

黑腹果蝇中辅酶 Q 的鉴定及其对寿命的影响

程 威¹, 李冬梅¹, 宋传超¹, 韩 伟¹, 杨丽容², 陈建明^{1, 2*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 国家海洋局第三海洋研究所, 国家海洋局生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要: 辅酶 Q 是存在于线粒体内膜上的脂溶性电子传递体, 它是呼吸链的重要组成部分. 辅酶 Q 在不同生物体内其侧链异戊二烯单位的数目不同, 目前对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) 中辅酶 Q 的存在形式和含量还不清楚. 利用高效液相色谱法分析鉴定了模式生物黑腹果蝇中辅酶 Q 的种类及含量. 实验结果表明: 黑腹果蝇中辅酶 Q9 与 Q10 并存, 辅酶 Q9 的含量约为 Q10 的 2.5 倍. 辅酶 Q 含量具性别差异, 其中辅酶 Q9 在雌性黑腹果蝇中含量较雄性约高 30%, 而辅酶 Q10 在雌性果蝇中则比雄性果蝇高约 33%; 辅酶 Q9 与 Q10 含量在辅酶 Q 合成酶 *coq 2* 的突变体中明显降低并且 *coq 2* 突变体的寿命较野生型略短. 这些实验结果将为利用黑腹果蝇模型研究辅酶 Q 的功能提供重要基础.

关键词: 辅酶 Q; 果蝇; 高效液相色谱; 寿命

中图分类号: Q 356.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)03-0607-05

辅酶 Q (coenzyme Q) 又名泛醌, 是一种脂溶性醌类化合物, 由美国威斯康辛大学的 Crane 等在 1957 年首先于牛心肌细胞线粒体中分离得到, 次年 Folkers 等测定了该类物质的化学结构^[1-2]. 辅酶 Q 是由一个具有氧化还原活性的苯醌环与多个半不饱和异戊二烯组成的侧链相连而形成, 这种独特的结构使其具备了特殊的功能^[1-2]. 辅酶 Q 在生物体内有 3 种氧化还原状态, 半醌型辅酶 Q、还原型辅酶 Q 和氧化型辅酶 Q. 20 世纪 60 年代辅酶 Q 在呼吸链中的作用被多个实验证明, 比如把线粒体内的辅酶 Q 除去或重新加入, 可导致还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 和琥珀酸脱氢酶失活或重新被激活^[3]. Crane 等的早期研究表明辅酶 Q 对线粒体呼吸链的电子传递具有重要功能, 它能把线粒体电子传递链上的电子从复合物 I 和 II 传送到复合物 III 上^[4].

Crane 等从牛心肌细胞中提取出来的辅酶 Q 侧链有 10 个异戊二烯单位, 称为辅酶 Q10, 研究者已经从多种生物体中提取到辅酶 Q, 在不同生物体内辅酶 Q 侧链上的异戊二烯单位数量有所不同. 目前从各种生物体内提取到的辅酶 Q 的侧链异戊二烯单位数从 6~10 不等, 例如在人类、拟南芥中主要以辅酶 Q10 形式存在; 在小鼠、大鼠、白斑鱼、线虫、产蛋白圆酵母以及某些昆虫, 如苍蝇和菜粉蝶中主要以辅酶 Q9 的形式

存在; 从大肠杆菌 K12 和棕色固氮菌中分离得到辅酶 Q8; 从圆酵母中分离到辅酶 Q7; 而从酿酒酵母中分离到辅酶 Q6^[4-5].

近期许多研究表明辅酶 Q 除了在线粒体呼吸链中的电子传递作用外, 还涉及细胞代谢的许多方面. 辅酶 Q 作为重要的辅助因子参与解偶联蛋白的质子泵活性调控^[6]. 此外它还作为线粒体通透性转换孔抑制剂, 调控细胞凋亡^[7]. 在真核细胞中, 辅酶 Q 除了线粒体膜外还广泛存在于内膜系统中, 如内质网、高尔基体等, 在这些内膜系统中, 辅酶 Q 主要作为抗氧化剂, 或辅助抗氧化剂把 α 维生素 E 自由基还原成维生素 E^[8-9]. 体外体内实验也证明了辅酶 Q 能抑制人淋巴细胞 DNA 过氧化而引发的 DNA 双链断裂^[10-11]. 此外, 辅酶 Q 还在酿酒酵母的质膜和溶酶体膜上的电子传递系统中发挥重要作用^[12-13]. 如今辅酶 Q 已经广泛应用于临床医疗, 普遍用来治疗心肌疾病以及神经退化性疾病, 如亨丁顿氏舞蹈症、帕金森和肌萎缩性脊髓侧索硬化症等^[14-15].

目前对辅酶 Q 分布和功能的研究大多局限于酵母、线虫, 在大鼠中的研究也十分有限, 研究还多集中在细胞水平上^[17-18]. 本文则针对黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*, 以下简称果蝇) 这一模式生物中的辅酶 Q 种类及含量进行研究, 并初步探讨了它对寿命的影响, 为从整体动物水平去分析辅酶 Q 的功能奠定基础.

收稿日期: 2010-05-27

基金项目: 国际科技合作项目 (2009DFA32760)

* 通信作者: chenjm@xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

十二烷基磺酸钠(SDS)、正己烷、丙酮、三氯甲烷、甲醇、乙醇、氯化钠均购于上海生工工程有限公司,辅酶 Q10 及 Q9 对照品均购于 Sigma 公司。

1.1.2 主要仪器

安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪。

1.1.3 果蝇食物配方

每升果蝇食物含玉米粉 67 g, 琼脂粉 5.3 g, 麦芽提取物 42.4 g, 大豆粉 9.2 g, 酵母提取物 15.9 g, 蔗糖 40 g, 丙酸 4.5 mL, 水 920 mL。

1.1.4 果蝇品系

野生型对照为 w^{1118} 由美国 UCSD William McGinnes 教授惠赠; 辅酶 Q 合成酶突变体 $coq2^{JV259}/TM6B$ 由美国 UCLA Utpal Banerjee 教授惠赠^[19]。

1.2 方法

1.2.1 果蝇饲养

饲养温度 25 °C, 相对湿度 65%, 光照周期为 12 h, 每天: 早晨 8:00—晚上 8:00。

1.2.2 果蝇中辅酶 Q 的提取

基本实验流程参照动物内脏提取辅酶 Q 的方法^[20]。将 100 mg 麻醉的果蝇分装入 5 个 1.5 mL Eppendorf 管中, 每管加入 300 μ L 0.1 mmol/L 的 SDS 溶液, 用特氟龙研磨棒研磨样品约 30 s 至均匀半透明悬浊液, 放置于涡旋振荡器上振荡 30 s 后, 用超声破碎仪冰浴超声 15 s。涡旋振荡 15 s 后每管加入 900 μ L V (正己烷): V (丙酮) = 1:1 再涡旋振荡 30 s, 超声 15 s, 于冰上冷却, 涡旋振荡 90 s 后, 以 1 000 g 离心力离心 3 min。将上清液转移至新的 Eppendorf 管中, 置于 30 °C 水浴上, 用氮气吹干。加入 1 mL V (三氯甲烷): V (甲醇) = 1:1 重新溶解后, 加入 0.5 mL 的质量分数为 0.7% NaCl 溶液洗涤一次, 离心后取上清液至新管中, 氮气吹干后加入 50 μ L 无水乙醇溶解, 样品置于 -20 °C 避光保存。

1.2.3 高效液相色谱法测定果蝇中辅酶 Q

辅酶 Q 的定量测定基本参照以前的报道^[20], 高效液相色谱条件: Phenomenex Gemini C18 110A 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 V (甲醇):

V (乙醇) = 1:1, 柱温 35 °C, 流速为 0.8 mL/min, 紫外检测器检测波长为 275 nm, 果蝇样品进样量 40 μ L, 运行时间 40 min。

辅酶 Q9、Q10 标准溶液配制: 精密称取辅酶 Q9、Q10 对照品 10 mg, 装入 100 mL 容量瓶中, 加入无水乙醇约 40 mL, 在 50 °C 水浴中振摇溶解, 放冷后, 用无水乙醇稀释至刻度, 作为对照品贮备液 -20 °C 避光保存。

1.2.4 果蝇寿命的统计

果蝇寿命的统计参照文献[21], 在 1.2.1 饲养条件下, 同一基因型同一性别共 200 只果蝇分 10 管饲养, 每管 20 只。每 3 d 统计一次果蝇死亡数并将活果蝇转移至新鲜食物中, 当每管存活果蝇数较少时可适当合并, 当每管总数不能超过 20 只。

2 实验结果

2.1 果蝇中辅酶 Q 组成

为了分析果蝇中辅酶 Q 的组成成分, 我们按照方法 1.2.1 对 100 mg 雌雄混合成体野生型果蝇 w^{1118} 进行了提取, 将提取产物和稀释成 50 μ g/mL 的辅酶 Q9、Q10 对照溶液进行高效液相色谱分析, 结果如图 1 所示。辅酶 Q9 对照品在 C18 分析柱中的保留时间约为 19.11 min (图 1A), 辅酶 Q10 对照品的保留时间约为 25.09 min (图 1B)。我们观察到果蝇提取物中也存在相应保留时间的特征峰, 而且保留时间为 18.905 min 的峰面积大于 25.324 min 的峰面积 (图 1C)。参照文献[1, 4, 18], 我们判定果蝇中存在两种形式的辅酶 Q, 即辅酶 Q9 和 Q10。根据高效液相色谱法定量分析, 辅酶 Q9 在成体果蝇中的含量约为 14.3 μ g/g, 而辅酶 Q10 的含量约为 4.8 μ g/g, 即辅酶 Q9 的含量约为辅酶 Q10 的 2.5 倍。

2.2 雌、雄性果蝇中辅酶 Q9 及 Q10 含量

为了进一步准确测定辅酶 Q 的组成及含量, 我们分别收集雌、雄性 w^{1118} 果蝇各 3 组, 每组含 100 mg 成体果蝇。6 组果蝇的辅酶 Q9 与 Q10 含量统计如图 2 所示, 雌雄性果蝇皆含有辅酶 Q9 与 Q10。此外雌性果蝇中辅酶 Q9、Q10 含量皆比雄性果蝇的高, 分别为 (14.8 $\pm$ 0.9) μ g/g 与 (5.6 $\pm$ 0.5) μ g/g; 而雄性果蝇中辅酶 Q9、Q10 含量分别为 (11.4 $\pm$ 0.6) μ g/g 与 (4.2 $\pm$ 0.7) μ g/g。根据统计, 辅酶 Q9 在雌性果蝇中的含量较雄性果蝇高约 30%, 而雌性果蝇中辅酶 Q10 则比雄性果蝇高约 33%。辅酶 Q9 与 Q10 的总

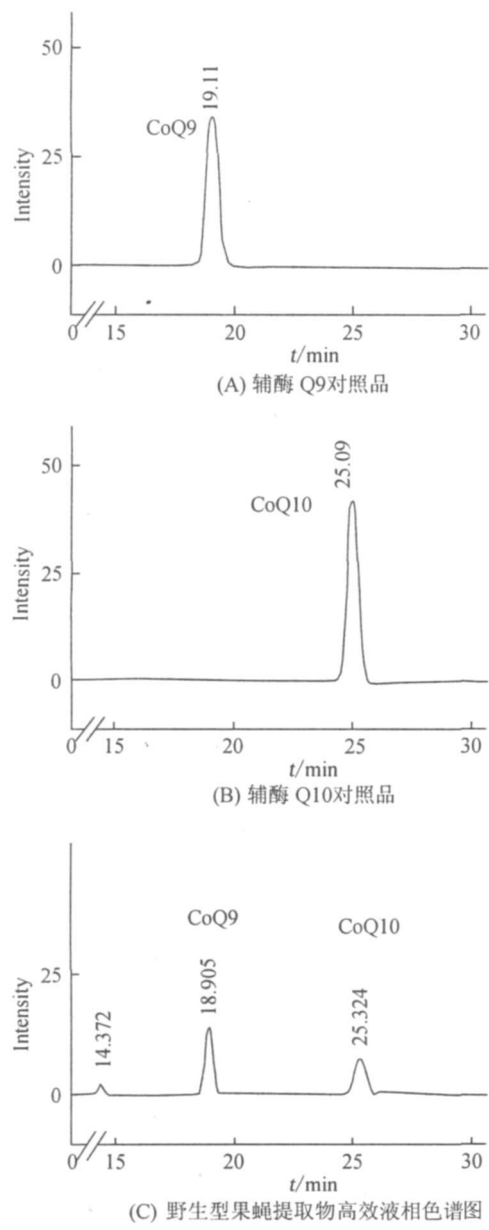


图 1 果蝇中辅酶 Q (Q9 和 Q10) 色谱图

Fig. 1 Chromatograms map of CoQ (Q9 and Q10) from fruit fly *w¹¹¹⁸*

量在雌、雄性果蝇中的含量分别为(20. 4 ±1. 4) μg/g 与(15. 6 ±1. 3) μg/g.

2.3 辅酶 Q 合成酶突变株果蝇中的辅酶 Q

近年来有数篇文献报道酵母与线虫中辅酶 Q 合成酶的研究^[22-24], 但果蝇中辅酶 Q 合成酶的研究尚未见报道. 最近 Banerjee 教授实验室制备了一系列线粒体蛋白基因的突变体, 其中有一个辅酶 Q 合成酶基因 *coq2* 的突变体 *coq2^{JV259}/TM6B*^[19]. 该突变体纯和致死, 但杂合子没有可见缺陷. 因为平衡染色体 TM6B 上有很多倒位、易位及其他突变, 在分析 *coq2^{JV259}* 缺陷

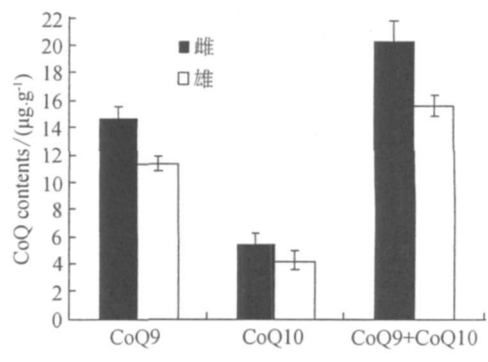


图 2 野生型果蝇不同性别中辅酶 Q 含量的比较

Fig. 2 Comparison of CoQ contents in *Drosophila* with different sexes

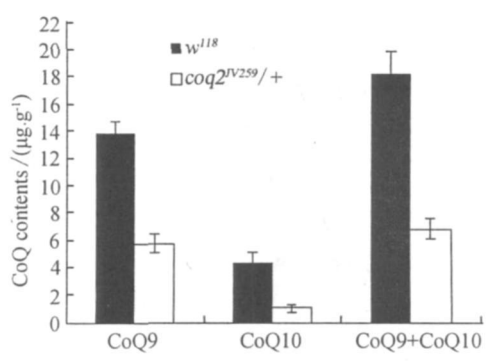


图 3 *coq2* 突变体与野生型果蝇中辅酶 Q 含量的比较

Fig. 3 Comparison of CoQ contents in *coq2* mutant and wild type control

时必须排除平衡染色体的影响. 我们将突变品系 *coq2^{JV259}/TM6B* 与野生型对照 *w¹¹¹⁸* 杂交, 在子一代中挑选杂合体 *coq2^{JV259}/+* 与 *w¹¹¹⁸* 作为野生型对照测定辅酶 Q9、Q10 的含量. 如图 3 所示, 杂合突变体 *coq2^{JV259}/+* 中辅酶 Q9 的含量明显降低, 为野生型对照的 45%; 而 Q10 含量的降低更为显著, 仅为野生型对照的 24%. 根据我们的测定, 辅酶 Q9 与 Q10 的总量在野生型对照中的含量约为 18. 3 μg/g, 而杂合突变体中的含量仅为 6. 8 μg/g. 所以辅酶 Q 合成酶 *coq2* 对辅酶 Q9 与 Q10 的合成皆至关重要, 与文献中报道的酵母与线虫的 *coq2* 功能一致^[22, 24].

2.4 辅酶 Q 合成酶 *coq2* 突变体对寿命的影响

Kayser 等发现线虫辅酶 Q 合成酶突变体的寿命较野生型对照明显增长, 而长时间摄取辅酶 Q 会缩短线虫的寿命^[25-26]. 但是在哺乳动物中似乎并不一样, 给小鼠长时间喂食辅酶 Q 能够延缓衰老^[19-20]. 为了检测辅酶 Q 对果蝇寿命的影响, 我们同时统计了辅酶 Q 合成酶杂合突变体 *coq2^{JV259}/+* 和野生型对照 *w¹¹¹⁸* 各 200 只雄性果蝇的寿命, 每 4 d 统计一次死亡

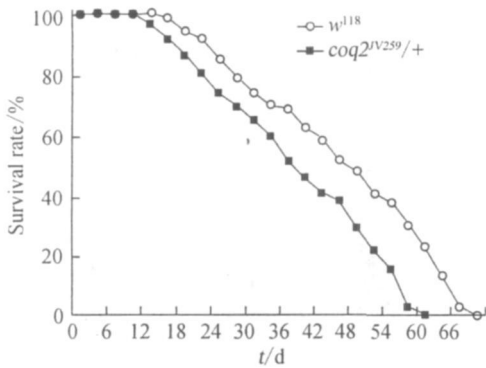


图4 $coq2$ 突变体与野生型果蝇寿命的比较

Fig. 4 Comparison of lifespans of $coq2$ mutant and wild type control

率. 存活率曲线如图4所示, 辅酶Q合成酶杂合突变体 $coq2^{JV259/+}$ 比野生型对照 w^{118} 的寿命略短. $coq2^{JV259/+}$ 的平均寿命为 32.2 d, 最低寿命为 12 d, 最高寿命为 57 d, 标准差为 11.0 d. w^{118} 的平均寿命为 37.4 d, 最低寿命为 15 d, 最高寿命为 66 d, 标准差为 11.2 d. 通过平均数显著性检验, $t = 6.6$, $p < 0.01$, 统计差异显著.

3 讨论

辅酶Q作为一个具有多种生物功能的脂溶性醌类化合物分布于几乎所有生物体中, 从原核生物到真核生物中都存在不同形式的辅酶Q^[1-5]. 目前对辅酶Q的分布、代谢、合成及功能性研究还多集中在细胞水平, 在酵母、线虫中的研究也十分有限. 利用培养细胞或简单生物体中可以更加方便地研究辅酶Q的各种生化特性, 但其生理功能在不同物种中不尽相同, 比如哺乳类细胞中辅酶Q的代谢与低等生物细胞有很大区别. 高等生物各组织中存在有效的系统能还原氧化态的辅酶Q, 从而保持较高的抗氧化水平^[18]. 但在线虫中可能正相反, 有实验证明长时间摄取辅酶Q会缩短线虫的寿命, 这可能是因为电子传递的增加导致了过氧化物(ROS)水平的上升^[24-26].

果蝇是奠定经典遗传学基础的重要模式生物之一, 已经被广泛运用于遗传学、发育生物学及药物筛选等研究领域. 果蝇比线虫更高等, 属于后生动物, 几乎所有哺乳类重要的信号通路在果蝇中都存在. 我们的实验结果显示, 果蝇的辅酶Q组成与哺乳类一致, 并且辅酶Q合成酶突变体寿命缩短也与目前公认的辅酶Q的抗衰老功能相符. 辅酶Q10是新一代的维生素, 除了在临床上救助突发心脏病等相关疾病外, 已经作为抗氧化及抗衰老的保健品供大众使用^[27-28]. 但我

们对辅酶Q的生理功能并不十分了解, 由于果蝇具有遗传背景清楚、突变体丰富、生长周期短等优点, 利用其研究辅酶Q的生理功能将发挥独特的优势. 我们的实验结果将有利于利用果蝇模型研究辅酶Q的功能.

参考文献:

- [1] Crane F L, Hatefi Y, Lester R L, et al. Isolation of a quinone from beef heart mitochondria[J]. Biochem Biophys Acta, 1957, 25(1): 220-221.
- [2] Wolf D E, Hoffman C H, Trenner N R, et al. Coenzyme Q structure studies on the coenzyme Q group[J]. J Am Chem Soc, 1958, 80: 4750-4752.
- [3] Ernster L, Lee I Y, Norling B, et al. Studies with ubiquinone depleted submitochondria particles[J]. Eur J Biochem, 1969, 9: 299-310.
- [4] Crane F L. Isolation of two quinones with coenzyme Q activity from Alfalfa[J]. Plant Physiol, 1959, 34(5): 546-551.
- [5] Olson R E, Rudney H. Biosynthesis of ubiquinone[J]. Vitam Horm, 1983, 40: 1-43.
- [6] Echay K S, Winkler E, Klingenberg M. Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function[J]. Nature, 2000, 408(6812): 609-613.
- [7] Walter L, Nogueira V, Lerverve X, et al. Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site[J]. J Biol Chem, 2000, 275(38): 29521-29527.
- [8] Kalen A, Norling B, Appelkvist E L, et al. Ubiquinone biosynthesis by the microsomal fraction from rat liver[J]. Biochim Biophys Acta, 1987, 926: 70-78.
- [9] Kagan V E, Nohl H, Quinn P J. Coenzyme Q: its role in scavenging and generation of radicals in membranes[C]// Handbook of Antioxidants. New York: Marcel Dekker Inc, 1996: 157-201.
- [10] Tomasetti M, Littarru G P, Stocker R, et al. Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27: 1027-1032.
- [11] Tomasetti M, Allea R, Borghi B, et al. In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage[J]. FASEB J, 2001, 15: 1425-1427.
- [12] Gille L, Nohl H. The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone[J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 375: 347-354.
- [13] Santos Ocana C, Villalba J M, Cordoba F, et al. Genetic evidence for coenzyme Q requirement in plasma membrane electron transport[J]. J Bioenerg Biomembr, 2000, 32(1): 1-10.

- 1998, 30(5): 465-475.
- [14] Langsjoenn P H, Langsjoen A M. Overview of the use of CoQ10 in cardiovascular disease[J]. Biofactors, 1999, 9: 273-284.
- [15] Koroshetz W J, Jenkins B G, Rosen B R, et al. Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10[J]. Ann Neurol, 1997, 41: 160-165.
- [16] Shults C W, Haas R H, Passov D, et al. Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects[J]. Ann Neurol, 1997, 42: 261-264.
- [17] Lasen P L, Clarke C F. Extension of life span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q[J]. Science, 2002, 295(5552): 120-123.
- [18] Lönnrot K, Holm P, Lagerstedt A, et al. The effects of lifelong ubiquinone Q10 supplementation on the Q9 and Q10 tissue concentrations and life span of male rats and mice[J]. Biochem Mol Biol Int, 1998, 44(4): 727-737.
- [19] Liao T S V, Call G B, Gupta P, et al. An efficient genetic screen in *Drosophila* to identify nuclear encoded genes with mitochondrial function[J]. Genetics, 2006, 174(1): 525-533.
- [20] Lass A, Sohal R S. Electron transport-linked ubiquinone dependent recycling of α -tocopherol inhibits autooxidation of mitochondrial membranes[J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 352: 229-236.
- [21] Wang M C, Bohmann D, Jasper H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*[J]. Developmental Cell, 2003, 5(5): 811-816.
- [22] Forsgren M, Attersand A, Lake S, et al. Isolation and functional expression of human CoQ2, a gene encoding a polyprenyl transferase involved in the synthesis of CoQ[J]. Biochem J, 2004, 382: 519-526.
- [23] Ohara K, Kokado Y, Yamamoto H, et al. Engineering of ubiquinone biosynthesis using the yeast CoQ2 gene confers oxidative stress tolerance in transgenic tobacco[J]. Plant J, 2004, 40(5): 734-743.
- [24] Rodríguez Aguilera J C, Gaviñán A, Asencio C. The role of ubiquinone in *Caenorhabditis elegans* longevity[J]. Ageing Res Rev, 2005, 4: 41-53.
- [25] Kayser E B, Sedensky M M, Morgan P G, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long lived mutant *clk-1*[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 54479-54486.
- [26] Ishii N, Senoo Matsuda N, Miyake K, et al. Coenzyme Q10 can prolong *C. elegans* lifespan by lowering oxidative stress[J]. Mech Ageing Dev, 2004, 125(1): 41-46.
- [27] Coles L, Harris S. Coenzyme Q10 and lifespan extension[J]. Advances in Anti Aging Medicine, 1996, 1: 205-215.
- [28] Quiles J L, Ochoa J J, Huertas J R, et al. Coenzyme Q supplementation protects from age related DNA double strand breaks and increases lifespan in rats fed on a PUFA rich diet[J]. Exp Gerontol, 2004, 39(2): 189-194.

Characterization of Coenzyme Q and Preliminary Investigation on Its Effect on Life span in *Drosophila melanogaster*

CHENG Wei¹, LI Dongmei¹, SONG Chuan'chao¹, HAN Wei¹,
YANG Lirong², CHEN Jiaming^{1,2*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Abstract: Coenzyme Q is an essential component of the mitochondrial respiratory chain as a lipid soluble electron transporter located in the inner membrane of mitochondria. The number of isoprenoid subunits in the coenzyme Q side chain varies in different species. The content of coenzyme Q in *Drosophila* has not been reported yet. In the present report, we analyzed the content of coenzyme Q in adult *Drosophila* by HPLC. We provided evidence that *Drosophila* contains both CoQ9 and CoQ10. The amount of CoQ9 is about 2.5 folds than that of CoQ10. We further showed the content of CoQ9 and CoQ10 in females are respectively about 30%, 33% higher than that in males. In addition, both concentrations of CoQ9 and CoQ10 are significantly reduced in the mutant of CoQ synthase gene *coq2* which appeared with shortened life span. These results provided a good basis to further investigate *in vivo* biological functions of CoQ in *Drosophila*.

Key words: coenzyme Q; *Drosophila*; HPLC; life span