

DOI:10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2013.11.008

田鼠巴贝虫(*Babesia microti*)的超微结构观察

陈韶红¹,蔡玉春¹,陈家旭¹,卢艳¹,俞彰²,张永年¹,艾琳¹,周晓农¹

摘要:目的 观察田鼠巴贝虫的超微结构,了解田鼠巴贝虫在宿主红细胞中发育的形态变化。方法 运用扫描电镜观察田鼠巴贝虫侵入宿主红细胞的过程,运用透射电镜观察田鼠巴贝虫发育的形态变化过程及宿主红细胞形态变化情况。结果 扫描电镜下观察到田鼠巴贝虫裂殖子大小在406~981nm之间,虫体发育过程分为裂殖子、分裂中的裂殖子、滋养体3个阶段,裂殖子是通过红细胞膜上微孔进入宿主红细胞,分裂中的裂殖子可使红细胞变形,滋养体是通过溶解红细胞膜游离红细胞。透射电镜观察到田鼠巴贝虫裂殖子的核膜为双层膜结构,虫体中有核糖体、微管、内质网、线粒体和溶酶体等完整的细胞器,分裂中的裂殖子在侵入后期可见食物空泡,滋养体的外膜和核不规则,胞浆中含有颗粒和空泡,宿主红细胞的电子密度随着虫体的发育而逐渐变稀疏。结论 田鼠巴贝虫是含有完整细胞器的单细胞有机体,具有一般细胞所有的基本结构,它能完成多细胞动物所具有的生命机能,并以宿主红细胞中的血红蛋白作为生存氧料。

关键词:田鼠巴贝虫;红细胞;超微结构

中图分类号:R382

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2013)11-1072-04

Ultramicrostructure observation of *Babesia microti*

CHEN Shao-hong¹, CAI Yu-chun¹, CHEN Jia-xu¹,
LU Yan¹, YU Zang², ZHANG Yong-nian¹, AI Lin¹, ZHOU Xiao-nong¹

(1. National Institute of Parasitic Diseases; Chinese Center for Disease Control and Prevention,
Key Laboratory of Parasite and Vector Biology; Ministry of Health, WHO Collaborating
Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China;
2. Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: The aim of this study is to observe the ultramicrostructure of *Babesia microti* and comprehend the morphologic change of *B. microti* developing in host's red cell. Scanning electron microscope (SEM) was used to observe the process that *B. microti* invaded into the host's red cell; transmission electron microscope (TEM) was applied to view the morphologic change of *B. microti* development as well as the morphologic alternation of host's red cell. The size of *B. microti* merozoite was 406-981 nm with the observation by SEM. There were three stages in development process—dividing into merozoite, dividing merozoite, and trophozoite. Merozoite entered into host's red cell through micropore on erythrocyte membrane; dividing merozoite could split the red blood cell deformability; trophozoite was able to dissociate red cell by dissolving erythrocyte membrane. When it comes to the observation by TEM, the nuclear membrane structure of merozoite was bilayer, with intact organelles such as ribosomes, microtubules, endoplasmic reticulum, mitochondria and lysosomes etc. inside. Food vacuoles could be found at late stage of invasion in dividing merozoite. The outer membrane and nuclear of trophozoite were irregular. Granules and vacuoles contained in kytoplasm. The electron density of the host erythrocyte was gradually thinning with the development of *B. microti*. It's indicated that *B. microti* is single-celled organisms which contains intact organelles and with general basic structure as common cell. This protozoa has the capability of life functions as multi-cellular animal and the host erythrocyte hemoglobin as the survival of oxygen feed.

KEY WORDS: *Babesia microti*; red cell; ultramicrostructure

Supported by the Special Fund for Health Research in the Public Interest(No. 201202019)

全国卫生行业科研专项(No. 201202019)资助

通讯作者:周晓农, Email:ipdzhouxn@sh163.net

作者单位:1. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025;
2. 复旦大学医学院, 上海 200032

Corresponding author: Zhou Xiao-nong, Email:ipdzhouxn@sh163.net

巴贝虫是一类经蜱传播, 红细胞内寄生的原虫,

属于孢子虫纲(Sporozoa)、巴贝虫科(Babesiidae)、巴贝虫属(*Babesia*)。巴贝虫种类很多,有双芽巴贝虫(*Babesia bigemina*)、牛巴贝虫(*B. bovis*)、马巴贝虫(*B. equi*)、犬巴贝虫(*B. canis*)、羊巴贝斯虫(*B. ovis*)和可感染人的分歧巴贝虫(*B. divergens*)和田鼠巴贝虫(*B. microti*)等^[1-4],而这些虫体的形态大小各不相同^[5],对虫体如何侵入宿主红细胞,并引起红细胞一系列变化的研究报道甚少,本研究通过对田鼠巴贝虫感染小鼠后不同时间血液中巴贝虫的超微结构的观察,为揭示田鼠巴贝虫的超微形态、生理、生化及增殖的生物学特性提供了基线资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 田鼠巴贝虫(*B. microti*)由中国科学院动物研究所提供,保种虫株为 *Babesia microti* ATCC PRA-99TM,感染 3~4 周龄雌性 BALB/c 小鼠,收集 1d、2d、3d、...、8d 小鼠抗凝血。

1.2 实验仪器 扫描电镜为日立 SU-8000;透射电镜为日立 7650 和 PHILIPS CM120;普通光镜为 OLYMPUS-BX51。

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集和固定 小鼠尾部采血涂薄血片,姬姆萨染色后置普通光镜油镜下观察,检查染虫率达到 20%时,眶窦虹吸管采血 0.5 ml 置抗凝管中,用 2.5%戊二醛固定液中进行预固定,用 0.1 mol/LPBS 冲洗,再用锇酸固定 2h,用 0.1mol/LPBS 冲洗。

1.3.2 扫描电镜观察 上述小鼠抗凝血固定样品经乙醇逐级脱水和醋酸正戊脂置换,置 HCP-2 临界干燥仪中置换干燥后用 IB-3 型离子溅射仪喷金,置日立 SU-8 000 扫描电镜下观察。

1.3.3 透射电镜观察 小鼠抗凝血用乙醇进行逐级脱水,再用环氧丙烷置换 20 min,再用环氧丙烷和 Epon812 的混合液在 37℃下浸透 2 h,最后包埋剂浸透 2 h。用牙签将样品块挑出,放入盛有少量包埋剂的胶囊内,再注满包埋剂,37℃聚合 12 h,48℃聚合 12 h,60℃聚合 48 h,最后用莱卡超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸双重染色,在透射电镜下 60 KV 观察双重染色切片。

2 结果

2.1 光镜下田鼠巴贝虫形态 BALBC 小鼠红细胞中出现虫体时间为感染后第 3d,虫体在红细胞中首先表现为一个紫色点状体,红细胞形态正常,第 4 d 虫体开始出现环形、戒子状、圆形、梨形、马耳他十

字、阿米巴样(图 1),胞核呈紫红色,环形的浆呈兰色,虫体寄生在红细胞内,最多达 6 虫寄生,感染高峰时段可见游离在红细胞外的虫体。

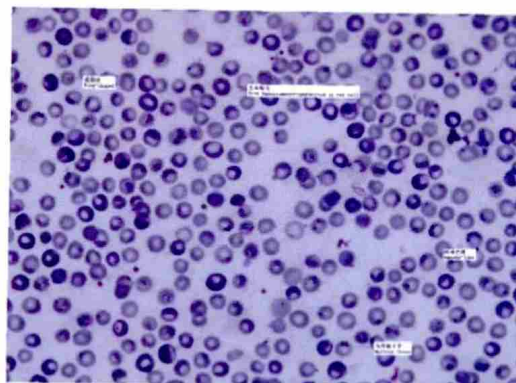


图 1 光镜下巴贝虫形态-100×10

Fig. 1 Morphology of *Babesia microti* under microscope-100×10

2.2 扫描电镜下感染田鼠巴贝虫红细胞的形态 见图 2。扫描电镜下显示,田鼠巴贝虫的裂殖子可通过红细胞上直径为 68.2~77.9 nm 凹陷的小孔进入宿主的红细胞(图 2-a),田鼠巴贝虫的裂殖子吸附红细胞后,红细胞的表面有粗糙的片状突起,且红细胞周围有大量的片状脱落(图 2-b),吸附红细胞的田鼠巴贝虫的裂殖子在扫描电镜下的直径大小在 406~981 nm,虫体进入宿主红细胞后可使宿主红细胞呈现多伪足状突起(图 2-c,d),经过一段时间的生长发育,田鼠巴贝虫滋养体游离红细胞(图 2-e)而正常小鼠红细胞则没有这些现象(图 2-f)。

2.3 透射电镜下田鼠巴贝虫和受侵犯红细胞形态

2.3.1 田鼠巴贝虫感染的红细胞形态变化 田鼠巴贝虫一般在感染后第 3 d 开始侵入宿主红细胞,最初宿主红细胞形态基本正常,虫体呈圆点状,透射电镜下红细胞电子密度较高,第 5 d 虫体开始发育,宿主红细胞开始变形呈现多种形态(图 3-b),第 6 d,随着虫体的分裂增殖长大,红细胞的电子密度逐渐变稀疏(图 3-c);虫体进入红细胞第 7 d,虫体发育为滋养体,滋养体将红细胞膜溶解红细胞膜破损(图 3-d);进入第 8d 滋养体自然逸出红细胞,被寄生过的红细胞在透射电镜下密度稀疏,只留下红细胞的空壳(图 3-e)。

2.3.2 田鼠巴贝虫发育状态 田鼠巴贝虫进入宿主红细胞后,虫体根据形态分为 3 个阶段,裂殖子、分裂中的裂殖子、滋养体,可出现多虫寄生于同一个红细胞中(图 4-a);一般刚侵入红细胞时裂殖子顶端与红细胞膜的弧面相对,形成月牙形间隙,此时红细胞膜逐渐被溶解,裂殖子进入红细胞中,裂殖子呈圆

形,外膜光滑呈连续包绕,虫体的核膜为双层膜结构,常偏于虫体一侧呈圆形,核的电子密度均匀,虫体中有核糖体、微管、内质网、线粒体和溶酶体(图4-b);分裂中的裂殖子的核常被拉长,可见棒状体呈水滴状,每个棒状体都有一个向外的管状物连接且互相缠绕与核接壤,分裂中裂殖子在侵入后期可见

食物空泡、微丝体和内质网、溶酶体(图4-c);滋养体阶段的虫体形态变化多端,虫体的外膜和核变得不规则,胞浆中含有许多颗粒和空泡,阿米巴形的滋养体随着伪足的运动而经常变换形状,随着虫体进一步发育,红细胞膜逐步溶解,虫体游离进入血清中寻找新的红细胞生存(图4-d,e)。

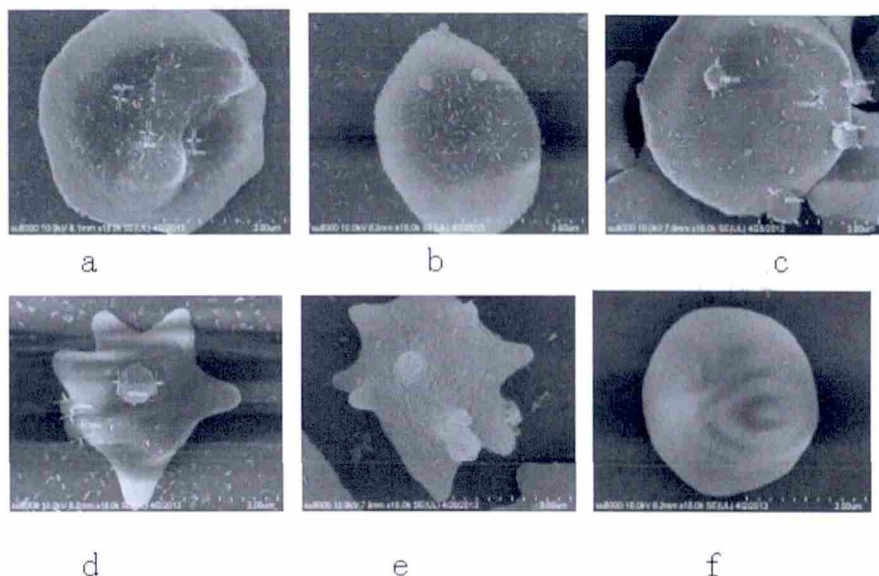


图2 扫描电镜下感染田鼠巴贝虫后鼠红细胞的形态×18 000倍

a: 侵入红细胞膜的小孔; b: 裂殖子吸附红细胞; c, d: 多个裂殖子吸附红细胞, 并呈多伪足状突起; e: 滋养体游离红细胞; f: 正常小鼠红细胞

Fig. 2 Morphology of erythrocytes infected with *Babesia microti* under scanning electron microscope (SEM) ×18 000

a: Holes on erythrocytes membrane; b: Erythrocytes absorbed on merozoites; c and d: Erythrocytes absorbed on multi-merozoites and showed multiple pseudopodia-like protrusions.

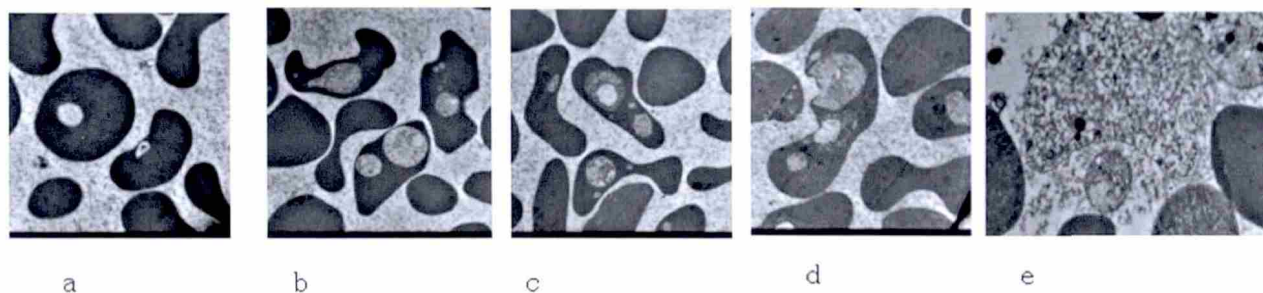


图3 透射电镜下田鼠巴贝虫感染的红细胞形态变化×27 500

a: 感染后第3 d; b: 感染后第5 d; c: 感染后第6 d; d: 感染后第7 d; e: 感染后第8 d

Fig. 3 Morphology of erythrocytes infected with *Babesia microti* under transmission electron microscope (TEM) ×27 500

a: 3 days after infection; b: 5 days after infection; c: 6 days after infection; d: 7 days after infection; e: 8 days after infection.

3 讨论

在光镜下田鼠巴贝虫的形态同恶性疟原虫非常相似,其形态有泪滴状、戒子状、圆形、梨形、棒状或阿米巴样,最典型的是马耳他十字^[6-7],但是对于其超微的结构国内外研究报道甚少, Carter^[8]等通过电镜检测血液中的巴贝虫,以区分巴贝虫和疟原虫,但未能详细描述巴贝虫的超微结构,这也是目前研

究巴田鼠贝虫的空白。有学者通过透射电镜观察了双芽巴贝虫透射电镜下的超微结构,认为双芽巴贝虫有裂殖子、分裂中的裂殖子和滋养体三个阶段,与我们观察到的田鼠巴贝虫相同,本文也验证了 Potgieter^[9-10]等观察的结果。另外,我们清晰的观察到了田鼠巴贝虫3个阶段的发育变化过程,认为虫体具有一般细胞所有的基本结构,有细胞膜、细胞质、

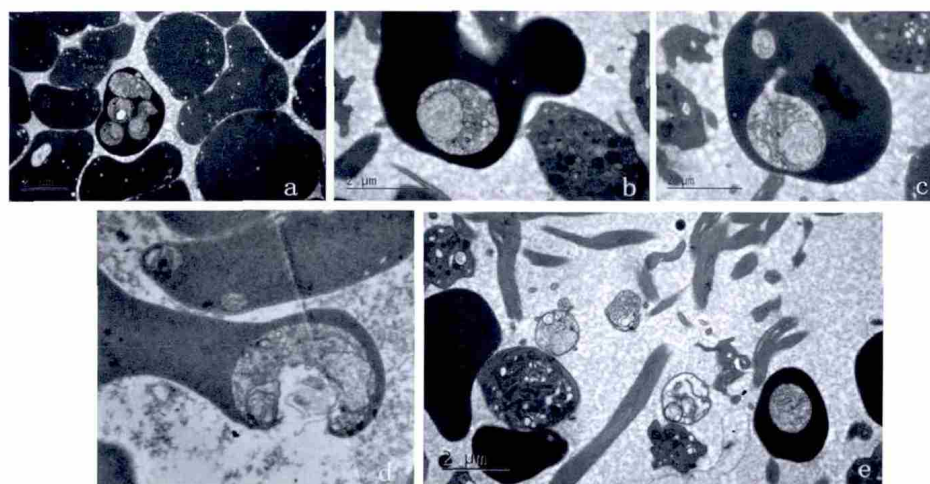


图 4 透射电镜下田鼠巴贝虫发育状态

a: 四虫寄生 $\times 48\,500$; b: 裂殖子 $\times 48\,500$; c: 分裂中的裂殖子 $\times 48\,500$; d: 滋养体即将破红细胞 $\times 48\,500$; e: 游离红细胞的滋养体 $\times 27\,500$

Fig. 4 Developmental state of *Babesia microti* under transmission electron microscope (TEM)

a: Four *Babesia microti* parasited in red cell $\times 48\,500$; b: Merozoite $\times 48\,500$; c: Dividing merozoites $\times 48\,500$; d: Trophozoites about to break erythrocytes $\times 48\,500$; e: Free erythrocyte trophozoites $\times 27\,500$.

细胞核和细胞器,是含有完整细胞器的单细胞有机体,它能完成多细胞动物所具有的生命机能,虫体的核膜为双层膜结构,与疟原虫的裂殖子的核膜相同^[11],核的电子密度均匀,虫体中有核糖体、微管、内质网、线粒体和溶酶体等完整细胞器,提示我们单细胞动物具有运动、消化、呼吸、排泄、感应、生殖等机能,宿主红细胞是田鼠巴贝虫寄生的良好环境;光镜下马耳他十字的出现与透射电镜观察到的多虫寄生是相符合的;同时发现,透射电镜下宿主红细胞的电子密度随着虫体发育而逐渐变稀疏,说明宿主红细胞中的血红蛋白被虫体消耗,验证了感染鼠出现血红蛋白尿、贫血等症状的临床表现。

扫描电镜观察,被田鼠巴贝虫裂殖子侵犯的宿主红细胞表面出现毛鳞片状的突起,虫体通过吸附宿主红细胞表面的微孔进入红细胞内寄生,可出现多个裂殖子同时吸附一个红细胞,滋养体可使宿主红细胞形态呈现伪足状突起,虫体大量消耗红细胞内血红蛋白,致使红细胞可发生破裂,虫体游离于血浆中,并寻找新的红细胞寄生,也与我们透射电镜下观察到的现象是相一致的。

参考文献:

- [1] Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: recent insights into an ancient disease [J]. Int J Parasitol, 2008, 38 (11): 1219-1237. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.03.001
- [2] Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR 3rd, et al. Babesiosis [J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(3):451-469.
- [3] Ristis M. Babesiosis of domestic animal and man[M]. New

York: Academic Press, 1989: 23-52.

- [4] Uilenberg G. International collaborative research significance of tick borne hemoparasitic disease of world animal health[J]. Vet Par, 1995, 55: 19-41.
- [5] Satoru K. Ultrastructure of intra-erythrocytic stage of *Babesia ovata*[J]. Jpn J Vet Sci, 1986, 48(5): 943-949.
- [6] Yao LN, Ruan W, Ceng CY, et al. Pathogen identification and clinical diagnosis for one case infected with *Babesia*[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2012, 30(2): 118-121. (in Chinese)
- 姚立农,阮卫,曾长佑等. 1 例人感染巴贝虫的诊断与病原体鉴定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(2): 118-121.
- [7] Cai YC, Lu Y, Chen SH, et al. Infection dynamics of *Babesia microti* in mice in different immune status[J]. Chin J Zoonoses, 2013, 29(2): 170-174. (in Chinese)
- 蔡玉春,卢艳,陈韶红等. 微小巴贝虫在不同免疫状态小鼠体内消长规律研究. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(2): 170-174.
- [8] Carter WJ, Yan Z, Cassai ND, et al. Detection of extracellular forms of babesia in the blood by electron microscopy: a diagnostic method for differentiation from *Plasmodium falciparum*[J]. Ultrastruct Pathol, 2003, 27(4): 211-216.
- [9] Potgieter FT, Els HJ. The fine structure of intra-Erythrocytic stages of *Babesia bigemina*[J]. Onderstepoort J Vet Res, 1977, 44(3): 157-168.
- [10] Friedboff K. Studies on the fine structure of *Babesia bigemina*, *B. divergens* and, *B. ovis*. Proceedings of the Second International Congress of Parasitology[J]. J Parasitol, 1970, 56(1): 110-111.
- [11] Wu GL. Human parasitology[M]. 4th ed, Beijing: People's Medical Publishing House, 2013: 233-237. (in Chinese)
- 吴观陵主编. 人体寄生虫学(第4版). 北京: 人民卫生出版社. 2013: 233-237.

收稿日期: 2013-07-01; 修回日期: 2013-09-17