

文章编号: 1000-7423(2006)-03-0187-05

【论著】

人芽囊原虫对实验感染昆明小鼠肠黏膜超微结构的影响

张红卫^{1,2}, 李文³, 颜秋叶², 贺丽君², 苏云普²

【摘要】 目的 观察昆明小鼠感染人芽囊原虫后肠黏膜超微结构的改变, 探讨人芽囊原虫的致病机制。方法 20 只昆明小鼠随机分为 4 组: A 和 D 组为接受免疫抑制剂(地塞米松)处理, B 组不用地塞米松处理, C 组为正常对照组。A 组和 B 组经口感染 20⁴ 人芽囊原虫包囊等, C 组和 D 组灌注等量 Locke 氏液作为对照。感染 6 d 后, 剖杀各组小鼠取回盲部肠黏膜处理后, 扫描和透射电镜下观察其超微结构。结果 扫描电镜下见 A、B 两组人芽囊原虫寄生在小鼠回盲部肠腔和肠黏膜表面, 个别虫体入侵肠黏膜及肠黏膜皱襞, 部分肠黏膜微绒毛呈局灶性破坏; 透射电镜下见部分吸收细胞表面微绒毛数目减少, 吸收细胞和杯状细胞线粒体水肿, 粗面内质网扩张、脱颗粒, 间质内淋巴细胞浸润及嗜酸粒细胞增多。A 组病变程度比 B 组重, C 组和 D 组未见异常。结论 感染人芽囊原虫的昆明小鼠回盲部肠黏膜超微结构有严重的损害, 肠黏膜损伤程度受机体免疫状态的影响。

【关键词】 人芽囊原虫; 小鼠; 肠黏膜; 透射电镜; 扫描电镜; 超微结构

中图分类号: R382.9

文献标识码: A

Impact of *Blastocystis hominis* Infection on Ultrastructure of Intestinal Mucosa in Mice

ZHANG Hong-wei^{1,2}, LI Wen³, YAN Qiu-ye², HE Li-jun², SU Yun-pu²

(1 Department of Occupational Health, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2 Henan Centre for Disease Prevention and Control, Zhengzhou 450003, China; 3 Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the ultrastructural change of intestinal mucosa in mice infected with *Blastocystis hominis*, and to study the pathogenic mechanism of *B.hominis* infection. **Methods** 20 Kunming mice were randomly divided into 4 groups; group A treated with immunosuppressant (dexamethasone), group B without immunosuppressant, group C as normal control and group D as immunosuppressant control. Groups A and B were then orally infected with 20⁴ cysts of *B. hominis*. Groups C and D were treated as control by infusing same volume of Locke's solution. Six days after inoculation, mice in each group were killed and mucosa of ileocecum was observed by transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscope (SEM). **Results** Under SEM, *B. hominis* located in enteric cavity and on the surface of ileocecum mucosa. Individual parasites also invaded into mucosa and its fold. Partial destruction of microvilli on the mucosa was observed. TEM observation indicated a reduction of microvilli on the surface of absorptive cells. Mitochondrial edema, rough endoplasmic reticulum dilatation and degranulation were found on absorptive cells and goblet cells. Lymphocyte infiltration and eosinophilia were found in intercellular stroma. Pathological changes in group A were more serious than that of group B. No abnormal change on the mucosal ultrastructure was found in groups C and D. **Conclusions** *B. hominis* infection causes significant ultrastructural lesion on the ileocecal mucosa in mice. Immune status of the mice can affect the degree of the lesion due to infection.

【Key words】 *Blastocystis hominis*; Mice; Intestinal mucosa; Transmission electron microscope (TEM); Scanning electron microscope (SEM); Ultrastructure

Supported by the Project of Science and Technology of Henan Province, China (No. 0224630058) and the Natural Science Fund of Henan Province, China (No. 0411043500)

基金项目: 河南省科技攻关项目(No. 0224630058); 河南省自然科学基金(No. 0411043500)

作者单位: 1 郑州大学公共卫生学院劳动卫生与职业病学教研室, 郑州 450016; 2 河南省疾病预防控制中心, 郑州 450003;

3 河南中医学院寄生虫学教研室, 郑州 450003

人芽囊原虫 (*Blastocystis hominis*) 是人类和其他动物肠道内的致病性原虫, 主要寄生在回盲部, 引起腹泻等症状, 其致病机制尚不清楚。研究表明, 感染人芽囊原虫可导致宿主肠黏膜充血、水肿和炎性细胞浸润等病理变化^[1], 但有关宿主肠黏膜超微结构的改变尚未见报道。作者曾将人芽囊原虫人工感染昆明小鼠, 用扫描电镜观察发现, 可导致肠黏膜呈网状、蜂窝状损伤^[2]。作者通过电镜观察感染人芽囊原虫的昆明小鼠肠黏膜超微结构的改变, 进一步探讨人芽囊原虫的致病机制。

材料与方 法

1 虫株来源

人芽囊原虫取自 1 名 35 岁男性间断腹泻患者的新鲜粪便, 经碘液染色法查见空泡型和阿米巴型虫体。将样本接种于加有 10% 灭活胎牛血清的 Locke 氏-鸡蛋双相培养基, 于 37 ℃ 培养, 48~72 h 转种 1 次, 传代保种。收集第 2 代已培养 48 h 的人芽囊原虫, 计数后用 Locke 氏液调成 0.5 ml 含 20⁴ 虫体液, 备用。

2 实验动物

实验用昆明品系正常雌性小鼠 20 只, 体重 (18±2)g, 购自河南省实验动物中心。镜检粪便未见肠道蠕虫和原虫。随机分为 4 组 (每组 5 只), A 和 D 组接受免疫抑制剂 (地塞米松) 处理, B 组不用地塞米松处理, C 组为正常对照组。

3 动物感染

各组小鼠于感染前用胃管灌注甲硝唑 (批号: 20031228, 湖北华中药业有限公司) 2 mg/只, 每天 2 次, 共 5 d。A 组和 D 组同时腹腔注射地塞米松磷酸钠注射液 (批号: 030329-1, 天津药业焦作股份有限公司), 2 mg/只, 1 次/d×5 d。间隔 1 d 后, 取上述虫体液用胃管灌注 A 组和 B 组小鼠, 0.5 ml/只, C 组和 D 组灌注等量 Locke 氏液作为对照。

4 光学显微镜检查

各组小鼠每天采集新鲜粪便涂片, 碘液染色后镜检。第 6 天剖杀, 取各个肠段的肠腔内容物或黏膜刮取物涂片, 碘液染色后镜检。

5 扫描电镜观察

用预冷生理盐水快速清洗肠回盲部标本, 2.5% 戊二醛溶液 (电子显微镜用, 德国 E.Merck 公司进口分

装) 4 ℃ 固定, 双蒸水清洗, 乙醇逐级脱水, 临界点干燥、喷金 (日立 IB-3 真空喷镀仪, 日本) 后扫描电镜 (日立 S-3500N 型, 日本) 观察。

6 透射电镜观察

用预冷生理盐水快速清洗肠回盲部标本, 用 4% 戊二醛溶液 4 ℃ 固定, 0.1 mol/L (pH 7.4) 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 清洗, 1% 锇酸固定, 0.1 mol/L (pH 7.4) PBS 清洗, 丙酮逐级脱水, 环氧树脂 812 (美国 SPI 公司) 包埋, 60 ℃ 聚合, 超薄切片 (莱卡 UCT 型超薄切片机, 德国莱卡公司), 醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色后透射电镜 (日立 H-7500 型, 日本) 观察。

结 果

1 光学显微镜检查

感染后第 2~5 天, A 组 5 只和 B 组 4 只小鼠粪便涂片均检出空泡型、颗粒型人芽囊原虫虫体, 其中 A 组 1 只小鼠在感染后 3 d 出现大便变软, 偶见黏液, 镜检发现较多空泡型、颗粒型虫体, 而 B 组 1 只小鼠、C 组和 D 组各 5 只小鼠的粪便样本均未检出虫体。第 6 天剖杀的 A 组 5 只小鼠和 B 组 4 只小鼠在回肠末段、回盲部、盲肠和结肠上段均发现空泡型、颗粒型人芽囊原虫虫体, 以回盲部和盲肠处较多。

2 扫描电镜观察

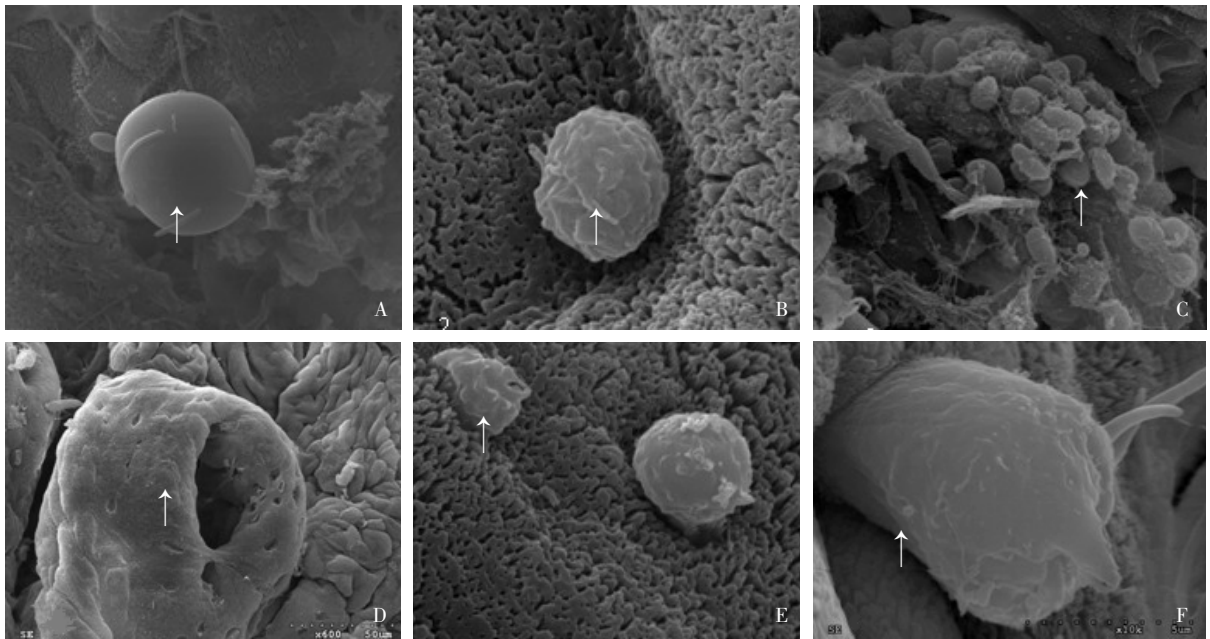
A 组 5 只小鼠和 B 组 4 只小鼠回盲部肠腔和肠黏膜查见人芽囊原虫, 虫体呈圆形或椭圆形、外表光滑或不光滑两种类型, 部分虫体表面附着细菌。肠腔内虫体数量较多, 附着于肠腔内容物, 肠黏膜表面凹陷部位可见少量虫体。其中 A 组 1 只小鼠部分肠黏膜局灶性破坏, 个别虫体入侵肠黏膜及肠黏膜皱襞 (图 1)。B 组 1 只小鼠、C 组和 D 组各 5 只小鼠均未查见虫体, 肠黏膜未见异常。

3 透射电镜观察

各组小鼠回盲部肠黏膜超微组织切片经透射电镜观察均未见人芽囊原虫虫体。A 组小鼠回盲部肠黏膜超微结构改变如下: ①部分吸收细胞表面微绒毛明显减少; ②部分吸收细胞和杯状细胞线粒体水肿, 嵴排列紊乱, 部分嵴和部分膜消失, 部分线粒体嵴全部融合, 电子密度增高。细胞内粗面内质网扩张, 呈池状, 有脱颗粒现象, 部分脱颗粒现象明显; ③可见间质内淋巴细胞浸润, 嗜酸粒细胞增多。其中 A 组 1 只小鼠见吸收细胞部分游离面的细胞膜破损消失, 细

胞质和线粒体溢出到细胞外，细胞间的紧密连接融合（图 2）。B 组 4 只小鼠回盲部肠黏膜超微结构改变基

本同 A 组，但程度轻，而 B 组 1 只小鼠、C 组和 D 组各 5 只小鼠回盲部肠黏膜未见异常（图 3）。

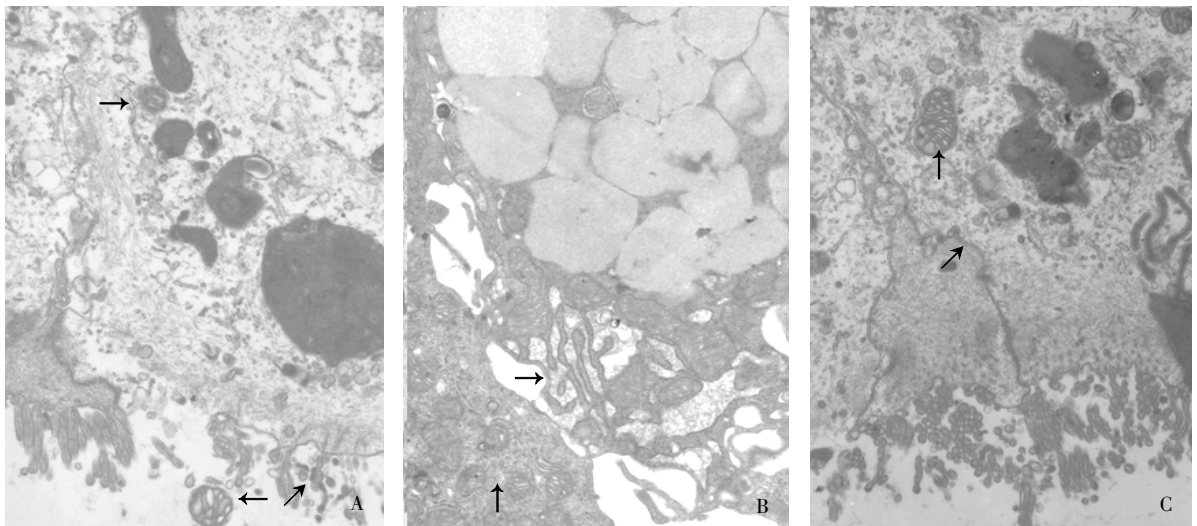


A: 无纤丝层虫体(↑, ×2500), B: 有纤丝层虫体(↑, ×5000), C: 虫体附着于肠腔内容物(↑, ×1500), D: 肠黏膜微绒毛局灶性破坏(↑, ×400), E: 虫体入侵肠黏膜(↑, ×8000), F: 虫体入侵肠黏膜皱襞(↑, ×10000)。

A: *B. hominis* without fibrillar surface(↑, ×2500), B: *B. hominis* with fibrillar surface(↑, ×5000), C: *B. hominis* adhering to content of enteric cavity(↑, ×1500), D: Focally destroyed microvillus of intestinal mucosa(↑, ×400), E: *B. hominis* invading intestinal mucosa(↑, ×8000), F: *B. hominis* invading mucosal fold(↑, ×10000).

图 1 感染人芽囊原虫昆明小鼠肠黏膜扫描电镜观察

Fig.1 Scanning electron micrograph of intestinal mucosa in mice infected with *B. hominis*

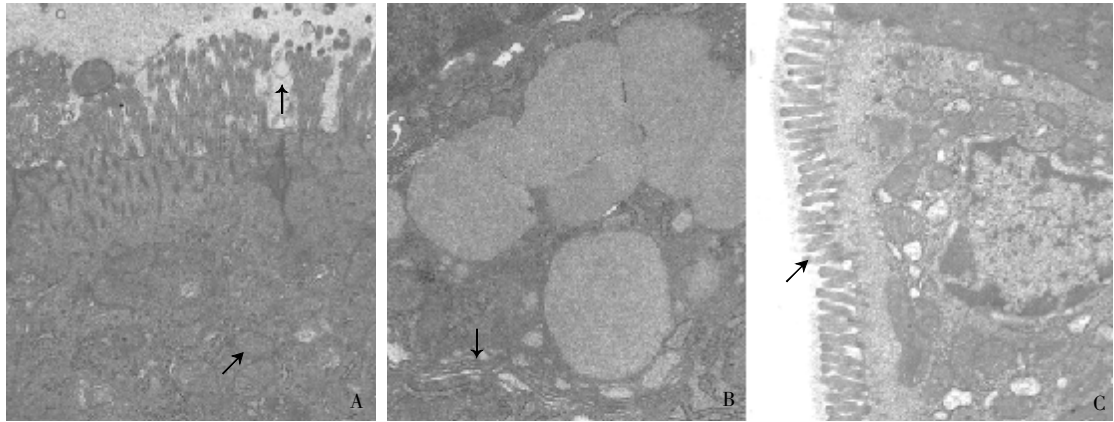


A: 吸收细胞: 微绒毛数量减少, 线粒体局部水肿 (→), 线粒体嵴排列紊乱, 部分嵴消失或融合 (↗); 部分游离面的细胞膜破损, 见一线粒体在肠腔 (←); B: 杯状细胞: 粗面内质网扩张呈池状, 有脱颗粒现象 (→), 线粒体局部水肿, 部分嵴和膜融合和消失 (↑), 高尔基复合体基本正常; C: 吸收细胞, 细胞质高度水肿, 细胞紧密连接部分融合 (↗), 线粒体中度水肿 (↑), 粗面内质网中度扩张。

A: Absorptive cell; reduced number of microvilli, partial edematous mitochondria (→), disordered arrangement and partial disappearance or fusion of mitochondrial crista (↗), partial damage of cellular membrane and one mitochondrion in enteric cavity (←). B: Goblet cell: rough endoplasmic reticulum dilated as pool shape, some showing degranulation (→); absorptive cell: partial edematous mitochondria, some of mitochondrial crista and mitochondrial membranes disappeared or fused (↑), normal Golgi's complex. C: Cytoplasm of absorptive cell highly edema, tight junction of cell was partly fused (↗); edematous mitochondria (↑) and moderately dilated rough endoplasmic reticulum.

图 2 感染人芽囊原虫 A 组昆明小鼠肠黏膜透射电镜观察(×10000)

Fig.2 Transmission electron micrograph of intestinal mucosa in group A mice infected with *B. hominis*(×10000)



A: 吸收细胞, 微绒毛数量稍减少 (↑), 线粒体轻度水肿, 线粒体嵴排列稍紊乱 (↗); B: 杯状细胞, 粗面内质网轻度扩张 (↓), 线粒体轻度水肿; C: 吸收细胞, 微绒毛正常 (↗)。

A: Absorptive cell, slightly reduced microvilli (↑), light edematous mitochondria, the mildly disordered arrangement of mitochondrial crista (↗); B: Goblet cell, slightly dilation of rough endoplasmic reticulum (↓) and modestly edematous mitochondria; C: Absorptive cell with normal microvilli (↗).

图3 感染人芽囊原虫 B 组昆明小鼠肠黏膜透射电镜观察(×10000)

Fig.3 Transmission electron micrograph of intestinal mucosa in group B mice infected with *B.hominis*(×10000)

讨 论

肠道吸收过程主要通过肠黏膜表面的微绒毛进行, 微绒毛减少和被破坏可导致肠道吸收功能障碍和紊乱。细胞内蛋白质是在粗面内质网的核糖体上合成的, 蛋白质合成及其实现细胞功能所需要的能量则主要来自线粒体, 肠道吸收细胞和杯状细胞超微结构的病理改变可导致细胞功能失调和障碍, 影响肠道吸收功能, 严重时可导致腹泻等症状。本研究显示, 感染人芽囊原虫的昆明小鼠, 其回盲部肠黏膜细胞表面微绒毛明显减少、线粒体水肿、线粒体部分嵴和膜消失、粗面内质网池状扩张及脱颗粒、间质内淋巴细胞浸润和嗜酸粒细胞增多, 而正常对照组小鼠肠黏膜超微结构未发现异常, 表明人芽囊原虫感染可导致肠黏膜细胞超微结构发生明显的病理改变。

人芽囊原虫虫体的侵入可直接导致肠壁屏障的损伤和破坏, 但虫体能否侵入肠黏膜对其产生致病性及致病程度有着重要的影响。Kaneda 等^[3]通过间接荧光抗体试验 (IFAT)、免疫电镜和蛋白质印迹法证实人芽囊原虫感染者血清中存在针对人芽囊原虫的特异性抗体, 而 Mahmoud 等^[4]在人芽囊原虫感染者的粪便和血清中发现人芽囊原虫特异性抗原, 提示人芽囊原虫虫体可能会通过侵入肠黏膜而进入血液。研究者一直试图寻找侵入肠黏膜的人芽囊原虫虫体, 但许多研究表明人芽囊原虫主要寄生在肠腔和肠黏膜表面, 而苏庆平等^[5]报道在动物感染的病理切片中发现人芽囊原虫虫体寄生于微绒毛刷缘和侵入上皮细胞。本实验结果表明, 虫体除多与肠黏膜表面和肠腔内容物附着

外, 个别虫体可入侵肠黏膜及肠黏膜皱襞。

动物实验未发现人芽囊原虫虫体侵入肠黏膜, 但肠黏膜病变却很严重, 其原因可能是因虫体接触和/或分泌毒素所致^[1]。Walderich 等^[6]发现人芽囊原虫及其虫体溶解物均可对中国仓鼠卵巢细胞(CHO 细胞)产生明显的细胞病变效应。Long 等^[7]发现人芽囊原虫及其培养上清与结肠癌-29 细胞(HT-29)及肠上皮细胞系 T-84 细胞株(T-84)共培养 24 h 后, 可刺激炎症因子如细胞因子白细胞介素-8(IL-8)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)释放增加。Dagci 等^[8]研究显示人芽囊原虫感染者肠道渗透力增加, 提示肠黏膜的完整性遭到破坏。本实验也发现部分吸收细胞游离面细胞膜破损消失, 细胞质和线粒体溢出到细胞外, 细胞间紧密连接融合。

人芽囊原虫感染与宿主的免疫状态有关, 获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者、使用免疫抑制剂者和恶性肿瘤患者人芽囊原虫感染率较高^[9,10]。本研究也发现接受免疫抑制剂的 A 组比非免疫抑制剂的 B 组超微结构改变明显, 其中 A 组 1 只小鼠粪便和肠道中人芽囊原虫虫体数量较多, 肠黏膜超微结构病变严重, 表现为粪便变软和黏液便的症状, 同样接受免疫抑制剂处理的 D 组对照小鼠肠黏膜超微结构未发现异常。而 B 组 1 只小鼠粪便和肠道中未发现人芽囊原虫虫体, 其肠黏膜也未见异常, 表明虽然人工感染人芽囊原虫, 但未发生虫体感染和寄生。

致谢 对河北医科大学电镜中心马洪骏教授及各位老师电镜制作和观察中给予的指导和帮助表示真诚的感谢!

参 考 文 献

[1] Abou El, Naga IF, Negm AY. Morphology, histochemistry and infectivity of *Blastocystis hominis* cyst[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2001, 31: 627-635.

[2] He LJ, Su YP, Yan QY, et al. Research on morphology and pathogenicity of *Blastocystis hominis* [J]. Chin J Parasit Dis Control, 1999, 112: 195, 196, Cover 3. (in Chinese)
(贺丽君, 苏云普, 颜秋叶, 等. 人芽囊原虫的形态观察及致病性研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, 112: 195, 196, 封 3.)

[3] Kaneda Y, Horiki N, Cheng X, et al. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals[J]. Tokai J Exp Clin Med, 2000, 25(2): 51-56.

[4] Mahmoud MS, Saleh WA. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2003, 33(1): 13-30.

[5] Su QP, Su JH, Xie ML, et al. Preliminary study on epidemiologic survey, clinical observation and pathogenic mechanism of *Blastocystis hominis*[J]. Chin J Zoonosis, 1994, 10(3): 41-43. (in

Chinese)
(苏庆平, 苏经华, 谢曼凌, 等. 人芽囊原虫的流调、临床观察和致病机制初探[J]. 中国人兽共患病杂志, 1994, 10(3): 41-43.)

[6] Walderich B, Bernauer S, Renner M, et al. Cytopathic effects of *Blastocystis hominis* on Chinese hamster ovary (CHO) and adenocarcinoma HT29 cell cultures[J]. Trop Med Int Hlth, 1998, 3: 385-390.

[7] Long HY, Handschack A, Konig W, et al. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells[J]. Parasitol Res, 2001, 87: 1029-1030.

[8] Dageci H, Ustun S, Taner MS, et al. Protozoan infections and intestinal permeability [J]. Acta Trop, 2002, 81: 1-5.

[9] Cironi O, Giacometti A, Drenaggi D, et al. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts[J]. Eur J Epidemiol, 1999, 15: 389-393.

[10] Tasova Y, Sahin B, Koltas SP, et al. Clinical significance and frequency of *Blastocystis hominis* in Turkish patients with hematological malignancy[J]. Acta Med Okayama, 2000, 54: 133-136.
(收稿日期: 2005-08-22 编辑: 富秀兰)

文章编号: 1000-7423(2006)-03-0191-01

【病例报告】

脑膜炎型脑囊尾蚴病误诊致双目失明 1 例报告

王新高, 王春雪, 赵性泉, 颜振瀛

中图分类号: R532.333 文献标识码: D

患者女性, 22 岁, 学生, 山西大同人。患者因头痛、呕吐 4 年余, 双眼视物不清约 10 个月, 失明 20 d, 于 2005 年 10 月 25 日来本院就诊。4 年前, 患者无明显诱因出现间歇性头痛, 呈全头痛, 时伴有呕吐, 未作任何处理。随后症状逐渐加重, 头痛持续时间延长, 并出现视力模糊。于 2005 年 10 月 3 日突然双目失明。自发病以来, 患者饮食睡眠尚可, 但记忆力减退, 无发热及小便失禁。既往无养鸽史、结核接触史和头外伤史。平时月经正常。查体: 一般状况可, 血压 120/75 mmHg, 神清, 语利, 双侧瞳孔等大等圆, 光反射迟钝, 双目失明, 无光感, 眼底苍白, 视乳头边界不清, 面纹称, 伸舌中, 四肢肌力肌张力正常, 双侧病理征 (-), 颈略强, 颈胸 1 指, 布氏、克氏征 (-), 感觉系统检查未见异常, 指鼻及跟膝胫试验稳准。发病期间, 患者曾到过多家医院就诊, 行头部 CT 和脑脊液检查, 均未确诊。行腰穿检查: 颅压 295 mmH₂O。脑脊液常规: 外观清晰, 潘氏 (-), 细胞总数 250/μl, 白细胞数 240/μl, 单核细胞 90%, 多核细胞 10%。脑脊液生化分析: 蛋白 293 mg/L, 氯化物 126 mmol/L, 糖 0.6 mmol/L。脑脊液细胞学: 以淋巴细胞为主, 伴嗜酸粒细胞轻微增多 (占 1.5%), 怀疑为脑囊尾蚴病。追问病史, 患者诉近 2 个月来有发作性的右上肢不自主抽动, 持续数秒钟, 因无意识丧失及其他不适, 未引起重视。进一步复习患者初期就诊 (2003 年 7 月 14 日) 的头部 CT 片发现: 左侧大脑半球灰白质交界处有数个小钙化点。本次入院后, 再行腰穿, 颅压 > 330 mmH₂O, 分别进行血、脑脊液 ELISA 囊尾蚴抗体检测 (另 1 份送北京协和医院检测), 结果均为阳性。结合患者的临床表现和其他辅助诊断, 最终诊断为慢性脑膜炎、脑囊尾蚴病及症状性癫痫。建议患者住院行脑脊液分流手术, 因家庭经济情况

原因未被采纳, 也未作抗囊尾蚴病治疗, 仅以卡马西平 (200 mg, 2 次/d, 长期口服) 控制癫痫发作, 以复方甘油合剂或静点甘露醇缓解头痛、呕吐等高血压症状。3 个月后随访, 患者仍双目失明, 头痛, 间有呕吐, 但右上肢不自主抽动消失。

讨论

脑囊尾蚴病是猪带绦虫幼虫 (囊尾蚴) 寄生于脑组织形成包囊所致, 是一种常见的中枢神经系统寄生虫感染, 主要流行于东北、华北、西北和山东一带。脑囊尾蚴病按临床表现可分为 5 型: 癫痫型、颅高压型、脑膜炎型、精神障碍型及脊髓型。脑膜炎型脑囊尾蚴病因其临床表现、脑脊液改变与其他原因引起的脑膜炎十分相似, 而容易误诊, 周洁信等^[1]报道脑囊尾蚴病误诊率为 59.3%, 而万里妹等^[2]报道该病误诊率高达 60.7%。本例患者发病 4 年来, 一直误诊且未进行适当的治疗, 以至发生梗阻性脑积水, 而未进行脑脊液分流术, 致使双目失明, 误诊教训深刻。因此对脑膜炎型脑囊尾蚴病的诊治问题须引起临床医务人员的高度重视。

参 考 文 献

[1] Zhou JX, Jin HW. Misdiagnostic analyses of 35 cases with meningitic neurocysticercosis[J]. Chin J Parasit Dis Control, 1999, 12: 209. (in Chinese)
(周洁信, 金宏伟. 脑膜炎型脑囊虫病误诊 35 例分析[J]. 中国寄生虫病防治杂志, 1999, 12: 209.)

[2] Wan LS, Sun YJ, Wang NN. Diagnostic analyses of 28 cases report of meningitis type neurocysticercosis [J]. Clin Misdiagnosis Mistherapy, 2004, 17(1): 30. (in Chinese)
(万里妹, 孙英杰, 王囡囡. 脑膜炎型脑囊虫病 28 例诊断分析[J]. 临床误诊误治, 2004, 17(1): 30.)

(收稿日期: 2006-01-04 编辑: 盛慧锋)