

doi: 10.7541/2016.69

菲牛蛭消化系统的组织学和组织化学研究

高胜涛¹ 苏岩^{1,2} 袁渊³ 陈冬明¹ 付宪冬³ 王志坚¹

(1. 西南大学生命科学学院水产科学重庆市重点实验室, 重庆 400715; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065; 3. 重庆市药用水蛭企业工程技术研究中心, 重庆 400800)

摘要: 利用解剖、HE和AB-PAS染色技术研究了菲牛蛭消化系统的形态结构及组织化学特征。结果表明, 菲牛蛭消化系统由消化管和单细胞唾液腺组成。消化管包括口、咽、食道、嗦囊、肠、直肠和肛门。口开孔于前吸盘腹中部, 口腔内有3片呈三角形排列的颚片, 颚片由辐射肌和横纹肌构成, 其脊上具单列细齿, 可切开寄主皮肤。单细胞唾液腺开口于颚片两侧的乳突上, 可分泌蛭素; 咽呈短球形, 由黏膜层、肌层和外膜构成, 肌层发达; 食道短而窄, 黏膜层见少量杯状细胞和大量嗜酸性颗粒; 嗦囊两侧有10对侧盲囊, 最后一对侧盲囊最长且延伸至肛门两侧; 肠部尚无明显分化, 可细分为肠和直肠。肠前段腔内有多盲囊状的细管, 形成“肠内盲囊”, 黏膜层具较多腺细胞, 黏膜下层发达, 具丰富的血管和淋巴细胞; 直肠肠腔明显大于肠的肠腔, 褶皱高度明显比肠的低, 上皮细胞间可见少量杯状细胞。AB-PAS染色结果显示菲牛蛭消化管黏液细胞有4种类型: I型被染成红色, II型被染成蓝色, III型染成紫红色, IV型染成蓝紫色。口腔部黏液细胞分布以IV型和III型为主, 少量II型与I型黏液细胞, 咽部以III型为主, 食道、嗦囊、肠前部以及直肠壁均无酸性和中性黏液细胞存在, 肠中后部以I型为主, 肛门壁存在大量的II型黏液细胞。讨论了菲牛蛭消化管结构特点与食性的关系等问题, 发现肠是菲牛蛭整个消化管最主要的消化和吸收场所, 且消化管特殊的结构特征决定了菲牛蛭主要以血液作为食物来源。

关键词: 菲牛蛭; 消化系统; 形态特征; 组织学; 组织化学

中图分类号: Q954.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2016)03-0514-10

菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis*, 俗称金边蚂蟥, 隶属于环节动物门 Annelida 蛭纲 Hirudinea 无吻蛭目 Arhynchobdellida 医蛭科 Hirudinidae 牛蛭属 *Poecilobdella*, 是吸血蛭类中个体较大的一种, 以吸吮人和脊椎动物如牛、青蛙等的血液为生^[1]。主要分布于我国的广东、广西和海南等地区。现代药理研究表明, 菲牛蛭所含天然水蛭素的抗凝血酶活性明显强于目前中药材市场上通用的非吸血水蛭类宽体金线蛭 *Whitmania pigra*^[2, 3], 而天然水蛭素又是迄今世界上所发现的最强天然抗凝血酶物质, 其凝血和溶栓作用优于传统的抗凝血药物——肝素^[4-6]。然而, 菲牛蛭作为治疗人类心脑血管疾病的原材料, 正随着目前环境的严重破坏而失去了生存的空间。近年来, 各地竞相开展菲牛蛭的人工养殖, 但对菲牛蛭的基础生物学知识缺乏了解, 在普

及人工养殖方面还面临着巨大的挑战。所以, 了解菲牛蛭的基础生物学对自然资源的保护和人工养殖的推广有极为重要的意义。

迄今, 对于菲牛蛭抗凝血酶活性的分离和纯化^[7, 8]、抗凝血酶活性基因的克隆和序列分析^[9-11]及水蛭素基因重组^[12]、神经生理学^[13, 14]等方面的研究, 国内外已有相关报道, 但对消化系统的具体结构、组织学和组织化学的研究还未见资料。本文旨在通过对菲牛蛭消化管组织学的研究, 以期为其消化生理的研究及其增殖提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试验用成体菲牛蛭采自广西钦州市。共20条, 体重为2—5 g。在25℃条件下实验室内养殖

收稿日期: 2015-05-22; 修订日期: 2015-10-12

基金项目: 重庆市万盛区科技局应用开发类项目(yykf-2014-002)资助 [Supported by Application Development Project in Wansheng District Science and Technology Bureau of Chongqing (yykf-2014-002)]

作者简介: 高胜涛(1988—), 男, 安徽宣城人; 在读硕士研究生; 主要研究方向为资源动物学。E-mail: 372825937@qq.com

通信作者: 王志坚(1969—), 男, 四川南充人; 教授, 博士; E-mail: wangzj1969@126.com

两个月, 实验前两周不投喂。

1.2 试验方法

将菲牛蛭放入10%—15%的乙醇中麻醉10min, 待其昏迷并舒展身体后, 吸干体表水分, 分别称重和测量体长, 沿背中线剪开, Nikon SMZ1000解剖镜下观察其形态特征, 拍照并测量相关数据。组织学材料取顎片、咽、食道、嗦囊、肠、直肠等, Bouin's液固定, 石蜡切片, 厚度为5—7 μm , HE染色, 中性树胶封片。组织化学观察采用阿利新蓝-过碘酸雪夫氏反应(AB-PAS)染色法显示黏液物质。在显微镜(Nikon DXM1200)下观察和拍照。

1.3 数据处理

采用Image-Pro Plus 6.0图像软件测量形态指标, SPSS软件对试验数据统计分析, 试验数据以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)表示, 显著性差异表示为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 消化系统的形态结构

菲牛蛭消化系统由消化管和单细胞唾液腺构成, 整个消化管由口腔、咽、食道、嗦囊、肠、直肠和肛门等部分组成(图版 I -1)。

口腔 菲牛蛭口开孔于前吸盘腹中部, 体视镜下可见口唇四周有白色乳状突起, 口腔大且深, 呈圆柱型, 腔内有数道肌肉性纵褶(图版 I -2)。口底有3枚肌肉型顎片, 大小一致, 呈新月形, 1枚居背面, 2枚居腹侧, 围成一倒“Y”形(图版 I -3)。顎脊上有约150—200颗单列细齿, 单细胞唾液腺则开口于顎两侧分散的乳突上, 共4列约30个左右, 其中靠近顎脊的乳突较小(图版 I -4)。

咽 咽位于VII—VIII体节, 咽前段与顎内基相连, 咽头发达, 整体呈短球形, 外围有发达的辐射肌牵引(图版 I -5)。咽腔较大, 腔内具6条宽而高的内纵褶, 背中和腹的两侧各一对, 并在咽前段会合(图版 I -6)。体视镜下咽头和咽内壁未观察到单细胞唾液腺乳突。

食道 食道短而直, 相对狭窄, 位于VIII—IX体节, 食道壁极薄, 呈透明状, 食道、咽与嗦囊无明显的分界(图版 I -7)。

嗦囊 菲牛蛭嗦囊平铺于神经索之上, 是整个消化管最长最发达的部位, 位于节IX—X X III体节, 两侧共伸出10对侧盲囊(图版 I -1), 前9对侧盲囊囊腔由前向后依次增大, 但第10对侧盲囊的囊腔长度和宽度都远大于前9对, 盲囊壁与食道相似, 几乎呈透明状。每对侧盲囊各分两叶, 前叶小、后叶

大, 其中最后一对侧盲囊最长, 位于X IX—X X III体节, 可延伸至肛门两侧(图版 I -1)。

肠 未出现明显的分化, 为一直行管, 始于嗦囊末端的幽门括约肌(图版 I -8), 后端通过一括约肌开口于直肠。肠前段膨大, 向后稍有变细, 至直肠前一段最细, 且颜色亦变为半透明状, 肠壁较嗦囊壁厚, 外面包裹一层网状的纤维组织(图版 I -9)。

直肠 直肠较短, 仅为肠长的1/5左右。整体膨大, 外表颜色半透明, 易与肠区分, 直肠的腔明显比肠的腔大, 直肠壁略薄于肠壁(图版 I -9)。

肛门 肛门直接与直肠相连, 无肛管, 通过尾吸盘背面前部开口向外(图版 I -10), 此段腔隙极度收缩。

2.2 消化系统的显微结构

菲牛蛭消化管主要由黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层组成, 各部位具体结构描述如下。

口腔壁 口腔壁无浆膜层(图版 II -1)。黏膜上皮为复层扁平上皮, 上皮细胞外有较厚的染成红色的物质。口腔内顎片由上皮细胞层、肌肉层和顎腔组成(图版 II -2)。上皮细胞表面覆盖一层半透明状的角质层, 上皮细胞为单层扁平细胞, 细胞排列紧密, 核位于细胞中部。上皮细胞层与肌肉层之间被一层较厚的腺泡层隔开, 该层细胞聚集成团, 形成腺泡(图版 II -2), 而具有分泌抗凝血酶活性物质的唾液腺乳突则镶嵌于该层, 乳突呈锥状, 乳突内分布有大量嗜碱性颗粒物质(图版 II -3), 该层腺泡状细胞团为抗凝血酶活性物质的分泌部位。发达的肌层围成顎, 肌层由横纹肌和辐射肌构成, 横纹肌肌束排列紧密, 无间隙, 顎片主要依靠非常发达的辐射肌锚定在体壁上。顎片内充满了大量的嗜碱性细胞和空泡状细胞, 细胞核清晰可见, 整个顎片被横穿的弹性纤维均匀分隔成多个小的部分(图版 II -2)。

咽 咽壁无黏膜下层, 浆膜层极薄, 几乎不可见(图版 II -4)。黏膜层包括复层扁平上皮、固有层和黏膜肌层, 黏膜上皮为复层扁平细胞, 无杯状细胞分布, 细胞排列紧密, 表层细胞扁平状, 仍可见细胞核, 未发生角质化, 深层基底细胞矮柱状。上皮向咽腔内突起, 伸出6道锥形皱襞, 呈辐射对称, 皱襞上有纹状缘。光镜下未观察到固有层。黏膜肌层为纵行肌, 较发达, 位于黏膜层下, 其肌纤维排列较松散, 在光镜下可见大量空隙。肌层发达, 主要为环肌, 由相同走向的肌束构成, 肌纤维排列紧密, 周围分布有大量围咽神经细胞。浆膜极薄, 肌层外另有发达的辐射肌牵引, 辐射肌由肌层外发出,

横穿整个肌层直达锥形皱襞,与肌层、黏膜肌层交织共同牵引咽部肌肉活动(图版 II-5)。

食道 食道管壁无黏膜下层,厚度约为15—30 μm ,内壁表层无角质层,纹状缘较厚,其下为食道上皮细胞,上皮大部分排成单列,细胞呈椭圆形或圆形,排列疏松,大小不一,弱嗜碱性,细胞核圆形,位于细胞基底部。上皮有固有膜支撑向腔内突出形成大量指状突起,突起的皱襞无分支(图版 II-6)。上皮细胞内散布大量嗜酸性颗粒,几乎无杯状细胞的分布。固有层为不规则的致密结缔组织,黏膜肌层为纵肌。肌层较厚,由外环内纵两层肌肉构成,外层环肌比内层纵肌厚,内层纵肌不连续间断分布。最外层为浆膜层,由疏松的结缔组织构成,可明显观察到大量成纤维细胞(图版 II-7)。

嗦囊 嗦囊囊腔较食道腔明显增大,除第10对侧盲囊外,囊壁厚度约为20—40 μm 。黏膜上皮为单层柱状细胞,细胞椭圆形,排列较松散,细胞核卵圆形,位于细胞中部,游离面具角质增厚,细胞间有极少量的杯状细胞。黏膜层向腔内突出,形成大量纵行褶皱,褶皱高度不一,呈指状,分支较少,排列稀疏。黏膜肌层不发达,仅稀疏分布于固有层间。黏膜下层较厚,为疏松的结缔组织,其中可见大量成纤维细胞和小血管。肌层仅环肌一层,非常发达,属于平滑肌。浆膜层极薄(图版 II-8)。第10对侧盲囊囊壁厚度约为15—30 μm ,囊壁厚度薄于前几对。上皮细胞游离面角质增厚程度大于其他嗦囊,上皮与固有层向囊腔伸出形成形状不一的皱襞,主要呈细长指状和叶片状,其高度明显大于其他嗦囊。肌层厚度略小于其他嗦囊(表 1),浆膜层几乎不可见(图版 II-9)。

肠 肠约占整段肠长的4/5,肠壁厚度明显大于嗦囊,其厚度约为40—100 μm 。黏膜上皮为单层柱状上皮,上皮细胞狭长且排列紧密,细胞核圆

形,位于细胞中央,细胞内有大量嗜酸性颗粒。上皮细胞间分布有少量空泡状的杯状细胞,细胞游离面纹状缘发达。黏膜层和部分黏膜下层向肠腔突出形成许多皱襞,部分皱襞形成次级皱襞,皱襞高度大约为食道和嗦囊的2倍(表 1)。皱襞中轴固有层有丰富的毛细血管,皱襞基底部可见肠腺。黏膜肌层由排列疏松的纵行平滑肌纤维组成。黏膜下层发达,其厚度是嗦囊的2倍(表 1),黏膜下层中含有大量的血管、成纤维细胞和淋巴细胞。肌层仅有较厚的环形肌一层,肌纤维排列不紧密,可见大量间隙。浆膜层极薄,间断贴附于肌层之上。整段肠除形成中央大的肠腔外,其四周还环顾有许多小的管状腔隙,形成特殊的“肠内盲囊”结构特征(图版 II-10)。

直肠 直肠仅约占整段肠长的1/5,直肠壁厚度约为30—70 μm 。直肠肠腔整体膨大,明显大于肠的肠腔。直肠壁无浆膜层。黏膜上皮细胞为单层柱状细胞,细胞呈矮柱状,排列紧密,细胞核多位于细胞基底部,细胞间分布少量杯状细胞,上皮皱襞短锥状,皱襞高度基本一致。黏膜肌层不发达。黏膜下层为疏松结缔组织,其中有丰富的血管、神经细胞和成纤维细胞分布。肌层仅有一层纵行肌,较薄且间断分布(图版 II-11)。

肛门 肛门壁无浆膜层。黏膜层上皮细胞为复层扁平上皮,而肌层的收缩导致肠腔腔隙极度减小。黏膜下层与固有膜分界不明显,肌层较厚,为内环、外纵两层,其中含少量淋巴细胞(图版 II-12)。菲牛蛭消化道不同形态指数见表 1。

2.3 消化系统的组织化学特征

根据AB-PAS染色结果,将菲牛蛭消化系统黏液细胞及其分泌的黏液物质分为以下4个类型(表 2)。

口腔部4种类型的黏液细胞均有分布,其中以III型和IV型黏液细胞并分泌混合黏液物质为主,

表 1 菲牛蛭消化管组织形态指数

Tab. 1 Morphological index of digestive tract of *P. manillensis* (μm)

形态指数 Morphological Index	食道Esophagus	嗦囊Crop	第十对嗦囊盲囊 Tenth caecum	肠Intestine	直肠Rectum
黏膜褶皱高Mucosal fold higher	40.76±2.39 ^b	48.34±3.32 ^b	70.26±5.63 ^c	88.23±10.64 ^d	19.54±1.11 ^a
黏膜下层厚 Submucosal layer thickness	0	10.10±0.59 ^a	10.00±0.68 ^a	21.07±1.56 ^c	16.07±1.44 ^b
肌层厚Muscular thickness	20.98±1.27 ^c	8.43±0.89 ^b	5.86±0.67 ^{ab}	38.45±2.04 ^d	4.44±0.50 ^a

注: 同行肩标字母相同表示组间差异不显著($P>0.05$), 字母相邻表示组间差异显著($P<0.05$), 字母相隔表示差异极显著($P>0.01$)

Note: The means followed by the same letter denote no significant differences ($P>0.05$), the means with adjacent letters mean significant difference ($P<0.05$), and the means with separate letters show very significant difference ($P>0.01$)

II型和I型黏液细胞分布较少(图版III-1)。咽部则含有丰富的III型黏液细胞和少量的I型黏液细胞,未观察到II型和IV型黏液细胞分布(图版III-2)。食道、整个嗦囊、肠前段和直肠均未发现4种类型的黏液细胞存在(图版III-3—6、8)。而肠中后段则含有丰富的I型和极少量的III型黏液细胞(图版III-7)。肛门壁近直肠端仅有II型黏液细胞存在(图版III-9)。整个消化管黏液细胞中黏液物质的数量和性质见(表3),但从消化管口腔直至肛门处黏液细胞的分布无明显的规律可寻。

3 讨论

3.1 消化系统的组织结构特征与食性的关系

菲牛蛭常生活于稻田、水沟和池塘等处,以吸吮人和脊椎动物如牛、青蛙等的血液为生,具极强的耐饥饿能力^[1]。菲牛蛭特殊的食性与消化系统的形态、结构和特性密切相关。本研究表明,菲牛蛭消化管不同段的组织结构差异明显,由此承担不同的消化和吸收功能。

与摄食方式相适应,菲牛蛭消化系统分化发育出具发达肌肉性纵褶的口腔,口腔大且深,口腔周

围有丰富的围口神经,而围口神经又是重要的化学感受器,同时,水蛭在觅食时头部和其他部位的体节感受器也会感受水的波动^[15,16],菲牛蛭口唇部在光镜下可同时观察到丰富的白色乳状突起—感受器,这些特殊的组织结构为菲牛蛭快速、稳定、准确的吸附到寄主皮肤表面奠定了基础,这与刘宏等^[17]在研究蚂蝗不同月龄口器组织学的实验中发现的结果是一致的。菲牛蛭口腔内3枚呈倒“Y”形排列的顎片上布有锐利的细齿,在发达的横纹肌和辐射肌往复地动作下可轻易切割开寄主的皮肤,血液在肌肉性咽的吮吸下,自由的流入消化道内,同时,顎片上着生的大量唾液腺乳突,可分泌抗凝血酶活性物质,阻止吸食到消化道内的血液凝固。

菲牛蛭咽为取食特化,咽部肌肉异常发达,在围咽神经的调节下,咽部横纹肌横向运动、纵肌纵向扩张,使短球形的咽不停吮动,加上矮柱状的上皮具纹状缘,便于血液顺利进入消化道。咽上皮细胞无法区分细胞间隙,也无角质层,主要是因为菲牛蛭以吸血为主,无需角质层保护,这与直隶环毛蚓*Pheretima tschiliensis*^[18]相似。

表 2 菲牛蛭消化管黏液细胞及其分泌的黏液物质分类

Tab. 2 Mucous cells and mucus secretion in digestive system of *P. manillensis*

黏液细胞 Mucus cells	AB反应 AB reaction	PAS反应 PAS reaction	AB-PAS染色 AB-PAS staining	黏液物质主要成分 Major components of mucus
I 型 I type	阴性 Negative	阳性 Positive	红色 Red	中性黏多糖 Neutral mucopolysaccharides
II 型 II type	阳性 Positive	阴性 Negative	蓝色 Blue	酸性黏多糖 Acid mucopolysaccharides
III 型 III type	阳性 Positive	阳性 Positive	紫红色 Purple reddish	中性偏酸性黏多糖 Mainly neutral mucopolysaccharides
IV 型 IV type	阳性 Positive	阳性 Positive	蓝紫色 Blue purple	酸性偏中性黏多糖 Mainly acid mucopolysaccharides

表 3 菲牛蛭消化管黏液物质性质

Tab. 3 Mucous substance properties in digestive system of *P. manillensis*

分布 Distributed	黏液物质性质 Mucous substance properties		
	酸性黏液 Acidic mucus	混合黏液 Mixed mucus	中性黏液 Neutral mucus
口腔 Oral cavity	++	++++	+
咽部 Pharynx	+	+++	+
食道 Esophagus	—	—	—
嗦囊 Crop	—	—	—
肠前段 Anterior intestine	—	—	—
肠中后段 Enteric and posterior intestine	+	++	+++
直肠 Rectum	—	—	—
肛门 Rump	++++	—	—

注: 反应强度级别: —, 阴性; +, 弱; ++, 中等; +++, 强; +++++, 强烈

Note: The intensity of the reaction is expressed in grades: —, negative; +, weak; ++, moderate; +++, intense; +++++, very intense

食道是连接咽和嗦囊的管道,陈立靖等^[19]对宽体金线蛭消化管的组织学观察研究表明,宽体金线蛭食道含丰富的杯状细胞,肌层不发达,为控制运送食物速率和初期消化的场所。本研究发现菲牛蛭食道很短,几乎无杯状细胞分布,基本不具酶活性,加上黏膜下层被发达的肌层取代,故食道仅起运输和内吞血液的作用。与以螺类为食的宽体金线蛭^[20]有所区别。

嗦囊为菲牛蛭消化管最发达的部位。菲牛蛭主要吸食人畜血液,其摄食具一定的随机性,摄食一次可维持很长的时间,其发达的嗦囊与存储食物密切相关。本实验解剖观察到菲牛蛭嗦囊两侧伸出10对盲囊,嗦囊上皮向腔内伸出形成丰富的褶皱,当血液流入嗦囊内,褶皱因囊腔膨大而迅速减少,这便于菲牛蛭存储大量的血液,而嗦囊上皮细胞间仅有的少量杯状细胞说明其消化能力较差。囊腔外周结缔组织、肌层环肌非常发达,而环肌的收缩又可使嗦囊变细^[21],以便血液流入肠道内,这为嗦囊的伸缩、储血和血液顺利进入肠道提供了基础条件。以上几点正解释了菲牛蛭一次摄食可长时间维持的原因。

与以螺类为食的宽体金线蛭相比,菲牛蛭的肠道更加细长。刘飞等^[22]对宽体金线蛭脏器和皮肤的组织结构观察发现蚂蝗的肠腔面有丰富的绒毛结构,曾端等^[23]认为肠道黏膜表面的结构和肠道分泌能力对物质的消化吸收有至关重要的作用。本研究同样发现菲牛蛭肠上皮有发达的绒毛结构,且上皮细胞间分布的嗜酸性颗粒有利于肠道的消化吸收,杯状细胞分泌的黏液有利于食物顺利进入肠道,较厚的肠道肌层,有利于肠道的蠕动,皱襞中轴固有层还有丰富的毛细血管分布,皱襞基底面发现有肠腺,这些都为肠的消化吸收提供了明显的帮助。此外,研究还发现,菲牛蛭肠腔内四周环绕与肠相同走向的细长管道,直接开口于肠壁,其结构与肠相同,这种长短不一的细管形成了特殊的“肠内盲囊”结构,此结构的出现可能一是为了增加血液的消化吸收的面积,二是减少大量血液对体内的冲击,起到缓冲的作用。因为菲牛蛭一次吸食血液重量可达自身体重的5—8倍,吸血一次又可长时间维持^[1],而菲牛蛭的整个消化和吸收都集中在肠部;其次,菲牛蛭无骨骼系统,肌肉系统发达,身体伸缩性极好,又长期生活在水环境中,吸食的大量血液在身体伸缩状态下会大面积移动,这种结构的出现减少了摄食的血液对肠道的冲击。所以,此结构与菲牛蛭的食性和习性密切相关。从“肠内盲囊”特殊结构的出现,到上皮细胞间嗜酸性颗粒、杯状细

胞数量的增多,再到肠道肌层厚度的增加,都要优于消化管的各部,所以,肠是菲牛蛭整个消化管最主要的消化和吸收场所,这与宽体金线蛭^[19]一致。

直肠与肠差异明显,直肠是整段肠体最膨大的部分,肠皱襞大为减少,上皮细胞有少量杯状细胞,黏膜下层血管丰富,可对食物进一步消化吸收。直肠末端膨大并开口于尾吸盘背面前部,形成结构简单的肛门,这与疣吻沙蚕*Tylorrhynchus heterochaetus*^[24]较为相似。总之,菲牛蛭消化系统结构较为简单,功能相对不完善,这也与环节动物门类消化系统结构的进化程度一致。

3.2 消化系统的黏液物质在进食过程中的作用

黏液细胞分泌的黏液中含有多种活性物质,如黏多糖、糖蛋白以及各种水解性酶类等成分^[25],因此,黏液物质在消化道各部的分布对消化道执行其功能至关重要。

本研究发现菲牛蛭消化管的始端与末端黏液细胞分布较集中,分泌丰富的黏液,有利于食物顺利进入消化管并被消化吸收。如口腔部黏液细胞分布密度大且类型多,与其结构和功能的复杂性有关,菲牛蛭摄食时会随着食物带入病原微生物,Ⅱ型和Ⅳ型黏液细胞分泌的黏液物质含丰富的水解酶^[25]等抗菌物质,可有效防止病原微生物直接进入体内,起到防御的作用,同样研究发现肛门处也有丰富的Ⅱ型黏液细胞。因口腔和肛门与外界直接接触,环境复杂,接触病原微生物几率较大,所以此两处分布的黏液细胞分泌的黏液物质种类和数量相对丰富,研究结果与王宜艳等^[26]对皱纹盘鲍*Haliotis discus hannai*的研究相一致。同时,在咽部观察到大量的Ⅲ型黏液细胞存在,而这些黏液细胞分泌的中性偏酸性的混合黏液物质被认为对食物的润滑和参与消化管内pH值的调节有至关重要的作用^[25]。食道、嗦囊、肠前段和直肠处的染色结果均未发现有任何黏液细胞的分布,此结果进一步说明了食道、嗦囊消化功能相对不强,食道起到食物运输的作用,嗦囊可存储大量食物,肠前段和直肠不是消化吸收的主要场所,肠的中后段是整个消化管重要的消化、吸收区域。从AB-PAS染色的结果发现肠中后段含大量的Ⅰ型黏液细胞,该类细胞分泌的中性黏液物质常与碱性磷酸酶共存,故有消化的功能,同时中性黏液物质还起到促进大分子物质在细胞膜间的吸收和运输,并与二糖和短脂肪酸的吸收功能有关^[27]。总之,从消化管黏液细胞的分布和类型可以看出消化管不同部位执行着各自重要的功能。

参考文献:

- [1] Yang T. Fauna Sinica (Annelida-Hirudinea) [M]. Beijing: Science Press. 1996, 120—122 [杨潼. 中国动物志(环节动物门·蛭纲). 北京: 科学出版社. 1996, 120—122]
- [2] Zhou Y, He Z L, Kong Y. Research progress on thrombin inhibitor [J]. *China Pharmaceuticals*, 2013, **22**(12): 9—11 [周莹, 何志龙, 孔毅. 凝血酶抑制剂的的研究进展. 中国药业, 2013, **22**(12): 9—11]
- [3] Li J, Yu X, Zhang J, *et al.* Anti-Thrombin activity analysis and effects of cryopreservation on anticoagulant activity of four species of leeches [J]. *Fisheries Science*, 2014, **33**(9): 591—593 [李军, 于翔, 张健, 等. 4种水蛭粗提物抗凝活性及冻存时间对菲牛蛭抗凝活性影响. 水产科学, 2014, **33**(9): 591—593]
- [4] Liu Y M, Yu S, Cui R Q, *et al.* Influencing factors in determination of anticoagulant activity of *Whitmania pigra* whitman by thrombin titration [J]. *China Pharmacist*, 2014, **17**(5): 789—793 [刘义梅, 喻珊, 崔瑞勤, 等. 凝血酶滴定法测定宽体金钱蛭抗凝血活性的影响因素. 中国药师, 2014, **17**(5): 789—793]
- [5] Wang B, Yang S Y, Zhou Z H, *et al.* Optimization of anticoagulant substance extraction methods of *Poecilobdella manillensis* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, **31**(20): 51—54 [汪波, 杨思毅, 周子华, 等. 菲牛蛭抗凝血活性物质提取方法研究. 中国农学通报, 2015, **31**(20): 51—54]
- [6] Kvist S, Min G S, Siddall M E. Diversity and selective pressures of anticoagulants in three medicinal leeches [J]. *Ecology and Evolution*, 2013, **3**(4): 918—933
- [7] Yang T, Li J Q, Yin P. Isolation and purification of Hirudin from a blood-sucking leech, *Hirudin Nipponia*, in China [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, **21**(2): 169—173 [杨潼, 李建秋, 尹平. 我国产日本医蛭水蛭素的分离和纯化. 水生生物学报, 1997, **21**(2): 169—173]
- [8] Fang F Y, Miao Y L, Liu H Q, *et al.* Emulsion liquid membrane extraction with D2EHPA mobile carrier *Hirudinaria manillensis* hirudin in experimental study [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, **37**(20): 3056—3061
- [9] Alaama M, Uddin A B M H, Ghawi A M, *et al.* Isolation and characterization of antithrombin peptides from the saliva of Malaysian Leeches [J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, **13**(4): 553—557
- [10] Li Y H. Gene clone and sequence analysis of the cDNA from *Hirudinaria manillensis* of Guangxi [J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2011, **32**(2): 92—94 [黎渊弘. 广西菲牛蛭水蛭素基因cDNA的克隆与序列分析. 中国生化药物杂志, 2011, **32**(2): 92—94]
- [11] Tang E G, Liu X P. Cloning and Sequencing of Hirudin Gene of *Hirudinaria Manillensis* in Guangdong [J]. *Academic Journal of Sun Yat-sen University of Medical Sciences*, 2002, **23**(2): 84—86 [谭恩光, 刘秀平. 广东菲牛蛭水蛭素基因的克隆和序列测定. 中山医科大学学报, 2002, **23**(2): 84]
- [12] Kim H Y, Sohn J H, Kim C H, *et al.* Rapid selection of multiple gene integrant for the production of recombinant hirudin in *Hansenula polymorpha* [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2000, **5**(1): 1—6
- [13] Jovanovic Z, Jovanovic S. Toxicity induced by cumene hydroperoxide in leech *Retzius* nerve cells: the protective role of glutathione [J]. *Folia Biologica*, 2013, **61**(1—2): 93—100
- [14] Jovanovic Z, Jovanovic S. A comparison of the effects of cumene hydroperoxide and hydrogen peroxide on *Retzius* nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga* [J]. *Experimental Animals*, 2013, **62**(1): 9—17
- [15] Mullins O J, Hackett J T, Buchanan J T, *et al.* Neuronal control of swimming behavior: comparison of vertebrate and invertebrate model systems [J]. *Progress in Neurobiology*, 2011, **93**(2): 244—269
- [16] Shen D, Lu Q, Wang L, *et al.* Ultrastructure of electrical synapses between nociceptive and anterior pagoda neurons in the CNS of the leech (*Whitmania pigra*) [J]. *Invertebrate Neuroscience*, 2002, **4**(4): 193—198
- [17] Liu H, Guo Q H, Shi H Z, *et al.* Histological and histochemical studies on mouth part of *Whitmania pigra* at different mouths age [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, **39**(12): 2258—2262 [刘飞, 郭巧生, 史红专, 等. 蚂蝗不同日龄口器组织学及组织化学研究. 中国中药杂志, 2014, **39**(12): 2258—2262]
- [18] Tan Z J, Han Y L, Zhang F R. Scanning electron microscopic studies on the digestive tract of *Pheretima techiensis* michaelson [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Neimenggu*, 1994, **25**(5): 540—545 [谭竹钧, 韩雅莉, 张福仁. 直隶环毛蚓消化道扫描电镜观察. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 1994, **25**(5): 540—545]
- [19] Chen L J, Wang X Y, Zang D F, *et al.* Histology of digestive tract in *Whitmania pigra* [J]. *Journal of Biology*, 2010, **27**(6): 25—28 [陈立婧, 王熙宇, 臧德法, 等. 宽体金钱蛭消化道的组织学观察. 生物学杂志, 2010, **27**(6): 25—28]
- [20] Chinese Pharmacopoeia. Radical [S]. 2010, 77 [中国药典. 一部. 2010, 77]
- [21] Zhang Z H. The muscles of the animals [J]. *Bulletin of Biology*, 2004, **39**(8): 20—21 [张子慧. 动物的肌肉. 生物学通报, 2004, **39**(8): 20—21]
- [22] Liu F, Shi H Z, Guo Q S, *et al.* Tissue structure observation of internal organs and skin of *Whitmania pigra* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, **31**(22): 1849—1852 [刘飞, 史红专, 郭巧生, 等. 蚂蝗脏器和皮肤的组织结构观察. 中国中药杂志, 2006, **31**(22): 1849—1852]
- [23] Zeng D, Ye Y T. Studies on digestive system and different feeding habits of some fishes in fresh water [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1998, **20**(4):

- 361—364 [曾端, 叶元土. 鱼类食性与消化系统结构的研究. 西南农业大学学报, 1998, **20**(4): 361—364]
- [24] Ma D C, Ye L H, Xu A Y, *et al.* A histological study of *Tylorrhynchus heterochaetus* [J]. *South China Fisheries Science*, 2014, **10**(4): 58—63 [马定昌, 叶柳荷, 许爱娉, 等. 疣吻沙蚕组织学的初步研究. 南方水产科学, 2014, **10**(4): 58—63]
- [25] Şenol N, Yeşil Ö. Histochemical analysis of glycoconjugates in the mucous cells in the gill of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W., 1792) [J]. *Suleyman Demirel University Journal of Science*, 2014, **9**(1): 6—11
- [26] Wang Y Y, Sun H S, Zheng M Y. Types and distribution of mucous cells in the digestive tract in Abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *Fisheries Science*, 2004, **23**(5): 1—4 [王宜艳, 孙虎山, 郑美玉. 皱纹盘鲍消化道黏液细胞类型与分布. 水产科学, 2004, **23**(5): 1—4]
- [27] Pedini V, Scocco P, Radaelli G, *et al.* Carbohydrate histochemistry of the alimentary canal of the shidrum, *Umbria cirrosa* [J]. *Journal of Veterinary Medicine Series C*, 2001, **30**(6): 345—349

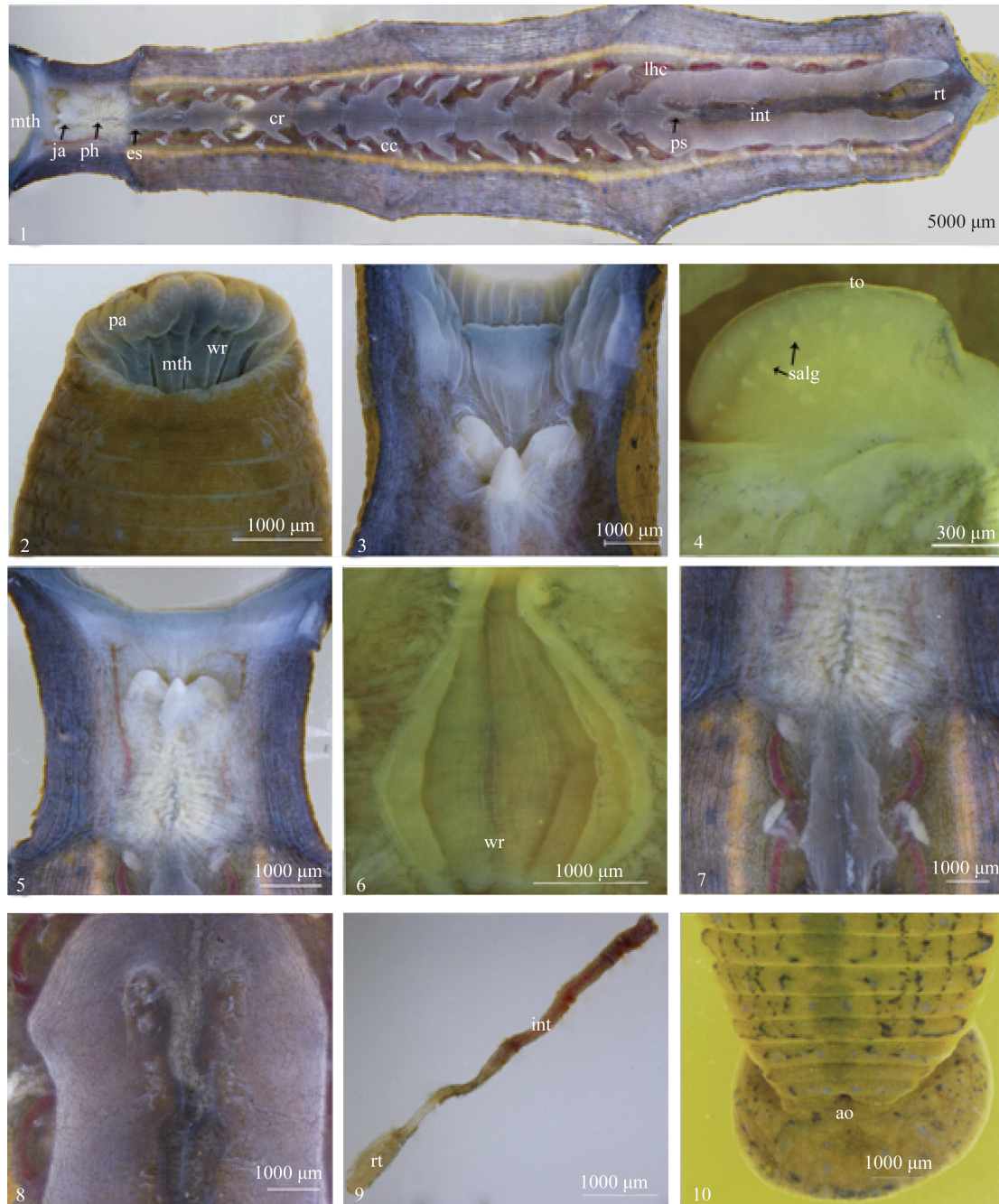
HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMISTRICAL STUDY ON DIGESTIVE SYSTEM OF *POECILOBDELLA MANILLENSIS*

GAO Sheng-Tao¹, SU Yan^{1,2}, YUAN Yuan³, CHEN Dong-Ming¹, FU Xian-Dong³ and WANG Zhi-Jian¹

(1. The Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China; 3. Chongqing Engineering Research Center for Enterprise Technology in Medicinal Leeches, Chongqing 400800, China)

Abstract: The current study investigated the morphological structure and histochemical characteristics of the digestive system of *Poecilobdella manillensis*. The results showed that the digestive system was consisted of digestive tract and unicellular salivary glands. Digestive tract includes mouth, pharynx, esophagus, crop, intestine, rectum, and anus. Mouth with three triangular arranged jaws inside opens in the central part of anterior sucker. These jaws, constituted by radiation and striated muscle and covered by single serration on ridge, can cut the skin of the host. Single-celled salivary glands opening on the mastoid on either side of the jaw secreted hirudin. The globose pharynx is mainly composed of mucosa, developed muscularis and adventitia from inside to outside. Esophagus is short and narrow with a few goblet cells and a large number of eosinophilic granules on the mucosa layer. There are 10 pairs of contralateral blind sac outstretched from both sides of crop, and the last and longest one extends to both sides of anus. The intestine is no obvious differentiation and can be subdivided into the intestine and rectum. There are several blind sac-like structures in intestinal front cavity, forming “inner blind sac in intestine”. Mucosa with more glandular cell and developed submucosa is rich in blood vessels and lymphocytes. Rectal cavity is obvious greater than intestinal lumen, while its fold height is lower than that of intestine. A few goblet cells can be seen between epithelial cells. According to AB-PAS staining, four types of mucous cells were observed in digestive system of the *P. manillensis*: type I (red), type II (blue), type III (purple reddish) and type IV (blue purple). Mucous cells in oral cavity were dominated by type IV and type III with a small amount of type II and type I. Type III cells were the major mucous cells in pharynx. There was no mucous cells in esophagus, crop, anterior intestine and rectum. Most of mucous cells in postmedian of intestine were of type I, but only type II in anus. We also discussed the relationship between the structural characteristics of the digestive tract of *P. manillensis* and the feeding habits.

Key words: *Poecilobdella manillensis*; Digestive system; Morphology characteristics; Histology; Histochemistry



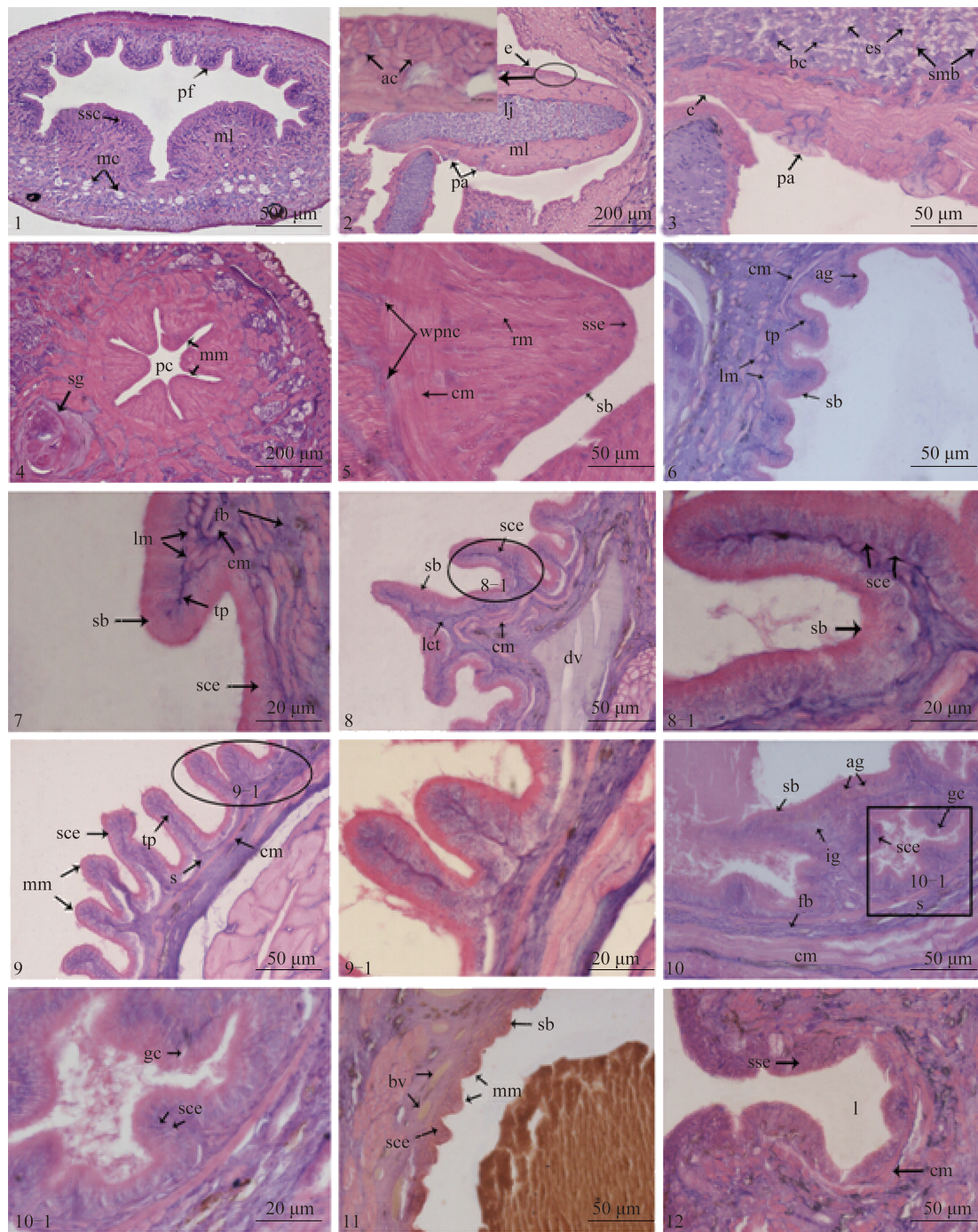
图版 I 菲牛蛭消化系统的形态学观察

Plate I The morphology of digestive system in *P. manillensis*

1. 消化系统解剖图; 2. 口腔; 3. 示颚片; 4. 示唾液腺乳突; 5. 咽及咽外辐射肌; 6. 咽内部及纵褶; 7. 食道; 8. 幽门括约肌; 9. 肠; 10. 肛门
1. anatomy of the digestive system; 2. oral cavity; 3. jaw; 4. salivary gland mastoid; 5. pharynx and radiation muscle; 6. the internal typhlosole of pharynx; 7. esophagus; 8. pyloric sphincter; 9. intestine; 10. anus

ao: 肛门; cc: 嗦囊盲囊; cr: 嗦囊; es: 食道; int: 肠; ja: 颚; lh: 侧血体腔管; mth: 口; pa: 乳突及感器; ph: 咽; ps: 幽门括约肌; rt: 直肠; salg: 唾液腺; to: 齿; wr: 纵褶

ao: anal orifice; cc: crop caeca; cr: crop; es: esophagus; int: intestine; ja: jaw; lh: lateral haemocoelomic channel; mth: mouth; pa: papilla; ph: pharynx; ps: pyloric sphincter; rt: rectum; salg: salivary gland; to: tooth; wr: wrinkle



图版 II 菲牛蛭消化系统的组织学观察(HE)

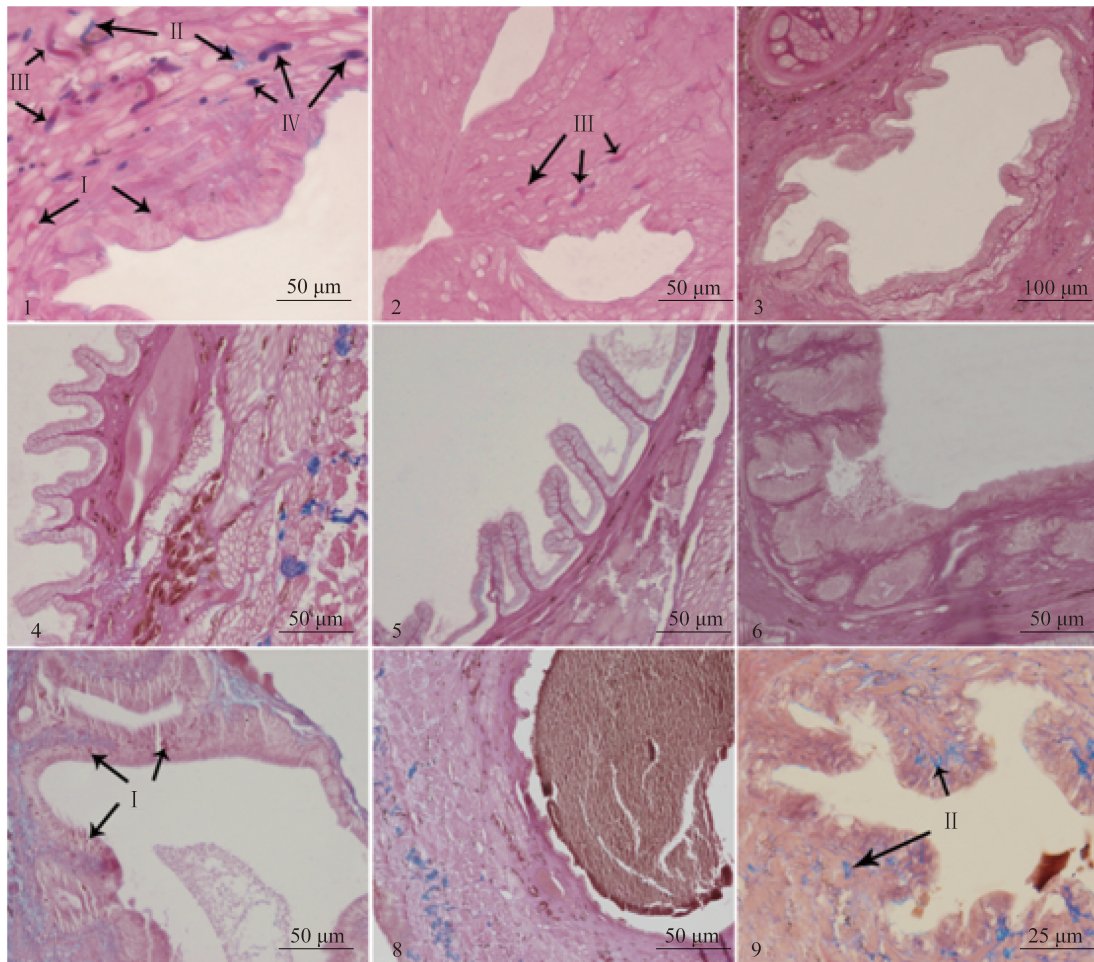
Plate II The Histology of digestive system in *H. manillensis* (HE staining)

1. 过口腔横切; 2—3. 颚片横切; 4—5. 过咽横切; 6—7. 过食道横切; 8. 嗦囊横切; 9. 10对嗦囊盲囊横切; 10. 肠横切; 11. 直肠横切; 12. 尾部横切, 示肛门

1. cross-section of oral cavity; 2—3. cross-section of the jaw; 4—5. cross-section of pharynx; 6—7. cross-section of esophagus; 8. cross-section of crop; 9. cross-section of tenth caecum; 10. cross-section of intestine; 11. cross-section of rectum; 12. cross-section of rump

ac: 腺泡; ag: 嗜酸性颗粒; bc: 嗜碱性细胞; bv: 血管; c: 角质层; cm: 环肌; ct: 致密结缔组织; dv: 背血管; e: 表皮细胞; es: 空泡状细胞; fb: 成纤维细胞; gc: 杯状细胞; ig: 肠腺; lj: 肠腔; lct: 疏松结缔组织; lm: 纵肌; lj: 颚腔; mc: 黏液细胞; ml: 肌层; mm: 黏膜层褶皱; pa: 乳突; pc: 咽腔; pf: 保护膜; rm: 辐射肌; s: 黏膜下层; sb: 纹状缘; sce: 单层柱状细胞; sg: 咽上神经节; smb: 横纹肌纤维束; sse: 复层扁平细胞; tp: 固有膜; wpnc: 围咽神经细胞

ac: acinar; ag: acidophil granule; bc: basophil cell; bv: blood vessel; c: cuticle; cm: circular muscle; ct: connective tissue; dv: dorsal vessel; e: epidermis; es: empty cells; fb: fibroblast; gc: goblet cell; ig: intestinal gland; l: lumen; lct: loose connective tissue; lm: longitudinal muscle; lj: lumen jaw; mc: mucilage cell; ml: muscular layer; mm: mucous membrane; pa: papilla; pc: pharyngeal cavity; pf: protective film; rm: radiate muscle; s: submucosa; sb: striated border; sce: simple columnar epithelium; sg: suprapharyngeal ganglion; smb: striated muscle fiber; sse: stratified squamous cells; tp: tunica propria; wpnc: wai pharynx nerve cells



图版 III 菲牛蛭消化系统不同类型黏液细胞(AB-PAS)

Plate III Different kind mucous cells in digestive system of *P. manillensis* (AB-PASstaining)

1. 过口腔横切; 2. 过咽横切; 3. 过食道横切; 4. 嗦囊横切; 5. 第10对嗦囊盲囊横切; 6. 肠前段横切; 7. 肠中后段横切; 8. 直肠横切; 9. 尾部横切, 示肛门

1. cross-section of oral cavity; 2. cross-section of pharynx; 3. cross-section of esophagus; 4. cross-section of crop; 5. cross-section of tenth caecum; 6. cross-section of anterior intestine; 7. cross-section of enteric and posterior intestine; 8. cross-section of rectum; 9. cross-section of rump

I: I 型黏液细胞; II: II 型黏液细胞; III: III 型黏液细胞; IV: IV 型黏液细胞

I: type I mucous cells; II: type II mucous cells; III: type III mucous cells; IV: type IV mucous cells