

文章编号:1002-2694(2004)06-0515-04

## 春季温度变化对钉螺酶活性的影响\*

杨 坤<sup>1</sup>,周晓农<sup>2</sup>,梁幼生<sup>1</sup>,洪青标<sup>1</sup>,张 燕<sup>3</sup>,张燕萍<sup>1</sup>,熊希凯<sup>3</sup>

**摘 要:**目的 了解春季气候变暖影响钉螺活动性及繁殖能力的作用机理。方法 春季采集的钉螺放入不同温度的恒温培养箱,模拟外界气候变暖。用酶组织化学技术观察不同温度下钉螺中枢神经节、雌雄生殖腺中的一氧化氮合酶(NOS)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)及乙酰胆碱酯酶(AchE)的变化。结果 各酶的平均灰度值随着温度升高呈下降趋势。在神经节中 25℃组 NOS、SDH 及 AchE 的平均灰度值明显低于对照组( $P<0.01$ );25℃组卵巢及睾丸组织 NOS、SDH 及 LDH 的平均灰度值显著低于对照组;各实验组神经节 LDH 的平均灰度值与对照组相比无显著性差异( $P>0.01$ )。结论 春季温度变化对钉螺的 NOS、SDH、LDH 及 AchE 活性均产生明显影响,温度升高使这些酶活性增强,提高了钉螺的活动性及繁殖力,为进一步研究全球气候变化对血吸虫病传播的影响提供了理论基础。

**关键词:**钉螺;酶组织化学;酶;温度

**中图分类号:**R383.2 **文献标识码:**A

## Influence of temperature change in spring on the activities of enzymes in *Oncomelania hupensis*

YANG Kun, ZHOU Xiao-nong, LIANG You-sheng, HONG Qing-biao, ZHAO Yan, ZHANG Yang-ping, XIONG Xi-kai

(Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

**ABSTRACT:** To understand the mechanism of the global warming impact on the activities and reproductions of *Oncomelania hupensis* during spring, the snails collected in spring were incubated in different temperatures that mimic the warming scenario in spring. The changes of nitric oxide synthase (NOS), succinic dehydrogenase (SDH), lactic dehydrogenase (LDH) and acetylcholinesterase (AchE) in the centric ganglions and gonads of *O. hupensis* were observed by using the enzyme-histochemical techniques. The results showed that the average gray densities of NOS, AchE, SDH and LDH presented a drop trend with increase in temperature, and those of NOS, SDH and AchE in the centric ganglions from 25℃ group and those of NOS, SDH and LDH in ovary and testicle from 25℃ group were all significantly lower than that of the control group; but no difference in the average gray density of LDH in the centric ganglions was found between all the other groups and control group. It concludes that change of temperature in spring impacts obviously to the activities of enzymes in the centric ganglions and gonads of oncomelania snails, because the increase of temperature in spring may trigger the activities of NOS, AchE and SDH to improve the activities and reproduction of oncomelania snails. These results provide the theoretical basis for the study on the impact of global warming on the transmission of schistosomiasis.

**KEY WORDS:** *Oncomelania hupensis*; enzyme-histochemistry; enzyme; temperature

钉螺作为日本血吸虫的惟一中间宿主,在我国其分布与日本血吸虫病流行区的分布相一致。温度变化可对钉螺产生影响,也必然会对血吸虫病传播产生影响。春季是钉螺生殖活动最为活跃季节,其生殖腺在该季节最为丰满,交配、产卵活动最为频繁。我们在利用酶组织化学技术观察冬季温度变化对钉螺酶活性影响的基础上<sup>[1]</sup>,继续观察了春季温度变化对钉螺酶活性的影响,旨在为进一步研究全球气候变暖对血吸虫病传播影响提供理论基础。

### 1 材料与方法

1.1 实验钉螺 于2002年3月中旬采自江苏南京

江浦长江洲滩,系湖北钉螺指名亚种,以群体逸蚴法剔除阳性钉螺,选择活力强,7~8旋的成螺备用。

1.2 钉螺的饲养及样本采集 实验钉螺,按饲养环境温度不同,随机分4组,即对照、15℃、20℃、25℃组。对照组钉螺放入平均温度为12℃的实验室内,15℃组、20℃组、25℃组钉螺分别饲养于15℃、20℃、25℃的恒温培养箱,饲养30d,饲养及样

\* 国家自然科学基金资助项目(编号: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;

3. 华中科技大学同济医学院

本采集同参考文献<sup>[1]</sup>。

### 1.3 酶组织化学观察

1.3.1 切片与孵育 分别采用 NADPH-d 酶组织化学法、Karnovsk-Roots 改良法、Nachlas 法及 Chayen 改良法显示一氧化氮合酶(NOS)、乙酰胆碱脂酶(AchE)、琥珀酸脱氢酶(SDH)及乳酸脱氢酶(LDH)<sup>[2]</sup>, 染色方法同参考文献<sup>[1]</sup>。

1.3.2 定性分析 光镜下根据组织着色反应强弱, NOS、SDH 及 LDH 分为 4 类, 即强阳性: 染色颗粒为蓝黑色或紫黑色, 分布密集; 中度阳性: 染色颗粒呈蓝色或紫色; 弱阳性: 染色颗粒呈浅蓝色或浅紫色; 阴性: 不着色。AchE 活性判断也分为 4 个等级, 即强阳性: 染色颗粒分布密集呈棕褐色或棕黄色; 中度阳性: 颗粒呈黄色; 弱阳性: 染色颗粒呈浅黄色; 阴性: 染色颗粒分布稀疏不着色。

1.3.3 定量分析 采用上海复日公司 Smartscap-2002 型全自动图像分析仪测定各酶的平均灰度值(平均灰度值同被检成份酶含量或活性成反比), 输入计算机建立数据库, 进行 F 检验, 并进行不同实验组的两两比较。

## 2 结 果

### 2.1 定性

2.2.1 方法对照组 阴性对照组各切片均不着色, 呈阴性反应; 阳性对照组中的小鼠的脑或肝组织各酶均呈强阳性反应。

2.2.2 NOS 反应 对照组的中枢神经节的中央纤维区为蓝黑色呈强阳性反应, 神经节周围胞体区为弱阳性反应(图 1)。25℃ 组的中枢神经节的中央纤维区有大量的蓝黑色颗粒, 光镜下几乎不透明, 呈强阳性反应(图 2)。对照组卵巢成熟卵细胞、各级未成熟卵细胞胞浆均呈中度阳性反应, 胞浆为蓝色; 20℃ 组和 25℃ 组着色明显加深, 尤以 25℃ 组为蓝黑色团块状, 呈强阳性反应(图 3)。对照组睾丸内精原细胞、精细胞和成熟精子为蓝褐色, 呈中度阳性, 25℃ 组睾丸内有部分蓝黑色颗粒沉淀, 呈中度阳性(图 4)。

2.2.3 SDH 反应 对照组的神经节纤维鞘及神经节核心部位为强阳性反应, 25℃ 组的着色深蓝色, 呈强阳性反应。对照组卵巢中各级生殖细胞均有较深着色, 呈强阳性反应, 20℃ 组及 25℃ 组明显加深, 有蓝黑色颗粒沉淀, 呈强阳性反应。对照组的睾丸组织呈强阳性反应, 25℃ 组的着色明显加深, 呈强阳性反应(图 5)。

2.2.4 LDH 反应 对照组钉螺的中枢神经节核心部位着色为蓝色或蓝黑色, 呈强阳性反应, 各实验组

的中枢神经节着色无明显变化。对照组睾丸组织及卵巢组织着色为蓝黑色, 25℃ 组的睾丸及卵巢组织(图 6)中有大量的蓝黑色颗粒沉淀, 呈强阳性反应。

2.2.5 AchE 反应 对照组的中枢神经节的神经纤维和神经胶质细胞反应呈强阳性, 神经节胞体区神经细胞呈弱阳性反应, 少数胶质细胞为强阳性(图 7)。20℃ 组及 25℃ 组, 光镜下神经节核心部位着色更深, 有棕褐色颗粒沉淀, 呈强阳性反应(图 8)。

2.3 定量 各酶的平均灰度值随着温度升高呈下降趋势。在神经节中 25℃ 组 NOS、SDH 及 AchE 的平均灰度值明显低于对照组( $P < 0.01$ )。卵巢中 20℃ 组及 25℃ 组 NOS 及 SDH 的平均灰度值显著低于对照组( $P < 0.01$ )。睾丸中 25℃ 组 NOS、SDH 及 LDH 的平均灰度值显著低于对照组( $P < 0.01$ ); 各实验组神经节 LDH 的平均灰度值与对照组相比无显著性差异( $P > 0.01$ ), 卵巢的 LDH 平均灰度值只有 25℃ 组明显低于对照组( $P < 0.01$ )(见表 1)。

## 3 讨 论

NO 在软体动物的嗅觉过程(olfactory processing)<sup>[3]</sup>、摄食活动(feeding behavior)<sup>[4]</sup>、伸缩(leaning)<sup>[5]</sup>及交配(mating)<sup>[6]</sup>中起着重要作用。NO 不但参与突触传递, 还参与非突触传递调节。25℃ 组神经节 NOS 活性较其它实验组明显升高, 提示温度升高可促使钉螺体内 NO 生成量明显增加, 可通过 NO/CGMP 对神经系统发挥重要的生理调节作用<sup>[7]</sup>, 增强钉螺的运动能力。温度升高造成神经系统的 NO 量生成增多, 生成的 NO 可影响钉螺的摄食活动(摄食方式、摄食时间及食物种类等)使钉螺的摄食活动加强, 钉螺体内的能量贮备增加, 钉螺的个体发育加快, 发育周期缩短。

超微结构显示钉螺神经纤维中央有许多线粒体, 提示神经节生物氧化活跃, 对外界环境变化敏感<sup>[8]</sup>。25℃ 组中枢神经节 SDH 活性明显高于其它实验组, 提示温度升高, 钉螺有氧代谢明显加强, 增强的有氧代谢可通过增强氧化磷酸化等机制使得钉螺足肌收缩运动的加强。

乙酰胆碱(Ach)是钉螺足肌的兴奋性递质, 同时在钉螺的足部肌肉中存在胆碱能受体<sup>[9]</sup>。AchE 的可通过水解 Ach 控制胆碱能神经元突触间的信息传递而实现对神经系统功能的调控。25℃ 组神经节的 AchE 活性明显高于对照组, 钉螺中枢神经节产生的 AchE 水解突触后膜的 Ach, 防止持续的去极化, 使神经兴奋顺利传递, 足肌中的神经的兴奋性增强, 提高钉螺的活动性。

钉螺的卵巢和睾丸每年均呈丰满和萎缩的周期

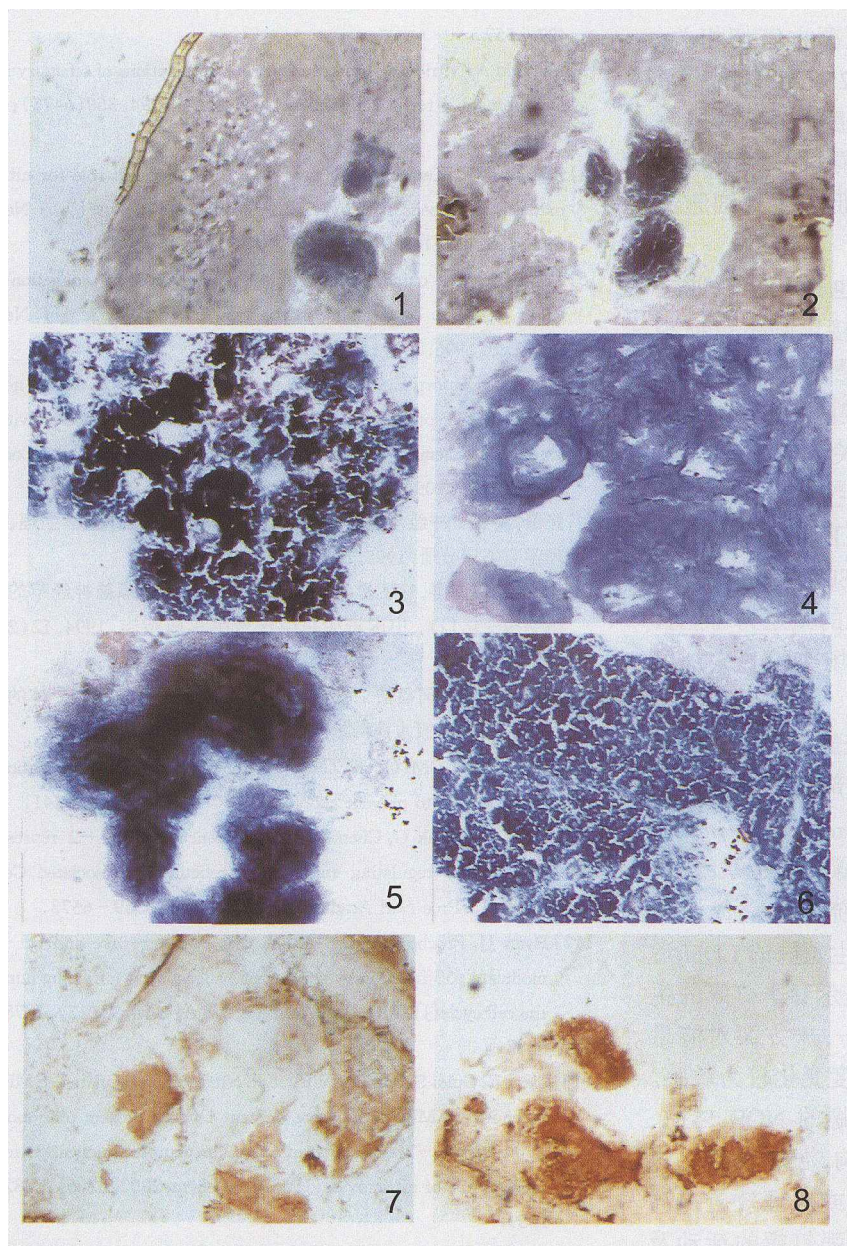


图1 对照组中枢神经节 NOS 强阳性反应(×100)

Fig.1 The high activity of NOS in the centric ganglion in the control group(×100)

图2 25℃组中枢神经节 NOS 强阳性反应(×100)

Fig.2 The high activity of NOS in the centric ganglion in the 25℃ group(×100)

图3 25℃组卵巢 NOS 呈强阳性(×100)

Fig.3 The high activity of NOS in the ovary in the 25℃ group(×100)

图4 25℃组睾丸 NOS 呈中度阳性(×100)

Fig.4 The middle activity of NOS in the testicle in the 25℃ group(×100)

图5 25℃组睾丸 SDH 呈强阳性(×100)

Fig.5 The high activity of SDH in testicle in the 25℃ group(×100)

图6 对照组睾丸 LDH 呈强阳性(×100)

Fig.6 The high activity of LDH in testicle in the control group(×100)

图7 对照组中枢神经节 AchE 强阳性反应(×100)

Fig.7 The high activity of AchE in the centric ganglion in the control group(×100)

图8 25℃组中枢神经节 AchE 强阳性反应(×100)

Fig.8 The high activity of AchE in the centric ganglion in the 25℃ group(×100)

表1 春季不同温度下钉螺组织 NOS、SDH、LDH 及 AchE 的平均灰度值

Table 1 The average gray density of NOS, SDH, LDH and AchE in snail at different temperature

实验组 Group	一氧化氮合酶 NOS			乳酸脱氢酶 LDH			乙酰胆碱酯酶 AchE		琥珀酸脱氢酶 SDH	
	中枢神经节 Centric ganglion	卵巢 Ovary	睾丸 Testicle	中枢神经节 Centric ganglion	卵巢 Ovary	睾丸 Testicle	中枢神经节 Centric ganglion	中枢神经节 Centric ganglion	卵巢 Ovary	睾丸 Testicle
对照组 Control group	0.5251± 0.0587 <sup>△</sup>	0.4886± 0.0287 <sup>△#</sup>	0.4709± 0.0147 <sup>△</sup>	0.3955± 0.0721	0.5182± 0.0157 <sup>△</sup>	0.5325± 0.0098 <sup>△</sup>	0.4340± 0.0421 <sup>△</sup>	0.4206± 0.0631 <sup>△</sup>	0.532± 0.0370 <sup>△</sup>	0.5362± 0.0185 <sup>△</sup>
15℃组 15℃ group	0.5423± 0.0442 <sup>△</sup>	0.5068± 0.0624 <sup>△#</sup>	0.4674± 0.0136 <sup>△</sup>	0.4194± 0.0338	0.5510± 0.0711 <sup>△</sup>	0.5291± 0.0115 <sup>△</sup>	0.4270± 0.0394 <sup>△</sup>	0.4441± 0.0552 <sup>△</sup>	0.5430± 0.0106 <sup>△</sup>	0.5262± 0.0240 <sup>△</sup>
20℃组 20℃ group	0.50516± 0.1154	0.3531± 0.0092 <sup>*△*</sup>	0.4593± 0.02144 <sup>△</sup>	0.3755± 0.09914	0.5032± 0.0303 <sup>△</sup>	0.5380± 0.0109 <sup>△</sup>	0.3807± 0.0470 <sup>*</sup>	0.4076± 0.0633 <sup>△</sup>	0.4820± 0.0168 <sup>*△</sup>	0.5324± 0.0128 <sup>△</sup>
25℃组 25℃ group	0.4153± 0.1119 <sup>*△</sup>	0.2521± 0.0646 <sup>*△#</sup>	0.3521± 0.0237 <sup>*</sup>	0.3953± 0.1041	0.4057± 0.0789 <sup>*</sup>	0.5012± 0.0154 <sup>*</sup>	0.3587± 0.0437 <sup>*</sup>	0.3399± 0.0135 <sup>*</sup>	0.4554± 0.0074 <sup>*</sup>	0.4466± 0.0671 <sup>*</sup>
F 值 F value	8.189	66.842	183.391	0.957	25.107	36.96	14.213	14.272	156.6	26.111
P 值 P value	<0.01	<0.01	<0.01	0.418	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

\* : 实验组与对照组比较 Comparison between the experimental groups and control group  $P < 0.01$ △ : 25℃组与其它实验组比较 Comparison between the 25℃ group and the other groups  $P < 0.01$ 

(C) 2004 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



性变化,此过程与生殖细胞的细胞凋亡密切相关,NO参与了这种细胞的凋亡过程。25℃组钉螺生殖腺的 NOS 活性增强,提示春季温度升高,可提高 NO 的生成量,产生的 NO 可以上调 bcl-2 基因表达,通过多种途径抑制凋亡<sup>[10-13]</sup>,促使生殖细胞的个体发育及整体数目增多。

钉螺生殖细胞的产生及发育也是一个耗能过程。如能量代谢过程受阻,势必直接影响生殖细胞的发育。位于线粒体膜上的 SDH 是精原细胞、精子及各级卵细胞进行有氧呼吸的关键酶,其活性的高低与生殖细胞的发生、发育密切相关。宋鸿焘等<sup>[14]</sup>发现垦种 2 年后江滩残存钉螺在生殖腺 SDH 活性下降的同时,其生存繁殖力也明显下降。本次实验 20℃ 及 25℃ 组螺的卵巢及睾丸的 SDH 活性明显高于对照组,提示春季温度升高,钉螺的繁殖力可能会得到进一步加强,但仍需进一步现场实验观察加以证实。

乳酸脱氢酶是无氧酵解的代表酶。处在有氧环境下的钉螺仍需通过此途径获取部分能量,Singh VK<sup>[15]</sup>研究杀螺剂对椎实螺(*Lymnaea acuminata*)作用机制时,发现杀螺剂作用于该螺的神经系统,使 LDH 活性明显降低,由于神经系统的能量代谢受阻,从而影响螺的生存。25℃ 组的生殖腺的 LDH 活性明显升高,无氧酵解活动增强,提示春季钉螺的生殖腺是新陈代谢最旺盛的器官之一,一方面对能量的需求大;另一方面对外界环境温度变化较为敏感。本次研究显示春季温度变化对钉螺的 NOS、SDH、LDH 及 AchE 活性均产生明显影响,温度升高使这些酶活性增强,并可通过多种生理或病理效应提高钉螺的活动性及生殖腺丰满度,增强钉螺的活动及繁殖力,为进一步研究全球气候变化对血吸虫病传播的影响提供了理论基础。

## 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(2):93-97.
- [2] 贾长恩,李树庚.组织化学[M].北京:人民卫生出版社,2001:

427-557.

- [3] Gelperin A. Nitric oxide mediates network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc[J]. Nature, 1994, 369(6475):61-63.
- [4] Elphick MR, Kemenes G, Staras K, et al. Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc[J]. J Neurosci, 1995, 15(11):7653-7664.
- [5] Teyke T. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia* [J]. Neurosci Lett, 1996, 206(1):29-32.
- [6] Pisu MB, Conforti E, Fenoglio C, et al. Nitric oxide-containing neurons in the nervous ganglia of *Helix aspersa* during rest and activity: immunocytochemical and enzyme histochemical detection[J]. J Comp Neurol, 1999, 409(2):274-284.
- [7] 张镛,秦震.神经系统的 NO/cGMP 系统[J].国外医学生理、病理学与临床分册,1995,16(2):77-79.
- [8] 李文桂,黄四喜,徐明星.经五氯酚钠浸泡后钉螺脑神经节的超微结构变化[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1994,12(2):125-128.
- [9] 耿辉,夏国瑾,何昌浩.槟榔碱对湖北钉螺足肌胆碱能受体的作用[J].中国血吸虫病防治杂志,1999,11(5):281-283.
- [10] Hockenbery DM, Oltvai ZN, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis[J]. Cell, 1993, 75(2):241.
- [11] Lam M, Duyak G, Chen L, et al. Evidence that bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated  $Ca^{2+}$  fluxes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:6569-6573.
- [12] Ryan JJ, Prochownik E, Gottlieb CA, et al. c-myc and bcl-2 modulate p53 function by altering p53 subcellular trafficking during the cell cycle[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(13):5878-5882.
- [13] Ciani E, Guidi S, Bartesaghi R, et al. Nitric oxide regulates cGMP-dependent cAMP-responsive element binding protein phosphorylation and Bcl-2 expression in cerebellar neurons: implication for a survival role of nitric oxide[J]. J Neurochem, 2002, 82(5):1282-1289.
- [14] 宋鸿焘,梁幼生.垦种 2 年后江滩残存钉螺组织化学与超微结构的变化[J].中国血吸虫病防治杂志,1997,9(9):37-39.
- [15] Singh VK, Singh S, Singh DK. Effect of active molluscicidal component of spices on different enzyme activities and biogenic amine levels in the nervous tissue of *Lymnaea acuminata* [J]. Phytother Res, 1999, 13(8):649-654.

收稿日期:2003-09-04;修回日期:2004-03-23

(上接第 534 页)

## 参考文献:

- [1] 朱兴全.旋毛虫病[M].郑州:河南科学技术出版社,1993:169-207.
- [2] Gamble HR, et al. Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis[J]. Am J Vet Res, 1984, 45:67.
- [3] 宋思扬,郑忠辉,黄耀坚,等.旋毛虫排泄-分泌抗原 p49 基因的克隆[J].厦门大学学报(自然科学版),1999,38(1):117.
- [4] 张伟光,蔡海松,林新坚,等.旋毛虫 p49 抗原基因克隆体外表达条件的研究[J].中国人兽共患病杂志,1998,14(2):7.

- [5] 刘光明,宋思扬,乔玉欢,等.旋毛虫 p49 抗原基因原核表达产物的纯化[J].中国人兽共患病杂志,1999,15(3):24.
- [6] 皮国华,何红英,谷淑燕.胶体金免疫吸附试验检测丙型肝炎病毒抗体[J].中华实验和临床病毒杂志,1995,9(4):371.
- [7] Spielberg F, Kabeya CM, Ryder RW, et al. Field testing and comparative evaluation of rapid, visually read screening assays for antibody to human immunodeficiency virus[J]. Lancet, 1989, 1(8638):580.
- [8] 宋世佩.旋毛虫病的危害与防治[J].医学动物防制,2002,18(1):39-40.

收稿日期:2003-07-07;修回日期:2004-03-23