

文章编号:1005-8737(2000)01-0103-04

·综述·

粘孢子虫(粘体门:粘孢子纲)的研究现状

Progress of studies on myxosporea (Protozoa: Myxozoa)

鲁义善, 汪建国

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

LU Yi-shan, WANG Jian-guo

(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

关键词: 粘孢子虫; 分类学; 生活史; 粘孢子虫病; 免疫学

Key word: myxosporera; taxonomy; life cycle; myxosporidiosis; immunology

中图分类号: Q959.115

文献标识码: A

粘孢子虫是变温动物体内常见的原生动类寄生虫,除少数种类寄生在两栖动物、爬行动物、环节动物和昆虫外,其寄主范围基本上是鱼类,可以说粘孢子虫是鱼类所特有的一类寄生虫,并给渔业生产造成极大的危害。自从1825年Jurine首次发现粘孢子虫所引起的鱼病以来,粘孢子虫及其所引发病害的研究已走过了170多年的历程,取得了丰硕的研究成果,尤其是在分类学、生活史和免疫学方面。在分类上,国内以陈启镛等的专著《中国动物志粘体门粘孢子纲(淡水)》^[1]为标志而达到系统化阶段;在生活史和免疫学方面,国外应用分子生物学手段,对粘孢子虫的生存规律及其所引发的病理反应作了阐述。本文对近十几年来这三方面的研究进行了系统总结,并对粘孢子虫生物学及粘孢子虫病的防治进行了有意义的探讨。

1 粘孢子虫的分类地位及分类系统

1.1 分类地位

国内外关于粘孢子虫的分类地位报道颇多。一般认为它们隶属于原生动物,其分类地位只是随原生动物从动物界的一门提升到亚界而发生相应的变化^[1,2]。随着研究的深入,粘孢子虫的许多独特的生物学特性逐渐得到了认识。首先,粘孢子虫的孢子发生明显具多细胞来源:1个孢子由5~

6个细胞发育而来,即2个极囊原细胞发育成2个极囊;2个壳瓣原细胞发育成2个壳瓣;而孢质细胞形成孢质^[3]。其次,孢子发生过程中的细胞分化、胶原蛋白的产生、细胞的连接形式、胆碱酯酶的活性等都是后生动物具有的特征^[4]。鉴于此,有的学者建议把它列入后生动物^[5,6]。Siddal^[4]分析了几种粘孢子虫的rDNA序列及形态学特征,指出粘孢子虫可能由腔肠动物进化而来。与此相反,柴建原等^[7]认为粘孢子虫只是在发育过程中要经历多细胞阶段,成熟以后只有孢质具细胞的生物学特性。所以,粘孢子虫应属原生动物。可见对粘孢子虫的隶属关系,学术界仍存有分歧。由于粘孢子虫是一个复杂的类群,其孢子母细胞的形成没有一种统一的模式,以单独一个种或几个种为对象所得到的结果是不具说服力的,因此笔者认为粘孢子虫应隶属于原生动物。

1.2 分类系统

迄今为止,粘孢子虫至少存在10种不同的分类系统,如Doflein(1898, 1899, 1909), Aurbach(1910, 1911), Parisi(1912), Poche(1913), Davis(1917), Kudo(1920, 1933), Tripathi(1948), Schulman(1959, 1964), Meglitsch(1960), Lom和Noble(1984, 1992)等都分别提出了不同的分类系统。其中以Schulman(1964), Lom Noble(1984, 1992)的分类系统较完善。陈启镛等^[1]总结了他们的成果之后,接受Levine等^[2]的意见,对粘孢子纲的分类系统作了进一步的修定,将粘孢子虫隶属于粘体门之下粘孢子纲;并接受Schulman同意将弧形虫属从两极科分出来,另建立亚门的主张,但是不同意把碘泡虫和粘体虫的科和属合并为一,取消粘体虫的科和属的观点。尽管如此,近年来的研究也提出了不少新的问题,尤其是在属这一阶元上。

收稿日期:1999-06-24

基金项目:中国科学院资助项目(K29511-131-111);农业部重点科研项目(渔95-B-96-06-03);湖北省自然科学基金资助项目(98J019)

作者简介:鲁义善(1976-),男,山东济南人,中国科学院水生生物研究所攻读硕士,从事寄生原生物学研究。

早在 1985 年, Lom^[8] 就用光学显微镜和电子显微镜观察鲤霍氏虫(*Hoferellus cyprini*)的早期发生后指出: 以前所报道的鲤霍氏虫其实是一种球孢虫(*Sphaerospora renicola*)生活史中的一种不完全发育形式。鲤霍氏虫并不是一个有效的分类阶元。前人所描述的这个种类的孢子可能属于另一个种——鲤冠孢虫(*Mitraspora cyprini*)。而且他指出: 若不能证明其它种类属于霍氏虫属的话, 那么, 霍氏虫属作为一个属的存在是值得怀疑的。可是, 随着 1986 年的鲤霍氏虫(*H. carassii*)分类位置的确定, 使霍氏虫属(*Hoferellus*)重新作为一个属而提出, 而鲤霍氏虫(*H. cyprini*)则作为典型种归属其下。冠孢虫属(*Mitraspora*)作为这个属的同物异名存在^[9]。Lom 曾提到的鲤霍氏虫和球孢虫之间的关系问题, 至今没有得到进一步的证明。

无独有偶, 1997 年, Fomena 和 Bouix^[10] 在观察了大量的标本后提出, 单囊碘泡虫(*Myxobolus unicapsulatus*)应归于单极虫属(*Thelohanellus*)作为尼罗单极虫(*T. niloticus*)存在, 因为它们的孢子只有 1 个极囊。在国内, 吴英松等^[11]发现兔抗圆形碘泡虫(*M. ratundus*)的抗体能与关桥碘泡虫(*M. guanqiaoensis*)及野鲤碘泡虫(*M. koi*)等碘泡虫属的孢子起交叉反应, 但不与饼形碘泡虫(*M. artus*)、多格里尾孢虫(*Henneguya dogeli*)、时珍粘体虫(*Myxosoma sigini*)、箭形单极虫(*T. sagittarius*)、湖北球孢虫(*hupehensis*)的孢子发生反应, 这表明粘孢子虫可能存在属特异性抗原, 但圆形碘泡虫、关桥碘泡虫、野鲤碘泡虫、饼形碘泡虫同为一属, 为什么兔抗圆形碘泡虫的抗体与前两种产生交叉反应, 却不与饼形碘泡虫发生反应, 因此作者就对饼形碘泡虫的所处分类位置是否合适产生了怀疑。由此可见, 在分类学这个最基础的学科上, 粘孢子虫仍存在着许多争议, 这无疑将更进一步地推动对粘孢子虫生物学及其病害学的研究。

2 粘孢子虫的生活史

近年来, 粘孢子虫生活史研究的热点之一是中间环节问题。已有越来越多的学者认为放射孢子虫(*Actinosporae*)是粘孢子虫生活史过程中存在于中间宿主寡毛类体内的一个发育阶段。

El-Mansy^[12] 用未经感染的正颤蚓(*Tubifex tubifex*)与鲢碘泡虫(*M. drjagini*)的成熟孢子混养, 27 d 以后首次发现放射孢子虫, 91 d 后放射孢子虫离开其中间宿主。除寡毛类以外, Bartholomew 等^[13]发现萨斯塔角形虫(*Ceratomyxa shasta*)的中间宿主为多毛类。他们把经放射孢子虫感染的多毛类中松纓虫(*Manayunkia speciosa*)和鳞鱼混养, 结果鱼被感染。他们用聚合酶链式反应(PCR)方法证明了这一点。PCR 的引物是按萨斯塔角形虫的 18S rDNA 序列设计的, 然后把引起鱼感染的多毛类中的放射孢子虫的 DNA 扩增并测序, 发现与萨斯塔角形虫孢子的 18S rDNA 具很大的同源性。Andree^[14]也作过同样性质的工作, 他用一个小的 rRNA 单元证明放射孢子虫和粘孢子虫是处在不同发育时期的同

一种类。他发现脑粘体虫(*M. cerebralis*)的放射孢子虫期和粘孢子虫期的 18S rRNA 序列同源性高达 99.8%, 比同属的 *M. insidiosus* (89.9%) 和 *M. squamalis* (77.8%) 都要高。

在放射孢子虫的形态学研究方面有许多报道^[15~17], 以 Lom^[18,19] 的工作较为突出, 他对放射孢子虫和粘孢子虫的超微结构作了详细的对照, 指出了它们之间的许多共同点: 线粒体常有管状或囊状的嵴和各种内含物; 高尔基体形状较典型或稍有变形; 粗面内质网及其上面的核糖体常形成螺旋状的多聚核糖体, 胞质体、吞噬小体及各种小管、脂肪体、 β -糖元颗粒等都存在; 典型的微管束可能是有丝分裂纺锤体的残余; 细胞连接或多或少地以分隔连接或桥粒的形式存在, 表面常有伪足状突起; 中心粒分离。他认为^[20], 放射孢子虫和粘孢子虫应该分别作为粘孢子虫生活史中的两个阶段中间宿主阶段和孢子期阶段。

需进一步指出的是, Roubal^[21] 首次在澳大利亚昆士兰的海水寡毛类中, 发现其感染了放射孢子虫(*Triactinomyxon* sp.), 感染率 0.2%, 如果放射孢子虫是粘孢子虫的中间阶段, 那么就可以认为海水寡毛类也可能是海水鱼类粘孢子虫的中间宿主。McGeorge^[22], Hallett^[23] 也分别在海水寡毛类中发现了 1 种放射孢子虫, 定为新种, 并对其结构作了详细的报道。

尽管有越来越多的人认为粘孢子虫的生活史中需要经历中间宿主, 同时也有实验得出相反的结论。Diamant^[24] 用无特定病原(specific-pathogen-free, SPF)的 *Sparus aurata* Linnaeus, 金头鲷幼鱼(平均重 11.3 g)为实验鱼作了海水产的李氏两极虫(*Myxidium leei*)的感染实验。其实验分 3 组: 第 1 组, 把实验鱼放在网箱内, 浸没在养有病鱼的水箱中; 第 2 组, 把实验鱼放在从病鱼水箱排出的水中; 第 3 组, 直接给实验鱼喂病鱼的被感染组织(切碎的肠组织)的饵料。结果发现, 第 1 组的 38 条鱼中有 12 条被感染, 感染率 31.6%; 第 2 组 30 条鱼中有 10 条被感染, 感染率 33.3%; 第 3 组的 30 条鱼中有 4 条被感染, 感染率 13.3%。实验表明有的海水粘孢子虫可不必经过放射孢子虫阶段, 而是可通过食物感染。由此可见两种途径可能都存在, 不同的种类有不同的方式, 至于同一种类的粘孢子虫是否有多种感染途径, 有待进一步研究。

3 粘孢子虫病及其免疫学

粘孢子虫种类繁多, 在《中国动物志 粘体门 粘孢子纲(淡水)》专著中就记载了我国的 574 种^[1], 国外报道也甚多, 几乎每年都有新种发现, 其中每一种都会对它的宿主鱼类产生不同程度的影响, 对渔业生产的危害极大。由于孢子具几丁质壳片, 药物很难杀灭它, 以致于粘孢子虫病的防治成了一个难题。关于粘孢子虫病的防治, 主要存在两种意见: 一是药物防治为主, 采用有效药物和有效方法, 不能说是绝对无效的, 而粘孢子虫抗原成分复杂且抗原性弱, 较难制成高效的疫苗; 另一种意见认为以免疫预防为主是比较好的防治

方法,因为很难找到对粘孢子虫孢子具有专一性杀伤作用的药物,而且药物防治对水环境副作用大,不利于水产养殖的可持续发展。在80年代以前,人们主要是寻求药物治疗的途径,但效果不是很好。近年来,关于粘孢子虫免疫防治的研究也在不断深入。在粘孢子虫病的免疫诊断方面,80年代初期,人们主要用病鱼抗血清作为探针用于判断粘孢子虫的感染。Bartholomew^[25]首次以感染萨斯塔角形虫的硬头鲷(*Salmo gairdneri* Richardson)腹水为抗原免疫小鼠,制备了4株单抗,采用间接荧光抗体试验(IFAT)和蛋白质印迹反应(Western-blot)表明,单抗只与营养体或孢母细胞抗原反应,而不与孢子抗原起反应,说明萨斯塔角形虫具有期特异性抗原。而且其中2株单抗能与球孢虫属及拟尾孢虫属的一些种类起交叉反应。继Bartholomew之后,真正利用单抗为手段进行粘孢子虫病诊断的是Adams^[26],他用抗PKX(PKX是分类位置未确定的一种粘孢子虫,能引起鱼肾增生)2株单抗作探针,对病原的表面抗原和生活史作了深入的研究。在免疫防病方面,Dalmo^[27]用微球体(胶乳颗粒、矿物质颗粒、脂质体等)作为抗原的携带者,让饥饿的鲑(*Salmo salar* Linnaeus)吞食,效果要比浸泡和腹腔注射好的多,这种免疫方法既实用又安全,副作用又小,很值得推广。Marin de Mateo^[28]指出刀豆凝集素(soybean agglutinin, SBA)几乎能诊断所有的球孢虫病,这是免疫组织化学应用的一个很好的例子。粘孢子虫病的免疫学研究在国内报道较少。谢杏人等^[29]以鲤为材料对“未明血液生物体”(Unidentified Blood Organism, UBO)进行了研究后发现,UBO的入侵可使宿主的白细胞数目增长31.86倍,这是一种典型的非特异性免疫反应。另外,吴英松等^[11]用超声波破碎圆形碘泡虫的孢子,提取可溶性抗原,并用它对26尾鲫进行抗体检测,结果证明了宿主血清中存在抗体;与此同时,他们还用提取的抗原进行了虫体的交叉反应实验,结果表明圆形碘泡虫生活史中存在共同抗原和属特异性抗原;用间接荧光抗体实验(IFAT)对圆形碘泡虫进行抗原定位,为特定抗原单抗的制备打下了坚实的基础。

4 展望

以上对粘孢子虫研究最新动态的综述,只是近年来研究的热点和重点,在一定程度上代表了该领域的研究方向。今后拟应加强3方面的研究,一是用分子免疫学技术研究粘孢子虫的免疫反应机理,寻求免疫防治的途径;二是用DNA分子杂交技术研究粘孢子虫的生活史,以期最终阐明其感染途径和生存规律;三是用DNA、蛋白质、同工酶的比较等分子系统学方法,探讨其进化规律,建立更加合理的粘孢子虫的自然分类系统^[1]。

4.1 分子免疫学技术的应用

目前,研究工作仍局限于抗血清的制备和抗体的检测,抗原的纯化及定位方面。今后应侧重于细胞工程抗体和基因工程抗体的研制和推广,所谓细胞工程抗体技术就是利用

B淋巴细胞杂交瘤生产单克隆抗体(简称单抗);而基因工程抗体则包括两方面内容:一是用DNA重组技术对已有的单抗进行改造,二是用抗体库技术筛选、克隆新的单抗。由此可见,单抗的制备是这两大工程的中心环节,尽管现代医学的单抗技术已经相当完备,但有关抗粘孢子虫的单抗的研究却刚刚起步。尽管如此,已初步显露出了美好的前景。在诊断方面,由于单抗是均一抗体,具高度特异性,易于标准化和质量控制。特别是用较高活性的非放射性同位素标记单抗,可使常规免疫学测定的敏感性、特异性、稳定性、精确性和速度性同时提高几个数量级^[30]。不管是在实践中检测粘孢子虫,还是科研中抗原及抗体构造的分析,都因为单抗仅能与单一的抗原决定基发生反应而相对简单;在治疗上,单抗可单独或作为载体制成生物导弹专一性的到达指定的病灶,从而消除病原体。另外,粘孢子虫的孢子表面有许多功能性的亚单位分子,为探讨其在致病方面的作用,我们可用单抗封闭该分子,进而观察其细胞功能的变化,从而推知该亚单位分子所起的作用。但需要指出的是,我们离抗粘孢子虫的单抗的诊断试剂盒及其产业化还有相当长的距离。

至于基因工程抗体技术,现在还没有成熟规范化的操作程序,但是用逆转录-PCR法(RT-PCR)克隆鱼的粘孢子虫Ig可变区基因则是切实可行的。我们就可以把特定的催化活性基因引入抗体的可变区基因内,从而制备有催化活性的抗体,即抗体酶。如果实现这一点,真正消灭粘孢子虫病化就指日可待了。

4.2 DNA分子杂交方法的应用

如上所述,粘孢子虫的生活史仍存在许多争议,我们可以把粘孢子虫的DNA提取出来,用P³²标记其dNTP制成DNA探针然后与放射孢子虫、PKX以及螺生原生动物(Swimbladder Protozoa, SBP)、UBO的DNA杂交从而判断它们与粘孢子虫的关系;至少在理论上可以用类似的方法来探测它们两两之间的关系。尽管这是一个相当繁重的工作,兼之其结果的代表性问题,故此所见报道很少,但这是一个新的生长点。

4.3 分子系统学方法的应用

现代分子系统学方法已得到广泛应用,但在粘孢子虫方面罕有报道,现代分子系统学的方法大都可借鉴到粘孢子虫的研究上来。如我们可以把某一个属的粘孢子虫的种类分别做线粒体DNA(mtDNA)的限制性内切酶图谱,然后作遗传距离计算和分析,可得到这个属的分子系统树;或者用16S rDNA的PCR扩增及RFLP分析方法比较种间差异,找出它们的亲缘关系;也可比较不同种之间的孢子壳瓣蛋白质的多态性而区分不同种类;也可采用同工酶的比较分析。但是,在1999年4月召开的第二届“中国科学院系统与进化生物学学术讨论会”上,专家们重申了形态学分类的重要性,并对某些分子系统分类方法产生质疑。他们认为物种组成具有多样性,利用进化上的某一单一序列或蛋白质(包括酶)不能作为分类的唯一依据。笔者认为,有些分子生物学数据的

相似性可能反映的仅是趋同进化,而不是来自共同祖先;而且分子分析只包含来自现存粘孢子虫的数据,不一定确切地反映其进化规律。因此,分子系统分类方法可给现有的分类系统提供佐证或起到修订作用,而不是替代以形态学、比较解剖学、比较胚胎学为基础的形态学分类方法。

致谢:本文承聂品研究员提出宝贵意见,深表谢意。

参考文献:

- [1] 陈启盛,马成伦.中国动物志:粘体门 粘孢子纲(淡水)[M].北京:科学出版社,1998.
- [2] Levine N D, et al. A newly revised classification of the Protozoa [J]. J Protozool, 1980, 27(1):37-58.
- [3] Lom J, et al. *Sphaerospora tincae* Plehn, 1925 and *S. galinae* Evlanov, 1981(Myxosporea) from the tench, *Tinca tinca* L.[J]. Protistologica, 1985b, 21:487-497.
- [4] Siddal M E, et al. The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria[J]. J Parasitol, 1995, 81(6):961-967.
- [5] Kent M L, et al. The demise of a class of protists: Taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the phylum Myxozoa Grasse, 1970[J]. Canadian Journal of Zoology, 1994, 72:932-937.
- [6] Smothers J F, et al. Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans[J]. Science[J], 1994, 265:1 719-1 721.
- [7] 柴建原,等. 吸鱼粘体虫在异育银鲫心脏中的孢子发生[J]. 动物学报, 1991, 37(4):397-401.
- [8] Lom J. *Hoferellus cyprini* Doflein, 1898 from carp kidney: a well established Myxosporean species or a sequence in the developmental cycle of *Sphaerospora renicola* Dykova and Lom. 1982[J]. Protistologica, 1985, 2:195-206.
- [9] Lom J. *Hoferellus cyprini* (Doflein, 1898) Berg, 1898 (syn: *Mitraspora cyprini* Fujita, 1912), *Myxobilatus nostalgicus* sp. N. and related species: partial revision of two Myxosporean genera[J]. Folia Parasitologica, 1986, 33:289-296.
- [10] Fomena A, Bouix G. Myxosporea (Protozoa; Myxozoa) of freshwater fishes in Africa: keys to genera and species [J]. Systematic Parasitology, 1997, 37(3):167-178.
- [11] 吴英松,汪建国. 圆形碘泡虫免疫原性的研究[J]. 水生生物学报, 2000, 24(3):246-251.
- [12] El-Mansy A, et al. Extrapiscine development of *Myxobolus drjagini* Akhmerov, 1954 (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternative hosts[J]. Acta veterinaria Hungarica, 1997, 45(4):427-438.
- [13] Bartholomew J L. Life cycle of *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonids, require a freshwater polychaete as alternative host[J]. Journal of Parasitology, 1997, 83(5):859-868.
- [14] Andree K B, et al. Small subunit ribosomal RNA sequence unite alternative actinosporean stages and myxosporean stages of *Myxobolus cerebralis* the causative agent of whirling disease in salmonid fish[J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 1997, 44(3):208-215.
- [15] El-Mansy A. Development of *Myxobolus hungaricus* (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternate host[J]. Dis Aquat Org, 1997, 31(3):227-232.
- [16] El-Matbouli M, et al. Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex* [J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28(1):195-217.
- [17] Yokovama H, et al. Fluorescent labelling of actinospores for determinin the portals of entry into fish[J]. Dis Aquat Org, 1997, 30(3):165-169.
- [18] Lom J, et al. Ultrastructural features of the actinosporean phase of myxosporean (phylum: Myxozoa): a comparative study[J]. Acta protozoologica, 1997, 36(2):83-103.
- [19] Lom J, et al. Comparative ultrastructure of Aurantiactinomyxon and Raabeia: actinosporean stages of Myxozoa life cycles[J]. Archiv fur protistenkunde, 1997, 148(1/2):173-189.
- [20] Lom J, et al. Guidelines for the uniform characterisation of the actinosporean stages of parasites of the phylum Myxozoa[J]. Dis Aquat Org, 1997, 30(1):1-9.
- [21] Roubal F R, et al. First record of triactinomyxon actinosporean in marine oligochaete[J]. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 1997, 17(3/4):83-85.
- [22] McGeorge J, et al. Studies of actinosporean myxozoan stages parasitic in oligochaetes from the sediments of a hatchery where Atlantic salmon harbour *Sphaerospora truttae* infection[J]. Dis Aquat Org, 1997, 30(2):107-119.
- [23] Hallett S L. Structure and development of a marine actinosporean, *Sphaeractinomyxon ersei* n. sp. (Myxozoa) [J]. Journal of Eukaryotic microbiology, 1998, 45(1):142-150.
- [24] Diamant A. Fish - to - fish transmission of a marine myxosporean[J]. Dis Aquat Org, 1997, 30:99-105.
- [25] Bartholomew J L. Development, characterization and use of monoclonal and polyclonal antibodies against the myxosporean, *Ceratomyxa shasta* [J]. J Protozool, 1989, 36(4):397-401.
- [26] Adams A, et al. Development of monoclonal antibodies to PK' X', the causative agent of proliferative kidney disease [J]. Journal of Fish Disease, 1992, 15:515-521.
- [27] Dalmo R A, et al. Microspheres as antigen carriers: studies on intestinal absorption and tissue localization of polystyrene microspheres in Atlantic salmon, *Salmon salar* L.[J]. Journal of Fish Disease, 1995, 18:87-91.
- [28] M Marin de Mateo, et al. Comparative studies of PKX and *Sphaerospora* spp. From salmonids using lectin and monoclonal antibody staining techniques[J]. Journal of Fish Diseases, 1996, 19:55-63.
- [29] 谢杏人,等. 鲤白细胞对“未明血液生物体”(UBO)的免疫反应[A]. 见:鱼病学研究论文集(第1辑)[C]. 北京:海洋出版社, 1993. 72-75.
- [30] 王世若,等. 动物免疫学[M]. 长春:吉林科学出版社, 1996.