

- [3] Pradhan A, Tripathi AK, Desai PV, *et al.* Structure and function of *Plasmodium falciparum* malate dehydrogenase; role of critical amino acids in co-substrate binding pocket [J]. *Biochimie*, 2009, 91(11-12): 1509-1517.
- [4] Zheng N, Xu J, Wu Z, *et al.* *Clonorchis sinensis*: molecular cloning and functional expression of novel cytosolic malate dehydrogenase [J]. *Exp Parasitol*, 2005, 109(4): 220-207.
- [5] 申川军, 何嵩, 郑小英, 等. 刚地弓形虫 LDH-Like MDH cDNA 的克隆和序列分析 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2005, 21(6): 461-466, 490.
- [6] Ma GY, Zhang JZ, Yin GR, *et al.* *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen [J]. *Exp Parasitol*, 2009, 122(1): 41-46.
- [7] 殷国荣, 孟晓丽, 马广源, 等. 弓形虫复合黏膜疫苗滴鼻免疫小鼠抵抗弓形虫感染作用 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2007, 25(4): 290-294.
- [8] 刘转转, 王海龙, 孟晓丽, 等. 重组弓形虫 Peroxiredoxin 蛋白的纯化及抗血清制备 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2011, 6(3): 201-203.
- [9] Wang HL, Yin LT, Meng XL, *et al.* Gene-cloning, expression, and antigenicity analysis of rho-try protein 17 of *Toxoplasma gondii* [J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2012, 30(1): 27-31.
- [10] Gietl C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1100(3): 217-234.
- [11] Madem D, Cai X, Abrahamsen MS. Evolution of *Cryptosporidium parvum* lactate dehydrogenase from malate dehydrogenase by a very recent event of gene duplication [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(3): 489-497.
- [12] Chall M, Sim TS. Functional characterization of an alternative [lactate dehydrogenase-like] malate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum* [J]. *Parasitol Res*, 2004, 92(1): 43-47.
- [13] Tripathi AK, Desai PV, Pradhan A, *et al.* An alpha-proteobacterial type malate dehydrogenase may complement LDH function in *Plasmodium falciparum*. Cloning and biochemical characterization of the enzyme [J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(17): 3488-3502.

(收稿日期: 2012-10-15 编辑: 衣凤芸)

文章编号: 1000-7423(2013)-01-0016-02

【研究简报】

湖北钉螺脑神经节的石蜡切片制作

谭苹*, 张洁, 李青

【提要】 为观察和研究湖北钉螺脑神经节的组织学结构, 借鉴其他软体动物神经系统石蜡切片的制作方法, 采用苏木素-伊红染色法 (HE) 制作湖北钉螺脑神经节石蜡切片。通过固定、脱水、透明、浸蜡、切片和染色等步骤, 制得钉螺脑神经节永久玻片标本, 镜下观察, 组织结构清晰。

【关键词】 湖北钉螺; 脑神经节; 石蜡切片

中图分类号: R383.241

文献标识码: B

Preparation of Paraffin Section of *Oncomelania hupensis* Cerebral Ganglions

TAN Ping*, ZHANG Jie, LI Qing

(Department of Parasitology, Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

【Abstract】 Following the method used in other mollusks, the specimen of the *Oncomelania hupensis* cerebral ganglions was fixed, dehydrated, transparentized, embedded in paraffin, sectioned, and stained with haematoxylin-eosin. The histological structure of the snail cerebral ganglions was clear in the permanent specimen under the microscope.

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; Cerebral ganglion; Paraffin section

* Corresponding author, E-mail: tanp61@yahoo.com.cn

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫的惟一中间宿主。灭螺药物几乎均对钉螺的一级神经节, 即脑神经节的组织和细胞结构、生化及酶学指标等产生影响^[1,2], 因此正确识别钉螺脑神经节的组织与细胞结构尤为重要。石蜡切片法是

观察正常组织与细胞结构及其病理变化的重要手段, 但钉螺脑神经节微小, 石蜡切片的制作难度较大, 至今未见制作其石蜡切片的报道。笔者借鉴其他软体动物神经系统石蜡切片的制作方法, 采用苏木素-伊红染色法 (HE) 制作钉螺脑神经节石蜡切片, 现报道如下。

作者单位: 武汉科技大学医学院寄生虫学教研室, 武汉 430065

* 通讯作者, E-mail: tanp61@yahoo.com.cn

1 材料与方

1.1 湖北钉螺脑神经节 钉螺采自湖北省武汉市近郊, 选择活力强的 7~8 旋阴性成螺解剖, 获取脑神经节。

1.2 主要试剂的配制和仪器 鲍氏固定液(100 ml): 含饱和苦味酸水溶液 75 ml、40%甲醛溶液 25 ml 和冰醋酸 5 ml。软蜡: 二甲苯与石蜡 1:1 配制。光学显微摄影仪 (DP70) 为日本 Olympus 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 取材与固定 将钉螺洗净后, 用破螺法^[3]破壳, 解剖镜下去壳, 游离软体, 分离脑神经节, 将多个钉螺的脑神经节浸入新鲜配制的鲍氏固定液中固定 8~16 h。

1.3.2 脱水与透明 自固定液中取出湖北钉螺脑神经节, 置于一块洁净小纱布中包好, 用别针封口。然后依次放入 30%、50%、70%和 80%乙醇中各脱水 60 min, 再依次放入 95%乙醇和 100%乙醇, 每个浓度脱水 2 次, 每次 15 min。然后置于二甲苯中透明 1~2 min。

1.3.3 浸蜡与包埋 小心打开纱布包, 取出其中的钉螺脑神经节, 浸入盛有软蜡的小瓷杯中, 然后加盖放入 42 °C 恒温箱中 1~2 h, 再浸入全石蜡 20 min。在室温下将熔融的全石蜡倒入铜条搭成的模格内至一半的高度, 小心挑取钉螺脑神经节标本置于其中, 然后继续倒入熔融石蜡至模格内, 直至覆盖标本, 待完全凝固。

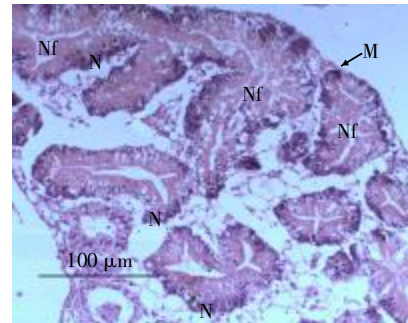
1.3.4 切片与贴片 拆去铜条, 将蜡块修整后, 装在切片机上, 切成 6 μm 厚的薄片, 切下的薄片连成蜡带, 用毛笔轻轻取下, 放入 50 °C 水浴锅内。蜡片受热后即慢慢展平, 待完全展平后, 用载玻片轻轻截取适当长度的蜡片使其贴附于载玻片上, 用解剖针将切片位置拨正, 倾去载玻片上的余水后, 将其置于 50 °C 恒温箱内干燥 2 d。所用载玻片需彻底洗净后烘干, 贴片前将载玻片表面涂抹一层蛋白甘油以防脱片。

1.3.5 脱蜡、复水和染色 将烘干的切片放入二甲苯脱蜡 2 次, 每次 3~5 min, 脱去石蜡。将脱蜡后的切片依次移入 100%乙醇、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇和蒸馏水中, 各停留 1~2 min, 自来水冲洗片刻。然后置于苏木素中浸染 3~10 min, 自来水冲洗片刻, 1%盐酸酒精分化 3~5 s, 自来水冲洗 10~20 min, 再移入 0.5%伊红溶液中浸染 1~2 min, 自来水冲洗。

1.3.6 脱水、透明和封片 切片依次放入 70%乙醇和 85%乙醇, 然后在 95%乙醇中脱水 2 次, 每次 1~2 min, 100%乙醇中脱水 2 次, 每次 2~4 min。移入二甲苯中透明 1~2 min, 重复一次, 取出切片, 擦去标本周围的二甲苯, 迅速在标本中央滴一小滴加拿大树胶 (二甲苯未干时进行), 加盖玻片, 45 °C 恒温箱中烘干, 制成永久玻片标本。所用盖玻片需先用 100%乙醇浸泡过夜, 然后蒸馏水浸泡数小时后擦干备用。

2 结果

本实验采用 HE 染色法制得了钉螺脑神经节组织的永久玻片标本。切片标本中, 钉螺脑神经节的组织结构清晰, 神经细胞排列呈分叶状, 每一神经叶的外缘为胞体区, 有密集不规则形状的紫红色细胞核分布, 中央为淡红色的神经纤维网, 在神



N: 神经节胞体区; Nf: 神经纤维网; M: 神经节被膜。

图 1 湖北钉螺脑神经节 (HE 染色, ×200)

经叶之间有网状神经纤维和少量细胞核。神经节被膜层覆盖于整个脑神经节表面, 其内可见紫红色的扁平细胞核 (图 1)。

3 讨论

关于软体动物神经系统的研究, 国内外已有相关报道^[46], 其神经节组织学结构大致相同, 均由表面的神经节被膜和近表面的胞体区以及中央神经纤维网所组成。钉螺属软体动物前鳃亚纲 (或扭神经亚纲) 中腹足目, 李赋京^[3]和金志良^[7]均已详细报道了钉螺神经系统的解剖形态, 李文桂等^[8]和谭苹等^[9]通过透射电镜观察了其神经节细胞, 但钉螺脑神经节的组织结构图至今未见报道。本文建立的湖北钉螺脑神经节石蜡切片制作方法为观察钉螺脑神经节的结构提供了方法。在标本制作的过程中需注意: ① 取材之后, 应立即投入鲍氏固定液中, 其固定均匀, 组织收缩较少, 有利于微小结构的显示和苏木素着色, 但该固定液不宜久置, 需在用前新鲜配制, 否则可能因氧化还原反应而影响固定效果; ② 由于钉螺脑神经节微小, 在逐级脱水时可用纱布将其包住以免丢失; ③ 其固定、脱水、染色和透明的时间均不宜过长。

参 考 文 献

- [1] 谭苹, 张学俊, 杨建明, 等. 空心莲子草对钉螺酶组织化学的影响[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(1): 11-16.
- [2] 朱丹, 李红军, 刘和香, 等. 密达利对湖北钉螺酶组织化学作用的观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 198-201.
- [3] 李赋京. 钉螺解剖与比较解剖[M]. 武汉: 湖北人民出版社, 1956: 1-44.
- [4] Swindale NV, Benjamin PR. The anatomy of neurosecretory neurones in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.) [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1976, 274(931): 169-202.
- [5] 李国华, 程济民, 王秋雨, 等. 脉红螺 (*Rapana venosa*) 神经系统解剖的初步研究[J]. 动物学报, 1990, 36(4): 345-351.
- [6] 洗黎, 王晓安, 张丽莉. 扁玉螺脑神经系统解剖及显微结构观察[J]. 动物学杂志, 2007, 42(6): 90-95.
- [7] 金志良. 钉螺神经系统的显微解剖[J]. 动物学报, 1993, 39(3): 229-238.
- [8] 李文桂, 黄四喜, 徐明星, 等. 经氯硝柳胺浸泡后湖北钉螺脑神经节的超微结构变化[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1997, 10(1): 42-45.
- [9] 谭苹, 杨建明, 官阳, 等. 空心莲子草对钉螺神经节及足肌超微结构的影响[J]. 电子显微学报, 2006, 25(6): 524-527.

(收稿日期: 2012-08-13 编辑: 瞿麟平)