

# 鼠疟原虫蚊期配子生殖的体外培养——在 Eagle MEM 培养基中发育的观察\*

李慧珠 王瑞芳 温永民 杨连雪

(北京第二医学院寄生虫学教研室)

为预防疟疾,开展疟原虫生物学、免疫学等方面的研究,从而设想建立疟原虫蚊期(配子生殖、孢子增殖)的体外培养系统。有关鼠疟原虫蚊期配子生殖的体外培养,国内外曾有不少的报道。近年来,国内曾用多种培养基对离体培养鼠动合子进行了初步观察<sup>[4]</sup>;同时又在鼠动合子的形成和离体培养方法上进行了研究<sup>[5,6]</sup>;国外学者罗萨利斯-龙奎尔(Rosales-Ronquillo)等<sup>[10,11]</sup>在使用含斯氏按蚊细胞原代培养物的 Eagle MEM 培养基和鲑鱼上皮细胞系 Eagle MEM 培养基对离体培养伯氏疟原虫的动合子进行了活体观察;斯皮尔(Speer)<sup>[8,9]</sup>也使用了含该种蚊细胞的 Eagle MEM 培养基进行鼠疟动合子能动性 and 超微结构的研究。我们曾采用含白纹伊蚊细胞的 199 培养基进行约氏疟原虫体外培养的初步研究<sup>[4]</sup>;随后,又分别在 1980 年和 1983 年用单一的 Eagle MEM 合成培养基对约氏疟原虫配子生殖进行体外培养,前后共进行了 18 次试验,较详细观察了在该种培养基中,疟原虫由配子体——动合子阶段的生长和发育。

## (一) 材料和方法

1. 约氏疟原虫约氏亚种(*Plasmodium yoelii* yoelii By 265 株)通过定期感染斯氏按蚊(*Anopheles Stephensi* HOR 株)和血传小鼠(C<sub>57</sub>和上海杂品系;体重 16—20 克)保种于本实验室内。试验选用经蚊传后血传 1—4 代第 3—5 天的小鼠供血。雌雄配子体的比例一般在 5—20:1/100 WBC,即可做为培养的血源。

2. Eagle MEM 培养基 系用 Eagle MEM 粉剂(日本制药株式会社产品)0.47 克溶解于 50 毫升的无离子水中,然后分装于疫苗瓶,以 10 磅 15 分钟高压灭菌,冷却后,贮藏于-20℃冰箱备用。使用时加入 20% 胎牛血清,并以 5.6% NaHCO<sub>3</sub> 调节培养基 pH 7.6—7.8。

3. 培养和观察 由感染约氏疟原虫小鼠眼眶取血,500 单位/毫升肝素以 1:10 的受染血抗凝,然后,用血色素管按培养基和血 3:1 的比例分种于含有培养基的青霉素小瓶内,置于 23—24℃恒温箱或室温内培养。待培养后,从

\* 军事医科院流研所时云林同志提供鼠疟,我组吴洪、张穗、张漪同志协助部分实验工作,特此致谢。

小瓶中按时取血,分别制作 10、30 分钟;1—6、12、24、48、72 小时的血涂片,吉氏染色,油镜观察,并摄像记录疟原虫的发育和形态特征;活体观察雄配子体出丝情况。

## (二) 结果

1. 疟原虫蚊期配子生殖的各阶段发育和形态特征

(1) 雄配子(图 3、4 见封 2,下同)。观察培养 10、30 分钟经染色所制备的血涂片。在小配子形成前,首先脱去红细胞的小配子体核先分裂,随着核的分裂胞质也向边缘伸出突起(图 1、2),逐渐延长为鞭毛状,然后离开母体,形成游离的雄配子。此时活体观察,可见由于核的分裂和胞质很快的分化而引起激烈的动荡,并带动周围的红细胞围绕着正在出丝的雄配子体进行迅速的旋转滚动,而把红细胞裹成一球团(图 24)。雄配子呈细丝状,染色后,因胞质呈酸性,故染成淡红色,核深红色,位于体中央或体前部,常呈念珠状排列,其所在处体稍膨大,多数的雄配子在其顶端具一个深红色点状的染色质粒,雄配子一般出现在 10、30 分钟,但也见于培养后 4、6、12、24 小时。平均大小  $14.375 \pm 0.5965$  微米。

(2) 雌配子(图 5、6)。在培养基中雌配子体很快脱去被胀大的红细胞;虫体开始逐渐缩小,圆形或卵圆形,核和胞质致密,一般着色深,核常位于一侧,无空泡,色素颗粒随虫体变小而渐减少。最早出现在培养后 10 分钟,有的试验在整个培养过程中都看到了雌配子,甚至在 72 小时仍可见,同时,还出现雌配子群聚成堆的现象。平均大小  $4.125 \pm 0.1445 \times 4.1 \pm 0.1763$  微米。在制片标本中没看到雌配子正在受精的过程,只见雄配子趋向于雌配子待受精的现象(图 7),有时也见到受精后的雌配子内含有尚未融合的两性核。

(3) 合子(图 8、9)。合子最早出现在 10 分钟,一般常见于培养后 3—5 小时,但在 48 小时仍见。合子多呈圆形,核位于一侧,圆形的空泡为最显著的特点,多位于中央;色素颗粒少且粗大,常围绕在空泡的边缘或散在胞质中;初形

成的合子一般较小,空泡大;晚期合子逐渐增大,空泡渐小;且合子边缘呈波浪形或外形不规则。在制片中也经常看到合子群聚成堆(图 10),如雌配子一样,有时更为显著,十几个合子群聚在一起(图 21),平均大小  $4.39 \pm 0.2913 \times 4.23 \pm 0.1583$  微米。

(4) 幼动合子(图 11、12)。由合子形成幼合子有两种类型,最常见的是由合子开始伸出逗点状突起渐发育为指状突起而形成幼合子(图 12、14);另一种偶见合子本身延伸而形成(图 11、13)。两型幼动合子在合子本体上都可可见圆形的空泡,核和色素颗粒。此两种雏形的幼动合子各经未成熟幼合子阶段(图 13、14),最终形成成熟幼合子(图 15)。幼动合子一般多出现在培养后 4—6、12 小时,在 24、48 小时也常见到。

(5) 成熟幼合子(图 15)。多数虫体弯曲呈香蕉形,前端钝圆,后端渐尖,少数虫体为两端钝圆的腊肠形。核常位于近中央或近体后半,空泡呈圆形,大小不一,通常 2—3 个,分列于核的前后;色素颗粒多数围绕在空泡的边缘,少数集中一堆,数堆或散在胞质中。幼合子最早出现在 6 小时,12 小时已出现较多。48 小时仍偶见成熟幼合子。平均大小  $14.62 \pm 0.337 \times 2.68 \pm 0.1210$  微米。成熟幼合子也出现了数个在一起的现象(图 23)。

2. 在培养基中配子体的出现 我们除观察了该种疟原虫配子生殖的各发育阶段外,在培养过程中也出现了配子体,如在一个试验中,24、48、72 小时的染色标本中先后查到了各期形态的配子体。

(1) 幼配子体(图 16)。其特点虫体边缘规则,无空泡,核和胞质较致密,色素颗粒少或缺如。虽在形态上尚未分化,雌雄两性很难区别,但已不同于刚进入红细胞内的裂殖子,也区别于具有空泡特点的滋养体。

(2) 未成熟配子体(图 17、18)。虫体尚未充满红细胞,边缘规则,色素颗粒多,分布均匀。两性体以核大小、位置及着色深浅已能初步区别。

(3) 成熟配子体(图 19、20)。形态上与鼠血内雌雄配子体很相似。虫体几乎充满整个红细胞,色素颗粒粗大,多而分散,有沿边缘分布的现象。雌性(图 19)核小而致密,深红色,常位于虫体一侧,胞质深,蓝色。雄性(图 20)有较大的核,占虫体 1/2,疏松,淡红色,位于体中央,胞质浅蓝色或近灰黄色。

### (三) 讨 论

1. 在 Eagle MEM 培养基中曾较详细观察约氏疟原虫配子生殖各阶段,从发育过程和形态描述的特征来看,与疟原虫活体培养——在斯氏按蚊胃内的发育各阶段和最后形成动合子相似<sup>[3]</sup>(图 22)。也与国内外报道的用含细胞的 Eagle MEM 和 199 培养基从鼠疟配子体培养发育到成熟的动合子所得结果也基本相同<sup>[10,11,12]</sup>;因而该种非细胞的 Eagle MEM 对鼠疟原虫配子生殖的体外培养为一良好培养基。另外,在该种培养基中,明显地出现了发育不同步的现象。即在 24 小时还见到游离的小配子,48、72 小时还出现较多的雌配子,自培养后 10 分钟出现合子,6 小时动合子已形成,而直到 48 小时仍可见。这种现象分析可能受体外培养的各种环境因素的影响,因而延缓了疟原虫发育的速度。

2. 由合子初分化为动合子时,可见两种类型。一是由合子伸出逗点状的突起,再是由合子本身伸长,此两型的形态与该种疟原虫活体培养在斯氏按蚊胃内所见相同<sup>[3]</sup>,也与 Rosales-Requillo 等在离体培养鼠疟原虫所报道的两种类型基本相似。有关成熟动合子在体外培养中出现的时间,国内报道最早在 7 小时<sup>[3]</sup>,国外报道在 15 小时<sup>[10]</sup>,而在 Eagle MEM 培养基中 6 小时就形成了成熟动合子,12 小时成熟动合子已较多;都比国内外报道的时间早;但是,这一结果与该种疟原虫在斯氏按蚊胃内发育的时间,即血餐后  $4\frac{1}{2}$  小时已看到成熟动合子的时间相近似<sup>[3]</sup>,也与 10 小时在数量上出现高峰的情况基本是一致的<sup>[11]</sup>。关于大配子、合子以及动合子出现聚集成堆的现象,与尤利(Yoelii)<sup>[12]</sup>

报道的相同,是否与静态培养和采血取样有关。

3. 在该种培养基内除观察到疟原虫配子生殖各发育阶段外,也发生了配子体,各期配子体的出现,可能由于采血培养时,少数不同步的、尚未分化和成熟的配子体在培养基内继续发育而形成的。另一方面也可能是原血内少数无性期的疟原虫在连续培养过程中由裂殖子分化快速发育为有性体。据学者<sup>[7]</sup>从研究离体培养中恶性疟原虫配子体产生所观察的现象,证明无性体增殖时,可同时分化配子体。因而,鼠疟原虫在离体培养中,由无性体诱变裂殖为配子体的可能性也是存在的。其原因是否对体外培养环境如温度或营养条件不适宜所引起,有待进一步观察。

### (四) 小 结

1. 约氏疟原虫蚊期配子生殖在 Eagle MEM 培养基中能完成正常发育;与在斯氏按蚊胃内活体培养发育过程和形态特征基本相同。并对其发育阶段的形态进行了较详细的描述。

2. 由合子初分化为动合子有两种类型。成熟动合子最早出现在 6 小时,12 小时已较多。同时也出现了大配子、合子以及动合子聚集成堆的现象,可能与静态培养和采血取样有关。

3. 在培养过程中,也出现了配子体,分析可能是少数不同步的尚未分化和成熟的配子体在培养基内继续发育而来,也可能在连续培养过程中由裂殖子分化而形成。

### 参 考 文 献

- [1] 刘燕明等 1983 约氏疟原虫蚊期生物学初步研究 北京第二医学院学报 2: 112—119。
- [2] 陈佩惠 1981 鼠疟原虫动合子体外培养初步研究 动物学杂志 (1): 1—3。
- [3] 陈佩惠等 1983 约氏疟原虫约氏亚种在斯氏按蚊内发育及三种按蚊敏感性的观察畜牧兽医学报 14(3): 146—154。
- [4] 李慧珠等 1980 鼠疟原虫早期孢子增殖的体外培养 北京第二医学院学报 4: 279—287。
- [5] 高兴政等 1981 离体培养中鼠疟原虫动合子形成过程形态学的初步观察 动物学报 27(2): 153—157。
- [6] 高兴政等 1983 离体培养鼠疟原虫动合子方法的研究 北京医学院学报 15(1): 25—27。
- [7] 黄家章 1984 恶性疟原虫配子体的生长规律及药物

对它的影响和作用 国外医学寄生虫病分册 2: 55—59。

- [ 8 ] Rosales-Ronquillo MC et al. 1974 In vitro ookinete development of the rodent malarial parasite, *plasmodium berghei*, *J. parasit.* 60(5): 819—824.
- [ 9 ] Rosales-Ronquillo MC et al, 1974 *Plasmodium berghei* ookinete formation in non-vector cell line. *J. parasit.*, 60(6): 1039—1040.
- [10] Speer CA et al. 1974 Motility of *plasmodium*

*berghei* ookinete in vitro. *J. invertebr. pathol.*, 24(2): 197—183.

- [11] Speer CA et al 1975 Scanning electron microscope observation of *plasmodium berghei* ookinetes in primary mosquito cell cultures. *J. invertebr. pathol.*, 25(1): 73—78.
- [12] Yoeli M et al 1968 *Plasmodium berghei* ookinete formation in vitro. *Exp. Parasit.*, 22: 122—128.

# 《鼠疟原虫蚊期配子生殖的体外培养——在 Eagle MEM 培养基中发育的观察》一文之附图(正文见第 14 页)

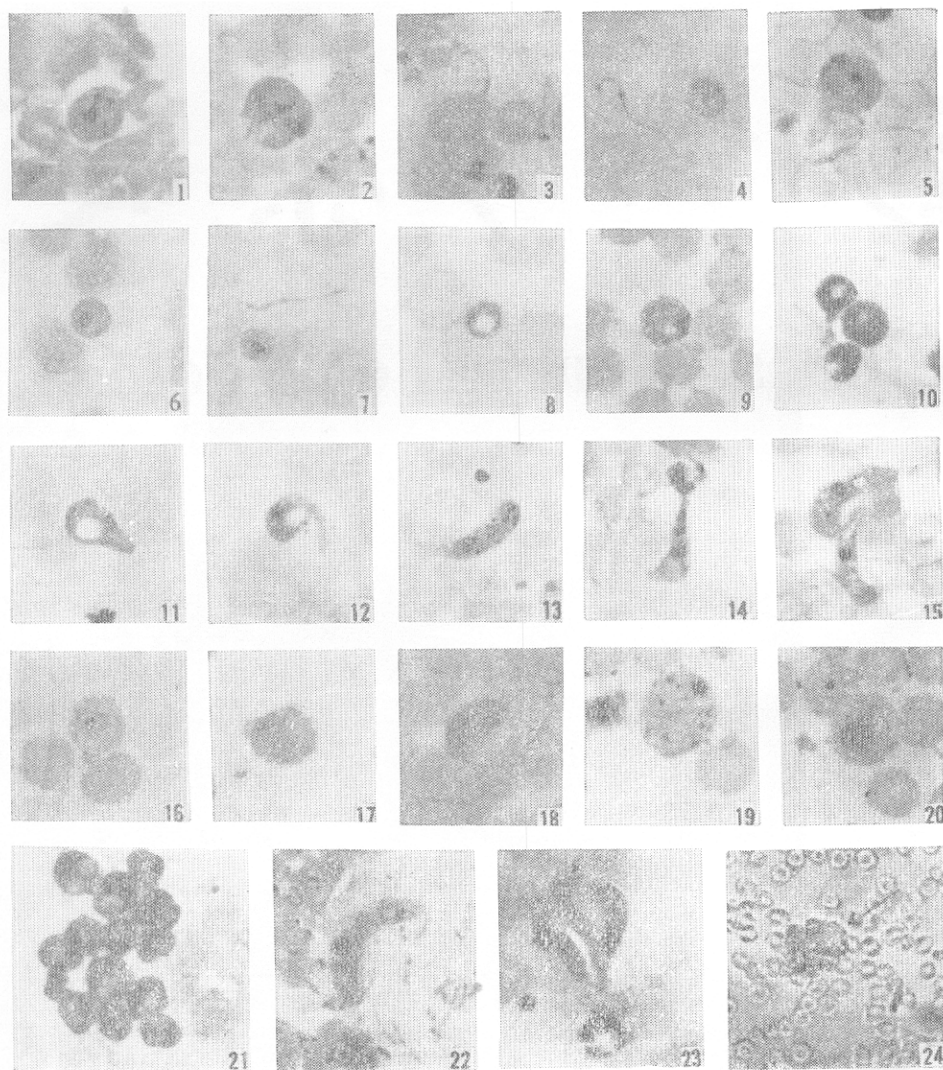


图 1—2 核分裂的雄配子体；图 3—4 游离的雄配子；图 5—6 雌配子；图 7 待受精的雌雄配子；  
图 8、9、10、21 合子和群聚的合子；图 11—12 两型幼动合子；图 13—14 未成熟动合子；图 15、  
23 成熟动合子；图 16 幼配子体；图 17 未成熟雌配子体；图 18 未成熟雄配子体；图 19 成熟  
雌配子体；图 20 成熟雄配子体；图 22 在斯氏按蚊胃内动合子；图 24 雄配子体出丝；(×1150)