

线粒体自噬的研究进展

刘丹慧 吕建新*

(温州医学院细胞与分子医学研究所, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 由于线粒体在生物氧化和能量转换过程中会产生活性氧, 线粒体 DNA 又比核 DNA 更容易发生突变, 因此线粒体是一种比较容易受到损伤的细胞器。及时清除细胞内受损的线粒体对细胞维持正常的状态具有重要的作用。细胞主要通过自噬来清除损伤线粒体, 维持细胞稳态。越来越多的研究表明, 线粒体自噬是一种特异性的过程, 线粒体通透性孔道通透性的改变在这个过程中起着重要的作用。线粒体自噬在维持细胞内线粒体的正常功能和基因组稳定性上起着重要作用, 但是线粒体发生自噬的信号通路及其调控机制还有待进一步深入研究。

关键词 线粒体损伤; 线粒体自噬; 活性氧

线粒体是真核动物细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所, 细胞生命活动所需能量的 80% 是由线粒体提供的, 因此, 有人将线粒体比喻为细胞的“动力工厂”。虽然线粒体的氧化磷酸化是一个比糖酵解更为高效的产能过程, 但这个过程会伴随着活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生^[1]。过量的 ROS 会引起线粒体损伤, 释放促凋亡因子, 引起细胞死亡^[2]。即使在正常情况下, 一部分线粒体也会因为积累 ROS 损伤而发生损伤。因此, 适时的清除老化和发生损伤的线粒体对于细胞的正常生长具有非常重要的作用。研究发现^[3], 细胞主要通过选择性自噬 (selective autophagy) 通路来进行线粒体的更新。有人将这个选择性的通过自噬来清除线粒体的过程称为线粒体自噬 (mitophagy)^[4]。本文将结合这一领域的最新进展, 对这一信号通路进行综述。

1 自噬简介

早在 1962 年, Ashford 等^[5]就在胰高血糖素处理的小鼠肝细胞中观察到了细胞自噬 (autophagy) 现象。1963 年, De Duve 在国际溶酶体生物学论坛上首次提出了细胞自噬的生物学概念: 细胞在缺乏营养和能量供应时, 部分细胞质与细胞器被包裹进一种特异性的双层膜或者多层膜结构的自噬体 (autophagosome) 中, 形成的自噬体再与溶酶体融合形成自噬溶酶体 (autolysosome), 胞质和细胞器成分在这里被降解为核苷酸、氨基酸、游离脂肪酸等小分子物质, 这些小分子物质可以被重新利用合成大分子或者合成 ATP^[6]。自噬作为细胞生存的一种机制, 在很多生理过程如清除损伤、衰老细胞器以及冗余蛋白上发挥着重要作

用^[7]。除营养和能量缺乏外, 氧化应激、感染以及蛋白质大量聚集等因素也可以诱导细胞发生自噬^[8]。通过自噬, 细胞可以在饥饿条件下存活数天甚至数周。但是过度激活的自噬会引起细胞发生程序性死亡, 这种细胞死亡方式被定义为 II 型细胞程序性死亡, 以电镜下出现大量双层膜结构的自噬体为形态学特征^[9]。

2 自噬的分子机制及调节

自噬的生理过程包括以下几个步骤: 信号刺激、自噬泡的形成、自噬泡与溶酶体融合、内容物的降解以及降解产物的释放。在细胞的正常生理活动中, 自噬维持在一个非常低的水平以保持细胞稳态^[10]。当细胞处于饥饿、营养因子缺乏的环境或者进行结构调整以及降解胞内代谢产物及损伤细胞器的时候, 细胞内的自噬水平会迅速上调, ROS、感染以及蛋白质产物的聚集都是细胞自噬的诱因。

发生自噬时, 细胞内首先形成杯状的自噬泡, 并随后将待自噬物质包裹起来。关于构成自噬泡的膜组分的来源还不清楚。有人认为这些膜组分来源于粗面内质网上的无核糖体区域, 也有人认为这些膜组分是一种新合成的结构, 因为在自噬泡上没有发现高尔基体和内质网的特异标记物^[11]。当吞噬泡特异性或者非特异性的包裹自噬靶标后, 形成双层膜结构的自噬体。然后自噬体与溶酶体发生融合, 并被溶酶体

收稿日期: 2008-05-21 接受日期: 2008-06-25

* 通讯作者。Tel: 0577-86689805, Fax: 0577-86689800, E-mail:

ljx@wzmc.net

内的水解酶降解以供能量产生或者物质再利用^[12]。

虽然人们很早就观察到了自噬现象的存在,但直到20世纪90年代,人们才在酵母中发现并鉴定了二十余种自噬相关基因(autophagy related genes, *Atg*),从而对自噬的分子机制有了一定研究^[13]。酵母的 *Atg* 可以根据功能的不同分成三类:(1)一对泛素样蛋白结合系统,包括 *Atg8* 和 *Atg12*。二者与自噬泡的延伸与形成有关;(2)磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶复合物(*PI3K complex*);(3)一个丝、苏氨酸激酶复合物,包括 *Atg1*、*Atg13* 和 *Atg17*,这个复合物在酵母细胞中与自噬的诱导相关。Young 等^[14]在哺乳动物细胞中鉴定了 *Atg1* 的同源物 *ULK1*。

在自噬泡形成并包裹待降解细胞质和细胞器时, *Atg12-Atg5* 复合物与 *Atg16* 结合,类 E1 酶蛋白 *Atg7* 激活 *Atg12*,形成 *Atg10*,后者是一种类 E2 酶蛋白。然后 *Atg10* 再与 *Atg5* 结合,从而形成自噬前体复合物^[15]。*LC3* 是 *Atg8* 在哺乳动物细胞中的同源蛋白。在哺乳动物中, *LC3* 以前体形式合成,被切割后形成其胞浆形式: *LC3-I*。细胞自噬时, *Atg3* 会切除其 C 端的 22 个氨基酸,从而形成 *LC3-II*,后者与磷脂结合后结合到细胞膜上^[16]。由于 *LC3-II* 只特异性的结合到新合成的自噬体上,因此已成为现在较为有效、应用比较广泛的自噬体标记物^[17]。部分 *LC3-II* 被包裹进自噬体双层膜结构的内侧,自噬体与溶酶体融合后就被降解,而自噬体表面的 *LC3-II* 也会由于与磷脂结合的断裂而与自噬体分离。Mizushima 等^[18]建立了 GFP-*LC3* 转基因小鼠,这样利用 GFP 的荧光特性就可以特异性的对自噬体的形成与发展进行跟踪,大大方便了对自噬分子机制的研究。在自噬溶酶体的形成过程中,一些重要的溶酶体蛋白如 *LAMP-2* 和 *CLN3* 与自噬体和溶酶体的融合密切相关,而组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 和组织蛋白酶 L 是降解内容物的主要执行蛋白^[10]。

细胞自噬是一个受到紧密调节的过程。雷帕霉素(rapamycin)的靶蛋白——TOR (target of rapamycin)是自噬的一个关键性调节因子。在存在足够的营养因子和营养成分的条件下, TOR 可以抑制自噬的发生,雷帕霉素可以通过抑制 TOR 的活性,模拟饥饿条件,诱导细胞发生自噬。在胰岛素样生长因子刺激下, I 型 *PI3K/AKT* 信号分子可以诱导 TOR 活化,从而抑制自噬^[19]。除 TOR 外, *AMPK* 在低能量条件下调节自噬,真核转录起始因子 2 α (*eIF2 α*) 在营养缺乏和内质网(ER)应激条件下调节自噬, *BH3* 蛋白家族可

以破坏 *Bcl-2* 对 *Beclin 1/PI3K* 的抑制作用,从而激活自噬。除此之外, *p53*、*DAPk*、*GTPase*、*Erk1/2* 等蛋白质都已经被证明与自噬的调节息息相关。

3 自噬的选择性

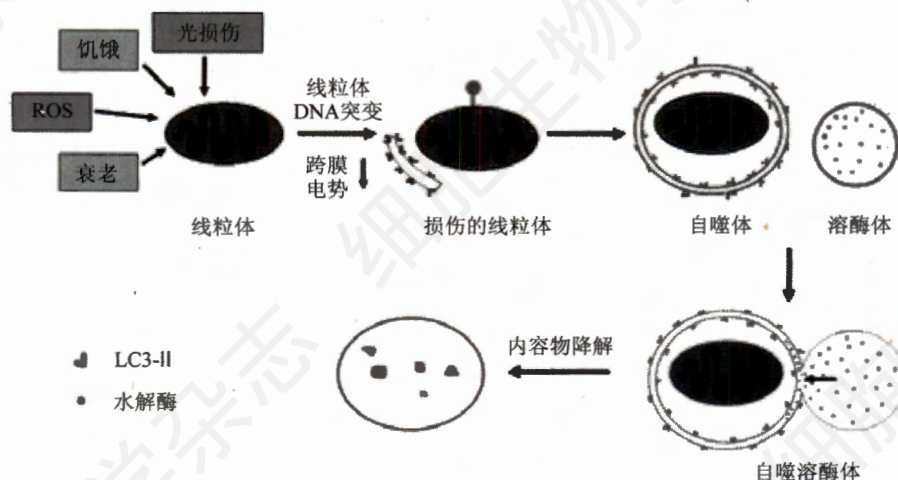
对于自噬是否存在特异的选择性一直存在争议,早期研究发现,胞质内具有不同半衰期的各种物质以相似的速率进入自噬体并被降解,自噬体内往往含有各种胞质组分和 ER、过氧化物酶体以及线粒体等细胞器^[20]。根据这些结果,人们认为自噬是一种没有特异性的降解过程。但也有研究显示在某些情况下自噬是有一定选择性的。早在 1966 年, Smith 等^[21]发现母鼠突然中断哺乳后,其脑垂体的催乳素细胞中出现大量吞噬催乳素颗粒的自噬泡, De Duve 将这种现象称为“*crinophagy*”,这可能是最早发现的选择性自噬,只是当时人们并不了解其具体机制。国内作者也曾报道注射类固醇激素后,在分泌类固醇的细胞中含有线粒体和内质网的自噬泡大量增加^[22]。这些结果提示自噬在细胞生理调控过程中起着重要的作用。另外,在酵母中,位于过氧化物酶体上的 *peroxin 14* 可以介导特异性的过氧化物酶体自噬(*pexophagy*)^[23]。胎儿出生后,由于不能再通过胎盘吸收营养,细胞会通过特异性的自噬来增加糖分解速度以提供给胎儿更多的营养,因此,此时细胞内自噬体中含有大量的糖原,而基本不含线粒体和其他细胞器^[24,25]。

有证据表明线粒体也可以发生特异性的自噬^[3], Lemasters^[4]首次提出了线粒体自噬(*mitophagy*)的概念。在酵母中,线粒体外膜蛋白 *Uth1p* 可以引起线粒体发生特异性的自噬,在哺乳动物中还没有发现其类似物。线粒体膜通透性改变(*mitochondrial permeability transition, MPT*)在这个过程中可能起着重要的作用^[26]。

4 线粒体自噬

线粒体自噬指在 ROS、营养缺乏、细胞衰老等外界刺激的作用下,细胞内的线粒体发生去极化出现损伤,损伤线粒体被特异性的包裹进自噬体中并与溶酶体融合,从而完成损伤线粒体的降解,维持细胞内环境的稳定(图 1)^[27]。

Elmore 等^[26]在使用血清饥饿法刺激大鼠肝细胞时,发现线粒体的自发去极化有明显的增强,这些去极化的线粒体被特异性的转运到自噬体和自噬溶酶体中降解掉。线粒体降解的平均时间约为 7 min^[28]。

图1 线粒体自噬过程简图^[27]

线粒体内膜非特异性通透性孔道(MPTP)抑制剂 CsA 可以抑制饥饿诱导的线粒体去极化以及自噬体和自噬溶酶体的扩增。同样, CsA 同源物 NIM811 也可以抑制线粒体自噬, 但同为免疫抑制剂的 tacrolimus 由于不能抑制 MPTP, 也不能抑制线粒体自噬的发生^[26,28]。Mizushima 等^[18]使用 GFP-LC3 转基因小鼠分离到的肝细胞进行了类似实验, 得到相同的结果。

为了证明细胞可以选择性的通过自噬清除发生损伤的线粒体, Kim 等^[29]使用 488nm 的氩激光照射 GFP-LC3 转基因小鼠的肝细胞局部, 发现低强度的激光照射可以引起线粒体暂时发生去极化, 但过几分钟后会恢复正常, 这时不会发生线粒体自噬。高强度的激光照射使线粒体发生永久损伤后, 照射局部的线粒体会被含 GFP-LC3 的双层膜结构(绿色荧光)包围, 形成的线粒体自噬体。这些结果表明在饥饿诱导的线粒体自噬过程中, 去极化的线粒体首先被包裹进含 LC3 的双层膜中, 线粒体的去极化与 MPT 直接相关, 包裹去极化线粒体的自噬体发生酸化并与溶酶体前体融合形成自噬溶酶体, 并将线粒体降解。

线粒体自噬的发生与调节除受自噬关键性因子的控制外, 还依赖于线粒体自身的信号调控。在酵母中, UTH1 和 AUP1 两种蛋白质在线粒体自噬中起着关键性作用^[30,31]。UTH1 是一种与线粒体生物产能和 ROS 应激密切相关的外膜蛋白, 在真核生物中不具有保守性。AUP1 位于线粒体间质, 可能属于蛋白磷酸酶 1K 家族。在酵母中, 当基因突变使线粒体无法维持跨膜电势时, 线粒体自噬水平明显上调, 损伤线粒体被特异性的清除^[32]。这说明线粒体自噬确实

受到自身信号分子的调节。

遗传学证据也证明线粒体的代谢与自噬密切相关。在重要的自噬相关基因 *Atg-7* 的基因剔除小鼠中, 其肝细胞中聚集了大量的异常线粒体^[33]。在体外培养的肝细胞中, 线粒体自噬可以被自噬的特异性抑制剂和线粒体去极化抑制剂(如环孢菌素)所抑制^[28]。

由于线粒体 DNA (mtDNA) 没有组蛋白的保护, 而且线粒体内 DNA 修复能力很弱, 因此 mtDNA 比核 DNA 更容易受到 ROS 攻击而发生突变^[34]。由于所有的 mtDNA 都处于转录激活状态, mtDNA 突变更容易引起功能异常蛋白的表达。这些因素都会导致线粒体发生损伤和功能紊乱。一些衰老器官的细胞发生有丝分裂后, 其新生细胞的线粒体经常呈现异常形态, 如肿胀、嵴结构消失以及内膜损伤等^[35,36]。许多研究表明随着机体的衰老, mtDNA 的突变程度会不断增加积累。一些 mtDNA 的突变可能会阻止线粒体自噬的发生, 而随着机体的衰老, 这类突变越来越多, 破坏了线粒体的正常功能, 又加速了衰老的发生。这可能是老化细胞中自噬活力变弱的原因^[37]。

这些结果都证明线粒体自噬是一个特异性的选择过程, 是细胞清除体内损伤线粒体以及维持自身稳态的一种重要的调节机制。

5 线粒体自噬与细胞死亡

对于自噬是促进还是抑制细胞死亡一直存在争议。由于去极化线粒体可以通过释放促凋亡蛋白激活细胞凋亡通路, 因此如果细胞通过自噬清除掉受损线粒体, 那么线粒体自噬将对细胞起到保护作用。

与此一致,有实验证据表明重要的自噬基因的缺失以及溶酶体功能的破坏会促进细胞发生依赖于 caspase 的凋亡^[38-40]。Zhang 等^[41]研究发现,低氧也可以诱导细胞发生线粒体自噬。在这一过程中,低氧诱导因子 HIF-1 诱导的 BNIP3 表达和 Beclin-1 与 Atg5 的组成性表达起着至关重要的作用。在长期处于低氧环境的细胞中,线粒体自噬可以阻止细胞产生过多的 ROS,从而抑制细胞死亡。但是,过度的自噬有可能引起组织蛋白酶或者其他蛋白水解酶从溶酶体或者自噬溶酶体中泄漏出来,从而引起细胞发生凋亡或者坏死。过度自噬引起的细胞程序性死亡已经被定义为 II 型细胞程序性死亡^[9]。

MPT 的程度可能决定着细胞是发生线粒体自噬还是凋亡或者坏死。外界刺激较弱时,有限的 MPT 只能破坏小部分线粒体,从而激活线粒体自噬,此时的自噬是作为细胞的一种自我保护机制而发生。随着外界刺激的增强,当线粒体自噬不足以清除损伤线粒体时,细胞会发生凋亡。最后,当过强的外界应激导致细胞内所有线粒体 MPT 发生强烈改变时,细胞内 ATP 的量急剧下降,细胞产能系统遭到完全破坏,不能提供自噬或者凋亡所需能量,这时,细胞发生坏死。因此,线粒体 MPT 的程度是决定细胞命运的一个重要因素^[27]。

6 线粒体自噬与人类疾病

众所周知,作为细胞内的一种重要细胞器,线粒体在细胞的生理活动中起着非常重要的作用。许多人类疾病的发生都与线粒体有着密切的关系。一种情况是由于线粒体基因组(mtDNA)和/或核基因组(nDNA)编码线粒体蛋白的基因变异引起的线粒体结构和氧化磷酸化功能的损伤而引起的疾病,称为线粒体疾病。线粒体疾病通常表现为 ATP 能量减少、ROS 增多和乳酸中毒等造成细胞损伤或细胞凋亡等。mtDNA 突变导致的氧化磷酸化功能的缺陷是引起神经肌肉疾病,导致记忆、视力、听力丧失和体力下降;造成心血管病、糖尿病、肠胃病、酒精中毒症、阿尔茨海默病、帕金森病以及肿瘤等多种疾病的重要病因。另一种情况是外界压力导致细胞生理活动异常,破坏了线粒体的正常功能或者产生大量的 ROS,从而引起疾病^[42]。

已经有报道证明自噬不仅与包括肿瘤和神经退化等多种疾病密切相关,而且参与了先天性免疫和适应性免疫系统的活化以及对外部病原体的清除^[43]。

在可控范围内,自噬通过降解受损细胞器或者增强细胞产能能力使细胞适应外界应激,否则则诱导细胞发生死亡^[9]。如前所述,线粒体损伤是许多人类疾病的直接诱因,而线粒体自噬是细胞清除体内损伤线粒体以及维持自身稳态的一种重要的调节机制。有研究表明,如果细胞出现自噬缺陷,会引起细胞内损伤和老化线粒体的大量聚集,从而促进肿瘤的发展。使用自噬诱导剂使抗凋亡的肿瘤细胞发生自噬性死亡可能是对肿瘤进行化疗的一个新方向^[44]。但是人们发现在乳腺癌、卵巢癌以及前列腺癌等肿瘤细胞中,重要的自噬相关基因 Beclin 1 发生了缺失^[45],这使一些通过诱导自噬来杀伤肿瘤细胞的药物不能发挥很好的效果。

因此,通过特异性的增强或者抑制细胞内线粒体自噬的程度,有可能为某些重大人类疾病的治疗提供新的思路 and 方向^[46]。但由于目前对自噬的信号通路还不是特别清楚,如何通过利用自噬特异性药物用于治疗还需要进一步研究。

7 小结

在正常的生理条件下,细胞通过自噬来清除内部发生损伤、失效以及多余的胞质组分,以维持细胞内环境的稳定。线粒体自噬在维持细胞内线粒体的正常功能和基因组稳定性上起着重要作用。但是线粒体发生自噬的信号通路及其调控机制还有待进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Chance B *et al. Physiol Rev*, 1979, **59**: 527
- [2] Dawson TL *et al. Am J Physiol*, 1993, **264**: C961
- [3] Xue L *et al. Curr Biol*, 2001, **11**: 361
- [4] Lemasters JJ. *Rejuvenation Res*, 2005, **8**: 3
- [5] Ashford TP *et al. J Cell Biol*, 1962, **12**: 198
- [6] Pfeifer U. *Acta Morphol Acad Sci Hung*, 1972, **20**: 247
- [7] Terman A *et al. J Pathol*, 2007, **211**: 134
- [8] Levine B *et al. Dev Cell*, 2004, **6**: 463
- [9] Gozuacik D *et al. Curr Top Dev Biol*, 2007, **78**: 217
- [10] Levine B *et al. Cell*, 2008, **132**: 27
- [11] Suzuki K *et al. EMBO J*, 2001, **20**: 5971
- [12] Mizushima N *Genes Dev*, 2007, **21**: 2861
- [13] Klionský DJ *et al. Dev Cell*, 2003, **5**: 539
- [14] Young AR *et al. J Cell Sci*, 2006, **119**: 3888
- [15] Ohsumi Y *et al. Semin Cell Dev Biol*, 2004, **15**: 231
- [16] Tanida I *et al. Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**: 2503
- [17] Mizushima N *et al. Autophagy*, 2007, **3**: 542
- [18] Mizushima N *et al. Mol Biol Cell*, 2004, **15**: 1101
- [19] Lum JJ *et al. Cell*, 2005, **120**: 237
- [20] Kopitz J *et al. J Cell Biol*, 1990, **111**: 941

- [21] Smith RE *et al.* *J Cell Biol*, 1966, **31**: 319
- [22] Yi J *et al.* *Anat Rec*, 1995, **242**: 137
- [23] Bellu AR *et al.* *FEMS Yeast Res*, 2001, **1**: 23
- [24] Kuma A *et al.* *Nature*, 2004, **432**: 1032
- [25] Kotoulas OB *et al.* *Pathol Res Pract*, 2006, **202**: 631
- [26] Elmore SP *et al.* *FASEB J*, 2001, **15**: 2286
- [27] Kim I *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 2007, **462**: 245
- [28] Rodriguez-Enriquez S *et al.* *Autophagy*, 2006, **2**: 39
- [29] Kim I *et al.* *Hepatology*, 2006, **44** (Suppl.1): 241A (Abstract)
- [30] Camougrand N *et al.* *FEMS Yeast Res*, 2004, **5**: 133
- [31] Tal R *et al.* *J Biol Chem*, 2007, **282**: 5617
- [32] Priault M *et al.* *Cell Death Differ*, 2005, **12**: 1613
- [33] Komatsu M *et al.* *J Cell Biol*, 2005, **169**: 425
- [34] Yakes FM *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 514
- [35] Beregi E *et al.* *Z Gerontol*, 1988, **21**: 83
- [36] Ermini M. *Gerontology*, 1976, **22**: 301
- [37] Terman A. *Gerontology*, 1995, 41 Suppl 2: 319
- [38] Debnath J *et al.* *Autophagy*, 2005, **1**: 66
- [39] Boya P *et al.* *Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 1025
- [40] Wu YT *et al.* *Autophagy*, 2008, **4**: 457
- [41] Zhang H *et al.* *J Biol Chem*, 2008, **283**: 10892
- [42] Leininger GM *et al.* *Nat Clin Pract Neurol*, 2006, **2**: 620
- [43] Schmid D *et al.* *Immunity*, 2007, **27**: 11
- [44] Ito H *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 2006, **98**: 625
- [45] Liang XH *et al.* *Nature*, 1999, **402**: 672
- [46] Armstrong JS. *Br J Pharmacol*, 2007, **151**: 1154

Progress in Mitophagy

Dan-Hui Liu, Jian-Xin Lu*

(Institute of Cellular and Molecular Medicine, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics,
Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract As reactive oxygen species (ROS) is a by-product of mitochondrial metabolism and mitochondrial DNA is more susceptible to oxidative damage than nuclear DNA, mitochondria are especially more prone to be damaged than other organelles. Timely elimination of aged and damaged mitochondria is essential to maintain the health of cells. The unhealthy mitochondria are mainly cleared by autophagy. Increasing evidence indicates that this is a selectively process termed mitophagy. The mitochondrial permeability transition pore plays important role in mitophagy. Mitophagy may play an essential role in maintaining mitochondrial function and genetic integrity, but its mechanism needs further investigation.

Key words mitochondrial damage; mitophagy; reactive oxygen species

Received: May 21, 2008 Accepted: June 25, 2008

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689805, Fax: 86-577-86689800, E-mail: ljx@wzmc.net