

低毒兴奋效应模拟热量限制调节酵母转运体基因表达及脂质代谢

汪大婷 曾庆平*

(广州中医药大学 热带医学研究所 广东 广州 510405)

摘要:【目的】已知 H_2O_2 介导的线粒体低毒兴奋效应(Mitohormesis)能模拟热量限制延长酵母寿命,但未知两者是否存在共同作用机理。【方法】利用依时菌落计数法测定酿酒酵母时序寿命(CLS),采用微阵列芯片分析 ATP 结合盒(ABC)转运体基因表达谱及脂质代谢模式的转变,通过酶学测定法比较超氧化物歧化酶(SOD)活性的动态变化。【结果】经热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯处理后,酵母 CLS 有不同程度延长,细胞解毒相关 ABC 转运体基因表达均下调或不变,促进长链脂肪酸运输的过氧化物酶体膜 ABC 转运体基因以及加速固醇摄取的质膜 ABC 转运体基因表达则显著上调。相应地,脂质分解(如脂肪酸 β -氧化)基因表达上调,脂质合成(如脂肪酸延伸及去饱和)基因表达则下调。不同处理组中催化线粒体 H_2O_2 生成的 Mn-SOD 活性提高,导致催化 H_2O_2 降解及转变的抗氧化酶基因表达上调。【结论】低毒兴奋效应及热量限制在酵母中发挥延寿作用,既有赖于抗氧化酶催化的活性氧(ROS)清除反应,也取决于 ABC 转运体介导的脂质转运及后续的脂质分解及再利用。

关键词: 低毒兴奋效应, 热量限制, ABC 转运体, 青蒿琥酯, 酵母

Modulation of yeast transporter gene expression and lipid metabolism by hormesis mimicking calorie restriction

WANG Da-Ting ZENG Qing-Ping*

(Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Guangzhou, Guangdong 510405, China)

Abstract: [Objective] Hydrogen peroxide-mediated ‘mitohormesis’ can mimic calorie restriction to extend yeast lifespan, but whether both share common mechanisms remains unknown. [Methods] Yeast chronological lifespan was determined by time-course colony counting. The fluctuations of ATP-binding cassette transporter gene expression profiles and lipid metabolism modes were analyzed by microarray chips. The dynamic changes of superoxide dismutase activities were compared by enzymatic assays. [Results] After treatment by calorie restriction, hydrogen peroxide or artesunate, yeast chronological lifespan was prolonged. Cellular detoxification-related transporter genes were downregulated or unchanged, whereas long-chain fatty acid transport-enhanced peroxisomal

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81273620)

*通讯作者: Tel: 86-20-36586075; ✉: qpzeng@gucm.edu.cn

收稿日期: 2013-12-29; 接受日期: 2014-02-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-18

transporter genes as well as sterol uptake-accelerated plasma membrane transporter genes were upregulated. Accordingly, genes for lipid degradation such as the β -oxidation of fatty acids were upregulated, whereas genes for lipid synthesis including the extension and unsaturation of fatty acids were downregulated. Among different treatment groups, increase of Mn-SOD activity for mitochondrial hydrogen peroxide generation led to upregulation of antioxidant enzyme genes for hydrogen peroxide degradation and conversion. **[Conclusion]** Hormesis and calorie restriction exerting longevity-promoting effects depend not only on antioxidant enzymes-catalyzed reactions for scavenging reactive oxygen species, but also on ATP-binding cassette transporters-mediated lipid transport and subsequent lipid degradation and reutilization.

Keywords: Hormesis, Calorie restriction, ATP-binding cassette transporter, Artesunate, Yeast

自 1935 年 McCay 发现热量限制能延长大鼠寿命以来, 大量研究证实热量限制可以延长酿酒酵母、啮齿类(大鼠及小鼠)、灵长类(猕猴)动物的寿命^[1]。同时, 也有证据显示热量限制能推迟代谢性疾病、神经退行性疾病、自身免疫性疾病的发病时间并显著降低病情严重程度。目前认为, 热量限制的抗衰老及长寿机理可能是促进线粒体的旺盛增殖并维持活跃的线粒体功能^[2]。据最新文献报道, 线粒体解偶联剂 2,4-二硝基苯酚通过促进线粒体增殖延长了小鼠的寿命^[3], 常见氧化剂 H_2O_2 则通过提高超氧化物歧化酶(SOD)活性延长了酿酒酵母的寿命^[4]。这种低浓度有毒物质促使生物功能增强的现象被称为“低毒兴奋效应”(Hormesis), 还有人专门针对活性氧(ROS)的抗衰老诱导作用提出了“线粒体低毒兴奋效应”(Mitohormesis)的新概念^[5]。

青蒿琥酯是由抗疟药青蒿素经过人工合成得到的可溶性衍生物, 它在体内可以活化形成以碳为中心的自由基(羰自由基)^[6], 并且还能通过抑制过氧化氢酶活性提高细胞中的 H_2O_2 含量^[7]。虽然热量限制与某些低浓度毒物一样具有延寿效果, 但两者之间是否存在共同的作用机理还不清楚。为此, 本研究拟测定青蒿琥酯是否介导低毒兴奋效应模拟热量限制延长酿酒酵母时序寿命(Chronological lifespan, CLS), 并对热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯处理过程中酵母抗氧化酶基因表达及 SOD 活性变化进行定量比较, 以探讨热量限制与低毒兴奋效应在抗氧化应激方面的异同。同时, 鉴于目前还不了解热量限制与低浓度毒物处理对细胞中物质代谢

的影响, 而且也不清楚在此过程中是否涉及代谢物质的跨膜转运, 本研究还将对热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯调控的 ABC (ATP-binding cassette) 转运体基因表达谱进行定量分析, 为初步阐明热量限制及低毒兴奋效应可能存在的抗衰老及延寿的共同机理打下基础。

ABC 转运体是生物界广泛存在而且最为庞大的蛋白质超家族之一, 它们大部分位于生物膜(如质膜、液泡膜、线粒体膜、过氧化物酶体膜等)上, 拥有共同的分子结构及结构域组成, 主要作用是催化 ATP 水解并利用其产生的能量实现物质的跨膜转运^[8]。ABC 转运体分属 5 个亚家族, 分别是多向耐药(Pleiotropic drug resistance, PDR)蛋白、多药耐药(Multidrug resistance, MDR)蛋白、多药耐药相关蛋白(Multidrug resistance-related protein, MRP)、肾上腺脑白质营养不良蛋白(Adrenoleukodystrophy protein, ALDp)和 YEF3/RL1, 可介导细胞内毒物降解及药物外排, 还参与线粒体功能调节、胞质铁硫蛋白成熟、溶酶体再生、氧化应激反应、脂质动态平衡等^[9]。截至目前为止, 国内外尚未开展热量限制介导的长寿效应与 ABC 转运体功能相互关系的系统研究, 也未见低毒兴奋效应调控 ABC 转运体基因表达及脂质代谢的相关报道。

1 材料与方法

1.1 酵母菌种、培养基和试剂

酿酒酵母 BY4743 购自 Invitrogen。YPD 液体培养基(g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20,

固体培养基加入琼脂粉 20。酵母膏和蛋白胨购自 OXIDE, 葡萄糖购自 Amersco, 琼脂粉购自北京鼎国昌盛公司。青蒿琥酯注射剂购自桂林南药公司, H_2O_2 购自广州化学试剂公司。SOD 活性测定试剂盒由南京建成公司提供。

1.2 细胞培养与分组处理

将 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存酵母菌种划线接种至 YPD 平板, 倒置于培养箱中 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 3 d 后, 挑取单菌落置于液体 YPD 培养基中, 恒温振荡培养($30\text{ }^\circ\text{C}$, 200 r/min)。热量限制组的葡萄糖含量为 5 g/L ^[10], 其他组为正常 YPD 培养基。液体培养至 72 h 后, 加入 100 nmol/L 青蒿琥酯或 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 40 min, 将培养物倒入 10 mL 离心管中, $4\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 8 min, 弃上清液, 立即置于 $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存, 用于微阵列芯片分析。

1.3 时序寿命测定

YPD 液体摇菌后, 分别于培养后 3、7、9、11、14、16、20 d 从各组取出培养液, 调整 $A_{600}=1.0$, 记为第一管, 混匀后从第一管中取出 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌液, 加入 $900\text{ }\mu\text{L}$ 无菌水, 混匀为第二管; 如此操作余下各管, 使稀释倍数分别为 0、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍。依次从各组不同管中吸取 $3\text{ }\mu\text{L}$ 菌液, 均匀涂布在直径 60 mm 的平板上, 倒置于 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 生化培养箱中培养, 至 72 h 取出计数菌落。青蒿琥酯及 H_2O_2 于培养后 7 d 加入, 热量限制从 0 h 开始。

1.4 SOD 活性测定

酵母在固体板上培养 3 d 后, 喷药处理 3 h, 取酵母菌体, 加入等量 90% 异丙醇, 振荡 2 h 破壁, $4\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 弃上清, PBS 冲洗, 加入等量 PBS, 振荡 2 h, $4\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 取 $30\text{ }\mu\text{L}$ 上清用于测定。

1.5 芯片分析与作图

酵母全基因组表达谱芯片分析委托上海康成公司协助完成, 基因表达聚类图采用 JAVA 7 编程的 MeV 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 青蒿琥酯介导低毒兴奋效应对酵母时序寿命的影响

为了确认低毒兴奋效应是否像热量限制一样能延长酵母的时序寿命, 分别对热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯处理的酵母存活率进行了依时统计, 结果如图 1 所示。从图 1 可以看出, 热量限制显著延长了酵母的时序寿命, 从培养后 3 d 开始到 20 d 结束, 存活率几乎保持在 100% 不变。低浓度($0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$) 青蒿琥酯可延长酵母时序寿命, 以 20 d 时为最显著; 高浓度($50\text{ }\mu\text{mol/L}$) 青蒿琥酯则不利于酵母存活, 16 d 时存活率为 0。 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 能适当延长酵母时序寿命, 早期效果优于 $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯, 但晚期效果比 $0.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ 青蒿琥酯差。

2.2 抗氧化酶基因表达谱的共同特征及差异调控

为了比较热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯调控酵母抗氧化酶基因表达的异同, 对 3 种不同处理的酵母细胞进行全基因组表达谱微阵列芯片分析, 并对 33 个细胞质及细胞器抗氧化酶基因表达数据进行

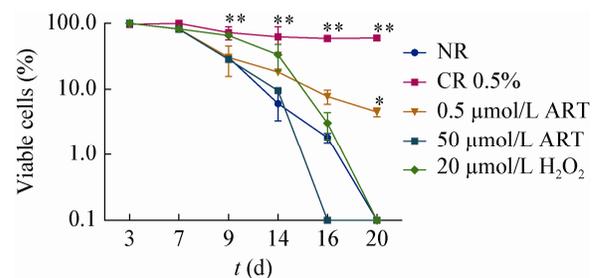


图 1 热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯对酵母时序寿命的影响

Figure 1 Effects of calorie restriction, hydrogen peroxide or artesunate on yeast chronological lifespan

注: NR: 热量不限制; CR 0.5%: 热量限制(5 g/L 葡萄糖); ART: 青蒿琥酯。*统计学差异显著($P<0.05$); **统计学差异极显著($P<0.01$)。

Note: NR: Calorie non-restriction; CR 0.5%: Calorie restriction (5 g/L sucrose); ART: Artesunate; *: Statistically significant difference ($P<0.05$); **: Statistically very significant difference ($P<0.01$).

了分类整理。结果显示, 普遍上调的基因共有 10 个, 其余均为下调, 其中上调幅度超过 2 倍的基因仅有 *GPX2* 和 *TRX3*。尽管热量限制中上调 2 倍以上的基因多达 5 个(*CTA1*、*GPX2*、*GTO1*、*TRR2* 和 *TRX3*), 但其变化趋势与 H_2O_2 、青蒿琥酯相似。

编码线粒体过氧化氢酶催化 H_2O_2 分解的 *CTA1* 及编码细胞质谷胱甘肽过氧化物酶催化 H_2O_2 转变的 *GPX2* 普遍上调, 而编码线粒体 Mn-SOD 催化超氧阴离子生成 H_2O_2 的 *SOD2* 普遍下调, 编码细胞质 Cu/Zn-SOD 的 *SOD1* 则基本不变(表 1)。

表 1 酵母抗氧化酶基因表达谱的定量比较

Table 1 Quantitative comparison on gene expression profiles of antioxidant enzymes in yeast

亚细胞定位 Subcellular localization	抗氧化酶/基因 Antioxidant enzyme/gene	热量限制 CR	H_2O_2 Hydrogen peroxide	青蒿琥酯 Artesunate	
Cytosol	Ahp1p/ <i>AHP1</i>	1.08	-1.01	1.00	
	Ccs1p/ <i>CCS1</i>	-1.18	1.15	1.32	
	Ctt1p/ <i>CTT1</i>	-2.05	-1.50	-1.45	
	Glr1p/ <i>GLR1</i>	-2.23	-1.14	1.04	
	Gpx2p/ <i>GPX2</i>	2.32	2.37	2.13	
	Grx8p/ <i>GRX8</i>	-1.96	2.44	1.55	
	Trr1p/ <i>TRR1</i>	-2.86	-1.56	-1.11	
	Trx1p/ <i>TRX1</i>	-1.63	1.27	1.12	
	Trx2p/ <i>TRX2</i>	1.56	1.69	1.58	
	Tsa1p/ <i>TSA1</i>	-1.31	1.08	1.15	
	Tsa2p/ <i>TSA2</i>	-1.21	1.01	-1.02	
	Sod1p/ <i>SOD1</i>	-1.01	1.04	1.04	
	Gto3p/ <i>GTO3</i>	-11.38	-17.58	-13.94	
	Grx1p/ <i>GRX1</i>	1.85	1.64	1.59	
	Grx2p/ <i>GRX2</i>	1.12	1.25	1.35	
	Grx3p/ <i>GRX3</i>	-1.40	-1.09	-1.03	
	Mitochondria	Cta1p/ <i>CTA1</i>	2.51	1.65	1.70
		Grx5p/ <i>GRX5</i>	1.05	-1.01	-1.04
		Gtt2p/ <i>GTT2</i>	-1.69	1.13	1.49
Mtm1p/ <i>MTM1</i>		-1.82	-1.14	-1.21	
Prx1p/ <i>PRX1</i>		-1.18	-1.11	1.00	
Sod2p/ <i>SOD2</i>		-1.27	-1.02	1.08	
Trr2p/ <i>TRR2</i>		2.39	1.26	1.24	
Trx3p/ <i>TRX3</i>		3.18	3.09	2.75	
Nuclei	Dot5p/ <i>DOT5</i>	-3.09	-2.63	-2.03	
	Grx4p/ <i>GRX4</i>	1.58	1.65	1.85	
Golgi	Grx6p/ <i>GRX4</i>	1.42	-1.05	1.01	
	Grx7p/ <i>GRX7</i>	-1.35	1.28	1.08	
Endoplasmic reticulum	Gtt1p/ <i>GTT1</i>	1.83	1.30	1.19	
Peroxisome	Gto1p/ <i>GTO1</i>	2.41	1.00	1.10	
Extracellular/intracellular/unknown	Gpx1p/ <i>GPX1</i>	1.15	-1.26	-1.15	
	Gsh1p/ <i>GSH1</i>	-1.47	-1.63	-1.56	
	Gsh2p/ <i>GSH2</i>	-2.52	-1.21	-1.17	

结果表明, 经过不同处理的酵母细胞, 其抗氧化酶基因表达水平并非普遍升高, 而是选择性升高, 这可能是由于受不同 ROS 诱导的结果。以线粒体为例, *CTA1* 表达上调及 *SOD2* 表达下调, 说明此时线粒体中的 ROS 以 H_2O_2 为主, 而不是超氧阴离子(O_2^-)。不过, 在处理之初线粒体中的 ROS 可能主要是 O_2^- , 因为它诱导 *SOD2* 上调会导致 O_2^- 转变成 H_2O_2 , 从而诱导 *CTA1* 上调, 并促进 H_2O_2 降解。这一推论有待 SOD 活性测定结果的验证。

2.3 总 SOD、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 活性的动态变化

为了验证酵母细胞中的 SOD 活性在处理前后

是否表现为“先升后降”的变化模式, 对热量限制处理过程中总 SOD、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 活性进行了依时跟踪测定。结果表明, 当热量限制仅为 12 h 时, 3 种 SOD 活性测定值均最高, 而处理 3 d 和 5 d 后, 活性逐渐降低, 至 7 d 时活性最低(图 2A-C)。同时, 还对不同浓度 H_2O_2 (500 nmol/L、20 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L)、青蒿琥酯 (100 nmol/L、500 nmol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L) 处理酵母细胞的 SOD 活性进行了测定, 结果发现这两种处理中总 SOD 活性与 Cu/Zn-SOD 活性均无显著变化, 但 Mn-SOD 活性在不同浓度处理后呈现出显著差异, 低浓度处理活性较高, 而高浓度处理活性较低(图 2D、E)。

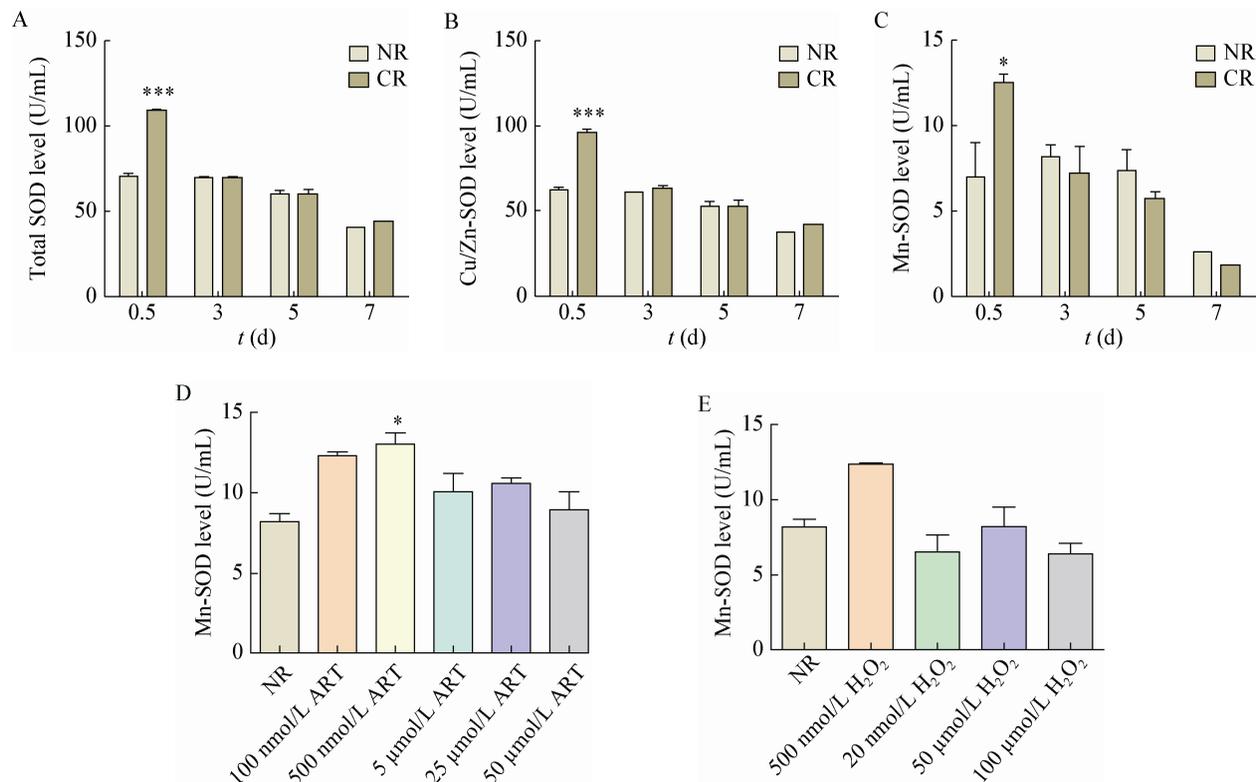


图 2 不同时间热量限制及不同浓度 H_2O_2 、青蒿琥酯处理酵母 SOD 活性比较

Figure 2 Comparison of SOD activities in yeast treated by different durations of CR and different concentrations of hydrogen peroxide or artesunate

注: A、B、C: 热量限制后总 SOD、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 活性变化; D、E: 青蒿琥酯、 H_2O_2 处理后 Mn-SOD 活性变化. NR: 热量不限制; CR: 热量限制; ART: 青蒿琥酯. *: 统计学差异显著 ($P < 0.05$); **: 统计学差异极显著 ($P < 0.001$).

Note: A, B and C: Changes in total SOD, Cu/Zn-SOD and Mn-SOD activities after CR exposure; D, E: Changes in Mn-SOD activity after treatment by artesunate or hydrogen peroxide. NR: Calorie non-restriction; CR: Calorie restriction; ART: Artesunate. *: Statistically significant difference ($P < 0.05$); **: Statistically very significant difference ($P < 0.001$).

结果证实, 热量限制酵母中 SOD 活性的变化趋势的确是“先升后降”, 这意味着处理前期 O_2^- 大量增加, 导致 SOD 合成也随之增加, 而处理后期 O_2^- 大幅减少, 使 SOD 合成相应减少。因此, O_2^- 诱导 *SOD2* 在先, 而 H_2O_2 诱导 *CTA1* 在后, 前述酵母细胞在处理后期 *CTA1* 表达上调及 *SOD2* 表达下调的现象得到合理解释。此外, H_2O_2 、青蒿琥酯对 Mn-SOD 的影响大于 Cu/Zn-SOD, 说明酵母细胞中 O_2^- 产生的主要场所是线粒体而不是细胞质。

2.4 ABC 转运体基因及其调控基因表达谱分析

为了分析热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯对 ABC 转运体基因表达的调控并比较其异同, 采用基因聚

类法对酵母全基因组表达谱微阵列芯片扫描结果中 ABC 转运体基因及其调控基因表达数据进行了定量分析。结果发现, 经过不同处理, 在 16 个 ABC 转运体基因中, 共有 10 个基因上调或下调的趋势一致, 其余 6 个基因部分相似, 其中青蒿琥酯与 H_2O_2 更为接近(图 3A)。在 11 个 ABC 转运体基因的调控基因中, 各处理组共有 7 个基因上调或下调的趋势一致, 其余 4 个基因部分相似(图 3B)。由此可见, H_2O_2 和青蒿琥酯可部分模拟热量限制对 ABC 转运体基因及其调控基因的表达诱导或阻遏作用。

表 2 详细列出了图 3 所示酵母中 16 个 ABC 转运体基因经热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯处理后表达水平的倍数变化。

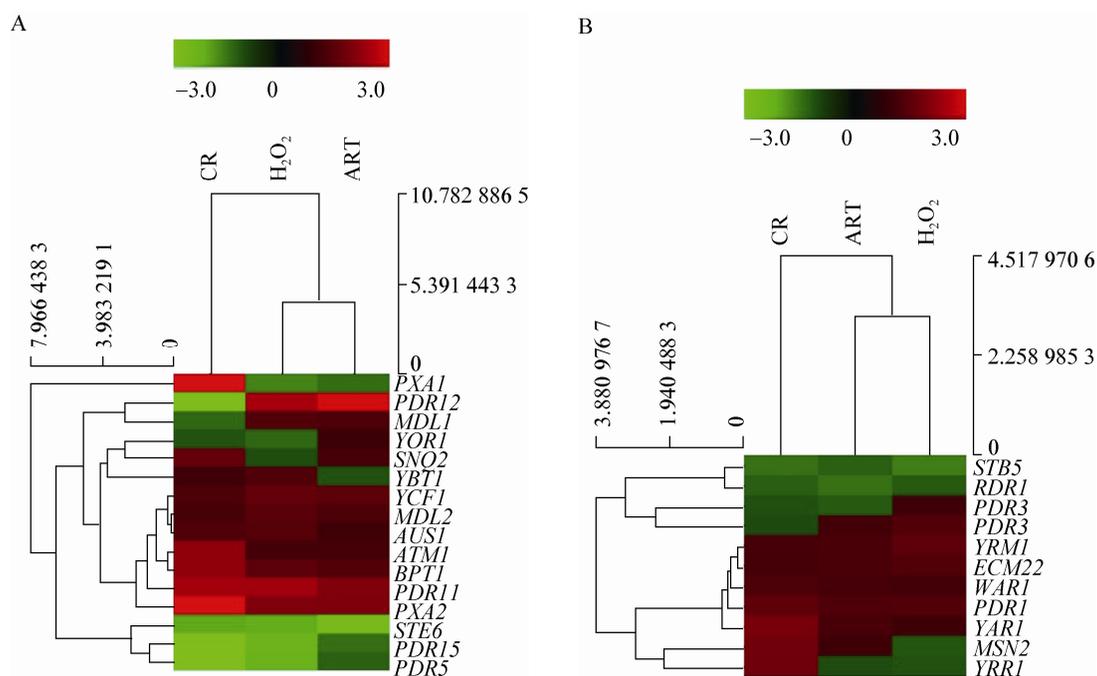


图 3 热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯对 ABC 转运体基因及其调控基因表达谱的影响

Figure 3 Effects of calorie restriction, hydrogen peroxide or artesunate on the expression profiles of ABC transporter genes and their regulator genes

注: A: ABC 转运基因表达聚类图; B: ABC 转运基因的调控基因表达聚类图。红色表示基因表达上调; 绿色表示基因表达下调。
Note: A: The clustering diagram of ABC transporter gene expression; B: The clustering diagram of ABC transporter regulator gene expression. The red color represents the upregulation of gene expression. The green color represents the downregulation of gene expression.

表 2 ABC 转运体基因表达谱的倍数变化
Table 2 The fold changes of ABC transporter gene expression profiles

ABC 转运体/基因 ABC transporter/Gene	蛋白质家族 Protein family	蛋白质功能 Protein function	热量限制 CR	H ₂ O ₂	青蒿琥酯 Artesunate
Plasma membrane					
Pdr5p/ <i>PDR5</i>	PDR protein	PDR, lipid transport	-4.57	-2.33	-1.29
Snq2p/ <i>SNQ2</i>	PDR protein	PDR	1.65	-1.08	1.17
Pdr12p/ <i>PDR12</i>	PDR protein	Weak acid stress response	-3.19	2.49	2.96
Pdr15p/ <i>PDR15</i>	PDR protein	General stress response	-3.16	-2.42	-1.44
Aus1p/ <i>AUS1</i>	PDR protein	Sterol uptake	1.31	1.42	1.05
Pdr11p/ <i>PDR11</i>	PDR protein	Sterol uptake	2.43	2.41	2.02
Yor1p/ <i>YOR1</i>	MRP/CFTR protein	PDR, lipid transport	-1.12	-1.36	1.02
Ste6p/ <i>STE6</i>	MDR protein	Mating factor transport	-2.08	-2.12	-2.82
Vacuole					
Bpt1p/ <i>BPT1</i>	MRP/CFTR protein	Cellular detoxification	2.23	1.56	1.36
Ybt1/ <i>YBT1</i>	MRP/CFTR protein	Unknown	1.06	1.34	-1.11
Ycf1p/ <i>YCF1</i>	MRP/CFTR protein	Cellular detoxification	1.26	1.63	1.54
Mitochondrial					
Atm1p/ <i>ATM1</i>	MDR protein	Fe(S)-translocation	2.20	1.15	1.14
Mdl1p/ <i>MDL1</i>	MDR protein	Oxidative stress response	-1.37	1.36	1.26
Mdl2p/ <i>MDL2</i>	MDR protein	Unknown	1.18	1.46	1.28
Peroxisomes					
Pxa1p/ <i>PXA1</i>	ALD protein	Fatty acid transport	5.47	-1.66	-1.43
Pxa2p/ <i>PXA2</i>	ALD protein	Fatty acid transport	4.11	2.00	1.98

由表 2 可知, 经不同处理后, 酵母液泡膜上与细胞解毒有关的 ABC 转运体基因 *BPT1* 和 *YCF1* 仅有轻微上调, 这可能是由于本研究中的热量限制并无毒物生成, H₂O₂ 也不需要 ABC 转运体解毒, 青蒿琥酯即使有毒但浓度很低。在氧化应激方面, 负责调控整体细胞氧化应激状态的质膜 ABC 转运体基因 *PDR15*, 在热量限制组下调 3.16 倍, 在 H₂O₂ 组和青蒿琥酯组分别下调 2.42 倍和 1.44 倍。负责调控线粒体氧化应激状态的线粒体膜 ABC 转运体基因 *MDL1*, 在热量限制组下调 1.37 倍, 在 H₂O₂ 组和青蒿琥酯组分别上调 1.36 倍和 1.26 倍。尽管经上述处理的酵母细胞中氧化应激水平大大下降, 但 H₂O₂ 组和青蒿琥酯组的线粒体氧化应激水平仍较高, 说明线粒体是 ROS 形成的主要场所。

由 *AUS1* 和 *PDR11* 编码的质膜 ABC 转运体

Aus1p 和 *Pdr11p* 负责固醇摄取, 二者在所有处理组中均出现表达上调, 而且表达水平类似, 其中 *AUS1* 上调低于 2 倍, *PDR11* 上调在 2 倍以上。过氧化物酶体膜 ABC 转运体 *Pxa1p* 和 *Pxa2p* 负责将长链脂肪酸转运至过氧化物酶体内进行 β -氧化, 热量限制组 *PXA1* 和 *PXA2* 分别上调 5.47 倍和 4.11 倍, H₂O₂ 组及青蒿琥酯组 *PXA2* 分别上调 2.00 倍和 1.98 倍, *PXA1* 则略有下调, 但低于 2 倍。以上结果表明, 热量限制、H₂O₂、青蒿琥酯可能经由 *Pdr11p* 促进固醇摄取, 热量限制可同时利用 *Pxa1p* 和 *Pxa2p* 加速长链脂肪酸转运, 而 H₂O₂、青蒿琥酯也能利用 *Pxa2p* 促进长链脂肪酸转运。

质膜 ABC 转运体 *Pdr5p* 负责脂质运输, *PDR5* 在热量限制、H₂O₂、青蒿琥酯组的表达分别下调 4.57、2.33、1.29 倍。另一个质膜 ABC 转运体 *Yor1p* 也有类似 *Pdr5p* 的作用, *YOR1* 在热量限制、H₂O₂、

青蒿琥酯组的表达水平有所下调。以上结果暗示, 经 Pdr5p 的脂质运输显著减弱, 而经 Yor1p 的脂质运输也略有下降, 说明此时贮存脂质主要是在胞内降解而不是向胞外运送。

2.5 脂质合成及分解代谢基因表达谱分析

为了考察热量限制、H₂O₂、青蒿琥酯处理对酵母脂质代谢的影响, 对脂质合成及分解代谢途径相关基因的表达水平进行了定量分析。结果表明, 在脂肪酸降解的 β -氧化相关基因表达方面, 热量限制组全部上调, 而且比对照高 2 倍以上, 最高上

调 6 倍(*POX1*); H₂O₂ 组和青蒿琥酯组部分上调或不变, 其中 H₂O₂ 组 *DIT2* 的表达水平高于对照 2 倍以上, 青蒿琥酯组 *DIT2* 和 *POX1* 的表达水平高于对照 2 倍以上。相反, 在脂肪酸合成(包括去饱和及延长)与固醇合成方面, 热量限制组全部下调, 而且比对照低 2 倍以上, 最低下调接近 7 倍(*ERG4*); H₂O₂ 组和青蒿琥酯组则部分下调或不变, 两组各有 2 个脂肪酸去饱和基因(*SUR4* 和 *TSC13*) 及一个固醇合成基因(*ERG25*)的表达水平低于对照 2 倍以上(表 3)。

表 3 脂质代谢相关基因表达的动态变化
Table 3 The dynamic changes of lipid metabolic pathway gene expression

脂质代谢 Lipid metabolism	基因 Gene	热量限制 CR	H ₂ O ₂	青蒿琥酯 Artesunate
β -Oxidation of fatty acids	<i>DIT2</i>	2.86	2.82	2.61
	<i>FAA2</i>	3.31	-1.06	1.38
	<i>FAA4</i>	2.13	-1.16	1.20
	<i>POT1</i>	4.56	1.56	1.60
	<i>POX1</i>	5.99	1.78	2.31
Biosynthesis of fatty acids	<i>ACC1</i>	-2.46	-1.21	1.50
	<i>FAS1</i>	-2.54	-1.53	1.00
	<i>FAS2</i>	-2.29	-1.22	1.19
Unsaturation of fatty acids	<i>FEN1</i>	-2.03	1.54	1.59
	<i>IFA38</i>	-2.02	-1.30	-1.22
	<i>SUR4</i>	-4.07	-3.54	-2.47
	<i>TSC13</i>	-2.37	-2.85	-2.15
Elongation of fatty acids	<i>OLE1</i>	-2.94	-1.12	-1.03
Biosynthesis of sterols	<i>ERG4</i>	-6.81	1.47	1.02
	<i>ERG5</i>	-2.56	1.06	1.05
	<i>ERG11</i>	-2.38	-1.51	-1.42
	<i>ERG25</i>	-3.14	-2.53	-2.03
	<i>ERG26</i>	-3.43	1.15	1.04

以上结果表明,热量限制可诱导脂肪酸降解相关基因表达上调,同时下调脂肪酸及固醇合成相关基因。 H_2O_2 或青蒿琥酯则能部分模拟热量限制对脂质代谢相关基因的调控模式,其总的趋势是上调脂质降解相关基因及下调脂质合成基因,表明以上3种不同的处理均可促进酵母中贮存脂质的动员和再利用。

3 讨论

对于低毒兴奋效应存在与否,目前还有颇多争议^[11-12]。不过,越来越多的证据显示,细胞暴露在低浓度化学毒物下(“锻炼”)可诱导解毒相关基因表达,有利于细胞对毒性环境的适应或抵抗更高浓度的化学毒物。例如,低浓度 H_2O_2 和2,4-二硝基苯酚就能促进细胞的抗氧化应激功能,减少ROS对生物大分子的损伤,并发挥抗衰老及延寿作用^[3-4]。本研究得出的有关青蒿琥酯延长酵母寿命的实验结果为线粒体低毒兴奋效应学说^[5]提供了有力的支持。我们还验证了青蒿琥酯可以模拟热量限制诱导抗氧化酶基因及ABC转运体基因表达,揭示了低毒兴奋效应与热量限制在延长酵母寿命上共享类似的作用机理:一是通过增加抗氧化酶来降低ROS对细胞的伤害;二是减少物质合成以节约原料并提高物质运输效率而促进物质分解和再利用。

本研究结果显示,尽管处理条件不同,但 H_2O_2 、青蒿琥酯像热量限制一样都能诱导抗氧化酶基因的高效表达及抗氧化酶活性的迅速升高,其诱导表达顺序是先上调解除 O_2^- 毒害的SOD表达,然后再上调解除 H_2O_2 毒害的CTA和GPX表达。例如,热量限制能使总SOD、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD活性同步提高,但会随时间推移逐渐降低其活性,推测是由于 O_2^- 被不断清除使产生的 O_2^- 不断减少的缘故。低浓度 H_2O_2 、青蒿琥酯主要升高Mn-SOD活性,而总SOD和Cu/Zn-SOD活性保持稳定,说明线粒体是 O_2^- 产生的主要细胞器。高活性抗氧化酶表达在抗衰老及长寿中的重要作用已在小鼠中

得到反复证实^[13-14],本研究有关热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯上调抗氧化酶基因表达的发现又为此提供了新的证据。

其次,本研究首次发现热量限制通过ABC转运体调节酵母脂质代谢模式:热量限制带来的物质供应减少,导致酵母脂质代谢从合成途径向降解途径转变,于是诱导过氧化物酶体膜ABC转运体基因PXA1和PXA2表达显著上调,从而促进长链脂肪酸运入过氧化物酶体进行 β -氧化,这意味着贮存脂质的消化与利用受到细胞的主动控制。同时,质膜ABC转运体基因AUS1和PDR11显著上调,促进了固醇的摄取和转变。有趣的是, H_2O_2 和青蒿琥酯在诱导ABC转运体基因方面表现出与热量限制的相似性,如都能上调PXA2的表达,因而都有利于长链脂肪酸的再利用,这说明从ABC转运体角度而言低毒兴奋效应与热量限制存在共同的作用机理。

Pxa1p和Pxa2p是人类Pmp70和ALD样过氧化物酶体转运蛋白的同源物,Pmp70与致命的神经退行性疾病肾上腺脑白质营养不良相关^[1]。缺乏Pxa1p和Pxa2p的酵母突变体不能在以脂肪酸为单一碳源的培养基上生长,表明其参与脂肪酸的分解和利用^[15-16]。本研究得出的关于热量限制、 H_2O_2 、青蒿琥酯导致PXA1和PXA2表达上调伴随脂肪酸 β -氧化相关基因表达上调的实验结果恰好为这一推论提供了完美的注解。

综上所述,本研究首次发现青蒿素衍生物能延长酵母寿命,并初步阐明热量限制与低毒兴奋效应在抗氧化酶基因与ABC转运体基因的诱导表达上享有交叉或共同的作用机制,青蒿琥酯可部分模拟热量限制在抗氧化酶基因与ABC转运体基因的表达调控模式。不过,目前对热量限制与低毒兴奋效应涉及的信号转导通路的细节尚不完全清楚,有待下一步开展更深入的研究。

参考文献

- [1] Weindruch R, Walford RL. Dietary restriction in mice beginning 1 year age: effect on lifespan and spontaneous

- cancer incidence[J]. *Science*, 1982, 215: 1415-1418.
- [2] Nisoli E, Carruba MO. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis[J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119: 2855-2862.
- [3] Cerqueira FM, Laurindo FRM, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling and calorie restriction increase fasting eNOS, Akt and mitochondrial biogenesis[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18433.
- [4] Mesquita A, Weinberger M, Silva A, et al. Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 2010, 107: 15123-15128.
- [5] Ristow M, Kim Z. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis)[J]. *Experimental Gerontology*, 2010, 45: 410-418.
- [6] Shandilya A, Chacko S, Jayaram B, et al. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2513.
- [7] Zeng QP, Xiao N, Wu P, et al. Artesunate potentiates antibiotics by inactivating bacterial heme- harbouring nitric oxide synthase and catalase[J]. *Biomedical Central Research Notes*, 2011, 4: 223.
- [8] Jungwirth H, Kuchler K. Yeast ABC transporters: a tale of sex, stress, drugs and aging[J]. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2006, 580: 1131-1138.
- [9] 王继红, 李西川, 蒋伶活. 酵母细胞中 ABC 转运蛋白的分类和功能[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(4): 491-496.
- [10] Lin SJ, Defossa PA, Guarente L. Requirement of NAD and *SIR2* for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Science*, 2000, 289: 2126-2128.
- [11] Kaiser J. Sipping from a poisoned chalice[J]. *Science*, 2003, 302: 376-379.
- [12] Axelrod D, Burns K, Davis D, et al. 'Hormesis'—an inappropriate extrapolation from the specific to the universal[J]. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 2004, 10: 335-339.
- [13] Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria[J]. *Science*, 2005, 308: 1909-1911.
- [14] Qiu X, Brown K, Hirschey MD, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation[J]. *Cell Metabolism*, 2010, 12: 662-667.
- [15] Hettema JK, van Roermund CW, Distel B, et al. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of European Molecular Biology Organization*, 1996, 15: 3813-3822.
- [16] Hiltunen JK, Mursula AM, Rottensteiner H, et al. The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 2003, 27: 35-64.