

低温保存的红细胞在体外培养恶性疟原虫上的应用

寄生虫学教研室 周元昌 管惟滨 黄文锦

疟原虫红内期体外培养需供以正常红细胞才能支持原虫生长繁殖^[1, 2], 习用 ACD 或 CPD 血, 置 4°C 下备用。Jensen 及 Trager 报道^[3] 血库过期的 ACD 血可供体外培养恶性疟原虫之用, 并认为对大量生产恶性疟原虫抗原有很大的现实意义。郭盛琪等介绍^[4] 制备血浆后的压积红细胞加“706”代血浆, 在 4°C 下存放 20 天仍可用于培养。但上述方法红细胞的保存时间均不长。为使培养时有更多的红细胞可利用, 并便于进行生物学研究, 我们对存放于 4°C 的红细胞及液氮冻存的红细胞用于培养恶性疟原虫, 作了对比观察。结果表明, 前者存放 5 周已不能用于培养; 后者于 140 天复苏后仍可支持原虫生长繁殖。现报道如下。

材料及方法

一、虫源

恶性疟原虫 FCC-1 株以二甲基亚砜 (DMSO) 作保护剂, 液氮冻存, 复苏后再加入冰冻后复苏的红细胞进行培养, 待繁殖到一定感染率时, 作为实验虫源。

二、正常红细胞

同一供血者 (O 型) 的 ACD 血, 于 4°C 下存放 7 天, 吸去血浆得压积红细胞。一部分加 DMSO 后以液氮速冻, 至试验日取出复苏; 另一部分加入等容积的“706”代血浆仍置于 4°C 下保存, 至试验日取出洗涤。两者同时用于培养作比较。

三、红细胞的冰冻、复苏及洗涤方法

正常或含虫的压积红细胞加等容积的

24% DMSO 后, 分装于 2ml 安瓿, 每支 1ml 悬液, 30 分钟后以液氮速冻。于试验日取出置 40°C 水浴中速融 1 分钟, 依次加入 2 倍容积的 25%、10% 及 5% 葡萄糖生理盐水, 混匀后静置 5 分钟, 2000 转/分钟离心 10 分钟, 吸弃上清液, 再用与压积细胞等容积的不含血清的培养液洗涤一次, 最后加入含血清的培养液配成 25% 悬液备用。未冰冻的红细胞只用 3 倍于压积细胞的不含血清的培养液洗涤 2 次, 加含血清的培养液配成 25% 悬液备用。

四、培养方法

参照 Trager 平皿蜡烛缸法进行。培养液中含 15% 兔血清。培养物中含红细胞约 8%, 其中正常红细胞与虫血比例为 5:1。置 36~37°C 下连续培养 6 天, 每天换液 1 次, 隔日采样一次, 涂薄片, 吉氏染色, 计算 5000 个红细胞中的感染率及各期原虫的百分率。

结 果

一、4°C 下存放 3 周及 4 周的红细胞冰冻复苏后的培养效果

分别取 4°C 下存放 3 周及 4 周的红细胞, 如上法于液氮冰冻 1 天, 各与未冰冻者进行比较。结果见表 1、2。由表 1 可见, 4°C 下存放 3 周的红细胞, 经冰冻后与未经冰冻者培养效果相似。表 2 表明, 4°C 下存放 4 周的红细胞, 经冰冻复苏后的培养效果与未冰冻者也较近似。将表 1 与表 2 相比, 4°C 下存放 4 周的红细胞, 不论经冰冻与否, 其培养效

果均不如4C下存放3周者。

表 1 4C下存放3周的红细胞经冰冻、复苏后的培养效果

培养时间(小时)	4C下21天*, 冰冻1天		4C下22天**, 未冰冻	
	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数
0	0.34		0.34	
48	0.95(0.84—1.04)	2.79	1.20(0.98—1.34)	3.53
96	4.25(4.12—4.48)	12.50	4.00(3.68—4.84)	11.75
144	5.20(4.68—5.70)	15.29	5.29(4.56—6.04)	15.56

* ACD血4C下7天,分去血浆加“706”代浆后4C下14天,共计21天
 ** ACD血4C下7天,分去血浆加“706”代浆后4C下15天,共计22天
 + 为四份标本平均数,括号内为最低及最高感染率

表 2 4C下存放4周的红细胞经冰冻、复苏后的培养效果

培养时间(小时)	4C下28天*, 冰冻1天		4C下29天**, 未冰冻	
	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数
0	0.36		0.36	
48	0.35(0.30—0.40)	0.97	0.42(0.34—0.50)	1.17
96	1.38(1.30—1.46)	3.83	1.59(1.20—1.84)	4.42
144	2.60(2.20—3.06)	7.22	3.32(3.20—3.84)	9.22

* ACD血4C下7天,分去血浆加“706”代浆后4C下21天,共计28天
 ** ACD血4C下7天,分去血浆加“706”代浆后4C下22天,共计29天
 + 为四份标本平均数,括号内为最低及最高感染率

二、4C下存放7天的红细胞,经冰冻不同时间后的培养效果

将ACD血于4C下存放7天,分离血浆后,部分置液氮冰冻28天及140天;部分加“706”代血浆仍存放于4C至28天。4C下存放7天并冰冻28天的红细胞,与4C下存放35天的红细胞作比较;4C下存放7天并冰冻140天的红细胞,与另一供血者的正常红细胞(试验前已证明培养效果良好)于4C下存放11天时进行比较。结果见表3、4。由表3可见,于4C下存放35天的红细胞,

培养效果远不如4C下存放7天并冰冻28天者,培养至96小时即见有溶血,至144小时明显溶血。

表 3 4C下存放7天,冰冻28天的红细胞与4C下35天的红细胞培养效果比较

培养时间(小时)	4C下7天, 冰冻28天		4C下35天	
	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数
0	0.35		0.35	
48	0.88(0.64—1.12)	2.51	0.53(0.40—0.66)	1.52
96	3.09(2.46—4.16)	8.83	1.23(0.90—1.76)*	3.51
144	4.51(4.30—4.88)	12.88	0.75(0.50—1.04)**	2.14

* 培养液颜色较深,有溶血现象
 ** 培养液颜色如红茶,明显溶血
 + 为四份标本平均数,括号内为最低及最高感染率

表 4 4C下7天,冰冻140天的红细胞与4C下11天的红细胞培养效果比较

培养时间(小时)	4C下7天, 冰冻140天		4C下11天*, 未冰冻	
	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数	红细胞平均感染率+(%)	增殖倍数
0	0.25		0.25	
48	0.65(0.60—0.71)	2.60	0.67(0.61—0.69)	2.68
96	1.08(1.04—1.12)	4.32	1.09(1.06—1.14)	4.36
144	4.45(3.14—5.80)	17.80	4.38(4.08—5.12)	17.52

* 为另一供血者的红细胞,试验前已证明培养效果良好
 + 为四份标本平均数,括号内为最低及最高感染率

表4表明,4C下存放7天并置液氮冰冻140天的红细胞,其培养效果与未经冰冻的新鲜红细胞相仿。

讨 论

据国内资料,ACD全血或代浆血中的红细胞在4C下随着存放时间延长其活力逐渐下降^[5],但Jensen及Trager试验证明,4C下3周的红细胞对恶性疟原虫的支持能力更好^[3]。我们试验证明,4C下存放7天或21天的红细胞,经冰冻复苏后,其支持恶性疟原虫生长的能力与未冰冻的红细胞相

仿。说明血库过期血(4C下存放3周)仍可冰冻贮存供体外培养用。4C存放5周的红细胞对原虫的支持能力大为降低,不宜用于培养,此结果与Jensen等的报道相似。

Litven认为^[6],在一定浓度下,甘油、DMSO等能对红细胞完全保护;Merymen也认为^[7],液氮冰冻时温度迅速下降,超过玻璃化的温度时,冰晶形成停止,则生物细胞在液氮中不会再发生损伤,哺乳类的红细胞贮存于液氮中基本上是无期限的。我们试验中4C下存放7天的红细胞,虽经液氮冻存140天,复苏后用于培养仍有相当好的效果,也说明红细胞于液氮中可长期贮存供培养用。

本试验证明,经冰冻的红细胞在复苏后仍可用于疟原虫体外培养,其对原虫生长的支持能力与未经冰冻的红细胞相似,实际意义至少有以下四方面: 1. 更充分地利用血库过期血,延长使用时间; 2. 在没有经常能提供新鲜红细胞来源的条件下,特别在现场工作中,携带冰冻贮存的红细胞,可便于随时应用; 3. 现场采集的特殊血型的红细胞,可利用冰冻方法带回实验室进行生物学

研究; 4. 取自人体的虫血,冰冻后再进行复苏培养时,不一定立即加入新鲜红细胞,原虫在复苏后仍有红细胞可供原虫侵入生长繁殖。此外,冻血用于临床输注时,输血反应大为减少^[6];如将冻血用于培养疟原虫,在收集裂殖子作免疫试验时,是否可减少因混有红细胞成分而引起的过敏反应,也值得研究。

(本文经龚建章教授审阅,特此致谢)

参 考 文 献

1. Trager W, et al: Human malaria parasites in continuous culture, Science 193:673, 1976.
2. Summary of discussions on in vitro cultivation of malaria parasites, Bull. WHO 55 (2-3): 411, 1977.
3. Jensen JB et al: Plasmodium falciparum in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method, J. Parasitol. 63:883, 1977.
4. 郭盛琪等: "706"代浆红细胞在恶性疟原虫培养上的应用(内部资料)1978.
5. 上海市中心血站:《红细胞低温保存鉴定会议资料》18页,(内部资料)1979.
6. Litven GG: Mechanism of cryoinjury in biological systems, Cryobiology 9:182, 1972.
7. Merymen HT: Mechanics of freezing in living cells and tissues, Science 124 :515, 1956.