

# 疟原虫研究的新进展——特拉格(Trager) 恶性疟原虫体外连续培养法的介绍

江静波 陈俊民 梁东昇  
(生物学系寄生虫学研究室)

威廉·特拉格(William Trager)是国际著名的寄生虫学家和原虫学家。他在1941年发表的“特拉格疟原虫培养技术”(Trager's Technic for *P. lophurae*)被认为是现代疟原虫培养法的开端<sup>[4]</sup>。

1976年特拉格与詹森(J. B. Jensen)合作研究恶性疟原虫(*P. falciparum*)体外连续培养成功<sup>[12]</sup>。这一成就很快就被西方学者认为是疟原虫研究史上的一个里程碑<sup>[10]</sup>。正如作者本人所说的：“它第一次使我们从事对人疟原虫的许多方面的研究摆脱了对人体的感染或夜猴的依赖”<sup>[7]</sup>。联合国卫生组织为此于1977年在特拉格教授所在的洛克菲勒大学(Rockefeller University)召开现场会议,推广他的先进经验。

这个成果公布迄今还不到两年,但它在疟原虫研究方面的促进作用已很明显;用此法培养获得的受染红细胞已提供作为生化研究<sup>[6]</sup>、细微结构的研究、化学治疗的研究和镰刀型红细胞遗传的人对恶性疟原虫抵抗力的细胞学基础的研究和用来制备虫苗接种夜猴的研究等<sup>[11,14]</sup>。

特拉格教授于1977年五月参加洛克菲勒大学教授访华团来到中国。他曾访问中山大学并且向我们详细地介绍了他培养恶性疟原虫成功的经验。回国之后,他又不断地把他和他的同事们的近著寄给我们。我们认为对特拉格教授及其协作者詹森博士的恶性疟原虫的培养法作一综合介绍,供我国有关方面参考,是很有意义的。

为了使读者容易了解,我们的介绍依次分为五个部分:(1)改良方法提出的理论依据及其成果;(2)培养基制备;(3)流动瓶培养法;(4)蜡烛瓶培养法;(5)结语。

## (1) 改良方法提出的理论依据及其成果

特拉格曾采用过传统的不断使红细胞在培养液中悬浮的方法,结果和他人一样,原虫无法维持到第五天<sup>[8]</sup>。这使他对传统的方法产生了怀疑,他认为,恶性疟原虫在人体红细胞中,其大部分的时间是贴附在微血管壁上,血液从其上流过,

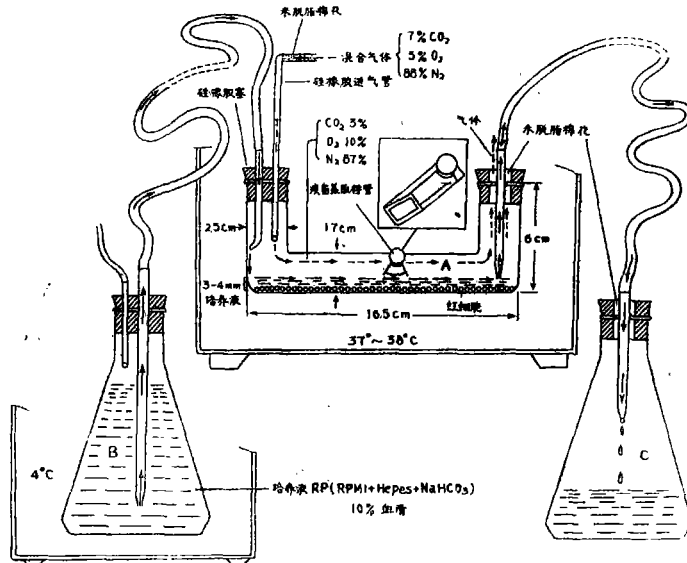
因此很可能不断的震荡而使之悬浮的方法对原虫是不利的。基此，他采取完全相反的设计，使一层红细胞附贴于瓶底，让培养液在其上流过（或使一层培养液覆盖在红细胞层之上，定期换新鲜的）。这就是流动瓶培养法，蜡瓶培养法和传统的疟原虫培养法最大不同的地方。使用这两种改良的方法，他们已能使恶性疟原虫在实验室中连续不断地培养下去。在开始时，所维持的原虫密度很低，最高不超过3%<sup>(8,12)</sup>。新近的报告：在流动瓶中培养的其密度通常达10%左右，有时也达到15~20%，在蜡瓶中通常为5~10%，有时也可达到20%或30%<sup>(11,14)</sup>。

## (2) 培养基配制

培养液的配制是采用 Moore 等用来培养人的白细胞的 RPMI 1640 培养液，加上 HEPES 缓冲液(25mM)和0.2%的  $\text{NaHCO}_3$  (以上称 RP)，用时再加上10%的人血清 (AB型、A型)，这就是完全的培养液；完全培养液和红细胞 (10% 或 8%) 混合便成培养基了。红细胞的制备方法是：将 AB型或 A型的人血 (在血库中存放2—3星期者效果更佳<sup>(5)</sup>)，放在每分钟2000转的离心机中10分钟，将上清和黄色层吸去后，加“RP”液，混匀后再离心，似此反复洗涤，最后得到的红细胞仍与上述方法制备的完全培养液以1:10的比例稀释，乃成培养基。(感染血源也用这种方法制备)。再次换新鲜培养基时，感染的红细胞与正常红细胞的比为1:100为宜。

## (3) 流动瓶培养法 (Flow-vial method)

流动瓶培养法的整个装置参看图一，由三个部分组成：流动瓶A是主要的原虫培养的地方，贮液瓶B是存放和供应新鲜的完全培养液 (即 RPMI 1640 + HEPES +  $\text{NaHCO}_3$  + 10~15%人血清) 的地方，收液瓶C是收集废弃的培养液的地方。流动瓶A放在37~38°C的温箱中，以利原虫的发育和繁殖；贮液瓶B则放在4°C的冰箱中，使培养液不易变质，收液瓶C则可放在外面。



图一

温箱和冰箱上面开小孔供管道通过。

流动瓶(或称流动管)是平底的,两端翘起,形成左右两个瓶口。由左边的瓶口的硅橡胶塞上插进两条玻璃管,一条是完全的培养液流进的地方,其下端开口处贴在瓶壁上,使完全培养液可以沿瓶壁向下流,其上方由硅橡胶管与贮液瓶相连[其通过温箱和冰箱上面的小孔处那一段用聚四氟乙烯涂漆的管(teflon lined tubing)]。硅橡胶管接连在一个Harvard蠕动泵上,这个蠕动泵可以根据需要调节流速把贮液瓶B中的培养液送到培养瓶A中。由左边硅橡胶塞上插进的另一条玻璃管与一条硅橡胶管相连,是混合气体( $\text{CO}_2 = 7\%$ ,  $\text{O}_2 = 5\%$ ,  $\text{N}_2 = 88\%$ )通进的管。流动瓶右边硅橡胶瓶塞孔中插进一玻璃管,其下端开口在距离瓶底3~4毫米处(这一点很重要),其上方由一硅橡胶管连接到收液瓶上通过硅橡胶瓶塞的玻璃管。这硅橡胶管也是安在一个Harvard蠕动泵上,蠕动泵的作用是把流动瓶中的培养液不断抽出送入收液瓶,这样就使流动瓶A中的培养液的深度永远保持在3~4毫米之间。右边硅橡胶塞上开孔的直径比插进玻璃管的直径大,玻璃管通过瓶塞时用未脱脂的棉花在周围裹紧,这样从左边气管输入的混合气体就可以由右边玻璃管周围的棉花逸出。

在贮液瓶B(500毫升)中贮完全培养液400毫升左右,其流入流动瓶A的速度是每天55毫升,因此每换一次贮液瓶,可供应一星期左右。

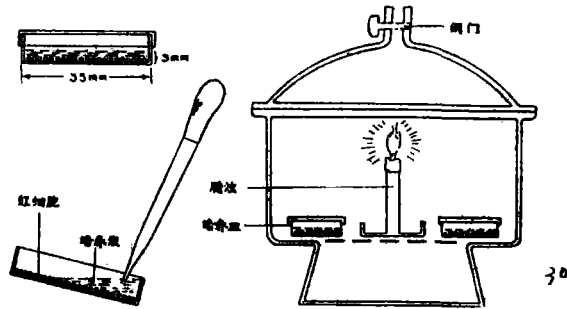
混合气体的输入速度控制在每秒钟一个气泡左右。由于硅橡胶管是可透气的,在流动瓶中的气体实际分析的结果是 $\text{CO}_2 = 3\%$ ,  $\text{O}_2 = 10\%$  和  $\text{N}_2 = 87\%$ 。

流动瓶中央的侧旁有一管口作取样和换入新鲜的红细胞之用。其孔口由疫苗瓶盖紧罩,取样和换入新鲜的红细胞都用注射器的针头通过瓶盖插入瓶内以便吸出或注入培养基。一般是每星期换新鲜的红细胞三次,每次取出流动瓶中的培养基(培养液+红细胞)约10毫升,留下培养基(其中一部分红细胞有疟原虫)约1毫升,然后注入新的培养基约10毫升。取出的培养基中的疟原虫可作虫苗的制备和其他的试验。

#### (4) 蜡烛瓶培养法(Candle-jar method)

这是一个古老的培养微生物的方法,而今被用来培养恶性疟原虫也取得良好的效果。如图二所示:在盖的顶端配备开关阀门的干燥瓶内直立一支白蜡烛,将蜡烛点燃之后,盖上瓶盖,使其上的阀门开着,待蜡烛熄灭之后将阀门关紧,这样就可以使瓶中的 $\text{CO}_2$ 含量增高, $\text{O}_2$ 的含量降低,有利于原虫的生长。

将原虫感染率约1%的培养基约1.5毫升放在35毫米直径的培养皿内,将培养皿放在蜡烛瓶中,蜡烛熄灭和瓶塞闭紧之后,将整个干燥瓶放在38℃的温箱中,每天换完全培养液一次,换培养液时将培养皿取出,使其略为倾斜(见图二),用滴管将培养液吸去,再换上新鲜的培养液。每隔3—4天将大部分培养基换上包含新鲜红细胞的培养基,换后的培养基的原虫密度约在1%左右,然后放在蜡烛瓶中再让原虫繁殖。



图二

将蜡烛瓶培养法与流动瓶培养法作比较时，可见前者适于用作小样品的多种试验的研究，而后者可作较大规模地繁殖原虫供试验之用。

### (5) 结 语

恶性疟原虫体外连续培养的成功，对人疟原虫的无性周期及其生化、药物的筛选、虫株的保存以及裂殖子虫苗的制备等研究都有其重大的意义。特别是恶性疟原虫裂殖子虫苗已被证实可使夜猴产生保护作用<sup>(15)</sup>，恶性疟原虫的体外培养的实用意义更大了，因为在目前的情况之下，裂殖子的来源看来还必须依赖恶性疟原虫在体外培养来供应。

提高红细胞的感染率看来仍是值得继续研究的课题。我们以补血或换血的方法使恶性疟原虫在被认为有完全免疫力的两种猕猴体内大量繁殖（目前我们仍认为原虫主要仍在人的红细胞间繁殖，因此和在培养基中的繁殖有某些相似之处），最高原虫密度可达46%<sup>(2,8)</sup>，因此在培养基中继续提高红细胞感染率仍是有可能的。

特拉格氏的改良恶性疟原虫体外培养法，无论是流动瓶或蜡烛瓶培养法，都是使红细胞附贴于瓶底并长期静止。这一改进是培养取得成功的关键。但是我们认为，长期绝对静止可能也有不利的地方。最近北京生物制品研究所仿效特拉格和詹森的蜡烛瓶培养法也可使恶性疟原虫在培养基中长期繁殖，但原虫率总是在1%以下。我们观看了样品制成的玻片标本，证明受染的红细胞中不少是有很多（5—6个）环状体者。这种数目众多的重复感染不但不会使产生的裂殖子数目增加，而且可使环状体发育不良。大量环状体的重复感染可能是由于培养基中的红细胞静止不动而裂殖子又未能远游之故。因此，我们认为，使整个培养基间歇地作短期的缓慢的摇荡（特别是在裂殖体破裂到侵入新的红细胞和形成环状体的阶段）可能对于增加原虫的感染率会有一些的作用。

我们还认为，今后继续探索在培养基中使用其他动物的红细胞代替人的红细胞的可能性，对于制造有实用价值的廉价虫苗将是很重要的。因为目前虽然可以用过期的人的红细胞来培养<sup>(6)</sup>，其来源毕竟太有限，虫苗的成本也必将是非常昂贵的。

我们从事人疟猴模研究的结果,用患者的血大量接种熊猴,间日疟原虫也可以在熊猴体内短期繁殖<sup>(2)</sup>。间日疟原虫红内期各期皆可出现在外周血液中,因此我们认为,使培养基缓慢摇动(避免剧烈震荡)的方法来从事对间日疟原虫培养的探索,也是很有意义的。

### 参 考 文 献

- [1] 两广疟疾猴模研究协作组: 间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*) 在熊猴 (*Macaca assamensis*) 体内的繁殖。中山大学学报 (自然科学版), 1977, (4): 5—19。
- [2] 两广疟疾猴模研究协作组: 恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 在国产三种猴体内的繁殖。中山大学学报 (自然科学版), 1978, (1): 5—19。
- [3] 疟疾猴模研究协作组: 恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 在猕猴和熊猴转种传代。中山大学学报 (自然科学版), 1978, (4): 5—15。
- [4] Geiman, Q. M., 1949, *In vitro* methods for study and cultivation of *Plasmodium*. In "Malariaology" edited by M. F. Boyd, Vol. I: 205—222.
- [5] Jensen, J. B., and Trager, W., 1977. *Plasmodium falciparum* in culture: Use of outdated erythrocytes and description of the candle—jar method. *J. Parasitol.*, 63: 883—886.
- [6] Kilejian A., and Jensen, J. B., 1977. A histidine—rich protein from *Plasmodium falciparum* and its reaction with membranes. *Bull. WHO*, 55: 191—198.
- [7] Trager, W., 1971. A new method for intraerythrocytic cultivation of malaria parasites (*Plasmodium coatneyi* and *P. falciparum*). *J. Protozool.*, 18: 239—242.
- [8] Trager, W., 1976. Prolonged cultivation of malaria parasites (*Parasites and coatneyi* and *P. falciparum*). In van den Bossche, H. Ed., "Biochemistry of ane Host-Parasite Relationships". North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 427—434.
- [9] Trager, W., 1977. Cultivation of *Plasmodium falciparum*. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 10: 277—278.
- [10] Trager, W., 1978. Cultivation of parasites *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27: 216—222.
- [11] Trager, W., 1978. *Plasmodium falciparum* in culture: An improved continuous flow method. *J. Protozool.* (in press)
- [12] Trager, W. and Jensen, J. B., 1976 Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 193: 673—675.
- [13] Trager, W. and Jensen, J. B., 1977. Cultivation of erythrocytic stages. *Bull. WHO*, 55: 363—365.
- [14] Trager, W. and Jensen, J. B., 1978. Cultivation malaria parasites. *Nature*,

Vol. 273 (Parasitology Supplement): 621-622.

- [15] Siddiqui, W. Z., 1977. An effective immunization of *Aotus trivirgatus* monkeys against *Plasmodium falciparum*. *Bull WHO.*, 55: 403.
- [16] Weinstein, P. P., 1977. Introduction of William Trager as the Charles Franklin Craig Lecturer for 1977. *Am. J. Trop. Med.*, 27: 215.

The recent important achievement in malaria  
research—Introducing Trager's methods  
for continuous culture of

*Plasmodium falciparum*

Prof. Trager's recent success in continuous culture of *Plasmodium falciparum* is regarded as a milestone of malaria research because, as stated by the investigator himself, "For the first time research on many aspects of human malaria is free from its former dependence on human infections or on the availability of *Aotus* monkeys."

A brief account of both the "flow-vial method" and the "candle-jar method" is here given and certain suggestions are made, basing on the experience of the writers in their research on the experimental hosts for human malaria in the last few years.

It is a pleasure to acknowledge the interesting talk of Prof. Trager to us on this subject during his visit to China in May last year, and also the reprints and unpublished manuscripts which he and Dr. Jensen have sent us thereafter.