

北京第二医学院

寄生虫学教研组 主译

热带病病原的体外培养

● 人民卫生出版社 ●

热带病病原的体外培养

北京第二医学院

寄生虫学教研组 主译

人 民 卫 生 出 版 社

**The in Vitro Cultivation of
the Pathogens
of Tropical Diseases**
**Proceedings of the Workshop held in
Nairobi, Kenya, 4-9 February 1979**
**Published on behalf of the
UNDP/WORLD BANK/WHO**
**Special Programme for
Research and Training in Tropical Diseases**
Schwabe & Co. AG, Basel

热带病病原的体外培养

北京第二医学院
寄生虫学教研组 主译

人民卫生出版社出版
(北京市崇文区天坛西里10号)

建外印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行

787×1092毫米32开本 13 $\frac{1}{2}$ 印张 4插页 293千字
1984年10月第1版 1984年10月第1版第1次印刷
印数: 00,001—3,450

统一书号: 14048·4688 定价: 2.10元

〔科技新书目77—76〕

译者前言

病原体的体外培养研究的重要意义在于可能供应大量病原作为控制疾病的研究材料。它不仅为病原体的生物学、生理学以及病原体与宿主互相关系的基础研究提供实验条件；而且也有关疾病的免疫学、流行病学、治疗与实验诊断等应用科学的研究提供有利条件。这方面的研究工作近年才逐渐为人们所重视。

本书系联合国开发计划署、世界银行、世界卫生组织热带病科研及培训专门规划的一个国际专家会议的意见和报告书。书中论述了六种重要的人体热带病：疟疾、血吸虫病、丝虫病、利什曼病、锥虫病和麻风，及一种危害牛的泰累尔氏梨浆虫病等病原体的体外培养的研究概况与新近进展。其中有的专题还详细介绍了新的实验技术方法和有关知识，对当前国内正在开展的疟疾、血吸虫病、丝虫病、利什曼病和麻风等重要疾病的研究，提供有价值的参考资料。

由于译者水平所限，错误之处望读者指正。

1981.4.

序 言

这套热带病研究丛书是联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织热带病科研及培训专题规划的一种出版物。丛书论述目前研究控制主要热带传染病中的突出问题。

专题规划希望能引起其他学科的科学工作者对这些问题的注意，对有关课题的传染病病原提供研究机会，并向这方面的研究工作者介绍其他生物医学科学的进展，为研究这些生物提供新的研究方法。

专题规划所指定的研究和培训课题有两个目的：①研究和发展新的和改进的工具，以控制主要的热带病；②加强热带国家的研究能力。

研究是全球性的，由多学科科学工作组领导的；培训和机构加强活动只限于在有这些疾病为流行的热带国家进行。

开始选择的六种疾病是疟疾、血吸虫病、丝虫病（包括旋盘尾丝虫病）、锥虫病（非洲睡眠病和美洲的恰加斯病（Chagas' disease）、利什曼病和麻风。科学工作者也进行贯穿各研究领域方面的工作，如：生物医学科学、媒介控制、流行病学及社会和经济的研究。

有兴趣参加专题规划的科学家被邀请提供更多的资料。

Dr Adetokunbo O. Lucas,
世界卫生组织热带病科研培训
专题规划主任，日内瓦，瑞士
(陈佩惠 译)

绪 言

现正继续努力研究以改进对人和家畜的主要热带传染病的控制。这方面研究的一个重要障碍是对致病病原的体外培养的现行方法不得当。这严重地阻碍着各个重要方面的研究，特别是阻碍着疫苗、药物和改进诊断试验的发展。

近来，国际动物病研究室，和联合国开发计划署/世界银行/世界卫生组织的热带病科研培训专题规划，联合组织了一个专题讨论会，综述这方面研究的现有知识和考虑如何使研究有所进展的问题。讨论了引起下列疾病的病原体：人的疟疾、血吸虫病、丝虫病、锥虫病、麻风、利什曼病、和牛的泰累尔氏梨浆虫病。本书是专题讨论会的报告资料。专题讨论会在肯尼亚首都内罗毕的国际动物病研究室召开。

专题讨论会评价了当前病原体培养现状的工作论文和最新进展的简讯。工作论文全部印出而短文以简讯形式介绍。论文之后的讨论由书面报告人小结。论文所发表的见解，当然是作者个人的观点，并不一定反映专题规划或国际动物病研究室的方针。书面报告人根据专题讨论会中的讨论书写了附录。

我们要对专题讨论会的全体参加者表示感谢，还要对国际动物病研究室和世界卫生组织协助会议取得圆满成功和为本书出版出力的有关人员表示感谢。我们希望这次会议和本书将能促进这些非常重要的人体和动物的病原体体外培养的研究，从而有助于发展控制疾病的新工具。

David S. Rowe, 联合国开发计划署/世界银行/
世界卫生组织热带病科研培训专题规划,
日内瓦, 瑞士
Hiroyuki Hirumi, 国际动物病研究室,
内罗毕, 肯尼亚

(陈佩惠 译)

目 录

第一部分	疟原虫的培养	1
第一章	疟原虫红细胞内期的培养.....	1
第二章	疟原虫红细胞外期的培养.....	12
第三章	疟原虫蚊期的体外培养.....	24
第四章	培养的恶性疟原虫对抗疟药物的敏感性.....	29
第五章	红细胞内疟原虫裂殖子的特性和分离.....	45
第六章	疟原虫子孢子的分离与纯化.....	70
第七章	恶性疟原虫的连续体外培养：市售小牛血清的应用.....	82
第八章	在恶性疟原虫连续培养中诱导配子体形成.....	91
第九章	恶性疟原虫和三日疟原虫在连续培养中同时繁殖.....	93
第十章	关于疟原虫讨论.....	94
第二部分	泰累尔氏梨浆虫的培养	98
第十一章	小泰累尔氏梨浆虫的生物学和牛的东海岸热.....	98
第十二章	泰累尔氏梨浆虫的体外培养.....	115
第十三章	感染小泰累尔氏梨浆虫大裂殖体的牛淋巴细胞体外培养的稳定性.....	132
第十四章	小泰累尔氏梨浆虫对不同细胞和动物系统的适应性.....	134
第十五章	小泰累尔氏梨浆虫的治疗：在培养物中与在牛体内治疗结果的相互关系.....	136

第十六章	小泰累尔氏梨浆虫的大裂殖体的分离和 半大规模的培养·····	140
第十七章	泰累尔氏梨浆虫在体外培养转变成同系 细胞系对牛淋巴细胞的刺激·····	143
第十八章	牛对被小泰累尔氏梨浆虫转化的受染细 胞系的易感性·····	146
第十九章	关于泰累尔氏梨浆虫的讨论·····	148
第三部分	非洲锥虫的培养·····	150
第二十章	感染动物的非洲锥虫体外培养的现状···	150
第二十一章	罗德西亚锥虫的感染型在体外培养的 生长·····	186
第二十二章	活动锥虫血液型的体外培养·····	187
第二十三章	涎染锥虫组织培养的研究·····	189
第二十四章	布鲁斯氏锥虫多形态株：在体外培养 发育后期型的转变及形成的血液型的 继代培养·····	190
第二十五章	丙酮酸盐作为维持布鲁斯氏锥虫 427 株血液型体外培养生存的一种因素···	194
第二十六章	布鲁斯氏锥虫在体外培养的抗原变 异·····	196
第二十七章	关于非洲锥虫的讨论·····	199
第四部分	克鲁斯氏锥虫的培养·····	202
第二十八章	应用体外细胞培养对克鲁斯氏锥虫研 究的动向·····	202
第二十九章	克鲁斯氏锥虫、墨西哥利什曼原虫和 杜氏利什曼原虫的分子生物学·····	216
第三十章	在细胞培养中大量生产克鲁斯氏锥虫的	

锥虫样鞭毛体和无鞭毛体期·····	223
第三十一章 克鲁斯氏锥虫的营养需要·····	225
第五部分 利什曼原虫的培养 ·····	227
第三十二章 利什曼原虫体外培养的近代知识·····	227
第三十三章 培养从脾脏提取物获得杜氏利什曼原虫作为辅助黑热病的诊断和治疗·····	250
第三十四章 体外培养杜氏利什曼原虫的无鞭毛体在巨噬细胞内的增殖·····	252
第六部分 麻风病原的培养 ·····	254
第三十五章 在鼠麻风分枝杆菌培养方法的基础上建立无细胞液体培养基培养麻风分枝杆菌的实验·····	254
第三十六章 关于鼠麻风分枝杆菌和麻风分枝杆菌在无细胞系统中培养的基本问题·····	273
第三十七章 鼠麻风分枝杆菌体外培养的初步结果(简讯)·····	291
第三十八章 关于麻风的讨论·····	293
第七部分 血吸虫的培养 ·····	297
第三十九章 血吸虫培养的现状:范围、改进,应用于防治·····	297
第四十章 曼氏血吸虫的培养·····	331
第四十一章 在人胚肝细胞原代培养中曼氏血吸虫卵分泌物的细胞毒性·····	333
第四十二章 血吸虫的讨论·····	334
第八部分 丝虫的培养 ·····	336
第四十三章 丝虫体外培养的现状·····	336
第四十四章 旋盘尾线虫的冷冻保存和体外培养·····	361

第四十五章	彭亨丝虫在体内和体外培养的营养供给和营养摄取	363
第四十六章	丝虫病的讨论	364
第九部分	营养条件	365
第四十七章	短膜虫培养基作为以卟啉为抗血鞭毛体化学治疗和转变金属新陈代谢的指标	365
第十部分	毒力	382
第四十八章	体内和体外的环境条件对寄生性微生物表面毒力决定簇的影响	382
第十一部分	圆桌会议	403
第四十九章	圆桌会议	403
附录一	培训	411
附录二	细胞和组织培养的设备及其供	413
附录三	可供选择的培养系统	418
附录四	对危害健康的概述	421

第 一 部 分

疟原虫的培养

第 一 章

疟原虫红细胞内期的培养

William Trager, The Rockefeller University, New York, USA

摘 要

恶性疟原虫的首次连续培养在 1976 年初就获得成功, 这种方法是在 RPMI 1640 培养基里, 加入人的红细胞, 使沉降为一层, 并供以气相 2~3% 的 CO_2 和 10% O_2 , 使培养基缓慢流过红细胞层来培养疟原虫的。这样就引向两个方面: 一是发展用手工操作更换培养基的简便平皿蜡烛缸法, 一是改良的培养基连续流动的方法。平皿法曾用于研究疟原虫在培养基中的变化, 抗疟药物的效果, 疟原虫的代谢, 以及它们在遗传变异的红细胞中的生长, 如具有镰刀状血红蛋白 (HbS) 的红细胞。连续流动方法用于长期维持原始培养物 (Stock culture) 则十分有益。连续培养 1~2 年, 在恶性疟原虫的三个不同的分离株中, 发现突出于受滋养体或裂殖体感染的红细胞表面的典型突出物 (结节) 的消失。

引言

疟原虫红内期培养工作的历史可简分为三个时期。第一个时期从1912年开始, Bass 和 Johns 首次用简易方法获得恶性疟原虫与间日疟原虫二者体外培养的有限的增殖。第二个时期以我1941年对鸟疟鹑疟原虫 *P. lophurae* 的研究开始, 随后不久继以 Ball 和 Gieman 对诺氏疟原虫 *P. knowlesi* 的研究。这两个时期, 连续培养均未取得成功。全部工作已反复回顾并充分总结, 见世界卫生组织技术报告丛书^[1]。确切地说, 第三个时期从三年前开始, 即1976年2月, 我整理了以往的三次观察: 首先, 培养基缓慢流过沉降的红细胞层, 对柯氏疟原虫 *P. coatneyi* 与恶性疟原虫都有利; 其次, George Moore 的白细胞培养基, 含有 HEPES 缓冲剂的 RPMI 1640 对支持震荡瓶中的柯氏疟原虫最初发育异常好; 第三, 提高 CO₂, 降低 O₂, 对疟原虫有利。从感染恶性疟原虫的夜猴 *Aotus trivirgatus* 取少量血, 与含有人的 AB 型红细胞、HEPES 缓冲剂的 RPMI 1640 培养基混合, 并补充以人血清, 然后放入一个流动容器内, 使培养基在沉降的细胞上面缓缓流过。气相含有 2~3% CO₂ 和近 10% O₂。经适当间隔, 供给新鲜人红细胞于培养基, 疟原虫开始增殖, 不久便在培养基中存活。于是这个工作引向两个方面, 一是用 Jensen 发展的简单平皿蜡烛缸法, 另一是用改良的连续流动方法。这些以及有关的研究已由 Trager 与 Jensen^[2] 总结在最近的评述中。在此, 我只简要描述现在用于恶性疟原虫连续培养的方法的主要特点, 获得的一些结果以及对未来工作的意见。

连续流动方法^[3]

一个狭长平底容器 (图 1-1) 盛有 3~4mm 深的 8%

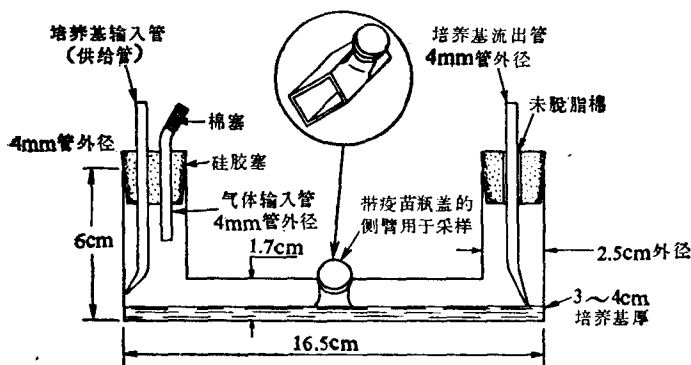


图 1-1

这个流动容器由 $17 \times 25\text{mm}$ 的长方形管道，及两端具有两个垂直的直径 25mm 的圆柱状颈部构成。另有一个长约 25mm 与直径 11mm 的侧臂与长方形管道连接成角度以便用注射器和针头通向底部。为了灭菌，在此侧臂上装有铝箔盖，两垂直颈均用棉花塞住并全部用纸包好。用时把侧臂铝箔去掉，并把消毒疫苗塞子塞住侧臂。通过右侧的垂直颈无菌地置入受染血悬液（ 10% 或 8% 的红细胞悬液 12ml ，适量的虫血，通常约 1% ）。此处装上一个输出管用 4 号硅胶塞换下棉塞。与此相似，左侧也用装有输入管和气体进入管的 4 号硅胶塞子换下棉塞。两个塞子各自包好并分别高压消毒。输入和输出管都要用铝箔盖扣上，保持无菌直至接通（自 J. Protozool., 1979）

红细胞悬液 12ml 。用 HEPES 缓冲的 RPMI 1640 培养基，补充以 10% 人血清，每日约以 $55 \sim 60\text{ml}$ 的流速流过红细胞。该培养基用保存在小冰箱内贮存瓶中的⁽¹⁾足够一周用的培养基补给。在容器一端，从表面抽出培养基，并收集于溢流瓶中。进出由压缩泵控制。从 $7\%\text{CO}_2$ - $5\%\text{O}_2$ -平衡 N_2 罐中缓缓输送，供给气相。通过硅胶管道导入，供给 $2 \sim 3\%\text{CO}_2$ 和 10% 左右 O_2 的大气。在血虫率约 10% 时，每星期一、三、五收获生长最多的感染细胞，并换上新的未感染细胞，使血虫率降低到 1% 左右（表 1-1）。经连续培养二

表 1-1 在两个连续流动容器中恶性疟原虫
(FCR-3/FMG系) 的生长

日期 (1978)	血 虫 百 分 率			
	容 器 A		容 器 B	
	以前	以后	以前	以后
9月18	19a)	2	15	1.6
9月20	13	1.4	11	1.2
9月22	14	1.2	8	0.8
9月25	17	0.7	20	1.5
9月27	8	1.6	11	0.7
9月29	14	1.6	6	0.9
10月2	19	1	15	0.9
10月4	9	0.8	11	1.3
10月6	13	0.4	13	0.9
10月9	14	1.5	17	1.2
10月11	13	0.9	14	1.4
10月13	12	1.2	13	1.1
10月16	21	1.2	15	1.2
10月18	12		17	

这个培养系在平皿中培养始自 1976 年 8 月 (Jensen 与 Trager, 1978), 体外培养连续生长直到 1978 年 6 月 30 日。此后, 该培养物冻存, 直到 1978 年 9 月 4 日在平皿中复苏, 并于 1978 年 9 月 8 日转至流动容器。

注意, 此图提示的是每星期一、三、五在补加 8% 新鲜红细胞悬液前后每 100 个红细胞中的疟原虫数。本次稀释后和下次稀释前 (即二或三天以后) 之间的比值就是增殖幅度。在间隔期为 3 天的, 一管增殖幅度为 12 到 35 倍, 平均为 20 倍, 另一管平均为 15 倍。两天间隔期的一管增殖幅度为 12 到 35 倍, 平均为 20 倍, 另一管平均为 15 倍。在两天间隔期的, 两个管增殖幅度为 6 到 16 倍, 平均为 10 倍*。

* 原文恐有误——译者著。

年以上，用光学和电子显微镜观察，疟原虫形态正常^[4]。

平皿蜡烛缸法^[5]

在这种非常简便的方法，将适量的6%或8%红细胞悬液，放进大小随意的平皿中，培养基深度为2~3mm。每天更换一次培养基，将平皿轻轻倾斜，吸去上清液，换上新鲜培养基。在放平皿的干燥器中，点燃一支蜡烛，等火熄灭，再将干燥器活塞关闭，即可得2~3%CO₂与15~18%O₂气相。如果最初用此法作培养时，血虫率为0.1%，4天后约可达5%。如果血虫率开始为1%，两天后，即在一个循环周期，就达到5%。须注意，这种方法得到的增殖不如流动容器的那样高。然而，用平皿也可获较高的血虫率；当血虫率超过5%时，一天可更换培养基两次，甚至三次。平皿法能够并已经反复地用于维持一个培养系。它的最大优点是方法简单，主要缺点是需要每日手工操作更换培养基。

培养基、血清和细胞

用连续流动法或平皿法，至今还没有发现一种比含25mM HEPES 缓冲剂的 RPMI 1640 更好的培养基。用10%或15%人血清可获得最好的结果。在开始由感染的人或夜猴建立新系时，可以采用AB型血清。一个培养系一旦建立，它应该在那些最容易获得的血型红细胞（A或O型）及同型血清中培养。新采的人血清可在-20℃贮存。新鲜兔血清可代替人血清（Rieckmann，个人通讯），而且，我们已肯定了此结果。

培养基用有谷酰胺而无碳酸盐的粉状 RPMI 1640 制备。制1升培养基，用10.4g 上述粉剂，溶于900ml 玻璃器重蒸水中。加入5.94g HEPES 缓冲剂。溶液稀释成960ml，通过孔隙0.45μm 的微孔滤筛过滤消毒。培养基在

用前加5%碳酸氢钠(轻微孔滤筛消毒),按每96ml含HEPES缓冲剂的RPMI 1640培养基加4ml碳酸氢钠的比例配制,至此即配制完成。然后加适量血清。配制好的培养基在密闭瓶中,在4℃可贮存一周。

取一定量的人血,放入酸-枸橼酸盐-葡萄糖或枸橼酸盐-磷酸盐-葡萄糖中贮存,作为人红细胞的来源,贮存于4℃,能用到4周。用离心的方法制备红细胞,并在无血清的配制好的培养基中洗二次,离心三次,每次离心后除去表面的淡黄色层。按所需的浓度,最后将细胞悬浮于有血清的配制好的培养基中。

同步与配子体的产生

不像在人宿主体内常见的情况,建立的疟原虫培养一般是不同步的(表1-2)。环形体最多,这并不是为奇,因为48小时裂殖周期至少有1/3是环形体。然而,不论用几种人工方法中的那一种都能诱发同步。Vanderberg(个人通讯)的方法最好,此法是将受染的细胞短暂地再悬浮于5%山梨醇(sorbitol)水溶液中,然后离心并再悬浮于培养基中。通过这种处理,环形体以外的所有时期都被杀死。然后,环

表 1-2 无性周期各期的典型分布

日 期	各 期 的 百 分 比					
	管 1			管 2		
	环	滋	裂	环	滋	裂
1/16/78	61	24	15	58	22	20
1/18/78	64	24	12	54	33	13
1/20/78	60	33	7	49	27	24
1/23/78	64	22	14	37	38	25