

线粒体融合蛋白 2 研究新进展 *

赵光举¹⁾ 卢中秋^{1)**} 姚咏明^{2)**}

(¹⁾温州医学院附属第一医院急诊科, 温州 325000; ²⁾解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100048)

摘要 线粒体融合蛋白 2(mitofusin-2, Mfn2)是一种高度保守的跨膜 GTP 酶, 在线粒体融合中的关键作用已为人所熟知. 随着认识的不断深入, Mfn2 在介导线粒体融合之外的功能日渐显现, 其在细胞信号转导、能量代谢、增殖及凋亡等生命过程中均具有重要调节作用. Mfn2 效应的广泛性及作用机制的复杂性预示着其在现代生物医学中可能极具应用价值. 综述了 Mfn2 结构和生物学功能研究的最新认识, 并简要介绍了 Mfn2 功能或表达异常与疾病发生的关系及其治疗学意义.

关键词 线粒体, 线粒体融合蛋白 2, 信号转导, 凋亡, 疾病

学科分类号 Q26, Q291

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00537

线粒体是一种高度动态的细胞器, 它们彼此连接成网络状, 并且不断地变换着形态结构和分布^[1-2]. 在哺乳动物中, 线粒体形态结构的改变是通过融合和分裂两个相反的过程来实现的^[1]. 线粒体融合蛋白 2(mitofusin-2, Mfn2)作为线粒体融合蛋白家族的重要一员, 在线粒体融合过程中的关键作用已毋庸置疑^[1-2]. 然而越来越多的证据表明, Mfn2 除介导线粒体融合外, 还参与了细胞的能量代谢、信号转导、增殖及凋亡等众多细胞生物学过程. 尤为重要的是, Mfn2 在诸如代谢性疾病、心血管系统疾病、肿瘤及 2 型遗传性运动和感觉神经病(Charcot-Marie-Tooth disease, CMT2)等疾病的发生和发展中也发挥重要作用, 并可能成为上述疾病治疗的有效靶点.

1 Mfn2 的结构特征

线粒体融合蛋白是一类高度保守的线粒体跨膜 GTP 酶类, 其同系物在酵母菌、秀丽隐杆线虫、果蝇和哺乳动物中均有发现^[3]. 在哺乳动物中, 线粒体融合蛋白有两种亚型, 即 Mfn1 和 Mfn2, 二者具有高度同源性(81%)^[3-4]. 人类 Mfn2 由 757 个氨基酸残基组成, 两次跨于线粒体外膜, 沿线粒体网络结构呈分散分布^[3-4]. 新近有资料证实, Mfn2 在内质网上也有分布并参与线粒体和内质网间的连接^[5]. 如图 1 所示, Mfn2 的 GTP 酶结构域位于 N

端, 该结构域由 5 个 G boxes 组成, C 端拥有跨膜结构域, 被面对内膜的一小段蛋白质分为两个部分. 跨膜区两侧各有一个疏水区, 为七肽重复序列(heptad repeat region 1/2, HR1/2), 是大多数卷曲螺旋(coiled-coil)形成的基础. Mfn2 的 N 端 GTP 酶结构域和 C 端的 HR2 均定位于胞浆, 该结构特征对于理解线粒体融合的发生至关重要^[1-4]. 虽然 Mfn1 与 Mfn2 具有高度同源性, 但其在线粒体融合过程中所起的作用并不完全相同, 如 Mfn1 的 GTP 酶水解活性约为 Mfn2 的 8 倍, 其诱导融合效率也高于 Mfn2^[6], 而且 OPA1 蛋白(OPA1 基因表达产物, 其突变可引起视神经萎缩)在融合中的作用依赖于 Mfn1, Mfn2 功能则取决于 OPA1^[7]. 更为重要的是, Mfn2 的 N 端拥有 Ras 结合位点^[8], 但此结构在 Mfn1 上尚未发现, 说明 Mfn2 可能具有介导线粒体融合以外的功能.

* 国家重点基础研究发展计划(2005CB522602), 国家自然科学基金(30672178, 30872683)资助项目和浙江省医学扶植重点建设学科计划(07-F04).

** 通讯联系人.

姚咏明. Tel: 13651382188, E-mail: c_ff@sina.com

卢中秋. Tel: 13957759958, E-mail: lzq640815@163.com

收稿日期: 2009-09-15, 接受日期: 2009-11-26

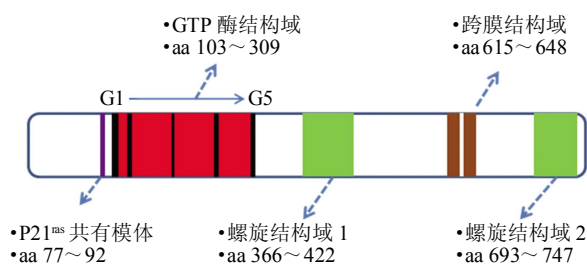


Fig. 1 Topology and main functional domains of human mitofusin-2^[1-4,8]

图1 人线粒体融合蛋白 2 的结构特征^[1-4,8]

2 Mfn2 对线粒体结构及功能的调节

2.1 Mfn2 在线粒体结构调节中的作用

在哺乳动物中, 线粒体呈现网络状或长管状结构, 同时进行着频繁的融合和分裂, 保持着动态平衡. 研究发现, 过表达 hMfn2(human mitofusin-2) 能使线粒体网络化程度加剧^[4], 缺失 Mfn2 的细胞, 其线粒体融合效率明显降低, 69% 线粒体未发生融合, 完全融合的线粒体仅占 1%, 线粒体呈现片段化现象, 如重新表达 Mfn2 基因, 线粒体将恢复为长管状^[9]. 这些资料提示 Mfn2 参与了线粒体融合的发生, 并发挥了重要调节作用.

结构功能分析显示, GTP 酶活性对于 Mfn2 介导线粒体融合效应至关重要^[9-11]. GTP 酶失活 Mfn2 突变体(如 hMfn2^{K109T})可使线粒体融合水平下降, 同时由于线粒体分裂的持续进行, 导致片段化线粒体产生^[10]; 相反, GTP 酶活性升高的 Mfn2 突变体 Mfn2^{RasG12V} 则可显著增强线粒体的融合效率^[11]. 有趣的是, hMfn2^{K109T} 和 GTP 结构域缺失的 hMfn2 与野生型 hMfn2 一样, 均能引起线粒体细胞核周围的集聚^[10], 提示 hMfn2 介导线粒体集聚的效应与 GTP 酶无关. 但包含螺旋结构域的 C 端 54 个氨基酸残基去除后, Mfn2 诱导线粒体聚集的能力则明显降低, 也丧失了对线粒体结构的调节作用^[10]. 除 GTP 酶结构及 C 端螺旋结构外, 缺失跨膜区的 Mfn2 其介导的融合效应也受损^[8,11], 而 Mfn2 面对内膜的肽段(aa 627~632)在线粒体融合过程中的作用同样不容忽视, 其 631 位点氨基酸残基突变可引起线粒体融合受抑^[11]. 鉴于 Mfn2 在线粒体融合中的作用依赖于与 OPA1(位于膜间隙和内膜)间的相互作用^[10], 那么位于膜间隙的 631 位点突变则可能妨碍了 Mfn2-OPA1 形成, 导致线粒体融合的障碍.

既往研究表明, 融合过程中 Mfn1 和 Mfn2 分

子 C 端的 HR2 可以相互结合形成同源(Mfn1-Mfn1/Mfn2-Mfn2)或异源(Mfn1-Mfn2)的多聚体, 使相邻的线粒体膜栓连在一起, 从而进行内外膜的融合及基质的混合, 此过程依赖于 GTP 酶的水解^[6](图 2). 但这并非 Mfn2 介导线粒体融合的主要方式, 因为 Mfn2 的 GTP 酶水解活性只有 Mfn1 的 1/8, Mfn1-Mfn2 和 Mfn2-Mfn2 多聚体促进线粒体融合的效率显著低于 Mfn1-Mfn1 多聚体^[6]. 融合分析发现, GTP 酶活性升高的突变体 Mfn2^{RasG12V} 能有效促进线粒体的融合, Mfn2^{RasG12V} 具有较高核苷酸转换率和较低的 GTP 酶水解活性, 说明 GTP 酶水解对于 Mfn2 促线粒体融合可能并非必需, Mfn2 可作为一种信号 GTP 酶调节线粒体融合效应^[11].

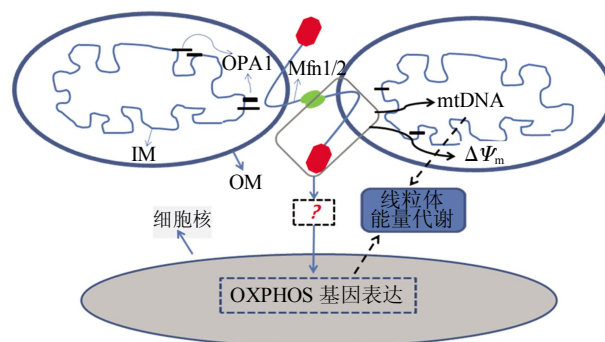


Fig. 2 Model of the role of Mfn2 in mitochondrial fusion and metabolism

图2 Mfn2 在线粒体融合及功能调节中的作用和机制

OM: 线粒体外膜; IM: 线粒体内膜; mtDNA: 线粒体 DNA; $\Delta\Psi_m$: 线粒体膜电位; OXPHOS: 氧化磷酸化.

2.2 Mfn2 对线粒体功能的影响

线粒体是所有真核细胞进行能量代谢和供给的核心细胞器, 目前的研究大多集中在 Mfn2 对线粒体能量调节方面. 缺失 Mfn2 的成纤维细胞线粒体膜电位和对葡萄糖氧化能力降低, 伴随氧耗的下降, 因而偶联氧耗没有改变, 但是与质子漏相关的线粒体呼吸功能明显受损^[12]. 在 L6E9 肌细胞中, Mfn2 缺失降低了线粒体对葡萄糖的氧化能力^[12-13]. 在这种情况下, 细胞葡萄糖转运和乳酸的形成显著增强, 而葡萄糖合成糖原的能力受到抑制^[13]. Mfn2 的突变同样能影响线粒体的能量代谢. 在人类成纤维细胞, R364Q 或 A166T 的 Mfn2 突变表现为线粒体基础氧耗升高, 寡霉素不敏感性呼吸功能增强, 线粒体膜电位降低, 但偶联呼吸正常. 这些情况是在线粒体数目及氧化呼吸链酶复合物正常的

情况下发生的^[14]。而其他位点的突变如 Mfn2^{M21V} 及 Mfn2^{T105M} 等并不影响线粒体的能量代谢^[14]，对于这种差异发生的原因目前还不清楚，尚有待深入探讨。

通过对 Mfn2 调节线粒体能量代谢途径的实验发现，缺失 Mfn2 细胞的线粒体呼吸链复合物亚单位 P39、P70、P49、 α 亚基表达均降低，与此同时，复合物 I 和 III，或 III 的酶活性也有所下降，但复合物 IV 无改变^[13]。在 Mfn1/2 同时缺失的细胞，则表现为呼吸链复合物 I，III，IV 的活性降低^[15]。更为重要的是，过表达 Mfn2 使得 HeLa 细胞线粒体膜电位显著升高，葡萄糖氧化能力也增强^[13]。另外，在 L6E9 肌细胞中，Mfn2 活性增强的突变体可诱导线粒体呼吸链复合物 I，IV，V 表达水平升高^[13]。由此可见，Mfn2 对线粒体呼吸链复合物表达和活性的影响可能是其调节线粒体能量代谢的重要途径(图 2)。

介导线粒体融合是 Mfn2 的重要功能之一，那么 Mfn2 对线粒体能量代谢功能的调节是否与线粒体融合有关呢？对于这个问题目前尚存争议。有学者认为，线粒体融合对于维持线粒体 DNA(mtDNA) 的功能、防止其突变起着关键作用。据报道，Mfn2 基因敲除将导致 mtDNA 的缺失^[16]，而 mtDNA 编码了线粒体呼吸链相关的 13 种蛋白质，故 Mfn2 功能异常所致 mtDNA 缺失或减少可能影响线粒体呼吸链的功能，进而造成线粒体能量代谢功能的损伤^[17]。新近，有人设计了一种 C 端去尾的 hMfn2 突变体 hMfn2^{602~757}，该突变体丧失了介导线粒体融合的作用。研究发现，在 HeLa 细胞中过表达 hMfn2^{602~757} 能显著提高线粒体的膜电位，增强葡萄糖的氧化能力，说明 Mfn2 调节线粒体的能量代谢并不依赖其促线粒体融合的效应^[13]。

3 Mfn2 在细胞信号转导中的调节作用及机制

3.1 Mfn2 与 Ras 信号通路

Ras 蛋白隶属于小单体 GTP 蛋白超家族，在调节细胞增殖、运动、黏附、生存和分化的信号机制中发挥重要作用。细胞内多种蛋白质可调控 Ras 活性，如 GTP 酶活化蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)、鸟嘌呤交换因子(guanine exchange factors, GEFs)等^[18]。当 Ras 与 GTP 结合后呈活化状态，而与 GDP 结合则相反^[18]。新近，Chen 等^[8]发现 Mfn2 同样参与了 Ras 活性的调节。Mfn2 的 N 端具有一

个 P21ras 共有模体(N-DVKGYSKVRGISEVL-C)，此结构在 Ras 蛋白家族中高度保守，从而为 Mfn2 与 Ras 的相互作用提供了结构基础^[8]。Mfn2 与 Ras 结合后可抑制其活化，进而使其下游信号蛋白 Raf 及 ERK1/2 失活^[8]。而剔除 P21ras 结构后，Mfn2 丧失了上述效应，证实该结构在 Mfn2 对 Ras 活性的调节中起着关键作用^[8]。Mfn2 除了可调节 Ras-Raf-胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)信号通路外，还参与了 Ras-PI3K-Akt 信号途径的调节(图 3)。在氧化应激诱导的心肌细胞凋亡模型中，Mfn2 表达水平显著增加，并与心肌细胞的凋亡率相关。单独过表达 Mfn2 可实现与氧化应激类似的效应，诱导 Akt 磷酸化水平降低，而通过腺病毒载体 ADV-CA-PI3K 增强 PI3K 活性，则可显著促进 Akt 的活化，并且能抑制 Mfn2 诱导的细胞凋亡^[19]。值得指出的是，Mfn2 对 Ras 信号通路的影响均与其介导的线粒体融合效应无关^[8, 19]。

3.2 Mfn2 与钙离子信号途径

业已明确，线粒体在维持和调控细胞对钙离子信号反应过程中起着核心作用。Rizzuto 等^[20]发现，大约有 20% 的线粒体与内质网间维持着紧密的连接，并推测线粒体和内质网间的连接状态决定了在三磷酸肌醇介导内质网释放钙离子后，线粒体摄取钙离子的能力。线粒体和内质网间的紧密连接发现至今已逾 40 年，但对于维持这种连接的关键因子一直未能发现。最近研究表明，Mfn2 不仅分布于线粒体，在与线粒体相连的内质网结构表面同样存在，位于内质网上的 Mfn2 可与线粒体上 Mfn1 或者 Mfn2 形成同源或异源的多聚体，维持线粒体和内质网的连接^[5]。通过三磷酸肌醇诱导内质网应激时钙离子释放后，缺失 Mfn2 细胞的线粒体摄取钙离子水平和速度均降低^[5]，提示 Mfn2 对于维持两种细胞器间的钙离子信号的传递及线粒体钙离子的摄取具有重要作用(图 3)。

除了线粒体和内质网间的连接外，细胞质膜区域线粒体的分布状态也影响着细胞钙离子信号的稳态。在 HeLa 癌细胞中过表达 hFis1 或 Drp1 后，线粒体呈现片段化和核周聚集现象，使分布于质膜部位的线粒体缺乏。在缺乏钙离子的培养基中，上述改变使组胺诱导的钙离子出胞效应明显增强，且内质网中钙离子水平迅速下降，质膜 Ca^{2+} -ATP 酶通道活性增强，同时由钙池操纵 Ca^{2+} 通道(store-operated Ca^{2+} channels, SOC)的钙离子内流增加^[21]。

实验已证实, 过表达 hMfn2 可引起线粒体的核周集聚^[4], 这种集聚可能同样会造成质膜区域线粒体数量的减少, 进而导致细胞对钙离子信号反应的异常。

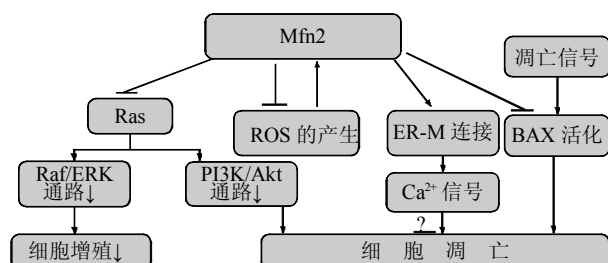


Fig. 3 Effects of Mfn2 in cellular signaling cascade and cell fate

图 3 Mfn2 在细胞信号转导中的作用及其对细胞状态的影响

Mfn2: 线粒体融合蛋白 2; ROS: 活性氧族; ER-M: 内质网和线粒体。

3.3 Mfn2 与活性氧族

活性氧族(reactive oxygen species, ROS)是一类化学性质活泼的含氧物质, 主要包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)和过氧化氢(H_2O_2)。生理状态下, 机体通过抗氧化酶和抗氧化剂的作用使得 ROS 维持在较低的水平; 当细胞产生的 ROS 水平超过其抗氧化能力时, 将导致细胞内大分子如脂类、蛋白质、DNA 的损伤, 这种“氧化应激状态”与众多疾病的发生有关。越来越多的证据提示, ROS 不仅是一种损伤性分子, 其对于细胞信号的转导也非常重要。ROS 能通过影响质膜钙离子通道活性而调节胞浆钙离子信号, 增强 Src 激酶或 P21Ras 活性而影响丝裂原活化蛋白激酶 ERK1/2 信号通路等^[22]。

业已明确, ROS 是细胞能量代谢产物, 主要来源于线粒体, 那么 ROS 的产生与线粒体融合/分裂及 Mfn2 的作用有无关联呢? 有人发现了一种巨型线粒体(megamitochondria)^[23], 其产生是 ROS 聚集的重要标志。在哺乳动物中, 线粒体结构是通过融合和分裂两种相反过程调节的, 那么 ROS 集聚所诱导巨型线粒体的产生就可能涉及到线粒体融合的加剧。事实上, 这种线粒体的形态结构与过表达 Mfn2 诱导线粒体融合加剧所表现出的结构特征极为类似, 且另有实验观察到氧化应激可促进心肌细胞 Mfn2 表达增强^[19], 因此不难推测 Mfn2 的升

高可能是 ROS 诱导巨型线粒体产生过程中的重要事件。遗憾的是, 目前尚无实验直接证实 Mfn2 对 ROS 依赖的信号通路影响。但据报道, 高糖诱导 ROS 的产生依赖于线粒体分裂的发生, 而过表达 Mfn2 能够阻止 ROS 的产生^[24], 这预示着 Mfn2 对 ROS 的产生可能具有重要调节作用, 进而影响 ROS 依赖的信号转导通路(图 3)。

4 Mfn2 对细胞状态的影响: 增殖和凋亡

4.1 Mfn2 与细胞增殖

1997 年, 我国学者陈光慧等^[25]发现, 在自发性高血压大鼠的血管平滑肌细胞中, Mfn2(又称高血压相关基因, hypertension related gene, HRG)的表达水平显著低于正常组。进一步研究发现, 血管紧张素 II、内皮素-1、白介素-1(interleukin-1, IL-1)等促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖的因素可抑制 Mfn2 的表达, 而心钠素、降钙素基因相关肽、肾上腺髓质降压素等抑制 VSMC 增殖的因素则可上调其表达。过表达 Mfn2 后 VSMC 增殖能力明显下降, 细胞周期停滞于 G0/G1 期, 说明 Mfn2 是一种重要的细胞增殖抑制因子, 因而也被称为细胞增殖抑制基因(hyperplasia suppressor gene, HSG)^[8]。

研究证实, Mfn2 通过多条途径调节细胞增殖状态^[8]。首先, Mfn2 与 Ras 结合并抑制其活化, 进而阻断 ERK1/2 的激活, 最终导致细胞周期停滞于 G0/G1 期。与此同时, Mfn2 能上调细胞周期蛋白激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)抑制剂 P21、P27 的表达, 鉴于 ERK1/2 的持续活化需要 CDK 抑制剂的下调或降解, 那么 Mfn2 上调 P21、P27 将导致 ERK1/2 活化受抑和细胞增殖能力降低。此外, Mfn2 还可能通过降低 Rb 磷酸化水平而影响细胞增殖, 因为 Rb 是哺乳动物细胞 G1/S 期转化的主要调节因子之一, 未磷酸化的 Rb 与转录因子如 E2F 蛋白家族结合并抑制其活性, 使细胞周期停滞于 G0/G1 期。

4.2 Mfn2 与细胞凋亡

线粒体在细胞凋亡中发挥着重要作用, 它可释放多种凋亡相关蛋白, 包括细胞色素 c、AIF、Smac/DIABLO 等。结构是功能的基础, 线粒体融合/分裂状态与细胞凋亡密切相关, 细胞凋亡过程中线粒体片段化现象被认为是由于线粒体分裂加剧或融合不足所引发。在凋亡过程中, 前凋亡物质 Bax 集聚到线粒体外膜潜在的分裂位点, 同时

DRP1 也从胞浆移位到这些位点, 介导线粒体分裂, 进而引起细胞凋亡的发生^[26]. 有趣的是, 在此过程中, 也观察到 Mfn2 与 Bax 共定位现象^[26], 提示 Mfn2 对细胞凋亡可能起到一定的正向或负向调节作用.

采用 siRNA 沉默 Mfn2 基因将导致线粒体的片段化, 同时增强了细胞对凋亡信号的敏感性^[27]; 相反, 过表达野生型 Mfn2^[27-28] 及其突变体 Mfn2^{RasG12V}^[8, 28] 能促进线粒体融合, 阻滞多种凋亡信号诱导的 Bax 活化、细胞色素 c 释放及凋亡的发生, 表明 Mfn2 促进线粒体融合可能作为一种保护性机制而抑制细胞凋亡的发生. 鉴于实验已证实 Mfn2 不依赖其介导线粒体融合的效应而抑制 Ras-Raf-ERK1/2 信号途径^[8], 且 ERK1/2 信号通路是诱导细胞凋亡的重要机制之一, 那么 Mfn2 就有可能通过介导线粒体融合以外的途径阻滞细胞凋亡.

新近有资料显示, 在 VSMC^[29] 和心肌细胞^[19] 中过表达 Mfn2 可通过阻断 Ras-PI3K-Akt 信号通路而诱导细胞凋亡的发生. Mfn2 还参与了线粒体和内质网间连接的形成, 过表达 Mfn2 能增强线粒体和内质网间的联系及细胞对钙离子信号的反应, 并可因此增强细胞对钙离子依赖凋亡的敏感性^[9], 这些过程中 Mfn2 呈现一种前凋亡物质的效应. 在肿瘤细胞中同样证实了这一点, 多种肿瘤细胞系采用腺病毒过表达 Mfn2, 在引起线粒体核周集聚的同时, 也导致线粒体膜电位下降及细胞色素 c 的释放, 最终引发细胞凋亡^[30]. 由此可以看出, Mfn2 与细胞凋亡的关系异常复杂, 而效应上的差异可能与不同转染体系下 Mfn2 表达水平^[30] 及不同凋亡信号途径有关.

5 Mfn2 在疾病发生中的作用及治疗学意义

5.1 Mfn2 与胰岛素抵抗

胰岛素抵抗是 II 型糖尿病和肥胖等疾病发生的重要原因, 而骨骼肌为其重要靶器官. 在饥饿和进食后, 骨骼肌细胞对葡萄糖和脂类的氧化能力下降是胰岛素抵抗的主要特征之一^[31]. 线粒体为机体能量代谢和供给的核心细胞器, 在代谢性疾病中的作用一直备受重视. 线粒体能量代谢功能的损害已被认为是组织器官胰岛素抵抗发生的根本原因^[32].

基于在肥胖和糖尿病患者骨骼肌中均观察到线粒体体积和数目的降低, 并伴有线粒体膜电位和氧化磷酸化水平下降的功能性损害^[31-32], 而细胞内线粒体结构和数目主要通过线粒体融合 / 分裂的转换

来实现, 因此, 胰岛素抵抗状态下可能在线粒体融合 / 分裂的失衡. Bach 等^[12]发现, Zucker 大鼠骨骼肌细胞中 Mfn2 蛋白和基因表达水平均显著下降, 电镜观察显示线粒体网络结构也降低了近 25%, 这种降低与 Mfn2 表达下降基本一致. 在临床肥胖症患者中也观察到 Mfn2 降低的现象, 而给予胆胰分流术治疗后, 在造成体重迅速下降的同时, 还能增强 Mfn2 的表达^[33]. 另据报道, 肥胖和非肥胖的 II 型糖尿病患者也存在 Mfn2 表达下降^[34]. 鉴于 Mfn2 缺失或功能异常所致线粒体功能的损害已被众多实验所证明(如 2.2 所述), 那么 Mfn2 表达下降极有可能是胰岛素抵抗发生的重要因素之一. 目前对于胰岛素抵抗状态下 Mfn2 表达降低的原因尚不清楚. TNF- α 和 IL-6 系与胰岛素抵抗发生相关重要因子, 胰岛素抵抗时二者均显著升高, 并增加了机体对胰岛素抵抗的敏感性^[34]. 离体实验观察到, TNF- α 和 IL-6 可显著下调 Mfn2 表达^[34], 但二者在体内是否存在类似的效应还有待进一步澄清.

既然在离体实验中已经观察到 Mfn2 对线粒体能量代谢的调节作用, II 型糖尿病等代谢性疾病的发生也与 Mfn2 密切相关, 生理状态下能量需求的改变能够影响 Mfn2 的表达也就不足为奇. 大鼠置于寒冷状态下 48 h, 其棕色脂肪组织和骨骼肌中 Mfn2 mRNA 水平显著增强, 注射 β 3 肾上腺素同样也增高了 Mfn2 的表达^[35]. 另外, 在剧烈运动后的骨骼肌细胞中, 不仅观察到 Mfn2 表达水平升高, 还发现 Mfn2 表达受 PGC-1 α -ERR α 途径的调控^[36], 从而为在转录水平调节 Mfn2 的表达提供了理论依据.

5.2 Mfn2 在心血管疾病发生中的作用

血管增殖异常, 如动脉粥样硬化和血管狭窄, 一直被认为是众多心血管疾病发生的原因, 而位于动脉被膜的 VSMC 过度增殖则是血管增殖异常的主要因素, 但是我们对于这种 VSMC 增殖分子机制的认识尚不清晰. Chen 等^[8]首先报道了 Mfn2 与 VSMC 增殖能力的关系. 研究发现, Mfn2 在高血压大鼠平滑肌细胞中表达降低, 而给予 Mfn2 转染可显著抑制 VSMC 的增殖, 证实 Mfn2 可能与高血压的发生有关. 在其他 VSMC 增殖异常的动物模型中也同样观察到 Mfn2 表达的异常. 在 apoE^{-/-} 大鼠动脉粥样硬化的颈动脉中, 随着动脉粥样硬化的发展, Mfn2 表达水平呈进行性下降, 粥样斑块中 Mfn2 表达的下降更为显著^[8]. 在球囊损伤血管再狭

窄模型中, 免疫组织化学及逆转录 PCR 检测显示, 大鼠颈动脉中 Mfn2 基因和蛋白质水平表达均明显减弱, 并呈现出动态变化的特点, 在损伤 1 周时开始下降, 2 周时达到低谷, 3 周时则有所恢复, 值得注意的是, 这种变化与球囊损伤后大鼠颈动脉 VSMC 增殖的进展状态是一致的. 若通过颈动脉鞘注射 Mfn2 重组腺病毒诱导 Mfn2 高表达, 则有效抑制新生内膜的增长和血管壁的重塑, 对损伤 21 天颈动脉分析发现, Mfn2 重组慢病毒载体治疗组大鼠动脉内膜 / 中膜比减少了近 90%^[8], 提示 Mfn2 腺病毒基因转染可能是血管增殖失调有效的治疗手段.

在认识到 Mfn2 对 VSMC 增殖的重要调节作用后, Fang 等^[37]观察了 Mfn2 在多种小鼠心肌肥厚模型中的表达情况. 结果发现, 在自发性高血压、主动脉弓缩窄、甲状腺素及苯肾上腺素诱发的小鼠心肌肥厚模型中, Mfn2 表达明显降低, 表明 Mfn2 表达与心肌肥厚的发生有关, 但其确切机制仍不明确. 同时, 实验还观察到在涉及 ERK1/2 活性增强的心肌肥厚小鼠, 其心肌细胞 Mfn2 表达下降, 而在小鼠急性心肌梗塞后非梗塞区心肌细胞中, ERK1/2 活性和 Mfn2 表达均无变化, 进一步证实 Mfn2 表达水平与 ERK1/2 活性呈负相关^[37]. 虽然 Mfn2 和 ERK1/2 在心肌肥厚发病中的确切意义及机制还有待深入研究, 但已有实验证实过表达 Mfn2 可抑制苯肾上腺素诱导心肌细胞肥大的发生, 初步提示 Mfn2 在心肌肥厚中的潜在治疗学价值^[38].

Mfn2 除了影响细胞增殖外, 还有广泛的细胞生物学效应, 如参与细胞凋亡的发生. 事实上, Mfn2 表达异常升高与氧化应激诱导心肌细胞凋亡发生的关系已得到证实, 抑制 Mfn2 表达则可阻滞凋亡的发生, 提示 Mfn2 可能成为心衰治疗的有效靶点^[39]. 我们有理由相信, 随着对 Mfn2 功能和作用认识的深入, 其在心血管疾病中的作用会日渐清晰, 将为心血管疾病的防治开辟新的途径.

5.3 Mfn2 与肿瘤

在发现 Mfn2 对 VSMC 具有抗增殖作用的同时, 有学者初步证明 Mfn2 对多种肿瘤细胞系有类似的作用, 尤其是乳腺癌细胞株 BM-1, 且 Mfn2 抗增殖的作用明显大于肿瘤抑制基因 p53^[8]. 进一步分析证实, Mfn2 定位于人的 1 号染色体短臂 36.3 位点, 细胞遗传学分析发现, 人 1 号染色体短臂 36 位点为许多恶性肿瘤的突变高发区, 许多肿瘤患者染色体的该区域会出现缺失或易位^[39]. 表明

Mfn2 可能是一种高效的抑癌基因, Mfn2 表达异常或功能缺失可能是肿瘤发生的重要原因.

国内学者陆续报道了 Mfn2 在肿瘤治疗中的作用. 据报道, 在 MCF-7 乳腺癌细胞系, Mfn2 具有明显抗增殖效应, 并可提高抑癌基因 RECK 表达水平, 同时抑制基质金属蛋白酶 -2 及基质金属蛋白酶 -9 的活性. 在肝癌细胞株 HepG2, Mfn2 可显著抑制其增殖, 诱导其凋亡. 新近, 有人对 Mfn2 的抗癌作用进行了比较系统的研究^[30]. 通过重组腺病毒载体在肿瘤细胞系 A549、HeLa、HT-29 和 MCF-7 及正常二倍体细胞系 BJ、L02 和 HEK293 中过表达 Mfn2 后发现, Mfn2 通过诱导肿瘤细胞凋亡使得肿瘤细胞系的活细胞数目显著减少, 而对正常的二倍体细胞系活细胞数目却没有影响. 在裸鼠模型中亦证实, Mfn2 可抑制肿瘤的发生^[30]. 更为重要的是, 无论是内源性 Mfn2 表达水平较高的 HeLa S3, 还是表达较低的 A549, 外源性 Mfn2 都能明显抑制肿瘤细胞的增殖, 说明 Mfn2 对肿瘤细胞的作用并不依赖于内源性 Mfn2 表达水平^[40]. 此外, Mfn2 还能增强癌细胞对化疗和放疗的敏感性^[30, 40], Mfn2 的这种效应同样高于抑癌基因 p53^[40], 体现了 Mfn2 在肿瘤治疗中的广泛应用前景.

5.4 Mfn2 与遗传性运动和感觉神经病

遗传性运动和感觉神经病(CMT), 又称之为腓骨肌萎缩症, 是一种以感觉功能衰弱和末梢肌肉萎缩为特征的高发性疾病, 并伴有深感觉反射缺失和足部畸形等症状. 该疾病根据其发病机制可分为以脱髓鞘为特征的 1, 3, 4 型和以轴突功能损害为特征的 2 型. CMT2 以慢性轴突功能损害和重构为特征, 导致正常神经纤维逐步缺失或运动神经传导能力的轻微降低^[17].

业已证明, Mfn2 突变与 CMT2 的发病密切相关. 在 CMT2A 患者中, Mfn2 大约存在 60 种突变类型, 其中大多数为错义突变. Mfn2 突变位点主要集中在 GTP 酶区(> 50%), 其中位于 94 位点氨基酸残基的突变几率显著高于其他位点^[17]. 同时, 在 N 端接近 Ras 结合的区域、C 端的 HR2 和 HR1 及其周边部位也发现了 Mfn2 的突变位点^[17]. 需要指出的是, 虽然 GTP 酶区的突变比率很大, 但该区的突变均未影响 Mfn2 的 GTP 结合活性, GTP 酶区以外位点的突变同样如此^[41].

尽管 CMT2A 患者存在 Mfn2 突变已是不争的事实, 且在运动神经元中表达 GTP 酶结构域突变的 Mfn2 基因 Mfn2^{T105M}, 能引起类似于 CMT2A 的

症状, 包括因运动神经损害所致肌肉萎缩^[42]. 遗憾的是, 研究人员并未检测表达正常的 Mfn2 是否也可引起类似的症状, 因而对于 Mfn2 突变是否参与 CMT2A 的发生及其作用机制至今尚不明确. 既往有研究发现, 神经节细胞及其长轴突对能量的缺乏敏感性很高, 相对于其他细胞对线粒体功能也更加依赖, 同时, 在神经系统线粒体也趋向于聚集到能量需求较高的部位, 这就要求线粒体维持有效能量供给和运动能力以满足神经系统正常的功能^[43]. 虽然 Mfn2 功能缺陷可通过影响线粒体融合和非依赖线粒体融合机制造成线粒体能量代谢的障碍, 表现为线粒体膜电位降低和氧化磷酸化水平下降, 但并无直接证据阐明 Mfn2 对神经系统线粒体的物质代谢、能量供给水平的影响及其在 CMT2A 致病中的作用. 令人振奋的是, 众多研究表明, Mfn2 突变所致线粒体运动能力减弱和分布异常可能是 CMT2A 发病的重要因素. Chen 等^[9]研究发现, Mfn2 基因敲除的小鼠胚胎成纤维细胞, 其线粒体具有短管状和球形两种形态, 短管状线粒体仍能维持有序的运动, 而球形线粒体却表现为随机的“布朗运动”. 虽然 Chen 等认为 Mfn2 缺失主要影响线粒体的融合, 但 Mfn2 已经表现出调节线粒体运动的潜在效应. 新近, 通过在神经系统中过表达 CMT2A 发病相关的 Mfn2 突变体后, 线粒体呈现明显的核周集聚, 进而使转运到长轴突和感觉神经末梢的线粒体急剧减少^[44], 过表达 Mfn2^{T105M} 也观察到类似的现象^[42]. 但 Mfn2 是通过何种方式影响线粒体的运动及分布还有待进一步研究.

6 小结与展望

随着研究的不断深入和领域的拓展, Mfn2 在介导线粒体融合以外功能日益受到关注. 业已明确, Mfn2 对细胞的能量代谢、信号转导、增殖与凋亡等生命活动过程均有重要调节作用. Mfn2 功能的多样性预示其可能具有广泛的应用前景, 事实上, Mfn2 在肿瘤和心血管系统疾病治疗中的价值已得到重视. 尽管如此, 目前仍有众多科学问题亟待解决, 如 Mfn2 不同结构域的功能有何差异和关联? 对线粒体能量代谢影响的确切机制是什么? 除了已经明确的 Ras 信号通路外, 其他胞内信号转导通路的调节作用和细胞生物学意义还有待阐明. 此外, Mfn2 在细胞凋亡中的作用与地位也存有争议. 这些问题的解决有助于进一步认识 Mfn2 在疾病发生中的作用及机制, 并为相关疾病的治疗提供

新的线索和途径.

参 考 文 献

- [1] Chen D C. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2006, **22**(1): 77–99
- [2] Westermann B. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *J Biol Chem*, 2008, **283**(20): 13501–13505
- [3] Rojo M, Legros F, Chateau D, *et al.* Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*, 2002, **115**(Pt 8): 1663–1674
- [4] Santel A, Fuller M T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 2001, **114**(Pt 5): 867–874
- [5] de Brito O M, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 2008, **456**(7222): 605–610
- [6] Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions *via* GTPase activity. *J Cell Sci*, 2004, **117**(Pt 26): 6535–6546
- [7] Cipolat S, de Brito O M, Dal Zilio B, *et al.* OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(45): 15927–15932
- [8] Chen K H, Guo X M, Ma D L, *et al.* Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**(9): 807–808
- [9] Chen H, Detmer S A, Ewald A J, *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 2003, **160**(2): 189–200
- [10] Eura Y, Ishihara N, Yokota S, *et al.* Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem*, 2003, **134**(3): 333–344
- [11] Neuspiel M, Zummo R, Gangaraju S, *et al.* Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem*, 2005, **280**(26): 25060–25070
- [12] Bach D, Pich S, Soriano F X, *et al.* Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem*, 2003, **278**(19): 17190–17197
- [13] Pich S, Bach D, Briones P, *et al.* the Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet*, 2005, **14**(11): 1405–1415
- [14] Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, *et al.* Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol*, 2007, **61**(4): 315–323
- [15] Chen H, Chomyn A, Chan D C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 2005, **280**(28): 26185–26192
- [16] Chen H, McCaffery J M, Chan D C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 2007, **130**(3): 548–562
- [17] Cartoni R, Martinou J C. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp*

- Neurol, 2009, **218**(2): 268–273
- [18] Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE*, 2004, **2004**(250): RE13
- [19] Shen T, Zheng M, Cao C, *et al.* Mitofusin-2 is a major determinant of oxidative stress-mediated heart muscle cell apoptosis. *J Biol Chem*, 2007, **282**(32): 23354–23361
- [20] Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, *et al.* Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*, 1998, **280**(5370): 1763–1766
- [21] Frieden M, Arnaudeau S, Castelbou C, *et al.* Subplasmalemmal mitochondria modulate the activity of plasma membrane Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem*, 2005, **280**(52): 43198–43208
- [22] Thannickal V J, Fanburg B L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279**(6): L1005–1028
- [23] Karbowski M, Kurono C, Nishizawa Y, *et al.* Induction of megamitochondria by some chemicals inducing oxidative stress in primary cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1349**(3): 242–250
- [24] Yu T, Robotham J L, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(8): 2653–2658
- [25] Chen G H, Liu N K, Zhou A, *et al.* The role of hypertension-related gene in aortic vascular smooth muscle cells from mice and rats. *Chin Med J*, 2001, **114**(8): 833–836
- [26] Karbowski M, Lee Y J, Gaume B, *et al.* Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol*, 2002, **159**(6): 931–938
- [27] Ugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, 2004, **279**(50): 52726–52734
- [28] Jahani A A, Cheung E C, Neuspiel M. Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury induced cell death. *J Biol Chem*, 2007, **282**(33): 23788–23798
- [29] Guo X, Chen K H, Guo Y, *et al.* Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis *via* mitochondrial death pathway. *Circ Res*, 2007, **101**(11): 1113–1122
- [30] Wu L, Li Z, Zhang Y, *et al.* Adenovirus-expressed human hyperplasia suppressor gene induces apoptosis in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7**(1): 222–232
- [31] Kelley D E, He J, Menshikova E V, *et al.* Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, **51**(10): 2944–2950
- [32] Petersen K F, Befroy D, Dufour S, *et al.* Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*, 2003, **300**(5622): 1140–1142
- [33] Gastaldi G, Russell A, Golay A, *et al.* Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator gene (PGC1A) during weight loss is related to insulin sensitivity but not to energy expenditure. *Diabetologia*, 2007, **50**(11): 2348–2355
- [34] Bach D, Naon D, Pich S, *et al.* Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes*, 2005, **54**(9): 2685–2693
- [35] Soriano F X, Liesa M, Bach D, *et al.* Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, mitofusin 2. *Diabetes*, 2006, **55**(6): 1783–1791
- [36] Cartoni R, Leger B, Hock M B, *et al.* Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol*, 2005, **567**(Pt 1): 349–358
- [37] Fang L, Moore X L, Gao X M, *et al.* Down-regulation of mitofusin-2 expression in cardiac hypertrophy *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci*, 2007, **80**(23): 2154–2160
- [38] 陈春蕾, 沈涛, 郑铭, 等. 线粒体融合蛋白 Mfn2 对心肌细胞肥大的抑制作用. *北京大学学报(医学版)*, 2008, **40**(5): 528–532
Chen C L, Shen T, Zheng M, *et al.* *Journal of Peking University*, 2008, **40**(5): 528–532
- [39] Weith A, Brodeur G M, Bruns G A, *et al.* Report of the second international workshop on human chromosome 1 mapping 1995. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, **72**(2–3): 114–144
- [40] 王萍, 毋丽娜, 蒋春笋, 等. 人增殖抑制基因(HSG)对肿瘤细胞系化疗敏感性的作用. *北京大学学报(医学版)*, 2005, **37**(2): 117–120
Wang P, Wu L N, Jiang C S, *et al.* *Journal Peking University*, 2005, **37**(2): 117–120
- [41] Baloh R H, Schmidt R E, Pestronk A, *et al.* Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci*, 2007, **27**(2): 422–430
- [42] Detmer S A, Vande Velde C, Cleveland D W, *et al.* Hindlimb gait defect due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum Mol Genet*, 2008, **17**(3): 367–375
- [43] Chen H, Chan D C. Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, **18**(4): 453–459

Research Progress of Mitofusin-2*

ZHAO Guang-Ju¹⁾, LU Zhong-Qiu^{1)**}, YAO Yong-Ming^{2)**}

¹⁾ Emergency Department, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;

²⁾ Burns Institute, First Hospital Affiliated to The Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

Abstract Mitofusin-2 (Mfn2) is a highly conserved transmembrane GTPase which plays a critical role in mitochondrial fusion process. Recent data have been demonstrated that Mfn2 is involved in the regulation of several crucial cellular pathways beyond fusion, including mitochondrial metabolism, cellular signaling cascade, apoptosis and proliferation. With multiple functions and complex mechanisms, Mfn2 might play potential role in the applications in modern medicine. The structure and basic biological function of Mfn2 were summarized, furthermore, the dysfunction of Mfn2 in certain diseases and its therapeutic value were also discussed.

Key words mitochondria, mitofusin-2, signal transduction, apoptosis, disease

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00537

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2005CB522602), The National Natural Science Foundation of China (30672178, 30872683) and The Medical Supporting Key Research Program from Zhejiang Province(07-F04).

**Corresponding author.

YAO Yong-Ming. Tel: 13651382188, E-mail: c_ff@sina.com

LU Zhong-Qiu. Tel: 13957759958, E-mail: lzq640815@163.com

Received: September 15, 2009 Accepted: November 26, 2009