

- and its expression[J]. *Exp Parasitol*, 2008, 118(1): 122-128.
- [3] Beckmann S, Grevelding CG. Paving the way for transgenic schistosomes[J]. *Parasitology*, 2012, 139(5): 651-668.
- [4] 刘睿, 赵琴平, 董惠芬, 等. RNA 干扰技术及其在血吸虫学研究中的应用[J]. *中国病原生物学杂志*, 2009, 4(6): 460-463.
- [5] Cheng GF, Lin JJ, Shi Y, *et al.* Dose-dependent inhibition of gynecophoral canal protein gene expression *in vitro* in the schistosome (*Schistosoma japonicum*) by RNA interference [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(6): 386-390.
- [6] Li HF, Wang XB, Jin YP, *et al.* Wnt4, the first member of the Wnt family identified in *Schistosoma japonicum*, regulates worm development by the canonical pathway [J]. *Parasitol Res*, 2010, 107(4): 795-805.
- [7] Zhao ZR, Lei L, Liu M, *et al.* *Schistosoma japonicum*: inhibition of Mago nashi gene expression by shRNA-mediated RNA interference[J]. *Exp Parasitol*, 2008, 119(3): 379-384.
- [8] 陈敏芳, 麦荣嘉, 莫倩珍, 等. 日本血吸虫小热休克蛋白Sjp40的 RNA 干扰效应[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(4): 456-461.
- [9] Yang Y, Jin Y, Liu P, *et al.* RNAi silencing of type V collagen in *Schistosoma japonicum* affects parasite morphology, spawning, and hatching[J]. *Parasitol Res*, 2012, 111(3): 1251-1257.
- [10] He Y, Cai G, Ni Y, *et al.* siRNA-mediated knockdown of two tyrosinase genes from *Schistosoma japonicum* cultured *in vitro*[J]. *Exp Parasitol*, 2012, 132(4): 394-402.
- [11] Panagiotou G, Christakopoulos P. NADPH-dependent D-aldose reductases and xylose fermentation in *Fusarium oxysporum* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2004, 97(5): 299-304.
- [12] 刘小鹏. 醛糖还原酶研究进展[J]. *南华大学学报(医学版)*, 2004, 32(1): 94-96.
- [13] Liu F, Lu J, Hu W, *et al.* New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*[J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(4): e29.
- [14] Spycher SE, Tabataba-Vakili S, O'Donnell VB, *et al.* Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells[J]. *FASEB J*, 1997, 11(2): 181-188.
- [15] Liu J, Wang J, Wang S, *et al.* Molecular cloning and characterization of *Schistosoma japonicum* aldose reductase [J]. *Parasitol Res*, 2013, 112(2): 549-558.
- [16] Liu J, Dyer DH, Cheng J, *et al.* Aldose reductase from *Schistosoma japonicum*: crystallization and structure-based inhibitor screening for discovering antischistosomal lead compounds[J]. *Parasite Vector*, 2013, 6: 162.
- [17] Krautz-Peterson G, Radwanska M, Ndegwa D, *et al.* Optimizing gene suppression in schistosomes using RNA interference[J]. *Mol Biochem Parasit*, 2007, 153(2): 194-202.
- [19] Krautz-Peterson G, Bhardwaj R, Faghiri Z, *et al.* RNA interference in schistosomes: machinery and methodology [J]. *Parasitology*, 2010, 137(3): 485-495.
- [20] Stefanic S, Dvorak J, Horn M, *et al.* RNA interference in *Schistosoma mansoni* schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(10): e850.

(收稿日期: 2013-11-04 编辑: 张争艳)

文章编号: 1000-7423(2014)-01-0021-04

【研究简报】

湖北钉螺糖原浓度的季节变化

黄春兰¹, 周书林^{1*}, 李朝品¹, 赵劲松¹, 杨进孙²

【提要】 于 2012 年 8 月到 2013 年 7 月每个月月初, 采集安徽芜湖青弋江滩上的钉螺, 压碎螺壳, 分离其肝脏和头足部肌肉, 用滤纸吸干组织外水分, 收集各部分组织并称重, 用硫酸-萘酚比色法测定湖北钉螺各月份的肝、头足肌和整体软体组织的糖原浓度。结果显示, 9 月至次年的 6 月, 整体软体组织和肝的糖原浓度逐月下降; 6 月雌性整体软体组织糖原浓度最低(0.55 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 而雄性则在 4 月降至全年最低值 (0.88 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 雌、雄螺整体软体组织年平均值分别为 2.99 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 3.39 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。肝糖原浓度 5 月最低 (♀=0.29 $\mu\text{g}/\text{mg}$, ♂=0.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 至 8 月同时达到最高 (♀=2.49 $\mu\text{g}/\text{mg}$, ♂=2.78 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 雌、雄螺肝糖原年平均值分别为 1.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 0.89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。头足肌糖原浓度从 2 月到 6 月逐月下降, 6 月最低 (♀=0.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$, ♂=0.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 12 月达到最高 (♀=16.59 $\mu\text{g}/\text{mg}$, ♂=10.06 $\mu\text{g}/\text{mg}$), 雌、雄螺头足肌糖原年平均值分别为 7.99 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 6.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。整体软体组织糖原浓度与肝糖原浓度存在线性正相关关系 ($P<0.05$), 且具有与肝糖原相似的月份变化规律。雌、雄螺的头足肌糖原浓度与整体软体组织和肝的糖原浓度呈线性正相关关系 ($P<0.05$), 头足肌糖原与整体软体组织和肝糖原浓度变化规律有部分相同。

【关键词】 湖北钉螺; 肝糖原; 头足肌糖原; 整体软体组织糖原; 季节变化

中图分类号: R383.241 文献标识码: B

Seasonal Changes of Glycogen Level in *Oncomelania hupensis*

HUANG Chun-lan¹, ZHOU Shu-lin^{1*}, LI Chao-pin¹, ZHAO Jin-song¹, YANG Jin-sun²

(1 Department of Parasitology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; 2 Department of Infectious Diseases, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

基金项目: 安徽省自然科学基金 (No. 11040606M214); 安徽省教育厅自然科学研究项目 (No. KJ2011B199)

作者单位: 1 皖南医学院医学寄生虫学教研室, 芜湖 241002; 2 皖南医学院弋矶山医院感染科, 芜湖 241002

* 通讯作者, E-mail: zsl@wnmc.edu.cn

【Abstract】 *Oncomelania hupensis* snails were collected from Qingyi River of Wuhu City from August 2012 to July 2013. Livers and pedal muscles of snails were dissected. Anthrone colorimetric method was used to evaluate the glycogen concentrations of whole-body, liver and muscle. The concentration of whole-body and liver glycogen decreased from September to next June. The whole body glycogen content in female (0.55 $\mu\text{g}/\text{mg}$) and male (0.88 $\mu\text{g}/\text{mg}$) snails was the lowest in June and April, respectively. The mean whole-body glycogen concentration in females and males was 2.99 and 3.39 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. Liver glycogen concentration was lowest in May ($\bar{x}=0.29 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\delta=0.22 \mu\text{g}/\text{mg}$), and reached peak level in August ($\bar{x}=2.49 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\delta=2.78 \mu\text{g}/\text{mg}$). The average liver glycogen concentration in female and male snails was 1.09 and 0.89 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The muscle glycogen concentration gradually decreased from February to June, the lowest was found in June ($\bar{x}=0.25 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\delta=0.41 \mu\text{g}/\text{mg}$), and reached peak level in December ($\bar{x}=16.59 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\delta=1006 \mu\text{g}/\text{mg}$). The average muscle glycogen concentration in female and male snails was 799 and 605 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. There was a positive linear correlation between whole-body and liver glycogen concentrations ($P<0.05$), and both of them had the similar trend in their monthly change. A positive linear correlation was found among whole-body, liver and muscle glycogen concentrations ($P<0.05$).

【Key words】 *Oncomelania hupensis*; Liver glycogen; Pedal muscle glycogen; Whole-body glycogen; Seasonal change

Supported by Anhui Provincial Natural Science Fund (No. 11040606M214) and Natural Science Fund of Anhui Provincial Education Department (No. KJ2011B199)

* Corresponding author, E-mail: zsl@wnmc.edu.cn

湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 是日本血吸虫惟一的中间宿主, 隶属于软体动物门, 腹足纲, 圆口螺科, 钉螺属, 属冷血动物^[1]。湖北钉螺的生存、繁殖和活动等具有明显的季节性, 如冬蛰夏伏现象等。糖原 (($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$)_n) 大量贮藏于动物肝脏和肌肉。据报道, 巴西蜗牛 (*Bulimulus tenuissimus*)、盖罩大蜗牛 (*Helix pomatia*) 和南美蜗牛 (*Megalobulimus oblongus*) 血淋巴中的葡萄糖, 肝脏、肾脏、腹足肌以及外套膜中的糖原和脂类含量等均与季节变化有关^[24]。此外, 低等冷血动物体内糖原还与冷血动物的越冬、繁殖等重要生命活动有关^[51]。黄文长^[12]对湖北钉螺常规、低温、水淹、饥饿和血吸虫感染后个体体内糖原变化进行了研究, 结果表明钉螺体内的糖原含量受诸多因素的影响。本实验通过测定现场采集的湖北钉螺各月份中整体软体组织、肝脏和头足部肌肉组织糖原含量, 旨在从季节变化角度揭示糖原在湖北钉螺体内贮存和动用的特点, 为揭示其生命活动规律提供有价值的信息。

1 材料与方 法

1.1 钉螺来源 钉螺于 2012 年 8 月~2013 年 7 月 (2013 年 1 月未采集) 采自安徽省芜湖市青弋江江滩, 每月月初采集 1 次。经鉴定为湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*), 有纵肋。未接触灭螺药物, 经逸蚴试验阴性的成螺, 大小为 8.5 mm×3.2 mm~9.5 mm×4.1 mm。置-80℃保存备用。

1.2 主要试剂与仪器 0.2% 萘酚试剂 (0.2 g 萘酚溶于 100 ml 浓硫酸中, 当天配制)、三氯乙酸和葡萄糖均为国产分析纯。紫外分光光度计 (U-28000) 为日本 Hitachi 公司产品, 高速冷冻离心机 (AvantiJ-26xp 型) 为美国 Beckman 公司产品。

1.3 软体组织获取 将钉螺洗净后, 采用镊钳十字交叉法压碎螺壳^[13], 在体视显微镜下剔去碎壳并鉴别雌雄, 显微镜下分离头足部肌肉和肝脏, 滤纸吸干软体外的多余水分 (注意低温保存)。分别收集头足肌、肝脏和整体软体组织, 称重后备用。

1.4 糖原样品的制备 称取钉螺头足肌、肝脏和整体软体组织各 25 mg, 分别加入 2 ml 5% 三氯乙酸 (TCA) 匀浆后, 用 3 ml TCA 涮洗匀浆器中余下的组织, 即得到 5 ml 匀浆液, 将匀浆液以 1 000×g 离心 15 min, 取上清加 95% 乙醇 20 ml, 混匀, 加塞子, 室温下竖立过夜, 沉淀完全后, 1 000×g 离心 15 min, 倒掉上清, 倒立放置 30 min, 根据组织的量用不同体积的蒸馏水溶解糖原, 震荡混匀, 即为糖原制备物^[14]。

1.5 糖原含量测定 采用硫酸-萘酚比色法, 分别将 0.5 ml 不同浓度的标准葡萄糖溶液加入到试管中, 然后加入 1.5 ml 的蒸馏水和 4 ml 0.2% 硫酸-萘酚, 空白对照加入 2 ml 的蒸馏水和 4 ml 0.2% 硫酸-萘酚。震荡混匀, 沸水浴 15 min, 取出后立即用冷水浴冷却至室温, 分光光度计测各管的吸光度 (A_{620}) 值, 每组重复测定 3 次, 取均值。参照文献 [14] 制作标准曲线, 以标准糖原浓度为横坐标, 相对应的各管吸光度 (A_{620}) 值为纵坐标, 采用 Microsoft Excel 2013 版软件绘制标准曲线。根据标准曲线相关系数计算不同组织糖原的浓度。

$$\text{单位组织的糖原浓度 } (\mu\text{g}/\text{mg}) = \frac{\text{葡萄糖浓度} \times \text{体积 (ml)}}{1.11 \times \text{单位组织的重量 (mg)}}$$

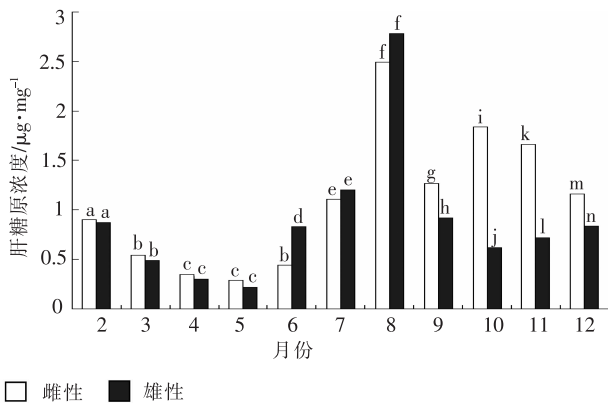
(注: 1.11 是 1 g 葡萄糖的浓度换算成糖原的浓度)。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件对所有数据进行统计学分析。同性别各月份间整体软体组织、肝和头足肌的糖原浓度进行单因素方差分析; 以性别和月份对雌、雄螺各月份间整体软体组织、肝和头足肌的糖原浓度进行双因素方差分析; 相同月份不同性别的整体软体组织、肝和头足肌的糖原浓度比较采用两独立样本均数的 t 检验; 整体软体组织、肝和头足肌的糖原浓度相关性分析采用 Pearson 法。

2 结 果

2.1 湖北钉螺肝糖原浓度的季节变化 湖北钉螺肝糖原浓度一整年变化差异有统计学意义 ($\bar{x}F=318.55$, $\delta F=566.84$)。9 月至

次年 5 月, 肝糖原含量总体呈下降趋势, 雌、雄螺肝糖原浓度均在 5 月份降至全年最低值 ($\text{♀}=0.29 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\text{♂}=0.22 \mu\text{g}/\text{mg}$), 6 到 8 月份时出现回升, 8 月份时雌、雄肝糖原浓度达到全年最高值 ($\text{♀}=2.49 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\text{♂}=2.78 \mu\text{g}/\text{mg}$), 雌、雄螺肝糖原浓度上升均显著, 之后继续下降。雌、雄螺肝糖原年平均值为 $1.09 \mu\text{g}/\text{mg}$ 和 $0.89 \mu\text{g}/\text{mg}$; 肝糖原年平均浓度约为整体软体组织糖原的 30%。双因素方差分析结果表明, 雌性一整年肝糖原值的总体水平高于雄性 ($F=120.896$, $P<0.05$), 月间差异也有统计学意义 ($F=196.321$, $P<0.05$) (图 1)。

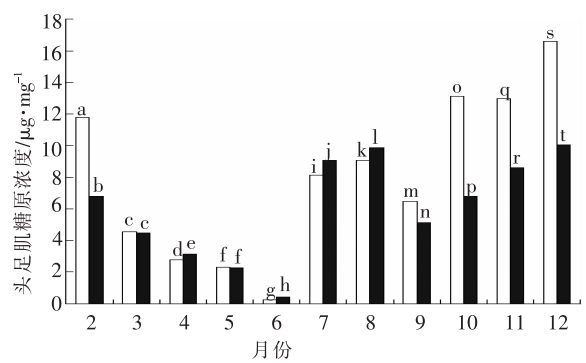


注: 不同字母表示差异有统计学意义 ($P<0.05$), 相同字母表示差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

图 1 湖北钉螺肝糖原浓度季节变化

2.2 湖北钉螺头足肌糖原浓度的季节变化 湖北钉螺头足肌糖原浓度一整年变化差异有统计学意义 ($\text{♀}F=15.590$, $\text{♂}F=691.582$)。2 月至 6 月, 头足肌糖原浓度总体呈下降趋势, 雌雄螺头足肌糖原浓度均在 6 月份降至全年最低值 ($\text{♀}=0.25 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\text{♂}=0.41 \mu\text{g}/\text{mg}$)。7 月至 12 月份, 头足肌糖原浓度总体呈上升趋势, 雌、雄螺头足肌糖原 12 月份时达到全年最高值 ($\text{♀}=16.59 \mu\text{g}/\text{mg}$, $\text{♂}=10.06 \mu\text{g}/\text{mg}$)。雌雄螺头足肌糖原年平均值为 $7.99 \mu\text{g}/\text{mg}$ 和 $6.05 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。双因素方差分析结果表明, 雌性一整年肌糖原值的总体水平高于雄性 ($F=593.907$, $P<0.05$), 月间差异也有统计学意义 ($F=987.915$, $P<0.05$)。头足肌糖原年平均浓度约为肝糖原浓度的 7 倍。相关分析结果显示, 雌、雄性头足肌糖原浓度与雌、雄性肝糖原浓度呈线性正相关 ($P<0.05$) (图 2)。

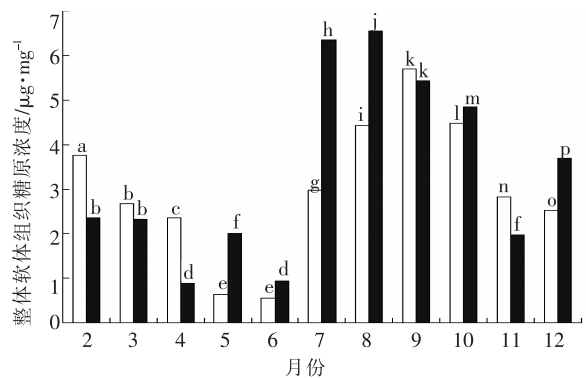
2.3 湖北钉螺整体软体组织糖原浓度的季节变化 湖北钉螺整体软体组织糖原浓度一整年变化差异有统计学意义 ($\text{♀}F=1.409$, $\text{♂}F=3.056$)。9 月至次年 6 月, 整体软体组织糖原浓度总体呈下降趋势。其中 7 到 8 月时出现回升, 雄性显著, 雌性不显著, 之后继续下降。雌性整体软体组织糖原浓度在 6 月降至全年最低值 ($0.55 \mu\text{g}/\text{mg}$), 而雄性则在 4 月降至全年最低值 ($0.88 \mu\text{g}/\text{mg}$), 其中 5 月有所回升, 但 6 月又继续下降。雄性整体软体组织糖原浓度 8 月时达到全年最高值 ($6.56 \mu\text{g}/\text{mg}$), 而雌性则 9 月达到全年最高值 ($5.70 \mu\text{g}/\text{mg}$)。雌、雄螺整体软体组织糖原年平均值分别为 $2.99 \mu\text{g}/\text{mg}$ 和 $3.39 \mu\text{g}/\text{mg}$ 。双因素方差分析结果表明, 雌性一整年整体软体组织糖原值的总体水平低于雄性 ($F=813.909$, $P<0.05$), 月间差异也有统计学意义 ($F=717.492$, $P<0.05$)。相关分析



注: 不同字母表示差异有统计学意义 ($P<0.05$), 相同字母表示差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

图 2 湖北钉螺头足肌糖原浓度季节变化

结果显示雌、雄性整体软体组织浓度与雌、雄性肝、头足肌糖原浓度呈线性正相关 ($P<0.05$) (图 3)。



注: 不同字母表示差异有统计学意义 ($P<0.05$), 相同字母表示差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

图 3 湖北钉螺整体软体组织糖原浓度的季节变化

3 讨论

湖北钉螺与其他低等动物一样, 交配、产卵、繁殖等行为容易受到外界因素的影响, 比如温度、湿度和光照时间等, 这些因素在新陈代谢过程中起到调节管理作用。本研究结果显示, 2~5 月湖北钉螺肝糖原浓度逐渐下降, 5 月雌、雄螺肝糖原浓度降到全年最低, 原因可能是钉螺出蛰后 (2 月底), 环境几乎没有食物提供, 钉螺在饥饿状况下繁殖, 肝糖原浓度继续下降似成必然。繁殖后, 体力消耗极大的钉螺摄入十分有限的食物, 不久即进入交配产卵期 (4~6 月)^[1], 随着环境温度逐渐升高, 钉螺摄食量随环境中食物的增多而加大, 6 月浓度逐渐上升, 8 月雌、雄螺肝糖原浓度达到全年最高值, 可能因为 8 月钉螺交配和产卵均处于停止状态^[1], 能量得以储存。9~11 月肝糖原浓度下降, 其原因可能是钉螺开始活动, 采集食物, 交配、产卵, 均需消耗能量, 导致肝糖原浓度继续下降, 其中 9 月肝糖原浓度下降显著, 原因可能是 8 月初至 9 月初期间是芜湖一年之中最炎热的季节, 高温下钉螺进食减少 (夏蛰), 能量支出大于摄入。12~2 月钉螺处于冬眠状态, 除了维持新陈代谢要消耗肝糖原, 还需要将部分糖原转化为血糖 (防冻保护

(下转第 28 页)