

# 用兔血清培养恶性疟原虫的实验报告

寄生虫学教研室 管惟滨 周元昌 黄文锦

恶性疟原虫体外培养在国内外均已成功,其培养液除含 RPMI1640 培养粉、HEPES 缓冲剂,并用 5% NaHCO<sub>3</sub> 调节 pH 外,必须添加人血清<sup>[1, 2]</sup>。因人血清来源困难,且价格昂贵,故寻找代用品就显得极为重要。我们自 1979 年 8 月开始,用兔血清代替人血清连续培养恶性疟原虫 400 多天,原虫繁殖旺盛,其感染率可高达 20% 以上,与用人血清同时进行比较无明显差异。兹将实验结果报告如下。

## 材 料 和 方 法

### 一、虫种来源

恶性疟原虫系北京及上海生物制品研究所合作,于 1977 年采自海南岛昌江县一病人(定名为 FCC<sub>1</sub> 株),1979 年 4 月引入本室。

### 二、营养液

系用日本进口 RPMI1640 营养粉 10.4g,加德国产 HEPES 缓冲粉 5.4g。先分别溶于双蒸馏水中,再合并成 960ml 营养液,加入每毫升含青、链霉素各 1 万单位的水溶液 5ml,用 EKS<sub>2</sub> 石棉板过滤除菌,分装每瓶 96ml,放于 4℃ 冰箱备用。使用前每瓶加 5% NaHCO<sub>3</sub> 4.2ml,然后再加入人或兔血清 10~15ml。pH 在 7.2 左右。

### 三、血球与血清

血球是 O 型或 B 型的 ACD 血,由我校第一附属医院血库供给,存 4℃ 冰箱内,可用三周。AB 型人血清由上海市中心血站供给。兔血清采自屠宰场的兔血,在室温下折出血清后离心过滤除菌,经 56℃ 灭活 30 分钟,放在 -20℃ 冰箱内备用。

### 四、培养方法

参照 Trager 及 Jensen 蜡烛缸法进行<sup>[1]</sup>。连续培养容器用 50ml 三角烧瓶,内盛培养物 5ml,其中感染及未感染的红细胞约占 5%。比较人及兔血清时,用塑料平皿(直径 3.5 厘米),每皿内盛 1.5ml 培养物,内含 10% 或 20% 的红细胞,原虫感染率为 1—2%。培养温度均为 35.5~37℃。每天更换培养液一次,每两天采样一次;涂片后用吉氏液染色,检查每 5000 个红细胞中的感染疟原虫的红细胞数,计算红细胞感染率。每组用三只皿,求平均值进行比较。

## 结 果

### 一、连续培养

实验于 1979 年 8 月 4 日开始,原虫用 RPMI1640 加人血清培养 115 天后,改用含 15% 兔血清的培养液培养,每次培养一个月,共试验三次,结果相似,现将最后一次结果列表如下(表 1)。

表 1 15%兔血清的培养液培养恶性疟原虫的结果\*

培养天数	红细胞感染率 (%)*	各期原虫百分率(%)		
		环状体	滋养体	裂殖体
1	4.56	56	13	31
3	22.80	85	5	10
7	21.36	61	2	37
11	17.24	42	5	53
15	21.28	51	1	48
19	23.16	69	0	31
23	12.32	60	9	31
27	6.68	74	7	19
31	15.44	50	6	44

\* 自第三天起,每 4 天加正常红细胞作 4 倍稀释

由上表可见,每四日查血结果,红细胞感染率为 4.56~23.16%, 其环状体、滋养体及裂殖体之平均百分率为 61、5.3 及 33.7。原虫生长良好。虽每 4 天以未感染红细胞作 4 倍稀释, 在 31 天内共稀释 7 次,其感染率仍有 4 次达 20% 以上。

二、加入血清与加兔血清的比较

实验分两大组进行, 一组实验培养物内

含 10% 的红细胞; 二组为了增加原虫数, 使培养物内含有 20% 的红细胞同时进行比较。其结果分述如下:

(一)共进行三次实验, 每次实验分四小组(每组设三只培养皿), 两组用人血清, 两组用兔血清。血清用量为每 100ml 营养液分别加 10 及 15ml。培养后 48 及 96 小时的结果列表如下(表 2)。

表 2 加入和兔血清培养恶性疟原虫的比较

实验次数	培养时间 (小时)	红 细 胞 感 染 率**			
		10ml*		15ml*	
		人血清	兔血清	人血清	兔血清
1	48	1.67 (1.28-2.36)	2.11 (1.96-2.40)	2.37 (1.80-3.12)	2.35 (2.04-2.60)
	96	2.11 (1.74-2.56)	2.76 (2.46-3.02)	3.25 (2.94-3.74)	2.90 (2.58-3.22)
2	48	2.81 (2.78-2.86)	3.21 (3.14-3.28)	3.53 (3.34-3.68)	3.51 (3.38-3.64)
	96	3.58 (3.40-3.72)	3.68 (3.62-3.74)	3.95 (3.84-4.04)	4.07 (3.98-4.14)

\* 每 100ml 营养液加血清量

\*\* 表中数字为 3 份标本的平均数, 括号内数字系 3 皿中最低和最高感染率

上述结果表明,培养 4 天原虫发育良好, 培养 96 小时其感染率均高于 48 小时。加 15ml 血清组繁殖率略高于 10ml 组。加入或兔血清的原虫繁殖结果相似, 无明显差异。

(二)为进一步比较加入血清和兔血清培养的结果, 用 2% 感染率的红细胞, 提高红细胞压积为 20%, 并设 10% 压积为对照, 以观察在加大了疟原虫数的条件下, 比较加两种血清培养的效果, 其结果见表 3。

由表 3 可见, 用两种血清内含不同比例的红细胞, 其原虫繁殖率无明显差异, 说明在加大了原虫数的条件下, 两种血清对原虫繁殖率的影响无明显区别。

讨 论

到目前为止, 疟原虫体外培养仍不可缺少血清。以往有人用动物血清代替人血清进行培养均不理想, 陈正仁等用小牛血清代人

表 3 加入血清和兔血清培养恶性疟原虫的比较

培养 时数	红 细 胞 感 染 率*			
	10%红细胞压积		20%红细胞压积	
	人血清	兔血清	人血清	兔血清
48	3.11 (3.00-3.24)	2.87 (2.48-3.08)	3.28 (3.20-3.36)	3.28 (3.16-3.48)
96	6.67 (6.52-6.80)	6.87 (6.80-7.08)	6.69 (6.40-7.00)	6.01 (5.60-6.44)

\* 表中数字为 3 份标本的平均数, 括号内数字为 3 份标本的最低和最高感染率。

血清培养, 其原虫感染率可达 8—10%<sup>[3]</sup>; Batcher 用马血清代人血清, 感染率为 10%<sup>[4]</sup>。Rieckmann 主张用兔血清代替人血清, 并经 Trager 进一步证实, 但我们实验时未见报告。我们在此启发下用兔血清代替人血清, 每 100 ml 营养液加灭活兔血清 15ml,

(下转 35 页)

(本文经龚建章教授审阅, 特此致谢!)

### 结 论

一、不论用 5% 山梨醇或 5% 甘露醇处理体外培养的恶性疟原虫, 均可将大部分感染有环状体以后各发育期原虫的红细胞溶解, 使得到发育较为同步的原虫。简化的处理方法也能得到较满意的效果。如处理前原虫发育较为整齐, 处理后培养 48 小时, 环状体比例可在 90% 以上。

二、据我们观察, 影响处理后原虫同步发育的因素为: 1) 处理前原虫的发育是否较整齐; 2) 处理时间的长短; 3) 虫株的不同。

### 参 考 文 献

1. Trager W, et al: Human malaria parasites in continuous culture Science 193: 673, 1976.
2. Jensen JB, et al: Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method J Parasit 63: 883, 1977.
3. Trager W, et al: Cultivation of malarial parasites Nature 273: 621, 1978.
4. Rieckmann KH, et al: Drug sensitivity of Plasmodium falciparum An in vitro Microtechnique, Lancet 1 (8054): 22, 1978.
5. Lambros C, et al: Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture J Parasit 65: 418, 1979.

(上接30页)

原虫生长得到满意的结果, 其繁殖率无异于人血清, 且兔血易得价廉。目前尚存在一些问题需进一步研究: (1) 兔血清中有效成分是什么, 需作分离。(2) 长久使用兔血清可否使原虫产生形态、生理、生化、免疫性能等变异。

### 参 考 文 献

1. Trager W, et al: Human malaria parasites in

continuous culture Science 193: 673-675, 1976.

2. 管惟滨等: 恶性疟原虫红内期体外连续培养的观察. 中华医学杂志 60 (10): 625, 1980.
3. Chen, et al: Studied on the cultivation of erythrocytic stage plasmodium in-vitro, Chinese Medical Journal 93 (1): 31-35, 1980.
4. Butcher GA: Factor affecting the in vitro culture of Plasmodium falciparum and Plasmodium knowlesi. Bulletin of World Health Organization 57: 17-26, 1979.