

# 人芽囊原虫分类学研究进展<sup>▲</sup>

战廷正 综述 石焕焕 审校

(广西医科大学寄生虫学教研室,南宁市 530021)

【关键词】 人芽囊原虫;分类学;基因型

【中图分类号】 R 381 【文献标识码】 A 【文章编号】 0253-4304(2010)02-0222-04

人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*, Bh)是最常见的人类肠道寄生原虫之一,高发于热带和亚热带地区,发展中国家感染率(30%~50%)明显高于发达国家(1.5%~10%)<sup>[1]</sup>。近些年来的一些临床研究表明,Bh是引起人类腹泻的一个致病因素<sup>[2]</sup>,但其致病性仍颇具争议,因为多数感染者为无症状带虫者<sup>[3]</sup>。Bh形态学上呈现多样性,并且各地的分离株均显示存在明显的遗传差异性。已有学者提出Bh存在不同的基因型。这些基因型具有哪些分类学特征?Bh的致病性是否与基因型有关?现已成为国内外学者研究的热点。本文结合虫种分类学、蛋白质及同工酶图谱、基因水平以及人源与动物源芽囊原虫同源性等方面,就近些年来Bh在分类学方面的研究进展加以综述。

## 1 虫种分类学地位

1849年,Loesch首次发现Bh,但并未引起人们的关注。1911年,Alexeieff将其命名为*Blastocystis enterocola*。随后Brumpt(1912)保留其属名,改变种名,称它为*Blastocystis hominis*,归属于酵母菌。20世纪中期Zierdt(1967)对Bh的生理、生化及培养等方面进行研究,概括了Bh具有原虫性质的生理形态特征,如严格厌氧,在真菌或细菌培养基上不生长,营养需求类似其他原虫,室温培养3d或4℃过夜死亡,中性条件下生长好,没有细胞壁,有饲养伪足,具有原虫特征的线粒体等,故将其归属于原生动物门、孢子亚门。1988年,Brumpt等<sup>[4]</sup>按Levine的分类命名法又将Bh分类地位确定为原生动物界、原生动物亚界、肉鞭毛虫门、肉足虫亚门、根足虫总纲、叶足虫纲、裸变形虫亚纲、阿米巴目、芽囊虫新亚目。1993年,我

国学者江静波等<sup>[5]</sup>提出:人芽囊原虫阿米巴型虫体并不完全包含Bh的所有特征,且缺乏顶复合器,故认为Bh应是原生动物界、原生动物亚界、肉鞭毛虫门、芽囊原虫亚门、芽囊原虫纲、芽囊原虫目、芽囊原虫科、芽囊原虫属。目前还未有一观点最终被大部分学者所接受。

## 2 蛋白质图谱的研究

蛋白质SDS-PAGE(十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)是比较简单而又实用的一种分析方法,许多动物、植物及菌物的研究表明其电泳图谱能够反映其亲缘关系。亲缘关系近的物种电泳图谱很类似,甚至完全相同;反之,亲缘关系远的物种电泳图谱则差异较大。因此蛋白质电泳可为Bh分类学的研究提供有力的佐证。1995年,Mansour等<sup>[6]</sup>对11株Bh做蛋白质SDS-PAGE研究发现其蛋白条带主要分布在12~95kDa,并发现存在两种蛋白质谱型,这两种谱型可通过35kDa和40kDa条带来区分。这个结果与Kukosche等<sup>[7]</sup>通过40kDa、45kDa和50kDa条带来区分蛋白谱型的结果不同。1999年,Lanuza等<sup>[8]</sup>对18例慢性痢疾病人的Bh分离株进行SDS-PAGE研究,发现Bh可溶性蛋白的分子量分布于24~200kDa。这些分离株共同表达的条带有31条,小部分的差异表现在149kDa、118kDa、106kDa、50kDa、48kDa、47kDa和30kDa蛋白条带,并依此分成3型。2008年,Hegazy等<sup>[9]</sup>对180例5~12岁儿童的Bh分离株电泳,得到的蛋白条带范围为24~130kDa。大部分分离株显示出相似的蛋白质谱型,仅有的小部分差异存在于有症状的标本中,表现为30kDa和50kDa的低表达和118kDa的高表达。

▲基金项目:广西科学基金(桂科自0991140)

### 3 同工酶谱的研究

原级同工酶主要是基因分化的产物,能真实地反映 DNA 一级序列的变异,而不是翻译后修饰的结果,也可用于 Bh 的分类学研究。Mansour 等<sup>[6]</sup>对 5 种同工酶的研究同样,将 11 株人芽囊原虫分成至少 2 个同工酶谱型,其中有 3 株在 6 磷酸脱氢酶谱中主酶带迁移较其他虫株快,同时在磷酸葡萄糖异构酶谱和苹果酸酶谱中主酶带迁移较其他虫株慢,故将这 3 株划分为 Z-1 谱型,其他株划分为 Z-2 谱型。Gerieke 等<sup>[10]</sup>选择了 3 种能区分致病性溶组织内阿米巴与非致病性迪斯帕内阿米巴的同工酶对 119 株人芽囊原虫的同工酶谱进行研究,结果显示:Bh 分别在己糖激酶谱、葡萄糖磷酸变位酶谱和磷酸葡萄糖异构酶谱分成 5 个、11 个、35 个谱型。由于同工酶在同一物种、同一个体的不同生长发育时期表现可存在差异,所以部分同工酶的重现性较差。

### 4 基因序列的研究

4.1 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析 即将基因组 DNA 的一段明确序列用特异性引物 PCR 扩增出来,将扩增产物用一种或多种限制性内切酶消化,观察其片段。目前 ssu rRNA 基因和 efla 基因的 RFLP 分析已证明 Bh 的遗传学多样性,提示 Bh 存在数个虫种或虫株。2000 年,Hoevers 等<sup>[11]</sup>用 ssu rDNA 的 RFLP 分析技术进行 Bh 地理分布方面的研究,应用 5 种酶(Sau3AI、MSPI、Alu I、SpeI、HhaI)对来自 4 个地区 14 株 Bh 的 1 800 bp ssu rDNA 作 RFLP 分析,共发现 12 种基因型,有 7 株为多基因型,但未发现 Bh 的地理起源与 RFLP 带型之间有关系。2001 年,Kaneda 等<sup>[12]</sup>用 PCR-RFLP 技术对 64 例 Bh 感染者分析,获得 8 个基因型,6 个是已知型,2 个是新型(VIII、IX),并发现日本人与非日本人之间的 Bh 基因型分布无差异。最近,Elwakil 等<sup>[13]</sup>应用 Hinf I、Rsa I 和 Sau3AI 对来自埃及的 14 个 Bh 分离株的 ssu rDNA 进行 PCR-RFLP 分析,得到了 7 种基因型,其中有 4 种已被报告过,3 种为新的基因型。但是由于 RFLP 技术选择的内切酶不同,不利于各实验结果的比较分析。

4.2 随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)分析 用一系列约 10 bp 的单

链随机引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,再通过凝胶电泳检测多态性。Yoshikawa 等<sup>[14]</sup>用 RAPD 技术分析人、鸡和爬行动物的基因型,结果来自日本和美国的 Bh 分离株 PCR 产物十分接近,然而来自新加坡的分离株的 PCR 产物却有较大差异,提示是 Bh 的种间变异株。此外日本 1 病例的人芽囊原虫 HE87-1 株、鸡的 CK86-1 株带型相似,鸡分离株是 Bh 的动物源虫株的可能性增加,提示某些 Bh 株具有交叉感染性。但 RAPD 技术稳定性不佳,重复性差是 RAPD 技术的缺点。

#### 4.3 序列标记位点(sequence tagged sites, STS)分析

在随意引物的基础上,利用已知位点的诊断性引物进行 PCR 扩增分析。此技术已广泛用于研究 Bh 的遗传差异。2004 年,Yoshikawa 等<sup>[15]</sup>根据 PCR-RAPD 的结果设计了 7 对 STS 引物(扩增产物对应的基因型依次为 subtype1 ~ subtype7)对来自日本、巴基斯坦、孟加拉、德国和泰国的不同人群 102 个 Bh 标本成功地进行基因分型,其中 99 个分离株为已知基因型,来自泰国的一个分离株显示为混合基因型,来自日本的 2 个分离株为未知基因型。研究结果表明除泰国分离株外,3 型为最常见基因型,其次是 1 型和 4 型;而 2 型、5 型和 7 型仅在来自日本和德国的分离株中罕见检测到;6 型未检测到。Yan 和 Li 等<sup>[16,17]</sup>用与 Yoshikawa 相同的方法分别对我国江西省赣南地区 35 例 Bh 标本和上海等 4 个地区的 192 例 Bh 标本进行了基因分型,也发现存在至少 4 个亚型。其中以 3 型最多见,多为无症状的带虫者;1 型次之,以有症状者居多,推测该型可能就是我国人芽囊原虫病的致病基因型。Ozyurt 和 Laetitia 等<sup>[18,19]</sup>对分别来自土耳其的 87 个 Bh 分离株和法国的 43 个 Bh 分离株研究,结果与先前学者的研究结果基本相同。该技术的使用使 Bh 的基因分型更加快速、简便。

#### 4.4 简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分析

SSR 位点在整个基因组中分布广泛、均匀且数量充足,因而多态性极其丰富;且分析时仅需要少量 DNA,质量要求不高。Init 等<sup>[20]</sup>用一对引物(TR7、TR8)PCR 扩增人芽囊原虫 SSR 序列,得到 280 ~ 500 bp 的产物,将 20 株人芽囊原虫分成 5 型。并发现所有来自消化道疾病患者的 Bh 的 PCR 产物都含有 280 bp 的片段,因此推测 280 bp 片段为 Bh 的致病性标记。

## 5 人源与动物源芽囊原虫同源性的研究

目前,从灵长类、啮齿类、鸟类、爬行动物、两栖动物和蟑螂类等昆虫中已分离出许多与 Bh 相似的芽囊原虫分离株。这些动物分离株与人分离株的分类学关系如何?是否具有同源性?也引起了国内外学者的广泛关注。2000 年, Snowden 等<sup>[21]</sup>对 8 株来自不同动物(牛、山羊、绵羊、豚鼠和罗猴)的芽囊原虫进行 ssu rRNA 基因的 RFLP 分析,根据 5 种限制性内切酶的酶切图谱差异得出 5 种基因型,发现不同种类宿主可存在同一基因型,同种宿主可表现出基因多态性,故认为芽囊原虫可能不是宿主特异性的,可能在某些宿主间存在交叉感染。2003 年, Thathaisong 等<sup>[22]</sup>用 RFLP 分析分别来自人、猪和马的 Bh 分离株的局部 ssu rRNA 序列,结果显示猪和马的芽囊原虫分离株为单一种系,并与人的分离株有 92% ~ 94% 的同源性。同年, Abe 等<sup>[23]</sup>同样用该技术先后发现寄生在灵长类动物、家畜以及鸟类的芽囊原虫也存在基因的多态性。在所调查的牛和猪的分离株中有 31.8% 同人的分离株基因型相似,这些分离株有传染人的潜能,为屠宰场、动物饲养员的高感染率提供生物学上的证据。2004 年, Yoshikawa 等<sup>[24]</sup>采用 7 种 STS 引物,进行猴、牛、猪、鸡、鹌鹑和雉的 51 个分离株基因型分析,得出芽囊原虫的基因型在哺乳类以 1 型、3 型、6 型居多,鸟类以 2 型、4 型为主,而 3 型为人类的主要型别的结论。2006 年, Parkar 等<sup>[25]</sup>在研究中发现,饲养员与动物以及生活在同一个村庄的人和狗体内所分离出的 Bh 属于相同基因型,并首次报告了一人分离株(TH522H1)的基因型属 5 型,再次为人与动物之间可能存在交叉感染提供了佐证。2009 年, Hisao 等<sup>[26]</sup>再次用 7 对 STS 引物对来自尼泊尔儿童的 Bh 分离株与当地恒河猴的芽囊原虫分离株进行基因型的比较,结果发现儿童分离株的基因型分布为 1 型 20%、2 型 20%、3 型 60%;而恒河猴的分离株中未见 3 型,1 型和 2 型各占 50% 和 70%,其中有 3 株表现为混合基因型,还有 1 株对 7 对引物均为阴性。随后对人和猴分离株的 2 型克隆,又发现了 3 个亚型,并且这 3 种亚型都存在于人和猴的分离株中。这些结果提示,恒河猴的芽囊原虫有感染人的可能。

至今为止,利用全部的 SSU rRNA 序列所构建的系统发生树,至少可将来源于不同宿主的芽囊原虫分

为 12 个基因群,其中主要有 7 个单系群<sup>[27]</sup>。I 群包含人、灵长类动物、牛、猪和鸟的分离株;II 群包含人和灵长类动物的分离株;III 群包含人、牛、猪的分离株;IV 群包含灵长类动物、鸟以及啮齿类动物的分离株;V 群包含牛和猪的分离株;VI 和 VII 群包含人和鸟的分离株。这些结果均显示在广泛的动物宿主中存在着能感染人的虫株,换句话说,在不同宿主间可以有交叉感染。

## 6 展望

虽然 Bh 已引起学者们的关注,但仍存在诸多问题,尤其是分类地位、形态学各型的相互关系及各自在生活史中所处的地位、致病机制与机体免疫机制的关系及分子生物学等方面。尽管研究者用不同的方法研究了人芽囊原虫的遗传多样性,并将人芽囊原虫分成不同种群,但因不同方法所分的种群不能建立起对应关系,难以将不同的研究进行比较或者统一分析,故建立起合适的动物模型也是 Bh 的研究重点之一。对 Bh 是否存在强、弱毒力株,何种虫株能引起临床症状等问题仍未作出一个客观的令人信服的最终结论。在 Bh 分类学研究方法中, DNA 水平的分析将是未来的发展方向。因此有必要进一步研究不同地区、人群来源、不同症状的 Bh 的基因型分布,解决其分类学上的一些问题。

## 参 考 文 献

- [1] Sohail MR, Fischer PR. Blastocystis hominis and travelers [J]. Travel Med Infect Dis, 2005, 3(1): 33 - 38.
- [2] Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp [J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(4): 639 - 665.
- [3] Taamasri P, Leclayova S, Rangsin R. Prevalence of Blastocystis hominis carriage in Thai army personnel based in Chonburi, Thailand [J]. Milit Med, 2002, 167(8): 643 - 646.
- [4] Zierdt CH, Ng GC, Ho LC, et al. Blastocystis hominis, a long misunderstood intestinal parasite [J]. Parasitol Today, 1988, 4(1): 15 - 17.
- [5] Jiang JB, He JG. Taxonomy status of Blastocystis hominis [J]. Parasitol Today, 1993, 9(1): 2 - 3.
- [6] Mansour NS, Mikhail EM, el Masry NA, et al. Biochemical characterisation of human isolates of Blastocystis hominis [J]. J Med Microbiol, 1995, 42(4): 304 - 307.
- [7] Kukoschke KG, Muller HE. SDS-PAGE and immunological analysis of different axenic Blastocystis hominis strains

- [J]. *J Med Microbiol*, 1991, 35(1): 35 - 39.
- [8] Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, et al. Soluble-protein and antigenic heterogeneity in axenic *Blastocystis hominis* isolates: pathogenic implications [J]. *Parasitol Res*, 1999, 85(2): 93 - 97.
- [9] Hegazy MM, Maklouf LM, El Hamshary EM, et al. Protein profile and morphometry of cultured human *Blastocystis hominis* from children with gastroenteritis and healthy ones [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2008, 38(2): 453 - 464.
- [10] Gerieke AS, Burchard GD, Knobloch J, et al. Isoenzyme patterns of *Blastocystis hominis* patient isolates derived from symptomatic and healthy carriers [J]. *Trop Med Int Health*, 1997, 2(3): 245 - 253.
- [11] Hoeyers J, Holman P, Logan K, et al. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts [J]. *Parasitol Res*, 2000, 86(1): 57 - 61.
- [12] Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, et al. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65(4): 393 - 396.
- [13] Elwakil HS, Talaat RM. Genetic analysis of *Blastocystis hominis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts in Egypt [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2009, 39(1): 99 - 109.
- [14] Yoshikawa H, Nagono I, Yap EH, et al. DNA polymorphism revealed by arbitrary primers polymerase chain reaction among *Blastocystis* strains isolated from humans, a chicken, and a reptile [J]. *J Eukaryot Microbiol*, 1996, 43(2): 127 - 130.
- [15] Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, et al. Polymerase chain reaction based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries [J]. *Parasitol Res*, 2004, 92(1): 22 - 29.
- [16] Yan YM, Su SL, Lr Y, et al. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China [J]. *Parasitol Res*, 2006, 99(5): 597 - 601.
- [17] Li LH, Zhang XP, Lv S, et al. Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China [J]. *Parasitol Res*, 2007, 102(1): 83 - 90.
- [18] Ozyurt M, Kurt O, Molbak K, et al. Molecular epidemiology of *Blastocystis* infections in Turkey [J]. *Parasitol Int*, 2008, 57(3): 300 - 306.
- [19] Souppart L, Sanciou G, Cian A, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France [J]. *Parasitol Res*, 2009, 105(2): 413 - 421.
- [20] Init I, Mak JW, Lokman Hakim S, et al. Strain differences in *Blastocystis* isolates as detected by a single set of polymerase chain reaction primers [J]. *Parasitol Res*, 1999, 85(2): 131 - 134.
- [21] Snowden K, Logan K, Blozinski C, et al. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts [J]. *Parasitol Res*, 2000, 86(1): 62 - 66.
- [22] Thatthaisong U, Worapong J, Mungthin M, et al. *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely related to *Blastocystis hominis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(3): 967 - 975.
- [23] Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene [J]. *Parasitol Res*, 2003, 90(2): 124 - 128.
- [24] Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds [J]. *Microbiology*, 2004, 150(5): 1 147 - 1 151.
- [25] Parkar U, Traub RJ, Kumar S, et al. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential [J]. *Parasitology*, 2007, 134(3): 359 - 367.
- [26] Hisao Yoshikawa, Zhiliang Wu, Kishor Pandey, et al. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from children and rhesus monkeys in Kathmandu, Nepal [J]. *Veterinary Parasitology*, 2009, 160(3 - 4): 295 - 300.
- [27] Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts [J]. *Vet Parasitol*, 2004, 120(3): 235 - 242.

(收稿日期: 2009 - 11 - 10 修回日期: 2009 - 12 - 15)

## ● 本刊关于论文版权的声明

本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》《中国期刊网》全文数据库、万方数据数字化期刊群,被中国核心期刊(遴选)数据库、中文科技期刊数据库等收录。凡本刊录用的论文将同时通过互联网出版发行,在世界范围内自由阅读、下载,此举有利于扩大作者及其作品的影响。凡投本刊的论文一经录用,本刊即认定作者将该文的复制权、发行权、信息化网络传播权、翻译权、汇编权等权利转让给本刊。如作者不同意转让上述权利,请务必在投稿时注明。特此声明。