

# 密达利对湖北钉螺酶组织化学作用的观察

朱丹<sup>1</sup>, 李红军<sup>2</sup>, 刘和香<sup>1</sup>, 张仪<sup>1</sup>, 郭俭<sup>1</sup>, 梁幼生<sup>1</sup>, 周晓农<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 观察经密达利 (40% 四聚乙醛水剂) 处理的钉螺组织酶活性变化, 探讨密达利杀螺机制。方法 取湖北钉螺 60 只, 均分 2 组。实验组用 100 mg/L 密达利浸泡 2 d, 取存活的钉螺, 分离完整的软体组织, 制作冷冻切片, 用酶组织化学方法对乳酸脱氢酶 (LDH), 琥珀酸脱氢酶 (SDH), 细胞色素 C 氧化酶 (CCO), 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和一氧化氮合酶 (NOS) 进行染色, 用显微图像分析系统定量测定其平均灰度值, 每种酶均取 10 只钉螺组织切片测定其灰度值。同时设未经药物处理的湖北钉螺对照组。结果 钉螺肝组织、口囊组织的 CCO 灰度值, 实验组分别为  $0.2042 \pm 0.0463$  和  $0.1695 \pm 0.0526$ , 分别低于对照组的  $0.5556 \pm 0.0878$  和  $0.6082 \pm 0.0723$ , 两者差异有统计学意义 ( $t=12.26$ ,  $P<0.01$ ); 神经节的 AChE 灰度值, 实验组为  $0.2618 \pm 0.0330$ , 低于对照组的  $0.5100 \pm 0.0295$ , 差异有统计学意义 ( $t=18.72$ ,  $P<0.01$ )。口囊、肌纤维中的 LDH 灰度值, 实验组分别为  $0.5801 \pm 0.0982$  和  $0.4043 \pm 0.1091$ , 分别高于对照组的  $0.1798 \pm 0.0476$  和  $0.0624 \pm 0.0342$ ; 咽管的 NOS 灰度值, 实验组为  $0.3502 \pm 0.1310$ , 高于对照组的  $0.2139 \pm 0.0603$ , 差异有统计学意义 ( $t=3.41$ ,  $P<0.01$ )。肌纤维和口囊的 SDH 灰度值, 实验组分别为  $0.1835 \pm 0.0771$  和  $0.4649 \pm 0.1039$ , 与对照组间的差异无统计学意义 ( $t=0.51$ ,  $P>0.05$ )。结论 密达利能抑制钉螺神经传导和能量代谢酶活性。

**【关键词】** 密达利; 钉螺; 酶; 组织化学

中图分类号: R978.82

文献标识码: A

## Enzyme Histochemistry: The Effect of META-Li on *Oncomelania hupensis*

ZHU Dan<sup>1</sup>, LI Hong-jun<sup>2</sup>, LIU He-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, GUO jian<sup>1</sup>,  
LIANG You-sheng<sup>2</sup>, ZHOU Xiao-nong<sup>1</sup>

(1 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China; 2 Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi 214064, China)

**【Abstract】** Objective To explore the killing mechanism of META-Li against *Oncomelania hupensis* by observing the change of enzyme activity in snail tissue. Methods Sixty snails were divided into 2 groups. Snails in experiment group were immersed in META-Li (100 mg/L) for 2d and soft tissue was separated for frozen sections. Histochemical staining for the enzymes CCO, LDH, SDH, AChE and NOS was done by routine method and the average grey density was measured under microscopy. Tissue sections of 10 snails were used to detect grey density for each enzyme. Snails without META-Li treatment served as control. Results The enzyme activity of CCO and AChE in the experiment group was significantly lower than that in the control ( $t=12.26$ ,  $P<0.01$ ), that of LDH and NOS in the experiment group was significantly higher than that in the control ( $t=3.41$ ,  $P<0.05$ ). There was no significant difference on the enzyme activity of SDH between the two groups ( $t=0.51$ ,  $P>0.05$ ). Conclusion The snail-killing effect of META-Li may be relevant to the enzyme activity in energy metabolism and the blocking of the nerve transmission.

**【Key words】** META-Li; *Oncomelania hupensis*; Enzyme; Histochemistry

酶是生命活动过程中的重要催化剂, 能调节机体的生理功能和新陈代谢, 是生物体重要的信使分子和效应分子, 酶的活性变化可反映机体在生理和病理状态下细胞代谢活动的改变。琥珀酸脱氢酶 (succinate

dehydrogenase, SDH)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome C oxidase, CCO) 是能量代谢的主要酶类, 能反映生物体的能量代谢变化<sup>[1]</sup>。乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 为有机体的神经递质效应分子, 调节机体的生理活动功能<sup>[2]</sup>。瑞士龙沙公司生产的密达系列产品为低毒类

作者单位: 1 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, WHO 疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病学和媒介生物学重点实验室, 上海 200025;

2 江苏省血吸虫病防治研究所, 无锡 214064

环保型农药,对钉螺有杀灭作用,其室内喷洒 24 h 半数致死剂量为  $0.78 \text{ g/m}^2$ ,现场喷洒  $2 \text{ g/m}^2$  7 d 钉螺死亡率达到 98%<sup>[1]</sup>。但对钉螺的作用机制方面的研究国内未见报道。本研究采用酶组织化学技术<sup>[2]</sup>,观察经密达利处理后的湖北钉螺体内组织酶活性变化,探讨其杀螺机制。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 药物 密达利 (40%四聚乙醛水剂) (批号: 4041-983),由瑞士龙沙 (香港)有限公司提供。

1.3 化学试剂 硝基四氮唑蓝 (NBT)、二胺基联苯胺·盐酸 (DAB·HCl)、过氧化氢酶 C-40、细胞色素 C 型、还原型辅酶 (NADH·Na<sub>2</sub>)、还原型尼可酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH),碘化乙酰硫代胆碱 (acetyl thiocholine iodide)、曲拉通 X-100 (Triton X-100),均由华美生物工程公司提供。

1.4 仪器设备 恒温冰冻切片机 (LEICA CM1850 型, Olympus BX40, 日本),生物显微图像分析系统 (smart seape 2002 4.01 版 上海复日科技有限公司)。

1.5 实验室条件 实验室温度为  $(25 \pm 2)$ ,相对湿度为  $65\% \pm 10\%$ 。

### 2 方法

2.1 钉螺及分组 湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 采自安徽省池州市贵池区清溪河滩,7~8 旋成螺 60 只,均分 2 组。实验组用  $100 \text{ mg/L}$  密达利浸泡 2 d,对照组未经药物处理。分别选取两组存活的钉螺各 10 只,用破壳解剖法去除螺壳,挑选无损伤螺体组织制作冷冻切片,粘附于盖玻片上,室温晾干备用。

2.2 酶组织化学染色 取上述备用切片,分别进行 LDH、SDH、CCO、AChE 和 NOS 的酶组织化学染色。

2.2.1 LDH 按文献 [5] 方法操作,取上述备用切片置 10 ml 孵育液 (含 NBT、NADH·Na<sub>2</sub>、 $0.05 \text{ mol/L}$  磷酸缓冲液、乳酸钠) 中,37℃ 反应 20 min。

2.2.2 SDH 按文献 [6] 方法操作,取上述备用切片置 10 ml 孵育液 (含 NBT、 $0.2 \text{ mol/L}$  琥珀酸钠缓冲液、 $0.2 \text{ mol/L}$  磷酸缓冲液) 中,37℃ 反应 30 min。

2.2.3 CCO 按文献 [7] 方法操作,取上述备用切片置 10 ml 孵育液 (含 DAB·HCl、 $0.2 \text{ mol/L}$  磷酸缓冲液 pH 7.4、过氧化氢酶 C-40、细胞色素 C 型) 中,37℃ 反应 60 min。

2.2.4 AChE 按文献 [8] 方法操作,先将钉螺软体置 4℃ 预冷的甲醛氯化钙溶液中过夜,固定并制作钉螺组织切片,置 10 ml 孵育液 (含 A 液和 B 液的混合

液, A 液为  $0.1 \text{ mol/L}$  pH 5.5 醋酸缓冲液、碘化乙酰硫代胆碱, B 液为  $0.1 \text{ mol/L}$  枸橼酸钠缓冲液、 $30 \text{ mmol/L}$  硫酸铜溶液、 $5 \text{ mmol/L}$  铁氰化钾溶液) 中,37℃ 反应 2 h。然后在孵育液及双氧水中 37℃ 反应 10 min。

2.2.5 NOS 按文献 [9] 方法操作,取上述备用切片置于 10 ml 孵育液 ( $1 \text{ mmol/L}$  NADPH、 $0.2 \text{ mmol/L}$  NBT、 $0.1 \text{ mol/L}$  pH 7.2 Tris·HCl、0.3% Triton X-100) 中,37℃ 反应 40 min。

2.3 灰度值测定 冷冻切片染色后,经双蒸水漂洗,自然晾干,梯度乙醇脱水、透明、封片,显微镜观察组织着色反应。采用复日 FR-988 生物显微图像分析系统观察钉螺组织切片 5 种酶的基本分布,选择酶活性强的组织进行观察,根据着色深浅进行酶组织化学定量分析。

### 3 酶试剂活性检测

取健康小鼠小脑置恒温冷冻切片机切片 ( $10 \mu\text{m}$ ),同 2.2 法将切片酶组织化学染色作为阳性对照,将切片孵育于等渗盐水替代的孵育液中,作为空白对照。

### 4 统计学分析

测定上述 5 种酶的活性,每种均取 10 只钉螺组织切片,以测定的灰度值表示其酶活性,计算平均值。用 Office2003 excel 软件进行统计分析。

## 结 果

### 1 LDH

钉螺肌纤维 LDH 平均灰度值,实验组为  $0.4043 \pm 0.1091$ ,对照组为  $0.0624 \pm 0.0342$ ,两者差异有统计学意义 ( $t=10.36$ ,  $P<0.01$ )。口囊的 LDH 平均灰度值,实验组为  $0.5801 \pm 0.0982$ ,对照组为  $0.1798 \pm 0.0476$ ,两者差异有统计学意义 ( $t=12.70$ ,  $P<0.01$ ) (图 1A~D)。

### 2 SDH

钉螺肌纤维的 SDH 平均灰度值,实验组为  $0.1835 \pm 0.0771$ ,对照组为  $0.2042 \pm 0.1353$ ,两者差异无统计学意义 ( $t=0.51$ ,  $P>0.05$ )。口囊的 SDH 平均灰度值,实验组为  $0.4649 \pm 0.1039$ ,对照组为  $0.4651 \pm 0.1559$ ,两者差异无统计学意义 ( $t=0.005$ ,  $P>0.05$ ) (图 1E~H)。

### 3 CCO

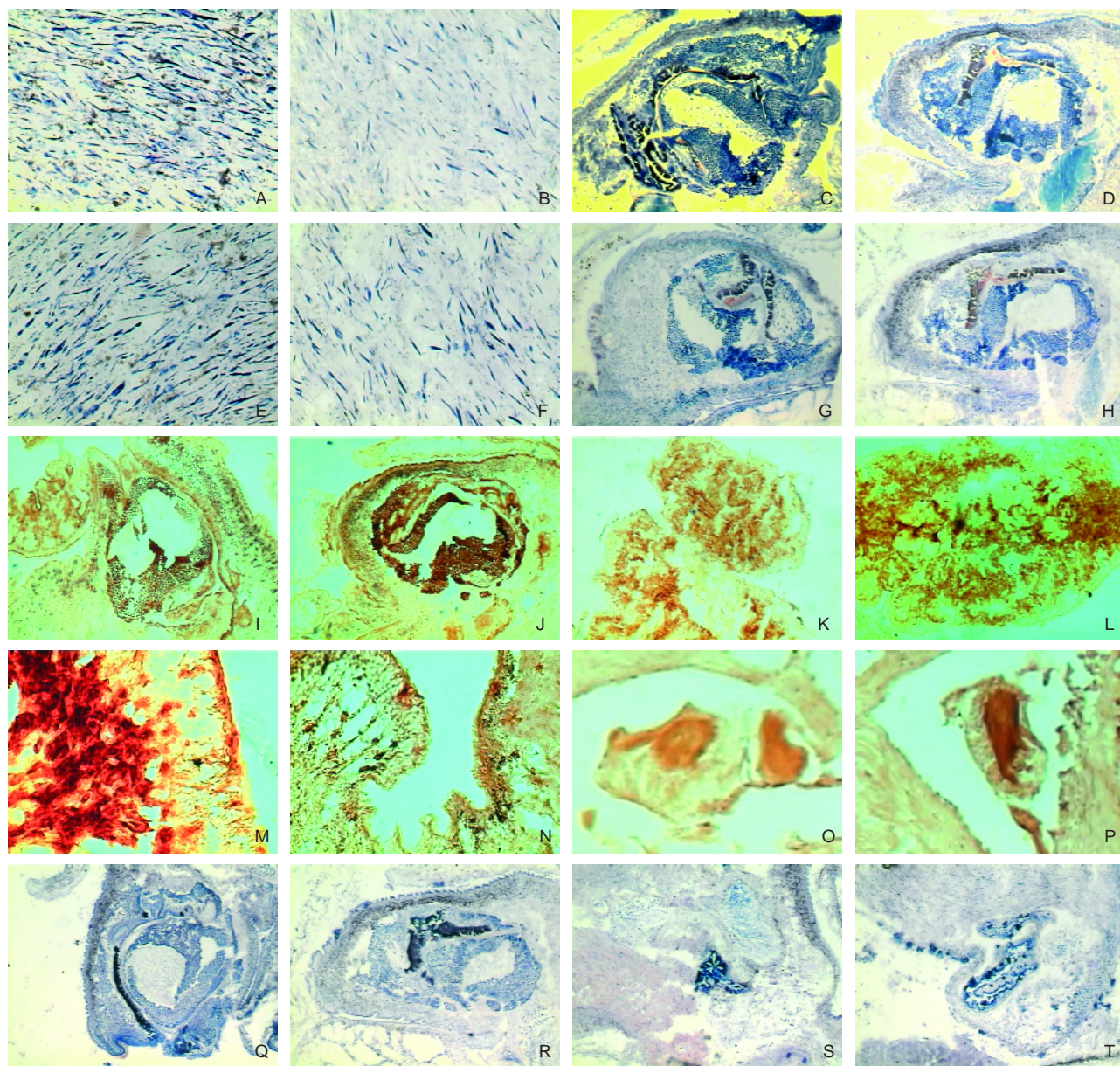
在钉螺口囊的 CCO 平均灰度值,实验组为  $0.1695 \pm 0.0526$ ,低于对照组  $0.6082 \pm 0.0723$ ,两者间差异有统



计学意义 ( $t=16.70, P<0.01$ )。肝脏部位的 CCO 平均灰度值, 实验组为  $0.2042 \pm 0.0463$ , 低于对照组的  $0.5556 \pm 0.0878$ , 两者间差异有统计学意义 ( $t=12.26, P<0.01$ ) (图 11 ~ 12)。

#### 4 AChE

钉螺表膜的 AChE 平均灰度值, 实验组为  $0.5928 \pm 0.1315$ , 高于对照组的  $0.1412 \pm 0.0205$ , 两者差异有统计学意义 ( $t=11.75, P<0.01$ )。而神经节的



A: 对照组肌纤维 LDH ( $\times 200$ ), B: 实验组肌纤维 LDH ( $\times 200$ ), C: 对照组口囊 LDH ( $\times 40$ ), D: 实验组口囊 LDH ( $\times 40$ ), E: 对照组肌纤维 SDH ( $\times 200$ ), F: 实验组肌纤维 SDH ( $\times 200$ ), G: 对照组口囊 SDH ( $\times 40$ ), H: 实验组口囊 SDH ( $\times 40$ ), I: 对照组口囊 CCO ( $\times 40$ ), J: 实验组口囊 CCO ( $\times 40$ ), K: 对照组肝脏 CCO ( $\times 40$ ), L: 实验组肝脏 CCO ( $\times 40$ ), M: 对照组表膜 AChE ( $\times 200$ ), N: 实验组表膜 AChE ( $\times 200$ ), O: 对照组神经节 AChE ( $\times 40$ ), P: 实验组神经节 AChE ( $\times 40$ ), Q: 对照组口囊 NOS ( $\times 40$ ), R: 实验组口囊 NOS ( $\times 40$ ), S: 对照组咽管 NOS ( $\times 40$ ), T: 实验组咽管 NOS ( $\times 40$ )。

A: LDH in muscle of control group ( $\times 200$ ), B: LDH in muscle of experiment group ( $\times 200$ ), C: LDH in jaws theca of control group ( $\times 40$ ), D: LDH in jaws theca of experiment group ( $\times 40$ ), E: SDH in Muscle of control group ( $\times 200$ ), F: SDH in Muscle of experiment group ( $\times 200$ ), G: SDH in jaws theca of control group ( $\times 40$ ), H: SDH in jaws theca of experiment group ( $\times 40$ ), I: CCO in jaws theca of control group ( $\times 40$ ), J: CCO in jaws theca of experiment group ( $\times 40$ ), K: CCO in Liver of control group ( $\times 40$ ), L: CCO in Liver of experiment group ( $\times 40$ ), M: AChE in Velum of control group ( $\times 200$ ), N: AChE in Velum of experiment group ( $\times 200$ ), O: AChE in ganglion of control group ( $\times 40$ ), P: AChE in ganglion of experiment group ( $\times 40$ ), Q: NOS in jaws theca of control group ( $\times 40$ ), R: NOS in jaws theca of experiment group ( $\times 40$ ), S: NOS in Pharyngeal cavity of control group ( $\times 40$ ), T: NOS in Pharyngeal cavity of experiment group ( $\times 40$ )。

图 1 密达利对钉螺酶组织化学观察

Fig.1 Enzyme histochemical observation of snails treated by META-Li



AChE 平均灰度值, 实验组为  $0.2618 \pm 0.0330$ , 低于对照组的  $0.5100 \pm 0.0295$ , 两者差异有统计学意义 ( $t=18.72$ ,  $P<0.01$ ) (图 1M-P)。

## 5 NOS

钉螺口囊的 NOS 平均灰度值, 实验组和对照组分别为  $0.5660 \pm 0.0955$  和  $0.5464 \pm 0.0863$ , 两组间差异无统计学意义 ( $t=0.59$ ,  $P>0.05$ )。咽管的 NOS 平均灰度值, 实验组为  $0.3502 \pm 0.1310$  高于对照组的  $0.2139 \pm 0.0603$ , 两者差异有统计学意义 ( $t=3.41$ ,  $P<0.01$ ) (图 1Q-T)。

## 6 酶试剂活性检测

小鼠小脑的蓝细胞及颗粒细胞为阳性反应; 以等渗盐水取代孵育液, 组织切片染色呈阴性反应, 证明酶试剂活性正常, 反应具有特异性。

## 讨 论

密达利对钉螺的酶组织化学的作用, 本研究主要观察与能量代谢和神经递质有关酶类的活性。LDH、SDH 和 CCO 广泛分布于钉螺组织中, 是有机体能量代谢中重要的催化酶之一, 能反映生物体的新陈代谢状况。LDH 分布于所有生物体细胞, 是生物无氧酵解代谢途径的代表酶。SDH 是重要的脱氢酶之一, 通常用于反映有氧氧化状况, CCO 是呼吸链集合体中电子传递系的末端酶, 参与细胞有氧代谢, 是线粒体的标志酶之一<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, 实验组钉螺口囊和肌纤维组织中的 LDH 活性明显下降, 而 SDH 的活性无显著变化。表明组织中糖元无氧酵解中乳酸脱氢酶活性受到抑制, 减少了丙酮酸的生成, 抑制了有氧氧化作用, 使得 SDH 酶的活性未发生变化。实验组钉螺肝组织和口囊组织中 CCO 活性明显上升, 表明糖代谢受到药物抑制后, 机体代偿性激活蛋白和脂类代谢, 增强了氧化磷酸化作用, 产生能量以弥补机体能量供应不足。糖代谢受到抑制, 蛋白质和脂类代谢的激活, 加速了钉螺的能量耗竭, 抑制钉螺能量供应致使钉螺死亡可能是密达利的杀螺作用机制之一, 能量耗竭致死过程相对较长, 是密达利杀螺作用较缓慢的原因之一。

AChE 的活性是神经细胞功能的重要指标, 实验组钉螺神经节的 AChE 活性明显增加, 导致钉螺神经传导介质乙酰胆碱 (ACh) 分解加速, 神经传导功能受到抑制, 肌肉运动功能受到抑制而失去正常活动能力, 密达利抑制钉螺神经节传导是其抑制钉螺上爬的

作用机制之一。NO 是一种神经递质, 为重要平滑肌松弛介质。NO 的生物合成是受 NOS 调节<sup>[2,11]</sup>。实验组钉螺咽管的 NOS 活性明显下降, 减少 NO 的合成并减少平滑肌松弛作用, 为 AChE 活性增加导致肌肉麻痹瘫痪后的机体代偿性减少 NOS 产生, 从而增加了肌肉收缩作用。AChE 和 NOS 间协同调节作用值得进一步探索。

## 参 考 文 献

- [1] Zhou AR, Cha XL. Biochemistry [M]. Beijing: Science Press, 2004. 52. (in Chinese)  
(周爱儒, 查锡良. 生物化学 [M]. 第 6 版: 北京人民出版社, 2004. 52.)
- [2] Zhong CS, Sun AY. NO Biomedicine [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1997. 60-66, 82-83. (in Chinese)  
(钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997. 60-66, 82-83.)
- [3] Zhu D, Zhou XN, Zhang SQ, et al. Study on the molluscicidal effect of META-Li against *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2006, 24: 200-203. (in Chinese)  
(朱丹, 周晓农, 张世清, 等. 密达利杀灭湖北钉螺效果的研究 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2006, 24: 200-203.)
- [4] Li HJ, Liang YS, Gong MQ, et al. Enzyme-histochemical observation on influence of nicosamide suspension in cercariae of *Schistosoma japonicum* [J]. Chin J Schisto Dis Control, 2005, 17: 190-194. (in Chinese)  
(李洪军, 梁幼生, 宫明强, 等. 氯硝柳胺悬浮剂对日本血吸虫尾蚴影响的酶组织化学观察 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2005, 17: 190-194.)
- [5] Chayan J. Practical Histochemistry [M]. London: John Wiley & Sons, 1974. 70-73.
- [6] Nachlas MM, Tsou KC, De Souza E, et al. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole [J]. J Histochem Cytochem, 1957, 5: 420.
- [7] Poylon RO, Brnko PV. Oxygen regulated transcription of cytochrome C and cytochrome C oxidase genes in yeast [J]. Biochem Biophys Acta, 1992, 1101: 252-256.
- [8] Kazuo Ogawa, Kazuo Nakane. Technology of Enzyme-Histochemistry [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1989. 41-43. (in Chinese)  
(小川和郎, 中根一穗. 酶组织化学技术 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1989. 41-43.)
- [9] Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases [J]. J Histochem Cytochem, 1964, 12: 219-221.
- [10] Zhou SL, Lin JY, Jiang MS. Science on *Schistosoma* [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2001. 27-28, 44-47. (in Chinese)  
(周述龙, 林建银, 蒋明森. 血吸虫学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2001. 27-28, 44-47.)
- [11] Zhou XN, Zhang Y, Hong QB, et al. Science on *Oncomelania* Snail [M]. Beijing: Science Press, 2005. 97-114. (in Chinese)  
(周晓农, 张仪, 洪青标, 等. 实用钉螺学 [M]. 北京: 科学出版社, 2005. 97-114.)
- [12] Liang YS, Dai JR, Zhu YC, et al. An enzyme-histochemical study of distribution of the nitric oxide synthase in *Oncomelania hupensis* [J]. Chin J Schisto Control, 2001, 13: 196-197. (in Chinese)  
(梁幼生, 戴建荣, 朱荫昌, 等. 钉螺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.)

(收稿日期: 2006-11-13 编辑: 富秀兰)