

钉螺一氧化氮合酶分布的酶组织化学研究^{*}

梁幼生¹ 戴建荣¹ 朱荫昌¹ 周晓农¹
张 艳² 熊希凯² 黄軼昕¹ 杭盘宇¹

【摘要】 目的 定位研究一氧化氮合酶(NOS)在日本血吸虫中间宿主—钉螺体内分布及活性。方法 用还原型尼可酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸硫辛酰胺脱氢酶(NADPH-d)酶组织化学技术,对钉螺软体的整体连续切片作系统观察。结果 头足部肌纤维间含丰富 NOS 阳性神经元;中枢神经节纤维区、心脏壁、雌雄生殖细胞、咽管等呈 NOS 强阳性;腮管壁呈 NOS 阳性。结论 NO 作为重要生物信使,直接参与钉螺神经肌肉运动、生殖和心血管调节等多种生命活动。
【关键词】 钉螺 一氧化氮合酶 NADPH-d 酶组织化学
【中图分类号】 R383.2⁺4 【文献标识码】 A

AN ENZYME-HISTOCHEMICAL STUDY OF DISTRIBUTION OF THE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN *ONCOMELANIA HUPENSIS* Liang Yousheng¹, Dai Jiangrong¹, Zhu Yinchang¹, Zhou Xiaonong¹, Zhang Yan², Xiong Xikai², Huang Yixin¹, Hang Panyu¹ 1 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases Wuxi 214064; 2 Department of Anatomy, Tongji School of Medicine, Huazhong Scientific and Technolohgical University

【ABSTRACT】 Objective To study the distribution and activity of nitric oxide synthase in the tissues of the schistosome vector snail, *Oncomelania hupensis*. Methods By way of nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) histochemical technique the continued sections of *Oncomelania hupensis* snails were investigated systematically. Results The richest NOS positive neurons were found among muscle cells in the head-foot region. The strong NOS positive reactions were demonstrated respectively in the center ganglions, heart wall, testes, ovary, pharyngeal cavity and ctenidium wall of the snails. Conclusion Nitric oxide, as a important biological messenger, is involved in regulating the movement of both nerves and muscles, the functions of reproduction and the cardiac system directly in *Oncomelania hupensis*.
【Key words】 *Oncomelania hupensis*, Nitric oxide synthase, NADPH-d, Enzyme-histochemistry

自 1987 年在生物体内发现了内源性一氧化氮(Nitric Oxide, NO)以来^[1],国内医学生物学学者对 NO 的生物学意义进行了广泛深入的研究,证实 NO 是生物体内重要的信使分子和效应分子,在机体的生理、病理过程中发挥着极大的作用。本文用还原型尼可酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸硫辛酰胺脱氢酶(nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate diaphorase, NADPH-d)酶组织化学技术,对日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)中间宿主—湖北钉螺

(*Oncomelania hupensis*) 软体内一氧化氮合酶(Nitric Oxide Synthase, NOS)分布作了定位观察,以研究 NO 在螺体内的存在、分布及其生物学功能,为进一步掌握钉螺的生理生化及代谢特征,为研制高效低毒的灭螺药物、探索新的灭螺方法及环境变化对其生态的影响等,提供理论依据。

材料与方法

实验钉螺采自江苏省南京市燕子矶江滩,系湖北钉螺指名亚种。以群体逸蚴法剔除感染性螺,选择活力强,7~8 旋的成螺,按李赋京(1956)的解剖法^[2],用止血钳夹碎螺壳,解剖显微镜下用解剖针仔细游离软体,去壳;挑选无机械损伤的软体作为实验观察材料。

新鲜软体不经固定,即刻置于 AO 恒冷箱切片冰冻台上,冰冻 15 min 后分别作纵行或横行连续切

^{*} 本研究为国家自然科学基金资助课题(批准号:30070684)内容之一。
作者单位 1 江苏省血吸虫病防治研究所(无锡 214064); 2 华中科技大学同济医学院解剖学教研室
作者简介 梁幼生(1958—),男,博士,副研究员。研究方向:钉螺生态学

片,切片厚 10 μm ;冻台温度为 $-14\sim-20^{\circ}\text{C}$;切片贴于 $18\text{ mm}\times 18\text{ mm}$ 盖玻片上,待干后,经双蒸水洗净,浸入 NADPH-d 孵育液(成份:1 mmol/L 还原型尼可酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸,0.2 mmol/L 氯化硝基四氮唑蓝,0.1 mol/L Tris·HCl pH7.2,0.3% Triton x-100),温箱内 37°C 反应 40 min,弃反应液,双蒸水冲洗,自然晾干,梯度酒精脱水、透明、封片,显微镜观察组织着色反应。

以大鼠小脑,样本置恒冷箱切片机切片(10 μm),同法同步作酶组织化学染色作为阳性对照,取大鼠小脑切片样本孵育于以等渗盐水替代 NADPH-d 液的孵育液内,作空白对照。

结 果

1 神经系

在钉螺头足部纵横交错的足肌及与厩相连的梭形肌纤维间,分布丰富的 NOS 强阳性神经元。神经元胞浆着色浓密,呈蓝黑色,光镜下不透光,其胞突亦呈 NOS 强阳性反应。细胞突起完整者可见神经纤维离开胞体延伸到周围肌纤维胞膜附近,并相互连接构成网络状。该类细胞以中、小型为主,形态以多角型多见(图 1)。中枢神经节中央纤维区均呈 NOS 强阳性反应;神经节周边胞体区为 NOS 反应阴性(图 2)。

2 消化系

口腔团、咽管(图 3)内壁呈 NOS 强阳性,外壁呈中等反应阳性。

3 生殖系

卵巢成熟卵细胞、各级未成熟卵细胞胞浆均呈 NOS 强阳性,胞浆着色为深蓝黑色,核空白区显著(图 4);副腺亦呈强阳性,内容物呈蓝黑色团块状。睾丸内精原细胞、精细胞和成熟精子,呈蓝褐色为 NOS 中等阳性(图 5);输精管管壁呈强阳性(图 6)。

4 血循环与呼吸系

心房、心室壁均呈 NOS 强阳性,着色呈网状(图 7)。腮叶呼吸上皮呈 NOS 中等阳性(图 8)。

5 对照试验

大鼠小脑的蓝细胞及颗粒细胞为 NOS 阳性反应;以等渗盐水取代 NADPH-d 液,切片染色呈阴性反应,证明酶试剂活性正常,反应特异。

讨 论

NO 是生物体内发现的第一个气体信使和效应分子,由于 NO 属带不配对电子的气体自由基,可广泛参与生物体多种生理、生化和病理调节,有关研究报告甚多^[3],但 NO 在软体动物,尤其是在血吸虫宿主螺的研究国内均较少见。研究 NO 在钉螺体内

活性与分布,对认识钉螺生理及代谢等有积极意义。

活体细胞内的 NO 是在 NOS 催化下,以精氨酸为底物,在有氧条件下由 NADPH 提供电子生成。NO 的生物合成是受 NOS 调节^[3]。已有研究证明, NOS 就是 NADPH-d^[4]。一般认为, NOS 可分为诱导型 NOS (Induce NOS, iNOS) 和构成型 NOS (Constitutive NOS, cNOS) 两大类^[5]。iNOS 是在诱生剂的作用下产生并被激活,参与细胞毒作用; cNOS 为细胞质固有的酶。采用 NADPH-d 酶组织化学法在钉螺体中显示 NOS,主要定位于神经、生殖、心血管等器官,可能均系 cNOS。cNOS 又可分为内皮型 NOS (eNOS) 和神经元型 (nNOS),这与钉螺 NOS 器管定位相一致。本文所采用 NADPH-d 酶组织化学法定位显示钉螺体内 NOS,为 NO 在螺体内分布的研究提供了方便易行的研究手段。

NO 是一新型的神经递质^[6],重要肌肉松弛介质^[3]。钉螺中枢神经节 NOS 活性很高,头足部肌肉间含有丰富 NOS 阳性神经元,表明 NO 在钉螺体内与神经肌肉运动和调节有关。我们在灭螺增效的研究中发现,经增效剂 B002 处理过的钉螺,头足部软体外伸,失去张力和附着能力,针刺后软体回缩困难;经 NADPH-d 酶组织化染色显示,螺足跖肌、梭形肌间 NOS 阳性神经元减少或消失,神经节 NOS 活性下降或消失^[7];表明钉螺体内的 NO 有可能是通过神经系统的作用参与肌肉运动调节,值得注意的是钉螺心脏壁上的 NOS 呈网状分布, NOS 是定位于心肌纤维,还是定位于存在于心肌间的神经元,难以定论。钉螺雌雄生殖细胞 NOS 活性均高,同样表明 NO 也直接参与钉螺生殖细胞发育与凋亡等过程。钉螺雌雄生殖腺年周期性的变化及环境因素对其影响与 NO 水平间关系的研究,对阐明钉螺某些生殖机制有着重要意义(本文图 1~8 见 255 页)。

参 考 文 献

- 1 Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate nitric oxide is an intermediate [J]. Biochemistry. 1988, 27 (24): 8 706~8 711
 - 2 李赋京著. 钉螺的解剖和比较解剖 [M]. 武汉:湖北人民出版社, 1956, 1~2
 - 3 钟慈生,孙安阳主编. 一氧化氮的生物医学 [M]. 上海:上海医科大学出版社, 1997
 - 4 贾毓生,鞠 躬. 神经系统中的一氧化氮和一氧化氮合酶 [J]. 神经解剖学杂志, 1993, 9(1): 1~6
 - 5 Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism [J]. J Biol Chem, 1993, 268: 12 231~12 234
 - 6 Culotta E. No news is good news [J]. Science, 1992, 258: 1 862~1 865
 - 7 戴建荣,梁幼生,王 锐,等. B002 对氯硝酰胺杀螺增效机理的研究 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2001, 14(1): 38~40
- 2001-02-01 收稿 2001-05-20 修回
(编辑:吴洪初)

钉螺 - 氧化氮合酶分布的酶组织化学研究

(正文见 196 - 197 页)



图1 头足部肌细胞间含丰富NOS阳性神经元($\times 200$)
Fig.1 The richest NOS positive neurons among muscle cells in the head-foot region ($\times 200$)

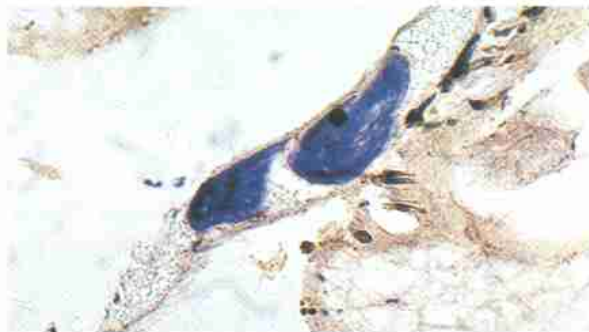


图2 中枢神经节内NOS强阳性($\times 200$)
Fig.2 The strong NOS positive reaction in the center ganglions ($\times 200$)



图3 咽管壁NOS强阳性($\times 200$)
Fig.3 The strong NOS positive reaction in the wall of pharyngeal cavity ($\times 200$)



图4 卵巢中卵细胞NOS强阳性($\times 200$)
Fig.4 The strong NOS positive reaction of ova in the ovary ($\times 200$)



图5 睾丸内精子细胞NOS阳性($\times 200$)
Fig.5 The NOS positive reaction of spermatoblasts in the testes ($\times 200$)



图6 输精管壁NOS强阳性($\times 200$)
Fig.6 The strong NOS positive reaction in the wall of ipermatocyst ($\times 200$)

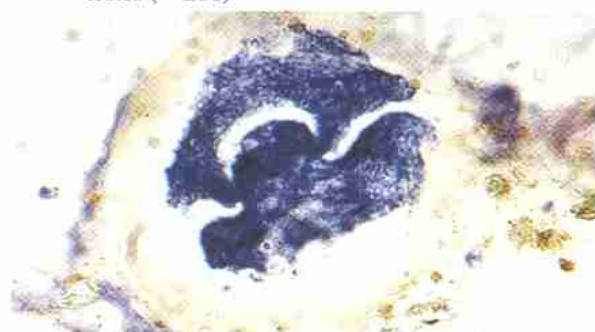


图7 心脏壁NOS强阳性($\times 200$)
Fig.7 The strong NOS positive reaction in the wall of heart ($\times 200$)



图8 腮管壁NOS阳性($\times 200$)
Fig.8 The NOS positive reaction in the wall of ctenidium ($\times 200$)