

斯氏艾美耳球虫小配子的发育及其超微结构

索勋¹ 孔繁瑶¹ 李安兴² 殷佩云¹

(1. 中国农业大学 动物医学院,北京 100094; 2. 中山大学 生命科学院,广州 510275)

摘要 结合光镜和电镜、切片和涂片技术,对斯氏艾美耳球虫(*Eimeria stiedai*)小配子发育期的超微结构进行了研究。小配子发育分2个阶段——生长与核分裂阶段及小配子的形成与分化阶段。早期小配子体单核,核仁小;随着核的分裂变为双核、四核和多核小配子体,后者因核极多,浅层分叶形成小配子体胚以利于核周边排列。各小配子体胚周边的核与嵌于核前方的线粒体向前突出并生长,最后分化形成小配子落入带虫空泡。成熟的小配子有2根鞭毛、1个大线粒体和1个强嗜碱性核、被单层膜。结果表明斯氏艾美耳球虫小配子发育遵循艾美耳属球虫小配子发育的一般规律。

关键词 斯氏艾美耳球虫;小配子;发育;超微结构

中图分类号 S 851.723

文章编号 1007-4333(2003)03-0107-06

文献标识码 A

Microgametogenesis and its ultrastructures of *Eimeria stiedai*

Suo Xun¹, Kong Fanyao¹, Li Anxing², Yin Peiyun¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Microgametogenesis and its ultrastructures of *Eimeria stiedai* ((Lindemann, 1865) Ksskalt and Hartmann 1907) were studied with light and electron microscopy. Microgametogenesis can be divided into two phases. The first is the phase of growth and reproduction of nuclei of the gametocyte. As the central mass of cytoplasm, in which there are many nuclei, grows, it separates into several parts and the nuclei become situated around each part, forming the gametoblast. The second phase of microgametogenesis begins with the appearance of the rudiments of the microgametes on the surface of the microgametocyte. These are protuberances containing nuclei, mitochondria, and basal bodies. Further development is associated with a lengthening of the newly formed rudiment, nucleus, and flagella. The posterior end of the microgamete is attached to the cytoplasm of the gametocyte, and finally the entire microgamete buds off from the surface of the gametocyte. A mature microgamete, consisting of two flagella, one mitochondrion and one nucleus, has an elongate crescent-shaped body and is enclosed by the unite membrane. The result showed that microgametogenesis of *E. stiedai* followed the general pattern of microgametogenesis of *Eimeria* spp.

Key words *Eimeria stiedai*; microgametogenesis; ultrastructure

球虫病是影响养兔业发展的重要因素之一, Hoop^[1]剖检了3 403只病死兔发现因球虫感染而病死的兔子占31%,其中*Eimeria stiedai*是主要病原之一。迄今发现,哺乳动物的艾美耳属球虫只有兔肝球虫即*E. stiedai*和貂肝球虫寄生于肝脏,其他种皆寄生于肠道;所以过去有关*E. stiedai*的生物学研究多集中在子孢子从肠腔到肝脏的移行过程^[2]。电镜技术的应用使球虫生物学研究走进超微世界,揭示出许多未知现象,其中一个代表性例子就是顶复器的发现和顶复器门(Apicomplexa Levine)概念的提

出,尽管如此,由于*E. stiedai*生活史的复杂性,其内生发育中有关子孢子的移行、裂殖生殖的代数和方式等问题尚有很多争议。有鉴于此,作者借光镜和电镜、切片和涂片诸技术相结合的手段,对其内生发育全过程及其各阶段虫体的超微结构进行了研究,兹报道*E. stiedai*小配子的发育及超微结构。

1 材料和方法

1.1 *E. stiedai* 纯种卵囊的收集和孢子化

用中国农业大学动物医学院寄生虫学研究室保

收稿日期:2003-02-06

作者简介:索勋,副教授,主要从事寄生虫免疫学、遗传学与分子生物学研究

存的孢子化 *E. stiedai* 卵囊感染 10 只 2 月龄新西兰兔(70 万个卵囊/只),21 d 后,剖杀取肝。将肝组织用匀浆机搅碎后,用 100、200 和 400 目三级铜网过滤,除去大块肝组织。取 400 目铜网滤下的球虫卵囊混悬液离心($1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 沉淀 5 min,弃上清液,沉淀物中加 2.5% 重铬酸钾液混匀,以卵囊 $1.4 \times 10^5\ \text{mL}^{-1}$ 的稀释度置大广口容器中,25℃ 温箱培养 4 d(每天摇动培养液 3 次)。将孢子化的卵囊收集到 500 mL 盐水瓶中于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 无球虫兔的培育

母兔配种后,转饲于无球虫环境里,并在每 kg 料中混入 30 mg 本室研制的抗球虫合剂,至仔兔断奶;仔兔在出生 20 d 后亦适当补以混药饲料至断奶。断奶后将仔兔移到喷烧过的兔笼上无药隔离饲养 23 日,粪检球虫,阴性兔(无球虫)留为实验用,未检出阳性兔。

1.3 感染后取材制样

1) 用孢子化卵囊经口感染,卵囊剂量为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ /只,设 3 只空白对照。21 d 后检查对照兔粪便,对照兔未被感染。

2) 感染后 2~72 h 间每隔 2 h,以及 4~15 d 间每天剖杀兔子 2 只,取其胃、肠内容物、肠粘膜、门脉血、肠系膜淋巴结、脾和肝等组织涂片;上述组织涂片用姬姆萨染色后的染片;肠、肠系膜淋巴结、脾和肝组织按常规方法固定、切片后的 HE 染色片;进行光镜观察。

3) 感染后 2~72 h 间每隔 6 h,以及 4~15 d 间每天剖杀兔子 2 只,取其肠、肠系膜淋巴结、脾和肝等组织,常规制成透射电镜样本,100S 型透射电镜观察,记录并照相。

2 结果

感染后第 13 天(即 312 h),*E. stiedai* 进入有性生殖阶段,第 4 代裂殖子侵入新的宿主细胞,其中的大部分发育为大配子体,小部分发育为小配子体并产生极多量的小配子。整个发育过程分为 2 个阶段,在宿主胆管上皮细胞内的带虫空泡中完成。

2.1 生长与核分裂阶段

侵入宿主细胞的第 4 代裂殖子包在带虫空泡里,原有结构和功能发生转化:运动阶段典型的细胞器逐渐退化,细胞体积增大,变圆,成为单核小配子体(图 1-1)。单核小配子体外被单层限制膜,限制膜

下偶见退化的原裂殖子的内膜复合体的片段。核大而圆,具明显的小核仁,位于核的一侧,核外被双层核膜,核膜上有多量核膜孔,细胞质中含大量粗面内质网和管泡型线粒体,前者多排列成束,亦或散布基质中;高尔基体常伴于核侧;一些脂肪体散在分布。带虫空泡与虫体间的空隙,有些部分大,含少量形状不定的物质;另一些空隙甚小,使得虫体表膜和宿主细胞呈松散的指状嵌合。

随后,小配子体进行核分裂,先裂为双核(图 1-2)、四核(图 1-3),最后分裂为拥有许多核的、核呈周边排列的、体积甚大的多核小配子体(图 1-4)。多核小配子体的特征是空泡数量增加,广布细胞基质中。此时,基质中仍含大量线粒体、内质网。小配子体的运动装置中心粒位于核与限制膜之间,中心锥尖部朝向中心粒(图 1-5)。

多核小配子体随着浅层的分叶,表面积大为增加,最终成为多叶小配子体(图 1-6),最后每个叶发育为椭圆形的、核位于周边的胚体(blastophore)(图 2-7)。这时,细胞基质中的线粒体融合变大,移至核与限制膜之间(图 2-8)。细胞核的染色物质呈斑块状分布于核质中和核膜下(图 2-9)。至此,小配子体已完成其生长与核分裂。

2.2 小配子的形成与分化阶段

小配子开始形成的标志是核前的限制膜向带虫空泡内突出,膜下中心粒的中央微管退化消失,转变为小配子鞭毛基粒,此后鞭毛由此生出。核质浓缩,随着限制膜的外突而向外生长,同时大量核质随之前移,后面留下一囊状残核于胞质中(图 2-10)。线粒体嵌于核前方,亦随核一起向前突出。在核与线粒体向限制膜下的空隙中突出时(这个空隙是因限制膜的外突而形成的),基质缩细,同时有一周电子致密带形成(图 2-11),使基部进一步变细,终致小配子和原配子细胞脱离,并游离于带虫空泡中。在上述整个发育过程中,小配子鞭毛亦生长加长,外被小配子体的限制膜。

游离于带虫空泡中的小配子进一步发育,鞭毛生长,体部拉长并弯曲呈月牙形,形成成熟小配子。成熟小配子的前端为电子致密的顶体,顶体下有 2 个基粒,鞭毛发自基粒,与体部成一定角度,鞭毛的微管系为典型的 9+2 模式,外被单层限制膜。小配子的线粒体和核膜外侧亦有一组微管,但个数和排列方式不易观察。

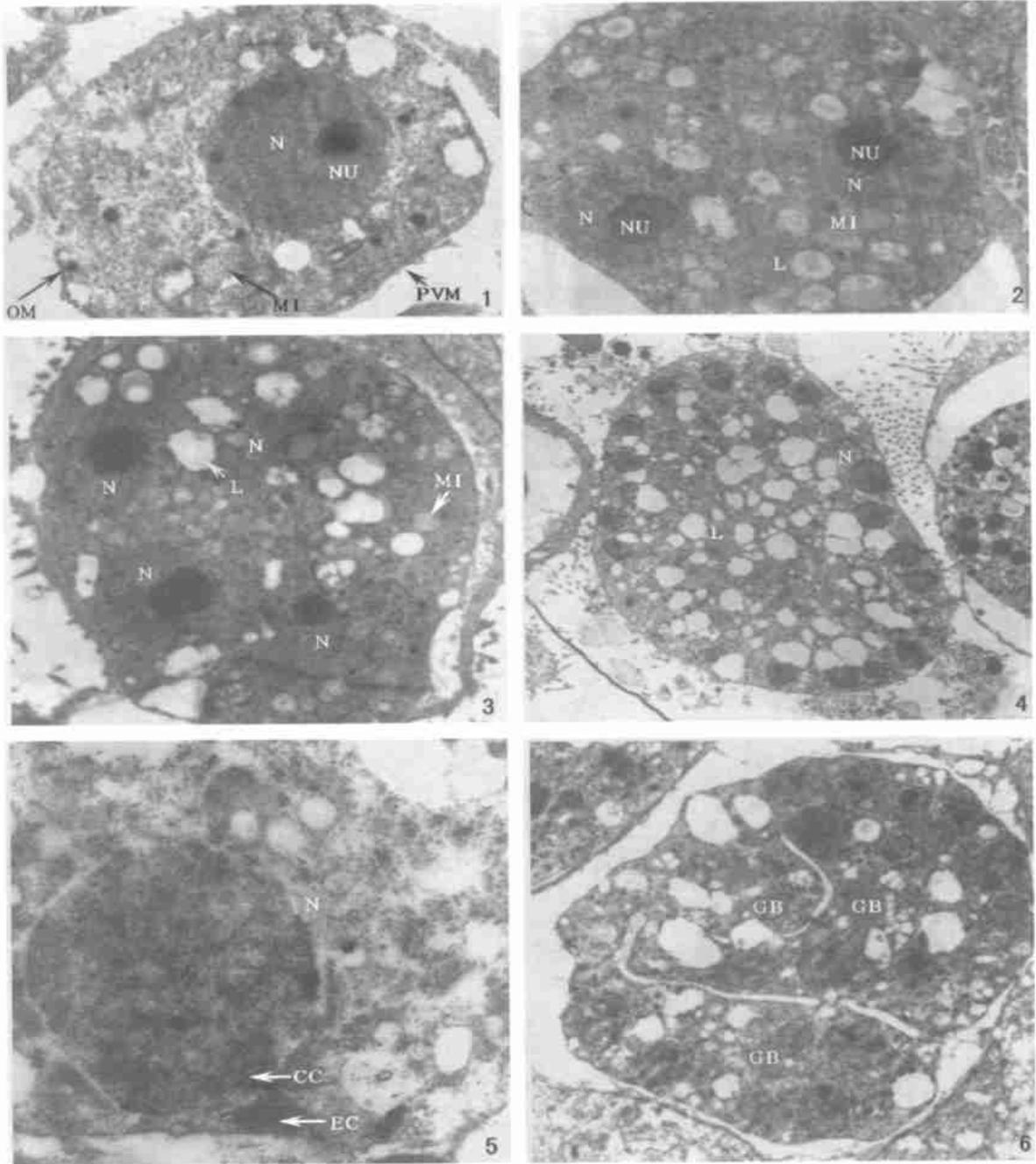


图 1 斯氏艾美耳球虫小配子的发育超微结构(1~6)

Fig. 1 Microgametogenesis and ultrastructures of *Eimeria stiedai*(1~6)

核(N), 核仁(NU), 线粒体(MI), 小配子体外膜(OM), 带虫空泡膜(PVM), 脂肪体(L), 中心锥(CC), 中心粒(CE), 多叶小配子体(GB), 残核(RN), 鞭毛(F), 电子致密板(OP), 小配子外膜(OM)

1. 感染后第 14 天, 已见有早期小配子体发育, $\times 10.5 \text{ k}$;
2. 双核小配子体, $\times 8.4 \text{ k}$;
3. 四核小配子体核, $\times 6.3 \text{ k}$;
4. 多核小配子体, $\times 3.15 \text{ k}$;
5. 小配子体的运动装置中心粒位于核于限制膜之间, 中心锥尖部朝向中心粒, $\times 31.5 \text{ k}$;
6. 多核小配子体随着浅层的分叶, 表面积大为增加, 最终成为多叶小配子体, $\times 5.25 \text{ k}$

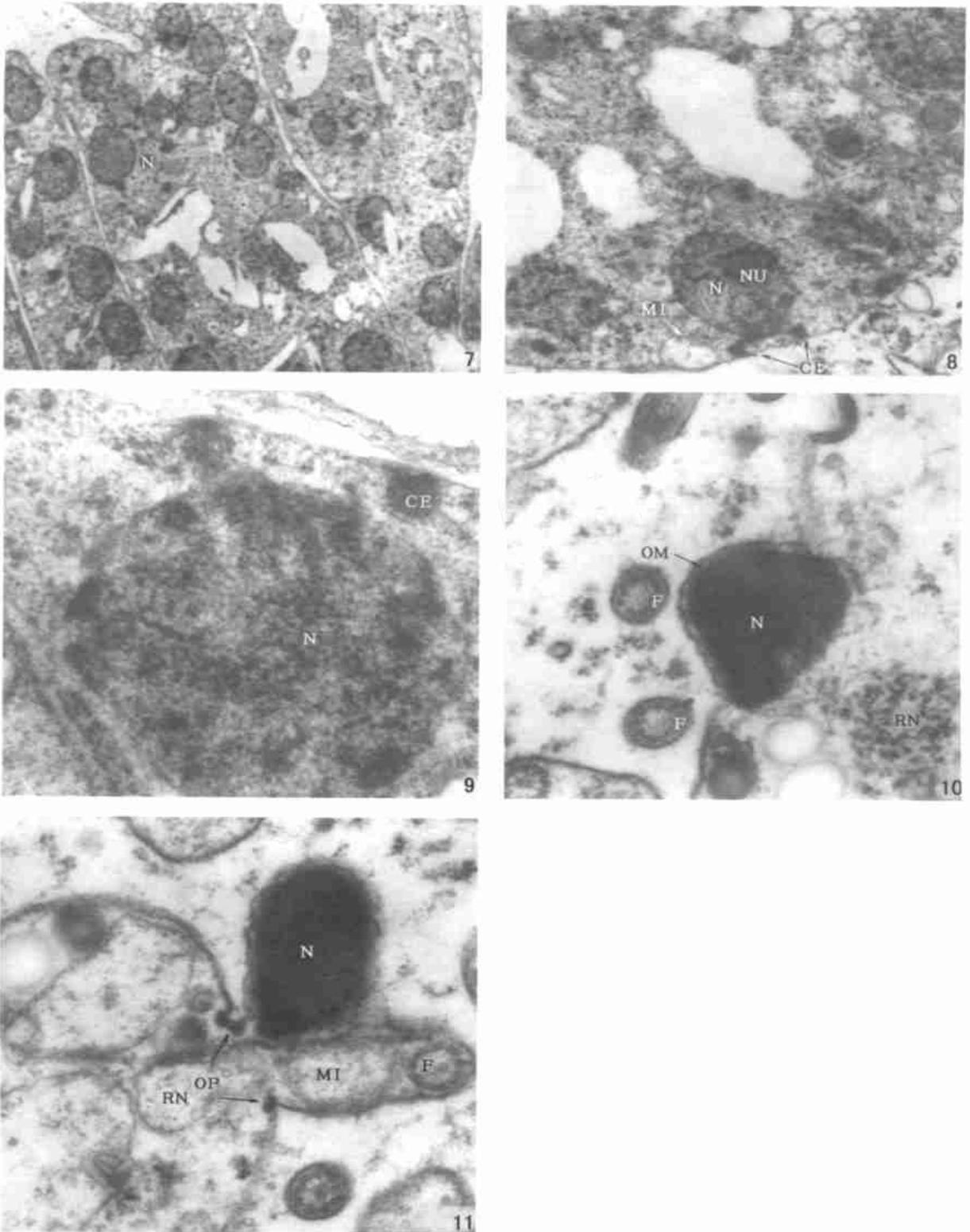


图2 斯氏艾美耳球虫小配子的发育超微结构(7~11)

Fig. 2 Microgametogenesis and ultrastructures of *Eimeria stiedai* (7~11)

7. 核排列在小配子体胚的周边, $\times 5.25$ k; 8. 细胞基质中的线粒体融合变大, 移至核与限制膜之间, $\times 15$ k;
 9. 核染色质增多并浓缩, 呈斑块状分布于核膜下, $\times 42$ k; 10. 浓缩的核向前突出, 残核留于小配子体残体中, $\times 42$ k;
 11. 小配子体部向带虫空泡中突出生长, 后端缩细呈柄状和小配子残体相连, 此时有电子致密板在相接处形成, $\times 42$ k

3 讨论与结论

3.1 带虫空泡与微孔

E. stiedai 裂殖生殖结束后, 部分裂殖子的形态结构发生改变, 发育为小配子体, 这与 *Eimeria* 属的其他种以及 *Wenyonella*、*Tyzzeria* 等属的情况相同。*E. stiedai* 小配子的发育发生在宿主细胞内的由单层膜包围的带虫空泡中, 这点与 *Eimeria* 属的其他种, 如 *E. intestinalis*^[3], *Wenyonella* 属的 *W. philiplevinei*^[4] 和 *Tyzzeria* 属的 *T. perniciososa*^[5] 相同。*E. stiedai* 所处的带虫空泡仅部分空泡较大, 内含不定形的物质, 刘群等^[3] 报道过由小配子体表膜向带虫空泡内逸出线粒体和基质小体, 作者所观察到的不定形物质是否属同一现象, 尚不明了。Speer^[6] 和 Scholtyseck 等^[7] 也曾分别报道过 *E. magna* 和 *E. ferrisi* 有相似的基质小体出现于带虫空泡中。*E. stiedai* 所处的带虫空泡的有一些部位空间很小, 致使表膜和宿主细胞呈松散的指状嵌合。

没有观察到 *E. stiedai* 小配子体有微孔, 与 Hammond 等^[8] 的观察一致。Scholtyseck 等^[9] 观察到 *E. perforans*, *E. magna*, *E. tenella*, *E. falciformis* 和 *T. gondii* 的小配子体表膜上都有典型的微孔存在; 刘群等^[3] 曾发现 *E. intestinalis* 小配子体表面有数个微孔; Feraado^[10], Hammond 等^[11] 和 Colley^[12] 曾分别观察到 *E. acervulina*, *E. auburnensis*, *E. nieschuli* 和 *Isospora* spp. 的小配子体有多个微孔。就微孔的功能问题, 诸多学者提出了共同看法, 认为微孔作为一种结构协助虫体吸取营养或排泄体内代谢产物。作者认为, 微孔的存在是虫体吸收营养或排泄废物的一条途径, 但不是惟一途径。Scholtyseck 和 Mehlhorn^[9] 认为微孔的消失与形成是应虫体的需要而发生的, 例如在 *E. auburnensis*^[11] 曾发现有 9 个紧密排列的微孔。可以这样推理, 作为单细胞动物的球虫, 其营养吸收方式是条件性、多途径的。在不同条件下, 采用适应当时条件的营养吸收方式。微孔作为营养吸收的一种器官, 可能应条件而产生、增多、减少或消失, 也是不同作者在不同虫体或同一虫体上发现微孔存在与否和数目不同的原因。当然也存在着电镜采样和制样而影响样本的问题。

3.2 小配子体的核分裂

E. stiedai 小配子体在核分裂时, 每个核分裂产生 2 个新核, 这与 *Eimeria* 属中的其他种一样。 *Sarcocystis*^[13] 的某些种, 小配子体的核不发生分裂, 而是

体积增大并形成诸多小叶伸向表膜, 再由每个核叶分化出小配子。

E. stiedai 的小配子体属大型小配子体, 在核分裂完成后, 产生许多的核, 为了增加周边排列, 继之表膜内陷, 使小配子体呈多叶状, 终于形成几个小配子体胚。这个过程与 *Caryotropha mesnili*, *Isospora felis* 及 *E. tenella* 在裂殖生殖过程中形成裂殖体胚的方式相同。*Eimeria* 属的其他几个种如 *E. maxima* 小配子体核分裂结束后, 也产生这种相似的结果。*E. perforans*^[8], *W. philiplevinei*^[4] 和 *T. perniciososa*^[5] 小配子体核分裂结束后, 表膜不内陷, 不形成小配子体胚。*E. stiedai* 小配子体核有核仁, 与 *E. magna*^[6] 和 *E. maxima* 相同, 与 *E. intestinalis*^[3], *W. philiplevinei*^[4] 和 *T. perniciososa*^[5] 不同。

3.3 小配子的形成与分化

在小配子形成时, 每个核或核叶将被整合到新分化形成的小配子中。但核是否全部或仅部分整合到新分化形成的小配子中, 不同种或属有别。与 *E. auburnensis*, *E. maxima* 和 *T. gondii*^[9] 相似, *E. stiedai* 的核仅部分整合到小配子中, 而 *E. perforans* 和 *Protococcidia* 的核则全部被整合到小配子中。此外, 在仅部分核被整合的虫种中, 被整合的部分和残留部分的比例又因虫种的不同而不同, 这个特性在分类学上是否占一席之地, 尚待探讨。

E. stiedai 的小配子在脱离残体前, 有一周加厚的电子致密圈在小配子基部形成。具此特征的虫种尚有 *E. nieschulzi*, *E. tenella*, *E. citeotinalis*, *E. maxima*, *E. auburnensis* 和 *T. gondii*^[9]; 与此不同者有 *E. perforans*^[9]。

3.4 小配子的鞭毛数与形态

Ferguson 等^[14] 报道中心粒中央微管退化为鞭毛基粒的现象, *E. stiedai* 亦有此现象。发生过程相同的还有 *B. intestinalis*^[3], *E. magna*^[15], *E. auburnensis*^[16], *E. ferris*^[7], *E. nieschulzi*^[12], *W. philiplevinei*^[4], *T. perniciososa* 和 *Isospora* spp.^[15]。

在作者查阅到的文献中, *E. falciformis*^[9], *E. perforans*, *E. tenella*^[17], *E. nieschulzi*^[12], *Aeberthi* 等的小配子具 3 根鞭毛; *E. stiedai* 与此不同, 有 2 根。拥 2 根者尚有: *E. intestinalis*^[3], *E. brunetti*, *E. prugenosis*, *E. magna*, *E. auburnensis*, *T. gondii*, *W. philiplevinei* - *nei*^[4] 和 *Sarcocystis* 属的一些种。*E. auburnensis*^[9], *E. maxima* 和 *T. perniciososa*^[5] 的小配子常携 2 根鞭毛, 偶见有 3 根者。有关小配子的整体

形态, Scholtyseck^[9]曾将 *Eimeria* 和 *Toxoplasma*, *Protococcidia* 和 *Haemosporina* 各归一型。*Eimeria* 和 *Toxoplasma* 属小配子细长弯曲型, *E. stiedai* 也不例外; *Protococcidia* (*Eucoccidium*, *Coelotropha*) 呈透镜型或杯型 (lens or cup-shaped); *Haemosporina* 为线型且不具线粒体。

3.5 结 论

研究表明, *E. stiedai* 小配子的发生属于球虫类小配子发育的常见模式, 亦分为 2 个阶段:

- 1) 小配子体的生长与核分裂阶段;
- 2) 小配子的形成与分化阶段。

参 考 文 献

- [1] Hoop P K, Ehrsam H, Keller B. 10 years of rabbit autopsy—a review of frequent disease and mortality causes [J]. *Schweiz Arch Tierheulkd*, 1993, 135(6~7):212~216
- [2] 索勋, 孔繁瑶, 李安兴, 等. 斯氏艾美耳球虫孢子的超微结构 [J]. *畜牧兽医学报*, 1998, 29(5):474~478
- [3] 刘群, 孔繁瑶, 殷佩云. 肠艾美耳球虫内生发育阶段超微结构研究: 小配子发育 [J]. *畜牧兽医学报*, 1993, 24(3):270~276
- [4] 李安兴, 孔繁瑶, 索勋, 等. 菲氏温扬球虫小配子发育的超微结构研究 [J]. *北京农业大学学报*, 1992, 18(4):453~457
- [5] 汪明, 孔繁瑶. 毁灭泰泽球虫内生发育的超微结构研究: 小配子生殖 [J]. *畜牧兽医学报*, 1989, 20(1):60~66
- [6] Speer A C, Danforth D H. Fine-structural aspects of microgametogenesis of *Eimeria magna* in rabbits and in kidney cell cultures [J]. *J Protozool*, 1976, 23(1):109~115
- [7] Scholtyseck E, Chobotar B, Senaud J, et al. Fine structure of microgametogenesis of *Eimeria ferisi* Levine and Ivens 1965 in *Mus musculus* [J]. *Z Parasitenk*, 1977, 51:229~240
- [8] Hammond D N, Scholtyseck E, Miner M L. The fine structure of microgametocytes of *Eimeria perforans*, *E. stiedae*, *E. bovis*, and *E. auburnensis* [J]. *J Parasitol*, 1967, 53:235~247
- [9] Scholtyseck E, Mehlhorn H. Electron microscope studies of microgametogenesis in coccidia and related groups [J]. *Z Parasitenk*, 1972, 38:95~131
- [10] Fernando M A, Stockdale P H G. Fine structural changes associated with microgametogenesis of *Eimeria aervulina* in chicken [J]. *Z Parasitenk*, 1973, 43:33~42
- [11] Hammond D M, Scholtyseck E, Chobotar B. Fine structural study of the microgametogenesis of *Eimeria auburnensis* [J]. *Z Parasitenk*, 1969, 33:65~84
- [12] Colley F C. Fine structure of microgametocytes and macrogametes of *Eimeria nieschuli* [J]. *J Protozool*, 1967, 14:663~674
- [13] Mehlhorn H, Heydorn A O. Electron microso pic study on gamogony of *Sarcocystis suibomims* in human tissue culture [J]. *Z Parasitenk*, 1979, 58:97~113
- [14] Ferguson D J P, Birch - Andersen A, Hutchison W M, et al. Ultrastructural studies on the endogenous development of *E. brunetti*: Microgametogeny and the microgamete [J]. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1977, 85:67~77
- [15] Snigirevskaya E S. Fine structure of microgame tocytes and macrogametes of *E. intestinalis*, *E. magna* [C]. Second International Congress of Parasitology, 1969
- [16] Hammond D M, Scholtyseck E, Chobotar B. Fine structural study of the microgenensis of *E. auburnensis* [J]. *Z Parasitenk*, 1969, 33:65~84
- [17] McLaren D J. Observations on the fine structural changes associated with schizogony and gametogony in *E. tenella* [J]. *Parasitology*, 1969, 59:563~574