

线粒体, 活性氧和细胞凋亡

赵云罡* 徐建兴

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 在能量代谢和自由基代谢中, 线粒体均占据着十分重要的地位. 通过呼吸链电子漏途径, 线粒体产生大量超氧阴离子, 并通过链式反应形成对机体有损伤作用的活性氧. 通过呼吸链电子漏, 氧化磷酸化解偶联, 线粒体内膜产生通透性转变孔道 (PTP) 及 Box- 和/或 PTP- 介导的细胞色素 c 向胞质的转移等种种因素, 线粒体参与一般抗氧化防御及细胞凋亡等重要生理过程的调控. 在与线粒体相关的细胞凋亡中, 活性氧的信号作用是十分明显的.

关键词 线粒体, 活性氧, 细胞凋亡, 电子漏, 细胞色素 c

学科分类号 Q244

在生物体内, 90% 以上的氧分子在线粒体中被消耗. 从生物氧化反应的分子过程看, 氧作为一种必需物质具有益害两重性. 一方面, 氧作为呼吸链的终端电子受体参与产生 ATP 的氧化磷酸化反应, 是维持生命的重要能量代谢过程; 另一方面, 氧可通过一系列化学反应生成有害的氧自由基, 造成细胞损伤并导致疾病和衰老.

$O_2/O_2^{\cdot -}$ 的氧化还原电位为 -0.15 V , 大部分细胞内物质都可以被 O_2 氧化, 但呼吸链末端氧化酶所特有的催化机制使有害的氧还原中间物紧密结合在酶蛋白上, 从而避免了伤害的发生. 然而在呼吸链的底物端有些物质, 如黄素蛋白 (flavins), 非血红素铁蛋白 (non-heme iron proteins), 醌 (quinols) 尤其是半醌 (semiquinones) 发生氧化反应的能障是很低的, 常常直接启动 O_2 的单电子还原 (one-electron reduction) 产生超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$). 这种在电子传递给末端氧化酶之前漏出呼吸链与氧反应生成超氧自由基的过程是线粒体生成有害活性氧的源头. 因此, 线粒体消耗氧一方面用于制造 ATP, 供机体的能量需求, 另一方面也会生成活性氧自由基损伤线粒体自身.

生命的进化使细胞发展了有效的抗氧化防御机制. 各种抗氧化酶是一个最重要的防御体系, 如广泛分布的超氧化物歧化酶和过氧化物酶在细胞浆中和线粒体内基质中起着重要的防御作用. 活性氧的生成能刺激抗氧化防御机制增高活性以对抗活性氧的伤害, 但是活性氧一旦生成过量过快细胞还是会受到损伤, 过度损伤的细胞将通过凋亡机制被清除以保证机体的正常生命活动.

实验证明线粒体是细胞中产生活性氧的一个重要部位. Chance 等^[1] 证明在正常生理情况下约有 2% 的氧消耗于线粒体活性氧的产生, 生成活性氧的前体是超氧阴离子自由基和双氧水, 它们是呼吸链底物端漏出的电子引起氧分子单电子还原而生成的. Xu 等^[2] 证明呼吸链氧端细胞色素 c 可以漏出电子还原双氧水, 这对呼吸链底物端电子漏产生的超氧自由基和双氧水起到了部分清除的作用, 使呼吸链成为一个自主防御的抗氧化系统. 实际上呼吸链底物端电子漏和氧端电子漏共同构建了超氧自由基的代谢路径 ($O_2^{\cdot -} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow H_2O$), 提示线粒体中存在着超氧自由基代谢过程.

如果把线粒体生成 $O_2^{\cdot -}$ 和 $O_2^{\cdot -}$ 的进一步反应看作是一种代谢过程, 则作为代谢产物的活性氧就不一定只是一个有害的群体, 在生理条件下一定的活性氧浓度应该是必需的. 细胞培养实验证明 nmol 水平的活性氧可促进细胞的增生, μmol 水平的活性氧可导致细胞凋亡, mmol 水平的活性氧引起细胞的损伤死亡^[3]. 所以低浓度活性氧的存在是正常的生理过程, 活性氧生成过多会引起细胞损伤. 氧胁迫达到一定程度, 以致于机体不能避免细胞受到损伤时, 机体可能将以细胞凋亡 (apoptosis) 的方式去除那些过度受伤的细胞, 而活性氧在启动和调节细胞凋亡的过程中扮演着重要的角色. 活性氧的积累可导致线粒体膨大, 线粒体内膜非特异性孔道产生, 细胞色素 c 从内膜脱落并流失到胞质

* 通讯联系人.

Tel: 010-64888504, E-mail: Tsaoyg@163.com

收稿日期: 2000-04-29, 接受日期: 2000-06-07

中, Bax 表达, 半胱天冬酶 (caspase) 活化等现象, 这些都是启动细胞凋亡的因素. Bcl-2 及 Bcl-X_L 等分子的表达则可以抑制线粒体活性氧的生成和阻止细胞凋亡的发生^[4]. 这些现象说明高浓度的活性氧不仅是有害因子而且是一种启动细胞凋亡的信号.

1 呼吸链电子漏和超氧自由基代谢

正常生理条件下约有 2% 的氧在线粒体中生成活性氧自由基^[1]. 活性氧的前体是 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 , 它们的产生部位是在呼吸链的底物端. 泛醌的自动氧化是 $O_2^{\cdot-}$ 产生的途径之一, 复合物 I 的异咯嗪半醌也是生成 $O_2^{\cdot-}$ 的部位. Lass 等^[5] 证明结合于线粒体膜上的 CoQ 的含量与线粒体的自由基产生速度

呈正相关. 复合物 I 的黄素蛋白和复合物 III 的细胞色素 b₅₆₆ 也对 $O_2^{\cdot-}$ 的产生负责^[2]. 当丙酮酸通过硫辛酸和 FAD 将 H 传递给 NAD^+ 时, FAD 也将电子供给分子氧, 生成 $O_2^{\cdot-}$. 因此, 线粒体呼吸链传递电子不是绝缘的, 而是在确定部位有漏电现象. 呼吸链底物端漏电生成的超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 会以三种途径代谢掉: a. 与 H^+ 加成产生 $HOO\cdot$ 自由基, 后者进入膜与不饱和脂肪酸中的双丙烯氢原子 (double allyle H atom) 反应生热; b. 歧化产生 H_2O_2 , 后者再被细胞色素 c 漏出的电子还原为 H_2O ^[2]; c. 直接被细胞色素 c 氧化. 图 1 的上半部分总结了呼吸链电子漏和生成 $O_2^{\cdot-}$ 的复杂代谢途径.

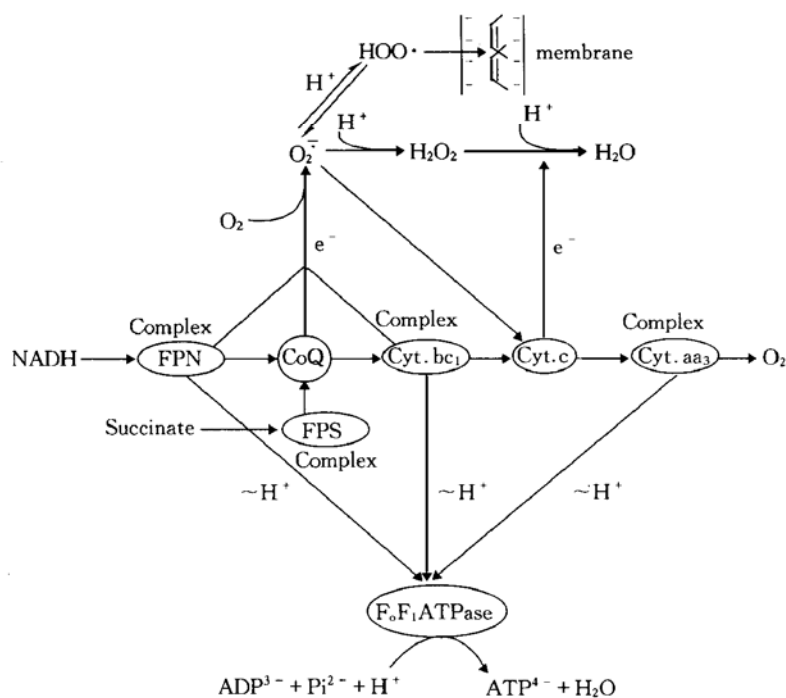


Fig. 1 Mitochondria working on both energy metabolism and radical metabolism

图 1 线粒体具能量代谢与自由基代谢两条途径

呼吸链电子传递偶联 ATP 合成, 电子漏与超氧自由基代谢相关.

事实上线粒体的呼吸链是以电子传递的方式进行能量代谢, 以电子漏的方式进行超氧自由基代谢, 线粒体中氧自由基的水平是呼吸链底物端和氧端电子漏动态平衡的结果.

2 线粒体在活性氧防御中的作用

线粒体的自由基代谢水平, 或者说呼吸链的电子漏程度和动物的生理状态密切相关, 衰老、运动疲劳和疾病等情况下都伴有呼吸链电子漏偏高的现象^[2]. 过高的自由基代谢水平常常是细胞损伤的

根源, 而在进化过程中, 机体同样发展了多种抗氧化机制, 调节和控制着机体的氧自由基水平.

2.1 解偶联抑制 O_2 的单电子还原

活性氧对细胞的威胁主要与静息状态 (resting state) 相关. 线粒体在状态 III 向状态 IV 转换中, 由于 ADP 耗尽, ATP 积累, 使 O_2 消耗的主要途径被切断, 导致 O_2 浓度升高. 而引起 O_2 单电子还原的主要靶分子黄素蛋白、辅酶 Q、细胞色素 b 和非血红素铁蛋白等都处于还原状态. 高氧的环境和高还原态的呼吸链正是促使电子漏生成 $O_2^{\cdot-}$ 的状

态. 解偶联作用使线粒体内膜质子漏 (proton leak) 增加, 跨膜电位 $\Delta\mu\text{H}^+$ 降低, 刺激 O_2^- 的消耗, 缓解 O_2^- 的产生^[6].

2.2 线粒体内膜上非特异孔道与抗氧化防御系统

当温和的解偶联不能阻止活性氧 (ROS) 的形成时, 积累 ROS 将激活线粒体上非特异的通透性转运孔道 (permeability transition pore, PTP) 开放^[4]. PTP 由分子质量约 1.5 ku 的大分子构成, 定位在线粒体内膜上. 由于其孔径较大, 不仅允许 H^+ 在膜两侧达到平衡, 也允许呼吸链作用的底物在细胞质与基质间达到平衡. 跨膜 $\Delta\mu\text{H}^+$ 的崩溃使呼吸链的呼吸速率达到最大值, 快速消耗氧导致活性氧产生的下降^[7]和 PTP 的关闭. 过高的 ROS 持续积累导致 PTP 的持续开放将引起细胞凋亡.

2.3 细胞色素 c 在抗氧化防御中起重要作用

细胞色素 c 在抗氧化系统中起着极其重要的作用. 图 1 已经显示了细胞色素 c 的电子漏可以部分清除 O_2^- 和 H_2O_2 , 而且氧化型的细胞色素 c 可以直接将 O_2^- 氧化为 H_2O . 在酵母中发现的细胞色素 c-细胞色素 c 过氧化物酶系统是 O_2^- 和 H_2O_2 的清除剂, 在静息状态时 (state 4) 向线粒体中加入细胞色素 c 可以强烈抑制 H_2O_2 的形成^[8]. 为了在线粒体中高速氧化 O_2^- , 细胞色素 c 必须被释放于膜间隙而成为溶解状态, 当它结合于复合物 III 或 IV 时, 其氧化 O_2^- 的能力远远不如抗坏血酸.

细胞色素 c 可以通过 NADH-细胞色素 b_5 还原酶和细胞色素 b_5 的途径介导 NADH 的氧化, 这种旁路电子传递途径的激活可以克服抗霉素 A 和鱼藤酮等抑制剂的作用, 降低 O_2^- 的产生水平. 细胞色素 b_5 的传递途径在肝中是固有的, 在肾及其他组织中稍弱.

3 高水平活性氧促使线粒体介导细胞凋亡

在一些不利条件下, 解偶联及 PTP 开放也不能避免细胞中过氧化产物的积累, 活性氧损伤线粒体 DNA 甚至核 DNA 的危险将显著增大, DNA 的损伤是可以遗传和积累的. 过多的受损细胞将影响组织和器官正常功能的发挥, 当机体不允许这些受损细胞与正常细胞共存时, 将启动细胞凋亡机制清除过度受损的细胞.

3.1 氧化胁迫是细胞凋亡的一种信号机制

在 p53 介导的凋亡中, 活性氧 (ROS) 处于中心信号位置. 氧化剂直接作用于细胞, 可引起细胞

内环境状态的显著改变, 如细胞内 Ca^{2+} 浓度上升, ATP 缺失和 NADH、GSH 及脂类的氧化等^[9]. 当 HL-60 细胞暴露于 Cu-NAT 中时, 线粒体脂过氧化物升高, 跨膜电位 $\Delta\phi_m$ 降低, 细胞发生凋亡^[10]. Karbowski 等^[11] 发现 ROS 导致膨大线粒体 (megamitochondria, MG) 的形成, 并且与细胞凋亡相关, MG 的形成可能是一个在亚细胞水平对不利环境的适应过程.

3.2 PTP 的产生及细胞色素 c 渗漏与细胞凋亡

当 ROS 水平上升到一定高度后, 线粒体内膜将出现 PTP, 使线粒体跨膜电位降低. 由于孔道对小于 1.5 ku 的大分子均可通过, H_2O 及小分子将到达基质, 导致基质膨胀而使线粒体内膜嵴被拉直, 外膜破裂. 如果这种线粒体数量增加, 在胞质中释放出的可溶性蛋白浓度达到一定阈值, 就会启动核凋亡的产生^[8]. 有报道指出, PTP 与电控离子通道 (voltage dependent anion channel, VDAC) 相关, 其开放是凋亡的早期事件^[11, 12].

大部分凋亡细胞中的细胞器并不溶解, 但可以检测到一些成分的外漏, 其中重要的是细胞色素 c. 在人的急性白血病细胞中, 细胞色素 c 释放到胞质可以导致细胞凋亡^[8]. 在 CEM 细胞系中, 用一些凋亡原 (apoptogens) 对细胞进行处理, 可以观察到细胞色素 c 从线粒体中漏出, 在 Bcl-2 过表达的细胞中细胞色素 c 仍存于线粒体中. 在 Bax 表达的细胞中, 细胞色素氧化酶的含量降低, 并大量将细胞色素 c 释放入胞质中. 共表达的 Bcl-X_L 可以完全阻止 Bax 的活性. 经物理学方法测定, Bax 可以形成 20~300pS 的单孔道, 在某些情况下可以达到 1nS. 假定 Bax 允许细胞色素 c 从线粒体膜间隙漏出, 可能是由于形成了细胞色素 c 特异的运输途径. 这种途径应该包括: a. Bax 与细胞色素 c 松散结合于线粒体外膜内表面; b. 细胞色素 c 通过 Bax 移位穿越线粒体膜; c. 细胞色素 c 释放到线粒体外^[8]. Bax 对凋亡的刺激作用是确定的^[13], 而 Bcl-2, Bcl-X_L 则可以使细胞色素 c 不能通过外膜, 可能是通过堵塞 PTP 或 Bax 产生的孔道起作用^[14].

细胞凋亡是一个复杂的过程: 当 ROS 水平较高时, 细胞色素 c 从线粒体内膜解离至膜间隙以进行防御. 当细胞不得不开放 PTP 时, 不仅导致 $\Delta\phi_m$ 的降低, 也使细胞色素 c 外漏. Bax 的产生也使这种流失成为可能. 定位于胞质的细胞色素 c 可以启动半胱天冬酶的级联活化, 由半胱天冬酶 3 启动凋亡. Bcl-2 和 Bcl-X_L 可以阻止孔道的形成和细

胞色素 c 的外漏, 从而抑制凋亡, 虽然没有完全确定, 但这种途径似乎是合理且可能存在的。

综上所述, 在进化过程中线粒体被赋予了特殊的功能, 它消耗氧用于合成 ATP 的同时不可避免地产生对机体有害的活性氧。针对后者机体进化发展了层层防御的系统以对抗有害活性氧的伤害, 细胞内活性氧的升高会启动层层防御系统来对抗活性氧的持续升高, 当各种手段均不能阻止持续升高的活性氧时, 机体将启动细胞凋亡机制清除过度受伤的细胞以保证组织和器官正常功能的发挥。线粒体在这些生命现象中扮演着重要的角色, 但目前的认识也仅仅停留在一个较浅的层面上, 很多问题有待于进一步的探索。

参 考 文 献

- 1 Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 1979, **59** (3): 527~605
- 2 Xu J X, Li X, Zhang Y X, *et al.* In: Lester P. eds. Mitochondrial respiratory chain: A Self-defense system against oxygen toxicity. Proceedings of the international symposium on natural antioxidants: molecular mechanisms and health effects. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1996, 530~539
- 3 Allen R G, Balin A K. Oxidative influence on development and differentiation: An overview of a free radical theory of development. *Free Radical Biology & Medicine*, 1989, **6** (6): 631~661
- 4 Skulachev V P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Quart Rev Biophys*, 1996, **29** (1): 169~202
- 5 Lass A, Sohal R S. Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free Radic Biol Med*, 1999, **27** (1/2): 220~226
- 6 Skulachev V P. Why are mitochondria involved in apoptosis. *FEBS Lett*, 1996, **397**: 7~10
- 7 Zoratti M, Szabo I. The mitochondria permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1241** (2): 139~176
- 8 Skulachev V P. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, 1998, **423** (2): 275~280
- 9 Orrenius S. Mechanisms of oxidative cell damage. In: Poli G, eds. *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Switzerland: Birkhauser Verlag, Basel, 1993: 47~64
- 10 Ma Y X, Ogino T, Kawabata T, *et al.* Cupric nitrilotriacetate-induced apoptosis in HL-60 cells association with lipid peroxidation, release of cytochrome c from mitochondria, and activation of caspase-3. *Free Radic Biol Med*, 1999, **27** (1/2): 227~233
- 11 Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, *et al.* Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 1999, **26** (1/2): 396~409
- 12 Yoshida H, Kong Y Y, Yoshida R, *et al.* Apaf1 is required for mitochondria pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, 1998, **94** (6): 739~750
- 13 Marzo I, Brenner C, Zamzami N, *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondria control of apoptosis. *Science*, 1998, **281** (5385): 2077~2031
- 14 Finucane D M, Wetzel E B, Waterhouse N J, *et al.* Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X_L. *J Biol Chem*, 1999, **274** (4): 2225~2233

Mitochondria, Reactive Oxygen Species and Apoptosis

ZHAO Yun-Gang*, XU Jian-Xing

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

Abstract Mitochondria are involved not only in energy metabolism but also in free radical metabolism. Superoxide anion can be generated through a way of electron leak of respiratory chain and the reactive oxygen species (ROS) can be formed in the further reactions of O₂^{•-} in mitochondria. The role of mitochondria in antioxidant functions and cell apoptosis is discussed in terms of electron leak of respiratory chain, uncoupling of oxidative phosphorylation, mitochondrial pore, Bax- or/and PTP-mediated release of cytochrome c from mitochondria and so on. The signaling act of ROS is emphasized in the regulation of cell apoptosis.

Key words mitochondria, reactive oxygen species, apoptosis, electron leak, cytochrome c.

* Corresponding author. Tel: 86-10-64888504, E-mail: Tsaoyg@163.com

Received: April 29, 2000 Accepted: June 7, 2000