

线粒体与衰老*

陈永红 杜冠华

(中国医学科学院·中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

中国图书分类号 R 339.38; R 342.3; R 394; R 977

文献标识码 A 文章编号 1001-1978(2000)05-0485-04

摘要 衰老是一种复杂的病理生理现象, 主要表现为机体各种功能的下降。大量研究结果表明, 衰老的发展过程与线粒体功能异常有密切关系。在衰老过程中, 线粒体生物学发生变化, 线粒体产生自由基和自由基对线粒体的损伤对衰老的发展起到促进作用; 线粒体 DNA 突变和线粒体对细胞死亡进程的调控与衰老的进程有密切关系。本文主要对以上内容作一综述。

关键词 线粒体; 衰老; 生物能量; 线粒体基因突变; 氧自由基; 细胞凋亡

线粒体是细胞内能量合成的主要场所, 对维持细胞正常生理功能起着重要作用。近年研究表明, 线粒体不仅做为体内的“能量加工厂”, 而且还与氧自由基的产生, 细胞死亡进程的调控有关。目前, 线粒体在老年及一些退行性疾病研究中再次成为热点之一。

1 线粒体生物学

线粒体是具有双层生物膜的小体, 内膜上具有许多皱折及颗粒, 是线粒体氧化磷酸化合成 ATP 的部位。此外, 线粒体含有自身的基因组-线粒体 DNA(mtDNA), 通过转录和翻译, 产生一部分与氧化磷酸化有关的蛋白质。

1.1 线粒体氧化磷酸化 与氧化磷酸化有关的蛋白质位于线粒体内膜上, 主要包括由氧化还原酶复合体组成的电子传递链、ATP 合成酶以及腺苷转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)。电子传递链是由 70 多种多肽组成, 按氧化还原电势由大到小依次排列, 被分为四类酶复合体, 分别称为复合体 I、II、III 和 IV。由三羧酸循环或脂肪酸 β 氧化产生的 NADH 及 FADH₂ 等以还原当量进入电子传递链, 来自 NADH 的电子首先进入酶复合体 I (NADH 脱氢酶), 随后传递给辅酶 Q (CoQ), 来自

FADH₂ 的电子首先进入酶复合体 II (琥珀酸脱氢酶), 随后传递给 CoQ, 电子从 CoQ 依次经过酶复合体 III (细胞色素 C 还原酶)、酶复合体 IV (细胞色素 C 氧化酶), 最后传递给氧产生水。在电子传递过程中所释放的能量被用来将基质内的质子泵出到线粒体内膜外, 从而在线粒体内膜两侧产生一电化学梯度, 形成线粒体膜电位 ($\Delta\phi_m$)。内膜外的质子可通过 ATP 合成酶 F₀ 亚基上的质子通道流回到基质内, 质子回流所释放的势能被用来使 ADP 磷酸化形成 ATP。线粒体内的 ATP 随后在 ANT 的作用下与胞浆 ADP 交换, 进入到细胞浆为细胞提供能量^[1]。

1.2 线粒体基因 mtDNA 位于线粒体基质内, 每个线粒体内含有数个拷贝。mtDNA 属母性遗传, 哺乳动物精子细胞 mtDNA 拷贝数非常低, 而卵细胞内的拷贝数极高 ($> 10^5$), 所以子代细胞内线粒体基因主要来源于母亲。mtDNA 是一种双链环形分子, 由 16 569 对碱基组成, 包含 37 种基因, 分别编码 12 S 和 16 S rRNA、22 种 tRNA 及 13 种氧化磷酸化酶复合体亚基。与线粒体功能有关的其它基因, 如编码其它氧化磷酸化蛋白, 代谢酶、DNA 和 RNA 多聚酶、核糖体蛋白、以及 mtDNA 调节因子等都是由核基因所编码, 它们在细胞核及胞浆内经转录和翻译后经特殊的载体运输到线粒体内^[2]。

2 线粒体与氧自由基损伤

细胞内大约 90% 的氧被线粒体所消耗, 它们大部分被电子传递链所传来的电子还原为水, 小部分氧被电子传递链中漏流出来的电子单价还原, 形成超氧阴离子。在正常生理状态下, 大约有 1% ~ 2% 的氧在线粒体内转变为超氧阴离子。因此, 线粒体是体内氧自由基的主要来源之一。生理条件下, 线粒体内存在着有效的抗氧化机制。超氧阴离子可由 Mn 超氧化物歧化酶催化生成过氧化氢, 后者可被谷胱甘酐过氧化物酶转化为水, 此外线粒体内维生素 C 和 E 也具有清除自由基的作用^[3]。

衰老机体, 线粒体内的自由基大量增加^[4], 一方面是由于老年时电子传递链功能降低, CoQ 部位聚集的电子增多, 导致电子漏流增加, 氧自由基产生增多, 另外衰老细胞线粒体对自由基的清除能力下降。急性大量产生的氧自由基可通过 Fenton 反

1999-12-29 收稿, 2000-04-05 修回

* 本课题为国家教委留学归国人员专项资金资助课题和国家人事部留学回国人员科技活动择优资助项目

作者简介: 陈永红, 女, 28 岁, 博士生;

杜冠华, 男, 44 岁, 教授, 中国药理学学会副秘书长, 国家药物筛选中心主任

应导致电子传递链酶复合体 I、II 和 III 内的 Fe-S 中心失活,从而使线粒体能量合成障碍,而慢性的氧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^[5]。

3 线粒体 DNA 突变

目前研究认为,老年及退行性疾病中,线粒体功能的异常与 mtDNA 突变有关。衰老时,mtDNA 突变明显增加,尤其是在脑、肌肉等高氧耗的组织内表现更为突出。采用多聚酶链式反应检测人类骨骼肌,发现 40 岁以下人的 mtDNA 突变发生率非常低,而 50 岁以上 mtDNA 则发生广泛的突变^[6]。突变也可见于脑内,75 岁以上老年人基底节及皮层不同脑区广泛存在着 5 kb 的缺失突变^[7]。

老年期,mtDNA 突变增加与线粒体自由基产生增多有关。mtDNA 与核基因组 DNA 相比,更易于受到自由基的损伤。这主要是由以下几点原因造成:①mtDNA 的位置靠近线粒体产生自由基的部位——线粒体内膜,因此容易直接受到线粒体自由基的攻击;②mtDNA 缺乏组蛋白的保护;③缺少 DNA 损伤修复系统;④mtDNA 不存在非编码区,因此由氧化损伤造成的突变均被转录^[8]。

mtDNA 突变主要分为 2 种,一种是可随母性遗传的点突变,另一种是重组突变。在重组突变中,最常见的是缺失突变,碱基缺失长度可达 9 kb。不同人碱基缺失的长度和位置不尽一致,但有一种缺失长度为 4 977 bp 的突变却很常见,被称为“普遍缺失”,可见于帕金森病人脑纹状体及老年人的不同组织 mtDNA 内^[9]。这种缺失突变主要是由于 mtDNA 双链分离,从而产生长片断的单链 DNA 所致。氧自由基可以使 mtDNA 碱基羟基化,例如形成 8-羟基脱氧鸟苷,取代 mtDNA 上脱氧鸟苷的位置,使碱基不能正常配对,从而导致 DNA 双链的解离,形成大片段的单链 DNA,发生缺失^[8]。mtDNA 突变增加,可影响 mtDNA 编码的与氧化磷酸化有关的蛋白的合成,导致 ATP 合成减少,当组织内生物能量供应不足时,即可表现出衰老的症状。

4 线粒体对细胞死亡进程的调控

衰老时,不仅细胞功能下降,细胞数目也减少^[10]。以前认为,衰老时的细胞死亡与线粒体产能减少,自由基产生增加有关^[11]。目前研究表明,线粒体在凋亡进程中起着更为重要的作用,线粒体主要通过可以诱导凋亡的蛋白及 bcl-2 家族调节凋亡的进程。

4.1 线粒体释放诱导凋亡的蛋白 Newmeyer 通过对无细胞体系的研究表明,细胞核凋亡样的改变

必须在线粒体匀浆存在的条件下才能出现,从而发现线粒体在凋亡进程中的重要作用^[12]。在线粒体内外膜之间含有与凋亡有关的蛋白质,包括细胞色素 C,凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF)。

细胞色素 C 可激活半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 启动细胞凋亡。caspase 是一类富含半胱氨酸的蛋白酶,存在于大多数细胞内,通常它们以单链的酶原形式存在于胞浆内。所有的 caspase 均有一个功能前区和一个酶促中心组成,功能前区结构的差异决定了 caspase 功能的不同。它具有高度保守的底物结合和酶促序列,且均在天门冬氨酸后将底物裂解^[13]。胞浆内的细胞色素 C 在 ATP、dATP 的参与下,与 apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) 形成一个复合体,apaf-1 通过其氨基端和 caspase-9 的功能前区相互作用,导致 caspase-3 的激活,后者可进一步激活 CAD (caspase activated DNase),最终导致染色体凝集, DNA 断裂,发生凋亡^[14]。

AIF 最初是由 Susin 及其同事发现的由线粒体所释放的另外一种与凋亡有关的因子^[15]。它是一种相对分子质量大约为 57 000 的黄素蛋白,与细菌的氧化还原酶同源。在正常情况下,它位于线粒体内外膜之间,诱导凋亡时,AIF 可进入到细胞核内,与细胞色素 C 不同的是,AIF 可直接使分离的细胞核染色体凝集, DNA 断裂为 50 kb 左右的片断,它可以诱导经纯化后的线粒体释放细胞色素 C 和 caspase,将 AIF 用显微注射的方式注射到胞浆内,可导致染色体凝集,线粒体 $\Delta\psi_M$ 下降。所有这些作用并不能为 caspase 的广谱抑制剂 Z-VAD-fmk 所阻断,说明 AIF 不是通过 caspase 的途径诱导细胞凋亡的发生^[16]。

通常,细胞色素 C 和 AIF 的释放需要线粒体膜电位 ($\Delta\psi_M$) 的改变及线粒体膜通透转运孔 (permeability transition pore, PTP) 的开放,对 PTP 的结构和组成目前并没有完全了解,已知 PTP 是由内膜上的 ANT,外膜上的电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VADC) 以及 VADC 外周上的苯二氮草类受体等组分组成。PTP 完全开放时,可允许相对分子质量小于 1500 的物质通过^[17]。

$\Delta\psi_M$ 下降及线粒体内 Ca^{2+} 增加可导致 PTP 开放,环孢菌素通过与 ANT 连接的 cyclophilin 作用使 PTP 关闭^[18],抑制 PTP 开放。PTP 开放,一方面可以破坏 $\Delta\psi_M$,使氧化磷酸化脱偶连,另一方面可导致 AIF 的释放。由于线粒体基质渗透压高,水分可通过开放的 PTP 进入线粒体内,导致线粒体肿胀。线

粒体内膜由于含有许多皱折,在肿胀时可以保持结构的完整,而外膜结构相对平整,因此肿胀将导致线粒体外膜破坏,使位于内外膜之间的细胞色素 C 及 AIF 大量释放。因此,PTP 的开放在凋亡过程中起重要作用^[19]。在线粒体基质内存在大量还原型谷胱甘肽,它的释放被认为是 PTP 开放的明显标志^[20]。

4.2 通过 bcl-2 家族蛋白的调控 bcl-2 是哺乳动物与线虫凋亡抑制基因 *ced-9* 同源的基因,它由多个同源蛋白共同组成 bcl-2 家族蛋白,其中 bcl-2、bcl-X(bcl-X_L、bcl-X_s、bcl-X_β)、mcl-1 和 bcl-A 为凋亡抑制基因, bax、bak、bad、bik 和 bcl-X_s 为凋亡促进基因,除 bcl-X_s 外大部分 bcl-2 家族蛋白位于线粒体外膜上,它主要通过羧基末端的疏水基插入到线粒体外膜上^[21]。

bcl-2 家族蛋白可通过多种方式调控凋亡的发生:① bcl-2 和 bcl-X_L 可直接在线粒体外膜形成一种通道,消除线粒体双层膜间隙的质子堆积,防止线粒体肿胀^[22];② bcl-2 和 bcl-X_L 可抑制由氧化磷酸化脱偶联所诱导的线粒体基质内 Ca²⁺ 的释放,并可加大膜电位,增强线粒体对 Ca²⁺ 的缓冲能力^[23,24];③ bcl-2 和 bcl-X_L 可抑制细胞色素 C 的释放^[25];④ bax 可诱导细胞色素 C 的释放,从而启动线粒体依赖的 caspase 的激活^[26]。

5 结语

根据以上论述,可以表明,线粒体通过多种途径参与了衰老的发生过程,因此,改善线粒体功能可延缓衰老。我们可以从以下几个方面开发抗衰老的药物:① 增强线粒体呼吸链功能,使能量合成增加,自由基产生减少;② 寻找有效的抗氧化剂,清除线粒体大量产生的自由基,减轻自由基损伤;③ 稳定线粒体(Δψ_M),使 PTP 关闭,抑制 AIF 的释放。如中药丹参有效成分丹酚酸 B 可明显提高衰老小鼠脑线粒体功能,使线粒体 3 态呼吸加大,线粒体呼吸链酶活性增高,并能够使其抗氧化能力增强,提示可能具有延缓衰老的作用。

参考文献

- 1 La Noue KF, Duszynski J. Kinetic studies of ATP synthesis the case for the positional change mechanism. *J Bioenerg Biomembr*, 1992; **24**: 499~ 506
- 2 Taanman JW. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, 1999; **1410**: 103~ 23
- 3 Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R *et al*. Oxidants in mitochondria from physiology to diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1995; **1271**: 67~ 74

- 4 Goodell SC, Cortopassi GA. Analysis of oxygen consumption and mitochondrial permeability with age in mice. *Mech Ageing Dev*, 1998; **101**: 245~ 56
- 5 Beckman KB, Nmes BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 1998; **78**: 547~ 81
- 6 Melov S, Shoffner JM, Kaufman A, Wallace DC. MtDNA marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle. *Nucleic Acids Res*, 1995; **23**(20): 4122~ 6
- 7 Corrañ Debrinski M, Horton T, Lott MT *et al*. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet*, 1992; **2**(4): 324~ 9
- 8 Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1995; **1271**: 177~ 89
- 9 Bonilla E, Tanji K, Hirano M *et al*. Mitochondrial involvement in Alzheimers disease. *Biochim Biophys Acta*, 1999; **1410**: 171~ 82
- 10 Napoleone P, Ferrante F, Ghirardi O. Age dependent nerve cell loss in the brain of Sprague-Dawley rats: Effect of long term acetyl-L-carnitine treatment. *Arch Gerontol Geriatr*, 1990; **10**: 173~ 85
- 11 Zorov DB. Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: A strategy of how to fight these. *Biochim Biophys Acta*, 1996; **1275**(1~ 2): 10~ 5
- 12 Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. Cell free apoptosis in Xenopus egg extracts: Inhibition by bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*, 1994; **79**: 353~ 64
- 13 Thornberry NA. caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull*, 1997; **53**(3): 478~ 90
- 14 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H *et al*. A caspase activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor I-CAD. *Nature*, 1998; **391**: 43~ 50
- 15 Susin SA, Zamzami N, Castedo M *et al*. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*, 1996; **184**: 1331~ 42
- 16 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N *et al*. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. *Nature*, 1999; **397**(4): 441~ 5
- 17 Bernardi P, Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore: a cyclosporin sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*, 1994; **26**(5): 509~ 17
- 18 Scorrano L, Nicolli A, Basso E *et al*. Two modes of activation of the permeability transition pore: The role of mitochondrial cyclophilin. *Mol Cell Biochem*, 1997; **174**: 181~ 4
- 19 Marchetti P, Castedo M, Susin SA *et al*. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*, 1996; **184**: 1155~ 60
- 20 Hirsch T, Marzo I, Kroemer G. Role of the mitochondrial permeability transition pore in apoptosis. *Biosci Rep*, 1997; **17**(1): 67~ 76
- 21 Tsujimoto Y. Role of bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, 1998; **3**(11): 697~ 707

粉防己碱药理作用研究进展*

王志荣 综述 李定国 陆汉明 审校

(上海第二医科大学新华医院, 上海 200092)

中国图书分类号 R 284.1; R 962

文献标识码 A 文章编号 1001-1978(2000)05-0488-05

摘要 粉防己碱是千金藤属防己科植物粉防己的主要生物活性成分, 属双苄基异喹啉类化合物。近年研究资料表明粉防己碱是①一种 Ca^{2+} 通道阻滞剂, 能够阻滞质膜电压或受体依赖性 Ca^{2+} 通道, 抑制细胞外 Ca^{2+} 内流和细胞内 Ca^{2+} 动员, 保护肝细胞、心肌细胞、神经细胞等免受毒物及缺血再灌注损伤, 但能促进白血病细胞内 Ca^{2+} 动员, 诱导细胞死亡; ②粉防己碱能够下调 T 细胞蛋白激酶 C 信号传导途径, 抑制 T 细胞增殖, 白介素 2 分泌及 T 细胞激活抗原的表达, 且能破坏局势细胞的完整性, 抑制其呼吸爆发和致炎因子释放; ③诱导肿瘤细胞凋亡; ④下调 P 糖蛋白活性, 逆转多药耐药; ⑤抑制血小板源生长因子诱导肝星状细胞及肺成纤维细

胞增殖及 I 型和 III 型胶原表达。因此粉防己碱具有抗肝、肺纤维化, 降低门脉高压及肺动脉高压, 抑炎, 抗肿瘤作用。

关键词 粉防己碱; 药理作用; 治疗; 研究进展

粉防己碱(tetrandrine, Tet) 是千金藤属防己科植物粉防己的主要活性成分, 化学结构属双苄基异喹啉类化合物。近年来, 国内外对其药理作用机制进行了较为广泛的研究。资料表明, Tet 具有多种生物学效应, 在治疗纤维化、门静脉和肺动脉高压, 免疫机能调节及肿瘤防治等方面具有很好的应用前景。

1 基本药理机制

1.1 Ca^{2+} 通道阻滞作用 Ca^{2+} 信号传导异常, 细胞浆 Ca^{2+} 浓度升高是多种疾病的病理生理基础。Tet 通过抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 干预细胞内 Ca^{2+} 分布, 维持细胞内 Ca^{2+} 稳态, 从而阻断有关病理过程。利用膜片钳记录技术表明 Tet 可剂量和时间依赖性

1999-12-29 收稿, 2000-05-17 修回

* 上海市科学技术发展基金资助, No 984319033

作者简介: 王志荣, 男, 35 岁, 博士生, 副教授;

李定国, 男, 52 岁, 教授, 博士生导师, 中华消化杂志等 10 余种杂志编委, 长期从事肝纤维化及肠易激综合征防治研究

- 22 Minn AJ, Velez P, Schendel SL *et al.* Bclx(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 1997; **385**: 335~57
- 23 Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W *et al.* Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; **95**: 1455~9
- 24 Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin 3 (IL-3) from an IL-3-dependent

hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem*, 1993; **268**: 6511~9

- 25 Yang J, Liu X, Bhalla K *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science*, 1997; **275**: 1129~32
- 26 Jil Rgensmeier, Xie ZH, Deveraux Q *et al.* Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; **95**: 4997~5002

Mitochondria and aging

CHEN Yong-Hong, DU Guang-Hua

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050)

ABSTRACT Aging is a complex pathological and physiological phenomenon characterized by the decline of many functions in human. Several lines of experimentation showed that the defect of the mitochondria function is one of the driving forces for the progress of aging. During the development of aging, the alteration of biology of mitochondria, the accumulation of the generation of "free radical" in mitochondria, the

mutation in mitochondria genomes and the control of the progress of death by mitochondria were suggested to be a number of novel mechanisms for mitochondria in aging. The experiment data focused on the role of mitochondria in aging are reviewed.

KEY WORDS mitochondria; aging; bioenergy; mutation of mtDNA; apoptosis