

## 体外培养阴道毛滴虫的形态定量观察

陈 熙<sup>1)</sup>, 周本江<sup>2, 3)</sup>

(1) 昆明医科大学病原生物学及免疫学实验室; 2) 病原生物学教研室, 云南 昆明 650500; 3) 昆明医科大学海源学院人体寄生虫学教研室, 云南 昆明 650106)

**[摘要]** **目的** 应用计算机图像分析系统定量观测体外培养的阴道毛滴虫滋养体的形态学特征. **方法** 应用计算机图像分析系统获取体外培养第3代后, 经吉-瑞氏混合染色的阴道毛滴虫滋养体, 随机抽样测量, 分别计算31个空泡型和210个无空泡型滋养体及其相应的胞核面积、周长、长轴、短轴、长短轴比; 测量空泡型滋养体的空泡面积、周长、长轴、短轴; 计算滋养体、胞质和胞核体积、核浆比. **结果** 空泡型滋养体的面积、周长、短轴、体积、胞质面积和胞质体积等数值均大于无空泡型滋养体的相应数值, 两者的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但长轴数值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 空泡型滋养体的胞核短轴数值大于无空泡型滋养体的胞核短轴数值, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 胞核面积、周长、体积、长轴以及长短轴比值的差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 无空泡型滋养体的长、短轴比值大于空泡型滋养体, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). **结论** 体外培养转种3代以上的阴道毛滴虫, 形态学参数均较正常寄生于人体的阴道毛滴虫数值为大; 空泡型滋养体由于胞质体积增大导致虫体变大, 形态变圆, 相应的胞核短轴变长.

**[关键词]** 阴道毛滴虫; 体外培养; 形态学; 计算机; 形态定量

**[中图分类号]** R382.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)05-0014-04

## Quantitative Morphological Observation of *Trichomonas vaginalis* Cultured in Vitro

CHEN Xi<sup>1)</sup>, ZHOU Ben-jiang<sup>2, 3)</sup>

(1) Laboratory of Pathogeny Biology and Immunology; 2) Dept. of Pathogenic Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Dept. of Human Parasitology, Haiyuan College of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650106, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the morphological feature of *Trichomonas vaginalis* cultured in vitro quantitatively by using computer image analysis system. **Methods** *T. vaginalis* were chosen after 3 generations subculture and stained by Giemsa-Wright's solution. Then the original binary pictures of *T. vaginalis* trophozoites were acquired. The trophozoites were divided into two groups according to the existence of vacuole in the cytoplasm. There were 210 trophozoites without vacuole and 31 trophozoites with vacuole. The area, perimeter, length, breadth, aspect ratio of each trophozoite and the nuclei in each group were measured respectively by the computer image analysis system, and the area, perimeter, length, breadth of vacuole in the cytoplasm were obtained too. The volumes of the trophozoites, cytoplasm and nuclei was calculated. **Results** The parameters of area, perimeter, breadth, volume, perimeter and volume of cytoplasm of trophozoites with vacuoles were larger than those of the trophozoites without vacuoles ( $P < 0.05$ ). But the parameters of length showed no significant difference between two groups ( $P > 0.05$ ). The parameters of nuclei showed no significant difference between two groups ( $P > 0.05$ ) except for the breadth ( $P < 0.05$ ). The aspect ratio of the trophozoites without vacuoles were larger than those of the trophozoites with vacuoles ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The morphological parameters of *T. vaginalis*

**[基金项目]** 云南省自然科学基金资助项目 (2010ZC111)

**[作者简介]** 陈熙 (1981~), 女, 云南曲靖市人, 医学硕士, 助理实验师, 主要从事医学寄生虫学实验教学工作.

**[通讯作者]** 周本江. E-mail: [kmbj998@yahoo.com.cn](mailto:kmbj998@yahoo.com.cn)

after 3 generations subculture in vitro are higher than those of *T. vaginalis* parasitizing in human bodies. The shape of the trophozoites with vacuoles becomes rounder and bigger than trophozoites without vacuoles. Their nuclei keep stable except for the parameters of breadth.

[Key words] *Trichomonas vaginalis*; Culture in vitro; Morphology; Quantitative morphological

阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis* donne, 1837)是泌尿生殖道鞭毛虫,虫体无色透明,呈梨形,借助鞭毛的摆动前行,以波动膜的波动做旋转式运动.其生活史仅有滋养体期.主要寄生于女性阴道和尿道,以及男性的尿道及前列腺等泌尿生殖器官,引起滴虫性阴道炎和尿道炎,是一种以性传播为主的传染病.据WHO报道,全球每年约有1.7亿人感染阴道毛滴虫<sup>[1]</sup>.我国女性的年发病率一般在10%左右<sup>[2]</sup>,最高可达38.41%<sup>[3]</sup>.阴道毛滴虫感染还与许多围产期并发症有关,如引起胎膜早破、早产、低体重儿等<sup>[4,5]</sup>;同时也是其它性传播疾病的潜在危险因素.以往对阴道毛滴虫的体外实验研究较多,但对阴道毛滴虫的形态改变大部分属于定性描述,本研究采用定量观察体外培养的阴道毛滴虫的形态变化,以此减少主观因素对实验结果的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 肝浸汤培养基制备** 取新鲜兔肝60g,蒸馏水400mL,将兔肝剪碎后加入少量蒸馏水,用高速组织捣碎机磨细后加入剩余蒸馏水,置冰箱内过夜<sup>[2]</sup>.次日加热煮沸30min,纱布过滤后的滤液约250mL即为肝浸汤.而后依次加入氯化钠2g,麦芽糖4g,半胱氨酸盐酸盐0.8g,最后加入蛋白胨8g,并加热使其迅速溶解,调节pH值至5.6,再次加热滤纸过滤后,取8mL分别置于15mm×150mm试管内,以脱脂棉塞住试管口,在121℃下高压灭菌20min后,置37℃恒温箱24h,检查无菌后可置于4℃冰箱内冷藏保存.用该方法保存的肝浸汤培养基可延续使用1~2个月.但在每次使用前需将肝浸汤培养基置于沸水中煮10min.

**1.1.2 虫株来源与接种培养** 虫株取自昆明医科大学第一附属医院妇科门诊阴道毛滴虫镜检阳性患者的阴道分泌物,在无菌条件下用棉签拭子从阴道后穹窿部位取材,接种于加入了2mL无菌健康马血清及少量青霉素的肝浸汤培养基中,置37℃培养箱内培养48h后,转种1次.

**1.1.3 仪器** 图像分析采用Nikon ECLIPSE 50i全

自动生物型显微镜及Nikon Model C-SHG1计算机图象分析系统,无菌操作箱、高压消毒柜、水浴恒温培养箱等均由昆明医科大学寄生虫学教研室提供.

### 1.2 方法

**1.2.1 制作阴道毛滴虫封片标本** (1) 拖片:采用经实验室转种后第3代培养36h的滴虫作为涂片染色的材料.取含滴虫培养液5mL加入离心管内混匀,1500r/min,离心3min,弃上清液,用滴管将离心管底部沉渣与管内的少量培养液吹匀,吸取1小滴混悬液滴于洁净的载玻片左1/3与右2/3交界处,直接用包装载玻片的隔离纸条以45°角与含滴虫的混悬液接触,然后缓慢匀速向右拖动纸条将液滴展开,拖出长度约为载玻片1/2左右的液带,拖出的液带厚度越均匀,染色效果越好;(2) 固定:将拖片置37℃恒温箱内15min快速干燥,取出后用玻棒蘸甲醇液在涂片上快速滚过,置室温下固定10min后即可用于染色.采用该方法固定的标本可保存3个月用于染色;(3) 染液配制用Giemsa、Wright's混合染液.瑞氏染液、姬氏染液原液按宋明华配制法<sup>[6]</sup>.取姬氏染液原液2mL,加pH6.4的磷酸盐缓冲液20mL(用1/15mol/L磷酸氢二钠和1/15mol/L磷酸二氢钾,按1:3的比例配制),再加入瑞氏染液原液1mL充分混匀后即成2:1新鲜混合染液;(4) 染色:将固定好的拖片放入盛有新鲜混合染液的染色缸内.在室温20℃~25℃条件下染色30min,若染色效果不满意,可根据室温适当调整染色时间亦可获得满意效果;(5) 封片:自染色缸内取出拖片后,用清水缓慢清洗染液,自然晾干后镜下观察标本制作效果,筛选滴虫形态和染色效果均佳的标本,以加拿大树脂与22mm×22mm的盖玻片封片.

**1.2.2 图像分析仪观察与测量阴道毛滴虫形态** 将制作好的阴道毛滴虫染色标本置于图像分析仪显微镜下用100×10倍油镜观察,每张封片按照从左到右,上下观测的方法每隔5个采集一个滴虫,测量其面积、周长、长轴、短轴、核面积、核周长、核长轴、核短轴,并应用图像分析软件手动勾勒出空泡边界,测量其面积、长轴、短轴.

### 1.3 统计学处理

将测量获得的数据及参数输入EXCEL2003

中, 分别计算有空泡及无空泡两型滋养体及胞核的面积、周长、长轴、短轴、体积、胞质面积与体积、长短轴比、核浆比, 其中滋养体及胞核的体积通过以下公式计算: 体积 =  $4/3 \pi \times (1/2B)^2 \times 1/2L$  (其中 B 表示短径, L 表示长径)<sup>[7]</sup>, 空泡的平均面积、周长、长轴、短轴、体积、胞质的体积为滋养体的体积与胞核的体积之差. 用 SPSS 计算各参数的均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ), 并对有空泡及无空泡两型滋养体上述相应数据进行 *t* 检验.

## 2 结果

在  $100 \times 10$  倍生物显微镜下观察制作的体外培养阴道毛滴虫封片标本, 杂质较少, 视野内虫体分布均匀, 伸展好. 虫体内部结构清晰, 形态特征明显. 体外培养 3 代的阴道毛滴虫部分滋养体胞质内出现空泡, 用图像分析仪共随机采集正常无空泡型滋养体 210 个, 空泡型滋养体 31 个.

### 2.1 两型滋养体的比较

分别比较两型滋养体的面积、周长、长轴、短轴, 体积、胞质面积、胞质体积、长短轴比等参数数据见表 1.

### 2.2 两型滋养体胞核的比较

采集的无空泡型滋养体 210 个, 空泡型滋养体 31 个, 分别比较两型滋养体细胞核的面积、周长、长轴、短轴、长短轴比、体积等参数数据见表 2.

### 2.3 空泡型滋养体中空泡的形态参数

采集的 31 个空泡型滋养体中共有 65 个空泡, 分别测量空泡的平均面积、周长、长轴、短轴、体积等参数数据见表 3.

### 2.4 两型滋养体核浆比之比较

采集的无空泡型滋养体 210 个, 平均核浆比为 ( $0.037 \pm 0.012$ ); 空泡型滋养体 31 个, 平均核浆比为 ( $0.020 \pm 0.004$ ), *t* 值为 14.197, 两型滋养体核浆比的差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ).

## 3 讨论

寄生于人体的阴道毛滴虫活体无色透明, 固定染色后呈梨形<sup>[7]</sup>. 而在体外培养一段时间后的阴道毛滴虫, 虫体逐渐变大, 固定染色后可呈近圆形或椭圆形, 胞质内出现空泡<sup>[8]</sup>. 这种形态上的变化可能与宿主和营养有关. 以往对阴道毛滴虫的体外实验研究较多, 但对其形态改变大部分属于定性描述, 实验不仅存在工作量大、测量计数困难, 而且无法精确地获得常用的形态学鉴定数据. 吴伟等<sup>[9]</sup>

表 1 阴道毛滴虫滋养体的各参数值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The parameters of *T. vaginalis* trophozoites ( $\bar{x} \pm s$ )

参数类别	无空泡型滋养体 (个数)	空泡型滋养体 (个数)
面积( $\mu\text{m}^2$ )	775.477 $\pm$ 122.303(210)	1 181.495 $\pm$ 194.659(31)**
周长( $\mu\text{m}$ )	87.774 $\pm$ 8.610(198)	130.048 $\pm$ 13.864(31)**
长轴( $\mu\text{m}$ )	34.175 $\pm$ 2.945(210)	43.379 $\pm$ 3.118(31)
短轴( $\mu\text{m}$ )	22.641 $\pm$ 2.663(210)	37.231 $\pm$ 3.912(31)*
体积( $\mu\text{m}^3$ )	9 318.195 $\pm$ 2 359.061(210)	3 1327.030 $\pm$ 6 384.015(31)**
胞质面积( $\mu\text{m}^2$ )	696.367 $\pm$ 116.777(209)	1 058.195 $\pm$ 185.172(31)*
胞质体积( $\mu\text{m}^3$ )	8 983.897 $\pm$ 2 348.556(206)	30 742.440 $\pm$ 6 338.347(31)**
长短轴比	1.570 $\pm$ 0.166(210)	1.123 $\pm$ 0.048(31)*

与无空泡型滋养体比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表 2 阴道毛滴虫滋养体胞核的各参数值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The parameters of nuclei of *T. vaginalis* trophozoites ( $\bar{x} \pm s$ )

参数类别	无空泡型滋养体胞核	空泡型滋养体胞核
面积( $\mu\text{m}^2$ )	78.482 $\pm$ 9.6016	123.230 $\pm$ 11.691
周长( $\mu\text{m}$ )	39.880 $\pm$ 5.887	58.108 $\pm$ 5.560
长轴( $\mu\text{m}$ )	10.459 $\pm$ 0.8147	13.675 $\pm$ 1.0729*
短轴( $\mu\text{m}$ )	7.513 $\pm$ 0.810	9.045 $\pm$ 0.592*
长短轴比	1.410 $\pm$ 0.201	1.523 $\pm$ 0.167
体积( $\mu\text{m}^3$ )	311.965 $\pm$ 67.504	584.589 $\pm$ 85.038

与无空泡型滋养体比较, \* $P < 0.05$ .

表3 阴道毛滴虫空泡型滋养体中空泡的各参数值

Tab. 3 The parameters of vacuoles of *T. vaginalis* trophozoites with vacuoles

参数类别	最小值	最大值	平均数	标准差
面积( $\mu\text{m}^2$ )	3.832	106.906	16.898	14.894
周长( $\mu\text{m}$ )	10.330	53.295	25.129	9.209
长轴( $\mu\text{m}$ )	3.222	15.333	5.960	2.080
短轴( $\mu\text{m}$ )	1.256	9.413	4.401	1.455
体积( $\mu\text{m}^3$ )	3.082	711.348	81.602	106.664

于2003年利用计算机图象分析系统探索建立阴道毛滴虫的形态学数据和参数,并指出其为量化及评价虫体的形态奠定了基础.本研究利用计算机图象分析系统对体外培养的阴道毛滴虫的形态作了定量观察,重点采集阴道毛滴虫的面积、周长、长轴、短轴等形态学参数,通过计算获得体积、长、短轴比值.与已报道的文献资料进行比较后,显示出本研究采用的“形态学定量法”能够极大地减少主观因素对实验结果的影响,大大地减轻了显微测量计数的劳动强度,又能更加精确地测量出常用的形态学鉴定数据,还可以对一些形态不规则的标本进行定量等优点,因此,作者认为形态学定量法在医学原虫的研究领域内是一个值得探讨和推广的实验方法.

本实验研究观察到两型滋养体,即空泡型滋养体与无空泡型滋养体,并测得无空泡型滋养体的长轴平均为( $34.175 \pm 2.945$ )  $\mu\text{m}$ ,短轴为( $22.641 \pm 2.663$ )  $\mu\text{m}$ ,均长于已报道的正常寄生于人体的阴道毛滴虫长轴(7~23  $\mu\text{m}$ )和短轴(10~15  $\mu\text{m}$ )值;与吴伟等<sup>[8]</sup>用图像分析仪测量体外培养阴道毛滴虫的形态相比,本实验的阴道毛滴虫的面积、周长、长轴、短轴、体积值均较大.可能与实验所采用的培养基制备方法、阴道毛滴虫转种代数不同有关.

空泡型滋养体的面积、周长、短轴、体积、胞质面积和胞质体积等数值均大于无空泡型滋养体的相应参数,但长轴数值无差异,无空泡型滋养体的长、短轴比值大于有空泡型滋养体的长、短轴比值.提示空泡型滋养体的增大主要是短轴相对增长,这也许能够解释体外培养阴道毛滴虫的形态通常由梨形变为近圆形或椭圆形的原因.而空泡型滋养体的胞核与无空泡型滋养体的相比,除空泡型滋养体的胞核短轴数值大于无空泡型滋养体的胞核短轴数值外,其他胞核的相关参数值(如面积、周长、体积、长轴以及长、短轴比值)均无差异.空泡型滋养体胞质面积增大,且与空泡的面积增大成正比,而胞核面积无明显改变,

空泡型滋养体核浆的比值明显减小,说明胞质面积的增加引起整个虫体面积的改变,核浆的比值相对变小.空泡型滋养体比无空泡型滋养体的体积明显增大,但核的体积无明显改变,提示空泡型滋养体的胞质体积增加而导致了滋养体体积的增大.

本实验通过应用先进的计算机图象分析系统,对体外培养的阴道毛滴虫进行了形态学观测,所得各种参数更加客观和精确,而且解决了形态不规则标本的定量问题.而实验观察到转种3代以上的阴道毛滴虫,其形态学参数均较正常寄生于人体的阴道毛滴虫为大,并可发生形态改变,尤其是空泡型滋养体由于胞质体积的增大而导致了虫体变大、形态变圆、相应的胞核短轴变长.这些参数可作为今后抗滴虫药效学评价的重要参考.

#### [参考文献]

- [1] GERBASE A C, ROWLEY J T, HEYMANN D H, et al. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs[J]. *Sex Transm Dis*, 1998, 74:12-16.
- [2] 余红梅. 我国阴道毛滴虫病流行现状及治疗[J]. *广州医药*, 1992, 23(3):54.
- [3] 陆华. 滴虫性、霉菌性阴道炎中药外治近况[J]. *中医药学报*, 1991, (4):31.
- [4] HEINE P, MCGREGOR J A. *Trichomonas vaginalis*: a re-emerging pathogen [J]. *Clin Obstet Gynecol*, 1993, 36: 137-144.
- [5] COTCH M F, PASTOREK J G, NUGENT R P, et al. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery [J]. *Sex Transm Dis*, 1997, 24:353-360.
- [6] 宋明华, 郭鄂. 阴道毛滴虫标本染色方法的探讨[J]. *医学动物防治*, 2005, 21(2):139-140.
- [7] 周本江, 郑葵阳. *医学寄生虫学*[M]. 北京: 科学出版社, 2007:37-38.
- [8] 吴伟, 杨建茹, 王述. 计算机图象分析系统对含空泡阴道毛滴虫形态的定量研究 [J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2004, 17(2):93-95.
- [9] 吴伟, 杨建茹, 高兴政, 等. Morphometry of *trichomonas vaginalis* by computer image analysis system: establishment and analysis of the morphological data and parameters [J]. *中国寄生虫病防治杂志*, 2003, 16(2):74-76.

(2013-02-21 收稿)