

液氮冻存和复苏对恶性疟原虫存活的影响

Influence of liquid nitrogen freezing and thawing on survival of *Plasmodium falciparum* parasite

曲 莉,潘卫庆* (第二军医大学基础部病原生物学教研室,上海 200433)

[关键词] 疟原虫,恶性;低温保存;复苏

[中图分类号] R 382.31 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2007)03-0346-02

自1976年 Trager 和 Jensen 成功建立了恶性疟原虫体外连续培养方法^[1]以来,该方法已广泛应用于恶性疟原虫分子生物学及免疫学的研究。恶性疟原虫的冻存与复苏,是能否成功进行体外培养的关键。国内外研究者^[2]对寄生虫冻存方法的探索已持续了半个多世纪,但就如何最大限度地减少低温对寄生虫的损伤,仍未得到规律性的结论。本实验对几种恶性疟原虫冻存复苏的方法进行了探讨,以期得到提高恶性疟原虫冻存后复苏成活率的更为有效的方法,为恶性疟原虫的体外培养提供有力的支持。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 液氮罐购自美国 TYLOR-WHARTON 公司;显微镜购于日本 Nikon 公司。二甲基亚砜(DMSO)、甘油、山梨醇、氯化钠等购于上海华舜公司。

1.2 方法 实验分3组进行,第一组使用冻存液1-复苏液1,这是目前国内各实验室普遍采用的方法;第二组使用冻存液2-复苏液2;第三组使用冻存液3-复苏液2。每组各冻存3管,各冻存管的冻存物取自同一个培养瓶,按上述方法冻存,1个月后按上述方法复苏,进行恶性疟原虫的常规培养。培养时每天换液,分别于24、48、72、96 h 采样,涂片染色,计数每3 000个红细胞中感染疟原虫的红细胞数。

1.2.1 液体配制 冻存液:(1) 24% DMSO/5% 葡萄糖-NaCl;(2) 28% 甘油/3% 山梨醇/0.9% 氯化钠;(3) 30% 甘油/PBS。高压灭菌,4℃保存。

复苏液:(1) 5% 葡萄糖-NaCl;(2) 16% 山梨醇/0.9% 氯化钠。

1.2.2 虫株与培养 以本室保存的恶性疟原虫 HCC1/HN 株作为虫源。参照 Trager 法在25 ml 三角烧瓶内培养,内含培养物5 ml,红细胞压积为3%,兔血清含量为15%,置37℃,5% CO₂ 培养箱内进行常规培养。

1.2.3 液氮冻存 分为3组,即使用3种冻存液。将恶性疟原虫体外培养物培养至环状体、感染率为3%时,2 000 r/min 离心5 min,弃上清,将沉淀物混匀,分别取150 μl 加入冷冻管内,各等量加入冻存液1、2、3。直接放入液氮罐中冻存(使用冻存液1和2时),或冰浴5~10 min 后再放入液氮罐中冻存(使用冻存液3时),每种方法各冻存3管。

1.2.4 复苏方法 冻存1个月后将冻存物从液氮取出,进行快速加温解冻。即迅速置于37℃水浴中1~3 min,溶化。将I组冻存物,分别加入复苏液1,温柔混匀;2 000 r/min 离心5 min,去上清;重复1次后,加入完全培养基和正常红细胞培养,使红细胞压积为3%。放置培养箱内培养,24 h后,

采样,甲醇固定5 min,吉姆萨染色,油镜下计数3 000个红细胞,计算原虫率。

将II、III组共6管冻存物分别加入10倍体积复苏液2,温柔混匀,2 000 r/min 离心5 min,去上清。再分别加入10倍体积不含血清培养基,离心,去上清。最后加入完全培养基和红细胞培养,同上。24 h后计数。

1.3 统计学处理 用SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

结果显示,每一实验组中的3瓶冻存管,培养物复苏培养后在各个采样观察时间,疟原虫红细胞感染数目大致相同。实验I组,疟原虫由于复苏后成活率比较低,所以24、48、72、96 h 红细胞感染率仅为0.1%、0.2%、0.7%和1.7%;实验II组24、48、72、96 h 的红细胞感染率分别为0.4%、0.5%、2.4%和3.4%;实验III组24、48、72、96 h 红细胞感染率分别为0.5%、0.7%、2%和4%。由此可见,在各采样时间点上实验II、III组的疟原虫成活率是实验I组的2倍以上,统计分析经96 h 培养的红细胞感染数,组间差异显著,并且实验II、III组的疟原虫红细胞感染数(102.33/3 000个红细胞和117.67/3 000个红细胞)显著高于实验I组(51.33/3 000个红细胞, $P < 0.01$),而实验II、III组之间没有差异($P > 0.05$)。

3 讨论

低温生物学自上世纪已广泛应用于医学研究的各个领域,但对寄生虫的冷冻保存的机制尚不十分清楚。研究证实,DMSO、甘油、葡萄糖为细胞内保护剂,而山梨醇为细胞外保护剂,甘油在慢冻时有较好的防止损伤的作用,常用于冻存鼠疟原虫。根据以上研究结果,本实验采用3种不同方法对恶性疟原虫的冻存复苏进行了实验比较,取得了很好的结果。实验I组采用细胞内保护剂、快速冷冻方法,是国内各实验室常采用的方法,但复苏时常出现溶血现象,推测可能是恶性疟原虫和被寄生的红细胞由于被快速冷休克损伤所致,从而影响了疟原虫的复苏成活率。实验II组采用的是细胞内和细胞外保护剂相结合,同样采用快速冷冻方法;实验III组采用细胞内保护剂,慢速冷冻的方法。实验结果显示,由于第II、III实验组复苏后24 h 的成活率较高,使得培

[作者简介] 曲 莉,实验师。

* Corresponding author. E-mail: liqu-xu@yahoo.com.cn

养后的恶性疟原虫很快进入快速增殖期。所以认为后两组实验方法较为理想,完全可以取代国内常用的 DMSO 冻存法。

[参 考 文 献]

[1] Trager W, Jensen J B. Human malaria parasites in continuous

culture[J]. Science, 1976, 119: 673.

[2] 陈佩惠,周述龙. 医学学寄生虫体外培养[M]. 北京:科学出版社, 1995: 58-66.

[收稿日期] 2006-08-20

[修回日期] 2007-01-08

[本文编辑] 邓晓群