

线粒体-内质网结构偶联的研究进展

秦佳宏 黄子通

随着对细胞超微结构的深入研究,线粒体和内质网的结构功能和它们之间的相互关系在诸多疾病发病机制和转归方面显示出及其重要的作用。线粒体-内质网结构偶联(mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes, MAMs)做为一个新发现的亚细胞结构将这两个重要细胞器的功能联系在一起,一个细胞器功能和结构的异常,通过 MAMs 可以影响或调控另一个细胞器^[1-3]。近年来,很多学者已经关注到 MAMs 在神经退行性疾病、缺血性脑损伤等病理状态下对内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)、非折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),以及线粒体功能障碍的影响和制约。本文对近年来 ERS 通过 MAMs 调控线粒体功能的相关研究进行综述,为临床研究提供依据,以期治疗神经功能障碍的药物研发提供新思路。

1 MAMs 的结构

MAMs 是线粒体外膜和内质网膜某些区域高度重叠部位,彼此相互“连接”,但又不发生膜融合,保持稳定的膜间距,一般认为在 10~30 nm 之间;结构偶联是不连续的,以簇状密度的形式呈现;有部分内质网膜呈管状环绕线粒体;与内质网偶联的线粒体外膜面积占总外膜面积的 4%~20% 不等。细胞动态过程中结构偶联不会分离,每个细胞器保持其特有的生理功能^[1]。

2 MAMs 的多功能分子基础

MAMs 相关功能的实现和其自身的形成都依赖具体的蛋白质分子作为功能载体。大约有数十种蛋白质富集于 MAMs,不但构成内质网和线粒体之间的物理连接和强大的功能复合体,而且,这些蛋白的表达变化还决定了两大细胞器间的相互作用。MAMs 的多功能蛋白质分子归纳起来可以分为以下几大类:脂质代谢相关蛋白质、钙信号传导相关蛋白质、内质网应激相关蛋白质、线粒体形态相关蛋白质和细胞凋亡相关蛋白质等^[2]。蛋白质具体功能见表 1。

表 1 MAMs 多功能蛋白质分子

功能	蛋白质
物理连接	MFN1、MFN2、ERMES、GRP75
脂质代谢	FACLA、ACAT1、PSSI/2、DGAT2
钙信号传导	IP3R、VDAC1、GRP75、Sigma-1R
线粒体形态调节	Drp1/Dnm1、MFN1、MFN2
凋亡	PML、S1T、PTEN
内质网应激	Ero1 α 、Bip、PERK、Sigma-1R

3 MAMs 的主要功能

MAMs 对两个细胞器间功能的“协作”具有重要作用,是线粒体和内质网发生交互作用的功能平台。与脂质代谢、钙信号传导、线粒体形态调节等密切相关,影响病理生理状态下神经元细胞的功能状态。

3.1 脂质代谢

内质网具有强大的磷脂合成功能,它与线粒体之间的磷脂转运依赖分别位于线粒体外膜和内质网膜上的几种酶,并需要在两类膜间转运多次^[4]。酵母中的研究发现,位于线粒体外膜和内质网膜上的四种线粒体相关蛋白质 Mmm1/Mdm10/Mmm12/Mdm34 复合物 ERMES (endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure),在磷脂转运中可能起到结构连接的作用^[5]。如果将其基因敲除, MAMs 解离,磷脂代谢异常。突变株中,人为地在线粒体外膜和内质网膜上表达可以相互作用的外源蛋白质分子,形成“人造”连接可将线粒体与内质网恢复结构偶联,磷脂代谢恢复正常^[6-7]。可见, MAMs 使得细胞器间磷脂转运具有空间便利,对细胞磷脂代谢有重要作用。有研究报道,在阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症和额颞叶痴呆等神经退行性疾病中,定位于 MAMs 处的某些蛋白受体通过与脂质神经酰胺结合后,干预脂质代谢从而影响神经细胞存活^[8]。

3.2 钙信号转导

MAMs 区域富含定位于内质网膜的钙释放通道蛋白 IP3R 和定位于线粒体外膜的孔蛋白 VDAC1,两者通过分子伴侣 GRP75 连接形成复合物,构成促进内质网和线粒体之间的 Ca²⁺ 信号转导通路^[9-10]。兴奋时, Ca²⁺ 从内质网释放到胞质中形成钙信号,线粒体摄取并储存少量 Ca²⁺。一方面, Ca²⁺ 可以调节线粒体功能,从而影响细胞生存状态;另一方面,线粒体对 Ca²⁺ 的摄取也会改变 Ca²⁺ 信号。

Rizzut 等^[9]研究发现,尽管胞质内 Ca²⁺ 浓度总是维持

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.09.027

作者单位: 510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院急诊医学科 中山大学心肺复苏研究所 [秦佳宏(中山大学在读博士研究生)、黄子通]

通信作者: 黄子通, Email: syxhzt@sina.cn

在很低的水平,但 MAMs 间存在局部高钙微区,内质网释放的 Ca^{2+} 在较短的扩散范围内保持较高浓度,从而被线粒体摄取。之后, Csordás 等^[11-12] 用外源分子制造更紧密的“人造”连接,使 MAMs 膜间距更近,发现线粒体内 Ca^{2+} 浓度明显升高,线粒体钙超载,大量促凋亡因子释放入胞质,诱导细胞凋亡;如果用蛋白酶水解使物理连接解离, MAMs 膜间距增大,线粒体则不能有效摄取 Ca^{2+} 。上述研究结果表明, MAMs 的异常,包括某些重要蛋白质缺失或膜间距变化,对于钙信号传导和线粒体功能具有重要影响。MAMs 不仅提供了细胞器间 Ca^{2+} 转运平台,而且将两者功能联系在一起,从多层次影响细胞生命活动^[13]。

有研究表明,线粒体和内质网之间的钙稳态失衡在神经退行性疾病的发病机制中起到重要作用,通过调控 MAMs 处的线粒体-内质网钙转运可以影响神经元的存活。例如,在亨廷顿疾病中亨廷顿突变蛋白与 MAMs 处的 IP3R 钙通道蛋白结合后导致线粒体膜渗透性转移通道敏感性增加,进而引起大量促凋亡因子释放,引起神经元凋亡^[10, 14]。

3.3 对线粒体形态的调节

Friedman 等^[15] 研究发现,线粒体分裂起始部位与 MAMs 位置高度重叠;通过电镜三维重构成像,管状内质网在线粒体分裂起始部位形成“缠绕”,内质网“缠绕”促使线粒体局部收缩,并逐步“募集”分裂相关蛋白 Drp1/Dnm1、MFF 等,最后将线粒体一分为二。

线粒体融合也受到 MAMs 相关蛋白的调控。线粒体融合蛋白 2 (MFN2) 在结构偶联中富集,一方面,它是重要的物理连接蛋白;另一方面,其本身也和线粒体融合蛋白 1 (MFN1) 共同调控线粒体融合。如果将其基因敲除,不仅会导致结构偶联解离,也会导致线粒体功能结构异常^[16]。

线粒体正常的动态分裂和融合保证了充足的线粒体能够在神经元细胞树突、轴突、突触以及神经纤维郎氏节部位聚集,并发挥其正常生理功能。MAMs 处相关线粒体分离/融合蛋白的异常或缺失会导致神经元突起及神经纤维形态和功能异常,从而引起相应的神经退行性疾病^[17-18]。

4 ERS 通过 MAMs 对线粒体的影响

神经系统疾病许多病理过程都伴随有 ERS 发生。此时,细胞自身通过 UPR 减少大多数蛋白质的合成,增强内质网的蛋白折叠功能,上调分子伴侣等靶基因的转录水平及促进内质网相关蛋白降解途径 (ER associated degradation, ERAD) 来减轻或终止 ERS。MAMs 作为内质网和线粒体间物质信息交流的节点和多功能交互平台,一方面,对 ERS 的启动及其反应水平具有重要调节作用。另一方面,ERS 也可以通过 MAMs 功能和结构的改变调控线粒体功能和代谢。笔者从以下几个方面进行讨论。

4.1 通过 Ca^{2+} 信号传导调控线粒体代谢功能

研究表明,ERS 早期阶段 MAMs 增加,促进 Ca^{2+} 在内

质网和线粒体间的转运^[19-20]。线粒体氧化呼吸链中几类脱氢酶都是钙依赖性的,而且 Ca^{2+} 在一定浓度范围内对线粒体功能起正调控作用^[21]。进入线粒体内 Ca^{2+} 流的增加,激活了三羧酸循环中钙依赖性脱氢酶,从而提高了线粒体氧化呼吸链活性,增强了线粒体代谢功能,ATP 产生增加。这个阶段,线粒体生物合成功能的增强一方面缓解了 ERS,另一方面增强了线粒体的适应性^[19, 22]。

然而,剧烈持久的 ERS 对 MAMs 的影响目前尚无定论,有报道称 MAMs 在这个时期明显减少^[23];亦有研究报道,剧烈持久的 ERS 在肥胖的糖尿病动物模型中通过增加 MAMs 部位,使更多的 Ca^{2+} 由内质网流入线粒体,内质网 Ca^{2+} 耗竭,而线粒体内 Ca^{2+} 超载、ROS 剧增、线粒体氧化呼吸功能受损、ATP 产生减少,线粒体内脂质和葡萄糖异常聚集,导致动物模型肝脂肪变性和葡萄糖耐量受损。阻断 Ca^{2+} 流或抑制 MAMs 物理连接蛋白 IP3R1 和 PACS-2 的表达后,线粒体葡萄糖和脂质代谢功能恢复,细胞稳态重建^[24]。

尽管目前已经有很多对 MAMs 结构和功能以及它调控内质网和线粒体相互作用的机制研究,但大都基于细胞水平,没有涉及完整的心肺复苏后脑功能障碍方面动物模型的研究。基于这些已有的病理生理机制的研究结果,笔者推测心脏骤停心肺复苏后全脑缺血-再灌注损伤诱导神经元产生剧烈的 ERS,可能在很大程度上恶化了神经元的缺血-再灌注损伤。还有待进一步研究验证以上假设。

4.2 通过 PERK 信号通路调控线粒体功能

PERK 是位于内质网膜上介导 UPR 的跨膜蛋白 (也称信号感受器) 之一,是内质网的 I 型跨膜丝/苏蛋白激酶,属于真核细胞翻译起始复合物 2 α (eIF2 α) 激酶家族成员。PERK 途径不仅是 UPR 的经典信号通路,而且还是 ERS 时线粒体蛋白质质量控制体系的重要组成部分,旨在调控线粒体内蛋白质稳态,防止错误折叠蛋白的过度聚集,减少由 ERS 带来的损伤,维持线粒体正常生理功能和细胞内环境稳态^[22]。

另外,PERK 和 MFN2 一起是 MAMs 的物理连接蛋白,对维持 MAMs 的稳定性起重要调节作用^[25]。MAMs 的完整是 PERK 发挥线粒体蛋白质质量控制作用的前提和保障。

线粒体在三个不同水平保持其蛋白的完整性:分子水平,细胞器水平和细胞水平。PERK 通路分别从这三个不同水平对线粒体蛋白质稳态进行调节^[22]。

4.2.1 PERK 调控分子水平的质量控制通路 轻度 ERS 时,PERK 诱导下游线粒体质量控制因子 LON 和 PERK 调控的转录因子 ATF4 的激活,通过转录和翻译机制直接增强线粒体保护功能,稳定线粒体蛋白质。LON 是线粒体蛋白质稳态的重要调控因子,激活后降解氧化损伤的线粒体蛋白,重组电子传递链复合物 IV,调控 mtDNA 转录,保护了 ERS 时线粒体蛋白质,使线粒体功能免受损害^[26-27]。

PERK 诱导 ATF4 激活其他线粒体质量控制因子,如分

子伴侣 HSPA9/GRP75, 同样起到稳定线粒体蛋白质的功能^[28]。包括输入新合成的蛋白质到线粒体中, 重新折叠线粒体基质中错误折叠或聚合的蛋白质, 通过 IP3R 和 VDAC1 增强 MAMs 与胞质的相互作用^[29-30]。PERK 也通过 eIF2a 磷酸化诱导的蛋白翻译减弱来影响线粒体蛋白质稳态, 减少新合成的未折叠蛋白的积累, 减轻蛋白质折叠压力^[31]。

通过 PERK 信号通路对线粒体蛋白质稳态的调控提示, MAMs 可能从分子水平上调控心肺复苏后全脑缺血-再灌注损伤。

4.2.2 PERK 调控细胞器水平的质量控制通路 ERS 引起的全线粒体功能障碍可以通过细胞器水平的质量控制通路纠正, 这个过程包括线粒体融合和分裂。线粒体融合能够从整体水平挽救受损线粒体。线粒体融合蛋白通过促进与内质网间的代谢物交换增强线粒体保护功能。另外, 线粒体分裂能使受损线粒体片段化, 并通过溶酶体自噬^[32]。

PERK 通过激活下游 ATF4 转录因子从而上调 E3 配体 Parkin 蛋白。Parkin 蛋白过表达后的保护作用有^[22]: (1) 增加了内质网和线粒体之间的 Ca^{2+} 交换, 从而增加线粒体自身生物合成功能; (2) 减轻 ERS 诱导的细胞死亡, 显示出 PERK 途径依赖的细胞保护作用; (3) 泛素化特地的蛋白酶; (4) 通过线粒体自噬清除受损线粒体等。ERS 时, 细胞通过 PERK 途径依赖的 Parkin 蛋白的表达后, 增加了细胞内蛋白质稳态来提高线粒体质量控制水平。可能从细胞器水平缓解了心肺复苏后脑功能障碍。

4.2.3 PERK 调控细胞水平的质量控制通路 强烈而持久的 ERS 超出以上两条通路的调控范围时, 通过细胞水平质量控制通路启动内质网介导的细胞凋亡途径^[33]。PERK 途径将 ERS 与细胞凋亡联系在一起, 通过 PERK 途径上调转录因子 CHOP 的表达。CHOP 能够促进 BCL-2 家族促凋亡蛋白的转录, 抑制促生存蛋白质的产生, 并使凋亡因子 Bax/Bak 聚集在线粒体外膜, 直接激活 Caspase。还有一些 CHOP 依赖的其他基因表达, 通过增加自由基产生诱导凋亡。最终, PERK 途径的下游调节因子 ATF4 和 CHOP 通过增加凋亡蛋白合成, 增加氧自由基产生和消耗 ATP 触发凋亡^[34]。

随着细胞水平的质量控制通路的激活, 神经细胞凋亡, 大量神经元细胞缺失, 可能使得复苏后全脑缺血-再灌注损伤引起的脑功能障碍向不可逆的方向发展。

5 展望

综上所述, ERS 时, 线粒体和内质网通过结构偶联相互作用为细胞的适应性反应提供了合适的信号网络结构基础。但是现有研究还没有涉及 MAMs 在心脏骤停心肺复苏全脑缺血-再灌注损伤模型中的相关探索。心肺复苏后脑缺血缺氧损伤引起剧烈的 ERS 时 MAMs 会做出些怎样的适应性改变? MAMs 作为一个多功能交互平台, 它的变化对心

肺复苏后脑神经元细胞内质网和线粒体的相关功能有何影响? MAMs 上是否存在作用靶点, 能够影响心肺复苏引起的 ERS, 从而降低对线粒体的损伤, 维持神经元细胞稳态, 减轻复苏后的脑功能障碍? MAMs 能否提供一个合适的治疗时间窗, 阻断凋亡发展, 减轻全脑缺血-再灌注损伤? 这将是笔者下一步开展的研究工作, 也希望有更多的学者致力于 MAMs 在心肺复苏后脑功能保护方面的探索, 突破目前复苏领域的瓶颈期。

参考文献

- [1] Rowland AA, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13 (10): 607-625. DOI: 10.1038/nrm3440.
- [2] 薛亮, 尹长城. 线粒体-内质网结构偶联的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2013 (12): 1791-1796. DOI: 10.11844/cjcb.2013.12.0288.
- [3] 许碧磊, 祝筱梅, 董宁, 等. 线粒体-内质网结构偶联与细胞免疫功能障碍 [J]. *生理科学进展*, 2016, 47 (1): 69-73.
- [4] Osman C, Voelker DR, Langer T, et al. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria [J]. *Cell Biol*, 2011, 192: 7-16. DOI: 10.1083/jcb.201006159.
- [5] Kornmann B, Currie E, Collins SR, et al. An ER mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen [J]. *Science*, 2009, 325 (5939): 477-481. DOI: 10.1126/science.1175088.
- [6] Stroud DA, Oeljeklaus S, Wiese S, et al. Composition and topology of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure [J]. *Mol Biol*, 2011, 413 (4): 743-750. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.09.012.
- [7] Voss C, Lahiri S, Young BP, et al. ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae* [J]. *Cell Sci*, 2012, 125 (20): 4791-4799. DOI: 10.1242/jcs.105635.
- [8] Hayashi T, Csordas FM. Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction [J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 77 (4): 517-528. DOI: 10.1124/mol.109.062539.
- [9] Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses [J]. *Science*, 1998, 280 (5370): 1763-1766.
- [10] Krols M, Isterdael GV, Asselbergh BW, et al. Mitochondria associated membranes as hubs for neurodegeneration [J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 131 (4): 505-523. DOI: 10.1007/s00401-015-1528-7.
- [11] Csordás G, Renken C, Varnai P, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria [J]. *Cell Biol*, 2006, 174 (7): 915-921. DOI: 10.1083/jcb.200604016.
- [12] Csordás G, Varnai P, Golenar T, et al. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface [J]. *Mol Cell*, 2010, 39 (1): 121-132. DOI:

- 10.1016/j.
- [13] Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, et al. Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787 (11): 1432-1451. DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.03.015.
- [14] Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, et al. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5 (8): 731-736. DOI: 10.1038/nn884.
- [15] Friedman JR, Lackner LL, West M, et al. ER tubules mark sites of mitochondrial division [J]. *Science*, 2011, 334 (6054): 358-362. DOI: 10.1126/science.1207385.
- [16] de Brito OM, Corrado L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria [J]. *Nature*, 2008, 456 (7222): 605-610. DOI: 10.1038/nature07534.
- [17] Nguyen TT, Ohwt SS, Weaver D, et al. Loss of Miro1-directed mitochondrial movement results in a novel murine model for neuron disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (35): E3631-3640. DOI: 10.1073/pnas.1402449111.
- [18] Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development [J]. *Cell*, 2006, 125 (7): 1241-1252. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.010.
- [19] Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, et al. Endoplasmic reticulum; ER stress regulates mitochondrial bioenergetics [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44 (1): 16-20. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.10.012.
- [20] Bravo R, Vicencio JM, Parra V, et al. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124 (Pt 13): 2143-1352. DOI: 10.1242/jcs.080762.
- [21] Giorgi C, De Stefani, Bononi A, et al. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum [J]. *Cell Biol*, 2009, 41 (10): 1817-1827. DOI: 10.1016/j.biocel.2009.04.010.
- [22] Rainbolt TK, Saunders JM, Wiseman RL. Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25 (10): 528-537. DOI: 10.1016/j.tem.2014.06.007.
- [23] Tubbs E, Theurey P, Vial G, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2014, 63 (10): 3279-3294. DOI: 10.2337/db13-1751.
- [24] Arruda AP, Pers BM, Parlakgul G, et al. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity [J]. *Nat Med*, 2014, 20 (12): 1427-1435. DOI: 10.1038/nm.3735.
- [25] Munoz JP, Ivanova S, Sanchez WJ, et al. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK [J]. *EMBO*, 2013, 32 (17): 2348-2361. DOI: 10.1038/emboj.2013.168.
- [26] Ngo JK, Davies KJ. Mitochondrial Lon protease is a human stress protein [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46 (8): 1042-1048. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.024.
- [27] Bender T, Leidold C, Ruppert T, et al. The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress [J]. *Proteomics*, 2010, 10 (7): 1426-1443. DOI: 10.1002/pmic.200800619.
- [28] Hori O, Ichinoda F, Tamatani T, et al. Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria; enhanced expression of Lon protease [J]. *Cell Biol Int*, 2002, 157 (7): 1151-1160. DOI: 10.1083/jcb.200108103.
- [29] Schmidt O, Pfammer N, Meisinger C. Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms [J]. *Cell Biol*, 2010, 11 (9): 655-667. DOI: 10.1038/nrm2959.
- [30] Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels [J]. *Cell Biol Int*, 2006, 175 (6): 901-911. DOI: 10.1083/jcb.200608073.
- [31] Baker BM, Nargund AM, Sun T, et al. Protective coupling of mitochondrial function and protein synthesis via the eIF2a kinase GCN-2 [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8 (6): e1002760. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002760.
- [32] Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress [J]. *Science*, 2012, 337 (6098): 1062-1065. DOI: 10.1126/science.1219855.
- [33] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13 (3): 184-190. DOI: 10.1038/ncb0311-184.
- [34] Han J, Back SH, Hur J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death [J]. *Cell Biol*, 2013, 15 (5): 481-490. DOI: 10.1038/ncb2738.

(收稿日期: 2017-02-19)

(本文编辑: 郑辛甜)