

· 研究简报 ·

食蟹猴疟原虫和猪尾猴疟原虫红外期的比较研究*

江 静 波**

(生物学系)

摘 要

用大量食蟹猴疟原虫子孢子(2.1×10^6)和猪尾猴疟原虫子孢子(9.53×10^6)各经股静脉接种一猕猴。前者在接种孢子后第7天,后者在第8天分别出现首次原虫血症。两猴皆用氯喹(10mg/kg)连续5天作胃管灌服,以清除血中原虫。食蟹猴疟原虫经氯喹治疗后出现3次复发,时间分别为孢子接种后30,56和155天。每次复发均用上述剂量的氯喹作同样的治疗。在猪尾猴疟原虫则在第1次氯喹治疗后一直无复发出现。用间接荧光抗体染色(IFAT)和吉氏染色法在食蟹猴疟原虫子孢子感染后第7天和62天的猴肝切片中均找到典型的休眠体,而在感染猪尾猴疟原虫第8天的肝切片中,只查到发育成熟的裂殖体而无休眠体。实验结果进一步证实,疟疾“复发”是“休眠体”经过一段时间蛰伏后发育成裂殖子所引起的。

关键词 食蟹猴疟原虫巴氏亚种,猪尾猴疟原虫,休眠体,猕猴,氯喹

疟原虫的研究已有100多年的历史,但有些重要环节,如“复发”现象至今仍未得到彻底的揭示^[1]。虽然有学者^[2,3]曾提出具“复发”特性的疟原虫存在速发型和迟发型两类孢子,但至今仍未从孢子群体中分离出两类不同的孢子。最近, Krotoski等^[4]用间接荧光抗体染色法在接种具“复发”特性的食蟹猴疟原虫子孢子后7天的猴肝切片中除发现正常的裂殖体外,还找到了一种呈单核状态的蛰伏小体,后称“休眠体”,他们用以解释疟疾的“复发”。以后,经过一系列深入的研究^[5-10],休眠体学说已得到普遍的承认。本文用已被证实具休眠体和“复发”的食蟹猴疟原虫与国产的三日型疟疾——猪尾猴疟原虫作对比研究,进一步验证休眠体与“复发”的关系。

1 材料和方法

1.1 疟原虫虫株的来源 食蟹猴疟原虫巴氏亚种(*Plasmodium cynomolgi bastianellii*) 1982年由美国引进,液氮保存。实验前1个月经复苏处理后接种健康猕猴。猪尾猴疟原虫(*P. inui*)为江静波等于1978年在广西产的熊猴(*Macaca assamensis*)中分离到^[11],液氮保存。实验前10天经复苏处理后接种猕猴。

1.2 实验用猴 均为猕猴(*Macaca mulatta*),体重1.5~2.0kg,健康无病,实验前血检1个月,确诊无任何疟原虫感染才用于实验。

本文1988年10月21日收到

* 国家自然科学基金、国家教委科研基金、中山大学科研基金资助

** 参加本集体研究项目者尚有梁东升、黄建成、廖家遗、李道生、伦照荣、李逸明

1.3 按蚊 本实验所用的均为大劣按蚊(*Anopheles dirus*)。感染方法主要参照我们以往的工作^[12,13]。

1.4 孢子子的分离和接种 按蚊血餐后12~14天,当大量孢子子已进入唾液腺后,在解剖镜中分离出唾液腺并吸置于含10%正常猴血清的MEM培养液中(4℃),研磨释出孢子子,收集计数后经股静脉接种。猴1接种食蟹猴疟原虫孢子子 2.1×10^6 ;猴2接种猪尾猴疟原虫孢子子 5.93×10^6 。

1.5 药物治疗 猴1和猴2药物治疗的时间及次数详见表1。氯喹用量均为10mg/kg,用胃管灌服,连续5天。

1.6 肝活检和肝组织的处理 猴1分别在感染食蟹猴疟原虫孢子子后的第7.5天和第62天进行肝活检;猴2则在感染猪尾猴疟原虫孢子子后的7.5天进行肝活检。所有肝组织块均用卡诺氏(Carnoy's)液固定,石蜡包埋。切片厚度为5μm。间接荧光抗体染色法主要参照Krotoski等的方法^[5]。

1.7 血液检查 所有实验猴均在接种孢子子后的第5天开始每天用厚、薄血片检查至首次虫血症出现。氯喹治疗后,隔天进行血检。猴1隔离观察6个月以上,猴2则隔离观察4个月。

2 结果

猴1(M1)在接种食蟹疟原虫孢子子后第7天出现首次虫血症。首次虫血症经氯喹连续治疗后第17天出现第一次“复发”。首次“复发”后3天用氯喹如上法治疗,停药后第19天再次出现“复发”。第二次虫血症出现后的第23天用氯喹作上述同样的治疗,停药后第73天出现第三次“复发”。此外,在孢子子感染后第7.5天的肝切片中,既发现发育正常的裂殖体(平均每平方厘米肝切片有7个),亦找到呈单核状态的休眠体(平均每平方厘米肝切片有2个)。然而,在孢子子感染后第62天的肝切片中则只见到休眠体(平均每平方厘米肝切片只有1个),未发现裂殖体,详见表1。

在猴2(M2),接种猪尾猴疟原虫孢子子后的第8天出现首次虫血症,2天后用氯喹治疗,4个月未见虫血症再度出现。第8天的肝切片中只发现发育成熟的裂殖体。未发现任何蛰伏的所谓休眠体(表1)。

表1 食蟹猴疟原虫和猪尾猴疟原虫孢子子感染猕猴的比较

Tab.1 Comparison of sporozoites infections of *Plasmodium cynomolgi* and *P. inui*

猴号	M1(841)	M2(873)	C*	K*
疟原虫种	<i>P. cynomolgi</i>	<i>P. inui</i>	<i>P. cynomolgi</i>	<i>P. knowlesi</i>
感染日期	1984. 5. 13	1987. 5. 29		
感染孢子子数	2.1×10^6	5.93×10^6	1.2×10^7	1.2×10^7
初发虫血症日期	1984. 5. 20	1987. 6. 6		
感染孢子子后 肝检日期	{ 1984. 5. 20 1984. 7. 15	1987. 6. 6	{ 13 days 84 days 168 days 229 days	{ 5 days 42 days

(续表1)

正常裂殖体数 (每平方厘米肝切片)	7	5	}	23	157
	0			2	0
				0	
				0	
休眠体数 (每平方厘米肝切片)	2	no	}	52 11	0
	1			25 7	0
氯喹治疗日期	1984. 5. 23~27	1987. 6. 8~12			
	1984. 6. 16~20				
	1984. 8. 1~5				
氯喹治疗后复发期	1984. 6. 13	no			
	1984. 7. 9				
	1984. 10. 18				

*引自 Bray, et al., 1985

3 讨论

疟疾“复发”现象几十年来一直是各国科学工作者寻求解决的一个重要课题。灵长类疟原虫红外期的发现^[14,15],曾被学者们用来解释疟疾的“复发”并广为人们支持和接受。然而,一系列的研究工作并未能证实 Shortt和Garnham认为疟疾“复发”是因红外期原虫在宿主肝细胞内不断繁殖、重新侵入红细胞所致之假说,以致 Garnham本人亦认为自己的意见不完善,须重新寻找“复发”的原因。

到70年代中,Shute等^[2],Lysenko等^[3]从研究间日疟原虫所得的结果认为,疟疾之“复发”是由于疟原虫本身的遗传特性所决定的。他们提出,具“复发”特性的疟原虫,其子孢子可能有两种类型:一类为速发型子孢子,另一类则为迟发型子孢子,前者占绝大多数,两类的比例约为1:1000。速发型子孢子在肝细胞内约8~12天发育成熟,迟发型子孢子则需几十天甚至一年以上才发育成熟,导致所谓“复发”的出现。

自从Krotoski等在以食蟹猴疟原虫子孢子感染后7天的猕猴肝切片中,用间接荧光抗体染色法结合吉氏染色法发现休眠体以来,一系列研究表明,休眠体与疟疾的“复发”有直接的关系。理由是:①休眠体的数量随复发的次数增加而减少^[5,6,10];②在所研究过的具“复发”特性的疟原虫,如食蟹猴疟原虫、间日疟原虫等都找到了休眠体^[5,9,16],无“复发”特性的疟原虫如诺氏疟原虫(*P.knowlesi*)则否^[10]。

我们以食蟹猴疟原虫和猪尾猴疟原虫作比较研究,再一次表明,休眠体的存在确实与“复发”有直接的关系。当首次虫血症在感染食蟹猴疟原虫子孢子的猕猴中出现后,曾用足以杀灭所有外周血液原虫剂量的氯喹治疗,结果虫血症还继续出现,并且反复多次(见表1)。与此同时,在第7.5天的肝切片中既找到成熟的裂殖体也找到蛰伏的休眠体,第62天的肝切片中则只找到蛰伏的休眠体,而且平均每平方厘米肝切片的数量比在7.5天找到的要少,与Krotoski等^[9],Bray等^[10]所得的结果相似。然而,在用无“复发”特性的猪尾猴疟原虫子孢子感染的猕猴中,当首次虫血症出现后,经氯喹治疗,4个月内未再出现“复发”。7.5天的肝切片中只找到成熟的裂殖体,没有发现任

何休眠体, 与 Bray 等用无“复发”特性的诺氏疟原虫 (*P. knowlesi*) 研究的结果相一致^[10]。结果进一步支持 Krotoski 等 (1985) 提出的休眠体假说。

从目前所得到的资料来看, 我们认为, 用休眠体理论解释疟疾的“复发”, 即使有学者呈谨慎的反对意见^[17], 但该假说无疑更能反映出间日型疟原虫生活史的全过程。因此由江静波, Bray 和 Krotoski 绘制的间日疟原虫最新生活史图解 (1988年版) 已为世界卫生组织 (WHO) 所接受。至于休眠体的形成和何种因素激发蛰伏的休眠体复苏并发育成裂殖子, 至今仍未解决。

参 考 文 献

- [1] Coatney G R, *J. Parasitol.*, 62 (1976), 3~9
- [2] Shute P G et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70 (1976), 474~481
- [3] Lysenko A J et al., *Bull. WHO*, 55 (1977), 541~549
- [4] Krotoski W A et al., *Br. Med. J.*, 1 (1980) 153~154
- [5] Krotoski W A et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 (1982), 24~35
- [6] Krotoski W A et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 (1982), 211~225
- [7] Krotoski W A et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 (1982), 1291~1293
- [8] Krotoski W A, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79 (1985), 1~11
- [9] Krotoski W A, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35 (1986), 263~274
- [10] Bray R S et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79 (1985), 269~273
- [11] 江静波等, 中山大学学报 (自然科学版), 1978, 1, 116~118
- [12] 江静波等, 疟疾研究 (疟疾免疫专集), 1979, 136~140
- [13] Jiang J B et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82 (1988), 56~58
- [14] Shortt H E et al., *Br. Med. J.*, 1 (1948), 1225~1232
- [15] Shortt H G et al., *Br. Med. J.*, 1 (1918), 517
- [16] Cogswell F et al., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32 (1983), 1454~1455
- [17] Shortt H E, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77 (1983), 734~746

A Comparative Study of the Exoerythrocytic Stages of *Plasmodium cynomolgi bastianellii* and *P. inui*

Jiang Jingbo*

Abstract

An inoculation of 2.1×10^6 sporozoites of *Plasmodium cynomolgi bastianellii* to a Rhesus monkey and 5.93×10^6 sporozoites of *p. inui* to another revealed that, after first parasitaemia which appeared 7 and 8 days after inoculations respectively and were cleared by chloroquine, the former gave rise 3 relapses on 30, 56 and 155 days while no relapse occurred in the latter. Hypnozoites were found on 7 and 62 days by IFAT and Giemsa's technic in case of *P. c. bastianellii* while no hypnozoite was seen in case of *P. inui*. Since the former is vivax malaria with relapse while the latter, being a quartan malaria, is known to be without, the relation between hypnozoite and relapses is evident. Therefore, our experiment supports the hypnozoite Theory for relapse as Bray (1985) who worked on *P. cynomolgi* and *P. knowlesi* does.

Keywords *Plasmodium cynomolgi bastianellii*, *P. inui*, hypnozoite, Rhesus monkey, chloroquine

* Department of Biology