

## 两种鸚形吸虫的后期生活史及其 囊蚴壁组织学和组织化学的研究\*

潘金培

(中国科学院水生生物研究所)

### 提 要

本文报道了用寄生在史氏黄颡鱼体腔内的 *Apatemon pellucidus* Yamaguti, 1933 (Strigeidae) 囊蚴和寄生在歧尾斗鱼、麦穗鱼和线细鲮肌肉内的 *Cyathocotyle sinense* sp. nov. (Cyathocotylidae) 囊蚴对家鸭作人工感染试验的结果。描述了两种鸚形吸虫的发育,并用组织学和组织化学方法研究了其囊蚴壁的构造和成分。另外,还对两种囊蚴壁的起源作了探讨。试验结果表明,囊蚴壁的内壁属胶元纤维结构、外壁为网状纤维结构;囊壁的組織化学成分主要为碳水化合物蛋白质复合物(包括粘蛋白、糖蛋白和中性粘多糖),囊蚴壁外壁的 DNA 含量不多, RNA 含量较丰富。外壁含酸性脂肪;内壁不含脂肪。作者认为两种囊蚴的外壁可能来源于寄主的网状内皮系统;内壁可能为幼虫本身分泌物形成。

关于蠕虫囊蚴壁组织学和组织化学的研究, Hunter & Dalton (1939) 和 Hunter & Hunter (1940) 等人曾进行过研究。他们报告了 *Clinostomum marginatum* 和 *Posthodiplostomum minimum* 囊蚴的组织学结构,并首先提出了构成囊蚴的二层囊壁的起源不同。但此后这方面的文献则不多见。五十年代中期,应用组织化学在吸虫方面的研究逐渐开始。Singh & Leward (1959) 对体外成囊的 *Notocotyle urbanensis* 的囊壁作了较为详细的研究。Bogitsh (1961, 1962)、Lynch & Bogitsh (1962) 报告了 *Posthodiplostomum minimum* 和 *Neoechinorhynchus cylindratus* 囊壁的組織学和化学特性。Dixon (1975) 报告了 *Oloacitrema narrabeenensis* 囊壁的化學組成。Alderson (1975) 用电子显微镜和组织化学方法对 *Spelotrema nicolli* 的囊壁进行了研究,并提出囊壁由四层組織结构和化学特性不同的囊膜组成。此外, Leward & Lee (1954, 1955) 报告了若干种蠕虫幼虫在寄主内转移和成囊过程的机制。Глинцинская (1961, 1962) 曾对几种吸虫发育过程中脂肪和糖元含量的变动现象作了报道。我国应用组织化学方法对吸虫的研究,开始于60年代。李树华(1964)和(1965)分别对怡乐村并殖吸虫 (*Paragonimus iloksuenensis* chen,

\* 此项工作是在广州中山医学院寄生虫教研组陈心陶教授指导下完成的,并得到徐秉银教授的鼓励和帮助,谨致以衷心感谢。

1940)和斯氏狸殖吸虫(*Pagumagonimus skrjabini* chen, 1959)的囊壁组织化学进行了研究。何毅勋(1962、1963、1964)对日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)组织化学的成分研究得比较详细。由于通过对囊壁组织化学的研究有助于了解虫体组织内各种主要化学成分的性质和分布、所以,可为寄生虫的离体培养和生活史的研究提供一定的依据。

## 材 料 和 方 法

### 1. 生活史试验

用人工胃液消化鱼肉或直接用压碎法取出囊蚴,用吸管将其注入刚孵出小鸭的食道中。定期解剖,观察虫体的发育情况。囊蚴及成虫标本,均用乙醇福尔马林固定,酸性洋红或台氏苏木精染色。

### 2. 组织学和组织化学试验

囊蚴取出后,立即进行固定。部分囊蚴连同寄主组织一起固定,以作组织学的观察。*Cyathocotyle sinense* 囊蚴采用双重包埋法,先将囊蚴包埋于1.2%的琼脂中,然后脱水、透蜡,石蜡切片。

(1) 组织学试验 囊蚴固定于 Carnoy's 液或 10%中性福尔马林。用 Carnoy's 液固定的标本,可保存于 80%酒精中备用。石蜡包埋中,切片厚度为 8 微米,采用: Mallory 氏阿尼林蓝胶元纤维染色法、Van Gieson 氏胶元纤维染色法及 Gormori 氏嗜银纤维染色法。

#### (2) 组织化学试验

a, 蛋白质: 囊蚴固定于 10%中性福尔马林液, 切片厚度为 8 及 16 微米, 按 Bonhag 氏溴酚蓝(B.P.B)法染色, 并分升汞溴酚蓝和不含升汞溴酚蓝二种, 测定其总蛋白质和碱性蛋白质。按 Millon 氏法 (Bensley & Gersh 氏变法) 测定含酪氨酸的蛋白质。Adems 氏二甲氨基苯甲醛——亚硝酸盐 (DMAB-nitrite) 法及 Romieu 法测定含色氨酸的蛋白质。Mayer 氏粘洋红(Musin-Carmine)法及 Leach 氏俾斯麦褐法 (Bismark brown) 测定其类粘蛋白。

b, 己糖类: 囊蚴固定于 Carnoy's 液 4—8 小时, 用 96%乙醇洗涤除去固定液, 保存于 96%乙醇中, 或用乙醇福尔马林固定 24 小时, 用 80%乙醇洗涤, 并保存于 80%乙醇中。如上法制片, 切片厚度 8 微米, 采用 McManus (1946) 法用高碘酸—Shiff 氏反应 (PAS 反应), 同时进行 4 组对照染色反应: (a) 不经高碘酸氧化, 直接用 Shiff 氏试剂染色, 证明切片是否含有游离醛存在; (b) 用 Gersh 法乙酰化来阻止 PAS 反应 (Pears, 1960), 证明 PAS 阳性反应是否由于 1:2 乙二醇基的存在; (c) 人工唾液或淀粉酶消化糖元。取唾液 10 毫升, 用蒸馏水稀释 10 倍并过滤, 切片在 37°C 滤过唾液内 置 10—20 分钟, 或用磷酸缓冲液配制 1%淀粉酶 (pH:7), 在 37°C 消化 15—30 分钟, 然后进行 shiff 氏试剂染色, 以区别 PAS 阳性反应是否因含糖元之故; (d) 提取脂肪。置切片于等量的氯仿和甲醇中 1—2 小时, 再经 Shiff 氏试剂染色, 以排除因脂类所呈的 PAS 反应。异染法 (Metachromasia) 系采用甲苯胺蓝 (Toluidine blue) 法 (标准法和 Hess & Hollander,

1947)测定其粘多糖物质。用 Hale 氏渗析铁和 PAS 结合法 (Rittes & Oleson, 1950) 进一步区分酸性粘多糖和粘蛋白的存在。Best 氏胭脂红染色法测定糖元的含量, 并可作为 PAS 法的参考。

c, 核糖核酸类: 囊蚴固定于 Carnoy's 液数小时, 并如上法保存于 96% 乙醇中, 切片厚度 8 微米, 采用 Feulgen 氏反应 (Feulgen & Rossenbech, 1924 变法), 测定去氧核糖核酸 (DNA), 对照试验不经盐酸水解。用 Brachet 氏的甲绿二苯氧芑氨及核糖核酸酶 (Methyl-green-pyronin & Ribonuclease) 法测定核糖核酸 (RNA), 对照试验在加 RNA 试剂前加入 10% 过氯酸, 4°C 经 24 小时, 将 RNA 分解。

d, 脂类: 囊蚴用 10% 中性福尔马林固定, 经三次丙酮脱水, 切片厚度 16 微米。用 McManus 氏苏丹黑 B (Sodan's black B) 染色测定脂类。Kay & whithead 氏苏丹 IV 法测定含中性脂肪及 Cain 氏的 Nile 蓝方法显示中性及酸性脂类。

上述各试验的具体操作, 主要参考 Pears (1960)、Davenport (1960)、Gurr (1958) 和 Lillie (1954) 各专著。

## 囊 蚴 发 育 观 察

### (一) *Apatemon pellucidus* Yamaguti 囊蚴的发育

囊蚴: 包裹很大, 卵圆形, 长为 0.691—0.998mm, 宽为 0.530—0.772mm。囊膜分二层, 外层很薄, 透明, 紧附于内层之上; 内层则十分厚而坚硬, 呈乳白色, 厚度为 0.048—0.161mm。包裹一端常增厚, 可达 0.29mm (图 1)。

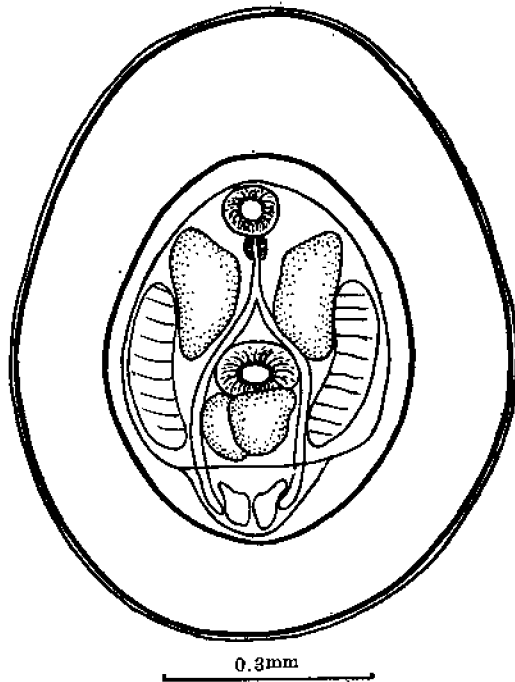


图 1 *Apatemon pellucidus* Yamaguti 的囊蚴。

脱囊后后尾蚴不活泼,体分前后两部,前体宽大,后体细小。口吸盘在顶端,无假吸盘。口吸盘两侧有二个很大的侧吸袋(lateral suctorial pouket),其后端延伸至前体的前1/3处。前咽不见,食管短,肠支到达后体末端,腹吸盘在前体后部。粘器二个,叶形,几乎占满前体的后半部。腹吸盘后还有一块长形的粘腺结构。后体很短,有两个开始发育的睾丸(图2)。

感染2天:虫体稍见增大,各器官除略为增大外,和囊蚴期无大变化(图3)。

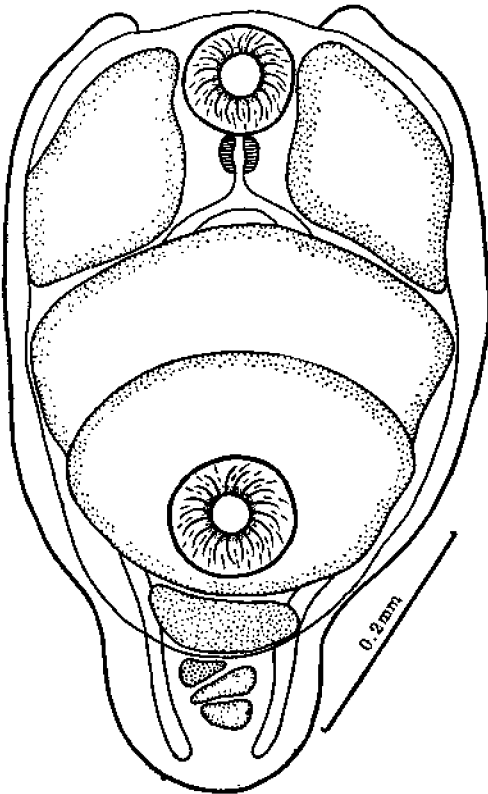


图2 *A. pellucidus* 后尾蚴的腹面观

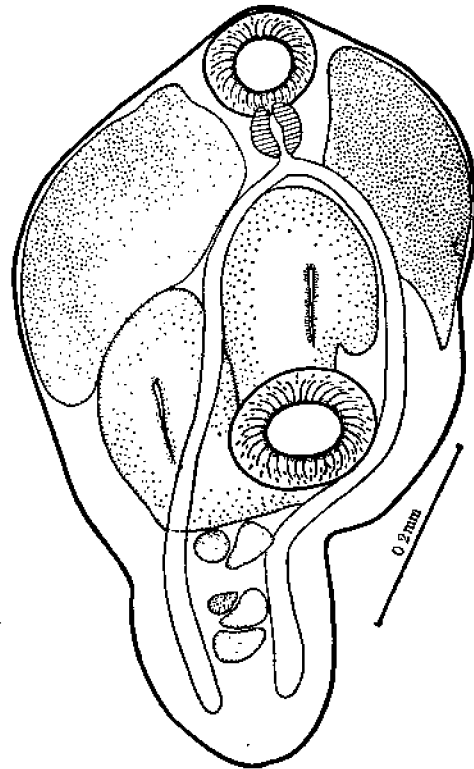


图3 *A. pellucidus* 感染2天时的腹面观

感染4天:虫体形状已似成虫,前体大小变化不大,后体却显著增大,二粘器已变为长形,生殖器官除卵未出现外,皆已形成(图4)。

感染6天:虫体已完全成熟。前体杯状,口吸盘圆形或椭圆形,前咽不见,食管短,肠支到达后体末端,二侧吸袋仍然存在,腹吸盘位于前体中部稍后,其后有二个粘器,能从体前端伸出体外,粘器后为一块粘腺结构。后体很长,全部充满生殖器官。睾丸2个,呈不规则的方形,前后排列在后体中部。睾丸下方为一个大的贮精囊,末端通入生殖腔内。卵巢卵圆形,位于前睾丸的上方。子宫内含卵不多,一般为数个至十多个,子宫末端亦通入生殖腔内。生殖腔位于体的底部,呈丁字形,最末端为生殖孔,通于体外。卵黄腺由无数滤泡小体组成,集中于后体的背面和中部,前部从后体顶端开始,后部截止于体末端稍前处(图5)。

囊蚴及成虫发育的测量见表1。

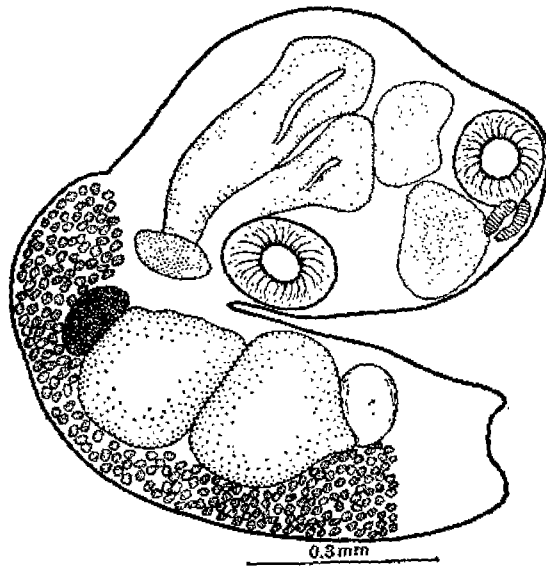


图 4 *A. pellucidus* 感染 4 天时的侧面观

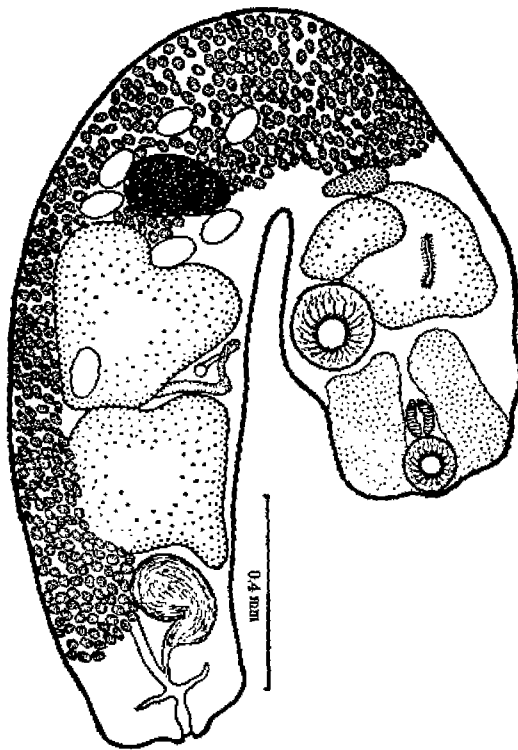


图 5 *A. pellucidus* 成虫的侧面观

表1 *Apatemon pellucidus* 囊蚴发育的测量

单位: 毫米

	囊 蚴	2 天
前 体	0.340 - 0.530 × 0.276 - 0.426 (0.433 × 0.348)	0.482 - 0.562 × 0.353 - 0.458 (0.517 × 0.403)
后 体	0.104 - 0.225 × 0.108 - 0.241 (0.149 × 0.150)	0.176 - 0.257 × 0.160 - 0.201 (0.205 × 0.183)
口吸盘	0.060 - 0.096 × 0.072 - 0.096 (0.078 × 0.084)	0.084 - 0.116 × 0.092 - 0.104 (0.099 × 0.097)
咽	0.032 - 0.048 × 0.030 - 0.048 (0.038 × 0.035)	0.044 - 0.050 × 0.034 - 0.040 (0.046 × 0.039)
腹吸盘	0.096 - 0.124 × 0.104 - 0.128 (0.105 × 0.114)	0.112 - 0.124 × 0.112 - 0.138 (0.116 × 0.126)
前 率	0.024 - 0.060 × 0.044 - 0.084 (0.032 × 0.050)	0.032 - 0.036 × 0.044 - 0.060 (0.034 × 0.052)
后 率	0.024 - 0.068 × 0.044 - 0.100 (0.034 × 0.048)	0.028 - 0.032 × 0.040 - 0.052 (0.030 × 0.048)
卵 巢	0.028 - 0.072 × 0.036 - 0.072 (0.032 × 0.040)	0.024 - 0.032 × 0.032 - 0.036 (0.028 × 0.034)
卵		
	4 天	6 天
前 体	0.506 - 0.667 × 0.418 - 0.578 (0.578 × 0.483)	0.530 - 0.763 × 0.442 - 0.627 (0.660 × 0.528)
后 体	0.779 - 1.053 × 0.305 - 0.426 (0.900 × 0.367)	0.998 - 1.738 × 0.354 - 0.483 (1.325 × 0.429)
口吸盘	0.108 - 0.152 × 0.104 - 0.140 (0.127 × 0.121)	0.092 - 0.140 × 0.092 - 0.140 (0.121 × 0.114)
咽	0.076 - 0.096 × 0.060 - 0.076 (0.084 × 0.066)	0.064 - 0.092 × 0.056 - 0.080 (0.078 × 0.065)
腹吸盘	0.132 - 0.200 × 0.128 - 0.196 (0.159 × 0.161)	0.124 - 0.388 × 0.120 - 0.130 (0.162 × 0.155)
前 率	0.176 - 0.289 × 0.217 - 0.337 (0.224 × 0.250)	0.200 - 0.377 × 0.180 - 0.377 (0.265 × 0.264)
后 率	0.217 - 0.337 × 0.241 - 0.313 (0.259 × 0.294)	0.208 - 0.402 × 0.191 - 0.329 (0.317 × 0.264)
卵 巢	0.072 - 0.096 × 0.132 - 0.160 (0.084 × 0.144)	0.076 - 0.144 × 0.140 - 0.240 (0.111 × 0.178)
卵		0.076 - 0.098 × 0.052 - 0.060 (0.091 × 0.056)

Yamaguti (1933) 描述本种囊蚴只有一层囊膜, 作者观察实应具二层, 由于外层甚薄, 且紧附于内层之上, 从外形是不易区分的, 但在切片标本中, 则可明显地看到分为内外二层。此外, 我们感染获得的成虫标本, 前体的宽度和卵巢亦显著的较 Yamaguti 的描述为

大,但其它形态特征,基本和 *A. pellucidus* 相符。

从囊蚴的发育过程中,可以看出在感染第 4 天时变化最为显著,后体比第 2 天时增长 4.5 倍,生殖器官亦已出现,第 5 天卵已形成,第 6 天虫体完全成熟。因此,囊蚴的发育,几乎主要在后体部分进行,成熟虫体的前体大小,只不过为刚脱囊虫体前体的 1.5 倍,而后体却差不多增大 10 倍。

## (二) 中华杯叶吸虫(新种)*Cyathocotyle sinense* sp. nov. 囊蚴的发育

囊蚴: 包裹象柠檬形,大小为  $0.264-0.361 \times 0.240-0.276\text{mm}$ 。囊膜二层,外层为寄主组织形成的纤维层,呈深棕色,厚度为  $0.018-0.026\text{mm}$ ,二端增厚部分可达  $0.044-0.080\text{mm}$ 。内层为蚴虫分泌,圆形,透明,厚而坚硬,厚度为  $0.028-0.052\text{mm}$ 。幼虫在囊内不大活动,排泄系统占虫体大部分体积,呈“W”形状(图 6)。

脱囊后后尾蚴不大活泼,呈椭圆形,前端稍尖,后端钝圆,大小为  $0.184-0.240 \times 0.136-0.180\text{mm}$ 。口吸盘大小为  $0.028-0.040 \times 0.036-0.048\text{mm}$ 。前咽不见,咽大小为  $0.020-0.024 \times 0.018-0.022\text{mm}$ 。食管短,肠支到达近体末端。腹吸盘在肠分支处,大小为  $0.018-0.024 \times 0.018-0.028\text{mm}$ 。虫体腹面有一个很大呈圆形的粘附器,占虫体中间大部分,大小为  $0.120-0.152 \times 0.108-0.140\text{mm}$ 。生殖系统未见发育,排泄系统很发达,呈“W”形,占后体大部分(图 7)。

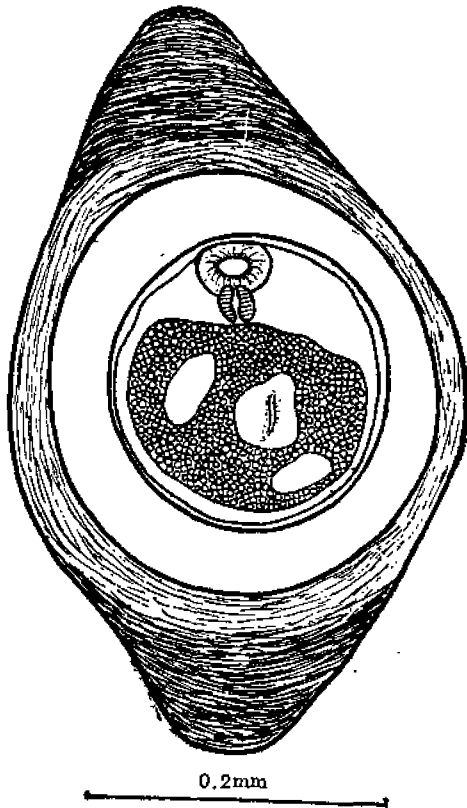


图 6 *Cyathocotyle sinense* sp. nov. 的囊蚴

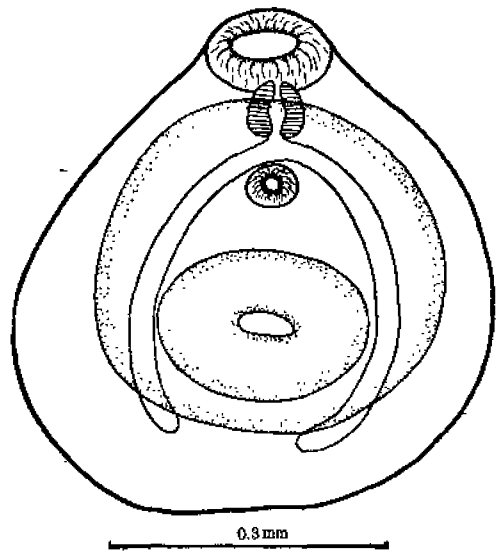


图 7 *C. sinense* sp. nov. 后尾蚴的背面观

感染 2 天: 虫体比后尾蚴增大很多, 呈梨形, 除卵未形成外, 睾丸、阴袋、卵巢、卵黄腺均已出现。各器官的大小测量如下: 虫体  $0.638-0.788 \times 0.482-0.611\text{mm}$ ; 口吸盘  $0.066-0.076 \times 0.080-0.084\text{mm}$ ; 咽  $0.054-0.068 \times 0.052-0.060\text{mm}$ ; 腹吸盘直径  $0.044-0.048\text{mm}$ ; 左辜  $0.297-0.368 \times 0.140-0.180\text{mm}$ ; 右辜  $0.248-0.300 \times 0.144-0.188\text{mm}$ ; 卵巢  $0.040-0.064 \times 0.072-0.084\text{mm}$ (图 8)。

感染 4 天: 虫体已完全成熟, 形状和 2 天时稍有不同, 体前半较宽, 后半稍微收狭。口吸盘端位, 椭圆形, 前咽不见, 咽发达, 食管不明显, 肠支到达体末端。腹吸盘未看见。睾丸位于体后半部, 平列或稍作斜列, 椭圆形, 二辜大小不等, 左辜较大, 右辜较小, 位置比左辜略高。阴袋棒状, 稍弯曲, 前半重叠于右辜背面, 其前部包含分成二段的贮精囊、射精管和前列腺细胞, 最后通入末端的生殖腔。卵巢椭圆形, 在左辜的前方。子宫很短, 仅在卵巢周围稍弯曲, 即向下和阴袋平行下行, 通入生殖腔。卵很大, 数目最多可达 20 个。卵黄腺十分发达, 呈不规则的滤泡状, 几布满全身, 前部自咽二侧开始, 并可伸延至体中央, 后部仅在二辜的外侧或部分重叠于辜丸, 末端终止于左辜后缘。根据 5 个整体封片标本的测量如下: 虫体  $0.740-0.996 \times 0.620-0.805\text{mm}$ ; 口吸盘  $0.064-0.084 \times 0.080-0.096\text{mm}$ ; 咽  $0.060-0.068 \times 0.060-0.080\text{mm}$ ; 左辜  $0.328-0.420 \times 0.120-0.200\text{mm}$ ; 右辜  $0.216-0.268 \times 0.124-0.172\text{mm}$ ; 阴袋  $0.212-0.296 \times 0.060-0.076\text{mm}$ ; 卵巢  $0.072-0.096 \times 0.092-0.140\text{mm}$ ; 卵  $0.096-0.120 \times 0.056-0.064\text{mm}$ (图 9)。

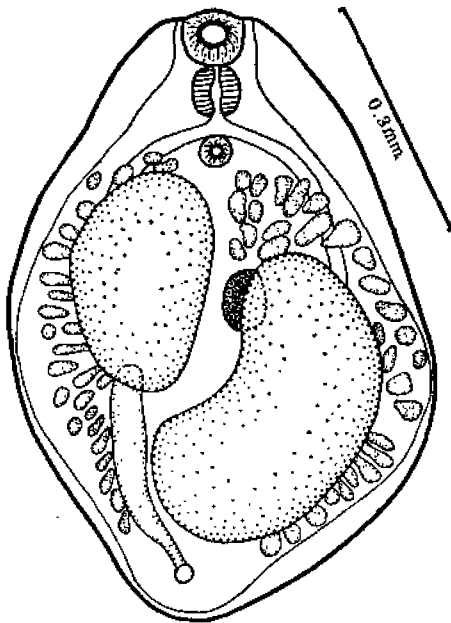


图 8 *C. sinense* sP. nov. 感染 2 天时的腹面观

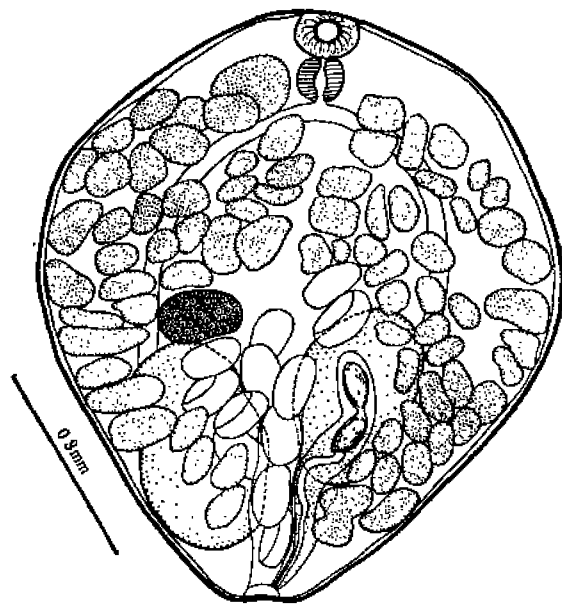


图 9 *C. sinense* sP. nov. 成虫的背面观

讨论 本属在国内除 Faust (1922) 报道了 *C. orientalis* 及其生活史外, Faust & Tang (1938) 和 Tang (1941) 还记录了其它 4 种。本种和 *C. orientalis* 颇相似, 囊蚴形



态除本种包裹比其略小外,咽的大小和肠的长度均有不同,且 *C. orientalis* 的囊蚴是寄生在田螺 (*Vivipara lapillosum*) 内。成虫则有如下的区别: (1) *C. orientalis* 的口吸盘直径为 0.11mm, 咽为 0.045mm, 口吸盘比咽大二倍多。本种口吸盘比其小, 而咽却比其大, 口吸盘仅比咽稍微大一点。(2) *C. orientalis* 的睾丸在体中部, 且明显比本种大, 本种的睾丸是在体后半部。(3) Faust (1922) 描述 *C. orientalis* 的子宫内只有虫卵 2 个, Dubois (1936) 认为可达 4 个, 本种成熟标本虫卵一般在 10 个以上, 最多可达 20 个, 而虫体和器官的大小均比他们所描述者为小, 因而不能认为是成熟程度不同的关系。根据这些不同, 似应与 *C. orientalis* 为一不同的种, 故而确定为新种, 并定名为 *Oyathocotyle sinense* sp. nov.。

关于腹吸盘是否存在于成虫, 亦见争论于 *C. orientalis*, 至今仍有两种不同意见。本种在囊蚴时期, 腹吸盘能明显地看见, 但在感染 2 天的未成熟童体, 腹吸盘已不甚明晰, 但其痕迹仍隐约可见, 至感染 4 天的成熟虫体, 则没有观察到腹吸盘存在。当然, 由于本种的卵黄腺特别发达, 有些标本在腹吸盘部位为很多卵黄腺所布满, 以致腹吸盘不易看到, 但在腹吸盘部位没有卵黄腺分布的标本, 同样未能看到腹吸盘的存在。从囊蚴发育的过程中, 童体的腹吸盘已不如后尾蚴时期明显, 这表明已有退化迹象, 至成虫时, 腹吸盘可能已完全退化, 故我们未能观察到。

## 组织学和组织化学试验结果

对于 Mallory 氏和 Van Gieson 氏二种胶原纤维染色法, 两种囊蚴的外壁及其囊外寄主组织均呈阴性反应, 内壁则呈阳性反应。用 Gormori 氏嗜银纤维染色法, 两种囊蚴的外壁和囊外寄主组织呈现阳性反应, 内壁则呈阴性反应。试验结果表明, 囊蚴的内壁属胶原纤维, 外壁则为网状纤维结构(见表 2)。

在蛋白质试验中, 含升汞和不含升汞二种溴酚蓝法的反应结果是, 两种囊蚴的内外壁均呈阳性反应, 但二者内壁的蓝色阳性反应, 均较其外壁稍弱, 这表明其内外壁均含有总蛋白质和碱性蛋白质, 但外壁的含量较内壁稍多。Millon 氏反应时两种囊蚴的内外壁均呈阳性, 但外壁反应较强, 说明外壁酪氨酸的含量较内壁丰富。二甲氨基苯甲醛——亚硝酸盐法和 Romieu 法反应时, 两种囊蚴的内外壁同呈阴性, 说明囊壁不含有可察量的色氨酸蛋白质存在。Mayer 氏粘洋红和俾斯麦褐法反应, 对两种囊蚴内外壁均为阳性, 但内壁较外壁为弱, 说明外壁含粘蛋白量较内壁为多。

PAS 反应中, *A. pellucidus* 囊蚴的外壁呈弱阳性, 而内壁则呈强阳性。 *C. sinense* 囊蚴的内外壁均呈同样的强阳性反应。Pears (1960) 指出, PAS 阳性物质, 实包括多糖、糖酯及碳水化合物与蛋白质的复合物三大类, 而后者更包括中性粘多糖、粘蛋白及糖蛋白。为了证明 PAS 阳性反应显示的物质, 必须用不同的对照, 以排除其它阳性反应的可能性, 才能确定此阳性反应属何类物质。对照试验(a)不经高碘酸氧化, 直接用 Schiff 氏试剂染色, 两种囊蚴内外壁均为阴性, 说明切片不含有游离醛存在。对照试验(b)用乙醚化阻止 PAS 反应, 切片分三组进行: 第 1 组按原来 PAS 方法染色, 结果与上述反应相同。第 2 组经乙醚化后, 两种囊蚴内外壁均为阴性。第 3 组经乙醚化后再用 KOH 处理, 又呈阳

表2 *A. pellucidus* 和 *C. sinense* 囊蚴壁组织学和组织化学试验结果

试 验 方 法		反 应 结 果			
		<i>A. pellucidus</i>		<i>C. sinense</i>	
		外 壁	内 壁	外 壁	内 壁
结缔组织	Mallory 苯胺蓝胶原纤维染色法	-(紫色)	+(蓝色)	-(紫色)	+(蓝色)
	Van Gieson 染色法	-(棕色)	+(橙黄色)	-(棕色)	±(浅蓝色)
	Gomori 嗜银纤维染色法	+(黑色)	-(棕色)	+(黑色)	-(棕色)
蛋白质类	溴酚蓝反应 {含汞 不含汞}	+(蓝色) +(蓝色)	+(蓝色) +(蓝色)	++(深蓝色) ++(深蓝色)	+(蓝色) +(蓝色)
	米伦反应	++(深棕色)	+(浅橙色)	++(深橙色)	+(浅橙色)
	二甲氨基苯甲醛——亚硝酸盐法	-(无色)	-(无色)	-(无色)	-(无色)
	Romieu 反应	-(无色)	-(无色)	-(无色)	-(无色)
	Mayer 粘洋红反应	+(粉红色)	+(浅粉红色)	+(浅红色)	+(粉红色)
	俾斯麦褐法	+(棕色)	+(浅棕色)	+(棕色)	+(浅棕色)
	含己糖类	PAS 反应	+(浅紫红色)	++(紫红色)	++(紫红色)
PAS 不经高碘酸		-(无色)	-(无色)	-(无色)	-(无色)
PAS 经唾液或淀粉酶消化		+(浅紫红色)	++(紫红色)	+(浅紫色)	++(紫红色)
PAS 经甲醇氯仿提脂		+(浅紫红色)	++(紫红色)	+(紫红色)	++(紫红色)
乙醚化阻止 PAS 反应 { (1) 组 (2) 组 (3) 组		+(浅紫红色)	++(紫红色)	++(紫红色)	++(紫红色)
		-(无色)	-(无色)	-(无色)	-(无色)
		+(浅紫红色)	++(紫红色)	++(紫红色)	++(紫红色)
甲苯胺蓝异染法		β异染(浅紫色)	β异染(紫色)	β异染(紫色)	β异染(蓝紫色)
Hale 渗析铁法		-(红色)	-(粉红色)	-(红色)	-(红色)
Hale + PAS 结合法		-(紫红色)	-(紫红色)	-(紫红色)	-(紫红色)
Best 胭脂红法	+(红色)	±(淡粉红色)	+(红色)	±(淡粉红色)	
脂 类	苏丹黑B反应	±(蓝绿色)	-(无色)	+(蓝色)	-(无色)
	苏丹 IV 反应	+(橙红色)	-(无色)	+(橙红色)	-(无色)
	Nile 蓝反应	+(蓝色)	-(无色)	+(蓝色)	-(无色)
核糖核酸	DNA 反应	++(紫红色)	-(无色)	+(浅红色)	-(无色)
	RNA 反应	++(深红色)	-(无色)	++(深红色)	-(无色)

注：“+”“++”表示阳性反应强度；“±”表示不明显阳性反应；“-”表示阴性反应。

性反应。据 Pears (1960) 所述：“任何能用 PAS 反应产生颜色的物质，经乙醚化而反应消失，再用碱处理反应又能恢复，说明含有多数 1:2 乙二醇基，且多半为碳水化合物”。对照试验(c)用人工唾液或淀粉酶消化糖元，*A. pellucidus* 囊蚴的内外壁仍为阳性反应，且颜色的深度与未经唾液消化者很难辨别有差异，证明囊壁糖元的含量极微，以致被构成囊壁的主要成分的颜色反应所遮盖，甚至经酶消化后，亦不影响阳性颜色的深度。*C. sinense* 囊蚴的内外壁经消化糖元后亦呈阳性，与未经消化的颜色相比，外壁似稍变浅，而内壁则无明显区别。Best 氏法反应，外壁红色，内壁浅红色，其外壁糖元含量似较 *A. pellucidus* 的外壁略为丰富。对照试验(d)提取脂肪后再经 shiff 氏试剂染色，两种囊蚴的内外壁仍呈阳性反应，但外壁颜色稍变浅，内壁则无变化，说明外壁含有少量的脂肪存在。

甲苯胺蓝法异染性反应，两种囊蚴结果相同，外壁呈弱的 β-异染，内壁则呈较强的 β-

异染。Hale's 渗析铁法及 Hale's 渗析铁和 PAS 结合法反应,内外壁均为阴性,说明囊壁所含者为非酸性粘多糖,而属中性粘多糖类。

试验表明,囊壁的组织化学成分主要为碳水化合物蛋白质复合物,如前述此物质实包括粘蛋白、糖蛋白及中性粘多糖,而此三种物质在目前组织化学技术中尚无法区分。

DNA、RNA 试验中,Feulgen 氏反应结果, *A. pellucidus* 囊蚴外壁为强阳性,细胞核清晰,呈紫红色。内壁则为阴性,无色而透明,或呈十分淡的红色,明显为非细胞结构。*C. sinense* 囊蚴的外壁为弱阳性,细胞核仅呈浅红色,说明含去氧核糖核酸量不多。内壁亦为阴性,无核结构。不经盐酸水解的对照,皆为阴性。甲绿二苯氧苄氨及核糖核酸酶测定 RNA,两种囊蚴外壁均呈深红色的强阳性反应,内壁则为阴性,经过氯酸的对照,均不显颜色,说明囊蚴外壁的核糖核酸量较为丰富。

苏丹黑 B 及苏丹 IV 脂类染色反应, *A. pellucidus* 囊蚴外壁呈微弱阳性, *C. sinense* 囊蚴外壁为弱阳性。Nile 蓝法反应,囊蚴外壁均为阳性,内壁为阴性。说明囊蚴的内壁不含有脂肪,而外壁有酸性脂肪存在。

讨论 关于吸虫囊蚴壁的起源问题,应用组织学和组织化学的方法已进行了一些探索,并得出一定的结论。但由于吸虫的种类不同,它的囊壁构造也不同。不同的寄主和寄生部位,亦能形成囊壁构造的差异。因而对囊壁起源的探讨,带来一定的困难。试验所得结果,恐暂时不能推论到所有吸虫囊壁的结构,而只能对该试验虫种的推断或结论。Hunter & Dalton (1939)曾最先提出囊壁可分为两种类型,一种是具二层囊壁,内壁是由寄生虫形成的透明层,外壁则为寄主形成的结缔组织层;另一种为囊壁仅一层,由寄主的结缔组织所形成。但据目前已知的资料,具有体外成囊能力的囊蚴,其囊壁皆起源于虫体。如 Sinsh & lewart (1959)观察 *Notocotylus urbanensis* 的囊壁具三层,皆由寄生虫本身腺体分泌物形成。李树华(1964)研究怡乐村并殖吸虫囊壁的形成过程,同样证明是由于尾蚴腺体分泌的结果。可见, Hunter 等将囊壁分成上述二种类型是不够恰当的。然而,体内成囊的吸虫囊蚴,其外壁起源于宿主,似乎已逐渐被证实。最早提出的亦为 Hunter 等 (1939),他们用 *Clinostomum marginatum* 尾蚴感染 4 种淡水鱼的比较观察,证明囊蚴的单一囊壁起源于宿主。此后, Erasmus (1962)、Bogitsh (1962) 分别说明 *Haplophanus lühei* 和 *Posthodiplostomum minimum* 的囊蚴外壁皆为寄主起源。陈心陶等 (1965)在研究斯氏狸殖吸虫中也提出同样的结论。本文所用二种囊蚴,从组织化学试验结果,与上述学者所报道的基本相同。首先,在囊蚴和寄主组织连附一起的组织切片,经 Mallory、van Gieson、Gormori 三种方法染色,寄主组织和外壁总显示同样的颜色反应,试验结果不仅表明了外壁属网状结缔组织结构,而且表明了和寄主组织的密切关系。其次,从 DNA、RNA 反应中,亦充分证明外壁为细胞结构。因此,我们有理由认为,这二种囊蚴的外壁皆起源于宿主。至于囊蚴外壁形成的机制,以往学者有各种解释。Hunter 等 (1940)曾认为 *P. minimum* 的外囊壁乃由寄主的肝细胞变化而来。Bogitsh (1962)不同意此论点,认为外囊壁乃为典型的成纤维细胞结构,而从内胚或外胚起源的细胞是不可能变成成纤维细胞的。他并提出外囊壁是由寄主的网状内皮系统分化而来。Bogitsh (1961)在研究棘头虫 (*Neoechinorhynchus cylindratus*) 的胞囊亦指出,脊椎动物的肝细胞不含有碱性磷脂酶,而胞囊外壁却含有这种酶存在,这完全不可能由不含有酶的肝细胞能产生含

有酶的外囊壁,因而提出外囊壁是由寄主的间质细胞变化而来。作者认为 Bogitsh 所述的吸虫囊蚴外壁的来源为寄主的网状内皮系统的论点比较合理,从而推断本试验之囊蚴外壁也可能属于这样的来源,成囊过程则相似于异物侵入脊椎动物的炎症反应。

关于囊蚴内壁的起源问题,目前众说纷云。Hunter 等(1940)首先提出内壁是由虫体本身角皮的脱落而形成。Bogitsh (1962)证明 *P. minimum* 内壁的化学成分和 Gersh & Catchpole (1949)报告的脊椎动物组织的基底膜和基质十分相似,主要不同是内壁为碳水化合物蛋白质复合物成分。并指出内壁中围绕虫体的液体内的颗粒,亦属同样的化学物质,因而他提出内壁起源有二方面:1. 由寄生虫分泌于囊内的 PAS 阳性颗粒,浓缩而成透明的内壁;2. 囊蚴的整个囊壁乃由寄主对寄生虫如外来蛋白的反应形成。Lewart & Lee (1954)亦说明旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)和粗头绦虫 (*Taenia taeniaeformis*) 的囊膜由寄主起源。Bogitsh (1961)研究 *N. cylindratus* 的报告中,也提到相近的论点,认为由寄主间质细胞变化而成的外囊壁的成纤维细胞,再分泌形成囊的内层。据本文试验结果,首先可以肯定囊蚴的内壁为非细胞结构,并属胶元纤维组织,其化学组成物质主要为碳水化合物蛋白质复合物,主要有酪氨酸、粘蛋白和中性粘多糖等,还有少量的糖元。虽然内壁的组织化学成分与外壁基本相同,但二者含量有差异,且内壁不含有脂类物质。在组织学方面,二层囊壁完全属不同的组织结构,如果说内壁是由寄主反应形成,那就是寄生虫在寄主的同一寄生部位,而为寄主反应产生二层组织结构完全不同的囊壁,是很难理解的。至于内壁是由外壁细胞分泌而来,更属不可能。因而可以认为内外壁并非同一来源,内壁可能为幼虫本身分泌物形成。据李树华(1964)对怡乐村并殖吸虫囊蚴壁的研究,认为囊壁的形成与尾蚴的粘腺有关。可惜本试验囊蚴的尾蚴尚未找到,故未能加以证实,但作者认为李氏的推论可能性是较大的。

## 小 结

本文对 *Apatemon pellucidus* 囊蚴和 *Cyathocotyle sinense* sp. nov. 囊蚴的发育及其成虫形态作了描述,前者在感染家鸭 6 天后成熟,后者为 4 天。

用组织学和组织化学方法,对两种囊蚴壁的组织结构及其化学成分进行了探讨,证明两种囊蚴的外壁均为细胞结构,并均属寄主的网状结缔组织构造。组织化学成分除含有少量的糖元和脂类外,主要为碳水化合物与蛋白质的复合物,包括酪氨酸、粘蛋白、中性粘多糖及糖蛋白等。两种囊蚴的内壁则为非细胞结构,属于胶元纤维构造,其主要组织化学成分,除不含脂类外,大致和外壁相同,但含量有区别。对二层囊壁的可能来源进行了讨论,外壁可能起源于寄主组织的网状内皮系统,其形成过程如寄主对异物的炎症反应。内壁可能由寄生虫本身分泌而来,其形成可能与尾蚴的粘腺有关。

## 参 考 文 献

- [1] 顾昌栋,1956. 昆明家鸭吸虫类的研究。南开大学学报(自然科学), (1): 95—106。
- [2] 严如柳,1959. 福州家鸭吸虫类的研究。福建师范学院学报,生物专号, I: 177—192。
- [3] 颜清华,1962. 南京家鸭吸虫的调查研究。南京师范学院自然科学报,第 4 期: 54—68。
- [4] 何毅勋,1962. 日本血吸虫的组织化学研究 I 成虫体内核酸、氨基酸、糖元和磷酸酶的分布。动物学报, 14:

- 433—440。
- [5] 何毅勋, 1963. 日本血吸虫的组织化学研究 II. 脂类、脂酶和非特异性酯酶的组织化学证明。动物学报, 15: 363—370。
- [6] 何毅勋、杨惠中, 1964. 日本血吸虫的组织化学研究 III. 在离体培养中虫体组织化学的动态。动物学报, 16(2): 165—174。
- [7] 李树华, 1964. 怡乐村并殖吸虫囊蚴壁形成及其组织化学的研究。寄生虫学报, 1(2): 153—161。
- [8] 陈心陶、胡孝素、何灌田, 1965. 斯氏狸殖吸虫囊蚴形态和囊壁组织化学的研究。寄生虫学报, 2(2): 157—166。
- [9] Alderson, G. D., 1975. Ultrastructure and histochemistry of the metacercarial cyst of *Spelotrema nicolli* (Microphallidae: Trematode). *International Journal for Parasitology*, 5(6): 659—665.
- [10] Bell, E. J. & Smyth, J. D., 1955. Cytological and histochemical criteria for evaluating development of trematodes and pseudophyllidean cestods in vivo and in vitro. *Parasit.* 49: 131—148.
- [11] Bogitsh, B. J., 1961. Histological and histochemical observation on the nature of the cyst of *Neocochinorhynchus cylindricus* in *Lepomis* sp. *Proc. Hel. Soc. Wash.*, 28: 75—81.
- [12] Bogitsh, R. J., 1962. The chemical nature of metacercarial cyst: 1. Histological and histochemical observations on the cyst of *Posthodiplostomum minimum*. *J. Parasit.* 48(1): 55—60.
- [13] Darnport, H. A., 1960. Histological and histochemical technics. London.
- [14] Dixon, K. E. 1975. The structure and composition of the cyst wall of the metacercaria of *Cleacitrema narrabeenensis* (Howell & Boarup, 1967) (Digenea: Philophthalmidae). *International Journal for Parasitology*, 5(1): 113—118.
- [15] Erasmus, D. A.: 1962. Studies on the adult and metacercaria of *Holostephanus lühei* Szidat. 1936. *Parasit.* 52(2): 353—374.
- [16] Faust, E. C., 1922. Phases in the life history of a holostome, *Cyathocotyle orientalis* Nov. spec. *J. Parasit.* 8(2): 75—85.
- [17] Faust, E. C. & Tang, C. C., 1938. Report on a collection of some chinese *Cyathocotylidae* (Trematoda: Strigeidea). *Livro Jub. Prof. Travassos*, 157—168.
- [18] Gurr, E., 1958. Methods of analytical histology and histochemistry. London.
- [19] Hunter, G. W. III. & Dalton, H. C., 1939. Studies on *Olinostomum marginatum* V. The cyst of the yellow grub of fish (*Clinostomum marginatum*). *Pro. Hel. Soc. Wash.*, 6: 73—76.
- [20] Hunter, G. W. III. & Hunter, W. S., 1940. Studies on the development of the metacercaria and nature of the cyst of *Posthodiplostomum minimum* (MacCallum, 1921) (Trematoda: Strigeata). *Tran. Amer. Micr. Soc.*, 59: 52—63.
- [21] Lewert, R. M. & Lee, C., 1954. Studies on the passage of helminth larvae through host tissue. I. Histochemical studies on extracellular changes caused by penetrating larvae. II. Enzymatic activity of larvae in vitro and in vivo. *J. Inf. Dis.*, 95: 13—51.
- [22] Lewert, R. M. & Lee, C., 1955. Studies on the passage of helminth larvae through host tissue. III. The effects of *Taenia taeniaeformis* on the rat liver as shown by histochemical techniques. *J. Inf. Dis.*, 97: 177—186.
- [23] Lillie, R. D., 1964. Histopathologic technic and practical histochemistry. 2d. Ed. London.
- [24] Lynch, D. L. & Bogitsh, B. J., 1962. The chemical nature of metacercarial cysts. II. Biochemical investigations on the cyst of *Posthodiplostomum minimum*. *J. Parasit.* 48(2): 241—243.
- [25] Pearse, A. G. E., 1960. Histochemistry: theoretical and applied. 2d. Ed. London.
- [26] Singh, K. S. & Lewart, R. M., 1959. Observation on the formation and chemical nature of metacercarial cysts of *Notocotylus urbanensis*. *J. Inf. Dis.*, 104: 138—141.
- [27] Tang, C. C., 1941. Morphology and life history of *Prosostephanus industrius* (Tubangui, 1922) Lutz, 1953 (Trematoda: Cyathotyliidae). *Peking Natur. Hist. Bull.*, 16(1): 29—43
- [28] Yamaguti, S., 1933. Studies on the helminth fauna of Japan. Pt I. Trematodes of birds.

- reptiles and mammals. *Jap. J. Zool.*, 5(1):1—134.
- [29] Гивецкая, Т. А., 1961. Динамика отложения жира в ходе жизненного цикла трематод. Доклады АН СССР, 139(4): 1016—1019.
- [30] Гивецкая, Т. А. и Досровлюхий, А. А., 1962. Гликоген и жир на разных фазах жизненного цикла сосальщиков. Вестник ленинград универ, 9(2): 66—84.
- [31] Скрабин, К. Т., 1961, Трематоды животных и человека. том 19: стр. 269—311.

## STUDIES OF THE LATE STAGE OF THE LIFE HISTORY OF TWO STRIGEID TREMATODES, WITH NOTES ON THE HISTOLOGICAL OBSERVATIONS AND HISTOCHEMICAL PROPERTIES OF THE CYSTS WALL

Pan Jinpei

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

### Abstract

The holostome metacercariae were found in the fresh water fishes of *Hypseleotris swinhonis*, *Macropodus opercularis*, *pseudorasbora parva* and *rasborinus lineatus* in Guangdong area. These encysted metacercariae have been experimentally fed to ducklings from which adult worms are obtained in the intestine. Two species have been identified, one is *Apatemon pellucidus* described by Yamaguti, 1933 and the other is a new species and the name *Cyathocotyle sinense* is given. The former requires 6 days to develop to adult after infection while the latter requires 4 days. Histological and histochemical structure of the cyst wall was studied.

Body pyriform, not concave ventrally, 0.740—0.996 by 0.620—0.805mm. Oral sucker terminal, Acetabulum absent. Pharynx developed, Esophagus not distinct. Caeca extending to posterior extremity of body. Testes diagonal and varying in size, Genital pore opening to the posterior terminal of the body. Ovary oval and anterior to the left testis, Uterus very short, Vitellaria follicles numerous and well developed. Eggs large, 0.096—0.120 by 0.056—0.064mm, Definitive host: *Macropodus opercularis*, *Pseudorasbora parva*, *Rasborinus lineatus*.

Location: intestine.

Locality: Guangzhou, Guangdong Province, China.

Type specimen: Deposited in the Department of Parasitology, Zhongshan Medical College, Guangzhou.

*C. sinense* sp. nov. is morphologically similar to *C. orientalis*, but they differ from the proportion of the oral sucker and pharynx, position and size of the testis, distribution and number of vitelline follicles and the eggs in number.

The outer wall of two species belong to areolar connective tissue, as well as their

chemical compositions, except containing a little amount of the glycogen and lipid, are consisted mainly of carbohydrate-protein complexes including tyrosine, mucoprotein, neutral mucopolysaccharide and glycoprotein. While the inner wall of two species is a non-cellular structure and belongs to collagenous fibers, its nature of histochemistry is similar to that of outer wall except that it lacks of lipid and has less in amount of the remaining elements. As for the origin of the cyst wall, the outer wall, similarly to that of the surrounding host tissue, is assumed to be originated from the host tissue and the inner wall may be formed from the excretory substances of the parasite itself.