

线粒体形态学改变与细胞凋亡

马 泰 朱启星*

(安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 合肥 230032)

摘要 近年来, 对于线粒体形态学以及其在凋亡过程中的改变和作用的研究打破了传统的观点。正常情况下, 线粒体在细胞内相互连接成管网状结构, 并发生着频繁的融合与分裂。融合和分裂由一系列蛋白质介导, 二者之间的动态平衡维持着线粒体的形态和功能。在细胞凋亡的早期, 线粒体融合和分裂失平衡, 导致线粒体管网状结构碎裂和嵴的重构, 这些改变对线粒体随后的变化以及凋亡的发生具有重要的意义。融合和分裂的蛋白质不仅调控线粒体形态和细胞凋亡过程, 也和某些凋亡相关疾病有关。此外, 促凋亡的 Bcl-2 蛋白可能通过改变线粒体的构形来调控凋亡过程。

关键词 细胞凋亡; 线粒体融合与分裂; 线粒体形态学

线粒体在细胞凋亡中居于重要地位。各种凋亡刺激引起的线粒体膜电位下降、膜通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)开放以及细胞色素 c、凋亡诱导因子(AIF)等线粒体蛋白的释放被认为是诱导凋亡发生的重要事件^[1]。一般认为, 凋亡细胞的形态学特征性表现是核固缩和凋亡小体的形成, 线粒体的形态在凋亡的早期可维持正常, 随着凋亡过程的进展可能会出现线粒体肿胀、空泡变等一些非特异性的改变。但近年来, 电子体层成像(electron tomography)和计算机技术在生物学中的发展及应用, 使得人们对线粒体形态有了重新认识。发现在凋亡的很早期线粒体的超微结构就发生了特异性改变, 而且这种改变对于线粒体随后的变化和其他凋亡事件的发生具有重要意义。现就近年来关于细胞凋亡早期线粒体形态学的改变及其意义的研究进展进行综述。

1 对线粒体超微结构的再认识

线粒体是一个由两层膜包裹的细胞器。外膜光滑连续, 结构相对简单; 内膜表面积较大, 高度折叠并向内突出形成嵴。内膜内为基质部分, 双层膜之间为膜间隙。这是人们通过电子显微镜观察得到的线粒体形态结构。50 多年来, 这种描述一直被写进教科书, 认为是线粒体的经典形态。然而, 这种基于二维图像得到的线粒体形态忽视了其在细胞内的立体构形。随着电子体层成像等技术的发展和运用, 这一经典描述已经受到了挑战。

1.1 动态变化的线粒体

研究人员通过对荧光标记的活细胞内的线粒体进行实时观察以及利用三维图像重建技术发现, 线粒体在细胞内并不是孤立和静止的。它们在细胞内彼此高度连接, 形成了一个动态的管网状结构, 并发生着频繁而持续的融合与分裂^[2]。线粒体的形态、数量以及在细胞内的分布也随细胞周期和外环境的改变而发生着不断的变化。例如 G₁ 期细胞线粒体成网络状, 而 S 期则分裂为碎片^[3]。线粒体不断进行着动态的分裂和融合, 这对于发挥线粒体和细胞功能具有重要意义。管网状结构使线粒体成为一个更为高效的能量供应系统, 并有利于信息沟通, 包括膜电位的迅速扩散平衡和线粒体内容物的交换。融合还使线粒体之间可以进行 mtDNA 的交换, 以有效地修复衰老和环境因素导致的 mtDNA 突变^[4]; 线粒体分裂使得细胞内不同区域的线粒体明确分工, 并保证线粒体在细胞分裂过程中平均分配到子代细胞中。总之, 在细胞的生命活动过程中, 线粒体进行着不断的分裂和融合, 二者之间维持着动态平衡, 这对于细胞积极有效地适应环境的改变具有重要意义。

1.2 线粒体的三维结构

线粒体内外两层膜的组织形式也较传统教科书描述的为复杂。三维重构的立体线粒体显示嵴并不

收稿日期: 2006-02-24 接受日期: 2006-06-19

国家自然科学基金资助项目 (No.30471469)

* 通讯作者。Tel/Fax: 0551-2923002, E-mail: zqxing@yeah.net

是内膜随机折叠凹陷形成的,而是具有复杂的拓朴学结构。内膜和嵴不断的发生着变化,嵴形成一个相对独立的结构,和内膜之间是由一狭窄的管状结构相连,这一结构被称为嵴连接(cristae junctions)^[5]。线粒体内膜的这种拓朴学组织形式对于线粒体的功能具有重要意义。根据理论推测和实验证实,线粒体80%以上的细胞色素c贮存于嵴内空间,所以嵴连接实际上是凋亡时细胞色素c动员和释放的中介膜^[6]。

1.3 调控线粒体形态的分子基础——融合和分裂蛋白质

线粒体间的融合和分裂涉及到四层膜,较一般的两个生物膜之间的融合分裂复杂。外膜间和内膜间必须正确的分裂和融合才能保证膜结构的完整性,防止内容物的漏出。因此,可以想象必然有一套精确协调的机制来调控这一过程^[7]。研究表明,线粒体的融合分裂由一系列蛋白质介导。这些蛋白质多属于发动蛋白(dynamin)超家族成员,含GTP酶结构域,并且在生物进化上相对保守。已经发现许多介导线粒体融合和分裂的蛋白质。它们通过调控线粒体的融合和分裂,影响着线粒体的形态和超微结构,并且与细胞凋亡也有密切的联系^[8,9]。

线粒体内膜和嵴形态的调控机制和外膜不同。介导外膜融合和分裂的分子不一定具有调控内膜和嵴的作用,而内膜形态调控蛋白也未必影响融合和

分裂过程。目前人们对于调控线粒体内膜和嵴结构的相关因子了解不多,已知介导线粒体融合的蛋白质OPA-1/Mgm1也参与了内膜和嵴形态的调节^[10]。而最近发现的一种蛋白质mitofilin可以影响内膜和嵴的形态和细胞凋亡,但不影响线粒体融合和分裂过程^[11](表1)^[12-24]。

2 凋亡早期线粒体的形态学改变

2.1 管网状结构碎裂

线粒体在细胞内形成了一个相互之间高度联系的动态管网状结构。而当细胞受到各种凋亡刺激后,在早期线粒体管网状结构出现崩溃,形成点泡状,表现为线粒体数目增多,称为线粒体管网状结构碎裂。线粒体管网状结构碎裂是融合和分裂失衡的结果。通常情况下线粒体融合与分裂速度相当,线粒体的数目与形态保持稳定。如果线粒体分裂过程受到抑制,线粒体的网络化程度就会加强;而当融合过程受阻,线粒体管网状结构会发生碎裂。细胞凋亡时线粒体碎裂的形成可由于分裂机制被激活导致分裂的增加所致,也可由于融合机制被抑制或者二者均存在^[12,13,23]。

线粒体管网状结构碎裂发生于凋亡的很早期,而且在许多刺激引起的细胞凋亡中均发现了这一现象^[25]。用凋亡诱导剂除莠霉素(herbimycin A,一种酪氨酸激酶抑制剂)作用于Colo-205细胞后,进行超

表1 参与线粒体融合和分裂的蛋白质结构、定位及作用

蛋白质		结构特点和定位	作用
人和哺乳动物	酵母		
Drp1	Dnm1	Dynamin 超家族大分子 GTP 酶, 位于胞浆	可在线粒体外膜分裂位点聚集, 介导外膜分裂 ^[12] ; 促进和抑制凋亡 ^[12-14]
hFis1	Fis1(Mdv2)	OMM 整合蛋白	可以招募 Dnm 到分裂点, 介导外膜分裂 ^[15] ; 促进凋亡 ^[13,15]
—	Mdv1 (Fis2/Gag3/Net2)	C 末端含 WD 重复序列	可能作为 Dnm 和 Fis1 的适配蛋白参与 Dnm1 在线粒体外膜分裂处的聚集, 介导外膜分裂 ^[16]
Rab32	—	小分子的 Rab32 家族 GTP 酶, 靠近线粒体	可能以 A 激酶锚定蛋白(AKAP)的形式发挥作用, 介导分裂 ^[17]
EndophilinB1	—	胞浆脂质转移酶	可向 OMM 转位, 介导分裂? ^[18]
BAP31	—	内质网膜整合蛋白, caspase-8 的作用底物	Caspase-8 切割后产生的 p20 片断可以促进线粒体分裂和细胞凋亡 ^[19]
MTP18	—	定位于 OMM	介导分裂, 抑制凋亡 ^[20]
OPA1	Mgm1	IMM, Dynamin 超家族大分子 GTP 酶	介导融合 ^[21] , 调控内膜和嵴形态 ^[10,13] ; 抑制凋亡 ^[13]
Mfn1&Mfn2	Fzo1	OMM, 含 C 端卷曲螺旋的双跨膜大分子 GTP 酶	介导外膜融合 ^[22] ; 抑制凋亡 ^[23]
Ugo1	—	OMM 整合蛋白	介导外膜融合 ^[24]
Mitofilin	—	膜间隙	调控内膜和嵴的形态; 抑制凋亡 ^[11]

OMM: outer mitochondrial membrane, 线粒体外膜; IMM: inner mitochondrial membrane, 线粒体内膜。

微结构分析,发现线粒体数量的增多与线粒体碎裂相符,而线粒体碎裂的发生与其他凋亡现象如凋亡小体的形成、TUNEL 阳性细胞数的增加以及 PARP (caspase 的底物)的切割均相关^[26]。介导线粒体分裂的蛋白质如 Drp-1 的过度表达后线粒体分裂增加,管网状结构出现碎裂,由十字孢碱(staurosporine, STS)所诱导的细胞凋亡也明显增加^[14],而 Drp1 的显性负突变体(dominant-negative mutant)(DrpK38A)或者利用小干扰 RNA(siRNA)沉默 Drp1 基因后,则可以抑制或者延迟线粒体碎裂以及细胞色素 *c* 释放、膜电位的下降和核 DNA 降解等凋亡事件的发生^[12,13]。hFis1 的过度表达能够引起线粒体碎裂和凋亡的发生,沉默 hFis1 基因则可以抑制各种凋亡刺激(STS, 放线菌素 D 或者 Fas 配体)诱导的凋亡发生^[13]。而融合蛋白 Mfn1&Mfn1 表达的下调后,线粒体网状结构消失,细胞对鬼臼毒甙诱导的凋亡敏感性增加^[23]。这些研究均说明线粒体管网状结构碎裂并非凋亡过程中的一个表面现象,而是参与了凋亡的调控。

虽然大多数研究证实,阻止线粒体分裂可抑制线粒体膜电位下降、细胞色素 *c* 的释放以及细胞凋亡的发生,但 Szabadkai 等^[14]的研究认为线粒体分裂在某些情况下也可能会抑制细胞凋亡。Drp-1 的过度表达在诱导线粒体出现碎裂的同时也可以降低线粒体 Ca^{2+} 摄取,因此对神经酰胺、 H_2O_2 和撤血清引起的细胞凋亡表现为抑制作用,因为这些凋亡刺激是 Ca^{2+} 依赖性的。Perfettini 等^[8]认为线粒体分裂是促进还是抑制线粒体外膜通透性增加以及随后的细胞死亡,主要取决于原发的凋亡刺激信号。

2.2 内膜和嵴的重构

细胞凋亡早期线粒体的另一个重要的形态学改变就是线粒体内膜和嵴的重构(cristae remodeling)。Scorrano 等^[6]用促凋亡蛋白 Bid 的活性形式——截短型 Bid(truncated Bid, tBid)处理小鼠肝脏线粒体,借助于电子体层摄影和三维重构技术观察在处理前线粒体内膜和嵴的形态发生的一系列连续改变。正常的内膜和嵴构形(Class I)在 tBid 处理后 2 min 内发生重构:嵴接头处增大并开放,单个的嵴发生融合并互相连接形成嵴网络;内膜由凸向基质侧变为凹向基质侧,使得基质空间增大,但线粒体外膜完整,无肿胀(Class II)。这种改变在处理 5 min 达到高峰,随时间推移,线粒体内出现不对称现象,部分区域的嵴消失,外膜开始破裂(Class III)。最

后,外膜完全破裂,线粒体出现肿胀。Class II 被认为是凋亡早期线粒体内膜和嵴的典型构形,细胞在受到各种凋亡刺激后,均出现线粒体的形态由 Class I 向 Class II 的转变。

OPA1 作为一种抗凋亡蛋白在调控线粒体内膜结构上发挥重要作用。利用 siRNA 下调 OPA1,则导致线粒体嵴形态的改变,以及罕见的囊泡样结构形成。这种改变和细胞色素 *c* 的释放以及随后的凋亡发生相关^[10]。Mitofilin 是最近发现的调控线粒体内膜和嵴形态的分子。John 等^[11]研究表明在 mitofilin 下调后,线粒体内膜重构,表现为内外膜比例增大,嵴消失,同时线粒体活性氧产生增加,细胞增殖下降、凋亡增加。

线粒体内膜和嵴的重构对于促进凋亡时细胞色素 *c* 的完全释放具有重要意义。由于线粒体 80% 以上的细胞色素 *c* 贮存于嵴内空间,只有不到 20% 的位于膜间隙内,因此要保证细胞凋亡时线粒体有足够的细胞色素 *c* 释放,嵴内空间的细胞色素 *c* 需要先经嵴连接至膜间隙,然后再释放入胞浆。Scorrano 等^[6]证实, tBid 在改变内膜和嵴形态的同时也使得细胞色素 *c* 在凋亡的较早期从嵴内释放到膜间隙,促进细胞色素 *c* 的最大化释放。

3 Bcl-2 家族蛋白与线粒体形态学改变

Bcl-2 家族蛋白主要通过作用于线粒体来调控细胞凋亡过程。包括促凋亡的(如 Bax、Bak、Bad、Bid、Bim 等)和抑制凋亡的(如 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、Mcl-1 等)两大类。所有 Bcl-2 家族成员均含有 1 个或多个 Bcl-2 同源结构域(BH1、BH2、BH3 和 BH4)。近年研究提示某些促凋亡 Bcl-2 蛋白似乎首先影响到线粒体的形态,然后再引起细胞色素 *c* 释放等改变。已知在凋亡被诱导后, Bax 会向线粒体外膜转位,和 Bak 在线粒体外膜形成 Bax/Bak 聚集灶(foci)^[27],引起细胞色素 *c* 释放和细胞凋亡。Frank 等^[12]发现 Bax 过度表达的细胞线粒体会自发发生碎裂,并对十字孢碱诱导的线粒体碎裂的敏感性增加。而当其 BH3 区域突变后这一促进作用消失。Bak 可能通过与融合和分裂的蛋白质相互作用干扰线粒体的融合和分裂过程,从而改变线粒体的形态。Karbowski 等^[28]发现 Bax/Bak 聚集灶的形成伴随着线粒体管网状结构的破坏和融合过程的抑制,而且该聚集灶总是位于线粒体外膜分裂的部位^[29],而 Drp1 介导的线粒体分裂正是通过在外膜分裂点的聚集实

现的。Lee 等^[13]认为 Drp1 可能在 Bax 的线粒体转位和细胞色素 *c* 释放之间的环节发挥凋亡调控作用。而 hFis1 似乎在 Bax 向线粒体转位之前发挥作用。

Bid 是仅含 BH3 结构域的促凋亡 Bcl-2 蛋白。Caspase-8 激活后作用于 Bid 形成有活性的 tBid。tBid 迁移到线粒体内, 促使包括细胞色素 *c* 在内的线粒体蛋白的释放。Scorrano 等^[6]证实 tBid 呈剂量和时间依赖性地诱导线粒体释放细胞色素 *c*。同时 tBid 也使内膜和嵴的形态重构, 正是这种构形的改变在某种程度上打开了嵴连接, 使得细胞色素 *c* 从嵴内空间被动员至膜间隙并释放入胞浆, 启动了 caspase 的级联激活。tBid 导致内膜重构机制尚不明确。Bid 与内膜上心磷脂的相互作用在其中可能发挥了作用^[30], 但 tBid 似乎不依赖于和 Bax 样蛋白的相互作用来重构线粒体。另外, 环孢霉素 A 可抑制 tBid 引起的内膜重构和细胞色素 *c* 的动员, 使细胞色素 *c* 释放大为减少。

4 小结与展望

电子体层成像技术的应用为人们展示了一个三维动态的线粒体, 而对其形态变化的分子基础的研究使人们认识到线粒体鲜为人知的一面, 进一步提升了线粒体在细胞凋亡中的地位。细胞受到凋亡刺激后形态的改变可能是线粒体整合凋亡信号后做出的第一反应。已知这种改变直接影响随后的线粒体膜电位下降和细胞色素 *c* 的释放等凋亡事件, 但具体机制尚不清楚。另外, 线粒体形态学改变不仅在凋亡中具有重要意义, 在凋亡相关疾病中也存在线粒体形态调控的异常。遗传性显性视神经萎缩 (dominant optic atrophy, DOA) 是一种显性遗传疾病, 研究发现其与 *OPA1* 基因的突变密切相关^[31]。在另外一种遗传性神经系统疾病——遗传性运动感觉神经病 (Charcot-Marie-Tooth neuropathy, CMT) 患者中

也存在 *Mfn2* 基因的突变^[32]。这些发现提示线粒体形态调控的异常与发育过程中神经细胞的异常丢失有关。深入阐明这些蛋白质与凋亡相关疾病的关系对于明确其发病机制并探讨治疗靶点具有深远的意义。

参考文献 (References)

- [1] Desagher S *et al. Trends Cell Biol*, 2000, **10**: 369
- [2] Bereiter-Hahn J *et al. Microsc Res Tech*, 1994, **27**: 198
- [3] Margineantu DH *et al. Mitochondrion*, 2002, **1**: 425
- [4] Nakada K *et al. Nat Med*, 2001, **7**: 934
- [5] Frey TG *et al. Trends Biochem Sci*, 2000, **25**: 319
- [6] Scorrano L *et al. Dev Cell*, 2002, **2**: 55
- [7] Pfanner N *et al. Science*, 2004, **305**: 1723
- [8] Perfettini JL *et al. Trends Cell Biol*, 2005, **15**: 179
- [9] Okamoto K *et al. Annu Rev Genet*, 2005, **39**: 503
- [10] Olichon A *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 7743
- [11] John GB *et al. Mol Biol Cell*, 2005, **16**: 1543
- [12] Frank S *et al. Dev Cell*, 2001, **1**: 515
- [13] Lee YJ *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 5001
- [14] Szabadkai G *et al. Mol Cell*, 2004, **16**: 59
- [15] James DI *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 36373
- [16] Tieu Q *et al. J Cell Biol*, 2000, **151**: 353
- [17] Alto NM *et al. J Cell Biol*, 2002, **158**: 659
- [18] Karbowski M *et al. J Cell Biol*, 2004, **166**: 1027
- [19] Breckenridge DG *et al. J Cell Biol*, 2003, **160**: 1115
- [20] Tondera D *et al. J Cell Sci*, 2005, **118**: 3049
- [21] Wong ED *et al. J Cell Biol*, 2000, **151**: 341
- [22] Hermann GJ *et al. J Cell Biol*, 1998, **143**: 359
- [23] Sugioka R *et al. J Biol Chem*, 2004, **279**: 52726
- [24] Sasaki H *et al. J Cell Biol*, 2001, **152**: 1123
- [25] Karbowski M *et al. Cell Death Differ*, 2003, **10**: 870
- [26] Mancini M *et al. J Cell Biol*, 1997, **138**: 449
- [27] Nechushtan A *et al. J Cell Biol*, 2001, **153**: 1265
- [28] Karbowski M *et al. J Cell Biol*, 2002, **159**: 931
- [29] Karbowski M *et al. J Cell Biol*, 2004, **164**: 493
- [30] Kim TH *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 3061
- [31] Delettre C *et al. Nat Genet*, 2000, **26**: 207
- [32] Zuchner S *et al. Nat Genet*, 2004, **36**: 449

Dynamics of Mitochondrial Morphology in Apoptosis

Tai Ma, Qi-Xing Zhu*

(Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract Mitochondria play an important role in apoptosis by integrating intrinsic and extrinsic apoptotic signals and releasing cytochrome *c* to initiate caspase cascade. In traditional opinions, there are no changes or nonspecific changes of mitochondrial morphology in early stage of apoptosis. With the discovery of frequent mitochondria fusion and fission in living cells and application of electron tomography plus 3D imaging in cell biology, concept has been renewed in recent years. Mitochondria in cell form a highly interconnected dynamic tubular network and undergo frequent fusion and fission mediated by series of molecules called fusion-fission proteins. The dynamic balance between fusion and fission maintains mitochondrial morphology and function. Once apoptosis is triggered and the balance is perturbed, mitochondrial tubular network will shift to fragmentation and the cristae will become remodeling. These changes are essential for downstream events of apoptosis including cytochrome *c* release and caspase cascade. Fusion-fission proteins influence the course of apoptosis via controlling mitochondrial morphology and ultrastructure, and may be responsible for apoptosis related disease, such as dominant optic atrophy (DOA) and Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT). On the other hand, apoptosis-regulating molecules such as Bcl-2 family members can also impact mitochondrial morphology. All these evidences imply significance of mitochondrial morphology in apoptosis and promote mitochondria to a higher position in cell survival and death.

Key words apoptosis; mitochondrial fusion and fission; mitochondrial morphology

Received: February 24, 2006 Accepted: June 19, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471469)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-551-2923002, E-mail: zqxing@yeah.net