

自由基和基因突變與人類老化的關係

魏耀揮

國立陽明大學生化研究所

一、我們為什麼會老化？

老化是動物或人體逐漸喪失各器官和組織的正常功能，導致個體本身容易罹患疾病、活力降低，而終至死亡的過程。導致人體老化的因素很多，自古以來就有不少王卿將相和士紳富豪積極尋求長生不老之術，生物醫學研究者和臨床醫師更是不斷地探究老化的原因及抗衰老的祕訣。近百年來，有關老化的研究以及被提出的有關老化的假說多不勝數，眾說紛紜，莫衷一是。而這些假說歸納起來大致可以分成兩大類：

1. 基因決定論：屬於這一類的假說倡言老化是生命中不可避免的遭遇，這派學者認為，老化是一個命定（programmed）及不可逆轉的（irreversible）過程，而控制這個過程的訊息或基因在生命誕生之時就已記載在每一個體的 DNA 中了。基本上，這一派的科學家認為老化是生物發展（development）過程的晚期。的確，有一些與生物對壓力的反應或 DNA 代謝有關的基因（泛稱老化基因，senescence gene）已被證實在老化過程中發生了質和量的變化。
2. 錯誤累積論：這一類的假說倡言老化是生物體內的生化分子損傷不斷累積的結果。這一派的學者認為生物在發展成長的過程中，體細胞不斷累積內源性（endogenous）和外源性（exogenous）破壞因子對組織器官的傷害；當組織細胞內的損傷累積至一定量並嚴重影響維持其生命的各種基本功能時，組織器官就發生病變以導個體的死亡。上述之氧化代謝所產生的活性氧分子（reactive oxygen species，簡稱 ROS）屬於內源性破壞因子，而外源性因子則包括病毒、細菌、紫外線、輻射線、藥物、毒物及環境污染物等。

動物和人體細胞粒線體處在一個充滿 ROS 及自由基的高氧壓環境，而參與製造呼吸酵素的粒線體 DNA 則位於產生 ROS 及自由基最旺盛的粒線體內膜上，因此粒線體內膜上的呼吸酵素系統必然會受到極高程度的氧化性破壞。近幾

年來，我們和國外的研究者分別觀察到人類肌肉和肝臟細胞粒線體功能隨著年紀增加而下降的現象，尤其是在能量消耗較大的器官（如：腦、骨骼肌、心肌和肝臟），這種下降的趨勢特別明顯，而這些器官生理功能的衰退也是老化初期最先顯現的癥狀（肌肉無力或記憶力衰退等）。為了探究粒線體呼吸功能隨著老化而下降的基本原因，我們和幾個國外的研究室乃自 1990 年開始探究粒線體內在老化過程中遭受破壞的生化分子。我們首先鎖定高突變率的粒線體 DNA，運用各種分子生物學技術有系統地偵測老年人組織之細胞粒線體 DNA 可能發生的突變。另一方面，我們也發展了一套半定量 PCR 技術來分析人體各組織中的突變型粒線體 DNA 之含量。過去十餘年來的研究顯示：粒線體 DNA 突變的確在人類以及其他動物的老化過程中扮演了極為重要的角色。

二、粒線體是人類細胞產生自由基的主要部位

自從 Albert Lehninger 教授和他的學生 Eugene Kennedy 在 1948 年成功地自大白鼠肝細胞分離純化出具有完整結構與功能的粒線體以來，生物能量學（bioenergetics）領域的學者一直都將此一領域的焦點放在粒線體的呼吸與氧化磷酸化作用的機制及其調節的研究上。經過四十餘年的努力，許多一流的生物化學及生物物理學家合作闡明了細胞合成 ATP 的分子機轉。二十餘年來，學界已普遍接受了英國生物化學家 Peter Mitchell 在 1961 年所提倡的化學滲透學說（chemiosmotic theory），認為粒線體是靠著電子傳遞過程所泵出的氫離子所形成的電化學電位差來驅動 ATP 的合成。然而，粒線體具有另一些鮮為人知的危險特性。事實上，動物及人類細胞內百分之九十以上的氧是由粒線體所消耗掉，而其中百分之一到百分之五的氧分子在正常生理情況下會轉變成 ROS。此外，粒線體的電子傳遞鏈也會不斷地產生其他的自由基，包括 ubisemiquinone 及 flavosemiquinone 等有機物半醌基。據保守的估計，粒線體內的自由基濃度經常維持在 10^{-11} M 左右。粒線體內膜含有很豐富的不飽和脂肪酸，在自由基和 ROS 的攻擊下會發生脂質過氧化（lipid peroxidation）的反應，其終產物丙二醛（malondialdehyde）的含量遠高於細胞其他部位的含量。更值得注意的是：粒線體 DNA 不具組織蛋白（histones）或其他的 DNA 結合蛋白質（DNA binding proteins），而卻處在充滿 ROS 及自由基的環境中。因此，過去幾年來科學家已發現：粒線體 DNA 遭受 ROS 或自由基破壞而產生的 8-羥去氧鳥苷酸（8-hydroxy 2'-deoxyguanosine, 8-OHdG）的含量比核 DNA 高出 80-200 倍。這些發現顯示粒線體比細胞其他任何部位（或胞器）承受了更高的氧化壓力（oxidative stress），自然地也就遭受較多的自由基損傷（free radical damage）。除此之外，有不少研究顯示：粒線體 DNA 的複製缺乏校讀的機制（proof-reading machinery），而且粒線體也不具備有效的 DNA 修補（DNA repair）功能。綜合以上的這些原因，粒線體 DNA 不斷地遭受到來自正常氧化代謝副產物 ROS 及其他自由基的攻擊，因而發生突變（mutation）的機率也就相當的高。事實上，已有研究指出人類粒線體

DNA的突變(或演化)速率大概是核DNA的17倍,而且粒線體DNA遭受氧化破壞的程度高並持續相當長的一段時間(不易修補)。

三、活性氧與自由基催化的化學反應

在生物體組織細胞內,由金屬蛋白質解體(degradation of metalloproteins)所釋放出來的銅和鐵可以透過一種稱為Fenton reaction的作用方式催化活性氧分子的產生。人和動物體細胞內最容易發生的是過氧化氫與還原態的銅離子(Cu^+)或鐵離子(Fe^{2+})反應而產生氫氧自由基(hydroxyl radicals)。在這個反應中,過氧化氫當作氧化劑,銅離子(Cu^+)或鐵離子(Fe^{2+})當作還原劑:



此外,游離輻射及紫外線的照射也可以產生氧自由基及有機物自由基(organic free radicals)。最近二十多年來的生化研究證實某些含鐵離子的氧化氫(oxidase)及加氧氫(oxygenase)在進行催化作用的同時也會產生氧自由基。肝臟進行解毒代謝反應時,為增加異物(外來物)的水溶解性而便於排出體外,常會運用NADPH:細胞色素P-450氧化氫(NADPH:cytochrome P-450 oxidase)催化毒物與外來物的氫氧化反應(hydroxylation),也會產生過氧化氫和氧自由基。

四、活性氧與自由基的生物毒性

氫氧自由基是所有活性氧分子中對生物體最具破壞性的自由基,因為它祇含有一個不配對電子(unpaired electron),非常不穩定,具有極高的化學反應性(high chemical reactivity)。它可以迅速攻擊生物體組織細胞中的蛋白質、脂質和核酸等重要的生化分子。蛋白質分子中的離氨酸(lysine)、組氨酸(histidine)及酪氨酸(tyrosine)等氨基酸最容易遭受氧化性修飾(oxidative modification)而破壞。通常,蛋白質和酵素會因遭受氧化性修飾而降低或完全喪失活性。細胞膜上的脂質通常含有相當多的不飽和脂肪酸,會在氫氧自由基的攻擊下發生脂質過氧化反應,產生含有活化態氧的脂肪酸自由基(fatty acid radicals),不但破壞細胞膜的微結構,也會降低細胞膜的流質性(membrane fluidity)而影響其正常的生化功能。

還原態的銅離子(Cu^+)可以直接與DNA分子反應而造成DNA雙股斷裂,但是最具傷害性的是還原態的銅離子(Cu^+)與氧氣分子反應而產生的氫氧自由基(hydroxyl radicals)。氫氧自由基攻擊DNA可以造成核糖核酸的氧化性修飾(oxidative modification),不但產生8-hydroxy 2'-deoxyguanosine (8-OHdG),並可進一步誘發基因突變(如:點突變或斷裂突變)。

五、與老化有關的粒線體DNA突變

早在 1988 年我們就發現人類肝臟細胞的粒線體呼吸酵素複體 I 及複體 IV 的活性隨年紀的增加而下降得特別顯著，但呼吸酵素複體 II 及複體 III 的活性在老化過程中卻沒有明顯的變化。此一觀察提供了一項極為重要的訊息：粒線體 DNA 的突變很可能是導致粒線體呼吸功能下降的主要原因，因為呼吸酵素複體 I 和 IV 各有 7 個及 3 個多胜肽是來自粒線體 DNA 上的基因表現，而呼吸酵素複體 III 祇有 1 個蛋白質（細胞色素 b）是粒線體 DNA 的基因產物，呼吸酵素複體 II 的所有組成多胜肽皆來自核 DNA 上的基因表現。那時我們已瞭解粒線體 DNA 遠比核 DNA 要容易發生突變，所以乃積極找尋與老化有關的粒線體 DNA 突變。

首先，我們運用所謂的聚合鏈鎖反應（polymerase chain reaction, PCR）及許多精心設計的核糖酸引子（primers）選擇性地增量粒線體 DNA 的某些特殊片斷。譬如：為了偵測位於核糖酸位置（nucleotide position, np）7901 到 np13928 之間的粒線體 DNA 斷損（mitochondrial DNA deletion），我們設計了四組的引子，運用一種所謂的引子位移 PCR 的技術確證了一個在老年人組織中最為常見的粒線體 DNA 斷損突變，其大小為 4,977 bp 長，稱為常見斷損突變（common deletion）。運用類似的分子生物學技術，我們陸續發現許多不同種類的斷損突變，其大小及斷損位置都不太一樣。迄今我們及國外的研究室已發現至少有二十餘種與人類老化有關的粒線體 DNA 斷損突變。而且，我們發現這些斷損突變的粒線體 DNA 發生頻率（frequency of occurrence）隨著年齡的增加而明顯地提高。另一方面，我們發展了一種以系列稀釋法為基礎的半定量 PCR 技術

（semi-quantitative PCR），對特定的斷損突變粒線體 DNA 進行定量分析。結果，我們發現各種人體組織中的斷損突變粒線體 DNA 的相對含量（proportion）隨著年齡的增加而呈指數級數的增加（exponentially increased）。除此之外，有德國 Münscher 等人及澳洲的 Linnane 與其同僚分別證實粒線體 DNA 在 np8344 及 np3243 所發生的 A→G 點突變（point mutation）在肌肉組織中的含量隨著年齡的增加而升高。這些與老化有關的斷損突變或點突變皆已被證實會損害粒線體 DNA 上的基因表現，因而間接破壞了粒線體的呼吸和氧化磷酸化的功能。

此外，我們運用一種謂的“背對背引子”（back-to-back primers）和 PCR 技術，首度發現人類粒線體 DNA 在老化過程中有數種序列重複突變（tandem duplication）的發生；而且，其中有五種突變出現的頻率和含量已證實會隨著老化而增加。由於這些序列重複突變都發生在控制粒線體 DNA 複製和基因表現的 D 環區域（D-loop region），我們推測這些序列重複突變會因為干擾粒線體 DNA 的複製而使每個細胞的粒線體 DNA 拷貝數變少，而且也會因為影響粒線體 DNA 上的基因表現而使呼吸酵素的生合成受到抑制或減緩，間接損害了粒線體的能量代謝功能。綜合這一系列的研究，我們確證：粒線體 DNA 的各種類型之突變，不論是單獨或合併發生，都隨著人體的老化而逐漸累積於各種組織器官中。當這些突變型粒線體 DNA 的含量達到一個閾值（threshold）的時候，粒線體的呼吸

酵素功能就發生顯著的缺陷，使得 ATP 合成的效率不敷細胞的能量需求，進而嚴重影響組織器官的正常生理功能，終至暴露出老化的徵兆 (aging signs)。值得一提的是：上述的這些粒線體 DNA 點突變和斷損突變無法在嬰兒和青少年的組織細胞中被偵測到，祇有在 30 歲以上的成人才開始發生並逐漸累積，而且在 60 歲之後以指數級數的方式急遽增加。所以，我們認為粒線體 DNA 的突變是動物和人類老化最早的徵兆。

六、與老化有關之其他重要的基因突變

由於分子生物學技術的進步，生命科學研究者再最近十年來已經在數種生物發現許多與老化有關的基因。其中以下列幾種基因最常被發現與老化有關：(1) 維持 DNA 完整性的酵素，其中以在 DNA 複製過程維持 DNA 分子兩端的完整之端粒酶(telomerase)與老化最有關係；(2) 參與重要基因表現及其調解之基因，如轉錄因子及一些蛋白質激酶(protein kinases)及磷酸酶(phosphatases)；(3) 參與能量代謝(如：一個影響線蟲壽命的 cytochrome b 基因點突變)及其調解之基因，如與糖解代謝或粒線體能量代謝相關的酵素；(4) 參與各種壓力反應及其調解之基因，如熱休克蛋白及參與氧化壓力反應(oxidative stress response)的酵素或蛋白質；(5) 參與細胞生長或分化及其調解之基因，如參與細胞週期(cell cycle)調控的蛋白質、調控因子或酵素；(6) 參與細胞內各種生化分子損傷(蛋白質氧化或 DNA 氧化性損傷)的修補酵素。

七、粒線體 DNA 突變與皮膚老化

我們曾大規模篩檢了二百多個人類皮膚檢體的粒線體 DNA。結果發現老年人的皮膚細胞的自由基清除酵素活性顯著降低。令我們十分驚訝的是老化皮膚組織的粒線體 DNA 發生突變的種類及相對含量比同年齡層個體的肝臟、肌肉和睪丸組織中的突變型粒線體 DNA 的種類及含量要高出甚多。別一方面，我們分別對被曝曬 (exposed) 及不被曝曬 (non-exposed) 部位的皮膚進行粒線體 DNA 突變的分析，結果發現被曝曬皮膚的粒線體 DNA 突變頻率和含量遠比非曝曬部位的皮膚要來得高。有趣的是，從同一個人身上所取得的曝曬皮膚所含之突變型粒線體 DNA 皆顯著高於非曝曬皮膚的含量；在有些案例中，我們發現被曝曬皮膚的 4,977bp 突變型粒線體 DNA 甚至佔了粒線體 DNA 總量的 50% 以上(這還不包括其他種類的 DNA 突變)！這些研究結果顯示：陽光紫外線照射(可產生自由基)對人類皮膚造成相當明顯的氧化性破壞。因此，光照引起的皮膚老化(photoaging)比起生理性的老化 (physiological aging) 要嚴重得多；這表示減少陽光紫外線的氧化傷害可以幫助保持皮膚的健康。

八、尿毒症患者血液透析與氧化性損傷

最近五年來，本研究室與台北榮民總醫院腎臟科唐德成醫師及台中光田綜合醫院腎臟科林柏松醫師合作，收集血液透析尿毒症病患及正常人的血液，以離心法分離血漿和些血球，分別進行抗氧化劑濃度及自由基清除酵素活性的分析。我們發現：血液透析病患的紅血球細胞中的抗氧化劑濃度(包括維生素 C, E 及穀胱甘肽)及自由基清除酵素活性(包括 Cu,Zn-SOD, catalase 及 glutathione peroxidase)都比正常人的相對值有顯著性的降低。而且血液透析患者血漿中的脂質過氧化物與 DNA 氧化性破壞產物 8-OHdG 以及紅血球細胞的脂質過氧化反應產物丙二醛也較正常人高。值得注意的是：以鐵劑和造血激素(erythropoietin)合併治療的病人若血液中鐵離子太高(iron overload)則會引起病人體內氧化壓力及氧化性破壞的增加。然而，我們發現運用經維生素 E 表面處理過的血液透析膜(Vitamin E-bonded membrane dialyzer)進行血液透析，可以有效降低患者血漿中的 DNA 氧化性破壞產物 8-OHdG 及紅血球細胞的脂質过氧化物的含量。因此，我們認為在血液透析系統中添加適量的抗氧化劑(維生素 C, E)可以減輕血液透析病人體內氧化壓力及氧化性破壞(譬如：紅血球細胞的損傷與溶血現象)，避免或降低長期接受血液透析治療的患者發生一些常見的併發症(譬如：粥狀動脈硬化症)，不但可以提升血液透析病人的生活品質，還能夠延長病人的壽命。

九、結論

雖然粒線體在細胞中負責製造 ATP 以供應動物及人體各組織器官執行其生理功能所需的能量，但卻也持續地製造 ROS 及自由基等高反應性的代謝副產物。這些頗具傷害性的副產物通常可以被細胞本身的抗氧化劑(如：穀胱甘肽及維生素 C 和 E 等)和自由基清除酵素(free radical scavengers)如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)等所中和而排除，因而不會對細胞造成傷害。然而，在老年人的組織細胞或接受血液透析治療的罹患尿毒症的病人血液中，抗氧化劑的含量降低及自由基清除酵素系統的缺陷可造成細胞內 ROS 及自由基增加，並破壞細胞內(特別是粒線體)的 DNA、RNA、脂質及蛋白質等生化分子。這種伴隨正常生物氧化代謝所衍生來的氧化性破壞，通常是無法避免也不容易介入調控。然而，外源性的氧化性破壞則大多為環境因子(如：陽光曝曬、空氣及飲水或食物中之污染物、藥物及毒物等)所造成，應該盡可能防止其侵害皮膚和人體其他的組織和器官。近幾年來的許多研究顯示：人類老化和一些老年性退化疾病的發生與人體某些器官或組織中的促氧化物/抗氧化物之平衡失調

(pro-oxidant/anti-oxidant imbalance)有密切的關係。因此，從食物中攝取足量的抗氧化劑和避免外源性的促氧化物接觸或進入人體，以防止 ROS 或自由基破壞粒線體 DNA 及核 DNA，將可防止組織細胞的氧化性損傷，延長你我充滿活力的青春歲月。

十、參考文獻

1. 馮清榮、魏耀揮 (1985) 粒線體老化理論。科學月刊第二十六卷第十二期，1022-1032.
2. Wei, Y. H., Lu, C. Y., Lee, H. C., Pang, C. Y., and Ma, Y. S. (1998) Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Annals of the New York Academy of Sciences* **854**:155-170.
3. Wei, Y. H. (1998) Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **217**:53-63.
4. Lu, C. Y., Lee, H. C., Fahn, H. J., and Wei, Y. H. (1999) Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutation Research* **423**:11-21.
5. Tarng, D. C., Wei, Y. H., Huang, T. P., Kuo, B. I. T., and Yang, W. C. (1999) Intravenous ascorbic acid as an adjuvant therapy for recombinant erythropoietin in hemodialysis patients with hyperferritinemia. *Kidney International* **55**:2477-2486.
6. Tarng, D. C., Huang, T. P., Liu, T. Y., Chen, H. W., Sung, Y. J., and Wei, Y. H. (2000) Effect of vitamin E-bonded membrane on the 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine level in leukocyte DNA of hemodialysis patients. *Kidney International* **58**:790-799.
7. Raha, S., and Robinson, B. H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences* **25**:502-508.
8. Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**:239-247.
9. Wei, Y. H., Lu, C. Y., Wei, C. Y., Ma, Y. S., and Lee, H. C. (2001) Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease — Consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chinese Journal of Physiology* **44**:1-11.
10. Lee, H. C., and Wei, Y. H. (2001) Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging (Review article). *Biogerontology* **2**:231-244.
11. Lim, P. S., Ma, Y. S., Cheng, Y. M., Chai, H., Lee, C. F., Chen T. L., and Wei, Y. H. (2002) Mitochondrial DNA mutations and oxidative damage in skeletal muscle of patients with chronic uremia. *Journal of Biomedical Science* **9**:549-560.