

酶组织化学在日本血吸虫及其中间宿主研究中的应用

杨坤¹综述 周晓农²审校

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

随着生物化学的迅速发展, 酶组织化学的方法学不断创新与改进。冰冻切片机的普遍推广, 组织细胞中酶活性得到保护, 能够显示的种类增多。电子显微镜的应用, 使酶组织化学在日本血吸虫病研究中的应用也越来越广泛, 主要应用于血吸虫与钉螺研究两个方面。用酶组织化学研究血吸虫体内酶存在情况、定位分布, 影响酶活性的各种因素, 对于揭示酶在血吸虫生命活动中的作用与规律以及对血吸虫病的诊断与治疗均有重要意义。钉螺是日本血吸虫的唯一中间宿主, 在我国分布广泛, 在钉螺研究中运用的酶组织化学技术, 对新灭螺药的研制、钉螺的抗药机制、钉螺分类及血吸虫病流行病学研究都有积极作用。综述如下。

1 酶组织化学原理及方法

酶组织化学把结构、功能及代谢结合起来, 以确定组织及细胞的化学成分, 并可定位、定量测定, 其原理是组织细胞中的化学成分和其相应的底物呈现一系列的化学反应, 形成于显微镜下可见的反应物。随着先进仪器的应用, 如 UNIVAR1280 型显微分光光度计、计算机图像分析系统 HPIAS-1000、IBAS 全自动图像分析系统等, 使酶组织化学不但可以定性分析, 还可以定量测定。近年来新发展的电镜酶技术是普通光镜组织化学技术在电镜水平上的发展和应用, 具有定位精确、观察细致, 能通过酶的特异性反应来显示酶在超微结构水平上的分布及其在细胞活动中的变化^[1]。

常用的观察指标, 分布与功能及方法见表 1^[2]。

2 酶组织化学在日本血吸虫研究中的应用

酶组织化学方法在血吸虫研究中的应用可推至 20 世纪 50 年代。Dusanic 等^[3]首先用组织化学方法揭示了曼氏血吸虫存在磷酸酶。Sodeman 等^[4]证明在日本血吸虫的尾蚴中存在磷酸酶。何毅勋^[5]对日本血吸

虫卵胎发育的组织化学研究揭示了磷酸酶在虫卵胚胎发育过程的动态变化, 且观察到日本血吸虫尾蚴的排泄系统中存在明显的磷酸酶活性, 提示磷酸酶与代谢物排泄和维持虫体生理平衡等方面有关。日本血吸虫生活史各阶段均存在胆碱酯酶, 主要为乙酰胆碱酯酶, 凡有神经分布就有胆碱酯酶, 如尾蚴体表的胆碱酯酶阳性的具纤毛感觉乳突可接受施于纤毛上的机械压力, 通过体、尾部神经肌肉运动及钻腺分泌物的作用, 很快突破宿主皮肤屏障, 完成感染过程^[6]。Orido^[7]证明在血吸虫尾蚴的神经系统中存在儿茶酚胺。酸性蛋白酶主要分布虫体的肠道上皮, 提示该类酸性蛋白酶可能与血红蛋白的终末消化作用有关^[8]。酚酶即酚氧化酶, 日本血吸虫只有雌虫的成熟卵黄细胞的颗粒球及新形成的虫卵壳才含有酚酶和酚类物质, 因此认为酚酶及酚类物质与日本血吸虫卵壳的形成有直接关系^[9]。陈子宸等^[10]观察不同虫龄雌虫卵黄腺细胞中颗粒球的动态变化, 以了解日本血吸虫造卵物质的消长规律, 发现了 60 d 虫龄的组织化学反应最强, 1~2 年虫龄的反应次之, 第 3 年虫龄的反应则较弱, 表明日本血吸虫在黄牛宿主体内, 其产卵量在感染后 2 年仍保持相当高的水平, 为感染宿主的控制时间提供了实验依据。另外, 应用组织化学方法对幼虫期的代谢活动进行研究, 有助于了解幼虫期无性繁殖的变化规律, 从而进一步调控血吸虫幼虫的发育达到控制以至消灭的目的^[11]。

在探讨有效抗日本血吸虫药物杀虫机制时, 观察虫体形态及虫体组织化学的变化是重要手段。体外将日本血吸虫培养于含吡喹酮的台氏液一小牛血清中 24 h, 其体表组织、排泄管管壁及卵黄腺内的碱性磷酸酶 (ALP) 反应均普遍减弱或消失, 尤以虫体体表的变化为最显著, 48 h 后酶反应完全消失, 同时虫体内糖原含量明显减少直至完全消失, 推测糖原的减少或消失与碱性磷酸酶活性抑制有关, 因为血吸虫通过体表吸收葡萄糖的过程需要碱性磷酸酶的参与^[12]。日本血吸虫的胆碱酯酶也是抗血吸虫药物作用的靶子之一。夏明仪等^[6]在观察毒扁豆碱、敌百虫对日本血吸虫的胆碱酯酶抑制试验时, 发现不同部位的胆碱酯酶被抑制的敏感性不同, 其口、腹吸盘的胆碱酯酶活力较

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, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病学重点实验室, 上海 200025

表 1 酶组织化学常用的观察指标, 分布与功能及方法

观察指标	分布与功能	方 法
碱性磷酸酶 (ALP)	细胞膜标志酶, 在动物微粒体内广泛分布, 与物质吸收运输有关	常用 Gomori 钙钴法加以改良, 利用磷酸酯为底物, 有的学者利用 Hayhoe 氏偶氮偶联法显示, 其底物是 2-磷酸萘酚钠
酸性磷酸酶 (ACP)	溶酶体内消化酶, 当溶酶体膜通透性变化或破裂时, 该酶才释放、活性增高, 导致细胞与组织自溶	利用 Gomori 氏硝酸铅改良法
三磷酸腺苷酶 (ATP-ase)	细胞分解 ATP 获取能量的关键酶, 分布于与物质吸收、能量转换及离子跨膜运动有关的部位	用 Wachstein-Meisen 法显示, 另有学者用 Niles 法显示, 以三磷酸腺苷二钠盐作底物
葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-P)	位于内质网, 参与糖代谢和蛋白质合成	显示法很多但其基本原理是该酶作用于葡萄糖-6-磷酸盐, 释放出磷酸基, 再与金属盐发生沉淀有色反应
胆碱脂酶 (ChE)	存在脊椎动物和一些无脊椎动物体内, 参与神经介质的传递、肌肉运动及物质代谢等多项生理功能, ChE 活性的强弱是神经细胞和功能的重要参考指标	用 Karnovsk-Roots 方法显示
琥珀酸脱氢酶 (SDH)	三羧酸循环的关键酶, 位于线粒体内膜之内, 在组织化学中常用这种酶来反映糖的有氧氧化	用 Chayen 法
乳酸脱氢酶 (LDH)	位于线粒体脊上, 反映无氧酵解状况	用 Nachles 法显示
一氧化氮合酶 (NOS)	一氧化氮 (NO) 合成的限速酶, 而 NO 是生物体内无处不在神经递质和第二信使	还原型辅酶 I (NAPD-d) 显示法
细胞色素氧化酶 (CCo)	线粒体标志酶, 位于线粒体内膜上, 是电子传递的末端酶, 线粒体借助该酶将电子传递给氧而获得能量, 为细胞代谢提供必要的 ATP 来源	用 G-Nadi 法
单胺氧化酶 (MAO)	是一种黄素蛋白, 能氧化单胺、二胺、酰胺、肾上腺素和 5-羟色胺, 分布线粒体内	硝基-BT 法
蛋白质	某些特定蛋白、某些氨基酸或功能基团, 核糖核酸 (RNA)、脱氧核糖核酸 (DNA)	利用过碘酸 Schiff 氏试剂的 Feulen 反应
糖类	糖原、粘多糖和糖脂类	利用过碘酸 Schiff 氏试剂的 PAS 反应

中枢神经节及纵神经干更易被抑制, 还观察到非特异性胆碱酯酶的抑制剂——四异丙基焦磷酸碱同样对日本血吸虫成虫的胆碱酯酶有抑制作用。酚酶在血吸虫卵壳的形成方面起主要作用, 而虫卵又是日本血吸虫病的最主要致病因素。因此, 抑制酚酶, 阻止虫卵的产生将可防止日本血吸虫病的严重病理损害的发生。刘光惠等^[13]分别对一次口服吡喹酮和硝硫氰胺 60 mg/kg 剂量治疗的实验兔, 停药后不同时间解剖, 取出雌虫和对照组的雌虫同时进行酚酶反应, 发现两药物治疗组均随停药时间延长酚酶反应逐渐减弱以至呈可疑阳性反应, 至 42 h 几乎是阴性反应, 提示两药的作用与抑制血吸虫虫卵的形成有关。

吡喹酮系目前抗血吸虫成虫及皮肤期童虫的较为理想的药物, 但抗肝期童虫作用较差, 与其化学结构完全不同的青蒿素的醚类衍生物——蒿甲醚与蒿乙醚对肝期血吸虫童虫及成虫有明显的杀伤作用。组织化学

研究显示这类药物能使肝期童虫和成虫体内糖原含量急剧下降, ALP 活性减弱, 以蒿甲醚 300 mg/(kg·d) 治疗组最为显著, 提示两种药物的作用机制可能与促使虫体能量的损耗有关^[14]。

3 酶组织化学在钉螺研究中的应用

控制与杀灭钉螺可阻断日本血吸虫病流行, 但首先必须了解钉螺的生理、生化特性以及外界环境因素对钉螺影响的机制, 这方面组织化学的应用越来越广泛。国外对其他螺类研究较多^[15-17], 梁幼生等^[18]首先用酶组织化学方法定位观察了钉螺软体内糖原分布及 7 种酶活性部位, 结果认为糖原、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、乳酸脱氢酶 (LDH) 在各系统分布广泛, 含量高或活性高; 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-P) 仅在卵巢部位活性高; 三磷酸腺苷 (ATP) 存在肝、胃、生殖腺等器官; ALP 以消化系统活性最高; 酸性磷酸酶

(ACP) 在螺体内活性较低, 并认为钉螺体内糖原为螺体能量的主要储备形式, 分布与组织器官的代谢旺盛程度相一致; SDH 广泛分布软体内, 结合生化证明钉螺体内存在柠檬酸代谢酶系, 表明三羧酸循环供能途径在钉螺体内普遍存在, 氧对其维持其生命的必要性; G-6-P 在卵巢内活性高, 提示该酶参与了螺卵的形成、发育过程; 神经节和神经干胆碱酯酶 (ChE) 活性高, 提示在钉螺神经系统 ChE 可能是神经递质之一, 神经系统的 ChE 可作为杀螺剂的靶子之一。梁幼生等^[19]用辅酶 II (NAPD-d) 酶组织化学方法, 观察了钉螺体内一氧化氮合酶 (NOS) 的分布, 其结果为足肌纤维间含丰富 NOS 阳性神经元, 中枢神经节纤维区, 心脏壁、雌雄性生殖细胞、腮管、咽管等呈 NOS 强阳性, 提示 NO 作为重要生物信使直接参与钉螺的神经肌肉运动、生殖和血管调节等多种生命活动, 为研制高效低毒的灭螺药、探索新的灭螺方法及研究环境变化对其生存的影响等, 提供理论依据。

改变环境措施对防制血吸虫病有重要意义。环境的改变影响钉螺生存繁殖, 可使其死亡率增高, 繁殖力下降。采用酶组织化学方法对实行垦种 2 年的江滩残存钉螺和原始芦滩钉螺的软体进行了定性、定量观察。结果显示江滩残存钉螺的糖原含量减少, ATP、G-6-P、细胞色素氧化酶 (CCo) 活性下降, LDH 和 SDH 的活性降低 ($P < 0.05$), 表明垦种改变了江滩钉螺孳生环境, 使钉螺体内代谢发生障碍, 能量枯竭, 以致生存繁殖能力下降^[20]。另有学者观察了水淹后钉螺软体组织及钉螺卵组织化学的变化, 结果表明软体组织及卵的糖原含量下降, 但 SDH、LDH 的变化不同, 水淹 30、60 d 软体组织的 SHD、LDH 活性升高, 而卵的 SDH 水淹第 10 天降为弱阳性, 30 d 消失; LDH 含量在水淹 20 d 时未见变化, 30 d 时降为阳性反应, 40 d 消失。可见水淹通过对能量代谢的影响, 使钉螺死亡率增高、繁殖力下降, 螺卵发育受阻, 但 SDH、LDH 变化的差异有待进一步研究^[21, 22]。

我国大陆钉螺分布区北至北纬 33°15′ 江苏省宝应县。为研究南水北调东线工程实现供水后, 随水流迁移扩散至北方的钉螺能否生存繁殖, 沿输水干线在北纬 33°15′ 以北的山东济宁、江苏徐州分别设点, 观察到钉螺在北方环境中生殖腺发育受到抑制, 生殖力下降, 并用酶组织化学方法对其影响机制进行了探索。结果表明济宁、徐州两地钉螺的睾丸与卵巢的糖原、组蛋白、DNA、CCo、SDH、LDH 的含量明显降低, 而两地钉螺的睾丸 SDH 的含量明显升高, 证实了钉螺被移至北方 3~6 个月后雌雄生殖腺萎缩, 生殖细胞的有关组化成份减少, 与生殖细胞发育、成熟有关的酶活性

发生异常变化, 最终导致钉螺繁殖力下降。提示钉螺的生殖腺因其为生殖细胞的发源地, 各种酶活性均较高, 是螺体新陈代谢最活跃的器官之一, 对外界环境影响也最为敏感^[23]。同时可利用这一生理特性, 采用物理或化学方法干扰其生殖腺代谢, 从而降低其繁殖力, 达到控制乃至消灭的效果, 值得进一步研究。

近年来随着灭螺增效剂的深入研究, 有关增效剂的作用机制研究增多。戴建荣等^[24]用酶组织化学方法对 O, O' -二乙基-O"- (邻氯苯乙腈) 硫代磷酸酯 (B002) 与氯硝柳胺合用增效机制进行了探讨, 结果 B002 使头足部糖原含量减少, 神经节和足肌中 ChE 及 NOS 活性下降。提示由于 B002 干扰钉螺神经介质的传递, 使得头足部肌肉失去张力, 对外界的反应消失, 从而增加了与氯硝柳胺的接触面而起增效作用。谭革等^[25]用酶组织化学研究槟榔碱 (arccosine) 灭螺增效的机制, 结果单用槟榔碱浸泡钉螺 24 h 后, 其中枢神经节 ATP 被明显破坏, ChE 轻度破坏; 槟榔碱与五氯酚钠、氯硝柳胺、射干合用时对钉螺中枢神经节 ATP 破坏作用大于后三者单用药物的作用, 定量测定各实验组 SDH、LDH 值无明显变化, 与正常对照组差异无显著性意义, 表明药物作用位点不在三羧酸循环和无氧酵解途径, 提示其增效作用的机制在于增强其他杀螺药的药效作用。药物的杀螺位点位于阻断氧化磷酸化偶联生成 ATP, 进而影响能量代谢, 使钉螺丧失机械运动及生物合成等生命功能而死亡。

20 世纪 80 年代我国寄生虫病防治工作者在湖南省洞庭湖区进行日本血吸虫流行病学调查, 发现洞庭湖区的日本血吸虫中间宿主—湖北钉螺同时存有一种外睾吸虫的感染, 且感染了外睾吸虫的钉螺几乎无血吸虫幼虫期的双重感染, 表现出较明显的对抗性。叶向群^[26]利用组织化学及扫描电镜对叶巢外睾吸虫进行观察, 以揭示外睾吸虫在钉螺宿主中对抗血吸虫的机制, 其组织学显示外睾吸虫雷蚴呈窄条状, 头端具有巨大的肌质咽, 组织化学采用 Mallory 三色法染色, 从雷蚴的纵切面切片中显示其纤维呈橘黄色阳性反应, 而雷蚴体壁着色稍深, 表明体壁中含有一定量的胶原纤维及网状纤维。提示, 叶巢外睾吸虫雷蚴具强大的肌质咽, 体壁具有肌纤维在螺类宿主体内可进行主动的摄食, 其对象包括日本血吸虫的尾蚴, 是叶巢外睾吸虫对抗血吸虫机制的一个重要方面。另外, 李卫湘等^[27]在实验室观察到感染洞庭湖外睾吸虫后钉螺的产卵量下降, 并用酶组织化学分析了 SDH、G-6-P 的变化, 探讨其机制, 结果阳性钉螺 SDH 活性有所升高。其原因可能是感染洞庭湖外睾吸虫后, 导致能量和营养的缺乏, 只能加速新陈代谢, 以满足寄生虫

和宿主两方面的需要,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,促进钉螺的死亡。阳性钉螺 G-6-P 活性下降,影响卵细胞能量供给,造成阳性钉螺产卵量的减少或不产卵。生物灭螺方法其中之一就有竞争性吸虫的应用,洞庭湖外螺吸虫对血吸虫流行区控制钉螺密度有一定作用,但其作用是否可靠持久,钉螺是否对之易感,终宿主是否能大量排卵,以及对人是否无害,值得进一步研究。

4 结语

目前,日本血吸虫病仍是我国一种流行广、危害严重的寄生虫病,消灭此病的早晚在很大程度上取决于人们对日本血吸虫及钉螺的了解与认识程度,其中,酶组织化学技术无疑是一种重要手段。酶组织化学依靠其直观性强、无需对组织进行分离、提取,就能获取组织细胞内代谢的大量信息的特点,而广泛应用。但同时也存在着一些问题和不足:① 标记结果的认定判断标准尚不一致,同一张染色切片阳性、阴性说法不同;或对于同一阳性结果其程度上的判断不同。目前对酶组织化学染色阳性标准也不一致,有的以阳性细胞数目计算,也有的以染色强度判断;具体在阳性细胞百分率和阳性程度认同上也存在差异;② 酶组织化学一般不能直接显示酶本身,而仅仅是反映酶发生作用的底物,可能同实际酶的分布不一致;③ 日本血吸虫及钉螺个体微小,且钉螺组织结构间隙大,组织化学过程中的固定及切片的影响因素较多,酶活性容易失活;④ 生物体内的一种酶可能有不同的亚型,目前酶组织化学不能区分不同的亚型,如 NOS 分 3 种亚型,而酶组织化学结果均为蓝色沉淀;⑤ 目前酶组织化学在日本血吸虫及其中间宿主涉及的酶很多,但特异性差,通常为了一个研究目的而选取多种酶。

近年来血吸虫及钉螺的抗药性问题越来越突出,酶组织化学在这一领域可进一步广泛应用,找到与抗药性有关的酶。全球气候变暖对血吸虫病传播影响的研究逐渐开展起来,酶组织化学在其机制研究也可作为一种重要的实验室工具。由于钉螺及血吸虫在切片中酶活性容易失活,应加强对切片及固定技术的研究,如引进包埋技术等。在血吸虫病方面的研究,国外已进入电镜下的超微水平,且同免疫组织化学相结合,其定量比较明确,国内学者在这方面的工作尚未大量开展,应进一步开展酶组织化学精确定量、特异性及应用性的研究。总之,目前在对血吸虫及其中间宿主的生理、生化及药物代谢的研究,尚无比较成熟的手段

时,酶组织化学必定发挥着重要作用。

参 考 文 献

- [1] 柳建发. 电镜酶技术及其在肿瘤学和寄生虫学上的应用[J]. 地方病通报, 1999, 14(3): 95-97.
- [2] 贾长恩, 李叔庚 主编. 组织化学[M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 13-582.
- [3] Dusanic DG. Histochemical observations of alkaline phosphatase in *Schistosoma mansoni*[J]. J Infect Dis, 1959, 105: 1-8.
- [4] Sodeman WA Jr, Berry EG, Fors MB. Schistosomal phosphatases. Histochemical localization of alkaline and acid phosphatase in cercariae of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, and *Schistosoma japonicum*[J]. Am J Trop Med Hyg, 1968, 17: 851-857.
- [5] 何毅勋. 日本血吸虫卵胚胎发育的组织化学研究[J]. 动物学报, 1979, 25: 304-310.
- [6] 夏明仪. 日本血吸虫胆碱酯酶的组织化学定位[J]. 动物学报, 1982, 28: 361-367.
- [7] Orido Y. Histochemical evidence of the catecholamine-associated nervous system in certain schistosome cercariae[J]. Parasitol Res, 1989, 76: 146-149.
- [8] Bogitsh BJ, Bogitsh BJ, Dresden MH. Fluorescent histochemistry of acid proteases in adult *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*[J]. J Parasitol, 1983, 69: 106-110.
- [9] 何毅勋. 日本血吸虫酚及酯酶的组织化学定位[J]. 动物学报, 1973, 19: 1-7.
- [10] 陈子宸, 林英娇. 日本血吸虫造卵物质组织化学动态观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 1996, 12(1): 49.
- [11] 胡敏, 周述龙. 日本血吸虫雌虫组织化学的初步观察[J]. 湖北预防医学杂志, 1996, 7(3): 29-30.
- [12] 杨元清. 吡啶酮对日本血吸虫及动物宿主肝脏作用的组织化学观察[J]. 中国医学科学院学报, 1979, 1(1): 7-10.
- [13] 刘光惠, 苏永芳, 罗雅, 等. 药物对血吸虫雌虫酯酶组织化学和形态学影响的观察[J]. 实用寄生虫病杂志, 1994, 2: 25-26.
- [14] 殷静雯, 杨元清. 蒿乙醚与蒿甲醚抗日本血吸虫作用的组织学和组织化学比较[J]. 中国药理学杂志, 1991, 12: 478-480.
- [15] Reader TA. Studies on the ultrastructure, histochemistry and cytochemistry of the uninfected digestive gland of *Bithynia tentaculata* (Mollusca: Gastropoda) and on the ultrastructure of this host organ in snails infected with larval digenaeans[J]. Z Parasitenkd, 1976, 50: 11-30.
- [16] Huang S, Kerschbaum HH, Engel E, et al. Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*[J]. J Neurochem, 1997, 69: 2516-2528.
- [17] Thavaradhara K, Leise EM. Localization of nitric oxide synthase-like immunoreactivity in the developing nervous system of the snail *Ilyanassa obsoleta*[J]. J Neurocytol, 2001, 30: 449-456.
- [18] 梁幼生, 熊希凯, 肖荣炜, 等. 钉螺组织化学与酶组织化学的研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1992, 4: 201-203.
- [19] 梁幼生, 戴建荣, 朱荫昌, 等. 一氧化氮合酶分布的酶组织化学研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2001, 13: 196-197.
- [20] 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: 37-39.
- [21] 梁幼生, 熊希凯, 宋鸿焘, 等. 冬季水淹后洲滩钉螺组织化学与超微结构的变化[J]. 动物学杂志, 1994, 29(3): 6-8.
- [22] 余冬保, 徐玉秀. 水淹对钉螺卵组织化学影响的实验研究[J]. 实用预防医学, 1996, 3: 147-148.
- [23] 梁幼生, 肖荣炜, 宋鸿焘, 等. 不同纬度地区钉螺生殖腺组织学、组织化学、酶组织化学和超微结构观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 1996, 8: 351-354.
- [24] 戴建荣, 梁幼生, 王锐, 等. B002 对氯硝柳胺杀螺增效机理的研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2001, 14: 38-40.
- [25] 谭萃, 何昌浩, 张艳, 等. 钉螺经不同的浸泡后酶组织学变化的观察[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(3): 34-37.
- [26] 叶向群. 叶巢外螺吸虫雷蚴的组织学、组织化学及扫描电镜观察[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(1): 135-140.
- [27] 李卫湘, 张仁利. 感染洞庭湖外螺吸虫后钉螺产卵量及酶组织化学变化[J]. 实用寄生虫病杂志, 1997, 5: 190.

(收稿日期: 2002-07-11 编辑: 富秀兰)