

冬季水淹后洲滩钉螺组织 化学与超微结构的变化

梁幼生¹⁾ 熊希凯²⁾ 宋鸿素³⁾ 肖荣炜¹⁾ 叶嘉馥¹⁾ 张家楷³⁾ 梅方雄²⁾

(1.江苏省血吸虫病防治研究所 无锡 214064 2.同济医科大学基础医学院

3.江苏省镇江市血吸虫病防治所)

摘要 实验表明,冬季持续水淹60天以上,湖沼地区洲滩钉螺死亡率增高、繁殖力下降。为探索其机制,运用组织化学与透射电镜技术观察了受淹钉螺软体组织。结果显示:水淹30、60天螺体内糖原含量减少;ALP、 Mg^{++} -ATPase、G-6-Pase活性下降;SDH、LDH、ACP活性增高;CHE活性无明显变化。水淹60天螺头足部软体与肝脏组织细胞肿胀并伴有线体肿胀、嵴断裂或空泡状变,粗面内质网脱颗粒,高尔基体囊状化、胞核增大或固缩,染色质凝集等。

关键词 钉螺,组织化学,酶,超微结构,冬季水淹

我们的实验观察证实,冬季持续水淹60天以上,湖沼地区钉螺成螺死亡率增高、繁殖力下降。这一结果与国内江湖洲滩钉螺现场分布相符合,即自然状态下冬季被水淹没的洲滩无或少有钉螺孳生^[1]。为进一步探索其影响机制,本文试用组织化学和透射电镜的方法,对受淹钉螺软体作了观察。

1 材料与方法

实验钉螺采自江苏南京燕子矶江滩,系湖北钉螺指名亚种。以群体逸蚴法剔除阳性螺,挑选活力强、螺龄相仿(7—8旋)成螺于1月初起分别饲于2玻璃缸内。水淹实验组缸内注以去氯自来水至0.5m深,在距缸底3cm处绷一尼龙窗纱盖,避免钉螺上爬。不淹对照缸内保持一定湿度。两组螺均置于4℃培养箱内。

1.1 组织化学观察 实验开始30、60天后,分别从2缸内随机提取活螺标本,去壳后挑选无机械损伤软体,按常规处理后作石蜡或冷冻切片,进行下列组织化学方法观察:葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)、碱性磷酸酶(ALP)按Culling法^[2]改良;乳酸脱氢酶(LDH)、糖原

(PAS反应)按Chayen方法^[3]改良;琥珀酸脱氢酶(SDH)按Nachlas方法改良;三磷酸腺苷酶(Mg^{++} -ATPase)按Wachstein-Meisen方法^[4]改良;胆碱酯酶(CHE)按Karnovsk-Roots方法^[5]改良;酸性磷酸酶(ACP)按Bancroft方法^[6]改良。根据上述组化反应着色深浅,在光镜下进行定性观察比较。各组随机抽取一定数量染色切片,用UNIVAR 1280型显微分光光度计进行扫描定量测定5种组化指标(PAS反应, LDH, SDH, ALP, G-6-Pase)的光密度(OD)值。被测螺每一指标测5个视野,共测20只螺,取其OD值平均数作定量比较。测定所选用波长分别: PAS反应480nm、LDH550nm、ALP500nm、G-6-Pase415nm、SDH580nm。

1.2 透射电镜观察 水淹60天及对照组活螺去除螺壳,用锐刀片截取头足部软体及肝脏,修成1mm³大小后迅速放入4℃预冷2.5%戊二醛中固定2小时。按透射电镜标本制作常规制成电镜标本,用Philips EM-400型透射电镜观察。

2 结果

2.1 组织化学观察

2.1.1 定性 (1) PAS 反应: 正常钉螺鳃管、肾囊与胃壁(图 1)、副腺、卵巢内成熟卵细胞的反应均很强,糖原含量丰富;肝脏腺管、头足部软体反应中等。水淹 30 天螺各器官反应呈弥漫性减弱;水淹 60 天后糖原减少更加明显,部分螺肾囊与胃壁、肝脏腺管几乎呈阴性反应(图 2)。(2) G-6-Pase: 正常螺仅局限于卵巢此酶活性很高(图 3);水淹 30、60 天螺酶活性减弱,染色反应减弱(图 4)。(3) Mg-ATPase: 正常螺肝脏腺管壁、睾丸、胃壁均有此酶存在(图 5)。水淹 30、60 天螺活性减弱,着色变浅(图 6)。(4) LDH: 正常螺口腔团、胃壁、肝脏腺管、中枢神经节、鳃管、睾丸、卵巢着色深,酶活性较高(图 7)。水淹 30 天各部着色更深,并呈弥散性分布;淹 60 天后着色颗粒粗大,尤以肝腺管最明显,多已聚集呈团块状充满腺管腔(图 8)。(5) SDH: 正常螺中枢神经节、生殖系器官 SDH 活性最强;头足部软体皮下实质及口腔团的酶分布松散,呈点状(图 9)。水淹 30、60 天后活性增强,主要以头足部和口腔团最明显(图 10)。(6) ALP: 正常螺肝脏腺管壁、胃肠壁、头足部表膜活性均较强。水淹 30、60 天后各部活性减弱,着色变浅,肝脏减弱最为明显。(7) ACP: 正常螺肝腺管壁、胃壁存在此酶,但活性较低。水淹 30、60 天螺该酶活性变高。(8) CHE: 正常螺在中枢神经节、肝、鳃等部活性

强;水淹 30、60 天螺酶活性未见明显变化。

2.1.2 定量 以空白片校正零点,OD 值大小与酶活性成正比。结果见表 1。水淹 30、60 天螺肝脏 PAS 反应与 ALP、卵巢部 G-6-Pase 的 OD 值与对照组螺相比,减少非常明显($p < 0.01$);水淹组螺头足部 SDH、肝脏 LDH 的 OD 值与对照螺比较,增加非常明显($p < 0.01$)。

显微分光光度计所测定量结果与光镜观察的定性结果相一致。

2.2 超微结构观察

正常钉螺头足部软体组织分上皮层、上皮下层和肌层。上皮层由纤毛细胞、无纤毛细胞和腺细胞构成一单层结构;上皮下层为一薄层结缔组织;其下为肌层。上皮层细胞内含内质网、线粒体数量较多;肌细胞的纤维胞浆和线粒体丰富(图 11)。水淹 60 天,可见细胞核肿大,染色质凝聚;线粒体肿胀、嵴断裂,呈空泡样变(图 12)。

正常钉螺肝腺管颗粒细胞和棒状细胞内含丰富的高尔基体、粗面内质网,线粒体等(图 13);分泌功能旺盛、胞浆内含各种不同电子密度的分泌泡(图 15);细胞核内染色质分布均匀(图 15)。水淹 60 天螺细胞核肿大或固缩,染色质凝集(图 16);分泌泡枯萎功能丧失(图 16);高尔基复合体亦肿胀;粗面内质网表面颗粒减少或消失;线粒体数量减少,基质颗粒减少或消失,内外膜及嵴完整性受损,呈自溶状态(图 14)。胞浆内出现溶酶体和自噬体。

表 1 钉螺水淹各组几种器官组化反应定量测定观察

组化指标	测定器官	水淹各组 OD 值 ($\bar{x} \pm SD$)			F 值*
		0 天(对照)	30 天	60 天	
PAS 反应	肝 脏	11.545 $\pm$ 1.524	2.946 $\pm$ 0.202	2.005 $\pm$ 0.072	524.749
G-6-Pase	卵 巢	34.175 $\pm$ 3.394	9.496 $\pm$ 1.099	4.539 $\pm$ 0.148	924.154
SDH	头足部	5.662 $\pm$ 0.664	10.673 $\pm$ 1.363	13.280 $\pm$ 1.474	150.924
ALP	肝 脏	25.242 $\pm$ 3.121	11.246 $\pm$ 1.521	7.877 $\pm$ 0.592	307.917
LDH	肝 脏	10.317 $\pm$ 2.143	14.148 $\pm$ 1.874	16.999 $\pm$ 1.942	42.504

* 同一组化指标三组 OD 值经 F 检验均 $p < 0.01$ 。

同一组化指标不同组间 OD 值经两两比较 q 检验均为 $p < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 碱性磷酸酶、糖原、三磷酸腺苷酶的变化

ALP 系微粒体酶,与物质吸收运输有关;糖原为动物糖代谢和能量储备源泉。 Mg^{++} -ATPase 定位于线粒体内膜与嵴,是细胞分解 ATP 获取能量的关键酶。糖原与上述酶保持一定活性(含量)对维持体内物质吸收、利用及贮备很重要。水淹 30、60 天后糖原减少或消失,两种酶活性减弱或丧失,提示冬季水淹对钉螺营养成分获取、能源储备、能量产生和利用等生理功能均有明显影响。体内因代谢障碍而缺乏能量、“能源枯竭”与受淹螺死亡增加、繁殖力下降有关。电镜所见,受淹螺体内线粒体完整性受到破坏或变性,高尔基体、内质网肿胀、分泌功能减弱等与酶的变化互为因果。粗面内质网脱颗粒是体内处于饥饿状态的佐证^[7]。另外,作者在现场实验中,见水淹 60 天螺捞离水体时,约有 1/5 呈开扉状,足肌失去吸附能力,软体外翻并肿胀,用针刺后软体缩入动作十分迟缓;死亡螺软体亦呈外伸状态,似与缺能有关。

3.2 葡萄糖-6-磷酸酶变化 该酶定位于滑面内质网,是参与糖代谢和蛋白质合成的重要酶。雌螺生殖腺该酶活性高,提示该参与钉螺生殖细胞发育、成熟及螺卵形成过程。水淹后 G-6-Pase 活性下降势必影响螺的生殖力。现场研究查见,经水淹后钉螺产卵量下降、所产卵孵化率下降。综合这两方面,可以认为该酶活性下降影响钉螺繁殖力。

3.3 酸性磷酸酶的变化 ACP 为溶酶体内消化酶。当溶酶体膜通透性变化或破裂时,该酶

才能释出、活性增高,导致细胞与组织自溶,被称之为“自杀酶”。正常钉螺 ACP 活性较低,水淹 30、60 天后螺的酶活性提高,并在电镜下见细胞内已出现溶酶体和自噬体。提示水淹作为不利因子,可使得溶酶体膜受损或稳定性破坏;ACP 释出所引起自溶作用,可加重螺体组织损害。

3.4 脱氢酶的变化 SDH, LDH 均定位于线粒体嵴上,在组织化学中通常用这二种酶来反映糖的有氧氧化和无氧酵解状况。水淹后两种酶活性均异常增高,这是螺对不适环境变化而产生的“应激”反应?抑或因体内缺能而启动某种代偿机制,尚不能定论。但这种糖代谢异常加快使得体内贮存消耗加速,最终只会导致“能源枯竭”加剧,促进螺的死亡。

致谢 本项工作得到了江苏省血吸虫病防治研究所肖荣炜、叶嘉馥、吴中兴等教授的具体指导;同济医科大学解剖学教研室梅方雄老师参加部分工作。谨致谢忱!

参考文献

- 1 毛守白主编.血吸虫生物学与血吸虫病的防治 人民卫生出版社,1990,300—303.
- 2 Culling CFA. Handbook of histopathological and histochemical techniques. Butterworths, 1974, 320.
- 3 Chayen J. Practical histochemistry. John Wiley & Sons, 1973, 70—73.
- 4 Wachstein MJ, Meisel Y. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 1957, 27:13.
- 5 Karnovsky MJ. Roots. A “Direct-Coloring” thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem Cytochem.* 1964, 12:219.
- 6 Bancroft JD. Histochemical Techniques. London and Boston, 1975, 234—264.
- 7 郑国镇.细胞生物学.高等教育出版社,1980,167.

图版说明

图1 正常钉螺肾囊(K)、胃壁糖原丰富(PAS反应较强)×90; 图2 水淹60天螺肾囊、胃壁糖原消失(PAS反应阴性)×90; 图3 正常钉螺卵巢部 G-6-Pase 活性强×180; 图4 水淹60天螺卵巢部 G-6-Pase 活性降低×180; 图5 正常螺肝腺管壁 Mg^{++} -ATPase 活性中等(箭头示)×90; 图6 水淹60天螺肝腺管壁 Mg^{++} -ATPase 活性降低或消失×90; 图7 正常钉螺肝腺管 LDH 活性较强×180; 图8 水淹60天螺肝腺管 LDH活性呈弥散性增高×180; 图9 正常钉螺口腔壁SDH活性中等×180; 图10 水淹30天螺口腔壁 SDH活性增强,酶颗粒粗大×180; 图11 正常钉螺头足部软体肌纤维内线粒体嵴数多,其内含基质电子密度高×5805; 图12 水淹60天螺头足部肌纤维线粒体肿胀、嵴断裂×9900; 图13 正常钉螺肝腺管颗粒细胞内线粒体(M)、粗面内质网丰富×16200; 图14 水淹60天螺肝腺管颗粒细胞线粒体溶解(M),粗面内质网脱颗粒(箭头示),并有自噬体存在×16200; 图15 正常钉螺肝腺管细胞核膜清晰,染色质分布均匀(N),分泌颗粒丰富(V)×5805; 图16 水淹60天螺肝腺管细胞核固缩,染色质凝集,膜模糊(N),分泌颗粒枯萎,出现自噬体(箭头示)×5805

HISTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF *ONCOMELANIA* SNAILS AFTER WINTER FLOODING IN MARSHLAND OF THE YANGTZE RIVER

LIANG Yousheng¹⁾ XIONG Xikai²⁾ SONG Hongtao³⁾ XIAO Rongwei¹⁾

YE Jiafu¹⁾ ZHANG Jiakai³⁾ MEI Fangxiong²⁾

(Jiangsu Institute of Schistosomiasis Control Wuxi 214064¹⁾; Tongji Medical University²⁾;
Zhengjiang Institute of Schistosomiasis Control³⁾)

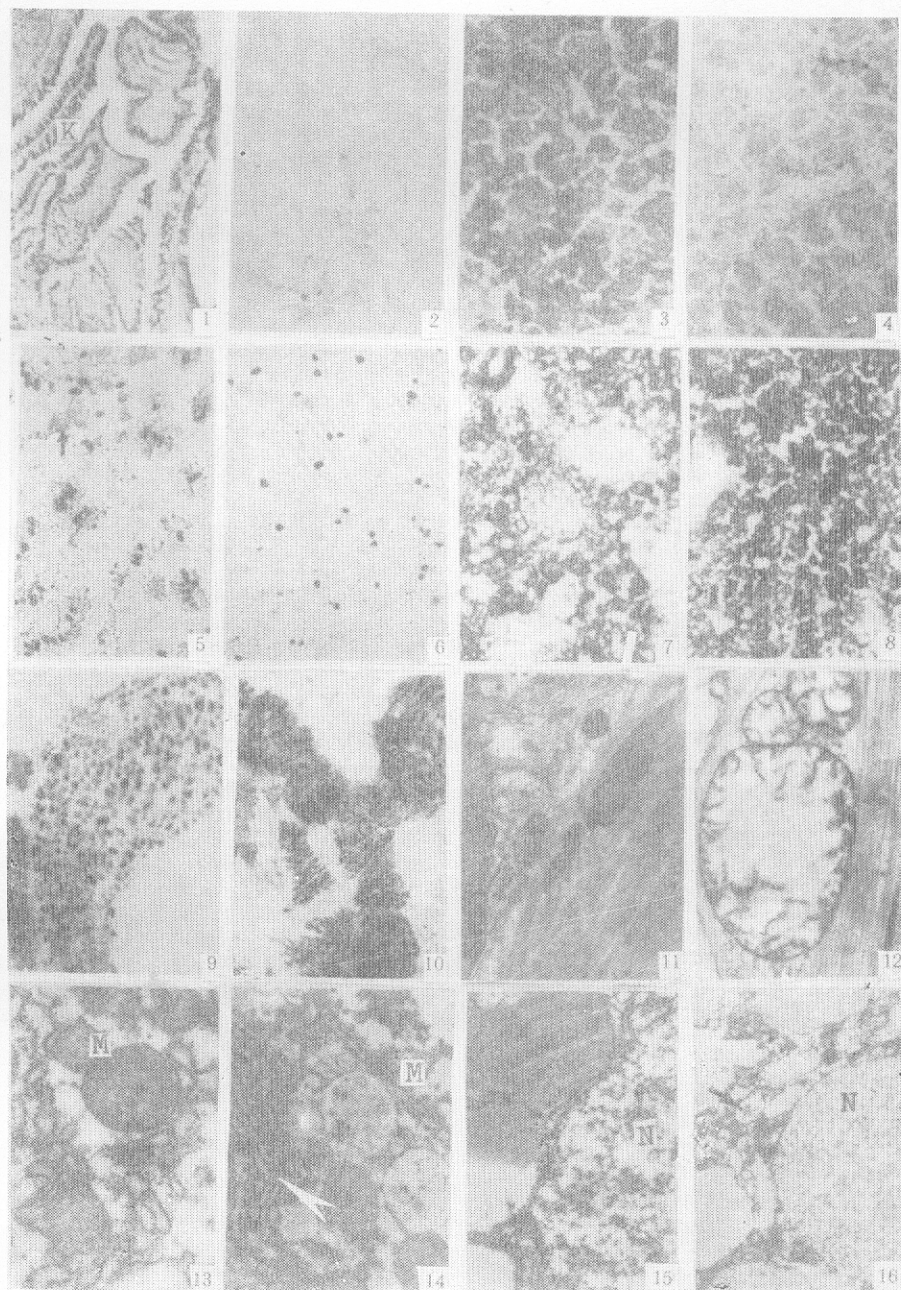
ABSTRACT Our field experiments have proven that the *oncomelania snails* have higher death rates and lower reproductive rates when they were submerged in water for 60—150 days during winter. In order to further evaluate the mechanism, the soft tissues of the snails submerged for 30—60 days were observed for histochemistry and ultrastructure. The histochemical observations showed that the glycogen content and the activities of ALP, Mg^{++} -ATPase and G-6-Pase were inhibited but those of SDH, LDH, ACP were elevated. These changes of the snails submerged for 60 days were more evidence than those submerged for 30 days. The ultrastructure changes were seen in cuticular cells and liver tissue of the snail submerged for 60 days. These cells and tissues were swollen with nuclei-enlargement, chromosome agglutination and disorderly arrangement of reticulum of endoplasm etc.

Key words *Oncomelania snail*, Histochemistry, Enzyme, Ultrastructure, Winter flooding

《冬季水淹后洲滩钉螺组织化学与超微结构的变化》

一文之附图

(正文见第 6 页)



(图版说明见第 8 页)