

武陵洞蛭卵茧的形态结构和化学组成

蒋能^{1,2}, 伍丽艳², 吴清姐², 刘志霄^{2*}

(1. 南京师范大学生命科学学院, 中国江苏南京 210046; 2. 吉首大学生物资源与环境科学学院, 中国湖南吉首 416000)

摘要: 卵茧是蛭类生活史中一个重要的阶段, 对卵茧进行研究具有重要的生态生物学意义。武陵洞蛭 (*Sinospelaeobdella wulingensis*) 是近年新发现的中国洞蛭属的模式种, 其在洞穴顶壁繁衍后代, 具有不同于水蛭和山蛭的生态生物学特征。鉴于武陵洞蛭的特殊性, 以及卵茧在洞蛭适应性进化过程中的关键作用, 本文对武陵洞蛭卵茧的形态结构和化学组成进行了初步研究, 结果显示: 1) 武陵洞蛭的卵茧大致呈椭球形, 长径(10.80±1.71) mm、短径(8.32±1.60) mm, 重量(135.3±76.8) mg; 2) 卵茧由外到内包括茧壁外层(蜂窝状)、茧壁内层、蛋白液和受精卵; 3) 茧内含有 17 种水解氨基酸和 11 种游离氨基酸, 其中谷氨酸和丙氨酸分别在水解氨基酸和游离氨基酸中的相对含量最高; 4) 在卵茧中共鉴定出 68 种可信蛋白质, 其中 27 种为未鉴定蛋白质, 其余 41 种可信蛋白质主要分为 6 类, 即抗氧化蛋白 5 种、酶蛋白 12 种、细胞骨架蛋白 6 种、结合蛋白 12 种、热休克蛋白 2 种、其他蛋白质 4 种。以上卵茧的形态结构和化学组成是洞蛭对洞穴生态环境长期适应的结果, 卵茧对洞蛭物种进化和种群存续的关键作用值得深入系统的研究。

关键词: 武陵洞蛭; 卵茧; 形态结构; 化学组成

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)03-0237-08

Morphology and Chemical Composition of *Sinospelaeobdella wulingensis* Cocoons

JIANG Neng^{1,2}, WU Liyan², WU Qingjie², LIU Zhixiao^{2*}

(1. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, Jiangsu, China; 2. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, Hunan, China)

Abstract: Cocoons are a key life-history stage of leeches, so it is of great ecobiological significance to clarify their morphological features and chemical composition. Wuling cave leeches (*Sinospelaeobdella wulingensis*) are the type species of the newly-described genus *Sinospelaeobdella*, which breed on the roof wall of karstic caves, and differ from water and land leeches ecobiologically. In view of the particularity of Wuling cave leeches and the key role of cocoons in the adaptive evolution of leeches, morphology and chemical composition of the cocoons were preliminarily studied. The results showed that: 1) Cocoons of Wuling cave leeches were roughly ellipsoidal, with a long diameter of (10.80±1.71) mm and a short one of (8.32±1.60) mm, and a weight of (135.3±76.8) mg; 2) From outside to inside, each cocoon had the outer layer (honeycomb) and inner layer of cocoon-wall, protein fluid and fertilized egg; 3) There were 17 kinds of hydrolyzed amino acids and 11 kinds of free amino acids in the cocoon, among which the relative contents of glutamic acid and alanine were the highest; 4) There were 68 kinds of trusted proteins identified in the cocoon, of which 27 were unidentified, and the remaining 41 could be divided into 6 categories, namely 5 antioxidant proteins, 12 enzyme proteins, 6 cytoskeletal proteins, 12 binding proteins, 2 heat shock proteins and 4 other proteins. The morphological characteristics and chemical composition of the cocoons reflect long-term adaptation of leeches to cave ecological environments. The crucial role of the cocoon in the species evolution and population sur-

收稿日期: 2022-09-14; 修回日期: 2022-12-04; 网络首发日期: 2023-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32160241); 湖南省自然科学基金项目(2021JJ30554)

作者简介: 蒋能(2000—), 女, 湖南永州人, 硕士研究生; * 通信作者: 刘志霄(1965—), 男, 湖南永州人, 博士, 教授, 主要从事动物生态与保护生物学研究, E-mail: zxliu1965@163.com。

vival of the leeches deserves further systematic investigation.

Key words: *Sinospelaeobdella wulingensis*; cocoon; morphology; chemical composition

(*Life Science Research*, 2023, 27(3): 237–244)

武陵洞蛭(*Sinospelaeobdella wulingensis*) (以下简称“洞蛭”)隶属环节动物门(Annelida)蛭纲(Hirudinea)无吻蛭目(Arhynchobdellida)山蛭科(Haemadipsidae)中国洞蛭属(*Sinospelaeobdella*), 是近年发现的新属种^[1], 主要分布于地质历史古老、岩溶地貌发育良好、溶洞众多的武陵山地区的少数溶洞中^[2-3]。

洞蛭终生栖息在黝暗潮湿和微环境相对稳定的洞穴顶壁, 以洞栖蝙蝠的血液为食, 体表色素缺乏, 已演化成为真洞穴动物^[4-5]。它们不同于水蛭和山蛭(陆蛭), 在洞顶壁完成全部生活史——幼体、亚成体、繁殖体(或成体)和卵茧4个阶段。洞蛭的幼体、亚成体和繁殖体都具有运动能力, 可趋利避害, 而卵茧黏附在溶洞的顶壁, 并且卵茧内的胚胎发育时间长达3个月以上, 期间易受外界环境因子的影响。在长期的进化过程中, 洞蛭卵茧产生了一些适应洞穴生态的形态结构与生理生化特征, 以保障种群的生存和繁衍。本文对洞蛭卵茧的形态结构及化学组成进行研究, 有助于洞蛭生活史特征的认识, 以及洞蛭个体发育和系统发展的深入研究。

1 材料与方法

1.1 研究材料

2022年3月, 在湘西州永顺县境内的湖南小溪国家级自然保护区金鸡洞(110°24'E, 28°78'N, 海拔888.90 m)和黄泥洞(110°24'E, 28°82'N, 海拔1 045.40 m)采集到洞蛭卵茧56个。用50 mL的密封样品瓶带回实验室, 置于4℃保存。

1.2 研究方法

1.2.1 卵茧的形态结构观察

用数显式游标卡尺测定卵茧的长径及短径, 精度为0.01 mm。用电子天平(FA224)称量卵茧的重量, 精度为0.1 mg。之后, 将卵茧置于体视显微镜(Motic SMZ-168)下, 仔细观察其外形特征与分层模式。用解剖剪和尖头镊子将卵茧的外层剥离, 观察其内部结构, 并拍照。

1.2.2 水解氨基酸的测定

将卵茧用粉碎机粉碎, 制成均匀粉状样品。称取0.2 g样品于水解管中, 加入10 mL 6 mol/L

盐酸溶液; 随后将其充氮保护, 拧紧瓶盖, 放入冷冻剂中处理3~5 min; 然后把水解管置于(110±1)℃的电热鼓风恒温箱, 使样品水解22 h。将水解液过滤至50 mL容量瓶, 并用水冲洗水解管定容。吸取1.0 mL滤液至15 mL试管内, 40℃减压至干燥, 用1.0 mL pH 2.2的柠檬酸钠缓冲液复溶, 振荡混匀, 经0.22 μm滤膜过滤后, 采用氨基酸自动分析仪(LA8080)进行测定^[6]。

1.2.3 游离氨基酸的测定

称取0.2 g混匀样品, 放入10 mL离心管中, 加入0.02 mol/L盐酸溶解定容。用5 mL甲醇和水依次活化C18前处理小柱, 加入2.5 mL样品和1.5 mL 0.02 mol/L盐酸, 过柱后的样品用0.02 mol/L盐酸定容到5 mL, 经0.45 μm滤膜过滤后, 采用氨基酸自动分析仪(LA8080)进行测定^[7]。

1.2.4 蛋白质种类分析

采用平衡酚法^[8]提取总蛋白质, 取150 μg总蛋白质, 于37℃水浴条件下酶解过夜(18~20 h)。脱盐后, 取上清液用于纳升级液相色谱(EASY-nLC 1200)分离, 再用Q-Exactive高分辨率质谱仪进行检测。

根据质谱测试原始文件(raw file), 用软件Proteome Discoverer 2.5检索相应的数据库, 最后得到蛋白质鉴定结果。查库所用的相关参数和说明如表1所示。

2 结果

2.1 武陵洞蛭卵茧的形态结构特征

武陵洞蛭卵茧黏附于洞顶壁, 大致呈椭球形, 长径(10.80±1.71) mm, 短径(8.32±1.60) mm, 重量(135.3±76.8) mg。由图1A~C可见, 其结构由外到内包括茧壁外层、茧壁内层、蛋白液和受精卵。茧壁外层刚产下时, 呈清亮的泡沫状, 随着时间的推移, 清亮的泡沫层泛黄, 并且风干成蜂窝层。但在幼蛭未孵出前, 泡沫层风干程度低, 蜂窝化不明显。幼蛭孵出后, 茧壁内、外层被破坏, 卵茧内所保存的液体流失, 于是卵茧外层风干速度加快, 形成像丝瓜络一样的结构, 蜂窝化十分明显。蜂窝层主要是由五边形、六边形和四边形围成的一个个立体小室构成, 室与室之间被透明薄膜隔开,

表 1 使用软件 Proteome Discoverer 2.5 查库时所用的参数
Table 1 Parameters used by Proteome Discoverer 2.5 software

Item	Value
Enzyme	Trypsin
Maximum missed cleavages	2
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	Oxidation (M)
Database	UniProt-organism 42736, UniProt-organism 486152, UniProt-organism 1348078, UniProt-organism 2301367, UniProt-taxonomy 13554, UniProt-taxonomy 42113, UniProt-taxonomy 85671
Peptide mass tolerance	10 ppm
Fragment mass tolerance	0.02 Da
False discovery rate (FDR)	≤0.05

互不相通(图 1D~E)。茧壁内层黄色,有许多突起,呈不平整的椭球形或球形,茧壁外层与其紧密连接(图 1D~E)。受精卵悬浮于茧壁内层所包裹的乳白色的蛋白液中,肉眼难以分辨(图 1E~F)。

2.2 武陵洞蛭卵茧的化学组成

2.2.1 水解氨基酸的种类及含量

由表 2 可知,武陵洞蛭卵茧含有 17 种水解氨基酸,每 100 g 样品的总量为 15.866 9 g,其中谷氨酸的相对含量最高,蛋氨酸的相对含量最低。必需氨基酸(赖氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸和组氨酸)占水解氨基酸总含量的 37.7%。

2.2.2 游离氨基酸的种类及含量

由表 3 可知,武陵洞蛭的卵茧具有 11 种游离氨基酸,总量较少,每 100 g 样品约为 0.132 1 g,

表 2 武陵洞蛭卵茧中 17 种水解氨基酸的含量
Table 2 Contents of 17 hydrolyzed amino acids in *S. wulingensis* cocoons

Amino acid	Content/g	Amino acid	Content/g
Glutamic acid	2.402 0	Glycine	0.886 8
Aspartic acid	1.733 9	Phenylalanine	0.630 4
Lysine	1.311 6	Alanine	0.626 9
Leucine	1.175 4	Tyrosine	0.536 5
Proline	1.184 9	Cystine	0.540 2
Serine	1.085 6	Histidine	0.466 0
Valine	1.068 2	Isoleucine	0.317 2
Threonine	0.924 9	Methionine	0.081 2
Arginine	0.895 2	Total	15.866 9

注:表中给出的是 100 g 样品中的氨基酸含量。

Note: The table shows the amino acid content of per 100 g sample.

其中,丙氨酸、缬氨酸和亮氨酸这 3 种游离氨基酸的相对含量较高,而胱氨酸的相对含量最低。

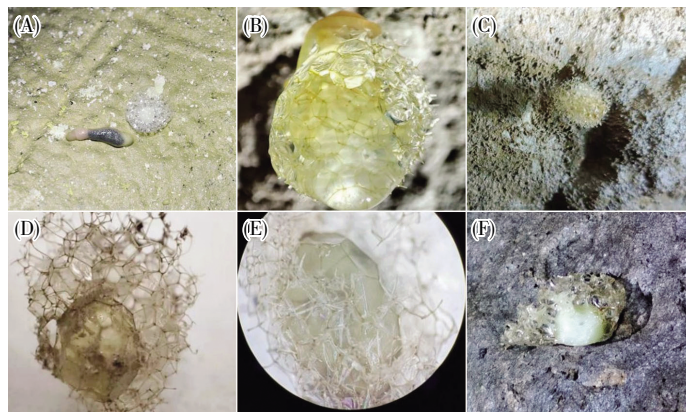


图 1 武陵洞蛭卵茧的形态结构

(A) 刚产下来的卵茧,茧壁外层是清亮的泡沫层,随着时间的推移,泡沫层逐渐变黄;(B) 幼蛭正在孵出时的卵茧状态;(C) 幼蛭孵出后,泡沫层最终变成蜂窝层;(D) 蜂窝层。它由三维微室组成,微室之间由薄膜隔开;(E) 茧壁内层是由五边形或六边形连接而成的带棱角的椭球形或球形,比蜂窝层薄膜更有韧性;(F) 茧壁内层包裹着乳白色或透明的黏稠状蛋白液。

Fig.1 Morphological structure of *S. wulingensis* cocoons

(A) A newly-laid cocoon. Its outer wall contains a layer of clear foam, which gradually turns to yellow with time; (B) Release of young leeches from a cocoon; (C) The foam layer turning into honeycomb layer after hatching; (D) The honeycomb layer. It consists of three-dimensional micro-chambers separated by thin membranes from each other; (E) The inner layer of cocoon wall. It is an angular ellipsoid/sphere composed of connected pentagons or hexagons, and has more tenacity than the honeycomb membrane; (F) The inner layer of cocoon wall covered with milky or transparent viscous albumen solution.

此外,有6种氨基酸(酪氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、精氨酸和组氨酸)未检出,可能是样本中这些氨基酸的含量低于仪器的检出限或者样本中缺乏这些氨基酸。

表3 武陵洞蛭卵茧中游离氨基酸的种类及含量
Table 3 Categories and Contents of free amino acid in *S. Wulingensis* cocoons

Amino acid	Content/g	Amino acid	Content/g
Alanine	0.032 1	Serine	0.001 3
Valine	0.022 6	Cystine	0.000 9
Leucine	0.021 0	Tyrosine	—
Threonine	0.015 4	Proline	—
Glutamic acid	0.011 3	Phenylalanine	—
Glycine	0.011 0	Methionine	—
Lysine	0.009 6	Arginine	—
Isoleucine	0.005 4	Histidine	—
Aspartic acid	0.001 5	Total content	0.132 1

注:表中给出的是100 g样品中的氨基酸含量,“—”指未检出。

Notes: The table shows the amino acid content of per 100 g sample. “—” means not detected.

2.2.3 蛋白质种类

通过液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术,本研究在卵茧中鉴定出68种可信蛋白质,其中27种蛋白质缺少相关研究资料,为未鉴定蛋白质。其余41种可信蛋白质主要分为6类,即抗氧化蛋白5种、酶蛋白12种、细胞骨架蛋白6种、与其他物质具有结合作用的蛋白质(结合蛋白)12种、热休克蛋白2种、其他蛋白质4种(表4)。

表4 武陵洞蛭卵茧内所含蛋白质的LC-MS/MS鉴定结果
Table 4 The LC-MS/MS identification results of proteins from *S. wulingensis* cocoons

Type of protein	Name of protein	Accession No.	Isoelectric point	Molecular weight/kD
Antioxidant protein	Extracellular globin D1	Q75ZP5	6.5	16.3
	Extracellular globin D2	Q75ZP4	6.5	16.9
	Extracellular globin M1	Q75ZP7	6.8	18.9
	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	T1FNC7	6.4	15.9
	Superoxide dismutase (fragment)	B9TY04	5.6	10.6
Enzyme protein	NADH dehydrogenase subunit 5	X2C9M1	8.4	65.9
	NADH dehydrogenase subunit 2	A0A8E5JS15	8.2	37.8
	Cytochrome c oxidase subunit 3	X2C3Y8	7.1	30.6
	Malate dehydrogenase	T1EDN4	7.9	36.4
	ATP synthase subunit beta	A0A286Q4U6	6.0	56.2
	2-Phospho-D-glycerate hydro-lyase	T1FM52	6.9	47.2
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A286Q507	7.9	36.4
	ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP	A0A286Q4Y6	9.8	23.5
	Protein disulfide-isomerase	T1EDN0	4.8	57.1
	Fructose-bisphosphate aldolase	T1FMP1	7.8	39.4
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	T1EM03	8.4	17.9
	ATPase protein 9	A0A286Q4T1	9.7	16.3

3 讨论

3.1 蛭类卵茧的形态结构差异

从现有文献上来看,洞蛭的卵茧与海南山蛭(*Haemadipsa hainana*)、日本医蛭(*Hirudo nipponia*)和宽体金线蛭(*Whitmania pigra*)等蛭种^[9-10]的卵茧结构较为相似,都有蜂窝状或海绵状的茧壁外层和光滑的茧壁内层,且受精卵悬浮于蛋白液中;而与泸沽石蛭(*Erpobdella luguensis*)、布氏齿蛭(*Odon-tobdella blanchardi*)、橄榄鱼蛭(*Piscicola olivacea*)和润盾盾蛭(*Placobdella ornata*)等蛭种^[9]的卵茧结构明显不同。此外,洞蛭卵茧的蜂窝层结构与日本医蛭(医蛭科)和金线蛭(黄蛭科)卵茧的蜂窝状结构也存在差异,而与同一科的海南山蛭最为相似,但洞蛭与海南山蛭的卵茧在大小、颜色和产卵场所等方面也存在明显的差异^[9-11](表5)。

当前,蛭类物种的分类鉴定主要依据成体的个体大小、体表条纹或色斑、生殖孔间距、肛门及尾吸盘等外部形态特征,以及咽、嗦囊、精囊、卵囊等内部解剖结构特点^[9, 12-13],或者结合分子数据^[1]进行整合分析。由于蛭类活体的身体柔软易变,经过酒精或福尔马林等保存液固定后,其体表条纹、体色等外形特征变化很大,通常会给物种鉴定带来诸多困难^[14],而蛭类卵茧的大小、形状、结构等特征则相对稳定且有明显的属种差异^[9-11, 14-17](表5),因此建议将卵茧的形态学特征作为重要的物种描述内容予以详细记述,以促进卵茧形态学及其生理生化与生态适应性特征的比较研究。

表4(续)

Type of protein	Name of protein	Accession No.	Isoelectric point	Molecular weight/kD
Cytoskeleton protein	Tubulin beta chain	T1FNQ3	4.9	50.3
	Actin (fragment)	O76950	5.6	41.4
	Cytoplasmic actin	Q2LDZ8	5.5	41.7
	Hau-cytoplasmic intermediate filament 3 (fragment)	G5DCY9	5.2	39.4
	Hau-cytoplasmic intermediate filament 8 (fragment)	G5DCZ4	5.1	38.3
	Myosin heavy chain (fragment)	A0A6G7MAK2	6.7	32.2
Binding protein	Calmodulin	Q9GRJ1	4.2	16.8
	Calreticulin	A1YB06	4.7	49.4
	Spectrin beta chain	T1ED35	5.3	266.4
	Transgelin	T1FWA9	7.9	52.3
	Filamin	Q6TY53	6.3	409.2
	EF-hand domain-containing protein	T1G2B6	4.6	16.4
	Calponin homology (CH) domain-containing protein	T1FFG0	8.4	18.0
	Myosin_tail_1 domain-containing protein	T1ECZ8	5.8	101.7
	PDZ domain-containing protein	T1ELE0	8.0	19.5
	ML domain-containing protein	T1F117	8.3	25.1
	WSD domain-containing protein	T1FHZ0	8.0	12.8
	STAS domain-containing protein	T1FW33	8.4	98.7
	Heat shock protein	HSP83	A0A8A2HCV5	5.1
HSP90		A0A8A2HEK1	5.0	91.3
Other protein	Prohibitin	T1FM79	5.4	29.9
	Histone H2A	T1EK33	10.6	9.7
	Gliarin (intermediate filament protein)	Q9XYD8	5.5	71.3
	Elongation factor 1 alpha (fragment)	O61256	7.5	41.2
Uncharacterized protein	Uncharacterized protein	E5L356	8.8	21.2
		T1FME7	5.5	41.8
		T1EDJ2	5.3	73.1
		T1FZT0	4.6	32.4
		T1FNQ0	5.6	70.6
		T1FNA0	5.6	74.5
		T1FPQ2	6.4	23.5
		T1FMM0	4.7	33.8
		T1FNP2	6.6	39.4
		T1FBL9	5.1	25.8
		T1ELT2	4.6	16.4
		T1EPE7	4.9	15.2
		T1ELU5	5.2	279.5
		T1FDI4	8.9	34.2
		T1FNN2	6.2	62.5
		T1FZ83	6.3	21.6
		T1FMK6	6.8	41.5
		T1EHS6	8.5	96.9
		T1F730	5.0	93.1
		T1FZP1	6.9	24.6
T1EUQ6	9.4	22.3		
T1EUG4	6.8	27.3		
T1FE37	5.5	59.6		
T1FKI3	10.0	22.4		
T1FT21	5.4	75.8		
T1EY76	5.1	578.0		
T1FCG2	8.8	114.0		

3.2 武陵洞蛭卵茧的适应性特征

洞蛭雌雄同体, 异体受精, 可全年交配, 一年四季都可产生卵茧, 这是对洞穴环境(在洞穴的深处通常气温和湿度等生态因子相对稳定, 季节性变化不明显或缺乏)的适应性生活史对策, 也是许

多真洞穴动物重要的繁育特征^[3]。

洞蛭通常将卵茧产于壁面相对平滑、凹凸不明显而不适合蝙蝠栖挂及其他动物活动的泥质或岩质的洞道的顶壁。卵茧黏附处不便于蝙蝠栖挂和其他动物活动, 这在很大程度上可避免蝙蝠、

表 5 8 种蛭类卵茧的基本信息
Table 5 Basic information on the cocoons of 8 leech species

Characteristic of cocoon	<i>S. wulingensis</i>	<i>H. hainana</i>	<i>H. nipponia</i>	<i>W. pigra</i>
Spawning site	Cave ceilings	Hay clump base, soil surface or soil crevices ^[11]	In dry and moist, relatively soft soil ^[9]	In the ridge of the field ^[9]
Morphological Structure	Outer wall of the cocoon contains foam layer-honeycomb layer (consists of bowl-shaped cells which form pentagonal or hexagonal shapes, with walls between the cells). The inner wall of the cocoon is wrapped in protein solution, and the fertilized egg is suspended in it ^[9-10]		Outer wall of cocoon contains soap foam layer-honeycomb layer or sponge layer (consists of short columns of pentagonal or hexagonal shape). Fertilized eggs are suspended in the proteinaceous fluid of the inner wall of the egg cocoon ^[9]	
Colour	White-pale yellow-tawny	Translucent-tan or coffee color ^[9]	Sugar-cane purple-maroon-grape red ^[9]	Orange yellow-tawny ^[15]
Average length and short diameter/mm	10.80, 8.32	13.50, 11.25 ^[9-10]	11.10, 8.10 ^[16]	26.60, 18.70 ^[14]
Average weight/g	0.14	0.18 ^[10]	0.11 ^[16]	1.77 ^[17]
Characteristic of cocoon	<i>O. blanchardi</i>	<i>E. luguensis</i>	<i>P. olivacea</i>	<i>P. ornata</i>
Spawning site	In the ridge of the field ^[9]	Under the rock ^[9]	Adhering to water plants or rocks ^[9]	Attached to the ventral surface of the parental body ^[9]
Morphological Structure	Smooth surface, no spongy layer, oval shape ^[9]	Smooth surface, no spongy layer, oval shape ^[9]	Oval shape ^[9]	Sheath-like mucous sac ^[9]
Colour	Dark brown ^[9]	Yellow-white-burnt yellow-ellorish brown or tan ^[9]	—	—
Average length and short diameter/mm	9.60, 6.50 ^[9]	7.52, 5.48 ^[9]	1.30, 0.80 ^[14]	—
Average weight/g	—	—	—	—

注：“—”指缺乏相关的信息。

Note: “—” means no relevant information.

小泡巨鼠等洞栖性动物在飞行、爬行及栖息过程中对卵茧的直接伤害或破坏。更值得注意的是，在卵茧分布点的附近通常有适合蝙蝠栖挂的钟乳石或其他岩石沉积物突起结构，这种卵茧的分布模式非常有利于洞蛭的种群繁衍，因为幼蛭从卵茧中孵出后，能够很快地寻找到蝙蝠，进而从蝙蝠身上吸取血液，以维持其生长发育之需要。

卵茧的茧壁分为两层，外层开始呈泡沫状，而后变成蜂窝状，这不仅可使较多的空气保持在茧的周围，还能减少茧内水分的丧失，以利于胚胎发育，是一种保护性的适应^[18]。而内层比外层的蜂窝状薄膜更具韧性，这为受精卵的发育提供了更好的保护。此外，洞蛭卵中卵黄的含量较少，而受精卵悬浮于内层包裹的蛋白液中，这为胚胎发育提供了充分的营养保障。

本研究在武陵洞蛭卵茧中共检测出 17 种水解氨基酸和 11 种游离氨基酸，其中游离氨基酸的含量较低(表 2~3)，说明氨基酸在卵茧中主要是以结合态的形式存在。在酶的催化下，谷氨酸可生成 α -酮戊二酸，在胚胎发育过程中积极参与三

羧酸循环^[19]；赖氨酸和亮氨酸在代谢中可分解成乙酰乙酸和乙酰辅酶 A，而乙酰乙酸和乙酰辅酶 A 是联结糖类代谢与脂类代谢的重要中间物质^[19]；组氨酸、酪氨酸、胱氨酸和蛋氨酸具有抗氧化作用，可有效降低活性氧对胚胎的毒害作用^[20]。

本研究从武陵洞蛭卵茧中鉴定出 68 种蛋白质(表 4)，其中抗氧化蛋白(胞外珠蛋白和超氧化物歧化酶)可清除活性氧，具有抗氧化活性，能保护暴露在空气或氧气中的细胞^[21-22]。卵茧中的多种酶类可能在胚胎发育过程中发挥重要作用，如：2-磷酸-D-甘油酸水解酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶和果糖-二磷酸缩醛酶参与糖酵解，苹果酸脱氢酶参与三羧酸循环等。卵茧中的细胞骨架蛋白(微管蛋白、中间纤维和肌动蛋白)是细胞骨架的重要组成部分，具有维持细胞形态结构的功能，可使细胞具有抗剪切力，而不易受到外界机械作用的伤害^[23]。此外，钙调蛋白、钙网蛋白和含 EF-hand 结构域蛋白与钙离子结合，具有分子伴侣活性，可调节细胞内钙稳态及细胞凋亡等多种生物学过程^[24-25]。细丝蛋白能与多种蛋白质配体相互作用，

发挥蛋白质水解、免疫调节、膜受体和激素受体等作用^[26]。热休克蛋白可在压力状态下维持蛋白质平衡,并且还参与转录控制、免疫应答和细胞凋亡调控等过程^[27]。蛋白质二硫键异构酶可在保证蛋白质活性方面发挥重要作用^[28]。翻译延伸因子1A不仅能促进依赖GTP的氨基酰tRNA与核糖体A位的结合,而且还参与信号转导、凋亡、细胞骨架组成等许多重要的细胞过程^[29]。显然,卵茧中这些功能不同的蛋白质共同维持着受精卵的生长发育,从而为种群繁衍提供物质保障。

总之,无论是形态结构,还是化学组成,洞蛭卵茧都呈现出对洞穴生态环境的适应性特征,卵茧是洞蛭物种进化和种群存续的关键所在,值得深入系统的研究。

致谢: 野外工作期间,得到湖南小溪国家级自然保护区工作人员汪承龙及周边群众的帮助;实验期间,得到吉首大学黄兴龙博士的支持和山东青岛斯坦德检测集团股份有限公司的帮助;论文撰写期间,得到南京师范大学计翔教授的悉心指导,谨此一并致以衷心的感谢。

参考文献(References):

- [1] HUANG T F, LIU Z W, GONG X Y, *et al.* Vampire in the darkness: a new genus and species of land leech exclusively blood-sucking cave-dwelling bats from China (Hirudina: Arhynchobdellida: Haemadipsidae)[J]. *Zootaxa*, 2019, 4560(2): 257–272.
- [2] 任伯淞, 黄太福, 伍丽艳, 等. 四川省邻水县发现武陵洞蛭[J]. *四川动物*(REN Bosong, HUANG Taifu, WU Liyan, *et al.* *Sinospelaobdella wulingensis* (Hirudinea, Haemadipsidae) found in Linshui County, Sichuan Province[J]. *Sichuan Journal of Zoology*), 2020, 39(6): 679–683.
- [3] 刘志霄. 洞穴生物学[M]. 北京: 科学出版社(LIU Zhixiao. *Cave Biology*[M]. Beijing: Science Press), 2021: 84–85, 129.
- [4] 黄太福. 洞栖性蝙蝠的数量调查与食蝠血洞蛭的新发现[D]. 吉首: 吉首大学(HUANG Taifu. *Census of Cave-dwelling Bats and a New Genus & Species of Batblood-sucking Landleech*[D]. Jishou: Jishou University), 2019: 28–49.
- [5] 伍丽艳, 刘力, 任伯淞, 等. 基于PAE编码系统对武陵洞蛭行为谱的初步研究[J]. *生命科学研究*(WU Liyan, LIU Li, REN Bosong, *et al.* *Preliminary investigation of the ethogram of *Sinospelaobdella wulingensis* based on PAE coding system*[J]. *Life Science Research*), 2022, 26(3): 239–246.
- [6] 胡先成, 李佳坤, 赵云龙. 河川沙塘鳢胚胎、仔鱼发育过程中蛋白质含量及氨基酸库的变化[J]. *动物学杂志*(HU Xiancheng, LI Jiakun, ZHAO Yunlong. *Changes in the protein content and amino acid pool during embryonic and larval development of *Odontobutis potamophilus**[J]. *Chinese Journal of Zoology*), 2020, 55(6): 776–783.
- [7] 贾哲, 陈晓婷, 潘南, 等. 基于电子舌快速检测冷藏斑东方鲀的新鲜度[J]. *现代食品科技*(JIA Zhe, CHEN Xiaoting, PAN Nan, *et al.* *The freshness of frozen *Fugu bimaculatus* detected by electronic tongue*[J]. *Modern Food Science and Technology*), 2021, 37(5): 220–229.
- [8] 蒂勒门特 H, 齐维 M, 达默韦尔 C, 等. 植物蛋白质组学实验指南[M]. 沈世华, 译. 北京: 科学出版社(THIELLEMENT H, ZIVY M, DAMERVAL C, *et al.* *Plant Proteomics Methods and Protocols*[M]. Translated by SHEN Shihua. Beijing: Science Press), 2013: 8–12.
- [9] 杨潼. 中国动物志: 环节动物门 蛭纲[M]. 北京: 科学出版社(YANG Tong. *Fauna Sinica (Annelida Hirudinea)*[M]. Beijing: Science Press), 1996: 29–30, 71–72, 94–95, 112–113, 138, 156–157, 182, 200.
- [10] 谭恩光, 陈晶, 钱月桃, 等. 海南山蛭 *Haemadipsa hainana* Song, *et al.* 的生长摄食和生殖[J]. *海南大学学报(自然科学版)*(TAN Enguang, CHEN Jing, QIAN Yueao, *et al.* *Growth, feeding and reproduction of the leech *Haemadipsa hainana* Song, et al*[J]. *Natural Science Journal of Hainan University*), 1992, 10(1): 16–23.
- [11] 张钧. 海南山蛭 *Haemadipsa hainana* 的生物学特性及综合治理研究[J]. *热带作物学报*(ZHANG Jun. *Biology and integrated control of *Haemadipsa hainana**[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*), 1988, 9(1): 107–114.
- [12] 谭恩光, 赵霞. 金线蛭属一新种(颞蛭目: 医蛭科)[J]. *动物分类学报*(TAN Enguang, ZHAO Xia. *A new species of the genus *Whitmania* from China (Gnathobdellida: Hirudidae)*[J]. *Zoological Systematics*), 2001, 26(1): 8–10.
- [13] 王德斌, 杨潼. 中国牛蛭属一新种记述(吻蛭目, 医蛭科)[J]. *动物分类学报*(WANG Debin, YANG Tong. *A new species of *Poecilobdella* from Yunnan, China (Arhynchobdellida, Hirudini-dae)*[J]. *Zoological Systematics*), 2008, 33(2): 344–347.
- [14] 宋大祥, 冯钟琪. 蚂蟥[M]. 北京: 科学出版社(SONG Daxiang, FENG Zhongqi. *Leech*[M]. Beijing: Science Press), 1978: 120, 125.
- [15] 熊良伟, 王帅兵, 王建国, 等. 宽体金线蛭繁殖性能及蛭苗生长特征研究[J]. *上海海洋大学学报*(XIONG Liangwei, WANG Shuaibing, WANG Jianguo, *et al.* *Study on reproductive ability and growth traits of the *Whitmania pigra* Whitman*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*), 2016, 25(3): 374–380.
- [16] 张健, 龚元, 于翔, 等. 温度和密度对日本医蛭繁殖的影响[J]. *水产学杂志*(ZHANG Jian, GONG Yuan, YU Xiang, *et al.* *Effects of temperature and density on breeding of leech *Hirudo nipponia* Whitman*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*), 2017, 30(2): 17–21.
- [17] 丁辰龙, 王宣朋, 王信海, 等. 宽体金线蛭4个繁殖性状指标的相关性分析[J]. *福建水产*(DING Chenlong, WANG Xuanpeng, WANG Xinhai, *et al.* *The correlation analysis in four reproduction traits of *Whitmania pigra**[J]. *Journal of Fujian Fisheries*), 2012, 34(6): 488–492.
- [18] 宋大祥. 浙江鄞县水田蛭类生活习性的初步观察[J]. *动物学报*(SONG Daxiang. *Preliminary notes on the behaviour of some paddy-field leeches from Yinxian, Zhejiang Province, China*[J]. *Acta Zoologica Sinica*), 1974, 20(1): 52–60.
- [19] 张明凤, 赵云龙, 赵艳民, 等. 隆线夏卵胚胎发育过程中形态及蛋白质、氨基酸组成和含量的变化[J]. *水产学报*(ZHANG Mingfeng, ZHAO Yunlong, ZHAO Yanmin, *et al.* *Morphology and composition and content of proteins and amino acids of the parthenogenetic egg of *Daphnia (Ctenodaphnia) carinata* during the embryonic development*[J]. *Journal of Fisheries of China*), 2005, 29(6): 783–790.
- [20] 孟凡国, 史红专, 王嘉, 等. 蚂蟥与梨形环棱螺营养成分的相关性研究[J]. *中国中药杂志*(MENG Fanguo, SHI Hongzhan, WANG Jia, *et al.* *Correlation analysis between nutritive components of *Whitmania pigra* and *Bellamyia purificata**[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*), 2013, 38(12): 1915–1918.

- [21] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报(DONG Liang, HE Yongzhi, WANG Yuanliang, *et al.* Research progress on application of superoxide dismutase (SOD)[J]. Journal of Agricultural Science and Technology), 2013, 15(5): 53–58.
- [22] HIEU V N, THUY L T T, HAI H, *et al.* Capacity of extracellular globins to reduce liver fibrosis via scavenging reactive oxygen species and promoting MMP-1 secretion[J]. Redox Biology, 2022, 52: 102286.
- [23] 徐国恒. 细胞骨架——肌动蛋白纤维[J]. 生物学通报(XU Guoheng. Cytoskeleton-actin filament[J]. Bulletin of Biology), 2005, 40(2): 43.
- [24] 李庆伟, 张撼, 逢越. 钙调蛋白结构、性质及其细胞生物学功能的研究进展[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版) (LI Qingwei, ZHANG Han, PANG Yue. The structure, properties and cellular biological functions of CaM[J]. Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition)), 2017, 40(1): 74–82.
- [25] 戴琳玉, 闫宇, 王路广, 等. 下调钙网蛋白基因表达可促进肝星状细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报(DAI Linyu, YAN Yu, WANG Luguang, *et al.* Down-regulation of calreticulin promotes apoptosis in hepatic stellate cells[J]. Journal of Army Medical University), 2021, 43(10): 908–914.
- [26] 邱琳, 李静燕, 王建浩, 等. 细丝蛋白与其蛋白配体的相互作用[J]. 常州大学学报(自然科学版) (QIU Lin, LI Jingyan, WANG Jianhao, *et al.* Filamins and their protein ligands[J]. Journal of Changzhou University (Natural Science Edition)), 2015, 27(2): 81–87.
- [27] 黄琳. 牙鲆免疫相关基因及热休克蛋白基因的转录表达[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所(HUANG Lin. Transcriptional Expression of Immune-related Genes and Heat Shock Protein Genes of Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2015: 19.
- [28] 王志强, 周智敏, 郭占云. 蛋白质二硫键异构酶家族的结构与功能[J]. 生命科学研究(WANG Zhiqiang, ZHOU Zhimin, GUO Zhanyun. The structure and function of the protein disulfide isomerase family[J]. Life Science Research), 2009, 13(6): 548–553.
- [29] 周冰, 曹诚, 刘传喧. 翻译延伸因子 1A 的研究进展[J]. 生物技术通讯(ZHOU Bing, CAO Cheng, LIU Chuanxuan. Advances in research on translation elongation factor 1 alpha[J]. Letters in Biotechnology), 2007, 18(2): 281–284.

(上接第 236 页)

- [24] WANG Y, GILBREATH T M, KUKUTLA P, *et al.* Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24767.
- [25] 寇若玫, 李月, 窦飞越, 等. 大分舌蜂不同龄期幼虫及滞育预蛹肠道细菌群落多样性及其差异[J]. 昆虫学报(KOU Ruomei, LI Yue, DOU Feiyue, *et al.* Diversity and differences of gut bacterial communities in different instar larvae and diapause prepupae of *Colletes gigas* (Hymenoptera: Colletidae)[J]. Acta Entomologica Sinica), 2021, 64(6): 682–693.
- [26] 翟小战. 中华按蚊肠道细菌群落研究[D]. 武汉: 华中农业大学(ZHAI Xiaozhan. The Intestinal Bacterial Flora Community Structure of *Anopheles sinensis* Mosquitoes (Diptera: Culicidae)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University), 2014.
- [27] 王晓明. 白纹伊蚊细菌微生物群多样性及功能研究[D]. 广州: 南方医科大学(WANG Xiaoming. Diversity and Function of Bacterial Microbiota in *Aedes albopictus*[D]. Guangzhou: Southern Medical University), 2017.
- [28] 张某, 杨璞, 朱家颖, 等. 基于 16S rDNA 基因序列的泽兰实蝇幼虫肠道细菌多样性分析[J]. 昆虫学报(ZHANG Mou, YANG Pu, ZHU Jiaying, *et al.* Analysis of the bacterial diversity in the intestine of larval *Procecidochares utilis* (Diptera: Trypetidae) based on 16S rDNA gene sequence[J]. Acta Entomologica Sinica), 2016, 59(2): 200–208.
- [29] 毛迎新, 谭荣荣, 王友平, 等. 基于 16S rDNA 序列的小贯小绿叶蝉共生细菌多样性研究[J]. 植物保护(MAO Yingxin, TAN Rongrong, WANG Youping, *et al.* Analysis of the bacterial diversity in adults of *Empoasca (Matsumurasca) onukii* based on 16S rDNA sequences[J]. Plant Protection), 2018, 44(3): 17–23, 48.
- [30] 靳亮, 王金昌, 王洪秀, 等. 16S rRNA 基因的 PCR-DGGE 技术分析茶尺蠖幼虫肠道细菌种群结构及多样性[J]. 江西科学(JIN Liang, WANG Jinchang, WANG Hongxiu, *et al.* Bacterial community in midguts of *Ectropis oblique* larvae by PCR-DGGE and 16S rRNA gene library analysis[J]. Jiangxi Science), 2013, 31(6): 759–763, 829.
- [31] 吕品, 元倩, 杨璞, 等. 基于 16S 测序分析白蜡虫二龄雌雄若虫共生菌的多样性分析[J]. 林业科学研究(LÜ Pin, QI Qian, YANG Pu, *et al.* Analysis on structure and diversity of bacterial community of the second-instar *Ericerus pela* nymph based on 16S rRNA high-throughput sequencing[J]. Forest Research), 2019, 32(5): 34–41.
- [32] 刘婧, 陈丹, 庄桂芬, 等. 家蝇发育过程中肠道可培养共生细菌的分离与鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志(LIU Jing, CHEN Dan, ZHUANG Guifen, *et al.* Isolation and identification of cultivable symbiotic bacteria from the intestinal tract of *Musca domestica* during development[J]. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases), 2017, 35(2): 120–124.
- [33] 杨海君, 谭周进, 肖启明, 等. 假单胞菌的生物防治作用研究[J]. 中国生态农业学报(YANG Haijun, TAN Zhoujin, XIAO Qiming, *et al.* Biocontrol functions of pseudomonad[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture), 2004, 12(3): 158–161.
- [34] 张春媚, 徐明洁, 李雪威, 等. 绿针假单胞菌的研究进展及农业应用潜力[J]. 微生物学报(ZHANG Chunmei, XU Mingjie, LI Xuewei, *et al.* Recent research advances and application potential in agriculture of *Pseudomonas chlororaphis*[J]. Acta Microbiologica Sinica), 2022, 62(2): 391–402.
- [35] 张力群, 张俊威. 假单胞菌产生的抗生素[J]. 中国生物防治学报(ZHANG Liqun, ZHANG Junwei. Antibiotics produced by *Pseudomonas* spp.[J]. Chinese Journal of Biological Control), 2015, 31(5): 750–756.
- [36] 廖美德, 梁世中. 昆虫病原线虫共生菌无色杆菌的研究概况[J]. 湖北农学院学报(LIAO Meide, LIANG Shizhong. A survey of researches on *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes[J]. Journal of Hubei Agricultural College), 2001, 21(3): 285–288.
- [37] RAJ A, KUMAR S, SINGH S K, *et al.* Characterization of a new *Providencia* sp. strain X1 producing multiple xylanases on wheat bran[J]. The Scientific World Journal, 2013, 2013: 386769.