

人芽囊原虫的光学和超微结构研究*

何建国 江静波 周宏 李肖梅
(生物学系) (广州市儿童医院)

摘 要

首次在中国记载了人芽囊原虫。利用光学和电子显微镜观察其生活史各阶段的形态结构,显示此虫除前人描述的三种类型之外,还存在一种我们称之为复分裂型 multiple fission form,该型虫体细胞可分裂成3~10余个数量不等的虫体。颗粒型虫体的繁殖颗粒,能在细胞质中产生;阿米巴型虫体形态变化大而活动性较强,但在变形过程中未见虫体移动;空泡型的超微结构显示具有双层膜的细胞核、内质网、核糖体和具双层膜的线粒体,线粒体内的电子半透明的管状或泡状结构,实质上是线粒体的嵴;颗粒型虫体内有4个电子密度均匀的球形颗粒,功能不详。颗粒型虫体也能以二分裂方式繁殖。

关键词 原生动动物,阿米巴目,人芽囊原虫,体外培养,腹泻,空泡型虫体,颗粒型虫体,阿米巴型虫体,复分裂

人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*)一直被认为是一种对人体无害的酵母;Zierdt(1967年)把它归为原生动物^[1];随后归为阿米巴目(*Amoebida*),建立新的亚目——芽囊原虫亚目^[2](*Blastocystina*),该虫体外培养成功,为研究其复杂的生活史和形态结构提供了方便^[1,3~7]。近年来大量的证据表明,它是一种寄生在高等灵长类和人的肠道可致病的寄生原虫^[8~13]。作者首次在中国记载了人芽囊原虫。本文着重研究体外培养的人芽囊原虫生活史各阶段的光学结构和超微结构。

1 材料与方法

1.1 虫株来源

H株来源于农村一腹泻儿童粪样,转种保存6个月;L株来源于广州市动物园一位猩猩饲养员粪样,转种保存4个月;R株来源于广州市红十字会医院一腹泻病人,转种保存4个月。

1.2 体外培养

在试管中,制成30°鸡蛋斜面培养基(E.M),加等体积的洛克氏液,高压灭菌,加无菌马血清使其浓度达到20%(培养基的总体积),最后加入1.5ml液体石蜡。用生理盐水稀释有人芽囊原虫的粪样,取少量加入培养基中,置于二氧化碳培养箱内,37℃培养2天检查,以后每隔2天转种一次。

本文1990年2月14日收到

1.3 光学显微镜观察

分别取培养24小时和36小时的H、L和R株的虫体,置于一洁净载玻片上,盖上盖玻片,用液体石蜡封闭盖玻片的边缘,置于37℃Leitz相差显微镜和Olympus干涉相差显微镜下观察。取起始pH8.5的培养基内培养6天的H株,方法同上,置Nikon相差显微镜下,在30℃左右的条件下,观察阿米巴型虫体。

1.4 电子显微镜观察

将5滴25%的戊二醛溶液加入已培养48小时10ml的H株培养液中,立即取出沉积的虫体,1000g离心5分钟,沉淀物用由0.1M二甲胂酸钠稀释的3%的戊二醛溶液(pH8.0)固定2小时,0.02M磷酸缓冲液(PBS)(pH8.0)冲洗,0.1M磷酸缓冲液稀释的2%锇酸后固定45分钟,磷酸缓冲液冲洗,用丙酮按常规方法脱水,Spurr's液渗透3小时,Spurr's液包埋,置70℃烘箱72小时,切片经醋酸铀染色和柠檬酸铅染色,在JEM-100CX电镜下观察。

2 结果

2.1 光学显微镜的观察

虫体转种培养24小时,多数是以二分裂方式繁殖的空泡型虫体*Vacuolated forms*,细胞核和细胞质均位于细胞内、外膜所形成的狭小的区域里,在细胞的边缘有许多不规则的月芽形结构(图版I-1)。

转种36小时,染色,许多虫体显示出由细胞质相连的多个细胞核,而虫体的大部分空间是被细胞质和细胞核分割而成的多个空泡结构,活体观察的结果也是如此(图版I-2),且与超微结构相符(图版IV-5)。活体观察显示虫体的复分裂状态*multiple fission form*,一个虫体有的分裂成3个、4个、甚至更多的虫体(图版I-3,4)。分裂的虫体与分裂所产生的虫体大小均不一。复分裂过程首先是细胞核不继分裂成许多个核,核与核之间只有少量的细胞质连接,其余的空间为空泡结构,此后,细胞外膜内陷,分裂成许多个小的虫体,这种状态在H株转种培养36小时以后,数量上占多数。

转种培养2天的培养基中,有大量由空泡型发育来的颗粒型虫体*granular form*,最初是虫体的中心体内少量的活动性很强、类似细菌的颗粒物质,随着培养时间的增加,颗粒性物质越积累越多,最后充满整个中心体(图版II-1)。这种类型的虫体形成的初期和后期,能以二分裂方式繁殖(图版II-2)。在培养时间较长的培养基中,很容易找到颗粒型虫体的繁殖颗粒。有些虫体的繁殖颗粒充满整个细胞,圆形,大小不一,约15个左右(图版II-3);也有一些虫体的颗粒暴露在细胞表面、圆形、大小不一,约30个左右(图版II-4);有些虫体的表面,有圆形大小不一的凹陷,其数量为20个左右(图版II-5);而有些虫体的圆形与大小不一的3~10个颗粒性物体,位于细胞外内膜之间的细胞质区域里(图版II-6);有些含有繁殖颗粒的颗粒型虫体已破裂,释放出繁殖颗粒(图版II-7)。

带有细菌的虫体,在起始pH8.5的培养基中培养6天,可观察到许多阿米巴型虫体

ameba form, 形态上类似溶组织阿米巴, 变化很大, 可以从不规则的长形变成不规则的方型或卵圆形(图版Ⅲ—1, 2)。其变形速度时快时慢, 开始是缓慢的, 到一定程度突然收缩或伸张(图版Ⅲ—3)。阿米巴型虫体内有许多明显的小颗粒物质。伪足伸缩过程中虫体未见移动, 活体观察未见细胞核和其他细胞器。

有些虫体内有杆状或圆形的类似细菌的活物体, 15分钟的观察结果表明: 开始圆形物体在细胞内, 杆状物体在细胞外(图版Ⅲ—4); 几分钟过后, 圆形物体渗出细胞外(图版Ⅲ—5); 此后圆形物体又进入细胞内, 杆状物体仍在细胞外(图版Ⅲ—6); 最后杆状物体也进入细胞内(图版Ⅲ—7), 向细胞中央移动。在圆形物体进、出细胞处和杆状物体进入细胞处, 形成一个小的锥形突起。

2.2 电子显微镜观察

人芽囊原虫无细胞壁, 最外侧为一层厚度不均的纤丝层filamentous layer。整个空泡型虫体为一层细胞外膜所包; 细胞质和细胞核位于细胞内膜与外膜之间的狭小区域里(图版Ⅳ—1)。圆形或椭圆形具有双层膜的细胞核, 内有月牙形的核染色质, 位于细胞的边缘, 细胞核所处位置的细胞质向中心体突起, 在一个超薄切片切面上可见双核的虫体。圆形或长形的具双层膜的线粒体数量较多, 通常排列在细胞核的周围, 内有圆形、椭圆形和长形的电子半透明结构, 约20个左右, 多数位于线粒体的边缘。这些实质上是线粒体的嵴。细胞核和线粒体周围有大量的核糖体和粗糙型内质网(图版Ⅳ—2, 3)。复分裂状态的超微结构与光学显微镜观察的结果相符, 细胞核与细胞边缘的细胞质由少量的细胞质连接, 细胞核周围是线粒体等结构(图版Ⅳ—5)。颗粒型虫体的超微结构显示4个大小不一的圆形的、电子密度均匀的物体(图版Ⅳ—4), 内部结构不详, 在它的周围是电子致密度不一的絮状物体, 这4个颗粒的功能尚不清楚, 在这个虫体中也见到3个大小不同的圆形空泡结构。

在H株中未见高尔基复合体。细菌处于细胞锥形突处的纤丝层中, 这与光学显微镜观察的结果相符。

3 讨论

人芽囊原虫已知有3种类型: 空泡型、颗粒型和阿米巴型虫体。本实验利用光学显微镜和电子显微镜观察, 证实虫体在培养基内36小时以上, 尚存在一种复分裂型multiple fission form。它是由空泡型虫体发育而成的, 虫体分裂不是在颗粒型虫体的中心体内进行; 空泡型虫体与这种类型的区别在于它的细胞质和细胞核均位于细胞外膜和细胞内膜所形成的狭小的区域里, 只有一个大的空泡, 并且以二分裂方式繁殖^[1~3], 而复分裂类型的虫体细胞核先分裂成多个, 并且不一定在细胞的边缘, 而是整个虫体分布, 中心体的空泡被分割成许多小空泡, 最后细胞外膜内陷形成许多个小的、大小不一的虫体。

未观察到颗粒型虫体的中心体的裂体生殖过程, Zierdt^[1, 3]认为在有些颗粒型虫体的中心体中进行裂体生殖, 而形成繁殖颗粒。本研究显示了Zierdt所描述的充满细胞的繁殖颗粒和脱离细胞表面的繁殖颗粒^[14], 同时观察到存在于狭窄的细胞质中的大小、形状和数量与Zierdt所示的两种繁殖颗粒相符合的颗粒。作者认为这3种形态是一个生

殖过程的不同阶段，繁殖颗粒也能在细胞质内产生，而不只单一在中心体中形成，如果细胞外膜破裂，颗粒释放出来，留下凹痕。如果细胞内膜破裂，繁殖颗粒就扩散到虫体的中心体中，充满整个虫体。

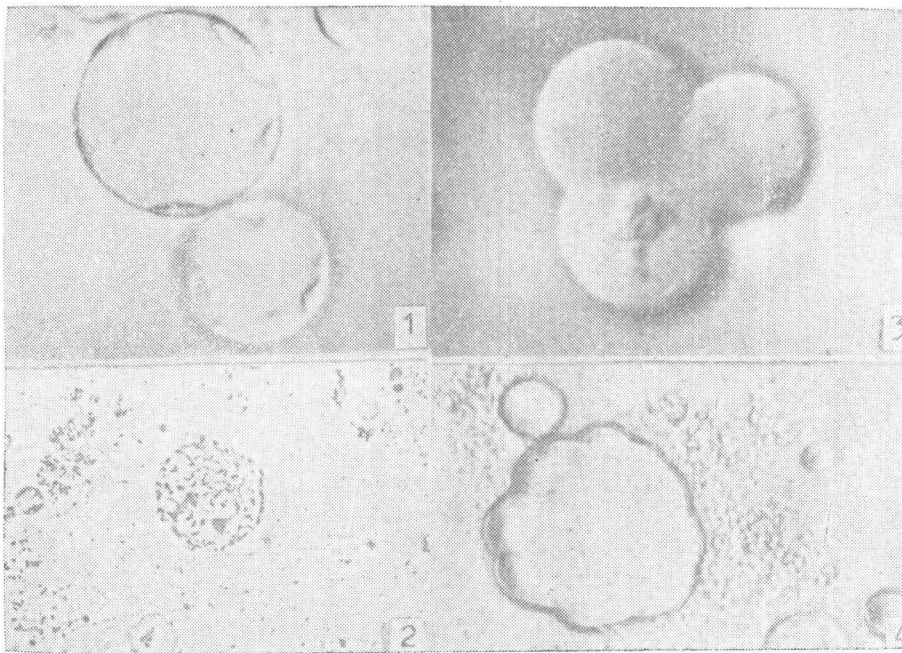
二分裂繁殖方式不仅在典型的空泡型虫体中发生^[1]，也可在早期和晚期的颗粒型虫体（中心体充满颗粒而细胞质和细胞核仍在边缘）中发生。

细菌与人芽囊原虫的共生关系早有研究^[15]，本文描述了细菌进入虫体的过程，并且在电镜中也观察到细菌性物体的存在。

Zierdt^[4]和Silard等^[6]都在线粒体内发现电子半透明的囊状或管状结构，从本实验结果来看，这些囊状结构多位于线粒体的边缘，并且是由线粒体内膜内陷的结果，因此认为这些结构是线粒体的嵴。

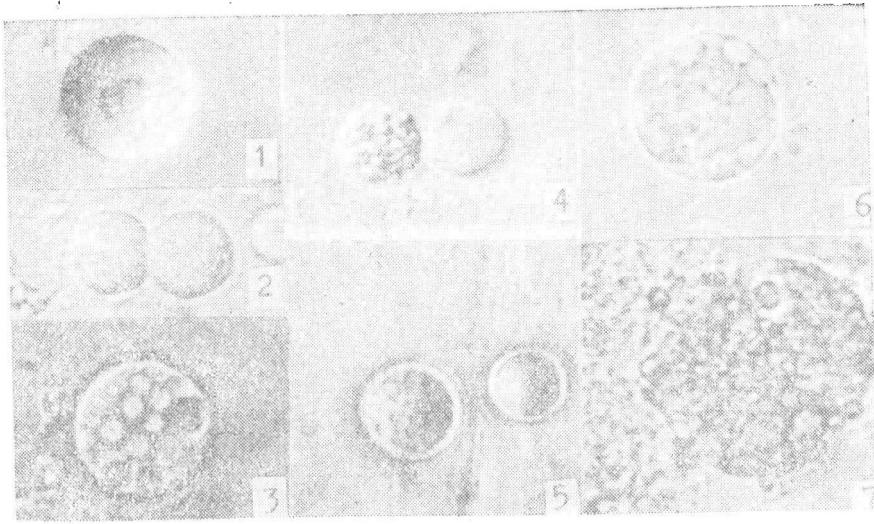
电子显微镜显示颗粒型虫体中的4个具单层膜的电子密度均匀的球形物体，与光学显微镜观察的繁殖颗粒是否为同一类物体，尚未能定论。

阿米巴型虫体与前人观察的结果相同。



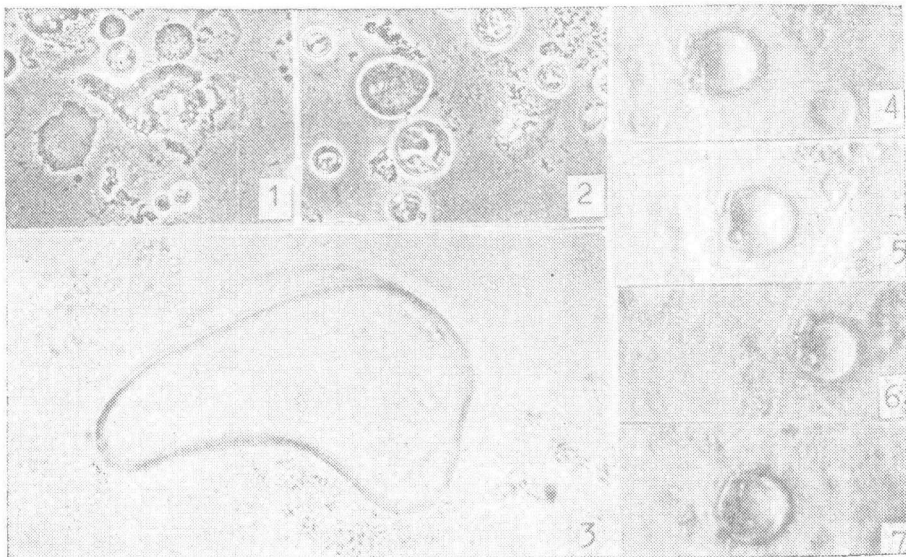
图版 I 人芽囊原虫的空泡型虫体和复分裂型虫体

1. 空泡型虫体，示细胞核和细胞质位于细胞边缘，中心体空泡占大部分体积×600；
2. 虫体细胞质和细胞核形成条形，分割中心体空泡×600；
- 3—4. 复分裂型虫体×600； 3. 示虫体经复分裂分成3个虫体； 4. 示虫体复分裂的初期阶段



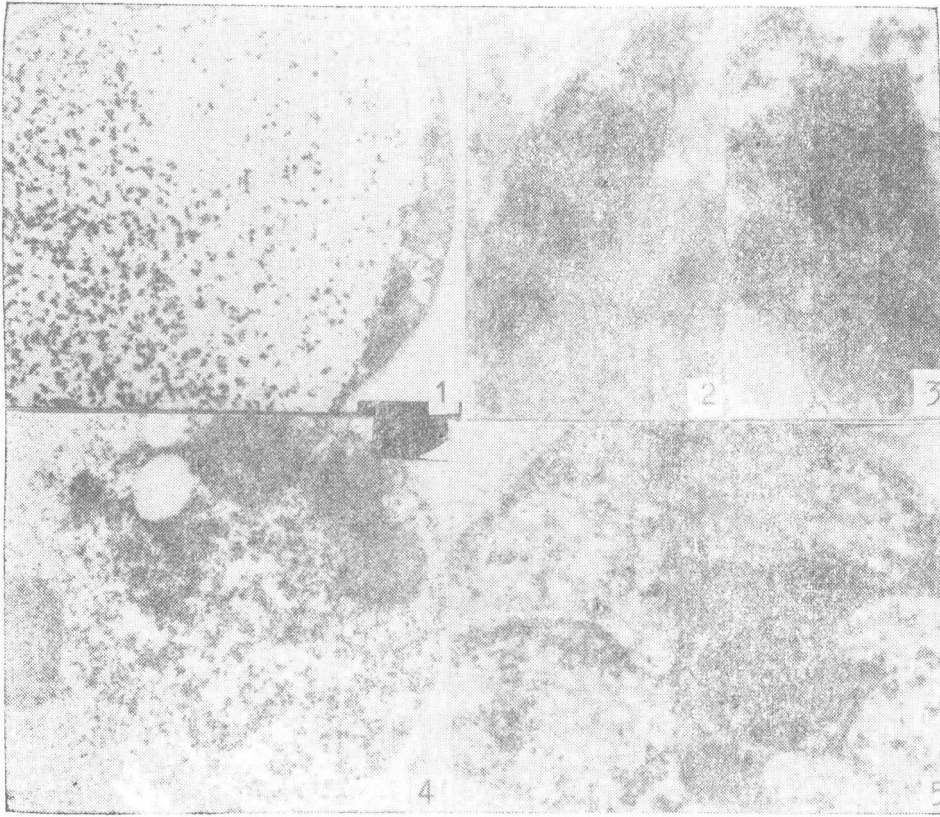
图版 II 人芽囊原虫的颗粒型虫体

1. 初期颗粒型虫体×600;
2. 以二分裂方式繁殖的颗粒型虫体×600;
3. 具繁殖颗粒的颗粒型虫体×600;
4. 繁殖颗粒位于细胞表面的颗粒型虫体×600;
5. 繁殖颗粒脱离细胞表面,虫体表面留下凹迹×600;
6. 繁殖颗粒位于细胞边缘的细胞质中×600;
7. 示破裂的具有繁殖颗粒的颗粒型虫体×600



图版 III 人芽囊原虫的阿米巴型虫体和细菌性物体进入虫体的过程

- 1~3. 阿米巴型虫体: 1. 示具有伪足的阿米巴型虫体×150; 2. 示卵圆形阿米巴型虫体×150;
3. 示一个虫体变形前后的两种形态×600.
- 4~7. 细菌性物体进入虫体的过程×150: 4. 示杆状和球状细菌性物体位于虫体外面; 5. 示杆状细菌性物体位于虫体外,球性细菌性物体一半已进入虫体; 6. 示杆状细菌性物体位于细胞外,球状细菌性物体在虫体内; 7. 示两种形态的细菌性物体均位于虫体内



图版Ⅳ 人芽囊原虫超微结构

1. 空泡型虫体×4000, 示细胞质位于细胞边缘, 虫体大部分体积为中心体空泡;
2. 示双层膜具2个核仁的细胞核×14000;
3. 示双层膜具有电子半透明的管状和泡状嵴的线粒体×20000;
4. 示4个不明功能的电子致密的圆形物体×14000;
5. 复分型虫体的细胞核和细胞质形成条形区域, 分割中心体空泡×14000

参 考 文 献

- [1] Zierdt C H et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 48(1967), 495~501
- [2] Zierdt C H, *Parasitol Today.*, 4(1988), 15~17
- [3] Zierdt C H, *J. Protozool.*, 21(1973), 114~121
- [4] Zierdt C H et al., *Z. Parasitenk.*, 50(1976), 277~283
- [5] Zierdt C H, *J. Protozool.*, 33(1986), 67~69
- [6] Silard R et al., *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 42(1983), 233~242
- [7] Tan H K et al., *Z. Parasitenk.*, 44(1974), 267~278
- [8] Mc Clure H M et al., *Lab. Anim. Sci.*, 30(1980), 890~894

- [9] Zierdt C H, *Clin. Microbiol. Newsl.*, 5(1983), 57~59
[10] Gallagher P G et al., *Pediatr. Infect. Dis.*, 4(1985), 556~557
[11] Babcock D et al., *N. Eng. J. Med.*, 313(1986), 1419
[12] El-Masry N A et al., *Tran. Roy. Soci. Trop. Med. Hyg.*, 82(1988), 173
[13] Phillips B P et al., *Exp. Parasitol.*, 39(1976), 358~364
[14] Zierdt C H et al., *Exp. Parasitol.*, 36(1974), 233~243
[15] Zierdt C H et al., *Exp. Parasitol.*, 39(1976), 422~430

Studies of Light Microscope Appearance and Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in Vitro Culture

He Jianguo* Jing Jingbo Zhou Hong Li Xiaomei

Abstract

The present paper is the first report of a parasitic protozoa *Blastocystis hominis* in China, It deals with its microscope morphology and ultrastructures, basing on living and stained materials isolated from the fecal samples of 3 diarrhea patients and kept apartly in continuons cultures in vitro fo study.

Apart from the 3 forms already reported for the parasite by previous investigators, namely, vacuolated form, granular form and ameda form, another form, which we call "multiple fission form" that eventually produces 3 to many new individuals, is here described. Reproductive granules of the granular form were seen to be formed in the cytoplasm of the parasite, Active extension and retraction of pseudopods of the ameba form were seen occasionally, but such activity did not result in cell progression. EM study of the vacuolated form revealed the nucleus with double membranes, rough endoplasmic reticulum, ribosomes and mitochondria of double membranes with abundant translucent tubular structures, the cristae. Granular form containing 4 large round granules of unknown function was observed, Ultrastructures of the multiple fission form were also studied.

Keywords Protozoa, Amoebida, vitro culture, diarrhea, *Blastocystis hominis*, vacuolated form, granular form, ameba form, multiple fission form

* Department of Biology