

使体外培养的恶性疟原虫同步发育 效果的观察

寄生虫学教研室 周元昌 管惟滨 黄文锦

恶性疟原虫体外培养使其与体内发育规律同步是筛选和研究抗疟药的重要方法。Trager等^[1-3]报道恶性疟原虫红内期体外连续培养成功后, Rieckmann^[4]又改进了体外微量测定方法, 为体外培养的疟原虫用于抗疟药研究创造了条件。Lambros^[5](1979)报道用5%山梨醇处理后达到同步发育。我们采用Lambros的方法, 观察其同步发育的效果, 发现疟原虫在处理前的情况、处理时间的长短以及不同虫株等因素对处理后疟原虫同步发育的效果有很大影响。现将实验结果报告如下。

材料及方法

一、虫源

一株为北京生物制品研究所自海南岛恶性疟患者分离所得, 由上海生物制品研究所转种至本实验室, 称为FCC-1株*。另一株为本实验室自海南岛另一恶性疟患者分离所得, 称FCC-3株。

二、培养方法

以RPMI 1640为培养基, HEPES作缓冲剂, 参照Trager和Jensen方法配制^[2-3]。每100ml培养液再加15ml兔血清。培养容器为50ml三角烧瓶, 内有培养物5ml, 其中感染及未感染的红细胞约占5%, 培养温度为36~37℃。待原虫增殖到一定数量时, 供试验用。

三、山梨醇及甘露醇

山梨醇为美国Sigma化学公司出品的粉剂(D-Sorbitol)。甘露醇为上海医药工业公司出品供临床输注用的20%溶液。均用重蒸

水配成5%的溶液, 经除菌过滤后放于4℃冰箱中备用。

四、操作方法

实验I~VI参照Lambros介绍的方法进行^[5]。将培养物吸至离心管中, 以2000转/分离心5分钟, 吸干上清液, 加入5倍于压积细胞的5%山梨醇或甘露醇, 混和, 在37℃下经一定时间后, 取出离心管, 同上转速再离心5分钟, 吸去上清及棕色沉淀层(其中含大量红细胞碎片及原虫碎片), 加入新鲜红细胞作2倍或3倍稀释, 再加培养液配成5%细胞悬液, 吸5ml置50ml的三角烧瓶中, 于 36.5 ± 0.5 ℃下培养。实验VII~X为简化操作步骤试验。将原培养瓶中的培养液尽量吸干, 留下培养物, 直接加入5%甘露醇10ml, 摇匀, 置37℃下45分钟, 然后再吸到离心管中离心。其余步骤均同前。

在加山梨醇或甘露醇前、后, 以及处理后培养48或96小时均采样涂片, 吉氏染色, 计算5000或10000个红细胞中感染原虫的百分率及各期原虫所占的百分率。

结果及讨论

一、处理前原虫的发育状况对效果的影响

我们在试验中多次用FCC-1株的不同批培养物参照Lambros方法处理, 但各次试验中处理后同步发育的效果并不一致。究其原因, 发现与原虫在处理前发育是否较一致

* 1979年9月在我国卫生部与世界卫生组织联合举办的疟原虫培养训练班上, 与Trager教授商定称为FCC-1株。

有关。处理前的原虫发育较整齐者,处理后同步发育的效果较好,反之则较差。以实验 I、II 结果为例(表 1)。实验 II 中原虫在处理前各期百分率的分布情况,较实验 I 中者相对集中些,故在处理后再培养 48 小时原虫同步发育的情况较好。在经山梨醇处理后,发育较成熟的晚期滋养体和裂殖体所寄生的红细胞几乎全被溶解,故对同步发育的影响很少;而发育较不成熟的晚期滋养体和发育较成熟的环状体在处理后再培养虽受到些影响,但往往还可继续存活发育,故对同步发育的影响较大。况且,环状体期本身发育时间约 30 小时,总会有参差不齐的情况。故培养物处理的时机,最好在有较多的发育较一致的环状体的

时候。

二、处理时间的长短对处理效果的影响
我们在多次实验中发现,延长处理时间可溶解较多的感染有较成熟原虫的红细胞,总的感染率虽因之而降低,但环状体比例却升高。以实验 III 为例(表 2)。处理 5 分钟后大环状体及小晚期滋养体仍分别有 18.5% 及 2.9%,处理 45 分钟后大环状体只占 10.5%,晚期滋养体全消失。培养 48 小时后,从原虫各期分布情况来看,仍以处理 45 分钟组较为同步。

三、不同虫株对处理效果的影响

我们对 FCC-3 株用山梨醇作同步处理,几次效果均不理想,推测可能是由于不同虫

表 1 FCC-1 株处理前的发育状况与处理后同步发育效果的关系

| 实验号及处理前后 | 红细胞感染率 (%) | 各期原虫百分率 (%) | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------|------|---------|------|------|------|
| | | 环状体** | | | 晚期滋养体** | | | 裂殖体 |
| | | 小 | 大 | 合计 | 小 | 大 | 合计 | |
| I 处理前 | 3.0 | 25.0 | 31.6 | 56.6 | 9.2 | 13.2 | 22.4 | 21.0 |
| 处理后 | 2.1 | 32.7 | 55.8 | 88.5 | 11.5 | | 11.5 | |
| 处理后再培养48小时* | 4.0 | 38.0 | 24.0 | 62.0 | 5.0 | 16.0 | 21.0 | 17.0 |
| II 处理前 | 1.8 | 48.0 | 3.4 | 51.4 | 2.8 | 17.3 | 20.1 | 28.5 |
| 处理后 | 0.9 | 71.8 | 8.2 | 80.0 | 2.4 | 15.2 | 17.6 | 2.4 |
| 处理后再培养48小时* | 1.7 | 55.1 | 39.2 | 94.3 | 1.1 | 2.9 | 4.0 | 1.7 |

* 经 5% 山梨醇处理 5 分钟后,加新鲜红细胞作 3 倍稀释后再培养。

** 虫体直径超过红细胞的 1/2 算作大环状体及大晚期滋养体,不及 1/2 者算作小环状体及小晚期滋养体,下同。

表 2 FCC-1 株经处理不同时间后对其同步发育的影响

| 实验号及处理前后 | 红细胞感染率 (%) | 各期原虫百分率 (%) | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------|------|-------|------|------|------|
| | | 环状体 | | | 晚期滋养体 | | | 裂殖体 |
| | | 小 | 大 | 合计 | 小 | 大 | 合计 | |
| III 处理前 | 2.6 | 56.5 | 10.7 | 67.2 | 2.3 | 19.1 | 21.4 | 11.4 |
| 处理 5 分钟后 | 1.4 | 78.6 | 18.5 | 97.1 | 2.9 | | 2.9 | |
| 处理后再培养48小时* | 3.3 | 77.3 | 16.0 | 93.3 | | 3.1 | 3.1 | 3.6 |
| 处理45分钟后 | 1.1 | 89.5 | 10.5 | 100 | | | | |
| 处理后再培养48小时* | 2.3 | 88.9 | 6.8 | 95.7 | | 1.7 | 1.7 | 2.6 |

* 经 5% 山梨醇处理后加新鲜红细胞作 2 倍稀释后再培养。

表 3 不同虫株处理后同步发育效果的比较

| 实验号及处理前后 | 红细胞感染率 (%) | 各期原虫百分率 (%) | | | | | | |
|-------------------|------------|-------------|------|------|-------|------|------|------|
| | | 环状体 | | | 晚期滋养体 | | | 裂殖体 |
| | | 小 | 大 | 合计 | 小 | 大 | 合计 | |
| IV FCC-1 株 | | | | | | | | |
| 处理前 | 1.5 | 47.4 | 6.5 | 53.9 | 9.2 | 19.7 | 28.9 | 17.2 |
| 处理后 | 1.2 | 79.7 | 13.5 | 93.2 | 3.4 | 3.4 | 6.8 | |
| 处理后再培养48小时* | 2.3 | 70.9 | 19.8 | 90.5 | | 1.7 | 1.7 | 7.8 |
| FCC-3 株 | | | | | | | | |
| 处理前 | 1.9 | 39.8 | 8.6 | 48.4 | 14.0 | 18.3 | 32.3 | 19.3 |
| 处理后 | 1.0 | 61.2 | 20.4 | 81.6 | 12.2 | 6.2 | 18.4 | |
| 处理后再培养48小时* | 1.5 | 39.5 | 34.2 | 73.7 | 6.6 | 9.2 | 15.8 | 10.5 |

* 经 5% 山梨醇处理 5 分钟后加新鲜红细胞作 3 倍稀释后再培养。

株感染的红细胞对 5% 山梨醇的反应不一所致。故进一步将 FCC-3 株与 FCC-1 株作了比较。在处理前两者的原虫各期分布百分率相差不大，但在处理 5 分钟后相差就较明显；在培养 48 小时后，FCC-1 株的同步发育情况远较 FCC-3 株为好(表 3)。以后我们又将 FCC-3 株延长处理时间，观察其同步发育效果的作用，结果仍不及 FCC-1 株(表 4 及图 1)。

表 4 FCC-3 株经处理不同时间后原虫同步发育的情况*

| 实验号及处理前后 | 红细胞感染率 (%) | 环状体百分率 (%) |
|--------------|------------|------------|
| V 处理前 | 2.2 | 39.9 |
| 处理 5 分钟后 | 1.1 | 65.8 |
| 处理后再培养48小时** | 0.9 | 58.7 |
| 处理后再培养96小时 | 2.0 | 58.5 |
| 处理25分钟后 | 1.1 | 71.4 |
| 处理后再培养48小时** | 0.9 | 58.0 |
| 处理后再培养96小时 | 2.0 | 58.0 |
| 处理45分钟后 | 0.8 | 82.5 |
| 处理后再培养48小时** | 0.8 | 77.1 |
| 处理后再培养96小时 | 1.6 | 65.0 |

* 表中数字为 2 份标本的平均数。

** 经 5% 山梨醇处理后加新鲜红细胞作 2 倍稀释后再培养。

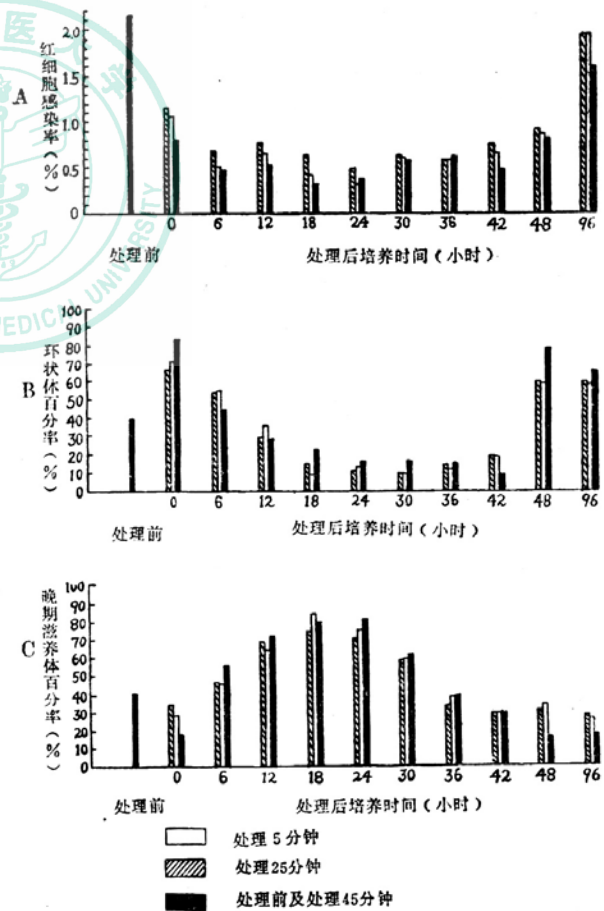


图 1 FCC-3 株经 5% 山梨醇处理不同时间后原虫发育情况比较(按 2 份标本的平均数绘制) A 红细胞感染率 B 环状体百分率 C 晚期滋养体百分率

由表 4 及图 1 可见, FCC—3 株分别经 5%山梨醇处理 5 分钟、25 分钟及 45 分钟后, 总的感染率依次降低, 但环状体的比例则依次升高。然而, 晚期滋养体的比例虽也依次降低, 但即使在处理 45 分钟组仍约占 20% (图 1)。这种情况在 FCC—1 株从未见过。培养 48 小时后, 处理 25 分钟组的环状体比例已与处理 5 分钟组相仿, 而处理 45 分钟组则仍明显高于前两组。

在疟原虫培养训练班上我们曾在 Trager 教授指导下, 以 5% 山梨醇处理 FCC—1 株 30 分钟, 结果环状体比例也只占 80% 左右。据 Trager 教授称, 在他实验室里的虫株只要处理 15 分钟即可得到满意的效果。这也可能是虫株不同所致。因此, 在以不同虫株进行同步处理时, 应个别地试验其效果, 才能选定适宜的处理时间。

从图 1 还可见, 经山梨醇处理后, FCC—3 株原虫感染率在培养初 24 小时内还有下降趋势, 在处理 25 分钟组及 45 分钟组更为明显, 这可能就是因为一部分感染有原虫的红细胞在培养过程中渐被破坏之故。因此, 为避免这种影响, 使结果能较确切地反映药物的作用, 我们不用处理后立即较同步的原虫, 而用处理后培养 48 小时新生的一代环状体(或其他发育期)进行药物试验。

四、山梨醇与甘露醇处理后原虫同步发育效果的比较

Lambros 称以甘露醇处理也有与山梨醇处理相似的效果。我们多次试验结果也属如此。以实验 VI 结果为例, 山梨醇和甘露醇处理后原虫同步发育的效果相似。处理后当时虽可查见 10% 左右的晚期滋养体, 但处理 45 分钟, 由于感染的红细胞在培养过程中渐溶解, 所以培养 48 小时, 甚至 96 小时后, 仍有相当好的同步性(表 5)。则更进一步说明延长处理时间至 45 分钟能改善同步发育的情况。

由于甘露醇溶液来源较方便, 且操作步

骤简单, 经几次实验观察(表 6), 结果表明, 采用简化的操作步骤后, FCC—1 株原虫同步发育均较好。处理后未加新鲜红细胞稀释, 原虫虽仍能侵入未感染的红细胞发育成环状体, 但原虫增殖的倍数不如在处理后再加新鲜红细胞稀释的各次实验。所以, 为供药物试验作同步处理时, 还是以处理后加新鲜红细胞稀释再培养为好。

表 5 FCC—1 株经山梨醇或甘露醇处理后同步发育效果的比较

| 实验号及处理前后 | 红细胞各期原虫百分率(%) | | | |
|-------------|---------------|------|-------|------|
| | 感染率 (%) | 环状体 | 晚期滋养体 | 裂殖体 |
| VI 处理前 | 1.8 | 51.4 | 20.1 | 28.5 |
| 山梨醇 | | | | |
| 处理后 | 0.9 | 90.0 | 10.1 | |
| 处理后再培养48小时* | 1.7 | 98.8 | 1.2 | |
| 处理后再培养96小时 | 6.8 | 94.4 | 4.0 | 1.6 |
| 甘露醇 | | | | |
| 处理后 | 0.9 | 89.4 | 10.6 | |
| 处理后再培养48小时* | 1.8 | 95.5 | 2.8 | 1.7 |
| 处理后再培养96小时 | 5.7 | 91.6 | 6.0 | 2.4 |

* 5%山梨醇或5%甘露醇处理45分钟后加新鲜红细胞作3倍稀释后再培养。

表 6 FCC—1 株经简化方法处理后同步发育的效果

| 实验号及处理前后 | 红细胞各期原虫百分率(%) | | | |
|-------------|---------------|-------|-------|------|
| | 感染率 (%) | 环状体 | 晚期滋养体 | 裂殖体 |
| VI 处理前 | 4.9 | 80.2 | 12.6 | 7.3 |
| 处理后 | 3.9 | 99.0 | 1.0 | |
| 处理后再培养48小时* | 10.1 | 95.6 | 1.2 | 3.2 |
| VII 处理前 | 1.6 | 74.7 | 15.2 | 10.1 |
| 处理后 | 1.2 | 100.0 | | |
| 处理后再培养48小时* | 3.7 | 97.9 | 0.5 | 1.6 |
| VIII 处理前 | 1.6 | 28.7 | 63.0 | 8.3 |
| 处理后 | 1.2 | 100.0 | | |
| 处理后再培养48小时* | 2.4 | 93.5 | 3.3 | 3.2 |
| IX 处理前 | 1.1 | 38.9 | 46.9 | 14.2 |
| 处理后 | 0.6 | 98.0 | 1.0 | 1.0 |
| 处理后再培养48小时* | 3.5 | 94.3 | 1.1 | 4.6 |

* 经5%甘露醇处理45分钟后未加新鲜红细胞稀释。

(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.