

MNNG 对日本血吸虫成虫细胞鸟氨酸脱羧酶活性作用的初步研究

范虹 黄敏 王倩 李曼军

【摘要】 目的 观察 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)诱导后日本血吸虫成虫细胞鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性的变化。方法 将日本血吸虫成虫剪碎后,收集成虫细胞,培养 1 wk 后依次用 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 MNNG 处理 48 h,用 RPMI-1640 加 10% 小牛血清及常量抗生素的培养基清洗数次并继续培养。对照组不用 MNNG 处理。分光光度法测定 ODC 活性。结果 MNNG 诱导后第 2、3 周 ODC 活性显著增高。结论 日本血吸虫成虫细胞内存在 ODC 活性, MNNG 具有增强 ODC 活性的作用。

【关键词】 日本血吸虫; N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG); 鸟氨酸脱羧酶

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Effect of MNNG on Ornithine Decarboxylase Activity in Cells from Adult *Schistosoma japonicum*

FAN Hong, HUANG Min, WANG Qian, LI Man-jun

(Department of Parasitology and Microbiology, Hubei Traditional Medical College, Wuhan 430061)

【Abstract】 Objective To observe the change of ornithine decarboxylase(ODC) activity in cells from adult *Schistosoma japonicum* after the cells were treated with N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG). **Methods** The cells were treated with MNNG at a concentration of 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48 hours after the cells being incubated for one week. The cells were then cultured with RPMI-1640 containing 10% calf serum. ODC activity was detected with spectrophotography. **Results** ODC activity rose significantly in two to three weeks after the cells were treated with MNNG. **Conclusion** There was ODC activity in cells from adult *S. japonicum* and MNNG has an effect to reinforce ODC activity in the cells.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*, MNNG, ornithine decarboxylase

体外培养条件下诱导血吸虫细胞发生转化进而增殖是研究血吸虫的重要课题之一。迄今,人们尚未找到能够诱导血吸虫细胞在体外持续增殖的有效的诱变剂。董惠芬等^[1]证实 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)可诱导日本血吸虫成虫培养细胞发生一定的增殖并出现转化灶。鸟氨酸脱羧酶(ODC)是生物合成多胺的关键酶,多胺在细胞增殖与分化中起重要调节作用。在转化细胞、肿瘤细胞和其他增殖旺盛的细胞中,ODC 活性和多胺含量明显增高^[2,3],因此 ODC 活性测定是目前研究细胞增殖的一个不可缺少的指标。本文报告 MNNG 诱导日本血吸虫成虫细胞 ODC 活性变化,为进一步研究 MNNG 对该类细胞转化、增殖作用提供参考资料。

材料与方 法

1 成虫的获取

取阳性钉螺(湖南省寄生虫病防治研究所提供),

常规逸出尾蚴,家兔经皮肤感染 1 800~2 000 条尾蚴,30 d 后灌注法收集成虫,置含青霉素 1 000 IU/ml、链霉素 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PBS 溶液中洗涤 2 h 备用。

2 日本血吸虫成虫细胞培养

参照董惠芬等^[4]方法。培养基为 RPMI-1640 和 10% 小牛血清,加常量抗生素(终浓度青霉素为 100 IU/ml,链霉素为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),pH7.2~7.4。将备用的虫体剪碎,用 0.25% 的胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化,离心。然后用培养基重悬浮,成为细胞含量为 $2.5 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液,接种于培养瓶中,每瓶接种 1 ml,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。

3 MNNG 处理

实验组细胞接种 1 wk 时依次用 MNNG (Sigma 产品) 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理 48 h,用 RPMI-1640 和 10% 小牛血清加常量抗生素的培养基清洗数次并继续培养。对照组不用 MNNG 处理,其余处理相同。

作者单位:湖北中医学院微生物寄生虫学教研室,武汉 430061

4 ODC 活性测定

于培养第 1、2、3、4、5 和 6 周时收集细胞，每次收集对照组和实验组细胞各 3 瓶。用 0℃ PBS 洗涤后置低温冰箱冻融 3 次，分别将各瓶细胞制成 0.1 ml 的细胞匀浆，分光光度法^[5]测定其 ODC 活性。测定条件为：样品 0.1 ml，底物浓度 3 nmol/L，pH7.2，37℃ 反应 60 min，显色后读取 OD_{420 nm} 值，于丁二胺 (PUT) 标准曲线上求得酶反应产物 (PUT) 生成量，以 2.5×10⁵ 细胞 60 min 内生成的 PUT 的 nmol 数表

示酶活性 (1 U=1 nmol/L PUT)。

结 果

MNNG 处理后日本血吸虫成虫细胞 ODC 活性变化见表 1。由表可知，培养过程中实验组细胞 ODC 活性在 MNNG 诱导后第 2、第 3 周 (培养第 4、第 5 周) 时显著上升，与同期对照组细胞 ODC 活性有显著性差异 ($P<0.01$ 和 $P<0.05$)。在其后 1 wk 有所下降，与同期对照组细胞无显著性差异 ($P>0.05$) (表 1)。

表 1 MNNG 处理后日本血吸虫成虫细胞 ODC 活性
Table 1 ODC activity of cells from adult *Schistosoma japonicum* treated by MNNG

组别 Group	不同培养时间 ODC 活性 ODC activity at different duration of culture (nmol of PUT/L) ($\bar{X}\pm s$)					
	1 wk	2 wk	3 wk	4 wk	5 wk	6 wk
实验组 Experiment	0.34±0.13	0.38±0.08	0.33±0.18	0.82±0.13**	0.81±0.12*	0.55±0.23
对照组 Control	0.34±0.13	0.28±0.12	0.42±0.21	0.33±0.12	0.36±0.20	0.11±0.14

注：* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

讨 论

有资料表明血吸虫存在极强的鸟氨酸转氨酶，可将鸟氨酸转化为脯氨酸^[6]。本文实验结果提示日本血吸虫成虫细胞内也存在 ODC 活性和鸟氨酸脱羧基代谢途径。ODC 是多胺生物合成中的关键酶，可催化鸟氨酸脱羧生成丁二胺 (PUT)。多胺包括 PUT、精胺和精脒，是细胞内重要的生物活性物质，可促进 DNA 的复制、RNA 和蛋白质的生物合成。可以推测，日本血吸虫成虫细胞的生长、增殖与分化也受到 ODC 的调控，抑制 ODC 活性的药物可能会干扰日本血吸虫成虫细胞的生长和增殖，使虫体存活时间缩短或死亡。在转化细胞、肿瘤细胞和其他增殖旺盛的细胞中，ODC 活性和多胺含量明显增高^[2,3]。细胞受刺激增殖时即伴有多胺合成的增加，并且先于 DNA、RNA 和蛋白质的合成^[3]；缺少多胺，细胞增殖与分化均会发生障碍。因此，ODC 活性测定是目前研究细胞增殖的一个不可缺少的指标。MNNG 是一种单功能烷化剂，其烷化基团可与 DNA 鸟嘌呤的 0~6 位发生共价结合，形成加合物 (adduct)，降低了鸟嘌呤与碱基的结合力，引起 DNA 碱基错配，由原来的 G:C 转换为 A:T，从而引起细胞表型的改变^[7]。本文 MNNG 诱导后第 2、第 3 周 (培养第 4、第 5 周) 日本血吸虫成虫细胞 ODC 活性明显上升 ($P<0.01$ 和 $P<0.05$)，提示 MNNG 具有提高该种细胞 ODC 活性、进而促进其增殖的作用，值得进一步研究。

在 MNNG 诱导后第 4 周 (培养第 6 周) 时 ODC 活性下降，与对照组无显著性差异 ($P>0.05$)，反映 MNNG 对该种细胞 ODC 活性作用不稳固。有资料表明，MNNG 对 DNA 的烷化作用可诱导细胞产生 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶 (O⁶-AGT)，这是一种具有高度特异性的 DNA 修复系统。该酶能将 O⁶-烷基鸟嘌呤的烷基转移到酶本身的半胱氨酸的巯基上，从而恢复鸟嘌呤原有结构^[8]。MNNG 诱导后第 4 周，日本血吸虫成虫细胞 ODC 活性恢复“正常”，是否与 O⁶-AGT 产生有关，有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 董惠芬, 蒋明森, 明珍平, 等. 甲基硝基亚硝基胍诱导日本血吸虫成虫培养细胞增殖的研究 [J]. 中国公共卫生, 2000, 16: 883-884.
- [2] 范慕贞. 多胺生物合成与肿瘤 [J]. 生理科学, 1985, 4: 209-212.
- [3] Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy [J]. Cancer Res, 1988, 48: 759-765.
- [4] 董惠芬, 蒋明森, 李璇, 等. 日本血吸虫细胞培养方法初探 [J]. 水生生物学报, 1995, 4: 382-383.
- [5] Ngo TT. Spectrophotometric assay for ornithine decarboxylase [J]. Anal Biochem, 1987, 160: 290-294.
- [6] 赵慰先主编. 人体寄生虫学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 341.
- [7] 刘毓谷主编. 卫生毒理学基础 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 97.
- [8] 张锐, 刘毓谷主编. 卫生毒理学 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997: 273.

(收稿日期: 2001 06 16 编辑: 富秀兰)