

线粒体通透性改变与细胞凋亡

李贵昌 综述,吴坤 审校

(哈尔滨医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,黑龙江 哈尔滨 150001)

【摘要】细胞凋亡受线粒体的调控,线粒体通透性改变(MPT)在凋亡中起着关键作用。Bcl-2家族蛋白等许多因子作用于线粒体,使线粒体膜上的通透性改变孔(PTP)开放,线粒体跨膜电位(ψ_m)降低甚至崩解,线粒体释放出细胞色素c、凋亡诱导因子(AIF)等凋亡相关因子,激活caspase级联反应,导致细胞凋亡。

【关键词】线粒体通透性改变;细胞凋亡;Bcl-2;细胞色素c;凋亡诱导因子

中图分类号:Q731

文献标识码:A

细胞凋亡是在基因调控下进行的细胞主动死亡过程。早期人们一直认为细胞核是调控凋亡的中心,1994年Newmeyer才第1次发现线粒体在非洲爪蟾卵细胞凋亡中起关键作用。近年研究发现,不同凋亡途径都是通过作用于线粒体膜来决定凋亡是否发生,因此人们对于凋亡的认识已经逐渐由细胞核为中心的调控模式转变为以线粒体为中心的调控模式¹。而线粒体在凋亡中的基本变化是线粒体通透性改变(mitochondrial permeability transition, MPT),并由此引起线粒体跨膜电位(ψ_m)降低和促凋亡物质释放等一系列变化,最终导致染色质浓集、DNA核小体间断裂等典型凋亡表现²。

1 MPT的机制

1.1 MPT与 ψ_m

线粒体是细胞氧化供能的动力工厂。由三羧酸循环产生的能量传递给电子,电子传递过程中释放能量,将质子从基质泵入膜间腔,形成 ψ_m 。质子在返回时又将能量传递给ADP和Pi,生成ATP,因此 ψ_m 对维持线粒体功能具有重要作用。MPT与 ψ_m 的稳定有密切关系。MPT是指线粒体内膜非特异性大孔道即通透性改变孔(permeability transition pore, PTP)的非特异性开放。PTP由线粒体内外膜及基质的多种蛋白质成分组成,PTP周期性开放,以维持线粒体内电化学平衡及稳定状态。当PTP持续开放时则出现 ψ_m 降低甚至完全崩解,而

ψ_m 的崩解与细胞凋亡关系密切。近年来陆续有报道证明 ψ_m 的降低早于核酸酶的激活,也早于磷脂酰丝氨酸暴露于细胞表面。而一旦 ψ_m 消失,细胞就会进入不可逆的凋亡过程,如果能稳定 ψ_m 就能阻止细胞凋亡²。

1.2 MPT与PTP复合体

目前MPT的机制还不完全清楚,但越来越多证据显示通透性改变孔复合体(permeability transition pore complex, PTPC)在MPT中起重要作用。PTPC是一种在线粒体内外膜之间连接部位形成的多聚蛋白质复合体结构,主要组成成分之一是腺苷酸移位酶(adenine nucleotide translocase, ANT)。ANT是位于内膜上的一种特殊转运载体蛋白,其生理功能是线粒体内外交换ATP和ADP,但是它也可以形成非特异性通道。PTPC似乎同时控制内外膜通透性和能量代谢,其中ANT可能在PTPC中起关键作用。巯基交联剂、氧化剂通过第56半胱氨酸残基的交联使ANT形成二聚体,此二聚体形成非特异性通道³。氧化剂、ANT配体、Bax、Ca²⁺可诱导非特异性通道形成,Bcl-2抑制此作用,但是不能影响巯基交联剂的诱导凋亡作用¹。ANT和外膜同样丰富的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)及线粒体基质中可溶性亲环蛋白D(cyclophilin-D, CyP-D)相互作用,以ANT—VDAC—CyP-D为核心⁴,同时可能与Bcl-2、Bax、外周苯并二噁受体⁵以及其他参与能量代谢的酶如己糖激酶和

肌酸激酶等相互作用,共同构成 PTPC。

1.3 MPT的结果

PTP有开放与关闭两种构象。PTP开放时可导致多种细胞致死性后果,如呼吸链脱偶联、 m 的消失、超氧离子产生、基质 Ca^{2+} 和 GSH 的外流,同时线粒体释放细胞色素 c 和凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF),导致细胞凋亡。当 PTP 分别与 Cyp-D 和 ANT 的特异性抑制剂环孢菌素 A 或米酵菌酸结合时 PTP 被关闭,从而抑制细胞凋亡的发生。PTP 开放具有自我放大现象,可以在接受死亡信号以后在同一细胞内形成正反馈,意味着 PTP 开放一旦发生就可不再依赖原来的刺激信号,细胞将不可逆地走向死亡⁶。

2 影响 MPT 的凋亡传导信号

现在有越来越多影响 MPT 的细胞内因子被发现,其中最重要的是 Bcl-2 家族相关蛋白,其次细胞内 Ca^{2+} 、活性氧、类脂代谢产物神经酰胺和神经节苷脂、ATP 和 ADP 以及某些 caspase 蛋白酶都可能直接或间接参与 MPT 的调控。

2.1 Bcl-2 家族

Bcl-2 及其家族是调节细胞凋亡的主要基因。目前已经发现 15 个成员,按功能可分为抗凋亡 (Bcl-2、Bcl-XL 等) 和促凋亡 (Bax、Bad、Bid 等) 两大家族,其编码的蛋白质作用于线粒体,双向调节细胞凋亡。Bcl-2 家族蛋白一般含有 4 个结构域 BH1~BH4,有些促凋亡成员如 Bax、Bad 只有 BH1~BH3 结构域, Bid 等则只有 BH3。Bcl-2 的亚细胞定位主要是线粒体膜,其 C 末端是一段疏水序列,可以插入线粒体外膜,胞浆部分可与 Bcl-2 家族成员形成同源或异源二聚体。不同的 Bcl-2 家族蛋白之间相互作用,抑制或促进细胞凋亡。

Bcl-2 能够抑制多种因素诱导的 MPT 和细胞色素 c 的释放,阻止凋亡的发生。其原理有多种假说,例如 Bcl-2 抑制线粒体活性氧的产生⁷、提高线粒体 Ca^{2+} 容许负荷⁶、与 Apaf-1 和 caspase-9 结合并固定于线粒体膜上,阻止 caspase 级联激活、Bcl-XL 与细胞色素 c 直接结合而减少其释放等。Brenner 将 ANT 与 Bax 或 Bcl-2 加入人工脂质双分子层中,通过电生理方法发现 Bax 与 ANT 相互作用,形成通道,而 ANT 与 Bcl-2 结合,抑制 Bax 通道的形成,从而抑制 MPT 的发生⁸。

近期有不少报道称线粒体释放促凋亡物质不需

MPT 的参与。Finucane 等的研究显示 Bax 诱导的细胞色素 c 释放不伴有 m 的降低、MPT 和线粒体肿胀^{9,10}。Antonsson 认为 Bax 在线粒体膜上形成相对分子量 96 000 和 26 000 的两种寡聚物,此寡聚物促进凋亡,但其中不含 ANT 和 VDAC, Bcl-2 抑制 Bax 的寡聚化。因此认为此寡聚物可能是细胞色素 c 的通道,它不依赖 MPT 和 m 的降低¹¹。Bid 是最近研究较多的一种 Bcl-2 家族促凋亡蛋白,仅含有 BH3 结构域,可以被 caspase-8 裂解为截短的 Bid (t-Bid)。t-Bid 转移到线粒体中使细胞色素 c 释放,激活下游的 caspase 级联和凋亡。Kim 等发现在游离线粒体中加入 t-Bid 诱导凋亡并不需要 MPT, MPT 抑制剂也不影响 t-Bid 促进细胞色素 c 的释放¹²。

2.2 胞浆中的 Ca^{2+}

Ca^{2+} 是一种有效的 MPT 诱导剂。超过生理剂量 ($>10 \mu\text{mol/L}$) Ca^{2+} 足以引起 MPT, 在低剂量时它可以促进其他促凋亡因子的效应。增加游离 Ca^{2+} 对诱导凋亡十分重要。尽管还不知道 Ca^{2+} 是否直接作用于线粒体,但已知 Bcl-2 过度表达能提高线粒体对 Ca^{2+} 的耐受力⁶。Schild 认为细胞色素 c 是通过线粒体外膜中游离状态的 VDAC 释放。在脑细胞中,低浓度 Ca^{2+} ($4 \mu\text{mol/L}$) 引起线粒体释放细胞色素 c, 原因可能是低浓度的 Ca^{2+} 使线粒体内外膜连接点 (VDAC-ANT) 减少,游离 VDAC 增多的结果。如果胞质中有高浓度 Ca^{2+} ($>100 \mu\text{mol/L}$) 则使 PTP 开放, m 崩解,线粒体肿胀,使外膜破裂,大量的细胞色素 c 释入胞质,使细胞凋亡。如果 ATP 完全不能产生,细胞就将出现坏死¹³。此外,胞质中 Ca^{2+} 可激活 Ca^{2+} 依赖性的内源性核酸内切酶,直接引起染色质浓集、DNA 断裂和细胞凋亡。

2.3 活性氧类

活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 包括超氧化物阴离子、组织过氧化物和自由基等。线粒体是 ROS 产生的主要场所。ROS 增多并非总是细胞内损伤的结果,它也可能是促凋亡的 p53 基因过度表达或是第二信使神经酰胺作用的结果。细胞内氧化还原电位的改变提高 ROS 产生,它通过耗竭还原状态 GSH 或 NADPH 足可以使 PTP 开放。NO 与超氧阴离子作用时产生的过氧硝酸盐也具有很强的诱导 PTP 开放的作用⁶。NO 和过氧硝酸盐通过使 ANT 中的巯基氧化,能够使含有 ANT 的蛋白脂质体发生通透性改变,并能诱导线粒体 MPT 和凋亡,环孢菌素 A 可以抑制这种作用¹⁴。

2.4 类脂信使

当细胞受多种凋亡信号刺激时,膜神经鞘磷脂水解产生磷脂酰胆碱和神经酰胺。神经酰胺可以诱导 MPT,但是它不能使分离的线粒体产生同样变化。原因是它必须在高尔基体中转化为神经节苷脂,再转运至线粒体使 PTP 开放,其作用机制还有待进一步研究⁶。

2.5 其他机制

ADP和 ATP 是 ANT 生理底物和 PTP 的内源抑制物,它们的耗竭促进 PTP 的开放。基质的碱性和 $\Delta\psi_m$ 降低也诱使 PTP 开放。因此抑制或是使呼吸链解耦联使 $\Delta\psi_m$ 降低时,也能诱导 MPT⁶。在 Fas/ CD95 途径中, Fas/ CD95 与配体结合激活 caspase-8, caspase-8 可以裂解 Bid, 同样 caspase-1 裂解 Bcl-XL, caspase-3 裂解 Bcl-2, 间接调节 MPT⁶。

3 线粒体释放的促凋亡因子

伴随 MPT 线粒体会释放膜间腔中的促凋亡因子,其中最重要的是细胞色素 c 和 AIF。

3.1 细胞色素 c、caspase

Zou 等研究小组发现并分离出 3 个凋亡蛋白酶活化因子 (apoptosis protease-activating factor, Apaf)。Apaf-1 存在于胞质中,氨基端有与较长前体结构域的 caspase 如 caspase-9 的氨基末端相似序列,称为 caspase 活化结合区。通过结构分析确定 Apaf-3 是 caspase-9, 而 Apaf-2 即是细胞色素 c。细胞色素 c 是电子传递链复合体的一个组分,由核基因编码,定位于线粒体内膜,在呼吸链中起传递电子的作用。当细胞色素 c 释放入胞质后与 Apaf-1 和 Caspase-9 结合,激活 caspase-9, caspase-9 再激活 caspase-3 从而激活 caspase 级联反应,使细胞凋亡。参与凋亡的 caspase-9、caspase-2 也是从线粒体中释放¹⁵。另外,细胞色素 c 释放以后,使线粒体呼吸链受损,抑制了 ATP 的合成,也可以导致凋亡的发生,只是这一过程发生在凋亡晚期。

关于细胞色素 c 释放的机制,最初认为是由 PTP 直接向细胞外释放。也有人认为是 PTP 开放后,由于线粒体基质内高浓度的溶质分子造成渗透性肿胀,内膜因有嵴,其表面积远大于外膜,故内膜仍完整,而外膜破裂,释放细胞色素 c。最近 Chiu 研究证实,细胞色素 c 释放早于 $\Delta\psi_m$ 改变,是一个更早期的凋亡事件。由于 $\Delta\psi_m$ 与 PTP 开放有密切关系,因此对上述观点提出疑问¹⁶。另一观点认为 Bcl-2 家族中促

凋亡成员 Bax 可以在线粒体外膜上形成特异性通道,介导细胞色素 c 的外流¹⁰。Shimizu 发现在缺乏 VDAC 的细胞中, Bax 不能诱导线粒体细胞色素 c 和 AIF 的释放以及 $\Delta\psi_m$ 的消失,而在 ANT 缺乏的细胞中则无此现象,说明 Bax 和 VDAC 相互作用促使细胞色素 c 释放¹⁷。

3.2 AIF

AIF 也是定位于线粒体膜间腔中一种由核基因编码的黄素蛋白,相对分子量 57 000,与细菌氧化还原酶同源。通常被限制在线粒体,当受凋亡信号刺激时转运至细胞核,使细胞核染色质浓集和 DNA 断裂。AIF 对胞核的作用不需 Apaf-1 和 caspase 等辅助因子,也不通过聚 ADP 核糖基聚合酶或核纤层蛋白的裂解¹⁸,但可以诱发纯化的线粒体释放细胞色素 c 和 caspase-9。广谱 caspase 抑制剂 (如 Z-VAD.fmk) 不能抑制 AIF 的诱凋亡作用²⁰, Bcl-2 抑制 AIF 的释放,但不影响已进入胞质中的 AIF 介导的凋亡。提示 AIF 是由线粒体释放的促凋亡因子¹⁹。

Susin 等用各种诱导凋亡的物质作用于 Apaf-1^{-/-} 或 caspase^{-/-} 细胞,使 AIF 向细胞核转移,并使 DNA 大尺度断裂 (约 50 kb),染色质出现第 1 阶段浓集,而在野生型细胞则出现 DNA 核小体间断裂和染色质的第 2 阶段浓集。如果 AIF 缺失,则抑制核 DNA 的断裂。因此推测 AIF 使 DNA 断裂成大片段,使受 caspase 激活的酶进一步水解 DNA,进而出现典型的凋亡表现²⁰。

4 MPT 在凋亡中的作用

以下几点观察说明 MPT 与细胞凋亡关系密切: MPT 通常发生在细胞凋亡或坏死之前: 不断增加的新发现的促凋亡因子都作用在线粒体膜,使其发生通透性改变; 抗凋亡的 Bcl-2 成员与线粒体膜蛋白相互作用,通过抑制 MPT 来抑制凋亡; 抑制 MPT 的药物如环孢菌素 A 和米酵菌酸能阻止或延迟细胞凋亡¹: 诱发 MPT 的苍术苷可诱导细胞凋亡。因此凋亡模式可以分为 3 个阶段,信号传递级联和损伤通路激活的前线粒体阶段 (发动阶段); MPT 阶段 (决定/影响因子阶段); 线粒体释放出的凋亡相关因子激活蛋白酶和核酶的后线粒体阶段 (降解阶段)¹。

尽管如此,对 MPT 在凋亡中的作用仍有争议。最近 Minamikawa 等在不同细胞系中用 CCCP 诱导线粒体出现 MPT、 $\Delta\psi_m$ 消失并伴有肿胀,经 72 h 仍

未出现细胞色素 c 释放和细胞凋亡^{21,22}。另外, Halestrap 等发现用肿瘤坏死因子诱导鼠纤维肉瘤细胞凋亡时,在凋亡变化完全出现之后 m 的降低才被观察到。由于在体内凋亡细胞会很快被巨噬细胞所识别和吞噬,因此推测在体内可能不会出现 m 的变化²³。

5 结 语

线粒体结构和功能的改变是凋亡的关键性环节,这其中以线粒体通透性改变最为重要,但是这一过程及其影响机制尚未完全清楚,很多研究结果相互矛盾。随着研究的不断深入,人们将最终揭开线粒体参与细胞凋亡真实面目。

参考文献:

- 1 Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita J. *Exp Cell Res*, 2000, 256(1): 19 ~ 26.
- 2 Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis J. *J Exp Med*, 1996, 183(4): 1 533 ~ 1 544.
- 3 Costantini P, Belzacq AS, Vieira HL, et al. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis J. *Oncogene*, 2000, 19(2): 307 ~ 314.
- 4 Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death J. *J Physiol*, 2000, 529 Pt 1: 11 ~ 21.
- 5 Chelli B, Falleni A, Salvetti F, et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial permeability transition induction in rat cardiac tissue J. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(6): 695 ~ 705.
- 6 Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, et al. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy J. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(13): 1 042 ~ 1 053.
- 7 Petit PX, Zamzami N, Vayssiere JL, et al. Implication of mitochondria in apoptosis J. *Mol Cell Biochem*, 1997, 174(1 ~ 2): 185 ~ 188.
- 8 Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of mitochondrial adenine nucleotide translocator J. *Oncogene*, 2000, 19(3): 329 ~ 336.
- 9 Finucane DM, Bossy-Wetzl E, Waterhouse NJ, et al. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X_L J. *J Biol Chem*, 1999, 274(4): 2 225 ~ 2 233.
- 10 Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, et al. Bax directly induces

- release of cytochrome c from isolated mitochondria J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 4 997 ~ 5 002.
- 11 Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptosis cells J. *J Biol Chem*, 2001, 276(15): 11 615 ~ 11 623.
- 12 Kim TH, Zhao Y, Barber MJ, et al. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax J. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39 474 ~ 39 481.
- 13 Schild L, Keilhoff G, Augustin W, et al. Distinct Ca²⁺ thresholds determine cytochrome c release or permeability transition pore opening in brain mitochondria J. *FASEB J*, 2001, 15(3): 565 ~ 567.
- 14 Vieira HL, Belzacq AS, Haouzi D, et al. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal J. *Oncogene*, 2001, 20(32): 4 305 ~ 4 316.
- 15 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Mitochondrial release of caspases-2 and-9 during the apoptotic process J. *J Exp Med*, 1999, 189, 381 ~ 394.
- 16 Chiu SM, Oleinick NL. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy J. *Br J Cancer*, 2001, 84(8): 1 099 ~ 1 106.
- 17 Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator J. *Oncogene*, 2000, 19(38): 4 309 ~ 4 318.
- 18 Susin SA, Zamzami N, Larochette N, et al. A cytofluorometric assay of nuclear apoptosis induced in a cell-free system: application to ceramide-induced apoptosis J. *Exp Cell Res*, 1997, 236(2): 397 ~ 403.
- 19 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor J. *Nature*, 1999, 397(6718): 441 ~ 446.
- 20 Susin SA, Dangas E, Ravagnan L, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis J. *J Exp Med*, 2000, 192(4): 571 ~ 579.
- 21 Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, et al. Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells J. *Exp Cell Res*, 1999, 246(1): 26 ~ 37.
- 22 Lim ML, Minamikawa T, Nagley P. The protonophore CCCP induces mitochondrial permeability transition without cytochrome c release in human osteosarcoma cells J. *FEBS Lett*, 2001, 503(1): 69 ~ 74.
- 23 Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, et al. Mitochondria and cell death J. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28(2): 170 ~ 177.