

线粒体自噬中 pink1 - parkin 途径 调控机制的研究进展

吴 优 卢中秋 姚咏明

摘 要 线粒体是调节细胞能量平衡和细胞死亡的重要细胞器,在内外环境影响下,受损、衰老的线粒体会对细胞生存造成严重的威胁。线粒体自噬(mitophagy)是指细胞选择性清除受损、衰老的线粒体,从而维持细胞内环境稳定。在帕金森病(Parkinson's disease, PD)的研究中发现, pink1 - parkin 途径参与膜电位降低引起的线粒体自噬的发生,对线粒体整个网络的功能完整性有着举足轻重的作用,然而其确切调控机制尚未明确。本文重点综述了近年来线粒体自噬中 pink1 - parkin 途径调控机制及其病理生理意义的研究进展。

关键词 线粒体;线粒体自噬; pink - parkin

中图分类号 R4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.046

业已明确,线粒体决定着细胞的生存与死亡,一方面通过氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)产生 ATP(adenosine triphosphate)提供细胞的能量需求,并通过钙离子通道将细胞质中的钙离子转运至线粒体储存,使细胞能够维持正常的功能;另一方面线粒体胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的异常累积以及产生凋亡相关蛋白,如细胞色素 C 和凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF),引起细胞受损以及诱导细胞死亡^[1]。此外,线粒体拥有单独的基因编码系统,因老化或者受损等因素引起的线粒体 DNA 突变由于线粒体基因构成的特殊性而不易修复,将带来严重的代谢性遗传性疾病。

线粒体自噬(mitophagy)是使细胞内线粒体的质量和数量保持平衡的一种调控机制,能及时清除功能障碍或多余的线粒体,在维持细胞稳态过程中具有重要意义。近年来的资料证实,线粒体自噬在不同致病因素、不同细胞中都有明显保护作用:①导致严重的遗传性疾病,例如线粒体肌病、脑病、乳酸酸中毒以及共振失调等疾病,线粒体自噬可选择性清除带有恶性基因突变的线粒体,从而减轻线粒体疾病^[2];②在脓

毒症诱发心肌收缩功能障碍的模型中,线粒体自噬使心排出量以及心肌酶得到明显的改善^[3];③在丙型肝炎病毒感染模型中观察到线粒体自噬体的形成,保护了感染的肝细胞和提高了动物生存率^[4]。由此可见,探讨线粒体自噬的调控机制有助于进一步了解疾病的发生机制,并为寻找新的治疗途径提供新的策略。

一、pink1 - parkin 途径与线粒体自噬

1. pink1 和 parkin 聚集于受损线粒体: Pink1 (PTEN - induced putative kinase protein 1)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,在正常情况下, pink1 通过线粒体外膜上线粒体外膜转运酶(translocase outer membrane, TOM)复合物作用,进入线粒体膜间腔;其后与内膜上的 TIM(translocase inner membrane)复合物相互作用,进一步转移至线粒体内膜上,被内膜上的早老素相关菱形蛋白(presenilin - associated rhomboid like protein, PARL)分解,将其降解,维持其低表达水平^[5,6]。 parkin (E₃ ubiquitin ligases)是一种 E₃ 泛素连接酶,首先具有连接酶的活性,共价连接泛素分子与底物并形成底物多聚泛素化链,使底物被蛋白酶识别并降解;其次通过单泛素化底物或由泛素内第 63 位的赖氨酸形成泛素化长链,调控信号通路^[7]。

当线粒体受损、衰老等状态下,线粒体膜电位下降, pink1 降解减缓或者消失,使 pink1 在线粒体外膜聚集。其后血浆中 parkin 亦聚集到受损的线粒体上,泛素化线粒体阴离子通道蛋白 VDAC1 (voltage - dependent anion channel 1)、融合蛋白酶 2 (GTPase mito-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81130035, 81372054);国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB518102)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院急诊医学中心(吴优、卢中秋);100048 北京,解放军总医院第一附属医院创伤研究中心(姚咏明)

通讯作者:卢中秋,电子信箱:lzq640815@163.com;姚咏明,电子信箱:c_ff@sina.com

fusin 2, Mfn2) 等,成为线粒体自噬诱导的信号,说明 pink1 的聚集与 parkin 聚集以及线粒体自噬存在明显的相关性。在飞行动物实验中发现,缺乏 pink1 或者 parkin 其中任何一种蛋白,导致线粒体功能障碍,而引起躯体肌肉神经症状。在 *Drosophila* 实验中,过表达 parkin 能够部分地弥补 pink1 敲除后所致功能障碍,而过表达 pink1 不能弥补 parkin 敲除后的功能障碍,证实在哺乳动物中 pink1 是 parkin 的上游蛋白。在后续碳酰氰间氯苯胺(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP)刺激 Hela 细胞的实验中证明, parkin 的聚集离不开上游的 pink1^[8]。虽然 pink1 在诱导 parkin 聚集至膜电位降低的线粒体上起到至关重要的作用,但是并非仅通过该途径来诱导 parkin 聚集。据报道,在缺乏 pink 基因的小鼠中,通过线粒体解偶联剂羰基-氰-对-三氟甲氧基本胺(carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone FCCP)依然可以诱导少量 parkin 聚集在去极化的线粒体上^[9]。Pink1 是如何诱导 parkin 聚集的确切机制尚不清楚,在 MEFs 细胞诱导线粒体自噬的实验中观察到, pink1 黏附于 parkin 并且磷酸化 parkin 的泛素区域 Ser65 (Serine 65),使其聚集到去极化的线粒体上并且泛素化下游的蛋白^[10]。但是上述结论目前仍存争议,有人研究相似条件下抑制 Ser65,发现 pink1 招募最终依然可以出现 parkin 聚集,说明其中可能存在磷酸化多个 E₃ 泛素连接酶相互作用,进而引起 parkin 的聚集,但具体过程尚未明确^[11]。值得指出的是,在损伤的线粒体上, Mfn2 在 pink1 氧化磷酸化作用下成为 parkin 的受体,诱导 parkin 聚集于线粒体,在 Mfn2 敲除后抑制了 parkin 的聚集^[12]。

2. pink1 - parkin 介导线粒体自噬:在哺乳动物细胞质杂交实验中观察得到,其细胞拥有野生型和线粒体基因突变型的线粒体, parkin 可选择性聚集在线粒体突变的线粒体上,并且将其清除^[2]。在帕金森病研究中,发现 pink1 和 parkin 编码基因的突变和受损的线粒体聚集的现象,进一步通过 *Drosophila* 基因学分析表明, pink1 - parkin 在调节线粒体功能完整性中发挥重要作用^[13]。因此, pink1 - parkin 与受损、老化线粒体的清除,维持线粒体网络的完整和细胞功能的正常有着重要意义。进一步探讨 pink1 - parkin 信号途径的作用证实, pink1、 parkin 不仅能募集到受损的线粒体上,而且线粒体随后出现了 LC3 (light chain 3) 阳性的自噬体和 LAMP1 (lysosomal - associated membrane protein 1) 阳性的溶酶体;然而在 pink1 和 parkin

基因分别敲除的情况下,自噬体和溶酶体均消失,提示 pink1 - parkin 途径对线粒体自噬的产生有着重要影响^[14]。此外,在细胞实验中敲除 pink1 反而没有抑制线粒体自噬,而是加强线粒体自噬,表明还有其他信号通道调控线粒体自噬,在 pink1 敲除的情况下,更加激发了其他途径的作用。由此可见,线粒体自噬是个多途径、多蛋白共同导致的一种清除受损、老化、多余线粒体的过程。

目前,关于 parkin 诱导自噬泡形成、发生线粒体自噬的方式仍是众说纷纭。有资料显示, VDAC1 和受体蛋白 SQSTM1 (ubiquitin - binding adaptor p62) 在 pink1 - parkin 介导的线粒体自噬中居重要地位:①在敲除 SQSTM1 基因后, FCCP 诱导下 parkin 阳性细胞中损伤的线粒体清除能力明显降低,受体蛋白 SQSTM1 通过募集到受损的线粒体上,随后 SQSTM1 与吞噬膜表面 Atg8 (autophagy - related gene 8) 同源蛋白 LC3 结合,从而诱导后续自噬泡的形成;② VDAC1 作为 parkin 形成多聚泛素链的目标蛋白,泛素化第 27 位赖氨酸,且在敲除 VDAC1 后 parkin 诱导的线粒体自噬明显下降,提示 VDAC1 与线粒体自噬密切相关。但是 SQSTM1、VDAC1 在 parkin 介导线粒体自噬中的确切作用尚未阐明,因为有资料显示,在 SQSTM1 缺乏的情况下依然可以产生线粒体自噬^[15-17]。有研究在 HEK293 细胞上采用 FCCP 诱导自噬,发现 Ambra1 (activating molecule in Beclin 1 - regulated autophagy, Beclin 1) 能够聚集在线粒体膜上形成 PI₃K (class III phosphatidylinositol 3 - kinase) 复合物,并通过受损线粒体与 LC3 结合形成吞噬泡^[18,19]。另据报道, Ambra1 可增强 parkin 诱导大量的线粒体自噬,在 parkin 缺乏时,大量 Ambra1 亦能诱导线粒体自噬的发生^[20]。并且细胞质中 SMURF1 (E₃ ubiquitin ligase) 在 parkin 诱导线粒体自噬过程中亦起着必要的作用,但其具体作用仍未阐明^[21]。

3. pink1 - parkin 途径与线粒体形态改变:生理状态下,线粒体通过细胞器内相关蛋白酶的融合和分裂来限制及延缓异常改变的积累,保证线粒体各项生理功能的正常进行,称之为线粒体的质量控制 (mitochondrial quality control, MQC)。线粒体的融合主要由线粒体外膜上的 Mfn2、Mfn1 和线粒体内上的 OPA1 (optic atrophy 1) 蛋白组成,而线粒体的分裂则主要由 Drp1 (dynamin - related protein 1) 组成, Drp1 本来是在细胞质中,当线粒体分裂时其被募集至线粒体

膜上和其他相关蛋白相互作用产生裂解^[22]。在果蝇的研究中发现, pink1 - parkin 途径与线粒体的融合与裂解有密切的关系, 过表达 Drp1 或者下调 Mfn2、OPA1 表达能够抑制 pink1 - parkin 突变导致的线粒体缺陷^[23]。然而在哺乳动物研究中得出了相反的结论, 例如在 SH - SY5Y 细胞中敲除 pink1 后引起线粒体的片段化, 而高表达 pink1 则增加线粒体的融合^[24]。但值得一提的是, 在果蝇和哺乳动物中, parkin 可以泛素化 Mfn2, 被相关的蛋白降解, 从未抑制线粒体的融合, 进而诱导后续线粒体自噬翻译。尽管融合蛋白酶的降解在线粒体自噬进展过程有着重要意义, 但是在没有融合蛋白酶的细胞中, pink1 - parkin 途径依然可以诱导线粒体自噬。

Miro (Rho - GTPase) 是线粒体的一种衔接蛋白, 可以铆钉驱动蛋白重链到线粒体膜上。pink1 促进 Miro 磷酸化后, 在 parkin 的作用下使 Miro 降解, 从而卸下驱动蛋白, 抑制线粒体的运动, 使得受损的线粒体处于一种隔离状态有利于线粒体自噬的开启。由此可见, 无论是线粒体融合/裂解的形态变化, 还是线粒体运动的机制变化对线粒体自噬来说是密不可分的重要反应。

当然, 线粒体自噬除了 pink1 - parkin 途径外, 还有 Bnip3/Nix (BH3 - only protein) 途径、线粒体外膜蛋白 FUNDC1 (the mitochondrial outer membrane protein) 介导的线粒体自噬。在不同刺激因素下, 多条通道共同介导了线粒体自噬, 维持了线粒体功能和形态的稳态以及细胞的正常新陈代谢。

二、线粒体自噬与疾病

线粒体自噬具有两面性, 即一方面正常范围内线粒体自噬可维持人体细胞的生理功能, 另一方面线粒体自噬水平过高和过低都会引发疾病。近年来研究发现, 线粒体自噬与人类多种疾病密切相关, 例如帕金森病、尼曼匹克病 (Niemann Pick disease, NPD)、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、慢性心力衰竭、肿瘤以及肌肉病变等。

1. 线粒体自噬与神经退行性病变: 由于脑是人体耗氧量最大的器官, 神经元内存在大量的线粒体对维持脑神经活性有着重要作用, 线粒体自噬能够清除受损线粒体而保护神经系统的发育与功能, 在神经元中是不可缺失的重要部分。在多种神经退行性疾病中, 例如帕金森病、尼曼匹克病、阿尔茨海默病等, 线粒体自噬状态发生紊乱, 伴随细胞的线粒体功能障碍, 神经元细胞的正常新陈代谢发生病理生理的改变。目

前认为帕金森病的主要机制是 pink1 - parkin 介导途径中 pink1、parkin 基因突变, 使线粒体自噬无法正常诱导, 导致神经元活性氧自由基的堆积以及凋亡系统的诱发对神经元细胞造成不可逆性损伤。

2. 线粒体自噬与肿瘤: 肿瘤是恶性细胞无限制的生长导致, 由于恶性细胞迅速分裂生长需要大量的能量, 线粒体是细胞能量提供的细胞器, 参与了肿瘤的发生与发展过程。线粒体自噬在肿瘤发生的早期阶段可以减少基因组损伤从而维持细胞正常, 在肿瘤发生后肿瘤细胞则通过线粒体自噬吞噬药物以及免疫效应反而获得了生存。Warburg 等研究发现, 肿瘤细胞缺氧产生的缺氧诱导因子促进线粒体自噬的 NIX/BNIP3 增加, 而肿瘤的增长受到了抑制, 说明线粒体自噬与肿瘤有密切的相关性, 在随后乳腺癌、上皮细胞肿瘤等癌症中也发现类似的现象, 线粒体自噬可抑制肿瘤的生长。

3. 线粒体自噬与心脏病: 心脏是全身血液循环动力来源, 心肌细胞同神经元一样需要大量能量的支持, 也是不可再生的细胞, 在心肌细胞有充足的线粒体分布。在脓毒症状态下常常诱发心肌受损, 心肌收缩力下降、心搏量降低、心肌酶水平升高, 最后造成心力衰竭。有资料证实, parkin 敲除细胞中心肌受损明显严重于未敲除 parkin 的心肌细胞, 说明 parkin 存在对心肌细胞具有保护效应; 进一步观察发现 parkin 与线粒体自噬密切相关, 提示线粒体自噬对于心肌损伤有保护作用^[3]。在小鼠心肌细胞缺血再灌注模型中发现, 他汀类药物主要通过线粒体自噬的诱导防止急性心肌损伤的发生与发展。

总而言之, 线粒体自噬与人类健康密切相关, 但是线粒体自噬的关键调控途径及其病理生理意义尚有待澄清; 目前对 pink1 - parkin 通路研究较多, 但其确切调控机制仍未完全明了。深入认识线粒体自噬的调控机制与关键环节, 将为相关疾病的防治开辟新途径。

参考文献

- Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics[J]. Annu Rev Pathol, 2010, 5: 297 - 348
- Suen DF, Narendra DP, Tanaka A, et al. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (26): 11835 - 11840
- Piquereau J, Godin R, Deschenes S, et al. Protective role of PARK2/Parkin in sepsis - induced cardiac contractile and mitochondrial dysfunction[J]. Autophagy, 2013, 9 (11): 1837 - 1851

(转第 130 页)

union of the posterior wall[J]. J Orthop Trauma, 2014, 28(7):377 – 383

- 10 Depre M, Ehrlich E, Van Hecken A, *et al.* Pharmacokinetics, COX – 2 specificity, and tolerability of supratherapeutic doses of rofecoxib in humans[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2000, 56(2):167 – 174
- 11 Pountos I, Georgouli T, Calori GM, *et al.* Do nonsteroidal anti – inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis [J]. Sci World J, 2012, 2012:606404
- 12 McCormack PL. Celecoxib: a review of its use for symptomatic relief in the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis[J]. Drugs, 2011, 71(18):2457 – 2489
- 13 Williams A. Should non – steroidal anti – inflammatory drugs be given to orthopaedic patients with fractures? [J]. Br J Hosp Med; Lond, 2007, 68(8):452
- 14 Dimmen S, Nordsletten L, Engebretsen L, *et al.* Negative effect of parecoxib on bone mineral during fracture healing in rats[J]. Acta Or-

thop, 2008, 79(3):438 – 444

- 15 Welting TJ, Caron MM, Emans PJ, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase – 2 impacts chondrocyte hypertrophic differentiation during endochondral ossification [J]. Eur Cell Mater, 2011, 22:420 – 36; discussion 436 – 437
- 16 Okada Y, Lorenzo J A, Freeman A M, *et al.* Prostaglandin G/H synthase – 2 is required for maximal formation of osteoclast – like cells in culture[J]. J Clin Invest, 2000, 105(6):823 – 832
- 17 Weinreb M, Shamir D, Machwate M, *et al.* Prostaglandin E₂ (PGE₂) increases the number of rat bone marrow osteogenic stromal cells (BMSC) via binding the EP4 receptor, activating sphingosine kinase and inhibiting caspase activity[J]. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2006, 75(2):81 – 90

(收稿日期:2016 – 06 – 15)

(修回日期:2016 – 07 – 24)

(接第 188 页)

- 4 Ou Jh J, Kim SJ, Syed GH, *et al.* Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of parkin and subsequent mitophagy[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(3): e1003285
- 5 Meissner C, Lorenz H, Weihofen A, *et al.* The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate pink1 trafficking[J]. Neurochem, 2011, 117(5): 856 – 867
- 6 Deas E, Plun – Favreau H, Gandhi S, *et al.* PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(5): 867 – 879
- 7 Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome – independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling [J]. Science, 2007, 315(5809): 201 – 205
- 8 Green DR, Narendra DP, Jin SM, *et al.* PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate parkin [J]. PLoS Biol, 2010, 8(1): e1000298
- 9 Sadoshima J, Kubli DA, Cortez MQ, *et al.* PINK1 is dispensable for mitochondrial recruitment of parkin and activation of mitophagy in cardiac myocytes[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0130707
- 10 Shiba – Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, *et al.* PINK1 – mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin – like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy [J]. Sci Rep, 2012, 2:1002
- 11 Shiba – Fukushima K, Arano T, Matsumoto G, *et al.* Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering[J]. PLoS Genet, 2014, 10(12): e1004861
- 12 Chen Y, Dorn GW. PINK1 – phosphorylated mitofusin 2 is a parkin receptor for culling damaged mitochondria[J]. Science, 2013, 340(6131): 471 – 475
- 13 Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, *et al.* Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(7): 4078 – 4083
- 14 Ashrafi G, Schlehe JS, LaVoie MJ, *et al.* Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1

and Parkin[J]. J Cell Biol, 2014, 206(5): 655 – 670

- 15 Ding WX, Ni HM, Li M, *et al.* Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species – mediated autophagy induction and Parkin – ubiquitin – p62 – mediated mitochondrial priming[J]. J Biol Chem, 2010, 285(36): 27879 – 27890
- 16 Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, *et al.* PINK1/Parkin – mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(2): 119 – 131
- 17 Narendra D, Kane LA, Hauser DN, *et al.* p62/SQSTM1 is required for Parkin – induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both[J]. Autophagy, 2014, 6(8): 1090 – 1106
- 18 Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, *et al.* The Parkinson – associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(6): 962 – 974
- 19 Van Humbeeck C, Cornelissen T, Hofkens H, *et al.* Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy[J]. J Neurosci, 2011, 31(28): 10249 – 10261
- 20 Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, *et al.* AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of Parkin and p62/SQSTM1 [J]. Cell Death Differ, 2015, 22(3): 419 – 432
- 21 Orvedahl A, Sumpter RJr., Xiao G, *et al.* Image – based genome – wide siRNA screen identifies selective autophagy factors[J]. Nature, 2011, 480(7375): 113 – 117
- 22 Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis[J]. Biol Chem, 2012, 393(7): 547 – 564
- 23 Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, *et al.* The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(5): 1638 – 1643
- 24 Dagda RK, Cherra SJ 3rd, Kulich SM, *et al.* Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission[J]. J Biol Chem, 2009, 284(20): 13843 – 13855

(收稿日期:2016 – 04 – 27)

(修回日期:2016 – 05 – 04)