

文章编号:1000-7423(2001)-03-0169-04

【实验报道】

## 人芽囊原虫的形态与超微结构

何妮<sup>1</sup> 张月清<sup>1</sup> 洪明理<sup>2</sup> 丛敏<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 观察人芽囊原虫的形态与超微结构。方法 对人芽囊原虫培养 4~5 d 的培养物进行多种染色后置光镜下观察形态结构,同时经过4%的戊二醛固定处理后在透射电镜下观察超微结构。结果 人芽囊原虫形态有空泡型、颗粒型、阿米巴型、复分裂型及包囊型等。分裂方式有二分裂方式及孢子分裂方式。透射电镜下可见虫体内含有细胞核、线粒体、粗面内质网、脂滴和溶酶体等细胞器,泡状结构内含有糖原颗粒。结论 人芽囊原虫空泡型的泡状结构可能与储留排泄物有关,阿米巴型可能系该虫的致病类型。

**【关键词】** 人芽囊原虫;形态;超微结构

中图分类号:R382.9

文献标识码:B

Morphological and Ultrastructural Observation of *Blastocystis hominis*HE Ni<sup>1</sup>, ZHANG Yue-qing<sup>1</sup>, HONG Ming-li<sup>2</sup>, CONG Min<sup>2</sup>

(Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing 100050)

**【Abstract】 Objective** To observe the morphology and ultrastructure of *Blastocystis hominis*. **Methods** Morphological observation was made with 4-5 days cultured *B. hominis* by light microscopy, and similar material fixed with 4% glutaraldehyde was used for transmission electron microscopy. **Results** Several forms of *B. hominis* were observed including vacuolar, granular, amebic, multifission and cystic forms. The multiplication patterns of *B. hominis* included both binary fission and sporogony. Under transmission electron microscope, the nuclei, mitochondria, rough endoplasmic reticula and lysosomes were observed in addition to lipid droplets in its cytoplasm, and glycogen in the central vacuole. **Conclusion** The central vacuole of vacuolar form may be related to the storage of the excreta. The amebic form of *B. hominis* might be pathogenic.

**【Key words】** *Blastocystis hominis*, morphology, ultrastructure

人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*, *B. h.*),是一种新近归属于芽囊原虫亚门的寄生于人和其它哺乳类动物的原虫<sup>[1]</sup>。分布范围广,涉及宿主较多,其分类地位和致病性等方面学术界颇有争议。该物种自1848年发现以来,曾被错误划归于酵母菌。20世纪中期 Zierdt(1967)对其生理、生化及培养等方面进行了研究,并确定为原虫。Zierdt等<sup>[2]</sup>发表“人芽囊原虫——一种长期被误解的肠道寄生虫”,引起学者们的广泛兴趣。随后国内外学者对该虫形态特征进行了较详尽的光学和超微结构的研究<sup>[3,4]</sup>。结合其生活史进行了空泡型与包囊型相互转化过程中形态变化的研究<sup>[5,6]</sup>。何建国等<sup>[7]</sup>对该原虫进行了详细的形态学研究。江静波等<sup>[8]</sup>采用细胞组织化学方法对*B. h.*琥珀酸脱氢酶进行了定性定位研究,探讨*B. h.*线粒体的形态和功能。本文将培养4~5 d的虫体经过多种常规的和特殊的组织化学染色后在光

镜下观察,同时将该标本经4%戊二醛固定处理后用透射电镜观察超微结构,以对虫体进行较系统的形态学比较。

## 材料与方法

## 1 虫株来源与处理

本实验采用的3个虫株(NBD株、NBC株和HBC株)均自江西赣南居民粪便中分离。NBD株取自有症状成年男性,NBC株和HBC株均取自无症状儿童。该3种*B. h.*皆由赣南医学院寄生虫学教研室吴国宏教授提供。

将3株*B. h.*分别放入鸡蛋斜面培养基(含20%马血清的洛克溶液)中,置35℃温箱培养。培养4~5 d的*B. h.*,以pH7.2 PBS液或生理盐水洗涤,220 g离心3次,每次5 min,去上清,取沉淀物(虫体)染色。

## 2 普通染色标本的制备

三色酸染色(trichrome stain)、瑞氏染色

作者单位:

1 北京热带医学研究所,北京 100050;

2 首都医科大学附属北京友谊医院实验中心,北京 100050

(Wright stain)、油红O染色(Oil red stain)和PAS染色(PAS stain)方法,参照《组织化学与免疫组织化学》(首都医科大学教材,1995年版)。染色过程为:虫体涂片→(固定液)固定→(不同染色液)染色→冲洗→明胶封片→显微镜下观察并摄影。

2.1 三色酸染色 肖氏固定液(Schaudinn's fixation)固定,三色酸染色液染色。将部分标本用蒸馏水处理后同法固定染色。

2.2 瑞氏染色 10%甲醛溶液固定,pH6.27的瑞氏染色液染色10 min。同时将部分标本溶血,孵育1 h后再按上法固定与染色。

2.3 油红O染色 甲醛-钙固定液固定,油红O染色液染色。

2.4 PAS染色 Carnoy固定液固定,PAS液染色。

### 3 吖啶橙染色标本制备

将虫体制成涂片,加入1‰吖啶橙溶液(pH7.2),置Olympus荧光显微镜紫外光下观察并摄影。

### 4 透射电镜标本制备

将沉淀物加入20%马血清洛克溶液,220 g离心5 min,去上清,加入4%戊二醛前固定,饿酸后固定,环氧树脂618号包埋,半薄切片定位,LEICA切片超薄切片,铀-铅染色后,置JEM-1200EX透射电镜下观察。

## 结 果

光镜下观察培养4~5 d的*B. h.*普通染色标本,可见大量空泡型虫体(图1)及少量阿米巴型虫体,但未见颗粒型虫体。电镜及荧光显微镜下见类似包囊型、颗粒型及复分裂型虫体。

#### 1 光学显微镜下观察普通染色标本

1.1 三色酸染色标本 光镜下观察以空泡型为主。多数直径为5.0~15.0 μm,虫体中央有一着色浅淡的泡状结构(center body即空泡)。胞浆浓染呈绿色新月状于虫体细胞膜与空泡膜之间,细胞核与核外染色体棒(chromidial bar)呈红色。用蒸馏水处理标本,可将滋养体溶解破坏再进行涂片染色,所观察的虫体较小,无明显泡状结构,红染的细胞核与核外染色体棒明显增多(图2)。

1.2 瑞氏染色标本 溶血孵育前的染色标本与溶血孵育1 h后的染色标本对比观察显示:孵育前与孵育后1 h虫体泡状结构内均未出现明显溶血样物质,仅胞浆出现该染色现象。由此推测泡状结构可能非*B. h.*摄食消化的场所(图3,图4)。

1.3 油红O染色标本 虫体胞浆结构内见红色脂滴,其数量及其大小不一。结合电镜照片推测脂滴存在于泡状结构的外围胞浆结构内(图5)。

1.4 PAS染色标本 虫体的泡状结构内显示PAS阳性紫红色沉淀物质,该物质一般为糖原或粘液物质(图6)。

1.5 吖啶橙染色标本 在荧光显微镜紫外光下观察,虫体透明,轮廓清晰,形态呈卵圆型或近卵圆型,细胞内可见淡绿色泡状结构和染成桔黄色的RNA样物质。此外,见部分虫体表面有数个‘出芽状’突起的子代个体(图7,图8)。

### 2 电镜标本的观察

*B. h.*以空泡型为主,其直径为5.0~15.0 μm,呈圆形或卵圆型,中间有一较大的透明泡状结构,内含数量不等的糖原颗粒物质。细胞核位于虫体周缘,单核或双核,圆形或类圆形,核直径约为2.8 μm,核膜内集聚块状的异染色质。线粒体一般1~4个,圆形或卵圆型,直径为1.0~1.4 μm,细胞核与线粒体周围聚集大量的粗面内质网,核附近可见高尔基复合体。泡状结构外围有大小不等的脂滴颗粒。此外,胞浆内见溶酶体样结构,部分虫体细胞膜上有微孔结构。虫体外有一层疏松的细胞外衣,厚度约100 nm,其上有纤维状突起,并粘附着细菌和同类虫体(图9)。

阿米巴型虫体形态不规则,可见伪足突起,在泡状结构内电子致密度增加(图9)。此外,在少数虫体的泡状结构内充满由大量致密颗粒,管泡状结构交替组成的高电子致密团。周围胞浆密度低,含大小形态不同的小泡状结构,细胞核异染色质比例增加。虫体外衣菲薄。该结构与何建国描述的颗粒型,Moore等描述的包囊型向空泡型转换的中间阶段相似<sup>[7,9]</sup>(图10)。较少数虫体体积较小,直径为3.2~5.5 μm,单核,含1~6个线粒体,线粒体稀少,胞浆电子致密度极高,细胞壁上有微孔,外被厚约100 nm左右不连续的细胞外衣。该结构与某些学者描述的包囊期形态相似(图9)。

复分裂型虫体内含多核,核与核之间胞质相连,

将泡状结构分隔成多个小“泡状结构”，该结构与何建国报道的相似<sup>[7]</sup>。

## 讨 论

多数学者认为 *B. h.* 有 3 种基本类型：空泡型、阿米巴型及颗粒型。近年研究尚提到复分裂型和包囊型。在包囊型中又可分为两种不同类型<sup>[4,7]</sup>。

在用光镜观察的各种染色标本中，仅见空泡型与阿米巴型，未见颗粒型。本文结果与某些学者所研究的结果相一致<sup>[5,10]</sup>。电镜观察虫体的超微结构时，除发现常见的空泡型和阿米巴型外，可见类似颗粒型、复分裂型和包囊型的虫体，但未见包囊型中有形态区别，也未见 3 株虫体之间有明显的形态区别。

关于 *B. h.* 空泡型泡状结构的功能，一般有代谢、繁殖和物质储存功能等 3 种假说。本研究发现在泡状结构内含糖原及粘液等物质，而脂滴存于泡状结构外围的胞浆内。推测泡状结构可能与排泄物滞留有关。

阿米巴型在普通培养物、成囊培养物及新鲜标本中均可见。Suresh 等<sup>[5]</sup>认为该型能吞噬细菌，可能为包囊形成做营养准备。文献报道阿米巴型在急性患者粪便中更为常见。提示阿米巴型可能系 *B. h.* 的致病型。

颗粒型，常见于培养时间长、营养欠佳、加入抗虫药的培养基及血清浓度过高的培养基中。而我们观察的标本是在正常传代，营养状况良好的条件下获得。这可能是光镜下未观察到典型颗粒型虫体的原因之一。电镜下的类颗粒型虫体与何建国等<sup>[7]</sup>描述的颗粒型及 Moe 等<sup>[9]</sup>所描述的包囊型向空泡型转化的过渡形态结构相似。据此推测，颗粒型可能并非本虫的基本生活类型<sup>[9]</sup>，而可能是发育过程中的过渡阶段或异常状态下的病理表现。

复分裂型，何建国等<sup>[7]</sup>的研究中曾提到该类型。我们在超微结构及吖啶橙染色标本中也见到了此型，并可见在母体表面产生的“出芽状”子代虫体。因此，我们认为本虫存有复分裂型并以孢子分裂方式进行繁殖。该方式曾有学者<sup>[11,12]</sup>提过，但未做详细论述。

本研究观察到包囊型虫体内含较多的 RNA 样物质。出现此种情况的原因可能与蛋白合成功能增

强有关。Moe 研究中指出包囊型虫体较能抵御外界不良环境，有利于 *B. h.* 的生存和传播。

*B. h.* 电镜标本中，可见胞浆内溶酶体，而在瑞氏染色标本中也见到与溶血孵育后虫体胞浆内出现溶血样物质。这提示 *B. h.* 可能通过细胞吞噬作用摄取营养物质，并于胞浆内进行消化吸收，该消化功能估计与泡状结构无关。

Zeman 等<sup>[4]</sup>的研究指出 *B. h.* 包囊型形态有两种区别，一种在囊壁外有纤维外衣，另一种则没有纤维外衣。而我们的观察中未见这两种形态区别。Stenzel 等<sup>[3]</sup>对包囊研究中提到虫体外衣与虫体囊壁之间有糖原颗粒、脂滴及不明颗粒物质。我们也未见到这些物质，出现上述现象的原因，可能与我们的标本制作有关。

致谢 感谢首都医科大学组织胚胎学教研室曾小蓓和孟庆峰老师在标本染色和摄影过程中给予的热忱帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Jiang TB, He TG. Taxonomy status of *Blastocystis hominis*. Parasitol Today, 1993, 9: 2-3.
- [2] Zierdt CH, Ng GC, Ho LC, et al. *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. Parasitol Today, 1988, 4: 15-17.
- [3] Stenzel DJ, Lee MG, Boregam PFL, et al. Morphological differences in *Blastocystis* cysts — an indication of different species. Parasitol Res, 1997, 83: 452-457.
- [4] Zeman V, Howe J, Ng M, et al. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. J Eukaryot Microbiol, 1995, 83: 306-308.
- [5] Suresh K, Howe J, Chong SY, et al. Ultrastructure changes during *in vitro* encystment of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res, 1994, 84: 327-335.
- [6] Moe KT, Singh M, Howe J, et al. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms *in vitro*. Parasitol Res, 1999, 85: 103-108.
- [7] 何建国, 江静波, 周宏, 等. 人芽囊原虫的光学和超微结构研究. 中山大学学报(自然科学版), 1990, 3: 29.
- [8] 江静波, 何建国. 人芽囊原虫琥珀酸脱氢酶定性定位研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1993, 11: 298-299.
- [9] Moe KT, Singh M, Howe J, et al. Observation on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human faces. Parasitol Res, 1996, 82: 439-444.
- [10] Lamza MD. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. Parasitol Res, 1997, 83: 60-63.
- [11] Suresh K, Ng GC, Ho LC, et al. Differentiation of various stages of *Blastocystis hominis* by acridine orange stains. J Parasitol, 1994, 24: 605-666.
- [12] Zierdt CH, Williams RL. *Blastocystis hominis* axenic cultivation. Exp Parasitol, 1974, 36: 233-243.

(收稿日期: 2000-06-12 编辑: 李雅卿)

将泡状结构分隔成多个小“泡状结构”，该结构与何建国报道的相似<sup>[7]</sup>。

## 讨 论

多数学者认为 *B. h.* 有 3 种基本类型：空泡型、阿米巴型及颗粒型。近年研究尚提到复分裂型和包囊型。在包囊型中又可分为两种不同类型<sup>[4,7]</sup>。

在用光镜观察的各种染色标本中，仅见空泡型与阿米巴型，未见颗粒型。本文结果与某些学者所研究的结果相一致<sup>[5,10]</sup>。电镜观察虫体的超微结构时，除发现常见的空泡型和阿米巴型外，可见类似颗粒型、复分裂型和包囊型的虫体，但未见包囊型中有形态区别，也未见 3 株虫体之间有明显的形态区别。

关于 *B. h.* 空泡型泡状结构的功能，一般有代谢、繁殖和物质储存功能等 3 种假说。本研究发现在泡状结构内含糖原及粘液等物质，而脂滴存于泡状结构外围的胞浆内。推测泡状结构可能与排泄物滞留有关。

阿米巴型在普通培养物、成囊培养物及新鲜标本中均可见。Suresh 等<sup>[5]</sup>认为该型能吞噬细菌，可能为包囊形成做营养准备。文献报道阿米巴型在急性患者粪便中更为常见。提示阿米巴型可能系 *B. h.* 的致病型。

颗粒型，常见于培养时间长、营养欠佳、加入抗虫药的培养基及血清浓度过高的培养基中。而我们观察的标本是在正常传代，营养状况良好的条件下获得。这可能是光镜下未观察到典型颗粒型虫体的原因之一。电镜下的类颗粒型虫体与何建国等<sup>[7]</sup>描述的颗粒型及 Moe 等<sup>[9]</sup>所描述的包囊型向空泡型转化的过渡形态结构相似。据此推测，颗粒型可能并非本虫的基本生活类型<sup>[9]</sup>，而可能是发育过程中的过渡阶段或异常状态下的病理表现。

复分裂型，何建国等<sup>[7]</sup>的研究中曾提到该类型。我们在超微结构及吖啶橙染色标本中也见到了此型，并可见在母体表面产生的“出芽状”子代虫体。因此，我们认为本虫存有复分裂型并以孢子分裂方式进行繁殖。该方式曾有学者<sup>[11,12]</sup>提过，但未做详细论述。

本研究观察到包囊型虫体内含较多的 RNA 样物质。出现此种情况的原因可能与蛋白合成功能增

强有关。Moe 研究中指出包囊型虫体较能抵御外界不良环境，有利于 *B. h.* 的生存和传播。

*B. h.* 电镜标本中，可见胞浆内溶酶体，而在瑞氏染色标本中也见到与溶血孵育后虫体胞浆内出现溶血样物质。这提示 *B. h.* 可能通过细胞吞噬作用摄取营养物质，并于胞浆内进行消化吸收，该消化功能估计与泡状结构无关。

Zeman 等<sup>[4]</sup>的研究指出 *B. h.* 包囊型形态有两种区别，一种在囊壁外有纤维外衣，另一种则没有纤维外衣。而我们的观察中未见这两种形态区别。Stenzel 等<sup>[3]</sup>对包囊研究中提到虫体外衣与虫体囊壁之间有糖原颗粒、脂滴及不明颗粒物质。我们也未见到这些物质，出现上述现象的原因，可能与我们的标本制作有关。

致谢 感谢首都医科大学组织胚胎学教研室曾小蓓和孟庆峰老师在标本染色和摄影过程中给予的热忱帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Jiang TB, He TG. Taxonomy status of *Blastocystis hominis*. Parasitol Today, 1993, 9: 2-3.
- [2] Zierdt CH, Ng GC, Ho LC, et al. *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. Parasitol Today, 1988, 4: 15-17.
- [3] Stenzel DJ, Lee MG, Boregam PFL, et al. Morphological differences in *Blastocystis* cysts — an indication of different species. Parasitol Res, 1997, 83: 452-457.
- [4] Zeman V, Howe J, Ng M, et al. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. J Eukaryot Microbiol, 1995, 83: 306-308.
- [5] Suresh K, Howe J, Chong SY, et al. Ultrastructure changes during *in vitro* encystment of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res, 1994, 84: 327-335.
- [6] Moe KT, Singh M, Howe J, et al. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms *in vitro*. Parasitol Res, 1999, 85: 103-108.
- [7] 何建国, 江静波, 周宏, 等. 人芽囊原虫的光学和超微结构研究. 中山大学学报(自然科学版), 1990, 3: 29.
- [8] 江静波, 何建国. 人芽囊原虫琥珀酸脱氢酶定性定位研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1993, 11: 298-299.
- [9] Moe KT, Singh M, Howe J, et al. Observation on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human faces. Parasitol Res, 1996, 82: 439-444.
- [10] Lamza MD. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. Parasitol Res, 1997, 83: 60-63.
- [11] Suresh K, Ng GC, Ho LC, et al. Differentiation of various stages of *Blastocystis hominis* by acridine orange stains. J Parasitol, 1994, 24: 605-666.
- [12] Zierdt CH, Williams RL. *Blastocystis hominis* axenic cultivation. Exp Parasitol, 1974, 36: 233-243.

(收稿日期: 2000-06-12 编辑: 李雅卿)