

## 红内期诺氏疟原虫体外培养的研究

陈正仁 高敏新 韩淑敏 李玉华

(卫生部生物制品研究所, 北京)

本文报道连续进行诺氏疟原虫 (*Plasmodium knowlesi*) 体外培养 183 天的试验。试验比较了改良 Harvard 培养液, RPMI 1640 培养液和 199 培养液, 我们认为用 199 培养液为基础培养液, 再加入几种生长因素和 15% 小牛血清, 可获得良好结果。该原虫用 Trager 燃烛法在 100 毫升三角瓶内装 5—6 毫升于 37℃ 培养。至少有 5 批培养均连续进行一个月以上, 第一批培养已达 183 天, 稀释倍数为  $5.4 \times 10^{42}$ 。至于另 4 批, 我们认为既已能超过一个月, 就可以无限期地连续进行培养, 故未继续。培养至 61、120、127 和 151 天时, 取培养物静脉注射健康猴, 每次剂量为十万个已感染疟原虫的细胞, 所有动物均显虫血症。除一只猴外均死于感染, 存活的猴所注射的是培养 120 天的样品。当虫血症达 11% 时, 感染逐渐减少, 形成低度带血。随后证实, 培养 127 天和 151 天的疟原虫仍未失去感染性。试验还证明, 低温保存的感染血液和新鲜血液同样可用于培养。

红内期人恶性疟原虫体外培养, 近来有很大进展。有人报道过对红内期诺氏疟原虫连续进行培养成功的结果<sup>[1]</sup>, 但尚未见到原始报告。最近, Butcher 氏等<sup>[2]</sup>按 Trager 氏方法培养诺氏疟原虫最长时间只有一周, 可认为尚未成功。我们参照 Trager<sup>[3]</sup> 和 Haynes<sup>[4]</sup> 的方法, 采用改良 199 培养液, 对诺氏疟原虫连续地进行培养传代, 获得成功。经连续地培养的原虫仍能感染猕猴, 其毒力无明显改变。用液氮超低温保存的感染血, 亦能成功地连续进行培养。

### 材料和方法

#### (一) 虫株

诺氏疟原虫 Nuri 株, 系 1973 年从英国引进, 上海寄生虫病研究所保种, 1974 年由上海生物制品研究所提供。本实验室系用液氮超低温冷冻和通过猴体传代保存。当猕猴受感染后虫血症超过 10% 以上时, 在环状期采集脱纤维血, 与等量甘油葡萄糖保护剂混合, 分装安瓶, 缓慢冷冻后置于液氮中保存。

#### (二) 营养液

改良 Harvard 营养液, RPMI 1640 和改良 199 营养液, 用时添加 10—15% 小牛血清。

#### (三) 培养容器

采用带棉塞的 100 毫升三角瓶, 棉塞中插入直径为 1.0 厘米的玻璃弯管, 培养瓶放置于玻璃干燥器内, 待燃烛熄灭后密闭, 于 37℃ 培养。后来试验中去掉玻璃弯管, 只用棉塞。

### 结 果

#### (一) 用感染血直接培养

当猴体虫血症达 1% 左右时, 采取脱纤维血液, 直接加入营养液 (9 份营养液加入 1 份血液), 混合后分装至培养瓶中, 每瓶 5—6 毫升, 置于玻璃干燥器中静止培养, 每隔 24 小时取样涂片, 用姬氏染色, 检查原虫形态并作计数, 根据原虫繁殖情况决定稀释倍数 (一般为 2—4 倍), 采用含新鲜红细胞的营养液稀释, 并转种新瓶。多

本文于 1978 年 4 月 15 日收到。

次试验均能使诺氏疟原虫连续传代培养一个月以上，现将一次连续培养结果列入表 1。

表 1 诺氏疟原虫连续培养结果

培养天数(天)	寄生率(%)	各期原虫比例(%)				累计稀释倍数
		环状体	滋养体	裂殖体	配子体	
0	3.60	72	26.5	0.5		
1	3.46		25	75		
2	2.98		87	13		5
3	2.94		97	3		15
4	2.12	4	92	4		45
5	1.48	20	56	24		90
10	1.32	5	78	17		$9.72 \times 10^3$
16	1.34	19	71	10		$3.16 \times 10^6$
20	1.52	19	58	23		$1.13 \times 10^8$
30	1.10	15	66	19		$6.69 \times 10^{12}$
39	0.26	4	80	16		$5.60 \times 10^{16}$
50	0.92	7	73	20		$5.60 \times 10^{19}$
61	1.40	13	63	24		$1.6 \times 10^{23}$
71	1.48	18	64	18		$6.0 \times 10^{27}$
80	1.14	11	73	16		$1.5 \times 10^{33}$
90	2.04	28	57	15		$6.3 \times 10^{38}$
101	0.70	2	80	18		$6.8 \times 10^{43}$
110	1.94	28	55	17		$6.3 \times 10^{47}$
120	2.08	11	76	13		$4.2 \times 10^{52}$
130	2.10	9	74	17		$2.7 \times 10^{57}$
140	2.12	19	50	31		$1.4 \times 10^{62}$
150	3.76	13	76	11		$2.2 \times 10^{69}$
160	2.62	24	67	9		$5.4 \times 10^{71}$
170	2.48	21	67	12		$3.3 \times 10^{76}$
183	2.38	23	68	8		$5.4 \times 10^{82}$

从表 1 中可看出，开始培养时原虫大部份为环状体，24 小时后几乎全部发育成裂殖体。按体内生长规律，24 小时为一周期，应全部发育成新的环状体，但在体外培养中经 24 小时只达到裂殖体期，比在体内繁殖延长数小时。根据我们以往的观察，在猕猴体内诺氏疟原虫环状体期约为 8 小时，滋养体期为 12 小时，裂殖体期为 4 小时。多次体外培养的结果均表现生长周期的延长。在培养初期可以明显地见到原虫周期性的发育，但随培养时间的延续，同步

性特征逐渐消失。虽然生长周期延长，但原虫仍不断繁殖，按每天的血液稀释倍数推算，培养到 183 天总的稀释倍数可达  $5.4 \times 10^{82}$ 。

(二) 超低温保存感染血的体外培养

取液氮保存的感染血在 40℃ 水浴中速溶化后，加入等量高渗葡萄糖溶液，放入装有微孔超滤膜的培养池内，用营养液作短期透析后再转种于培养瓶中进行培养。

在培养过程中发现，前两周左右原虫生长不稳定，寄生率有下降趋势，这可能是经液氮冷冻后的原虫需要有短期的适应过程，适应后原虫即能较稳定地发育繁殖。

采用低温保存血液作多次培养，均能使诺氏疟原虫在体外顺利地生长，说明这种体外培养具有可重复性。

(三) 连续培养后原虫毒力测定

取经培养 2、4、5 个月的诺氏疟原虫分别感染猕猴，每只静脉注射 10 万个受感染的红细胞，随后逐天检查外周血液，观察原虫在体内繁殖情况，结果见表 2。

表 2 体外培养的诺氏疟原虫感染猕猴结果

猴号	体外培养时间(天)	外周血原虫			存活天数(天)
		出现时间(天)	高峰时间(天)	高峰值(%)	
54	61	3	8	52.8	9
55	120	2	14	11.05	活存
56	127	3	13	90	13
57	151	3	8	90	8

讨 论

人恶性疟原虫体外培养的成功，对红内期疟原虫的免疫研究起了很大的推进作用。我们对诺氏疟原虫连续进行培养，可实现稳定的繁殖，一般每天增长 3—4 倍，为获得较大量的原虫抗原以进行免疫研究提供了条件。

营养液成份是培养获得成功的关键问题之一。我们曾试用过 Harvard 营养液<sup>[5]</sup>，

改良 Harvard 营养液<sup>[6]</sup>, RPMI1640<sup>[7]</sup> 和 199 营养液, 这些营养液都能维持诺氏疟原虫生长繁殖, 但繁殖倍数不高, 因而不理想。经多次试验, 在 199 营养液的基础上添加肌酐、肌醇、腺苷、ATP、辅酶 A、谷胱甘肽、双甘氨酸、维生素丙和葡萄糖, 使培养获得了较好的结果。在我们配制的改良 199 营养液中人疟原虫也能维持较好的生长, 是较适用的营养液, 配制后存放冰箱半年内使用, 未发现有利不利影响。

过去认为在培养液中加入与原虫的宿主同种的血清较好, 如培养人疟原虫时, 加入 AB 型人血清, 培养诺氏疟原虫时加入猴血清。从我们的试验结果看, 加入同种猴血清有时反不如加入小牛血清效果好, 因而采用小牛血清以代替猴血清。关于血清的保存, Trigg 氏<sup>[8]</sup> 认为血清在 4℃ 保存一个月, 某些刺激生长因素即被破坏。我们现在用的小牛血清于 -20℃ 保存已超过两年, 有时在 2—8℃ 冰箱存放半年以上, 仍能维持诺氏疟原虫正常生长。说明血清中刺激原虫生长的成份是较稳定的, 至于这些成份的性质, 有待进一步研究。营养液中加入血清含量从 10% 增至 15%, 获得了较好的结果, 这与 Trager 氏的结果是一致的。

不同猴的血液对维持诺氏疟原虫的生长有一定的差异, 当选择出适合的供血猴后, 应尽可能固定使用, 以减少由于更换血液带来的不利因素。另外还必须考虑红细胞的保存, 我们采用脱纤维血液在冰箱保存 1—4 周, 效果良好。采用脱纤维血操作简便, 无须加抗凝剂和反复洗涤, 保留了原血液中除纤维蛋白以外的所有成份。在脱纤维的过程中还可除去部份白细胞。无白细胞血液对原虫生长有利早已有证明<sup>[9,10]</sup>。Trager 氏认为, 在人恶性疟原虫连续进行培养时用陈旧的血液有利, 这可能与白细

胞减少有关。

在每次培养过程开始时, 原虫尚未改变其发育的同步性, 在这个阶段加入新鲜血液的时间, 应选择滋养体晚期或裂殖体早期; 如在裂殖体成熟期加血, 则由于操作时环境改变较大, 会或多或少地影响裂殖子侵入新鲜红细胞的能力, 如果过早加血, 则红细胞在体外培养条件下经过时间较长, 也可能会影响裂殖子的入侵。所以在适宜的时期加入血液有利于疟原虫的连续传代。当疟原虫逐渐失去发育的同步性以后, 加血的时间就不那么重要了。

用超低温保存的感染血作体外培养, 涉及到保护剂成份、冻融方法及融化后去除保护剂中影响原虫生长的不利因素等问题。Pavanand 氏等人<sup>[11]</sup> 认为甘油保护剂不理想, 改用二甲基亚砜。但我们经过试验, 认为甘油葡萄糖盐水仍不失为较好的保护剂, 用慢冻速溶法处理, 原虫在保存年余后仍能复苏, 对猕猴的感染力亦未见明显改变, 仍可供体外培养用。

原虫毒力试验的结果表明, 经体外培养不同时间的疟原虫对猕猴仍有较强的毒力。从外周血中首次出现疟原虫的时间和与对猕猴的致死作用看来, 与正常新鲜血中疟原虫感染的情况相似。然而用培养 120 天和 127 天的疟原虫感染的两只猕猴, 虫血症高峰出现的时间比通常明显延迟, 并且其中有一只虫血症峰值仅达到 11.05%, 随后逐渐下降, 成为长期慢性带虫状态。由于其后用培养 151 天的原虫接种的猴仍表现了正常的感染过程, 所以上述现象似乎应归结为猴的个体差异所致。但这些现象启示我们, 经过长期的传代生长之后, 疟原虫有可能在毒力等特性上发生改变, 因而存在着用人工诱导培养新的变异株的可能性。

## 参 考 文 献

- [1] Summary of discussions: *Bull. WHO*, 55: 411, 1977.
- [2] Butcher, G. A. et al.: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 71: 277, 1977.
- [3] Trager, W. et al.: *Science*, 193: 673, 1976.
- [4] Haynes, J. D. et al.: *Nature*, 263: 767, 1976.
- [5] Afinsen, C. B. et al.: *J. Ex. Med.*, 84: 607, 1946.
- [6] Butcher, G. A. et al.: *Parasitology*, 62: 309, 1971.
- [7] Moore, G. E. et al.: *J. A. M. A.*, 199: 519, 1967.
- [8] Trigg, P. I.: *Parasitology*, 59: 915, 1969.
- [9] Williams, S. G. et al.: *Annal Trop. Med. Parasitol.*, 67: 169, 1973.
- [10] Richards, W. H. G. et al.: *ibid.*, 67: 179, 1973.
- [11] Pavanand, K. et al.: *J. Parasitol.*, 60: 537, 1974.

## STUDIES ON THE CULTIVATION OF *PLASMODIUM KNOWLESI* IN VITRO BY CONTINUOUSLY INOCULATING TECHNIQUE

Chen Zheng-ren\*    Gao Min-xing    Han Shu-min    Li Yu-hua

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing)

Cultivation of *Plasmodium knowlesi* in vitro by continuously inoculating technique for 183 days is reported. Various culture media such as modified Harvard medium RPMI 1640 medium and media 199 were compared. It was found that 199 as the basic medium, to which various growth factors and 15% fetal calf serum have been added, showed the best results. Erlenmeyer flask served as the culture vessel, each containing 5 or 6 ml of the sample, and Trager's candle method was utilized to grow the parasites at 37°C. At least 5 successful attempts have been made over one month period, and one of these, the first successful culture, was continuously cultivated up to 183 days equivalent a dilution rate of  $5.4 \times 10^{82}$ . The other four were discontinued considering the parasite to be able to indefinitely passed after a month's growth.

Materials from culture of 61-, 120-, 127-, and 151-day-cultures were taken for the intravenous injection into normal monkeys. The dose used was about 100,000 infected cells and all the animals came down with parasitemia and all but one died from the infection. The only survival one was infected with the 120-day-sample, which after clear demonstration of parasitemia of 11% of the peripheral red blood cells, then the infection gradually declined. The animal has shown no relapse and remained alive. It appears that the infectivity of the parasites growing in vitro for more than 180 days did not lose its virulence. It was also found that infected blood kept in deep freeze could be cultured as well as those infected freshly.

\* i.e. Chen Chen-jen