

参赛队员姓名： 王馨聆

中学： 上海市世界外国语中学

省份： 上海

国家/地区： 中国

指导教师姓名： 刘骥龙、傅鸣

论文题目： 阿西维辛与 DON 对果蝇精巢中细胞  
蛇形成的影响

## 论文题目：阿西维辛与 DON 对果蝇精巢中细胞蛇形成的影响

### 摘要：

细胞蛇是一种丝状结构的新型细胞器，它由 CTP 合成酶在细胞中聚合而成。作为在进化过程中极为保守的亚细胞结构，其生物学意义尚待更深入探索。本文通过给果蝇喂食 DON 和阿西维辛 Acivicin 两种 L-谷氨酰胺类似物，比较两种药物对果蝇精巢细胞中细胞蛇组装数量的影响。研究发现，在果蝇精巢细胞中，DON 能提高细胞蛇的数量，且 DON 的浓度越高，细胞蛇增加的越多。然而阿西维辛对于细胞蛇的形成并没有显著的影响。结果表明，DON 能很有效的抑制 CTPS 活性，促进细胞蛇组装，而阿西维辛作用并不明显，说明细胞蛇的数量能作为评价 DON 对 CTPS 抑制能力的标准，这为 DON 在癌症治疗中的成效评估提供了生物学方法。

**方法：**将通过掺杂了不同浓度药物的酵母糊，在饥饿培养基中喂养果蝇 30 小时。之后，解剖雄果蝇的精巢并保存，孵育一抗和二抗。在其后通过共聚焦显微镜观察果蝇精巢细胞中细胞蛇的数量，以判断两种药物对于细胞蛇形成数量的影响。

我在这一实验的研究中，致力于发现细胞蛇与 2 种抑制其组成成分活性药物的影响。在这一实验中，2 种治疗癌症的药物被运用了一种新的检测作用的方法，检测它们对于 CTP 合成酶活性的影响是否能由细胞蛇体现。通过本实验的研究，在今后的医领域中，研究人员可以尝试在 DON 被用于抑制癌细胞复制时，通过这一方法检测药物的效果，与药物浓度对复制速度的影响，从而延长癌症患者的性命。

本研究的目的是通过比较 DON 和阿西维辛对果蝇精巢中细胞蛇组装数量的影响，揭示它们对 CTPS 合成酶的抑制能力。本研究结果发现，DON 能有效抑制 CTPS 的活性，增加细胞蛇的数量。该结果提示细胞蛇的数量能作为检测 DON 在抑制癌细胞复制数量上的方法。在今后的研究领域中，研究者可进一步尝试 DON 的药物浓度对抑制癌细胞增长的影响。同时，以细胞蛇的数量作为研究指标，探究不同 L-谷氨酰胺类似物对 CTP 合成酶的抑制效果。

**关键词：**细胞蛇；DON；阿西维辛；CTP 合成酶；果蝇精巢；L-谷氨酰胺类似物

# Title: Effects of Acivicin and DON on the Formation of Cytoophidia in *Drosophila testis*

## Abstract

The cytoophidium is a filament new organelle which consists of CTP synthase. The cytoophidium represent a new type of intracellular compartment, but its biological significances remain to be explored. In this experiment, fruit flies were treated with a L-glutamine analog 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) and Acivicin and then we observed the formation of cytoophidia under confocal microscopy in *Drosophila testis*. We found that the higher the concentration of DON, the more cytoophidia were observed. But acivicin does not affect the formation of cytoophidia significantly. *The data demonstrates that L-glutamine analogs could be useful tools in the study of the biological function and assembly mechanisms of cytoophidia.*

**Method** : In order to figure out the relationships between cytoophidia and the two L-glutamine analogs , several procedures are done. *Drosophila* is fed in medium without food but wet yeast paste which is churned with different concentrations of the drug for 30 hours . After that, the testis of the *drosophila* will be dissected and preserved .Then the testis will be incubated with primary antibody and secondary antibody. The number of cytoophidia in the cells is observed by confocal microscopy in order determine the effect of the two drugs on the formation of cytoophidia .

In this experimental study, I was dedicated in finding the effects of two drugs on inhibiting activity the ingredient of cytoophidia which is CTPs. In this experiment, two drugs for the treatment of cancer were treated with a new method of detection to determine whether their effects on CTP synthase activity were manifested by cytoophidia. Through the study of this experiment, in the future medical field, the researchers can try to use DON to inhibit cancer cell replication, through this method to detect the effect of drugs, and drug concentration on the speed of replication, thereby extending the cancer The patient's life.

The aim of this study was to compare the effects of DON and acivicin on the assembly of cytoophidia in *Drosophila testis* and to demonstrate their ability to inhibit CTPS synthase. The results of this study found that DON can effectively inhibit the activity of CTPS, and increase the amount of cytoophidia. The results suggest that the number of cytoophidia can be used as a method of detecting DON in inhibiting the number of the replication in cancer cell. In the future research field, researchers can further investigate concentration of DON on the inhibition of cancer cell growth. At the same time, the inhibitory effect of different L - glutamine analogues on CTP synthase was investigated by using the number of cell snakes as the research indexes.

**Keywords:** cytoophidia; DON; acivicin; CTP synthase; *Drosophila testis* ; L-glutamine analo

本参赛团队声明所提交的论文是在指导老师下进行的研究工作和取得的研究成果。尽本团队所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人或本团队已经发表或撰写过的研究成果。若有不实之处，本人愿意承担一切相关责任。

参赛团队签名: 王馨聆

日期: 2017年9月14日

## 目录

摘要:	2
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1. 研究背景</b>	<b>6</b>
1.1. CTP 合成酶	6
1.2. 细胞蛇	6
1.3. L-谷氨酰胺类似物	7
1.4. 果蝇	7
1.5 本研究的目的是	9
<b>2.研究方法</b>	<b>10</b>
2.1. 主要仪器和试剂	10
2.1.1. 仪器	10
2.1.2. 用品与试剂	10
2.2 研究步骤	11
2.2.1. 筛选并制作酵母糊（用以向果蝇喂食）	11
2.2.2. 制作含有 DON 和阿西维辛的酵母糊	12
2.2.3. 向果蝇喂含有 DON 和阿西维辛的酵母糊	13
2.2.4. 解剖雄果蝇的精巢	14
2.2.5. 孵育一抗	14
2.2.6. 孵育二抗	14
2.2.7. 制片	15
2.2.8. 使用共聚焦显微镜观察	15
<b>3.实验结果</b>	<b>17</b>
3.1. 细胞蛇的形成与观察	17
3.2. DON 对果蝇精巢中细胞蛇的影响	17
3.3. 阿西维辛对果蝇精巢中细胞蛇的影响	17
3.4. 两种 L-谷氨酰胺的类似物对果蝇精巢中细胞蛇影响的对比	18
<b>4. 讨论</b>	<b>20</b>
<b>5.展望</b>	<b>21</b>
<b>6.致谢</b>	<b>22</b>
参考文献:	23

# 论文题目：阿西维辛与 DON 对果蝇精巢细胞蛇形成的影响

## 1. 研究背景

### 1.1. CTP 合成酶

CTP 是通过谷氨酰化酶催化 UTP 而成的，它可以作为脂类合成前体，也是生物大分子核糖核酸（RNA）及脱氧核糖核酸（DNA）的前体物。CTP 合成酶通过催化 ATP 依赖性的胞质相关谷氨酰胺转氨酶，将酰胺氮从谷氨酰胺转移到 UTP 的 C-4 位，以形成 CTP（Lieberman, 1956）。已经发现 CTP 合酶在许多类型的癌细胞中上调，如肝癌，白血病，结肠癌等。CTP 合成酶一直是开发抗癌，病毒和寄生虫药物的有吸引力的靶标。

### 1.2. 细胞蛇

在 2010 年，称为细胞蛇的丝状结构首次被发现于果蝇细胞中（Liu JL, 2010）。其后，这一结构先后在细菌，芽殖酵母及人类细胞中被证实。这种无膜细胞器是由代谢酶组装成的蛇形结构，形态上，蛇状结构与细胞质中很多经典细胞器如线粒体，内质网和细胞核区分开来。从细菌，动物到人体细胞里均有细胞蛇，其保守性明显跨原核生物和真核生物，这表明了细胞蛇的形成具有重要的生物功能。近期研究表明，细胞蛇是响应于代谢状态和外部环境压力的动态结构。多条证据证实了代谢酶如 CTPS 的聚合和肌苷单磷酸脱氢酶转化为丝状细胞蛇结构来调节酶活性。

为了揭示细胞蛇的组成，一个经典的方法是亚细胞分离。当 CTPS 过表达时，在培养细胞中将形成巨大的细胞蛇结构（Aughey 等，2014），研究者可以利用生物化学手段纯化和提炼细胞蛇结构。此外，使用全基因组筛选荧光标记的蛋白质方法，可以找到形成丝状结构的蛋白质，进而观察到细胞蛇结构。例如，Shen 等利用此方法发现在芽殖酵母中至少有 23 种蛋白可以形成此类似结构。（Shen 等，2016）

形成细胞蛇是一种调节代谢的方式，数学模型表明形成丝氨酸结构的好处是快速改变酶活性（Barry 等，2014）。形成细胞蛇也可作为代谢稳定剂和缓冲体系，以便细胞可以容纳许多分子而不释放其活性，提高代谢效率。当细胞需要更多的 CTPS 活性时，来自细胞蛇的 CTPS 分子被释放到细胞质中以增加游离 CTPS 分子的浓度，最终提高 CTPS 的局部浓度。此外，细胞蛇或许可以延长相关蛋白的寿命，在癌症中，细胞蛇的出现是细胞获得异常增值能力的一个标志。总之，在漫长的进化过程中，细胞蛇依然存在于生物体中而未被淘汰，表明它对生物体的延续起到至关重要的作用。

### 1.3. L-谷氨酰胺类似物

CTP 水平异常和 CTP 合成酶活性极高是多种形式的癌症，如白血病，肝细胞癌和结肠癌的共同特征。L-谷氨酰胺类似物 DON 通过不可逆地结合其谷氨酰胺转移酶结构域，来抑制和降低 CTP 合酶活性（Levitzki&Koshland, 1971）。因此，DON 已被测试为抗肿瘤，抗病毒和抗寄生虫剂（Lyons 等，1990; Hofer 等，2001）。

阿西维辛 Acivicin 是一种 L-谷氨酰胺拮抗剂。1985 年和 1986 年作为抗癌药物用于 II 期临床的疗效评价（Earhart, Robert H, 1987）。研究证实，它对白血病、移植于裸小鼠的人类乳腺肿瘤和肺肿瘤细胞有抑制效果。。对肝癌细胞也可进行抑制（Ze Peng, 1984）。

体外生长的小鼠 P388 和 L1210 白血病细胞对 DON 与阿西维辛的敏感程度大大高于其他药物。（Rosenfeld, H., J. Roberts, 1981.）DON 运输系统类似阿西维辛，有强烈的温度依赖性，通过“L”转运系统进行谷氨酰胺的抑制，而不是谷氨酸的抑制。（Huber, Klaus R., H. Rosenfeld, J. Roberts, 1981.）Acivicin 是 CTP 和 GMP 合成酶的有效抑制剂，而 DON 能有效抑制 FGAM 合成酶及 CTP 合成酶。

### 1.4. 果蝇

本实验的研究对象黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*），是实验室中备受青睐的模式生物。果蝇具有很高的生物学地位，对其研究已经有100多年的历史。随着生命科学的不断发展，果蝇的生物学地位也不断提高，这不仅仅是因为果蝇是最简洁和最常用的多细胞模式动物，而且相比于其它多细胞动物，它具有多方面的优点：（1）果蝇个体小，非常适于在实验室大规模饲养。（2）果蝇的食物来源容易，且成本低廉。（3）果蝇的生活周期短，便于观察。在室温条件下（25℃，湿度50%）黑腹果蝇的整个生活周期是10天，此间陆续经历胚胎期、幼虫期、前蛹期、蛹期和成虫期。其中胚胎、一龄、二龄、三龄和前蛹期各一天，再经历5天蛹期后破茧成蝇(图1来自<http://flymove.uni-muenster.de/>)。（4）果蝇的生殖能力强，平均每只雌蝇一生能产500多个卵，大量的后代适于进行表型分析。（5）果蝇的卵在体外孵化，这使得对其发育的各个阶段的研究非常方便。（6）果蝇遗传背景清晰，遗传操作方法成熟，如FLP-FRT系统、Gal4-UAS系统等。（7）果蝇与哺乳动物的多数信号传导通路都是保守的，这为研究信号的传递提供了便利，如Hedgehog signaling、Notch signaling、Hippo signaling、Wnt signaling等。这些优势不仅为生物学研究提供了便捷条件，更为我们对更为复杂的生物体进行更加深入的研究奠定了基础。

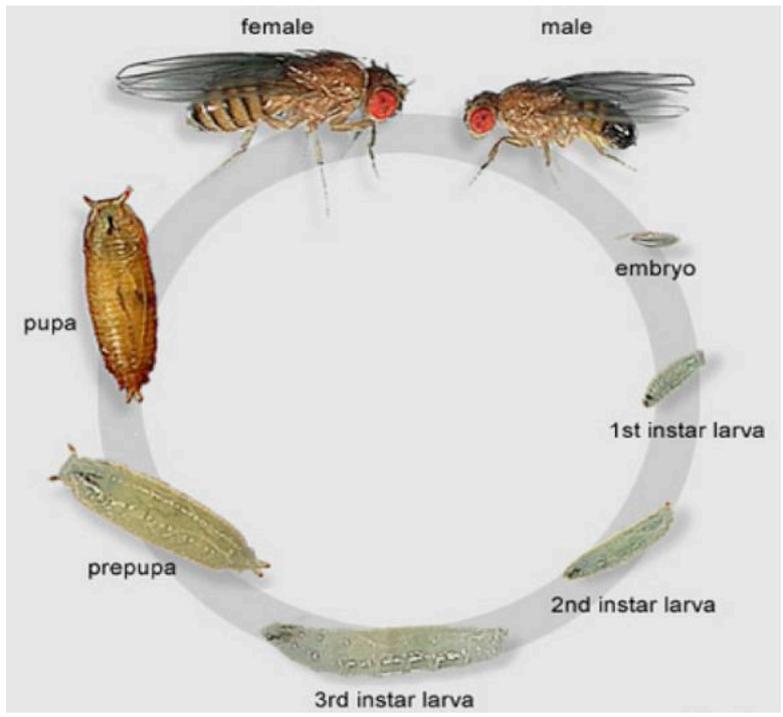


图 1 果蝇发育过程

果蝇种系细胞中的大多数细胞分裂是线性的。细胞蛇在果蝇许多细胞中都存在，例如细胞蛇在果蝇视叶中的神经上皮干细胞中十分丰富。相比之下，幼虫淋巴腺中的细胞色素通常显示为环形或 C 形（Liu 2010）。果蝇有两个精巢，形状为长而卷曲状的管状，精巢里有两类干细胞，包括生殖干细胞和体节干细胞。

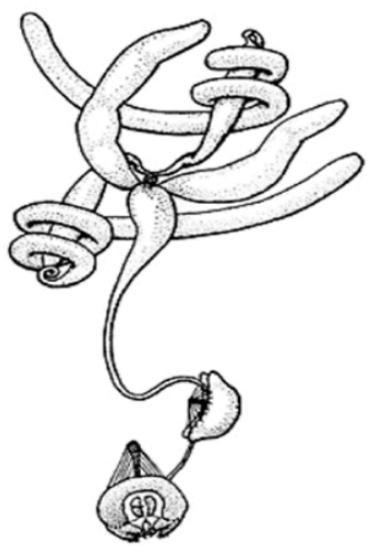


图 2 果蝇精巢 (Phillip D. Zamore, Shengmei Ma, 2011)

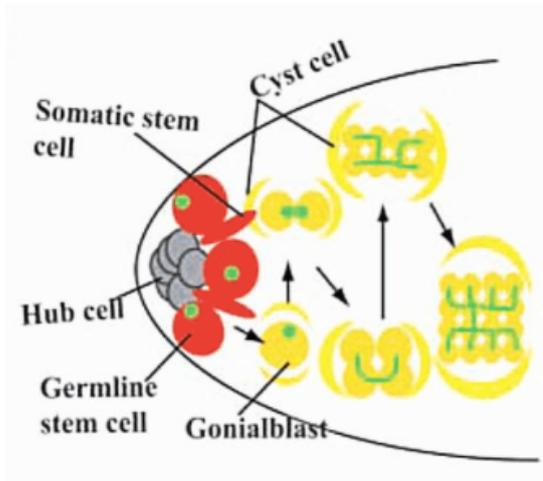


图 3: 果蝇精巢

## 1.5 本研究的目

DON和阿西维辛均可以抑制CTPS活性，而丧失活性的CTPS将形成细胞蛇。因此，通过观察果蝇精巢中细胞蛇的数量，将能比较DON和阿西维辛对CTPS的抑制功能。另外，肿瘤细胞和癌细胞中有大量的CTPS，考察DON和阿西维辛对CTPS的抑制功能，将能揭示细胞蛇数量在检测L-谷氨酰胺药物对抑制癌细胞增长方面的可行性。

本研究的目的是比较阿西维辛和DON对果蝇精巢中细胞蛇形成数量的影响，揭示两种CTPS活性抑制药物与细胞蛇形成数量之间的关系。

## 2.研究方法

### 2.1. 主要仪器和试剂

#### 2.1.1. 仪器

2ml EP 管

枪头

饥饿培养基 (2%agar)

CO<sub>2</sub>

培养皿

移液枪 (GILSON, 美国)

显微镜 (LEICA MZ8, 德国)

单面刀片 (Fisher Scientific, 美国)

解剖镊 (World Precision Instruments ,Inc , 美国)

载玻片(世泰, 中国)

盖玻片 (Fisher Scientific, 美国)

凡士林

共聚焦显微镜 LSM510 (Zeiss , 德国)

#### 2.1.2. 用品与试剂

W1118 果蝇

纯净水

活性酵母 (Angel 安琪, 中国)

DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucine crystalline) (Sigma-Aldrich, 美国)

Acivicin (Cayman ,美国)

Grace's Insect Medium (Thermo Fisher, 美国)

37% Formoldehyde 10x (Sigma-Aldrich, 美国)

PST (自制)

Hoechst (Hoechst AG, 德国)

A488 anti-rabbit alexa (Molecular Probes, 美国)

## 2.2 研究步骤

### 2.2.1. 筛选并制作酵母糊（用以向果蝇喂食）

1. 准备 5 支 2ml EP 管。
2. 向 5 支 2ml EP 管中加入 500 $\mu$ l 活性酵母。
3. 用 200 $\mu$ l 移液枪分别向 5 支 2ml EP 管中加入 500 $\mu$ l，560 $\mu$ l，600 $\mu$ l，650 $\mu$ l，750 $\mu$ l，850 $\mu$ l 纯净水。
4. 搅拌 2ml EP 管中的活性酵母与水，直到酵母已被搅拌均匀，成为糊状。
5. 筛选所制作的酵母糊。

筛选结果：

水加入的量越多，酵母糊越稀

加入 500 $\mu$ l，560 $\mu$ l 水后，酵母糊粘稠，不适合用于对果蝇喂食。

加入 750 $\mu$ l，850 $\mu$ l 水后，酵母糊过稀，不适合用于对果蝇喂食。

加入 600 $\mu$ l，650 $\mu$ l 水后，酵母糊较为适合果蝇进食。

因此，选择用 650 $\mu$ l 活性酵母与 600 $\mu$ l 纯净水来制作果蝇食物。

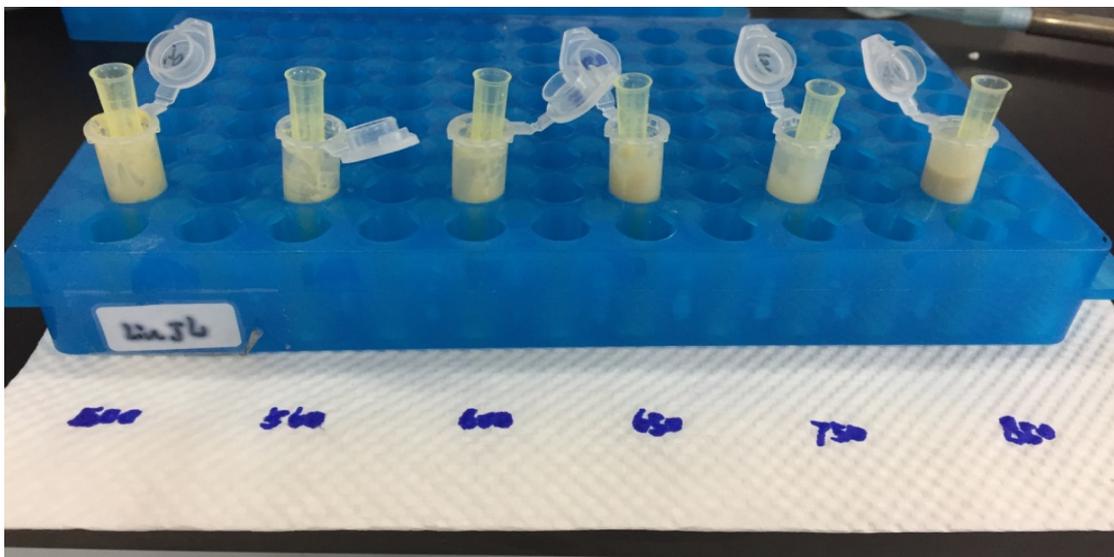


图 4：用不同微升的纯净水筛选并制作酵母糊

### 2.2.2.制作含有 DON 和阿西维辛的酵母糊

1. 用 600 $\mu$ l 活性酵母与 650 $\mu$ l 纯净水来制作酵母糊
2. 计算向酵母糊中加入  $1 \times 10^{-6}$ mol ,与  $5 \times 10^{-6}$ molDON 的体积

计算:

名称	DON
分子式	$C_6H_9N_3O_3$
摩尔质量	171.1 g/mol
原液浓度	5g/L = 0.029222677 mol/ L
溶剂 (H <sub>2</sub> O)	600 $\mu$ l = $6 \times 10^{-4}$ L
物质的量: $5 \times 10^{-6}$ mol	1.02 $\mu$ l
物质的量: $1.5 \times 10^{-5}$ mol	5.11 $\mu$ l

3. 向酵母糊中分别加入 1.02 $\mu$ l, 5.11 $\mu$ lDON 并在 EP 管上作记号
4. 将酵母糊搅拌均匀
5. 计算向酵母糊中加入  $1 \times 10^{-6}$ mol ,与  $5 \times 10^{-6}$ mol 阿西维辛的体积

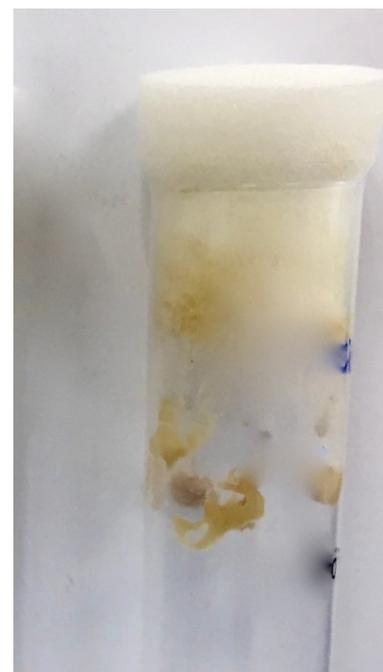
计算:

名称	阿西维辛 Acivicin
分子式	$C_5H_7ClN_2O_3$
摩尔质量	178.6 g/mol
原液浓度	$10 \times 10^{-3}$ mol/L
溶剂 (H <sub>2</sub> O)	600 $\mu$ l = $6 \times 10^{-4}$ L
物质的量: $5 \times 10^{-6}$ mol	3.0 $\mu$ l
物质的量: $1.5 \times 10^{-5}$ mol	9.0 $\mu$ l

6. 向酵母糊中分别加入 3.0 $\mu$ l, 9.0 $\mu$ l 阿西维辛并在 EP 管上作记号
7. 将酵母糊搅拌均匀

### 2.2.3.向果蝇喂含有 DON 和阿西维辛的酵母糊

- 1.用 CO<sub>2</sub> 气枪将 w1118 果蝇麻醉
- 2.筛选出各 12 只雄果蝇, 12 只雌果蝇放入饥饿培养基中
- 3.步骤 2 重复共 5 次
- 4.将未加入药品的酵母糊涂在培养基进海绵塞处并作记号
- 5.将加入 1.02 $\mu$ lDON 的酵母糊涂抹在培养基进海绵塞处并作记号
- 6.将加入 5.11 $\mu$ lDON 的酵母糊涂抹在培养基进海绵塞处并作记号
- 7.将加入 3.0 $\mu$ l 阿西维辛的酵母糊涂抹在培养基进海绵塞处并作记号
- 8.将加入 9.0 $\mu$ l 阿西维辛的酵母糊涂抹在培养基进海绵塞处并作记号
- 9.将海绵塞塞住 5 个培养基
- 10.记录喂食时间, 于 25 $^{\circ}$ C, 湿度 60%果蝇培养箱培养 30 小时。



图

5: 筛选雄果蝇图 6 培养基中添加的酵母糊

#### 2.2.4.解剖雄果蝇的精巢

- 1.在 CO<sub>2</sub> 的作用下麻醉果蝇，并区分雌雄。
- 2.在含有 Grace's Insect medium 的培养皿中对果蝇进行一次解剖。此次解剖需要快速进行，不需要将附属组织解剖干净。操作如下：

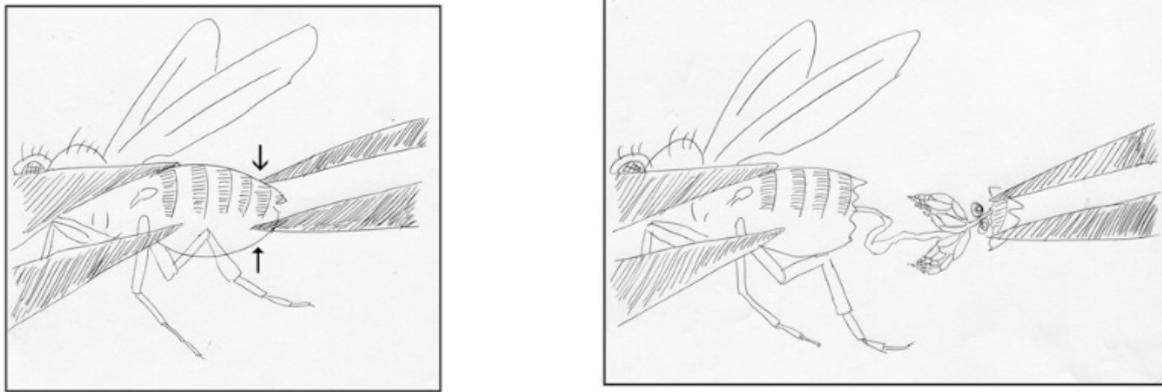


图 7&8 解剖果蝇 (Liu JL)

- 3.使已用刀片切过的 20 $\mu$ l 枪头，将组织转移至 1.5ml 的 EP 管中。
- 4.吸净离心管中的液体，并加入 200 $\mu$ l 3.7%Formoldehyde ,固定 10 分钟。
- 5.吸净 3.7%Formoldehyde 后，加入 1ml PST ( PST50ml= 3mL 5%TritonX-100+2.5mL10%马血清+44.5mL PBS) 冲净一遍后洗净。
- 6.再加入 1mL PST 将固定好的组织转移至培养皿中进行二次解剖。
- 7.将剥离好的组织用切过的枪头转移至 500 $\mu$ l EP 管。
- 8.将液体吸净后，加入 200 $\mu$ l PST 放入 4 $^{\circ}$ C 保存。
- 9.将服下药物与未服下药物的五组分别进行解剖，并进行标注。

#### 2.2.5.孵育一抗

1. 稀释抗体 (R  $\alpha$ CTPS y88) 1:50= sug/mL 10X
2. 取 16 $\mu$ l 含有解剖好的精巢的 PST, 和 4 $\mu$ l 一抗加入 EP 管中。
3. 温室孵育 24 小时。

#### 2.2.6.孵育二抗

##### 1.稀释 Hoechst

10mg/mL 1 :1000 10X( 1 $\mu$ g/mL)

##### 2.稀释二抗

G  $\alpha$  R A488 (1:50) 10X

- 3.在已经放置过一夜的 EP 管中加入 200 $\mu$ lPST 清洗。

4. 吸净液体, 注意将解剖完的精巢留在 EP 管中。
5. 制作二抗溶液, 并倒入含有精巢的 EP 管中。

2 $\mu$ l Hoechst + 2 $\mu$ l 二抗 + 16 $\mu$ l PST

6. 温室孵育 24 小时。

### 2.2.7. 制片

1. 将擦干净的载玻片置于平面。
2. 在载玻片上四个角点 (1.8cm x 1.8cm) 涂上凡士林。
3. 转移约 15 $\mu$ l 含有样品至干净的盖玻片中央。
4. 将载玻片涂上凡士林的一面对准载玻片, 并放在盖玻片上。
5. 轻轻敲打, 使薄片间的液体均匀并把气泡赶走。
6. 用指甲油封片。
7. 风干后再做上标记。
8. 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

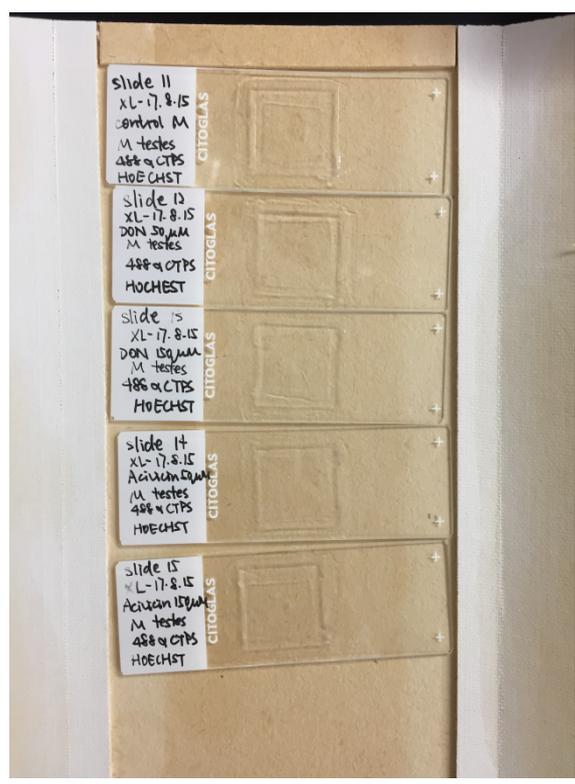
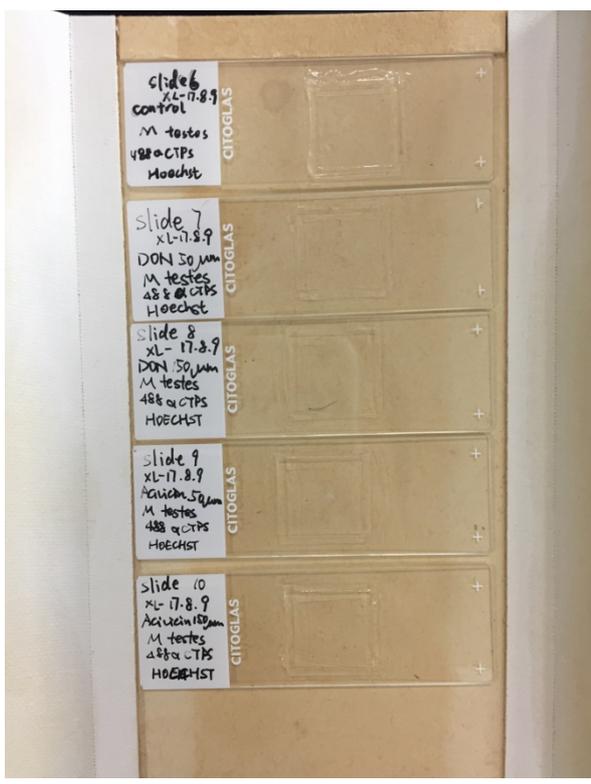


图 9&10 制片并做标记

### 2.2.8. 使用共聚焦显微镜观察

1. 开启显微镜。

2. 开启软件。
3. 开启激光。
4. 将载玻片安装在显微镜上。
5. 用显微镜找到样品。
6. 使用 60x 的镜头时，涂上油。
7. 在软件上调整设置。
8. 使用软件并拍摄。
9. 保存所拍摄的照片。
10. 关闭仪器。
11. 擦拭镜头。

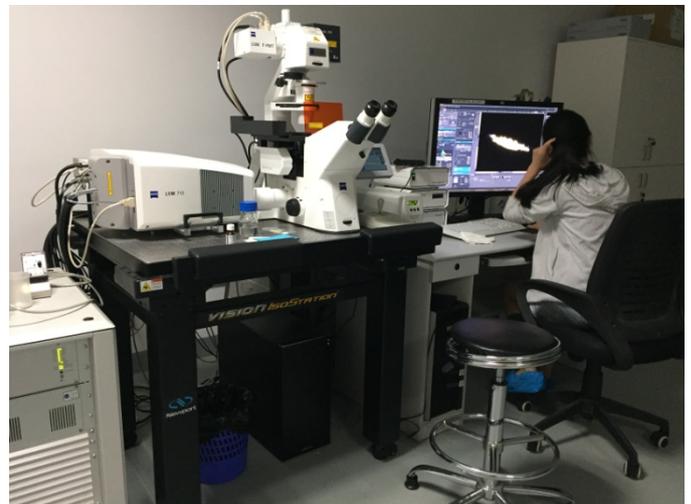
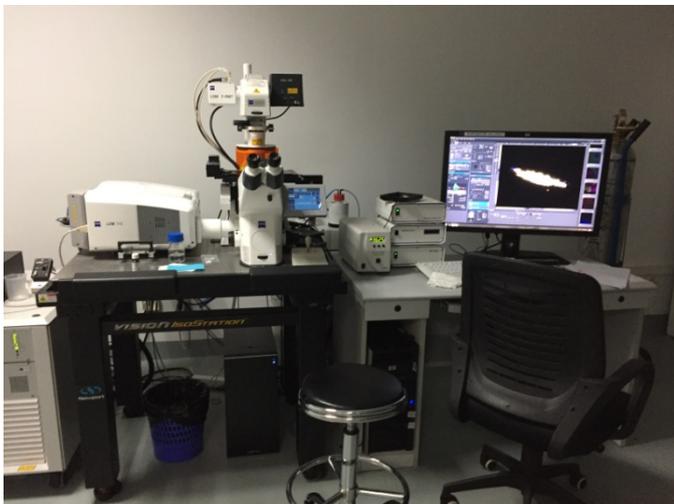


图 10&11 使用共聚焦显微镜观察样品

■ slide11 CONTROL Testes 40Xoil1.czi	2017年8月15日 上午10:08	2.2 MB
■ slide12 DON50uM Testes 40Xoil1.czi	2017年8月15日 上午10:22	2.2 MB
■ slide12 DON50uM Testes 40Xoil2.czi	2017年8月15日 上午10:25	2.2 MB
■ slide12 DON50uM Testes 40Xoil3.czi	2017年8月15日 上午10:35	51.5 MB
■ slide12 DON50uM Testes 40Xoil4 z-stack.czi	2017年8月15日 上午10:57	98.7 MB
■ slide13 DON150uM Testes 20X 1.czi	2017年8月15日 上午11:18	2.2 MB
■ slide14 acivicin50uM bristle 40Xoil1 z-stack.czi	2017年8月15日 上午11:43	41 MB
■ slide14 acivicin50uM Testes 40Xoil1 z-stack.czi	2017年8月15日 上午11:37	86.1 MB
■ slide14 acivicin50uM Testes 40Xoil2.czi	2017年8月15日 上午11:50	2.2 MB
■ slide14 acivicin50uM Testes 40Xoil3.czi	2017年8月15日 上午11:52	2.2 MB
■ slide14 acivicin50uM Testes 40Xoil4 z-stack.czi	2017年8月15日 下午12:10	128.1 MB
■ slide15 acivicin150uM Testes 40Xoil1.czi	2017年8月15日 下午12:15	2.2 MB
■ slide15 acivicin150uM Testes 40Xoil2.czi	2017年8月15日 下午12:18	2.2 MB
■ slide15 acivicin150uM Testes 40Xoil3.czi	2017年8月15日 下午12:20	2.2 MB
■ slide15 acivicin150uM Testes 40Xoil4.czi	2017年8月15日 下午12:23	2.2 MB
■ slide15 acivicin150uM Testes 40Xoil5.czi	2017年8月15日 下午12:26	2.2 MB
■ slide15 acivicin150uM Teste...oil6 z-stackzoomin 2.3x.czi	2017年8月15日 下午12:31	23.2 MB

图 12: 分类保存所拍摄照片

### 3. 实验结果

#### 3.1. 细胞蛇的形成与观察



图 13: W118 果蝇精巢中的细胞蛇

通过共聚焦显微镜, 我观察到 CTPS 在果蝇的细胞中, 会形成细胞蛇。在本实验中, 主要观察的是果蝇的精巢中细胞蛇。由共聚焦显微镜们可以清楚的看到, 在经过染色后, 果蝇的精巢中有纤维状的细胞蛇。由于孵育了抗体, 因此我可以清晰的在显微镜中看到细胞蛇。表明在果蝇的精巢细胞中, CTPS 会形成细胞蛇。

#### 3.2. DON 对果蝇精巢中细胞蛇的影响

在被含有  $5 \times 10^{-6}$  mol DON 的酵母糊喂养过 30 小时后, 果蝇精巢中的细胞蛇含量比控制组有所增加。具体数值见表 1。

在被含有  $1.5 \times 10^{-5}$  mol DON 的酵母糊喂养过 30 小时后, 果蝇精巢中的细胞蛇含量比控制组有所增加。

相比而言, 果蝇摄入 DON 的浓度越高, 细胞蛇的数量越多。

#### 3.3. 阿西维辛对果蝇精巢中细胞蛇的影响

在被含有  $5 \times 10^{-6}$  mol 阿西维辛的酵母糊喂养过 30 小时后, 果蝇精巢中的细胞蛇数量相比控制组无明显变化。具体数值见表 1。

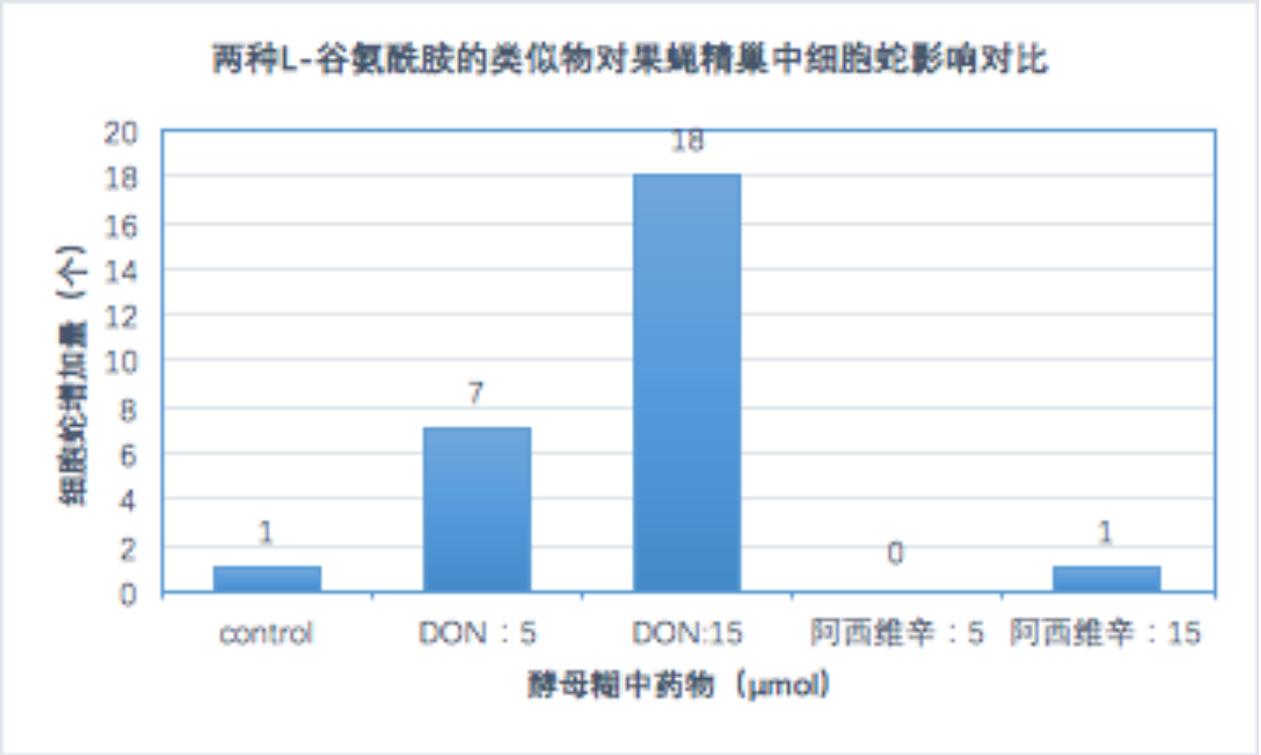
在被含有  $1.5 \times 10^{-5}$  mol 阿西维辛的酵母糊喂养过 30 小时后, 果蝇精巢中的细胞蛇数量相比控制组无明显变化。

3.4. 两种 L-谷氨酰胺的类似物对果蝇精巢中细胞蛇影响的对比

两种 L- 谷氨酰胺类似物中，DON 对于果蝇细胞蛇数量增长的影响，比阿西维辛更大。并且，果蝇摄入 DON 的浓度越高，所形成的细胞蛇数量便越多。若果蝇摄入阿西维辛，精巢中细胞蛇的数量变化不明显，说明阿西维辛并不会抑制 CTP 合成酶的活性以促进细胞蛇的生成以。

表 1 不同浓度 DON 和阿西维辛对细胞蛇数量的影响

	细胞蛇数量 (单位: 个)
control	1
	细胞蛇增加量 (单位: 个)
5×10 <sup>-6</sup> mol DON	7
1.5×10 <sup>-5</sup> mol DON	18
5×10 <sup>-6</sup> mol 阿西维辛	0
1.5×10 <sup>-5</sup> mol 阿西维辛	1



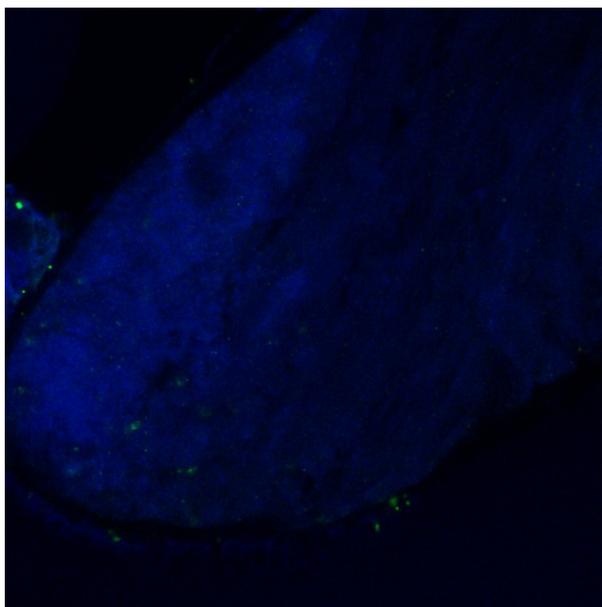
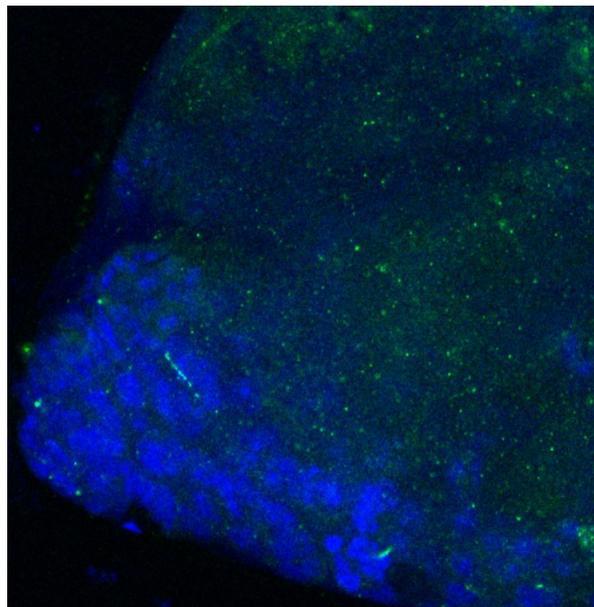


图 14: 未摄入药物时果蝇精巢图



15: 摄入阿西维辛 150 $\mu\text{mol} / \text{l}$  的果蝇

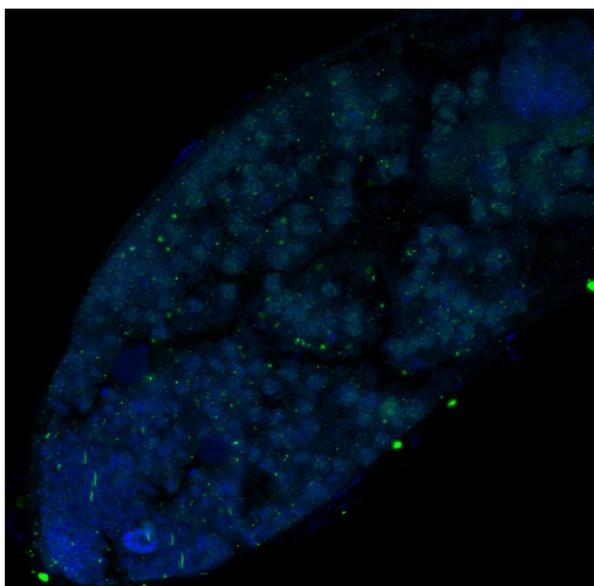
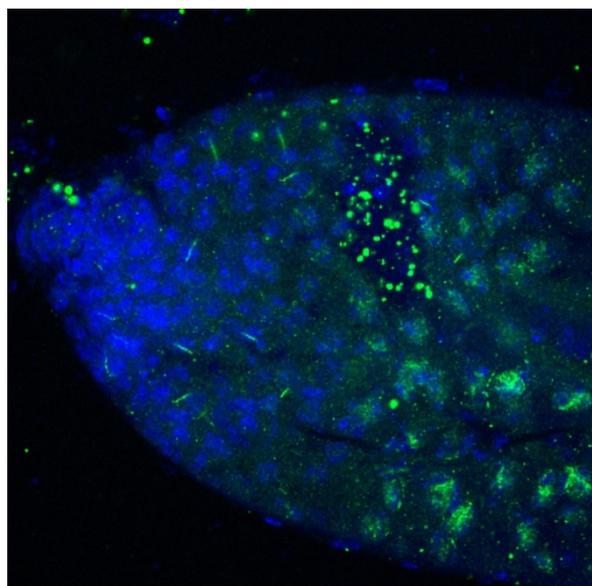


图 16: 摄入 DON50 $\mu\text{mol} / \text{l}$  的果蝇精巢图



17: 摄入 DON150 $\mu\text{mol} / \text{l}$  的果蝇

## 4. 讨论

在本课题的研究中, 为了更加清晰的观察细胞蛇的形成, 我一共做了 3 组实验, 每组实验都包括了 5 个变量。每个变量中都含有至少 10 个雄果蝇样本。我将这些果蝇的精巢解剖后, 通过共聚焦显微镜观察, 并计算每组变量所产生细胞蛇数量的平均值。其后, 再将 3 组的实验数据计算出平均值, 从而得出上述表格中的数据而进行比较。

在前人的研究中, 阿西维辛与 DON 可以抑制 CTPs 的活性, 因此我推测在果蝇摄取了这两种药物后, CTPs 的数量可以被抑制, 并且形成细胞蛇, 因为细胞蛇正是由失去了活性的 CTPs 形成的。肿瘤、癌细胞中活性的 CTPs 含量较多, 肿瘤和癌细胞中 CTPs 含量的减少可能与细胞蛇数量的增加有关。在目前的科学界研究中, 科学家致力于判断癌症与细胞蛇的关系。(Ke- Mian) 细胞蛇的数量也许在未来可以作为判断肿瘤或癌细胞是否被药物抑制复制速度的标志。

在试验后, 我发现 L-谷氨酰胺类似物阿西维辛对于果蝇精巢细胞内的细胞蛇的形成数量并没有明显的影响。可以判断在这一细胞内, 阿西维辛不能抑制 CTPs 的活性, 不会形成细胞蛇。由于在肿瘤、癌细胞中的活性 CTPs 的含量比正常细胞多, 本实验结果证明阿西维辛不能对其进行抑制。然而, 为了观察阿西维辛浓度对细胞蛇数量的影响, 本实验中阿西维辛的浓度只设置了 2 个比较水平, 可能出现了地板效应, 无法观察到阿西维辛的效果。对于通过摄入阿西维辛而抑制 CTPs 形成, 并以细胞蛇的数量为评价标准, 判断阿西维辛对抑制癌细胞复制的成效方面, 仍需更多的探究。

在进行了对比后, 我发现果蝇所摄入 DON 的浓度越高, 所形成的细胞蛇的数量越多。也就是说, 当谷氨酰胺类似物 DON 被摄入后, 细胞内的活性 CTPs 的数量可以受到抑制, 并且可以通过对细胞蛇的形成数量进行检测, 观察 DON 对 CTPs 的影响。因此, 细胞蛇数量可以作为标志物, 研究 DON 对于 CTPs 抑制作用。在现实生活中, 由于 DON 是一种治疗癌症的药物, 这一实验可以为检测 DON 对抑制癌细胞复制的药效, 提供一种生物方法。

## 5. 展望

通过实验了解到, DON 可以促进细胞蛇的形成, 然而阿西维辛却没有此效果。因此, 希望在日后了解:

1. DON 促进细胞蛇形成后, 细胞蛇保持其数量的时间。
2. 在不同的时间内, 摄入相同浓度 L-谷氨酰胺类似物对于细胞蛇形成的影响。
3. 其他的 L-谷氨酰胺类似物对于细胞蛇形成的影响。
4. 雌雄果蝇在摄入不同的 L-谷氨酰胺类似物后, 这些类似物对细胞蛇影响的相似性及独特性。
5. 不同生长阶段的果蝇摄入 L-谷氨酰胺类似物后, 在形成细胞蛇数量上的区别。

由于细胞蛇形成后, 构成它的 CTP 合成酶会失去活性, DON 又可以促进细胞蛇的形成。在肿瘤细胞中, CTP 合成酶的数量比常量多。因此, 希望在日后了解:

1. DON 是否可以抑制肿瘤中 CTP 合成酶的活性, 以控制肿瘤细胞的复制。
2. L-谷氨酰胺类似物是否可以作为肿瘤、癌症治疗时的一种药物。

## 6.致谢

在2017年中，我在上海科技大学教授、实验室人员、学生的帮助下，在国家蛋白质中心了解并完成了本实验。在此，尤其感谢陪伴、指导我进行实验的章元兵师兄。感谢指导老师刘骥龙教授与实验室的导师与前辈。

细胞蛇作为2010年发现的细胞器，其中的奥秘是无尽的。通过他们的帮助与指导，我渐渐对其有了了解。也正是在这一新奇的体验过程中感受到了世界的神奇，在见证了科学研究者兢兢业业、精细严谨的工作，并深表敬佩。

## 参考文献:

Liu, Ji Long. "Intracellular compartmentation of CTP synthase in Drosophila. " *Journal of Genetics & Genomics* 37.5(2010):281-296.

Aughey, G. N., et al. "Nucleotide synthesis is regulated by cytoophidium formation during neurodevelopment and adaptive metabolism. " *3.11(2014):1045-1056.*

Barry RM, Bitbol AF, Lorestani A, Charles EJ, Habrian CH, et al. 2014. Large-scale filament formation inhibits the activity of CTP synthetase. *eLife* 3:e03638

Shen QJ, Kassim H, Huang Y, Li H, Zhang J, et al. 2016. Filamentation of metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Genet. Genom.* 43:393–404.

LIEBERMAN, I. "Enzymatic Amination of Uridine Triphosphate to Cytidine Triphosphate." *The Journal of Biological Chemistry.*, U.S. National Library of Medicine, Oct. 1956, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13367044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13367044).

Levitzki, A., Koshland Jr., D.E., 1971. Cytidine triphosphate synthetase. Covalent intermediates and mechanisms of action. *Biochemistry* 10, 3365e3371.

Rosenfeld, H., and J. Roberts. "Enhancement of anti-tumor activity of glutamine antagonists DON and acivicin in cell culture by glutaminase-asparaginase." *41.4(1981):1324-1328.*

Huber, Klaus R., H. Rosenfeld, and J. Roberts. "Uptake of glutamine antimetabolites 6- diazo-5- oxo- L- norleucine (DON) and acivicin in sensitive and resistant tumor cell lines." *International Journal of Cancer* 41.5(1988):752-5.

Lyons, S D, M. E. Sant, and R. I. Christopherson. "Cytotoxic mechanisms of glutamine antagonists in mouse L1210 leukemia. " *Journal of Biological Chemistry* 265.19(1990):11377.

Ze Peng 彭泽. "Acivicin 与潘生丁合并用药对肝癌细胞 3924 A 的影响." *国际药学研究杂志* 1(1984).

Zamore, Phillip D., and S. Ma. "Isolation of *Drosophila melanogaster* Testes." *Journal of Visualized Experiments Jove* 51.51(2011):e2641-e2641.

Earhart, Robert H. Acivicin: A new antimetabolite. *Concepts, Clinical Developments, and Therapeutic Advances in Cancer Chemotherapy.* Springer US, 19

## 简历

团队成员:

王馨聆简历:

2012. 09~2016.06: 上海市世界外国语中学(初中部)

2016.09~现在 : 上海市世界外国语中学(高中部)

指导老师:

傅鸣简历:

上海交通大学 ( 本科、硕士 )

上海市世界外国语中学(高中部)

刘骥龙简历:

刘冀珑, 1971 年生于江西九江。

细胞蛇 (Cytoophidia) 的发现者。

牛津大学 MRC Programme Leader。

2007 年 8 月, 成为英国牛津大学医学部的生理、解剖与遗传系, 博士生导师。  
毕业于北京林业大学 (本科), 中国农业大学 (硕), 中国科学院动物研究所 (博)。

博士后时与康涅狄格大学的胚胎学家杨向中教授和卡内基研究所细胞生物学家 Joseph Gall 教授合作。

2016 年 6 月入职上海科技大学任教授。