

文章编号:1000-7423(2003)-03-0140-04

## 不同温度对钉螺生殖腺一氧化氮合酶 基因表达的影响

杨坤<sup>1</sup> 周晓农<sup>2</sup> 余传信<sup>1</sup> 殷旭仁<sup>1</sup> 洪青标<sup>1</sup> 孙乐平<sup>1</sup> 杨国静<sup>1</sup> 张燕萍<sup>1</sup> 黄轶昕<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 研究不同温度下钉螺生殖腺一氧化氮合酶(NOS)mRNA 表达的变化规律。方法 钉螺放入不同温度(0℃、15℃、25℃)的培养箱内饲养 1 个月。用总 RNA 抽提试剂盒抽提总 RNA,参照哺乳动物 NOS 的保守序列,设计出钉螺 NOS 的简并引物。用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定各实验组钉螺生殖腺 NOS mRNA 的表达量。结果 各实验组均有特异性 PCR 产物条带出现,0℃组和 25℃组的 NOS mRNA 表达量明显高于对照组( $P < 0.01$ ),15℃组与对照组相比差异无显著性( $P > 0.05$ )。结论 本研究设计的引物是可行的,温度变化可影响钉螺生殖腺 NOS mRNA 的表达。

**【关键词】** 温度;钉螺;一氧化氮合酶;基因表达

中图分类号:R383.241

文献标识码:A

### Expression of Nitric Oxide Synthase (NOS) mRNA in the Gonad of *Oncomelania hupensis* Cultured in Different Temperature

YANG Kun<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>2</sup>, YU Chuan-xin<sup>1</sup>, YIN Xu-ren<sup>1</sup>, HONG Qing-biao<sup>1</sup>, SUN Le-ping<sup>1</sup>

YANG Guo-jing<sup>1</sup>, ZHANG Yan-ping<sup>1</sup>, HUANG Yi-xin<sup>1</sup>

(1 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064; 2 Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200025)

**【Abstract】 Objective** To study the expression of nitric oxide synthase (NOS)mRNA in the gonad of *Oncomelania hupensis* in different temperature. **Methods** The snails were cultured at temperature of 0℃, 15℃ and 25℃ for 1 month. The total RNA of each group was extracted with the RNA extraction kit. A pair of degenerate primers was designed from conserved regions of mammalian NOSs, and the expression of NOS mRNA in the gonad was measured by means of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The target genes of NOS were detected in the gonad of snails. The level of expression of snail NOS mRNA in 25℃ group and 0℃ group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.01$ ), there was no significant difference for the expression products between 15℃ group and control group ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion** The designation of primers of the snails was validated. The impact of temperature on the expression of snail NOS mRNA was determined, which suggested that NO plays an important role in the physiological and pathological modulation.

**【Key words】** temperature, *Oncomelania hupensis*, nitric oxide synthase (NOS), gene expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 300070684)

为研究不同温度对钉螺的生存和繁殖的影响,本研究利用酶组织化学技术对不同温度下钉螺生殖腺及头足部一氧化氮合酶(NOS)的变化情况进行了观察分析,结果表明钉螺生殖腺 NOS 对外界温度变化较为敏感<sup>[1]</sup>。一氧化氮(NO)作为重要的生物信息分子和效应分子,在生物体内发挥重要的生理和病理作用。NOS 是 NO 合成的唯一限速酶,很多研究显示 NOS 调节可发生在蛋白质水平或基因水平<sup>[2,3]</sup>,本研究利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,观察不同温度下钉螺生殖腺中 NOS 基因的 mRNA 表达水平的变化,旨在进一步探讨温度变化与 NO 表达水平之间关系以及对钉螺生存繁殖影响的作用机制。

### 材料与方法

#### 1 实验对象与分组

3月初采集江苏南京江浦洲滩钉螺,系湖北钉螺指名亚种,以群体逸蚴法剔除阳性钉螺,选择活动力强,7~8旋的成螺备用。各实验组随机挑选 10 只雌性钉螺标本,共分 4 组:A 组对照组,B 组 0℃实验组,C 组 15℃实验组,D 组 25℃实验组。A 组放置室内饲养(平均温度约 12℃),B、C、D 实验组钉螺分别放入 0℃、15℃和 25℃恒温培养箱,A、B、D 组饲养一个月,B 组饲养 3 周。以上各实验组钉螺均置于方形搪瓷盘中,盘底层为海绵,上层为草纸,加少量水使其半湿半干,B 组较其它实验组更为干燥。各实验组均每周定期去掉死亡钉螺。

基金项目:国家自然科学基金(No. 300070684)

作者单位:1 江苏省血吸虫病防治研究所,无锡 214064; 2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所,上海 200025

## 2 试剂和仪器

总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 反应试剂盒(上海华美生物公司)、质粒纯化试剂盒(Promega 公司)、dNTP、Taq DNA 聚合酶(上海生工生物工程公司)。PCR 仪(PERKIN ELMER-840)、DECKMAN DU640 核酸与蛋白质分析仪、Bio-Bas 凝胶成像图像分析系统(Bio-Bas 公司)。

## 3 方法

**3.1 总 RNA 提取** 按李赋京<sup>[4]</sup>破螺法,解剖镜下去壳暴露软体,用手术刀分离并挑选无机械性损伤的生殖腺团,用总 RNA 抽提试剂盒抽提生殖腺总 RNA,步骤:取解剖好的生殖腺放入 4℃ 预冷匀浆器中,加 300 μl 变性液,冰浴充分匀浆,再加酚:氯仿:异戊醇混合液,振荡混匀,室温放置 2~3 min,2 500 g 离心 10 min,取上清液加 2 μl 糖原、2 μl 7.5 mol/L 醋酸铵和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置过夜,然后 4℃, 2 500 g 离心 10 min,弃上清,用 75% 的乙醇漂洗 RNA,2 500 g 离心 5 min,弃上清,干燥后用 20 μl 无 RNase 水稀释。用核酸与蛋白质分析仪测定总 RNA 的浓度和纯度(A260/A280 比值)。

### 3.2 RT-PCR 反应

**3.2.1 PCR 引物的设计与合成** 参照文献[5],根据哺乳动物 NOS 的保守顺序设计钉螺 NOS 一对简并引物,P1:5'-TT(GT)CC(GT)GTTT(GT)GT(GT)GC-3'和 P2:5'-GG(GT)TGGTATAGGG(GT)AC-3'。参照基因为血吸虫虫卵毛蚴抗原(mP10)基因,由江苏省血吸虫病防治研究所余传信博士提供。根据 mP10 基因序列设计参照 PCR 引物,P3:5'-GCGGATCCATG-GATCTCGTCTCAATG-3'和 P4:5'-GCGTCGACT-TAGTGTATTATGACCTGAACC-3',以上引物均由上海生工生物工程公司合成。

**3.2.2 RT-PCR** 参照 Abdallahi 等<sup>[6]</sup>所建立的 RT-PCR 定量测定小鼠 NOS mRNA 的方法建立钉螺 NOS mRNA 的测定方法,根据总 RNA 的浓度取 2 μg 总 RNA,利用 RT-PCR 反应试剂盒行 RT-PCR 反应,反应体系:RT-PCR 酶反应混合物 2 μl、20×buffer(无 Mg<sup>2+</sup>)1.5 μl、MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L)2.5 μl、dNTP(2.5 mmol/L)3 μl、P1 1 μl、P2 1 μl、总 RNA 2 μg,加去离子水至总反应体积为 30 μl,然后再加液体石蜡 30 μl,稍离心,使液体石蜡覆盖其上,在 PCR 反应仪上先行 RT 反应:37℃ 60 min;再进行 PCR 反应:变性(95℃ 1 min)、退火(53℃ 1 min)及延伸(72℃ 2 min)总扩增次数为 35 个循环,继续 72℃ 5 min 终止反应。

**3.2.3 PCR 反应** 把含有质粒(含有 mP10 基因克隆

片段)的单一菌种接种于含有抗生素的 3 ml LB 培养液中,置于 15 ml 通气良好的试管中,37℃ 剧烈振摇过夜,取 1.5 ml 培养物倒入微量离心管 1 300 g 10 min,吸去上清液,利用 Promega 公司的质粒纯化试剂盒纯化质粒 DNA。参照 PCR 反应体系为:10×buffer (MgCl<sub>2</sub> 15 mmol/L)10 μl、4×dNTP 8 μl、P3 2 μl、P4 2 μl、TaqDNA 聚合酶 2 μl、质粒 DNA 2 μl,加去离子水至总反应体积为 100 μl,再加液体石蜡 100 μl,在同一台 PCR 反应仪以同样条件进行 PCR 反应。

## 4 结果观察

反应完成后各取 10 μl PCR 反应产物,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/ml 的溴化乙锭)100V 1 h。电泳完成后在紫外灯下观察照相,用 Bio-Bas 凝胶成像分析系统对 PCR 产物条带进行光密度扫描分析,为消除系统及定量误差,NOS 表达水平以 NOS mRNA 的相对量即 NOS/mP10 光密度比值来计算,实验重复 6 次,结果进行方差分析。

## 结 果

钉螺生殖腺组织总 RNA 经反转录后用设计的简并引物进行扩增,其产物长度约为 300 bp,参照质粒 DNA 经 PCR 扩增后其产物为 316 bp,均与预期扩增产物大小相符。各实验组生殖腺 NOS mRNA PCR 产物电泳带明显不均一,对照组和 15℃ 实验组电泳带浅暗,而 0℃ 实验组电泳带较明亮,25℃ 实验组电泳带最为明亮,质粒 DNA PCR 产物的亮度基本上保持不变,见图 1。

光密度扫描分析显示,NOS 相对表达量为 25℃ 组和 0℃ 组明显高于对照组和 15℃ 组( $P < 0.01$ );而 15℃ 组的比值与对照组相比,差异无显著性( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 各实验组 NOS mRNA 表达比较( $n = 6$ )  
Table 1 The value of expression of NOS gene in various groups( $n = 6$ )

组 别 Group	比 值 Value
对照组 Control group	0.5547 ± 0.0092
0℃ 组 0℃ group	0.6298 ± 0.019*
15℃ 组 15℃ group	0.5729 ± 0.0106
25℃ 组 25℃ group	0.6846 ± 0.0220*

\* 与对照组相比差异有显著性  $P < 0.01$

\* Values significantly different from that of the control group,  $P < 0.01$

## 讨 论

NO 是一种重要的信息分子,可调节心血管、神

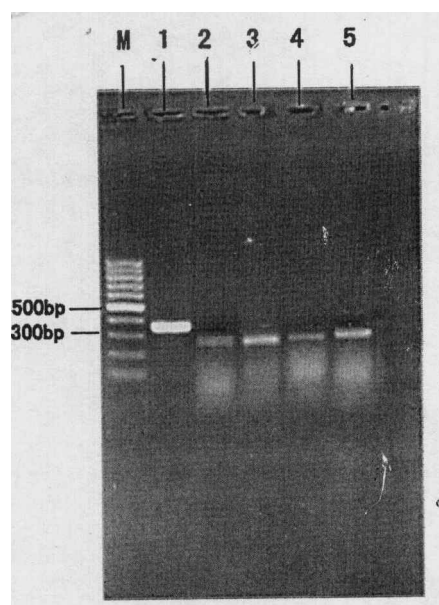


图 1 钉螺生殖腺 NOS 基因表达电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of PCR products of NOS of the gonad of snails M 标志物 1 mP10 2 对照组 3 0 °C 组 4 15 °C 组 5 25 °C 组  
M Marker 1 mP10 2 Control group 3 0 °C group 4 15 °C group 5 25 °C group

经、免疫等系统多种功能,生物体内含有 3 种 NOS,分别为神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)、诱导型(iNOS),iNOS 广泛存在机体许多细胞中,受刺激后诱导合成。NO 半衰期短,合成以后只能以自分泌或旁分泌形式发挥作用。近年的研究表明,NO-NOS 系统可参与卵巢生理功能活动的调节<sup>[7]</sup>。本研究对不同温度下钉螺生殖腺 NOS 的酶组织化学变化的结论与其相似。目前,有关同类研究尚未见报道。

mRNA 量的测定是研究基因表达的一个常用方法,主要方法有斑点杂交、Northern blotting 等几种方法,但由于 mRNA 的含量少又极易降解,因此对于含量极少 mRNA 样品,难以获得 mRNA,测定较为困难。近年开展的简便、快速 RT-PCR 技术,不仅可使少量的 mRNA 通过 RT-PCR 得以扩增,且可通过加入外源性 RNA 或 DNA 作为外标进行定量或半定量来检测样品 mRNA 的量。在哺乳动物如人、牛及鼠中的一氧化氮合酶 cDNA 已经成功被克隆出来<sup>[8,9]</sup>,Korneev 等<sup>[5]</sup>第一次报道了软体动物神经系统的 NOS 的基因,并且发现其与哺乳动物神经的 NOS 基因有一定的同源性。因此,本研究利用文献参照哺乳动物的 NOS 保守序列设计出钉螺的 NOS 的 PCR 上下游引物,参照 Abdallahi OMS 所建立的 RT-PCR 定量测定小鼠 NOS mRNA 方法建立了钉螺 NOS mRNA 的测定方法。实验结果显示,各实验组 PCR 产物条带明显,说明所设计引物是可行的。为消除系统及定量误差,Abdallahi

OMS 以小鼠的“看家基因”HPRT(次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶)为内参照,以 NOS/HPRT 的比值表示 NOS mRNA 的表达量,但在钉螺中目前不知其“看家基因”,因此选用与钉螺 NOS PCR 产物相近的血吸虫虫卵毛蚴抗原基因做外参照。本文只需 2 μg 总 RNA 即可测出组织中所含的 NOS mRNA,远远低于其它方法所需的总 RNA 的量<sup>[10]</sup>,但操作过程中总 RNA 的量必须准确,且每次电泳时外参照 PCR 产物的量要保证准确。

酶组织化学显示不同温度下生殖腺 NOS 活性或含量也不同,本实验进一步证实了酶学的不同可能与基因表达的不同相关。25 °C 组的 NOS mRNA 的表达量明显高于对照组,NOS mRNA 表达升高,使 NOS 的量或活性都随之升高,其 NO 的含量也随之增加,NO 激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)升高细胞内环鸟苷酸(cGMP)发挥多种生物效应<sup>[11]</sup>,NO 还可不依赖 cGMP 直接激活某些通道等多种渠道提高钉螺生殖细胞的生理活性<sup>[12]</sup>。生殖细胞是螺体代谢最旺盛的细胞,细胞凋亡参与其过程,资料显示,NO 有抑制细胞凋亡的作用<sup>[13]</sup>,生成的 NO 同样可能通过抑制细胞凋亡而提高钉螺的生殖能力。0 °C 组的 NOS mRNA 表达量明显升高,提示温度降低诱导 NOS mRNA 的表达,生成的 NO 一方面可能具应激作用,在钉螺的生殖腺中起着保护细胞和抑制生殖细胞凋亡的作用;另一方面,诱导的 NOS 生成过量的 NO 对生殖细胞发生细胞毒作用,过量的 NO 作用于巯基使与能量代谢或抗氧化有关的酶失活,同时也可能与超氧离子生成 ONOO<sup>-</sup>,甚至直接损伤 DNA 而使钉螺的生殖能力下降,抑制钉螺的生殖。对照组与 15 °C 相比其 NOS mRNA 表达无显著性差异,提示 NOS 的表达需要一个过程,与外界因素诱导的强度有关,15 °C 组虽较对照组温度稍高,但不足诱导大量的 NOS 表达,其酶学表现无差异性,另一方面也提示了外界诱导 NOS 表达增加,可能主要是平时不表达或表达很少的 iNOS mRNA。

本研究显示 0 °C 组的 NOS 基因表达量明显高于对照组,而酶组织化学观察显示,随着温度下降其活性或含量呈下降趋势,两者变化趋势不一致,其原因可能为组织化学技术检测组织 NOS 活性的局限性,检测受多种因素影响,且不能反映 NOS 的不同亚型,NOS 的 3 种亚型,分别有不同的基因编码。本研究利用哺乳动物的保守顺序设计的引物,未区分其亚型不同,故检测的 NOS 亚型和酶组织化学检测的 NOS 亚型可能就不一致;再则可能为钉螺体内存在蛋白质翻译调控机制,表达的 NOS mRNA 不能有效地翻译成 NOS。Pierrot 等<sup>[14]</sup>在研究曼氏血吸虫疫苗时也发现曼氏血

吸虫成虫体内有弹性蛋白酶基因 mRNA 表达,而成虫体内却检测不到弹性蛋白酶,并提出了曼氏血吸虫成虫体内存在蛋白质翻译调控机制。两者结果不一致的具体原因,有待于进一步研究。

本研究首次从基因的角度研究了温度变化与钉螺 NOS 表达水平之间的关系,为今后进一步从基因水平研究气候变暖与血吸虫病传播之间关系奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 杨坤,周晓农,梁幼生,等. 冬季温度变化对钉螺一氧化氮合酶的影响[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15: 93-97.
- [2] Kunz D, Muhl H, Waker G, *et al.* Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal messenger cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5387-5391.
- [3] 刘成龙,靳安民,周初松,等. 脊髓损伤后诱导型一氧化氮合酶基因表达变化的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21: 327-328.
- [4] 李赋京. 钉螺解剖与比较解剖[M]. 武汉:湖北人民出版社, 1956: 1-44.
- [5] Komeev SA, Piper MR, Picot J, *et al.* Molecular characterization of NOS in a mollusc: expression in a giant modulatory neuron[J]. J Neurobiol, 1998, 35: 65-76.
- [6] Abdallahi OMS, Bensalem H, Diagana M, *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase activity reduces liver injury in murine schistosomiasis. Parasitology, 2001, 122: 309-315.

[7] 李庆雷,倪江,吴克非,等. 一氧化氮与小鼠离体黄体细胞凋亡的关系及白细胞介素-1 $\beta$  对其影响[J]. 生殖与避孕, 2001, 21: 15-19.

[8] Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene[J]. J Biol Chem, 1993, 268: 17478-17488.

[9] Venema RC, Nishida K, Alexander RW, *et al.* Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase[J]. Biochem Biophys Acta, 1994, 1218: 413-420.

[10] 李珊珊,任秀花. 3 种 mRNA 检测方法比较[J]. 河南医科大学学报, 2000, 35: 113-114.

[11] Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. Trends Neurosci[J]. 2002, 25: 510-517.

[12] Bolotina VM, Najibi S, Palacinao JJ, *et al.* Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle[J]. Nature, 1994, 368: 850-853.

[13] Genaro AM, Hortelano S, Alvares Z, *et al.* Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels[J]. J Clin Invest, 1995, 95: 1884-1890.

[14] Pierrot C, Godin C, Liu JL, *et al.* *Schistosoma mansoni* elastase: an immune target regulated during the parasite life-cycle[J]. Parasitology, 1996, 113: 519-526.

(收稿日期: 2002-12-23 编辑: 伯韦)

文章编号: 1000-7423(2003)-03-0143-01

## 【病例报告】

### 输入性疟疾一例报道

李懿宏 范树奇

中图分类号: R531.32

文献标识码: D

患者,男,42岁,黑龙江省大庆市人,2002年4月赴加纳经商3个月。归国后自觉周身不适、乏力、食欲不振,继而冷感约1h后开始发热,最高达38℃左右,持续4~5h后大量出汗,体温随之降至正常,但症状反复发作。来我室就诊,首次查耳血涂片疟原虫阴性。4天后复诊,患者贫血、皮肤黄染、体温39℃左右、头晕、腹泻、心悸、呼吸困难、大汗淋漓。采耳血涂片染色检查,发现多量恶性疟原虫环状体,油镜(100倍)每视野均见10

余个,确诊为恶性疟。转哈医大附属第二医院传染科住院治疗。经抗疟治疗及口服双氢青蒿素[北京第六制药厂生产批号(LOT)090400]20mg×18片(每日3次,每次2片,共3天),口服伯氨喹每日一次,连服8d后康复。血涂片未见疟原虫,10d后皮肤黄染消退。出院再次血检,未见疟原虫。

本病例提示,改革开放后,国际交往频繁,赴热带病高发区人员应加强预防,及时检诊,防止成为传染源而传播蔓延。

(收稿日期: 2003-03-05 编辑: 伯韦)

作者单位: 哈尔滨医科大学寄生虫学教研室, 哈尔滨 150086