

# 腺苷酸环化酶Cyr1突变对酿酒酵母时序寿命的影响

刘莹\* 王国丽 毕强 徐鸿翊

(中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110001)

**摘要** 为了研究腺苷酸环化酶Cyr1对酵母细胞时序寿命的影响, 我们使用Cyr1Δ与野生菌DBY746来检测酵母细胞的时序寿命, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或热抵抗能力以及线粒体膜形态。结果表明, Cyr1Δ的时序寿命是DBY746的2.25倍, 在强卡路里限制调节下, 两者的生存时间均有延长, DBY746和Cyr1Δ达到10%生存率的时间分别为13 d和45 d。Cyr1Δ有更强的抵抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和热处理能力, 同时发现Cyr1Δ比DBY746在培养第3 d和第5 d有更完整的线粒体膜形态。

**关键词** 酿酒酵母; 腺苷酸环化酶Cyr1; 时序寿命; 线粒体膜形态

酿酒酵母作为单细胞生物模型有两种研究衰老的确认指标, 一是复制寿命(replicative life span, RLS), 二是时序寿命(chronological life span, CLS), 前者是测量细胞衰老前亲代细胞产生的子代细胞数, 即有丝分裂数; 而后者是测定亲代细胞在液体培养条件下的生存时间。复制寿命被认为与有丝分裂期组织的衰老相关, 而时序寿命则与有丝分裂后期组织的衰老有关<sup>[1,2]</sup>。卡路里限制(Calorie restriction, CR)可以干扰和减缓迄今从酵母到小鼠等几乎所有物种的生存寿命<sup>[3,4]</sup>。尽管目前关于卡路里限制如何调节生命周期有很多假说, 但其作用机制尚无明确。Min等<sup>[5]</sup>证明在酵母细胞中, 卡路里限制引起的生命周期延长与Ras/PKA、Tor和Sch9等传导途径相关, Ras/cAMP/PKA/Rim15/Msn2/4和Tor/Sch9/Rim15/Gis1是卡路里限制依赖的两条主要调节途径。Ras/cAMP/PKA和Tor/Sch9在细胞保护、抗氧化和细胞分裂调节中也发挥重要作用<sup>[6]</sup>, 这些基因与哺乳动物Ras、PKA、Tor、Akt以及S6K高度同源, 已被证明在人类衰老和相关疫病中发挥重要作用。

Cyr1编码酵母腺苷酸环化酶, 腺苷酸环化酶催化ATP产生cAMP, 从而激活cAMP依赖的蛋白激酶活性。腺苷酸环化酶是膜结合蛋白, 其中Ras结合区与Ras相偶联, 受Ras信号调节, 在cAMP/PKA途径中调节多种代谢途径, 包括细胞周期、应激反应和衰老进程<sup>[7]</sup>。

线粒体在细胞衰老中的重要作用已得到广泛认可, 在致衰老的内、外信号刺激下, 线粒体膜结构发生变化, 将膜间隙的多种可溶性蛋白释放入胞浆,

其结构和功能的变化对细胞衰老的研究有着重要的意义<sup>[8]</sup>。研究Cyr1如何参与调节衰老进程以及对线粒体结构和功能的影响, 对研究衰老机制及未来抗衰老药物的开发都有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒和培养基

野生菌DBY746: MATa leu2-3 112 his3D1 trp1-289 ura 3-52 GAL+, Cyr1Δ: MATa leu2-3 112 his3D1 trp1-289 ura3-52 GAL+ cyr1::mTn, 来自Longo实验室<sup>[9]</sup>。Ycp50-CYR1(CEN, URA)来自Carl Mann实验室, 所有培养基采用Longo衰老培养基<sup>[9]</sup>, 即在SDC配方基础上四倍量的色氨酸、亮氨酸、尿嘧啶和组氨酸, 因为DBY746背景菌是leu2-3, 112 his3D1 trp1-289 ura 3-52, 即leu、his、trp、ura表型缺失, 四倍量的四种氨基酸主要是为了消除野生菌的表型缺陷。常规2%葡萄糖作为碳源, 特殊注明的除外。在实验中充分考虑到为了避免营养性缺失可能带来的影响, 转化了空载体以保证菌株具有相同的遗传背景。固体培养基为YPD平板, 10 g/L酵母提取物、20 g/L胰蛋白胨、20 g/L琼脂溶解于去离子水中, 高压后加入葡萄糖使其终浓度为2%。每次实验均从-80 °C冰箱中取菌株, 涂YPD平板, 在30 °C温箱培养2~3 d, 后取5~6个克隆接种于2 ml的培养基中过夜培养, 制备过夜饱和培养物(saturated overnight culture, SONC),

收稿日期: 2010-10-15 接受日期: 2011-03-07

国家自然科学基金(No.30640002)资助项目

\*通讯作者。Tel: 024-23256451, E-mail: yingliucmu@gmail.com

用SONC接种衰老培养基进行实验。

## 1.2 时序寿命测定

参考Longo方法<sup>[9]</sup>。新鲜SONC接种于25 ml衰老培养基中, 起始 $D_{600}=0.1$ , 第3 d当细胞进入稳定期并停止分裂时我们认定此时的生存率为100%, 时间计算为0天。此后每隔2~3 d取50  $\mu$ l样品, 倍比稀释涂YPD平板, 30  $^{\circ}$ C培养箱培养2~3 d后计数克隆, 并计算生存率。在卡路里限制实验中, 新鲜SONC接种衰老培养基后, 培养到第3 d取样品计数并计为0 d, 同时将酵母细胞低速离心收集, 用去离子水洗3次后, 重新接种在25 ml去离子水中继续培养, 此过程严格无菌。此后每2 d更换新的灭菌去离子水做培养基并计数克隆数量、生存率。为消除误差, 每次实验均需从-80  $^{\circ}$ C冰箱重新取菌, 新制备培养基和灭菌水, 新鲜的SONC。每个菌株同时接种3个平行培养瓶, 每个培养瓶样品稀释并涂2个平行YPD板计数克隆, 实验至少重复3次。

## 1.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和热抵抗实验

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抵抗实验: 取 $1 \times 10^7$ 酵母细胞( $D_{600} \approx 1$ ), 室温下135 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理1 h, 去离子水清洗3次, 并10 $\times$ 倍比稀释后涂YPD平板, 30  $^{\circ}$ C培养箱培养2~3 d, 照相观察。

热抵抗实验: 从培养瓶中取1 ml培养液, 在55  $^{\circ}$ C水温摇床中培养1 h, 后取 $1 \times 10^7$ 细胞, 10 $\times$ 倍比稀释后涂YPD板, 30  $^{\circ}$ C培养2~3 d, 照相观察。

## 1.4 荧光显微镜观察线粒体结构

pYX232-mtGFP是表达GFP标记的线粒体膜蛋白<sup>[10]</sup>的质粒, 将质粒转化酵母细胞后, 荧光显微镜观察。Nikon Eclipse E00荧光显微镜, Apo 100 $\times$ 目镜, 1.4倍物镜。图像抓拍用SPOT RT9.0 onochrome-6相机, MetaMorph(Version 6.3.0)软件。所有图像用photoshop 7.0分析处理。

## 2 结果

### 2.1 DBY746和*Cyr1* $\Delta$ 的时序寿命

用Longo的衰老培养基培养野生DBY746和*Cyr1* $\Delta$ , 测定细胞时序寿命。如图1所示, 相比DBY746在第5 d 8%的生存率, *Cyr1* $\Delta$ 有60%的生存率。而第7 d野生菌的生存率在3%以下, 而*Cyr1* $\Delta$ 在第13 d生存率才达到4%左右。*Cyr1* $\Delta$ 生存时间要比DBY746延长接近一倍。图2表示酵母细胞在强卡路里限制条件下, 无论是DBY746或是*Cyr1* $\Delta$ 生存时间都有延长。

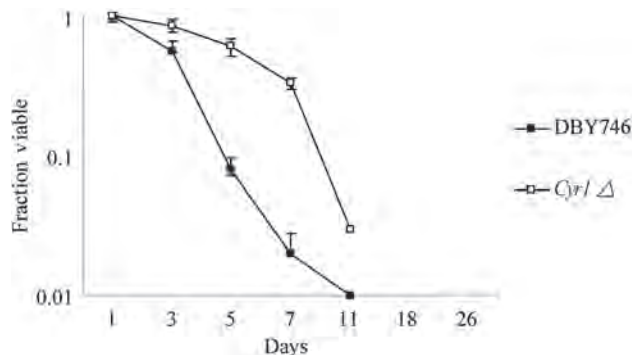


图1 相比DBY746, 在2%葡萄糖的衰老培养基中*Cyr1* $\Delta$ 增加酵母细胞时序寿命

每种菌株同时设3组平行培养液, 本实验重复3次。

Fig.1 *Cyr1* $\Delta$  mutant increased chronological life span compared with DBY746 in 2% glucose aging medium

Triplicate cultures for each strain were used and the experiments were repeated 3 times.

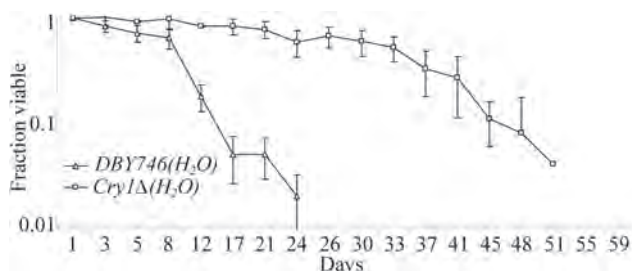


图2 卡路里限制情况下*Cyr1* $\Delta$ 时序寿命

新鲜SONC接种到含2%葡萄糖的衰老培养基中, 30  $^{\circ}$ C培养3 d后低速离心, 消毒去离子水洗3次, 重新注入25 ml去离子水继续培养, 以后每隔2 d水洗并注入新的去离子水, 每菌株设3个平行实验, 实验重复2次得到相同结果。

Fig.2 *Cyr1* $\Delta$  chronological life span under caloric restriction

Fresh SONC were inoculated into aging medium with 2% glucose and cultured for 3 days with shaking at 30  $^{\circ}$ C, the cells were centrifuged in lower speed at RT and washed with sterile water for three times. And then were resuspended in 25ml water and maintained at 30  $^{\circ}$ C with shaking. Every 2 days, the cells were washed and resuspended in fresh water, three cultures of each strain were used and the experiments were repeated twice. Error bars represent standard errors.

DBY746的第24 d生存率降到2%左右, 是常规衰老培养基的生存时间的3倍, *Cyr1* $\Delta$ 在第24 d还有59%的生存率, 在第51 d降到3%的生存率。结果表明无论是在正常培育或是在强卡路里限制条件下*Cyr1* $\Delta$ 比野生DBY746的有更长时序寿命。

### 2.2 稳定期*Cyr1* $\Delta$ 的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>抵抗和热抵抗能力

在对酵母细胞进行时序寿命测定的同时, 取不同时间点的酵母细胞进行抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和热抵抗实验。图3

表明, 在培养的第1 d和第6 d, *Cyr1Δ*比DBY746菌有更强的抵抗能力。同时检测是否这种结果确实是由于*Cyr1*基因的缺失引起的, 我们对*Cyr1Δ*转化了Ycp50-CYR1质粒, 即恢复了细胞内CYR1的表达, 发现*Cyr1Δ*/CYR1的抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和热抵抗的能力恢复到与野生DBY746相似。验证了*Cyr1Δ*对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和热的抵抗力是由于*Cyr1*基因突变引起的。结果表明*Cyr1Δ*相比野生DBY746有更强的抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能力和热抵抗能力。

### 2.3 *Cyr1Δ*细胞的线粒体膜形态改变

我们对*Cyr1Δ*和DBY746进行了碳源选择实验, 分别将酵母菌在含有2%葡萄糖、3%甘油或3%乙醇

的YP培养板上培养。图4表明*Cyr1Δ*在3%的乙醇的YP培养基中生长缓慢, 在3%甘油培养基中不能生长。这一结果表明*Cyr1Δ*不能很好地利用甘油和乙醇, 可能意味着其线粒体的功能和结构可能发生了改变, 图5细胞中转化了可以用来观察线粒体膜蛋白结构的GFP标记的pYX232-mtGFP后, 在不同的培养时间取细胞荧光显微镜观察线粒体膜形态。结果发现, 在培养的第1 d野生和突变菌线粒体膜形态没有太大差别, 在第3 d野生DBY746的荧光呈现体积较大的量点, 呈分散分布, 有些细胞内甚至看不到荧光标记。而*Cyr1Δ*细胞的荧光结果显示有60%以上的

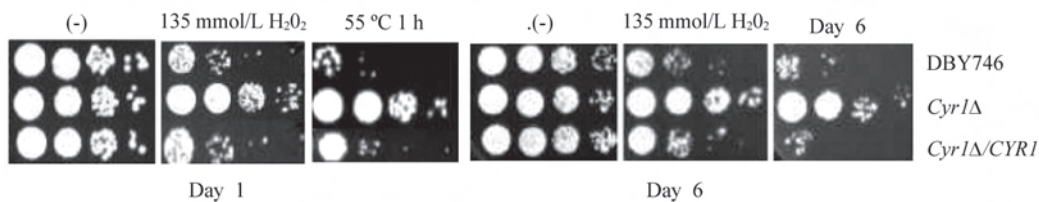


图3 *Cyr1Δ*提高了酵母细胞抗过氧化物和热处理能力

培养液加入135 mmol/L 过氧化氢或在55 °C热处理1 h后, 10×倍比稀释涂YPD板; *Cyr1Δ*/CYR1是指在*Cyr1*突变的酵母细胞中转化yCP50-CYR1质粒以达到恢复CYR1的表达目的。

Fig.3 *Cyr1Δ* enhanced hydrogen dioxide and heat stress resistance

The cells taken from cultures, were subject to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (135 mmol/L) or 55 °C heat stress for 1 h, 10-fold serial dilutions were prepared and spotted onto YPD plates; *Cyr1Δ*/CYR1 represents that *Cyr1* mutant was transformed with yCP50-CYR1 plasmid to put back CYR1.

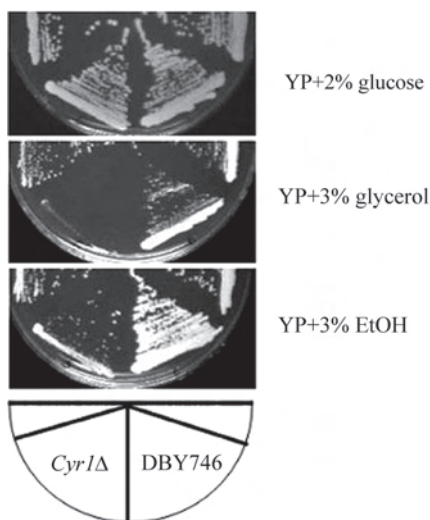


图4 *Cyr1Δ*和DBY746在葡萄糖、甘油和乙醇做碳源的YP培养基的生长情况

当细胞培养到稳定期后, 取10 μl培养液涂不同YP平板, 30 °C培养2-3 d。

Fig.4 *Cyr1Δ* and DBY746 were growth at YP with 2% glucose, 3% glycerol and 3% ethanol as carbon sources

3 μl of stationary phase cells were spread on the different plates and incubated at 30 °C for 2 to 3 days.

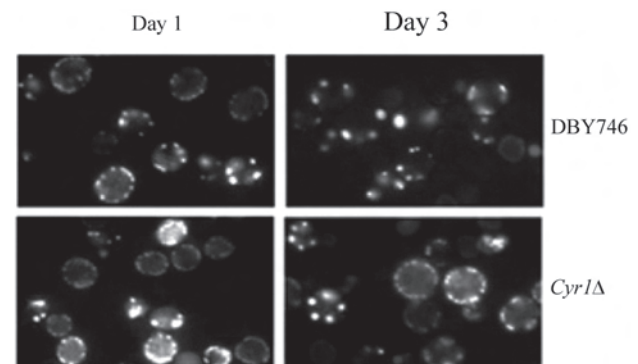


图5 DBY746和*Cyr1Δ*在培养第1 d和第3 d的线粒体形态细胞被转化pYX232-mtGFP来观察线粒体膜结构, 检测每种酵母细胞数量超过500个酵母细胞; 细胞观察使用荧光显微镜绿色光栅。实验重复3次得到类似的结果。

Fig.5 The results of mitochondria morphology of DBY746 and *Cyr1Δ* at day 1 and day 3

The cells were transformed with pYX232-mtGFP to detect mitochondrial membrane, total the number of the cells of each strain was more than 500 hundreds; the cells were visualized by fluorescence microscopy in green filter; the experiments were repeated three times and got the similar results.

细胞还呈现完整的点/线连续状态, 18%呈大点或散点, 22%没有荧光标记。

### 3 讨论

酵母细胞中有三个基因Ras2、Cyr1和Sch9, 他们与哺乳动物G蛋白-Ras、腺苷酸环化酶、丝/苏氨酸蛋白激酶Akt高度同源而受到注视<sup>[3]</sup>, Ras-cAMP途径在酵母细胞应激反应发挥了很大作用<sup>[11]</sup>。CYR1催化ATP产生cAMP从而激活cAMP依赖的蛋白激酶, 即蛋白激酶A, 蛋白激酶A广泛影响其下游的一系列蛋白的活性调节细胞生长和增殖等。我们的研究结果表明, 在Cyr1突变后酵母时序寿命增加, 相应的对抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和热能力加强, 这与Fabrizio等<sup>[12]</sup>的结果基本一致, 不同的是Fabrizio没有关于在卡路里限制条件下的Cyr1Δ后酵母细胞的时序寿命的报道, 也没有关于这种性状与线粒体膜改变的关系的报道。酵母培养过程中加入2%葡萄糖也是常规培养条件之一, 氨基酸限制或糖的限制也可称卡路里限制, 卡路里限制可以提高从酵母到蠕虫、果蝇、小鼠的生命周期。实验中我们采用了Min等<sup>[5]</sup>强卡路里限制法, 从实验结果看没有任何营养成分而只有水的条件下野生DBY746的时序寿命是在普通培养条件下的3倍左右, Cyr1Δ是4倍左右, 可见Cyr1基因在一定程度上参与了卡路里限制的生存时间延长, 但一定还有其他基因同时参与了调控, 如可能的基因包括Tor1/2、Sch9、Ras2等<sup>[3]</sup>。

生命周期延长一般同时伴随着细胞对各种环境应激能力的提高, 我们的实验结果证明, Cyr1Δ相比DBY746都有明显增加的抵抗热和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的能力, 这说明Cyr1直接或间接影响了一些衰老或应激反应调节蛋白的功能, 而且这种调节是以副调控为主。因为酵母细胞可以利用不同的碳源生长, 如甘油、乙醇、乙酸、乳糖等。比较了野生DBY746和Cyr1Δ在乙醇和甘油中的生长情况, 发现Cyr1Δ在乙醇培养基中生长缓慢, 在甘油培养基中几乎不能生长, 这让我们考虑到是否Cyr1Δ的线粒体结构或功能发生了改变? 因此我们用线粒体膜的特定蛋白GFP标记在培养的不同时间点观察线粒体的膜形态改变, 发现

在培养的第三天开始, Cyr1Δ的荧光显示线粒体膜呈现连续的点线状, 而DBY746则出现大的断续的亮点或荧光消失, 细胞荧光亮点多且呈现点线状说明细胞的线粒体膜结构保持完好。结果显示Cyr1Δ比野生菌线粒体膜有更好的完整性, 线粒体形态结构的改变可能意味着线粒体功能的改变, 有关Cyr1突变后的线粒体各相关功能正在研究中。

### 参考文献(References)

- 1 Masoro EJ. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech Ageing Dev* 2005; 126(9): 913-22.
- 2 Weindruch R, Walford RL. The retardation of aging and disease by dietary restriction. Springfield: Charles C. Thomas Press, 1988, 436.
- 3 Fabrizio P, Longo VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2003; 2(2): 73-81.
- 4 Masoro EJ. Sbufield history: caloric restriction, slowing aging, and extending life. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003, RE2.
- 5 Wei M, Fabrizio P, Hu J, Ge H, Cheng C, Li L, Longo VD. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PkA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics* 2008; 4(1): 139-49.
- 6 Martin DE, Souillard A, Hall MN. TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 2004; 119(7): 969-79.
- 7 Reinders A, Burckert N, Boller T, Wiemken A, De Virgilio C. *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev* 1998; 12(18): 2943-55.
- 8 Gurarente L. Mitochondria-a nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell* 2008; 132(25): 171-6.
- 9 Parrella E, Longo VD. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* to study mitochondrial dysfunction and disease. *Methods* 2008; 46(4): 256-62.
- 10 Westermann B, Neupert W. Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2000; 16(5): 1421-7.
- 11 Garreau H, Hasan RN, Renault G, Estruch F, Boy-Marcotte E, Jacquet M. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 2000; 146(Pt 9): 2113-20.
- 12 Fabrizio P, Pozza F, Pletcher SD, Gendron CM, Longo VD. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science* 2001; 292(5515): 288-90.

## The Effect of *Cyr1* Mutant in *Sacharomyces cerevisiae* Chronological Life Span

Ying Liu\*, Guo-Li Wang, Qiang Bi, Hong-Xuan Xu

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract** In order to investigate the effect of *Cyr1* mutant in yeast life span extension, we measured Chronological life span, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or heat stress resistance and mitochondria morphology in DBY746 and *Cyr1*Δ. Compared with DBY746, *Cyr1*Δ had almost 2.25-fold life span extension. There was further extension of the life span of both strains under extreme CR. The 10% survival of DBY746 was 13 days and the *Cyr1*Δ was 45 days. The *Cyr1*Δ had more resistance to heat or hydrogen peroxide stress and relatively normal mitochondria membrane morphology than wild type at day 3 and day 5.

**Key words** *Sacharomyces cerevisiae*; adenylate cyclase *Cyr1*; chronological life span (CLS); mitochondria membrane morphology

---

Received: October 15, 2010 Accepted: March 7, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30640002)

\*Corresponding author. Tel: 86-24-23256451, E-mail: yingliucmu@gmail.com