

# 副衣原体 BN9 株成堆裸露颗粒的发现及其形成机制探讨

李勤学 姜庆五 沈洁 李子华

**【摘要】** 目的 探索副衣原体在棘阿米巴内的生长发育变化特征。方法 采用阿米巴共培养技术,通过染色和电镜观察了解不同时期滋养体中副衣原体生长的形态变化。结果 在电镜下,可见副衣原体 BN9 存在典型的二个生活形态:即网织体和原体,在滋养体内可形成成熟的吞噬内体,网织体在吞噬内体内以二分裂方式繁殖,然后发育成成熟的原体颗粒,吞噬内体中,可见原体与网织体并存;胞浆中可见较多的游离原体颗粒。在成熟囊胞中,胞浆内可见较多的游离原体颗粒。感染后期,观察到成堆的圆形裸露的颗粒,有原体和网织体,而宿主阿米巴的细胞结构已被溶解,吉姆尼兹染色表现为蓝紫色。结论 副衣原体在阿米巴内可形成吞噬内体,出现二个发育期:网织体期和原体期,可发生胞内释放,反复形成吞噬体而复制繁殖,最终导致阿米巴滋养体裂解或溶解,轻度感染的滋养体可发生囊胞化,成熟囊胞的胞浆内可携带有感染能力的原体颗粒。

**【关键词】** 副衣原体;自由生活阿米巴;电镜观察

The discovery of naked cluster particles of *Parachlamydia* and its developmental mechanism LI Qin-xue, JIANG Qing-wu, SHEN Jie, LI Zi-hua. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: JIANG Qing-wu, Email: qwjiang@shmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To study the survival and developmental morphology of *Parachlamydia* (BN9) within *Acanthamoeba*. **Methods** The morphology of BN9 within *Acanthamoeba* was studied by inverted phase contrast microscope, electron microscope, Gimenez and AO-staining with amoebal co-culture. **Results** The endosomal maturation-blocked were formed after the egress of BN9. Two developmental stages-elementary and reticulate bodies, were both observed within the vacuoles. The reticulate bodies, multiplied by binary fission, were located mainly within the vacuoles, while the elementary bodies can also be located in the plasma individually. The naked cluster particles were observed after the trophozoites cytolysis with Gimenez-staining. The light infectious trophozoites could encyst, and elementary bodies could survive within the mature cysts. **Conclusion** The egress of BN9 could form the endosomal maturation-blocked, which was presented in two developmental stages-elementary and reticulate bodies. It exhibited the cytolysin activity that could lyse the infectious trophozoites and were expelled in the vesicles. A few light infected amoeba could encyst with survival elementary bodies in the plasma.

**【Key words】** *Parachlamydia*; *Acanthamoeba*; Electron microscopy

自 1997 年首次发现自由生活阿米巴胞内菌的副衣原体,至今被发现的副衣原体已有 15 种<sup>[1,2]</sup>,具有与衣原体属相类似的特性,如具有典型的发育阶段:革兰阴性的网织体(reticulate body, RB)期和革兰阳性的原体(elementary body, EB)期<sup>[3]</sup>,但与常见的衣原体如肺炎衣原体不同,不能用常规的方法进行培养,除了进行阿米巴的共培养外,未见有其他培养成功的报道,并且副衣原体在阿米巴内的

生活周期的特性尚不清楚,其寄生或共生机制知道更少。而越来越多的报道其与临床呼吸道肺炎有关,可能是人类的潜在致病菌<sup>[4-7]</sup>。因此我们进行副衣原体 BN9 在棘阿米巴培养中的生活特性及其共生机制的研究。

## 材料与方法

1. 菌株及培养方法:副衣原体 BN9 株(ATCC VR1476),在卡氏棘阿米巴(ATCC 30579)中的共同培养,培养基采用 PYG1034[蛋白胨(Difco 0118) 10.0 g;酵母浸液(Difco 0127)10.0 g;酵母核酸

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院  
通讯作者:姜庆五,Email:qwjiang@shmu.edu.cn

(Sigma R-6625) 1.0 g ; 叶酸 15.0 mg ; 氯高铁血红素 1.0 mg ; 双蒸水 880.0 ml ; 小牛血清 100.0 ml ; 缓冲液 20 ml (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  18.1 g ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25.0 g ; 双蒸水 1.0 L ) , 校正 pH 至 6.5 ] 在细胞瓶中 30℃ 共培养 , 同时以空白阿米巴培养为对照。

2. 检测方法 : 在倒置显微镜下观察阿米巴滋养体的生长情况 , 3 天左右细胞瓶内棘阿米巴滋养体处于对数生长期 , 分别于 48 h、72 h 和 5 天成囊胞后 , 用吸管吹吸液体 , 使贴壁阿米巴脱落于液体中 , 然后取培养液 2~3 ml , 1000 r/min , 离心 10 min , 弃上清后 , 将沉淀加培养液悬浮成密度约为  $1 \times 10^6$  个 /ml 进行玻片细胞涂片 , 然后进行吉姆尼兹染色 , 在显微镜下观察。

3. 电镜观察 : 同时分别于 48 h、72 h、5 天取培养液 2 ml , 离心后用戊二醛固定 , 超薄切片后透射电镜观察。

### 结 果

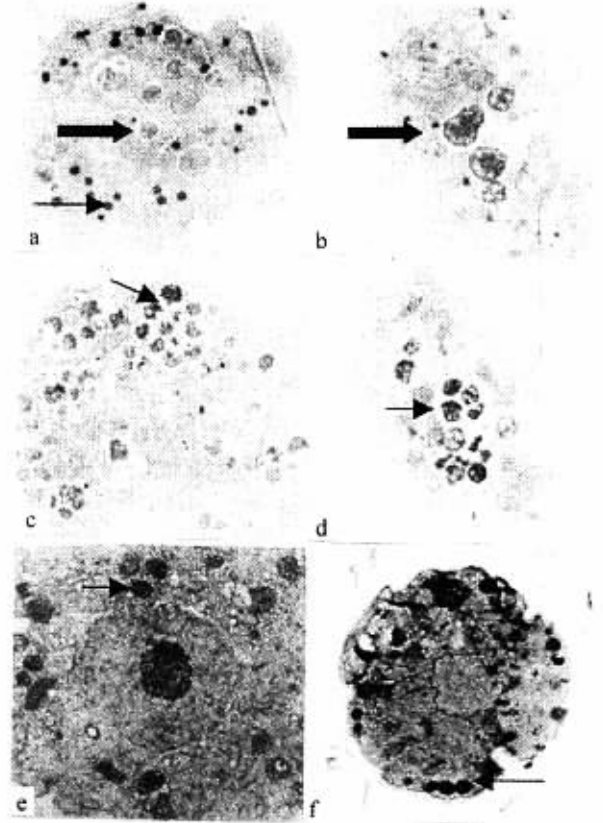
1. 副衣原体在卡氏棘阿米巴内的生活发育 : 电镜下超微结构可见在阿米巴中 BN9 颗粒存在两种密度明显不同的形态 , BN9 颗粒在滋养体内可形成吞噬体内 , 其中密度较低的为网质体 , 可表现为不同的形态 , 有椭圆形、半月形、不规则形 , 大小约为  $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m}$  ( 图 1 a ) ; 吞噬泡内可见网质体的二分分裂形态 ( 图 1 b ) ; 吞噬体内可见单个网质体 , 也可见多个网质体 , 部分可见少量的致密的原体颗粒 , 小圆形 约  $0.2 \sim 0.4 \mu\text{m}$  , 也可与网织体共存于吞噬体中 ( 图 1 b、c、d ) 。在胞浆中 , 也可见游离的原体颗粒 , 单个分散分布或成小堆。同时可见在吞噬体中网织体颗粒溶解现象。在成熟的阿米巴囊胞的胞浆中 , 可见较多的游离的原体颗粒 ( 图 1 e、f ) 。

2. 染色后形态学观察 : 在阿米巴共培养后期 , 我们观察到大部分感染的阿米巴滋养体出现溶解 , 副衣原体表现为成堆的大小不等的裸露圆形颗粒 , 在吉姆尼兹染色中 , 呈蓝紫色 , 其分布正好占满整个阿米巴原虫轮廓 ( 图 2 ) 。

### 讨 论

实验中 , 可见副衣原体存在明显的二个生活周期形态 , 即网织体和原体期 , 这与衣原体属的生活史相同 , 在电镜下可见致密的原体被阿米巴吞噬并在胞内形成吞噬体 , 可见原体在吞噬泡中发育成疏松的具有代谢能力的网织体 , 并经二分裂方式繁殖 , 分

裂后的网织体再发育成致密的原体 , 这与 Amann 等<sup>[1]</sup>的副衣原体的发育假设相同 , 而 Gilbert , Raoul<sup>[8]</sup>在电镜下还可见有月牙体阶段 , 认为可能是副衣原体发育的介于网织体和原体间的生活期 , 也具有感染能力。



a : → 为 EB 颗粒 , → 为在吞噬溶酶体空泡内的 RB ; b : RB 在吞噬体空泡内二分裂增殖 ; c、d : 阿米巴滋养体吞噬体空泡内含有较多的副衣原体颗粒 , 其中 RB 和 EB 共存 (  $\times 6500$  倍 ) ; e、f : 阿米巴囊胞内的 EB 颗粒 , 游离形式存在 (  $\times 6500$  倍 )

图1 卡氏棘阿米巴内副衣原体的电镜观察



阿米巴滋养体已被副衣原体融解 , 可见大小不同的颗粒 , 大的为 RB 颗粒 , 小的为 EB 颗粒 (  $\times 1000$  倍 )

图2 副衣原体致阿米巴滋养体溶解的吉姆尼兹染色观察

胞内菌感染阿米巴滋养体及其在胞内寄生或共生机制的认识,主要来自于对嗜肺军团菌的研究,胞内菌可通过细菌的配体如菌毛或原虫受体介导吸附至宿主细胞的表面<sup>[9]</sup>,进入阿米巴后 1 h 内,被封入由线粒体包围的吞噬体中,细菌吞噬体被多层来自于粗内质网膜所包围,形成一种阻断成熟的吞噬内体(endosomal maturation-blocked, EMB),该吞噬体被阻断溶酶体的溶合,胞内菌可在 EMB 中复制繁殖<sup>[10]</sup>。

本研究电镜下可见副衣原体颗粒被吞后,在滋养体内形成大小不同的吞噬体,可见明显的吞噬体外膜结构,有的为单个的原体颗粒,有的原体在吞噬泡中发育成密度较低的网织体,并发生与衣原体一样的二分裂,发育成成熟的原体,这与嗜肺军团菌在阿米巴滋养体中的生存机制相似,但在副衣原体感染的滋养体的胞浆中,可见散在的原体游离分布其中,而未见吞噬体结构,暂称为游离状原体颗粒,其形成来源可能为:①在成熟吞噬体中,发育成熟并具有感染能力的原体颗粒可发生胞内胞吐,释放原体进入胞浆中,成为游离的原体;②这是由体外经滋养体的胞吞作用进入胞浆中的原体,尚未开始形成吞噬体。胞浆中的游离的原体是否能够长期独立存在,是否能抵抗宿主细胞中溶菌酶类消化?其生存结果尚不清楚。我们认为游离原体长期独立存在可能性较小,因此推测,游离的原体在滋养体中需进一步受内质网的包围,形成新的阻断成熟吞噬体,并在内大量繁殖,再发生胞内裂解释放,这样连续进行,最终导致整个滋养体的溶解或裂解,而副衣原体最终被释放至胞外,感染新的滋养体。在本研究中,通过不同的染色,我们观察到阿米巴滋养体的完全溶解的现象,在溶解后的滋养体中可见裸露成堆的副衣原体颗粒,占据整个阿米巴滋养体,这印证了我们的上述推测,这与军团菌的直接胞吐释放,而不裂解宿主的方式不同<sup>[11,12]</sup>。

实验中我们观察到在阿米巴的囊胞内生存的主要为游离原体颗粒,而不形成吞噬体,这些游离的原体的生存机制可能是,在囊胞静止期,胞内一些溶菌酶类活性降低,因此胞浆中的游离原体颗粒能够不形成吞噬体而游离生存,不被溶菌酶分解杀死,同时在囊胞中的游离原体可因囊胞外壳保护,能够抵制不利的生存外环境,如温度、营养条件、消毒剂和抗生素等,在适宜的条件下,囊胞再发育成滋养体时,游离原体又能形成新的吞噬体发育繁殖。在实验中

我们观察到大部分感染后的滋养体发生溶解外,部分轻度感染的滋养体可发生囊胞化,这与已报道的感染副衣原体的阿米巴大部分失去成囊活力,但仍有少量可发生囊胞化的结果一致<sup>[8,13]</sup>,但也有学者认为感染衣原体后的阿米巴滋养体失去囊胞化的能力<sup>[14]</sup>。

越来越多研究认为副衣原体与临床呼吸系统疾病有关<sup>[3,7,15-19]</sup>,同时,与成人川崎综合征和某些血管损害有关。副衣原体的原体颗粒能够在阿米巴囊胞中长期生存,阿米巴就成为其重要的环境贮存宿主,也是它的重要的传播媒介。棘阿米巴在环境中广泛分布,因此这些衣原体样微生物存在潜在的广泛传播的危险,由于副衣原体只能在阿米巴培养中被发现,其流行状况可能被低估,值得引起重视。

#### 参 考 文 献

- 1 Amann R, Springer N, Ludwig W, et al. Obligate intracellular bacterial parasites of Acanthamoebae related to Chlamydia spp. Appl Environ Microbiol, 1997, 63:115-121.
- 2 Daniele C, Venditti D, Valassina M. New parachlamydial 16S rDNA phylotypes detected in human clinical samples. Res Microbiol, 2002, 153:563-567.
- 3 Gilbert G, Raoult D. Parachlamydia ceae: potential emerging pathogens. Emerg Infect Dis, 2002, 8:625-630.
- 4 Corsaro D, Venditti D, Le FA, et al. A new chlamydia-like 16S rDNA sequence from a clinical sample. Microbiology, 2001, 147:515-516.
- 5 Michel R, Bradley HP, Muller KD, et al. Acanthamoeba from human nasal mucosa infected with an obligate intracellular parasite. Eur J Protistol, 1994, 30:104-110.
- 6 李勤学, 姜庆五. 自由生活阿米巴胞内寄生菌的研究进展. 中国公共卫生, 2004, 20:115-117.
- 7 Birtles RJ, Rowbotham TJ, Story C, et al. Chlamydia-like obligate parasite of free-living amoebae. Lancet, 1996, 349:925-926.
- 8 Gilbert G, Raoult D. Crescent bodies of Parachlamydia acanthamoeba and its life cycle within acanthamoeba polyphaga: an electron micrograph study. Appl Environ Microbiol, 2002, 68:3076-3084.
- 9 Omar SH, Venkataraman C, Bradley JH, et al. Heterogeneity in the Attachment and Uptake Mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, Legionella pneumophila, by protozoan hosts. Appl Environ Microbiol, 1998, 64:126-132.
- 10 Koji M, Ogawa M, Miyamoto H, et al. Entry and intracellular localization of Legionella dumoffii in vero cells. Microbial Pathogenesis, 1998, 24:65-73.
- 11 Gil S, Howard AS. How is the intracellular fate of the Legionella pneumophila phagosome determined? Trend Microbiol, 1998, 7:253-255.
- 12 Maelle M, Yousef AK. How does Legionella pneumophila exit the host cell? Trend Microbiol, 2002, 11:258-260.
- 13 Maureen GF, Dvoskin B, Kahane S. Infections with the chlamydia-like microorganism Simkania negevensis: a possible emerging pathogen. Micro Infect, 2003, 5:1013-1021.
- 14 Matthias H, Wagner M, Moller KD, et al. Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba hartmannella vermiformis. Microbiology, 2000, 146:1231-1239.

- 15 Kahane S, Dvoskin B, Mathias M, et al. Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:4789-4795.
- 16 Gilbert G, Berger P, Papazian L, et al. Parachlamydia cecae as rare agents of pneumonia. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9:755-756.
- 17 Jacobus M, Ossewaarde, Meijer A. Molecular evidence for the existence of additional members of the order Chlamydiales. *Microbiology*, 1999, 145:411-417.

- 18 Andres E, Heinemann M, Simnacher U, et al. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia Pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63:1396-1399.
- 19 Matthias H, Wagner M. Evidence for additional genus-level diversity of Chlamydiales in the environment. *FEMS Microbiol Letters* 2001, 204:71-74.

(收稿日期 2004-04-26)  
(本文编辑:尹廉)

## · 疾病控制 ·

### 湖北省 1997~2002 年出生缺陷监测分析

龚丽艳 毛宗福 李向东

随着传染性疾病和感染性疾病逐渐得到控制,出生缺陷逐渐成为导致围产儿、婴儿死亡的重要原因,成为主要的公共卫生问题之一。我们对湖北省 1997~2002 年出生缺陷监测资料进行分析。

1. 对象与方法:采用以医院为基础的监测方案。监测对象为监测医院出生的孕 28 周到产后 7 天的围产儿。22 类出生缺陷的诊断,依据中国出生缺陷监测中心下发的“22 类出生缺陷诊断标准”。专人填写、收集资料,所有资料录入湖北省出生缺陷计算机管理系统,SPSS 11.0 统计软件处理、分析。

2. 结果:共监测围产儿 130 196 例,占同期出生人口总数的 7.0%。6 年监测围产儿基本特征构成比变化经行  $\chi^2$  检验,居住地、孕母年龄、胎数及转归的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。运用趋势  $\chi^2$  检验:监测对象中,农村围产儿比例上升,孕母年龄  $> 30$  岁组有增加趋势,但均不是简单线性上升关系,胎数随时间有线性上升趋势,转归随时间无上升或下降趋势。1997~2002 年全省出生缺陷监测网共发现出生缺陷儿 1042 例,其中发生一种缺陷所占比例 84.8%,发生二种及以上缺陷所占比例 15.2%,平均出生缺陷患病率 80.0/万。6 个不同年度经行  $\chi^2$  检验差异有统计学意义( $\chi^2 = 16.5, P = 0.006$ )。经趋势  $\chi^2$  检验:回归  $\chi^2 = 13.5, P < 0.01$ ,偏差  $\chi^2 = 3.0 (P > 0.05)$ ,呈现逐年线性上升趋势,其趋势系数  $b = 5.42/万$ ,95% 可信区间(CI):2.54/万~8.30/万。不同居住地出生缺陷患病率农村高于城市( $\chi^2 = 4.32, P < 0.05$ )。6 年间出生缺陷患病率变化,经趋势  $\chi^2$  检验:城镇出生缺陷率与时间之间没有相关关系;农村地区出生缺陷率与时间呈现逐年线性上升趋势,不同性别出生缺陷患病率男性高于女性( $\chi^2 = 15.5, P < 0.001$ )。进一步应用趋势  $\chi^2$  检验,男性出生缺陷率与时间之间没有相关关系;女性出生缺陷率与时间呈线性上升关系。不同孕母年龄出生缺陷患病率经趋势  $\chi^2$  检验:随孕母年龄增加出生缺陷患病率有线性

上升趋势,其趋势系数  $b = 7.23/万$ ,95% CI:3.82/万~10.64/万。不同季节出生缺陷患病率的变化经  $\chi^2$  检验无统计学差异( $\chi^2 = 7.17, P > 0.05$ )。不同胎数围产儿出生缺陷患病率多胎高于单胎( $\chi^2 = 3.93, P < 0.05$ )。出生缺陷患病率顺位前 6 位(平均患病率  $> 5/万$ )依次为全唇裂、多指(趾)、外耳其他畸形、先天性脑积水、肢体短缩、神经管畸形。前 6 位出生缺陷合计占全部 22 种出生缺陷总数的 55.9%。22 种出生缺陷按年度进行趋势  $\chi^2$  检验表明,6 年来多指(趾)、腹裂、唐氏综合征三种缺陷患病率有变化( $P < 0.05$ )。对多指(趾)、腹裂、唐氏综合征三种缺陷进一步的线性趋势分析,结果患病率呈线性趋势增长。主要出生缺陷城乡分布:多指(趾)、小耳畸形和无脑畸形患病率乡村高于城市( $P < 0.05$ )。先天性心脏病患病率城市高于乡村( $P < 0.01$ )。其他出生缺陷城乡差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。主要出生缺陷性别分布:脊柱裂患病率女性高于男性( $P < 0.01$ )。外耳其他畸形、尿道下裂患病率男性高于女性( $P < 0.05$ )。其他类别差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。出生缺陷平均诊断孕周( $37.6 \pm 3.37$ )周,各年比较差异无统计学意义。出生缺陷确诊方法主要为临床诊断,占 67.75%;其次为超声检查,占 21.33%;尸体解剖、染色体检查及其他检查方法所占构成比依此为 5.52%、2.92% 和 2.50%。

本出生缺陷监测网数据均来自医院产科的出生登记,所记载的出生缺陷均系孕 28 周至出生后 7 天内的诊断,资料反映的出生缺陷发生情况实际上是出生时出生缺陷的患病率,低于整个人口出生缺陷发生率。监测的围产儿居住地城镇围产儿明显多于乡村,对真实地反映农村出生缺陷的发生情况可能会有一定的偏差。1997~2002 年湖北省 6 年出生缺陷患病总体变化呈现出上升的趋势,但居全国中下水平。全唇裂和多指(趾)畸形始终位居第一或第二位,是高发畸形,多指(趾)、腹裂、唐氏综合征患病率有增长趋势。找出这些畸形发生的原因加强预防是今后工作的主要方向。

(收稿日期 2004-04-15)  
(本文编辑:张林东)

作者单位:430070 武汉 湖北省妇幼保健院(龚丽艳),武汉大学基础医学院(毛宗福)湖北省卫生厅(李向东)