

# 不同发育期贝居腹盾吸虫体内 乙酰胆碱酯酶分布特征

张浩<sup>①</sup> 柏青杨<sup>①</sup> 杜凤霞<sup>①</sup> 李玉霞<sup>②</sup> 杨秀静<sup>①</sup>

① 齐齐哈尔医学院医学技术学院 齐齐哈尔 161006; ② 齐齐哈尔五官医院 齐齐哈尔 161006

**摘要:** 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 被证明存在于多种吸虫体内, 但是关于 AChE 在吸虫发育过程中的分布变化情况却少有报道。本实验以贝居腹盾吸虫 (*Aspidogaster conchicola*) 为研究对象, 选取不同发育阶段的虫体, 分别采用醋酸洋红染色和乙酰胆碱酯酶组织化学染色方法, 对比处于不同发育阶段虫体的正常结构及乙酰胆碱酯酶分布特征, 了解乙酰胆碱酯酶在吸虫发育过程中的分布变化规律。结果显示, 从河蚌 (*Anodonta woodiana*) 体内获得的虫体根据内部器官的发育程度, 可以分为 4 个不同发育阶段, 即幼虫阶段 I、幼虫阶段 II、成虫阶段 I、成虫阶段 II。乙酰胆碱酯酶的分布在不同发育阶段存在着明显差异, 幼虫阶段 I 的睾丸及阴茎囊基部最先出现乙酰胆碱酯酶阳性反应, 幼虫阶段 II 在子宫末端膨大部位出现阳性反应; 成虫阶段 I 的卵黄腺、输卵管出现阳性反应, 并且随着虫体的发育上述部位的阳性反应逐渐加强。而该吸虫的附着、消化、排泄器官在发育早期即出现较强的阳性反应, 并伴随虫体发育全过程。该吸虫的神经系统在幼虫早期既已具备脑神经节、主要神经干等结构, 而完整、复杂的中枢神经结构至成虫阶段才得以清晰显现。结果表明, 乙酰胆碱酯酶的分布区域及反应程度随着虫体的发育而出现变化。

**关键词:** 贝居腹盾吸虫; 发育; 乙酰胆碱酯酶

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 04-655-08

## Distribution of Acetylcholinesterase at Different Development Stages of *Aspidogaster conchicola*

ZHANG Hao<sup>①</sup> BAI Qing-Yang<sup>①</sup> DU Feng-Xia<sup>①</sup> LI Yu-Xia<sup>②</sup> YANG Xiu-Jing<sup>①</sup>

① Medical Technology College of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006; ② Qiqihar ENT Hospital, Qiqihar 161006, China

**Abstract:** It has been proved the acetylcholinesterase (AChE) exists in various trematodes, but little is known about its distribution change during their development process. A total of 32 trematodes, of which 12 were at larval stage and 20 were adult, were collected for examination. The acetocarmine staining and acetylcholinesterase histochemical staining were respectively conducted after the trematodes were fixed and sliced, and the distribution of AChE was observed under a light microscope. The results showed that the

**基金项目** 黑龙江省教育厅 2013 年度科学技术研究 (面上) 项目 (No. 12531781);

**第一作者介绍** 张浩, 男, 教授; 研究方向: 寄生虫学; E-mail: zhbysw@aliyun.com。

收稿日期: 2015-10-27, 修回日期: 2016-02-05 DOI: 10.13859/j.cjz.201604017

development of trematodes could be divided into 4 stages: larval stage I, larval stage II, adult stage I, and adult stage II. The distribution patterns of AChE were significantly different at different development stages (Table 1). The testis and basal penis sac at larval stage I first displayed AChE-positive staining, and the bulge metraterm showed positive-staining at larval stage II; yolk gland and fallopian tube showed positive staining at adult stage I, and positive staining was gradually strengthened with the development of the trematodes. Its attaching, digestive and excretory organs showed strong positive staining from early development stages, and such staining existed throughout the whole development process. The nervous system at larval stage I showed cerebral ganglion, main nerve trunk structure, and complete and complex central nervous structure clearly developed at adult stage. The results suggest that the distribution pattern and staining intensity of AChE changes with the development of the trematodes.

**Key words:** *Aspidogaster conchicola*; Development; Acetylcholinesterase (AChE)

盾盘亚纲是吸虫纲中较为原始的一个类群，与复殖亚纲存在着较近的亲缘关系。多数学者认为它们是近代复殖类吸虫的祖先“原复殖类” (Proto-digenean) 的模式 (Тимофеева 1975, 唐仲璋等 1980, Rohde 2001, 2002, 唐崇惕等 2005)。这类吸虫的发育过程没有世代交替和宿主转换，吸虫腹面具有一个大的、结构复杂的盾盘附着器 (adhesive disc)。贝居腹盾吸虫 (*Aspidogaster conchicola*) 是盾盘亚纲的代表种，主要寄生于河蚌 (*Anodonta* sp.) 的围心腔内，其发育过程不需要转换宿主，在河蚌体内可以获得不同发育阶段的虫体。有关这种吸虫的研究报道较少，Petkevičiūtė (2001) 曾报道它的染色体核型，Gao 等 (2003) 用扫描电镜技术观察、比较了贝居腹盾吸虫和另外一种盾盘吸虫 *A. ijimai* 的形态差异。Timofeeva (1971) 最早利用乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 组织化学定位的方法显示了贝居腹盾吸虫神经系统的解剖结构，但并未提及这种物质在内部器官的分布。最近相关研究报道了，神经递质 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 的在贝居腹盾吸虫体内的分布 (Tolstenkov et al. 2010)。乙酰胆碱酯酶是一种丝氨酸水解酶，它的主要功能是在胆碱能神经突触处快速水解神经递质乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh)，而终止其对突触后膜的兴奋作用，保证神经信号在生物体内的正

常传递。近年因乙酰胆碱酯酶 (AChE) 在研制杀虫剂和治疗神经疾病的药物方面具有重要意义，而备受研究者的关注 (万选才等 1999, 周伯儒等 2012, Pérez-Legaspi et al. 2015)。乙酰胆碱酯酶 (AChE) 已被证明存在于包括盾盘吸虫在内的多种吸虫体内，但是这种物质在吸虫幼虫阶段的分布情况却鲜有报道 (张浩等 2010)。本研究以贝居腹盾吸虫这种原始吸虫为模式动物，利用乙酰胆碱酯酶的组织化学定位方法，分析不同阶段吸虫体内乙酰胆碱酯酶的分布特点及变化规律，为深入研究乙酰胆碱酯酶 (AChE) 在该种吸虫体内的作用机制提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 虫体获取

在黑龙江省嫩江流域齐齐哈尔段捕获野生河蚌，送实验室解剖，在围心腔内检获虫体。虫体置生理盐水中，4℃冰箱中保存备用。实验前 10% 中性福尔马林固定。

### 1.2 主要实验试剂和仪器

碘化乙酰硫代胆碱购自瑞士 Fluka 公司，洋红 (胭脂红) 购自上海化学试剂公司。生物显微镜 (CX31-RBSF) 和显微描绘器 (U-DA7G25730) 为日本 Olympus 公司产品，电子天平 (FA2004N) 为上海精密科学仪器有限公司产品。

### 1.3 染色方法

采用张浩等(2010)的方法,取冲洗过夜的虫体,蒸馏水清洗3次,每组5或6只,置于作用液(含碘化乙酰硫代胆碱 12.5 mg、0.06 mol/L 醋酸钠 15.8 ml、0.1 mol/L 醋酸 0.5 ml、0.1 mol/L 柠檬酸钠 1.2 ml、30 mmol/L 硫酸铜 2.5 ml、5 mmol/L 铁氰化钾 2.5 ml)中,室温下染色3~6 h。生物显微镜下观察染色效果,当乙酰胆碱酯酶活性部位呈现红棕色或深棕色、整体结构显示清晰时(约6 h),从作用液中挑取虫体,置蒸馏水中。虫体反复冲洗后,经逐级酒精脱水、透明、封片后镜下观察、测量、显微摄影(张浩等 2010)。常规染色采用醋酸洋红染色法,操作方法按参照陈佩惠(1988)所述。

### 1.4 虫体发育阶段的鉴定方法

先在解剖镜下,根据虫体大小进行初步筛选,然后将清洗过的虫体固定、染色、透明、封片,显微镜下根据虫体内睾丸、卵巢、子宫、卵黄腺等生殖器官的发育状态来确定虫体的发育阶段。对不同发育阶段虫体分别统计其长度范围以及长和宽的平均值,以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。

## 2 结果

### 2.1 幼虫阶段

幼虫阶段个体微小、生殖器官发育不完备,该阶段的突出特征是未出现卵黄腺(vitelline glands)这一结构。此阶段虫体长度1.1~2.1 mm,虫体平均大小(长 $\times$ 宽)为(1.47 $\pm$ 0.31) mm $\times$ (0.62 $\pm$ 0.11) mm ( $n=12$ )。

**2.1.1 幼虫常规染色的形态特征** 虫体发育早期(幼虫阶段 I),可观察到口、咽(pharynx)、肠道(caeca)、盾盘附着器(adhesive disc)等器官。已具备雌、雄生殖器官的雏形,但睾丸、卵巢相距较近,较难区分。输卵管、子宫以及输精管、阴茎囊等呈并行的管状,向体前伸展并汇合于附着器前缘的生殖孔(genital pore)(图1)。随着虫体的发育,幼虫阶段 II 可以较

明确地区分出雄性的睾丸、输精管、阴茎囊和阴茎囊基部的前列腺;雌性的卵巢、输卵管、子宫及其末段的膨大等结构。但幼虫阶段尚未出现卵黄腺(图2)。

**2.1.2 幼虫阶段乙酰胆碱酯酶的分布特征** 幼虫的2个脑神经节(cranial ganglia)以及由脑神经节向体前和体后发出的神经干、附着器内神经网都呈乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性,显深棕色。幼虫的内部器官如消化系统的咽、肠道和排泄系统的2条主排泄管(excretory duct)也呈乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性,而在醋酸洋红染色的标本中未观察到这两条排泄管。在幼虫阶段 I,虫体的睾丸出现弱的乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性,同时阴茎囊(cirrus pouch)的基部也出现阳性反应(图1);在幼虫阶段 II,睾丸和阴茎囊的基部阳性反应增强,显深棕色,同时子宫(uterus)末段的膨大部位也出现弱的乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性,呈淡棕色(图2)。在幼虫阶段 II 的常规染色标本中可以分辨出卵巢,但在组织化学染色标本中该部位并未出现乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性反应。

### 2.2 成虫阶段

成虫已具有完整的生殖器官,各生殖器官在形态学上清晰可辨。此阶段的明显标志是出现了卵黄腺。根据子宫内是否出现虫卵,又可将成虫分为成虫阶段 I 和成虫阶段 II。

**2.2.1 成虫常规染色的形态特征** 成虫阶段 I 的虫体长度1.3~2.4 mm,平均大小为(1.83 $\pm$ 0.37) mm $\times$ (0.72 $\pm$ 0.16) mm ( $n=10$ )。卵黄腺滤泡状,排列在虫体两侧,起于虫体中部,延伸至肠道末端,子宫内未见虫卵(图3)。成虫阶段 II 的虫体子宫内开始出现虫卵,且不断增多。阴茎囊和子宫发育良好,一些虫体在子宫末段或可发现待排出的虫卵,阴茎肌肉质,可以伸出阴茎囊(图4)。成虫阶段 II 的虫体长度1.75~3.75 mm,平均大小为(3.13 $\pm$ 0.56) mm $\times$ (1.07 $\pm$ 0.15) mm ( $n=10$ )。

**2.2.2 成虫阶段乙酰胆碱酯酶的分布特征** 成虫阶段的睾丸显色较幼虫阶段明显加深。整个

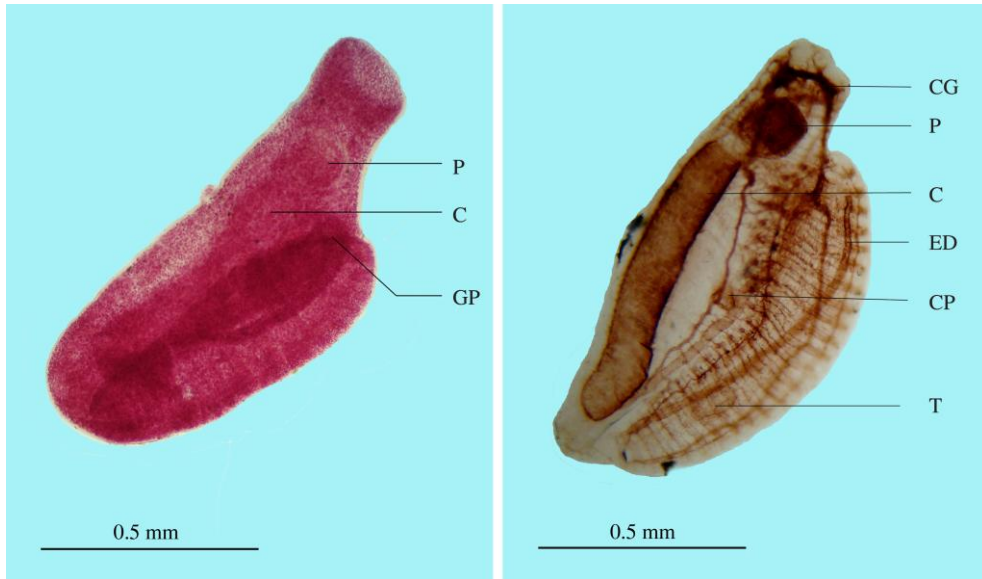


图 1 醋酸洋红染色（左）和组织化学染色（右）的幼虫阶段 I

Fig. 1 Acetic acid carmine staining (the left) and histochemical staining (the right) of larval stage I trematodes

C. 肠; CG. 脑神经节; CP. 阴茎囊; ED. 排泄管; GP. 生殖孔; P. 咽; T. 睾丸。

C. Caeca; CG. Cranial ganglia; CP. Cirrus pouch; ED. Excretory duct; GP. Genital pore; P. Pharynx; T. Testis.

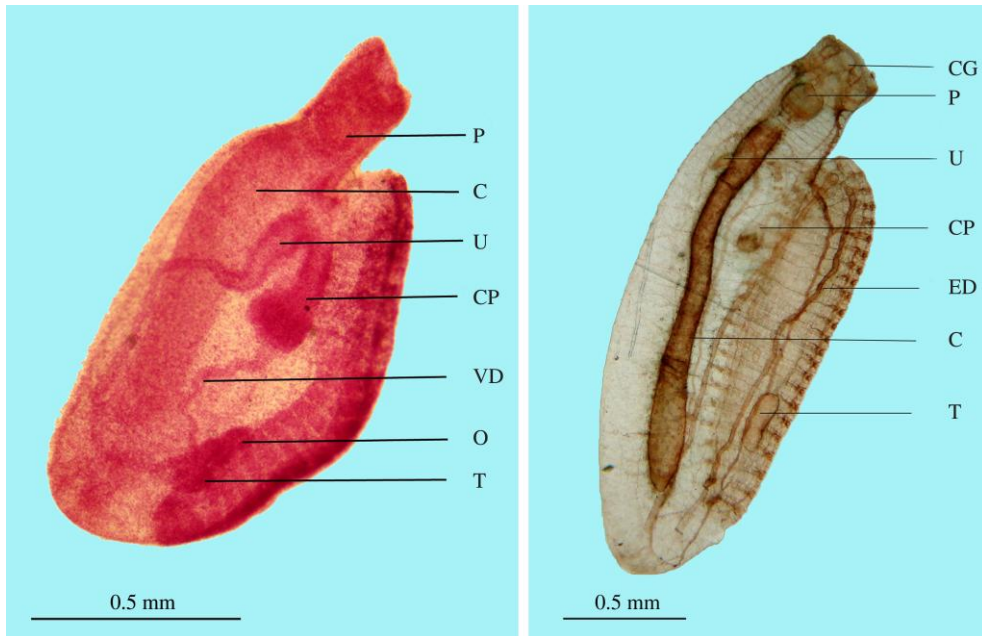


图 2 醋酸洋红染色（左）和组织化学染色（右）的幼虫阶段 II

Fig. 2 Acetic acid carmine staining (the left) and histochemical staining (the right) of larval stage II trematodes

C. 肠; CG. 脑神经节; CP. 阴茎囊; ED. 排泄管; O. 卵巢; P. 咽; T. 睾丸; U. 子宫; VD. 输精管。

C. Caeca; CG. Cranial ganglia; CP. Cirrus pouch; ED. Excretory duct; O. Ovary; P. Pharynx; T. Testis; U. Uterus; VD. Vas deferens.

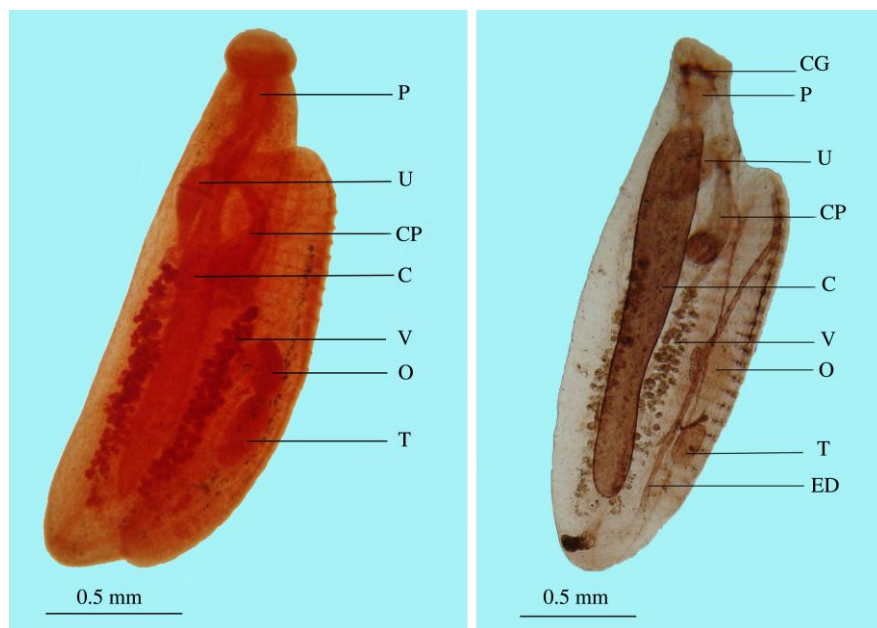


图 3 醋酸洋红染色（左）和组织化学染色（右）的成虫阶段 I

Fig. 3 Acetic acid carmine staining (the left) and histochemical staining (the right) of adult stage I trematodes

C. 肠; CG. 脑神经节; CP. 阴茎囊; ED. 排泄管; O. 卵巢; P. 咽; T. 睾丸; U. 子宫; V. 卵黄腺。

C. Caeca; CG. Cranial ganglia; CP. Cirrus pouch; ED. Excretory duct; O. Ovary; P. Pharynx; T. Testis; U. Uterus; V. Vitelline glands.



图 4 醋酸洋红染色（左）和组织化学染色（右）的成虫阶段 II

Fig. 4 Acetic acid carmine staining (the left) and histochemical staining (the right) of adult stage II trematodes

C. 肠; CG. 脑神经节; CP. 阴茎囊; ED. 排泄管; O. 卵巢; P. 咽; T. 睾丸; U. 子宫; V. 卵黄腺。

C. Caeca; CG. Cranial ganglia; CP. Cirrus pouch; ED. Excretory duct; O. Ovary; P. Pharynx; T. Testis; U. Uterus; V. Vitelline gland.

阴茎囊出现阳性反应，基部呈深棕色，其他部位呈浅棕色，而幼虫阶段仅仅基部呈现阳性反应。子宫末段明显膨大，并出现弱阳性反应，呈浅棕色。成虫早期出现的卵黄腺也呈明显的阳性反应（图 5a）。成虫的卵巢一般不着色，而与之相连的输卵管却可以出现较强的阳性反应，输卵管呈明显的棕色，且输卵管内的隔膜也清晰可辨（图 5a）。成虫阶段 I 子宫内尚未出现虫卵，但随着虫体发育至成虫阶段 II，子

宫内的虫卵亦呈乙酰胆碱酯酶（AChE）阳性，显淡棕色（图 5b）。

不同发育阶段虫体生殖器官的乙酰胆碱酯酶分布差异见表 1。

### 2.3 不同发育阶段虫体神经结构的差异

**2.3.1 中枢神经结构** 中枢神经由 1 对脑神经节、脑神经节之间的神经联合以及由脑神经节向体前和体后发出的神经干组成。幼虫和成虫的脑神经节、神经联合以及 1 对后腹神经干（这

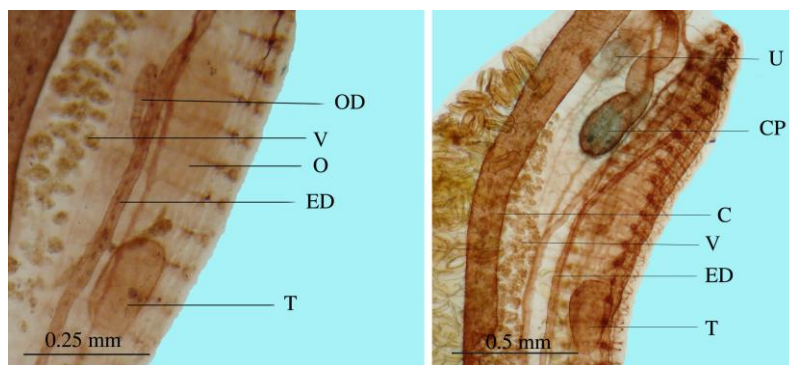


图 5 成虫阶段 I（左）和 II（右）的生殖器官

Fig. 5 Reproductive organs of the adult stage I (the left) and II (the right) trematodes

C. 肠; CP. 阴茎囊; ED. 排泄管; O. 卵巢; OD. 输卵管; T. 睾丸; U. 子宫; V. 卵黄腺。

C. Caeca; CP. Cirrus pouch; ED. Excretory duct; O. Ovary; OD. Oviduct; T. Testis; U. Uterus; V. Vitelline glands.

表 1 不同发育阶段虫体生殖器官乙酰胆碱酯酶（AChE）分布区域的比较

Table 1 Comparison of acetylcholinesterase (AChE) distribution in reproductive organs at different development stages of trematodes

分布区域 Distribution area	幼虫 I Larval stage I	幼虫 II Larval stage II	成虫 I Adult stage I	成虫 II Adult stage II
睾丸 Testis	+	+	+	+
阴茎囊 Cirrus pouch	+	+	+	+
卵巢 Ovary	-	-	-	-
输卵管 Oviduct	-	-	+	+
卵黄腺 Vitelline glands	-	-	+	+
子宫（末段） Uterus (endpiece)	-	+	+	+
虫卵 Eggs	-	-	-	+

+ 阳性反应; - 阴性反应。+ AChE positive reaction, - AChE negative reaction.

对神经干通过多对短的神支与附着器内的神经网络相联)呈深棕色。成虫的体前神经干及其分支清晰可辨,并在口孔周围形成1个“花边状”的围口神经环(commisural terminalais anterior);幼虫虽然可以观察到体前神经干,但是较细的分支和围口神经环并不清晰(图6)。

**2.3.2 盾盘附着器上的神经网络** 盾盘附着器的神经网络在虫体发育初期就已经具备雏形,其神经分布包括环绕整个吸附器的环行神经、横向成对的神经联合,它们共同构成近似梯形的神经网络。随着虫体的发育,附着器面积逐渐增大,内部凹槽数量不断增多,但神经分布的基本模式不变。该吸虫的边缘器(marginal organ)规律地分布在吸附器的周边,圆形、呈深棕色(图1, 4, 5)。

### 3 讨论

Williams (1942)对贝居腹盾吸虫的发育阶段进行过研究,他根据该吸虫腹吸盘的发育情况及虫体大小将幼虫分为4个阶段。但是文中未提及生殖器官的发育状况,内部结构仅仅提到了排泄系统。本文作者在对贝居腹盾吸虫活体的观察中发现,腹吸盘发育成熟较早,而且与生殖器官的发育并不同步,因而以生殖器官的发育状态来鉴别发育期更客观。本实验显

示,贝居腹盾吸虫发育早期雌雄生殖器官在形态学上难以区分;进而卵黄腺的出现又可将虫体发育分为不同的阶段;而子宫内虫卵的出现则标志着个体发育进入完全成熟阶段。

不同发育阶段的虫体,其生殖系统乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性反应部位有明显的差异,幼虫早期仅在睾丸和阴茎囊基部出现弱阳性反应。随着虫体的发育,阳性反应逐渐加强并且扩展到整个阴茎囊,并且在子宫末段膨大部位也出现阳性反应。而在生殖器官发育完备的成虫期,输卵管、卵黄腺和子宫末段也出现了阳性反应。这个结果提示,在同一体内部的雌性、雄性生殖器官发育并不同步,雄性生殖器官可能更早出现与乙酰胆碱酯酶(AChE)相关的生理功能。但在整个发育过程中卵巢并未出现阳性反应或仅仅出现较弱的阳性,而输卵管部却可出现较强的乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性,这种现象的原因还有待于探讨。Tolstakov等(2010)对神经递质5-羟色胺(5-HT)的研究显示,在阴茎囊和子宫末段的膨大区域存在着密集的5-羟色胺能神经网络,结合本实验结果提示这些部位可能不只存在1种神经递质。

乙酰胆碱酯酶(AChE)主要存在于胆碱能神经末梢突触间隙,它与乙酰胆碱(ACh)受体一起参与完成神经突触之间以及神经与肌肉突触之间动作电位的传递(周伯儒等 2012)。

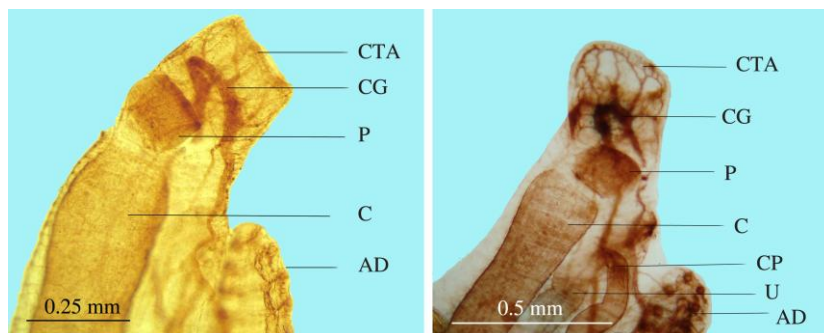


图6 幼虫(左)和成虫(右)头部神经侧面观

Fig. 6 Nerves in the head (lateral view) at larval (the left) and adult (the right) stages

AD. 盾盘附着器; C. 肠; CG. 脑神经节; CTA. 围口神经环; CP. 阴茎囊; P. 咽; U. 子宫。

AD. Adhesive disc; C. Caeca; CG. Cranial ganglia; CTA. Commisural terminalais anterior; CP. Cirrus pouch; P. Pharynx; U. Uterus.

在本次实验中,有肌肉组织分布的咽、肠、排泄管等部位都出现乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性反应,提示胆碱酯酶可能与上述器官的肌肉运动相关。另外,幼虫和成虫的脑神经节、主要神经干、附着器上的神经网络等都出现乙酰胆碱酯酶(AChE)阳性反应,说明这种物质广泛存在于吸虫的神经系统。至于上述结构是否存在胆碱能神经元还有待于进一步实验证实。

### 参 考 文 献

- Gao Q, Nie P, Yao W J. 2003. Scanning electron microscopy of *Aspidogaster ijimai* Kawamura, 1913 and *A. conchicola* Baer, 1827 (Aspidogastrea, Aspidogastridae) with reference to their fish definitive-host specificity. *Parasitology Research*, 91(6): 439–443.
- Pérez-Legaspi I A, Rico-Martínez R, Quintanar J L. 2015. Reduced expression of exocytotic proteins caused by anti-cholinesterase pesticides in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Monogononta). *Brazilian Journal of Biology*, 75(3): 759–765.
- Petkevičiūtė R. 2001. Chromosomes of *Aspidogaster conchicola*. *Journal of Helminthology*, 75(3): 295–297.
- Rohde K. 2001. The Aspidogastrea: an archaic group of Platyhelminthes // Littlewood D T J, Bray R A. *Interrelationships of the Platyhelminthes*. London: Taylor and Francis, 159–167.
- Rohde K. 2002. Subclass Aspidogastrea Faust & Tang, 1936 // Gibson D I, Jones A, Bray R A. *Keys to Trematoda. Volume I*. London: CABI and The Natural History Museum, 5–14.
- Timofeeva T A. 1971. The structure of the nervous system of *Aspidogaster conchicola* K. Baer, 1827 (Trematoda, Aspidogastrea). *Parasitology*, 5(6): 517–523.
- Tolstakov O, Terenina N, Kreshchenko N, et al. 2010. The pattern of FMRFamide and serotonin immunoreactive elements in the nervous system of *Aspidogaster conchicola* K. Baer, 1827 (Aspidogastrea, Aspidogastridae). *Belgian Journal of Zoology*, 140 (Suppl): 133–136.
- Williams C O. 1942. Observations on the life history and taxonomic relationships of the trematode *Aspidogaster conchicola*. *Journal of Parasitology*, 28(6): 467–475.
- Тимофеева Т А. 1975. Об Эволюции и Филогении Аспидогастрид. *Паразитология*, 9: 105–111.
- 陈佩惠. 1988. 人体寄生虫学实验技术. 北京: 科学出版社, 15–16.
- 唐崇惕, 唐仲璋. 2005. 中国吸虫学. 福建: 福建科学技术出版社, 261–297.
- 唐仲璋, 唐崇惕. 1980. 两种盾盘吸虫的生活史及吸虫纲系统发生的讨论. *水生生物学集刊*, 7(2): 153–169.
- 万选才, 杨天祝, 徐承焘. 1999. 现代神经生物学. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 122–129.
- 张浩, 张威, 杜凤霞, 等. 2010. 二种盾盘吸虫 *Aspidogaster conchicola* 和 *Lophotaspis orientalis* (Subclass Aspidogastrea) 神经系统的比较研究. *四川动物*, 29(6): 774–777.
- 周伯儒, 卢慧菀, 曹慧玲, 等. 2012. 乙酰胆碱酯酶分子研究进展. *生物技术通讯*, 23(1): 148–152.