

文章编号: 1001-098X(2003)02-0090-04

细胞凋亡的线粒体调控机制与电离辐射

刘光伟, 龚守良

摘要: 线粒体在外界刺激(如电离辐射)诱发细胞凋亡中起中心调控作用。各种死亡信号通过 Bcl-2 家族蛋白或直接诱导线粒体膜通透性增加、细胞色素 c 释放和 caspases 激活, 最终引起细胞凋亡。线粒体膜通透性改变的机制, 目前还不完全清楚。简要综述细胞凋亡的线粒体调控机制及电离辐射在其机制中的可能作用。

关键词: 细胞凋亡; 线粒体; 调控机制; 膜通透性; 细胞色素 c; 电离辐射

中图分类号: Q244, Q756 **文献标识码:** A

Mitochondrial control mechanism on apoptosis and ionizing radiation

LIU Guang-wei, GONG Shou-liang

(*MH Radiobiology Research Unit, School of Public Health, Jilin University, Changchun 130021, China*)

Abstract: Mitochondria play a major role in apoptosis triggered by many stimuli. The various death signals induce directly and indirectly (through Bcl-2 family proteins) the increase of mitochondrial membrane permeability, the release of cytochrome c and the activation of caspases. The mechanisms that lead to this permeability are not yet completely understood. Here, we review briefly the mechanisms of mitochondrial control during apoptosis and the possible effects of ionizing radiation in their mechanisms.

Key words: apoptosis; mitochondria; control mechanism; permeability; cytochrome c; ionizing radiation

近年来发现, 在死亡信号触发细胞凋亡中, 线粒体通过释放 Cyt c (细胞色素 c), 激活半胱氨酸蛋白酶(caspases), 发挥中心调控作用。目前认为, 在哺乳动物细胞的细胞质中, Cyt c 与 Apaf-1(凋亡蛋白激活因子-1)结合, 在 ATP(腺苷三磷酸)存在时, 形成复合物并激活 caspase 9 前体, 再激活其他 caspases, 从而诱发凋亡。除 Cyt c 以外, caspases、AIF(凋亡诱导因子)、HSP70 和 HSP10(热休克蛋白 70 和 10)、腺苷酸激酶和亚硫酸氧化酶等在正常情况下也存在于线粒体内外膜间, Bcl-2 家族蛋白对它们的释放起重要调控作用。

1 Bcl-2 家族蛋白的调控作用

收稿日期: 2003-01-21

作者简介: ①刘光伟(1973-),男,吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室(吉林长春,130021)博士研究生,主要从事电离辐射生物效应研究。

②龚守良(1945-),男,吉林大学公共卫生学院卫生部放射生物学重点实验室教授,博士生导师,主要从事电离辐射生物效应研究。

Bcl-2 家族蛋白主要包括抑制凋亡成员(如 Bcl-2、Bcl-xl 和 Bcl-w 等)及促进凋亡成员(如 Bax、Bak、Bad 和 Bid 等)。这些蛋白最多含有 4 种 Bcl-2 同源(BH)结构域,分别为 BH1、BH2、BH3 和 BH4。除了 Bad 和 Bid,其家族蛋白的 C 末端均含有 20 个氨基酸残基组成的疏水穿膜结构域,分布于线粒体外膜上。目前认为, Bcl-2 家族蛋白调节细胞凋亡的主要机制是通过 Cyt c 释放实现的。

用某些细胞毒因子处理后,多种细胞由于 Bcl-2 或 Bcl-xl 蛋白过表达可有效防止线粒体 Cyt c 释放、caspases 激活和细胞凋亡。无细胞系统实验研究表明^[1],外源性 Bcl-2 防止 Cyt c 释放与线粒体功能有关;而在其他死亡信号不存在时,促凋亡蛋白 Bax 异位表达可以触发 Cyt c 释放。Bax 直接加入分离的线粒体环境中,可以诱导 Cyt c 释放,但这种效应可被邻近细胞 Bcl-xl 过表达或通过直接加入重组的 Bcl-xl 阻断。caspases 抑制剂虽不影响 Cyt c 的释放,但可有效地阻断 caspases 激活和延缓细胞凋亡。这暗示, Bax 可以直接调控 Cyt c 释放和 cas-

pase 不参与此调控过程。Bcl-2 存在于线粒体外膜上,而 Bad、Bid 和 Bim 蛋白存在于细胞质中,在细胞凋亡时可以转入线粒体,起到重要凋亡调控作用。细胞质中的信号分子可以与这些 Bcl-2 家族蛋白结合并调节其活性,从而调控线粒体 Cyt c 的释放。这些蛋白的转位是通过特异的转录后调节机制来完成的,例如去极化(在 Bad 第 35 位氨基酸发生)和断裂(在 Bid 第 2 位氨基酸发生)等^[2]。

在死亡信号刺激下, Bax 激活可以从细胞质转入线粒体,接着其构型改变和 N 末端暴露,同时出现明显的寡聚化,最后插入线粒体外膜,形成完整的膜蛋白,引发 Cyt c 迅速释放。有趣的是, Bax 的寡聚化可以明显增强其转位、线粒体功能失常和细胞凋亡。Bcl-2 和 Bcl-xl 可以有效防止 Bax 这些变化的发生,但在分离的线粒体体系中加入重组全长或截短的 Bid 却可以诱导上述变化的发生^[3]。这些资料显示, Bax 或 Bax 类似蛋白可能是调控 Cyt c 释放的一类开关和许多凋亡途径中的中心调控分子。

虽然大多数 Bcl-2 家族蛋白调控细胞凋亡明显依赖于线粒体,但不能排除其相关蛋白非依赖线粒体的可能性。有研究表明^[4],在不同细胞株中,由显微注射 Cyt c 而诱发的凋亡可以通过 Bcl-2 过表达抑制;而在另一些情况下,不阻断 Cyt c 释放, Bcl-2 也可以抑制 Bax 诱导的 caspases 激活和细胞凋亡。这暗示,某些情况下 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白可能在 Cyt c 的下游起作用。

2 线粒体外膜非特异性破裂机制

细胞凋亡时,细胞质中水分子和溶剂进入线粒体基质,使其膨胀。由于内膜有大量嵴,比外膜有更大表面,故内膜基质膨胀扩展撑裂外膜,使膜间内容释放;由于线粒体内膜完整,基质内容不受影响。

有两种观点可以解释基质膨胀。第一种观点认为,在一些体系中内膜开始超极化先于 Cyt c 释放。根据 Sugiyama T 等人^[5]的报告,在凋亡时细胞质 ADP(腺苷二磷酸)不能同线粒体 ATP 交换,结果导致内膜超极化。VDAC(电位依赖性离子通道)位于线粒体外膜,其运输作用由专一性的反向转运载体 ANT(线粒体异位酶)来调节。ANT 是促甲状腺素的专一性受体,位于线粒体内膜。VDAC 的关闭可引起 ATP-ADP 交换功能障碍,抑制 FIFO-ATP 酶活性,导致 H⁺再摄入到基质受抑,使线粒体内膜超极

化,线粒体跨膜电位增加,促进基质渗透性膨胀。但是,这种观点与线粒体巨通道(即膜转换孔, PTP)机制的另一种观点相矛盾。PTP 是一种高传输非选择性通道,由线粒体内外膜相邻位转膜蛋白并置形成。大量资料表明, PTP 基本单位可能由 ANT、VDAC 和亲环素 D 构成。PTP 开放可以受多种生理效应因子如 Ca²⁺和腺嘌呤核苷酸浓度下降,无机磷酸盐、活性氧和 pH 变化,跨膜电位下降及 Bax 蛋白诱导等调节。PTP 的开放引起线粒体膜通透性突然增加,可使质量小于 15 00 的分子通过,导致 H⁺依赖性膜电位崩解和细胞质与线粒体基质之间化学梯度失衡,使基质高度浓缩,引起其进行性渗透性膨胀,最终外膜膨胀破裂^[6]。

支持 PTP 机制的人认为,膜电位崩解先于胞核变化,并且证明 PTP 特异抑制剂米醇菌酸或者亲环素 A 可以防止细胞凋亡;而苍朮苷通过开放 PTP 可以诱导基质膨胀和细胞凋亡^[7]。但是,支持第一种观点的认为^[8], PTP 可能是 Cyt c 释放的结果,而不是原因。许多研究也表明, Cyt c 的释放可以出现在膜电位崩解之前^[9]。在一些分离线粒体的实验中,用重组 Bax 或 Bid 蛋白在不引起膜电位下降、线粒体外膜膨胀或破裂情况下就可以诱导 Cyt c 释放。Eskes R 等^[10]报告,在完整细胞或分离的线粒体环境中, Bax 诱导 Cyt c 的释放不能被亲环素 A 或米醇菌素抑制。这暗示,至少在某些情况下, Cyt c 释放非依赖 PTP 开放和线粒体膨胀。虽然线粒体外膜破裂机制明显存在许多缺陷,但是可以解释像 Cyt c 等膜间蛋白释放这类问题。

3 细胞色素 c 专一性通道机制

Basanez G 等^[10]认为, Bcl-2 家族蛋白调控线粒体功能主要依赖于 Bcl-xl 蛋白的三维结构,它包括 2 个中心,主要由疏水的 α 解旋酶($\alpha 5$ 和 $\alpha 6$)构成。Bcl-2、Bad 和 Bid 蛋白也存在高度同源序列,其结构相似于白喉毒素和一些细菌大肠毒素的孔形成结构域,构成离子和蛋白通道。Bcl-xl、Bax、Bad 和 Bid 蛋白的截短形式的功能同细菌毒素孔道形成相似,在合成脂质体小囊泡和平面脂质体双层时可以形成功能性离子通道。这种通道有多种传输状态,具有 pH 和电位敏感性及低离子选择性等特点。Bcl-2 家族抗凋亡与促凋亡蛋白固定通道明显不同,这或许可以解释它们对 Cyt c 的不同影响。更有趣

的是, Bcl-2 可防止通道在脂质体的形成。Cecconi F 等^[11]认为, Bax 和 Bcl-2 家族蛋白可能通过寡聚化, 使其 2 个解旋酶扩展到线粒体双层膜, 从而在脂质体形成传输通道, 诱发 Cyt c 释放。另有研究发现^[12], Bax 和 Bid 的截短形式 (tBid) 可以减少线粒体膜的稳定性。这暗示, 促凋亡成员可能通过直接降低线粒体外膜稳定性发挥作用。Bax 和 tBid 也可以通过减少线粒体膜的线性张力, 使油脂孔形成或蛋白脂质体复合物增大, 从而允许膜间蛋白扩散入细胞质。也有人认为^[13], Bax 可能与 VDAC 结合形成 Cyt c 传输通道。当 VDAC 在脂质体重新形成时, Bax 和 Bak 促进通道开放, 而 Bcl-x1 使其关闭。而且, Bax 和 Bak 可以诱导 VDAC 构型改变, 或与 VDAC 结合形成巨通道, 但 Bax 和 Bak 或 VDAC 单独在脂质体不能形成 Cyt c 通道。Cyt c 专一性通道机制可以解释, 在某些情况下只有保持线粒体功能正常, 才能保证 caspases 激活过程中所需的 ATP。

4 电离辐射诱导的细胞凋亡线粒体调控机制

电离辐射与化学药物等其他死亡刺激诱导的细胞凋亡具有不同的调控途径。Ogawa Y 等^[14]发现, 在 10mV X 射线直线加速器经 5 Gy 照射后 0、3、6、10 和 20h, 人 T 细胞凋亡百分率分别为 5%、10%、20%、35% 和 70%。采用显微视频系统的荧光显微镜及线粒体膜电位指示剂观察, 5 Gy 照射后 10 h, 50% 以上 T 细胞显示线粒体膜电位下降; 采用荧光染料 annexin V 和 PI (碘化丙啶) 证实, T 细胞凋亡率分别为 40% 和 50%; Cyt c 在照射后 10 h 从线粒体释放入细胞质, 20 h 达峰值。这暗示, 在电离辐射诱导 T 细胞凋亡中, 线粒体跨膜电位崩解和 Cyt c 释放起重要调控作用, 后者的释放可能是凋亡刺激信号诱发线粒体基质膨胀所致。然而, Gao W 等^[15]发现, 在紫外线诱导凋亡时, Cyt c 从线粒体释放入细胞质, 线粒体并不膨胀; 而在其释放 10 min 左右, 线粒体却膨胀成球形。这暗示, Cyt c 的释放可能不是由于线粒体膨胀导致外膜破裂所致。Canton M 等^[16]采用补骨素和紫外线 A 光化学疗法发现, 线粒体膜电位崩解和 Cyt c 释放是由于 PTP 开放引起, 采用 PTP 抑制剂亲环素 A 可以有效防止线粒体膜电位崩解、Cyt c 释放和减轻细胞凋亡。Cristiano F 等^[17]发现, 1~16 Gy X 射线照射后出现剂量依赖性线粒体跨膜电位下降, 并且出现在膜通透性改变之后。Tanaja N

等^[18]采用无细胞系统分析证实, 线粒体变化是电离辐射诱发细胞凋亡的早期事件, 包括 PTP 开放、膜电位崩解和 Cyt c 释放; Apaf-1 和 ATP 是启动 Cyt c 释放及诱导细胞凋亡的必需因素。这一系列实验暗示, 辐射可能通过诱导线粒体 PTP 开放, 引起线粒体外膜通透性改变、跨膜电位崩解和 Cyt c 释放, 导致线粒体基质膨胀和细胞凋亡。但是, 由于辐射诱导细胞凋亡的线粒体调控机制是一个复杂的过程, 许多问题有待深入研究。另外, Bcl-2 家族蛋白在辐射诱导细胞凋亡线粒体调控中可能也起重要调控作用。Nakagawa Y 等^[19]在紫外线照射 NIH3T3 细胞诱导凋亡中观察到, 在照后 2 h, 内源性 Bcl-x1 蛋白表达减少; 照后 8 h, Bax 蛋白表达增加; 照后 48 h, 50% 以上细胞发生凋亡; 同时也发现, Bcl-x1 持续性过表达可以通过防止线粒体膜电位崩解而有效防止紫外线诱导的细胞凋亡的发生。

参考文献:

- [1] Wang QF, Chen JC, Hsieh SJ, et al. Regulation of Bcl-2 family molecules and activation of caspase cascade involved in gypenosides induced apoptosis in human pipitoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2002, 183(2):169-178.
- [2] Nakagami H, Morishi R, Yamamoto K, et al. Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of Bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane[J]. *Diabetes*, 2002, 51(8): 2604-2611.
- [3] Yamamura T, Otani H, Nakao Y, et al. IGF-I differentially regulates Bcl-x1 and Bax and confers myocardial protection in the rat heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 80(3): 1191-1200.
- [4] Dimatola T, Dascoli F, Fenzi G, et al. Amiodarone induces cytochrome c release and apoptosis through an iodine independent mechanism[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(11): 4323-4330.
- [5] Sugiyama T, Shimizu S, Matsuoko Y, et al. Activation of mitochondrial voltage dependent anion channel by proapoptotic BH3-only protein Bim[J]. *Oncogene*, 2002, 21(32): 4944-4956.
- [6] Mather M, Rottenberg H. Polycations induce the release of soluble intermembrane mitochondrial proteins[J]. *Biochem Biophys Acta*, 2001, 1503(3): 357-368.
- [7] Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells, reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50): 47379-47386.
- [8] Kleibl Z, Raisova M, Novotny J, et al. Apoptosis and its importance in the development and therapy of tumors[J]. *SB Lek*, 2002, 103(1): 1-13.

- [9] Eskes R, Rosse T. Bax-induced cytochrome c release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg^{2+} ions[J]. *J Cell Biol*, 2000, 143(2): 217-224.
- [10] Basanez C, Zhang J, Chau BN, et al. Pro-apoptotic cleavage products of Bcl-xl from cytochrome c conducting pores in pure lipid membranes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (33): 31083-31097.
- [11] Cecconi F, Gruss P. Apaf1 in developmental apoptosis and cancer: how many ways to die[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58 (11): 1688-1697.
- [12] Wei MC, Zong WX, Chang EH, et al. Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death[J]. *Science*, 2001, 292(5517): 227-230.
- [13] Wei MC, Zong WX, Chen EH, et al. Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death[J]. *Science*, 2001, 292(5517): 624-626.
- [14] Ogawa Y, Nishioda A, Kobayashi T, et al. Mitochondrial cytochrome c release in radiation induced apoptosis of human peripheral T cells[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 10(3): 263-268.
- [15] Gao W, Pu Y, Luo KQ, et al. Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells[J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(15): 2855-2862.
- [16] Canton M, Caffreri S, Dallacqua F, et al. PUVA-induced apoptosis involves mitochondrial dysfunction caused by the opening of the permeability transition pore [J]. *FEBS Lett*, 2002, 522(1-3): 168-172.
- [17] Cristiano F, Claudio DA, Roberto B, et al. Sequence of metabolic changes during X-ray-induced apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 247(1): 160-167.
- [18] Tanaja N, Tjaldens R, Philbert MA, et al. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in cell a free system [J]. *Oncogene*, 2001, 20(2): 167-177.
- [19] Nakagawa Y, Okaka S, Hatano M, et al. Downregulation of Bcl-xl is relevant to UV-induced apoptosis in fibroblasts[J]. *J Biochem Mol*, 2002, 35(5): 452-458.

· 简 讯 ·

全国高等医学院校教材《核医学》书讯

五年制全国高等医学院校《核医学》教材由北京大学第一医院核医学科主任王荣福教授主编，中国核医学奠基人王世真院士写序。本教材真正反映了当今新的医学教育理念、思维和方法，并体现基础与临床相结合以及学科的交叉融合，同时在内容上涵盖本专业教学大纲的要求，内容全面而精炼(本书共32万字，200页)。与《核医学》教材配套的《核医学要点与自测》(包括各种试题、病例分析及参考答案)和《核医学》网络课件即将出版，将大大地方便教师教学和有利于学生复习，同时为核医学专业资格、核医学技术专业资格晋升及报考研究生考试提供了很好的复习素材。

本书价格每本19.60元，另加购书款10%的挂号邮资。需购者请与北京大学第一医院核医学科胡怀湘医师联系，邮编：100034，电话：010-66171122-2732或4732。

更改会议通知

由《中国临床医学影像杂志》编辑部举办的“第十三届全国临床医学影像学术会议”暨医学影像学及介入放射学新进展继续教育学习班原定于2003年5月份举办，因故延至9月份，地点不变(山东青岛)，来稿请在信封上注明“青岛会议征文”寄至：沈阳市和平区三好街36号《中国临床医学影像杂志》编辑部 阎宁收。

邮政编码：110004，或将论文文字内容发至本刊电子信箱，主题处注明“青岛会议征文”字样。

E-mail: jccmsy@mail.sy.ln.cn.

电话(传真)：024-23925069。截稿日期：2003年7月底。望各位读者周之。欢迎广大读者和作者投稿，届时参加会议。投稿事宜请与《中国临床医学影像杂志》编辑部联系索取会议通知。

《中国临床医学影像杂志》编辑部

2003年3月