

应用脐带血清体外培养恶性疟原虫的研究*

李传明

苏天成

(武汉冶金高专寄生虫学教研室)

(湖北医学院寄生虫学教研室)

摘要 为寻找一种价廉、易得能代替正常成人血清体外培养疟原虫的代用品,本文参照 Trager—Jensen 蜡烛缸培养法,探讨了用新生儿脐带血清体外培养恶性疟原虫的效果,并与用正常成人血清培养进行了比较。实验结果表明脐带血清不仅能长期维持恶性疟原虫的体外生长,而且其培养效果优于成人血清 ($P < 0.01$),是体外培养疟原虫的良好血清来源。

恶性疟原虫红内期体外连续培养已获成功^[1]。其培养液中除含 RPMI-1640 粉、HEPES 缓冲剂,并用 NaHCO_3 调节外,还必须添加人血清。采用正常成人血清虽然可使疟原虫的生长达到良好状态,但长期使用正常成人血清有许多不足,如价格昂贵、来源困难、不易获得,且在疟疾流行区得到的血清往往含有某些免疫抑制因子,对疟原虫生长不利。因此,寻找一种价廉易得能代替正常成人血清体外培养疟原虫的代用品显得十分必要。本文在国内首次报告了用脐带血清代替成人血清培养恶性疟原虫的效果,并与用成人血清培养进行了比较。

材料和方法

虫种 恶性疟原虫 FCC-1/MN 株引自中国医学科学院基础医学研究所。

培养液的配制 将 10.40 克 RPMI-1640 粉溶于 900 毫升 (ml) 双蒸水中,加入 5.94 克 HEPES 缓冲剂,必要时加入 4 万单位庆大霉素预防污染,然后加双蒸水至 960 ml 后充分混匀。过滤除菌,每 96ml 分装于 100ml 瓶内,根据需要置 4°C 或 -20°C 冰箱内贮存备用。临用时每 96ml 培养液中加入新鲜配制的 5% NaHCO_3 4.2ml 及成人血清或脐带血清 10—15 ml,最终 pH 为 7.2—7.4。

培养方法 参照 Trager—Jensen 蜡烛缸培养法进行^[1]。培养器皿用 25ml 三角烧瓶,内

盛培养物 2.5—3ml,其中红细胞压积在进行长期培养时为 8%,进行比较实验时为 10% 或 20%。培养液的脐带血清浓度为 10% 或 15%,均设相同浓度的成人血清组作对照。培养温度为 $36.5—38^\circ\text{C}$ 。每天更换培养液一次,每 3—4 天加新鲜红细胞将红细胞感染率稀释一次。采样涂片后姬氏染色,每片计数 2000 个红细胞中的感染红细胞数,计算红细胞感染率。

结 果

(一) 用含脐带血清培养液进行恶性疟原虫体外连续培养的观察

本实验先后进行了三次,每次培养 30—60 天不等。培养液的脐带血清浓度为 10%,培养物红细胞压积为 8%,培养起始时红细胞感染率为 1%。每培养 3—4 天加新鲜红细胞将红细胞感染率作 5—6 倍稀释。结果(见表 1)疟原虫生长良好,表中数值为每次稀释前的红细胞感染率,红细胞感染率每 3—4 天增加 6—14 倍。在上述相同的实验条件下,有时红细胞感染率可高达 20% 以上。实验结果表明脐带血清可长期维持恶性疟原虫的体外生长。

(二) 不同浓度脐带血清与成人血清培养恶性疟原虫的比较

实验共进行四次,每次实验分两组(每组设

* 本文实验在湖北医学院完成。

表1 脐带血清体外连续培养恶性疟原虫结果

培养天数	红细胞感染率 (%) [*]	各期疟原虫构成百分比		
		环状体	大滋养体	裂殖体
0	1.00	34	48	18
1	3.81	54	40	6
4	12.48	23	68	9
8	13.94	33	60	7
12	9.70	18	71	11
15	11.27	37	57	6
19	14.05	25	68	7
23	12.15	16	75	9
27	10.17	17	72	11
31	10.54	32	53	15
35	13.26	17	72	11
39	15.21	18	72	10
43	10.49	28	59	13
47	9.39	26	58	16
51	14.02	13	70	17
55	11.38	14	72	14
59	12.52	20	72	8
60	2.83	39	50	11

* 每培养3—4天加新鲜红细胞作5—6倍稀释。

三瓶)。一组用10%脐带血清,另一组用15%脐带血清,两组分别设同浓度的成人血清组作对照。实验时,培养物红细胞压积为8%,分别将培养24小时(h)、48h、72h及96h时红细胞感染率进行比较并经统计学处理。结果培养24h时,各组之间均无显著性差异($P > 0.05$)。培养48h时,脐带血清组与成人血清组之间有显著性差异($P < 0.05$),前者红细胞感染率高于后者。培养72h及96h时,15%脐带血清组与15%成人血清组之间无显著性差异($P > 0.05$),而10%脐带血清组与10%成人血清组之间有高度显著性差异($P < 0.01$),10%脐带血清组红细胞感染率高于10%成人血清组(见表2)。从总体实验结果表明,脐带血清培养恶性疟原虫的效果较好,特别是10%脐带血清优于10%成人血清。

(三)脐带血清在不同的红细胞压积中培养恶性疟原虫的观察

实验分别进行了两次,每次实验分两组(每

表2 脐带血清和成人血清培养恶性疟原虫比较

培养时间 (小时)	红细胞感染率% ($P \pm 1.96Sp$) [*]			
	10% [△]		15% [△]	
	脐带血清	成人血清	脐带血清	成人血清
24	2.30±0.41 ($P > 0.05$)	2.25±0.45	2.81±0.46 ($P > 0.05$)	2.29±0.45
48	6.38±0.61 ($P < 0.05$)	5.54±0.57	7.45±0.65 ($P < 0.05$)	6.36±0.76
72	9.94±0.82 ($P < 0.01$)	7.64±0.65	10.41±0.74 ($P > 0.05$)	9.98±0.73
96	13.13±0.84 ($P < 0.01$)	11.58±0.78	13.54±0.94 ($P > 0.05$)	12.59±0.82

* 表中数值为6份样本平均红细胞感染率 $\pm 1.96 \times$ 率的标准误。 [△] 培养液的血清浓度。

表3 脐带血清和成人血清在不同红细胞压积中培养恶性疟原虫比较

培养时间 (小时)	红细胞感染率% ($P \pm 1.96Sp$) [*]			
	脐带血清		成人血清	
	10% [△]	20% [△]	20% [△]	10% [△]
48	5.23±0.78 ($P > 0.05$)	5.24±0.48 ($P < 0.01$)	2.90±0.59 ($P < 0.01$)	5.15±0.78 ($P < 0.01$)
96	9.70±1.01 ($P > 0.05$)	8.49±0.98 ($P < 0.01$)	6.20±0.82 ($P < 0.01$)	9.61±1.04 ($P < 0.01$)

* 表中数值为6份样本平均红细胞感染率 $\pm 1.96 \times$ 率的标准误。 [△] 培养物红细胞压积。

组设三瓶), 培养物红细胞压积分别为 10% 及 20%, 两组均设相同红细胞压积的正常成人血清组作对照。培养液血清浓度均为 15%, 分别将培养 48h 及 96h 时的红细胞感染率进行比较并经统计学处理。结果(见表 3) 红细胞压积为 20% 时, 脐带血清组与成人血清组之间有高度显著性差异 ($P < 0.01$), 脐带血清组红细胞感染率高于成人血清组。红细胞压积为 10% 及 20% 的两个脐带血清组之间无显著性差异 ($P > 0.05$); 而在两个成人血清组之间有高度显著性差异 ($P < 0.01$), 10% 红细胞压积组感染率高于 20% 组。

讨 论

血清是体外培养疟原虫必不可少的营养成分, 如前言所述, 长期使用正常成人血清有许多不足。最初人们试图用现有的商品动物血清代替人血清, 但没有成功。Jensen (1979 年) 用加小羊和猪血清的培养液培养疟原虫, 只能观察到少数几代增殖^[7]。Hediba 等 (1980 年) 报告用小牛血清加蛋白胨可代替人血清, 但疟原虫对这一环境需要长达 9 个月的适应过程^[8]。Divo 等 (1982 年) 用新鲜收集的混合牛血清、猪血清、马血清、绵羊血清和商品胎牛血清、小牛血清, 并将各种动物血清相混合, 加或不加蛋白胨, 与用人血清培养相比较。结果除牛血清加蛋白胨可支持疟原虫生长, 而红细胞感染率出现较低外, 其它动物血清均不能代替人血清^[4]。Sax 等 (1980 年) 和管惟滨等 (1987 年) 报告兔血清可代替人血清体外培养恶性疟原虫, 但也需要一定的适应过程, 并且有的原虫株不适于兔血清内生长^[9,10]。

本实验选用了新生儿脐带血清代替正常成人血清进行恶性疟原虫的体外培养。脐带血来源方便、价廉易得, 只要与妇产科医生友好合作, 我们可以从每个新生儿脐带收集到 50—100ml 全血, 从中分离出 30—50ml 血清供培养之用。实验结果表明脐带血清可长期维持恶性疟原虫的体外生长, 与 Druilhe (1980 年) 报道一致^[11]。并且, 从本实验总体结果表明脐带血

清培养恶性疟原虫的效果较好, 尤其以 10% 脐带血清优于成人血清。Divo 等认为不同个体的成人血清维持疟原虫生长的能力不一, 如果将多份血清收集在一起, 则其培养效果优于单份血清^[4]。我们的实验证明脐带血清, 不论是单份或多份混合血清均能维持恶性疟原虫的最佳生长状态。

从我们试验结果来看, 在培养基内添加脐带血清促进恶性疟原虫生长的能力比成人血清强, 分析可能是脐带血清提供了更丰富的营养成分所致。根据报道脐带血清和成人血清在营养成分上有很大的不同, 一些物质在母体血浆中尽管比胎儿血中浓度低, 但为了适应胎儿迅速生长的需要, 也能从母体转运给胎儿。矿物质如铁、钙、碘等, 水溶性的维生素如维生素 B₁、B₂、B₁₂、C、叶酸等^[12]。其中很多物质是疟原虫生长所必需的, 如叶酸对嘌呤和嘧啶的合成起着辅助作用; 维生素 C 有增强叶酸转变为较活泼的亚叶酸的作用; 维生素 B₁、B₂ 有促进细胞氧化的作用, 有助于糖代谢。但脐带血清中对疟原虫生长起主要作用的营养成分有待更进一步的研究和阐明。

另外, 新生儿血清中的各种补体成分仅为母体的 50—60%。母体在妊娠期间由于免疫抑制、血清稀释及免疫抑制因子的存在, Ig G、Ig A 和 Ig M 在整个孕期均有特征性意义的下降^[13]。并且, 免疫球蛋白只有 Ig G 可以通过胎盘。因此, 处于相对免疫低下状态的新生儿脐带血清, 也可能是有利于疟原虫生长繁殖的因素之一。

本实验结果表明, 来源方便、易得的脐带血清, 不仅能长期维持恶性疟原虫的体外生长, 而且其培养效果优于成人血清, 是体外培养疟原虫的良好血清来源。应用脐带血清代替成人血清培养疟原虫, 可获得一定的经济效益和社会效益, 为进一步研究疟原虫的生理生化、免疫、疟疾疫苗和筛选抗疟药物等提供了更为有利的条件。脐带血清中对疟原虫生长起主要作用的营养成分还有待更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 上海第一医学院主编 1980 妇产科学 57 人民卫生出版社。
- [2] 管惟滨等 1987 恶性疟原虫 FCC₁₁₁/JS 株的建立 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 5(2): 101—103。
- [3] Amino, N. et al. 1978 Changes of serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM, and IgE during pregnancy. *Obstetric Gynecol* 52: 415—419.
- [4] Divo, A. A., Jensen, J. B. 1982 Studies on serum requirements for the cultivation of *Plasmodium falciparum*. I. Animal sera. *Bull WHO* 60(4): 565—569.
- [5] Druilhe, P. 1980 *Plasmodium falciparum* in culture: improvements using umbilical cord serum and medium modifications. *Tropenmed Parasit* 31: 409—413.
- [6] Frediba, T., et al. 1980 Peptones and calf serum as a replacement for human serum in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol* 66(2): 236—239.
- [7] Jensen, J. B. 1979 Some aspects of serum requirements for continuous cultivation of *Plasmodium falciparum*. *Bull WHO* 57(suppl. 1): 27—31.
- [8] Jensen, J. B., Trager, W. 1977 *Plasmodium falciparum* in culture: use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. Parasitol* 63(5): 883—886.
- [9] Sax, L. J., Releckmann, K. H. 1980 Use of rabbit serum in the cultivation of *Plasmodium falciparum*. *J Parasitol* 66(4): 621—624.
- [10] Trager, W., Jensen, J. B. 1976 Human malaria parasites in Continuous culture. *Science* 193: 673—675.