

研究简报

夹竹桃对钉螺的毒杀作用及机理研究

王万贤¹ 杨毅¹ 王宏² 张勇¹ 舒丽慧¹ 张佳磊¹ 侯金华¹

(1. 湖北大学生命科学学院, 武汉 430062; 2. 上海交通大学环境科学与工程技术学院, 上海 200240)

STUDIES ON THE MOLLUSCICIDAL ACTIVITY OF NERIUM INDICUM TO ONCOMELANIA HUPENSIS

WANG Wan-Xian¹, YANG Yi¹, WANG Hong², ZHANG Yong¹, SHU Li-Hui¹, ZHANG Jia-Lei¹ and HOU Jin-Hua¹

(1. School of Life Science, Hubei University, Wuhan 430062; 2. School of Environmental Science and Engineering,
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

关键词: 夹竹桃; 钉螺; 化感作用; 控制血吸虫病

Key words: *Nerium indicum* Mill.; *Oncomelania hupensis*; Allelopathy; Schistosomiasis by ecological project

中图分类号: R184.38 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)03-0448-05

血吸虫病(Schistosomiasis)是严重危害人民身体健康的疾病^[1]。疫区的淡水资源既不能作为饮用、洗涤等生活安全用水,也不能作为农田灌溉、水产养殖等生产安全用水,不但极大地制约了国家经济的发展,同时还限制了人们生活、生产活动的自由,严重威胁着人们的身体健康和生命^[2]。此外,大规模使用氯硝柳胺等化学灭螺剂所导致的化学污染比血吸虫、生活垃圾以及工业三废等造成的污染面积更大、程度更深,对人们的健康更为有害^[3]。由于日本血吸虫的寄主十分广泛(能至少寄生于哺乳动物的6个目17个科33属中的44个种和亚种^[11]),使得目前血吸虫病的防治工作变得十分艰难。

钉螺(*Oncomelania hupensis* Gredler)是日本血吸虫(*Schistosoma japonicum* Katsurade)的唯一中间寄主,是血吸虫病传播不可缺少的环节,但钉螺也是血吸虫生活周期中最脆弱的一环,灭螺能有效地减少血吸虫病的传播^[4]。近半个世纪以来,灭螺措施倍受重视,成为控制血吸虫病的重心。利用化学药物灭螺成为首选方法^[5]。自1946年以来,大约有7000种化学药物用于灭螺实验^[6]。但化学灭螺剂对环境污染引起人们的高度重视,一直想获得纯天然的植物灭螺药物。自Archibald(1933)第一次用*Balanites aegyptiaca*的果实进行灭螺以来,至今已有1000余种植物用于灭螺试验^[7],发现其

中20多种植物具有强烈的灭螺作用^[8];在这方面我国研究人员也做了大量的研究工作。我们对孳生钉螺的长江中下游水域江滩、湖洲及沟渠两旁生长的近100种水生与湿生植物,采取随机选取样地的方法,开展了它们对钉螺分布影响的调查研究,发现其中夹竹桃等近20种植物与钉螺的相关性系数 $\chi^2 > 3.814$;特别是夹竹桃与钉螺的相关性系数 $\chi^2 > 6.635$,能明显抑制钉螺的繁衍^[1,9]。

1 材料和方法

1.1 实验材料 实验用钉螺采自湖南省洞庭湖区,转入23温室饲养,选用能正常活动的阴性、7—8旋成螺作为实验材料;实验用夹竹桃(*Nerium indicum* Mill.)的新鲜材料根皮、茎皮、叶、花均采自湖北大学校园沙湖及池塘边,沟渠旁。

1.2 灭螺活性的测定 实验采用浸泡法。将夹竹桃的新鲜根皮、茎皮、叶、花清洗,切碎,按相当于干重的比例浸入适量的无氯清水中,分别配成5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%6个不同浓度梯度的处理溶液。选取健康钉螺100只为一组,每20个装入一个尼龙网袋中,分别将各组(5袋/组)钉螺浸入盛有2000mL不同浓度的新鲜夹竹桃叶水溶液的玻璃缸中,另设浓度为0.0001%氯硝柳胺水溶液和无氯清水对

收稿日期:2005-10-25;修改日期:2006-12-28

基金项目:国家自然科学基金(30471506, 39670654);湖北省中药生物技术重点实验室基金(4300620103)资助

作者简介:王万贤(1949—),男,湖南汉寿人;教授;主要从事植物生态及环境生物工程研究 E-mail: wangwx@hubei.edu.cn

通讯作者:杨毅, E-mail: yangyi2006@yahoo.com.cn

照。实验在温度控制在 23 ± 1 条件下进行。分别于处理 1、2、3、4、5d 后,将各处理中的钉螺随机取出 1 袋,用无氯水冲洗数次,再放入清水中静置 1d,然后作存活检查:开厝爬行者为活螺,余下的用敲碎和解剖卸刺的方法,鉴别死活。实验重复 3 次,取其平均值作为实验结果。

1.3 过氧化物酶同工酶电泳样品的制备 用夹竹桃的新鲜叶按干重 0.1%、0.05%、0.01% 浓度配制水浸液。将 50 个钉螺分别浸养于不同浓度的处理液中,处理 12h、24h 和 36h 后分别取出活钉螺,并用无氯清水漂洗干净,吸干水分,敲碎螺壳,取出整个软体组织,加磷酸缓冲液^[10] 1 滴/螺,冰浴匀浆。匀浆液 0 8000r/min 冷冻离心,上清液与溴酚蓝指示剂等量混合后作为电泳样品。正常饲养螺作为对照组。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)。使用 Hoefer SE600 垂直板电泳仪,所有电泳及染色药品均为亚法公司进口分装。贮液配制参照 Hames B D 和 Rickwood D 等以及 Hoefer 公司电泳指南。采用 Tris-Gly 高 pH 不连续缓冲系统(7.5%分离胶-3.00%浓缩胶),板距 1mm,板胶 16mm × 17mm。每槽加样 20μL,恒流 20mA,22 条件下电泳 6h 左右。染色,冲洗,固定,拍照。正常饲养螺作为对照组。

1.4 电镜样品的制备 将钉螺肝脏用刀片切成 1mm³ 的小块放于 4 预冷的 2.5%戊二醛中前固定 2h,再经 1%锇酸后固定 2h,逐级酒精及丙酮脱水。1 1 纯丙酮与 618 环氧树脂包埋液室温浸透 2—3h,纯包埋液浸透 2—3h,37 → 45 → 60 聚合 36h,LKBV 型超薄切片机制片,日立 H-600 型透射电镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 夹竹桃的新鲜叶水浸液灭螺活性初试结果与分析

用不同浓度的夹竹桃的新鲜叶水浸液处理钉螺,在不同时间的处理下,钉螺死亡率存在差异。其规律是随处理浓度的增加,钉螺死亡率呈上升趋势。0.10% 以上的夹竹桃的新鲜叶水浸液均具有 100% 的明显毒杀钉螺致死效果(表 1)。

表 1 夹竹桃的新鲜叶水浸液灭螺效果统计

Tab. 1 The mortality of snails after treated by the lixivium of the fresh leaves of *N. indicum*

处理液浓度 Concentration(%)	钉螺死亡率 The mortality(%)				
	1d	2d	3d	4d	5d
0.01	0	10.0	16.7	21.7	30.0
0.05	13.3	21.7	28.3	36.7	58.3
0.10	21.7	53.3	95.0	100	100
0.50	51.7	100	100	100	100
1.00	88.3	100	100	100	100
5.00	100	100	100	100	100
氯硝柳胺(0.0001 %) Niclosanidum	90.0	95.0	100	100	100
清水对照 Water	0	0	0	1.7	1.7

2.2 夹竹桃新鲜叶水浸液与氯硝柳胺灭螺效果的比较

氯硝柳胺是普遍使用的化学灭螺剂。将夹竹桃新鲜叶的灭螺效果与之对照,可知达 0.10% 浓度的夹竹桃新鲜叶水浸液就可与 0.0001% 氯硝柳胺溶液的灭螺效果相当。不过夹竹桃新鲜叶水浸液的毒效较氯硝柳胺略慢。用 0.0001% 氯硝柳胺溶液处理钉螺 2—3d 可达 100% 的死亡率,而用 0.10% 以上的夹竹桃的新鲜叶水浸液处理需要 3—4d 才能达到同样的效果(表 1)。

2.3 夹竹桃各部水浸液灭螺效果的比较

用夹竹桃不同部位(新鲜根皮、茎皮、叶、花)新鲜材料制作 0.10% 水浸液处理钉螺,结果如图 1 所示,用夹竹桃不同部位的 0.10% 水浸液处理钉螺 5d,均能达到 100% 的杀灭效果,说明夹竹桃各部水浸液都具有明显的毒杀钉螺作用,其中以茎皮水浸液的毒杀钉螺作用最强,到处理的第 3d 时,钉螺死亡率就能达到 100%;叶与根皮的毒杀作用稍次,到处理的第 4d 时也可达到 100%;花部的毒杀作用较弱。

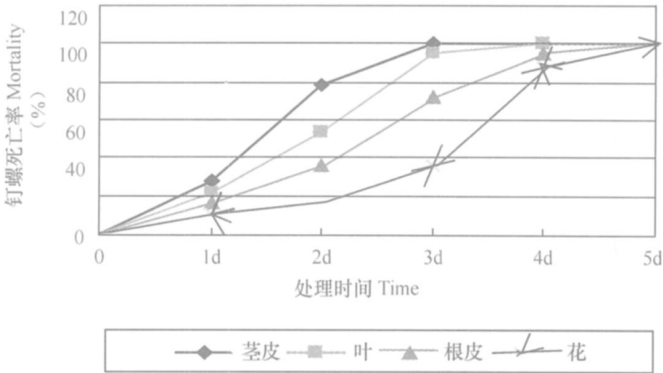


图 1 夹竹桃各部新鲜材料水浸液毒杀钉螺作用比较

Fig. 1 The molluscicidal effect of the lixivium of the parties of *N. indicum*

2.4 过氧化物酶同工酶电泳结果与分析

过氧化物酶(POX)是动物体内一种重要的解毒酶系统,且是钉螺对外界刺激反应最强烈的同工酶之一。采用聚丙烯酰胺电泳技术分离经夹竹桃新鲜叶水浸液不同时间处理钉螺样品的 POX,我们得到的电泳图谱如图 2、图 3、图 4 所示。我们未做酶谱的薄层扫描,但从凝胶显色时颜色的深浅可以大致判断过氧化物酶的活性强弱。在处理 12h 时,显示各处理样品的酶活高于对照组,表现为酶带颜色加深,有新的酶带出现(图 2);而在处理 24h(图 3)和 36h(图 4)后,各处理的样品酶带浅于对照组,酶带颜色逐渐变浅,直到消失。这与正常的病理反应完全一致。在中毒早期,药物刺激 POX 的表达,增强钉螺肝脏的解毒能力;在中毒中后期,由于药

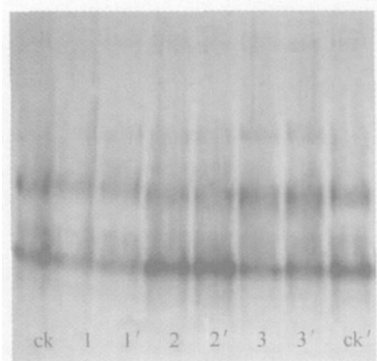


图 2 夹竹桃的新鲜叶水浸液处理 12h 时钉螺过氧化物酶同工酶图谱

Fig. 2 POX isozyme profiles after treated by the lixivium of the fresh leaves of *N. indicum* in 12h *

* ck, ck': 对照样品; 1, 1': 浓度为 0.01% 的夹竹桃新鲜叶水浸液处理样品; 2, 2': 浓度为 0.05% 的夹竹桃新鲜叶水浸液处理样品; 3, 3': 浓度为 0.1% 的夹竹桃新鲜叶水浸液处理样品。图 2 与图 3、图 4 的注释相同

* ck, ck': samples controlled; 1, 1': Samples treated by 0.01% fresh leaves of *N. indicum* Mill.; 2, 2': Samples treated by 0.05% fresh leaves of *N. indicum* Mill.; 3, 3': Samples treated by 0.1% fresh leaves of *N. indicum* Mill.. Same notes used in Fig. 3 and Fig. 4

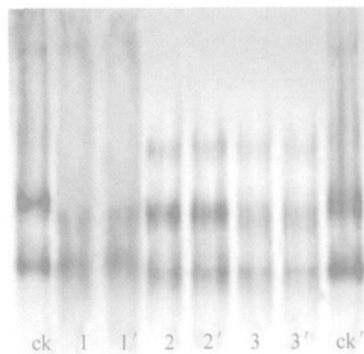


图 3 夹竹桃的新鲜叶水浸液处理 24h 时钉螺过氧化物酶同工酶图谱

Fig. 3 POX isozyme profiles after treated by 0.10% lixivium of the fresh leaves of *N. indicum* in 24h

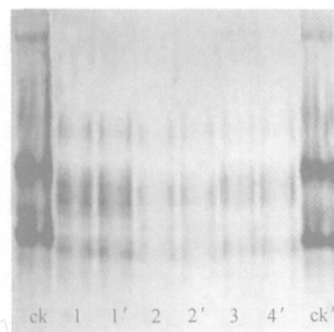


图 4 夹竹桃的新鲜叶水浸液处理 36h 时钉螺过氧化物酶同工酶图谱

Fig. 4 POX isozyme profiles after treated by 0.10% lixivium of the fresh leaves of *N. indicum* in 36h

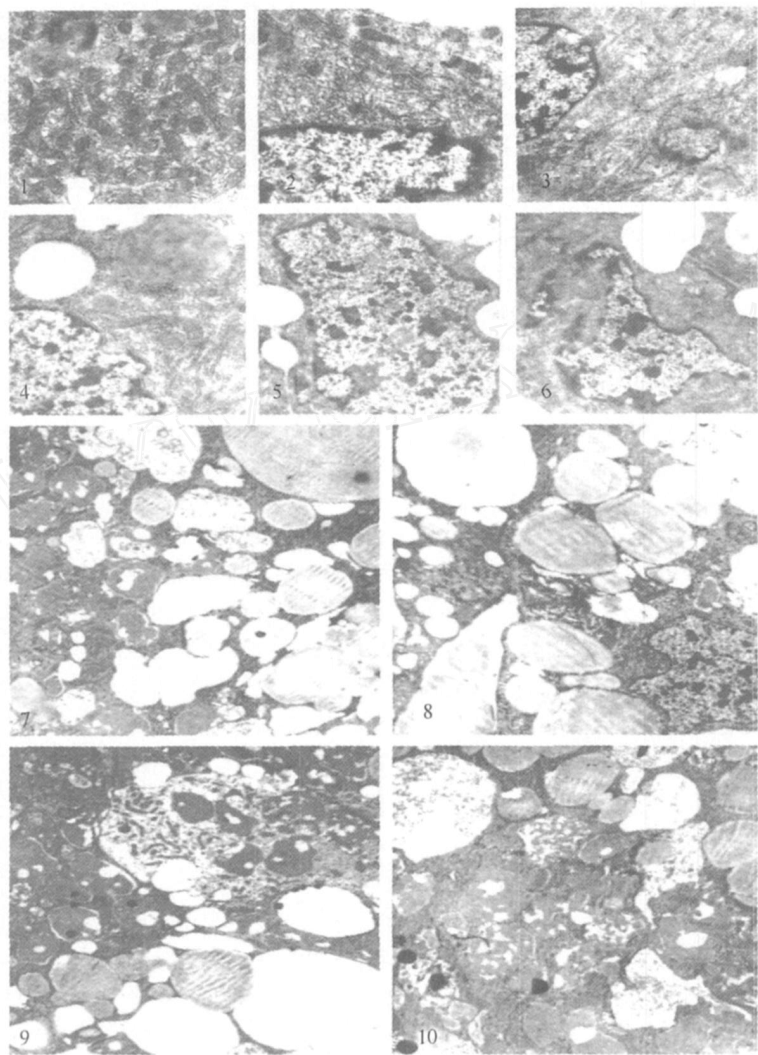
物作用时间或强度超过钉螺生理阈限,其体内物质和能量代谢出现紊乱,从而抑制酶的合成;在接近死亡的机体中,氧化酶酶的合成几乎停止。

2.5 夹竹桃新鲜叶水浸液对钉螺肝脏损伤的透射电镜观察

分别取清水饲养 70h(对照)、0.10% 浓度的夹竹桃新鲜叶水浸液处理 36h(死亡率达到 50%时)、处理 70h(死亡率达到 90%时)的钉螺的肝脏部分作切片,在透射电镜下观察拍照,结果:对照(图版 :1—3)的钉螺肝脏细胞的细胞核完整,核膜圆滑、粗面型内质网排列在细胞核的周围,高尔基体、溶酶体等细胞器分布在细胞质中清晰可见,线粒体大量聚集,数量很多;死亡率达到 50%时(图版 :4—6)的钉螺肝脏的细胞核的核膜内陷,细胞核轻度肿胀甚至崩解分裂,染色质疏松,线粒体数目减少、凝聚或轻度肿胀,基质致密,嵴呈短管状,粗面内质网腔扩大,呈短管状,排列混乱脱颗粒,片段状散在性分布,可见指纹状排列,胞质内的基质稀疏,同时出现少量的致密体,这些致密体大部分是有溶酶体和线粒体转化而成的,所以导致了线粒体大量减少,高尔基体等细胞器的结构不完整,在电镜下很难找到清晰可见的完整的细胞器;死亡率达到 90%时(图版 :7—10)的细胞核溶解破碎,仅有少量凝集融合的染色体斑块,胞质内的细胞器有大小不等的空泡样变性,细胞器的结构已无法辨别,只见一些残留的细胞器片段,核膜残缺不全,细胞器严重变性,线粒体嵴模糊,大量的致密体和形状、大小不等的空泡充满了整个细胞,胞膜不完整。

3 讨论

项目组在孳生钉螺的长江中下游水域江滩、湖洲及沟渠两旁采用随机选取样地的方法进行调查时发现夹竹桃对钉螺有明显驱逐与杀灭作用^[1,11]。实验室研究进一步证实了夹竹桃具有很强的灭螺活性,0.10% 浓度的夹竹桃新鲜叶水浸液约与 0.0001% 氯硝柳胺溶液的灭螺效果相当;不过夹竹桃强叶的毒效较氯硝柳胺略慢,用 0.0001% 氯硝柳胺溶液处理钉螺 2—3d 可达 100% 的死亡率,而用 0.10% 的夹竹桃强心总甙水溶液处理需要 3—4d 才能达到同样的效果,但夹竹桃强心总甙属于生物源类药物,对人类的生存及生态环境较



图版

1—3 为正常肝脏细胞的透射电镜图:1. 正常细胞的线粒体、溶酶体(Bar = 1μm) ;2. 正常细胞的细胞核、高尔基体(Bar = 1μm) ;3. 正常细胞的细胞核、内质网(Bar = 1μm) ;4—6 为死亡率达到 50 %时的钉螺肝脏细胞的透射电镜图:4. 线粒体数目减少、内质网指纹状排列(Bar = 1μm) ;5. 细胞核膨胀、核膜内折(Bar = 1μm) ;6. 细胞核核膜崩解、出现致密体(Bar = 1μm) ;7—10 为死亡率达到 90 %时的钉螺肝脏细胞的透射电镜图:7. 不同形状大小的空泡(Bar = 1μm) ;8. 残存的细胞核(Bar = 1μm) ;9. 无完整细胞器、仅存残留片段(Bar = 1μm) ;10. 致密体布满整个细胞(Bar = 1μm)

1 - 3. The normal liver cell of *O. hupensis* :1. Showing the mitochondria and lysosome ;2. Showing the nucleus and dictyosomes ;3. Showing the nucleus and ER of the normal liver cell ;4 - 6. The liver cell of *O. hupensis* treated after 36 hours :4. The number of mitochondria less , ER vesiculate ;5. The nucleus swollen up to become sphere and the nuclear envelope pitfall ;6. The nucleus envelope melt and organelle disperses ;7 - 10. The liver cell of *O. hupensis* treated after 72 hours :7. Showing the big or small blank spaces ;8. Showing the broken nucleus ;9. Showing the rER destroyed completely , mitochondria broken up and lysosomes ;10. Showing the the nucleolus disperses ER vesiculate

化学灭螺剂氯硝柳胺等要安全得多。

夹竹桃植物各部的新鲜材料的水浸液对钉螺都具有较强的毒杀作用,并在微观上导致钉螺的生理生化及形态病理表现出一系列显著变化,显示夹竹桃对钉螺具有较强化感作用证据。我们认为实验研究所得结论,将为研制新的具有中国特色的植物成份灭螺剂打下基础,并可以为合成仿生灭螺剂以及最终构建生态工程中强化感作用植物群落灭螺提供理论依据。

过氧化物酶(POX)是动物体内一种重要的解毒酶系统,

且是钉螺对外界刺激反应最强烈的同工酶之一^[12]。我们得到的 POX 电泳图谱所反映的明显变化揭示 POX 具有特定的病理生化意义,可以作为钉螺中毒的指标。从三张酶谱中,我们发现样品总的 POX 的变化规律为中毒早期经处理样品的酶活高于对照组,表现为酶带颜色加深,但图中的第 1 号样品酶带浅于对照组,这可能是因为在此之前的某一时刻就已经达到酶活高峰,制样的时候已处于酶活下降的阶段。而在中毒中期和后期经处理样品的酶活低于对照组,直至酶带完全消失。这与正常的病理反应完全一致。在中毒早期,药

物刺激 POX 的表达,增强钉螺肝脏的解毒能力;在中毒中后期,由于药物作用时间或强度超过钉螺生理阈限,肝脏等解毒器官受到损伤,其体内物质和能量代谢出现紊乱,从而抑制酶的合成;在接近死亡的机体中,过氧化物酶的合成几乎停止。

用植物灭螺的研究是目前国际上灭螺研究的热点,本文目前所做的工作仅仅是前期的探求实验。但灭螺研究的发展趋势是生态灭螺^[13,14],这使得仅有实验室的工作是远远不够的,尤其是对分布于中国、日本、菲律宾的两栖习性的湖北钉螺^[15,16],还需要更多地开展野外调查及人工灭螺植物群落中钉螺消长规律的研究,如江滩生态环境的改建,人工林各层次植物种类的选择,各植物的搭配比例,栽培密度,人工辅助能量的供给等;植物对生活在其周围的钉螺等生物的化感作用机理,这些都是今后工作的重点。只有综合两方面的工作,生态灭螺才能真正实施并造福于人类。

参考文献:

- [1] Wang W X, Yang Y, Ke W S, et al. Killing Effect of soaking of fresh *Pterocarya stenoptera* on *Oncomelania hupensis* [J]. *Chinese of Applied Ecology*, 1999, **10**(4):478—480 [王万贤,杨毅,柯文山,等.枫杨水浸液灭螺实验研究.应用生态学报,1999, **10**(4):478—480]
- [2] Zhang X D, Yang X C, Peng Z H. Relationships between the surviving *Oncomelania* and beaches environmental factors [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **19**(2):265—269 [张旭东,杨晓春,彭镇华.钉螺分布与滩地环境因子的关系.生态学报,1999, **19**(2):265—269]
- [3] Marston P, Hostettmann K. Review article number 6: plant molluscicides [J]. *Phytochemistry*, 1985, **24**(4):639—652
- [4] Barbosa F S. Determination and control of schistosomiasis [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1995, **90**(2):155—159
- [5] Perrett S, Whitfield P J. Currently available molluscicides [J]. *Parasitology Today*, 1996, **12**(4):156—159
- [6] Souza C P. Molluscicide control of snail vectors of schistosomiasis [J]. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1995, **90**(2):165—168
- [7] Archibald R G. The use of the fruit of the tree *Balanites aegyptiaca* in the control of schistosomiasis in the Sudan [J]. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 1933, **27**:207—211
- [8] Li S Y, Wang H P, Chen H X, et al. Isolation of constituents from *Oleander Nerium indicum* with molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* [J]. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 1999, **21**(4):376—378 [李顺意,王慧平,陈怀新,等.夹竹桃灭螺活性成份的分离纯化.湖北大学学报(自然科学版), 1999, **21**(4):376—378]
- [9] Yang Y, Ke W S, Wang W X, et al. Effect of *Nerium indicum* on killing *Oncomelania hupensis* [J]. *Chinese of Applied Ecology*, 2000, **11**(6):959—960 [杨毅,柯文山,王万贤,等.夹竹桃灭螺效果初报.应用生态学报,2000, **11**(6):959—960]
- [10] Zhang Y, Feng T, George M D. Study on allele frequency in *oncomelania* from the mainland of China [J]. *Chinese Journal of Parasitic Diseases*, 1994, **12**(3):172—177 [张仪,冯婷,George M Davis.中国大陆钉螺等位基因点的研究.中国寄生虫学与寄生虫病杂志,1994, **12**(3):172—177]
- [11] Yang Y, Wang W X, Li X Y, et al. Apreliminary study on the killing effectiveness of the soaking liquid of *Pterocarya stenoptera* on *Oncomelania* in one year [J]. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 1998, **20**(4):390—393 [杨毅,王万贤,李晓宇,等.枫杨水浸液周年灭螺实验初报.湖北大学学报(自然科学版),1998, **20**(4):390—393]
- [12] Guo Y H. Plant molluscicide studies in the People's Republic of China [M]. In: Mott K E (Ed.), *Plant Molluscicides* [C]. A Willy Medical Publication. 1987, 289—298
- [13] Dias L C S, Maecal J O, Gasser C M. Control of schistosomiasis transmission [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 1995, **90**(2):285—288
- [14] Peng G H. The primary research of microwane resource (2450MC, 600W) inactivation on *Oncomelania hupensis* under several stimulant ecotopes [J]. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 1985, **7**(2):376—378 [彭光汉.2450MC、600W微波源对钉螺在几种模拟生态条件下灭活效应的初探.湖北大学学报(自然科学版),1985, **7**(2):376—378]
- [15] Liu Y Y. Notes on the lassification of the Chinese oncomelaniid snails [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1974, **20**(3):223—230 [刘月英.关于我国钉螺的分类问题.动物学报,1974, **20**(3):223—230]
- [16] Yu F A, Peng W P, Peng Z H, et al. Plant allelopathy effects [J]. *Chinese of Applied Ecology*, 1996, **7**(4):407—410 [於凤安,彭卫平,彭镇华,等.利用植物化感作用灭螺效果的研究.应用生态学报,1996, **7**(4):407—410]