

体外培养日本血吸虫成虫生殖器官 超微结构的观察*

华先欣 周述龙

(湖北医学院寄生虫学教研室、血吸虫病研究室, 武汉)

提 要

将日本血吸虫成虫于 851 培养基中培养 23 天后, 对其生殖器官进行透射电镜观察。观察结果显示, 雌虫卵巢内卵母细胞出现不同程度的变性、坏死; 成熟卵黄细胞的卵黄小滴融合, 脂质小滴数量增多、体积增大; 培养后期卵壳形成发生障碍, 最终导致无活性、无卵壳的畸形卵形成。超微结构观察首次显示, 体外初产期虫卵卵壳中有条带状低电子密度区和高电子密度区相间排列。

关键词 日本血吸虫, 生殖器官, 超微结构, 体外培养, 卵壳

虽然血吸虫体外培养研究迄今已取得长足进展, 但目前人工转变的童虫培养到产卵阶段所产的虫卵是异常的^[5,12], 在完全离体条件下重复血吸虫在哺乳类宿主中的生活史阶段还有待完成。体外培养条件适宜与否, 关键在于血吸虫生殖系统能否在其中正常发育或维持正常结构和机能^[5,11]。我们通过观察营养因素对血吸虫产卵的影响, 配制了比较适于成虫产卵的 851 培养基。目前, 体外培养日本血吸虫生殖器官超微结构变化尚未见报道。为了从超微结构水平了解日本血吸虫在体外培养后期产卵异常的原因, 本文对在 851 培养基中培养 23 天的雌雄虫生殖器官及体外初产期虫卵进行了透射电镜观察。

材 料 和 方 法

(一) 培养基

在培养童虫的 841 培养基^[12]中加入 ATP、维生素 C、部分 199 培养基, 并用水解酪蛋白代替水解乳蛋白, 配制成 851 培养基。

(二) 成虫的收集和培养

1. 灌注液和洗涤液 灌注液为含有 32u/ml 肝素的无菌 Earle's 液。在 Earle's 液中加入 0.5% 水解乳蛋白、300u/ml 青霉素、300 μ g/ml 链霉素和 160u/ml 庆大霉素, 过滤除菌后为洗涤液。

* 本研究为国家自然科学基金资助课题
1986年11月16日收到。

2. 成虫的收集和培养 每只健康家兔感染复性日本血吸虫尾蚴 200—400 条。42 天后在无菌条件下灌注取虫。将收集的虫体用预温的洗涤液共洗涤 5—6 次,然后将虫体转移到盛有 851 培养液的培养皿中。培养液在使用前须用 4.4% 碳酸氢钠溶液将其 pH 值调至 7.6—7.8,置于通有 5% CO_2 的培养箱内预温半小时。

在解剖镜下,将活泼无损的雌雄虫成对接种到盛有 4ml 851 培养液的培养瓶内,每瓶 4 对。然后迅速将培养物置于 CO_2 培养箱内,培养温度为 37—37.5℃, CO_2 浓度为 5%。每周更换培养液 2 次,23 天后中止培养。

(三) 电镜标本的制备和观察

将培养早期产出的初产卵、培养 23 天后的雌雄虫先后用 2.5% 戊二醛、1% 锇酸和醋酸铀的 70% 酒精溶液固定^[3],分级酒精脱水,常规方法包埋。半薄切片后用 1% 美蓝染液染色,光镜下定位卵巢、卵模和睾丸等组织^[6]。定位后超薄切片,Hitachi 600 电镜下观察、拍照。在观察培养成虫的同时,我们还观察了载体内取出的正常成虫的生殖器官作为对照。

结 果

(一) 雌虫生殖器官的超微结构

1. 卵巢 卵巢周围的包膜完整,卵母细胞相互紧密排列。卵母细胞外形不规则,核大、内有核仁及异染色质。胞质边缘偶见圆形的皮质颗粒。卵母细胞发生不同程度的变性,卵巢后部卵母细胞变性愈加明显。严重者核膜皱缩,核仁及异染色质均消失;胞质内出现大小不等的空泡及形态不规则的电子致密颗粒,细胞界限消失(图版 I:1)。

2. 卵黄腺 成熟卵黄细胞核质比例较小,核仁少见,异染色质粗大。胞质中出现成熟卵黄细胞特征性的卵黄小滴和脂质小滴。有些卵黄小滴中的小致密颗粒相互融合,形成一团均匀的电子致密物,周围的内质网消失或粗面内质网表面的核糖体脱落。脂质小体数目增多、体积增大,甚至压迫细胞核(图版 I:2)。结构正常的卵黄小滴周围有丰富的粗面内质网分布(图版 I:3)。

3. 卵模和梅氏腺 卵模上皮细胞有立方形和扁平形两种类型。不同的上皮细胞形态可能取决于卵模的伸缩机能状态。上皮细胞核圆形,核仁结构不明显,含小量异染色质;胞质含丰富的分泌颗粒;胞质的腔面向卵模腔内伸出许多细长的指状绒毛(图版 I:4)。

卵模腔内可见卵黄细胞和卵黄细胞破裂后释出的卵黄物质。腔内大部分卵黄细胞是成熟的,含丰富的卵黄小滴和脂质小滴;仅少量细胞核质比例较大,核仁粗大;胞质中含少量脂质小滴和不均一的电子致密颗粒(图版 I:5)。这可能是未成熟卵黄细胞,被过早排入卵模腔内。

卵模周围有梅氏腺细胞分布(图版 I:6)。腺细胞核大,形态不规则。核仁亦粗大,电子密度高,异染色质稀少。胞质中有核糖体、粗面内质网、线粒体、高尔基复合体以及圆形、椭圆形的梅氏腺分泌颗粒(图版 II:7)。

4. 子宫 子宫内膜结构与体被相似。不同的是子宫壁较厚,内表面有丛状分布的指

状突起伸入宫腔内。子宫壁肌层及基底膜均完整无缺。宫腔内偶见虫卵样结构(图版 II: 8)。

(二) 雄虫生殖器官的超微结构

睾丸组织内可见支持细胞、精子和脂肪空泡。支持细胞的形态与曼氏血吸虫相似,外形不规则,胞质呈树突状。核的形态亦不规则,核仁、核膜清晰,异染色质散在分布。胞质内可见线粒体、核糖体和粗面内质网(图版 II: 9)。精子分布在支持细胞之间,以不同方向交错排列。精子头部较大,呈椭圆形,电子密度较高。精子周围可见一些脂滴分布(图版 II: 10)。

(三) 虫卵的超微结构

体外培养早期产出的初产期虫卵有完整的卵壳。根据卵壳的超微结构特点可将其分为内、中、外三层。内、外层较薄,电子密度较高。中层较厚,电子密度较内、外层低,其间有条带状高电子密度区和低电子密度区相间排列。未发现贯穿卵壳的卵孔。卵壳外层有短而锐利的微棘向外突出,有的微棘被折断。卵内卵黄细胞破溃为均匀的小颗粒,小颗粒之间有少量空泡分布(图版 II: 11)。培养后期虫体形成的虫卵体积小,形态亦不规则,且缺乏典型的卵壳结构。卵内未见卵细胞,虫卵仅为卵黄细胞和卵黄细胞释放的物质堆积而成(图版 II: 8)。

讨 论

迄今为止,无论是从童虫体外培养到产卵阶段的成虫还是载体内取出的正常成虫,均不能在体外长时间维持正常生殖机能,生殖器官出现不同程度的变性^[9,11]。与正常日本血吸虫生殖器官的超微结构比较,培养 23 天后雌虫的卵模、梅氏腺、卵黄管、子宫以及雄虫睾丸内的支持细胞、精子尚未见明显超微结构异常改变。仅雌虫的卵母细胞和成熟卵黄细胞发生变性。

卵母细胞的变性程度不一致。愈接近卵巢后部的卵母细胞愈成熟,其变性亦愈加明显。可能卵母细胞发育后期所需营养及其他条件更为复杂,而培养系统未能提供适宜条件,最终导致卵母细胞变性、坏死。Erasmus (1975)^[7] 根据卵黄细胞超微结构特点将其发育过程分为 4 期。本实验中,发育早期的未成熟卵黄细胞超微结构未见明显异常变化;成熟卵黄细胞则发生变性,胞质内卵黄小滴融合、解体,脂质小体数量增多、体积增大。周围缺乏内质网的卵黄小滴常融合,而结构正常的卵黄小滴周围有丰富的粗面内质网分布,因此,粗面内质网可能与正常卵黄小滴的形成有关。何毅勋等 (1974)^[11] 认为,卵黄细胞排入卵模后释出其中的卵黄物质。后者含有卵壳前身蛋白、酚类物质和酚酶等。这些成分都是形成卵壳的必需物质。酚酶在卵模内被激活后,将酚类或酪氨酸氧化为醌类物质^[10]。醌类物质与卵壳蛋白交联形成卵壳硬蛋白,最后建成坚韧的正常卵壳。培养 23 天后雌虫卵母细胞、含有形成卵壳必需成分的成熟卵黄细胞发生变性或坏死,卵壳形成的正常酶促生化过程可能发生障碍,因而导致无活性、无卵壳的异常虫卵产出。雄虫睾丸内尽管出现

一些脂肪空泡,但精子及支持细胞的超微结构无明显异常改变^[3]。因此,本实验的观察结果不仅可从超微结构水平解释体外培养后期产卵量显著减少,异常虫卵大量出现的原因,而且还提示,日本血吸虫雌虫的生殖器官尤其是卵巢和卵黄腺对体外培养条件最为敏感。为改进培养条件,在体外重复日本血吸虫在哺乳类宿主体内的生活史阶段,首先必须满足生殖系统营养、代谢的需要。

何毅勋等(1979)^[2]报道日本血吸虫卵壳超微结构可分内、外两层,卵壳上未见卵孔,他们认为通过卵壳的物质转运是以渗透的方式进行的。魏梅雄等(1983)^[4]发现日本血吸虫卵壳上有蛇形微管道。何、魏等均以宿主体内得到的虫卵为观察材料;因此,电镜下不能确定所观察的卵壳结构属于哪一期的虫卵。本实验采用体外培养方法,得到比较单一的初产期虫卵。超微结构显示,初产期虫卵卵壳可分三层,未发现卵孔。可能不同发育阶段虫卵卵壳各有其超微结构特点。初产期虫卵卵壳中层有条带状高电子密度区和低电子密度区相间分布。初产期虫卵发育过程中物质交换可能通过低电子密度区以渗透方式进行。但也不能排除体外培养过程中卵壳发生上述超微结构改变。

参 考 文 献

- [1] 何毅勋、杨惠中, 1974. 日本血吸虫卵形成的生理. 动物学报, **20**(2): 243—289.
- [2] 何毅勋、龚祖坝、马金鑫, 1979. 日本血吸虫卵壳的超微结构. 中国医学科学院学报, **1**(2): 144—146.
- [3] 洪涛主编, 1980. 电镜取材固定的几种不同方法. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 123 页. 科学出版社.
- [4] 魏梅雄、郑恩民、钱澄怀、陆秀英, 1983. 日本血吸虫卵卵壳及环卵沉淀物的超微结构. 中华医学杂志 **63**: 278—280.
- [5] Basch, P. F., 1981. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro: 2. production of infertile eggs by worms cultured from cercariae. *J. Parasitol.*, **67**(2): 180—190.
- [6] Erasmus, D. A., 1973. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and 'unisexual' female *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **67**(2): 165—183.
- [7] Erasmus, D. A., 1975. *Schistosoma mansoni*: Development of the vitelline cell, its role in drug sequestration, and changes induced by Astiban. *Exp. Parasitol.* **38**(2): 240—256.
- [8] Irie, Y., Basch, P. F., Beach, N., 1983. Reproductive ultrastructure of adult *Schistosoma mansoni* grown in vitro. *J. Parasitol.*, **69**(3): 559—566.
- [9] Otubanjo, O. A., 1981. *Schistosoma mansoni*: the sustentacular cells of testes. *Parasitology*, **82**(1): 125—130.
- [10] Seed, J. L., Kiltz, C. D., Bennett, J. L., 1980. *Schistosoma mansoni*: Tyrosine, a putative in vivo substrate of phenol oxidase. *Exp. Parasitol.*, **50**(1): 33—44.
- [11] Shaw, J. R. and Erasmus, D. A., 1977. *Schistosoma mansoni*: differential cell death associated with in vitro culture and treatment with Astiban (Roche). *Parasitology*, **75**(1): 101—109.
- [12] Wang Wei and Zhou Shulong, 1986. Cultivation in vitro of *Schistosoma japonicum* from cercariae to egg-producing adult stage. *Chin. Med. J.*, **99**(9): 713—716.

ULTRASTRUCTURE OF REPRODUCTIVE ORGANS OF ADULT *SCHISTOSOMA JAPONICUM* CULTURED IN VITRO

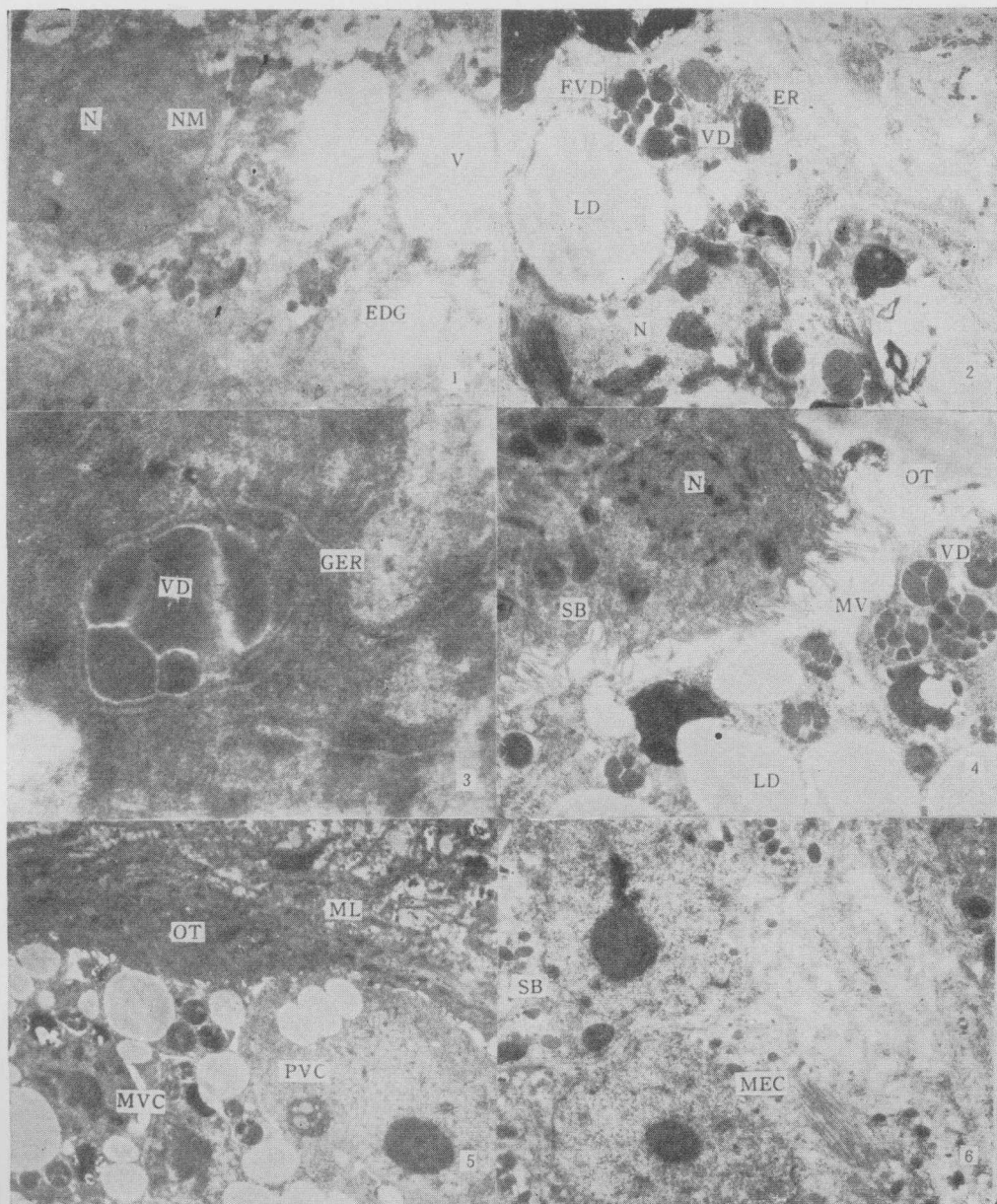
Hua Xianxin and Zhou Shulong

(Department of Medical Parasitology & Research Laboratory of Schistosomiasis, Hubei Medical College, Wuhan)

Abstract

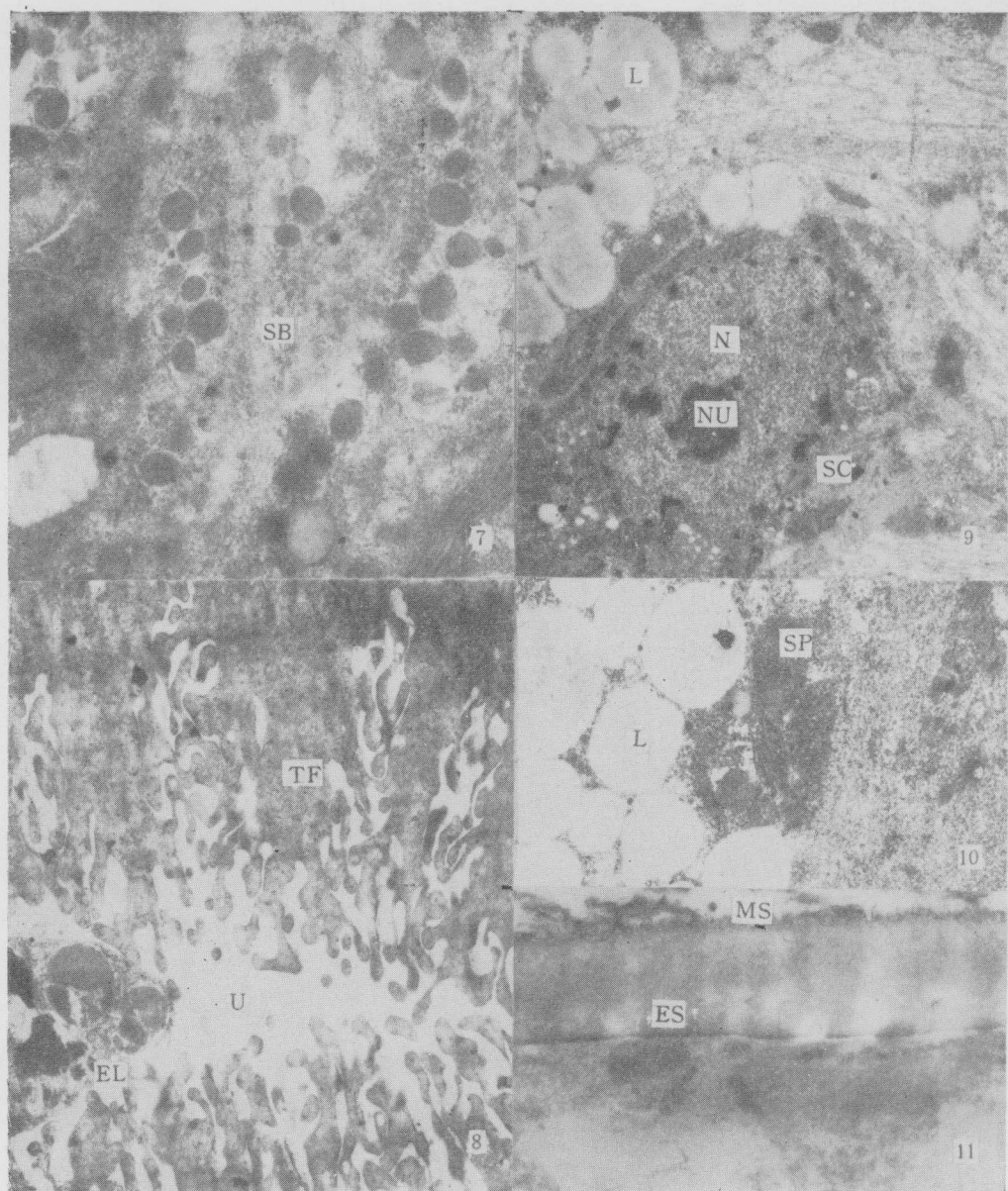
Adult *Schistosoma japonicum* was cultured in 851 medium for 23 days before ultrastructural observation. The ultrastructures of the reproductive organs of the adult worms reveal that some oocytes in the ovary degenerate or become necrotic. The mature vitelline cells also degenerate; some vitelline droplets have fused. On the other hand, the number of the lipid droplets and their volume increase. The eggs formed during the posterior period of culture are devoid of eggshells and ova. However, the reproductive organs, such as the testes in male and the ootype, Mehlis' gland and uterus in female seem to maintain their normal structures. It indicates that the female reproductive organs, especially the ovary and vitelline gland are most sensitive to the conditions of culture *in vitro*. The results may explain why the function of egg-laying declines and the percentage of the abnormal eggs increases in the posterior culture period, and also may provide clues to improve our culture system. The ultrastructure of the eggs demonstrate that there are belt-shaped zones of high-electron density alternating with zones of low-electron density in the eggshell of the eggs from early reproductive stage. The possible function of the structure is briefly discussed.

Key words *Schistosoma japonicum*, Reproductive organs, Ultrastructure, Culture *in vitro*, Egg-shell



- 1 卵巢后部切片,卵母细胞核(N)、核膜(NM)皱缩,胞质中出现空泡(V)和电子致密颗粒(EDG), $\times 12500$;
- 2 卵黄腺切片,示成熟卵黄细胞胞质内的卵黄小滴(VD)、融合的卵黄小滴(FVD)、内质网(ER)及增大的脂质小滴(LD)、被压变形的细胞核(N), $\times 18750$;
- 3 卵黄细胞切片,示正常卵黄小滴(VD)及其周围丰富的粗面内质网(GER) $\times 25000$;
- 4 卵模切片,示卵模(OT)上皮细胞腔面的微绒毛(MV)、细胞质内梅氏腺分泌小体(SB)、卵模腔内卵黄小滴(VD)和脂质小滴(LD) $\times 12500$;
- 5 卵模切片,示卵模腔内成熟卵黄细胞(MVC)和未成熟卵黄细胞(PVC),卵模肌层(ML)完整, $\times 6250$;
- 6 梅氏腺切片,示卵模(OT)周围梅氏腺细胞(MEC),胞质内有梅氏腺分泌小体(SB) $\times 12500$

1. Cross section of posterior end of the ovary, showing the wrinkled nuclear membrane (NM) and vacuoles (V) and electrondense granules (EDG) in cytoplasm of the oocyte, $\times 12500$; 2. Section of vitelline cells, showing the vitelline droplets (VD), fused vitelline droplets (FVD), endoplasmic reticulum (ER), and pressed nucleus (N) in cytoplasm of the mature vitelline cell, $\times 18750$; 3. Section of a vitelline droplet (VD), showing abundant granular endoplasmic reticulum (GER) around the droplet, $\times 25000$; 4. Section of the ootype (OT), showing the microvilli (MV) on the luminal epithelia, the electron-dense secretory bodies (SB) of Mehlis' gland cells and vitelline droplets (VD) and lipid droplets (LD) in the lumen, $\times 12500$; 5. The mature vitelline cells (MVC) and premature vitelline cells (PVC) in the lumen of the ootype (OT) with complete muscle layers (ML), $\times 6250$; 6. Section of Mehlis' gland showing Mehlis' gland cells (MEC) near the wall of the ootype (OT) and the secretory bodies in the Mehlis gland cells, $\times 12500$



7. 梅氏腺切片, 示不同成熟阶段的梅氏腺分泌小体 (SB), $\times 20000$; 8. 子宫切片, 示子宫 (U) 内壁表面不规则的皮层皱褶 (TF) 和宫腔内无卵壳的卵样结构 (EL), $\times 12000$; 9. 睾丸切片, 示支持细胞 (SC)、胞核 (N)、核仁 (NU)、内质网 (ER)、支持细胞周围的脂滴 (L), $\times 10000$; 10. 睾丸切片, 示精子 (SP) 及其周围的脂滴 (L), $\times 10000$; 11. 体外初产期虫卵切片, 卵壳 (ES) 内、外层薄而致密, 外层表面附有微棘 (MS), 中层有条带状高电子密度区和低电子密度区相间排列, $\times 25000$

7. Section of Mehlis' gland, showing the secretory bodies (SB) at different stages of maturation, $\times 20000$; 8. Section of the uterus, showing the irregular tegument foldings (TF) on the wall of the uterus and egg-like structure (EL) without eggshell, $\times 12000$; 9. Section of the testes, showing the nucleus (N), nucleolus (NU), and endoplasmic reticulum (ER) in the sustentacular cells (SC) and lipid drops (L), $\times 10000$; 10. Section of the testes, showing the sperms (SP) and lipid drops (L), $\times 10000$; 11. Details of the eggshell of an egg of early reproductive stage, showing the electrondensities of external and internal layers being higher, the microspines (MS) attaching to the exterior layer and the belt-shaped zones of high-electron density alternating with those of low-electron density, $\times 25000$