

Influence of Benzene, Acetone on the Liquid-crystal Structure of Phosphatidylethanolamine

Sun Runguang* Wang Dehua Wang Mingzheng Wan Xiuqing

(Experimental Centre of Shuanxi Normal University, Xian 710062)

(* Institute of Theoretical Physics Academia Sinica, China)

Zhang Jing

(Xian Chemical Industry Research Institute, Xian 710002)

ABSTRACT

The influence of benzene and acetone on the liquid-crystal structure of phosphatidylethanolamine (PE) was investigated respectively by method of the small angle X-ray scattering (SAXS). The experiments showed that the benzene enabled the tie of PE in liquid-crystal state to change from lamellar phase into cubic phase, then induced it from cubic phase into hexagonal phase, and finally to impel it changing from hexagonal phase into liquid state. Meanwhile, in this phase transition of the tie removal appeared the red shift. Besides, the acetone was also capable of removing the tie of PE in liquid-crystal state from lamellar phase into cubic phase. Again, the red shift appeared in these transitions of the tie. However, when PE in liquid-crystal state was induced into hexagonal phase, the acetone was unable to impel it from hexagonal phase into liquid phase like benzene, but stabilized it only in hexagonal phase.

Key words liquid-crystal state, phase transition, phosphatidylethanolamine

两种新呼吸链抑制剂对心肌抑制剂抑制作用的比较*

郭大海** 徐建兴

古练权

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

(中山大学化学系, 广州)

提 要

用抑制剂作为分子工具研究呼吸链的电子传递机制已有相当长的历史, 电子传递链各个区段均有酶专一的抑制剂被发现和使用。鉴于呼吸链中三个与泛醌反应相关的酶[还原辅酶 I: 泛醌还原酶 (NADH-Q reductase NQR)、琥珀酸: 泛醌还原酶 (succinate-Q reductase SQR) 和泛醌: 细胞色素 c 还原酶 (QH₂-cytochrome c reductase QCR)] 均催化同一底物反应, 从酶学角度看应存在一类抑制剂能对三个催化泛醌反应的酶兼有抑制作用。经合成和筛选发现 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺和 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶具备这类性质, 它们对催化泛醌反应的三个酶都有抑制作用, 而对与泛醌无关的末端氧化酶 (cytochrome c oxidase) 无任何作用。3-硝

*国家自然科学基金支持。

**现地址: 中国科学院遗传所。

收稿日期: 1992-12-22 修回日期: 1993-05-27

基-N-十二烷基水杨酰胺对检测的心肌制剂各段酶活性的抑制能力均强于 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶。

关键词 呼吸链, 抑制剂, 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺, 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶

线粒体是广泛存在于各种真核生物细胞中的重要细胞器, 它通过氧化磷酸化过程生成 ATP, 供细胞内各种化学反应与功能的能量所需。催化氧化磷酸化反应的酶是定位于线粒体内膜的呼吸链和与之偶联的 ATP 酶。

呼吸链的重要功能是传递电子, 泛醌在呼吸链中处在三个酶 (还原辅酶 I : 泛醌还原酶、琥珀酸 : 泛醌还原酶和泛醌 : 细胞色素 c 还原酶) 交汇处起着调节和传递电子的作用。根据 P. Michell 的泛醌循环 (Q-cycle) 假说^[1], 泛醌不仅是电子传递体而且是质子跨膜载体, 因此, 泛醌在生物能量转换过程中的作用机制问题十分令人关注。

抑制剂是研究呼吸链电子传递机制的分子工具, 有些抑制剂对电子传递机制研究起了很大的推动作用, 如通过对泛醌 : 细胞色素 c 还原酶的专一抑制剂抗霉素 A (antimycin A) 的应用导致了 1972 年 Wikstrom 和 Berden 提出分枝电子传递模型^[2], 和后来的 Q-cycle 假说^[1]及修正的 Q-cycle 模型^[3]。这些新假说均引入了泛醌两步还原的概念, 较圆满地解释了直链传递机制不能解释的现象。Q-cycle 机制强调泛醌 : 细胞色素 c 还原酶中有两个醌反应中心 (center i 和 center o) 分别位于膜内外两侧, 还原的泛醌在 center o 被氧化并释放质子, 在 center i 泛醌结合质子被还原, 如此泛醌在传递电子的同时转移质子跨膜, 成为能量偶联的关键环节。相继 King 和 Yu 等提出了泛醌结合蛋白 (Q-binding protein) 理论, 认为催化泛醌反应的三个酶中都有各自的泛醌结合蛋白^[4], 进一步推动了对泛醌作用机制的研究。抑制剂 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺和 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶是我们合成并筛选出来的一类新型呼吸链抑制剂, 它们不像已知的呼吸链抑制剂只作用于某一个酶, 而是对催化泛醌反应

的不同的酶兼有抑制作用^[5-7], 作者企图用这类抑制剂作为分子工具研究泛醌反应机制和泛醌结合蛋白。

本文用心肌制剂为材料, 通过使用不同的人工电子供体和受体, 对电子传递链的不同区段酶活力进行检测, 并检查 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺和 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶的抑制作用, 证明了它们只作用于和泛醌反应有关的酶。

1 材料与方法

1.1 心肌制剂的制备

心肌制剂 (HMP) 是参照 King 的方法^[8]从猪心肌肉中提取的。制备流程如下:

猪心于冰浴中剪去血管、脂肪和结缔组织并绞成肉末

称取 800g 肉末, 于预冷的捣碎机中按 3ml/g 与预冷的 10mmol/L KH_2PO_3 混合并捣碎 1min. (捣碎前加入适量的 KOH, 以保持捣碎后溶液 pH 在 7.0—7.4 之间。)

离心, K-70D 型机 3000r/min × 20min, 4℃

弃去沉淀

上悬液用 8 层沙布过滤

滤液置于冰浴中, 用 2mol/L HAC 调 pH 至 6.0, 即刻同上法离心

沉淀悬浮于 6 倍体积的 10mmol/L KH_2PO_3 中洗涤, 然后同上法离心

沉淀悬浮于 pH7.8 H_3BO_3 - Na_2HPO_4 缓冲液中匀浆, 所得 HMP 于冰箱中保存 (防冻) 5d 内使用。

1.2 蛋白浓度的测定

蛋白浓度的测定按 Yonetani 的双缩脲法进行^[9]. 为了精确我们通常取 4 支试管, 分别加 HMP 0, 10, 20, 40 μ l, 再各加 5% 脱氧胆酸钠 0.05ml, 加 30% 双氧水 0.02ml, 并加水补足至每管 0.25ml, 最后加双缩脲试剂 1ml. 25℃ 静置 20min 于岛津 UV-250 分光光度计上测定 A_{540} 值, 用 A 值对加入 HMP 微升数作一相关直线, 从直线上求出单位体积 HMP 的 A 值, 再从标准曲线上算出蛋白浓度.

1.3 呼吸链不同区段酶活力的测定

测定电子从琥珀酸到氧 (琥珀酸氧化酶)、从还原辅酶 I 到氧 (NADH 氧化酶)、从泛醌到氧以及从细胞色素 c 到氧 (末端氧化酶) 的传递活力是在 30℃ 条件下, 用 Clark 氧电极测定的. 测定琥珀酸氧化酶的体系为 2.5ml, 含 50mmol/L pH7.4 的磷酸缓冲液, 0.1mmol/L EDTA, 40mmol/L 琥珀酸钠, 2.5 μ mol/L 鱼藤酮. NADH 氧化酶活力的测定体系 2.5ml, 含 50mmol/L pH7.4 的磷酸缓冲液, 0.1mmol/L EDTA, 3mmol/L NADH, 50 μ mol/L 噻吩甲酰三氟丙酮 (TTFA). 从泛醌到氧酶活力的测定体系 2.5ml, 含 100mmol/L pH7.4 的磷酸缓冲液, 0.3mmol/L EDTA, 2.5 μ mol/L Q_2H_2 . 末端氧化酶的测定体系 2.0ml, 含 25mmol/L pH7.9 的 Tris-HAC 缓冲液, 7mg 抗坏血酸, 0.7mmol/L TMPD. 测定时先将反应体系于测氧仪反应杯中预热至 30℃, 然后加 2mg HMP 起反应, 同时记录氧消耗速率. 测氧法详见参考文献 [10]. 测定琥珀酸: 泛醌还原酶和还原辅酶 I: 泛醌还原酶的酶活力是用人工电子受体 2, 6-二氯酚胺氮 (DCIP) 在岛津 UV-3000 上于 25℃ 恒温条件下进行的. 测定体系 3ml, 含 0.1mmol/L pH7.4 的磷酸缓冲液, 0.3mmol/L EDTA, 0.053mmol/L 2, 6-二氯酚胺氮和 20mmol/L 琥珀酸钠或 2mmol/L NADH. 测定时先将反应体系预温, 然后加 0.5—1mg HMP 起反应, 同时监测 A_{600} 的变化, 用消光系数 21mmol/L⁻¹·cm⁻¹ 计算 2, 6-二氯酚胺氮的还原速度, 方法详见文献 [11].

1.4 试剂

抑制剂 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺和 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶是参照文献方法合成 (已另行发表). 含两个异戊二烯侧链的泛醌 Q_2 是参照 shunk 等方法合成^[12], 配成乙醇溶液, 浓度测定依文献 [13] 方法进行. Q_2H_2 是由 Q_2 在铂碳催化下于隔绝空气的小瓶中用氢气小心还原制得, 用前制备. N, N, N', N'-四甲基对苯二胺 (TMPD) 购于 BDH 公司, 噻吩甲酰三氟丙酮 (TTFA) Korch-Light 进口分装. NADH 和鱼藤酮 (rotenone) 购于 Sigma 公司. 琥珀酸钠购于 Aldrich 公司. 其余试剂均为北京化工厂分析纯产品.

2 结果与讨论

2.1 两种抑制剂均对末端氧化酶无抑制作用

心肌制剂是完整的呼吸链酶系. 参照文献 [14] 方法, 用 TMPD 作电子供体还原细胞色素 c, 并用抗坏血酸保持 TMPD 处于还原态, 如此可建立电子从细胞色素 c 到氧的传递, 监测氧的消耗速率即可测得细胞色素氧化酶活性. 在加入两种抑制剂时, 没有测得氧耗速率的变化, 说明这两种化合物不抑制细胞色素 c 氧化酶活性.

2.2 两种抑制剂对琥珀酸氧化酶的抑制作用

在测定液中加入鱼藤酮以阻断 NADH 到泛醌的电子传递, 再加琥珀酸钠测定电子从琥珀酸到氧的传递即可计算琥珀酸氧化酶活性. 图 1 显示了两种抑制剂在不同浓度下对该酶的抑制作用.

前面证明了两种抑制剂对细胞色素氧化酶无作用, 所以对琥珀酸氧化酶的抑制实际上代表了对琥珀酸到细胞色素 c 段电子传递的抑制作用. 从图 1 看出, 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺比 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶显示较强的抑制能力. 图 2 比较了有无鱼藤酮情况下, 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶对琥珀酸氧化酶活性抑制曲线, 两条曲线基本相同, 说明有无

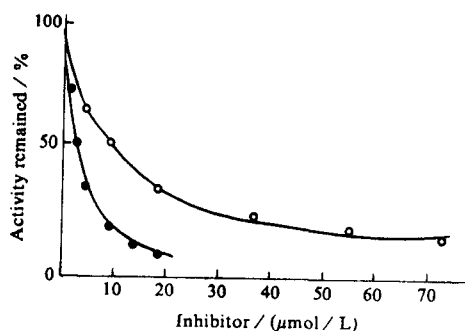


图 1 两种抑制剂对琥珀酸氧化酶的抑制作用

Fig. 1 The inhibitory effect of the two inhibitors on succinate oxidase

- 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺,
- 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶
- 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide,
- 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

鱼藤酮对此测定无影响,这是由于 HMP 中内源底物 NADH 很少的缘故。

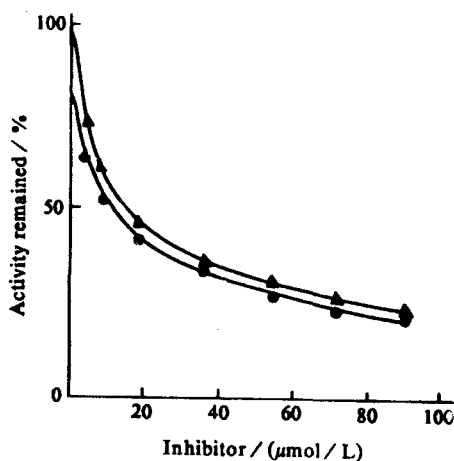


图 2 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶对琥珀酸氧化酶的抑制作用,有无鱼藤酮的比较

Fig. 2 The inhibitory effect of 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine on succinate oxidase in the presence and absence of rotenone respectively

- ▲—▲ 加鱼藤酮 2.5 μmol/L 抑制还原辅酶 I : 泛醌还原酶活力,
- 无鱼藤酮对照.
- ▲—▲ in the presence of 2.5 μmol/L rotenone,
- without rotenone.

2.3 两种抑制剂对 NADH 氧化酶活力的抑制作用

在测定液中加入噻吩甲酰三氟丙酮以抑制琥珀酸到泛醌的电子传递,再加入底物 NADH 可测得 NADH 氧化酶活性. 图 3 显示两种抑制剂对此酶活性的抑制作用,同样道理,这种抑制作用实际代表对 NADH 到细胞色素 c 段电子传递的抑制。

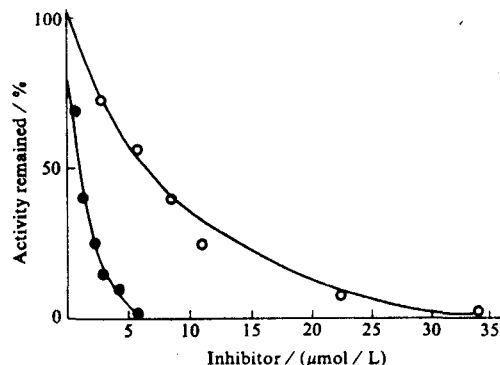


图 3 两种抑制剂对 NADH 氧化酶的抑制作用

Fig. 3 The inhibitory effect of the two inhibitors on NADH oxidase

- 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺,
- 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶
- 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide,
- 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

电子从琥珀酸到细胞色素 c 的传递和从 NADH 到细胞色素 c 的传递在从泛醌到细胞色素 c 这一段是共同的. 因此分别测定抑制剂对琥珀酸到泛醌和还原辅酶 I 到泛醌以及泛醌到细胞色素 c 三段电子传递活性的作用将能更明确地说明抑制剂的性质。

2.4 两种抑制剂对还原辅酶 I : 泛醌还原酶、琥珀酸 : 泛醌还原酶和泛醌 : 细胞色素 c 还原酶的作用

用 NADH 作电子供体, 2,6-二氯吩嗪氮作电子受体可测得还原辅酶 I : 泛醌还原酶的电子传递活性. 用琥珀酸作电子供体, 同样 2,6-二氯吩嗪氮作电子受体可测得琥珀酸 : 泛醌还原酶的电子传递活性. 由于 2,6-二氯吩嗪氮还原时 600nm 光吸收峰明显下降, 可用分光光度

计监测这两段酶活力的变化,图4和图5分别显示了两种抑制剂对还原辅酶 I : 泛醌还原酶和琥珀酸 : 泛醌还原酶的抑制情况。

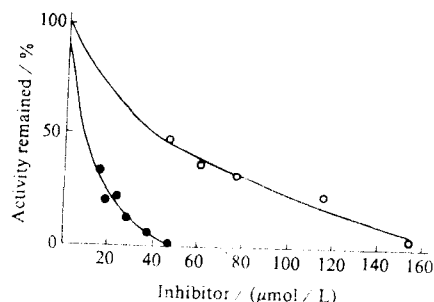


图4 两种抑制剂对还原辅酶 I : 泛醌还原酶的抑制作用

Fig. 4 The inhibitory effect of the two inhibitors on

NADH-Q reductase

- ● 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺,
- ○ 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶
- ● 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide,
- ○ 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

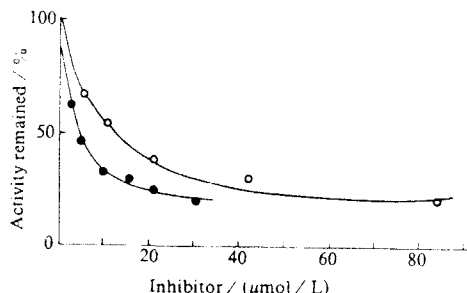


图5 两种抑制剂对琥珀酸 : 泛醌还原酶的抑制作用

Fig. 5 The inhibitory effect of the two inhibitors

on succinate-Q reductase

- ● 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺,
- ○ 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶
- ● 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide,
- ○ 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

泛醌 : 细胞色素 c 还原酶活性的测定可用人工电子供体 Q_2H_2 作底物,细胞色素 c 作电子受体。细胞色素 c 还原时 550nm 吸收峰增高,监测此峰变化的速率可计算该酶活性。图6给出了两种抑制剂对泛醌 : 细胞色素 c 还原酶活

性的抑制作用。

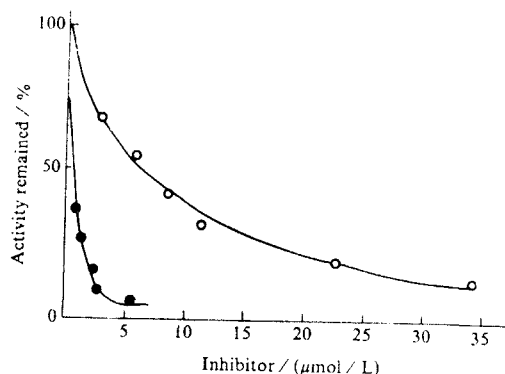


图6 两种抑制剂对泛醌 : 细胞色素 c 还原酶的抑制作用

Fig. 6 The inhibitory effect of the two inhibitors on QH_2 -cytochrome c reductase

- ● 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺,
- ○ 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶
- ● 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide,
- ○ 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

为了比较两种抑制剂对呼吸链不同区段酶活力的抑制能力,我们将这两种抑制剂对琥珀酸 : 泛醌还原酶 (SQR)、还原辅酶 I : 泛醌还原酶 (NQR) 和泛醌 : 细胞色素 c 还原酶 (QCR) 的半抑制浓度作表如下:

抑制剂	半抑制浓度 / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		
	SQR	NQR	QCR
3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺	4.9	9.0	0.5
2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶	12.5	40.0	6.5

这两种抑制剂的分子结构上都含有一个长链烷基,因此分子疏水性很强,烷基链长大于十个碳原子化合物在水脂两相分配时大部分分配在脂相^[7],它们的作用位点显然在脂膜内的疏水区。由于它们头部的环状结构不同,因而表现出对不同酶催化的醌反应不同的抑制能力。从图7所示的分子结构看,两种分子的头部都含有一个羟基,推测这个羟基可能在抑制功能上起重要作用,它可能通过干扰泛醌的脱氢加氢反应而达到抑制效果。

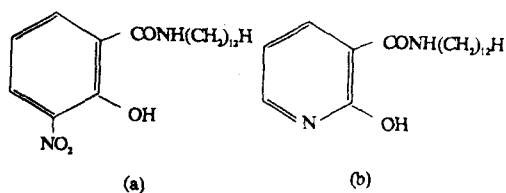


图7 抑制剂分子结构

Fig. 7 Molecular structure of inhibitors

(a) 3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺

3-nitrosalicyl-N-dodecylamide,

(b) 2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶

2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺和2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶是基于泛醌反应抑制剂这一想法设计的,它们表现出对不同催化泛醌反应的酶兼有抑制作用的性质,而对与泛醌无关的末端细胞色素c氧化酶不抑制。与已知的呼吸链酶抑制剂鱼藤酮、噻吩甲酰三氟丙酮、抗霉素A等相比,3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺和2-羟基-3-N-十二烷基酰胺吡啶对催化泛醌反应的酶没有专一性,而对三个酶催化的泛醌反应兼有抑制作用,也就是说这两种抑制剂从作用机制讲作用于三个酶催化泛醌反应的共同性方面。而鱼藤酮、噻吩甲酰三氟丙酮、抗霉素A等均是酶专一性的抑制剂,它们作用于三个酶各自催化机制的特异性方面。仔细比较这两类抑制剂与上述各个酶专一性抑制剂的异同,有助于对呼吸链泛醌区段酶催化机制比较深入的研究。3-硝基-N-十二烷基水杨酰胺具有潜在应用价值,已证明将叠氮基取代硝基后的3-叠氮-N-十二烷基水杨酰胺依然保持原分子同样的抑制性质,因此可以将此分子做成光敏标记分子对三个酶中的抑制位点进行光敏标记,从而可辨认出参与催化泛醌反应的泛醌结合蛋白。

参 考 文 献

- 1 Michell P. Possible molecular mechanisms of the proto-
- 2 Wikstrom M K F, Berden J A. Oxidoreduction of cytochrome b in presence of antimycin. *Biochim Biophys Acta*, 1972; **283**:403
- 3 Trumpower B L, Edwards C A. Identification of oxidation factor as a reconstitutively active form of the iron-sulfur protein of the cytochrome bc₁ segment of the respiratory chain. *FEBS Lett*, 1979; **100**:13-16
- 4 Yu Changan, Yu Linda. Ubiquinone-binding protein. *Biochim Biophys Acta*, 1981; **639**:99-128
- 5 徐建兴,肖燕,古练权等. 3-硝基-N-甲基水杨酰胺对琥珀酸细胞色素c还原酶的抑制作用. *生物化学杂志*, 1987; **3**(2):139
- 6 Liu Chun, Xu jianxing, Gu Lianquan *et al.* Inhibition of succinate-ubiquinone reductase by nitrosalicyl-N-alkylamides. *Biochim Biophys Acta*, 1991; **1057**:373-376
- 7 徐建兴,张震平,古练权等. 泛醌反应抑制剂3-硝基-N-烷基水杨酰胺. *生物化学与生物物理学报*, 1991; **23**(6):513-519
- 8 King T E. Reconstitution of respiratory chain enzyme system. *J Biol Chem*, 1961; **236**:2342
- 9 Yonetani T. Studies on cytochrome oxidase. *J Biol Chem*, 1961; **236**:1680
- 10 Sanadi D R, Jacobs E E. Assay of oxidative phosphorylation at the cytochrome oxidase region (site I). In: Estabrook R W *et al.* eds, *Methods in enzymology*, New York: Academic press Inc. 1967; **X**:38-41
- 11 King T E, Takemori S. Reconstitution of the respiratory enzyme systems; VI preparation of the cytochrome bc₁ complex from heart muscle. *Biochim Biophys Acta*, 1962; **63**:192-194
- 12 Shunk C H. Coenzyme I synthesis of 6-farnesyl and 6-phytyl derivatives of 2, 3-dimethoxy-5-methyl benzoquinone and related analoges. *J Am Chem Soc*, 1958; **80**:4753
- 13 Redfearn E R. Isolation and determination of ubiquinone. In: Estabrook R W *et al.* *Methods in enzymology*, New York: Academic press Inc, 1967; **X**:381
- 14 David L B, Shelagh F M, Margoliash E. Mitochondrial cytochrome c: purification and activity of native and chemically modified cytochrome c. In: Sidney F *et al.* eds. *Methods in enzymology*, New York: Academic press inc, 1978; **L**, (part D); 158

Comparison of the Effects of two Synthesized Inhibitors of Respiratory Chain on Heart Muscle Preparation

Guo Dahai Xu Jianxing

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Gu Lianquan

(Department of chemistry, Zhongshan University, Guangzhou)

ABSTRACT

The inhibitory effects of two synthesized 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide and 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine on the respiratory chain had been compared by using heart muscle preparation from pig heart. 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide showed stronger effect than 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine on all the three Q-related enzymes of NADH-Q reductase, succinate-Q reductase and QH_2 -cytochrome c reductase. No any inhibitory effect of this two compounds on the terminal oxidase had been observed. The hydroxy groups in the rings of both compounds may be involved in the inhibitory effect through their disturbance on the hydration and dehydration of ubiquinone.

Key words respiratory chain, inhibitor, 3-nitrosalicyl-N-dodecylamide, 2-hydroxy-3-N-dodecylamide-pyridine

重组人超氧化物歧化酶化学修饰的初步研究

骆训懿 王晶翼 谢邦铁 李战青 刘晓琳 陈晓穗

(海军总医院分子生物学研究室, 北京 100037)

提 要

在高效表达重组人铜锌超氧化物歧化酶(rh Cu/Zn SOD),并纯化得到比活大于 4000 单位的 rh Cu/Zn SOD 纯品的基础上,采用活化酯法将聚乙二醇(PEG)与 rh Cu/Zn SOD 交联,获得分子量约 6 万的 PEG-SOD 交联物。经 PEG 修饰的酶稳定性增强,表现为对酸、碱和热的耐受力均较未交联酶高。修饰酶的生物半衰期为 15h,是天然酶的 90 倍,酶活性保留 80% 以上。还实验观察了修饰剂用量与修饰酶保留活性之间的关系。

关键词 超氧化物歧化酶,蛋白质化学修饰,聚乙二醇,基因工程

超氧化物歧化酶(SOD)作为超氧自由基的天然清除剂,可抗炎、抗辐射、抗衰老、抗肿瘤以及抗缺血后再灌注损伤,具有广泛的医用价值。但是因为生物半衰期短(仅 10min 左右)、异体蛋白免疫原性以及稳定性较差等缺点,使其作为药用酶受到局限。基因工程 SOD 未解决生物半衰期短的问题,并有报道,从大

肠杆菌获得的重组人 SOD(rh SOD)仍具有免疫原性,故也限制了其临床应用。近年来,国内外采用无毒、无免疫原性的高分子化合物如聚乙二醇(PEG)^[1]、右旋糖酐^[2]、淀粉^[3]等对天然 SOD 进行化学修饰,得到生物半衰期延