

体外培养的恶性疟原虫的超微结构

叶祖光 李泽琳

(中医研究院中药研究所, 北京)

傅湘琦 柳和培

(中医研究院中心实验室, 北京)

高敏新 陈正仁 张乃临

(卫生部北京生物制品研究所, 北京)

采用电镜技术, 观察了体外培养的海南株红内期恶性疟原虫的超微结构。结果表明, 海南株恶性疟原虫与其他种株恶性疟原虫的超微结构相同, 它具有许多哺乳类疟原虫的形态学特征, 但是又与鸟类疟原虫有不少类似之处。因此, 恶性疟原虫在形态学上是一种较独特的哺乳类疟原虫。恶性疟原虫感染的宿主红细胞, 主要发生两个形态学变化: 一是在红细胞胞浆中出现狭长的 Maurer 氏裂隙, 二是在红细胞膜下出现小瘤节样的突出物。

鉴于恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 对人类健康危害程度甚大, 同时其抗药性的产生给疟疾化疗带来一定困难, 因此人们试图通过对恶性疟原虫形态学和生化代谢等方面的研究进一步了解它的生物学特征, 进而推动疟疾化疗和免疫的进展。采用电镜技术研究恶性疟原虫的超微结构, 有助于进一步了解它的一些形态学特征。1976年连续体外培养红内期恶性疟原虫获得了成功^[1], 两年后我国海南株恶性疟原虫连续体外培养也告成功^[2], 这为恶性疟原虫的超微结构的研究提供了方便的条件。1978年 Langreth 等人较全面地描述了体外培养的红内期恶性疟原虫的超微结构^[3], 但在电镜下观察并描述我国自己连续体外培养的海南株恶性疟原虫超微结构, 至今尚未见到报道。

材料与方 法

(一) 海南株 (FCC/HN) 恶性疟原虫

1977 年从海南岛恶性疟患者身上分离得到, 保存在液氮中, 1978 年复苏后用蜡虫缸法开始连

续体外培养^[1,4], 培养基为含有 15% 兔血清的 RPMI1640 培养基。

(二) 电镜标本的制备

将培养物离心, 去掉上清液, 加入 4% 的戊二醛固定液, 在 4℃ 预固定 2 小时, 离心去掉上清液, 加入 Millonig's 缓冲液清洗, 然后用 1% 的锇酸溶液后固定 2 小时, 当样品用重蒸馏水清洗后, 用一系列递增浓度的丙酮脱水, 用 quito 812 包埋剂包埋, 然后将超薄切片用醋酸铀和枸橼酸铅溶液分别进行复染, 并在 H-500 型电镜下观察。

结 果

经电镜观察, 体外培养的海南株红内期恶性疟原虫的超微结构如下:

(一) 环状体

环状体常有一个较大的核 (N), 核内容物较紧密, 胞浆中有时可见含有色素颗粒的食泡 (FV), 偶尔有滑面内质网出现, 此时胞口结构很难看到。被晚期环状体感染的红细胞胞浆中, 常有狭长的裂隙 (C) 出现, 裂隙的两侧壁分别由一层单位膜所

本文于 1981 年 7 月 11 日收到。

组成, 这就是光学显微镜下所观察到的 Maurer 氏点(图版 I-1)。

(二) 滋养体

随着环状体的生长发育, 疟原虫便进入大滋养体期, 一般疟原虫的滋养体比较活跃, 整个虫体胞浆中布满游离型的核蛋白体颗粒, 虫体胞浆中常含有一个较大的食泡。当食泡中的血红蛋白逐渐消化降解时, 食泡中的电子密度下降, 食泡中常含有血红蛋白消化降解的终产物——色素颗粒(P)。恶性疟原虫的色素颗粒呈规则的晶体形状, 由于用高 pH 的枸橼酸铅溶液染色, 使本来电子密度较高的色素颗粒溶解而残留下空白透明区(图版 I-2, 3)。疟原虫的限制膜常内折 (Invagination) 而形成伪食泡 (FF), 它是由双层膜包围, 里面没有色素颗粒(图版 I-3), 因而它不具有消化血红蛋白的功能。滋养体常有胞口结构 (CT), 在胞口的口孔处有两对电子密度较高的小节块, 这是辨认胞口的一个重要形态学特征(图版 I-4)。恶性疟原虫的线粒体 (M) 为双层膜所包围, 其内腔常有少量的管状嵴(图版 II-5)。恶性疟原虫的核膜是由双层膜所组成, 外层膜上有核蛋白体颗粒附着, 核膜上有核孔, 核内布满较为松散的核蛋白体样颗粒, 未见有核仁(图版 I-2, 图版 II-5, 7)。在虫体胞浆中有时有髓鞘样的多层膜小体 (Multilaminated-membraned body 略为 MB)、电子密度较高的初级溶酶体 (LS) 以及一些吞饮小泡(图版 II-5, 7)。在滋养体所感染的红细胞膜下常出现小瘤节样的突出物 (Knob, 略为 K), 这些圆形的小瘤节电子密度较高, 当疟原虫发育到晚期滋养体和裂殖体时, 这些小瘤节体积变大, 数量减少, 且有脱落和彼此融合的趋势(图版 I-3, 图版 II-6, 8)。

(三) 裂殖体

当疟原虫生长发育到一定程度时, 核

开始分裂, 一般难以观察到核正在分裂的状态。疟原虫的裂殖子所特有的一些细胞器在其侵入红细胞后不久便退化消失, 但在裂殖体期这些细胞器又重新分化出现。首先在疟原虫限制膜下出现一段段表膜复合结构。这种膜结构向虫体胞浆纵深方向伸延, 将新形成的裂殖子完全包围。此外棒状体 (R) 和微丝 (MN) 也相继出现(图版 II-6, 8)。有时裂殖体胞浆中见到粗面内质网, 在较成熟的裂殖体中, 子代的线粒体和核分别移行到各个裂殖子中, 仅有残余小体 (RB) 留在母体胞浆中, 残余小体的体积较大, 其中含有许多粗大的色素颗粒。

讨 论

1956 年 Fulton 等人首次应用超薄切片技术观察了疟原虫的超微结构^[5], 次年 Rudzinska 和 Trager 二人较系统地描述了疟原虫的超微结构^[6]。但在 1976 年以前, 有关恶性疟原虫超微结构的报道却很少, 这主要是因为供试验用的恶性疟原虫来源匮乏和取材困难。尽管如此, 人们还是采用了人疟猴模^[7-9] 或从恶性疟患者身上直接取材^[10-12] 等方法观察了恶性疟原虫的超微结构。恶性疟原虫体外连续培养的成功使这方面的研究有了进展, 同样也使我们有可能进行海南株恶性疟原虫超微结构的研究。

恶性疟原虫的无性体是由双层膜包围, 外层膜是起源于宿主红细胞的纳虫空泡膜, 内层膜是疟原虫的限制膜。在裂殖子入侵红细胞的过程中, 棒状体和微丝释放出含有大量组氨酸成分的蛋白质^[13]。它是一种膜的活性剂, 能使红细胞膜内折, 形成纳虫空泡进而将裂殖子包裹在宿主红细胞胞浆中。此外, 在裂殖体期的裂殖子从宿主细胞中的释放过程中, 棒状体和微丝

也起着同样的作用^[14]。

关于红内期疟原虫的摄食方式, 鸟类疟原虫主要是胞口摄食, 而哺乳类疟原虫有胞口摄食和胞饮两种方式^[15], 恶性疟原虫的摄食方式属于后一类^[1,6]。本试验也发现典型的胞口, 同时也偶见有吞饮小泡, 因而红内期恶性疟原虫通过胞口摄食已确定无疑。但也存在有胞饮摄食的可能性, 尤其在环状体期, 胞口很难见到。恶性疟原虫的食泡较大而且具有消化血红蛋白的能力, 这和鸟类疟原虫的消化方式相同而区别于鼠疟原虫等哺乳类疟原虫^[7,16]。后者的食泡较小, 虽有较大的食泡但并没有消化功能, 只有从大食泡上“招落”下来的消化小囊才具有消化功能。恶性疟原虫的大食泡中常有消化血红蛋白的终产物——色素颗粒, 但有时也可见到含有色素颗粒的小食泡。因而, 红内期恶性疟原虫的消化过程可能以大食泡为主, 小食泡为辅。恶性疟原虫的色素颗粒在形态上和生化性质上都同于其他哺乳类疟原虫而不同于鸟类疟原虫, 它们呈规则的晶体形状且易溶于碱性溶液, 因而在电镜下有时可见到溶解后的色素颗粒呈空白透亮。此外, 在虫体胞浆中还常有双层膜包围的伪食泡, 它是由虫体限制膜内折所形成的^[15,17], 利用电镜组化技术, 发现它基本上不含有酸性磷酸酶^[18], 因而它没有消化功能。

象鸟类疟原虫一样, 恶性疟原虫线粒体的内腔常有典型的管状嵴, 而哺乳类疟原虫一般只有无嵴的线粒体。线粒体嵴的有无可能和疟原虫的生化代谢特点有关, 有嵴线粒体的疟原虫能够利用三羧酸循环进行物质代谢, 而无嵴线粒体的则没有功能完整的三羧循环^[19]。

尽管恶性疟原虫本身是一种哺乳类疟原虫, 而且也具有不少哺乳类疟原虫的形态特点, 例如没有核仁以及色素颗粒呈晶

体状且易溶于碱性溶液, 但是, 它在另外一些方面又类似于鸟类疟原虫, 其中包括线粒体内腔有管状嵴以及食泡较大且具有消化功能。因此红内期恶性疟原虫在形态学上是一种较独特的哺乳类疟原虫。

被恶性疟原虫感染的红细胞一般出现两种形态学变化: 先是在晚期环状体所寄生的红细胞胞浆中出现 Maurer 氏裂隙, 其生理作用目前尚不清楚; 后是在早期滋养体所寄生的红细胞膜下出现许多小瘤节。这些瘤节的免疫抗原性完全不同于红细胞膜^[20]。小瘤节出现的时间相当于恶性疟原虫滋养体在末梢血中消失进入内脏深部小血管进行裂殖的时候, 实际上这些小瘤节就是感染的红细胞在内脏小血管内皮上的附着点。因此, 现在普遍认为, 这些小瘤节在恶性疟原虫的内脏深部小血管的裂殖过程中起着关键的作用^[9,12,21,22]。最近报道^[22], 随着恶性疟原虫在体外培养时间的延长, 这些小瘤节可以逐渐减少乃至消失, 而且不同种株的恶性疟原虫的小瘤节消失得快慢程度也不尽相同。此外, 有人发现我国另外一株海南株 (FCC₁/HN) 恶性疟原虫在长期连续体外培养时, 小瘤节也有逐渐消失的趋向^[23]。本试验所用的 FCC₂/HN 海南株恶性疟原虫在体外培养已达三年之久 (1978—1981 年), 但仍能见到不少小瘤节的存在。因而我国体外培养的 FCC₂/HN 株恶性疟原虫, 其小瘤节减少消失的过程可能属于较缓慢的类型。

参 考 文 献

- [1] Trager, W. and J. B. Jensen: *Science*, 193(4254): 673, 1976.
- [2] 高敏新等: *微生物学报*, 19(1): 88, 1979.
- [3] Langreth, S. G. et al.: *J. Protozool.*, 25(4): 443, 1978.
- [4] Chen Zhengren et al.: *Chin. Med. J.*, 93(1): 31, 1980.
- [5] Fulton, J. D. and T. H. Flewett: *Trans. R.*

- Soc. Trop. Med. Hyg.*, 50(2): 150, 1956.
- [6] Rudzinska, M. A. and W. Trager: *J. Protozool.*, 4(3): 190, 1957.
- [7] ——— and ———: *J. Protozool.*, 12(4): 563, 1965.
- [8] Smith, D. H. et al.: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 63(4): 433, 1969.
- [9] Luse, S. A. and L. H. Miller: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 20(3): 655, 1971.
- [10] Ladda, R. et al.: *Trans. E. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60(3): 369, 1966.
- [11] Trager, W. et al.: *Bull. W. H. O.*, 35(6): 883, 1966.
- [12] Miller, L. H.: *Trans. E. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 66(3): 459, 1972.
- [13] Kilejian, A. and J. B. Jensen: *Bull. W. H. O.*, 55(2-3): 191, 1977.
- [14] Seed, T. M. et al.: *Exp. Parasit.*, 39(2): 262, 1976.
- [15] Aikawa, M.: *Exp. Parasit.*, 30(2): 284, 1971.
- [16] ——— et al.: *Milit. Med.*, 131: 969 (Suppl.), 1966.
- [17] Ladda, R. L.: *Milit. Med.*, 134: 825 (Suppl.), 1969.
- [18] Aikawa, M. and P. E. Thompson: *J. Parasit.*, 57(3): 603, 1971.
- [19] Aikawa, M.: *Bull. W. H. O.*, 55(2-3): 139, 1977.
- [20] Kilejian, A. et al.: *Exp. Parasit.*, 42(1): 157, 1977.
- [21] Rudzinska, M. A. and W. Trager: *J. Protozool.*, 15(1): 73, 1968.
- [22] Langreth, S. G. et al.: *Exp. Parasit.*, 48(2): 213, 1979.
- [23] 李德明等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1(1): 291, 1981.

ULTRASTRUCTURE OF *P. FALCIPARUM* IN CONTINUOUS CULTURE IN VITRO

Ye Zuguang Li Zelin

(Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing)

Fu Xiangqi Liu Hepei

(Central Laboratory, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing)

Gao Minxin Chen Zhengren Zhang Nailin

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing)

The ultrastructure of intraerythrocytic stage of *P. falciparum*, Hainan strain, in continuous culture *in vitro* was examined by electron microscopy. The results indicated that the fine structures of different developmental stages of the Hainan strain were the same as those of the other strains of *P. falciparum*. It had some ultrastructural characteristics of the mammalian plasmodia, such as nucleus without a nucleolus and pigment grains being rectangular and crystal in shape. However, on the other hand, it had also

some similarities to the avian plasmodia in ultrastructure, including the food vacuole, which was bigger and had digestive functions, and the mitochondria containing some typical microtubular cristae. So, the intraerythrocytic stage of *P. falciparum* is morphologically a unique mammalian malarial parasite. Generally, two morphological changes of infected host cells were observed: elongated Maurer's clefts appeared in the cytoplasm, and the knob-like protrusion lying underneath the erythrocytic membrane.