

药物对柔嫩艾美尔球虫 内生阶段超微结构影响的研究

张振岚* 汪志楷 徐福南

(南京农业大学兽医系)

摘 要

本文对柔嫩艾美尔球虫 (*Eimeria tenella*) 在鸡体内正常发育的超微结构和分别用三种抗球虫药物处理情况下超微结构的变化进行了观察和比较研究, 注意到125ppm尼卡巴嗪 (Nicarbazin) 能引起裂殖生殖阶段的滋养体或初生裂殖体及裂殖子的线粒体、内质网等膜结构系统和核的异常变化; 168ppm磺胺喹恶啉 (SQ) 对滋养体、初生裂殖体及裂殖子、大配子和卵囊壁的形成均有影响, 对裂殖生殖阶段的影响主要表现为核膜的增生复制等一系列核的异常变化; 对配子生殖阶段的影响表现为I型和II型卵囊壁形成颗粒 (WFB₁和WFB₂) 的异常变化; 80ppm盐霉素 (Salinomycin) 对上皮内淋巴细胞 (IEL) 中的子孢子及粘膜中成熟裂殖子的影响表现为表皮的分离或破裂及胞浆内微线粒 (MN) 和多糖颗粒 (PG) 等的轮廓模糊。由药物引起的其他一些超微结构的异常变化也作了观察和描述。

关键词 柔嫩艾美尔球虫, 超微结构, 抗球虫药物

目前已知的药物抗球虫作用的机制均是从生化与代谢的角度建立起来的, 而有关药物对球虫超微结构影响的研究则刚刚起步。八十年代初, Pillito等观察了氨丙啉、氟脲啶和二硝基苯酰胺 (又名球痢灵) 对巨型艾美尔球虫 (*E. maxima*) 配子生殖阶段超微结构的影响, 注意到三种药物均能引起大配子及卵囊形成早期的异常变化^[1]; Dost等 (1985) 在其综述中也提及盐霉素能引起 *E. tenella* 裂殖子超微结构的异常变化, 而对配子生殖阶段则没有影响^[2]。我国目前尚未开展这方面的工作。

本次研究选用了三种不同的抗球虫制剂, 在超微结构的水平上观察了它们对柔嫩艾美尔球虫内生性发育阶段的影响, 以期从形态学的角度对药物抗球虫的效能和作用机制作进一步了解, 并希望对药物和球虫的生理生化及代谢方面的研究提供参考。

材 料 与 方 法

一、动物、虫种及药品

(一) 动物: 刚出壳的白羽罗斯肉用雏鸡隔离饲养在无球虫的环境下直到实验开始^[3]; 饲喂消毒过的饲料和自由饮用新鲜自来水。

(二) 虫种: 由中国农业科学院上海血吸虫病研究所提供的纯种柔嫩艾美尔球虫 (*E. tenella*) 卵囊, 经接种无球虫雏鸡大量增殖后冷藏备用。

*现在南京市畜牧兽医站工作。

**本文于1990年1月12日收到修改稿。

(三) 药物: 尼卡巴嗪 (Nicarbazin)、磺胺喹恶啉 (Sulfaquinoxiline, SQ)、盐霉素 (Salinomycin) 分别以125ppm、168ppm和80ppm剂量均匀拌于饲料中投给。

二、试验设计及样品处理 隔离饲养至20日龄的66只雏鸡随机分为一个感染对照组, 共30只, 和分别使用三种药物的处理组, 各12只。用药2天后, 每雏经口腔接种 5.0×10^5 个*E. tenella*孢子化卵囊。对照组在接种后于44, 56, 68, 72, 90, 96, 106, 114, 120, 131, 138, 141, 144, 147, 150小时各取2只采样; 尼卡巴嗪处理组于72, 96, 120, 138, 144, 150小时, 磺胺喹恶啉处理组于80, 90, 114, 138, 144, 150小时, 而盐霉素处理组于44, 56, 68, 139, 144, 150小时各取2只采样。

雏鸡颈椎脱位致死, 剖腹取盲肠, 于盲肠中部快速切取0.5~1.5mm长条形肠壁组织数小块, 投入2.5%戊二醛溶液(用0.2M二甲基胍酸钠缓冲液配制, pH7.2~7.4)中固定4~12小时, 然后按电镜常规处理制成包埋块。切片并染色后于JEM-100CX I透射电镜80KV条件下观察。

结 果

一、磺胺喹恶啉处理 裂殖生殖阶段和配子生殖阶段均可见到虫体超微结构的异常变化。首先观察到滋养体的核膜向内形成皱褶(箭头), 构成核内伪包涵体(图Q1); 也有些核发生浓缩、坏死并崩解, 嗜电子密度显著增强。某些初生裂殖体的核膜增生并向胞浆内形成多重折叠或形成髓磷脂相, 以及胞浆中有个量形状不一、大小不等的空泡, 部分空泡内尚有少量细胞碎片, 故又称自噬空泡, 而此时胞浆限制膜仍基本完整。

配子生殖阶段可观察到某些大配子的WFB₁颗粒的嗜电子密度较正常对照稍低, 且呈不均匀性, 而由此型颗粒物质构成的卵囊壁外层虽已融合为电子密度均匀层, 但厚薄不一致, 似乎有对称性(空头箭头, 图Q2)。此时合子的限制膜没有复制的迹象, 而WFB₂颗粒仍大量分布于胞浆中, 且有些颗粒的轮廓模糊或直径缩小, 亦有相互融合的现象(箭头)。

二、尼卡巴嗪处理 超微结构的异常变化主要见于滋养体、初生裂殖体和裂殖子。可观察到滋养体的核染色质集结于近核膜处并浓染(箭头, 图N1), 与正常对照相比嗜电子密度显著增强; 同时胞浆内粗面内质网(ER)有脱颗粒现象, 并伴有内质网池的收缩。在其他虫体也可观察到内质网池的扩张。此外, 线粒体扩张、嵴的数目减少或线粒体固缩的现象也可观察到。

核的另一变化是核质变淡, 核周间隙增大且不规则, 或核膜溶解消失; 亦可见到核膜尚存而核质减少或消失的现象。

另一明显的变化是初生裂殖体的胞浆内或核内含有大量增生复制的膜结构(图N2), 且这些膜结构或平行排列构成小管状结构, 或重叠排列构成板层小体(单箭头), 以及构成梅花样(空心箭头)或线粒体样结构(双箭头)。

发育成熟的裂殖体中某些裂殖子的一侧表皮形成锯齿状构造, 且排列较规则。

三、盐霉素处理 上皮细胞内子孢子的微细构造未能辨清, 但在某些上皮内淋巴细胞(IEL)中可观察到子孢子表皮的外膜有破裂或模糊现象(箭头, 图S1), 其内的多糖粒(PG)及微线粒(MN)的轮廓也稍有模糊。

部分成熟裂殖子的形态也不规则(图S2),表皮的外限制膜(OM)分离、断裂,内膜复合体变得模糊,其表面有疏松状物或膜折叠状物(长箭头);其内部构造也不如正常情况下清晰,微线粒(MN)和多数糖颗粒(PG)轮廓模糊,且糖颗粒与正常对照相比其直径有缩小的现象。胞浆内尚可见到多膜的结构(短箭头)。此外,宿主细胞构成的围虫泡膜(MPV)也呈起伏的不规则状,似乎向胞浆内凹入比较明显,局部也有向胞浆方向破裂的现象(双箭头);围虫泡内尚可见到圆形的围膜空泡(空心箭头)。

讨 论 与 小 结

此三种药物均能引起*E. tenella*生物膜系统超微结构的异常变化,尽管引起变化的程度和性质有所不同,但作为屏障或支持结构的生物膜无论是直接受药物作用所致的变化,还是继发的适应性或退行变化,似乎是不可避免。磺胺喹恶啉和尼卡巴嗪还能引起裂殖生殖阶段的滋养体、初生裂殖体及裂殖子的核的异常变化。

SQ作用于滋养体或初生裂殖体的较早变化是核膜的增生,或向核内形成皱褶,构成核内伪包涵体(图Q1);或向胞浆内形成多重排列,构成髓磷脂相。胞浆内的自噬空泡,根据核膜的增生情况判断,很可能来源于增生的核膜。目前已从生化的角度了解到磺胺类药物能抑制叶酸合成,扰乱核酸代谢,因而影响核的分裂增殖。一旦核的代谢活性受到影响就有可能发生核的一系列变性变化。

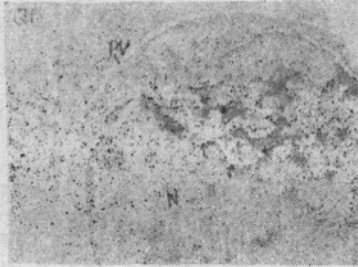
滋养体或初生裂殖体核的浓缩、溶解和核膜的异常变化,以及膜结构的大量增生复制在尼卡巴嗪处理情况下也同样观察到。但与SQ不同的是,在发生上述变化的同时胞浆内的其它成分如内质网、线粒体等也发生了形态结构的异常变化。胞浆内大量膜结构的排列方式与SQ引起的也稍和差别,且膜结构之间有大量中等到弱的嗜电子物质。此外,这些膜结构除与核膜相联系即有可能来源于核膜增生外,似乎还来源于内质网和线粒体膜的增生和复制(图N2)。尼卡巴嗪对成熟裂殖子的核也有影响,但最先引起的变化有可能是表皮,因为某些裂殖子仅表现为表皮的皱褶,而此类现象在没有用药的情况下未观察到,这很可能是因膜下微管受到药物的刺激作用而产生的收缩所致。

Wang(1978)的试验表明尼卡巴嗪在有蛋白质(如牛血清白蛋白,BSA)介导的情况下能导致鸡红细胞内 K^+ 的溢出,并据此推测,同样在蛋白质介导下能扰乱球虫的微环境^[4]。这似乎能解释实验中观察到的一些现象,如线粒体及内质网池的扩张及核质溶解等,就有可能是微环境紊乱的结果。

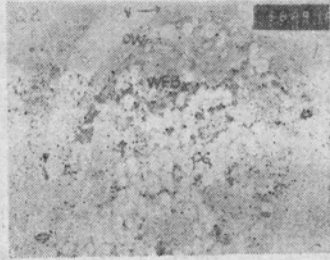
已知载体类药物能介导单价或二价阳离子穿过生物膜,从而破坏了膜两侧的离子浓度梯度或电化学梯度,使膜的通透性大大改变,过多的水分进入虫体致膜破裂^[5]。实验中观察到子孢子和成熟裂殖子表皮的异常变化也说明了这一点,如外限制膜(OM)和内膜复合体(IM)的分离及表皮膜的破裂等。此外,围虫泡膜及裂殖子内部成分的变化也与上述推论相符合。Wang(1982)认为载体类也能通过抑制宿主细胞营养物质的运输而向接抑制球虫的发育^[5]。这可以解释IEL中子孢子发生超微结构异常的现象。

SQ能引起WFB₁颗粒电子密度和均匀性的变化,但似乎并不影响它参与卵囊壁的形成。根据卵囊壁外层已形成后,WFB₂颗粒仍分布于整个胞浆中而未见移行到限制膜下,同时,合子的限制膜似乎也不再复制,可以说明SQ对WFB₂颗粒有毒性作用。因在正常

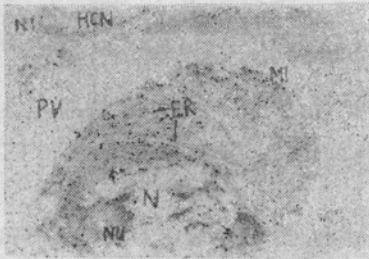
对照中卵囊壁外层未完全形成时,合子的限制膜就开始复制。Pittilo等(1981)^[1]在研究氨丙啉等药物对*E. maxima*卵囊形成早期的影响时,也观察到类似现象。



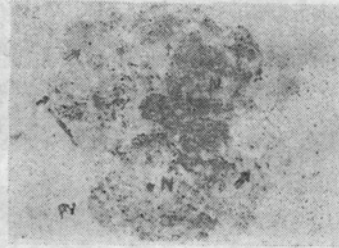
图Q1 滋养体。核膜增生形成核内伪包涵体(箭头);核(N)及围虫泡(PV)。
×19000



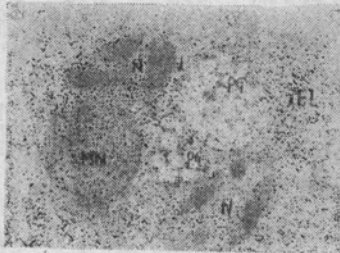
图Q2 卵囊壁外层已形成的卵囊。示散布于胞浆中的I型卵囊壁形成颗粒(WFB₂)及相互融合现象(单箭头);多糖颗粒(PG);卵囊壁外层(OW)厚薄不一致且呈对称性(空心箭头);胚膜(V)。×5800



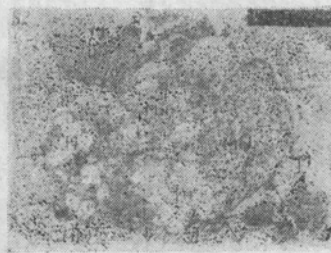
图N1 滋养体。示已脱颗粒的粗面内质网(ER);线粒体(Mi);核(N)及核仁(NU);围虫泡(PV);宿主细胞核(HCN)。×10000



图N2 已被破坏的初生裂殖体。胞浆内大量呈平行或重叠排列的膜结构(箭头)以及呈梅花状排列(空心箭头)和线粒体样膜结构(双箭头);核(N)和围虫泡(PV)。×14000



图S1 呈多角形的上皮内淋巴细胞(IEL)及其核(N);IEL中的孢子(S);其表皮的外膜分离并破裂(箭头);微线粒(MN)及多糖颗粒(PG)的轮廓模糊。
×10000



图S2 围虫泡内形态结构异常的裂殖子(M)。示轮廓模糊的微线粒(MN)及多糖颗粒(PG);多膜结构及髓磷脂相(短箭头);表皮分离或破裂(长箭头);围虫泡膜(MPV)向胞浆内凹入(双箭头);围膜空泡(空心箭头)。×10000

参 考 文 献

- [1] Pittilo, R. M. et al., 1981. Ultrastructural changes in the macrogamete and early oocyst of *Eimeria maxima* resulting from drug treatment. *Parasitology*, 83: 285~291.
- [2] Dost, G. et al., 1985. Development of salinomycin as an anticoccidial in replacement chickens. in: *Research in avian coccidiosis* (McDougald, L.R. et al, eds.), 285~293, University of Georgia.
- [3] 张振岚等, 1989. 隔离式育雏器的设计. *畜牧与兽医*, 5: 214~215.
- [4] Wang, C.C., 1978. Biochemical and nutritional aspects of coccidia. in: *Avian Coccidiosis* (Long, P. L. et al. eds.) *British Poultry Science*, 135~184, Ltd., Edinburgh.
- [5] Wang, C.C., 1982. Biochemistry and physiology of coccidia. in: *The biology of the Coccidia* (Long, P. L. ed.), 167~228, University Park Press, Baltimore.

THE EFFECT OF DRUGS ON THE UitraSTRUCTURE
OF EIMERIA TENELLA IN ENDOGENOUS
DEVELOPMENTAL STAGES

Zhang Zhenlan, Wang Zhikai, Xu Funan

(Department of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University)

Abstract

The ultrastructural changes at merogony and gametogony stages of *Eimeria tenella* were observed carefully in the cecal mucosa of chickens fed three different anticoccidial drugs and had been compared with the controls. Nicarbazin at 125 ppm, sulphaquinoxaline (SQ) at 168 ppm and salinomycin at 80 ppm caused considerable morphological abnormalities at the parasites in the merogony. And also SQ could produce morphological abnormalities at the wall-forming bodies of type I (WFBI) and type II (WFB II) in the gametogony. The membranous abnormality at the mitochondrion, endoplasmic reticulum, etc, and abnormal changes at the nucleus of trophozoite, young schizont and merozoite were seen in Nicarbazin treatment group. A series of changes in merogony (trophozoite, young Schizont and merozoite) had taken place in SQ treatment group, mainly expressing by nucleus abnormalities, such as the duplicating at the nucleus membrane. The effect of salinomycin on sporozoites in the intraepithelial lymphocyte and on matural merozoites in the mucosa were expressed by the separation or destruction of pellicle and the indistinct outlines of micronemes, polysaccharide granule, etc. in the plasma. Other abnormalities resulting from drug treatment are also reported.

Key words *Eimeria tenella*, Ultrastructure, Anticoccidial