

用恶性疟原虫红内期体外培养技术筛选人疟动物模型

龙祖培 叶奕英

(广西医学院寄生虫学教研室, 南宁)

高敏新 李玉华 韩淑敏 张乃临

(卫生部北京生物制品研究所, 北京)

采用恶性疟原虫红内期体外培养技术筛选人疟动物模型, 并用培养的疟原虫接种实验动物进行对比观察。白掌长臂猿红细胞对海南两个虫株和柬埔寨株都易感, 用培养海南 1 株的猿血接种原输血猿, 引起的原虫血症持续 38 天, 接种后第 2 周原虫密度升至 $11.6/10^4$ (红细胞) 高峰。蜂猴和猕猴对恶性疟原虫都不敏感。实验结果表明, 恶性疟原虫体外连续培养技术可作为人疟动物模型初步筛选之用。

血传感染动物是人疟动物模型实验的传统方法之一, 对寻找敏感动物起了很好的作用^[1,2]。由于疟疾流行有一定季节性, 高密度的原虫血症病例很少, 致使筛选动物实验受到限制。为了广泛地筛选敏感动物, 对实验方法有进一步探索的必要。Haynes 等报道恶性疟原虫体外培养 72 小时, 只有易感的人和猩猩的红细胞能支持原虫生长, 不易感的猕猴和豚鼠的红细胞则不受染^[3], 这就表明实验动物对人疟是否易感, 其红细胞的易感性是一个关键。本实验选用 3 种灵长类动物的红细胞作恶性疟原虫体外培养, 观察原虫的生长繁殖, 并用培养的原虫接种实验动物, 进行体外和体内实验的对比观察。

材 料 和 方 法

(一) 实验动物

1. 白掌长臂猿 (*Hylobates lar*): 自泰国引进, 雌性, 体重 4.5kg。
2. 蜂猴 (*Nycticebus coucang*): 产地广西, 雄性, 体重 0.8kg。
3. 猕猴 (*Macaca mulatta*): 产地广西, 雄性, 体重 3kg。

(二) 恶性疟原虫虫株

中国海南 1 株和 2 株 (FCC₁/HN 和 FCC₂/HN) 均取自海南岛恶性疟患者, 经液氮保存, 实验室连续传代培养。柬埔寨株 (Camb.) 系由 Dr. William Chin 赠送, 实验室连续传代培养。

(三) 培养方法

采用 3.5cm 塑料平皿静止培养, 营养液为 RPMI 1640 添加 25mM 的 HEPES 缓冲剂, 再加兔血清配制成 15% 血清营养液。详细培养法按高敏新等的报告^[4]。

(四) 动物试验

用培养的疟原虫血经静脉接种动物, 每天采耳垂血制作血片检查原虫。

结 果

(一) 体外培养

1. 白掌长臂猿红细胞培养恶性疟原虫 3 个虫株: FCC₁/HN、FCC₂/HN 和 Camb. 株经 3—4 天培养, 原虫寄生率均迅速增至 15% 以上, FCC₁/HN 株于第 3 天达 17.6%。

2. 白掌长臂猿和蜂猴红细胞培养恶性疟原虫 FCC₁/HN 株的结果见图 1。用长

本文于 1981 年 3 月 3 日收到。

臂猿红细胞连续 3 次稀释培养, 每加入红细胞后 3—4 天原虫寄生率均迅速增至 12% 以上。在同一时间和相同条件下, 首次加入蜂猴红细胞培养, 第 3 天原虫寄生率升至 8.9%, 第 2 次加红细胞再次培养, 寄生率仅维持原水平, 第 3 次加红细胞再培养, 寄生率则由 1.3% 降至 0.3%。

3. 白掌长臂猿和猕猴红细胞培养恶性疟原虫 Camb. 株的结果见图 2。在同一时间和条件下, 长臂猿红细胞培养的原虫第 4 天寄生率增长 3 倍, 再加红细胞稀释至 0.9% 培养, 次日即升至 1.5%; 用猕猴红细胞培养的原虫, 开始时寄生率为 1.56%, 以后逐日下降, 第 5 天降至 0.3%。用猕猴红细胞重复第 2 次实验, 开始原虫寄生率为 0.23%, 以后亦逐日减少, 第 5 天时降至 0.008%。

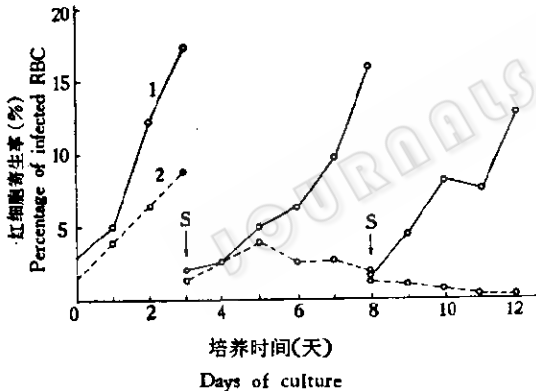


图 1 恶性疟原虫 (FCC₁/HN 株) 在白掌长臂猿和猕猴红细胞内的繁殖

Fig. 1 *P. falciparum* (FCC₁/HN strain) multiplying in the erythrocytes of two species of primates
1 白掌长臂猿 (*H. lar*) 2 猕猴 (*N. coucang*)
S 稀释再培养 subculture

(二) 动物试验

1. 感染白掌长臂猿: 该猿切除脾脏已 150 天, 用连续培养至第 10 天的恶性疟原虫 FCC₁/HN 株的猿血作静脉接种, 接种虫量为 2.4×10^8 , 其中环状体占 87%。接种后即在该猿末梢血查见原虫, 原虫血症

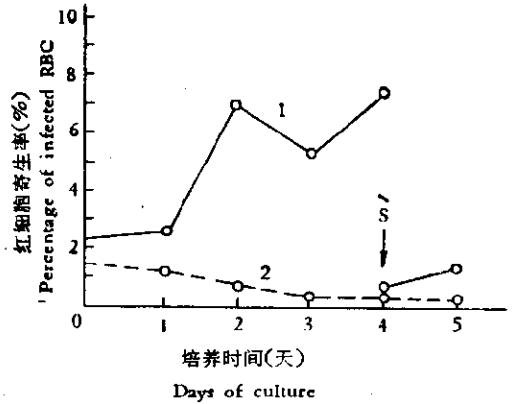


图 2 恶性疟原虫 (Camb. 株) 在白掌长臂猿和猕猴红细胞内的繁殖

Fig. 2 *P. falciparum* (Camb. strain) multiplying in the erythrocytes of two species of primates
图注同图 1 Same as Fig. 1

持续 38 天(图 3), 接种后第 2 周原虫密度升至 $11.6/10^4$ (红细胞) 高峰, 第 62 天再次查见原虫, 但次日又消失, 直至第 92 天观察结束时未再发现原虫。在感染猿的末梢血内出现环状体、晚期滋养体和裂殖体, 第 12—16 天查见纺锤状未成熟的配子体。

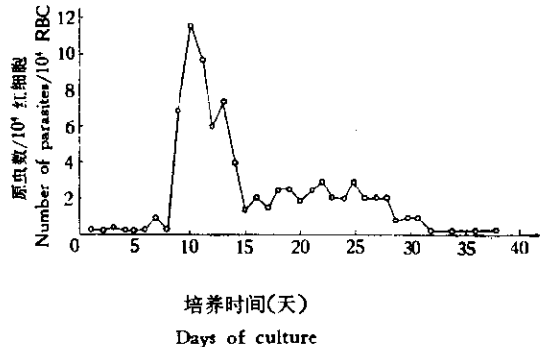


图 3 白掌长臂猿接种恶性疟原虫 (FCC₁/HN 株) 后出现的原虫血症

Fig. 3 Parasitemia of *P. falciparum* (FCC₁/HN strain) in *Hylobates lar* infected by the inoculation of parasitized blood

2. 感染蜂猴: 该猴脾脏已切除 35 天。由于用该猴的红细胞培养的原虫数量一再下降, 故以连续培养至第 20 天的恶性疟原虫 FCC₁/HN 株的白掌长臂猿血接种该猴,

接种虫量为 6.23×10^8 , 其中环状体占 50%。接种后第 1—6 天蜂猴末梢血只查见极少数变性的环状体和晚期滋养体, 第 7 天原虫消失, 直至第 42 天观察结束时均未发现原虫。

讨 论

Ward 等 (1965, 1966) 和 Gould 等 (1966) 首先证明白掌长臂猿对恶性疟原虫是敏感的, 无论是血传接种、血传转种传代或蚊传均可引起感染^[5-7]。我们选用了这种动物的红细胞做恶性疟原虫红内期体外培养实验, FCC₁/HN、FCC₂/HN 株和 Camb. 株在其红细胞内生长繁殖都很好。用培养 FCC₁/HN 株的含虫猿血接种原输血猿, 所出现的原虫血症持续达 38 天, 并于接种后第 2 周原虫密度升至 $11.6/10^4$ (红细胞) 高峰, 在猿的末梢血内能见到发育良好的各期原虫。这一对比实验结果, 不仅表明白掌长臂猿对恶性疟原虫中国海南株是敏感的, 更重要的是证明应用恶性疟原虫红内期体外培养法对长臂猿红细胞敏感性的测定是可靠的。

蜂猴红细胞培养的恶性疟原虫虽在初期原虫数量有上升现象, 但连续培养则其寄生率渐次下降至很低水平。用白掌长臂猿红细胞培养的同一种原虫接种该蜂猴, 接种的虫量虽达 6.23×10^8 , 接种后原虫迅速变性, 并于一周完全消失。通过体外和体内对比实验证明蜂猴对恶性疟原虫是不敏感的, 用疟原虫红内期体外连续培养亦能测定其红细胞对恶性疟原虫的感受性较差。

猕猴红细胞培养恶性疟原虫 Camb. 株的结果很差, 与 Haynes 等 (1976) 用培养法实验的结果相似^[3], 与血传接种猕猴的实验结果相符^[1,8], 说明猕猴是不易感动物。

血传接种动物试验在人疟动物模型的

实验研究中已被广泛应用, 确实是一个较好的试验方法。由于血源是取自疟疾病人, 高密度原虫血不易获得, 时间受疟疾流行季节的限制, 试验选用的幼龄动物来源缺少, 试验基地设于疟区也受条件和交通运输的影响, 因而难于大量筛选动物。恶性疟原虫体外培养时, 原虫能在哺乳类动物的红细胞内生长与供血动物体内红细胞的易感性是相关的^[3]。白掌长臂猿本身对恶性疟原虫易感, 用其红细胞作体外培养也表现敏感。蜂猴和猕猴本身对恶性疟原虫不易感, 它们的红细胞用于体外培养也同样不敏感。这就表明采用恶性疟原虫红内期体外培养法筛选敏感动物是简便可行的。只要具备体外培养条件, 便可在实验室进行筛选试验, 既能节省试验动物, 又可广泛筛选动物, 不受季节时间限制。所以我们认为这一实验方法是值得推荐的。

参 考 文 献

- [1] 江静波: 中山大学学报 (自然科学版), 1976 年第一期, 第 73—86 页。
- [2] Young, M. D. et al.: *Exp. Parasit.*, **38** (1): 136—152, 1975.
- [3] Haynes, J. D. et al.: *Nature*, **263**(5580):767—769, 1976.
- [4] 高敏新等: 微生物学报, **19**(1): 88—90, 1979
- [5] Ward, R. A. et al.: *Science*, **150**(3703): 1604—1605, 1965.
- [6] Ward, R. A. & F. C. Candigan: *Mit. Med.*, **131** (9, Suppl.): 944—951, 1966.
- [7] Gould, D. J. & F. C. Candigan: *Science*, **153** (3742): 1384, 1966.
- [8] 江静波等: 中山大学学报 (自然科学版), 1978 年第 4 期, 第 5—15 页。

APPLICATION OF THE *IN VITRO* CULTIVATION OF ERYTHROCYTIC STAGES OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN THE SCREENING OF SENSITIVE ANIMALS AS MALARIAL MODEL

Long Zupei Ye Yiyang

(Department of Parasitology, Guangxi Medical College, Nanning)

Gao Minxin Li Yuhua Han Shumin Zhang Nailin

(National Vaccine and Serum Institute, Beijing)

An attempt was made to use the petri dish candle jar method of cultivation of erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* to screen sensitive animals. The medium used was RPMI 1640 with 25 mM Hepes buffer, to which 15% rabbit serum was added. Red blood cells obtained from a *Hylobates lar*, a *Nycticebus coucang* and a *Macaca mulatta* were tested separately. The experiment showed that only the erythrocytes of the *Hylobates lar* were susceptible to the FCC₁/HN, FCC₂/HN and Cambodian strains of *P. falciparum*, the density of the parasites being as high as over 12% in 3—4 days of cultivation. The animal, which was

then inoculated with the culture material containing its own blood and parasites of the FCC₁/HN strain, showed a patent parasitemia for 38 days. A peak of 11.6/10⁴ RBC was reached in the second week of parasitemia. The erythrocytes of the *Nycticebus coucang* and *Macaca mulatta* were proved to be refractory to *P. falciparum* by both *in vivo* tests and *in vitro* culture methods. The result of this preliminary experiment indicated that the technique of *in vitro* continuous cultivation of *P. falciparum* might be a feasible method for the screening of sensitive animals as malarial model