·综 述·

线粒体 DNA 拷贝数与疾病

刘 誉,马祎楠*
(北京大学第一医院中心实验室,北京 100034)

【摘 要】 线粒体是人体中的重要细胞器,参与生物体的新陈代谢,线粒体DNA(mtDNA)拷贝数更是与糖尿病、心血管疾病、神经系统疾病和肿瘤等多种疾病密切相关。mtDNA突变常常导致多器官功能障碍,从而产生一系列的临床综合征。本文回顾近年来有关mtDNA拷贝数的文献,对mtDNA拷贝数及其调控机制、以及mtDNA与临床疾病的相关性等方面进行阐述。

【关键词】 线粒体DNA;拷贝数;调控;疾病
【中图分类号】 R363 【文献标识码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.06.0111

Mitochondrial DNA copy number and disease

LIU Yu, MA Yi-Nan*
(Central Laboratory, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

【Abstract】 Mitochondrion, an important organelle in human body, participates in the energy metabolism. Copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) is closely associated with diabetes, cardiovascular disease, nerve system disease and cancer *etc*, and mtDNA mutation often leads to multiple organ dysfunction, resulting in a series of clinical syndromes. This article reviewed the literatures concerning mtDNA copy number published in recent years, and elaborated the number, its regulative mechanism and the association with clinical diseases.

【Key words】 mitochondrial DNA; copy number; regulation; diseases
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81271256).
Corresponding author: MA Yi-Nan, E-mail: mayinan1014@163.com

线粒体是真核生物细胞内的重要细胞器,处于新陈代谢和生物能量转换的中心地位。核DNA和线粒体DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)共同编码呼吸链体系与氧化磷酸化过程中的多个相关因子,因此mtDNA的完整性对生物体各器官的正常生理功能具有重要意义。随着越来越多的mtDNA突变被发现,线粒体疾病的基因型、临床症状以及诊断治疗都得到了突飞猛进的发展,尤其是mtDNA的拷贝数与临床疾病的关系日益受到重视。

1 mtDNA拷贝数的定义

拷贝数是指某基因在某一生物的基因组中的个数。每个线粒体含有2~10个mtDNA拷贝数,每个细胞含有10~1000个线粒体,但不同组织细胞的线粒体数目有所差异,每个外周血单个核细胞、肌细胞和神经元中线粒体数目分别为223~854个、1075~2794个和1200~10 800个[1]。

2 mtDNA拷贝数及其调控

2.1 mtDNA的复制

哺乳动物的mtDNA是一个长度约为16.5 kb的结构紧密的双链闭合环状分子,外环为重链(H链),内环为轻链(L链),其mtDNA复制以D环复制方式为主。过去几十年,人们对mtDNA拷贝数进行了广泛的研究,发现mtDNA重链起始位点复制的开始必须有一个转录伴随的引物RNA结构复合体的合成,随后复制在线粒体DNA聚合酶γ(mitochondrial DNA polymerase γ,mtDNApolγ)、线粒体单链DNA结合蛋白(mitochondrial single-stranded-DNA-binding protein,mtSSB)等因子的作用下进行。

收稿日期:2015-11-10;**修回日期**:2015-12-14
基金项目:国家自然科学基金(81271256)
通信作者:马祎楠,E-mail:mayinan1014@163.com

在RNA引物合成过程中,RNA引物的成熟不仅需要RNA聚合酶(RNA polymerase,RNA pol),还需要一个重要的转录因子——线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA)的参与[2]。

2.2 mtDNA复制的调控

2.2.1 mtTFA mtTFA是由核基因编码的线粒体核心转录调控因子,属于高迁移率(high mobility group,HMG)蛋白家族,含有两个HMG盒(box)结构域[3]。线粒体启动子的起始由mtTFA的量调节,mtTFA通过结合在mtDNA轻、重链启动子的上游来促进mtDNA的转录[4]。mtTFA介导mtDNA含量增加的可能机制有两种:(1)mtTFA较高频率地结合于轻链启动子,提升转录介导的复制启始;(2)mtTFA结合全基因组,可能通过降低DNA的更新速率以稳定mtDNA的稳态水平。亦有学者认为[5],mtTFA大量且非特异地结合线粒体基因组,形成DNA环,引起超螺旋化,散在分布的点状蛋白-DNA结构形成类核。类核是线粒体基因组的功能单位,保证mtDNA免受多种损害。研究发现,mtTFA结合mtDNA,可对抗人β淀粉样蛋白(Aβ)1~42对人神经母细胞瘤细胞氧化呼吸链的损伤,原因可能是mtTFA过表达可维护线粒体类核结构及调节mtDNA拷贝数,从而改变细胞生存能力,降低细胞凋亡率,可见mtTFA可能与通过类核结构保护mtDNA免受氧化损伤有关,从而调控mtDNA拷贝数[6]。

2.2.2 mtDNApolγ mtDNApolγ是所有DNA聚合酶中唯一位于线粒体并参与mtDNA复制及修复的酶。mtDNApolγ由一个催化亚基(polγA)和两个附属亚基(polγB)组成,分别由不同的核基因编码。mtDNApolγ对mtDNA的调控在一定程度上受核DNA甲基化的影响,编码mtDNApolγ的核基因CpG岛上外显子2高度甲基化,影响该CpG岛下游的延伸及mtDNApolγ的前体mRNA选择性剪切和激活,抑制mRNA表达水平,从而影响mtDNA复制[7]。越来越多的研究表明,尽管人类线粒体疾病是由线粒体基因突变及线粒体DNA编码蛋白功能异常引起,但线粒体疾病的突变位点更多位于常染色体上,且由mtDNApolγ引起的突变最为常见[8]。其中研究最为深入的A467T突变可导致mtDNApolγ催化亚基的催化活性和DNA结合能力严重下降,并影响其与附属亚基的相互作用,从而使人类mtDNA不能正常合成,引起阿尔珀斯-胡滕洛迩综合征(Alpers-Huttenlocher syndrome,AHS)等线粒体疾病[9]。

2.2.3 mtSSB mtSSB在mtDNA复制起始以及链延伸过程中发挥重要作用。真核生物的mtSSB是一个13~18 ku的保守因子。研究发现,随着mtSSB有助于模板DNA的解链,复制过程中,mtSSB与中间体——单链线粒体DNA结合,以防止单链DNA再次复性或被DNA酶降解。同时mtSSB还可以促进mtDNApolγ的活性,保证mtDNA复制链正常延伸。mtSSB对mtDNApolγ的刺激作用随浓度变化,即低浓度的mtSSB对mtDNApolγ无作用,而阈值浓度刺激作用增强[10]。此外,mtSSB还可增强引物与模板DNA的识别,可提高mtDNA复制起始速率近30倍。故mtSSB对mtDNA复制起始阶段mtDNApolγ-模板-引物这一复合物的形成必不可少,且可增强复合物的稳定性[11]。

3 mtDNA拷贝数与疾病

3.1 mtDNA拷贝数与线粒体DNA耗竭综合征

线粒体DNA耗竭综合征(mitochondrial DNA depletion syndrome,MDS)是一种由核基因突变引起的常染色体隐性病,是由mtDNA拷贝数下降或缺失导致特异性器官或组织的线粒体氧化呼吸功能受损、能量生成障碍,进而引起的一系列临床症状的总称。根据临床症状,MDS可分为4个亚组:肝脑型、肌型、脑肌病型和神经胃肠道型[12]。MDS常常涉及突变的基因,包括TK2,SUCLA2,SUCLG1,RRM2B,DGUOK,MPV17,TYMP和POLG1,其中POLG1基因突变备受关注。POLG1基因位于15q24,编码唯一参与mtDNA复制和修复的mtDNApolγ。据统计,约有45个不同的POLG基因点突变和片段缺失都可引起AHS,467A>T和243G>C是POLG1突变引起AHS最常见的两个突变位点[13]。典型的AHS患者在幼年时期常表现为难治性癫痫、神经退行性病变和肝脏疾病。另一些AHS患者则出现精神萎靡、难治性癫痫、卒中样发作、肝脏病变及共济失调等症状,更有AHS患者表现为低血糖症、血乳酸升高和肝衰竭。这类患者通常在婴儿时期出现症状,且病情较重,生存率低[14]。

脱氧鸟苷酸激酶(deoxyguanosine kinase,DGUOK)缺失为常染色体隐性致病,临床症状分为肝脑型MDS和孤立性肝损害两种形式。DGUOK位于2p13,编码DGUOK[12],其可催化脱氧核糖核苷酸嘌呤碱基的磷酸化作用。其中一个引起MDS的DGUOK点突变为位于3号外显子313C>T,突变后

形成终止密码。其他突变还包括 34C > T,3G > A,494A > T 倒位,766-767insGATT 插入 444-62C > A 插入[15]。而引起孤立性肝损害的 DGUOK 基因突变主要有 137A > G 和 797T > G[16]。肝脑型 MDS 患者通常出现发育迟缓、头小畸形、肌张力下降、肝脾肿大、黄疸或胆道闭锁等;而孤立性肝损害患者最终可演变为肾功能不全[14]。

核基因 MPV17 位于 2p23-21,编码线粒体内膜的通道蛋白,MPV17 突变是引起肝脑型 MDS 最主要的原因。尽管有个别报道在成年人中检测出 MPV17 基因突变,但大部分患者都是新生儿和儿童,肝、脑受损是最明显的临床表现[17]。几乎所有患者都有肝功能不全症状、胆道闭锁、黄疸和凝血功能障碍,此外,喂养困难、低血糖、血乳酸升高、肌张力下降和生长发育迟缓也是常见表现[18]。

3.2 mtDNA 拷贝数与临床相关疾病

3.2.1 mtDNA 拷贝数与糖尿病 糖尿病性视网膜病变大鼠病程初期,线粒体损伤防御机制活跃,mtTFA、D-环区 mtDNA-mtTFA 复合物、mtDNApolγ 及 mtDNA 拷贝数升高。随病程进展,mtDNA 功能受损,mtTFA、mtDNA-mtTFA 复合物减少,mtDNA 拷贝数下降[19]。Nile 等[20]通过建立 MIN6 细胞系发现,在沉默 mtTFA 后诱导生成的细胞中,mtDNA 拷贝数下降 40%,mtDNA 拷贝数下降影响线粒体呼吸氧化功能和 ATP 生成,胰岛素分泌功能严重受损。

3.2.2 mtDNA 拷贝数与心血管疾病 已有文献报道[21],心力衰竭患者的心肌细胞中 mtDNA 拷贝数明显下降,氧化应激加重心力衰竭和心肌重塑,而线粒体内电子传递链正是氧化自由基的重要来源。在心肌梗死小鼠体内,过表达抗氧化基因过氧化物氧还酶(peroxiredoxin)-3(Prx-3)和 mtTFA 可在一定程度上提高心力衰竭患者的 mtDNA 拷贝数,延缓病理性心肌重塑,提高小鼠生存率。Ikeda 等[22]发现,在过表达 mtTFA 和 Twinkle 解螺旋蛋白(由位于常染色体 10q24 的 C10orf2/PEO1 基因编码,参与 mtDNA 复制过程的解螺旋过程)的小鼠中,mtDNA 拷贝数增加 2 倍,且减轻了离心性心肌肥大中的心肌损伤。因此,增加 mtDNA 拷贝数成为治疗氧化应激介导的心肌损伤的新途径。

3.2.3 mtDNA 拷贝数与神经系统疾病 mtTFA 过表达能抑制 Aβ 引起的呼吸链活性降低、ATP 和细胞色素 C 氧化酶含量减少,保护mtDNA免受 Aβ 的毒性作用。在亨廷顿病(Huntington disease,HD)发病机制中,过氧化体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1α(peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α,PGC-1α)受损引起的线粒体功能障碍受到重视,mtTFA是 PGC-1α 通过下游调控因子和核呼吸因子(nuclear respiratory factor-1,NRF-1)调节线粒体功能的最重要靶点之一。在 HD 转基因小鼠的肌肉、纹状体和 HD 患者的肌肉活检中,均观察到明显的 PGC-1α 表达下降及相应的 NRF-1 和 mtTFA 表达下降。

3.2.4 mtDNA 拷贝数与肿瘤 线粒体对许多致癌因素敏感,mtDNA 拷贝数的变化与多种肿瘤的发生、发展具有相关性。Sun 等[23]通过检测 139 名子宫内膜癌患者外周血发现,其 mtDNA 拷贝数明显高于对照组,在患子宫内膜癌的高危因素中,高血压、糖尿病和肥胖也与细胞中 mtDNA 的低拷贝数密切相关。据 Melkonian 等[24]报道,细胞中 mtDNA 低拷贝数增加肾细胞肾癌的发生率,尤其在女性、年龄 <60 岁以及有高血压病史的患者中相关性更强。mtDNA 拷贝数与某些肿瘤分化程度成反比。过去认为乳腺癌患者 mtDNA 拷贝数减少,但 Xia 等[25]发现Ⅰ期乳腺癌患者 mtDNA 拷贝数呈低水平,而Ⅱ~Ⅳ期患者则增高,这可能与 mtDNA 受活性氧自由基(reactive oxygen species,ROS)不断攻击、复制增强以及代偿能量需求有关。

3.3 mtDNA 拷贝数与线粒体 A3243G 突变

细胞中野生型 mtDNA 拷贝数含量与线粒体的氧化功能密切相关,Liu 等[26]通过检测 115 名带有线粒体 A3243G 点突变患者的外周血细胞和尿液细胞发现,尿液细胞中野生型 mtDNA 拷贝数与疾病复杂程度呈负相关,即野生型 mtDNA 拷贝数越多,患者临床症状越单一、病情越轻;随着患者的临床表型(如癫痫、智力低下、卒中、肌无力、头痛等)复杂程度加重,血液及尿液的野生型拷贝数逐渐减少,而突变比例逐渐增加,但听力下降和糖尿病的发病率却是降低的。除此之外,尿液中和血液中突变型 mtDNA拷贝数也是判断 A3243G 患者疾病复杂程度的重要指标。这一发现表明,线粒体拷贝数变异为揭示线粒体疾病的临床表型差异奠定了基础。

4 治疗与药物

对于线粒体疾病,至今尚未发现有效的治疗方法,临床上一般采用药物或支持性疗法来缓解患者的症状,如补充维生素、改善营养、治疗癫痫发作、调节血乳酸水平、外科矫正上睑下垂症等。目前,临床上针对 A3243G 突变引起的乳酸酸中毒及卒中样发

作的线粒体脑肌病多采用鸡尾酒疗法,即联合应用多种抗氧化剂和维生素及辅因子。

综上所述,线粒体转录因子作为线粒体转录和复制的重要调节子,mtTFA的缺失可导致mtDNA拷贝数的减少和严重的呼吸链缺陷,mtTFA的过表达可显著改善线粒体的功能缺陷,进而起到缓解疾病的作用。进一步了解mtTFA在细胞内的调控对于线粒体疾病的治疗有重要意义。mtTFA的多态性不仅与疾病相关,还与个体的体能和寿命相关,因此,mtTFA可作为疾病治疗和改善机体功能的一个潜在靶点。

【参考文献】

[1] Xing J, Chen M, Wood CG, *et al*. Mitochondrial DNA content: its genetic heritability and association with renal cell carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(15): 1104-1112.

[2] Moraes CT. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells[J]? Trends Genet, 2001, 17(4): 199-205.

[3] Peng H, Chen P. Current situation and progression in the research of mitochondrial transcription factor A[J]. Int J Respir, 2010, 30(17), 1074-1080.[彭 红, 陈 平. 线粒体转录因子A的研究现状及进展[J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(17), 1074-1080.]

[4] Zhang JL, Zhang YJ, Wang J, *et al*. Mitochondrial transcription factor A and related disease[J]. Chin J Cell Biol, 2013, 35(5): 712-719.[张纪亮, 张宜家, 王 杰, 等. 线粒体转录因子A及其相关疾病[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 712-719.]

[5] Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(9-10): 921-929.

[6] Xu S, Zhong M, Zhang L, *et al*. Overexpression of Tfam protects mitochondria against beta-amyloid-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells[J]. FEBS J, 2009, 276(14): 3800-3809.

[7] Kelly RD, Mahmud A, Mckenzie M, *et al*. Mitochondrial DNA copy number is regulated in a tissue specific manner by DNA methylation of the nuclear-encoded DNA polymerase gamma A[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(20): 10124-10138.

[8] Maier D, Farr CL, Poeck B, *et al*. Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(4): 821-830.

[9] Ding YZ. Research progress in POLG mutations[J]. Med Recapitulate, 2012, 18(3): 344-347.[丁一宗. DNA聚合酶γ基因突变研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(3): 344-347.]

[10] Ciesielski GL, Bermek O, Rosado-Ruiz FA, *et al*. Mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins stimulate the activity of DNA polymerase γ by organization of the template DNA[J]. J Biol Chem, 2015, 290(48): 28697-286707.

[11] Miralles Fusté J, Shi Y, Wanrooij S, *et al*. *In vivo* occupancy of mitochondrial single-stranded DNA binding protein supports the strand displacement mode of DNA replication[J]. PLoS Genet, 10(12): e1004832.

[12] Nogueira C, Almeida LS, Nesti C, *et al*. Syndromes associated with mitochondrial DNA depletion[J]. Ital J Pediatr, 2014, 40: 34.

[13] de Vries MC, Rodenburg RJ, Morava E, *et al*. Multiple oxidative phosphorylation deficiencies in severe childhood multi-system disorders due to polymerase gamma (POLG1) mutations[J]. Eur J Pediatr, 2007, 166(3): 229-234.

[14] Finsterer J, Ahting U. Mitochondrial depletion syndromes in children and adults[J]. Can J Neurol Sci, 2013, 40(5): 635-644.

[15] Brahimi N, Jambou M, Sarzi E, *et al*. The first founder DGUOK mutation associated with hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome[J]. Mol Genet Metab, 2009, 97(3): 221-226.

[16] Mousson de Camaret B, Taanman JW, Padet S, *et al*. Kinetic properties of mutant deoxyguanosine kinase in a case of reversible hepatic mtDNA depletion[J]. Biochem J, 2007, 402(2): 377-385.

[17] Löllgen S, Weiher H. The role of the Mpv17 protein mutations of which cause mitochondrial DNA depletion syndrome (MDDS): lessons from homologs in different species[J]. Biol Chem, 2015, 396(1): 13-25.

[18] Uusimaa J, Evans J, SmithC, *et al*. Clinical, biochemical, cellular and molecular characterization of mitochondrial DNA depletion syndrome due to novel mutations in the MPV17 gene[J]. Eur J Hum Genet, 2014, 22(2): 184-191.

[19] Santos JM, Tewari S, Kowluru RA. A compensatory mechanism protects retinal mitochondria from initial insult in diabetic retinopathy[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(9): 1729-1737.

[20] Nile DL, Brown AE, Kumaheri MA, *et al*. Age-related mitochondrial DNA depletion and the impact on pancreatic Beta cell function[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115433.

[21] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure[J]. Circ J, 2008, 72(Suppl A): 31-37.

[22] Ikeda M, Ide T, Fujino T, *et al*. Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119687.

[23] Sun Y, Zhang L, Ho SS, *et al*. Lower mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes increases the risk of endometrial cancer[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(6): 1111-1117.

[24] Melkonian SC, Wang X, Gu J. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood leukocytes and the risk of clear cell renal cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2015, 36(2): 249-255.

[25] Xia P, An HX, Dang CX, *et al*. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer[J]. BMC Cancer, 2009, 9: 454.

[26] Liu H, Ma Y, Fang F, *et al*. Wild-type mitochondrial DNA copy number in urinary cells as an useful marker for diagnosing severity of the mitochondrial diseases[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e67146.

(编辑:吕青远)