

文章编号: 1000-7423(2008)-05-0397-02

【研究简报】

## 改良吉氏染色法观察体外培养的阴道毛滴虫分裂繁殖

方正明\*, 邓伟文, 朱红刚, 杨振德, 刘建军

【摘要】 采用改良吉氏染色法观察体外培养的阴道毛滴虫分裂相。结果显示, 分裂间期为 66.5%, 二分裂期为 24.1%, 多分裂期为 9.4%。二分裂虫体可划分为前有丝分裂期、前期、中期、后期和末期。多分裂虫体可见含 3~7 或 8 个子体, 其中含 3 和 4 个子体的分别占 69.1% 和 24.5%。还可见一些形态异常虫体。

【关键词】 阴道毛滴虫; 分裂; 吉氏染色法

中图分类号: R382.211 文献标识码: B

## Observation on Mitosis of *Trichomonas vaginalis* Cultivated in vitro Using Modified Giemsa Staining

FANG Zheng-ming\*, DENG Wei-wen, ZHU Hong-gang, YANG Zhen-de, LIU Jian-jun

(Department of Parasitology and Microbiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 The observation showed that the percentage of *Trichomonas vaginalis* trophozoites at the stages of interphase, binary fission and multiple fission was 66.5%, 24.1% and 9.4% respectively. Cells in binary fission could be classified as premitosis phase, prophase, metaphase, anaphase and telophase. 3 to 8 microcosms were seen in one trophozoite under multiple fission and the percentage of trophozoites with 3 and 4 microcosms occupied 69% and 24.5% respectively. Cells with abnormal morphs were also observed.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*; Mitosis; Giemsa staining

Supported by the Experiment Technology Research Program, Huazhong University of Science and Technology (No. 40)

\* Corresponding author, E-mail: fzm@mails.tjmu.edu.cn

阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*) 寄生在男女泌尿生殖道, 引起女性阴道炎及男性尿道炎和前列腺炎等滴虫病, 虫体营二分裂和多分裂法繁殖。本研究用改良的吉氏染色法体外观察其二分裂和多分裂繁殖情况, 报告如下。

### 1 材料与方 法

1.1 阴道毛滴虫 2007 年 6 月由武汉协和医院门诊部自阴道毛滴虫病患者 (女, 31 岁, 武汉市人) 阴道后穹窿分泌物中采集, 经生理盐水涂片、镜检, 查见阴道毛滴虫活虫体, 并于当日及时接种。

1.2 体外培养 肝-豚-糖培养基制备: 取新鲜牛肝 15 g, 剪成小块置 100 ml 纯水中煮沸 30 min, 用纱布滤除残渣, 加蛋白胨 2.0 g、盐酸半胱氨酸 0.2 g、麦芽糖 1.0 g 和 NaCl 0.5 g, 溶解后用滤纸过滤, pH 值调至 5.6~5.8, 分装试管各 8 ml, 高压灭菌后置 4 °C 冰箱保存, 7 d 内使用。用前每管加无菌灭活小牛血清 2 ml (含青霉素 1000 U 和链霉素 1 mg)。取上述患者阴道分泌物标本 20  $\mu$ l, 接种于试管中, 置(36.5 $\pm$ 0.5) °C 恒温箱培养

48 h。

1.3 制作标本片及显微镜观察 取管底部含密集虫体的培养基 1 ml, 置 1.5 ml 离心管, 用吸管吹吸混匀, 取 10  $\mu$ l 虫体悬液涂制直径为 20 mm 的薄膜玻片标本, 自然干燥后立即浸入甲醇固定 10 min。用 pH7.0 的 PBS 将吉氏染液按 1:15 稀释后滴于薄膜, 置湿盘中染色 12 h, 自来水冲洗, 晾干。摄影显微镜 (NIKON, 日本) 观察及拍摄 (KODAK200 彩色胶卷) 虫体分裂相照片。

1.4 统计学分析 随机观察 1000 个虫体, 计数各类分裂相虫数及百分比。

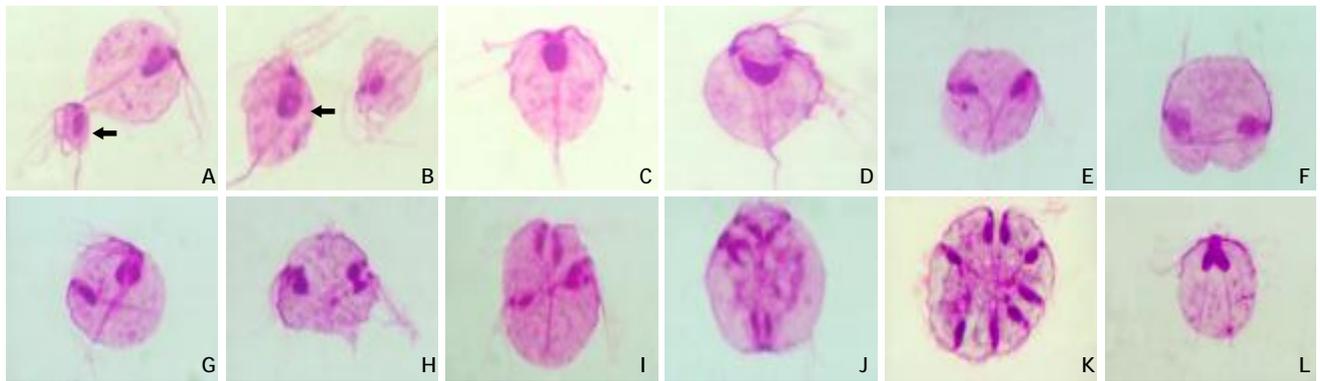
### 2 结果

2.1 虫体形态 典型虫体形态, 大小正常的分裂间期虫体, 其前鞭毛、波动膜、核、轴柱、毛基体、基染色杆及副基纤维清晰可见。小型虫体, 细胞核大小正常, 细胞质较少, 细胞器结构齐全 (图 1 A)。前有丝分裂期 (premitosis phase), 核体积增大, 前鞭毛数量多于 4 根 (图 1 B)。二分裂前期 (prophase), 1 个核, 鞭毛、波动膜及毛基体轴柱已复制完毕 (图 1 C)。二分裂中期 (metaphase), 核出现凹痕, 鞭毛、波动膜及毛基体向两极移动 (图 1 D)。二分裂后期 (anaphase), 2 个核分离, 形成镜像对称的 2 个子体 (图 1 E)。二分裂末期 (telophase), 胞

基金项目: 华中科技大学 2007 年实验技术研究项目 (No. 40)

作者单位: 华中科技大学同济医学院病原生物学系, 武汉 430030

\* 通讯作者, E-mail: fzm@mails.tjmu.edu.cn



A: 小型虫体, B: 前有丝分裂期, C: 前期, D: 中期, E: 后期, F: 末期, G: 3 核虫体, H: 4 核虫体, I: 5 核虫体, J: 6 核虫体, K: 8 核虫体, L: 核与鞭毛和轴柱等同步复制的虫体。

图 1 改良吉氏染色法体外观察阴道毛滴虫分裂繁殖图 (×1000)

质出现凹痕 (图 1 F)。多分裂虫体, 其中 1 对 3 核虫体呈对称排列 (图 1 G), 2 对 4 核虫体呈对称排列 (图 1 H), 2 对 5 核虫体呈对称排列 (图 1 I), 3 对 6 核虫体呈对称排列 (图 1 J), 8 核虫体 (图 1 K)。非典型形态, 可见无核滋养体, 以及核、鞭毛和轴柱等同步复制的虫体 (图 1 L)。

2.2 各类分裂相的百分比 随机观察 1 000 个虫体, 66.5% (665/1 000) 处于分裂间期, 24.1% (241/1 000) 营二分裂, 9.4% (94/1 000) 营多分裂。分裂间期的虫体, 73% (486/665) 大小正常, 27% (179/665) 为小型虫体。二分裂期各期比例为: 前有丝分裂期 3.5% (8/241)、前期 2% (5/241)、中期 14.5% (35/241)、后期 75% (181/241)、末期 5% (12/241)。

营多分裂的虫体中, 3 核占 69.1% (65/94)、4 核占 24.4% (23/94)、5 核占 4.5% (4/94)、6 核占 1% (1/94)、7 核占 1% (1/94) 及 8 核为 0 (0/94)。

### 3 讨论

吉氏染色法是常用的染色方法之一, 在涂片、固定和染色时间方面经过改进, 用于阴道毛滴虫染色, 其鞭毛、波动膜、核、轴柱、毛基体、基染色杆和副基纤维等清晰可见, 虫体形态自然<sup>[1, 2]</sup>。

对于阴道毛滴虫分裂繁殖的研究, 多采用电子显微镜以及荧光标记技术进行活体连续观察<sup>[3-5]</sup>。作者认为, 这些方法不便于观察大量虫体, 对于发育过程中出现时间短暂的虫体、或数量极少的变异虫体易遗漏。本研究取样涂制标本片, 将体外培养的阴道毛滴虫瞬间“定格”, 用改良吉氏染色法, 虫体结构清晰, 形态自然, 便于观察。

本研究根据细胞有丝分裂规律结合阴道毛滴虫吉氏染色形态特点, 将阴道毛滴虫分裂过程划分为分裂间期、前有丝分裂期、前期、中期、后期和末期等 6 期, 与 Ribeiro 等<sup>[5]</sup>的划分相同。还查见一些处于分裂间期的小型虫体 (占分裂间期虫数的 27%), 但未见处于二分裂分裂期的小型虫体。推测这些小型虫体可能来自多分裂繁殖。细胞分裂周期中各期细胞相对数量

间接反映了各期细胞发育持续时间的长短。本实验结果显示, 阴道毛滴虫分裂期的后期 (胞质分离期) 持续时间最长, 其次是中期。关于多分裂繁殖的虫体结构, 子体多呈对称排列, 提示多分裂虫体可能是由虫体内的连续二分裂形成的。其中, 内含子体数目较少的虫体比例较高, 如 3 和 4 核虫体分别占 69.0% 和 24.5%。这可能是由于子体数目多的母体易裂解等原因。Ribeiro 等<sup>[5]</sup>认为鞭毛、轴柱和基体等结构在核分裂前已复制完毕。本研究显示的大多数虫体分裂相特征支持以上观点, 但同时发现部分虫体的非典型形态特征, 即核与鞭毛、轴柱和基体等同步复制。还发现极少数无核滋养体, 其可否继续生长发育, 有待进一步活体观察研究。

本研究用改良吉氏染色法, 观察体外培养的阴道毛滴虫分裂繁殖情况, 简便易行, 标本保存已有 8 年仍未褪色。可为抗滴虫药物的筛选及药物作用机制研究提供方便。

### 参 考 文 献

- [1] Fang ZM. A modified method for preparation of *Trichomonas vaginalis* specimen [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, 19 (1): 55. (in Chinese)  
(方正明. 阴道毛滴虫标本制作的改良方法 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19 (1): 55.)
- [2] Fang ZM. Effect of smear thickness on the morphology of protozoan parasites in specimen preparation [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002, 20 (4): 215. (in Chinese)  
(方正明. 原虫玻片标本制作中涂片厚度对原虫结构的影响 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20 (4): 215.)
- [3] Zuo YT, Riley DE, Krieger JN. Flagellar duplication and migration during the *Trichomonas vaginalis* cell cycle [J]. J Parasitol, 1999, 85 (2): 203-207.
- [4] Gómez CE, Mena LR, Hernández J, et al. *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis [J]. Exp Parasitol, 2000, 96 (1): 130-138.
- [5] Ribeiro KC, Monteiro LH, Benchimol M. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis* [J]. J Eukaryot Microbiol, 2000, 47 (5): 481-492.

(收稿日期: 2008-03-27 编辑: 富秀兰)