

综述与专论

线粒体跨膜电位与细胞凋亡

蔡循* 陈国强 陈竺 王振义

(上海第二医科大学附属瑞金医院上海血液学研究所, 上海 200025)

摘要 细胞凋亡作为细胞固有的、受机体严密调控的细胞死亡形式, 在多细胞生物体清除衰老细胞及无能细胞等方面发挥重要的作用. 近年来, 细胞凋亡的研究重点已从细胞核转向线粒体. 各种死亡信号诱导线粒体膜通透性改变孔 (permeability transition pore, PT pore) 开放, 引起线粒体跨膜电位下降, 导致促凋亡物质释放, 继而激活 caspase, 最终使细胞凋亡. Bcl-2 和 Bcl-X_L 通过对线粒体作用而抑制细胞凋亡, 而 Bax、Bak 与 Bad 通过调节线粒体而诱导细胞凋亡.

关键词 细胞凋亡, 线粒体, 半胱氨酸蛋白酶, Bcl-2

学科分类号 R329.24

细胞凋亡亦称程序性死亡, 为多细胞生物清除衰老细胞及无能细胞的一种主要自稳机制. 细胞凋亡的发生发展过程可划分为三个时期, 即诱导期、效应期和降解期. 其中, 诱导期的特点取决于特定的凋亡诱导信号. 降解期的细胞呈现特征性的形态学和生物化学改变. 效应期是由各种信号传导通路参与, 并且标志着细胞进入不可逆凋亡. 目前, 随着对细胞凋亡机制研究不断深入, 线粒体在细胞凋亡中的作用受到关注并形成研究热点之一. 本文就细胞凋亡时线粒体跨膜电位变化及其机制和它与 caspase 家族及 Bcl-2 家族间的关系作一综述.

1 线粒体跨膜电位形成及其于凋亡中变化

线粒体为一双层膜围成的囊状结构, 外膜与内膜间的空腔称为外室, 由内膜包围的腔称为内室或线粒体基质. 线粒体外膜通透性较大, 分子质量在 15 ku 以下物质可自由通过, 因此胞质成分与线粒体外室基本相似. 线粒体内膜通透性小, 分子质量大于 1.5 ku 物质不易通过, 但内膜存在一些载体蛋白与通道以便运输某些物质. 质子泵存在于内膜, 它将基质内质子泵入外室, 从而形成横跨线粒体内膜的线粒体跨膜电位 (mitochondrial transmembrane potential, 用 $\Delta\psi_m$ 表示). 跨膜电位内室为负, 外室为正. Kroemer 等^[1]报道该跨膜电位对维持线粒体正常功能是必要的, 跨膜电位存在使一些正电荷荧光染料如 rhodamine 123、DiOC6 (3)、JC-1、CMX-ROS 可结合到线粒体基质.

凋亡机制的深入研究表明, 在几乎所有诱导剂引起的各种类型的细胞凋亡如在剔除神经生长因子诱导的交感神经元细胞凋亡、糖皮质激素诱导淋巴瘤细胞凋亡、肿瘤坏死因子诱导的单核细胞凋亡、人类免疫缺陷病毒诱导的外周血 T 淋巴细胞凋亡中, 均出现 $\Delta\psi_m$ 下降, 并且这种改变发生于凋亡细胞的形态学改变之前, 提示 $\Delta\psi_m$ 下降为凋亡早期阶段. 通过抑制 $\Delta\psi_m$ 下降, 可以阻抑细胞凋亡的发生, 说明 $\Delta\psi_m$ 为凋亡的特异性改变.

2 线粒体 $\Delta\psi_m$ 改变的机制——膜通透性改变

许多功能实验表明, 凋亡细胞的线粒体 $\Delta\psi_m$ 下降与膜通透性改变 (permeability transition, PT) 有关. PT 改变又与 PT 孔 (PT pore) 开放有关. Zamzami 等^[2]报道 PT 孔位于线粒体内外膜间, 是一种由蛋白质组成的复合体. 该复合体由胞质的己糖激酶、外膜的 peripheral benzodiazepine receptor (PBR)、电位依赖的阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)、外室的肌酸激酶、内膜的腺苷酸转运蛋白 (adenine nucleotide translocator, ANT) 及基质的亲环蛋白 D (cyclophilin D) 组成. 组成 PT 孔的蛋白质之间的确切结合位点虽然尚不清楚, 但是 ANT 构象改变与 PT 孔开放之间关系已初步阐明. 当 ANT 的构象处于 c 态时, PT

* 通讯联系人.

Tel: 021-64370045-690959, E-mail: xuncaiy@yahoo.com

收稿日期: 2000-01-24, 接受日期: 2000-02-29

孔开放, 而处于 m 态时, PT 孔关闭. 影响 ANT 构象改变的因素为: 苍术苷 (atractyloside) 与二酰胺 (diamide) 使 ANT 构象处于 c 态; Bongkerkic acid (BA) 与含巯基的多肽使 ANT 构象处于 m 态. 在生理情况下, PT 孔周期性开放, 使外室里的质子或正离子进入内室, 从而防止外室正离子过度蓄积. 实验证明, 细胞凋亡时, PT 孔开放, 并且促进 PT 孔开放的物质可诱导细胞凋亡, 而抑制 PT 孔开放的物质可阻抑细胞凋亡^[3-5].

3 线粒体跨膜电位改变与 caspase 家族关系

随着人们对凋亡机制研究的不断深入, 半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 家族的作用越来越受到人们关注. caspase 中“c”代表该酶为半胱氨酸蛋白酶 (cysteine protease), 而“aspase”代表酶的底物中含有天冬氨酸 (aspartic acid). 迄今为止, 已发现 13 种 caspase, 并分别按发表日期的先后以阿拉伯数字命名. 其中, caspase 1、3、6、7、8、10 有促进凋亡作用. 目前, 研究较多的是 caspase 1 与 caspase 3 和线粒体跨膜电位之间的关系. 通过对 Fas/APO-1 诱导胸腺细胞凋亡的研究证实: caspase 1 降解早于 $\Delta\phi_m$ 下降, 而 caspase 3 降解则迟于 $\Delta\phi_m$ 下降^[6]. 同样的结果由 Brown^[7] 和 Higuchi^[8] 在不同实验模型中得到证实. caspase 3 的激活与 $\Delta\phi_m$ 之间是如何联系的? 现知 caspase 3 的激活主要有两条途径: a. $\Delta\phi_m$ 下降时, 从线粒体外室释放的凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 激活 caspase 3. b. 从线粒体释放出来的细胞色素 c 与凋亡蛋白酶激活因子-1 (apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1) 和 caspase 9 形成复合体, 活化 caspase 3 (图 1)^[9].

现将 AIF、细胞色素 c 与 Apaf-1 分别叙述. AIF 是由 Susin 等^[10] 于 1996 年发现, 它具有以下特点: a. 普遍存在, 且高度保守; b. 由核基因组编码; c. 是分子质量为 50 ku 的膜间蛋白, 不同于细胞色素 c; d. 无胞浆时可诱导核凋亡; e. 没有核内切酶活性, 但可导致分离核的 DNA 裂解, 提示它可能通过激活存在于于核的内切酶起作用; f. 可被 caspase 3 的抑制剂 Z-VAD. Fmk 抑制, 但不同于 caspase 3. 释放入胞浆的 AIF 可直接激活 caspase 3, 而 Bcl-2 抑制其释放, 但并不抑制其合成, 也不抑制已释放入胞浆内的 AIF 的作用. 细胞色素 c 是由核编码的蛋白质, 位于线粒体外室.

在细胞发生凋亡的早期, 它经外膜释放入胞浆, 这一过程早于 PT 孔开放. Bcl-2 与 Bcl-X_L 可阻止它的释放. Apaf-1 与线虫的 CED-4 相似. 它的氨基端由 caspase 循环结构域 (caspase recruitment domain, CARD) 组成, 羧基端具有 12 个 WD-40 重复区, 中间 320 个氨基酸残基则与 CED-4 有 22% 的同源, 48% 的相似^[10]. Apaf-1 可通过其 N 端的 CARD 与 caspase 9 的 CARD 结合, 而它的羧基端 12 个 WD-40 重复区则可与细胞色素 c 结合, 通过 Apaf-1 这种桥梁作用, 最终形成细胞色素 c-Apaf-1-caspase 9 复合体. 鉴于 Apaf-1 与 CED-4 有部分同源, 并且它们的功能也相似, 故可推测它是哺乳类动物细胞中 CED-4 的同源体. 由于在线虫, CED-4 可与 CED-9 (相当于人体内的 Bcl-2) 结合, 因此提示 Bcl-2 也可与 Apaf-1 结合. 当凋亡信号传导至线粒体时, Bcl-2 释放 Apaf-1, 在 dATP 或 ATP 存在的情况下, Apaf-1 与细胞色素 c 和 caspase 9 结合, 激活 caspase 9, 后者作为蛋白酶, 激活凋亡的效应分子 caspase 3, 引起核凋亡.

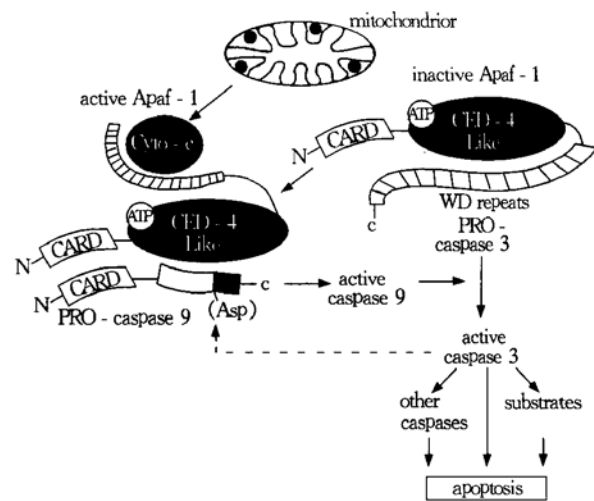


图 1 细胞色素 c 介导的 caspase 3 的激活途径^[9]

Fig. 1 Cytochrome c-mediated activation of caspase 3^[9]

4 线粒体跨膜电位改变与 Bcl-2 家族的关系

Bcl-2 家族主要包括抑制凋亡的成员如 Bcl-2、Bcl-W 与 Bcl-X_L 等, 以及促进凋亡的成员如 Bax、Bak、Bad 与 Bid 等. 序列比较与突变分析显示, 这些成员中最多含有四种 Bcl-2 同源 (Bcl-2 homology, BH) 结构域, 分别为 BH1、BH2、BH3、BH4. 其中, Bcl-2、Bcl-W 与 Bcl-X_L 含有以上四种结构域, Bax、Bak 与 Bad 含有 BH1、BH2 与 BH3, 而 Bid 仅含有 BH3 结构域. 除了 Bad 与

Bid, 以上几种 Bcl-2 家族成员的 C 端均含有 20 个氨基酸残基组成的疏水穿膜 (transmembrane, TM) 结构域, 它们可以籍此结构域分布于线粒体膜上. 实验证明, Bax 与 Bcl-X_L 调节细胞凋亡是依赖 TM 结构域. 未激活的 Bax 与 Bcl-X_L 存在于胞浆. Hsu 等^[11] 报道在胸腺细胞凋亡早期, Bax 与 Bcl-X_L 的分布发生改变, 从胞浆移到线粒体膜. Bad 因为没有 TM 结构域而分布于胞浆, 与 Bax 和 Bcl-X_L 一样, 当 H₂O₂ 诱导心肌细胞凋亡时, 它从胞浆移到线粒体膜^[12]. 除去 TM 后的 Bcl-2 其抑制凋亡作用随不同的实验体系而不同, 这可能与 Bcl-2 在不同实验体系中的作用强弱以及它在内质网与核膜上的作用大小有关. Cook 等^[12] 发现 H₂O₂ 诱导心肌细胞凋亡时, $\Delta\phi_m$ 下降, 并且胞浆内的 Bad 转移到线粒体, 随后 Bad 与 Bcl-2 均降解. 以上提示 Bad、Bax、Bcl-2 与 Bcl-X_L 抑制或促进凋亡的作用可能与线粒体有关. 功能实验提示这几种基因在凋亡中的作用是通过调节线粒体 $\Delta\phi_m$ 下降而实现^[13,14]. 那么, 它们又是如何使 $\Delta\phi_m$ 下降的呢? 最近, 文献报道 Bcl-2 抑制 $\Delta\phi_m$ 下降可能是通过保持线粒体内、外膜的完整性以及增加线粒体基质内质子的外流而实现的^[15,16]. Bcl-2 还可直接与 Apaf-1 结合, 形成 Bcl-2-Apaf-1-caspase 9 复合物, 抑制 caspase 9 对 caspase 3 的激活作用. Bcl-X_L 的结构与一些细菌毒素的孔形成结构域相似, 并且在合成的脂质膜中 Bcl-X_L 可以形成离子通道, 抑制内膜超极化与线粒体肿胀, 保持外膜完整性, 阻止细胞色素 c 的释放^[17]. Narita 等^[18] 以分离的线粒体为模型, 证实 Bax 与 Bak 诱导 $\Delta\phi_m$ 下降是通过与线粒体外膜上的 VDAC 结合, 使 PT 孔开放实现的, 并且 BH3 结构域为必需的. Shimizu^[19] 与 Finucane^[20] 研究也得出同样结论, 而且证明 Bcl-X_L 可以抑制 Bax 对 PT 孔的作用, 并且提出其抑制作用是通过 Bcl-X_L 与 VDAC 直接结合而关闭 VDAC, 最终使 PT 孔关闭.

综上所述, 线粒体跨膜电位下降为凋亡早期现象, 其形成与 PT 孔开放有关. caspase 家族成员中 caspase 1 可诱导 PT 孔开放, $\Delta\phi_m$ 下降, 而 caspase 3 激活则发生在 $\Delta\phi_m$ 下降之后, 且依赖于 AIF 释放或细胞色素 c-Apaf-1-caspase 9 复合体的形成. Bcl-2 通过稳定线粒体内、外膜与离子通道或与 Apaf-1 结合而抑制凋亡. Bcl-X_L 通过形成离子通道、抑制细胞色素 c 的释放和与 VDAC 直接结合而阻抑细胞凋亡. Bax 与 Bak 通过与 VDAC 结合而

促进 PT 孔开放, 诱导凋亡.

参 考 文 献

- 1 Kroemer G, Zamzami N, Susin S A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 1997, **18** (1): 44~ 51
- 2 Zamzami N, Hirsch T, Dallaporte B, *et al.* Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomemb*, 1997, **29** (2): 185~ 193
- 3 Hortelano S, Dallaporte B, Zamzami N, *et al.* Nitric oxide induces apoptosis via triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett*, 1997, **410** (2~ 3): 373~ 377
- 4 Marchetti P, Hirsch T, Zamzami N, *et al.* Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol*, 1996, **157** (11): 4830~ 4836
- 5 Marchetti P, Castedo M, Susin S A, *et al.* Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*, 1996, **184** (3): 1155~ 1160
- 6 Susin S A, Zamzami N, Castedo M, *et al.* The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95 and ceramide-induced apoptosis. *J Exp Med*, 1997, **186** (1): 25~ 37
- 7 Brown J, Higo H, Mckalip A, *et al.* Human papillomavirus (HPV) 16E6 sensitizes cells to atractyloside-induced apoptosis: role of p53, ICE-like proteases and the mitochondrial permeability transition. *J Cell Biochem*, 1997, **66** (2): 245~ 255
- 8 Higuchi M, Aggarwal B B, Yeh E T H. Activation of CPP32-like protease in tumor necrosis factor-induced apoptosis is dependent on mitochondrial function. *J Clin Invest*, 1997, **99** (7): 1751~ 1758
- 9 Reed J C. Cytochrome c: Can't live with it-can't live without it. *Cell*, 1997, **91** (5): 559~ 562
- 10 Susin S A, Zamzami N, Castedo M, *et al.* Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*, 1996, **184** (4): 1331~ 1341
- 11 Hsu Y T, Wolter K G, Youle R J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X_L during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (8): 3668~ 3672
- 12 Cook S A, Sugden P H, Clerk A. Regulation of Bcl-2 family proteins during development and in response to oxidative stress in cardiac myocytes: association with changes in mitochondrial membrane potential. *Circ Res*, 1999, **85** (10): 940~ 949
- 13 Kim C N, Wang X, Huang Y, *et al.* Overexpression of Bcl-X_L inhibits Ara-c induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res*, 1997, **57** (15): 3115~ 3120
- 14 Rosse T, Oliver R, Monney L, *et al.* Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 1998, **391** (6666): 496~ 499
- 15 Zamzami N, Susin S A, Marchetti P, *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 1996, **183** (4): 1533~ 1544
- 16 Ruth M K, Ella B W, Douglas R G, *et al.* The release of cytochrome c from apoptosis. *Science*, 1997, **275** (5303): 1132~ 1136
- 17 Heiden M V, Chandel N S, Williamson E K, *et al.* Bcl-X_L regulates the volume homeostasis of mitochondrial. *Cell*, 1997, **91** (5): 627~ 637

- 18 Narita M, Shimizu S, Ito T, *et al.* Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondrial. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (25): 14681~ 14686
- 19 Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 1999, **399** (6735): 483~ 487
- 20 Finucane D M, Bossy W E, Waterhouse N J, *et al.* Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondrial is inhibitable by Bcl-X_L. *J Biol Chem*, 1999, **274** (4): 2225~ 2233

Mitochondrial Transmembrane Potential and Cell Apoptosis

CAI Xun*, CHEN Guo-Qiang, CHEN Zhu, WANG Zherr Yi

(Shanghai Institute of Hematology, Rui-jin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract Apoptosis, an intrinsic cell death model which is regulated by organisms, is essential for the maintenance of tissue homeostasis in multicellular organisms. Recently, researchers on cell apoptosis have paid more attention on mitochondrion than on nucleus. Different death stimulus induces opening of PT pore, degradation of mitochondrial transmembrane potential, activation of caspase and inducing cell apoptosis. Bcl-2 and Bcl-X_L inhibit cell apoptosis via mitochondrion while Bax, Bak and Bad induce apoptosis by means of regulation of mitochondrion.

Key words cell apoptosis, mitochondrion, caspase, bcl 2

* Corresponding author. Tel: 86-21-64370045-690959, E-mail: xuncaiy@yahoo.com

Received: January 24, 2000 Accepted: February 29, 2000

1999 年中国科技论文统计结果

国家科学技术部中国科技信息研究所于 2000 年 12 月 13 日召开“2000 年中国科技论文统计结果新闻发布会”。会上公布了 1999 年中国科技论文统计结果。

1999 年我国科技工作者发表国际论文(含期刊论文和会议论文)共 46 188 篇,比上一年增加 11 185 篇,增长 32.0%,位居世界第 8 位。

主要反映自然科学基础研究结果的《SCI》所收录的论文,我国有 24 476 篇,比上一年增加 4 638 篇,增长 23.4%。按论文数排序,我国已由上年的第 12 位跃居世界第 10 位。

反映工程科学研究情况的《EI》收录的论文,我国有 14 807 篇,比上一年增加 4 915 篇,增长 49.7%。由上年的第 5 位跃居世界第 3 位。

我国国际论文的被引用数由上年的 11 549 篇增加到 13 024 篇。被引用次数由 21 511 次增加到 25 173 次,分别增长 12.8% 和 17.0%。

国内论文数据统计结果为:1999 年我国科技人员在国内科技期刊上共发表论文 162 775 篇,比上一年增加 29 434 篇,同口径增长 13.0%。海外作者在我国刊物上发表论文 745 篇,比上一年增加 115 篇。

按《ISTP》统计,我国国际会议论文数为 6 905 篇,比上年增加 1 632 篇,增长 31.0%,在世界排名中,由去年的第 10 位跃至第 8 位。

1999 年《SCI》收录我国期刊(不含台湾期刊)56 种。