DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.035
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
1598 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

综述

文章编号:1000-5404(2004)17-1598-03

线粒体膜通透性转换孔与细胞凋亡

Mitochondrial permeability transition pore and apoptosis

陈东风[1] 综述,房殿春[2] 审校 (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042,[2]西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

众多研究表明,线粒体功能改变与细胞凋亡密切相关,包括释放促凋亡因子、活性氧过度生成、能量产生障碍、胞浆内钙失衡等。近年来的研究表明,线粒体膜通透性转换(mitochondrial permeability transition, MPT)的发生在细胞凋亡中的作用非常关键[1,2]。

1 线粒体通透性转换与凋亡

正常情况下线粒体外膜为高通透性,而内膜相对通透性低。线粒体跨膜电位($\Delta\Psi m$)是线粒体内膜两侧电子的不对称分布造成的,线粒体内膜的低通透性和电化学质子梯度是维持膜电位的基础。线粒体内、外膜上的孔道的正常状态维持着线粒体膜电位,而正常的线粒体膜电位是线粒体功能所必须。细胞凋亡过程中许多重要事件的发生都与线粒体密切相关,线粒体能将凋亡信号从细胞的一个系统转移到另一个系统,如从胞质到核,在这一过程中,MPT起着关键作用。各种亚致死损伤及受体介导的信号途径导致细胞凋亡各有其独特途径,如活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)和/或细胞内氧化还原状态的改变,白细胞介素-1β转化酶及其同源蛋白以及丝氨酸的激活,都以不同途径促使细胞凋亡。而这些途径最终都将归结于PT(permeability transition)的发生,导致细胞凋亡。发生MPT的线粒体将释放凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF),后者是凋亡降解阶段发挥作用的重要因子之一。凋亡过程中PT的发生导致AIF的释放是线粒体促凋亡活性的关键所在。事实表明,MPT抑制剂能阻止凋亡细胞所有特征的出现,如$\Delta\Psi m$丧失、磷酯酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)的外翻、胞质空泡化、还原型谷胱甘肽的减少、胞质Ca^{2+}的增加、DNA片段的形成及核纤层蛋白的降解,所以在凋亡的一系列过程中,MPT作为中心环节起到了限速作用,而MPT所产生的后果亦出现在凋亡的降解阶段[3]。MPT的发生引起至少3个相互独立的,在凋亡效应阶段普遍出现的特征性标志:①胞质氧化还原状态改变;②PS暴露于细胞外表面;③核凋亡。

2 线粒体通透性转换孔

MPT的现象在数十年前被描述:线粒体大面积肿胀并伴随Ca^{2+}超载,最初被认为是线粒体内膜的非特异性损伤,但是,在后来的研究中,逐渐达成共识:可能存在的PT孔是惟一的分子实体,允许分子量<1 500的物质穿过线粒体内膜,能被钙离子的螯合作用快速关闭。因为PT孔允许质子的快速通过,它的开放伴随着线粒体的去极化和氧化磷酸化解偶联。另外,为了平衡小分子溶质穿过线粒体内膜的渗透压差,使得基质中蛋白质浓度增高,这些胶体渗透压的影响便是线粒体的大面积肿胀[4]。通过后来的一系列研究,已经达成了一些共识:MPT的发生是由于一种非特异性孔道的开放引起的,这种孔被称为:线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP,或简称为PT孔)。正常情况下,PT孔容许分子量<1 500的溶质通过。线粒体内膜的PT孔开放启动MPT:Ca^{2+}、无机磷酸盐、pH增大、ROS促进MPT的发生,而CsA(环孢素A)、Mg^{2+}、pH减小、磷酯酶抑制剂、狄布卡因、米帕林阻止PT孔开放[5]。而其开放的结果是:胞质中大量>1 500的分子非选择性的扩散入线粒体内膜,造成了线粒体去极化、氧化磷酸化解耦联,ATP的合成远大于分解[6]。对缺血再灌注损伤的实验研究中发现MPT的发生可以有两种结局:凋亡和坏死。发生MPT后的ATP耗竭同糖酵解的ATP生成之间的平衡决定着细胞的命运,并认为MPT是缺血/再灌注损伤造成坏死或凋亡的共同通道[7]。

3 PT孔结构模型

PT孔的分子构成尚不清楚,目前占优势的假说认为:PT孔跨线粒体内、外膜,由两层膜和基质的蛋白组成。通过抑制和重构研究显示:腺嘌呤核苷酸易位子(adenine nucleotide translocator, ANT)位于线粒体内膜,是PT孔的基本组成部分[8,9]。由研究者认为ANT通过改变线粒体的能量代谢来作用于PT孔的开放。苍术甙从胞质侧与ANT结合,诱导MPT,而米酵菌酸从基质侧结合,阻滞MPT。其他蛋白质构成PT孔复合物,包括电压依赖性离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)位于外膜以及来源于基质中的环孢素A结合蛋白D(CypD)。VDAC对于保持外膜对需进出线粒体的代谢物的通透性非常重要,比如ATP、ADP,此外,VDAC参与了线粒体内膜间隙中蛋白的释放而在细胞凋亡中扮演重要角色,并且在植物和动物细胞的死亡过程中均起重要作用是生物进化的保守部分之一[10]。另外构成PT孔的蛋白包括:己糖激酶、外围的苯二氮卓受体、前凋亡蛋白如Bax。这种孔的功能模式被认为米酵菌酸、苍术甙和ANT的配体激活,通过CsA与CypD连接而被其阻滞。

但是这种PT孔的结构模型仍有些不能解释的现象:虽然Ca^{2+}依赖性激活和CsA对其抑制被认为是MPT的特征性标志,却有些实验显示MPT能在缺乏Ca^{2+}的情况下发生[11,12],而CsA

作者简介:陈东风(1964-),男,重庆市涪陵区人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝纤维化、脂肪肝、幽门螺杆菌方面的研究,发表论文45篇。电话(023)68757362

收稿日期:2004-01-07;修回日期:2004-06-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

对它的抑制也是短暂的或无效的[11]; 虽然报道氧应激是造成 CypD 与线粒体膜结合的原因, 在 Ca^{2+} 和外源性氧化剂缺乏的情况下 VDAC 和 ANT 仍能与 CypD 牢固结合[13]; 虽然 PT 孔的电压差能够通过 ANT 再生, ANT 与 VDAC 和 CypD 结合, ANT 再加上其他蛋白, 但是线粒体的阴离子载体如天冬氨酸/谷氨酸和磷酸盐载体, 能够通过非特意性通道使其重新生成[14]。小的外源性肽和细胞色素 C 氧化酶Ⅳ亚单位的线粒体基质靶片段能够造成 MPT, 并能被 CsA 抑制[12]。虽然 PT 孔被描述为是线粒体膜上的一个正常结构, 而典型 MPT 的诱导需要线粒体膜损伤, 如氧应激和蛋白质二硫键交联所导致的膜损伤。不同的诱因造成 PT 孔的开放原理以及相同因素作用但在不同的器官、组织, PT 孔的开放模式都是不相同的[15]。由于以上因素, 有学者认为 PT 孔的开放可由于很多不同的诱导因子造成, 分为两种模式: 由 Ca^{2+} 激活、CsA 和 Mg^{2+} 抑制的可调模式; 非 Ca^{2+} 依赖性激活、对 CsA 和 Mg^{2+} 不敏感的不可调模式。

4　PT 孔可调和不可调的开放

研究者发现, PT 孔的确存在可调和不可调的开放。环孢霉素 A 可以抑制 PT 孔的开放, 但并非在所有情况下都如此。在 Lihua 等[16] 的研究中, 为了区分 CsA 敏感和不敏感的 MPT, 对大鼠肝线粒体予以不同剂量的多种 MPT 诱导因子处理, 观测线粒体肿胀情况、cyclophilin D 与膜的结合以及 PT 孔的直径。他们发现低剂量的诱导因子造成 Ca^{2+} 依赖性 MPT, 并被 CsA 和 Mg^{2+} 抑制; 而高剂量的诱导因子引起非 Ca^{2+} 依赖性及对 CsA 和 Mg^{2+} 不敏感的 MPT。可调的和不可调的 PT 孔都通过同样的诱导因子引起开放, CypD 伴随可调 PT 孔的开放与膜结合, 但并非不可调 PT 孔开放所需要。最终提出了一个新的孔道功能模式: PT 孔的开放是由于线粒体内膜蛋白因氧应激及其他发生错折叠而聚合。伴侣蛋白最初通过这些错折叠蛋白的聚集而阻滞传导位点, 但是, 升高的 Ca^{2+} 浓度打开了这些可调的 PT 孔, 并能被 CsA 阻滞。当蛋白的聚集超过了伴侣蛋白的阻滞能力时, 不可调的 PT 孔开放发生了。

5　PT 孔的开放与细胞色素 C 的释放

细胞色素 C 是一种水溶性蛋白质, 位于线粒体内、外膜之间, 并与内膜松弛连接。在胞质核糖体上合成去血红素 CytC, 经专门途径——无需信号肽、电化学势和一般的蛋白转运机制, 进入线粒体内外膜之间, 在得到一个血红素分子后, 成为完整的 CytC, 并带上正电荷而不能通过外膜。细胞色素 C 如何从线粒体释放出来尚不清楚, 目前有两种假说: ① Bcl-2 家族蛋白具有成孔性质, 猜测可以直接调节线粒体外膜对细胞色素 C 的通透性。②VDAC 通透性增加, 细胞色素 C 释放入胞浆, 与凋亡蛋白酶活化因子 1(Apaf-1)、半胱氨酸蛋白酶 9(caspase-9)的前体形成凋亡小体, 在 dATP 的辅助下, 激活 caspase-9, caspase-9 再酶解 Caspase-3 前体, 活化的 Caspase-3 再瀑布式激活 Caspase-2、6、8、10 等, 最终引起细胞凋亡。细胞内的氧化还原势能可能与 CytC 释放有关。凋亡信号传导过程早期即可发生细胞内氧化还原态不平衡, 从而使氧化还原态敏感因子改变, 如一些巯基由原来的还原态转变为不活泼的氧化态, 这些因子的改变导致线粒体外膜通透性增加, 致使 CytC 释放。也有研究者对 MPT 与细胞色素 C 释放的研究中认为, 在过氧化氢、钙超载等诱导因子的作用下, MPT 作为细胞内的毒性传感器造成了细胞色素 C 的释放。Yang 等观察到在提取的线粒体中细胞色素 C 的释放都是由 MPT 的经典诱导因子造成的, 并能被 MPT 的抑制因子如 CsA 抑制。并通过他们的研究认为是由于 MPT 的发生才造成细胞色素 C 从线粒体上释放。

6　Bcl-2 家族与 PT 孔

许多研究已表明原癌基因 Bcl-2 是调节细胞凋亡途径中的一个重要因素, 随着研究的深入, 又发现许多基因结构与 Bcl-2 相似, 具有保守的 BH1 和 BH2 区(BH: Bcl-2 同源结构域), 参与细胞凋亡的调节。线粒体外膜上有许多 Bcl-2 蛋白家族。蛋白质三级结构分析显示, 他们具有成孔道的结构域, Bcl-xl、Bcl-2、Bax、Bid 等能结合到人工膜上, 形成离子通道。

在细胞存活状态下, Bax 以 BH3 结构域与 Bcl-2 及 Bcl-xl 的 BH3 结构域形成异质二聚体, Shimizu 等[17] 运用脂质体运载 VDAC 系统模拟线粒体, 研究 Bcl-2 家族与 CytC 释放的关系, 发现 Bcl-xl 直接与 VDAC 结合, 使之关闭; 而 Bax、Bak 能加速 VDAC 开放, CytC 从 VDAC 漏出脂质体, 缺乏 VDAC 的线粒体, Bax、Bak 不能促进 CytC 的释放, 这一研究表明, 作为外膜 PT 孔的 VDAC, 是 CytC 释放的通道, 受 Bcl-2 蛋白家族调节。这一新发现有待更多的研究来证实。对线粒体研究发现, 线粒体 PT 孔位于富含 Bax、Bcl-2、Bcl-xl 的地方。体外实验中 Bax、Bcl-2、Bcl-xl 可形成脂质双分子层通道, 由于 Bax 和 Bcl-xl、Bcl-2 有不同的离子选择性, Bax 促进 PT 孔开放, 释放 CytC, 激活 caspase 级联反应, 诱导细胞凋亡[18]; Bcl-2、Bcl-xl 抑制 PT 孔开放, 阻止细胞凋亡[19]。Bcl-2 和 Bcl-xl 还可通过调节线粒体内外膜之间基质的 pH 值, 增加质子外流, 提高 Ca^{2+} 缓冲能力, 维持 $\triangle\Psi m$ 稳定。Shimizu 等[20] 发现从高表达 Bcl-2 的细胞株和 Bcl-2 转基因小鼠分离出的线粒体仍能维持 $\triangle\Psi m$ 和 PT 孔稳定, 进一步研究证实 Bcl-2 的存在增加了 H^+ 的外流, 即使使用 SF6846(一种促进 H^+ 内流的物质), Bcl-2 在短暂的质子内流之后介导质子外流。Bcl-2 在线粒体外膜的过量表达抑制了 t-butylhydroperoxide, protorophore 或 atractyloside 诱导的 PT, 却不能抑制其他因素, 如 500 μmol/L Ca^{2+} 或肼(diamide)诱导的 PT。因此, Bcl-2 只能在较窄的范围内抑制 PT 的发生。Bcl-2 抑制 PT 的机制是阻止一些小分子如 Ca^{2+} 从基质中释放以及 AIF 从内外膜之间释放到胞质中。

PT 孔的发现对线粒体在细胞凋亡中作用的研究开辟了一条崭新的思路, 人们对它的认识还非常有限, 包括它确切的结构、功能模式、调节方式等, 可以确信的是, 通过对它不断的深入研究, 人们将会对细胞的两种死亡方式有极其重要的发现, 并有极大的应用前景。

关键词: 线粒体; 膜通透性转换孔; 凋亡
中图法分类号: R329.25　　文献标识码: A

参考文献:

[1] Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, *et al*. Role of mitochondrial permeability tansition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2002, 274(1): 16—24.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[2] Hirakawa A, Takeyama N, Nakatani T, *et al*. Mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in ischemia-reperfusion injury of the rat liver[J]. J Surg Res, 2003, 111(2): 240—247.
[3] 陈 先, 许彩民, 潘华珍. 线粒体与细胞凋亡[J]. 解剖学报, 2000, 31(3): 285—287.
[4] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death[J]. Biochem J, 1999, 341(Pt 2): 233—249.
[5] Kim J S, He L, Lemasters J J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(3): 463—470.
[6] Halestrap A P, Clarke S J, Javadov S A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardioprotection [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(3): 372—385.
[7] Halestrap A P. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury[J]. Biochem Soc Symp, 1999, 66: 181—203.
[8] Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, *et al*. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition[J]. Biochem J, 1998, 336(Pt 2): 287—290.
[9] Crompton M, Virji S, Ward J M. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore[J]. Eur J Biochem, 1998, 258(2): 729—735.
[10] Godbole A, Varghese J, Sarin A, *et al*. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1642(1-2): 87—96.
[11] Kristal B S, Brown A M. Ganglioside GD3, the mitochondrial permeability transition, and apoptosis[J]. Biol J Chem, 1999, 274(2): 23169—23175.
[12] Kowaltowski A J, Castilho R F. Ca^{2+} acting at the external side of the inner mitochondrial membrane can stimulate mitochondrial permeability transition induced by phenylarsine oxide[J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1322(2-3): 221—229.
[13] Halestrap A P, Woodfield K Y, Connern C P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase[J]. J Biol Chem, 1997, 272(6): 3346—3354.
[14] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, *et al*. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5385): 2027—2031.
[15] Li M, Xia T, Jiang C S, *et al*. Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis[J]. Toxicology, 2003, 194(1-2): 19—33.
[16] He L, Lemasters J J. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function [J]? FEBS Lett, 2002, 512(1-3): 1—7.
[17] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC[J]. Nature, 1999, 399(6735): 483—487.
[18] Marzo I, Brenner C, Zamzami N, *et al*. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5385): 2027—2031.
[19] Zamzami N, Marzo I, Susin S A, *et al*. The thiol crosslinking agent diamide overcomes the apoptosis-inhibitory effect of Bcl-2 by enforcing mitochondrial permeability transition[J]. Oncogene, 1998, 16(8): 1055—1063.
[20] Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, *et al*. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(4): 1455—1459.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)17-1600-02

KAI1 基因转染肝癌 MHCC97-H 细胞及鉴定

Transfection of KAI1 gene into MHCC97-H hepatocellular carcinoma cells and its identification

司遂海，杨建民，彭志红，周 平，罗元辉 （第三军医大学西南医院全军消化内科中心，重庆 400038）

原发性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，转移与复发是影响预后的主要因素。KAI1 基因是近年新发现的肿瘤转移抑制基因[1]。为深入研究 KAI1 基因在肝癌侵袭、转移中的作用，我们构建了 KAI1 正、反义基因真核表达质粒，并将其成功地分别转染入高转移潜能的肝癌 MHCC97-H 细胞株中，现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

pCMV-KAI1 表达质粒由 KAI1 基因发现者美国国立卫生研究院 Barrett 教授和 Dong 博士惠赠，全长 8.2 kb，含 KAI1 全长结构基因 1.6 kb 的 cDNA 片段。真核表达质粒载体 pCI-neo 全长 5.47 kb，为 Promega 公司产品。转染用脂质体 DOTAP 为 Roche 公司产品。MHCC97-H 是一种高转移潜能的肝癌细胞株[2]，购自上海复旦大学中山医院肝癌研究所。KAI1 单抗为 Santa Cruz 公司产品。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30070348)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30070348)
作者简介：司遂海(1966—)，男，河南省新郑市人，硕士，主治医师，现在山东省济宁医学院附属医院消化科，E-mail：cdaghba@yahoo.com.cn
通信作者：杨建民，现在浙江省杭州市浙江省人民医院消化内科，电话：(0571)85235404，E-mail：jianminyang@hotmail.com
收稿日期：2003-06-19；修回日期：2004-01-10

（下转 1604 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net