

线粒体内质网结构偶联介导的线粒体Ca²⁺摄取及其与肿瘤发生关系研究进展

朱子建¹ 张嘉煜¹ 孙夏承² 郭欣³ 季乐乐^{2*} 黄启超^{2*}

(¹第四军医大学基础医学院四大队, 西安 710032; ²第四军医大学基础医学院教学实验中心, 西安 710032; ³第四军医大学第一附属医院神经内科, 西安 710032)

摘要 线粒体内质网结构偶联(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes, MAMs)是线粒体外膜与内质网膜间形成的、具有稳定间距的相互作用膜结构,在介导两细胞器间的物质和信息传递中发挥关键作用。研究表明, MAMs上分布有大量Ca²⁺转运通道及相关调控蛋白,可精细调控线粒体Ca²⁺稳态及ATP生成、细胞凋亡等一系列重要细胞生命活动。进一步研究还发现, MAMs上富集了大量肿瘤相关分子,因此,其参与恶性肿瘤发生的作用机制迅速成为肿瘤基础研究的热点。该文围绕MAMs对线粒体Ca²⁺摄取及肿瘤发生调控的最新研究进展予以综述,旨在为进一步理解肿瘤发病机制提供新的思路和依据。

关键词 线粒体; 线粒体内质网结构偶联; Ca²⁺信号; 肿瘤

Progress in the Study of the Relationship between Mitochondria Ca²⁺ Intake Mediated by Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes and Tumorigenesis

Zhu Zijian¹, Zhang Jiayu¹, Sun Xiacheng², Guo Xin³, Ji Lele^{2*}, Huang Qichao^{2*}

(¹The Fourth Brigade, School of Basic Medical Sciences, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

²Preclinical Medical Teaching Experiment Center of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

³First Affiliated Hospital Neurology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) are regions of the endoplasmic reticulum (ER) tethered to mitochondria, which play a key role in mediating material transfer and signal transduction between the two organelles. Recent studies have demonstrated that a large number of Ca²⁺ transporter proteins and their regulatory proteins are located on MAMs, which can finely regulate a series of important cellular activities such as mitochondrial Ca²⁺ homeostasis, ATP production and cell apoptosis. Further studies also imply that MAMs are also enriched with many oncogenic proteins and tumor suppressor proteins, which are closely related to the regulation of Ca²⁺ transport. Therefore, the role of MAMs in tumorigenesis has received extensive attention. In this review, we focus on the regulatory mechanisms of Ca²⁺ transport mediated by MAMs and their role in tumorigenesis, aiming to acquire the new insight to further understanding the pathogenesis of tumors.

Keywords mitochondria; mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes; Ca²⁺ signal; tumor

收稿日期: 2018-06-20 接受日期: 2018-08-27

国家自然科学基金(批准号: 81772935、81400197)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15829727685, E-mail: seasonglad@126.com; Tel: 15771902435, E-mail: huangqichao1@163.com

Received: June 20, 2018 Accepted: August 27, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81772935, 81400197)

*Corresponding authors. Tel: +86-15829727685, E-mail: seasonglad@126.com; Tel: +86-15771902435, E-mail: huangqichao1@163.com

网络出版时间: 2018-11-27 16:57:22 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181127.1650.006.html>

线粒体 (mitochondria) 和内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 作为真核细胞中最重要的细胞器和Ca²⁺库, 在生命活动中存在着紧密联系。随着电子显微镜、超高分辨率荧光成像技术以及蛋白组学鉴定技术的发展, 人们逐渐在多种真核细胞中发现, 线粒体和内质网间可通过蛋白相互作用形成特殊的物理连接, 并将这种现象命名为线粒体内质网结构偶联 (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes, MAMs)。越来越多的证据表明, MAMs最重要的功能之一就是促进线粒体Ca²⁺摄取, 进而调节三羧酸循环中关键酶的活性, 对ATP和细胞凋亡等具有重要意义^[1-3]。进一步研究发现, 包括代谢类疾病^[4]、神经退行性病变^[5]在内的多种疾病都与MAMs介导线粒体Ca²⁺摄取异常有关。可见, MAMs结构与功能的稳定是维持细胞正常生命活动的必要条件之一。在肿瘤相关研究中, MAMs介导线粒体Ca²⁺摄取异常日益受到基础及临床研究者的关注, 并取得了初步进展。因此, 系统了解相关知识对进一步加深理解肿瘤发生机制和建立肿瘤治疗新方法具有重要的理论指导意义。

1 MAMs的结构基础

早在20世纪70年代, Morré等^[6]就在电镜下观察

到线粒体外膜和内质网膜间存在紧密接触, 但其结构及功能尚不清楚。直到90年代初期, Jean Vance实验室^[7]通过差速离心等技术首次分离纯化这种内质网与线粒体相互偶联结构, 对其蛋白组分进行了初步分析, 并将其命名为MAMs。近年来, 随着越来越多关于MAMs分子组成及功能研究工作的开展, 人们对MAMs的认识也更为清楚, 即MAMs是指线粒体外膜和内质网膜之间形成的紧密物理连接(10~25 nm), 随着细胞内微环境的改变“募集”蛋白分子构成细胞器间动态的偶联“平台”, 将线粒体和内质网功能连接起来。例如, MAMs附近可形成高Ca²⁺微区, 促进线粒体Ca²⁺摄取, 进而调控多种细胞生命活动。此外, MAMs还被发现与细胞脂质代谢、能量代谢等密切相关。

2 MAMs介导的Ca²⁺转运的分子构成

目前, 人们已发现数十种蛋白定位于MAMs并与MAMs功能密切相关。其中一部分蛋白为Ca²⁺通道, 如1,4,5-三磷酸肌醇受体蛋白 (inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP₃R)、电压依赖性阴离子通道蛋白 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 以及位于线粒体内膜的线粒体钙单向转运体 (mitochondrial calcium uniporter, MCU) 等。此外, 一些调控Ca²⁺转运的蛋白分子也被发现定位于MAMs区域(图1)。

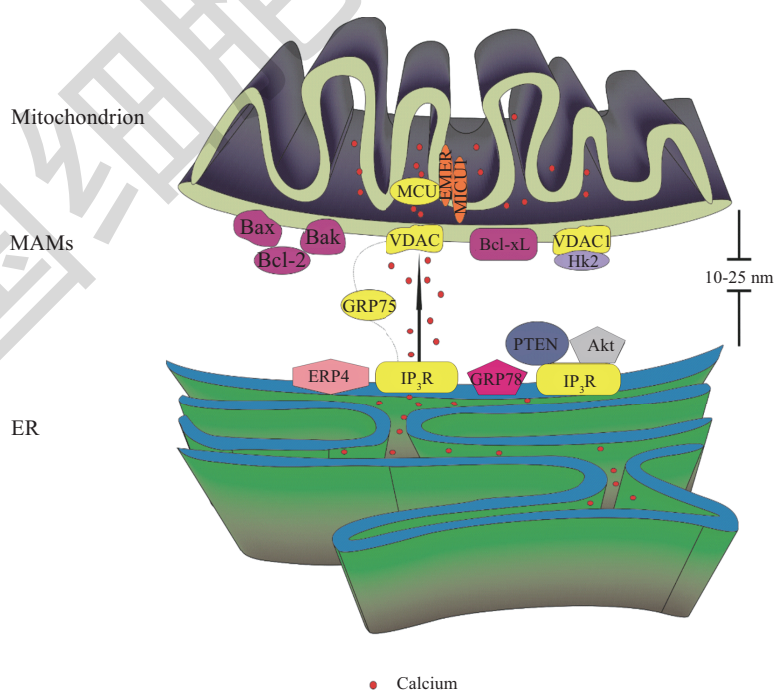


图1 线粒体内质网结构偶联(MAMs)的结构模式示意图(根据参考文献[8]修改)

Fig.1 Schematic representation of the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) (modified from reference [8])

2.1 内质网膜上的1,4,5-三磷酸肌醇受体(IP₃R)

IP₃R是一种普遍存在于内质网的Ca²⁺释放通道蛋白,可被胞内第二信使1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)激活并参与MAMs区域内的Ca²⁺精确调控。IP₃R有三个亚型,即IP₃R1、IP₃R2、IP₃R3,分别由2 749、2 709及2 701个氨基酸残基构成,具有高度同源性,大部分细胞三个亚型均有表达。当细胞受到胞外环境刺激进而激活G蛋白偶联受体时,胞内迅速升高的IP₃可通过与IP₃R结合导致内质网Ca²⁺释放,进而在MAMs附近形成高Ca²⁺微区,并通过正反馈激活IP₃R释放更多储存在内质网中的Ca²⁺,促进线粒体钙摄取。而当胞质内Ca²⁺浓度超过300 nmol/L时,则负反馈抑制IP₃R活性。此外,细胞内一些代谢产物也会通过调节IP₃R活性影响MAMs区域内Ca²⁺的转运效率。例如,葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)能促进IP₃R活性,从而增加线粒体对Ca²⁺的摄入,而同样位于MAMs上的内质网蛋白44(endoplasmic reticulum protein 44, ERP44)则与GRP78竞争相同的作用靶点,当ERP44表达上调时将抑制IP₃R的活性,减少ER内Ca²⁺释放^[8-9]。此外,ATP可促进IP₃R介导的Ca²⁺释放,而肝素则是IP₃R的特异性抑制剂^[10]。

2.2 线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道(VDAC)

VDAC是受线粒体外膜电势调控的一类选择性通道,可转运包括Ca²⁺在内的多种阳离子、阴离子和线粒体代谢底物^[11]。VDAC有VDAC1、VDAC2、VDAC3三种不同的亚型,并且通过与不同调控蛋白结合而行使不同功能。其中,VDAC1可形成孔状结构且表达于MAMs上,因此,可介导ER释放的Ca²⁺快速转运到线粒体内外膜间腔^[12]。例如,Rapizzi等^[13]发现,在诱导ER释放Ca²⁺的情况下,过表达VDAC1的HeLa细胞和骨骼肌细胞线粒体内Ca²⁺浓度显著升高,敲除VDAC1则导致线粒体Ca²⁺浓度显著降低。此外,位于MAMs区域的葡萄糖调节蛋白75(glucose-regulated protein 75, GRP75)可以促进VDAC1和IP₃R间的联系,进而促进线粒体Ca²⁺摄取。因此,可通过减少VDAC1和IP₃R间的相互作用来抑制线粒体Ca²⁺摄取^[14]。

2.3 线粒体内膜上的线粒体钙单向转运体(MCU)及其复合体

MCU是位于线粒体内膜上重要的Ca²⁺摄取通

道蛋白。研究表明, Ca²⁺依赖MCU进入线粒体基质的过程是一个依赖于线粒体内膜电势、顺Ca²⁺电化学梯度扩散的过程。因MCU只介导Ca²⁺吸收而不介导其释放,故而MCU被称为线粒体钙单向转运体^[15]。MCU摄入Ca²⁺的过程需要多个调控蛋白质形成复合体,包括MICU1、MICU2、MCUb和EMRE^[16-17]等蛋白。其中, MICU1承担着“守门员”的角色,它可以稳定MCU复合物所在的结构域并控制Ca²⁺在线粒体中的积累,防止线粒体Ca²⁺超载的发生^[18]。而EMRE则扮演着MICU和MCU间的桥梁作用,敲除EMRE后,MCU活性会降低,导致线粒体对Ca²⁺摄取减少。MCU的表达还受到微小核糖核酸-25(microRNA-25, miR-25)的调控, miR-25表达上调能够抑制MCU的表达而减少线粒体对Ca²⁺的摄取^[19]。由此可见,MCU转运Ca²⁺是一个高度复杂并受到严格调控的过程。

3 Ca²⁺摄取对线粒体功能的影响

MAMs介导Ca²⁺由ER释放进入线粒体,引起线粒体内部一系列生化反应,从而调控各种细胞生命活动。一方面,生理状态下线粒体Ca²⁺升高可调节Krebs循环中多种酶活性进而促进线粒体ATP的生成。例如,丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)可受到线粒体Ca²⁺激活发生去磷酸化,促进丙酮酸氧化脱羧为乙酰辅酶A。异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, ICDH)和酮戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase, OGDH)在线粒体Ca²⁺变构调节作用下,可增强与底物的亲和力加速Krebs循环^[20]。此外,还有研究证明,线粒体Ca²⁺可直接激活线粒体中电子传递链和F₀F₁ATP合酶的活性^[21-22]。而另一方面,线粒体基质内Ca²⁺的过量累积则会导致ROS的生成和“渗透性转运”,使线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放,干扰线粒体的膜电位并破坏氧化磷酸化作用,进而导致线粒体肿胀或崩解及促凋亡因子的释放,最终引发细胞死亡。由此可见,线粒体的Ca²⁺稳态调节显著影响着细胞的生命活动进程。

4 MAMs调控Ca²⁺转运对肿瘤发生的影响

近年来,越来越多的研究证实,线粒体Ca²⁺在肿瘤细胞生存、迁移、侵袭中发挥重要调控作用。例如,在多种类型肿瘤细胞中,线粒体Ca²⁺浓度降低,

进而加速肿瘤细胞由有氧呼吸向糖酵解转变, 促进细胞增殖。此外, 线粒体Ca²⁺水平的降低还被认为是导致肿瘤细胞凋亡抵抗的核心环节^[23]。更为引人关注的是, 新近研究表明, MAMs上定位有多种抑癌蛋白和致癌蛋白, 并对调控MAMs区域的线粒体Ca²⁺转运起关键作用。一般情况下, 抑癌蛋白能够促进MAMs区域线粒体Ca²⁺转运, 而致癌蛋白则可以抑制其转运^[24]。因此, 增强MAMs区域的线粒体Ca²⁺转运对诱发肿瘤细胞凋亡具有重要意义。

4.1 B细胞性淋巴瘤-2(B-cell CLL/lymphoma-2, Bcl-2)家族蛋白

Bcl-2家族蛋白在调控线粒体相关细胞凋亡途径中发挥关键作用。根据功能不同, Bcl-2家族蛋白可分为促凋亡和抗凋亡两类^[25]。近年来的许多研究表明, Bcl-2家族蛋白可以和IP₃R的不同功能区相互作用, 进而促进或抑制IP₃R介导的Ca²⁺信号, 从而调控肿瘤细胞的凋亡^[25-27]。其中, 抗凋亡蛋白Bcl-2是第一个被证实通过调控线粒体Ca²⁺来抑制凋亡的蛋白^[25-26]。Williams等^[27]发现, 大量Bcl-2富集于MAMs区域的, 并可通过与IP₃R相互作用抑制其Ca²⁺通道活性, 进而抵抗肿瘤细胞凋亡。Monaco等^[28]发现, 抗凋亡蛋白Bcl-xL在某些肿瘤中高表达, Bcl-xL能与VDAC1相互作用限制线粒体Ca²⁺摄取从而抑制凋亡^[29]。同时, 它还能通过拮抗Bcl-2家族其他成员来阻断肿瘤细胞凋亡通路, 包括Bak、Bax及Bid等蛋白^[30]。

4.2 Akt蛋白

已有众多研究表明, 位于MAMs上的致癌蛋白Akt能促进IP₃R3磷酸化, 抑制内质网Ca²⁺释放和肿瘤细胞的凋亡^[31-32], 同时, Akt还可以通过磷酸化己糖激酶2(hexokinase 2, HK2)促进HK2和VDAC1的相互作用, 进而抑制Ca²⁺依赖的细胞凋亡应答。最近研究发现, 位于MAMs上的PTEN可通过对PIP₃的脱磷酸作用拮抗PI₃K/Akt通路, 下调Akt活性, 使其磷酸化IP₃R3的能力下降, 最终促进肿瘤细胞凋亡^[33]。

5 总结与展望

自1971年Morré等^[6]发现了MAMs的存在后, 研究人员关于MAMs结构及相关功能的探索便从未停止过。目前, 越来越多的证据表明, MAMs结构功能异常与肿瘤发生存在密切的联系, MAMs上定位了许多肿瘤相关蛋白分子, 在调节线粒体Ca²⁺转运

过程中发挥关键作用, 进而以我们并不熟知的方式对肿瘤的发生发展起着至关重要的调控作用。同时, MAMs上定位的肿瘤相关蛋白有待进一步探索, MAMs结构功能异常在肿瘤发生进展中的作用机制至今还尚未完全被阐明。因此, 更加深入研究MAMs的相关结构及介导肿瘤发生的机制, 对寻找治疗肿瘤的有效靶点及新药物的开发具有重要意义。

参考文献 (References)

- 1 Bonora M, Patergnani S, Rimessi A, De Marchi E, Suski JM, Bononi A, *et al.* ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal* 2012; 8(3): 343-57.
- 2 Denton RM, Randle PJ, Martin BR. Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J* 1972; 128(1): 161-3.
- 3 McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 1990; 70(2): 391-425.
- 4 Arruda AP, Pers BM, Parlakgul G, Guney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med* 2014; 20(12): 1427-35.
- 5 Krols M, van Isterdael G, Asselbergh B, Kremer A, Lippens S, Timmerman V, *et al.* Mitochondria-associated membranes as hubs for neurodegeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 2016; 131(4): 505-23.
- 6 Morré DJ, Merritt WD, Lembi CA. Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem. *Protoplasma* 1971; 73(1): 43-9.
- 7 Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem* 1990; 265(13): 7248-56.
- 8 Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, *et al.* Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium* 2018; 69: 62-72.
- 9 Higo T, Hattori M, Nakamura T, Natsume T, Michikawa T, Mikoshiba K. Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 2005; 120(1): 85-98.
- 10 Ivanova H, Vervliet T, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Bultynck G. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843(10): 2164-83.
- 11 Colombini M. The VDAC channel: Molecular basis for selectivity. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(10): 2498-502.
- 12 De Stefani D, Bononi A, Romagnoli A, Messina A, De Pinto V, Pinton P, *et al.* VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *Cell Death Differ* 2012; 19(2): 267-73.
- 13 Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird G, *et al.* Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* 2002; 159(4): 613-24.
- 14 Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski

- MR, Cavagna D, *et al.* Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels. *J Cell Biol* 2006; 175(6): 901-11.
- 15 Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 2004; 427(6972): 360-4.
- 16 Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, *et al.* MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Mol Cell* 2014; 53(5): 726-37.
- 17 Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, *et al.* The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *EMBO J* 2013; 32(17): 2362-76.
- 18 Mallilankaraman K, Doonan P, Cardenas C, Chandramoorthy HC, Muller M, Miller R, *et al.* MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cell survival. *Cell* 2012; 151(3): 630-44.
- 19 Zaglia T, Ceriotti P, Campo A, Borile G, Armani A, Carullo P, *et al.* Content of mitochondrial calcium uniporter (MCU) in cardiomyocytes is regulated by microRNA-1 in physiologic and pathologic hypertrophy. *Natl Acad Sci USA* 2017; 114(43): E9006-e15.
- 20 Denton RM, Richards DA, Chin JG. Calcium ions and the regulation of NAD^{+} -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues. *Biochem J* 1978; 176(3): 899-906.
- 21 Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS. Ca^{2+} activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F_0/F_1 -ATPase. *American journal of physiology. Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(2): C423-35.
- 22 Glancy B, Willis WT, Chess DJ, Balaban RS. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry* 2013; 52: 2793-809.
- 23 Bittremieux M, Parys JB, Pinton P, Bultynck G. ER functions of oncogenes and tumor suppressors: Modulators of intracellular Ca^{2+} signaling. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(6 Pt B): 1364-78.
- 24 Herrera-Cruz MS, Simmen T. Cancer: untethering mitochondria from the endoplasmic reticulum? *Frontiers in oncology* 2017; 7: 105.
- 25 Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J* 2001; 20(11): 2690-701.
- 26 Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, *et al.* Reduced loading of intracellular Ca^{2+} stores and downregulation of capacitative Ca^{2+} influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol* 2000; 148(5): 857-62.
- 27 Williams A, Hayashi T, Wolozny D, Yin B, Su TC, Betenbaugh MJ, *et al.* The non-apoptotic action of Bcl-xL: regulating Ca^{2+} signaling and bioenergetics at the ER-mitochondrion interface. *J Bioenerg Biomembr* 2016; 48(3): 211-25.
- 28 Monaco G, Decrock E, Arbel N, van Vliet AR, La Rovere RM, De Smedt H, *et al.* The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of pro-apoptotic Ca^{2+} signals to mitochondria. *J Biol Chem* 2015; 290(14): 9150-61.
- 29 Tsai MF, Jiang D, Zhao L, Clapham D, Miller C. Functional reconstitution of the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter Letm1. *J Gen Physiol* 2014; 143(1): 67-73.
- 30 Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 4): 437-41.
- 31 Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, De Smedt H, Rietdorf K, Kotelevets L, *et al.* Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca^{2+} release and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(7): 2427-32.
- 32 Marchi S, Marinello M, Bononi A, Bonora M, Giorgi C, Rimessi A, *et al.* Selective modulation of subtype III IP(3)R by Akt regulates ER Ca^{2+} release and apoptosis. *Cell Death Dis* 2012; 3: 3: e304.
- 33 Masliah-Planchon J, Pasmant E, Luscan A, Laurendeau I, Ortonne N, Hivelin M, *et al.* MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis. *BMC Genomics* 2013; 14: 473.