

# L-苹果酸对苹果酸天冬氨酸穿梭转运蛋白及酶基因表达的作用研究

吴军林<sup>1,2,3</sup>, 吴清平<sup>2,\*</sup>, 韦明肯<sup>2</sup>, 吴慧清<sup>2</sup>, 周小燕<sup>2</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301;

2. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东 广州 510070

3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** 采用半定量 RT-PCR 方法, 对小鼠给予 L-苹果酸后肝线粒体苹果酸天冬氨酸穿梭相关的两种线粒体酶: 线粒体天冬氨酸氨基转移酶(mitochondrial aspartate aminotransferase, mAST)及线粒体苹果酸脱氢酶(mitochondrial malate dehydrogenase, mMDH)及线粒体内膜上的天冬氨酸谷氨酸转运蛋白(AGC)与  $\alpha$ -酮戊二酸苹果酸转运蛋白(OMC)的基因表达进行检测, 探讨了 L-苹果酸对肝线粒体苹果酸天冬氨酸穿梭的关键酶及转运蛋白 mRNA 表达规律。半定量 RT-PCR 结果表明: 剂量组小鼠肝线粒体转运蛋白 AGC mRNA 的表达显著高于空白对照组, 而 mAST、mMDH 及转运蛋白 OMC mRNA 的表达无显著性差异。由此可知, L-苹果酸能促进 TCA 循环及苹果酸天冬氨酸穿梭, 其分子生物学机理与 L-苹果酸提高 AGC 的基因表达水平有关。

**关键词:** L-苹果酸; 苹果酸天冬氨酸穿梭; 转运蛋白

## Effect of L-malate on Gene Expression of Proteins and Enzymes Related to the Malate-aspartate Shuttle

WU Jun-Lin<sup>1,2,3</sup>, WU Qing-Ping<sup>2,\*</sup>, WEI Ming-Ken<sup>2</sup>, WU Hui-Qing<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-Yan<sup>2</sup>

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;  
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China;  
3. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** To investigate the expression change of two key enzymes in mitochondria and carried proteins (AGC and OMC) in inner member of mitochondria related to malate-aspartate shuttle, the expression of these proteins was examined in liver of mice treated L-malate by methods of RT-PCR. RT-PCR was used to analyze the expression of key enzymes (mAST and mMDH) mRNA and carried protein (AGC and OMC) mRNA after treatment of L-malate. The results indicated that the

收稿日期 2006-08-01

\*通讯作者

基金项目: 广州市科技攻关重大项目(2004Z-E6001); 广东省科技计划项目(2004B40101011)

作者简介: 吴军林(1977-), 男, 博士研究生, 研究方向为功能食品与生物化学。

- against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, 26: 407-411.
- [5] Malkoski Marina Kappacin. A novel antibacterial peptide from bovine milk[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, (8): 2309-2315.
- [6] Tomita, et al. Process for large-scale production of antimicrobial peptide in high purity[P]. United States Patent. 5317084.
- [7] Hiroyuki Wakabayashi, Hiroshi Matsumoto, Koichi Hashimoto, et al. N-acylated and D-enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1999, 43(5): 1267-1269.
- [8] 胡志和, 等. 乳铁蛋白和乳铁素的抗菌活性比较[J]. *食品科学*, 2005, (8): 99-102.
- [9] 张东送, 等. 乳铁素 B 的抗菌活性及其影响因素[J]. *食品与生物技术学报*, 2005, (2): 1-5.

expression of AGC mRNA was increased significantly in the L-malate treated group compared with control group. There were no difference in the levels of mAST, mMDH and OMC mRNA. The results predict a potential molecule mechanism that L-malate increased capability of the malate-aspartate shuttle by enhancing the level of AGC mRNA.

Key words: L-malate; malate-aspartate shuttle; carried protein

中图分类号: Q812

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)11-0229-04

L-苹果酸(LMA)是优良的酸味剂和调酸剂,具有重要的生理功能:缓解体力疲劳作用<sup>[1,2]</sup>;提高运动员无氧做功能力,加速无氧运动后心率恢复<sup>[3]</sup>;对心脏病、肝脏病有治疗和保护作用<sup>[4]</sup>;还能降低抗癌药物对肾脏和骨髓细胞的毒害<sup>[5]</sup>。L-苹果酸是生物体代谢三羧酸循环(TCA循环)及其支路乙醛酸循环的中间产物,也是CO<sub>2</sub>固定反应的产物,在代谢过程中不断参与其它物质的合成代谢,同时作为能量物质的前体物质,直接参与线粒体的能量代谢,使LMA在生物体代谢过程中处于一种枢纽位置,因此,对调节生物体内的代谢活动具有重要的作用<sup>[6]</sup>。L-苹果酸又是苹果酸天冬氨酸穿梭的重要组成部分,对胞质与基质之间还原当量的转移发挥重要作用。苹果酸天冬氨酸穿梭主要存在于肝和心脏中。如图1所示<sup>[7]</sup>,胞质中的NADH在脱氢酶的作用下,使草酰乙酸还原成苹果酸,后者通过线粒体内膜上的 $\alpha$ -酮戊二酸转运蛋白(OMC)进入基质,在基质脱氢酶的作用下重新生成草酰乙酸和NADH, NADH进入电子呼吸链生成ATP,而基质内生成的草酰乙酸经谷草转氨酶的作用生成天冬氨酸,后者经酸性氨基酸转运载体(AGC)转运出基质再转变成草酰乙酸,继续进行穿梭。由此可见,苹果酸天冬氨酸穿梭对于ATP的可持续供给起到关键作用,有研究显示补充L-苹果酸可以显著提高ATP的生成<sup>[8]</sup>,但是目前其作用机制还不清楚,而苹果酸作用于苹果酸天冬氨酸穿梭的研究也未见报道。

本研究外源给予小鼠一定剂量的L-苹果酸,采用半定量RT-PCR方法对肝线粒体苹果酸天冬氨酸穿梭两种线粒体内膜转运蛋白: $\alpha$ -酮戊二酸苹果酸转运蛋白(OMC)及天冬氨酸谷氨酸转运蛋白(AGC)和两种线粒体酶:天冬氨酸氨基转移酶(mAST)及苹果酸脱氢酶(mMDH)的基因表达进行检测,以探讨L-苹果酸对肝线粒体苹果酸天冬氨酸穿梭的转运蛋白及酶mRNA表达规律,探索L-苹果酸对苹果酸天冬氨酸穿梭的影响,为苹果酸抗疲劳的消除作用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物和实验室

SPF级NIH种雄性小鼠,2月龄(体重:18~22g),

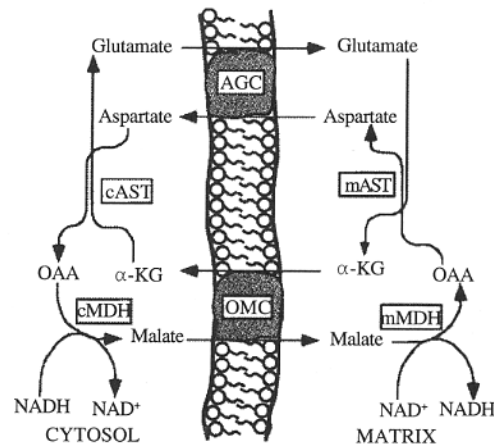


图1 苹果酸天冬氨酸穿梭示意图  
Fig.1 Schematic of malate aspartate shuttle

由第一军医大学实验动物中心提供。颗粒饲料由第一军医大学实验动物中心提供。动物实验室:SPF级,合格书粤检证号2001C059,室温(22±0.5℃);湿度60%~80%。

#### 1.1.2 仪器和试剂

L-苹果酸由广东环凯微生物科技有限公司提供,经HPLC检验纯度在99.9%以上。RNAeasy Mini Kit和RNA LA PCR™ Kit(AMV)购自北京赛百盛基因技术有限公司,所用引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 分组与给药

实验小鼠在实验室条件下观察1周后,采用随机分组方法将20只NIH小鼠分为空白对照组和受试物组(0.210g/L-苹果酸/kg bw),每组各10只动物。空白对照组每天给予生理盐水,受试物组按照剂量给予受试样品(L-苹果酸用纯净水溶解,NaOH调pH值7.2后配成剂量所需浓度),连续灌胃30d后进行各项试验。

### 1.2.2 总RNA提取

小鼠于末次给予L-苹果酸30min后,断头处死,迅速取肝。按照赛百盛公司提供的RNAeasy Mini Kit操作说明,采用TRIzol一步法抽提小鼠肝总RNA, RNA溶于无核酸酶水中,取样用紫外分光光度计测A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>吸收值,剩下的存放于-80℃冰箱备用。

### 1.2.3 半定量RT-PCR

RT-PCR实验用赛百盛公司提供的RT-PCR试剂盒

RNA LA PCR™ Kit, 将反转录和特异性片段扩增在一个反应管中进行, 反应管中加入提取的总 RNA 2 μg 作为模板。根据 GenBank 数据库中的序列, 设计特异性引物, 所用的引物序列及扩增长度见表 1, 利用 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 扩增。GAPDH 的 RT-PCR 反应条件为: 42℃ 60min; 94℃ 5min; 94℃ 30s, 60℃ 40s, 72℃ 30s, 进行 30 个循环; 72℃ 7min 延伸。OMC、AGC、mAST、mMDH 的 mRNA 扩增条件除了退火温度为 58℃ 外, 其他条件与 GAPDH 相同, 为确保扩增的特异性, 各组均设 2 种对照, 分别是用无核酸酶水代替 RNA 样品、不经反转录进行直接 PCR, 其他条件不变。5 μl 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 (含终浓度 0.5mg/L Goldview) 上电泳, 电泳图谱用 Quantity One 软件 (Bio-Rad Inc.) 进行分析, 测条带的 A 值, 所得值经内参照 GAPDH 校正, 对校正值进行统计学分析。

1.2.4 数据统计方法

各组数据均采用 Mean ± standard deviation (SD) 表示, 数据间的差异性比较采用 t 检验, 显著性差异以 p < 0.05 和 p < 0.01 为标准。以上数据分析均采用 SPSS 10.0 软件完成。

2 结果与分析

小鼠肝组织中均能够检测到 OMC、AGC、mMDH、mAST、GAPDH mRNA 的表达, 且其各自 mRNA 的水平可以通过测定其完整条带的光密度对其定量。我们通过比较 L-苹果酸组与空白组小鼠肝组织中 OMC、AGC、mMDH、mAST 的 mRNA 与 GAPDH mRNA 的比值来判断 L-苹果酸是否增强或抑制 OMC、AGC、mMDH、mAST 的基因转录。L-苹果酸对肝组织中 OMC、AGC、mMDH、mAST 的基因表达水平的影响如图 2、表 2 和图 3。图 2 显示了部分的基因表达 RT-PCR 分析结果, 表 2 和图 3 则显示了其全部结果。表 2 和图 3 显示, L-苹果酸组与空白对照组相比较, 肝组织中 AGC 的基因表达显著性提高 (p < 0.05), 而 OMC、

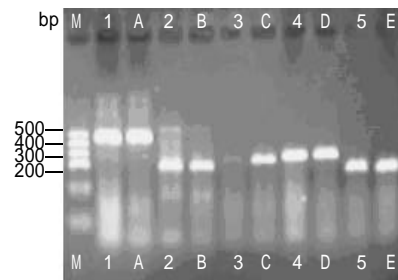


图 2 苹果酸对肝 mMDH, mAST, OMC 及 AGC 基因表达的影响  
Fig.2 Effect of L-malate on gene-expression level of liver OMC, AGC

表 2 补充苹果酸的小鼠肝组织中 mRNA 表达水平的测定  
Table 2 Determination of mRNA expression in liver of mouse treated with L-malate

	OMC	AGC	mMDH	mAST
对照组	0.611 ± 0.307	0.204 ± 0.058	0.806 ± 0.374	0.717 ± 0.214
剂量组	0.574 ± 0.237	0.506 ± 0.287*	0.884 ± 0.303	0.801 ± 0.294
p	0.879	0.048 < 0.05	0.793	0.708

mAST、mMDH 的基因表达无显著性差异, 说明 L-苹果酸能够显著提高肝组织中 AGC 的基因表达。

3 讨论

苹果酸天冬氨酸穿梭是肝线粒体中最主要的 NADH 穿梭<sup>[6]</sup>, 苹果酸天冬氨酸穿梭将胞质中 NADH 转运到基质中起到重要的生理作用, 且与多种代谢反应紧密相关。近年来研究资料表明, 苹果酸脱氢酶 (MDH) 是苹果酸天冬氨酸的限速酶<sup>[9]</sup>, 在我们的前期研究中发现, L-苹果酸可以显著增加线粒体苹果酸脱氢酶 (mMDH) 的活性<sup>[10]</sup>, 其活性的提高意味着整个苹果酸天冬氨酸的穿梭效率的提高, 机体 ATP 的合成效率也相应地得到提高, 较合理地解释了 L-苹果酸促进 ATP 的生物合成。而有关 L-苹果酸对小鼠肝苹果酸天冬氨酸穿梭相关基因表达的影响, 目前国内外罕见研究报道。

本研究重点在于研究 L-苹果酸对苹果酸天冬氨酸穿梭两种跨膜转运蛋白及相关的两种线粒体酶的基因表达

表 1 RT-PCR 引物参数  
Table 1 Primers of genes related to development and condition for RT-PCR

引物	引物序列	注册号	退火温度	片段长度
GAPDH	F (5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3')	AB017801	60	476
	R (3'-TTAGGACGTAGGTGACCACG-5')			
OMC	F (5'-CTGGCTGGGATGGGTGCT-3')	NM024211	58	211
	R (3'-GTGGATGTGGTGATGAGCGGAAC-5')			
AGC	F (5'-CTTGTTTATGGTGGCGTTCC-3')	MM015829	58	255
	R (3'-GTTGCTCTGTTACGGTCTG-5')			
mMDH	F (5'-TTGCCCTCAAAGTTGTGATGTG-3')	M16229	58	276
	R (3'-GTAGCAGTCTCGCTTGTGCAA-5')			
mAST	F (5'-TCCCGACAGCCTTTGCG-3')	NM010325	58	170
	R (3'-ATAGACCTTGAAGCAGCCGAG-5')			

的影响。本研究发现 L- 苹果酸组 mMDH mRNA 水平较空白对照有增加趋势, 但无显著性差异 ( $p > 0.05$ ), 并不如所料的那样得到相应的提高。L- 苹果酸对肝组织 mRNA 水平的影响与 L- 苹果酸显著提高肝组织 mMDH 活性表现出非一致性。可以说明 L- 苹果酸能够促进肝组织 mMDH 翻译阶段的合成, 而 L- 苹果酸对肝组织 mAST 的活性与 mRNA 水平均无显著性影响, 表现出一致性。

位于线粒体膜上的天冬氨酸谷氨酸穿梭蛋白 (AGC) 在由丙酮酸转变成磷酸烯醇式丙酮酸的过程中起到关键作用, 而  $\alpha$ - 酮戊二酸苹果酸转运蛋白 (OMC) 则在苹果酸和  $\alpha$ - 酮戊二酸进出线粒体过程起到载体的作用<sup>[11]</sup>。因此探讨苹果酸天冬氨酸穿梭能力对我们研究肝脏代谢过程有着重要的意义。AGC 作为一个电势驱动 (electrogenically driven) 蛋白, 是苹果酸天冬氨酸穿梭代谢的限速步骤<sup>[12,13]</sup>, 其活性由线粒体内膜势能决定。AGC 的候选基因是 (candidate gene) 最近才被报道出来<sup>[14,15]</sup>, Palmieri 等人研究指出 AGC 有 aralar 1 和 citrin 等几种异构体, 其中肝组织中只有 citrin 一种异构体<sup>[16]</sup>, 因此本研究以 citrin 为研究对象。由实验结果可知, 补充 L- 苹果酸的大鼠 AGC 基因表达显著高于对照组 ( $p < 0.05$ ), OMC 差异不显著 ( $p > 0.05$ )。我们的前期研究中发现, L- 苹果酸的补充显著增加了苹果酸天冬氨酸的转运能力<sup>[10]</sup>, 而外源补充 L- 苹果酸能显著增加胞浆和线粒体中 L- 苹果酸的浓度。可见 L- 苹果酸的转运能力的提高不是直接通过调节 OMC 的基因表达水平来实现, 很可能是 L- 苹果酸促进了 OMC 翻译阶段的合成, 或者是 OMC 被动提高其转运 L- 苹果酸负载能力的机体适应性反应。因此, L- 苹果酸能促进 TCA 循环及苹果酸天冬氨酸穿梭, 其分子生物学机理与 L- 苹果酸提高 AGC 的基因表达水平有关。

本文没有直接测定苹果酸天冬氨酸穿梭蛋白 AGC、

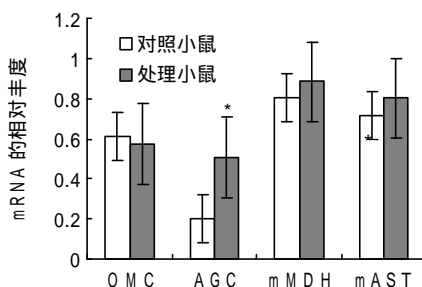


图3 苹果酸对小鼠肝组织中 OMC, AGC, mMDH 及 mAST mRNA 水平的影响

Fig.3 Detection of OMC, AGC, mMDH and mAST mRNA in liver of mouse treated with and without L-malate

OMC 的蛋白水平。如果能进一步探讨其 mRNA 水平与蛋白水平的关系, 将会进一步揭示 L- 苹果酸对苹果酸天冬氨酸穿梭的作用机制, 因此有关这方面的研究需要更多的深入进行。

#### 参考文献:

- [1] Bendahan D, Mattei J P, Ghattas B, et al. Citrulline/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle[J]. *Br J Sports Med*, 2002, 36: 282-289.
- [2] 邱俊强, 冯美云, 杨旭, 等. 补充苹果酸低聚糖饮料对自行车运动员有氧做功能力的影响[J]. *体育科学*, 2004, 24(9): 25-27.
- [3] 樊庆敏, 刘刚, 冯美云, 等. 补充苹果酸复合营养液对拳击运动员做功能力的影响[J]. *北京体育大学学报*, 2004, 10(27): 1356-1358.
- [4] 张菊梅, 吴清平, 周小燕, 等. L- 苹果酸的生理功能及应用前景[J]. *微生物学通报*, 1997, 24(2): 116-117.
- [5] Sugiyama K, Ueda H, et al. Protective effect of sodium L- malate, an active constituent isolated from angelicae radix, on cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced toxic[J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42(12): 2565-2568.
- [6] 梅郁, 张缙. L- 苹果酸代谢与运动[J]. *中国运动医学杂志*, 2005, 25(4): 509-511.
- [7] Scholz T D, Teneyck Y J, Cchutte B C. Hyroid hormone regulation of the NADH shuttles in liver and cardiac mitochondria[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2000, 32: 1-10.
- [8] Bendahan D, Mattei J P, Ghattas B, et al. Citrulline/malate promotes aerobic energy production in human exercising muscle[J]. *Br J Sports Med*, 2002, 36: 282-289.
- [9] Macdonald M J. Evidence of the malate aspartate shuttle in pancreatic islet[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1982, 213: 643-649.
- [10] Wu J, Wu Q, Huang J, et al. Effects of L-malate on physical stamina and activities of enzymes related to the malate-aspartate shuttle in liver of mice[J]. *Physiology research*, 2006, published on-line.
- [11] 邱俊强, 谷建民, 冯美云. 有氧运动中影响运动能力的代谢因素[J]. *北京体育大学学报*, 2004, 27(7): 903-907.
- [12] Kunz W S, Davis E J. Control of reversible intracellular transfer of reducing potential[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 284: 40-46.
- [13] LaNoue K F, Tischler M E. Electrogenic characteristics of the mitochondrial glutamate-aspartate antiporter[J]. *J Biol Chem*, 1974, 249: 7522-7528.
- [14] Palmieri L, Pardo B, Lasorsa F M, et al. Citrin and aralar1 are  $Ca^{2+}$ -stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria[J]. *EMBO J*, 2001, 20(18): 5060-5069.
- [15] Ralphe J C, Bedell K, Segar J L, et al. Correlation between myocardial malate/aspartate shuttle activity and EAAT1 protein expression in hyper- and hypothyroidism[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(5): 2521-2526.
- [16] Rubi B, del Rrco A, Bratley C, et al. The malate-aspartate NADH shuttle member Aralar 1 determines glucose metabolic fate, mitochondrial activity, and insulin secretion in beta cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(27): 55659-55666.