

线粒体在细胞凋亡中的变化与作用

刘丽君 彭建新* 洪华珠 叶雯 乔媛媛

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430079)

摘要 在各种凋亡信号的诱导下, 线粒体会发生显著的结构与功能性的变化, 包括各种促凋亡蛋白(如细胞色素 *c*, 凋亡诱导因子等)的释放, 线粒体膜电位的丢失, 电子传递链的变化, 以及细胞内氧化还原状态的变化; 核转录因子以线粒体为中介也参与了细胞凋亡的调控。线粒体在哺乳动物细胞凋亡中具有核心地位和作用, 昆虫细胞凋亡的研究表明, 线粒体与昆虫细胞凋亡也有密切的关系。线粒体在细胞凋亡中的作用可能具有普遍意义。

关键词 线粒体细胞凋亡和; 促凋亡蛋白; 线粒体通透性转换孔; 转录因子

线粒体是细胞内主要的 ATP 生产中心, 在细胞凋亡、人的衰老、癌症、信号转导的发生过程中起着非常重要的作用。近年来, 线粒体被视为细胞凋亡的关键元件。对线粒体与细胞凋亡之间联系的早期认识来自于 Newmeyer 等^[1]对爪蟾卵细胞提取物的无细胞凋亡体系的研究, 发现卵细胞提取物的线粒体组成可以使游离细胞核的染色体凝集, 提示了线粒体在细胞凋亡中的作用。越来越多的研究表明, 在凋亡信号的刺激下, 线粒体的膜电位会丢失, 线粒体的通透性会发生变化, 各种凋亡因子会从线粒体释放到细胞质中, 它们或激活 caspase, 或独立地破坏核染色质, 从而表现出细胞凋亡的各种形态特征, 即胞质浓缩, DNA 的大规模片段化, 最后细胞膜内陷形成凋亡小体^[2]。弄清线粒体在细胞凋亡中的作用机制, 对于研究细胞凋亡的调控机制具有重要的理论意义, 同时对于开发药物来治疗癌症、老年痴呆症也具有广阔的应用价值和开发前景。

1 促凋亡蛋白因子的释放

1.1 细胞色素 *c*(cytc)的释放

cytc 具有双重功能, 除了参与电子传递外, 在细胞凋亡的启动中, cytc 作为一个凋亡起始因子也起着重要作用。Liu 等^[3]用 HeLa 细胞的离心上清液体系(s-100)来研究 caspase-3 激活及 DNA 的片段化机制, 发现 caspase-3 的激活依赖于 cytc。用星形孢菌素诱导 HeLa 细胞凋亡, 发现凋亡后 HeLa 细胞的细胞质中 cytc 会增加, 说明凋亡过程中 cytc 从线粒体释放到细胞质中。在细胞质中, cytc 与 Apaf-1、

ATP/dATP 结合并发生多聚化从而形成凋亡体, 凋亡体的形成使 Apaf-1 的 CARD 结构域向外暴露, 与同样具有 CARD 结构域的 procaspase-9 相结合, 引起 procaspase-9 的自活化^[4,5], 从而有效的切割和活化下游的效应半胱氨酸蛋白酶——caspase-3, 活化的 caspase-3 切割与激活 DNA 片段化因子(DFF), 将 DFF 切割成分子量分别为 45 kDa 与 40 kDa 的两个亚单位, 小亚基 40 kDa 具有核酸内切酶的活性, 切割核 DNA, 使之产生以核小体 DNA 长度为基数的 DNA 片段^[6]。

cytc 释放导致的后果与细胞类型有关。在有的细胞中, 释放到细胞质中的 cytc 可被利用, 将 caspase 激活, 导致细胞凋亡; 而在有的细胞中存在内源性的 caspase 抑制剂, 释放的 cytc 将无法诱导 caspase 介导的凋亡, 大量的 cytc 的释放引起电子传递链的丢失, 最后细胞向坏死的方向发展^[7]。

1.2 caspase-3 前体(procaspase-3)的释放

在某些细胞的线粒体膜间腔中存在 caspase-3 的前体蛋白, 细胞凋亡的过程中, procaspase-3 会从线粒体释放到细胞质中, 从而导致 caspase 介导的细胞凋亡^[8], 但是 procaspase-3 是在释放之前就被激活了还是进入细胞质后被激活的还未弄清。

1.3 凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)的释放

收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-12-10

国家自然科学基金资助项目(No.30370056)

* 通讯作者。Tel: 027-67862431, Fax: 027-67861497, E-mail:

jianxinpeng@21cn.com

AIF 是一种 57 kDa 的双功能黄素蛋白, 定位于线粒体的双层膜间区, 具有电子供体/受体功能。AIF 的氨基酸序列在人与老鼠之间是保守的, 都定位于 X 染色体上。AIF 与细菌氧化还原酶具有同源性, 但是它的氧化还原酶活性在凋亡过程中并不起作用。

当凋亡被诱导后, AIF 从线粒体中释放出来, 获能后直接进入细胞核内, 独立地将染色质降解为 60 kDa 左右的片段, 引起染色质凝缩与片段化^[9]。有研究表明, AIF 是早期胚胎形态建成的过程中细胞凋亡所必须的。同时也有研究表明 AIF 的重组体能诱导纯化的线粒体中 cytc、caspase-9 的释放。将 AIF 微注射到正常细胞中, 会引起正常细胞的染色质凝集、线粒体膜电位的消失, 以及磷脂酰丝氨酸外露于质膜上^[10], 这些现象是 caspase 的广谱抑制剂所不能抑制的^[9]。以上研究都表明: AIF 是在 cytc 释放的上游阶段起作用, 并且这种作用不依赖于 caspase, 也不依赖于 cytc、Apaf-1、caspase-9 构成的凋亡体。最近有研究发现, 线虫的线粒体上定位有 AIF 的同源性蛋白 WAH-1, 这种蛋白质也具有促凋亡作用, 但是 WAH-1 的促凋亡作用是依赖于 caspase 的^[11]。

1.4 核酸内切酶 G(EndoG)

Li 等^[12]从 Bid 预处理的小鼠肝细胞线粒体上清液中纯化了一种 30 kDa 的核酸内切酶 EndoG, 它可以使细胞核 DNA 产生 200 bp 为基数的 DNA 片段。EndoG 由核基因编码, 在细胞质中翻译, 然后转运到线粒体中。一旦 EndoG 从线粒体膜间区释放, 它可直接诱导 DNA 的片段化。在 DNA 片段化过程中起主要作用的核酸酶 DFF-40 的活化依赖于 caspase-3 对 DFF-45 的切割^[6], 而 EndoG 的活化是不依赖于 caspase 的。AIF 和 EndoG 的发现说明, 除依赖 cytc、Apaf-1 和 caspase-9 形成的凋亡体之外, 线粒体还可启动一条不依赖 caspase 的凋亡途径。细胞凋亡过程中, 除以上几种促凋亡蛋白外, Smac/Diablo 与 Htr2A/Omi 这两种蛋白质也会从线粒体释放到细胞质中, 它们通过抑制 caspase 的抑制因子 IAP 的作用, 从而促使 caspase 的活化^[13]。

在凋亡刺激因子的作用下, 线粒体中的促凋亡蛋白可通过两种方式释放。其一, 由于线粒体内膜两侧渗透压的不平衡导致线粒体基质的膨胀, 引起线粒体通透性的变化; 其二, 外膜上通透性转换孔的形成^[14]。有研究表明, 在凋亡的早期阶段能检测

到 cytc 的释放, 但没有线粒体膜电位的下降, 并且 cytc 的释放能被 caspase 的广谱抑制剂 ZVAD-fmk 所抑制。另外, 由 cytc 激活的 caspase-3 可特意性地切割 Bcl-2, 使其失去对 MPTP 的抑制作用, 从而释放更多的 cytc^[15]。这表明线粒体在细胞凋亡过程中并不是 caspase 活化的诱发剂, 而是 caspase 活化的放大器^[13]。

2 线粒体通透性转换孔的结构与作用

线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是一种调控机构, 能造成线粒体跨膜电位 $\Delta\Psi$ 的降低, 线粒体内 Ca^{2+} 减少和内部产生自由基减少, 使细胞维持正常的生理功能。但一旦失去基质代谢物、线粒体膨胀或其他细胞器损伤后将长期开放, 对线粒体和细胞有害^[16]。

MPTP 是由内膜上的蛋白质 ANT(adenine nucleotide translocase)、亲环素 D(cyclophilinD)及外膜上的孔蛋白电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)构成^[17]。正常的细胞中, 这 3 种蛋白质在线粒体内外膜交接处协同作用构成一个仅让不超过 1.5 kDa 的分子可通过的通道, 并且抗凋亡家族成员 Bcl-2 与 Bcl-xl 直接与 VDAC 结合, 抑制 VDAC 的开放, 从而形成正常的离子通道, 促进了线粒体基质中质子的外流, 以及 ATP/ADP 在线粒体与细胞质之间的交换, 维持了线粒体正常的生理功能^[18]。当细胞凋亡时, MPTP 能将 Bax 蛋白集中到自身周围, 使形成的通道孔径更大^[16,17], 这个非选择性通道的持续开放使跨内膜的 H^+ 梯度消失并使呼吸链解偶联。更重要的是, MPTP 开放导致基质的高渗性引起的线粒体的异常调节。由于线粒体内膜具有多次折叠的嵴结构, 所以它具有比外膜更大的表面积, 因此基质体积的膨胀最终会引起外膜的破坏, 导致促凋亡蛋白从线粒体向细胞质释放^[7]。

MPTP 的抑制因子, 包括环孢菌素(能与亲环素相连, 与 ANT 相关)、米酵母酸(能抑制 ANT), 都能抑制体系的凋亡。其他直接影响 MPTP 的刺激因子, 如氧化剂、细胞质中 Ca^{2+} 的病理性增加, 都能引起线粒体外膜的破坏以及促凋亡蛋白的释放。因此, MPTP 在细胞凋亡中具有重要作用^[17]。

3 核转录因子以线粒体为中介对细胞凋亡的调节

在凋亡信号分子作用下, 核转录因子对于线粒

体已不再是一种陌生的因子。转录因子 TR3、p53 在亚细胞上的重新定位将线粒体的凋亡调控通路提高到一个新的水平。正常情况下, 转录因子 p53、TR3 都定位于细胞核, 在凋亡诱导因子的作用下, TR3、p53 会过量表达, 从细胞核释放出来, 定位于线粒体, 并引起线粒体通透性的改变, 使各种促凋亡蛋白(cytc、AIF、procaspase-3、caspase-9)释放到细胞质中^[19]。

在体外, 重组后的 TR3 加到纯化的线粒体中会引起线粒体中 cytc 的释放, 这表明 TR3 定位于线粒体并引起线粒体通透性的改变并不需要其他蛋白质的参与。同时有研究证明了能抑制通透性转换孔形成的环孢菌素 A 可抑制 TR3 对线粒体通透性的改变, 那么定位于线粒体膜上的环孢菌素 A 的抑制效应因子是否就是 TR3 在线粒体上的受体蛋白呢, 这点还有待于进一步的证明^[19]。另外, 转录因子 TR3 通过与 Bcl-2、Bcl-x1 氨基末端的环结构(抗凋亡活性部位)相互作用, 同时具促凋亡功能的 BH3 结构域外露, 使 Bcl-2、Bcl-x1 从抗凋亡的构型转变为促凋亡的构型, 从而促进凋亡的发生^[20]。

转录因子 p53 又是一种肿瘤坏死因子, 在肿瘤细胞的凋亡过程中起着非常重要的调节作用。细胞凋亡时, p53 在 MDM2(一种泛素 E3)的泛素化作用下, 部分氨基酸残基降解, 使得 p53 出核, 然后与线粒体上的热休克蛋白 HSP60、HSP70 结合并定位于线粒体^[21]。研究发现编码 p53 的第 72 位密码子的突变会影响 p53 的出核以及在线粒体上的定位, Arg72 比 Pro72 更易被 MDM2 泛素化降解, 并且与 Hsp60、Hsp70 有更强的结合力^[21]。定位于线粒体上的 p53 能与 Bak、Bax 直接相互作用, 这种相互作用解除了 Bak 与 Mcl-1(Bcl-2 蛋白家族中的抗凋亡蛋白)的结合, 使 Bak 中的 BH3 结构域外露, 从而处于促凋亡的结构构象^[22]; 此外, 这种相互作用还引起 Bak、Bax 多聚化, 这一系列的变化导致线粒体通透性的改变, 使各种促凋亡因子释放到细胞质中^[23]。

4 昆虫细胞凋亡过程中线粒体的变化和作用

昆虫是自然界最大的生物类群, 线粒体在昆虫细胞凋亡中的变化和作用亦引起注重。Sahdev 等^[24]在研究 p35 抑制氧化剂诱导昆虫细胞凋亡的过程中, 发现紫外线诱导 Sf9 细胞凋亡时, 也会出现 cytc 的释放及 caspase 的激活。实验证明了只有细胞在被 UV 诱导凋亡之前有 p35 的表达, 才会抑制 cytc 的

释放及 caspase 的激活。在果蝇 BG2 细胞的凋亡过程中, 没有检测到 cytc 的释放, 但是 caspase 的起始因子 Dronc 与 caspase 的效应因子 Drice 能在线粒体的附近形成 700 kDa 大小的复合物, 这种复合物类似于哺乳动物中的凋亡体, 并且在 BG2 细胞的 S-100 提取物中加入 cytc 可加快这种复合物的形成。另外, 在果蝇的 SL-2 细胞凋亡过程中可检测到 cytc 的释放, 在果蝇卵细胞凋亡过程中可检测到线粒体中 cytc 结构的变化^[25]。这表明线粒体在昆虫细胞凋亡中也具有重要作用。

5 小结

综上所述, 线粒体在细胞凋亡中起着主开关作用。虽然对细胞凋亡的线粒体途径的研究在最近 5~10 年间取得了重大进展, 但还有一些问题待解决, 如线粒体中各种促凋亡蛋白释放的精密调控机制, 以及它们与线粒体功能的丧失(如氧化磷酸化的解偶联, ATP/ADP 转换缺陷等)之间有什么关系等。另外, 虽然线粒体在细胞凋亡中的作用具有普遍性, 但是其调控机制在昆虫细胞与哺乳动物细胞之间存在很大的差异。如昆虫细胞中凋亡体的形成并不一定依赖 cytc, 昆虫细胞凋亡过程中, 其它的促凋亡因子 AIF、EndoG、Smac、Omi 是否也在起作用, 以及这些凋亡因子的释放是否也受到转录因子、Bcl-2 基因家族的调控? 这些问题都有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Newmeyer DD *et al. Cell*, 1994, **79**: 353
- [2] Hengartner MO. *Nature*, 2000, **407**: 770
- [3] Liu X *et al. Cell*, 1996, **86**: 147
- [4] Zou H *et al. Cell*, 1997, **90**: 405
- [5] Jiang X *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 31199
- [6] Liu X *et al. Cell*, 1997, **89**: 175
- [7] Green DR *et al. Science*, 1998, **281**: 1309
- [8] Mancini M *et al. J Cell Biol*, 1998, **140**: 1485
- [9] Susin SA *et al. Nature*, 1999, **397**: 441
- [10] Joza N *et al. Nature*, 2001, **410**: 549
- [11] Wang X *et al. Science*, 2002, **298**: 1587
- [12] Li LY *et al. Nature*, 2001, **412**: 95
- [13] Lassus P *et al. Science*, 2002, **297**: 1352
- [14] Ott M *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 1259
- [15] Gao CF *et al. Exp Cell Res*, 2001, **265**: 145
- [16] Crompton M. *Biochem J*, 1999, **341**: 233
- [17] Shimizu S *et al. Nature*, 1999, **399**: 483
- [18] Vander Helden MG *et al. Nat Cell Biol*, 1999, **1**: E209
- [19] Brenner C *et al. Science*, 2000, **289**: 1150

- [20] Perfettini JL *et al. Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 386
[21] Dumont P *et al. Nat Genet*, 2003, **33**: 357
[22] Leu JI *et al. Nat Cell Biol*, 2004, **6**: 443
[23] Chipuk JE *et al. Science.*, 2004, **303**: 1010
[24] Sahdev S *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **307**: 483
[25] Dorstyn L *et al. J Cell Biol*, 2002, **156**: 1089

Mitochondrial Changes and Role in Apoptosis

Li-Jun Liu, Jian-Xin Peng*, Hua-Zhu Hong, Wen Ye, Yuan-Yuan Qiao
(*Entomology Institute, Central China Normal University, Wuhan 430079, China*)

Abstract Mitochondrion takes place in great changes in structure and function including the release of proapoptotic factors (such as cytochrome *c*, apoptosis inducing factor), loss of mitochondrial transmembrane potential, changes in electron transport, altered cellular oxidation-reduction etc, when cells are induced to undergo apoptosis by apoptotic stimuli. Transcriptional factors involve in the regulation of apoptosis through locating in mitochondrion. Mitochondrion play a role in central function on mammalian cell apoptosis. Recent studies revealed that mitochondrion has close relation with insect cell apoptosis. Mitochondrial function on apoptosis may be of universal significance.

Key words mitochondrion; apoptosis; proapoptotic factor; mitochondrial permeability transition pore; transcriptional factor

Received: July 25, 2004 Accepted: December 10, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370056)

*Corresponding author. Tel: 86-27-67862431, Fax: 86-27-67861497, E-mail: jianxinpeng@21cn.com