

综 述

cAMP信号与动物细胞线粒体功能

贾振伟*

(内蒙古民族大学动物科技学院, 黄牛遗传繁育研究所, 通辽 028043)

摘要 线粒体是真核生物细胞内重要的细胞器, 主要功能是通过氧化磷酸化作用为细胞生命活动提供能量, 并与细胞的生长、发育及衰老等重要生物过程密切相关。许多研究表明, 线粒体蛋白质的磷酸化在调控氧化代谢方面发挥了重要作用, 而且环腺苷一磷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)依赖的蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)信号通路参与了该过程的调控, 但cAMP/PKA信号通路在调控线粒体代谢方面的作用一直存在争议。因此, 该文综述了线粒体内cAMP的来源、线粒体cAMP信号系统及对cAMP对线粒体功能的调控, 旨在为全面了解cAMP/PKA信号通路在调控线粒体功能方面的作用提供具体参考。

关键词 环腺苷一磷酸; 动物细胞; 线粒体生物合成; 蛋白质磷酸化

cAMP Signaling and Mitochondria Function in Animal Cell

Jia Zhenwei*

(Institute of Yellow Cattle Genetics-Breeding and Reproduction, College of Animal Science and Technology,
Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028043, China)

Abstract Mitochondria are most important intracellular organelles which provide energy for cell life activities via oxidative phosphorylation. In addition, some important biological processes, like the growth, development and aging of cells are closely related to mitochondria. Accumulating evidences have shown that phosphorylation of mitochondrial proteins has emerged as an important player in the regulation of mitochondrial oxidative metabolism. Moreover, the ubiquitous second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and its cellular effector protein kinase A (PKA) constitute one of the most widely studied signaling cascades, yet the roles of cAMP signaling and PKA phosphorylation of mitochondrial proteins in the regulation of mitochondrial metabolism remain controversial issues. Therefore, in this review, we summarized current knowledge on generation of cAMP and its signaling system in mitochondria, and the role of cAMP in regulating mitochondrial energy metabolism and other relevant aspects of mitochondrial signaling, which would give rise to a comprehensive understanding of the role of cAMP/PKA signal pathway in the control of mitochondrion function.

Keywords cAMP; animal cell; mitochondrion biogenesis; protein phosphorylation

收稿日期: 2016-03-31 接受日期: 2016-07-12

内蒙古自然科学基金(批准号: 2015MS0304)和内蒙古民族大学科学研究基金(批准号: NMDGP1401)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0475-8314845, E-mail: zhenwei1999@sina.com

Received: March 31, 2016 Accepted: July 12, 2016

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region of China (Grant No.2015MS0304) and the Science Research Foundation of Inner Mongolia University for the Nationalities (Grant No.NMDGP1401)

*Corresponding author. Tel: +86-475-8314845, E-mail: zhenwei1999@sina.com

网络出版时间: 2016-10-28 13:41:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161028.1341.008.html>

线粒体是真核生物细胞重要的细胞器, 主要功能是通过氧化磷酸化为细胞生命活动提供能量, 同时参与钙离子稳态、活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平及细胞凋亡的调控, 并与细胞生长、发育及衰老等重要生物过程密切相关。目前, 许多研究表明, 线粒体功能障碍不仅导致人类帕金森病、阿尔茨海默病和糖尿病等疾病的发生^[1-3], 也能使人类和动物的卵母细胞质量下降, 造成生殖功能障碍^[4]。

哺乳动物细胞为了适应代谢底物和能量需求变化的过程, 需要线粒体对此过程具备快速反应的能力。多年来, 大量的研究认为, 线粒体酶的翻译后修饰可能与哺乳动物细胞能量代谢相关, 但这些酶调控线粒体能量代谢的分子机制仍不清楚。尽管已有研究证明, 线粒体蛋白质可逆磷酸化在调控氧化代谢方面发挥了重要作用, 然而调控这些蛋白质磷酸化的许多激酶的调节亚基及靶向作用蛋白质仍在鉴别中^[5]。

环腺苷一磷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是细胞内重要的第二信使, 能够激活多种下游因子来调控线粒体功能, 其中, 蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)是研究最清楚的依赖cAMP的蛋白激酶^[5]。由于线粒体内cAMP的来源、PKA在线粒体内的定位及PKA对线粒体外和内影响作用的差异通过实验手段很难测定, 因此, cAMP/PKA信号通路在调控线粒体代谢方面的作用一直存在争议。鉴于以上原因, 本文主要对线粒体外和内cAMP信号系统及对线粒体功能的调控进行了综述, 为治疗线粒体功能障碍导致的疾病筛选靶向调控物质提供理论基础。

1 线粒体外cAMP信号系统

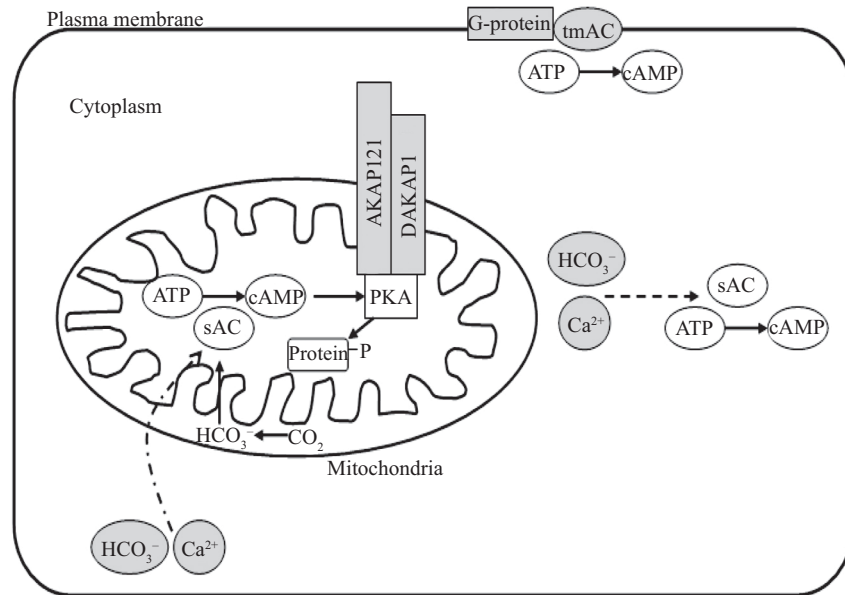
cAMP是首个被发现的第二信使, 由腺苷酸环化酶催化ATP产生。哺乳动物具有与细胞膜整合的腺苷酸环化酶(transmembrane adenylyl cyclase, tmAC)和细胞内可溶性腺苷酸环化酶(soluble adenylyl cyclase, sAC)两种类型。其中, 膜整合类型由9个基因编码, 氨基端和羧基端都朝向细胞质, 并且tmAC蛋白质朝向细胞质的一面具有两个催化结构域, 主要负责tmAC的活性。tmAC受G蛋白的调控, 当细胞外信号与G蛋白受体结合后使其激活, 活化的G蛋白激活tmAC, tmAC催化ATP产生cAMP。sAC由单一基因编码多亚基复合体, 不受G蛋白的调控, 主要受细胞内钙离子和碳酸氢盐的调控(图1)。动

物细胞受到信号的刺激, tmAC和细胞质及细胞核内sAC被激活, 催化ATP产生cAMP, 激活下游效应因子调控细胞生理机能。目前普遍认为, cAMP调控的效应因子主要有3种, 包括PKA、cAMP激活交换蛋白(exchange protein activated by cAMP, EPAC)和环核苷酸门控离子通道, 但其仅在激活PKA对线粒体功能调控方面的研究比较清楚。目前研究已证明, 细胞质内cAMP激活PKA, 使cAMP应答原件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)磷酸化, 随后CREB进入细胞核调控核DNA编码线粒体的基因表达^[6]。A型激酶锚定蛋白(A-kinase anchoring proteins, AKAPs)是一组结构不同而功能相关的蛋白质, 其主要功能是高效地将cAMP依赖的PKA锚定于特定的亚细胞结构。研究发现, AKAPs能够将细胞质内的PKA锚定于线粒体外膜上, 使一些蛋白质磷酸化^[7]。另有研究发现, 线粒体膜间隙含有鞘氨醇激酶相互作用蛋白(sphingosine kinase interacting protein, SKIP), SKIP与AKAPs具有类似功能, 能够锚定PKA, 而且cAMP能渗透进入线粒体调控PKA的活性, 说明cAMP/PKA信号也可能使线粒体膜间隙内相关蛋白质磷酸化, 进而调控线粒体机能^[8]。

2 线粒体基质内cAMP信号系统

2.1 线粒体基质内cAMP来源

早期, Zippin等^[9]利用特异的可溶性AC抗血清进行细胞质免疫化学实验发现, sAC定位于线粒体内, 说明线粒体基质可能产生cAMP。DiPilato等^[10]使用基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的cAMP探针检测细胞质内的cAMP, 发现细胞质内产生的cAMP能够达到线粒体外膜、进入基质内, 说明线粒体内cAMP也可能来源于细胞质。随后, DiPilato等^[10]的研究结果受到来自于生物化学研究方面的挑战。有研究提出, 细胞质内cAMP不能通过线粒体内膜渗透进入基质内, 线粒体基质内的cAMP由sAC催化ATP产生^[11]。特别重要的是, 近年一些学者使用cAMP敏感的FRET传感器特异性靶向线粒体基质cAMP, 进一步证明细胞质内cAMP不能进入线粒体基质内; 同时, 这些研究也发现, 线粒体内sAC受钙离子和碳酸氢盐的调控, 细胞代谢产生的碳酸氢盐能够激活线粒体内sAC, 促进cAMP的产生, 胞质内钙离子进入线粒体后也能激活sAC, 促进cAMP的产生^[12-13](图1)。这些研究结果揭



哺乳动物细胞cAMP由位于细胞膜上G蛋白偶联的腺苷酸环化酶(tmAC)、细胞质和线粒体内可溶性腺苷酸环化酶(sAC)催化ATP产生。细胞质内sAC受来自于细胞外空间的 Ca^{2+} 和 HCO_3^- 水平的调控,线粒体内代谢产生的 HCO_3^- 及细胞质内 Ca^{2+} 调控线粒体内sAC的活性。线粒体AKAP(AKAP121和DAKAP1)锚定PKA,诱导线粒体内相关蛋白质磷酸化。

In mammalian cells, cAMP is generated from ATP via the action of the transmembrane adenylyl cyclase (tmsAC) and G protein located in the plasma membrane or via the action of soluble adenylyl cyclase (sAC) located in the cytoplasm, in the nucleus, and in the mitochondrial matrix. sAC can be activated by Ca^{2+} and HCO_3^- derived from the extracellular space. In mitochondria, sAC can be activated by HCO_3^- generated from the CO_2 derived from the Krebs cycle via the action of carbonic anhydrase. Specific AKAP mitochondrial proteins (AKAP121 and DAKAP1) interact with PKA to induce phosphorylation of mitochondrial substrates.

图1 哺乳动物细胞cAMP的来源

Fig.1 The source of cAMP in mammalian cells

示,细胞线粒体基质内cAMP主要由sAC催化ATP产生。

2.2 线粒体内受cAMP调控的效应因子

目前认为,线粒体内受cAMP调控的效应因子主要是PKA和EPAC,研究比较清楚的是PKA。自上世纪70年代,许多学者提出PKA位于线粒体内^[14-16]。近年, Ma等^[17]研究证明了上述观点,发现PKA位于人胎盘细胞线粒体内,而且采用蔗糖密度梯度离心方法发现,PKA的催化亚基主要位于线粒体外膜上。有研究证明,PKA位于线粒体内,其中调控亚基在线粒体基质和内膜上含量丰富,催化亚基在线粒体基质内含量丰富^[16,18-19]。PKA由2个催化亚基和2个调节亚基组成,细胞内cAMP水平较低时,催化亚基和两个调节亚基结合为复合体,当细胞受外界信号的刺激产生高水平cAMP,cAMP将结合PKA的调控亚基,改变调控亚基构象,使调节亚基和催化亚基解离,释放出催化亚基,进而使下游底物磷酸化发挥生物学作用。近年来, Grimsrud等^[20]研究分析了线粒体的磷酸肽,发现了超过100个能被PKA磷酸化的靶蛋白,说明线粒体内PKA能够使线粒体多种蛋白质磷酸化。

EPAC是一种受cAMP依赖的鸟嘌呤核苷酸交换因子,有研究发现,EPAC位于细胞线粒体内^[21]。体外研究表明,用于激活纯化EPAC的cAMP浓度是激活PKA的10倍^[22]。但随后的研究发现,EPAC和PKA与cAMP结合的能力相似,说明两者都可能对生理浓度的cAMP产生反应^[23]。另外,EPAC与PKA亚基相似,都受到一些调控因子的影响,通过与其结合发挥生物学作用^[24]。但目前关于EPAC调控线粒体功能方面的作用及机制一直不清楚,其与线粒体之间的关系需要进一步调查。

3 cAMP对线粒体功能的调控

3.1 线粒体生物合成

cAMP应答原件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)是一种调控基因表达的重要转录因子。一般认为,细胞质内高水平的cAMP激活PKA,激活的PKA进入细胞核内使CREB磷酸化,促进过氧化物酶体增生物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)基因表达。PGC-1 α 是

一种核转录辅激活因子,与核呼吸因子1/2(nuclear respiratory factor 1/2, *NRF1/2*)基因启动子结合使其转录激活, *NRF1/2*水平增加后不仅促进了核基因组编码的呼吸链复合体蛋白基因、参与呼吸链复合体蛋白转运和组装的蛋白质基因的表达,而且也促进了线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, *TFAM*)基因的表达, *TFAM*进入线粒体后与线粒体RNA聚合酶互作增强了线粒体基因组编码的蛋白表达,进而调控细胞线粒体的生物合成^[25]。Bogacka等^[26]利用福斯克林激活体外培养的前脂肪细胞tmAC, cAMP水平提高后激活PKA,增加了细胞线粒体DNA(mtDNA)的拷贝数。Ray Hamidie等^[27]使用姜黄素处理小鼠,同时对其进行耐力训练,发现增加了肌肉细胞cAMP水平以及cAMP/PKA通路下游调控因子磷酸化的CREB水平。Chowanadisai等^[28]发现,抑制小鼠肝细胞CREB或PGC-1 α 的活性,阻断了吡咯喹啉醌诱导肝细胞线粒体的生物合成。这些研究结果揭示, cAMP/PKA/CREB/PGC-1 α 信号通路在调控细胞线粒体生物合成方面发挥了重要作用。

目前研究证明, CREB不仅定位于细胞核内,调控细胞核编码基因的表达,而且也存在线粒体内,其可能在Hsp70等分子伴侣的作用下从细胞质转位至线粒体,线粒体膜电位和外膜转位酶(translocase of the outer membrane, TOM)复合体在其转位的过程中发挥了重要作用^[29-30]。Ryu等^[31]研究发现,神经细胞线粒体内CREB与mtDNA的D环结合,而且,这些细胞过表达线粒体标记的CREB,促进了细胞核编码的呼吸链复合体I亚基ND2、ND4和ND5基因的表达^[32]。Lee等^[29]也发现,线粒体CREB调控了神经细胞存活以及mtDNA编码基因的表达。De Rasmo等^[30]研究证明,线粒体内PKA能够使CREB磷酸化,磷酸化的CREB调控了mtDNA编码的呼吸链复合体相关亚基基因(*ND1*、*ND6*和*COXIII/ATP6*)的表达。综上所述,线粒体内的cAMP/PKA/CREB信号系统也可能调控mtDNA编码基因的表达,但细胞质内磷酸化的CREB是否转位进入线粒体调控其编码的基因表达尚不确定。

Lon蛋白酶是一种同质寡聚环状的ATP依赖蛋白质,主要定位于线粒体基质内。值得关注的是, Matsushima等^[33]发现, Lon蛋白酶能够通过降解TFAM,维持TFAM/mtDNA的稳定性,调控了线粒体的生物合成。随后, Lu等^[34]证明,线粒体中的PKA能

够磷酸化TFAM,导致TFAM迅速被Lon蛋白酶选择性地降解。这些结果揭示,线粒体内的cAMP/PKA信号也可能参与了Lon蛋白酶对TFAM丰度和功能的调控,进而维持mtDNA的稳定和表达。

此外,研究认为,线粒体生物合成需要在细胞质内合成大约1 500个核基因编码的多肽,随后转运至线粒体, TOM复合体在这些多肽转运过程中发挥了重要作用^[35]。TOM复合体由TOM70、TOM22和TOM40三种核心组分组成。研究表明, cAMP/PKA也能使其磷酸化,抑制核编码的线粒体蛋白转运,降低线粒体的生物合成,并使细胞代谢由氧化磷酸化向糖酵解的途径转变^[36-37]。

3.2 线粒体形态动力学

线粒体是高度动态变化的细胞器,在细胞不同生命过程中或外界环境刺激下发生频繁的融合与分裂,维持线粒体网络的稳态,线粒体融合和分裂的动态过程被称为线粒体动力学。哺乳动物调控细胞线粒体融合的主要分子主要有Mfn1、Mfn2和视神经萎缩相关蛋白1(optic atrophy 1, OPA1),调控线粒体分裂的分子主要有Drp1与Fis1。研究发现,线粒体的动态变化与电子传递链的活性密切相关^[38]。

目前认为,细胞质内cAMP能够调控线粒体的动态变化。例如,研究发现, cAMP激活PKA后将Drp1丝氨酸磷酸化(Ser637),阻止了Drp1移位至线粒体的表面,磷酸化的Drp1使线粒体的延长,促进其融合,形成线粒体网络,增强氧化磷酸化功能^[39]。Merrill等^[40]发现,线粒体外膜上Drp1磷酸化的突变体或者过表达PKA诱导了神经细胞线粒体的融合,有利于神经保护网的形成及神经细胞的存活。PKA能够使作用底物蛋白磷酸化,相反,蛋白磷酸酶能够使PKA作用的底物去磷酸化。研究发现,线粒体外膜上的PKA和蛋白磷酸酶PP2A分别通过调节Drp1的磷酸化水平,抑制或促进线粒体分裂,进而影响神经细胞的发育^[41-42]。这些研究结果说明,细胞质内cAMP/PKA信号与线粒体动力学密切相关。另外, cAMP/PKA信号调控Drp1的磷酸化影响线粒体形态重塑期间,一些锚定蛋白可能参与了该过程的调控。例如,近年研究发现,糖原合酶激酶-3(glycogen synthase kinase-3, GSK-3)与GSKIP(一种小型A型激酶锚定蛋白)锚定结合PKA,参与了cAMP/PKA信号对人神经细胞Drp1磷酸化的调控^[43]。另外,有研究发现,PKA也能磷酸化Mfn2, Mfn2磷酸化后与OPA1结合,可能

参与了线粒体的融合^[44-45]。但目前cAMP/PKA信号仅在磷酸化Drp1影响动物细胞线粒体形态变化方面研究得比较清楚,关于调节线粒体的融合和分裂的分子机制仍不明确,需要深入研究。

3.3 线粒体起始的细胞凋亡

线粒体是调控细胞凋亡的关键细胞器,许多Bcl-2家族抗凋亡蛋白(如Bcl-2和Bcl-XL)和促凋亡蛋白(如BAX、BAK和BAD)定位于线粒体膜上,其中Bcl-2家族促凋亡蛋白能够促进细胞色素C释放,诱导细胞凋亡。目前普遍认为,cAMP信号调控了线粒体起始的细胞凋亡。许多研究使用调控细胞内cAMP浓度的试剂,发现维持细胞内高水平的cAMP促进了细胞凋亡,其机制可能是cAMP激活PKA后使位于线粒体外膜上的BAX等促凋亡蛋白磷酸化,使其转位至线粒体,进而激活细胞凋亡通路,释放细胞色素C,引起胱冬肽酶(caspase)家族蛋白活化级联反应,诱导细胞凋亡^[46-48]。然而,另外一些研究证明,cAMP信号通路也能够抑制神经细胞、胃上皮及肝等多种类型细胞的凋亡^[49-51]。研究发现,使用前列腺素E2或腺苷酸环化酶激活剂增加细胞内的cAMP水平,促进了细胞抗凋亡,而且使用一些抗凋亡的因子处理细胞,发现其通过cAMP/PKA信号通路实现抗凋亡的作用^[52-54]。值得注意的是,有研究发现,白细胞介素3激活cAMP/PKA信号使凋亡促进因子BAD磷酸化,抑制了细胞凋亡,其机制可能是在线粒体外膜上形成PKA-BAD复合物,进而阻止BAD引起的细胞凋亡^[55-56]。这些研究结果揭示,cAMP信号通路也具有抗凋亡的作用,但目前关于其抗凋亡机制尚不十分明确。

综上所述,cAMP/PKA信号通路激活后可能具有促凋亡或抑制凋亡的作用,但此信号通路调控细胞凋亡存在差异的分子机制尚不完全清楚,可能归咎于细胞类型的不同以及环境条件的差异。

3.4 呼吸链复合体蛋白的磷酸化

早期研究认为,细胞质和线粒体内cAMP依赖的PKA共同催化了线粒体呼吸链蛋白质亚基的磷酸化^[57-58]。目前许多证据表明,线粒体内存在sAC/cAMP/PKA信号系统,其在调控呼吸链复合体蛋白质磷酸化方面发挥了关键作用^[11,59]。尽管细胞质内cAMP不能进入线粒体基质内调控PKA的活性,但信号因子激活tmAC将增加细胞质内的cAMP,促进线粒体积累Ca²⁺,Ca²⁺水平升高后能够激活线粒体

内sAC,产生cAMP激活PKA,进而使呼吸链复合体蛋白磷酸化^[60]。Papa等^[61]研究发现,PKA激活后使线粒体呼吸链复合体I多个亚基磷酸化,增强了其活性。NDUFS4是由细胞核编码的线粒体呼吸链复合体I的辅助亚基,具有调控呼吸链复合体I装配和活性的功能,是人类致命性神经系统综合征热点突变基因。为了了解呼吸链复合体I亚基磷酸化与其功能的关系,有研究发现,线粒体基质内的PKA能够将NDUFS4磷酸化,而且患有致命性神经系统综合病人的成纤维细胞NDUFS4突变亚基后,cAMP依赖的NDUFS4磷酸化程度下降,同时发现线粒体呼吸链复合体I活性降低^[62-63]。许多研究推测,呼吸链复合体I亚基的磷酸化可能调控了复合体I转运和装配,进而影响其活性^[64-65]。目前,尽管发现多个亚基能够被磷酸化,但磷酸化后对其功能的影响及作用机制仍很不清楚,因此,关于cAMP依赖的线粒体复合体I亚基蛋白磷酸化与其功能的联系仍需要深入调查。

研究表明,线粒体内sAC/cAMP/PKA信号通路也能使呼吸链复合体IV亚基-1磷酸化,说明sAC/cAMP/PKA也可能参与了呼吸链复合体IV功能的调控^[11]。有实验证据表明,呼吸链复合体IV亚基-1基因突变后ROS产量增加,同时,PGC1 α 和NRF1基因表达量增加,进而促进线粒体生物合成,用于补偿呼吸链复合体IV亚基-1基因突变导致的氧化代谢功能的异常,而且线粒体sAC/cAMP/PKA信号通路激活后,提高了呼吸链复合体IV的活性,增强了氧化磷酸化功能^[66]。目前,关于线粒体呼吸链复合体IV许多磷酸化位点已确认为苏氨酸和色氨酸,调控其位点磷酸化的激酶种类仍有待确定,但实验证据表明,线粒体呼吸链复合体IV存在多个潜在的cAMP/PKA信号磷酸化位点,可能在调控线粒体氧化代谢和ROS产生方面发挥了重要作用^[67]。

呼吸链复合体V,即ATP合成酶,可在线粒体呼吸链复合体产生的跨膜质子动力势的推动下,利用ADP和Pi催化合成ATP,而且,当线粒体膜电位下降后,ATP合成酶也可以催化ATP水解。近年研究发现,ATP合成酶抑制因子1(ATPase inhibitory factor 1, ATPIF1)能够结合ATP合成酶,使其活性下降,线粒体sAC/cAMP/PKA信号能够使ATPIF1磷酸化,阻止其与ATP合成酶结合,进而提高ATP合成酶的活性^[68]。综上所述,线粒体内sAC/cAMP/PKA信号通路能够使呼吸链复合体I和IV相关亚基蛋白磷酸化,也能使

ATP合成酶抑制因子1磷酸化,进而调控呼吸链复合体蛋白功能,但其是否能够使其他复合体亚基磷酸化尚不确定,尚需进一步研究。

3.5 氧化磷酸化代谢能力

目前研究已经证明, sAC和PKA位于细胞线粒体内, sAC被激活后催化ATP产生cAMP^[10,69]。线粒体内产生的cAMP激活PKA, 激活的PKA能够将多种细胞呼吸链复合体亚基磷酸化, 提高其活性^[69]。研究还发现, ATP合成酶抑制因子能够与ATP合成酶结合, 使其构象发生变化, 抑制其活性^[70]。值得注意的是, 近年研究发现, sAC/cAMP/PKA信号系统能够使ATP合成酶抑制因子丝氨酸磷酸化(Ser 39), 阻止其与ATP合成酶结合, 进而增强ATP合成酶活性、促进ATP的产生^[71]。这些研究结果说明, 动物细胞线粒体内的sAC/cAMP/PKA信号系统在调控氧化磷酸化代谢方面发挥了重要作用。

碳酸酐酶是一种利用碳酸氢盐和离子平衡CO₂水平的广谱酶, 研究发现, 5型碳酸酐酶的2个亚基位于线粒体内^[72]。碳酸酐酶、sAC和三羧酸循环代谢共存于线粒体内, 说明三羧酸循环产生的CO₂可能被线粒体内的碳酸酐酶转化为碳酸氢盐, 调控sAC的活性, 可能影响sAC/cAMP/PKA信号系统调控氧化磷酸化代谢的作用。Acin-Perez等^[11]通过研究证明, 线粒体内sAC/cAMP/PKA信号通路调控了氧化磷酸化代谢, 而且代谢程度对线粒体内生理浓度的碳酸氢盐、代谢产生的CO₂水平及碳酸酐酶活性敏感。因此, 线粒体内sAC/cAMP/PKA信号通路对代谢活性的敏感是解释细胞代谢活动与营养获取之间相关的关键机制。随着细胞获取营养物质, 其代谢能力增强, 线粒体CO₂水平和基质内碳酸氢盐浓度升高, 激活了sAC/cAMP/PKA信号通路, 进一步促进氧化磷酸化代谢, 同时限制了ROS的产生。

4 小结

综上所述, 动物细胞质及线粒体基质内存在cAMP信号系统, 在细胞内外信号的刺激及环境胁迫的影响下, cAMP信号应答后调控了线粒体生物合成、氧化代谢及线粒体起始的细胞凋亡等功能。值得注意的是, 线粒体基质内存在的sAC受到细胞信号刺激能够产生cAMP, 激活下游因子调控线粒体代谢功能。线粒体内亚区域产生cAMP的信号系统受钙离子和碳酸氢盐的调控, 这些信号因子协同调控

能量代谢, 但钙离子和碳酸氢盐是否调节胞质和线粒体内的cAMP信号尚不清楚, 而且cAMP信号与其他信号交互作用至何种程度, 进而实现对线粒体功能的调控有待探究。

线粒体内存在的cAMP信号系统能够激活位于线粒体内的呼吸链复合体蛋白调控氧化代谢, 但这些蛋白横跨线粒体内膜, 分布于线粒体基质或膜间腔等不同的区域, 因此可能受到线粒体不同区域cAMP/PKA信号的调控, 协调影响呼吸链复合体活性。随着线粒体磷酸化蛋白质组、磷酸二酯酶类、激酶及磷酸酶等方面研究的广泛深入, 将可能建立调控线粒体蛋白质磷酸化及活性的复杂信号网络。

cAMP主要调控PKA、EPAC和环核苷酸门控离子通道等下游效应因子, 但目前cAMP/PKA信号研究得比较明确, 而对其他的下游靶蛋白及其功能研究较少, 未来仍需要深入调查。随着人们对cAMP调控下游靶蛋白的研究深入, 将可能阐明线粒体通过与其他细胞器互作, 进而调控线粒体生物合成、形态动力学以及氧化代谢等生理过程的机制。

鉴于cAMP信号系统在调控动物细胞线粒体动态、生物合成及氧化代谢方面发挥了重要作用, 未来人们可通过操纵cAMP信号系统来调节线粒体功能, 同时筛选调控cAMP/PKA信号系统的功能物质, 为治疗线粒体功能障碍导致的疾病开辟新的研究方向。

参考文献 (References)

- 1 Siddiqui A, Bhaumik D, Chinta SJ, Rane A, Rajagopalan S, Lieu CA, *et al.* Mitochondrial quality control via the PGC1 α -TFEB signaling pathway is compromised by Parkin Q311X mutation but independently restored by Rapamycin. *J Neurosci* 2015; 35(37): 12833-44.
- 2 Yin F, Sancheti H, Liu Z, Cadenas E. Mitochondrial function in ageing: Coordination with signalling and transcriptional pathways. *J Physiol* 2016; 594(8): 2025-42.
- 3 Zamora M, Pardo R, Villena JA. Pharmacological induction of mitochondrial biogenesis as a therapeutic strategy for the treatment of type 2 diabetes. *Biochem Pharmacol* 2015; 98(1): 16-28.
- 4 Schatten H, Sun QY, Prather R. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2014; 12: 111.
- 5 Valsecchi F, Ramos-Espiritu LS, Buck J, Levin LR, Manfredi G. cAMP and mitochondria. *Physiology (Bethesda)* 2013; 28(3): 199-209.
- 6 Wu Z, Huang X, Feng Y, Handschin C, Gullicksen PS, Bare O, *et al.* Transducer of regulated CREB-binding proteins (TORCs) induce PGC-1 α transcription and mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(39): 14379-84.
- 7 Kim H, Scimia MC, Wilkinson D, Trelles RD, Wood MR, Bow-

- tell D, *et al.* Fine-tuning of Drp1/Fis1 availability by AKAP121/Siah2 regulates mitochondrial adaptation to hypoxia. *Mol Cell* 2011; 44(4): 532-44.
- 8 Means CK, Lygren B, Langeberg LK, Jain A, Dixon RE, Vega AL, *et al.* An entirely specific type I A-kinase anchoring protein that can sequester two molecules of protein kinase A at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(48): 1227-35.
 - 9 Zippin JH, Chen Y, Nahirney P, Kamenetsky M, Wuttke MS, Fischman DA, *et al.* Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J* 2003; 17(1): 82-4.
 - 10 DiPilato LM, Cheng X, Zhang J. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16513-8.
 - 11 Acin-Perez R, Salazar E, Kamenetsky M, Buck J, Levin LR, Manfredi G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2009; 9(3): 265-76.
 - 12 Di Benedetto G, Scalzotto E, Mongillo M, Pozzan T. Mitochondrial Ca^{2+} uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab* 2013; 17(6): 965-75.
 - 13 Lefkimiatis K, Leronni D, Hofer AM. The inner and outer compartments of mitochondria are sites of distinct cAMP/PKA signaling dynamics. *J Cell Biol* 2013; 202(3): 453-62.
 - 14 Kleitke B, Sydow H, Wollenberger A. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase activity in isolated guinea pig and rat liver mitochondria. *Acta Biol Med Ger* 1976; 35(3/4): K9-K17.
 - 15 Verdanis A. Protein kinase activity at the inner membrane of mammalian mitochondria. *J Biol Chem* 1977; 252(3): 807-13.
 - 16 Schwoch G, Trinczek B, Bode C. Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP dependent protein kinases in mitochondria from various rat tissues. *Biochem J* 1990; 270(1): 181-8.
 - 17 Ma MP, Thomson M. Protein kinase A subunit alpha catalytic and a kinase anchoring protein 79 in human placental mitochondria. *Open Biochem J* 2012; 6(1): 23-30.
 - 18 Technikova-Dobrova Z, Sardanelli AM, Papa S. Phosphorylation of mitochondrial proteins in bovine heart: Characterization of kinases and substrates. *FEBS Lett* 1993; 322(1): 51-5.
 - 19 Sardanelli AM, Technikova-Dobrova Z, Speranza F, Mazzocca A, Scacco S, Papa S. Topology of the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase and its substrates. *FEBS Lett* 1996; 396(2/3): 276-8.
 - 20 Grimsrud PA, Carson JJ, Hebert AS, Hubler SL, Niemi NM, Bailey DJ, *et al.* A quantitative map of the liver mitochondrial phosphoproteome reveals posttranslational control of ketogenesis. *Cell Metab* 2012; 16(5): 672-83.
 - 21 Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): A multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev* 2013; 65(2): 670-709.
 - 22 Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, *et al.* A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* 2002; 4(11): 901-6.
 - 23 Dao KK, Teigen K, Kopperud R, Hodneland E, Schwede F, Christensen AE, *et al.* Dorskland, Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem* 2006; 281(30): 21500-11.
 - 24 Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: Compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal* 2011; 23(8): 1257-66.
 - 25 Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J* 2015; 282(4): 647-72.
 - 26 Bogacka I, Ukropcova B, McNeil M, Gimble JM, Smith SR. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(12): 6650-6.
 - 27 Ray Hamidie RD, Yamada T, Ishizawa R, Saito Y, Masuda K. Curcumin treatment enhances the effect of exercise on mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by increasing cAMP levels. *Metabolism* 2015; 64(10): 1334-47.
 - 28 Chowanadisai W, Bauerly KA, Tchapanian E, Wong A, Cortopassi GA, Rucker RB. Pyrroloquinoline quinone stimulates mitochondrial biogenesis through cAMP response element-binding protein phosphorylation and increased PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* 2010; 285(1): 142-52.
 - 29 Lee J, Kim CH, Simon DK, Aminova LR, Andreyev AY, Kushnareva YE, *et al.* Mitochondrial cyclic AMP responsive element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J Biol Chem* 2005; 280(49): 40398-401.
 - 30 De Rasmio D, Signorile A, Roca E, Papa S. cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *FEBS J* 2009; 276(16): 4325-33.
 - 31 Ryu H, Lee J, Impey S, Ratan RR, Ferrante RJ. Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(39): 13915-20.
 - 32 De Rasmio D, Signorile A, Roca E, Papa S. cAMP response element-binding protein (CREB) is imported into mitochondria and promotes protein synthesis. *FEBS J* 2009; 276(16): 4325-33.
 - 33 Matsushima Y, Goto Y, Kaguni LS. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(43): 18410-5.
 - 34 Lu B, Lee J, Nie X, Li M, Morozov YI, Venkatesh S, *et al.* Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol Cell* 2013; 49(1): 121-32.
 - 35 Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: From proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(9): 655-67.
 - 36 Gerbeth C, Schmidt O, Rao S, Harbauer AB, Mikropoulou D, Opalinska M, *et al.* Glucose-induced regulation of protein import receptor Tom22 by cytosolic and mitochondria-bound kinases. *Cell Metab* 2013; 18(4): 578-87.
 - 37 Rao S, Schmidt O, Harbauer AB, Schonfisch B, Guiard B, Pfanner N, *et al.* Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: Protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import. *Mol Biol Cell* 2012; 23(9): 1618-27.

- 38 Chauhan A, Vera J, Wolkenhauer O. The systems biology of mitochondrial fission and fusion and implications for disease and aging. *Biogerontology* 2014; 15(1): 1-12.
- 39 Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, *et al.* Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(41): 15803-8.
- 40 Merrill RA, Dagda RK, Dickey AS, Cribbs JT, Green SH, Usachev YM, *et al.* Mechanism of neuroprotective mitochondrial remodeling by PKA/AKAP1. *PLoS Biol* 2011; 9(4): e1000612.
- 41 Cribbs JT, Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 2007; 8(10): 939-44.
- 42 Dickey AS, Strack S. PKA/AKAP1 and PP2A/B β 2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics. *J Neurosci* 2011; 31(44): 15716-26.
- 43 Loh JK, Lin CC, Yang MC, Chou CH, Chen WS, Hong MC, *et al.* GSKIP- and GSK3-mediated anchoring strengthens cAMP/PKA/Drp1 axis signaling in the regulation of mitochondrial elongation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853(8): 1796-807.
- 44 Zhou W, Chen KH, Cao W, Zeng J, Liao H, Zhao L, *et al.* Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2. *Atherosclerosis* 2010; 211(1): 216-23.
- 45 Rogne M, Tasken K. Compartmentalization of cAMP signaling in adipogenesis, lipogenesis, and lipolysis. *Horm Metab Res* 2014; 46(12): 833-40.
- 46 Ding B, Abe J, Wei H, Xu H, Che W, Aizawa T, *et al.* A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(41): 14771-6.
- 47 Zhu Y, Yao J, Meng Y, Kasai A, Hiramatsu N, Hayakawa K, *et al.* Profiling of functional phosphodiesterase in mesangial cells using a CRE-SEAP-based reporting system. *Br J Pharmacol* 2006; 148(6): 833-44.
- 48 Dou AX, Wang X. Cyclic adenosine monophosphate signal pathway in targeted therapy of lymphoma. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123(1): 95-9.
- 49 Krakstad C, Christensen AE, Døskeland SO. cAMP protects neutrophils against TNF- α -induced apoptosis by activation of cAMP-dependent protein kinase, independently of exchange protein directly activated by cAMP (Epac). *J Leukoc Biol* 2004; 76(3): 641-7.
- 50 Leone V, di Palma A, Ricchi P, Acquaviva F, Giannouli M, Di Prisco AM, *et al.* Acquaviva, PGE2 inhibits apoptosis in human adenocarcinoma Caco-2 cell line through Ras-PI3K association and cAMP-dependent kinase A activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293(4): G673-81.
- 51 Gates A, Hohenester S, Anwer MS, Webster CR. Webster, cAMP-GEF cytoprotection by Src tyrosine kinase activation of phosphoinositide-3-kinase p110 β /phosphatidylinositol-3-OH kinase β in rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296(4): G764-74.
- 52 Hoshino T, Tsutsumi S, Tomisato W, Hwang HJ, Tsuchiya T, Mizushima T. Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J Biol Chem* 2003; 278(15): 12752-8.
- 53 Zhang J, Wang Q, Zhu N, Yu M, Shen B, Xiang J, Lin A. Cyclic AMP inhibits JNK activation by CREB-mediated induction of c-FLIP(L) and MKP-1, thereby antagonizing UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1654-62.
- 54 Cornu M, Modi H, Kawamori D, Kulkarni RN, Joffraud M, Thorens B. Thorens, Glucagonlike peptide-1 increases beta-cell glucose competence and proliferation by translational induction of insulin-like growth factor-1 receptor expression. *J Biol Chem* 2010; 285(14): 10538-45.
- 55 Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ, Taylor SS, *et al.* Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell* 1999; 3(4): 413-22.
- 56 Yang J, Li JH, Wang J, Zhang CY. Molecular modeling of BAD complex resided in a mitochondrion integrating glycolysis and apoptosis. *J Theor Biol* 2010; 266(2): 231-41.
- 57 Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 971-1005.
- 58 Sardanelli AM, Signorile A, Nuzzi R, Rasmø DD, Technikova-Dobrova Z, Drahota Z, *et al.* Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMP-dependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 2006; 580(24): 5690-6.
- 59 Koopman WJ, Distelmaier F, Smeitink JA, Willems PH. OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J* 2013; 32(1): 9-29.
- 60 García-Bermúdez J, Cuezva JM. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1857(8): 1167-82.
- 61 Papa S, De Rasmø D, Scacco S, Signorile A, Technikova-Dobrova Z, Palmisano G, *et al.* Mammalian complex I: A regulable and vulnerable pacemaker in mitochondrial respiratory function. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777(7/8): 719-28.
- 62 Papa S, Scacco S, Sardanelli AM, Vergari R, Papa F, Budde S, *et al.* Mutation in the NDUFS4 gene of complex I abolishes cAMP-dependent activation of the complex in a child with fatal neurological syndrome. *FEBS Lett* 2001; 489(2/3): 259-62.
- 63 Papa S, De Rasmø D. Complex I deficiencies in neurological disorders. *Trends Mol Med* 2013; 19(1): 61-9.
- 64 Palmisano G, Sardanelli AM, Signorile A, Papa S, Larsen MR. The phosphorylation pattern of bovine heart complex I subunits. *Proteomics* 2007; 7(10): 1575-83.
- 65 Covian R, Balaban RS. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303(8): H940-66.
- 66 Acin-Perez R, Salazar E, Brosel S, Yang H, Schon EA, Manfredi G. Modulation of mitochondrial protein phosphorylation by soluble adenylyl cyclase ameliorates cytochrome oxidase defects. *EMBO Mol Med* 2009; 1: 392-406.
- 67 Huttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, *et al.* Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1817(4): 598-609.
- 68 García-Bermúdez J, Sánchez-Arago M, Soldevilla B, Del Arco A, Nuevo-Tapióles C, Cuezva JM. PKA phosphorylates the ATPase inhibitory factor 1 and inactivates its capacity to bind and inhibit the mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Cell Rep* 2015; 12(12): 2143-55.

- 69 Acin-Perez R, Gatti DL, Bai Y, Manfredi G. Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: Coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab* 2011; 13(6): 712-9.
- 70 García-Bermúdez J, Sánchez-Aragó M, Soldevilla B, Del Arco A, Nuevo-Tapióles C, Cuezva JM. PKA phosphorylates the ATPase inhibitory factor 1 and inactivates its capacity to bind and inhibit the mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Cell Rep* 2015; 12(12): 2143-55.
- 71 De Rasmio D, Micelli L, Santeramo A, Signorile A, Lattanzio P, Papa S. cAMP regulates the functional activity, coupling efficiency and structural organization of mammalian FOF1 ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1857(4): 350-8.
- 72 Henry RP. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu Rev Physiol* 1996; 58: 523-38.