综述

文章编号:1000-5404(2006)16-1726-03

线粒体氧化应激及其在神经退行性疾病神经细胞凋亡中的作用

陈 平,梁立平,杨 杰 (同济大学生命科学与技术学院,上海 200092)

神经退行性疾病是一类严重影响人类健康的常见病,现普遍认为线粒体是控制细胞凋亡的中心和产生氧自由基的主要场所,线粒体功能失调可以导致许多神经系统退行性疾病的发生。神经元死亡是一些神经系统退行性疾病的共同特征,其中包括较少数病程进展较快(2~3年)的肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)及病程较长(20年或更长)的如帕金森病(Parkinson disease,PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer disease,AD)、享廷顿病(Huntington disease,HD)等,某些导致这些疾病的发病机制现已得到基本确认,其中线粒体功能失调以及由线粒体介导的神经细胞凋亡在退行性疾病发生、发展中起了重要作用[1],研究促进或抑制神经元凋亡的机制可以为预防和治疗神经系统退行性疾病提供新的思路和方法。氧化应激是指活性氧生成与抗氧化防御系统之间的不平衡状态,氧化应激可在活性氧生成超过抗氧化防御系统时或者在抗氧化剂活性降低时发生,氧化应激导致线粒体能量代谢失调,进一步损伤线粒体,从而促进神经退行性疾病的发生、发展。现就线粒体氧化应激及其在神经退行性疾病神经细胞凋亡中的作用进行综述。

1 线粒体与自由基损伤

1.1 线粒体活性氧的产生与代谢

线粒体具有有氧呼吸的特殊功能,细胞内大约90%的氧在线粒体被消耗。在正常情况下,绝大部分的氧在线粒体内被电子传递链传来的电子还原为水,极小部分(3%~4%)氧被电子传递链中"漏出"的电子单价还原,形成超氧阴离子,成为细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)的主要来源,ROS在体内主要以超氧阴离子($O_2^-\cdot$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(OH·)等形式存在。生理条件下线粒体内存在有效的抗氧化机制,自由基可被抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等)和抗氧化物(如维生素C、维生素E等)清除[2]。

1.2 ROS对线粒体的作用

作为细胞内ROS的主要来源,线粒体的结构暴露于较高浓度的ROS下,并更易受其攻击。急性大量产生的氧自由基抑制电子传递链酶复合体Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ的活性,从而使线粒体能量合成障碍,自由基损伤可造成线粒体及细胞内蛋白质、脂类及核酸的氧化,最终导致线粒体功能下降[3]。顺乌头酸酶是具有铁-硫蛋白中心的三羧酸循环的限速酶,其极易被氧自由基抑制而失活。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine,MPTP)是一种特殊的神经毒素通过抑制线粒体复合体Ⅰ而产生氧自由基来损伤多巴胺神经元,已被普遍用来制作实验性PD动物模型。现已证明线粒体顺乌头酸酶在MPTP实验性PD中是线粒体铁积聚的早期来源,超氧阴离子通过氧化使线粒体顺乌头酸酶失活在PD发病中具有重要作用。在线粒体锰超氧化物歧化酶(superoxide dismutase 2, SOD2)过表达的转基因鼠,MPTP对线粒体顺乌头酸酶失活、铁积聚及多巴胺丢失的毒性作用被抑制,而在线粒体SOD2缺陷的转基因鼠其毒性作用增强[4]。

脂质过氧化对线粒体膜结构尤其是线粒体内膜的损伤最重,一方面是因为线粒体内膜是最靠近线粒体产生$O_2^-\cdot$的部位。另一方面线粒体内膜含有大量的高度不饱和脂肪酸—心磷脂,使其更易受到ROS的攻击。研究表明,氧化应激导致的脂质减少以心磷脂的减少最为明显,其降低比例远高于其他脂类。脂质过氧化可导致线粒体膜流动性下降,从而改变膜的性质并使膜结合蛋白从膜上分离[3]。

ROS对线粒体膜蛋白的作用既有直接作用,如修饰胱氨酸、蛋氨酸的残基,使线粒体膜蛋白之间或和脂类发生巯基交联,修饰脯氨酸、精氨酸和赖氨酸残基,产生羰基化蛋白;又可以是脂质过氧化的结果。膜蛋白的氧化可导致线粒体内的酶活性下降甚至失活[5],诱导线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,mtPTP)的开放。

mtDNA遭受的氧化攻击长期累积后就会导致DNA突变频率的增加,产生功能受损的蛋白。另一方面mtDNA较易发生突变,其突变率是细胞核DNA(nDNA)的10倍以上,主要原因可能是因为mtDNA位于线粒体内膜的基质中,线粒体基质在氧化磷酸化过程中会产生大量的氧自由基,这些氧自由基对mtDNA产生氧化损伤,同时由于mtDNA缺乏DNA保护蛋白,如组蛋白,直接裸露于基质中[6]。

2 氧化应激时线粒体损伤在神经元凋亡中的作用

随着神经生物化学和组织化学研究技术的进步,发现线粒体氧化应激与退行性疾病神经元凋亡存在重要联系。Liang等[7]研究得出红藻氨酸可诱导线粒体过氧化物生成增加,而在SOD2过表达的转基因鼠可减少其海马神经元的丢失。然而,线粒体氧化应激与退行性疾病神经元凋亡具体的分子机制目前还不十分清楚,概括起来主要有以下几个方面认识。

2.1 增加线粒体膜的通透性

线粒体内、外膜的通透性差别最大,外膜允许电解质、水、蔗糖及小于10×10^3的分子自由通过,内膜与外膜正好相反,内膜在正常情况下不允许离子、蔗糖等透过,仅允许不带电荷的小分子通过,如水、氧、二氧化碳、尿素及甘油等,故外源性的抗氧化物质不易进入线粒体[8]。

几乎所有的诱导细胞凋亡的刺激因素都可诱发线粒体的结构改变和功能障碍,并由此产生一系列关键性变化,如细胞

作者简介:陈 平(1972-),男,安徽省安庆市人,博士研究生,讲师,主要从事神经退行性疾病方面的研究。电话:(021)65986852

收稿日期:2005-12-13;修回日期:2006-03-10

色素 C(cytochrome C, Cyt c)释放，与凋亡激活因子-1 (apoptosis activating factor-1, Apaf-1)结合，启动 Apaf-1-caspase-9 - caspase-3 细胞凋亡蛋白级联反应，诱导细胞凋亡。研究表明，bcl-2，bcl-xL 定位在线粒体外膜 mtPTP，而 bax 则散布在基质中，呈可溶性。外源性或内源性的刺激因子作用于细胞线粒体时，促凋亡的 bcl-2 基因家族可促进 mtPTP 开放，释放 Cyt c，激活 caspase 级联反应，而抑制凋亡的 bcl-2 基因家族可抑制 mtPTP 的开放[9]。

ROS 的积累可以导致线粒体的膜系统受到损害，线粒体肿胀，激活 mtPTP 开放，mtPTP 的开放可释放促凋亡蛋白如 Cyt c、Smac(second mitochondrial- derived activator of caspase)、Omi、endonuclease G、Apaf-1、caspase-9 等[10]，促进细胞凋亡，也有报道指出 mtPTP 的开放，凋亡前蛋白 Bax 转移到线粒体上[11]，促使 Cyt c 从内膜脱落并流失到细胞质中，caspase 活化，从而启动细胞凋亡[12]，Takeyama 等[13]研究发现，细胞经 H_2O_2 处理后，氧应激诱发细胞凋亡的过程中，引起线粒体内膜通透性改变，mtPTP 形成并开放，导致膜去极化，Cyt c 从线粒体移位到细胞质中，从而引起 caspase 依赖性的细胞凋亡。Carmody 等[14]的实验结果表明 ROS 的增加可直接或间接损伤线粒体膜，造成膜电位下降[15]。而线粒体膜电位的下降可导致膜的通透性增高，使线粒体膜间腔的 Cyt c 释放入细胞质[16~18]，与 Apaf-1 及 pro-caspase-9 形成凋亡小体(apoptosome)，在 ATP 参与下，凋亡小体内的 pro-caspase-9 可自身激活，形成具有活性的 caspase-9，后者进一步激活 caspase-3，6，7 等[19]，活化的 caspase 可进一步导致线粒体膜破裂，致使线粒体进一步释放其他一些 caspases 及激活因子，导致细胞凋亡。

2.2　抑制线粒体呼吸链功能引起细胞凋亡

线粒体是产生 ATP 的中心，在脑组织，能量大部分用于维持神经递质功能。而线粒体酶复合物Ⅰ活性降低，ATP 合成减少，可诱发兴奋性氨基酸毒性。由于能量减少，造成细胞内、外离子失衡，膜电位下降，抑制了去极化、谷氨酸能刺激突触后膜的复极，导致一些电压依赖性 Ca^{2+} 通道持续开放，造成 Ca^{2+} 急剧内流，细胞 Ca^{2+} 增加耗竭细胞内 ATP，同时通过活化蛋白酶、脂肪酶、核酸内切酶，介导了兴奋性氨基酸毒性细胞损伤，造成神经元的凋亡。同时呼吸链的损伤可使线粒体合成 ATP 的功能发生障碍，线粒体的功能障碍又可导致自由基产生增多，过多的氧自由基不能被及时清除，又可引起生物膜结构蛋白质和脂质过氧化，损害线粒体膜的通透性，引起电子传递链活性的进一步下降，进而形成恶性循环，使氧自由基生成进一步增加[20]。神经细胞在氧化应激过程中生成的 ROS 引发神经元凋亡可通过：释放 Cyt c 激活 Caspase-3，导致细胞凋亡；细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，激活 Caspase-2，引发神经细胞凋亡[21]。小脑颗粒神经元经一氧化氮供体 S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(S-nitroso-N-acetylpenicillamine，SNAP) 处理 3 h 后，线粒体跨膜电位降低，同时细胞内 ATP 含量下降，而一氧化氮的特异性清除剂血红蛋白对此具有保护作用，说明一氧化氮可以透过细胞膜、线粒体膜等生物膜，修饰某些蛋白质的巯基、血红素辅基及铁硫中心，从而显著性地抑制线粒体呼吸链酶复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ及Ⅳ的活力[22]。PD 患者黑质中酶复合体Ⅰ缺陷导致自由基产生增多，使线粒体膜脂质过氧化，损伤 mtDNA，加重线粒体功能障碍；同时增多的自由基可漏出线粒体，损伤细胞的蛋白质、脂肪及核基因，造成细胞凋亡[23]。Kovacs 等[24]研究表明，细胞培养过程中，如果呼吸链中酶复合体Ⅰ(酶复合体Ⅰ就是 NADH 脱氢酶复合体)缺陷，则细胞可产生大量超氧化物。用抗-Fas 处理引起 LHON 的细胞系及与复合体Ⅰ缺陷有关的 mtDNA 突变细胞系，均更易被诱导凋亡[25,26]。因此研究者提出这样的问题，即增加 LHON 细胞中 ROS 产量是否对凋亡敏感性有所影响。有报道显示过氧化氢的合成增加只出现在具有神经元表型的突变 LHON 细胞中，而不出现在未分化的细胞表型中。这些结果提示 ROS 的产生具有组织特异性，不一定在凋亡敏感性方面起作用。HD 患者的脑组织发现复合酶Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ的活性都有降低的现象，而复合体酶Ⅳ的活性没有改变[27]。

2.3　线粒体 DNA 的损伤引起细胞凋亡

线粒体 DNA 是一双链环状分子，长度为 16 956 bp，占细胞总 DNA 的 0.1% ~1%，是独立于细胞核染色体 DNA (nDNA)以外的又一基因组，编码区共 37 个基因，编码 22 个 tRNA 基因，2 个 rRNA 基因，13 个与氧化磷酸化有关的蛋白质基因[28]，其基因产物均直接或间接与氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS) 有关，OXPHOS 是脑细胞 ATP 和 ROS 的主要来源，并在调节细胞内钙稳态平衡和细胞生存/ 死亡中起关键作用[29]。虽然 mtDNA 转录的 mRNA 只编码线粒体内膜中呼吸酶复合体的 6 个亚单位共 13 个多肽，但这 6 个亚单位都参与了细胞内电子传递和氧化磷酸化的作用，过度氧化应激可造成 mtDNA 损伤。mtDNA 损伤可能通过下列途径对线粒体功能和退行性变产生影响：①mtDNA 突变引起 OXPHOS 基因受损，影响 mtDNA 编码与氧化磷酸化有关蛋白质的合成，使基因指令的与呼吸链有关的酶出现异常，造成线粒体氧化磷酸化功能障碍；②mtDNA 突变引起的电子传递链的功能缺陷可能增加线粒体中 ROS 的生成，最终形成 ROS 恶性循环；③线粒体功能失调，产生的能量不足以维持正常的细胞功能，可导致细胞死亡，组织器官退变，引起退行性变。有研究报道指出在前脑缺血 3.5 min 后，海马 CA1 区神经元线粒体 DNA 的表达呈选择性和进行性降低。Silva 等[30]报道指出细胞发生凋亡或坏死受多种因素调控，其中 mtDNA 损伤或许就是诸多调控因素之一。对于不在 tRNA 基因上的 mtDNA 点突变(即 Leber 遗传性视神经病变)ND4 基因的 G11778A 突变或者 ATPase6 基因的 8993 位 T 突变为 C，该突变与神经性病变、共济失调、视网膜炎有关，或者与母系遗传 Leigh 症有关[31]。

3　展望

综上所述，神经退行性疾病的致病因素大都涉及氧化应激和生物能量，表现为神经元的进行性损失和功能紊乱，线粒体作为细胞产生能量的中心及活性氧的重要来源，在神经退行性疾病发生、发展中起了重要作用。在神经细胞凋亡过程中，线粒体介导了关键的限速步骤，线粒体对细胞凋亡具有调控作用。线粒体结构和功能障碍是各种刺激因素诱导细胞凋亡的中心事件，并由此导致线粒体内凋亡诱发因子的释放，参与对细胞凋亡的调控。线粒体作为 ROS 的主要来源，更容易受 ROS 影响，导致线粒体膜的通透性增加、呼吸链的功能抑制及 mtDNA 的损伤，从而参与了细胞凋亡过程。然而，也有研究表明神经细胞凋亡不是退行性疾病患者神经细胞死亡的主要方式，可能有其他机制介导神经退行性疾病中神经元的死亡[32]。如在

对 AD 尸检标本的研究结果显示，AD 患者神经细胞胞体没有明显减少，而神经元的神经纤维消失，在 AD 海马中仅 0.02% ~0.05% 的神经元有某些凋亡的特征性改变，如表达激活的 caspase-3，在 synuclein 病患者大脑中仅 1% ~2% 的黑质多巴胺能神经元有 DNA 片段化，且与正常人群没有显著差异。由于 mtDNA 突变引发并维持凋亡过程的复杂性，同时 ROS 在凋亡中的作用及调控凋亡的相关因子尚有待进一步研究，故目前很难得出一般性结论。然而，该领域取得的进展，将有利于更好地认识细胞自身补偿甚至逆转细胞死亡的对策，更能深入地阐明退行性变过程，并为延缓退行性变找到一条途径。

关键词：线粒体；凋亡；神经系统疾病；应激；氧化还原
中图法分类号：R329.25 **文献标识码**：A

参考文献：

[1] LEMASTERS J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging[J]. Rejuvenation Res, 2005, 8(1): 3-5.
[2] TURRENS J F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species[J]. J Physiol, 2003, 552(Pt 2): 335-344.
[3] SCHIPPER H M. Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing[J]. Ageing Res Rev, 2004, 3(3): 265-301.
[4] LIANG L P, PATEL M. Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease[J]. J Neurochem, 2004, 90(5): 1076-1084.
[5] FORSMARK-ANDREE P, LEE C P, DALLNER G, *et al*. Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 22(3): 391-400.
[6] LOPEZ-TORRES M, GREDILLA R, SANZ A, *et al*. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(9): 882-889.
[7] LIANG L P, HO Y S, PATEL M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage[J]. Neuroscience, 2000, 101(3): 563-570.
[8] EMERIT J, EDEAS M, BRICAIRE F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. Biomed Pharmacother, 2004, 58(1): 39-46.
[9] CHAN P H. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia[J]. Neurochem Res, 2004, 29(11): 1943-1949.
[10] HAEBERLEIN S L. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death[J]. Neurochem Res, 2004, 29(3): 521-530.
[11] POLLACK M, PHANEUF S, DIRKS A, *et al*. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 959: 93-107.
[12] KO C H, SHEN S C, HSU C S, *et al*. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, and caspase cascade[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(6): 913-927.
[13] TAKEYAMA N, MIKI S, HIRAKAWA A, *et al*. Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2002, 274(1): 16-24.
[14] CARMODY R J, COTTER T G. Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro[J]. Cell Death Differ, 2000, 7(3): 282-291.
[15] FERNANDEZ-GOMEZ F J, GALINDO M F, GOMEZ-LAZARO M, *et al*. Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway[J]. Br J Pharmacol, 2005, 144(4): 528-537.
[16] ISHISAKA R, UTSUMI K, UTSUMI T. Involvement of lysosomal cysteine proteases in hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(9): 1865-1872.
[17] KULMS D, SCHWARZ T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5-6): 837-841.
[18] KULMS D, SCHWARZ T. Molecular mechanisms involved in UV-induced apoptotic cell death[J]. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2002, 15(5): 342-347.
[19] ANURADHA C D, KANNO S, HIRANO S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells[J]. Free Radic Biol Med, 2001, 31(3): 367-373.
[20] PERL A, NAGY G, GERGELY P, *et al*. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Methods Mol Med, 2004, 102: 87-114.
[21] ANNUNZIATO L, AMOROSO S, PANNACCIONE A, *et al*. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions[J]. Toxicol Lett, 2003, 139(2-3): 125-133.
[22] LU Y M, MIYAZAWA K, YAMAGUCHI K, *et al*. Deletion of mitochondrial ATPase inhibitor in the yeast Saccharomyces cerevisiae decreased cellular and mitochondrial ATP levels under non-nutritional conditions and induced a respiration-deficient cell-type[J]. J Biochem (Tokyo), 2001, 130(6): 873-878.
[23] ZOCCARATO F, TOSCANO P, ALEXANDRE A. Dopamine-derived dopaminochrome promotes H(2)O(2) release at mitochondrial complex I: stimulation by rotenone, control by Ca(2+), and relevance to Parkinson disease[J]. J Biol Chem, 2005, 280(16): 15587-15594.
[24] KOVACS G G, HOFTBERGER R, MAJTENYI K, *et al*. Neuropathology of white matter disease in Leber's hereditary optic neuropathy[J]. Brain, 2005, 128(Pt 1): 35-41.
[25] DANIELSON S R, WONG A, CARELLI V, *et al*. Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-Induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 5810-5815.
[26] WONG A, CAVELIER L, COLLINS-SCHRAMM H E, *et al*. Differentiation-specific effects of LHON mutations introduced into neuronal NT2 cells[J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(4): 431-438.
[27] CALABRESE V, LODI R, TONON C, *et al*. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia[J]. J Neurol Sci, 2005, 233(1-2): 145-162.
[28] SCHNEIDER A, EBERT D. Covariation of mitochondrial genome size with gene lengths: evidence for gene length reduction during mitochondrial evolution[J]. J Mol Evol, 2004, 59(1): 90-96.
[29] REGO A C, OLIVEIRA C R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases[J]. Neurochem Res, 2003, 28(10): 1563-1574.
[30] SILVA J P, LARSSON N G. Manipulation of mitochondrial DNA gene expression in the mouse[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1555(1-3): 106-110.
[31] SERVIDEI S. Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation[J]. Neuromuscul Disord, 2004, 14(1): 107-116.
[32] JELLINGER K A, STADELMANN C H. The enigma of cell death in neurodegenerative disorders[J]. J Neural Transm Suppl, 2000, (60): 21-36.

（编辑 王 红）