

钉螺柠檬酸代谢酶系及琥珀酸脱氢酶的初步研究

王根法 宋庚明

(中国预防医学科学院寄生虫病研究所)

摘要 应用比色法测得钉螺体内有柠檬酸缩合酶、顺乌头酸酶及异柠檬酸酶的活力。新杀螺剂溴乙酰胺作用后，钉螺的柠檬酸缩合酶活力减低 26%，而对顺乌头酸酶及异柠檬酸酶无影响。体外试验丙二酸及二乙基二硫代氨基甲酸钠都可抑制钉螺琥珀酸脱氢酶，而钉螺在后者 2ppm 的溶液中浸泡 48 小时，有 90—100% 的死亡。

钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫的中间宿主，广泛分布于我国南方的一些地区，危害性较大。钉螺在自然界的生长、发育、繁殖过程都需要消耗能量，研究钉螺能量代

谢的途径不仅有助于阐明其能量的主要来源，还可以为寻找新的杀螺剂提供依据。前文^[1]研究钉螺生理生化时证明了钉螺需要摄入氧气，杀螺剂可以抑制钉螺摄入氧气，说明氧气对钉

螺的代谢起着重要的作用,为此本文进行了钉螺三羧酸循环中柠檬酸酶系及琥珀酸脱氢酶的研究。

实验材料

钉螺 采用安徽省贵池县野外成熟钉螺。实验在解剖镜下除去螺壳,将所取出的螺体软组织磨成匀浆作为酶的样品。

实验药品 异柠檬酸, NAD, 辅酶 A 系 Sigma 产品;琥珀酸、苹果酸购自 Fluka;柠檬酸为上海第一试剂厂分析纯产品;铁氰化钾、石油醚为国产分析纯。杀螺剂溴乙酰胺、氯硝柳胺、氯乙酰胺、碘乙酰胺均为本所药物化学室提供。

测定方法与结果

(一) 柠檬酸缩合酶活力的测定 将每毫升 2 只钉螺软体组织的匀浆于含有 3.3×10^{-2} mol/L $MgCl_2$, 6.6×10^{-3} mol/L 半胱氨酸, 1.5×10^{-2} mol/L ATP, 10^{-4} mol/L NAD 及 5×10^{-2} mol/L 辅酶 A pH 8.0 的 Tris 缓冲液中,与草酰乙酸及乙酸钠作用 $30^\circ C$ 、2 小时后用 10% TCA 终止反应,空白管在加入草酰乙酸及乙酸钠时先用 TCA 终止酶反应,测得酶活力为 $1.60 \pm 0.17 \mu\text{mol/h/mg}$ 蛋白。

(二) 顺乌头酸酶活力的测定 反应系统为 pH7.4 的磷酸缓冲液内含 6.25×10^{-3} mol/L 异柠檬酸; 1.25×10^{-3} mol/L 细胞色素 C; 1.25×10^{-4} mol/L $MnCl_2$; 4.125×10^{-3} mol/L $MgCl_2$ 及含有 2 只钉螺的匀浆,反应在 $30^\circ C$ 中进行 2 小时,加 10% TCA 终止酶反应,应用 Taylor^[3] 氏比色法测定柠檬酸生成量。顺乌头酸酶活力平均为 $0.26 \mu\text{mol/h/mg}$ 蛋白。

(三) 异柠檬酸脱氢酶活力的测定 将相等于 1 只钉螺软体的匀浆与含有异柠檬酸为基质及 NAD 在 pH7.4 的磷酸缓冲液内反应 2 小时,以 10% TCA 终止酶反应后,应用 Fridmann 氏^[4]法测定上清液中 α -酮戊二酸的产生。测得钉螺异柠檬酸脱氢酶活力平均为 $0.12 \pm 0.02 \mu\text{mol/h/mg}$ 蛋白。

(四) 溴乙酰胺等杀螺剂对此酶系的影响

实验分体内及体外试验。体内试验为钉螺先接受 2ppm 溴乙酰胺水溶液浸泡 20 小时,然后将钉螺软体匀浆与基质培养后测其酶活力。体外试验则为未用药钉螺软体匀浆和杀螺剂及基质共同培养后测定其酶活力。溴乙酰胺体外试验对柠檬酸缩合酶活力无明显影响而体内试验酶活力由 1.60 ± 0.17 降低至 1.18 ± 0.11 , $P < 0.01$ 有显著差异。体内、外试验,钉螺异柠檬酸脱氢酶不受溴乙酰胺的影响。在本实验条件下杀螺剂溴乙酰胺、氯乙酰胺、氯硝柳胺及碘乙酰胺对钉螺顺乌头酸酶并无明显的影响。

(五) 钉螺琥珀酸脱氢酶活力的测定

参照汪静英氏^[2]等所用的比色法测定,即以琥珀酸还原正铁氰化钾引起 $420 \mu\text{m}$ 吸收光的减少作为酶活力之测定,反应液为 $100 \mu\text{mol/L}$ 磷酸缓冲液 pH7.8 内含 $60 \mu\text{mol/L}$ 琥珀酸及 $17.5 \mu\text{mol/L}$ 铁氰化钾以及相当于 2 只钉螺软体的酶液,总容积为 3.5ml 在 $30^\circ C$ 温育 10 分钟后用 20% 三氯醋酸终止酶反应,然后加水 2.5ml 离心除去沉淀后,取上清液在 $420 \text{m}\mu$ 波长分光光度计 (Hitach Model 100—40) 中测定其光吸收,以正铁氰化钾还原速度 $\mu\text{mol/h/mg}$ 蛋白表示酶活力。在上述条件中,反应 10 分钟时酶活力为 $1.07 \pm 0.06 \mu\text{mol/h/mg}$ 蛋白,反应在 20 分钟内成直线。

应用二种化合物对钉螺琥珀酸脱氢酶的体外试验的结果表明 2.8×10^{-2} mol/L 丙二酸及 10^{-5} mol/L 的二乙基二硫代氨基甲酸钠可明显抑制钉螺的琥珀酸脱氢酶的活力,见表 1。2ppm

表 1 抑制钉螺琥珀酸脱氢酶的试验

组 别	抑制剂浓度 (mol/L)	酶活力* ($\bar{X} \pm SD$)	实验样本	P 值
对照组	—	1.07 ± 0.06	6	
二乙基二硫代氨基甲酸钠	1×10^{-5}	0.79 ± 0.19	6	< 0.01
丙二酸	2.8×10^{-2}	0.21 ± 0.12	6	< 0.01

* 单位: $\mu\text{mol/h/mg}$ 蛋白。

二乙基二硫代氨基甲酸钠溶液与钉螺接触 48 小时,经过 3 天观察,可发现 90—100% 的钉

螺被杀死。

讨 论

钉螺的生长发育、产卵繁殖都需要消耗能量, ATP 是能量产生及储存的形式, 通过有氧代谢的三羧酸循环分解一分子葡萄糖可产生 36—38 分子 ATP, 钉螺是否也通过此循环获得 ATP, 在钉螺的代谢途径方面的工作尚未深入开展的时候, 我们觉得探索此循环是有一定意义的。从实验中证明了钉螺有柠檬酸缩合酶、顺乌头酸酶以及异柠檬酸脱氢酶, 杀螺剂溴乙酰胺并不影响钉螺顺乌头酸酶、异柠檬酸脱氢酶及琥珀酸脱氢酶, 仅在体内试验时对柠檬酸缩合酶有抑制作用。

丙二酸为琥珀酸脱氢酶特异性的抑制剂, 也有抑制钉螺这一酶活力的作用。Keilin 等^[4] (1940) 报告二乙基二硫代氨基甲酸钠对心肌琥珀酸氧化酶、脱氢酶有很强的抑制作用。我们

的实验也证明了较低浓度的二乙基二硫代氨基甲酸钠有抑制钉螺的琥珀酸脱氢酶的作用, 用此化合物于杀螺试验有明显效果, 通过这些实验说明对钉螺基础代谢研究有助于筛选新杀螺剂; 也进一步表明有氧代谢琥珀酸脱氢酶对钉螺的生存有一定的重要性, 值得作进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 王根法等 1989 钉螺的耗氧量及杀螺剂对它的影响 动物学报 35(2)
- [2] 汪静英等 1956 琥珀酸脱氢酶的研究 生理学报 20(2): 84
- [3] Friedmann T. E. et al 1943 The determination of acids keto in blood and urine *J. Biol. Chem.* 147: 485
- [4] Keilin D. 1940 Succinic dehydrogenase cytochrome system of cells intracellular respiration system catalysing aerobic oxidation of succinic acid *Proc. Roy. Soc. (London) B.* 129: 277
- [5] Taylor T. G. 1953 Microdetermination of nitrite acid *Biochem. J.* 54: 48