

*C. elegans*中*clk-1*基因对寿命的影响

章丛婕 王科洁 刘振亚 黄佳涛 周怀彬 吕建新*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

摘要 *clk-1*[clock (biological timing) abnormality-1]是泛醌合成所必需的, 参与电子传递过程, 从而影响线粒体呼吸功能, 其突变是已发现的第一个寿命延长的线粒体基因突变。该文通过对线虫表型、线粒体功能的相关检测来研究*clk-1*突变和*clk-1* RNAi(RNA interference)对线虫寿命的影响。结果表明, *clk-1*突变线虫MQ130寿命延长, 线粒体中活性氧类(reactive oxygen species, ROS)水平升高而胞质中ROS水平下降, 总ATP含量升高; *clk-1* RNAi线虫寿命缩短, 线粒体中ROS水平下降而胞质中ROS水平升高, 总ATP含量下降。ROS作为细胞的一种信号分子, 与线虫的衰老密切相关; ATP是能量代谢的一个重要指标, 其含量的升高代表着能量代谢缓慢。由此可见, *clk-1*突变线虫和*clk-1* RNAi线虫寿命的差异可能与线粒体和胞质中ROS的不同功能以及能量代谢速率的不同有关。

关键词 秀丽线虫; *clk-1*; 寿命; ROS; ATP

Effects of *clk-1* on Lifespan of *Caenorhabditis elegans*

Zhang Congjie, Wang Kejie, Liu Zhenya, Huang Jiatao, Zhou Huaibin, Lü Jianxin*

(School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract *clk-1* [clock (biological timing) abnormality-1] encodes an enzyme required in CoQ biosynthesis, a redox-active lipid which acts as an electron carrier in the electron transport chain of the mitochondria. And *clk-1* is mutant is the first longevity of mitochondrial gene mutation. By studying the phenotypes and mitochondrial functions, we investigate that *clk-1* mutant and *clk-1* RNAi (RNA interference) had different influences on Lifespan. *clk-1*(qm30) mutant led to increased longevity, elevated the level of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria and decreased the level of ROS in cytoplasm. *clk-1*(qm30) mutant had higher ATP content. While *clk-1* RNAi led to shorten lifespan, decreased the level of mitochondrial ROS and elevated the level of cytoplasmic ROS. *clk-1* RNAi had significant lower ATP content. ROS, as cell signaling molecule, has an important role in aging; ATP is a significant index of energy metabolism, and the higher level represents slow energy metabolism. We suppose the difference of lifespan may depend on the function of the mitochondrial and cytoplasmic ROS and energy metabolism.

Keywords *Caenorhabditis elegans*; *clk-1*; lifespan; ROS; ATP

秀丽线虫, 全称秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*), 是一种常见的、生活在土壤中的小型线虫, 成虫体长约1.2 mm。其体长虽小, 但体内各系统

齐全, 包括上皮系统、神经系统、外分泌系统、肌肉组织、腔泡、消化系统和生殖系统等^[1], 这为其作为模式生物进行不同的科学研究提供了前提条

收稿日期: 2016-12-22 接受日期: 2017-04-12

浙江省自然科学基金(批准号: LY13H250002)和浙江省教育厅一般科研项目(批准号: Y201534276)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87692820, E-mail: jxlu313@163.com

Received: December 22, 2016 Accepted: April 12, 2017

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY13H250002) and the Zhejiang Province Education Department General Scientific Research Project (Grant No.Y201534276)

*Corresponding author. Tel: +86-571-87692820, E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2017-05-19 17:46:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170519.1746.014.html>

件。目前,秀丽线虫已被广泛用于研究寿命延长的分子机制,已有文献报道线粒体功能的改变可以延长线虫寿命^[1]。本文正是利用秀丽线虫这一模式生物,通过对其表型、线粒体功能的相关检测来研究*clk-1*[clock (biological timing) abnormality-1]突变和*clk-1* RNAi(RNA interference)对线虫寿命的不同影响。

线粒体是铁硫簇、血红素、ATP合成的主要场所^[2],是通过氧化磷酸化进行能量代谢必不可少的细胞器,也是细胞内活性氧类(reactive oxygen species, ROS)的主要来源^[3],同时它还参与了细胞自噬、凋亡、发育、分裂、信号传递等几乎所有的生化过程^[4-5]。线粒体功能的紊乱可以导致许多疾病的发生,如费氏共济失调、阿尔茨海默症、帕金森病、糖尿病、Leber视神经病等^[6-7]。线虫的线粒体呼吸链(mitochondrial respiratory chain, MRC)结构、三羧酸循环以及生物能量代谢等许多途径均类似于哺乳动物^[8-9]。线粒体是细胞内ROS的主要来源,因此线粒体与衰老的发生有一定的关系。衰老是身体各器官功能逐渐衰退,细胞内蛋白质、脂类、DNA等损伤逐渐积累,细胞及细胞器稳态逐渐失衡的过程^[10],同时也是基因与环境等多种复杂因素相互作用的结果^[11]。自由基积累、端粒缩短、DNA的表观遗传学修饰等是目前解释衰老的主要假说。ROS属于自由基,其对衰老的作用机制目前有两种不同的假说。一种是衰老自由基假说,即自由基可以对细胞内大分子如蛋白质、脂类、DNA造成损伤,引起细胞功能紊乱,最终导致衰老^[12-13];另一种假说认为,ROS的增加并不能影响线虫寿命,两者具体关系还有待研究^[14]。

虽然已经提出了ROS介导的氧化损伤可以导致衰老,同时ROS也被证实参与了信号通路。然而,最近的研究已经表明,百草枯引起的ROS水平轻度增加可以促进长寿,提出了ROS的升高可以改变线虫的生理发育速度,影响多种长寿基因突变体包括*clk-1*突变体的寿命。*clk-1*突变是发现的第一个线粒体长寿突变体^[15],定位于线粒体膜上,属于高度保守的羟化酶DMQ(demethoxyubiquinone),其活性影响线虫发育、生长、行为以及衰老等各个方面。*clk-1*编码此蛋白质的187个氨基酸残基^[16-17],这蛋白质序列可以通过解聚和组装两种方式裸露TRC(tandemly repeated in *clk-1*)结构域,该结构域主要决定不同生物体内蛋白质的相似性^[18]。同时,*clk-1*是泛醌合成所必需的,其参与从复合体I或II传输电子至复合体

III的电子传递过程^[19],从而来影响线粒体呼吸功能。*clk-1*突变线虫的生长发育和生理过程缓慢,如生长周期、胚胎发育、胚胎后发育、活动频率和衰老。同时,*clk-1*突变线虫的线粒体功能只有轻微的损伤。在线虫体内,过表达*clk-1*引起线粒体活性增强,影响线虫活动频率,缩短寿命。*clk-1*调节着线虫的呼吸、行为及衰老等生物过程。事实上,目前对衰老的生理机制和分子机制都有着大量的研究,但是涉及到衰老相关的具体功能和分子机制部分还需要做很多的工作。衰老对生物体来说也是一个完整的进程,在研究中应该贯穿着生物体的整个生命进程;另外,很多线粒体基因功能的改变会引起线虫寿命的改变^[18]。综合文献报道,*nuo-6*和*isp-1*分别是线粒体复合体I和III的亚基^[20],对*nuo-6*和*isp-1*进行突变和RNAi处理,线虫寿命均延长^[21]。然而在该文中,我们发现,*clk-1*突变导致线虫寿命延长,*clk-1* RNAi导致线虫寿命缩短。在此基础上,我们展开*clk-1*基因对线虫寿命影响的研究。

1 材料与方法

1.1 线虫、菌株、质粒的来源

线虫品系: N2、MQ130[*clk-1*(qm30)III]、CF1553 muIs84[(pAD76)*sod-3p::GFP+rol-6*(su1006)]、大肠杆菌HT115及OP50、质粒L4440和线粒体文库(表达有相应线粒体功能基因dsRNA的HT115菌)均购自美国线虫遗传学中心(*Caenorhabditis* Genetics Center, CGC)。*clk-1* RNAi菌株是本实验室采用无缝克隆技术重组构建的。

1.2 主要实验试剂

琼脂、胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钙、硫酸镁、H₂DCFDA(货号35848)、苹果酸、左旋咪唑、Rhodamine 6G均购自Sigma公司。IPTG、氨苄青霉素购自碧云天生物科技有限公司。荧光定量PCR试剂盒、逆转录试剂盒、rTaq PCR酶、DNA marker、DEPC水购自TaKaRa公司。Trizol、BCA蛋白浓度测定试剂盒、超氧阴离子检测试剂盒、ATP测定试剂盒购自Life Technologies公司。四环素盐酸盐、胆固醇购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 干扰菌株的构建以及测序鉴定

1.3.1 引物设计 本实验室构建了三种干扰菌株,*clk-1* RNAi菌株来自购买的线粒体文库。*clk-1.1* RNAi菌株是干扰*clk-1*上游片段,*clk-1.2* RNAi菌株

是干扰*clk-1*下游片段。引物设计如下所示。*clk-1*上游: 5'-CTC GGT GTC GGT TCA GCA CTT-3', *clk-1*下游: 5'-CAG GAT CGT CGG CAA GGA GTT-3'; *clk-1.1*上游: 5'-AAC CCG TGG AGC ACA TAC-3', *clk-1.1*下游: 5'-AGA GCA TAA GCA GCC ACA-3'; *clk-1.2*上游: 5'-TCG GTT CAG CAC TTC TAG-3', *clk-1.2*下游: 5'-TTT CTC AGC AAT CGC AAT-3'。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,用双蒸水将其溶解,浓度为10 μmol/L。

1.3.2 DNA提取以及PCR扩增 挑取单线虫于25 μL/管的蛋白酶K, 65 °C孵育90 min, 95 °C灭活5 min, 12 000 ×g离心5 min, 取10 μL上清即为DNA。PCR扩增体系: 10 μL 2×phanta Master Mix、上下游引物(10 μmol/L)各0.2 μL、10 μL秀丽线虫DNA模板。PCR扩增程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30个循环; 72 °C 10 min, 4 °C保存。取2 μL产物,以1.0%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 扩增产物与质粒L4440连接、转化、鉴定 线性化L4440质粒(酶切位点Hind III)体系: 1 μL Hind III、2 μL 10×M9缓冲液、17 μL质粒L4440。按上述成分分配好后, 37 °C反应4 h, 65 °C灭活20 min。无缝克隆重组体系: 4 μL无缝克隆反应液、1 μL线性化质粒L4440、2 μL纯化的PCR片段, ddH₂O补足至20 μL。混匀后, 37 °C水浴40 min后, 置于冰上进行转化。次日挑5~10颗周围有卫星菌落的单菌落摇菌, 提质粒进行酶切鉴定。将酶切鉴定为阳性的菌落送到上海桑尼生物科技有限公司测序。

秀丽线虫RNAi的方法一般有四种, 包括显微注射法、喂食法、将线虫放在含dsRNA的溶液中以及通过转基因手段在活体内表达shRNA引起RNAi效应。在这四种方法中, 显微注射法RNAi效果最好, 但同转基因法一样费时、费力、效率较低, 而浸泡法成功率较低。喂食法因其成本较低且可同时处理大批量线虫, 成为了大多数实验室的首选。综上所述, 本实验室选择喂食法进行RNAi。

1.4 突变线虫的鉴定

*clk-1*突变线虫MQ130是纯合体, 缺失590 bp, 缺失片段包含*clk-1*基因的最后一个外显子, 属于无效突变, 使*clk-1*编码的蛋白质失去功能。

1.4.1 引物设计 *clk-1*内侧引物上游: 5'-CTT CTA GTG TTC CCG CCA CC-3', *clk-1*内侧引物下游: 5'-CGT GTC AGG ACC GAA ATC AA-3'; *clk-1*外侧引物上游: 5'-ACA TCG GGT TTC GCA CTA TT-3',

*clk-1*外侧引物下游: 5'-CGT AAT CGC TTA TAC GGT AG-3'。引物由上海桑尼生物科技有限公司合成,用双蒸水将其溶解,浓度为10 μmol/L。

1.4.2 DNA提取以及PCR扩增 挑取单线虫于25 μL/管的蛋白酶K, 65 °C孵育90 min, 95 °C灭活5 min, 12 000 ×g离心5 min, 取10 μL上清即为DNA。外侧引物PCR扩增体系如下: 10 μL 2×phanta Master Mix、上下游引物(10 μmol/L)各0.2 μL、10 μL秀丽线虫DNA模板。PCR扩增程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 150 s, 30个循环; 72 °C 10 min, 4 °C保存。取2 μL产物以1.0%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。内侧引物PCR扩增体系如下: 8 μL 2×phanta Master Mix、2 μL双蒸水、上下游引物(10 μmol/L)各0.2 μL、10 μL秀丽线虫DNA模板。PCR扩增程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 150 s, 35个循环; 72 °C 10 min, 4 °C保存。取2 μL产物以1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 秀丽线虫大小测定(以*clk-1* RNAi为例)

将野生型线虫N2和*clk-1*突变线虫MQ130进行F1代同步化后放于20 °C恒温培养箱中培养, 待长至距卵3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d时, 将两组线虫培养平板直接置于Nikon倒置显微镜下拍摄20条线虫的体型大小。同时, 拍摄1 mm标尺作为参考。线虫大小用Image J软件测量, 通过与标尺大小比对即可算出实验组和对照组线虫的实际大小。

注意事项: 拍摄温度控制在20 °C; 每次拍照参数设置应保持一致。在拍摄期间, 为保证干扰效果的存在, 实验组和对照组需要每天转板一次, 同时防止线虫产卵过多把菌膜吃光以及子代混入母代中影响实验结果的准确性。待线虫不产卵后, 可根据生长情况两天转一次新板。

1.6 秀丽线虫繁殖力的测定

将野生型线虫N2和*clk-1*突变线虫MQ130同步化后放于20 °C恒温培养箱中培养待长至成虫期(Young Adult)时, 分别挑取10条实验组和10条对照组线虫转移至铺有OP50菌膜的新鲜板上。时刻观察两组线虫的产卵情况, 待产卵开始时记录下时间。每天在此时间将两组线虫分别移至对应的新板上, 计作产卵1 d, 直至两组线虫分别产卵结束为止。统计从产卵开始至产卵结束时实验组和对照组线虫每24 h的产卵数量。因卵较小在显微镜下不易辨别, 故待板上的卵孵化长至L4期时放于65 °C烘箱中烘30 min, 使板

上线虫死亡后于Nikon ECLIPSE TS100倒置显微镜下统计幼虫数量,未孵化出幼虫的卵不计入内。

1.7 秀丽线虫吞咽频率、游泳频率测定(以*clk-1* RNAi为例)

将两组N2进行F1代同步化后放于20 °C恒温培养箱中培养待长至距卵3 d、6 d、10 d、14 d、17 d时,将两组线虫培养平板直接置于Nikon倒置显微镜下拍摄20条线虫的咽部运动,之后记录每条线虫在30 s内的吞咽频率。

游泳频率测定不同的是在距卵第3 d、6 d、10 d、14 d、17 d时将实验组和对照组线虫挑至加有300 μ L M9缓冲液的96孔板,在解剖镜下计数每条线虫在1 min内的身体摆动次数,即为游泳频率。

注意事项:拍摄温度控制在20 °C;每次拍照参数设置应保持一致。

1.8 秀丽线虫体内脂褐素积累测定

将两组N2进行F1代同步化后放于20 °C恒温培养箱中培养,待长至距卵第4 d、7 d、11 d、15 d、17 d时分别挑取15条实验组和15条对照组线虫至滴有20 μ L 0.25 mmol/L麻醉剂的0.2%琼脂糖玻片上,用牙签支撑盖玻片一端轻轻放下并保证线虫体型完整无损。立即将制备好的线虫玻片放于Nikon ECLIPSE Ni正置荧光显微镜下观察线虫体内绿色荧光情况。用Image J软件分析两组线虫体内绿色荧光强度,并用GraphPad Prism 5进行数据统计分析绘图。

注意事项:拍摄温度控制在20 °C;每次拍照参数设置应保持一致。

1.9 秀丽线虫ROS测定(线粒体提取法)(以*clk-1* RNAi为例)

实验组*clk-1*和空载组L4440分别进行F1代同步化,待长至Young Adult时,用M9缓冲液将两组线虫分别冲至15 mL离心管中,静置待线虫沉降至管底,弃上清。再用M9缓冲液重悬,重复此步骤3~4次。分别加120 μ L线粒体提取液重悬,之后移至匀浆器中,每组匀浆30次左右,冰上操作。将匀浆液转移至1.5 mL EP管中,4 °C、600 \times g离心10 min,取上清。4 °C、18 000 \times g离心10 min,取上清测胞质中ROS水平,沉淀加入40~50 μ L线粒体提取液,不重悬直接4 °C、18 000 \times g离心5 min,弃上清,沉淀加入110 μ L线粒体分析液重悬,混匀测线粒体中ROS水平。

1.10 秀丽线虫ATP测定(以*clk-1* RNAi为例)

实验组*clk-1*和空载组L4440分别进行F1代同

步化,待长至Young Adult时,用M9缓冲液将两组线虫分别冲至15 mL离心管中,静置待线虫沉降至管底,弃上清。再用M9缓冲液重悬,重复此步骤3~4次。分别加30 μ L ATP提取液重悬,之后移至匀浆器中,每组匀浆30次左右,冰上操作。分别将匀浆液转移至1.5 mL EP管中,4 °C、11 000 \times g离心5 min,取上清测定蛋白质浓度。之后100 °C 15 min,再4 °C、11 000 \times g离心10 min,取上清用于ATP测定(Invitrogen, Carlsbad, California, USA; Cat: A22066)^[21]。

1.11 统计学处理

采用Graphpad Prism 5软件进行数据处理。以mean \pm S.D.表示,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

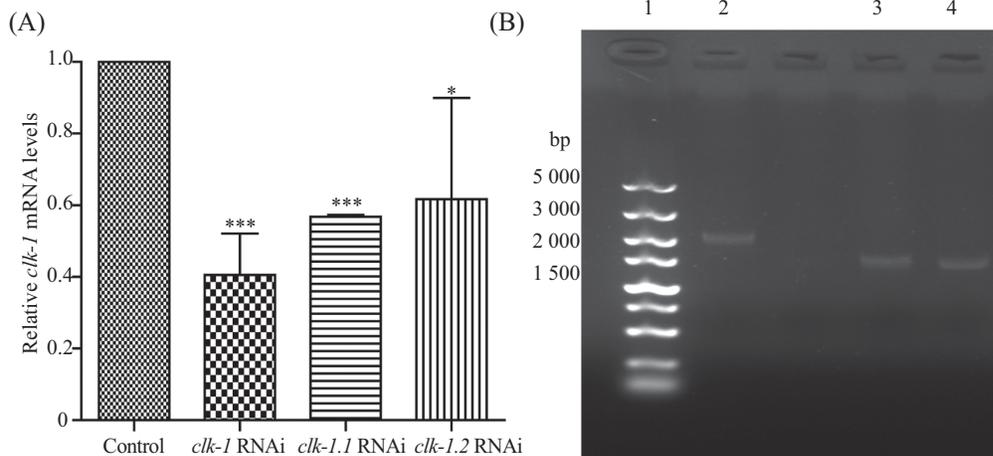
2 结果

2.1 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi菌株的鉴定

本实验室构建了三种干扰菌株,*clk-1* RNAi菌株来自购买的线粒体文库,*clk-1.1* RNAi菌株是干扰*clk-1*上游片段,*clk-1.2* RNAi菌株是干扰*clk-1*下游片段。荧光定量PCR鉴定三种菌株的干扰效果,结果显示,三次独立重复实验中实验组*clk-1*的mRNA水平相对于空载组L4440分别下降了约60%、43%、38%(图1A)。从中选择干扰效果最好的一组,*clk-1* RNAi为实验组,另外选择*nuo-6* RNAi作为阳性对照组(*nuo-6*是线粒体复合物I的亚基,对其进行突变和干扰处理,线虫寿命均延长^[21],因此选择*nuo-6* RNAi作为阳性对照组)。运用PCR鉴定*clk-1*突变线虫MQ130,内测引物扩增片段大小2 100 bp,突变线虫MQ130缺失590 bp,最终扩增片段大小为1 500 bp左右,与目的片段大小一致(图1B),由此可见,此线虫是*clk-1*突变模型。

2.2 *clk-1*突变线虫MQ130寿命延长及其表型测定

分别测定实验组*clk-1*突变线虫MQ130和对照组野生型线虫N2的寿命以及大小、繁殖力、吞咽、游泳等指标。研究发现,*clk-1*突变线虫MQ130相比于对照组寿命延长,平均寿命延长1~2 d(图2A, $P < 0.01$);*clk-1*突变线虫MQ130相比于对照组产卵数量显著下降,且产卵高峰期在距卵第7 d(168 h),相比于对照组推迟约2 d(图2B);*clk-1*突变线虫MQ130相比于对照组体型变小,发育延缓3~4 d(图2C和图2D);*clk-1*突变线虫MQ130相比于对照组吞咽和运动能力缓慢且下降速率缓慢(图2E和图2F)。此结果提示,



A: 荧光定量PCR验证三种菌株*clk-1*的mRNA水平; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较; B: 运用PCR鉴定突变线虫MQ130的电泳图; 1: DL5000 marker; 2: 对照组(野生型线虫N2); 3、4: 突变线虫MQ130。

A: the mRNA levels of *clk-1* was confirmed by Real-time PCR, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with control; B: *clk-1* mutant was identified by PCR; 1: DL5000 marker; 2: control group (wild type N2); 3,4: *clk-1* mutant MQ130.

图1 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi菌株的鉴定

Fig.1 Identification of *clk-1* mutant and *clk-1* RNAi

MQ130寿命延长且生长发育延缓。

2.3 *clk-1* RNAi线虫寿命缩短及其表型测定

分别测定*clk-1* RNAi线虫和空载组L4440线虫的寿命以及大小、吞咽、游泳、脂褐素积累等指标。结果发现,*clk-1* RNAi线虫相比于对照组平均寿命缩短(图3A);*clk-1* RNAi线虫相比于对照组体型不变、发育正常(图3B和图3C);*clk-1* RNAi线虫在距卵第10 d(241 h)吞咽速率相比于对照组明显下降(图3D);*clk-1* RNAi线虫在距卵第17 d(409 h)运动能力相比于对照组明显下降(图3E);*clk-1* RNAi线虫相比于对照组脂褐素积累速率增高(图3F)。此结果提示,*clk-1* RNAi线虫寿命缩短且衰老加速。

2.4 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫体内的膜电位水平

用罗丹明6G染料通过活体染色法分别测定*clk-1*突变线虫MQ130和对照组N2、*clk-1* RNAi线虫和空载组L4440线虫体内的膜电位。在线虫各个时期, MQ130体内膜电位水平均低于对照组, *clk-1* RNAi线虫体内膜电位水平则呈现先高于对照组后低于对照组的趋势(图4A和图4B)。

2.5 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫体内总ATP含量

分别测定*clk-1*突变线虫MQ130和对照组N2、*clk-1* RNAi线虫和空载组L4440在Young Adult时期线虫体内总ATP的含量。我们发现, MQ130体内总

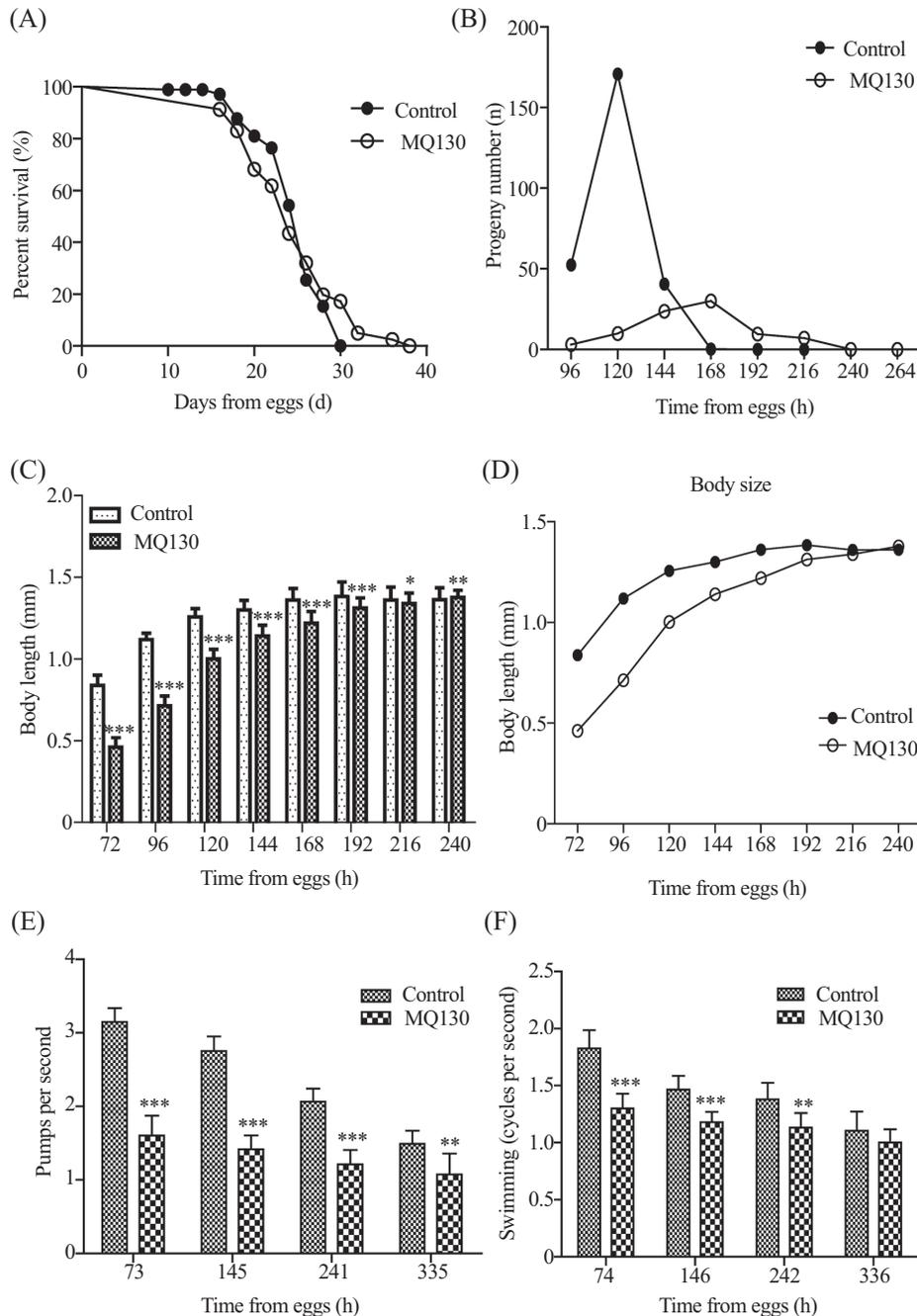
ATP含量升高(图5A); *clk-1* RNAi线虫体内总ATP含量下降(图5B)。

2.6 *clk-1*突变线虫MQ130(qm30)和*clk-1* RNAi线虫体内线粒体和胞质中ROS水平

选取提线粒体的方法, 用 H_2DCFDA 染料分别测定MQ130和正常对照组N2、*clk-1* RNAi和正常空载组L4440在Young Adult时期线虫体内线粒体和胞质ROS中的水平。我们发现, MQ130线粒体中ROS水平升高, 胞质中ROS水平下降(图6A和图6B); *clk-1* RNAi线虫线粒体中ROS水平下降, 胞质中ROS水平升高(图6C和图6D)。

2.7 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫体内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)表达情况

选取CF1553这一品系线虫, 它的*sod-3*启动子连接有GFP, 故GFP的强度可直接反映SOD-3的分布。一般情况下, SOD-3表达在线虫头部、尾部, 有时会在阴户表达。对CF1553 muIs84[(pAD76)*sod-3p::GFP+rol-6(su1006)*]线虫进行*clk-1* RNAi, 观察其荧光强度, 并用荧光定量PCR检测Young Adult时期线虫体内相关基因(*sod-1*、*sod-2*、*sod-3*、*sod-4*、*sod-5*)的mRNA水平。与对照组相比, *clk-1* RNAi线虫SOD-3荧光蛋白表达量升高, 但没有*nuo-6* RNAi线虫SOD-3荧光蛋白表达量升高明显(图7A); *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫*sod-1*、*sod-2*、



A: *clk-1*突变线虫MQ130寿命, $n=80$; B: *clk-1*突变线虫MQ130繁殖力, $n=10$; C: *clk-1*突变线虫MQ130大小柱状图, $n=20$; D: *clk-1*突变线虫MQ130大小折线图, $n=20$; E: *clk-1* RNAi线虫吞咽柱状图, $n=20$; F: *clk-1* RNAi线虫游泳柱状图, $n=20$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组比较。

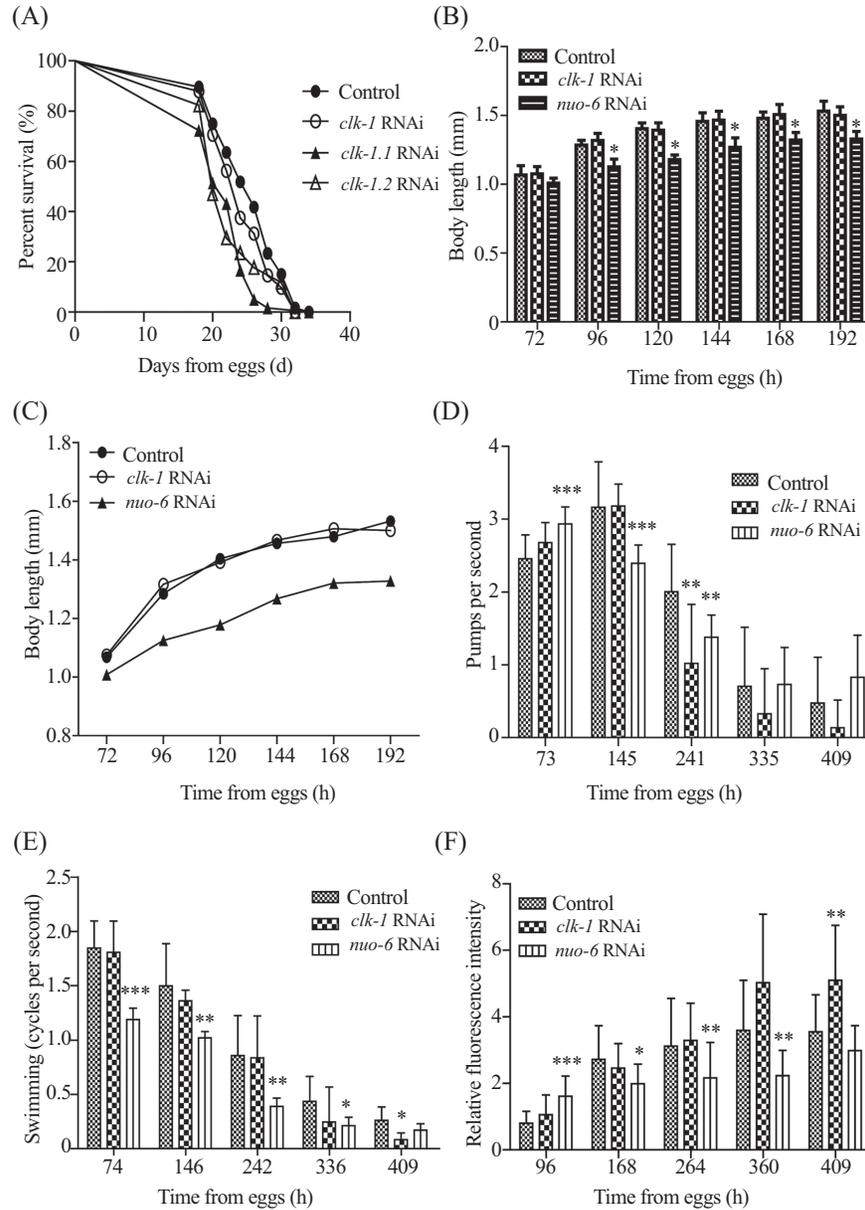
A: the lifespan of MQ130, $n=80$; B: the fecundity of MQ130, $n=10$; C: the body size of MQ130 in histogram, $n=20$; D: the body size of MQ130 in line chart, $n=20$; E: the pumping of MQ130 in histogram, $n=20$; F: the swimming of MQ130 in histogram, $n=20$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

图2 *clk-1*突变线虫MQ130寿命及表型
Fig.2 The lifespan and the phenotypes of MQ130

sod-3、*sod-4*、*sod-5*的mRNA水平上调, 但*clk-1*突变线虫MQ130 *sod-1*、*sod-4*、*sod-5* mRNA水平高于*sod-2*、*sod-3*; *clk-1* RNAi线虫*sod-1*、*sod-4*、*sod-5*的mRNA水平低于*sod-2*、*sod-3*(图7B)。

3 讨论

在人类中, 线粒体功能相关基因的突变导致了各种疾病的发生^[22]。能量需求高的组织首先受到危害, 比如神经、心脏、肌肉、肾脏以及内分泌系统,



A: *clk-1* RNAi线虫的寿命, $n=76$; B: *clk-1* RNAi线虫大小柱状图, $n=20$; C: *clk-1* RNAi线虫大小折线图, $n=20$; D: *clk-1* RNAi线虫吞咽柱状图, $n=20$; E: *clk-1* RNAi线虫游泳柱状图, $n=20$; F: *clk-1* RNAi线虫脂褐素积累柱状图, $n=15$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与对照组比较。

A: the lifespan of *clk-1* RNAi, $n=76$; B: the body of *clk-1* RNAi in histogram, $n=20$; C: the body of *clk-1* RNAi in line chart, $n=20$; D: the pumping of *clk-1* RNAi in histogram, $n=20$; E: the swimming of *clk-1* RNAi in histogram, $n=20$; F: the content of lipofuscin of *clk-1* RNAi in histogram, $n=15$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

图3 *clk-1* RNAi线虫寿命及表型

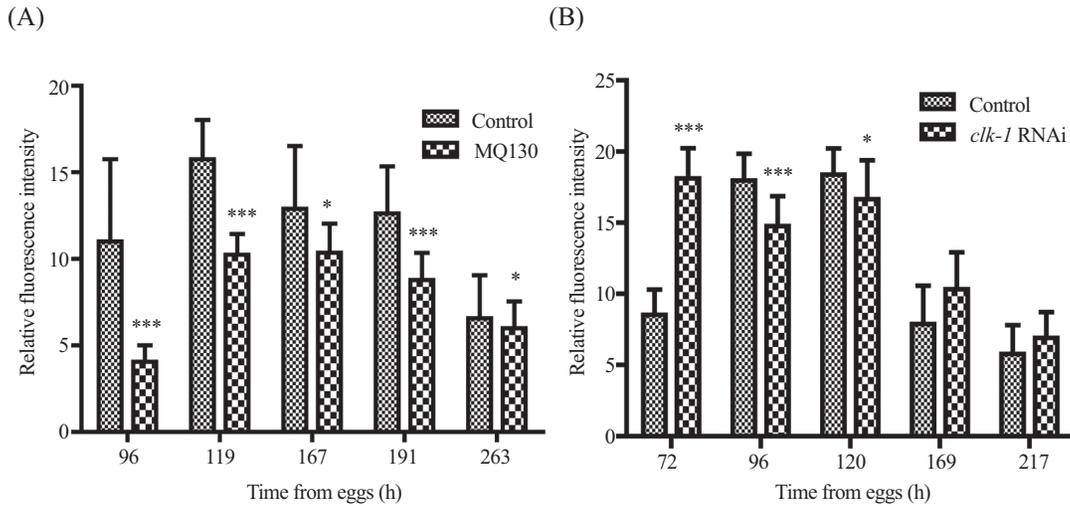
Fig.3 The lifespan and the phenotypes of *clk-1* RNAi

其中神经退行性病变FRDA(Friedreich's Ataxia)就是由于编码frataxin蛋白的*FXN*基因缺陷造成的^[23]。然而线粒体功能相关基因的突变却引起了线虫寿命的延长,但这一具体机制尚不明确。

在本实验中,我们首先测定了*clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫的寿命,发现MQ130寿命延长,*clk-1* RNAi线虫寿命缩短。在线虫中,有很多反映其衰老的指标,如体型大小和繁殖力反映其生

长发育状态,吞咽、游泳速率反映其健康状况,脂褐素含量代表其衰老程度。在本实验中,我们检测了这些指标后发现,MQ130线虫生长发育推迟,*clk-1* RNAi线虫衰老加速。同时,我们用荧光定量PCR验证了*clk-1*的mRNA水平确实是下降的。基于*clk-1*突变和*clk-1* RNAi对线虫寿命的不同影响,我们研究了ROS和能量代谢可能在寿命调节中起到的不同作用。

随后,我们测定了*clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1*

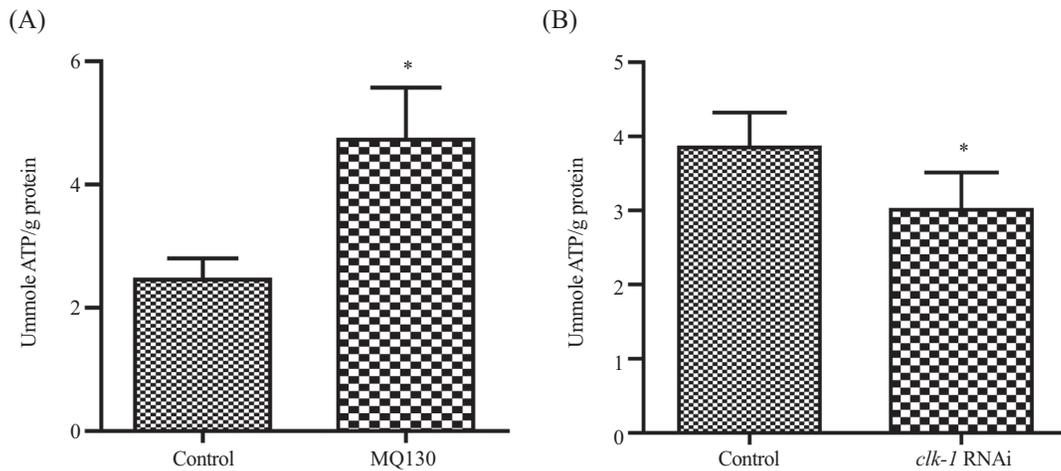


A: *clk-1*突变线虫MQ130膜电位, $n=20$; B: *clk-1* RNAi线虫膜电位, $n=20$; * $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与对照组比较。

A: the MMP level of MQ130, $n=20$; B: the MMP level of *clk-1* RNAi, $n=20$; * $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with control group.

图4 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫体内膜电位水平

Fig.4 The MMP level of MQ130 and *clk-1* RNAi



A: MQ130总ATP含量; B: *clk-1* RNAi线虫总ATP含量; * $P<0.05$, 与对照组比较。

A: the total ATP level of MQ130; B: the total ATP level of *clk-1* RNAi; * $P<0.05$ compared with control group.

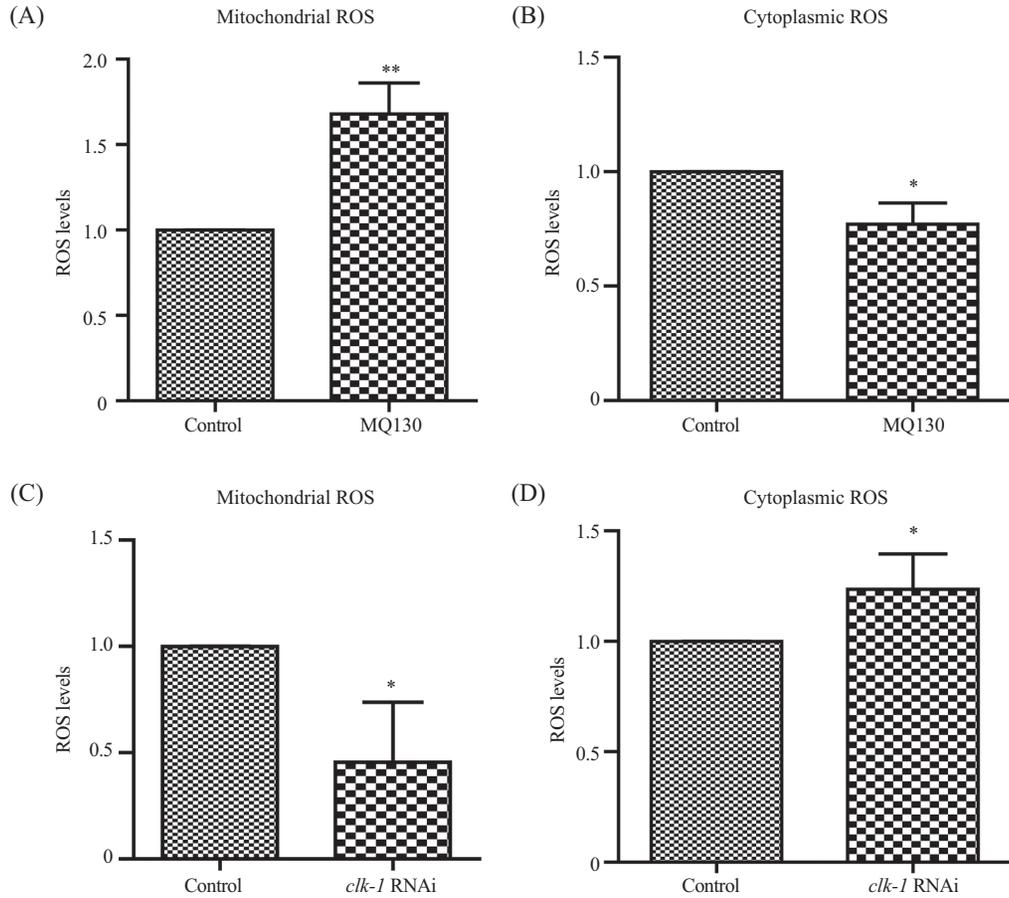
图5 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫体内总ATP含量

Fig.5 The total ATP level of MQ130 and *clk-1* RNAi

RNAi线虫的能量代谢情况。在线虫的呼吸过程中,线粒体内膜将产生的能量以电化学势能的形式储存起来,在其两侧形成质子及其他离子的浓度差,从而产生膜电位。正常的线粒体膜电位在线粒体氧化磷酸化、ATP的产生中起着重要作用,是细胞正常生理功能维持的基础。ATP是能量代谢的一个重要指标,其含量的升高代表着能量代谢缓慢。结果显示,*clk-1*突变线虫膜电位水平下降,反映了细胞能量产生减少,而总ATP含量升高,反映了能量的产生大于能量的消耗,侧面说明了线虫的代谢缓慢。*clk-1* RNAi线虫膜电位水平升高,反映了细胞能量产生增

加,而总ATP含量下降,反映了能量消耗大于能量产生,侧面说明了线虫的代谢迅速。

紧接着,我们测定了*clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫线粒体和胞质中ROS水平发现,*clk-1*突变线虫MQ130线粒体中ROS水平升高而胞质中ROS水平下降。*clk-1* RNAi线虫线粒体中ROS水平下降而胞质中ROS水平升高。这可能是由于线粒体和胞质中抗氧化防御能力的不同,导致ROS水平在不同部位存在差异,最终诱导细胞变化及可能的衰老过程。在氧化应激时,线虫对氧自由基敏感性增加,激活了保护性机制来对抗ROS造成的损

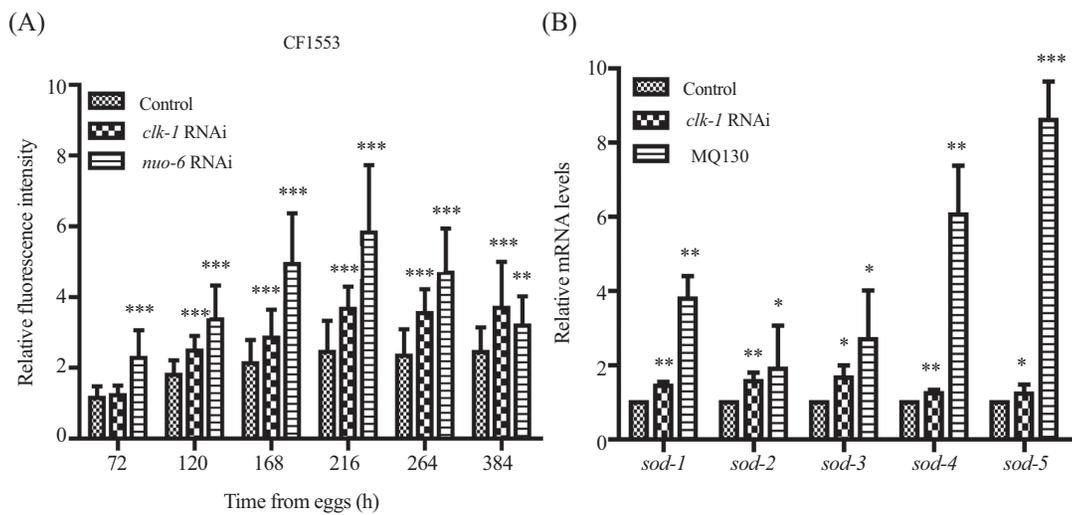


A: MQ130线粒体中ROS水平; B: MQ130胞质中ROS水平; C: *clk-1* RNAi线虫线粒体中ROS水平; D: *clk-1* RNAi线虫胞质中ROS水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: the mitochondrial ROS level of MQ130; B: the cytoplasmic ROS level of MQ130; C: the mitochondrial ROS level of *clk-1* RNAi; D: the cytoplasmic ROS level of *clk-1* RNAi; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图6 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫体内线粒体和胞质中ROS水平

Fig.6 The mitochondrial and cytoplasmic ROS level of MQ130 and *clk-1* RNAi



A: CF1553荧光强度, $n=20$; B: *sod-1*、*sod-2*、*sod-3*、*sod-4*、*sod-5* mRNA水平; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较。

A: the fluorescence intensity of CF1553, $n=20$; B: the mRNA levels of *sod-1*, *sod-2*, *sod-3*, *sod-4* and *sod-5* of MQ130 and *clk-1* RNAi are confirmed by Real-time PCR; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with control group.

图7 *clk-1*突变线虫MQ130和*clk-1* RNAi线虫体内*sod* mRNA表达情况

Fig.7 The *sod* mRNA expression of *clk-1* RNAi and MQ130

害,当保护性机制的激活程度足以降低ROS的毒性作用时,与正常条件相比,就有效减少了损伤的积累,最终引起了寿命延长。总之,ROS的量是氧化应激水平与保护性机制动态平衡的结果。同时,我们选取CF1553这一品系线虫,其荧光强度可直接反映SOD-3的分布。*clk-1* RNAi线虫超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的激活程度低于*nuo-6* RNAi线虫,还不足以降低ROS的毒性作用来延长寿命。之后我们用荧光定量PCR验证了相关基因的mRNA水平(*sod-1*、*sod-4*、*sod-5*主要作用于胞质,*sod-2*、*sod-3*主要作用于线粒体^[24]),发现*clk-1*突变主要是激活胞质内SOD的表达从而引起胞质中ROS水平下降;而*clk-1* RNAi后主要是激活线粒体内SOD的表达从而引起线粒体中ROS水平下降。在细胞中,抗氧化防御系统是由多种酶和自由基清除剂构成,如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、过氧化氢酶等。在保护机体免受ROS损伤时,SOD起着主要作用,它可以把超氧化物转化成过氧化氢和分子氧。超氧化物歧化酶家族中的每一员对氧化应激的反应起着重要的作用,它们能够清除生物体内线粒体或胞质中的氧自由基,提高对外界应激的抵抗能力,从而使机体更好地适应外界的不良环境。根据寿命长短规律,我们推测,线粒体ROS和胞质ROS有着相反的作用。线粒体ROS的增加可以延长寿命,而胞质ROS的增加却引起寿命缩短。这一结果与最近Schaar等^[24]发表的文章报道相似,但是线粒体和胞质中的ROS是如何影响线虫寿命仍需作进一步研究。

该文主要以秀丽线虫为模型,对*clk-1*进行突变和干扰处理后发现线虫寿命有所不同,基于此现象研究ROS、氧化防御、能量代谢与衰老之间的关系,对目前衰老自由基理论提出质疑的同时也提出了新的观点。线粒体ROS的增加延长寿命,胞质ROS的增加缩短寿命,同时在线粒体受损时,氧化防御(线粒体和胞质中SOD的表达上调)和能量代谢减缓在寿命延长中起到了重要作用。线粒体作为细胞代谢的主要场所和ATP、血红素等重要物质的合成场所,其功能的稳定和衰老的发生密切相关。目前,我们可以得出这样的结论:线粒体对衰老和年龄相关疾病起着重要的作用。然而,由线粒体功能引起的衰老过程仍然没有解决其机制问题。线粒体ROS的作用仍然是有争议的,支持线粒体衰老自

由基理论(mitochondrial free radical theory of aging, MFRTA)的数据和挑战MFRTA的新数据表明,至少在低等生物(如线虫)中ROS可以延长寿命。未来的研究工作应解决哪些细胞是产生ROS的主力 and 这些细胞是如何产生ROS的,ROS作用于不同部位对寿命产生的影响和对与年龄有关的疾病的影响。深入研究线粒体功能紊乱是如何引起细胞反馈性地激活保护性机制的,对于疾病的治疗甚至延缓衰老的发生都有现实或潜在意义,如何延长线粒体相关基因突变线虫的寿命还需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Polk TA, Farah MJ. The neural development and organization of letter recognition: Evidence from functional neuroimaging, computational modeling, and behavioral studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(3): 847-52.
- 2 Henze K, Martin W. Evolutionary biology: Essence of mitochondria. *Nature* 2003; 426(6963): 127-8.
- 3 Lanza IR, Nair KS. Mitochondrial function as a determinant of lifespan. *Pflug Arch Eur J Phy* 2010; 459(2): 277-89.
- 4 Bess AS, Crocker TL, Ryde IT, Meyer JN. Mitochondrial dynamics and autophagy aid in removal of persistent mitochondrial DNA damage in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(16): 7916-31.
- 5 McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: More than just a powerhouse. *Curr Biol* 2006; 16(14): 551-60.
- 6 Smits P, Smeitink J, van HL. Mitochondrial translation and beyond: Processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010(1): 98-116.
- 7 Harbauer A, Zahedi R, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C. The protein import machinery of mitochondria—a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab* 2014; 19(3): 357-72.
- 8 Murfitt RR, Vogel K, Sanadi DR. Characterization of the mitochondria of the free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Phys B* 1976; 53(4): 423-30.
- 9 O'Riordan VB, Burnell AM. Intermediary metabolism in the dauer larva of the nematode *Caenorhabditis elegans*-II. The glyoxylate cycle and fatty-acid oxidation. *Comp Biochem Phys B* 1990; 95(1): 125-30.
- 10 Schöneich C. Protein modification in aging: An update. *Exp Gerontol* 2006; 41(9): 807-12.
- 11 Helfand SL, Rogina B. Regulation of gene expression During aging. Springer Berlin Heidelberg 2000; 29: 67-80.
- 12 Farooqui T, Farooqui AA. Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev* 2009; 130(4): 203-15.
- 13 Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78(2): 547-81.
- 14 Sanz A. Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? *Biochim Biophys Acta* 2016; 1857(8): 1116-26.

- 15 Wong A, Boutis P, Hekimi S. Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 1995; 139(3): 1247-59.
- 16 Jonassen T, Marbois BN, Kim L, Chin A, Xia YR, Lusic AJ, *et al.* Isolation and sequencing of the rat Coq7 gene and the mapping of mouse Coq7 to chromosome 7. *Arch Biochem Biol* 1996; 330(2): 285-9.
- 17 Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, Lussier M, Bussey H, Hekimi S. Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 1997; 275(5302): 980-3.
- 18 Felkai S, Lemieux J, Labbé JC, Brown GG, Hekimi S. *Clk-1* controls respiration, behavior and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 1999; 18(7): 1783-92.
- 19 Miyadera H, Amino H, Hiraishi A, Taka H, Murayama K, Miyoshi H, *et al.* Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7713-6.
- 20 Feng J, Bussière F, Hekimi S. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell* 2001; 1(5): 633-44.
- 21 Yang W, Hekimi S. Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in *elegans*. *Ageing Cell* 2010; 9(3): 433-47.
- 22 Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39(1): 359-407.
- 23 Campuzano V, Pandolfo M. Friedreich's ataxia: Autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 2013; 271(7): 294.
- 24 Schaar CE, Dues DJ, Spielbauer KK, Machiela E, Cooper JF, Senchuk M, *et al.* Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet* 2015; 11(2): e1004972.