

我国寄生虫低温保存的研究概况

沈 树 满 沈 静 德

(第一军医大学寄生虫学教研室)

随着寄生虫科研工作的不断深入,仍然以动物接种和体外培养的保种方法,已远不能适应目前科研的需要,因此,迫切需要探索一种新的保种方法,以便能随时提供教学、科研标本。近年来,一门方兴未艾的低温生物学(cryobio-

logy)应运而生。国外已做了大量寄生虫低温保存的研究,沈静德^[1],周元昌等^[18]和陶鸿章等^[25]均作了综述。但国内寄生虫的低温保存的研究尚无综合性报道,本文特将我国的研究概况综述如下。

一、寄生虫低温保存的种类

过去在寄生虫研究中,常采用动物接种或体外培养等进行保种,但经过长期传代保种的寄生虫,其毒力和生物学特性会发生改变,甚至出现变异株的现象,给寄生虫的研究带来一定的影响。如诺氏疟原虫(*Plasmodium knowlesi*)经过体外连续培养后,原虫生长周期延缓,毒力减退,甚至失去形成配子体或再感染的能力^[5,19,31]。因此,有人认为在毒力未减退或形成配子体能力未丧失之前进行低温保存,即:低温保存→培养→再低温保存的方法来解决疟原虫连续培养中出现的毒力下降或生物学特性改变的缺点。

七十年代以来,我国开展了寄生虫低温保存的研究。迄今已对14种原虫和3种蠕虫进行了低温保存的研究,并获得成功。郭盛淇等^[21]和高敏新等^[22]先后用二甲基亚砷(DMSO)和甘油作保护剂。液氮冻存恶性疟原虫(*P. falciparum*)成功。同年,李德明等^[20]和陈正仁等^[23]用速冻法和慢冻法进行了诺氏疟原虫低温保存亦获得满意效果。韩凤连^[22]以5%的甘油磷酸缓冲液作保护剂,分别对鸡疟原虫(*P. gallinaceum*)、柏氏鼠疟原虫(*P. berghei*)和食蟹猴疟原虫(*P. cynomolgi*)的红内期原虫和含子孢子的蚊体于三种不同温度中进行保存,结果,子孢子保存了90天仍具活力;鸡疟原虫和柏氏鼠疟原虫的红内期原虫的活力可维持80和180天之久。陈秋侃等^[23]报道了柏氏疟原虫经低温冻存一个月后仍有感染力。陈金富等^[24]用甘油和DMSO作保护剂,将约氏疟原虫(*P. yoelii*)于液氮中保存275天,原虫的毒力和生物学特性未发生改变。徐友祥等^[25]又对液氮保存1个月、1年和3年的约氏疟原虫血分别接种小鼠,全部获得成功。毛克强等^[2]分别对低温保存不同时间的约氏疟原虫、弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、人毛滴虫(*Trichomonas hominis*)和阴道毛滴虫(*T. vaginalis*)的形态和毒力进行了较详细观察,认为经过长期低温保存的原虫,其形态和致病性均无明显

改变。

赵文远^[29]报道了以蔗糖卵黄作保存液,使弓形虫在液氮中存活419天;另外,用牛血清为保护剂,在4℃中保存了51天。徐克继等^[24,25]先后应用聚乙烯吡咯酮(PVP)、甘油和乙二醇(EG)为保护剂,液氮中保存弓形虫速殖子4个月和一年以上。李哲等^[11]在4℃冰箱中保存弓形虫49天仍有感染力和再感染力。田广孚等^[12]单独使用DMSO为保护剂,以慢冻法分别将牛瑟氏泰勒焦虫(*Theileria sergenti*)和环形泰勒焦虫(*T. annulata*)在-196℃中保存了299天及356天。孙榴男等^[4]用DMSO和小牛血清作保护剂,对冻存1—2年的马媾疫锥虫(*Trypanosoma equiperdum*)与传代锥虫的形态、致病性和药物耐受性等方面进行了比较,结果基本一致,虫体的超微结构也无明显差异。

薛燕萍等^[33]报道了用DMSO和马血清混合液为保护剂,液氮冻存溶组织阿米巴(*Entamoeba histolytica*)滋养体4—192天,结果虫体的毒力与对照组无明显差异。

陈金富等^[15,16]以DMSO、PVP、EG为保护剂,用二步法和三步慢冻法对人毛滴虫(*T. hominis*)进行冻存,并对虫体的毒力及其形态结构进行了电镜观察研究,认为在保护剂中加入适量的吐温-80能增强保护剂的作用。

张月清等^[30]分别对低温保存了33和65天后的蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)进行了培养观察,也都获得满意效果。

蠕虫是多细胞的生物,对低温的耐受力远比原虫差,因此它对低温保存要求更高^[26],难度更大。目前,国内对蠕虫方面的低温研究主要有丝虫。

沈静德等^[6]在国内首次报道了以PVP、DMSO、EG为保护剂,采用二步慢冻法和快速解冻法对牛指状腹腔丝虫(*Setaria digitata*)和犬恶丝虫(*Dirofilaria immitis*)微丝蚴进行低温保存并获得成功,冻存时间至少12天。以后,陶鸿章等^[27,28]在低温保存马来丝虫(*Brugia malayi*)微丝蚴的研究中发现DMSO与血清合用时能提高微丝蚴的存活力和蚊媒对

微丝蚴的感染率。而5% DMSO 是微丝蚴低温保存的最佳浓度。同时还证明,被冻存与未冻存的微丝蚴在蚊体内继续发育的能力相同。王世海等^[1]在实验中发现,用速冻法冻存的微丝蚴会导致死亡或成活率只有30—40%,沈静德等^[7,8]首次单独系用PVP为保护剂,液氮冻存犬恶丝虫微丝蚴,存活率为86%且对虫体无毒性,认为PVP可作为其他蠕虫低温保存的保护剂。陶鸿章等^[29]用二步慢冻法冻存马来丝虫微丝蚴达964天之久,而在冻存前和复苏时加入一定的血清对提高微丝蚴的存活力有重要作用。沈丽英等^[9]以DMSO和小牛血清为保护剂用慢冻法对含III期幼虫的全蚊冻存了30、90和150天,结果幼虫存活率分别为54%、52%和46%,经接种沙鼠三个月后,微丝蚴的检出率分别为66%、50%和0%。

二、冻存方法

在寄生虫低温研究中,原虫和蠕虫的冻存方法大致相同,主要可分为致冷剂的选择、冷冻保护剂的选择及去除,冷冻和复温速度等,如选择得当,便会取得低温保存的满意效果。

(一) 致冷剂的选择 通常采用机械冰箱、干冰和液氮三种。机械冰箱的温度能达-60℃,但因受电压或停电等原因,导致温度不够恒定,给实验带来影响;干冰可稳定于-70℃,只是干冰耗损快,需经常补充;液氮可达-196℃,稳定不变,而且在没有自动控温仪的情况下,可利用在液氮气相中,上下调节出不同的温度。目前国内多采用液氮作致冷剂。我们认为,致冷剂的选择,主要是根据工作中的需要和可能来选用。

(二) 冷冻保护剂的选择 关于低温保存中是否需要保护剂,目前观点尚不一致,少数人认为保护剂属化学药品,对虫体有一定的损害,但多数人仍倾向于使用低温保护剂。在蠕虫和原虫的低温研究中,保护剂的选用亦不尽相同,例如,原虫的低温保护剂常用甘油、DMSO、PVP、羟乙基淀粉(HES)和乙二醇等,在这些保护剂中,根据其作用不同和分子的大小,有

人将保护剂分为两大类,即甘油和DMSO的分子小,可渗透生物膜,称为穿透性保护剂(细胞内保护剂);而PVP和HES的分子大,不穿透生物膜,称为非穿透性保护剂(细胞外保护剂)。除上述保护剂外,血清和某些媒介昆虫的整体或组织也可作为保护剂。而在丝虫低温保存研究中,尤以DMSO和血清较为常用。

在实际工作中,因寄生虫的种类不同,选用的保护剂亦各异,如疟原虫红内期多选用甘油和DMSO作保护剂,至今尚未见用细胞外保护剂的报道。而在丝虫的低温研究中,无论是使用细胞内或细胞外保护剂,都可收到良好效果。另外,有人在使用保护剂的同时加入少量的吐温-80,便有增强保护剂的作用。关于保护剂的浓度,目前报道不一,主要是因虫而异,如恶性疟原虫则以12% DMSO效果最好,而柏氏疟原虫和鸡疟原虫则以16.6%的甘油为佳。陶鸿章^[27]认为5% DMSO是丝虫微丝蚴低温保存的最佳浓度。总之,保护剂的浓度在寄生虫低温保存中至关重要,各种虫体所需的低温保护剂的最佳浓度仍在进一步探索中。

(三) 冷冻及复苏速度的选择 一般认为,选择最佳的冷冻及复苏速度是减少或避免细胞内外冰晶形成,降低生物体损伤的有效措施,是寄生虫低温保存成败的关键。因此,在工作中可根据不同虫种分别选用一步法(速冻法)、二步和三步慢冻法。速冻法是直接迅速地将保存标本投入致冷剂中,适用于单细胞类寄生虫,如疟原虫、弓形虫等;慢冻法是先将冻存标本分别于4℃至-80℃之间预冻,然后投入液氮中。在丝虫微丝蚴的冻存中,通常采用慢冻法效果较好,即以1℃/分钟的速度,缓缓降至一个较适宜温度(中间温度),数分钟后投入液氮中。陶鸿章等^[22]认为冻存微丝蚴的最佳中间温度为-17℃。

经过低温保存后的寄生虫,多采用快速解冻法解冻,整个过程控制在1分钟之内,即取出后迅速浸入37—45℃的温水浴中,要注意使样品的四周均匀地在恒定的温度中迅速融解,避免激烈震动。

(四) 保护剂的洗脱 DMSO 在常温下对虫体有一定毒性, 因此使用时常在 4℃ 环境中添加, 解冻后应及时洗脱, 越快越好, 以减轻对虫体的毒性。在疟原虫的冻存中, 去除保护剂的方法主要有两种: (1) 洗脱法 将解冻后的样品与等量 10% 葡萄糖生理盐水或 3.5% NaCl 高渗盐水混匀, 平衡数分钟后再加入 3—5 倍量 5% 的葡萄糖生理盐水, 充分混合, 室内平衡后在 1000—2000 rpm 下离心 10 分钟, 如此重复 2—3 次, 弃去上清液, 后将沉淀物移入三角烧瓶中培养。(2) 透析法 将样品移入带有刻度的离心管内, 加入等量的 25% 葡萄糖生理盐水, 混匀后倾入透析膜上进行透析, 后移入三角烧瓶中培养。由于透析法比较麻烦, 故一般多采用洗脱法。目前常用的洗脱液还有蔗糖生理盐水、葡萄糖生理盐水、山梨醇溶液、甘露醇溶液和生理盐水等。

丝虫保护剂的洗脱比疟原虫简便, 解冻后的标本应尽快用血清、台氏液或生理盐水等稀释洗涤, 室内温度高时应在 4℃ 环境中操作, 以减轻 DMSO 对微丝蚴的损害。

三、观察指标

为了解经低温保存后虫体的活力和感染力, 国内常用以下几种测定方法。

(一) 虫体活动力的观察 对低温保存后的微丝蚴, 可直接在光镜下随机观察 100 条以上即可初步测定虫体的存活率、正常外貌百分率(指微丝蚴能活动、无变性、无空泡、皱缩和断裂), 这是当前国内最简单、常用的方法之一。

(二) 体外培养 复苏后的寄生虫, 用常规的培养方法, 经一段时间培养后, 观察虫体能否发育繁殖以及毒力等生物学特性有无改变。

(三) 相应的昆虫感染试验 将冻存后的寄生虫的某个感染时期注入或喂饲适宜的宿主, 以观察其感染力及继续发育的情况。

(四) 动物模型的接种试验 将冻存后的感染期幼虫注入健康动物体内, 观察虫体的侵入、移行和对宿主的致病力。

(五) 药物的敏感性和耐受性试验 用常

规传代与冻存后传代的虫体进行比较试验^[4], 观察两种虫体的反应是否一致, 如锥虫低温保存的实验证明两者无明显差异。

(六) 超微结构的观察 用电子显微镜观察两种传代虫体形态的变化, 如锥虫观察的结果, 通过超薄切片的观察表明, 常规传代的虫体与超低温保存的传代虫体在形态与结构上也无明显差别^[4]。

结 束 语

寄生虫的低温保存, 是目前最先进的保存方法。美国、日本已建立了“细胞库”和“原虫库”等。目前国内寄生虫低温保存的研究是为建立“虫库”^[4], 以便随时给教学、科研、医疗上提供虫源和标本, 具有重要意义。

由于我国寄生虫的低温保存目前尚缺乏系统研究, 而且多为手工操作, 因此, 有关单位应给予足够重视, 多投入人力物力, 使我国此项研究更上一层楼, 为我国社会主义建设做出贡献。

参 考 文 献

- [1] 王世海等 1986 周期型马来丝虫微丝蚴液氮内保存的初步观察 贵州医药 10(6): 21。
- [2] 毛克强等 1985 液氮冻存原虫的观察 寄生虫学与寄生虫病杂志 3(3): 238—239。
- [3] 田广孚等 1986 牛瑟氏泰勒焦虫和环形泰勒焦虫液氮保存试验 中国兽医科技 (3): 36。
- [4] 孙楠勇等 1988 锥虫的深冻保存及其生物学特性观察 药物分析杂志 8(1): 13—15。
- [5] 沈静德 1983 寄生虫低温保存 国外医学·寄生虫分册 (6): 251—254。
- [6] 沈静德等 1985 液氮冻存丝虫微丝蚴中三种保护剂的比较研究 第一军医大学学报 5(4): 288—290。
- [7] ———— 1986 液氮冻存微丝蚴成功初报 动物学报 33(3): 298。
- [8] ———— 1986 以 PVP 再次冻存犬恶丝虫微丝蚴成功 中华医学杂志 66(11): 647。
- [9] 沈丽英等 1987 马来丝虫微丝蚴和感染幼虫低温保存技术的研究 全国第二次寄生虫学学术讨论会(上册) 437。
- [10] 李德明等 1979 红内期诺氏疟原虫超低温保存及其体外培养 疟疾研究(疟疾免疫专集) 7—10。
- [11] 李哲等 1986 弓形虫普通冰箱保存方法试验 西安医科大学学报 7(3): 248—250。
- [12] 陈正仁等 1979 红内期诺氏疟原虫体外连续传代培养 疟疾研究(疟疾免疫专集) 1—2。
- [13] 陈秋佩等 1982 低温保存柏氏疟原虫的活力观察 研

- 究 中国原生动物学学会第一次学术讨论会论文摘要汇编 46—47。
- [14] 陈金富等 1985 约氏疟原虫超低温保存及其在小鼠体内自然消长的观察 福建医药杂志 7(3): 28—29。
- [15] —— 1987 人毛滴虫的保种与亚显微结构观察 中国人兽共患病杂志 3(6): 15—16。
- [16] —— 1987 人毛滴虫的保种—培养、超低温保存与动物保种的试验观察 福建医学院学报 21(1): 13。
- [17] 陈关君等 1984 介绍美国细胞库 中华流行病学杂志 5(1): 37。
- [18] 周元昌等 1981 低温技术在疟原虫红内期保存中的应用 国外医学《寄生虫分册》(4): 145—149。
- [19] 赵文远等 1980 猪弓形体不同温度保存试验 家畜传染病 (3): 9—10。
- [20] 郭盛祺等 1979 超低温保存的人恶性疟原虫的体外连续培养 疟疾研究(疟疾免疫专集) 18—20。
- [21] 高敏新等 1979 超低温保存的人恶性疟原虫体外培养 疟疾研究(疟疾免疫专集) 15—17。
- [22] 徐友祥等 1987 复苏约氏疟原虫在小鼠体内的自然消长 全国第二次寄生虫学学术讨论会上册 128。
- [23] 徐克继等 1983 寄生原虫超低温保存的研究(弓形虫速殖子) 中国原生动物学学会第二次学术讨论会论文摘要汇编 49。
- [24] —— 1984 寄生原虫超低温保存的研究——弓形虫速殖子的超低温保存 上海第二医学院建国35周年学术报告会 44。
- [25] 陶鸿章 1985 微丝蚴低温保存 遵义医学院学报 8(4): 44—47。
- [26] 陶鸿章等 1985 影响马来丝虫微丝蚴低温保存因素的初步探讨 遵义医学院学报 8(4): 24—26。
- [27] —— 1985 马来丝虫微丝蚴低温保存及其后在中华按蚊体内继续发育的观察 动物学报 32(4): 383—384。
- [28] —— 1986 964天冷冻保存的马来微丝蚴的生物学特性 遵义医学院学报 9(4): 4—5。
- [29] 张月清等 1984 贾第虫的培养及其分裂繁殖情况的观察 寄生虫学与寄生虫病杂志 2(3): 170—172。
- [30] 韩凤连 1977 疟原虫的低温保存 国外军事医学第五分册 (3): 30—33。
- [31] —— 1979 疟原虫的低温保存试验 疟疾研究(疟疾免疫专集) 132—134。
- [32] 薛燕萍等 1984 Eh滋养体的液氮冻存和复苏 观察 中华医学杂志 64(12): 765。