

日本医蛭进食前后唾液腺的形态学变化

鲍亮¹ 王泽冲¹ 蔡美香¹ 邢月婷² 罗媛媛^{1*}

(¹中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018; ²浙江大学医学院, 杭州 310058)

摘要 为研究日本医蛭(*Hirudo nipponica*)进食前后唾液腺的形态和超微结构特征, 该文通过光学显微镜和电子显微镜对日本医蛭唾液腺进行观察。基于光学显微镜成像, 观察到日本医蛭咽部具有三角形肌肉颚, 唾液腺呈葡萄状依附在颚上, 腺体呈乳白色且对称分布在颚周围。HE染色结果表明, 唾液腺细胞是由卵球形的体细胞和细长的导管组成的, 且细胞核位于细胞底部或边缘。未进食的日本医蛭唾液腺细胞染色浅, 细胞质饱满; 进食后的日本医蛭唾液腺细胞染色深, 细胞质结构疏松。基于透射电子显微镜成像, 观察到唾液腺细胞中存在球形分泌颗粒, 且分泌颗粒内部存在高电子密度的致密成分。未进食的日本医蛭唾液腺细胞结构紧致, 分泌颗粒相互挤压, 且大量分泌颗粒内含致密成分; 进食后的日本医蛭唾液腺细胞结构疏松, 分泌颗粒之间存在空隙, 且分泌颗粒内致密成分消失。基于扫描电子显微镜成像, 观察到唾液腺细胞呈葡萄状排列。未进食的日本医蛭唾液腺细胞表面光滑, 细胞圆润; 进食后的日本医蛭唾液腺细胞表面存在大量颗粒物质, 细胞凹陷。以上结果表明, 日本医蛭进食后, 唾液腺细胞分泌出的多种分泌蛋白是分泌颗粒中的致密成分, 而大部分分泌颗粒还存在于唾液腺细胞内。

关键词 日本医蛭; 唾液腺细胞; 超微结构; 分泌颗粒; 致密成分

Morphological Changes of Salivary Glands in *Hirudo nipponica* before and after Feeding

BAO Liang¹, WANG Zechong¹, CAI Meixiang¹, XING Yueting², LUO Yuanyuan^{1*}

(¹College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China;

²College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract To study the morphological and ultrastructural characteristics of salivary glands of *Hirudo nipponica* before and after feeding, the salivary glands of *H. nipponica* were observed by light microscope and electron microscope. Based on optical microscope imaging, it was observed that the pharynx of *H. nipponica* had a triangular muscle jaw, the salivary glands were attached to the jaw in a grape-like shape, and the glands were milky white and symmetrically distributed around the jaw. Results of HE staining showed that salivary gland cells were composed of ovoid somatic cells and elongated ducts, and the nuclei were located at the bottom or edge of the cells. The salivary gland cells of the unfed *H. nipponica* were lightly stained and the cytoplasm was plump; the salivary gland cells of the fed *H. nipponica* had dark staining and loose cytoplasm. Based on transmission electron microscopy imaging, spherical secretory granules were observed in salivary gland cells, and there was dense matter with high electron density inside the secretory granules. The salivary gland cells of the

收稿日期: 2022-2-14 接受日期: 2022-5-5

国家自然科学基金(批准号: 31440030)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13958077529, E-mail: yyluo@cjlu.edu.cn

Received: February 14, 2022 Accepted: May 5, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31440030)

*Corresponding author. Tel: +86-13958077529, E-mail: yyluo@cjlu.edu.cn

unfed *H. nipponica* were compact, the secretory granules squeezed each other, and a large number of secretory granules contained dense matter. However, the salivary gland cells of *H. nipponica* after feeding were loose in space, and there were gaps between secretory granules. Moreover, the dense matter in secretory granules disappeared. Based on scanning electron microscopy imaging, salivary gland cells were observed in a grape-like arrangement. The salivary gland cells of the unfed *H. nipponica* had smooth surface and rounded cells; the surface of the salivary gland cells of the fed *H. nipponica* had many extracellular particulates and the cells were pitted. The above results showed that various secretory proteins secreted by salivary gland cells were dense matter in the secretory granules after *H. nipponica* were feeding, and most of the secretory granules were still in the salivary gland cells.

Keywords *Hirudo nipponica*; salivary gland cells; ultrastructure; secretory granules; dense matter

日本医蛭(*Hirudo nipponica*)是亚洲药用水蛭,隶属于环节动物门(Annelida)蛭纲(Clitellata)无吻蛭目(Arhynchobdellida)医蛭科(Hirudinidae)医蛭属(*Hirudo*)。日本医蛭在我国北起东北各省和内蒙古,南达台湾和广东,从东部沿海向西至四川、甘肃等地均有分布。日本医蛭干品是我国经典的活血化瘀药材^[1],迄今已发现日本医蛭唾液内有多种活性物质^[2],包括酶^[3]、抗炎剂^[4]、抗凝剂^[5]等,尤其是强力的抗凝成分水蛭素^[6]。唾液中的大多数物质是在唾液腺细胞内合成的^[7]。日本医蛭是通过吸食哺乳类^[8]和两栖类^[9]甚至它们同类^[10]的血液获取食物的。研究发现,哺乳动物的血液中含有日本医蛭达到性成熟所需的激素和其他成分^[11],因此成为日本医蛭的重要食物来源。日本医蛭一次吸食血液的时长为20~30 min^[12],这期间大约有40 000个唾液腺细胞会分泌唾液蛋白到血液中以防止血液凝固^[13],这些吸食的血液会被存储在体内,在接下来的几个月甚至一年的时间中逐步被消化^[14-15]。日本医蛭唾液腺位于第3至第9体节之间,并附着在颞的两个肌肉带上^[12],由颞脊上的齿结构通过化学刺激^[16]和热刺激^[8]分泌唾液。日本医蛭进食后的重量是其进食前的7~9倍^[8],进食导致的体壁膨胀限制了日本医蛭继续吸食血液^[17]。

关于蛭纲动物的唾液腺超微结构,现已有相关研究对巨型亚马逊水蛭(*Haementeria ghilianii*)唾液腺的超微结构进行报道^[18],而对日本医蛭的唾液腺形态结构报道较少。日本医蛭是研究嗜血水蛭生物学的模型动物,在本研究中我们使用成年日本医蛭来排除生长和发育对实验的干扰。我们的研究目的是分析日本医蛭进食前后的唾液腺的形态学变化,进而探讨其分泌机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与解剖

实验用日本医蛭购自重庆志微生物有限公司,批号为20210714。日本医蛭体长5~10 cm,略呈圆柱状,背腹稍扁平。背部黄绿色或黄褐色,有5条黄白色的纵纹,以中间一条较宽。纵纹的两旁有密集的黑褐色细斑点。黄白色纵纹又将灰绿底色隔成6条纵纹,以背中两条最宽阔,背侧两条较细。腹面两侧边缘各有一条很细的灰绿色纵纹,无斑纹。饲养环境条件:室温为(24±2) °C,光照时间白天(L):黑夜(D)=12:12。实验开始前,将日本医蛭进食后保持饥饿状态至1个月。使1个月未进食的日本医蛭进食,分别取进食30 min后、进食1天后、进食3天后、进食5天后和进食10天后的日本医蛭进行解剖实验。将日本医蛭用10%的乙醇麻醉,15 min后将麻醉的日本医蛭沿背中线从前向后解剖,去除结缔组织后露出唾液腺,取出唾液腺组织并置于D-PBS缓冲液中。

1.2 苏木精-伊红染色(HE染色)

将解剖的唾液腺迅速转移至4%多聚甲醛固定液中,并在4 °C下放置过夜。进行20%、30%、50%、70%、80%、90%和100%梯度酒精脱水各15 min。100%二甲苯透明,石蜡渗透包埋,病理切片机制片,切片厚度为5 μm。苏木精-伊红染色后,用光学显微镜(奥特光学BK-FL)观察并拍照。

1.3 透射电子显微镜(TEM)

将解剖的唾液腺迅速转移至2.5%戊二醛中,并在4 °C下放置过夜。分别用PBS缓冲液漂洗三次,每次15 min,在1%四氧化锇中进行固定1 h,然后再用PBS缓冲液漂洗样品三次,每次15 min。进行30%、50%、80%、90%、95%和100%梯度酒精脱水各15 min,然后用丙酮浸泡20 min。在丙酮和包

埋剂 1:1 配制的溶液中浸泡 1 h, 再在丙酮与包埋剂 1:3 配制的溶液中浸泡 3 h。取出组织块于纯包埋剂中, 放入包埋板中, 65 °C 聚合器中加温 24~48 h, 将聚合后的样品保存在干燥器中。超薄切片机切片 (厚度为 120 nm), 醋酸铀-柠檬酸铅双染色, 置于铜网上, 用透射电子显微镜 (日立 H-7650) 观察并拍照。

1.4 扫描电子显微镜 (SEM)

将解剖的唾液腺迅速转移至 2.5% 戊二醛中, 并在 4 °C 下放置过夜。分别用 PBS 缓冲液漂洗三次, 每次 15 min, 在 1% 四氧化中进行固定 2 h, 然后再用 PBS 缓冲液漂洗样品三次, 每次 15 min。进行 30%、50%、80%、90%、95% 和 100% 梯度酒精脱水各 15 min。用乙醇和乙酸异戊酯 1:1 配制的溶液浸泡 30 min, 再用纯乙酸异戊酯浸泡 2 h。样品用临界点干燥机干燥, 样品镀膜后, 用扫描电子显微镜 (日立 TM-3000) 观察

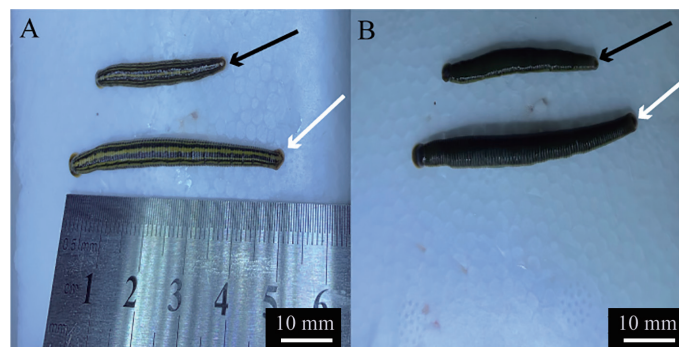
并拍照。

2 结果

2.1 唾液腺的形态

日本医蛭体狭长, 呈圆柱状, 前端钝圆, 尾端尖细。腹部扁平, 呈深绿色 (图 1B)。背部有灰绿色和黄白色相间的纵纹 (图 1A)。日本医蛭进食后, 身体变长变宽。

日本医蛭的咽部具有三角形肌肉颚, 颚呈纺锤形, 唾液腺呈乳白色且对称分布在颚周围 (图 2A)。HE 染色观察发现, 唾液腺由许多分散的唾液腺细胞组成, 每个唾液腺细胞都细分为卵球形的体细胞和细长的导管部分 (图 2B), 唾液腺细胞胞体直径为 20~50 μm , 导管长为 50~200 μm 。唾液腺细胞呈卵球状; 细胞核位于细胞边缘或底部。未进食的日本

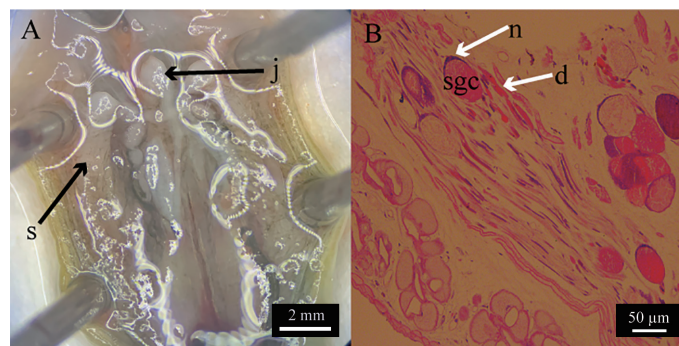


A: 日本医蛭背面; B: 日本医蛭腹面。黑色箭头为 1 个月未进食的日本医蛭, 白色箭头为进食 30 min 后的日本医蛭。

A: dorsal surface of *Hirudo nipponica*; B: ventral surface of *Hirudo nipponica*. The black arrow represents the *Hirudo nipponica* that has not been fed for one month, and the white arrow represents the *Hirudo nipponica* that has been fed for half an hour.

图 1 日本医蛭外形观察

Fig.1 Observation of the appearance of *Hirudo nipponica*



A: 日本医蛭唾液腺解剖图; B: 日本医蛭唾液腺 HE 染色图。j: 颚; s: 唾液腺组织; sgc: 唾液腺细胞; d: 导管; n: 细胞核。

A: anatomical diagram of salivary glands of *Hirudo nipponica*; B: HE staining image of salivary glands of *Hirudo nipponica*. j: jaw; s: salivary gland tissue; sgc: salivary gland cells; d: duct; n: nucleus.

图 2 日本医蛭唾液腺的解剖图和 HE 染色图

Fig.2 Anatomical diagram and HE staining image of salivary glands of *Hirudo nipponica*

医蛭唾液腺细胞胞质饱满, 细胞质染色浅(图3A); 进食30 min后的日本医蛭唾液腺细胞结构疏松, 细胞质染色深(图3B); 进食1天后的日本医蛭部分唾液腺细胞结构疏松, 细胞质染色深(图3C); 进食3天后的日本医蛭唾液腺细胞结构逐渐紧致, 细胞质染色深(图3D); 进食5天后的日本医蛭唾液腺细胞饱满, 细胞质染色浅(图3E); 进食10天后的日本医蛭唾液腺细胞圆润饱满, 细胞质染色浅(图3F)。

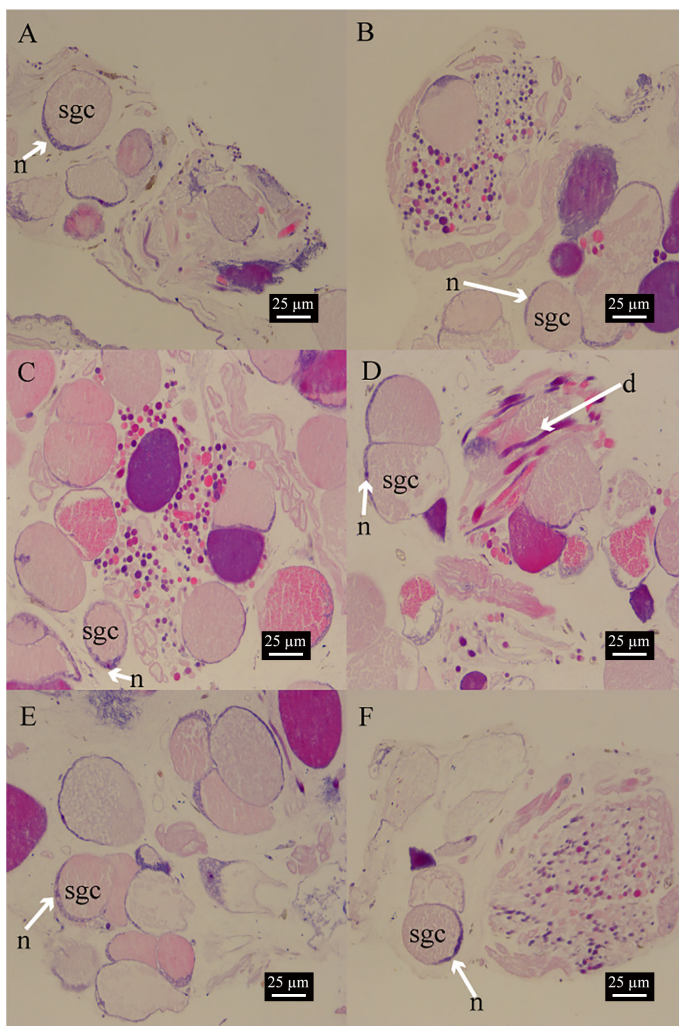
2.2 唾液腺细胞的超微结构

日本医蛭唾液腺细胞是通过颞脊上的齿释放唾液腺分泌物的, 我们通过透射电镜观察颞脊上的齿, 发现1个月未进食的日本医蛭表面钙化齿结构疏松, 无明显分泌物质(图4A)。进食1天后的齿结构中

分泌物质明显增多, 表面钙化齿中央出现缝隙, 缝隙中有分泌物质(图4B)。

透射电镜观察发现, 唾液腺细胞周围存在很多肌肉细胞, 肌肉细胞中有大量的线粒体, 唾液腺细胞呈卵球形, 细胞内部存在分泌颗粒, 分泌颗粒呈球形或椭球形, 部分分泌颗粒内部有球形致密成分, 致密成分沉积在分泌颗粒底部或边缘(图5A), 且部分致密成分会从分泌颗粒中分离出来成为致密颗粒游离到唾液腺细胞边缘(图5B)。通过纵切1个月未进食的日本医蛭唾液腺细胞导管发现其中有大量的颗粒状物质(图5C)。

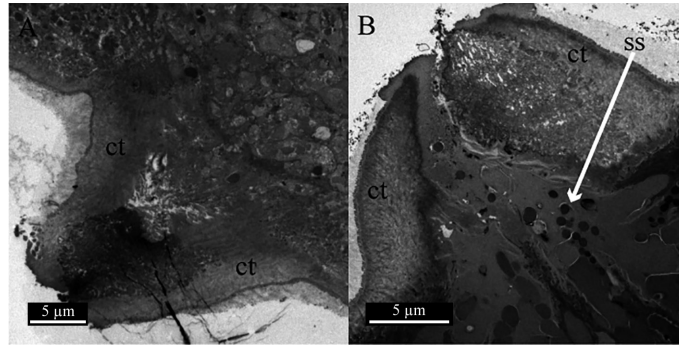
1个月未进食的日本医蛭唾液腺细胞(图6A), 细胞空间紧致, 分泌颗粒相互挤压, 分泌颗粒之间



A: 1个月未进食; B: 进食30 min后; C: 进食1天后; D: 进食3天后; E: 进食5天后; F: 进食10天后。sgc: 唾液腺细胞; d: 导管; n: 细胞核。
A: no feeding for a month; B: half an hour after feeding; C: one day after feeding; D: three days after feeding; E: five days after feeding; F: ten days after feeding. sgc: salivary gland cells; d: duct; n: nucleus.

图3 不同取食阶段日本医蛭的唾液腺组织观察

Fig.3 Observation on salivary gland tissues of *Hirudo nipponica* at different feeding stages

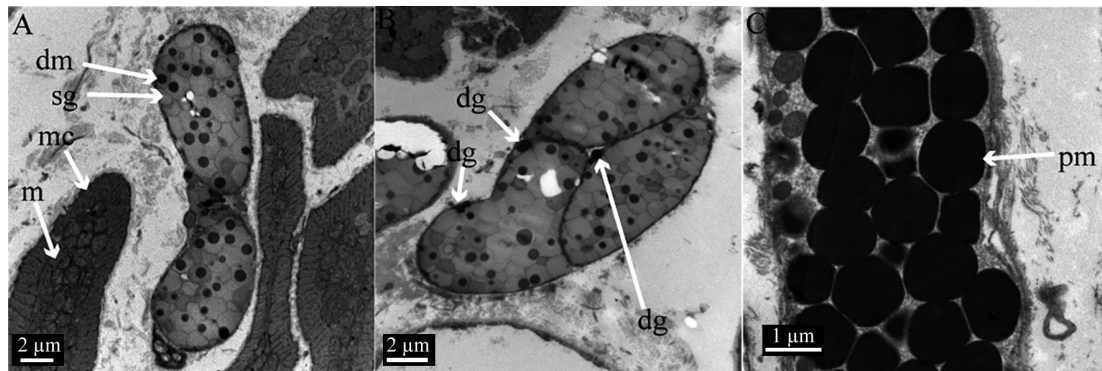


A: 1个月未进食; B: 进食1天后。ct: 钙化齿; ss: 分泌物质。

A: no feeding for a month; B: one day after feeding. ct: calcified tooth; ss: secretory substance.

图4 进食前后日本医蛭的齿部位透射电镜观察

Fig.4 Transmission electron microscope observation of the teeth of *Hirudo nipponica* before and after feeding



A: 1个月未进食的日本医蛭唾液腺细胞及其周围的肌肉细胞; B: 1个月未进食的日本医蛭唾液腺细胞致密颗粒分布; C: 1个月未进食的日本医蛭唾液腺细胞导管纵切图。sg: 分泌颗粒; dm: 致密成分; mc: 肌肉细胞; m: 线粒体; dg: 致密颗粒; pm: 颗粒状物质。

A: salivary gland cells and surrounding muscle cells of *Hirudo nipponica* that have not been fed for a month; B: dense granules distribution of salivary gland cells of *Hirudo nipponica* that have not been fed for a month; C: longitudinal section of salivary gland cells of *Hirudo nipponica* that have not been fed for a month. sg: secretory granules; dm: dense matter; mc: muscle cells; m: mitochondria; dg: dense granules; pm: particulate matter.

图5 日本医蛭唾液腺细胞透射电镜观察

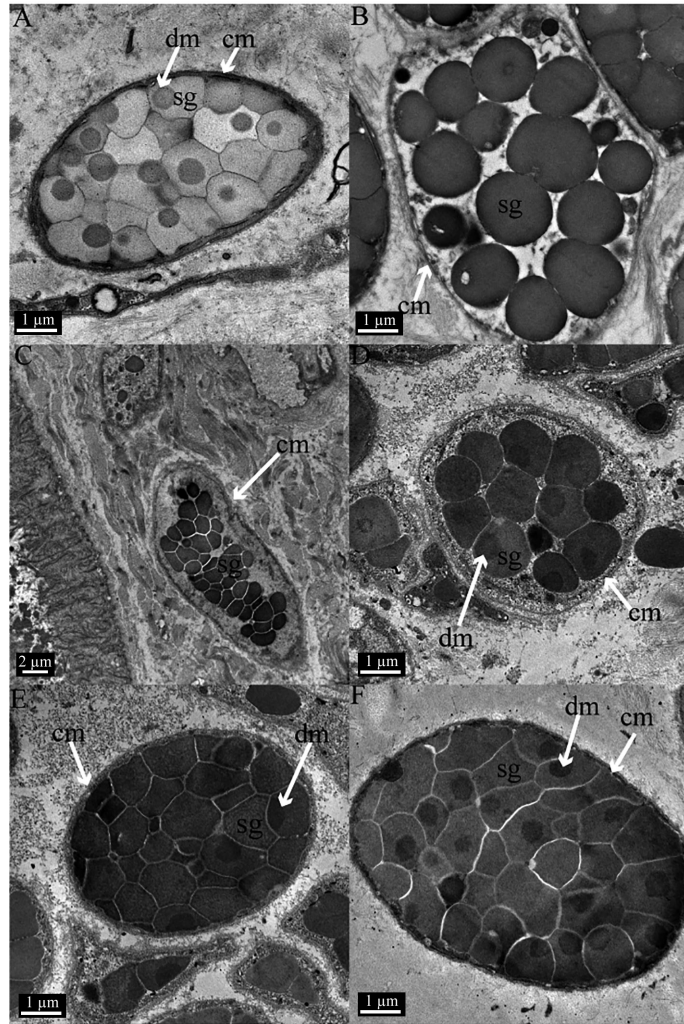
Fig.5 Transmission electron microscope observation of salivary gland cells of *Hirudo nipponica*

没有空隙,几乎每个分泌颗粒中都有致密成分,致密成分电子密度高;进食30 min后的日本医蛭唾液腺细胞(图6B),细胞空间疏松,分泌颗粒之间有很大空隙,分泌颗粒电子密度变高,分泌颗粒中几乎没有致密成分;进食1天后的日本医蛭唾液腺细胞(图6C),细胞空间疏松,分泌颗粒开始相互挤压,分泌颗粒之间有空隙,分泌颗粒电子密度高,分泌颗粒中没有致密成分;进食3天后的日本医蛭唾液腺细胞(图6D),细胞空间开始变得紧致,分泌颗粒相互挤压,分泌颗粒之间空隙变小,分泌颗粒电子密度变低,分泌颗粒中开始形成致密成分,致密成分电子密度低;进食5天后的日本医蛭唾液腺细胞(图6E),细胞空间紧致,分泌颗粒相互挤压,分泌颗粒之间几乎没有空隙,分泌颗粒电子密度不断变低,

分泌颗粒中的致密成分不断浓缩,致密成分电子密度不断变大;进食10天后的日本医蛭唾液腺细胞(图6F),细胞空间紧致,分泌颗粒相互挤压,几乎没有空隙,分泌颗粒电子密度低,越来越多的分泌颗粒中有致密成分形成,且致密成分电子密度高。

扫描电镜观察发现,唾液腺细胞表现为卵球形细胞的集合,唾液腺细胞群旁边有很多细长的导管,整个唾液腺被结缔组织囊包裹,汇集成千上万个卵球形分泌细胞,组成葡萄状排列模式的细胞网络系统(图7A和图7B),同时观察到唾液腺细胞之间有胞间连接(图7C)。

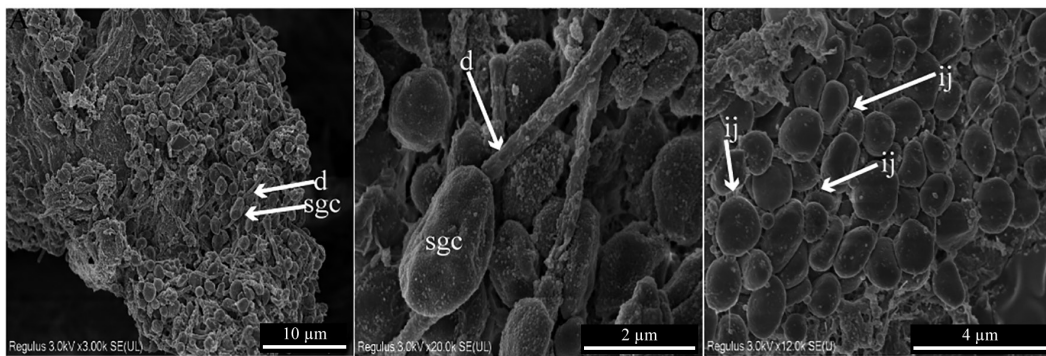
未进食的日本医蛭唾液腺细胞表明光滑且细胞饱满(图8A);进食30 min后的日本医蛭唾液腺细胞表面有大量颗粒物质,质膜皱缩,细胞凹陷(图8B);



A: 1个月未进食; B: 进食30 min后; C: 进食1天后; D: 进食3天后; E: 进食5天后; F: 进食10天后。sg: 分泌颗粒; dm: 致密成分; cm: 细胞膜。
A: no feeding for a month; B: half an hour after feeding; C: one day after feeding; D: three days after feeding; E: five days after feeding; F: ten days after feeding. sg: secretory granules; dm: dense matter; cm: cell membrane.

图6 不同取食阶段日本医蛭的唾液腺细胞透射电镜观察

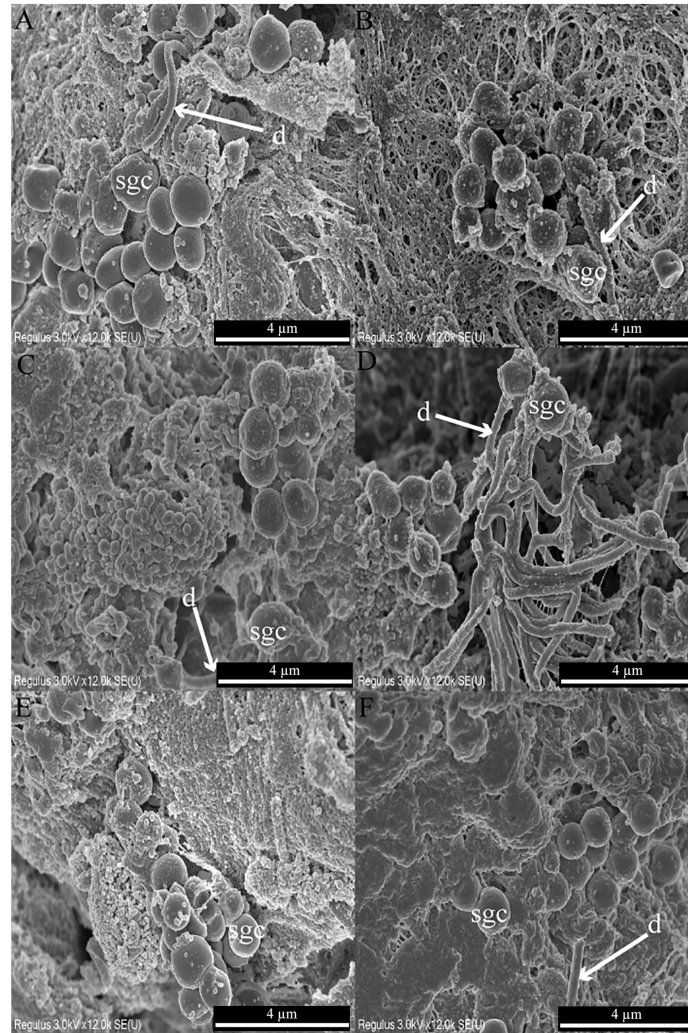
Fig.6 Transmission electron microscope observation of salivary gland cells of *Hirudo nipponica* at different feeding stages



A: 唾液腺组织; B: 唾液腺细胞; C: 唾液腺细胞间连接。sgc: 唾液腺细胞; d: 导管; ij: 细胞连接。
A: salivary gland tissue; B: salivary gland cells; C: intercellular junctions of salivary gland cells. sgc: salivary gland cells; d: duct; ij: intercellular junctions.

图7 日本医蛭唾液腺细胞的扫描电镜观察

Fig.7 Scanning electron microscope observation of salivary gland cells of *Hirudo nipponica*



A: 1个月未进食; B: 进食30 min后; C: 进食1天后; D: 进食3天后; E: 进食5天后; F: 进食10天后。d: 导管; sgc: 唾液腺细胞。

A: no feeding for a month; B: half an hour after feeding; C: one day after feeding; D: three days after feeding; E: five days after feeding; F: ten days after feeding. d: duct; sgc: salivary gland cells.

图8 不同取食阶段日本医蛭的唾液腺扫描电镜观察

Fig.8 Scanning electron microscope observation of salivary glands of *Hirudo nipponica* at different feeding stages

进食1天后的日本医蛭唾液腺细胞表面有颗粒物质且细胞凹陷(图8C); 进食3天后的日本医蛭唾液腺细胞表面有颗粒物质且细胞开始变圆润(图8D); 进食5天后的日本医蛭唾液腺细胞表面有较少颗粒物质且细胞圆润(图8E); 进食10天后的日本医蛭唾液腺细胞表面也有较少颗粒物质且细胞圆润(图8F)。其中进食30 min后的日本医蛭唾液腺细胞表面的颗粒物质最多, 凹陷程度最大(图8B); 进食10天后的日本医蛭唾液腺细胞(图8F), 表面的颗粒物质最少, 凹陷程度最小。

3 讨论

我们在观察到的进食前后日本医蛭唾液腺细

胞形态和超微结构基础上进行以下2个方面的讨论: (1) 日本医蛭唾液腺形态与分泌的适应性; (2) 日本医蛭唾液腺细胞的结构与分泌过程的相关性。

3.1 日本医蛭唾液腺形态与分泌的适应性

一般来说, 分泌细胞通常疏松分布于表皮, 并形成特化的分泌上皮。日本医蛭唾液腺细胞由1个细胞体和1个细长的导管部分组成, 这种细胞形状与舌蛭科润饰盾蛭(*Placobdella ornate*)相类似^[19]。MARSHALL等^[12]发现, 欧洲医蛭(*H. medicinalis*)颞间隙有大量的唾液腺细胞, 并且唾液腺细胞的导管部分连接至颞, 而我们通过透射电镜观察到日本医蛭唾液腺颞脊的齿部位分泌出颗粒物质, 这也与之相对应。

表1 日本医蛭不同取食阶段唾液腺细胞扫描电镜和透射电镜观察结果
Table 1 SEM (scanning electron microscopy) and TEM (transmission electron microscopy) observation results of salivary gland cells of *Hirudo nipponica* at different feeding stages

进食状态 Eating state	扫描电镜 SEM		透射电镜 TEM		
	唾液腺细胞形态 Morphology of salivary gland cells	唾液腺细胞外部情况 External conditions of salivary gland cells	唾液腺细胞内部状态 Internal state of salivary gland cells	分泌颗粒 Secretory granules	致密成分 Dense matter
No feeding for a month	Cells were round	No extracellular particulate	Compact structure	Low electron density	High electron density
Half an hour after feeding	Cells were pitted	Many extracellular particulates	Loose structure	High electron density	Disappeared
One day after feeding	Cells were pitted	Many extracellular particulates	Loose structure	High electron density	Little or no
Three days after feeding	Cells started to round	Many extracellular particulates	The structure began to tighten	Electron density became lower	Low electron density
Five days after feeding	Cells were round	Few extracellular particulates	Compact structure	Electron density kept getting lower	Low electron density
Ten days after feeding	Cells were round	No extracellular particulate	Compact structure	Low electron density	High electron density

3.2 日本医蛭唾液腺细胞的结构与分泌过程的相关性

透射电镜观察发现, 日本医蛭唾液腺旁有大量肌肉细胞, 且肌肉细胞中有大量的线粒体, 已有研究报道在蚯蚓的咽腺导管中, 肌肉细胞会推动分泌产物通过咽腺导管完成分泌^[20], 据此我们推测肌肉细胞可能同样会促进唾液腺细胞分泌。目前在润饰盾蛭(*P. ornate*)中发现有四种不同类型的唾液腺细胞, 其分别分泌不同电子密度的分泌颗粒^[19]。我们发现日本医蛭唾液腺细胞中的分泌颗粒形状通常是球形或椭球形, 当分泌颗粒之间空间小且相互挤压时, 分泌颗粒表现出规则的线性边框结构, 部分分泌颗粒的内部还存在致密成分。纵切唾液腺细胞导管后, 发现分泌颗粒内致密成分的大小和电子密度跟导管内部的颗粒状物质大小和电子密度一样, 这也证明了日本医蛭唾液腺细胞分泌出去的主要是分泌颗粒内致密成分形成的致密颗粒。

不同电子密度的分泌颗粒的蛋白质含量不同, 分泌颗粒电子密度越大, 说明分泌颗粒的蛋白质含量越高。日本医蛭在进食前, 唾液腺细胞结构紧致, 分泌颗粒中有大量的致密成分, 分泌颗粒电子密度低, 致密成分电子密度高; 日本医蛭在进食后, 唾液腺细胞结构疏松且分泌颗粒内几乎没有致密成分; 日本医蛭在进食几天后, 唾液腺细胞结构由疏松转

变为紧致且几乎每个分泌颗粒中都有致密成分形成, 致密成分电子密度变高(表1)。我们推测日本医蛭进食时, 其三角形肌肉颚先牢固地叮咬猎物, 通过颚脊上的齿先将猎物皮肤切割成小裂口, 然后分泌出唾液腺分泌物, 且这些唾液腺分泌物主要由唾液腺细胞分泌颗粒中的致密成分形成的致密颗粒构成。致密颗粒由唾液腺细胞体分泌, 通过导管后到达颚, 最后从颚脊上的齿中间分泌出去。唾液腺分泌物主要成分包括水蛭素、抗菌肽、透明质酸酶、胶原酶、血清素等, 这些分泌物与猎物凝血混合后, 能阻断纤维蛋白凝块的形成, 防止凝血^[15], 增加猎物出血量, 提高日本医蛭进食效率。进食完成后, 唾液腺细胞不断合成唾液中各种蛋白质, 合成的蛋白质经高尔基体分选包装成分泌颗粒, 并逐渐浓缩成致密成分储存在分泌颗粒里, 沉积在分泌颗粒底部或边缘, 致密成分从分泌颗粒中分离成致密颗粒, 游离到唾液腺细胞表面, 最后到达导管准备下次分泌, 这也与我们通过扫描电镜发现的进食后唾液腺细胞表面有大量颗粒物质相对应。这种分泌方式能够让唾液腺细胞不断将分泌蛋白浓缩成致密成分, 大大提高了日本医蛭唾液腺细胞的分泌蛋白合成和分泌效率。关于人工养殖方面, 鉴于上述讨论分析, 进食10天后, 唾液腺细胞中的致密成分电子密度才比较高, 而高电子密度的致密成分对日本医蛭进食血液食物

起抗凝作用,有助于日本医蛭的消化吸收。所以推荐养殖日本医蛭的喂食时间间隔至少10天,以提高其对血液食物的利用率。关于提取天然水蛭素方面,鉴于上述讨论分析,1个月未进食时致密成分电子密度是最高的,表明其蛋白质含量是最高的,所以推荐提取日本医蛭水蛭素的时间在进食后的1个月。

唾液腺分泌的方式尚存在争议,本研究丰富了单细胞腺体分泌的基础理论,并为日本医蛭的人工养殖和天然水蛭素的提取提供了重要参考。

——致谢

感谢浙江省农业科学院电镜室宋西娇老师为样品透射电镜和扫描电镜的观察提供有益的帮助和建议。

参考文献 (References)

- [1] 杨潼. 中国动物志, 环节动物门, 蛭纲[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 110-5.
- [2] BASKOVA I P, ZAVALOVA L L, BASANOVA A V, et al. Protein profiling of the medicinal leech salivary gland secretion by proteomic analytical methods [J]. *Biochemistry*, 2004, 69(7): 770-5.
- [3] MANUVERA V A, KURDYUMOV A S, FILONOVA K A, et al. Generation of recombinant destabilase-lysozyme from medicinal leeches in three different expression systems [J]. *Protein Expression Purif*, 2015, 116: 50-8.
- [4] LU Z, SHI P, YOU H, et al. Transcriptomic analysis of the salivary gland of medicinal leech *Hirudo nipponia* [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205875.
- [5] BASKOVA I P, KALABUSHEV S N, AKHAEV D N, et al. Role of isopeptidolysis in the process of thrombolysis [J]. *Thromb Res*, 2018, 165: 18-23.
- [6] JUNREN C, XIAOFANG X, HUIQIONG Z, et al. Pharmacological activities and mechanisms of hirudin and its derivatives: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 660757.
- [7] RIGBI M, LEVY H, IRAQI F, et al. The saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*: I. Biochemical characterization of the high molecular weight fraction [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1987, 87(3): 567-73.
- [8] DICKINSON M H, LENT C M. Feeding behavior of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* L. [J]. *J Comp Physiol A*, 1984, 154(4): 449-55.
- [9] MERILÄ J, STERNER M. Medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) attacking and killing adult amphibians [J]. *Ann Zool Fenn*, 2002, 39(4): 343-6.
- [10] KUTSCHERA U, ROTH M. Cannibalism in a population of the medicinal leech (*Hirudo medicinalis* L.) [J]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 2005, 32(6): 751-3.
- [11] WILKIN P J, SCOFIELD A M. Growth of the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*, under natural and laboratory conditions [J]. *Freshwater Biol*, 1991, 25(3): 547-53.
- [12] MARSHALL C G, LENT C M. Excitability and secretory activity in the salivary gland cells of jawed leeches (*Hirudinea: Gnathobdellida*) [J]. *J Exp Biol*, 1988, 137: 89-105.
- [13] LEMKE S, MÜLLER C, LIPKE E, et al. May salivary gland secretory proteins from hematophagous leeches (*Hirudo verbana*) reach pharmacologically relevant concentrations in the vertebrate host [J]? *PLoS One*, 2013, 8(9): e73809.
- [14] ZEBE E, ROTERS F J, KAIPING B. Metabolic changes in the medical leech *Hirudo medicinalis* following feeding [J]. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 1986, 84(1): 49-55.
- [15] HILDEBRANDT J P, LEMKE S. Small bite, large impact-saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis* [J]. *Naturwissenschaften*, 2011, 98(12): 995-1008.
- [16] ELLIOTT E J. Chemosensory stimuli in feeding behavior of the leech *Hirudo medicinalis* [J]. *J Comp Physiol A*, 1986, 159(3): 391-401.
- [17] LENT C M, FLIEGNER K H, FREEDMAN E, et al. Ingestive behaviour and physiology of the medicinal leech [J]. *J Exp Biol*, 1988, 137: 513-27.
- [18] WALZ B, SCHÄFFNER K H, SAWYER R T. Ultrastructure of the anterior salivary gland cells of the giant leech, *Haementeria ghilianii* (Annelida, Hirudinea) [J]. *J Morphol*, 1988, 196(3): 321-32.
- [19] MOSER W E, DESSER S S. Morphological, histochemical and ultrastructural characterization of the salivary glands and proboscises of three species of glossiphoniid leeches (*Hirudinea: Rhynchobdellia*) [J]. *J Morphol*, 1995, 225(1): 1-18.
- [20] REGER J F. A fine structure study on the organization and innervation of pharyngeal glands and associated ciliated epithelium in the annelid *Enchytraeus albidus* [J]. *J Ultrastruct Res*, 1967, 20(5): 451-61.