

鼠疟原虫动合子体外培养初步研究*

陈佩惠 王瑞芳 王凤芸

(北京第二医学院寄生虫学教研组)

鼠疟原虫孢子增殖期的体外培养,对疟原虫生物学以及人体疟原虫的体外培养的研究,不论在理论方面,或是实验技术的探讨,都有一定的参考价值;尤其近年来疟疾免疫学进展已进入子孢子疫苗研制阶段,对于这方面的研究,更赋予现实意义。

六十年代以后,国外陆续报道有关伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)的孢子增殖早期阶段,即动合子的体外培养情况,最早是尤利和厄普马尼斯(Yoeli & Upmani)¹⁾曾用斯氏按蚊(*Anopheles stephensi*)胃浸液(与阳性鼠血按1:3比例混合)培养成动合子,其数量为24—400个/1涂片。同年阿尔杰(Alger)报道该种疟原虫动合子在肝素抗凝的受染鼠血中形成。之后,罗萨勒斯-郎奎洛等(Rosales-Ronquillo, et al.)²⁾和夏皮罗(Shapiro, et al.)³⁾先后用含有斯氏按蚊或鲮鱼(*Pimephales promelas*)细胞培养物的MEM培养基,也培养了成熟动合子,其数量,前者为258—500个/1低倍视野,后者有一个实验,动合子最多达5个/1油镜视野,但多数为1—2个/1涂片。晚近韦斯和范德伯格(Weiss & Vanderberg)⁴⁾以阳性鼠血分别接种于MEM、199或BME等合成培养基中(均加15%胎牛血清),获得成熟动合子,其中以MEM-Earle盐液的培养效果最好,动合子数量多达 $2.142 \pm 664^{(2)+}/\text{mm}^3$ 血液,而BME-Hank盐液的动合子数量最少,为 $46 \pm 5^{(3)}/\text{mm}^3$ 。国内尚无这方面研究资料。我们于1977—1978年初先后应用数种培养基对约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii yoelii*)进行体外培养动合子的试验研究。现简述如下。

材 料 和 方 法

约氏疟原虫来自法国巴黎自然博物馆,经斯氏按蚊(英国HoR株)和血液传染保存于小白鼠体内。

(一) 培养基的制备

1. 洛克液(Locke's solution) 氯化钠9克,氯化钾0.4克,氯化钙0.2克,碳酸钠0.2克,葡萄糖2.5克,蒸馏水1000毫升。10磅消毒20分钟。

2. 肝素(B. P. Erous) 用生理盐水配成500单位/1毫升的浓度,8磅消毒10分钟,连续2次。

3. BME(含Earle盐液)合成培养基 仿弗利法佐娃(Frlifazova),用前加5%胎牛血清。

4. 雌性埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)腹部浸液(简称“蚊浸液”) 羽化后3—4日龄的雌蚊,用乙醚麻醉,然后在无菌操作条件下,以怀持

* 本实验用的埃及伊蚊由张志敏同志供应,潘李珍和杨连雪同志参加部分工作,陈申同志协助拍照,阳性鼠系59175部队时云林同志支援,谨此致谢。

- 1) Yoeli, M. & Upmanis, R. S. 1968 *Plasmodium berghei* ookinete formation in vitro. *Exp. parasit.* 2: 122—128.
- 2) Rosales-Ronquillo, M. C. & Silverman, P. H. 1974 *In vitro* ookinete development of the rodent malarial parasite, *Plasmodium berghei*. *J. parasit.* 60 (5): 819—824.
- 3) Shapiro, M. et al., 1975 Evaluation of a method for *in vitro* ookinete development of the rodent malarial parasite, *Plasmodium berghei*. *J. Parasit.* 61 (6): 1105—1106.
- 4) Weiss, M. M. & Vanderberg, J. P. 1977 Studies on *Plasmodium* ookinetes: II, *In vitro* formation of *Plasmodium berghei* ookinetes. *J. Parasit.* 63 (5): 932—934.

(White) 液(氯化汞 0.25 克, 氯化钠 6.5 克, 盐酸 1.25 毫升, 纯酒精 250 毫升, 蒸馏水 1000 毫升) 消毒 15 分钟, 再经 70% 酒精消毒 5 分钟, 用蒸馏水洗 3 次, 洛克氏液再洗一次。然后切去头、胸部和附肢, 把腹部移于含有定量洛克氏液的研磨器中, 研成混浊液, 分装于小西林瓶内, 保存于 4℃ 冰箱备用。

(二) 培养方法

先从鼠尾取一滴血, 滴于玻片上, 加少量枸橼酸钠溶液(枸橼酸钠 15 克, 氯化钠 4 克, 蒸馏水 1000 毫升), 盖以盖玻片, 在高倍镜下观察。一般在室温中约 8—15 分钟内可见到雄配子形成(出丝)。当雄配子体出丝时, 可见到其周围裹着一团红细胞, 随着正在出丝的雄配子体而旋转滚动。同时另取一滴鼠血作薄涂片, 吉氏液染色, 并统计 100 个白细胞中的雌雄配子体数量。然后, 或从鼠尾部取血, 以肝素湿润的刻度管吸取定量血液, 或摘去一只鼠眼球, 用含定量肝素的小瓶收集流出的全部血液。再按血液和各种培养基的不同比例容量分别混合于培养瓶中。保持于 19—25℃ 环境中, 按预定的时间作活体观察、薄涂片、吉氏液染色、油镜观察。

结果与讨论

通过应用七种培养基, 对 30 余只阳性鼠血作体外培养试验。结果从蚊浸液(与鼠血、肝素的比为 3:3:2 或 1:2), BME 合成培养基(1:1 或 2 或 3), 洛克液(2:1), 肝素(2:3) 等四种培养基获得成熟动合子(图 1—4), 其形态构造特征与雌蚊体内活体培养的相似(图 5)。

(一) 动合子出现的时间, 最早见于培养后 15 小时(25℃), 但大多数成熟动合子出现于 21—24 小时, 直至 35 小时尚见少数动合子。曾以蚊浸液培养物作活体观察, 看到在 21—24 小时(22℃ 左右) 最活泼, 25 小时之后动合子的活动逐渐缓慢。

(二) 培养基的成分不同, 效果也不一样, 四种培养基中, 从蚊浸液和 BME 两种培养基效果较好。如在同一实验(VII-1) 中, 曾用蚊浸液、洛克液和肝素三种培养基培养一只阳性

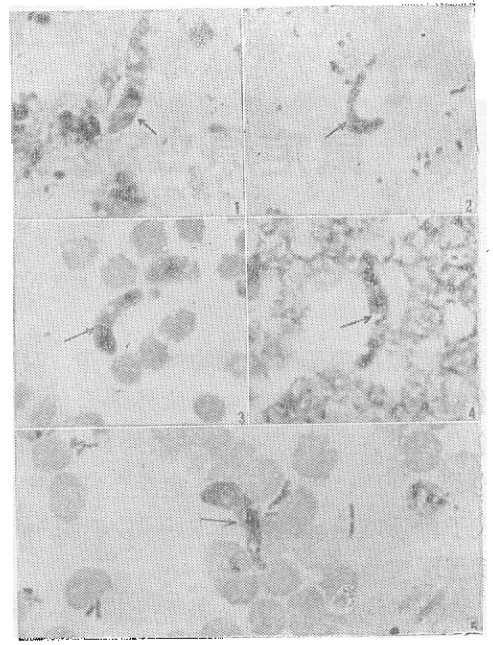


图 1—5 鼠疟原虫动合子体外培养, ×1500

1. 雌性埃及伊蚊腹部浸液培养基, 体外培养后 26 小时。2. BME 合成培养基, 培养后 23 小时。3. 洛克液培养基, 培养 23 小时。4. 肝素培养基, 培养后 24 小时。5. 斯氏按蚊体内培养后 22 小时。

鼠血的结果(见表 1)。

表 1 三种培养基的效果比较

培养基与鼠血量之比	20个动合子测量结果(微米)			动合子最多数量/1涂片	
	大	小	平均		
蚊浸液:肝素:鼠血 (3:2:3)	8.5—19	2—3.80	14.30	2.66	140+
洛克液:鼠血 (2:1)	8.0—13	2—4.2	11.65	2.63	40+
肝素:鼠血 (2:3)	8.0—16	2—4.80	12.45	2.88	40+

从表 1 中可见在蚊浸液中形成动合子的数量较多(140+/1 涂片), 个体也较大, 20 个动合子的大小平均为 14.30 × 2.66 微米。而另一次实验(VIII-1 号), 在 BME 培养基中形成动合子的数量最多达 520+/1 涂片, 测量 20 个动合子大小为 8—16 × 2—4 微米, 平均 12.55 × 2.50 微米。上述初步观察表明, 雌性埃及伊蚊腹部浸液(加定量肝素)和 BME-Earle 盐液(加 5% 胎牛血清)合成培养基, 可提供进一步试验条件。

(三) 迄今国内外尚未获得一个理想而稳

定的鼠疟原虫动合子体外培养条件,从而说明,影响疟原虫动合子形成因素很复杂。正如前人所报道,除了培养基的条件外,温度、酸碱度、配子体的数量和活力,以及宿主血内白细胞的吞噬作用等均是影响疟原虫动合子形成的重要因素。据我们初步观察,在体外培养过程中,下列几种因素与约氏疟原虫动合子形成有一定的关系。

1. 温度 文献记载伯氏疟原虫在斯氏按蚊体内发育的温度范围为 16—24℃,一般以 21—22℃ 为宜;而约氏疟原虫则为 19—27℃、以 24℃ 左右为宜。对于阻碍疟原虫孢子增殖发育,较高温度比较低温度更甚;而不适的温度对早期孢子增殖的损害更为严重。本实验形成动合子的温度在 19—25℃,或更高时,大多数雄配子形成受抑制,即使形成少量动合子,发育也不完全。高温对疟原虫危害性较大的主要原因,或是破坏了疟原虫所需的生长因素的合成;或是导致蚊体内代谢活动的增强;或因蚊胃内消化酶分泌量增高,而损害和妨碍疟原虫的发育。还有可能引起蚊胃内细菌群落的变化,甚至产生毒素而引起 pH 变化等,而破坏疟原虫的正常发育。

2. 配子体的数量与活力 配子体需要一定数量,而且雌雄性的比例也要适当。一般情况,配子体数量多,动合子的数量也多。但是,本文

某些实验结果与前人报道的相似,虽然配子体数量较多,却未见动合子形成,其原因也可能与配子体的雌雄性之比例不适当,以及配子体未成熟或者衰老有关。我们的实验表明,一般以血传第一代到第五代,和接种原虫后的第 3—5 天,带配子体鼠血作培养效果较好,可能因为在这期间配子体完全成熟,活力较强。

3. 白细胞的吞噬作用 有人报道,宿主血内白细胞具有吞噬疟原虫配子体的能力,尤其在体外培养条件下,白细胞吞噬能力更活跃。辛登和斯莫利 (Sinden & Smalley) 比较了在蚊体外培养和蚊体内活体培养条件下,白细胞对恶性疟原虫 (*P. falciparum*) 配子体的吞噬作用,发现在体外培养中,经 24 小时就有 66% 从红细胞逸出的配子体,被中性白细胞和单核白细胞(少量)所吞食;而同时在蚊胃内,只有 7% 被吞食。我们初步观察,从获得动合子的六个实验中,以上述二个实验 (VII-1 和 VIII-1) 的鼠血内白细胞数量较少,而表现白细胞数量与动合子数量成反比的现象,可能与白细胞的吞噬作用有关。

总之,人们对于影响疟原虫孢子增殖发育的因素,需要进一步探讨。这方面的研究,对于成功地进行其体外培养是有益的,在此基础上继续探索更简便而有效的培养条件。