



呼吸链电子漏在细胞凋亡中的作用*

徐建兴**

(中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 实验证明细胞色素 c 具有很强的抗氧化功能, 在线粒体中氧化态的细胞色素 c 直接清除 $O_2^{\cdot-}$, 还原态的细胞色素 c 清除 H_2O_2 . 由于呼吸链传递电子合成 ATP 的同时, 总有少部分电子从呼吸链底物端的复合物 I 和 III 漏出, 而且漏出的电子首先使氧分子还原成 $O_2^{\cdot-}$, 然后 $O_2^{\cdot-}$ 歧化成 H_2O_2 , 所以细胞色素 c 清除 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的功能使呼吸链出现了两条电子漏旁路. 细胞色素 c 通过这两条电子漏路径实现其控制线粒体中 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 水平的功能. 根据两条电子漏旁路都是 $O_2^{\cdot-}$ 代谢路径的事实, 引进了线粒体自由基代谢的概念, 并从自由基代谢失调的角度探讨了呼吸链电子漏在细胞凋亡中的作用.

关键词 细胞色素 c, 抗氧化, 呼吸链电子漏, 线粒体自由基代谢

学科分类号 Q255

细胞色素 c 参与细胞凋亡现象的发现使线粒体在细胞生命活动中的重要地位日益受到生物学家的广泛重视^[1], 线粒体自身的基础理论研究也因此得到了迅速的发展.

回顾线粒体研究的历史, 早在人们开始认识到线粒体的功能是制造 ATP 的时候 (20 世纪 40~50 年代), 就已经知道线粒体也制造 H_2O_2 . 线粒体制造 ATP 的功能在 Slate^[2] 高能中间物学说, Mitchell^[3] 化学渗透学说, 和 Boyer^[4] 构象学说等多个学说的推动下, 进行了近半个世纪的研究取得了圆满的进展. 而线粒体制造 H_2O_2 的功能却长时期没有什么进展, 其主要原因是缺少适当的理论指导和可靠的实验检测手段. 20 世纪 70 年代美国著名生物能力学家 Chance 建立了检测线粒体产生 H_2O_2 的实验方法, 并证明在正常生理条件下约有 2% 的线粒体耗氧量用于制造 H_2O_2 ^[5]. 那么线粒体中的 H_2O_2 是如何产生的呢? 线粒体产生 H_2O_2 的生理意义是什么呢? 这些问题的研究在 1980 年以后逐渐取得了进展. 已认识到线粒体的 H_2O_2 是由超氧自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 歧化而来, 而 $O_2^{\cdot-}$ 是氧分子被呼吸链底物端漏出的电子进行单电子还原形成的^[6]. 已确定呼吸链底物端复合物 I 和 III 各有一个漏电子位点产生超氧自由基和双氧水^[7,8].

当人们关注线粒体 H_2O_2 生成的精确部位和分子机制时, 我们思考了 H_2O_2 怎样清除的问题. 因为 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 是线粒体产生有害活性氧 (ROS) 的根源, 如果不能及时清除, 将导致线粒体自身受到自由基损伤. 基于这种考虑, 我们在 1995 年提出了呼吸链自身通过细胞色素 c 漏电子清除底物端

漏电产生的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的电子漏路径假说, 并指出这个电子漏路径是超氧自由基代谢路径 ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O$) 的本质^[9,10]. 提出这一假设的根据有三点: a. 酵母中有一个叫做细胞色素 c 过氧化物酶的分子催化细胞色素 c 与 H_2O_2 的反应 ($Cytc^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Cytc^{+3} + H_2O$)^[11]; b. 根据氧化还原电位的数值, 细胞色素 c 与 H_2O_2 的上述反应是可以自发进行的; c. 1988 年我们用纯化的呼吸链片段琥珀酸细胞色素 c 还原酶作为电子传递体, 把底物琥珀酸作为电子供体, 直接观察到了电子从琥珀酸经过细胞色素 c 向 H_2O_2 传递的过程^[12].

仅仅证明细胞色素 c 向外源 H_2O_2 传递电子是远远不够的. 论证这一假说的关键是实验证明细胞色素 c 清除呼吸链底物端漏电子产生的 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 . 这一实验论证在本实验室近期的工作中得到圆满的结果, 部分实验结果已经发表^[13~15].

既然呼吸链电子漏旁路是一个超氧自由基代谢 ($O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O$) 途径, 那么就可以推论线粒体中存在一个与能量代谢并存的超氧自由基代谢过程. 把文献中零散记载的而又可以在线粒体中发生的超氧自由基的各种反应途径总结在一起, 我们得到了如图 1 所示的结果. 有 4 条超氧自由基反应途径被总结到线粒体的自由基代谢过程中, 如图 1 上半部分所示.

* 国家自然科学基金资助项目 (39570193) 和国家科学技术部资金部分资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888504, E-mail: xujx@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2003-01-24, 接受日期: 2003-02-28

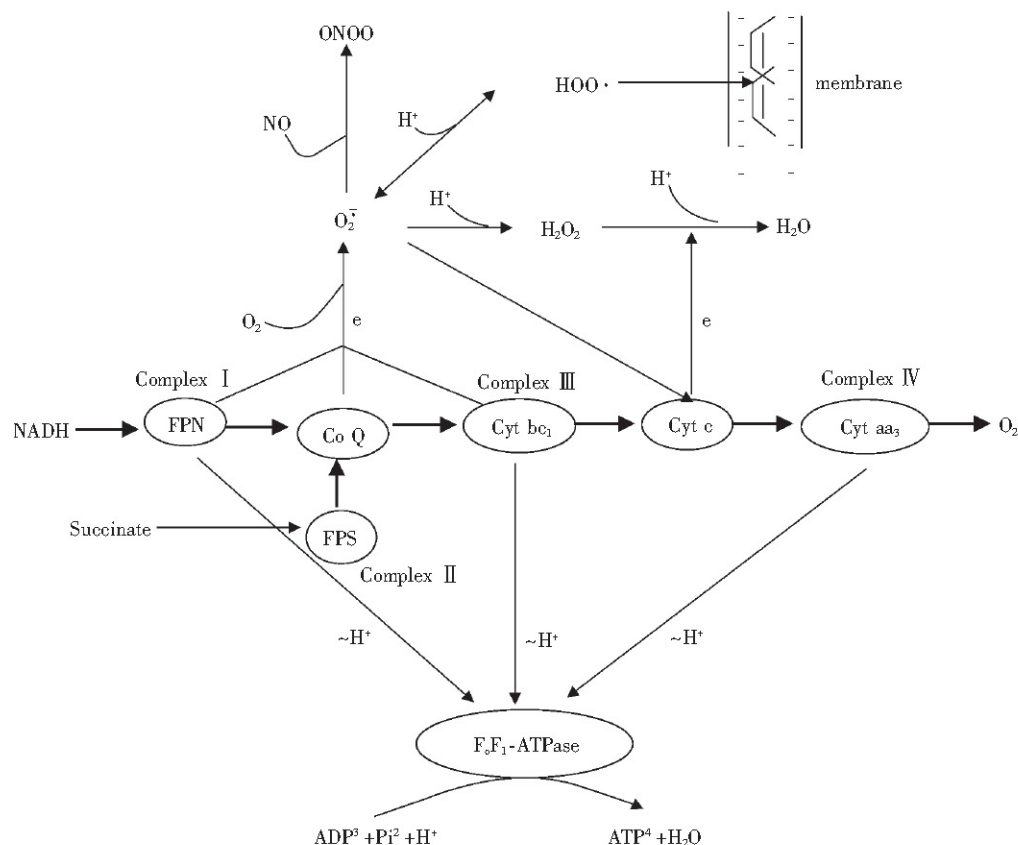


Fig. 1 The electron leak linked radical metabolism (upper) and electron transfer coupled energy metabolism (lower) in mitochondria

图1 线粒体中与呼吸链电子漏相连的自由基代谢(上)和与电子传递偶联的能量代谢(下)

中间箭头联系的圆环代表呼吸链酶,上半部分表示呼吸链电子漏产生的 $O_2^{\cdot -}$ 和 4 条 $O_2^{\cdot -}$ 代谢途径,下半部分表示与呼吸链偶联的 ATP 合成。

引进一个与能量代谢并存的自由基代谢过程,可以使我们对线粒体的功能有一个全新的理解,自由基代谢与能量代谢分享呼吸链底物供给的电子,这意味着电子在两者之间的分配状态决定着线粒体自身的代谢状态。如果自由基代谢偏高意味着线粒体潜在的负面效应和机体偏离正常而出现病理状态。我们已经在衰老、运动疲劳、和老年退行性疾病等病理状态下的动物线粒体中检测到自由基代谢水平偏高的现象^[10]。

细胞凋亡是机体筛选更新细胞的一种手段,衰老或过度受伤的细胞必须以一种不伤及相邻细胞的方式自行凋亡,以便让健康的细胞取代它的位置保持生命活力。是什么因素决定着一个细胞必须凋亡呢?根据图1分析,线粒体的自由基代谢状态可能占据重要的地位。细胞培养实验证明 10^{-9} mol/L 水平的氧自由基促进细胞增殖, 10^{-6} mol/L 水平

的氧自由基引起细胞凋亡, 10^{-3} mol/L 水平的氧自由基引起细胞的损伤死亡。这说明线粒体的自由基代谢状态决定着细胞的生死存亡。我们在实验中发现把细胞色素 c 从呼吸链中抽提出来以后,呼吸链底物端漏电生成氧自由基的水平会比正常呼吸链高出 7~8 倍。当把细胞色素 c 重组回去时,这些增高的氧自由基生成量会呈指数地下降直至达到正常水平。这意味着呼吸链中细胞色素 c 的含量对呼吸链底物端漏电的程度有着直接的影响^[13]。目前认为,细胞凋亡的第一步是细胞色素 c 从线粒体漏出转移到胞浆中启动凋亡信号因子。但是根据我们的实验观察,当细胞色素 c 刚刚离开呼吸链的瞬间,细胞色素 c 还没有到达凋亡启动位点之前,大量的氧自由基就已经由呼吸链底物端漏电生成,这一点揭示了线粒体的氧自由基代谢状态与细胞凋亡之间的因果关系。很多因素可以影响线粒体的氧

自由基代谢状态,特别是呼吸链酶系自身受到的氧自由基损伤,这种损伤使呼吸链电子传递不畅通而引起漏电程度的增高,漏电程度增高造成氧自由基生成增多和呼吸链的进一步受损.如此恶性循环使线粒体的氧自由基代谢状态不断恶化,当这种恶化程度达到一定的限度不能再继续维持细胞的生命活动时,细胞必须凋亡.健康的细胞不断取代受损的细胞是机体保持生命活力的必要条件,过度受损的细胞必须及时凋亡.

参 考 文 献

- 1 Liu X, Kim C N, Yang J, *et al.* Induction of apoptotic program in cell-free extracts requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, **86** (1): 147~157
- 2 Slate E C. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature (London)*, 1953, **172** (28): 975~976
- 3 Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 1961, **191** (4784): 144~148
- 4 Boyer P D. The ATP synthase—A splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66**: 717~749
- 5 Chance B, Sies H, Boveris A, *et al.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979, **59** (3): 527~605
- 6 Loschen G, Azz A, Richter C, *et al.* Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, 1974, **42** (1): 68~72
- 7 Turrens J F, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 1980, **191** (2): 421~427
- 8 Zhang L, Yu L, Yu C A. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem*, 1998, **273** (51): 33972~33976
- 9 徐建兴. 线粒体参与氧自由基代谢的功能. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22** (2): 179~180
- 10 Xu J X. *Prog Biochem Biophys*, 1995, **22** (2): 179~180
- 11 Xu J X, Li X, Zhang Y X, *et al.* Mitochondrial respiratory chain: a self-defense system against oxygen toxicity. In: Packer L, eds. *Proc Internal Symp on Native Antioxidants; Molecular Mechanism and Health Effects*. Illinois: AOCS Press, 1996. 530~539
- 11 Yonetani T. Cytochrome c peroxidase (Bakers' yeast). *Meth Enzymol*, 1967, **10**: 336~339
- 12 Xu J X. New function of cytochromes in mitochondria. *Abstracts Book of the 2th Japan-China Bilateral Symposium on Biophysics, Japan*, 1988
- 13 Zhao Y, Wang Z B, Xu J X. The effect of cytochrome c on the generation and elimination of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in mitochondria. *J Biol Chem*, 2003, **278** (4): 2356~2360
- 14 Wang Z B, Zhao Y, Xu J X. Cytochrome c is a hydrogen peroxide scavenger in mitochondria. *Protein and Peptide Letters*, 2003, **10** (3): 1~7
- 15 徐建兴. 呼吸链的电子漏路径和线粒体的超氧自由基代谢及其生物学意义. *基础医学与临床*, 2001, **21** (5): 389~394
- Xu J X. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2001, **21** (5): 389~394

The Role of Electron Leakage of Mitochondrial Respiratory Chain in Cell Apoptosis*

XU Jian-Xing**

(National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Cytochrome c has been proved to be a powerful scavenger of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 , the ferricytochrome c scavenges $O_2^{\cdot-}$ and the ferrocycytochrome c scavenges H_2O_2 . As the respiratory chain leak some electrons from complex I and III to generate $O_2^{\cdot-}$ and then $O_2^{\cdot-}$ dismutate to H_2O_2 , the scavenge of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 by cytochrome c makes respiratory chain operated with two electron leak bypass. Cytochrome c plays a role to keep $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in the normal physiological level in mitochondria. A concept of radical metabolism is introduced into mitochondria based on the electron leak bypass is the metabolic path of $O_2^{\cdot-}$. The role of electron leak of respiratory chain in cell apoptosis is discussed in the dysfunction of radical metabolism of mitochondria.

Key words cytochrome c, radical scavenger, electron leak of respiratory chain, radical metabolism of mitochondria

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (39570193) and Part by The Ministry of Science and Technology of China.

** Corresponding author. Tel: 86-10-64888504, E-mail: xujx@sun5.ibp.ac.cn

Received: January 24, 2003 Accepted: February 28, 2003