

自由基对线粒体 DNA 的氧化损伤与衰老*

曾昭惠 张宗玉

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

摘要 自由基是一类氧化剂, 对生物具有多种损害作用. 衰老的自由基学说是有关衰老机理的诸多学说之一. 线粒体 DNA 组成结构特殊, 易受自由基攻击; 目前认为, 线粒体 DNA 的氧化损伤是自由基引起衰老的分子基础.

关键词 衰老, 自由基, 线粒体 DNA

1956年, D. Harman^[1]提出了衰老的自由基学说, 其基本观点是, 衰老是由自由基引起的组织随机毒害的结果^[2]. 此后, D. Harman^[1]及其他学者^[3,4]陆续地在这方面作了大量的研究, 认为自由基对生物具有多种损害作用, 它直接或间接地引起生物衰老, 或为衰老原因, 或为衰老结果. 自由基损害作用的机制主要涉及 DNA 的损伤, 尤其是线粒体 DNA (mtDNA) 的氧化损伤, 这因线粒体 DNA 在结构组成及功能上具有特殊性, 受氧自由基氧化损伤的可能性大, 后果严重, 与生物衰老关系密切. 因而, 近年来, 线粒体 DNA 的损伤已成为当今科学工作者探讨生物衰老分子机理的热点.

1 自由基及其氧化损伤作用

1.1 自由基概念及类型

自由基又称游离基, 系指外层轨道含有未配对电子的原子、原子团或特殊状态的分子^[5]. 自由基中以氧自由基 (oxygen free radicals, OFR) 对机体危害最大. OFR 包括超氧阴离子自由基 (O_2^-)、羟自由基 ($OH\cdot$) 等. 过氧化氢 (H_2O_2) 及单线态氧 (1O_2) 虽不是 OFR^[5], 但其经过反应可形成 OFR 或涉及自由基反应, 所以常常把它们也列入到氧自由基中一起讨论. 有学者将这一类具有氧化作用的自由基及其类似物统称为活性氧类 (activated oxygen species, AOS)^[6]或反应性氧类 (reactive oxygen species, ROS)^[6,7], 有的学者也称其为氧化

剂原 (prooxidant)^[2,8]. 本文仍沿用传统的概念——自由基来代表这一类氧化剂.

1.2 机体内自由基的来源及防御系统

体内的自由基主要来源于酶促反应与非酶促反应. 酶促反应系指呼吸链氧化磷酸化及微粒体细胞色素 P_{450} 系统等在其反应过程中产生自由基, 如黄嘌呤氧化可产生超氧阴离子 (O_2^-). 而非酶促反应指氧与有机化合物反应、电离辐射引起共价键化合物均裂等, 如水经辐射分解可产生 O_2^- 及 H_2O_2 .

自由基是机体正常代谢产物, 虽然它在细胞代谢过程中连续不断地产生^[2], 但由于机体存在防御系统, 故正常情况下危害不大. 机体对自由基损伤的防御主要通过以下途径进行^[2]: a. 酶类: 如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-POD) 等; b. 抗氧化剂: 如维生素 E、维生素 C、 β -胡萝卜素及辅酶 Q_{10} 等; c. DNA 损伤修复系统可修复自由基引起的 DNA 氧化损伤.

1.3 自由基氧化作用与抗氧化防御系统作用间失衡引起的生物损害作用

正常机体, 自由基氧化作用与抗氧化防御作用处于动态平衡中, 但在机体衰老时, 机体

* 国家自然科学基金资助项目 39230330.

收稿日期: 1994-11-08, 修回日期: 1995-03-07

2.2 自由基对 mtDNA 的损伤及其与衰老的关系

线粒体 DNA 较核 DNA 易受自由基攻击氧化损伤而引起突变, 其突变率是核 DNA 的 10~100 倍, 可引起呼吸链功能减退, 这因 mtDNA 具有组成结构特点。

线粒体 DNA 呈双链环状, 独立存在于细胞核外, 每个细胞含数百个线粒体, 每个线粒体含 2~10 个基因组 DNA。在真菌植物, 其大小在 100~2500 kb 范围内, 而在哺乳动物, 其大小约 16 kb。人类 mtDNA 含 16 569 bp, 其全部序列已被测定。它包含有 22 个 tRNA 基因, 2 个 rRNA 基因, 13 个有关氧化磷酸化多肽链编码的基因, 即复合物 I (NADH-CoQ 还原酶) 的 ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5 和 ND6, 复合物 III (CoQ-细胞色素 c 还原酶) 的细胞色素 b, 复合物 IV (细胞色素 c 氧化酶) 的 Co I、CoII 及 CoIII, 以及复合物 V (ATPase) 的亚单位 6 和 8 (AbL)。所有这些亚单位都是呼吸链的组成成分, 因而直接参与氧化磷酸化^[15]。

线粒体 DNA 不仅组成上有其特殊性, 且结构上及代谢方面也有其特点。如 mtDNA 是裸露的, 外无组蛋白保护; 其代谢转换率高; 催化 mtDNA 复制的 DNA 聚合酶 γ 不具有校对作用, 致使错误率高; 与核 DNA 相比 mtDNA 缺乏修复机制等。故 mtDNA 易受自由基等毒性物质攻击而损伤, 损伤后又不易被修复而累积^[14]。实验证明, 苯并芘的衍生物对 mtDNA 的化学修饰高于核 DNA 40~90 倍; 黄曲霉毒素 B₁ 与肝 mtDNA 共价结合高于核 DNA 3~4 倍, 且这些附加物不易被清除, 可持续存在 24 h^[14]。

有人报道^[14], mtDNA 对线粒体膜的脂质过氧化作用及氧化应激 (oxidative stress) 较敏感。位于基质的 mtDNA 易受呼吸链产生的自由基损伤, 引起 DNA 损伤有氧化作用、甲基化作用、脱氨基作用及脱嘌呤作用等诸多方式^[16]。自由基主要是通过氧化作用损伤 mtDNA。mtDNA 氧化损伤后可造成碱基片段

丢失、碱基修饰及插入突变等, 其中以片段缺失较多见。近年来, 已确定老年人不同组织的 mtDNA 缺失类型有十几种^[17]。某些缺失只发现于某类组织, 而另一些缺失却可能在不同组织或器官中出现, 4977 bp 的缺失是这些缺失中最普遍和研究得最多的^[17]。骨骼肌是线粒体 DNA 缺失最多见的一种靶组织, 且与衰老也相关。

3 年龄相关的 mtDNA 缺失的判断准则及研究途径初探

线粒体 DNA 缺失也可能与某些线粒体疾病如 Kearns-Sayre 综合征 (KSS)、Leber's 遗传性视神经病 (leber's hereditary optic neuropathy, LHON)、肌阵挛性癫痫和碎红纤维病 (myoclonic epilepsy with ragged-red fibers disease, MERRF) 等有关。因此, 建立某些准则以鉴别年龄相关的 mtDNA 缺失是重要而实用的。a. 缺失应仅出现于老年受试者的 mtDNA 中, 且可测定其量, 在婴儿至成年期的相同组织的 mtDNA 中, 用普通 PCR 法不能被检测到; b. 缺失的发生率及含量应随增龄而增加; c. 缺失应在无症状的老年个体中被检测到。依据以上三条准则则可排除与疾病有关的专一性缺失^[10]。

目前, 用于研究 mtDNA 随增龄变化的方法主要有: a. 解链温度与电子显微镜相结合测定错误片段的发生率以检测 mtDNA 插入或缺失突变; Piko 及其同事 (1988) 用此方法检测发现 mtDNA 突变在青年小鼠肝为 1%, 而老年小鼠达 5%。b. 聚合酶链式反应即 PCR 技术已被广泛用于线粒体 DNA 专一性缺失的分析。c. 线粒体 DNA 的点突变可能与其功能紊乱有关, 氧化剂诱导 mtDNA 损伤可通过测定大鼠肝 mtDNA 7-甲基鸟苷衍生物的量进行分析^[4]。

综上所述, 近年来, 衰老的自由基学说越来越受到人们重视, 而自由基引起衰老的分子机理也成为研究者们探讨的主题。尽管一些实验结果表明自由基在衰老过程中起到一定作用, 但迄今仍无个体衰老时组织产生过量自由

基的直接证据,也不十分清楚是否自由基的产生与清除之不平衡引起衰老,或此平衡仅为衰老之被动结果.总之,自由基可能是引起生物衰老的诸多因素之一^[2],且自由基对 mtDNA 的氧化损伤作用是肯定的,但其与衰老的关系,或为因,或为果,有待进一步实验观察.

参 考 文 献

- 1 Harman D. *Mutat Res*, 1992; **275**: 257
- 2 Nohl H. *British Medical Bulletin*, 1993; **49** (3): 653
- 3 Johnson J E, Walford J R, Harman D *et al.* Free radicals, aging and degenerative disease. New York: Alan Rliss Inc, 1986; **8**: 14
- 4 Armstrong D, Sohl R S, Cutler R G *et al.* Free radicals in molecular biology. New York: Raven Press, 1983: 27
- 5 张鑫生. *青海医药杂志*, 1991; (1): 51
- 6 Kowald A, Kirkwood T B L. *Mutat Res*, 1993; **295**: 93
- 7 Richter C. *Mutat Res*, 1992; **275**: 249
- 8 Sohl R S, Brunt U T. *Mutat Res*, 1992; **275**: 295
- 9 Holmes G E, Bernstein C, Bernstein H. *Mutat Res*, 1992; **275**: 305
- 10 Wei Y H. *Mutat Res*, 1992; **275**: 145
- 11 Richter C. *FEBS Letters*, 1988; **241**: 1
- 12 Melhorn R J, Cole G. *Adv Free Radical Biol Med*, 1985; **1**: 165
- 13 Boveris A, Oshino N, Chance B. *J Biochem*, 1972; **128**: 617

- 14 Schapira A H V, Cooper J M. *Mutat Res*, 1992; **275**: 133
- 15 Tristchler H J, Medori R. *Neurology*, 1993; **43** (2): 280
- 16 Halliwell B, Aruoma O I. *DNA and free radical*. New York: Ellis Horwood Limited Press, 1993
- 17 Zhang C F, Baumer A, Maxwell R J *et al.* *FEBS Letters*, 1992; **297** (1, 2): 34

The Oxidative Damage of Mitochondrial DNA by Free Radicals and Aging. Zeng Zhaohui, Zhang Zongyu (*Laboratory of Molecular Mechanism of Aging, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Free radicals, a type of oxidants, cause various damage to organisms. The free radical hypothesis of aging is one of the theories about aging mechanism. Mitochondrial DNA, which has a special organization and structure, is prone to be attacked by free radicals. Now the oxidative damage of mitochondrial DNA is thought as the molecular basis of senescence causing by free radicals.

Key words aging, free radical, mitochondrial DNA

欢迎订阅1996《遗传》及1995《遗传》增刊

《遗传》杂志是由中国科学院遗传研究所和中国遗传学会主办的全国性学术期刊,连续多年被评为“中国自然科学核心期刊”.1996年,《遗传》继续由邮局发行,邮发代号:2-810,全年6期,定价3.0元,欢迎广大读者到当地邮局订阅.若有漏订,可向《遗传》编辑部汇款补订.

另外,为了缓解稿件积压、缩短出版时滞,经上级批准,本刊编辑部将编辑出版1995《遗传》增刊.本期增刊共发表综述类稿件20余篇,

内容涉及植物遗传与育种、动物遗传学、分子与微生物遗传学等各个领域.该期增刊计18万字,96页,订价6元,1995年8月出版,本编辑部发行,欢迎订阅.

订阅办法:请将购刊款寄至:100101北京安定门外大屯路917大楼:中科院遗传所《遗传》编辑部林章祺同志收,并在汇款单附言中注明购《遗传》的年、期份数或95增刊册数及您的地址、邮政编码,以便及时准确地投寄刊物和发票.