

华枝睾吸虫与次睾属两种吸虫囊蚴的 分离及脱囊观察*

陈 锡 慰

(南京医学院寄生虫学教研室)

在江苏省的华枝睾吸虫病流行区,经常发现鱼体寄生有后睾科吸虫的囊蚴,例如:在麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)与棒花鱼(*Pseudogobio rivularis*)中的华枝睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)、东方次睾吸虫(*Metorchis orientalis*)及台湾次睾吸虫(*Metorchis taiwanensis*)的囊蚴。为分离这些囊蚴,一般需人工消化鱼肉,但各地应用的消化方法不尽相同,对其分离囊蚴的效果是否有别,不甚了解。为此,本文就其中较为常用的方法作了比较,并观察此三种囊蚴的脱囊过程,现报告如下。

一、材料与方 法

(一) 鱼体囊蚴的分离

1. 鱼的采集及处理 麦穗鱼与棒花鱼采自江苏邳县及宿迁县华枝睾吸虫病流行区。将鱼绞碎混匀后分成若干份,每份 40 克。

2. 人工消化液的配制及鱼肉消化方法 配制每升生理盐水与普通自来水分别含胃蛋白酶 7 克、浓盐酸 1 毫升的消化液。另配制每升生理盐水含胃蛋白酶 7 克,但分别含浓盐酸 1 毫升、5 毫升、1 当量浓度盐酸 82 毫升(相当于浓盐酸 6—7 毫升)以及缺酸的四种消化液。每份鱼肉分别放入烧杯,按比例加入消化液(每升消化鱼肉 40 克)后,置 37℃ 温箱中,不时搅拌,使鱼肉充分消化。按不同时间取出烧杯,滤去残渣,水洗沉淀后留取沉渣。部分鱼肉不经消化

* 本文承赵慰先教授,沈一平、杨炳贵副教授审阅,林珍主管技师指导摄影,谨此一并致谢。

除去粗渣,水洗沉淀后检取囊蚴。

3. 囊蚴计数及活力判断 计数华枝睾吸虫囊蚴并观察其活力。将上述消化的全部沉渣分别置刻度离心管内,澄清后每管保留沉渣与上清液共5毫升。以口径为0.05毫升/滴的吸管吹匀沉渣及囊蚴后吸液,在一张载片上分别滴2滴,每管吸三次共6滴。镜下计数每滴内的囊蚴,取平均数乘100,即为全部沉渣(5ml)的囊蚴总数。在低倍镜下(50×)持续观察半分钟,囊内后尾蚴活动并可在胰液脱囊的为存活的虫体。

(二) 吸虫囊蚴的人工脱囊

1. 三种吸虫囊蚴的形态特征 徐锡藩等认为麦穗鱼或棒花鱼体内的华枝睾吸虫、东方次睾吸虫与台湾次睾吸虫的囊蚴形态相似,主要依据囊蚴的大小与囊壁的厚度区别。华枝睾吸虫囊蚴壁厚3微米,东方次睾吸虫囊壁厚9—14微米,而台湾次睾吸虫囊壁厚40—64微米。^[3]

2. 人工胰液的配制及脱囊方法 配制每100毫升生理盐水含无水碳酸钠0.2克及分别含胰蛋白酶0.05克、0.5克、5克的三种胰液。0.5%胰液用于观察不同温度对脱囊的影响。均采用经消化的囊蚴,对照液为生理盐水。囊蚴置入玻片凹孔内,加入胰液,在解剖镜下于不同时间计数脱囊的后尾蚴。

3. 后尾蚴的生存力 脱囊的后尾蚴置入生理盐水,在37℃、4℃及不恒定室温下观察其生活时间。活的后尾蚴虫体能够伸缩蠕动;死亡后则活动停止,内部结构渐趋消失,虫体卷曲或膨大呈絮状及解体。

4. 胰液作用下三种囊蚴囊壁的变化 将胰液加至经消化的囊蚴,镜下观察囊壁的改变并摄影。未经消化的囊蚴作为比较。

二、结 果

(一) 不同消化方法分离囊蚴的情况 生理盐水的消化液对鱼肉消化3、6及16小时获取的囊蚴数基本相似。自来水配制消化液在延

长鱼肉消化时间后检取的囊蚴增多,消化16小时,每0.05毫升沉渣平均含9个囊蚴,与消化3小时的平均4.3个囊蚴相比有显著差异($F=3.68, P<0.05$)。消化3小时,生理盐水消化液分离的囊蚴(9.2个/0.05毫升)明显多于自来水配制液的囊蚴(4.3个/0.05毫升)($t=2.95, P<0.05$)、但在16小时,二者统计学的差异不明显。囊蚴活力及脱囊能力未见显著差别(表1)。

(二) 酸度不同的消化液分离囊蚴的情况 以每升生理盐水含浓盐酸1毫升的消化液获取囊蚴最多(9.5个/0.05毫升),含1当量浓度盐酸82毫升的次之(7.7个/0.05毫升),缺酸液分离囊蚴最少(3.5个/0.05毫升),三者之间的差异非常显著($F=9.02, P<0.01$) (表2)。缺酸液分离囊蚴的囊壁附着絮状物,沉渣较多。后尾蚴的脱囊率似乎以缺酸组稍高、脱囊亦较快。

(三) 不同浓度胰液对两种囊蚴脱囊的影响 在37℃,华枝睾吸虫囊蚴于5%胰液内脱囊较快,加入胰液后5分钟,脱囊率达96.7%(29/30);而在0.05%胰液脱囊率为30.0%(9/30)。东方次睾囊蚴在浓度高的胰液也有少数脱囊(表3)。

(四) 不同温度对两种囊蚴脱囊的影响 在37℃或18—21℃观察6小时,华枝睾吸虫的脱囊数相似(28/30只);东方次睾脱囊很少(1/30)。在37℃,华枝睾囊蚴置生理盐水1小时,有少数脱囊(2/30);东方次睾吸虫则未见脱囊。

(五) 不同温度对华枝睾吸虫后尾蚴生活力的影响 在37℃及4℃,脱囊的后尾蚴在生理盐水内可生活24—36小时,4℃24小时的存活率为68.0%,37℃的存活率为36.4%。但至36小时,4℃生理盐水内后尾蚴的存活率仅4%,37℃的则为0。置21℃室温12小时,后经夜间温度变化(温差约10℃)的后尾蚴全部死亡。

(六) 三种囊蚴脱囊时囊壁的变化 华枝睾吸虫囊蚴经胰液作用1—2分钟后,外层囊壁

表 1 生理盐水与自来水配制的消化液从鱼肉分离华枝睾吸虫囊蚴的情况

消化时间 (小时)	消化液 种类	囊 蚴		后尾物活力			脱 囊*		
		平均数 (只)	总 数 (只)	检查数 (只)	存活数 (只)	率 (%)	检查数 (只)	脱 囊 (只)	率 (%)
3	生理盐水	9.2	917	55	55	100	30	30	100
3	自 来 水	4.3	433	26	26	100	28	28	100
6	生理盐水	9.2	917	55	55	100	30	30	100
6	自 来 水	6.5	650	39	39	100	30	30	100
16	生理盐水	9.5	950	57	57	100	30	30	100
16	自 来 水	9.0	900	54	54	100	30	30	100

* 脱囊用 0.5% 胰液, 在 18—21℃ 室温下观察 1 小时。

表 2 酸度不同的消化液从鱼肉分离华枝睾吸虫囊蚴的情况

消 化 液		囊 蚴		脱 囊*			不同时间内的脱囊数(只)						
种 类	pH 值	平均数	总数 (只)	检查数	脱囊数 (只)	率 (%)	1	3	5	10	20	30	60 (分钟)
含浓盐酸 1ml	3	9.5	950	30	29	96.7	0	1	7	15	23	29	29
含浓盐酸 5ml	2	6.5	650	30	28	93.3	0	1	6	12	22	27	28
含 1N 盐酸 82ml	2	7.7	767	30	29	96.7	0	0	2	4	13	28	29
不含酸	7	3.5	350	30	30	100.0	1	7	9	15	20	27	30

* 经 37℃ 消化 16 小时的囊蚴, 脱囊用 0.5% 胰液。

表 3 不同浓度胰液对两种吸虫囊蚴脱囊的影响(在 37℃ 进行)

胰液种类	华枝睾吸虫囊蚴脱囊数(只)									东方次睾吸虫囊蚴脱囊数(只)								
	检查数 (只)	1	3	5	10	20	30	60	120 (分钟)	检查数 (只)	1	3	5	10	20	30	60	120 (分钟)
0.05%	30	0	2	9	10	15	16	26	28	30	0	0	0	0	0	0	0	1
5%	30	6	23	29	29	29	30	30	30	30	0	0	0	2	10	12	14	15

表 4 东方次睾与台湾次睾吸虫囊蚴脱囊时囊壁的变化(20℃ 进行)

囊蚴种类	观察数 (只)	胰 液 种 类	不同时间内(分钟)囊蚴外壁的改变及脱囊数(只)				
			5	10	15	30	60
东方次睾	5	0.05%	不变	变薄(3)	脱囊(3)	脱囊(3)	脱囊(3)
东方次睾	5	5%	不变	变薄(3)	脱囊(3)变薄(1)	脱囊(4)	脱囊(4)变薄(1)
东方次睾*	5	0.05%	不变	不变	不变	不变	不变
台湾次睾	5	0.05%	皱缩、破裂(2)	皱缩、破裂(3)	脱落(5)	脱落(5)	脱落(5)
台湾次睾	5	5%	皱缩、破裂(4)	脱落(4)	脱落(4)	脱落(5)	脱囊(1)脱落(4)

* 未经消化分离的囊蚴。其余均为消化的囊蚴。

很快变薄及消失, 内壁由原来的椭圆形而随着虫体的运动变长或缩短, 随后幼虫破囊而出。台湾次睾吸虫囊蚴外壁颇厚, 变化易见, 接触胰液后, 外壁局部很快出现松散状隆凸或边缘皱缩, 以至外壁整块剥脱及溶解, 内壁形状也随虫

体伸缩而变形, 但脱囊较慢并需较高浓度胰液作用。东方次睾吸虫囊蚴囊壁的变化与上述二种吸虫相似, 变化速度似乎介于二者之间。未经胃蛋白酶消化的囊蚴与胰液接触后, 囊壁未见改变, 亦不脱囊(表 4)(图 1—9)。

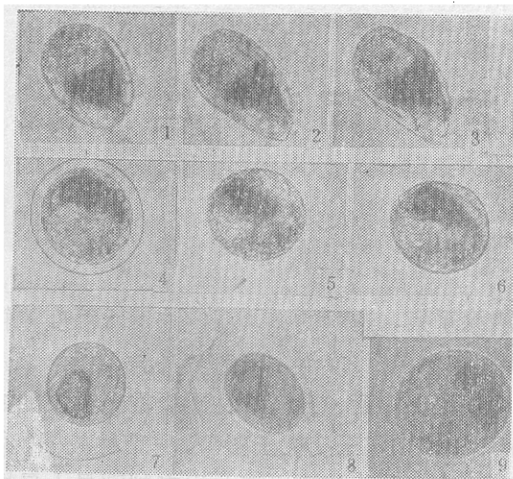


图1 华枝睾吸虫囊蚴(未加胰液); 图2 5%胰液加入后2分钟,囊壁变薄,椭圆形不规则; 图3 5%胰液加入后3分钟,囊蚴外壁已溶解,内壁尚存,后尾蚴即将破囊; 图4 东方次睾吸虫囊蚴(未加胰液); 图5 5%胰液加入后5分钟,囊蚴外壁变薄; 图6 5%胰液加入后10分钟,囊蚴外壁完全消失; 图7 台湾次睾吸虫囊蚴(未加胰液); 图8 5%胰液加入后10分钟,囊蚴外壁局部(右下方)出现松散状隆起,左上外壁开始溶解; 图9 5%胰液加入后30分钟,囊蚴外壁完全溶解消失。(图7、8为130×,其余180×)

三、讨论与小结

(一) 胃蛋白酶消化液分离吸虫囊蚴沿用已久,本文比较了消化液的配制及消化时间等影响因素。观察到酸度不同的消化液,以每升溶液含1毫升浓盐酸较为合适,鱼肉消化3小时,获取囊蚴较多;普通自来水配制消化液也可获得较好效果,但费时颇久。实验结果提示:胃蛋白酶在生理盐水中水解蛋白质的速度较在缺盐液要快。莱特勒(Laidler 1958)认为胃蛋白酶以蛋白质为底物,其最适pH值通常为1.5—2.5之间。本实验含1毫升浓盐酸消化液

的pH为3,与上述pH值相近。缺酸液分离囊蚴效果颇低,可能是胃蛋白酶未发挥其作用。

(二) 关于三种吸虫囊蚴脱囊的机制:陈心陶认为华枝睾吸虫囊蚴的外壁不受胃液或胰蛋白酶单独作用的影响,但经胃液及胰蛋白酶的先后处理,外壁就被消化,其后,幼虫可以冲破内壁逸出。本实验证实三种吸虫囊蚴的外壁均需经胃蛋白酶及胰蛋白酶的先后作用才被消化,经胃蛋白酶作用的囊蚴外壁仍可维持原有形态,但加入胰液后,外壁开始溶解消失,其后,囊蚴内壁尚存,但不能保持原有的椭圆形。说明三种吸虫囊蚴的外壁对维持囊蚴的外形具很大作用。胃蛋白酶或胰蛋白酶对囊壁的作用机制可能较为复杂。莱特勒认为前者只作用于具有一般结构的某些肽键,而未发现能作用于肽键以外的其它键。胰蛋白酶除作用于肽键外,也能水解酰胺键和酯键,并对这些键的作用比对肽键的作用要快。由此推测该三种囊蚴的外壁可能均含有脂质,但这二种酶作用于囊壁的何种成分,尚不清楚。

此外,经胃蛋白酶消化的囊蚴接触胰液后,囊内幼虫活动加剧,提示胰液可能对后尾蚴产生刺激。从本实验来看,消化液中的胃蛋白酶及胰蛋白酶对三种吸虫的脱囊具有促进作用。

参 考 文 献

- 陈心陶 1965 医学寄生虫学。人民卫生出版社。
 Laidler KJ 1958 酶作用的化学动力学(朱德煦译)。科学出版社。
 Hsui HF et al 1938 Studies on helminths of fowls 1. on the second intermediate hosts of *Metorchis orientalis* and *M. taiwanensis* liver flukes of ducks. Chin. M. J Suppl 2: 433.