

约氏疟原虫配子体形成的形态学特征^{*}

毛映红 徐 蓓 刘宝丰^{**}

(中国医学科学院 中国协和医科大学基础医学研究所 北京 100005)

摘要:应用六氰酸铁钾和锇酸双染色法的透射电镜技术,对红内期疟原虫配子体形成过程中的形态生物学特征进行识别。结果表明,配子体是一渐进发育的单核、惰性(团块样、虫体不活跃)虫体,其核旁有一个由扁平囊和泡状小体极性排列组成的细胞器——高尔基体(Golgi complex),虫体被膜下有嗜锇小体。其雌性配子体的结构特点是核质较致密、内质网丰富和被膜下嗜锇小体多;而雄性配子体却是核质较疏松、线粒体发达、内质网和嗜锇小体少。结论是红内期疟原虫配子体形成与裂体增殖过程中形态结构的明显差别,雌雄配子体在结构与发育上明显的差异,都具有特定的生物学与生态学意义。

关键词:疟原虫;配子体生成;高尔基体;电镜

中图分类号:R382.3⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2004)03-72-04

The Morphological Characteristics of *Plasmodium yoelii* Gametocytogenesis

MAO Ying-Hong XU Bei LIU Bao-Feng

(Department of Etiology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

Abstract: Using the potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$) and osmic acid OsO_4 double-dye-techniques in TEM microscopy, the morphological characteristics of the gametocytogenesis of *Plasmodium yoelii* was identified. The gametocytes were shown to be gradually developed mononuclear and inactive (clot-like) bodies. There is a polarized organelle, Golgi complex consisted of several saccules and some vesicles beside the nucleus and there are some osmiophilic bodies beneath the parasite pellicule. The characteristics of female gametocytes include dense nucleoplasm, rich endoplasmic reticulum and more osmiophilic bodies, while the male gametocytes are characterized by a less densified nucleoplasm, fully developed mitochondria and fewer osmiophilic bodies. These differences between gametocytogenesis and schizogony as well as the structure and development of the female and male gametocytes there are importantly ecologic significances.

Key words: *Plasmodium yoelii*; Gametocytogenesis; Golgi complex; E.M microcopy

红内期有性的配子体生成(gametocytogenesis)与无性的裂体增殖(schizogony)^[1]是两种完全不同的发育类型。红内期周期性的裂体增殖引起疟疾的临床发病,配子体生成引起疟原虫在人与蚊媒间的转换,这些疟原虫的生态学转换都具有特定的形态学基础^[2],除了恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的配子体有特殊的“新月(crescent)”样形态,易于在光镜下识别外,其它疟原虫配子体均呈球形,一些细胞器在光镜下不易识别,因而不易与其晚期滋养体区别^[3]。所以,在透射电镜下动态、系统地观察配子体生成过程中的发育与结构

特征,将对疟原虫生物学、诊断学和疫苗学提供形态学基础。

^{*} 国家自然科学基金(No. 3860249),世界银行,国立新加坡大学的部分实验资助;

^{**} 通讯作者;

第一作者介绍 毛映红,女,42岁,主管技师;从事疟疾免疫研究及教学工作。

收稿日期:2004-01-20,修回日期:2004-03-10

1 材料与方法

1.1 动物 Balb/c 小鼠由解放军军事医学科学院动物所提供。

1.2 疟原虫 约氏疟原虫 (*Plasmodium yoelii*, P. y.) 由军事医学科学院微生物流行病学研究所引进, 本实验室小鼠血传保种。

1.3 方法 每只小鼠以 1.0×10^7 的感染红细胞 (PRBC) 量从腹腔内接种。感染后 5 d, 原虫血症可达 50%, 从眼眶采血, 立即滴入 4℃ 枸橼酸 PBS 中。离心弃去上清液, 吹起沉淀细胞待用。在 4.0 % 蔗糖、1.0 % 戊二醛 (GA)、0.1 mol/L 二甲砷酸钠-盐酸缓冲液 (cacodylate-HCl buffer, CHB) 中固定 1.5 h, PBS 洗 3 次后, 以 1.5 % 六氰酸铁钾和 1.0 % 锇酸的 CHB 液复染固定 1.5 h。PBS 洗 2 次, 乙醇常规脱水。再以 50 % (V/V) 无水乙醇-低粘度环氧树脂 (LVER) 的混匀液浸透 6 h, 再换为 100 % LVER 浸透过夜。65℃ 下包埋并聚合。超薄切片上网后, 用 50 % 乙醇-饱和醋酸铀水溶液和 0.4% 枸橼酸铅-0.1 mol/L NaOH 水溶液先后染色, 洗涤后在透射电镜 (Philip-400T) 下观察。

2 结果

在用常规醛类对细胞固定后, 用六氰酸铁钾和锇酸复染的细胞器及其生物膜更清晰可见, 如: 早期虫体中的膜迷路 (lm, 图版 I: 1), 核膜与食物泡 (fv, 图版 I: 1, 2), 胞浆中的内织网 (er, 图版 I: 5, 6), 线粒体 (mc, 图版 I: 2, 7), 被膜下的嗜钼小体 (ob, 图版 I: 5 ~ 7) 和核旁由多层穹窿样排列的扁平囊 (s) 和囊层凹陷内众多的泡状小体 (v) 组成的高尔基体 (G) (图版 I: 6) 等结构都完整清晰、易于识别。图版 I: 2, 3, 5, 6 和 7 中分别可见这些不同生长发育期的红内期疟原虫都呈现一样的团块样单核虫体 (图版 I: 4 为扫描电镜 SEM 下的鬼形红细胞 PRBC 和寄生其中的虫体 P)、虫体 (未见阿米巴样的胞浆活动) 不活跃。

虫体内部结构的特点是: 不同发育期 (形体大小不等) 的虫体都是单核的, 其核旁都具有一个膜泡样结构 (亮区) 的细胞器 (mv), 尤其在图版 I: 6 中呈现出一个典型的由多层穹窿样扁平囊 (sacculles, s) 和一簇在其穹窿内大小与致密度不同的泡状小体 (vesicles, v) 构成的一个典型的高尔基体 (Golgi complex, G)。

图版 I: 6 与 7 分别呈现两种具有不同结构特征的红内期约氏疟原虫的雌雄配子体, 两者有 6 个方面的异同 (表 1)。

表 1 雌、雄配子体的结构差异

	雌配子体	雄配子体
虫体发育核 (n)	充分 单核、致密	充分 单核、松散
核旁的高尔基体 (G)	有	有
被膜下嗜钼小体 (ob)	多	少
内织网 (er)	丰富	少
线粒体 (mc)	不发达	发达

3 讨论

经醛类常规固定的细胞, 再经六氰酸铁钾和锇酸复染的细胞标本, 呈现有更完整清晰的各种细胞器与结构, 这可能是六氰酸铁钾与锇酸对生物膜及其膜 (糖) 蛋白有更好的固定与染色作用^[4], 所以复染技术有利于在成熟配子体中发现不易被发现的^[5]、和阶段特异性形成的高尔基体^[6]。

在约氏疟原虫配子体生成过程中, 其高尔基体与惰性的单核虫体同步发育, 一起成熟。在与疟原虫同属头端复合体门 (apicomplexan) 弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 的细胞周期中, 其高尔基体的生成目前认为有两种模式, 一种认为是从内质网基础上衍生的, 而另一种则认为, 一个新高尔基体的形成需要一个前体 (a pre-existing Golgi)^[10, 11]。本文中的高尔基体扁平囊成熟面凹陷内串珠样排列的泡状小体呈膜样, 其大小与致密度不等, 其中成熟泡状小体较大而致密^[6], 且与被膜下的嗜钼小体在结构上类似。被膜下具外膜的嗜钼小体紧贴被膜, 似与被膜有融合, 融合后其膜与膜蛋白可外化 (exocytosis)^[7], 可为配子体更添新的被膜 (糖蛋白)。

雌配子体依次呈现: 丰富的内织网-典型的高尔基体-众多的被膜下成熟的嗜钼小体, 这三位一体的独特结构链可提示: 蛋白质肽链的合成-糖基化-和新生膜蛋白的外化, 即被膜的替换, 为一个典型的细胞分子过程^[8, 9]。配子体以此来抵抗随后而至的蚊胃对配子体的消化 (其它红内期虫体被蚊胃消化)。所以, 在约氏疟原虫配子体中出现的高尔基体, 可提示为配子体抵抗蚊胃消化这一生态适应的形态学基础。

雄配子体是 8 倍体^[1], 它可在蚊胃内分化、出丝 (exflagellation) 为 8 个雄配子, 丝状、运动性的雄配子携带着单倍体的遗传物质与雌配子受精。而 2 倍体的雌配子体在蚊胃内经一次减数分裂, 成一个单倍体的雌配子与雄配子受精后, 还要继续发育成合子、动合子和卵囊^[8]。所以, 雌雄配子体各自具有了上述在核质、内织网、线粒体和被膜下嗜钼小体等不同的物质与结构

基础(表 1),以适应不同发育与生态学需要。

依据上述红内期疟原虫配子体的形态结构特征,识别它们的依据是:(1)充分发育的单核虫体;(2)虫体不活跃;(3)核旁有 Golgi 体;(4)被膜下有嗜钡小体。而鉴别雌雄配子体的依据则是:雌配子体核致密、内织网丰富、被膜下嗜钡颗粒多;雄配子体则核松散、内织网和被膜下嗜钡小体少而线粒体发达。

参 考 文 献

- [1] Bray R S, Garnham P C C. The life-cycle of primate malaria parasites. *British Med Bull*, 1982, **38**(2):117 ~ 122.
- [2] Shute G T. The microscopic diagnosis of malaria. In: Wernsdorfer W H, McGregor I, eds. *Malaria, Principles and Practice of Malariology*. Churchill Livingstone Edinburgh, 1988, 781 ~ 814.
- [3] Hommel M. Malaria Diagnosis, *Parasitology*. Cox FEG, 1998, 386 ~ 388.
- [4] Liu Baofeng, Mah lee Ng, Zaman V, et al. Some ultra structural characteristics of *Plasmodium yoelii* in erythrocytic and gametocytyosis. *Chinese J of Parasitology and Parasitology*, 1988, **6**(4):249 ~ 252.
- [5] Aikawa M. Malaria and Red Cell, Ciba Foundation Symposium. London: Pitman, 1983, 45.
- [6] James E Rothman. The compartmental organization of the Golgi apparatus. *Sci Am*, 1985, **253**(3):84 ~ 89.
- [7] Lodish H F. Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. *J Biol Chem*, 1988, **263**(5):2 107 ~ 2 110.
- [8] Lodish H F, Kong N. Glucose removal from N-linked oligosaccharides is required for efficient maturation of certain secretory glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol*, 1984, **98**:1 720 ~ 1 729.
- [9] Lodish H F, Kong N, Hirani S, et al. A vesicular intermediate in the transport of hepatoma secretory proteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J Cell Biol*, 1987, **104**:1 720 ~ 1 729.
- [10] Pelletier L, Charleene A S, et al. Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 2002, **418**:548 ~ 551.
- [11] Roos D S, et al. Transport and trafficking: *Toxoplasma* as a model for *Plasmodium*. *Novartis Found Symp*, 1999, **226**:176 ~ 195.

图 版 说 明

1. 入侵红细胞的早期虫体,不能区分是裂体增殖还是配子生成的分化状态。透射电镜示椭圆形食物泡(fv)及其上方的疟色素颗粒(p)和左侧生物膜样残留体(lm)。
2. 发育中的单核虫体,呈团块样,不活泼,纵向条形核(n)的右下侧为一椭圆形食物泡(fv),核左侧有一生物膜性、尚不明结构的细胞器(mv)。
3. 发育较充分的单核虫体,虫体不活跃,具有双层核膜的虫体核(n)位于左下方,其右上有一富含生物膜的细胞器(mv),虫体上方的胞浆中内织网(er)丰富。
4. 扫描电镜下,鬼形(ghost)感染红细胞内可见一呈球形的不活跃虫体(parasite, P)。
5. 透射电镜下,示感染红细胞内有一个充分发育的单核虫体,且不活跃,核旁左侧有一膜样细胞(器)亮区,在其左上侧有一线粒体(mc),胞质内织网(er)丰富,虫体被膜下可见多个膜样嗜钡小体(ob)。
6. 充分发育的单核虫体,虫体左下方的核质(n)较致密,上方有数层穹窿样扁平囊(s)和穹窿凹陷内众多大小与电子致密性不等的泡状小体(v)组成的极性细胞器,即为高尔基体(G)结构。此外虫体的胞浆内织网(er)丰富,被膜下嗜钡小体(ob)较多,呈现典型的雌配子体的结构与生理特征。
7. 示充分发育的单核虫体,与图版 I:5,6 中虫体不同的是横卧于虫体内的核(n),其核质较疏松,核上方也有一个(非典型切面的)高尔基体(G),其胞浆内织网(er)少,虫体左侧的食物泡近圆形,被膜下嗜钡小体(ob)较少,但位于虫体下缘的线粒体(mc)发达,呈现典型的雄配子体的结构与生理特征。

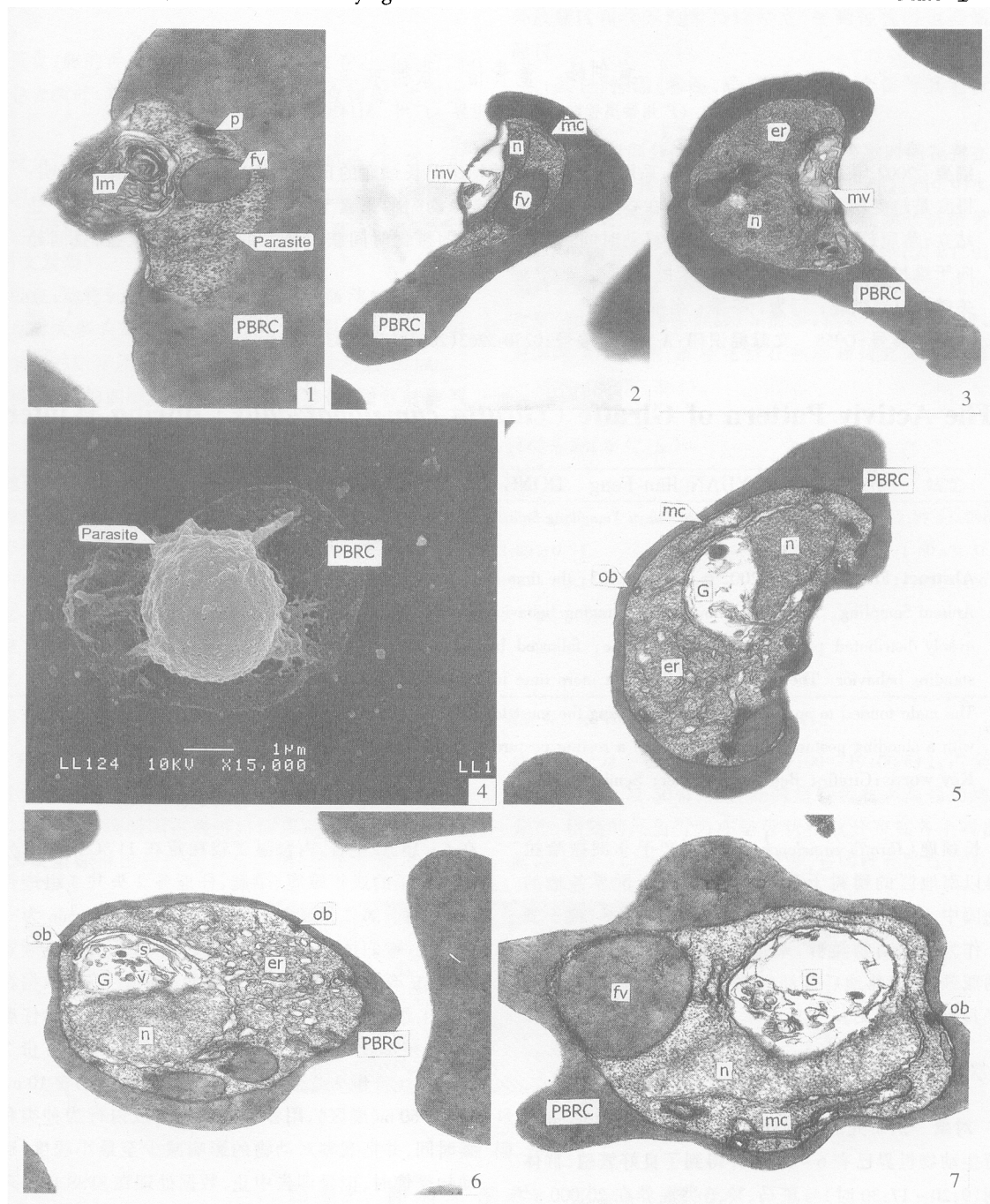
毛映红等: 约氏疟原虫配子体形成的形态学特征

图版 I

MAO Ying-Hong *et al.*: The Morphological Characteristics of *Plasmodium yuei*

Gametocytogenesis

Plate I



PBRC: 疟原虫感染的红细胞; lm: 膜迷路; fv: 食物泡; p: 疟色素颗粒; n: 核; mc: 线粒体; mv: 膜泡样结构; P: 疟原虫; er: 内质网; ob: 嗜饿小体; G: 高尔基体; s: 扁平囊; v: 泡状小体