

梭子蟹肌孢虫的组织分布与形式特点

王元¹, 周俊芳¹, 房文红^{1*}, 李新苍¹,
马立才¹, 赵姝¹, 陈甜甜^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 利用透射电镜技术研究了梭子蟹肌孢虫在三疣梭子蟹体内的组织分布和形式特点, 结果显示, 梭子蟹肌孢虫主要寄生在骨骼肌、血淋巴、鳃、胃和肠, 而在心脏、肝胰腺、性腺和神经等部位未发现。在胃和肠的结缔组织以及骨骼肌中发现梭子蟹肌孢虫的分裂体, 表明其可以在这些组织的细胞中增殖, 尤其是在骨骼肌细胞中, 大量不同发育时期的虫体显示了该虫对骨骼肌的亲嗜性。梭子蟹肌孢虫的分裂体以及其他增殖期的细胞仅寄生于宿主细胞内, 而成熟的孢子可存在于宿主细胞内和细胞外基质中。梭子蟹肌孢虫的孢子有6种存在形式, 在宿主细胞内和宿主细胞外基质中各有3种。孢子在宿主细胞内的存在形式: ①孢子直接寄生于宿主细胞质中, 自由游离, 无膜包围; ②孢子被单层膜包围, 类微绒毛样突起物部分溶解, 这种情况见于专业性吞噬细胞——无颗粒细胞内; ③孢子被层状环形膜结构包围, 类微绒毛样突起物清晰, 这种情况见于非专业性吞噬细胞内。孢子在宿主细胞外基质中的存在形式: ①孢子自由游离, 无膜包围, 类微绒毛样突起物清晰; ②多个孢子被体液性被囊包围, 类微绒毛样突起物清晰; ③孢子无膜包围, 孢外壁与类微绒毛样突起物消失。本研究阐明了梭子蟹肌孢虫在三疣梭子蟹体内的组织分布和孢子的存在形式, 为进一步研究微孢子虫在宿主蟹体内的迁移规律提供了重要的基础数据。

关键词: 微孢子虫; 三疣梭子蟹; 寄生; 存在形式

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

微孢子虫具有广泛的宿主类型, 可感染大多数无脊椎动物和一些脊椎动物。早在1838年就有微孢子虫感染鱼类的报道, 至今已有170多年的研究历史。目前已发现90多个属的微孢子虫可感染水生动物, 且对部分经济品种造成重要损失^[1]。微孢子虫是海水和淡水甲壳类动物中常见致病寄生虫之一, 以蟹为宿主的种类约11~12种^[2]。国外研究发现*Ameson*属的微孢子虫主要侵染海水蟹类^[2-4], 本实验室前期的研究表明, 梭子蟹肌孢虫(*Ameson* sp.)可感染我国三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*), 是我国沿海养殖三疣

梭子蟹的重要预防病原, 可大量寄生于三疣梭子蟹骨骼肌细胞中, 并导致骨骼肌组织发生白化症状^[5], 但其是否能寄生于三疣梭子蟹其他组织(或部位), 寄生的形式是否一样, 这些未知的问题是进一步研究梭子蟹肌孢虫在宿主体内迁移规律的重要基础。鉴于此, 实验利用透射电镜技术研究了梭子蟹肌孢虫在宿主体内的寄生组织分布和形态特征, 发现了孢子新的存在形式, 并更全面描述了其在宿主体内的寄生形式, 初步探讨了寄生形式与宿主细胞及细胞间质之间的关系, 丰富了微孢子虫病原生物学数

收稿日期: 2016-04-07 修回日期: 2016-09-18

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303047); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(东海水产研究所 2014T03)

通信作者: 房文红, E-mail: fwenhong@163.com

据, 为切断梭子蟹肌孢子虫的体内迁移途径和防治三疣梭子蟹微孢子虫病提供了理论依据。

1 材料与方 法

实验用蟹为江苏沿海三疣梭子蟹养殖区的活体雌、雄病蟹, 个体质量为100~350 g。

样品固定 先用2 mL无菌注射器抽取病蟹游泳足基节处血淋巴1 mL, 迅速取下针头, 注入到装有1 mL戊二醛—甲醛混合固定液(含量分别为2.5%和2%)的离心管中, 轻微颠倒混匀, 固定5 min后2000 r/min离心5 min, 弃上清液, 向离心管中加入新的戊二醛—甲醛混合固定液固定。解剖病蟹, 取鳃、心脏、肝胰腺、性腺(卵巢和精巢)、肠、神经、骨骼肌等组织, 用解剖刀切成1~2 mm³的小块, 置于戊二醛—甲醛混合固定液中, 4℃固定24 h。

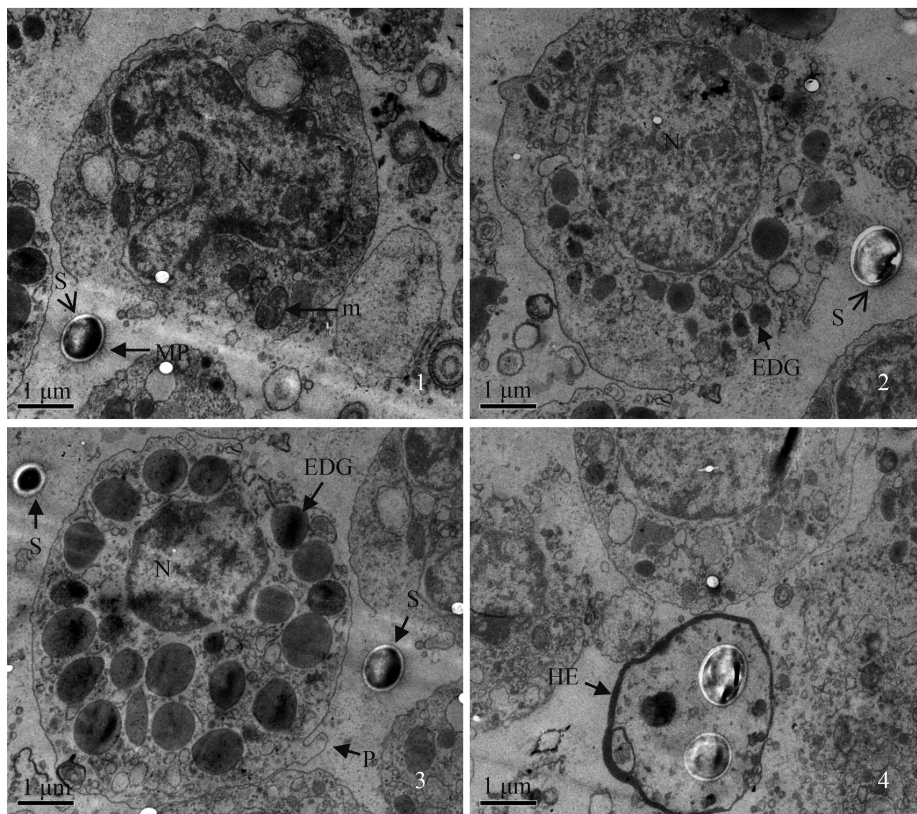
透射电镜样品处理 样品经1%锇酸复固定、磷酸缓冲液漂洗、梯度乙醇逐级脱水、环

氧树脂包埋等一系列常规步骤, 制成超薄切片, 再经醋酸铀、柠檬酸铅双重染色等处理, 最后在JEM-1230型透射电镜下观察、拍照。

2 结 果

2.1 血淋巴中的梭子蟹肌孢子虫

梭子蟹肌孢子虫的孢子随机散布在血淋巴中的无颗粒细胞(图版I-1)、小颗粒细胞(图版I-2)和大颗粒细胞(图版I-3)周围, 多数呈游离状态, 少数由体液性被囊包围(图版I-4), 被囊外表呈黑色, 大小为3.7 μm×2.9 μm, 与血细胞膜相比较厚, 电子致密。游离孢子及体液性被囊内孢子的孢壁周围均具有呈放射状的类微绒毛样突起物, 绒毛细、短, 长度约100 nm。大颗粒细胞虽伸出伪足, 但在其细胞膜表面未发现游离孢子粘附。梭子蟹肌孢子虫卵块发育期和产孢期的细胞在三类血细胞内的现象也未发现。



图版 I 三疣梭子蟹血淋巴中梭子蟹肌孢子虫

N.血细胞核; m.线粒体; S.成熟孢子; MP.类微绒毛样突起物; EDG.电子致密颗粒; P.伪足; HE.体液性被囊, 下同

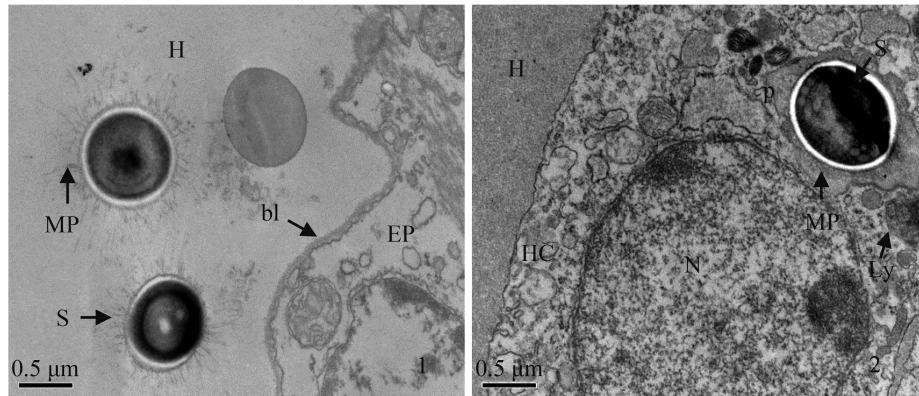
Plate I The microsporidian in the hemolymph of *P. trituberculatus*

N.the nucleus of hemocyte; m.the mitochondrion; S.the mature spore; MP.the microvilli-like projections; EDG.the electron dense granule; P.the pseudopodium; HE.the humoral encapsulation, the same below

2.2 鳃中的梭子蟹肌孢子虫

在三疣梭子蟹鳃上皮细胞中未观察到梭子蟹肌孢子虫孢子，但在鳃中央血腔的血淋巴中发现数个孢子游离，孢壁周围的类微绒毛样突起物结构清晰、呈放射状(图版II-1)。同时，在血

淋巴中的无颗粒细胞内观察到梭子蟹肌孢子虫孢子：孢子由不规则的吞噬小体膜紧紧约束；类微绒毛样突起物部分存在，但已不明显，似与膜内的物质融合，且长度与血淋巴中游离的孢子相比较短(图版II-2)。



图版 II 三疣梭子蟹鳃中梭子蟹肌孢子虫

H.血淋巴；bl.基膜；EP.上皮细胞；HC.血细胞；p.吞噬小体；N.宿主细胞核；Ly.溶酶体，下同

Plate II The microsporidian in the gill of *P. trituberculatus*

H. hemolymph; bl. basal lamina; EP. epithelial cell; HC. haemocyte; p. phagosome; N. the nucleus of the host cell; Ly. lysosome, the same below

2.3 胃中的梭子蟹肌孢子虫

梭子蟹肌孢子虫寄生在胃黏膜下层的疏松结缔组织的细胞内和细胞外基质中。孢子在细胞内存在两种形式：一种形式是孢子由层状环形膜结构包围(图版III-1, 2)，孢壁外的类微绒毛样突起物基部较粗、嗜碱性，整体结构依然清晰可辨，电子致密的层状环形膜结构染色较深，周围附着宿主线粒体，而且在胃细胞内观察到梭子蟹肌孢子虫的分裂体，分裂体含有一个二倍体核(图版III-1)；另一种形式是孢子外无膜包围，孢子直接生存于宿主的细胞质中，类微绒毛样突起物及孢子内部结构清晰可辨，孢子附近分布有宿主线粒体(图版III-3)。孢子在疏松结缔组织的细胞外基质中也处于游离状态，同样无膜结构包围(图版III-4)。

2.4 肠中的梭子蟹肌孢子虫

在肠外膜层疏松结缔组织的细胞中观察到梭子蟹肌孢子虫的分裂体和孢子。分裂体位于宿主细胞核附近，处于卵块发育期，其内含有一个二倍体核和大量形状大小不一的空泡(图版IV-1)。孢子由多层膜结构包围，类微绒毛样突起物

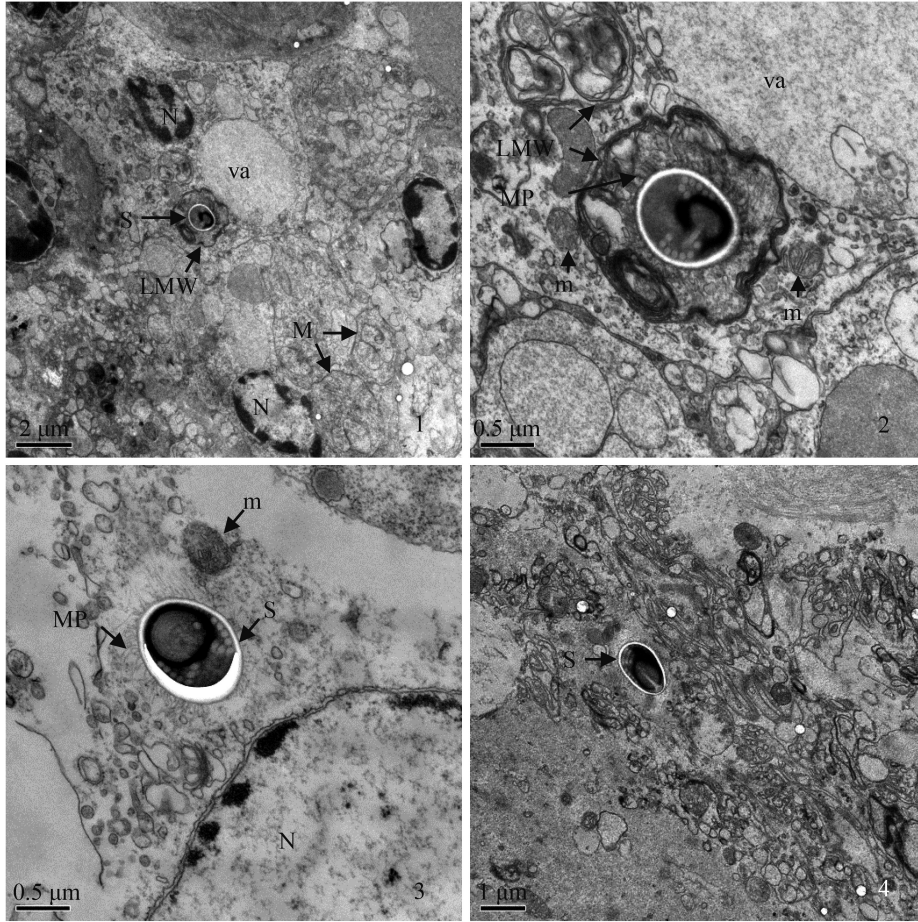
结构清晰、呈放射状并支撑膜结构。多层膜结构的层数并非一致，在与较长的类微绒毛接触的部分呈现单层结构，其他部分则为两层或两层以上。多层膜外粘附线粒体和溶酶体，溶酶体膜与多层膜结构发生融合(图版IV-2)。特殊的现象是，在由3个细胞紧靠形成的小体积的细胞外基质中发现梭子蟹肌孢子虫的孢子，孢外壁及类微绒毛样突起物已经无法辨识，透明孢内壁周围的细胞外基质电子密度增加，染色比外围的基质深(图版IV-3, 4)。

2.5 骨骼肌中的梭子蟹肌孢子虫

在肌纤维内观察到大量不同时期的梭子蟹肌孢子虫，包括分裂体、母孢子、孢子母细胞和孢子。各个时期的虫体均直接在肌浆中生长发育，虫体除自身的质膜(或孢壁)结构外无其他膜结构包围。有些孢子外壁上的类微绒毛样突起物在肌浆中呈摆动状，有些则呈放射状(图版V)。

2.6 其他部位

心脏、肝胰腺、性腺(卵巢和精巢)、神经等器官组织中均未观察到梭子蟹肌孢子虫孢子或其他时期的虫体。



图版 III 三疣梭子蟹胃中的梭子蟹肌孢虫

va.空泡; M.分裂体; LMW.层状环形膜结构, 下同

Plate III The microsporidian in the stomach of *P. trituberculatus*

va.vacuole; M.meront; LMW.lamellar membranous whorls, the same below

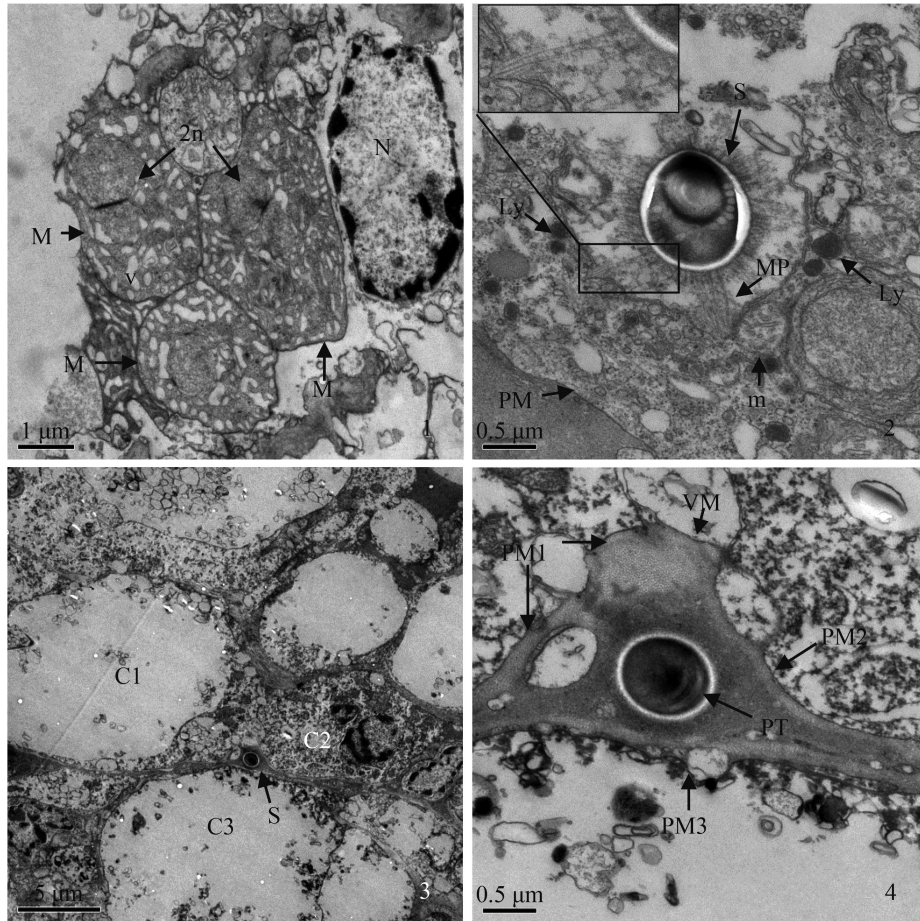
2.7 梭子蟹肌孢虫孢子在宿主体内的存在形式

本研究发现梭子蟹肌孢虫的孢子既可存在于细胞内也可存在于细胞外基质中。孢子有6种存在形式, 根据其不同特点绘制了相应的模式图: ①孢子存在于细胞内, 自由游离, 无膜包围(图版VI-1); ②孢子存在于细胞内, 被单层吞噬小体膜包围, 类微绒毛样突起物部分溶解(图版VI-2); ③孢子存在于细胞内, 由吞噬溶酶体形成的层状环形膜结构包围, 类微绒毛样突起物清晰(图版VI-3); ④孢子存在于细胞外基质中, 自由游离, 无膜包围, 类微绒毛样突起物清晰(图版VI-4); ⑤孢子存在于细胞外基质中, 多个孢子被体液性被囊包围, 类微绒毛样突起物清晰(图版VI-5); ⑥孢子存在于细胞外基质中, 无膜包围, 孢外壁与类微绒毛样突起物消失(图版VI-6)。

3 讨论

3.1 微孢子虫的专性细胞内寄生与寄生部位

微孢子虫目前归类为真菌生物, 其仅能利用细胞内资源并在细胞内进行自我繁殖, 而在细胞外无法增殖^[6]。本研究在宿主细胞内和细胞外基质中均发现梭子蟹肌孢虫的孢子, 且仅在胃、肠和肌肉组织的细胞内观察到梭子蟹肌孢虫的增殖信号——分裂体, 而在细胞外基质中未观察到梭子蟹肌孢虫分裂体或其他增殖时期的细胞, 说明梭子蟹肌孢虫的自我繁殖完全依赖宿主细胞内资源, 证实其是专性细胞内寄生生物。但专性细胞内寄生并不意味着梭子蟹肌孢虫不能在细胞以外的环境中生存, 血淋巴和胃疏松结缔组织中的游离孢子表明了梭子蟹肌孢虫能以孢子的形式寄生于宿主的细胞外基质中。因此,



图版 IV 三疣梭子蟹肠中的梭子蟹肌孢虫

v.空泡; 2 n.二倍体核; PT.孢子的极管; PM.宿主细胞膜; C1、C2、C3.三个宿主细胞; PM1、PM2、PM3.三个宿主细胞膜; VM.分泌小泡膜

Plate IV The microsporidian in the gut of *P. trituberculatus*

v. vacuole; 2 n. diplokernel; PT. the polar tube; PM. the membrane of the host cell; C1, C2 and C3. three different host cells; PM1, PM2 and PM3. the membranes of three host cells; VM. the membrane of the secretory vesicles

基于繁殖属性，梭子蟹肌孢虫是专性细胞内寄生物；基于存在位置，梭子蟹肌孢虫可寄生于宿主的细胞内和细胞外基质中。

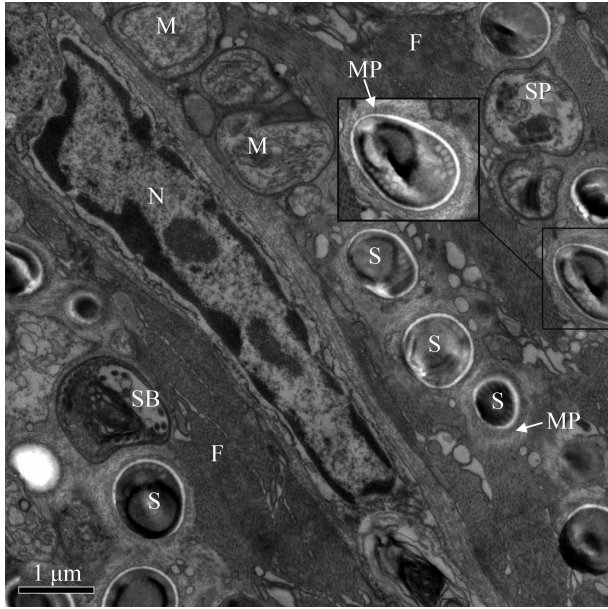
3.2 微孢子虫孢子在宿主体内的存在形式

图版VI-1这种无膜包围的形式可能与梭子蟹肌孢虫本身的特性有关，*Ameson*属微孢子虫，不形成纳虫空泡结构^[7]，当孢原质被注入到宿主细胞内后^[8]，周围不产生纳虫空泡膜，可直接发育成分裂体并进一步发育成孢子，因而无膜结构包围。

图版VI-2这种形式应与宿主细胞免疫反应相关，单层吞噬小体膜由无颗粒细胞产生。无颗粒细胞是虾蟹等甲壳动物细胞免疫中重要的专业性吞噬细胞^[9]，主要吞噬细菌等个体小于10 μm

的外来病原微生物^[10]。Couzinet等^[11]发现吞噬后的孢子被单层膜结构紧紧包围，与此种现象类似。另外，本研究还观察到类微绒毛样突起物出现部分溶解的现象，这可能是溶酶体造成的，吞噬小体与溶酶体融合生成吞噬溶酶体，可以隔离、溶解或消化异物，这也反映了无颗粒细胞较强的免疫保护能力。

图版VI-3这种形式也应与宿主细胞免疫反应相关，发生于非专业性吞噬细胞内。Ohshima等^[12]和Dermaut等^[13]研究表明，溶酶体、异物与层状环形膜结构之间存在相关性，本研究根据膜的结构形态及电子密度的变化，推测图版III-2中电子致密的层状环形膜结构是由图版IV-2中的多层膜结构经溶酶体作用形成的。一般认为吞噬体内的外源性物质可被溶酶体内的多种酸性水解



图版 V 三疣梭子蟹骨骼肌中的梭子蟹肌孢虫

N.肌细胞核; F.肌原纤维; M.分裂体细胞; SP.正在分裂的母孢子细胞; SB.孢子母细胞

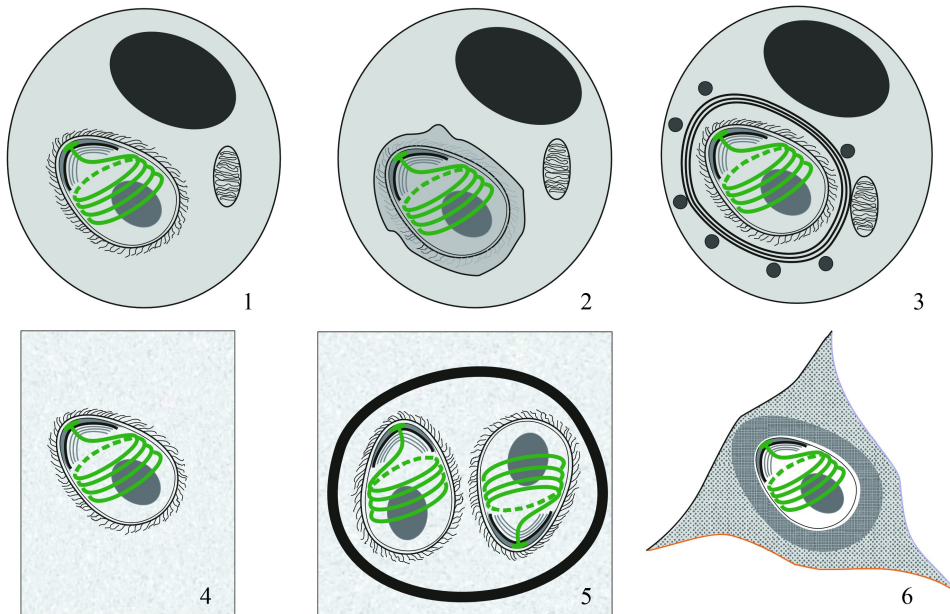
Plate V The microsporidian in the muscle of *Portunus trituberculatus*

N. the nucleus of the muscle cell; F. myofibril; M. meront; SP. the separation of sporont; SB. sporoblast

酶分解、消化, Dyková等^[14]发现吞噬细胞内的孢子仅剩下孢子空壳, 内部结构已经消失, 认为某些酶具有几丁质渗透性, 能通过孢内壁层逐渐溶解孢子内部。但本研究发现, 孢子的各细胞器及类微绒毛样突起物超微结构清晰, 这说明孢子并没有被分解消化, 宿主的免疫反应仅能限制孢子的活动范围, 暗示微孢子虫已经具备了抵御宿主免疫应答的机制, 也反映出非专业性吞噬细胞在应对微孢子虫方面的免疫能力弱于专业性的吞噬细胞——无颗粒细胞。

图版VI-4这种形式较为常见。血淋巴中较多的游离孢子可能与肌纤维被破坏有关, 感染末期, 孢子可能从破裂的肌纤维内释放出来并进入血淋巴中^[2], 而此时的宿主基本已经失去免疫力, 血淋巴中免疫细胞无法将多数的孢子清除, 故孢子数量较多。

图版VI-5这种形式应与宿主体液免疫反应有关。体液性被囊是一种抗细菌、抗真菌和寄生虫的快速、高效反应机制^[15]。血淋巴中存在形成体液性被囊所需的黑素和蛋白多醣复合物等物质, 这些物质起初以小液滴形式出现于外源物



图版 VI 孢子在宿主体内的存在形式

圆形表示宿主细胞; 矩形表示血淋巴环境; ●. 宿主细胞核; ●. 孢子; ●. 线粒体; ●. 溶酶体; ○. 体液性被囊; 图6中3条不同颜色曲线表示3个不同细胞膜

Plate VI The existing forms of spores in the host

Round represents host cell; rectangular represents hemolymph; ●. the nucleus of host cell; ●. spore; ●. mitochondrion; ●. lysosome; ○. the humoral encapsulation; three curves with different color represent three membranes of different host cells in figure 6

表面, 数目逐渐增多并沉积形成完整被膜, 电子致密, 颜色表现为黑色或褐色, 厚度可达数微米。目前尚未有微孢子虫引起宿主体液性被囊的详细研究。

图版VI-6这种形式极为特殊, 近似三角形的细胞外基质中, 孢子周围的基质电子密度高于其外围基质的电子密度, 而孢外壁与类微绒毛样突起物又均消失, 这很可能是它们与周围细胞外基质某些成分相互作用造成的。Byrd等^[16]研究发现细胞外基质中的纤连蛋白参与中性粒细胞胞外陷阱的释放, 认为在中性粒细胞胞外杀菌机制中, 细胞外基质是快速抗真菌免疫反应的关键。本研究中, 孢外壁与类微绒毛样突起物均消失, 说明细胞外基质具有抗微孢子虫的作用, 而孢子是如何进入细胞外基质等问题尚不明确, 需进一步研究。

综上, 孢子的体内存在形式与其所处的环境、细胞类型以及宿主免疫反应等密切相关。

参考文献:

- [1] Stentiford G D. Microsporidia: diverse, dynamic, and emergent pathogens in aquatic systems.[J]. Trends in Parasitology, 2013, 29(11): 567-578.
- [2] Small H J, Meyer G R, Stentiford G D, *et al.* *Ameson metacarcini* sp. nov. (Microsporidia) infecting the muscles of Dungeness crabs *Metacarcinus magister* from British Columbia, Canada.[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2014, 110(3): 213-225.
- [3] Findley A M, Blakeney E W, Weidner E H. *Ameson michaelis* (Microsporidia) in the blue crab, *Callinectes sapidus*: parasite-induced alterations in the biochemical composition of host tissues[J]. The Biological Bulletin, 1981, 161(1): 115-125.
- [4] Ryazanova T V, Eliseikina M G. Microsporidia of the genera *Thelohania* (Thelohaniidae) and *Ameson* (Pereziidae) in two species of lithodid crabs from the Sea of Okhotsk[J]. Russian Journal of Marine Biology, 2010, 36(6): 435-442.
- [5] 王浩, 王元, 房文红, 等. 微孢子虫感染三疣梭子蟹的肌组织病理及其免疫相关酶活性[J]. 海洋渔业, 2015, 37(5): 457-464.
- Wang H, Wang Y, Fang W H, *et al.* The influence of microsporidian infection on muscle tissue and immune-related enzyme activities in *Portunus trituberculatus*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(5): 457-464(in Chinese).
- [6] Molestina R, Becnel J J, Weiss L M. Culture and propagation of Microsporidia[M]//Weiss L M, Becnel J J. Microsporidia: Pathogens of Opportunity. Oxford Wiley-Blackwell. 2014: 457-467.
- [7] Sprague V, Becnel J J, Hazard E I. Taxonomy of phylum Microspora[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1992, 18(5-6): 285-395.
- [8] Franzen C. Microsporidia: how can they invade other cells?[J]. Trends in Parasitology, 2004, 20(6): 275-279.
- [9] Hauton C. The scope of the crustacean immune system for disease control[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(2): 251-260.
- [10] Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, *et al.* Review: immunity mechanisms in crustaceans[J]. Innate Immunity, 2009, 15(3): 179-188.
- [11] Couzinet S, Cejas E, Schittny J, *et al.* Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(12): 6939-6945.
- [12] Ohshima T, Murray G J, Swaim W D, *et al.* α -Galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(6): 2540-2544.
- [13] Dermaut B, Norga K K, Kania A, *et al.* Aberrant lysosomal carbohydrate storage accompanies endocytic defects and neurodegeneration in *Drosophila benchwarmer*[J]. The Journal of Cell Biology, 2005, 170(1): 127-139.
- [14] Dyková I, Lom J. Tissue reactions to microsporidian infections in fish[J]. Journal of Fish Diseases, 1980, 3(4): 265-283.
- [15] 吕鸿声. 昆虫免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.
- Lü H S. Principles of insect immunology[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2008.(in Chinese)
- [16] Byrd A S, O'Brien X M, Johnson C M, *et al.* An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*[J]. The Journal of Immunology, 2013, 190(8): 4136-4148.

The tissue distribution and formal features of the *Ameson* sp. infecting *Portunus trituberculatus*

WANG Yuan¹, ZHOU Junfang¹, FANG Wenhong^{1*}, LI Xincang¹,
MA Licai¹, ZHAO Shu¹, CHEN Tiantian^{1,2}

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, China Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The method of transmission electron microscope was used to study the tissue distribution and formal characteristics of the microsporidian, *Ameson* sp. in the host *Portunus trituberculatus*. The results showed that the microsporidians were distributed mainly in the skeletal muscle, hemolymph, stomach and gut, no found in the heart, hepatopancreas, gonad and nervous tissues. Some meronts were found in the host skeletal muscle, connective tissue of the stomach and gut, indicating that the microsporidian was able to multiply in these tissues, especially in the skeletal muscle cells. A large number of microsporidians of different periods implied the tissue tropism of this microsporidian. The meronts and other multiplicative cells of the microsporidian were observed only in host cells, and the mature spores could exist within host cells and extracellular matrix. A total of six existing forms of mature spores were found. The three within host cells: ① The free spore without a membrane surrounding directly parasitized within the host cytoplasm. ② The spore was surrounded by a single membrane with the microvilli-like projections partly dissolved. This form was generally observed within an agranular cell (i.e. the professional phagocyte). ③ The spore was surrounded by lamellar membranous whorls and the microvilli-like projections was clearly visible. This form was found in nonprofessional phagocytes. The three within the host extracellular matrix: ① The spore was free without a membrane surrounding. The microvilli-like projections were clearly visible. ② Several spores were surrounded by a humoral encapsulation. The microvilli-like projections were clearly visible. ③ The spore was free without a membrane surrounding. The exospore and microvilli-like projections both disappeared. The present study sheds light on the tissue distribution of microsporidian and existing form of the spore, and provides important data for the further study on the migration of microsporidia in the crab.

Key words: microsporidian; *Portunus trituberculatus*; parasitism; existing form

Corresponding author: FANG Wenhong. E-mail: fwenhong@163.com

Funding projects: National Special Research Fund for Non-profit Sector (Agriculture) (201303047); Central-level Non-profit Scientific Research Institutes Special Funds (East China Sea Fisheries Research Institute 2014T03)