

抗疟药体外微量筛选方法的观察

寄生虫学教研室 黄文锦 管惟滨 周元昌

体外连续培养恶性疟原虫的成功^[1],为抗疟药筛选开辟了新的途径。国外用微量培养技术,测定恶性疟原虫虫株抗药性^[2]。近年来,国内已建立体外连续培养恶性疟原虫^[3, 4, 5]。以体外培养物为虫源,建立抗疟药体外筛选的常规方法,至今尚未见报道。

采用微量培养技术,耗量小、操作简便,符合体外药物初筛要求。但在一定的容器内培养时,适宜的培养物容量和其中所需含的红细胞量^[6],都是影响原虫增长的重要因素。同时,为使药物浓度恒定,培养期中最好不更换营养液。为此,何时采样较为恰当,也需进行选择。本文对上述几方面,进行了比较观察,并以该方法试测氯喹,观察其效果。现将实验结果报道如下。

材料和方法

一、培养液

RPMI 1640为培养基,Hepes作缓冲剂,参照 Trager 和 Jensen 的方法配制^[6-7]。实验时,每100ml营养液加兔血清15ml。

二、红细胞

我校第一附属医院血库提供ACD保存全血或分浆后血细胞加等量706代血浆^[4],血型有O、AB及B型,分装安瓿贮于4℃,供三周内使用。用时经5%葡萄糖生理盐水洗涤、离心二次,最后得红细胞压积备用。

三、虫血细胞悬液

恶性疟原虫系本室连续培养500天以上的FCC-1株,实验前2~3天加红细胞稀释。用于实验的培养物,一般原虫感染率2~5%,用前经离心,得虫血红细胞压积,加入已洗涤之红细胞压积稀释,使最终疟原

虫的感染率为1%左右,然后加入营养液,配成含红细胞量各为10%、5%及2.5%(V/V)的虫血细胞悬液。

四、培养

培养容器采用上塑三厂生产的微量塑料测定板,每板有40个孔,每孔内径6.7mm,深10mm。使用前先经紫外线照射30分钟。用微量移液器,按实验要求,分别吸取含红细胞不同比例的虫血悬液200或100 μ l,注入每个孔内,每组的培养标本数为10~13孔,依照静止蜡烛缸培养^[1],温度37℃,每24小时重新点烛及观察温度一次。除特定观察采样时间的实验外,一般均培养48小时后,制薄血膜片、吉氏染色镜检,观察5000个红细胞中原虫数,并计算原虫感染百分率。

五、抗疟药

磷酸氯喹注射剂(上海第十制药厂批号770611),每毫升含基质40mg。以5%葡萄糖生理盐水,配成含基质0.8mg/mg作母液,然后按所需的浓度,加5%葡萄糖生理盐水稀释而成。仍用微量移液器,于每孔内分别先加入各浓度药液20 μ l,对照组加5%葡萄糖生理盐水。最后于每孔内,各加入虫血细胞悬液180 μ l,每孔内总容量为200 μ l(如试验100 μ l时,用量均减半),内含红细胞量2.5%或5%,并使氯喹在每孔内最终浓度各含基质0.03、0.015、0.0075 μ g/ml,稍加振荡混匀后进行培养。

结 果

一、对培养容量及不同红细胞含量的比较观察

实验结果如表 1 所示, 三组不同红细胞含量的原虫率, 不论培养容量多少, 都以 2.5% 细胞组的原虫率为高(4.64 和 4.58), 其次是 5% 细胞组(2.13 和 3.02), 10% 组最低(0.46 和 0.44)。从两个培养容量间比较, 含细胞 2.5% 与 10% 二组, 在 200 μ l 和 100 μ l 的原虫率都基本接近。含细胞 5% 组, 在 100 μ l 内略高于 200 μ l 中的原虫率。

表 1 两个培养容量及不同红细胞含量的原虫率比较

培养容量(μ l)	不同红细胞含量的原虫率(%)+		
	2.5%	5%	10%
200	4.64 (4.08—5.10)**	2.13 (1.80—2.38)	0.46 (0.22—0.70)
100	4.58 (3.58—5.10)	3.02 (2.30—3.58)	0.44 (0.20—0.78)

+ 13 个标本之平均数

** 括号内数字为最低和最高原虫率

二、不同采样时间的观察

不同容量及不同红细胞含量的培养物, 经培养 24、48 和 72 小时后, 分别采样, 检查各组原虫率。每组均为 10 个标本, 求出平均数。结果表明, 三个不同采样时间的各组原虫率, 均有差异(图 1)。在开始 24 小时, 原虫增殖不明显; 48 小时, 含细胞 2.5% 组原虫率, 明显升高。72 小时观察各组原虫率, 都呈下降趋势。由此说明 48 小时, 原虫生长繁殖好, 此时采样最为适宜。

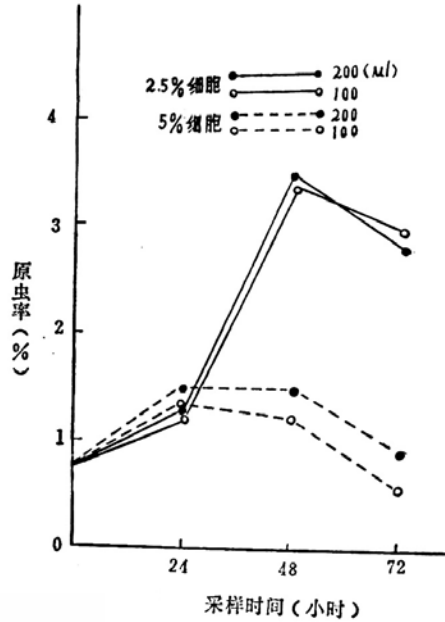


图 1 不同时间采样的原虫率

三、试测氯喹的观察

根据以上实验结果, 采用每孔 200 μ l 容量培养物, 其中含细胞量 2.5% 和 5% (V/V), 氯喹剂量分别为 0.03、0.015 和 0.0075 μ g/ml 虫血悬液, 经 48 小时培养采样检查, 计算其减虫率, 其结果见表 2。实验结果表明, 氯喹作用于疟原虫后, 其药物组的原虫率, 随药物浓度的递增而降低, 尤以含红细胞 2.5% 的实验结果, 反应较规律。其减虫率在 90% 以上的有效浓度为 0.03 μ g/ml。

表 2 微量法测试氯喹对恶性疟原虫的效果

红细胞含量 (%)	实验结果	实验 I				实验 II			
		对照	氯喹浓度(μ g/ml)			对照	氯喹浓度(μ g/ml)		
			0.03	0.015	0.0075		0.03	0.015	0.0075
2.5	原虫率+	1.86	0.014 (0—0.04)	0.214 (0.08—0.44)	1.512 (1.20—1.96)	2.29	0.018 (0.02—0.06)	0.530 (0.40—0.60)	1.690 (1.42—1.92)
	减虫率		99.25	88.47	18.53		98.36	76.94	26.20
5	原虫率**	1.55	0.084 (0.08—0.22)	1.437 (1.30—1.44)	1.50 (1.24—1.92)	1.48	0.294 (0.22—0.42)	1.06 (0.92—1.20)	1.68 (1.42—1.90)
	减虫率		94.56	7.05	2.97		80.13	28.38	0

+ 为 10 个标本平均数括号内数字为最低与最高原虫率。

** 实验 I 为 9 个标本平均数, 余为 10 个标本平均数。

讨 论

一、体外筛选抗疟药,若用恶性疟原虫感染的夜猴(*Aotus trivirgatus*)虫血,原虫发育期一致,同步性好,可以观察药物抑制无性原虫成熟为裂殖体的百分比为指标^[2]。由于我国缺乏可供建立恶性疟原虫模型的夜猴,若用原虫培养物为虫源,其中的原虫发育同步性差,无法以原虫成熟受抑制的比率,来评价药物。只有比较疟原虫,在有药与无药条件下的原虫感染率,作为药物初筛的观察指标。以上实验证明,在一定培养条件下,此法是完全可行的。

二、由微量培养的实验结果,说明疟原虫的增殖与培养物中所含的红细胞量密切相关。当含红细胞 2.5% 时,最有利于原虫的生长繁殖,故在该含量的两个不同容量中,原虫率都较高。

三、微量培养中,如用适宜红细胞悬液,不更换营养液,在 48 小时后采样,观察原虫生长繁殖良好。说明正常情况下,不论培养物 200 μ l 或 100 μ l 内所含营养液,均可维持原虫在 48 小时内的裂体增殖。此法用于药物筛选,既可使药液浓度恒定,也可使操作大为简化。

四、从初步试测氯喹结果看,2.5% 细胞含量的培养物对药物反应较规律且稳定。我们还观察了 200 μ l 与 100 μ l 悬液中试测的结果。两者无显著差异。为此,实验时如需足够血量制片,则可以用 200 μ l; 但是只要操作熟练,100 μ l 也可获得基本上相同的效果。

从试测氯喹的效果看,使疟原虫减虫率达 90% 以上时,在每毫升虫血悬液中的有效浓度为 0.03 μ g, 世界卫生组织曾报道

(1965)^[8], 成人服氯喹总量 650mg 基质,对恶性疟原虫敏感株的有效血浆浓度为 30 μ g/l, 这与本文上述试测氯喹的有效浓度 0.03 μ g/ml 相一致。由此可见,所用之微量法其可靠性较好。

小 结

用恶性疟体外培养物为虫源,采用塑料微量测定板,每孔培养量 200 μ l(或 100 μ l),其中细胞含量为 2.5%(V/V),药液量占 1/10,在培养 48 小时内不更换营养液,腊烛缸 37 C 静止培养,48 小时后观察药物组与对照组原虫数,并计算其减虫率为评价药物的指标。以此作为抗疟药初筛方法,其优点是耗量小,操作简便,较为可靠。关于其他观察指标问题,尚需进一步研究。

(此项工作在龚建章教授指导下进行。李锦明同志参加部分技术工作,特致谢意)

参 考 文 献

1. Trager W, et al: Human malaria parasites in continuous culture Science 193:673 1976.
2. Rieckmann KH, et al: Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* An in-vitro micro-technique Lancet (8054): 22 1978.
3. 高敏新等: 红内期人恶性疟原虫体外连续培养。微生物学报 19(1):88-90 1979
4. 郭盛祺等: 超低温保存的人恶性疟原虫的体外连续培养 江苏医药 4: 19-21, 1980.
5. 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.
6. Jensen JB, et al: *Plasmodium falciparum* in culture: Use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. J Parasitology 63(5): 883, 1977.
7. Trager W, et al: Cultivation of malarial parasites Nature 273: 621, 1978.
8. Peters W: Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria p.492, Academic press, London and New York, 1970.