

线粒体 DNA 的损伤及其对细胞的影响

唐 春, 别 平 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所, 重庆 400038)

[摘要] 线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是线粒体内具有遗传效应的双股闭环 DNA 分子,其遗传信息量虽小,却控制着线粒体一些最基本的性质,对细胞及其功能有着重要影响。mtDNA 的损伤会导致细胞结构及功能的变化,已越来越引起人们的重视。本文就近年来 mtDNA 的损伤及其对细胞影响的研究进展作一综述。

[关键词] DNA, 线粒体; DNA 损伤; 细胞

[中图分类号] R 329.25; R 342.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0211-04

Damage of mitochondrial DNA and its influence on cells

TANG Chun, BIE Ping (Southwest Hospital & Institute of Hepatobiliary Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[ABSTRACT] Mitochondrial DNA(mtDNA), a double-stranded circular molecular, encodes several genes essential for mitochondrial and cellular functions despite its small amount of genetic information. Damage of mtDNA can lead to changes of cellular structures and functions and this fact is drawing more and more attention. This review summarized the recent research about mtDNA damage and its influence on cells.

[KEY WORDS] DNA, mitochondrial; DNA damage; cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2):211-214]

线粒体是细胞质中重要的细胞器之一,作为细胞能量储存和提供的场所,其以氧化磷酸化方式将食物内蕴藏的能量转变为可被机体直接利用的 ATP 高能磷酸化合物。动物体 85% 的能量产生于此。线粒体内的线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是核外惟一具有遗传效应的物质,控制着线粒体一些基本性质,对细胞的结构及功能有着重要影响。mtDNA 由于其自身的结构特点及其处于线粒体这个氧化磷酸化活跃的部位,极易受损,从而影响细胞的能量代谢、分裂增生等,并且与细胞的凋亡、恶变等有着密切的关系。

1 线粒体 DNA 的结构特点及其易损性

mtDNA 具有自我复制功能并能控制一定的遗传性状,其遗传信息量虽小,却控制着线粒体一些最基本的性质。自 Anderson 等^[1]1981 年测定出人 mtDNA 的全部序列以来,其作为一种结构相对简单而精致的真核生物基因组,引起了人们的极大兴趣。人 mtDNA 为全长 16 596 bp 的双股闭环分子,一股为重链(H 链),一股为轻链(L 链),均具有编码功能,其编码 2 个 rRNA、22 个 tRNA 以及 13 个与氧化磷酸化有关的多肽。mtDNA 非编码控制区(control region)包括 HV 区(hypervariable region)、D-loop 区及复制转录区,除此之外,mtDNA 各基因之间很少有非编码碱基的存在。mtDNA 的基因结构全部是外显子,不包含内含子。哺乳动物细胞 mtDNA 仅占整个细胞 DNA 的 0.1%~1%,1 个线粒体中可含有 2~10 个 mtDNA,而整个细胞可含有 1 000 多个 mtDNA。mtDNA 可以发生突变,突变后同样有遗传效应。

mtDNA 缺乏有效的基因修复系统,而且由于线粒体自身的特点使之极易受损。原因可能有以下几点:(1)mtDNA 几乎不受 DNA 结合蛋白质(组蛋白)的保护,即是裸露的,易

受外界因素损伤;(2)线粒体内脂肪/DNA 的比值很高,使具有嗜脂性的致癌物优先在占细胞总 DNA 量很少的 mtDNA 上聚集;(3)mtDNA 在整个细胞周期中处于不停的合成状态,易受外界因素的干扰,稳定性差;(4)线粒体内氧浓度很高,易产生氧自由基及过氧化氢等活性氧簇,本身又不能合成谷胱甘肽将其有效去除,因此 mtDNA 易受活性氧损伤^[2],造成核酸片段的丢失、碱基修饰以及插入突变等,尤以核酸片段的丢失最为常见;(5)mtDNA 在复制时由于 mtDNA 多聚酶 γ 的校对性差,以及 tRNA 基因部位易形成发夹样结构,导致其复制错配频率明显高于核 DNA^[3]。

mtDNA 的损伤因素众多,包括物理因素、化学因素、药物、衰老等,在成年体细胞,最常见的是缺血缺氧引起氧自由基及一氧化氮增多,而 ATP 生成减少所造成的损伤。在二氯化钴模拟的缺氧模型中,mtDNA 是氧化损伤的最初目标^[4]。缺血缺氧情况下, DNA 氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟嘌呤(OH⁸dG)^[5]在 mtDNA 中含量显著增多,mtDNA 迅速断裂、缺损,而核 DNA 则保持相对稳定^[6]。

2 线粒体 DNA 损伤对细胞的影响

mtDNA 无内含子,所以 mtDNA 损伤更具有功能性的结果,更容易造成细胞的损害。但相对于核 DNA, mtDNA 损伤具有一些特殊的遗传特征^[7-9]:(1)由于线粒体存在于细胞中,故 mtDNA 的遗传方式为母系遗传,因此,发生在生殖细胞中的突变能引起母系家族性疾病,而发生在发育过程中或体细胞组织中的突变则会引起散发的疾病和与年龄相

[作者简介] 唐 春, 博士, 主治医师。
E-mail: tangchun73@hotmail.com

关的氧化磷酸化活性降低。(2)一个细胞中往往有成百上千个线粒体,一个细胞内所有的 mtDNA 分子都是一致的,为同质性。而当 mtDNA 突变时,就会导致细胞内同时存在野生型和突变型,这两种 mtDNA 为异质性,此时,细胞分裂与线粒体增殖都导致一种被称作“复制分离”的过程。突变型 mtDNA 若得到发展,就会改变表现型。(3)mtDNA 突变的表型与核基因的表达不同,主要由某种组织中野生型与突变型 mtDNA 的相对比例及该种组织对线粒体 ATP 产生的依赖程度所决定。突变型 mtDNA 的数目需达到某种程度才足以引起某器官或组织的功能异常,这称为阈值效应。此外,突变 mtDNA 在不同组织中的差别表达与这些组织对线粒体供给能量的依赖程度密切相关。中枢神经系统、心脏、骨骼肌、肝脏等对能量依赖程度较高,氧化磷酸化功能缺陷往往在这些器官和组织中表现也明显。(4)mtDNA 中各基因排列紧密,利用率高,除 mtDNA D-loop 区的一小段区域外,其他序列无内含子,且部分区域出现基因的重叠,因此 mtDNA 的任何突变都会累及基因组中的一个重要功能区域。基于 mtDNA 基因组的高度限制性以及其在能量代谢中占据的枢纽性地位,病理性的 mtDNA 突变更为普遍。(5)mtDNA 已确定了多于核氧化磷酸化基因约 10 倍以上的同义及置换突变,加之 mtDNA 易受损伤的结构特点导致了高频的基因突变。故氧化磷酸化功能随年龄增长而降低,其与体细胞中 mtDNA 突变的累积相平行。

mtDNA 的损害,可以造成细胞功能的一系列变化,主要表现在以下几个方面。

2.1 影响呼吸链复合物的活性 研究^[10]表明,缺血缺氧情况下,mtDNA 损伤加重,呼吸链复合物 I 和 IV 活性下降显著,可能系它们的大多数亚单位由 mtDNA 编码所致。mtDNA 氧化损伤在人类主要是 mtDNA¹⁹⁷⁷ 缺失,mtDNA⁴⁹⁷⁷ 缺失是由 4 977 个碱基对缺失组成,从人类 mtDNA 8 483 位到 13 459 位,由重复序列 ACCTCCTCACCA 组成。此缺失区域编码线粒体 ATP 酶亚单位 6、细胞色素氧化酶亚单位 3 和还原酶尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚单位 3、4L、4、5,此功能区域碱基对缺失易导致呼吸链复合物功能受损,ATP 生成减少。

2.2 与细胞凋亡有关 线粒体凋亡是细胞凋亡发生的第一步^[11],而 mtDNA 作为线粒体内的重要物质,在凋亡过程中发挥着重要作用。mtDNA 的大片段缺失,可增加人类细胞对紫外线导致凋亡的易感性^[12];在游离脂肪酸造成的 β 细胞凋亡,mtDNA 是其敏感损伤目标^[13];它也是石棉等因素导致细胞凋亡的首要靶目标^[14]。其主要通过氧化相关机制损害 mtDNA,从而导致细胞凋亡。研究^[15]显示,细胞内氧自由基生成增加,有 mtDNA 的细胞在 3~4 d 内迅速死亡,而无 mtDNA 的细胞则对氧化作用相对耐受。近年来,有学者发现缺少 mtDNA 的细胞也能发生凋亡^[16],但其凋亡发生机制及信号传递与存在 mtDNA 的细胞有明显不同。并且 mtDNA 损伤所致的细胞氧化磷酸化缺陷能加速细胞凋亡的发生^[17]。

2.3 与细胞分裂增生有关 线粒体广泛参与了细胞的各种功能,细胞线粒体丢失、mtDNA 的损伤,可影响细胞分裂增

殖,导致细胞死亡及各种疾病^[18,19]。其影响因素考虑有以下几点:(1)影响细胞的能量代谢,造成细胞能量供应不足,从而影响细胞分裂增生。(2)mtDNA 突变后,影响线粒体 DNA 复制和分裂的速度。在细胞有丝分裂时,线粒体 DNA 也要发生复制、分离的过程,将母细胞的 mtDNA 复制后分配到两个子细胞。当 mtDNA 发生突变后,在细胞有丝分裂时,mtDNA 的复制和分离速度减慢^[20],从而影响到整个细胞的有丝分裂速度,造成细胞分裂增生减慢。(3)影响细胞骨架。细胞骨架主要由肌动蛋白丝、微管和中间丝组成,其参与了细胞增殖、维持细胞形态及细胞间的连接等活动,而中间丝的结构要靠磷酸化及去磷酸化调控。线粒体功能障碍时,要影响细胞的磷酸化及去磷酸化功能,从而影响细胞骨架的正常功能。Rusanen 等^[21]观察有 mtDNA 3 243→G 突变的成肌细胞发现,由于细胞的氧化磷酸化障碍选择性地造成了波形蛋白网络断裂,波形蛋白丝的极性紊乱,长度变化,在细胞核周围形成较大的束包绕细胞核,细胞数目增长速度明显低于对照组。(4)线粒体功能受损时,可激活钙/钙调蛋白激酶 IV (calcium/calmodulin kinase IV, CaMK IV),激活 cAMP 反应体结合蛋白(cAMP-responsive element-binding protein, CREB),从而影响细胞增殖^[22]。(5)影响细胞端粒;mtDNA 受损时,影响线粒体功能,可造成细胞端粒缩短,从而影响细胞的分裂复制^[23]。

2.4 与细胞恶变有关 目前认为肿瘤的生物特征不仅取决于核内遗传物质,而且与核外的 mtDNA 也有一定的关系。mtDNA 的易受损伤的结构特点决定了其极易受致癌物攻击,是致癌物作用的重要靶点^[24],各种因素所致的 mtDNA 损伤(包括突变、整合和不稳定性等)与细胞的癌变、肿瘤的发生之间可能存在一定的关系。有学者发现,mtDNA D-loop 环不稳定以及线粒体拷贝数的减少,与人类体细胞的癌变有关^[25]。在许多肿瘤中亦有线粒体 DNA 畸变的报道。并且,mtDNA 损伤时,还可能增加肿瘤的侵袭性^[26];但也有研究认为^[27],mtDNA 的改变是细胞癌变的一个重要因素,mtDNA 拷贝数的改变多出现在细胞癌变的早期,而与肿瘤的转移并无相关性。mtDNA 损伤导致肿瘤的可能机制有以下几个方面。

2.4.1 mtDNA 突变和表达异常 mtDNA 缺乏内含子,突变大都发生于编码区。mtDNA 在各种与之结合高效的内源性损伤因子和外源性致癌物的作用下发生突变,突变的累积增加了肿瘤的发生危险性。已知活性氧簇与 ATP 的生成和肿瘤的启动、进展有关^[28]。正常细胞线粒体可摄取机体 90% 以上的氧,1%~2% 用于转化为活性氧簇超氧化物和过氧化物等;mtDNA 的突变可以增加活性氧簇的产生,而活性氧簇的增多又加重了突变效应,从而加剧了活性氧簇超氧化物和过氧化物的氧化损伤作用,影响线粒体基因组的生物发生并激活核基因组^[29]。肿瘤细胞 mtDNA 的转录水平(mRNA)常常增高,而过氧化氢等活性氧簇可以影响 mtDNA 的表达^[30]。

2.4.2 线粒体基因组不稳定 微卫星不稳定(MSI)是核基因组的不稳定性(NGI)中最常见且仅在肿瘤组织中发生的事件。线粒体基因组也可以出现不稳定(mitochondrial ge-

nome instability, mtGD)。活性氧簇的破坏、滑链错配和不平衡交换可能是 mtGI 产生的主要原因^[31]。mtGI 以 D-loop 区的 (CA)_n 和 PolyC 为最常见。

2.4.3 mtDNA 与核内 DNA 间的整合作用 在生物的不断进化过程中,适当的线粒体基因组成分对核基因组的插入整合作用对生物进化有意义,并且某些 mtDNA 插入核 DNA,还可修复核 DNA 的损伤^[32]。但不良的插入可能是某些遗传病、畸形甚至肿瘤易感性的主要病因之一^[33]。在内源性和(或)外源性损伤因子的直接或间接作用下会造成线粒体的肿胀裂解,mtDNA 损伤片段产生过多,同时由于胞质中 DNA 酶活性较正常细胞明显下降,甚至丧失,导致 mtDNA 的降解失调,使游离于线粒体外的 mtDNA 片段得以大量产生,获得游离的 mtDNA 在一定的条件下就可能具有类似致癌病毒的作用,穿过核孔,随机整合到核基因组中。假如这种整合抑制了肿瘤抑制基因或激活了癌基因的活性,就可能致细胞的恶性转化^[34]。

3 小结与展望

mtDNA 作为核外的遗传物质,控制着线粒体的基本功能,由于其所处的位置及自身结构特点,极易受损,其损伤对细胞的影响,特别是对细胞恶变的影响,正越来越引起重视。mtDNA 损伤后是如何进行修复的?同时,因线粒体基因组的复制和转录都接受了细胞核的指导和调控^[35,36],核 DNA 与 mtDNA 的相互关系如何?两者之间相互影响的具体途径怎样?这些问题,都需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Anderson SA, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome [J]. *Nature*, 1981, 290:457-465.
- [2] Fariss MW, Chan CB, Patel M, et al. Role of mitochondria in toxic oxidative stress [J]. *Mol Interv*, 2005, 5:94-111.
- [3] Pinz KG, Shibutani S, Bogenhagen DF. Action of mitochondrial DNA polymerase gamma at sites of base loss or oxidative damage [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:9202-9206.
- [4] Wang G, Hazra TK, Mitra S, et al. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoC₁₂ in rat neuronal PC12 cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28:2135-2140.
- [5] Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1411:351-369.
- [6] Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, et al. Oxygen stress induces an apoptic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 209:723-729.
- [7] Wallace DC. Diseases of mitochondrial DNA [J]. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61:1175-1212.
- [8] DiMauro S, Moraes CT. Mitochondrial encephalomyopathies [J]. *Arch Neurol*, 1993, 50:1197-1208.
- [9] Wallace DC. Report of the committee on human mitochondrial DNA [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1989, 51:612-621.
- [10] Kwast KE, Hand SC. Acute depression of mitochondrial protein synthesis during anoxia; contributions of oxygen sensing, matrix acidification and redox state [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271:7313-7319.
- [11] Schapira AH. Mitochondrial disorders [J]. *Curr Opin Neurol*, 1997, 10:43-47.
- [12] Lee CF, Liu CY, Chen SM, et al. Attenuation of UV-induced apoptosis by coenzyme Q10 in human cells harboring large-scale deletion of mitochondrial DNA [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1042:429-438.
- [13] Grishko V, Rachek L, Musiyenko S, et al. Involvement of mtDNA damage in free fatty acid-induced apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38:755-762.
- [14] Shukla A, Jung M, Stern M, et al. Asbestos induces mitochondrial DNA damage and dysfunction linked to the development of apoptosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285:L1018-L1025.
- [15] Shoskes DA, Xie Y, Gonzalez-Cadavid NF, et al. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat; implications for renal transplantation [J]. *Transplantation*, 1997, 63:495-500.
- [16] Marchetti P, Susin SA, Decaudin D, et al. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cell lacking mitochondrial DNA [J]. *Cancer Res*, 1996, 56:2033-2038.
- [17] Leonard JV, Schapira AH. Mitochondrial respiratory chain disorders II: neurodegenerative disorders and nuclear gene defects [J]. *Lancet*, 2000, 355:389-394.
- [18] Ohta S. A multi-functional organelle mitochondrion is involved in cell death, proliferation and disease [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10:2485-2494.
- [19] Jazayeri M, Andreyev A, Will Y, et al. Inducible expression of a dominant negative DNA polymerase-gamma depletes mitochondrial DNA and produces a rho0 phenotype [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:9823-9830.
- [20] Reder C. Mutated mtDNA distribution in exponentially growing cell cultures and how the segregation rate is increased by the mitochondrial compartments [J]. *Acta Biotheor*, 2001, 49:235-245.
- [21] Rusanen H, Annunen J, Yla-Outinen H, et al. Cytoskeletal structure of myoblasts with the mitochondrial DNA 3243A→G mutation and of osteosarcoma cells with respiratory chain deficiency [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2002, 53:231-238.
- [22] Arnould T, Vankoningsloo S, Renard P, et al. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation [J]. *EMBO J*, 2002, 21:53-63.
- [23] Passos JF, von Zglinicki T. Mitochondria, telomeres and cell senescence [J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40:466-472.
- [24] Heddi A, Stepien G, Benke PJ, et al. Coordinate induction of energy gene expression in tissues of mitochondrial disease patients [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274:22968-22976.
- [25] Lee HC, Yin PH, Lin JC, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1042:109-122.
- [26] Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23:759-768.
- [27] Mambo E, Chatterjee A, Xing M, et al. Tumor-specific changes in mtDNA content in human cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116:920-924.
- [28] Toyokuni S, Sagripanti JL. Iron chelators modulate the production of DNA strand breaks and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine [J]. *Free Radic Res*, 1999, 31:123-128.

- [29] Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. *Science*, 1999, 283:1482-1488.
- [30] Li JM, Cai Q, Zhou H, et al. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8:1117-1122.
- [31] Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith JM. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA[J]. *Science*, 1999, 286:2524-2525.
- [32] Willett-Brozick JE, Savul SA, Richey LE, et al. Germ line insertion of mtDNA at the breakpoint junction of a reciprocal constitutional translocation[J]. *Hum Genet*, 2001, 109: 216-223.
- [33] Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans[J]. *Nature*, 2000, 408:708-713.
- [34] Shay JW, Werbin H. New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging[J]. *Mutat Res*, 1992, 275:227-235.
- [35] Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1410:103-123.
- [36] Battersby BJ, Loredó-Osti JC, Shoubridge EA. Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation[J]. *Nat Genet*, 2003, 33:183-186.
- [收稿日期] 2005-06-13 [修回日期] 2005-12-15
[本文编辑] 孙岩