

红内期人恶性疟原虫体外连续培养

高敏新 李玉华 韩淑敏 陈正仁

(卫生部生物制品研究所, 北京)

在诺氏疟原虫体外连续培养 180 天成功后, 进行了人恶性疟原虫体外培养。从现场选用患者血, 用脱纤维方法抗凝, 加甘油葡萄糖保护剂, 在液氮内保存。培养时将冻血融化后, 加入高渗葡萄糖并经微孔超滤膜透析后, 移种 100 毫升三角瓶, 按诺氏疟原虫培养方法, 连续传代培养, 到目前为止已培养 70 天。实验证明只要每天更换营养液, 每 2—3 天添加新鲜人的红细胞, 可以达到连续传代的目的。从血片上见到各期原虫形态正常, 并有不同形态配子体的出现。本文对人恶性疟原虫体外培养有关因素进行了讨论。

人恶性疟原虫体外连续培养的成功^[1,2], 推动了疟疾免疫的研究工作。国外系利用人恶性疟感染猕猴后采血培养, 由于猕猴来源和饲养都有一定困难, 所以我们采用直接从病人收集人恶性疟原虫, 在液氮超低温容器内保存, 需要时取保存血直接进行培养, 已能在体外传代。实验证明, 只要及时添加新鲜人的红细胞和定期更换营养液, 可以达到体外转种传代, 现将连续培养 70 天结果分述如下:

材料和方法

(一) 虫种来源: 采自海南岛患人恶性疟的 10 岁男孩, A 型血, 在外周血检环状体期采血。用脱纤维方法抗凝, 与等量甘油葡萄糖保护剂混合, 分装安瓿液氮内保存。

(二) 营养液: 改良 199 营养液系用 199 粉剂, 添加 ATP、辅酶 A、腺苷、谷胱甘肽、双甘氨酸、葡萄糖和维生素 C。配制后用赛氏滤器除菌过滤, 用时添加 10—15% 小牛血清。

(三) 培养条件: 用 100 毫升三角瓶, 塞棉塞静置于干燥器内点蜡烛培养。按 5—10% 血液浓度, 每瓶加入 5—6 毫升容量, 每天更换一次营养液, 每 2—3 天添加一次新鲜人的红细胞。

(四) 保存血脱甘油方法: 由于保存血液中含 15% 甘油保护剂, 融化后直接加入营养液易产

生溶血, 故采用 50% 高渗葡萄糖盐水与等量保存血混合, 经硝酸纤维素膜旋转透析, 再移种 100 毫升三角瓶内, 按诺氏疟原虫连续培养方法传代^[1]。

结果和讨论

人恶性疟原虫连续培养结果表及图版 1。从表中可以看出, 融化后经脱甘油处理, 原虫很快可以复苏, 0 小时 100% 环状体, 24 小时原虫均发展成滋养体。因冻前外周血约为 3.4%, 冻后经一天培养有 1% 形态正常, 为冻前寄生率的 1/3, 这与 Haynes^[2] 报道的冷冻原虫活存率为 20—50% 相似。继续培养第二天后形成裂殖体和第二代新的环状体, 但寄生率没有明显增长, 相反地在另一次培养中第三、四天寄生率有明显增加, 这可能与添加新的血细胞有关。从表中第 5—20 天寄生率上下波动比较恒定, 但 20 天以后有逐渐下降趋势, 可能与采用的血液陈旧有关。后改用第二供血者新鲜的脱纤维人血, 亦为 A 型, 在第 41 天原虫明显回升, 寄生率达 1.1%。

本文于 1978 年 7 月 18 月收到。

于 56 天后改用 O 型血液, 原虫同样地能正常发育, 证明添加新鲜人血时血型关系不大, 关键应考虑血液新鲜程度。脱纤维血采集后当天即可使用, 在 4℃ 冰箱内保存, 可以用 3—4 周。本实验证明: 人红细胞愈新鲜愈好。而 Trager^[1] 认为要用 ACD 保存血, 以保存三周后用为好, 这可能与 ACD 保存血陈旧后, 其中白细胞被破坏有关。相反地脱纤维血在用玻珠振荡中部分白细胞已被去除, 所以新采的脱纤维血能更好地提供原虫发育条件, 不需存放陈旧后用。

表 人恶性疟原虫连续培养结果

培养天数 (天)	5000 红细胞中各期原虫数				
	环状体	滋养体	裂殖体	配子体	总数
0	42		1		43
1		52			52
2	7	1	5		13
3	3	17			20
4		8	4		12
5	26	7	2		35
10	22	20	4		46
15	6	20	2		28
20	8	17	2	1	28
30	7	7			14
41	12	35	8		55
50	6	23	3	1	33
60	2	22	2		26
70	8	22	4		34

关于气体的补给, 我们认为通入较高的二氧化碳气体主要是维持营养液的酸碱度, 用干燥器点蜡烛办法, CO₂ 含量占 3%、O₂ 18%。Butcher^[4] 有关人恶性疟的两篇主要报道提到的培养通气条件, 看来气体比例悬殊较大。本试验用病毒培养的小方瓶塞胶塞方法静止培养, 不通气也能维持原虫很好地发育。这与疫苗生产中不通气培养类似, 如果不通气在 37℃ 下能维持恒定的酸碱度, 则可简化今后虫苗生产条件, 这

些工作有待进一步研究。

人恶性疟原虫静止培养中, 往往观察到一个红细胞重复感染机率较多, 有时可高达 5—6 个原虫侵入一个红细胞内, 这对提高原虫寄生率和再培养均不利, 是否由于静止状态裂殖子集中有关, 或是由于红细胞受体的缘故。如果是前者的话, 那么当裂殖体破裂前将小瓶轻微地转动, 有利于裂殖体分散开, 可能是提高培养中感染率的一个方法。

关于原虫寄生率的检查方法, 目前采用涂片姬氏染色计数方法。我们是每一血片计数 5000 个红细胞, 观察其中各期原虫比例。这种方法既费力又不准确, 往往因血片观察部位不同差异较大。所以直接血片计数只能相对地反映原虫寄生率, 因此有必要研究在原虫繁殖中能反映原虫率相关的生化及其他测定方法。

培养中配子体的产生, 在现场人恶性疟原虫体外培养中发现很容易形成配子体, 尤其是经氯奎治疗的患者血, 经培养后配子体很快产生, 有时可高达 8—18% 以上。另外也发现培养条件不适合无性期原虫生长时, 也容易产生配子体, 如一例人恶性疟培养, 0 时 100% 环状体, 培养第 5 天其他原虫退化, 而配子体占 4—22%, 7 个样品平均占 10.8%。在长期连续培养中也经常见到不同形态的配子体, 如梭形、半月形和香蕉形等。体外产生配子体供蚊媒叮咬, 发育子孢子是个较好的途径; 大量配子体还可提供免疫用^[5]。至于如何诱导配子体产生, 有待深入探讨。

关于体外培养虫株变异, 在诺氏疟连续培养中, 似乎见到有一定的影响, 在缺乏敏感动物模型情况下, 无法用人体进行试验, 故必须在长期连续培养后, 建立测定人恶性疟原虫有无变异的方法。

参 考 文 献

- [1] Trager, W. et al.: *Science*, 193:673, 1976.
[2] Haynes, J. D. et al.: *Nature*, 263:757,

1976.

- [3] 陈正仁等: *微生物学报*, 18(4):332—335, 1978.
[4] Butcher, G. A. et al.: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71:277, 1977.
[5] Miller, L. H. et al.: *Nature*, 263:57, 1976.

CONTINUOUS CULTURE OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN VITRO AFTER BEING KEPT IN DEEP-FREEZE

Gao Min-xin, Li Yu-hua, Han Shu-min, Chen Zheng-ren

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing)

After having succeeded in growing *Plasmodium knowlesi* in vitro for over 180 days, attempt to cultivate human malaria protozoa, *P. falciparum*, in vitro was also made. So far, it is possible to carry the culture for 70 days. Infected blood was taken from a patient and was kept in deep freeze after the addition of glucose-glycerine as the protective agent at -190°C . Before culture, blood kept in frozen ampoules, was removed from liquid nitrogen and quickly thawed. The technique used for the culture of *P. knowlesi* was employed. In order to avoid hemolysis of the preserved blood

cells, high concentration of glucose was added and cultivated in a dialysis apparatus. After that, the blood sample was transferred to Erlenmeyer flasks and cultured in the presence of CO_2 in a candle desiccator at 37°C . Medium was replaced daily with the addition of fresh defibrinated human blood every 2 to 3 days. It was found that all erythrocytic stages of the *P. falciparum* could be observed and when the growth conditions were not very favorable, some gametocytes were also seen. Factors relating to the in vitro culture of human plasmodium were discussed.