

- [13] Robinson WP et al., 1996, *Prenat Diagn*, 16(9):837-844.
- [14] Tonk V et al., 1996, *Am J Med Genet*, 66(4):426-428.
- [15] Smith A et al., 1993, *Clin Genet*, 43(1):5-8.
- [16] Fryns JP, 1992, *Ann Genet*, 35(3):186-188.
- [17] Dayna J et al., 1992, *Am J Human Genet*, 50:174.
- [18] Han JY et al., 1994, *J Hum Genet*, 55(5): 960-967.
- [19] Page SL and Shaffer LG, 1998, *Chromosome Res*, 6(2): 115-122.
- [20] Bandyopadhyay R et al., 2001, *Chromosome Res*, 9(3): 235-242.
- [21] Bigoni F et al., 1997, *Am J Phys Anthropol*, 102(3):315-327.

线粒体氧化磷酸化的异常与人类疾病

迟万好* 明镇寰* 潘建伟* 曹明富** 朱睦元*,***

(*浙江大学生命科学院 杭州 310012 **杭州师范学院生命科学院 杭州 310036)

线粒体的氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)在机体中发挥重要的作用。OXPHOS的异常经常会导致各种线粒体疾病。目前关于线粒体在一些退行性疾病及衰老的研究非常活跃,本文综述近年来国内外对线粒体 OXPHOS 异常与各种疾病的相关报道。

一、线粒体的 OXPHOS 及其作用

1. OXPHOS

线粒体通过 OXPHOS 产生 ATP,供给机体能量。参与 OXPHOS 的酶位于线粒体的内膜上,主要包括由氧化还原酶复合体组成的电子传递链、ATP 合成酶(复合体 V)以及腺苷转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)。电子传递链是由 70 多种多肽组成,分别被称为酶复合体 I、II、III 和 IV。由三羧酸循环或脂肪酸- β 氧化产生的 NADH 和 FADH₂ 等以还原态进行电子传递链,来自 NADH 的电子先进入酶复合体 I (NADH 脱氢酶),然后传递给辅酶 Q(CoQ);来自 FADH₂ 的电子先进入酶复合体 II (琥珀酸脱氢酶),然后传递给 CoQ,电子 CoQ 依次经过酶复合体 III (细胞色素 C 还原酶)、酶复合体 IV (细胞色素 C 氧化酶),最后传递给氧形成水。在电子传递的过程中有能量释放出来,这些能量在 ATP 合成酶(酶复合体 V)的作用下就转换成 ATP。线粒体内的 ATP 随后在 ANT 的作用下与胞质 ADP 交换,进入到细胞质中为细胞提供能量。

2. OXPHOS 的作用

当 OXPHOS 中电子传递链被阻断时,电子就聚集在酶复合体 I 及 CoQ,此时电子若传递给氧就形成了超氧阴离子(O₂^{·-})。线粒体中的 Mn 超氧歧化酶(MnSOD)可将 O₂^{·-} 歧化成 H₂O₂。谷胱甘肽过氧化酶(GPx)又可将后者转变成水。当有还原态

的过渡金属存在时, H₂O₂ 就会转变成·OH。活性氧(reactive oxygen species, ROS)突然的增多使电子传递链中酶复合体 I、II、III 中心的 Fe-S 以及三羧酸循环中顺乌头酸酶失活,最终导致线粒体能量产生下降;若 ROS 是缓慢积累则会造成线粒体的氧化损伤。线粒体氧化损伤可能使线粒体内膜通道-PTP(permeability transition pore)开放,由此释放了原来存在于线粒体内膜空间里的细胞色素 C(cyt C)和 AIF(apoptosis-inducing factor)等促凋亡因子以及许多 caspases,导致细胞凋亡的发生^[1]。

因此,线粒体 OXPHOS 主要参与能量的产生、ROS(O₂^{·-}、·OH 及 H₂O₂)的形成及凋亡的调控。由于这三个过程在人体中发挥重要的作用,所以 OXPHOS 的异常会导致各种疾病的发生。人类中许多退行性疾病都是与线粒体 OXPHOS 异常有关。

二、线粒体 OXPHOS 异常引发疾病

1. mtDNA 突变引发的 OXPHOS 异常

mtDNA 编码 13 种参与 OXPHOS 的蛋白质,分别是酶复合体 I 的 7 个亚单位、酶复合体 III 中的细胞色素 b、酶复合体 IV 中的细胞色素 C 氧化酶(cytochrome C oxidase, COX) I、II、III 三个亚单位、酶复合体 V 的 6 和 8 两个亚单位。人类的许多疾病是由于内源的 DNA 发生突变。而 mtDNA 因没有 DNA 修复系统,也没有组蛋白的保护,而且经常暴露于 ROS 中,所以较核基因更易发生突变,大约是核基因组的 10-20 倍。因此由 mtDNA 突变造成的 OXPHOS 异常也很普遍。

(1) 与 OXPHOS 中酶复合体 I 有关的突变

基金项目:国家自然科学基金(39770420, 30100115)和浙江省自然科学基金(300255)资助项目。

*** 通讯作者。

勒伯氏遗传性视神经病(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON)是编码 OXPHOS 中复合体 I (NADH 脱氢酶)的不同亚单位的基因发生突变引起的。例如:DN6 基因上 14484 位点发生 T→C 突变^[2]、ND5 基因上 13513 位点发生 G→A 突变^[3]、ND4 基因上 11778 位点发生 G→A 突变^[4]、ND1 基因上 3460 位点发生 G→A 突变^[5]。这些突变都会影响到 OXPHOS 中复合体 I 的功能,使 OXPHOS 不能正常地进行。LHON 患者表现出突然失明等症状。

(2) 与 OXPHOS 中酶复合体 IV 有关的突变

当编码 COX III 亚单位的基因上 9957 位点发生 T→C 突变,就会导致线粒体神经肌肉性疾病中最常见的 MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke like episodes)^[6]。MELAS 患者表现出线粒体肌病、线粒体性脑病、乳酸中毒和中风样发作等症状。

(3) 与 OXPHOS 中酶复合体 V 有关的突变

编码 ATP 合成酶亚单位 6 的 ATP6 基因 8993 位点发生 T→G 突变,也会引起赖氏综合症(Leigh's syndrome)。突变使 ATP 合成酶亚单位 6 该处的亮氨酸被精氨酸取代,因此 ATP 合成酶不能很好的发挥作用,能量产生减少^[7]。

到目前为止已经发现因 mtDNA 突变导致 OXPHOS 异常所引发的疾病有很多(见表 1)。

从表中可以看出,一种突变可能会引发多种疾病。例如,同样是 ND4 基因上 11778 位点发生 G→A 突变,可以表现为 LHON 和帕金森综合征;而同一种疾病表型(像 LHON)可能由不同的突变引起。这说明 mtDNA 突变具有异质性。这可能是因为 OXPHOS 过程的损坏是疾病发生的主要原因,任何其他因素都可能影响其表型^[8]。另外,OXPHOS 作用的三个过程也是相互影响的。例如,破坏 OXPHOS 的突变会降低能量的产生且损害细胞的很多生化过程;电子传递链的抑制使细胞内 ROS 浓度增大及氧化压力的上升;能量的下降,氧化压力的上升又会使线粒体 PTP 开放,导致细胞凋亡。它们的相互影响也是 mtDNA 突变具有异质性的一个原因。

2. 核基因突变引发的 OXPHOS 异常

由于参与线粒体 OXPHOS 中的一些蛋白(例如,COX 的一些亚单位)是由核基因组编码的,除此以外核编码的许多蛋白还参与维持 mtDNA 的结构和功能,所以核基因组突变会影响到线粒体 OXPHOS 的正常进行。

表 1 MtDNA 突变和表型^[8]

基因	突变	表型
ND1	T3308C	双侧纹状体坏死或线粒体肌病、线粒体性脑病、乳酸中毒和中风样发作
	G3460A	勒伯氏遗传性视神经病
ND4	7bp 插入	肌病和(或)运动不耐受性
	A11696G	勒伯氏遗传性视神经病或肌张力障碍
	G11778A	勒伯氏遗传性视神经病
	G11778A	帕金森氏综合征
ND5	G11832A	运动不耐受性
	G13513A	线粒体肌病、线粒体性脑病、乳酸中毒和中风样发作
	G13513A	勒伯氏遗传性视神经病或线粒体肌病、线粒体性脑病、乳酸中毒和中风样发作
ND6	G14459A	勒伯氏遗传性视神经病或肌张力障碍
	T14596A	赖氏综合征
Cytochrome b	T14484C	勒伯氏遗传性视神经病或肌张力障碍
	4-bp 缺失	勒伯氏遗传性视神经病
	G14846A	帕金森氏综合征或线粒体肌病、线粒体性脑病、乳酸中毒和中风样发作
	G15059A	运动不耐受性
	G15084A	运动不耐受性
	G15168A	运动不耐受性
	G15243A	运动不耐受性
	G15498A	心肌病
	G15615A	运动不耐受性
	G15723A	运动不耐受性
	G15762A	肌病
	COX I	T6721C,
T6742C		类运动神经元疾病
5-bp 缺失		肌阵挛性共济失调或耳聋
COS II	G6930A	肌病或共济失调或耳聋
	T7587C	肌病
COS III	T7671C	脑病或运动不耐受性
	G9952A	线粒体肌病、线粒体性脑病、乳酸中毒和中风样发作
	T9957C	运动不耐受性
ATPase	15-bp 缺失	赖氏综合征
	T8993G	赖氏综合征
	T8993G	赖氏综合征
	T8993G	神经原衰弱、共济失调和色素性视网膜炎
	T8993G	神经原衰弱、共济失调和色素性视网膜炎或母系遗传的赖氏综合征
	T9176C	神经原衰弱、共济失调和色素性视网膜炎或母系遗传的赖氏综合征
	T8851C	双侧纹状体坏死
	T9176C	双侧纹状体坏死

弗里德赖希氏共济失调(Friedreich ataxia)是常染色体隐性神经系统衰退性紊乱。该疾病是由于 SPG2 基因外显子 6 上有 2bp 的缺失及 SPG7 基因 2228 位点上插入 A(腺嘌呤)造成的。突变发生后使线粒体中参与铁离子(iron)内稳等功能的 Frataxin 蛋白发生异常,进而导致与铁离子有关的线粒体酶(例如酶复合体 I、II、III)功能失调^[9]。

遗传性痉挛疾病(hereditary spastic paraparesis)表现出进行性痉挛、神经疾病、共济失调、视网膜炎及耳聋等症状。该疾病主要是由于 16 号染色体上编码 paraplegin 蛋白的基因发生突变造成的。观察发现病人细胞中的 paraplegin 蛋白浓度降低,而且有 OXPHOS 缺陷。目前还不清楚它是如何影响线粒体 OXPHOS 的过程的。此外,染色体 2 号、8 号、14

号及 15 号突变都可引发该疾病的发生^[8]。

杭廷顿氏疾病(Huntington's disease)是由于 4 号染色体上编码 huntingtin 蛋白的基因发生突变引起的。在该疾病中观察到有明显的线粒体 OXPHOS 缺陷,其中酶复合体 II、III 严重缺陷,酶复合体 IV 中度缺陷。Huntingtin 蛋白如何引发该缺陷也不清楚^[8]。虽然现已知道 huntingtin 蛋白在胚胎发育中发挥重要作用,但其具体的功能还不清楚。

三、OXPHOS 异常引发疾病的可能机理

1. 当 OXPHOS 因各种原因而受到破坏时,能量的供应就出现障碍。不同人的能量阈值不同,一般说来,老龄人的阈值要高于年轻人,所以老龄人中发生退化性疾病的比例要高于年轻人。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种老年期痴呆综合征,编码 COX II 的基因发生突变(G8206A, A8224T)使 COX 的功能发生缺陷,造成能量产生的不足所引起的^[10]。此外,不同组织的能量阈值也不同。例如,脑和肌肉对 OXPHOS 的依赖性很高,因此 mtDNA 突变很容易引发神经疾病和肌病。

2. ROS 的积累可以减少能量的产生,也可以使线粒体内的各种成分遭受到氧化损伤,因而就不可能很好的完成其功能。

3. mtDNA 突变使线粒体中由核基因组编码的蛋白质亚单位与 mtDNA 编码的亚单位的比例失调,导致细胞色素 C 的释放。细胞色素 C 的释放又激活了凋亡途径,而后者又反过来抑制线粒体的翻译过程及核编码的线粒体蛋白的转运,如此形成了一个恶性循环,最终使患者的疾病越来越严重^[11]。最近, Mott^[12]等发现 mtDNA 突变的转基因小鼠中 DNA 及蛋白质的氧化产物没有增多。mtDNA 突变只是引起 Bcl-2、Bfl-1 表达的上升。这说明在疾病发生的过程中有可能在线粒体和核之间存在着信号传导途径,而细胞凋亡可能是这个信号传导过程中的一部分。

四、可能的治疗方法

由于线粒体疾病的异质性和技术上的很多问题,到目前没有有效的治疗方法。但因线粒体疾病的主要原因是 mtDNA 突变,所以针对 mtDNA 突变提出了三个基因治疗方案。

1. 采用基因打靶的方法,使反义寡核苷酸定位于线粒体内,这样反义寡核苷酸就可以与发生突变的

的 mtDNA 结合,阻止其复制,从而提高正常 mtDNA 的比例^[13]。但这种方法很容易引起 mtDNA 的丢失,造成线粒体内没有 DNA。

2. 采用基因打靶的方法,让定位于线粒体内的外源 DNA 执行突变的 mtDNA 的功能^[14]。该方法虽然可以避免 mtDNA 的丢失,但现在还不知道如此一来线粒体的转录、翻译系统是否能正常进行。以上两种方法存在一个关键的问题就是外源 DNA 如何定位于线粒体中。

3. 将外源 DNA 通过基因打靶定位于细胞核中。外源 DNA 通过碱基替代消除核 DNA 与 mtDNA 之间的差别,从而可以编码正确的蛋白质。在蛋白质前加一个前导序列这样就可以让编码出来的蛋白质准确的定位于线粒体中,这就是所谓的'异源表达'(allotopic expression)。由于该方法中只是运用核基因表达及线粒体蛋白质的输入系统,所以异源表达在线粒体疾病的基因治疗中具有广阔的前景。但是现在针对这种方法也提出了许多问题^[15]。在哺乳动物细胞中对 mtDNA 编码的 13 个 OXPHOS 有关的蛋白质的异源表达仍然存在很多的困难, inteins (self-splicing 'introns of proteins') 的应用可能会有助于问题的解决。

摘要

线粒体的 OXPHOS 在三个方面发挥作用:提供能量、形成 ROS 及启动凋亡。参与该过程的酶主要有酶复合体 I、II、III、IV 和 V,所有影响这些酶正常发挥作用的因素都会导致氧化磷酸化的异常,进而引发各种疾病。基因治疗对线粒体疾病可能有效。

参考文献

- [1] Wallace D C. 1999, *Science*, **283**:1482-1488.
- [2] Johns D R. et al., 1992, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**:1551-1557.
- [3] Ouweland J M. et al., 1999, *Diabetologia*, **42**:485-492.
- [4] Wallace D C. et al. 1988, *Science*, **242**:1427-1430.
- [5] Huoponen K. et al., 1991, *Am. J. Hum. Genet.*, **48**:1147-1153.
- [6] Jacobs H T. et al., 2000, *Hum. Mol. Genet.*, **9**:463-465.
- [7] Santorelli F M. et al., 1994, *Neurology*, **44**:972-974.
- [8] Pulkes T. et al., 2001, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **49**:27-43.
- [9] Leonard J V. et al., 2000, *Lancet*, **355**:389-394.
- [10] Qiu X Z. et al., 2001, *Brain Res.*, **893**:261-263.
- [11] Mirabella M., et al., 2000, *Brain*, **123**:93-104.
- [12] Mott J L., et al., 2001, *Mutation Res.*, **474**:35-45.
- [13] Taylor R W., et al., 1997, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29**:195-205.
- [14] Seibel P. et al., 1995, *Nucleic Acids Res.*, **23**:10-17.
- [15] Aubrey D. N. J. de Grey. 2000, *TIBTECH*, **181**:394-399.