

用换人血方法使恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*) 在猕猴和熊猴体内 转种传代的研究

疟疾猴模研究协作组*

近百年来西方科学工作者以间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)接种猕猴类(macaques)做了大量的试验,仅Cadigan等(1966)^[6]以恶性疟原虫接种三种猕猴使它们出现极轻度的虫血症^[1,12]。1974年两广疟疾猴模研究协作组,在广西百色地区以间日疟原虫接种经切脾的熊猴,发现原虫不但能在熊猴体内生存六天,而且繁殖良好。在接种后的第三天静注健康人的鲜血7毫升,次日(第四日),原虫密度突然升高,超过了接种后一小时内的原虫密度^[2]。这一实验结果,说明前人(Ganha 1966)^[6]等关于“间日疟原虫既不能在猕猴体内生存,也不能繁殖”的结论并非完全正确。该协作组还报告曾以恶性疟原虫接种猕猴、熊猴和黑叶猴,发现在外周血液中皆可以看到原虫发育的各个时期和配子母体的形成,原虫出现时间最长者在猕猴为16天,熊猴为10天,黑叶猴为25天^[3]。他们曾提出可以考虑通过换血的办法使恶性疟原虫在经过换了人血的猴体内大量繁殖、传代、使其最终在猴体内适应下来的设想。(因为实验证明换了人血的猴仍可以继续存活下去)^[3]。

1975年我们在广西百色地区,用一个恶性疟患者的鲜血接种一只体重0.8公斤的猕猴婴猴,接种的原虫总数是 2.4×10^8 个,一小时后血检原虫密度是0.7%,第36小时(补注5—6毫升健康人血之后)及84小时,原虫密度两次出现高峰,分别为1.42%和1.14%,超过接种后一小时的水平。在原虫密度达高峰时我们曾试图换血转种,因猴死而未能进行。

1976年我们又在广东海南岛,以一个恶性疟患者的鲜血接种一只猕猴的幼猴。接种后四天内连续补注健康人血3次,原虫在猴体内发育极佳,原虫密度最高时不

*协作单位:广西医学院、广西中医学院、中山大学、广东省卫生防疫站、上海寄生虫病防治研究所。

执笔人:江静波、龙祖培、周洁嫻。

但大大超过接种后1小时(2.44%)的水平,而且高达10%左右(9.98%)。抽取该猴体内的血分别转种到经换入血的1只猕猴和1只熊猴,效果更佳,最高原虫密度分别达到20.95%和26%。一般在6天之内原虫率急降,必须及时转种传代。我们用换血方法转种了11代猴,其中有2只猴原虫寄生率分别达46%和26%者,出现恶性症状,肠大量出血而死亡,与当地恶性肠型疟疾相似(Garnham曾称此为疟型痢)。由此可见,使用换血方法,可使恶性疟原虫在猕猴和熊猴中大量繁殖,严重者可以致死。至于原虫数在6天之内会急降的原因,尚有待今后进一步研究。

一、材料和方法

(一)实验用猴 全为猕猴和熊猴,除2公斤以上者购自贵州省之外,其余均购自广西。

(二)实验方法 实验猴于接种、转种前均切除脾脏。接、转种后用免疫抑制剂硫唑嘌呤,每天肌注1次,连续2—3日,每次用量按每公斤体重5毫克计。

感染血源取自海南乐东县一重症恶性疟患者,经离心去其血浆,加生理盐水至等量,于离体后2小时静注入一只猕猴。感染血源的恶性疟原虫为大环状体,密度12.88%,接种虫量 103.04×10^8 个。转种的血源均采自感染猴,转种虫量在 $9.5—368 \times 10^8$ 。

大多数实验猴于临转种前换入血25—100毫升,血型与病人血相同(B型),以后再适当补给同型的人血;8号猕猴,于接种前未换入血,但以后连续补入血3次。

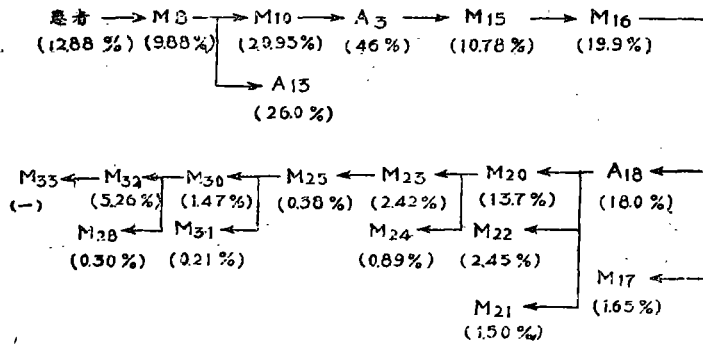
二、实验结果

用患者血(原虫密度12.88%)静注8号猕猴后,1小时内原虫密度为2.49%,但虫数很快下降,经静注健康人血30毫升后,第41小时回升到3.47%。当原虫发育到大环状体时,抽血40毫升转种到经换了人血的10号猕猴,同时补还人血40毫升。原虫数再次下降之后于第88小时第2次回升至9.98%。当其血中再次出现大环状体时,又抽血38毫升转种经换了人血的13号熊猴,同时又补还人血40毫升。该猴因呼吸窒息于第92小时死去。

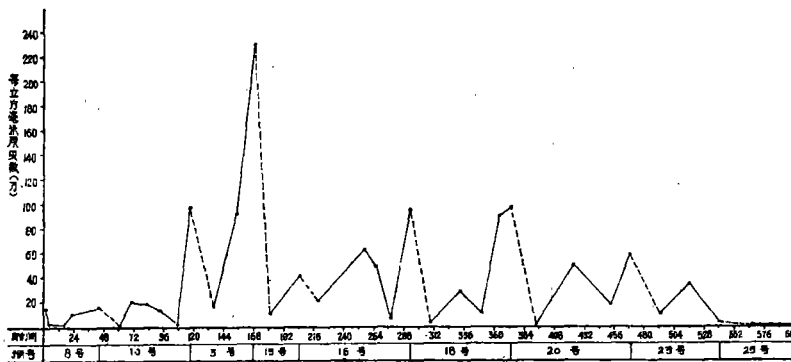
原虫自8号猴开始,在猕猴和熊猴中反复转种传代,前后转种了11代,共用猴19只,其转种传代过程见表一(M代表猕猴,A代表熊猴,括号内为最高原虫寄生率)。

从8号猴连续血传转种了18只猴。前10只猴中有7只猴(10、13、3、15、16、18、20号)原虫发育极好,原虫血症最高峰达10%以上,其中13号和3号熊猴原虫密度最高峰分别为26%和46%,因重度原虫血症于第3天死去。18号熊猴和10号、16号猕猴的原虫密度也达到20%上下;15号和20号猕猴原虫达10%以上,与原来病人血

表一 恶性疟原虫在猴与猴间转种传代过程：



中原虫密度相近。另外3只猴（17、21和22号猕猴）体内原虫则远比上述7只猴为少。20号以后的8只转种猴的原虫密度大幅度下降。在转种到23、24及25号猴时，所用人血为医院血库冷藏1周的备用血，原虫在这3只猴体内的发育呈停滞状态。25号猴经2次补给新鲜人血，并静注细胞营养液（即199液）20毫升，原虫稍有恢复活力的情形，但原虫密度仍较低。以后转种的虫量已降至 20×10^8 以下，其后二次转种的4只猴的原虫密度仅维持低度水平。32号猴因突然发生急性化脓性结肠炎而死亡。死后虽抽心血转种到33号猴，但原虫不继续发育，致使实验中断（见表二）。由于我们在猴与猴间的转种传代所使用的都是从猴体抽出来的肝素化的鲜血，一般在半小时之内转种，因此就原虫本身的发育而言是没有被中断的（见图一）。



图一：人恶性疟原虫在猴体内的连续发育

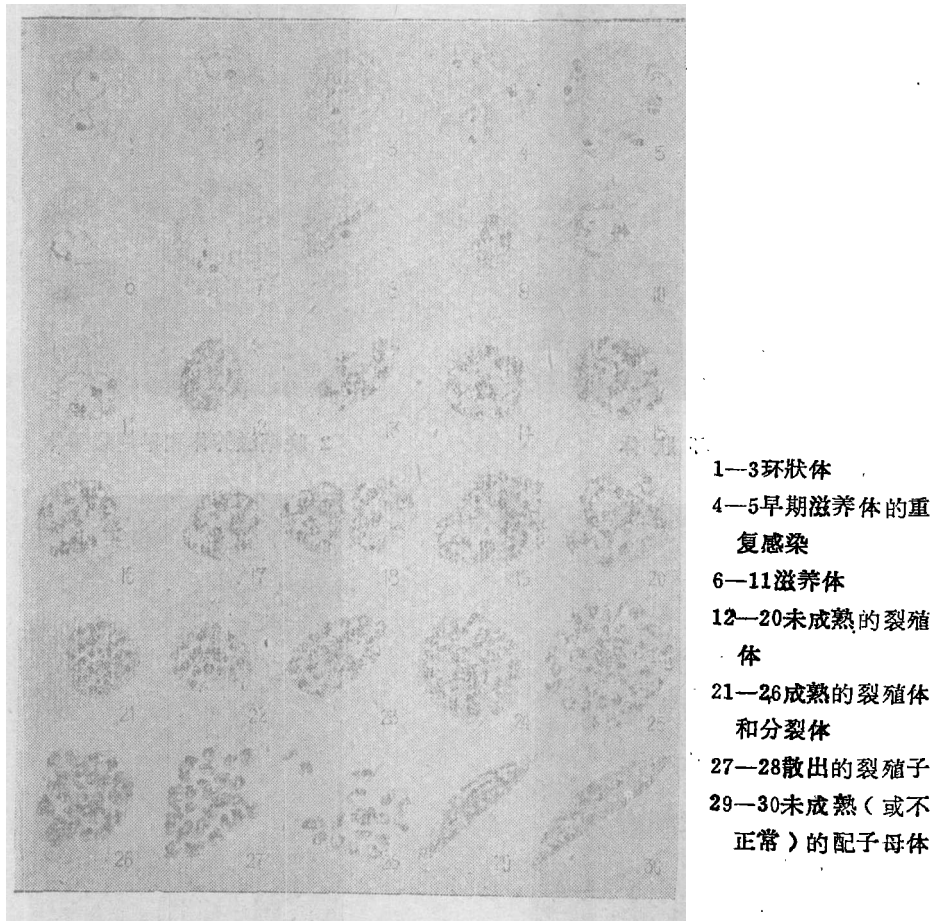
恶性疟原虫在经换入人血的猴体内发育情况是：(1)每36—48小时出现一个裂殖周期；(2)在同一猴体内，原虫最多只出现3个显著的裂殖周期，无论原虫密度多高，如猴不死亡，则一般在6天后原虫即基本上消失或不再繁殖；(3)虽然在猴与

表二 人恶性疟原虫血传和转种的结果

猴号	猴种	性别	体重 (公斤)	接种距切 脾天数	接种前换 入血量 (毫升)	静脉接种		5天内补入 血次数	持续时间(小时)	虫血		猴活与死
						血量	虫数 $\times 10^3$			最高红细胞 寄生率%	每立方毫米最高 原虫数(万)	
8	猕猴	雌	1.6	4	0	20	104	3	92	9.98	49.9	死
10	猕猴	雄	1.8	6	70	10	67	3	138	20.95	104.75	活
13	熊猴	雄	1.5	6	50	38	120	1	49	26.0	130.0	死
3	熊猴	雌	1.5	6	50	23	240	2	76	46.0	230	死
15	猕猴	雌	2.5	5	60	16	368	1	110	10.78	53.9	活
16	猕猴	雌	3.0	7	80	30	111	1	160	19.9	99.5	活
18	熊猴	雌	2.2	0	70	20	200	2	143	18.0	90.0	活
20	猕猴	雌	3.0	2	85	25	243.7	1	164	13.7	68.5	活
23	猕猴	雌	1.35	7	30	33	193.8	2	90	2.42	12.1	死
25	熊猴	雌	1.95	12	70	44	11.8	2	189	0.38	1.9	活
30	熊猴	雌	2.25	0	0	50	9.5	2	118	1.47	7.35	活
32	熊猴	雌	2.57	0	45	35	25.7	1	93	5.26	26.3	活
17	猕猴	雌	1.1	1	0	17	100	1	128	1.65	8.25	活
22	熊猴	雌	4.2	3年	100	30	234	1	111	2.45	12.25	活
24	猕猴	雌	1.3	8	×	30	141	2	110	0.89	4.45	活
31	熊猴	雄	1.45	1	35.0	45	×	1	45	0.21	1.05	死
28	猕猴	雌	1.15	8	25	32	×	1	45	0.30	1.5	活
21	猕猴	雌	2.4	1	70	24	87.36	1	158	1.56	7.8	活

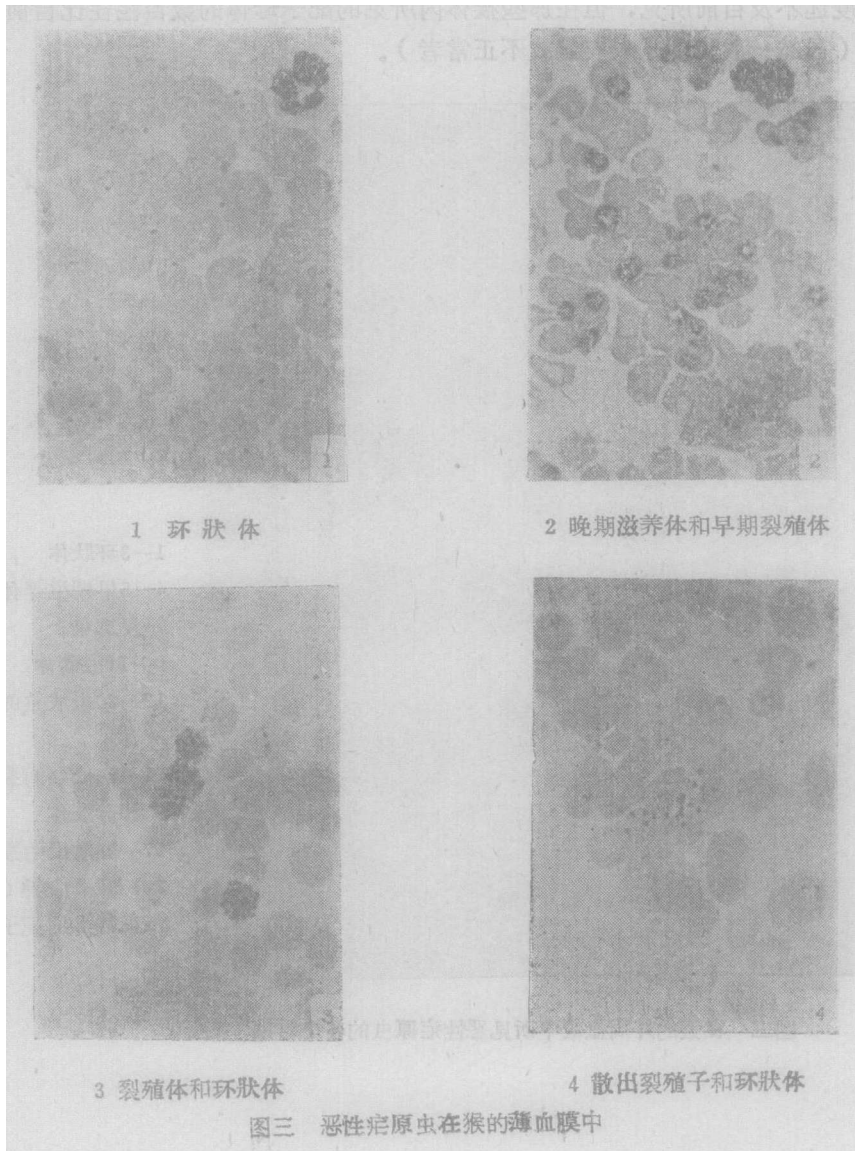
注：“△”=换健康人鲜血；“×”=血量或虫数不准确；●每次15—50毫升，一般为20—30毫升

猴之间反复转种了11代,各期原虫在外周血液中的都可以看到。原虫的发育十分齐整,在连续采血所制的大量血片标本中,在同一血片所见者一般都是同一发育阶段的原虫(裂殖体和早期环状体可同时存在),只间中查得少数不同期者。这现象说明原虫在猴体中反复传代,其发育的同步性是很稳定的;(4)从猴体内原虫数的消长情况看来,原虫数达到高峰时所见者则均为环状体,在出现晚期滋养体和裂殖体时则原虫密度大幅度减少;(5)配子母体仅在少数猴的血片中出现,数量甚少,往往只在厚血膜中才见到,而且都是发育未成熟或不正常者(图二29、30)。两广疟疾猴模研究协作组在广西百色地区用恶性疟原虫接种三种未换血的猴的结果,虽然其总的原虫密度远不及目前所见,但在那些猴体内所见的配子母体的数目往往比目前所见多得多(虽然一般也都是未成熟或不正常者)。



图二 在猴的外周血液中所见恶性疟原虫的各个时期

在实验猴,尤其是出现重疟原虫血症的猴,血内恶性疟原虫发育极佳。环状体期红细胞重复感染现象很普遍,以2—3个原虫同寄生于一个红细胞内为最多,有时多至4—5个原虫。在10号猴的血片中,曾查到在一个红细胞内有9个染色质粒,由于细胞质环不明显,普通光学显微镜无法判定原虫数。由大环状体发育过渡到滋养体过程中,其一侧的细胞质增厚突出,以后细胞质逐渐增多,呈深蓝色,有成带状者(图二8)。空胞则逐渐缩小到消失,细胞核也增大,位于中央或偏置中央,虫体变椭圆至圆形,黄褐色的疟色素分散于细胞质内(图二9、10)。滋养体或裂殖体寄生的红细胞有粘聚现象,少者2—5个在一起,多者10个以上粘聚成团(图三3)。



早期裂殖体呈类圆形,胞质深蓝色,核较大,为不规则形,疟色素黄褐色。成熟裂殖体几充满受染的红细胞,裂殖子数一般为8—26个,以20—22个为常见。个别猴的血片常见30个以上(如10号猕猴)(图二25),最多达46个;裂殖子为不规则排列,色素集中形成一深褐色团块,大多数位于偏中央或边缘。配子母体仅在少数猴血内查到,数量很少。配子母体呈纺锤形,两端较尖,疟色素亦为黄褐色颗粒,分散排列(图二29、30)。

恶性疟原虫在猕猴和熊猴体内的繁殖和引起的结果似有一定差异。在出现高密度原虫血症的8只猴中,3只熊猴原虫密度均在20%以上,其中2只熊猴(13号和3号)于转种后第3天因贫血、便血、衰竭而致死。5只猕猴中只有10号、16号猴原虫密度达到20%,而8号、15号和20号猴仅达10%上下。这几只猕猴也出现贫血、食欲不振、不爱动、低头驼背、坐势不正等情状,但未致死。

对致死的2只熊猴及时作了尸检。13号熊猴的空肠血管充血瘀血,密布出血点,回肠较空肠为轻,结肠血管充血和密布出血点,肠系膜充血和散布出血点,淋巴结大而充血,脑血管充血,脑沟变浅窄,脑质较实,呈水肿症。3号熊猴心脏较硬,心外膜紫红,表面不光滑,右心房室内有较多凝血块,肺有点状紫红色斑点,胃贲门粘膜散见紫红色点,幽门粘膜下及胃十二指肠球部、十二指肠近端粘膜皆有弥漫性大小不等的出血点,空肠上段粘膜有散在性郁血及出血,回肠以下肠段粘膜有散在出血点及斑,结肠段淋巴结肿大呈紫红色。

三、讨 论

(一)我们于1976年对实验猴采用换补健康人的鲜血这个前人未曾做过的方法,使恶性疟原虫在猕猴、熊猴转种传代取得了较好的结果,表现在:(1)原虫不但在这两种猴体内繁殖,而且其密度大多数可达10%以上的红细胞感染率,最高者还可以达到46%,这种密度在人体寄生中是少见和罕见者。它不但远超Cadigan等(1966)^[6]以恶性疟原虫接种三种猕猴中的最高密度,而且还比较前此两广疟疾猴模研究协作组在广西百色地区接种三种猕猴的最高密度还要高得多^[1,2],已达到国外夜猴体内所见的一般水平(Geiman和Meagher,1967)^[7],但还不及在夜猴中所见的最高水平—87%(Geiman等1969)^[8]。(2)在原虫密度特高的两只熊猴(分别为46%和26%)出现凶险型疟疾症状而死亡,主要表现为消化道和内脏器官大量出血。(3)原虫在每只猴内虽然只能繁殖三个周期,但在原虫密度达高峰时可以用它来转种传代(我们已连续传至11代猴)。若猴源充足而换人血又处理得当的话,也许可以在猴与猴中长期连续转种传代下去。

(二)除换、补健康人的鲜血外,采用毒力强的原虫株也是取得成功的一个重要因素。我们曾在同一时期用另一个患者鲜血10毫升,原虫密度达14.4%,发育至大环状体时,接种到一只换了健康人的鲜血的猕猴,总虫量虽达 41.04×10^8 ,但原虫在

猴体内发育不良,逐渐退化,至第3天消失。

(三)我们在连续转种传代的后期使用了医院血库冷藏一周的人血,转种后原虫发育不好,虫数锐减至极低程度。由此看来,人血是否新鲜似乎与原虫的发育有很大的关系,不过Trager和Jensen用贮存2周以上的红细胞培养恶性疟原虫并无不良效果^(9,10)。因此这个问题尚须进一步研究。

(四)无论是在熊猴或猕猴,在末梢血液中皆可见原虫发育的各个时期,这一点和前人的报道相同^(1,3)。目前换血实验的结果,原虫能在猴体中大量繁殖,使我们可以进一步了解恶性疟原虫在试验猴体中的发育规律。其无性周期在36—48小时。原虫在猴体中发育的同步性极明显,当数量达到高峰时几乎完全是环状体,而出现滋养体时原虫数迅速下降,至裂殖体出现时下降到最低的水平,至下一代环状体出现时又迅速回升。这一现象和前人在夜猴中所见者相似(Voller等,1969)⁽⁶⁾,更值得注意的是,在形成滋养体时,受染的红细胞常有粘聚在一起的现象,由2个至10多个不等。恶性疟原虫重要的病理之一是“含疟原虫的红细胞的粘性增加,故常凝集成栓子,完全堵塞毛细血管”。并且“由于肠壁小动脉的血栓形成(含疟原虫的红血球的凝集),部分肠管可以发生出血性坏死”(秦光煜,1964)⁽⁴⁾。目前我们看到了含滋养体期的红细胞有明显的粘聚现象(但一般不是溶合在一起),也看到因原虫血症严重而致死的猴在肠管中充血瘀血和密布出血点以至引起大量便血至死的情形。看来猴体中的病理和人体中所见者确有相同之处,在这方面仍有待于进一步的研究。

(五)目前我们未能肯定是否部份原虫已进入了猴的红细胞。但值得注意的是,3号熊猴换血2次共70毫升,该猴体重1.5公斤,估计所换的人血量约占猴血量的一半,而红细胞寄生率的高峰达46%。若全部寄生者都是人的红细胞,那么几乎所换入的红细胞都在这个时期同时被寄生了。因此有可能所寄生者有一部分是猴的红细胞。不过,由于原虫繁殖一般不超过三个周期,在6天后即急降或消失,这样看来,即使有侵入猴的红细胞的情形,可能为数是很少的,也可能侵入后发育不良,因此未能继续在猴体内不断繁殖下去。

(六)虽然原虫在猴体繁殖的时间短,原虫是否能侵入猴红细胞尚未可知。但目前的进展是有相当意义的:(1)我们可以用换血的方法使恶性疟原虫在猴体中大量繁殖,以得到大量的原虫作为抗原或作其他(如培养等)之用;(2)我们可以使用这种方法将原虫从现场带回到实验室,并且在猴体中转种传代,作种种试验,包括对凶险型疟疾症状和病理的观察和试验,也可用作原虫种株的研究。由于目前用换血方法接种和转种两种常见猴的成功,已为我们今后对疟原虫的研究提供了不少的方便。

参 考 文 献

- [1] 江静波: 人疟动物模型研究的回顾与前瞻, 中山大学学报(自然科学版), 1976(1): 73—86.
- [2] 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—9,
- [3] 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,
- [4] 卫生部医学科学研究委员会寄生虫病学编辑委员会: 《寄生虫病学》(上册). 上海科学技术出版社: 270—295 (1964)
- [5] Cadigan, F. C., Spertzel, R. O., Chaicumpun, V. and Puhomechareon, S., 1966. *Plasmodium falciparum* in non-human primates (macaque monkeys). *Mil. Med.*, 131(Suppl.): 959—960.
- [6] Garnham, P. C. C., 1936. *Malaria Parasites and other Haemosporidia*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [7] Geiman, Q. M. and Meagher, M. J., 1967. Susceptibility of a new world monkey to *Plasmodium falciparum* from man. *Nature*, 215:437—439.
- [8] Geiman, Q. M., Siddiqui, W. A. and Schnell, J. V., 1969. Biological basis for susceptibility of *Aotus trivirgatus* to species of plasmodia from man. *Mil. Med.*, 134:180—186.
- [9] 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.
- [10] Trager, W. and Jensen, J. B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture, *Science*, 193:672—675.
- [11] Voller, A., Richards, H. B., Hawkey, C. M. and Ridley, D. S., 1969. Human malaria (*Plasmodium falciparum*) in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). *J. Trop. Med. Hyg.*, 72: 153—160.
- [12] Young, M. D., Baerg, D. C. and Rossan, R. N., 1975. Experimental monkey hosts for human plasmodia. *Exp. Parasitol.*, 38:136—152.

The Successive Passages and Heavy Infections of *Plasmodium falciparum* in the Two Species of Macaques the Blood of Which Has Been Partly Replaced by Human Blood

(Summary)

In our previous papers, we reported the developments and multiplications of *Plasmodium falciparum* in the three species of the Old World monkeys including *Macaca mulatta*, although the infections are of low level and subsided abruptly or disappeared completely in five or six days. Accordingly a suggestion was then made that "Just before inoculation, a part of the monkey's blood be drawn off and a same amount of human blood be transfused into it so that there will be abundant human red blood cells in which the parasites inoculated may multiply".

The present paper is a report on our experiments as designed above. It is very interesting to note that in the monkeys (*M. mulatta* and *M. assamensis*) the blood of which had been partly or largely replaced by human blood, *P. falciparum* did flourish with the highest infection of 46% of the red blood cells. Immature or abnormal gametocytes may occasionally be found, however rare, in the thick blood films. Eleven successive passages have been carried in 18 monkeys treated in the same manner, but no sign of improvement has so far been detected in either the length of patency or the intensity of infection. Maybe the parasites could not develop well in the monkeys' red blood cells or they could not invade them at all. To our surprise two of the experimental hosts (all *M. assamensis*) of infection rates 26% and 46% died of serious intestinal haemorrhages very much like the local pernicious human cases.

We do not know at present whether it is possible to make the parasite finally adapted to the monkey-hosts through such continuous passages (it would be impossible if the monkeys' red blood cell never support the parasite). But we find the present achievement quite useful

in that it provides us with a new method to study the blood stages of *P. falciparum* (all are found in the peripheral circulation of such experimental hosts) for identification of different subspecies or strains; likewise to bring the active parasites from the epidemic region to the laboratory far off for cultivation, etc. It also provides us with a means by which a considerable amount of merozoites may be obtained for antigen preparation. Besides, fetal cases of such animals may also serve somewhat as models for the study of "pernicious intestinal malaria" (Written by Jingbo Jiang, Zupei Long and Jiexian Zou)

亚毫米波氰化氢 (HCN) 气体激 射器研制简报

亚毫米波是正在开辟中的电磁波波段,介于微波与可见光之间。它具有波长短、频带宽、与物质作用强烈、能穿透高浓度等离子体等特点,对物质结构基础研究、通讯、雷达、等离子体诊断,以及环境污染测量等均有广泛应用。

为了解决亚毫米波源的问题,我们进行了HCN激光器的试制工作,以期获得波长为 $337\mu\text{m}$ 的亚毫米波连续振荡源。激光器采用内腔结构,放电管长1米。激光器采用小孔耦合输出,进行试验获得 $337\mu\text{m}$ 亚毫米波输出,用红外区定标的激光功率计测量,输出功率约1 mW左右。用两种不同工作物质都能得到同一量级的输出功率,连续改变腔的长度,可以观察到一系列相当于波长等于 $337\mu\text{m}$ 的谐振尖峰。为获得最佳输出功率,提高稳定性,正在对激光器结构以及最佳工作条件等作进一步的试验。

物理系 亚毫米波研究室