

• 综 述 •

线粒体蛋白质组学与细胞凋亡信号转导的研究进展*

眭维国¹, 崔甄甄^{1,2}, 薛 雯¹, 邹贵勉¹, 陈洁晶¹综述, 戴 勇^{1△}审校

(1. 广西桂林解放军第一八一医院肾脏科/全军肾移植与透析治疗中心/广西代谢性疾病研究重点实验室, 广西桂林 541002; 2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

关键词: 线粒体; 蛋白质组学; 细胞凋亡; 信号转导之; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.17.028**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)17-2107-03

线粒体在真核细胞中广泛分布,为细胞代谢以及能量产生的主要细胞器,同时也参与多项细胞的重要生理过程,其蛋白质结构与功能的改变同人类疾病息息相关,如退行性疾病、心脏病、衰老和癌症等。蛋白质组学是对一个基因组或一种细胞、组织、器官所表达的全部蛋白质成分进行分析的新兴学科,其中热点之一就是线粒体的研究。

1 线粒体蛋白质组学与细胞凋亡信号转导通路

1.1 线粒体蛋白质组学概述 蛋白质组学是指在大规模水平上研究蛋白质的特征,包括蛋白质的表达水平、翻译后的修饰、蛋白与蛋白相互作用等,以此得到蛋白质水平上的有关疾病发生、细胞代谢等过程的相关信息。线粒体蛋白质组学主要是鉴定整个线粒体或线粒体亚结构中所含的一套完整的蛋白质。由于许多疾病与线粒体功能的异常密切相关,不论是原发性或继发性功能紊乱,任何一种功能性紊乱都会对细胞的生存带来严重影响,因此许多疾病可通过跟踪线粒体功能障碍来诊断^[1]。线粒体几乎分布在所有细胞中,许多人类疾病都与线粒体功能的异常有所关联,线粒体蛋白质组学在这类疾病诊断和靶标发现中具有广泛的应用。

1.2 线粒体通路 细胞凋亡是由于机体内环境变化或死亡信号触发以及在基因调控下所引起的细胞主动死亡过程,这一过程有消除体内老化细胞与潜在异常生长细胞的功能,对保持机体的稳态起着重要作用^[2]。对细胞凋亡的深入研究发现,线粒体与细胞凋亡之间存在着密不可分的关系。

目前发现细胞凋亡主要经过 3 条信号转导通路,其中线粒体通路起到主导作用,被称为内源性通路。在多细胞生物体中,遭到破坏或病毒感染的异常细胞由一个严格监管的自杀性程序所控制,进而发生程序性死亡或凋亡。细胞外的死亡信号或细胞内 DNA 的损伤造成细胞内适配器分子的聚集,引发促凋亡的 Bcl-2 家族成员发生蛋白水解、脱磷酸化等修饰,使其由无活性态转变为活性态,进而从胞浆向线粒体膜移动,使得线粒体开放、线粒体膜电位降低等变化,细胞色素 C 等凋亡信号分子进入胞浆,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)开始活化^[3],从而使得凋亡的特征性发生改变,凋亡蛋白通过膜孔的形成可导致线粒体肿胀,还可增加线粒体膜的通透性,最终引起细胞凋亡效应导致细胞凋亡。

1.3 影响线粒体通路信号转导的因素

1.3.1 Ca²⁺ Ca²⁺ 作为第二信使参与调节细胞膜通透性、酶活性及 DNA 的合成。通过 Ca²⁺ 与线粒体上金属位点的结合,线粒体开放,进而改变线粒体通透性,造成渗透压发生变化,导

致线粒体膜的电势改变,使其失去合成 ATP 的能力,使得 ATP 耗竭,线粒体皱缩,细胞色素 C 从线粒体中释放,Caspase 活化,最终诱发细胞凋亡^[4-5]。

1.3.2 Bcl-2 家族 Bcl-2 家族成员对细胞的生存和死亡具有重要的调控作用,主要作用于线粒体外膜、内质网膜和核膜上。Bcl-2 家族成员通形成同源或异源二聚体,使促凋亡与抗凋亡作用相互中和,当促凋亡作用占优势时,线粒体中的细胞凋亡信号和随后的蛋白酶激活因子被调控性的释放到胞浆中,使得线粒体功能丧失,进而促进细胞凋亡^[6]。研究发现,Bcl-2 家族成员是通过形成离子通道,调节细胞色素 C 的重新分布与线粒体的极化状态来发挥促凋亡或抗凋亡作用的。

1.3.3 细胞色素 C 细胞色素 C 不仅在呼吸链中传递电子,在细胞凋亡程序中还是一种主要的调控蛋白。在线粒体损伤后,细胞色素 C 作为传感器被释放到细胞质中,进而引发凋亡程序的执行。当细胞色素 C 释放后,线粒体呼吸链受损,ATP 的合成受到抑制,也可导致凋亡的发生。

1.3.4 Caspase 家族 Caspase 家族和线粒体共同参与细胞凋亡。死亡信号激活 Caspase 后,Caspase 会激活第二信使,如 Ca²⁺、Bcl-2、神经酰胺、活性氧等,被激活的第二信使作用于线粒体,线粒体释放的 proCaspase-2、3、9 被激活,进而又激活 Caspase-3、6、7。被激活的 Caspase-3、6、7 作用于 p38 激酶,使线粒体通透性进一步提高,从而促进 Caspase-2、3、9 的再一次释放,依次循环,使得死亡信号级联放大,最终加快细胞凋亡。

2 线粒体蛋白质组学与信号转导途径在癌症方面的相关研究

2.1 信号通路与癌细胞凋亡 线粒体途径中,细胞的整个凋亡过程需涉及多种因子及相关因素的参与,其中 Caspase 的线粒体激活因子(Smac)是一种从线粒体内释放到细胞质中的重要凋亡调节蛋白,具有增加 Caspase-3 活性,促进细胞凋亡的作用,其中 PI3K/Akt 信号通路、Smac 基因与癌细胞的凋亡关系尤为密切。

2.1.1 PI3K/Akt 信号通路与肿瘤 细胞是通过形成各种网络通路来传递各种增殖与凋亡信号的。其中,PI3K/Akt 信号通路在多种人类肿瘤中表达失调,对肿瘤细胞的增殖与凋亡进行调节,与肿瘤的血管形成和侵袭转移关系密切,对患者的预后产生影响,同时为肿瘤的治疗提供了新的靶点^[7]。正是由于 PI3K/Akt 信号通路在肿瘤的发生、发展过程中起到了关键性作用,因此通过 PI3K/Akt 信号通路来促进癌细胞凋亡的思路已成为当今药物开发的一个新方向。

2.1.2 Smac 蛋白与癌细胞 Smac 蛋白是近年来发现的一种

* 基金项目:国家“重大新药创新”科技重大专项课题资助项目(2011zx09102-101-03);广西科技计划资助项目(桂科攻 0898017)。△ 通讯作者,E-mail:daiyong22@yahoo.com.cn。

从线粒体内释放到细胞质中的重要凋亡调节蛋白,是除细胞色素 C 以外被大家所认知的另一种线粒体促凋亡蛋白,具有增强 Caspase-3 活性,促进细胞凋亡的作用^[8]。Smac 蛋白可通过两种途径促进凋亡,一是依靠 Caspase-3 的蛋白水解作用,二是增强成熟 Caspase-3 的酶催化活性^[7]。由此可推,Smac 蛋白通过上述两种途径中的一种来促进癌细胞凋亡,只是在不同的生理机能或者不同生理条件下进行的途径有所不同。

2.2 人类疾病与药物研发的应用 细胞凋亡过程是信号级联传递最终导致细胞死亡的过程,因此正确执行细胞凋亡任务对机体的平衡与发展是极为重要的,若机体存在细胞凋亡缺陷,会容易发生自身免疫性疾病,神经系统疾病和癌症等^[9]。近几年来,癌症治疗研究也开始着重于细胞凋亡方面,细胞的增殖、分化、凋亡均与癌症的发生、发展密切相关,细胞凋亡的信号转导通路机制为抗癌药物的设计研发提供了有效的策略与目标,为相关治疗提供了更有效的药物靶标^[10]。

线粒体途径是癌细胞执行死亡程序过程中必不可少的途径之一,最近的一些抗癌战略针对线粒体通路机制从而制定了诱导癌细胞死亡方略^[11-12],也有部分抗癌药物通过利用信号转导分子进而引起线粒体膜通透性的改变,最终引发细胞凋亡,从而达到治疗癌症的目的^[13],由此看来,线粒体改变引起的细胞凋亡在许多生理、病理过程中起着重要作用。斑蝥素是一种具有强大抗癌活性的药物,主要用于治疗肝癌、食管癌及胃癌。研究表明,斑蝥素的抗癌作用机制主要是增加 Ca^{2+} 的释放,破坏线粒体膜电位,降低 Bcl-2 的表达,释放细胞色素,促进凋亡诱导因子从线粒体中释放,从而诱导细胞凋亡^[14]。近年来随着医药科技的蓬勃发展,同斑蝥素作用机制与功能相似的抗癌物质也不断被发现,如:蟾蜍毒素、蝎子毒液提取物、巴西蘑菇提取物等^[15-17]。

在动物细胞中,线粒体蛋白具有直接激活细胞凋亡程序的功能,近年来根据这一特征研发的一系列以诱导癌细胞凋亡为重要机制的低度性抗癌药物备受推崇,其抗癌的机制在今后的研究中会进一步阐明,其在癌症治疗中将发挥越来越大的作用。

3 线粒体蛋白质组学的研究技术与常见问题

目前对线粒体蛋白质组的分析工作有两方面内容,一是通过双向电泳等技术得到正常生理条件下的蛋白质图谱,建立相应的数据库;二是比较在不同的生理状况和不同的干预条件下蛋白质组发生的差异性改变。通过这两方面的工作可以进行比较蛋白质组研究,从而对线粒体疾病的机制进行探究。

3.1 线粒体蛋白质组研究技术 线粒体蛋白质组研究常用的技术有:(1)用于线粒体分离纯化的技术,如差速离心、蔗糖密度梯度离心、Nycodenz 密度梯度离心等。(2)用于蛋白质分离的双向凝胶电泳(2-DE)、差异凝胶电泳(DIGE)、色谱技术等。(3)用于蛋白质鉴定的技术,如质谱技术(MS)、ICAT 技术、蛋白质芯片技术、蛋白质测序、氨基酸组成分析等。(4)蛋白质相互作用组学分析技术,如酵母双杂交系统、噬菌体展示技术、表面等离子体共振技术、串联亲和纯化(TAP)等。(5)生物信息工程学,以计算机与相关软件为工具,运用信息学和数理统计的方法来对生物大分子信息进行获取、加工、分类、检索、分析与比较,可分析鉴定蛋白质的理化性质、相互作用以及功能预测等。

3.2 线粒体蛋白质组研究的技术问题

3.2.1 线粒体样品的可用性 线粒体包含在白细胞和血小板中,但通常在血液样本中含量极低,以至于线粒体蛋白质组的

系统特性描述就只能在白血病细胞中进行。手术切除的组织标本通常用作人类参考材料,有时也用活检的方法取患者的组织^[18],从而对疾病作出相应的诊断。通用的方法是表征患者的线粒体体外增殖分化,另一种方法是研究线粒体基因差异建立胞质混合(Cybrid)细胞株,细胞通过与无核细胞融合,产生 Cybrid 结合核基因组。Cybrid 技术是一种广泛应用的工具,用于阐明线粒体的功能性障碍疾病,例如神经退行性疾病中的阿尔茨海默病和帕金森病,此方法在癌症方面也得到了很好的应用^[19]。

3.2.2 线粒体样品的处理 线粒体可从广泛的生物资源中通过差速离心纯化来获得,通过使用专业配方的化学试剂与离心机,使得细胞裂解并分馏,最终得到所需样品。用另一种方法继续分析线粒体分数和蛋白质相关数据,为了能进一步简化并避免分馏程序,现已制定了有关使用整个组织印迹提高线粒体蛋白质组分析纯化效率的方法^[20]。虽然这种方法不能揭示所有的线粒体蛋白,但它可正确评价细胞质与线粒体蛋白质病理之间的失衡以及多种线粒体成分。

3.2.3 线粒体蛋白质组分析技术 标准的 2-DE 技术广泛应用于线粒体蛋白质组学的调查,它提供了最高理论分辨率,帮助蛋白质鉴定。但由于线粒体含有丰富的膜蛋白,具有高度的疏水性,在普通样品裂解液中的溶解性很低。因此,2-DE 中的某些程序也逐渐被其他的蛋白质组分析技术中的程序所代替^[21-22]。在蛋白质鉴定过程中,按一定比例向样品中添加中性洗涤剂,以增加疏水性蛋白质溶解度,此方法可使膜蛋白的溶解度大幅提高^[23],使分析工作进行得更顺利。然而,随着质谱数据处理的改进^[24],当蛋白质不完全分解甚至彻底混合在一起时,蛋白质也有可能被正确识别。针对其较高的溶解力和承载能力,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳常用于包括线粒体在内的细胞膜/细胞器,而色谱程序则不经常使用^[25]。

4 展 望

随着线粒体研究热潮的到来,线粒体蛋白质组学研究逐渐成为重点,虽说研究过程中某些问题依旧存在,比如线粒体膜蛋白问题、线粒体样品纯度的问题等,但随着技术不断提高,对线粒体在细胞凋亡与肿瘤的发生机制研究的深入,将为肿瘤疾病的治疗提供新的思路和策略,同时也给相关药物的开发研制提供了新的研究方向。

参考文献

- [1] Cwerman-Thibault H, Sahel J A, Corral-Debrinski M. Mitochondrial medicine: to a new era of gene therapy for mitochondrial DNA mutations[J]. J Inher Metab Dis, 2011, 34(2): 327-344.
- [2] 刘萍, 丛国正, 独军政, 等. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(3): 715-716.
- [3] Baines CP. The cardiac mitochondrion: nexus of stress[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 61-80.
- [4] Hinson JA, Roberts DW, James LP. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis [J]. Handb Exp Pharmacol, 2010 (196): 369-405.
- [5] Gogvadze V, Norberg E, Orrenius S, et al. Involvement of Ca^{2+} and ROS in alpha-tocopheryl succinate-induced mitochondrial permeabilization[J]. Int J Cancer, 2010, 127(8): 1823-1832.
- [6] Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4): 532-539.
- [7] 石松菁, 黄昌明, 石松长. 靶向抑制 PI3K/Akt 信号通路对 Smac

基因表达与胃癌细胞凋亡的影响[J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(6): 496-499.

[8] Yu J, Wang P, Ming L, et al. SMAC/Diablo mediates the proapoptotic function of PUMA by regulating PUMA-induced mitochondrial events[J]. *Oncogene*, 2007, 26(29): 4189-4198.

[9] Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death[J]. *Essays Biochem*, 2010, 47: 99-114.

[10] Indran I R, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1807(6): 735-745.

[11] Maas C, Verbrugge I, Savich G, et al. Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(10): 1613-1623.

[12] Buron N, Porceddu M, Brabant M, et al. Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization [J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9924.

[13] Kroemer G. Pathophysiological implications of mitochondrial cell death control[J]. *Bull Mem Acad R Med Belg*, 2010, 165(3/4): 205-210.

[14] Kuo JH, Chu YL, Yang JS, et al. Cantharidin induces apoptosis in human bladder cancer TSGH 8301 cells through mitochondria-dependent signal pathways[J]. *Int J Oncol*, 2010, 37(5): 1243-1250.

[15] Zargan J, Umar S, Sajad M, et al. Scorpion venom (*Odontobuthus doriae*) induces apoptosis by depolarization of mitochondria and reduces S-phase population in human breast cancer cells (MCF-7) [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(8): 1748-1756.

[16] Qi F, Inagaki Y, Gao B, et al. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways[J]. *Cancer Science*, 2011, 102(5):

951-958.

[17] Fan MJ, Lin YC, Yang JS, et al. Crude extracts of *Agaricus brasiliensis* induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway[J]. *In Vivo*, 2011, 25(3): 355-366.

[18] Dunn MJ. Proteomics-Clinical Applications reviews 2011[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2011, 5(1/2): 4-6.

[19] Mizutani S, Miyato Y, Shidara Y, et al. Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer cells to anticancer drugs[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(16): 1680-1687.

[20] Loro E, Gianazza E, Cazzola S, et al. Development and characterization of polyspecific anti-mitochondrion antibodies for proteomics studies on in toto tissue homogenates[J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(12): 1329-1341.

[21] Miller I, Eberini I, Gianazza E. Other than IPG-DALT: 2-DE variants[J]. *Proteomics*, 2010, 10(5): 586-610.

[22] Wumaier Z, Nubel E, Wittig I, et al. Chapter 8 Two-dimensional native electrophoresis for fluorescent and functional assays of mitochondrial complexes[J]. *Methods Enzymol*, 2009, 456(2): 153-168.

[23] Dudkina NV, Kouril R, Peters K, et al. Structure and function of mitochondrial supercomplexes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(6/7): 664-670.

[24] Chait BT. Mass spectrometry in the postgenomic era[J]. *Annu Rev Biochem*, 2011, 80(2): 239-246.

[25] Cui Z, Hou J, Chen X, et al. The profile of mitochondrial proteins and their phosphorylation signaling network in INS-1 beta cells [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 2898-2908.

(收稿日期: 2012-03-29)

• 综 述 •

抗 Hp IgG 抗体和胃蛋白酶原联合检测在早期胃癌筛查中的应用进展

程 烽 综述, 林建著 审校

(福建中医药大学附属第二人民医院健康体检中心检验科, 福建福州 3500003)

关键词: 胃肿瘤; 螺杆菌, 幽门; 胃蛋白酶原; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 17. 029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)17-2109-03

胃癌是世界第四大常见肿瘤, 东亚(日本、中国)、东欧、中美洲和南美洲是胃癌的高发区^[1]。胃癌的发生与胃部细菌感染密切相关, 其中幽门螺杆菌(Hp)最为常见^[2-3]。较长的病史为胃癌癌前病变的检测和及时有效的干预提供了机会^[4]。因此, 早期发现胃癌是提高胃癌生存率、降低死亡率的关键。

胃镜检查被称为确诊胃癌的“金标准”, 但因其具有创伤性、费用较贵, 早期诊断价值有限等原因, 不适于大规模人群的筛查。日本学者于 2007 年开始推荐使用血清抗 Hp IgG 抗体和血清胃蛋白酶原(PG)联合检测的方法用于大规模的胃癌早期筛查。因此方法对人群发生胃癌的危险性分为 A、B、C 和 D 组而简称为“ABC 法”^[5]。本文就此法的应用进展作一简要综述。

1 胃癌和 Hp 感染

Hp 感染是导致慢性胃炎、萎缩性胃炎、胃溃疡和胃癌的主要原因, 和胃癌发生密切相关^[6-7]。Uemura 等^[8]对 1 526 例

个体进行长达 10 年的跟踪观察表明, 在 Hp 感染阳性者中, 5% 发生胃癌; 在 Hp 感染阴性者中, 没有 1 例发生胃癌。虽然从更长的时期观察, 在 Hp 根除治疗的患者中也发现了胃癌的复发, 但其复发率明显低于未进行 Hp 根除治疗的患者。早期胃癌患者, 在内窥镜治疗后, 必须进行 Hp 根除治疗以防止异时胃癌的发生^[9-10]。

2 血清 PG 法

PG 是胃特异性产生的胃蛋白酶前体, 根据生化和免疫学特性差异, 分为 PG I 和 PG II 两种类型。PG I 主要由胃底腺主细胞产生, 而全部的胃黏膜可分泌 PG II, 如: 胃底腺、贲门腺和幽门腺以及十二指肠上段的 Brunner 腺。PG 虽 99% 分泌入胃腔, 但仍有 1% 进入血液, 这些可作为血清 PG 被检测出来^[11]。

血清 PG 水平可以反应胃黏膜的功能和形态状况。胃体黏膜萎缩由 Hp 感染或自身免疫性引起, 常伴有肠上皮增生和