

南水北调工程对日本血吸虫中间宿主湖北钉螺 (*Oncomelania hupensis*) 分布的影响

汪 伟, 梁幼生*, 戴建荣, 黄轶昕

(江苏省血吸虫病防治研究所、卫生部寄生虫病预防与控制技术重点实验室、
江苏省寄生虫分子生物学重点实验室、江苏省寄生虫病学重点学科, 无锡 214064)

摘要: 中国南水北调工程是缓解北方缺水 and 生态环境恶化的重大战略性工程。从长江下游引水北上的南水北调东线工程, 因其引水口处在有日本血吸虫中间宿主湖北钉螺孳生的江苏省江都市, 并且输水干线将穿过我国钉螺分布区及其最北点的宝应县(北纬 33°15′) 进入钉螺非分布区。为探讨因南水北调将钉螺带到北方钉螺非分布区后, 钉螺能否生存与繁殖并形成新有螺区, 研究沿工程输水干线在江苏徐州(北纬 34°21′) 和山东济宁(北纬 35°23′) 现场设点, 采用螺笼放养定量观察法, 对北移钉螺生存繁殖力及其子代钉螺的适应性作了为期 8a 的纵向观察; 采用组织学、组织化学、酶组织化学及电镜技术, 观察了北移钉螺生殖腺变化。结果: 北移钉螺及其子代在徐州存活时间不超过 8a, 在济宁存活时间不超过 1.5a; 钉螺北移 3~6 个月后, 其雌、雄生殖腺均呈萎缩状, 相关代谢酶和组化成分含量出现异常变化。研究认为, 南水北调若将钉螺移至北纬 33°15′~34°21′ 地区, 钉螺虽然能存活一定时间, 但其繁殖力逐年下降, 种群呈逐渐消亡趋势; 若移至北纬 35°23′ 以北地区, 钉螺则难以存活。因而, 随南水北调移至北纬 33°15′ 以北地区的钉螺难以正常生存繁殖形成新的有螺区。

关键词: 南水北调工程; 湖北钉螺; 分布; 生态学

文章编号: 1000-0933(2008)09-4235-11 中图分类号: Q142, Q178, Q958, R383 文献标识码: A

Impact of the construction of the South-to-North Water Diversion Project on distribution of *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of *Schistosoma japonicum* in China

WANG Wei, LIANG You-Sheng*, DAI Jian-Rong, HUANG Yi-Xin

Jiangsu Institute of Parasitic Diseases; Key Laboratory on Technology for Parasitic Disease Prevention and Control, Ministry of Health; Jiangsu Provincial Key Laboratory on Molecular Biology of Parasites; Jiangsu Provincial Key Subject on Parasitic Diseases, Wuxi 214064, Jiangsu Province, China
Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(9): 4235 ~ 4245.

Abstract: The South-to-North Water Diversion Project (SNWDP) is the key national water conservation project in China to improve water resources and relieve water shortage in the northern part of China. The water intake of the Eastern Route Project (ERP) of SNWDP is located in Jiangdu County, Jiangsu Province, which is a breeding site of *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of *Schistosoma japonicum*. The water diversion route of ERP will cross Baoying County (33° 15' N latitude), the northern limit of the current distribution of the snails in China and then pass through regions where the snails do not currently exist. In order to investigate the possibility of survival and reproduction of snails in their new

基金项目: 江苏省医学领军人才资助项目

收稿日期: 2008-04-11; 修订日期: 2008-06-16

作者简介: 王伟 (1982 ~), 男, 安徽无为, 主要从事血吸虫病流行病学及钉螺生物学研究. E-mail: wangweijipd@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liangys58@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by grants from the Jiangsu Province's Outstanding Medical Academic Leader program

Received date: 2008-04-11; **Accepted date:** 2008-06-16

Biography: WANG Wei, mainly engaged in epidemiology of schistosomiasis and biology of *Oncomelania* snail. E-mail: wangweijipd@yahoo.com.cn

habitats, two areas along the diversion route of the ERP, namely Jining City of Shandong Province ($35^{\circ}23' N$ latitude) and Xuzhou City of Jiangsu Province ($34^{\circ}21' N$ latitude) were selected as field study sites. A longitudinal study on the survival and reproduction of the snails in the north was made using the quantitative techniques over a period of 8 years. Changes of the gonads of the snails moved north were measured using a range of histological, histochemical, enzyme-histochemical and electron microscopic techniques. The results showed that, the survival time of the transferred snails and their offspring in Xuzhou was limited to a period of 8 years, comparing with survival time of 1.5 years for snails moved to Jining. The gonads of the male and female snails were atrophied after being moved north for 3—6 months, while abnormal changes in the histochemistry and metabolic enzymes occurred. It is indicated that if the snails moved to the areas between $33^{\circ}15'$ and $34^{\circ}21' N$ latitude, though the snails were able to survive in Xuzhou for a limited period, the snail populations decreased gradually due to the decline in the rate of reproduction. If the snails moved to the northern part of $35^{\circ}23' N$ latitude, they can hardly survive. It is concluded that if the snails moved to north of $33^{\circ}15' N$ latitude, it is difficult to survive and reproduce, and further create new snail habitats for *Oncomelania hupensis* snails.

Key Words: South-to-North Water Diversion Project; *Oncomelania hupensis*; distribution; ecology

血吸虫病是一种严重危害人类健康,阻碍社会经济发展的人畜共患寄生虫病。全球有 76 个国家和地区流行血吸虫病,流行区人口约 6 亿,感染者约 2 亿,患者约 2 千万^[1]。中国主要流行日本血吸虫病,目前流行区主要分布在长江中下游沿岸 5 省的湖区和云南、四川 2 省的大山区,血吸虫病人 671 265 例^[2]。钉螺是日本血吸虫的惟一中间宿主,是构成血吸虫病传播的不可缺失环节^[3]。中国大陆钉螺分布区位于北纬 $33^{\circ}15'$ 以南地区^[4]。流行病学研究证明,中国钉螺的地理分布区与血吸虫病流行区呈高度的一致性^[5],凡有血吸虫病流行的地区必有钉螺孳生^[3]。控制与消灭钉螺是控制与阻断血吸虫病传播的主要措施之一^[4,5]。

南水北调是我国优化水资源配置,解决北方地区缺水的一项战略性措施,关系到我国北方地区经济、社会和生态环境可持续发展的长远利益。从长江下游江苏段引水北上的南水北调东线工程,因其引水口处在有日本血吸虫中间宿主湖北钉螺孳生的江苏省江都市,并且输水干线途经我国钉螺分布区并从分布区最北点的宝应县(北纬 $33^{\circ}15'$)境内进入非分布区^[6~8],因而,在工程建成并实现供水后,钉螺随水流向北迁移扩散可能性难以完全排除。为了研究因南水北调将钉螺带到北纬 $33^{\circ}15'$ 以北地区后,钉螺能否生存与繁殖,并形成新的有螺区,从而可能导致中国血吸虫病流行区向北扩展,本研究沿工程输水干线现场设点,采用螺笼放养钉螺的方法,对放养在北方地区的钉螺生存繁殖力进行了为期 8a 的现场定量纵向观察,并采用组织学、组织化学、酶组织化学和电镜技术观察北移钉螺的生殖腺变化,以期以南水北调工程安全运行提供论证依据。

1 内容与方法

1.1 实验现场

沿着南水北调输水干线分别选择山东济宁(北纬 $35^{\circ}23'$)和江苏徐州(北纬 $34^{\circ}21'$)作为实验观察点,两地均为血吸虫病非流行区,均无钉螺孳生;选择江苏镇江(北纬 $32^{\circ}10'$)作为对照观察点,该地历史上是血吸虫病重度流行区,沿江江滩至今仍有钉螺分布(图 1)。实验现场和对照现场均设在能长年保持稳定水位的自然水塘边,周围无排放污水的工厂,各点常年均有专人看护。

1.2 材料

1.2.1 钉螺

实验用钉螺采自江苏省南京市龙潭江滩,实验前以群体逸蛭法剔除血吸虫感染阳性钉螺,挑选爬动活跃的幼螺(体长 <5 mm),在体视显微镜下区分雌雄后分别饲养,备用。

1.2.2 螺笼

实验用螺笼系用 8 号铁丝扎制成 $200\text{ mm} \times 100\text{ mm} \times 100\text{ mm}$ 的框架,周围覆以粗孔铁丝网,内衬 14 孔/25.4 mm 窗纱和 120 孔/25.4 mm 尼龙纱绢。笼底铺有一层厚 10 cm、带有完整植被的当地泥皮。

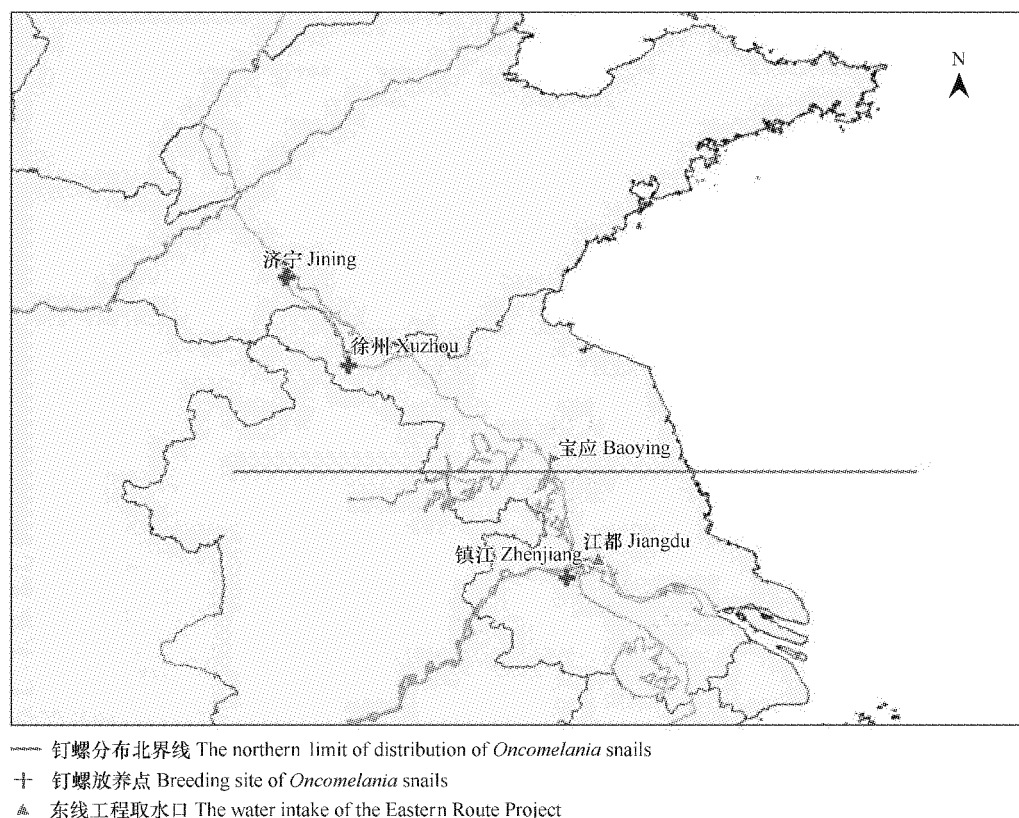


图1 钉螺放养点分布图

Fig. 1 Distribution of the breeding sites of *Oncomelania* snails

济宁 Jinan; 徐州 Xuzhou; 宝应 Baoying; 镇江 Zhenjiang; 江都 Jiangdu; 钉螺分布北界线 The northern limit of distribution of *Oncomelania* snails; 钉螺放养点 Breeding site of *Oncomelania* snail; 东线工程取水口 The water intake of the Eastern Route Project

1.3 钉螺生存和繁殖观察

1.3.1 生存

于1991年9月初,在每只螺笼内放置100只实验钉螺(雌雄各半),用细铁丝封紧笼盖后,将螺笼呈30°角倾斜放置在3个观察现场的水塘边,以使螺笼内泥土1/3浸在水中,2/3在水线上(图2)。而后每3个月分别从各现场提取2只螺笼,用20孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土,收集全部钉螺,用敲击法鉴定钉螺死活^[5],计算钉螺死亡率。

1.3.2 繁殖

于1992年2月初,在3个现场分别筛取放养活螺100只(雌雄各半),重新设框,方法同上。3~6月间,每隔30 d用120孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土1次,在解剖镜下分离捡获螺卵。筛出的钉螺重新放回新铺泥土的螺笼内继续放养。观察钉螺在当地产卵量。

5月份从3个现场钉螺所产的同一批螺卵中,分别选取1000只泥皮完整的螺卵置于直径9 cm的培养皿中,加入当地水塘水至水深2 cm,置室温(25℃)下孵化。每隔5 d用吸管吸出幼螺,记录孵出的幼螺数,并补充培养皿内的水,保持水深为2 cm。共观察30 d,计算孵化率。取同批孵出的子代幼螺各500只,分别置螺笼内放养于现场。5个月后以20孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土,收集全部钉螺,统计活成螺(体长>5 mm)数量。

1991年9月,在3个现场分别设置2个螺笼,内置200只钉螺(雌雄各半)放养在现场,分别于1、2a后用20孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土,收集全部钉螺,以敲击法鉴定钉螺死活^[4],统计放养1、2a的钉螺增殖数。

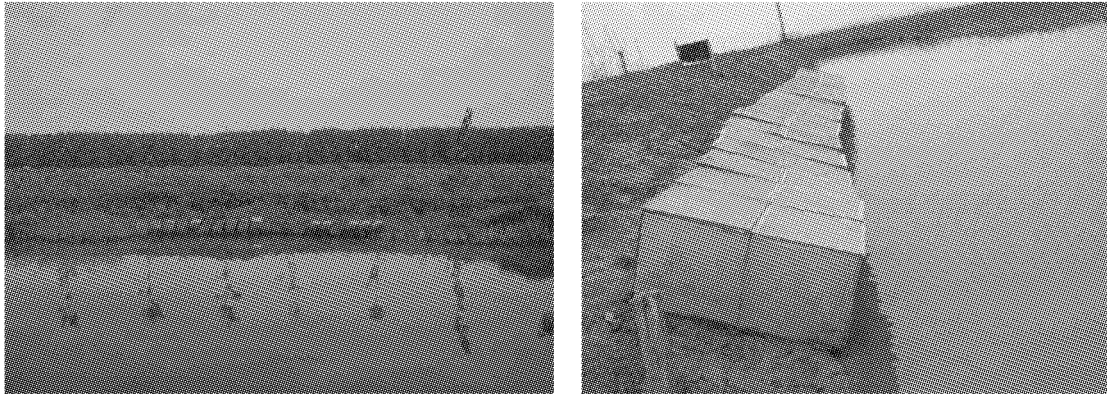


图2 现场螺笼安置图

Fig. 2 Placement of snail cages in study areas

1.4 北移钉螺生殖腺组织学、组织化学、酶组织化学及超微结构观察

放养3个月后(1991年11月),分别从3个现场筛取活雄螺,放养6个月后(1992年3月)筛取活雌螺。两次采集的钉螺标本均参照文献^[9]方法破壳,解剖镜下去壳,暴露钉螺软体,分离睾丸或卵巢,挑选无机械损伤的生殖腺,分别作如下处理:

(1) 组织学

置10%福尔马林溶液中固定,常规石蜡包埋、切片,HE染色。

(2) 组织化学

置100%乙醇中固定6h,常规石蜡包埋、切片,参照文献^[10]方法显示糖原(PAS反应)。

将切片放入60℃ 1 mol·L⁻¹的HCl溶液中60 min,4℃ 1 mol·L⁻¹的HCl溶液中1 min,Schiff试剂中60 min,连二亚硫酸钠水溶液及蒸馏水中冲洗。显微镜下可见DNA呈红紫色。

置4℃预冷的甲醛钙溶液(4%甲醛溶液100 ml中加氯化钙4 g)中固定24 h后,常规石蜡包埋、切片。切片脱蜡后置100℃ 5%三氯醋酸水溶液中15 min,再置于70%乙醇和水中漂洗,用22℃ 0.1%快绿(Fast Green FCF)染色30 min,镜下可见碱性蛋白(精氨酸和赖氨酸)呈亮绿色。

(3) 酶组织化学

新鲜标本不经固定,即刻置于LEICA CM1850型冰冻切片机(德国产)冷冻15 min后作连续切片,参照文献^[11]方法显示细胞色素C氧化酶(cytochrome oxidase, CCO)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH);Wachstein法^[12]显示5'-核苷酸酶(5'-Nucleotidase, 5'-NT);改良Culling法^[13]显示葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-Pase);Nachlas法^[14]显示琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)。

上述染色片经双蒸水漂洗,自然晾干,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,制成玻片标本。

进行上述组织化学、酶组织化学反应时,分别采用唾液消化、沸水或化学剂破坏及免去作用液中的底物等作方法对照。同时分别选用小白鼠含相应成分或酶活性高的组织切片与钉螺切片同缸孵育染色,作为阳性对照。根据着色反应深浅,在光镜下分为5个等级:阴性(-)、阳性(+)、中等阳性(++)、较强阳性(+++)、强阳性(++++) ,进行定性观察。3个观察现场各随机抽取一定数量切片,采用IBAS200图像分析仪(德国产)测定糖原、DNA、组蛋白、CCO、LDH和SDH等6项指标的灰度值。每一指标测20只钉螺标本,每一标本随机测5个视野,取灰度值的平均值作定量比较。

(4) 超微结构观察

取3个现场活雄螺软体,解剖镜下分离睾丸组织,挑选无机械损伤的标本迅速置于经4℃预冷的2.5%戊二醛溶液中固定2 h,经固定、脱水、浸泡、聚合包埋后,用LKB超薄切片机(瑞典产)连续切片,醋酸铀和枸橼酸铅复染后,在OPTON EM10C/CR型透射电镜(德国产)下观察,拍照。

1.5 北移传代钉螺适应性观察

1995 年 9 月,在 2 个实验现场(江苏徐州和山东济宁)和对照现场分别设置螺笼,实验现场每只螺笼内放置 200 只在江苏徐州放养 3a 的第 3 代幼螺(雌雄各半);对照区(江苏镇江)螺笼内放置经当地放养 3 年的第 3 代幼螺 200 只(雌雄各半),具体方法同上。观察开始后,每 12 个月分别提取 1 螺笼,筛获钉螺,鉴别钉螺死活,计算钉螺存活率。

同时,在 3 个观察现场分别放置螺笼各 1 只,内置经江苏徐州或镇江放养 3a 的第 3 代幼螺各 300 只,现场放养 3 个月以 20 孔/25.4 mm 铜丝筛筛洗笼内泥土,收集全部钉螺,统计活成螺数量,计算幼螺成活率。

1.6 北移传代钉螺对血吸虫易感性观察

1.6.1 钉螺

实验钉螺系江苏南京龙潭钉螺移至徐州放养 3a 后的第 3 代钉螺,对照钉螺系龙潭钉螺移至镇江放养 3 年后的第 3 代钉螺。挑选活力强的当年新产幼螺用于本观察。

1.6.2 日本血吸虫毛蚴

从安徽贵池血吸虫病流行区江滩采集感染性钉螺,在室内逸出尾蚴感染家兔,45 d 解剖感染兔,取肝脏匀浆后筛选、沉淀,分离出血吸虫卵,虫卵置于三角烧瓶中加入脱氯自来水孵化出毛蚴。

1.6.3 方法

分别取实验钉螺和对照钉螺各 100 只,置于直径 15 cm 的培养皿中,覆以尼龙纱网以防止钉螺爬出。按每螺 4 ml 比例在皿内加入江苏徐州现场水塘水,室温(25 ℃)白炽灯光照条件下,按钉螺与毛蚴数量 1:5、1:20、1:40 的比例投放新孵出的日本血吸虫毛蚴,感染 4 h 后,捞出钉螺置实验室常温下分盘饲养。8 周后解剖观察钉螺感染情况,计算钉螺感染率。

2 结果

2.1 钉螺生存和繁殖

2.1.1 生存

经过 3、6、9、12、15、18、21、24 个月放养后,山东济宁现场钉螺死亡率分别为 14.29%、35.33%、83.33%、95.18%、98.84%、100%、100% 和 100%,江苏徐州现场钉螺死亡率分别为 14.51%、16.23%、44.68%、79.57%、85.75%、86.24%、90.58% 和 76.73%。与对照区江苏镇江现场钉螺死亡率比较,除放养在江苏徐州 6 个月钉螺死亡率差异无统计学意义外($P > 0.05$),其他各个时间差异均具有非常显著性(P 均 < 0.01) (表 1)。

表 1 钉螺经不同时间放养后死亡率变化 (%)

Table 1 Changes of mortality rates of *Oncomelania hupensis* snails with different time

实验现场 Study area	3 个月 For 3 months(1991-12)	6 个月 For 6 months(1992-03)	9 个月 For 9 months(1992-06)	12 个月 For 12 months(1992-09)
济宁 Jining	14.29(25/175)	35.33(65/184)	83.33(140/168)	95.18(158/166)
徐州 Xuzhou	14.51(28/193)	16.23(31/191)	44.68(84/188)	79.57(1 819/2 286)
镇江 Zhenjiang	3.66(7/191)	10.93(20/183)	15.38(28/182)	32.38(406/1 254)
实验现场 Study area	15 个月 For 15 months(1992-12)	18 个月 For 18 months(1993-03)	21 个月 For 21 months(1993-06)	24 个月 For 24 months(1993-09)
济宁 Jining	98.84(170/172)	100.0(162/162)	100.0(164/164)	100.0(158/158)
徐州 Xuzhou	85.75(1 890/2 204)	86.24(1 711/1 984)	90.58(1847/2039)	76.73(1790/2333)
镇江 Zhenjiang	28.32(290/1 024)	30.68(301/981)	29.37(289/984)	31.58(576/1824)

2.1.2 繁殖

山东济宁和江苏徐州现场 3~6 月间每对钉螺平均产卵量分别为 15.93 只和 50.24 只,而江苏镇江为 69.16 只,差异均具有非常显著性(P 均 < 0.01)。山东济宁螺卵孵化率为 32.50%,江苏徐州为 71.00%,对照区江苏镇江为 89.00%,差异亦具有非常显著性(P 均 < 0.01)。山东济宁和江苏徐州幼螺成活率分别为 0 和 43.60%,对照区江苏镇江为 85.20%,差异均具有显著性(P 均 < 0.01) (表 2)。200 只钉螺放养 1a 后,山

东济宁仅存 8 只活螺,江苏徐州为 467 只,对照区江苏镇江为 848 只;第 2 年山东济宁已无活螺,徐州为 543 只,镇江为 1 248 只,实验区和对照区差异显著(P 均 <0.01)。

表 2 钉螺在不同现场产卵量、螺卵孵化率和孵出幼螺成活率

Table 2 Amount of breeding eggs, hatching rate of snail eggs and survival rate of young snails in study areas

实验现场 Study area	3~6 月份产卵量 No. breeding egg between March and June ($SD \pm S$)	螺卵 Snail egg		幼螺 Young snail	
		孵出量 No. hatching	孵化率(%) Hatching rate	成螺数 No. adult snails	存活率(%) Survival rate
济宁 Jining	15.930 1 $\pm$ 2.141 9	325	32.50	0	0
徐州 Xuzhou	50.244 4 $\pm$ 5.146 2	710	71.00	218	43.60
镇江 Zhenjiang	69.159 1 $\pm$ 5.467 5	890	89.00	426	85.20

2.2 北移钉螺生殖腺组织学、组织化学、酶组织化学和超微结构

2.2.1 组织学

江苏镇江钉螺睾丸小叶分支粗大丰满,内部充满大量发育成熟精子;卵巢呈长叶状,分支多而丰满,内部充满各个不同发育阶段的卵细胞。而山东济宁和江苏徐州钉螺的睾丸和卵巢则呈不同程度的萎缩状态,腺体被空泡样结构取代,各级生殖细胞减少,尤以山东济宁钉螺更为明显(图 3~图 8)。



图 3 镇江钉螺睾丸(HE 染色, $\times 200$)

Fig. 3 Testes of the snails fed in Zhenjiang (HE staining, $\times 200$)

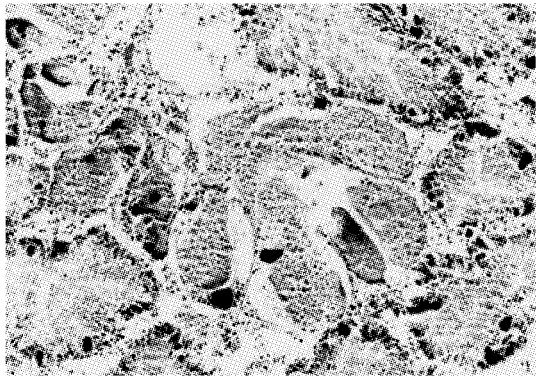


图 4 镇江钉螺卵巢(HE 染色, $\times 200$)

Fig. 4 Ovary of the snails fed in Zhenjiang (HE staining, $\times 200$)



图 5 萎缩的徐州钉螺睾丸(HE 染色, $\times 200$)

Fig. 5 Shrinking testes of the snails fed in Xuzhou (HE staining, $\times 200$)

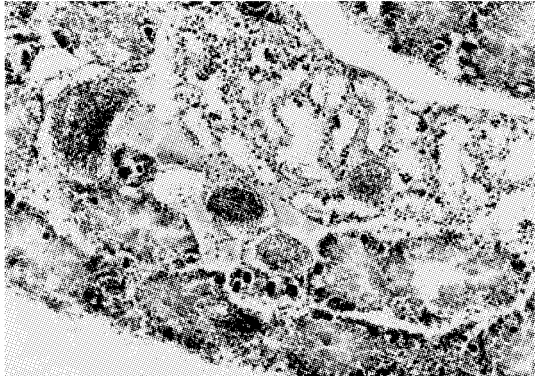


图 6 萎缩的济宁钉螺睾丸(HE 染色, $\times 200$)

Fig. 6 Shrinking testes of the snails fed in Jining (HE staining, $\times 200$)

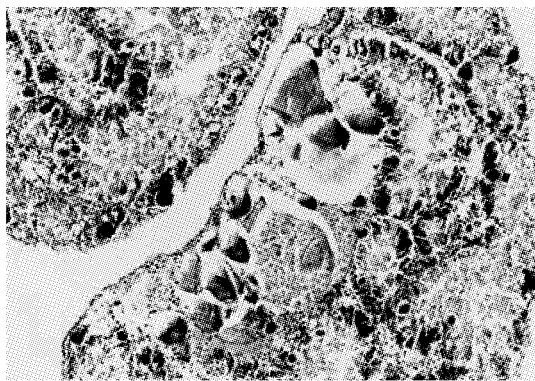


图7 萎缩的徐州钉螺卵巢(HE 染色, ×200)

Fig. 7 Shrinking ovary of the snails fed in Xuzhou (HE staining, ×200)

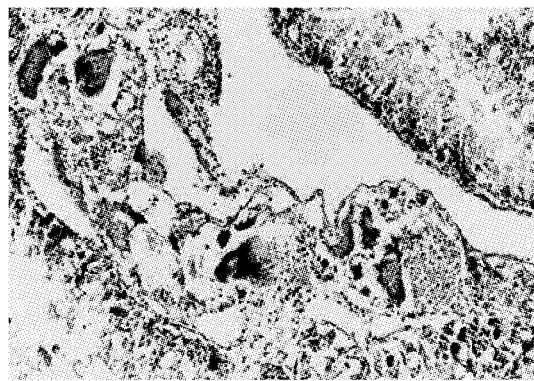


图8 萎缩的济宁钉螺卵巢(HE 染色, ×200)

Fig. 8 Shrinking ovary of the snails fed in Jinan (HE staining, ×200)

2.2.2 组织化学和酶组织化学

(1) 定性 江苏镇江钉螺睾丸内糖原、DNA 丰富,CCO、5'-NT、LDH 活性高,SDH 活性较低;山东济宁和江苏徐州钉螺睾丸内糖原、DNA 含量及 CCO、5'-NT、LDH 酶活性均较镇江钉螺降低,但 SDH 酶活性升高,这些变化均尤以山东济宁钉螺更为显著。江苏镇江钉螺卵巢内糖原、组蛋白丰富,CCO、5'-NT、LDH、G-6-Pase 活性均高;山东济宁和江苏徐州钉螺卵巢内糖原、组蛋白含量和酶活性均有下降(表3)。

表3 钉螺生殖腺的组织化学与酶组织化学反应⁽¹⁾Table 3 Reactions of histochemistry and enzyme-histochemistry in gonads of *Oncomelania hupensis* snails

实验现场 Study area	PAS		组蛋白 Histone	DNA		CCO	
	睾丸 Testes	卵巢 Ovary	卵巢 Ovary	睾丸 Testes	卵巢 Ovary	睾丸 Testes	卵巢 Ovary
济宁 Jinan	++(↓)	+~-(↓↓)	+~-(↓↓)	++(↓↓)	+++~++(↓)	+++~++(↓)	
徐州 Xuzhou	++(↓)	++~+(↓)	++~+(↓)	+++~++(↓)	++++	+++~++(↓)	
镇江 Zhenjiang	++++	++++	++++	++++	++++	++++~++++	
实验现场 Study area	5'-NT		SDH		LDH		G-6-Pase
	睾丸 Testes	卵巢 Ovary	睾丸 Testes	卵巢 Ovary	睾丸 Testes	卵巢 Ovary	卵巢 Ovary
济宁 Jinan	+(↓)	++~+(↓)	+++++(↑↑)	+++~++(↓)	+~-(↓↓)		+(↓↓)
徐州 Xuzhou	+(↓)	++~+(↓)	++++(↑)	+++~++(↓)	++~+(↓)		++(↓)
镇江 Zhenjiang	++	++++~+++++	++++	++++	++++		++++

(1) -: 阴性反应;+: 阳性反应;+: 中等阳性反应;+: 较强阳性反应;+: 强阳性反应。

(↓): 反应强度较对照区下降;(↓↓): 反应强度较对照区显著下降。

(1) -: Negative reaction;+: Positive reaction;+: Moderately positive reaction;+: Intensely positive reaction;+: Most intensely positive reaction.

(↓): Compared with the control, the intensity of reaction declined; (↓↓): Compared with the control, the intensity of reaction declined significantly.

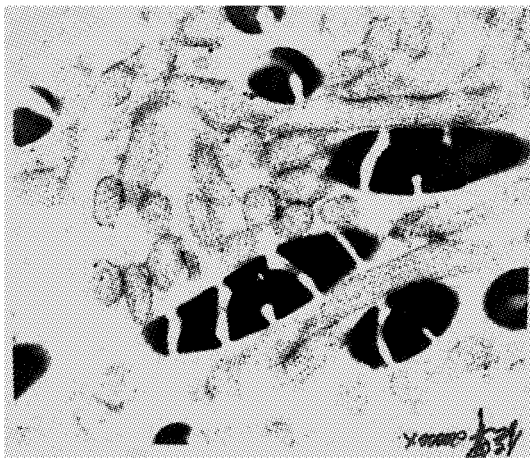
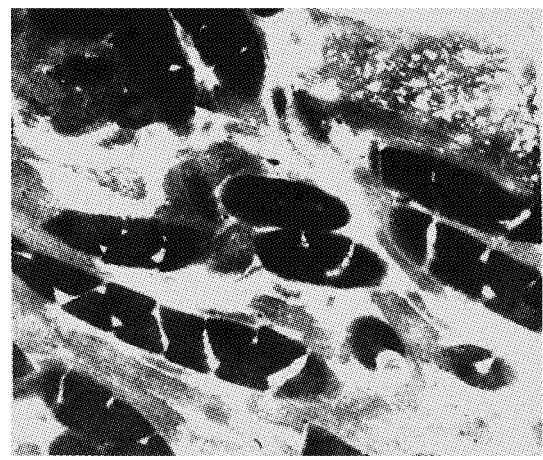
(2) 定量 除睾丸 SDH 外,江苏镇江钉螺睾丸和卵巢 PAS 反应、组蛋白、DNA、CCO、SDH、LDH 的灰度值均高于山东济宁和江苏徐州钉螺(P 均 <0.01),而山东济宁和江苏徐州钉螺睾丸 SDH 的灰度值高于江苏镇江钉螺(P 均 <0.01)(表4)。

2.2.3 超微结构

江苏镇江钉螺睾丸内含精子丰富,成熟精子分头、体两部分,头部含一电子密度极高的呈螺旋状的染色体,嵴棱角分明;体较疏松(图9)。北移山东济宁和江苏徐州钉螺睾丸内精细胞减少,成熟精子头、体部呈不同程度的肿胀,电子密度下降、破溃,甚至呈崩解状,尤以山东济宁钉螺更为明显(图10、图11)。

表 4 钉螺生殖腺组织化学和酶组织化学的平均灰度值($SD \pm S$)Table 4 Average gray densities of histochemical and enzyme-histochemical reactions in gonads of *Oncomelania hupensis* snails

实验现场 Study area	PAS		组蛋白 Histone	DNA
	睾丸 Testes	卵巢 Ovary	卵巢 Ovary	睾丸 Testes
济宁 Jining	0.271 9 $\pm$ 0.019 5	0.231 4 $\pm$ 0.020 9	0.277 5 $\pm$ 0.044 9	0.206 9 $\pm$ 0.019 2
徐州 Xuzhou	0.336 8 $\pm$ 0.042 4	0.225 3 $\pm$ 0.024 2	0.317 8 $\pm$ 0.057 8	0.233 6 $\pm$ 0.013 1
镇江 Zhenjiang	0.359 6 $\pm$ 0.028 8	0.335 9 $\pm$ 0.036 3	0.476 5 $\pm$ 0.031 8	0.255 4 $\pm$ 0.019 6
实验现场 Study area	CCO		SDH	LDH
	睾丸 Testes	卵巢 Ovary	睾丸 Testes	睾丸 Testes
济宁 Jining	0.407 0 $\pm$ 0.048 9	0.250 1 $\pm$ 0.022 7	0.704 5 $\pm$ 0.101 0	0.350 1 $\pm$ 0.085 5
徐州 Xuzhou	0.394 2 $\pm$ 0.044 0	0.314 8 $\pm$ 0.026 3	0.563 0 $\pm$ 0.086 3	0.476 0 $\pm$ 0.082 3
镇江 Zhenjiang	0.624 3 $\pm$ 0.071 8	0.358 3 $\pm$ 0.042 4	0.431 9 $\pm$ 0.043 5	0.550 8 $\pm$ 0.070 7

图 9 镇江钉螺睾丸内精子($\times 20\ 000$)Fig. 9 Spermatozoa in the testes of the snails fed in Zhenjiang ($\times 20\ 000$)图 10 徐州钉螺睾丸内精子($\times 20\ 000$)Fig. 10 Spermatozoa in the testes of the snails fed in Xuzhou ($\times 20\ 000$)

2.3 北移传代钉螺北方适应性

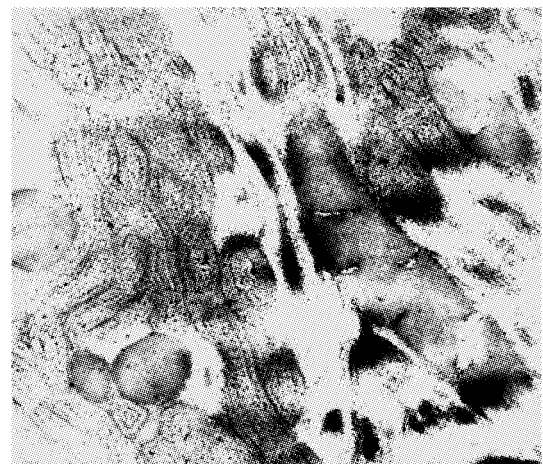
江苏南京龙潭钉螺移至徐州放养 3a 后的第 3 代子螺,在山东济宁放养 1a 后的存活率即为 0;在江苏徐州 4~8a 的钉螺存活率分别为 34.76%、16.93%、6.17%、0.74% 和 0;而对照区江苏镇江钉螺存活率分别为 71.67%、68.38%、60.54%、58.42% 和 56.72%。江苏徐州与对照区镇江钉螺存活率比较,差异具有非常显著性(P 均 < 0.01)(表 5)。

2.4 北移传代钉螺对血吸虫的易感性

钉螺与毛蚴分别以 1:5、1:20、1:40 比例感染时,江苏徐州子代钉螺感染率分别为 14.89%、65.96% 和 62.22%,对照江苏镇江子代钉螺感染率分别为 16.84%、56.25% 和 69.41%,差异均无显著性(P 均 > 0.05)(表 6)。

3 讨论

国外因兴建大型水利工程导致曼氏或埃及血吸虫病流行区扩大或流程度加重不乏其例。如在非洲大陆的埃及、加纳、尼日尔、尼日利亚、坦桑尼亚、喀麦隆、苏丹、塞内加尔等国的埃及或曼氏血吸虫病流行被认为

图 11 济宁钉螺睾丸内精子($\times 20\ 000$)Fig. 11 Spermatozoa in the testes of the snails fed in Jining ($\times 20\ 000$)

均与大型水库建设有关^[15~25]。其原因是,流行于非洲大陆的为曼氏和埃及血吸虫病,曼氏和埃及血吸虫的中间宿主双脐螺和小泡螺均系完全生活在水体中的水生螺类,可随水四处扩散。因而,水利工程建设是导致曼氏和埃及血吸虫病流行的主要因素^[26]。而在中国大陆流行的为日本血吸虫病,日本血吸虫中间宿主为钉螺。钉螺系狭温性水陆两栖软体动物,其生存和繁殖均需一定的自然环境条件,如气温、湿度、植被及土壤等,因而我国大陆钉螺的分布区域局限在北纬 33°15' 以南地区^[4]。钉螺生态习性与水生螺完全不同,钉螺的幼螺在水体中生长发育,可随水扩散;但成螺主要栖息在半干半湿的土表,或“冬陆夏水”的江湖洲滩上,扩散形式主要是附着在漂浮物上随水流扩散^[5]。有关水利工程建设造成钉螺扩散蔓延也有报道,但通常与灌溉模式密切相关^[27~29]。

表 5 钉螺放养 4~8a 后存活率变化(%)

Table 5 Changes of survival rates of *Oncomelania hupensis* snails after 4—8 years

实验现场 Study area	4a After 4 years (1995-09)	5a After 5 years (1996-09)	6a After 6 years (1997-09)	7a After 7 years (1998-09)	8a After 8 years (1999-09)
徐州 Xuzhou	34.76(236/679)	16.93(175/1 034)	6.17(61/989)	0.74(8/1 082)	0(0/1 041)
镇江 Zhenjiang	71.67(693/967)	68.38(982/1 436)	60.54(1 045/1 726)	58.42(1370/2345)	56.72(1 630/2 874)
χ^2	221.0197	639.308 7	770.056 3	1 024.674 0	1 011.573 0
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表 6 北移传代钉螺对日本血吸虫易感性

Table 6 Susceptibility of *Oncomelania hupensis* snails for 3 years to *Schistosoma japonicum*

实验现场 Study area	1:5 ⁽¹⁾			1:20 ⁽¹⁾			1:40 ⁽¹⁾		
	感染数 No. infected	阳性数 No. positive	感染率(%) Infection rate	感染数 No. infected	阳性数 No. positive	感染率(%) Infection rate	感染数 No. infected	阳性数 No. positive	感染率(%) Infection rate
徐州 Xuzhou	94	14	14.89	94	62	65.96	90	56	62.22
镇江 Zhenjiang	95	16	16.84	80	45	56.25	85	59	69.41
χ^2	—	—	0.134 3	—	—	1.720 0	—	—	1.002 9
P	—	—	>0.05	—	—	>0.05	—	—	>0.05

(1) 钉螺与毛蚴感染比例 the proportion of *Oncomelania hupensis* snail to miracidium of *Schistosoma japonicum* for infection

南水北调东线工程从长江引水的取水口位于有钉螺分布的江苏省江都市,并且主要输水干线需要穿越江苏省历史有螺区进入北纬 33°15' 以北地区。因而,在南水北调工程实施并运行后,会否随着调水导致钉螺扩散,使得江苏省历史有螺区重新有钉螺孳生,并进而沿着输水干线向北扩散,在北方形成新的钉螺分布区,从而导致血吸虫病流行区向北扩展引起了广泛关注^[30~34]。南水北调对血吸虫病流行的影响,关键在于钉螺能否随调水扩散,以及如果一旦有钉螺扩散到非分布区后,能否生存和繁殖,并形成新的钉螺分布区^[35]。钉螺在自然状态下随水扩散形式主要是吸附在漂浮物载体上的成螺和营水生活的幼螺,随水流动由上游向下游扩散^[5]。已有研究资料证明,南水北调工程采用了 13 级泵站逐级抽提由地势低的南方向地势高的北方调水。在其逐级提水过程中,由于水泵的作用可使钉螺成螺与载体分离,脱落的钉螺掉入深水区后不能存活;同时,由于在输水线沿途所修建的水闸、拦污栏、消力池等水工建筑物均具有阻拦、沉淀钉螺作用,因而在调水过程中,钉螺成螺通过输水干线扩散的危险性较小^[36,37]。但由于长江中下游是血吸虫病重度流行区,南水北调进水口周围的江滩上就有钉螺孳生;输水干线穿越江苏省血吸虫病流行区进入北纬 33°15' 以北地区的钉螺非分布区。营水生活的钉螺幼螺随水流漂浮扩散的可能性依然难以排除。

为探讨一旦有钉螺随调水扩散到 33°15' 以北地区后能否生存并繁殖,本研究沿着南水北调东线工程输水干线,在钉螺非分布区现场布置观察点,采用人工北移幼螺笼养法定量观察幼螺在北纬 33°15' 以北地区的生存和繁殖。结果,经过 18 个月后,山东济宁观察点钉螺死亡率达 100%,子代幼螺成活率亦为 0,证明钉螺在北纬 35°23' 以北地区难以生存。在江苏徐州,钉螺经过 9~24 个月后,死亡率显著增高(P 均 <0.01),产卵

量、螺卵孵化率、子代幼螺成活率及年增殖数均显著下降(P 均 < 0.01)。钉螺生殖腺的组织学、组织化学、酶组织化学和超微结构观察发现,钉螺北移徐州 3~6 个月后,雌、雄螺生殖腺萎缩,生殖细胞减少;精子出现不同程度变形;参与形成生殖细胞的有关组化成分减少;与生殖细胞发育、成熟有关的酶活性发生异常变化。现场生态学观察及实验室形态学与生理生化研究均证明,虽然钉螺在徐州能够存活一定时间,但因其繁殖力显著下降,种群数逐渐减少。因而,北纬 $33^{\circ}21'$ 地区仍不适合钉螺生存与繁衍。

由于在徐州经过 24 个月后,虽然钉螺生存率和繁殖力明显降低,但仍有部分钉螺能够生存并繁殖。为了进一步阐明北移徐州生存并能传代子代钉螺能否逐渐适应北方环境而得以繁衍,及对血吸虫的易感性有无变化,本研究在对在徐州生存的子 3 代钉螺继续纵向观察的同时,又将其移至山东济宁进行观察。结果,江苏徐州钉螺生存率逐年持续下降,呈逐渐消亡趋势;到第 8 年,钉螺全部死亡。北移至山东济宁钉螺,一年内全部死亡。表明北移至徐州经自然选择能够存活的钉螺仍然难以适应北方的自然环境而繁衍。北移至江苏徐州的钉螺在当地水塘水中的感染实验证明,徐州传代钉螺对血吸虫仍然保持易感性。

本研究认为,似可将中国大陆北纬 $35^{\circ}23'$ 以北地区列为钉螺非生存区;北纬 $35^{\circ}23' \sim 33^{\circ}15'$ 列为钉螺非适宜生存区; $33^{\circ}15'$ 以南地区为钉螺适宜生存区。若南水北调将钉螺移至非生存区,钉螺则不能存活。若移至非适宜生存区,钉螺因不能适应北方环境,其生存与繁殖力逐年下降,呈逐渐消亡趋势。

由于移至徐州并且能够存活的钉螺在当地的水体中仍能保持对血吸虫的易感性,提示若南水北调将钉螺移至非适宜生存区,钉螺仍然能生存一定时间,在钉螺存活期间,一旦有传染源输入,在当地仍有构成血吸虫病传播的潜在危险。故在南水北调东线工程规划与建设过程中,应进一步加强水泵站前防螺阻螺设施建设,以防止或减少钉螺随水进入输水河道及扩散。在调水运行后,在输水干线穿行的有螺区的水工设施周围,应强化查螺灭螺措施,降低钉螺密度以减少钉螺扩散;在输水干线穿行的钉螺非适宜分布区,应加强钉螺监测措施,以确保南水北调安全运行。

References:

- [1] Engels D, Chitsulo L, Montresor A, *et al.* The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*, 2002, 82(2): 139–146.
- [2] Hao Y, Wu XH, Xia G, *et al.* Schistosomiasis situation in the People's Republic of China in 2005. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2006, 18(5): 321–324.
- [3] Huan H C. Characteristics of *Schistosoma japonicum* and schistosomiasis japonica. In: Yuan H C, Zhang S J, Jiang Q W. *Schistosomiasis control: Theory and Practice*. Shanghai: Fudan University Press, 2003. 3–4.
- [4] Department of Diseases Control, Ministry of Health. *Handbook of Schistosomiasis Control (the third)*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2000. 23.
- [5] Wang T P, He J C. Ecology of *Oncomelania* Snail. In: Zhou X N. *Science on Oncomelania Snail*. Beijing: Science Press, 2005. 148, 154–157.
- [6] Chen Z, Yang G J. Geography of *Oncomelania* Snail. In: Zhou X N. *Science on Oncomelania Snail*. Beijing: Science Press, 2005. 185.
- [7] Guo Y H. Ecology of *Oncomelania* Snail. In: Mao C P. *Biology of schistosome and control of schistosomiasis*. Beijing: People's Medical Publishing House, 1990. 199–200.
- [8] Huang Y X, Tian Z Z, Sun L P, *et al.* Impact of project diverting Yangtze River water to Northern Jiangsu on transmission towards north of *Oncomelania hupensis* snails. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2005, 17(3): 184–189.
- [9] Li F J. *Anatomy and Comparative Anatomy of Oncomelania Snail*. Wuhan: Hubei People's Press, 1956. 52.
- [10] Chayen J, Bitensky Z, Butcher R G. *Practical Histochemistry*. New York: John Wiley and Sons, 1973. 70–73.
- [11] Kazuro O, Nakane P K. *Techniques for Enzyme Cytochemistry*. Zhong CS Translation. Shanghai: Shanghai Medical University Press, 1989. 52.
- [12] Wachstein M, Meisel E. Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH; with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *American Journal of Clinical Pathology*, 1957, 27(1): 13–23.
- [13] Culling C F A. *Handbook of histopathological and histochemical techniques: including museum techniques (the third)*. London: Butterworth, 1974. 320.
- [14] Nachlas M M, Tsou K C, De Souza E, *et al.* Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1957, 5(4): 420–436.
- [15] Dazo B C, Biles J E. The schistosomiasis situation in the lake Nasser areas. The Arab Republic of Egypt. World Health Organization Schistosomiasis, 1971, 72: 23.
- [16] World Health Organization. The control of schistosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organization Technical Report Series, 1985, 728: 1–113.
- [17] Khalil M. The national campaign for the treatment and control of bilharziasis for the scientific and economic aspects. *Journal of Royal Egypt Medical Association*, 1949, 32: 817–856.

- [18] Ernould J C, Ba K, Sellin B. The impact of the local water-development programme on the abundance of the intermediate hosts of schistosomiasis in three villages of the Senegal River delta. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1999, 93(2): 135–145.
- [19] Hunter J M, Rey L, Scott D. Man-made lakes and man-made diseases. Towards a policy resolution. *Social Science and Medicine*, 1982, 16(11): 1127–1145.
- [20] Southgate V R. Schistosomiasis in the Senegal River Basin: before and after the construction of the dams at Diama, Senegal and Manantali, Mali and future prospects. *Journal of Helminthology*, 1997, 71(2): 125–132.
- [21] Audibert M, Josserean R, Josse R, *et al.* Irrigation, schistosomiasis, and malaria in the Logone Valley, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1990, 42(6): 550–560.
- [22] Talla I, Kongs A, Verle P, *et al.* Outbreak of intestinal schistosomiasis in the Senegal River Basin. *Annals of Social Belgium Medicine and Tropica*, 1990, 70(3): 173–180.
- [23] Ofiozie I E. Human health and sustainable water resources development in Nigeria: Schistosomiasis in artificial lakes. *Natural Resources Forum*, 2002, 26: 150–160.
- [24] Oladejo S O, Ofiozie I E. Unabated schistosomiasis transmission in Erinle River Dam, Osun State, Nigeria: evidence of neglect of environmental effects of development projects. *Tropical Medicine and International Health*, 2006, 11(6): 843–850.
- [25] Utzinger J, Tanner M. Microhabitat preferences of *Biomphalaria pfeifferi* and *Lymnaea natalensis* in a natural and a man-made habitat in southeastern Tanzania. *Memo rias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2000, 95(3): 287–294.
- [26] Steinmann P, Keiser J, Bos R, *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006, 6(7): 411–425.
- [27] Dai S J. Investigation on the spread of *Oncomelania* snails induced by the Chencun irrigation water conservancy project and changes of the endemic situation of schistosomiasis. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 1995, 7(6): 355–356.
- [28] Cheng J Q, Lu S Y. The influence of the Four Lakes engineering on the variation of the snail ecological environment and on the endemic of schistosomiasis. *Journal of Environment and Health*, 1990, 7(3): 101–103.
- [29] Xiao R W, Ye J F, Tao L F. Studies on snail breeding after the construction of the Three Gorges Dam area and the spread of *Oncomelania* snail in lower reaches of the dam to reservoir area. In: Fang ZY. *Impact of Three Gorges Reservoir Project on ecology and environment*. Beijing: China WaterPower Press, 1988. 159–207.
- [30] Zhang B Y. Can the South-to-North Water Diversion Project induce the spread of snails to the north? *Popular Science*, 1994, (1): 14–15.
- [31] Wang T P, Zhang S Q. Relationship between the South-to-North Water Diversion Project and snails spread and schistosomiasis transmission. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2002, 33(2): 87–89.
- [32] Zhou X N, Wang L Y, Zheng J, *et al.* Potential impact of South-North Water Transfer Project on transmission and distribution of schistosomiasis japonica. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2003, 15(4): 294–297.
- [33] Shi Y. Thinking about the snail spread during the construction of the South-to-North Water Transfer Project. *Scientific and Technical Information of Gansu*, 2004, 33(5): 183–184.
- [34] Gu F. The South-to-North Water Diversion Project: with the consideration of the schistosomiasis spreading to the north of China. *Medicine and Health Care*, 2005, 13(3): 35.
- [35] Xiao R W, Sun Q Q, Chen Y T. Does the South-to-North Water Diversion Project lead to the spread of *Oncomelania* snails to the north? *Geographical Research*, 1982, 1(4): 73–79.
- [36] Huang Y X, Gao Y, Hong Q B, *et al.* Observation on *Oncomelania hupensis* spread in Jiangdu pumping station in the east route of South-North Water Diversion Project. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2006, 18(4): 247–251.
- [37] Huang Y X, Xu Z K, Ren Z Y, *et al.* Impact of water flow on transmission towards north of *Oncomelania hupensis* after the first phase of the east route of South-to-North Water Diversion Project. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2007, 19(2): 91–97.

参考文献:

- [2] 郝阳,吴晓华,郑浩,等. 2006 年全国血吸虫病疫情通报. *中国血吸虫病防治杂志*, 2007, 19(6): 401–404.
- [3] 袁鸿昌. 日本血吸虫(病)特征. 见:袁鸿昌,张绍基,姜庆五主编. *血吸虫病防治理论与实践*. 上海:复旦大学出版社, 2003. 3–4.
- [4] 中华人民共和国卫生部疾病控制司. *血吸虫病防治手册*(第 3 版). 上海:上海科学技术出版社, 2000. 23.
- [5] 汪天平,何家昶. 钉螺的生态学. 见:周晓农主编. *实用钉螺学*. 北京:科学出版社, 2005. 148, 154–157.
- [6] 陈朝,杨国静. 钉螺的地理学. 见:周晓农主编. *实用钉螺学*. 北京:科学出版社, 2005. 185.
- [7] 郭源华. 钉螺的生态. 见:毛守白主编. *血吸虫生物学与血吸虫病的防治*. 北京:人民卫生出版社, 1990. 299–300.
- [8] 黄铁昕,田忠志,孙乐平,等. 江苏省江水北调对钉螺北移扩散影响的研究. *中国血吸虫病防治杂志*, 2005, 17(3): 184–189.
- [9] 李赋京. *钉螺的解剖和比较解剖*. 武汉:湖北人民出版社, 1956. 52.
- [11] 小川和郎,中根一穗. *酶组织细胞化学技术*. 钟慈声译. 上海:上海医科大学出版社, 1989. 52.
- [27] 戴尚金. 陈村灌区水利工程引起钉螺扩散和疫情变化的调查分析. *中国血吸虫病防治杂志*, 1995, 7(6): 355–356.
- [28] 程锦泉,鲁生业. 四湖工程对钉螺生态环境演变及血吸虫病流行影响的探讨. *环境与健康杂志*, 1990, 7(3): 101–103.
- [29] 肖荣伟,叶嘉馥,陶亮凤. 长江三峡建坝库区钉螺孳生及坝下游钉螺向库区扩散问题的研究. 见:方子云主编. *长江三峡工程生态与环境影响论文集*. 北京:水利水电出版社, 1988. 159–207.
- [30] 赵伯阳. 南水北调会使血吸虫病北移吗? *科学大众(中学版)*, 1994, (1): 14–15.
- [31] 汪天平,张世清. 南水北调与钉螺扩散和血吸虫病蔓延. *中华流行病学杂志*, 2002, 33(2): 87–89.
- [32] 周晓农,王立英,郑江,等. 南水北调对血吸虫病传播扩散的调查. *中国血吸虫病防治杂志*, 2003, 15(4): 296–297.
- [33] 石岩. 南水北调工程中钉螺扩散问题刍议. *甘肃科技纵横*, 2004, 33(5): 183–184.
- [34] 谷峰. 南水北调 谨防“瘟神”向北入侵. *医药与保健*, 2005, 13(3): 35.
- [35] 肖荣伟,孙庆琪,陈云庭,等. 南水北调是否会引起钉螺北移的研究. *地理研究*, 1982, 1(4): 73–79.
- [36] 黄铁昕,高扬,洪青标,等. 南水北调东线江都泵站钉螺扩散情况现场观察. *中国血吸虫病防治杂志*, 2006, 18(4): 247–251.
- [37] 黄铁昕,徐子恺,任志远,等. 南水北调东线一期工程实施后水流水势变化对钉螺北移的影响. *中国血吸虫病防治杂志*, 2007, 19(2): 91–97.



图1 钉螺放养点分布图

Fig. 1 Distribution of the breeding sites of *Oncomelania* snails

济宁 Jinan; 徐州 Xuzhou; 宝应 Baoying; 镇江 Zhenjiang; 江都 Jiangdu; 钉螺分布北界线 The northern limit of distribution of *Oncomelania* snails; 钉螺放养点 Breeding site of *Oncomelania* snail; 东线工程取水口 The water intake of the Eastern Route Project

1.3 钉螺生存和繁殖观察

1.3.1 生存

于1991年9月初,在每只螺笼内放置100只实验钉螺(雌雄各半),用细铁丝封紧笼盖后,将螺笼呈30°角倾斜放置在3个观察现场的水塘边,以使螺笼内泥土1/3浸在水中,2/3在水线上(图2)。而后每3个月分别从各现场提取2只螺笼,用20孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土,收集全部钉螺,用敲击法鉴定钉螺死活^[5],计算钉螺死亡率。

1.3.2 繁殖

于1992年2月初,在3个现场分别筛取放养活螺100只(雌雄各半),重新设框,方法同上。3~6月间,每隔30 d用120孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土1次,在解剖镜下分离捡获螺卵。筛出的钉螺重新放回新铺泥土的螺笼内继续放养。观察钉螺在当地产卵量。

5月份从3个现场钉螺所产的同一批螺卵中,分别选取1000只泥皮完整的螺卵置于直径9 cm的培养皿中,加入当地水塘水至水深2 cm,置室温(25℃)下孵化。每隔5 d用吸管吸出幼螺,记录孵出的幼螺数,并补充培养皿内的水,保持水深为2 cm。共观察30 d,计算孵化率。取同批孵出的子代幼螺各500只,分别置螺笼内放养于现场。5个月后以20孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土,收集全部钉螺,统计活成螺(体长>5 mm)数量。

1991年9月,在3个现场分别设置2个螺笼,内置200只钉螺(雌雄各半)放养在现场,分别于1、2a后用20孔/25.4 mm铜丝筛筛洗笼内泥土,收集全部钉螺,以敲击法鉴定钉螺死活^[4],统计放养1、2a的钉螺增殖数。



图2 现场螺笼安置图

Fig. 2 Placement of snail cages in study areas

1.4 北移钉螺生殖腺组织学、组织化学、酶组织化学及超微结构观察

放养3个月(1991年11月),分别从3个现场筛选活雄螺,放养6个月后(1992年3月)筛选活雌螺。两次采集的钉螺标本均参照文献^[9]方法破壳,解剖镜下去壳,暴露钉螺软体,分离睾丸或卵巢,挑选无机械损伤的生殖腺,分别作如下处理:

(1) 组织学

置10%福尔马林溶液中固定,常规石蜡包埋、切片,HE染色。

(2) 组织化学

置100%乙醇中固定6h,常规石蜡包埋、切片,参照文献^[10]方法显示糖原(PAS反应)。

将切片放入60℃ 1 mol·L⁻¹的HCl溶液中60 min,4℃ 1 mol·L⁻¹的HCl溶液中1 min,Schiff试剂中60 min,连二亚硫酸钠水溶液及蒸馏水中冲洗。显微镜下可见DNA呈红紫色。

置4℃预冷的甲醛钙溶液(4%甲醛溶液100 ml中加氯化钙4 g)中固定24 h后,常规石蜡包埋、切片。切片脱蜡后置100℃ 5%三氯醋酸水溶液中15 min,再置于70%乙醇和水中漂洗,用22℃ 0.1%快绿(Fast Green FCF)染色30 min,镜下可见碱性蛋白(精氨酸和赖氨酸)呈亮绿色。

(3) 酶组织化学

新鲜标本不经固定,即刻置于LEICA CM1850型冰冻切片机(德国产)冷冻15 min后作连续切片,参照文献^[11]方法显示细胞色素C氧化酶(cytochrome oxidase, CCO)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH);Wachstein法^[12]显示5'-核苷酸酶(5'-Nucleotidase, 5'-NT);改良Culling法^[13]显示葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-Pase);Nachlas法^[14]显示琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)。

上述染色片经双蒸水漂洗,自然晾干,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,制成玻片标本。

进行上述组织化学、酶组织化学反应时,分别采用唾液消化、沸水或化学剂破坏及免去作用液中的底物等作方法对照。同时分别选用小白鼠含相应成分或酶活性高的组织切片与钉螺切片同缸孵育染色,作为阳性对照。根据着色反应深浅,在光镜下分为5个等级:阴性(-)、阳性(+)、中等阳性(++)、较强阳性(+++)、强阳性(++++) ,进行定性观察。3个观察现场各随机抽取一定数量切片,采用IBAS200图像分析仪(德国产)测定糖原、DNA、组蛋白、CCO、LDH和SDH等6项指标的灰度值。每一指标测20只钉螺标本,每一标本随机测5个视野,取灰度值的平均值作定量比较。

(4) 超微结构观察

取3个现场活雄螺软体,解剖镜下分离睾丸组织,挑选无机械损伤的标本迅速置于经4℃预冷的2.5%戊二醛溶液中固定2 h,经固定、脱水、浸泡、聚合包埋后,用LKB超薄切片机(瑞典产)连续切片,醋酸铀和枸橼酸铅复染后,在OPTON EM10C/CR型透射电镜(德国产)下观察,拍照。