAC上存在2个ATP结合位点,并且发现了VDAC的核苷酸结合位点在其N端。ATP和ADP通过对VDAC胞浆面和线粒体面的两个结合位点的相互作用控制VDAC通道的状态,从而调节细胞的能量供应。

Glu也能调节VDAC的活性<sup>[12]</sup>。低浓度Glu能电压依赖性促进VDAC的关闭。在低电压条件下,Glu可部分甚至完全抑制VDAC的长时程、高传导开放。另外,在多种核苷酸和环核苷酸中,只有NADH和Mg<sup>2+</sup>-NADPH影响VDAC的门控特性。NADH能引起分离的线粒体外膜对ADP的通透性急剧降低<sup>[13]</sup>。

#### 3.3 阳离子

有证据表明哺乳类VDAC1分子上具Ca<sup>2+</sup>结合位点:(1)La<sup>3+</sup>、Tb<sup>3+</sup>能取代Ca<sup>2+</sup>,结合到钙结合蛋白上,引起通道关闭<sup>[14]</sup>;(2)钌红(Ruthenium Red, RuR)能专一性作用于一些钙结合蛋白<sup>[14]</sup>,时间依赖性地引起VDAC关闭,并将VDAC稳定在完全关闭的状态。Ca<sup>2+</sup>可拮抗RuR的抑制作用;(3)Ca<sup>2+</sup>的结合引起VDAC电泳的迁移。

EGTA不能重新打开La<sup>3+</sup>关闭的VDAC,推测La<sup>3+</sup>可能结合于孔道内的某个部位,说明VDAC存在着一个或多个阳离子的结合位点。此外,Al(OH)<sub>3</sub>对VDAC呈电压依赖性影响,也表明VDAC上存在2个金属离子结合位点。

#### 3.4 胞浆及线粒体蛋白

许多蛋白质可影响VDAC的开放、关闭,它们大多位于线粒体内或到达线粒体内与VDAC相互作用,发挥其调节功能。不同物种(哺乳类、真菌、高等植物)线粒体内的这些调节成分是高度保守的。已知VDAC具有己糖激酶(hexokinase, HK)和肌酸激酶(creatine kinase, CK)结合位点,还能与苯二氮卓受体等形成复合物。ANT和细胞色素c(cyt c)也能与VDAC结合。近来还发现,VDAC可与Bcl-2家族蛋白相互作用而受到调节。研究发现,Bax和Bak可直接与VDAC结合,加速VDAC的开放;Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>与VDAC连接后促使VDAC关闭,但Bik和Bid则不影响其活性。即抗凋亡因子关闭VDAC,而促凋亡因子开放VDAC<sup>[15,16]</sup>。当多种因素存在时,VDAC最终的门控特性将取决于各因素之间的竞争或协同。

### 4 VDAC与细胞内钙信号

线粒体功能和细胞钙信号之间存在相互影响<sup>[17]</sup>。大量证据表明,线粒体Ca<sup>2+</sup>转运既可影响线粒体基质内Ca<sup>2+</sup>敏感代谢酶的活性,调控线粒体能量代谢,也可通过摄取或释放Ca<sup>2+</sup>而调控胞内的Ca<sup>2+</sup>浓度。而在线粒体代谢功能紊乱、凋亡、癌

变以及缺血性细胞损伤过程中, 往往伴随着线粒体钙浓度的改变<sup>[1]</sup>。

内质网和线粒体都是维持胞内钙稳态的钙库。已发现, 过度表达 VDAC-GFP, 可允许  $\text{Ca}^{2+}$  从内质网释放后, 快速扩散到线粒体内, 增加线粒体基质中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度<sup>[18]</sup>。将  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  包裹在构建的 VDAC 脂质体中, 可测得脂质体中  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  迅速释放到无钙基质中, 表明 VDAC 为线粒体外膜上提供了  $\text{Ca}^{2+}$  释出线粒体的通道。因此 VDAC 作为  $\text{Ca}^{2+}$  进出线粒体的通道, 在钙稳态维持和细胞活性调节中起关键作用。

## 5 VDAC与细胞死亡

线粒体可释放 cyt c 等蛋白质, 诱导细胞凋亡或坏死<sup>[19]</sup>。cyt c 等的释放引起线粒体呼吸链抑制、膜电位丧失、糖酵解终止, 最终导致细胞坏死。cyt c 也可以激活 caspases, 引起瀑布式反应<sup>[20]</sup>, 诱导细胞凋亡。无论是坏死还是凋亡, 都是由 cyt c 等从线粒体内外膜间隙中释放出来引起的, 这提示我们, 线粒体外膜通透性增加是细胞死亡的关键步骤。线粒体外膜形成 VDAC-Bax 通道或 Bcl-2 家族蛋白单通道均可诱导凋亡<sup>[21,22]</sup>。事实上, VDAC 以两种主要的方式调控线粒体介导的细胞死亡: 一是作为线粒体通透性转运孔(permeability transition pore, PTP)主要组成成分调控细胞死亡; 另一是与 Bcl-2 家族蛋白相互作用调控细胞死亡(图 1)。

### 5.1 VDAC 参与 PTP 介导的细胞死亡

PTP 是一种在线粒体内外膜之间连接部位形成的多聚蛋白质复合体组成的孔道结构, 主要由位于线粒体外膜的 VDAC、内膜的 ANT 以及其他蛋白质

组成。其中, VDAC 作为其重要组成成分决定着 PTP 开放状态。现普遍认为 PTP 的高通透性开放是引发细胞死亡, 尤其是凋亡的关键<sup>[23]</sup>。生理条件下, PTP 呈低通透性、可逆地开放(直径为  $0.2\sim 0.3\ \mu\text{m}$ ), 而在病理条件下, PTP 呈高通透性开放状态(直径为  $1.6\sim 2.8\ \mu\text{m}$ ), 引起线粒体肿胀、膜电位下降以及 cyt c 等的释放, 最终导致细胞凋亡或坏死<sup>[1]</sup>。而 VDAC 作为线粒体 PTP 的主要成分, 成为启动线粒体介导的细胞死亡的重要因素。

当 VDAC 基因被剔除, 无论是分离的酵母线粒体还是酵母细胞均不能诱发线粒体膜电位下降及 cyt c 的释放, 但注射人类 VDAC1 后, 可逆转<sup>[24]</sup>。近来发现, VDAC1 抗体能抑制脂质体中 VDAC 的活性。在分离的线粒体中, 抗体能阻断  $\text{Ca}^{2+}$  诱发的 cyt c 的释放和线粒体膜电位下降, 说明 VDAC 对于线粒体膜的通透性转移也是必需的。

### 5.2 VDAC 与 Bcl-2 家族蛋白的相互作用

VDAC 在凋亡中的重要作用源于人们发现 Bcl- $X_L$ 、Bax、Bak 等 Bcl-2 家族蛋白能直接与 VDAC 发生相互作用。体外构建脂质体的电生理研究发现, 抗凋亡蛋白 Bcl- $X_L$  关闭 VDAC; 凋亡蛋白 Bax(或 Bak) 则与 VDAC 形成一个巨大孔道, 允许一些蛋白质(包括 cyt c 等)通透。当 VDAC 基因被剔除, 无论是分离的酵母线粒体还是酵母细胞均不能由 Bax(或 Bak) 引起 cyt c 的释放, 但当注射人类 VDAC1 后此释放过程可重新诱导产生<sup>[24]</sup>, 说明 VDAC 对于 Bax(或 Bak) 引起的 cyt c 释放是必需的。

近来, 使用 VDAC 抗体, 发现 VDAC 在哺乳细胞凋亡中起重要作用。两种人类的 VDAC 抗体, 它们均能抑制脂质体中 VDAC 的活性。在分离的线粒体中, 这些抗体能阻断 Bax(或 Bak) 诱导的 cyt c 的释放, 而此时并不伴随线粒体膜电位和线粒体肿胀度的改变, 表明 VDAC 参与了 Bax 引起的 cyt c 释放。把抗体微注射入细胞, 同样可抑制由注射重组 Bax 所诱导的 cyt c 的释放。

由此看来, VDAC 作为线粒体外膜的一种重要蛋白质, 在调节细胞代谢、维持胞内钙稳态及调控细胞死亡中均发挥了重要作用。可以预测, VDAC 可能将成为筛选有关药物的新靶点。

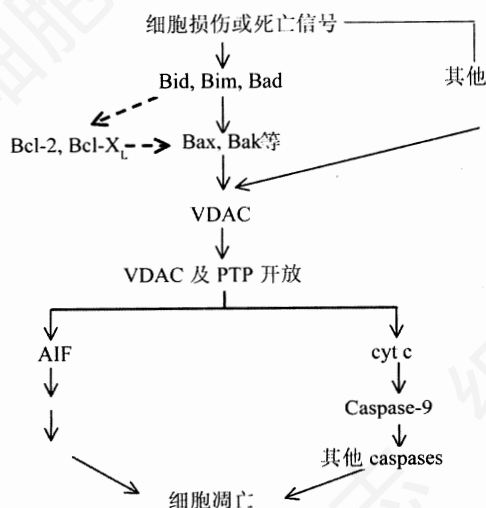


图 1 VDAC 介导的细胞凋亡示意图

### 参考文献 (References)

- [1] Newmeyer DD *et al. Cell*, 2003, **112**: 481
- [2] Bay DC *et al. Biochem Cell Biol*, 2002, **80**: 551
- [3] Shoshan-Barmatz V *et al. Cell Biochem Biophys*, 2003, **39**: 279

- [4] Cesar Mde C *et al. Arch Biochem Biophys*, 2004, **422**: 191
- [5] Liberatori S *et al. Proteomics*, 2004, **4**: 1335
- [6] Colombini M. *Mol Cell Biochem*, 2004, **256/257**: 107
- [7] Song J *et al. J Biol Chem*, 1998, **273**: 24406
- [8] Song J *et al. Biophys J*, 1998, **74**: 2926
- [9] Vyssokikh M *et al. Mol Cell Biochem*, 2004, **256/257**: 117
- [10] Shimizu S *et al. J Cell Biol*, 2001, **152**: 237
- [11] Rostovtseva TK *et al. Biophys J*, 1998, **74**: 2365
- [12] Gincel D *et al. J Bioenerg Biomembr*, 2004, **36**: 179
- [13] Lee A *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 26724
- [14] Gincel D *et al. Biochem J*, 2001, **358**: 147
- [15] Shimizu S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 3100
- [16] Vander-Heiden MG *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 19414
- [17] Hajnoczky G *et al. Cell Calcium*, 2002, **32**: 363
- [18] Lemasters JJ *et al. J Bioenerg Biomembr*, 1999, **31**: 305
- [19] Lim ML *et al. J Biomed Sci*, 2002, **9**: 488
- [20] 马丽焱. *细胞生物学杂志*, 2004, **26**: 29
- [21] Shimizu S *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 12321
- [22] Adachi M *et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, **287**: G695
- [23] Crompton M *et al. Biochimie*, 2002, **84**: 143
- [24] Shimizu S *et al. Oncogene*, 2000, **19**: 4309

## Mitochondrial VDAC and Its Modulation

Xin-Hui Tang<sup>1,2</sup>, Jing Gao<sup>1\*</sup>, Qiang Xu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Materia Medica, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, China;*

<sup>2</sup>*Department of Biology, Yancheng Teachers College, Yancheng 240002, China;*

<sup>3</sup>*State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China)*

**Abstract** Voltage-dependant anion channel (VDAC), a 31 kDa membrane protein, forms an aqueous channel in the mitochondrial outer membrane. As a protein providing the pathway for transporting anions, cations, ATP and other metabolites into and out of the mitochondria, VDAC plays very important roles in not only the regulation of mitochondrial basic physiological function such as energy transduction, substance metabolism, intracellular calcium homeostasis but cell death. This paper summarizes the recent advances in the research on the structure, characterization, and the regulation of VDAC channel and reviews the physiological relevance of VDAC to calcium homeostasis and mitochondria-mediated necrosis and apoptosis.

**Key words** mitochondria; voltage-dependant anion channel; calcium homeostasis; necrosis and apoptosis

Received: July 30, 2004 Accepted: November 26, 2004

\*Corresponding author. Tel: 86-25-83593374, Fax: 86-25-83686559, E-mail: jinggao@nju.edu.cn