

61: 931

10 Corral-Debrinski M, Stępien G, Shoffner L M. J Am Med Assoc. 1991; 266: 1812

11 Muller-Hocker J. Am J Pathol. 1989; 134: 1167

Mitochondrial DNA and Diseases. Jiang Bingkun (Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China).

Abstract The human mitochondrial DNA (mtDNA) is a 16569 bp closed circular double helix molecule. It codes for 13 subunits of oxi-

dative phosphorylation (OXPHOS) enzyme plus the structural rRNAs and tRNAs. Over the past years, a number of mtDNA mutations that cause human diseases have been identified, such as blindness, deafness, cardiac failure, and human degenerative diseases. Mitochondrial DNA diseases may be much more common than previously thought.

Key words mitochondrial DNA, genetic mutation, OXPHOS disease

吡咯喹啉醌 (PQQ) 的研究进展*

张经纬 赵永芳**

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 吡咯喹啉醌是一种与烟酰胺核苷酸、黄素核苷酸不同的新型辅基。近年来, 荷兰、日本等学者对它进行了初步研究, 而国内研究起步较晚。文章综述了吡咯喹啉醌的发现、分离纯化、鉴定、理化性质以及生理功能, 这有利于进一步研究吡咯喹啉醌的分布、产生机理、生物学性质、生理功能及其应用。这将对促进酶学学科的发展具有重要的理论和实践意义。

关键词 吡咯喹啉醌, 辅基, 分离纯化

众所周知, 脱氢酶 (dehydrogenase) 的辅基有烟酰胺核苷酸 (NAD^+ 和 NADP^+)、黄素核苷酸 (FMN 和 FAD)、辅酶 A、辅酶 Q 等, 迄今为止, 对它们的结构、理化性质、生理功能已经进行了较深入的研究。在 60 年代还发现了另一类脱氢酶, 它们并不依赖于烟酰胺核苷酸、黄素核苷酸等, 能氧化很多一级醇, 并以甲基吩嗪硫酸甲酯为最初受氢体, 直到 70 年代末才清楚它们含有一种新型的辅基——吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quinone, PQQ), 后来在氨氧化酶、硝基链烷氧化酶、腈水解酶等氧化还原酶中也发现有辅基吡咯喹啉醌, 并将这一类以吡咯喹啉醌为辅基的酶统称为醌蛋白 (quinoproteins), 目前发现主要分布于原核生物以及部分植物和哺乳动物之中, 人们对它的结构、理化性质和生理功能做了一定研究, 认

为吡咯喹啉醌不仅是醌蛋白的辅基, 而且作为一种生长因子, 促进微生物和植物的生长, 刺激植物花粉的萌发等。

1 吡咯喹啉醌 (PQQ) 的发现

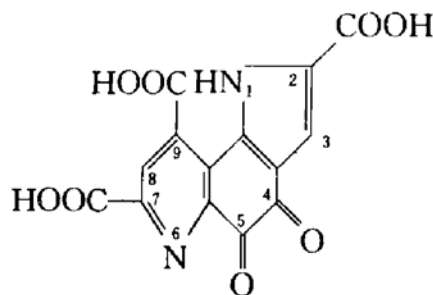
在脱氢酶的研究过程中, 人们从荧光极毛杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的膜上纯化得到了与电子传递链相连的 D-葡萄糖脱氢酶, 发现此酶的辅基与 NAD (P) 和黄素辅基不同^[1]。而且从亚氧化葡萄糖细菌 (*Gluconobacter suboxydans*) 中分离出的醇脱氢酶^[2]、醛脱氢酶^[3]、D-葡萄糖脱氢酶^[4]以及从细菌 W3A1 分

* 国家自然科学基金资助项目。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1994-01-25, 修回日期: 1994-05-21

离的甲氨脱氢酶^[5]和哺乳动物胎盘赖氨酰氧化酶^[6]也发现有相同的辅基. 这个辅基的性质与不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 葡萄糖脱氢酶以及假单胞杆菌 (*Pseudomonas sp.*) M27, 嗜酸红假单胞杆菌 (*Rhodopseudomonas acidophila*) 和生丝微菌 (*Hyphomicrobium X*) 甲醇脱氢酶的辅基非常相似. 在 1979 年, Duine 等人提出这个特异的辅基就是吡咯喹啉醌 (PQQ), 同时, Salishury 等人应用 X 射线分析测定了它的结构, 并且通过化学的方法合成了吡咯喹啉醌, 其结构为:



2 吡咯喹啉醌的分离纯化和鉴定

吡咯喹啉醌是醌蛋白的辅基, 在生物体代谢过程中起着重要作用. 为了研究吡咯喹啉醌的结构、性质和功能, 已经从微生物、植物和哺乳动物中分离纯化得到各种醌蛋白及其辅基吡咯喹啉醌, 并阐明了它们之间的关系.

2.1 分离纯化

2.1.1 醌蛋白的分离纯化 Ameyama 等首先从液化葡萄糖细菌 (*Gluconobacter liguefaciens*) IFO 12388, 亚氧化葡萄糖细菌变种 (*Gluconobacter suboxydans var.*) αIFO 3254, 亚氧化葡萄糖细菌 IFO 12528, 氧化葡萄糖细菌 (*Gluconobacter oxydans*) IFO 3287, 纹膜醋酸杆菌 (*Acetobacter aceti*) IFO 3284 等细菌中分离纯化得到醇脱氢酶^[2]. 采用 Triton X-100 处理菌株, 经 DEAE-Sephadex A 50 和羟基磷灰石 (HA) 柱层析得到纯化, 此酶最适 pH 为微酸性 (约 pH 5.5), 分子量为 150 000, 凝胶电泳表明为三个亚基, 亚基分子量分别 85 000、49 000、14 000. 同样, Duine 等人也分离得到以吡咯喹啉醌为辅基的甲醇脱氢酶.

Groen 等^[7]从铜绿色极毛杆菌 (*Pseu-*

domonas aeruginosa) LMD 80.53 中分离到醇脱氢酶, 通过破细胞、离心, 过 DEAE-Sephacel 柱, 并经硅胶柱 (silical-gel column) 去掉细胞色素 c, 再经高效液相色谱分析. 其研究表明, NH_4Cl 是醇脱氢酶的激活剂, 而环丙醇能使之丧失活性.

Matsushita 等^[8]为了比较乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 菌膜上和胞液中 D-葡萄糖脱氢酶的特性, 对这两种不同存在部位的酶进行了分离纯化. 应用 Triton X-100 破细胞, 离心将菌膜和胞液分开, 分别采用 DEAE-Toyopearl, CM-Toyopearl, 羟基磷灰石和 Phenyl-Sephacel 柱层析的方法获得 D-葡萄糖脱氢酶. 同时, 在 *Gluconobacter suboxydans* 和 *Acetobacter aceti* 中分离纯化出葡萄糖脱氢酶.

Lobenstein-Verbeek 等^[9]从牛血清中纯化了氨氧化酶. 将牛血清用固体硫酸铵分级沉淀, 沉淀用磷酸钾溶液溶解并透析, 再经 DEAE-Sephacel, ConA-Sephacel 和 Seppak C₁₈ Cartridge 柱层析纯化出氨氧化酶. 另外, Meer 等^[6]和 Ameyama 等^[10]分别从人胎盘组织和狗肝脏中纯化出醌蛋白赖氨酰氧化酶和胆碱脱氢酶.

2.1.2 吡咯喹啉醌的提取 在 70 年代末, Duine 等从 *Hyphomicrobium X* 中分离纯化出甲醇脱氢酶及其辅基吡咯喹啉醌. 在该酶液中加入适量的甲醇, 离心, 上清液过 Amberlyst 离子交换柱, 先用甲醇水溶液洗涤, 再用含饱和氯化钠的甲醇水溶液洗脱, 纯化的吡咯喹啉醌呈砖红色. 他们直接从完整细菌细胞中, 用相似的方法也提取出吡咯喹啉醌.

Shimao 等^[11]将假单胞杆菌 VM 15C 和恶臭假单胞杆菌 (*Pseudomonas putida*) VM 15A 混合培养, 从中分离得到了吡咯喹啉醌. 将该种混合培养的聚乙烯醇 (PVA) 降解菌悬液离心, 上清液过 DEAE-Toyopearl 650M 柱, 以含有氯化钾的磷酸缓冲液梯度洗脱, 所提取的吡咯喹啉醌也呈砖红色.

Ameyama 等^[10]改用 DEAE-Sephadex A 25

柱层析的方法分别从 *Pseudomonas* AM₁ 和肝脏线粒体中也分离出了吡咯喹啉醌。

近年来,赵永芳等^[12]也从降解聚乙烯醇的假单胞菌中提取出吡咯喹啉醌,并进行了鉴定。该物质在纤维素薄层板上或层析滤纸中(正丙醇/乙酸铵为展层剂)展层后,在紫外灯下可进行检测。

2.2 鉴定

2.2.1 显色反应 据研究报告^[1,11], *Pseudomonas aeruginosa* 或者 *Acinetobacter calcoaceticus* PQQ⁻ 突变株只能形成葡萄糖脱氢酶酶蛋白,而不能形成该酶的辅基吡咯喹啉醌。将含有该酶蛋白的细菌与外源吡咯喹啉醌吸附在葡萄糖-溴麝香草酚蓝(BTB)平皿上,由于葡萄糖酸的形成使 pH 降低,根据平皿上黄色圆圈的大小与溶液中吡咯喹啉醌浓度对数之间的线性关系,可对吡咯喹啉醌定性定量分析。

2.2.2 重组 Ameyama 等^[13]用 EDTA 处理大肠杆菌(*E. Coli*) K-12 细菌菌膜,使醌蛋白 D-葡萄糖脱氢酶脱去辅基吡咯喹啉醌,丧失其活性。当 EDTA 处理后的该菌膜碎片,在 Mg²⁺ 存在下与外源吡咯喹啉醌一起温育,通过测定 D-葡萄糖脱氢酶活性的恢复,可对吡咯喹啉醌进行定性定量分析。此法较灵敏,当吡咯喹啉醌含量达 10ng 就能测定出来。

2.2.3 色谱法 Duine 等^[14]在 HPLC 反相柱上用离子对色谱建立了一种简便的测定和紫外检测吡咯喹啉醌的方法。将样品用丁醛处理,使吡咯喹啉醌转化为一种稳定的加合物,该加合物在测定系统中有一适当的保留时间。如果用硼氢化钠处理样品使吡咯喹啉醌还原以及用高碘酸钠使吡咯喹啉醌氧化,将提高该测定方法的灵敏度和选择性。

3 吡咯喹啉醌的某些特性

3.1 金属离子对醌蛋白的影响

据研究报告^[5,6],吡咯喹啉醌是以共价键的方式与酶蛋白相结合,并且需要金属离子参与该结合过程。当然不同的醌蛋白需要

不同种类和数量的金属离子,如 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17933 的乙醇脱氢酶^[15]每个亚基需要 1 个 Ca²⁺ 或者 Sr²⁺。 *Acinetobacter calcoaceticus* 的葡萄糖脱氢酶^[16]每个亚基需要 2 个 Ca²⁺ 或者 Mn²⁺, Cd²⁺, *Gluconobacter suboxydans* 的醇脱氢酶也需要 Ca²⁺ 或 Mg²⁺, 并且这些金属离子是醌蛋白活性表现不可缺少的。

3.2 吡咯喹啉醌的光谱性质

吡咯喹啉醌具有特异的吸收光谱和荧光光谱,在 249nm 波长下,其摩尔吸收系数为 18 400mol⁻¹ · cm⁻¹。乙醇脱氢酶的吡咯喹啉醌,在不同 pH 条件下具有相同的吸收光谱,在中性条件下,在 249nm 和 330nm 处有最大吸收,在 270nm 处有平台,在 400—600nm 之间有一低而宽的吸收峰。在中性条件下,其荧光光谱表明,在 260nm, 330nm 和 380nm 处有三个激发峰,465nm 处有发射峰^[7,12]。但 Decker 等^[17]报道,在 pH 7.0—10.0 范围内,吡咯喹啉醌的吸收光谱和荧光光谱明显不同,只有在低温条件下,光谱才变得非常相似。在低温时,随着温度的升高,荧光强度明显增强,相反,当降温时,荧光强度也减弱,表明荧光物质与非荧光物质之间的转化是随温度的变化而进行。

从吡咯喹啉醌结构可知^[9,14,17],在中性或弱酸性条件下,其强的酸性基团将使之成为阴离子,能与许多化合物如水、硼酸、醇、醛、酮、氨、胺、脲、氰化物、苯胍等结合形成相应的加合物,例如其 C₅ 羰基很易与醛、酮发生反应形成荧光化合物,也可与水 and 醇发生共价加合导致荧光强度的变化。据报道^[16],在 pH 6.0 时,吡咯喹啉醌最强吸收在 249nm, 330nm, 在 5mmol/L CaCl₂ 中,三个羧基都与 Ca²⁺ 形成加合物,其吸收峰从 330nm 转移到 348nm, 同时在 5mmol/L MnCl₂ 或者 HgCl₂ 中,也可看到在 330nm 的吸收峰转移到更长的波长。据报道,亲核氨基酸能与吡咯喹啉醌反应生成氨酰-PQQ,同时肽也能生成肽酰-PQQ,肽酰-PQQ 在 220—330nm 间有高强度的激发光谱。

此外,吡咯喹啉醌也易被氧化剂氧化和还原剂还原,结果其光谱性质发生明显的变化^[14]。

3.3 吡咯喹啉醌的生理功能

3.3.1 吡咯喹啉醌是醌蛋白的辅基,参与呼吸链电子传递 除醇脱氢酶、醛脱氢酶、葡萄糖脱氢酶外,硝基链烷氧化酶、聚乙二醇脱氢酶、铜氨氧化酶、赖氨酸氧化酶、腈水解酶以及胆碱脱氢酶也是以吡咯喹啉醌为辅基^[6,9-11,13]。在许多细菌中,醌蛋白脱氢酶的功能表现在与呼吸链相连,经过辅酶Q把电子传递到末端电子受体和氧,提供生长所需的生物能。当缺乏这些脱氢酶时,氰化物、迭氮化合物等对呼吸链的阻断作用增强。Matsushita等^[8]报道,乙酸菌呼吸链的主要脱氢酶是结合于膜上的醌蛋白D-葡萄糖脱氢酶和醇脱氢酶,*Acetobacter aceti*和*Gluconobacter suboxydans*醇脱氢酶是呼吸链的重要组成成分,它直接将电子传递给细胞质膜上的辅酶Q。据研究报告,醌蛋白葡萄糖脱氢酶也参与呼吸链电子传递,在维持跨膜离子梯度中起重要作用,同时由于吡咯喹啉醌的存在,通过葡萄糖推动了氨基酸的吸收。此外,醌蛋白甲氨脱氢酶的辅基吡咯喹啉醌也是电子传递的中间分子^[18]。

3.3.2 吡咯喹啉醌是生长刺激因子 早在乙酸菌生长因子研究初期,Rao和Stockes就提出,在酵母或肝脏抽提液中存在一种物质,它能加速细胞的生长,并能还原糖及其衍生物。后来,Goldman等人希望从酵母抽提液中分离这种物质,但没有获得成功。在70年代,Hijikata等人研究在酵母抽提液中的这种生长刺激物质,能使迟缓期缩短,并研究了它的性质,但没有获得这种物质,此外,该物质还能刺激乙酸菌形成乙酸。后来的研究证明,这种物质就是吡咯喹啉醌。

在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和大肠杆菌(*E. Coli*)的半乳糖突变株中,由于其基因缺少半乳糖操纵子,通常不能进行半乳糖代谢,也不能在半乳糖中生长,但是当向其生长介质中加入一定浓度的吡咯喹啉醌,其生长得到恢复。

Shimao等^[11]研究表明,在*Pseudomonas* sp. VM 15C和*Pseudomonas putia* VM 15A混合连续培养中,前者产生分解聚乙烯醇的酶,后者产生利用聚乙烯醇必不可少而非常有效的生长因子,该因子就是吡咯喹啉醌,它不仅能刺激聚乙烯醇降解菌在聚乙烯醇上生长,也能增加其生长速度,吡咯喹啉醌在0.05—4.0ng/ml浓度范围内,降解菌的生长速度和生长范围将随浓度增加而增加。除此之外,吡咯喹啉醌也是*Pseudomonas* sp. VT1B、VA3B、VM6B、VM10B利用聚乙烯醇所必需的生长因子。

Ameyama等^[19]提出,吡咯喹啉醌对微生物生长有两方面的刺激作用,其一,吡咯喹啉醌作为必需的生长因子,随着其数量的增加而刺激细胞的增殖和细胞总数的增加,其二,吡咯喹啉醌缩短微生物生长的迟缓期,但并不能增加对数期的增长速度或停止期的细胞总数。

此外,Long Baoxiong等^[20]报道,吡咯喹啉醌还能刺激高等植物花粉萌发和花粉管的延长,这种刺激作用与吡咯喹啉醌浓度相关,并且在植物雌蕊中的吡咯喹啉醌可能还参与了授粉作用。

在原核生物、植物和哺乳动物中,都广泛存在着吡咯喹啉醌,它不仅是许多酶的辅基,在酶促反应中担负着传递电子、质子和化学基团的功能,也能刺激微生物的生长,植物花粉的萌发,促进植物的生长,尽管如此,对于吡咯喹啉醌的分布状况、产生机理、结构、功能和生物学性质将有待进一步研究,这对促进酶学学科的发展有其重要的理论意义,并且,对推动吡咯喹啉醌在食品、轻工、农业和医药等方面的应用也将具有重要实践意义。

致 谢 承蒙中国科学院武汉病毒研究所 王银善研究员审阅,在此深表感谢。

参 考 文 献

- 1 Matsushita K, Ohno Y, Shinagawa E *et al.* Agric Biol Chem, 1980; 44 (7): 1505

- 2 Adachi O, Tayama K, Shinagawa E *et al.* Agric Biol Chem, 1978; **42** (11): 2045
- 3 Adachi O, Tayama K, Shinagawa E *et al.* Agric Biol Chem, 1980; **44** (3): 503
- 4 Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K *et al.* Agric Biol Chem, 1981; **45** (4): 851
- 5 McIntire W S, Stults J T. Biochem Biophys Res Commun, 1986; **141** (2): 562
- 6 Robert A, Meer Van Der, Duine J A *et al.* Biochem J, 1986; **239**: 789
- 7 Groen B, Frank J, Duine J A *et al.* Biochem J, 1984; **223**: 921
- 8 Matsushita K, Shinagawa E. Biochemistry, 1989; **28**: 6276
- 9 Lobenstein-Verbeek C L, Jongejan J A, Frank J *et al.* FEBS Lett, 1984; **170** (2): 305
- 10 Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K *et al.* Agric Biol Chem, 1985; **49** (2): 3623
- 11 Shimao M, Yamamoto H, Ninomiya K *et al.* Agric Biol Chem, 1984; **48** (11): 2873
- 12 赵永芳, 王银善, 刘卫群等. 见: 第七次全国生物化学学术会议专题报告(摘要)及论文(摘要)汇编. 生物化学杂志(专刊), 沈阳, 1993: 135
- 13 Ameyama M, Nonobe J, Shinagawa E *et al.* Anal Biochem, 1985; **151**: 263
- 14 Duine J A, Frank J, Jongejan J A *et al.* Anal Biochem, 1983; **149**: 239
- 15 Mutzel A, Gorisch H. Agric Biol Chem, 1991; **55** (7): 1721
- 16 Geiger O, Gorisch H. Biochem J, 1989; **261**: 415
- 17 Dekker R H, Duine J A, Frank J *et al.* Eur J Biochem, 1982; **125**: 69
- 18 Davidson V L, Jones L H, Kumar M A. Biochemistry, 1990; **29**: 10786
- 19 Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K *et al.* Biol Chem, 1985; **49** (3): 699
- 20 Long Baoxiong, Sekiya J, Shimose N. Agric Biol Chem, 1988; **52** (4): 1065

Advance in the Studies of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ). Zhang Jingwei, Zhao Yongfang (School of life science, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) is a novel prosthetic group and differs from nicotinamid nucleotides, flavin nucleotides ever studied. In the recent decades, PQQ has been studied in Holland, Japan etc, but it was started studying lately in our country. The discovery, isolation, purification, assay, properties and functions of PQQ are introduced. It is beneficial for further studies of its existence, reaction mechanism, biological properties, physiological functions and application of PQQ. Studying the new prosthetic group has important significants in theory and practice for the development of enzyme sciences.

Key words pyrroloquinoline quinone, prosthetic group, isolation and purification

基因转移与肿瘤基因工程疫苗

付体辉, 谢之荣

(四川省肿瘤研究所, 成都 610041)

摘要 综述了近年来有关利用基因转移技术修饰肿瘤细胞制备肿瘤基因工程疫苗的最新研究进展, 着重阐述了逆转录病毒载体介导的基因转移及其安全性; 归纳了目前可用于肿瘤基因工程疫苗的各种目的基因的特点及作用并对这类肿瘤疫苗制备过程中所存在的问题进行了分析。

关键词 基因转移, 逆转录病毒载体, 免疫原性, 肿瘤基因工程疫苗